沖縄県におけるカンキツグリーニング病保毒虫 発生現状と分布状況

大石 毅・豊里 哲也・諸見里知絵・玉城 秀和・上間 君子・谷口 昌弘・河村 太
(沖縄県農業研究センター)

Geographical distribution of the Asian citrus psyllid infected with *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Okinawa Prefecture. Tsuyoshi Ooishi, Tetsuya Toyosato, Chie Moromizato, Hidekazu Tamashiro, Kimiko Uema, Masahiro Taniguchi, Futoshi Kawamura. (Okinawa Prefectural Agricultural Research Center, Makabe 820, Itoman, Okinawa 901-0336, Japan)

沖縄県内においてミカンキジラミ成虫 (*Diaphorina citri* Kuwayama) を採集し、PCR 検定によりカンキツグリーニング病 (以下: HLB) 保毒虫の分布と発生状況を調査した。分布調査の結果、これまで HLB の発生が確認されていない南大東島と北大東島では保毒虫は検出されなかった。しかし、HLB の発生が確認されている沖縄島、石垣島、宮古島、与那国島、伊是名島および伊平屋島では保毒虫が検出され、保毒虫率はゲッキツでは 0~21.0%、カンキツ類では 9.6~48.4% であった。本病に罹病しないとされるゲッキツ上にも保毒虫が確認されたことから、ミカンキジラミ成虫はカンキツ類からゲッキツへと移動していることが示唆された。また 2002 年 2 月~2004 年 1 月にかけて 3~5 ヶ月ごとに行った定期調査の結果、保毒虫の明確な季節的変動は確認されなかった。

Key words : *Murraya exotica* L., orange jasmine, transmission

緒 言

ミカンキジラミ (*Diaphorina citri* Kuwayama) はカンキツグリーニング病 (Citrus huanglongbing, 以下 HLB) の病原体である *Candidatus Liberibacter asiaticus* を媒介することから (Xu et al., 1988), 本病が分布するカンキツ栽培地域においてはもっとも重要な害虫である。本種の寄主範囲はミカン科の植物に限られ、各種栽培カンキツ類のほか、ゲッキツ *Murraya exotica* L. などが好適な寄主植物となっている (Aubert, 1987)。とくにゲッキツは HLB の発病は見られないが (Miyakawa, 1980), 沖縄県内において生垣や路側帯に多く植栽され (高江洲, 2001; 河野, 2001), 開花期から結実期を除き新芽を形成するため、ミカンキジラミの主要な発生源となっている。ミカンキジラミは国内において奄美大島以南 (屋富祖, 2002) および屋久島に分布することが確認されている (井上, 2004)。また、HLB は日本国内では 1988 年に沖縄県西表島で初めて発生が確認され (Miyakawa and Tsuno, 1989), その後、南北大東島を除く沖縄県全域および鹿児島県の徳之島と喜界島に分布を拡大した (河野ら, 1997; 渡久地・河野,

1997; 内藤ら, 2001; 芦原, 2005)。HLB は病株からの取木や接木、またはミカンキジラミにより媒介される。特に、近年の HLB 発生地域の拡大の大きな要因のひとつにミカンキジラミによる虫媒伝染が考えられている。そのため、今後の HLB の感染拡大防止において、本種の防除は重要である。しかし、HLB とミカンキジラミの伝搬様式には不明な点が多く、県内における HLB 保毒虫に関する発生状況についての報告もない。

今回、カンキツ類とゲッキツに生息するミカンキジラミ成虫を採集し、PCR 法により HLB 保毒虫の分布および発生状況について調査したので報告する。

なお、本研究の一部は (独) 農業・生物系特定産業技術研究機構運営費交付金プロジェクト研究 No. 166n「作物及び家畜生産における気候温暖化の影響評価とその制御技術の開発」の助成により行われた。また、本文に入るに先立ち、PCR 検定についてご指導をくださった産業技術総合研究所 (独) の深津武馬博士に厚く御礼申し上げる。

