

特集：果樹病原体の病原性検定法

序 章

農研機構 果樹研究所 いわ岩 なみ波 とおる徹

は じ め に

「作物病原菌研究技法の基礎」(大畑貫一ら 編, 1995)という大変役に立つ本があるが、その序の冒頭に以下のような記述がある。「以前から、植物病理で特に生態研究をする場合は、対象となる病害を思い通りに発病できるように、はじめて一人前になったといわれたものである」。「一人前の研究者になる」という教育的な視点はさておき、病害研究において病原性検定はいつの時代でも重要であり、果樹病害研究も例外ではない。特に近年において、温暖化にともないこれまで国内ではなかったりごくまれであった病原体が見つかったり、ディープシーケンシングなどの新規手法で新たな病原体(候補)が見いだされているため、実際に接種をして病原性を確認すべき場面は増えている。また、病原体かどうかだけの検定だけでなく、病原菌のレース判定は接種試験が不可欠である。さらに、耐病性育種の場面では単なる定性的な接種試験ではなく、定量的な接種が求められている。以上のような背景により、果樹病原体の病原性検定を行う場面は今後ますます頻繁になると予想される。

一方、近年では病害研究者、防除担当者等が自ら果樹の病原体を分離・培養して病原性を検定する場合、その「やり方」を教えてくれる先輩が減ってきているため、分離した菌の病原性検定をしたり、耐病性品種のスクリーニングをしたりするときに、困惑する場面が生じてきているように思われる。ほとんどの果樹の病原体(糸状菌、細菌、ウイルス、ウイロイド)は分離や病原性の検定にちょっとしたコツが必要で、上述の「作物病原菌研究技法の基礎」や過去の「植物防疫」誌でもいくつかの果樹病原体の取り扱い方が紹介されている。しかし、コツが記載された過去の文献も手に入りにくくなっているうえに、法令改正などにより使いにくくなった手法(汁液接種の際にニコチンを使うなど)などもある。さらに最新の分子生物学的なテクニックの中にも果樹に応用するには独特のコツが必要な場合もある。そこで、本特集においては、果樹の主な病原体を対象に、病原性検定

法の方法やコツについて解説する。

理想的には主要果樹の主要な病原体について、標準化された病原性検定法を取り上げるべきであったが、今回は紙面の制約などもあり、カンキツ、リンゴ、ブドウ等から、最近研究の進んだ代表的な病原体を取り上げた。別の機会に、第2弾、第3弾の企画をして、重要な果樹病原体を網羅するようにしていきたい。

I 接種する果樹の部位

果樹から分離された病原体を接種するときには、樹体そのものに接種する場合、樹体の一部を切りとって接種する場合、および実生苗に接種する場合等があり、それぞれの場合で病理学的な意味が異なるので、注意が必要である。また、結果を記載する場合にもその点に留意して、どのような部位にどのように接種したかを明記することが大切である。

1 葉、枝、果実を用いる場合

材料が比較的得やすいのは、葉や枝である。また、果実は季節が限られるが、店から簡単に購入できるメリットがある。これらの材料を用いる場合は、特に新しい組織を用いるか、古くて硬化した組織を用いるかを目的に応じて選び、明確に記録することが重要である。また、葉よりも枝を用いたほうが再現性よく結果が得られる場合もあり、その逆もあり得る。また葉や枝は、大きな樹についたまま接種したほうがよい場合と、切り取って実験室で接種したほうがよい場合もある。このため予備試験を行って一番よい方法を見極める必要がある。果実を店で購入した場合は、必ずしも正確に同定済みの材料ではないことを覚悟しておくべきであろう。

2 実生苗を用いる場合

大きな樹体を直接用いるより、ポット植えた実生苗を用いるほうが効率的であり、数を沢山こなせるので再現性のあるデータが得られやすい。また、ほとんどの果樹のウイルス、ウイロイドは種子伝染しないため、ウイルス、ウイロイドの戻し接種には実生苗を用いるメリットが大きい。ただし、カンキツの珠心胚実生では、親の品種と同様と考えてよいが、他の樹種の実生苗は親の品種とは異なっていることに注意する。例えば、ウメ品種「八郎」の種子から得られた実生苗は「八郎」ではない。な

Methods for Estimating Pathogenicity of Agents in Fruit Trees.
By Toru IWANAMI

(キーワード：果樹病原体, 検定法, 分離, 接種)

お、英語の論文で、実生苗と接ぎ木苗を区別せずに、seedlingと標記（誤記）されている場合があり、注意を要する（特にネーティブではない外国人の英語論文に多い。一方、日本人で間違っただけで標記している人はほとんどいない）。

3 接ぎ木苗を用いる場合

全く同じ品種での病徴を見たいときは、大きな樹から枝を取り、接ぎ木苗を養成する。この方法ではほぼ同じ形質の苗をそろえられるメリットがある。特に台木が問題にならない場合は、できるだけ強勢台木を用いると生育がよくなる。例えばカンキツでは、通常栽培で用いられるカラタチを台木とするよりは、ラフレモンを用いたほうが、早く苗木を育成できる。糸状菌や細菌病の病原性検定では、接ぎ木苗を用いて問題とならないことが多く、特に市販の接ぎ木苗を用いることで手間が省ける場合も多い。ただし、信頼できる業者から入手した方がよい。

