

## トマト根に同時接種したフザリウム病菌の遺伝子標識法による識別

野々村照雄\*・畑佐哲也\*・前田和彦\*\*・豊田秀吉\*

\*近畿大学農学部農学科・\*\*近畿大学湯浅農場

### Simultaneous detection of GFP- and GUS-marked fungi of different formae speciales of *Fusarium oxysporum* on plant roots

Teruo NONOMURA\*, Tetsuya HATASU\*, Kazuhiko MAEDA\*\* and Hideyoshi TOYODA\*

\*Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, Kinki University,  
3327-204 Nakamachi, Nara 631-8505, Japan

\*\*Experimental Farm, Kinki University, 2355-2 Yuasa, Wakayama 643-0004, Japan

#### Synopsis

In our attempt to visualize the infection behavior of fungal wilt pathogens inoculated onto plant roots, the fungi were genetically marked with two reporter genes. *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (FOM) and *F. o.* f. sp. *lycopersici* (FOL) were transformed using the green fluorescence protein gene (GFP) and the  $\beta$ -glucuronidase gene (GUS), respectively. In the present study, we attempted to directly distinguish different formae speciales of *F. oxysporum* on the same plant roots by expression of different marker genes. Microconidia of GFP-marked FOM (FOM-001) and GUS-marked FOL (FOL-005) were inoculated onto roots of cotyledonal seedlings, and inoculated roots were first observed under a fluorescence microscope in order to detect FOM-001 and then stained with X-gluc (substrate for GUS assay) in order to detect FOL-005 under a light microscope. Consequently, both transformed pathogens could be clearly distinguished at the same site of inoculation. These results suggest that the dual transformation of *F. oxysporum* is useful for analyzing the behavior of nonpathogenic *F. oxysporum* challenge-inoculated with pathogenic *F. oxysporum*.

#### I. 緒言

植物は病原菌による感染を受けると、様々な病徴を示す。このように植物に病気を引き起こす病原体を植物病原菌と呼んでいる。筆者らは植物病原菌の中で特に、土壌病害（土壌生息性病原菌が引き起こす病害）に注目し、植物病理学上、重要かつ難防除土壌病害とされているフザリウム病菌 (*Fusarium oxysporum*) を取り上げ、その防除策を検討することとした。フザリウム病菌は不完全菌類に属する糸状菌であり、植物根部から侵入感染した後、導管閉塞を引き起こし、植物を萎

ちよう・枯死させる。また、本菌は種々の分化型（宿主植物のみに感染し、病気を引き起こすことのできる菌の総称）に分けられ、分生胞子の形態が非常に類似しているため、分化型間で本菌を区別することは不可能である。フザリウム病菌から植物を守るためには、本菌の感染挙動を明らかにすることが必須であると考えられるが、土壌病害では、その感染部位が土壌中に埋没している根部であることから、病原体の動態を追跡することが非常に困難である。そこで、筆者らを含む多くの研究者が、種々のマーカー遺伝子を導入し、植物根上での本菌の感染挙動解析を行ってきた<sup>1-12)</sup>。

本実験では、遺伝子標識法によるフザリウム病菌のモニタリング法を開発するため、マーカー遺伝子として緑色蛍光タンパク質生産遺伝子 (GFP遺伝子<sup>13)</sup>) と  $\beta$ -グルクロニダーゼ生産遺伝子 (GUS遺伝子<sup>14)</sup>) を用い、植物根上での2種分化型菌の同時識別を試みることにした。

## II. 材料および方法

### 1. フザリウム病菌と培養条件

本実験では、GFP遺伝子を導入したメロンつる割病菌 (FOM-001) と、GUS遺伝子を導入したトマト萎ちょう病菌 (FOL-005) を用いた。2種分化型菌を50  $\mu$ g/mlのハイグロマイシン添加ツアベック寒天培地で25°C、7日間培養した後、ウレタン入りのツアベック液体培地中に菌叢ディスクを植菌し、25°Cで3日間振とう培養した (ウレタン培養法)。培養後、3,000 rpmで5分間遠心分離し、得られた小型分生胞子を滅菌水に懸濁して、再度、遠心洗浄した。洗浄後、分生胞子を $1.0 \times 10^7$  胞子/mlになるように調整し、以後の実験に用いた。

