

カラタチ台温州ミカン「原口早生」で確認されたカンキツエクソコー ティスウイルス以外のウイルスによる複合感染と樹体への影響

草野 成夫・井樋 昭宏・栗原 実
(福岡県農業総合試験場果樹苗木分場)

Multiple infection with citrus viroids other than citrus exocortis viroid in Satsuma mandarin trees on trifoliate orange rootstock and its influence on the trees. Nario Kusano, Akihiro Ibi and Minoru Kuwahara (Fruit Tree Sapling Branch, Fukuoka Agricultural Research Center, Kurume, Fukuoka, 839-1212, Japan)

We investigated Satsuma mandarin 'Haraguchi Wase' trees on trifoliate orange rootstocks showing exocortis-like symptoms. The results of bioassay using 'Etrog' citron (Arizona) 861-S 1 and RT-PCR showed that the trees were infected with 1 to 4 citrus viroids but not with citrus exocortis viroid (CEVd). According to a survey, the more serious was the damage to the rootstock, the larger was the decrease in tree canopy volume and trunk diameter. It appeared that multiple infection caused enormous damage, such as bark scaling, which is normally characteristic of CEVd infection in trifoliate orange rootstock. We suspect that hop stunt viroid (HSVd) and citrus viroid-III (CVd-III) in the viroid complex causes severe symptoms in trifoliate orange rootstock, and that additional infection with CVd-OS and/or CVd-I-LSS causes even worse damage.

Key words : citrus viroids, Haraguchi Wase, multiple infection, RT-PCR, Satsuma mandarin

緒 言

果樹は永年性作物であり、ウイルスやウイルス以外のウイルスに一旦感染すると果実収量や品質、樹勢低下など、長期に亘り大きな影響を受ける。カンキツに被害を与えるウイルスの代表的なものとして、エクソコーティス病の病原体である *Pospiviroid* 属のカンキツエクソコーティスウイルス (CEVd) が知られている。日本におけるほとんどの栽培カンキツの台木として用いられているカラタチは CEVd 感受性であり、カラタチ台カンキツ樹が本ウイルスに感染すると台木部の剥皮や亀裂症状、樹全体の矮化や収量低下が起こり、衰弱により、最終的には枯死に到る。その他のウイルスとしては、*Apscaviroid* 属のカンキツベントリーフウイルス (CBLVd)、カンキツウイルスⅢ (CVd-Ⅲ)、カンキツウイルス OS (CVd-OS)、CBLVd の特殊な変異株とされる CVd-I-LSS、*Hostuviroid* 属のホップ矮化ウイルス (HSVd)、*Cocadviroid* 属のカンキツウイルスⅣ (CVd-Ⅳ) が報告されている (Duran-Vila et al., 2000; Ito et al., 2000a)。CEVd を除いた他のカンキツのウイルス (以

下 CVd と略) は、その分子生物学的な特性もそれぞれ異なるが、指標植物であるエトログシロンに無病徴もしくは中程度の病徴を示し、カンキツ樹全体を適度に矮化させる効果もあることから、カンキツ栽培における単位面積当たりの収量増加や果実品質向上を目的として、今まで30年間近く、有効利用のための試験・研究が行われてきた (Roistacher et al., 1977, 1993; Nauer et al., 1988; Hadas and Bar-Joseph, 1991; Owens et al., 1999)。ところが、近年、日本において CEVd 以外のウイルスの複合感染によりカラタチ台木の剥皮および樹全体の樹勢低下など CEVd 類似の被害が発生する可能性が指摘された (村本, 2001; Ito et al., 2002a)。これらのウイルスは、接ぎ木伝染だけでなく、収穫や剪定等の各種管理作業においても容易に器具伝染するため (Garnsey and Weathers, 1972)、今後、大きな問題となる可能性があるが、カンキツ栽培圃場単位の調査事例はない。

そこで、一般のカンキツ栽培圃場から CEVd 感染による被害と類似した症状を呈する栽培樹を探索し、遺伝子診断により全てのウイルス保毒の有無を明らかにするとともに、保毒ウイルスの種類およびその組み合わせ

