

リアルタイム PCR によるコムギ条斑病菌の高感度特異的検出

作物生産生物学講座 植物病理学分野

西森 智

【背景と目的】

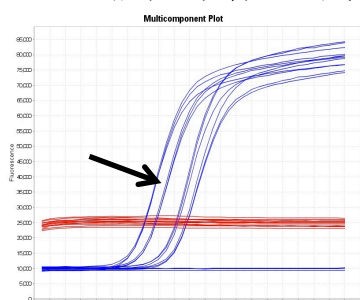
Cephalosporium gramineum によって引き起こされるコムギ条斑病は、収量を激減させる秋まきコムギの重要な土壌伝染性病害である。本病の防除には抵抗性品種の利用が望ましいが、その育種には病原菌の感染動態を定量的に把握する技術が欠かせない。本研究ではリアルタイム PCR を用いて本病原菌の定量法を確立することを目的とした。

【方法】

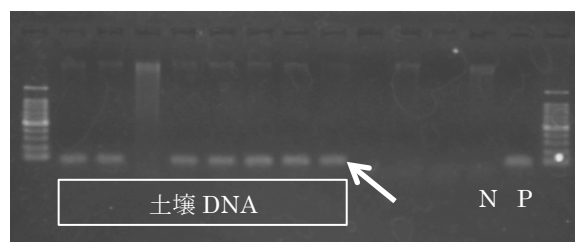
コムギ条斑病菌の IGS 領域におけるシークエンスをもとにプライマー、プローブ候補を探索し、4つの遺伝子型に共通のセットを作成した。このセットの特異性や感度を調査・評価し、その後、発病土壌からの条斑病菌胞子の検出・定量を検討した。

【結果】

作成されたプライマーは *C. gramineum* 89 菌株において特異的な DNA の増幅が見られ、その他の 17 種の糸状菌では増幅されなかった。また本プライマー、プローブを用いたリアルタイム PCR は 1 pg/ μ l の条斑病菌 DNA、 10^3 spores/g soil の条斑病胞子を検出可能であり、コムギ由来の DNA の影響は受けないことが明らかにされた。接種土壌から抽出した DNA の PCR および電気泳動試験によって全てのサンプルから特異的なバンドが確認され、PCR 阻害は起こらないことが確認された。しかしながら、同サンプルを用いたリアルタイム PCR は全て陰性を示し、抽出条件、破碎条件、サンプル条件によって結果は影響されず、定量できなかった。



(図 1. リアルタイム PCR による条斑病菌の検出)



(図 2. PCR 増幅された土壌 DNA の電気泳動結果)

【考察および結論】

本研究により、作成されたプライマー、プローブはコムギ条斑病菌を特異的かつ高感度に検出でき、コムギ条斑病に対する定量的な検出法として期待できることが示唆された。しかし、本法を用いた土壌からの定量においては、病原菌 DNA は増幅されているものの蛍光が検出されなかったことから、土壌中のプローブに対する阻害物質の存在が疑われた。今後、さらなる抽出法の改良やリアルタイム PCR 条件の検討が必要であろう。