

第7回 アグリ技術シーズセミナー

—果樹生産の最新技術と6次産業化の可能性—

カンキツグリーンニング病原細菌の培養と 簡易診断キットへの応用の可能性

藤川 貴史



果樹研究所

品種育成・病害虫研究領域

ftakashi@affrc.go.jp

カンキツグリーニング病原細菌の培養と 簡易診断キットへの応用の可能性





そもそもカンキツグリーンング
病って何なの？

なぜ培養するの？

培養したら何かいいこと
あるの？

診断キットは誰が
使うの？

簡易診断キットって？

6次産業化と何か
関係あるの？



健全葉



罹病葉



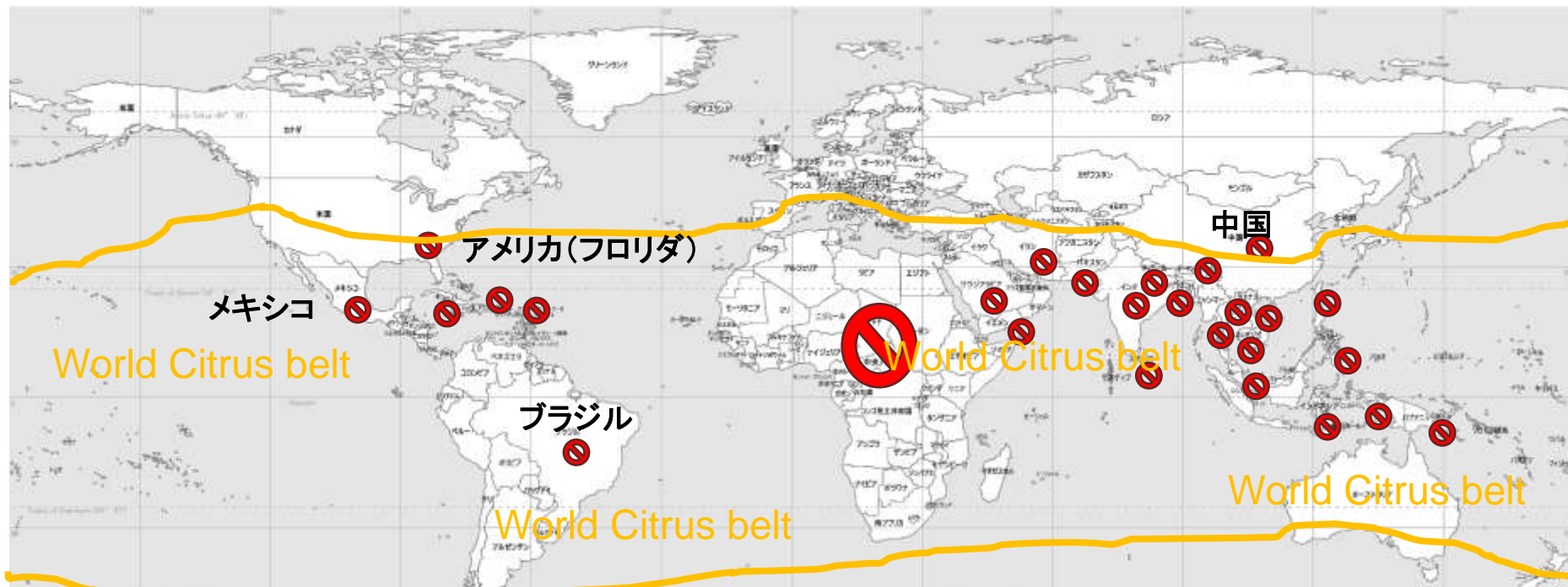
枯死する

樹勢が衰え...



2～数年





輸入禁止地域（カンキツグリーニング病原菌が有害対象微生物）植物防疫法別表二（第九条関係）



世界のカンキツ栽培地域

世界の主要なカンキツ栽培地域で
カンキツグリーニング病が発生している。

- ・カンキツグリーニング病の発生地のカンキツ類やミカン科の植物（ワンプ、ゾウノリンゴ等）の生植物は輸入できない。
- ・他の病害・虫害の危険もあって、この地域のカンキツは果実も輸入されていない。

