

リンゴ果実疫病菌の遺伝子診断法の開発 (予報)

須崎 浩一・吉田 幸二

(果樹試験場リンゴ支場)

Development of Molecular Identification Method for Causal Fungi of
Apple Phytophthora Fruit Rot.(Preview Report)

Kouichi SUZAKI and Kouji YOSHIDA

(Apple Research Center, National Institute of Fruit Tree Science)

1 はじめに

日本国内においてリンゴ果実疫病を引き起こす疫病菌として、*Phytophthora cactorum*, *P. cambivora*, *P. syringae* の3種が知られている。*P. cactorum*¹⁾ 及び *P. cambivora*²⁾ は主に幼果に被害を与え、*P. syringae* は収穫期から貯蔵中の成熟果に被害³⁾ を与えることが報告されている。

Phytophthora 属には所属する種が多く、日本国内だけでも20数種が報告されている。*Phytophthora* 属菌の識別は従来、培養性状や繁殖器官の形態に基づいて行われてきた。しかし、リンゴ果実に被害を与える3種類の *Phytophthora* 属菌は、被害果の外観から病原の識別が困難なこと、また従来の方法では識別に手間と経験を要していたことから、迅速な病原診断技術の開発が求められている。そこで *Phytophthora* 属菌の rDNA-ITS 領域解析を行い、種特異的な PCR プライマーを用いたリンゴ果実疫病菌の識別法の開発を試みた。

2 試験方法

(1) 供試菌株及び培養方法：供試菌株として日本国内で分離された *Phytophthora* 属菌10種16菌株を供試した(表1)。各供試菌株は V-8 ジュース寒天斜面培地で保存し、DNA 抽出には CV-8 液体培地上、20℃で3~4日間静置培養した生菌体を使用した。

(2) 菌体 DNA の抽出及び rDNA-ITS 領域の PCR による増幅：CV-8 液体培地上で培養した菌体はペーパータオルで水分を除いて液体窒素とともに磨砕し、常法に従いフェノール抽出、RNase 処理、PEG 処理を行い DNA を抽出・精製した。*Phytophthora* 属菌の rDNA-ITS 領域の PCR による増幅は White らの設計したプライマー、ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') 及び ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') を用い、遺伝子増幅装置 (Perkin Elmer, GeneAmp System 9600) で変性 (94℃, 1分), アニーリング (55℃, 2分), 伸長 (75℃, 3分) を30回繰り返して行った。PCR によって増幅された DNA 断片は2%アガロースゲル電気泳動によって確認した。

(3) 供試菌株の ITS-RFLP による種間多型の確認：増

表1 本試験に用いた菌株

種名	菌株名	分離源
<i>Phytophthora cactorum</i>	A-230	土壌
"	MAFF235096	チューリップ
<i>Phytophthora cambivora</i>	A-84 (A ¹)	リンゴ根部
"	A-265 (A ²)	リンゴ根部
"	AP-3	リンゴ根部 (MM106)
"	SHPA-1	リンゴ根部 (MM106)
<i>Phytophthora capsici</i>	MAFF305920	スイカ
"	MAFF305921	ナス
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	MAFF305565	イチイ
<i>Phytophthora citrophthora</i>	MAFF305938	オウレン
<i>Phytophthora infestans</i>	MAFF235883	バレイショ
<i>Phytophthora megasperma</i>	MAFF235802	ダイズ
<i>Phytophthora nicotianae</i>	MAFF235785	イタチカズラ
var. <i>nicotianae</i>		
<i>Phytophthora nicotianae</i>	MAFF305796	ニチニチソウ
var. <i>parasitica</i>		
<i>Phytophthora syringae</i>	KU-10	リンゴ果実 (ふじ)
<i>Phytophthora vignae</i>	MAFF235805	アズキ

