

カンキツグリーニング病の発生に係わる 冬季低温と汚染土壌の影響

尾崎克巳¹, 山口健一^{2*}, 宮川経邦³

¹前園芸学部園芸学科; ²環境園芸学部環境園芸学科; ³前園芸学部食品工学科

2010年10月20日受付; 2011年1月14日受理

**Influence of low temperature during the winter and bacteria-infested soil
on the development of citrus greening disease**

Katsumi Ozaki¹, Ken-ichi Yamaguchi^{2*} and Tsunekuni Miyagawa³

¹Former Dept. of Horticulture, ²Dept. of Environmental Horticulture, ³Former Dept. of Food Engineering,
Minami Kyushu University, Tatenochi, Miyakonojo city, Miyazaki 885-0035, Japan

Received October 20, 2010; Accepted January 14, 2011

Citrus greening disease (CG) is one of the most serious diseases in citrus production, which first occurred in Asia and Africa. In Japan, CG was found in the southern island of Okinawa in 1988, and has gradually spread toward north. CG is caused by a gram-negative bacterium, *Candidatus Liberibacter*, which is non-culturable and phloem-restricted. Here we have examined the influence of low temperature and the bacterium-infested soil on the development of CG under climate conditions in Miyazaki Prefecture. In this study, we have confirmed that the ratio of infected branches of Ponkan trees decreased during the winter (from Dec. to Mar.) based on the number of the pathogen detected using PCR and LAMP methods. This result revealed that low temperature during the winter was beneficial for suppressing the occurrence of CG. Moreover, the injection of antibiotic, tetracycline, into CG-infected trees, which were grown under low temperature, led to a relatively high level of suppression of CG. It was suggested that the combination of antibiotic injection and cultivation under low temperature might be effective for CG control. Furthermore, when seedlings of Ponkan trees were planted in the bacterium-infested soil, CG has not appeared until 31 months after the planting. The result has suggested that CG is not a soil-borne disease. In addition, our data on grafting of CG-infected branches have indicated that CG is transmitted only by tissue-fusion, not by contact of infected organs.

Key words: citrus greening disease, *Candidatus Liberibacter*, low temperature, tetracycline, soil transmission.

緒 言

カンキツグリーニング病は*Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Ca. L. africanus*および*Ca. L. americanus*の3種の病原細菌によって引き起こされる植物細菌病で、日本に発生している本病の病原細菌は*Candidatus Liberibacter asiaticus*である (da Graca 1991, Texeria et al. 2005)。

本病は東南アジア、日本、南アフリカ、アメリカやブラジルなどのカンキツ生産地で発生しており、発病すると数年以内に枯死に至る被害の大きな要防除病害

である。カンキツ類での症状は主に葉に現れるが、果実および枝にも発生する。葉の病徴は主脈の黄化、退緑斑紋更に葉全体の黄化、落葉へと進展する。果実は着色不良となって小型化し、小枝も枯れる (da Graca 1991)。また、本病の病徴は微量要素の欠乏による生理障害と類似しており、目視による判別が困難とされ (Ohtsu et al. 1998, 宮川 2000)、PCR法やLAMP法を用いた病原細菌の遺伝子診断が感染の確認に利用されている (Jagoueix et al. 1996, Hoy et al. 2001, Okuda et al. 2005)。

カンキツグリーニング病 (CGと略す) の日本での発生は1988年に西表島で初めて確認され (Miyakawa and Tsuno 1989)、その後1994年に沖縄本島の各地で (河野ら1997, 内藤ら2001)、2002年には鹿児島県の与論島、

*連絡著者: E-mail, ken@nankyudai.ac.jp

次いで徳之島、沖永良部島、喜界島（濱島ら2003、篠原ら2006）で発生が確認されている。このようにCGの発生地域は年々北上しており、鹿児島県の未発生地域や宮崎県を含む周辺他県への拡大が懸念されている。

CGは接木や取り木の栄養繁殖による伝搬とミカンキジラミ（*Diaphorina citri kuwayama*）による永続的伝搬とが知られているが（da Graca 1991、宮川2000）、これ以外の伝搬については明らかでない。CGに対して登録農薬のない現状における防除対策としては、感染株の早期発見と伐採・伐根焼却処分および媒介昆虫ミカンキジラミの駆除以外には有効な手段がない。そのため発生地域ではより有効な防除法の確立が望まれている。

