

# LAMP-FLP 法による植物病原菌の特異的検出

平成 31 年

三重大学 生物資源学研究科

修士課程 資源循環学専攻

甲村 瞭次

## LAMP-FLP 法による植物病原菌の特異的検出

### 第 1 章 LAMP-FLP 法による三重県のベンズイミダゾール系薬剤抵抗性系統コムギ赤かび病菌のモニタリング調査

#### 第 1 節 緒言

#### 第 2 節 材料と方法

第 1 項 野外サンプルと分生子懸濁液の作成

第 2 項 LAMP-FLP 法を用いたモニタリング調査

第 3 項 DNA 抽出

第 4 項 PCR 法によるヒストン遺伝子配列の増幅とシーケンス反応

第 5 項 分子系統解析

#### 第 3 節 結果

第 1 項 LAMP-FLP 法によるモニタリング調査

第 2 項 分子系統解析の結果

#### 第 4 節 考察

第 1 章の図・表

引用文献

### 第 2 章 LAMP-FLP 法によるベンズイミダゾール系薬剤抵抗性系統イネばか苗病菌の特異的検出の検討

#### 第 1 節 緒言

#### 第 2 節 材料と方法

第 1 項 供試菌株

第 2 項 DNA 抽出

第 3 項 LAMP-FLP 法の予備試験

第 4 項 LAMP-FLP 法による本試験

第 5 項 PCR 法による  $\beta 2$  チューブリン遺伝子配列の増幅とシーケンス反応

#### 第 3 節 結果

第 1 項 LAMP-FLP 法の予備試験

第 2 項 LAMP-FLP 法による本試験

#### 第 4 節 考察

第 2 章の図・表

引用文献

### 第3章 フィリピンバナナ分離菌株の分子系統と形態による種同定と LAMP-FLP 法によるバナナパナマ病菌の特異的検出の検討

#### 第1節 緒言

#### 第2節 材料と方法

##### 第1項 供試菌株

##### 第2項 DNA抽出

##### 第3項 ヒストン H3 塩基配列を用いた系統解析

##### 第4項 IGS 領域の PCR とシーケンス

##### 第5項 Foc VCG01213 の分子生物学的手法に基づいた同定

##### 第6項 LAMP-FLP 法による Foc TR4(VCG01213)の特異的検出の検討

#### 第3節 結果

##### 第1項 ヒストン H3 塩基配列を用いた分子系統解析

##### 第2項 IGS 領域の系統解析及び TR4 特異的 PCR の結果

##### 第3項 LAMP-FLP の結果

#### 第4節 考察

#### 第3章の図・表

#### 引用文献

#### 総合考察

#### 引用文献

#### 摘要

#### 謝辞

## 第1章 LAMP-FLP法による三重県のベンズイミダゾール系薬剤抵抗性系統コムギ赤かび病菌のモニタリング調査

### 第1節 緒言

コムギ (*Triticum aestivum* L.) はイネ科コムギ属の草本植物で、イネ、トウモロコシと並び、三大作物の一つである。起源はトルコ南東部からイラク北部、西部であると推定される。古く日本に渡来した作物の一つで、4~5世紀に伝来したとされ、8世紀頃には水田の裏作として広く栽培されるようになった。主な病害には赤かび病、さび病、うどんこ病、雪腐病などの他、ウイルス病の萎縮病、縞萎縮病がある (牧野 1977; 星川 1980; 石井ら 2003)。平成 29 年の日本全体のコムギの作付面積は約 21 万ヘクタール、生産量 90 万トンである。平成 29 年産の三重県のムギ類 (コムギ、二条オオムギ、六条オオムギ、ハダカムギ) は作付面積が 6750 ヘクタールで全国 7 位、収穫量 19800 トンで 9 位である。特にコムギについては作付面積が 6430 ヘクタールで 5 位、収穫量は 19000 トンで 7 位とコムギ主産県になっている (三重県農林水産部 2017)。三重県内で生産されたコムギは三重県名産の伊勢うどんの麺やたれ、パン、中華麺などに利用されており、三重県の食を支える上で重要な作物の一つである。

*Fusarium graminearum* Schwabe (= *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch) はコムギなどのムギ類に重要病害の一つであるムギ類赤かび病を引き起こす。この病害は収量が減少するだけでなく、収穫物に人間や家畜に有害なデオキシニバレノール (DON) やニバレノール (NIV) などのトリコテセン類カビ毒が蓄積するため注意が必要で、穂、葉、葉鞘、稈などに発生が見られ、幼苗でも発病することがある。特に罹病穂では一部または全体が赤褐色になり、穎の合わせ目などに鮭肉色や桃色のカビが生じる。これは赤かび病菌の分生子塊と分生子を形成するフィアライドと菌糸などが密にクッション状に形成されたものでスポロドキア (sporodochium) と呼ばれており、この病害の特徴的な標徴となっている (北島ら 1967; 大場 2009; 堀江ら 2014)。厚生労働省によりコムギの DON 濃度の暫定基準値が 1.1mg/kg (1ppm) に設定されており (厚生労働省 2002)、この基準を超えた場合、販売が自主規制される (農林水産省 2017)。また赤かび粒が生産物 1000 粒に 1 粒混入すると規格外となるため (農林水産省 2003)、商品価値は著しく低下する。したがって、コムギ生産において赤かび病を防除し、カビ毒の蓄積を防ぐことは重要である (大場 2009; 渡邊ら 2013)。近年、多遺伝子座の分子系統解析によって、これまで一種だと考えられてきた赤かび病菌 *F. graminearum* が異なる複数の種に分かれることが示され、また赤かび病菌の分布が国や地域によって異なっていることが明らかになった。これらは総称して *F. graminearum* 種複合体 (*F. graminearum* species complex; FGSC) と呼ばれており、少なくとも 16 種から構成される (O' Donnell et al. 2000, 2004, 2008; Starkey et al. 2007; Yli-Mattila et al. 2009; Sarver et al. 2011)。日

本では主にこれらのうち 2 種、*F. graminearum* s. str. (狭義) と *F. asiaticum* の分布が確認されており、形態的特徴から種を同定することが困難であるため、核 DNA の分子系統学的手法により区別することが必要である (Suga et al. 2008)。先行研究で三重県におけるコムギ赤かび病菌の種構成は調べられており、これらの報告によれば、見いだされた種はすべて *F. asiaticum* であり、*F. graminearum* s. str. は確認されていない (上田ら 2007; Suga et al. 2008; 甲村 2017)。

コムギ品種の大部分は赤かび病に対して強い抵抗性を持たないため、主に薬剤を用いた防除が行われている。日本では赤かび病防除薬剤はチオファネートメチル(商品名トップジン M) といったメチルベンズイミダゾールカーバメート (MBC) 殺菌剤グループのベンズイミダゾール類薬剤 (Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) コード 1) が広く用いられている (Suga et al. 2011; 農林水産省 2017)。一方で容易に抵抗性が生じる事が知られ、この薬剤の作用機作は微小管を構成している  $\beta$  チューブリンに結合し、有糸核分裂と細胞分裂を阻害(FRAC: B1) して殺菌効果を示すが(田辺 2013)、様々な植物病原菌でベンズイミダゾール系薬剤抵抗性系統が見つかっており、これらは作用点である  $\beta$  チューブリン遺伝子に点突然変異を持つことが知られている (Koenraad et al. 1992; Yarden and Katan 1993; Albertini et al. 1999; Ma et al. 2003; Maymon et al. 2006)。ムギ類赤かび病でも同じく点突然変異を伴う薬剤抵抗性系統が確認されており (Chen et al. 2009; Liu et al. 2010; Chen et al. 2015)、日本でも大分、福岡、熊本、三重県で発生が確認されている (Suga et al. 2011)。日本のベンズイミダゾール系薬剤抵抗性コムギ赤かび病菌では  $\beta 2$  チューブリン遺伝子の 167、198、200 番目のいずれかのアミノ酸をコードするコドンに点突然変異が存在している (Suga et al. 2011、甲村 2017)。167 番目のコドンでは塩基配列が TTT から TAT に置換し、コードするアミノ酸がフェニルアラニン(F)からチロシン(Y)に置き換わる (TTT→TAT; F167Y)。また 198 番目のコドンでは GAG から CAG に置換しており、アミノ酸はグルタミン酸(E) からグルタミン(Q) (GAG→CAG; E198Q)、200 番目のコドンでは TTC から TAC に置換し、アミノ酸はフェニルアラニン(F)からチロシン(Y)に変わる (TTC→TAC; F200Y)。三重県では 2008 年に初めてムギ類赤かび病のコムギでベンズイミダゾール系薬剤耐性系統の発生が確認され(黒田・鈴木 2008)、その後、 $\beta 2$  チューブリン遺伝子の 200 番目のコドンに強度抵抗性変異 (MIC 100ppm 以上)をもつ F200Y 抵抗性系統であることが分かった。また 2015、16 年には 198 番目のコドンに変異を持つ E198Q 抵抗性系統の発生が日本で初めて報告された (甲村 2016)。しかし 2017 年は薬剤抵抗性系統の発生は確認されなかったことから (Komura et al. 2017)、三重県ではベンズイミダゾール系薬剤抵抗性赤かび病菌の発生が定着した菌によるものではなく、不規則、突発的に発生するものと考えられている (中嶋ら 2019)。

ムギ類赤かび病を効果的に防除するためには、定期的に薬剤抵抗性系統の発達・分布を調査することが重要である。これはベンズイミダゾール系薬剤には交叉耐性ととも、

負の交叉耐性が生じることが知られ (Fujimura et al. 1992)、適切な防除薬剤を選択することで抵抗性系統の発生を抑制するとともに、病害を抑制することができる。しかし、大量の単孢子分離菌株を確立し、培養に基づいた薬剤感受性試験を行うのは非常に手間や時間がかかるため、簡易かつ迅速に感受性検定を行う手法が求められていた。そこで著者らは、コムギ赤かび病について、loop-mediated isothermal amplification-fluorescent loop primer (LAMP-FLP)法を用いたベンズイミダゾール系薬剤抵抗性系統の検定法を開発した(Komura et al. 2017)。この手法は LAMP 法により増幅された特定の領域に存在するターゲット領域に相補的な消光プローブを設計し、いったん加熱により一本鎖に解離させた LAMP 産物にこのプローブが再会合する時に、ターゲット配列内の変異の有無によって生じる再会合時の温度差をもとに、変異を検出する手法である。著者らの研究では異なる 2 つのプライマー・プローブセットを用いることにより、コムギ赤かび病菌の  $\beta 2$  チューブリン遺伝子の複数の薬剤抵抗性変異を同時に迅速かつ高感度に検出することを可能としており (Komura et al. 2017)、特に実用上、擬陰性を排除するために変異のない配列を特異的かつ確実に検出するよう設計されている。野外から採集した赤かび病に罹病したコムギ穂を直接利用して薬剤抵抗性変異の検出を行うことができるため、培養や抽出など作業の労力を省くことができる (Komura et al. 2017)。

本研究では三重県で 2018 年に発生した赤かび病において、ベンズイミダゾール系薬剤抵抗性系統がどの程度発生しているのかを調べるために、LAMP-FLP 法による野外サンプルを用いた薬剤抵抗性系統のモニタリング調査を実施した。そして本研究結果が三重県のコムギ生産における効果的な赤かび病防除に寄与することを目的とする。

## 第2節 材料と方法

### 第1項 供試野外サンプルと分生子懸濁液の作成

2018年に採集された赤かび病罹病コムギ穂79サンプルをLAMP-FLP実験に供試した(表1)。赤かび病罹病コムギ穂に付着しているスポロドキアを火焰滅菌した柄付き針を用いて、以下のように分生子懸濁液を作成した。まず火焰滅菌した白金へらを1xTAEバッファー400 $\mu$ lを入れたチューブに浸し、バッファーで濡れた白金へらの先端部分をスポロドキアに3~4回接触させ、スポロドキアを付着させた。その後、白金へらを再びバッファーの入ったチューブに浸してスポロドキアを懸濁した。この作業を3~5回繰り返して、分生子懸濁液を調製した。調製した懸濁液を5秒間ほどボルテックスした後、スピンドウンした溶液を以下のLAMP-FLP実験に用いた。サンプル溶液はチューブのフタに採集年とサンプル名を書き、-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

### 第2項 LAMP-FLP法を用いたモニタリング調査

三重県では既にベンズイミダゾール系薬剤抵抗性コムギ赤かび病菌の発生が報告されている(黒田・鈴木 2008; 甲村 2017)。2018年のコムギ赤かび病においてどの程度の薬剤抵抗性系統が発生しているのかを調べるためにKomuraら(2017)で開発されたLAMP-FLP法による薬剤抵抗性コムギ赤かび病菌検定法を用いたモニタリング調査を実施した。2018年の赤かび罹病コムギ穂から作成した分生子懸濁液79サンプルをLAMP-FLP法によるモニタリング調査に用いた。LAMP反応試薬は10x反応バッファー(ニッポン・ジーン, 東京)、25mM dNTPs(ニッポン・ジーン, 東京)、1.6  $\mu$ M FIPプライマー(ID847 FIP または ID13 FIP)とBIPプライマー(ID847 BIP または ID13 BIP)(表2; 図1)、0.2  $\mu$ MのF3プライマー(ID847 F3 または ID13 F3)とB3プライマー(ID847 B3 または ID13 B3)(表2; 図1)、0.8  $\mu$ M上流側ループプライマー(ID847 LF90 または ID13 LF98)(表2; 図1)、0.2  $\mu$ Mの下流側蛍光標識ループプライマー(ID847 FLB90 または ID13 FLB98)(表2; 図1)、0.5  $\mu$ Mの消光プローブ(Probe Dabcyl)(ID847 または ID13)(表2; 図1)、1 $\mu$ l増幅酵素(ニッポン・ジーン, 東京)、そして調製した分生子懸濁液サンプル4 $\mu$ lの計25 $\mu$ lをLAMP法用8連チューブ(栄研化学, 東京)に入れ、調合した。混合液をスピンドウンしてチューブの底に集め、LAMP法用測定装置LF-8 plus(ニッポン・ジーン, 東京)にセットした。滅菌水をネガティブコントロールとして用いた。LAMP反応は66 $^{\circ}$ Cで45分間行われ、その後、消光プローブの再会合による会合曲線解析を行い、自動で薬剤抵抗性変異の有無を判定した。消光現象の起こった温度の計測データの取得は5秒毎に行った。

### 第3項 DNA抽出

モニタリング調査で抵抗性変異が検出されたコムギ穂 3 サンプルから分離された赤かび病菌株から DNA を抽出した (表 3)。DNA 抽出は Microbial DNA Isolation Kit (Mo Bio, US)を用いて、取扱説明書に従って以下のように行った。

クリーンベンチ(三洋電機, 東京)内で、培養菌株の菌糸体をオートクレーブ滅菌した爪楊枝で掻きとり、MicroBeads Tube に入れて攪拌した。その後、この MicroBeads Tube に MicroBeads Solution を 300 $\mu$ l 加え、さらに Solution MD1 50 $\mu$ l を加えた。MicroBead Tubes は最大速度で 10 分間ボルテックスをかけた後、遠心分離機 (KuBoTa, 日本) を用いて室温 (20–25 $^{\circ}$ C) で 10000 $\times$ g で 30 秒間遠心分離した。遠心分離後、上澄み液を新しい 2ml マイクロチューブに 300–350 $\mu$ l 移した。この上澄み液に Solution MD2 を 100 $\mu$ l 加え、5 秒間ボルテックスした後、約 4 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした。次に室温で 10000 $\times$ g で 1 分間遠心分離した。遠心分離後、上澄みを新しいマイクロチューブに約 400 $\mu$ l 移した。この上澄みに Solution MD3 を 900 $\mu$ l 加え、5 秒間ボルテックスした。この溶液から約 700 $\mu$ l をスピンドフィルター付きのマイクロチューブに移し、室温で 10000 $\times$ g で 30 秒間遠心分離した。スピンドフィルターを通して下に落ちた溶液は廃液として捨てた。この作業を 2–3 回繰り返した。次にスピンドフィルター付きのマイクロチューブに Solution MD4 を 300 $\mu$ l 加え 10000 $\times$ g で室温 30 秒遠心分離し、同様に下に落ちた廃液は捨て、続けて室温で 10000 $\times$ g で一分間遠心分離した。遠心分離後のチューブからスピンドフィルターを取り出し、フィルターの外側が濡れていないかどうか確認してから新しい 2ml マイクロチューブに装着した。Solution MD5 をスピンドフィルターの白いフィルターメンブレンの中央に入るように 50 $\mu$ l 加えた。このチューブを 10000 $\times$ g で 30 秒間、室温で遠心分離した。遠心分離した後、スピンドフィルターを捨て、チューブのふたに MUCC 番号を書いたシールを貼り、-20 $^{\circ}$ C で保存した。

### 第4項 PCR 法によるヒストン遺伝子配列の増幅とシーケンス反応

供試したサンプルの分類学上の正確な位置を把握するため、ヒストン遺伝子コード領域を用いた分子系統解析を行った。PCR 反応は前のセクションで抽出した DNA を用いて行った。プライマーペア H3-1a と H3-1b はヒストン H3 遺伝子の一部を増幅するために用いた (Glass and Donaldson 1995)(表 4)。PCR 反応液は 10–50 ng DNA 1 $\mu$ l、ddH<sub>2</sub>O 8.20 $\mu$ l、50mM MgCl<sub>2</sub> (Bioline, London, UK) 0.38 $\mu$ l、1x 反応バッファー (Bioline) 1.25 $\mu$ l、1mM dNTPs (Bioline)、上流側プライマー 10 $\mu$ M H3-1a、下流側プライマー 10 $\mu$ M H3-1b、Biotaq (Bioline) 5 unit/ $\mu$ L 0.06 $\mu$ l の計 12.5 $\mu$ l を入れ、混合した。混合液をスピンドウンして PCR チューブの底に集め、サーマルサイクラー (T100, Bio-Rad, US) にセットして PCR 反応を行った。PCR 反応は 94 $^{\circ}$ C で 2 分の初期乖離反応後、

94°Cで 60 秒の乖離反応、56°Cで 60 秒のアニーリング反応、72°Cで 60 秒の伸長反応を 30 サイクル、最後に 72°Cで 5 分間の最終伸長反応を行った。PCR 反応終了後、DNA 増幅を確認するため、PCR 反応液 2 $\mu$ l に対し、GelRed (Biotium, Inc. US) 2 $\mu$ l を加えた計 4 $\mu$ l を 1.2%TAE アガロースゲル中の各ウェルにアプライし、100V、30 分間電気泳動を行った。同様に 100bp ラダーマーカー (New England Biolab, Beverly, MA) 2 $\mu$ l に対し、GelRed 2 $\mu$ l を加えた計 4 $\mu$ l を泳動の距離の把握のために PCR 反応液と同時に電気泳動し、ゲル撮影装置 FAS-V (日本ジェネティクス, 東京)にて LED ライト下で可視化した。

分子系統解析に用いるヒストン H3 塩基配列を得るため、先ほど電気泳動で確認した PCR 産物をテンプレートとしてシーケンス反応に用いた。シーケンス反応には上述したプライマーペアを用いた。BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を使用し、説明書に従って反応を行った後、反応産物は Sephadex G-50 fine (GE ヘルスケア, 東京)を充填・膨潤させたマルチスクリーンプレート HV 0.45 $\mu$ m (ミリポア, ドイツ)にて精製した。この精製産物を三重大学地域イノベーション推進機構先端科学研究支援センターのオートシーケンサー (AB DNA analyzer 3730xl) で塩基配列を取得した。取得した DNA 塩基配列は MEGA7.0 (Tamura et al. 2016) 上で、フェログラムを目視で確認しながらアセンブルを行い、遺伝子解析ソフト Bioedit v.7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>)を用いて目的とする範囲の塩基配列を決定した。その後配列は NIH/NCBI の Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome))で類似塩基配列を検索し、目的とする塩基配列を取得できていることを確認した。

## 第 5 項 分子系統解析

シーケンス解析で得られたヒストン H3 塩基配列を用いて分子系統解析を行った。系統解析は MEGA7.0(Tamura et al. 2016)を用いて、最大節約系統樹を作成した。供試菌株の塩基配列データや NCBI から得た *Fusarium graminearum* 種複合体の塩基配列データ (表 5) を加え、MAFFT version 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>)を用いてアライメントを行った。アウトグループは *Fusarium pseudgraminearum* (AY452849.1, AY452848.1) のヒストン H3 塩基配列データを用いた。塩基配列内のギャップは第 5 塩基として扱った。最大節約法に基づいたステップ数が一番少ない系統樹は発見的探索法で選ばれた。樹形の探索は TBR (Tree-bisection-reconnection) 条件下で初期系統樹は 10 与え、MP search level は 3 に設定して行われた。ブートストラップ検定は 500 回繰り返され、枝の信頼度を評価した。また一致指数 (CI)、保持指数 (RI)、修正一致指数 (RC)を求め、系統樹

の信頼性を評価した。

## 第3節 結果

### 第1項 LAMP-FLP法によるモニタリング調査

2018年の赤かび病に罹病したコムギ穂79サンプルから分生子懸濁液を作成して試験を行った。その結果、79サンプル中3サンプルで薬剤抵抗性変異を検出した(表1; 図2)。この結果は三重県農業研究所により実施された培地に基づいたベンズイミダゾール系薬剤感受性試験の結果と一致した(表1)。検出ピーク温度はそれぞれMUCC2566(18-3)では55.68°C、MUCC2567(21-4)で50.48°C、MUCC2568(17-3)で50.05°Cとなった。このLAMP-FLPの検出ピーク温度から、Komuraら(2017)より3サンプルのうち2サンプルがβ2チューブリン遺伝子の198番目のコドン配列においてGAGからCAGへの塩基置換、1サンプルが200番目のコドン配列においてTTTからTATへの塩基置換を持つことが推定された。またLAMP-FLP法により全てのサンプルでβ2チューブリン遺伝子配列の増幅が確認されたことから、これらの種はすべて*Fusarium graminearum* s. str.もしくは*Fusarium asiaticum*のいずれかであることが示唆された。

### 第2項 分子系統解析の結果

ベンズイミダゾール薬剤抵抗性コムギ赤かび病菌3サンプルのヒストンH3遺伝子のシーケンス反応で得られた塩基配列をデータベース上で検索した結果、全て*F. asiaticum*がヒットした(表3)。またこれらの塩基配列とデータベース上の*Fusarium graminearum*種複合体種のヒストンH3塩基配列データを用いて最大節約系統樹を作成した結果、4サンプル全て*F. asiaticum*とクレードを形成した(図3)。これらの結果より、LAMP-FLP法で薬剤抵抗性変異が検出されたサンプルはすべて*F. asiaticum*であることが示唆された。

#### 第4節 考察

赤かび病では収穫物に DON や NIV などのカビ毒が蓄積し問題になる。これらのカビ毒は急性毒性として嘔吐・腹痛・めまい・下痢・頭痛などの症状を示すが、このカビ毒による死亡例は過去に報告されていない。しかし、低濃度のカビ毒汚染であっても長期間の摂取により、成長抑制、体重減少や免疫異常などの症状を引き起こすことが明らかにされている（中島 2008）。したがって、コムギ生産において赤かび病によるカビ毒汚染を減少させることは食の安全上重要であり、日本では赤かび病によるカビ毒蓄積量及び赤かび粒の混入率において規制が設けられている（厚生労働省 2002; 農林水産省 2003）。コムギ赤かび病は 4-5 月のコムギの開花期(出穂前後から乳熟期)に高温多湿の条件下で感染しやすいことが知られており、出穂期の曇雨天には注意が必要である（坂 2002）。しかし、日本でこの時期は降水量が比較的多く、赤かび病が感染しやすい環境であるため、開花初期に薬剤を散布して赤かび病の発生を予防している。三重県ではコムギの開花始期から盛期に薬剤散布を奨励しており、また、曇雨天が続く場合は追加の薬剤散布を呼びかけている（三重県病害虫防除所 2018）。

