

バクテリア様微生物による イチゴ葉縁退緑病（新称）の発生

中央農業総合研究センター ^た田 ^{なか}中 ^{みのる}種

はじめに

2004年2月、愛媛県で栽培されていたイチゴに、株全体の萎縮叢生、葉縁の退緑、果実の奇形等の症状を引き起こす病害が発生し、筆者らはこれらの病害が国内未報告のバクテリア様微生物、'*Candidatus* Phlomobacter fragariae' の感染によって引き起こされることを明らかにし、イチゴ葉縁退緑病と命名した (TANAKA et al., 2006)。本病は海外から侵入した病害である可能性が高く、国内で発生地域を拡大させつつある状況と思われる。'*Ca. P. fragariae*' は昆虫によって媒介され、宿主細胞内に寄生するため、昆虫媒介性ウイルスと同様に化学的防除は困難であると考えられ、本病の発生が全国的に拡大すれば、我が国のイチゴ栽培に深刻な影響を与えることが危惧される。そこで、本稿では本病のこれまでの海外における研究成果の概要を紹介するとともに、国内における発生状況を報告し、今後の課題について論じることとしたい。

I バクテリア様微生物

バクテリア様微生物 (Bacteria-like organism, BLO) とは、特定の系統分類学的グループに属する微生物群をさすものではなく、便宜的に用いられている用語である。一般的な表現として、例えば電子顕微鏡観察で「形態的には細菌と判断できるが、ほかの情報がないので断定できない」場合などに用いられることもあるが、専門用語的に用いられる場合には、偏性細胞内寄生性（宿主細胞外で増殖できない）の小球・桿菌状の原核微生物を指す。具体的には、動物の病原体として知られるリケッチアやクラミジア、昆虫の共生微生物のボルバキアなどがこれに相当する。植物病原体としては、篩部あるいは木部局在性で、一般的な培地では培養が不可能か非常に困難な原核微生物（難培養性原核生物 (fastidious prokaryote)）の中で細胞壁を有する微生物群に相当し、これまで知られているものはすべて昆虫によって媒介される。

Occurrence of Strawberry Marginal Chlorosis Caused by '*Candidatus* Phlomobacter fragariae' in Japan. By Minoru TANAKA
(キーワード: バクテリア様微生物 (BLO), イチゴ, 葉縁退緑病)

植物病原 BLO としては、近年、南西諸島で常発するようになり、本土への侵入が危惧されているカンキツグリーニング病の病原体 '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' や、国内未発生のブドウピアス病や peach phony 病の病原体, *Xylella fastidiosa* などがよく知られているが、いずれの BLO による病害も経済的被害が大きく、防除が困難なことから、国際的にも重要な問題になっている。なお、バクテリア様微生物はリケッチア様微生物 (Rickettsia-like organisms, RLO) と表記されることもある。

II Marginal chlorosis of strawberry の発生と被害

イチゴ葉縁退緑病は、海外では marginal chlorosis of strawberry (以下 SMC) として知られている。1993 年に Plant Disease 誌でフランスにおける初発生が報告されて以来、これまでにフランス以外の国・地域における発生は論文として正式に報告されていないが、スペインでは 84 年に SMC に類似した症状を示すイチゴ病害が発生していることや、国際塩基配列データベース上に病原 BLO のイタリア北西部分離株の 16S rRNA 塩基配列が登録されていることから、フランスおよび近隣諸国に分布していることが推察される。

フランスにおけるイチゴ栽培は、①ウイルスフリー化された組織培養苗から一次増殖したものを親株として春に苗生産圃場に定植し、夏から秋にかけて果実生産用の苗を収穫する、②数か月の低温 (0℃) 処理後に果実生産圃場 (トンネル栽培) に移植し、一般的には翌年の初夏から果実生産が開始され、その後 1～3 年間生産を続ける、といった体系になっている。苗生産圃場と果実生産圃場は地理的に離れており、苗の生産は主に冷涼な気候で知られるフランス北西部のロワール渓谷地域で行われており、果実の生産は海洋性気候で冬季も比較的温暖なフランス南西部のアキテーヌ地方などが中心となっている。

1988 年、これらのイチゴ栽培地域において従来知られている病害とは全く異なる病徴の新病害が発生した。その病徴は、苗生産圃場では 7 月ごろから現れ、最初に展開葉の裏側が赤味を帯び、次に葉の表側も赤化してい

