

カンキツグリーニング病菌保毒ミカンキジラミの季節変動

川合崇之*・菊川華織・筑木秀毅・板尾正俊・横山 亨

那覇植物防疫事務所

Seasonal Variability of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in *Diaphorina citri* Kuwayama. Takashi KAWAI*, Kaori KIKUKAWA, Hideki CHIKUGI, Masatoshi ITAO and Toru YOKOYAMA (Naha Plant Protection Station, 2-11-1 Minato-machi, Naha-shi, Okinawa 900-0001, Japan. *Research Division, Yokohama Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* **46**: 79-84 (2010).

Abstract: Huanglongbing (HLB) is a severe citrus disease caused by *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las), which is phloem-limited, nonculturable, and transmitted by the Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri* Kuwayama). In this study, we developed a Taq-Man Real-time PCR assay and attempted to detect Las in psyllids using it. The psyllids were collected monthly from Las infected *Citrus depressa*. Las in psyllids was detected every month (March to February), but the concentration of Las in psyllids varied seasonally.

Key words: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las), Real-time PCR, *Diaphorina citri* Kuwayama

緒 言

日本で発生が確認されているカンキツグリーニング病（正式英名：Huanglongbing; 以下HLB）は、難培養性細菌 *Candidatus Liberibacter asiaticus*（以下Las）によって引き起こされるカンキツ類の病気で、感染したカンキツ樹は葉が黄化し、落葉、枝枯れ等の症状が現れ、最終的に枯死に至る（芦原、2004）。本病は接木伝染とミカンキジラミ（*Diaphorina citri* Kuwayama）により、永続的に媒介される（DA GRACA, 1991）。日本でのHLBの発生は1988年に西表島ではじめて確認され、その後1997年には沖縄県内17市町村において感染樹が確認された（渡久地ら、1997）。1997年8月、農林水産省は本病の未発生地域へのまん延を防止するため植物防疫法施行規則を一部改正し、本病の発生地域となった沖縄県から本病の宿主植物及びミカンキジラミの移動を規制したが、その発生は沖縄県にとどまらず、2004年までに鹿児島県喜界島、徳之島、沖永良部島、与論島においても感染樹が確認され（篠原ら、2006）、2007年4月、移動規制地域を拡大するとともに、喜界島において本病の根絶を図るため緊急防除措置を開始した（平成19年農林水産省令 第8号）。

これらの検疫措置を講じるためには、Lasの発生範囲を的確に確認することが極めて重要である。Lasの発生範囲を調べるためには、現在検出の主流となっているPCR等による遺伝子診断により（房安ら、2006）、HLB病徴を示すカンキツ葉を検定するが、罹病樹体内のLas濃度は全体的に低く局在しており（OKUDA *et al.*, 2005）、検定操作の煩雑さも生じるなど、多くの問題がある。このような中

で、Real-time PCRにより樹体内のLasを検出及び定量する試験が行われており（TATINENI *et al.*, 2008; MANJUNATH *et al.*, 2008など）、その検出感度は従来のPCR法より高いことが報告されている（WANG *et al.*, 2006）。一方、ある地域や果樹園へ侵入するHLBの早期検出のためにミカンキジラミを利用する試みはされていないが（MANJUNATH *et al.*, 2008）、HLB発生地域に生息するミカンキジラミはLasを保毒している可能性が高いことから、その保毒検定の有効性が期待される。

そのため、Real-time PCR法を開発し、同法を用いたミカンキジラミの保毒検定を行うとともに、より効率的なHLB発生調査方法を確立するための予備試験としてミカンキジラミの保毒試験を行ったので報告する。

材料および方法

HLB接種源

1994年に沖縄県糸満市で発見されたHLB自然発病樹（シークワサー： *Citrus depressa* Hayata）から採取した罹病枝を1995年に接木して隔離施設で保存してきたラフレモン（*Citrus jambhiri* Lush）のHLB罹病樹を接種源とした。なお、本罹病樹はJAGOEIX *et al.* (1994) のプライマーによるPCRでHLB感染を確認した。

