

カンキツトリステザウイルス弱毒系統の選抜

第1報 罹病性品種に対する病原性およびユズ幼苗割接ぎ法 における干渉作用に基づく選抜

下村克己・平島敬太¹⁾・草野成夫
(果樹苗木分場)

福岡県内のカンキツ現地ほ場の樹齢20～100年生の樹より、カンキツトリステザウイルス (CTV) 強毒系統の感染に対して干渉作用を示す系統を探索し、2つの弱毒系統を選抜した。これらの弱毒系統はいずれも、CTVに罹病性の品種である‘ユズ’、‘宮内伊予柑’および‘土佐文旦’の生育に対する影響が認められず、典型的な病徴であるステムピッチングの発生もなかった。選抜した弱毒系統のCTV強毒系統に対する干渉作用の有無をユズ幼苗割接ぎ法により検討した結果、強毒系統の感染は認められず、干渉作用を有すると判断された。

[キーワード：カンキツトリステザウイルス、弱毒系統、幼苗割接ぎ法、干渉作用]

Selection of Mild Strains against a Severe Strain of Citrus Tristeza Virus(CTV)

1. Selection of Mild Strains of CTV Based on Virulence against CTV-sensitive Citrus Varieties and Checking the Cross-Protection Ability by Cleft Grafting Method. SHIMOMURA Katsumi, Keita HIRASHIMA and Nario KUSANO (Fukuoka Agric. Res. Cent., Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 18:87-91 (1999)

Two mild strains of citrus tristeza virus (CTV) were isolated from old citrus trees in citrus fields in FUKUOKA Prefecture. ‘YUZU’ (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka), ‘MIYAUCHIYOKAN’ (*Citrus iyo hort.* ex Tanaka) and ‘TOSABUNTAN’ pomelo (*Citrus grandis* Osbeck) which are ctv-sensitive varieties had no damage or symptoms of ctv after inoculation of each mild strain. Their abilities to protect citrus trees against a severe strain of CTV were checked by the cleft grafting method for little seedlings. The severe strain of CTV was not transmitted to ‘YUZU’ trees pre-inoculated with each mild strain by ten aphids (*Toxoptera citricidus* kirk.). These results suggest that the two mild strains of CTV have cross-protection ability against the severe one.

[Key words: citrus tristeza virus, mild strain, cleft grafting method, cross-protection]

緒 言

カンキツトリステザウイルス (CTV) は、主に中晩生カンキツにおいて樹勢や収量の低下、さらには枯死を招くなど、栽培上最も重要な病原の一つである。本病原による被害は、CTV罹病性の台木や品種を利用している国々で特に深刻であり、その防除対策も古くから取り組まれてきた²⁾。わが国では、CTVに免疫性を有する‘カラタチ’ (*Poncirus trifoliata* Raf.) を台木として利用してきたことと共に、抵抗性を有するウンシュウミカン中心の栽培がなされてきたため、他の国々ほど大きな問題になってこなかった。しかし、CTV罹病性の品種を台木として利用した場合のような急性の萎凋・枯死は起きないものの、‘カラタチ’を台木として利用しても、CTVに罹病性の中晩生カンキツを栽培する場合は、収量や果実品質の低下等による被害が大きい。

カンキツのウイルス病対策としては、ウイルスフリー化が広く行われ^{6,12,19)}、CTVについても熱処理と茎頂接

木の併用によりウイルスフリー個体を得ることが可能である。しかし、わが国で栽培されているカンキツ類のほとんどは、CTVの強毒系統に感染している¹⁰⁾ こと、

CTVはカンキツ栽培地帯に広く分布しているミカンクロアブラムシ (*Toxoptera citricidus* kirk.) 等によって虫媒伝染する⁹⁾ ことから、ウイルスフリー樹を栽植しても再感染する可能性が高く、ウイルスフリー化単独では防除対策として十分でない。

そこで、強毒系統の感染に対し干渉作用を有する弱毒ウイルスの実用化が図られ^{1,3,8,11,14)}、わが国では広島県の‘八朔’ (*Citrus hassaku hort.* ex Tanaka) から分離された HM-55¹⁵⁾ が広く利用されてきた。しかし、この HM-55 の干渉作用が品種によって異なる⁸⁾ ことが指摘されたことから、近年増加してきた中晩生の新品種に対応するためには、新たな弱毒ウイルスを探索あるいは作出し、その選択肢を広げる必要がある。

