

## 試験研究成果普及情報

部門	病害虫	対象	研究
課題名：青枯病菌汚染黒ボク土壌からの新たな DNA抽出方法の確立			
[ 要約 ]黒ボク土壌からトマト青枯病菌の DNAを安定的に抽出できる KCl法を開発した。本法と PCR法を組み合わせることにより、土壌中の青枯病菌を迅速かつ高感度に検出できる。			
キーワード トマト、トマト青枯病、土壌病害、病害診断、PCR			
実施機関名	主 査	農林総合研究センター・生産環境部・微生物工学研究室	
	協力機関	農林総合研究センター・生産環境部・病理昆虫研究室	
実施期間	2006年度～2008年度		

### [ 目的及び背景 ]

トマト青枯病は、*Ralstonia solanacearum*により引き起こされる。この青枯病菌は地中深くで何年も生存し、トマト等の宿主植物が植えられると病害を引き起こす。このため、土壌中における青枯病菌の有無を判別することは極めて重要である。近年、植物病原菌の迅速検出法として遺伝子増幅法（PCR法）が利用されている。しかし、土壌中から病原菌 DNAを抽出する場合、遊離した DNAと土壌との再結合及び土壌中の PCR反応阻害物質の存在により、PCR法の適用が困難であった。そこで、青枯病汚染土壌からの効率的な DNA抽出方法を開発し、PCR法による青枯病菌検出方法を確立する。

### [ 成果内容 ]

- 1 新規に開発した KCl法を用いると、従来の方法では難しかった黒ボク土壌から、トマト青枯病菌の DNAを抽出できる。
- 2 KCl法は、図1に示した手順で行う。青枯病菌汚染土壌を 10% KCl 及びスキムミルクを含むバッファで懸濁すると、土壌と菌体の結合がはなれ菌体が遊離する。この状態で 32x gの低速遠心分離を行うことにより、土壌と菌体を分離する。この菌体を回収し、DNA抽出を行う。
- 3 KCl法と PCR法による青枯病菌検出法（Lee and Wang, 2000）を組み合わせることにより、青枯病菌の菌密度が  $10^3$ CFU/g以上の汚染土壌から病原菌を検出できる。（表1及び図2）。

### [ 留意事項 ]

本法は、非常に高感度な検出方法であるため、操作過程の異物混入等に十分留意する必要がある。

### [ 普及対象地域 ]

### [ 行政上の措置 ]

### [ 普及状況 ]

[ 成果の概要 ]

供試土壌 0.2gに懸濁バッファ (10%KCl+  
5 mg/mlスキムミルク) を 1,000 $\mu$  加える

撈拌 30分間

遠心分離 600rpm(32x g) 5分間

上清を 800 $\mu$  回収

遠心分離 15000rpm(20,400x g) 5分間

上清を捨て、TEバッファ 1000 $\mu$  加え撈拌

遠心分離 15000rpm(20,400x g) 5分間

上清を捨て、沈殿に対しMagExtractor-plant  
genome kit ( TOYOBO) を用いてDNA抽出を行う

図1 KCl法による土壌からのDNA抽出手順

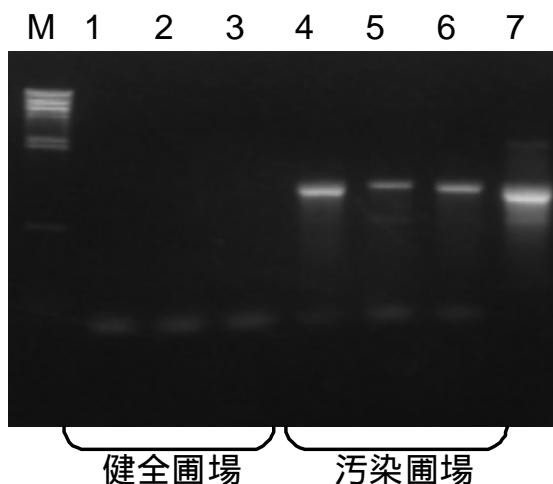


図2 KCl法により抽出したトマト  
青枯病菌のPCRによる検出

1) 青枯病菌検出プライマーは BP4-L& BP4-R  
( Lee and Wang, 2000) を用いた

表1 DNA抽出方法の違いがPCR反応に及ぼす影響

抽出方法	試料土壌中の菌密度 (cfu/g)					
	0	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
KCl法	- <sup>1)</sup>	-	+	+	+	+
FC法 <sup>2)</sup>	-	-	-	-	-	+
Kageyama法 <sup>3)</sup>	-	-	-	-	-	+
ISOL法 <sup>4)</sup>	-	-	-	-	+	+
MgEx法 <sup>5)</sup>	-	-	-	-	-	+

1)+ はPCR増幅有り、- はPCR増幅なしを示す。

2)FC法はフェノール・クロロホルム抽出法を用いてDNA抽出を行った。

3)Kageyama法は、Kageyamaら (2001)が報告した抽出法を用いてDNA抽出を行った。

4)ISOL法はを ISOL for Beads Beating kit(ニッポンジーン)を用いてDNA抽出を行った。

5)MgEx法はMagExtractor-plant genome kit ( TOYOBO) を用いてDNA抽出を行った。

[ 発表及び関連文献 ]

- 1) PCRを用いた黒ボク土壌からのトマト青枯病菌の検出、植物病理学会報、第 75巻第 1巻、2009年

[ その他 ]