

分子マーカーを利用したコムギ条斑病菌の生態学的研究

生物資源科学専攻 作物生産生物学講座 植物病理学研究室 平澤 貴大

1. はじめに

コムギ条斑病は *Cephalosporium gramineum* によって引き起こされる土壤伝染性病害である。本病の対策には、予め土壤中菌密度を把握する必要があるが、リアルタイム PCR 法は効率的に土壤中菌量の定量を可能にする。しかし、土壤中には PCR 増幅を阻害する物質が含まれていることが報告されている。特に、土壤夾雑物が含まれた DNA サンプルからは、リアルタイム PCR による検出・定量が困難であった。土壤から DNA を抽出する方法と、DNA を精製する方法の改良が必要となる。本研究は、リアルタイム PCR を用いた土壤中の本病原菌の定量法を確立することを目的とした。

2. 方法

土壤から DNA を抽出するにあたっての前処理として、KCl 法について検討した。

(1) KCl 法の検証

KCl 法により土壤中に存在する *C. gramineum* が定量できるかを、12 の土壤を供試し実験を行った。3 段階 (2×10^4 , 2×10^3 , 2×10^2 spore / ml) に希釈した胞子懸濁液を等量、土壤に混入して保菌土壤を作成した。これら保菌土壤 0.3 g に KCl (10 %) とスキムミルク (5 mg / ml) を添加した水溶液 1000 μ l を混和し 15 分毎に 3 回攪拌した。さらに 15 分静置した後、600 rpm で遠心回収した上清 800 μ l を新しいチューブに移し、15000 rpm で高速遠心、Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit (FAVOGEN) により DNA を抽出した。回収した DNA サンプルを *C. gramineum* 特異的プライマープロブを用いて、リアルタイム PCR を行い、DNA の定量を行った。

(2) KCl 法と土壤 DNA 抽出キット (Extrap Soil DNA Kit) の比較

3 段階 (10^6 , 10^5 , 10^4 spore / ml) に希釈した胞子懸濁液を土壤に混和、保菌土壤を作成し、そこから DNA 抽出を行った。方法は、①KCl 法 + Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit ②KCl 法 + 摩砕 + Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit ③Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2(日鉄住金環境株式会社)の 3 通りで行い比較した。

3. 結果と考察

(1) KCl 法の検証

12 の土壤から今回行った濃度すべてで検出が可能であった。12 のうち 10 の土壤で、希釈段階に対応した結果となった。KCl 法により、土壤中の *C. gramineum* を定量できることが示唆された。

(2) KCl 法と土壤 DNA 抽出キットの比較

①と②の方法で、リアルタイム PCR による定量が可能であった。しかし、③の方法では、検出ができなかった。土壤抽出キットではリアルタイム PCR の検出を阻害する物質を除去できなかったことが考えられる。

4. まとめ

前処理として KCl 法を用いることで、土壤中の *C. gramineum* のリアルタイム PCR で検出・定量できることが可能となった。今後は、土壤の採集方法、また土壤に吸着された DNA を補正するための方法を確立する必要がある。