

マルチプレックス PCR によるブドウ根頭がんしゅ病菌の罹病ブドウ樹組織からの迅速検出*

川口 章・井上 幸次

A Rapid Detection of Tumorigenic *Agrobacterium vitis* Strains in Infected Tissue of Grapevine by Multiplex PCR

Akira Kawaguchi and Koji Inoue

緒 言

ブドウ根頭がんしゅ病（病原細菌：腫瘍形成性 *Agrobacterium vitis*）は、乳白色から淡褐色で径数 mm の柔らかいこぶを接木部付近の主幹の粗皮下や主枝などの地上部に形成し、時間の経過とともに暗褐色で不整形の大きながんしゅとなり、樹勢の低下や若木の枯死、果実品質の劣化などの被害を起こす病害で、岡山県でも露地および施設栽培のブドウで発生が認められている。病原細菌は土壌中に長く生存して伝染源となること、病原細菌を保菌した苗木の流通によって本病の広域的な伝染が起こることは一般的に知られている (Burr et al., 1998)。本邦産ブドウ根頭がんしゅ病菌は3グループの遺伝子型に類別され、それぞれが日本中に広く分布していることから、我が国においても保菌した苗木の流通によって病原細菌が地理的に拡大している可能性が指摘されている (Kawaguchi et al., 2008)。

本病は地上部にがんしゅという特徴的な症状を呈することから生産者も気づきやすいが、接木部や傷口などに生理的に形成されたカルスとの違いが明瞭でない場合も多く、また、病徴が現れていない保菌樹と健全樹とを区別できないことから、本病の診断には選択培地 (Brisbane and Kerr, 1983 ; Roy and Sasser, 1993) を用いた病原細菌の分離培養が必須である。しかしながら分離および培養、病原性の確認や細菌学的検査には多大な時間と労力がかかるため、迅速な診断の支障となっていた。さらに、選択培地についても確実な選択性に欠け

ており、Roy and Sasser 培地 (Roy and Sasser, 1993) を用いてブドウ樹組織から細菌を分離したところ *A. vitis* だけでなく非病原性 *A. tumefaciens* (= *A. radiobacter* biovar 1)、*Pseudomonas* 属細菌及び *Xanthomonas* 属細菌が *A. vitis* と同じ形状のコロニーを形成した (Kawaguchi et al., 2005b)。そこで、著者らは新たな診断手法の一つとしてブドウ根頭がんしゅ病菌の16S rDNA を標的とした特異的プライマーと、Tiプラスミド (以下、pTi) 上に存在する病原性関連遺伝子の一つである *virC* 領域を標的とした特異的プライマー (澤田ら, 2003) とを組み合わせたマルチプレックス PCR (Polymerase Chain Reaction) 法を開発し、分離された細菌の簡易同定が可能となった (Kawaguchi et al., 2005a, 2005b)。

本報告では、さらに迅速な診断法を開発するため、罹病したブドウ樹組織から DNA を直接抽出する方法 (以下、DNA 直接抽出法) とマルチプレックス PCR 法を組み合わせ、病原細菌の分離作業が不要な検出法の開発を行ったので報告する。なお、近年の分子生物学的手法による系統解析の研究により、*Agrobacterium* 属細菌は *Rhizobium* 属細菌との一体性が高いことがわかり、*Rhizobium* 属に統合すべきとの議論がある (Young et al., 2002) が、本報告では命名上の混乱を避けるため、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd edition, vol.2 (Young et al., 2005) に従い、*Agrobacterium* 属細菌として学名表記した。

