

温州萎縮病の周年検定について

静岡県農林技術研究所果樹研究センター	かとう 加藤	みつひろ 光弘	いしい 石井	かなこ 香奈子*
静岡県農林技術研究所	かげ 影	やま 山	ちづ 津	こ 子
三重県紀州地域農業改良普及センター	うえ 上	にし 西	ひろ 啓	し 資
三重県農業研究所	ふじ 藤	た 田	あや 絢	か 香
福岡県農業総合試験場	くさ 草	の 野	なり 成	お 夫
佐賀県果樹試験場	の 野	ぐち 口	ま 真	ゆみ 弓
農研機構果樹研究所	いわ 岩	なみ 波		と おる 徹

はじめに

温州萎縮病は、温州萎縮ウイルス (*Satsuma dwarf virus*: SDV) によって引き起こされる病害である。接木や土壌を介してカンキツに感染し、果実品質や収量を低下させるウイルス病であるために感染後の治療手段がなく、生産現場では問題となっている。ウンシュウミカンに感染すると最も病徴が激しく表れて舟型葉やさじ型葉とよばれる葉の奇形を生ずる。カンキツの種類によっては感染しても外観上は奇形などの症状が現れないため、感染に気づかないことがある。健全な苗木生産を行うためにはウイルス検定を定期的実施し、無毒な母樹から穂木を確保することが重要となる。このため、カンキツ生産地では大量検定可能な酵素結合抗体法 (ELISA 法) によるウイルス検定が実施され、無毒の苗木や穂木の確保に努めている。

しかし、ELISA 法は操作や試薬の調整が煩雑で専門知識が必要とされることから、実施は研究機関に限定される。そのため、生産者が希望する時期に検定を行うことは困難なことが多い。すなわち、春の新梢展葉後にウイルス感染が疑われる葉の奇形症状に気付いてもすぐにはウイルス感染を確認できず、翌年春の新梢の発芽期まで検定を待たなければならない。このようなウイルス感染が疑われる母樹の放置によって、翌年春までの1年間に隣接樹へSDVの感染が広がる危険性がある。そこで、生産者自らが簡易に圃場でウイルス検定できるイムノク

ロマト診断キット「SDVクロマト」を用い、新梢の時期以外でも採取可能な部位でウイルス検定ができないか検討し、1年を通して検出が可能であることを確認したので紹介する。試験方法などについて、詳しくは加藤ら (2014) を参照されたい。

なお、本研究は新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業「効率的茎頂接ぎ木と地域版簡易診断キットを活用した無毒カンキツ苗供給システムの開発」(平成22～24年度)による研究成果の一部である。

I イムノクロマト検定

1 概要および使用方法

イムノクロマト診断キットは、毛細管現象によってSDVの抗体がメンブレンフィルター上にある判定部の抗体まで移動し、抗原抗体反応により発色した後に目視で判定するという、イムノクロマト法を利用した簡易検定キット (商品名: SDVクロマト, 株式会社ミズホメディア) である (図-1)。春の新梢を用いた検定の有効性が明らかとなり (KUSANO et al., 2007), 2008年に市販



図-1 イムノクロマト診断キット (商品名: SDVクロマト)

All-Season Detection of *Satsuma dwarf virus*. By Mitsuhiro KATO, Kanako ISHII, Chizuko KAGEYAMA, Hiroshi UENISHI, Ayaka FUJITA, Nario KUSANO, Mayumi NOGUCHI and Toru IWANAMI

(キーワード: 温州萎縮病, イムノクロマト法, 周年検定, カンキツ)