### 2. 病原性検定

得られた形質転換菌 (FOM-001とFOL-005) が、植物に対し病原性を保持しているか否かを検討するため、メロンおよびトマトを用い、病原性検定を行った。上記で $1.0 \times 10^7$  胞子/mlに調整した胞子懸濁液を用い、メロン幼苗およびトマト幼苗の根部に10  $\mu$ l滴下接種し、25°Cで3週間培養した後、病徴の有無を観察した<sup>15,16)</sup>。

### 3. マーカー遺伝子を利用したフザリウム病菌の同時識別

FOM-001とFOL-005を使用し、同一平面状で導入遺伝子発現による識別が可能か否かを検討した。本実験では、同一視野での顕微鏡観察を容易にするため、薄層の寒天培地を作成した。すなわち、シャーレ内にカバーガラス (1.8  $\times$  1.8 cm) を置床した後、50  $\mu$ g/mlのハイグロマイシン添加ツアベック寒天培地を重層し、カバーガラスの部分を取り出した。FOM-001とFOL-005の菌糸体を上記で作成したプレートの両端に置床した後、25°Cで2日間培養した。培養後、2種のフザリウム病菌菌糸が接触する部位でGFP遺伝子発現

を蛍光顕微鏡下で観察した。次にGUS検定を行うため、同サンプルを10 mlの0.1%グルタルアルデヒドを含むリン酸緩衝液 (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH7.0) に浸漬した後、真空条件下で10分間固定処理を施し、リン酸緩衝液で4回洗浄した。さらに、GUS反応液 (50 mM リン酸緩衝液、0.5 mM フェリシアンカリウム、0.5 mM フェロシアンカリウム、10 mM EDTA、0.1% トリトンX-100、1.0 mM 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-グルクロニド) に浸漬して、37°Cで2日間、酵素反応させた<sup>17)</sup>。反応後、菌糸細胞内でのGUS遺伝子発現によるインジゴ形成の有無を光学顕微鏡下で観察した。

### 4. 幼苗プレート栽培法

異なるマーカー遺伝子を導入したフザリウム病菌をメロンおよびトマトの根部に接種するため、筆者らの研究室で考案した幼苗プレート栽培法を用いた<sup>18)</sup>。シャーレ内のろ紙上にメロン種子 (*Cucumis melo* L. 品種 アールスフェバリット) およびトマト種子 (*Lycopersicon esculentum* M. 品種 ポンデローザ) をそれぞれ10粒ずつ播種し、25°Cの温度条件下で発芽させた後、ろ紙を重層したプレート (2  $\times$  15 cm) 上に置床して子葉展開期まで育苗した。本栽培システムでは、特に温度の維持、根部の遮光および幼苗植物の生育管理に重点をおいた。

### 5. マーカー遺伝子を利用したフザリウム病菌のトマト根上での同時識別

FOM-001とFOL-005を使用し、トマト根上で両菌の識別が可能か否かについて検討した。2種のフザリウム病菌をウレタン培養法により、25°C、3日間振とう培養し、それぞれの分生胞子を $1.0 \times 10^7$  胞子/mlに調整した。得られた胞子懸濁液を等量混合し、幼苗プレート上で7日間育成させたトマト幼苗の根上に10  $\mu$ l滴下接種した。接種2日後に、接種部位 (2 cm) を切断し、根上で菌糸伸長しているFOM-001のGFP遺伝子発現を蛍光顕微鏡下で観察した。次に同サンプルを0.1%のグルタルアルデヒドを含むリン酸緩衝液により10分間固定処理を施し、GUS反応液に浸漬して37°Cで2日間反応させた後、光学顕微鏡下で観察した。GFP遺伝子発現に関しては、オリ

