

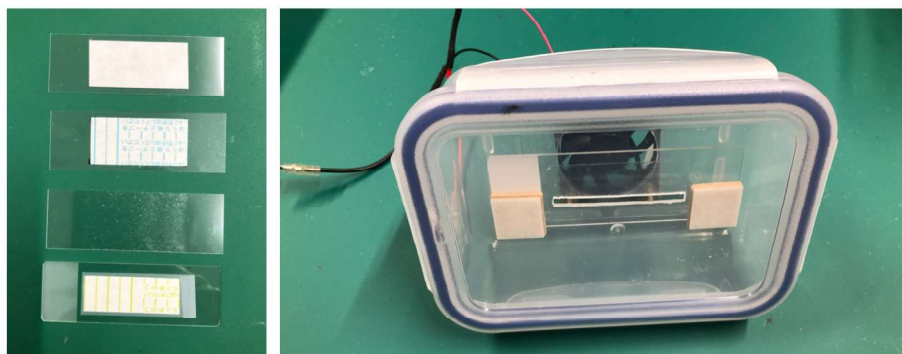


図2 試験に供した4種類の粘着テープ等(左)および比較に用いた胞子トラップ(右:長野県果樹試験場より情報提供)

粘着テープ等は、上から「No. 539R」「スコッチ665-3-18」、ワセリン(以上3種は透明PVCシートに貼付け)、「スコッチ810」(両面テープによりスライドガラスに貼り付け)。テープには粘着面保護の剥離紙が付いており、使用時に取り除く。

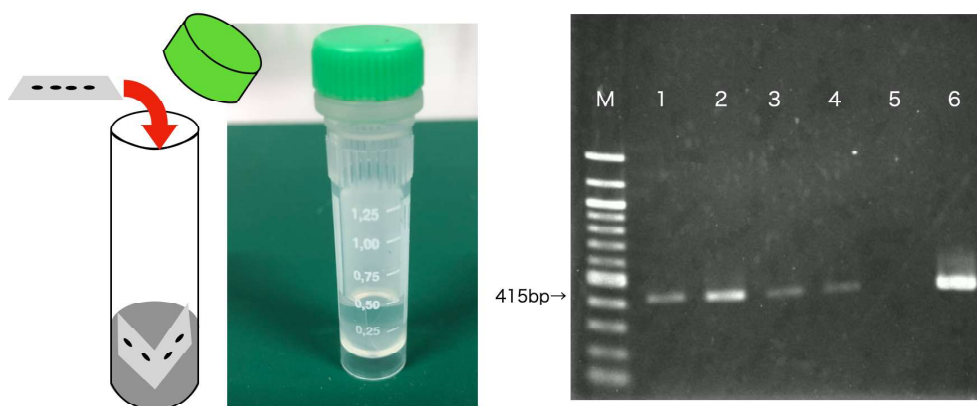


図3 テープからのキレックス法(参考:三浦,2017)による抽出の模式図および実物(左)と抽出したDNAからのアクチン標的プライマーを用いたPCR結果(右)

(左)テープには分生孢子懸濁液(約 $4-5 \times 10^4$ 個/ml)約50 μ lを、約5mm $\times$ 2cmの帯状に滴下し、乾燥後DNA抽出まで -30°C で保存した。分生孢子付着部分を帯状に切り出し、2つに折り曲げて、2mlチューブ内の500 μ lの0.5%キレックス樹脂懸濁液に35 μ lの2mg/mlプロテアーゼK溶液を加えたものへ浸漬した。これを 56°C 24hr処理後、 99.9°C 3min加熱処理して、上清をDNA溶液とした。

(右)プライマーは V_{lact}-28F と V_{lact}-442R。M:マーカー、1,2:「No.539R」(1と2は異なる菌株)、3,4:「スコッチ 810」(3と4は異なる菌株)、5:ネガティブコントロール(サンプルなしのキレックス樹脂懸濁液)、6:ポジティブコントロール(菌体から抽出した DNA)

4. 考察

国外で既報の褐斑病菌のLAMPプライマーは日本国内の褐斑病菌の検出に適用しようとしたがいずれも良好な結果を得られなかった。国内外の菌株間における標的遺伝子の配列の違いおよびプライマーの作成位置に留意する必要がある。黒星病についてはターゲット遺伝子がEF-1 α であり、ITSとコピー数が違うことから、検出限界を上げるためにはターゲットとする配列やプライマーの作成位置について再検討する必要がある。また、両病害とも試験は青森県分離株を使用したことから、他県の実験株についても検討を行う必要がある。