

研究報告

キリてんぐ巢病に関する研究

(県単課題 平成10年～14年)

武井利之
古川成治
川口知穂(現森林林業領域)

目 次

要 旨

はじめに	-----	2
試験方法	-----	2
- 1 調査地と試料採取		
- 2 ファイトプラズマの確認		
- 3 葉の乾燥および粉碎		
- 4 単糖および糖アルコールの分析		
- 5 構成元素分析		
- 6 カルシウム施肥と接種試験		
結果	-----	4
- 1 福島県会津地域におけるキリてんぐ巢症状		
- 2 キリてんぐ巢病病原体の検出		
- 3 てんぐ巢病罹病葉の障害		
- 3 - 1 単糖および糖アルコール		
- 3 - 2 葉の構成元素		
- 4 カルシウム施肥と接種試験		
考察	-----	8
引用文献	-----	9

要 旨

キリ衰退原因の一つと考えられるキリてんぐ巢病について、会津地域における存在の有無および罹病葉の成分化学的特徴を明らかにした。会津地域を調査した結果、典型的てんぐ巢症状を示すキリが存在した。このキリ葉を PCR 法による遺伝子診断に供した結果、てんぐ病の病原体が存在することが明らかとなった。続いて、てんぐ巢病に罹病したキリの障害を明らかにする目的で、ストレス対応成分である単糖類と糖アルコールを含む低分子成分を罹病葉と非罹病葉で比較した。その結果、罹病葉と非罹病葉で大差がなかった。次に、植物体の奇形などの原因となる必須元素の過不足を検討した。その結果、罹病葉は非罹病葉に比べてカルシウム含量が低いことが明らかとなった。そこで、カルシウムを施肥して生育させたキリに、病原体の接種を試みが、てんぐ巢病予防の効果を確認することができなかった。

受理日：平成15年3月13日

はじめに

キリは本県の特産品で、その材は高級家具や工芸品として用いられている。近年、キリの生育不良や若齢木の枯損が目立ち、キリとキリ関連産業の衰退が危惧されている。これらキリの衰退の要因の一つとして、キリてんぐ巣病が考えられる。キリてんぐ巣病の病徴¹⁾は、小枝が密に群生するものである。一本の枝から腋芽が伸びて小枝となり、その小枝からまた腋芽が発生するという現象が、絶えずくりかえされる。病幹部の葉は、特に小型で黄色みを帯びており、越冬の際、枯れ果てる。てんぐ巣病の病原体はファイトプラズマとされている^{2,3)}。東北地方のキリてんぐ巣病については、中村により詳細に検討され⁴⁾、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション (PCR) を用いたファイトプラズマの検出方法^{5,6)}、キリ葉内でのファイトプラズマの出現と消失⁷⁾について、報告されている。しかし、罹病の原因や病原体の感染経路は明らかにされていない。病原体のファイトプラズマには、媒介者が存在すると考えられており、日本ではクサギカメムシに関する報告⁸⁾がなされているが、追証されていない。また、キリ畑で採取した昆虫類の PCR 分析⁴⁾においても、ファイトプラズマ媒介者の存在は見いだされなかった。さらに、ファイトプラズマは培養や接種等の人為的管理方法が確立されていない。

福島県会津地域においては、1998年に中村により、無作為に選んだキリ葉の遺伝子診断によりファイトプラズマの存在が示唆された⁴⁾。また、奇形花芽からも高頻度でファイトプラズマが検出され、てんぐ巣病の存在が示唆された。しかし、てんぐ巣症状の確認や、てんぐ症状を示す葉にファイトプラズマが存在するか否か等については、明らかにされていなかった。

一方、植物体は病原体に侵された場合、ファイトアレキシンのような抗菌物質を合成したり、乾燥や低温などのストレスを受けた場合、糖類を合成するなどの動的抵抗性反応を起こす。キリてんぐ巣病においても、ファイトプラズマが師部組織に密集している^{4,9)}ことなどから、これに対抗する生理的反応を起こしている可能性が考えられる。また、植物の形態異常の要因には、必須元素の過剰や欠乏が関与している場合が多い。樹木でも必須元素の欠乏に由来する多くの欠乏症状が生じる¹⁰⁾。しかしながら、てんぐ巣病罹病によるキリの生理的対応や、構成元素に関する知見はない。キリてんぐ巣病の防除策を検討するための基礎的調査として、罹病によるキリの障害を明らかにする必要がある。