HLB感染苗木

2005年4月及び2006年2月に2年生のシークワサー実生苗木（それぞれ5本及び14本）にHLB接種源のラフレモン休眠芽を芽接ぎして野外網室内（沖縄県那覇市）で保管栽培した後、2006年9月にJAGOEIX *et al.* (1994) のプライマーによるPCRでHLB感染を確認し、ミカンキジ

*現在、 横浜植物防疫所調査研究部

Table 1. Nucleotide sequences of primers and Universal Probe Library (TaqMan probes) used in this study

	primer or probe	Nucleotide sequence	Position
Las	TufBF	ttg gta cgg tga caa cag atg	3063-3083※1
	TufBR	aaa tca acc gca cca ctc tt	3107-3126※1
	probe	tgctgttc	3091-3099※1
<i>Diaphorina citri</i>	WinF	gta acg ttc gtg gca gca	59-76※2
	WinR	acg gat tca gct gga agt tg	99-118※2
	probe	tggggaag	80-87※2

※1: Position number on DDBJ/EMBL/Genbank accession no. AY342001

※2: Position number on DDBJ/EMBL/Genbank accession no. AF231365

Table 2. Reaction mixture for quantative real-time PCR

	Volume (μl)
PCR grade water	11.8
Forward primer (10 μM)	1.0
Reverse primer (10 μM)	1.0
Light Cyclor TaqMan Master	4.0
probe (10 μM)	0.2
cDNA	2.0
Total	20.0

ラミの保毒試験に供試した。

ミカンキジラミ

各種試験に供試するために野外網室（沖縄県那覇市）内栽培のゲッキツ上で飼育しているミカンキジラミ200頭を2007年6月にHLB感染苗木（合計19本）を栽培している野外網室内で放飼し、5世代以上累代飼育した成虫を保毒試験に供試した。

野外網室の気温測定

野外網室内の気温は、網室内の中心にあるHLB感染苗木の1本の枝に温度データロガー（ティアンドデイ製TR-51）を高さ約40cmの苗木の中間地点（地上約30cm）に設置し、温度を10分ごとに計測した。これを基に平均気温と気温が40°Cを超えた日数を月ごとに集計した。

保毒試験の方法

HLB感染苗木上のミカンキジラミ成虫を毎月無作為に採集した。採集した成虫のうち、2008年3月・34頭、4月・40頭、5月・60頭、6月・46頭、7月・46頭、8月・55頭、9月・61頭、10月・44頭、11月・19頭、12月・6頭、2009年・1月5頭、2月・5頭を以下の方法によりDNA抽出しReal-time PCRによる検出試験に供試した。

DNA抽出方法

20mlマイクロチューブに試料（1試料当たりミカンキジラミ1頭）とジルコニアビーズ（直径5mm）を入れ、100 μlのDNA抽出緩衝液（40mM Tris-HCl、40mM EDTA、100mM NaCl、40 μg/ml Proteinase K）とともにTissueLyser（Qiagen社製）で磨砕した。磨砕処理後ジルコニアビーズを取り除き、さらに270 μlのDNA抽出緩衝液と30 μlの10% sarcosylを添加し、混和後、55°Cで1時間保温した。300 μlのフェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコール（25:24:1）を加え、混和後10,000rpmで10分間（10°C）遠心分離した。新しい1.5mlチューブに上清を300 μl移し、200 μlのフェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコール（25:24:1）を加え、混和後、10,000rpmで10分間（10°C）遠心分離した。新しい1.5mlチューブに上清を200 μl移し、イソプロパノール240 μlを加え、静かに混ぜた後に12,000rpmで15分間（4°C）遠心分離した。沈殿に70%冷エタノール400 μlを加え、15,000rpmで10分間（4°C）遠心分離し沈殿を一晚乾燥させ、40 μlのTE緩衝液を加えた。これを鋳型DNAとしてReal-time PCRに供試した。