CGの拡大・侵入が懸念される南九州の宮崎県において、筆者らは、屋外の隔離網室でCG罹病株を栽培したところ、前年発病した枝が翌春には病徴が消失すると共に春芽の着生葉がPCR検定で陰性反応を示すなど冬季の低温によって、CGの発生が抑制される可能性を報告した（宮川ら2000）。

一方、本病原細菌は篩部組織の細胞に局在しており、発病枝の出現が不均一であること等が報告されている（da Graca 1991、Garnier and Bove 2000、濱島、林川2005、山口ら2006）。そこで、既往の知見を詳細に検討し、CGの発生に及ぼす自然条件下での冬季低温の影響を遺伝子診断法と生物検定法を用いて明らかにする（尾崎ら2011）とともに、抗生物質であるテトラサイクリン剤との併用効果についても検討した。更に、本病の土壌を介した伝搬の有無を明らかにするために、発病株を栽培した跡地ポット土壌への定植による感染と発病株との混植による伝搬の有無について検討した。今回は、それらの結果を報告する。

材料および方法

CG発生に係わる冬季低温の影響

感染株の作出 当大学で保存する発病株と植物防疫法に基づいて導入した発病株から穂木を採取し、鉢植えの2年生ポンカン苗に接木接種した。接木は主に腹接ぎ法を用いたが、一部芽接木法で接種した。供試株No.0351、0503は与論島からの導入株を接木し、それ以外の供試株は当大学保存株を接木した。活着後にPCR法で感染を確認した株を発病株として各種試験に供試した。なお、以下の試験は、植物防疫法に従い、予め許可を得た当大学高鍋キャンパスのガラス温室および屋外の隔離ステンレス網室内で実施した（図1）。

試験枝の選定 2005年から3年間10月から12月に掛けて、上記鉢植えの感染株から、当年の春芽（着葉5～6枚）を1株当たり5から10本の枝を任意に選択し、試験枝に選定した。この試験枝は毎年の試験開始時（12月）に必ず1枝当たり着葉を2～3枚採取し、PCR法あるいはLAMP法でCG感染の有無を再確認した。

冬季低温処理期間 宮崎県高鍋町当大学高鍋キャンパス内の自然気象条件下で12月上旬から翌年の3月上旬の期間を冬季の低温処理期間とした。なお、この期



図1. 隔離ステンレス網室とカンキツ栽培の様子

間中、供試株は屋外の隔離網室で栽培管理した。

検定葉の採取 低温処理後の3月上旬に、試験枝から1枝当たり着葉2～3枚を採取し、PCR法あるいはLAMP法でCG感染の有無を検定した。

低温処理後の切取り試験枝の接木による感染の検定 2007年10月に鉢植えの感染ポンカン株から任意に1株当たり数枝を選び、PCR法およびLAMP法の両方法で陽性反応を示した枝を試験枝として供試した。この鉢植え株を屋外の隔離網室内で冬季低温条件下で栽培管理した。低温処理後の2008年3月に試験枝の先端部2芽を切り取って穂木として、直ちに健全な2年生ポンカン苗に切り接ぎ法で接木した。この株を温室内で栽培し、接木穂の芽から伸長した春芽の着生葉について感染の有無を7月と10月にPCR法とLAMP法とで検定した。また、台木ポンカンへの伝搬についても検討した。更に、低温処理後も屋外の網室で栽培管理した親株の先端2芽を切り取った基部における感染の有無も7月と10月にPCR法とLAMP法で検定した。

DNAの抽出 2005年12月と2006年3月の検定ではCTAB法（Murray and Thompson 1980）に準拠し、その他は市販のNucleon PhytoPure kit（アマシャム、東京）を使用した。採取した2～3枚の葉は中肋部を切り取って、細断後に液体窒素で凍結させた後、乳鉢内で磨碎した。この葉の磨碎粉末から約150mgを計量し、検定に供試した。これ以外の操作は奥田の方法（奥田ら2007）に準拠した。

