アジサイ葉化病（新称）の発生と phytoplasma の検出

兼平 勉*・堀越 紀夫*・山北 祐子*・篠原 正行*

Tsutomu KANEHIRA*, Norio HORIKOSHI*, Yuuko YAMAKITA* and Masayuki SHINOHARA*:
Occurrence of Hydrangea Phyllody in Japan and Detection of the Causal Phytoplasma

Abstract

In 1994 and 1995, hydrangea phyllody occurred in Tochigi, Shizuoka and Oita Prefectures, Japan. The affected plants (*Hydrangea macrophylla* and *H. serrata*) showed phyllody and proliferation of flower organs, as well as stunting and dieback. Electron microscopy revealed the presence of phytoplasmas in the phloem sieve elements of affected sepals and leaves. The phytoplasmas were transmitted to healthy *Catharanthus roseus* by graft inoculation. Using primers for 16S rDNA by polymerase chain reaction (PCR), DNA fragments of 1.3 and 0.75 kbp were amplified in DNA samples extracted from affected hydrangeas but not in those extracted from healthy plants. This is the first report on the occurrence of hydrangea phyllody in Japan.

Key words: hydrangea phyllody, *Hydrangea* spp., phytoplasma.

1994～1995年、栃木、静岡、大分県で採取されたアジサイ (*Hydrangea macrophylla* (Thunb. ex J. Murr.) Ser. f. *macrophylla*), ガクアジサイ (*H. macrophylla* (Thunb. ex J. Murr.) Ser. f. *normalis* (E.H. Wils.) Hara), ヤマアジサイ (*H. serrata* (Thunb.) Ser.)⁶⁾ で緑花または、葉化症状を示す株が認められた。Phytoplasma によるアジサイの病害の発生は米国^{2,3)} イタリア⁴⁾, フランス¹⁾ ほかで認められているが、日本国内での自然発生の報告はない。著者らはこれらの症状を呈したアジサイを供試して、電子顕微鏡と PCR (polymerase chain reaction) 法により phytoplasma の検出を試みるとともに、接木による伝染性について検討したので報告する。

病徴 葉化症状を現した供試材料は Table 1 に示したとおり栃木県産のガクアジサイほか合計7株を供試した。これらの葉化症状は6月上旬の開花初期から発生し、がく片は淡緑色～濃緑色を呈した (Plate I-2, 3)。葉化した花器は健全な花に比べて開花している時期が長く、10月過ぎても残存している例があった。栃木県産のガクアジサイ (試料番号 NU94875) では葉化した花器の中央から新たな芽条が形成され、つきぬき症状 (proliferation) を呈し、さらにその芽条先端に花器類似構造が形成されることもあった (Plate I-3)。一方、静岡県産の試料番号 NU95227 のアジサイでは1株の中に葉化した花序と外観健全な花序が混在していた (Plate I-1)。この他に枝の枯込みや衰退症状を示した株も認められ、試料によって現れる病徴は多

様であった。

電顕観察 葉化症状を示したがく片や芽条を用い、2% グルタルアルデヒド含有 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) で 2～16 時間前固定し、その後、1% 四酸化オスミウムを含む同緩衝液で 2 時間後固定した。この試料を常法に従いエタノール系列で脱水し、エポン樹脂に包埋した。試料ブロックからダイヤモンドナイフで超薄切片を作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色して電顕観察に供した。その結果、葉化症状を示した試料の篩部維管束細胞内に 150～600 nm で多型性の phytoplasma 粒子が多数観察された (Plate I-4)。しかし、このような粒子は健全試料では観察されなかった。

PCR 増幅 健全あるいは葉化症状を示したアジサイからの全 DNA の抽出は主に Namba *et al.*⁵⁾ の方法に準じて行った。すなわち、0.3 g の凍結試料を 0.9 ml の 2% CTAB を含む抽出用緩衝液とともに磨砕した後、65°C、30 分間加熱した。12,000 rpm、5 分間遠心分離した上清液をクロロホルム-イソアミルアルコール処理した後、冷エタノールによる沈澱を得た。これを TE 緩衝液に溶解して DNA 試料とした。一部の試料については Yoshikawa *et al.*⁷⁾ の方法により DNA 試料を調製した。PCR 法は Namba *et al.*⁵⁾ による phytoplasma の 16S rDNA を標的としたユニバーサルプライマー (SN910502 と SN910601) と phytoplasma に特異的なプライマー (SN910601 と SN920204) を用い、ザイモリアクター II (アトー社, AB-

* 日本大学生物資源科学部 College of Bioresource Sciences, Nihon University, Fujisawa 252, Japan

Table 1. Hydrangea phyllody samples used

Sample code	Plant	Locality
NU94875	<i>Hydrangea macrophylla</i> f. <i>normalis</i>	Tochigi
NU95095	<i>H. macrophylla</i> f. <i>macrophylla</i>	Tochigi
NU94883	<i>H. serrata</i>	Shizuoka
NU95170	<i>H. serrata</i>	Shizuoka
NU95227	<i>H. macrophylla</i> f. <i>macrophylla</i>	Shizuoka
NU94884	<i>H. serrata</i>	Oita
NU95094	<i>H. serrata</i>	Oita

