

リアルタイム PCR 法及び DNA 抽出キットを使用したキウイフルーツ花粉からの キウイフルーツかいよう病菌 biovar 3 の検出法の検討

高井 裕一郎・上松 寛・松浦 貴之

横浜植物防疫所調査研究部

Consideration of Real-time PCR and DNA Extraction Kit to detect *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3 from Kiwifruit Pollen. Yuichiro Takai, Hiroshi Uematsu and Takayuki Matsuura (Research Division, Yokohama Plant Protection Station, 1-16-10, Shin-yamashita, Naka-Ku, Yokohama, 231-0801 Japan). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan*. 58: 15-18 (2022).

Abstract: Establishing a means of detecting *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3 (Psa3) from kiwifruit pollen is important to prevent transmission by contaminated pollen. To develop easy methods for detecting Psa3 from pollen, a DNA extraction kit and real-time PCR using three primer sets, Psa F1/R2 (Rees-George et al, 2011), Psa_A1 F2/R1 and Psa_Z5 F2/R2 (Andersen et al., 2018) were investigated. The reaction conditions of three primer sets were modified from different conditions to those that were identical to test with one machine at the same time. Psa3 were detected correctly in all primer sets, even under modified condition. Next, sample DNA extracted from Psa3-contaminated pollen by an extraction kit were tested by a real-time PCR used in three primer sets. Psa3 was detected and its sensitivities were 10^3 cfu (Psa F1/R2 and Psa_Z5 F2/R2) and 10^4 cfu (Psa_A1 F2/R1).

Key Words: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3, real-time PCR, DNA extraction kit, kiwifruit, pollen

緒 言

キウイフルーツかいよう病は *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) を病原菌とする細菌病で、キウイフルーツの枝にかいよう症状、葉に斑点症状等が発生する（澤田・藤川、2019）。Psa には多様性解析に基づいて 5 つの生理型 (biovar 1, 2, 3, 5, 6) に類別されており、biovar 3 は特に病原性が強いとされている（澤田・藤川、2019）。そのため、Psa biovar 3 (Psa3) が国内で初めて発見されて以降、我が国では本菌の蔓延を防止するために定めた防除マニュアルに沿って防除を行っている（農林水産省、2018）。また、本菌の侵入を警戒し、発生国から輸入する栽培用の宿主植物の生植物に対しては、輸出国での遺伝子診断や無発生生産園地からの輸出を求めている。

本菌は風雨や接ぎ木で伝搬する他、汚染花粉による伝染の可能性も示唆されている（農林水産省、2020）。花粉からの検定には、ろ過装置で Psa3 をメンブレン上に集菌し、メンブレン洗浄液を遺伝子検定用鋳型として調製し、コンベンショナル PCR で検定する方法がある（農林水産省、2018）。この方法による調製では、ろ過装置が消耗品ではなく検体毎に洗浄が必要であり、多検体の検出には適さないが、Gallelli *et al.* (2011) は

花粉からの DNA 抽出にキットを用いて調製する方法を報告しており、この方法を用いれば検体毎の洗浄が不要で、問題を解消することができる。また、コンベンショナル PCR は反応後に電気泳動を行う必要があり煩雑な面があるが、リアルタイム PCR では電気泳動は不要である。Rees-George *et al.* (2010) は Psa3 を含む Psa 全ての biovar を検出するプライマーセット (Psa F1/R2)、Andersen *et al.* (2018) は Psa3 を特異的に検出するプライマーセット (Psa_A1 F2/R1 and Psa_Z5 F2/R2) を報告している。本試験では検定の簡易化を目指し、既報では反応条件が異なる複数のプライマーを同一の条件で同時に反応させた場合の性能確認として、プライマーの特異性調査を行った。次に DNA 抽出キットで調製した鋳型を用いたリアルタイム PCR による Psa3 の検出の可否及びその性能を調査した。

材料及び方法

1. 供試菌株

国内で分離された菌株及び農林水産大臣の許可を受けて輸入した菌株で、Psa の biovar 1 (Psa1): 24 株、biovar 2 (Psa2): 1 株、biovar 3: 30 株、biovar 5 (Psa5): 1 株、biovar 6 (Psa6): 1 菌株、及び