PCR法によるCGの検出 2005年12月と2006年3月の検定にはプライマーとしてOI 1およびOI 2c（Jagoueix et al. 1996）を使用した。それ以外はMHO353およびMHO354（Hoy et al. 2001）をPCRプライマーとし、DNAの増幅にはTakara EX Taq（タカラバイオ、大津）を使用した。サーマルサイクラーの設定条件は、94℃で3分間、その後94℃で30秒間、56℃で30秒間、72℃で60秒間を1サイクルとする反応を35回行い、最後に72℃で10分間反応させた。得られたPCR産物は1%アガロースゲルで、50ボルト、35分間電気泳動を行った。泳動ゲルはエチジウムブロマイド（1μg/ml）で染色した後、紫外線照射下でバンドを観察し、CG病原細菌の有無を検定した。

LAMP法によるCGの検出 LAMP法は市販のカン

キツグリーンング病診断キット（ニッポンジーン，東京）を使用し，検定方法は取扱い説明書に準拠した。

冬季低温処理とテトラサイクリン剤の併用による発病抑制

テトラサイクリン剤の樹体内注入 鉢植え5年生のCG感染ボンカン株を供試し，主幹の2ないし3カ所（上部，中部，下部）に電気ドリルを用いて，直径約5mm，深さ約5mmの穴を開け，その穴にテトラサイクリン剤（2%溶液）を所定量注入した．抗生物質の注入は1日1回とし，5日から7日間継続した．注入時期は冬季低温処理の前後とした．

試験枝の選定 テトラサイクリン剤の処理前あるいは冬季低温処理前に，1株当たり当該年次の春枝を5～8本を任意に選び，PCR法で陽性反応を示した枝のみを試験枝に選定した．

検定葉の採取 各試験の調査時に試験枝から伸長した春枝の葉を採取し，PCR法あるいはLAMP法でCG感染の有無を判定した．なお，PCR法およびLAMP法は前述の方法で行った．

試験株の栽培管理 冬季低温処理後の3月以降は温室内で栽培管理した．

CG発生に係わる汚染土壌の影響

供試土壌および調査法 CG発病株を2年間ポット栽培した跡地土壌（細根や切断根を含む）に，実生のボンカン2年生苗木を2006年3月に定植し，7ヶ月後，17ヶ月後，27ヶ月後，31ヶ月後に病徴の有無を観察するとともに着葉を採取し，PCR法とLAMP法でCG感染の有無を検定した．試験株の栽培管理は温室内で行った．供試株数は8株使用した．

発病株との混植栽培 CG発病株とボンカン実生2年生苗木を各々の根部が接触するように9号素焼鉢に2006年3月に混植した．混植7ヶ月後，17ヶ月後，27ヶ月後，

31ヶ月後に病徴の有無を観察するとともに着葉を採取し，PCR法とLAMP法でCG感染の有無を検定した．試験株の栽培管理は温室内で行った．供試株数は4株とした．

結 果

CG発生に係わる冬季低温の影響

試験枝の冬季低温処理前（前年の12月）と後（当年3月）における感染率の変動を同一株についてみると，表1に示したように，2006年3月では4株中3株で感染枝率の低下が認められ，その全感染枝率は44%から19%に低下した．2007年3月の低温処理後における感染枝の低下は7株中2株で認められたが，その全感染枝率の低下は62%から60%と小幅であった．2008年の冬季低温処理後の感染株の変動は11株中4株で低下が認められ，その全感染枝率は85%から75%へと低下していた．この冬季低温による影響を株別に見ると，感染枝率の低い株において顕著であった．

一方，7月の検定結果では，2007年，2008年の両年とも多くの試験株で感染枝率が高まり，高温期に向かって病原細菌の増殖が示唆された．しかし，中には0623株や0632株など低い感染枝率が維持され，健全化に向かう株も認められた（表1）．なお，2003年の春に接木により感染させた3株（0351, 0310, 0317）をはじめ，全ての試験株において2009年3月まで枯死株は認められなかった．

鉢植えの発病株を冬季低温処理した後，3月にこの試験枝の先端部2芽を切り取り，穂木として健全なボンカン苗木に接木した（図2）．その接木穂木から出芽・伸長した春芽のCG感染状況を表2に示した．試験枝27本の内，活着した接木穂木は22本であった．この22本の春芽における感染状況を見ると，7月にはPCR法と

