

マーガレット組織からのPCRによる根頭がんしゅ病菌の直接検出法

村上 恭子^{a)}, 藤原 亜紀^{b)}

キーワード：マーガレット, 根頭がんしゅ病, *Rhizobium radiobacter* (Ti), PCR, 直接検出

A method for direct detection of *Rhizobium radiobacter* (Ti) from marguerite tissue

Kyoko MURAKAMI^{a)}, Aki FUJIWARA^{b)}

Key words: marguerite, crown gall, *Rhizobium radiobacter* (Ti), PCR, direct detection

Abstract

We isolated bacteria from the galls forming on marguerite plants in Kagawa Prefecture and identified them based on pathogenicity and 16S rDNA sequence as *Rhizobium radiobacter* (Ti). In the case of crown gall of marguerite, we also found that the larger the gall, the smaller the number of stalks produced, which adversely affects cut flower productivity.

In the case of marguerite, the surface layer of stems close to the plant base, and the roots proved to provide the best samples for direct detection using PCR of *Rhizobium radiobacter* (Ti) in plant tissues, with detection becoming more difficult the further away from the plant base the sample is taken. Samples should be well-ground using liquid nitrogen or a similar method. DNA extraction using a silica monolith spin column enables highly sensitive, rapid detection.

摘 要

香川県下のマーガレットに形成されたがんしゅから細菌を単離し、病原性や16S rDNAの塩基配列を調査した結果、単離された細菌はマーガレット根頭がんしゅ病菌 (*Rhizobium radiobacter* (Ti)) であると判断された。また、マーガレット根頭がんしゅ病の発病により形成されるがんしゅが大きいほど分枝数が減少し、切花の生産性に影響を与えていることが確認できた。

マーガレット根頭がんしゅ病菌を植物組織からPCRを用いて直接検出するための試料採取部位としては、株元に近い茎の表層または根が適しており、株元から離れる

ほど検出されにくくなる。試料は液体窒素などを用いて十分に摩砕することが望ましい。また、シリカモノリススピニングカラムを用いてDNA抽出を行うことで、短時間で高感度の検出が可能である。

緒 言

香川県のマーガレット生産は昭和30年代から始まり、令和2年度の切り花出荷量は1,021千本で、全国1位である¹⁾。要因として、温暖な気候や日照時間の長さ、水はけのよい土壌などのマーガレット栽培に適した条件が揃っていたことがあげられる。病害虫の発生により生産が伸び悩む時期を経て、昭和63年に園芸総合センターで

a) 生産環境部門 b) 農業生産流通課

受理日：2022年3月31日

茎頂培養苗の養成に取り組み始めたことや生産現場の施設化率の向上などにより、出荷量は順調に増加した。その後平成10年頃をピークに出荷量、栽培面積は徐々に減少しているが、施設の高度化などの生産現場の努力により出荷量の維持と品質の向上が図られている。

マーガレットの生産性に影響を与える要因の一つに根頭がんしゅ病の発生がある（太田・西山⁴⁾）。香川県では現在も茎頂培養苗を用いた原種生産を行っているが、無病化の確認には多大な労力が必要である。実際には、親株を養成する段階で穂を採って挿し芽床に挿し、25℃多湿の発病好適条件に置き、発根後掘り上げてがんしゅの有無を目視で確認している。しかし穂に形成されるがんしゅは位置が定まっていないため見つけづらく、また直径2mm前後のものが多いため土粒との見分けが難しい（図－1）。

近年の植物病理学における遺伝子診断技術の進歩は目覚ましいものがある。根頭がんしゅ病においても病原性細菌の遺伝子診断法が開発されている（澤田ら⁵⁾，Suzaki et al.⁶⁾）。また、ブドウでは植物組織からの分離細菌において確立されたマルチプレックスPCRによる検出方法が、植物組織からの直接検出にも適用できると報告されている（川口²⁾）。しかし、液体窒素や高額なキットを用いて純度の高いDNAを抽出する必要があるため、多検体の検定に用いるには課題が多い。

