

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K05654

研究課題名（和文）FISH法によるタマネギべと病菌および乾腐病菌の検出

研究課題名（英文）Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepa* and *Peronospora destructor* by FISH

研究代表者

草場 基章（Kusaba, Motoaki）

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号：90304881

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：休眠孢子であるタマネギべと病菌の卵孢子および乾腐病菌の厚膜孢子についてFISH法による土壌中からの検出を試みた。rRNAを標的として、これらの菌を特異的に検出可能なFISHプローブを設計した。厚膜孢子ではrRNAの発現量が低くFISH法による検出は困難となった。卵孢子についても同様の問題が生じたが、土壌中でrRNAの発現量が高まるフェーズを見出したことで、FISH法による検出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではタマネギべと病菌の卵孢子についてFISH法による蛍光染色を可能とした。これは他菌も含めて卵孢子のFISH法による染色に成功した世界で初めての例となり、高い学術的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：I attempted to detect the oospores of onion mildew fungus and the chlamydospores of *Fusarium basal rot* fungus from the soil by the FISH method. We designed FISH probes targeting rRNA that could specifically detect each of fungi. It was difficult to detect chlamydospores of the *Fusarium* pathogen by the FISH method since the expression level of rRNA in the spores was significantly low. Although the same problem arose with oospores, I found a phase in which rRNA expression levels in the oospores increase in the soil and succeeded in detecting the spores by the FISH method.

研究分野：植物病理学

キーワード：卵孢子 厚膜孢子 タマネギべと病菌 タマネギ乾腐病菌 FISH

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

佐賀県は日本における重要タマネギ産地であり、全国第2位の出荷量を誇る。一方、佐賀県では近年になってべと病および乾腐病が多発するようになり、タマネギ生産に大きな被害をもたらしている。これら病害の原因菌(べと病菌, *Peronospora destructor*; 乾腐病菌, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*)はどちらも土壌伝染性の糸状菌として知られている。その土壌中の伝染源は卵胞子(べと病菌)および厚膜胞子(乾腐病菌)であり、土壌中で休眠により耐久生存をしている。このように、これらタマネギの病害も含めて土壌伝染性の病害は農薬が届かない土壌中に伝染源があるため、一般的に化学的防除法の適用は困難となる。そのため、その防除には土壌中の伝染源量(菌量)の正確な把握から発生程度を予測する土壌診断が重要となる。すなわち、診断結果に応じて転作や休作などの作付け体系の変更による耕手的防除が主な手段となる。しかしながら、これらタマネギの病害については土壌診断法は確立されておらず、その防除をより困難なものとしていた。

2. 研究の目的

タマネギべと病および乾腐病の防除法確立に資することを目的として、これら病害の土壌診断にFISH法を適用することを考えた。これら病害も含め、土壌伝染性病害の土壌診断には土壌から抽出したDNAを鋳型としたリアルタイムPCR法やLAMP法の利用による菌量測定が考えられている。一方、DNAは死菌からも抽出されるため、これら手法では死菌まで併せた菌量が推定されてしまうといった問題が生じる。FISH法は蛍光標識オリゴヌクレオチドプローブを細胞内でハイブリダイズさせ、細胞を蛍光で染色する手法である。その際、プローブの標的をRNAにすることにより、生きた細胞のみを選別して染色することができる。そのため、土壌中の病原菌の菌量を生菌ベースで把握することが可能となる。

3. 研究の方法

(1)胞子の採集 タマネギべと病菌については分生胞子ならびに卵胞子を供試した。本菌は培養ができない絶対寄生菌であるため、これら胞子は自然発病した罹病タマネギ株に由来するものを供試した。分生胞子は病斑上に形成されたものを綿棒でかき取ることで採集した。卵胞子は罹病葉に形成されたものを既報の方法(Van der Gaag and Frinking 1996)により抽出して採集した。また、卵胞子については土壌と混合した後に既報の方法(Van der Gaag and Frinking 1997)により抽出したのも供試した。タマネギ乾腐病菌については分生胞子ならびに厚膜胞子を供試した。分生胞子は常法により培地上で形成させたものを用いた。厚膜胞子はフスマ培養土壌混和接種法(小林 1995)により土壌中で形成させたものを用いた。厚膜胞子の土壌からの抽出は既報の方法(Van der Gaag and Frinking 1997)により行った。