これらのことから、本研究では、まず始めに会津地方のキリにおけるキリてんぐ巣病の実態を明らかにする目的で、てんぐ巣症状を示す個体の有無およびファイトプラズマの存在の確認を行った。続いて、キリのストレス対応、および、構成元素の過不足の有無について検討した。

試験方法

- 1 調査地と試料採取

調査地は会津地域とした。

実験には、柳津町のキリ畑内でてんぐ巣症状を示す個体 (試料 1 I) と示さない個体 (試料 1 N I)、三島町のでんぐ巣病を示す個体の罹病部 (試料 2 I) と非罹病部 (試料 2 N I)、および喜多方市のでんぐ巣病を示す個体の罹病部 (試料 3 I) と非罹病部 (試料 3 N I) をそれぞれ採取して用いた。

- 2 ファイトプラズマの確認

ファイトプラズマは、中村らの方法^{4・7)}に従い PCR によりファイトプラズマリボソームタンパク質遺伝子の一部を増幅、検出することにより確認した。

調査値にて採取した葉に液体窒素を加え、乳鉢で摩砕した。これを CTAB 中で攪拌し、クロロホルム：オクタノール混合液を加え振とうした。遠心分離後、上清にイソプロパノールを加えて混合し、遠心分離した。得られた沈殿を少量の TE に溶解し、RNase で処理した。続いて、5MNaCl、TE、フェノール飽和 TE を加えて振とう後、遠心分離し、上清に 3M 酢酸ナトリウム、エタノールを加えて振とうした。これを遠心分離し、沈殿として DNA を得た。

得られた DNA を TE に溶解し、蒸留水、10 * Buffer、50mMMgCl₂、プライマー、dNTP、TaqDNA ポリメラーゼの混合液に加えて、1 サイクル{ 94 -1min.、 50 -1min.、 72 -2min. } を 50 回繰り返し + 72 -5min. で PCR を行った。これを 1 % アガロースゲル/TAE で電気泳動した後、エチレンブロマイドで染色し、UV トランスイルミネーター上でファイトプラズマ特異的産物の有無を観察した。プライマーは、rp3 : AACTTCTAGCACAAACTTGC、rp2 : CGATATTTAGTTCTTTTTGG を使用した。

- 3 葉の乾燥および粉砕

採取した葉に液体窒素を加えて凍結し、小片とした後、YELA 製凍結乾燥器にて凍結乾燥した。これを CMT 社製振動式粉砕器にて粉砕し、葉の粉末試料を調製した。なお、粉砕にはタングステンカーバイト製ポットを用いた。

- 4 単糖および糖アルコールの分析

葉の粉末試料に 70 %エタノールを加えて攪拌し、ろ過して可溶部を得た。ろ液に内部標準物質としてソルビトールを加え、ピリジン：無水酢酸混液でアセチル化して島津製ガスクロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィー・質量分析装置を用いて糖アルコールを分析した。分析カラムは、DB-225 を用いた。また、同様にして調製し、内部標準物質を加えたろ液を Waters 製高速液体クロマトグラフィー装置により単糖類と糖アルコール分析した。カラムは Sugar-Pak Ca + ガードカラム Sugar-Pak Ca を使用した。単糖および糖アルコール標準品として、ラムノース、フコース、アラビノース、キシロース、マンノース、フルクトース、ガラクトース、グルコース、およびこれらを還元して調製した糖アルコールを用いた。オリゴ糖標準品としてマルトース、マルトトリオース、プルラン (P-10) を用いた。

- 5 構成元素分析

葉の粉末試料を島津製圧縮機により成形した後、島津製 XRF1500 により元素を定性、定量した。標準品は、National Institute of Standards & Technology 製 PeachLeaves、Apple Leaves、Pine Needles、および State Bureau of Technical Supervision 製 Tea を使用した。

- 6 接種試験

林業研究センター内で実生より栽培した 1 年生キリ 10 個体を、5 月に同所内の圃場に移植した。このうち 5 個体に、6 月、8 月、および 10 月上旬に 1 本当たり 50g の消石灰 (水酸化カルシウム) を根元の周囲、半径 50cm 以内に散布し、土壌と攪拌した。10 月上旬に、これら

