メンブレンフィルター免疫染色法を利用したスイカ種子からの スイカ果実汚斑細菌病菌の検出と分離

松浦 貴之^{1*,**}・白川 隆²・佐藤 仁敏³・井上 康宏¹・畔上 耕児¹

ABSTRACT

MATSUURA, T.^{1*,**}, SHIRAKAWA, T.², SATO, M.³, INOUE, Y.¹ and AZEGAMI, K.¹ (2008). Detection and isolation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* from watermelon seeds using membrane filtration immunostaining. Jpn. J. Phytopathol. 74: 153–156.

We developed a new method to detect *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seeds, by modifying the membrane filter immunostaining method, which was developed to detect *Burkholderia glumae* in rice seeds. The detection threshold of this new method for *A. avenae* subsp. *citrulli* was several cfu per 100 ml phosphate buffer using 1000 commercial watermelon seeds. Living cells of *A. avenae* subsp. *citrulli* could be obtained by stamping the membrane on selective medium plate before immunostaining.

(Received June 11, 2007; Accepted November 12, 2007)

Key words: *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, bacterial fruit blotch, immunostaining, membrane filter, watermelon seeds, detection

スイカ果実汚斑細菌病は、1998年に山形県のスイカにおいて国内で初めて発生が確認された（白川ら、2000）後、鳥取県（佐古・船原、2002）、長野県（小木曽ら、2001）、徳島県、熊本県で散発的に発生が確認されている。本病は *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*（以下、Aac）により引き起こされ、種子伝染することが知られている（Rane and Latinl, 1992）。また、本菌による果実汚斑細菌病は、スイカ以外にもトウガン（小木曽ら、2005）、メロン（富田ら、2006; 堀田ら、2006）で発生が確認されており、これらの発生原因も種子伝染であると報告されている（小木曽ら、2005; 上松ら、2006）。そのため、本病の発生を防止するには健全種子の供給が重要と考えられ、汚染種子の混入を高感度・高精度に検出する検査方法の確立が重要となる。また、PCRや免疫学的手法で検出された汚染種子を感染源として証明するためには、少なくとも生き残った細菌を分離する必要がある。現在まで汚染種子からのAacの検出方法は、実際に種子を播種して幼苗に現れる病徴観察

と、それに続く病原細菌の分離からなる Seedling Grow-out (USDA-APHIS National Seed Health System, 2004) と、種子を浸漬した緩衝液から Immunomagnetic beads を用いた Immunomagnetic separation and polymerase chain reaction (IMS-PCR) で Aac を検出する方法が報告されている（Walcott and Gitaitis, 2000）。前者は発病苗から Aac を分離するため信頼性が高いものと考えられているが、種子の Aac 汚染率と苗での発病は同等とは限らない。さらに、大量で多ロットの種子について検定するためには育苗管理に多大な労力がかかり、かつ育苗場所の確保が必要となる。一方、後者は多数の種子ロットを迅速に検定することは可能であるが、PCRによる判定であることから死細菌を陽性とする危険性がある。

高精度な種子伝染性細菌病菌の検出法として、メンブレンフィルターと選択培地を用いて定量的に検出する方法（メンブレンフィルター免疫染色法）が考案されており、本法は5000粒のイネ種子に0.1%程度の割合でイネもみ枯細菌病菌

¹ 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究センター（〒305-8666 茨城県つくば市観音台3-1-1） National Agricultural Research Center, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8666, Japan

² 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所（〒305-8666 茨城県つくば市観音台3-1-1） National Institute of Vegetable and Tea Science, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8666, Japan

³ 独立行政法人種苗管理センター（〒305-0852 茨城県つくば市藤本2-2） National Center for Seeds and Seedlings, Fujimoto, Tsukuba, Ibaraki 305-0852, Japan

* Corresponding author (E-mail: matsuyu1@affrc.go.jp)

** 現在：横浜植物防疫所（〒231-0801 神奈川県横浜市中区新山下1-16-10） Plant Protection Station, Shinyamashita, Naka-ku, Yokohama, Kanagawa 231-0801, Japan

Table 1. Bacterial isolates used in this study and reaction of dot immunobinding assay (DIBA) and PCR