(2)供試プローブ タマネギべと病菌についてはPd-18Sp2-PNA(ATTGCAACAGTCTATCCCTA)およびPd-ITS-PNA(ACATGCCACCAGCAGCCGCC)を用いた。Pd-18Sp2-PNAは18S rRNA 遺伝子内のタマネギべと病菌が属するツユかび科に特異的な配列を標的として設計した。Pd-ITS-PNAはITS領域内のタマネギべと病菌に特異的な配列から設計した。タマネギ乾腐病菌についてはFo28S(CCGCCTTTATCCCCCGGGGA)およびFoITS(ACCAGTAACGAGGGTTT)を用いた。Fo28Sは28S rRNA 遺伝子内、FoITSはITS領域内の*Fusarium*属菌特異的な配列から設計した。これらプローブはペプチド核酸で合成し、Cy3で蛍光標識した。また、FISHのハイブリダイゼーション条件の検討には真核生物のユニバーサルプローブとして知られるEUK516を用いた(Amann et al. 1990)。

(3)ハイブリダイゼーション 供試プローブのハイブリダイゼーションはBaschien et al. (2008)の方法(条件I)およびMiller and Scholin (1998, 2000)の方法(条件II)により行った。条件Iは組織固定にはパラホルムアルデヒド、ハイブリダイゼーションにはホルムアミドをベースとしたバッファーを用いることを特徴とする。条件IIは組織固定にはエタノール、ハイブリダイゼーションにはNaCl等の塩類をベースに調整したバッファーを用いることを特徴とする。

4. 研究成果

(1)ハイブリダイゼーション条件の検討 条件IおよびIIの比較のため、タマネギべと病菌の分生胞子を対象に真核生物のユニバーサルプローブであるEUK516を用いてFISH法を行った。その結果、どちらの条件においても分生胞子からは同等と考えられる強い蛍光発色が観察された。すなわち、分生胞子を対象としたFISH法ではどちらの条件によっても蛍光発色による検出が可能であることが明らかとなった。そこで、以下の検討では有害なパラホルムアルデヒドおよびホルムアミドを使用しないためより安全に実施可能な条件IIによりハイブリダイゼーションを行うこととした。

(2) プローブの特異性の検討 タマネギベと病菌の検出のために設計した Pd-18Sp2-PNA ならびに Pd-ITS-PNA についてハイブリダイゼーションの特異性を検討した。ツुकカビ科としてタマネギベと病菌に加えて *Phytophthora* 属 4 種、*Plasmopara* 属 1 種、フハイカビ科として *Pythium* 属 1 種、シラサビ科として *Albugo* 属 1 種の分生子あるいは菌糸を対象にハイブリダイゼーションを行った。その結果、Pd-18Sp2-PNA ではツुकカビ科の種のみから、Pd-ITS-PNA ではタマネギベと病菌のみから蛍光発色が観察され、これらプローブの特異性が確認された (図 1)。タマネギ乾腐病菌の検出のために設計した Fo28S および FoITS については *Fusarium* 属菌としてタマネギ乾腐病菌に加えて *F. fujikuroi*、他属の菌としてタマネギ常在菌である *Alternaria* sp. ならびに *Botrytis* sp. の分生子あるいは菌糸を対象にハイブリダイゼーションを行った。その結果、どちらのプローブも供試した *Fusarium* 属菌 2 種のみから蛍光発色が観察され、その特異性が確認された (図 2)。そこで、本研究で設計したプローブによる特異的検出をさらに確認するため、両菌それぞれについて発病タマネギ株からの検出を試みた。プローブとしては Pd-18Sp2-PNA および Fo28S をそれぞれ用いた。発病タマネギ株から切り出した組織切片を ClearSee™ (富士フィルム和光純薬株式会社) による透明化処理後に、ハイブリダイゼーションに供試した。ハイブリダイゼーションは条件 II で行ったが、組織の変性を防ぐため、エタノールによる脱水処理を省いた。両菌のどちらについても、Pd-18Sp2-PNA あるいは Fo28S のハイブリダイゼーションにより植物組織中に伸展する菌糸の蛍光発色による特異的な検出が可能であることが明らかとなった (図 3 および 4)。また、タマネギベと病は全身発病症状を示すことから、発病株の各器官から採取した組織片を供試して、ハイブリダイゼーションを行った。その結果、根を除く、全ての器官の組織からタマネギベと病菌の菌糸が検出された (図 3)。

