

カンキツグリーニング病菌の宿主範囲調査 —ゲッキツはカンキツグリーニング病菌の宿主植物か—

藪 喜吉・池城隆明¹⁾・松浦貴之・木村 茂
濱上昭人²⁾・藤原裕治*・小橋川嘉一*・宮國正一郎*
横浜植物防疫所・*那覇植物防疫事務所

Investigation of Host Range of *Candidatus Liberobacter asiaticum*—Is *Murraya paniculata* a Host Plant of *Candidatus L. asiaticum*?—Kiyoshi DAI, Takaaki IKESHIRO, Takayuki MATSUURA, Shigeru KIMURA, Akito HAMAGAMI*, Yuuji FUJIWARA*, Yoshikazu KOBASHIGAWA* and Syouchiro MIYAKUNI* (Research Division Yokohama Plant Protection Station 1-16-10, Shinyamashita, Naka-ku, Yokohama 231-0801, Japan and *Naha Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* **41**: 53–57 (2005).

Abstract: We have attempted to contain Huanglongbing (ex-citrus greening disease) in Okinawa by enforcing quarantine regulations. In 2002, it was found on Yoronjima Island in Kagoshima Prefecture. Later, it was also found on Okinoerabujima Island, Tokunoshima Island and Kikaijima Island which are part of Kagoshima Prefecture. As the national and regional specialists were investigating the disease distribution, the mandarin orange farmers expressed the need to regulate the *Murraya paniculata*. They believed that the disease may be carried by *M. paniculata*. We investigated a possibility that *M. paniculata* would be infected with the pathogen of the disease, using PCR assay, after grafting the bud of infected *Citrus* spp. to *M. paniculata*. Consequently, there was no example to which *Candidatus Liberobacter asiaticum* infected with *M. paniculata*. We believed that *M. paniculata* is not the host plant of *L. asiaticum*.

Key words: *Murraya paniculata*, *Candidatus Liberobacter asiaticum*, grafting, PCR assay

はじめに

カンキツの大病害であるカンキツグリーニング病 (Huanglongbing*) は1988年、我が国では初めて沖縄県西表島で確認 (宮川,1989) され、1993年には大東島を除く沖縄県全域にその分布を拡大した。我が国はこのことを重く見て、1997年植物防疫法施行規則を改正し、本病原菌 *Candidatus Liberobacter asiaticum* の宿主植物であるカラタチ属 *Poncirus* Raf.、キンカン属 *Fortunella* Swingle 及びミカン属 *Citrus* L. の生植物 (種子、生果実を除く) 及び本病の媒介虫であるミカンキジラミ *Diaphorina citri* (Martinez and Wallace) について沖縄県からの移動を禁止し、本病の北上阻止を図った。この間、ミカンキジラミの好適寄主であるゲッキツ *Murraya paniculata* (L.) Jack は、文献調査をもとに本病に感染しないと、規制対象植物にはならなかった。

2001年3月、沖縄本島の北に位置する鹿児島県与論島において、6本のカンキツ樹がカンキツグリーニング病に罹病していたことが濱島ら (2002) によって確認され、その後、沖永良部島、徳之島及び喜界島の一部でも罹病

樹が確認されている。そして、分布調査、防除作業を通じ、地元関係者から「ゲッキツが本当に感染しないのか、本病のまん延を阻止するため、ゲッキツを移動規制の対象にしてほしい」との要望が出る (大島新聞,2003) などゲッキツが本病原菌の宿主となるかが論議の的となった。

ゲッキツは台湾、沖縄、奄美群島に広く分布するミカン科の植物であり、その植物体上でミカンキジラミの産卵増殖が年に8～10回繰り返される (荳原,1997)。沖縄、奄美群島での本病罹病樹近くにはゲッキツが自生又は植栽されていることが多く、カンキツグリーニング病菌の宿主植物となるのであれば現行の移動制限措置の適用に問題があることになる。

そのため、筆者らは改めて文献調査を実施するとともに、ゲッキツが宿主植物であるかどうか検証・試験を行うこととした。

文献調査の結果、宮川ら (2000) の報告にミカンキジラミ及び接ぎ木による接種でゲッキツ上に病徴を認めたとの記載があったものの、接種源及び病徴を現したゲッキツ内の病原体の確認には言及していなかった。そこで、接ぎ木接種による病原体の接種源からゲッキツへの移行の有無について高精度に本病原菌の検出ができるPCR検定を用いて感染の有無を確認するとともに病徴発現について調査した。

* Huanglongbing: The 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists 2000.

