

## 隔離検疫でカンキツ苗木から検出した Citrus Viroid-I-LSS

井上 豊・伊藤隆男\*・川相依子・唯 伸二・難波 一郎

神戸植物防疫所

\*独立行政法人農業技術研究機構・果樹研究所カンキツ研究部（口之津）

Citrus viroid-I-LSS detected from citrus plants at post-entry quarantine. Yutaka INOUE, Takao ITO\*, Yoriko KAWAI, Shinji TADA and Ichiro NAMBA (Kobe Plant Protection Station, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 703 Befu, Ikawadani, Nishi-ku, Kobe 651-2115 Japan; \*Department of Citrus Research, National Institute of Fruit Tree Science, Kuchinotsu, Nagasaki 859-2501, Japan). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* **39**: 75-77 (2003).

**Abstract:** Citrus viroid-I-LSS (CVd-I-LSS) was detected by RT-PCR from citrus plants (*Citrus aurantifolia*) imported from Pakistan into Japan at post-entry quarantine. Nucleotide sequencing analysis of the RT-PCR products showed that the products contained two new variants of CVd-I-LSS. This is the first report of the detection of CVd-I-LSS from citrus plants other than in Japan, which shows that CVd-I-LSS can be distributed not only in Japan but also in other countries.

**Key words:** Citrus viroid-I-LSS, *Citrus bent leaf viroid*, RT-PCR, Pakistan

### はじめに

平成13年2月にパキスタンからライム苗木 (*Citrus aurantifolia*) 5本が輸入された。隔離検疫において、カンキツウイロイドの検定植物であるエトログシトロン系統アリゾナ 861-S1 による接ぎ木検定を行ったところ、葉脈の褐変、葉の下垂及び激しいエピナスティー症状が確認された (Fig. 1)。これにより、カンキツウイロイドの感染が疑われたため、RT-PCR による各カンキツウイロイドの保毒検定を行ったところ、すべての個体から *Citrus exocortis viroid*, *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd), *Hop stunt viroid*, *Citrus viroid III* 及び Citrus viroid-I-LSS (CVd-I-LSS) と想定されるバンドが検出された。この中で CVd-I-LSS は、現在 CBLVd の特別な変異株と考えられているウイロイドであり、日本以外での報告事例はない (Iro *et al.*, 2002)。そこで今回検出された CVd-I-LSS の全塩基配列を決定し、既報の CVd-I-LSS と比較を行ったところ、本ウイロイドは CVd-I-LSS の新たな変異株であることが判明したので報告する。



Fig. 1. Symptoms, such as epinasty and leaf bending, induced on Arizona 861-S1 'Etrog' citron by grafting of scions of the citrus plant from Pakistan.

```

Cvd-I-LSS      1  CGGAGACUUCUUGGUUCCUGUGGACACCCUCAGCCUACCUCCGGAAGAAAAAG 60
Cvd-I-LSS(PK-1)  .....U.....
Cvd-I-LSS(PK-2)  .....
*****

Cvd-I-LSS      61  UCAUUAAGAGGCCAGAGGACUGAGCGGUCGUCGACGAAGGCUC-CUCAGUCGC 120
Cvd-I-LSS(PK-1)  .....C.....
Cvd-I-LSS(PK-2)  A.....U.....
***** ** *****

Cvd-I-LSS      121 AGAGCGCCGUGGUAUCGACUGGCCUCCGGUGGAAA-ACGAAGAUUCGUUCAUUUCUG 180
Cvd-I-LSS(PK-1)  .....
Cvd-I-LSS(PK-2)  .....G-A...C-U.....
***** * *****

Cvd-I-LSS      181  UAACCGGACGGUCCUUCGCGCCGAGCGCUGGUCGCGUAGUCAGCGGAGACUCC 240
Cvd-I-LSS(PK-1)  .....UAG.....C.....
Cvd-I-LSS(PK-2)  .....A.....
***** *****

Cvd-I-LSS      241  GUCUCUACCCUCCGAGGCGUUUCACUGACCGACUCCGUAGCGGGGAGAGGG 300
Cvd-I-LSS(PK-1)  .....UU.....
Cvd-I-LSS(PK-2)  -A...U.....A...CU--U-U-U-A.....
* **** ***** ** * * *

Cvd-I-LSS      301  UGAAGCCUGUGAACCCUGAGGGUCCU 329
Cvd-I-LSS(PK-1)  .....C.....
Cvd-I-LSS(PK-2)  .....
*****

