

カンキツグリーニング病原菌の迅速な簡易検定法の開発

穴見栄子・釘宮敏浩・土門英司¹⁾・斎藤 彰¹⁾
(株式会社ミップス・¹⁾九州沖縄農業研究センター)

Eiko Anami, Toshihiro Kugimiya, Eiji Domon and Akira Saito :
A fast and simple diagnostic method for the detection of the huanglongbin bacterium
(*Candidatus Liberibacter asiaticus*)

国の特定重要病害カンキツグリーニング病 (以下 CG と略す) は、沖縄県および鹿児島県の一部で発生が確認されている。CG 病原菌 (*Candidatus Liberibacter*) は師部局在性の難培養性細菌であり、ミカンキジラミによって媒介される。予防には初期発生段階での罹病樹の発見と除去が肝要であるが、肉眼判定や生物判定では早期発見が困難であるため PCR による診断が行われている。今回は罹病したラフレモン (*Citrus jambhiri* Lush) を用いて、DNA 抽出部位の検討ならびにプライマーの検出感度の調査を行った。

1. 材料および方法

1) 罹病したラフレモンから採取した葉を中肋、中肋以外の葉組織、葉の上部および下部に分け、各組織 0.1g を試料とした。カンキツ用に改良した CTAB 法により DNA を抽出し、CG 病原菌に特異的なプライマー A 2 / J5 (Hocquellet ら 1999) を用いて PCR を行った。

2) 罹病樹から抽出した DNA 溶液の希釈系列 (1 μ l 当たり 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng, 0.5 ng, 0.1 ng, 0.05 ng, 0.01 ng, 0.001 ng, 0.0001ng) を作製した。これらを試料として、現在までに発表されている CG 病原菌に特異的なプライマーについて検出感度の調査を行った。使用したプライマーは、(A) OI1 / OI2c (Jagoueix ら 1994), (B) A2 / J5 (Hocquellet ら 1999), (C) MHO353 / MHO354 (Hoy ら 2001), (D) F20 / R21 (Hung ら 1999) の 4 種である。

2. 結果および考察

1) ラフレモンの葉から抽出した DNA 溶液の濃度を蛍光光度計で測定した結果、中肋、中肋以外の組織ともに十分な量の DNA を抽出できた (第 1 表)。また、中肋以外の組織から抽出した DNA を用いても、CG 病原菌の検出は可能であった (第 1 図)。

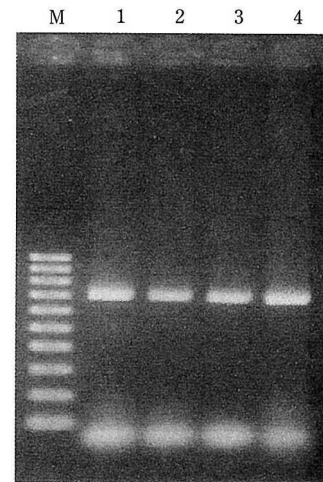
2) プライマーの検出感度を調査した結果を第 2 図に示した。OI1 / OI2c においては 5ng / μ l (A), A2 / J5 では 0.5ng / μ l (B), MHO353 / MHO354 では 0.1 ng / μ l (C), F20 / R21 では 5ng / μ l (D) までの検出が可能であった。

以上の結果から、プライマー MHO353 / MHO354 (C) の感度は、従来用いられてきたプライマー OI1 / OI2c (A) とプライマー F20 / R21 (D) の 50 倍、また A 2 / J5 (B) の 10 倍で CG 病原菌の検出が可能であることが明らかとなった。

今後はプライマー MHO353 / MHO354 を用いたマルチプレックス PCR の検討を行う予定である。

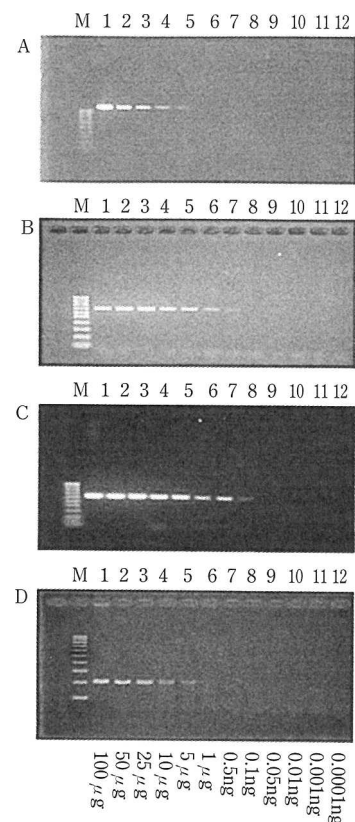
第 1 表 組織別 DNA 収量

抽出組織	DNA 収量 (ng)
中肋	2.5
中肋以外の組織	6.96
葉の上部	7.58
葉の下部	5.95



第 1 図 各組織から抽出した DNA にプライマー A 2 / J 5 を適用して PCR を行った結果

注) 1 中肋, 2 中肋以外の組織, 3 葉の上部, 4 葉の下部。



第 2 図 各プライマーによる検出限界

A プライマー OI1/OI2c, B プライマー A2/J5,
C プライマー MHO353/MHO354, D プライマー F20/R21.
1-12: 鋳型 DNA 量, 1 100ng, 2 50ng, 3 25ng, 4 10ng,
5 5ng, 6 1ng, 7 0.5ng, 8 0.1 ng, 9 0.05ng,
10 0.01ng, 11 0.001ng, 12 0.0001ng