

農研機構で実施するカンキツウイルス・ウイロイドのフリー化および検定

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 果樹茶業研究部門 公開日: 2019-03-22 キーワード: citrus, virus, viroid, elimination, certification 作成者: 太田, 智 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00002068

研究資料

農研機構で実施するカンキツウイルス・ウイロイドのフリー化および検定

太田 智*

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
果樹研究所カンキツ研究領域
424-0292 静岡県静岡市

The Methods for Elimination and Certification of
Citrus Virus and Viroid Conducted in NARO, Japan

Satoshi OHTA*

Citrus Research Division, Institute of Fruit Tree Science
National Agriculture and Food Research Organization (NARO)
Shizuoka, Shizuoka 424-0204, Japan

Summary

Prior to distributing scions of new citrus cultivars developed by the Institute of Fruit Tree Science at Japan's National Agriculture and Food Research Organization (NARO), viruses and viroids are eliminated, and the scions are inoculated with a mild *Citrus tristeza virus* (CTV) strain. NARO has not previously published the method for elimination and certification, and therefore, there have been some inquiries from other organizations. Therefore, we aimed to demonstrate the method for virus and viroid elimination and certification of clean citrus seedlings. We perform shoot tip grafting (Takahara et al. 1986) with some modification to recover virus- and viroid-free plants. Derived seedlings are grafted by approach for growth promotion, according to Takahara et al. (1981). We then test these seedlings for a multitude of viruses and viroids present in Japan, based on RT-PCR. The seedlings must pass the test twice; in approximately one year, and in one and a half years after approach grafting, they are certified as virus- and viroid-free plants. M16a is used as a mild CTV strain, and the infection is confirmed according to the method of Kano et al. (2006). Virus- and viroid-free and M16a-infected trees are kept in isolation structures, and scissors are disinfected at the time of pruning and correcting scions to reduce reinfection. Subsequently, we perform DNA marker typing, create a map of trees, and attach nameplates to avoid mixing up varieties. It would be impossible to certify seedlings as free for every type of virus and viroid. Nevertheless, each research station should choose the best method for the most complete elimination and certification as is possible and should distribute virus- and viroid-free seedlings to prevent multiple infections in

orchards.

Key words: citrus, virus, viroid, elimination, certification

緒 言

日本には、カンキツに感染するウイルス6種（カンキツトリステザウイルス：*Citrus tristeza virus* (CTV)、温州萎縮ウイルス：*Satsuma dwarf virus* (SDV)、カンキツモザイクウイルス：*Citrus mosaic virus* (CiMV)、ナツカン萎縮ウイルス：*Natsudaidai dwarf virus* (NDV)、ネーブル斑葉モザイクウイルス：*Navel orange infectious mottling virus* (NIMV)、リンゴステムグルーピングウイルス：*Apple stem grooving virus* (ASGV))、およびウイロイド7種（カンキツエクソコーティスウイロイド：*Citrus exocortis viroid* (CEVd)、カンキツベントリーフウイロイド：*Citrus bent leaf viroid* (CBLVd)、ホップ矮化ウイロイド：*Hop stant viroid* (HSVd)、カンキツウイロイドⅢ：*Citrus viroid III* (CVd-III)、カンキツウイロイドⅣ：*Citrus viroid IV* (CVd-IV)、カンキツウイロイドⅤ：*Citrus viroid V* (CVd-V)、カンキツウイロイドOS：*Citrus viroid OS* (CVd-OS))が存在する。なお、CiMV、NDV、およびNIMVは、温州萎縮グループに属しSDVと近縁である(Iwanami et al., 2001; Tanaka and Yamada, 1972)。日本国内でウイルスが問題になった例としては、CTVにより広島県のハッサク産地で大きな被害が出たことが有名である(田中・山田, 1964)。また、1950年代以降には、SDVによるウンシュウミカンへの被害も広まった(伊沢, 1966; 野村ら, 2000; 牛山・大垣, 1969)。1970年代には、CiMVによるトラミカンの発生が問題となり(Yamamoto and Yamaguchi, 1980)、ウイルス検定の重要性が広く知られるようになった。ウイロイドについては、これまでに国内の産地で大きな被害の報告はないが、各地で存在が明らかとなっている(Ito et al., 2002a; 田中・山田, 1971)。海外では、カクヘキシアウイロイド：*Citrus cachexia viroid* (CCaVd)が強毒のウイロイドとして知られており(Reanwarakorn and Semancik, 1999; Semancik et al., 1988)日本でも植物検疫上の特定重要病害虫に指定されている。

ウイルス・ウイロイドによる被害は、菌類・細菌類とは様相が異なり、特定の気象条件の下で圃場全体に被害が出るような一過性のものではない。一度感染してしまった樹からは永久に除去することができないた

め、感染樹の伐採が必要となる。CTVはミカンクロアブラムシにより(Bennett and Costa, 1949; 井上, 1983)、SDVは土壌を通じて(伊沢, 1966)感染拡大する。ウイロイドは、剪定鋏やノコギリなどを介して伝染する(Barbosa et al., 2005)。したがって、ウイルス・ウイロイドは、年月が経つにつれ圃場に蓄積していく。単独では被害を及ぼさないウイルス・ウイロイドでも、複数の種が同時に感染(複合感染)すると被害が出る(Ito et al., 2002a)。複合感染は、‘不知火’の流通初期に大きな問題を起こしたことで知られている(伊藤, 1999)。これらのことから、園地において感染拡大を抑えるのはもちろんのこと、苗木生産の段階でもウイルス・ウイロイドに感染していない(フリー)苗木を養成することが求められる。

これまで、フリー苗木を作出するために、様々な方法が開発されてきた。多胚性の種子をもつ品種では、珠心胚実生の育成が簡単で有効な手段となる(Weathers and Calavan, 1959)。単胚性や無核性の品種では、珠心や胚珠の培養によりフリー化が可能である(Bitters et al., 1972; Rangan et al., 1968)。しかしながら、これらの方法で得た苗木は幼弱相に戻るため、結実するまでに時間がかかる、棘が長いなど欠点があった。幼弱相に戻さずフリー化を行うために、高温下で発芽させた芽を用いる熱処理法が考案された(Calavan et al., 1972; Desjardins et al., 1957; Grant, 1957; 家城・山田, 1984; Roistacher and Calavan, 1972)。しかしながら、熱処理法ではフリー化が難しいウイルス・ウイロイドが存在した(Roistacher, 1977)。近年、これまでの問題を解決するため、茎頂接ぎ木法が開発され(Murashige et al., 1972; Navarro et al., 1975; Roistacher et al., 1976)、今日まで優れた技術として利用されてきた(Pina et al., 2015)。一方、日本では、簡易茎頂接ぎ木法が開発され(高原ら, 1986)、茎頂接ぎ木法で必要だった無菌操作が不要になった。

