

試験研究成果普及情報

部門	病害虫	対象	普及
課題名：PCR法によるサンダーソニア乾腐病菌の検出技術の開発			
〔要約〕既報のPCR法を用いてサンダーソニア乾腐病菌 (<i>Fusarium proliferatum</i>) を種子や圃場土壌から検出できる。種子消毒や土壌消毒の前後にPCR法により検定を行うことで、消毒の効果を判定できる。			
キーワード [※] サンダーソニア、乾腐病、PCR			
実施機関名	主 査 農林総合研究センター 生物工学研究室 協力機関 農林総合研究センター 生産環境研究室、岐阜大学流域圏科学研究センター、山武農業事務所、丸朝園芸農協花卉部		
実施期間	2017年度～2019年度		

[目的及び背景]

サンダーソニアはイヌサフラン科の球根植物で、山武地域台地地帯の切り花の主要品目であるが、球根養成の過程において発芽不良等が発生し、球根の安定的な確保が困難となっている。そのような中、発芽不良にサンダーソニア乾腐病菌 (*Fusarium proliferatum*) が関与していることが明らかとなった（生産環境研究室、令和2年度試験研究成果普及情報）。そこで、同病原菌による汚染実態を把握し、対策技術を確立するために植物体や栽培環境から生物工学的的手法により同病原菌を検出する技術を開発する。

[成果内容]

- 1 サンダーソニア乾腐病菌 (*F. proliferatum*) 及び近縁のフザリウム属菌等に対して、既報のプライマーセット（表1）を用いてPCR法を行ったところ、PR01及びPR02のセットが、最も特異性が高かった。このプライマーセットは近縁種の *Gibberella fujikuroi* においても増幅が見られるものの、千葉県内のサンダーソニアから分離されたサンダーソニア乾腐病菌の全ての菌株で増幅が見られ、他のフザリウム属菌等では増幅しない（表2）。
- 2 生産者が自家採取した種子からは、約60%の割合でサンダーソニア乾腐病菌が検出され、高い割合で種子汚染されている。一方、チウラム・ベノミル水和剤（ベンレートT水和剤）による種子消毒後は検出されないことから、播種前の種子消毒は有効な対策技術となる（表3）。本薬剤は、花き類のフザリウム・リゾクトニア菌に対して種子処理機による種子粉衣での登録がある。
- 3 土壌中のサンダーソニア乾腐病菌に対するPCR法による検出限界は、約 10^5 cfu/g 乾土であるのに対し、土壌にフザリウム属菌選択培地（Fo-G2 液体培地）を添加し、25℃で4日間培養することにより検出感度が1,000倍以上に高まり、低密度の土壌からも検出が可能になる（表4）。

- 4 現地のサンダーソニア栽培圃場（11 か所）から採取した土壌について、3 の PCR 法による検定を行った場合、サンダーソニアを初めて栽培する圃場 1 か所を除く 10 か所全ての圃場でサンダーソニア乾腐病菌が検出されることから、多くの圃場が同病原菌により汚染されている可能性がある（表 5）。
- 5 各種土壌消毒後の圃場について、3 の PCR 法により検定したところ、無処理区を除き、消毒後はサンダーソニア乾腐病菌が検出されなくなり、生産環境研究室による選択培地を用いた検定結果とも一致したことから（生産環境研究室、令和 2 年度試験研究成果普及情報）、PR01 及び PR02 のプライマーセットを用いた PCR 法により土壌消毒の効果を判定できる（表 6）。

[留意事項]

[普及対象地域]

県内全域

[行政上の措置]

[普及状況]

[成果の概要]