Psa 以外の植物病原細菌 23 株を供試した (Table 1)。ジャガイモ半合成寒天培地 (ジャガイモ塊茎 300g の煎汁、ペプトン 5g、スクロース 15g、硝酸カルシウム四水和物 0.5g、リン酸水素二ナトリウム 12 水和物 2g、寒天 16g、蒸留水 1L) で 27℃、24～48 時間培養したものをを用いた。特異性試験には全ての菌株、花

粉からの検出には非汚染花粉に添加する菌株として YPPS1414 (Psa3) をを用いた。リアルタイム PCR の鋳型として、菌体を滅菌水に懸濁して吸光度 O.D.610=0.1 に調製した細菌懸濁液を 95℃ で 10 分間熱処理を行い、氷水で急冷したものをを用いた。

Table 1 Bacteria strains tested in this study.

Bacteria	strain*	origin
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> biovar 1	YPPS1239, YPPS1241, YPPS1244, YPPS1245, YPPS1246, YPPS1247, YPPS1250, YPPS1251, YPPS1262, YPPS1263, YPPS1264, YPPS1373, YPPS1409, YPPS1410, YPPS1411, YPPS1412, YPPS1416, YPPS1417, YPPS1421, YPPS1422, YPPS1423, YPPS1459, YPPS1460, YPPS1461	Japan
<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> biovar 2	ICMP19072	Korea
<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> biovar 3	YPPS1235, YPPS1236, YPPS1237, YPPS1238, YPPS1240, YPPS1242, YPPS1243, YPPS1248, YPPS1249, YPPS1252, YPPS1253, YPPS1254, YPPS1255, YPPS1256, YPPS1257, YPPS1258, YPPS1259, YPPS1260, YPPS1261, YPPS1374, YPPS1375, YPPS1376, YPPS1413, YPPS1414, YPPS1415, YPPS1418, YPPS1419, YPPS1420	Japan
	ICMP18744	Italy
	ICMP19072	Chile
<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> biovar 5	YPPS1278	Japan
<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> biovar 6	YPPS1388	Japan
<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidifoliorum</i>	ICMP18807	New Zealand
<i>P. cichorii</i>	YPPS239	Japan
<i>P. marginalis</i> pv. <i>marginalis</i>	YPPS77	Japan
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	YPPS1566	Japan
<i>P. syringae</i> pv. <i>cerasicola</i>	YPPS1547	Japan
<i>P. syringae</i> pv. <i>coriandoricola</i>	YPPS1531	Japan
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	YPPS81	Japan
<i>P. syringae</i> pv. <i>mori</i>	YPPS1699	Japan
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	YPPS529	Japan
<i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i>	YPPS471	Japan
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	YPPS943	Japan
<i>P. viridiflava</i>	YPPS78	Japan
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	YPPS648	Japan
<i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	ATCC29625	USA
<i>Burkholderia caryophylli</i>	MAFF302797	Japan
<i>B. gladioli</i> pv. <i>gladili</i>	YPPS254	Japan
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	YPPS33	Japan
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>oortii</i>	YPPS30	Japan
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	YPPS1650	Japan
<i>Pectobacterium cypripedii</i>	ATCC29267	USA
<i>Ralstonia solanacearum</i>	YPPS1660	Japan
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	YPPS196	Japan
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	YPPS313	Japan

* ATCC: American Type Culture Collection, YPPS: Yokohama Plant Protection Station, ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants, MAFF: Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries

2. リアルタイム PCR

Table 2 に記載した 3 種類のプライマーセットをリアルタイム PCR に供試した。PCR の反応液は 1×PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems)、400nM Forward primer 及び Reverse primer、鋳型 DNA 2µl (トータル 10µl) とし、反応容器は MicroAmp 8-Cap Strip、リアルタイム PCR 装置は QuantStudio 3 (Applied Biosystems) を用いた。1 台の機械で反応を完結させる及び増幅曲線の立ち上がりを早くするために Andersen *et al.* (2018)

の反応条件を変更し、50℃ 2分、95℃ 2分の後、95℃ 15秒及び 66℃ 45秒を 1 サイクルとする反応を 40 サイクル行った。Ct 値 (Threshold Cycle) を測定するための Threshold 値は機器のソフトウェアの自動設定とした。融解曲線分析では 95℃ 15秒の処理の後、60℃ から 95℃ まで 1.6℃ / second の比率で温度を上昇させ、Tm (Melting temperature) 値を測定した。特異性試験は 1 点で 2 反復実施し、花粉からの検出では 2 点並行で実施した。

Table 2 Primer list tested in this study.

