

## 試験研究成果普及情報

部門	病虫害	対象	研究
課題名：ネギベと病遺伝子診断技術			
<p>[要約] 県内で収集したネギベと病菌の DNA 情報とデータベースに登録されたネギベと病菌の DNA 情報をもとに、本菌を迅速かつ高感度に診断する遺伝子診断技術を開発した。これにより、初期症状が疑われる黄化したネギからも本菌を検出することができる。</p>			
キーワード <sup>※</sup> ネギ、ネギベと病、遺伝子診断、発病初期			
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、北総園芸研究所・東総野菜研究室、担い手支援課専門普及指導室、海匠農業事務所、山武農業事務所	
実施期間	2011年度～2013年度		

### [目的及び背景]

ネギベと病菌 *Peronospora destructor* は絶対寄生菌であり、明瞭な病徴が現れる前の植物の診断は難しい。そこで、遺伝子増幅法を用いたネギベと病菌の検出手法を開発し、迅速かつ高感度な診断技術を確立する。

### [成果内容]

- 1 千葉県内で採集したネギベと病菌の塩基配列並びに DDBJ (DNA Data Bank of Japan、<http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>) で公開されている *Peronospora destructor* 及びその類縁菌の rDNA-ITS 領域の塩基配列をもとに作製したプライマー Pd-F3 及び Pd-R4-2 を用いた PCR により、ネギベと病菌を特異的に判別できる (図 1)。
- 2 本研究で作成したネギ葉からのネギベと病菌検出マニュアル (図 2) に従って遺伝子診断を行うことにより、約 1 日で、明瞭な症状を呈した株の病斑部及びその無病徴部、初期症状を呈した株の黄変部 (図 3) 及びその無病徴部からも本菌を検出できる (図 4)。
- 3 本マニュアルに従った遺伝子診断により、県内のネギ圃場の黄化葉からネギベと病菌が検出され、その圃場では 19 日後に本病が多発したので、本診断技術は実用可能である。

### [留意事項]

### [普及対象地域]

県内全域

[行政上の措置]

[普及状況]

[成果の概要]

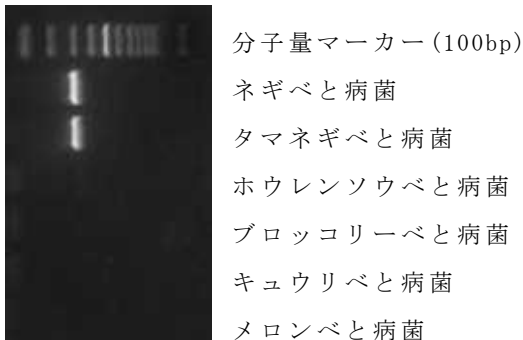


図1 作製したプライマーPd-F3及びPd-R4-2によるPCR産物の電気泳動図(注)ネギベと病菌とタマネギベと病菌は同一



図3 DNA抽出に用いた葉試料

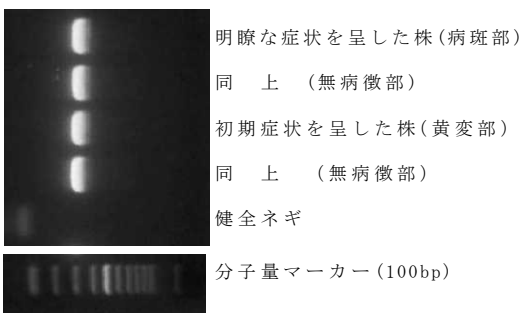


図4 ネギベと病菌検出マニュアルに従った遺伝子診断による各種ネギ葉からのべと病菌の検出

1. ネギ葉からのDNA抽出

- 1) 葉<sup>1)</sup> (0.05 g) を切り取り、70%エタノールに30秒間浸漬し、蒸留水で洗浄する
- 2) IBバッファー (10% PEG 6000、0.35Mソルビトール、0.1M Tris-HCl (pH8.0)、0.5%スベルミジン、0.5%スベルミン、1%メルカプトエタノール)<sup>2)</sup> を1mL加え、乳鉢で磨砕する
- 3) 磨砕液を2mLエッペンチューブに移し、遠心分離 (15,000 rpm、5分)
- 4) 上清を除去し、IBバッファーを1mL加えて攪拌し遠心分離 (同上)
- 5) 上清を除去し、MagExtractor Plant Genome kit (TOYOBO) の溶解液を300  $\mu$ L加える
- 6) kitの手順に従いDNAを抽出する

2. PCR条件と結果の判定

- 1) 1st round PCR  
ア 反応液組成: 2 $\times$ Go Taq Green Master Mix (Promega) 10  $\mu$ L、プライマー(Pd-F2: 5' - GAACCCTATCATGGCGAGT-3' 及びPd-R1: 5' - CCGACTAGCCATACTGACAGC-3')各200 nM、DNA溶液 1  $\mu$ L、最終容量20  $\mu$ L  
イ 反応条件<sup>3)</sup>: 95 $^{\circ}$ C 2:00 $\rightarrow$ [95 $^{\circ}$ C 0:30 $\rightarrow$ 55 $^{\circ}$ C 0:30 $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 0:30] $\times$ 40 $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 8:00
- 2) 2nd round PCR  
ア 反応液組成: 2 $\times$ Go Taq Green Master Mix (Promega) 10  $\mu$ L、プライマー(Pd-F3: 5' -GCAACTTTCAGCAGTGGATG-3' 及びPd-R4-2: 5' -CAGCCTTACAACCAGAAG-3')各200 nM、1st round PCR産物の20倍希釈液 1  $\mu$ L、最終容量20  $\mu$ L  
イ 反応条件<sup>3)</sup>: 95 $^{\circ}$ C 2:00 $\rightarrow$ [95 $^{\circ}$ C 0:30 $\rightarrow$ 57 $^{\circ}$ C 0:30 $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 0:30] $\times$ 40 $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 8:00
- 3) 判定: 1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、約320 bpの増幅産物を確認する

注1) サンプリングの時期は「ねぎべと病ナビ」(平成26年度試験研究成果普及情報)による感染危険日後を、対象は部分的に黄化した葉を目安とする  
2) 参考文献「新版植物のPCR実験プロトコール」秀潤社、1997  
3) Mastercycler<sup>®</sup> ep (epENDORF) を用いた場合の条件。機種によって調整する。

図2 ネギ葉からのネギベと病菌検出マニュアル

[発表及び関連文献]

- 1 平成26年度試験研究成果発表会(野菜部門)
- 2 吉田菜々子ら、nested-PCRによる無病徴のネギ葉からのネギベと病菌の検出、日本植物病理学会報、第79巻第3号、2013年
- 3 緊急技術開発促進事業「ネギベと病防除支援情報システムの構築」研究成果集、平成26年

- 4 平成 26 年度試験研究成果普及情報「ネギベと病防除支援情報システム「ねぎべと病なび」

[その他]

- 1 平成 22 年度試験研究要望課題（提起機関：山武農業事務所）
- 2 緊急技術開発促進事業「ネギベと病防除支援情報システム」の構築（平成 23～25 年度）