のキリの地上約 1.5m の位置で樹皮を約 1.5cm 四方に切り取り、露出した形成層に、接種用試料を接触させた。接種用試料は、会津地域にて採取した罹病葉を直ちに 10 倍量のイオン交換水中で約十秒間ホモジナイズして調製した。これを、樹皮切除部に塗った後、周囲をテープで覆って固定した。感染の有無は、接種後の観察で、てんぐ巢症状が現れるか否かで判別した。

結果

- 1 福島県会津地域におけるキリてんぐ巢症状

会津地域のキリについて、てんぐ巢症状の有無を調査した。その結果、てんぐ巢症状を示すキリが認められた。てんぐ巢症状を示すキリが見られた地域を図 1 に示した。

東北地方のキリは明確なてんぐ巢症状を示さない^{4, 11)}とされていたが、本調査で見いだされた症状は、小枝に黄色みを帯びた小型の葉をつける、明らかなてんぐ巢症状を示しており、罹病していない周囲の枝葉と容易に区別できるものであった。

てんぐ巢症状を示した個体および実験試料を写真 1 に示した。

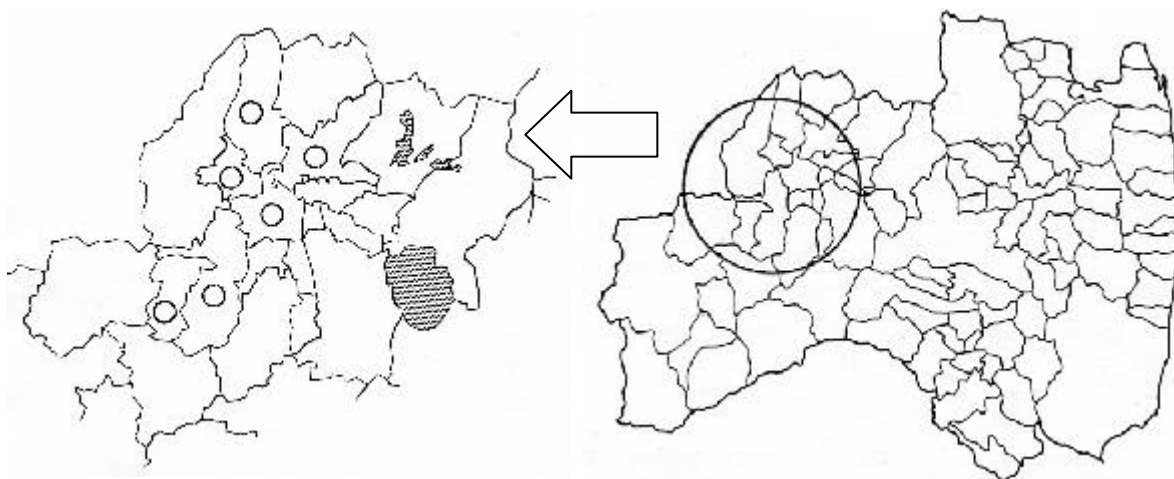


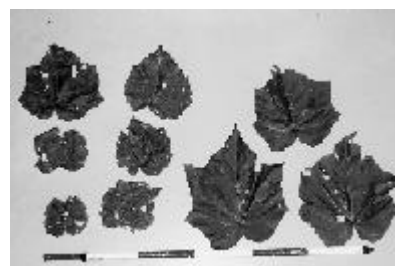
図 1 てんぐ巢症状を示すキリが見られた地域
○ : てんぐ巢症状あり



A



B



C



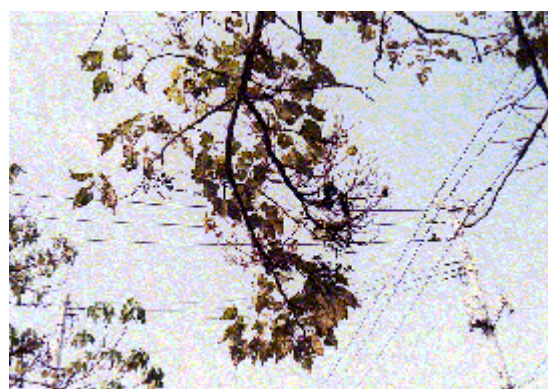
D



E



F



G

写真1 実験試料および会津地域で見られるてんぐ巣症状

A：試料1 Iを採取したてんぐ巣病を示す個体、B：試料1 N Iを採取したてんぐ巣病を示さない個体、C：試料1 I（左6枚）と試料1 N I（右3枚）、D：試料2 I（右）と試料2 N I（左）、E：試料3 I（右下）と試料3 N I（左上）、F会津地域で見られるてんぐ巣症状、G会津地域で見られるてんぐ巣症状

