PCR 法によるサヤヌカグサ類からのイネ白葉枯病菌の検出と評価

塚本 昇市^{1,2}・安達 直人^{1*}・竹谷 宏二¹

ABSTRACT

TSUKAMOTO, S.^{1,2}, ADACHI, N.^{1*} and TAKETANI, K.¹ (2002). Detection and estimation of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in *Leersia* by PCR. Jpn. J. Phytopathol. 68: 153-155.

In 17 areas of paddy field alongside the Morimoto River in Kanazawa, rice plants and the weed *Leersia* infected with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* were screened and assayed by PCR. Diseased rice plants were found in eight of 17 areas. Of these eight areas, diseased and PCR-positive *Leersia* plants were found in four areas; asymptomatic but PCR-positive *Leersia* were found in two areas; no *Leersia* was found in two areas. In the remaining nine areas, all *Leersia* were asymptomatic and PCR-negative. In conclusion, PCR assay could be useful for detecting the pathogen and can be used as a forecasting method for bacterial blight of rice.

(Received November 22, 2001; Accepted April 8, 2002)

Key words: bacterial blight, rice, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Leersia*, PCR, forecast.

サヤヌカグサやエゾノサヤヌカグサなどの畦畔雑草は、イネと同様に *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* による白葉枯病に自然感染³⁾、地上部が枯死しても冬季には病原細菌が地下茎で越冬できることから⁶⁾、イネ白葉枯病の重要な伝染源であると考えられており、その感染実態を予め把握することで本田のイネについての発生予察が期待できる。無病徴の植物体から病原細菌を検出する場合、遠沈濃縮接種法⁴⁾やファージ法⁵⁾があるが、時間を要することやその作業の煩雑性のため、またファージ法では天候等による日格差のため、情報の迅速性が求められる発生予察上では実用的であるとは言いがたい。そこでより簡便かつ迅速な検出が期待されるPCR法の応用の是非を検討した。すなわち、白葉枯病の常発地が存在する森下川（石川県金沢市）の下流域において、イネおよびサヤヌカグサ類の発病、サヤヌカグサ類の分布の調査を行い、さらに病徴を呈さないサヤヌカグサ類からのPCR法による病原細菌の検出を試み、両者を比較した。

発病調査 1999年8月に、森下川流域の16町（二俣、市瀬、小嶺、直江野、古屋谷、宮野、正部、薬師、不動寺、

月浦、堅田、岩出、北森本、大場×2、忠縄、才田）17地点におけるイネの発病の有無を圃場の畦畔部から見歩き調査した。その結果、宮野、堅田、岩出、北森本、大場×2、忠縄、才田の8地点で発病を認めた（第1表、第1図）。

サヤヌカグサ類の分布および発病調査 1999年8月および10月に、イネの発病調査圃場付近の用水、畦畔および水田内におけるサヤヌカグサ類の自生と発病の有無を調査した。サヤヌカグサの自生は調査地点のほぼ全域で確認されたが、エゾノサヤヌカグサは森下川下流の一部の圃場でのみ確認された。サヤヌカグサ類の白葉枯病が認められた地点では、イネの発病が必ず認められた。また、サヤヌカグサ類の発病が認められなかった地点においても、イネの発病が認められる場合もあった。しかし、イネの発病が認められないにも関わらず、サヤヌカグサ類の発病が認められる事例はなかった（第1表）。

サヤヌカグサ類の白葉枯病保菌調査 1999年10月に、サヤヌカグサ確認地点よりそれぞれ1～5ヶ所のサヤヌカグサを採集し、本病原細菌に特異的なプライマーを用いた

¹ 石川県農業総合研究センター（〒920-3198 石川県金沢市才田町戊295-1） Ishikawa Agriculture Research Center, Saida, Kanazawa, Ishikawa 920-3198, Japan

² 現在：石川県農林水産部（〒920-8580 石川県金沢市広坂2-1-1） Department of Agriculture, Forestry and Fisheries, Ishikawa Prefectural Office, Hirosaka, Kanazawa, Ishikawa 920-8580, Japan

* Corresponding author (E-mail: n-adc@pref.ishikawa.jp)

