

[研究成果名]スライド凝集反応によるアブラナ科野菜黒斑細菌病の迅速診断技術

[要約]アブラナ科野菜黒斑細菌病菌に特異的な抗血清を作製し、これを利用したスライド凝集反応法により、アブラナ科野菜の黒斑細菌病を迅速かつ簡易に診断できる。

[キーワード]アブラナ科野菜、黒斑細菌病、*Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis*、診断

[担当]長野県野菜花き試験場・環境部

[代表連絡先]電話 0263-52-1148

[背景・ねらい]

近年、長野県内の主要産地でアブラナ科野菜黒斑細菌病が発生し、年々その被害が拡大傾向にある。本病は本圃での発生だけでなく、育苗中の苗でも発生が確認されており、罹病した苗を本圃に定植すると、降雨により周辺の健全株に二次伝染する。苗の初期病斑は他の病害または生理障害と識別が難しいため、生産現場からは本病の簡易かつ迅速な診断技術の開発が望まれている。そこで、黒斑細菌病菌に特異的な抗血清を利用し、現地で適用可能な診断技術を開発する。

[成果の内容・特徴]

1. アブラナ科野菜黒斑細菌病菌 (*P. syringae* pv. *alisalensis* KB211 株) に対して特異的な抗血清を、白色ラテックス粒子に感作させて作製したスライド凝集反応試薬を利用した診断方法は以下の通りである (図1)。
 - ア 検査したい病斑部分の葉 (1 cm² 程度) を採取し、水道水 (1 ~ 2 ml) とともにフィンガーマッシャーに入れて、すりつぶした後、磨砕液を二つ穴ホールスライドガラスに 1 滴 (10 ~ 20 μl) 滴下する。
 - イ 滴下した磨砕液に、注射器でスライド凝集反応試薬を 1 滴 (10 ~ 20 μl) 滴下する。続いて、つまようじなどを使用し、2 ~ 3 分ゆっくり混和する。
 - ウ 凝集の有無を確認し、凝集が認められた場合には黒斑細菌病と判定する。
2. 作製したスライド凝集反応試薬は、アブラナ科野菜では *P. syringae* pv. *alisalensis* と *P. syringae* pv. *maculicola* が検出できる。本試薬は、長野県内の露地野菜類で問題となる他の細菌性病害には反応しない (表1)。また本試薬は 10⁷CFU/ml 以上の病原菌数で凝集が認められる。
3. 現地で自然発生した発病株をスライド凝集反応法で検定すると、通常の組織内分離による結果と完全に一致することから、実用性は高い (表2)。

[成果の活用面・留意点]

1. 本病の病斑には、概ね葉 1 g あたり 10⁸CFU 以上の菌数が存在しているため、病徴を示す試料は診断できるが、無病徴の試料では判定に適さない。
2. 診断マニュアルに使用している器具類は、フィンガーマッシャー (約 200 円/個)、二つ穴ホールスライドガラス (約 5 円/枚)、注射器 (テルモシリンジ; 約 10 円/本) である。なお、フィンガーマッシャーの代替品として乳鉢やビニール袋、注射器の代用品としてピペットマンも利用できる。
3. スライド凝集反応試薬は、長野県野菜花き試験場で作製したものであり、市販されていない。

[具体的データ]

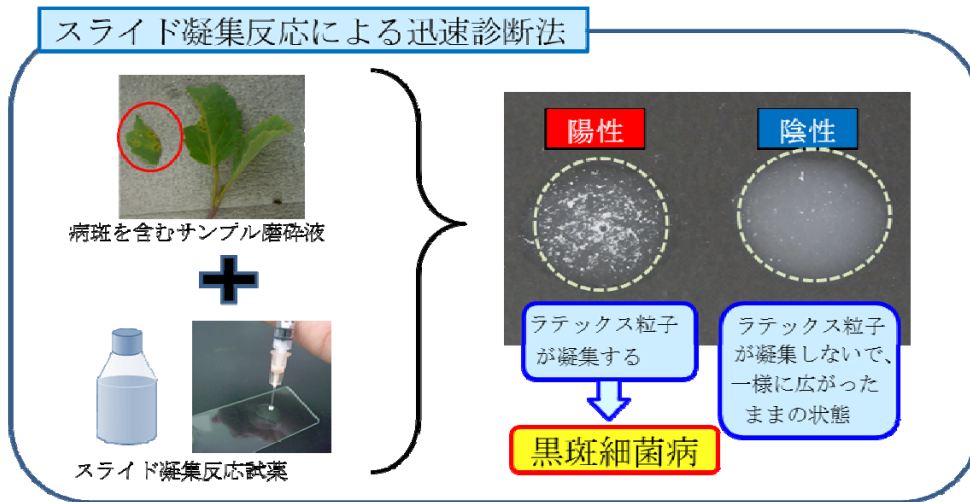


図1 アブラナ科野菜黒斑細菌病の診断方法

表1 スライド凝集反応法による植物病原細菌の検出

病名	菌名	供試菌株	凝集反応 ^{a)}
アブラナ科野菜類の黒斑細菌病	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>alisalensis</i>	県内のアブラナ科野菜または緑肥用エンバクから分離された100菌株	+
アブラナ科野菜類の黒斑細菌病	<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	MAFF302539	+
キャベツ黒腐病	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	CAX303	-
野菜類軟腐病	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	ECL113	-
レタス腐敗病	<i>P. cichorii</i>	PCL2001, PCL701	-
レタス腐敗病	<i>P. marginalis</i>	MAFF301378	-
レタス腐敗病	<i>P. viridiflava</i>	MAFF301347	-
レタス斑点細菌病	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vitians</i>	XV9971	-

a) + : 凝集反応が認められた。 - : 凝集反応が認められなかった。

表2 スライド凝集反応法と組織内分離の検査結果

品目	病斑形成部位	検体数	スライド凝集反応		組織内分離	
			陽性	陰性	陽性	陰性
キャベツ	子葉, 本葉	10	4	6	4	6
	外葉, 結球葉	4	2	2	2	2
ハクサイ	子葉, 本葉	10	0	10	0	10
	外葉, 結球葉	6	4	2	4	2
ブロッコリー	子葉, 本葉	30	16	14	16	14

スライド凝集反応：病斑部位を含むように本葉または子葉を1 cm² 切り取り、滅菌水1 ml とともに磨砕し、10 μl の磨砕液と10 μl のスライド凝集反応試薬をスライド上で混和し、凝集の有無を確認した。
 組織内分離：常法にしたがい、罹病組織を70%エタノールで2回洗後、滅菌水で2回洗浄し、滅菌水2滴とともにメスで破碎し、YP培地に塗布し、5日後にアブラナ科野菜類の黒斑細菌病菌のコロニーを確認した。

[その他]

研究課題名：黒斑細菌病に打ち勝つアブラナ科野菜の栽培体系構築

予算区分： 県単

研究期間：2012~2013

研究担当者：石山佳幸、小木曾秀紀、山岸菜穂、藤永真史、吉沢栄治