

スクラッチ法によるカンキツグリーニング病の迅速簡易診断

澤岬 哲也^{1*}・豊里 哲也¹・河野 伸二¹・田場 聡²・
田場 奏美¹・大城 篤¹・沼澤 雅哉¹・渡慶次美歌¹

ABSTRACT

TAKUSHI, T.^{1*}, TOYOZATO, T.¹, KAWANO, S.¹, TABA, S.², TABA, K.¹, OOSHIRO, A.¹, NUMAZAWA, M.¹ and TOKESHI, M.¹ (2007). Scratch method for simple, rapid diagnosis of citrus huanglongbing using iodine to detect high accumulation of starch in the citrus leaves. Jpn. J. Phytopathol. 73: 3-8

We demonstrated a rapid and simple diagnostic method (scratch method) for citrus huanglongbing (HLB) by detecting high accumulation of starch in the citrus leaves with the iodine-starch reaction. The average quantity of starch was 514.2 mg/kg in HLB-infected citrus leaves and 85.6 mg/kg in healthy leaves (Welch's *t*-test $p < 0.01$), a significant difference in starch levels between diseased and healthy leaves. Based on this result, we devised a scratch method using abrasive paper for HLB diagnosis. Scratch the surface of a citrus leaf at least 20 times with abrasive paper, put the abrasive paper into 1 ml water in a vinyl pack, add to about 25 μ l iodine solution 50 mM for dyeing starch. Iodine-reacted solutions show mostly 'dark brown or black' and 'yellow or orange' which are HLB-positive and negative, respectively. The scratch method and PCR assay of field samples showed more than 90% agreement. In addition, the scratch method did not give false HLB-positive reactions for healthy, nutrient-deficient or other disease leaves infected with *Citrus tatter leaf virus* and *Hop stunt viroid*. Therefore, the scratch method will be useful for rapid, simple detection of HLB in the field.

(Received February 24, 2006; Accepted July 13, 2006)

Key words: citrus huanglongbing, iodine-starch reaction, starch, scratch method.

緒 言

特定重要病害であるカンキツグリーニング病 (citrus huanglongbing : 以下 HLB) は、現在、沖縄県および鹿児島県の一部地域で発生が確認されている。我が国では1988年に沖縄県の西表島で初めて本病の発生が確認され (Miyakawa and Tsuno, 1989), その後1999年までに南北大東島を除く地域に発生が拡大した (河野ほか, 1997; 渡久地・河野, 1997; 内藤ほか, 2001)。我が国で発生する HLB 病原菌 ('*Candidatus Liberibacter asiaticus*') は師部局在の難培養性細菌であり、ミカンキジラミ (*Diaphorina citri* Kuwayama) によって媒介される。発病樹は葉が黄化し、樹勢衰弱して収量低下および果実の品質低下をもたらすことから、日本本土へと発生域の拡大が進むと、わが国のカンキツ産地に多大な被害を及ぼすことが懸念される。

本病への有効な登録薬剤がない現在、防除対策は発病初期での罹病樹の伐採除去が重要な手段である。沖縄県では1997年から特定重要病害虫特別対策事業により HLB 発生状況の全県一斉調査並びに防除伐採指導、啓発普及などの総合的な防除対策を行っている。HLB 罹病樹の葉 (以下、HLB 感染葉) の病徴は要素欠乏症や生理障害と類似し、肉眼による識別が困難であるため、発生調査では主に polymerase chain reaction (PCR 法) による検定が行われている。PCR 法は精度の高い優れた検定法であるが、核酸抽出や PCR 時のサーマルサイクラーの能力等により1日あたりの検定数が制限され、県全域より持ち込まれる大量のサンプルを短期間で処理することが困難となっている。また、設備や試薬コストが高く、技術者の熟練が要求されるため、限られた機関でしか診断できない。それらの理由により、迅速な診断結果が得られず、伐採防除までに

¹ 沖縄県農業研究センター (〒901-0336 沖縄県糸満市真壁820) Okinawa Prefectural Agricultural Research Center, Makabe 820, Itoman, Okinawa 901-0336, Japan

