

リンゴさび果病の病原ウィロイド発見と 伝染防止

小金沢 碩 城

(果樹試験場盛岡支場)

Discovery of Causal Viroid of Apple Scar Skin Disease
and Control of Its Spread

Hiroki KOGANEZAWA

(Morioka Branch, Fruit Tree Research Station)

1 はじめに

我が国におけるリンゴの生産量は年間100万tに達して、生産過剰ぎみになっている。その対策として高接ぎによる新品種への更新が行われつつあるが、それに伴うウイルス病の拡散が懸念されている。果樹がウイルスに感染すると生産量が低下し、果実品質が低下する。このウイルスの被害はウイルスフリー樹を利用することにより回避できる。ウイルスフリー苗作出のためには熱処理や茎頂培養あるいは両者を併用する方法が実用化されている。しかし、これらの手法で行ってもウイルスフリー化は完全でなく、得られた苗がウイルスフリーであるか否かを検定する必要がある。

現在リンゴでは表—1に示すような検定法が定められている。リンゴのウイルス病は8種類あるが、このうち4種の検定法は候補樹について病徴を観察するにとどまっている。これは病原ウイルスがまだ不明であることと、果実にのみ病徴を発現するために実用的な検定法がない

ためである。このため果樹試験場盛岡支場ではこれらのウイルス病の病原ウイルスを明らかにし、実用的な検定法を開発する試験を行ってきた。その結果、リンゴさび果病の病原はウイルスではなく、ウィロイドであることを明らかにした。また同時にウィロイドとしての性質を利用したリンゴさび果病の検定法を開発した。

2 来歴及び発生状況

リンゴさび果病は昭和9年当時の満州農事試験場に奉職していた大塚により、奉天で開催された第二回満州農学会で国光の新病害として世界で初めて発表された。氏は接木により伝染することを認め、満州リンゴさび果病と命名した。氏によれば中国ではそれ以前から発生していたとのことである。

日本では昭和25年ころ長野県に発生が確認されたのが最初で、以後満州の二字をとりリンゴさび果病の名で呼ばれるようになった。この病名から葉害や気象的要因によって起こる果面の

表一 1 リンゴのウイルスフリー母樹選定に際してのウイルス検定法

ウ イ ル ス 病	指 標 植 物	観 察 期 間 そ の 他
リンゴクロロティック リーフスポット	マルス・シャイデケリー	温室では3か月，ほ場では1シーズン，エライザ検定も合せて行う
リンゴステムグルーピング	ミツバカイドウMO-65 バージニアクラブK-6	} 2シーズン エライザ検定も合せて行う
リンゴステムピッチング	ミツバカイドウMO-65 マルス・シャイデケリー	} 温室では3か月 ほ場では1シーズン
リンゴプラチカルパ スケーリーバーク	マルス・プラチカルパ	2シーズン
リンゴモザイク病 輪状さび果病 さび果病（斑入り果病） 奇形果病		} 候補樹について病徴を観察する

さびと混合してはならない。これらもさび果と呼ばれるが，さび果病とは原因も対策も異なる。

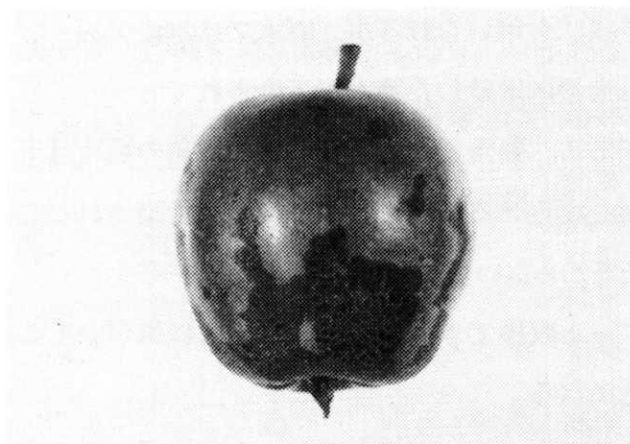
このさび果病とは別に岩手県でスターキング・デリシャスの果実に斑入りの症状が現われる病気が見つかり，リンゴ斑入り果病と命名されたが，その後の接木接種試験の結果さび果病と斑入り果病は同じ病原によって起こることが分かった。