Species	Strain	Source	Locality	DIBA ^{a)}	PCR ^{b)}
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	YPPS 319	Watermelon seedling	Yamagata	+	+
	YPPS 320	Watermelon seedling	Yamagata	+	+
	YPPS 349	Watermelon seed	Yamagata	+	+
	YPPS 355	Watermelon seed	Yamagata	+	+
	YPPS 371	Watermelon seedling	Nagano	+	+
	YPPS 430	Watermelon fruit	Tottori	+	+
	YPPS 452	Watermelon fruit	Tokushima	+	+
	NARCB 200107	Rice seedling	Kumamoto	±	—
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	NARCB 200304	Rice seedling	Kumamoto	±	—
	NARCB 200308	Rice seedling	Kumamoto	±	—
	AZ 92212	Rice seedling	Kumamoto	±	—
	AZ 92213	Rice seedling	Kumamoto	±	—
	AZ 92217	Rice seedling	Kumamoto	+	—

Abbreviations: YPPS: Yokohama Plant Protection Station; NARCB: National Agricultural Research Center Bacterial Collection; AZ: isolated by K. Azegami in 1992

a) +: positive reaction, ±: weakly positive reaction

b) +: a specific single fragment of 248 bp was amplified, —: no amplification

Primers: Schaad et al. (2000)

汚染種子が含まれる試料からも高精度に病原細菌を検出することができる」と報告されている (小原ら, 2003). そこで本研究では, 1000 粒のスイカ種子からスイカ果実汚斑細菌病菌を高精度に検出, 分離するため, 既報の Aac 用選択培地 (以下, AacSM) (白川, 2002) を用いたメンブレンフィルター免疫染色法の適用について検討した.

供試菌株 供試菌株として, 農林水産省横浜植物防疫所より分譲された Aac 7 菌株と本研究室に保存していた *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (以下, Aaa) 6 菌株を用いた (Table 1).

アルカリフォスファターゼコンジュゲート (IgG-AP) の作製と反応特異性調査 アルカリフォスファターゼコンジュゲート (IgG-AP) は, 以下のように作製した. まず, 横浜植物防疫所より分譲された抗 Aac (YPPS 319) 血清よりアフィゲル MAPS-II キット (BIO-RAD) を用いて IgG を精製した. IgG-AP は, 精製した IgG とアルカリフォスファターゼ (Sigma, Type VII-S) を用いてグルタルアルデヒド 1 段階法で作製した. 得られた IgG-AP について直接法による Dot Immuno Binding Assay (DIBA) (小宮ら, 2002) での Aac の検出限界と供試菌株の反応特異性を調査した. その結果, IgG-AP を 1600 倍に希釈した場合の検出限界は約 10^6 cfu/ml であり, 供試した Aac の全菌株が反応した. しかし, 対照で供試した 6 菌株の Aaa にも弱い反応が認められ, 特に AZ 92217 菌株は, Aac とほぼ同等の強い反応を示した (Table 1). このことから, 免疫染色のみによる Aac の特異的検出は困難と判断した.

種子浸漬液の検討 小原ら (2003) は, 滅菌水にモミを浸漬し超音波処理を行った後, メンブレンフィルターで集菌

し, イネもみ枯細菌病菌を効率的に回収している. また白川 (2002) は 0.01 M のリン酸緩衝液 (PB) を増菌のために用いている. AacSM 上での培養実験から, Aac は pH 6.5 ~ 8.5 で生育可能であり, またスイカ種子を浸漬すると浸漬液の pH が酸性側に傾くことを考慮し, Aac の回収に用いる種子浸漬液を 0.01 M PB (pH 8.0) とした.

