‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ によるリンドウてんぐ巢病の発生 (病原追加)

田中 穰^{1*}・児玉 勝雄²・千葉 賢一²・岩館 康哉²・宇杉 富雄¹

ABSTRACT

TANAKA, M.^{1*}, KODAMA, K.², CHIBA, K.², IWADATE, Y.² and USUGI, T.¹ (2006). Occurrence of gentian witches'-broom caused by ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’. Jpn. J. Phytopathol. 72: 191-194.

The causal phytoplasma of gentian witches'-broom, found in Iwate Prefecture in 2005, was identified phylogenetically as ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’, but not ‘*Candidatus Phytoplasma pruni*’, which was previously reported as the pathogen of gentian witches' broom in Japan. The causal phytoplasma was also revealed to be transmitted by *Macrosteles striifrons*. We propose adding ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ to the pathogens of gentian witches'-broom.

(Received December 7, 2005; Accepted March 8, 2006)

Key words: ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’, gentian witches'-broom, *Macrosteles striifrons*

リンドウ (*Gentiana* spp.) は、お盆やお彼岸の供花として需要が高く日本各地で栽培されているが、岩手県では1960年代前半から本格的にリンドウ栽培を始めており、1964年には県独自でリンドウの育種を開始するなど生産振興に努め、1985年には生産額、栽培面積共に国内最大の生産県となり現在に至っている。リンドウてんぐ巢病は、岩手県及び福島県における発生が奥田ら (1972) により初めて報告され、透過型電子顕微鏡により罹病株の篩部にファイトプラズマ (当時はマイコプラズマ様微生物と呼称) が観察された。1973年には、新潟県妙高高原町における発生が報告され、媒介昆虫がキマダラヒロヨコバイ (*Scleroracrus flavopictus* Ishihara) であることが明らかとなった (小池ら, 1973)。その後、新潟県分離株については媒介様式や宿主植物範囲について詳細な試験が行われている (塩見, 1988)。また、近年の 16S rRNA 遺伝子の系統遺伝学的な解析により、リンドウてんぐ巢病をはじめとするキマダラヒロヨコバイによって媒介されるファイトプラズマ病の病原は、暫定種名 ‘*Candidatus Phytoplasma pruni*’ として提案される予定である Western X-disease group に分類されることが明らかになっている (Namba *et al.*, 1993, Okuda *et al.*, 1997, IRPCM, 2004)。しかし、岩手県で発生したリンドウてんぐ巢病については、初発生の報告以後は圃場にお

ける病害の発生率は極めて低かったことなどから、媒介昆虫種の特異性や病原体の系統遺伝学的な同定に関する報告はなく不明なままとなっている。さらに近年、岩手県内では“こぶ症”とよばれるリンドウに生育抑制、節間の短縮および節部の異常肥大を引き起こす原因不明の障害が増加しつつあるが (児玉ら, 2004)、“こぶ症”とファイトプラズマ感染の関連の有無についても明瞭にする必要があった。そこで本試験では、2005年に岩手県で発生したリンドウてんぐ巢病の病原ファイトプラズマを同定するとともに、リンドウ“こぶ症”とファイトプラズマ感染の関連性について検討を行った。

電子顕微鏡観察

岩手県浄法寺町で採集した典型的な萎黄叢生症状を示す病株 (品種: ジョバンニ) から葉脈を切り出し、グルタルアルデヒド固定液 (3% グルタルアルデヒド, 0.25 M スクロース, 0.25 M リン酸緩衝液, pH 7.0) で1時間前固定し、ついで Dalton 固定液 (Dalton, 1955; 4% K₂Cr₂O₇, pH 7.35, 3.4% NaCl 及び 4% OsO₄ を 1:1:2 の割合で混合したもの) で2時間後固定した。この試料を常法によりエタノール系列で脱水し、スパー樹脂に包埋した。包埋した試料から超薄切片を作製し、硝酸鉛と酢酸ウラン

¹ 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究センター (〒305-8666 茨城県つくば市観音台3-1-1) National Agricultural Research Center, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8666, Japan

