

奄美群島におけるカンキツグリーニング病罹病葉の 病徴型による病徴診断の検討

房安聡司^{*}・秀島和幸^{***}・永喜大士・藤田武利・松浦貴之^{1)****}

門司植物防疫所名瀬支所

The Study on Symptom types of Huanglongbing-infected leaves in Amami islands. Satoshi Fusayasu^{*}, Kazuyuki Hideshima^{**}, Taishi Eiki, Taketoshi Fujita and Takayuki Matsuura^{1)****} (* Moji Plant Protection Station 1-3-10, Nishikaigan, Moji-ku, Kitakyushu, 801-0841 Japan. ** Fukuoka Airport Branch, Moji Plant Protection Station **** Yokohama Plant Protection¹⁾ Research Division, Yokohama Plant Protection) *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* **50** : 83-88

Abstract: Identification of Huanglongbing infections by visual observation is difficult because physical factors such as nutrient deficiencies can cause similar symptoms. In this study, we observed the leaf symptom types of citrus trees infected by *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) in Okinoerabu Island and investigated the detection rate for each symptom type. Furthermore, we investigated the associations among the leaf symptom types and copy number of Las DNA. The copy number of Las DNA in citrus leaves with symptoms was estimated by quantitative PCR analysis. Leaf mottling, complex vein yellowing and yellow blotching had a high detection rate. The copy number of Las DNA in leaves with vein yellowing was lower than that in leaves with other symptom types. There was no considerable difference in the copy number of Las DNA among the other symptoms. Furthermore, there was no major difference between mild and severe mottling. Therefore, to conduct more efficient surveys for Las detection, we should preferentially and aggressively collect leaves with mottling and leaves with mild symptoms.

Key words: *Candidatus Liberibacter asiaticus*, leaf symptom type, quantitative PCR analysis

緒 言

カンキツグリーニング病(Huanglongbing, 以下HLB)は、カンキツ類に樹勢の低下、収量の減少を引き起こし、最終的に罹病樹が枯死に至る重要病害であり、東南アジアやフロリダ半島、ブラジル等のカンキツ生産地域で甚大な被害を及ぼしている(da Graca, 1991、Texeira *et al.*, 2005)。本病の病原菌として*Candidatus Liberibacter asiaticus*(以下Las)、*Ca. L. africanus*及び*Ca. L. americanus*の3種が報告されており、日本で発生が確認されているLasは接木及びミカンキジラミ(*Diaphorina citri* Kuwayama)による永続的な媒介により健全樹へ感染する(da Graca, 1991)。日本では、1988年に沖縄県西表島において発生が初めて確認された後(Miyakawa and Tsuno, 1989)、沖縄県のほぼ全域(河野ら, 1997、内藤ら, 2001)及び鹿児島県の奄美群島の一部(濱島ら, 2003、篠原ら, 2006)でも発生が確認された。現在、本病の未発生地域へのまん延を防止するため、植物防疫法により本病の発生地域から本病原菌の宿主植物、ミカンキジラミ及び

その寄主植物の移動を規制するとともに、各自治体において終息またはまん延防止のための防除を行っている。

奄美群島では、本病原菌の発生調査が鹿児島県により定期的に実施されている。住宅地、果樹園等に植栽されているカンキツ樹を観察し、Ohtsu *et al.*(1998)の病徴型を呈した葉を採取後、PCR検定を行った結果、本病原菌が検出された場合は罹病樹と判断し、当該樹の伐採を行っている(篠原ら, 2006、都外川ら, 2010)。しかし、本病原菌による罹病樹の病徴は微量要素の欠乏症状等と類似していることから(Ohtsu *et al.*, 1998)、発生調査における病徴の判断は困難を伴う。また、本病原菌のカンキツ樹体内における分布は偏在することが指摘されており(岩波ら, 2009)、罹病樹であったとしても採取試料に本病原菌が存在しない、または菌濃度が検出限界以下の場合、検出を行うことができず、罹病樹を見落としてしまう可能性が考えられる。従って、本病原菌による罹病樹の病徴や、病徴の違いによる検出頻度及び菌濃度の傾向について把握することは、発生調査における試料採取の判断において重要と考えられる。