材料および方法

1. 分布調査

分布調査は2004年4月20日から28日にかけて、沖縄島北部、伊平屋島、伊是名島、宮古島、石垣島、与那国島、南大東島および北大東島にて行った。

2. 定期調査

定期調査は2002年11月から2004年2月にかけて、3～5ヶ月おきに沖縄島北部、宮古島、石垣島、西表島にて行った。各島の調査地点は第1図に示した。

3. 採集方法

生垣や路側帯のゲッキツと園地または庭木のカンキツ類（主にシークワサー *Citrus depressa* L., タンカン *Citrus tankan*）に生息するミカンキジラミ成虫を捕虫網（直径40cm）または吸虫管を用いて採集した。各島それぞれ13～21ヶ所について行った。採集個体は株（4～58頭/株）ごとに、Fukatsu (1999) の方法に従い保存液（アセトン）の入ったサンプル管（マルエム社製：Type No. 3）に保存し、実験室に持ち帰った。

4. PCR 検定法

PCR 検定は採集したすべての個体について行った。

DNA 抽出はマイクロチューブ（BIOplastics 社製：0.2 ml）にミカンキジラミ成虫1個体と100 μ l の抽出緩衝液（0.01M Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA-3 Na, 0.025M NaCl, 5% プロテイナーゼ K）を加え、滅菌した爪楊枝で磨砕し、55℃60分、94℃15分処理した後、遠心した上澄みを鋳型 DNA として用いた。PCR 反応液は、鋳型 DNA 1 μ l に Siti et al. (2000) の HLB 特異的プライマー、GOINfwd（5'-GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA-3'）と GOrev（5'-GCCTCGCGACTTCGCAACCAT-3'）をそれぞれ 1 μ l（10pM）、Ex Taq DNA Polymerase（タカラバイオ社製）を 0.1 μ l、dNTP Mixture を 1.6 μ l、10× Ex Taq Buffer を 2 μ l 加え、精製水で全量を 20 μ l とした。PCR 反応はサーマルサイクラー（GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems）を用い、94℃ 1分、52℃ 1分、72℃ 1分を 30 サイクル、70℃ 10分を 1 サイクル行った。得られた PCR 産物について 1% アガーロースゲルを用いて電気泳動の後、臭化エチジウムで染色し増幅 DNA 産物を確認した。供試虫が HLB を保毒しているならば、約 1100bp の増幅 DNA 産物（バンド）が得られる。このバンドの有無により、HLB の保毒を確認した。

第1図 定期調査の調査地点

○：カンキツ類，△：ゲッキツ。

結 果

分布調査の結果を第2図に示した。HLBの発生が確認されていない南北大東島を除くすべての調査地域において保毒虫が検出され、与那国島以外の調査地域においてカンキツ類とゲッキツの両方から保毒虫が検出された。保毒虫率はカンキツ類で9.6～48.4%，ゲッキツでは4.5～21.0%であった。

定期調査の結果を第1～4表に示した。沖縄島北部の保毒虫率は、ゲッキツで0.5～4.0%，カンキツ類では22.2～41.5%であった（第1表）。石垣島の保毒虫率は、

第1表 沖縄島北部のゲッキツおよびカンキツ類から採集されたミカンキジラミ成虫の検定結果

寄主植物	調査年月	調査本数	検定虫数	陽性虫数	保毒虫率 (%)
ゲッキツ	2002/11	7	193	1	0.5
	2003/03	10	130	4	3.1
	2003/08	8	209	1	0.5
	2003/12	16	100	4	4.0
	2002/11	15	297	109	36.7
カンキツ類	2003/03	9	180	40	22.2
	2003/08	7	125	28	22.4
	2003/12	18	272	113	41.5
	2004/02	2	62	23	37.1

ゲッキツでは調査を開始した2002年12月から2003年10月まで0.0～1.1%と保毒率は低かった。しかし、2004年1月には22.2%に増加した（第2表）。カンキツ類では0.0～57.9%であった（第2表）。西表島のゲッキツでは調査を開始した2002年12月から2003年8月まで保毒虫は検出されなかった。しかし、その後2003年10月と2004年1月には保毒虫が検出され、保毒虫率はそれぞれ1.3%と18.0%の値を示した（第3表）。また、カンキツ類では

第2表 石垣島のゲッキツおよびカンキツ類から採集されたミカンキジラミ成虫の検定結果

寄主植物	調査年月	調査本数	検定虫数	陽性虫数	保毒虫率 (%)
ゲッキツ	2002/12	5	167	0	0.0
	2003/03	8	111	1	0.9
	2003/05	3	30	0	0.0
	2003/08	6	183	2	1.1
	2003/10	6	83	0	0.0
	2004/01	6	72	16	22.2
カンキツ類	2002/12	2	27	1	3.7
	2003/03	2	20	0	0.0
	2003/05	6	98	28	28.6
	2003/08	13	18	1	5.6
	2003/10	13	57	11	19.3
	2004/01	6	38	22	57.9

