

# イチジク株枯病の遺伝子診断\*

愛媛県立果樹試験場 <sup>しみず</sup>清水 <sup>しんいち</sup>伸一\*\*・<sup>みよし</sup>三好 <sup>たかのり</sup>孝典

## はじめに

イチジク株枯病は、子の菌類に属する *Ceratocystis fimbriata* ELLIS et HALSTED を病原とする土壌伝染性病害である。1980年に愛知県で初めて確認（加藤ら, 1982）されて以来、現在では全国の多くのイチジク栽培府県で株枯病の発生が報告されている（梶谷, 1992；向島ら, 1997；清水・三好, 1999；外側ら, 1999）。また、近年ではブラジルのイチジクにおいても株枯病の発生が報告（THORPE et al., 2005）されるなど、広範囲で問題となっている。特に本邦では主要品種である‘榊井ドーフィン’および‘蓬莱柿’ともに本病に罹病性で、一度発生すると急速にまん延し成木でも短期間で枯死に至るなどその被害は甚大であるため、イチジク栽培における重要な病害の一つと位置付けられている（加藤ら, 1982；細見・瓦谷, 2004）。

防除対策として、現地では改植後からのトップジンM水和剤などの土壌灌注が年間6回を基本として行われている（廣田ら, 1984；清水ら, 1999）が、土壌伝染性病害であるため、効果の維持には薬剤の連年処理が必要である。一方現地では、薬剤処理の労力軽減や環境に配慮した発病回避策が望まれている。現在、その解決策として一部のイチジク生産府県が共同で、本病に抵抗性のある台木を利用した栽培技術の開発に取り組んでいるところである。

本稿では、その早期実現のため株枯病菌の土壌中やイチジク組織内の所在を確認するPCR検出法の検討を行ったので紹介する。

## I 土壌からの株枯病菌の検出

### 1 全DNA抽出法の検討

PCRによる土壌からの微生物検出のためには、DNA抽出時に土壌中のPCR阻害物質を可能な限り取り除く

Genetic Diagnosis of Fig *Ceratocystis* Canker Caused by *Ceratocystis fimbriata*. By Shinichi SHIMIZU and Takanori MIYOSHI  
(キーワード：イチジク株枯病, PCR, *Ceratocystis fimbriata*, 抵抗性台木選抜)

\* 本研究は、2004～06年度先端技術を活用した農林水産研究高度化事業「抵抗性台木を用いたイチジク株枯病防除技術の開発」の一環として行った。

\*\* 現所属：愛媛県農林水産部農産園芸課

ことが重要となる（WILSON, 1997）。そこでDNAを特異的に吸着、洗浄可能なDNA抽出キット（MagExtractor Plant Genome, 東洋紡）を用いて抽出した（清水ら, 2001）。すなわち、10gの土壌試料に2倍量（w/v）の0.05%の寒天液を添加し、5分間かくはんした後、室温で60分間静置した。その上清液（1.5～2ml）を7,000rpmで5分間遠心し、得られた沈殿をキットに付属の溶解液300 $\mu$ lを添加して2分間激しく混合、65 $^{\circ}$ Cで10分間処理（途中で3回かくはん）した。さらに300mlのクロロホルム・イソアミルアルコール（24：1）を添加、激しく混合し、12,000rpmで10分間遠心した後、250 $\mu$ lの水層を回収した。その後、キットに添付された手順に従って全DNAを抽出した。PCRは得られた全DNA抽出液を用いて、CFF3（5'-GATAAGA-GATATGCTGCTTTGG-3'）とCFR3（5'-GTTTC-CAACAGAAGTTGAATACAG-3'）のプライマー対およびPCR反応における阻害物質の影響軽減のため1/50量の10%スキムミルク液（De Boer et al., 1995）を反応液に添加して行った。なお、供試土壌は滅菌培養土にイチジク株枯病菌子のう胞子を土壌乾燥重1g当たり $10^5$ 個の濃度になるよう添加して調製した。