く病徴が観察される。葉の赤化は葉の縁から始まり、中肋へ向かう。新しく展開してくる葉は通常の 1/10 ほどに小さくなり、幅 1～2 mm の典型的な葉縁退緑症状 (marginal chlorosis) を呈し、杯状になることが多い。根系には広い範囲でネクロシスが生じ、全体的に黒褐色を帯びる。また、このような病徴はランナーを通じて親株から子株へと伝染した。果実生産圃場では、若い葉から典型的な葉縁退緑症状が観察されるようになり、ついにはすべての葉に広がる。葉は健全に比べて小さく杯状になる。生産される果実は小さく、奇形、着色異常、軟化なども生じ、酸味が強く商品価値は全くないものであった。1990 年の調査では、SMC の発生した 38 の苗生産圃場で栽培されていた 59 品種、総計 109 万 1 千個体の 35% に発病が認められ、果実生産圃場においては平均して約 20% の感染株率を示し、中には 90% を超える感染株率の圃場も存在した (NOURRISSEAU et al., 1993)。

III ‘*Candidatus Phlomobacter fragariae*’

DAPI 染色による蛍光顕微鏡観察および超薄切片の透過型電子顕微鏡観察により、SMC に罹病したイチゴでは、節部特異的にバクテリア様微生物が存在していることが明らかにされた (NOURRISSEAU et al., 1993)。ZREIK et al. (1998) は、病原 BLO の 16S リボソーム RNA 遺伝子 (16S rDNA) の塩基配列を決定し、分子系統遺伝学的な解析の結果から、新属新種の微生物として暫定種名 ‘*Candidatus Phlomobacter fragariae*’ (暫定種名は引用符で囲み、斜体の *Candidatus* の後にローマン体で記述するルールになっている) と命名した。16S rDNA 塩基配列の相同性解析から、‘*Ca. P. fragariae*’ は、グラム陰性の γ -proteobacteria 綱の腸内細菌科に属し、塩基配列が既知の微生物では、多くの昆虫の二次共生細菌 (宿主昆虫にとって生存に必須ではない共生関係にある共生細菌) として知られる *Arsenophonus* 属細菌と最も高い相同性を示した。また、決定された塩基配列を基に設計されたプライマーセット Fra4/Fra5 により ‘*Ca. P. fragariae*’ を罹病植物から PCR 法によって検出する技術が開発された (ZREIK et al., 1998)。しかし、前述したように ‘*Ca. P. fragariae*’ の 16S rDNA は昆虫の二次共生細菌と非常に相同性が高く、媒介昆虫の探索のために、野外から採集した昆虫から Fra4/Fra5 を用いて ‘*Ca. P. fragariae*’ の検出を試みると、共生細菌の 16S rDNA が増幅されて偽陽性を示すことが多く、昆虫からの検出には適していなかった。そこで、‘*Ca. P. fragariae*’ を虫体から特異的に検出するために、新たに *spoT* 遺伝子 (ppGpp (グアノシン 4 リン酸) 分解酵素遺伝子) 領域がクロ-

ニングされ、この塩基配列に基づいて設計されたプライマーセット Pfr1/Pfr4 を用いて PCR を行い、さらに PCR 産物を RFLP 解析することで高精度の検出が可能となった (FOISSAC et al., 2000)。これらの遺伝子診断技術を用いた網羅的探索等の結果、その発生から 15 年の年月を経て、ようやく ‘*Ca. P. fragariae*’ が自然環境下でヒシウカ科の *Cixius wagneri* によって媒介されることが明らかとなった。また果実生産圃場においては、春季 (4 月下旬～5 月) と晩夏～初秋の二つの時期に保毒虫が多く、イチゴへの感染が生じている可能性の高いことが判明した (DANET et al., 2003)。