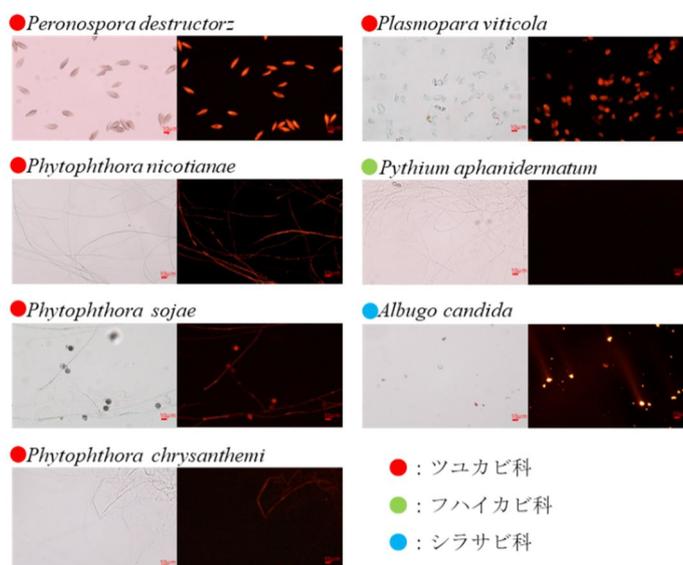
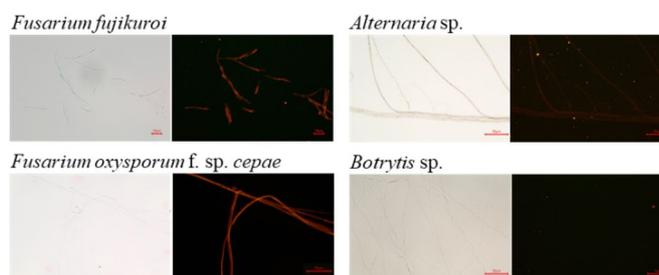


図 1 FISH プローブの特異性の検討. 供試菌の菌糸あるいは胞子を対象としてツुकカビ科特異的のプローブである Pd-18Sp2-PNA をハイブリダイズさせた。



プローブ : Fo28S (*Fusarium* 属菌特異的のプローブ)

図 2 FISH プローブの特異性の検討. 供試菌の菌糸を対象として *Fusarium* 属菌特異的のプローブである Fo28S をハイブリダイズさせた。

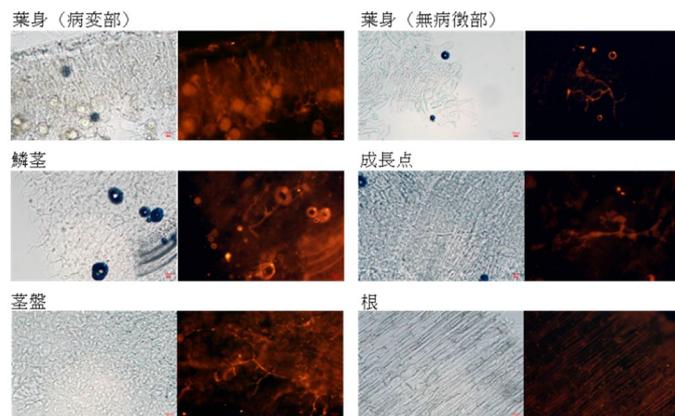


図 3 FISH 法によるタマネギ組織からのタマネギベと病菌の検出. 全身発病症状を示したタマネギ株の各器官から組織片を切り出し ClearSee™ (富士フィルム和光純薬株式会社) による透明化処理後に、Pd-18Sp2-PNA をプローブとしたハイブリダイゼーションに供試した。

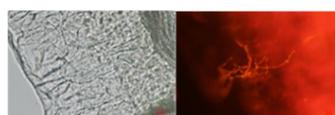


図 4 FISH 法によるタマネギ組織からのタマネギ乾腐病菌の検出. 発病タマネギ株について本菌が主に分布する鱗茎から組織片を切り出し ClearSee™ (富士フィルム和光純薬株式会社) による透明化処理後に、Fo28S をプローブとしたハイブリダイゼーションに供試した。

