

試験研究成果普及情報

部門	病害虫	対象	研究
課題名：PCR法によるナシ樹組織からのナシ萎縮病菌 <i>Fomitiporia</i> sp. の検出法			
〔要約〕新たに開発したナシ萎縮病菌 <i>Fomitiporia</i> sp. の特異的検出プライマーを用いた PCR 法により、ナシ萎縮病に罹病したナシ樹の材質腐朽組織から同菌を検出できる。			
キーワード ¹⁾ ナシ、ナシ萎縮病、 <i>Fomitiporia</i> sp.、検出技術、PCR			
実施機関名	主 査 農林総合研究センター・生産環境部・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、生産技術部・果樹研究室、(独) 農研機構果樹研究所		
実施期間	2011年度～2012年度		

〔目的及び背景〕

ナシ萎縮病は、*Fomitiporia* sp. (和名：チャアナタケモドキ) による病害であることが明らかとなった。一方、本菌の形態的特徴の調査には時間を要する上に、分類・同定は困難であることから、簡便な同定法が必要である。また、ナシ萎縮病の防除対策を考える上では、本菌の感染経路や樹体内における動向等を明らかにする必要があり、そのためには本菌を高感度に検出する方法が必要である。そこで、本菌に特異的なプライマーを設計し、ナシ樹から PCR により本菌を検出する方法を確立する。

〔成果内容〕

- 1 ナシ萎縮病菌 4 菌株及び *Fomitiporia* 属に属する類縁菌の rDNA ITS 領域の塩基配列を調査し、ナシ萎縮病菌にのみ共通の塩基配列を見出した。この塩基配列を基に、ナシ萎縮病菌の特異的検出プライマーセット (FP-f2、FP-r1) を設計した (表 1)。
- 2 開発したプライマーを用いた PCR 法により、ナシ萎縮病菌と同属の類縁菌から、本菌のみを特異的に検出できる (図 1)。
- 3 開発したプライマーを用いた PCR 法により、本病菌を接種したナシ樹の材質腐朽組織から本病菌を検出できる (図 2)。その際、組織からの DNA 抽出は、サンドペーパーを用いて試料を摩砕する方法 (Nakaune ら, 2007) を改変して行う (図 3)。

〔留意事項〕

本法は、高感度な検出方法であるため、操作時には対象外試料の混入等に留意する。

〔普及対象地域〕

〔行政上の措置〕

ナシ萎縮病菌の同定については、平成 23 年度病害虫発生予察特殊報第 6 号に記載。

〔普及状況〕

[成果の概要]

表 1 ナシ萎縮病菌の特異的検出プライマーセット

プライマー名	塩基配列
FP-f2	5' - AGT AAT GAT AAT AAT CTT GGT TC - 3'
FP-r1	5' - AAA CAG TAC CAG CTT GTG TA - 3'

注 1) 本プライマーセットを用いた PCR 法によりナシ萎縮病菌から得られる増幅産物は 356bp
 2) PCR 条件 : 95°C 2 分間の後、95°C 30 秒→58°C 30 秒→72°C 30 秒を 40 回、その後 72°C 5 分間

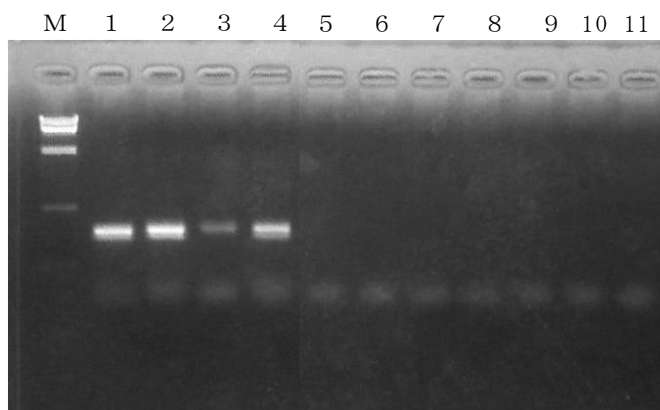


図 1 類縁菌からのナシ萎縮病菌の特異的検出

注) レーン 1 ~ 4 : ナシ萎縮病菌 (*Fomitiporia* sp.)
 5 ~ 6 : *Fomitiporia punctata*
 7 ~ 10 : *Fomitiporia caryophylli*
 11 : *Fomitiporia torulosa*
 M : DNA 分子量マーカー (λ / *Hind*III)

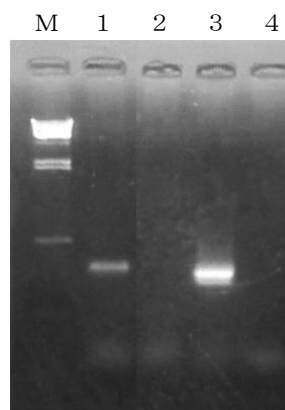


図 2 ナシ樹の材質腐朽組織からのナシ萎縮病菌の検出

注) レーン 1 : ナシ萎縮病菌接種樹 2 : 同無接種樹 3 : 陽性コントロール (同菌ゲノム DNA) 4 : 陰性コントロール (滅菌水)
 M : DNA 分子量マーカー (λ / *Hind*III)

ナシ樹の材質腐朽組織 (木片)
 ↓
 耐水サンドペーパー (#240) に摩砕バッファ 1 mL を滴下、バッファと共に木片を 100 回こする
 ↓
 木粉を含む摩砕液をマイクロチューブに移す
 ↓
 遠心分離 (15,000rpm、5 分間)
 ↓
 上清を除去・新しい摩砕バッファを 1 mL 加え、攪拌する
 ↓
 遠心分離 (15,000rpm、5 分間)
 ↓
 上清を除去・木粉に MagExtractor Plant Genome キットの溶解液を 300 μ L 加え、攪拌する
 以下、キットの手順に従い、DNA を抽出する

図 3 ナシ樹の材質腐朽組織からの DNA 抽出手順

注 1) 摩砕バッファ組成 : 10% ポリエチレングリコール (MW 6000)、0.35M ソルビトール、0.1 M Tris-HCl (pH8.0)、0.5% spermidin、0.5% spermine、1% メルカプトエタノール
 2) MagExtractor Plant Genome キット (TOYOBO、品番 : NPK-501)

[発表及び関連文献]

PCR によるナシ萎縮病菌 *Fomitiporia* sp. の罹病樹からの検出、日本植物病理学会報、第 78 巻第 1 号、2012 年 (講演要旨)