フリー化の後には、フリーであることを確認するために検定が必要となる。検定方法としては、感受性植物を用いた生物検定法、電子顕微鏡による観察(Bar-Joseph and Loebenstein, 1970)、およびELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)法(Bar-Joseph et al., 1979; 川合・西尾, 1990)などが開発されている。

しかしながら、これらの方法は特定のウイルス・ウイロイドを対象とした手法であり、一つの手法ですべてのウイルス・ウイロイドを検定することはできない。近年になり、分子生物学の発展とともに、RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) 法による検定法の開発が進んだ。RT-PCR 法では、一度 RNA を抽出すれば、それをもとに各種ウイルス・ウイロイドを対象とした PCR 実験を行うことができる。また、一度に複数のウイルス・ウイロイドを PCR 増幅するための multiplex 法も開発され、効率化が図られた (Ito et al., 2002b; Roy et al., 2005)。このほか、SDV については、園地での簡易な検定が可能なキットが開発・市販されている (Kusano et al., 2007)。

苗木生産における他のウイルス対策としては、CTV に関して最も技術が確立している。これは、先述のとおり、CTV がアブラムシによって容易に伝播し、世界各地で多くの被害をもたらしてきたことに由来する。現在では、抵抗性台木の利用 (Bordignon et al., 2007)、および弱毒系統の接種 (Grant and Costa, 1951; Grant and Higgins, 1957; Lee and Keremane, 2013; Olson, 1956) により、一部の罹病性品種を除き大きな被害は認められなくなっている。なお、弱毒系統とは、植物に及ぼす被害が比較的少ない系統のことで、あらかじめ弱毒系統を接種しておくことで強毒系統による被害が軽減される。この効果を、緩衝効果と呼ぶ。日本では、古くから強度の CTV 抵抗性 (免疫性と呼ぶこともある) をもつカラタチおよびその変異系統のヒリュウを台木として利用してきた。弱毒系統の接種に関しては、M16a が選抜され、利用されている (Kano et al., 1992; Koizumi et al., 1991)。

海外では、歴史的にウイルス・ウイロイドによる大きな被害を経験してきたことから、フリー苗を流通させる体制が早くから構築されてきた (Lee, 2000; Navarro et al., 1976a; Sheta et al., 2004)。スペインでは、政府承認の制度として、公立試験場と苗木業者が一体となった長年の取り組みにより、国内すべての成木がフリー苗に置き換えられた (Pina et al., 2015)。一方、日本では、公立の機関を中心に新品種のフリー化が行われているものの、各機関の自主的な取り組みに頼っている。このため、農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所 (以下、農研機構果樹研究所と略す) には、フリー化法、検定法、および管理方法などについて問い合わせがある。本研究資料では、ウイルス・ウイロイド対策技術の普及と統一化を目的に、農研機構果樹研究所で採用している一連の方法を紹介することとした。

方 法

農研機構果樹研究所では、育成したカンキツ新品種について、ウイルス・ウイロイドを除去したフリー樹を作成している。選抜試験中の系統は、圃場に植栽されているため、ウイルスやウイロイドに感染している場合が多い。したがって、有望な系統については、品種登録前にフリー化を開始する。全体の流れは Table 1 に示す。具体的な方法は、以下の通りである。

1. フリー化

熱処理を利用した簡易茎頂接ぎ木法 (高原ら, 1986) に従って行う。ただし、設備の関係または簡便化のため

Table 1. The process for recovering virus- and viroid-free seedlings, and cross-protection of CTV.

Steps	Reference
1. Virus and viroid elimination	
1) Shoot tip grafting	Takahara et al. 1986
2) Approach grafting for growth promotion	Takahara et al. 1981
2. Certification of virus- and viroid-free seedlings ^z	
1) RNA extraction by using ISOGEN (Wako, Japan)	Fig. 2
2) Reverse transcription	Table 1 and 2
3) PCR	Table 3-5
4) Separation and detection (5% acrylamide gel, stained with ethidium bromide)	
3. Cross-protection of CTV	
1) Graft inoculation with a mild strain, M16a	
2) Confirmation of infection	Kano et al., 2006, Table 1-5

^z Test twice; approximately in one year, and one and a half years after approach grafting.

めに、若干の変更を加えた。変更点は、以下の通りである。台木用カラタチの播種については、外種皮のみを剥皮する。滅菌後の種子は、シャーレでなく、大きめのトレイに滅菌水で湿らせたキムタオルを敷いて播種し、同じ大きさのトレイで蓋をする。発根の際、恒温機の温度設定は26℃とする。発根後の植え付けには、赤玉土(小粒)を入れたポリエチレンポット(黒色1.5号)を用いる。採穂は、通常は2.5 cmの芽を用いるが、タイミングによってそれ以上(8 cm程度まで)伸びた芽も用いる。熱処理は、昼(7-19時):35℃、夜(19-7時):30℃に設定した人工気象室内で行う。その後、高原ら(1981)に従い、寄せ接ぎにより生育促進を図る。寄せ接ぎをする台木には、論文中(高原ら, 1981)の試験結果に従い、ラフレモンの3.5年生を用いる。ただし、スペースの関係上、台木の力枝を残さずに切断する。

2. 検定

寄せ接ぎしたフリー化個体の枝が直径1 cm以上になった後、日本に存在が確認されているウイルス・ウイロイド全13種および隔離検疫対象に指定され日本に進入の恐れがあるCCaVd(Ito et al. 2006)について、RT-PCR法による検定を行う。半年後に再度検定を行い、2度の検定で合格したものをフリー樹とみなす。ウイルス・ウイロイドの増殖適温に違いがあるため、2度の検定は、夏と冬など異なる季節に行う。

(1) RNA抽出

直径1 cm以上になった枝の樹皮および維管束(幅1 cm長さ2 cmほど)をカミソリで切り出す(Fig. 1-a, b)。袋に切り出したサンプルを入れ、万力で押し潰す(Fig. 1-c)。袋は、厚手(0.1 mm)のラミネートフィルムを用い、インパルスシーラーでA4サイズの9分の1

程度の大きさの袋状にする。ISOGEN(Wako, 日本) 500 μ lを加え、指で軽く揉みながら混合する。以降、ISOGENのマニュアル(プロトコール1-1 RNAの単離)に従いRNAを抽出する。ただし、開始時のサンプルが少量であるため、使用する試薬類はマニュアルの半量とする。抽出後には、真空乾燥させたRNAを滅菌水100 μ lに溶解する。

(2) RT-PCR

はじめに、抽出したRNAを鋳型に逆転写反応を行う。反応液の組成と反応のプログラムはTable 2, 3の通りである。次に、合成したcDNAを滅菌水で5倍希釈し、

Table 2. Components of reaction liquid for reverse transcription.