¹⁾横浜植物防疫所調査研究部

そこで、本調査では試料採取の際に優先的に採取すべき葉の病徴について検証するため、鹿児島県沖永良部島で確認されたHLB自然罹病樹の葉の病徴について観察し、病徴型別の発現頻度を調査した。また、カンキツ葉の病徴及び発症程度別に葉内のLasの濃度(遺伝子のコピー数)を定量解析することで検定に供試する検体として適当な病徴について検討を行った。

材料および方法

1. 供試試料

2010年6月、2011年2月、5月及び11月の鹿児島県大島郡知名町、2010年9月及び11月の和泊町におけるHLBの発生調査でLasの感染が確認されたカンキツ樹65本の亜主枝ごとに着いた

複数枚の葉を1検体として試験に供した。なお、発生調査における検定に準じるため、1検体当たり複数枚の葉を用いた。供試した葉はOhtsu *et al.*(1998)の病徴型による分類を行うとともに(Fig. 1)、Type Iの病徴型については退緑斑紋の病徴が葉表面全体に現れる場合(以下、明瞭な退緑斑紋)(Fig. 1 I-1)と葉表面の一部のみに現れる場合(以下、不明瞭な退緑斑紋)(Fig. 1 I-2)に発症程度を分類した。Type IIIの病徴型については主脈及び側脈が緑色に残る場合と(以下、部分的な退緑化)(Fig. 1 III-1)主脈を残して葉表面全体が黄化している場合(以下、全体的な退緑化)(Fig. 1 III-2)に発症程度を分類した。また、1枚の葉にType V及びVIIの病徴型を同時に呈している場合は「Type V+VII」の病徴型に分類した(Fig. 1 V+VII)。同一亜主枝内の葉が、異なる病徴型または発症程度を呈した場合は、病徴型または発症程度ごとに供試した。

