

カンキツ優良品種「不知火」から検出されたカンキツウイロイド

古賀 敬一¹⁾・伊藤 隆男²⁾・家城 洋之²⁾・大久保宣雄¹⁾*

(¹⁾長崎県果樹試験場・²⁾果樹試験場興津支場)

Citrus viroids detected from an excellent variety of citrus 'Shiranui'. Keiichi KOGA¹⁾, Takao ITOH²⁾, Hiroyuki IEKI²⁾ and Nobuo OHKUBO¹⁾ * (¹⁾Nagasaki Fruit Tree Experiment Station, Omura, Nagasaki 856. ²⁾Okitsu Branch, Fruit Tree Research Station, Shimizu, Shizuoka 424-02)

Key words: viroid, citrus 'Shiranui', biological indexing, sPAGE

緒 言

最近のカンキツ産地の動向は、消費嗜好の変化や産地間競争の激化などにより、品種の更新がめまぐるしく、特に、接木から収穫までの期間が短い高接ぎ更新が主体となっている。しかし、この品種更新を急ぐあまり健全穂木の供給が間に合わず、ウイルス・ウイロイド検定が実施されていない穂木や高接ぎ樹から取った穂木が出回ったり、健全穂木であっても高接ぎする中間台の保毒によって汚染され、現場でウイルス・ウイロイドの蔓延がみられる。ウイルスは電子顕微鏡観察や ELISA などの血清反応によって検出が可能であるが、ウイロイドは核酸のみで構成された環状一本鎖 RNA であるため、これらの方法による検出は不可能である。また最近では優良品種の「不知火」の一部からウイルス・ウイロイドの保毒が確認されている⁵⁾。そこで長崎県果樹試験場所有の「不知火」と県内2産地の「不知火」(2~4年生苗木)について、ウイロイド検定を行った。

なお、本報告は平成7年度農林水産省果樹試験場興津支場依頼研究員研修の成果である。また文献検索に御協力頂いた果樹試験場口之津支場の塩谷浩氏に対し、厚く御礼申し上げる。

材料および方法

1. 接木接種による生物検定

1995年9月に、検定する県内AおよびB産地の「不知火」樹片を、2~3年生のライム実生苗に3か所接木接種し、検定植物である「エトログシロン」(アリゾナ 861 S-1)を2か所接木した。この苗木を昼30℃、夜

28℃に設定した屋外の人工気象器内に置き、その3か月後に「エトログシロン」新葉の症状を観察した。本場所有樹については、1994年3月に前述と同様に接種してガラス室に置き、その4~6か月後に調査した。