そこで、今回は福岡県の現地ほ場において弱毒系統を探索し、罹病性品種に対する病原性やユズ幼苗割接ぎ法による干渉作用に基づいて、弱毒ウイルスとして有望な2系統のウイルスを選抜したので報告する。

試験方法および結果

1 弱毒系統分離候補樹の選定

1988年に本県のカンキツ栽培産地5ヶ町村のほ場から、

1) 現生産環境研究所

20年生以上の樹で生産性が高く、生育の良い中晩生のカンキツを選定し、'八朔' 4樹、'ワシントンネーブル' (*Citrus sinensis* Osbeck var. *brasiliensis* Tanaka) 7樹、'日向夏' (*Citrus tamurana* hort ex Tanaka) 3樹、'甘夏' (*Citrus natsudaidai* Hayata) 1樹の計15樹を弱毒系統分離候補樹とした(第1表)。

2 病原性評価による選抜

(1) 弱毒系統分離候補樹の発病程度による選抜(一次選抜)

弱毒系統分離候補樹のCTV保毒の有無は、酵素結合抗体法(ELISA)⁴⁾により調査し、全て陽性であることを確認した。また、CTVの発病程度は、「カンキツの調査方法」(農林水産省果樹試験場興津支場編1987年)に準じて、1樹当たり10~23本の2年枝のステムピッチング発病程度を調査し、その程度により4段階に分けて、数値化して評価した(第1表)。

その結果、CTVによるステムピッチングの発病程度は、'ワシントンネーブル'で比較的高く、'八朔'、'日向夏'では低い樹が認められた(第1表)。そこで、ステムピッチング発病程度が低かった'八朔'1樹をHaM1、'日向夏'3樹をHyM1、HyM2、HyM3とそれぞれ命名し二次選抜に供試した。

第1表 ELISA法によりCTV保毒を確認した弱毒系統分離候補樹の来歴とステムピッチング発病程度(1988年)

品 種 名	No.	樹 齢 (年)	所在地	ステムピッチングの発病状況				発病度 ¹⁾
				発病程度別枝数(本)				
				無	軽	中	甚	
八 朔	1	35	山川町	3	7	0	0	14.0
"	2	35	"	1	8	2	0	25.4
"	3	20	"	3	6	2	0	21.8
"	4	35	"	3	15	2	0	23.0
日 向 夏	1	80	大島村	12	11	0	0	9.5
"	2	80	"	6	6	0	0	10.0
"	3	100	"	3	8	1	0	16.9
甘 夏	1	30	福岡町	1	10	2	0	26.6
ワシントンネーブル	1	70	"	0	8	4	0	33.3
"	2	25	山川町	0	5	5	0	40.0
"	3	60	福岡町	0	8	6	0	37.0
"	4	70	古賀町	0	6	9	6	60.0
"	5	70	"	0	8	5	8	60.0
"	6	92	"	0	5	11	7	63.4
"	7	92	"	0	12	8	1	39.0

注) 1) 発病度 = $\frac{(\text{軽} \times 1) + (\text{中} \times 3) + (\text{甚} \times 5)}{\text{総調査枝数} \times 5} \times 100$

(2) 'メキシカンライム'に対する病原性評価による選抜(二次選抜)

'メキシカンライム' (*Citrus aurantifolia* Swingle) は、挿し木繁殖後、口径15cm、容量10ℓのポットで1年間育成した。この無毒の'メキシカンライム'に、一次選抜した弱毒系統分離候補樹が保毒するウイルス(以下、弱毒候補ウイルスとする)を1988年5月に接ぎ木接種し、ライム葉上に現れる反応を調査した。さらに、1989年10月に樹容積(長径×短径×高さ×0.7で算出後に換算)を算出し、これを弱毒候補ウイルス自体が生

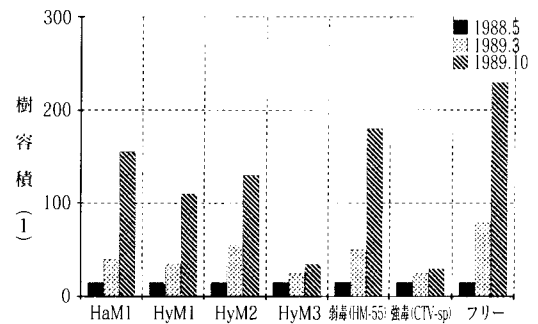
育量に及ぼす影響として評価した。対照として、HM-55と強毒系統(ステムピッチング系:CTV-sp)を接種したものと、無接種(以下、フリーとする)のものを用いて比較した。なお、試験には各区5樹供試し、土壌にはUCソイルミックス¹⁷⁾を用い、虫媒伝染を防ぐため網室ハウス内で管理した。