一方、ウイルス、ウイロイドの病原性検定をする場合は、接ぎ木した穂木が既に何らかのウイルス、ウイロイドに感染している場合が多いので、そのままでは重複感染の結果しか見ることができない。このため熱処理や茎頂接ぎ木等でウイルス・ウイロイドフリーの母樹を作出し、それから接ぎ木苗を増殖する必要がある、やや手間がかかる。また、接ぎ木増殖の際には、汁液伝染性のウイルス、ウイロイドのコンタミを防ぐため、接ぎ木ナイフや剪定はさみの消毒をする必要がある。以前は、消毒にホルマリンと水酸化ナトリウムの混合液を普通に用いていたが、劇物に相当するため接ぎ木を行う温室などのオープンな場所では非常に使いにくい。このため次亜塩素酸を含有する市販の洗剤を代用することもあるが、製品や製造年により次亜塩素酸の濃度（製品に表示されていないことが多い）が変更されていて、消毒効果が期待できない可能性があることに常に留意する。ディスプレイのナイフなどを用いると消毒の手間を省くことができる。

4 樹体そのものを用いる場合

腐らん病などの主幹病害では、やはり大鉢や圃場に植栽された大きな樹体そのものに接種する必要がある。他の病原菌が多数混在する条件での試験となり、また結果が出るまでに長い年月がかかる場合が多いので、病原性検定試験中のコンタミに注意するとともに、再現性を保証するため反復を増やすことがポイントとなる。

II 「単離した病原体の接種」をサポートする技術、機器

病原体の病原性検定は伝統的な植物病害研究の手法で

あるが、最近発達してきた手法が試験を進めるうえで非常に役に立つ場合がある。病原性検定のうえで重要なステップは、均一な1種類の病原体の調整であるが、糸状菌や細菌と異なりウイルスやウイロイドは単孢子分離や限界希釈で、均一な1種類の病原体を調整できない。植物組織上で汁液接種と局部病斑分離を繰り返しても、厳密な意味での単離は困難であるし、果樹では汁液接種が難しい、あるいは不可能なウイルスもある。このような場合は次善の策として、できるだけ小さな組織を用いた接ぎ木接種を繰り返す、媒介昆虫がいる場合は1頭の虫を用いた虫媒接種を繰り返す、などの方法が試みられてきた。しかしこれらの方法はやはり不完全であった。近年、ウイルスやウイロイドの全ゲノムあるいはその2量体などをクローニング（単離）し、これを植物に接種する方法が発達してきており、果樹病原体の病原性検定法にも応用可能である。

1 全ゲノムクローニング

ウイルスやウイロイドの全ゲノム（全長）クローニングは、主にゲノムサイズの比較的小さいウイルス、ウイロイドで報告されているが、カンキツトリステザウイルスなど全長が20 kbほどのウイルスでも、全ゲノム（全長）クローニングと植物への感染例が知られている。接種法には、全ゲノムから、感染性のRNAを転写して植物に接種する方法と、全ゲノムを35Sなどのプロモーターの下流につないだプラスミドを含むアグロバクテリウムの菌体を直接植物に接種する方法がある。感染性のクローン作成は技術的に困難であり、遺伝子組換え実験の設備や手続きが必要となるが、一度感染が成立すれば、単一種の分子（クローン化された）の病原性を見ることができ、結果の解釈が非常に簡単になる。

2 次世代シーケンサーによる潜在性のウイルス、ウイロイドの検定

近年、次世代シーケンサーの普及が進み、応用場面が広がっている。果樹病原体の病原性検定法の場面でも、例えば、接種する苗木などに潜在性のウイルス、ウイロイド等が感染していないかどうかのチェックに用いることができる。接種前の苗木の葉などから、全RNAを抽出し、大半を占めるリボゾームRNAを除去した後ライブリーを調整し、残り全部のRNAの塩基配列を解読する。機械やシステムの性能にもよるが、1回の実験で500万個以上の断片を解析できる。この程度解析すると、潜在感染しているウイルス、ウイロイドの断片も相当数解析され、相同性検索を行うと既知のウイルス、ウイロイドはすぐに同定できる。また、新規のウイルス、ウイロイドであっても、種間に保存されている配列など

から、ウイルス、ウイロイド感染を推定することができる。もちろん、無の完全証明は不可能であるため、本法によってもウイルス、ウイロイドフリーであることの完全証明にはならないが、有力な状況証拠にはなり得る。

お わ り に

最後に、筆者の専門であるカンキツのウイルス病に関する古典的な名著をいくつか挙げておく。これから果樹病害に携わる人たちには是非一読を勧めたい。本特集がこれらの古典的名著を補完して、多くの方の果樹病害防除に関する業務の一助となれば幸いである。

果樹のウイルス病（宮川経邦，1975）

果樹ウイルスの木本植物や草本植物を用いた病原性検定について詳しく述べられている。

原色果樹のウイルス・ウイロイド病（家城洋之，2002）

果樹ウイルス，ウイロイドの比較的新しい手法について述べられている。

Graft-transmissible diseases of citrus（Roistacher, 1991）

世界中で発生する重要なカンキツの接ぎ木伝染性病害の検定法が、step-by-stepのプロトコールとして載っている。カンキツで新たな侵入病害が発生したときに最初にチェックすべき参考文献の一つである。カンキツグリーンング病が南西諸島で確認されたときも本書が大いに役立った。

引 用 文 献

- 1) 家城洋之 編（2002）：原色 果樹のウイルス・ウイロイド病 診断・検定・防除，農山漁村文化協会，東京，114 pp.
- 2) 宮川経邦（1975）：果樹のウイルス病—研究と対策—，農山漁村文化協会，東京，254 pp.
- 3) 大畑寛一ら 編（1995）：作物病原研究技法の基礎—分離・培養・接種—，日本植物防疫協会，東京，342 pp.
- 4) Roistacher, C. N. (1991) : Graft-Transmissible Diseases of Citrus, FAO, Rome, 266 pp.