本試験にあたり、供試菌株であるブドウ根頭がんしゅ病菌 G-Ag-27株を分譲頂いた独立行政法人農業生物資

* 本報告の一部は 2005 年度日本植物病理学会関西西部会で報告した。

源研究所ジーンバンク澤田宏之博士に厚くお礼申し上げます。

試験方法

1. 供試菌株および罹病樹の作成

ブドウ根頭がんしゅ病菌 G-Ag-27株を脇本処方ジャガイモ半合成寒天培地（以下、脇本寒天培地）で前培養し、滅菌水で約 1×10^8 cells/ml に調整した懸濁液を接種源とした。ブドウは6年生の簡易被覆栽培‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’（以下、アレキ）8樹と、ポット（直径15cm）に定植した1年生（実生）の‘ネオ・マスカット’（以下、ネオマス）23樹を供試した。‘アレキ’2樹と‘ネオマス’15樹の主幹に病原細菌懸濁液を浸した注射針で1樹あたり5~10箇所単刺有傷接種（Sawada et al., 1990；Kawaguchi et al., 2005b, 2007）した。また、別の‘アレキ’2樹の株元に病原細菌懸濁液を1樹あたり3L、同様に‘ネオマス’2樹の株元に1樹あたり500mlを灌注した。‘アレキ’4樹と‘ネオマス’6樹を病原細菌無接種のネガティブコントロールとした。接種3ヶ月後にがんしゅ形成を認めたものについてはがんしゅ組織、主幹組織または接木部組織を、形成を認

めなかったものについては主幹組織または接木部組織を500~1,000mg 削り取り、以下の試験に供試した。

2. 植物組織からの DNA 抽出とマルチプレックス PCR

削り取ったブドウ組織を液体窒素存在下で磨砕し、約100mgの磨砕粉末を得た。DNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN社製）を用いて磨砕粉末から全DNAを抽出、精製し、DNA溶液50 μ lを得た。各DNA溶液1 μ lを鋳型とし、*Agrobacterium*属菌の病原性関連遺伝子 *virC1-virC2* の1部分（414-bp）が増幅される VCF3（5'-GGC GGC CGY GCY GAA AGR AAR ACY T）と VCR3（5'-AAG AAC GYG GNA TGT TGC ATC TYA C）（澤田ら, 2003；Kawaguchi et al., 2005a, 2005b）、*A. vitis* の16S rDNA の1部分（570-bp）が増幅される Ab3-F3（5'-ATG ACG GTA GTC GGA GAA GAA GCC）と Ab3-R4（5'-CTG TCT CTG TGT CCC CGA AAG G）の2組のプライマーセット（Kawaguchi et al., 2005a, 2005b）を供試してサーマルサイクラー（TaKaRa PCR Thermal Cycler MP TP3000, TaKaRa社製）にてPCR（95 $^{\circ}$ C14分30秒を1サイクル、95 $^{\circ}$ C20秒、62 $^{\circ}$ C1分30秒及び72 $^{\circ}$ C1分30秒を33サイクル、72 $^{\circ}$ C10分を1サイクル後

Table 1. Detection of tumorigenic *Agrobacterium vitis* in plant tissues from grapevines using multiplex PCR

Cultivar	Sample	No. of sample	Inoculation of pathogen	Gall formation	Re-isolated inoculum	Positive samples of PCR result
Muscat of Alexandria	Gall	2	2 ^z	2	0	2
Neo Muscat (Seedling)	Gall	15	15 ^z	15	14	15
Muscat of Alexandria	Graft union	2	2 ^y	0	0	2
Neo Muscat (Seedling)	Stem	2	2 ^y	0	0	2
Muscat of Alexandria	Graft union	4	0	0	0	0
Neo Muscat (Seedling)	Stem	6	0	0	0	0

^z Inoculated tumorigenic *A. vitis* strain G-Ag-27 by the needle prick method (Sawada et al., 1990; Kawaguchi et al., 2005b, 2007)

^y Inoculated tumorigenic *A. vitis* strain G-Ag-27 by affusion of cell suspension (10^8 cells/ml)

表1 マルチプレックス PCR によるブドウ樹組織からのブドウ根頭がんしゅ病菌の検出

品 種	部 位	供試樹数	病原細菌接種樹数	発病樹数	接種菌が再分離された樹数	RCR で陽性反応になった樹数
マスカット・オブ・アレキサンドリア	がんしゅ組織	2	2 ^z	2	0	2
ネオ・マスカット (実生)	がんしゅ組織	15	15 ^z	15	14	15
マスカット・オブ・アレキサンドリア	接木部組織	2	2 ^y	0	0	2
ネオ・マスカット (実生)	主幹組織	2	2 ^y	0	0	2
マスカット・オブ・アレキサンドリア	接木部組織	4	0	0	0	0
ネオ・マスカット (実生)	主幹組織	6	0	0	0	0