その結果、供試した弱毒候補ウイルス4系統はいずれも、弱毒系統HM-55と同様にベインクリアリング(葉脈透過)は起こすものの、強毒系統特有のベインコーキング(葉脈硬化)¹⁶⁾は発現させなかった(第2表)。そこで、それら4系統の内、接種後の'メキシカンライム'の樹容積の推移(第1図)において、強毒接種樹よりも生育が良好で、フリー樹やHM-55接種樹に準じる生育を示した'八朔'由来のHaM1および'日向夏'由来のHyM2を選抜し、三次選抜に供試した。

第2表 'メキシカンライム'に対する弱毒候補ウイルスの病原性評価(1989年)

供試ウイルス	ライム葉の反応	
	葉脈透過	葉脈硬化
HaM1	+(4/5) ¹⁾	-(0/5)
HyM1	+(3/5)	-(0/5)
HyM2	+(4/5)	-(0/5)
HyM3	+(4/5)	-(0/5)
弱毒(HM-55)	+(5/5)	-(0/5)
強毒(CTV-sp)	+(5/5)	+(5/5)
フリー	-(0/5)	-(0/5)

注) 1) () は、病状発現個体数/供試数。



第1図 弱毒候補ウイルスの接種が'メキシカンライム'樹容積に及ぼす影響

(3) 'ユズ'実生に対する病原性評価による選抜(三次選抜)

二次選抜と同様のポットに栽植した'ユズ' (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka) 実生1年生苗に、二次選抜した弱毒候補ウイルス2系統を接ぎ木接種した。対照として、強毒系統(ステムピッチング系:CTV-sp、シードリングイエローズ系:CTV-sy)および無接種を設置した。

なお、試験には各区20樹供試し、その他の管理は二次選抜と同様とした。

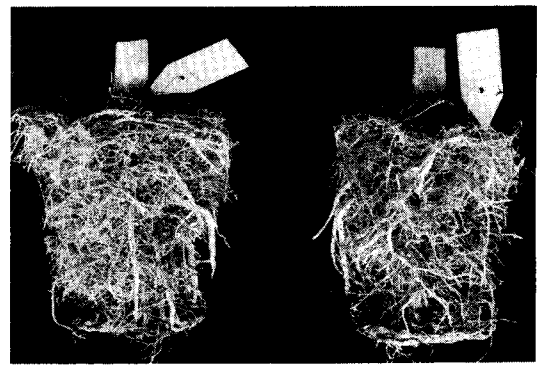
また、接種3年後に主幹径、樹高および葉数を調査すると共に、各区3樹を解体し、地上部重、地下部重を測定した。さらに、根の直径を測り、細根(<2.0mm)、

小根(2.0~5.0mm)、中根(5.0~10mm)、大根

(10～20mm)、根幹に分けた後、重量を測定し根群比率を算出した。

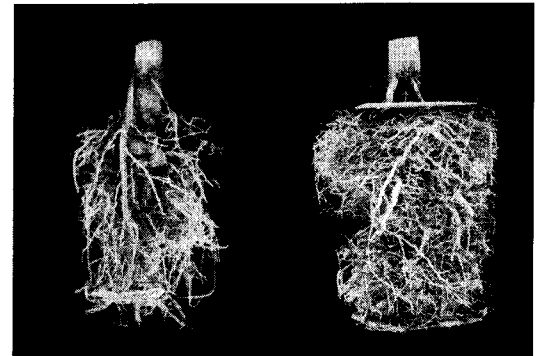
その結果、弱毒候補ウイルスHaM1、HyM2を接種した‘ユズ’実生の主幹径、樹高、葉数、地上部重は、フリー樹と同等であった。しかし、CTV-sp接種樹と比較すると樹高および地上部重は明らかに優っていた(第3表)。

また、HaM1、HyM2を接種した‘ユズ’実生の地下部重は、強毒接種樹に比べて明らかに重く、根群比率についても同様に、細根および小根の比率は、強毒系統CTV-sp接種樹と比較してHaM1、HyM2、フリーが高く、根系の充実度に差が認められた(第4表、第2図)。