² 琉球大学農学部 (〒903-0213 沖縄県中頭郡西原町字千原1) Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus, Senbaru 1, Nishihara, Nakagami, Okinawa 903-0213, Japan

* Corresponding author (E-mail: takushit@pref.okinawa.lg.jp)

時間を要するため、罹病樹を長期間放置する場合もある。よって効率的で迅速、簡易に診断できる検定技術の開発が急務となっている。

HLB 感染葉では、柵状組織内に多量のデンプンが異常蓄積するため (Schneider, 1968; 田中ほか, 1974), その現象に着目してヨウ素デンプン反応を利用した HLB 簡易検定法が開発されてきた (Onuki *et al.*, 2002; 田場ほか, 2003; Hong *et al.*, 2003). 田場ら (2003) の方法は感染葉を粉碎、煮沸して葉内のデンプン抽出液を得て、上清にヨウ素溶液を添加して発色の度合いにより罹病の有無を判定するもので、PCR 法や生物検定に比べ簡易である。しかし、組織の粉碎や煮沸、マイクロプレートへの上清液の注入等に時間と手間を要し、発色 (青～藍色) の違いによる目視での判定が難しいことから、現場機関での普及には至っておらず、さらなる簡易化が求められている。また、電子顕微鏡観察による HLB 感染葉内のデンプン粒の多量蓄積は確認されているが (Schneider, 1968; 田中ほか, 1974), 感染葉と健全葉における詳細なデンプンの定量比較についてはこれまで報告がない。

そこで本研究では、HLB 感染葉に異常蓄積するデンプンを定量的に明らかにし、サンドペーパーを利用した簡易で迅速性のある診断法 (スクラッチ法) の開発とその有用性について検討した。

実験材料および方法

供試植物 2005年6月14日に沖縄県農業試験場 (現: 沖縄県農業研究センター) 内ガラス室で保存のシークワーシャー (*Citrus depressa*) 9年木 (HLB 感染樹), シークワーシャー11年木 (健全樹), ポンカン (*C. reliculata*) 6年木 (カンキツタターリーフウイルス: CTLV 感染樹), 天草 (*C. amakusa*: [Kiyomi (*C. unshiu* × *C. sinensis*) × *C. unshiu* Marc. cv. Okitsu × Page (*C. paradisi* Macf. × *C. clementina* hort. ex Tanaka)]) 6年木 (ホップわい化ウイルス: HSVd 感染樹), オートー (*C. oto*) 9年木 (HLB 感染樹), オートー9年木 (健全樹), ポンカン (*C. reliculata*) 9年木 (HLB 感染樹), ポンカン9年木 (健全樹) の各樹より退緑, まだら退緑, 脈間黄化, 黄化の特徴的症候を示す葉を肉眼診断 (那須ほか, 2003) により採取し, 1葉を1検定試料とした。また, 2005年6月11日に沖縄県うるま市農家園, 2005年10月7日に石垣市農家園のタンカン (*C. tankan*) から無症状, 退緑, まだら退緑, 脈間黄化, 黄化の症状別に葉を採取し, 野外採取試料とした。

PCR 法 スクラッチ法で検定した試料を PCR 法で再度検定した。PCR 検定のための核酸は, 試料の葉1枚の中

筋から, CTAB 法 (Murray and Thompson, 1980) で抽出した。PCR 反応は, 得られた核酸試料に Jagoueix (1994) らの病原菌 16S rDNA に対する特異プライマー (O11, O12c) と Ex *Taq* DNA Polymerase PCR 反応液 (タカラバイオ製) を加え, サーマルサイクラー (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700) を用いて, 94°C 5分間の熱変性後, 94°C 1分間, 60°C 1分間, 72°C 2分間を40サイクル, 72°C 10分間を1サイクルで行った。PCR 産物は1%アガロースゲルを用いた電気泳動の後, 臭化エチジウムで増幅 DNA 産物を染色して HLB 感染の有無を判定した。

