

カンキツグリーニング病菌検出に適した試料供試部位の検討

金丸 俊司・永喜 大士¹⁾・内藺 豊

門司植物防疫所名瀬支所

Branch Collar Sampling of Citrus Trees for the Effective Detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Shunji Kanamaru, Taishi Eiki¹⁾ and Yutaka Uchizono (Naze Substation, Moji Plant Protection Station, 1-1, Nagahamamachi, Naze, Kagoshima, 894-0036, Japan¹⁾ Kansai Airport Substation, Kobe Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan*. **52**: 17-22 (2016).

Abstract: According to the past reports, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las), the causal agent of citrus greening disease (huanglongbing), is unevenly distributed in the host plant. Therefore, the use of appropriate parts (i.e. where Las is present in high concentrations) for real-time PCR allows easier detection of the pest. In this study, two plant parts, the branch collar and the petiole, were examined for suitability in real-time PCR. As a result, the use of branch collars resulted in higher Las detection rates and Las concentrations in comparison with that of petioles. While the disadvantage in the use of branch collars can be the longer sample preparation time than that of petioles, the newly developed method (DNA extraction from a branch collar without shredding) successfully demonstrated significant reduction in sample preparation time without lowering the Las detection rate nor Las concentration. These results indicate that the use of branch collars in real-time PCR will be practically useful and effective in order to detect trees infected by Las. However, even when we use branch collars for real-time PCR, it is not always possible to detect trees infected by Las. Therefore, when we sample branch collars, we must choose multiple branches.

Key Words: *Candidatus Liberibacter asiaticus*, branch collar, petiole, real-time PCR

緒 言

カンキツグリーニング病（Huanglongbing、以下 HLB）は、アフリカ、アジア、南北アメリカ等で発生しているカンキツ類の重要な病害で、*Candidatus Liberibacter asiaticus*（以下 Las）、*Ca. L. africanus* 及び *Ca. L. americanus* の3種の病原細菌によって引き起こされる。HLBは、接ぎ木及びミカンキジラミ（*Diaphorina citri*）による永続的な媒介により伝搬され（da Graca, 1991）、感染樹は、葉の黄化、落葉、果実の着色不良等を起こし、最終的に枯死に至る（da Graca, 1991; Texeria *et al.*, 2005; 芦原, 2006）。日本国内で発生している HLB は Las によるものであり、1988年に沖縄県の西表島で初めて確認され（Miyakawa and Tsuno, 1989）、その後、沖縄県の各地（河野ら, 1997; 内藤ら, 2001）並びに鹿児島県の与論島、沖永良部島、徳之島及び喜界島で発生が確認された（濱島ら, 2003; 篠原ら, 2006）。このうち、喜界島においては、2007年4月から植物防疫法に基づく緊急防除事業が実施され（都外川ら, 2010; 堀江・都外川, 2014）、2012年3月に、本病菌の根絶が達成された（門司植物防疫所, 2012）。

現在、奄美群島では、鹿児島県によって発生調査が定期的実施され、感染樹の早期発見及び当該樹の早期伐採に努め、本病菌の根絶を目指している。発生調査で採取された葉は、奥田ら（2009）のリアルタイム PCR 法によって感染の有無を確認しているが（松浦ら, 2012）、Las は樹体内で遍在しており（岩波ら, 2009）、感染樹であってもリアルタイム PCR 法によって検出されない枝があることが報告されている（Teixeria *et al.*, 2008）。従って、HLB 発生調査においては、Las が高濃度かつ高確率で存在する部位を採取し、検定に供試することが求められる。

そこで、Las の検出率が高く、かつ、高濃度で存在するとの報告（中西ら, 2014）があるブランチカラー（新梢基部の膨らんだ部分）の皮層部と、現在検定に用いている葉柄との間で、①採取時期、②品種別及び③葉の病徴の有無によって、Las の検出率及び濃度を比較し、どちらが検定に供試する部位として適当かを検討した。

¹⁾ 神戸植物防疫所関西空港支所



Fig 1. Branch collar sample preparation method.