Reaction components	Volume for one sample (μ l)
Rnase Free dH ₂ O	2.875
10 \times RNA PCR Buffer	1
dNTP (10 mM)	1
MgCl ₂ (25 mM)	2
Random 6 mer (100 μ M)	0.5
AMV RTase XL for RT PCR (5 U/ μ l)	0.5
Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μ l)	0.125
Template RNA	2
Total	10

Table 3. Protocol for reverse transcription.

Temperature	Reaction time
23 $^{\circ}$ C	10 min
42 $^{\circ}$ C	30 min
99 $^{\circ}$ C	5 min
5 $^{\circ}$ C	5 min

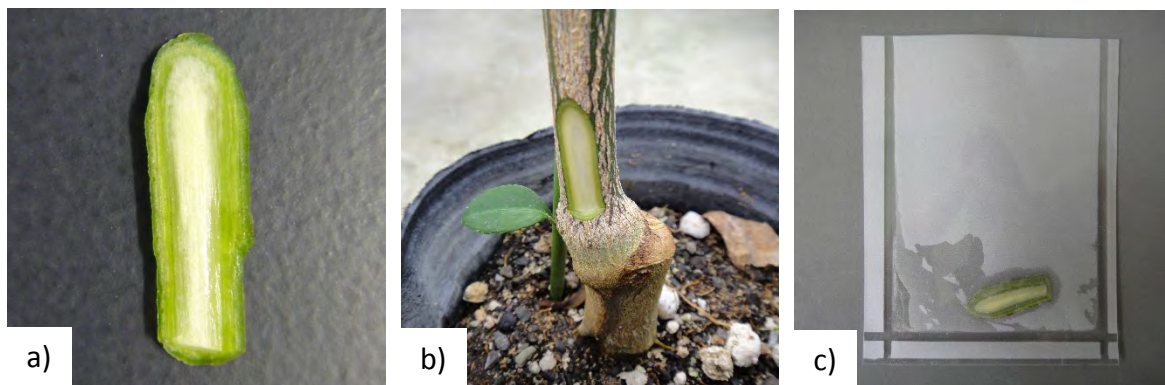


Fig. 1. Plant material for RNA extraction: a) Bark and vascular bundles cut out; b) Scar after cutting a sample from a seedling grafted by approach; and c) Sample in a laminate film bag, flattened using a vise.

それを鋳型に各ウイルス・ウイロイドを対象とした PCR を行う。検定するウイルス・ウイロイドの種類およびプライマー配列、PCR 反応条件、およびポジティブコントロールの材料は Table 4, 5, 6 に示した通りである。なお、温州萎縮ウイルスグループに属し SDV と近縁の CiMV, NDV, および NIMV は、SDV と共通の塩基配列部分に設計されたプライマーセット (Iwanami, 2010) を用いる。一方、CBLVd の変異系統である CVd-I-LSS (low sequence similarity) (Ito et al., 2000) は、CBLVd とは異なるプライマーセットで検出を行う。CVd-V については、異なる系統が既に確認されているため、2 種類のプライマーセット (Ito and Ohta, 2010)

を用いる。CCaVd については、同種の HSVd と識別するために、独自に設計したプライマーセットを用いる。CEVd, CVd-I-LSS, CVd-OS, HSVd, CVd-III, および CVd-IV については multiplex PCR (Ito et al., 2002b) を行い、他のウイルス・ウイロイドはそれぞれ単独で PCR を行う。ただし、multiplex PCR においてポジティブコントロールで PCR 増幅産物が得られない種があった場合には、別の反応条件で単独で PCR を行う (Table 5)。また、RNA 抽出の成功を確認するため、分光光度計 (当方では、Nano Drop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) を使用) を用いて RNA 濃度を測定し、植物の RNA (アクチン) の PCR 増幅を行う。なお、

Table 4. PCR primer sets.

Target	Primer	Sequence	Fragment size (bp)	Reference
CTV	FKS01	AAGGTTACGAGGAGGCAACC	565	Kano et al., 2006
	RKS02	ACTCGAAGGGCGTTAGTACG		
SDV	FW146	ACTAGGGATAGCGCCCTAG	350	Iwanami, 2010
	RV488	GGACCGATATTGGGCCAT		
ASGV (CTLV)	CTLV-AM	TAGAAAAACCCACACTAACCCGGAAATGC	456	Ito et al., 2002b
	CTLV-AP	CCTGAATTGAAAACCTTTGCTGCCACTT		
CEVd	CEV-AM3	CCGGGGATCCCTGAAGGACTT	371	Ito et al., 2002b
	CBLV-AP2	TCCCCTTCACCCGAGCGCTGC		
CBLVd	CBLV-CM2	TCGACGACGACCAGTCAGCT	233	Ito et al., 2002b
	CBLV-AP2	TCCCCTTCACCCGAGCGCTGC		
CVd-I-LSS	CB2-CM	ACGACCGCTCAGTCTCCTCT	247	Ito et al., 2000; Ito et al., 2002b
	CB2-AP	CTGTAAACCGGACCGGTCTCCTTC		
CVd-OS	Cb3-AM6	GTCCGCTCGACTAGCGGCAGAGAGC	166	Ito et al., 2002b
	CB3-AP	CGTCGACGAAGGCATGTGAGCTT		
HSVd	CV2-AM	CCGGGGCTCCTTTCTCAGGTAAGT	302	Ito et al., 2002b
	CV2-AP	GGCAACTCTTCTCAGAATCCAGC		
CCaVd	CiChx_f1	AGAATCCAGCGGGGGCGTG	120	Unpublished data
	CiChx_r1	TCTCATCGGAAGAGCCAGAAGG		
CVd-III	CV3-AM	TCACCAACTTAGCTGCCTTCGTC	271	Ito et al., 2002b; Rakowski et al., 1994
	CV3-AP	CTCCGCTAGTCGAAAGACTCCGC		
CVd-IV	CV4-AM3	TCTATCTCAGGTCGCGAAGGAAGAAGC	209	Ito et al., 2002b
	CV4-AP4	TCTGGGGAATTTCTCTGCGGGACC		
CVd-V	PI	TCGACGAAGGCCGGTGAGCA	294	Serra et al., 2008
	PII	CGACGACAGGTGAGTACTCTCTAC		
CVd-V	PIII	TGTGGGTCACCCCGCCCC	294	Serra et al., 2008
	PIV	GGAACCACAAGGTTGTTTAC		
Actin (Plant RNA)	MWYFM14R_F	CTCAAAGGCGAGTATGATGAG	120	DC895394 ^y
	MWYFM14R_R	GAGTTCGCGAAACGAGACAC		
CTV-M16a	P6	ACTTTCTACGCATCGTTATCATTC	285, 515 ^z	Kano et al., 2006
	N7	TACACGCAAGATGGAGAGACTAAAT		

