

あたらしい 農業技術

No.546

温州萎縮病の簡易な検定法と 土壌処理対策

平成 22 年度

—静岡県経済産業部—

要 旨

1 技術、情報の内容及び特徴

- (1) 今までのウイルス検定法であるELISA法は、一部のカンキツ品では非特異反応により誤った判定をすることがあります。
- (2) より正確で簡易なウイルス検定法であるイムノクロマト法の利用を検討した結果、柔らかい葉だけでなく果実の果皮を用いることで4月から収穫期までの長期間に亘って検定が可能となりました。
- (3) 温州萎縮病に感染したカンキツ樹および圃場内でのウイルスの動態を調査し、切断された根から再発芽したカラタチはウイルスの伝染源となることが明らかとなりました。
- (4) 土壌消毒剤を用いて汚染土壌を処理すると、後作のカンキツに再感染が起こらないことが明らかとなりました。
- (5) 農薬メーカー等と協力して農薬登録を進めた結果、平成20年10月に温州萎縮病の農薬としてクロルピクリンが登録され、使用可能となりました。

2 技術、情報の適用効果

温州萎縮病の感染拡大阻止および防除対策が可能となります。

3 適用範囲

県下全域のカンキツ栽培園

4 普及上の留意点

- (1) 柔らかい葉や果実を用いたイムノクロマト法によるウイルス簡易検定は、生産現場で誰でも利用できる技術であるが、使用方法について正しい知識を普及する必要があります。
- (2) クロルピクリンによる土壌消毒は、機械が入らない傾斜地などでは重労働であり、薬剤も劇物であるため、土壌処理法についても正しい知識を持ち、適切に処理する必要があります。

目 次

はじめに	1
1 温州萎縮ウイルスの簡易検定法	2
(1) 従来 of 検定方法 (ELISA 法) の問題点	2
(2) 簡易診断キット (SDV クロマト)	3
(3) 診断方法	3
(4) 検出可能時期	4
2 温州萎縮ウイルス汚染土壌の対策	5
(1) 感染樹抜根後のウイルス残存場所	5
(2) クロルピクリンによる土壌消毒効果	6
(3) クロルピクリンによる土壌消毒方法	7
(4) クロルピクリンによる土壌処理上の注意点	8
おわりに	8
参考文献	8

はじめに

温州萎縮病は、温州萎縮ウイルス (*Satsuma dwarf virus*: SDV) によって引き起こされる病害です。ウンシュウミカンに感染すると最も病徴が激しく表れ、清見などのウンシュウミカンを親とする品種の中にも病徴が表れるものがあります。症状としては、春葉が舟型やさじ型 (図1) となり、枝の節間が短縮して叢生し (図2)、樹勢が低下し、最終的には収量の減少をもたらします。近年、原因ウイルスの遺伝子解析が進み、今まで異なるウイルス病と考えられてきたウイルスの中に、温州萎縮ウイルスと近縁のウイルスがあることが明らかになりました。これらは、病徴や伝染方法など基本的には同じですが、カンキツの種類に対する病原性が異なることが解っています (表1)。本ウイルスは、接木で伝染するので、穂木を採取する母樹が感染していると育苗した苗木にすべて感染します。また、土壌を介して伝染するため、感染樹をそのまま放置しておくと、周囲の樹に次々とウイルスが感染し、汚染が広まってしまいます。一度ほ場がウイルスに汚染されると、新たに健全なカンキツを植えても数年後には再び感染してしまうため、新品種の導入には注意が必要ですし、農地の流動化にも影響を与えてしまいます。さらに厄介なことにウイルス病は感染した後では治療する手段がないため、ウイルス感染樹の抜き取り処分や汚染土壌の消毒が重要であり、対策を怠ると感染拡大を招くこととなります。

このウイルスについてはまだ不明な点が多く、防除対策も十分ではありませんが、温州萎縮病の感染樹を簡易に正確に検定する方法やウイルス汚染土壌を処理する方法を検討しましたので紹介します。



図1 温州萎縮病の病徴
(舟型葉、さじ型葉)



図2 温州萎縮病の病徴
(枝の叢生)