- ① Separate the cured shoot with the side branch cortical layer from the side branch (the red arrow points to the branch collar).
 - ② Cut in about 5 mm to fit the upper and lower branch collars.
 - ③ Decorticate the cortical layer.
- And engrave only the cortical layer and extract DNA.

材料及び方法

1. 供試試料

2014年2月、鹿児島県大島郡知名町（沖永良部島）のLas感染樹5樹から57枝、同年7月同郡和泊町（沖永良部島）のLas感染樹10樹から101枝、同年12月、和泊町のLas感染樹5樹から50枝を採取し、供試試料とした。

2. 試料調製及びDNA抽出

ブランチカラーは、側枝に発生する硬化した新梢を側枝の皮層が残るように分離し、カミソリを用いてブランチカラー中心部から上下合わせて5mmを切断後、皮層部を剥いで1mm程度に細断した（Fig.1）。

葉柄は、新梢の1番下の葉のものを供試し、基部から5mmを切断し、1mm程度に細断した。

調製したブランチカラー及び葉柄は、重量を計測後、2.0mlマイクロチューブ（以下2mlチューブ）に入れ、市販のDNeasy Plant Mini Kit[®]（キアゲン社）を用いて、DNA抽出を行った。

なお、ブランチカラーと葉柄は同一の新梢から採取した。

3. リアルタイムPCR法による定量解析

Las濃度の定量解析は、奥田ら（2009）のリアルタイムPCR法（インターカレーター法）を用い、反応は増幅試薬SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus)（タカラバイオ）及びリアルタイムPCR装置Thermal Cycler Dice[®] Real Time System II（タカラバイオ）を用いて行った。反応液は、最終濃度0.4 μ Mの*tufB*遺伝子領域を標的としたプライマー（*TufB*-F1及び*TufB*-R1）と、鋳型として上記のDNA抽出液を3 μ l添加し、20 μ lに調整した。反応条件は、タカラバイオの推奨する条件（95℃ 30秒の熱変性の後、95℃ 5秒、60℃ 30秒のサイクルを40サイクル）を使用した。

反応後、機器に付属のソフトウェア（Software Ver.4）を用いて増幅曲線を解析し、second derivative maximum法により閾値サイクル（Ct値）を算出した。

試料中のLasの濃度を推定するために用いた標準試料は松浦ら（2012）が作成したPCR産物を用いた。3.7 $\times 10^6$ 、3.7 $\times 10^4$ 、3.7 $\times 10^2$ 、3.7 $\times 10^0$ コピー/ μ lに段階希釈した標準試料を、リアルタイムPCR法の反応試験ごとに同時に供試し、得られた検量線より、Lasの濃度を推定した。なお、1コピー/ μ l以上の値を示し、かつ、融解曲線がポジティブコントロールと一致したものを陽性と判定した。

Table 1. Comparison of detection rate of Las between branch collars and petioles (month).

Month of sampling	Number of trees	Number of cured shoots	Part of trees*	Number of positive samples	Detection rate (%)
February ※ 3	5	57	Branch collar	10	17.5
			Petiole	7	12.3
July ※ 2	10	101	Branch collar	40	39.6 a'
			Petiole	34	33.7 b'
December ※ 3	5	50	Branch collar	30	60.0
			Petiole	27	54.0
Total ※ 1	20	208	Branch collar	80	38.5 a
			Petiole	68	32.7 b

※ 1: Values with different letters (a, b) are significantly different in totals ($p < 0.01$, McNemar's test).

※ 2: Values with different letters (a', b') are significantly different in July ($p < 0.05$, McNemar's test).

※ 3: McNemar's test ($p > 0.05$) shows no significant differences between branch collars and petioles in February and December.

*Branch collars and petioles were collected from the same shoots.