² 岩手県農業研究センター (〒024-0003 岩手県北上市成田20-1) Iwate Agricultural Research Center, Kitakami, Iwate 024-0003, Japan

* Corresponding author (E-mail: minomino@affrc.go.jp)

第1図 電子顕微鏡によりリンドウてんぐ巢症状株の節部に観察されるファイトプラズマ
バーの長さは約1 μmに相当する

で二重染色後、透過型電子顕微鏡による観察を行った。その結果、供試した病葉の節部細胞内に大小多数のファイトプラズマ粒子が観察された（第1図）。

PCR 検定

浄法寺町で採集したてんぐ巢症状株に加えて、盛岡市手代森（品種：早生5及びイーハトーヴォ）、衣川村（品種：イーハトーヴォ及び由伽の舞）で採集されたてんぐ巢症状株、松尾村（品種：安代の秋）、石鳥谷町（品種：花巻ピンク及びえぞ早生）で採集されたこぶ症株、岩手県農業研究センターで栽培されていた外観健全株（2年株、品種：えぞ早生）及び実生苗（播種後約3ヶ月、品種：イーハトーヴォ）からPCR法によるファイトプラズマの検出を試みた。各試料の茎組織約0.1gを切り出し、改良CTAB法（Nakashima *et al.*, 1991）により全核酸を抽出し、最終50 μlのRNase A（20 μg/ml）を含むTE緩衝液に溶解し核酸試料原液とした。原液をTE緩衝液で10倍に希釈した試料を鋳型に、ファイトプラズマに特異的なプライマーセットP1/P7（Schneider *et al.*, 1995）による16S rRNA遺伝子領域のPCR増幅を行った。その結果、リンドウてんぐ巢病試料からは陽性反応を示す約1850 bpのDNAの増幅が認められたが、こぶ症株、外観健全株、実生苗の試料からはDNAの増幅は全く認められなかった（第2図）。さらにLeeら（1998）の手法に従い、P1/P7プライマーを用いたPCR産物の30倍希釈液を鋳型に用いてR16F2n/R16R2プライマーセットによるnested PCRを行ったところ、全く同様の結果を示した（データは省略）。これらの結果は今回発生したリンドウのてんぐ巢症状がファイトプラズマ感染によるものであることを示しており、また、リンドウ

第2図 リンドウのてんぐ巢症状株及びこぶ症株からのファイトプラズマ16S rRNA遺伝子のPCR検出
M：lambda DNA *Hind* III 分解産物（マーカー）
レーン1-5：てんぐ巢症状株、1：浄法寺町（品種：ジョバンニ）、2：盛岡市手代森（早生5）、3：盛岡市手代森（イーハトーヴォ）、4：衣川村（イーハトーヴォ）、5：衣川村（由伽の舞）、レーン6-10：こぶ症株、6, 7：松尾村（安代の秋）、8, 9：石鳥谷町（花巻ピンク）、10：石鳥谷町（踊り子）、11：外観健全株（えぞ早生）、12：実生苗（イーハトーヴォ）、13：タマネギ萎黄病ファイトプラズマ感染シュンギク（陽性対照）、14：蒸留水（陰性対照）。矢印は1850 bpの位置を示す。

