

PCRによる白さび病菌のコマツナ種子からの検出

杉村輝彦・小笠原直毅*¹・守家成紀*¹・朝井 計*²Specific Detection of White rust (*Albugo macrospora* (Togashi) S. Ito) from Seeds of Komatsuna (*Brassica campestris* L.) by PCRTeruhiko SUGIMURA, Naotake OGASAWARA*¹, Shigeki MORIYA*¹ and Kei ASAI*²

Summary

We amplified the nuclear rDNA-ITS region of White rust (*Albugo macrospora*) and Komatsuna (*Brassica campestris*) by PCR and determined their nucleotide sequences. We designed primers for amplifying specifically the ITS region of *A. macrospora* by comparing their sequences. We were able to detect pathogens from seeds of *B. campestris* specifically using this primer set and annealing at 55°C in PCR. The disease did not develop by sowing seeds.

Key words : detection, *Albugo macrospora*, *Brassica campestris*, seed, PCR

緒 言

コマツナ (*Brassica campestris* L.) に発生する白さび病 (*Albugo macrospora* (Togashi) S. Ito) は葉に少しでも発生すると商品価値を失うため、被害は大きい。防除には雨よけ栽培と薬剤散布が行われるが、多発する場合があります、防除が困難となっている。これは本菌が絶対寄生菌であり、培養不可能であるため種子伝染の有無等の伝染経路が明らかになっていないことが原因の一つと考えられる。近年、PCR (Polymerase Chain Reaction) 手法を用いて核rDNA-ITS (Internal Transcribed Spacer) 領域に種特異的プライマーを設計することにより、発病株などから菌の検出が試みられている^{3, 7)}。ここではPCRにより植物体から菌を検出し、伝染経路を明らかにして防除に資するために、コマツナ白さび病菌の核rDNA-ITS領域の塩基配列の解明、属特異的プライマーの設計、種子からの菌の検出を試みた。さらに播種後の発病調査をすることで、PCRによる菌の検出の有無と発病との関係を調査した。

材料および方法

DNA抽出方法 コマツナ白さび病菌 (*Albugo macrospora*) のDNAはコマツナ葉を含む分生胞子塊10個程度からLeeらの方法に準じて抽出した⁶⁾。コマツナ (‘夏楽天’, タキイ種苗株) のDNAは健全と思われる展開間もない新葉からEdwardsの方法に従い²⁾、一部改変して抽出した⁸⁾。PCRに適した種子量を調査した試験では、黒色で大きな種子1個 (生重5.5mg), 5個 (同11.2mg), 10個 (同30.8mg), 20個 (同55.3mg), 50個 (同106mg), 100個 (同251.6mg) を微量遠沈管内で磨砕し、Edwards法でDNAを抽出した。それぞれ20, 50, 100, 100, 100, 200 μ l のTEに溶解した。充実が不十分な種子で保菌が推測されたので、種子の外観 (種皮色や大きさ) と菌検出との関係を調査した試験では、種子を形状から黒く大きい種子 (以下、黒色種子; 10個平均生重28.9mg), 灰色の大きい種子 (以下、灰色種子; 同30.5mg), 茶色で大きい種子 (以下、茶色種子; 同28.6mg), 茶色あるいは黒色の小さい種子 (以下、小種子; 同14mg) の4種類に分けて、それぞれの10個ずつからEdwards法でDNAを抽出して50 μ l のTEに溶解

*1 国立奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科情報生命科学専攻構造機能ゲノム学領域システム細胞学分野

*2 埼玉大学理学部

した。

PCR 白さび病菌およびコマツナ葉を用いた試験ではWhiteらの方法に準じて⁹⁾、既報と同様にして行った⁸⁾。すなわち、糸状菌の核rDNA-ITS領域を増幅するプライマーセットITS5 (5'-ggaagttaaagtctgtaacaagg-3') + ITS4 (5'-tcctccgcttattgatatgc-3') を使用し、PCRは反応液50 μ l 中に鋳型DNAを混和して行った。PCR反応はDNAの予備変性を94℃・1分間行った後、DNA変性を94℃・30秒、プライマーのアニーリングを55℃・30秒、伸長反応を72℃・1分30秒で25サイクル行った。また、PCRに適した種子量を調査した試験では、糸状菌用共通プライマーセットおよび今回設計した白さび病菌に特異的なAmプライマーセットAmF (5'-gggctaaccgaaggcttttg-3') + AmR (5'-agagcaacaacacgcatcc-3') を使用し、種子からの白さび病菌の検出を検討した試験では、Amプライマーセットを用いて、それぞれ30サイクルとした。PCR産物は反応液10 μ l をアガロースゲルで電気泳動し、分離、検出した。