本研究ではまず、香川県のマーガレットから採集したがんしゅから細菌の単離を行い、これまで行われていなかった塩基配列レベルでの菌種の推定を試みた。つぎに、がんしゅの形成がマーガレットの生産性に及ぼす影響について調査を行った。さらに、マーガレット根頭がんしゅ病の遺伝子診断に用いるDNA抽出法について検

討し、植物組織から直接根頭がんしゅ病菌を検出する簡易な手法を確立し、未発病の植物体からの病原菌検出が可能であることを確認した。

材料および方法

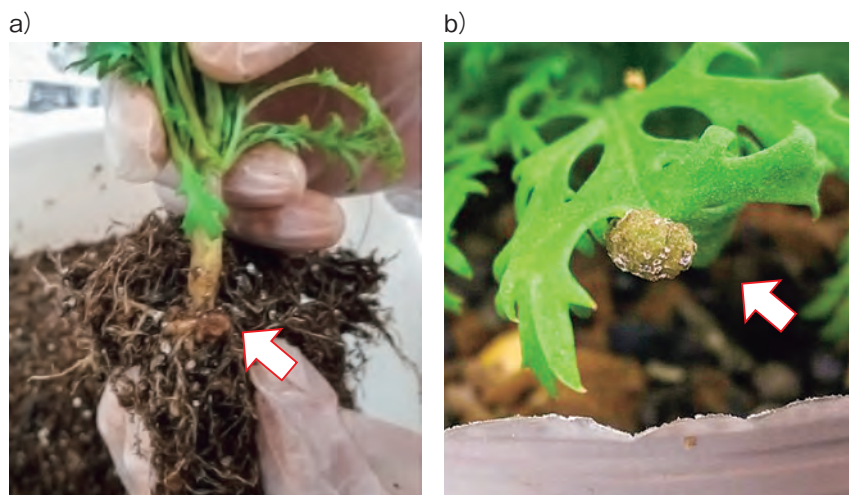
試験1：香川県のマーガレットから採集したがんしゅからの細菌の単離と同定

1. 細菌の単離

マーガレット現地採取株2株（No.3，10）の株元に形成されたがんしゅから、常法により病原菌の分離を行った。すなわちまず、がんしゅおよびその周辺を滅菌水で十分洗浄し、滅菌したメスでがんしゅを切り取って70%エタノールで表面殺菌した。さらに、内部の未褐変の柔らかい組織を滅菌したメスで採取して滅菌水中ですりつぶした後、普通寒天培地（以後、NA培地）上で画線培養し、単一集落を釣菌することを2回繰り返して分離菌を得た。

2. 病原性試験

検定植物として、トマト（品種「TY千果」タキイ種苗）およびヒマワリ（品種「F1 DMRサンリッチオレンジ」タキイ種苗）を用いた。1. で得られた分離菌（No.3-1，10-1）をNA培地上で25℃，2日間培養した集落を滅菌水に懸濁し、約 1×10^8 および 1×10^9 cfu/mLに調整したものを接種源とした。対照は、滅菌超純水とした。ポリポットで栽培した幼苗の茎に注射器を用いて単刺有傷接種（1株の主幹に3カ所）した。接種は2020年7月7日に行い、接種後はプラスチックフィルム温室で管理した。病原性の判定は接種20日後に行い、目視でがんしゅの形成を確認した。



図－1 挿し穂苗に形成されたがんしゅ
a) 穂の切り口 b) 葉の先端部

3. 16S rDNAの塩基配列の決定

分離菌 (No.3-1, 3-2, 10-1, 10-2) をNA培地で25℃, 4日間培養し, 得られた集落をピペットチップの先で釣菌し, 抽出液 (0.5N NaOH, 0.2% SDS) 100μLに懸濁した。遠心後の上清を10倍希釈し, 1μLを鋳型とした (NaOH-SDS法) (Wang et al.⁸⁾)。反応酵素はAmpliTaq Gold 360 master mix (Thermo Fisher Scientific), プライマーは, 既報のグラム陰性細菌16S rDNA増幅用ユニバーサルプライマーを一部改変した27F-1/1492R-1 (表-1) 各0.2μMを用い, 超純水で反応液量を10μLに合わせた。サーマルサイクラーはPCR Thermal Cycler Dice™ (タカラバイオ) を用い, 95℃9分 - (94℃30秒 - 55℃30秒 - 72℃2分) × 35サイクル - 72℃7分でPCRを行った。増幅産物はMonoFasI ((株) アニモス) を用いて精製し, ユーロフィンジェノミクス (株) のDNAシーケンス受託解析により塩基配列を決定した。

