

# RAPD マーカーを利用した白紋羽病菌系統判別の試み

## 1. 試験のねらい

栃木県ではナシやブドウで白紋羽病の発生が見られ、特にブドウの早期加温ハウス栽培で問題となっているが、枯死した樹を改植して対応しているのが現状である。しかし、改植した樹も3年程度で発病するケースが多く、実用的かつ有効な防除法の確立が望まれている。そこで、白紋羽病菌の宿主範囲について解明し、実用的な防除技術を開発するため、DNA マーカー利用の可能性について、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法を用いて検討した。

## 2. 試験方法

供試菌株は岡山 No. 1、岡山 No. 2、岡山 No. 4、岡山 No. 6、岡山 No. 7、岡山 No. 8、岡山 No. 9、岡山 No.10 (分離源ブドウ)、岡山 No. 3 (分離源アスパラガス)、印-3 (分離源ナシ)、R-24 (分離源クリ)、非病原性 *Fusarium* U-7 (分離源サツマイモ) の12菌株とした。全DNAの抽出は Lee and Taylor の方法に従い、RAPD 法はプライマーに日本ジーン社の12 mer のオリゴヌクレオチド (表-1) を用い、反応溶液組成は表-2、PCR 反応条件は図-1 のとおり行った。PCR 反応後は、各サンプルから5  $\mu$ l とり、1.5% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した後、UV 照射下で増幅されたバンドを確認した。

## 3. 試験結果及び考察

- (1) 白紋羽病菌及び非病原性 *Fusarium* の DNA 抽出は Lee and Taylor の方法が適用できた。本抽出法は様々な糸状菌の簡易抽出法として適用できると思われる。
- (2) 表-1 のプライマーを用い、表-2 及び図-1 の条件で PCR を行ったところ、112個の RAPD マーカーが得られた。
- (3) A04、A08、A22、A30の4つのプライマーを用いて、供試した全ての菌株相互間の識別が可能であった (図-2、3、4、5)。
- (4) プライマー A22のマーカー①は、ブドウより分離した菌株の岡山 No. 2を除いた全菌株から検出され、ナシ及びクリから分離された菌株からは検出されなかった。
- (5) A05、A06、A07、A08、A22の5つのプライマーについては、再現性が確認された。
- (6) これらのことから、RAPD 法による白紋羽病菌の系統判別の可能性が示唆されたが、さらに多くの菌株を収集し、データの蓄積を図る必要がある。

## 4. 成果の要約

白紋羽病菌の全 DNA は簡易な方法で抽出が可能であり、抽出した DNA は PCR による増幅が可能であった。RAPD 法を用いて供試した全ての菌株相互間の識別が可能であり、白紋羽病菌の系統判別の可能性が示唆された。

(担当者 生物工学部 生井 潔)

表-1 使用したランダムプライマーとアニーリング温度

| アニーリング温度 | 使用プライマー番号                       |
|----------|---------------------------------|
| 42℃      | A05、A06、A07、A08、A22             |
|          | A05+A06、A05+A08、A05+A22、A06+A08 |
|          | A06+A22、A07+A08、A07+A22、A08+A22 |
| 38℃      | A02、A04、A24、A25、A29、A30、A41、A44 |

表-2 PCR 反応溶液組成

| 成分                               | 溶量                            | 終濃度                               |
|----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| template DNA (5 ng / $\mu$ l 程度) | 2 $\mu$ l                     | 10ng 程度                           |
| 10× PCR buffer                   | 2.5 $\mu$ l                   | 1×                                |
| dNTP mix (2.5mM)                 | 2 $\mu$ l                     | 0.2mM                             |
| primer (7.8 $\mu$ M)             | 1.6(1+1) $\mu$ l <sup>*</sup> | 0.5(0.3+0.3) $\mu$ l <sup>*</sup> |
| Taq (5 U / $\mu$ l)              | 0.2 $\mu$ l                   | 1 U                               |
| + DW                             |                               |                                   |
| total                            | 25 $\mu$ l                    |                                   |