磁性シリカビーズ抽出法による土壌からの検出効果を確認するため、ポリビニルピロリドン（PVPP）またはセチルトリメチルアンモニウムブロミド（CTAB）を用いた従来の清澄化方法（Zhou et al., 1996）と比較したところ、磁性シリカビーズ抽出した全DNAを用いた場合のみ増幅産物が確認され（図-1）、検討した中では磁性シリカビーズ抽出が最も土壌中のPCR阻害物質を効率良く除去することが可能であった。

### 2 PCRによる土壌からの検出限界

乾燥重1g当たり $10^5$ から $10^0$ 個の子のう胞子濃度に調製した土壌試料（各10g）を用いて、前述の磁性シリカビーズ法で全DNAを抽出した。それをテンプレートとしてCFF3およびCFR3プライマーを用い一次PCRを行ったところ、 $10^4$ 個の胞子濃度まで検出することが可能であった。さらに、そのPCR反応液を用いてCFF3とCFR5（5'-CTACACAGGGGAGCTGGCAAG-3'）のプライマーでsemi-nested PCRを行ったところ検出限界は $10^1$ 個まで向上した。また同じく株枯病菌添加土壌を用いて、梶谷ら（1995）の株枯病菌検出法であ

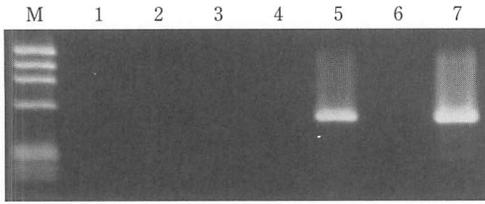


図-1 異なる抽出法による土壌からの株枯病菌のPCR検出

1: 株枯病菌の添加土壌から CTAB 抽出, 2: 非添加土壌から CTAB 抽出, 3: 添加土壌から PVPP 抽出, 4: 非添加土壌から PVPP 抽出, 5: 添加土壌から磁性シリカビーズ抽出, 6: 非添加土壌からシリカビーズ抽出, 7: 培養した株枯病菌から抽出, M:  $\phi$ X174/HaeIII マーカーを示した。

表-1 PCR および枝挿法によるイチジク株枯病菌の土壌からの検出限界の比較

検出法	孢子濃度 (個/乾燥土壌 1g)					
	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0</sup>
PCR	一次	+	+	-	-	-
		(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
PCR	semi-nested	+	+	+	+	-
		(2)	(2)	(2)	(2)	(2)
枝挿法	NT	+	+	+	+	-
		(5)	(7)	(10)	(15)	(15 ≤)

a) 検出結果の+は陽性, -は陰性, NTは未調査, ( )は検出日数を示した。b) PCRの検出日数は20試料の処理に要した日数とした。c) 枝挿法の検出日数は株枯病菌子のう数の確認日とした。

イチジク切り枝を用いた枝挿法と比較したところ、希釈限界で両者の差は認められなかったが、判定に要する日数では枝挿法の15日間に対してPCR検出が2日間と短期間であった(表-1)。さらに、現地の株枯病発病圃場より採取した土壌から株枯病菌の検出を試みたところ、枝挿法で菌が検出された土壌試料はPCR検出においても同様な結果となったが、中にはPCR検出で陽性となった供試土壌において、枝挿法では他の糸状菌が優先的に生育し株枯病菌が確認されなかった事例も認められた。

以上のことから、磁性シリカビーズ法による全DNA抽出およびPCRにより、土壌中の株枯病菌を高感度で検出することが可能であることが明らかとなった。なお、枝挿法は特別な機器が不要で簡易であることから、PCR法と枝挿法を調査内容に応じて使い分けることで、効率的な株枯病菌の診断が可能になると考えられる。