2. 電気泳動 (sPAGE: sequential polyacrylamide gel electrophoresis) による検定

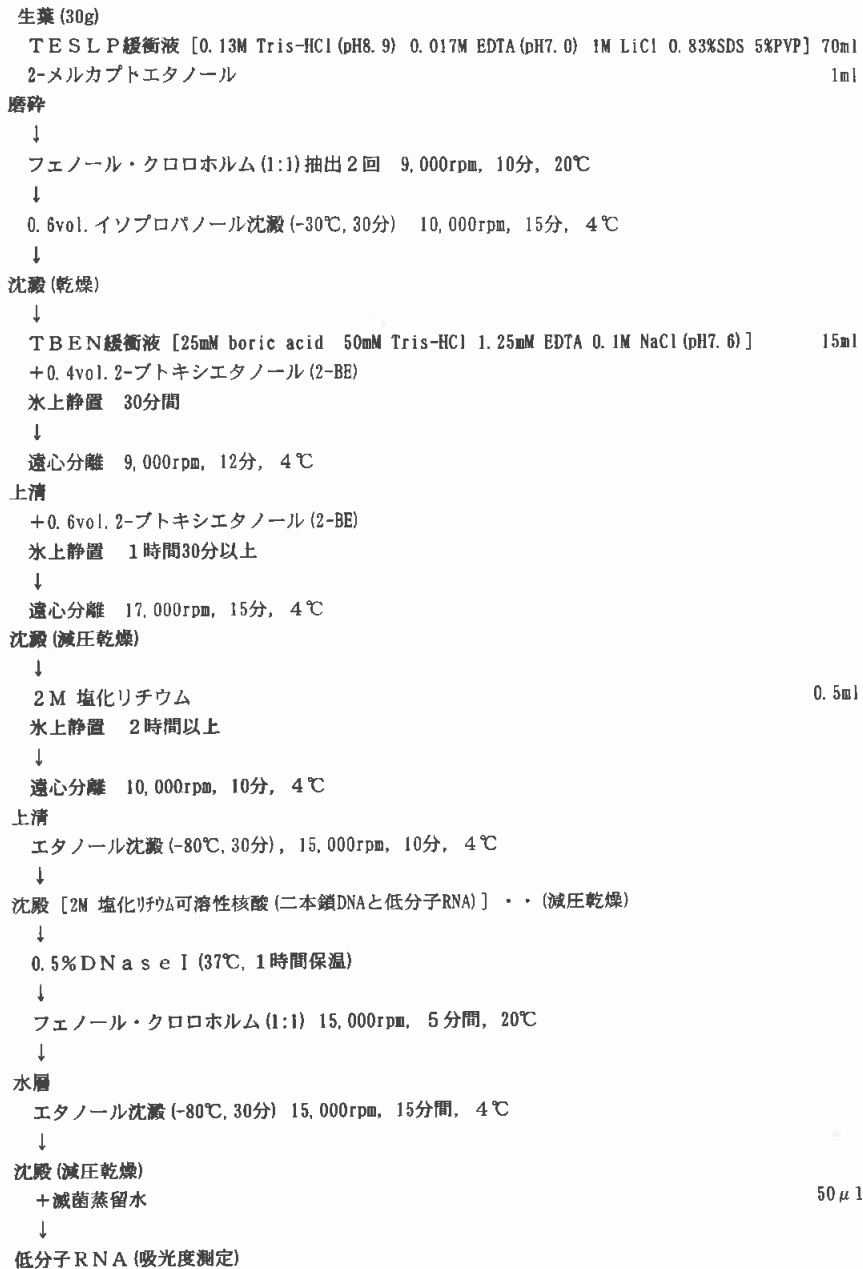
通常ウイロイドは、二本鎖 RNA と似た棒状構造 (rod structure) をとっており、熱や薬品等によって変性させると環状構造 (circular form) になる¹⁾。この特性を活かして、寄主植物由来の線状一本鎖 RNA から環状一本鎖 RNA であるウイロイドだけを分離する電気泳動法 (sPAGE^{6,7)}) を試みた。

供試したサンプルは、本場所有「不知火」の樹片を接木接種した「エトログシロン」と、県内B産地の「不知火」およびその樹片を接木接種した「エトログシロン」を用いた。それぞれ採集した生葉30gを、TESLP 緩衝液で磨砕し、フェノール・クロロホルム処理を行い、イソプロパノールで沈澱させた。このときペレットの状態がゼリー状であれば、ブトキシエタノールによる多糖類の除去を行ったが、ゆで卵の黄身のような状態であれば、すでに多糖類が除去されているので、ブトキシエタノール処理を行わず、2M 塩化リチウムに溶解し、不溶な高分子 RNA を除去した。そして DNase I により DNA を除去し、低分子 RNA だけを抽出した (第1図)。

sPAGE による電気泳動は、抽出した低分子 RNA を5%未変性ポリアクリルアミドゲル (泳動緩衝液 1×TAE pH 7.2) で、ウェル下8.5cmの部分にブROMフェノールブルー (BPB) が来るまで泳動した。取り出したゲルのウェル下3.5~5.5cmの部分を取り取り、新しいガラス板に逆さまにのせて、その上に8M尿素5%変性ポリアクリルアミドゲルを流し込んだ。変性ゲル (泳動緩衝液0.25×TBE) では、電極を逆にして下から上に