表1 温州萎縮ウイルスとその近縁ウイルスの特徴

ウイルス名 (英名:略号)	病名	症状を示すカンキツの品種・系統 (発生している地域)	主な症状	伝染方法
温州萎縮ウイルス (<i>Satsuma dwarf virus</i> : SDV)	温州萎縮病	ウンシュウミカン (全国)、清見、せとか、はれひめ、西之香、天草	春梢の葉が舟型・さじ型となる枝が叢生、樹全体が萎縮、樹勢低下、果実の品質・収量が低下する	
カンキツモザイクウイルス (<i>Citrus mosaic virus</i> : CiMV)	カンキツモザイク病	ウンシュウミカン (全国)、スイートオレンジ(大分県:黄化斑紋症)	果実の着色が始まる9月・10月頃から、果面に着色しない斑紋 (トラミカン) を生じ、陥没する 果実は腰高・奇形、果皮は厚くなり、味は淡泊となる	接木
ナツカン萎縮ウイルス (<i>Natsudaikai dwarf virus</i> : NDV)	ナツカン萎縮病	ナツダイダイ (山口県)、ウンシュウミカン (清水区興津)	ナツダイダイの春枝の幼葉がまだらになり巻く ウンシュウミカンでは舟型葉となる	土壌
ネーブル斑葉モザイクウイルス (<i>Navel orange infectious mottling virus</i> : NIMV)	ネーブル斑葉モザイク病	ネーブル (和歌山県)、ウンシュウミカン	ネーブルの春葉・夏秋葉の展葉中の柔らかい葉に黄白色の退緑した斑点が出て、硬化すると葉裏に褐色の壊死斑が見られる 果実にも黄白色の斑紋 ウンシュウミカンでは舟型葉となる	
ヒュウガナツウイルス (<i>Hyuganatsu virus</i> : HV)	(なし)	ヒュウガナツ (高知県、愛媛県)	温州萎縮ウイルスと同じ症状 同じヒュウガナツで見られたコンケーブガムに類似の症状 (茶年輪症、パームクーヘン症) は別の原因と考えられている	接木 土壌?

1 温州萎縮ウイルスの簡易検定法

従来の方法に比べて簡便かつ迅速に検定できる簡易診断キット (SDV クロマト) が(独)農研機構果樹研究所等の研究グループにより開発されました。その検定精度を確認し、診断可能な時期を拡大する方法を開発しましたので紹介します。

(1) 従来検定方法 (ELISA 法) の問題点

ウイルス検定する方法として、大量処理が可能でコストが安いという理由から ELISA 法が従来より採用されてきました。しかし、カンキツの種類によっては異常な反応を示したり、陽性と診断された個体が翌年には陰性と診断されるなど、検定結果に疑問が残る場合がいくつか観察されていました。そこで、検出感度が最も高い RT-PCR 法、最近開発されたイムノクロマト法を用いて再検定を行い、検定結果を比較してみました。なお、イムノクロマト法については (2) の項目でもう少し詳しく説明します。

その結果、ELISA 法は再検定すると結果が異なることから検定結果が安定しない、RT-PCR 法やイムノクロマト法の結果と一致しない場合がいくつかみられました。また、ELISA 法による検定では、判定結果に間違いが生じやすい品種は、ザボンやユズの仲間が多いことがわかりました (表2)。

表2 ウイルス検定方法の違いによる検定結果の相違

品種 または種類	1回目		2回目				備考 柑橋の分類 (田中の分類より)	
	ELISA法		ELISA法		イムノクロマト法			RT-PCR法
	OD ₄₀₅	判定*	OD ₄₀₅	判定*	発色 (1~8)	判定**		
クレメンチン	0.42	+	1.77	+	1	-	-	ミカン区
谷川文旦	2.38	+	0.95	+	1	-	-	ザボン区
麻豆文旦	0.13	-	0.59	+	1	-	-	〃
大橋	1.78	+	1.54	+	1	-	-	ダイダイ区
舟床蜜柑	0.68	+	2.87	+	1	-	-	〃
イーチャンエンシス	1.57	+	3.44	+	1	-	-	ユズ区
イーチャンレモン	1.62	+	4.07	+	1	-	-	〃
多田錦	0.38	+	0.53	+	1	-	-	〃
花柚	1.17	+	0.16	-	1	-	-	〃
スタチ	0.96	+	0.18	-	1	-	-	〃
サムソンタンゼロ	0.38	+	0.14	-	1	-	-	ダイダイ区×ミカン区

* 60分後に吸光度(波長405nm)を測定し、陰性試料(OD₄₀₅ = 0.14~0.16)の2倍以上を+と判定

** 15分後に、色調表により、目視で発色程度を1~8の8段階で識別し、4. 5以上を+と判定

(2) 簡易診断キット (SDV クロマト)

