

試験研究成果普及情報

部門	野菜	対象	研究
課題名：ウリ類ホモプシス根腐病菌汚染土壌の遺伝子診断による汚染程度評価法			
<p>[要約] リアルタイム PCR を用いた遺伝子診断により土壌中のホモプシス根腐病菌の菌密度を迅速かつ高感度に評価できる。本法の所要時間は3日程度であり、実際に発病が問題となる菌密度よりも低いレベルまで検出できる。</p>			
<p>キーワード スイカ、ホモプシス根腐病、<i>Phomopsis sclerotiodes</i>、急性萎凋症、土壌汚染程度</p>			
実施機関名	主 査	農林総合研究センター 生物工学研究室	
	協力機関	農林総合研究センター 病理昆虫研究室、野菜研究室、 農林総合研究センター 水稻・畑地園芸研究所 東総野菜研究室、海匠農業事務所、千葉大学	
実施期間	2012年度～2014年度		

[目的及び背景]

ウリ類ホモプシス根腐病菌に対して、従来の生物検定法（キュウリ幼苗検定法）に比べて迅速、簡便、正確な遺伝子工学的手法を用いた定量法を確立する。また、本手法を用いて調査した消毒後の菌密度と圃場の発病度との関係を明らかにし、消毒効果の評価法を確立する。

[成果内容]

- 1 本法は、土壌から DNA を抽出し、ホモプシス根腐病菌に特異的な PCR プライマー及び TaqMan プローブ (Shishido *et al.*, 2013) を用いたリアルタイム PCR により土壌中のホモプシス根腐病菌を定量する方法である (図 1)。
- 2 キュウリ幼苗検定法では判定に 4 週間以上を要するが、本法の所要時間は 3 日程度である。
- 3 本法の検出限界は 1 cfu/g 土壌 (土壌 1 g に 1 コロニー存在) であり、実際に発病が問題となる菌密度 (10cfu/g 土壌) よりも低いレベルまで検出できる (表 1)。
- 4 自然汚染圃場のキュウリ幼苗検定の発病度と補正後の DNA 定量値との間には有意な正の相関が認められる (表 2)。
- 5 以上のことから、本法により土壌中のホモプシス根腐病菌の菌密度を迅速かつ高感度に評価できる。なお、遺伝子診断法による補正後の DNA 定量値が 0.04 pg/ μ L 以下であれば、キュウリ幼苗検定の発病度が 10 未満であり、ホモプシス根腐病発生の危険性は概ね低い (表 2)。
- 6 本法を用いて土壌消毒後の土壌からの菌密度を評価すると、菌密度の低下を確認できる (表 3)。

[留意事項]

[普及対象地域]

県内全域の研究機関あるいは指導機関

[行政上の措置]

[普及状況]

[成果の概要]

①前処理

土壌を60℃で12時間乾燥後、乳棒で粉碎して篩（2mm目合）に通し、シェイクマスター（バイオメディカルサイエンス）で振とう（1500 rpm、2分間）

②土壌0.4gに内部標準（GFP遺伝子の一部を挿入したプラスミドベクター）を添加

③DNA抽出

20%スキムミルク水溶液を128 μ L添加

Phosphate buffer (FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) 付属) を850 μ L添加

FastPrep FP120により5.5 m/秒で30秒間破碎

DES（上記キット付属）80 μ Lで溶出

DNA Clean & Concentrator Kit (ZYMO Research) で精製、DES 30 μ Lで溶出

④リアルタイムPCR

ア) 反応液組成

上記鋳型DNA	2 μ L
TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)	12.5 μ L
プライマー-CPs2f (5' -ACTGCTTGGTGTGGGGCACC -3')	400mM
CPs2r (5' - TCCAGAACGAAATATAATTTACTACGCTCGG -3')	400nM
TaqMan probe CPs2t (5' - AAAGGGCGGGCCCTGAAATCTAGTGGCGA -3'、 5' 末端を6-Carboxyfluorescein (6-FAM)、3' 末端をBHQ-1で標識)	200nM

滅菌蒸留水で25 μ Lに調整

イ) PCR反応条件

95℃で10分間変性後、95℃で30秒、60℃で30秒、72℃で30秒を1サイクルとして40サイクル

ウ) 検量線

菌体から抽出したDNAをEASY Dilution for Real Time PCR（タカラバイオ）で5段階に希釈したもの（0.01 ~100 pg/ μ L）を用いて検量線を作成する

⑤内部標準による補正

GFP遺伝子特異的プライマー

forward:5' -TGGCCCTGTCCTTTTACCAG-3'

reverse:5' -TTTTTCGTTGGGATCTTTCGAA-3'