“こぶ症”株からはファイトプラズマは検出されなかったことから、両者には関連性はないものと推察された。

RFLP による病原ファイトプラズマの同定

病原ファイトプラズマを同定するために浄法寺町株について、Leeら（1998）の方法に準じてnested PCR増幅産物のrestriction fragment length polymorphism（RFLP）解析を行った。nested PCR産物をカラム精製により脱塩及びプライマーの除去を行った上で、17種の制限酵素、*Mse*I, *Alu*I, *Rsa*I, *Hha*I, *Hae*III, *Hpa*II, *Taq*I, *Hin*FI, *Sau*3AI, *Kpn*I, *Bsh*1236I（*Tha*I）, *Bam*HI, *Dra*I, *Eco*RI, *Hpa*I, *Ssp*I, *Bfa*Iを用いて、それぞれ製造元で定められた条件下でDNA消化を行った。対照としてリンドウてんぐ巢病ファイトプラズマ新潟県分離株及び‘*Candidatus* *Phytoplasma asteris*’（Lee *et al.*, 2004）に属するタマネギ萎黄病ファイトプラズマ（宮原ら, 1982, Namba *et al.*, 1993）についても同様の手順で行った。各消化DNA試料をアガロース（4% 3:1 NuSieve Agarose）電気泳動像を行い、泳動パターンの比較を行ったところ、浄法寺町試料の泳動パターンは、Leeらの分類では16Sr III-Bとされるキマダラヒロヨコバイ媒介性のリンドウてんぐ巢病（新潟県分離株）とは、制限酵素*Mse*I, *Alu*I, *Hha*I, *Hpa*II, *Kpn*I等による消化パターンが大きく異なり、一方で全ての酵素で16Sr I-Bに分類されるタマネギ萎黄病ファイトプラズマ

第3図 病原ファイトプラズマのRFLP解析

A: 浄法寺町で採集したてんぐ巢症状株, B: タマネギ萎黄病ファイトプラズマ感染シュンギク株, C: リンドウてんぐ病新潟県分離株.

レーン M, 100 bp ラダーマーカー; レーン 1-17, 各試料の nested PCR 産物の制限酵素消化 DNA (1, *Mse*I; 2, *Alu*I; 3, *Rsa*I; 4, *Hha*I; 5, *Hae*III; 6, *Hpa*II; 7, *Taq*I; 8, *Hinf*I; 9, *Sau*3AI; 10, *Kpn*I; 11, *Bsh*1236I; 12, *Bam*HI; 13, *Dra*I; 14, *Eco*RI; 15, *Hpa*I; 16, *Ssp*I; 17, *Bfa*I).

と一致するパターンを示したため, 本病の病原ファイトプラズマは種としては '*Ca. P. asteris*' に分類されることが明らかになった (第3図). 盛岡市手代森及び衣川村株については, nested PCR 産物を *Mse*I, *Alu*I, *Rsa*I の3酵素による消化 DNA を電気泳動したところ, 浄法寺町株と同様に 16Sr I-B のパターンを示し, これらの株についても同様に '*Ca. P. asteris*' が病原ファイトプラズマであることが明らかとなった (データは省略).

昆虫伝搬試験

昆虫伝搬試験には, 中央農業総合研究センターファイトプラズマ病害研究室で継代飼育しているヒメフタテンヨコバイ (*Macrostes striifrons* Anufriev) 及びキマダラヒロヨコバイ (*Scleroracrus flavopictus* Ishihara) を用いた. 伝搬試験に用いたヒメフタテンヨコバイは, 常にヒメフタテンヨコバイ媒介性ファイトプラズマが感染しないイネ上で産卵・生育させることで継代し, 無毒な状態を維持している

第1表 岩手県浄法寺町で発生したリンドウてんぐ巢病の昆虫伝搬試験結果

供試媒介昆虫種	獲得吸汁開始後		
	3 週間目	4 週間目	5 週間目
ヒメフタテンヨコバイ	1/3 ^{a)}	2/3	2/3
キマダラヒロヨコバイ	NT ^{b)}	0/3	0/3

a) 発病株数/接種株数

b) Not tested.

個体群を用いた. 同様にキマダラヒロヨコバイは, キマダラヒロヨコバイ媒介性ファイトプラズマが感染しないヨモギ上で産卵させて得られた無毒の虫を健全シロクローバ上で産卵・生育させることで増殖させた個体群を供試した. 獲得吸汁は, 浄法寺町で採集した典型的な病徴を示す病株の頂部を切り出し, 三角フラスコに差して水揚げしたものを, 円筒形の飼育ケージ内にいれ, そこにヒメフタテンヨコバイあるいはキマダラヒロヨコバイの数10頭の2~3令幼虫を放飼し, 25~28°C の昆虫飼育用の温室内で2日間獲得吸汁させた. その後, ヒメフタテンヨコバイはシュンギク上で, キマダラヒロヨコバイはシロクローバ上で飼育し, 獲得吸汁開始後から3, 4, 5週間目に接種試験に供した. 接種吸汁は, シュンギク幼苗1株当たりヒメフタテンヨコバイ10頭, キマダラヒロヨコバイ5頭を7日間放飼し, 接種吸汁終了後は約28°Cの温室に移し病徴の観察を行った. その結果, ヒメフタテンヨコバイを用いて接種を行ったシュンギクは3週間目で3株中1株が, 4, 5週間目で3株中2株が, 典型的な萎黄叢生症状を示したのに対して, キマダラヒロヨコバイを用いて接種を行った場合にはいずれの検定植物にも病徴の発現は認められなかった (第1表).

