

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の設計

杉村 輝彦*

Nucleotide Sequence of Nuclear rDNA-ITS Regions and Design of Genus Specific Primers for the Regions of Several Plant Pathogens of Strawberry and Chrysanthemum.

Teruhiko SUGIMURA

Summary

From 3 pathogens of strawberry (*Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Sphaerotheca humuli*) and 2 of chrysanthemum (*Puccinia horiana*, *Septoria chrysanthemella*), we amplified their rDNA-ITS regions by PCR and determined the nucleotide sequences. This is the first report of the whole ITS sequences from *S. humuli*, *S. chrysanthemella* and *P. horiana* and ITSb sequence from *C. gloeosporioides*. Based on the sequences, we designed primers that would amplify specifically the ITS region of each pathogen. The primer set for *S. humuli* amplified only its ITS region among 16 pathogens examined when annealing was done at 58°C in PCR. Unfortunately, primer sets for 3 other pathogens did not show specificity. As the ITS sequences of various pathogens have been available, further trials would enable to identify the best primer sets for other pathogens.

Key words: *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Sphaerotheca humuli*, *Puccinia horiana*, *Septoria chrysanthemella*, PCR, genus specific primer

緒 言

イチゴ, キクなどの栄養繁殖性作物は親株からの採苗を行うため, 親株が発病していると苗でも発病する可能性が高い。苗に病徴が観察されれば選抜が可能であるが, 潜在感染株は低温や高温など適温以外の条件下では発病しないため, 感染苗が本圃に持ち込まれやすい。イチゴの主要病害である炭疽病や萎黄病は低温期に, イチゴうどんこ病やキク白さび病等は高温期に無病徴感染となる。潜在感染の確認方法としては, 炭疽病では無病徴株をビニル袋に入れ, 28°Cで2~3週間置き, 発病の確認と形成された分生胞子を検鏡する方法が提唱されている¹³⁾。また, 萎黄病では選択培地を用いてクラウンから菌の検出が行われているが, これらの方法は日数を要するうえ, コンタミネーションにより正確な診断ができない場合がある。

近年, DNAの分析技術としてPCR (Polymerase Chain Reaction) 手法が広く利用されているが⁶⁾, PCRはDNA断片を百万倍にも増幅することから, 非常に感度が高く, わずかにDNAが存在する潜在感染などの診断に利用できる^{1,12)}。また, 核リボソームDNA (rDNA) のITS領域 (Internal Transcribed Spacer, 第1図) は生物の種や属で高度に保存されているため, その領域の塩基配列を解析することで種の特異等に利用でき, ITS領域に種特異的なプライマーを設計することで, 複数の菌が存在しても特定種のみをPCRにより検出できる^{1,10,12,14,15)}。この方法を利用して, コムギ葉枯病 (*Septoria tritici*)¹⁾, イネ科作物立枯病 (*Gaeumannomyces graminis*)⁷⁾, 苗立枯病類 (*Pythium ultimum*)¹⁰⁾, メロン黒点根腐病菌 (*Monosporascus* spp.)¹²⁾, パーティシリウム病 (*Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae*)¹⁴⁾などで, 土壌や発病株からの菌の検出が試みられている。

* 現 農業大学校

そこで、本県特産物のイチゴ、キクの主要病害であるイチゴ炭疽病、萎黄病、うどんこ病およびキク白さび病、黒斑病の無病徴感染株をPCRにより検出するために、ここでは各種病原菌のrDNA-ITS領域のシークエンスの決定および属特異的プライマーの設計を試みた。

