

沖縄におけるホルトノキのファイトプラズマ病害（速報と解説）

琉球大学農学部 亀山 統一
沖縄県森林資源研究センター 伊藤 俊輔

A phytoplasmatous disease of *Elaeocarpus sylvestris* var. *ellipticus* in Okinawa Island
Norikazu Kameyama (Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus) and Shunsuke Itoh (Okinawa Prefectural Forest Resources Research Center)

1. はじめに

ホルトノキ (*Elaeocarpus sylvestris* (Lour.) Poiret var. *ellipticus* (Thumb.) Hara ホルトノキ科) は、沖縄県の重要な緑化樹種である。沖縄島においては中南部を中心に広く街路・公園緑地に植栽され、浦添市では「市民の木」に指定されている。近年、沖縄島のホルトノキ植栽木に、衰退症状を示すものが目立って観察されるようになった。その病徴は、葉の黄化・小型化、枝枯、樹冠の着葉低下ないし退廃である。台風来襲後や劣悪な植栽条件下の衰退現象にも似るが、不可逆的に病徴が進展するなど、それでは説明しにくい事例がある。

折しも、沖縄県は2012年度より5年間の予定で「沖縄らしいみどりを守ろう事業」を始めた。同事業の下で設置された「保全検討委員会」は優先的に保全・防除を行う病害虫の一つにフクギおよびホルトノキのファイトプラズマ病を挙げた¹⁾。この選定時点において、ホルトノキについては、日本本土においてファイトプラズマを病原とするホルトノキ萎黄病が知られており、病原の検出法が確立していた²⁾が、沖縄県内では本病の存在は確かめられていなかった。一方、フクギについては、衰退被害が知られ本報共著者の伊藤らが衰退木からファイトプラズマを検出しているが³⁾、検出率が時に極めて低く、病原を特定しがたいという問題点があった。以上のことから、沖縄県におけるホルトノキとフクギの衰退症状の実態解明と病原の探索が主要な課題とされた。

そこで、ホルトノキについて、まず沖縄島において衰退木からファイトプラズマが検出されるか、また、検出された場合、ファイトプラズマは、園地や街路樹などの小集団内部で、また地域間で、どのような感染状況を示しているのか検討することとした。あわせて、ホルトノキ萎黄病との異同についても検討を加えることとした。

2. 調査地及び調査項目

琉球大学（西原町）構内の小緑地のホルトノキ植栽木の1個体に衰退が認められた。この小緑地は植栽後20年以上が経過しており、衰退木は舗装された通路に面した林縁部にあるものの、そこに強い環境負荷は認められず、隣接する他樹種の高木にも衰退が見られないことから、台風や立地環境などによる衰退の可能性は低いものと推測された。そこで、この個体に着目して2014年3月に、任意に3枝を選び（以下同様）枝葉を採取した。

さらに、この植栽地のホルトノキ全43個体について、2014年5～6月に立木位置および病徴発現の程度を記録し、枝葉を採取した。同時に、構内に単木状に植栽・自生する3個体について、病徴発現の程度を記録し、枝葉を採取した。

一方、名護市1カ所3個体から2014年3月に、浦添市1カ所3個体から2014年8月に、枝葉を採取した。日本本土のホルトノキ萎黄病発生地域の試料として、福岡県福岡市1カ所1個体・同柳川市2カ所計8個体から、2014年7月に枝葉を採取した。

各個体とも3枝の枝葉から2枚ずつ成葉をとり、その主脈を切り出して凍結粉碎し、市販キット (Qiagen 社 DNeasy Plant Kits) により DNA を取り出した。抽出 DNA から、ファイトプラズマ DNA の 16S rRNA 領域を増幅する数種の万能プライマーを用いた PCR 法により、病原ファイトプラズマの検出を試みた。使用したプライマーセットは、表-1 に示した 7 通りである。このうち 1 のセット (R16mF2/R16mR1 と R16F2n/R16R2) が、日本本土におけるホルトノキ萎黄病の同定・検出に用いられたものであり²⁾、沖縄ではこのセットを用いてフクギ衰退木からのファイトプラズマが検出されている³⁾。2~7 のセットは、16S rRNA 系統解析に用いられる万能プライマーから、著者らが任意に選定したものである。