本キットは、インフルエンザウイルスなどのヒトの臨床診断に用いられているイムノクロマト法という手法を用いた診断キットです(図3)。試薬や道具はすべてキットに付属しているので、特別な機器を必要とせず、ほ場現場での診断が可能で、測定時間はわずか15分で診断できるという利点を持っています。

(3) 診断方法

診断キットに付属の容器に試料0.1gと摩砕液0.5mlを入れ(図4)、容器の外から手で30回揉んで試料をつぶします(図5)。判定用のテストプレートに摩砕容器から3滴滴下して15分後に判定し、ラインが2本出ると陽性です(図6)。ほ場で簡単に診断でき、すぐに結果が分かります。



図3 簡易診断キット



図4 検定試料



図5 試料の摩砕
(容器を手で30回揉む)

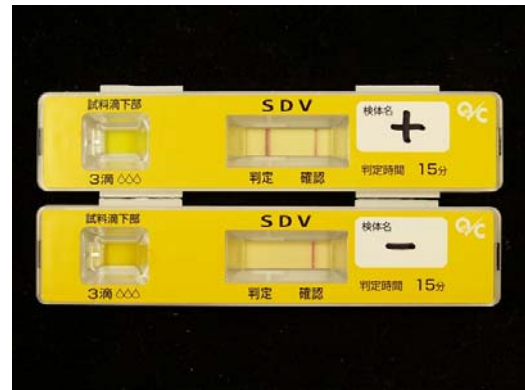


図6 判定（上段が陽性）

（4）検定可能時期

RT-PCR 法は検出感度が高いため、硬化した葉でも検定できますが、ELISA 法やイムノクマト法では、診断できる試料は春の新梢のみに限定されていました。温州萎縮病の症状は春の新梢が展葉するときに表れるため、新梢硬化後に異常に気づいても翌年まで検定ができませんでした。そこで、簡易診断キットを利用して、春以外の時期の検定について検討を行いました。

最初に温州萎縮病にかかったウンシュウミカンを用いて部位ごとのウイルス濃度を測定しました。ウイルス濃度は従来の方で試料として用いられている春の新梢で最も高く、次いで果実の果皮、枝の樹皮、硬くなった春葉、根の順であることが分かりました。このことから、新梢の次にウイルス濃度が高い幼果の果皮等を使って検定が可能かどうかを検討しました。

その結果、簡易診断キットを用いると春の新梢だけでなく、7～8月の硬くなる前の葉や6月～収穫期の果実の果皮でも検定可能であることがわかりました。8、9月の果実の果皮を用いると検定精度がやや低下するものの、新梢の時期から収穫期までの期間であればいつでも検定が可能となりました(図7)。ただし、RT-PCR 法に比べると検出感度は数100倍は低いと考えられます。従って、感染初期などのウイルス濃度の低い期間には簡易キットでは検出できないことがあります。近くに感染個体がある場合には、一度だけの検定ではなく翌年も検定を続ける必要があります。