グリーンング病
+ 媒介虫蔓延

どうしたらいいのか？

グリーンング病原菌感染樹の
検査・診断

感染樹の除去

殺虫剤による媒介虫の駆除

健全苗木の生産・確保

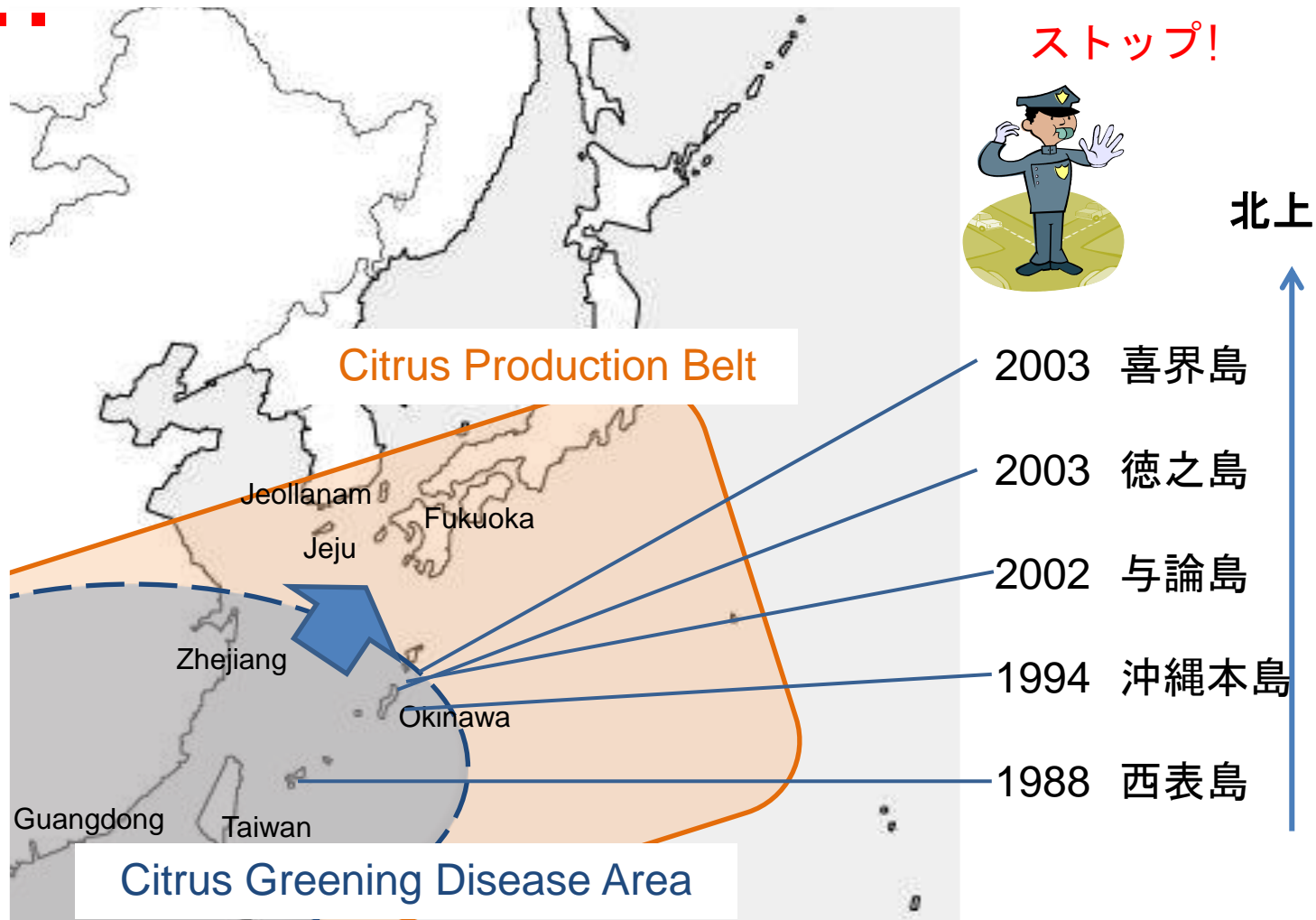
健全樹への改植及び生育
非収穫時期中の収量低下

コストがかかるが、
やるしかない！

罹病樹の果実収量減少、品質低下

罹病樹の枯死

日本では・・・



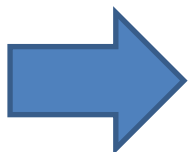
- ・日本国内においては2003年まで本病害が北上していた。
- ・現在、緊急防除や根絶事業で病害の北進を食い止めている。



国内のみかん及びかんきつ類は、青果だけで2000億円規模の産業

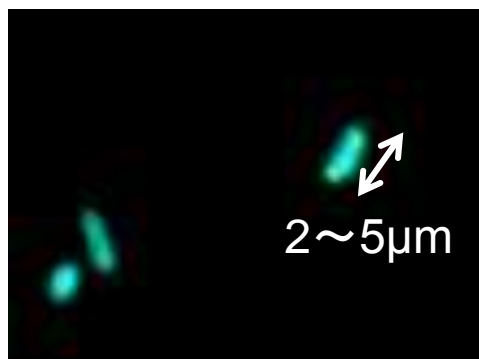
みかん	栽培面積	(平成23年)	48,000 ha
その他かんきつ	栽培面積	(平成23年)	28,000 ha
みかん	卸売数量	(平成22年)	676,442 t
その他かんきつ	卸売数量	(平成22年)	397,005 t
みかん	卸売価額	(平成22年)	1462億円
その他かんきつ	卸売価額	(平成22年)	774億円

農林水産省統計より



カンキツグリーニング病の餌食にならないようにする

グリーンング病原細菌とは？



‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ (Las) → 日本に侵入している菌
 ‘*Candidatus Liberibacter africanus*’ (Laf)
 ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ (Lam)

