

成績概要書（2008年1月作成）

課題分類：

研究課題：ばれいしょの種いも伝染性細菌病の簡易で高精度な保菌検定法

担当部署：中央農試 生産環境部 病虫科、(独)北農研 バレイショ栽培技術研究チーム

担当者名：

協力分担：(独)種苗管理センター北海道中央農場

予算区分：国費受託（高度化事業）

研究期間：2005～2007年度（平成17～19年度）

1. 目的

ばれいしょの種いも伝染性細菌病（黒あし病・青枯病・輪腐病）の簡易で高精度な保菌検定法を開発する。

2. 方法

- 1) 増菌法：生育に好適な液体培地と培養条件（培養日数・振とうの有無）
- 2) ポリクローナル抗体の作成とそれを用いた ELISA の検出精度の検討
- 3) 種特異的プライマーの設計とそれを用いた PCR の検出精度の検討
- 4) 増菌法と ELISA および PCR を用いた保菌塊茎からの病原菌の検出

3. 成果の概要

1) 本試験で用いた検定菌株は黒あし病菌3種の23菌株、青枯病菌4菌株、輪腐病菌2菌株、軟腐病菌8菌株などの計41菌株であり、そのうちジャガイモ分離株が31株、本道産分離株が19菌株を占める。

2) 黒あし病菌、青枯病菌および輪腐病菌5種の保菌種いもからの共通の増菌法として、基本培地には King'B 液体培地が好適であった。検出のための培養条件としては黒あし病菌、青枯病菌は25℃、2日間、輪腐病菌では同、6日間以上の振とう培養が必要であった。

3) 黒あし病菌3種、青枯病菌および輪腐病菌に対する種特異的なポリクローナル抗体を作成した。これらを用いた直接法 ELISA による識別を行った結果、一部の黒あし病菌間で非特異反応が見られたものの、それぞれの菌種の識別が可能であった。検出限界菌密度は黒あし病菌のうち、*E. chrysanthemi*（以下 Echr と略記）、*E. carotovora* subsp. *atroseptica*（同 Eca）および *E. c.* subsp. *carotovora* に（同 Ecc）はそれぞれ 10^4 、 10^6 および 10^4 生菌数/ml、青枯病菌と輪腐病菌は 10^4 と 10^6 生菌数/ml であった（表2）。

4) PCR による検定では、黒あし病菌 Echr については Smid et al. (1995)、Nassar et al. (1996) の方法、Eca については De Boer and Ward (1995) の方法、輪腐病菌については Lee et al. (1997) の方法が有効と考えられた。

5) 黒あし病菌 Ecc の ITS 領域の塩基配列を他の類縁病原菌と比較して、PCR 用の種特異的プライマーを設計した（表1）。これを用いて本菌種の識別を試みた結果、少ない菌株数ではあるが高い特異性が期待された（図2）。

6) 青枯病菌共通およびジャガイモに病原性を有する4系統に対して Ito et al. (1998) の方法は、本菌共通および各系統の検出特異性が高かった。

7) これら PCR による各病原菌の検出限界菌密度は輪腐病菌で 10^1 生菌数、その他の菌種で 10^2 生菌数と検出精度がいずれも高かった（表2）。

8) 増菌法と ELISA を組み合わせた検定法により種いもからの検出を試みた結果、黒あし病菌と青枯病菌は検出が可能であった。しかし、輪腐病菌では検出精度が低く、有効ではなかった（表3）。

9) 増菌法と PCR を組み合わせた検定法により種いもからの検出を試みた結果、黒あし病菌3種、青枯病菌および輪腐病菌の検出が可能であった（表3）。ただし、輪腐病菌では増菌法の改良による検出精度の向上が必要と考えられる。