試験2: がんしゅの形成が生産性に及ぼす影響の調査

根頭がんしゅ病の発病が見られる栽培ほ場において, 株元に形成されたがんしゅの大きさと分枝数を調査した。がんしゅの大きさは, がんしゅの最大直径が莖径以上のものを「大」, 莖径未満のものを「小」, がんしゅが確認できないものを「無」とした (図-2)。

品種は「白花在来種」, 発根苗の定植は2019年9月末, ピンチは葉を12枚程度残して1回, 採花は2020年3月上旬。調査日は, 採花終了後の5月15日。ビニール温室に定植されている1300株のうち中央2列の400株を調査対

象とした。

試験3: がんしゅ病菌検出方法の簡易化の検討

1. がんしゅ以外の組織からの根頭がんしゅ病菌の検出
供試材料は, がんしゅが形成された発病株 (品種「白花在来種」) 2株 (A, B) とした。株Aは, 2つのがんしゅ形成部位からそれぞれ試料を採取した。

褐変部分を除いたがんしゅ切片 (厚さ1mm) およびがんしゅの1cm下の茎から削り取った維管束部分を試料とし, 液体窒素で凍結させて乳棒・乳鉢で摩砕した。改変CTAB法 (Porebski et al.⁷⁾) およびDNeasy Plant mini kit (QIAGEN) を用いてDNAを抽出後, 1×TEで供試材料と等量 (w/v) のDNA溶液とし, そのうち1μLを鋳型とした。抽出したDNA溶液は, 分光光度計NanoDrop-1000 (LMS) で測定し, 純度 ($OD_{260/280}$, $OD_{260/230}$) と抽出量を確認した。プライマーは, *Rhizobium* 属細菌の病原性関連遺伝子 *virC* オペロン (*virC1*, *virC2*) を検出するように設計されたVCF3/VCR3 (表-1) 各0.5μMを使用した。PCRサイクルは95℃9分 - (94℃30秒 - 55℃30秒 - 72℃1分) × 40サイクル - 72℃7分とし, 他の条件は試験1の3. と同様とした。

得られたPCR産物は2%アガロースゲル (Agarose TypeII (SIGMA)), 泳動バッファー0.5×TBEで100V25分間電気泳動し, GelRed (Biotium) で染色し, UV照射下でバンドを確認した。

2. 簡易DNA抽出法および試料摩砕方法の検討

供試材料は1. と同じ2株とした。

表-1 本研究で使ったプライマー

primer	sequence (5'-3')	備考
27F-1	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	Weisburg et al. ⁸⁾ のプライマーfD1を一部改変
1492R-1	GGCTACCTTGTTACGACTT	Weisburg et al. ⁸⁾ のプライマーrP2を一部改変
VCF3	GGCGGGCGYGCYGAAGRAARACYT	Suzaki et al. ⁵⁾
VCR3	AAGAACGYGGNATGTTGCATCTYAC	Suzaki et al. ⁵⁾



無

小

大

図-2 がんしゅの大きさの分類基準

無: がんしゅ確認不能 小: がんしゅ最大直径 < 莖径 大: がんしゅ最大直径 ≥ 莖径

簡易DNA抽出法として、NaOH-SDS法と MonoFasI (アニモス) の検討を行った。

試料の摩砕方法として、液体窒素で凍結させて乳棒・乳鉢で摩砕する方法または抽出液に直径3mmのステンレスビーズ2個を加え、ビーズ式破碎装置 Shake-Master[®] AUTO (バイオメディカルサイエンス) で1,100rpm 3分間破碎する方法の検討を行った。NaOH-SDS法については、抽出液を加えてペッスルで摩砕する方法もあわせて検討した。

NaOH-SDS法は、試料10mgを摩砕して供試し、プロトコルは試験1の3.と同様とした。MonoFasIは、摩砕した試料30mgに100μL 1×TEを加えて懸濁し、14,000rpm, 10分, 15℃で遠心後の上清90μLを10倍量のBufferA (キット添付)を入れたスピнкаラムに添加し、



