イムノクロマト診断キットによる温州萎縮ウイルスの周年検定

加藤 光弘^{1*}・影山智津子²・石井香奈子¹・上西 啓資³・
藤田 絢香⁴・草野 成夫⁵・野口 真弓⁶・岩波 徹⁷

ABSTRACT

KATO, M.^{1*}, KAGEYAMA, C.², ISHII, K.¹, UENISHI, H.³, FUJITA, A.⁴, KUSANO, N.⁵, NOGUCHI, M.⁶ and IWANAMI, T.⁷ (2014). All-season detection of *Satsuma dwarf virus* using an immunochromatographic assay kit. Jpn. J. Phytopathol. 80: 222–228.

Satsuma dwarf virus (SDV) causes serious damage to citrus production by reducing the quality and yield of fruit. SDV in young shoots of citrus trees is usually detected using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); however, such tests can only be performed during several weeks in the spring and are time-consuming. To overcome these issues, we developed an all-season, rapid detection method using an immunochromatographic assay (ICA) kit. The results obtained using this system showed that petals, stigmas, and ovaries sampled from SDV-infected plants during the spring gave positive results that were comparable to those obtained using shoots. In the summer and autumn, the virus was detected from the flavedo of fruits of SDV-infected plants at a high frequency and more frequently detected in the flavedo of fruits from inside the tree crown than in fruits from the exterior of the crown. In the winter, flavedo from fruits stored at ambient temperature for 3 months also tested positive. The frequency of detection was sometimes lower in fruits obtained in the summer or stored at ambient temperature for 1–3 months. We therefore recommend that more samples should be taken from fruits for SDV diagnosis using ICA. SDV diagnosis of citrus scions in the winter is more effective using young leaves and flower buds that have been sprouted by soaking the cut shoot under controlled conditions such as a growth chamber at approximately 27°C. These results showed that all-season diagnosis of SDV is feasible using samples from young shoots, flower buds, fruits in the summer, stored fruits in the winter, and from samples sprouted from scions during the winter.

(Received September 30, 2013; Accepted February 28, 2014)

Key words: *Satsuma dwarf virus*, immunochromatographic assay, all-season, detection, citrus

緒 言

カンキツを栽培する上で問題となるウイルス病として、*Satsuma dwarf virus* (以下 SDV) を病原ウイルスとする温州萎縮病が挙げられる。SDV はカンキツ属、カラタチ属に感

染するが、ウンシュウミカン (*Citrus unshiu* Marc.) が最も被害を受けやすく、感染すると舟型葉やさじ型葉とよばれる葉の奇形を生ずる。カンキツの種類によっては感染しても外観上は奇形などの症状が現れないため、感染に気づかないことがある。感染後は樹勢が徐々に低下し、それに伴っ

¹ 静岡県農林技術研究所果樹研究センター (〒424-0905 静岡県静岡市清水区駒越西 2-12-10) Shizuoka Prefectural Research Institute of Agriculture and Forestry, Fruit Tree Research Center, 2-12-10 Komagoenishi, Shimizu-ku, Shizuoka, Shizuoka 424-0905, Japan

² 静岡県農林技術研究所 (〒438-0803 静岡県磐田市富丘 678-1) Shizuoka Prefectural Research Institute of Agriculture and Forestry, 678-1 Tomigaoka, Iwata, Shizuoka 438-0803, Japan

³ 三重県紀州地域農業改良普及センター (〒519-4393 三重県熊野市井戸町 371) Mie Kisyu Agricultural Extension Center, 371 Ido-cho, Kumano-city, Mie 519-4393, Japan

⁴ 三重県農業研究所 (〒515-2316 三重県松阪市嬉野町 530) Mie Prefecture Agricultural Research Institute, 530 Ureshino-cho, Matsusaka-city, Mie 515-2316, Japan

⁵ 福岡県農業総合試験場 (〒818-8549 福岡県筑紫野市吉木 578) Fukuoka Agricultural Research Center, 587 Yoshiki, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan

⁶ 佐賀県果樹試験場 (〒845-0014 佐賀県小城市小城町晴気 91) Saga Fruit Tree Experiment Station, 91 Haruke, Ogi, Saga 845-0014, Japan

⁷ 農研機構果樹研究所 (〒305-8605 茨城県つくば市藤本 2-1) NARO Institute of Fruit Tree Science, National Agricultural Research Organization (NARO), Fujimoto 2-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8605, Japan

* Corresponding author (E-mail: mitsuhiro1_kato@pref.shizuoka.lg.jp)

て果実品質や収量も低下する。ウイルス病のため感染後の治療手段がないことから、生産現場では問題となっている。

SDV は接木伝染することが知られている。感染しても病徴が現れない場合があることから、健全な苗木生産を行うためにはウイルス検定を定期的の実施し、無毒な母樹から穂木を確保することが重要となる。このため、カンキツ生産地では大量検定可能な酵素結合抗体法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay : 以下 ELISA 法, Bar-Joseph *et al.*, 1979; Clark *et al.*, 1977) によるウイルス検定が実施され、無毒の苗木や穂木の確保に努めている。実際に静岡県では、1995～2012 年の間に生産者、生産者団体から検定依頼を受け、累計で 15,540 検体に対して ELISA 検定を実施した。検体は春枝、夏枝、秋枝の新梢に限定され (宇杉・斎藤, 1980), かつ春の新梢が検定する上で最も容易であり、高い感度で検出可能であること (久原, 1980) から、一般的に 4～5 月に採取した新梢を用いて検定が行われている。しかし、ELISA 法は操作や試薬の調整が煩雑で専門知識が必要とされることから実施は研究機関に限定される。そのため生産者が希望する時期に検定を行うことは困難なことが多い。すなわち、春の新梢展葉後にウイルス感染が疑われる葉の奇形症状に気付いてもすぐにはウイルス感染を確認できず、翌年春の新梢の発芽期まで検定を待たなければならない。このようなウイルス感染が疑われる母樹の放置によって、この 1 年間に隣接樹へ SDV の感染が広がる危険性がある。

SDV は土壌伝染することが知られており、磯田ら (1991) によると感染樹を伐採、伐根し、さらに深さ 40 cm の耕起を行って改植しても 5 年後には再感染樹が認められている。したがって、感染樹の除去および表土の耕起を行う処理では対策として不十分であるとされている。SDV はベクターなど土壌伝染機構の詳細が不明であるが、クロロピクリンによる土壌消毒効果が明らかになり (影山ら, 2011), 2009 年にクロロピクリン剤がカンキツ (苗木) に農薬登録されたことから、現在 (2013 年) では土壌消毒による対策が可能である。しかし、感染樹を早期発見して汚染の拡大防止対策を取るためにも、ウイルス検定は非常に重要な作業である。

生産者自らが簡易には場でウイルス検定できるイムノクロマト診断キット「SDV クロマト[®]」が開発された。SDV クロマトは毛細管現象によって SDV の抗体がメンブレンフィルター上にある判定部の抗体まで移動し、抗原抗体反応により発色した後に目視で判定するという、イムノクロマト法を利用した簡易検定キットである。ELISA 法と同様、春の新梢を用いた検定の有効性が明らかとなり (Kusano *et al.*, 2007), 2008 年に市販が開始された。

温州萎縮ウイルスには SDV の他に、変異系統であるカン

キツモザイクウイルス (CiMV), ネーブル斑葉モザイクウイルス (NiMV), ヒュウガナツウイルス (HV) が存在 (Ito *et al.*, 2004; Iwanami *et al.*, 2001) し、西日本のカンキツ産地を中心に CiMV 系統が多く発生していることが報告されている (畠村ら, 2013)。また、SDV クロマトは市販の抗体を用いた ELISA 法では検出できない CiMV 系統の検出が可能であり (Kusano *et al.*, 2007), NiMV や HV 等、既報の SDV グループ全ての系統の検出に有効である (草野ら, 2013)。従って本キットは非常に汎用性の高い診断法である。