Primer	Sequence (5'-3')	Product size (bp)	Tm of amplicon (°C)*	Reference
PsaF1	TTTTGCTTTGCACACCCGATTTT	280	88.0 ~ 88.2	Rees-George <i>et al.</i> (2010)
PsaR2	CACGCACCCCTTCAATCAGGATG			
Psa_A1 F2	GCCTCGATGTCGGCGC	132	85.0	Andersen <i>et al.</i> (2018)
Psa_A1 R1	ATTCGATAGAAGAACTTCTTTGCGTTT			
Psa_Z5 F2	ACAACCTTCAGGCTACAATACTTACGC	102	80.6	
Psa_Z5 R2	CTCAGGATGCGTTTCGGTTAC			

*Andersen *et al.* (2018)

3. キウイフルーツ花粉からの DNA 抽出及びリアルタイム PCR による Psa3 の検出

DNA 抽出キットは MagExtractor Plant genome (東洋紡) を用いた。50ml チューブに Psa3 に汚染されていないキウイフルーツ花粉 1.5g、生理食塩水 13ml 及び YPPS1414 株を用いて約 1.0×10^8 cfu/ml に調製した細菌懸濁液 100µl を添加し、室温、150rpm、60 分間振とうした。室温、500rpm、5 分間で遠心分離を行い、上清 8ml を 4 本の 2ml チューブに分注した。室温、10000rpm、10 分間で遠心分離を行い、上清を捨て、各チューブに 40µl の滅菌水を添加し、ボルテックスで攪拌した。各懸濁液を 1.5ml チューブに集め、懸濁液にキット付属の溶解液 300µl を添加し、それ以降の手順はキット添付のプロトコルに従った。得られた抽出液の一部を、Psa3 陰性花粉から同様に DNA を抽出した液 (陰性花粉抽出液) を用いて 10 倍ずつ段階希釈を行い、 1.0×10^7 cfu ~ 1.0×10^2 cfu の Psa3 汚染花粉抽出液を得た。Table 2 のプライマーセットを用いて、2 点並行でリアルタイム PCR を行い、各プライマーセットの検出感度を調査した。陰性コントロールには水と陰性花粉抽出液、陽性コントロールには Psa3 の細菌懸濁液を用いた。

結果及び考察

Psa F1/R2 のプライマーセットでは、供試した Psa の 5 つの生理型全ての菌株で増幅が確認され、Ct 値は 16 前後であった。P. syringae pv. actinidifoliorum (Psaf) を除く Psa 以外の菌株では増幅は確認されなかった。Psaf では立ち上がりが遅く、Ct 値が 36 であったものの増幅が確認された。なお、Psaf は Psa の bivar 4 から独立した新 pathovar (Cunty *et al.*, 2015) で、同プライマーを用いたコンベンショナル PCR にて検出されること (澤田ら、2017) が報告されている。

Psa_A1 F2/R1 のプライマーセットでは、Psa3 は全ての菌株

で増幅が確認され、Ct 値は 18 前後であった。Psa 以外の菌株では増幅は確認されなかった。Psa3 を除く Psa 菌株では、Psa1 で 3 菌株 (YPPS 1244, YPPS 1247, YPPS 1417)、Psa2 で 1 菌株 (ICMP 19072) の増幅が確認されたものの、再現性はなく、Ct 値はそれぞれ、34、35、38、39 で立ち上がりは遅かった。融解曲線分析では 2 菌株 (YPPS 1244, YPPS 1417) 由来の増幅産物の Tm 値は Psa3 の Tm 値と近く (84.5℃)、他の 2 菌株 (YPPS 1247, ICMP 19072) 由来の増幅産物の Tm 値は異なった (80.5℃、77.1℃)。このように、Psa1 または 2 の 4 菌株で増幅が確認され、その内 2 菌株では Psa3 と近い Tm 値を示したものの、増幅反応に再現性はなく、これらの反応は非特異反応であると判断した。