幅された rDNA-ITS の DNA 断片は DNA 精製用スピニングカラム (TaKaRa SUPEREC-02) を用いて未反応プライマー及び dNTP を除去した。精製した DNA 断片は、制限酵素 *Hinf* I, *Hae* III, *Msp* I 及び *Tth*HB 8 I を用いて37℃ (*Tth*HB 8 I は65℃), 2時間処理を行った後、2%アガロースゲル電気泳動によって RFLP による種間多型を確認した。

(4) 種特異的 PCR プライマーの設計及びそれらを用いたリンゴ果実疫病菌の識別：*P. cactorum*, *P. cambivora* 及び *P. syringae* の ITS 領域を含む DNA 断片は大腸菌プラスミドベクター (Promega, pGEM-T) に組み込んだ後、大腸菌 (TaKaRa, JM109 コンピテントセル) でクローニングを行い、DNA シーケンサー (Perkin Elmer, ABI PRISM GENETIC ANALYZER 310) により塩基配列を決定した。決定された塩基配列を基に3種のリンゴ果実疫病菌に対する種特異的 PCR プライマーを設計した。これらの PCR プライマーを用いて、PCR による3種リンゴ果実疫病菌間の識別及び種々の *Phytophthora* 属菌とリンゴ果実疫病菌の識別を試みた。

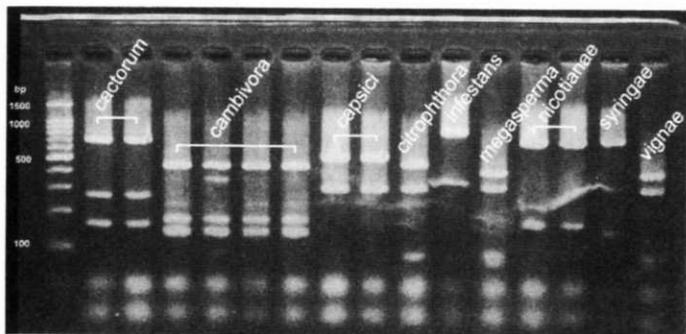


図 1 疫病菌の ITS-RFLP (*Hae* III 処理)

3 試験結果及び考察

White らの設計した ITS 領域増幅用プライマー (ITS 1, ITS 4) を用いて供試菌株の ITS 領域を PCR により増幅を試みた。その結果, すべての供試菌株で約 900bp の増幅 DNA 断片が現れた。これらの DNA 断片を制限酵素 *Hinf* I, *Hae* III, *Msp* I 及び *Tth*HB 8 I で処理した結果, いずれの酵素処理においても *Phytophthora* 属菌の種毎に異なるバンドパターンが現れた (図 1)。このことから ITS 領域の塩基配列の差異を基に種の識別が可能と考えられた。

さらに, *P. cactorum*, *P. cambivora* 及び *P. syringae* の ITS 領域の塩基配列を決定し, 3 種のリンゴ果実疫病菌を特異的に識別可能な PCR プライマーを設計した。これらのプライマーを用いて PCR を行い, 3 種のリンゴ果実疫病菌間の識別及び他種 *Phytophthora* 属菌とリンゴ果実疫病菌の識別を試みた。その結果, *P. cactorum* 識別用プライマーを用いて PCR を行った場合は *P. cactorum* で予想された長さのバンドが現れたが, *P. cambivora* の一部の菌株, また, *P. cinnamomi*, *P. infestans* 及び *P. nicotianae* においてもバンドが現れた (図 2 A)。これら以外の *Phytophthora* 属菌ではバンドは現れなかった。*P. cambivora* 及び, *P. cinnamomi* は *P. cactorum* とバンドの長さが異なったため互いの識別は可能であったが, *P. infestans* 及び *P. nicotianae* は *P. cactorum* と同じ長さのバンドが現れたため識別は不可能であった。このため *P. cactorum* 識別用プライマーは今後再設計が必要と思われた。*P. cambivora* 識別用プライマーを用いた場合は *P. cambivora* のみで予想された長さのバンドが現れ, 他種の *Phytophthora* 属菌ではバンドが現れなかった (図 2 B)。同様に, *P. syringae* 識別用プライマーを用いた場合も *P. syringae* のみで予想された長さのバンドが現れ, 他種の *Phytophthora* 属菌ではバンドが現れなかった (図 2 C)。以上から *P. cactorum* について識別用プライマーの改良が今後必要であるが, 種特異的プライマーを用いた PCR によって, 3 種のリンゴ果実疫病菌間の識別や, 他種の *Phytophthora* 属菌からリンゴ果実疫病菌のみを迅速に識別することが可能と思われた。