Real-time PCRによる検出

Real-time PCRは、定量的にLasを検出可能で、また検出感度が高いことから、優れたLas検出方法として期待されている（LI, 2007）。いくつかあるReal-time PCRのうち、非特異的産物を測定する可能性の低いTaqManプローブ法により（有賀、2007）、Okudaら（2005）がLAMP法の開発に利用したLasのrplKJL-rpoBオペロン領域（RPL）の塩基配列からプライマーを設計し、LightCycler ST-300（Roche社）を用いて試験を行った。Lasには台湾株と日本株の間に変異が見られることから（古屋ら、2008）、我が国に発生するLasを高い信頼性で検定が行えるよう、本試験では国内で発生している沖縄産Lasの塩基配列、すなわち、DDBJ/EMBL/Genbank登録番号AY342001（tufB-secE-nusG-rplKAJL-rpoB gene cluster）からプライマー及びプローブの設計をUniversal Probe Libraryアッセイデザインセンター（www.universalprobelibrary.com）のProbeFinderソフトウェア（Version 2.43）を用いた。また、内部標準としてのミカンキジラミのプライマー及

びプローブについては同登録番号 AF231365 (diffusible secreted glycoprotein (wg) gene) を用いて同様に設計した。

反応液の組成は Table 2 に示した。95°C で 10 分の変成処理の後、95°C、10 秒、60°C、25 秒を 45 サイクル、その後 40°C、30 秒の温度処理を実施した。

反応後、LightCycler Software Version 4.1 を用いて増幅曲線を解析し、second derivative maximum 法により閾値サイクル (Ct 値) を算出した。

Las 及びミカンキジラミの DNA コピー数を定めるための外部標準として、それぞれのプライマーにより得られた PCR 産物のクローニングを (株) 日本遺伝子研究所に依頼し作製されたプラスミド DNA は、TufBF, BR 産物が 2×10^{10} コピー/ μ l、WinF, R 産物が 1×10^{10} コピー/ μ l であった。

Las の検出試験では、 $2 \times 10^1 \sim 2 \times 10^6$ コピー/ μ l (6 検体)、ミカンキジラミの検出では $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ コピー/ μ l (4 検体) に希釈したプラスミド DNA を、抽出済みの鋳型 DNA とともに Real-time PCR を実施し、プラスミド DNA の増幅曲線から得られる検量線により各試料から得られるミカンキジラミ及び Las の DNA コピー数を算出した。

保毒虫であるのか否かについての評価は、Real-time PCR により Las が検出された試料を保毒虫とした。

また、相対的な保毒濃度を以下の式により保毒指数として求めた。

$$\text{保毒指数} = \frac{\text{TufB, FR 産物の DNA コピー数}}{\text{WinF, R 産物の DNA コピー数}} \times 100$$

この式により算出した保毒指数は、0~1 未満、1 以上~100 未満、100 以上の 3 段階に分け、各月ごとの割合を集計した。

結 果

月毎の野外網室の気温

平均気温と気温 40°C を超えた日数を Fig. 1 に示した。平均気温が 25°C を下回ったのは 2008 年、3、11、12 月、2009 年 1、2 月で、30°C を超えていたのは 2008 年 6、7、8 月であった。最高気温が 40°C を超えた日数は、5 月は 3 日、6 月は 17 日、7、8 月は 27 日、9 月は 13 日となった。他の月で 40°C を超えた日はなかった。

Real-time PCR による検出

設計されたプライマーセットによって増幅される産物は、念のため BLAST 検索を行い、同産物と合致するのは Las 及びミカンキジラミの塩基配列のみで、それ以外の塩基配列は一部が合致したのみであることを確認したことから、十分に特異性が高いと考えられた。

Las 及びミカンキジラミ検定用のプラスミド DNA は、それぞれ $4 \times 10^1 \sim 4 \times 10^6$ コピー及び $2 \times 10^1 \sim 2 \times 10^6$ コピーを鋳型にして、Real-time PCR を行って得られた平均的な増幅曲線及びそれに基づき作成された検量線を Fig. 2 に示した。プラスミド DNA の量が多いほど、少ないサイ

クル数で立ち上がりが見られた。各鋳型 DNA から TufB, F 産物の DNA は $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^6$ コピー単位で検出され、WinF, R 産物の DNA は平均 1.8×10^5 コピー検出された。

保毒虫率及び保毒濃度

月ごとの保毒虫率及び保毒指数の割合は Fig. 3 に示した。

保毒虫率は 2008 年 4、5、6、9 月及び 2009 年 1 月は 95% (それぞれ 95.0%、98.3%、97.8%、100% 及び 100%) 以上であった。2008 年 3 月、7 月、8 月、12 月及び 2009 年 2 月は 80%~84.8% (それぞれ 82.4%、84.8%、83.6%、83.3% 及び 80.0%)、2008 年 10、11 月は 77.3% 及び 73.7% であった。