塩基配列の解読 白さび病菌については鞭毛菌類のrDNAの5.8S内に設計したプライマーooF (5'-ctgcgaactgcgatacgtaa-3') とooR (5'-cattacgtatcgagttcgcag-3') を使用してITSa領域 (18Sと5.8Sにはさまれた領域：使用プライマーセットITS5 + ooR) とITSb領域 (5.8Sと28Sにはさまれた領域：使用プライマーセットooF + ITS4) に分けて増幅し、解析した。ITSa領域については菌由来の単一バンドのみが認められたのでPCR産物を精製後、塩基配列の解読、解析を行った。コマツナについては既報に従い⁸⁾、前述の抽出したDNAを鋳型として糸状菌用プライマーセットを用いてPCRを行い、PCR産物の精製後、塩基配列の解読を行った。なお、白さび病菌の5.8Sの塩基配列についてはAmプライマーセットにより生成されたPCR産物を解析した。

クローニング 白さび病菌のITSb領域についてはサイズの異なる2種のPCR産物が認められたので、PCR精製産物の1 μ l について、pT7 Blue Perfectly Blunt Cloning Kit (NOVAGEN) を使用して、目的断片をプラスミドに挿入後、大腸菌コンピテントセルに導入し、クローニングした。コロニーPCRで挿入断片を確認後、8コロニーに

ついてプラスミドの精製を行い、PCR産物を精製後、3クローンについて塩基配列の解読、解析を行った。

プライマーの設計と特異性の検討

既報⁸⁾と同様の16種の植物病原菌 (第1表) とコマツナの核rDNA-ITS領域の塩基配列を比較して、特異性が高いと思われる部位に20塩基前後のプライマーを設計し、アニーリング温度55℃で特異性を検定した。

第1表 コマツナ白さび病菌に設計したAmプライマーの特異性検定結果

Table 1. Specificity of genius specific Am primer set among 16 plant pathogens and komatsuna

病原菌植物	PCRによる増幅の有無 ^{a)}
<i>Botrytis cinerea</i>	—
<i>Septoria chrysanthemella</i>	—
<i>Fusarium oxysporum</i>	—
<i>F. graminearum</i>	—
<i>Sclerotium sclerotiorum</i>	—
<i>Pyricularia oryzae</i>	—
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	—
<i>C. orbiculare</i>	—
<i>Thielaviopsis basicola</i>	—
<i>Rhizoctonia solani</i>	—
<i>Phytophthora capsici</i>	—
<i>Pythium aphanidermatum</i>	—
<i>P. myriotylum</i>	—
<i>Sphaerotheca humuli</i>	—
<i>Puccinia horiana</i>	—
<i>Albugo macrospora</i>	+
コマツナ ('夏楽天')	—

a) AmプライマーセットAmF (5'-gggctaaccgaaggcttttg-3') + AmR (5'-agagcaacaacacgcatcc-3') を用いて、アニーリングを55℃でPCRを行った。

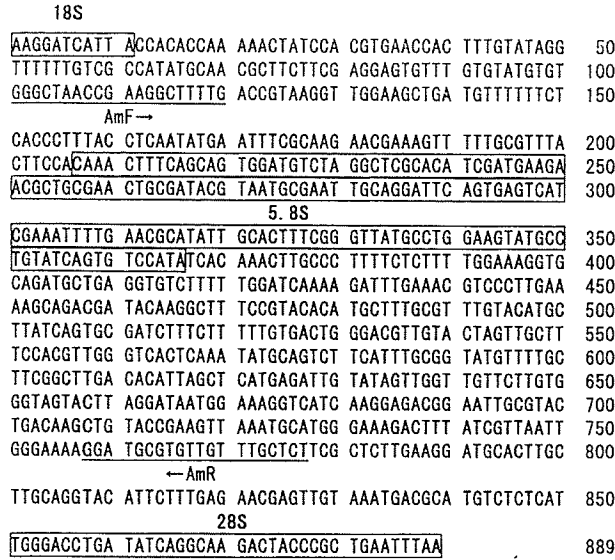
生育および発病調査

各形状の種子を132粒ずつ計528粒、鉢用土を入れた播種箱に3月上旬に播種し、ガラス室内に置いて散水で管理した。子葉展開時に発芽率および健苗率を、播種30日後に発病の有無を調査した。