表1. 冬季の低温処理がカンキツグリーンング病感染枝の発生に及ぼす影響

供試株 No.	2005年 12月	2006年		2007年			2008年	
		3月	12月	3月	7月	10月	7月	10月
0351	1/2	1/5	6/6	7/7	5/8	8/8	7/9	9/9
0310	1/6	1/5	3/3	3/3	3/5	5/5	3/4	4/4
0317	3/5	0/2	3/4	4/4	5/5	5/5	3/5	5/5
0503	3/5	1/4	6/6	6/6	8/8	8/8	5/5	5/5
0623			2/10	0/8	2/8	2/8	0/5	1/5
0624			6/6	7/7	7/7	7/7	5/5	5/5
0632			2/10	0/10	2/5	1/5	0/5	0/5
0726						7/7	7/7	7/7
0727						6/6	6/6	6/6
0729						5/5	5/5	5/5
0731						4/4	4/4	4/4

- 注 1) 数値は陽性反応枝数/調査枝数を表す.
 2) 低温処理は12月から翌年3月上旬まで屋外で行った.
 3) 7月の検定は，前年の調査で陽性反応を示した枝から春に出芽伸長した枝（春芽）を用いた.
 4) 7月と10月の検定は，同一試験枝の着生葉を用いた.

表2. 低温処理後の感染枝を接木した穂木からの春芽および台木におけるカンキツグリーンング病感染枝の発生状況

株 No.	試験枝 の感染	接木穂木 の活着	穂木からの春芽の感染		台木ボンカン の感染	親株基部からの春芽の感染***	
			7月	10月		7月	10月
1	+	○**	+	+	+	-	+
2	+	○	-	-	-	+	+
3	+	○	+	+	+	+	+
4	+	○	-	-	-	+	+
5	+	○	-	-	-	+	+
6	+	○	-	-	-	+	+
7	+	○	+	+	+	+	+
8	+	○	+	+	+	+	+
9	+	○	-	-	-	+	+
10	+	○	-	-	-	+	+
11	+	○	+	+	+	+	+
12	+	○	+	+	+	+	+
13	+	○	+	+	+	+	+
14	+	○	+	+	+	+	+
15	+	○	+	+	+	+	+
16	+	○	+	+	+	+	+
17	+	○	+	+	+	+	+
18	+	○	+	+	+	+	+
19	+	○	+	+	+	+	+
20	+	○	+	+	+	+	+
21	+	○	+	+	+	+	+
22	+	○	+	+	+	+	+
23	+	×			-	+	+
24	+	×			-	+	+
25	+	×			-	+	+
26	+	×			-	+	+
27	+	×			-	+	+
28	-	○	-	-	-	-	-

- 注 1) 低温処理（2007年12月～2008年3月）した発病株の試験枝の先端2芽を切除し、これを穂木として健全ボンカンに切接木法で接木した。
 2) * +は陽性反応，-は陰性反応を示す。
 3) ** ○は活着，×は不活着を示す。
 4) *** 低温処理後に穂木を採取した試験枝の基部から伸長した発病株の春芽。

LAMP法ともに陰性反応を示した株が6株認められ、陽性反応を示した株は16株であった。更に10月に同一枝を再度検定したところ、7月と同じ結果を示した（表2，図2）。

台木であるボンカン株では、春芽が陽性反応を示した16株は全て陽性反応を示し、病徴も発現しており、台木へのCG伝搬が確認された。一方、陰性反応を示した6株のボンカン台木では全て陰性であった。

これらの結果から、冬季の低温処理はCGの発生を抑制することが示唆された。また、試験枝を2芽採取した親株の残存基部から伸長した春芽について、PCR法とLAMP法で7月と10月に検定したところ、7月に検定した1株を除き全て陽性反応を示し、3月以降における病原細菌の樹体内での増殖、拡散が示唆された。なお、接木穂が不活着の株においては、ボンカン台への

感染は何れも認められなかった（表2）。

試験期間中の最低気温は、2005年12月と2008年2月では月平均最低気温1.3と1.2度と他の年次と比べて低く経過した。その他の年次及び月の最低気温は試験期間を通じてほぼ類似していた（表3）。