¹⁾ 現那覇植物防疫事務所

²⁾ 現横浜植物防疫所

材料及び方法

試験は那覇植物防疫事務所及び横浜植物防疫所調査研究部の2か所で行い、材料及びPCR検定はそれぞれの所で通常用いている以下の方法を採用した。

1. 接種源

那覇ではカンキツグリーンング病に罹病しているラフレモン *C. jambhiri* Lush. 苗を、横浜ではシクワシャー *C. depressa* Hayata 苗を接種源として用いた。接種源については葉に明確なカンキツグリーンング病特有の病徴を有し、且つPCR検定で罹病を確認した。

2. 調査対象植物

実生3年のゲッキツ苗（太さ0.7cm程度）を供試した。

3. 接種方法及び検定試料の採取

接種源の接ぎ穂をゲッキツの地際部から約15cm及び25cmの2か所に腹接ぎし接種を行った。

接種2週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月及び6ヶ月後に接種源である接穂そのものの樹皮及び接種部位から約2cm離れた上下の2か所のゲッキツ樹皮をナイフにて篩部組織を含むように0.1~0.3g採取し、これをPCR検定用の試料とした。

陽性対照として本病に感受性であるシクワシャー実生苗を用い、ゲッキツ同様に接ぎ木接種を行った後、病徴発現までの間PCR検定を実施した。

供試苗数は、ゲッキツについて那覇、横浜共に1区につき苗2本、対照区については那覇が1区につき苗2本、横浜では1本とした。

4. PCR検定の方法

核酸の抽出及びPCR法

[那覇] HUNGら（1999）の方法を改変した以下の方法を用いた。

試料にトリス、EDTA、塩化ナトリウム、プロテナーゼKを含むバッファーを加えて磨砕し、更にサルコシルを加えて混合した。チューブに移して55℃、1時間静置した後遠心分離を行い、上清にCTABを加えて65℃10分間の熱処理後、更にフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールの混合液を加え、遠心分離を行いタンパク質や多糖類を除去した。

その後、イソプロピルアルコールとエタノールで核酸を沈殿させ、TEバッファーに溶解してPCR用の核酸試料とした。

PCR反応はDNA変性を94℃、アニーリングを60℃、伸長反応を72℃で行った。

[横浜] DELLAPORTAら（1983）の方法を一部改変した以下の方法を用いた。

試料をトリス、塩化ナトリウム、メルカプトエタノールを含むバッファーで磨砕し、更にEDTA、SDS、PVPを含むバッファーを加えて磨砕した。チューブに移して65℃10分の熱処理後、酢酸カリウムを加えて氷中で静置し、遠心分離によりタンパク質や多糖類を取り除いた。その後、イソプロピルアルコールとエタノールで核酸を沈殿させ、蒸留水に溶解してPCR用の核酸試料とした。

PCRの条件は、DNA変性を94℃で行い、プライマーのアニーリング及び伸長反応を同じ68℃で行うシャトルPCRとした。

なお、プライマーはJAGOUÉIXら（1994）の本病原菌16S rDNAに対する特異プライマー（Plus chain OI 1、5'-GCG CGT ATG CAA TAC GAG CGG CA-3、Minus chain OI 2 C 5'-GCC TCG CGA CTT CC AAC CCA T-3'）を用いた。

電気泳動及び染色

PCR産物は、1.5%のアガロースゲルを用い、100Vで電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色して1160bpに相当するバンドの確認を行った。

結果及び考察

試験結果の概要をTable 1及びTable 2に示した。

調査対象植物：ゲッキツ

接種2週間：那覇、横浜共に、接種源である接ぎ穂を台木2本から計4個をはぎ取り、PCR検定を実施したところ、4個すべての接ぎ穂でカンキツグリーンング病菌に特異的なバンドが検出され、本菌の保毒を確認した。接ぎ穂はすべて緑色を呈し活着しているように思われた。次に、接ぎ穂の上下2cmの樹皮部計8か所をとり、PCR検定を行った。その結果、すべての区で特異的なバンドは検出されなかった。

接種1か月：那覇では4個の接ぎ穂は全て緑色を呈し活力を保っていた。これらについて検定を行った結果、4個全てで特異的なバンドが検出された。樹皮部8か所の検定では特異的なバンドは検出されなかった。横浜では接ぎ穂2個は活着しているが、残り2個には活力がない様子であった。これら4個について検定を実施したところ、活着している2個の接ぎ穂からは特異的なバンドが検出されたが、他の2個で検出されなかった。接ぎ穂上下の樹皮部8か所を検定したが、すべての区で特異的なバンドは検出されなかった。

接種2か月：那覇及び横浜の接ぎ穂4個共に活力を保っていた。那覇では接ぎ穂4個全てで特異的なバンドが検出され、横浜では2個で検出された。樹皮部8か所について那覇、横浜共に特異的なバンドは検出されなかった。

