

植物地下部に侵入する寄生菌類の網羅的検出技術開発

2. 水田周辺雑草地下部からのイネ苗立枯病菌 *Pythium* spp. の検出戸田武¹, 古屋廣光¹¹ 秋田県立大学 生物資源科学部 生物生産科学科

Pythium spp.は土壌微生物の中でも多くの植物に大きな被害を及ぼす卵菌類の一種である。本菌類は広く存在し、作物の生産に大きく影響するが、圃場で詳しい情報が伝わっている例は極めて少ない。*Pythium* spp. にイネ苗立枯病菌とされる種は8種類あり、これらはメヒシバなどのイネ科雑草の根を伝染源としていと考えられている。本研究では、近年開発した*Pythium* spp.の属特異的プライマーによる検出法によって、イネ苗立枯病菌をメヒシバから*Pythium* spp.を検出できるか検証し、実用的に分析技術とできるか検討した。秋田県内の8地点からメヒシバの根を合計64サンプル採取して検出に使用した結果、検出された増幅産物のサイズ値から、イネ苗立枯病菌の*P. arrhenomanes*, *P. sylvaticum* および*P. spinosum*は高い頻度で検出された。これらの3種のうち1種以上は各採取地のメヒシバ根から検出されたことから、メヒシバの根にイネ苗立枯病菌が存在する可能性は高いと考えられた。今後、属特異的プライマーによる検出法が他の植物からの*Pythium* spp.の検出に適用できると考えられる。

キーワード: *Pythium* spp., 属特異的プライマー, メヒシバ

土壌伝染性の卵菌類 *Pythium* spp.は様々な植物に寄生して、大きな被害を及ぼすことが知られている。*Pythium* spp.による病害は複数の種が関与することが多く、イネ苗立枯病では8種類 (*Pythium aristosporum* Vanterpool, *P. arrhenomanes* Drechsler, *P. graminicola* Subramanian, *P. inflatum* Matthews, *P. irregulare* Buisman, *P. sylvaticum* W.A. Campbell & F.F. Hendrix, *P. spinosum* Sawada, *P. torulosum* Coker & F. Patterson) が報告されている (遠藤, 及び茨木, 1986; 加藤, 中西, 高日, 中神, 及び小川, 1985a; 加藤, 中西, 高日, 及び中神, 1985b)。これらのうち *P. arrhenomanes* は、青森, 岩手, 秋田, 宮城, 新潟, 富山および長野では本病の最も重要な種である (Toda, Iwasa, Fuji, & Furuya, 2015; 山下, 戸田, 和田, 及び武田, 2012; 戸田, 守川, 藤, 及び古屋, 2010)。さらに, *P. arrhenomanes* はメヒシバやエノコログサなどのイネ科雑草の根に広く存在することが明らかになっている (Toda et al. 2015)。また, 米国

においてイタリアンライグラスなどのイネ科雑草の根が, *P. arrhenomanes* によるトウモロコシ立枯病の主な伝染源となっていることが示唆された (Dissanayake, Hoy, & Griffin, 1997)。同様のことは *P. arrhenomanes* のほかのイネ苗立枯病菌でも考えられる。

Pythium spp.による病害は一つの植物に複数種が侵入することによって発生することも少なくない。病害を正確に診断して, 対策をとるためには *Pythium* spp.を的確に検出する必要があるが, 従来法では病害に関与する種を全て検出することは容易ではなく, 現在までほとんど行われていない。

我々は近年, 植物地下部に侵入する菌類を網羅的に検出する技術を開発している。その過程で *Pythium* 属特異的プライマーを開発し, *Pythium* spp.を網羅的に検出する技術を開発した (戸田, 2014)。

本研究では, 網羅的検出技術をイネ苗立枯病に適用し, 病原菌類の雑草 (メヒシバ) への寄生と生存

の可能性を検証した。

材料および方法

メヒシバの採取

秋田県内の大潟村(細粒グライ土), 潟上市天王(黒泥土), 秋田市上新城(灰色低地土), 秋田市岩見三内(黒ボク土), 秋田市雄和(黒ボク土), 北秋田市合川(黒ボク土), 鹿角市花輪(黒ボク土), 横手市大雄(黒ボク土) から, メヒシバ (*Digitaria ciliaris* (Retz.) Koel) を 8 個体ずつ, 合計 64 サンプル採取した。採取後のメヒシバの根は洗浄した後, 使用時まで-30℃で保存した。