本キットの開発・販売により生産者自らが簡易に、短時間で検定を行うことが可能となったが、検定可能時期については春先に限定されていた。一方で、生産現場からは、春の新梢を取り逃してしまった後に樹の異変に気づいた時や、接ぎ木用穂木採取直前の 1～2 月にウイルス保毒の有無を確認したいという要望がある。新梢以外の材料でも RT-PCR 法を用いれば検定が可能である (Iwanami, 2010; Shimizu *et al.*, 2011; 下村・野口, 2003)。しかしながら、本方法も特別な機器や専門知識を必要とするために実施可能な機関が限定されることから、生産現場では仕方なく翌年の春まで待たされる場合が多かった。そこで、「SDV クロマト」を用い、新梢の時期以外でも採取可能な部位でウイルス検定ができないか検討し、花蕾、果皮、冬季の切り枝から発生させた新梢および花蕾を用いることにより、周年検出が可能であることを確認したので報告する。

材料および方法

供試材料 SDV に感染した静岡県のウンシュウミカン「青島温州」を 3 樹供試し、それらの樹から検定に必要な部位を採取した。また、静岡県以外のカンキツ生産地域 (佐賀県、福岡県、三重県) の供試樹は、果実および冬季切り枝水挿し法による新梢の検定に供試した。

供試樹 (青島温州 No. 3, 13, 15) の SDV 感染確認 静岡県の「青島温州」3 樹 (青島温州 No. 3, 13, 15) よりそれぞれ 15 ヶ所から無作為に春の新梢または未硬化葉を採取し、それらを併せて 0.3 g とし 3 反復で ELISA 法により検定を行った。なお採取及び検定については、2006 年～2010 年までの毎年 5 月、2010 年は 7 月 20 日、8 月 24 日、9 月 28 日、10 月 28 日、11 月 17 日に行った。

イムノクロマト検定に用いる材料の各部位からの採取 春の新梢による検定では、静岡県の「青島温州」3 樹 (青島温州 No. 3, 13, 15) よりそれぞれ 15 ヶ所から無作為に新梢を採取し、それらを併せて 0.1 g として 3 反復でイムノクロマト法により検定を行った。なお、採取及び検定については 2013 年 5 月 2 日に行った。花蕾による検定では、静岡

県の「青島温州」3樹（青島温州 No. 3, 13, 15）よりそれぞれ30花を採取し、花卉、柱頭、子房の部位別に分離して、各部位ごとにそれらを併せて0.1gとして3反復でイムノクロマト法により検定を行った。なお、採取及び検定は2013年5月2日に行った。果実による検定では、果実のどの部位が検定に適するかを明らかにするため、静岡県「青島温州」2樹（青島温州 No. 3, 13）からそれぞれ採取した5果を果皮（フラベド、アルベド）、果肉に分けて1果実1反復でイムノクロマト法により検定を行った。アルベドは摩砕液を吸収しやすく、検体量を通常使用する0.1gとした場合は十分量の摩砕液が得られなかったことから、ここでは0.05gで検定した。なお、採取及び検定は2013年8月27日に行った。

果実の採取時期と樹上着果位置がイムノクロマト検定に及ぼす影響 過去の試験結果から、果皮を用いた検定においては夏季に検出率が減少する事例が確認されている（加藤ら, 2011）。そこで、着果位置の違いが検出率に与える影響を調査した。静岡県「青島温州」3樹（青島温州 No. 3, 13, 15）から樹上の着果位置別に果実を採取して検定を行った。日光がよく当り、樹の外周部に着生する果実（以後、外成り果）、日光があまり当らず、樹の内部に着生する果実（以後、内成り果）について各樹3果を採取し、0.1gとして3反復でイムノクロマト法により検定を行った。検定には果皮（フラベド）を用い、採取及び検定は2012年6月14日、7月5日、8月6日、9月10日、10月15日および11月7日に行った。また、佐賀県の「上野早生」1樹についても2011年8月26日に果実を採取し、検定に供試した。

長期貯蔵がイムノクロマト検定に及ぼす影響 静岡県の「青島温州」3樹（青島温州 No. 3, 13, 15）から2010年12月27日に果実を収穫し、木箱に入れて常温貯蔵庫にて貯蔵した。貯蔵1, 2, 3ヶ月後に各区3果を取り出し、果皮（フラベド）を0.1g採取して3反復でイムノクロマト法により検定を行った。