と樹勢、被害等の樹体反応に関する特性調査を行ったので報告する。

本研究に当たり、マルチプレックスRT-PCR等のご指導を頂いた独立行政法人果樹研究所伊藤隆男博士に感謝申し上げます。

材料および方法

1. 圃場調査

2000年より県内のカンキツ産地での調査や聞き取りを行った。その結果、2002年に、414本植栽されている10年生温州ミカン「原口早生」圃場において、CEVd被害に類似した症状が観察された。そこで、上記した414本中、高接ぎや間伐による樹体生育への影響がないと考えられる388本について、カラタチ台木の病徴発現程度や幹周、樹冠容積調査を行った。なお、幹周および樹冠容積調査については、カンキツの調査方法（農林水産省果樹試験場興津支場編、1987）により行った。

2. RT-PCRによる保毒ウィロイドの解析

調査圃場は階段状に植栽されていたため、ウィロイドの保毒調査は、カラタチ台木部に剥皮の病徴が出ている樹の周辺樹に絞って行った。具体的には、カラタチ台木部に病徴を発現している樹87本中48本、無病徴樹301本中88本、合計136本について緑枝を採取し、カンキツウィロイドの指標植物であるエトログシトロン系統アリゾナ861-S 1へ接ぎ木接種を行うとともに、RT-PCRによる解析を行った。「原口早生」の穂木（3月採取）および接ぎ木接種したエトログシトロン新梢（7～8月）の樹皮部分からカミソリで縦約1 cm、横2～3 mmを切り出し、ISOGEN（ニッポンジーン社）を用い、添付マニュアルに従って全RNAの抽出を行い、抽出したRNA試料を鋳型としてRT-PCRに使用した。RT-PCRは、逆転写酵素M-MLV（invitrogen）とPremix Taq（TAKARA）の組み合わせで行った。CEVd、CBLVd、

HSVd、CVd-Ⅲ、CVd-OS、CVd-Ⅳ、CVd-I-LSS検出用のプライマーとしては、Ito et al. (2002a, 2002b) が報告しているマルチプレックスRT-PCR用プライマーおよび単独RT-PCR用プライマーを使用した。マルチプレックスRT-PCRの増幅産物はポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、2D-銀染色試薬・Ⅱ「第一」（第一化学薬品（株））により銀染色を行って検出した。単独RT-PCRの場合は、1.5%アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色を行い増幅産物のバンドの有無を確認した。また、サーマルサイクラー（アステック（株）製、PC808）の温度・時間等の条件は、逆転写反応を37℃、60分で、PCRは熱変性94℃、30秒、アニーリング60℃、30秒、伸長反応72℃、10秒で35サイクル行った。

結果

1. 「原口早生」圃場におけるカラタチ台木部の病徴と樹の生育

2002年および2003年に行ったカラタチ台木部の病徴および幹周、樹冠容積の調査結果を第1表に示した。圃場に植栽されている388本について調査したところ、87本で台木部に樹皮の亀裂や剥皮症状が観察された。そのうち、病徴の激しいもの（CEVd被害とほぼ同様の症状）が25本、中位の症状が28本、軽い症状が34本であった（第1図）。樹冠容積についてみると、台木部の病徴の激しいもので無病徴の72%であり、有意な差が認められた（第1表；シェフェの多重検定、 $P < 0.01$ ）。また、中位の症状や軽い症状でもそれぞれ84%、90%と無病徴のものと比較して小さくなったが、有意な差はなかった。台木部に病徴が発現した樹では、無病徴樹と比較して全体的に樹高は低く、幹周は小さくなる傾向にあった。

2. 保毒ウィロイドの種類と保毒パターン

原口早生の穂木から直接抽出したRNA試料を用いた



第1図 「原口早生」圃場において認められたカラタチ台木部の病徴
A：軽， B：中， C：甚。

第1表 「原口早生」圃場におけるカラタチ台木部の病徴発現状況と樹体生育状況^{a)}

病徴	本数	割合 ^{c)} (%)	樹高 (cm)	長径 (cm)	短径 (cm)	幹周 (cm)	樹冠容積 (m ³)
甚 ^{b)}	25	6.4	180	213	163	23.3	4.5a ^{d)}
中	28	7.2	188	233	167	24.1	5.2ab
軽	34	8.8	193	228	175	23.0	5.6ab
無病徴	301	77.6	200	248	175	24.8	6.2b
合計	388	100.0					

a) 間伐等による樹体生育への影響がないと考えられた樹のみ388本、2002年で10年生を調査対象とした。樹体生育に関する数値は2002、2003年の2カ年平均。長径、短径は、樹冠の横径の長い部分と短い部分。b) 第1図参照。c) 調査樹総数に対する割合。d) 同英字間にはシェフェの多重検定(1%)により有意差を認められない。