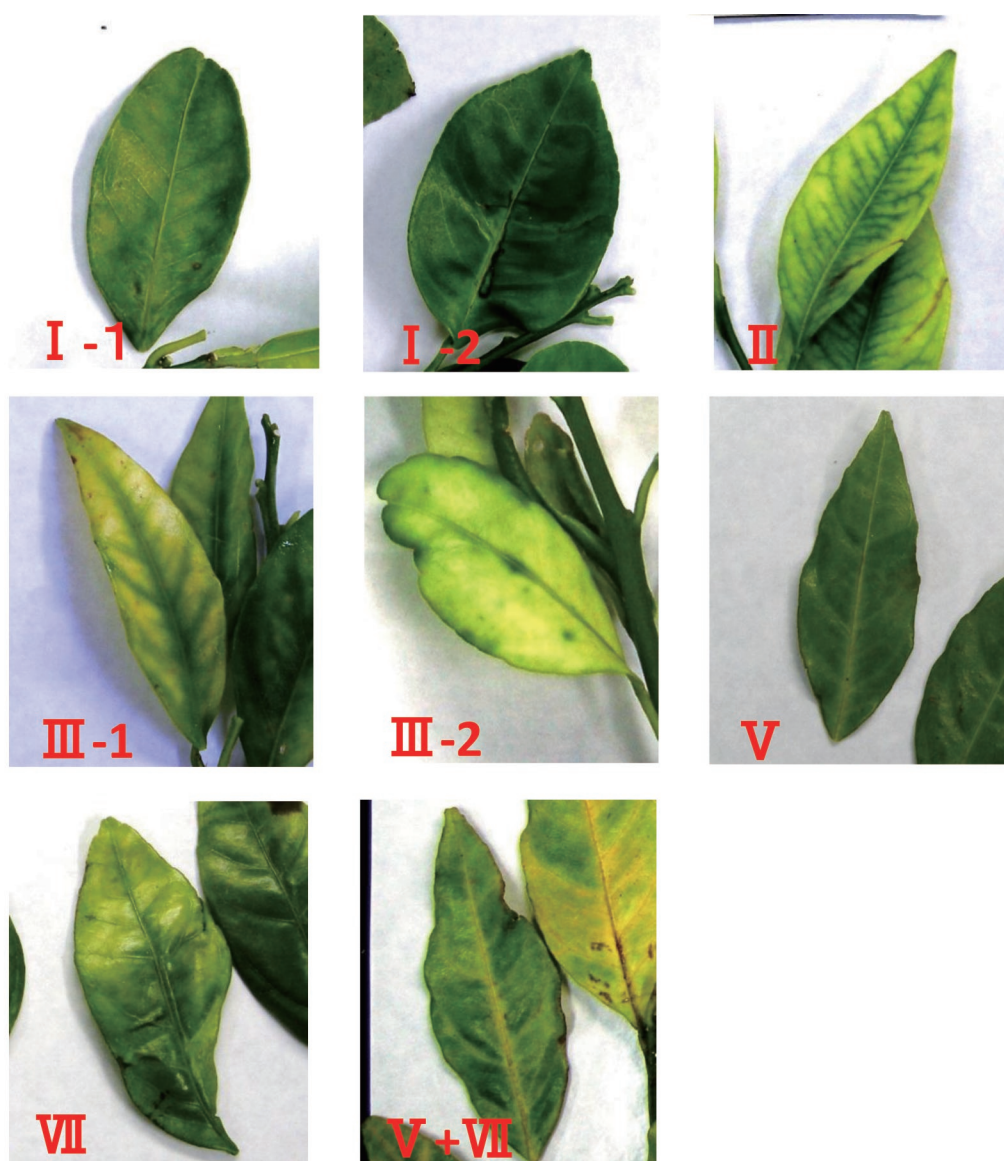


Fig. 1. Symptoms of Las of this survey materials.

I: mottling (Type I), II: chlorosis with green netlike veins (Type II), III: severe chlorosis with green main veins (Type III), V: vein yellowing (Type V), VII: yellow blotching (Type VII), V+VII: complex of vein yellowing and yellow blotching (Type V+VII)

2. DNA抽出及び鋳型DNAの調整

松浦ら(2012)のCTAB法を改変して行った。カンキツ葉の中肋0.05gを滅菌カミソリで細断し、2.0mlマイクロチューブ内で、タングステンビーズ、100 μ lのCTAB緩衝液(200mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM EDTA, 1.4M NaCl, 0.5% PVP, 1% CTAB)とともにミキサーミルMM300(Retsch)を用いて磨砕した後、900 μ lのCTAB緩衝液を加え、65℃で30分間処理後、得られた上清700 μ lを1.5mlチューブに移し、等量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(25:24:1)を加え、遠心分離(12,000rpm, 10min.)を行った。得られた上清400 μ lに500 μ lのイソプロピルアルコールを加え、軽く混和した後、室温で5分間静置し、遠心分離(12,000rpm, 10min.)を行った。得られた沈殿を400 μ lの70%エタノールでリンスした後、100 μ lの0.1TE(10mM Tris-HCl pH8.0, 0.1mM EDTA)に溶解した。

得られた抽出液について分光光度計BioSpec-mini(島津製作所)で吸光度測定を行い、DNA濃度及びDNA純度を算出し、OD260/OD280の比率が1.8以上であることを確認した後、0.1TEを用いてDNA濃度を10 μ g/mlに希釈し、鋳型DNAとした。

3. リアルタイムPCRによる定量解析

定量解析は、奥田ら(2009)のリアルタイムPCR(インターカラーター法)を用いて行った。反応は増幅試薬SYBR® Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time)(タカラバイオ)及びリアルタイムPCR装置LightCycler 1.5(Roche)を用いた。反応液は、最終濃度0.4 μ Mのプライマー(TufB-F1及びTufB-R1)と上記の鋳型DNAを3 μ l添加し、20 μ lに調製した。反応条件は、95℃, 30秒の熱変性の後、95℃, 5秒、60℃, 15秒、80℃, 10秒のサイクルを45サイクル行った。

反応後、LightCycler Software Version 4.1(Roche)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(CP値)を算出した。

試料中のLasの濃度を推定するために用いた標準試料は松浦ら(2012)が作製したPCR産物を用いた。3.7 $\times 10^6$ 、3.7 $\times 10^4$ 、3.7 $\times 10^2$ 及び3.7 $\times 10^0$ コピー/ μ lに段階希釈した標準試料を、リアルタイムPCRの反応試験ごとに同時に供試し、得られた検量線より、Lasの濃度を推定した。

結 果

1. 罹病樹における病徴型

供試した葉の病徴型を調査したところ、供試した罹病樹65本において、Type I、II、III、V、VII及びV+VIIの病徴型が確認されたが、Type IV及びVIの病徴型は確認されなかった。

