

成績概要書(作成 2004年1月)

研究課題名:ダイコンパーティシリウム黒点病の PCR 土壌診断による被害回避指針
(ダイコンパーティシリウム黒点病に対する高精度簡易土壌検診法の開発)
(土壌検診によるダイコンパーティシリウム黒点病の被害回避対策)

担当部署:花 野菜技術センター 研究部 病虫科
十勝農業試験場 生産研究部 てん菜畑作園芸科

協力・分担関係:南羊蹄地区農業改良普及センター
十勝東部地区農業改良普及センター
十勝中部地区農業改良普及センター

予算区分:国費補助(地域基幹)

研究期間:1999 ~ 2003 年度(平成 11 ~ 15 年度)

1. 目的

ダイコンパーティシリウム黒点病に対する簡易で迅速な土壌検診法を開発し、ダイコン作付けに当たって被害回避対策の指針とする。

2. 方法

PCR 検定による土壌検診法の開発に取り組んだ。

1)プライマー設定

ダイコンパーティシリウム黒点病菌(*Verticillium dahliae*, *V. albo-atrum*)を特異的に検出するプライマーの設定について検討した。

2)土壌からの核酸抽出方法

液体窒素、フェノール・クロロホルムを用いない、マイクロチューブ内での土壌からの核酸抽出方法について検討した。

3)抽出核酸の純化

土壌から抽出した核酸を PCR 反応に使用可能な試料とするための純化方法について、市販の核酸純化キットの比較検討を行った。

4)PCR 検定と微小菌核定量結果との関係

PCR 検定と本病原菌微小菌核密度定量結果との比較検討を行った。

5)PCR による土壌検診

圃場から採取した土壌について PCR 検定および微小菌核密度定量を行うとともに、ダイコン作付け後の本病発病程度を調査し、検定結果と発病との関係を調査した。

6)ダイコンパーティシリウム黒点病に対する耕種的防除

汚染圃場においてだいこんを栽培し、本病への抵抗性品種間差を確認した。また、作型についても検討した。

3. 成果の概要

1) *V. dahliae*, *V. albo-atrum* の ITS 領域の配列を基に両種を特異的に検出するプライマーセットを設定した。

2) ガラスビーズを用い、マイクロチューブ 1 本で行う土壌からの核酸抽出方法を開発した。

3) 市販の核酸純化キットのうち、土壌検診に適したキットを選抜した。

4) 本病発生圃場の土壌について PCR 検定を行った結果、生土 0.2g からの検定では微小菌核密度 10 個以上の土壌から検出が可能だった。

5) 圃場の微小菌核密度とだいこんの発病との関係は明らかにできなかったものの、風乾調製した土壌 0.1g を 2 反復で PCR 検定した結果、1 本でも + 反応が出た試料については、本病の発生が認められた。

6) 風乾調製の期間を除けば、PCR による検診に要する時間は 1 日程度であり、これまで 3 ~ 4 週間かかっていた検定時間を大幅に短縮することができる。また、特別な技術を必要としないため、PCR を行える環境であれば誰にでも検診が可能である。

7) 本病に対する抵抗性の品種間差が示された。また、作型では初夏まきで発病株率が高く、春まきで低かった。

表1. PCR検診まとめ

試料採取	融雪後、圃場当たり5ヶ所より土壌を採取
試料調製	採取後風乾・2mmメッシュ篩掛け・乳鉢で破碎
核酸抽出法	別図
純化キット	MagExtractor Plant Genome (TOYOBO)
プライマー	ND1/D2
酵素	ExTaq (TAKARA)
電気泳動	1.5%アガロースゲル

清潔な1.5mlマイクロチューブを使用する

- 0.2 g ガラスビーズ(径2mm)
- 0.1 g 土壌
- 250 μl Extraction buffer
- 50 μl 10% SDS溶液
- 10 μl スキムミルク溶液 (0.2 g/ml)

表2. 土壌検診とダイコンパーティシリウム黒点病発病調査結果

MS/g dry soil	PCR検定	調査月日	品種名	発病度	発病株率
0.0	-	8月26日	夏つかさ	0.0	0.0
0.0	-	8月26日	夏つかさ	0.0	0.0
0.0	-	8月26日	夏つかさ	0.0	0.0
0.0	-	8月26日	夏つかさ	0.0	0.0
0.0	-	8月26日	夏つかさ	0.0	0.0
0.0	-	8月26日	夏つかさ	0.0	0.0
0.0	-	8月18日	YR桜坂	0.0	0.0
0.0	-	8月18日	YR桜坂	0.0	0.0
0.0	-	8月18日	夏つかさ	0.0	0.0
0.0	-	8月18日	夏つかさ	0.0	0.0
0.2	-	8月18日	YR桜坂	0.6	5.0
5.5	+	8月24日	夏つかさ	7.2	21.1
7.3	+	8月18日	夏つかさ	2.5	10.0
11.8	+	9月3日	夏つかさ	0.9	5.9
11.8	+	9月3日	健志総太り	0.8	6.5
11.8	+	9月3日	道南2号	1.2	8.0
11.8	+	9月3日	優等生	4.0	19.4
11.8	+	9月3日	貴宮	6.8	27.7
11.8	+	9月3日	YR桜坂	5.8	34.0
11.8	+	9月3日	初舞台	9.1	38.5
11.8	+	9月3日	晩抽喜太一	10.2	48.8
27.9	+	7月31日	夏つかさ	6.9	25.0

PCR検定 ■

- +: 特異バンドが薄いが確認された
- : 特異バンドが確認されなかった

ボルテックスで1min搅拌

150 μl 塩化ベンジル

ボルテックスで1min搅拌

55 , 40~60min加熱

150 μl 3M酢酸ナトリウム溶液

転倒混和

5 min 水中で急冷

15,000 rpm ,10min遠心

上清を回収

図1. 土壌からの核酸抽出法

前歴での発生	無発生	少発生	少~中発生	中発生以上
PCR検診結果	- -	- -	+ -	+ +
対策	作付け可 + 適切な輪作	抵抗性品種 + 適切な輪作	土壌消毒+抵抗性品種 または 作付け回避	

対策の選択に当たっては、前歴の発病程度を十分考慮する。

4. 成果の活用面と留意点

- 1) ダイコンパーティシリウム黒点病の被害回避指針として活用する。
- 2) 検診結果による対策の選択に当たっては前歴における発生程度を考慮する。
- 3) 本試験における土壌検診の対象は *V. dahliae* のみである。

5. 残された問題とその対応

- 1) 土壌消毒, 作付け回避以外の被害回避対策
- 2) PCR 検診結果とパーティシリウム黒点病発病程度に関する知見の集積