RT-PCRでは、マルチプレックスおよび単独プライマーともにウイルスの検出が不安定であった。そこで、接ぎ木接種を行ったエトログシロンからの抽出RNA試料を用いたところ、安定的に検出が可能であった。そこで以降の検出では、全てエトログシロンからの抽出サンプルを用いた。

カラタチ台木での病徴発現樹48本、無病徴樹88本について特異プライマーを用いたRT-PCR解析を行った結果、いずれもCEVdは検出されなかった。しかし、すべての

樹からCEVd以外のウイルスが1種類以上検出された。検出されたウイルスは、HSVd、CVd-Ⅲ、CVd-OSおよびCVd-I-LSSの4種類であり、その他のCBLVdとCVd-Ⅳは検出されなかった。第2表に被検樹におけるウイルスの保毒パターンを示した。3種類を保毒する樹が全体の約50%を占めており、その中でもHSVd、CVd-Ⅲ、CVd-OSの組み合わせが最も多かった。

3. 保毒ウイルスの数および組み合わせとカラタチ台木部における病徴発現との関係

保毒ウイルス数とカラタチ台木部における病徴発現との関係を見ると、保毒ウイルス数が多いほど台木部の病徴は激しくなる傾向が認められた。すなわち、4種類保毒樹の約70%には何らかの病徴が認められ、3種類あるいは2種類を保毒した樹では、無病徴の樹の割合が多く、保毒数が1種類の場合、病徴は認められなかった。また、カラタチ台木部における病徴発現と保毒ウイルスの種類との関係を見ると、RT-PCR解析を行った病徴発現樹48本中HSVdとCVd-Ⅲの両方を保毒したものは44本と多く、全体の約92%を占めた。また、CVd-I-LSS、CVd-OSの関与率はそれぞれ75.0%、77.1%で、ほぼ等しかった(第2表)。

第2表 「原口早生」が保毒していたウイルスの種類とカラタチ台木部における病徴発現との関係^{a)}

保毒 ウイルス数	ウイルスの種類				病徴程度別本数							割合 ^{d)} (%)
	HSVd	CVd-Ⅲ	CVd-OS	CVd-I-LSS	甚 ^{b)}	中	軽	発病樹計	割合(%) ^{c)}	無病徴	計	
4	○	○	○	○	12(31.6) ^{e)}	7(18.4)	8(21.1)	27(71.1)	56.2	11(28.9)	38(100)	28.0
	○	○		○	2(20.0)	4(40.0)	1(10.0)	7(70.0)	14.6	3(30.0)	10(100)	7.4
	○	○	○	○	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0.0	4(100)	4(100)	2.9
	○	○	○		1(2.0)	2(3.9)	5(9.8)	8(15.7)	16.7	43(84.3)	51(100)	37.5
	○	○	○	○	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0.0	4(100)	4(100)	2.9
				計	3(4.3)	6(8.7)	6(8.7)	15(21.7)	31.3	54(78.3)	69(100)	50.7
2	○	○			0(0.0)	1(25.0)	1(25.0)	2(50.0)	4.2	2(50.0)	4(100)	2.9
	○	○		○	1(50.0)	0(0.0)	1(50.0)	2(100)	4.2	0(0.0)	2(100)	1.5
	○		○		1(12.5)	0(0.0)	0(0.0)	1(12.5)	2.1	7(87.5)	8(100)	5.9
	○			○	0(0.0)	1(100)	0(0.0)	1(100)	2.1	0(0.0)	1(100)	0.7
	○	○	○		0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0.0	8(100)	8(100)	5.9
				計	2(8.7)	2(8.7)	2(8.7)	6(26.1)	12.6	17(73.9)	23(100)	16.9
1		○			0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0.0	4(100)	4(100)	2.9
			○		0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0.0	2(100)	2(100)	1.5
					0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0.0	6(100)	6(100)	4.4
				計	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0.0	6(100)	6(100)	4.4
				総計17	15	16	48	100.0	88	136	100.0	

a) カラタチ台木部における病徴発現樹48本とその周辺の無病徴樹88本、計136本を調査対象とし、ウイルスはRT-PCRにより検出した。b) 第1図参照。c) 病徴発現樹総数に対する割合。d) 調査樹総数に対する割合。e) ()内の数値は保毒ウイルスの種類が同じ樹の総数に対する割合(%)。