第1表 イネ白葉枯病の発病状況とサヤヌカグサ類の発病・保菌状況

調査地点	白葉枯病の発病		PCR
	イネ	サヤヌカグサ類	
1 二俣	— ¹⁾	× ²⁾	
2 市瀬	—	—	0/3 ³⁾
3 小嶺	—	—	0/1
4 直江野	—	—	0/3
5 古屋谷	—	—	0/3
6 宮野	+	+	2/4
7 正部	—	—	0/3
8 葉師	—	—	0/1
9 不動寺	—	—	0/2
10 月浦	—	—	0/2
11 堅田	+	+	4/5
12 岩出	+	—	3/5
13 北森本	+	×	
14 大場1	+	+	4/4
15 大場2	+	+	2/5
16 忠縄	+	—	1/5
17 才田	+	×	

1) + : 発病が認められた, — : 発病が認められなかった。

2) × : サヤヌカグサ類の自生が確認されなかった。

3) PCR によるサヤヌカグサ類からの白葉枯病菌の検出結果 (保菌サンプル数/全サンプル数)。

第1図 調査地点

○はイネ白葉枯病が確認されなかった, ●は確認された地点を示す。

PCR 法¹⁾により白葉枯病菌の検出を試みた。1 サンプルにつき3～5本の無病徴の植物体を、根部を含む地際部の約20 cmを3 cm程度に裁断し、10～15 mlの水道水とともに試験管内で30分間振とうし、そのうち5 μlをPCRに供試した。遺伝子増幅が認められたものを白葉枯病菌保菌サヤヌカグサと判断した。その結果、検出率に差があるも

の、サヤヌカグサの発病の有無に関わらず、イネの発病が認められた全ての地点から白葉枯病菌が検出された。また、イネの発病が認められなかった地点では白葉枯病菌は検出されなかった (第1表)。PCRは鋳型となる遺伝子さえ存在していれば陽性反応が得られるため、厳密には病原細菌の生存や感染力を確かめるものではないが、白葉枯病の発生盛期である7月に灌漑水をサンプルとしPCRを行った結果、田面水や用水中のファージ数が1 mlあたり数千個を超える場合にのみ遺伝子増幅が見られ (第2表)、検出の有無がファージ数と連動する傾向が認められることから²⁾、病原細菌の実際の消長と関連づけることができるものと思われる。

以上の結果から、サヤヌカグサの白葉枯病菌の保菌とイネ白葉枯病の発病は密接に関係しており、PCRにより効率的にサヤヌカグサの保菌を調査できることが示された。PCRを用いたサヤヌカグサからの白葉枯病菌の検出に関して、サンプリング方法や供試するサンプル数について改善の余地があり、また、検出に用いたサンプル数に差があるものの、発病が認められていない地点からも確実に検出できることは特筆すべき点である。また、2000年の4～7月にかけて同調査地区のサヤヌカグサのPCRによる保菌調査を行った結果、堅田地区で7月に一度だけ白葉枯病菌が検出されたが、他の地点ではいずれの時期においても検出されなかった。さらにイネおよびサヤヌカグサの発病調査を行ったが、ともに発病は一切認められなかった。これは7月から8月にかけて極めて高温小雨で推移し、本病の増殖、感染、発病に不適な条件であったためと思われる (第3表)。これらのことは、PCRによるサヤヌカグサの保菌調査が、本病の発生予察を行う上で重要な判断根拠となりうることを示している。今後、サンプリング方法等を見直した上で、発生量と対比させることによって発生予察技術を確認する必要がある。一方で、サヤヌカグサの自生が確認されなかった地点においても、イネの発病が認められた圃場が存在した。サヤヌカグサの自生があったにもかかわらず調査では発見できなかった、もしくは調査地点外からの灌漑水による病原細菌の流入や本田内の土壌中越冬の可能性が考えられるが、さらに検討が必要であると思われる。

PCR法の留意点としてその非特異的反応の可能性を無視できない。遠沈濃縮接種法は植物に対する病原性が、ファージ法は細菌に対する寄主性が、それぞれ技術的な柱となっており、特異性に関しては問題がないと思われる。PCR法に関しては、標的配列が同一であれば増幅されるため、シーケンズが未解読の近縁種に対する誤検出が危

