

[成果情報名] 検疫有害植物 *Candidatus Liberibacter solanacearum* を検出できる新規プライマーセット

[要約] 新規に開発した PCR プライマーにより検疫有害植物 *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Lso) を特異的かつ高感度に検出できる。本プライマーは、コンベンショナル PCR およびリアルタイム PCR のいずれにも利用できる。

[キーワード] *Candidatus Liberibacter solanacearum*、遺伝子診断、PCR 法

[担当] 九州沖縄農業研究センター・生産環境研究領域・病害グループ、果樹茶業研究部門・生産・流通研究領域・病害ユニット

[代表連絡先] q_info@ml.affrc.go.jp、Tel:096-242-7682

[分類] 研究成果情報

[背景・ねらい]

Candidatus Liberibacter solanacearum (Lso) は、ナス科およびセリ科植物に感染する難防除病原細菌である。本菌は国内未発生のキジラミ類によって媒介されるが、近年、ニンジンにおいて種子伝染が疑われており、ニンジン種子のグローバルな流通の下、わが国はじめ世界各国で侵入が警戒されている検疫有害植物である。

現在、国内外の種苗検査機関や植物検疫機関において、Lso 汚染種子の検査は PCR 法（コンベンショナル PCR およびリアルタイム PCR）により実施されている。しかし、既存の Lso 検出用 PCR プライマーは近縁種 *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) の検出用プライマーを基に作製されていることもあり特異性が低い。また、コンベンショナル PCR とリアルタイム PCR とで用いるプライマーがそれぞれ異なっているために、それぞれの検出結果について偽陽性・偽陰性の確認や、検出結果の再現性検証が求められている。そこで検出の再現性検証がし易いように、コンベンショナル PCR およびリアルタイム PCR いずれの検出法でも利用可能で、特異性が高い新規プライマーを新たに開発する。

[成果の内容・特徴]

1. 新規プライマーセット (Lso-931F/LsoLSS) は、Lso の 16S rDNA 配列と様々な細菌の 16S rDNA 配列 (Lso 以外の *Candidatus Liberibacter* 属細菌の 16S rDNA 遺伝子配列も含む) との比較から見出された Lso 特異塩基を有する領域を基に設計されたものである (表 1)。
2. 本プライマーセットを利用して、Lso DNA を鋳型に PCR を行うと、近縁種である Las、*Ca. L. americanus* (Lam)、および *Ca. L. europaeus* (Leu) の 3 種と識別が可能であり、Lso を特異的に検出することができる (図 1)。
3. 本プライマーセットを用いて上記の Lso DNA の希釈系列を鋳型にリアルタイム PCR を行うと、植物由来 DNA の非特異的増幅はなく、極少量の Lso DNA を特異的に検出することができる (図 2)。
4. 本プライマーセットは、Lso を特異的に識別でき、コンベンショナル PCR およびリアルタイム PCR いずれでも利用可能である。

[成果の活用面・留意点]

1. Lso 感染が疑われる輸入種子や苗等において本プライマーセットを用いた検査を行うことで、国内未発生の本病原菌の侵入リスク低減に貢献できる。
2. 本プライマーセットを用いた検査を行うことで、再現可能な結果を国際的に共有することができる。

3. 本プライマーセットは、Taqman probe 法によるリアルタイム PCR でも利用可能である。

[具体的データ]

表1 Lso 検出用プライマーセットのリスト

プライマー名	配列*	備考
① Lso-931F	5'-CAGCCCTTGACATATAGAGGACG-3'	新規の Lso 検査用プライマー (Fujiwara and Fujikawa, 2016)
LsoLSS	5'-ACCCAACATCTAGATAAAATC-3'	
② Lso-F	5'-GTCGAGCGCTTATT TTTAATAGGA-3'	既存の Lso 検査用プライマー (Li <i>et al.</i> , 2009)
HLBr	5'-GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG-3'	
③ CaLsppF	5'-GCAGGCTTAACAC ATGCAAGT-3'	既存の Lso 検査用プライマー (Teresani <i>et al.</i> , 2014)
CaLsppR	5'-GCACACGTTTCCATGCGTTAT-3'	