冬季低温処理とテトラサイクリン剤の併用によるCG発病抑制

既に、CGの感染穂木を抗生物質溶液に浸漬することによって、無毒化されることが報告されている（Bove 1980, 宮川 1979）。そこで、冬季の低温処理とテトラサイクリン剤の樹体内注入との併用によるCGの発病抑制効果について検討した。表4に示したように、感染枝率100%を示すボンカン株に本剤を樹体内に所定量注入後に、冬季低温処理すると、出芽・伸長

表3. 冬季低温処理期間中の最低気温の推移

年次	項目 (℃)	1月 (半旬別)				2月 (半旬別)				3月 (半旬別)				12月 (半旬別)			
		1	2	3	平均	1	2	3	平均	1	2	3	平均	1	2	3	平均
2005	半旬別最低気温	1.6	1.1	3.6	2.1	3.8	5.6	1.4	3.6	3.6	5.2	6.9	5.2	3.2	0.4	0.2	1.3
	日最低気温	-0.8	-1.7	-2.5		-1.8	0.2	-2.3		-0.2	-1.8	1.8		-0.2	-3.5	-2.1	
2006	半旬別最低気温	1.4	5.8	3.1	3.4	1.5	6.1	7.9	5.2	5.4	4.6	6.5	5.5	6.0	6.7	3.5	5.4
	日最低気温	-2.4	1.6	-1.0		-3.0	0.7	5.6		-0.2	0.0	1.7		0.2	1.5	-3.0	
2007	半旬別最低気温	4.8	3.5	3.0	3.8	4.3	5.3	6.3	5.3	4.9	4.7	9.7	6.4	3.8	5.7	8.8	6.1
	日最低気温	-0.4	0.2	-1.6		-3.7	1.8	3.2		-0.4	1.3	3.2		2.0	2.0	1.5	
2008	半旬別最低気温	2.3	5.9	4.1	4.1	1.0	0.7	1.8	1.2	3.7	9.4	7.2	6.8	4.2	5.0	2.9	4.0
	日最低気温	-1.7	-0.4	-1.7		-1.5	-2.8	-0.4		-0.3	4.8	3.4		-3.3	2.1	-0.4	

注 1) 大学内の気象実測値。

表4. 冬季低温処理とテトラサイクリン剤の併用がカンキツグリーンング病感染枝の発生に及ぼす影響

供試株 No.	テトラサイクリン剤*		薬剤処理時の試験枝		試験枝から出芽した春芽**	
	注入箇所数	注入量 (μl)	陰性	陽性	陰性	陽性
1	2	280	0	6	3	3
2	2	280	0	6	6	0
3	3	420	0	10	7	3
4	3	420	0	7	6	1
5	3	420	0	7	4	3
6 (対照)	—	—	0	5	0	7

注 1) 冬季低温処理は2007年12月上旬～2008年3月上旬に屋外で行った。

2) * テトラサイクリン剤の樹体内注入は2007年11月に実施した。

3) ** 2008年10月にLAMP法で検定した。

した春芽の感染枝率が28%まで低下し、発病抑制効果が認められた。この発病抑制効果とテトラサイクリン剤の注入箇所数や注入量との関係は個体間で差異があり、判然としなかった(表4, 図5)。

次に、テトラサイクリン剤の樹体内への注入時期を冬季低温処理の前と後について検討したところ、表5に示したように、7月の時点では冬季低温処理前に本剤を樹体内に注入した場合、試験株2株の供試14枝は全て陰性反応を示した。一方、冬季低温処理後に本剤を注入した場合は、供試した13枝中8枝が陰性反応を示した。以上から、併用処理によりCGの発病抑制作用が認められ、特に、冬季低温処理前に本剤の注入処理によって高い抑制効果が得られた。しかしながら、高温期を経た11月になると再び感染枝率が高まり、その効果が低下した(表5)。

CG発生に係わる汚染土壌の影響

発病株を栽培した跡地土壌に定植したポンカン株から定植7ヶ月後、17ヶ月後、27ヶ月後、31ヶ月後に1株当たり2枝から着生葉を採取し、PCR法とLAMP法で検定したところ、表6に示したように、8株中16枝から採取した全ての葉で陰性反応を示した。なお、ポンカン株には、試験期間を通じて病徴らしき症状は認めなかった。