*現在 長崎県総合農林試験場

*Present address: Nagasaki Agricultural and Forestry Experiment Station, Isahaya, Nagasaki 854



第1図 ウイロイドを含む低分子RNAの抽出法

泳動し、銀染色してバンドを観察した (第2図)。

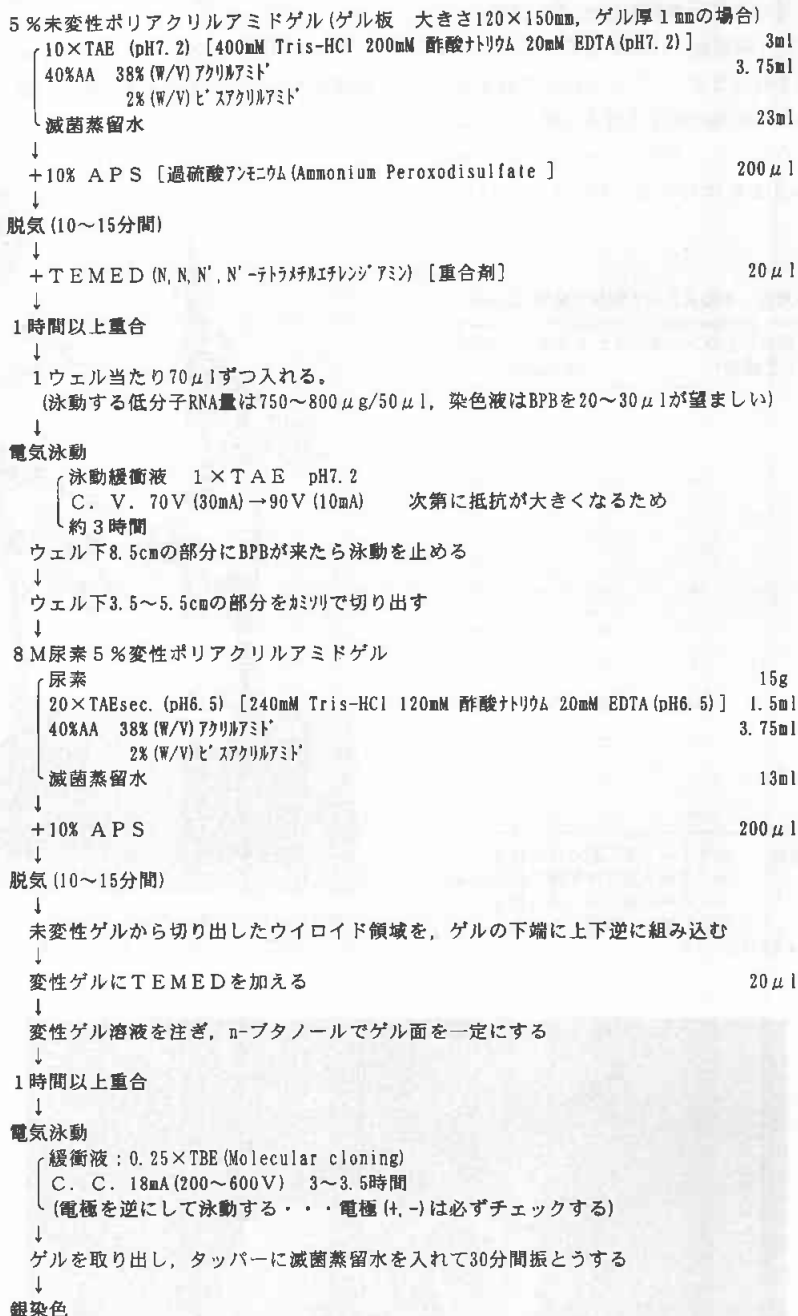
結 果

1. 接木接種による生物検定

本場所有樹は、検定を行った11樹のうち8樹にエピナスティー症状が認められた。また、すべての樹で葉の下垂または葉脈および葉柄が褐変する病徴が認められた

(第1表および第3, 4図)。

県内A産地の2年生苗木は、29樹のうち19樹にエピナスティー症状、16樹に下垂症状、25樹に褐変症状が認められた。また3症状とも認められるのは9樹で、3症状のうち1症状でも認められるのは28樹であった。3症状とも認められなかったのは1樹だけであったが、葉が淡緑化しており判然としなかった (第2表)。



第2図 電気泳動 (sPAGE) によるウイロイドの検出法

県内B産地の4年生苗木は, 10樹のうち1樹にエピナスティー症状と褐変症状が認められ, 1樹にわずかな下垂症状がみられた。しかし, いずれの症状とも軽微で, はっきりした病徴を示さなかった (第3表)。

2. 電気泳動 (sPAGE) による検定

本場所有樹は, 樹片を接木接種した「エトログシトロン」の3樹からそれぞれ低分子RNAを抽出し, 電気泳動を行った。その結果, 3樹ともカンキツエクソコーチスウイロイド (CEVd) は検出されなかったが, カン

キツウイロイド (CVd I ~ III) 様の 3 本のバンドが確認され、複合感染していることが判明した (第 5 図)。

県内 B 産地樹は、「不知火」11 樹から低分子 RNA を抽出し、電気泳動を行ったが、バンドは認められなかった。そこで、今後は B 産地の樹片を接木接種した「エトログシトロン」から抽出し、泳動したところ、カンキツウイロイド (CVd II または CVd III) 様の 1 本のバンドが確認された。

考 察

