

## スクロース合成酵素遺伝子を内部コントロールに用いた カンキツグリーンング病の高精度 PCR 診断法

浦崎 直也<sup>1</sup>・上原 司<sup>1</sup>・河野 伸二<sup>1\*</sup>

### ABSTRACT

URASAKI, N<sup>1</sup>., UEHARA, T<sup>1</sup>. and KAWANO, S<sup>1\*</sup>. (2007). Highly reliable polymerase chain reaction assay for citrus huanglongbing (citrus greening disease) using the sucrose synthase gene as an internal control. Jpn. J. Phytopathol. 73: 25-28.

The polymerase chain reaction (PCR) was used with an internal control to exclude false-negative reactions in a citrus huanglongbing (HLB) assay. Degenerated primers, CSSF-1 (5'-GACACTGTTGGWCAGTATGA-3') and CSSR-1 (5'-TCRTACAVTGCAGGTTGCAC-3'), for the internal control were constructed based on the sucrose synthase genes of *Citrus unshiu*, *Medicago sativa*, *Daucus carota*, *Arabidopsis thaliana* and *Phaseolus vulgaris*. Multiplex PCR with the CSS primer and the O11-O12c primer amplified two DNA fragments corresponding to the sucrose synthase gene and the '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' 16S rDNA gene from '*Candidatus L. asiaticus*' infected citrus DNA, respectively. A DNA fragment of the sucrose synthase gene was solely amplified from healthy samples. No amplified fragment was detected in incomplete reactions.

(Received January 11, 2006; Accepted August 2, 2006)

**Key words:** citrus huanglongbing, PCR assay, internal control, sucrose synthase gene

### 緒 言

我が国の南西諸島に発生しているカンキツグリーンング病 (citrus huanglongbing, HLB) は、カンキツ類の重要病害の一つである (Miyakawa and Tsuno, 1989; 渡久地・河野, 1997; 濱島ら, 2003). 本病はミカンキジラミ (*Diaphorina citri*) によって媒介される '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' によって引き起こされる (Jagoueix *et al.*, 1994). 現在, HLB の感染拡大阻止のため, 罹病樹の伐採による防除事業が行われている. HLB の病徴は, カミキリムシによる被害や窒素やマンガン欠乏などの生理障害による症状に酷似しているため (Koen and Langenegger, 1970; Ohtsu *et al.*, 1998), 防除にあたっては '*Candidatus L. asiaticus*' 特異的プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による診断が行われている (渡久地・河野, 1997; 内藤ら, 2001). しかし, 罹病樹体内の '*Candidatus L. asiaticus*' の分布が不均一であることに加え, その菌密度も低いことから, PCR 検定では樹全体からのサンプリングが行われている (Hung *et al.*, 1999; 内藤ら, 2001). そのため, HLB 発生を広域的に調査するには, 大量の試料に対して

PCR 検定を行う必要がある. この場合, サンプルの状態や DNA の精製条件により, DNA が十分抽出されない場合や不純物により PCR 反応が阻害された場合には, HLB 罹病樹であっても HLB 陰性と判定される危険がある. このような誤診を防ぐため, PCR 反応そのものが適正に行われたことを確認できる検定法が求められている. その手法の一つとして, 内部コントロール遺伝子が利用されている. 例えば, 性特異的 DNA マーカーを用いたパパイヤの性識別では, パパイン遺伝子を PCR の内部コントロールとして (Urasaki *et al.*, 2002), またリンゴのウイルス検定においては, ミトコンドリアの *nad5* 遺伝子が RT-PCR の内部コントロールとして利用されている (Menzel *et al.*, 2002). このように, 適切な内部コントロールを設定できれば, 通常の PCR 検定の手順に, 内部コントロールのプライマーを追加するだけで検定結果に基づく診断の信頼性が向上する.

そこで我々は, HLB の PCR 検定における誤診防止のため, スクロース合成酵素遺伝子を内部コントロールに用いたカンキツグリーンング病の高精度 PCR 診断法を開発した. その概要を報告する.