第2図 沖縄島および周辺離島における保毒虫の分布調査。a) 数値は保毒虫率。b) HLB 陽性個体数 / 検定虫数。

第3表 西表島のゲッキツおよびカンキツ類から採集されたミカンキジラミ成虫の検定結果

寄主植物	調査年月	調査本数	検定虫数	陽性虫数	保毒虫率 (%)
ゲッキツ	2002/12	2	42	0	0.0
	2003/03	6	60	0	0.0
	2003/05	5	35	0	0.0
	2003/08	3	119	0	0.0
	2003/10	3	75	1	1.3
	2004/01	2	50	9	18.0
カンキツ類	2002/12	2	26	0	0.0
	2003/03	5	67	4	5.9
	2003/05	2	17	0	0.0
	2003/08	4	14	0	0.0
	2003/10	3	10	0	0.0
	2004/01	- a)	-	-	-

a) 採集個体なし。

2003年3月の保毒虫率は5.9%であったが、調査株がHLB発病により枯死または伐採されたため、その後はカンキツ類からはミカンキジラミ成虫はほとんど採集されず、保毒虫も検出されなかった(第3表)。宮古島の保毒虫率は、ゲッキツで0.0~20.4%(第4表)、カンキツ類では3.1~43.8%であった(第4表)。今回の調査においては、保毒虫率の季節的な変動は確認できなかった。

いずれの調査においてもゲッキツとカンキツ類の両方から保毒虫が検出されたが、保毒虫率はカンキツ類に比較してゲッキツでは低い値を示した。カンキツ類上でミカンキジラミの卵および幼虫が観察されることはまれであった。今回の調査において、ミカンキジラミ成虫が採集されたカンキツ類はすべて住宅地域の庭木または粗放的に栽培されている園の木であり、薬剤防除が行われ、管理の行きとどいた園地からはほとんど採集されなかった。

考 察

今回の一連の調査でゲッキツ上にHLB保毒虫が生息することが初めて明らかとなった(第1~4表, 第2図)。このことは、ミカンキジラミ成虫がゲッキツとカンキツ類間を移動していることを示唆している。特に、石垣島においては、周囲約300m以内にカンキツ類が存在しないゲッキツ上で保毒虫が検出されたことから、ミカンキジラミ成虫は少なくとも数百mの距離を移動してきた可能性がある。沖縄県北部のカンキツ栽培地域におけるカンキツ類の保毒虫率の最大値は41.5%であり(第1表)、HLB多発生地域であるインドネシアのカンキ

第4表 宮古島のゲッキツおよびカンキツ類から採集されたミカンキジラミ成虫の検定結果

寄主植物	調査年月	調査本数	検定虫数	陽性虫数	保毒虫率 (%)
ゲッキツ	2002/12	4	38	0	0.0
	2003/03	6	60	0	0.0
	2003/05	7	91	7	7.7
	2003/08	7	117	1	0.9
	2003/10	7	87	2	2.3
	2004/01	6	49	10	20.4
カンキツ類	2002/12	- a)	-	-	-
	2003/03	1	52	2	3.8
	2003/05	2	65	2	3.1
	2003/08	9	70	8	11.4
	2003/10	7	71	19	26.8
	2004/01	6	73	32	43.8

a) 採集個体なし。

ツ *Citrus nobilis* から採集されたミカンキジラミ成虫の保毒虫率45.2%(Siti et al., 2000)と比較してもほとんど差は無く、極めて高い保毒虫率であった。

定期調査では、保毒虫率の季節的変動は明らかではなかった(第1~4表)。その原因として調査日によって採集したサンプル数にばらつきが大きいこと、調査株がHLB発症により枯死、伐採されてしまったことなどが考えられる。また、2004年1月は石垣島、西表島および宮古島の保毒率は急激に増加した(第2~4表)。この要因として調査対象地域のHLBの感染が拡大し、それに伴い保毒虫が増加した、もしくはこの時期の環境条件がミカンキジラミのHLB病原体の保毒に適していた、さらにはミカンキジラミの移動分散が頻繁に起こった、など様々なことが考えられる。保毒率は調査地域のHLBの発生状況やミカンキジラミ成虫の移動分散に大きく影響を受けると考えられたことから、調査方法について検討する必要があると思われる。