カンキツのウイルス・ウイロイド病は、全身感染する病害であり、発病するまでに数年を要するため、潜在感

第 1 表 長崎県試所有「不知火」の生物検定結果 (1994)

供試株	「エトログシトロン」葉のエピナスティー症状 ^{a)} (7.29調査)			(9.20調査)		
	I ^{b)}	II	III	I	II	III
不知火 No. 1	+	-	+	+	-	卅
2	-	+	+	±	卅	卅
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	+	±
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	±	-	-
7	卅	卅	卅	卅	卅	卅
8	-	+	-	±	卅	+
9	-	-	-	±	-	-
10	+	卅	-	卅	卅	±
11	-	-	-	-	-	-

^{a)} エピナスティー症状
 ±: 1 ~ 2 葉に軽く見られる
 +: 3 ~ 5 葉にやや強く見られる
 卅: 6 ~ 10 葉に強くみられる
 卅: 10 葉以上に強くみられる

^{b)} ウイロイド検定は 3 反復行った。



第 4 図 接木接種によるカンキツウイロイドの生物検定
 左: 長崎県試「不知火」 右: 「岩崎早生」原木 (健全)



第 3 図 「エトログシトロン」新葉に発生したエピナスティー症状

第2表 県内A産地樹の生物検定結果(1995)

供試株	「エトログシロン」葉の病徴			
	エピナスティー ^{a)}	下垂 ^{b)}	褐変 ^{c)}	その他
不知火 No. 1	—	+	卅	
2	+	+	卅	
4	+	—	+	
5	+	+	卅	
6	卅	+	卅	
7	—	—	—	葉の淡緑
10	卅	—	卅	
11	卅	卅	卅	
12	—	—	+	
13	+	+	+	葉の淡緑
14	卅	+	卅	
15	卅	—	卅	
16	+	—	+	
17	+	—	+	葉の淡緑
18	—	卅	卅	
19	—	+	卅	
20	—	—	+	
21	+	—	—	
22	卅	+	卅	
23	卅	+	卅	
24	+	—	+	
25	+	+	—	
26	卅	+	+	
27	—	+	卅	
28	—	—	+	
30	—	+	+	
35	+	—	—	葉の淡緑
36	—	+	+	
50	+	—	+	