```

**Fig. 2.** Nucleotide sequence comparison of two new CVd-I-LSS variants, PK-1 and PK-2, with CVd-I-LSS, respectively. Bars denote gaps inserted to maximize sequence similarity among these sequence data.

## 材料及び方法

### RNA 抽出試料

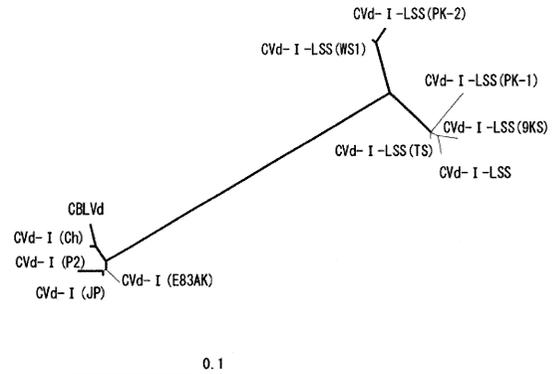
隔離検疫中のパキスタン産ライム 5 本をエトログ シトロン系統アリゾナ 861-S1 に接ぎ木接種し、3 カ月目に葉に病徴が明瞭に現れた時点で、葉柄部をそれぞれ採取し、RNA 抽出試料とした。

### ウイルス RNA の塩基配列解析

試料からの、RNA 抽出、RT-PCR、クローニング及び塩基配列解析は、Ito *et al.* (2000) の方法を用いて、次のように行った。

#### 1. 核酸の抽出及び RT-PCR

まずウイルス核酸を ISOGEN (Nippon Gene) を使用してカンキツ葉柄部 0.02 g から抽出し、ランダムヘキサマー及び RNA PCR Kit ver. 2.1 (Takara) を使用し、42°C、30 分で逆転写を行った。次いで、PCR Amplification Kit (Takara) 及び 2 組の CVd-I-LSS に特異的なプライマー対 CB2-CM(5'-ACGACCGCT-CAGTCTCCTCT-3') と CB 2-CP (5'-CGTCGACGA-AGGCTCCTCAGTC-3') 及び CB 2-TM (5'-GTCTC-CGAGGAGCCCTCAGG-3') と CB 2-TP (5'-TTCTT-GTGGTTCCTGTGGTG-3') を使用し、それぞれにつ



**Fig. 3.** Unrooted phylogenetic tree generated from multiple alignment calculated by CLUSTAL W(8) with bootstrapping in 1,000 replicates among the overall nucleotide sequences of the CBLVd variants including the two new variants PK-1 and PK-2. Bootstrap values >60% is drawn by thickened line. Nucleotide sequences of the CBLVd, CVd-I (Ch), CVd-I (Jp) and CVd-I (E83AK) and the CVd-I-LSS variants, 9KS, TS, WS1 and WS2 were described previously (ASHULIN *et al.*, 1991; FLORES *et al.*, 1998; HATAYA *et al.*, 1998).