ンパス社製の蛍光顕微鏡BX-60（励起フィルターBP460-490、吸収フィルターBA510IF）を用いた。

### Ⅲ. 結果および考察

#### 1. 分化型の異なるフザリウム病菌の形質転換体の作出

メロンつる割病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *melonis* MAFF305122) については、GFP遺伝子を導入し、形質転換体を作出したことをすでに報告している<sup>18)</sup>。本実験では、トマト萎ちょう病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* MAFF103036) に目印となる他のマーカー遺伝子を導入するため、図1に示すプラスミドpHPG8-11 (GUS遺伝子およびハイグロマイシン抵抗性遺伝子を保持) を用い、形質転換を行った。すなわち、トマト萎ちょう病菌から常法<sup>19)</sup>により、プロトプラストを作製した後、Restriction enzyme-mediated integration (REMI法) を用いて、制限酵素 *Hin* dIII で処理した直鎖状のpHPG8-11を本菌に導入し、形質転換体 (FOL-005) を作出した。プラスミドベクターはコーネル大学、B. G. Turgeon博士から分譲された。FOL-005の染色体DNAへのマーカー

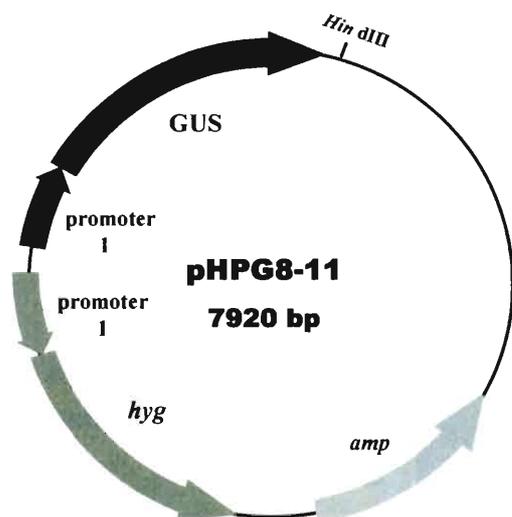


Fig. 1. Plasmid vector used for transformation of *Fusarium oxysporum*. The plasmid pHPG8-11 contains the  $\beta$ -glucuronidase gene (GUS) as a reporter marker and hygromycin B resistant gene (*hyg*) as a selective marker flanked with the constitutive expression promoter of *Cochliobolus heterostrophus*.

遺伝子の挿入は、PCR法およびGUS遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションにより確認した。また、本菌染色体DNAに組み込まれたマーカー遺伝子は後代まで安定的に伝えられた。

#### 2. 病原性検定

フザリウム病菌の感染挙動を解析するためには、得られた形質転換体が野生株と同様な病原性を示す必要がある。そこで、幼苗プレート法を用い、FOM-001とFOL-005の病原性検定を行った (表1)。本実験では、菌接種後、メロン幼苗で2週間、トマト幼苗で3週間、経時的に病徴の進展が観察された。その結果、FOL-005は、野生株同様、トマト幼苗において根部の褐変化、子葉の黄化・萎ちょうおよび枯死の病徴を示した。しかしながら、本菌をメロン幼苗根に接種した場合は、全く病徴を示さなかった。一方、FOM-001は、メロン幼苗でのみ顕著な病徴を示したが、トマト幼苗では、全く病徴を示さなかった。以上の結果から、供試菌は宿主植物にのみ特異的に感染し、病徴を示した。