ベンズイミダゾール系薬剤に対して強度の薬剤耐性を有する F200Y 抵抗性系統赤かび病菌は、2008 年に三重県で初めて報告されたが（黒田・鈴木 2008）、その後継続したモニタリング調査においても確認されておらず、本研究による F200Y 抵抗性系統発生の確認は約 10 年ぶりの報告となる。F200Y 系統は三重県以外では大分県と福岡県で確認されているが（Suga et al. 2011）、長期間発生が確認されなかったことや発生が確認された圃場も異なることから、本研究で確認された F200Y 変異系統は 2008 年に発生した抵抗性系統とは関係なく独立して発生したと考えられる。また確認されたもう一つの抵抗性系統である E198Q 変異系統に関しては、2015 年に三重県で初めて発生が確認された後、2016 年にも発生が確認されている（甲村 2017; Komura et al. 2017）。2017 年は発生が確認されなかったが（Komura et al. 2017）、2018 年には再び発生が確認された。日本で E198Q 変異系統は三重県のみで確認されているが、日本以外では中国で発生が報告されているものの、その前変異に占める割合は数%にすぎない（Liu et al. 2010; Chen et al. 2015）。三重県では E198Q 変異系統は 2015 年に 2 サンプル、2016 年に 2 サンプル、そして 2018 年は 2 サンプル、発生が確認されている。これらの抵抗性系統が確認された場所はすべて三重県の中勢地域であるが、圃場の場所はそれぞれ異なり、離れている。さらには 2 年連続で同じ圃場から薬剤耐性系統の発生が確認された事例は無い（中嶋ら 2019）。このことからそれぞれの E198Q 抵抗性系統赤かび病菌は独立して発生しているように思われる。また抵抗性系統が発生しているコムギ品種はすべて‘あやひかり’であったが、2015、16 年には‘ニシノカオリ’からも発生が確認されており、栽培品種の違いが、抵抗性発現に与える影響は無いように思われる（中嶋ら 2019）（表 6）。中嶋ら（2019）によれば E198Q 変異系統は培養による薬剤感受性

試験で MIC が低く、またコムギの植物体への接種試験でも防除効果の低下は確認されていないことから、薬剤抵抗性はそれほど強くないと考えられ、中国での試験結果と一致する (Chen et al. 2015)。

分子系統解析の結果より、これらの変異系統の由来を考察すると、変異系統 3 サンプルは日本の *F. asiaticum* と同じクレードを形成し、*F. asiaticum* と同定された。このことから、中国での発生報告のない *F. asiaticum* が、E198Q 変異による抵抗性を獲得した後、日本に複数回侵入した可能性は低いと思われ、日本で独立して発生したと考えられる(図 2)。三重県では 2017 年産コムギについて出穂期以降の天候が安定しており、赤かび病の発生も少なかった(三重県農林水産部 2017)。また 2018 年の赤かび病の発生は平年並みであったため、平年よりも多量の防除薬剤を散布していたとは考えられない。今回の結果と合わせて過去のモニタリングデータを参照したところ、薬剤抵抗性系統が多発した年は無く、増加傾向も見られない(表 6, 7)。このためベンズイミダゾール系薬剤抵抗性系統の増加の傾向はないと考えられ、また定着の可能性についてもないと思われる。これらは県の積極的な指導により、散布回数、方法などが守られ、その成果が現れていると考えられる。しかし、低頻度ではあるものの薬剤抵抗性系統、特に E198Q 抵抗性系統の発生が継続して確認されていることや、約 10 年ぶりに F200Y 抵抗性系統が確認されたことから、圃場でのモニタリング調査を継続していく必要がある。

現在、三重県で赤かび病防除に用いられる薬剤は、抵抗性が出現する危険性が高いがトップジン M (ベンズイミダゾール系薬剤) が主たる位置を占めている。今後、抵抗性系統が増加し安定した防除効果が得られなくなった場合には、登録のあるテブコナゾールなどの他系統薬剤への変更を検討する必要がある。しかし、トップジン M はムギ以外にも多くの野菜などで農薬登録され、農家も施用に習熟しており、目的外の作物への農薬飛散(ドリフト)対策等にも対応が比較的容易で、今後も使用することを望んでいる。このため、圃場での薬剤抵抗性系統の発生・分布の動向を今後も定期的にモニタリングすることは、防除計画を構築する上で重要になる。また、迅速かつ適切な防除計画を構築するために、分子生物学的手法に基づいた薬剤抵抗性系統検定は重要である。

中国では 1970 年代半ばからコムギ赤かび病の防除にベンズイミダゾール系薬剤の一つであるカーベンダジム剤の使用を開始し (Zhou and Jia, 2015)、約 20 年後の 1992 年には浙江省でベンズイミダゾール系薬剤抵抗性系統の *F. asiaticum* が初めて確認された。中国におけるコムギ赤かび病の抵抗性変異は F167Y 変異が抵抗性系統全体の約 9 割を占め (Chen et al. 2015)、その抵抗性系統の発達は緩やかであった (Zhou and Jia 2015)。しかし 1998 年には浙江省で抵抗性系統の割合が 20% 弱にまで増加し (Zhou and Jia, 2015)、同様の現象は江蘇省でも報告されている。日本では 2004 年に大分県で初めてベンズイミダゾール系薬剤抵抗性赤かび病菌が確認されたが (Suga et al. 2011)、その後の継続的な発生や発達は報告されておらず、また三重県でも同様に抵抗性系統の発達・定着は確認されていない。このことから日本においてはコムギ赤かび病菌のベンズ

イミダゾール系薬剤抵抗性系統の発達は緩やかであると考えられる。

中国で発生が確認されている F167Y 抵抗性系統は、日本では熊本県でのみ発生が確認されており (Suga et al. 2011)、また日本で発生した抵抗性系統全体に対する割合も約 13%と低い (Suga et al. 2011; 甲村 2016)。さらに中国における E198Q 系統と F200Y 系統の発生率はそれぞれ 1.4%、2.7%と低い (Chen et al. 2015)。また中国では *F. asiaticum* の抵抗性系統が確認されているが、*F. graminearum* s. str. の抵抗性系統は確認されていない (Zhou and Jia 2015)。このように三重県含む日本と中国では薬剤抵抗性コムギ赤かび病菌における傾向が異なる部分があるが、今後、日本でも薬剤抵抗性赤かび病菌の急激な発達の可能性もある。本研究の結果が今後の三重県のコムギ赤かび病防除に寄与し、安定したコムギ生産に貢献することを望む。

第1章 図・表

表1：2018年赤かび病罹病コムギ穂サンプルとLAMP-FLP法の結果

サンプル	生物検定	LAMP-FLP	推定抵抗性変異
1-1	S	S	
1-2	S	S	
2-1	S	S	
2-2	S	S	
3-1	S	S	
3-2	S	S	
4-1	S	S	
4-2	S	S	
5-1	S	S	
5-2	S	S	
6-1	S	S	
6-2	S	S	
7-1	S	S	
7-2	S	S	
8-1	S	S	
8-2	S	S	
9-1	S	S	
9-2	S	S	
10-1	S	S	
10-2	S	S	
11-1	S	S	
11-2	S	S	
12-1	S	S	
12-2	S	S	
13-1	S	S	
13-2	S	S	
14-1	S	S	
14-2	S	S	
15-1	S	S	
15-2	S	S	
16-1	S	S	
16-2	S	S	
17-2(MUCC2569)	S	S	
17-3(MUCC2568)	R	R	F200Y
18-1	S	S	
18-3(MUCC2566)	R	R	E198Q
19-1	S	S	
19-2	S	S	

表 1 の続き

20-1	S	S	
20-2	S	S	
21-2	S	S	
21-4(MUCC2567)	R	R	E198Q
22-1	S	S	
22-2	S	S	
23-1	S	S	
23-2	S	S	
24-1	S	S	
24-2	S	S	
25-1	S	S	
25-2	S	S	
26-2	S	S	
26-3	S	S	
27-1	S	S	
27-2	S	S	
28-1	S	S	
28-2	S	S	
29-1	S	S	
29-2	S	S	
30-1	S	S	
30-2	S	S	
31-1	S	S	
31-2	S	S	
32-1	S	S	
32-2	S	S	
33-1	S	S	
34-1	S	S	
34-2	S	S	
35-1	S	S	
35-2	S	S	
36-1	S	S	
36-2	S	S	
37-1	S	S	
37-2	S	S	
38-1	S	S	
38-2	S	S	
39-1	S	S	
39-2	S	S	
40-1	S	S	
40-2	S	S	

生物検定；培養に基づいたベンズイミダゾール系薬剤感受性試験

表 2 : LAMP-FLP 法に用いた LAMP-FLP 法用プライマー・プローブセット

プライマー・プローブ	ラベル	遺伝子領域	プライマー配列(5'-3')	ターゲット変異	引用文献
FIPプライマー	ID13	$\beta$ 2 チューブリン	CCATACCGGAACCGGTACCACGTGACCACCCTTCAGGGT		Komura et al. 2017
BIPプライマー	ID13	$\beta$ 2 チューブリン	TCCAAGATCCGCGAGGAGTCCAGTGGCGTTGTAAGGTTCAA		Komura et al. 2017
F3プライマー	ID13	$\beta$ 2 チューブリン	CGTCGCGAGGTTGAGAAC		Komura et al. 2017
B3プライマー	ID13	$\beta$ 2 チューブリン	ACGAGCTGGTTCAGAGACAA	F167Y	Komura et al. 2017
上流側ループプライマー	ID13	$\beta$ 2 チューブリン	AGAGTGCCTCAGCTGGAA		Komura et al. 2017
蛍光標識下流側ループプライマー	ID13	$\beta$ 2 チューブリン	CCCAAGGTTTCCGATACCCGTTG		Komura et al. 2017
消光プローブ	ID13	$\beta$ 2 チューブリン	CCACCTTTTCCGTTATGTCCTC		Komura et al. 2017
FIPプライマー	ID 847	$\beta$ 2 チューブリン	GGACCCTCAAGATCGCCGATCGCCATGACGGTAGAAATCAGG		Komura et al. 2017
BIPプライマー	ID 847	$\beta$ 2 チューブリン	CTCGTAGATATCGTACAGAGCCTCGGTTGTTGAACCTTACAACGCC		Komura et al. 2017
F3プライマー	ID 847	$\beta$ 2 チューブリン	CGGAAACA TGTCGTACACACC		Komura et al. 2017
B3プライマー	ID 847	$\beta$ 2 チューブリン	GCCCAAGGTTTCCGATACC	E198Q & F200Y	Komura et al. 2017
上流側ループプライマー	ID 847	$\beta$ 2 チューブリン	TTCGTACGCCGATCTCAACTA		Komura et al. 2017
蛍光標識下流側ループプライマー	ID 847	$\beta$ 2 チューブリン	TTCTCGACGAGCTGGTTCAGAGAC		Komura et al. 2017
消光プローブ	ID 847	$\beta$ 2 チューブリン	GATACAGAAGGTCTCGTTCAGA		Komura et al. 2017

表 3 : DNA 抽出、PCR 反応に用いたサンプル

MUCC	サンプル	Blast検索の結果
2566	18-3	NRRL13818 <i>F. asiaticum</i>
2567	21-4	NRRL13818 <i>F. asiaticum</i>
2568	17-3	NRRL13818 <i>F. asiaticum</i>

表 4 : 本研究の PCR・シーケンスに用いたプライマー

プライマー	遺伝子領域	プライマー配列(5'-3')	引用文献
H3-1a	ヒストンH3	ACTAAGCAGACCGCCCGCAGG	Glass and Dnaldson 1995
H3-1b	ヒストンH3	GCGGGCGAGCTGGATGTCCTT	Glass and Dnaldson 1995

表 5 : 分子系統解析に用いたヒストン H3 塩基配列データ

Accession number	NRRL	菌名	引用文献等
AY452843.1	26156	<i>Fusarium asiaticum</i>	O'Donnell et al.2004
AY452820.1	6101	<i>Fusarium asiaticum</i>	O'Donnell et al.2004
KM889635.1	54221	<i>Fusarium nepalense</i>	Sarver et al(未出版)
KM889634.1	54220	<i>Fusarium nepalense</i>	Sarver et al(未出版)
AY452857.1	31205	<i>Fusarium cortaderiae</i>	O'Donnell et al.2004
AY452856.1	29297	<i>Fusarium cortaderiae</i>	O'Donnell et al.2004
AY452855.1	29306	<i>Fusarium cortaderiae</i>	O'Donnell et al.2004
AY452846.1	28723	<i>Fusarium meridionale</i>	O'Donnell et al.2004
AY452837.1	28721	<i>Fusarium meridionale</i>	O'Donnell et al.2004
AY452823.1	28718	<i>Fusarium austroamericanum</i>	O'Donnell et al.2004
AY452822.1	2903	<i>Fusarium austroamericanum</i>	O'Donnell et al.2004
AY452841.1	26754	<i>Fusarium acaciae-meransii</i>	O'Donnell et al.2004
AY452840.1	26752	<i>Fusarium acaciae-meransii</i>	O'Donnell et al.2004
DQ459727.1	38405	<i>Fusarium sp</i>	Starkey et al. 2007
DQ459726.1	38380	<i>Fusarium sp</i>	Starkey et al. 2007
DQ459725.1	36905	<i>Fusarium sp</i>	Starkey et al. 2007
AY452847.1	29148	<i>Fusarium mesoamericanum</i>	O'Donnell et al.2004
AY452826.1	25797	<i>Fusarium mesoamericanum</i>	O'Donnell et al.2004
FJ240250.1	45800	<i>Fusarium vorosii</i>	O'Donnell et al.2008
FJ240242.1	46718	<i>Fusarium aethiopicum</i>	O'Donnell et al.2008
FJ240241.1	46710	<i>Fusarium aethiopicum</i>	O'Donnell et al.2008
DQ459721.1	29149	<i>Gibberella zeae</i>	Starkey et al. 2007
DQ459719.1	38393	<i>Gibberella zeae</i>	Starkey et al. 2007
DQ459718.1	38383	<i>Gibberella zeae</i>	Starkey et al. 2007
DQ459717.1	38395	<i>Gibberella zeae</i>	Starkey et al. 2007
DQ459716.1	38381	<i>Gibberella zeae</i>	Starkey et al. 2007
DQ459715.1	38369	<i>Gibberella zeae</i>	Starkey et al. 2007
DQ459720.1	38371	<i>Gibberella zeae</i>	Starkey et al. 2007
AY452821.1	13818	<i>Fusarium asiaticum</i>	O'Donnell et al.2004
AY452844.1	28720	<i>Fusarium asiaticum</i>	O'Donnell et al.2004
KM889638.1	54197	<i>Fusarium louisianense</i>	Sarver et al(未出版)
KM889637.1	54196	<i>Fusarium louisianense</i>	Sarver et al(未出版)
FJ240251.1	45833	<i>Fusarium sp.</i>	O'Donnell et al.2008
FJ240249.1	45795	<i>Fusarium sp.</i>	O'Donnell et al.2008
FJ240247.1	45681	<i>Fusarium sp.</i>	O'Donnell et al.2008
FJ240246.1	45665	<i>Fusarium sp.</i>	O'Donnell et al.2008
AY452828.1	29011	<i>Fusarium boothii</i>	O'Donnell et al.2004
AY452827.1	26916	<i>Fusarium boothii</i>	O'Donnell et al.2004
AY452861.1	31281	<i>Fusarium brasiliicum</i>	O'Donnell et al.2004
AY452860.1	31238	<i>Fusarium brasiliicum</i>	O'Donnell et al.2004
FJ240248.1	45790	<i>Fusarium vorosi</i>	O'Donnell et al.2008
AY452849.1	28338	<i>Fusarium pseudograminearum</i>	O'Donnell et al.2004
AY452848.1	28062	<i>Fusarium pseudograminearum</i>	O'Donnell et al.2004

表 6：ベンズイミダゾール系薬剤抵抗性コムギ赤かび病菌の過去の発生リスト

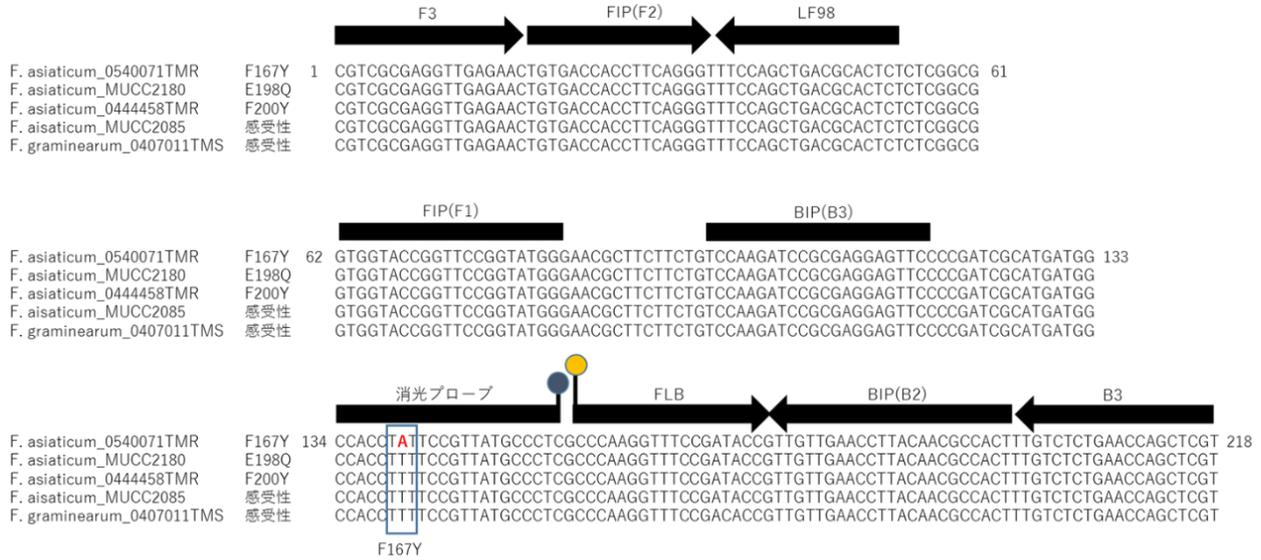
年	耐性程度	変異部位	種	場所	品種
2008	耐性菌	F200Y	<i>Fusarium asiaticum</i>	三重県中勢地区	あやひかり
2015	中度耐性菌	E198Q	<i>Fusarium asiaticum</i>	三重県中勢地区	ニシノカオリ
			<i>Fusarium asiaticum</i>	三重県中勢地区	ニシノカオリ
2016	中度耐性菌	E198Q	<i>Fusarium asiaticum</i>	三重県中勢地区	あやひかり
			<i>Fusarium asiaticum</i>	三重県中勢地区	ニシノカオリ
2018	耐性菌	F200Y	<i>Fusarium asiaticum</i>	三重県中勢地区	あやひかり
	中度耐性菌	E198Q	<i>Fusarium asiaticum</i>	三重県中勢地区	あやひかり
			<i>Fusarium asiaticum</i>	三重県中勢地区	あやひかり

表 7；コムギ赤かび病菌のチオファネートメチル剤感受性検定の推移

年度	調査圃場数	耐性菌	中度耐性菌	感受性菌	供試菌株	耐性菌発生率(%)
2003	-	0	0	55	55	0
2004	-	0	0	28	28	0
2005	-	0	3	61	64	4.7
2006	-	0	0	56	56	0
2007	-	0	0	20	20	0
2008	24	4	0	44	48	8.3
2008a*	2	6	0	6	12	50
2009	37	0	0	152	152	0
2010	14	0	0	70	70	0
2011*	-	-	-	-	-	0
2012	21	0	0	44	44	0
2013	7	0	0	40	40	0
2014	18	0	0	66	66	0
2015	26	0	2	100	102	2
2016	72	0	2	152	154	1.3
2017	24	0	0	42	42	0
2018	40	1	2	139	142	2.1

\*2008a は抵抗性菌発生圃場から再分離、2011b は検定を実施していない

A



B

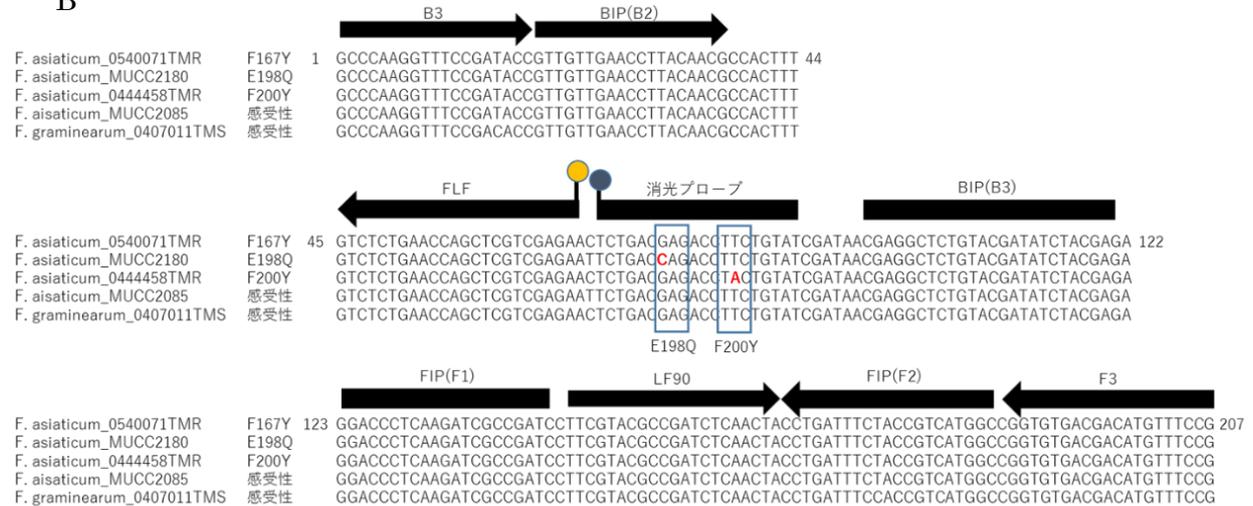


図 1 : LAMP-FLP 法に用いたプライマー・プローブセットの位置

A: F167Y 検出用プライマー・プローブセット

B: E198Q、F200Y 検出用プライマー・プローブセット

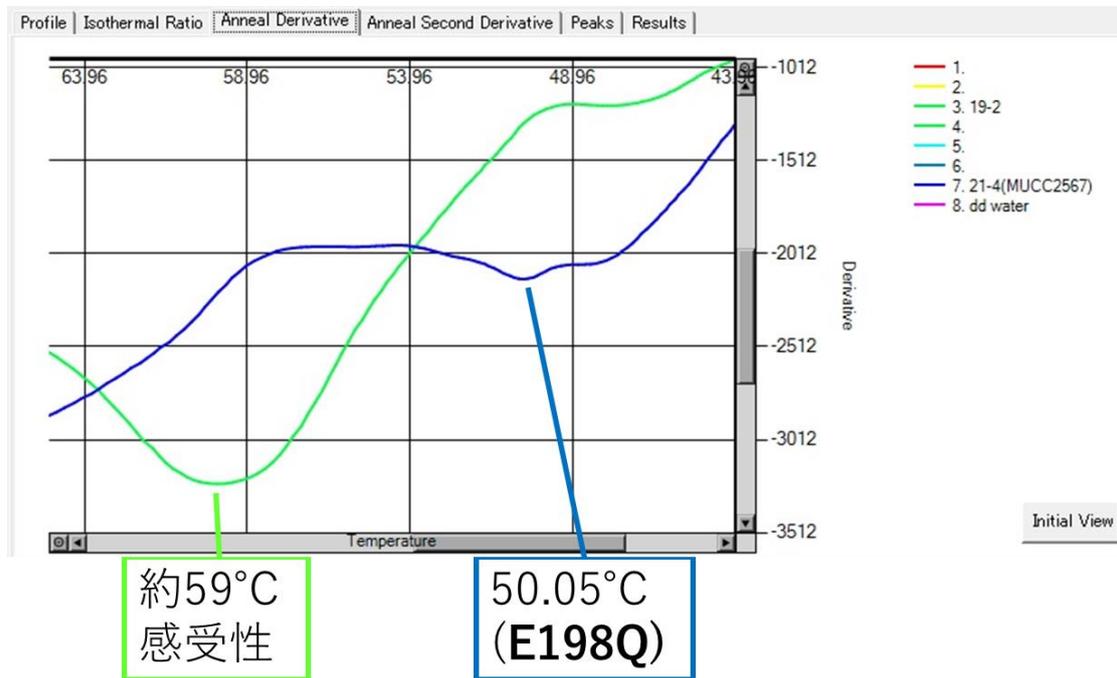
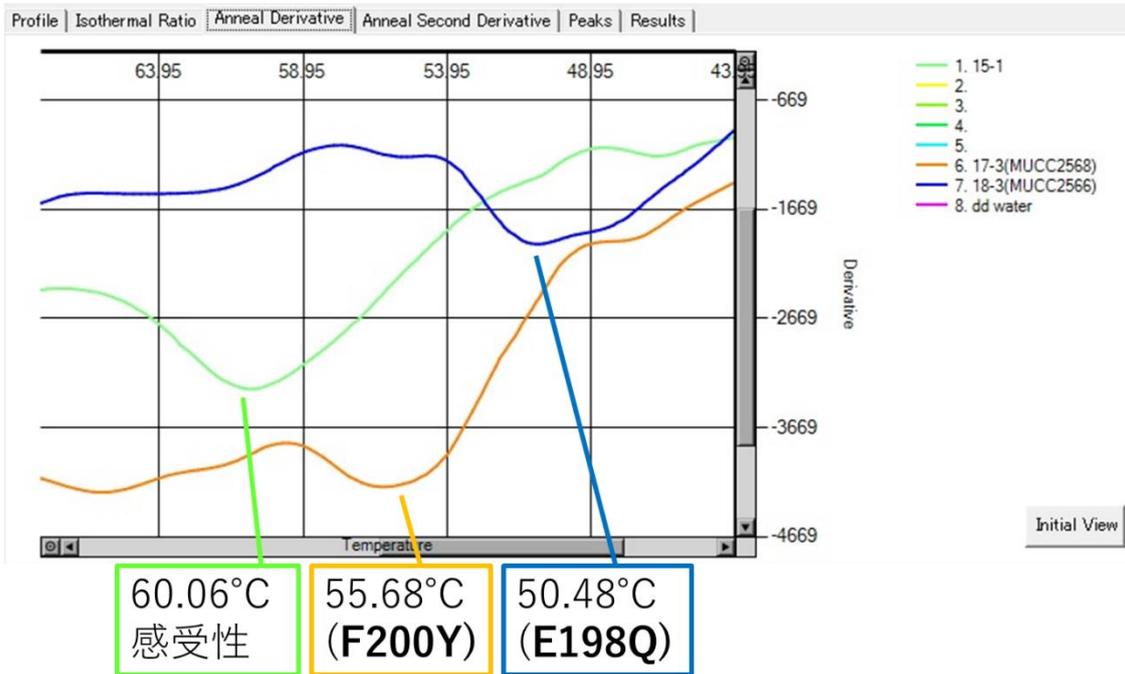