PCR は、Qiagen 社 Taq PCR Master Mix を用い、温度・時間設定はオリジナルに準拠しつつ適宜調整した。PCR 産物を常法にて電気泳動にかけ、各プライマーセットに特有な塩基長の DNA バンドが出現するか確認した。

表-1 ホルトノキからのファイトプラズマ検出に用いた万能プライマー・セット

PCR 法	プライマーセット		典拠
1 nested	1 回目	R16mF2(CATGCAAGTCGAACGA)/R16mR1 (C TTAACCCCAATCATCGAC)	Lee et al. (1998) ⁴⁾ 河辺ら (1999) ²⁾
	2 回目	R16F2n(GAAACGACTGCTAAGACTG)/R16R2 (TGACGGGCGGTGTACAAACCCCG)	
2 nested	1 回目	P1 (AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT)/P7 (CGTCCTTCATCGGCTCTT)	Deng and Hiruki (1991) ⁵⁾ Schneider et al. (1995) ⁶⁾
	2 回目	R16F2n/R16R2	
3 Semi-nested	1 回目	P1/P7	
	2 回目	P1/L1n(CAAGGCATCCACTGT)	Liu et al. (2011) ⁷⁾
4 direct		f1 (AGTGGCGAACGGGTGAGTAA)/r1 (CGTC AGTAAAGACCCAGCAA)	Lin and Lin (1998) ⁸⁾
5 direct		R16F1 (AAGACGAGGATAACAGTTGG)/R16R0 (GGATACCTTGTTACGACTTAACCCC)	Lee et al. 1995 ⁹⁾
6 direct		16R758F (GTCTTTACTGACGCTGAGGC)/16R 1232R (CTTCAGTACCCTTTGTAAC)	Gibb et al. 1995 ¹⁰⁾
7 direct		fU5 (CGGCAATGGAGGAAACT)/fU3 (TTCAGC TACTCTTTGTAACA)	Lorenz et al. 1995 ¹¹⁾

3. 結果及び考察

ホルトノキ萎黄病の病原ファイトプラズマを検出するプライマーセットである R16mF2/R16mR1 と R16F2n/R16R2 を用いた nested PCR 法によって、2014 年 3 月に採取した

供試木試料のいずれからも DNA 断片は増幅されなかった。

P1/P7 と R16F2n/R16R2、P1/P7 と P1/L1n、f1/r1、R16F1/R16R0 の各プライマーセットを用いた場合、2014 年 3 月に採取した供試木試料のいずれからも、DNA 断片は増幅されなかった。

一方、16R758F/16R1232R を用いると、琉球大学構内の衰退木試料から、ファイトプラズマに特有の約 510 塩基長の DNA が増幅され、その再現性は高かった。また、fU5/fU3 を用いると、同じ試料から DNA が増幅されることがあったが、その再現性は低く、反応の安定性を欠いた。

樹木のファイトプラズマは感染の密度が低く、また季節や枝葉の齢により感染密度も変化することがあるので、PCR 反応を用いても検出されない可能性がある。また、万能プライマーでも全てのファイトプラズマを検出できるわけではなく、数種類のプライマーセットで検出を試みるのが常法である。また、沖縄産の樹種でも PCR を阻害する不純物が抽出 DNA に含まれる場合もある（亀山(未発表)など）。以上のことから、万能プライマーのいずれかで検出されれば、ファイトプラズマの感染が確認されるが、検出されない場合には、存在しないことが示唆されるのではなく、存在が確認されないことを意味するのみである。

したがって、上記の結果から、少なくとも沖縄島のホルトノキ 1 個体にファイトプラズマが感染していたことは明らかとなった。そこで、16R758F/16R1232R のプライマーセットを用いて、沖縄島内および福岡県内の供試木の試料からのファイトプラズマを試みた。

