ミツバてんぐ巢病及びタマネギ萎黄病のヒシモンモドキによる伝搬

西村 典夫^{1*}・中島 智¹・川北 弘²・佐藤 守²・難波 成任³・藤澤 一郎¹・土崎 常男¹

ABSTRACT

NISHIMURA, N.^{1*}, NAKAJIMA, S.¹, KAWAKITA, H.², SATO, M.², NAMBA, S.³, FUJISAWA, I.¹ and TSUCHIZAKI, T.¹ (2004). Transmission of *Cryptotaenia japonica* Witches' Broom and Onion Yellows by *Hishimonoides sellatiformis*. Jpn. J. Phytopathol. 70: 22-25.

Cryptotaenia japonica witches' broom phytoplasma (CJWP) and onion yellows phytoplasma (OYP) were transmitted by the leafhopper *H. sellatiformis*. CJWP and OYP were also detected by PCR in *H. sellatiformis* fed on infected plants. Latent periods in *H. sellatiformis* of CJWP and OYP were 13-17 days. The phytoplasmas were detected by PCR in leafhoppers at about 7 days after the start of acquisition feeding. This is the first report of the transmission of CJWP and OYP by *H. sellatiformis*.

(Received August 15, 2003; Accepted October 20, 2003)

Key words: *Cryptotaenia japonica* witches' broom phytoplasma, onion yellows phytoplasma, *Hishimonoides sellatiformis*, transmission.

ミツバてんぐ巢病ファイトプラズマ (*Cryptotaenia japonica* witches' broom phytoplasma, CJWP) およびタマネギ萎黄病ファイトプラズマ (onion yellows phytoplasma, OYP) は、ともに日本産ファイトプラズマで、AY 16S-group に分類される (Jung ほか, 2003)。そして両ファイトプラズマはともにヒメフタテンヨコバイ (*Macrostelus strifrons* Anufriev) およびヒシモンヨコバイ (*Hishimonus sellatus* Uhler) によって伝搬されることが明らかにされている (Nishimura ほか, 1998)。一方、日本産ファイトプラズマで、AY 16S-group に分類されるものとして、他にクワ萎縮病ファイトプラズマ (mulberry dwarf phytoplasma, MDP) がある (Jung ほか, 2003)。MDP はヒシモンヨコバイ (鑄方・松本, 1931) とヒシモンモドキ (*Hishimonoides sellatiformis* Ishihara) (石島, 1971) によって伝搬されることが報告されている。これらのことから、CJWP と OYP がヒシモンモドキによって伝搬される可能性について興味を持たれるが、いずれもその可否についてはこれまで知られていない。そこで両ファイトプラズマがヒシモンモドキにより伝搬されるか否かについて調べ

る実験を行ったのでその結果を報告する。

供試材料および PCR による獲得吸汁虫からのファイトプラズマの検出 供試した CJWP 分離株及び OYP 分離株は、既報 (Nishimura ほか, 1998) の実験に用いたものと同じである。ヒシモンモドキは山形県のクワ畑で採集し、温室内で継代飼育したものを用いた (Fig. 1)。本ヨコバイの MDP 伝搬能を調べるため、幼虫を MDP 感染クワ上で獲得吸汁させ (7 日間)、獲得吸汁開始後 24 日以上経過した虫を、健全クワ上で 1 本当たり 7 頭以上放飼し (6 日以上) 接種吸汁させた。その結果、感染率は 100% (6/6) と、MDP の伝搬能力の高い虫であることを確認した。また、その他供試したヒメフタテンヨコバイおよびヒシモンヨコバイは、既報 (Nishimura ほか, 1998) の実験に用いたものと同じである。なお、各種ヨコバイを用いた本実験は、すべて 25~30°C の温度条件で行った。供試植物には、CJWP ではミツバ (*Cryptotaenia japonica* Hassk., 品種: 柳川 2 号) 及びシュンギク (*Chrysanthemum coronarium*, 品種: きわめ) を、OYP ではシュンギク (品種: きわめ) を用いた。

¹ 鯉淵学園 (〒319-0323 東茨城郡内原町鯉淵5965) Koibuchi College of Agriculture, Uchihara 319-0323, Japan

² 農業生物資源研究所 (〒305-8634 つくば市大和1-2) National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305-8634 Japan

³ 東京大学大学院新領域創成科学研究科 (〒277-8562 柏市柏の葉5-1-5) Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, Kashiwa 277-8562, Japan

* Corresponding author (E-mail: sa-nakajima@mail.koibuchi.ac.jp)

Fig. 1. *Hishimonoides sellatiformis* leafhopper.

