

南根腐病菌をモデルとする樹病罹病木を想定した病原菌特異的定量方法の確立

山口宗義¹・秋庭満輝¹・佐橋憲生¹・矢崎健一¹

1 森林総合研究所

要旨：定量 PCR 法(以下 qPCR 法)を用いて、南根腐病菌である *Phellinus noxius* をモデルとし宿主樹木数種の木粉を用いて、材内に存在する菌の特異的かつ定量的解析方法を定量 PCR 法 (以下 qPCR 法) により確立した。*P. noxius* 株 15 菌株に対し、近縁種 4 株および植物種由来 DNA を対照に特異的に検出されうる定量 PCR プログラムを最適化した。次に、定量性を確認するため、既知量の *P. noxius* 菌体を含む希釈系列を用いた定量解析を行った。また、樹木内部の菌の定量性を確認するために、イヌマキ、フクギ、ホルトノキ、モクマオウの 4 樹種を対象に各樹木存在下の定量解析を行った。その結果、*P. noxius* のみが検出されうる定量 PCR 条件の最適化に成功した。また、回帰分析の結果、各種樹木存在下における定量性も示された。

キーワード：南根腐病，定量 PCR 法，樹病，菌糸体定量

Establishment of a pathogen-specific quantification method assuming diseased trees using *Phellinus noxius* as a model

Muneyoshi Yamaguchi¹, Mitsuteru Akiba¹, Norio Sahashi¹, Kenichi Yazaki¹

1 Forestry and Forest Products Research Institute

Abstract: Using the quantitative PCR method (qPCR method), we established a specific and quantitative analysis method of this fungi in several kinds of wood modeled on *Phellinus noxius*, which is a pathogen of brown root rot. Using 15 strains of *P. noxius* strain, we optimized a qPCR program that can specifically separate and quantify *P. noxius* DNA from control DNA, which is derived from 4 related species and plant species. In order to confirm the quantitiveness, a quantitative analysis was performed using a dilution series containing a known amount of *P. noxius* mycelium. In addition, in order to confirm the quantitiveness of fungal mycelium in tree, quantitative analysis was performed using a mixture of mycelium and each wood, which was used four tree species, *Podocarpus macrophyllus*, *Garcinia subelliptica*, *Elaeocarpus zollingeri*, and *Casuarina equisetifolia*. As a result of optimizing the qPCR conditions, only the *P. noxius* strain were successfully detected. In addition, regression analysis suggests that the qPCR method is also available in the mixture condition of the *P. noxius* and another tree.

Key-word: *Phellinus noxius*, qPCR method, forest pathology, quantification of mycelium

I はじめに

菌類やバクテリアを病原とする樹病による樹木の衰退により短期間で森林の健全性が損なわれる。病原の感染拡大防止のためには樹病の早期発見が重要であるが、現在、その診断は外部からの観察可能な病徴によるところが大きい。しかし、根や幹から感染する樹病は、病徴が顕在化するはるか以前に潜在的に病気が進行している(4)。特に土壌中の根から感染する土壌病害は早期発見及び防除が困難である。

近年、熱帯・亜熱帯地域において「南根腐病」(図-1)による被害が深刻である。本病は担子菌 *Phellinus noxius* (和名:シマサルノコシカケ)が樹木根系へ感染した後、罹病木は根・葉が枯損・脱落し、枯死に至る。日本では南西諸島と小笠原諸島において多数の被害が確認されてい

る(2, 3)。また、樹種を選ばず感染することから被害が拡大しやすい(1)ため、将来、地球温暖化に伴い本州でも蔓延する恐れがある。そのため、本病の早期発見技術の開発が急務である。



図-1 南根腐病菌に侵入された樹木と樹木断面
Fig.1 The wood infected with southern root rot fungi.