葉内デンプン含量の測定 デンプン含量測定には, ヨウ素比色法を用いた (杉山ほか, 2001)。あらかじめ PCR 法にて検定したシークワーシャー, オートー, ポンカンの健全および罹病樹より, 無症状, 退緑, まだら退緑, 脈間黄化, 黄化の症状別に葉を採取し, 1症状につき3葉を1試料とした。各試料を80°Cで3日間乾燥させ, ミキサーで微粉碎し, 試料0.1gに蒸留水を10ml加え, 100°Cの湯煎中で30分間熱処理を行った。その後, ろ過および遠心分離 (11, 100g) を行い, 上清液を採取した。これに1M塩酸5μlと0.05Mヨウ素溶液を10μl添加して呈色させた後, 分光光度計 (HITACHI U-2000) により660nmの吸光度を測定した。

スクラッチ法 供試植物の各樹より無症状, 退緑, まだら退緑, 脈間黄化, 黄化の症状別に1葉ずつ採取し, 1cm × 2cm 四方に切り取った耐水性サンドペーパー (耐水処理研磨紙 Item 社製, #120) を用いて, 葉を破らない程度の強さで採取した葉の表側を削るように20回擦った。そのサンドペーパーをビニールパック (チャック付) に入れ, 1mlの水道水を添加した。サンドペーパーに付着した表皮組織を水に懸濁するように軽く揉んだ後, 0.05Mヨウ素溶液を約25μl添加し, 水溶液の染色の有無で HLB 感染を判定した。判定は, 水溶液の着色に基づいて行い, こげ茶 (黒粒が混じる) および黒色は HLB 陽性, 黄色および橙色を陰性とした (Fig. 1)。

結 果

HLB 感染葉と健全葉における葉内デンプン含量

あらかじめ PCR 検定によって HLB 感染の有無を判定したシークワーシャー, オートー, ポンカンの3種において, ヨウ素比色法による葉内デンプン含量の比較を行った。その結果, 3種いずれにおいても健全葉と比較して HLB 感染葉で高いデンプン含量が検出され, 3種の平均は健全葉で85.6mg/kgであったのに対し, 感染葉では514.2mg/kgと約6倍濃度の著しいデンプン蓄積量が認められた

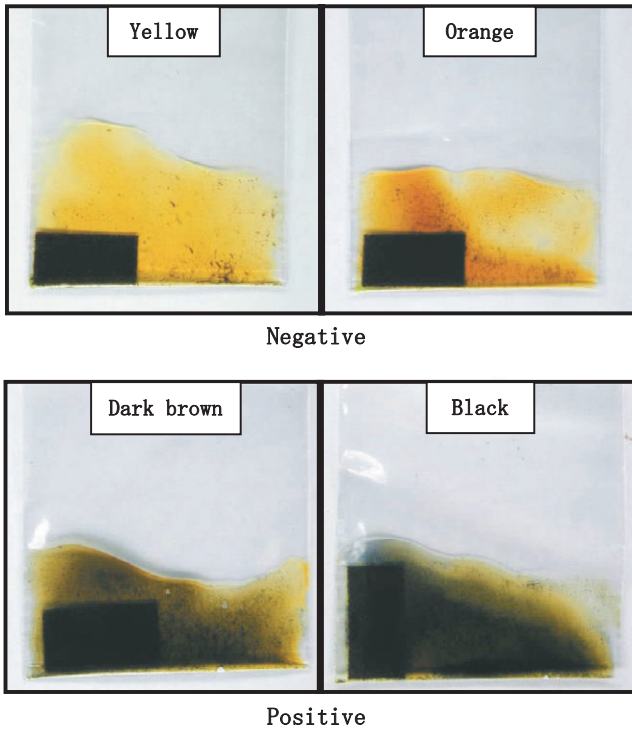


Fig. 1. Iodine-starch reaction in the scratch method (top, left): yellow, negative; (top, right): orange, negative; (bottom, left): dark brown, positive; (bottom, right): black, positive

(Fig. 2).