材料および方法

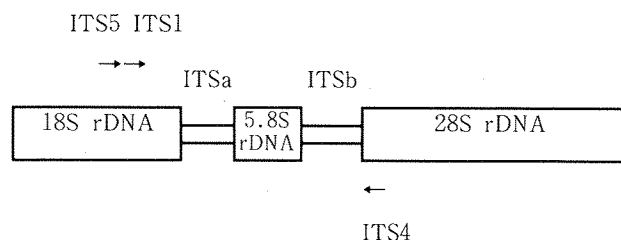
供試病原菌 イチゴ炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*, 以下, 炭疽病菌), イチゴ萎黄病菌 (*Fusarium oxysporum*, 以下, 萎黄病菌), はPS液面培養菌, キク黒斑病菌 (*Septoria chrysanthemella*, 以下, 黒斑病菌)はPSA培地上の菌そう100~200mg (生重) からDNAを抽出した。イチゴうどんこ病菌 (*Sphaerotheca humuli*, 以下, うどんこ病菌) およびキク白さび病菌 (*Puccinia horiana*, 以下, 白さび病菌)は生体上の分生孢子あるいは担子孢子からDNAを抽出した。また, プライマーの属特異性を検定するため, さらに11種の病原菌のDNAを抽出した (第2表)。

菌のDNA抽出方法 Leeら¹¹⁾の方法に準じてDNAを抽出した。抽出用緩衝液 (50mM Tris-HCl (pH7.2), 50mM EDTA, 3%SDS, 1%メルカプトエタノール) を入れたエッペンドルフチューブ内で菌体を専用のホモジナイザーで磨砕し (分生孢子あるいは担子孢子的場合は抽出用緩衝液に混和), 65℃で1時間インキュベートした。次に, TE (Tris-HCl pH7.2, EDTA) 飽和フェノールとクロロフォルムを加えて振とう後14,000rpmで4℃・15分間遠心した。上清を取り, 1/10溶の3M酢酸ナトリウム (pH8.0) と溶液の0.54倍のイソプロパノールを加え軽く混和した。14,000rpmで10分間遠心してDNAを沈殿させ, 上清を捨て, 70%エタノールで沈殿を洗浄した。乾燥後, TEに溶解してPCRのための鋳型DNAとした。

植物のDNA抽出方法 イチゴ (‘宝交早生’), キク (‘松本城’) およびコマツナ (‘夏楽天’) についてEdwards法 (改変)¹²⁾に従ってDNAを抽出した。抽出用緩衝液 (200mM Tris-HCl (pH7.2), 25mM EDTA, 250mM NaCl, 25mM DTT, 0.5% SDS) を入れたエッペンドルフチューブ内に展開直後の幼葉片 (生重約100~

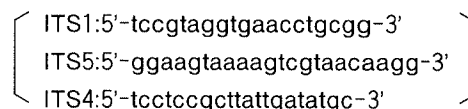
200mg) を入れ, 専用のホモジナイザーで磨砕して14,000rpmで4℃・15分間遠心した。上清を取り, TE飽和フェノールとクロロフォルムを加え, 振とう後14,000rpmで4℃・15分間遠心した。上清 (水層) を取り, 溶液の0.6倍のイソプロパノールを加えて混和後15分間室温に置いた。14,000rpmで15分間 (室温) 遠心した後, 上清を捨てて, 70%エタノールで沈殿を洗浄した。乾燥後TEに溶解してPCRのための鋳型DNAとした。

PCR Whiteら¹⁹⁾の方法に準じて, 糸状菌のrDNA-ITS領域を増幅するプライマーセットITS1 (5'-tccgtaggtgaacctgcgg-3') + ITS4 (5'-tcctccgcttattgatatgc-3') あるいはITS5 (5'-ggaagtaaaagtctgaacaagg-3') + ITS4を使用した (第1図)。PCRは宝酒造社のキットを用いて, 反応液50μl (PCR緩衝液 5μl, 2.5mM dNTP 4μl, プライマー 各25pmol, AmpliTaq DNA合成酵素1.25U, 滅菌蒸留水) 中に鋳型DNAを約1~20ng混和した。PCR反応はDNAの予備変性を94℃・1分間行った後, DNA変性 (94℃・30秒), プライマーアニーリング (55℃・30秒), 伸長反応 (72℃・1分30秒) を25~30サイクル行った。PCR産物は, 反応液10μlを1.8%アガロースゲル (0.5μg/ml臭化エチジウム, 2×TAE緩衝液混和) で電気泳動 (0.5μg/ml臭化エチジウムを含む1×TAE緩衝液中) し, 分離, 検出した。なお, 菌の特異的検出を調査した試験ではアニーリング温度を55, 58, 60, 65℃に変化させ, 反応液量は20μl, 25サイクルとした。



