

特集：果樹病原体の病原性検定法

# カンキツグリーニング病原細菌の虫媒接種法

農研機構 果樹研究所 カンキツ研究領域 <sup>いの</sup>井 <sup>うえ</sup>上 <sup>ひろ</sup>広 <sup>みつ</sup>光

## はじめに

カンキツグリーニング病は、アジアの熱帯～亜熱帯気候域のほぼ全域のほか、アメリカ大陸およびアフリカ大陸の一部で発生するカンキツ類の細菌病である。本病は、日本国内では奄美群島（奄美大島とその付属島嶼を除く）以南の南西諸島で発生し、2012年には国内分布の北限である鹿児島県喜界島での根絶が達成された（現在の北限は同県徳之島）。しかしながら、同年には米国最大のカンキツ生産地帯であるカリフォルニア州で発生が確認されるなど、世界的に見ればなお分布と被害が拡大しつつある重要病害である。

本病は、媒介昆虫ミカンキジラミが感染樹上で篩管液を吸汁する際に病原細菌（*Candidatus Liberibacter* 属）を体内に取り込んで保毒し（獲得吸汁）、次に保毒虫が健全樹上で唾液とともに細菌を吐き出すこと（接種吸汁）によって虫媒伝染すると考えられる。しかし、保毒虫が必ずしも媒介能力を持つわけではなく、虫媒伝染の詳しい仕組みには不明な点が多い。虫媒伝染に関する研究が遅れているのは、昆虫と細菌、植物の3者にまたがる研究に（心理的ハードルを感じて）取り組む人が少ないためかもしれない。だが、関連する法令などの諸条件をクリアして実験環境を整え、生きたキジラミと感染樹の取り扱いに慣れ、そして簡単な遺伝子検定技術を身につければ、虫媒接種はさほど難しくはない。

虫媒接種技術は、虫媒伝染機構の解明に必須であることはもちろんだが、それ以外にも感染樹を大量に作成する目的のほか、高度な遺伝子解析などのために病原細菌を保毒虫体内で「培養」して高濃度の病原細菌遺伝子を得たい場合など、様々な研究に応用・展開できる。本稿では、筆者がこれまでに数千本のカンキツに虫媒接種を行ってきた経験を踏まえて、通常は論文中に記述されないようなコツを交えながら、材料の準備から始まり、ミカンキジラミの増殖、保毒虫の作成と植物への接種を経て、遺伝子検定に至る一連の手技を紹介する。

Method for Insect Transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by *Diaphorina citri*. By Hiromitsu INOUE

（キーワード：ミカンキジラミ、カンキツグリーニング病、虫媒接種）

## I 材料および器具の準備

### 1 感染樹等の入手と管理設備

#### (1) 関連する法令等について

現在国内でカンキツグリーニング病が発生しているのは鹿児島県の徳之島以南と沖縄県のみであり、これらの地域から未発生地帯へ病原細菌や感染植物、ミカンキジラミを移動することは植物防疫法によって規制されている。そのため、感染植物の導入にあたっては、管轄の植物防疫所を通じて農林水産大臣名による移動禁止植物等移動許可—いわゆる「大臣許可」—を得る必要がある（国外からの導入には輸入禁止品の輸入にかかる大臣許可が必要）。移動後の保管および実験を行う場所については、移動禁止品が散逸することのないように厳重に管理できる施設が必要で、個別の施設すべてについて当局の承認が必要である。枝葉や使用した器具類はそのつど高熱滅菌処理して廃棄するなど常に万全の措置を講じて取り扱うことは言うまでもないほか、毎年度末には当局による保管数量などの現物確認を受け、管理利用状況について植物防疫所を通じて農林水産大臣あて報告しなければならない。

ミカンキジラミについては、保毒の可能性のある病害発生地帯の個体群を導入する場合は大臣許可が必要であるが、奄美大島などの病害未発生地帯の個体群であれば大臣許可を必要としない。ただし、管轄の植物防疫所に管理・保管届を提出しなければならない。筆者は奄美大島産の個体群を累代飼育して試験に使用している。

#### (2) 感染樹の作成と管理

虫媒伝染によって感染樹を作成すれば、それを次の獲得吸汁源（虫媒接種のための保毒源）として使用することができるが、初めは接ぎ木によって感染樹を作成ことになる。接ぎ木技法の詳細についてはここでは割愛するが、筆者はまず病害発生地帯から導入した穂木をラフレモン実生苗（播種から1～2年経過した樹高50～80 cm程度のもの）に数箇所腹接ぎして感染させた。ラフレモンは本病に比較的強いいため、少なくとも5年程度は衰弱や枯死することなく試験に使用できる。感染樹は日中30℃、夜間25℃に制御した自然採光型の恒温槽（ガラス温室）で栽培している。