図2. 接木に用いた穂木から伸長した春芽

左：陰性の穂木，右：陽性の穂木

発病株と混植したポンカン株から定植7ヶ月後、17ヶ月後、27ヶ月後、31ヶ月後に1株当たり5枝から着生葉を採取し、PCR法とLAMP法で検定した。表6に示したように、何れも全ての株で陰性反応を示した。更

表5. テトラサイクリン剤の注入時期とカンキツグリーニング病抑制効果との関係

供試株 No.	テトラサイクリン剤* の注入時期	試験枝	試験枝から伸長した春芽	
		2006年10月	2007年7月	2007年11月
1	低温処理前（2006年11月）	6/6	0/7	2/7
2	低温処理前（2006年11月）	6/6	0/7	4/7
3	低温処理後（2007年3月）	4/4	3/6	5/6
4	低温処理後（2007年3月）	7/7	2/7	6/7

注 1) 数値は陽性反応数/調査枝数を示す。

2) * 2%溶液600 μ l/株を樹体内に注入した。

表6. 発病樹の栽培跡土壌及び発病樹との混植栽培におけるカンキツグリーニング病の感染の有無

供試ボンカン の栽培条件	供試株数	定植7ヶ月後		17ヶ月後		27ヶ月後		31ヶ月後	
		陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
発病樹栽培跡土壌	8	0	16	0	16	0	16	0	16
発病樹と混植栽培	4	0	12	0	12	0	20	0	20
対照（健全土）	2	0	6	0	6	0	6	0	6

注 1) 混植栽培に用いた発病樹は試験期間を通じて全て陽性反応を示した。

表7. カンキツグリーニング病発病樹根部からのPCR検定

供試部位	検定数	PCR反応	
		陽性	陰性
細根	7	5	2
葉	4	4	0

注 1) 混植栽培に用いた発病樹。

に、ボンカン株には、試験期間を通じて病徴らしき症状は認めなかった。

混植栽培したポット内における健全ボンカンと発病ボンカンの根は、図3でその分布状況を示したように、両株の根は絡み合いポット一杯に分布していた。根に付着している土を可能な限り除去し、根を観察したが、両株の根がお互いに融合している様な場面は見受けられなかった。なお、混植した発病株は2008年7月までに2本が枯死した。また、発病株から採取した葉は各検定期間とも全て陽性反応を示した。混植栽培に用いた発病株の根からPCR法で病原細菌の検出を試みたところ、表7に示したように、供試した根の7本中5本で陽性反応が認められた（表7、図4）。

考 察

栽培地の圃場におけるカンキツでは、CG感染枝の発生が不均一となったり（濱島，林川 2005）、垂主枝においては病原細菌の検出頻度に顕著な差が認められる（岩波ら2009）ことが指摘されているが、本試験においては、供試する試験枝を特定し、試験開始前後に

必ずPCR法あるいはLAMP法で検定を実施して比較検討してきたので、それらの指摘を十分考慮したものと考えられる。

CG発病株を宮崎県高鍋町の自然条件下で冬季低温期間に栽培すると、樹体内の病原細菌が消滅や活性の低下あるいはPCR法またはLAMP法で検出限界濃度以下に減少することが明らかとなった。これらの結果については、前報（宮川ら2000）とほぼ一致していた。しかし、4月以降の高温に伴って感染が再び確認され、冬季の低温処理による抑制作用の持続期間は比較的短いものと判断された。一方、少数株であるが、感染枝も増加せずむしろ健全化の現象も認められた。このように供試株によって無毒化の成否に差異を生ずる要因については今後の検討課題である。

以上のように、冬季の低温処理によるCG発生の抑制効果は実用的な防除対策としては不十分であるものの、感染の拡大抑制や枯死までの遅延に役立つものと考えられる。

また、本試験に供試したCG発病株はポット栽培であったが、約10年を経過しても枯死しなかった点を考えると、栽培管理が被害の増大や枯死の発生に大きく関わる可能性が示唆された。

CGの防除対策としては、早期発見、伐採・抜根が基本であるが、本試験結果から、抗生物質であるテトラサイクリン剤を樹体内に注入し、その後冬季低温の条件下で栽培することによって、発病抑制効果が高まるということが明らかとなった。この知見は、伐採等が困難な銘木や由緒あるカンキツ樹などの治療や予防に活用できるものと期待される。しかしながら、実用化のためには、本剤の樹体内の移動や注入方法、薬剤の残留性等々の検討を要する。