結 果

白さび病菌のPCRと核rDNA-ITS領域の塩基配列

コマツナ白さび病菌について既報と同様の方法でコマツナ葉を含む分生胞子からDNAを抽出でき、PCRが可能であった。さらに、塩基配列を解析した結果、核rDNA-ITS領域を含む889bpの塩基配列が明らかとなった(第1図)。

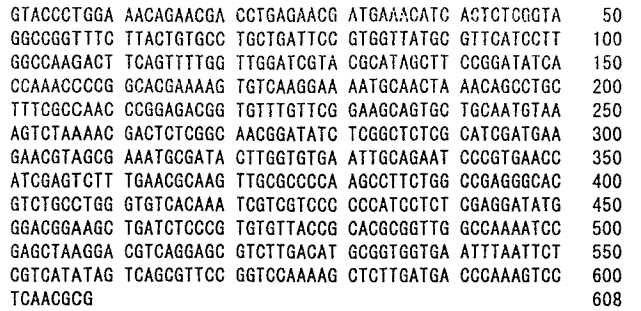


第1図 コマツナ白さび病菌の核rDNA-ITS領域の塩基配列(下線部は属特異的プライマー設定部位)

Fig.1. Sequence of nuclear rDNA-ITS regions of *Albugo macrospora*

コマツナのPCRと核rDNA-ITS領域の塩基配列

糸状菌共通のプライマーセットを用いることで、植物についても核rDNA-ITS領域を増幅できることから⁸⁾、PCRを行って塩基配列を解析した結果、コマツナでは608bpの塩基配列が明らかとなった(第2図)。



第2図 コマツナ(‘夏楽天’)の核rDNA-ITS領域の塩基配列

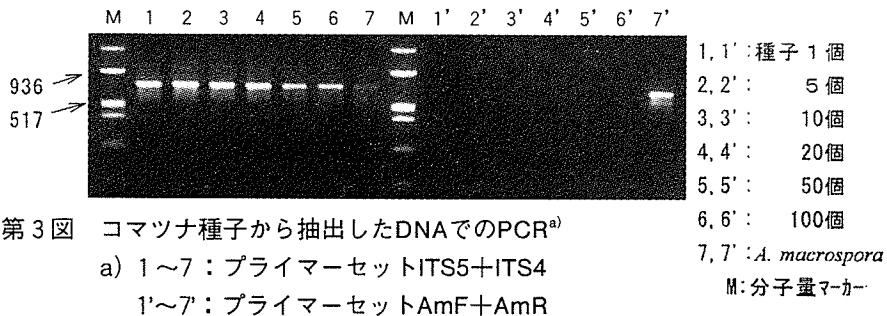
Fig.2. Sequence of nuclear rDNA-ITS regions of *Brassica campestris* cv. Natsurakuten

プライマーの特異性検定

白さび病菌とコマツナ葉とのITS領域の比較では相同性は25%と低く、菌のみを検出できるプライマーの設計が可能と考えられたので、属特異的なプライマーの設計を試みた。その結果、今回設計したAmプライマーセットでPCRを行うと、アニリング温度55℃で15種類の他属菌やコマツナ葉などと区別でき、白さび病菌では677bpの増幅産物が認められた(第1表)。

PCRに適したDNAを抽出するための種子量

PCRに適したDNAを抽出するための種子量を2種のプライマーセットを用いて調査した結果、糸状菌共通のプライマーセットを用いた場合、コマツナ由来の増幅産物が明確に生成された。種子1~20個から抽出したDNAからのPCRではほぼ同程度の増幅産物が認められたが、50~100個(生重100mg以上)からのDNAでは明らかに増幅産物が少なくなった(第3図)。一方、Amプライマーセッ



第3図 コマツナ種子から抽出したDNAでのPCR⁹⁾
a) 1~7: プライマーセットITS5+ITS4
1'~7': プライマーセットAmF+AmR

Fig.3. Amplified products of nuclear rDNA-ITS regions from seeds of *B. campestris* and *A. macrospora* by PCR using different two primer sets

トを用いた場合、種子からのDNAでPCRを行った場合、増幅産物は認められなかったが、菌を含むDNAでは明確な増幅産物が認められず、本試験で設計したAmプライマーセットを用いることで菌のみを明確に検出できた。