属特異的プライマーによる *Pythium* spp. の DNA 断片の検出

各地で採取したメヒシバの根を 100g 取り, 2 ml 凍結保存用チューブに移してサンプルとして使用した。各サンプルは DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) によって DNA を抽出した。

濃度調整後の DNA を属特異的プライマーによる PCR (Polymerase Chain Reaction) に使用した。プライマーはリボソーム DNA の ITS (Internal Transcribed Spacer) 領域の増幅に使用される ITS1 および *Pythium* 属特異的プライマーである PytLR (戸田, 2014) を使用した。PCR 混合液は 19 μ l に試薬を 1x Buffer, 200 μ M dNTP mix, 0.05 U/ μ l TaqGold DNA polymerase (ともに Applied Biosystems), 5 pmol/ μ l プライマー ITS1 および PytLR となるように調整し, DNA 1 μ l を加え, 合計 20 μ l とした。プライマー-PytLR は VIC 蛍光標識 (Applied Biosystems) して使用した。PCR には Thermal Cycler (タカラバイオ) を使用し, 95℃ 10 分間を 1 サイクル, 95℃ 1 分間, 55℃ 1 分間, 72℃ 2 分間を 35 サイクル, および 72℃ 7 分間を 1 サイクルに設定した。PCR 後の混合液を 2 μ l 取り, 2%アガロースゲルによる電気泳動に使用し, エチジウムブロマイド溶液で染色した後, UV トランスイルミネーターで確認した。

増幅産物はジェネティックアナライザー (Applied Biosystems) によってサイズ値を決定させた。各サンプルから得られた増幅産物のサイズ値から, 病原

菌として知られる種の識別を行った。プライマー ITS1/PytLR によって増幅される DNA 断片は *Pythium* spp. の ITS 領域が含まれており, 長さが 900 以上であることが明らかになっているため, サイズ値は 900 以上の増幅産物を検出とした。検出された増幅産物のサイズ値から, 過去の報告 (戸田, 2014) を参考にして種を決定した。また, 各地のメヒシバ根で検出された増幅産物にイネ苗立枯病菌が含まれているか調べた。

大潟村-5



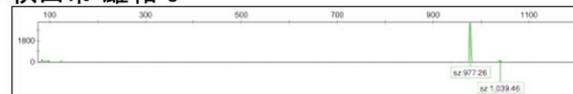
潟上市 天王-5



秋田市 上新城-3



秋田市 雄和-6



秋田市 雄和-7



北秋田市 合川-2



図 1 ヒメシバ根から検出された *Pythium* 属菌の増幅産物 (サイズ値 900 以上を検出)

結果

秋田県内の 8 地点で収集したメヒシバの根 64 サンプルを *Pythium* 属特異的プライマーによる検出に使用した。その結果, 60 サンプルから合計で 23 のサイズ値の異なる増幅産物が検出された。増幅産物数が 1 であったのは 7 サンプルであった (図 1, 大潟村-5)。それ以外の 53 サンプルからは, 2 以上の複

表1 各採取地のメヒシバ根から検出された*Pythium*属菌の増幅産物のサイズ値および検出数

採取地	土壌	948-	958-	977-	981-	991-	1006-	1038-	1048-	1059-	1080-	1090-	1110-	1160-
		949	962	979*	984	994	1007	1041	1052	1061	1082*	1093*	1112	1163
大潟村	細粒グライ土	—	3	7	—	2	1	—	—	—	5	—	—	—
潟上市 天王	黒泥土	—	1	—	8	8	—	2	6	—	5	3	3	2
秋田市 上新城	灰色低地土	—	2	5	1	—	1	6	1	—	4	4	—	—
秋田市 岩見三内	黒ボク土	—	4	—	4	4	—	—	—	—	1	—	7	—
秋田市 雄和	黒ボク土	—	2	8	—	—	—	4	—	—	—	1	—	—
北秋田市 合川	黒ボク土	—	7	—	2	2	3	—	—	—	4	8	—	2
鹿角市 花輪	黒ボク土	2	6	8	—	7	—	7	—	—	6	—	—	3
横手市 大雄	黒ボク土	3	4	—	2	—	—	—	—	4	7	2	—	—

*サイズ値から977-979は*Pythium arrhenomanes*、1080-1082は*P. sylvaticum*、1090-1093は*P. spinosum*と明らかになっている

数の増幅産物が検出され（図2, 秋田市上新城-3, 秋田市雄和-6, -7, 北秋田市合川-2), 最大で8の増幅産物が検出されるサンプルも見られた（図2, 潟上市天王-5).