図 2 : LAMP-FLP の結果の一部(消光ピーク温度)

縦軸は蛍光値の一次微分、横軸は温度

それぞれの消光ピーク温度は 15-1; 60.06°C、17-3(MUCC2568); 55.68°C、18-3(MUCC2566); 50.48°C、19-2; 約 59°C、21-4(MUCC2567); 50.05°C

CI=0.88  
 RI=0.953125  
 RC=0.83875

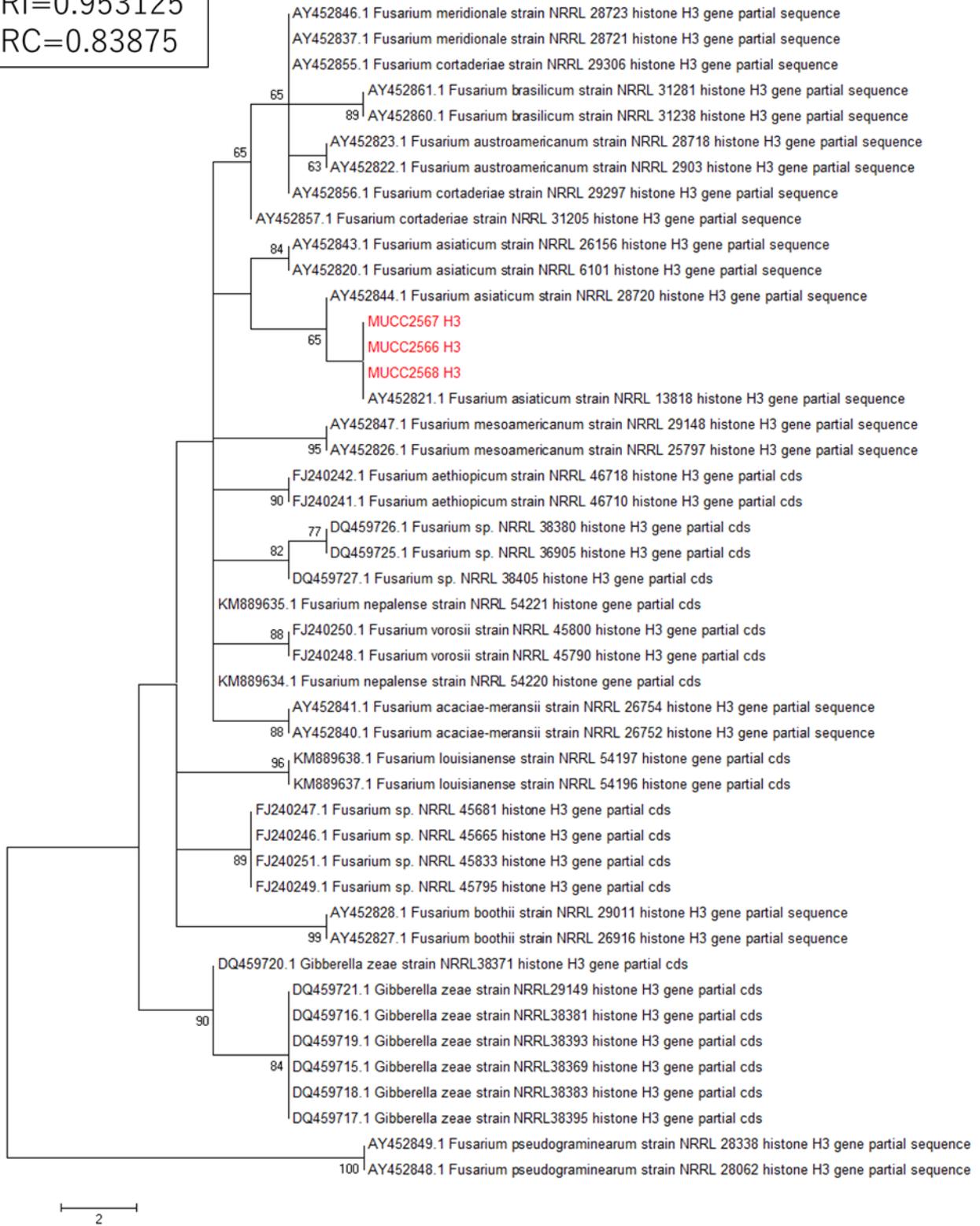


図 3: ヒストン H3 塩基配列から得た最大節約系統樹の一つ、系統樹の各枝に 500 回のブートストラップ検定による数値(%)を示し、50%以上支持された枝に数値を示した。

## 引用文献

Albertini C, Gredt M, and Leroux P, (1999). Mutations of the  $\beta$ -tubulin gene associated with different phenotypes of benzimidazole resistance in the cereal eyespot fungi *Tapesia yallundae* and *Tapesia acutormis*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 64: 17–23.

Chen CJ, Yu JJ, Bi CW, Zhang YN, Xu JQ, et al. (2009). Mutations in a  $\beta$ Tubulin Confer Resistance of *Gibberella zeae* to Benzimidazole Fungicides. *Phytopathology* 99: 1403–1411.

Chen Y, Yang X, Gu CY, Zhang AF, Gao TC, Zhou MG, (2015). Genotypes and phenotypic characterization of field *Fusarium asiaticum* isolates resistant to carbendazim in Anhui province of China. *Plant Dis.* 99: 342–346.

Fujimura M, Oeda K, Inoue H, Kato T, (1992). A single amino-acid substitution in the beta-tubulin gene of *Neurospora* confers both carbendazim resistance and diethofencarb sensitivity.

Glass NL, Donaldson GC, (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol* 61: 1323–1330.

星川清親, (1980). 新編食用作物. P183-251.

堀江弘道ら, (2014). 植物病原菌類の見分け方. 大誠社 p142-143 .

石井龍一, 中世古公男, 高崎康夫, (2003). 作物学各論. 朝倉書店.p22-31

北島博, 梶原敏宏, (1967). 原色作物病害図説 第3版. 養賢堂 p44.

Koenraadt H, Somerville SC, Jones AL, (1992). Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 82: 1348–1354.

厚生労働省, (2002). 小麦のデオキシニバレノールに係る暫定的な基準値の設定について. 食発第 0521001 号.

黒田克利・鈴木啓史 (2009). 三重県におけるチオファネートメチル剤耐性赤かび病菌の初確認. 関西病虫研報 51: 37-38.

Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870–1874.

甲村瞭次, (2017). 平成 28 年度卒業論文 三重県で発生したベンゾイミダゾール系薬剤抵抗性コムギ赤かび病菌に関する研究. 1-22.

Komura R, Kawakami T, Nakajima K, Suzuki H, Nakashima C (2017). Simultaneous detection of benzimidazole-resistant strains of *Fusarium* head blight using the loop-mediated isothermal amplification-fluorescent loop primer method. *Journal of General Plant Pathology*, Volume 84, Issue 4: 247–253.

Liu X, Yin YN, Wu JB, Jiang JH and Ma ZH (2010). Identification and characterization of carbendazim-resistant isolates of *Gibberella zeae*. *Plant Dis* 94: 1137–1142.

Ma Z, Yoshimura MA, Michailides TJ (2003). Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 7145–7152.

牧野富太郎, (1977). 牧野新日本植物図鑑 31 版. 北隆館 p712

Maymon M, Zveibil A, Pivonia S, Minz D, Freeman S (2006). Identification and characterization of benomyl-resistant and -sensitive populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from statice (*Limonium* spp.). *Phytopathology* 96: 542–548.

三重県農林水産部, (2017). 三重の麦情報. 1-26.

三重県病害虫防除所, (2018). 病害虫防除技術情報第 1 号(コムギ赤かび病).

中嶋香織, 川上拓, 甲村瞭次, 辻朋子, 鈴木啓史, 磯崎真英, 中島千晴, 黒田克利, (2019). 三重県におけるムギ類赤かび病菌のチオファネートメチル剤耐性菌の発生状況. 植物病理学会 (講演要旨).

中島隆, (2008). 麦類赤かび病の防除を通じて食品の安全性確保に貢献するトップジン M. 農薬時代 第 190 号: 8-11.

農林水産省, (2003). 農産物規格規程(小麦、大麦及びはだか麦の検査規格).

農林水産省, (2017). いろいろなカビ毒(デオキシニバレノール).

[http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk\\_analysis/priority/kabidoku/kabi\\_iroiro.html](http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/kabidoku/kabi_iroiro.html).

O'Donnell K., Kistler HC, Tacke BK., and Casper HH, (2000). Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 7905–7910.

O'Donnell K., Ward TJ, Geiser DM., Kistler HC, and Aoki T, (2004) Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. Fungal Genet. Biol. 41: 600–623.

O'Donnell K, Ward TJ, Aberra D, Kistler HC, Aoki T, Orwig N, Kimura M, Bjørnstad Å, Klemsdal SS, (2008) Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. Fungal Genet. Biol. 45: 1514–1522.

大場淳司, (2009). 宮城県におけるムギ類赤かび病の発生生態とマイコトキシンの低減技術に関する研究.

坂智広, (2002). ムギ類赤かび病の生理・生態およびコムギの抵抗性. 植物防疫 56: 58-63.

Starkey, DE, Ward TJ, Aoki T, Gale LR, Kistler HC, Geiser DM, Suga H, To'th B, Varga J, O'Donnell K, (2007). Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium*

head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal Genet. Biol.* 44: 1191–1204.

Suga H, Karugia GW, Ward T, Gale LR, Tomimura K, Nakajima T, Miyasaka A, Koizumi S, Kageyama K, Hyakumachi M, (2008). Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species complex in Japan. *Phytopathology* 98: 159–166.

Suga H, Nakajima T, Kageyama K, and Hyakumachi M, (2011). The genetic profile and molecular diagnosis of thiophanate-methyl resistant strains of *Fusarium asiaticum* in Japan. *Fungal Biol.* 115: 1244–1250.

田辺憲太郎, (2013). 殺菌剤の耐性菌発生リスク評価. *農薬時代* 195: 18-24.

上田晃久, 西本浩之, 加藤順久, 平野哲司, 深谷雅博, (2007). 東海地方に分布するムギ類赤かび病菌の菌種及びマイコトキシン産生型. *愛知県農総試研報* 39: 17-23.

渡邊好昭, 藤田雅也, 柳沢貴司, (2013). 麦の高品質多収技術: 品種・加工適性と栽培. p53–55

Yarden O, Katan T, (1993). Mutation leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 83: 1478–1483.

Yli-Mattila T, Gagkaeva T, Ward TJ, Aoki T, Kistler HC, O'Donnell K, (2009). A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian far east. *Mycologia* 101: 841–852.

Zhou MG, Jia XJ, (2015). Part IV Resistance Management in Major Crops: Chapter19 Wheat pathogens in China. In: Ishii H, Hollomon D, editors. *Fungicide Resistance in Plant Pathogens: Principles and a Guide to Practical Management*. Japan: Springer. 313–328

## 第2章 LAMP-FLP法によるベンズイミダゾール系薬剤抵抗性系統イネばか苗病菌の特異的検出の検討

### 第1節 緒言

イネ (*Oryza sativa* L)はイネ科イネ属の草本植物で、コムギ、トウモロコシと並ぶ三大作物の一つであり、インド型と日本型イネに大別される。日本では縄文末期ごろに稲作文化を持った人々が移住、イネ栽培を始め、広まったとされる。稲作は当初は九州地方に始まり、3~4世紀には関東にまで及び、弥生時代には農業の中心が稲作になっていた(星川 1977)。世界のイネの栽培面積は約1.6億ヘクタールであり、生産量は約7.4億トンである(FAOSTAT 2016)。日本の2018年産水稻(子実用)の作付面積は約147万ヘクタールで、生産量は778万トンである(農林水産省大臣官房統計部 2018)。日本の平成28年の米の食料自給率(重量ベース)は約97%であり(農林水産省 2018)、日本人にとって極めて重要な作物の一つである。また近年、我が国では家畜の飼料として利用する飼料用米等の生産拡大も目指している(農林水産省 2015)。

イネばか苗病は糸状菌 *Fusarium fujikuroi* Nirenberg (= *Gibberella fujikuroi* [Sawada] Ito, in Ito & Kimura)によって引き起こされるイネの重要病害の一つであり、育苗期や本田移植後に背丈が異常に伸びる徒長症状を示すのが大きな特徴である(堀 1898; 沢田 1912; 佐々木 1987)。この徒長症状は *F. fujikuroi* が産生する植物ホルモンであるジベレリンによるものである(黒沢 1926; 藪田 1935)。ばか苗病は種子伝染性の病害であり、主に種子予措中(浸種、催芽処理)に病原菌に汚染された籾から健全籾に感染する(藤 2013)。育苗期の一般的な症状は、色が淡く、ひょろりと徒長し、葉身は開く(藤 2018)。本田に移植された罹病苗は葉鞘や節間が徒長、黄化し、その後は早晩枯死、消失する。しかし一部の株は枯死後も本田に残り、枯死株の株元に分生子塊を形成する。開花期に分生子は飛散、健全株の花に付着し、葯や柱頭から感染する。感染した株は概ね稔実し保菌籾となる。このとき保菌籾の内穎と外穎の接合部に淡紅色のスポロドキアを形成することがあり、「赤籾」と呼ばれる(沢田・黒沢 1924; 伊藤・木村 1931)。保菌籾は収穫時に健全籾と接触・汚染し、これが翌年のばか苗病感染源となる(藤 2018; 佐々木 1987; 渡辺 1985)。*Fusarium fujikuroi* 種複合体 (*Fusarium fujikuroi* species complex; FFSC)はイネばか苗病菌 *F. fujikuroi* を含む50以上の系統学的種から構成される(Nirenberg et al. 1998; O' Donnell et al. 1998)。この種複合体の一部の種はフモニシン類と呼ばれるカビ毒を産生する(Suga et al. 2014)。このカビ毒は動物実験において発癌性が認められており、また胎児の神経管障害との関連が示唆されている(内閣府 2017)。しかし食品からのフモニシン類摂取量は一般的な日本人の健康に悪影響を与える可能性は低いと判断され、日本では食品や飼料にフモニシン類の基準値は設定されていない(内閣府 2017)。一方で、フモニシン類はウマの白質脳軟化症

(ELEM)やブタの肺水腫 (PPE)のような家畜の疾病を引き起こす (農林水産省 2017)。近年、*F. fujikuroi* の一部の株もこのカビ毒を産生することが明らかになっており注意が必要である (Suga et al. 2014)。

現在、イネばか苗病は種子消毒によって防除が行われており、主にベンズイミダゾール系薬剤やイプコナゾールのような EBI (エルゴステロール合成阻害剤)系薬剤や温湯消毒が一般的である (Suga et al. 2018; 藤 2018)。しかし 1980 年代からベンズイミダゾール系薬剤に対して抵抗性を示すばか苗病菌が発生し始めた (小川・諏訪 1981; 北村ら 1982)。これらの薬剤抵抗性系統は  $\beta 2$  チューブリン遺伝子の特定の位置に点突然変異を持つことが明らかにされており (Chen et al. 2014; 須賀ら 2017)、 $\beta 2$  チューブリン遺伝子の 198 と 200 番目のコドンのいずれかに一塩基変異を持っていることが明らかにされている。前者は 198 番目のコドン配列が GAG から GTG へ置換し、コードするアミノ酸がグルタミン酸 (E)からバリン (V)に変化 (GAG→GTG; E198V)した系統と、AAG に置換し、アミノ酸がグルタミン酸 (E)からリシン (K)に変わった (GAG→AAG; E198K)抵抗性系統、後者では  $\beta 2$  チューブリン遺伝子の 200 番目コドン塩基配列が TTC から TAC に置換し、コードするアミノ酸がフェニルアラニン (F)からチロシン (Y)に置き換わった (TTC→TAC; F200Y)系統の発生が確認されている。F200Y 抵抗性系統は中国と日本で発生が、E198V 系統は中国のみ、E198K 系統は日本でそれぞれ発生が報告されている (Chen et al. 2014; 須賀 2017)。

定期的に薬剤抵抗性系統の発達・分布を調査することはイネばか苗病を効果的に防除し、健全苗の安定的な生産にとって重要である。抵抗性系統の発生を効率よく調査するためには分子生物学的手法に基づいた検定法は効果的である。しかし、先行研究においてベンズイミダゾール系薬剤抵抗性イネばか苗病菌の検定法は検討されてこなかった。また *F. fujikuroi* を形態的特徴に基づいて同定することは困難であり、DNA シーケンスや交配試験が必要とされる (Suga et al. 2014)。このため簡易かつ迅速に *F. fujikuroi* の種同定を行い、同時にベンズイミダゾール系薬剤抵抗性系統を検定する必要がある。著者らは、コムギ赤かび病菌において全てのベンズイミダゾール抵抗性系統を LAMP-FLP 法を用いて検定法が開発した (Komura et al. 2017)。この手法は迅速に、高感度かつ特異的にコムギ赤かび病菌 *Fusarium graminearum* s. str.もしくは *F. asiaticum* の  $\beta 2$  チューブリン塩基配列を増幅し、さらに薬剤抵抗性変異を検出可能であり、加えて圃場で採集された罹病植物を利用した検出も可能である (Komura et al. 2017)。そこで本研究では、LAMP-FLP 法を用いてイネばか苗病菌 *F. fujikuroi* の全てのベンズイミダゾール系薬剤抵抗性系統の特異的な検出を試みた。本研究により、イネ栽培に被害を与える薬剤抵抗性イネばか苗病菌の迅速かつ簡易な診断が可能となり、これによる防除計画の構築を容易にし、日本人の食生活に重要なイネの栽培安定化に寄与することを目的とする。

## 第2節 材料と方法

### 第1項 供試菌株

今回の実験では岐阜大学科学研究基盤センター保有の *F. fujikuroi* 7 菌株を実験に供試した (表 1)。これらの菌株は培地を用いた薬剤感受性試験とシーケンス解析によって、ベンズイミダゾール系薬剤に対する感受性および  $\beta 2$  チューブリン遺伝子における薬剤抵抗性変異の有無は確認されている (Suga et al. 2018)。また培地を用いたベンズイミダゾール系薬剤感受性試験済みの *F. fujikuroi* 96 菌株由来の DNA 抽出液 (Suga et al. 2018) を試験に用いた (表 2)。

### 第2項 DNA 抽出

DNA 抽出は Microbial DNA Isolation Kit (Mo Bio, US) を用いて、取扱説明書に従って、本稿の第1章、第1節、第1項と同様に行った。DNA 抽出溶液は、チューブのふたに MUCC 番号を書いたシールを貼り、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### 第3項 LAMP-FLP 法の予備試験

LAMP-FLP 法によるイネ馬鹿苗病菌 *F. fujikuroi* のベンズイミダゾール系薬剤抵抗性変異の特異的検出を検討するため、7 菌株の DNA 抽出液を用いて LAMP-FLP 法による実験を行った。このプライマーセットも、コムギ赤かび病菌の薬剤抵抗性変異系統用検出用プライマーセットと同様、変異のない配列を確実に検出することで擬陰性を排除し、変異が予想される配列の場合にはより詳細な検討を行うことを前提に、変異のない配列を検出できるよう設計された。LAMP 反応試薬は  $10\times$  反応バッファー (ニッポン・ジーン)、 $25\text{mM}$  dNTPs (ニッポン・ジーン)、 $1.6\ \mu\text{M}$  FIP プライマー ID17 FIP と BIP プライマー (ID17 BIP (表 2)、 $0.2\ \mu\text{M}$  の F3 プライマー ID17 F3 と B3 プライマー ID17 B3 (表 2)、 $0.8\ \mu\text{M}$  下流側ループプライマー ID17 LB90 (表 2)、 $0.2\ \mu\text{M}$  の上流側蛍光標識ループプライマー ID17 FLF90 (表 2)、 $0.5\ \mu\text{M}$  の消光プローブ (Probe DabcyI) ID17 (表 2)、 $1\ \mu\text{l}$  増幅酵素、そして希釈した PCR 産物  $4\ \mu\text{l}$  の計  $25\ \mu\text{l}$  を入れ、調合した。混合液をスピンドウンして LAMP 反応用チューブ (栄研化学) の底に集め、LAMP 法用測定装置 LF-8 (ニッポン・ジーン) にセットして、LAMP 反応を行った。滅菌水をネガティブコントロールとして用いた。LAMP 反応は  $66^{\circ}\text{C}$  で 35 分間行われ、その後、消光プローブの再会合による会合曲線分析を行い、抵抗性変異の有無を判定した。消光現象の起きた計測データの取得は 2 秒毎に行った。

#### 第4項 LAMP-FLP法による本試験

96菌株のDNA抽出溶液でLAMP-FLP法による試験を行った(表3)。LAMP反応は前のセクションの条件検討と同様にLAMP法用測定装置LF-8 plus(ニッポン・ジーン、東京)で行い、自動で薬剤抵抗性変異の有無を判定した。データの取得は5秒毎に行った。

