

試験研究成果普及情報

部門	病虫害	対象	研究
課題名：遺伝子診断法によるトマト萎凋病菌レース判別技術の開発			
〔要約〕 開発した遺伝子診断法はトマト萎凋病菌の非病原力遺伝子の転写の有無とその変異を調べることによりレースを判別するものである。従来の生物検定ではトマトに菌を接種してから3週間以上を要するのに対し、本法は6日程度でレースを判別することができる。			
キーワード トマト、トマト萎凋病菌、 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i> 、レース判別、遺伝子診断			
実施機関名	主 査	農林総合研究センター 生物工学研究室	
	協力機関	農林総合研究センター 病理昆虫研究室、担い手支援課専門普及指導室	
実施期間	2014年度～2016年度		

〔目的及び背景〕

トマト萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*) はレースごとに抵抗性を持つ台木や品種が異なることから、本病の防除では圃場で発生しているレースを把握することが望ましい。従来のレース判別法である生物検定は、検定植物の準備や管理に多大な労力がかかる上、トマトに菌を接種してから3週間以上を要するため、多くのサンプルを診断することが難しかった。一方、近年の研究によりトマト萎凋病菌のレース分化に関与する非病原力遺伝子の変異様式が明らかになっている。そこで、この非病原力遺伝子を調べることにより、生物検定よりも迅速にレースを判別する方法を開発した。

〔成果内容〕

- 1 開発した遺伝子診断法は、トマト萎凋病菌の持つ3種類の遺伝子 (AVR: 非病原力遺伝子) AVR1、AVR2 及び AVR3 の転写とその変異の有無を調べることによりレースを判別する。まず、RT-PCR によって AVR3 の転写を検出してトマト萎凋病菌であるかを確認し、AVR1 及び AVR2 の転写を検出して AVR1 が検出される場合はレース 1、されない場合はレース 2 または 3 と判別する。さらにレース 2 とレース 3 については、AVR2 の変異の有無を CEL ヌクレアーゼによる遺伝子変異検出法を用いて調べ、変異が存在する場合はレース 3 と判別する (図 1、2、3、表 1)。
- 2 本法を用いて千葉県内のトマトから分離した *Fusarium* 属菌 36 菌株及び農業生物資源ジーンバンクより取得したレース 1 及びレース 2 の菌株、他県で分離されたレース 3 の菌株を調査し、生物検定のレース判別結果と比較した結果、遺伝子診断法だけで判別できなかった 3 菌株以外は、全ての菌株で両手法によるレース判別結果が一致した (表 2)。以上から、本遺伝子診断法は多くの菌株に適応可能と考えられる。
- 3 本遺伝子診断法はトマトに菌を接種してからおよそ 6 日でレースを判別することができる

できる。

[留意事項]

AVR3 の転写が検出されるが AVR1、AVR2 の転写が検出されない場合は、本遺伝子診断法ではレースを判別することができないため、生物検定を実施する。

[普及対象地域]

県内全域の研究機関及び指導機関

[行政上の措置]

[普及状況]

[成果の概要]