考 察

カンキツの主要台木としては、アメリカではシトレンジ類やシングルシトルメロが、ブラジルではラングブアタイムが、スペインやイスラエルではシトレンジ類が用いられており、カラタチの台木としての利用は、日本やアメリカなどの一部の地域に限られている。しかし、カラタチは、経済寿命が他の台木と比較して短い欠点はあるものの、樹体が矮化して高品質果実生産に適する等の利点もある。CVd 感染の樹体への影響に関する外国での知見は、カラタチ台カンキツでの CVd の単独感染から複合感染によるものまで多岐に亘っているが、樹冠容積の減少、即ち矮化を良い方向に捉える報告も見られる。日本においては、草野・下村 (1994) が温州ミカンでの CVd の複合感染について報告を行い、その後、畑谷ら (1995)、伊藤ら (1996) も CVd 保毒の実態や CVd の塩基配列について報告を行っている。CVd の複合感染が樹体生育や台木部の剥皮等、重大な影響を及ぼす可能性については、村本 (2001) や Ito et al (2002a) らの報告があり、いくつかの CVd を保毒したカンキツ樹のカラタチ台木部に CEVd 被害と同程度の亀裂や剥皮症状などを認め、樹全体のわい化も観察している。

今回、カラタチ台木部に激しい病徴を示している温州ミカン「原口早生」においても、CEVd 保毒は認められないのに CEVd 被害と同程度の症状を発現していることから、CVd の複合感染が原因であることが示唆された。CVd の保毒数が樹体に及ぼす影響については、保毒する CVd の種類が多いほど台木部の症状が激しい傾向が認められた (第 2 表)。また、カラタチ台木部における病徴発現には、HSVd と CVd-Ⅲ の関与率が高いと考えられ、CVd-Ⅰ-LSS、CVd-OS がそれに付随すると病徴が激しくなることが推察された。今回検出された CVd は 4 種類であるが、台木部の症状が激しい樹では樹冠容積の減少が見られ、カンキツ生産上の大きな阻害要因となると考えられる。また、第 2 表のように種々の組み合わせの保毒樹が存在しており、2 種類の保毒でも病徴発現をしている樹もあった。以上のことから、台木部の病徴に関しては、CVd の感染から病徴発現までの期間や複合感染した CVd の組み合わせ、同種類のウイルスでも数塩基の違いによって病原性が異なる変異株の存在すること等 (Ben-Shaul et al.1995; Reanwarakorn et al.1998; Owens et al.2000; Ito et al.2000; 草野・井樋, 2003)、複雑な要因が関与している可能性がある。また、日本で発生する CVd の中には、外国では未報告の CVd-OS、CVd-Ⅰ-LSS が含まれており、CVd のどのような組み合

わせがカラタチ台木部の激しい亀裂や剥皮症状を起こすのか、今後詳細に検討する必要がある。

日本における CVd の複合感染による CEVd 被害類似症状の発見はごく最近であることから、今後、カンキツ産地での被害報告が増加する可能性があり、ウイルス研究の進展が強く望まれるところである。

摘 要

温州ミカン「原口早生」の一般栽培圃場からカンキツエクソコーティスウイルス (CEVd) による被害に類似した症状を呈した樹を多数発見し、検定植物エトログシトロンや RT-PCR による検定を行ったところ、CEVd 以外の 4 種類のカンキツウイルス (CVd) を種々の組み合わせで 2 種類以上保毒していることが明らかとなった。カンキツ樹体の調査では、カラタチ台木部の症状が激しいほど樹冠容積や幹周の減少が顕著であった。また、CVd 保毒が樹体に及ぼす影響を調査したところ、保毒ウイルス数が多いほど台木部の病徴が激しい傾向が認められた。なお、カラタチ台木部の剥皮等の病徴発現には、ホップ矮化ウイルス (HSVd) と CVd-Ⅲ の複合感染による影響が大きく、これに CVd-OS、CVd-Ⅰ-LSS が単独または複合感染することによって発現程度がさらに激しくなる可能性が考えられた。