メンブレンフィルター (MF) 免疫染色法 MF 免疫染色法は小原ら (2003) の方法に準じて行った. まず, ガラス繊維フィルター (47 mm 径; Glass Fiber Disks with Binder, Extra Thick; Pall Corporation, P/N66078) と MF (孔径 5.0 μ m, 47 mm 径, ポリカーボネート; MILLIPORE, TMTP04700) を重ねてセットしたリユーザブルボルトトップフィルターシステム (Nalge Nunc International, 500 ml) を用いて, 試料液を吸引ろ過して夾雑物を除去した. そのろ液を, エタノールに浸漬後滅菌水で置換することにより親水化した MF (孔径 0.45 μ m, 47 mm 径, 疎水性ポリビニリデンフロライド; MILLIPORE, HVHP04700) をセットした同フィルターシステムを用いて再度吸引ろ過し, MF 上に集菌した. 集菌した MF を AacSM 平板培地にのせて, 37°C で 3 日間培養した.

培養後, MF の表面に Tween10 倍 TBS (0.02 M Tris, 0.15 M NaCl, 0.5% Tween20, pH 7.5) を 3 ml 滴下し, 火炎滅菌したコンラージ棒で MF 表面に生育した細菌集落を剥離, 除去した. その MF を, Tween10 倍 TBS を 5 ml 入れた径 50 mm のシャーレに移し, 5 分間, 室温で振とうした (80 rpm, 以下同じ). その後, MF を 5 分間煮沸処理した後, ブロッキング液 (2% スキムミルク / Tween10 倍 TBS) に浸漬し, 30 分間, 室温で振とうした. 次に, Tween10 倍 TBS で 1600 倍に

希釈した抗 Aac IgG-AP 液に MF を浸漬し、1 時間室温で振とうすることにより、MF 上の細菌集落痕に対する血清反応を行った。その後、適量の Tween10 倍 TBS で 5 分間ずつ 4 回振とう洗浄した後、基質液 (SIGMA, SIGMAFAST BCIP/NBT) で約 5 分間呈色反応を行った。流水洗浄で呈色反応を停止させ、ろ紙上に置き風乾した後、青紫色の呈色が観察された細菌集落痕を陽性とした。

なお、培養後の MF を免疫染色する前に、生菌の分離及び PCR による検出を可能とするため、MF 上の細菌集落を新しい AacSM 平板培地に転写し、37°C で 2 ~ 3 日間培養した。

PCR による確認 MF 免疫染色で陽性反応を示した細菌集落痕の位置と対応するレプリカ AacSM 平板培地上の集落について、Schaad ら (2000) の特異的プライマー (SEQID4 5'-TCGTCATTACTGAATTTCAACA-3', SEQID5 5'-CCTCCACCAACCAATACGCT-3') を用いたコロニー PCR を行った。PCR は、TAKARA Ex Taq (TAKARA) と GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer) を用いて行い、PCR 反応液 (TAKARA Ex Taq 0.5 U, dNTP 200 μ M, 1 $\times$ PCR buffer, 各プライマー 2.5 pmol) に 98°C で 5 分間処理した細菌懸濁液 5.0 μ l を鋳型として添加し、総量を 20 μ l とした。反応条件は Walcott ら (2003) の方法に準じ、95°C 5 分の後に、95°C 30 秒、53°C 30 秒、72°C 30 秒を 35 サイクル繰り返し、最後に 72°C 5 分とした。PCR 産物を 2% のアガロースゲルで電気泳動した後、臭化エチジウムで染色した。紫外線照射下で Aac に特異的な 248 bp の DNA 断片の増幅の有無を確認した。

以上の方法により供試した Aac 7 菌株及び Aaa 6 菌株について PCR を行ったところ、Aac 7 菌株のみに特異的なバンドが検出された (Table 1)。

MF 免疫染色法の検出限界調査

1) スイカ種子浸漬液に Aac を混入した場合 スイカ種子 (品種: 綺王 MK, 乾熱処理済み, 大和農園, 以下同じ) 約 1000 粒をガラス製ねじ口瓶 (500 ml 容) 中の 0.01 M PB (pH 8.0) 100 ml に入れた後、最終濃度が、それぞれおよそ 1, 10, 10² cfu/100 ml になるように Aac (YPPS 319 株, 以下こ