^z PCR products were digested with restriction enzyme *Hae*III.^y DDBJ accession number.

multiplex PCRでは、QIAGEN® Multiplex PCR Kit (QIAGEN, Germany) を用い、単独のPCRでは AmpliTaq Gold® Fast PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いる。

(3) 分離・検出

5% アクリルアミドミニスラブゲルを用いた電気泳動によりPCR産物を分離し、エチジウムブロマイド染色

により検出する。

3. CTV弱毒系統の接種および検出

CTV弱毒系統は、M16a (Kano et al., 1992; Koizumi et al., 1991) を用いる。接種は、M16a感染樹の穂木をフリー樹の株元に芽接ぎする。M16a感染の確認は、芽接ぎから約1年後に先述のRT-PCR法に基づいて行う。ただし、RNA抽出については、樹皮ではな

Table 5. PCR protocols.

Target	Expected size (bp)	PCR protocol					
		Initial denaturation (94°C)	Denaturation (94°C)	Primer annealing	Extension (72°C)	No. of cycles	Final extension (72°C)
CTV	565	10 min	30 sec	30 sec / 53°C	30 sec	40	5 min
SDV	350	10 min	30 sec	30 sec / 50°C	30 sec	40	5 min
ASGV	456	10 min	30 sec	30 sec / 66°C	30 sec	40	5 min
Multiplex	166-371	10 min	30 sec	10 sec / 60°C ^z	10 sec	40	5 min
CEVd	371	10 min	30 sec	30 sec / 62°C	30 sec	40	5 min
CVd-I-LSS	247	10 min	30 sec	10 sec / 64°C	30 sec	40	5 min
CVd-OS	166	10 min	30 sec	30 sec / 62°C	30 sec	40	5 min
HSVd	302	10 min	30 sec	30 sec / 60°C	30 sec	40	5 min
CVd-III	271	10 min	30 sec	30 sec / 60°C	30 sec	40	5 min
CVd-IV	209	10 min	30 sec	30 sec / 64°C	30 sec	40	5 min
CBLVd	233	10 min	30 sec	30 sec / 66°C	30 sec	37	5 min
CCaVd	120	10 min	30 sec	30 sec / 62°C	30 sec	35	5 min
CVd-V (primer: PI and PII)	294	10 min	20 sec	20 sec / 60°C	45 sec	40	5 min
CVd-V (primer: PIII and PIV)	294	10 min	20 sec	20 sec / 62°C	45 sec	40	5 min
Actin	120	10 min	30 sec	30 sec / 50°C	30 sec	35	5 min
CTV-M16a	799	10 min	30 sec	30 sec / 52°C	45 sec	40	5 min

^z The ramp speed to decrease the temperature was set to be approximately one minute from 94 to 60 °C.

Table 6. Plant material for positive controls.

Target	Sample name	Sitation
CTV	M16a	Kano and Koizumi, 1991
SDV	S-58	Iwanami et al., 1999
ASGV	N-297 (CTLV)	Iwanami and Ieki, 1994
Multiplex	TS and ADG	Ito et al., 2002a
CEVd	ADG	
CVd-I-LSS	TS	
CVd-OS	TS	
HSVd	TS	
CVd-III	TS	
CVd-IV	TS	
CBLVd	TS	
CCaVd	WS	Ito et al., 2006
CVd-V	TS	
CTV-M16a	M16a	

く葉柄 (100 mg) を用いる。PCR の条件等は, Kano et al. (2006) を参考とする (Table 4, 5, 6)。得られた PCR 産物を, 制限酵素 (*HaeIII*) で切断後 (90 min, 37° C), 他のウイルス・ウイロイドと同様の方法で分離・検出する。

4. 保存・増殖

ウイルスフリー樹および M16a 接種樹は, ガラス温室または網室で保存し, アブラムシの侵入に注意する。剪定の際には, 汁液感染を防ぐため, 樹ごとにハサミの消毒 (消毒液: 4% 水酸化ナトリウム, 4% ホルムアルデヒド) を行う。大量の穂木を配布するために, フリー樹または M16a 接種樹から穂を採取し, 接ぎ木により増殖を行う。このとき, 台木は, ガラス温室または網室で播種・育苗したカラタチを用いる。増殖した樹も, ガラス温室または網室で管理する。

5. 穂木取り・配布

品種の混同を防ぐため, DNA マーカーを用い品種鑑定を行う。穂木採取後の混乱を避けるため, 異なる品種の穂木は一度には取り扱わない。なお, 当方では, 登録品種の穂木配布を一般社団法人日本果樹種苗協会 (種苗協会) に委託している。

結果および考察

果樹研究所カンキツ研究興津拠点では, 2008 年度に簡易茎頂接ぎ木法および RT-PCR 法を導入し, 改良を加えながらフリー化を行ってきた。2015 年 8 月までの約 7 年半の間に, 圃場または実験による診断結果からウイルス・ウイロイドの感染が疑われた 56 品種・系統の茎頂接ぎ木を行った。得られた個体について RT-PCR 法による検定を 2 度行い, 56 品種・系統すべてのフリー化が確認された (Table 7)。

1. フリー化

熱処理を利用した簡易茎頂接ぎ木法 (高原ら, 1986) に従ったが, 一部変更を加えた。台木用カラタチの播種において, 外種皮のみを剥皮して播種したところ, 内種皮まで剥皮した場合と同じく, 7 日間で 50 粒中 48 粒 (96%) の種子が発根した。なお, 外種皮を剥皮しない場合, 発根率が同じ 96% に達するまでに 10 日かかった。外種皮の剥皮は容易であるが, 内種皮の剥皮は繊細で時間を要するため, 簡便化のために外種皮のみを剥皮することとした。穂木用の芽の採取では, タイ