- 2 キリてんぐ巢病病原体の検出

ファイトプラズマの存在を確認する目的で、各調査地にて採取した葉を、PCR法による遺伝子分析に供した。その結果、てんぐ巢症状を示す葉からファイトプラズマ特異的産物が検出された。一方、肉眼観察により、てんぐ巢症状を示していないと判断される葉からは、いずれの試料からもファイトプラズマ特異的産物が検出されなかった。ファイトプラズマ特異的産物を検出した結果を写真2に示した。

本調査により、会津地域にてんぐ巢症状を呈するキリが存在することが明らかとなった。また、てんぐ巢症状を示す葉に病原体とされるファイトプラズマが存在し、てんぐ巢症状を示さない葉には存在しないことを確認した。

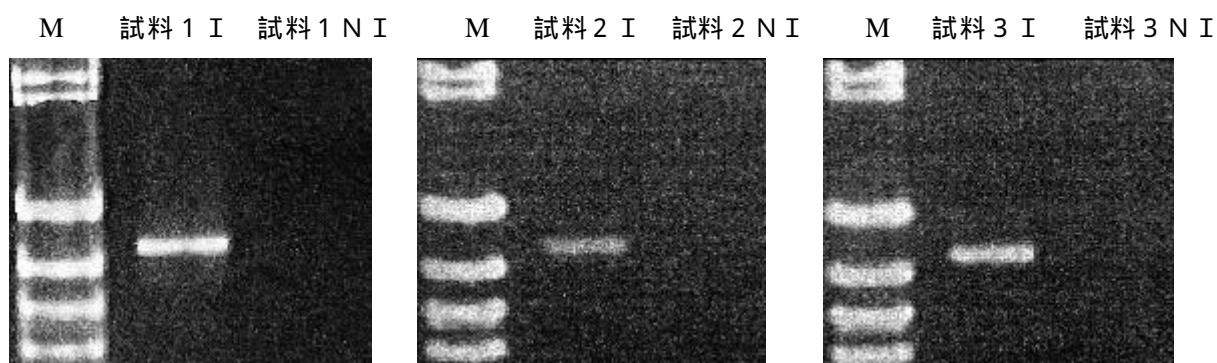


写真2 ファイトプラズマ特異的産物を検出した結果

M はマーカー

- 3 てんぐ巢病罹病葉の障害

- 3 - 1 単糖および糖アルコール

てんぐ巢病に罹病した葉および非罹病葉の糖類を分析した結果を表1に示した。

てんぐ巢病に罹病した葉および非罹病葉双方に、糖類を含む低分子物質として、未知物質A、糖未知物質B、および *myo*-イノシトールを検出した。既知の糖類と相対保持時間および質量スペクトルを比較して、同定できたのは *myo*-イノシトールのみであった。標準品として使用した他の単糖と糖アルコールは検出されなかった。

葉から検出された物質A、物質B、および *myo*-イノシトールの内部標準物質（ソルビトール）に対する割合は、罹病葉でそれぞれ 13.62、1.00、および 0.79、非罹病葉でそれぞれ 14.44、0.52、および 0.80 で、類似した値であった。また、それらの乾燥葉に対する割合も近似した値であった。

表 1 キリ葉 70%メタノール可溶部重量と組成

	罹病	非罹病
乾燥葉に対する重量百分率 (%)	13.6	13.4
化合物の相対比		
A 未同定	13.62	14.44
B 単糖・未同定	1.00	0.52
C <i>myo</i> -イノシトール	0.79	0.80
D ソルビトール (内部標準)	1.00	1.00

- 3 - 2 葉の構成元素

てんぐ巢病に罹病したキリ葉の構成元素を明らかにする目的で、蛍光X線分析を行った。試料 1、2、および3の、てんぐ巢病に罹病した葉 (I) と非罹病の葉 (NI) の構成元素を表 2 に示した。

各試料の主な構成元素は、試料ごとに含量の差はあるが、カルシウム、カリウム、リン、マグネシウム、およびイオウであった。この他、塩素、ケイ素、鉄、アルミニウム、銅、マンガン、亜鉛、ストロンチウム、ルビジウムが検出された。各試料ごとに比較すると、罹病した葉は非罹病葉に比べてカルシウムの含量が、1/5 ~ 1/2 と少ない特徴が共通していた^{12, 13)}。