全試料の症状別でのデンプン含量を比較すると、感染葉では、無症状の葉のデンプンは0~681 mg/kgの範囲で検出され、含量は一定ではなかった。一方、症状のある葉では300 mg/kg以上のデンプンが認められ、退緑、脈間黄化および黄化の各症状の試料の多くで500 mg/kg以上の値で検出された。また健全葉では、無症状および要素欠乏による各症状ともに、多くの試料においてデンプン含量は100 mg/kg以下であり、要素欠乏によるデンプンの異常蓄積は認められなかった (Fig. 3).

PCR法とスクラッチ法におけるHLB罹病判定比較

あらかじめPCR検定によってHLB感染の有無を判定したシークワーシャーの葉を用いて、スクラッチ法とPCR法との症状別および要素欠乏症状でのHLB罹病判定比較を行った。その結果、HLB感染葉では調査した38試料のうち、検定方法の違いによる判定結果の不一致は2試料のみで、その他の試料では全て判定が一致し、94.7%と高い一致率を示した。症状別では、無症状および黄化でそれぞれ1試料ずつ判定結果に差異がみられたが、退緑および脈間黄化では全ての試料で判定が一致した。また健全葉では、全ての試料で両検定法による判定が一致し、要素欠乏による各症状においても、スクラッチ法およびPCR法

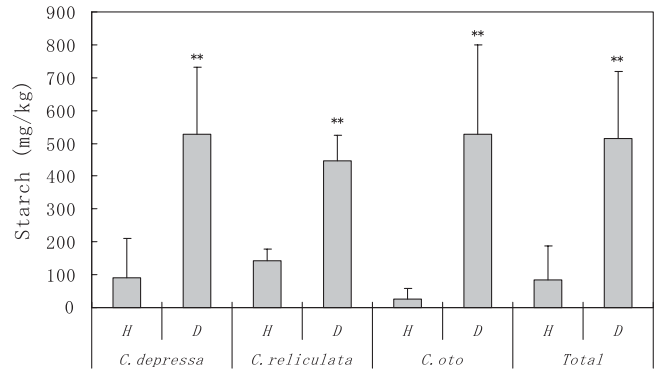


Fig. 2. Comparison of starch content in three species of healthy and diseased citrus leaves. H: healthy leaves, D: HLB infected leaves. **: Indicate significant differences at $p < 0.01$ as determined by Welch's *t*-test.

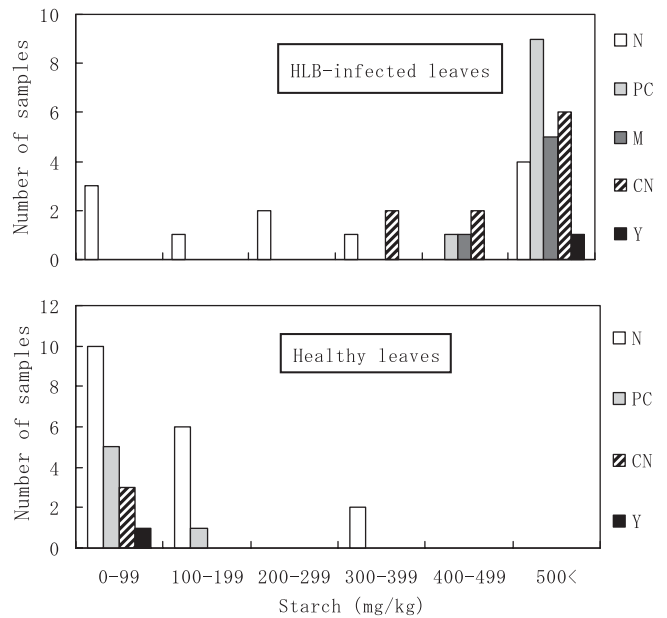


Fig. 3. Comparison of starch content in citrus huanglongbing-diseased leaves with different symptoms and in healthy leaves. N: no symptoms, PC: pale chlorosis, M: mottling, CN: chlorosis with green netlike vein, Y: yellowing.

による陽性反応はみられなかった (Table 1).