ミングによって 8 cm 程度まで伸長した芽も用いることとした。茎頂接ぎ木においては, 台木の伸長と穂木品種の発芽のタイミングを合わせる必要がある。しかしながら, 発芽は断続的に起こるため, 育成した台木を無駄にしないために, 長めに伸びた芽も利用した。熱処理については, 昼 (7-19 時): 35°C, 夜 (19-7 時): 30°C とした。フリー化したい熱処理用の母樹に古いものが多かったため, 枯死するのを避けるため, 論文中 (高原ら, 1986) で成績の良かった条件より昼の高温 (35°C) の時間を 4 時間少なくした。このほか, フリー化の成功率とは直接関係しないと考えられた以下の点について, 実験環境の都合や簡便化のために変更を加えた。滅菌後の種子は, 一度に多くの種子を取り扱うために大きめのトレイで発根させた。発根は, 恒温機を他の目的でも使用していたため, 大きな温度差がなければよいと考え 26°C で行った。発根後の植え付けには, 赤玉土 (小粒) を入れたポリエチレンポット (黒色 1.5 号) を用いた。これは, 当方で所有する顕微鏡の機種 (顕微鏡鏡体 (SZX7; OLYMPUS, 日本) をユニバーサル架台 1 型 (SZ2-STU1; OLYMPUS, 日本) に設置して使用) との兼ね合いによるところが大きい。寄せ接ぎの際には, 狭いスペースに多くの個体を置く必要があったため, 台木を折り曲げて力枝として残すことができなかった。

簡易茎頂接ぎ木法は, 顕微鏡下での繊細な作業であるため, 手先の器用さや練習が必要となる。当方では熟練した非常勤職員が作業を行っているが, 成功率は 30-50% 程度である (Ohta et al., 2011)。茎頂を切り出す際, 大きめに切り出すと活着率は向上するがフリー化率は低下し, 小さめに切り出すとフリー化率は向上するが活着率は低下する (Navarro et al., 1976b)。ウイルス・ウイロイドの種類によってもフリー化の成功率に差があり, 日本に存在する種では CTV や CEVd はフリー化しやすく, ASGV はフリー化しにくい (Navarro 1981; Roistacher and Kitto, 1977; Roistacher et al., 1976)。このことから, 感染しているウイルス・ウイロイドの種によって, フリー化に最適な茎頂の大きさが異なると考えられる。当方では, 細かな戦略は立てていないが, 活着率が低い場合は茎頂を大きめ (0.3 mm 程度) に切り出し, ウイルス・ウイロイドが除去しにくい場合には茎頂を小さめ (0.2 mm 以下) に切り出すなどの工夫をしている。今後は, 熱処理の温度にも注目をし, 除去したいウイルス・ウイロイドの種類ごとに異なる温度設定にすることも検討したい。また, ヒトの病気用に開発された抗ウイルス剤のリバビリン

やホスカルネットが、数種のカンキツウイルス・ウイロイドに対して有効なことが示唆されている (Greño et al., 1990; Iwanami and Ieki, 1994; Ohta et al., 2011). 現在, 他のウイルス・ウイロイドに対する効果は検証中で不明であるが, このような新しい技術の導

入も期待される. カンキツは穂木増殖が可能のため, 成功率を極力高めて一度に多数のフリー樹を作成するといった必要はない. したがって, 担当する各所の事情によっては, 成功率よりも簡便さを選択することも可能と考えられる.

Table 7. List of varieties and strains from which viruses and viroids were eliminated, and which were certified virus-free.

Accession No. ^z	Variety or strain name	Viruses or viroids eliminated ^y	Year ^x
-	Vietnam Citrus Col. No.97-3A	-	2009
-	Vietnam Citrus Col. No.97-21A	-	2009
-	Vietnam Citrus Col. No.98-4A(Mac Cam)	-	2009
201338	Kikaimikan (COL/KAGOSHIMA/2000/MAFF/0003)	-	2009
204404	COL/KAGOSHIMA/2000/MAFF/0069	-	2009
-	Feminero apireno lemon	CCaVd	2009
-	Feminero ovale lemon	CCaVd	2009
-	Kankitsu Okitsu 62	-	2009-2010
-	Kankitsu Okitsu 63	CTV	2009-2010
245235	Kankitsu Okitsu 65	-	2009-2010
-	Rinoka	CTV, CVd-I-LSS, HSVd	2009-2010
-	U-22	-	2009-2010
-	Adamopoulos lemon	CCaVd	2009-2011
117370	Bouquet de fleurs	CEVd, HSVd, CVd-III, CCaVd	2009-2011
115503	Maglene	CEVd, CVd-III, CCaVd	2009-2011
-	Kankitsu Okitsu 67	-	2010
116173	Hystrix (78102)	-	2010
113455	Bonanza	-	2010
113448	Pummelo-White type (78048)	-	2010
225854	Thailand citrus Col. No. 83-110	CVd-OS	2010
117660	Greece citrus Col. No. 87-56	-	2010
117948	Kishumikan Iharaichijyouji	-	2010
117360	Tengu	CEVd	2010
203326	Kiyonoka	-	2010
-	Kankitsu Okitsu 59 (K-640)	-	2010
-	P-555	-	2010
-	Q-348	-	2010
-	R-63	-	2010
-	R-190	-	2010
-	R-663	-	2010
-	T-12	-	2010
-	T-58	-	2010
171502	Akiyama Navel	CTV, HSVd, CVd-III	2010

^z Numbers from NIAS Genebank (http://www.gene.affrc.go.jp/index_en.php). '-' indicates not registered.

^y We did not test what kind of virus and viroids infected the mother tree. Virus and viroids were detected from seedlings which were derived after shoot tip grafting. '-' shows no virus and no viroids were detected from any seedlings.

^x Fiscal years in which shoot tip grafting was conducted.

2. 検定

RNA 抽出および RT-PCR については、ISOGEN を用い、そのマニュアルに従った。サンプルは、ウイルス・ウイロイドの想定される存在部位に基づき、維管束および樹皮とした。ISOGEN を用いた理由は、カンキツのウイロイドの抽出で実績があった (Ito et al., 2000) ためである。なお、他の方法や市販のキット等との比較は十分に行っていない。

PCR については、multiplex PCR により、最大 8 種のウイルス・ウイロイドを同時に検定することが可能とされる (Ito et al., 2002b)。しかしながら、我々の実験では、8 種のウイルス・ウイロイドを明瞭に検出することは難しかった。このため、経験上 multiplex PCR が難しかった CBLVd と、異なるポジティブコントロールを用いなければいけない ASGV については、単独で PCR を行うこととした。ただし、multiplex PCR を行う 6 種についても、ポジティブコントロールにおいて検出されなかった種については、それぞれ単独で PCR

をやり直す必要があった。

ウイルス・ウイロイドの検定においては、厳密な試験が要求される。すべてのウイルスを見逃すことができない工程である。そのような考えに基づき、幾つかの PCR キットや反応条件を検討した中から、最も高感度に検出できた方法を採用してきた。また、再現性を得るために、異なる時期に 2 度の検定を行い、合格したものをフリー樹として認定してきた。また、保存中の再感染のリスクも皆無ではないため、5 年に一度すべてのウイルス・ウイロイドを再検定することにした。また、増殖した穂木取り用の母樹については、3 年に一度すべてのウイルス・ウイロイドを、毎年 1 度 CTV を検定している (ただし、M16a 接種樹については、M16a が検出されるため、CTV の検定は不要)。しかしながら、現状の人員や設備の制約により、不十分と考えられる要素もあった。ウイルス・ウイロイドが一部の枝だけに存在する場合を想定すれば、できるだけ異なる部位から、異なる時期に、より多くのサンプルを検定するのが望ましい。また、プライマーセットの選

Table 7. Continued.

