

PCR検出技術を利用したイチジク株枯病菌の樹体内における動態確認と その品種抵抗性評価への応用

清水伸一**・三好孝典・細見彰洋*

(愛媛県農林水産研究所果樹研究センター・*大阪府環境農林水産総合研究所・

**現 愛媛県農林水産部ブランド戦略課)

Detection of Ceratocystis Canker Disease in Fig Trees by PCR and Application of This Technique to Evaluate the Resistance of Fig Varieties to Canker Disease

By Shinichi SHIMIZU**, Takanori MIYOSHI, and Akihiro HOSOMI*

(Fruits Tree Research Center, Ehime Research Institute of Agriculture, Forestry and Fisheries, Matsuyama, Shimoidai-machi, Ehime 791-0012

*Research Institute of Environment, Agriculture and Fisheries, Osaka Prefectural Government, Habikino, Shakudo, Osaka 583-0862

**Present address : Ehime government, Agriculture, Forestry and Fisheries Department, Matsuyama, Ichiban-chou, Ehime 790-8570

To efficiently select rootstocks that are resistant to fig ceratocystis canker (caused by *Ceratocystis fimbriata* Ellis et Halsted), we examined the detection method by polymerase chain reaction (PCR) to detect *C. fimbriata* in the tissues of fig trees and the evaluation of resistance of fig varieties to canker disease using this detection method. The results showed that nested PCR is a highly sensitive method that enabled the detection of *C. fimbriata* from total DNA that was extracted from fig tree tissues using the magnetic silica beads. The fungus could be detected in not only diseased tissues but also healthy tissues at the circumference. This method was thought to be effective in evaluating the presence and spread of *C. fimbriata* in nondiseased tissues. These results suggest that this PCR technique is effective as a method of estimating cultivar resistance against *C. fimbriata* on the basis of a comparative study of the spread of fungus in disease-susceptible and disease-resistant fig varieties after inoculation of *C. fimbriata*.

緒 言

イチジク株枯病は、子のう菌類に属する *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(細見・瓦谷, 2004; 梶谷, 1992; 向島ら, 1997; 清水ら, 1999; 外側ら, 1999)。本邦の主要品種である榊井ドーフィンおよび蓬菜柿

ともに本病に罹病性(細見・瓦谷, 2004; 清水ら, 1999)で、その被害は一度発生するとまん延が急速で成木でも短期間で枯死に至るなど甚大であるため、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(細見・瓦谷, 2004; 清水・三好, 1999)。

本病の防除対策として、既往の研究成果(廣田ら, 1984; 清水ら, 1999)に基づき、トリフルミゾール水和剤等の土壌かん注が改植後から行われているところであるが、土壌伝染性であるため防

第1表 供試プライマー

| プライマー | 配列 | 方向 | 増幅産物 (bp) | 引用 |
|------------|-------------------------------------|-------|-----------|-------------------|
| 一次PCR | CFF3 5'-GATAAGAGATATGCTGCTTGG-3' | フォワード | 520 | 清水ら (2002) |
| | CFR3 5'-GTTTCCAACAGAAGTTGAATACAG-3' | リバーズ | | |
| Nested PCR | CFF5 5'-CACTACCAGCAGTATAATTCT-3' | フォワード | 370 | 本研究 清水ら (2002) |
| | CFR5 5'-CTACACAGGGGAGCTGGCAAG-3' | リバーズ | | |

除効果の維持には薬剤の連年施用が必須となっている。イチジク産地では処理労力の軽減や環境に配慮した発病回避策が望まれており、解決策として一部のイチジク生産府県では本病に抵抗性のある台木を選抜し、それを利用した被害回避技術の開発が精力的に行われているところである(細見・清水, 2008)。