CTLV および HSVd 感染葉における判定比較では、ポンカンおよび天草のいずれの品種においても、スクラッチ法による陽性反応は認められず、全ての試料において両検定法による判定が一致した (Table 2).

沖縄県うるま市の園地から採取したタンカン葉におけるPCR法とスクラッチ法とのHLB罹病判定比較では、調査した24樹78試料のうち、75試料で両検定による判定が一致

Table 1. Diagnosis of citrus huanglongbing by scratch method and PCR in *Citrus depressa* leaves

	Symptom ^{a)}	No. leaves	Positive (+)		Negative (-)		Unclear (±)		Agreement with PCR (%)
			PCR	Scratch	PCR	Scratch	PCR	Scratch	
Infected trees	N	10	1	0	9	10	0	0	94.7
	PC	10	0	0	10	10	0	0	
	CN	10	10	10	0	0	0	0	
	Y	8	6	7	1	1	1	0	
Healthy trees	N	10	0	0	10	10	0	0	100.0
	PC	10	0	0	10	10	0	0	
	CN	10	0	0	10	10	0	0	
	Y	10	0	0	10	10	0	0	

a) N, no symptoms; PC, pale chlorosis; CN, chlorosis with green netlike vein; Y, yellowing

Table 2. Diagnosis of citrus huanglongbing by scratch method and PCR in CTLV- and HSVd-infected *Citrus* leaves

	Variety	Symptom ^{a)}	No. leaves	Positive (+)		Negative (-)		Unclear (±)	
				PCR	Scratch	PCR	Scratch	PCR	Scratch
HSVd ^{b)} leaves	<i>C. amakusa</i>	N	5	0	0	5	5	0	0
		PC	10	0	0	10	10	0	0
		Y	5	0	0	5	5	0	0
CTLV leaves	<i>C. reliculata</i>	PC	10	0	0	10	10	0	0

a) N, no symptoms; PC, pale chlorosis; Y, yellowing

b) HSVd: *Hop stunt viroid*, CTLV: *Citrus tatter leaf virus*

Table 3. Diagnosis of citrus huanglongbing by scratch method and PCR on field samples from *Citrus tankan*

	No. trees	Symptom ^{a)}	No. leaves	Positive (+)		Negative (-)		Unclear (±)		Agreement with PCR (%)	
				PCR	Scratch	PCR	Scratch	PCR	Scratch	Trees	Leaves
Uruma city	24	N	23	0	0	23	23	0	0	91.7	96.2
		PC	25	1	2	24	23	0	0		
		CN	23	1	1	22	22	0	0		
		Y	7	2	2	5	4	0	1		
Ishigaki city	7	N	5	0	0	5	5	0	0	100.0	90.0
		PC	8	1	1	7	6	0	1		
		M	3	3	3	0	0	0	0		
		CN	2	0	0	2	2	0	0		
		Y	2	0	0	2	2	0	0		

a) N, no symptoms; PC, pale chlorosis; CN, chlorosis with green netlike vein; M, mottling; Y, yellowing

し、樹あたりおよび葉あたりの一致率はそれぞれ91.7%、96.2%と高い値を示した。また両検定法ともに退緑、脈間黄化、黄化の症状葉で陽性が検出された (Table 3)。また石垣島中心地に位置する石垣市の園地より採取したタンカン葉における罹病判定比較の結果、調査した7樹20試料のうち18試料で両検定法による判定が一致し、樹あたりおよび葉あたりの一致率はそれぞれ100%、90.0%と高い値であった。また症状別では退緑、まだら退緑でのみ両検定法による陽性反応が認められた (Table 3)。

考 察

本研究ではHLB感染葉と健全葉において、葉内に蓄積するデンブンを定量的に比較検討した。その結果、HLB感染葉では500 mg/kg以上の濃度でデンブンを検出され、健全葉と比較して異常にデンブンを蓄積することが明らかとなった。またHLB感染葉では、無症状と比較して退緑、まだら退緑および脈間黄化の症状を示した葉でデンブンの増加が認められた。一方、健全葉における無症状ならば