の株を試験に供試した) を添加した後、超音波洗浄機 (BRANSONIC 321, BRANSON) で 5 分間超音波処理を行って試料液とした。その後 MF 免疫染色法で Aac の検出及び分離を試みた。また、添加した Aac の菌数は、希釈平板法により AacSM 平板培地上に形成された集落数から算出した。3 回の反復試験を行ったところ、希釈平板法で集落が検出されない区においても MF 上で陽性反応が観察された (Table 2)。また、MF 上の陽性集落痕に対応するレプリカ AacSM 平板培地上の集落について PCR を行った結果、各処理区全てにおいて Aac に特異的な DNA 断片の増幅が確認された。

2) スイカ種子に Aac 人工汚染種子を混合した場合 人工汚染種子は、Aac 懸濁液 (およそ 10⁸ cfu/ml) に 1 時間浸漬した後、風乾することによって作製した。この人工汚染種子の平均保菌量は 40 cfu/粒, Seedling Grow-out による発病率は 36% であった。平均保菌量は人工汚染種子 100 粒を 10 ml の 0.01 M PB (pH 8.0) に浸漬し、5 分間の超音波処理を行った後、AacSM 平板培地に希釈平板培養することで算出した。スイカ種子 1000 粒当たり、それぞれ 1, 5, 10 粒の人工汚染種子を混入し (1/1000 区, 5/1000 区, 10/1000 区), 前述と同様に試料液を作製し、MF 免疫染色法で Aac の検出と分離を試みた。その結果、1 粒の汚染種子を混入した場合でも 5 反復中 2 反復で陽性反応が観察された。しかし、5, 10 粒の人工汚染種子を混入した区においても検出できない場合があった。また、MF 免疫染色法で陽性となった集落痕に対応したレプリカ上の集落は、PCR により Aac 特異的な DNA 断片の増幅が確認された (Table 3, Fig. 1)。

以上の結果から、AacSM 平板培地を用いた MF 免疫染色法を用いると、1000 粒といった比較的大量のスイカ種子から高感度に Aac を検出できることが示された。この手法は、選択培地と抗血清を組み合わせてすることによって、浸漬液 100 ml 中に数 cfu 以上の Aac が存在した場合には、確実に検出が可能であった。しかし、人工汚染種子を混合した場合は、検出できる場合とできない場合があった。人工汚染種子の平均保菌量は 40 cfu/粒であったが、実際に 1/1000 区において、5 回の

Table 2. Recovery threshold of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* by membrane filter immunostaining (MFIS) method

Putative colony number of serial dilutions (per 100 ml)	Dot number ^{a)} (colony number) ^{b)}		
	repetition 1	repetition 2	repetition 3
10 ²	NC ^{c)} (79.0)	NT ^{d)}	NT
10 ¹	34 (7.7)	4 (5.3)	12 (5.3)
10 ⁰	4 (0)	1 (0)	2 (0)

a) Number of immunostained dots on membrane filter

b) Average number of colonies on three AacSM plates

c) Not countable

d) Not tested

Table 3. Detection rate of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seeds using membrane filter immunostaining (MFIS) after different levels of artificial infestation

Rate of Aac contaminated seed (%)	Detection rate
10/1000 seeds (1)	2/3 repetition
5/1000 seeds (0.5)	2/3 repetition
1/1000 seeds (0.1)	2/5 repetition

Fig. 1. Immunostained dots on membrane filter observed using membrane filter immunostaining (MFIS) method (left) and colonies of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) on replica AacSM plate (right). The arrows indicate the stains and corresponding colonies. Bacterial cells were trapped on a membrane filter after filtration of 100 ml of 0.01 M phosphate buffer (pH 8.0) used to wash 1000 watermelon seeds. The seeds were contaminated with Aac cells at a rate of 0.1%.