Accession No. ^z	Variety or strain name	Viruses or viroids eliminated ^y	Year ^x
113127	Urata unshiu	CTV	2010
117514	Oogimi kuganii	-	2010
113392	Kobayashi mikan	-	2010
113149	Satsuma gigante	CCaVd	2010
-	Jutarou unshiu nucellar 33	-	2010
-	Blood orange	CTV	2010
113169	Frua mandarin	CTV	2010
113223	Bergamot	HSVd	2010
117299	Fukuhara orange	-	2010-2011
-	T-35	CTV, CVd-IV	2010-2012
117287	Oochou villafranca	CCaVd	2010-2012
117946	Hinoakebono	CTV, CVd-OS	2010-2013
-	P-1102	CTV	2010-2014
113172	Man Ju (Mankitsu)	-	2011
223657	Tamami	CTV	2011
244567	Puchimaru	CTV, CVd-V	2012
245233	Asumi	CTV	2012
-	Xuegan nucellar	CTV, SDV, HSVd, CVd-III, CCaVd	2012-2013
168853	Satsuma salzara	CCaVd	2012-2014
117293	Naruto	CCaVd	2012-2014
117281	Honda buntan	CCaVd	2012-2014
117290	Lapithos lemon	CTV, SDV, CEVd, CVd-I-LSS, HSVd, CCaVd	2012-2015
113385	Lee	CTV, SDV	2013-2014

択については、同じウイルスでも系統が異なるとプライマー配列の部分で変異が起きる可能性がある。全系統を網羅するには、新しい系統が発見される度にプライマー配列を見直す必要がある。農研機構果樹研究所では、2008年時点でDDBJデータベースに登録されていた情報をもとに、できるだけ多くの系統に一致するプライマーセットを既存の報告の中から選択することにした。しかしながら、2008年以降に報告された系統もあるため(Shimizu et al., 2011)、今後は随時、新技術の導入を行う必要があると考えられた。また、ISOGENはRNAとDNAを分離して抽出することのできる試薬ではあるが、DNAの混入が皆無ではないため、今後は植物のRNA(アクチン)をコントロールとして増幅する前にDNase I処理を行うことを検討している。

3. CTV弱毒系統の接種

ウイルスフリー樹を植栽しても、CTVはミカンクロアブラムシによって容易に伝染してしまう。このため、当方では、最近の育成品種のうちCTVに比較的弱い品種には弱毒系統(M16a)を接種してきた。フリー樹全体にM16aが感染するのに必要な期間は不明であるが、樹高1.5m程の2~3年生の樹では、経験的に1年ほどが目安と考えられた。PCR増幅断片が検出されなかった場合には、増殖用や配布用の穂木としては利用せず、時間を空けてから再度検定を行う必要があった。なお、苗木業者からの穂木の希望数量が多い年には、種苗協会と相談のうえM16a未接種のフリー樹から穂木を採取することもあった。

4. 品種鑑定

技術の発展に伴い、当方では2012年度からDNAマーカーを用いて穂木配布用母樹の品種鑑定を開始した。2014年度には、レモン新品種‘璃の香’について品種鑑定を行い、品種登録当初からウイルス・ウイロイド検定と品種鑑定の双方を実施した最初の例となった。品種鑑定の方法については、未公表のデータを含むため、詳しい方法は示せないが、個体識別能力が高いとされるSSRマーカーを用いている。今後、農研機構果樹研究所から種苗協会を通じて会員の苗木業者に流通させる穂木については、古い品種も含めてすべて品種鑑定済みの母樹から採取する計画である。なお、品種鑑定済みの樹にはラベルを付け、配置図を作成して混乱のないように管理している。

5. 最後に

日本には、国内のカンキツウイルス・ウイロイドに関する法的な制度はなく、対策は当事者の自主的な取り組みに頼っている。また、フリー化や検定に関してこれまで述べてきた一連の方法は、100%の健全を保障できる技術ではない。なぜなら、既述のとおり、検定回数、サンプルの部位、検定期間などの労力的な問題、およびRT-PCR法におけるプライマー配列部位の共通性などの問題があるからである。しかしながら、複合感染防止の観点から、フリー苗の流通は今後もカンキツ産業にとって重要な課題である。品種の穂木生産に関わる各研究機関が、それぞれ対応できる範囲で最善の方法を検討・採用することが望まれる。本研究資料が、その際の参考になれば幸いである。

謝 辞

本研究のうち多くの部分は、農業生物資源ジーンバンク事業により行われました。簡易茎頂接ぎ木の技術指導をしてくださいました高原利雄氏、ウイルス・ウイロイド検定の技術指導をしてくださいました伊藤隆男氏、清水徳郎氏、および実際の仕事に従事してくださいました望月峰子氏に感謝いたします。

摘 要

農研機構果樹研究所では、育成したカンキツ品種の穂木配布に際し、感染していたウイルス・ウイロイドを除去(フリー化)し、通常CTV弱毒系統の接種を行っている。農研機構果樹研究所では、それら方法について公表していなかったため、外部から質問を受けることがあった。したがって、フリー化と検定に関する一連の方法を紹介することにした。フリー化は、高原ら(1986)の簡易茎頂接ぎ木法を一部改変して行う。作成した茎頂接ぎ木個体は、寄せ接ぎ(高原ら, 1981)により生育促進を図る。検定は、日本に存在する計13種のウイルス・ウイロイドを対象とし、RT-PCR法によって行う。寄せ接ぎ1年後、および1年半後を目処に、2度の検定に合格した個体をフリー樹とみなす。CTV弱毒系統にはM16aを用い、Kano et al. (2006)に従い感染の確認を行う。再感染のリスクを抑えるため、フリー樹およびM16a接種樹は隔離施設で管理し、剪定や穂木取りの際にはハサミを消毒する。また、品種の混同を防ぐため、DNAマーカーを用いた品種鑑定、配置図の作成、ラベリングなどを行う。すべてのウイルス・ウイロイドに完全にフリーであることを証明するのは