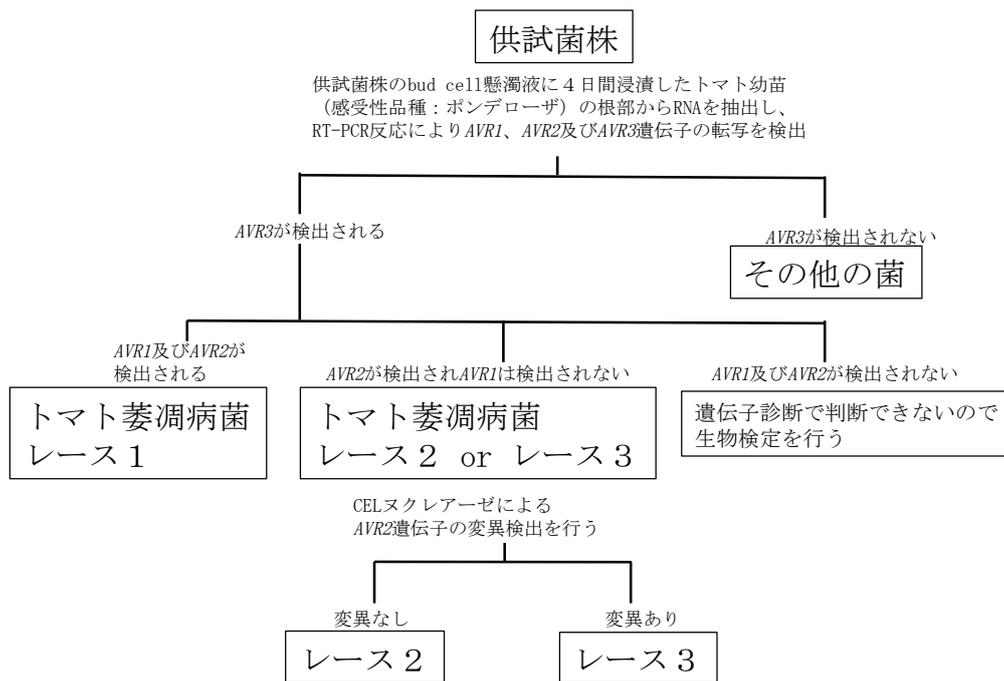


図 1 開発した遺伝子診断法によるレース判別の流れ

表 1 遺伝子診断法に用いるプライマー

用途	プライマー名	配列 (5' - 3')	標的	引用文献
RT-PCR	P12-F1	CCCCGAATTGAGGTGAAG	AVR3	Rep <i>et al.</i> (2004) <i>Molecular Microbiology</i> , 53(5): 1373-1383
	P12-R1	AATAGAGCCTGCAAAGCATG		
	SIX4F	ACTCGTTGTTATTGCTTCGG	AVR1	
	SIX4R	CGGAGTGAAGAAGAAGCTAA		
	FP962	TGAGCGGGCTGGCAATTC	AVR2	Michielse <i>et al.</i> (2009) <i>PLoS Pathogens</i> 5(10): e1000637
	FP963	CAATCCTCTGAGATAGTAAG		
CELヌクレアーゼによる変異検出	SIX3-F1	CCAGCCAGAAGGCCAGTTT	AVR2	Van der Does <i>et al.</i> (2008) <i>Environmental Microbiology</i> 10(6): 1475-1485
	SIX3-R2	GGCAATTAACCACTCTGCC		

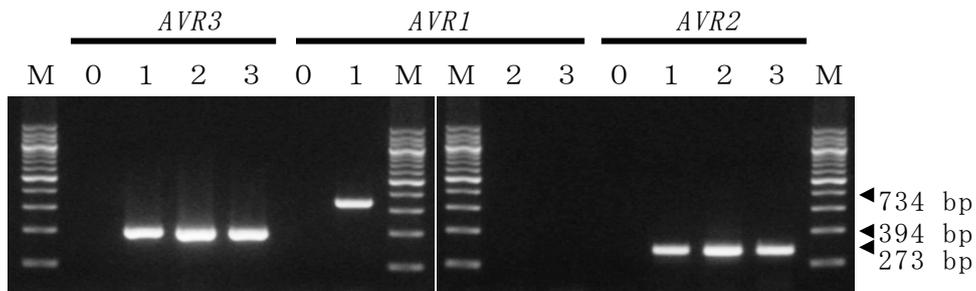


図2 トマトに接種した各レース菌株の非病原力遺伝子の RT-PCR 結果

注) M: 200bp ladder marker、0: 無接種、1: レース1、2: レース2、3: レース3

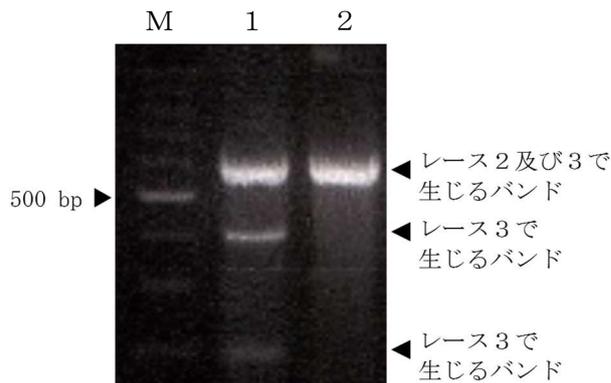


図3 CELヌクレアーゼによるレース2とレース3の判別

注1) M: 100bp ladder marker、1: レース3、2: レース2

表2 千葉県のとまとから分離された *Fusarium* 属菌 36 菌株のレース判別結果

判別法	判別結果	菌株数
遺伝子診断と生物検定の 結果が一致	レース1	2
	レース2	30
	トマト萎凋病菌ではない	1
生物検定 ^{注)}	レース2	2
	病原性なし	1
計		36

注) AVR3 は検出されたが AVR1 及び AVR2 が検出されず、本遺伝子診断法では判別できなかった。生物検定: 播種後 25°C で 10~12 日栽培したトマト苗 (ボンデローザ (農業生物資源研究所 JP32937): 萎凋病抵抗性なし、桃太郎 (タキイ種苗): レース1 抵抗性、桃太郎エイト (タキイ種苗): レース2 抵抗性、ブロック (サカタのタネ): レース3 抵抗性) 各 4 株に供試菌株の bud cell 懸濁液 (10⁵ 個/mL) を株あたり 3mL 接種し、25°C で 21 日間栽培後に萎凋または導管褐変を呈した株が 2 株以上の品種を感受性と判断し、病原菌のレースを判定した。

[発表及び関連文献]

中田菜々子ら、RT-PCR 及び CEL ヌクレアーゼを用いたトマト萎凋病菌レースの遺伝子診断法、平成 29 年度日本植物病理学会関東部会 (口頭発表)、2017 年

[その他]

千葉県ではレース3の発生は未確認である。万が一発生が認められた際にも、予め診断技術を確立しておくことで迅速に対応できる。