根粒菌(マメ科植物の根で窒素固定をする共生菌)の仲間なのに…。
 植物病原細菌らしい病原因子をもっていない。(見つからない)
 それどころか自活して生きていく為の遺伝子をたくさん失っている。
 (ゲノムDNAのサイズは大腸菌の4分の1程度)

伝染方法

(1) 虫媒伝染



成虫



幼虫

体長3mm

ミカンキジラミ

写真: 果樹研 上地博士提供

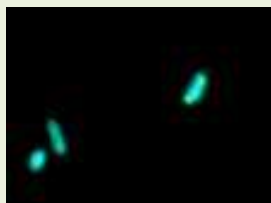
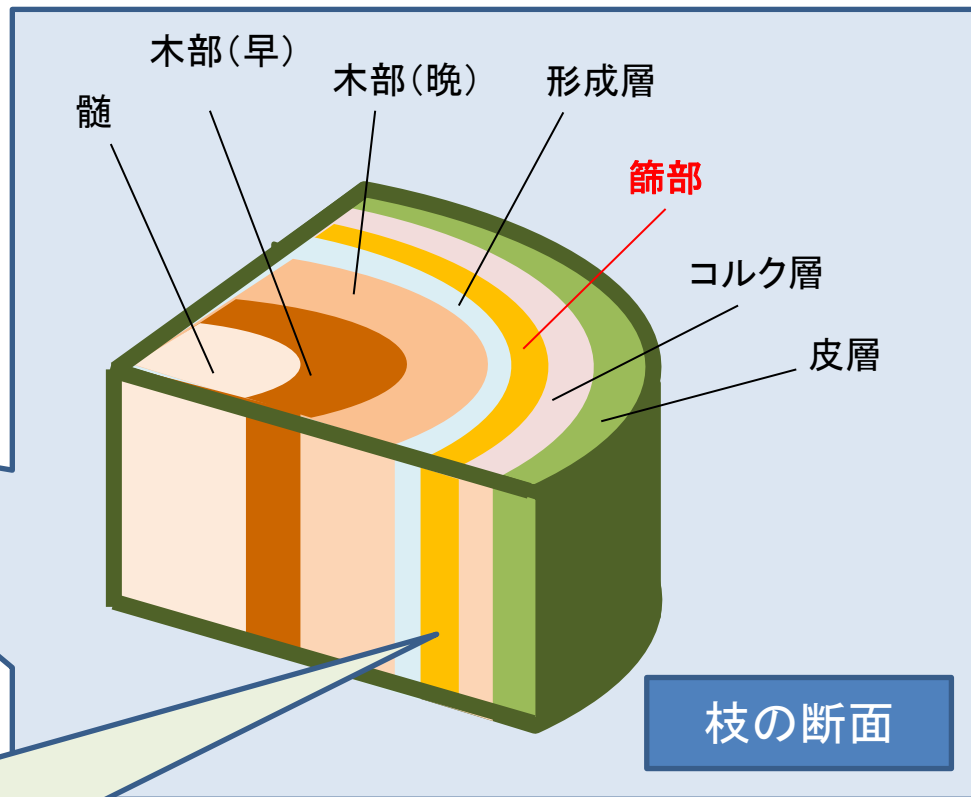
ミカンキジラミが葉や枝から篩管液を吸汁する時に、伝播される。
 ミカンキジラミの体内で菌は増殖できる。