^z 単刺有傷接種法 (Sawada et al., 1990; Kawaguchi et al., 2005b, 2007) でブドウ根頭がんしゅ病菌 G-Ag-27株を接種した

^y 菌懸濁液 (10^8 cells/ml) の灌注処理によってブドウ根頭がんしゅ病菌 G-Ag-27株を接種した

4℃で保存)を行った。DNAポリメラーゼはQIAGEN Multiplex PCR kit (QIAGEN社製)を供試した。PCR後、各サンプル1μlを3%アガロースゲルで100V、30分程度電気泳動した。

3. 植物組織からの病原細菌の再分離

試験方法1. で得られた組織片の約300mgを70%エタノールで1分間表面殺菌した後、滅菌水5mlを加えて磨砕し、100μlをRoy and Sasserの培地(以下RS培地: Roy and Sasser, 1993)に塗布して30℃で5日間培養後に、コロニー形成の有無を観察した。

結果及び考察

供試したブドウ組織片のうち、ブドウ根頭がんしゅ病菌を地上部に単刺有傷接種した‘アレキ’2樹と‘ネオマス’15樹、株元に灌注接種した‘アレキ’及び‘ネオマス’各2樹ではマルチプレックスPCRにより570-bpと414-bpのバンドの増幅が確認されたが、病原細菌無接種の‘アレキ’4樹と‘ネオマス’6樹からはバンドは検出されなかった(Table 1, Fig. 1)。病原細菌を接種したが(Table 1, Fig. 1)がんしゅ形成がなかった‘アレキ’と‘ネオマス’各2樹の主幹または接木部組織にお

いてもマルチプレックスPCRで陽性を示したことから、本手法によってブドウ根頭がんしゅ病菌を保菌した樹からでも病原細菌を検出できる可能性が示唆された。一方、病原細菌を接種した全21樹のうち、RS培地で再分離されたのはがんしゅ組織を供試した‘ネオマス’の14樹であり、残りの7樹からは再分離されなかった(Table 1)。しかしながら、本手法では再分離できなかった7樹の試料においても陽性となったことから、本手法の検出感度は選択培地による分離培養法と比較してより高いと思われる(Table 1)。一般的に根頭がんしゅ病菌は自らがpTiに存在するT-DNAと呼ばれるDNA断片を植物細胞に注入して細胞を形質転換により腫瘍化させるが、腫瘍細胞からは*Agrobacterium*属細菌が資化できるオパインと総称される特殊なアミノ酸が分泌され、根頭がんしゅ病菌はオパインを栄養源として増殖する(Zupan et al., 2000)。本報告ではがんしゅ組織からのみ病原細菌が再分離されたが、‘アレキ’2樹と‘ネオマス’1樹ではがんしゅ組織を供試したにもかかわらず再分離されなかった。これは、これら3樹の生育が旺盛でなく、形成されたがんしゅ自体も小さかったことから、がんしゅ組織に含まれるオパインの量が十分でなく、病原細菌の増殖量が少なかった可能性が考えられた。

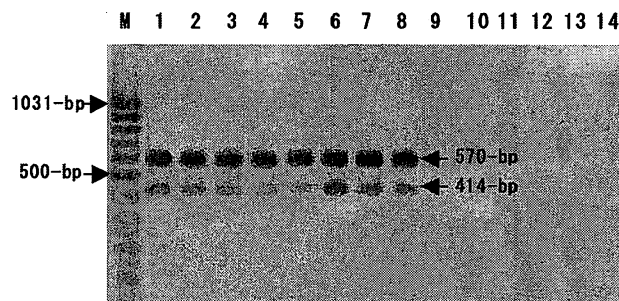


Fig. 1. Amplification products obtained by multiplex PCR separated by agarose (3%) gel electrophoresis.