PCRによる種子からの菌の検出

種子10個からDNAを抽出してAmプライマーセットでPCRを行った結果、種子の形状に関係なく菌に由来すると思われる増幅産物が認められた(第4図)。

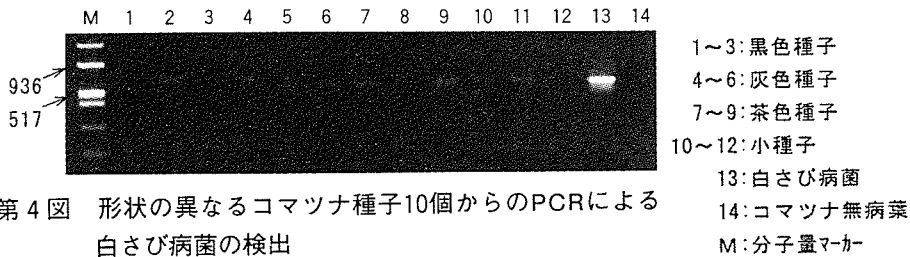


Fig.4. Detection of *A. macrospora* from seeds of *B. campestris* by PCR

発病調査

PCRによる白さび病菌の検出に使用した種子を播種して発病を調査した結果、茶色種子、小種子では一部の苗の葉に黄化、ねじれなどが発生し、健苗率が低くなったが、いずれの種子でも播種30日後に発病は認められなかった(第2表)。

第2表 コマツナ種子の各種形状の構成比、発芽率および白さび病の発病

Table 2. Disease development of white rust on seedlings of *B. campestris*

調査項目(%)	種子の形状			
	黒色	灰色	茶色	小
構成比	50.3	4.7	19.7	25.3
発芽率	87.1	93.9	84.8	87.9
健苗率 ^{a)}	75.0	76.5	62.9	62.9
発病株率 ^{b)}	0.0	0.0	0.0	0.0

a) 未発芽, 発芽の遅れ, 子葉の黄化, よじれ等を除いた苗。
b) 播種30日後に調査。

考 察

近年, PCRを用いることで植物や土壌などから菌の検出が試みられており^{3, 7)}, 既報で奈良県における主要作物の主要病原菌についてDNA抽出法, PCRの条件, 塩基配列の解明と菌に特異的なプライマーの設計を検討した⁸⁾。今回, 既報と同様の項目についてコマツナ白さび病菌を用い

て調査した結果, 889bpの塩基配列が明らかとなり, ナズナに寄生する同属の *Albugo candida* とは ITSa領域で100%塩基配列が一致し, ITSb領域では6塩基異なるのみで相同性が非常に高かった¹⁾。欧米では以前まで *A. macrospora* は *A. candida* の1レースのとして扱われていたことから⁵⁾, 相同性の高さも理解できるが, コマツナ菌はナズナには感染しないことが確認されており⁵⁾, 本領域と寄生性の相違については関係が低いと考えられる。

白さび病菌に特異的なプライマーを設計するためにはコマツナと菌の塩基配列を比較し, 相同性の低い部位にプライマーを設計する必要がある。そこで, コマツナの核rDNA-ITS領域を解析した結果, 608bpの塩基配列が明らかとなり, これは最も近縁のカブ (*B. rapa*) とITSb領域で1塩基異なるのみであった¹⁰⁾。アブラナ科白さび病菌は3系統存在し, ①ダイコンにのみ寄生性を示す菌, ②ハクサイ, カブ, コマツナ, タイサイ, キョウナなど主に中国野菜に寄生性を示す菌, ③タカナ, カラシナ, 洋種ナタネに寄生性を示す菌に分かれることが指摘されている^{4, 5)}。今回, ダイコン菌, タカナ菌については塩基配列の解明は行っていないが, 既報の中で *Fusarium* 属菌について指摘したように⁸⁾, ITS領域で菌の寄生性を区別するのは不可能であると考えられる。

白さび病菌とコマツナ葉とのITS領域の比較では相同性は25%と低く, 菌のみを検出できるプラ

イマーの設計が可能と考えられた。そこで、菌に特異的であると思われる部位にプライマー（Amプライマーセット）を設計したところ、本プライマーセットを使用してPCRを行うことで、16種の植物病原菌とコマツナとは区別でき、属レベルでは特異性が認められた。ただし、本プライマーセットが種レベルで特異性かどうかは未検討であり、さらなる検討を要する。

コマツナ種子から抽出したDNAで糸状菌共通のプライマーセットとAmプライマーセットを用いてPCRを行うと、前者ではコマツナ由来と思われる増幅産物が生成され、菌由来の増幅産物は明確に区別できなかったが、後者では菌のみの増幅産物が明確に現れ、菌のみの検出が可能であると考えられた。しかし、既報でイチゴの成熟葉、クラウン、ロゼット株から抽出したDNAを鋳型としてPCRを行った場合に、多糖類、ポリフェノール類がDNA溶液中に混入しているためPCR反応が阻害されたことを示唆した⁸⁾。また、キクではDNA抽出葉の材料の量が多いと反応が阻害される傾向が認められた⁸⁾。本試験でも種子の量によっては反応阻害が懸念されたので、PCRに適した種子量について検討した結果、種子50個以上から一度にDNAを抽出するとPCRの阻害反応が認められた。一方、種子1個からでもDNAが抽出できPCRが可能であったが、菌が存在しても菌由来のDNAはわずかで、菌の検出には不利であると考えられた。そこで一度に多数の種子からDNAを抽出する場合、5～20個以内が適すると考えられる。