罹病樹と媒介虫のセットで、病原菌は健全樹に感染し拡がっていく。

(2) 接木伝染



罹病樹から病原菌が接いだ健全樹に感染し拡がっていく。



グリーンング病原細菌は
宿主植物の篩部(師部)に
局在・偏在する

篩部=養分の通り道

人間で言えば、血液の中に菌がいるようなもの

➡ 防除が難しい



そもそもカンキツグリーンング
病って何なの？

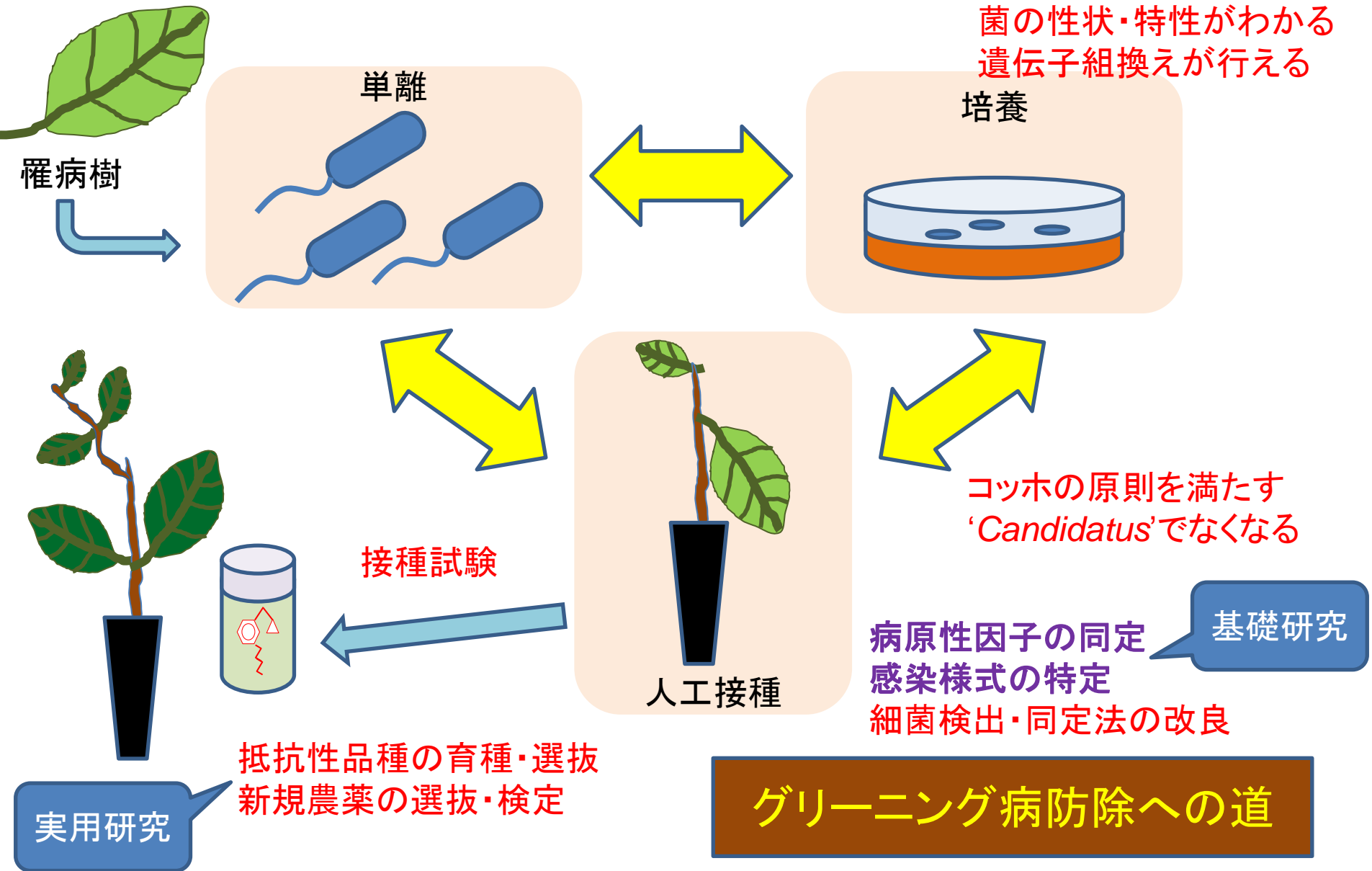
なぜ培養するの？

培養したら何かいいこと
あるの？

診断キットは誰が
使うの？

簡易診断キットって？

6次産業化と何か
関係あるの？



year

1984

Garnett (Cit. Subtrop. Fruit J.)
Isolation of the greening organism
MIG medium

2008

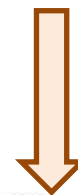
Davis et al. (Plant Dis.) Co-cultivation
of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'
with actinobacteria from citrus with
Huanglongbing
BBM3 medium

2009

Sechler et al. (Phytopathol.)
Cultivation of '*Candidatus*
Liberibacter asiaticus', '*Ca. L.*
africanus', and '*Ca. L. americanus*'
associated with Huanglongbing
LiberA medium

2011

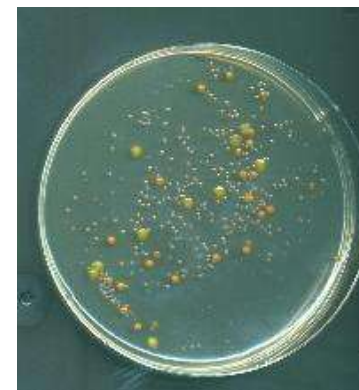
これまでこの病原細菌を培養できた
という報告はあるが...



再現性に問題あり
本病原菌以外の菌が培養されてくる



LiberA



MIG

year

1984

Garnett (Cit. Subtrop. Fruit J.)
Isolation of the greening organism
MIG medium

2008

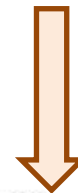
Davis et al. (Plant Dis.) Co-cultivation
of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'
with actinobacteria from citrus with
Huanglongbing
BBM3 medium

2009

Sechler et al. (Phytopathol.)
Cultivation of '*Candidatus*
Liberibacter asiaticus', '*Ca. L.*
africanus', and '*Ca. L. americanus*'
associated with Huanglongbing
LiberA medium

2011

これまでこの病原細菌を培養できた
という報告はあるが...