ミカンキジラミ健全虫の維持と増殖にはゲッキツを使用する。ゲッキツは乾燥や過湿にも強く、強剪定にも耐え、新芽の誘導が容易なため、産卵基質として管理しやすい。ゲッキツの種子は培養土にそのまま播種すれば容易に発芽し、カンキツ種子のような剥皮は不要である。ゲッキツは‘シルクジャスミン’などの名称で園芸店でも販売されているが、通常は産地が不明なので、論文などに使用植物の起源を記す際に問題が生じる。海外由来のこともあるようだ。筆者は奄美大島産を使用している。

## 2 飼育に使用する器具類

### (1) 吸虫管 (図-1)

ミカンキジラミ成虫を吸気によって集めるための簡易なもので、安価に自作できる。筆者が使用するものは、長さ60 cm程度に切ったビニールチューブホース(内径6 mm×外径8 mm)と、長さ7 cm程度に切ったポリプロピレン(PP)製硬質パイプ(内径5 mm×外径7 mm)、そして汎用の容量1,000  $\mu$ lピペットチップを組合せたものである。上記部品の接合部2箇所には虫や異物の吸入を防ぐために約2 cm四方のナイロンメッシュシートを挟み込むが、これはPPパイプとピペットチップの間だけでもよい。ナイロンメッシュについては、筆者は網目が細かくて丈夫なオープニング(隙間の一辺)48  $\mu$ mのものを使用しているが、より目の粗い、通常の捕虫網に使用される網を流用しても差し支えない。ピペットチップの先端部は、そのままではキジラミが通過できないので、わずかにハサミで切り落として先端開口部の内径を1.5～2.0 mm程度にしておく。先端部の口径が大きいと、いったん吸ったキジラミが外に出てしまう恐れがあるため、吸入後は開口部をパラフィルムなどの

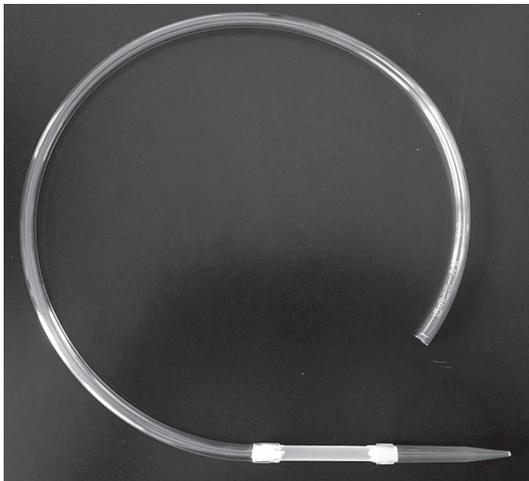


図-1 簡易吸虫管

伸縮フィルムで塞いでおくとよい。

### (2) 産卵用容器 (図-2)

ミカンキジラミ健全虫を増殖する際に、特定の新芽に集中して産卵させるために使用する。筆者が使用するものは、50 mlの透明コニカルチューブ(フタねじ込み式の遠沈管)の本体下部の円錐型部分をパイプカッターなどで切断し(これが基部側になる)、フタの中央部に熱した金属管(コルクボーラーなど)で通気穴を開けたものである。産卵させたい新芽の基部に当たる枝を、半径に切り込みを入れた円柱型スポンジの中心部に挟み込み、このスポンジをコニカルチューブ基部に差し込んで固定する。次にキジラミ成虫(雌雄合わせて10匹前後)をチューブ内に投入し、本体とフタの間にナイロンメッシュを挟んだ後にフタをねじ込んで閉める。スポンジは、ショウジョウバエ飼育用ボトルに使用するポリウレタン素材のスポンジ栓(直径34 mm、長さ45 mm)を半分の長さに切って使用している。この方法で、数日から1週間で数百個の卵を得ることができる。