接種3か月：那覇及び横浜の接ぎ穂4個共に活力を保ち、展葉するものもあった。那覇では接ぎ穂2個で特異的なバンドは検出された。横浜では3個で特異的なバンドが検出された。樹皮部の検定では那覇、横浜共に8か所い

Table 1. Results of Inoculation Test in Two Experiment Sites Concerning PCR Assay

Inoculation Period		Naha		Yokohama		Naha		Yokohama	
		Inoculum source (grafted scion)	Inoculated Plant (<i>M. paniculata</i>)	Inoculum source (grafted scion)	Inoculated Plant (<i>M. paniculata</i>)	Inoculum source (grafted scion)	Inoculated Plant (<i>C. depressa</i>)	Inoculum source (grafted scion)	Inoculated Plant (<i>C. depressa</i>)
Two weeks	a	+	+	---	---	+	+	---	---
	b	+	+	---	---	+	+	---	---
One month	a	+	+	---	die +	+	+	---	+ -
	b	+	+	---	die +	+	+	---	NT
Two months	a	+	+	---	+	+	+	+++ -	+ + + -
	b	+	+	---	-	+	+	+++ -	NT
Three months	a	+	+	---	-	+	+	---	NT
	b	-	-	---	+	+	+	---	---
Four months	a	+	+	---	+	+	+	---	---
	b	+	-	---	-	+	+	---	---
Five months	a	die -	---	+	+	---	---	---	---
	b	die +	---	NT	NT	---	---	---	---
Six months	a	+	die	---	+	---	---	---	---
	b	+	-	---	NT	---	NT	---	---

+ : Specific band by PCR - : No-specific band by PCR die : not vivid NT : not tested
 Experimental places: In each green house of Naha Plant Protection Station, and Yokohama Plant Protection Station.
 Inoculation method: Diseased scions of citrus were grafted in seedlings of *Murraya paniculata* (examined plants) and *Citrus depressa* (control).
 Detection method of pathogen: After inoculation (two weeks, one month, two months, three months, four months, five months, and six months), samples of stem parts of *M. paniculata* were analyzed by PCR for detection of a pathogen.

Table 2. Results of Inoculation Test Concerning Symptom

Inoculation Period		Symptom on <i>M. paniculata</i>		Symptom on <i>C. depressa</i>	
		Naha	Yokohama	Naha	Yokohama
Two weeks	a	-	-	-	-
	b	-	-	-	-
One month	a	-	-	-	-
	b	-	-	-	-
Two months	a	-	-	+	+
	b	-	-	+	+
Three months	a	-	-	-	-
	b	-	-	-	-
Four months	a	-	-	-	-
	b	-	-	-	-
Five months	a	-	-	-	-
	b	-	-	-	-
Six months	a	-	-	-	-
	b	-	-	-	-

+ : appearance of symptom - : No-appearance of symptom

ずれの区とも検出されなかった。

接種4か月：那覇及び横浜の接ぎ穂4個共に活着していた。那覇では接ぎ穂4個中3個で特異的バンドが検出され、横浜では4個中1個で検出された。樹皮部については那覇、横浜共に検出されなかった。

接種5か月：那覇の接ぎ穂4個の内2個が活力を失い、これらについては検定から除外した。樹皮部の検定は8か所を検定した。その結果、接ぎ穂の1個で特異的バンドが検出され、樹皮部全てからは検出されなかった。横浜では活着している2個の接ぎ穂についてPCR検定を実施し、2個共に特異的バンドが検出された。樹皮部4か所からは検出されなかった。

接種6か月：那覇では接ぎ穂4個の内1個が活力を失

ったことからこれを除外し、3個について検定を行った。その結果、2個から特異的バンドが検出された。樹皮8か所については検出されなかった。横浜では接ぎ穂2個を検定し、1個から検出され、樹皮部4か所からは検出されなかった。