(3) 卵胞子・厚膜胞子の検出 罹病葉から抽出したタマネギベと病菌の卵胞子について FISH 法による蛍光染色を試みた。卵胞子は細胞壁が厚いためプローブが細胞質内に浸透しない可能性が考えられた。そこで、Proteinase K によるタンパク質分解、および、Cellulase と β -glucanase による細胞壁分解処理した卵胞子

を供試することとした。Pd-18Sp2-PNA をプローブとしたハイブリダイゼーションを行ったところ、卵胞子からは全く蛍光発色が観察されなかった。タマネギ乾腐病菌の厚膜胞子についても同様の処理をした後、Fo28S をプローブとしてハイブリダイゼーションを行ったが、蛍光発色は得られなかった。このように蛍光発色が観察されなかった理由としてこれら胞子は休眠状態（仮死状態）にあるため、rRNA の発現量が極端に少ないことが考えられた。そこで、タマネギ乾腐病菌の厚膜胞子については既報（Bindslev et al. 2002）の方法を参考に in situ PCR により Fo28S の標的 DNA 配列を増幅した後に同プローブによるハイブリダイゼーションを行った。しかしながら、理由は不明であるが目的とした DNA 領域の増幅が起こらず、ハイブリダイゼーションにより厚膜胞子からは蛍光発色が観察されなかった。以上のことより、これら休眠胞子を FISH 法により蛍光染色で検出するためには、代謝の活性化により rRNA の発現を促すことが重要と考えられた。そこで、より、大きく観察が容易なタマネギべと病菌の卵胞子に焦点を絞り、代謝の活性化の誘導について検討を行った。上述の実験では罹病葉から抽出した卵胞子を用いていることから、罹病葉中で卵胞子は既に代謝活動を止めて休眠を開始していると予想された。罹病葉から抽出した直後の卵胞子について形態観察を行ったところ、脂質貯蔵器官である Ooplast の輪郭が不鮮明であることが明らかとなった。このような卵胞子を土壌に混合すると 1 週間で Ooplast の輪郭が鮮明なものに変化することが明らかとなった（図 5）。このことから、予想に反して罹病葉中の卵胞子は未成熟なまま代謝が止まっており、土壌中で成熟することで休眠状態になることが予想された。そこで、罹病葉から抽出した卵胞子を土壌に混合してから 5 日後に抽出して FISH 法による観察に供試した。また、これまでの検討では条件 II によりハイブリダイゼーションを行っていた。しかしながら、本条件の固定処理では、エタノールにより卵胞子の細胞質に変質が起こり、脂質の膜が生じることが明らかとなった。すなわち、この脂質の膜により標的 rRNA 分子と結合したプローブの蛍光が遮断されている可能性が考えられた。そこで、固定処理までの操作は条件 I により行い、その後のハイブリダイゼーションから蛍光観察までは条件 II に従って行うこととした。このように変更を加えたところ、Pd-18Sp2-PNA のハイブリダイゼーションにより卵胞子から蛍光染色による発色が観察された（図 6）。一方、同様のハイブリダイゼーションによっても罹病葉から抽出した卵胞子（土壌と混合していない卵胞子）については蛍光発色が観察されなかった（図 6）。すなわち、本検討により観察された蛍光発色は固定法の変更のみにより観察されるようになったものではなく、卵胞子が成熟するための変化に伴い代謝が活性化した結果であると考えられた。

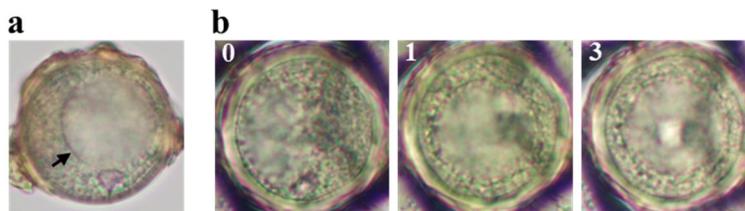


図 5 a, タマネギべと病菌の卵胞子に形成された Ooplast(\blacktriangleright)。b, 土壌中における Ooplast の経時的形態変化。38 μ m 目開ナイロンメッシュの網目に卵胞子を吸引固定した。観察対象とした卵胞子のナイロンメッシュ上の位置を写真撮影により特定した後(0), このナイロンメッシュを土壌に埋設した。埋設 1 週間後, 3 週間後にナイロンメッシュをそれぞれ土壌から回収し, 観察対象とした卵胞子の形態を写真撮影により記録した