冬季切り枝水挿し法の新梢・花蕾を用いたイムノクロマト検定 ハウスミカンで着花予想に使われる枝挿し法（大倉・迫田, 1993）を参考に、冬季（2012年2月8日）に静岡県の「青島温州」3樹（青島温州 No. 3, 13, 15）から緑枝を採取した後、20cm程度の長さに切断し、新梢、花蕾の発生を促進するためベンジルアミノブリン液剤（商品名：ピーエー液剤）200倍をハンドスプレーで約10ml/樹散布した。処理枝は水道水を入れたビーカーに挿して、乾燥を防止するためビニール袋で覆って27°Cの恒温槽で15日間処理した後、5～10ヶ所から採取した新梢と花蕾をいくつか併せて0.1gとして1反復でイムノクロマト法により検定を行った。また三重県の1ほ場の「崎久保早生」2樹、2ほ場の「み

え紀南1号」5樹は2011年2月、福岡県の「宮川早生」1樹は2011年1月に採取して同様の検定を行った。

検定方法 ELISA法は、高橋（1998）の方法により、DAS-ELISA法で行った。日本植物防疫協会研究所より購入した抗SDV抗体を用い、摩砕液の希釈濃度は10倍、コンジュゲートおよび γ -グロブリンは500倍に希釈して使用した。プレートリーダー（サンライズリモート, TECAN）により基質投入1時間後に吸光度（405 nm）を測定した。健全の測定値（0.1）より2倍以上高い吸光度を陽性と判定した。なお、2006～2008年は目視により判定した。イムノクロマト法は、SDVクロマト（株式会社ミズホメディ）を用いて付属の説明書に従って検定を行った。すなわち、採取した試料から0.1g（イムノクロマト検定に用いる材料の各部位からの採取 果実部位の影響のみ0.05g）を計り取り、摩砕液を0.5ml入れた摩砕容器ですりつぶし、検定プレートに3滴滴下して検定を行い、目視でバンドが確認された場合に陽性と判定した。なお、すりつぶしは摩砕装置（商品名：オートマッシャーAM-8, エスメック社製）により15秒間行った。

結 果

供試樹（青島温州 No. 3, 13, 15）のSDV感染確認

2006年から毎年ELISA法で検定を行って感染の有無を確認したところ、青島温州 No. 3, 13は2006年に、青島温州 No. 15は2009年に初めて陽性と診断され、SDV感染が確認された。また、2010年にはELISA法で5月および7月から11月まで毎月検定したところ、青島温州 No. 3, 13, 15の吸光度の平均値はそれぞれ1.0, 0.8, 0.5であり、青島温州 No. 3の吸光度が他に比べて高い傾向にあり、3樹のうち感染確認時期が最も遅い青島温州 No. 15の吸光度が最も低かった（第1表）。

春の新梢による検定

新梢を用いたイムノクロマト法による試験では、すべての検体で陽性と診断され、新梢を用いるとSDVを検出できることが確認された（第2表）。

花蕾による検定

花および蕾を用いたイムノクロマト法による試験では、花卉、柱頭、子房のいずれの部位でも陽性と診断され、これらの部位を用いるとSDVを検出できることが確認された（第3表）。

果実部位の影響

果実部位別のイムノクロマト法による試験では、平均検出率がフラベドでは90%（10果中で9果）、アルベドでは30%（10果中で3果）、果肉では20%（10果中で2果）であり、フラベドを用いるとSDVを高率に検出できることが

第1表 供試樹のSDV感染確認試験（青島温州）

系統名	感染確認 時期 ^{a)}	ELISA 吸光度 ^{b)}							病徴
		5月	7月	8月	9月	10月	11月	平均	
青島温州 No. 3	2006年5月	1.7	0.3	0.8	1.1	1.0	1.1	1.0	樹全体の葉が奇形
青島温州 No. 13	2006年5月	1.8	0.3	0.3	0.6	0.6	1.0	0.8	樹全体の葉が奇形
青島温州 No. 15	2009年5月	1.2	0.1	0.4	0.6	0.3	0.1	0.5	樹の一部の葉が奇形
対照：健全樹	—	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—

a) 春の新梢を用いた ELISA 法による診断. 2005 年以前には診断を行っておらず, 2006 年以降毎年実施した.

