

BIO-PCRによるタバコ立枯病菌の検出法

福島県農業総合センター ね 本 和 俊

はじめに

植物病原細菌 *Ralstonia solanacearum* によるタバコ立枯病 (=ナス科植物青枯病) は、土壌伝染性の難防除病害である。本病は、病勢の進展が早く、株が枯死するなど、葉タバコ栽培において大きな減収をもたらすことから、被害の拡大が問題となっている。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。立枯病菌 (青枯病菌) の土壌中からの検出法としては、間接 ELISA などの血清学的手法や生物検定などが知られているが、一般には原・小野選択培地 (原・小野, 1984) や SMSA 選択培地 (ELPHINSTONE et al., 1996) を用いた希釈平板法が広く適用されている。選択培地の検出感度は 10^2 cfu/g 乾土レベルで (細菌や糸状菌などの生育が多い場合は 10^3 cfu/g 乾土レベル)、これ以下のレベルの汚染土壌から立枯病菌を検出することは困難である。そこで、SMSA 液体選択培地で土壌中の立枯病菌を増菌後、立枯病菌に特異的なプライマーを用いて行う BIO-PCR 法 (SCHAAD et al., 1995; PRADHANANG et al., 2000) を利用することで、 10^1 cfu/g 乾土レベルの汚染土壌から本菌の検出を試みた。本稿では、この高感度検出手法について、その概要を紹介する。

I 新たな PCR プライマーの設計

BIO-PCR に使用するプライマーの条件としては、立枯病菌の DNA 断片だけを特異的に増幅し、他の植物病原細菌や土壌細菌などの PCR 産物が確認されないことが重要である。このため、初めに立枯病の検出に既存のプライマー利用の可能性を検討した。青枯病菌の 16S rDNA を基にした OLI-1 と Y2 (SEAL et al., 1993)、膜タンパク遺伝子を基にした 759 と 760 (OPINA et al., 1997; ITO et al., 1998) について、常法に従って PCR を実施した。その結果、これらの既存プライマーでは立枯病菌以外にも *Pseudomonas* 属菌や *Burkholderia* 属菌、選択培地に出現する土壌細菌などに疑似の DNA 産物が確認されるなど特異性が低く、BIO-PCR へ使用不可能であった。

そこで、新たに *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* (MUKAIHARA et al., 2004) の配列を基にした 2 組の特異的プライマーセット *hpx2-A*, *hpx2-B* と *hpx2-C*, *hpx2-D* を作製して検討をした (図-1)。*hpx2* の配列は GC 含量が高いことから、PCR は TaKaRa LA Taq と GC Buffer I を用いて図-2 に示す反応条件で実施した。得られた PCR 産物 $5\mu\text{l}$ 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、増幅された DNA を確認した。立枯病菌 (レース 1, 生理型 3, 4) では、それぞれ 988 bp と 145 bp の PCR 産物を確認した。

さらに、各プライマーセットの検出感度について検討した。 3.7×10^7 cfu/ml に調製した立枯病菌液を段階希釈し、PCR 試料として *hpx2-A* と *hpx2-B* を用いた PCR を行い、 10^3 cfu/ml のレベルでの検出を確認した。また、*hpx2-C* と *hpx2-D* を用いた nested PCR では