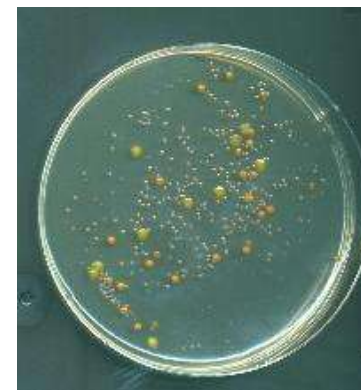


再現性に問題あり
本病原菌以外の菌が培養されてくる

世界中でグリーンング病原細菌は培養できていない！

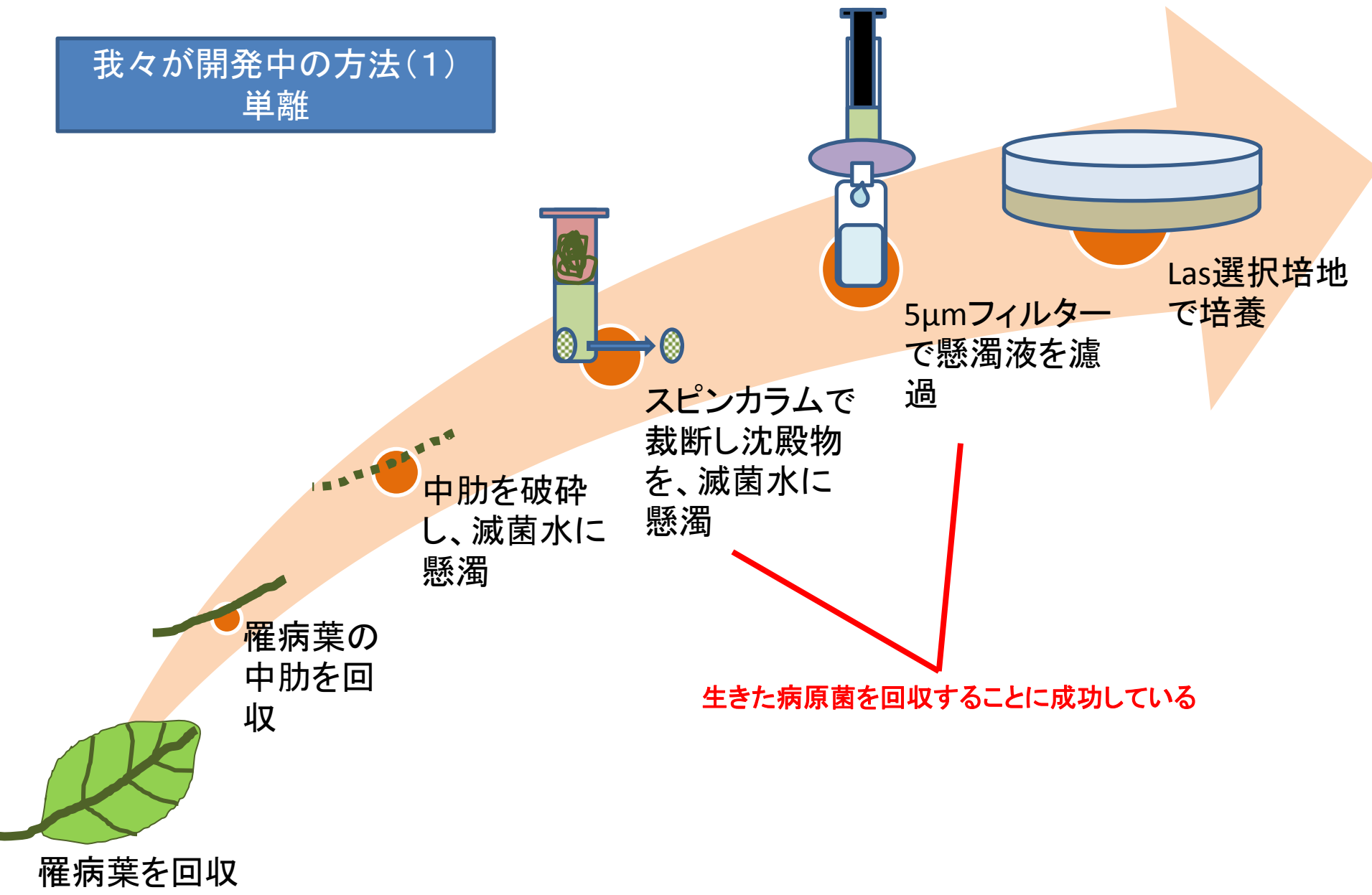


LiberA

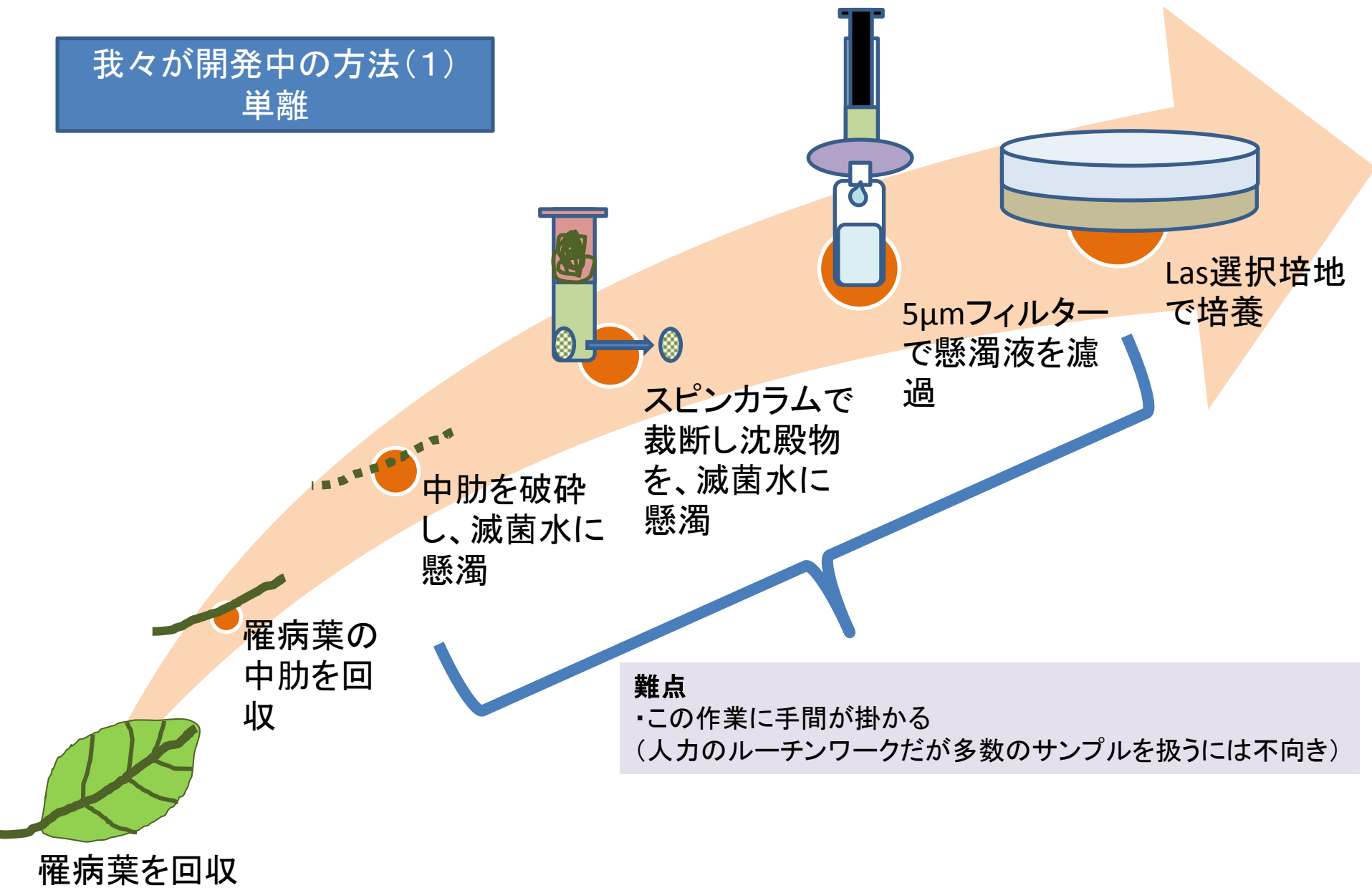


MIG

我々が開発中の方法(1)
単離

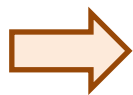


我々が開発中の方法(1)
単離



グリーンング病原細菌の選択培地をつくるには・・・

・ゲノム情報を利用する



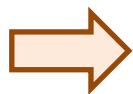
病原細菌が有している遺伝子から代謝系を予測



不完全な代謝系に対して、培地に関係する成分を添加する
(=健康サプリメントの発想)