リアルタイム PCR 法により得られた結果から、検出率（陽性数 / 総供試数 $\times 100$ ）及び単位重量当たりの菌濃度（コピー数 / mg）を算出し、サンプリング時期（2 月、7 月、12 月）、品種別（タンカン (*Citrus tankan*)、カボチャ (*C. keraji* var. *kabuchii*)、シークリブ (*C. depressa*)) 及び葉における病徴の有無により、ブランチカラーと葉柄間での検出率及び菌濃度を比較した。

4. ブランチカラー試料調製法の検討

ブランチカラーの試料調製方法の簡略化を検討するための試験を行った。

ブランチカラー中心部から上下合わせて 1cm を切断し、皮層部を剥いで縦に 2 分割した。一方を従来どおりカミソリで細断し（以下、細断処理法）、もう一方を裁断することなくそのまま（以下、無処理法）重量を計測した。それぞれの試料と

ステンレスビーズを 2ml チューブに入れ、 -20°C で凍結させた。凍結させた試料を、DNeasy Plant Mini Kit[®]（キアゲン社）を用いて DNA 抽出後、上記リアルタイム PCR 法を行い、細断処理法と無処理法による Las の菌濃度を比較した。

結 果

各月のブランチカラーと葉柄からの Las の検出率を比較したところ、2 月と 12 月では、有意な差は認められなかったが ($p > 0.05$, McNemar 検定)、7 月ではブランチカラーの検出率が有意に高くなった ($p < 0.05$, McNemar 検定) (Table 1)。菌濃度では、各月ともブランチカラーと葉柄との間に有意な差は認められなかった ($p > 0.05$, Wilcoxon 符号付順位和検定) (Fig.2)。

2 月は、検出率、菌濃度ともに著しく低く、また、品種も不明のものが多かったため、以下の分析は夏季と秋季のデータの

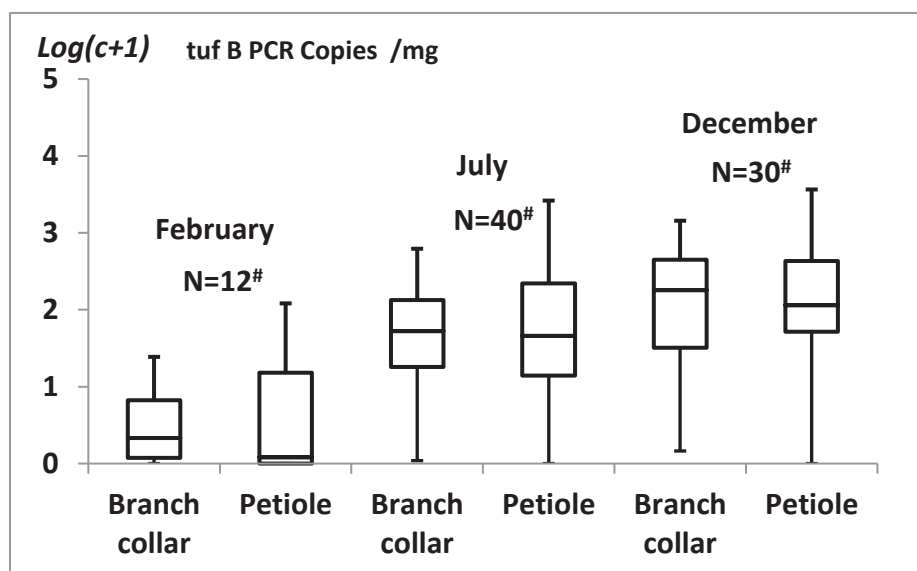


Fig 2. Box plot shows the distribution of Las concentration (month). Wilcoxon signed-rank test ($p > 0.05$) shows no significant differences between branch collars and petioles in each month.

#Number of branches that became positive in either branch collars or petioles.

Table 2. Comparison of detection rate of Las between branch collars and petioles (cultivar).