#### 第5項 PCR法による $\beta 2$ チューブリン遺伝子配列の増幅とシーケンス反応

LAMP-FLP法の結果と培養に基づいた薬剤感受性試験の結果が一致しなかった3サンプル(Wo17, Wo23, Wo37)について、 $\beta 2$ チューブリン遺伝子の抵抗性変異の有無を確認するためシーケンス解析を行った。プライマーペア $\beta 2$ -Fと $\beta 2$ -Rは $\beta 2$ チューブリンの塩基配列を増幅するために用いた(Chen et al. 2014)(表4)。PCR反応液は10-50 ng DNA 1 $\mu$ l、ddH<sub>2</sub>O 8.20 $\mu$ l、50mM MgCl<sub>2</sub> (Bioline, London, UK) 0.38 $\mu$ l、1x反応バッファー (Bioline) 1.25 $\mu$ l、1mM dNTPs (Bioline)、上流側プライマー10 $\mu$ M  $\beta 2$ -F、下流側プライマー 10 $\mu$ M  $\beta 2$ -R、Biotaq (Bioline) 5 unit/ $\mu$ L 0.06 $\mu$ lの計12.5 $\mu$ lを入れ、混合した。混合液をスピンドウンしてPCRチューブの底に集め、サーマルサイクラー(T100, Bio-Rad, US)でPCR反応を行った。PCRは94°Cで2分の初期乖離反応後、94°Cで60秒の乖離反応、58°Cで60秒のアニーリング反応、72°Cで60秒の伸長反応を30サイクル、最後に72°Cで5分間の最終伸長反応を行った。PCR反応終了後、DNA増幅を確認するため、PCR反応液2 $\mu$ lに対し、GelRed (Biotium, Inc., US) 2 $\mu$ lを加えた計4 $\mu$ lを1.2%TAEアガロースゲル中の各ウェルにアプライし、100V、30分間電気泳動を行った。同様に100bpラダーマーカー(New England Biolab, Beverly, MA) 2 $\mu$ lに対し、GelRed 2 $\mu$ lを加えた計4 $\mu$ lを泳動の距離の把握のためにPCR反応液と同時に電気泳動し、ゲル撮影装置FAS-V(日本ジェネティクス、東京)にて可視化した。

シーケンス反応は電気泳動で確認したPCR産物と上述のプライマーペアを用いて、第1章の第1節第4項と同様に行い、DNA塩基配列を取得した。取得した塩基配列はMEGA7.0(Tamura et al. 2016)やBioedit v.7.2.5を用いてアセンブルして塩基配列を完成させた。NIH/NCBIのBasic Local Alignment Search Tool(BLASTn:[https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome))で類似塩基配列を検索して、目的とするDNA配列が得られたことを確認した。

### 第3節 結果

#### 第1項 LAMP-FLP法の予備試験

LAMP-FLP法によるベンズイミダゾール系薬剤抵抗性変異検定に供試した *F. fujikuroi* 7菌株は、全て感受性株で感受性系統の配列が、全ての抵抗性株で薬剤抵抗性変異が検出された。したがって LAMP-FLPの結果と培地上で行った薬剤感受性試験の結果は一致した(表1; 図1)。また検出ピーク温度はそれぞれ感受性系統で平均 56.78°C、E198K 抵抗性系統で平均 48.69°C(最低 48.41–最高 49.1°C)、F200Y 抵抗性系統で平均 51.64°C(51.11–52.16°C)であった(表1; 図2)。検出ピーク温度は感受性系統と E198K 抵抗性系統で約 8°C、感受性系統と F200Y 抵抗性系統で約 5°C、E198K 抵抗性系統と F200Y 抵抗性系統で約 3°Cの温度差が確認された。

#### 第2項 LAMP-FLP法による本試験

96菌株(40サンプルが薬剤抵抗性系統、56サンプルが感受性系統)のDNA抽出液を用いて、LAMP-FLP法による薬剤抵抗性変異の検出を行った結果、抵抗性系統40サンプルのうち37サンプルで薬剤抵抗性変異が検出され、また感受性系統56サンプルで全て薬剤感受性系統の配列が検出された(表3)。したがって、96サンプル中93サンプルで LAMP-FLP法の結果と培地を用いた薬剤感受性試験の結果と一致していた(表3)。しかし、抵抗性系統3サンプルでは LAMP-FLP法の結果と生物検定の結果が一致しなかった。そのうち2サンプル(Wo17, Wo23)は培地を用いた薬剤感受性試験で抵抗性を示したのにも関わらず、LAMP-FLP試験では薬剤抵抗性変異を検出できなかった。残る1サンプル(Wo37)も培地を用いた薬剤感受性試験で抵抗性を示したが、LAMP-FLP試験では薬剤抵抗性変異と感受性系統配列の両方を検出した。そこで、これら3サンプルについて、 $\beta 2$  チューブリン遺伝子のシーケンス解析を行い、薬剤抵抗性変異の有無を調べたところ、Wo37では198番目のコドンが GAG から CAG に置換しており、コードするアミノ酸がグルタミン酸からグルタミンに変わっていたことが確認された。一方、Wo17と W23では $\beta 2$  チューブリン遺伝子の198番目、200番目のコドンの配列はそれぞれ GAG、TTCであり、この部分には薬剤抵抗性変異が存在しないことが確認された。

#### 第4節 考察

本研究では LAMP-FLP 法によるイネばか苗病菌 *F. fujikuroi* におけるベンズイミダゾール系薬剤抵抗性系統の迅速で特異的な検出の検討を行った。薬剤感受性系統と抵抗性系統の検出ピーク温度差は最高で約 8°C (感受性系統と F200Y 系統)、最低でも約 5°C (感受性系統と E198K 系統)の温度差があり、プライマーセットの設計通り、プローブ内の感受性系統と抵抗性系統は温度差から識別することは可能であった。しかし、抵抗性系統は検出ピーク温度に約 1°Cの幅があり、E198K と F200Y 抵抗性系統の検出ピーク温度差は約 3°Cと比較的小さい。Komura ら (2017)の研究結果ではそれぞれの感受性・抵抗性系統の検出ピーク温度に約 2-3°Cの幅があることを報告している。したがって、異なる抵抗性系統の検出ピーク温度からの識別はある程度は可能であるが、ピーク温度によっては判断が難しい。本研究では、LAMP-FLP 法を 66°C、45 分で実施したが、DNA 増幅ピークの計測データから、反応時間 20 分で完全に増幅が終わっていることから (図 1)、DNA 抽出液を用いた試験では 25-30 分の反応時間で十分であると考えられる。

ベンズイミダゾール系薬剤は作用点が  $\beta$  チューブリンであり、作用点が単一であるため FRAC において抵抗性系統の発生リスクが高いとされる薬剤で (Albertini et al. 1999, Koenraadt et al. 1992)。 $\beta$  チューブリン領域の変異による抵抗性の発現は *Fusarium graminearum* (= *Gibberella zeae*), *Neurospora crassa* (Fujimura et al. 1992), *Botrytis cinerea* (Yardan&Katan 1993), *Colletotrichum gloeosporioides* (Maymon et al. 2006), *Sclerotinia sclerotiorum* (Yang et al. 2004) などで示されている。イネばか苗病菌 *F. fujikuroi* では  $\beta$  2 チューブリン遺伝子の 198、200 番目のコドンに抵抗性変異を持つことが分かっている (Chen et al. 2014; Suga et al. 2017)。96 菌株の DNA 抽出液を用いて、LAMP-FLP 法による薬剤抵抗性変異を検定の結果 93 サンプルで LAMP-FLP 法の試験結果と生物検定の結果が一致した。しかしながら、3 サンプルでは、これら試験結果が完全に一致せず、うち 1 サンプル (Wo37)で薬剤抵抗性変異と同時に変異のない薬剤感受性系統の配列も検出された。また 2 サンプル (Wo17, Wo23)では、薬剤抵抗性変異が検出されなかった。これらの事象については、Wo37 由来の変異の存在する配列では、 $\beta$  2 チューブリン遺伝子の 198 番目のコドンが GAG から AAG に置換しており、コードするアミノ酸がグルタミン酸からリシンになっていることが確認された。このことから、薬剤抵抗性変異のない感受性系統の配列ピークを検出した理由はコンタミネーションもしくはコピー間多型、細胞間の多型などが考えられるが、確定は出来なかった。一方、他の 2 サンプル Wo17 と Wo23 では、 $\beta$  2 チューブリン遺伝子の 198、200 番目のコドンの配列が薬剤感受性系統の配列と同じであり、変異が見られなかった。このことから、この 2 サンプルは先行研究 (Chen et al. 2014; 須賀ら 2017) で報告されてきた E198V、E198K、F200Y 抵抗性系統ではなく、他の場

所に変異が存在することにより抵抗性が発現したことが示唆された。本研究で用いた LAMP-FLP 法用の消光プローブは  $\beta 2$  チューブリン遺伝子の 198 及び 200 番目のコドンに存在する変異を検出するために設計されている。他の菌類においては  $\beta$  チューブリン遺伝子のベンズイミダゾール系薬剤抵抗性変異は 198、200 番目のコドン以外に 6、50、167、240 番目でも確認されている (Ma et al. 2003; McKay et al. 1998; Albertini et al. 1999; Gafur et al. 1998)。またイネばか苗病菌と同じ *Fusarium* 属のコムギ赤かび病菌では  $\beta 2$  チューブリン遺伝子の 167 番目のアミノ酸をコードするコドンに抵抗性変異を持っており、この系統は抵抗性系統全体の約 9 割を占めている (Duan et al. 2014; Chen et al. 2015)。今回の研究でシーケンス解析した 2 サンプルでは先に述べた  $\beta 2$  チューブリン遺伝子の 198、200 番目のコドン以外で 50、167、240 番目のコドンには薬剤抵抗性に関与する変異が起こることが知られているが、本研究で用いたサンプルの 6 番目のコドン配列に関してはプライマーの結合部位の近くのため、解析できなかった。また得られたシーケンスの質が悪いものの 50、167、240 番目のコドンにおいては薬剤抵抗性に関与する既知の変異は見られなかった。このようなサンプルは培地上の薬剤感受性試験では抵抗性を示し、表現形質では陽性であるものの、検査結果では陰性と判断されてしまう擬陰性となる。防除効果を低下させる薬剤抵抗性系統を見逃すことは、防除計画の設定ミスや、薬剤抵抗性系統の蔓延を引き起こす恐れがあるため、この擬陰性反応をいかに排除するかが課題であると思われる。その後、岐阜大学科学研究基盤センターで実施された培養に基づく薬剤感受性再試験にて上記の Wo17 と Wo23 はチオファネートメチル 100 ppm 含有 PDA 培地で生育できず、またシーケンス解析の結果から  $\beta$  チューブリン遺伝子に薬剤抵抗性変異が無いことが確認された。このことから Wo17 と Wo23 はチオファネートメチル剤に対して感受性系統であることが明らかになり、本研究で行われた LAMP-FLP 法およびシーケンス解析の結果を支持している。従って、本研究で実施された LAMP-FLP 法による試験結果と培養に基づく薬剤感受性試験の結果は一致した。本研究の結果から、一つのプライマー・プローブセットによる LAMP-FLP 法で異なる 2 つの抵抗性変異を迅速かつ同時に検出できることが示された。本研究で用いたプローブは  $\beta 2$  チューブリン遺伝子の 198、200 番目の抵抗性変異の位置に設計されていることから、E198V 抵抗性系統の検出も同様に可能であると考えられる。

また今回 LAMP-FLP 法に用いた機器は前のセクションの条件検討では LAMP 法用測定装置 LF-8 (ニッポン・ジーン、東京)を用いたが、今回の試験で用いたのは LF-8 の改良版である LAMP 法用測定装置 LF-8 plus (ニッポン・ジーン)を用いた。LF-8 plus では LF-8 と同じ条件で試験を行った場合、計測データのグラフで計測の精度が高くなり計測頻度が増加したことによる多数のピークが発生する。実際に会合曲線分析にかかる時間が従来の機器に比べ 15 分から 20 分程度長くなっていた。このため LF-8 では 2 秒毎に計測データのサンプリングを行っていたが、LF-8 plus では 5 秒毎にデータをサ

ンプリングするように変更した。これにより、非特異的なピークの発生を抑えることが可能になった。この変更によってサンプリングデータの高温、低温側が少し削られるが、消光ピーク温度の検出範囲からはずれていることから結果への影響はないと考えている。また自動ピーク検出の温度範囲は LAMP-FLP の予備試験結果より、感受性系統配列のピーク温度検出範囲を 56–62°C、抵抗性変異検出の温度範囲を 48–56°C に設定した。さらに検出ピークの閾値は予備試験の結果などから感受性系統を濁度で -2000、抵抗性変異ピークを -1000 に設定した。これらの設定変更により感受性系統と抵抗性系統の自動検出・識別を安定させることができた。

本研究でイネばか苗病菌における分子生物学的手法に基づいたベンズイミダゾール系薬剤抵抗性系統検出法の検討は初めて行われた。本研究で検討された LAMP-FLP 法は *F. fujikuroi* の  $\beta 2$  チューブリン遺伝子を迅速に増幅し、さらに現在知られているベンズイミダゾール系薬剤抵抗性変異 (E198K や F200Y) の特異的検出が可能であることが示された。今後は本手法をより現場で使える技術とするための試験方法を検討することが重要である。本研究では菌株から抽出した DNA で LAMP-FLP の試験を行ったが、病原菌の分離、培養、DNA 抽出といった作業が必要になるため非常に手間がかかる。いくつかの研究はイネ馬鹿苗病菌 *F. fujikuroi* をイネの籾や植物体からの分子生物学的手法による検出を検討してきた (Amatulli et al.2012; 藤 2013)。また Komura ら (2017) は赤かび病に罹病したコムギ穂に形成された病原菌のスポロドキアから調製した分生子懸濁液を用いた薬剤感受性検定を行っている。今後、イネの籾を直接利用した LAMP-FLP 法による薬剤感受性試験が可能になれば、収穫した稲籾を用いた迅速なモニタリング調査が可能になり、効果的な防除計画の素早い構築が期待できると思われる。

第2章 図・表

表1：LAMP 予備試験に用いたサンプルと結果

MUCC	菌株	生物検定	抵抗性変異	LAMP-FLP	
				感受性ピーク (56-62°C)	抵抗性ピーク (48-56°C)
2367	Gfc1524502TMS	感受性系統	なし	56.78	-
2368	Gfc0825009TMS	感受性系統	なし	56.78	-
2369	Gfc1524101TMR	抵抗性系統	E198K	-	48.41
2370	Gfc1524102ReTMR	抵抗性系統	E198K	61.78	48.56
2371	Gfc1524502ReTMR	抵抗性系統	E198K	-	49.1
2372	Gfc0801001TMR	抵抗性系統	F200Y	-	52.16
2373	Gfc1521033TMR	抵抗性系統	F200Y	-	51.11
-	滅菌水	-	-	-	-

生物検定はチオファネートメチル 100ppm 含有 PDA 培地上の薬剤感受性試験で判定  
抵抗性変異は  $\beta 2$  チューブリン遺伝子のシーケンス解析により同定

表 2 : LAMP-FLP 法の実用化試験に用いたサンプルとその結果

サンプル	チオファネート メチル感受性	Working No.	LAMP-FLP	
			感受性ピーク (56-62°C)	抵抗性ピーク (48-56°C)
MAFF235949	S	1	○	
Gfc0801001	R(F200Y)	2		●
Gfc0801002	R	3		●
Gfc0801003	R	4		●
MYG92-10	R	5		●
SMN86-2	R	6		●
MIE92-4	R	7		●
Gfc9424702	R	8		●
Gfc9424703	R	9		●
Gfc9424707	R	10		●
Gfc0625001	R	11		●
Gfc0625002	R	12		●
Gfc0625004	R	13		●
Gfc0625005	R	14		●
Gfc0625006	R	15		●
Gfc0625007	R	16		●
Gfc0625008	R→S	17	○	
Gfc0625010	R	18		●
Gfc0925005	R	19		●
Gfc0925010	R	20		●
Gfc0925011	R	21		●
Gfc0925012	R	22		●
APF06083	R→S	23	○	
Gfc8707123	R	24		●
Gfc8707182	R	25		●
Gfc8707117	R	26		●
Gfc8707249	S	27	○	
Gfc8707642	R	28		●
Gfc0825001	R	29		●
Gfc0825002	R	30		●
Gfc0825003	R	31		●
Gfc0825004	R	32		●
Gfc0825005	R	33		●
Gfc0825006	R	34		●
Gfc0901002	R	35		●
Gfc0901005	R	36		●
Gfc0901009	R	37	○	●
Gfc1004001	R	38		●
Gfc1004002	R	39		●
Gfc1034001	R	40		●
GL24	S	41	○	
GL25	S	42	○	
GL27	S	43	○	
GL28	R	44		●

表 2 の続き

MAFF235463	S	45	○
Gfc1004003	S	46	○
Gfc1006001	S	47	○
Gfc1006002	S	48	○
Gfc1006007	S	49	○
Gfc1019001	S	50	○
Gfc1019003	S	51	○
Gfc1019004	S	52	○
Gfc1016022	S	53	○
Gfc1016024	S	54	○
Gfc1016025	S	55	○
Gfc1016026	S	56	○
Gfc0821004	S	57	○
Gfc0921001	S	58	○
Gfc0921002	S	59	○
Gfc0921009	S	60	○
Gfc0921014	S	61	○
Gfc0921034	S	62	○
Gfc0921039	S	63	○
Gfc0921040	S	64	○
Gfc0921041	S	65	○
Gfc1025029	S	66	○
Gfc1025037	S	67	○
Gfc1025091	S	68	○
Gfc1034002	S	69	○
Gfc1041003	S	70	○
Gfc1041010	S	71	○
Gfc1041011	S	72	○
Gfc1043032	S	73	○
Gfc1043035	S	74	○
Gfc1043037	S	75	○
Gfc1043045	S	76	○
Gfc1043046	S	77	○
Gfc1043047	S	78	○
Mo78	S	79	○
Mo80	S	80	○
Mo141	S	81	○
Mo136	S	82	○
Mo309	S	83	○
IBR89-1	S	84	○
Gfc0825007	S	85	○
Gfc0825009	S(TMS)	86	○
Gfc0825011	S	87	○
Gfc0009063	S	88	○
Gfc0009105	S	89	○
Gfc0009110	S	90	○
Gfc0009117	S	91	○
41-79	S	92	○
41-84	S	93	○
41-116	S	94	○
41-108	S	95	○
Gfc1524102ReTMR	R(E198K)	-	●

生物検定はチオファネートメチル 100ppm 含有 PDA 培地上の薬剤感受性試験で判定  
 S: 感受性、R: 抵抗性、Gfc0625008(Wo17)と APF06083(Wo23)は生物検定の結果が途中  
 で修正され、R→S となった。

表 3 : LAMP-FLP 法に用いたプライマー・プローブセット

プライマー・プローブ	ラベル	遺伝子領域	プライマー・プローブ配列(5'-3')	ターゲット変異	引用
FIPプライマー	ID17	$\beta$ 2チユ-ブリン	TCTCGTAAATGTCGTACAAAGCCGTCGAACCTTACAACGCC		(未発表)
BIPプライマー	ID17	$\beta$ 2チユ-ブリン	AGACCCCTGAAGATCGCTGATCCAGGCCATAACTGTCGAGAT		(未発表)
F3プライマー	ID17	$\beta$ 2チユ-ブリン	TCGCCCAAGGTTTCTGAT		(未発表)
B3プライマー	ID17	$\beta$ 2チユ-ブリン	TCGGAAACA TGTCGTCAC	E198K & F200Y	(未発表)
蛍光標識上流側ループプライマー	ID17	$\beta$ 2チユ-ブリン	TTCTCGACAAAGCTGGTTCAATGACA		(未発表)
下流側ループプライマー	ID17	$\beta$ 2チユ-ブリン	TTCTTATGCCGATCTTAACCTACCTG		(未発表)
消光プローブ	ID17	$\beta$ 2チユ-ブリン	GATACAGaAGGTCtATCGGA		(未発表)

表 4 : PCR 及びシークエンズ反応に用いたプライマー

プライマー	遺伝子領域	プライマー配列(5'-3')	引用文献
$\beta$ 2F	$\beta$ 2チユ-ブリン	TGCTGATACTCGCTGACC	Chen et al., 2014
$\beta$ 2R	$\beta$ 2チユ-ブリン	TTCTGCTTTGAGGGACAT	Chen et al., 2014

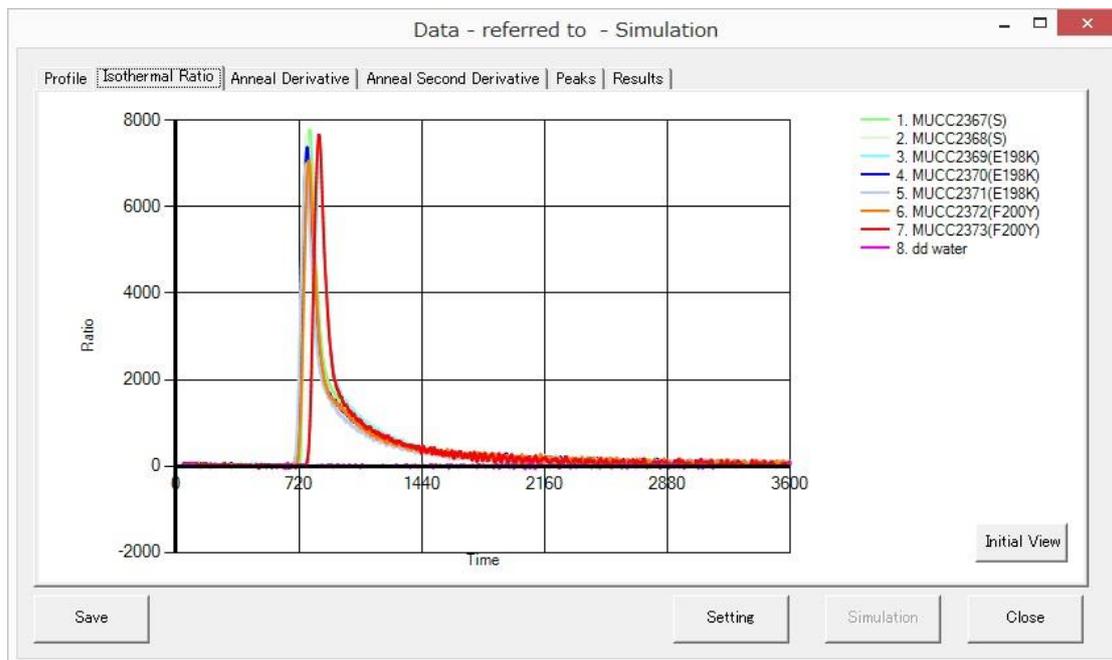


図 1 : LAMP-FLP 法による予備試験(DNA 増幅)

縦軸 ; 濁度の測定、横軸 ; 反応時間

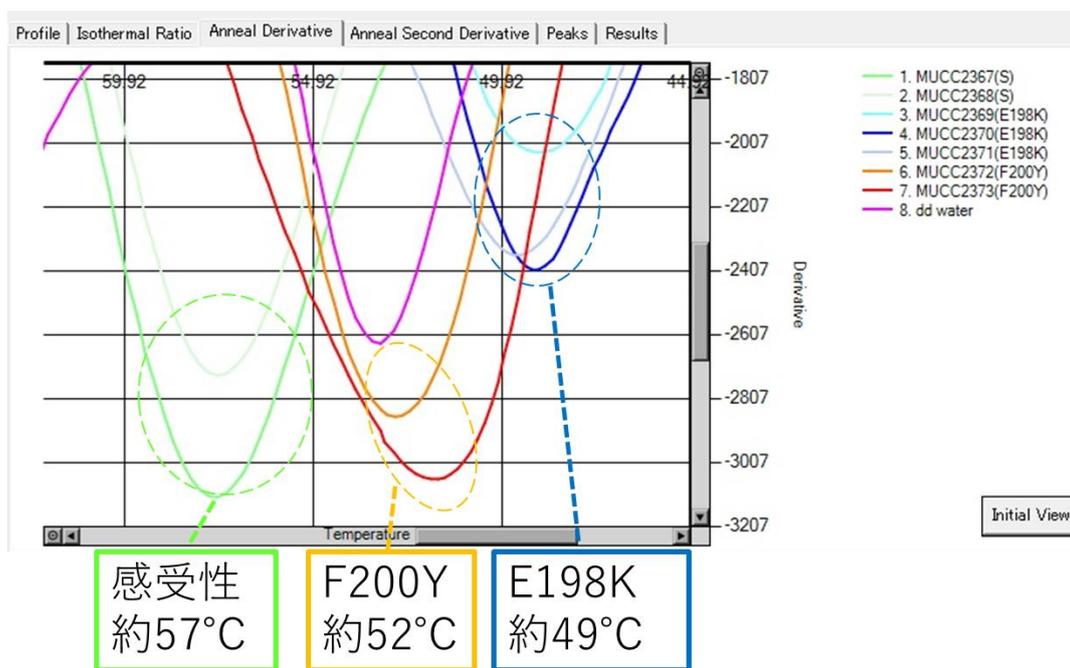


図 2 : LAMP-FLP 法による予備試験(会合曲線分析)

縦軸 ; 蛍光値の一次微分、横軸 ; 反応温度

## 引用文献

Amatulli MT, Spadaro D, Gullino ML, Garibaldi A, (2012). Conventional and real-time PCR for the identification of *Fusarium fujikuroi* and *Fusarium proliferatum* from diseased rice tissues and seeds. *Eur J Plant Pathol* 134: 401–408.