表-2 株枯病菌を接種したイチジク(榊井ドーフィン)切り枝からのPCRによる検出

切り枝	検出方法 など	接種部位からの距離 (cm)					
		0	2	4	6	8	10
接種	組織の褐変	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	PCR	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	2/3
	PDA培地	2/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3
未接種	組織の褐変	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	PCR	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	PDA培地	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

a) 切り枝は各区3反復で、表中の数値は、褐変または陽性部位数/調査部位数を示した。b) 接種は株枯病菌の菌そうを貼付けパラフィルムで覆って接種した後、25℃で静置した。c) 接種7日後の切り枝の接種部位から組織を採取した。

## II イチジク組織からの株枯病菌の検出

### 1 株枯病菌接種イチジク切り枝からのPCRによる検出

組織からの全DNA抽出は、前章で述べた土壌からの抽出法を一部変更して行った。すなわち、採取した100mgのイチジク枝組織片をポリプロピレン製小袋(縦8cm×横3cm)に入れ、滅菌水を100 $\mu$ l添加後ハンマーで打ち、小袋中の採取組織を破碎してその粗汁液を回収した。その後、キットに付属の溶解液300 $\mu$ lを添加し、キットに添付された手順に従って全DNAを抽出した。なお、DNA抽出に用いた組織は、株枯病菌を接種した約20cm長の切り枝(品種:榊井ドーフィン)を用いて、接種部位とその部位から枝の先端方向に2cm間隔で10cmまでの組織を採取した。また、PCRに用いたプライマーは、一次PCRとしてCFF3およびCFR3プライマーを用い、そこで特異的な増幅産物が確認されなかった場合には、一次PCR増幅産物を用いてCFF5(5'-CACTACCAGCAGTATAATTCT-3')およびCFR5の組み合わせでnested PCRを行った。

その結果、PCRでは接種部位およびその部位から2cm離れた褐変組織に加え、4~10cmの範囲の外観上健全な組織からも株枯病菌が検出された。PCRによる検出効率を調査するため、採取試料をポテトデキストロース寒天培地に置床して菌の分離を行ったところ、株枯病菌の増殖が確認された範囲は接種部位および2cmの病斑形成された範囲のみであった(表-2)。

また、本検出手順によりテンプレートの10段階希釈によるPCR検出限界を調査したところ、用いた試料によって10~1,000倍と異なり、さらにnested PCR行う

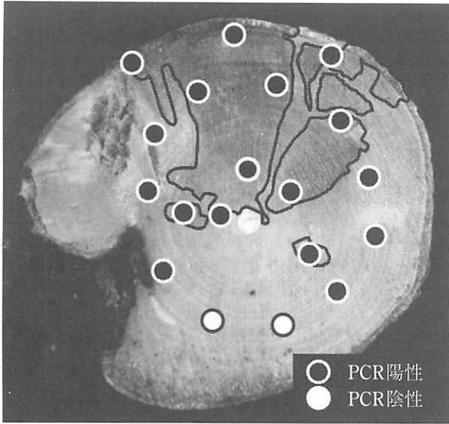


図-2 自然発病樹の組織からのPCRによる検出線でご囲まれた範囲は、褐変した組織を示した。

ことにより10倍以上の検出限界の向上が図られた(データ省略)。このことから、磁性シリカビーズ抽出は、土壌に加えイチジク組織からの抽出においても有効であり、その試料を用いてPCRを行うことでイチジク組織中の株枯病菌を高感度検出することが可能であることが明らかとなった。

## 2 自然発病組織からのPCRによる検出

自然発病組織からの株枯病菌の検出を試みるため、愛媛県内の現地イチジク圃場の株枯病発病樹(品種:蓬萊柿)の主幹横断面から、全DNA抽出およびnested PCRを行った。その結果、横断面の褐変部およびその周辺の健全組織から株枯病菌が検出された(図-2)。さらに、株枯病菌が検出されなかった部位の一部を縦方向に切断し、その下方の組織からPCRにより菌の検出を行ったところ、確認されなかった。また、現地から採取した27樹のイチジク発病樹組織片からPCRで株枯病菌の検出を試みたところ、いずれの調査樹からも菌を検出することが可能であった。