Cultivar (scientific name)	Number of trees	Number of cured shoots	Part of trees*	Number of positive samples	Detection rate (%)
Kabocha (<i>Citrus keraji</i> var. <i>kabuchii</i>)	4	39	Branch collar	23	59.0
			Petiole	20	51.3
Tankan (<i>C. tankan</i>)	5	52	Branch collar	25	48.1
			Petiole	22	42.3
Shi-kuribu (<i>C. depressa</i>)	3	30	Branch collar	9	30.0
			Petiole	6	20.0
Unknown (<i>C. spp.</i>)	3	30	Branch collar	13	43.3
			Petiole	13	43.3
Total	15	151	Branch collar	70	46.4
			Petiole	61	40.4

McNemar's test ($p > 0.05$) shows no significant differences between branch collars and petioles in each cultivar.

*Branch collars and petioles were collected from the same shoots.

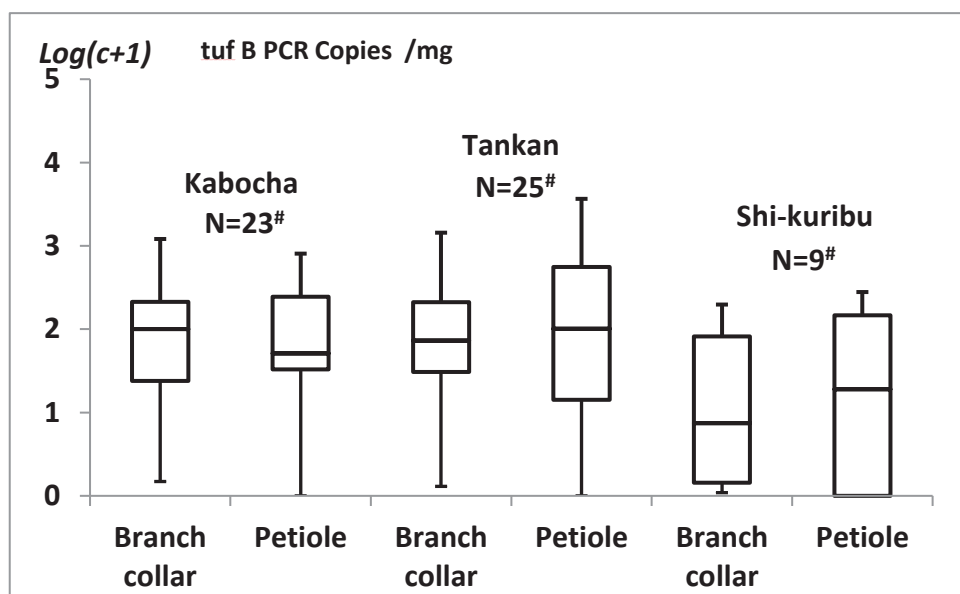


Fig 3. Box plot distribution of Las concentration (cultivar) .

Wilcoxon signed-rank test ($p > 0.05$) shows no significant differences between branch collars and petioles in each cultivar.

Number of branches that became positive in either branch collars or petioles.

みを用いて行った。

品種ごとにブランチカラーと葉柄の検出率を統計解析したところ、各品種とも両部位間に有意な差は認められなかった ($p > 0.05$, McNemar 検定) (Table 2)。菌濃度でも、ブランチカラーと葉柄との間に有意な差は認められなかった ($p > 0.05$, Wilcoxon 符号付順位和検定) (Fig.3)。

病徴の有無別にブランチカラーと葉柄の検出率を統計解析したところ、病徴の有無に関わらず、両部位間に有意な差は認められなかった ($p > 0.05$, McNemar 検定) (Table 3)。菌濃度では、病徴有りでは有意な差は認められなかった ($p > 0.05$, Wilcoxon

符号付順位和検定) が、病徴無しではブランチカラーの方が有意に高くなった ($p < 0.01$, Wilcoxon 符号付順位和検定) (Fig.4)。

ブランチカラー試料調製法の検討では、各手法 30 サンプルずつ供試し、試験を行ったところ、細断処理法で 29 サンプル、無処理法で 30 サンプルが陽性と判定された。また、両手法間で菌濃度に有意な差は認められなかった ($p > 0.05$, Wilcoxon 符号付順位和検定) (Fig.5)。試料調製時間は、細断処理法が平均して約 174 秒を要したのに対し、無処理法では平均約 68 秒であり、葉柄における試料調整時間 (平均約 103 秒) よりも時間を短縮することができた。