Chen ZH, Gao T, Liang SP, Liu KX, Zhou MG, Chen CJ, (2014). Molecular mechanism of resistance of *Fusarium fujikuroi* to benzimidazole fungicides. *FEMS Microbiology Letters* 357: 77–84.

FAOSTAT, (2016). <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RF>.

Fujimura M, Oeda K, Inoue H, Kato T, (1992). A single amino-acid substitution in the beta-tubulin gene of *Neurospora* confers both carbendazim resistance and diethofencarb sensitivity. *Current Genetics* 21: 399–404.

Gafur A., Tanaka C, Shimizu K, Ouchi S, Tsuda M, (1998). Molecular analysis and characterization of the *Cochliobolus heterostrophus* beta-tubulin gene and its possible role in conferring resistance to benomyl. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44: 217–223.

原田守, (2007). 平成 18 年度 日本各地で発生したトマトすすかび病に関する研究.

藤普一, (2013). 化学農薬を用いない水稻種子消毒法の普及による諸問題とその対策, *植物防疫*, 第 67 卷 第 4 号: 223–227

藤普一, (2018). イネばか苗病の発生生態と防除, *植物防疫* 第 72 卷 第 4 号: 254–258

星川清親, (1985). 新編 食用作物. 養賢堂. P19–27

堀正太郎, (1898). 稲の馬鹿苗試験. *農事試報告* 12: 278–282

伊藤誠哉・木村甚弥, (1931). イネ馬鹿苗病に関する研究. *北海道農事試報* 27 : 1–94.

北村義男, 保積隆夫, 田中徳己, (1982). ベノミル剤耐性イネ馬鹿苗病菌の出現. *日植病報*. 56: 134(講演要旨).

Komura R, Kawakami T, Nakajima K, Suzuki H, Nakashima C, (2017). Simultaneous detection of benzimidazole-resistant strains of *Fusarium* head blight using the loop-mediated isothermal amplification-fluorescent loop primer method. *Journal of General Plant Pathology* , Volume 84, Issue 4: 247–253.

Kumar S, Stecher G, Tamura K, (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870–1874.

黒沢英一, (1926). 稲馬鹿苗病菌の分泌物に関する実験的研究 (予報). 台湾博物学会報 16(87): 213–227.

Ma Z, Yoshimura M, Michailides TJ, (2003). Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California. *Appl. Environ. Microbiol.*69: 7145–7152.

McKay GJ, Egan D, Morris E, Brown AE, (1998). Identification of benzimidazole resistance in *Cladobotryum dendroides* using a PCR-based method. *Mycol. Res.* 102: 671–676.

Maymon M, Zveibil A, Pivonia S, Minz D, Freeman S, (2006). Identification and characterization of benomyl-resistant and -sensitive populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from statice (*Limonium* spp.). *Phytopathology* 96: 542–548.

内閣府食品安全委員会, (2017).特集フモニシンについて. 食品安全 52 号: 2

Nirenberg H, and O'Donnell K, (1998). New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella jiljikuroides* species complex. *Mycologia* 90: 434–458.

農林水産省大臣官房統計部, (2018). 農林水産統計 平成 30 年産水陸稲の収穫量.

農林水産省大臣官房政策課食料安全保障室, (2018). 平成 29 年度食料需給表.

農林水産省, (2015). 食料・農業・農村基本計画.

O'Donnell K., Cigelnik E, and Nirenberg HI, (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90: 465–493.

小川勝美, 諏訪正義, (1981). 岩手県に分布するイネ馬鹿苗病菌のベノミル感受性について. 北日本病中研報 32: 160(講演要旨).

佐々木次雄, (1987). イネばか苗病の発生生態と防除に関する研究. 東北農業試験場研究報告 74: 1-47.

沢田兼吉, (1912). 本島農作物の病害. 台湾農事報 63: 100.

沢田兼吉・黒沢英一, (1924). 稲馬鹿苗病予防に就いて(予報)、台湾総督府中央研究所農業部集報 21 : 1–19.

Suga H, Kitajima M, Nagumo R et al., (2014). A single nucleotide polymorphism in the translation elongation factor 1a gene correlates with the ability to produce fumonisin in Japanese *Fusarium fujikuroi*. *Fungal Biol* 118: 402– 412.

須賀晴久, 川畑文子, 清水将文, 景山幸二, (2017). イネばか苗病菌 *Fusarium fujikuroi* のチオファネートメチル耐性と  $\beta 2$  チューブリン遺伝子の変異. 日本植物病理学会関西部会.

Steenkamp ET, Wingfield BD, Coutinho TA, Wingfield MJ, Marasas WF, (1999). Differentiation of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* by histone gene sequence data. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3401–3406.

田辺憲太郎, (2013). 殺菌剤の耐性菌発生リスク評価. 農薬時代 195号: 18–24.

渡部茂, (1985). イネ馬鹿苗病の発生生態並びにその防除技術の改善に関する研究, 岩手県立農業試験場研究報告 25号: 1–73.

藪田貞治郎, (1935). 稲の馬鹿苗病菌の生化学. 農及園 9: 2145–2152.

Yarden O, Katan T, (1993). Mutation leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 83: 1478–1483.

Yang J, Pan Y, Zhu G, Zhou Y, (2004). The resistance mechanisms of *Sclerotinia sclerotiorum* to carbendazim and diethofencarb Acta Phytophyl. Sin., 31: 74–78.

### 第3章 フィリピンのバナナ分離菌株の分子系統による種同定及び LAMP-FLP 法によるバナナ新パナマ病菌の特異的検出の検討

#### 第1節 緒言

バナナ (banana; *Musa* spp.)はバショウ科バショウ属の多年生草本でありマレー半島を中心とした東南アジアが起源とされている (岩佐 1984)。農作物の中でも栽培の歴史は古く、紀元前 5 千年前には栽培化されていたとされる (岩佐 1984)。現在のバナナ品種はマレー半島を起源とする 2 倍体の野生バナナ (*Musa acminata* Colla)から単為結果性及び雄性、雌性不稔性を得たものがインドやフィリピンの野生種 (*Musa balbisiana* Colla)と交雑した品種、あるいはその過程で発生した 3 倍体の品種である。バナナは多くの生産国で主食として食され、また他国への輸出による収入源として重要な作物である (Dita et al. 2010)。統計によれば世界全体のバナナの生産量は約 1.13 億トンであり、フィリピンの生産量は約 580 万トンで 6 位である。また世界全体のバナナ輸出量は約 2 千万トン (輸出額約 1 兆円)でフィリピンの輸出量は約 140 万トンで 5 位 (輸出額は 6 位)である (FAOSTAT 2016)。日本は海外から約 96 万トンのバナナを輸入していて、国別で見ると、フィリピン、エクアドル、台湾の順に輸入量が多い。このうちフィリピンからの輸入量が約 75 万トンであり、全体の 8 割を占めている (財務省貿易統計(輸入) 2016)。このようにバナナは南米、アフリカ、そしてアジア地域の様々な農業基幹経済にとって重要な輸出品目であり、国際貿易において 5 番目に重要な作物であるとされる (Aurore et al. 2009)。

パナマ病は糸状菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) によって引き起こされるバナナの重要病害である (Stover 1962; Ploetz 2006)。本病害は典型的な導管病害で、バナナの株を萎凋させる。発病初期は古い葉で黄化や萎凋症状が見られ、症状は若い葉にも進行し最終的に株全体が枯死する。植物体内部では根茎の退色や、偽茎の導管のネクロシスが見られる (Dita et al. 2010)。Foc は厚膜胞子を作り、宿主が存在しなくても土壤中に残存し (Lucas et al. 1998; Dita et al. 2010)、他の土壌病害と同じく土壌中から Foc を完全に除去することは困難である。このため一度 Foc で土壌が汚染されると、その地域では長期間、感受性バナナ品種を栽培することができなくなる (Stover 1962, 1990)。Foc には品種によって病原性が異なる 4 つのレースが存在している。レース 1 は 'Gros Michel' や、'Lady Finger'、'Apple' のような AAB (異質 3 倍体)ゲノムを持つバナナ品種に病気を引き起こす。このレース 1 は 1950 年代に猛威を振るい、世界中のバナナ産地で当時の主力品種 'Gros Michel' に大きな被害をもたらし、パナマ病抵抗性品種である 'Cavendish' にとって変わられた。レース 2 は 'Bluggoe' のような ABB ゲノムを持つバナナ品種に病気を引き起こし、またレース 3 はバナナ品種に病気を引き起こさないことから、病原体として認識されていない。レース 4 は AAA ゲノム

を持つ ‘Cavendish’ に病原性を有し、レース 1, レース 2 の感受性品種にも病気を引き起こす。このレース 4 は ST4 (Subtropical race 4) と TR4 (tropical race 4) に分かれ、ST4 は低温条件下など植物体に環境ストレスがかかりやすい条件下でのみパナマ病を引き起こす。一方、TR4 は環境条件に関わらず病気を引き起こすことから、世界で問題になっている (柏・有江 2014)。

この Foc TR4 によるパナマ病は新パナマ病とも呼ばれ、台湾における最初の報告から 20 年あまりで、分布域が急速に広がり、近年では中国、インドネシア、フィリピン、マレーシア、台湾、オーストラリア (Ploetz 2006a, 2006b; Ploetz et al. 2015b)、モザンビーク (Butler 2013)、オマーン (Ordonez et al. 2015a)、イスラエル (Maymon et al. 2018)、ミャンマー (Zheng et al. 2018)、ベトナム (Hung et al. 2018)、ラオス (Chittarath et al. 2018)、ヨルダン (García-Bastidas et al. 2014)、パキスタン、レバノン (Ordonez et al. 2015b) など発生が報告されている。現時点で効果的な対策はなく (Ploetz et al. 2015)、TR4 罹病植物および汚染土壌の診断、根絶、隔離による移動制限によって Foc TR4 の分布拡大を防いでいる (Dita et al., 2010; 柏・有江 2014)。Foc には少なくとも 24 の VCG (菌糸和合群) が存在しており、Foc TR4 は VCG01213(01216) で表される (Puhalla 1985; Ordonez et al. 2015a)。 *Fusarium oxysporum* の特定の種を宿主とする分化型 (*formae specialis*; f. sp.) や品種によって病原性が異なるレースは形態的特徴からの同定は困難であり、宿主植物への接種による病原性試験が必要である (Lieven et al. 2008)。このため、TR4 の診断はバナナ植物体 (AAA ‘Cavendish’) への接種試験と硝酸塩利用欠損菌株 (Nit 変異菌株) による VCG 試験によって行われているが、これらの試験には非常に大きな手間や時間がかかる (Puhalla 1985; Dita et al. 2010)。

Dita ら(2010)は rDNA 遺伝子間領域塩基配列 (rDNA-IGS) を用いて Foc VCG01213 を特異的プライマーを用いて検出する方法を開発した。また IGS 領域を利用したリアルタイム PCR や、リアルタイム LAMP (RealAmp) 法に基づいた VCG01213 特異的検出法が開発されてきた (Lin et al. 2013, Zhang et al. 2013)。一方、PCR 法は電気泳動のような作業や、リアルタイム PCR やリアルタイム LAMP 法では、高価な機器が必要になるため、熱帯地域を主とする生産現場に導入・普及させることは難しい。そこで一塩基置換を検出できる LAMP-FLP 法を用いて、サンプルの VCG を特定し Foc TR4 を判別する手法の開発に取り組んだ。本研究によって、世界中のバナナ生産に大きな被害を与える新パナマ病の迅速かつ簡易な診断が可能となり、これによる栽培計画の構築を容易にし、バナナの栽培安定化に寄与することを目的とする。

## 第2節 材料と方法

### 第1項 供試菌株

フィリピンのバナナ園でパナマ病の症状と疑われるバナナ植物体（品種キャベンデイッシュ）から分離された菌株 19 株を試験管にて輸入した（表 1）。輸入した菌株には MUCC 番号が付与され、菌株および抽出 DNA の管理に用いられた。輸入菌株はクリーンベンチ（三洋電機）内にて火焰滅菌した針を用いて直径 9cm の SNA 培地（Nirenberg 1976）に移殖、インキュベータ内にて 3 日間 25°C 暗黒条件下で培養し、以後の試験に供した。培養後、クリーンベンチ内でオートクレーブ滅菌したストローで培地を菌糸体ディスクを 5 枚打ち抜き、10%グリセロール溶液の入ったセラムチューブに移した。チューブは-80°Cで保存された。またそれぞれを PDA 培地に移し、インキュベータ内にて 3 日間 25°C 暗黒下、3 日間培養した。この PDA 培地上の菌株は次の DNA 抽出に用いられた。

### 第2項 DNA 抽出

DNA 抽出は DNeasy® UltraClean® Microbial Kit (QIAGEN, Netherlands)を用いて、取扱説明書に従って行い、DNA 抽出液は、チューブのふたに MUCC 番号を書いたシールを貼り、-20°Cで保存した。

### 第3項 ヒストン H3 塩基配列を用いた系統解析

フィリピンのバナナ分離菌株の分類学的位置を調べるためにヒストン H3 遺伝子領域を用いて分子系統解析を行った。PCR 反応及びシーケンス反応は表 1 に示した菌株を用いて、第 1 章の第 2 節第 4 項と同様に行い、DNA 塩基配列を取得した。取得した塩基配列は MEGA7.0 (Tamura et al. 2016) や Bioedit v.7.2.5 を用いてアセンブルして塩基配列を完成させた。NIH/NCBI の Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn:[https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome))で類似塩基配列を検索して、目的とする DNA 配列が得られているか確認した。

系統解析は MEGA7.0 (Tamura et al. 2016)を用いて、最大節約系統樹を作成した。供試菌株の塩基配列データに農業生物資源ジーンバンク (Genbank Project, NARO)([https://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro\\_approved.php#fusarium.](https://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_approved.php#fusarium.))から得た *Fusarium* 属菌のヒストン H3 塩基配列データ(表 2)を加え、MAFFT version 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>)を用いてアライメントを行った。

さらに *F. subglutinans* strain MRC6525(AF150860.1)と MRC6524(AF150861.1)とマレーシア産の Foc TR4 のヒストン H3 塩基配列データもデータセットに加えた(表 7)。塩基配列内のギャップは第 5 塩基として扱った。最大節約法に基づいたステップ数が一番少ない系統樹は発見的探索法で選ばれた。樹形の探索は SPR (Subtree-Pruning-Regrafting) 条件下で初期系統樹を 10 与え、MP search level は 3 に設定して行われた。ブートストラップ法は 500 回繰り返され、枝の信頼度を評価した。また一致指数 (CI)、保持指数 (RI)、修正一致指数 (RC)を求め、系統樹の信頼性を評価した。

#### 第 4 項 IGS 領域の PCR とシーケンス

Foc の VCG を判定するためには窒素利用能変異株や対照株を用いた対峙培養が必要である。しかしながら、これらの株の入手は困難であることから、公開されているこれらの対照株の判別が可能な核 DNA IGS 領域塩基配列による VCG の推定を行った。PCR 反応は表 1 に示した菌株を用いて行った。プライマーペア iNL11 と iCNS1 は IGS (intergenic spacer)領域遺伝子を増幅するために用いられた(O'Donnell et al. 2009; Dita et al. 2010)(表 2)。PCR 反応液は 10-50 ng DNA 1 $\mu$ l、ddH<sub>2</sub>O 8.20 $\mu$ l、50mM MgCl<sub>2</sub> (Bioline) 0.38 $\mu$ l、1x 反応バッファー (Bioline) 1.25 $\mu$ l、1mM dNTPs (Bioline)、上流側プライマー10 $\mu$ M iNL11、下流側プライマー 10 $\mu$ M iCNS1、Biotaq (Bioline) 5 unit/ $\mu$ L 0.06 $\mu$ l の計 12.5 $\mu$ l を入れ、混合した。混合液をスピンドウンして PCR チューブの底に集め、サーマルサイクラー (T100, Bio-Rad, US)にセットして PCR 反応を行った。PCR 反応は 95 $^{\circ}$ Cで 5 分の初期乖離反応後、95 $^{\circ}$ Cで 60 秒の乖離反応、62 $^{\circ}$ Cで 60 秒のアニーリング反応、72 $^{\circ}$ Cで 3 分の伸長反応を 30 サイクル、最後に 72 $^{\circ}$ Cで 10 分間の最終伸長反応を行った。PCR 反応終了後、DNA 増幅を確認するため、前のセクションと同様に電気泳動を行いゲルを観察した。シーケンス反応は上記のプライマーペアにプライマー NLa と CNSa を加え(O'Donnell et al. 2009; Dita et al. 2010)、DNA 増幅を確認した PCR 産物を用いて、第 1 章の第 2 節、第 4 項と同様に行い、塩基配列を取得した。取得した配列は MEGA7.0( Tamura et al. 2016) や遺伝子解析ソフトウェア Bioedit v.7.2.5(<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>)を用いてアセンブルを行い、塩基配列を完成させた。NIH/NCBI の Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn:[https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome))で類似塩基配列を検索して、目的とする DNA 配列が得られているか確認した。確認された配列は前述と同様にマレーシア産菌株の IGS 領域塩基配列データ(表 7)とジーンバンクから得られた Foc の IGS 塩基配列データ(表 4)とともに MEGA7.0 でアライメントを行い、Dita ら(2010)で報告された Foc TR4 特異的 SNP の有無を確認した。また得られた IGS 塩基配列データから上記の第 3 項と同様に最大節約系統樹を作成し、供試菌株の VCG を推定した。系統樹作成に用い

た IGS 領域データセットは表 5 に示した。

#### 第 5 項 Foc VCG01213 の分子生物学的手法に基づいた同定

供試菌株の中に Foc VCG01213 が存在するかどうか調べるために、Dita ら(2010)が開発した Foc VCG01213 特異的検出法を行った。PCR 反応は表 1 に示した菌株を用いて行った。Foc VCG01213 特異的プライマーペア Foc TR4-F と Foc TR4-R は IGS (intergenic spacer) 領域遺伝子のうち、Foc VCG01213 の特異的配列を増幅するために用いた(Dita et al. 2010)(表 2)。PCR 反応液は 10-50 ng DNA 1 $\mu$ l、ddH<sub>2</sub>O 8.20 $\mu$ l、50mM MgCl<sub>2</sub> (Bioline, London, UK) 0.38 $\mu$ l、1x 反応バッファー (Bioline) 1.25 $\mu$ l、1mM dNTPs (Bioline)、上流側プライマー 10 $\mu$ M Foc TR4-F、下流側プライマー 10 $\mu$ M Foc TR4-R、Biotaq (Bioline) 5 unit/ $\mu$ L 0.06 $\mu$ l の計 12.5 $\mu$ l とした。混合液をスピンドウンして PCR チューブの底に集め、サーマルサイクラー (T100, Bio-Rad, US) にセットして PCR 反応を行った。PCR 反応は 95°C で 5 分の初期乖離反応後、95°C で 60 秒の乖離反応、60°C で 60 秒のアニーリング反応、72°C で 3 分の伸長反応を 30 サイクル、最後に 72°C で 10 分間の最終伸長反応を行った。PCR 反応終了後、DNA 増幅を確認するため、PCR 反応液 2 $\mu$ l に対し、GelRed (Biotium, Inc., US) 2 $\mu$ l を加えた計 4 $\mu$ l を 1.2%TAE アガロースゲル中の各ウェルにアプライし、同様に 100bp ラダーマーカー (New England Biolab, Beverly, MA) 2 $\mu$ l に対し、GelRed 2 $\mu$ l を加えた計 4 $\mu$ l を泳動の距離の把握のために PCR 反応液と同時に 100V、30 分間電気泳動を行った。泳動後のアガロースゲルは、ゲル撮影装置 FAS-V (日本ジェネティクス株式会社, 東京) にて LED ライト下で可視化し、撮影した。

#### 第 6 項 LAMP-FLP 法による Foc TR4(VCG01213)の特異的検出の検討

本研究で設計された LAMP-FLP 法用のプライマー・プローブセットを評価するため、フィリピン産 19 菌株とマレーシア産 15 菌株の DNA 抽出液を用いて LAMP-FLP 法を用いた実験を行った。LAMP 反応試薬は 10 $\times$ 反応バッファー (ニッポン・ジーン)、25mM dNTPs (ニッポン・ジーン)、1.6  $\mu$ M ID65 FIP プライマーと ID65 BIP プライマー (表 2; 図 6)、0.2  $\mu$ M の ID65 F3 プライマーと ID65 B3 プライマー (表 2; 図 6)、0.8  $\mu$ M ID65 LF90 下流側ループプライマー (表 2; 図 6)、0.2  $\mu$ M の ID65 FLB(上流側蛍光標識ループプライマー) 1 または FLB 2(表 2; 図 6)、0.5  $\mu$ M の ID65 Probe Dabcyl 1 (消光プローブ)または Probe Dabcyl 2(表 2; 図 6)、1 $\mu$ l 増幅酵素、そして希釈した PCR 産物 4 $\mu$ l の計 25 $\mu$ l を入れ、調合した。本試験で用いた消光プローブは Foc TR4 の配列にフルマッチで設計されている(表 5; 図 6)。混合液をスピンドウンしてチューブの底に集め、LAMP 法用測定装置 LF-8 (ニッポン・ジーン) にセットして、

LAMP 反応を行った。滅菌水はネガティブコントロールとして用いられた。LAMP 反応は 66℃で 25 分間行われ、その後、消光プローブによる会合曲線分析による抵抗性変異の有無の判定を行った。

### 第3節 結果

#### 第1項 ヒストン H3 塩基配列を用いた分子系統解析

供試菌株 19 菌株から得られたヒストン H3 塩基配列データをデータベース上で検索したところ 14 菌株で *Fusarium oxysporum* strain R1(KJ866871.1)、4 菌株で *Fusarium subglutinans* MRC6525(AF150860.1)がヒットした。残りの 1 菌株ではヒストン H3 塩基配列が得られなかった。またこれらの塩基配列とデータベース上の *Fusarium oxysporum* 種複合体種のヒストン H3 塩基配列データを用いて最大節約系統樹を作成した結果、14 菌株が *Fusarium oxysporum* とクレードを形成した(図 1)。また、それ以外の 4 菌株は *Fusarium subglutinans* と *Fusarium sacchari* とクレードを形成した(図 1)。またマレーシア産 15 菌株のうち、12 菌株が *F. oxysporum* と 2 菌株が *F. asiaticum* とクレードを形成した(表 7; 図 1)。

#### 第2項 IGS 領域の系統解析及び TR4 特異的 PCR の結果

ヒストン H3 塩基配列に基づく系統関係から *F. oxysporum* と推定された 14 菌株にて IGS 領域のシーケンス反応を行い、DNA 塩基配列を取得した。シーケンス解析の結果からすべての菌株で Dita ら (2010) で報告された Foc VCG01213 特異的 SNP が確認された(図 3)。また IGS 塩基配列に基づく系統解析から、これらの菌株はすべて VCG01213 の菌株とクレードを形成した(図 4)。またこれらの菌株にて Dita ら (2010) で開発された Foc TR4 (VCG01213) 特異的 PCR を行った結果、14 菌株で Foc VCG01213 に特有の長さ約 463bp の DNA バンドが確認された(図 5)。マレーシア産 15 菌株では、IGS 領域塩基配列が得られなかった 2 菌株を除く 13 菌株の配列データを系統解析に用いた。その結果、13 菌株で Foc TR4(VCG01213)の菌株とクレードを形成した(図 4)。