第3表 県内B産地樹の生物検定結果(1995)

供試株	「エトログシロン」葉の病徴			
	エピナスティー ^{a)}	下垂 ^{b)}	褐変 ^{c)}	その他
不知火 No. 1	—	—	—	
2	—	—	—	
3	—	—	—	
4	—	—	—	
5	—	—	—	
6	—	—	—	葉のねじれ
7	—	+	—	
8	—	—	—	葉のねじれ
9	+	—	+	
11	—	—	—	

a) エピナスティー症状

—: 葉が巻いていない

+: 軽いエピナスティー症状がみられる

卅: 中程度のエピナスティー症状がみられる

卅卅: 強いエピナスティー症状がみられる

b) 下垂症状

—: 葉が垂れていない

+: 軽い下垂症状がみられる

卅: 中程度の下垂症状がみられる

卅卅: 強い下垂症状がみられる

c) 褐変症状

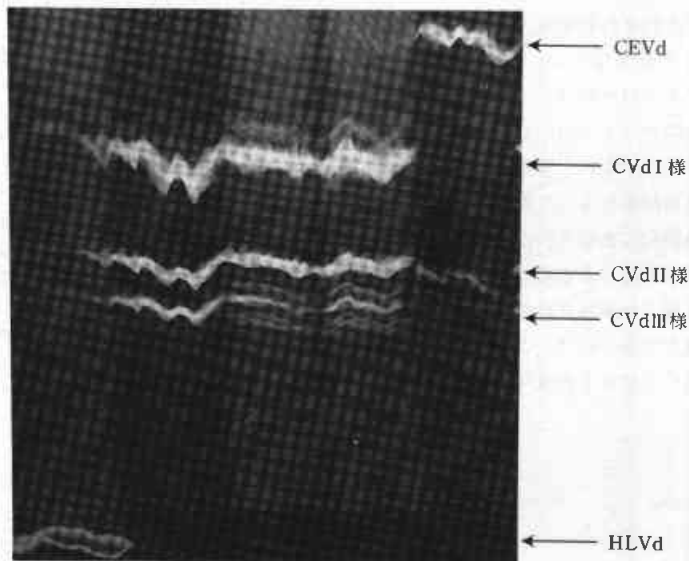
—: 葉脈, 葉柄が褐変していない

+: 褐変が散見される

卅: 葉脈, 葉柄の一部に強く褐変がみられる

卅卅: 葉脈, 葉柄の全体に強く褐変がみられる

1 2 3 4 5



第5図 sPAGEによる電気泳動像

Lane 1: HLVd, Lane 2: 長崎県試「不知火」No. 2, Lane 3: 長崎県試「不知火」No. 8,
Lane 4: 長崎県試「不知火」No. 10, Lane 5: CEVd

染に気付かないことが多い。また一度感染すると、その樹が植えられている限り保毒し続け、その樹から穂木を取って作られた苗木にも、ウイルス・ウイロイドが脈々と受け継がれていく。さらに高接ぎ更新を繰り返すことによって、何種類ものウイルス・ウイロイドが混合感染してしまうという悪循環になってしまう。

今回のウイロイド検定の結果、本場所有「不知火」および県内2産地の「不知火」にウイロイドの保毒が認められた。また保毒率が高く、複合感染しているものもあった。「不知火」は品種の特性として、一旦結実すると樹勢が弱くなるので³⁾、最近では露地栽培から屋根かけ栽培やハウス栽培へ転換しつつあるが、ウイロイドは、単独感染より複合感染の方が激しい病徴を示し^{4,9)}、ウイルスと違って高温期に増殖する性質があるため²⁾、今後被害の進展が懸念される。また今回調査した本場および両産地の穂木は、九州管内外から導入されており、本県に限らず他県のカンキツ産地でも同じ現状ではないかと推察される。さらにウイロイドは接木だけでなく、せん定バサミ等によって隣接樹へ伝染するので、取り扱いには十分注意する必要がある。