表 2 - 1 キリ葉に含まれる元素 (試料 1)

元素名	罹病 (I)	非罹病 (NI)
カルシウム	1.2	2.4
カリウム	0.9	1.2
リン	0.2	0.2
マグネシウム	0.2	0.2
イオウ	0.1	0.1
その他微量検出された元素 塩素、ケイ素、鉄、アルミニウム、銅、マンガン、亜鉛、ストロンチウム、ルビジウム		

値は乾燥葉に対する重量百分率

表 2 - 2 キリ葉に含まれる元素 (試料 2)

元素名	罹病 (I)	非罹病 (NI)
カルシウム	0.7	1.4
カリウム	0.8	0.9
リン	0.3	0.2
マグネシウム	0.1	0.1
イオウ	0.1	0.2
その他微量検出された元素 塩素、ケイ素、鉄、アルミニウム、銅、亜鉛、ストロンチウム		

値は乾燥葉に対する重量百分率

表 2 - 3 キリ葉に含まれる元素（試料 3）

元素名	罹病（I）	非罹病（NI）
カルシウム	0.3	1.7
カリウム	2.0	1.0
リン	0.1	0.1
マグネシウム	0.1	0.2
イオウ	0.1	0.2

その他微量検出された元素
 塩素、ケイ素、鉄、アルミニウム、銅、亜鉛、ストロンチウム
 値は乾燥葉に対する重量百分率

- 4 カルシウム施肥と接種試験

葉の構成元素を定量した結果、罹病した葉のカルシウム含量が非罹病葉に比べて低かったことから、土壌のカルシウム含量が低いことに起因するキリのカルシウム不足が、てんぐ巣症状に関与している可能性が考えられた。そこで、カルシウムを施肥した場合、てんぐ巣病予防に有効か否かの検討を試みた。ただし、病原体のファイトプラズマは培養や接種等の管理ができないため、人為的な感染、発病などがなされた報告例はなく、接種方法も確立していない。本実験では、採取した葉を試料木の形成層に直接接触させることで接種を試みた。

接種後、経過を観察した結果を表 3 に示した。

カルシウム施肥の有無に関わらず、試料木すべてにてんぐ巣症状が現れなかった。従って、てんぐ巣病へのカルシウム施肥の効果を確認することができなかった。

表 3 カルシウム施肥の効果

個体	カルシウム施肥	接種	てんぐ巣症状
1	+	+	-
2	+	+	-
3	+	+	-
4	+	-	-
5	+	-	-
6	-	+	-
7	-	+	-
8	-	+	-
9	-	-	-
10	-	-	-

+ : 有り - : 無し

考察

会津地域での調査において、小枝に黄色みを帯びた小型の葉をつける、明らかにてんぐ巣症状を示すキリが見いだされた。この病徴は、罹病していない周囲の枝葉と容易に区別できるも

のであった。会津地域を含め、東北地方のキリは明確なてんぐ巣症状を示さない^{4,11)}とされていたが、本調査によりてんぐ巣症状が存在することを確認した。また、病原体の遺伝子診断の結果、病原体は、てんぐ巣症状を示す葉にのみ存在し、てんぐ巣症状を示さない葉には存在しないことが明らかとなった。この手法が本県のてんぐ巣病罹病診断に適用できることが示された。PCR法を用いた遺伝子診断の結果は、肉眼観察の結果と一致していたことから、肉眼観察も罹病判別に有効と考えられるが、確実な罹病判定には肉眼観察と遺伝子診断の双方が必要と考えられる。

一般に植物は、病害虫や高低温、乾燥などに対し、対抗する反応が起きることから、キリも罹病に伴うストレスに対応する反応を起こしていると考えられた。てんぐ巣病に罹病したキリの、ストレス対応物質である葉の単糖および糖アルコールの含量を調査した結果、非罹病葉のそれと大差がなく、これらの化合物を介した浸透圧調節が起きている可能性は低いと考えられた。