#### 第3項 LAMP-FLP の結果

上記のフィリピン産 19 菌株及び 15 菌株にて LAMP-FLP 法による Foc TR4 特異的検出を行った結果、プライマーセット①(表 6)を用いた結果ではヒストン H3 及び IGS 領域の塩基配列に基づく系統関係から Foc TR4(VCG01213)と示唆されたフィリピン産 14 菌株で平均 57.1°C (最低 56–最高 58.6°C) の消光温度ピークを検出し、これは想定された消光ピーク温度に一致した(図 6)。またマレーシア産の 15 菌株でも同様に平均 57.9°C(56.6–59.9°C)の消光温度ピークを検出した。したがって、フィリピン産 14 菌株とマレーシア産 15 菌株で Foc TR4(VCG01213)フルマッチ配列を検出した。一方で、*F. sacchari* と推定されたフィリピン産 4 菌株ではターゲットは DNA は増幅されな

った(図 6)。プライマーセット②を用いた結果、プライマーセット①と同様に VCG01213 と示唆されたフィリピン産 14 菌株とマレーシア産 15 菌株でターゲット DNA 配列は増幅された(図 7)。しかし、消光ピーク温度は計測されたもので少なくとも 45°C 以下となり、設計されたプローブの想定された  $T_m$  値よりもかなり低かった(図 7)。

#### 第4節 考察

ヒストン H3 塩基配列に基づく系統解析から *Fusarium oxysporum* とクレードを形成した 14 菌株は *F. oxysporum* であると推定された(表 1; 図 1)。一方で 4 菌株は *Fusarium sacchari* と *Fusarium subglutinans* とクレードを形成した(図 1)。*F. sacchari* はサトウキビしょう頭腐敗病の病原であり (Ploetz 2006; 青木ら 2014)、*F. subglutinans* は海外でトウモロコシの *Fusarium ear rot* の病原の一つとされる (Goertz et al. 2010; 岡部 2015)。どちらも *Fusarium fujikuroi* 種複合体に所属し、その一部の種で独立した交配群(Mating Population; MP)が認識され、*F. sacchari* は MP-B、*F. subglutinans* は MP-E の交配群とされている。先行研究では系統樹上でこの 2 種は異なるクレードに位置することが報告されている (Herron et al. 2015; Sandoval-Denis et al. 2018)。一方で、この 2 種は混同される可能性があり、同定には交配試験や分子マーカーが必要とされる (Ploetz 2006c)。また *F. subglutinans* は分類学的な異動が著しい種の一つであり、保存施設等に預けられている *F. subglutinans* は *F. sacchari* や *F. concentricum* のような別種として再同定される可能性が高いとされる (青木 2009)。本研究のデータセットに加えた *F. subglutinans* MRC6524 と MRC6525 はサトウキビと関連があると記述され、また交配群も MP-B と記述されていることから (Steenkamp et al. 1999)、MRC6524 と MRC6525 は *F. sacchari* であると推定した。従って、この 4 菌株は *F. subglutinans* ではなく *F. sacchari* であることが示唆された。フィリピンではサトウキビの栽培も一般的に行われており (Singh et al. 2004)、本研究で供試した分離菌株を採集した地域でもサトウキビの栽培が行われていたことがある。またフィリピンでは *F. sacchari* の存在も報告されており (Ploetz 2006)、バナナの果実から *F. sacchari* が分離されたという報告もあることから (Tarnowski et al. 2010)、土壌中あるいはバナナ植物体中に内生的に存在していた *F. sacchari* が分離されたのではないかと思われる。

上記の *F. oxysporum* と同定された 14 菌株の IGS 塩基配列のシーケンス解析及び系統解析は 14 菌株全てが *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* の VCG01213 であることを示唆した(図 4)。IGS 塩基配列から得られた系統樹ですべての VCG01213 は一つのクレードを形成し(図 4)、これは先行研究の結果と一致した (Fourie et al. 2009)。さらにこの結果は PCR 法による Foc TR4 特異的検出法 (Dita et al. 2010) の結果を支持した。従って分子系統関係から、この 14 菌株は VCG01213 であると同定され、Foc TR4 であることが示唆された。これらの菌株が Foc TR4 であるかどうかより詳細に調べるために、バナナ品種 ‘Cabendish’ への接種による病原性試験や VCG 試験のような生物検定が必要であると思われる。

Foc TR4 はバナナの起源地とされるマレー半島を中心とした東南アジアが起源であると考えられている (Maryani et al. 2019)。本研究でフィリピン及びマレーシアで発生した新パナマ病菌 Foc TR4 についてヒストン H3 領域の塩基配列を用いた系統解析

は初めて行われた。その結果から、マレーシアとフィリピンの Foc TR4 は単系統であることが示唆された(図 1)。この結果は先行研究と一致した (Maryani et al. 2019)。VCG は多くの分化型でレースの遺伝的関係を反映するといわれており、同一の VCG の菌株は一般的に同一のクローンに属すると考えられている(Kistler 1997; 青木 2014)。IGS 領域の分子系統関係からこれらの菌株は VCG01213 であることが示唆されており、上記の説を支持している。一方で、ヒストン H3 遺伝子領域のみでは種内のより詳細な調査は難しいと思われる。本研究では一つの遺伝子領域のみを用いて解析を行っているが、先行研究では TEF-1 $\alpha$ 、RPB1、RPB2 塩基配列の多遺伝子座結合マトリックスを用いた分子系統解析が行われてきた (Maryani et al. 2019)。Maryani ら(2019)は上記の 3 遺伝子領域の系統関係と、病原性試験の結果から、これまでの多くの研究と同じく Foc TR4 は多系統 (polyphyletic) なレース 1 とは異なり、単系統で種として認識が可能であり、*Fusarium odoratissimum* N. Maryani, L. Lombard, Kema & Crous を提案した。しかし、この単独の系統の中には、先行研究で接種による病原性試験の結果から Foc レース 1 と同定された系統も含まれている。これは、病原性試験の均一性やそのサンプル数が確保されているか疑問な点もあることから、今後、菌株の同定の正確性を含め、さらに検討する必要がある。

本研究で LAMP-FLP 法による Foc TR4 の特異的検出法の検討は初めて行われた。プライマーセット①を用いた結果、消光ピーク温度の結果と想定されたプローブの T<sub>m</sub> 値から前述の Foc TR4 と示唆されたフィリピン産 14 菌株とマレーシア産 15 菌株で Foc TR4(VCG01213)配列が検出された(表 1,7)。一方で *F. sacchari* と同定された菌株ではターゲット DNA は増幅されなかった(図 6)。このことから本研究で行った LAMP-FLP 法で Foc TR4 の検出が可能であることが示唆された。また濁度による DNA 増幅の測定データを見ると、約 20 分程度で DNA のターゲット領域が完全に増幅されていることから (図 6)、培養菌株由来の DNA 抽出溶液を用いた試験では 25–30 分の反応時間で増幅が可能であると思われる。また検出結果を安定させるために、本研究で行った LAMP-FLP 試験の結果のシミュレーションから、データのサンプリングは 5 秒毎に行い、そして自動判定を行うためのピーク検出の温度範囲は LAMP-FLP の結果とプローブの想定された T<sub>m</sub> 値からフルマッチ配列(Foc TR4)のピーク温度検出範囲を 55–61°C、ミスマッチ配列検出の温度範囲を 49–55°Cが適当と判断した。検出ピークの閾値は暫定的にフルマッチ配列とミスマッチ配列ピークを –300 に設定したが、今後、他の VCG 菌株を用いた試験結果によっては修正される可能性もある。一方でプライマーセット②を用いた結果、消光ピーク温度が想定されたプローブの T<sub>m</sub> 値(約 54.9°C)よりかなり低く計測された(図 7)。ターゲット DNA はプライマーセット①と同様に増幅されていることから(図 7)、原因は消光プローブに関連していると思われるが、本研究で明らかにすることはできなかった。Foc TR4(VCG01213)の検出はプライマーセット①のみで十分可能であるが、プライマーセット②は Foc TR4(VCG01213)以外の Foc VCG

菌株も検出できるように設計されている。今後はプライマーセット②をより詳細に検討するため、異なる VCG に属する Foc を用いた試験や測定機器の温度設定を検討することが課題であると考えられた。

本研究で検討した LAMP-FLP 法による特異的検出法は培養菌株から抽出した DNA 溶液を用いた。今後は、菌株の分離や DNA 抽出などの作業の手間を省き、検出をより迅速に実施するため、バナナの茎や葉などのような植物体あるいは Foc TR4 汚染土壌を直接用いた LAMP-FLP 法による Foc TR4(VCG01213)の特異的検出を検討するべきである。

またマレーシア産 15 菌株中 4 菌株で、ヒストン H3 塩基配列及び IGS 塩基配列の系統解析、そして特異的プライマーを用いた PCR そして LAMP-FLP 法の結果は一致しなかった(表 7)。ヒストン H3 配列の系統関係から 2 菌株が *F. asiaticum* と推定されたことから、原因の一つに別種の菌株 DNA によるコンタミネーションが考えられる。また一部の菌株にて PCR 反応による増幅が見られなかったことから、実験操作あるいは抽出 DNA の濃度も原因と考えられた。しかしこの 15 菌株はプライマーセット①を用いた LAMP-FLP 法において VCG01213 が検出された。これは LAMP-FLP 法の検出感度や特異性が非常に高く、抽出 DNA の濃度やコンタミネーションの影響を受けなかったことが要因と思われた。

本研究結果が今後の Foc TR4 に関わる研究及びバナナ生産地での新パナマ病防除に役立つことを期待する。

第3章 図・表

表1 フィリピンのパナマ病罹病バナナ 'Cabendish' からの分離菌株リスト

MUCC <sup>c</sup>	株名	採集年月日	Foc TR4特異的PCR	系統解析(IGS) <sup>a</sup>	系統解析(ヒストンH3) <sup>b</sup>	LAMP-FLP <sup>d</sup>
2700	NE-001	2018/11/19	-	-	<i>Fusarium sacchari</i>	-
2701	NE-002	2018/11/19	-	-	<i>Fusarium sacchari</i>	-
2702	NE-003	2018/11/19	-	-	配列を取得できなかった	-
2703	NE-004	2018/11/19	-	-	<i>Fusarium sacchari</i>	-
2704	NE-005	2018/11/19	-	-	<i>Fusarium sacchari</i>	-
2705	DV-006	2018/12/20	VCG01213	VCG01213	<i>Fusarium oxysporum</i>	VCG01213
2706	DV-007	2018/12/20	VCG01213	VCG01213	<i>Fusarium oxysporum</i>	VCG01213
2707	DV-008	2018/12/20	VCG01213	VCG01213	<i>Fusarium oxysporum</i>	VCG01213
2708	DV-009	2018/12/20	VCG01213	VCG01213	<i>Fusarium oxysporum</i>	VCG01213
2709	DV-010	2018/12/20	VCG01213	VCG01213	<i>Fusarium oxysporum</i>	VCG01213
2710	DV-011	2018/12/20	VCG01213	VCG01213	<i>Fusarium oxysporum</i>	VCG01213
2711	DV-012	2018/12/20	VCG01213	VCG01213	<i>Fusarium oxysporum</i>	VCG01213
2712	DV-013	2018/12/20	VCG01213	VCG01213	<i>Fusarium oxysporum</i>	VCG01213
2713	DV-014	2018/12/20	VCG01213	VCG01213	<i>Fusarium oxysporum</i>	VCG01213
2714	DV-015	2018/12/20	VCG01213	VCG01213	<i>Fusarium oxysporum</i>	VCG01213
2715	DV-016	2018/12/20	VCG01213	VCG01213	<i>Fusarium oxysporum</i>	VCG01213
2716	DV-017	2018/12/20	VCG01213	VCG01213	<i>Fusarium oxysporum</i>	VCG01213
2717	DV-018	2018/12/20	VCG01213	VCG01213	<i>Fusarium oxysporum</i>	VCG01213
2718	DV-020	2018/12/20	VCG01213	VCG01213	<i>Fusarium oxysporum</i>	VCG01213

<sup>a</sup> 系統解析(IGS)は Foc TR4 特異的 SNP の確認かつ系統樹上で Foc TR4(VCG01213)とクレードを形成した株を VCG01213 と推定

<sup>b</sup> 系統解析(ヒストン H3)は系統解析と Blast 検索から種を推定

<sup>c</sup> 三重大学カルチャーコレクション所蔵

<sup>d</sup> プライマーセット①を用いた LAMP-FLP 法で消光ピーク(55-61℃)が確認されたサンプルを VCG01213 とした

— : PCR 産物や塩基配列を得られなかったことを示す

表 2 : PDA 培地と SNA 培地の組成

培地	材料	量
SNA培地 (Nirenberg 1976)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0g
	KNO <sub>3</sub>	1.0g
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5g
	KCl	0.5g
	グルコース	0.2g
	スクロース	0.2g
	水	1.0L
	寒天	20.0g
PDA培地	PDA	39.0g
	寒天	17.07g
	水	1 L

表 3 : PCR 及びシーケンス反応に用いたプライマー

プライマー	遺伝子領域	プライマー配列(5'-3')	用途	引用文献
H3-1a	ヒストンH3	ACTAAGCAGACCGCCGCAGG	PCR、シーケンス	Glass and Dnaldson 1995
H3-1b	ヒストンH3	GCGGGCGAGCTGGATGTCCTT	PCR、シーケンス	Glass and Dnaldson 1995
FocTR4-F	IGS(intergenic spacer)	CACGTTTAAGGTGCCATGAGAG	Foc TR4特異的PCR	Dita et al. 2010
FocTR4-R	IGS(intergenic spacer)	CGCACGCCAGGACTGCCTCGTGA	Foc TR4特異的PCR	Dita et al. 2010
iNL11	IGS(intergenic spacer)	AGGCTTCGGCTTAGCGTCTTAG	PCR、シーケンス	O'Donnell et al. 2009
iCNS1	IGS(intergenic spacer)	TTTCGCAGTGAGGTCCGCAG	PCR、シーケンス	O'Donnell et al. 2009
NLa	IGS(intergenic spacer)	TCTAGGGTAGGCKRGTTTGTC	PCR、シーケンス	O'Donnell et al. 2009
CNSa	IGS(intergenic spacer)	TCTCATRTACCCCTCCGAGACC	PCR、シーケンス	O'Donnell et al. 2009

表 4 ヒストン H3 に基づく系統解析に用いた塩基配列データ

MAFF番号	学名	分離源	採集地
240360	<i>Fusarium acuminatum</i>	土壌	茨城
240370	<i>Fusarium acuminatum</i>	小麦(普通系)	熊本
240366	<i>Fusarium asiaticum</i>	小麦(普通系)	茨城
240367	<i>Fusarium asiaticum</i>	小麦(普通系)	沖縄
240368	<i>Fusarium asiaticum</i>	小麦(普通系)	広島
240375	<i>Fusarium asiaticum</i>	小麦(普通系)	鹿児島
240354	<i>Fusarium avenaceum</i>	小麦(普通系)	北海道
240363	<i>Fusarium avenaceum</i>	小麦(普通系)	北海道
240371	<i>Fusarium avenaceum</i>	小麦(普通系)	岩手
240376	<i>Fusarium avenaceum</i>	らっきょう	千葉
101144	<i>Fusarium cerealis</i>	小麦(普通系)	北海道
236397	<i>Fusarium circinatum</i>	リュウキュウマツ	鹿児島
235976	<i>Fusarium coeruleum</i>	ばれいしょ	北海道
235977	<i>Fusarium coeruleum</i>	ばれいしょ	北海道
237650	<i>Fusarium concentricum</i>	小麦(普通系)	鹿児島
236454	<i>Fusarium culmorum</i>	ペントグラス	茨城
305607	<i>Fusarium cuneirostrum</i>	いんげんまめ	不明
238422	<i>Fusarium decemcellulare</i>	アテモヤ	静岡
238423	<i>Fusarium decemcellulare</i>	アテモヤ	静岡
238424	<i>Fusarium decemcellulare</i>	アテモヤ	静岡
240179	<i>Fusarium foetens</i>	エラティオール・ペゴニア	宮城
240180	<i>Fusarium foetens</i>	エラティオール・ペゴニア	宮城
237530	<i>Fusarium fractiflexum</i>	シンビジューム類(ヨウラン)	日本国内
238531	<i>Fusarium fujikuroi</i>	稲	茨城
237511	<i>Fusarium globosum</i>	小麦(普通系)	沖縄
240353	<i>Fusarium graminearum</i>	小麦(普通系)	北海道
240365	<i>Fusarium graminearum</i>	小麦(普通系)	北海道
236532	<i>Fusarium incarnatum</i>	小麦(普通系)	茨城
240355	<i>Fusarium incarnatum</i>	小麦(普通系)	鹿児島
240364	<i>Fusarium incarnatum</i>	稲	茨城
240372	<i>Fusarium kyushuense</i>	小麦(普通系)	鹿児島
840045	<i>Fusarium lateritium f. mori</i>	クワ属	滋賀
237507	<i>Fusarium nisikadoi</i>	ハチク	茨城
239069	<i>Fusarium nygamai</i>	さとうきび	鹿児島
410171	<i>Fusarium oxysporum</i>	ヒメヤシヤブシ	山形
410172	<i>Fusarium oxysporum</i>	キリ	東京
240357	<i>Fusarium poae</i>	小麦(普通系)	熊本
240374	<i>Fusarium poae</i>	小麦(普通系)	北海道
410715	<i>Fusarium proliferatum</i>	スギ	京都
410716	<i>Fusarium proliferatum</i>	スギ	京都
306334	<i>Fusarium redolens</i>	コンニャク	群馬
306335	<i>Fusarium redolens</i>	コンニャク	群馬
306336	<i>Fusarium redolens</i>	コンニャク	群馬
306337	<i>Fusarium redolens</i>	コンニャク	群馬
239074	<i>Fusarium sacchari</i>	さとうきび	鹿児島
238542	<i>Fusarium solani f. robiniae</i>	ハリエンジュ	日本国内
238541	<i>Fusarium solani f. xanthoxyli</i>	サンショウ	兵庫
238538	<i>Fusarium solani f. sp. mori</i>	カラヤマ桑(とうぐわ)	長野
840046	<i>Fusarium solani f. sp. mori</i>	カラヤマ桑(とうぐわ)	宮崎
840047	<i>Fusarium solani f. sp. pisi</i>	クワ属	長野
240356	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	小麦(普通系)	北海道
240373	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	小麦(普通系)	北海道
238974	<i>Fusarium striatum</i>	くだものけいそう	東京
240020	<i>Fusarium striatum</i>	ミヤコグサ	東京
241719	<i>Fusarium thapsinum</i>	ソルガム(もろこし)	茨城
241721	<i>Fusarium thapsinum</i>	ソルガム(もろこし)	茨城
241722	<i>Fusarium thapsinum</i>	ソルガム(もろこし)	茨城
240358	<i>Fusarium tricinctum</i>	小麦(普通系)	岩手
240087	<i>Fusarium verticillioides</i>	トウモロコシ	神奈川
240093	<i>Fusarium verticillioides</i>	トウモロコシ	神奈川
240095	<i>Fusarium verticillioides</i>	トウモロコシ	神奈川
241221	<i>Fusarium vorosii</i>	小麦(普通系)	北海道
241222	<i>Fusarium vorosii</i>	小麦(普通系)	北海道

表 5 系統解析に用いた IGS 塩基配列データ

菌株名	Accession no	種及び分化型	推定レース	VCG	宿主(品種)	採集地	引用文献
NRRL36102	FJ985558.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>		0121	Cavendish	台湾	O'Donnell et al. 2009
NRRL25603	FJ985480.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>		0122	Cavendish	オーストラリア	O'Donnell et al. 2009
NRRL26022	FJ985482.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>		0123	Pisang Awak	タイ	O'Donnell et al. 2009
NRRL25607	FJ985469.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	R2	0124	Blugoe	アメリカ合衆国	O'Donnell et al. 2009
NRRL36107	FJ985559.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>		0126	Maqueno	ホンジュラス	O'Donnell et al. 2009
NRRL36110	FJ985560.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>		0129	Cavendish	オーストラリア	O'Donnell et al. 2009
NRRL26029	FJ985483.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	R1	01210	Silk	フロリダ	O'Donnell et al. 2009
NRRL36114	FJ985561.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	TR4	01213	Pisang Manurung	インドネシア	O'Donnell et al. 2009
NRRL25609	FJ985481.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>		01214	Harare	マラウイ	O'Donnell et al. 2009
NRRL36120	FJ985564.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>		01218	Pisang Awak	タイ	O'Donnell et al. 2009
NRRL36118	FJ985563.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>		01221	Pisang Awak	タイ	O'Donnell et al. 2009
NRRL36116	FJ985562.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>		01223	Pisang Keling	マレーシア	O'Donnell et al. 2009
CAV 009	FJ664988.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	ST4	0120	Cavendish	南アフリカ	Fourie et al. 2009
CAV 293	FJ664989.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	ST4	0120	Dwarf Cavendish	カナリー諸島	Fourie et al. 2009
CAV 294	FJ664990.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	R1	0120	Highgate	ホンジュラス	Fourie et al. 2009
CAV 296	FJ664991.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	R1	0120	Highgate	ホンジュラス	Fourie et al. 2009
CAV 298	FJ664993.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	R1	0120/15	Banana	ブラジル	Fourie et al. 2009
CAV 299	FJ664994.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	ST4	0120/15	Gros Michel	ナイジェリア	Fourie et al. 2009
CAV 612	FJ664992.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	R1	01215	Gros Michel	コスタリカ	Fourie et al. 2009
CAV 607	FJ664995.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	ST4	0122	Cavendish	フィリピン	Fourie et al. 2009
CAV 605	FJ664996.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	ST4	0122	Cavendish	フィリピン	Fourie et al. 2009
CAV 613	FJ664968.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	R1	0126	Latundan	フィリピン	Fourie et al. 2009
CAV 793	FJ664969.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	R1	0126	Pisang Rubus	インドネシア	Fourie et al. 2009
CAV 794	FJ664970.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	R1	0126	Pisang Rubus	インドネシア	Fourie et al. 2009
CAV 1051	FJ664971.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	R1	01210	Apple	アメリカ	Fourie et al. 2009
CAV 632	FJ664972.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	R1	01210	Highgate	ホンジュラス	Fourie et al. 2009
CAV 847	FJ664973.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>		01219	Pisang Raja Sereh	インドネシア	Fourie et al. 2009
CAV 195	FJ664974.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>		01219	Pisang Ambon	インドネシア	Fourie et al. 2009
RP7	FJ664975.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	R4	0121	Cavendish	台湾	Fourie et al. 2009
RP8	FJ664976.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	R4	0121	Cavendish	台湾	Fourie et al. 2009
RP9	FJ664977.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	R4	0121	Cavendish	台湾	Fourie et al. 2009
CAV 810	FJ664978.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	TR4	01213	Pisang Berangan	インドネシア	Fourie et al. 2009
CAV 811	FJ664979.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	TR4	01213	Pisang Susu	インドネシア	Fourie et al. 2009
CAV 300	FJ664980.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	TR4	01213	Valery	インドネシア	Fourie et al. 2009
CAV 312	FJ664984.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	TR4	01213/16	Pisang udang	マレーシア	Fourie et al. 2009
CAV 313	FJ664985.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	TR4	01213/16	Pisang awak legor	マレーシア	Fourie et al. 2009
CAV 814	FJ664981.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	TR4	01216	Cavendish	インドネシア	Fourie et al. 2009
CAV 815	FJ664982.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	TR4	01216	Cavendish	インドネシア	Fourie et al. 2009
CAV 604	FJ664983.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	TR4	01216	Cavendish	インドネシア	Fourie et al. 2009
CAV 602	FJ665005.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	R1 or R2	0124	Lady finger	オーストラリア	Fourie et al. 2009
CAV 609	FJ665006.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	R1 or R2	0124	Lady finger	オーストラリア	Fourie et al. 2009
CAV 786	FJ665007.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	R1 or R2	0124	Lady finger	オーストラリア	Fourie et al. 2009
8611	FJ665008.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	R1 or R2	0125	Lady finger	オーストラリア	Fourie et al. 2009
23480	FJ665009.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	R1 or R2	0125	Lady finger	オーストラリア	Fourie et al. 2009
23487	FJ665010.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	R1 or R2	0125	Lady finger	オーストラリア	Fourie et al. 2009
CAV 1097(22993)	FJ665011.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>		0128	Blue Java	オーストラリア	Fourie et al. 2009
CAV 1096(22994)	FJ665012.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>		0128	Blugoe	オーストラリア	Fourie et al. 2009
24211	FJ665013.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	R4	01220	Cavendish	オーストラリア	Fourie et al. 2009
24219	FJ665014.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	R4	01220	Cavendish	オーストラリア	Fourie et al. 2009
CAV 957	FJ665000.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	R1	0123	Kluai Namwa	タイ	Fourie et al. 2009
CAV 929	FJ664999.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	R1	0123	Latundan	フィリピン	Fourie et al. 2009
CAV 933	FJ665001.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	R1	0123	Kluai Namwa	タイ	Fourie et al. 2009
23510	FJ664986.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	STR4	0129	Lady finger	オーストラリア	Fourie et al. 2009
CAV 1100	FJ664987.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	STR4	0129	Lady finger	オーストラリア	Fourie et al. 2009
23631	FJ664997.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	STR4	01211	SH3142	オーストラリア	Fourie et al. 2009
RP58	FJ665015.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>		01212	Ney poovan	タンザニア	Fourie et al. 2009
CAV 189	FJ665004.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>		01214	Harare	マラウイ	Fourie et al. 2009
CAV 871	FJ665002.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>		01217	Pisang Rastali	マレーシア	Fourie et al. 2009
CAV 1107	FJ664998.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	R1	0129/11	Chuoi xiem	ベトナム	Fourie et al. 2009
CAV 194	FJ665003.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>		01218	Pisang Siem	インドネシア	Fourie et al. 2009
NRRL26024	AY527732.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>		不明	Banana	ホンジュラス	O'Donnell et al 2004