本病は青森県，秋田県，宮城県，山形県，福島県などにも発生が認められ，リンゴ栽培地帯のほとんどで発生している。昭和59年の青森県りんご試験場及び昭和56年の岩手県園芸試験場での調査ではそれぞれの県内9か所で発生が確認されている。罹病した樹は発見され次第伐採されるため被害としては目立たない。

3 病 徴

本病の病徴はリンゴの果実にのみ現れ，葉や

枝は健全と差がないのが普通である。果実での病徴は品種によって異なる。主に果面にさびが生じるものと斑入りの症状が現れるものとがある。現在までに知られている主な品種の病徴を表一2に示した。さびの病徴の典型的な場合はがくあ部から果こう部にかけて果面に五条のさび状コルク層が放射状に形成される。この五条という数字は種子の入っている心室が五個あるのに対応している。国光などの品種では6月中旬ころ，水浸状の斑紋が生じ，この部分に後にさびや亀裂が生じる。印度ではがくあ部周辺全体にさびが生じる（図一1）。またスターキング・デリシャスなどの赤いリンゴでは果面全体に淡紅色又は黄色の退色斑紋が生じる。これを斑入り果病と呼ぶ。この斑入り症状はがくあ部の近くに多く，9月以降果実が着色してから初めて肉眼で観察できる。ゴールデン・デリシャスや陸奥などの黄色系品種では通常無病徴感染する



図一 1 リンゴさび果病の病徴(品種:印度)

が、赤く着色するような栽培条件下では斑入りの症状が現れる。また王林では緑色の濃淡が現れる。さび果病にかかると果実の外観が損なわれるだけでなく果実が小さくなり、また芳香も少なくなりかつ味も落ちる。

果実での病徴は感染してからの年数や気象条件、病原の系統などによって左右される。スター

キング・デリシャスでは感染してから最初に現れる病徴は上に述べたように斑入りであるが、年数を重ねるに従いさびの割合が多くなる。また異常気象の年は亀裂ができる品種ではその度合いが高まる。病原の系統では表一 1 の軽度感受性品種は弱い系統に感染しても病徴を発現しない。またふじに対してはさびを生ずる系統としない系統がある。

いったん発病すると治療する術はなく、発病した果実の商品価値は全くない。したがって発病樹は伐採し、改植しなければならない。

果実での病徴は以上のようなものであるが、葉にも病徴が現れるという報告がある。青木・大庭は罹病国光穂木をズミ台木に切り接ぎした結果、上部の葉が葉の裏側に湾曲するのを観察した。この湾曲葉は罹病している国光の新梢には認め

表一 2 リンゴさび果病の病徴発現における品種間差異

品 種	病 徴	品 種	病 徴
耐病性品種		高度感受性品種	
ゴールデン・デリシャス	斑入り	デ リ シ ャ ス	斑入り, さび
岩 木	—	白 竜	さ び
陸 奥	斑入り	鶏 冠	斑入り, さび
鶴 の 卵	—	国 光	さび, 裂果
		恵	さび, 裂果
		スターキング・デリシャス	斑入り, さび
軽度感受性品種		クラブリンゴ及び野生種	
旭 祝	斑入り	檳 子	斑入り
紅 玉	斑入り	紅 海 裳	斑入り
王 林	斑入り	N Y 11894	斑入り
	緑 斑	紫 太 平	さ び
中度感受性品種		シュガークラブ	斑入り
ふ じ	斑入り, さび	ロビンクラブ	斑入り
つ、 が る	斑入り	ヴァージニアクラブ	さ び
ジョナゴールド	さ び	花紅 (<i>Malus asiatica</i>)	斑入り
金 星	さ び	山定子 (<i>M. baccata</i>)	斑入り, さび
印 度	さ び		
レット・ゴールド	斑入り		