このことから、本法は発病組織に加えて、褐変部以外の周辺の健全組織から株枯病菌を検出することが可能で、肉眼観察では確認できない未発病組織における病原菌の存在の有無および移動範囲を把握する手段として有効であることが考えられた。また本法は、株枯病の診断のためにも利用できることが明らかとなった。

## III 菌の樹体内分布確認による株枯病品種抵抗性評価法の検討

検討はポット植えイチジク苗木(品種:榊井ドーフィン、セレスト)を供試して行った。2006年7月4日に株枯病菌を接種し、54日後の8月29日に接種部位から

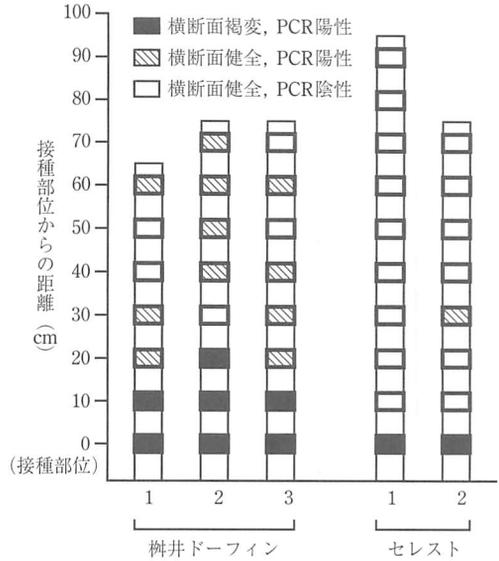


図-3 イチジク苗木に感染した株枯病菌の樹体内分布状況

10 cm 間隔で枝を切断した後、枝横断面の褐変状況を確認するとともに、組織から前述の手順で全DNA抽出してPCR検出を行った。なお、接種は当年新梢の基部より2~5 cm 上方の位置に株枯病菌を虫ピンで付傷接種後、屋根かけハウス内で育成した。

まず、接種枝横断面の褐変状況を確認したところ、'榊井ドーフィン'では接種部位から10または20 cm の位置において認められたが、'セレスト'では接種部位のみであった。各切断面からPCRで株枯病菌の検出を試みたところ、'榊井ドーフィン'では切断面の褐変部位に加え、健全部位の多くの組織で株枯病菌が確認されたが、'セレスト'では接種部位以外で増幅産物が認められた部位は1箇所のみであった(図-3)。なお、両品種ともに、調査部位間で連続してPCR検出されない場合も見られたが、その原因については本研究で確認することができなかった。これらの菌の検出状況の比較により、株枯病に対して'榊井ドーフィン'が罹病性で、'セレスト'が耐病性を有した品種であることが判断された。本結果は、既往の報告(清水・三好, 1999; 細見・瓦谷, 2004)と一致するもので、これらのことからPCRによるイチジク樹体内の株枯病菌の検出により、品種抵抗性程度の強弱を推定することが可能であると推察された。

## おわりに

植物病原糸状菌や細菌のPCRによる検出は、これまで主に病原菌の同定を目的として用いられてきたが、近年、薬剤の防除効果の評価などへの活用が試みられてい

る(三好, 2005)。今回, 土壌やイチジク組織中のイチジク株枯病菌の挙動を客観的に確認する PCR 検出法を確立し, イチジク株枯病に対する品種抵抗性の評価への応用を検討したところ, その有効性が示唆された。一方, イチジクは挿し木の自根樹での栽培が一般的であるが, 強勢台木を用いた栽培実証が一部の地域で始まっており(Hosomi et al., 2002; 細見, 2006), その接木技術を用いて難防除病害である株枯病の抵抗性台木利用による被害回避技術の検討がなされているところである。今後, PCR 検出法は既存品種や育成個体の選抜期間の短縮化を図るために利用され, 抵抗性台木を用いたイチジク株枯病防除技術が早期に確立されることが望まれる。