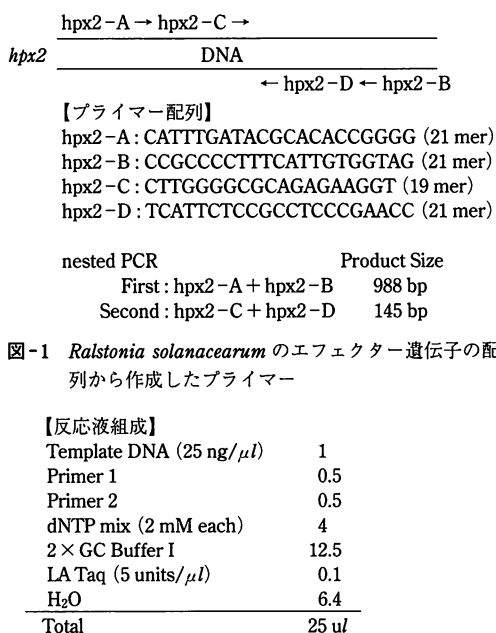


図-1 *Ralstonia solanacearum* のエフェクター遺伝子の配列から作成したプライマー

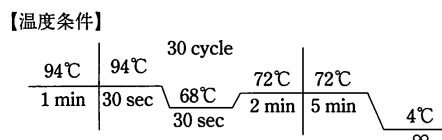


図-2 PCR の反応液組成と反応条件

Quantitative Detection of Low Level of *Ralstonia solanacearum* in Soil Using BIO-PCR. By Kazutoshi NEMOTO

(キーワード: BIO-PCR, タバコ, 立枯病, 青枯病)

10⁰ cfu/mlの低濃度でも検出可能であった(図-3)。

*hpx2*のプライマーセットは、植物病原細菌を含む *Pseudomonas* 属, *Burkholderia* 属, *Acidovorax* 属および

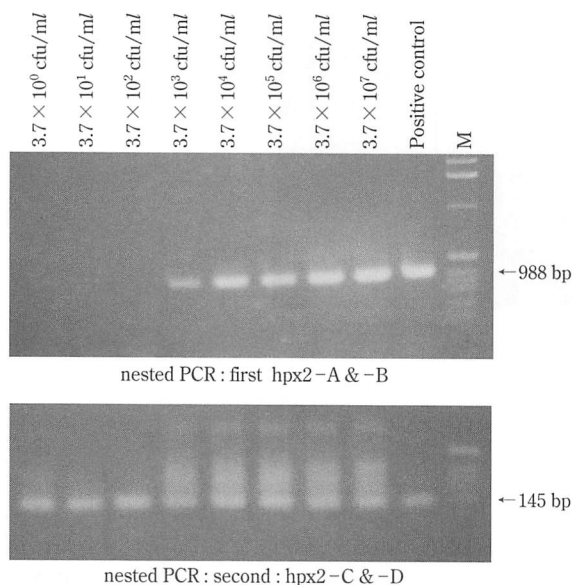


図-3 nested PCRでの立枯病菌の検出

立枯病菌液を段階希釈(3.7 × 10⁷ ~ 3.7 cfu/mlに調整)後, 希釈液 90 μl に 0.5N NaOH を 10 μl 加え 100℃で5分間煮沸し PCR 試料とした。

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, 立枯病菌の検出プライマーとして特異性が高いと考えられた(表-1)。

II BIO-PCRによる土壌中からの立枯病菌の検出

土壌中からの PCR 試料の調製は, 土壌 10 g に対して SMSA 液体選択培地 100 ml を加え, 一定時間培養し, その懸濁液 90 μl に 10 μl の 0.5N NaOH を加え 5 分間煮沸したものを PCR 試料として用いた(図-4)。

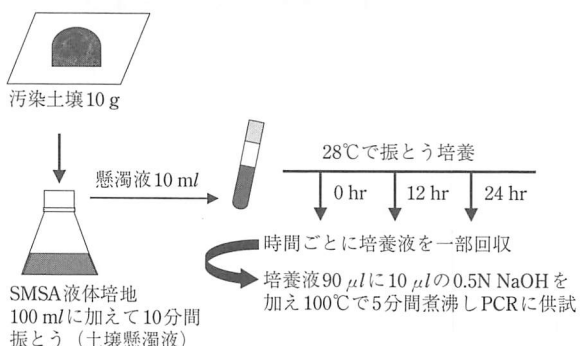


図-4 土壌中からの PCR 試料の調製法

表-1 植物, 土壌から分離された細菌(植物病原細菌を含む)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>	シンビジウム	-
3	<i>Pseudomonas marginalis</i> (pv. <i>marginalis</i>)	レタス	-
4	<i>Pseudomonas marginalis</i>	シンビジウム	-
5	<i>Pseudomonas</i> sp.	サトウキビ	-
6	<i>Pseudomonas</i> sp.	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>	センダン	-
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.