図－3 穂からの試料採取位置

ピペッティングで混合した。その後はキットのプロトコルに従い、30μLのBufferC (キット添付)で溶出した。

PCRおよびPCR産物の確認は試験3の1.と同様に行った。

3. 簡易DNA抽出法および検出可能部位の検討

供試材料は、がんしゅが形成された採穂用親株 (品種「白花在来種」) 2株とした。各株から、穂、株元茎の維管束部、根およびがんしゅを採取して供試した。穂は、株の高さの上から1/3の位置にある穂3本および下から1/3の位置にある穂3本を用い、穂ごとに茎 (維管束を含む表皮) と葉柄 (図－3) を採取した。

試料の摩砕はビーズ式破碎装置を使用し、簡易DNA抽出法はNaOH-SDS法またはMonoFasIとし、方法は試験3の2.と同様とした。PCRおよびPCR産物の確認は試験3の1.と同様に行った。

試験4：採穂時期が陽性率に及ぼす影響

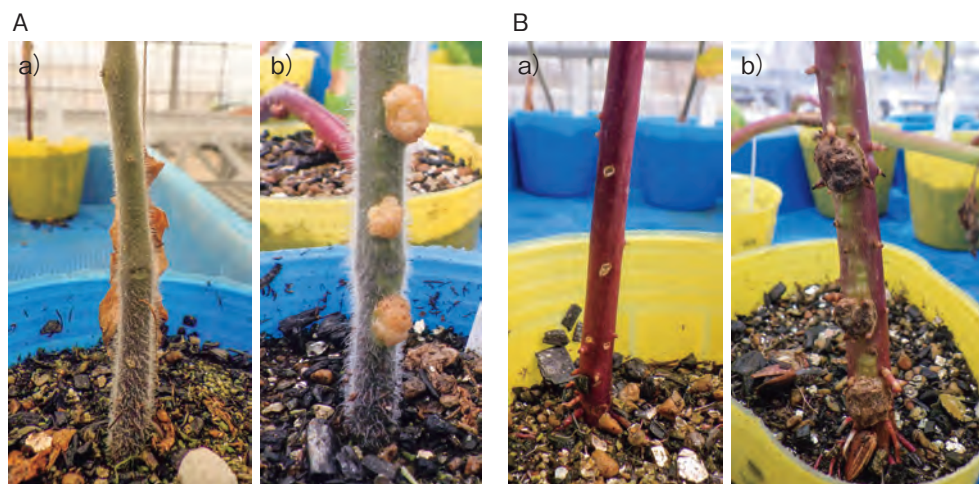
発病した親株から2020年4月に採穂して養成した病徴の見られない19株を用いて、試験3と同様に検定をおこなった。ただし、試料の摩砕はビーズ式破碎装置、DNA抽出はMonoFasIを用いた。

検定は7月27日 (株元茎)、9月1日および10月6日 (穂の茎) の3回行った。7月は1反復、9月および10月については2反復とした。

結 果

試験1：香川のマーガレットから採集したがんしゅからの細菌の単離と同定

マーガレット県内採取株2株 (No.3, 10) の株元に形成されたがんしゅから菌を分離した。得られた菌株 (No.3-1, 10-1) を用いてトマトおよびヒマワリへの



図－4 検定植物への分離菌の接種により形成されたがんしゅ

A：トマト B：ヒマワリ a)：水接種 b)：分離菌接種

*接種20日後のようす

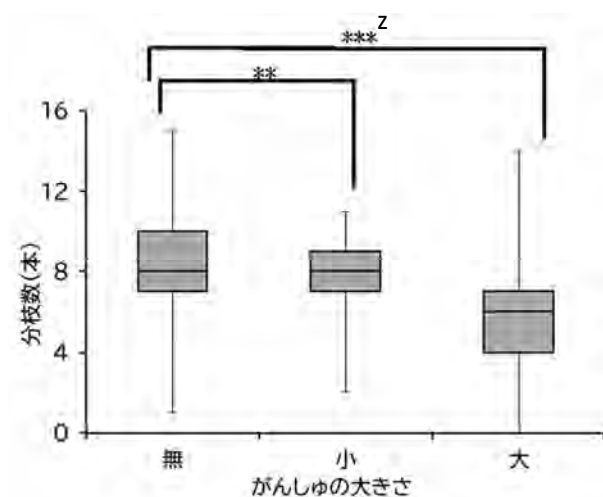
接種試験を行ったところ、全ての植物で接種箇所にかんしゅが形成されていた。水を接種した対照植物では、かんしゅの形成は認められなかった（図－4）。