IV 関連する病害

Marginal chlorosis of strawberry の初発生から 3 年後の 1991 年、同じフランスの東部ブルゴーニュ地方では、テンサイに糖含量低下症 (the syndrome “basses richesses” of sugar beet, 以下 SBR) を引き起こす新病害が発生した。病徴は晩夏になって現れ、地上部では展開葉の黄化や新葉の叢生症状、地下部では維管束の褐変が生じ、根部の糖含量が劇的に低下する。経済的な被害も大きく、1992 年には 1,000 ha 以上にわたる圃場で収入が半減するほどであった。GATINEAU et al. (2001) は SBR が stolbur phytoplasma の感染で引き起こされ、ヒシウカ科の *Pentastiridius* 属の昆虫によって媒介されることを明らかにした。しかし、SBR の症状を示しながらも phytoplasma が検出されない病株が多存在することから、BLO を含む他の病原体の関与を検討したところ、非ファイトプラズマ性の SBR 症状株は、‘*Ca. P. fragariae*’ の 16S rDNA 検出用プライマーセット Fra4/Fra5 を用いた PCR で陽性反応を示し、電子顕微鏡観察でも節部局在性の BLO の存在が確認されたことから、‘*Ca. P. fragariae*’ と同一もしくは非常に近縁と考えられる BLO に感染していることが示された。さらに SBR の病原 BLO も *Pentastiridius* 属昆虫によって媒介されることが明らかとなった (GATINEAU et al., 2002)、SBR の病原がイチゴに感染するかどうか (またはその逆) については不明であり今後の研究の進展が待たれる。

興味深いことに、近年になって SMC の症状も SBR と同様に、イチゴに stolbur phytoplasma が感染することで引き起こされることが明らかとなったが、病徴観察による BLO 感染とファイトプラズマ感染の識別は極めて困難である。両者はイチゴ栽培地域に混在しながらも、苗の生産地域では発病株の多くが stolbur phytoplasma 感染によるものであり、果実生産圃場では逆に ‘*Ca. P. fragariae*’ の感染によるものがほとんどであった (DANET

et al., 2003)。このように '*Ca. Phlomobacter*' 属の BLO による病害は、いずれも同一宿主に同様の病徴を引き起こすファイトプラズマ病と複合的に発生しており、その病原ファイトプラズマもファイトプラズマの媒介昆虫としては、ほとんど例のないヒシウンカ科の昆虫によって媒介されていることは、単なる偶然に過ぎないかもしれないが、両病害の発生生態に何らかの関連がある可能性もあるため、今後の国内における BLO 病とファイトプラズマ病の関連についても留意する必要がある。

V 国内におけるイチゴ葉縁退緑病の発生

2004 年 2 月、愛媛県で栽培されていたイチゴに株全体の萎縮叢生、葉縁の退緑、果実の奇形等の症状を引き起こす病害が発生した（口絵①）。これらの症状はファイトプラズマに感染した植物の一般的な症状に類似しており、また、'*Ca. P. fragariae*' 感染による SMC の症状ともほぼ一致していたが、展開葉の赤化については、葉裏がほのかに赤～赤紫色を帯びている程度で論文の記述に比べて穏やかであった。罹病イチゴの葉脈の超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡で観察したところ、篩部に直径 220～260 nm、長さ 1.5 μm 以上の BLO 粒子の存在が認められたが（口絵②）、ファイトプラズマは観察されなかった。ファイトプラズマおよび '*Ca. P. fragariae*' について PCR による検出を既報の手法に準じて試みたところ、発病イチゴ試料から特異的に '*Ca. P. fragariae*' の 16S rDNA および *spoT* 遺伝子が検出されたが（図-1）、ファイトプラズマの 16S rDNA は全く検出されなかった。これらの結果から本病害は '*Ca. P. fragariae*' の感染による新病害であることが明らかとなり、病名として「葉縁退緑病」が提案された。ほぼ同時期に千葉県館山市周辺においても、イチゴに同様の SMC 症状株を呈する病害が発生しており、愛媛県株と同様に特異的な PCR による検出を試みたところ陽性反応を示し、'*Ca. P. fragariae*' の感染が確認された。2004 年、05 年に館山市、南房総市でイチゴ葉縁退緑病発生実態を調査したところ、04 年は「とちおとめ」と「章姫（あきひめ）」の 2 品種で発生が認められ、発生株率は調査圃場全体の 0.1%、05 年は「とちおとめ」、「章姫」、「さちのか」および「女峰」の 4 品種で発生が認められ、発生率は 0.08% であった（田中ら、2006）。

これらの病原 BLO 間の系統関係や起源を明らかにするために、DANET et al. (2004) の手法に従って、愛媛県および千葉県分離株について 16S rDNA の塩基配列を試みた。すなわち、'*Ca. P. fragariae*' の 16S rDNA を特異的に検出する PCR 用のプライマー Fra4/Fra5 と細菌