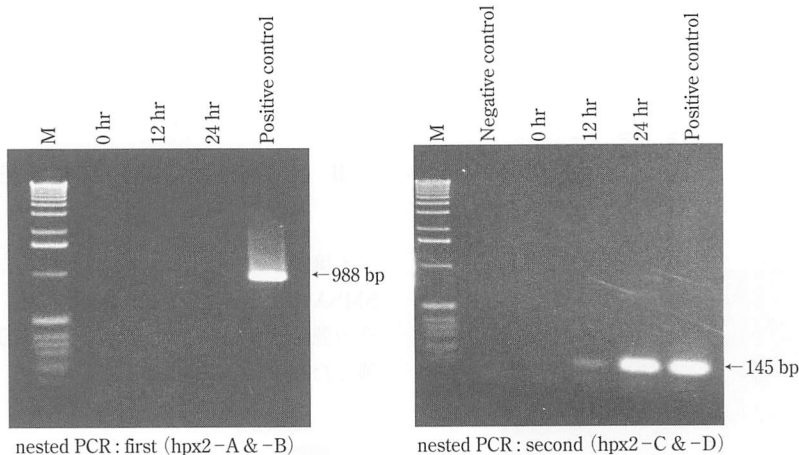


図-5 培養時間と nested PCR による立枯病菌の検出

2.3×10^1 cfu/g 乾土の汚染土壌を培養後、0, 12, 24 時間ごとの培養液 $90 \mu\text{l}$ に 0.5N NaOH を $10 \mu\text{l}$ 加え 100°C で 5 分間煮沸し PCR 試料とした。

表-2 BIO-PCR による土壌中の立枯病菌の検出

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	

+ 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。

立枯病菌を 2.3×10^1 cfu/g 乾土に調製した汚染土壌 (褐色森林土) に SMSA 液体培地を加え培養し、PCR 試料とした。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)。そこで、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 プライマーセットを用いた 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)。

おわりに

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。

BIO-PCR による土壌中の立枯病菌の検出において、土壌による DNA の吸着や腐植酸などによる酵素反応の阻害が問題となる場合がある。星野ら (2002) は DNA の抽出効率や PCR 反応効率を向上させるため、スキムミルクや RNA の抽出バッファーへ添加が有効であると報告している。また、土壌から DNA を抽出する (土壌由来の腐植酸を除去する) キットなども各種市販されている。これらの手法やキットを利用することで、PCR の反応効率の向上が期待できる。

立枯病菌は低密度でも発病する可能性が高いことから、タバコ栽培圃場の立枯病菌を高感度で検出することは適切な防除指導に生かせると考えられる。現在、土壤消毒剤に頼った一律の防除が広く行われていることから、今後は菌密度に応じた防除法の開発に結びつけることが重要となる。

最後に本試験を行うに当たり懇切なご指導と本稿のご校閲をいただいた中央農業総合研究センター中保一浩博士に心から感謝申し上げます。

引用文献

- 1) ELPHINSTONE, J. G. et al. (1996): *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 26: 663 ~ 678.
- 2) 原 秀紀・小野邦明 (1984): *植物防疫* 38: 76 ~ 79.
- 3) 星野 (高田) 裕子ら (2002): *土と微生物* 56: 141.
- 4) MUKAIHARA, T. et al. (2004): *Mol. Microbiology* 54: 863 ~ 875.
- 5) ITO, S. et al. (1998): *J. Phytopathol.* 146: 379 ~ 384.
- 6) OPINA, N. et al. (1997): *As. Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 5: 19 ~ 33.
- 7) PRADHANANG et al. (2000): *Plant Pathology* 49: 414 ~ 422.
- 8) SCHAAD et al. (1995): *Phytopathology* 85: 243 ~ 248.
- 9) SEAL et al. (1993): *Journal of General Microbiology* 139: 1587 ~ 1594.

※なお、関連する特集号として本年2月号に「青枯病」が掲載されています。