CGは栄養繁殖組織や媒介虫によって伝搬すること



図3. カンキツグリーニング病発病株との混植栽培

左：混植栽培の状況 右：根の分布状況（ポット内 左側：発病株、右側：供試株）

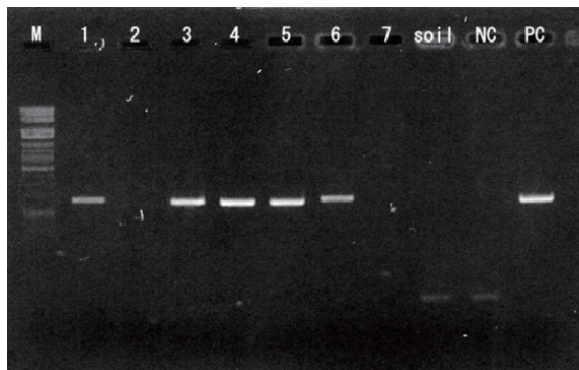


図4. 根および土壌のPCR検定結果

M：分子量マーカー，1～7レーン：根，soil：土壌，NC：陰性対照，PC：陽性対照

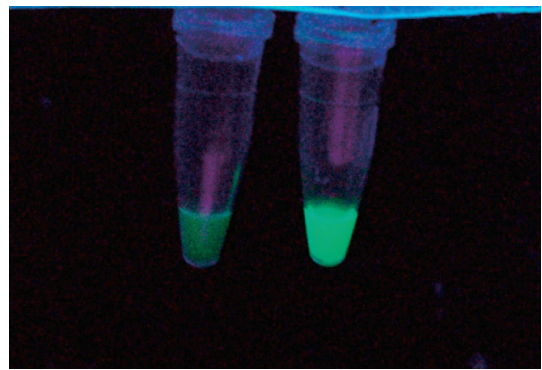


図5. LAMP法による検定

左：陰性反応，右：陽性反応

は知られているが，土壌や根の接触による伝搬の有無に関する知見は少ないので検討したところ，CG発病カンキツ栽培跡地土壌およびCG発病カンキツ株との混植栽培したカンキツからは何れも感染が認められなかった．また，感染枝を切り接木法で接木しても不活着の場合には感染しなかった．これらの点から，枝や根の罹病組織と健全な組織が単に接触したのみでは伝搬しないことが示唆され，組織的な融合が生じた場合に伝搬が起こるものと推察された．

摘 要

宮崎県高鍋町の自然気象条件下における冬季低温および汚染土壌がカンキツグリーニング病 (CG) の発生に及ぼす影響について検討した．

CG発病株を冬季の低温条件下で栽培すると，感染枝率が減少することが，PCR法およびLAMP法による病原細菌の検出結果から認められ，冬季低温処理がCGの発生に抑制的に作用することが明らかとなった．

CG発病のカンキツ樹内にテトラサイクリン剤を注入処理後，冬季低温下で栽培すると，比較的高い発病抑制効果が認められた．発病抑制作用を示す両者の組み合わせはCG対策の一つとしての利用の可能性が示された．

CG発病株のカンキツを栽培した跡地土壌に定植したカンキツおよびCG発病カンキツ株と混植栽培したカンキツからは，31ヶ月後まで全く感染が認められなかった．以上の結果から，CGは土壌を介した伝搬および根の接触による伝染をしないものと判断された．

謝 辞

本研究は、農林水産省高度化事業「難病害カンキツグリーニング病の拡大阻止技術の開発（2003年度～2005年度）」および「遺伝情報とナノテクを活用したグリーニング病産地回復技術の開発（2006年度～2008年度）」によって行った。関係各位に感謝の意を表する。