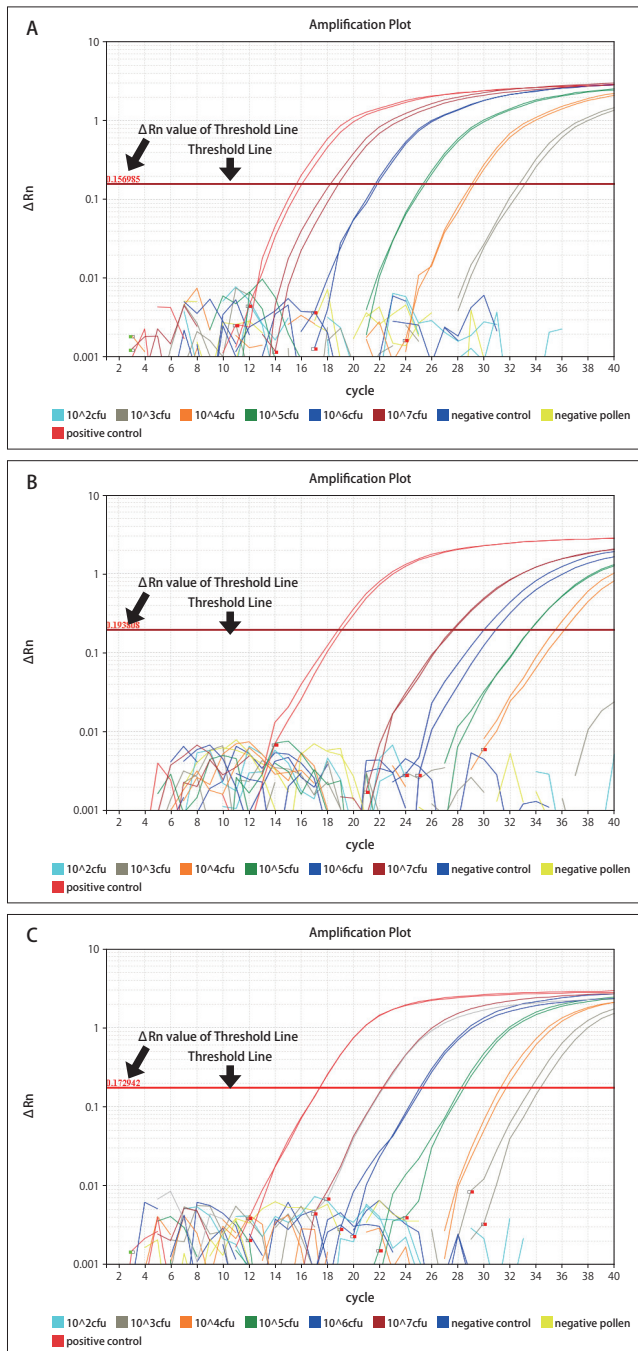
Psa_Z5 F2/R2 のプライマーセットでは Psa3 のみで増幅が確認された。

以上、リアルタイム PCR の反応条件を既報の条件から変更した結果、Psa F1/R2 のプライマーセットは Psaf に弱く反応したものの、Psa に対して特異性が高いことが示された。また、Psa3 特異的な Psa_A1 F2/R1 及び Psa_Z5 F2/R2 のプライマーセットにおいて、Psa_A1 F2/R1 は Psa3 以外の他の biovar 4 菌株に対して非特異反応を示し、Psa_Z5 F2/R2 は非特異反応が無かったことから、本試験の範囲においては Psa_Z5 F2/R2 の方が Psa_A1 F2/R1 より特異性が高いことが示された。ただし、Psa_A1 F2/R1 の非特異反応も実用上の問題はないと考えられた。

花粉からの検出では、すべてのプライマーセットで検出され、Psa3 を添加していない試験区では陰性だった。Psa F1/R2、Psa_A1 F2/R1 及び Psa_Z5 F2/R2 の各プライマーセットの検出感度はそれぞれ、約 1×10^3 cfu、 1×10^4 cfu 及び 1×10^3 cfu だった (Fig 1)。自然汚染花粉中の Psa3 の濃度は 1g あたり 10^4 cfu 程度だと報告されている (Everett *et al.*, 2015, Ministry for Primary Industries New Zealand Government, 2011)。本試験で検討した検出方法の検出限界は 1.5g あたり約 1×10^3 cfu、 1×10^4 cfu であっ