b) 2010 年測定, 3 検体の平均測定値

第2表 5月の新梢におけるSDV検出結果

系統名	経過年数 ^{a)}	検出率 ^{b)}
青島温州 No. 3	7	3/3
青島温州 No. 13	7	3/3
青島温州 No. 15	4	3/3
対照：健全樹	—	0/3

a) 診断実施時におけるSDV感染確認後経過年数

b) イムノクロマト法による30分後の検出率(陽性数/検定数)

第3表 5月の花の部位別におけるSDV検出結果

系統名	経過年数 ^{a)}	部位	検出率 ^{b)}
青島温州 No. 3	7	花弁	3/3
		柱頭	3/3
		子房	3/3
青島温州 No. 13	7	花弁	3/3
		柱頭	3/3
		子房	3/3
青島温州 No. 15	4	花弁	3/3
		柱頭	3/3
		子房	3/3
対照：健全樹	—	花弁	0/3
		柱頭	0/3
		子房	0/3

a) 診断実施時におけるSDV感染確認後経過年数

b) イムノクロマト法による30分後の検出率(陽性数/検定数)

第4表 果実部分別のSDV検出結果^{a)}

系統名	経過 年数 ^{b)}	診断部位		
		フラベド	アルベド	果肉
青島温州 No. 3	7	5/5 ^{c)}	3/5	1/5
青島温州 No. 13	7	4/5	0/5	1/5
感染樹合計		9/10	3/10	2/10
対照：健全樹	—	0/5	0/5	0/5

a) 試料 0.05 g を計り取って 20 倍希釈で検定した.

b) 診断実施時におけるSDV感染確認後経過年数

c) イムノクロマト法による30分後の検出率(陽性数/検定数)

確認された(第4表).

果実の採取時期と樹上着果位置の影響

日光の強弱が果皮の検定結果に与える影響をイムノクロマト法により経時的に調査した. その結果, 6, 7, 11 月では外成り果と内成り果のいずれも検出率は 100% (9 果中で 9 果) であった. しかし, 8, 9 月の検定では, 感染確認後の経過年数が 6 年である青島 No. 3 ではいずれの果実からも検出されたのに対し, その他の 2 樹では外成り果より内成り果の方が高い検出率を示した(第5表). さらに, 佐賀県では 8 月に採取した「上野早生」1 樹の 23 果のうち, 検出率が内成り果では 83%, 外成り果では 55% であり, 静岡県

長期貯蔵による影響

収穫して長期貯蔵した果実の果皮による検定をイムノクロマト法により行ったところ, 感染確認後の経過年数が 1 年である青島 No. 15 では陽性率が 40 ~ 100% (5 果の中で, 2 ~ 5 果) と検定期間により差が見られた. 感染確認後の経過年数が 4 年である青島 No. 3 や青島 No. 13 では, 詰まりにより摩砕液がプレート上を流れないことにより正しく検定が行えなかった検体を除くと, いずれも検出率は 100% であった. 以上の結果から, 少なくとも貯蔵 3 ヶ月後の果皮からでも SDV を検出できることが確認された(第6表).

冬季切り枝水挿し法の新梢・花蕾による検定

冬季切り枝水挿し法によりイムノクロマト法を用いた検定では, すべての検体で SDV の検出が可能であった(第7表). また, 三重県では 1 ほ場の「崎久保早生」2 樹中 2 樹, 2 ほ場の「みえ紀南 1 号」5 樹中 4 樹で SDV の検出が可能であった. さらに, 福岡県では, SDV の一系統である CiMV に感染した「宮川早生」1 樹でも SDV の検出が可能であった.

