

## 沖縄県におけるカンキツグリーニング病発生調査と地域別採取株のRFLP解析

内藤 孝・田場 聡・豊里哲也・河野伸二<sup>1)</sup>・高江洲和子 (沖縄県農業試験場<sup>1)</sup> 沖縄県農業試験場宮古支場)

Takashi NAITO, Satoshi TABA, Tetsuya TOYOSATO, Shinji KAWANO and Kazuko TAKAESU :  
Occurrence and RFLP Analysis of Citrus Huanglongbing (Greening Disease) in Okinawa Prefecture

カンキツグリーニング病は、アジア、アフリカのカンキツ産地に古くから発生して、カンキツ生産に大きな被害をもたらしている。本病は我が国において植物防疫法の特定重要病害のひとつに指定されている。本病の日本における発生は1988年に沖縄県西表島で<sup>4)</sup>、1994年には沖縄本島で確認されている<sup>3)</sup>。病原体は難培養性細菌であり、発病における性質の違いなどからアジア型とアフリカ型に分けられる。最近、この2つの型は16Sリボゾーム遺伝子の塩基配列に違いがあり、制限酵素 *Xba I* を用いたRFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) でも分類できると報告されている<sup>2)</sup>。*Xba I* により、アジア型のバンドパターンは2本に分かれ、一方アフリカ型は3本になる。沖縄県では、カンキツグリーニング病対策として1997年から、全県の発生調査を行うとともに、罹病樹伐採による防除を展開している<sup>5)</sup>。

著者らは、本病害の防除を効率よく推進するために、PCR (Polymerase chain reaction) 法検定による全県の発生状況調査と、発生している病原菌の型を明らかにするため、RFLP解析を行ったので、その結果について報告する。

### 1. 材料および方法

#### 1) 発生調査

発生調査は、1997年9月から1999年3月まで、果樹園および住宅の植栽樹について行った。まず調査地の全てのミカン、カンキツ類をそれぞれ病徴観察により調査した。その際、葉に黄化などのグリーニング病類似症状の現れている樹から、葉付きの3~4枝を採集してPCR検定を行った。

#### 2) PCR検定

PCR検定のための核酸は、採集した試料の葉3枚程度の中肋から、CTAB法で抽出した。対照として、ガラス室で接木継代中のグリーニング病罹病株、および実生健全株からも同様に核酸抽出した。

PCR反応は、得られた核酸試料にJAGOUËIXら<sup>1)</sup>の病原菌の16Sr DNAに対する特異プライマーとrTaq DNA Polymerase PCR反応液(宝酒造製)を加え、サーマルサイクラー (ASTEPC-700) を用いて、95Cで9分を1サイクル、94C30秒、60C1分、72C30秒を35サイクル、72Cで7分を1サイクル行った。

PCR産物は1%アガロースゲルを用い電気泳動の後、臭化エチジウム染色して、バンドの確認を行い、グリーニング病感染の有無を判定した。

#### 3) RFLP解析

カンキツグリーニング病と診断されたPCR産物を *Xba I* により37Cで1時間処理し、4%アガロースゲル電気泳動によりバンドパターンの確認を行った。

### 2. 結果および考察

沖縄県各地の、果樹園および住宅地植栽樹の563地点の約5万本以上を病徴観察により調査し、そのうち病徴と類似する病状を呈していた542樹についてPCR検定した結果、北部の離島をはじめ、中部、南部、慶良間諸島、久米島、宮古、八重山諸島など、ほぼ沖縄県全域にあたる29市町村の172樹からグリーニング病病原体が検出された。しかし、南、北大東島地域では両島全域の71地点、74樹を調査したにも関わらず、罹病樹は全く確認されなかった。

この結果より、カンキツグリーニング病は大東諸島を除いた、沖縄県のほぼ全域に発生していることが確認された。

また、採取した類似症状樹からグリーニング病が検出される割合は住宅地域で108/251樹(陽性樹数/検定樹数)と高く、果樹園では64/291樹と低い傾向にあった。このことより、本病は主に媒介虫により住宅地域を中心として広がっているものと思われる。

さらに検定により各地から得られた113株の16Sr DNA増幅産物のRFLP解析を行った結果、竹富島で採取した1分離株(T-8)を除き、約640bpおよび520bpの2本に切断され、JAGOUËIXらの報告<sup>2)</sup>によるアジア型の結果と一致した。

T-8は、PCRにより通常バンド(1100bp)の他に特異的に約800bp付近に短いバンドが増幅され、これら増幅産物について *Xba I* により同様の処理を行った結果、1100bpのバンドは、*Xba I* により2本に切断されたが、短いバンドは切断されなかった。T-8は、アジア型と考えられるが、約800bpのバンドが増幅される理由は不明である。

以上の結果より、沖縄県に発生しているカンキツグリーニング病は全てアジア型に属すると思われる。

また、T-8の特異バンドは、接木接種を経ても検出されるため、今後、更に詳しい解析を行う予定である。

### 引用文献

- 1) JAGOUËIX S, J M BOVE and M GARNIER, Int J Syst Bacteriol 44: 379-386, 1994
- 2) JAGOUËIX S, J M BOVE and M GARNIER, Proceedings of 13th IOCV Conference: 384-387, 1996
- 3) 河野伸二 蘇 鴻基 上原勝江 日植病報 63, 256, 1997.
- 4) MIYAKAWA, T and K, TSUNO, Ann Phytopath Soc Jpn 55: 667-670, 1989
- 5) 渡久地彰男 河野伸二 植物防疫 51, 565-570, 1997