#### 3. マーカー遺伝子を利用したフザリウム病菌の同時識別

異なるマーカー遺伝子の発現を利用し、同一視野での2分化型菌 (FOM-001とFOL-005) を識別することを試みた。作成した薄層の寒天培地上にFOM-001とFOL-005の菌叢ディスクを置床し、26℃で7日間、共存培養した。培養後、FOM-001とFOL-005の菌糸接触部位を蛍光顕微鏡で観察したところ、FOM-001菌糸細胞内でGFP遺伝子の発現が確認された。また、同サンプルをGUS反応液に浸漬反応させた後、同一部位を光学顕微鏡で観察したところ、FOL-005菌糸細胞内でGUS遺伝子の発現が確認されたことから、分化型の異なるフザリウム病菌をマーカー遺伝子発現により、同一平面上で識別することが可能となった (図2)。

#### 4. マーカー遺伝子を利用したフザリウム病菌のトマト根上での同時識別

FOM-001とFOL-005の孢子懸濁液をそれぞれ  $1.0 \times 10^7$  孢子/ml に調整した後、等量混合し、トマト幼苗根に  $10 \mu\text{l}$  滴下接種した。混合接種後

Table 1. Pathogenicity of GFP- and GUS-marked microconidia of formae speciales of *Fusarium oxysporum* on cotyledonal seedlings of tomato and melon

Strains <sup>a)</sup>	Integrated marker genes			Number of seedlings with disease symptoms / inoculated ones					
	GFP	GUS	hyg	Tomato <sup>b)</sup>			Melon <sup>c)</sup>		
				1	2	3	1	2	3 <sup>d)</sup>
MAFF103036	-	-	-	6/10	6/10	6/10	0/10	0/10	0/10
FOL-005	-	+	+	6/10	5/10	6/10	0/10	0/10	0/10
MAFF305122	-	-	-	0/10	0/10	0/10	9/10	9/10	10/10
FOM-001	+	-	+	0/10	0/10	0/10	9/10	9/10	9/10

a) FOL-005 was obtained by transforming protoplasts of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* MAFF103036 with the plasmid pHPG8-11. FOM-001 was obtained by transforming protoplasts of *F. oxysporum* f. sp. *melonis* MAFF305122 with the plasmid pIGPAPA.

b) Necrosis at the inoculation site of roots, yellowing of cotyledons, stem necrosis and wilting were observed 10 to 14 days, 16 to 18 days and 20 to 21 days after inoculation, respectively.

c) Necrosis at the inoculation sites of roots, water-soaked constrictions and cracking of lower hypocotyls and wilting were observed 5 to 9 days, 9 to 10 days and 14 to 15 days after inoculation, respectively.

d) Pathogenicity tests were conducted three times.