たことから、各プライマーセットの感度は十分であると考えられる。

以上、本試験ではキウイフルーツ花粉からの *Psa3* の簡易的検出法として、市販のキットで抽出した DNA をリアルタイム PCR で検出する方法の検証を行った結果、当該方法によって *Psa3* を検出できることが確認できた。本方法により、現行の花粉の検定の内、労力と時間がかかるろ過装置の洗浄及び電気泳動が必要なくなり、省力化することができる。また、花粉からの生菌分離方法（農林水産省、2018）においても本手法は有効であると考えられる。



A~C: The result of realtime PCR of each the primer set.
A: Psa F1/R2 B: Psa_A1 F2/R1 C: Psa_Z5 F2/R2

Fig.1 Amplification plot of Realtime PCR to detect *Psa3* from extracted DNA for *Psa3*-contaminated pollen.

謝 辞

本試験を行うにあたり、DNA 抽出キットを用いた花粉からの検出について情報提供いただいた愛媛県農林水産部農産園芸課の清水伸一博士に感謝申し上げます。

引用文献

- Andersen, M. T., M. D. Templeton, J. Rees-George, J. L. Vanneste, D. A. Cornish, J. Yu, W. Cui, T. J. Braggins, K. Babu, J. F. Mackay and E. H. A. Rikkerink (2018) Highly specific assays to detect isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3 and *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* directly from plant material. *Plant Pathol.* **67**: 1220-1230.
- Cunty, A., F. Poliakkoff, C. Rivoal, S. Cesbron, M. Fischer-Le Saux, C. Lemaire, M. A. Jacques, C. Manceau and J. L. Vanneste (2015). Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) isolated from France and assignment of Psa biovar 4 to a *de novo* pathovar: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* pv. nov. *Plant Pathol.* **64**: 582-596.
- Everett, K.R., M.J. Vergara, I.P.S. Pushparajah (2016). Heat treatments for killing *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on contaminated kiwifruit pollen. *Acta Hort.* **1144**: 385-390. (Abstr.)
- Gallelli, A., S. Talocci, A. L'Aurora, S. Loreti (2011) Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, causal agent of bacterial canker of kiwifruit, from symptomless fruits and twigs, and from pollen. *Phytopathol. Mediterr.* **50**: 462-472.
- Ministry for Primary Industries New Zealand Government (2011) Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* from leaves and pollen collected from symptomatic and asymptomatic *Actinidia chinensis* in Te Puke, Bay of Plenty. (online) available from <<https://kvh.org.nz/vdb/document/91512>>, (accessed 2021-10-12).
- Rees-George, J., J. L. Vanneste, D. A. Cornish, I. P. S. Pushparajah, J. Yu, M. D. Templeton and K. R. Everett (2010) Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* using polymerase chain reaction (PCR) primers based on the 16S-23S rDNA intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions. *Plant Pathol.* **59**: 453-464.
- 澤田宏之・藤川貴史・北宜裕・折原紀子・篠崎毅・清水伸一・中畝良二・瀧川雄一 (2017) マタタビ類斑点細菌病 (新称) の原因菌である *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* の特徴. *日植病報* **83**: 136-150.
- 澤田宏之・藤川貴史 (2019) キウイフルーツかきよう病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*) における遺伝的多様性. *日植病報* **85**: 3-17.
- 農林水産省 (2018) 「キウイフルーツかきよう病の *Psa3* 系統の防除対策マニュアル (暫定版)」の改訂について. (オンライン), 入手先 <<https://www.maff.go.jp/j/syuan/syokubo/gaicyu/siryout2/attach/pdf/index-14.pdf>>, (参照 2021-10-12)
- 農林水産省 (2020) *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3 (キウイフルーツかきよう病菌 *Psa3*) に関する病害虫リスクアナリシス報告書. (オンライン), 入手先 <<https://www.maff.go.jp/j/syuan/keneki/kikaku/attach/pdf/prs-25.pdf>>, (参照 2021-10-12)