<sup>1</sup> 沖縄県農業研究センター (〒901-0336 沖縄県糸満市真壁820) Okinawa Prefectural Agricultural Research Center 820, Makabe, Itoman, Okinawa 901-0336, Japan

\* Corresponding author (E-mail: kawanosh@pref.okinawa.lg.jp)

## 材料および方法

**DNAの精製** 本研究室で保存しているシイクワシャー (*Citrus depressa*, 品種および系統: 無核, 旭川), ゲッキツ (*Murraya exotica*) およびカラタチ (*Poncirus trifoliata*) ならびに名護支所で保存されているウンシュウミカン (*C. unshiu*, 品種: 興津早生), 市場より購入した果実ヒュウガナツ (*C. tamurana*), ポンカン (*C. reticulata*), ダイダイ (*C. aurantium*), ライム (*C. aurantifolia*), レモン (*C. limon*), イヨカン (*C. iyo*), ハッサク (*C. hassaku*), ユズ (*C. junos*), シラヌイ (*C. unshiu* × *reticulata*) およびスダチ (*C. sudachi*) を供試した. DNAの抽出にはCTAB法 (Murray and Thompson, 1980) を用い, 購入果実は果皮から, その他の品種は葉からDNAを抽出した.

**内部コントロール増幅用プライマーの設計** 全塩基配列が明らかとなっているウンシュウミカンのスクロース合成酵素遺伝子 (*CitSUS1-2*, DDBJ/EMBL/GenBank accession

No. AB029401, Komatsu *et al.*, 2002) を内部コントロールとした. また, 内部コントロールがミカン科植物全般から増幅されるようにするため, プログラム Clustal W を用いてムラサキウマゴヤシ (AF049487), ニンジン (X75332), シロイヌナズナ (X70990), インゲンマメ (AF315375) のスクロース合成酵素遺伝子の多重整列を行い, 保存領域2か所から, ディジェネレートプライマー CSSF-1 (5'-GACACTGTTGGWCAGTATGA-3') および CSSR-1 (5'-TCRTACAVTGCAGGTTGCAC-3') を設計した. 両プライマーにより 662 bp のスクロース合成酵素の部分配列が増幅される (Fig. 1).

**PCR** PCRは, 市販酵素 (*TaKaRa Ex Taq*, タカラバイオ, 東京) を用いた. '*Candidatus L. asiaticus*' 特異的プライマーは, Jagoueix *et al.* (1994) による O11 と O12c を用いた. スクロース合成酵素遺伝子および '*Candidatus L. asiaticus*' の 16S rDNA の同時増幅には, CSSF-1 と CSSR-1 を 0.5 μM, O11 と O12c を 1.0 μM の濃度で混合,

## A) Multiple alignment of sucrose synthase genes

Forward primer: CSSF-1

```

CitSUS1-2      2324 TACTTTCTATAATTTTCAGTAAGGACACTGTTGGTCAGTATGAGAGTCACACTGCTTTTCAC 2383
ATSUS1        GCTTTACTCATTTTGCAGCAAGAAAGAACTGTTGGGCAGTATGAAAGCCACACGGCCTTTAC
MSSUS        -----AGGATAAGGTTGGACAGTATGAGAGTCACACTGCCTTTAC
PVSUS        -----AGGACACTGTTGGACAGTATGAGTCTCACACAGCTTTTCAC
DCRNASS      -----AGGATACTGTTGGACAGTATGAGAGTCATACTGCCTTTAC
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                CSSF-1
  
```

Reverse primer: CSSR-1

```

CitSUS1-2      2984 TTTTGTGCAACCTGCACTGTATGAGGCCTTTGGCTTGACTGTTGTTGAGGCCATGACCTG 3043
ATSUS1        TTTTGTGCAACCTGCATTGTATGAAGCCTTTGGTTGACTGTTGTTGAGGCCATGACCTG
MSSUS        TTTTGTGCAACCTGCCGTGTACGAAGCTTTGGTTGACTGTTGTTGAGGCCATGACCTG
PVSUS        CTTTGTGCAACCTGCAGTGTATGAGGCATTTGGTTGACTGTTGTTGAGGCCATGACTTG
DCRNASS      TTTTGTGCAACCTGCATTCTACGAGGCTTTGGTTTAACTGTTGTTGAGGCCATGACCTG
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                CSSR-1
  
