

農作物重要病害の遺伝子診断技術の確立

【研究の目的】

ウリ科野菜果実汚斑細菌病はスイカやメロン等ウリ科作物に感染する重要病害である。原因菌である *Acidovorax avenae* subsp. *citrullii*(以下 Aac)は強い病原性を持ち、感染すると幼苗から果実まで全ての段階で被害を与える。本病原菌はイネ科作物の褐条病の原因菌 (*A. avenae* subsp. *avenae* 以下 Aaa)と極めて近縁であり、農家や種苗会社からこの2つを正確に識別する方法の開発を望む声強い。そこで本研究は遺伝子診断によりこれらを効果的に識別することを目指し、以下の実験を行った。

【試料・方法】

(1) Cycleave PCR 法による Aac と Aaa の識別：研究に用いた Aac と Aaa は、ともに日本で分離された菌株を 4 株ずつ、アメリカで分離されたの菌株を 1 株ずつ入手して用いた。これらの塩基配列を調べ、昨年報告した 16S rDNA 領域における Aac と Aaa の変異箇所が保存されていることを確認した。そして、変異箇所をプローブとして Cycleave PCR 法により両菌の識別を試みた。

(2) 人工汚染種子からの検出：スイカまたはメロンの種子に人為的に菌を接種し、Cycleave PCR による検出を試みた。10⁸CFU/mL に調整した Aac と Aaa の懸濁液にスイカまたはメロンの種子を浸した後、乾燥させ、28°C でインキュベーションした。0、1、5、10 日後に種子から DNA を抽出し、Cycleave PCR 法により菌量を定量した。

【結果】

(1) Cycleave PCR による識別：16S rDNA 領域にプライマーとプローブを設計し、Cycleave PCR を行った結果、両菌に特異的な蛍光強度の増大が見られた。さらに、それぞれのプローブの蛍光色素に ROX と FAM を用いることにより、両菌を混在させた試料で同時に両菌を測定することができた。検出感度について評価したところ、菌体の DNA 濃度 100 fg/・1 まで検出できた。

(2) 人工汚染種子からの検出：Acidovorax 接種直後（0 日目）では、すべての

種子と接種菌の組み合わせにおいて菌が検出された。日数の経過とともに、菌量が減少する場合と増加する場合が見られ、作物種や品種の違い、そして接種菌株の組み合わせにより、種子感染の様相が異なることが分かった。

【まとめと課題】

設計したプライマーとプローブは、供試した Aac 株および Aaa 株について検出・判別出来ることが確認できた。さらに、人工汚染種子から Aac 株を検出することができたことにより、輸入種子に対する検査への応用が期待される。しかし、実際の果実由来の汚染種子に対応できるかはまだ不明であり、その検証が必要である。また、種子での検出感度を上げるため、培養・増菌方法についても検討する必要がある。

本研究の内容は、平成 26 年度日本植物病理学会大会において発表した。