表 1 サンダーソニア乾腐病菌を検出する PCR 法の開発に供試したプライマーセット及び PCR の方法

名称	配列 (5'-3')	反応液組成	反応条件	出典
CLPR01	TGCATCAGACCACTCAAATCCT	プライマー各250nM、 1×GoTaq Green Master Mix (Promega)	94°C 2:00+[94°C 0:15+56°C 0:30+72°C 0:30]×40+72°C 5:00	Mule et al., FEMS Microbiology Letters 230: 235-240, 2004
PR01	CTTTCGCCAAGTTTCTTC	プライマー各300nM、 1×GoTaq Green Master Mix (Promega)	94°C 2:00+[94°C 0:30+56°C 0:30+72°C 0:30]×40+72°C 5:00	Mule et al., European Journal of Plant Pathology 110: 495- 502, 2004
PR02	TGTCAGTAACTCGACGTTGTTG	プライマー各250nM、 1×GoTaq Green Master Mix (Promega)	94°C 2:00+[94°C 0:15+62°C 1:00]× 40+72°C 5:00	Nicolaisen et al., Journal of Microbiological Methods 76: 234-240, 2009
Fpro220	CTTCGATCGCGCTCCT	プライマー各250nM、 1×GoTaq Green Master Mix (Promega)	94°C 2:00+[94°C 0:15+62°C 1:00]× 40+72°C 5:00	Nicolaisen et al., Journal of Microbiological Methods 76: 234-240, 2009
Fpro270	CACGTTTCGAATCGCAAGTG	プライマー各250nM、 1×GoTaq Green Master Mix (Promega)	94°C 2:00+[94°C 0:15+62°C 1:00]× 40+72°C 5:00	Nicolaisen et al., Journal of Microbiological Methods 76: 234-240, 2009

表2 サンダーソニア乾腐病菌 (*Fusarium proliferatum*) 及び近縁種に対する各プライマーセットの特異性

供試菌株	プライマーセット		
	CLPR01/CLPR02	PR01/PR02	Fpro220/Fpro270
<i>Fusarium proliferatum</i>	Ih3	—	+
	Ih4	+	+
	Sh3	+	+
	AK3	—	+
	AK5-1	+	+
	AK8	+	+
	AK9	—	+
	CK14S1S	nt	+
	CK14S2S	nt	+
<i>Fusarium oxysporum</i>	—	—	+
<i>Fusarium solani</i>	—	—	+
<i>Gibberella fujikuroi</i>	nt	+	nt
<i>Rhizoctonia solani</i>	nt	—	nt
<i>Phytophthora nicotianae</i>	nt	—	nt
<i>Sclerotium rolfsii</i>	nt	—	nt

注) + : 想定サイズの DNA 断片の増幅、— : 増幅無し、nt : 試験せずを示す

表3 生産者の自家採種種子への種子消毒の有無が PCR 検定結果に与える影響

試験区	供試 種子数	<i>Fusarium proliferatum</i> が検出された種子数(%)
チウラム・ベノミル水和剤 (ベンレートT水和剤20) ²⁾	208	0 (0)
無処理	208	124 (59.6)

注1) 種子を Fo-G2 培地に置床し 25℃で7日間培養した。得られた菌糸をかきとり、シカジーニクス DNA 抽出試薬 ST(関東化学)を用いて DNA を抽出し、Suga et al. (Fungal Biology, 2014) に従って PCR-RFLP 法により、*F. proliferatum* であるかを判定した

2) 本薬剤は花き類のフザリウム・リゾクトニア菌に対して、種子処理機による種子粉衣での登録がある。ここでは消毒後の種子のサンダーソニア乾腐病菌検出の有無を調査するため、試験的に種子処理機を使用せずに乾燥種子重量の 0.5%の薬剤を粉衣した

表 4 土壌へのフザリウム選択培地添加と培養の有無が
PCR の検出感度にあたる影響

人工汚染土 ³⁾ の希釈倍率 (推定菌密度 ⁴⁾)	培養前	培養後 ⁵⁾
1	+	nt
10 ⁻¹ (10 ⁶ cfu/g 乾土)	+	+
10 ⁻² (10 ⁵ cfu/g 乾土)	+	+
10 ⁻³ (10 ⁴ cfu/g 乾土)	-	+
10 ⁻⁴ (10 ³ cfu/g 乾土)	-	+
10 ⁻⁵ (10 ² cfu/g 乾土)	-	+