第1図 核rDNA-ITS領域 (ITSa+5.8S+ITSb) と糸状菌共通プライマー

Fig.1. Location of nuclear rDNA-ITS region and common primer in fungi



PCR産物の精製 PCR反応液50～100 μ l をCENTRICON (AMICON) を使用して，5,000rpm・10分2回，1,300rpm・10分1回処理し，PCR産物を精製，回収した。

塩基配列の決定 PCR精製産物4～8 μ l を使用してDye Terminator Sequence法により，シーケンス反応を行い，310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems Inc.) で塩基配列を解読した。

プライマーの設計・合成 供試病原菌，その宿主植物，同一宿主に寄生する他の病原菌における核rDNA-ITS領域の塩基配列をGene Works (Oxford Molecular Group Inc.) により比較し，各病原菌に特異的であると思われる位置に，20塩基前後のプライマーを設計した (第1表)。プライマーはモデル394 DNA/RNA synthesizer (PE Applied Biosystems Inc.) により合成した。

結 果

DNAの抽出とPCR

菌糸材料100～200mgから500ng～10 μ gのDNAが抽出でき，それらを鋳型としてITS1+ITS4あるいはITS5+ITS4のプライマーセットでPCRを行うと約510～650bpのDNA断片 (rDNA-ITS領域) が増幅された (第2図)。なお，イチゴでは材料約100mgから200～500ng，キクでは100～200mgから2.5～11 μ gのDNAが抽出でき，それらを鋳型としてITS1+ITS4あるいはITS5+ITS4のプライマーセットでPCRを行うと約650bpのDNA断片が増幅された。

rDNA-ITS領域のシーケンス

増幅されたPCR産物の塩基配列決定を試みたところ，炭疽病菌ではrDNA-ITS領域の547bp，萎黄病菌では519bp，うどんこ病菌では542bp，黒

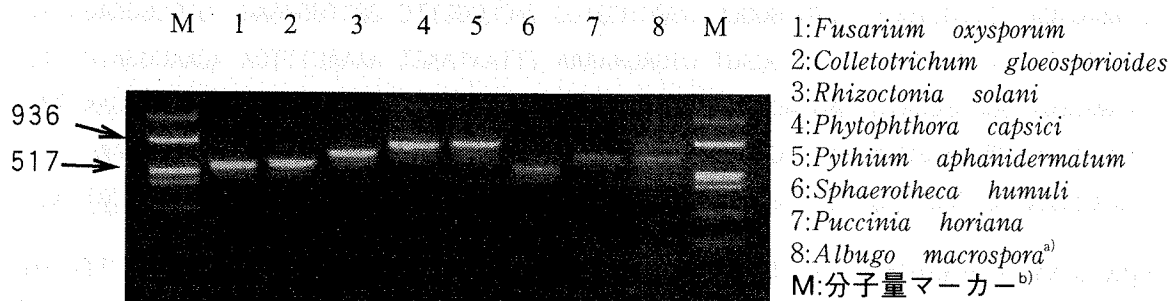
第1表 各種病原菌の属特異的プライマーとそのプライマーを用いて増幅されるPCR産物の長さ

Table 1. Sequence of genus specific primers in 4 plant pathogens and size of amplified production by PCR using their primers

病原菌	プライマー名	シーケンス ^{a)}	増幅サイズ (bp)
イチゴ炭疽病菌 (<i>C.gloeosporioides</i>)	CgF	tcggcgccccgccggaggataa	379
	CgR	aattggggggttttacggcaa	
イチゴ萎黄病菌 (<i>F.oxysporum</i>)	FoF	gagtttacaactcccaaacccc	436
	FoR	laacggcgtggccgcgacgalt	
イチゴうどんこ病菌 (<i>S. humuli</i>)	ShF	acgcaggacgcttgcctccgc	391
	ShR	acaacggtaccgccactctg	
キク白さび病菌 (<i>P. horiana</i>)	PhF	cacccaaactatlttaaacac	約550 ^{b)}
	PhR	gggtttttagaagcttcc	
	PhF2	ctttattgtggettgcacccc	428
	PhR2	gacagcaaacactcaacatcc	

