

スギ赤枯病対策に関する研究

予算区分： 県 単 | 研究期間：平成 30～令和 3 年度 | 担 当：森林科学係 北野 皓大

(2) PCR 法による同定技術の確立

I はじめに

スギ赤枯病は、*Passalora sequoiae* によって引き起こされるスギ苗木生産における重大な病害である。感染力が強いと言われており、感染した苗は治癒することはない。対策として苗木への殺菌剤の散布は有効で、ボルドー液の散布が恒常的に行われていたが、2017 年春の出荷では罹病した苗木が植林され、過去に例のない大被害が発生した。赤枯病に関する研究は 1955 年頃には行われていたが、その後の研究成果は少なく、知識を持つ林業技術者も少ない。対策として、苗畑での被害の発生を防ぐとともに発生時の早期発見による迅速な対処が必要であり、赤枯れ病の初期の診断が求められる。赤枯病の診断をする際には、詳細な肉眼的及び顕微鏡的観察が重要であり、他の類似する病害との識別をする必要がある。また 2019 年に分子生物学的手法による同定にむけ、種特異的プライマーが開発された¹⁾。そこで、本年度は発生時の早期発見を目的とした複数の診断方法の実現を目指し、国立研究開発法人森林総合研究所の指導の下、罹病葉を用いて PCR 法による赤枯病同定手法の確立を試みた。

II 方法

1 罹病葉の PCR 法による赤枯病の同定

供試体は赤枯病の罹病葉（表-1）を用いた接種試験を行ったスギ苗木の罹病葉とした。赤枯病菌の種特異的プライマーを用いて供試体の DNA 抽出物を鋳型とし PCR 増幅を行い、電気泳動で増幅の有無を確認した。DNA 抽出は Prepman™ Ultra Sample Preparation Reagent (Thermo Fisher Scientific(株)) を用い、罹病葉から鋳型 DNA を抽出した。PCR 反応液は超純水で希釈（表-2）した鋳型 DNA 1 μl 又は 2 μl、GoTaq® Green Master Mix (プロメガ(株)) 12.5 μl、各プライマー (10 μM) 0.5 μl、超純水 10.5 μl



図-1 スギ赤枯病の罹病葉

又は 9.5 μl を混合し、合計 25 μl になるよう調整した。PCR 反応終了後 1.5%アガロースゲルに Gel Red Nucleic Acid Gel Stain (コスモバイオ(株)) を添加し電気泳動を行った。アガロースゲルはアガロース S<錠> ((株)ニッポンジーン) を用い作成した。電気泳動後、トランスイルミネーターにて増幅したバンドを確認した。

表-1 赤枯病の罹病段階

	採取日	苗木	分生子の有無
供試体 1	2月 21 日	恒温器 (20°C)	有 (少量)
供試体 2	3月 2 日	屋外	無 (少量の子座)



図-2 供試体 1



図-3 供試体 2

III 結果及び考察

PCR 法によるスギ赤枯病菌の検出結果を図-4、図-5に示す。罹病葉いずれにおいてもスギ赤枯病菌のバンドを確認することができた。供試体上のスギ赤枯病菌の量によって検出されるバンドの位置は異なるが、希釈液 500 倍～2000 倍のいずれかで検出された。また鋳型 DNA が 1 μ l と 2 μ l のどちらでも陽性を検出することができた。

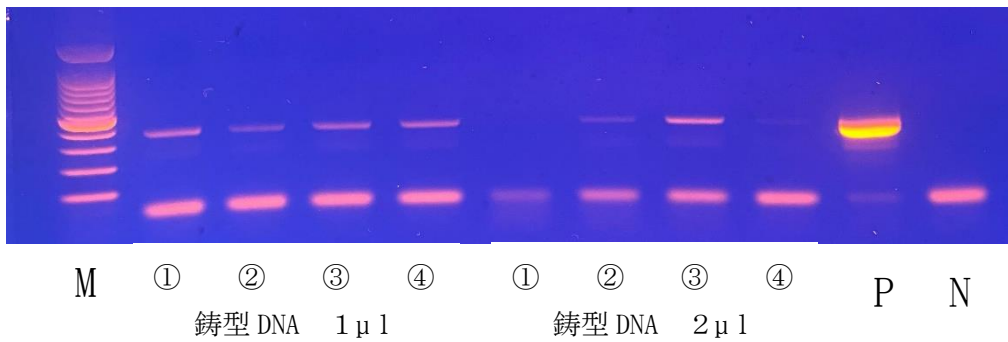


図-4 供試体 1 の電気泳動結果

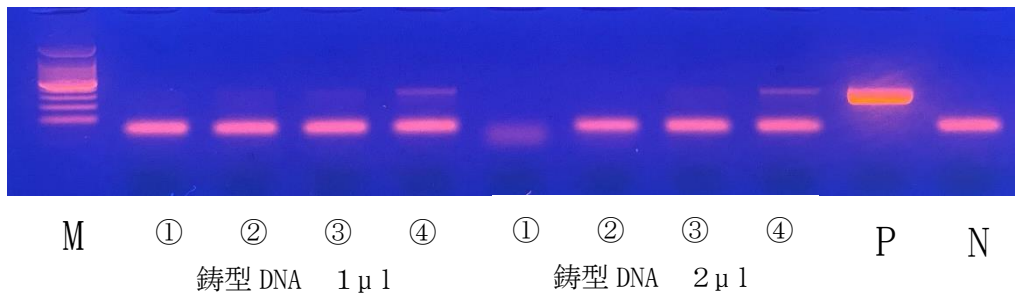


図-5 供試体 2 の電気泳動結果

M: 100bp ラダーマーカー
 P: ポジティブコントロール
 N: ネガティブコントロール

表-2 鋳型 DNA の希釈倍率

①	②	③	④
×500	×1000	×1500	×2000

引用文献

1) 安藤裕萌：種特異的プライマーを用いたスギ赤枯病の早期診断，樹木医学研究 23 巻・2 号：98-99，2019