土壤中に存在する環境 DNA を分析し、分子生物学的な手法を用いた微生物叢の把握や特定微生物の存在量を把握する技術が開発され、自然環境中の微生物動態が把握されつつある。本報では、その技術を応用し、南根腐病菌である *Phellinus noxius* をモデルとした数種の木材内における本菌の特異的かつ定量的解析方法を定量 PCR 法によって確立したので報告する。

II 材料と方法

1. 材料

供試南根腐病菌株：*Phellinus noxius* KPN57, 84,130, 212, 260, 117, 141, 163, 186, 267, 304, 323, 327, 334, 363 (計 15 株 森林総合研究所保存株)

近縁種：*Phellinus lamaensis* FSM141, *Pyrrhoderma sendaiense* WD1765, *Phellinus lamaensis* WD1849, *Pyrrhoderma adamantinum* WD2074 (森林総合研究所保存株)

沖縄の樹木の腐朽根から分離した *Polyporales* 目または *Hymenochaetales* 目の菌株：KF86, KF87, KF88, KF89, KF92, KF94 (森林総合研究所保存株)

菌による希釈を行う対照菌体として食用キノコ菌ウスヒラタケ *Pleurotus pulmonarius*, 樹木内部の菌を定量する条件下での想定対象樹木としてイヌマキ *Podocarpus macrophyllus*, フクギ *Garcinia subelliptica*, ホルトノキ *Elaeocarpus zollingeri*, モクマオウ *Casuarina equisetifolia* を用いた。

2. DNA の抽出と特異性試験

PD(ポテトデキストロース)寒天平板培地で増殖させた南根腐病菌、近縁種、樹木分離菌の各菌糸体を常法の DNA 抽出方法で抽出し、定量 PCR による特異性試験に供した。使用したプライマーは Wang らが ITS 領域から設計されたプライマー(PN-1F:agtttgcgctcatccatctc, PN-2R:agccgactaccgccagcag, G1-F:gcccttctccgctattg, G1-R:cttgatgctggtgggtctct) (6) を候補に用いた。定量 PCR 機は Roche 社製の Light Cycler 480 II (ヒートブロック方式温度制御), 使用酵素は TOYOBO 社製の THUNDERBIRD SYBR qPCR mix を用いた。

3. 定量性試験

定量性を確認するため、*P. noxius* 培養菌体を調整し、凍結乾燥後の粉体を他の粉体菌体(ウスヒラタケ)で希釈系列を作成し標準試料とした。イヌマキ、フクギ、ホルトノキ、モクマオウの各樹木粉体より既知量の *P. noxius* が混和している標準試料を作製した。これら標準試料から既報(5)に基づき DNA を抽出し定量 PCR 法にて *P. noxius* 菌を検出および定量に供した。

III 結果と考察

1. 特異性試験 1

Wang らが、既報(6)で南根腐病菌 *P. noxius* を土壤中の DNA から抽出したサンプルを用いて検出および定量 PCR 法で定量した条件があるため、その方法で供試南根腐病菌株、近縁種、樹木根分離菌株の DNA を用いて定量 PCR を行った。PCR 条件は①PN-1F/2R primer 使用時で 95°C45 秒, 60°C45 秒, 72°C60 秒を 50 サイクル, ②G1-F/R primer 使用時で 94°C45 秒, 56°C45 秒, 72°C45 秒を 50 サイクルとした。定量 PCR 法で増幅した産物をアガロースゲル電気泳動に供した(図-2)。

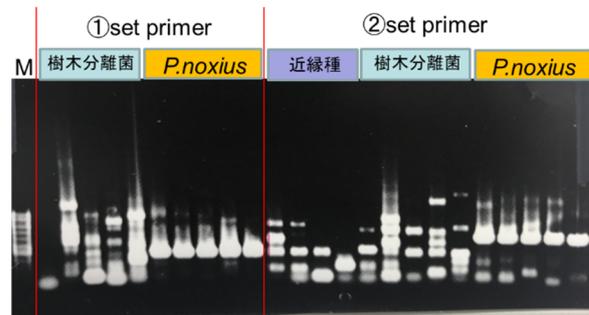


図-2 既報PCR条件における増幅産物

Fig.2 The amplification products under previously reported PCR conditions .