表 6 : LAMP-FLP 法用 Foc TR4(VCG01213)特異的プライマー・プローブセット

プライマー・プローブ	ラベル	遺伝子領域	配列(5'-3')	対象	引用文献	
FIPプライマー	ID65	IGS	TCACACCCACTTTTGCAAAATCACTGGTTGGCTGGTGAGAT	プライマー セット① Foc TR4 検出用	未発表	
BIPプライマー	ID65	IGS	TGGGAAATCGGTTTTCTGCAACATTTCTACATATCCCGC		未発表	
F3プライマー	ID65	IGS	GATCACATTTGGTGAAGAGG		未発表	
B3プライマー	ID65	IGS	GAACCTACCCTGGACCTG		未発表	
上流側ループライマー(LF)	ID65	IGS	TCTACATTGCACCTTTTGTC		未発表	
蛍光標識下流側ループライマー1 (FLB1)	ID65	IGS	CGAGACGACCTCAACGGTACCA		未発表	
消光プローブ1(Probe Dabcyl 1)	ID65	IGS	CCATGAGAGGCACCTCTC		未発表	
蛍光標識下流側ループライマー2 (FLB2)	ID65	IGS	GCCATGAGAGGCACCTC		プライマー セット② Foc TR4 及び他 VCG検出 用	未発表
消光プローブ2(Probe Dabcyl 2)	ID65	IGS	TGAGAGCAaGTTTGAGGT			未発表
						未発表

表 系統解析及び LAMP-FLP 法に用いたマレーシア産菌株

	株名	Foc TR4特異的PCR	系統解析(IGS) <sup>a</sup>	系統解析(ヒストンH3) <sup>b</sup>	LAMP-FLP <sup>c</sup>
1	PP2R	-	-	<i>Fusarium asiaticum</i>	VCG01213
2	AP21S	VCG01213	VCG01213	<i>Fusarium oxysporum</i>	VCG01213
3	BPP31C	VCG01213	VCG01213	<i>Fusarium oxysporum</i>	VCG01213
4	KP23S	VCG01213	VCG01213	<i>Fusarium asiaticum</i>	VCG01213
5	BP2	VCG01213	-	-	VCG01213
6	AHP32S	VCG01213	VCG01213	<i>Fusarium oxysporum</i>	VCG01213
7	PP32R	VCG01213	VCG01213	<i>Fusarium oxysporum</i>	VCG01213
8	RSP21C	VCG01213	VCG01213	<i>Fusarium oxysporum</i>	VCG01213
9	AP4UPM	VCG01213	VCG01213	<i>Fusarium oxysporum</i>	VCG01213
10	PP23S	VCG01213	VCG01213	<i>Fusarium oxysporum</i>	VCG01213
11	SAP12S	VCG01213	VCG01213	<i>Fusarium oxysporum</i>	VCG01213
12	AHP41S	VCG01213	VCG01213	<i>Fusarium oxysporum</i>	VCG01213
13	BP510S	VCG01213	VCG01213	<i>Fusarium oxysporum</i>	VCG01213
14	PP14S	VCG01213	VCG01213	<i>Fusarium oxysporum</i>	VCG01213
15	JSR2	-	VCG01213	<i>Fusarium oxysporum</i>	VCG01213

<sup>a</sup> 系統解析(IGS)は Foc TR4 特異的 SNP の確認かつ系統樹上で Foc TR4(VCG01213)とクレードを形成した株を VCG01213 と推定

<sup>b</sup> 系統解析(ヒストン H3)は系統解析と Blast 検索から種を推定

<sup>c</sup> プライマーセット①を用いた LAMP-FLP 法で消光ピーク(55-61℃)が確認されたサンプルを VCG01213 とした

— : PCR 産物や塩基配列を得られなかったことを示す

CI=0.445743  
 RI=0.886728  
 RC=0.3952528

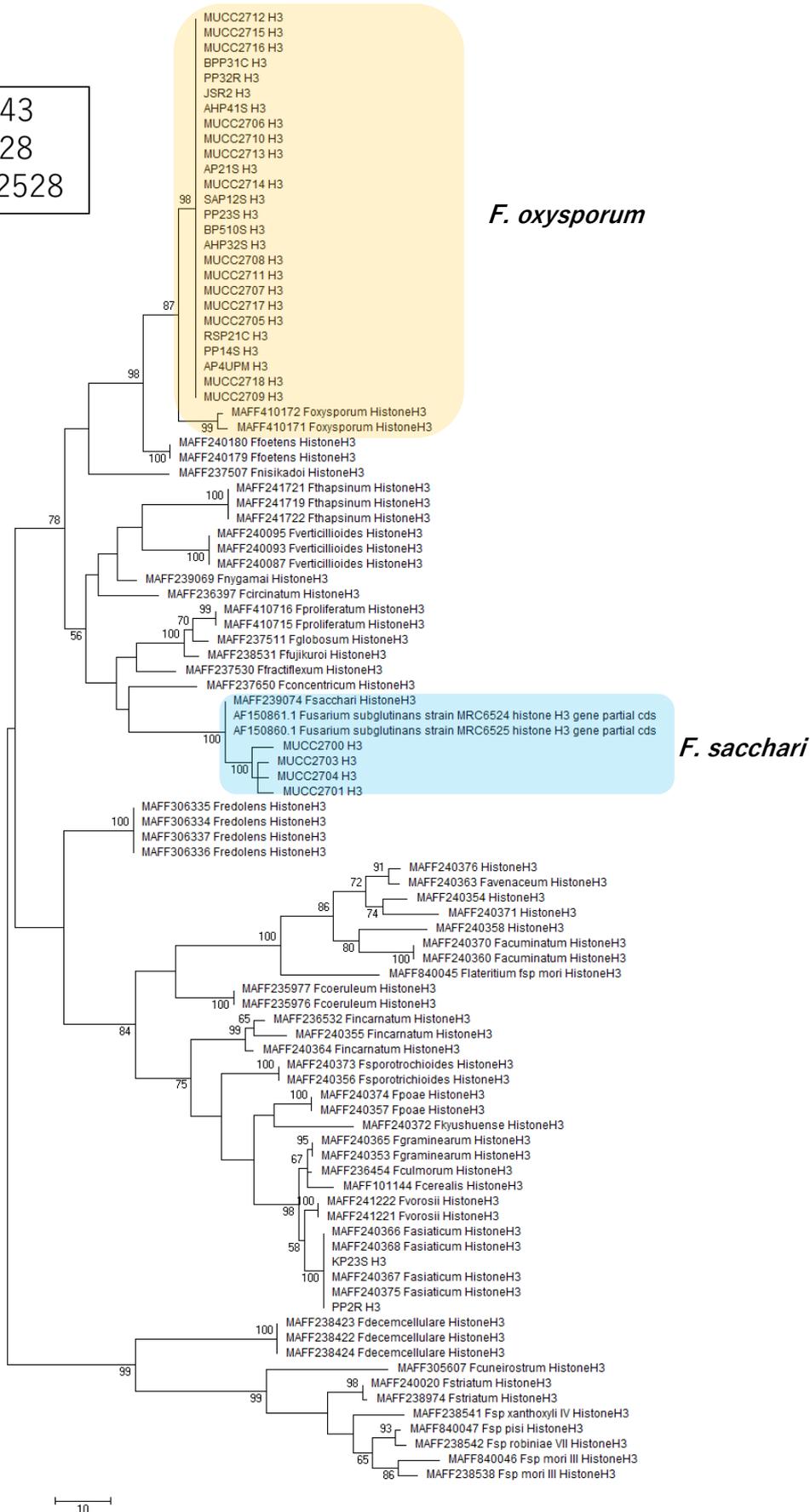


図 1：ヒストン H3 遺伝子から得られた最大節約系統樹の一つ、系統樹の各枝には 500 回のブートストラップ検定による数値(%)で 50%以上で支持された枝に数値を示した。

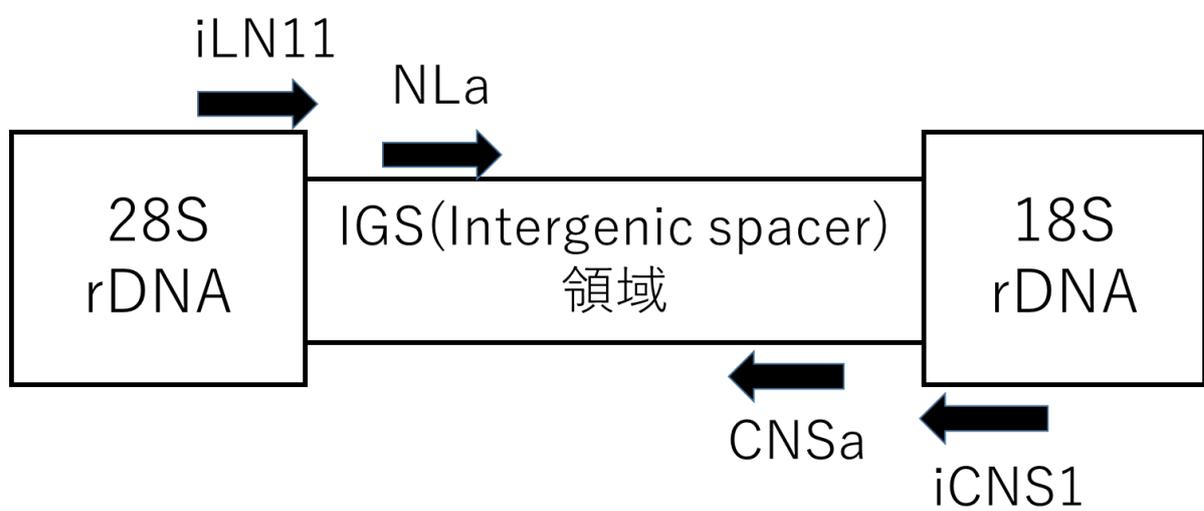


図2：IGS領域のPCR及びシーケンスに用いたプライマー位置

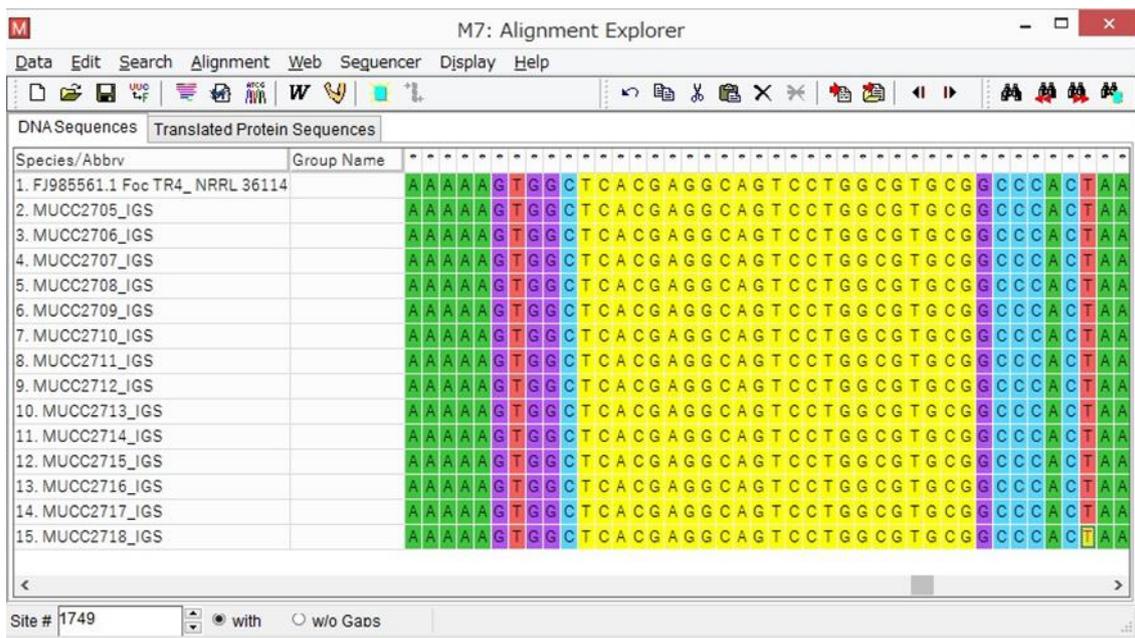
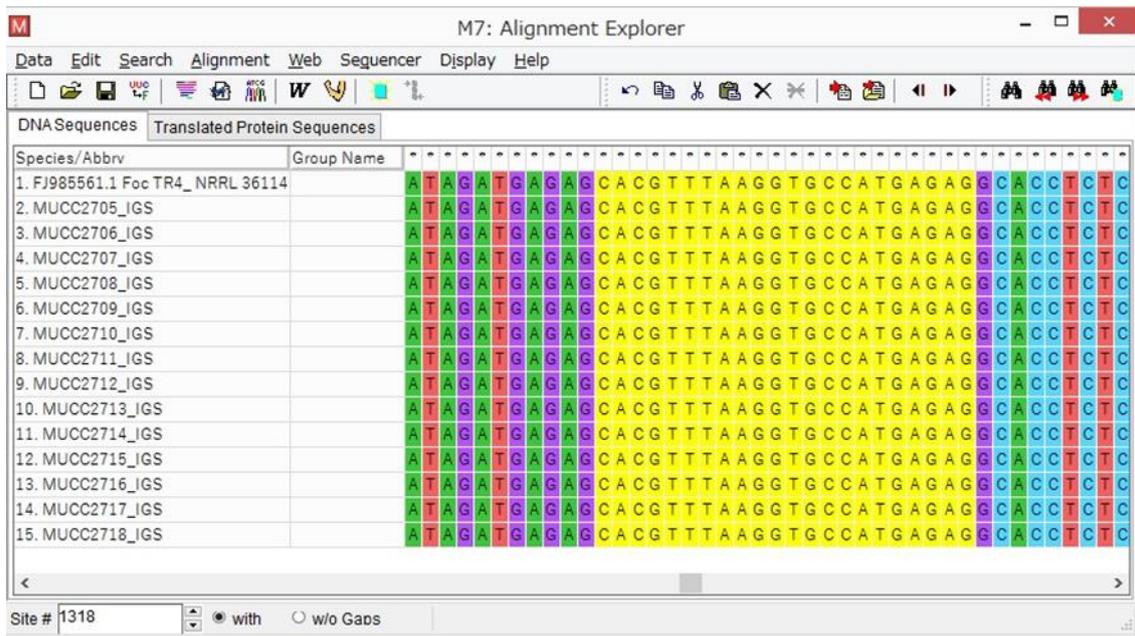
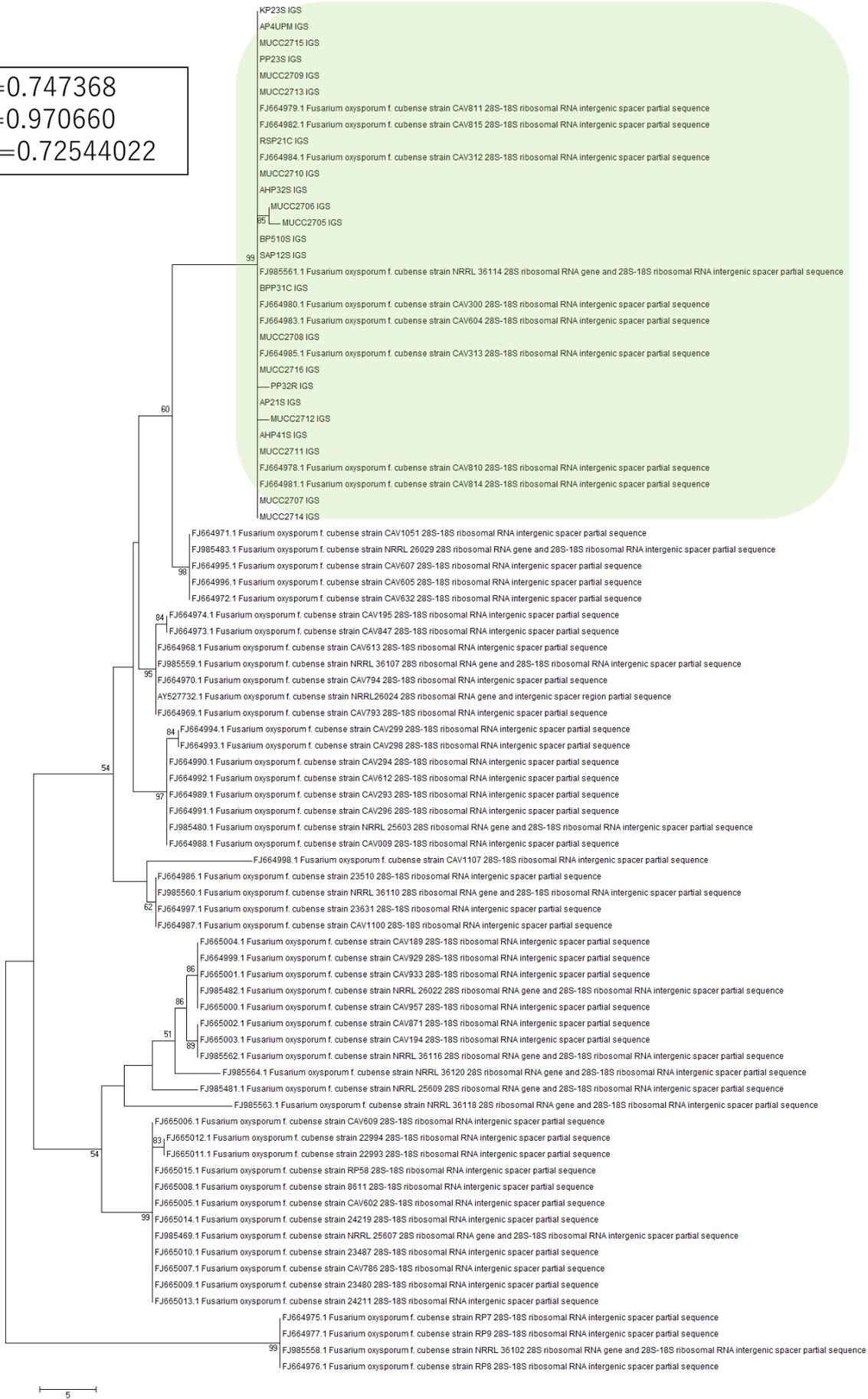


図 3 : MEGA7.0 上における IGS 領域のアライメントの一部  
 上図 : 上流側の配列、下図 : 下流側の配列、黄色で示された部分が VCG01213(Foc TR4) に特異的な配列を示す

CI=0.747368  
 RI=0.970660  
 RC=0.72544022



**Foc TR4  
(VCG01213)**

図 4 : IGS 遺伝子から得られた最大節約系統樹の一つ、系統樹の各枝には 500 回のブートストラップ検定による数値(%)を示す。50%以上で支持された枝に数値を示した。

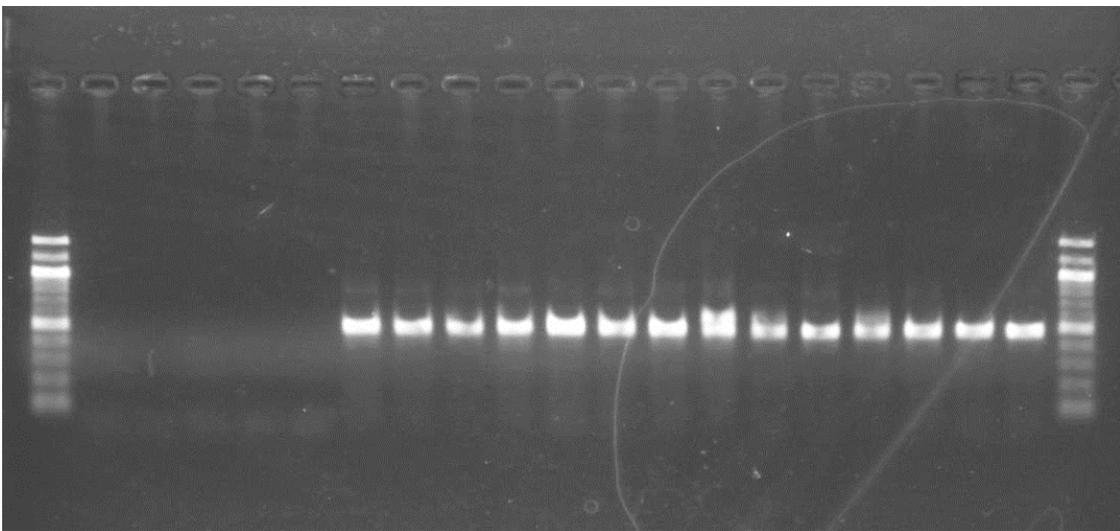


図 5 : Dita ら(2010)で開発された PCR 法による Foc TR4 特異的検出法の結果  
レーン 1、21; ラダーマーカ、レーン 2; MUCC2700、レーン 3; MUCC2701、レーン  
4; MUCC2702、レーン 5; MUCC2703、レーン 6; MUCC2704、レーン 7; MUCC2705、  
レーン 8; MUCC2706、レーン 9; MUCC2707、レーン 10; MUCC2708、レーン 11;  
MUCC2709、レーン 12; MUCC2710、レーン 13; MUCC2711、レーン 14; MUCC2712、  
レーン 15; MUCC2713、レーン 16; MUCC2714、レーン 17; MUCC2715、レーン 18;  
MUCC2716、レーン 19; MUCC2717、レーン 20; MUCC2718