引用文献

- Bove, J. M., Bonnet, P., Garnier, M. and Aubert, B. (1980) Penicillin and tetracycline treatment of greening disease-affected citrus plants in the glasshouse, and the bacterial nature of the procaryote associated with greening. *Proc. 8th. Conf. IOCV*. p. 91-102.
- da Graca, J. V. (1991) Citrus greening disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **29**: 109-136.
- Garnier, M. and J. M. Bove (2000) Huanglongbing (Greening). In *Compendium of Citrus Diseases*. 2nd edition. Edited by Timmer, L.M., S. M. Garnsey and J. H. Graham, APS Press Minnesota, USA, pp.46-48.
- 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 (講要).
- 濱島朗子, 林川修二 (2005) 初発地帯における病害および媒介虫の生態解明と診断・防除への応用. 九農研シンポジウム「難防除病害カンキツグリーニング病の拡大阻止技術開発の現状」pp.16-25.
- Hoy, M.A., A. Jeyaprakash and R. Nguyen (2001) Long PCR is a sensitive method for detecting *Liberobacter asiaticum* in parasitoids undergoing risk assessment in quarantine. *Biol. Control.* **22**: 278-287.
- 岩波徹, 上地奈美, 河野伸二 (2009) カンキツグリーニング病に感染したシークワーシャー樹体内におけるPCR検出率の季節変動. *九病虫研会報* **55**: 68-75.
- Jagoueix, S., J. M. Bove and M. Garnier (1996) PCR detection of the two *Candidatus Liberobacter* species associated with greening disease of citrus. *Mol. Cell. Probes* **10**: 43-50.
- 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**: 253 (講要).
- 宮川邦経 (1979) カンキツリクビン (グリーニング病) の病徴発現に及ぼすペニシリンおよび2, 3抗生物質処理の影響. *日植病報* **45**: 401-403.
- Miyakawa, T. and K. Tsuno (1989) Occurrence of Citrus Greening disease in the southern islands of Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **55**: 667-670.
- 宮川経邦, 内藤 孝, 尾崎克巳 (2000) 発生北限地域におけるカンキツグリーニング病 (Huanglongbing) の発病生態. *南九州大学研報* No. 30 (A): 13-26.
- 宮川経邦 (2000) カンキツグリーニング病－世界的な発生分布とその被害－. *南九州大学研報* No. 30 (A): 53-63.
- Murray, M.G. and Thompson, W.E. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* **8**: 4321-4326.
- 内藤考, 田場聡, 豊里哲也, 河野伸二, 高江州和子, 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. *沖縄農研報* **23**: 74-81.
- Ohtsu, Y., K. Nakashima, M. Prommintara and Y. Tomiyasu (1998) Typical symptoms of citrus greening on mandarin trees in Nepal, supported by detection and characterization of ribosomal DNA of the causal organisms. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **64**: 539-545.
- Okuda, M., M. matsumoto, Y. Tanaka, S. Subandiyah and T. Iwanami (2005) Characterization of the *tufB*-*secE*-*nusG*-*rpIkA*JL-*rpoB* gene cluster of the citrus greening organism and detection by loopmediated isothermal amplification. *Plant Dis.* **89**: 705-711.
- 奥田ら研究チーム (2007) ウイルス検定マニュアル PCR, RT-PCR (DNA抽出編). (独) 農研機構 九州沖縄農研センター暖地施設野菜花卉研究チームホームページ <http://konarc.naro.affrc.go.jp/veg/sisetu-team/Iden/Iden/37807B79-326E-4C41>.
- 尾崎克巳, 山口健一, 宮川経邦 (2011) カンキツグリーニング病発生に及ぼす冬季低温の影響. *日植病報* **77**: 37 (講要).
- 篠原和孝, 湯田達也, 西本周代, 濱島朗子, 橋元祥一, 時村金愛, 佐藤哲治 (2006) 奄美諸島におけるカンキツグリーニング病の発生調査 (第1報 奄美諸島における分布の特徴). *九病虫研会報* **52**: 6-10.
- Texeria, D.C., Ayres, J., Kitajima, E. W., Tanaka, F. A. O., Danet, L., Jagoueix-Eveillard, S., Saillard, C. and Bove, J. M. (2005) First report of a Huanglongbing-like disease of citrus in Sao Paulo state, Brazil and association of a new *Liberibacter* species, *Candidatus Liberibacter americanus*. *Plant Dis.* **89**: 107.
- 山口健一, 二階堂真理子, 葉棚将大, 尾崎克巳 (2006) 冬季低温によるカンキツグリーニング病菌の樹体内増殖抑制. *園芸学会誌 (別)* **75**: 42 (講要).