Type Iの病徴型を示した罹病樹について発症程度を分類したところ、24本で明瞭な退緑斑紋を示した一方、13本で不明瞭な退緑斑紋を示した(Table 1)。また、Type IIIについては、11本で部分的な退緑化を示した一方、8本で全体的な退緑化を示し、そのうち5本は硬化葉、3本は未硬化葉だった。

罹病樹において、病徴と思われる異常を示した葉でも、Lasが検出される場合と検出されない場合があった(Table 1)。病徴型及び発症程度ごとにLasの検出率について調査を行ったところ、明瞭な退緑斑紋を示すType I及びType V+VIIの病徴型において、他の病徴型と比較して高い検出率を示す傾向が認められた(Table 1)。一方、Type II及びType VIIの病徴型については、他の病徴型と比較して低い検出率を示す傾向が認められた。

Table 1. Number of symptom types (number of trees and sub-main branches) on Las infected trees and detection rate.

Symptom types	Number of trees ¹⁾	Number of sub-main branches ²⁾		Detection rate ³⁾ (%)
		Detection	Undetection	
Type I (severe mottling)	24	37	4	90.2 a
Type I (mild mottling)	13	31	15	67.4 ab
Type II	13	17	12	58.6 b
Type III (partial chlorosis of developed leaves)	11	29	6	82.9 ab
Type III (general chlorosis of developed leaves)	5	5	1	83.3 ab
Type III (general chlorosis of developing leaves)	3	5	2	71.4 ab
Type V	6	7	3	70.0 ab
Type VII	6	7	8	46.7 b
Type V+VII	10	17	1	94.4 a

¹⁾A total of 65 Las infected trees were investigated. In the case of the trees with multiple symptom types, counted each symptom type in these number.

²⁾Leaves on the sub-main branches were investigated as material.

³⁾Values with the different letter (a, b) are significantly different ($p < 0.05$, χ^2 -test).

2. リアルタイムPCRによる定量解析

病徴型別にLasのコピー数の比較を行ったところ、いずれの病徴型においても有意な差は認められなかったが($p>0.05$ 、Tukey-KramerのHSD検定)、TypeVの病徴型が他の病徴型と比較して低い傾向を示した(Table 2)。

発症程度別にLasが検出された試料についてそのコピー数の比較を行ったところ、TypeIの病徴型については、明瞭な

退緑斑紋と不明瞭な退緑斑紋において有意な差は認められなかった($p>0.05$ 、 t 検定)(Table 3)。また、TypeⅢの病徴型については、硬化葉の間で全体的な退緑化と部分的な退緑化において有意な差は認められなかったが、未硬化葉については供試した葉にいずれも全体的な退緑化を示していたにも関わらず、硬化葉と比較して有意に低い値を示した($p<0.05$ 、Tukey-KramerのHSD検定)(Table 4)。

Table 2. Comparison of copy number of Las DNA between each symptom type on Developed leaves.

Symptom types	Number of sub-main branches ¹⁾	Average of copy number of Las DNA ²⁾ (copy/ μ l) Mean $\pm$ SE
Type I	68	$2.61 \times 10^3 \pm 7.84 \times 10^2$
Type II	17	$3.37 \times 10^3 \pm 9.81 \times 10^2$
Type III	34	$1.08 \times 10^3 \pm 1.91 \times 10^2$
Type V	7	$2.36 \times 10^2 \pm 9.60 \times 10^1$
Type VII	7	$2.36 \times 10^3 \pm 1.19 \times 10^3$
Type V + VII	17	$3.62 \times 10^3 \pm 1.66 \times 10^3$

¹⁾Leaves on the sub-main branches were investigated as material.

²⁾The Tukey-Kramer HSD test ($p>0.05$) shows no significant differences between each symptom types.

Table 3. Comparison of copy number of Las DNA between symptom degree of Type I.

Symptom types and degree	Number of sub-main branches ¹⁾	Average of copy number of Las DNA ²⁾ (copy/ μ l) Mean $\pm$ SE
Type I (severe mottling)	37	$3.13 \times 10^3 \pm 1.27 \times 10^3$
Type I (mild mottling)	31	$1.99 \times 10^3 \pm 8.17 \times 10^2$

¹⁾Leaves on the sub-main branches were investigated as material.

²⁾The t -test ($p>0.05$) shows no significant difference between each symptom type.