Table 3. Comparison of detection rate of Las between branch collars and petioles (symptomatic and asymptomatic).

symptomatic or asymptomatic	Number of cured shoots	part of trees*	Number of positive samples	Detection rate (%)
symptomatic	105	Branch collar	58	55.2
		Petiole	53	50.5
asymptomatic	46	Branch collar	12	26.1
		Petiole	8	17.4
Total	151	Branch collar	70	46.4
		Petiole	61	40.4

McNemar's test ($p > 0.05$) shows no significant differences between branch collars and petioles in symptomatic and asymptomatic samples.

*Branch collars and petioles were collected from the same shoots.

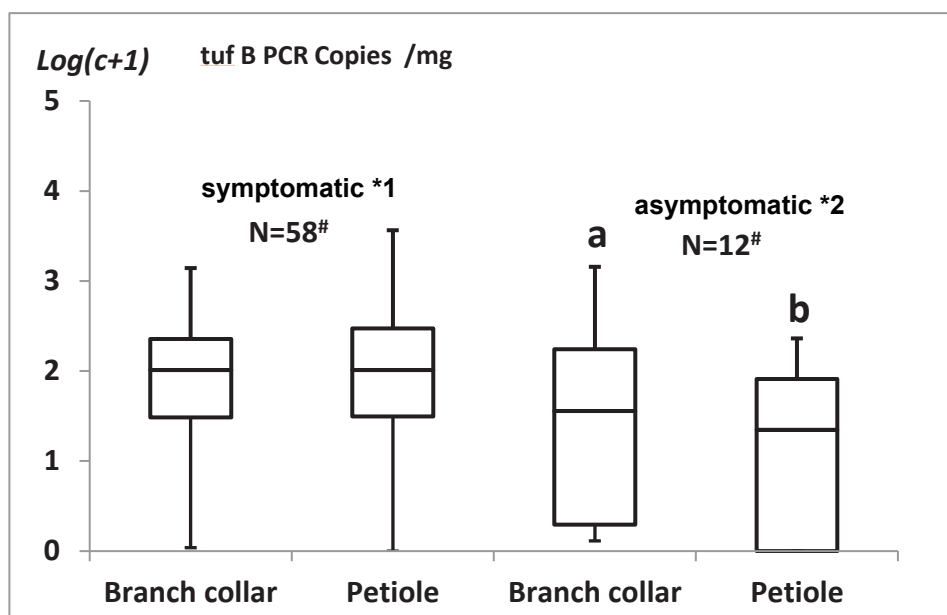


Fig 4. Box plot distribution of Las concentration (symptomatic and asymptomatic).

*1: Wilcoxon signed-rank test ($p > 0.05$) shows no significant differences between branch collars and petioles in symptomatic samples.

*2: Values with different letters (a, b) are significantly different in asymptomatic ($p < 0.01$, Wilcoxon signed-rank test).

Number of branches that became positive in either branch collars or petioles.

