

スギ赤枯病対策に関する研究（2）

予算区分：県 単	研究期間：平成30～令和3年度	担 当：森林科学係 白石 泉
----------	-----------------	----------------

PCR法による同定技術の確立

I はじめに

スギ赤枯病は、*Passalora sequoiae*によって引き起こされるスギ苗木生産における重大な病害である。被害対策としては、適期の薬剤散布による苗畑での被害の発生を防ぐとともに、発生時の早期発見による迅速な対処が必要であり、赤枯れ病の初期の診断が求められる。赤枯病の診断をする際には、詳細な肉眼的及び顕微鏡的観察が重要であり、他の類似する病害との識別をする必要がある。また2019年に分子生物学的手法による同定にむけ、種特異的プライマーが開発された¹⁾。そこで、本年度は発生時の早期発見を目的とした複数の診断方法の実現を目指し、国立研究開発法人森林総合研究所の指導の下、菌株および罹病葉を用いてPCR法による赤枯病同定手法の確立を試みた。さらに、より早期でのPCR法による赤枯病の検出を目指し、罹病葉を罹病段階に分け、各段階でのPCR法による同定を検証した。

II 方 法

1 培養菌株と罹病葉のPCR法による赤枯病の同定

供試体は（国研）森林総合研究所より取り寄せた菌株をPDA平板培地に接種し、20℃の恒温器で培養した培養菌株と、赤枯病の罹病葉を用いた接種試験を行ったスギ苗木の罹病葉とした。赤枯病菌の種特異的プライマーを用いて供試体のDNA抽出物を鋳型としPCR増幅を行い、電気泳動で増幅の有無を確認した。DNA抽出はPrepman™ Ultra Sample Preparation Reagent（Thermo Fisher Scientific(株)）を用い、培養菌株および罹病葉から鋳型DNAを抽出した。PCR反応液は鋳型DNA 1μl、GoTaq® Green Master Mix（プロメガ(株)）12.5μl、各プライマー（10μM）0.5μl、超純水10.5μlを混合し調整した。PCR反応終了後1.5%アガロースゲルによる電気泳動を行った。アガロースゲルはアガロースS<錠>（(株)ニッポンジーン）を用い作成した。増幅したバンドをGel Green Nucleic Acid Gel Stain（コスモバイオ(株)）で蛍光染色し、確認した。



図-1 スギ赤枯病の罹病葉

2 罹病段階ごとのPCR法による赤枯病の同定

供試体は、赤枯病の罹病葉を用いた接種試験を行ったスギ苗木から抽出した、罹病段階の異なる葉とした（図-2）。なお、罹病段階の区分は表-1のとおりである。罹病段階別に1枚ずつ針葉を抽出し、供試体とした。1と同様の方法でPCR法による赤枯病菌の検出を行った。



図-2 試験に用いた罹病葉

表-1 赤枯病の罹病段階

罹病段階	1	2	3
針葉の状況	全体	全体～半分	半分～一部
色：赤褐色～褐色			
表徴：暗緑色の毛羽立ち	あり	あり	なし

III 結果及び考察

1 培養菌株と罹病葉のPCR法による赤枯病の同定

PCR法によるスギ赤枯病菌の検出結果を図-3、図-4に示す。培養菌株および罹病葉いずれにおいてもスギ赤枯病菌のバンドを確認することができた。

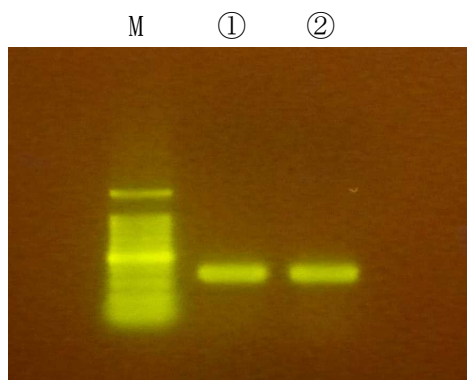


図-3 培養菌株の電気泳動結果

M:100bpラダーマーカー

①②スギ赤枯病菌

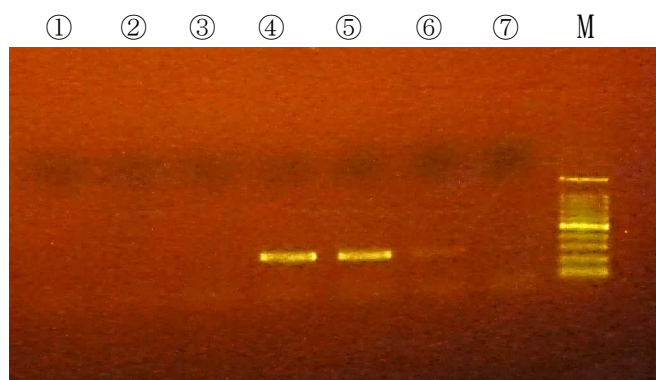


図-4 罹病葉の電気泳動結果

M:100bpラダーマーカー ①～⑦：スギ赤枯病罹病葉

罹病葉由来のDNA抽出物の希釈倍率は以下のとおり。

①	②	③	④	⑤	⑥	⑦
×1	×2	×5	×10	×100	×500	×1000

2 罹病段階ごとのPCR法による赤枯病の同定

PCR法によるスギ赤枯病菌の検出結果を図-5に示す。供試体1、2のDNA抽出物・10倍希釈において、スギ赤枯病菌のバンドをはっきりと確認することができた。今後は罹病葉からの赤枯病菌の詳細な検出条件の検討を行う予定である。

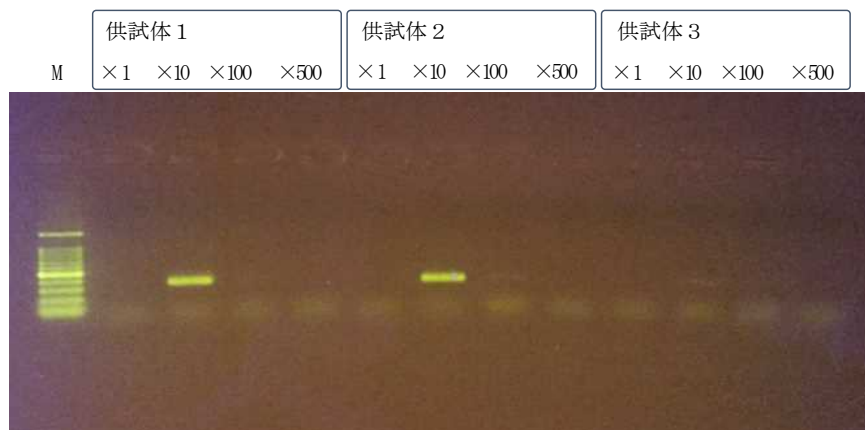


図-5 培養菌株の電気泳動結果

M:100bpラダーマーカー。供試体1, 2 スギ赤枯病菌

引用文献

- 1) 安藤裕萌：種特異的プライマーを用いたスギ赤枯病の早期診断，樹木医学研究 23巻・2号：98-99，2019