種子から菌を検出するために、種子を外観上4種類に分けて10個ずつDNAを抽出し、今回設計したAmプライマーセットを用いてPCRを行うと、種子の形状に関係なく菌が検出された。なお、本試験では種子に菌が存在しても微量であると考え、30サイクルでPCRを行ったが、この場合220bp付近にコマツナ由来と考えられる、わずかな増幅産物が認められる場合があるが、増幅断片サイズで区別できる。

さらに、各形状の種子を3月に播種して発病調査を行った結果、いずれの種子からも発病は認められなかった。菌が検出されたにもかかわらず発病が認められなかった原因として、第一に、既に

指摘されているように³⁾、不活化している白さび病菌を検出した場合が考えられる。PCRは非常に感度が高いが、菌の生死に関係なくDNAが増殖されるので、高い頻度で陽性になると考えられ、それが伝染源になり得るかどうかはさらに調査が必要である。第二に、薬剤の種子粉衣により発病しなかったことが考えられる。すなわち、種子に菌が存在しても薬剤の効果により必ずしも発病しない場合があると推測される。

以上の結果から、PCRにより種子からの菌の検出が可能であり、診断等にも利用できると考えられるが、生菌と死菌を区別する方法やPCRによりどの程度の増幅産物量があれば発病に至るかなどについて、さらに調査が必要である。また、今回の結果から、現地での本病の多発要因は種子伝染の可能性は低く、すでに指摘されているように⁵⁾、周年栽培による菌密度の上昇、圃場内に常に宿主植物が存在して伝染環が切れないこと、罹病株の放置や残さのすき込み等の要因が大きいと考えられる。したがって、防除対策としては伝染源の除去、圃場衛生、薬剤防除など総合的に防除対策を組み立てる必要があると考えられる。

摘 要

コマツナ白さび病菌についてDNA抽出とPCR、核rDNA-ITS領域の塩基配列の解明、菌に特異的なプライマーの設計を行った結果、設計したプライマーの特異性が確認された。コマツナ種子10個からDNAを抽出し、菌に特異的なプライマーでPCRを行った結果、菌の存在が確認された。しかし、種子を播種して発病を調査した結果、発病は認められなかった。

引用文献

1. Cooke, D. E. L., Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G., Brasier, C. M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and Oomycetes. *Fungal Genet. Biol.* 30:17-32.
2. Edwards, K., Johnstone, C. and Thompson, C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids*

- Res. 19(6):1349.
3. Henson, J.M., Goins, T., Grey, W., Mathre, D. E., and Elliott, M.L. 1993. Use of polymerase chain reaction to detect *Gaeumannomyces graminis* DNA in plants grown in artificially and naturally infested soil. *Phytopathology* 83:283-287.
 4. 樋浦 誠. 1930. Biologic forms of *Albugo candida* (Pers.) Kuntze on some cruciferous plants. *Jap. J. Bot.* 5(1):1-20.
 5. 堀江博道・菅田重雄. 1980. コマツナ白さび病の生態. *東京農試研報* 13:31-47.
 6. Lee, S.B. and Talor, J.W. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. pages 282-287 in :PCR protocols:A guide to methods and applications. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White, eds. Academic Press, San Diego, CA.
 7. Schilling, A. G. , Moller, E. M. and Geiger, H. H. 1996. Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *F. avenaceum*. *Phytopathology*. 86:515-522.
 8. 杉村輝彦. 2001. イチゴ, キク病原菌の核 rDNA-ITS領域のシーケンスと属特異的プライマー. *奈良農技センター報告* 32:9-18.
 9. White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Talor, J. 1990. Amplification and direct sequence of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pages 315-322 in : PCR protocols:A guide to methods and applications. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White, eds. Academic Press, San Diego, CA.
 10. Yang, Y.W., Lai, K.N., Tai, P.Y., Ma, D.P., and Li, W.H. 1999. Molecular phylogenetic studies of Brassica, Rorippa, Arabidopsis, and allied genera based on the internal transcribed spacer region of 18S-25S rDNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 13:455-462.
-