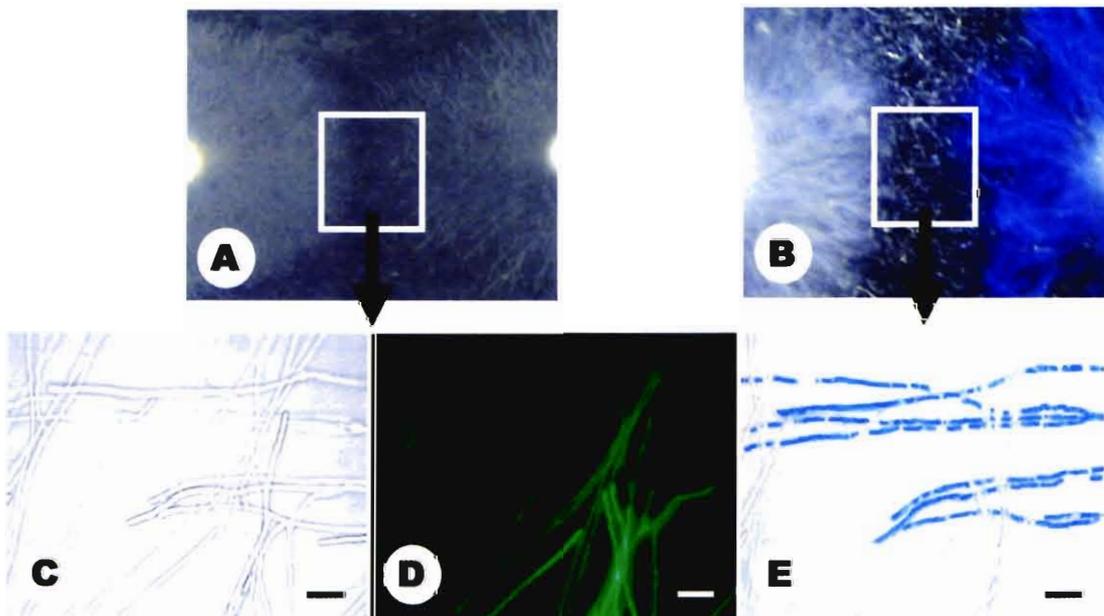


Fig. 2. Discrimination of GFP- and GUS-marked *Fusarium oxysporum* at same sight of observation. A: Fungal mycelia of GFP-marked *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (FOM-001) (left) and GUS-marked *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL-005) (right) on hygromycin-containing Czapek medium. B: Blue-stained mycelium of FOL-005 in A. C: Vegetative hyphae of FOM-001 and FOL-005. D: GFP-fluorescing hyphae of FOM-001 in C. E: Blue-stained hyphae of FOL-005 in C. These hyphae were first observed under fluorescence microscopy and then GUS-stained for light microscopic observation. Bar represents 10  $\mu$  m.

(2日目に接種部位(2 cm)を切断し、蛍光顕微鏡でGFP遺伝子発現を観察したところ、FOM-001の菌糸細胞で緑色蛍光を確認することができた。また、同サンプルをGUS反応液に浸漬した後、光学顕微鏡下でGUS遺伝子発現を観察したところ、FOL-005の菌糸細胞内でインジゴ形成が確認された。以上のことから、異なるマーカー遺伝子の発現により、トマト根上で2分化型菌の識別が可能となった(図3)。

このようにして、遺伝子工学技術を用い、種々のマーカー遺伝子を病原性および非病原性フザリウム病菌に付与すれば、その遺伝子発現の相違により、明確に両菌を識別することができるとともに、宿主植物および非宿主植物根上での本菌の感染挙動が明確になるものと考えられる。

### 謝辞

本研究を行うにあたり近畿大学学内研究助成No. GS10)の援助を受けた。

### 引用文献

- 1) A. L. LAGOPODI, A. F. J. RAM, G. E. M. LAMERS, P. J. PUNT, C. A. M. J. J. VAN DEN HONDEL, B. J. J. LUGTENBERG and G. V. BLOEMBERG : *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **15**, 172-179 (2002)
- 2) C. ALABOUVETTE and Y. COUPEAUDIER : *In* Biological Control of Plant Diseases (E. C. TJAMOS, G. C. PAPAIVAS and R. J. COOK, eds.) 415-426, *Plenum Press, New York*, (1992)
- 3) H. C. KISTLER and U. K. BENNY : *Curr. Genet.*, **13**, 145-149 (1988)
- 4) H. TANPO, H. TOYODA, T. NONOMURA and S. OUCHI : *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, **60**, 225-227 (1994)
- 5) J. R. BAO, J. VELEMA, K. F. DOBINSON and G. LAZAROVITS : *Can. J. Plant Pathol.*, **22**, 70-78 (2000)
- 6) J.R.BAO and G.LAZAROVITS : *Phytopathology*, **91**, 449-456 (2001)
- 7) P. C. KEARNEY and J. M. TIEDJE : *In* Biotechnology for Crop Protection (P.A. HEDIN, J.J. MENN and R. M. HOLLINGWORTH, eds) 352-358, *American Chemical Society, Washington, D.C.*, (1988)
- 8) R. MAOR, M. PUYESKY, B. A. HORWITZ and A. SHARON : *Mycol. Res.*, **102**, 491-496 (1998)
- 9) T. NONOMURA, H. TOYODA, Y. MATSUDA and S. OUCHI : *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, **62**, 576-579 (1996)
- 10) T. NONOMURA, H. TOYODA, Y. MATSUDA and S. OUCHI : *Bull. Inst. Compr. Agric. Sci. Kinki Univ.*, **6**, 53-56 (1998)
- 11) T. SPELLIG, A. BOTTIN and R. KAHMANN : *Mol. Gen. Genet.*, **252**, 503-509 (1996)
- 12) Y. COUPEAUDIER, M.-J. DABOUSSI, A. EPARVIER,