さらに、菌株（No.3-1, 3-2, 10-1, 10-2）を用いて16S rDNAの塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、太田・西山⁴⁾によりマーガレットの自然病斑から分離された菌株（MAFF No. 301223）の配列と100%一致していた。

以上の結果より、マーガレットのかんしゅ部分から単離した細菌は、マーガレット根頭かんしゅ病菌（*Rhizobium radiobacter* (Ti)）であると判断した。

試験2：かんしゅの形成が生産性に及ぼす影響の調査

かんしゅの大きさと分枝数を調査した結果を図－5に示した。中央値はかんしゅの大きさが「無」および「小」



図－5 かんしゅの大きさと分枝数
かんしゅの大きさの基準（無，小，大）は図2に示した
n=278（無），43（小），78（大）
エラーバーは最小および最大値，箱上部は75%タイル，下部は25%タイル，箱内部の線は50%を示す
Z：Welchのt検定により***は0.1%水準で有意差あり，**は1%水準で有意差あり

で8，「大」では6であり，75パーセンタイルはそれぞれ10，9，7，平均値はそれぞれ8.8，7.6，5.5であった。かんしゅ無とかんしゅ小およびかんしゅ大の間でWelchのt検定を行ったところ有意差が見られ（かんしゅ大； $P<0.001$ ，かんしゅ小； $P<0.01$ ），かんしゅが大きいほど分枝数が少ない傾向が明らかとなった。

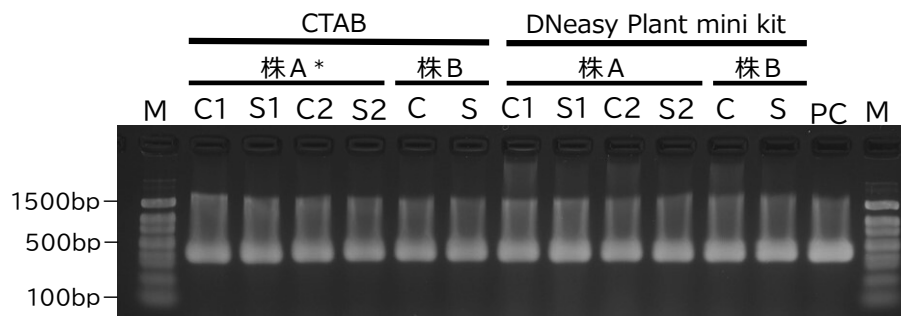
さらに，かんしゅの赤道面で茎を切断したところ，かんしゅは維管束を中心に茎を潰すように形成されていた（図－6）。

試験3：簡易DNA抽出法および検出可能部位の検討

かんしゅ切片およびかんしゅの1 cm下の茎の維管束部分から抽出したDNAを用いてPCRを行った結果，かんしゅ切片だけでなく，茎の維管束部分からも根頭かんしゅ病菌が検出可能であった。また，DNeasy Plant mini kitの方が改変CTAB法よりも，抽出されたDNAの純度，量ともに高くなったが（データ省略），いずれの方法でも検出は可能であった（図－7）。