a) 5末端から3末端へのシーケンス。

b) 未解読領域があるので推定値。



第2図 各種病原菌の核rDNA-ITS領域のPCR増幅断片

Fig.2. PCR amplified products of nuclear rDNA-ITS regions from several plant pathogens

a) 610bp付近のバンドはコマツナ由来。

b) pUC19のHinfI およびScaI による切断断片。

斑病菌では498bpの塩基配列が明らかとなった (第3図, 第4図, 第5図, 第7図)。白さび病菌ではITSb領域の一部が解読不能であったが、約570bpの塩基配列が明らかとなった (第6図)。

```

TGGCGAGGGA TCATTACTGA GTTTACGCTC TATAACCCTT TGTGAACATA CCTATAACTG TTGCTTCGGC 70
GGGTAGGGTC TCCCGCACCC TCCCGGCCTC CCGCCTCCGG GCGGGTCGGC GCCCGCCGGA GGATAACCAA 140
                                     CgF →
ACTCTGATTT AACGACGTTT CTTCTGAGTG GTACAAGCAA ATAATCAAAA CTTTTAACAA CGGATCTCTT 210
GGTTCTGGCA TCGATGAAGA ACGCAGCGAA ATGCGATAAG TAATGTGAAT TGCAGAATTC AGTGAATCAT 280
CGAATCTTTG AACGCACATT GCGCCCGCCA GCATTCTGGC GGGCATGCCT GTTCGAGCGT CATTTC AACCC 350
CTCAAGCTCT GCTTGGTGTT GGGGCCCTAC AGCTGATGTA GGCCCTCAA GGTAGTGGCG GACCCTCCCG 420
GAGCCTCCTT TGCCTAGTAA CTTTACGCTC CGCACTGGGA TCCGGAGGGA CTCTTGCCGT AAAACCCCC 490
                                     ← CgR
AATTTTCCAA AGGTTGACCT CGGATCAGGT AGGAATACCC GCTGAACTTA AGCATAT 547

```

下線は属特異的プライマー

第3図 イチゴ炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) の核rDNA-ITS領域の塩基配列

Fig.3. Nucleotide sequence of nuclear rDNA-ITS regions of *Colletotrichum gloeosporioides*

```

CCTGCGGAGG GATCATTACC GAGTTTACAA CTCCCAAACC CCTGTGAACA TACCACTTGT TGCCTCGGCG 70
                                     FoF →
GATCAGCCCG CTCCCGGTAA AACGGGACGG CCCGCCAGAG GACCCCTAAA CTCTGTTTCT ATATGTA ACT 140
TCTGAGTAAA ACCATAAATA AATCAAAACT TTCAACAACG GATCTCTTGG TTCTGGC ATC GATGAAGA AC 210
GCAGCAA AAT GCGATAAGTA ATGTGAATTG CAGAATTCAG TGAATCATCG AATCTTTGAA CGCACATTGC 280
GCCCCCAGT ATTCTGGCGG GCATGCCTGT TCGAGCGTCA TTTCAACCCT CAAGCACAGC TTGGTGTGG 350
GACTCGCGTT AATTCGCGTT CCTCAAATTG ATTGGCGGTC ACGTCGAGCT TCCATAGCGT AGTAGTAAAA 420
CCCTCGTTAC TGGTAATCGT CGCGGCCACG CCGTTAAACC CCAACTTCTG AATGTTGACC TCGGATCAGG 490
                                     ← FoR
TAGGAATACC CGCTGAACTT AAGCATATA 519