に要素欠乏症を示した葉ではデンプンの多量蓄積は認められなかった。このことから、デンプンの異常蓄積はHLBの感染によって特異的に起こる現象であることが確認され、Schneider (1968) および田中ら (1974) の報告と一致した。また症状の明瞭な葉でデンプン蓄積量も高まることから、症状の進行に伴いデンプン蓄積量も増加していくことが推察された。HLB感染による葉内デンプン蓄積の機構については、これまで明らかになっていないが、田中ら (1974) は、ポンカン罹病葉において師部組織の壊死、収縮が起因となり柔細胞並びに葉緑体内にデンプンが蓄積すると推察している。このことから、デンプンの異常蓄積は、HLBの師部感染による同化産物の転流阻害によって引き起こされる可能性が示唆された。またSchneider (1968) は、罹病葉に蓄積するデンプン粒によって柵状組織が膨張し、これにより葉緑体が破壊され、葉に黄斑が現れることを示唆している。これらのことから、葉内におけるデンプン蓄積メカニズムは、HLBによる病徴発現機構に深く関与しているものと考えられる。

本研究で示したスクラッチ法は、耐水性サンドペーパーで柵状組織内に蓄積したデンプンを削り取ることにより、より効率よくデンプンを抽出できることが特徴となっている。これにより、従来の田場ら (2003) の検定法では1試料15~20分間程度の時間を要したのに対し、スクラッチ法では検定試料の粉碎と煮沸が省略され2分間以内での検定が可能となった。また検定に必要な器具類や装置が大幅に減少し、より低コストかつ簡易となった。

本スクラッチ法の検出結果は、供試植物の全ての試料において90%以上の高い一致率でPCR法と一致した。また、要素欠乏による類似症状ならびにCTLVおよびHSVd感染葉においてもスクラッチ法によるデンプン染色の陽性反応は認められず、HLB感染葉とは明確な判別が可能であった。

HLB感染葉では、無症状と比較して退緑、まだら退緑、脈間黄化の症状の明瞭な葉で葉内デンプン含量が高まり、スクラッチ法によるHLB陽性率も高まる傾向を示した。このことから、本診断法では葉採取時における病徴の肉眼診断が重要であると考えられた。那須ら (2003) は、沖縄県におけるHLBの特徴的症狀を明らかにし、タンカンでは中肋の黄化、脈間黄化、まだら退緑、葉脈のコルク化および黄化の5症状で高い陽性率になることを報告した。また、Ohtsu *et al.* (1998) も同様にネパールの主要品種スンドラの特徴的症狀から、主脈が緑色に残る退緑化、脈間黄化、葉脈のコルク化の3症状でDNA量が多くPCR診断に適用すると報告した。これらのことから、特徴的症狀によ

る肉眼診断 (那須ほか, 2003) とスクラッチ法を併用することにより、生産現場において高い精度での診断が可能であると考えられた。

しかし、本診断法ではPCR検定との判定が一致しない、または染色の判定が困難な擬陽性の試料もわずかに認められている。よって本法を用いた診断にあたっては1樹より複数枚の症状葉を検定し、総合的に罹病の有無を判定することが望まれる。また奥田ら (2002) は、ウンシュウミカンにおける葉、根の炭水化物濃度が着果負担や季節によって影響することを明らかにし、田場ら (2003) は、時期によって簡易検定の精度が変動することを指摘している。本研究は6月から10月までの試験期間内で行った検定結果であるため、今後、HLB感染樹および健全樹における年間を通した葉内デンプン蓄積の季節的変動を明らかにし、診断精度について検討する必要がある。

以上の結果から、スクラッチ法がカンキツグリーンング病の迅速簡易診断法として有用であり、特徴的症狀による肉眼診断 (那須ほか, 2003) との併用により、実用性の高い圃場診断技術として利用できると考えられた。