HLB病原体の伝搬メカニズムは不明であるが、一般的に虫媒性の節節局在型の病原体は媒介虫の体内で増殖し、唾液腺へ移行することによって伝搬される(福士ら, 1986)。PCR法による検定は感度が高いため、HLB感染株の節管液をミカンキジラミが吸汁することにより、唾液腺にHLBが無い場合でも腸内にHLB病原体が残っていれば保毒虫として検出される。そのため、今回検出された保毒虫の中にもそのような状態のサンプルが多く含まれていると考えられる。今後は唾液腺にHLB病原体を有する保毒虫の検定法、ミカンキジラミ体内におけるHLB病原体の移行や増殖機構は検討すべき重要な課題

であると考えられる。

感染株の早期発見は HLB の感染拡大防止対策として非常に重要である。そのため、沖縄県においては HLB 感染樹の検定にスクラッチ法 (澤岬ら, 2006) や PCR 法 (Jagoueix et al., 1994) を用いることにより発病株の検定を行っているが、発症前に HLB の感染の有無を正確に判定することは困難である。今後、HLB 保毒虫のモニタリングを実施することにより、HLB の発生未確認地域では感染または発症前に感染拡大をより早く検知できる可能性がある。また、HLB 発生地域において HLB の保毒率は病株の伐採や薬剤散布後の防除効果を評価する指標の一つとして有効であろう。

引用文献

- 芦原 亘 (2005) カンキツグリーニング病と媒介昆虫ミカンキジラミの分布拡大. 今月の農業 49(1): 77-81.
- Aubert, B. (1987) *Trioza erythrae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea) the two vectors of citrus greening disease: biological aspects and possible control strategies. Fruits 42: 149-162.
- Fukatsu, T. (1999) Acetone preservation: a practical technique for molecular analysis. Mol. Ecol. 8: 1935-1945.
- 福士貞吉・鈴木直治・四方英四郎 (1986) 植物のウイルス病. 養賢堂 (東京), pp. 514.
- 井上広光 (2004) キジラミ類の分類と生態 (2). 植物防疫 58: 29-32.
- Jagoueix, S., J.-M. Bove and M. Garnier (1994) The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the *Proteobacteria*. J. Int. Syst. Bacteriol. 44: 379-386.
- 河野伸二・蘇 鴻基・上原勝江 (1997) 沖縄本島におけるカンキツグリーニング病の初発生. 日植病報 63: 256.
- 河野勝行 (2001) わが国におけるカンキツグリーニング病. 農業および園芸 76: 855-863.
- Miyakawa, T. (1980) Experimentally-induced symptoms and host range of citrus likubin (greening disease). Ann. Phytopath. Soc. Jpn. 46: 224-230.
- Miyakawa, T. and K. Tsuno (1989) Occurrence of citrus greening disease in the southern islands of Japan. Ann. Phytopath. Soc. Jpn. 55: 667-670.
- 内藤 孝・田場 聡・豊里哲也・河野伸二・高江洲和子・上原勝江 (2001) カンキツグリーニング病の PCR による検定法と沖縄地域における発生分布. 沖縄県農業試験場研究報告 23: 74-81.
- Siti, S., N. Nikoh, S. Tsuyumu, S. Somowiyarjo and T. Fukatsu (2000) Complex endosymbiotic microbiota of the citrus psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea). Zoo. Sci. 17: 983-989.
- 高江洲和子 (2001) 沖縄県におけるカンキツグリーニング病の発生状況. 今月の農業 45(7): 76-80.
- 澤岬哲也・豊里哲也・河野伸二・田場 聡・田場奏美・大城 篤・沼澤雅哉・渡慶次美歌 (2006) スクラッチ法によるカンキツグリーニング病の迅速簡易診断. 日植病報 (印刷中).
- 渡久地章男・河野伸二 (1997) 沖縄県におけるカンキツグリーニング病の発生状況および防除対策. 植物防疫 51: 565-570.
- Xu, C. F., Y. H. Xia, K. B. Li and C. Ke, (1988) Further study of the transmission of citrus huanglongbing by a psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. Pro. 10th Conf. IOCV (Riverside, CA) pp. 243-248.
- 屋富祖昌子 (2002) 琉球列島産昆虫目録 増補改訂版 (東清二監修, 屋富祖昌子・金城政勝・林 正美・小濱継雄・佐々木健志・木村正明・河村 太 編). 沖縄生物学会 (西原), pp. 570.

(2006年4月30日受領; 8月14日受理)