ることはできなかった。後沢らは5品種の罹病穂木をマルバ台に接木し、湾曲葉の発生を調査したが、国光苗25本中3本に認めたのみであったとし湾曲葉をもって保毒の有無の判定を行うことは問題があると述べた。一方劉らはこの湾曲葉は国光のほか鶏冠等にも発生し、成木にも認められると述べて、保毒の有無を検定する際に、専ら国光を用いて湾曲葉を調査しているのである。筆者はまだこの湾曲葉を見たことがなく、類似の葉の症状は遺伝的な変異で生じることも知られているので劉らの論文を読むまでは青木らの湾曲葉は何かの間違いと考えていた。劉らは台木として山定子 (*Malus baccata*) を用いており、青木らの用いたズミは満州ズミ (*M. baccata*) のことである。もし湾曲葉がさび果病の病徴であるならば検定は簡単になるので今後台木との関連や発病に關与する環境要因等を調査する必要があると思われる。

リンゴ以外ではナシに潜在感染することが知られている。ナシとリンゴの混植園やナシ園に隣接しているリンゴ樹では非常に多くさび果病が発生しているという調査がある。ナシではヨウナシ、チュウゴクナシ、ワナシを問わず感染しても無病徴である。

4 伝 染

本病は接木で伝染し、高接ぎや樹皮の埋め込みなどの方法により接種すると、1、2年後に発病する。病徴は初め接種部位周辺にのみ現れ、3年ほどかかって樹全体に広がる。高接ぎする際に中間台が保毒していると、高接ぎした穂木は感染する。高接ぎしてから果実がなるまで数年かかるので、発病に気がつくのは高接ぎしてから3～5年後のことが多い。高接ぎは穂木の

増殖にも用いられるが、原木では無毒であっても大量に増殖した穂木が汚染されてしまうこともある。通常このような穂木の増殖の場合は果実を成らせることをしないので、汚染されたことを知らないまま保毒穂木を用いて一挙更新し、やっと収穫できる年になって発病に気がつくことになる。

他のウィロイド病と同じように虫媒伝染は認められていない。また汁液伝染の報告もないが、後で述べるようにフェノール抽出したRNAで切り付け接種すると感染するので、せん定鋏や接木ナイフで移る可能性はある。

リンゴの根は互いに接触すると融合するので、隣接した樹では伝染することがある。後沢らは保毒苗と健全苗の根をからませて植付ければ、感染すると報告している。根に直接接木した場合も容易に感染させることができる。ナシからリンゴに伝染するのも同じく根の接触伝染と考えられる。

5 病原がウィロイドである証拠

筆者らはリンゴさび果病に罹病した果実の電子顕微鏡観察や各種の草本植物への接種試験を行ったが結果はすべて陰性であった。そこで本病がウィロイド病であるかどうかを調べる試験を行った。

ウィロイドは最も小さい病原体で、その本体は1本鎖のRNAである。リンゴさび果病の病原体がウィロイドであることは次のような事実から判明した。

まず、罹病果実より核酸に抽出し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動による解析を行った。その結果、健全対照や他のウイルス病感染樹に認められない2種の低分子RNAが特異的に検

表-3 各種リンゴ果実からのウィロイド様核酸の検出

樹番号	供試品種	原奇主の徴	幼熟の別	RNA1	RNA2
1	インド	さび果	幼果 熟果	+	+
2	インド	斑入り果	幼果 熟果	+	+
3	インド	斑入り果	熟果	+	-
4	恵	さび果	熟果	+	-
5	スターキング・デリシヤス	斑入り果	熟果	+	-
6	インド	健全	幼果 熟果	-	-
7	恵	健全	熟果	-	-
8	スターキング・デリシヤス	健全	熟果	-	-
9	ゴールデン・デリシヤス	健全	熟果	-	-
10	インド	奇形果	幼果 熟果	-	-
11	ゴールデン・デリシヤス	奇形果	熟果	-	-

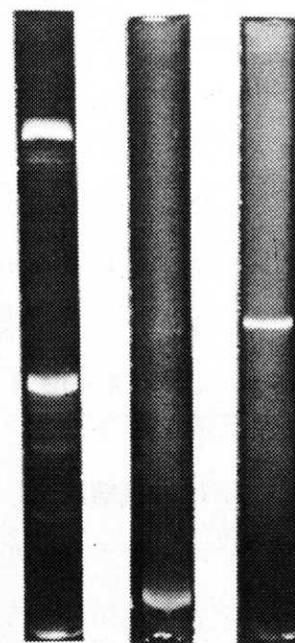


図-2 精製した低分子RNAの変性条件下での電気泳動像

注. 左: RNA 1
中: RNA 2
右: RNA 2(泳動前に100℃, 2分熱処理)

