

15. PCR法によるすすかび病菌の特異的検出法の確立

岡久美子・岡田清嗣・大木 理*・望月知史* (*大阪府立大)

1. 目的

すすかび病菌 (*Mycovellosiella natrassii*) によって引き起こされるすすかび病は、施設ナス栽培地で発生し、多大な被害をもたらしている。本病はナス葉裏面に白～灰褐色のビロード状の病斑を形成し、最終的に葉全体が黄化し落葉する。本病の防除には発生初期の薬剤散布が効果的であるが、本菌の発病に至るまでの潜伏期間は長く、防除のタイミングを逸して被害を拡大させている。このことより、本菌の感染初期における効果的な防除を行うには、病徴が現れる前、すなわち、潜在感染している病原菌の早期検出が重要である。近年、短時間で検出感度が高い病原菌の検出方法として、PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)法を用いた遺伝子診断法が活用されている。そこで、本研究ではPCR法によるすすかび病菌の早期検出法の確立を試みた。

2. 方法

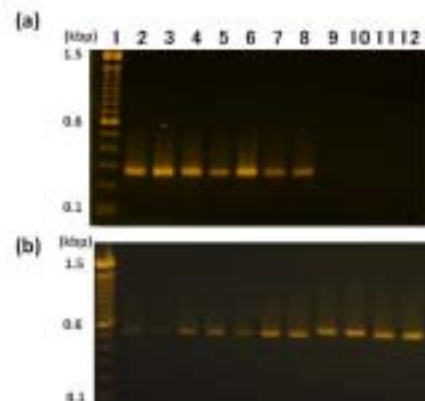
すすかび病菌から抽出したDNAにおけるリボソームRNA遺伝子のInternal transcribed spacer(ITS)領域をクローニングした。得られたITS領域の塩基配列中にすすかび病菌に特異的な276塩基の産物を増幅するPCRプライマー、MyNF(5'-AGGTCAATTTAACACTGCAT-3')とMyNR(5'-CTCAGCCGGAAGACTTTAAG-3')を設計した。本プライマーの有効性を確認するために、すすかび病菌を含むナスの病原菌のDNAを鋳型としてPCRを行った。次に、すすかび病菌分生子(10⁵個/ml)を噴霧接種1か月後に葉の裏面に病斑が形成され、その病斑部およびその周辺の無病徴部(見かけ上は健全部)、また無病徴である上位葉(全くの健全部)の3か所よりDNAを抽出し、本プライマーを用いてすすかび病菌のPCR検出を行った。

3. 結果および考察

1)すすかび病菌に特異的なPCR産物を増幅するプライマーを設計し、そのプライマーの有効性を確認した結果、すすかび病菌においては標的DNA断片である276 bpのバンドが検出されたが、灰色かび病菌や黒枯病菌においてはバンドが見られなかった(第1図)。このことより、本プライマーによるすすかび病菌の検出が可能であることが示唆された。

2)すすかび病菌を接種したナス葉上の病斑部およびその周辺部、上位葉のDNAを鋳型としたPCR検出を行った結果、病斑部およびその周辺部において増幅産物が検出されたが、上位葉では検出されなかった。このことより、肉眼では病斑が観察されないが潜在感染している部位からも本法によるすすかび病菌の検出が可能であることが明らかとなった。

3)以上のことより、本PCR法は、すすかび病菌を迅速、簡便に検出するのに有効であると考えられ、今後、実際の栽培現場における発生予察に利用可能かどうかの検討を行う。



第1図.PCR法による各病原菌の検出

(a) ナスすすかび病菌特異的プライマー

(b) ITS1, ITS4 プライマー

1:マーカー,2-8:ナスすすかび病菌,9,10:ナス黒枯病菌,11,12:ナス灰色かび病菌

PCR法によるナスすすかび病菌の特異的検出法の確立

食の安全研究部 防除土壌グループ・*大阪府立大



岡 久美子・岡田 清嗣・大木 理*・望月 知史*

ナスすすかび病は、施設ナス栽培地で発生し、多大な被害をもたらしている。本病の防除には発生初期の薬剤散布が効果的ではあるが、本菌の発病に至るまでの潜伏期間は長く、防除のタイミングを逸して被害を拡大させている。このことより、本菌の感染初期における効果的な防除を行うには、病徴が現れる前に病原菌の早期検出が重要であり、本実験ではPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)法によるすすかび病菌の特異的検出法の確立を試みた。



ナスすすかび病

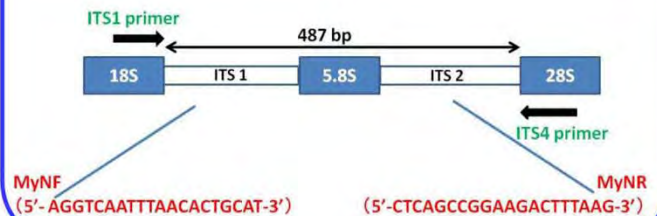


ナスすすかび病菌分生子
(*Mycovellosiella nattrassii*)

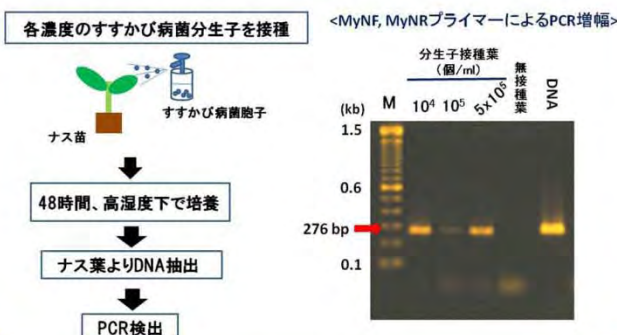
病原菌特異的プライマーを用いたPCR法とは



すすかび病菌rDNAのITS領域における特異的プライマーの設計



各濃度のすすかび病菌接種ナス葉からのPCR検出

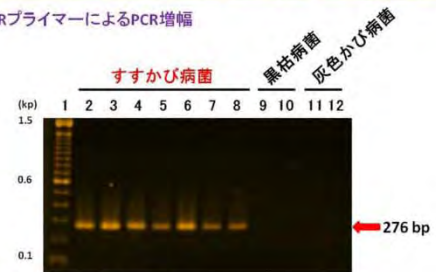


すすかび病菌接種ナス苗からのPCR検出



特異的プライマー(MyNF, MyNR)によるすすかび病菌のPCR検出

(a) MyNF, MyNRプライマーによるPCR増幅



(b) ITS1', ITS4'プライマーによるPCR増幅



まとめ

- ★ ナスすすかび病菌を特異的に検出することが可能なプライマー(MyNF, MyNR)を設計した。
 - ★ 本プライマーを用いたPCR検出では、10⁴ 個/mlの孢子濃度まで菌を検出することが可能であった。
 - ★ 肉眼では観察されない、潜在的感染部位からの菌の検出も可能であった。
- 本PCR法は、感染初期においてすすかび病菌を迅速、簡便に検出するのに有効であると考えられ、今後、実際の栽培現場における発生予察への利用が期待される。