* 現所属: 静岡県西部農林事務所

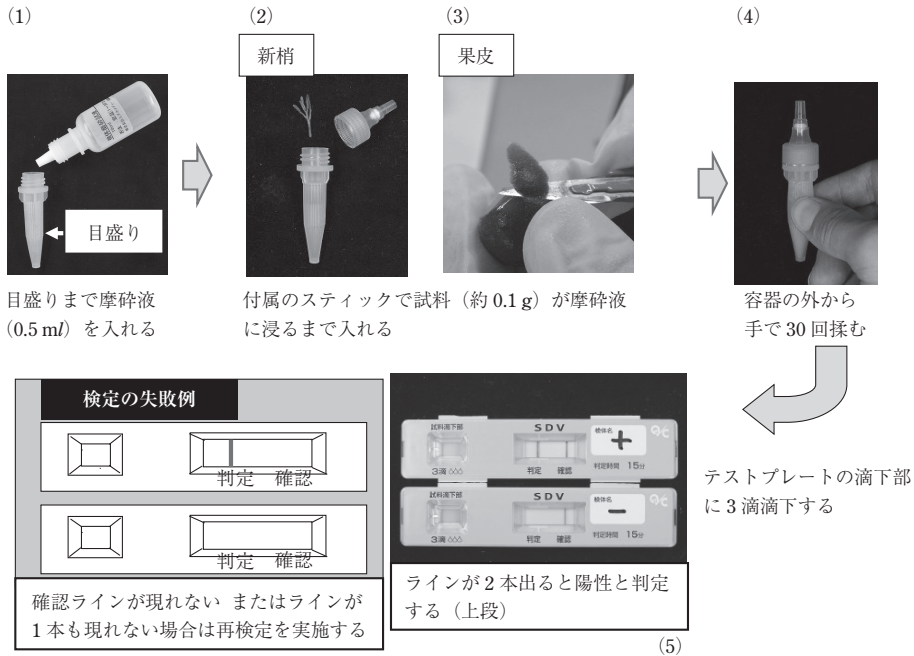


図-2 診断方法

が開始された。

本キットに付属されている説明書に従って手順通りに行うと簡単に検定ができる。試料を摩擦して検定プレートに滴下後、目視で確認および判定ラインの2本が確認された場合に陽性と判定する (図-2)。

本研究では、本キットによるイムノクロマト検定により、ウイルス検定を行った。

2 SDV 変異系統の検出について

温州萎縮ウイルスにはSDVのほか、変異系統であるカンキツモザイクウイルス (CiMV)、ネーブル斑葉モザイクウイルス (NiMV)、ヒュウガナツウイルス (HV) が存在することが報告されている (IWANAMI et al., 2001; Iro et al., 2004)。また、SDV クロマトは市販の抗体を用いた ELISA 法では検出できない CiMV, NiMV, HV 等の既報の SDV グループすべての系統の検出に有効であることがわかっている (KUSANO et al., 2007; 草野ら, 2013)。

II 各部位から採取した試料によるイムノクロマト検定

1 春の新梢および花蕾による検定

SDV 感染を確認済みである静岡県の‘青島温州’ (以後、‘青島温州’) 3 樹 (‘青島温州’ No. 3, 13, 15) より、新梢はそれぞれ無作為に 15 箇所から採取し、花蕾はそれぞれ 30 花を 5 月に採取して花卉、柱頭、子房の部位別に分離して 3 反復で検定を行った (図-3 A, B)。

その結果、今まで有効性が確認されていた新梢だけでなく、花および蕾を用いた場合もすべての検体で陽性と診断され、SDV を検出できることが確認された (表-1, 2)。

2 果実部位の影響

次に、果実による検定の可能性を検討するため、果実を部位ごとにわけて検定を行った。‘青島温州’ 2 樹 (‘青島温州’ No. 3, 13) から 8 月にそれぞれ採取した 5 果を果皮 (フラベド, アルベド), 果肉に分けて検定を行った。

その結果、検出率がフラベドでは 90% (10 果中で 9 果), アルベドでは 30% (10 果中で 3 果), 果肉では 20% (10 果中で 2 果) であり、フラベド (以後、果皮) を用いると SDV を高率に検出できることが確認された (表-3)。

3 果実の採取時期と樹上着果位置がイムノクロマト検定に及ぼす影響

過去の試験結果から、果皮を用いた検定においては夏季に検出率が減少する事例が確認されている (加藤ら, 2011)。そこで、着果位置の違いが検出率に与える影響を調査した。

‘青島温州’ 3 樹 (‘青島温州’ No. 3, 13, 15) から樹上の着果位置別に果実を採取して検定を行った。日光がよく当たり、樹の外周部に着生する果実 (以後、外成り果), 日光があまり当たらず、樹の内部に着生する果実 (以後、内成り果) について各樹 3 果を採取して検定を行った。