以上の結果から, 2005年度に岩手県で発生したリンドウのてんぐ巢症状は, '*Candidatus Phytoplasma asteris*' に属し, ヒメフタテンヨコバイによる病原獲得が可能なファイトプラズマであることが明らかとなった. 病原ファイトプラズマの種は異なるものの, その病徴は, これまでに報告されているキマダラヒロヨコバイ媒介性ファイトプラズマによるリンドウてんぐ巢病による病徴の範疇に入り, 病徴観察による病原の判別は困難であることから, 本病原をリンドウてんぐ巢病の病原として追加することを提案したい.

引用文献

Dalton, A. J. (1955). A chrome-osmium tetroxide fixative for electron microscopy. *Anat. Rec.* 121: 281A.

- The IRPCM phytoplasma/spiroplasma working team – phytoplasma taxonomy group. (2004). '*Candidatus* Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1243–1255.
- 小池賢治・奥田誠一・織田真吾 (1973). リンドウてんぐ巢病について—症状と媒介昆虫. 北陸病害虫研報 21: 111–115.
- 児玉勝雄・内藤善美・千葉賢一・勝部和則・藤原一道・梅沢学 (2004). 岩手県におけるリンドウこぶ症の発生状況について. 園芸学会東北支部平成16年度大会研究発表要旨: 51–52.
- Lee, I. M., Gundersen-Rindal, D. E., Davis, R. E. and Bartoszyk, M. (1998). Revised classification scheme of phytoplasma based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1153–1169.
- Lee, I. M., Gundersen-Rindal, D. E., Davis, R. E., Bottner, K. D., Marcone, C. and Seemüller, E. (2004). '*Candidatus* Phytoplasma asteris', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1037–1048.
- 宮原和夫・松崎正文・田中欽二・佐古宣道. (1982). マイコプラズマ様微生物によるタマネギ萎黄病 (新称) の発生について. 日植病報 48: 551–554.
- Nakashima, K., Kato, S., Iwanami, S. and Murata, N. (1991). Cloning and detection of chromosomal and extrachromosomal DNA from mycoplasma-like organisms that cause yellow dwarf disease of rice. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3570–3575.
- Namba, S., Oyaizu, H., Kato, S., Iwanami, S. and Tsuchizaki, T. (1993). Phylogenetic diversity of phytopathogenic mycoplasma-like organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 461–467.
- 奥田誠一・岸国平・土居養二・与良清 (1972). レタス萎黄病による芯止まり症状, リンドウてんぐ巢病およびシュンギクてんぐ巢病について. 日植病報 38: 215 (講要).
- Okuda, S., Prince, J. P., Davis, R. E., Dally, E. L., Lee, I-M., Mogen, B. and Kato, S. (1997). Two groups of phytoplasmas from Japan distinguished on the basis of amplification and restriction analysis of 16S rDNA. *Plant Disease* 81: 301–305.
- Schneider, B., Seemüller, E., Smart, D. C. and Kirkpatrick, B. C. (1995). Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasma. *In* Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology, Vol. 1 (Razin, S. and Tully, J. G. eds.), pp. 369–380, Academic Press, San Diego.
- 塩見敏樹 (1988). リンドウてんぐ巢病 MLO の宿主範囲ならびにキマダラヒロヨコバイによる伝搬様式. 関西病虫研報 30: 31–36.