

BIO-PCRによるタバコ立枯病菌の検出法

根本和俊・中保一浩*

(福島県農業総合センター・*中央農業総合研究センター)

The Method of Detecting Low-level *Ralstonia solanacearum* in Soil by BIO-PCR

Kazutoshi NEMOTO and Kazuhiro NAKAHO*

(Fukushima Agricultural Technology Centre, *National Agricultural Research Center)

1 はじめに

植物病原細菌 *Ralstonia solanacearum* による立枯病 (ナス科植物青枯病) は、土壌伝染性で病勢の進展が早く葉たばこ栽培に大きな減収をもたらす重要病害である。

立枯病の効果的な防除を行うためには、土壌中の病原細菌密度を把握することが重要であるが、選択培地を用いた立枯病菌の検出・定量では 10^3 cfu/g 乾土未満の汚染土壌から立枯病菌を安定的に検出することは困難である。

そこで液体選択培地で土壌中の立枯病菌を増殖させた後、特異的プライマーを用いて行う BIO-PCR 法¹⁾ を利用して本菌を高感度に検出する方法を検討した。

2 試験方法

(1) 立枯病菌に特異的なプライマーの作製

Ralstonia solanacearum のタイプⅢ分泌系のエフェクター遺伝子と推定される *hrp* レギュロン遺伝子 *hpx2*²⁾ の配列を基に立枯病菌に特異的プライマーの設計を行った。

(2) BIO-PCR による立枯病菌の検出方法

土壌中からの PCR 試料の調製は、土壌 10g に対して SMSA 液体選択培地 100ml を加え、一定時間培養し、その懸濁液 90μl に 10μl の 0.5N NaOH を加え 5 分間煮沸したものを PCR 試料とした (図 1)。

(3) PCR

PCR は TaKaRa LA Taq と GC Buffer I を用いて図 2 に示す反応条件に従って Perkin Elmer 社 Thermal cycler 9600 で実施した。

(4) 土壌中の立枯病菌の検出

立枯病菌 (T01-02) を 2.3×10^1 cfu/g 乾土に調製した汚染土壌 (褐色森林土) を用いて BIO-PCR による検出を行った。次に、選択培地を用いた希釈平板法で立枯病菌が検出されなかった低汚染土壌について、同様に立枯病菌の検出を試みた。

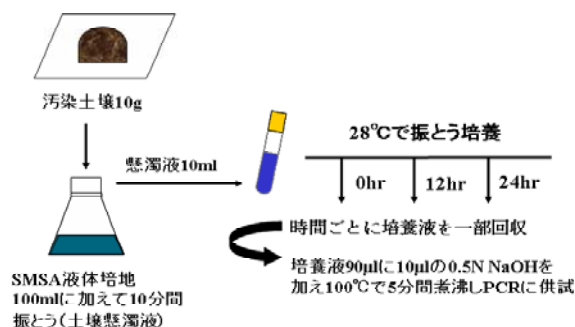


図1 BIO-PCR による土壌中からの立枯病菌の検出法

【反応液組成】

Template DNA(25ng/ul)	1
Primer 1	0.5
Primer 2	0.5
dNTP mix (2mM each)	4
2 × GC Buffer I	12.5
LA Taq (5 units/ul)	0.1
H ₂ O	6.4
Total	25 ul

【温度条件】

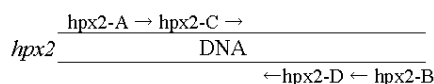
94°C 1min	94°C 30sec	30cycle 68°C 30sec	72°C 2min	72°C 5min	4°C ∞
--------------	---------------	--------------------------	--------------	--------------	----------

図2 PCRの反応液組成と反応条件

3 試験結果及び考察

(1) 立枯病菌に特異的なプライマー

立枯病菌のエフェクター遺伝子を基にプライマーセット hpx2-A, hpx2-B と hpx2-C, hpx2-D を作製した (図 3)。このプライマーセットを用いた PCR で得られた産物 5μl を 2%アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイド染色を行ったところ、DNA の増幅が確認された。立枯病菌 (レース 1、生理型 3、4) では、それぞれ 988bp と 145bp の PCR 産物が得られた (図 3)。



【プライマー配列】

hpx2-A : CATTTGATACGCACACCGGGG (21mer)
hpx2-B : CCGCCCCCTTTCATTGTGGTAG (21mer)
hpx2-C : CTTGGGGCGCAGAGAAGGT (19mer)
hpx2-D : TCATTCTCCGCCTCCCGAACC (21mer)

nested PCR	Product Size
First : hpx2-A + hpx2-B	988bp
Second : hpx2-C + hpx2-D	145bp

図3 立枯病菌に特異的な hpx2 プライマー

(3) hpx2 プライマーの検出感度と特異性

検出感度については 3.7×10^7 cfu/ml に調製した立枯病菌液 (T01-02) を段階希釈し、PCR 試料として各プライマーセットを用いて PCR を行った。その結果、hpx2-A と hpx2-B を用いた PCR では、 10^3 cfu/ml のレベルで PCR 産物が確認できた。また、hpx2-C と hpx2-D を用いた nested PCR では 10^0 cfu/ml の低濃度でも検出可能であった (図 4)。立枯病菌以外の植物病原細菌や土壌から分離された細菌についても同様に PCR 試料として調製し、hpx2-A と hpx2-B を用いた PCR を行った。

hpx2-A と hpx2-B を用いた PCR では、植物病原細菌を含む *Pseudomonas* 属、*Burkholderia* 属、*Acidovorax* 属および *Herbaspirillum* 属細菌 18 菌株および SMSA 培地で出現する土壌細菌 8 株でも PCR 産物が認められなかったことから、立枯病菌の検出用プライマーとして特異性が高いと考えられた (表 1)。