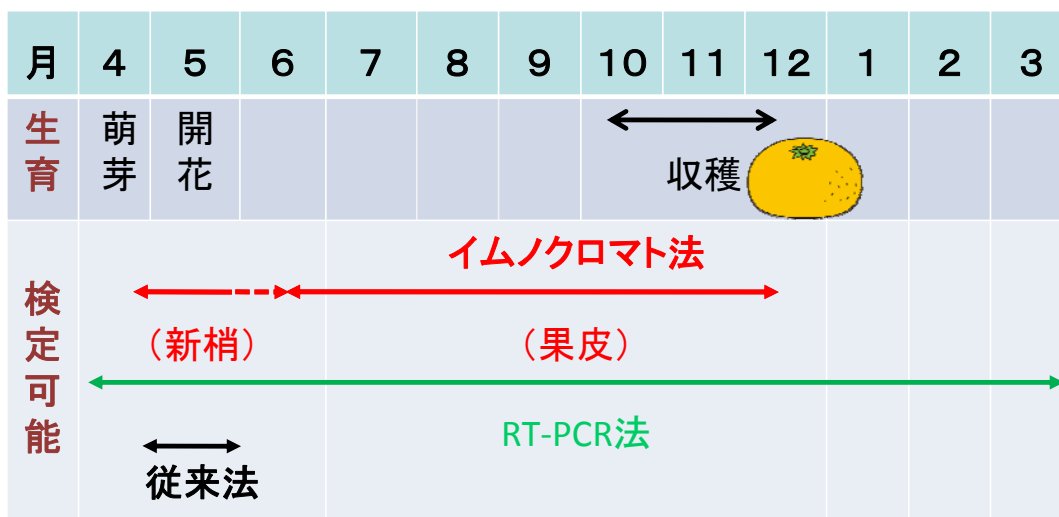


図7 カンキツの生育時期とウイルス検定の可能時期

2 温州萎縮ウイルス汚染土壌の対策

(1) 感染樹抜根後のウイルス残存場所

温州萎縮ウイルスに感染した樹について、機械で根を引き抜いた（抜根）4 ヶ月後に、跡地の土中に埋まっている根と周囲に生えていたカラタチの葉と根を採取し、ウイルス検定を行いました（図8）。その結果、土中に埋まっている根からは SDV は検出されませんでした。周囲に生えていたカラタチからは SDV が検出されました。これらは抜根した樹の残存した根から再発芽したカラタチです。根が腐ればウイルスは消滅しますが、根が生きていればウイルスは生存できることから、再発芽したカラタチはウイルスの伝染源となることがわかりました。このことから、抜根後にカラタチが再発芽しないように除草剤等で根を枯らす必要があることがわかりました。

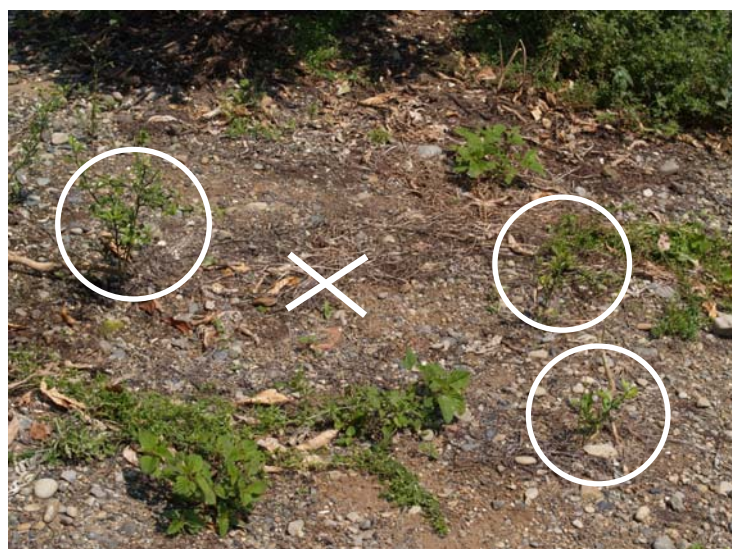


図8 抜根後に生えてくるカラタチ

×印：感染樹の植栽跡、○印：再発芽したカラタチ

(2) クロルピクリンによる土壤消毒効果

果樹研究センターでは温州萎縮ウイルス感染後の土壤処理方法の検討と抵抗性台木を選抜する試験を行っており、その試験よりウイルス汚染土壤の無毒化に関する知見が得られましたので紹介します。

試験した台木は、わい性で一般的によく使われるが温州萎縮ウイルスに感染しやすいカラタチ、樹勢が強いが温州萎縮ウイルスに感染しても症状が現れにくいナツダイダイ、両者の特性を併せ持つと予想されるナツダイダイとカラタチの交雑個体を使用しました。

土壤処理方法では、温州萎縮ウイルスに汚染された土壤をクロルピクリンにより土壤消毒した区と感染樹を除草剤で処理して枯らした区、感染樹をそのまま残した対照区の3区を設定しました。感染樹または感染樹跡を中心におき、それを取り囲むように1mの距離に上記の3種類の台木を交互に植えて、平成9年からウイルス感染の有無を毎年調査しました(図9)。



図9 ウイルス感染試験の模式図

カラタチへの感染の推移で土壤処理方法を比較すると、感染樹を残した対照区では定植3年後に最初の感染が確認され、その後増加し、定植9年後には100%の個体が感染しました。除草剤処理区では定植7年後に初めて感染個体が確認されましたが、その後の増加は確認されませんでした。土壤消毒区では定植後の11年間に感染は全く確認されませんでした(図10)。