保毒指数については、0 以上 1 未満の個体の割合が 50% を超えた月は 2008 年 3、4、7~11 月、2009 年 2 月の計 8 ヶ月だった。保毒指数 1 以上 100 未満だった個体割合は 2008 年 5、6、10、11 月、2009 年 1 月で 20% を超え、5 月が 66.7% となった。保毒指数 100 以上だった個体割合が 10% 以上であった月は 2008 年 3、6、12 月、2009 年 1、2 月であり、12 月、1 月はそれぞれ 50%、40% となった。

考 察

これまで、著者らは保毒虫の作出について予備的な試験を行っており、2007 年に野外網室内の HLB 感染苗木上で累代飼育した成虫を JAGOUÉIX *et al.* (1994) のプライマーにより PCR 検定した結果、保毒虫が高い確率で検出された (陽性率 78%)。このことから、保毒虫の作出及び検出が可能であることは判明したが、PCR による検出は定性的であり、各ミカンキジラミが保毒している Las の濃度については不明であった (川合ら、未発表)。今回、Real-time PCR で調査した結果、月ごとの保毒虫率は 10、11 月はそれぞれ 77.3% と 73.7% であったが、その他の月では 80% 以上であり、HLB 感染苗木上でのミカンキジラミの累代飼育により、年間を通して高い確率で保毒虫を作出できることが確認された。保毒濃度については、保毒指数 1 未満の割合が 12 ヶ月中 8 ヶ月で、虫体内に低濃度に Las が存在している個体が非常に多いことが示唆された。保毒指数が 10 以上の個体の割合が高い月でも 12 月、1 月は採集個体数が非常に少なく検定頭数も少なくなった。

今回の試験の試料として累代飼育虫を無作為に採集しており、終齢幼虫で Las を吸汁、獲得した成虫は羽化後に Las 濃度が高くなることを考慮すると (INOUE *et al.*, 2009)、羽化後日数が不明な試料の保毒濃度に関する分析は困難である。また、今回の試験結果は 1 年間のものであり、毎年保毒濃度の高い個体が得られる時期が同じであるのか否かは調査を継続する必要があるが、ミカンキジラミの Las 保毒濃度については季節変動がある可能性が示唆された。

今回の試験における野外網室内の気温は、自然環境条件よりも特に夏期に平均気温及び最高気温が高くなる傾向が見られた。Las は熱耐性があり、30°C を超えても病徴発現し、ミカンキジラミも熱耐性があるとされている