続いて、生育不良や奇形の原因となる栄養元素の過不足を明らかにする目的で、キリ葉の構成元素を分析した。その結果、罹病葉は、非罹病葉に比べてカルシウム含量が低い特徴があった。カルシウムは、細胞壁構成に重要な元素であり、要求度の高い必須元素であることから、欠乏による影響も大きいと考えられる。また、カルシウムは植物体内で移動性が乏しく¹⁴⁾、土壤中の絶対量不足や、吸収が抑制される環境下におかれた場合、それ以後の新生組織である葉の先端や葉縁が白色または褐色に枯死する欠乏症が生じる¹⁰⁾。これらのことから、てんぐ巣症状を生ずる可能性の一つにカルシウムが関与している可能性が考えられた。

そこで、カルシウムを施肥して育成したキリに病原体の接種を試みたが、カルシウム施肥の有無に関わらず、感染が認められず、その効果を確認することができなかった。この原因として、接種方法が不適切であったことが考えられる。キリてんぐ巣病の防除技術を確立するためには、ファイトプラズマの培養や接種等の人為的管理技術の確立が必要であると考えられる。

引用文献

- 1) 熊倉囃雄；キリ：社団法人農山漁村文化協会 p.117 (1982)。
- 2) 土居養二、寺中理明、与良清、明日山秀文；クワ萎縮病、ジャガイモてんぐ巣病、Aster yellows 感染ペチュニアならびにキリてんぐ巣病の罹病茎葉師部に見いだされた Mycoplasma 様 (あるいは PTL 様) 微生物について。日植病報 33, p.259-266 (1967)。
- 3) 明日山秀文・飯田俊武；日本作物ウイルス病総覧：農業技術協会 p.347 (1967)。
- 4) 中村仁：キリてんぐ巣病に関する研究 - キリてんぐ巣病の遺伝子診断法の確立と東北地方における発生調査 - 。岩手大学大学院農学研究科 修士論文 (1995)。
- 5) Nobuyuki YOSHIKAWA, Hitoshi NAKAMURA, NorioSAHASHI, Takamori KUBONO, Kazunori KATUUBE, Tsugio SHOJI and Tsuyoshi TAKAHASHI；Amplification and Nucleotide Sequence of Ribosomal Protein and 16S rRNA Genes of Mycoplasma-like Organism Associated with Paulownia Witches' Broom。Ann. Phytopathol. Soc. Japan60, p.569-575 (1994)。
- 6) H. NAKAMURA, N. Yoshikawa, T. Takahashi, N. Sahashi, T. Kubono, T. Shoji；Evaluation of Primer Pairs for the Reliable Diagnosis of Paulownia Witches'-Broom Disease Using a Polymerase Chain Reaction。Plant Disease 80(3), p.302-305 (1996)。

- 7) Norio SAHASHI, Hitoshi NAKAMURA, Nobuyuki YOSHIKAWA, Takamori KUBONO, Tsugio SHOJI and Tsuyoshi TAKAHASHI : Distribution and Seasonal Variation in Detection of Phytoplasma in Bark Phloem Tissues of Single Paulownia Trees Infected with Witches' Broom . Ann. Phytopathol. Soc.Japan 61 , p.481-484 (1995).
- 8) 塩沢広康 : クサギカメムシによるキリてんぐ巢病の伝搬 . 植防研報 4 , p.45-50 (1986).
- 9) 高村尚武、作山健 ; 岩手県に発生したキリてんぐ巢病樹からのマイコプラズマ様微生物の検出 : 森林防疫 28, No.1 , p.7 (1979).
- 10) 畑野健一・佐々木恵彦 ; 樹木の生長と環境 : 養賢堂 p.331 (1998).
- 11) 吉川信幸、中村仁、佐橋憲生 ; 遺伝子診断を利用した東北地方におけるキリてんぐ巢病の発生調査 : 森林防疫 48, No.4 , p.2 (1999).
- 12 武井利之、古川成治 ; てんぐ巢病罹病キリの微量成分 : 第 49 回日本木材学会大会研究発表要旨集 p.592 ,(1999).
- 13) 武井利之、古川成治、東順一 ; てんぐ巢病罹病キリの微量成分 () : 第 50 回日本木材学会大会研究発表要旨集 p.681 ,(2000).
- 14) Atsushi KUMATA, Akira KAWANA, Hirozumi KATAOKA ; Trends of Foliar Elements in Various Phases of Growth of Deciduous Trees : ROEST SITE EVALUTION AND LONG-TERM PRODUCTIVITY : University of Washintong Press SEATTLE AND LONDON p. 22-33 (1988).