考 察

一般的にカンキツのウイルス検定では ELISA 法が採用されている. 検体として春の新梢のみを用いることから, 葉が硬化して最適な新梢を採取できなかったために正確な検

第 5 表 6 月～11 月における外成り果と内成り果からの SDV 検出結果

	系統名	経過年数 ^{a)}	6 月	7 月	8 月	9 月	10 月	11 月
外成り果	青島温州 No. 3	6	3/3 ^{b)}	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	青島温州 No. 13	6	3/3	3/3	2/3	2/3	3/3	3/3
	青島温州 No. 15	3	3/3	3/3	0/3	1/3	3/3	3/3
	合計		9/9	9/9	5/9	6/9	9/9	9/9
内成り果	青島温州 No. 3	6	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	青島温州 No. 13	6	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	青島温州 No. 15	3	3/3	3/3	3/3	2/3	2/3	3/3
	合計		9/9	9/9	9/9	8/9	8/9	9/9

a) 診断実施時における SDV 感染確認後経過年数

b) イムノクロマト法による 30 分後の検出率 (陽性数 / 検定数)

第 6 表 1 月～3 月まで貯蔵した果実からの SDV 検出結果

系統名	経過年数 ^{a)}	診断時期		
		貯蔵 1 ヶ月後	貯蔵 2 ヶ月後	貯蔵 3 ヶ月後
青島温州 No. 3	4	5/5 ^{b)}	4/4 ^{c)}	5/5
青島温州 No. 13	4	5/5	4/4 ^{c)}	5/5
青島温州 No. 15	1	2/5	5/5	3/5

a) 診断実施時における SDV 感染確認後経過年数

b) イムノクロマト法による 30 分後の検出率 (陽性数 / 検定数)

c) 摩砕液がプレート上を流れず、正しい検定が行えなかった 1 検体を除く。

第 7 表 2 月の切り枝水挿し法の新梢・花蕾における SDV 検出結果

系統名	経過年数 ^{a)}	部位	判定結果 ^{b)}
青島温州 No. 3	6	新梢	+
青島温州 No. 13	6	新梢	+
青島温州 No. 15	3	新梢	+
		花蕾	+
対照: 健全樹		新梢	-

a) 診断実施時における SDV 感染確認後経過年数

b) イムノクロマト法による 30 分後の診断結果

定が不可能であったり、農作業の都合でウイルス検定を断念する場合がある。ELISA 法は専門知識を必要とし、検定には 2 日間を要することから、簡易迅速性に欠けている。そこで簡易で迅速な検定が可能である SDV クロマトを活用して、新梢発生時期以降の花蕾、果実、冬季に採取した枝を用いた簡易な周年検定に取り組んだ。まず、新梢の採取が遅れてしまった場合には 5 月に花蕾を用いることにより検出が可能である。6～12 月では果実を用いることにより検出が可能であるが、果実の部位としてはフラベドを用い、梅雨明け以降の気温が高くなる初夏～秋季には検出率の高い内成り果を用いるなどの注意が必要である。さらに、収穫後の貯蔵果実でも検出が可能であり、1～3 月には冬季に採

取した枝を用いた切り枝水挿し法により検出が可能である。これにより、接ぎ木用穂木を採取する直前に SDV を検出することができた。

従来から、ELISA 法では SDV グループの中でも CiMV 系統やその他の系統が検出出来ない可能性があり、RT-PCR 法による検定が利用されている (Iwanami, 2010; Shimizu *et al.*, 2011)。しかし、草野ら (2013) は、改良版 SDV クロマトが SDV グループの系統を全て検出できることを明らかにしている。本改良で検出感度が向上し、従来 RT-PCR 法のみであった SDV の全系統の診断が可能となった。

今回の調査において、「みえ紀南 1 号」を用いた冬季切り枝水挿し法による検定では 5 樹中 1 樹で SDV が検出されず、接ぎ木用穂木採取前に感染樹を特定できない事例が確認されたが、同様な試験を実施した他県ではこのような事例は見つかっておらず (私信)、今後この原因を明らかにする必要がある。しかし、栄養繁殖性であるカンキツは 1 本の母樹から 1000 本程度の穂木が採取されるため、検定しないで採穂すればウイルス病が一気に蔓延する恐れがある。このために母樹検定は特に重要であることから、検定漏れのリスクを回避するため、複数回に渡って検定を実施することが望ましいと考えられる。