2つ以上のメヒシバ根から検出された増幅産物を表1にまとめた. イネ苗立枯病菌として報告されている*P. arrhenomanes*, *P. graminicola*, *P. spinosum*, *P. sylvaticum*, および*P. torulosum*は, 増幅産物のサイズ値がそれぞれ977-979, 957-958, 1090-1092, 1080-1082, および958-959を示すことが明らかになっている（戸田, 2014).

サイズ値977-979 (*P. arrhenomanes*)の増幅産物がメヒシバ根から検出されたのは大潟村, 秋田市上新城, 秋田市雄和, 鹿角市花輪の4地域であった（表1). これらの地域において, *P. arrhenomanes*の増幅産物はそれぞれ半数以上のメヒシバの根から検出された. サイズ値1080-1082 (*P. sylvaticum*)の増幅産物は秋田市雄和以外の7地点の地域から検出され, 鹿角市花輪および横手市大雄では検出頻度が高かった. サイズ値1090-1093 (*P. spinosum*)は潟上市天王, 秋田市上新城, 秋田市雄和, 北秋田市合川, 鹿角市花輪, および横手市大雄の5地点で検出され, 北秋田市合川では全てのメヒシバ根から検出された（表1). サイズ値958-962 (*P. graminicola*, *P. myriotylum* および*P. torulosum*)を示す増幅産物は8地点全てから検出され, 特に北秋田市合川および鹿角市花輪で高い頻度で検出された.

種は明らかになっていないが, 多く検出された増幅産物では, 981-984は5地点, 991-994は5地点で, および1038-1041は4地点で検出された. 981-984

は潟上市天王で, 991-994は潟上市天王および鹿角市花輪で特に検出頻度が高かった. 1038-1041は秋田市上新城および鹿角市花輪で検出頻度が高いなど, 地域によってはそれぞれの増幅産物の検出頻度に違いが見られる結果となった（表1).

考察

Pythium spp.は多くの種が広い範囲の植物に寄生するとともに, 一つの植物の根に複数の種が侵入することが多い. 本研究の結果, メヒシバの根から, 属特異的プライマーによって複数の増幅産物が検出され, 一地域に最大で11種の*Pythium* spp.が検出された（表1, 潟上市天王). イネ苗立枯病菌の*P. arrhenomanes*（サイズ値977-979), *P. sylvaticum*（1080-1082), および*P. spinosum*（1090-1093)の3種は各地域から少なくとも1種は検出された. また, サイズ値958-962を示す増幅産物は全ての地点から検出された. このサイズ値の増幅産物の中には*P. graminicola*, *P. torulosum* および*P. myriotylum*が含まれる可能性がある. これらのことから, メヒシバを採取した各地域ではイネ苗立枯病の病原菌が少なくとも1種類以上は存在すると考えられた.

また, 1株のメヒシバの根から, 様々な*Pythium* spp.が検出されると同時に, *P. arrhenomanes*, *P. sylvaticum*, および*P. spinosum*のうち2種または3種も同時に検出される場合も多く見られた. これらのことから, 本研究の属特異的プライマーによる検出法によって, メヒシバ根から増幅産物が多く検出される中に病原菌とされる*Pythium* spp.を複数で同

時に検出できることが示された。この手法はメヒシバのほかの様々な植物にも対応できる可能性は高い。複数の *Pythium* spp. が関与する病害に対して、それぞれの種の生態等の調査に利用できると考えられる。

各地域の土壌は、5 地域が黒ボク土である以外は異なっているが、メヒシバ根から検出された種の組み合わせと土壌との関係性は見られなかった (表 1)。各地域で検出される種やその頻度は、土壌の種類に関係なく大きく異なっており、大潟村および秋田市雄和では *P. arrhenomanes*、北秋田市合川では 958-962 および *P. spinosum*、横手市大雄では *P. sylvaticum* などが高い頻度で検出された (表 1)。これらのことから、各 *Pythium* spp. の検出頻度は採取した地域で異なるとともに、種の分布も地域によって異なることが強く示唆された。