※： ( ) 内はプライマーを2種類組合せて使用の時

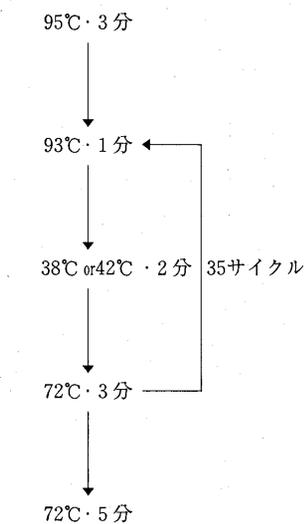


図-1 PCR 条件

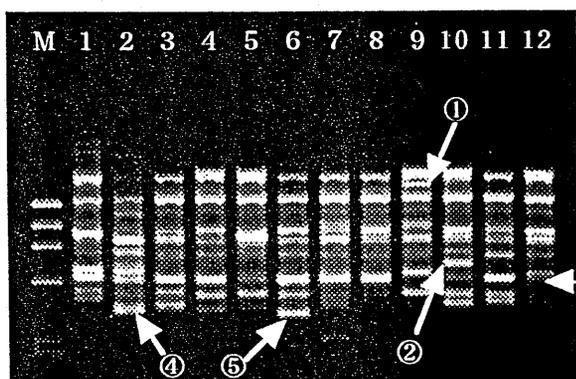


図-2 プライマー-A04を用いたPCRの電気泳動結果

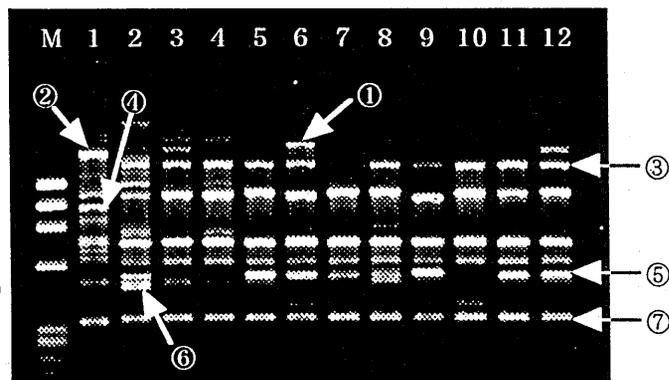


図-3 プライマー-A08を用いたPCRの電気泳動結果

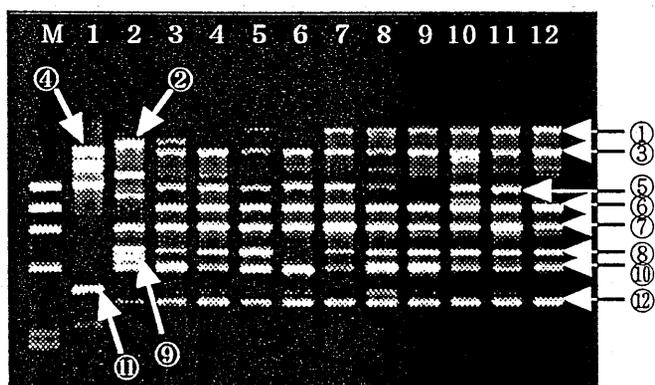


図-4 プライマー-A22を用いたPCRの電気泳動結果

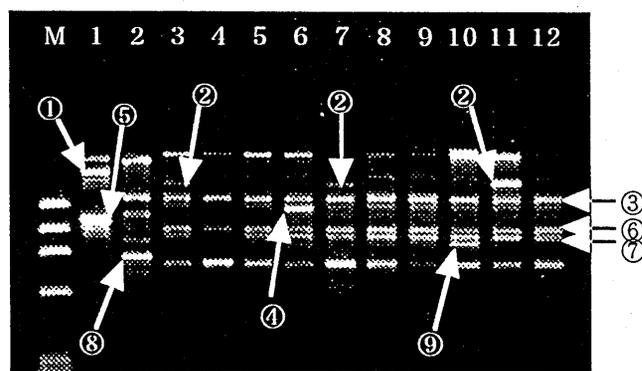


図-5 プライマー-A30を用いたPCRの電気泳動結果

M : マーカー ( $\phi$  X174/Hae III digest)、1 : U-7、2 : 印-3、3 : R-24、4 : 岡山 No. 3、5 : 岡山 No. 1、6 : 岡山 No. 2、7 : 岡山 No. 4、8 : 岡山 No. 6、9 : 岡山 No. 7、10 : 岡山 No. 8、11 : 岡山 No. 9、12 : 岡山 No. 10