不可能と考えられる。しかしながら、カンキツ産地での複合感染を防ぐためには、各所で対応しうる最善の方法を採用し、できる限りフリーの苗木を流通させることが望まれる。

引用文献

- 1) Barbosa, C. J., J. A. Pina, J. Pérez-Panadés, L. Bernad, P. Serra, L. Navarro and N. Duran-Vila. 2005. Mechanical transmission of citrus viroids. *Plant Dis.* 89 : 749-754.
- 2) Bar-Joseph, M. and G. Loebenstein. 1970. Rapid diagnosis of the citrus tristeza disease by electron microscopy of partially purified preparations. *Phytopathology.* 60 : 1510-1512.
- 3) Bar-Joseph, M., S. M. Garnsey, D. Gonsalves, M. Moscovitz, D. E. Purcifull, M. F. Clark and G. Loebenstein. 1979. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology.* 69 : 190-194.
- 4) Bennett, C. W. and A. S. Costa. 1949. Tristeza disease of citrus. *J. Agric. Res. (Washington, D. C.).* 78 : 207-237.
- 5) Bitters, W. P., T. Murashige, T. S. Rangan and E. Nauer. 1972. Investigations on establishing virus-free citrus plants through tissue culture. *Proc. 5th Conf. IOCV.* 267-271.
- 6) Bordignon, R, H. P. M. Filho, W. J. Siqueira, L. A Ambrósio, A. Conagin, R. M. Pio, J. P. Junior, J. T. Sobrinho and M. A. Machado. 2007. Selected citrus rootstock hybrids introduced into the germplasm collection of the Instituto Agronômico. *Boletim Científico.* 14.
- 7) Calavan, E. C., C. N. Roistacher and E. M. Nauer. 1972. Thermotherapy of citrus for inactivation of certain viruses. *Plant Disease Repr.* 56 : 976-980.
- 8) Desjardins, P. R., J. M. Wallace, C. T. Lange and R. J. Drake. 1957. The suppression of tristeza virus symptoms in Mexican lime seedlings by heat treatment. *Plant Disease Repr.* 41 : 230-231.
- 9) Grant, T. J. 1957. Effect of heat treatments on tristeza and psorosis viruses in citrus. *Plant Disease Repr.* 41 : 232-234.
- 10) Grant, T. J. and A. S. Costa. 1951. A mild strain of the tristeza virus of citrus. *Phytopathology.* 41 : 114-122.
- 11) Grant, T. J. and R. P. Higgins. 1957. Occurrence of mixtures of tristeza virus strains in citrus. *Phytopathology.* 47 : 272-276.
- 12) Greño, V., M. Cambra, L. Navarro and N. Durán-Vila. 1990. Effect of antiviral chemicals on the development and virus content of citrus buds cultured in vitro. *Sci. Hortic.* 45 : 75-87.
- 13) 家城洋之・山田峻一. 1984. 熱処理によるカンキツトリステザウイルス, 温州萎縮ウイルス及びタターリーフウイルスの無毒化. *果樹試報 B.* 11 : 71-87.
- 14) 井上一男. 1983. ユキヤナギアブラムシ, ワタアブラムシによるカンキツトリステザウイルスの伝搬. *静岡柑験研報.* 19 : 59-63.
- 15) 伊藤隆男. 1999. カンキツウイロイドの病原性, 診断法および国内での分布. *植物防疫.* 53 : 347-350.
- 16) Ito, T., T. Furuta, T. Ito, M. Isaka, Y. Ide and J. Kaneyoshi. 2006. Identification of cachexia-inducible *Hop stunt viroid* variants in citrus orchards in Japan using biological indexing and improved reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Gen. Plant Pathol.* 72 : 378-382.
- 17) Ito, T., H. Ieki and K. Ozaki. 2000. A population of variants of a viroid closely related to citrus viroid-I in citrus plants. *Arch. Virol.* 145 : 2105-2114.
- 18) Ito, T., H. Ieki and K. Ozaki. 2002b. Simultaneous detection of six citrus viroids and *Apple stem grooving virus* from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods.* 106 : 235-239.
- 19) Ito, T., H. Ieki, K. Ozaki, T. Iwanami, K. Nakahara, T. Hataya, T. Ito, M. Isaka and T. Kano. 2002a. Multiple citrus viroids in citrus from Japan and their ability to produce exocortis-like symptoms in citron. *Phytopathology.* 92 : 542-547.
- 20) Ito, T. and S. Ohta. 2010. First report of Citrus viroid V in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* 76 : 348-350.
- 21) Iwanami, T. 2010. Properties and control of Satsuma dwarf virus. *JARQ.* 44 : 1-6.
- 22) Iwanami, T. and H. Ieki. 1994. Elimination of citrus tatter leaf virus from shoots of potted citrus plants by ribavirin. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* 60 : 595-599.
- 23) Iwanami, T., Y. Kondo and A. V. Karasev. 1999. Nucleotide sequences and taxonomy of satsuma dwarf virus. *J. Gen. Virol.* 80 : 793-797.