既報の条件を再現して定量 PCR を行った結果、*P. noxius* 以外の樹木分離菌でも PCR で増幅される PCR 条件であることが確認された。また、既報で特異性を考慮した定量 PCR として *P. noxius* を定量する方法として報告されている②の G1 プライマー使用の方法でも、近縁種が増幅しており、本条件での定量 PCR を用いた方法には、特異性が求められる条件下の非特異性断片の生成、目的 DNA サイズより長いサイズの DNA 断片の増幅生成において問題があり、本条件での定量 PCR は不適切であることが確認された。

これらのプライマーを再利用し、PCR 条件の検討、最適化を行うことでこの問題を解決し、定量 PCR が可能な条件を検討した。

2. 特異性試験 2

供試南根腐病菌株、近縁種、樹木根から分離した真菌類菌株の DNA を用いて、定量 PCR の反応条件最適化を行った。条件検討した中での最適化された結果、使用プライマーは上述①の PN-1F, PN-2R プライマーセットを用い、PCR 条件は 95°C 10 秒, 69°C 20 秒, 72°C 8 秒を 50 サイクルとする条件で最適化された。本条件での増幅結果を示す(図-3)。

P. noxius のみが増幅し、近縁種や他の菌、微生物、樹木由来 DNA では増幅しない PCR 条件の最適化に成功した。改良点は、アニーリング温度条件を比較的厳しい温

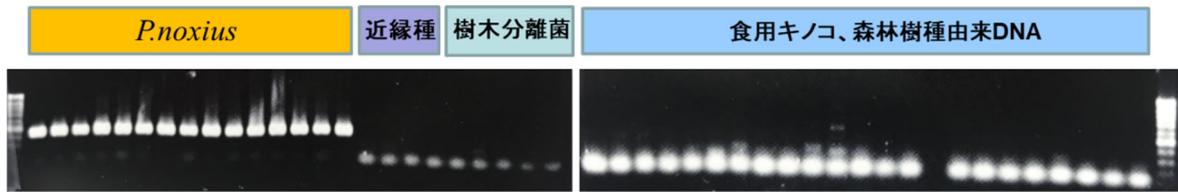


図-3 最適化されたPCR条件における増幅産物

Fig.3 The amplification products under optimized PCR conditions .

度である 69°Cに設定したこと、伸長温度条件を比較的短い8秒に設定したこと、PCR 反応時の温度による酵素劣化を防ぐため、乖離温度 95°Cでの時間を短くしたこと、である。

また、他の真菌類や森林で生育する樹木で本 PCR 条件が反応しないことを確かめるため、食用きのこ類や代表的な樹種（クロマツ、アカマツ、ヤマザクラ、ツツジ、サカキ、シラベ、ネジキ、ホオノキ、ソヨゴ、リョウブ等）由来 DNA を用いた PCR を行ったが DNA の増幅が確認されなかった。以上により、*P. noxius* の DNA のみが増幅する特異的条件が明らかとなった。

3. 定量性試験 1

定量性を確認するため、*P. noxius* 培養菌体を調整し、凍結乾燥後の粉体を他の粉体菌体（ウスヒラタケ）で希釈系列を作成し標準試料とした。

この標準試料から既報 (5) に基づき DNA を抽出し最適化された PCR 条件での定量 PCR 法にて *P. noxius* 菌を検出および定量に供した。なお、ウスヒラタケ DNA は本 PCR 条件で増幅しないことは確認済みである。各 *P. noxius* 菌含有濃度と Ct 値に対し線形単回帰分析を行った (図-4)。なお、Ct 値は PCR 増幅 DNA 産物が検出される量にまで到達するまでの PCR 反応サイクル数、*P. noxius* 菌含有濃度 (P.nox.conc) は *P. noxius* 粉体菌体量のウスヒラタケ粉体菌体量に対する存在濃度 (g/g) である。