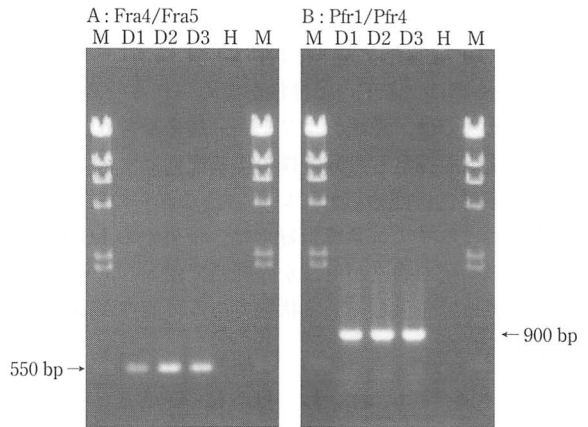


図-1 '*Candidatus Phlomobacter fragariae*' の PCR 法による検出

A: 16S rDNA, B: *spoT* 遺伝子。陽性試料 (D1～D3) では、約 550 bp (A) および約 900 bp (B) の DNA が特異的に増幅されるが、健全試料 (H) では増幅されない。

16S rDNA のユニバーサルプライマー fd1/rp1 を使い、fd1/Fra4 および Fra5/rp1 の組み合わせで PCR を行うことにより 16S rDNA の全長をカバーし、互いに重複する領域をもつ 2 種の DNA 断片を増幅してそれぞれの DNA 断片をダイレクトシーケンスすることで全長の塩基配列を決定した。その結果、愛媛分離株と千葉分離株の 16S rDNA 塩基配列は 100% 一致して塩基配列データベース上のフランス産 '*Ca. P. fragariae*' 分離株である LG2001 株とは 99.7% の一致率を示した。最近の DANET et al. (2004) の報告によると、'*Ca. P. fragariae*' の 16S rDNA はゲノム中にコピーが複数あり、コピー間に若干の塩基配列の差異、すなわち塩基配列異質性 (sequence heterogeneity) が認められている。つまり、データベースに登録されている LG2001 株の塩基配列は、複数ある 16S rDNA コピーの一つに過ぎない。ダイレクトシーケンスによって得られた日本分離株の塩基配列は、塩基配列異質性を示す箇所については多数決的に決定されており、DANET et al. (2004) が報告している多数のクローンから得られた LG2001 株のコンセンサスシーケンスとの比較がより妥当と考え、実際に比較した結果、二つの塩基配列は 100% 一致し、日本産分離株と LG2001 株は同一の系統に属すると考えられた。一方、同じく塩基配列データベース上に登録されている SBR の病原 BLO や、イタリア北西部の罹病イチゴに由来する '*Ca. P. fragariae*' 分離株 (8 分離株) の塩基配列とは、97～98% の一致率にとどまり、日本分離株は、これらの分離株とは若干異なる系統であることが示唆さ

れた。また、イタリア産の 8 分離株では、分離株間の 16S rDNA 塩基配列の相同性は非常に高い (99.0 ~ 99.9%) もの、若干の多様性が認められるのに対して、日本分離株では、愛媛および千葉分離株を含め、複数の異なる地点で採集した分離株の塩基配列はすべて同一であり、多様性は認められていない。これらの結果から、日本におけるイチゴ葉縁退緑病は、海外から LG2001 株と同一の系統の病原が何らかの経路で侵入し、その系統のみが各地で発生している状態である可能性が高いことが示唆された。

お わ り に

千葉県におけるイチゴ葉縁退緑病の発生状況は、フランスの果実生産園場における SMC の発生状況と比べると発生株率に大きな差がある。この原因は、フランスではトンネル内に苗を移植した後も媒介昆虫による '*Ca. P. fragariae*' の伝搬が生じているのに対して、千葉県での発病株は、おそらく既に '*Ca. P. fragariae*' に感染した苗がハウス内で発病したに過ぎず、移植後のハウス内では媒介昆虫による伝搬が生じていないためだと推察できる。愛媛県における発生も、現地調査の結果から発病株は特定の由来をもつ苗に限られている可能性が高いことがわかった。つまり、千葉県や愛媛県では本病の伝染環は成立していない可能性が高い。一方で、既に日本固有の栽培品種 4 品種において '*Ca. P. fragariae*' の感染が確認されていることから、国内の何処かでは伝染環が成立