### (3) ナイロンメッシュの袋 (図-3)

ゲッキツ上での健全虫の維持・増殖や、感染樹上での獲得吸汁時に、鉢植え植物の地上部を覆うのに用いる。ミカンキジラミを閉じ込めたい枝葉部分にこの袋を被せ、幹や枝で口を閉じ結束用ビニール被覆針金(商品名:ねじりっこなど)で縛る。植物に袋がけしたまま中の虫を観察・回収できるよう、一部にマジックテープで閉閉する開口部があると便利である。筆者は手製のものを使用しているが、小さめ(口径30 cm程度)の捕虫網の網や、生け花用の剣山などで小さな通気孔を多数開けたビニール袋でも代用できる。

### (4) 接種吸汁時に幼苗を覆う筒状容器 (図-4)

保毒虫を幼苗に接種する場合に用いる。三つのサイズのアクリルパイプと1枚のナイロンメッシュシートを組合せたもので、精度が要求されるパイプの切断加工はメ



図-2 50 ml 遠沈管を加工した産卵用容器



図-3 ナイロンメッシュの袋



図-4 幼苗への接種吸汁用アクリル樹脂製筒状容器

ーカーに依頼するが、組み立ては自分でできる。パイプのサイズ(高さ×外径×内径)は、本体150×65×61 mm, フタ30×70×66 mm(フタ内径は本体外径より1 mm大きい), そしてフタ上部にメッシュシートを挟んで固定する外枠10×76×70 mmである。メッシュシートは余裕を持って10 cm四方程度に切っておき、フタと外枠の間に挟み、外枠を嵌めて固定し、余った部分をカッターナイフなどで切って仕上げる。フタの外径と外枠の内径が同一サイズなので組み立てには慣れが必要だが、この部分には余裕がないほうがよい。なお、メッシュシートは、通常の捕虫網よりも目が細かく丈夫な、オープニング48 $\mu$ mのものを勧める。

## II 保毒虫の作成と虫媒接種

### 1 感染樹での獲得吸汁

ミカンキジラミは、獲得吸汁を開始した発育段階によって保毒と媒介の効率が異なる。すなわち、成虫期よりも幼虫期に病原細菌を獲得した場合のほうが、保毒率、虫体内病原細菌濃度、そして伝染効率が低い(INOUE et al., 2009; 井上, 2009; PELTZ-STELINSKI et al., 2010)。よって、伝染を高い確率で成功させたければ、幼虫期から獲得吸汁を開始することになる。とすれば、最初から感染カンキツ上に産卵させて全幼虫期間にわたって感染樹上で吸汁・発育させるのが理想的と思われるかもしれないが、筆者はこの方法では感染樹上のキジラミ個体数を制御することが難しく、歩留まりが悪い(得られる高濃度保毒虫が少ない)と感じる。産卵させた新芽近くに多くの幼虫が集中するため、吸汁と保毒にかかる条件が悪化するかもしれない。

そのため筆者は、剪定で新芽を誘導しやすいゲッキツ上で健全幼虫を増殖し、取り扱いが比較的容易な5齢(終齢)幼虫を湿らせた面相筆で1匹ずつ感染樹の葉上に移している。樹高約50 cmで葉が40枚程度の感染樹であれば、100～150匹に十分に獲得吸汁させることができる。幼虫を付けた感染樹は、枝葉部分(多くの場合は地上部すべてを)をナイロンメッシュの袋で覆う(図-3)。注意すべきこととして、感染樹上に移してから1～2日のうちに羽化する幼虫は、獲得吸汁開始時点で幼虫体の中に成虫体が完成している(ファレート成虫)と考えられるので、このような幼虫は使用しないほうがよい。成熟した5齢幼虫は背面が凸型に膨らむので、そのような幼虫を避けるか、獲得吸汁開始から1～2日で羽化した成虫を取り除けばよい。獲得吸汁開始から5日程度経って羽化した個体は十分に保毒できていると考えてよい。

幼虫期の獲得吸汁期間がわずか24時間程度であっても高濃度保毒虫を作成することはできる(INOUE et al., 2009)が、羽化後もそのまま感染樹上での吸汁を続けたほうが、より高濃度の保毒虫を多く得ることができる。とはいえ、28℃での成虫生存期間は40日前後(TSAI and LIU, 2000)のため、後の接種吸汁のことも考えて獲得吸汁は20日間程度にとどめておくのがよいだろう。獲得吸汁は25℃, 15 L:9 Dの恒温器内で行っている。

### 2 健全樹での接種吸汁

獲得吸汁を終えた成虫は吸虫管で集めた後、健全な試験植物への接種に移る。個体ごとの虫媒伝染効率を調査する場合は多数の反復試験が必要になるため、播種後1～2か月程度の幼苗(高さ10 cm, 本葉5～6枚程度)