反復試験のうち MF 免疫染色法で確認された集落数は 0 個が 3 回, 4 個が 1 回, 28 個が 1 回とかなりの差があった。1) の結果から, 浸漬液中に 40 cfu の Aac が存在していれば検出することが可能と考えられるが, 必ずしもその様な結果にならなかったことから, 混合した 1 粒の汚染種子における Aac の付着量が異なっていたことが原因の一つとして考えられる。

なお, 一つの手法による特異的検出法では, 目的以外の細菌も検出する可能性がある。そこで, 本手法では免疫染色に加えて, 染色前に細菌を AacSM 平板培地に転写し, 得られた集落に対して, 特異的 PCR を行った。その結果, 免疫染色で疑陽性反応 (Aac でないにもかかわらず免疫染色で呈色反応を示した集落) を示した細菌を区別することが可能となった。また, このように生細菌を分離することで, 病原性の調査, 細菌学的性質調査を行うことができ, 分離細菌のより正確な同定が可能になる。

今回供試したスイカ種子は, 乾熱処理がされており, 常在菌が少ないと考えられることから, 今後, 未消毒スイカ種子を用い, この手法が適用可能か否かについて検証する必要がある。さらに, 今回作製した人工汚染種子だけではなく, 自

然汚染種子を用いた場合にも, 同様の感度で検出できるか否かを調査する必要がある。

Rane と Latin (1992) は, 自然汚染種子, 人工汚染種子の種皮及び胚の両方から Aac を分離しており, また Walcott ら (2003) は花器感染が種子伝染につながると報告しているが, Aac の種子上の存在部位の詳細については未だ解明されていない。種子上の Aac 存在部位及び苗が発病にいたるまでの Aac の挙動の解明が, この病害の種子からの検出について重要であり, 今後詳細な調査をする必要がある。

本研究を行うにあたり, 試験用の種子を分譲してくださった (株) 大和農園種苗販売部 浜田三紀夫氏にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 堀田治邦・塚本貴敬・上松 寛・安岡眞二 (2006). 日本で発生した *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* によるメロン果実汚染細菌病 (新称). 日植病報 72: 82 (講要).
- 小宮友紀子・白川 隆・我孫子和雄 (2002). Dot Immuno-Binding Assay および Tissue Printing Immunoassay によるスイカ果実汚染細菌病の血清学的診断法. 日植病報 68: 291-296.
- 小木曾秀紀・藤永真史・清水時哉 (2001). 長野県におけるスイカ果実汚染細菌病の発生. 関東東山病虫研報 48: 33-36.
- 小木曾秀紀・藤永真史・松崎良一・上松 寛 (2005). スイカ接木苗に発生した台木トウガン種子に起因する果実汚染細菌病. 日植病報 71: 290 (講要).
- 小原達二・安達直人・畔上耕児 (2003). メンブレンフィルター・免疫染色法によるイネ種子からのもみ枯細菌病の高感度定量検出. 日植病報 69: 309-310 (講要).
- Rane, K. K. and Latin, R. X. (1992). Bacterial fruit blotch of watermelon: association of the pathogen with seed. Plant Dis. 76: 509-512.
- 佐古 勇・船原みどり (2002). 栽培圃場で発生したスイカ果実汚染細菌病の病徴の特徴と防除. 日植病報 68: 260 (講要).
- Schaad, N. W., Song, W. Y. and Hatziloukas, E. (2000). PCR primers for detection of plant pathogenic species and subspecies of *Acidovorax*. US Patent 6 146 834.
- 白川 隆・菊池繁美・加藤智宏・我孫子和雄・川合 明 (2000). 日本におけるスイカ果実汚染細菌病の発生. 日植病報 66: 223-231.
- 白川 隆 (2002). スイカ果実汚染細菌病の防除技術の開発. 農林水産技術会議事務局 研究成果 401.
- 富田恭範・小河原孝司・白川 隆・佐藤仁敏・鹿島哲朗・中西宏 (2006). 茨城県におけるスイカ果実汚染細菌病によるメロン病害の発生. 日植病報 72: 312 (講要).
- 上松 寛・塚本貴敬・堀田治邦・佐藤成良 (2006). タイ産メロン種子による *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* の伝搬. 日植病報 72: 46 (講要).
- USDA-APHIS National Seed Health System (2004). *Acidovorax avenae* ssp. *citrulli*. In: Vegetable Crop Methods, <http://www.nshs.iastate.edu/VEG.Crops.pdf>
- Walcott, R. R. and Gitaitis, R. D. (2000). Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. Plant Dis. 84: 470-474.
- Walcott, R. R., Gitaitis, R. D. and Castro, A. C. (2003). Role of blossoms in watermelon seed infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Phytopathology 93: 528-534.