

試験研究成果普及情報

部門	病害虫	対象	研究
課題名：PCR法を用いたネギ黒腐菌核病菌の初期感染時期の特定方法			
〔要約〕 秋冬どり栽培におけるネギ黒腐菌核病菌の初期感染時期は、10月上旬から定期的にネギの最外葉及び根を採取し、PCR検定を行うことにより特定できる。			
キーワード 秋冬ネギ、ネギ黒腐菌核病、PCR			
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、土壌環境研究室 水稲・畑地園芸研究所 東総野菜研究室、ちばみどり農業協同組合、山武市農業協同組合、長生農業協同組合、(公社)千葉県園芸協会、担い手支援課、東葛飾農業事務所、海匝農業事務所、山武農業事務所、長生農業事務所	
実施期間	2017年度～2020年度		

〔目的及び背景〕

千葉県内のネギ産地では、特に秋冬どり栽培においてネギ黒腐菌核病の発生が増加している。ネギ黒腐菌核病は、土壌伝染性の難防除病害であり、前作の被害残渣に形成された菌核が第一次伝染源になると考えられている。ネギ黒腐菌核病を適期に防除するためには第一次伝染源からの感染時期を明らかにする必要がある。そこで、PCR法を用いた秋冬どり栽培におけるネギ黒腐菌核病菌の初期感染時期の特定方法を開発する。

〔成果内容〕

- 1 「ネギべと病遺伝子診断技術」（平成26年度試験研究成果普及情報）のDNA抽出方法（以下、従来法）及びその改良法（図1）により、ネギ黒腐菌核病既発生圃場の無病徴のネギ最外葉からDNAを抽出し、Haq et al.（2003）によるプライマーを用いたネギ黒腐菌核病のPCR検定を行った結果、改良法による検出率は従来法のそれよりも優れた（図2）。
- 2 令和元年10月上旬から11月下旬にかけて、前年にネギ黒腐菌核病が発生した無防除のネギ圃場において1～2週間おきにネギを6株採取し、それぞれの株から基部付近の最外葉及び根（先端付近の3～4本）を0.05g切りとり、1の改良法を用いてDNAを抽出し、PCR検定を行ったところ、11月14日に3株の根から初めてネギ黒腐菌核病菌が検出された（表1）。
- 3 令和2年10月上旬から11月中旬にかけて、前年にネギ黒腐菌核病が発生した無防除のネギ圃場において2週間おきにネギを6株採取し、それぞれの株から基部付近の最外葉、茎盤部、根（基部付近の3～4本）及び根（先端付近の3～4本、前述の基部付近を採取した根と同一の根）を0.05g切りとり、1の改良法を用いてDNAを抽出

し、PCR 検定を行ったところ、10 月 21 日に 1 株の最外葉から、11 月 4 日には 1 株の根（先端付近）からネギ黒腐菌核病菌が検出された（表 2）。

- 4 以上の結果から、ネギ黒腐菌核病菌の初期感染部位は最外葉もしくは根（先端付近）のどちらかであり、秋冬どり栽培のネギ圃場において 10 月上旬から定期的にネギを採取し、改良法により両部位から DNA を抽出し、PCR 検定を行うことによりネギ黒腐菌核病の初期感染時期を特定できる。

[留意事項]

[普及対象地域]

県内ネギ産地

[行政上の措置]

[普及状況]

[成果の概要]

「ネギベと病遺伝子診断技術」によるDNA抽出法：従来法
1. ネギの組織を0.05g切り取る
↓
2. 蒸留水中で洗う。
↓
3. 70%エタノールに30秒間浸漬する。
↓
4. 滅菌水で洗い流し、キムワイブで水分を軽く取る。
↓
5. 滅菌した乳鉢に入れる。
↓
6. 以下を乳鉢に入れ良く磨砕する。 IBバッファー ^{※2)} 1,000 μ l、メルカプトエタノール 10 μ l
↓
7. 2 mlのチューブに磨砕液を全て移す。
↓
8. 遠心分離 15,000rpm 5分間
↓
9. 上清み液をピペットで吸い出し捨てる。
↓
10. 以下を加えてボルテックスで1分間激しく攪拌する。 IBバッファー ^{※2)} 1,000 μ l、メルカプトエタノール 10 μ l
↓
11. 遠心分離 15,000 rpm 5分間
↓
12. 上清み液をピペットで吸い出し捨てる。
↓
13. 沈殿にMagEx kit ^{※3)} の溶解液300 μ lを加え攪拌する。
↓
14. ボルテックスで1分間激しく攪拌する。
↓
15. 65°Cで10分間インキュベートする。 (3~4分おきにボルテックスで5秒間激しく攪拌する)
↓
16. クロロフォルム300 μ lを加え、1分間激しく攪拌する(ボルテックス不可)。
↓
17. 15,000 rpmで5分間遠心分離する。
↓
18. 上面の水相部分を250 μ l回収し、新しい1.5mlのチューブに移す。
↓
19. MagEx kitの吸着液600 μ l加える。
↓
20. MagEx kitの磁気ビーズ40 μ lを加える。(以下、MagEx Kitの説明書に従う)