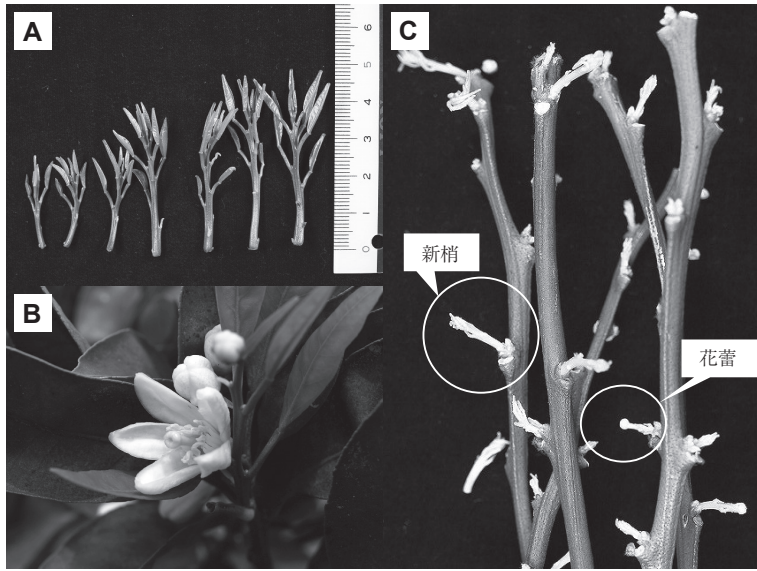


図-3 検定に供試した部位

A: 新梢 B: 花蕾 C: 冬季切り枝水挿し法の新梢および花蕾

表-1 5月の新梢におけるSDV検出結果

系統名	検出率 (陽性数/検定数)
青島温州 No. 3	3/3
青島温州 No. 13	3/3
青島温州 No. 15	3/3
対照: 健全樹	0/3

表-2 5月の花の部位別におけるSDV検出結果

系統名	部位	検出率 (陽性数/検定数)
青島温州 No. 3	花卉	3/3
	柱頭	3/3
	子房	3/3
青島温州 No. 13	花卉	3/3
	柱頭	3/3
	子房	3/3
青島温州 No. 15	花卉	3/3
	柱頭	3/3
	子房	3/3
対照: 健全樹	花卉	0/3
	柱頭	0/3
	子房	0/3

検定には果皮を用い、採取および検定は6～11月まで経時的に行った。試験に用いた‘青島温州’3樹については、毎年ウイルス検定を実施して感染確認時期を把握しており、検定結果との関連性も見た。また、佐賀県の‘上野早生’1樹についても8月に果実を採取し、検定に供試した。

表-3 果実部分別のSDV検出結果

系統名	診断部位		
	フラベド	アルベド	果肉
青島温州 No. 3	5/5 ^{a)}	3/5	1/5
青島温州 No. 13	4/5	0/5	1/5
感染樹合計	9/10	3/10	2/10
対照: 健全樹	0/5	0/5	0/5

a) イムノクロマト法による検出率 (陽性数/検定数)。

その結果、6, 7, 11月では外成り果と内成り果のいずれも検出率は100% (9果中で9果) であった。しかし、8, 9月の検定では供試樹により検定結果が異なり、‘青島 No. 3’ではいずれの果実からも検出されたのに対し、その他の2樹では外成り果より内成り果のほうが高い検出率を示した。(表-4)。さらに、佐賀県では8月に採取した‘上野早生’1樹の23果のうち、検出率が内成り果では83%、外成り果では55%であり、‘青島温州’の試験例と同様に内成り果のほうが高い検出率を示した。

夏季は高温によりELISA法ではSDVの検出が不安定になることが報告されている (CHANGYONG et al., 1994)。これは樹体内において高温の影響によりウイルス量が低下することに起因しており、同様な抗原抗体反応を利用したイムノクロマト法でも夏季に検出率が低下したと考えられる。

4 長期貯蔵がイムノクロマト検定に及ぼす影響

‘青島温州’3樹 (‘青島温州’ No. 3, 13, 15) から12月

表-4 6～11月における外成り果と内成り果からのSDV検出結果

系統名		6月	7月	8月	9月	10月	11月
外成り果	青島温州 No.3	3/3 ^{a)}	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	青島温州 No.13	3/3	3/3	2/3	2/3	3/3	3/3
	青島温州 No.15	3/3	3/3	0/3	1/3	3/3	3/3
	合計	9/9	9/9	5/9	6/9	9/9	9/9
内成り果	青島温州 No.3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	青島温州 No.13	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	青島温州 No.15	3/3	3/3	3/3	2/3	2/3	3/3
	合計	9/9	9/9	9/9	8/9	8/9	9/9

a) イムノクロマト法による検出率 (陽性数/検定数).