* Lso 特異塩基は太字で表記。

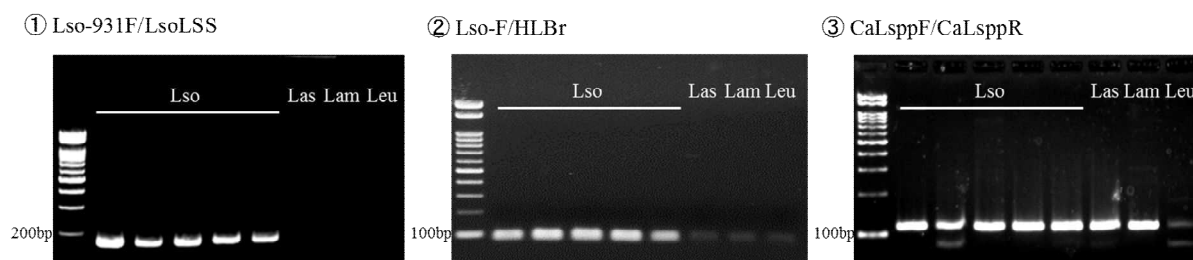


図1 新規プライマーセットによる Lso 特異的検出

Lso-931F/LsoLss プライマーセット (①) を用いた PCR では、Lso のみを特異的に検出し、近縁種である Las, Lam, Leu を検出することはない。既存の検査用プライマーセット (②, ③) では近縁種の非特異検出が認められる。

鋳型となる Lso、Las、Lam、Leu の各 DNA は、それぞれの 16S rDNA 全長の PCR 産物をもとに反応液中に 10^8 コピー数になるように調整されたものを用いた。

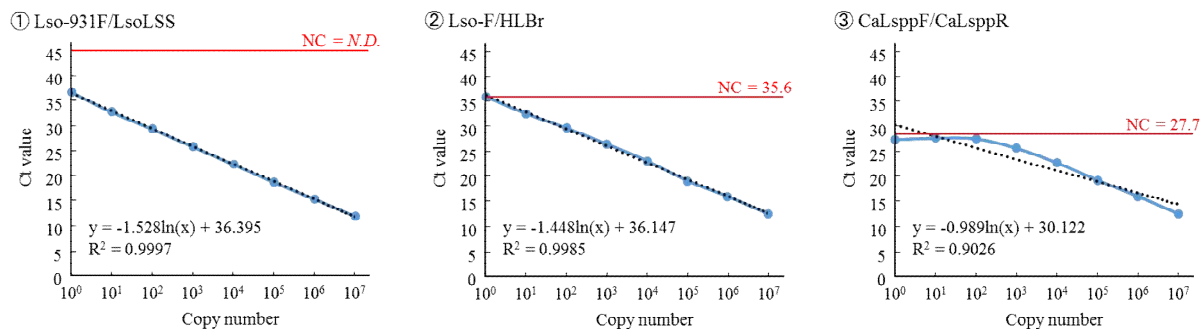


図2 新規プライマーセットによる Lso の検出感度 (リアルタイム PCR)

Lso-931F/LsoLSS プライマーセット(①)を使ってリアルタイム PCR(SYBR green 法)を行うと、ニンジン種子由来 DNA に極めて少量の Lso DNA が混入した場合でも、対照区(②, ③)と比べて Lso DNA のみを明確に検出することができる。鋳型には既知コピー数に調製した希釈系列の Lso DNA を定量のニンジン種子由来 DNA に混合したものを用いた。NC: ネガティブコントロール(ニンジン種子由来 DNA のみ)。N. D.: 検出なし。

(藤原和樹、藤川貴史)

[その他]

研究担当者: 藤原和樹、藤川貴史

発表論文等:

- 1) Fujiwara K. and Fujikawa T. (2016) J. Plant Pathol. 98(3): 63-68
- 2) 藤川貴史「核酸、プライマーセットおよびこれを用いたカンジダタス・リベリバクター・ソラナセアルムの検出方法」特願 2015-159251(2015年8月11日)