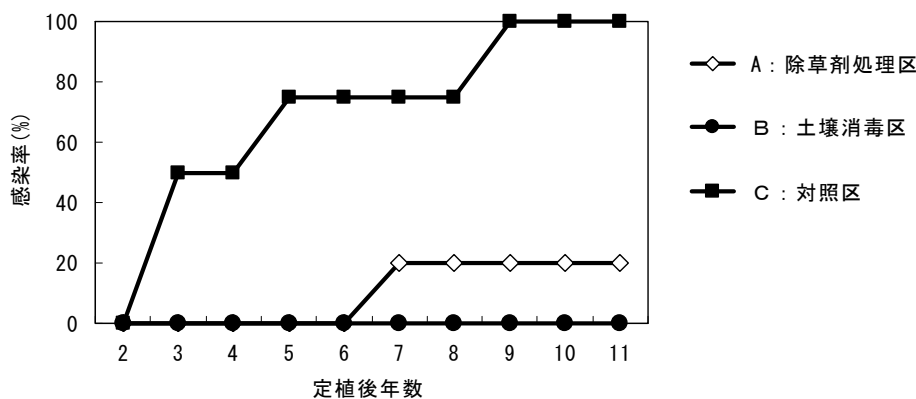


図10 感染樹および土壤消毒の処理方法と温州萎縮病の感染推移

続いて、各台木系統におけるウイルス感染の推移を調査したところ、対照区ではカラタチの感染が最も高く、定植3年後には50%となり、9年目には100%の個体が感染しました。また、交雑個体は

8年後に1個体が感染しましたが、その後の感染はなく、ナツダイダイでは全く感染が確認されませんでした。除草剤処理区ではカラタチで感染が確認されましたが、交雑個体やナツダイダイでは感染が確認されませんでした。土壌消毒処理区ではいずれも感染は確認されませんでした(図11)。

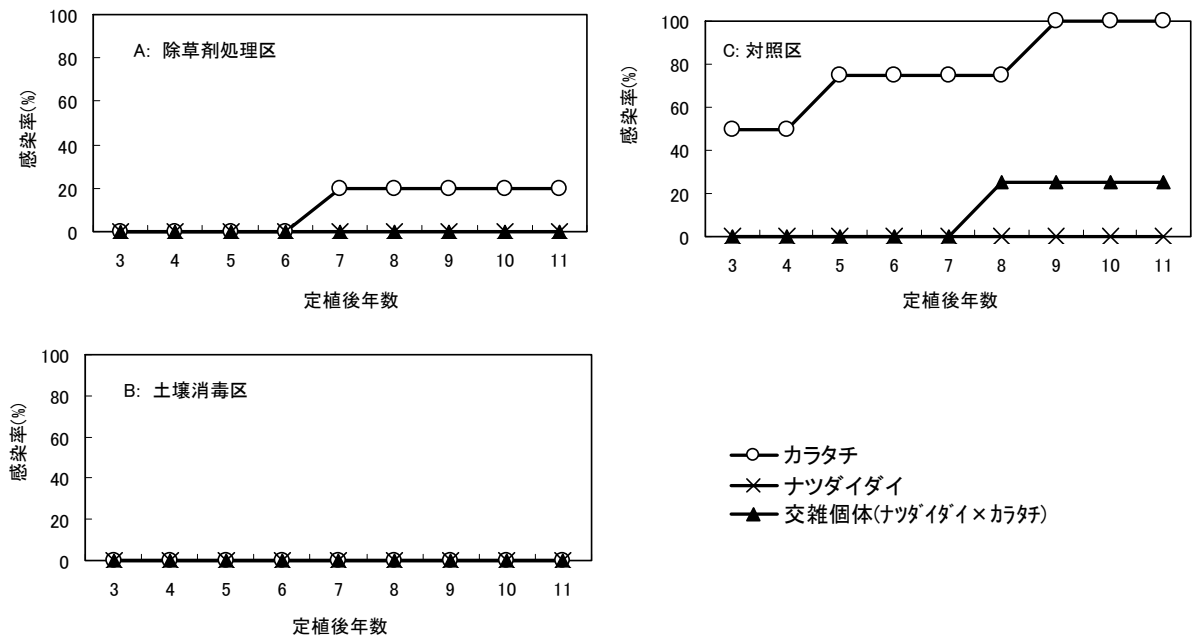


図11 台木品種別の温州萎縮病の感染推移

以上の調査から、クロルピクリンは温州萎縮病に対して有効な土壌消毒剤であることが確認されたため、農薬メーカー等と協力して農薬登録を進めました。その結果、平成20年10月、クロルピクリンくん蒸剤(99.5%クロールピクリン剤及び錠剤)は温州萎縮病に対して最初の有効な薬剤として「かんきつ(苗木)」に農薬登録され、使用が可能となりました。

