参考資料（平成 26 年度）
分類名〔病害虫〕

リアルタイム PCR 法を用いたアブラナ科野菜根こぶ病菌の簡便・高感度検出

宮城県農業・園芸総合研究所

１　取り上げた理由

アブラナ科野菜根こぶ病は，難防除土壌病害として知られている。土壌中の菌密度（休眠胞子）の測定は，蛍光顕微鏡を用いる方法が開発されているが，休眠胞子の識別に熟練が必要な上に作業が繁雑で，検出感度が低いという問題点がある。そこで，遺伝子診断技術の一つであるリアルタイム PCR（qPCR）法を用いた土壌中の根こぶ病菌の検出について検討し，従来の方法よりも簡便かつ高感度に検出できたので参考資料とする。

２　参考資料

１）qPCR 法を用いて土壌中の根こぶ病菌を特異的に検出できる。
２）検定作業は DNA 抽出，サンプル調整，qPCR 解析の手順となる（図１）。
３）Ct 値と図 2 の検量線を用いて，DNA 量，休眠胞子数を推定できる。図 2A の検量線を用いた場合は DNA 量，図 2B の検量線を用いた場合は乾土 1g 当たりの休眠胞子数が算出できる。
４）DNA 量は 500fg まで，休眠胞子数は 1×10^2 個/g 乾土まで検出できる。
５）本技術の所要時間は合計約 3 時間 30 分であり，即日で検出が可能である。

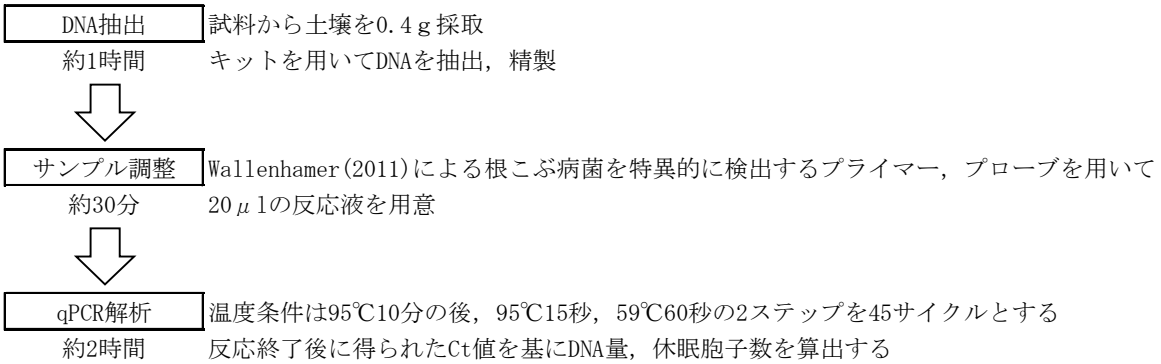

図１　根こぶ病菌定量検出の流れ

３　利活用の留意点

１）土壌抽出 DNA は，凍結状態（-80℃）で長期間保存できる。
２）本技術ではリアルタイム PCR 装置を利用する。
３）1 試料当たりの消耗品の費用は約 110 円である。
４）土壌中の菌密度を推定できるため，ほ場間比較（表１）や，土壌消毒効果の確認等に活用できると考えられる。
５）蛍光顕微鏡を用いた測定の場合，検出限界は休眠胞子数で 1×10^4 個/g 乾土である。
６）検量線の作成は園芸培土（商品名：ニッピ園芸培土１号）を用いた。

（問い合わせ先：宮城県農業・園芸総合研究所　バイオテクノロジー開発部　電話 022-383-8131）

4　背景となった主要な試験研究

1）研究課題名及び研究期間

病害虫の定量的遺伝子診断技術の開発と防除への応用　（平成 24～26 年）

2）参考データ

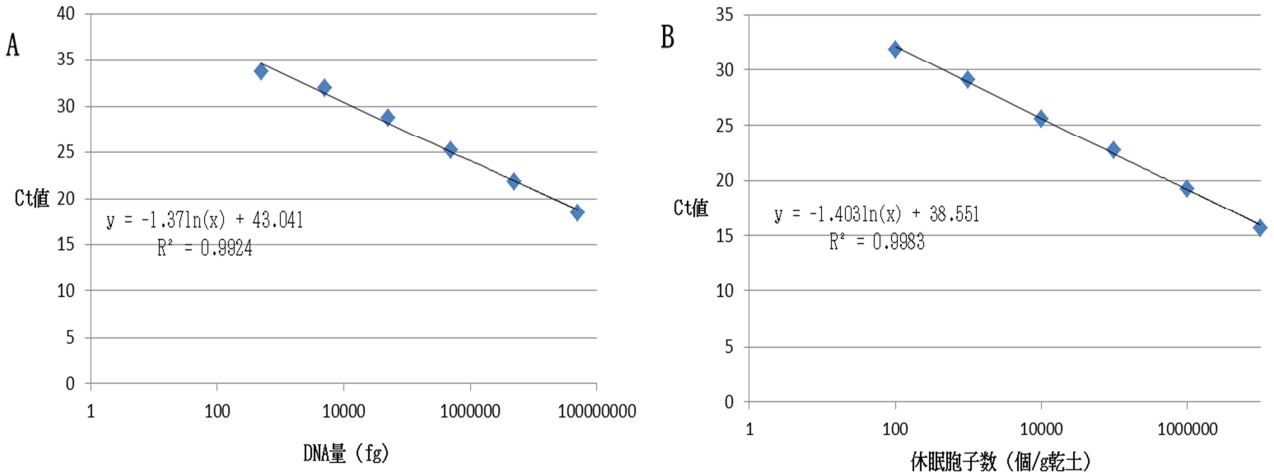

図２　測定する際に用いる検量線

A：希釈 DNA から作成，B：休眠胞子懸濁液を添加した土壌由来 DNA から作成

＊Ct 値：PCR 増幅産物がある一定量に達したときのサイクル数

表１　qPCR 法による土壌からの根こぶ病菌の検出事例

土壌採取地	Ct値	DNA量（fg）	休眠胞子数（個/g乾土）
Aほ場（根こぶ病発生歴有り）	19.80±0.01	2.3×10^{7}	6.2×10^{5}
Bほ場（根こぶ病発生歴無し）	34.06±0.08	－	－

＊－：未検出

＊Ct 値は 3 回測定した平均±標準偏差

＊20cm 深程度の土壌をほ場の 4 隅と中央の 5 地点から採取して均一に混合し，1 試料（1kg 程度）とした。

3）発表論文等

a　関連する普及に移す技術

なし

b　その他

なし

4）共同研究機関

なし