引用文献

- Ben-Shaul, A., Y. Guang, N. Mogilner, R.Hadas, M. Mawassi, R. Gafny and M. Bar-Joseph (1995) Genomic diversity among populations of citrus viroids from different graft-transmissible dwarfing complexes in Israel. *Phytopathology* 85 : 359-364.
- Duran-Vila, N., S. J. Semancik and P. Broadbent (2000) Viroid diseases, cachexia and exocortis. *Compendium of citrus diseases*. 2nd ed. (Timmer, L. W., M. S. Garnsey and H. J. Graham eds.) pp. 51-54, The American Phytopathological Society, ST. Paul. MN.
- Garnsey, M. S. and L. G. Weathers (1972) Factors affecting mechanical spread of exocortis virus. *In. Pro. Cof. Int. Orgn. Citrus Virol.*, 5th (Price, W. C. eds.) pp. 105-111, IOCV, Gainesville, Florida.
- 畑谷達児・中原健二・小原達二・家城洋之・加納健・四方英四郎・木村郁夫 (1995) カンキツウイルスグループⅠの検出と塩基配列. *日植病報* 61 : 279 (講要).
- Hadas, R. and M. Bar-Joseph (1991) Variation in tree size and rootstock scaling of grapefruit trees

- inoculated with a complex of citrus viroids. In. Pro. Cof. Int. Orgn. Citrus Virol., 11th (Brlansky R. H., R. F. Lee and Timmer, L. W. eds.) pp240-243, IOCV, Riverside, CA.
- 伊藤隆男・家城洋之・岩波徹 (1996) わが国のカンキツが保毒するカンキツウイロイド. 日植病報 62 : 321 (講要).
- Ito, T., H. Ieki and K. Ozaki (2000) A population of variants of a viroid closely related to citrus viroid- I in citrus plants. Arch. Virol. 145 : 2105- 2114.
- Ito, T., H. Ieki, K. Ozaki, T. Iwanami, K. Nakahara, T. Hataya T. Ito, M. Isaka and T. Kano (2002a) Multiple citrus viroid from Japan and their ability to produce Exocortis-like symptoms in citron. Phytopathology 92 : 542-547.
- Ito, T., H. Ieki and K. Ozaki (2002b) Simultaneous detection of six citrus viroids and Apple stem grooving virus from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. J. Virol. Methods 106 : 235-239.
- 伊庭慶昭・河瀬憲次 (1987) カンキツの調査方法. 生態調査法. (河瀬憲次編) 農林水産省果樹試験場興津支場, pp. 1-2.
- 草野成夫・下村克己 (1994) 温州ミカンから検出される数種のウイロイドについて. 日植病報 60 : 394 (講要).
- 草野成夫・井樋昭宏 (2003) 各種カンキツから見いだされたホップ矮化ウイロイドの変異株. 九州農業研究 65 : 93.
- 村本和之 (2001) カンキツエクソコーティスウイロイド以外のウイロイドによるカンキツの樹勢低下とカラタチ台木の剥皮症状. 山口農試研報 52 : 61-67.
- Nauer, E. M., C. N. Roistacher, E. C. Calavan and T. L. Carson (1988) The effect of citrus exocortis viroid (CEV) and related mild citrus viroids (CV) on field performance of Washington nevel orange on two rootstocks. In. Pro. Cof. Int. Orgn. Citrus Virol., 10th (Timmer, L. W., S. M. Garnsey and L. Navarro eds.) pp204-210, IOCV, Riverside, CA.
- Owens, R. A., S. M. Thompson, P. A. Felistein and S. M. Garnsey (1999) Effects of sequence variation on symptom induction by citrus viroid III. Ann. appl. Biol. 134 : 73-80.
- Owens, R. A., G. Yang, D. Gundersen-Rindal, R.W.Hammond, T. Candresse and M. Bar-Joseph (2000) Both point mutation and RNA recombination to the sequence diversity of citrus viroid III. Virus Genes 20 : 243-252.
- Roistacher, C. N., J. A. Bash and J. S. Semancik (1993) Distinct disease symptoms in Poncirus trifoliata induced by three citrus viroids from three specific groups. In. Pro. Cof. Int. Orgn. Citrus Virol., 12th (Moreno, P., J. V. daGraca and L. W. Timmer eds) pp173-179, IOCV, Riverside, CA.
- Reanwarakorn, K. and J. S. Semancik (1998) Regulation of pathogenicity in hop stunt viroid-related group II citrus viroids. J. Gen. Virology. 79 : 3163-3171.
- Roistacher, C. N., E. C. Calavan, R. L. Blue, L. Navarro and R. Gonzales (1977) A new more sensitive citron indicator for detection of mild isolates of citrus exocortis viroid (CEV). Plant Dis. Rep. 61 : 135-139.
- (2005年4月30日受領; 8月12日受理)