#### 引用文献

1) DE BOER, S. H. et al. (1995): *Nucleic Acids Res.* **23**: 2567 ~

2568.  
 2) 廣田耕作ら (1984): 愛知農総試研報 **16**: 211 ~ 218.  
 3) Hosomi, A. et al. (2002): *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **71**: 171 ~ 176.  
 4) 細見彰洋・瓦谷光男 (2004): 関西病虫研報 **46**: 29 ~ 32.  
 5) ——— (2006): 近畿中国四国農研 **93** ~ 97.  
 6) 梶谷裕二 (1992): 日植病報 **58**: 111 ~ 112 (講要).  
 7) ——— (1995): 同上 **61**: 229 (講要).  
 8) 加藤喜重郎ら (1982): 植物防疫 **36**: 55 ~ 59.  
 9) 三好孝典 (2005): 同上 **59**: 513 ~ 516.  
 10) 向島博行ら (1997): 北陸病虫研報 **45**: 33 ~ 40.  
 11) 清水伸一・三好孝典 (1999): 植物防疫 **53**: 25 ~ 27.  
 12) ———ら (1999): 愛媛果樹試研報 **13**: 27 ~ 35.  
 13) ———ら (2002): 同上 **15**: 35 ~ 40.  
 14) 外側正之ら (1999): 静岡柑試研報 **28**: 51 ~ 62.  
 15) Wilson, I. G. (1997): *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3741 ~ 3751.  
 16) Zhou, J. et al. (1996): *ibid.* **62**: 316 ~ 322.

## 登録が失効した農薬 (19.12.1 ~ 12.31)

掲載は, 種類名, 登録番号: 商品名 (製造者又は輸入者) 登録失効年月日。

#### 「殺虫剤」

- 酸化エチレンくん蒸剤  
7225: カボックス-10 (液化炭酸) 07/12/08
- マラソン乳剤  
9469: クミアイマラソン乳剤 (クミアイ化学工業) 07/12/10
- NAC 水和剤  
9518: クミアイミクロデナボン水和剤 85 (クミアイ化学工業) 07/12/10
- BT 水和剤  
20735: ガードジェットフロアブル (クボタ) 07/12/20
- BPMC・MEP 粉剤  
14411: 三共スミバッサ粉剤 20DL (三共アグロ) 07/12/26
- BPMC 粉剤  
14421: 三共バッサ粉剤 DL (三共アグロ) 07/12/26
- BPMC 粉剤  
14425: ヤシマバッサ粉剤 DL (協友アグリ) 07/12/26

#### 「殺虫殺菌剤」

- カルタップ・フラメトピル粒剤  
20097: アグロスパダンリンバー 1 キロ粒剤 (住友化学) 07/12/11

#### 「殺菌剤」

- バリダマイシン・フェリムゾン水和剤  
18469: トルファン (住友化学) 07/12/4
- トリホリン乳剤  
15640: 金鳥サブロー乳剤 (大日本除虫菊) 07/12/16

#### ●イミノクタジン酢酸塩塗布剤

15657: ヤシマベフラン塗布剤 3 (協友アグリ) 07/12/16

#### ●有機銅水和剤

15663: 日農ドキリン水和剤 80 (日本農薬) 07/12/16

#### ●フサライド・EDDP 粉剤

15669: ヤシマヒノラブサイド粉剤 35DL (協友アグリ) 07/12/16

#### ●ポリオキシシン水和剤

13844: ホクコーポリオキシシン AL 水和剤 (北興化学工業) 07/12/26

#### 「除草剤」

#### ●グリホサートイソプロピルアミン塩液剤

21460: マルガリーダ AL (住商アグロインターナショナル) 07/12/22

21461: クサゼロイッキ AL (ピー・エス・アグリカ) 07/12/22

21462: ネコソギ液剤 AL (レインボー薬品) 07/12/22

21463: カレリーナ AL (ヤシマ産業) 07/12/22

21464: ネコソギ液剤 (ヤシマ産業) 07/12/22

#### 「その他」

#### ●石灰窒素

5405: 信越粒状石灰窒素 40 (コープケミカル) 2007/12/05