(4) 土壌中からの立枯病菌の検出

2.3×10^1 cfu/g 乾土に調製した汚染土壌から BIO-PCR によって得られた試料について hpx2-A と hpx2-B を用いた PCR では 24 時間の培養では、DNA の増幅が確認できなかった。しかし、hpx2-C と hpx2-D のプライマーを用いた nested PCR では、12 時間培養の試料から立枯病菌由来と推定される PCR 産物が確認された (図 5)。

次に、選択培地を用いた希釈平板法では立枯病菌が検出されなかったタバコ栽培土壌について、同様に病原細菌の検出を試みた。その結果、hpx2-C と hpx2-D を用いた nested PCR により、選択培地では検出できない低レベルの汚染土壌から立枯病菌の存在を確認することができた (表 2)。

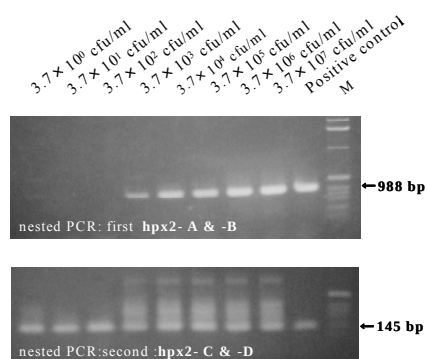


図4 nestedPCRでの立枯病菌の検出感度

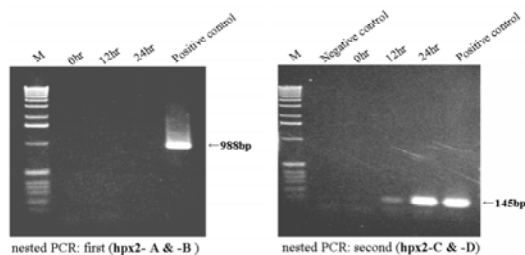


図5 BIO-PCR による土壌中からの立枯病菌の検出

表 1 植物、土壌から分離された細菌に対する hpx2-A と hpx2-B を用いた PCR

No.	細菌名	分離源	PCR産物
1	<i>Burkholderia andropogonis</i>	チューリップ	-
2	<i>Burkholderia gladioli</i>	シンビジューム	-
3	<i>Pseudomonas marginalis</i> (pv. <i>marginalis</i>)	レタス	-
4	<i>Pseudomonas marginalis</i>	シンビジューム	-
5	<i>Pseudomonas sp</i>	サトウキビ	-
6	<i>Pseudomonas sp</i>	イチゴ	-
7	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	トマト	-
8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	コムギ	-
9	<i>Pseudomonas syringae</i> (pv. <i>syringae</i>)	モモ	-
10	<i>Pseudomonas cicholii</i>	レタス	-
11	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	フクジュソウ	-
12	<i>Pseudomonas corrugata</i>	トマト	-
13	<i>Pseudomonas meliae</i>	ゼンダン	-
14	<i>Acidovorax konjaci</i>	コンニャク	-
15	<i>Pseudomonas putida</i>	土壌	-
16	<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	サトウキビ	-
17	<i>Burkholderia caryophylli</i>	カーネーション	-
18	<i>Acidovorax avenae</i>	イネ	-
19	<i>R. solanacearum</i> (MAFF 301067)	ナス	+
20	<i>R. solanacearum</i> (T01-02)	タバコ	+
21	<i>R. solanacearum</i> (8107)	トマト	+

+ : 検出あり、- : 検出されず

表 2 低汚染土壌からの立枯病菌の検出

土壌 (種類)	希釈平板法	立枯病菌密度 (cfu/g乾土)	BIO-PCR
A (黒ボク土)	+	1.7×10^3	
B (黒ボク土)	-		+
C (黒ボク土)	-		-
D (褐色森林土)	+	9.4×10^4	
E (褐色森林土)	+	1.2×10^5	

注 +は立枯病菌が検出されたことを-は検出されなかったことを示す。

4 まとめ

今回、選択培地による増菌法とPCRを組み合わせたBIO-PCRにより、従来の検出限界以下の 10^1 cfu/g乾土レベルで土壌中から立枯病菌の検出が可能となった。

立枯病菌は低密度でも発病する可能性が高いことから、高感度での検出が可能となったことは、ほ場ごとの菌密度の把握が可能となり適切な防除に生かせると考えられる。

引用文献

- 1) Schaad, N.W.; Cheong, S.S.; Tamaki, S.; Hatziloukas, E.; and Panopoulos, N.J. 1995 A Combined Biological and Enzymatic Amplification (BIO-PCR) Technique to Detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in Bean Seed Extracts, *Phytopathology* 85:243-248.
- 2) Mukaiharu, T. ; Tamura, N. ; Murata Y. ;Iwabuchi, M. 2004. Genetic screening of Hrp type III -related pathogenicity genes controlled by the HrpB transcriptional activator in *Ralstonia solanacearum*, *Mol. Microbiology* 54: 863-875