

イチゴ萎黄病菌など分子マーカーによる *Fusarium oxysporum* の分化型・レースの診断法

岐阜大学生命科学総合研究支援センターゲノム研究分野 須賀晴久

はじめに

Fusarium oxysporum は世界中の土壌に生息し、100種以上の植物に萎凋、つる割れ、根腐れ等の病害を引き起こす重要な病原菌である。しかし、種という単位ではなく菌株という単位で見ると病気を起こす植物は基本的に1種ないし数種に限られている。つまり、個々の菌株には宿主植物種に対する特異性があり、例えばトマトの病原菌株は、トマト以外のイチゴなどに病気を起こすことはなく、逆にイチゴの病原菌株は、イチゴ以外のトマトなどに病気を起こすことはない。そこで、*F. oxysporum* は宿主植物種への特異性に基づいて、例えばトマトの病原菌は forma specialis (f. sp.) *lycopersici*, イチゴの病原菌は f. sp. *fragariae* のように種内が分化型 (f. sp.) に細分化されている。また分化型によってはさらに個々の菌株に植物品種への特異性が見られるものもあり、そのような分化型はさらにレースとして細分化されている。植物栽培現場では植物体や土壌等から *F. oxysporum* がよく分離されるが、病原菌の特定にあたっては特に注意を要する。というのも *F. oxysporum* は植物病原菌ばかりではなく、病気を起こさない、つまり非病原菌もあり、極端な場合、病斑部から分離されたものでも必ずしも病原菌とは限らないからである。非病原性 *F. oxysporum* は病害の発生の有無にかかわらず、栽培現場で頻繁に分離されるが、病原菌とは形態的な見分けがつかないため、病原菌と混同されやすい。分離された *F. oxysporum* が病原菌かどうかを判定するには、実際に分離菌を植物に接種して病気を起こさせてみなければならない。接種試験には設備、知識、技術が必要なうえ、植物を栽培するための期間、さらに接種して発病するまでの期間も必要で、通常はかなりの時間が必要となる。先に述べたように非病原性の *F. oxysporum* は植物栽培現場には普遍的に存在するため、*F. oxysporum* が分離された場合に病原菌か非病

原菌かにかかわらずすべて防除するというのでは、作業量やコストがかかり過ぎることになる。そこで *F. oxysporum* について、迅速簡易に病原菌(分化型やレース)を診断するための方法が求められている。ここでは *F. oxysporum* において分化型・レース特異的な PCR 用プライマーの開発に利用されている inter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP)-PCR およびそれを利用したイチゴ萎黄病菌の簡易診断法の開発、これまでに開発された *F. oxysporum* の分化型・レース診断用分子マーカーを紹介する。

I IRAP-PCR とは

IRAP-PCR とは、ゲノム上のトランスポゾン関連配列間を PCR で増幅させる方法のことで、主に増幅 DNA の多型を検出する目的に利用されている。通常トランスポゾンそのものを PCR で増幅するのであれば、1ペア(2種類)のプライマーを内向きになるように用意する。これに対し IRAP-PCR では、あえて外向きのプライマーを使用して PCR を行う。外向きのプライマーで PCR を実施すると、理論上、プライマーはゲノム DNA にアニーリングして新しい DNA 鎖を合成するが、近傍に反対向きにアニーリングするもう1種類のプライマーがない限り、指数関数的な DNA の増幅が起こらない。ここで言う近傍とは PCR による増幅が可能なサイズ(距離)のことである。一般の Taq DNA ポリメラーゼの場合、PCR で増幅できる DNA は、数千 bp であり、特殊な Long PCR 用のポリメラーゼを利用する場合でも 10 Kbp 程度とされている。一般にゲノム上でこのような近距離にトランスポゾン関連配列が位置することは多くないため、外向きのプライマーを用いた PCR ではあまり DNA の増幅を期待できない。しかし、*F. oxysporum* の場合、これまでにゲノムから様々な種類のトランスポゾン関連配列が多数検出されており、ゲノム全体の 5% にも達するとされている。実際に *F. oxysporum* では IRAP-PCR により DNA が増幅し、その増幅パターンに種内多型も認められている。したがって、そのような増幅 DNA 中に分化型やレースに特異的なものが見つければ、それらを診断用の分子マーカーにすることができる。本来、分化型やレースの診断ではそれらを決定している遺伝子を

Diagnostic Methods of Forma Specialis Including f. sp. *fragariae* and Race of *Fusarium oxysporum* Based on Molecular Markers.
By Haruhisa SUGA

(キーワード: 同定, 宿主特異性, 分子診断, 土壌伝染性植物病原菌, 検出)