```

下線は属特異的プライマー

第4図 イチゴ萎黄病菌 (*Fusarium oxysporum*) の核rDNA-ITS領域の塩基配列

Fig.4. Nucleotide sequence of nuclear rDNA-ITS regions of *Fusarium oxysporum*

```

CCTGCGGAAG ATCATTACTG AGCGCGAAGC CACGCAGGAC GCTTGTCCCG CGCGGCTGAC CCTCCACCCG 70
                                     ShF →
TGTGAACTGA TTTTGTGCT TTGGCGGGCC GGGCTCGACC TACCGGCTTC GGCTGGGGAG TGCCCGCCAG 140
AGAAGCCCCA ACTCGTGCAG TTAGTGCAGT CTGAGAAAAA TTTAATAAGT AAAACTTTCA ACAACGGATC 210
TCTTGGCTCT GGCATCGATG AAGAACGCAG CGAAATGCGA TAAGTAATGT GAATTGCAGA ATTTAGTGAA 280
TCATCGAATC TTTGAACGCA CATTGCGCCC CCCGGTATTC CGAGGGGCAT GCCTGTTCGA GCGTCAGA AC 350
ATCCTCTCAA GCCTGGCTTG GTCTTGGGGC GCGCCGGGCTC GGCCTCCCT AAACAGAGTG GCGGTACCGT 420
                                     ← ShR
TGIGCTCTCC GCGTAGTCAC GTATCTCGCG ACAGAGTGGC GATGGGACCT GCCAAAACCC ACCTATTTTT 490
TGGATGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACTTA AGCATATCAA TA 542

```

下線は属特異的プライマー

第5図 イチゴうどんこ病菌 (*Sphaerotheca humuli*) の核rDNA-ITS領域の塩基配列

Fig.5. Nucleotide sequence of nuclear rDNA-ITS regions of *Sphaerotheca humuli*

```

AAAAGAACTA GAGTGCACTT TATTGTGGCT TGACCCCTTT TAAATATATC ACCCAAACTA TTTTAACT 70
                                     PhF2→                                     PhF→
TGGTTGCATG AATTTTTGAA AGGTTCATTG CAATTGAGTA TAAGTAACTT CTTTTACTA AGAAATGTTA 140
CATTACCCCC CCCCCCCTT TATTTTTTAC CCCCTTTTTT ATTATATAAC ACAAGTTTAA ATGAACGTAA 210
AAAACCCCTT AATTATAAAA TAACTTTTAA CAATGGATCT CTAGGCTCTC ACATCGATGA AGAACACAGT 280
GAAATGTGAT AAGTAATGTG AATTGCAGAA TTCAGTGAAT CATCGAATCT TTGAACGCAT CTTGCACCTT 350
TTGGTATTCC AAAAGGTACA CCTGTTTGGAG TGTCATGAAA CCCTCTCACA AAATAATTTT TGTTAATTAT 420
                                     ←PhR2
TTAGTGATG TTGAGTGTTG CTGTCATTAG CTCACTTTAA ATATATCAGT CACTTTTTTT TTTTTTTTTT 490
T . . . . . AAA AAAAAAAAAA GAAGACTTCT AAAAACCCAA AATTAATCTT TAAGACCTCA
                                     ←PhR
AATCAGGTGG GACTACCCGC TGAACTTAA
    “ . . . ” は未解読塩基
    下線部は属特異的プライマー設定部位

```

第6図 キク白さび病菌 (*Puccinia horiana*) の核rDNA-ITS領域の塩基配列

Fig.6. Nucleotide sequence of nuclear rDNA-ITS regions of *Puccinia horiana*

```

AGGGATCATT ACTGAGTGAG GGCCTTCGGG CTCGACCTCC AACCTTTGT GAACACAAC TGTGCTTCG 70
GGGGCGACCC TGCCGTTTCG ACGGCGAGCG CCCCCGGAGA CCTTCAAACA CTGCATCTTT GCGTCGGAGT 140
TTAAGTAAAT TAAACAAAAC TTTCAACAAC GGATCTCTTG GTTCTGGCAT CGATGAAGAA CGCAGCGAAA 210
TGCATAAGT AATGTGAATT GCAGAATTCA GTGAATCATC GAATCTTTGA ACGCACATTG CGCCCTTTGG 280
TATTCCGAAG GGCATGCCTG TTCGAGCGTC ATTTACCAC TCAAGCCTGG CTTGGTATTG GGCGCCGCGG 350
TCAATCCGCG CGCCTCAAAG TCTCCGGCTG AGCTGTCCGT CTCTAAGCGT TGTGATTTCA TTAATCGCTT 420
CGGAGTGCGG GCGGCCGCGG CCGTTAAATC TTTCACAAGG TTGACCTCGG ATCAGGTAGG GATACCCGCT 490
GAACTTAA 498

```

第7図 キク黒斑病 (*Septoria chrysanthemella*) の核rDNA-ITS領域の塩基配列

Fig.7. Nucleotide sequence of nuclear rDNA-ITS regions of *Septoria chrysanthemella*.