CJWP または OYP を獲得吸汁開始後、7～30日経過したヒシモンモドキを用いて、PCR により保毒の有無を調べた。PCR 反応に用いた鋳型 DNA の抽出法、ファイトプラズマ 16SrRNA 遺伝子を特異的に増幅するプライマーセット (SN910601, SN920204), PCR 反応液, 反応条件等は既報に従った (Namba ほか, 1993)。

ヒシモンモドキによる CJWP の伝搬と PCR による虫からの検出 CJWP に感染したミツバまたはシュンギク上で無毒のヒシモンモドキの 3～4 令幼虫を 1～2 日間獲得吸汁させたのち健全クワ上に移し接種吸汁させた。獲得吸汁開始後 15～29 日間経過したヒシモンモドキについて、

一部の虫は PCR により CJWP 保毒の有無を調べ、残りの虫は健全シュンギク上に 1 株当たり 5 頭以上放飼し、1～3 日間接種吸汁させたのち、殺虫剤散布により虫を除去し、その後シュンギクの発病の有無を調べた (Table 1)。

その結果、罹病シュンギクを獲得吸汁源とし、獲得吸汁開始後 25 日を経過した虫で接種吸汁したシュンギクでは 100% (6/6) 発病し、PCR による虫の保毒検定でも 6/7 と高率に保毒していることが確認された。罹病ミツバを獲得吸汁源とした場合、獲得吸汁開始後 15～21 日を経過した虫で接種吸汁したシュンギクでは発病率 0% (0/4)、22 日、23 から 29 日経過した虫ではそれぞれ 10% (1/10) であり、また PCR 検定でも 24 日経過の虫で 10% (1/10)、30 日経過した虫で 1/10 とともに低率ながら保毒していることが確認された。以上の結果から、ヒシモンモドキが CJWP の新たな媒介者であることが明らかとなった。なお罹病ミツバを獲得吸汁源とした場合に発病率ならびに保毒虫率が共に低かった理由として、ヒシモンモドキがミツバを好まないこと、また CJWP に感染したミツバはてんぐ巣症状になるため植物体が小さく虫の吸汁行動が妨げられる可能性などが考えられた。

ヒシモンモドキによる OYP の伝搬と PCR による虫からの検出 ヒシモンモドキを OYP に感染したシュンギクで 1～2 日獲得吸汁後健全クワ上に放飼した。一定期間経過したヒシモンモドキについて、一部の虫は PCR で保毒の有無を調べ、一部の虫は健全シュンギク上に 1 株当たり 10 頭、もしくは 10 株当たり 10 頭を放飼して 1 日間接種吸汁

Table 1. Transmission of *Cryptotaenia japonica* witches' broom phytoplasma (CJWP) and onion yellows phytoplasma (OYP) by *H. sellatiformis* and detection of CJWP and OYP in *H. sellatiformis* by PCR

Phytoplasma	Plants for acquisition feeding	Transmission		Detection	
		Days after acquisition ^{a)}	Inoculation tests ^{b)}	Days after acquisition ^{a)}	Detection by PCR
CJWP	<i>C. coronarium</i>	25	6/6 ^{c)}	25	6/7 ^{d)}
	<i>C. japonica</i>	15～21	0/4	24	1/10
		22	1/10	30	1/10
		23～29	1/10		
OYP	<i>C. coronarium</i>	15～19	0/3	7	4/11
		21～23	2/2	14	9/12
		28	10/10	21	8/12
				28	2/7
				30	3/8

a) *H. sellatiformis* leafhoppers were given 1～2 days of acquisition access feeding.

b) *H. sellatiformis* leafhoppers were given 1～3 days of inoculation access feeding on healthy *C. coronarium*.

c) Numerator is the number of diseased plants. Denominator is the number of inoculated plants.

d) Numerator is the number of insects detected by PCR. Denominator is the number of insects tested.