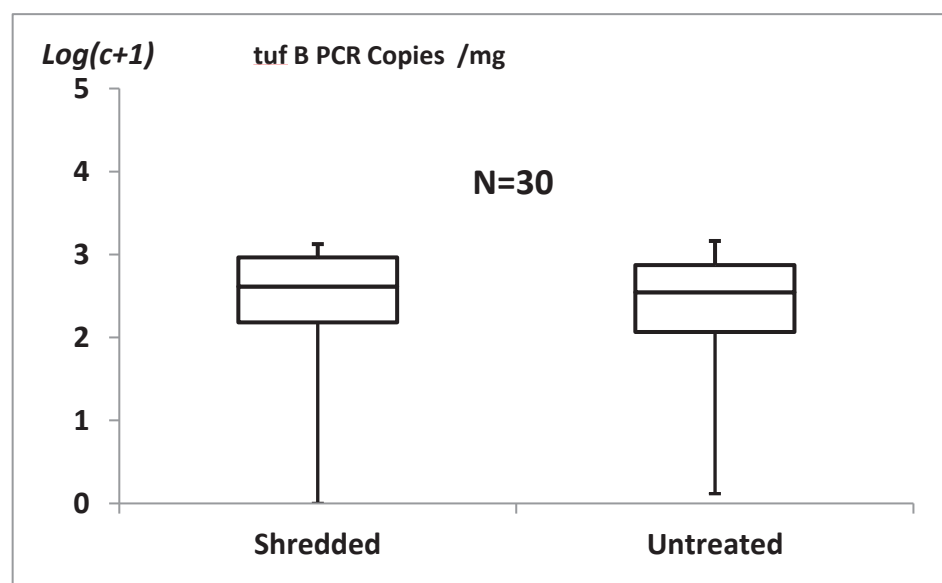


Fig 5. Box plot distribution of Las concentration (shredded branch collars and untreated branch collars).

Wilcoxon signed-rank test ($p > 0.05$) shows no significant differences

between shredded branch collars and untreated branch collars.

考 察

本調査において、Las の検出率は、7月ではブランチカラーが葉柄より有意に高かった。さらに、有意差の無かったその他の月、品種別及び病徴の有無におけるブランチカラーからのLas の検出率は葉柄と同程度以上であった。また、Las の濃度は、

無病徴の場合、ブランチカラーが葉柄より有意に高く、月ごと及び品種ごとでは、両部位は同程度であった。中西ら (2014) の報告によると、ブランチカラー付近の Las の検出率及び濃度が最も高いとのことであるが、本調査においても、ブランチカラーは葉柄と同程度以上の検出率と菌濃度を有していることが示された。特に、無病徴の樹では、ブランチカラーの菌濃度が

葉柄よりも有意に高かった。偽陰性を引き起こすリスクを抑制し、検定の精度を向上させるため、菌濃度の高いブランチカラーを供試することは適切と考える。さらに、試料調製方法として無処理法を導入することで、試料調製時間を現在の約 103 秒から、約 68 秒に抑えることができ、作業の効率化が図られる。

なお、ブランチカラーであっても、採取月、品種に関わらず、100% 検出することはできず、中には、採取した 10 枝全てで陰性となった樹もあった。また、無病徴の新梢と比べると検出率は高かったものの、房安ら (2014) の報告と同様に、Las の病徴と思われた新梢であっても検出されなかった試料も多かった。従って、ブランチカラーを採取する場合においても、病徴の有る新梢を優先的に採取した上で、複数の新梢からまんべんなく採取することが重要と考える。なお、ブランチカラーには、水分、養分等を枝や幹に移動させる役割があるため、ブランチカラーを取り除いた場合、枝の下部が枯れてしまうおそれがあり、幼木や剪定などの管理を適切に行っている樹から採取する際には、極力樹体に影響のないよう注意する必要がある。一方、ブランチカラーには、台風等の影響により落葉した樹であっても採取できるという利点もある。

以上のことから、ブランチカラーの方が供試部位として適しており、今後 HLB 発生調査を行う際には、上述の点に注意しつつ、ブランチカラーを積極的に採取するべきと考える。ただし、ブランチカラーを採取しても感染樹を見落とす可能性があるため、今後も供試部位についての調査を進め、新たな知見が得られた際は、HLB 発生調査に活用できるか検討するべきと考える。