設計プライマーの属特異性検定

各菌種の塩基配列に基づき設計した属特異的プライマーの特異性検定の結果を第2表に示した。炭疽病菌検出用に設計したCgプライマーセットを使用してアニーリング温度55~60℃でPCRを行うと炭疽病菌で約380bpの明確な増幅断片が認められた。しかし、同属の*C. orbiculare*や他属の5菌ではアニーリング温度が65℃でもわずかにPCR増幅が認められた。その他属菌および植物ではアニーリング温度55~60℃で増幅されなかった。萎黄病菌用に設計されたFoプライマーセットを使

用してアニーリング温度55~60℃でPCRを行うと萎黄病菌と*F. graminearum*で約440bpの明確な増幅断片が認められた。他属の7菌ではアニーリング温度が60℃でもわずかにPCR増幅が認められたが、その他属菌および植物ではアニーリング温度55~58℃で増幅されなかった。うどんこ病菌検出用に設計したShプライマーセットを使用してアニーリング温度55~58℃でPCRを行うとうどんこ病菌では明確な約390bpの増幅産物が認められたが、その他属菌および植物では増幅されなかった。白さび病菌検出用に設計したPhプライマーセッ

第2表 各属特異的プライマーによる特異性検定^{a)}

Table 2. Specificity of genius specific primers among 16 plant pathogens and 3 plants

病原菌 植物	プライマーセット ^{b)}			
	Cg	Fo	Sh	Ph2
<i>Botrytis cinerea</i>	-	-	-	z
<i>Septoria chrysanthemella</i>	-	-	-	z
<i>Fusarium oxysporum</i>	y	+	-	z
<i>F. graminearum?</i>	z	+	-	z
<i>Sclerotium sclerotiorum</i>	z	±	-	z
<i>Pyricularia oryzae</i>	-	±	x	z
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	+	±	-	z
<i>C. orbiculare</i>	z	-	-	-
<i>Thielaviopsis basicola</i>	-	x	-	z
<i>Rhizoctonia solani</i>	z	x	-	z
<i>Phytophthora capsici</i>	z	±	x	z
<i>Pythium aphanidermatum</i>	y	±	-	z
<i>P. myriotylum</i>	y	±	-	z
<i>Sphaerotheca humuli</i>	-	-	+	-
<i>Puccinia horiana</i>	-	-	-	+
<i>Albugo macrospora</i>	-	±	-	-
イチゴ ('宝交早生')	-	-	-	?
キク ('松本城')	-	-	-	z
コマツナ ('夏楽天')	-	-	-	?

a) PCR増幅で評価。

- : アニール温度が55℃で増幅産物が認められないもの。

+ : アニール温度が55, 58, 60℃で明確な増幅産物が認められるもの。

± : アニール温度が55, 58, 60℃でわずかに増幅産物が認められるもの。

x : アニール温度が55℃でわずかに増幅産物が認められたが, 58℃で増幅産物が認められなくなったもの。

y : アニール温度が55, 58℃でわずかに増幅産物が認められたが, 60℃で増幅産物が認められなくなったもの。

z : アニール温度が65℃でわずかに増幅産物が認められるもの。

b) ? は未調査。

トはアニール温度55℃では増幅産物が少なかった。Ph2プライマーセットを使用すると増幅産物は多くなるが, アニール温度65℃でPCRを行っても他属菌12菌株およびキクでわずかに増幅産物が認められた。

考 察

イチゴ病原菌3種, キク病原菌2種についてLeeら¹¹⁾およびWhiteら¹⁹⁾の方法でDNAを抽出し, PCRを行った結果, rDNA-ITS領域を増幅し, その配列決定を行うことができた。特に, イチゴうどんこ病菌やキク白さび病菌など絶対寄生菌の分生孢子などからでもDNAが抽出でき, PCRおよびダイレクトシークエンスが可能であった。これま

で絶対寄生菌をPCRを用いて解析した例は少なかったが, トウモロコシ南方さび病で遺伝的変異の検討が行われているように⁸⁾, 本手法を用いることでDNAレベルでの菌の生態解明が容易になると思われる。