10) 以上のことから、図3に示す、保菌検定マニュアルを作成した。

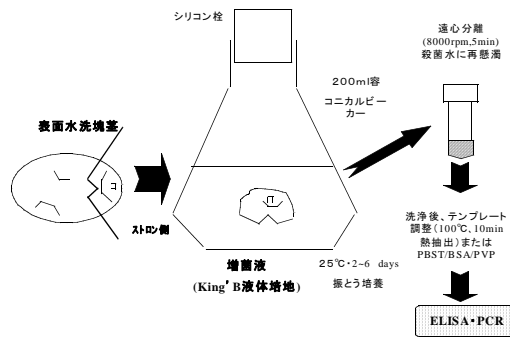


図1 増菌法とELISA・PCRを組み合わせた各病原菌の検出法

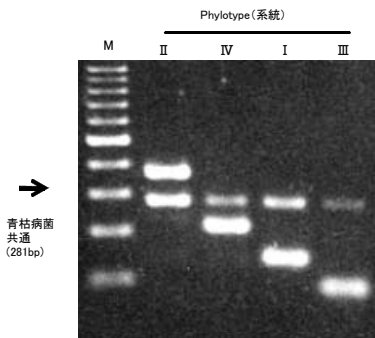


図2 マルチプレックスPCRによる青枯病菌Phylotypeの識別
M: 100bp DNA Ladder

表3 病原菌を塗布した塊茎断片からの増菌法とELISA・PCRによる検出

病原菌	接種菌数 (CFU)	増殖菌数 (CFU/ml)				ELISA反応	PCRによる増幅
		0	3.3×10^0	3.3×10^2	3.3×10^4		
Echr	接種菌数 (CFU)	0	3.3×10^0	3.3×10^2	3.3×10^4	3.3×10^6	
	増殖菌数 (CFU/ml)	0	3.0×10^{13}	8.0×10^{12}	1.0×10^{13}	1.0×10^{13}	
	ELISA反応	-	+	+	+	+	
	PCRによる増幅	-	-	+	+	+	
Eca	接種菌数 (CFU)	0	1×10^1	1×10^3	1×10^5	1×10^7	
	増殖菌数 (CFU/ml)	0	2.0×10^{10}	1.3×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}	
	ELISA反応	-	+	+	+	+	
	PCRによる増幅	-	+	+	+	+	
Ecc	接種菌数 (CFU)	0	4.6×10^1	4.6×10^2	4.6×10^3	4.6×10^6	
	増殖菌数 (CFU/ml)	0	5.0×10^{14}	1.5×10^{16}	1.2×10^{16}	1.0×10^{16}	
	ELISA反応	-	+	+	+	+	
	PCRによる増幅	-	+	+	+	+	
青枯病菌	接種菌数 (CFU)	0	6.6×10^1	6.6×10^2	6.6×10^4	6.6×10^6	
	増殖菌数 (CFU/ml)	0	1.5×10^{13}	2.6×10^{12}	2.0×10^{13}	8.0×10^{11}	
	ELISA反応	-	+	+	+	+	
	PCRによる増幅	-	+	+	+	+	
輪腐病菌	接種菌数 (CFU)	0	1.8×10^2	1.8×10^5	1.8×10^6	1.8×10^7	
	増殖菌数 (CFU/ml)	0	0	7.4×10^{10}	7.0×10^{10}	8.0×10^{10}	
	ELISA反応	-	-	-	-	+	
	PCRによる増幅	-	-	+	+	+	

表1 各病原菌検出のためのPCR用プライマー

病原菌	菌種・系統	名称	塩基配列(5'-3')	増幅サイズ
黒あし病菌	Echr a)	ERWFOR	ACGCATGAAATCGGCCATGC	600bp
		CHRREV	AGTGTGCGGTACAGCACGT	
	Echr b)	ADE1	GATCAGAAAGCCCGCAGCCAGAT	420bp
		ADE2	CTGTGGCCGATCAGGATGGTTTTGTCGTGC	
	Eca c)	Eca1f	AGTGCTGCGGTACAGCACGT	690bp
		Eca2r	GCACACTTCATCCAGCGGA	
Ecc d)	DHT1	TGTAGACTCATGCTGACGCGGA	270bp	
	DHT2	GGCTGACAAAACACGATGACC		
青枯病菌	全系統	759	GTCCCGTCAACTCACTTTCC	281bp
		e) 760	GTCCCGTCAGCAATGCGGAATCG	
	系統 I	1F	CGTTGATGAGCGCGCAATTT	144bp
	系統 II	2F	AAGTTATGGACGGTGAAGTC	372bp
	系統 III	3F	ATTACCAGCAATCGAAGATT	91bp
	系統 IV	4F	ATTGCCAAGACGAGAGAAGTA	213bp
共通	reverse	TTCGGTTGACCCTATAACGAGT		
輪腐病菌 f)	-	CMSIF1	TGTAAGTGGCCATGACGTTGG	1kbp
		CMSIR1	TACTGGTCAATGACGTTGGT	

a): Nassar et al.(1996), b) Smid et al.(1995), c): De Boar and Ward (1995), d): 堀田・田中(2007), e) Ito et al.(1998), f) Lee et al.(1997)

表2 ELISAとPCRによる検出限界菌密度

菌種	検出限界菌密度(CFU)	
	ELISA	PCR
Echr a)	10000	100
Eca	$1E+06$	100
Ecc	10000	100
青枯病菌	10000	100
輪腐病菌	$1E+06$	10

a) Smid et al.(1995)による。

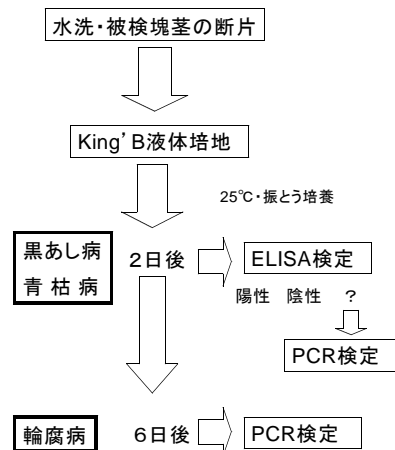


図3 保菌検定マニュアル

4. 成果の活用面と留意点

- 1) 本成果は種いも生産の場面における種いも伝染性細菌病の保菌検定法として活用する。
- 2) 本試験で作製したポリクローナル抗体は配布が可能である。

5. 残された問題点とその対応

- 1) 輪腐病菌の選択的培養法
- 2) マルチプレックス PCR の可能性
- 3) 外国産菌株での特異性と検出精度