Table 4. Comparison of copy number of Las DNA between symptom degree of Type III.

Symptom types and degree	Number of sub-main branches ¹⁾	Average of copy number of Las DNA ²⁾ (copy/ μ l) Mean $\pm$ SE
Type III (partial chlorosis of developed leaves)	29	$8.96 \times 10^2 \pm 1.68 \times 10^2$ a
Type III (general chlorosis of developed leaves)	5	$2.18 \times 10^3 \pm 7.51 \times 10^2$ a
Type III (general chlorosis of developing leaves)	5	$3.63 \times 10^1 \pm 1.22 \times 10^1$ b

¹⁾Leaves on the sub-main branches were investigated as material.

²⁾Values with the different letter (a, b) are significantly different ($p<0.05$, Tukey-Kramer HSD test).

考 察

本病原菌の発生地域において、終息またはまん延の防止を図るためには、罹病樹の早期発見及び伐採が重要である。従って、調査者が個々の判断で病徴の有無を確認し、試料採取を行う発生調査において、効果的に罹病樹を発見するためには、病徴に対する認識を統一させる必要がある。本調査では、自然罹病樹における病徴型及びLasのコピー数を調査することにより、本病原菌の発生調査における病徴診断の際の一助とすることを目的とするものである。

本調査で供試した罹病樹について、病徴型及び発症程度別にLasの検出率を調査した結果、TypeⅠ及びTypeⅤ+Ⅶが比較的高い値を示したことから、これらの病徴型を示した葉はLasに感染している可能性が高いことが示唆された。一方で、罹病樹においてHLBの病徴を呈した葉からLasが検出されなかった試料が確認されたことから、自然罹病樹におけるこれらの病徴がLasだけでなく微量元素の欠乏症状等、他の要因で引き起こされる可能性が考えられる。類似症状の要因を検証するためには、今後の調査が必要と思われる。

Lasが検出された試料についてそのコピー数を定量解析し、病徴型別に比較したところ、硬化葉の場合はいずれの病徴型においても有意な差は認められなかった。また、TypeⅠ及びTypeⅢにおいて発症程度別に比較したところ、有意な差は認められず、不明瞭な病徴を呈する葉においても検出に十分なLasのコピー数が確認された。病徴発現と葉内のLasの増加の関係については、無病徴葉内でLasが増加した後、病徴が発現し、以後の増加は認められなかったことが報告されている(Lopes *et al.*, 2009)。従って、本調査で用いた不明瞭な退緑斑紋の発症程度の葉においては、既に菌濃度が一定の水準に達している可能性が考えられる。一方、未硬化葉については奥田ら(2009)の報告と同様、Lasのコピー数が低い値を示す傾向が認められた。

以上のことから、Lasの検出率が高かったTypeⅠ及びTypeⅤ+Ⅶの病徴型を示す葉について、より積極的に採取することで、罹病樹を効果的に発見することが可能であると思われる。また、TypeⅠについては、発症程度が不明瞭な退緑斑紋を示す場合が多く認められ、Lasの検出率も他の病徴型と比較して有意な差は認められなかった。Lasのコピー数も明瞭な退緑斑紋と同程度の値を示したことから、PCR検定において精度の低下を招く可能性が低いことが示された。病徴が不明瞭な場合、当該樹が罹病している可能性は低いと、調査者に思われがちであるが、発生調査の際は発症程度にとらわれず、病徴が不明瞭な葉も含めた採取を行うことが重要と考えられる。

また、全体的な退緑化を示す葉は、調査者にとって容易に認識できるため、病徴診断を行う上では一つの手がかりになる。しかし、それが未硬化葉の場合は、硬化葉と比較してLasのコピー数が低いため、PCR検定の精度が低下する可能性が考えられる。従って、検体としては硬化葉を採取する方が

適当と思われる。

TypeⅣ及びⅥの病徴型については、今回の調査において罹病樹が確認されなかったため、調査を行うことができなかった。本病徴型についても、Lasのコピー数との関係を検証することが今後の課題と思われる。また、病徴の発現様式は、温度等の生育条件やカンキツ種によって異なる可能性が考えられる(宮川ら2000、Folimonova *et al.*, 2009)。今後は、供試料における採取時期別及びカンキツ種別に調査を行い、病徴の発現様式やLasのコピー数に影響を及ぼす要因について検証を進める必要があると思われる。その上で、今後も病徴に関する調査を進め、新たな知見が得られた際は随時、発生調査の参考にするべきと思われる。