Taq Manプローブ (5' -AACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCC-3'、5' 末端をhexachlorofluorescein (HEX)、3' 末端をBHQ-1で標識)

上記のプライマー・プローブセットでリアルタイムPCR（反応液組成・反応条件は④に同じ、検量線は内部標準を希釈して作成）を行い、土壌DNA中のGFP遺伝子の定量値を算出し、その回収率によりサンプルの定量値を補正する

図 1 リアルタイム PCR によるホモシス根腐病菌の DNA 定量法

表 1 人工汚染土におけるホモプシス根腐病菌の密度と遺伝子診断法による本菌 DNA の定量値

土壌	菌密度 (cfu/g土壌)	DNA定量値 (pg/ μ L) ^{注1)}
	0.068	ND
園芸培土 (ニッピ園芸培土)	0.68	ND
	1.0	0.01 \pm 0.00
	6.8	0.85 \pm 0.69
	68	2.09 \pm 0.05
	0.068	ND
	0.68	ND
黒ボク土	1.0	0.04 \pm 0.01
	6.8	2.26 \pm 1.99
	68	17.30 \pm 2.40

注 1) 3 回の反復試験により算出された平均値 \pm 標準誤差。標準試料による補正は行っていない。ND は検出限界 (0.01pg/ μ L) 未満を表す。

2) 人工汚染土は、液体培地で培養した菌体を破砕したものを各土壌に混和して調製した。

表 2 スイカ生産圃場から採取した土壌におけるキュウリ幼苗検定の発病度と遺伝子診断法による本菌 DNA の定量値

土壌試料	幼苗検定発病度 ¹⁾	補正後の DNA定量値 (pg/ μ L) ²⁾	
A	26.6	16.09 \pm 5.87	
B	18.9	10.73 \pm 6.63	
C	17.2	2.41 \pm 1.95	$r_s=0.975$ ³⁾
D	17.2	1.03 \pm 0.61	$p<0.01$
E	10.9	ND	
F	9.4	0.04 \pm 0.00	

注 1) 幼苗検定発病度 = Σ (各指数 \times 株数) / (4 \times 調査株数) \times 100

キュウリ「南極 1 号」の幼苗 16 本を供試土壌に移植し、25°C で 4 週間栽培し、以下の基準で指数を調査し、幼苗検定発病度を算出した。

指数 0 : 発病なし、指数 1 : 移植 4 週後に萎凋はみられないが、根に褐変がみられる株、指数 2 : 3 ~ 4 週目までに萎凋・枯死した株、指数 3 : 2 ~ 3 週目までに萎凋・枯死した株、指数 4 : 1 ~ 2 週目までに萎凋・枯死した株

2) 3 回の反復試験により算出された平均値 \pm 標準誤差を表す。ND は検出限界 (0.01pg/ μ L) 未満を表す。

3) フリー統計ソフト R (ver. 3.1.3) を用いて試料 E を除く発病度と DNA 定量値との間でスピアマンの順位相関係数を求めた。

表 3 ホモプシス根腐病を対象とした土壌消毒前後のキュウリ幼苗検定の発病度と遺伝子診断法による DNA 定量値

土壌サンプル ^{注1)}	幼苗検定発病度 ²⁾		DNA定量値 (pg/ μ L)	
	消毒前	消毒後	消毒前	消毒後
A	12.5	0	0.01	ND ³⁾
B	6.3	0	0.04	ND

注 1) 汚染圃場の土壌を用いた

2) 幼苗検定の発病度は図 1 に同じ

3) ND : 検出限界 (0.01pg/ μ L) 未満

[発表及び関連文献]

- 1 Shishido *et al.*, Comparison of PCR assays for detection and quantification of *Phomopsis sclerotiioides* in plant and soil., J. Gen. Plant Pathol., 79 (2013)
- 2 横山とも子ら 幼苗検定による土壌中のウリ類ホモプシス根腐病菌の密度および圃場における発病の推定 平成 26 年度日本植物病理学会大会 (2013)
- 3 中田菜々子ら ウリ類ホモプシス根腐病菌汚染土壌における real-time PCR による本菌の定量値とキュウリ幼苗検定法による発病度との関係 平成 26 年度日本植物病理学会大会 (2013)
- 4 中田菜々子ら リアルタイム PCR による土壌からのウリ類ホモプシス根腐病菌高感度定量のための土壌 DNA 抽出法の改良 日本植物病理学会報 81 (2015)

[その他]

- 1 緊急技術開発促進事業「低濃度エタノール土壌還元消毒法の実用化と実証」（平成24～26年度）
- 2 TaqMan プローブ：蛍光物質とクエンチャー（蛍光を消光する物質）で修飾したオリゴヌクレオチド。PCR で増幅される部位に結合し、蛍光強度から増幅量を推定することができる。