HaM1

HyM2



CTV-SP

フリー

第2図 弱毒候補ウイルス接種後における‘ユズ’の根の状況(1994年)

第3表 ‘ユズ’実生の生育に対する弱毒候補ウイルスの影響(1994年)

試験区	調査項目			
	主幹径 (mm)	樹高 (cm)	葉数	地上部重 ¹⁾ (g)
HaM1	18.2 ^{a2)}	165 ^a	491 ^a	355 ^a
HyM2	17.3 ^a	147 ^a	410 ^a	350 ^a
CTV-sp	16.5 ^a	120 ^b	396 ^a	213 ^b
CTV-sy	16.4 ^a	132 ^b	387 ^a	245 ^{ab}
フリー	17.4 ^a	151 ^a	457 ^a	295 ^a

注)1)地上部重は、風乾重。

2)英小文字は、Tukeyの多重検定で異符号間に5%水準で有意差有り。

第4表 ‘ユズ’実生の根群に対する弱毒候補ウイルスの影響(1994年)

接種ウイルス	地下部重 ¹⁾ (g)	根群比率(%)				
		細根	小根	中根	大根	根幹
HaM1	167 ^{a2)}	17.1 ^a	7.8 ^a	7.2	26.7	41.2
HyM2	164 ^a	26.7 ^a	7.9 ^a	5.2	27.7	32.5
CTV-sp	89 ^b	7.9 ^b	4.5 ^b	1.7	41.8	44.1
CTV-sy	109 ^b	22.5 ^a	6.4 ^{ab}	9.7	17.0	44.4
フリー	152 ^a	25.3 ^a	9.2 ^a	12.2	17.1	36.3

注)1)地下部重は、風乾重。

2)英小文字は、根群比を逆正弦変換後、Tukeyの多重検定を行い、異符号間に5%の水準で有意差有り。

(4) 栽培品種に対する病原性評価による選抜(4次選抜)

熱処理および茎頂接ぎ木法によりウイルスフリー化した‘宮内伊予柑’(*Citrus iyo hort.ex Tanaka*)および‘土佐文旦’(*Citrus grandis Osbeck*)を二次選抜と同様のポットに栽植、育成した‘カラタチ’に切り接ぎし1年間育苗した後、口径25cm、容量20ℓのポットに移植して三次選抜した弱毒候補ウイルスを接ぎ木接種した。対照として、強毒系統(CTV-sp)および無接種を設置した。接種4年後に三次選抜と同様にして、葉数および主幹径を調査した。なお、試験には各区5樹供試し、その他の管理は二次選抜と同様にして行った。

その結果、弱毒候補ウイルスHaM1およびHyM2を接種した‘宮内伊予柑’は、葉数では、フリーやCTV-sp接種と差がなかった。一方、主幹径では、フリーと同様にCTV-sp接種より明らかに優った(第5表)。また、

第5表 栽培品種の葉数および主幹径に及ぼす弱毒候補ウイルスの影響(1995年)

品種名	接種ウイルス	葉数	主幹径(mm)
宮内伊予柑	HaM1	417 ^{a1)}	16.3 ^a
	HyM2	358 ^a	16.0 ^a
	CTV-sp	267 ^a	13.7 ^b
	フリー	469 ^a	17.1 ^a
土佐文旦	HaM1	179 ^a	18.1 ^a
	HyM2	203 ^a	17.3 ^a
	CTV-sp	89 ^b	15.8 ^b
	フリー	147 ^a	17.0 ^a

注)1)英小文字は、Tukeyの多重検定で異符号間に1%水準で有意差有り。

‘土佐文旦’では、葉数および主幹径において、HaM1、HyM2ともにフリーと同等で差が認められず、強毒系統CTV-sp接種よりも明らかに生育が良好であった(第5表)。

3 ‘ユズ’における干渉作用評価による選抜(5次選抜)

弱毒候補ウイルスの干渉作用を重田ら¹⁸⁾の方法に準じて幼苗割接ぎ法により評価した。すなわち、二次選抜と同様のポットに栽植した‘カラタチ’実生に、三次選抜で用いた弱毒ウイルスを接種した(一次接種)‘ユズ’実生の腋芽を割接ぎし、発芽伸長させた。この幼苗割接ぎ苗に対し、強毒系統(CTV-sp)を保毒した‘ラフレモン’(*Citrus jambhiri Lush.*)の新梢上で飼育して、CTV強毒系統の伝搬能を獲得させたミカンクロアブラムシを

