

通し番号	4451
------	------

分類番号	21-25-14-01
------	-------------

(成果情報名) ダイコン種子からの白さび病菌 (<i>Albugo macrospora</i>) の検出
[要約]ダイコン白さび病菌のrDNA-ITS2領域に設計した特異プライマーを用いてPCRを行えば、ダイコン種子1粒から白さび病菌を検出できる。また、このプライマーを用いた定量PCR法により白さび病菌数を定量できる。
(実施機関・部名) 神奈川県農業技術センター・農業環境研究部 連絡先0466-58-0333

[背景・ねらい]

白さび病菌により引き起こされるダイコンわか症は、三浦半島地区をはじめ全国各地で発生し、年により大きな被害をもたらしている。葉に発生した白さび病菌が根部へ感染する状況が明らかにされつつあるが、葉における本病発生の第1次伝染源については未だ不明であるが、種子伝染の可能性が高いと考えられている。白さび病菌の休眠態で、有性生殖によって形成される卵胞子は宿主の葉や根部の感染組織では形成されないのに対し、莢内で大量に形成されることから、これが種子に付着して第一次感染源になるものと考えられる。一方、近年、遺伝子診断法により卵菌類の低量検出並びに定量的な測定が可能となっている。そこで、遺伝子診断法によるダイコン種子からの本病原菌の検出と定量を試みる。

[成果の内容・特徴]

- 1 わか症組織より抽出した全DNAから卵菌類特異プライマーを用いたPCRにより増幅したrDNA-ITS2領域の塩基配列を、既報告の塩基配列と比較すると、韓国のダイコンより分離されたダイコン白さび病菌と一致する(表1)。
- 2 そこで、rDNA-ITS2領域に、ALmFとALRを設計し、白さび病菌特異プライマーとし、核酸抽出キット(Nucleon Phytopure ; GEヘルスケアバイオサイエンス社)緩衝液中で種子を振盪して抽出した全DNAを鋳型にPCRを行うと、供試した市販の3品種すべてから白さび病菌が検出される(図2)。
- 3 種子を種皮と胚・胚乳に分けて全DNAを抽出し、上記の得意プライマーを用いてPCRを行うと種皮からのみ白さび病菌が検出される(図3)。
- 4 ‘青さかり’と‘耐病総太り’の種子それぞれ8粒を、1粒ずつ別々に各種皮から全DNAを抽出して、同様にPCRを行うと、種子1粒から白さび病菌を検出できる(図4)。
- 5 ダイコン白さび病菌特異プライマーALmFとALRを用いて、インターカレーター法(SYBR Green I)により定量PCRを行うと、種子に付着した白さび病菌を定量的に検出できる(表4)。

[成果の活用面・留意点]

- 1 ダイコン種子に付着した白さび病菌の量が、は種後の本病発生程度にどのように影響するかは不明である。

[具体的データ]

表1 白さび病およびわっか症を発症したダイコンから特異プライマーによりPCRで増幅したrDNA塩基配列と既報告の各種アブラナ科白さび病菌rDNA遺伝子(ITS1-5.8S-ITS2)塩基配列の比較

発生地	菌属種	宿主	塩基配列の相同性(%)	登録番号
英国	<i>Albugo candida</i>	(キャベツ) <i>Brassica oleracea</i>	99.1	AF241768
韓国	<i>Albugo candida</i>	(ダイコン) <i>Raphanus sativus</i>	100.0	AY929843
韓国	<i>Albugo candida</i>	ナタネ <i>Brassica campestris</i>	98.6	DQ418495
韓国	<i>Albugo candida</i>	ムラサキナズナ <i>Aubrieta deltoidea</i>	99.4	DQ418500
韓国	<i>Albugo candida</i>	ウスユキナズナ <i>Berteroa incana</i>	99.4	DQ418495
韓国	<i>Albugo candida</i>	ルッコラ <i>Eruca sativa</i>	98.6	DQ418503
平塚	<i>Albugo macrospora</i>	ダイコン <i>Raphanus sativus</i> var. <i>horensis</i>	—	—

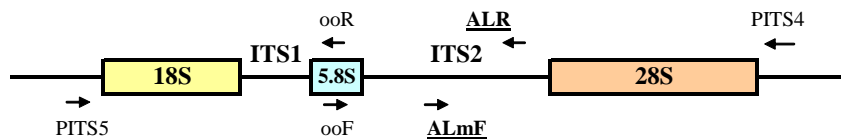


図1 卵菌類のrDNA-ITS領域の遺伝子地図およびプライマー設計位置

PITS5/PITS4: >900bp PITS5/ooR : 310bp ooF/PITS4 : 640bp ALmF/ALR : 179bp

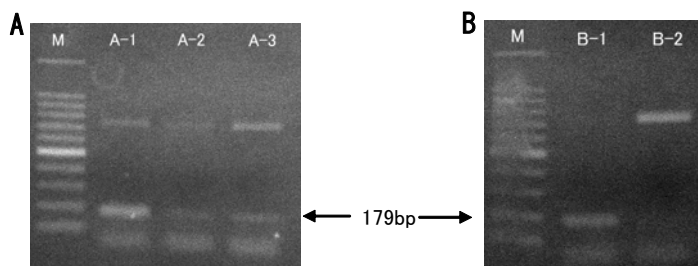


図2 3品種の購入ダイコン種子(20粒)をDNA抽出緩衝液で洗浄して抽出した全DNA(A)及びダイコン種子(青さかり)の各部位から抽出した全DNA(B)を鋳型にし、白さび病菌特異プライマーを用いて行ったPCRの増幅DNA産物

A-1 : “青さかり”(みかど種苗) A-2 : “竜神三浦”(サカタの) A-3 : 耐病総太り(タキイ種苗)

B-1 : 種皮(青さかり) B-2 : 胚乳・胚(青さかり) M : 100bpラダーマーカー

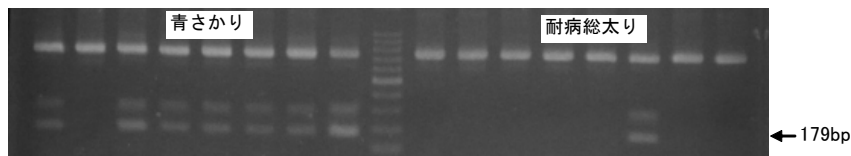


図3 ダイコン市販品種(青さかり、耐病総太り)種子1粒の種皮から抽出した全DNAを鋳型にし、白さび病菌特異プライマーを用いて行ったPCRの増幅DNA産物

表2 異なるダイコン品種の種子から抽出した全DNAを鋳型にした定量PCRによる白さび病菌DNA量と白さび病感

品種名	DNA量を分生子数に換算 ^{Y)}	栽培試験による白さび病に対する感受性 ^{Z)}
健志総太り	1.1	中
YRてんぐ	5.4	高
早太り聖護院	1.2	低
秋いち	32.7	高
YRくらま	1.2	低
竜神三浦2号	0.7	低
おこのみ	0.5	低
あきしの	0.9	低
青さかり	10.3	—
耐病総太り	1.1	—

X,Y): DNA量は分生子 1.33×10^5 からDNAを抽出して1mlに懸濁し、この濃度を100として検量線を作成した。

Z): 栽培試験による感受性は「ダイコン白さび病およびわっか症に対する感受性の品種間差(小林ら1998、関東病虫研報)」から引用

[資料名]平成21年度試験研究成績書(平成21年度)

[研究課題名]診断・同定の迅速化と発生予察法改善による病害虫制御技術の開発

[研究期間]平成21年度

[研究者担当名]植草秀敏・折原紀子・野村研