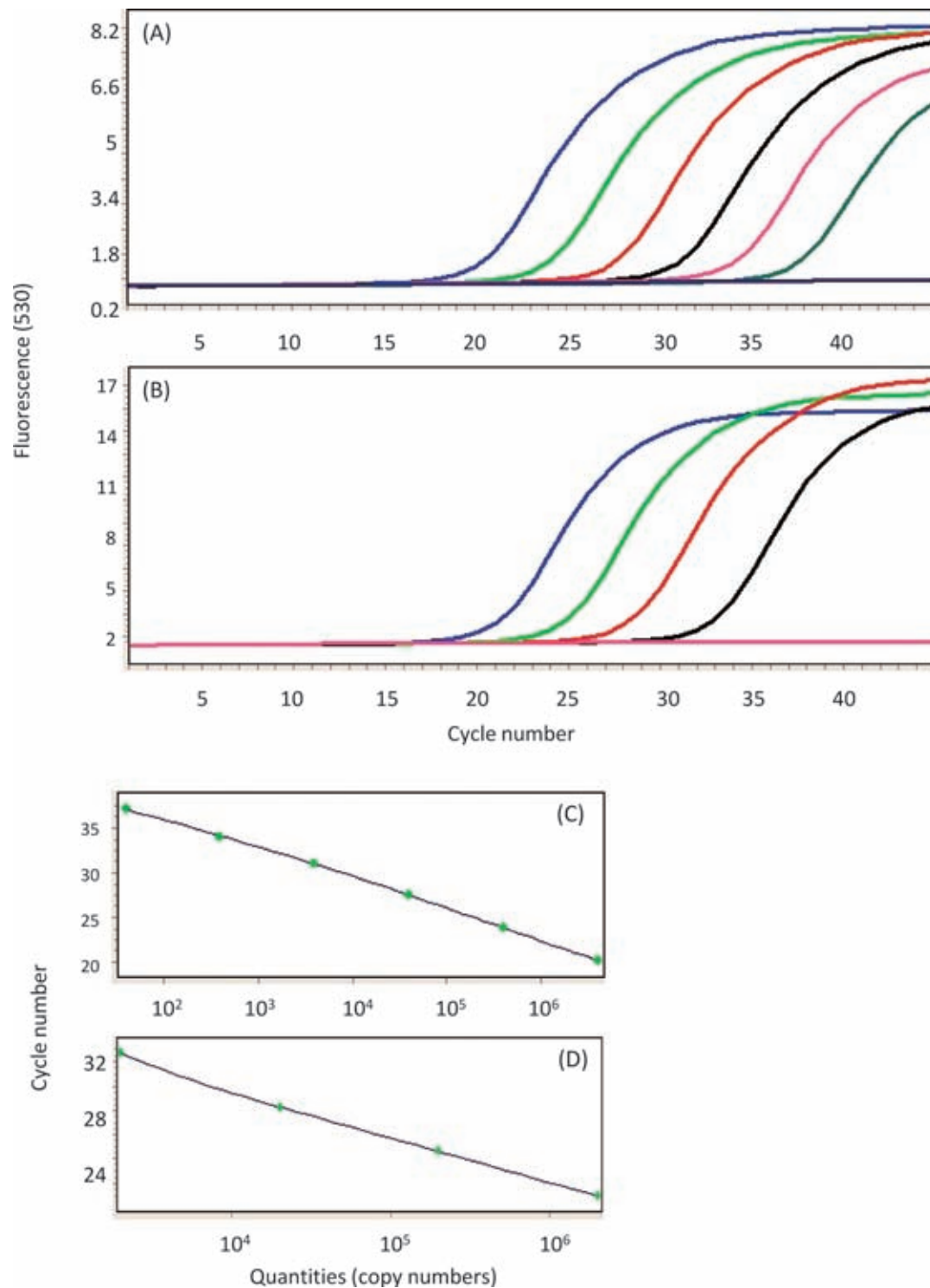


Fig. 1. (A) Amplification curves of dilution series of plasmid DNA (data series from left, 10^6 to 10^1 and negative control) for *Las*. (B) Amplification curves of dilution series of plasmid DNA (data series from left, 10^6 to 10^3 and negative control) for *Diaphorina citri*. (C) Standard curves of plasmid DNA (data series from left, 10^1 to 10^6) for *Las*. (D) Standard curves of plasmid DNA (data series from left, 10^3 to 10^6) for *Diaphorina citri*.

(BOVE, 2006)。しかし、 32°C 、 35°C 、 38°C の温度条件下に置いたHLB感染樹体内のLas濃度が 38°C の条件では低下し (LOPES *et al.*, 2009)、またミカンキジラミについては 15°C から 30°C の恒温条件下に比べて、 33°C の条件下では卵から成虫に羽化せず、成虫の寿命も短くなったという報告がある (LIU *et al.*, 2000)。特に7、8月は気温が非

常に高く、このことがHLB感染苗木内のLas濃度の減少やミカンキジラミの寿命等への影響を及ぼし、7月から9月における保毒濃度の低い個体数の増加につながったことが考えられる。11月から2月の検定頭数の減少は、採集個体数の減少のためであるが、この要因としては植物体の新梢発生が少なかったことがあげられる。これは沖縄の温州