に果実を収穫し、木箱に入れて常温貯蔵庫にて貯蔵した。貯蔵1, 2, 3か月後に各区3果を取り出して検定を行った。

その結果、感染確認後の経過年数が1年である‘青島温州’ No.15では陽性率が40%～100% (5果の中で、2～5果)と検定時期により差が見られた。‘青島温州’ No.3や‘青島温州’ No.13では、詰まりにより摩砕液がプレート上を流れないことにより正しく検定が行えなかった検体を除くと、いずれも検出率は100%であった。以上の結果から、少なくとも貯蔵3か月後の果皮からでもSDVを検出できることが確認された (表-5)。

5 冬季切り枝水挿し法の新梢・花蕾を用いたイムノクロマト検定

ハウスミカンで着花予想に使われる枝挿し法 (大倉・追田, 1993) を参考に、冬季 (2月) に‘青島温州’ 3樹 (‘青島温州’ No.3, 13, 15) から緑枝を採取した後、20 cm程度の長さに切断し、新梢、花蕾の発生を促進するためベンジルアミノプリン液剤 (商品名: ビーエー液剤) 200倍を散布した。処理枝は水道水を入れたビーカーに挿して、乾燥を防止するためビニール袋で覆って27℃の恒温槽で15日間処理した後、新梢と花蕾をいくつか併せて0.1gとして検定を行った。また三重県の‘崎久保早生’、‘みえ紀南1号’、福岡県の‘宮川早生’でも同様の検定を行った (図-3C)。

その結果、採取したすべての新梢および花蕾でSDVの検出が可能であった (表-6)。また、三重県の‘崎久保早生’、‘みえ紀南1号’においても同様にSDVの検出が可能であった。福岡県の‘宮川早生’はSDVの一系統であるCiMVに感染した樹であるが、CiMVの検出も可能であった。

今回の調査において、‘みえ紀南1号’を用いた冬季切り枝水挿し法による検定では5樹中1樹でSDVが検出されず、接ぎ木用穂木採取前に感染樹を特定できない事

表-5 1～3月まで貯蔵した果実からのSDV検出結果

系統名	診断時期		
	貯蔵1か月後	貯蔵2か月後	貯蔵3か月後
青島温州 No.3	5/5 ^{a)}	4/4 ^{b)}	5/5
青島温州 No.13	5/5	4/4 ^{b)}	5/5
青島温州 No.15	2/5	5/5	3/5

a) イムノクロマト法による検出率 (陽性数/検定数).

b) 摩砕液がプレート上を流れず、正しい検定が行えなかった1検体を除く。

表-6 2月の切り枝水挿し法の新梢・花蕾におけるSDV検出結果

系統名	部位	検出率 (陽性数/検定数)
青島温州 No.3	新梢	1/1
青島温州 No.13	新梢	1/1
青島温州 No.15	新梢	1/1
	花蕾	1/1
対照: 健全樹	新梢	0/1

例が確認されたが、同様な試験を実施した他県ではこのような事例は見つかっておらず (私信)、今後この原因を明らかにする必要がある。しかし、栄養繁殖性であるカンキツは1本の母樹から1,000本程度の穂木が採取されるため、検定しないで採穂すればウイルス病が一気にまん延する恐れがある。このために母樹検定は特に重要であることから、検定漏れのリスクを回避するため、複数回に渡って検定を実施することが望ましいと考えられる。

おわりに

本研究の結果から、SDVクロマトにより花蕾、果実や冬季に採取した枝からSDVの検出が可能であることが明らかとなり、検定したいときに採取可能な部位を用いることで、1年中かつ高率にSDVを検出することが可能となった。

これにより無毒な苗木供給と土壌汚染の拡大防止に寄与することが期待される。今後は生産現場のウイルス検定で活用していく体制を整備しながら現地実証を実施し、現場で使用する際の問題点を明らかにしつつ普及を図っていく必要がある。

引用文献

- 1) CHANGYONG, Z. et al. (1994): Virologica Sinica 3: 239～244.
- 2) ITO, T. et al. (2004): Arch Virol. 149: 1459～1465.
- 3) IWANAMI, T. et al. (2001): ibid. 146: 807～813.
- 4) 加藤光弘ら (2011): 日植病報 77: 193 (講要).
- 5) ———ら (2014): 同上 80: 222～228.
- 6) KUSANO, N. et al. (2007): J. Gen. Plant Pathol. 73: 66～71.
- 7) 草野成夫ら (2013): 日植病報 79: 244 (講要).
- 8) 大倉野寿・追田和好 (1993): 九州農業研究 55: 216.