図－6 かんしゅ形成位置の横断面の様子
左上写真の橙色の線の位置で茎とがんしゅを切断した。

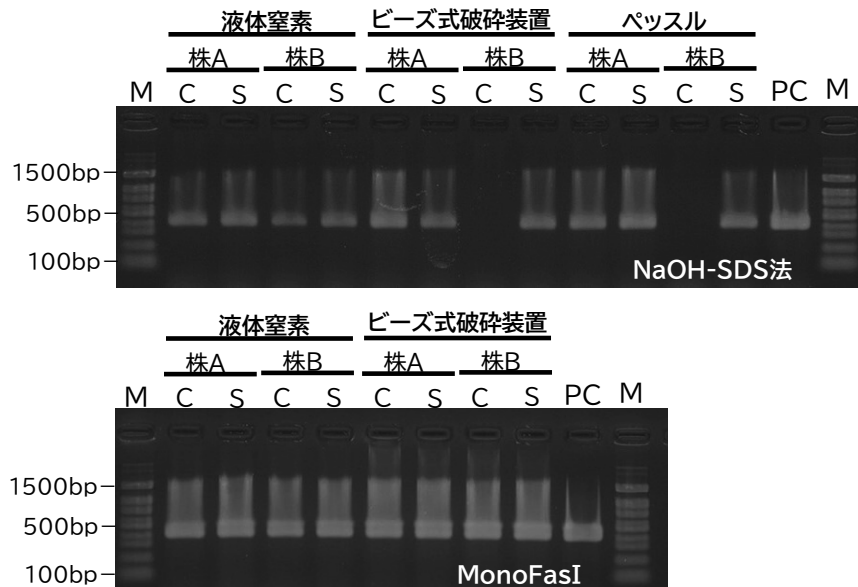


図－7 かんしゅおよび直下の茎からのかんしゅ病菌の検出
C：かんしゅ S：茎（かんしゅの1 cm下の維管束部）
*株Aは2つのかんしゅを採取した
PC：陽性コントロール（No.3-1）
M：100bp Ladder Marker

多検体の検定に対応するため、簡易DNA抽出法および試料の摩砕方法を検討した。その結果、液体窒素を用いた場合にいずれの簡易DNA抽出法でも安定して検出が可能であった。一方、ビーズ式破碎装置およびベッス

