

[成果情報名]カーネーションの萎凋細菌病検出法における BIO-PCR 法の有効性と検定使用部位

[要約]PCR 法と前培養法を組み合わせた BIO-PCR 法は、選択培地による従来法と比較して特異性および検出感度が高い方法であり、萎凋細菌病菌の感染有無の確認に有効である。萎凋細菌病検定の使用部位は、最下位葉を用いるのが実用的である。

[キーワード]カーネーション、萎凋細菌病、BIO-PCR 法、選択培地

[担当]長崎県農林技術開発センター・農産園芸研究部門・花き・生物工学研究室

[代表連絡先]電話 0957-26-3330

[分類]研究成果情報

[背景・ねらい]

長崎県をはじめとする西南暖地でのカーネーション栽培において、*Burkholderia caryophylli* による萎凋細菌病の発生が大きな問題となっている。本病の発生抑制には病原菌を栽培圃場に持ち込まないことが最も重要であるため、親苗の感染の有無を判断するための精度の高い検定法の開発が望まれている。これまで、選択培地や PCR による検出法が報告されているが、*B. caryophylli* 以外の菌も検出する場合があるため、より精度の高い検出法が求められている。そこで、本研究では、病原菌の感染植物内での動態調査を行い、検定使用部位の検討を行う。加えて、BIO-PCR 法を用いた新たな検定法と従来の選択培地を用いた方法（以下：選択培地法とする）との精度の比較を行い、本法の有効性を確認する。

[成果の内容・特徴]

1. プライマーセットは、リボソーム RNA 遺伝子の ITS 領域を標的にして、*B. caryophylli* と近縁の *Acidovorax*、*Burkholderia* および *Pseudomonas* 属細菌の塩基配列情報（DDBJ データベース参照）と比較して設計を行っている。設計したプライマーを用いて、*B. caryophylli* とその近縁種の DNA を供試し PCR した結果、*B. caryophylli* のみバンドが検出され、高い特異性が確認される（図 1）。
2. 萎凋細菌病感染株について、菌接種 7 日目から茎部と葉部において病原菌が検出される。茎部の下位節および最下位葉においては、接種 7 日目から 28 日目まで継続して病原菌が検出される（図 2）。
3. 選択培地法では菌接種 20 日目以降に初めて病原菌が分離され、検出株数は供試 5 株中 1~4 株である。BIO-PCR 法では菌接種 5 日目から病原菌が検出され、菌接種 30 日目以降には枯死株を除いたすべての接種株において、病原菌が検出される（表 1）。

[成果の活用面・留意点]

1. 供試品種には萎凋細菌病罹病性品種「フランセスコ」を用いた。
2. 選択培地には Kawanishi et al. (2009) の培地を用い、BIO-PCR 法の前培養には同培地から寒天を除いた液体選択培地を用いた。
3. 植物体への病原菌接種は浸根接種法を用いた。
4. 茎部のほうが高密度で病原菌が検出されるが、BIO-PCR 法では実用面から、親苗の萎凋細菌検定には最下位葉の使用が推奨される。

[具体的データ]

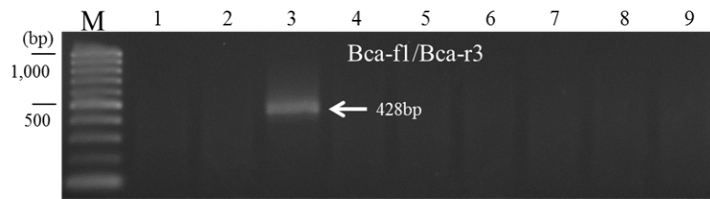


図1 新たに開発したプライマーを用いたPCR結果

M:100bp DNA Ladder, 1: *Acidovorax avenae* MAFF 301141, 2: *Burkholderia andropogonis* MAFF 301005, 3: *B. caryophylli* MAFF 301060, 4: *B. gladioli* pv. *gladioli* MAFF 302385, 5: *B. glumae* MAFF 301169<sup>T</sup>, 6: *B. plantarii* MAFF 301723<sup>T</sup>, 7: *Burkholderia* sp. Bsp1, 8: *Ralstonia solanacearum* MAFF 211266, 9: water control.

注) プライマー配列は以下の通りである。

Bca-f1: 5'-GCTTTAGCACTTACGAGCAT-3', Bca-r3: 5'-GGCATCTTTTCGATTCCTTT-3'

個体番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	個体番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12								
上位													上位																				
6						○				○			6						△				△										
5	×	×	○	×	○	○	×	×	○	○	○	○	5						△				△										
4	×	×	○	×	○	○	×	△	○	○	○	○	4	×	×	×	×	△	△	×	□	△	△	△	×								
3	×	×	○	×	○	○	×	△	○	○	○	○	3	×	△	×	×	×	△	△	□	△	○	○	×								
2	×	○	○	×	○	○	△	○	○	○	○	○	2	□	△	×	△	△	□	×	△	△	△	△	×								
下位	○	○	○	×	○	○	△	○	○	△	○	○	下位	□	(-)	△	△	□	○	×	○	○	(-)	○	△								
	7日				14日				21日				28日					7日				14日				21日				28日			

(a) 茎部

(b) 葉部

図2 病原菌感染植物内における病原菌の動態

○: >10<sup>8</sup>CFU/g生重量、△: 10<sup>3</sup>~10<sup>6</sup>CFU/g生重量、□: <10<sup>3</sup>CFU/g生重量、  
×: 検出不可、(-): 落葉

※萎凋細菌病菌を浸根接種させた植物体をポットに定植し、7日ごとに茎部と葉部、それぞれ節ごとの病原菌密度を測定した。病原菌の検出には選択培地法を用いた。

表1 選択培地法とBIO-PCR法における萎凋細菌検出精度の比較

	萎凋細菌接種後日数						
	5	10	15	20	25	30	35
選択培地 (従来法)	0/5 <sup>2</sup>	0/5	0/5	1/5	4/5	1/5	1/5
BIO-PCR法	3/5	3/5	2/5	2/5	3/5	5/5	5/5

2) 検出株数/試験株数

注) 各試験区35株 (日数あたり5株ずつ) 供試した。

※選択培地法およびBIO-PCR法の具体的手順については次のとおりである。

選択培地法: 植物サンプル (最下位葉) を70%エタノールに浸漬し表面殺菌後、乳鉢で滅菌水を加えてすり潰した。すり潰した懸濁液を3段階希釈して各濃度3枚ずつ選択培地に塗布し28℃、5日間培養した。

BIO-PCR法: 植物サンプル (最下位葉) を70%エタノールに30秒間浸漬し表面殺菌後、萎凋細菌病菌の液体選択培地に浸漬し、28℃・暗所で5日間振とう培養した。培養液を鋳型にPCRを行った。

PCR反応組成液は、培養液1μl、0.1μMの両プライマー、2.5U/μl KAPA3G Plant DNA Polymeraseを0.08μl、規定量のPCRバッファーによる全量10μlとした。PCR反応条件は、95℃で10分間反応させ、95℃・20秒、58℃・15秒、72℃・30秒を1サイクルとして40サイクル繰り返した後、72℃で2分間伸長反応を行った。

(長崎県農林技術開発センター)

[その他]

予算区分: 県単

研究期間: 2017~2019年度

研究担当者: 渡川友里恵、波部一平、植松紘一、堀田光生 (農研機構)

発表論文等: 1) Habe I. et al. (2021) J. Gen. Plant Pathol. doi: 10.1007/s10327-021-00983-1

2) 渡川ら (2019) 園芸学会九州支部研究収録、27:52