- 注 1) 改変塩化ベンジル法 (平成 23 年度千葉県農林総合研究センター成果普及技術資料「イチゴ炭疽病・萎黄病・疫病感染苗検査マニュアル」) により、土壌から DNA を抽出し、プライマー PR01/PR02 を用いて PCR を行った。PCR 反応液にはウシ血清アルブミン (BSA) を 0.4 μg/μL 添加した
- 2) + : 想定サイズの DNA 断片が増幅、- : 増幅無し、nt : 試験せずを示す
- 3) サンダーソニア乾腐病菌 *F. proliferatum* CK14S2S 株を土壌ふすま培地を用いて 25℃ で 5 か月間培養後、市販の園芸培土で 2 倍 (w/w) に希釈し、人工汚染土を作製した。これを更に 10 倍~10⁵ 倍に希釈して試験に供試した
- 4) 10⁻² 及び 10⁻³ に希釈した人工汚染土壌について Fo-G2 培地を用いた希釈平板法を行い、出現コロニーの一部を Suga et al. (Fungal Biology, 2014) の PCR-RFLP 法により同定し、*F. proliferatum* と同定されたコロニーと同形態のコロニーを計測し、同結果から全ての供試土壌の菌密度を推定した
- 5) 土壌約 10 g に Fo-G2 液体培地を 2 mL 加え、25℃ で 4 日間培養した

表 5 現地のサンダーソニア栽培圃場土壌の PCR 検定結果

圃場No.	採取時期	検定結果 ²⁾	備考 (採取時の状況等)
No.1	令和元年 5 月	-/-/-	実生苗育成中、サンダーソニアを初めて栽培する圃場
No.2		+/-/+	実生苗育成中
No.3		+/+/-	実生苗育成中
No.4	令和元年 6 月	+/+/+	空圃場
No.5		-/+/+	空圃場
No.6		+/+/+	球根養成中
No.7		+/+/+	球根養成中
No.8		+/+/+	空圃場 (花切後)
No.9		+/+/+	空圃場 (花切後)
No.10		+/+/+	空圃場
No.11		+/-/+	空圃場

注 1) 土壌約 10 g に Fo-G2 液体培地を 2 mL 加え、25℃で 4 日間培養した後、表 4 の注 1) と同様に検定を行った

2) + : 想定サイズの DNA 断片の増幅、- : 増幅無しを示し、左から順にハウス入口付近 / 中ほど / 奥の結果を示す

表 6 サンダーソニア乾腐病に対する各種土壌消毒の効果と PCR 検定結果

試験区	消毒期間 ⁵⁾ (日)	反復	菌密度 ⁶⁾ (cfu/g)	PCR ⁷⁾
土壌還元 消毒区 ²⁾	21	1	0	-
		2	0	-
		3	0	-
太陽熱 消毒区 ³⁾	28	1	0	-
		2	0	-
		3	0	-
薬剤 消毒区 ⁴⁾	14	1	0	-
		2	0	-
		3	0	-
無処理区	28	1	2,500	+
		2	1,917	+
		3	167	+

注 1) 土壌消毒は令和元年 7 月 31 日から開始し、消毒期間終了後、直ちに被覆を除去し、0-20cm の土壌を採取した

2) 土壌還元消毒区は、1t/10a のフスマを混和後被覆し、灌水した

3) 太陽熱消毒区は散水後、被覆した

4) 薬剤消毒区はクロルピクリンくん蒸剤を処理した

5) 消毒期間は各消毒法の処理期間 (日) を示す

6) Fo-N2 培地を用いた希釈平板法により計数した。0 は、検出限界以下を示す

7) PCR 検定は、表 5 の注 1) と同様に実施した。+ は、想定サイズの DNA 断片の増幅、- は増幅無しを示す

[発表及び関連文献]

- 1 令和2年度試験研究成果発表会（花植木部門）
- 2 令和2年度試験研究成果普及情報「サンダーソニアに発生する球根障害の原因とその対策」
- 3 緊急技術開発促進事業「サンダーソニアの優良球根養成のための球根障害対策の確立」研究成果集、令和2年3月

[その他]

- 1 平成27年度試験研究要望課題（提起機関：山武農業事務所）
- 2 緊急技術開発促進事業「サンダーソニアの優良球根養成のための球根障害対策の確立」（平成29年度～令和元年度）