- 24) Iwanami, T., Y. Kondo, M. Kobayashi, S. S. Han and A. V. Karasev. 2001. Sequence diversity and interrelationships among isolates of satsuma dwarf-related viruses. *Arch. Virol.* 146 : 807-813.
- 25) 伊沢房雄. 1966. 温州萎縮病に関する調査 愛知県蒲郡附近における. 愛知園試研報. 5 : 1-9.
- 26) Kano, T. and M. Koizumi. 1991. Separation of citrus tristeza virus (CTV) serotypes through aphid transmission. *Proc. 11th Conf. IOCV.* 82-85.
- 27) Kano, T., M. Koizumi, T. Iwanami and H. Ieki. 1992. Cross-protection by protective strain M16A of citrus tristeza virus (CTV) in 'Morita Navel' orange monitored by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using two monoclonal antibodies. *Bull. Fruit Tree Res. Stn.* 23 : 169-177.
- 28) Kano, T., T. Natsuaki, M. Isaka, G. Suastika, S. Okuda and H. Ieki. 2006. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Citrus tristeza virus* isolates in Japan and its application to cross-protection experiments. *Bull. Natl. Inst. Fruit Tree Sci.* 5 : 63-70.
- 29) 川合 昭・西尾 健. 1990. 酵素結合抗体法 (ELISA) によるカンキツタターリーフウイルスの検出. *日植病報.* 56 : 342-345.
- 30) Koizumi, M., S. Kuhara, H. Ieki, T. Kano, A. Tanaka and T. Iwanami. 1991. A report of preinoculation to control stem pitting disease of Naval orange in fields up to 1989. *Proc. 11th. Conf. IOCV.* 125-127.
- 31) Kusano, N., K. Hirashima, M. Kuwahara, K. Narahara, T. Imamura, T. Mimori, K. Nakahira and K. Torii. 2007. Immunochromatographic assay for simple and rapid detection of *Satsuma dwarf virus* and related viruses using monoclonal antibodies. *J. Gen. Plant Pathol.* 73 : 66-71.
- 32) Lee, R. F. 2000. Why have mandatory citrus certification programs? *Proc. 14th Conf. IOCV.* 311-325.
- 33) Lee, R. F. and M. L. Keremane. 2013. Mild strain cross protection of tristeza: a review of research to protect against decline on sour orange in Florida. *Front. Microbiol.* 4 : 259.
- 34) Murashige, T., W. P. Bitters, T. S. Rangan, E. M. Nauer, C. N. Roistacher and P. B. Holliday. 1972. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free *Citrus* clones. *HortScience.* 7 : 118-119.
- 35) Navarro, L. 1981. Citrus shoot-tip grafting *in vitro* (STG) and its applications: A review. In *Proc. Int. Soc. Citriculture.* 452-456.
- 36) Navarro, L., C. N. Roistacher and T. Murashige. 1975. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 100 : 471-479.
- 37) Navarro, L., C. N. Roistacher and T. Murashige. 1976b. Effect of size and source of shoot tips on psorosis-A and exocortis content of navel orange plants obtained by shoot-tip grafting *in vitro*. *Proc. 7th Conf. IOCV.* 194-197.
- 38) Navarro, L., C. N. Roistacher and T. Murashige. 1976a. The citrus variety improvement program in Spain. *Proc. 7th Conf. IOCV.* 198-203.
- 39) 野村明子・増井弘子・芹澤拙夫・太田光輝. 2000. 静岡県におけるカンキツのウイルス保毒状況. *静岡柑試研報.* 29 : 31-37.
- 40) Ohta, S., T. Kuniga, F. Nishikawa, A. Yamasaki, T. Endo, T. Iwanami and T. Yoshioka. 2011. Evaluation of novel antiviral agents in the elimination of *Satsuma dwarf virus* (SDV) by Semi-micrografting in Citrus. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 80 : 145-149.
- 41) Olson, E. O. 1956. Mild and severe strains of tristeza virus in Texas citrus. *Phytopathology.* 46 : 336-341.
- 42) Pina, J. A., P. Chomé, M. C. Vives and L. Navarro. 2015. The citrus nursery tree certification program in Spain. *Proc. XIIth Intl. Citrus Congress.* 745-751.
- 43) Rangan, T. S., T. Murashige and W. P. Bitters. 1968. *In vitro* initiation of nucellar embryos in monoembryonic *Citrus*. *HortScience.* 3 : 226-227.
- 44) Reanwarakorn, K. and J. S. Semancik. 1999. Correlation of hop stunt viroid variants to cachexia and xyloporosis diseases of citrus. *Phytopathology.* 89 : 568-574.
- 45) Roistacher, C. N. 1977. Elimination of citrus pathogens in propagative budwood. I. Budwood selection, indexing and thermotherapy. *Proc. Int. Soc. Citriculture.* 3 : 965-972.
- 46) Roistacher, C. N. and E. C. Calavan. 1972. Heat tolerance of preconditioned citrus budwood for virus

- inactivation. Proc. 5th Conf. IOCV. 256-261.
- 47) Roistacher, C. N. and S. L. Kitto. 1977. Elimination of additional citrus viruses by shoot-tip grafting *in vitro*. Plant Disease Repr. 594-596.
- 48) Roistacher, C. N., L. Navarro and T. Murashige. 1976. Recovery of citrus selections free of several viruses, exocortis viroid, and *Spiroplasma citri* by shoot tip grafting *in vitro*. Proc. 7th Conf. IOCV. 186-193.
- 49) Roy, A., A. Fayad, G. Barthe and R. H. Brlansky. 2005. A multiplex polymerase chain reaction method for reliable, sensitive and simultaneous detection of multiple viruses in citrus trees. J. Virol. Methods. 129 : 47-55.
- 50) Semancik, J. S., C. N. Roistacher, R. Rivera-Bustamante and N. Duran-Vila. 1988. Citrus cachexia viroid, a new viroid of citrus: Relationship to viroids of the exocortis disease complex. J. Gen. Virol. 69 : 3059-3068.
- 51) Serra, P., C. J. Barbosa, J. A. Daròs, R. Flores and N. Duran-Vila. 2008. Citrus viroid V: molecular characterization and synergistic interactions with other members of the genus Apscaviroid. Virology, 370 : 102-112.
- 52) Sheta, E., E. S. Salem, A. M. Abou-Zeid, M. Osman, M. A. Shafik, A. El-Hawari, J. Safurim, A. M. D' Onghia and A. Camacho. 2004. Development of a citrus certification program in Egypt. Proc. 15th Conf. IOCV. 321-329.
- 53) Shimizu, S. I., T. Ito, T. Miyoshi, Y. Tachibana and T. Ito. 2011. A broad spectrum, one-step RT-PCR to detect *Satsuma dwarf virus* variants using universal primers targeting both segmented RNAs 1 and 2. J. Gen. Plant Pathol. 77 : 326-330.
- 54) 高原利雄・奥代直巳・久原重松. 1986. 簡易茎頂接ぎ木法によるカンキツウイルスの無毒化. 果樹試報D. 8 : 13-24.
- 55) 高原利雄・奥代直巳・生山 巖. 1981. 寄せ接ぎによるカンキツ類の実生及び茎頂接ぎ木苗の生育促進. 果樹試報D. 3 : 23-33.
- 56) 田中寛康・山田峻一. 1971. わが国におけるカンキツの exocortis の発生状況 - 1963 年～1971 年における調査-. 園試報B. 11 : 149-155.
- 57) Tanaka, H. and S. YAMADA. 1972. Evidence for a relationship among the viruses of satsuma dwarf, citrus mosaic, navel infectious mottling, natsudaikai dwarf, citrus variagation and citrus crinkley leaf. Proc. 5th Conf. IOCV. 71-76.
- 58) 田中彰一・山田峻一. 1964. ハッサク萎縮病に関する研究 第1報 病徴および病原ウイルス. 園試報B. 3 : 67-82.
- 59) 牛山欽司・大垣智昭. 1969. 温州萎縮病に関する研究:1. 神奈川県下の発生状況と被害の実態. 日植病報. 35 : 130.
- 60) Weathers, L. G. and E. C. Calavan. 1959. Nucellar embryony: a means of freeing citrus clones of viruses. In : Wallace, J. M (Ed.). Citrus Virus Diseases. p. 197-202. Univ. Calif. Div. Agr. Sci., Berkeley.
- 61) Yamamoto, S. and A. Yamaguchi. 1980. Spread of citrus mosaic through distribution of a new clone of satsuma mandarin. Proc. 10th Conf. IOCV. 230-231.