

マツ葉枯性病害の簡易診断法の確立

農林生産学科 教授

木原 淳一

研究成果の概要

平成26年度は、クロマツ葉枯性病害の簡易診断のために、リボゾーム遺伝子の種特異的配列から種特異的プライマーを作成し、PCR法によりクロマツ葉枯性病害の原因となる病原菌の検出法を確立した。しかし、PCR法は、反応・検出に時間がかかること、また、専用の機器（サーマルサイクラー）が必要なことから、今回、PCR法よりも簡易的に、かつ、検出時間を短縮できるLAMP法（Loop-Mediated Isothermal Amplification法）を用いた、クロマツ葉枯性病害の簡易診断法の確立を試みた。

はじめに、クロマツ赤斑葉枯病菌（*Dothistroma septosporum*）に特異的な *VbsA* 遺伝子の部分塩基配列から、LAMP法に必要な4種類のプライマーを作成した。この4種類のプライマーとクロマツ赤斑葉枯病菌のDNAを用いてLAMP法を行なった結果、クロマツ赤斑葉枯病菌のDNAを用いた場合のみ、LAMP反応特有のラダーバンドを検出することができた。松江市城山公園のクロマツから採集した針葉を用いて、クロマツ赤斑葉枯病菌の検出を試みた結果、検出の頻度は非常に低く、赤斑葉枯病菌はあまり感染していないことが示唆された。

次に、クロマツ褐斑葉枯病菌（*Lecanosticta acicola*）の検出のため、はじめに、ランダムプライマーを用いて、褐斑葉枯病菌に特有なPCR増幅断片をスクリーニングするとともに、その遺伝子配列を決定した。この遺伝子配列から、LAMP法に必要な4種類のプライマーを作成した。この4種類のプライマーと褐斑葉枯病菌のDNAを用いてLAMP法を行なった結果、褐斑葉枯病菌のDNAを用いた場合のみ、LAMP反応特有のラダーバンドを検出することができた（図1）。松江市城山公園のクロマツから採集した針葉を用いて、褐斑葉枯病菌の検出を試みた結果、病徴を伴った針葉に加えて、無病徴の針葉からも褐斑葉枯病菌を検出した。以上の結果から、褐斑葉枯病菌が健全なクロマツ針葉に感染後、無病徴のまま潜在感染しており、何らかの外的・内的な環境要因によって病徴が現れる病害であることが推察された。さらに、LAMP増幅産物の確認方法として、電気泳動（図1）に加え、蛍光目視検出試薬法、及び、ビオチン-FITCプローブを用いた検出法も有効であることを確認した。

一方、クロマツ針葉から抽出したDNAを鋳型に、糸状菌のリボゾーム遺伝子のITS領域を増幅するプライマーを用いてPCRを行ない、クロマツ針葉内に生息している糸状菌の種類について調査を行なった。その結果、クロマツ針葉内には、クロマツ葉枯性病害に関与する病原菌以外に、数種の糸状菌が生息していることを確認した。これら糸状菌は、クロマツ針葉内で内生菌として生息していると考えられる。これら内生菌のクロマツ針葉における役割については不明であり、今後、内生菌の分離、及び、性状解析を行なう予定である。

社会への貢献・その他

クロマツは、島根県の「県木」であり、また、島根県内の市町村において、松江市ではマツが、出雲市や江津市ではクロマツが「市の木」として定められている。クロマツ葉枯性病害は、庭園や公園での被害が目立つことから、その予防と防除が重要である。無病徴のクロマツ針葉を用いて、病原菌を検出できることは、葉枯性病害の発生リスクを判断する指標のひとつとして有効であり、従来の農薬による防除のみならず、今後、内生菌を利用した防除法についても検討していきたいと考えている。

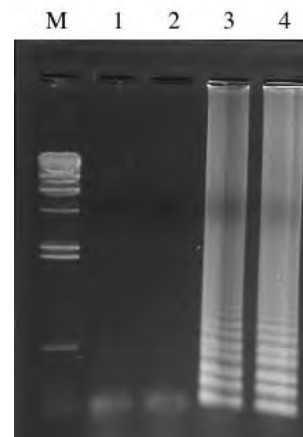


図1 LAMP増幅産物の電気泳動
 M：マーカ（λ/Hind III）
 1：すす葉枯病菌（TEC01-1 菌株）
 2：セプトリア葉枯病菌（Ya02-1 菌株）
 3：褐斑葉枯病菌（629 菌株）
 4：褐斑葉枯病菌（824 菌株）