出された(表-3)。この2種のRNAを電気泳動度の早いものから順にASSARNA 1, ASSARNA 2(以下それぞれRNA 1, RNA 2と略す)と命名した。両RNA共に落花直後の果実を除いては収穫するまで検出でき、また無病徴感染している果実からも検出できる。果実以外では樹皮に多く含まれている。葉ではRNA 2は検出できるがRNA 1の量は非常に少ない。葉や樹皮から検出する場合は同じ位置に泳動される宿主RNAが存在するために、電気泳動を2回行う必要があった。これらの2種のRNAはウィロイドで通常用いられる方法を組み合わせれば精製することができる。まずフェノール抽出を行った後、2-メソキシエタノールによる多糖類の除去、次いでCF-11セルロースを担体としたカラムクロマトグラフィー、最

後にポリアクリルアミドゲル電気泳動を最初未変性、次いで変性条件で行って精製する。抽出材料としては果実が最も良い。果実には来雑する宿主核酸も少なく、また容易に多量の材料を得ることができる。しかしRNAの収量は少なく、果実1kgより最高で15μg, 通常は5μg程度しかRNA 1を得ることができない。

2種のRNAのうちRNA 1は既知のウィロイドと同じ性質をもっている。すなわち、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で既知ウィロイドとほぼ同じ位置に泳動され、低濃度ゲルでは分子量は大きく、高濃度ゲルでは小さく見積もられるというウィロイドと同じ性質を示した。また尿素を含む変性条件下では2本のバンドに分かれた(図-2)。他のウィロイドに関する報告から遅く泳動されるバンドは環状、速く泳動さ

表-4 リンゴさび果病罹病樹に見出されるRNA1の戻し接種試験

試料	接種方法	接種日	59年	60年
全RNA	カーボランダム法	57. 4. 22	1 / 13	1 / 13
RNA 1 (1回泳動)	切り付け法	58. 7. 4	8 / 14	11 / 15
RNA 1 (2回泳動)	切り付け法	59. 9. 28		2 / 12
RNA 2 (2回泳動)	切り付け法	59. 9. 28		0 / 10
RNA 1 + 2 (2回泳動)	せん定痕滴下法	59. 6. 22		0 / 13

れるバンドは線状構造をしていると思われる。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製した試料をリンゴ実生苗にカミソリの刃で切り付け接種を行った結果、感染し増殖することが分かった(表-4)。リンゴ実生はウイルスフリーなので、RNA 1はウイロイドと同じように自立的に増殖できるということになる。

RNA 1に感染した実生からNY11894というクラブリンゴに接木接種したところ斑入り果の症状が現れた。

一方、RNA 2の性質はRNA 1とかなり異なる。RNA 2は高塩濃度でRNaseに抵抗性であり、2本鎖RNAと思われた。CF-11セルロースクロマトグラフィーやヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーにおける挙動も2本鎖RNAのそれと一致した。更に尿素による変性条件下でのゲル電気泳動で異常に早く泳動された。このことからRNA 2は線状2本鎖と推定された。また、熱処理をして完全に変性させ、1本鎖の状態で泳動させた場合、RNA 1より分子量は大きかった(図-2)。最初RNA 2はRNA 1の複製型(RF)と考えたが、既知のウイロイドでRNA 2のように比較的多量のRNAが検出されることはない。RNA 2の機能については現在不明である。

6 さび果病の検定法

リンゴさび果病の主な伝染方法は人間の手による接木である。感染は古い樹に新品種を高接ぎする際に起こる。したがって、本病の最良な防除方法は高接ぎする際に、穂木並びに高接ぎされる中間台が本病に感染していないことを確認しておくことである。

ウイロイド病の診断法としては検定植物に接種する生物検定法、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により直接ウイロイドを検出する方法等がある。

