

イチゴ萎黄病菌の遺伝子診断技術の開発

1. 試験のねらい

イチゴ萎黄病 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *fragariae*) は、葉の黄化・奇形、萎凋、枯死などを招き、最重要病害の一つとなっている。本病の診断には、病原菌の分離、培養、接種試験等を行う必要があるため、多くの時間と労力が必要となる。

そこで、本菌に特異的なプライマーを作製し、萎黄病菌の迅速かつ高精度な遺伝子診断技術を開発する。

2. 試験方法

(1) 供試菌株

種または分化型の異なる *Fusarium* 属菌 (ジーンバンク分譲菌株) 計 21 菌株 (表-1)。

(2) RAPD による多型検出

県内菌株から抽出した DNA を 120 種類のランダムプライマーを用いて、PCR を行い、増幅する RAPD マーカーを検出した。

(3) RAPD マーカーの STS 化

本菌の識別が可能な RAPD マーカーは、特異的断片を切り出し、TA クローニング後、塩基配列を決定した。得られた塩基配列情報をもとにプライマーを設計し、STS 化マーカーの増幅の有無を検討した。

(4) イチゴ萎黄病感染株からの検出

本菌接種 4 週間後のイチゴ苗を用いて、最下位葉の托葉、根 (先端部および基部) から DNA を抽出し、最適検出部位の検討を行った。

3. 試験結果および考察

(1) 120 種類のランダムプライマーを用いて PCR 増幅を行った結果、11 プライマーで RAPD マーカーの増幅が認められた。

(2) 11 個の RAPD マーカーについて STS 化を行い、得られた増幅断片全長の塩基配列により、数種のプライマーを設計した (表-2)。

(3) E18-164F/E18-1554R をプライマーセットとした PCR 反応では、本菌の他、分化型の異なる 7 菌株 (*F.oxysporum* f.sp. *cucumerinum*, *dianthi*, *lagenariae*, *lini*, *lycopersici*, *niveum*, *spinaciae*) で同じサイズの増幅が認められた。そこで、この PCR 反応液を鋳型とした Nested-PCR を行ったところ、E18-750R2 を Nested-PCR プライマーとし、アニーリング温度を 52 とした PCR 反応により本菌をほぼ特異的に検出することが可能となった (図-1、2)。

(4) 県内から分離した本菌の接種株からの検出では、根の基部に比較して托葉や根の先端部での検出効率が高く、特に托葉部位が検出部位として適していることが明らかとなった (図-3)。

4. 成果の要約

イチゴ萎黄病菌に対して特異性の高い PCR プライマーセットを開発し、短時間で高精度な診断が可能となった。

(担当者 環境技術部 病理昆虫研究室 後藤知昭*) *現 経営技術課

表-1 供試した *Fusarium* 属菌 (ジーンバンク分譲菌株)

No	MAFF番号	学名	宿主
1	305556	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>asparagi</i>	アスパラガス
2	103071	<i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>batatas</i>	サツマイモ
3	103054	<i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i>	キュウリ
4	305946	<i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>dianthi</i>	カーネーション
5	727510	<i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>fragariae</i>	イチゴ
6	305610	<i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>gladioli</i>	グラジオラス
7	103008	<i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>lagenariae</i>	ユウガオ
8	305120	<i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>lini</i>	アサ
9	103007	<i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	トマト
10	103051	<i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>melongenae</i>	ナス
11	305544	<i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i>	メロン
12	305543	<i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>niveum</i>	スイカ
13	103044	<i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>radisis-lycopersici</i>	トマト
14	103058	<i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>raphani</i>	ダイコン
15	103059	<i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>spinaciae</i>	ホウレンソウ
16	235725	<i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>tracheiphilum</i>	ササゲ
17	235107	<i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>tulipae</i>	チューリップ
18	235104	<i>F.roseum</i> f.sp. <i>cerealis</i>	チューリップ
19	731042	<i>F.solani</i> f.sp. <i>radicicola</i>	ニンジン
20	305125	<i>F.solani</i> f.sp. <i>psi</i>	スイートピー
21	235949	<i>F.moniliforme</i>	イネ



図-1 E18-164F/E18-1554Rのプライマーセットを用いた *Fusarium* 属菌のPCR増幅
M: 100bpラダー
1~21: 表-1参照

表-2 供試したプライマー配列

プライマー名	配列
E18.2-F	5'-AATGACGGCGGGTTGGAAA-3'
E18.2-R	5'-GGATATCGGTCAAGAGAACGTAGA-3'
E18-164F	5'-GATCACCTGCGAAGCGATATAT-3'
E18-1554R	5'-GCAATACACTGCATATAGCAT-3'
E18-750R2	5'-GAGTATACTGTTAGATT-3'



図-2 E18-164F/750R2プライマーセットを用いたNested-PCRによるイチゴ萎黄病菌の特異的検出
M; 100bpラダー
1~21: 表-1参照

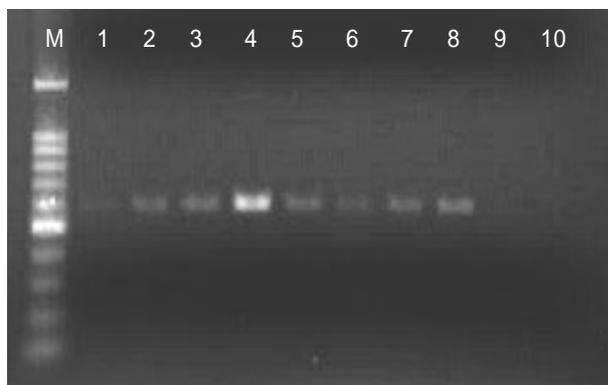


図-3 E18.164F/E18.750R2のプライマーセットを用いたNested-PCRによるイチゴ萎黄病菌の特異的検出
M:100bpラダー
1,2:F10S 3,4:F31W 5,6:F112W2
7,8:NPF75 9,10:無処理区
1~8:現地採集菌株