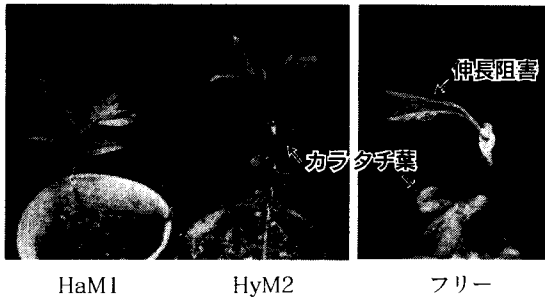
1樹当たり10頭放飼し、2日間吸汁(二次接種)させた。その後、幼苗は網室ハウス内で管理し、葉の黄化や伸長阻害の有無を調査して干渉作用を評価した。

その結果、CTVフリーの幼苗割接ぎ‘ユズ’の5個体中2個体で強毒系統感染による葉の黄化症状と新梢先端の芽枯れによる伸長阻害が観察された(第6表、第3図)。また、第3図で幼苗割接ぎに用いた‘カラタチ’の葉を基準にして比較すると分かるように、CTVフリーの幼苗割接ぎ‘ユズ’の葉は明らかに小さく、二次接種された強毒系統の生育に対する影響が顕著に認められた。一方、弱毒候補ウイルスHaM1およびHyM2を一次接種した幼苗割接ぎ‘ユズ’では、葉の黄化症状や伸長阻害は認められなかった(第6表、第3図)。

第6表 ユズ幼苗割接ぎ法による弱毒候補ウイルスの強毒系統感染に対する干渉作用(1997年)

弱毒候補ウイルス	葉の黄化	伸長阻害
HaM1	-(0/5) ¹⁾	-(0/5)
HyM2	-(0/5)	-(0/5)
フリー	+(2/5)	+(2/5)

注)1)()内は、症状発現個体数/供試数。



第3図 弱毒候補ウイルスがユズ幼苗割接ぎ法において示した干渉作用

考 察

弱毒系統を得る方法としては、ウイルスに感染し、しかも生育が良好な栽培樹から選抜する方法と、樹が保毒するウイルスに熱処理を施し、病原性を弱めたウイルスを作出する方法⁷⁾とがある。今回、前者の方法によって選抜した弱毒候補ウイルス2系統のライム葉上での反応は、HM-55と同様であった。また、その影響を樹容積の推移で見ると、強毒系統接種樹よりも良好で、HM-55接種樹およびフリー樹に準じる生育を示した。このことから、これらの弱毒候補ウイルスは、CTVの弱毒系統であると考えられ、今後適用可能な栽培品種を検討して、実用化を図る必要があると考えられた。

対象品種に適用可能かどうかの判定基準として、第1に樹の生育に対して悪影響を及ぼさないことが上げられる。今回、CTV罹病性の‘ユズ’、‘宮内伊予柑’および‘土佐文旦’の生育に対して悪影響が認められなかったことに加え、2~3年枝のステムピッチングの発生が認められなかった(下村ら、未発表)ことから、これらの品種で用いる弱毒ウイルスとして有望であると考えられた。

判定基準の第2として、干渉作用を有することが上げられる。しかし、この判定には、長期間にわたる樹体および収量等の調査が必要である。そこで、重田らが‘ユズ’の弱毒ウイルスYH-23選抜の際に用いた幼苗割接ぎ法¹⁸⁾を適用し、干渉作用を有する可能性について調査した。今回の調査結果からは、CTV弱毒ウイルスとして適用可能なカンキツの品種としては、‘ユズ’に限定されるものの、選抜したウイルスはCTV強毒系統の二次接種に対して干渉作用を示した点で、有望な弱毒系統であると考えられた。また、この幼苗割接ぎ法は、‘ユズ’以外の品種にも適用可能である¹⁸⁾ことから、今後新品種を含めた他の栽培品種における干渉作用の有無を調査し、選抜した弱毒系統の適用可能な品種を検討する必要がある。