Lanes: M, 50-bp DNA ladder; 1 to 5, galls from grapevine seedling cv. Neo Muscat inoculated pathogen by needle pick method; 6, galls from grapevine plant cv. Muscat of Alexandria inoculated pathogen by needle pick method; 7 to 8, graft unions from grapevine plant cv; Muscat of Alexandria inoculated pathogen by affusion of cell suspension; 9 to 12, stems from grapevine seedling cv. Neo Muscat no-inoculated as negative control; 13 to 14, graft unions from grapevine plant cv; Muscat of Alexandria no-inoculated as negative control. The expected positions of the 570-bp and 414-bp fragments are shown.

図1 マルチプレックスPCRによる増幅産物の3%アガロースゲル電気泳動写真。

レーン: M, 50-bp DNA ラダーマーカー; 1~5, ネオ・マスカット(実生)に病原細菌を単刺有傷接種して形成されたがんしゅ組織; 6, マスカット・オブ・アレキサンドリアに病原細菌を接種して形成されたがんしゅ組織; 7~8, 根に病原細菌懸濁液を灌注したマスカット・オブ・アレキサンドリアの接木部組織; 9~12, 病原細菌を接種していないネオ・マスカット(実生)の主幹組織; 13~14, 病原細菌を接種していないマスカット・オブ・アレキサンドリアの接木部組織。

以上のように、ブドウ樹の組織片からのDNA直接抽出とマルチプレックスPCRを組み合わせた本手法は病原細菌を接種した樹の組織片の全てから病原細菌を検出することができた。また、本手法は本病原細菌の再分離ができなかったサンプルにおいても病原細菌の遺伝子断片を検出できたことから、本病の迅速な診断に有効であると考えられる。

本報告ではがんしゅ組織を主に供試したが、実際の診断場面では、地上部または根のがんしゅ様の組織を用いて本手法による診断が可能と考えられる。しかし、苗木生産用の母樹などの症状が現れていない樹の保菌検査では、いつの時期のどの部位に菌が局在しているかを明らかにした上で、供試試料の採集方法について検討する必要がある。ブドウ根頭がんしゅ病菌は植物細胞に侵入する際、外傷や凍害による細胞の損傷が侵入経路となるとされていることや (Burr et al., 1998), 接木部付近にがんしゅの形成が見られることが比較的多いことから、症状がない樹ではまず接木部の組織を供試することが考えられる。さらに発病樹では、春先に剪定痕から滲出してくる樹液から本病原細菌が検出されることがあり (Burr and Katz, 1983; Lehoczy, 1971; 山本ら, 1994), これは冬期間に密度が下がった病原細菌が春になって発病部で増殖し、樹液の移動とともに樹全体へ移動したためと考えられていることから (Burr and Katz, 1983; Lehoczy, 1971; 山本ら, 1994), 発病樹や保菌樹の樹液からの本手法による検出についても検討する必要がある。

ブドウ根頭がんしゅ病に対しては現在のところ治療的な対策がないため、生育不良や枯死に至った場合には改植する必要があるが、本病は土壌伝染性であることから新しい苗木を発病樹があった場所に定植することは避けなければならない。その際、土壌での病原細菌の有無を調べるために、土壌中に存在する微生物のDNAを土壌から直接抽出し本研究で用いたマルチプレックスPCRを行う方法を今後検討する必要がある。しかし、土壌中には未知の微生物が非常に多く含まれることから、より検出精度の高いプライマーやプローブの設計、PCRの反応条件の再検討等が必要となることが予想される。これらについては今後の課題である。

摘 要

ブドウ根頭がんしゅ病菌の検出には、これまで選択培地が利用されてきたが、確実な選択性に欠けることや、病原細菌の分離および培養、病原性の確認や細菌学的検査には多大な時間と労力がかかるため、迅速な診断の支