謝 辞

最後に本調査を遂行するに当たり、ブランチカラーの採取法などご指導頂いた鹿児島県農政部農業開発総合センター大島支場主任研究員尾川宜広氏、日頃より本病菌の防除に関して多大なるご尽力を頂いている鹿児島県大島支庁農政普及課特殊病害虫係の職員各位及びサンプル採取にご協力いただいた鹿児島県大島郡和泊町役場及び知名町役場の職員各位に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 芦原亘 (2006) カンキツグリーニング病と媒介昆虫ミカンキジラミの分布と研究の現状. 植物防疫 **60**: 291-294.
- da Graca, J.V. (1991) Citrus greening disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **29**: 109-136.
- 房安聡司・秀島和幸・永喜大士・藤田武利・松浦貴之 (2014) 奄美群島におけるカンキツグリーニング病罹病葉の病徴型による病徴診断の検討. 植防研報 **50**: 83-88.
- 濱島朗子・橋元祥一・永松講二・牟田辰朗 (2003) 鹿児島県におけるカンキツグリーニング病の初発生. 日植病報 **69**: 307-308 (講要).
- 堀江宏彰・都外川総明 (2014) 奄美諸島におけるカンキツグ

- リーニング病の発生調査 (第 3 報 第 2 期調査後の感染樹発生の推移). 九病虫研会報 **60**: 37-42.
- 岩波徹・上地奈美・河野伸二 (2009) カンキツグリーニング病に感染したシークワーシャー樹体内における PCR 検出率の季節変動. 九病虫研会報 **55**: 68-75.
- 河野伸二・蘇鴻基・上原勝江 (1997) 沖縄本島におけるカンキツグリーニング病の初発生. 日植病報 **63**: 256 (講要).
- 松浦貴之・藤原裕治・齊藤範彦・吉岡潤治・秀島和幸 (2012) カンキツグリーニング病菌調査に利用する 2 種のリアルタイム PCR 法の比較. 植防研報 **48**: 1-6.
- Miyakawa, T. and K. Tsuno (1989) Occurrence of Citrus Greening Disease in the southern islands of Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* **55**: 667-670.
- 内藤孝・田場聡・豊里哲也・河野伸二・高江洲和子・上原勝江 (2001) カンキツグリーニング病の PCR による検定法と沖縄地域における発生分布. 沖縄県農業試験場研究報告 **23**: 74-81.
- 中西善裕・嶺崎研・宮路克彦 (2014) カンキツ樹のブランチカラーからのカンキツグリーニング病原細菌高精度検出. 日植病報 **80**: 25 (講要).
- 農林水産省門司植物防疫所 (2012) 喜界島におけるカンキツグリーニング病の緊急防除と根絶. 植物防疫 **66**: 348-349.
- 奥田充・河野伸二・澤岬哲也・岩波徹 (2009) 低濃度に感染した野外試料から *Candidatus Liberibacter asiaticus* を検出する場合における遺伝子増幅法による陽性率の違い. 九病虫研会報 **55**: 62-67.
- 篠原和孝・湯田達也・倉本周代・濱島朗子・橋元祥一・時村金愛・佐藤哲二 (2006) 奄美諸島におけるカンキツグリーニング病の発生調査 (第 1 報 奄美諸島における分布の特徴). 九病虫研会報 **52**: 6-10.
- Teixeira D.C., C. Saillard, C. Couture, E.C. Martins, N.A. Wulff, S. Eveillard-Jagoueix, P.T. Yamamoto, A.J. Ayres and J.M. Bove (2008) Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of Huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. *Mol. Cell. Probes.* **22**: 139-150.
- Texeria, D.C., J. Ayres, E.W. Kitajima, F.A.O. Tanaka, L. Danet, S. Jagoueix, C. Saillard and J.M. Bove (2005) First report of a Huanglongbing-like disease of citrus Sao Paulo State, Brasil and Association of a New *Liberibacter* Species, "*Candidatus Liberibacter americanus*", with the Disease. *Plant Dis.* **89**: 107. (Abstr.)
- 都外川総明・堀江宏彰・篠原和孝・湯田達也 (2010) 奄美諸島におけるカンキツグリーニング病の発生調査 (第 2 報 第 1 期調査後の感染樹発生の推移). 九病虫研会報 **56**: 20-26.