```

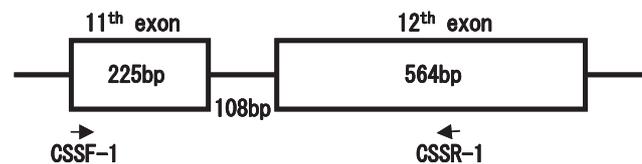
B) CSSF-1 and CSSR-1 positions in exon/intron structure of *CitSUS1-2*

Fig. 1. Multiple alignment A) and physical map B) of the sucrose synthase genes used as an internal control for PCR. Positions of primers are indicated by arrows. *CitSUS1-2* (*Citrus unshiu*, AB029401), *ATSUS1* (*Arabidopsis thaliana*, X70990), *MSSUS* (*Medicago sativa*, AF049487), *PVSUS* (*Phaseolus vulgaris*, AF315375) and *DCRNASS* (*Daucus carota*, X75332) were obtained from DDBJ/EMBL/GenBank databases. Asterisks indicate nucleotide residues that are conserved among the five sucrose synthase genes. Exons and introns are drawn as boxes and lines, respectively.

単独増幅の場合は 1.0  $\mu\text{M}$  で PCR を行った. 検出感度は, HLB 罹病樹の中肋 (0.1 g) から抽出・精製した DNA 溶液を原液とし, 滅菌蒸留水で 5 倍ずつ段階希釈した試料を用いて, 16S rDNA とスクロース合成酵素遺伝子の単独および同時増幅実験により評価した. 温度条件は, 92°C で 2 分間熱変性させた後, 熱変性 92°C, 1 分間, アニール 60°C, 1 分間, 伸長反応 72°C, 1 分間を 1 サイクルとして 40 サイクル行い, 続いて 72°C で 5 分間の伸長反応を行った. 反応終了後の試料は, 電気泳動を行うまでの間 4°C で保存した. 電気泳動は, 1.5% アガロースゲルを用いて, 100 V で 30 分間行い, 泳動終了後, 臭化エチジウムで染色し, 紫外線下 (354 nm) でバンドの有無とその位置で判定した.

結果および考察

供試材料より抽出した DNA を鋳型とし, CSSF-1 と CSSR-1 を用いて PCR を行った. その結果, 供試全品種より, 期待される大きさである 662 bp のスクロース合成酵素遺伝子断片が増幅された (Fig. 2). 同様に, HLB 罹病樹から抽出した DNA を鋳型とし, ‘*Candidatus L. asiaticus*’ 16S rDNA 増幅用プライマー (O11 と O12c) を用いて PCR を行った結果, HLB 感染に特異的な 1160 bp の DNA 断片が増幅された. 両プライマーを同一チューブに混合し, PCR を行った結果, それぞれの DNA 断片が増幅された (Fig. 2).

検出感度を評価するため, HLB 罹病樹の中肋 (0.1 g) から抽出・精製した DNA 溶液を原液 (225 ng/ $\mu\text{l}$ ) とし, 滅菌蒸留水で 5 倍ずつ段階希釈した試料を用いて PCR を行った. 単独増幅の場合, スクロース合成酵素遺伝子 (CSSF-1 と CSSR-1) および ‘*Candidatus L. asiaticus*’ 16S rDNA (O11 と O12c) では, 反応液中のサンプル DNA 濃