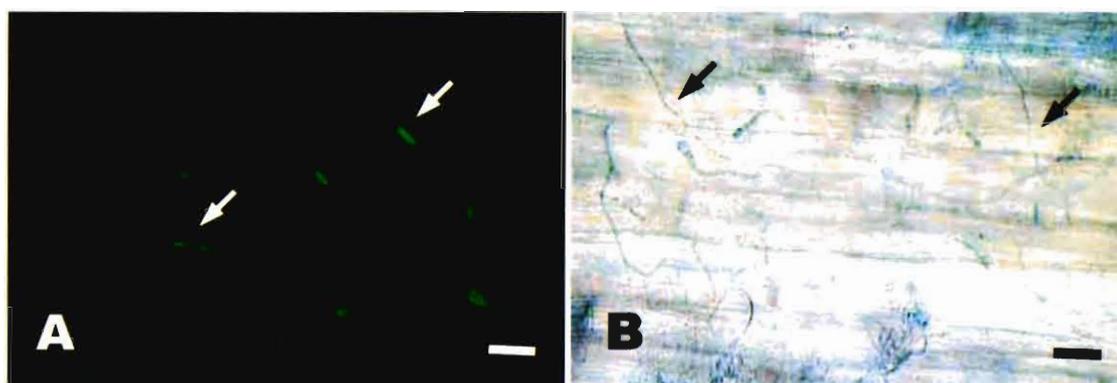


Fig. 3. Detection of GFP-marked nonpathogenic (FOM-001) (A) and GUS-marked pathogenic fungi (FOL-005) (B) inoculated into roots of tomato cotyledonal seedlings. Microconidia of FOM-001 and FOL-005 were mixedly inoculated and observed by a fluorescent and light microscope 2 days after inoculation. Bar represents 10  $\mu$  m.

- T. LANGIN and J. ORCIVAL : *Appl. Environ. Microbiol.*, *59*, 1767-1773 (1993)
- 13) M. CHALFIE, Y. TU, G. EUSKIRCHEN, W. W. WARD and D. C. PRASHER : *Science*, *263*, 802-805 (1994)
- 14) R. A. JEFFERSON : *Plant Mol. Biol. Rep.*, *5*, 387-405 (1987)
- 15) J. P. JONES : In Compendium of Tomato Diseases (J. B. JONES, J. P. JONES, R. E. STALL and T. A. ZITTER, eds.) 15, *The American Phytopathology Society, Minnesota*, (1997)
- 16) R. D. MARTYN and T. R. GORDON : In Compendium of Cucurbit Diseases (T. A. ZITTER, D. L. HOPKINS and C. E. THOMAS, eds.) 14-15, *The American Phytopathological Society, Minnesota*, (1998)
- 17) R. A. JEFFERSON : *Nature*, *342*, 837-838 (1989)
- 18) T. NONOMURA, Y. MATSUDA, M. TAKASUGI, T. OOTANI, T. HASEGAWA, K. MIYAJIMA, T. HATASA and H. TOYODA : *J. Gen. Plant Pathol.*, *67*, 273-280 (2001)
- 19) B.G. TURGEON, H. BOHLMANN, L.M. CIUFFETTI, S.K. CHRISTIANSEN, G. YANG, W. SCHAFER and O.C. YODER : *Mol. Gen. Genet.*, *238*, 270-284 (1993)