ルによる摩砕では、NaOH-SDS法で検出されない試料があった（図－8）。

さらに、株全体に試料採取範囲を広げて検出可能部位の検討を行った。ビーズ式破碎装置を用いて試料を摩砕

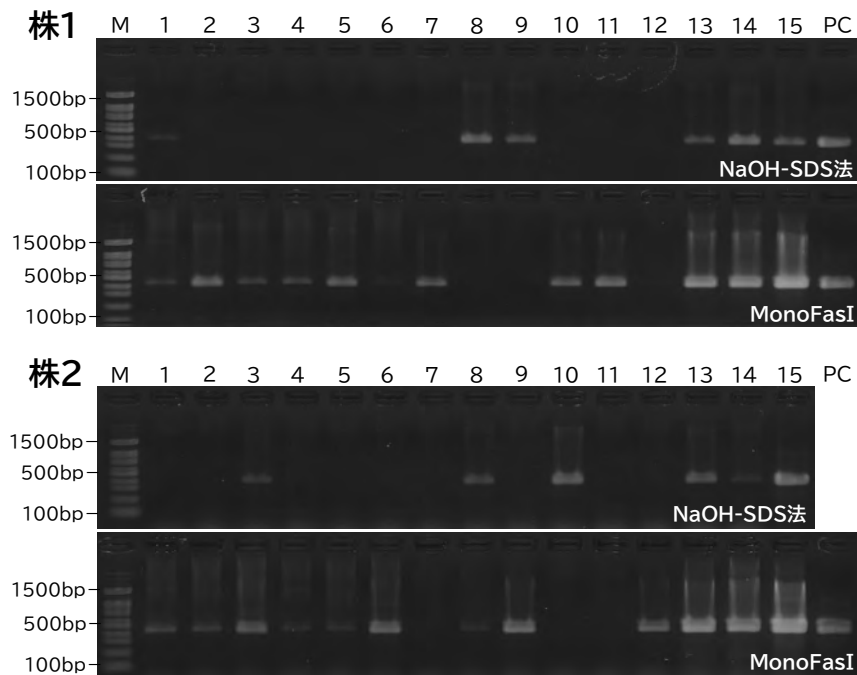


図－8 DNA抽出法と試料の摩砕方法が検出に及ぼす影響

C：がんしゅ S：茎（がんしゅの1 cm下の維管束部）

PC：陽性コントロール（No.3-1）

M：100bp Ladder Marker



図－9 簡易DNA抽出法と検出可能部位の比較

1, 2, 3：株上方の穂（茎） 4, 5, 6：株下方の穂（茎）

7, 8, 9：株上方の穂（葉柄） 10, 11, 12：株下方の穂（葉柄）

13：株元茎 14：根 15：がんしゅ

PC：陽性コントロール（No.3-1） M：100bp Ladder Marker

表2 無病徴株からの時期別検出結果

Sample No.	7月 株元茎	9月 穂の茎	10月 穂の茎
1	－	＋／－	＋／＋
2	＋	＋／＋	－
3	＋	＋／＋	＋／－
4	＋	－／－	－／－
5	－	＋／＋	枯死
6	＋	－／－	＋／＋
7	＋	＋／－	＋／＋
8	－	＋／＋	－／－
9	＋	＋／＋	＋／－
10	＋	＋／－	＋／＋
11	＋	－／－	＋／－
12	＋	＋／＋	＋／－
13	＋	＋／＋	＋／－
14	＋	＋／＋	＋／－
15	＋	＋／＋	＋／－
16	－	＋／＋	＋／＋
17	＋	＋／＋	＋／－
18	＋	＋／＋	＋／－
19	＋	＋／＋	＋／－
陽性株率（％） ^z	78.9	68.4	33.3

＋：陽性，－：陰性

Z：9，10月は2点ともに陽性の株を陽性株とした

し、2つの簡易DNA抽出法を検討した結果、MonoFasIの方がNaOH-SDS法よりも検出できる割合が高くなった。これは、供試した2株ともに同じ結果であった（図－9）。また、MonoFasIの方が濃くはっきりとしたバンドが確認できた。さらに試料の部位別に検出結果を見ると、株元茎および根ではがんしゅと同等の濃さのバンドが確認できたが、穂の茎、葉柄の順に、主茎から離れるにしたがい検出されにくくなった。

試験4：採穂時期が陽性率に及ぼす影響

7月、9月、10月の3回、時期をずらして検定を行った。7月は株元茎を供試し、78.9%の株が陽性となった。9，10月は、株の高さの1/2より下の位置にある穂の茎を、各株原則2点供試した。2点ともにバンドが確認された株を陽性とする、9月の陽性株率は68.4%であった。一方、10月は33.3%に低下した（表－2）。

考 察

まず、マーガレット（品種「白花在来種」）の香川県内採取株2株（No.3，10）の株元に形成されたがんしゅから分離菌株を得た。これらの菌株はトマトおよびヒマ

ワリへの接種試験でがんしゅの形成が認められ、病原性が確認でき、さらに16S rDNAの塩基配列が、太田・西山⁴⁾により静岡県で採取されたマーガレット根頭がんしゅ病菌（*Rhizobium radiobacter*：MAFF No. 301223）の配列と100%一致していたことから、マーガレット根頭がんしゅ病菌であると判断した。

近年、従来の分類のための指標に加えて、細菌の分類と同定を行うための細菌全体に共通の汎用性の高い指標として、16S rDNAの塩基配列データが利用されている。16S rDNAの塩基配列を決定して系統解析を行うことで、未知の菌株がどの属に所属しているか、あるいはどの菌種と類縁関係にあるかを推定することができる（大楠・江崎³⁾）。また、農業生物資源ジーンバンクの遺伝資源データベースでは、16S rDNAを含むいくつかの指標となる遺伝子について塩基配列データが登録されている。

つぎに、根頭がんしゅ病の発病が生産性に及ぼす影響を確認するため、根頭がんしゅ病発生ほ場においてがんしゅの大きさと分枝数について調査した。その結果、がんしゅが大きいほど分枝数が少なくなり、発病によって生産性が低下することが明らかとなった。がんしゅは維管束を中心に茎を潰すように形成されており、根からの養分や水の供給が阻害されて生育が悪くなると考えられた。