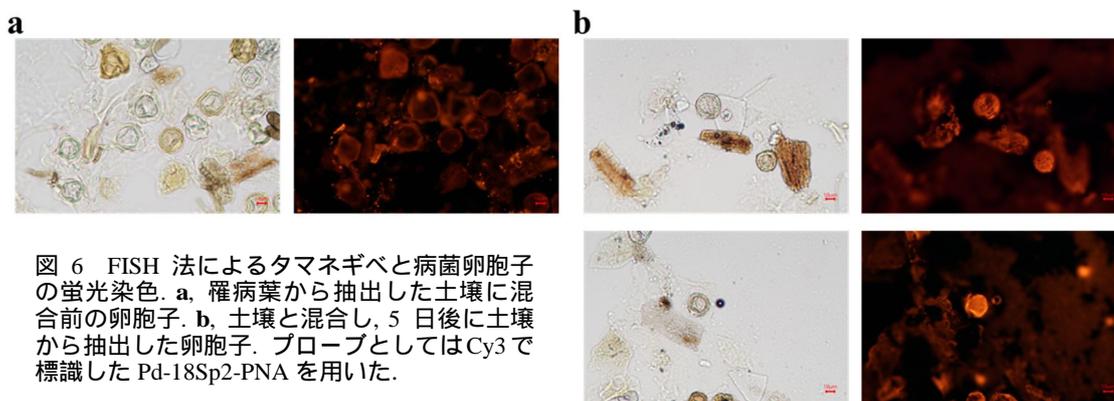


図 6 FISH 法によるタマネギべと病菌卵胞子の蛍光染色。a, 罹病葉から抽出した土壌に混合前の卵胞子。b, 土壌と混合し, 5 日後に土壌から抽出した卵胞子。プローブとしては Cy3 で標識した Pd-18Sp2-PNA を用いた。

引用文献

Amann RI, Krumholz L, Stahl DA (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol* 172:762–770

Baschien C, Manz W, Neu TR, Marvanová L, Szewzyk U (2008) In situ detection of freshwater fungi in an alpine stream by new taxon-specific fluorescence in situ hybridization probes. *Appl Environ Microbiol* 74:6427–6436

Bindslev L, Oliver RP, Johansen B (2002) In situ PCR for detection and identification of fungal species. *Mycol Res* 106: 277-279

小林 紀彦 (1995) フザリウム菌による病害(萎ちょう性). 作物病原菌研究技法の基礎(大畑 貫一ら 編). 日本植物病防疫協会(東京): pp295-300

Miller PE, Scholin CA (1998) Identification and enumeration of cultured and wild *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) using species-specific LSU rRNA-targeted fluorescent probes and filter-based whole cell hybridization. *J Phycol* 34:371-382

Miller PE, Scholin CA (2000) On detection of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species using whole cell hybridization: Sample fixation and stability. *J Phycol* 36:238-250

Van der Gaag DJ, Frinking HD (1996) Extraction from plant tissue and germination of oospores of *Peronospora viciae* f. sp. *pisi*. *J. Phytopathol.* 144: 57-62

Van der Gaag DJ, Frinking HD (1997) Extraction of oospores of *Peronospora viciae* from soil. *Plant Pathol* 46: 675-679.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古嶋隼弥・草場基章
2. 発表標題 FISH法によるタマネギ乾腐病菌およびタマネギベと病菌の植物組織からの検出
3. 学会等名 日本植物病理学会九州部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 草場基章, 高木里歩
2. 発表標題 Fluorescence in situ hybridization (FISH)法によるタマネギベと病菌分生胞子の検出
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高谷 樹・近藤知弥・井手洋一・草場基章
2. 発表標題 タマネギベと病菌の休眠型卵胞子は輪郭が明瞭な Ooplast 様構造物を有する.
3. 学会等名 日本植物病理学会九州部会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------