一方、CTVの弱毒ウイルスとして、農林水産省果樹試験場で興津16号から分離されたM16A⁵⁾は‘森田ネーブル’(Citrus sinensis Osbeck var. brasiliensis Tanaka)で、山口県で‘ユズ’から分離されたYH-23¹³⁾は‘ユズ’で干渉作用を示すことが最近報告されている。したがって、今後、今回選抜した2つの弱毒系統とM16AやYH-23といった国内で分離された弱毒系統をはじめ、他の優良な弱毒系統^{3,11,14)}との、各種の栽培品種における病原性の比較や分子生物学的解析・比較を実施し、弱毒系統の効果的な利用法を確立する必要がある。

引用文献

- Balaraman, K. (1980) Interaction studies between a mild strain of tristeza on acid lime and other virus-like disease of citrus. In Proc. 8th Conf. IOCV. IOCV, Riverside: 54-59.
- Bar-Joseph, M., R. Marcus and R. F. Lee (1989) The continuous challenge of citrus tristeza virus control. Ann. Rev. Phytopathol. 27: 291-316.
- Giacometti, D. C. and C. M. Araujo (1965) Cross protection from tristeza in different species of citrus. In Proc. 3rd Conf. IOCV. Univ. Florida Press, Gainesville: 14-17.
- 花川 薫 (1993) 酵素結合抗体法 (ELISA法). 植物病理学実験法. (佐藤昭二・後藤正夫・土居養二編), 東京: 講談社, pp. 199-202.
- Ieki, H., A. Yamaguchi, T. Kano, M. Koizumi and T. Iwanami (1997) Control of stem pitting disease caused by citrus tristeza virus using protective mild strains in Navel Orange. Ann. phytopathol. Soc. Jpn. 63: 170-175.
- 家城洋之・山田峻一 (1984) 熱処理によるカンキツトリステザウイルス、温州萎縮ウイルス及びカンキツタターリーフウイルスの無毒化. 果樹試報 B11: 71-87.
- 家城洋之・山口 昭 (1986) カンキツトリステザウイルス (CTV) 弱毒系統探索法の改良及び熱処理による作出. 果樹試報 B13: 71-79.
- 小泉銘册・久原重松 (1985) カンキツトリステザウイルス (CTV) に干渉効果を示す弱毒ウイルスの探索.

- 果樹試報 **D7**:89-108.
- 9) 小泉銘册(1993)ステムピット病 (ハッサク萎縮病). 作物ウイルス病事典. (土崎常男・栃原比呂志・亀谷満朗・柳瀬春夫), 東京: 全国農村教育協会, pp.592-593.
- 10) 宮川経邦(1977)わが国のカンキツに保毒されるトリステザウイルスの系統. 徳島果試報 **6**:1-7.
- 11) Muller, G.W and A.S.Costa (1972) Reduction in yield of Galego lime avoided by preimmunization with mild strains of tristeza virus. *In Proc.5th Conf.IOCV.Univ.Florida Press, Gaines ville*:171-175.
- 12) Navarro, L.(1981) Citrus shoot-tip grafting in vitro (STG) and its application.A review.*Proc. Int.Soc.Citriculture.*:452-456.
- 13) 野崎 匠・村本和之・中田榮一郎・重田 進(1995) ユズのカンキツトリステザウイルス (CTV) に対して高い干渉効果を示す弱毒ウイルスの選抜. 山口農試研報 **46**:106-113.
- 14) Roistacher, C.N., J.A.Dodds and J.A.Bash (1988) Cross protection against citrus tristeza seed ling yellows and stem pitting viruses by protective isolates developed in greenhouse plants.*In Proc.10th Conf.IOCV.IOCV,Riverside*: 91-100.
- 15) 佐々木 篤(1974)ハッサク萎縮病に関する研究. 広島果試特別研報 **2**:8-12.
- 16) 佐々木 篤(1977)トリステザウイルスの検定. カンキツのウイルス病診断. (宮川経邦・佐々木 篤共著), 東京: 農山漁村文化協会, pp.56-61.
- 17) 佐々木 篤(1986)鉢育苗及び鉢植え樹によるカンキツ無病樹の品種特性短期評価法試験第1報培養上, 植木鉢, 鉢植え法の検討. 広島果試研報 **11**:9-21.
- 18) 重田 進・村本和之・中田榮一郎・野崎 匠(1995)カンキツトリステザウイルス (CTV) 弱毒系統の早期検定法. 山口農試研報 **46**:98-105.
- 19) 高原利雄・奥代直巳・久原重松(1986)簡易茎頂接ぎ木法によるカンキツウイルスの無毒化. 果樹試報 **D8**:13-24.