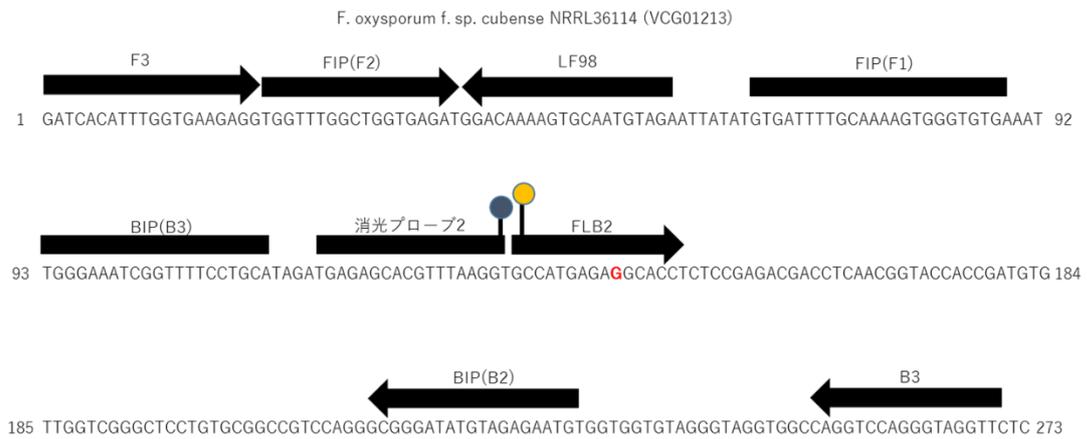
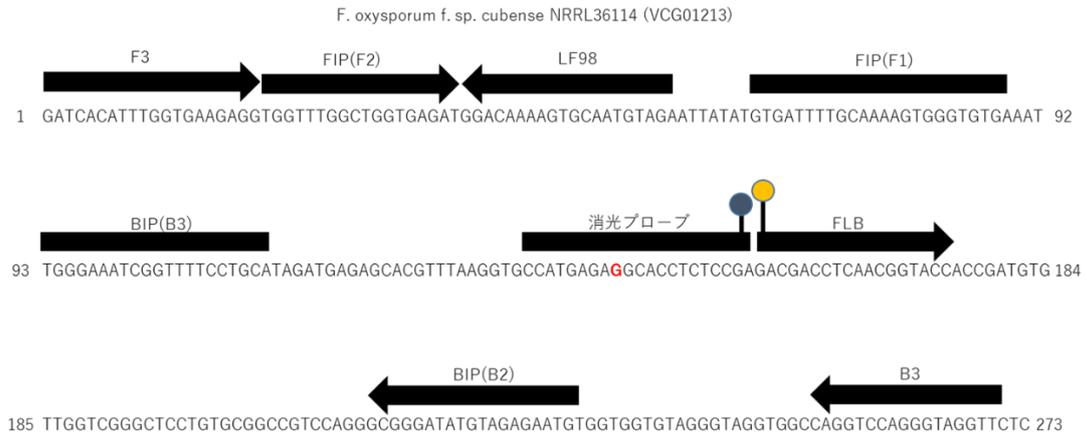
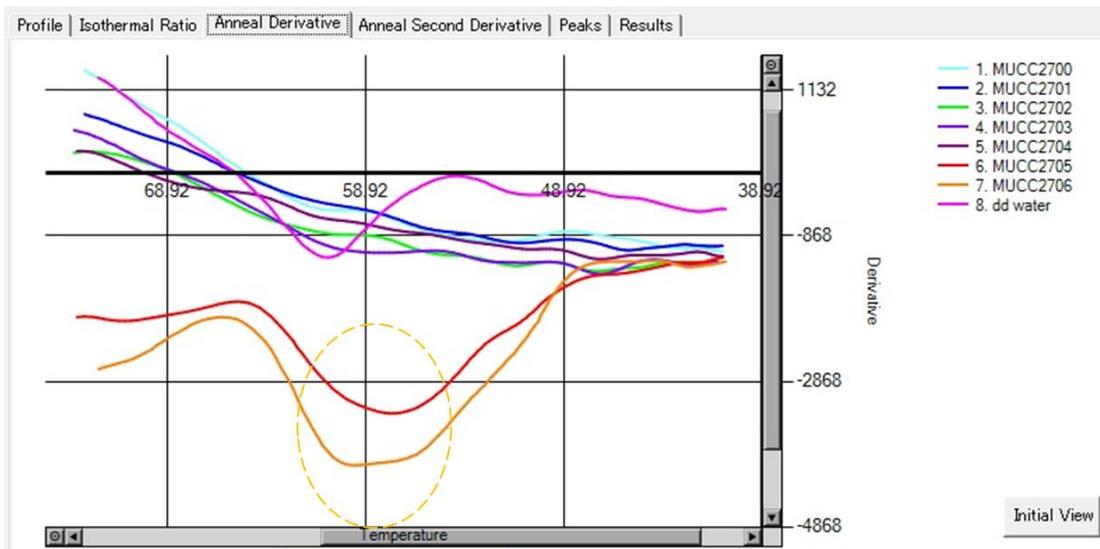
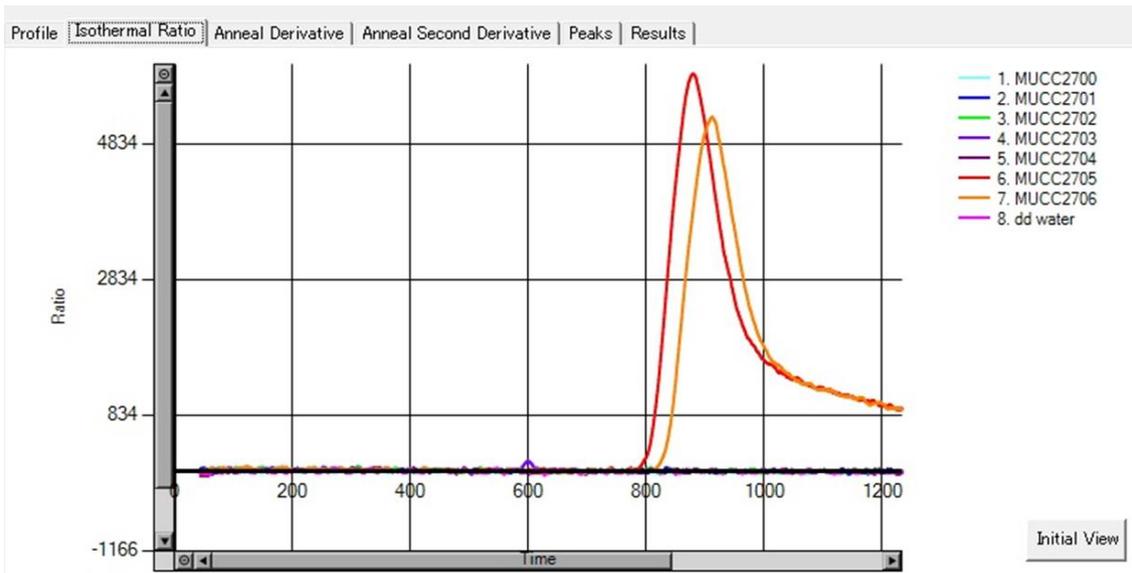


図 6 : LAMP-FLP 法に用いた IGS 塩基配列におけるプライマー・プローブの位置  
 VCG01213 に特異的な塩基を赤字で示した。上図はプライマーセット①、下図はプライ  
 マーセット②の設計位置。消光プローブと FLB 以外はすべて共通。



VCG01213  
約57-58°C

図6 LAMP-FLP(プライマーセット①)の結果

上図は DNA 増幅の計測データで縦軸が濁度、横軸が反応時間

下図は蛍光プライマーと消光プローブによる会合曲線分析で、縦軸は蛍光値の一次微分、横軸は反応温度、MUCC2700-2704は *F. sacchari*、MUCC2705、2706は Foc VCG01213。

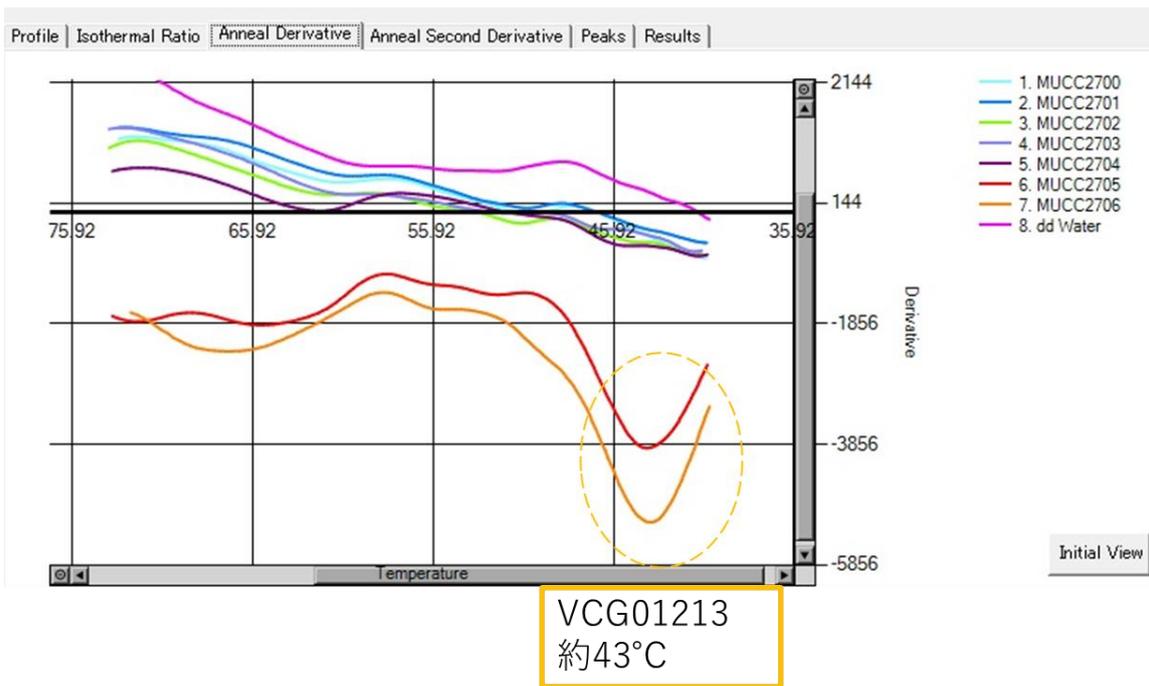
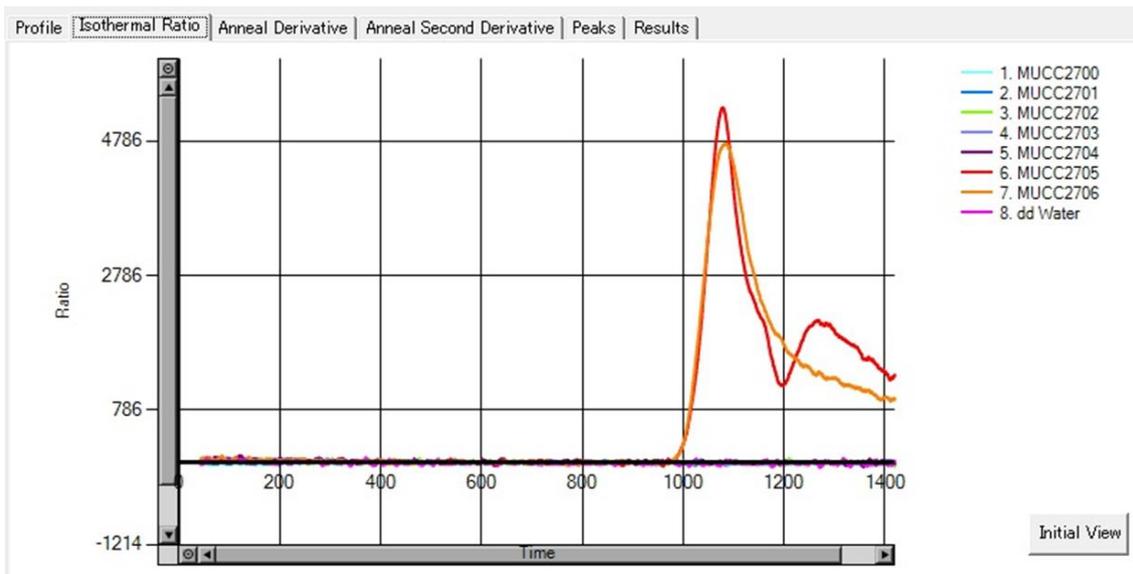


図7 LAMP-FLP(プライマーセット②)の結果

上図は DNA 増幅の計測データで縦軸が濁度、横軸が反応時間

下図は蛍光プライマーと消光プローブによる会合曲線分析で、縦軸は蛍光値の一次微分、横軸は反応温度、MUCC2700-2704は *F. sacchari*、MUCC2705、2706は Foc VCG01213。

## 引用文献

青木孝之 (2009) *Fusarium* 属の分類法. 日本微生物資源学会誌 25(1): 1-12

青木孝之, O'Donnell K, Geiser DM, (2014). 植物病原 *Fusarium* 属菌の系統学: その現状と将来への展望. 日植病報 80 特集号: 73-80

Aurore G, Parfait B, Fahrasmane L, (2009). Bananas, raw materials for making processed food products. Trends in Food Science & Technology 20, 78–91.

Butler D, (2013). Fungus threatens top banana. Nature 504, 195–196.

Chittarath K, Mostert D, Crew KS, Viljoen A, Kong G, Molina AB, Thomas JE, (2018). First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4 (VCG01213/16) associated with Cavendish bananas in Laos. Plant Dis. 102: 449.

Dita MA, Waalwijk C, Buddenhagen IW, Souza MT, Kema G H J, (2010). A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana *Fusarium* wilt pathogen. Plant Pathology, 59, 348–357.

Dita M, Barquero M, Heck D, Mizubuti ESG, Staver CP, (2018). *Fusarium* Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs Toward Sustainable Disease Management. Frontiers in Plant Science 9: 1468

FAOSTAT, (2016). <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RF>

García-Bastidas F, Ordóñez N, Konkol J, Al-Qasim M, Naser Z, Abdelwali, M., Salem N, Waalwijk C, Ploetz RC, Kema GHJ, (2014). First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4 associated with Panama disease of banana outside Southeast Asia. Plant Dis. Notes. 98: 694.

Goertz A., Zuehlke S, Spiteller M, Steiner U, Dehne HW, Waalwijk C, Vries I, Oerke EC, (2010). *Fusarium* species and mycotoxin profiles on commercial maize hybrids in Germany. Eur. J. Plant Pathol. 128, 101–111.

Herron DA, Wingfield MJ, Wingfield BD, Rodas CA, Marincowitz S, Steenkamp ET,

(2015). Novel taxa in the *Fusarium fujikuroi* species complex from *Pinus* spp. *Studies in Mycology* 80: 131–150.

Hung TN, Hung NQ, Mostert D, Viljoen A., Chao CP, and Molina AB, (2018). First report of *Fusarium* wilt on Cavendish bananas, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 (VCG 01213/16), in Vietnam. *Plant Dis.* 102: 448–448.

Kistler HC, (1997). Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 87: 474–479.

Komura R, Kawakami T, Nakajima K, Suzuki H, Nakashima C. (2017). Simultaneous detection of benzimidazole-resistant strains of *Fusarium* head blight using the loop-mediated isothermal amplification-fluorescent loop primer method. *Journal of General Plant Pathology* , Volume 84, Issue 4: 247–253

Kumar S, Stecher G, Tamura K, (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870–1874.

Lievens B, RepM, Thomma B, (2008). Recent developments in the molecular discrimination of formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Pest Management Science* 64: 781–8.

Maryani N, Lombard L, Poerba YS, Subandiyah S, Crous PW, Kema GHJ, (2019). Phylogeny and genetic diversity of the banana *Fusarium* wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin. *Studies in Mycology* 92: 155–1

Maymon M, Shpatz U, Harel YM, Levy E, Elkind G, Teverovsky E, Gofman R, Haberman A, Zemorski R, Ezra N, Levi Y, Or G, Galpaz N, Freeman S, (2018). First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 causing *Fusarium* wilt of Cavendish bananas in Israel. *Plant Dis. Notes.* 98: 694

Nirenberg H, (1976). Untersuchungen über die morphologische und biologische differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola*. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem* 169: 1–117.

O'Donnell K, Gueidan C, Sink S, Johnston PR, Crous PW, Glenn A, Riley R, Zitomer NC, Colyer P, Waalwijk C, Lee T, Moretti A, Kang S, Kim H, Geiser DM, Juba JH, Baayen RP, Cromey MG, Bithell S, Sutton DA, Skovgaard K, Ploetz R, Kistler HC, Elliott M, Davis M, Sarver BAJ, (2009). A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genetics and Biology* 46, 936–48.

岡部郁子, (2015). 赤かび病の一種, *Fusarium ear rot* によるトウモロコシ登熟過程でのフモニシン蓄積. *日草誌* 61: 94-96

Ordonez N, Seidl MF, Waalwijk C, et al. (2015a). Worse comes to worst: bananas and Panama disease—when plant and pathogen clones meet. *PLoS Pathogens* 11: e1005197.

Ordoñez N, García-Bastidas F, Laghari HB, Akkary MY, Harfouche, EN, Awar BN, al, et al. (2015b). First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4 causing Panama disease in Cavendish bananas in Pakistan and Lebanon. *Plant Dis. Notes*. 100:209. doi: 10.1094/PDIS-12-14-1356-PD

Ploetz RC, Correll JC, (1988). Vegetative compatibility among races of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Plant Dis.* 72, 325–328

Ploetz RC (2006a). *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Phytopathology*, 96, 653–656.

Ploetz RC (2006b). Panama disease, an old nemesis rears its ugly head: Part 2, the Cavendish era and beyond. *Plant Health Progress*.

Ploetz RC, (2006c). *Fusarium*-induced diseases of tropical, perennial crops. *Phytopathology* 96, 648–652.

Ploetz RC, Kema GHJ, Ma LJ, (2015a). Impact of diseases on export and smallholder production of banana. *Annual Review of Phytopathology*.

Ploetz RC, (2015b). Management of *Fusarium* wilt of banana: a review with special

reference to tropical race 4. *Crop Prot.* 73: 7-15.

Ploetz, R., Freeman, S., Konkol, J., Al-Abed, A., Naser, Z., Shalan, K., Barakat R, Israeli Y, (2015c). Tropical race 4 of Panama disease in the Middle East. *Phytoparasitica* 43: 283–293

Puhalla JE (1985). Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany* 63: 179–183

Sandoval-Denis M, Guarnaccia V, Polizzi G, Crous PW, (2018). Symptomatic Citrus trees reveal a new pathogenic lineage in *Fusarium* and two new *Neocosmospora* species. *Persoonia* 40: 1–25.

Singh BU, Padmaja PG, Seetharama N, (2004). Biology and management of the sugarcane aphid, *Melanaphis sacchari* (Zehntner) (Homoptera: Aphididae), in sorghum: a review. *Crop Protection* 23: 739–755.

Steenkamp ET, Wingfield BD, Coutinho TA, Wingfield MJ, Marasas WF, (1999). Differentiation of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* by histone gene sequence data. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3401–3406.

Stover RH, (1962). *Fusarial Wilt (Panama Disease) of Bananas and Other Musa Species*. Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute

Stover RH, (1990). *Fusarium wilt of banana: some history and current status of the disease*. In: Ploetz RC, ed. *Fusarium Wilt of Banana*. St Paul, MN, USA: APS Press, 1–7.

Tarnowski TL, Perez-Martinez JM, & Ploetz RC, (2010). Fuzzy pedicel: a new postharvest disease of banana. *Plant Disease*, 94, 621–627.

財務省, (2016). 財務省貿易統計(輸入)

Zheng SJ, García-Bastidas FA, Li X, Zeng L, Bai T, Xu S, et al. Yin K, Li H, Fu G, Yu Y, Yang L, Nguyen HC, Douangboupha B, Khaing AA, Drenth A, Seidl MF, Meijer HJG, Kema GHJ, (2018). New geographical insights of the latest expansion of

*Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical race 4 into the greater Mekong subregion. *Front. Plant Sci.* 9: 457

## 総合考察

本研究では様々な *Fusarium* 属菌について、LAMP-FLP 法による薬剤抵抗性系統や VCG(菌糸和合群)の迅速検出を行った。これらは生物検定(培養に基づく薬剤感受性試験、宿主植物への接種による病原性試験、対峙培養による VCG 検定など)が必要になるが、本研究の LAMP-FLP 法はこれらの生物検定と同様の試験結果を迅速かつ簡易に出すことができた。また生物検定では分からない抵抗性系統の種類も判定することができる。例えば、コムギ赤かび病菌のベンズイミダゾール系薬剤抵抗性系統には 3 種類 (F167Y、E198Q、F200Y)存在するが(Suga et al. 2011)、このうち F167Y と F200Y 系統は薬剤に対して高度抵抗性菌であり、生物検定では区別できない。一方で LAMP-FLP 法はこの 2 系統含むすべての抵抗性系統を 1 プライマーセットや消光ピーク温度から識別が可能である(Komura et al. 2017)。また LAMP-FLP 法は感度や特異性が高く、夾雑物の影響を受けにくいいため、野外サンプルを用いた試験も可能であり、分離・培養・DNA 抽出・電気泳動などの手間を省くことが可能であり(Komura et al. 2017)、従来の PCR 法よりも迅速に検出は可能である。これらのことから、LAMP-FLP 法は植物病原菌の検出法として有用な手法であると考えられる。

LAMP-FLP 法を含む分子生物学的手法による菌の検出において、擬陰性を排除し、正確な検出結果を得るためには、対象とされる菌の分類学的研究などの基礎研究に基づいてプライマーを設計する必要がある。またプライマーを設計する際、ITS 領域のような変異の蓄積しやすい領域は避けるなど、利用する遺伝子領域の選択も重要である。

農作物の病害や薬剤抵抗性系統の発生が確認された時、農薬散布等の防除対策を実施するが、その際に病害の迅速かつ正確な診断が必要である。従って病害診断の遅れは、病害の拡大につながる恐れがある。LAMP-FLP 法は植物病原菌や薬剤抵抗性系統を迅速に検出し、より効果的な病害防除及び農作物の安定生産に寄与することが期待できる。本手法の今後の導入・普及に期待したい。

引用文献(総合考察)

甲村瞭次, (2017). 平成 28 年度卒業論文 三重県で発生したベンゾイミダゾール系薬剤抵抗性コムギ赤かび病菌に関する研究. 1-22.

Komura R, Kawakami T, Nakajima K, Suzuki H, Nakashima C. (2017). Simultaneous detection of benzimidazole-resistant strains of *Fusarium* head blight using the loop-mediated isothermal amplification-fluorescent loop primer method. *Journal of General Plant Pathology* , Volume 84, Issue 4: 247–253

Suga H, Nakajima T, Kageyama K, and Hyakumachi M, (2011). The genetic profile and molecular diagnosis of thiophanate-methyl resistant strains of *Fusarium asiaticum* in Japan. *Fungal Biol.* 115: 1244–1250.

## 摘要

本研究では、LAMP-FLP 法による植物病原菌の特異的検出について検討を行った。第 1 章では LAMP-FLP 法による三重県のコムギ赤かび病菌についてベンズイミダゾール系薬剤抵抗性系統のモニタリングを実施した。結果、79 サンプル中 3 サンプルで薬剤抵抗性変異が検出され、これらは培養による薬剤感受性試験の結果と一致した。さらに LAMP-FLP 法の消光ピーク温度から 2 試料が E198Q、1 試料が F200Y 抵抗性系統であることが示唆された。ヒストン H3 遺伝子の系統関係からこの 3 サンプルはすべて *F. asiaticum* であることが示唆された。第 2 章では LAMP-FLP 法によるベンズイミダゾール系薬剤抵抗性イネばか苗病菌の特異的検出を検討した。結果、全てのサンプルで LAMP-FLP 法の結果と培養による薬剤感受性試験の結果が一致した。このことから本手法で現在報告されている E198K 及び F200Y 抵抗性系統の同時検出が可能であることが示唆された。第 3 章ではフィリピンの新パナマ病罹病株から分離された菌株の系統関係からの種同定及び LAMP-FLP 法による Foc TR4 の特異的検出を検討した。結果、ヒストン H3 及び IGS 領域の系統関係からフィリピン産 14 菌株が Foc TR4 であることが示唆された。さらに、LAMP-FLP 法により Foc TR4 を他の系統からの特異的検出が可能であることが示唆された。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、熱心に御指導頂きました中島千晴教授に心から感謝申し上げます。また日頃より多大の便宜を図って頂きました白水貴助教授に厚く御礼申し上げます。貴重な標本および菌株を送付頂きました三重県農業研究所の川上拓氏、中島香織氏、岐阜大学生命科学センターの須賀晴久准教授、フィリピンの研究者の方々に厚く御礼申し上げます。また貴重なデータを提供していただいた Anysia 氏にも厚く御礼申し上げます。最後に同じ研究室に所属する学生、研究員一同に心から感謝の意を表します。