させ、シュンギクの発病の有無を調べた (Table 1)。

その結果、獲得吸汁開始後15～19日の虫を使用した場合は、シュンギクは発病せず (0/3)、虫体内潜伏期間の存在が示唆された。獲得吸汁開始後21～23日経過した虫を使用した場合には、シュンギクは100% (2/2) 発病し、また、獲得吸汁開始後28日を経過した虫を使用した場合には、100% (10/10) のシュンギクが発病した。また、獲得吸汁開始後7日、14日、21日、28日、30日を経過した虫のPCR検定でそれぞれ36% (4/11)、75% (9/12)、67% (8/12)、28% (2/7)、38% (3/8) の個体からOYPが検出された。以上の結果から、ヒシモンモドキがOYPの新たな媒介者であることが明らかとなった。なお、獲得吸汁開始後7日の虫では、PCR後の電気泳動のファイトプラズマの特異的バンドに虫によるDNA増幅量の差が認められた (Fig. 2)。定量PCRを行わなければ正確には判断できないが、虫体内のOYPの濃度に差のある可能性も示唆された。しかし、獲得吸汁開始後14日以降では特異的バンドのDNA量はすべて多く、保毒虫体内のOYPが高濃度に達している可能性が示唆された。

CJWP 及び OYP のヒシモンモドキ体内における潜伏期間 ヒシモンモドキはMDPを病クワから獲得吸汁後、一定期間の虫体内潜伏期間を経て健全なクワへ伝搬するようになることが報告されているが (石島, 1971)、本実験でもOYPに虫体内潜伏期間の存在が示唆された。そこでCJWP 及び OYP のヒシモンモドキ体内における潜伏期間の存在を調べる目的で、より詳しい実験を行った。すなわち、CJWP または OYP に感染したシュンギクでそれぞれ1日間獲得吸汁したヒシモンモドキを、獲得吸汁開始後7日、12日、17日、22日、27日目にそれぞれシュンギク10本

当たり10頭を1日間放飼し、発病の有無を調べると共に、PCRにより保毒虫検定を行った (Table 2)。

その結果、接種試験では、CJWP および OYP 共に17日目からシュンギクに発病が認められた。この結果から、CJWP 及び OYP は共にヒシモンモドキ体内の潜伏期間は13～17日と推定された。またCJWPは獲得吸汁開始後7日目の虫から、OYPは12日目の虫から、ファイトプラズマの保毒がPCRにより確認された。なお、CJWPの場合、獲得吸汁開始後7日目及び12日目の虫で、PCR後の電気泳動のファイトプラズマの特異的バンドには、虫によって濃淡の差があり、虫体内のCJWPの濃度に差がある可能性が示唆された。しかし、17日以降では特異的バンドはすべて同様に濃く、保毒虫体内のCJWPが高濃度に達している可能性が示唆された。なお、OYPの場合、Table 1の実験で、獲得吸汁開始後7日目の虫からOYPが検出されたことから、CJWP 及び OYP は共に虫体内で獲得吸汁開始後7日目前後に本実験で用いた一段階PCR法によって検出可能な濃度にまで増殖すると推定された。MDPのヒシモンモドキの虫体内潜伏期間は21～39日、或いは24日～30日と報告されており (石島, 1971)、CJWP と OYP は、MDP に比べ短い結果となった。しかし、温度等の実験条件が異なるので、今回の試験結果からCJWP と OYP がMDPよりヒシモンモドキにおける虫体内潜伏期間が短いと結論することはできないと考えられる。

3種ヨコバイにおけるCJWP保毒虫率の比較 Table 1に示したように、ヒシモンモドキをCJWP罹病シュンギクで1日獲得吸汁させ、その後25日目にPCRによりCJWPの保毒検定を行った結果、86% (6/7) の保毒率で

Fig. 2. Detection of onion yellows phytoplasma (OYP) in *H. sellatiformis* by PCR
Lanes 1-11, *H. sellatiformis* at 7 days after acquisition feeding; Lane 12, garland chrysanthemum leaves infected with OYP;
Lane 13, marker (λ /Hind III).