(3) クロルピクリンによる土壌消毒方法

土壌消毒は適切な方法で行われないと十分な効果は得られません。以下に消毒方法を記しますので、作業する際の参考としてください。なお、使用方法等は平成22年6月現在の農薬登録に基づいて記載しましたので、実際に使用する際には登録内容を確認して使用してください。

- ア 温度が低いとガス化が悪く十分な効果が得られないこともあるので、原則として地温7℃以上の時に使用する。
- イ 前作の残渣を取り除いた後、深く耕し、細かく砕いて整地します。
- ウ 土の表面はやや乾いた程度で、土を握って放したあと、2～3個に割れる程度の水分量の時に散布します。
- エ 消石灰等アルカリ肥料は薬害を生じる可能性があるため、ガス抜き後に施用する。元肥は2割程度減肥しておきます。
- オ クロルピクリンは容易に気化して催涙性のあるガスを発生し、皮膚に対して強い刺激があります。そのため、散布の際は保護手袋、保護衣、保護眼鏡、保護マスクを必ず着用します。特

に 99.5%クロルピクリンは開封直後から気化しますので、専用の処理器具や防毒マスクを使用する必要があります。

カ 99.5%クロルピクリン剤は 1 穴当たり 5 m l (40 L/10 a) を、錠剤は m² 当たり 20 錠をばら撒き散布します。

キ 散布後直ちに覆土し、ポリエチレン、ビニール等で土壌表面を被覆します。

ク 処理後、20 日以上経過してから被覆の除去し、中耕などで十分ガス抜きを行い、土壌中からクロルピクリンの臭気がしなくなってから定植する。

(4) クロルピクリンによる土壌処理上の注意点

クロルピクリンは刺激性のあるガスを発生するため、取り扱いには十分な注意が必要です。以下の項目を参考にして適正に処理してください。

ア クロルピクリンは容易に気化して催涙性のあるガスを発生し、皮膚に対して強い刺激があります。そのため、散布の際は保護手袋、保護衣、保護眼鏡、保護マスクを必ず着用します。

イ 錠剤を使用する際には、

- ・外包装の開封は、風通しの良いところで、風下に向かい、顔から離して行う。
- ・内包装フィルムは破らないで使用する。
- ・内包装に使用されている袋は、ガス不透過性、水溶性のもので、処理後土壌水分により溶解し、クロルピクリンガスの放出が始まるため、使用前に内包装フィルムに水分が付着しないように注意する。
- ・開封した錠剤は乾燥した容器に移して使用し、全量を使い切る。

ウ 土壌表面の被覆をしない場合は十分な効果が期待できないだけでなく、クロルピクリンガスが急速に気化することにより周辺農作物に被害を及ぼす恐れがあるので、処理後直ちに土壌表面を被覆する。

おわりに

温州萎縮ウイルスをはじめ、果樹ではウイルスが感染してから発病するまでは多くの年数がかかります。そのため、ウイルス検定を行って感染樹の早期に発見に努めることは非常に重要です。しかし、感染樹を発見しても汚染土壌の処理は重労働であることから、十分な対策がとれないのが現状です。今後は簡易な土壌消毒法の開発やその効果の確認方法を検討するとともに、農薬に依存した防除対策だけでなく、抵抗性台木の育成も重要と考えられます。

参考文献

- 1) 草野成夫, 2007, 温州萎縮ウイルス簡易診断キットの開発. 今月の農業 農薬・資材・技術, 51(7), 96-101.
- 2) 影山智津子, 2009. 温州萎縮ウイルス (SDV) 汚染土壌における土壌消毒の効果と台木の耐病性. 植物防疫, 63, 18-20.

農林技術研究所果樹研究センター 上席研究員 加藤光弘
農林技術研究所植物保護科 科長 影山智津子

上席研究員	伏見典晃
農林業局農山村共生課 班長	市川 健
中部農林事務所 主査	増井弘子
東部農林事務所 主査	神尾章子
元農業試験場 場長	芹澤拙夫
元農業試験場 病虫害部長	太田光輝