さび果病を生物検定する場合には感受性品種に接木接種することになるが、この方法は本病の潜伏期間が長いこと、果実のみに病徴が発現するために検定植物の育成に時間がかかり、かつまた広い面積を必要とすることなどから実用的でない。前述した国光苗の湾曲葉を利用する方法について劉らの報告によれば4月に切接ぎすれば7月には病徴が発現することであり、検定に要する期間は短くなり、また検定用の穂木を用意するのも簡単である。他の方法としては、クラブリンゴの利用が考えられている。クラブリンゴのNY11894は接木した穂木に果実を成らせることは容易であり、感染すれば斑入りの症状が現れる(表-5)。

表-5 クラブリンゴへのさび果病の接種
(柳瀬, 1986)

クラブリン ゴの種 類	接 種 源			
	P128	P125	P-112	P127
NY-11894	F	F, S	F	0
NY-11902	0	0	—	—

注. 1984年に接種, 1985年に調査
F: 斑入り, S: さび, O: 無病徴
—: 未結実

現在考えられる実用的な検定方法にポリアクリルアミドゲル電気泳動がある。樹皮よりフェノール抽出して, 塩化マンガン処理後, エタノール沈殿を行って電気泳動を行う。具体的な手法はつぎのとおりであり, 実際の検定例を図-3に示した。

リンゴさび果病の検定法

(1) 0.5 g の樹皮を鋏で切り刻み, 2.5ml の抽出緩衝液 (0.1 M Tris, 0.5 M NaCl, 0.5 % SDS, 0.5 % 2-メルカプトエタノール, pH 8.5), 1.5ml の水飽和フェノール (0.1 % 8-ヒドロキシキノリンを含む) と1.5ml のクロロホルムを加え, ポリトロンホモジナイザーで15,000rpm, 1 分間磨砕する。

(2) 8,000rpm, 10分間遠心し, 水層を2 ml 取る。

(3) 0.5ml の0.125 M 塩化マンガンを加え, 氷冷下30分間静置する。

(4) 12,000rpm, 10分間遠心して, 上清を取る。

(5) 上清に0.5ml の0.1 M EDTA と3.0 ml の冷エタノールを加えて, -20°C で1 時間静置する。

(6) 12,000rpm, 10分間遠心し, 沈殿させる。

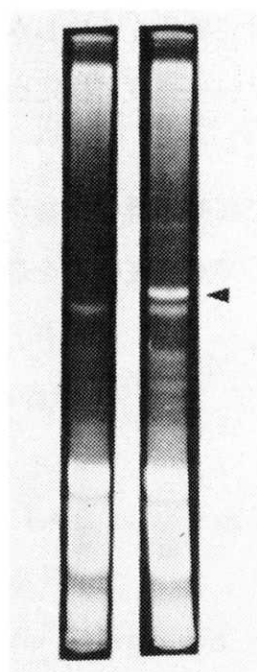


図-3 リンゴさび果病の検定例

注. 左: 健全
右: 感染

(7) 沈殿に1 ml の70 % 冷エタノール (0.25 M 酢酸ナトリウムを含む) を加え, 良く振った後, 12,000rpm, 5 分間遠心し, 真空下, 乾燥させる。

(8) 沈殿を50 μl の溶液 (0.005 % BPB, 5 % しょ糖液) に溶解させレーニングの緩衝液を用い, 5 % ゲル電気泳動を2 時間行う。

(9) ゲルをエチジウムブロミドで15分間染色し, ついで15分間脱色させた後, 写真撮影する。

以上述べた検定済みの無病穂木及び台木を利用し, 発病した樹は伐採し, その根は完全に除去してから改植すれば, 本病はほとんど防除できると思われる。これ以外では作業器具の消毒や隣接樹からの接触伝染の防止なども考えられる。これは一部の枝のみに病徴が認められまだ生産を続けたい場合やナシ樹と隣接している場合のみ必要と思われる。

7 今後の問題点

リンゴさび果病は以上述べたようにポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて, 無病であることを確認した樹を用いて栽培すれば防除で

きる。しかし電気泳動では12検体くらいしか検定出来ない。今後多数の試料を一度に検定出来る方法を開発しなければならない。

さび果病のほかにもまだ病原未詳の病害がいくつかある。これらに対しても現在研究を進め

ているが、結果が得られるまでまだ時間がかかる。幸いにもこれらの病害の病原は熱処理により不活化されやすい。新たな発生を防ぐためには熱処理してウイルスフリーになった苗を普及させることが重要である。