度がそれぞれ 0.144 pg/ $\mu\text{l}$  (5<sup>7</sup>倍希釈) および 0.72 pg/ $\mu\text{l}$  (5<sup>6</sup>倍希釈) まで DNA の増幅が認められた (Fig. 3). 一方, 同時増幅では, 3.6 pg/ $\mu\text{l}$  (5<sup>5</sup>倍希釈) までバンドの増幅が認められた. 同時増幅では, 単独増幅と比較してやや検出感度が低下したが, HLB 発生を調査する際には原液を用いて検定を行っているため, HLB の大量検定における罹病樹判定に実用上の影響はないと考えられる. しかし, 各地の圃場や民地のカンキツ類から採集される大量の試料には, 葉の黄化などの HLB 類似症状に加え, ほとんど枯死したものの, 病害虫被害でひどく汚れたものなどが多数含まれており, 大量検定においてそれらをすべて取り除くのは困難である. このため, これまでの O11 と O12c プライマーを用いた PCR 検定では, DNA サンプルの状態により発生する誤診を完全に排除できない. そこで, PCR 検定の結果, 遺伝子の増幅が認められず陰性と判断された試料につ

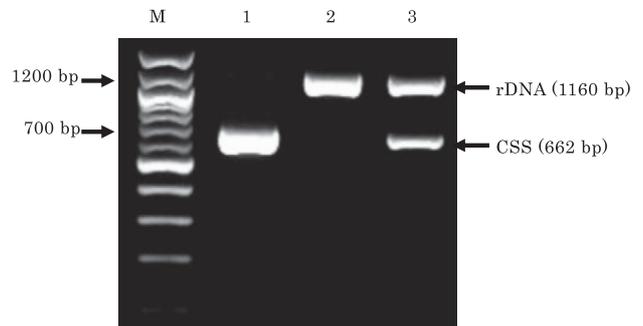


Fig. 2. Simultaneous amplification of ‘*Candidatus L. asiaticus*’ 16S rDNA (rDNA: 1160 bp) and sucrose synthase gene (CSS: 662 bp) by multiplex PCR. Lane M, 100-bp DNA Ladder (New England BioLabs); lane 1, primer set (1.0  $\mu\text{M}$ ) for sucrose synthase gene (662 bp); lane 2, primer set (1.0  $\mu\text{M}$ ) for ‘*Candidatus L. asiaticus*’ 16S rDNA (1160 bp); lane 3, primer sets for sucrose synthase gene (0.5  $\mu\text{M}$ ) and ‘*Candidatus L. asiaticus*’ 16S rDNA (1.0  $\mu\text{M}$ ).

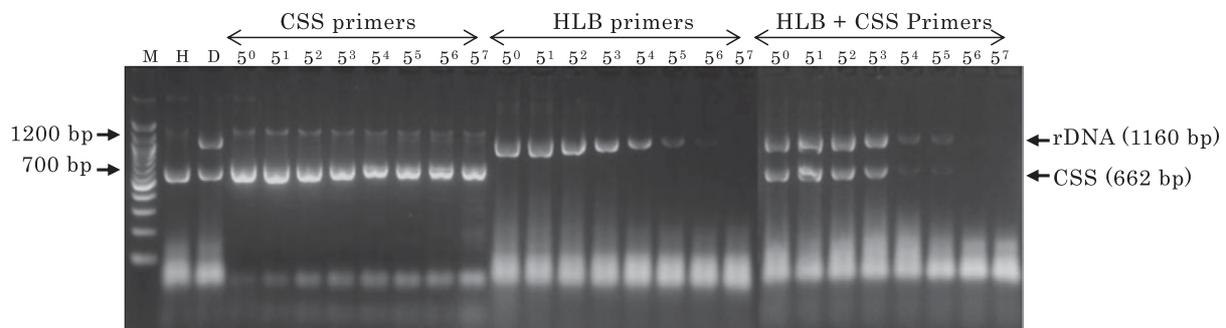


Fig. 3. Dilution endpoint of simultaneous amplification of ‘*Candidatus L. asiaticus*’ 16S rDNA (rDNA: 1160 bp) and sucrose synthase gene (CSS: 662 bp) by multiplex PCR. Lane M, 100-bp DNA Ladder (New England BioLabs); lane H, DNA (10 ng/ $\mu\text{l}$ ) from healthy *C. depressa*; lane D, DNA (11.25 ng/ $\mu\text{l}$ ) from diseased *C. depressa*; lanes 5<sup>0</sup>-5<sup>7</sup>, DNA from diseased *C. depressa*, which was diluted 5<sup>n</sup> (n=0 to 7) fold by distilled water (ranged from 11.25 ng/ $\mu\text{l}$  (5<sup>0</sup>) to 0.144 pg/ $\mu\text{l}$  (5<sup>7</sup>)).