カンキツのウイロイドは、塩基数、塩基配列の相同性および指標植物に対する反応から、カンキツエクソコーティスウイロイド¹⁰⁾ (CEVd) の他に、カンキツウイロイド (CEVd I~IV) が検出されており、さらに5~12bp 前後の違いでそれぞれ2~4系統に分類されている¹⁰⁾。また各ウイロイドの接木検定の結果から、病徴や発現に要した日数がそれぞれ異なっており、カンキツに対する病原性がそれぞれ異なることが判明している²⁾。しかし、エクソコーティス以外のウイロイドは不明な点が多く、特に日本特有のカラタチ台に対する病原性については、詳しく解明されていない。果樹試験場興津支場の家城らによると、茎頂接木によって無毒化した「不知火」は、樹勢が強まる傾向にあるとのことから、樹勢が弱い原因はウイロイドの影響による可能性が高いと考えられる。現在、興津支場より譲渡されたウイルス・ウイロイドフリー苗木を育成中であるので、これを健全母樹とし、この母樹から採穂して苗木を育成する予定である。

摘 要

長崎県果樹試験場所有の「不知火」と県内2産地の「不知火」(2~4年生苗木)について、ウイロイド検定を行った。

1. 「エトログシトロン」(アリゾナ861 S-1)による接木検定により、本場所有11樹のうち8樹にエピナスティー症状が認められ、すべての樹で葉の下垂または葉脈および葉柄が褐変する病徴が認められた。また、県内A産地の2年生苗木29樹のうち19樹にエピナスティー症状、16樹に下垂症状、25樹に褐変症状が認められ、3症状とも認められるのは9樹であった。県内B産地の4年生苗木は、10樹のうち1樹にエピナスティー症状と褐変症状が認められ、1樹にわずかな下垂症状がみられたが、いずれの症状とも軽微であった。

2. 「不知火」樹片を接木接種した「エトログシトロン」生葉から低分子RNAを抽出し、電気泳動(sPAGE)を行ったところ、本場所有樹からカンキツウイロイド(CVd I~III)様の3本のバンドが確認された。また、県内B産地樹からカンキツウイロイド(CVd IIまたはCVd III)様の1本のバンドが確認された。

引用文献

- 1) Duran-VILA, N., J. A. PINA, J. F. BALLESTER, J. JUAREZ, C. N. ROISTACHER, R. Rivera-BUSTAMANTE and J. S. SEMANCIK. (1988) *Journal of General Virology* 69: 3069-3080.
- 2) Duran-VILA, N., J. A. PINA and L. NAVARRO. (1993) *Proceedings of the 12th conference IOCV*: 202-211.
- 3) 藤田賢輔・平山秀文・重岡 開 (1992) *九農研* 54: 239.
- 4) 伊藤隆男・家城洋之 (1996) *日植病報*: 投稿中.
- 5) 草野成夫・下村克巳 (1994) *九病虫研会報* 40: 146.
- 6) Rivera-BUSTAMANTE, R., R. GIN, and J. S. SEMANCIK. (1986) *Analytical Biochemistry* 156: 91-95.
- 7) SCHUMACHER, J. (1983) *Analytical Biochemistry* 135: 288-295.
- 8) SEMANCIK, J. S. and Duran-VILA, N. (1991) *Proceedings of the 11th conference IOCV*: 125-135.
- 9) SEMANCIK, J. S., D. J. GUMPF and J. A. BASH. (1991) *Proceedings of the 11th conference IOCV*: 189-195.
- 10) 田中寛康・山田峻一 (1969) *園試報* 89: 181-195.
- 11) 脇山哲ら (1993) *植物病原性微生物研究法*: 243.

(1996年4月30日 受領)