果樹では土壌伝染性病害に対する品種抵抗性の評価を汚染ほ場で数年かけて行うが、交配で得られた多くの個体をほ場で調査することは難しいため、前段階として抵抗性候補株をできる限り絞り込むことが重要となる。そのため、候補株の切り枝やポット苗木に病原菌を接種して評価が行なわれているが、病斑形成や枯死に至るまでに期間を要するため、効率的な選抜方法の確立が望まれている。そこで、本研究では、台木選抜の効率化の手法として、病原菌を高感度で検出できるPCR法を利用した株枯病菌のイチジク組織からの検出方法の確立およびそれを利用した品種の抵抗性の評価の可能性について検討を行った。

なお、本研究の実施にあたり多大なる御協力および御助言を賜った福岡県農業総合試験場豊前分場 栗村光男博士に感謝申し上げます。

本研究は、平成16～18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。

材料および方法

供試菌

1998年に愛媛県周桑郡小松町(現 西条市)の株枯病発病イチジク樹から、常法で分離して得られたFT01株を各種試験に用いた。

PCRによるイチジク株枯病菌の検出

イチジク組織からの全DNA抽出は、既報(清

水ら, 2002)の土壌からの全DNA抽出手順を一部変更して行った。すなわち、採取した100mgの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 μ l添加後、ハンマーで打ち小袋中の採取組織を破砕してその粗汁液を回収した。その後、磁性シリカビーズを利用した核酸抽出キット(MagExtractor Plant Genome, 東洋紡)を用いて既報に従い抽出した。PCRは既報(清水ら, 2002)の手順に従い、1 μ lの全DNA抽出液を鋳型として20 μ lの液量で反応を行った後、アガーロース電気泳動および臭化エチジウム染色により増幅産物の有無を確認した。なおPCRには、イチジク株枯病菌を特異的に検出できる3種(CFF3, CFR3およびCFR5)のプライマー(清水ら, 2002)に加え、特異性を高めるために新たなプライマー-CFF5を設計して用いた(第1表)。プライマーの組合せは一次PCRとしてCFF3およびCFR3を用い、特異的な増幅産物が確認されなかった場合には一次PCRの産物を30～100倍希釈してCFF5およびCFR5の組合せでnested PCRを行った。

株枯病菌接種イチジク切り枝からのPCRによる検出

約20cmに切断したイチジク(品種:榊井ドーフイン)1年生枝3本を供試して接種を行った。切り枝の樹皮の一部を除去し、10日間培養した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 $^{\circ}$ Cで静置した。接種7日後に切り枝の接種部位およびそこから枝の先端方向に10cmまで2cm間隔で枝組織を採取し、前述の手順に従って全DNA抽出およびPCRを行って株枯病菌を確認した。

なお、PCRによる検出効率を検討するため、アンピシリン(50 μ g/ml)を添加したポテトデキストロース寒天(PDA)培地に採取試料片を置床し、25 $^{\circ}$ Cで7～14日間静置して組織からの株枯病菌の

第2表 株枯病菌を接種したイチジク切り枝からのPCRによる検出

| 接種の有無 | 検出方法等 | 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 |

注) 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。肉眼観察は切断面の褐変状況を確認、組織分離はPDA培地を用い採取試料片を置床して25℃で7～14日間静置後に株枯病菌を確認。

分離を行って比較した。

結果および考察

自然発病樹組織からのPCRによる検出

2004年10月に、愛媛県内の現地イチジクほ場の株枯病発病樹（品種：蓬萊柿）の主幹横断面から組織を採取し、前述の手順に従って全DNA抽出およびnested PCRを行って株枯病菌を検出した。また、2004～2006年にかけて、県内の現地発病樹の病斑形成部から組織を採取し、PCRで株枯病菌の検出を行った。

なお、主幹切断面からの試料の採取に当たっては、ノコギリで切断した際に生じた切りくずによる試料への汚染を防ぐため、あらかじめカッターを用いてバーナーおよび70%エタノールで滅菌を行いながらノコギリの切断面組織を2mm程度除去した。