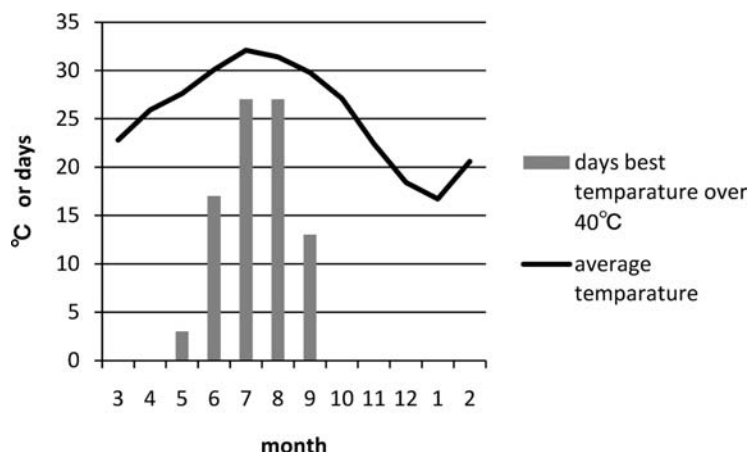


Fig. 2. The average temperature and days of best temperature over 40°C per month from March 2008 to February 2009

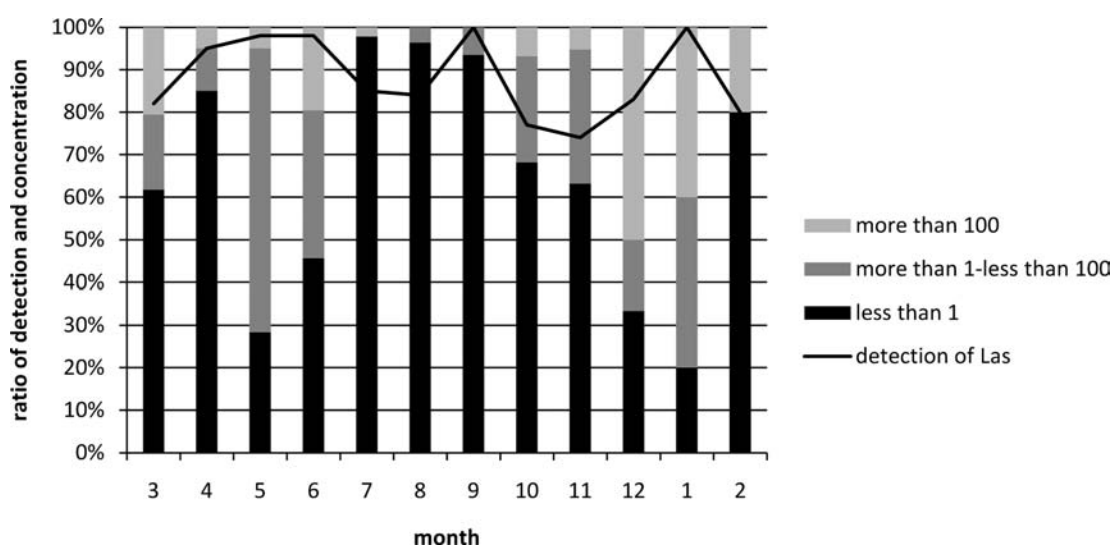


Fig. 3. Ratio of detection and the concentration of Las in psyllids per month from March 2008 to February 2009

みかんの新梢発生率が3~4月、7月、10月に高くなるが（外間ら、2001）、同様のことがシークワーサーにも当てはまり、冬期にミカンキジラミの産卵場所である新梢がほとんど見られなかったことが次世代の発生に影響したと考えられる。以上から、保毒濃度のある程度高い個体を多く得るには5月あるいは6月が適していると思われた。野外網室は自然条件下と異なるため、一概には言えないが、HLB発生地域をより確実に確定するための保毒キジラミ調査は、この時期に実施するのが効果的であると考えられた。

今回の結果から、累代飼育から得られた個体を複数頭用いることによりミカンキジラミのLas保毒検定時の陽性対照区としての利用が可能になったといえる。実際のHLB防除事業におけるミカンキジラミの採集頭数は数百あるいは数千頭以上であることが想定される。この場合、1頭ずつのLas保毒検定では非常に多くの時間と労力がかかるため、数十頭のうち1頭が保毒虫であっても確実にLasを検出できるような効率的な検定方法の確立が望まれる。