その結果、*P. noxius* 菌糸量と Ct 値に相関があり、菌糸

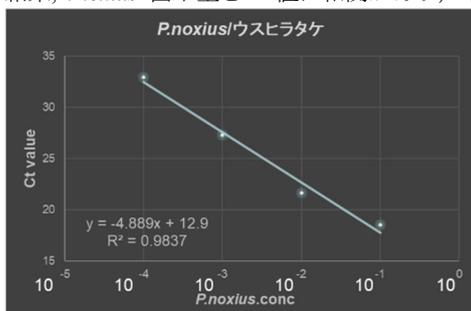


図-4 菌体中の*P. noxius*菌含有濃度とCt値の関係

Fig.4 The relationship between *P. noxius* concentration and Ct value in mycelium.

のみが存在する条件下での定量性が示された。

4. 定量性試験 2

木材中の定量性も確認するために、イヌマキ、フクギ、ホルトノキ、モクマオウの4樹種を用い、各樹木粉体を樹木に対して既知の *P. noxius* が混和している標準試料を作製した。

この標準試料から既報(5)に基づき DNA を抽出し最適化された PCR 条件での定量 PCR 法にて *P. noxius* 菌を検出および定量に供した。なお、各樹木由来 DNA は本 PCR 条件で増幅しないことは確認済みである。各 *P. noxius* 菌含有濃度と Ct 値に対し線形単回帰分析を行った(図-5)。

P. noxius 菌糸量と Ct 値に相関があり、イヌマキ、フクギ、ホルトノキ、モクマオウの各樹種環境下で、*P. noxius* 菌が定量可能であることが示された。また、おのおのの樹種環境下では正の相関が得られているが、樹種間では標準曲線の傾きや切片が異なることも明らかとなった。これは、測定対象となる *P. noxius* 菌の存在する環境場から DNA を抽出する際の抽出効率の違いや PCR 反応における反応効率の違い等が複雑に影響しているものと推察される。

IV まとめ

本研究において、樹木木粉内で存在する南根腐菌の特異的定量方法の確立に成功した。これにより、対象樹木の幹や根を部分的に採取し、その器官内の樹病菌の検出に加え、樹病菌を定量できる。特異性および検出感度が高いことから病徴が現れる以前の軽微な感染であっても把握可能である。

一方、菌の生育反応場である各樹木の違いにより、標準曲線の傾き及び切片が異なることから、測定する反応場を基準に標準曲線を作成しそれを基に定量することの重要性が明らかとなった。測定対象物のみや抽出された DNA のみから希釈系列を作成し、それから得られる標準曲線から定量 PCR により定量する方法が散見するが、目的によっては誤測定を生む可能性があるため注意が必要である。

