

[成果情報名] *hrpZ* 遺伝子を利用したコムギ植物体からの黒節病菌検出

[要約] *hrpZ* 遺伝子の特定領域を増幅させる PCR によってムギ類黒節病菌を高精度に検出できる。この方法で、病徴が極めて小さいコムギ植物体からであっても本菌を検出できる。

[キーワード] コムギ、植物体、黒節病菌、*hrpZ* 遺伝子、検出

[担当] 三重農研・経営植物工学研究課、循環機能開発研究課、作物研究課

[代表連絡先] 電話 0598-42-6354

[区分] 関東東海北陸農業・関東東海・病害虫（病害）

[分類] 研究・参考

[背景・ねらい]

ムギ類黒節病の発生には、汚染種子による伝染が主因とされているが、汚染種子の元となった植物体における黒節病汚染程度との関係は明らかにされていない。また、コムギの植物体における黒節病の病徴には様々なものがあり、外観だけで本病か否かを診断することは容易でない。そこで、コムギ植物体から、PCR 法によって黒節病菌を検出する方法を開発する。

[成果の内容・特徴]

1. コムギの黒変病徴組織から分離した細菌について、その溶菌液を鋳型に、*hrpZIII* プライマー Forward: 5'-agctggccgaggaactgatg-3'、Reverse: 5'-aactggtcaagatcctgagc-3' (Inoue and Takikawa 2005) を用いて PCR 反応を行うと、特異的な増幅産物 (753bp) を示す菌株が得られる (図 1)。この PCR での検定結果は、幼苗鞘葉接種による病原性検定 (鈴木ら 2009) の結果 (誤判定 2 株を除く) と一致する (表 1)。すなわち、黒節病菌を高精度に検出できる。
2. コムギの黒変病徴組織から細菌を単離せず、直接、病徴組織から市販キットにより DNA を抽出し、*hrpZIII* プライマーを用いた PCR によって黒節病菌を検出できる。この場合、細菌の単離ができない程度の小さい病徴からでも検出が可能である (図 2)。

[成果の活用面・留意点]

1. 本法により植物体における黒節病菌感染を精度よく調査でき、選択培地による種子の汚染率調査 (2009 研究成果情報) と合わせて両者の関係解明に役立てることができ。
2. ムギ類黒節病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *japonica* と遺伝的に極めて近い菌 (*P. syringae* pv. *aptata*, pv. *pisi*, pv. *lapsa*, pv. *aceris*) では、*hrpZIII* プライマーによる PCR で陽性となる。

[具体的データ]

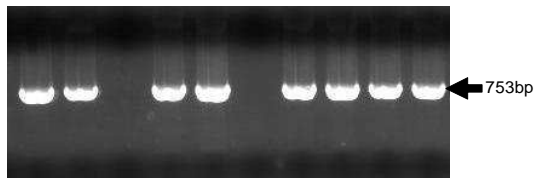


図1 PCRによる *hrpZ* 遺伝子の特異的領域の増幅
hrpZ III (Inoue and Takikawa, 2005) を黒節病菌検出用プライマーとし、供試細菌の 0.1% Triton X-100 溶菌液を鋳型に PCR で増幅した。反応条件は、95°C・2m-[95°C・15s-60°C・15s-72°C・30s] × 30 サイクル-72°C・10m。その PCR 産物を 1.5% アガロースゲルに電気泳動した。特異的な増幅産物 (753bp) が現れる細菌を陽性とした。

表1 コムギの病徴組織からの分離菌における病原性検定と *hrpZ* 遺伝子検出の相関

| | 病原性検定 (鞘葉接種法) | <i>hrpZIII</i> -PCR |
|-------|------------------|---------------------|
| +(陽性) | 106 | 104 |
| -(陰性) | 51 | 53 |

2009年4~5月、黒変病徴のあるコムギ株を採取し、そこから分離した細菌 157 菌株を供試。鞘葉接種法では、2 株の *Pseudomonas viridiflava* (16S rRNA 分析による判定)を陽性と誤判定。


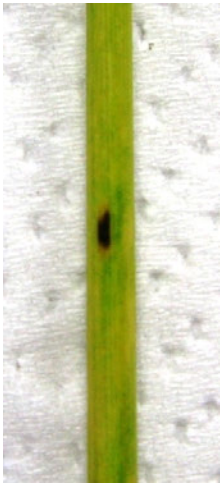

| 発生程度 | 重度(稈) | 軽度(稈) | 軽度(種子) |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 病徴例 |  |  |  |
| 目視診断 | ○ | × | × |
| 細菌の単離 | ○ | ×~△ | ×~△ |
| <i>hrpZIII</i> -PCR | ○ | ○ | ○ |

図2 発病が軽度のコムギ植物体における黒節病菌の検出

2010年5~6月圃場において、様々な黒変病徴を示すコムギ植物体 42 株を採取。その中で発病が重度の株と軽度の株(稈、種子)の病徴を例示。目視診断は、病徴の外観だけで黒節病菌と判断できるか否か。細菌の単離は、病徴の組織片を細菌培地 (NA 等) に移植しての細菌の分離(その後の PCR 等による検出)ができるか否か。*hrpZIII*-PCR は、病徴の組織片 (5mm 角) から ISOPLANT (ニッポンジーン) で抽出した DNA を鋳型に、*hrpZIII* プライマーで PCR 反応させることにより、特異的な増幅産物 (753bp) が得られるか否か。○:可能、△:やや難、×:困難

(橋爪不二夫)

[その他]

研究課題名: 小麦「あやひかり」の黒節病感染を回避する種子生産技術の開発

予算区分: 国補 (研究成果実用化推進事業)

研究期間: 2009~2010 年度

研究担当者: 橋爪不二夫、鈴木啓史、辻朋子、松本憲悟、山川智大、黒田克利