謝 辞

本報告にあたり、解析に関する技術的指導及び助言を頂いた九州沖縄農業研究センター(現農林水産省農林水産技術会議事務局)の奥田充博士、日頃より本病原菌の防除に関して多大なるご尽力を頂いている鹿児島県大島支庁農政普及課特殊病害虫係の職員各位及び本調査にご協力頂いた鹿児島県大島郡知名町役場及び和泊町役場の職員各位に厚くお礼申し上げます。

引用文献

- da Graca, J. V. (1991) Citrus greening disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **29**: 109-136.
- Folimonova, S. Y., C. J. Robertson, S. M. Garnsey, S. Gowda and W. O. Dawson (2009) Examination of the responses of different genotypes of Citrus to Huanglongbing (Citrus greening) under different conditions. *Phytopathology*. **99**: 1346-1354.
- 濱島朗子・橋元祥一・永松講二・牟田辰朗 (2003) 鹿児島県におけるカンキツグリーニング病の初発生. 日植病報 **69**: 307-308 (講要).
- 岩波徹・上地奈美・河野伸二 (2009) カンキツグリーニング病に感染したシークワーシャー樹体内におけるPCR検出率の季節変動. 九病虫研会報 **55**: 68-75.
- 河野伸二・蘇鴻基・上原勝江 (1997) 沖縄本島におけるカンキツグリーニング病の初発生. 日植病報 **63**: 256 (講要).
- 松浦貴之・藤原裕治・齊藤範彦・吉岡潤治・秀島和幸 (2012) カンキツグリーニング病菌調査に利用する2種のリアルタイムPCR法の比較. 植防研報 **48**: 1-6.
- Lopes, S. A., E. Bertolini, G. F. Frare, E. C. Martins, N. A. Wulff, D. C. Teixeira, N. G. Fernandes and M. Cambra (2009) Graft transmission efficiencies and multiplication of '*Candidatus Liberibacter americanus*' and '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in citrus plants. *Phytopathology*. **99**: 301-306.

- 宮川経邦・内藤孝・尾崎克巳 (2000) 発生北限地域におけるカンキツグリーニング病(Huanglongbing)の発病生態. 南九州大学研報**30(A)**: 13-26.
- Miyakawa, T. and K. Tsuno (1989) Occurrence of Citrus Greening Disease in the southern islands of Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* **55**: 667-670.
- 内藤孝・田場聡・豊里哲也・河野伸二・高江洲和子・上原勝江 (2001) カンキツグリーニング病のPCRによる検定法と沖縄地域における発生分布. 沖縄県農業試験場研究報告**23**: 74-81.
- Ohtsu, Y., K. Nakashima, M. Prommintara and Y. Tomiyasu (1998) Typical symptoms of citrus greening on mandarin trees in Nepal, supported by detection and characterization of ribosomal DNA of the causal Organisms. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **64**: 539-545.
- 奥田充・河野伸二・澤岬哲也・岩波徹 (2009) 低濃度に感染した野外試料から *Candidatus Liberibacter asiaticus* を検出する場合における遺伝子増幅法による陽性率の違い. 九病虫研会報**55**: 62-67.
- 篠原和孝・湯田達也・倉本周代・濱島朗子・橋元祥一・時村金愛・佐藤哲二 (2006) 奄美諸島におけるカンキツグリーニング病の発生調査 (第1報 奄美諸島における分布の特徴). 九病虫研会報**52**: 6-10.
- Texeira, D. C., J. Ayres, E. W. Kitajima, F. A. O. Tanaka, L. Danet, S. Jagoueix, C. Saillard, and J. M. Bove (2005) First report of a Huanglongbing-like disease of citrus in Sao Paulo State, Brazil and association of a new *Liberibacter* species, "*Candidatus Liberibacter americanus*", with the disease. *Plant Dis.* **89**: 107. (Abstr.)
- 都外川総明・堀江宏彰・篠原和孝・湯田達也 (2010) 奄美諸島におけるカンキツグリーニング病の発生調査 (第2報 第1期調査後の感染樹発生の推移). 九病虫研会報**56**: 20-26.