本報では、樹種として4種類を試みたが、他の樹種や樹木が生育している土壌環境下でも定量可能な技術にす

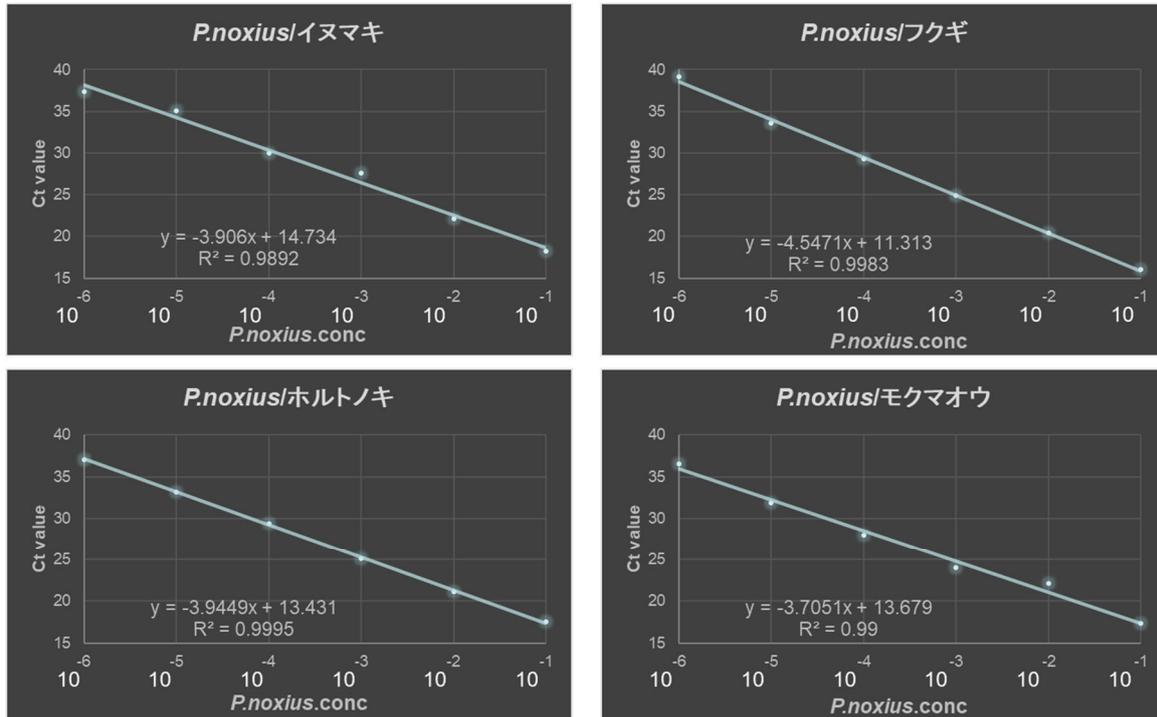


図-5 各樹木中の*P.noxius*菌含有濃度とCt値の関係

Fig.5 The relationship between *P.noxius* concentration and Ct value in each kind of woods.

るためにも、他の樹種や土壌も含めた定量技術の開発が次への課題となる。

謝辞：本研究は JSPS 科研費 21H02241 の支援を受けて実施した。また、本研究は国立研究開発法人森林総合研究所エンカレッジモデルによる研究支援を受けた。また、試験体樹木の収集において協力を受けた沖縄県森林資源研究センターの酒井康子氏に感謝いたします。

引用文献

- (1) Sahashi N, Akiba M, Takemoto S, Yokoi T, Ota Y, Kanzaki N (2014) *Phellinus noxius* causes brown root rot on four important conifer species in Japan. *European Journal of Plant Pathology* 140: 869–873.
- (2) Sahashi N, Akiba M, Ota Y, Masuya H, Hattori T, Mukai A, Shimada R, Ono T, Sato T (2015) Brown root rot caused by *Phellinus noxius* in the Ogasawara (Bonin) islands, southern Japan – current status of the disease and its host plants. *Australasian Plant Disease Notes* 10: 33.
- (3) Sahashi N, Akiba M, Ishihara M, Ota Y, Kanzaki N (2012) Brown root rot of trees caused by *Phellinus noxius* in the Ryukyu Islands, subtropical areas in Japan. *Forest Pathology* 42: 353-361.
- (4) Yazaki K, Takanashi T, Kanzaki N, Komatsu M, Levia D

F, Kabeya D, Tobita H, Kitao M, Ishida A (2018) Pine wilt disease causes cavitation around the resin canals and irrecoverable xylem conduit dysfunction. *Journal of Experimental Botany* 69: 589–602.

(5) Yamaguchi M, Narimatsu M, Fujita T, Kawai M, Kobayashi H, Ohta A, Yamada A, Matushita N, Neda H, Shimokawa T, Murata H (2016) A qPCR assay that specifically quantifies *Tricholoma matsutake* biomass in natural soil. *Mycorrhiza* 26: 847-861

(6) Wang Y-F, Meng H, Gu VW, Gu J-D (2016) Molecular diagnosis of the brown root rot disease agent *Phellinus noxius* on trees and in soil by rDNA ITS analysis. *Applied Environmental Biotechnology* 1: 81-91