現在の飼育法では、HLB感染苗木中のLas及びミカンキ

ジラミが季節による気温変動の影響を強く受けられる。また、幼虫期にLasを保毒した成虫の羽化後の日数が保毒濃度にも関係するため、保毒濃度の高いミカンキジラミを多く得るには、温度管理された条件下での栽培、飼育が必要と考えられる。Las及びミカンキジラミにとって好適な環境下であれば、年間を通じた個体数の維持が可能になり、Las保毒濃度の高いミカンキジラミの作出を確実にできるようなと考えられる。そのことにより、ミカンキジラミの好適宿主であるゲッキツなど国内でHLB感染の確認されていない植物への虫媒接種によるHLB感染確認試験など、HLBを取り巻く課題に対する新たな研究が可能になると思われる。

謝 辞

本調査を遂行するに当たり、Real-time PCRによるミカンキジラミからのLasの検出方法についてご助言と提案をくださった果樹研究所の井上広光博士に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 芦原 亘 (2004) 九州中・南部の冬期の温度条件におけるミカンキジラミ *Diaphorina citri* Kuwayama 成虫の生存消長. 日本応用動物昆虫学会誌 **48**: 207-211
- 有賀博文 (2007) リアルタイム定量PCRの原理と活用. 日本水産学会誌 **73**: 292-295
- BOVE, J. M. (2006) Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* **88**: 7-37
- DA GRACA, J. V. (1991) Citrus greening disease. *Ann. Rev. phytopath.* **29**: 109-136
- INOUE, H., J. OHNISHI, T. ITO, K. TOMIMURA, S. MIYATA, T. IWANAMI and W. ASHIHARA (2009) Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. *Annals of Applied Biology* **155**: 29-36
- 外間数男・村上昭人 (2001) ミカンキジラミの発生分布と生態及び防除. 沖縄農業 **35**: 3-14.
- 房安聡司・佐藤哲治・清水宏昭 (2006) カンキツグリーニング病菌 (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) のLAMP法による検定方法の検討. 植防研報 **42**: 75-80.
- 古屋典子・宮田伸一・富村健太・久保田健嗣・奥田 充・蘇 鴻基・岩波 徹 (2008) カンキツグリーニング病原細菌の台湾分離株と日本分離株との間に認められた遺伝的変異 (講要). 日植病報 **74**: 42.
- JAGOUEIX, S., J. M. BOVE and M. GARNIER (1994) The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the subdivision of the Proteobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 379-386.
- LIU, Y. H. and J.-H. TSAI (2000) Effect of temperature on biology and life table parameters of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). *Annals of applied Biology* **137**: 201-206.
- LOPES, S. A. and G. F. FRARE (2009) Liberibacters associated with citrus Huanglongbing in Brazil: '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' Is Heat Tolerant, '*Ca. L. americanus*' is heat sensitive. *Plant disease* **93**: 257-262.
- MANJUNATH, K. L., S. E. HALBERT, C. RAMADUGU, S. WEBB and R. F. LEE (2008) Detection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in *Diaphorina citri* and its importance in the management of citrus huanglongbing in Florida. *Phytopathology* **98**: 387-396.
- LI, W. (2007) Evaluation of DNA amplification methods for improved detection of "*Candidatus Liberibacter Species*" associated with citrus huanglongbing. *Plant disease* **91**: 51-58.
- OKUDA, M., M. MATSUMOTO and Y. TANAKA (2005) Characterization of the *tufB*-*secE*-*nusG*-*rplKAJL*-*rpoB* gene cluster of the citrus greening organism and detection by loop-mediated isothermal amplification. *Plant disease* **89**: 705-711.
- 篠原和孝・湯田達也・西本周代・濱島朗子・橋本祥一・時村金愛・佐藤哲治 (2006) 奄美群島におけるカンキツグリーニング病の発生調査. 九病虫会報 **52**: 6-10.
- TATINENI, S., U. SHANKAR SAGARAM, S. GOWDA, C.-J. ROBERTSON, W.-O. DAWSON, T. IWANAMI and N. WANG (2008) In Planta Distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' as Revealed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real-Time PCR. *Phytopathology* **98**: 592-599.
- 渡久地章男・河野伸二 (1997) 沖縄県におけるカンキツグリーニング病の発生状況および防除対策. 植物防疫 **51**: 565-570.
- WANG, Z., Y. YIN, H. HU, Q. YUAN, G. PENG and Y. XIA (2006) Development and application of molecular-based diagnosis for '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', the causal pathogen of citrus huanglongbing. *Plant Pathology* **55**: 630-638.