

リアルタイム PCR によるトマト萎凋病菌レースの特異識別

東京農工大学 ^{いなみ}稲見 ^{けいご}圭悟・^{よしおか}吉岡 ^{ちづ}千津・^{てらおか}寺岡 ^{とおる}徹・^{ありえ}有江 ^{つとむ}力
 埼玉県農林総合研究センター ^{ひら}平 ^の野 ^{やす}泰 ^し志
 中央農業総合研究センター ^{かわ}川 ^べ部 ^{まさ}真 ^と登
 農業環境技術研究所 ^{つし}對 ^ま馬 ^{せい}誠 ^や也

はじめに

土壌環境中には多種多様な微生物が棲息するが、この一部は植物に病害を引き起こす病原菌である。土壌病原菌によって引き起こされる病害を回避するため、臭化メチルなどの土壌燻蒸剤で土壌消毒を行うことが一般的であったが、モントリオール議定書に基づく臭化メチルの使用禁止や減化学農薬を求める社会的背景の下、土壌病害の防除はますます困難になりつつある。なかでも *Fusarium oxysporum* による病害は、病原菌が耐久性を有する厚膜胞子で長期間土壌中に生存するため、一度発生すると防除は極めて困難である。

F. oxysporum 種内には分化型およびレース（本稿では便宜的に併せて病原型と表現する）が分化している。*F. oxysporum* による病害は多種の植物で報告されているため、*F. oxysporum* が多犯性であるかのような印象を与えるが、実際には、各菌株の宿主範囲は極めて狭く、その宿主範囲に基づいて「分化型 *forma specialis* (f. sp.)」に分類されている。例えば、トマト萎凋病菌 f. sp. *lycopersici* はトマトのみを、イチゴ萎黄病菌 f. sp. *fragariae* はイチゴのみを宿主とし得る。さらに、一部の分化型内には感染可能な品種が異なる「レース」の分化が見られ、例えばトマト萎凋病菌では三つのレース（1～3）が報告されている。レースと品種の関係は、萎凋病菌が有する非病原力遺伝子 (*AVR1*, *AVR2*, *AVR3*) と品種が有する萎凋病抵抗性遺伝子 (*I*, *I-2*, *I-3*) の組み合わせに基づき、遺伝子対遺伝子説 (FLOR, 1956) で説明される (表-1)。一方で、植物に対する病原性をもたないと考えられる、いわゆる非病原性 *F. oxysporum* 菌も環

中にはあまねく棲息する。萎凋病罹病トマト組織からさえ、萎凋病菌だけでなく非病原性の菌株がしばしば分離される。

土壌病害の防除は大変困難であるため、土壌検診を行ってどのような病原菌が潜んでいるのかを知ることが栽培する植物種や品種の選定、耕種の防除措置立案等の点で農業生産者にとって重要な情報になり得る。そのためには、病原菌を非病原性菌株と区別するだけでなく、病原型をも識別する技術が必要になる。*F. oxysporum* の病原型を形態などによって識別することは不可能であるため、これまでは分離菌を判別品種に接種し、発病の有無を検定することで病原型を識別してきた。しかしこの方法による識別には約2か月を要することから、より迅速な病原型識別技術の確立が求められている。識別の迅速化を目指して、免疫学的手法の利用 (ARIE et al., 1998)、アインザイムや多型解析、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の複合的利用 (ATTITALA et al., 2004) 等が試みられたが、病原型識別への利用には至らなかった。

本稿では、トマト萎凋病菌およびそのレースの特異識別を目的としたリアルタイム PCR の応用例を紹介する。なお、本稿は INAMI et al. (2010) の概要であるため、詳しくはそちらをご参照いただきたい。

I TaqMan プローブ法によるリアルタイム PCR の原理

詳しい原理については佐々木 (2003) などをご参照いただきたい。リアルタイム PCR は、サーマルサイクラー (DNA 増幅器) と分光蛍光光度計を併せた装置を用いて行い、DNA 断片の増幅を蛍光強度によってモニタリングする。TaqMan プローブ法を用いたリアルタイム PCR による病原型識別の原理の概要を図-1 に示す。TaqMan プローブの蛍光色素 (FAM) の蛍光はクエンチャーによって消光されている (図-1 A)。病原型菌株特異識別用プライマーおよびプローブと相同の配列が鋳型 DNA に存在、すなわち、標的病原型菌株がサンプル

Differential Determination of Races of Tomato Wilt Pathogen by Real-Time PCR. By Keigo INAMI, Chizu YOSHIOKA, Yasushi HIRANO, Masato KAWABE, Seiya TSUSHIMA, Tohru TERAOKA and Tsutomu ARIE

(キーワード: *Fusarium oxysporum*, 分化型, レース, リアルタイム PCR, TaqMan プローブ, 非病原力遺伝子)