

## 各種カンキツから見出されたホップ矮化ウイルスの変異株

草野成夫・井樋昭宏 (福岡県農業総合試験場果樹苗木分場)

Nario Kusano and Akihiro Ibi :  
Variants of Hop Stunt Viroid isolated from Citrus Varieties

カンキツから分離されるホップ矮化ウイルス (HSVd) は、従来、塩基配列や塩基数の違いにより CVd-Ⅱ a, CVd-Ⅱ b, CVd-Ⅱ c と分類されていたが、最近、HSVd で統一されつつある。従来、HSVd は、カンキツには病徴を示さないとされていたが、最近、その他のカンキツウイルスと複合して感染することにより、カンキツ台木であるカラタチに、カンキツエクソコーティスウイルスによる剥皮症状と類似した症状を起したり、カンキツ樹体の樹容積拡大阻害や収量低下など悪影響を及ぼすことが明らかとなっている<sup>1,2</sup>。

今回、各種カンキツから検出した HSVd についてシーケンスを行い塩基配列を解読した結果、未報告の変異株を確認したので報告する。

## 1. 材料および方法

果樹苗木分場保存のカンキツおよび各地から採集したカンキツ240個体について、RNA 抽出試薬 ISOGEN (日本ジーン) を用い、新梢 0.05g から全核酸を抽出して RT-PCR に供試した。RT には M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) を、PCR には Premix Taq (宝酒造) を用いた。RT-PCR の温度条件は、草野・下村の方法を用いた<sup>3</sup>。上記サンプルの保毒の有無は、HSVd の中央保存領域に位置するプライマーセットによりスクリーニングを行った。塩基配列の決定は、HSVd 保毒のサンプルについて3種類のプライマーセットを用い、RT-PCR により増幅した PCR 産物をダイレクトシーケンスにより行った。なお、混合感染をしてダイレクトシーケンスができないサンプルについては、クローニングを行った。

## 2. 結果および考察

カンキツ240個体中24個体で HSVd が検出された。シーケンスの結果、既報の塩基数303nt<sup>1</sup> (未報告:

Palacio-Bielsa *et al.*, 2001) のものが7個体であった。既報の CVd-Ⅱ a<sup>2</sup> に相当する塩基数302nt のウイルス (未報告: Peyru *et al.*, 2001; Pagliano *et al.*, 2001) は約半数であり、その内、2塩基で置換が起こり未知のものが2個体あった。また、ホップタイプに属する塩基数295~299nt のウイルスを保毒しているものが3個体あり、重複して保毒していたものが2個体あった。その中には、塩基数295nt である既報の CVd-Ⅱ c<sup>3</sup> (未報告: citrus yellow corky vein viroid A; Roy, A. and Ramachandran, P., 2002) や塩基数296nt である AD1<sup>2</sup> と同じものもみいだされた。なお、プライマーとして作成した HSVd の中央保存領域部分での塩基の置換や欠落等の変異は、全てのサンプルでみいだされなかった。供試したカンキツの中で5個体が未報告のウイルスを保毒しており、各種カンキツが保毒している HSVd は、複数の変異株が存在することが明らかとなった。

今後、この変異株の感染性クローンを作り、カラタチ台木やカンキツ樹体の果実、生育に及ぼす影響について調査する予定である。

## 引用文献

- 1) HSU, Y.H., CHEN, W. and OWENS, R.A. *Virus Genes* 9, 193-195, 1995.
- 2) ITO, T., IEKI, H., OZAKI, T., IWANAMI, T., NAKAHARA, K., HATAYA, T., ITO, T., ISAKA, M., and KANO, T., *Phytopathol.* 92, 542-547, 2002.
- 3) 草野成夫・下村克己: 日植病報 63, 119-123, 1997.
- 4) 村本和之: 常緑果樹試験研究成績概要集 214-219, 2002.
- 5) REANWARAKORN, K. and SEMANCIK, J. S. *Phytopathol.* 89, 568-574, 1999.

	TL			P				V				TR			V			C			P					TL			
	10	26	27	47	50	51	52	57	107	108	110	116	136	154	181	184	194	197	208	209	210	247	248	249	258	265	291	293	
CVd-Ⅱ a	U	G	-	A	C	A	G	G	G	A	A	A	U	U	U	U	U	C	G	A	G	U	U	C	-	U	U	U	302nt
SD01	.	A	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	-	.	.	.	303nt(99%): CVd-Ⅱ a
SD12	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	C	G	A	.	.	C	-	.	.	.	302nt(98%)
KC01	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	G	.	.	.	.	C	G	A	.	.	C	-	.	.	.	302nt(98%)
SD35	.	A	-	.	.	.	.	.	.	.	.	-	A	.	.	-	U	.	C	G	A	-	-	C	-	.	.	.	297nt(96%)
KC21	.	A	-	G	C	A	-	.	.	.	.	.	A	.	.	-	C	U	C	G	A	-	-	C	-	.	.	.	298nt(98%)
KC32	.	A	-	G	C	A	-	.	.	.	.	.	-	.	.	-	C	U	C	G	A	-	-	C	-	.	.	.	297nt(95%)
KC33	.	A	-	.	.	.	.	.	G	-	-	.	A	.	.	-	C	U	C	G	A	-	-	C	-	C	.	.	297nt(95%)
KC31	.	A	-	G	C	A	-	.	G	-	-	.	-	.	.	-	C	U	U	G	A	.	.	C	-	C	.	.	297nt(95%)
KC55	.	A	-	G	C	A	-	.	G	-	-	.	-	.	.	.	.	.	C	G	A	-	-	C	-	.	.	.	295nt(95%)
KC34	.	A	A	G	C	A	-	.	G	-	-	.	.	.	.	-	C	U	C	G	A	-	-	C	-	.	.	.	297nt(95%)
KC51	.	A	-	G	C	A	-	.	G	-	-	.	-	.	.	-	C	U	C	G	A	-	-	C	-	.	.	.	295nt(94%): CVd-Ⅱ c
KC52	.	A	-	G	C	A	-	.	A	G	-	-	.	.	.	-	C	U	C	G	A	-	-	C	-	.	.	.	295nt(94%)
KC11	.	A	A	G	C	A	-	.	G	-	-	.	A	.	.	-	C	U	C	G	A	-	-	C	-	C	.	.	299nt(94%)
KC41	.	A	-	G	C	A	-	.	G	-	-	.	A	.	.	-	C	U	C	G	A	-	-	C	-	.	.	.	296nt(94%): AD2
KC54	C	A	-	G	G	C	A	-	G	-	-	C	-	.	.	-	C	U	C	G	A	-	-	C	-	.	.	.	295nt(93%)

第1図 カンキツ HSVd の塩基配列の異変

注) a) 同じ塩基は中点 (・) で示した。また、塩基の欠失はバー (-) で示した。

b) TL: terminal left, P: pathogenic, V: Variable, TR: terminal right.