イチジク苗木における株枯病菌の樹体内移動の確認

2006年7月4日にポット植えイチジク苗木（品種：榊井ドーフィン 3株およびceleste 2株）へ株枯病菌を接種し、54日後の8月29日に接種位置から10cm間隔で枝を切断した後、その断面の褐変状況を確認するとともに、組織中の株枯病菌を前述の手順によりPCR検出した。なお、接種は、供試樹の当年の新梢基部より2～5cm上部の位置に樹皮の上から虫ピンで付傷し、10日間培養した株枯病菌の子のう胞子塊を1個埋め込みパラフィルムで覆った後、屋根かけハウス内で育成した。

株枯病菌接種切り枝からのPCRによる検出

PCRによる検出では接種部位およびその部位から2cm上方の褐変組織の範囲に加え、4～10cm上方の外観上健全な組織からも株枯病菌に特異的なPCR増幅産物が確認された。一方、菌の組織分離による確認では株枯病菌の増殖が確認された部位は病斑形成がみられた接種部および2cm上方までで、中には接種部位にもかかわらず他の糸状菌の増殖により株枯病菌が確認されない場合も認められた。また、未接種の切り枝からはいずれの方法によっても株枯病菌は検出されず、PCRによる検出は菌の組織分離と比較して検出感度が高く、株枯病菌の存在範囲の識別に有効であることが明らかとなった（第2表）。

なお、本検出手順におけるテンプレートの10段階希釈によるPCR検出限界は、用いた試料で異なり10～1000倍であったが、nested PCR行うことにより10倍以上の検出限界の向上が図られた。本法により土壤中だけでなく、イチジク組織中の株枯病菌の高感度検出が可能であると推察された。

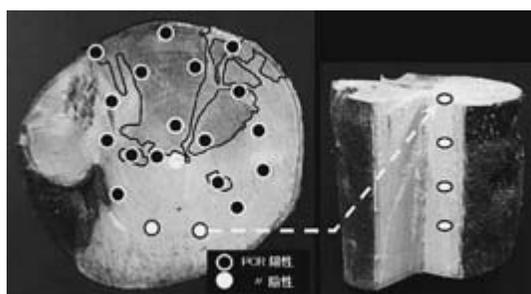
自然発病組織からのPCRによる検出

自然発病成木樹の主幹横断面からPCRで株枯病菌を検出したところ、褐変部およびその周辺の健全組織から株枯病菌が確認された。さらに、株枯病菌が確認されなかった一つの部位を縦方向に切断し、その下方組織からPCRにより菌の検出を行ったところ、確認することはできなかった（第1図）。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、すべての試料から菌を検出することがで

第3表 イチジク苗木に感染した株枯病菌の樹体内移動状況の確認

| 品種 | 樹番号 | 接種枝 | | 接種部位からの距離 (cm) | | | | | | | | | |
|---------|-----|---------|-----------|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 全長 (cm) | 接種部径 (mm) | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 |
| 梶井ドーフィン | 1 | 64.0 | 8.4 | ++ | ++ | + | + | - | - | + | | | |
| | 2 | 76.5 | 7.2 | ++ | ++ | ++ | - | + | + | + | + | | |
| | 3 | 72.0 | 8.3 | ++ | ++ | + | + | + | - | + | - | | |
| | 検出数 | | | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 2/3 | 2/3 | 1/3 | 3/3 | 1/2 | | |
| celeste | 1 | 96.5 | 9.0 | ++ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 2 | 71.0 | 9.8 | ++ | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| | 検出数 | | | 2/2 | 0/2 | 0/2 | 1/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 | 0/1 |

注) ++は横断面の褐変および株枯病菌ともに確認、+は横断面の褐変はなかったが菌は確認、-は横断面の褐変および菌も確認されなかった、検出数の数値は、陽性部位数/供試部位数を示した。調査はポット植え苗木を用いて2006年7月4日に接種、54日後の8月29日に枝横断面の褐変状況の確認および組織採取した。



第1図 自然発病樹の組織からのPCRによる検出 (左はイチジク主幹部横断面、右が主幹縦断面)

きた。

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存在の有無や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。