・カンキツの篩管液の成分を考慮する

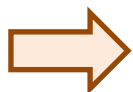


病原細菌はカンキツの篩部に局在している



カンキツの篩管液成分が培地成分になる

・培地成分について改めて考え直す



寒天培地といっても、agarがいいのか？
窒素源・アミノ酸源としてペプトンでいいのか？
他の菌(雑菌)のコンタミネーションを防ぐには？



我々が開発中の方法(2)
培養

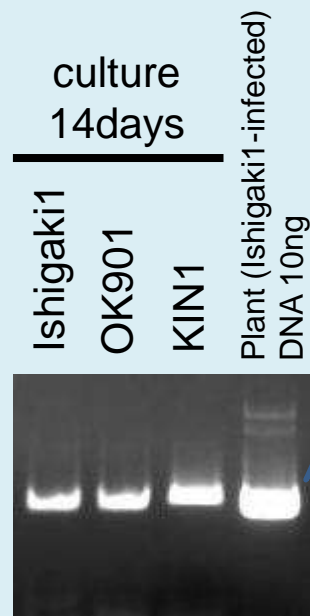
開発した培地(A)
2週間培養



目に見えるコロニーはない

しかし、培地表面を調べてみると・・・

病原菌DNA検出



病原菌のDNAが
検出される

=菌が存在する

培地表面を掻き取り懸濁液
を調整し、新たな培地(A)に
塗布し培養する

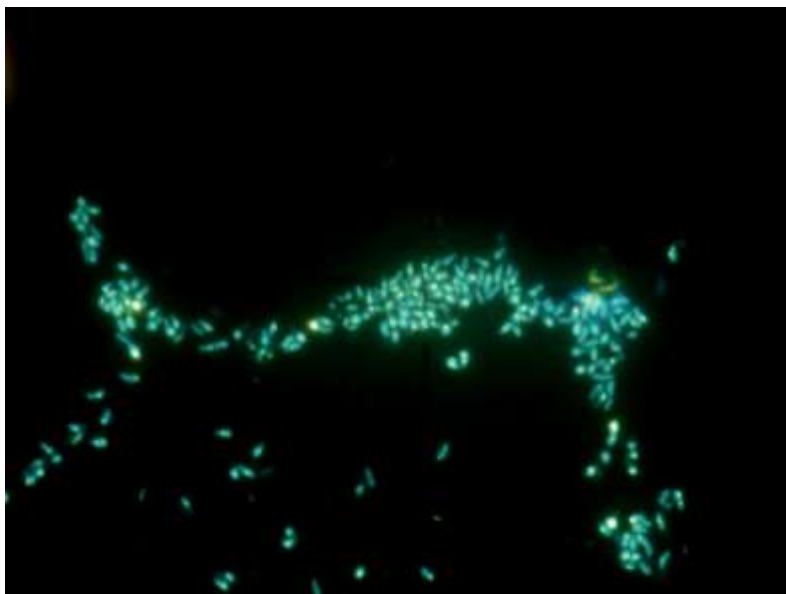
↓
20日後培地で
病原菌のDNAが検出された

↓
3回の継代培養ができています

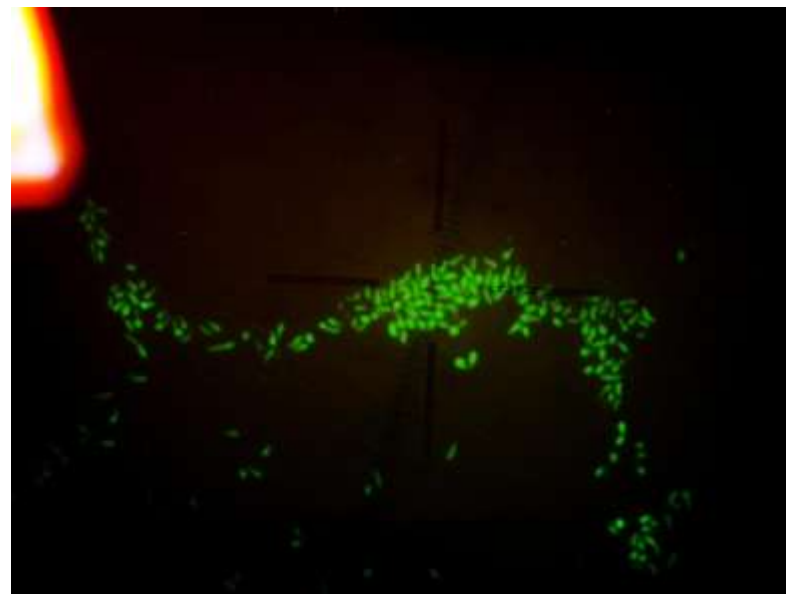
本病原菌を継続して培養できることに成功している！

新しく開発した培地(A)で培養

DAPI (生菌を染色)



LAS-specific site of 16S rRNA (LSS)



培地上で菌のコロニーは目に見えないが、
FISH法による観察を行うと生きた菌体が確認できる

我々が開発中の方法(2)
培養

開発した培地(A)
2週間培養

目に見えるコロニーはない

しかし、培地表面を調べてみると・・・

難点

・培地を作製するのに手間がかかる

(微量な成分を他種類用いるので、研究室では良いが、多量のサンプルを調べるような検定現場では効率が悪い)

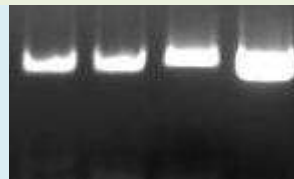
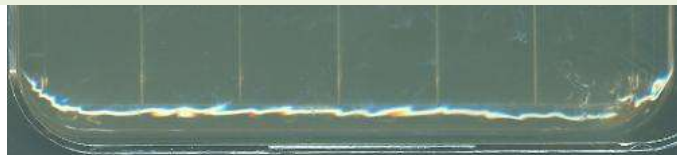
* 医療現場では、培地がキット化されている

・目に見えないので、普及して使用できない

(毎回DNA検出するのは、コストが掛かる)