本研究によって、64 のメヒシバの地下部から 23 種類の *Pythium* spp. が検出され、うち 3 種が病原菌であることが明らかになった。これらの結果は、サンプルを採取後に多大な労力を必要とせずに迅速に得ることができた。さらに、根に存在する種を推定することなく、複数の病原菌を一度に検出した。これらのことから、属特異的プライマーによる検出法は、病原菌の *Pythium* spp. の検出に実用的にも優れた方法と考えられる。

文献

- Chun, SC., Schneider, RW. (1998) Sites of infection by *Pythium* species in rice seedlings and effects of plant age and ease development *Phytopathology* 88:1255-1261.
- Dissanayake, N., Hoy, JW., & Griffin, JL. (1997) Weed hosts of the sugarcane root rot pathogen, *Pythium arrhenomanes* *Plant Disease* 81:587-591.
- 遠藤頼嗣, 茨木忠雄 (1986) 「イネの箱育苗後期に発生する萎凋性立枯苗の関与菌について」『北日本病虫研究会報』 37:189, 1986.
- 加藤重博, 中西逸朗, 高日幸義, 中神和人, 小川正己 (1985a) 「*Pythium* 属菌によるイネ苗立枯病に関する研究 (1) 出芽前後の苗立枯病の発生に関与する *Pythium* 属菌」『日植病報日本植物病理学会報』 51:159-167.
- 加藤重博, 中西逸朗, 高日幸義, 中神和人 (1985b) 「*Pythium* 属菌によるイネ苗立枯病に関する研究 (2) 育苗中・後期の苗立枯病の発生に関与する *Pythium* 属菌」『日本植物病理学会報』 51:168-175.
- Toda, T., Iwasa, A., Fuji, S., & Furuya, H. (2015). Widespread occurrence of *Pythium arrhenomanes* pathogenic to rice seedlings around Japanese rice fields *Plant Disease* 99:1823-1831.
- 戸田 武, 守川俊幸, 藤 晋一, 古屋廣光 (2010). 「富山県で採取されたイネ苗立枯病罹病苗から分離された *Pythium* spp. の種の同定」『日本植物病理学会報』 76: 44. (講要)
- 戸田 武 (2014). 「RISA 法を使用した根の菌相解析による *Pythium* spp. の効果的な検出」『土壤伝染病談話会レポート』 27: 58-66.
- van der Plaats-Niterink, AJ. (1981) 「Monograph of the genus *Pythium*」『Study of Mycology』 21:1-242.
- 山下 亨, 戸田 武, 和田美佐, 武田和男 (2012) 「長野県における *Pythium arrhenomanes* によるイネ苗立枯病の発生とメタラキシルに対する薬剤感受性」『関東東山病虫害研究会報』 59:127-130.

〔平成 28 年 7 月 20 日受付〕
〔平成 28 年 7 月 31 日受理〕

Development of a molecular technique for detection of deleterious and pathogenic soil microorganisms in plant roots

2. Detection of *Pythium* Species from Roots of Poaceae Plants near Rice Fields

Takeshi Toda, Hiromitsu Furuya

Department of Biological Production, Faculty of Bioresource Science, Akita Prefectural University

Pythium spp. is one of the oomycetes causing severe disease in a wide range of plants. Among the 8 *Pythium* spp. known as pathogens of rice seedlings, *Pythium arrhenomanes* may reside in the roots of Poaceae weeds, which can lead to the infection of other crops. In this study, southern crabgrass was used to detect the *Pythium* spp. causing disease in rice seedlings. Southern crabgrass was collected from 8 fields in Akita Prefecture, and a detection technique involving genus-specific primers for *Pythium* spp. was used on the roots of the collected samples. Amplified fragments of the known rice seedling pathogens *P. arrhenomanes*, *P. sylvaticum*, and *P. spinosum* were detected in the roots of southern crabgrass at a high frequency. Furthermore, *Pythium* spp. that are pathogenic to rice seedlings were found in all the 8 collection sites. The collection of additional weeds and crops from a higher number of locations can provide more information on the distribution of the pathogenic *Pythium* spp.

Keywords: *Pythium* species, genus-specific primer, southern crabgrass