摘 要

カンキツグリーンング病 (HLB) の罹病葉内に異常蓄積するデンプン検出による迅速簡易診断法の開発を行った。あらかじめPCR検定によってHLB感染の有無を判定したシークワーシャー、オートーおよびポンカンの3種において、ヨウ素比色法による葉内デンプン含量を比較した結果、3種とも健全葉と比較してHLB感染葉で高い濃度のデンプンが検出され、平均値は健全葉が85.6 mg/kgであったのに対し、感染葉では514.2 mg/kgと約6倍の著しいデンプンの蓄積が認められた。この結果をもとに、葉内デンプンを抽出するために、サンドペーパーを用いたスクラッチ法を考案した。まず、葉表をサンドペーパーで20回程度擦り、そのサンドペーパーを水1 mlの入ったビニールパックに入れる。その後、50 mMのヨウ素溶液を25 μ l添加し染色させる。水溶液が濃いこげ茶または黒であれば陽性、黄色または橙色であれば陰性となる。現地から採取した試料におけるスクラッチ法とPCR法とのHLB罹病判定比較を行った結果、樹および葉あたりともに90%以上の高い一致率が認められた。また要素欠乏症状を呈した葉およびCTLV、HSVd感染葉では、スクラッチ法によるHLB陽性反応は認められなかった。以上の結果、スクラッチ法は圃場におけるカンキツグリーンング病の迅速簡易診断法として有用と考えられた。

謝 辞

本研究を進めるに当たり、貴重なご助言をいただいた沖縄県農業研究センター病虫管理技術開発班 安田慶次博士ならびに試料検定に協力を頂いた沖縄県農業研究センター 川武恵梨子研究嘱託員に深甚なる感謝の意を表す。

引用文献

- Hong, L. T. T. and Truc, N. T. N. (2003). Iodine reaction quick detection of huanglongbin disease. Proceedings of the 2003 annual workshop of JIRCAS Mekong Delta Project: 1-11.
- Jagoueix, S., Bové, J. M. and Garnier, M. (1994). The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the *Proteobacteria*. Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 379-386.
- 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).
- Miyakawa, T. and Tsuno, K. (1989). Occurrence of citrus greening disease in the southern islands of Japan. Ann. Phytopath. Soc. Jpn 55: 667-670.
- Murray, M. G. and Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8: 4321-4325.
- 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. 沖縄農試研究報告 23: 74-81.
- 那須奏美・大島正好・田場 聡・大城 篤・高江洲和子 (2003). 沖縄県のカンキツ類で発生しているグリーニング病の特徴的症候を用いた肉眼診断法の検討. 日植病報 69 (3): 308 (講要).
- 那須奏美・田場 聡・大城 篤・高江洲和子 (2003). 沖縄県に発生しているカンキツグリーニング病と圃場における診断法. 第22回植物細菌病談話会講演要旨集 11-19.
- Ohtsu, Y., Nakashima, K., Prommintara, M. and Tomiyasu, Y. (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 均・野田勝二・木原武士・平林利郎 (2002). 樹別交互結実させたウンシュウミカン2品種の生産樹・遊休樹の細根量, 着花・新梢発生並びに葉・根中炭水化物濃度の比較. 園学雑 71: 588-590.
- Onuki, M., Truc, N. T. N. and Nesumi, H. (2002). Useful histological method for distinguishing citrus yellowing leaves infected with huanglongbing from those caused by other factors. Proceedings of the 2002 annual workshop of JIRCAS Mekong Delta Project: 114-118.
- Schneider, H. (1968). Anatomy of greening-diseased sweet orange shoots. Phytopathology 58: 1155-1160.
- 杉山泰之・大城 晃 (2001). ウンシュウミカンの栄養診断のためのヨウ素比色法によるデンブシ簡易測定法. 日本土壤肥科学雑誌 72: 81-84.
- 田場 聡・那須奏美・高江洲和子・大城 篤・諸見里善一 (2003). ヨウ素・デンブシ反応を用いたカンキツグリーニング病の簡易検定の検討. 九病虫研会報 49: 121 (講要).
- 田中彰一・土居養二 (1974). 柑橘のLikubinおよびLeaf-mottlingの病原体と推定されるMycoplasma-like Organismについて. 玉川大農研報 14: 64-70.
- 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.