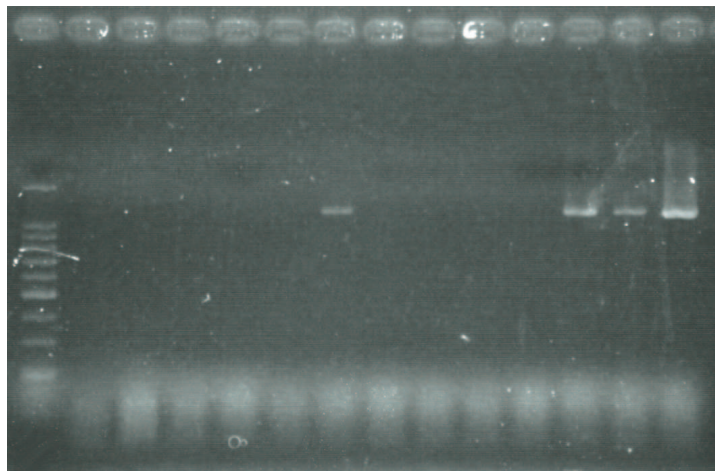
対照区（シクワシャー）

接種2週間：那覇、横浜共に接ぎ穂の活力はあった。接ぎ穂4個各々についてPCR検定を実施したところ、4個すべてでカンキツグリーンング病菌に特異的なバンドが検出された。接ぎ穂の上下2cmの樹皮部8か所を同様に検定した結果、すべてで検出されなかった。

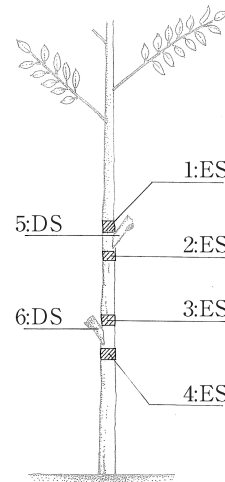
接種1か月：那覇では4個の接ぎ穂は全てに活力がありPCR検定の結果、4個全てで特異的バンドが検出され



Figure 1. Susceptible test of Huanglongbing on *M. paniculata* (four months after inoculation)



1 2 3 4 5 6 1 2 3 4 5 6 Cont.
a-seedling b-seedling



ES Examined sample, DS Disease section
Illustration shows sampled parts on tested
M. paniculata

Figure 2. Result of PCR assay at three months after inoculation (Yokohama).

た。樹皮部 8 か所の検定では検出されなかった。横浜では、接ぎ穂 2 個の内 1 個に特異的バンドが検出された。樹皮部 4 か所を検定したところ、3 か所でカンキツグリーンニング病菌の特異的バンドを検出した。

接種 2 か月：那覇では 4 個の接ぎ穂は全てに活力があり PCR 検定の結果、4 個全てで特異的バンドを検出した。樹皮部 8 か所では、6 か所から検出された。横浜では、接ぎ穂 2 個ともに特異的バンドが検出されなかったものの、上下樹皮部共 4 か所中 3 か所で特異的バンドを検出

した。また、接種したシクワシャーの葉の脈間に淡い退緑域が認められた。これについて PCR 検定を行ったところ、特異的バンドが検出され、本病の病徴であることが確認された。

今回の接種試験において横浜、那覇共にほぼ同様の結果を得ることができた。

対照区として用いたシクワシャーへの接ぎ木接種によるカンキツグリーンニング病の感染は、横浜においては接種後 1 か月で、那覇でも 2 か月後には PCR 検定で確認

され、またこの頃には、被接种植物上に病徴が発現することも確認した。これに対し、罹病接ぎ穂をゲッキツに接ぎ木接種した場合、2週間から6か月に渡るいずれの試験区においても本病原菌は接ぎ穂組織中に留まり、ゲッキツ組織に移行しなかったことがPCR検定及び病徴観察で確認された。以上のことから、ゲッキツは従前から言われているとおりカンキツグリーニング病の自然宿主ではないことを再確認するとともに、少なくとも接ぎ木接種による本病の接種は困難であることから、ゲッキツはカンキツグリーニング病の宿主植物になり得ないものとする。

引用文献

- 芦原 亘 (1997) カンキツグリーニング病の媒介昆虫ミカンキジラミ *Diaphorina citri* の生態と防除. 植物防疫51:312-315
- DELLAPORTA, S.L. JOBNATHAN WOOD, JAMES B. HICKS (1983) A Plant DNA Miniprep: Version II. Plant Molecular Biology Reporter 1, 19-21
- 濱島朗子・橋本祥一・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
- HUNG T.H., MENG-LING WU, HONG-JI SU (1999) Detection of Fastidious Bacteria Causing Citrus Greening Disease by Nonradioactive DNA Probes. 日植病報65: 140-146
- 宮川経邦. (2000) (総説) カンキツグリーニング病-世界的な発生分布とその被害-. 南九州大学園芸学部研究報告第30号 (A) 53-63
- 大島新聞社2003. 4月18日版. 植物防疫法による移動規制「ゲッキツ」も要請の動き
- JAGOUÉIX, S. JOSEPH-MARIE BOVE and MONIQUE GARNIER (1994) The Phloem-Limited Bacterium of Greening Disease of Citrus Is a Member of the α Subdivision of the Proteobacteria. International Journal of Systematic Bacteriology 44: 379-386