が実験用スペースの観点からも取り扱いやすい。接種吸汁に使用する樹種は試験の目的に合わせて選定するが、保毒虫の虫媒伝染能力の有無を調査するのであれば、実生苗の生育が揃いやすく、病徴が早くかつ顕著に顕れるユズの使用を勧める。実生苗の播種・育成法については加納(1989)などを参照されたい。筆者は、種子を剥皮・消毒後、小粒鹿沼土あるいはパーミキュライト上で発芽させた後に、市販の花・野菜用培養土とピートモスを2:1の割合で混ぜた土を使用して育苗用ビニール製ポット(口径9×高さ7.6 cm)に植え替え、25℃のガラス温室で1か月程度栽培して試験に用いている。苗に接種用容器(図-4)を被せて中に保毒虫を投入し、これを4×5列のポット用トレーに並べて、25℃、15L:9Dの恒温室内で20日間接種する。接種吸汁期間が長ければ伝染成功率がより高まると考えられるが、長過ぎると途中で死亡する個体が多くなり、接種後の供試虫の回収率が下がるため、筆者は接種吸汁期間を20日間としている。単に感染樹を増やしたい場合などで、接種後に供試虫を回収して保毒状況を調査する必要がなければ、接種吸汁期間をより長くしてもよい。樹高40 cmを超えるような比較的大きな植物を使用する場合は、接種圧を高めるために数十～数百匹の保毒虫を、一部の枝葉、あるいは樹全体にナイロンメッシュ袋をかけて接種する。

### III 虫媒接種後の管理と検定

#### 1 試験植物の栽培

接種吸汁が終了した試験植物は、キジラミの付着がないことを確認してから育成のためのガラス温室に移す。虫媒接種に雌を使用した場合は試験植物上に産卵している可能性があるため、ふ化まで1週間程度置いてからマシン油や化学合成農薬を散布する(25℃での卵期間は4日前後; Tsai and Liu, 2000)。雄のつもりでも、誤って雌を使用してしまう恐れもあるので、念のために必ず薬剤処理するようにしたい。雌雄は腹部末端の交尾器形状で見分ける(図-5)。

薬剤処理が済んだ植物は、深型のビニールポット(口径105×高さ225 mm)に植え替え、感染樹栽培用の隔離ガラス温室で検定まで栽培する。

#### 2 植物の検定

感染の有無を判定するためには、植物から抽出した全核酸中の病原細菌DNAを増幅検出する遺伝子検定を行う。手法としてはPCR(+アガロースゲル電気泳動)法、リアルタイムPCR法、LAMP法が多く利用される。筆者が採用しているのは前二者で、通常は簡便で低コストのPCR法、より高感度に検出したい場合や病原細菌量



図-5 ミカンキジラミ雌雄の腹部末端形状(左前翅は除去してある)

を定量したい場合にはリアルタイムPCR法を行う。

ユズ実生苗が感染した場合、接種終了から2～3箇月も経てば、葉が反り、葉脈が浮き出て、はっきりとした黄斑が顕れ(口絵①)、PCR法などで陽性検出できる。しかし、ユズ以外のカンキツを用いた場合、あるいは樹高40 cmを超えるような大きな樹を用いた場合は、接種から1年程度待たないと確実な判定が下せないこともある。

植物の葉を採取する際は、先端付近の新しい若葉や病徴発現が進んで葉脈がコルク化しているような古い葉は避け、中位の葉を選ぶことが望ましい。すぐに抽出を行わない場合は、葉を小型のチャック付きポリ袋などに入れて-20℃以下のフリーザーで保存する。筆者は、DNAの抽出に市販キット(キアゲン社製、DNeasy Plant Mini Kit)を使用し、葉の中肋(主脈)のみを片刃カミソリ(ヒゲ剃り用替え刃)で0.5 mm程度に細かく刻み、キット付属のバッファーを入れた1.5 mlのサンプリングチューブ内でプラスチック製ペッスルを用いてすり潰している。マルチピーズショッカーなどの破砕器を使わないこの方法では植物組織を粉々にすることはできないが、バッファーは緑色の粗汁液で懸濁し、その後の精製によって検出に十分な量のDNAを得ることができる。カンキツグリーンング病原細菌(アジア型)の検出用プライマーは多数が報告されているが、筆者はやや古典的ながらOI1/OI2c(JAGOUËIX et al., 1994)を使用している。実験的環境下で感染した幼苗では全身に高濃度感染していることが予想されるうえ、多種類の細菌やウイルスに感染している可能性は低いため、このプライマーセットでも十分に特異的な検出ができる。低濃度感染植物や野外で採取したサンプルを検定する場合には、よ