Table 2. Incubation period for *Cryptotaenia japonica* witches' broom phytoplasma (CJWP) and onion yellows phytoplasma (OYP) in *H. sellatiformis*

Phytoplasma	Plants for acquisition feeding	Days after acquisition ^{a)}	Inoculation tests ^{b)}	Detection by PCR
OYP	<i>C. coronarium</i>	7	0/10 ^{c)}	0/10 ^{d)}
		12	0/10	1/10
		17	2/10	4/7
		22	3/10	7/10
		27	4/10	4/8
CJWP	<i>C. coronarium</i>	7	— ^{e)}	2/10
		12	0/10	4/10
		17	2/10	2/9
		22	3/10	5/10
		27	3/10	1/10

a) *H. sellatiformis* had 1 day of acquisition access feeding on infected plantsb) *H. sellatiformis* had 1 day of inoculation access feeding on healthy *C. coronarium*.

c) Numerator is the number of diseased plants. Denominator is the number of inoculated plants.

d) Numerator is the number of insects detected by PCR. Denominator is the number of insects tested.

e) Not tested.

あったことから、ヒシモンモドキが高率でCJWPを保毒することが明らかになった。CJWPはヒメフタテンヨコバイ及びヒシモンヨコバイによっても媒介されるが(Nishimura ほか, 1998), 獲得吸汁後の虫の保毒率にこれら3種の虫の間で差があるかどうかを調べた。ヒメフタテンヨコバイ及びヒシモンヨコバイをCJWPに感染したシュンギク上でそれぞれ1日獲得吸汁させた後、ヒメフタテンヨコバイは健全イネでヒシモンヨコバイは健全クワで、それぞれ飼育し、獲得吸汁開始後24日目にPCRにより虫の保毒検定を行った。その結果、ヒメフタテンヨコバイでは70% (7/10), ヒシモンヨコバイでは78% (7/9) の保毒率であったことから、これら3種ヨコバイの間ではCJWPの保毒虫率にはほとんど差がないと推定された。

以上の結果、ヒシモンモドキがCJWPおよびOYPを伝搬することが明らかとなったが、これはヒシモンモドキがヒメフタテンヨコバイ媒介性のAY 16S-groupのファイトプラズマを媒介することを明らかにした最初の報告である。ヒシモンモドキは1965年に山形県及び長野県の桑園で発見された新属新種の昆虫で(Ishihara, 1965), 1971年にはヒシモンモドキがMDPを媒介することが報告された(石島, 1971)。ヒシモンモドキは日本国内での分布が限られ、発生数も少ないことから、圃場でCJWP及びOYPの媒介虫となることはないと考えられる。しかし、最近ヒシモンモドキの卵巣、産下卵においてMDPが検出され、経卵伝染の可能性も強く(Kawakita ほか, 2000), ヒシモンモドキはファイトプラズマと媒介昆虫との関係を解析する上で有用な昆虫と考えられる。CJWP及びOYPがヒシ

モンモドキにおいて経卵伝染するかどうかについては興味ある問題であり、今後検討する必要がある。

また、本研究は生物系特定産業技術推進機構との共同研究の一環として行ったものである。

引用文献

- 鑄方末彦・松本鹿蔵 (1931). 桑樹萎縮病の病原について. 蚕糸学報 13(6): 58 (講要).
- Ishihara, T. (1965). Two new Cicadellid-species of agricultural importance (Insecta: Hemiptera) Japanese J. Appl. Ent. Zool. 9: 19-22.
- 石島 嶺 (1971). クワ萎縮病のヒシモンモドキによる媒介. 日蚕雑 40: 136-140.
- Kawakita, H., Saiki, T., Wei, W., Mitsuhashi, W., Watanabe, K. and Sato, M. (2000). Identification of mulberry dwarf phytoplasmas in the genital organs and eggs of leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*. Phytopathology 90: 909-914.
- 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.
- Jung, H.-Y., Sawayanagi, T., Wongkaew, P., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Wei, W., Oshima, K., Miyata, S., Ugaki, M., Hibi T. and Namba, S. (2003). "*Candidatus Phytoplasma oryzae*", a new phytoplasma taxon associated with rice yellow dwarf disease. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. in press.
- Nishimura, N., Nakajima, S., Sawayanagi, T., Namba, S., Shiomi, T., Matsuda, I. and Tsuchizaki, T. (1998). Transmission of *Cryptotaenia japonica* witches' broom and onion yellows phytoplasmas by *Hishimonus sellatus* Uhler. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 64: 474-477.