1820 型)で反応を行った。最初のサイクルは熱変性 (94°C, 90 秒間), アニーリング (59°C, 2 分間), 伸長反応 (72°C, 3 分間)で行い, その後, 94°C, 2 分間の熱変性の他は前述と同様とし, 最後の伸長反応を 7 分間として PCR サイクルを 50 回繰返した。PCR 増幅した試料は常法によりアガロース電気泳動し, 1 µg/ml 臭化エチジウムで染色してから観察した。Phytoplasma の対照としてクワ萎縮病罹病葉からの DNA 試料を用いた。その結果, 葉化症状を示したアジサイの 7 試料で約 1.3 kbp のバンドが増幅されたが, 健全なアジサイからの試料ではこのバンドは認められなかった (Fig. 1-A)。また, 1.3 kbp のバンドが増幅された DNA 試料については phytoplasma に特異的なプライマーを用いて PCR 増幅したところ, 約 0.75 kbp のバンドが認められた (Fig. 1-B)。

接木伝染 ニチニチソウ (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don.) の実生苗に葉化したアジサイの芽条を接木接種したところ, 健全ニチニチソウに比べ小葉化し, 生育が不良となり, 一部のニチニチソウでは枯死することもあった。接木接種したニチニチソウから前述のとおり全 DNA を抽出して PCR 増幅したところ, 同じように約 1.3 と 0.75 kbp のバンドが確認された。

以上の結果から栃木県などで発生したアジサイの葉化症状は phytoplasma による病害であると考えられた。ここでは接木接種によるニチニチソウへの伝染性を確認したが, 今後は媒介虫を明らかにするとともに, 16S rDNA の塩基配列を解析して他の phytoplasma と比較検討し, 分類群の所属を明らかにする必要がある。本病の報告は国内で見あたらないのでアジサイ葉化病 (新称) と称することを提案したい。

試料の入手に当たり御尽力いただいた埼玉県蚕業試験場 八木田秀幸博士に感謝の意を表す。また, 種々ご協力いただいた飯田昌由, 清水 弘, 瀧口康策, 山口 靖, 山本武臣の各氏に感謝の意を表す。

Fig. 1. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of 16S rDNA sequences from hydrangea phyllody phytoplasma using primers SN910502 and SN910601 (A), and SN910601 and SN920204 (B). PCR products were separated by electrophoresis through a 1.2% agarose gel. DNA templates for PCR were derived from affected hydrangea samples NU94875 (lane 1), NU95095 (lane 2), NU94883 (lane 3), NU95170 (lane 4), NU95227 (lane 5), NU94884 (lane 6), NU95094 (lane 7), healthy hydrangea (lane 8) and mulberry dwarf phytoplasma (lane 9). Lane M is a 1kb DNA ladder (GIBCO BLR).

引用文献

1. Cousin, M.-T. and Sharma, A.K. (1986). Association of mycoplasma-like organisms (MLOs) with mild type of *Hydrangea* virescence: A study with 60-1000 nm thick sections. *J. Phytopathol.* 115: 274-282.
2. Hearon, S.S., Lawson, R.H., Smith, F.F., McKenzie, J.T. and Rosen, J. (1976). Morphology of filamentous forms of mycoplasma-like organisms associated with *Hydrangea* virescence. *Phytopathology* 66: 608-616.

3. Lawson, R.H. and Smith, F.F. (1980). Three stable types of *Hydrangea* virescence that differ in severity in foliage and flowers. *Plant Dis.* 64 : 659-661.
4. Lee, I.M., Hammond, R.W., Davis, R.E. and Gundersen, D.E. (1993). Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83 : 834-842.
5. Namba, S., Kato, S., Iwanami, S., Oyaizu, H., Shiozawa, H. and Tsuchizaki, T. (1993). Detection and differentiation of plant pathogenic mycoplasma-like organisms using polymerase chain reaction. *Phytopathology* 83 : 786-791.
6. 大場秀章 (1988). 園芸植物大事典 I (塚本洋太郎ほか編), 小学館, 東京, pp. 69-75.
7. Yoshikawa, N., Nakamura, H., Sahashi, N., Kubono, T., Katsube, K., Shoji, T. and Takahashi, T. (1994). Amplification and nucleotide sequences of ribosomal protein and 16 S rRNA genes of mycoplasma-like organism associated with paulownia witches' broom. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 60 : 569-575.

(平成 8 年 3 月 21 日受付 ; 平成 8 年 6 月 12 日受理)

Explanation of plate

Plate I Symptoms of hydrangea phyllody and morphology of phytoplasma.

1. A diseased plant (*Hydrangea macrophylla* f. *macrophylla*, sample NU95227) with normal flowers. Arrow heads indicate phyllody flowers.
2. Phyllody in *Hydrangea serrata* (sample NU95094).
3. Proliferation or new shoot formation on phyllody flowers in *Hydrangea macrophylla* f. *normalis* (sample NU94875).
4. Transmission electron micrograph of phytoplasmas observed in a phloem sieve element from sepals of diseased *Hydrangea macrophylla* f. *normalis* (sample NU94875). Scale bar : 200 nm.

Plate I