さらに、PCRによるがんしゅ以外の部位からの根頭がんしゅ病菌の検出を目的として、いくつかの検討を行った。まず、液体窒素を用いて高い純度が得られるDNeasy Plant mini kit及び改変CTAB法でDNAを抽出し、がんしゅとその直下の茎から根頭がんしゅ病菌の検出が可能であることを確認した。マーガレットは主茎中心部が木化しているが、樹木類と比較して茎表面が柔らかく試料が採取しやすい。また、茎の一部のみを削って試料とすることで株へのダメージを抑えることができる。そのため、がんしゅ直下の茎については維管束部分を削るように試料を採取することになった。マーガレットのがんしゅは維管束を中心に形成されており（図－6）、また、ブドウでは休眠枝の剪定痕を再度切断して出てくる樹液から病原性のある根頭がんしゅ病菌が分離されている（川口²⁾）ことから、この採取方法ががんしゅ以外の茎からの安定した根頭がんしゅ病菌の検出につながったと考えられる。

また、試料の摩砕方法について検討した結果、NaOH-SDS法ではビーズ式破砕装置を用いた場合よりも液体窒素を用いた場合に検出率が高くなった。これは、液体窒素を用いた場合には繊維状の組織も容易に粉状に

摩砕できるが、ビーズ式破砕装置では硬化組織や繊維状組織の完全な摩砕が難しいためと考えられる。ただし、液体窒素はコストと手間の点で問題がある。一方シリカモノリススピンカラムを用いたキットであるMonoFasIでは、ビーズ式破砕装置を用いても安定した検出が可能であった。そこで、この方法を用いてさらに検討を行った。その結果、株の上方から採取した穂を検定に用いた場合でも根頭がんしゅ病菌の検出が可能であることが明らかとなった。またMonoFasIは、抽出時間が10検体あたり約50分と短いという長所もある。

根頭がんしゅ病菌の検出されやすさには採取部位および採取時期で差が見られた。採取部位については、がんしゅが形成されやすい株元付近が最も検出が容易で、株元から離れるほど検出されにくくなる傾向が見られた。また採取時期については、穂の茎を用いて検定を行った9、10月について比較すると、9月よりも10月の方が検出されにくかった。これは、気温の低下に伴って蒸散量が減少し、師管液の動きが鈍くなったことが一因ではないかと考えられた。今後、年間を通じた調査を行って根頭がんしゅ病菌の季節的変動を確認することで、菌濃度の低い時期が明らかとなり、茎頂培養による菌の除去や菌濃度の抑制に役立てることが可能になると考えられる。

謝 辞

本研究を行うにあたり、西讃農業改良普及センター花き経営担当の皆様には多大なるご協力をいただきました。深く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) 香川県農政水産部 (2022): 統計で見る香川の農業・水産業 令和4年度版: 16
- 2) 川口章 (2009): ブドウ根頭がんしゅ病の診断と生物的防除および病原細菌の系統解析に関する研究. 岡山県農業総合センター農業試験場研究報告 27: 63-124
- 3) 大楠清文, 江崎孝行 (2009): 分子系統解析に基づいた細菌の分類と同定. Sysmex Journal Web 10 (2): 1-11
- 4) 太田光輝, 西山幸司 (1984): 花き類の根頭がんしゅ病に関する研究: I. 病害の発生ならびに病原細菌の細菌学的性質. 日本植物病理学会報 50 (2): 197-204
- 5) 澤田宏之, 須崎浩一, 川口章 (2016): コロニーダ

- イレクトのマルチプレックスPCRによる植物病原性Rhizobium属細菌 (旧Agrobacterium属細菌) のプラスミド型別. 日本植物病理学会報 82 (2): 116-124
- 6) Suzuki K., Yoshida K. and Sawada H. (2004): Detection of tumorigenic Agrobacterium strains from infected apple saplings by colony PCR with improved PCR primers. Journal of General Plant Pathology 70: 342-347
 - 7) Porebski S., Bailey L.G. and Baum B.R. (1997): Modification of a CTAB DNA extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components.. Plant Molecular Biology Reporter 15 (1): 8-15
 - 8) Wang H., Qi M. and Cutler A. J. (1993): A simple method of preparing plant samples for PCR. Nucleic Acids Research 21: 4153-4154
 - 9) Weisburg W.G., Barms S.M., Pelletier D.A. and Lane D.J. (1991): 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology 173: 697-703