いて、接木検定を実施することにより、診断の信頼性を補ってきた。しかし、生物検定を行うには、多数のカンキツ苗が必要な上に病害虫フリーの隔離施設と3か月以上の長期間を必要とするとともに、それに伴った労力と費用が問題である。さらに、試料によっては、様々な病害虫被害による汚染がひどく穂木として不適で、接木検定が不可能な場合もある。

本報告の高精度 PCR 診断法は、スクロース合成酵素遺伝子を内部コントロールに利用することにより、無病樹からはスクロース合成酵素遺伝子のみが、罹病樹からは 'Candidatus L. asiaticus' 16S rDNA とスクロース合成酵素遺伝子の両方が増幅され、DNA 抽出または PCR の失敗の場合は何も増幅されない。そのため、DNA 精製の不備に起因する罹病樹を陰性と判定する誤診を防ぐことができるとともに、短期間かつ安価な診断ができる。さらに、スクロース合成酵素遺伝子断片がカンキツ属ではないゲッキツやカラタチからも増幅されたことから、本法は広くミカン科植物全般のグリーンング病検定にも利用できる可能性がある。

#### 謝 辞

本試験の一部は、農林水産省が実施した先端技術を活用した農林水産研究高度化事業（1529）による受託研究による。また、本研究を遂行するにあたり、沖縄県農業研究センター石垣支所の井上裕嗣主任研究員には、貴重なカンキツ類を提供していただいた。ここに感謝申し上げる。

#### 引用文献

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ンング病の初発生. 日植病報 69:

307（講要）.

- Hung, T. H., Ling, M. L. and Su, H. J. (1999). Detection of fastidious bacteria causing citrus greening disease by nonradioactive DNA probes. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 65: 140-146.
- Jagoueix, S. J., Bove, M. and Garnier, M. (1994). The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the  $\alpha$ -subdivision of the *Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 379-386.
- Koen, T. J. and Langenegger, W. (1970). Effect of greening virus on the macroelement content of citrus leaves. *Farming S. Afr.* 45: 65.
- Komatsu, A., Moriguchi, T., Koyama, K., Omura, M. and Akihama, T. (2002). Analysis of sucrose synthase genes in citrus suggests different roles and phylogenetic relationships. *J. Exp. Bot.* 53: 61-71.
- Menzel, W., Jelkmann, W. and Maiss, E. (2002). Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *J. Virol. Methods* 99: 81-92.
- Miyakawa, T. and Tsuno, K. (1989). Occurrence of citrus greening disease in the southern islands of Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 55: 667-670.
- Murray, M. G. and Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4325.
- 内藤 孝・田場 聡・豊里哲也・河野伸二・高江洲和子・上原勝江（2001）. カンキツグリーンング病の 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.
- Ohtsu, Y., Nakashima, K., Prommintara, M. and Tomiyasu, Y. (1998). Typical symptoms of citrus greening on mandarin trees in Nepal, supported by detection and characterization of ribosomal DNA of the causal organisms. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 64: 153-159.
- 渡久地章男・河野伸二（1997）. 沖縄県におけるカンキツグリーンング病の発生状況及び防除対策. 植物防疫 26: 241-244.
- Urasaki, N., Tarora, K., Uehara, T., Chinen, I., Terauchi, R. and Tokumoto, M. (2002). Rapid and highly reliable sex diagnostic PCR assay for papaya (*Carica papaya* L.). *Breeding Science* 52: 333-335.