* 培地の改良

* 可視化ツールの作成



塗布し培養する
↓
20日後培地で
病原菌のDNAが検出された
↓
3回の継代培養ができています

本病原菌を継続して培養できることに成功している！



そもそもカンキツグリーンング病って何なの？

なぜ培養するの？

培養したら何かいいことあるの？

診断キットは誰が使うの？

簡易診断キットって？

6次産業化と何か関係あるの？

カンキツグリーンング病原細菌及び罹病樹の診断方法

1. DNA検定

- (1) PCR法 …… 最も普及している（機械と試薬が必要）
- (2) リアルタイムPCR法 …… 正確性が高い（高額機械と高額試薬が必要）
- (3) LAMP法 …… 簡便、キットとして市販されている
- (4) ICAN法 …… 簡便、キットとして市販されている

2. 物質検定

- (1) ヨウ素デンプン反応 …… 罹病樹はデンプンが蓄積されることを利用（誤差が大きい）
- (2) 鉄・マンガン含有量 …… 罹病樹は内在する鉄イオンやマンガンイオンが減少することを利用（誤差が大きい）
- (3) 近赤外線波長 …… 罹病樹と健全樹で近赤外線波長の吸収量が異なる（他の病害と区別できていない）

3. 免疫検定

- …… 菌体を含む罹病樹液成分を抗原としてELISA法による検定（失敗に終わっている）

4. 接ぎ木検定

- …… 罹病樹の疑いのある木から穂木をとり、健全樹に接ぎ木して病徴が健全樹体に現れるかをみる（熟練者でないと成功しない）

5. 見取り検定

- …… 目視で病徴を確認する（熟練者であっても正確に判断するのは難しい）

カンキツグリーンング病原細菌及び罹病樹の診断方法

1. DNA検定



- (1) PCR法
- (2) リアルタイムPCR法
- (3) LAMP法
- (4) ICAN法

罹病樹のサンプル中の菌が少ないと、擬陰性になる
 検出条件を間違えると擬陽性になる
 死んで無害(病原性無し、感染力無し)の菌も検出される
 お金がかかる

2. 物質検定

- (1) ヨウ素デンプン反応
- (2) 鉄・マンガン含有量
- (3) 近赤外線波長

- … 罹病樹はデンプンが蓄積されることを利用 (誤差が大きい)
- … 罹病樹は内在する鉄イオンやマンガンイオンが減少することを利用 (誤差が大きい)
- … 罹病樹と健全樹で近赤外線波長の吸収量が異なる (他の病害と区別できていない)

3. 免疫検定



従来の方法ではうまくいかない
 → 新しい方法で可能性はある

4. 接ぎ木検定



従来の方法では誰でもできる技術ではない
 → 新しい方法で可能性はある

5. 見取り検定

- … 目視で病徴を確認する (熟練者であっても正確に判断するのは難しい)

カンキツグリーンング病原細菌及び罹病樹の診断方法

第6の検定方法として

病原細菌の培養



罹病樹のサンプル中の菌が少なくても、培養し増殖させることができる

生きて病原性と感染力を持っている菌を培養できる

特別な装置や技術を必要としない

一度に多数のサンプルを検定することができる

DNA検定に比べてはるかに安価である

更に培養した菌をDNA検定することによって、二重の検定が可能である

(免疫検定、接ぎ木検定への応用性も)

誰が使用するのか？

検疫や防除所、研究機関

産地(海外含む)の農業法人や流通業者、民間検査会社 (現状の国内では難しいかも)

世界中で需要が見込まれる！



そもそもカンキツグリーンング病って何なの？

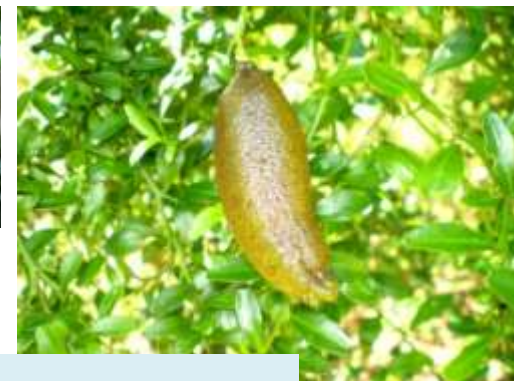
なぜ培養するの？

培養したら何かいいことあるの？

診断キットは誰が使うの？

簡易診断キットって？

6次産業化と何か関係あるの？

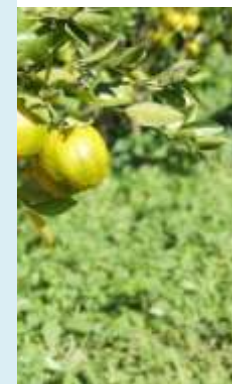


病原細菌培養による簡易診断キットがあれば・・・

**国内にこれまで無かった新しいカンキツ類を
食卓で食べられるかも。**

**今まで利用できなかった遺伝資源を使った品種育成で
全く新しい果物ができるかも。**

果実としてではなく、新しい観賞用植物が国内に流通するかも。





ご静聴ありがとうございました。

藤川 貴史

農業・食品産業技術総合研究機構 果樹研究所
品種育成・病害虫研究領域
ftakashi@affrc.go.jp