第2表 イネ白葉枯病菌のPCRによる検出とファージ数の増減

圃場／天候	月 日	5月			6月				7月					8月			10
	10 晴	24 曇	30 晴	6 晴	14 小雨	21 曇	27 雨	6 晴	10 晴	18 曇	25 雨	31 晴	2 晴	8 晴	16 晴	4 小雨	
A	田 ¹⁾ 用	2 ²⁾ 1	0 0	0 0	0 0	0.5 30.5	0 0	0 27	27.5 26.5	64.5 73.5				— —	>500 >500	0 183	
B	田 用	1.5 24.5	3 0	1.5 0.5	1 1.5	0 0	4 0	0* >600	0.5 0		3	>1000		—	>300	195.5 600	
C	田 用	0.5 1	— —	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 19.5	1 124.5	1.5 26	0 23.5	28 2.5	— —	0 >500	75.5 1	600 1
D	田 用	0.5 0	— —	0 0	0 0	0 0	1 0.5	0 319		89.5 3		17.5			0 >500	43.5 55	0 600
E	田 用	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0		0 0			0	242	2 3	—	6	— 4.5	
F	田 用	0 0	0 2.5	— —	— —	— 0	— 0	— 0.5				0 0	12 0		2 0	— —	— —

1) 田：田面水，用：用水。

2) ファージ数/ml，空欄：水が無くPCR・ファージとも欠測，—：ファージ調査無。

U：シャーレ全面が溶菌し計数不可，■：PCRにより検出された，*：初発生確認。

第3表 イネ白葉枯病多発生年および少発生年の気象概要 (7・8月)

年	7月	8月
1991 (900) ¹⁾	25.2 ²⁾ 316.5	25.5 162.0
1995 (872)	25.3 505.0	28.1 246.0
1998 (871)	25.6 127.0	26.4 373.0
2000 (159)	26.9 105.0	28.4 5.5

1) 石川県下におけるイネ白葉枯病の発生面積 (ha)。

2) 上段：平均気温 (°C)，下段：降水量 (mm)。

惧されるが，本研究において，白葉枯病発生圃場と未発生圃場での結果に明らかな差が認められたことから，イネ科植物や水田周囲の水系に関しては十分な特異性を発揮できるものと判断した。ただし *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, *incanae*, *zinniae* については，今回用いたプライマーでは非特異的反応を示すことが知られており¹⁾，これらの病原細菌が確認される地域では一考を要するものと思われる。

従来法であるファージ法は天候や気温に左右されやすく，調査時の気象条件によって結果が変化し，ある地区での発生の有無など，面的な発生予察を行う場合には不適当であると考えられる。しかし，PCR法による病原細菌の

検出はサヤヌカグサの実際の感染を調査する方法であり，同じく実際の感染を調査できる遠沈濃縮接種法と比して著しく早急かつ能率的に実施できる点で優れていると思われる。今後，本法を用いイネへの感染時期を特定することや，サヤヌカグサ類の詳細な分布，保菌調査を行うことで，本病原細菌の生態解明に向けて大きく前進できるものと思われる。

なお，石川植物の会会員米山競一氏にはサヤヌカグサ類の同定を行っていただいた。ここに記し厚くお礼申し上げる。

引用文献

- Adachi, N. and Oku, T. (2000). PCR-mediated detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by amplification of the 16S-23S rDNA spacer region sequence. J. Gen. Plant Pathol. 66: 303-309.
- 安達直人・塚本昇市・竹谷宏二 (2001). PCR法を用いたイネ白葉枯病菌の検出の発生予察への応用. 日植病報 67: 333 (講要).
- 後藤和夫・深津量栄・大畑貫一 (1953). 稲白葉枯病の稲及び雑草による越冬. 農園 28: 207-208.
- 水上武幸 (1961). 稲白葉枯病に関する生態学的研究. 佐賀大学農学彙報 13: 1-85.
- 吉村彰治 (1963). 稲白葉枯病の発生生態に関する診断学的研究. 北陸農試報告 5: 27-182.
- 脇本 哲 (1956). 稲白葉枯病菌の土壌中での越冬. 農園 31: 1413-1414.