「ネギベと病遺伝子診断技術」を改良したDNA抽出法：改良法
1. ネギの組織を0.05g切り取る
↓
2. 蒸留水中で洗う。
↓
3. 70%エタノールに30秒間浸漬する。
↓
4. 滅菌水で洗い流し、キムワイブで水分を軽く取り、2mlのチューブに入れる。
↓
5. チューブにメタルコーンを入れ、-80°Cのフリーザーを用いて凍結する。
↓
6. 多検体細胞破碎装置(シェイクマスターBMS-12)を用いて1分間磨砕する。
↓
7. メタルコーンを取り出し、チューブに以下を加える。 IBバッファー ^{※2)} 1,000 μ l、メルカプトエタノール 10 μ l
↓
8. ボルテックスで1分間激しく攪拌する。
↓
9. 遠心分離 15,000rpm 5分間
↓
10. 上清み液をピペットで吸い出し捨てる。
↓
11. 以下を加えてボルテックスで1分間激しく攪拌する。 IBバッファー ^{※2)} 1,000 μ l、メルカプトエタノール 10 μ l
↓
12. 遠心分離 15,000 rpm 5分間
↓
13. 上清み液をピペットで吸い出し捨てる。
↓
14. 沈殿にMagEx kit ^{※3)} の溶解液300 μ lを加え攪拌する。
↓
15. ボルテックスで1分間激しく攪拌する。
↓
16. 65°Cで10分間インキュベートする。 (3~4分おきにボルテックスで5秒間激しく攪拌する)
↓
17. クロロフォルム300 μ lを加え、1分間激しく攪拌する(ボルテックス不可)。
↓
18. 15,000 rpmで5分間遠心分離する。
↓
19. 上面の水相部分を250 μ l回収し、新しい1.5mlのチューブに移す。
↓
20. MagEx kitの吸着液600 μ l加える。
↓
21. MagEx kitの磁気ビーズ40 μ lを加える。(以下、MagEx Kitの説明書に従う)

図1 ネギ黒腐菌核病菌を検出するPCRに用いる鋳型DNAの抽出方法の改良

注1) 灰色網掛け部分に変更箇所

2) IBバッファー(組成): 10% ポリエチレングリコール(分子量6000)、0.35M ソルビトール、0.1M Tris-HCl(pH8.0)、0.5% spermidin、0.5% spermine

3) MagEx kit: MagExtractor-Plant Genome kit (TOYOBO)