障となっていた。そこで、本病原細菌の分離作業を行うことなく、植物組織からDNAを抽出する方法とマルチプレックスPCR法を組み合わせて、本病原細菌の迅速な検出法の開発を試みた。その結果、本手法はがんしゅ組織および無病徴の保菌樹組織からも病原細菌を検出することができた。また、本手法は本病原細菌の再分離できない場合でも病原細菌の遺伝子断片を検出できたことから、本手法は本病の迅速な診断に有効であると考えられる。

引用文献

- Brisbane, P. G. and A. Kerr (1983) Selective media for three biovars of *Agrobacterium*. J. Appl. Bacteriol., 54 : 425-431.
- Burr, T. J. and B. H. Katz (1983) Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 from grapevine galls and sap, and from vineyard soil. Phytopathology, 73 : 163-165
- Burr, T. J., C. Bazzi, S. Süle and L. Otten (1998) Crown gall of grape : Biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. Plant Dis., 82 : 1288-1297.
- Kawaguchi, A., H. Sawada, K. Inoue and H. Nasu (2005a) Multiplex PCR for the identification of *Agrobacterium* biovar 3 strains. J. Gen. Plant Pathol., 71 : 54-59.
- Kawaguchi, A., K. Inoue and H. Nasu (2005b) Inhibition of crown gall formation by *Agrobacterium radiobacter* biovar 3 strains isolated from grapevine. J. Gen. Plant Pathol., 71 : 422-430.
- Kawaguchi, A., K. Inoue and H. Nasu (2007) Biological control of grapevine crown gall by nonpathogenic *Agrobacterium vitis* strain VAR03-1. J. Gen. Plant Pathol., 73 : 133-138.
- Kawaguchi, A., H. Sawada and Y. Ichinose (2008) Phylogenetic and serological analyses reveal genetic diversity of *Agrobacterium vitis* strains in Japan. Plant Pathol., 57 : 747-753.
- Lehoczy, J. (1971) Further evidences concerning the systematic spreading of *Agrobacterium tumefaciens* in the vascular system of grapevines. Vitis, 10 : 215-221.
- Sawada, H., H. Ieki and Y. Takikawa (1990) Identification of grapevine crown gall bacteria isolated in Japan. Ann. Phytopathol. Soc. Japan, 56 : 199-206.

- 澤田宏之・土屋健一 (2003) *Agrobacterium* 属細菌の分類. 日植病報, 69 : 349-365.
- Roy, M. A. and M. Sasser (1983) A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3. *Phytopathology* 73 : 810.
- 山本 淳・広沢敬之 (1994) 島根県におけるブドウ根頭がんしゅ病の発生と伝染経路. 島根県農業試験場研究報告, 28 : 9-19.
- Zupan, J., T. R Muth, O. Draper and P. Zambryski (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants : a feast of fundamental insights. *The Plant Journal*, 23 : 11-28.
- Young, J. M., L. D. Kuykendall, E. Martínez-Romero, A. Kerr and H Sawada (2001) A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations : *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int. J Syst. Evol. Microbiol.* 51 : 89-103.
- Young J. M., A. Kerr and H. Sawada (2005) Genus II. *Agrobacterium*. In : Garrity GM (ed) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 2. Springer Verlag, New York, pp. 340-345.

Summary

A practical method to identify rapidly both tumorigenic and nonpathogenic *Agrobacterium vitis* at the same time using multiplex PCR with two primer sets (VCF3/VCR3 and Ab3-F3/Ab3-R4) , which had been developed in previous report, needs to be isolated potential pathogenic strain from grapevine which had symptoms of crown gall or even symptomless. However, there is a possibility that the isolation of *A. vitis* during the sampling of grapevine will be fail. In diagnosis for grapevine crown gall, furthermore, a prompter detection method is necessary and requested without accompanying the isolation of pathogen. In this study, a rapid detection method of tumorigenic *A. vitis* using the multiplex PCR and DNA extracted from a tissue of grapevine was developed. It was possible to yield positive results of multiplex PCR from several grapevines whether symptom of crown gall or not, suggesting that this method has high sensitivity.