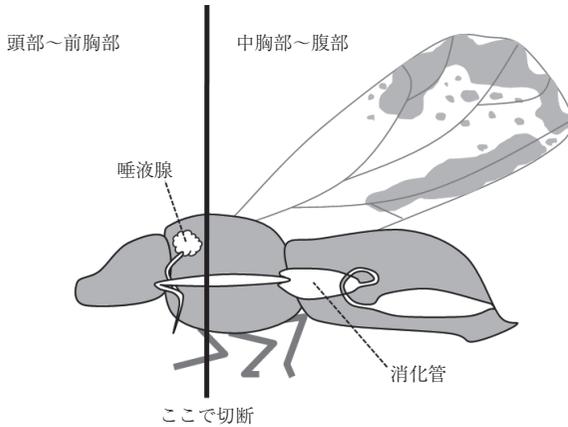


図-6 唾液腺保毒検定のためのミカンキジラミ成虫の切断位置

り高感度で特異的とされる Las606/LSS (FUJIKAWA and IWANAMI, 2012) などの最新プライマーの利用も検討されたい。PCR 温度条件は使用する酵素やプライマーに依存するためここでは具体的には紹介しないが、筆者の手法については INOUE et al. (2009) を参照いただきたい。リアルタイム PCR 法では、標的遺伝子（筆者の場合は病原細菌 *tufB* 遺伝子）に特異的なプローブを使用する TaqMan PCR 法を採用している。TaqMan PCR 法による定量的高感度検出の詳細については INOUE et al. (2009) あるいは井上 (2009) を参照いただきたい。

### 3 保毒虫の検定

植物への接種が終了した供試虫は、吸虫管で回収後、DNA 抽出まで  $-20^{\circ}\text{C}$  以下のフリーザーで保存する。99.5%エタノールに浸漬して保存してもよい。筆者は、市販キット（キアゲン社製、DNeasy Blood & Tissue Kit）と磨砕用プラスチックベッセルを使用して DNA を抽出し、TaqMan PCR 法によって虫体内の病原細菌 *tufB* 遺伝子を定量検出している。しかし、DNA 抽出効

率はサンプルごとに異なることが予想され、病原細菌遺伝子のみ絶対定量ではこの影響を強く受ける恐れがある。そのため、内部標準として同一サンプル中のミカンキジラミ核遺伝子 *ug* についても定量し、病原細菌 *tufB* 遺伝子コピー数をミカンキジラミ *ug* 遺伝子コピー数で除して病原細菌濃度としている。

保毒虫の体内では消化管などにも多量の病原細菌が存在するが、これらの細菌は虫媒伝染に関与しないため、虫体全体の病原細菌濃度からは個体の媒介能力を推し量ることはできない。はじめに述べたように、保毒虫は唾液ととともに病原細菌を吐き出すことで媒介すると考えられることから、媒介能力の高い保毒虫は唾液腺に高濃度保毒していることが強く予想される。そこで筆者は、薄刃カミソリで虫体を前後（頭部～前胸部と中胸部～腹部；図-6）に切り分け、それぞれの部位から DNA を抽出して病原細菌濃度を定量したうえで、唾液腺を含む頭部～前胸部の細菌濃度を媒介能力の指標としている。

### おわりに

紙幅の都合により十分にはノウハウを紹介しきれなかったが、本稿がこれから虫媒接種に取り組もうという方の力になり、カンキツグリーンニング病研究の進展の一助となれば幸いである。不明な点は気軽に筆者にお問い合わせいただきたい。

### 引用文献

- 1) FUJIKAWA, T. and T. IWANAMI (2012): Mol. Cel. Probes 26: 194 ~ 197.
- 2) INOUE, H. et al. (2009): Ann. Appl. Biol. 155: 29 ~ 36.
- 3) 井上広光 (2009): 植物防疫 63: 499 ~ 502.
- 4) JAGOUËX, S. et al. (1994): Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 379 ~ 386.
- 5) 加納 健 (1989): 植物防疫 43: 227 ~ 231.
- 6) PELTZ-STELINSKI, K. S. et al. (2010): J. Econ. Entomol. 103: 1531 ~ 1541.
- 7) TSAI, J. M. and Y. H. LIU (2000): J. Econ. Entomol. 93: 1721 ~ 1725.