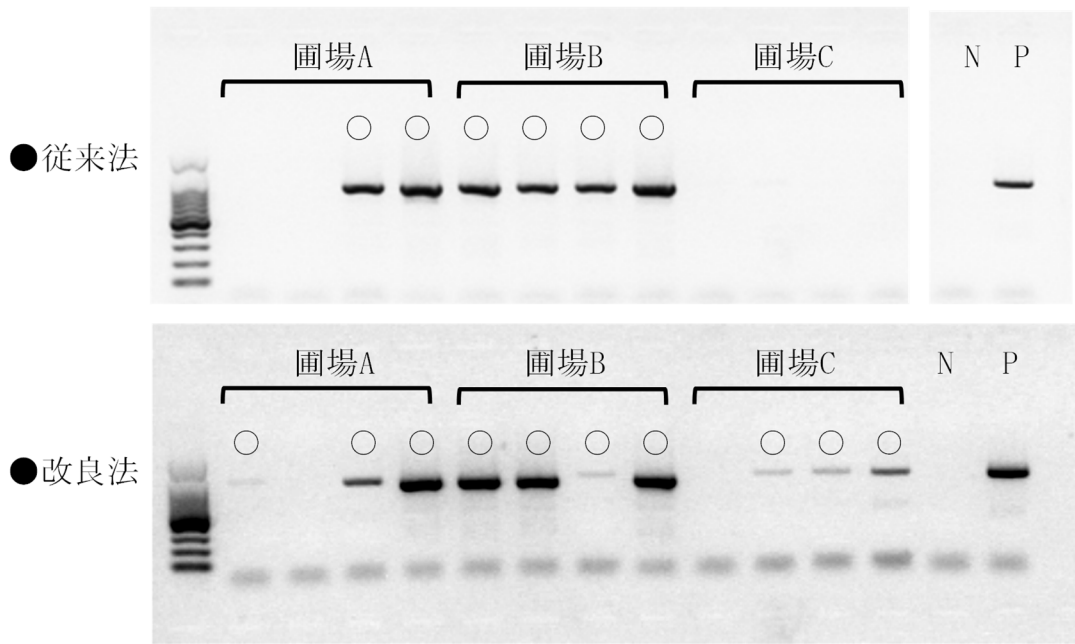


図2 ネギのDNA抽出方法の違いがPCR検定結果に与える影響

注) 平成29年12月上旬にネギ黒腐菌核病既発生圃場A~Cから無病徴のネギを4株ずつ採取し、従来法及び改良法により同一株の最外葉からDNAを抽出し、PCR検定を行った。N: ネガティブコントロール、P: ポジティブコントロール、○: PCR産物の増幅が確認された株を示す

表1 令和元年に無防除のネギ圃場から採取したネギの部位別のネギ黒腐菌核病菌のPCR検定結果

部位	株No.	採取日					
		10月3日	10月17日	10月30日	11月14日	11月22日	11月29日
最外葉	1	×	×	×	×	×	○
	2	×	×	×	×	×	×
	3	×	×	×	×	×	○
	4	×	×	×	×	×	×
	5	×	×	×	×	×	○
	6	×	×	×	×	×	×
根(先端)	1	×	×	×	○	×	○
	2	×	×	×	×	○	○
	3	×	×	×	○	×	○
	4	×	×	×	×	○	○
	5	×	×	×	×	○	○
	6	×	×	×	○	○	○

注) ○が検出された株を、×が検出されなかった株を示す

表2 令和2年に無防除のネギ圃場から採取したネギの
部位別のネギ黒腐菌核病菌のPCR検定結果

部位	株No.	採取日			
		10月6日	10月21日	11月4日	11月18日
最外葉	1	×	×	×	○
	2	×	○	×	○
	3	×	×	×	○
	4	×	×	×	○
	5	×	×	×	○
	6	×	×	×	○
茎盤部	1	×	×	×	○
	2	×	×	×	○
	3	×	×	×	○
	4	×	×	×	×
	5	×	×	×	×
	6	×	×	×	×
根（基部）	1	×	×	×	○
	2	×	×	×	○
	3	×	×	×	×
	4	×	×	×	×
	5	×	×	×	×
	6	×	×	×	×
根（先端）	1	×	×	○	○
	2	×	×	×	○
	3	×	×	×	○
	4	×	×	×	○
	5	×	×	×	○
	6	×	×	×	○

注) ○が検出された株を、×が検出されなかった株を示す

[発表及び関連文献]

- 1 Haq et al. Detection of *Sclerotium cepivorum* within onion plants using PCR primers, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2003 62:185-189
- 2 平成26年度試験研究成果普及情報「ネギべと病遺伝子診断技術」
- 3 高橋ら、PCR法を用いたネギ黒腐菌核病菌の初期感染時期と感染部位の特定、令和3年度日本植物病理学会大会
- 4 令和3年度試験研究成果普及情報「ネギ黒腐菌核病の初期感染の時期と地温の関係」
- 5 令和3年度試験研究成果普及情報「ネギ黒腐菌核病防除に向けた現地調査及び対策選択支援チャート図の作成」

[その他]

- 1 平成 28 年度試験研究要望課題（提起機関：山武農業事務所）
- 2 プロジェクト研究事業「環境に配慮したネギ黒腐菌核病総合対策システムの構築」
（平成 29 年度～令和 2 年度）