

選択培地とPCRを組み合わせた 土壌中からのタバコ立枯病菌の高感度検出法

福島県たばこ試験場
平成14年度成績概要
分類コード 06-01-11230000

部門名 特用作物-タバコ-土壌微生物、病害虫防除
担当者 根本和俊・二階堂英行

I 新技術の解説

1 要旨

*Ralstonia solanacearum*により生じる立枯病は、土壌伝染性の難防除病害であり、葉たばこ栽培に大きな減収をもたらす病害としてその被害の拡大が問題となっている。従来、土壌中からの立枯病菌の検出・定量には選択培地を用いてきたが、 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った。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たPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)を行うことにより 10^1 cfu/g乾土レベルの汚染土壌から本菌を高感度に検出する方法を確立した。

- (1) *Ralstonia solanacearum*の病原性関連性遺伝子hpx2の配列からプライマーセットhpx2-A&-B、hpx2-C&-Dを作製した。hpx2-A&-Bとhpx2-C&-Dを用いたPCRにより、立枯病菌(レース1、生理型3、4)ではそれぞれ988bpと145bpの産物が認められる(図1)。
- (2) 汚染土壌10g(10^1 cfu/g乾土レベル)を改変SMSA液体選択培地100mlに加え、10分間振とうした懸濁液10mlを試験管に移し、28℃で12~24時間浸とう培養する。培養液90 μ lに10 μ lの0.5N NaOHを加え、5分間煮沸したものをPCR試料とする(図2)。
- (3) hpx2-A&-Bとhpx2-C&-Dを用いたnested PCRでは、12時間以上の培養液で立枯病菌に特異的な145bpの産物が確認される(図3)。

2 期待される効果

既存の選択培地で検出できない低密度な土壌中の立枯病菌も液体選択培地とPCRを組み合わせることによって検出可能である。

3 適用範囲

県内葉たばこ栽培地域

4 普及上の留意点

- (1) 腐植酸等のPCR反応阻害物質を多く含む土壌ではこの方法が利用できない可能性がある。
- (2) DNA増幅装置などの設備を必要とするため、試験場での検出に制限される。

II 具体的データ等

【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 産物の大きさ
First : hpx2-A + hpx2-B 988bp
Second : hpx2-C + hpx2-D 145bp

【PCR条件】

94℃		30 cycle		72℃	
1min	30sec	68℃	30sec	2min	5min
94℃		72℃		4℃	
1min		30sec		∞	

図1 立枯病菌の病原性遺伝子hpx2の配列により設計したプライマーとPCR条件

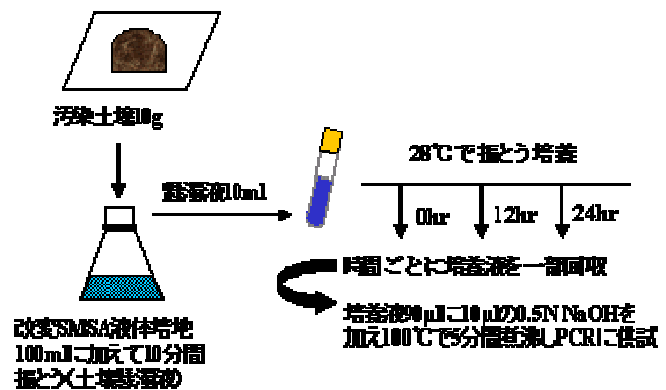


図2 汚染土壌からのPCR試料の調製法と培養時間

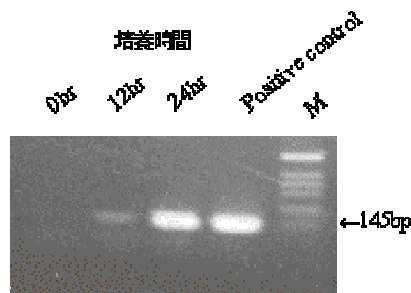


図3 培養時間とnested PCRによる立枯病菌の検出

表1 選択培地とPCRを組み合わせた土壌中の立枯病菌の検出

土壌(種類)	希釈平板法	液体選択培地+PCR	立枯病菌密度 (cfu/g乾土)
A(黒ボク土)	+		1.7×10^3
B(黒ボク土)	-	+	10^3 未満
C(黒ボク土)	-	-	10^1 未満
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。

Ⅲ その他

1 執筆者

根本和俊、菅野雅敏

2 主な参考文献・資料

- (1) 中保ら(2002) 日本植物病理学会 平成14年度関東部会講演要旨予稿集: 9.
- (2) 根本ら(2002) 日本植物病理学会 平成14年度関東部会講演要旨予稿集: 10.