夏季は高温により ELISA 法では SDV の検出が不安定にな

る (Changyong *et al.*, 1994). これは樹体内において高温の影響によりウイルス量が低下することに起因しており, 同様な抗原抗体反応を利用したイムノクロマト法でも夏季に検出率が低下した. 下大迫・栗山 (1981) は, 直射日光により外成り果の果実表面の温度は 45°C 以上の高温になったと報告しており, 特に日光が当たる外成り果での検出が低かったのは, 高温による影響が顕著であったためと推察される.

今回の試験では感染確認後の感染経過年数が異なるウンシュウミカン樹を供試した. 感染確認後の経過年数は, 新梢, 花蕾の検定時で 4 年, 冬季切り枝水挿し法の新梢では 3 年である「青島温州」を試験に用いたが, それらすべての検体からは SDV が検出された. また, SDV クロマトの検出感度は ELISA 法より優れることが報告されている (Kusano *et al.*, 2007). しかし, 今回の夏季採取の果実および長期貯蔵果実による検定では調査樹により検出率が異なった. 原因は不明であるが, 経過年数が少ないと樹内のウイルス濃度が不均一である可能性が考えられる. 感染確認後の経過年数が一番少ない青島 No. 15 は他の 2 樹と比較して, 検出率が内成り果では 67% (3 果中で 2 果), 長期貯蔵果実では 40% (5 果中で 2 果) と低い事例が確認されていることから, 場合によっては正確な検定が行えない可能性がある. 果実については 3 果 3 反復で検定を行ったが, 新梢並みに 15 果 3 反復で行うことでウイルスの局在性を回避することができ, 検出率の低下が抑えられると考えられる. このことから, 検出漏れのリスクを最小限に抑えるためには, 新梢, 果実ともなるべく多くの部位から採取して検定することが必要であると考えられる.

本研究により, SDV クロマトにより花蕾・果実や冬季に採取した枝から SDV の検出が可能であることが明らかとなったことから, 検定したいときに採取可能な部位を用いることで, 1 年中かつ高率に SDV を検出することが可能となった. これにより無毒な苗木供給と土壌汚染の拡大防止に寄与することが期待される. 今後は生産現場のウイルス検定で活用していく体制を整備しながら現地実証を実施し, 現場で使用する際の問題点を明らかにしつつ普及を図っていく必要がある.

謝 辞

本論文については, 新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業「効率的茎頂接ぎ木と地域版簡易診断キットを活用した無毒カンキツ苗木供給システムの開発」(平成 22 年度～24 年度) による研究成果の一部である.

摘 要

SDV により引き起こされる温州萎縮病は収量や果実品質の低下を引き起こすことから問題となっている. カンキツのウイルス検定はこれまで ELISA 法が一般的に用いられてきたが, 新梢を検体とすることから検定できる期間が 1 年のうち数週間と限定されており, かつ検定に時間を要することが問題となっていた. そこで, イムノクロマト診断キットにより簡単, 迅速に, かつ周年可能な SDV 検出方法を検討した. その結果, 春の新梢と同様に, 花については花弁, 柱頭, 子房の部位別に分離して検定したところ, いずれの部位を用いても検出可能であった. 夏季から秋季にかけては, 果皮のフラベド部分を用いると高率に検出が可能であり, 特に日光の照射量が多い夏季は内成り果の果皮を用いると検出率が高かった. 冬季においては, 3 ヶ月間常温貯蔵庫で貯蔵した果実の果皮からも検出可能であった. 夏季採取の果実や長期貯蔵果実でも検出が可能であったが, 検体によっては検出率が低下する事例が確認されたので検定する際はなるべく多くの果実を供試する必要がある. また, カンキツ苗木育成のための穂木のウイルス診断に際しては, 冬季切り枝水挿し法による新梢や花蕾を用いても陽性反応が確認された. これらの結果から, SDV クロマトによる検定に新梢, 花蕾, 果皮, 冬季の切り枝から発生させた新梢や花蕾を用いることで SDV の周年検出が可能となった.