しており、媒介昆虫を介して感染イチゴ (あるいは中間宿主) から健全イチゴへ '*Ca. P. fragariae*' が伝搬されていることは間違いない。フランスで SMC を媒介している *Cixius wagneri* は国内には分布していないため、日本では異なる種の昆虫によって媒介されていると考えられる。全国的に広く分布するヒシウンカ科の昆虫、例えばヒシウンカ (*Pentastiridius apicalis*) が媒介昆虫となり得る場合には、伝染環が成立している地域、すなわち苗の移植後も媒介昆虫による '*Ca. P. fragariae*' の伝染が生じる地域が拡大し、経済的な被害が増大することが懸念される。本病のこれ以上の拡大を阻止するためには、一刻も早く、国内における伝染環の成立している地域、および媒介昆虫種を特定し、伝染環を解明することが必要である。そのために、現在我々は感染苗の由来を追跡し、伝染環の成立している地域を探索するとともに、より効率的に虫体内から '*Ca. P. fragariae*' を検出できる技術の開発に取り組んでいる。

引 用 文 献

- 1) DANET, J. L. et al. (2003): *Phytopathology* 93: 644 ~ 649.
- 2) ——— et al. (2004): *Acta Hort.* 656: 87 ~ 92.
- 3) FOISSAC, X. et al. (2000): *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3474 ~ 3480.
- 4) GATINEAU, F. et al. (2001): *Eur. J. Plant Pathol.* 107: 263 ~ 271.
- 5) ——— et al. (2002): *Phytopathology* 92: 384 ~ 392.
- 6) NOURISSEAU, J. G. et al. (1993): *Plant Dis.* 77: 1055 ~ 1059.
- 7) TANAKA, M. et al. (2006): *J. Gen. Plant Pathol.* 72: (印刷中).
- 8) 田中千華ら (2006): 平成 18 年度日本植物病理学会関東部会講演要旨予稿集: 7.
- 9) ZREIK, L. et al. (1998): *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 257 ~ 261.

(新しく登録された農薬 13 ページからの続き)

つつじ: ツツジゲンバイ: 発生初期

つばき: チャドクガ: 発生初期

さくら: アメリカシロヒトリ, モンクロシヤチホコ: 発生初期

花き類・観葉植物: アザミウマ類, アブラムシ類, アオムシ, ヨトウムシ類: 発生初期

きく: マメハモグリバエ, オオタバコガ: 発生初期

グラジオラス: アザミウマ類: 植付時

ストック: コナガ, ハイマダラノメイガ: 発生初期

宿根アスター: ヨメナスジハモグリバエ: 発生初期

オンシジウム: カイガラムシ類: 発生初期

カーネーション: コナガ: 発生初期

ひまわり: タバコガ: 発生初期

斑入りアマドコロ: ハマキムシ類: 発生初期

リアトリス: ハマキムシ類: 発生初期

樹木類: アザミウマ類, 発生初期

芝: スジキリヨトウ, シバツトガ, タマナヤガ, ケラ, シバオサゾウムシ成虫, アカフツヅリガ: 発生初期

●カルタップ・ブプロフェジン粒剤

21822: ST アブロードパダン粒剤 (住化武田農薬) 2006/10/18
カルタップ: 4.0%, ブプロフェジン: 2.0%

稲: ニカメイチュウ, コブノメイガ, ウンカ類幼虫, イネツトムシ: 収穫 30 日前まで

●MEP マイクロカプセル剤

21824: 協友スミチオン MC (協友アグリ) 2006/10/18
MEP: 20.0%

稲: カメムシ類: 収穫 21 日前まで (空中散布, 無人ヘリコプターによる散布)

「殺虫・殺菌剤」

●ジノテフラン・テブフェノジド・ブプロフェジン・フサライド・フルトラニル粉剤

21801: ワイドナーエース粉剤 DL (日本農薬) 2006/10/4

ジノテフラン: 0.35%, テブフェノジド: 0.75%, ブプロフェジン: 1.0%, フサライド: 2.5%, フルトラニル: 2.0%

稲: ツマグロヨコバイ, ウンカ類, カメムシ類, コブノメイガ, いもち病 (穂いもち), 紋枯病: 収穫 14 日前まで

(28 ページに続く)