イチジク苗木における株枯病菌の樹体内移動の確認

新梢横断面組織の褐変は、梶井ドーフィンでは接種部位から10または20cmの位置において認められたが、celesteでは接種部位のみであった。PCRによる検出は、梶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、celesteでは接種部位以外で増幅産物が認められた部位は1カ所のみであった(第3表)。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みられたが、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PCRにおける菌の検出状況の比

較により、株枯病に対して梶井ドーフィンが罹病性で、celesteが耐病性を有した品種であることが推察された。本結果は、既往の報告(細見・瓦谷, 2004; 清水・三好, 1999)と一致するものであった。

今回の研究結果により、PCRによりイチジク樹体内における株枯病菌の移動状況を把握できることが確認され、そのPCR検出技術を利用して株枯病菌接種イチジク個体における菌の動態確認を行うことで、株枯病抵抗性程度の強弱を迅速に推定することが可能と考えられた。

PCRによる病原菌の検出技術は、精密検出が可能であるためウイルス病等の病害診断に多く利用されており、近年、防除法の確立のための評価方法として応用された事例もみられてきている(三好, 2005)。PCR検出技術の病害に対する抵抗性品種選抜への応用に関する研究はこれまでに少ないが、定量が可能なりアルタイムPCR法を利用して、菌の検出に加え病原菌量を把握することで、さらに精度の高い品種抵抗性選抜手法を開発することが可能と考えられる。

今後、これらの病原菌の高感度検出法を利用して既存品種や育成個体の選抜期間の短縮化を図り、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。

摘 要

イチジク株枯病抵抗性台木選抜を効率的に行うため、イチジク組織からのPCRによる株枯病菌の

検出法の確立およびそれを利用した品種抵抗性評価法について検討を行った。その結果、磁性シリカビーズを用いてイチジク組織から全DNAを抽出し、nested PCRを行うことで高感度に株枯病菌を検出することが可能であった。また、本法は発病組織に加えて、その周辺の無病徴組織からも株枯病菌を検出することが可能で、無病徴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。以上の結果から、本法による苗木組織中の株枯病菌の移動状況の比較結果から、品種の抵抗性評価に応用することが可能と考えられる。

引用文献

- 廣田耕作・加藤喜重郎・宮川寿之（1984）：イチジク株枯病の薬剤防除について。愛知農総試研報，16:211-218.
- 細見彰洋・瓦谷光男（2004）：台木用イチジク‘Zidi’及び‘King’のイチジク株枯病に対する抵抗性の強度。関西病虫研報，46:29-32.
- 細見彰洋・清水伸一（2008）：抵抗性台木を用いたイチジク株枯病防除技術の開発。農業技術，63:358-362.
- 梶谷裕二（1992）：福岡県に初発生したイチジク株枯病について。日植病報，58:111-112（講要）.
- 加藤喜重郎・廣田耕作・宮川壽之（1982）：イチジクの新病害“株枯病”。植物防疫，36:55-59.
- 三好孝典（2005）：樹冠流下雨水中の病原細菌量によるカンキツかいよう病防除薬剤の評価。植物防疫，59:13-16.
- 向島博行・斉藤毅・松崎卓志（1997）：富山県で初発生したイチジク株枯病，北陸病虫研報，45:33-40.
- 清水伸一・三好孝典・越智政勝・橘泰宣（1999）：愛媛県におけるイチジク株枯病の発生とチオファネートメチル・トリフルミゾール水和剤による防除。愛媛果樹試研報，13:27-35.
- 清水伸一・三好孝典（1999）：イチジク株枯病の発生生態と当面の防除対策。植物防疫，53:25-27.
- 清水伸一・三好孝典・兼松聡子（2002）：磁性シリカビーズを用いたイチジク株枯病菌のPCRによる土壌からの検出。愛媛果樹試研報，15:35-40.
- 外側正之・増井伸一・野村明子・増井（塩崎）弘子（1999）イチジク株枯れ症状の発生と防除。静岡柑試研報，28:51-62.