その結果、福岡県福岡市および柳川市、浦添市、西原町（琉球大学）の供試木から高率でファイトプラズマが検出された。全ての供試木からの検出結果を表-2 に示した。

表-2. 各地のホルトノキからのファイトプラズマの検出

試料採取地	供試木数	検出木数
名護市字名護	3	0
浦添市前田	3	2
西原町千原（琉大構内小緑地）	43	34
西原町千原（琉大構内孤立植栽木）	3	0
福岡市早良区西新	1	1
柳川市柳町、城隅町	8	8

琉球大学構内の小緑地において、ホルトノキ全個体を小葉化・黄化・樹冠変形衰退の 3 つの病徴について、それぞれ目視により 5 段階に類別して記録したところ、1 つ以上の病徴の形成が認められた 17 個体全てからファイトプラズマが検出され、いずれの病徴も示さない 26 個体中 17 個体からファイトプラズマが検出された。非検出の全個体と、検出された個体の一部を 9 月に再調査したところ、6 月の結果から検出・非検出に転じた個体がそれぞれあった。

このうち、2013 年夏に樹冠の明瞭な衰退が認められ、2014 年 3 月にファイトプラズマを検出した 1 個体は、6 月にも再検出され、2013～14 年に 2 回の台風の来襲と 1 回の強剪定を経て萌芽を繰り返したが、2014 年夏に枯死した。一方、小緑地外の琉大構内の植栽木 3

個体からは2014年6月には検出されなかった。

ホルトノキ萎黄病の感染地域である福岡市と柳川市において、沖縄と同一の万能プライマーでファイトプラズマが検出されたことは、沖縄島の調査木の一部が示している衰退症状はファイトプラズマによるホルトノキ萎黄病である可能性を示唆している。一方、本衰退症状の病徴進展は遅かった。また、調査した小植栽地では、病徴を示す個体からは高率でファイトプラズマが検出されたが、無病徴の個体からも少なからず検出された。これらのが、病徴の発現・緩慢な進展の前後に無病徴の感染期間がありうることを示唆するのか、それとも衰退と関係なくファイトプラズマが感染していることを示唆するのか、判断するにはなお検討を要する。しかし、本衰退症状については、ホルトノキ萎黄病が沖縄島に存在することを前提とした防除対策の検討が是非着手されるべきであると考えられる。

引用文献

- 1) 亀山統一 (2014) 九州沖縄地区から 沖縄らしいみどりを守ろう事業. 樹木医学研究 18: 16-17.
- 2) 河辺祐嗣ほか (1999) ファイトプラズマによるホルトノキ萎黄病 (新称). 日植病報 65, 654.
- 3) 河辺祐嗣ほか (2009) 沖縄本島で発生したフクギの衰退枯死被害. 日本森林学会大会発表データベース 120: 278, 2009.
- 4) Lee et al. (1998) Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16s rRNA and ribosomal protein gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology 48: 1153-1169.
- 5) Deng, S. and D. Hiruki (1991) Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. J. Microbiol. Methods 14: 53-61.
- 6) Schneider et al. (1995) Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In S. Razin and J.G. Tully (eds.), Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology, Vol. 1. Academic Press, San Diego, California, pp.369-380.
- 7) Liu et al. (2011) Phytoplasmas of two 16S rDNA groups are associated with pear decline in Taiwan. Botanical Studies 52: 313-320.
- 8) Lin TC and Lin CP (1998) Evaluation of universal PCR primers for the detection of phytoplasmas. Plant Pathol Bull 7:33-42.
- 9) Lee et al. (1995) Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. Phytopathology 85: 728-735.
- 10) Gibb et al. 1995 Studies on sweet potato little-leaf phytoplasma detected in sweet potato and other plant species growing in Northern Australia. Phytopathology 85: 169-174.
- 11) Lorenz et al. (1995) Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. Phytopathology 85: 771-776.

(連絡先 亀山統一 kameyama@agr.u-ryukyu.ac.jp)