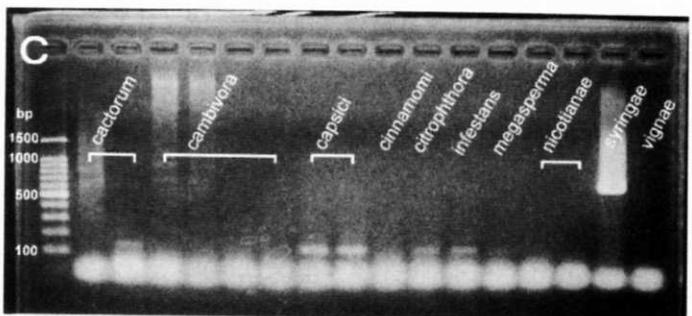
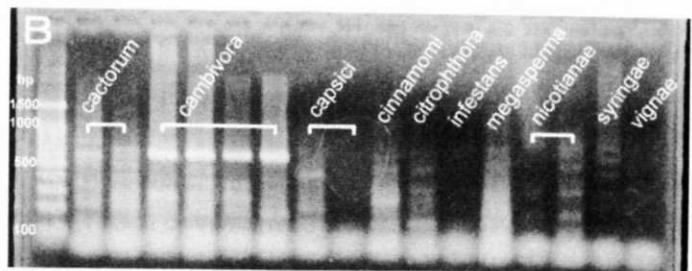
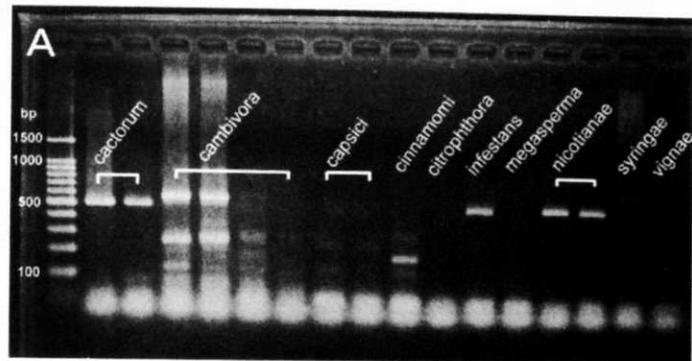


図 2 PCR によるリンゴ果実疫病菌の識別

- A. *P. cactorum* 検出用プライマーでの PCR 産物
- B. *P. cambivora* " "
- C. *P. syringae* " "

4 ま と め

リンゴ果実疫病菌として 3 種の *Phytophthora* 属菌が報告されている。これらを互いに, また他種 *Phytophthora* 属菌から容易に識別することを目的に rDNA-ITS 領域の構造解析を行い, リンゴ果実疫病菌を PCR によって識別するためのプライマーを設計した。本プライマーを用いた PCR によって 3 種のリンゴ果実疫病菌の識別は可能であった。さらに, 3 種のリンゴ果実疫病菌を他種 *Phytophthora* 属菌から識別することも可能であった。

引 用 文 献

- 1) 柳瀬春夫, 佐久間勉. 1979. 疫病菌によるリンゴ及びセイヨウナシの幼果腐敗について. 果樹試報 C 6: 105-119.
- 2) 飯島章彦, 斎藤栄成, 萩原正明. 1988. リンゴの新葉, 幼果, 新梢に発生した疫病. 関東東山病害虫研報 35: 104-106.
- 3) 藤田孝二. 1996. *Phytophthora syringae* (Kleb.) Kleb. によるリンゴ果実疫病の発生生態と防除に関する研究. 青森りんご試報 29: 37-114.