引 用 文 献

- Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., Gonsalves, D., Moscovitz, M., Purcifull, D.C. and Clark, M.F. (1979). The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 69: 190–194.
- Changyong, Z., Xueyuan, Z. and Yuanhui, J. (1994). Annual change of ELISA values of satsuma dwarf virus in different parts of satsuma budling and of citrus tristeza virus in different parts of sweet orange seedling. *Virologica Sinica* 3: 239–244.
- Clark, M.F. and Adams, A.N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475–483.
- 磯田隆晴・行徳 裕・山田一字 (1991). カンキツウイルス病に関する研究 (第 8 報) 温州萎縮病の発生跡地対策. 九病虫研会報 37: 55–58.
- Ito, T., Iwanami, T., Ieki, H., Shimomura, K., Shimizu, S. and Ito, T. (2004). A new virus related to *Satsuma dwarf virus*: the nucleotide sequence of the 3'-terminal regions of Hyuganatsu virus RNAs 1 and 2. *Arch. Virol.* 149: 1459–1465.
- Iwanami, T., Kondou, Y., Kobayashi, M., Hann, S.S. and Karasev, A.V. (2001). Sequence diversity and interrelationships among isolates of satsuma dwarf-related viruses. *Arch. Virol.* 146: 807–813.
- Iwanami, T. (2010). Properties and control of satsuma dwarf virus.

- J.A.R.Q. 44: 1-6.
- 影山智津子・市川 健・太田光輝・増井弘子・芹沢拙夫・伏見典晃・神尾章子・岩波 徹 (2011). 温州萎縮ウイルス (SDV) 汚染ほ場における土壌消毒の効果と台木の耐病性. 静岡農林研報 4: 61-66.
- 加藤光弘・石井香奈子・草野成夫・榎原謙次・田中雅士・岩波 徹 (2011). イムノクロマト・キットを用いたカンキツのウイルス検定. 日植病報 77: 193. (講要)
- 久原重松 (1980) 酵素結合抗体法 (ELISA) による植物ウイルス病の診断. 植物防疫 34: 129-135.
- Kusano, N., Hirashima, K., Kuwahara, M., Narahara, K., Imamura, T., Mimori, T., Nakahira, K. and Torii, K. (2007). Immunochromatographic assay for simple and rapid detection of *Satsuma dwarf virus* and related viruses using monoclonal antibodies. J. Gen. Plant Pathol. 73: 66-71.
- 草野成夫・岩波 徹・榎原謙次・田中雅士・村本晃司・牛島孝策 (2013). 改良版 SDV (温州萎縮ウイルス) クロマトは SDV グループの系統を全て検出できる. 日植病報 79: 244. (講要)
- 大倉野寿・迫田和好 (1993). 水挿し法によるハウスミカンの着花予測. 九州農業研究 55: 216.
- Shimizu, S., Ito, T., Miyoshi, T., Tachibana, Y. and Ito, T. (2011). A broad spectrum, one-step RT-PCR to detect *Satsuma dwarf virus* variants using universal primers targeting both segmented RNAs 1 and 2. J. Gen. Plant Pathol. 77: 326-330.
- 下村克己・野口保弘 (2003). 逆転写遺伝子増幅法による温州萎縮ウイルスの高感度検出. 福岡農総試研報 22: 99-102.
- 下大迫三徳・栗山隆明 (1981). 早生温州の日やけ症防止に関する研究. 福岡園芸試研報 19: 1-8.
- 高橋義行 (1998). ELISA 法—その特徴と実施上の注意点—. 植物防疫 42: 88-92.
- 富村健太・中嶋香織・市ノ木山浩道・野口真弓・加藤光弘・岩波 徹 (2013). 本邦における温州萎縮ウイルスの系統分布. 日植病報 79: 210. (講要)
- 宇杉富雄・斎藤康夫 (1980). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法による温州萎縮ウイルスの検出. 日植病報 46: 106. (講要)