いて、DNA変性94°C 30秒、アニーリング55°C 10秒、DNA伸長72°C 5秒を30回繰り返す反応条件で逆転写した核酸を増幅した。PCRによって増幅されたcDNAは、1.5%アガロースゲルの電気泳動で確認した。

## 2. クローニング

上記のRT-PCRにより最も明瞭なバンドが確認された個体からのPCR産物をTA Cloning Kit (Invitrogen)によってpCR 2.1ベクターに挿入しクローニングを行った。

## 3. 塩基配列解析

クローニングしたPCR産物の塩基配列の解読は、Texas Red M13 Forward (Reverse) プライマー及びThermo Sequence Pre-mixed Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech) を利用しジデオキシ法によって行った。塩基配列の解析は、DINASIS software ver. 3.7 (Hitachi Software Engineering) で行った。

## 結果及び考察

塩基配列解析の結果2種類のウイルス核酸の塩基配列を決定し、それぞれPK-1、PK-2とした(Fig. 2)。これらの株と既報のCVd-I-LSSの塩基配列(Ito *et al.*, 2000)を比較したところ、PK-1、PK-2はともに1塩基少ない326ntで、それぞれ96.6%及び93.9%の相同性を示した。また、同様にASHULINら(1991)が報告するCBLVdとも比較をしたところ、相同性は82.0%及び81.7%であった。そこで、その他のCVd-I-LSS変異株及びCBLVd変異株と比較を行うことを目的に、全塩基配列を基にした系統樹を作成した(Fig. 3)。この結果、PK-1とPK-2は、ともに、CVd-I-LSS変異株群内に位置し、他のCBLVd変異株群とは明らかに区別され、CVd-I-LSSの変異株であると考えられた。今回、これらの変異株がパキスタン由来のカンキツ苗木から検出されたことから、日本以外の国においてもCVd-I-LSSが存在する可能性が示された。

CVd-I-LSSの生物学的性状については、未だ不明な点が多いが、エトログシトロン系統アリゾナ861-S1での反応は、CBLVdと同等以上に激しく(Ito *et al.*, 2000)、また、他のウイルスと混合感染するとさら

に激しい症状を示すことが示唆されている(Ito *et al.*, 2002)。また、カンキツウイルスには、同一種内に多数の変異株が存在し、わずかな塩基配列の違いで病原性が大きく異なることも知られている(REANWARAKORN and SEMANCIK, 1999; OWENS *et al.*, 1999)。今回一つの樹から2種類のCVd-I-LSSの変異株を検出したことから、今後はこれらの変異株をカンキツに接種し病徴との関係を明らかにしたい。

## 引用文献

- ASHULIN, L., O. LACHMAN, R. HADAS and M. BAR-JOSEPH (1991) Nucleotide sequence of a new viroid species, citrus bent leaf viroid (CBLVd) isolated from grapefruit in Israel. *Nucleic Acids Res.* **19**(17), 4767.
- FLORES, R., J. W. RANGLES, M. BAR-JOSEPH and T. DIENER (1998) A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Arch. Virol.* **143**: 623-629.
- HATAYA, T., K. NAKAHARA, T. OHARA, H. IEKI and T. KANO (1998) Citrus viroid Ia is a derivative of citrus bent leaf viroid (CVd-Ib) by partial sequence duplications in the right terminal region. *Arch. Virol.* **143**: 971-980.
- 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. IWATANI, K. NAKAHARA, T. HATAYA, T. ITO, M. ISAKA and T. KANO (2002) Multiple Citrus Viroids in Citrus from Japan and Their Ability to Produce Exocortis-like Symptoms in Citron. *Phytopathology* **92**: 542-547.
- OWENS, R. A., S. M. THOMPSON, P. A. FELDSTEIN and S. M. GARNSEY (1999) Effects of natural sequence variation on symptom induction by citrus viroid III. *Ann. Appl. Biol.* **134**: 73-80.
- REANWARAKORN, K. and J. S. SEMANCIK (1999) Correlation of hop stunt viroid variants to cachexia and xyroporosis diseases of citrus. *Phytopathology* **89**: 568-574.
- THOMPSON, J. D., D. G. HIGGINGS and T. J. GIBSON (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.