イチゴ炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) については, rDNAのITSa領域の塩基配列はすでに明らかにされており, イチゴでは菌株間で塩基配列に差がないと報告されている¹⁷⁾。本試験でITSb領域の塩基配列が新たに明らかとなり, ITSa領域ではイチゴ由来の菌とジャスミン由来の菌では4塩基異なったが, ITSb領域は100%一致した。*Colletotrichum*属菌用に設計したプライマーセットはアニール温度65℃でも他属菌で増幅される場合があり, 十分な特異性はなかった

ことから今後さらに検討が必要である。

*Fusarium oxysporum*についてはイチゴ由来の菌（イチゴ萎黄病菌）とナデシコ由来の菌（ナデシコ立枯病菌）ではrDNA-ITS領域の塩基配列に差がなかったことから，本領域を指標にして宿主の相違，病原性の有無は判別されないものと考えられた。今回*Fusarium*属菌用に設計したプライマーセットはアニーリング温度60℃でも他属菌で増幅される場合があり，十分な特異性はなかった。*Fusarium oxysporum*については病原性の有無が問題となることから，ITS領域を指標とするよりは病原性をコードする領域にプライマーを設計する必要があると考えられる。

イチゴうどんこ病菌 (*Sphaerotheca humuli*) のITS領域の塩基配列は同属のキュウリ菌 (*S. cucurbitae*) と51塩基異なり，相同性は低かった。本菌については種特異的プライマーを用いてアニーリング温度63℃で同属菌，他属菌とを区別できたと報告されている¹⁸⁾。本試験で設計したプライマーセットを使用した場合においても，*Fusarium*菌や*Colletotrichum*菌など他属菌とはアニーリング温度58℃で区別でき，潜在感染株の検出に利用できる可能性が示唆された。ただし，うどんこ病菌のみを特異的に検出するためには，今後イチゴに感染する主要な他属菌において本プライマーによるPCR増幅の有無の検討が必要である。

キク白さび病菌 (*Puccinia horiana*) についてはrDNA-ITS領域の約570bpの塩基配列が明らかとなったが，ITSb領域で解読不能領域が存在した。この領域にはチミン(T)あるいはアデニン(A)がともに10塩基以上連続する区間が隣接して存在し，この特徴的な配列が塩基配列解読不能の原因と考えられた。Phプライマーセットはアデニンおよびチミンの比率が高く，アニーリング温度55℃以上では増幅産物が少なくなるため，特異的検出には不適であった。一方，Ph2プライマーは増幅産物量は増加するが，他属菌でも増幅が起こり，特異性は低いと考えられた。今後，アデニン，チミンが連続する場合においても塩基配列が解読できるようになれば，黒さび病菌や褐さび病菌などの塩基配列を解明，比較することにより，白さび病菌に特異的なプライマーの設計が可能になると考えられる。

キク黒斑病菌 (*Septoria chrysanthemella*) は約500bpの塩基配列が明らかとなったが，コムギ葉枯病 (*Septoria tritici*) と相同性が約80%であった。本菌については今回は特異的なプライマーの設計は行わなかったが，キク褐斑病菌の塩基配列を解明し，比較，解析が必要である。

なお，今回，無病と考えられるイチゴ，キクの展開直後の幼葉から抽出したDNAを鋳型として，糸状菌共通のプライマー (ITS1+ITS4あるいはITS5+ITS4) でPCRを行った結果，約650bpの増幅断片が認められた。これは，植物にもプライマーがアニールする類似配列が存在するからであった。しかし，イチゴの成熟葉，クラウン，ロゼット株から抽出したDNAを鋳型として同様にPCRを行っても増幅が認められない場合があった。これは既に報告されているように^{7,16)}，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反応が阻害されたと考えられる。一方，キクでは相対的にPCR阻害程度は低かったものの，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。以上のことから，植物材料からEdwardsの方法⁹⁾によりDNAを抽出する場合，展開直後の葉や幼葉を選ぶようにし，材料の量はDNA抽出用緩衝液600 μ lあたり100mg以下が適当であると考えられた。

以上，イチゴ炭疽病菌，萎黄病菌，キク白さび病菌では今回設計したプライマーは十分な特異性はなかったが，イチゴうどんこ病菌についてはプライマーの特異性は高いと考えられた。今後，プライマーの特異性をさらに検討すれば，PCR手法により潜在感染株を迅速に判別でき，無病苗の選抜等に利用できると考えられる。

摘 要

イチゴ病原菌3種（炭疽病菌，萎黄病菌，うどんこ病菌）およびキク病原菌2種（白さび病菌，黒斑病菌）のDNAを抽出し，rDNA-ITS領域のPCR増幅とシーケンスを行った。イチゴうどんこ病菌，キク黒斑病菌ではITS領域の全塩基配列，炭疽病菌のITSb領域の配列，キク白さび病菌の一部塩基配列が今回初めて明らかとなった。塩基配列に基づき属特異的プライマーを設計し，PCR

を行った結果、炭疽病菌、萎黄病菌、白さび病菌については特異性が低かったが、うどんこ病菌では今回供試した16種の菌と3種の植物からアニーリング温度58℃で特異的なバンドの検出が可能であった。

謝 辞

本研究を行うに当たり、終始懇切な指導をして頂いた、国立奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞生物学専攻細胞遺伝学講座の小笠原直毅教授、守家成紀助教授、朝井計助手、様々な助言と協力をして頂いた小林助手、院生の方々に厚くお礼申し上げます。

引用文献

1. Beck, J.J. and Ligon, J.M. 1995. Polymerase chain reaction assays for the detection of *Stagonospora nodorum* and *Septoria tritici* in wheat. *Phytopathology*. 85:319-324.
2. De Boer, S.H. and Ward, L.J. 1995. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. *Phytopathology*. 85:854-858.
3. Doss, R. P. and Welty, R. E. 1995. A Polymerase chain reaction-based procedure for detection of *Acremonium coenophialum* in tall fescue. *Phytopathology*. 85:913-917.
4. 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.
5. Freeman, S. and Katan, T. 1997. Identification of *Colletotrichum* species responsible for Antracnose and root necrosis of strawberry in Israel. *Phytopathology*. 87:516-521.
6. Henson, J. M. and French, R. 1993. The Polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 81-109.
7. ———, 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.
8. 平八重一之・川瀬章夫・梅田陽子・中谷大樹・山口武夫・西和文. 1998. トウモロコシ南方さび病菌の遺伝的変異の検討. 九病虫研会報. 44:12-14.
9. ———・西和文・岩野正敬. 1997. rDNA ITS領域の多型によるいもち病菌の類別. 九病虫研会報. 43:8-11.
10. Kageyama, K., Ohyama, A. and Hyakumachi, M. 1997. Detection of *Pythium ultimum* using Polymerase chain reaction with species specific primers. *Plant Dis.* 81:1155-1160.
11. 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.
12. Lovic, B.R., Martyn, R.D. and Miller, M.E. 1995. Sequence analysis of the ITS region of rDNA in *Monosporascus* spp. to evaluate its potential for PCR-mediated detection. *Phytopathology*. 85:655-661.
13. 岡山健夫. 1994. イチゴ炭そ病の病原菌、発生生態および発病制御に関する研究. 奈良農試研報. 特別報告. 57-60.
14. Nazar, R.N., Hu, X., Schmidt, J., Culham, D. and Robb, J. 1991. Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of verticillium wilt pathogens. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39: 1-11.
15. 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.
16. 塩飽邦子・岩井豊通・山元義久. 1996. ドットプロットハイブリダイゼーションによるキクわい化ウイルス(Chrysanthemum Stunt

Viroid)の検定. 関西病虫研報. 38:1-6.

17. Sreenivasaprasad,S., Brown,A.E. and Mills,P.R. 1992. DNA sequence variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. *Physiol.Mol. Plant Pathol.* 41:265-281.
 18. 高松 進・森 康浩・奈尾雅浩・廣瀬由紀夫・久能 均. 1997. イチゴうどんこ病菌を特異的に検出するためのPCRプライマーの作出. 日植病報 (講要) . 63(6):512.
 19. 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.
-