

# ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’による リンドウてんぐ巢病の発生

中央農業総合研究センター 田 中 穰

## はじめに

1967年に故 土居養二博士らによってファイトプラズマ〔当時の呼称はマイコプラズマ様微生物 (mycoplasma-like organism, MLO)〕が新規植物病原体として発見されて以来、これまでに世界中で数百種、国内においても多くのファイトプラズマ病の発生が報告されており、日本植物病名目録には70種余の病名が掲載されている。ところが、その病原名欄を見ると、他の病原体の例とは異なり、種名はなく「ファイトプラズマ」と記載されているだけである。これらの多くはファイトプラズマがMLOと呼ばれていた（あるいはそれ以前）の分類未詳の時期に病名が記載されているので、当然の帰結ではあるのだが、現在、ファイトプラズマ分類に関しては、既に‘*Candidatus Phytoplasma*’属（*Candidatus*は暫定的分類単位であることを示す接頭語）が正式に創設されており、属内はIJSEM（International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology）誌に掲載済みの26種を含め30以上の種が分類命名されている状況である。ファイトプラズマは、その電子顕微鏡観察像や、萎黄叢生、てんぐ巢、花の葉化・緑化等の感染植物に引き起こす独特の病徴は、全体に共通しており病原ファイトプラズマによる差異は少ない。一方で病害対策のうえで重要となる媒介昆虫や寄主植物範囲といった特性は、種あるいは系統によって大きく異なるため、今後発生したファイトプラズマ病については、系統遺伝学的手法により病原の種・系統レベルまで同定することが望ましい。本稿では、2005年に岩手県で発生したリンドウてんぐ巢病についてPCR-RFLP法による種の同定を行い、従来とは異なる種のファイトプラズマが病原であることを明らかにした事例（田中ら、2006）について紹介したい。

## I リンドウてんぐ巢病

リンドウてんぐ巢病は、1972年に岩手県および福島

Occurrence of Gentian Witches'-broom Caused by ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’. By Minoru TANAKA

（キーワード：リンドウ、てんぐ巢病、ファイトプラズマ、ヒメフタテンヨコバイ）

県における発生が初めて報告され（奥田ら、1972）、1973年には、新潟県妙高高原町（現 妙高市）においても発生し、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り（小池ら、1973）、その後、媒介様式や宿主植物範囲について詳細な試験が行われた（塩見、1988）。さらにリンドウてんぐ巢病新潟県分離株を含む、国内で採集されたキマダラヒロヨコバイ媒介性のファイトプラズマ12分離株は、16S rRNA 遺伝子の塩基配列は全分離株で同一であり、種としては‘*Candidatus Phytoplasma pruni*’（2004年に暫定学名が提案されているが、現時点ではIJSEM誌未掲載）に分類されることが明らかにされた（田中ら、1997；IRPCM, 2004）。

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、圃場における病害の発生率は極めて低く栽培上の問題にはならなかったこともあり、媒介昆虫種の特定や種の同定は行われなかった。ところが近年、岩手県内で“こぶ症”と呼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ており（児玉ら、2004）、その原因究明の一環として、“こぶ症”とてんぐ巢病の関係、すなわち“こぶ症”がファイトプラズマ感染によって引き起こされるか否かについて明らかにする必要がある、てんぐ巢病の病原ファイトプラズマについても同定が行われた。

## II PCR 検定

2005年夏に、岩手県各地から“こぶ症”およびてんぐ巢病の典型的な症状を呈するリンドウ株を採集し、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からCTAB法（NAKASHIMA et al., 1991）により全核酸を抽出し、50μlのRNase A（20μg/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 遺伝子のPCR増幅を行った。その結果、てんぐ巢症状の病株からは陽性を示す約1,850塩基対のDNAの増幅が認められたが、こぶ症株、外観健全株の試料からはDNAの増幅は全く認められなかった。さらに精査するために、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 を行ったが、全く同様の結果であった。これらの結果から、リンドウ“こぶ症”の原因はファイトプラズマ感染とは無関係であることが明瞭に示された。

### Ⅲ ファイトプラズマの同定

厳密に言えば、ファイトプラズマの種を同定するためには、16S rRNA 遺伝子の全長塩基配列を決定し、既存種との相同性を解析する必要があるが、restriction fragment length polymorphism (RFLP) による解析は、より簡便な手法で必要な情報が得られ、また、結果が電気泳動パターンに可視化され一目瞭然となることもあり、現在でも広く用いられている。ここでは採集した病株のうち、浄法寺町分離株について、LEE et al. (1998) の方法に準じて nested PCR 産物の RFLP 解析を行った。前述した R16F2n/R16R2 プライマーセットによる nested PCR 産物を 17 種の制限酵素、*Mse* I, *Alu* I, *Rsa* I, *Hha*

I, *Hae* III, *Hpa* II, *Taq* I, *Hinf* I, *Sau*3A I, *Kpn* I, *Bsh*1236 I, *Bam*H I, *Dra* I, *Eco*R I, *Hpa* I, *Ssp* I, *Bfa* I を用いて DNA 消化し、4% アガロースゲル電気泳動を行った。対照としてリンドウてんぐ巣病ファイトプラズマ新潟県分離株および '*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。その結果、浄法寺町分離株の泳動パターンは、すべての酵素でタマネギ萎黄病ファイトプラズマ、すなわち '*Ca. P. asteris*' と一致し、一方でリンドウてんぐ巣病新潟県分離株、即ち '*Ca. P. pruni*' 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っていた (図-1)。採集した他のてんぐ巣症状分離株についても *Mse* I, *Alu* I, *Rsa* I の 3 酵素による消化を行ったところすべての株が浄法寺町分離株と同様に '*Ca. P. asteris*' のパターンを示した。

さらに、浄法寺町分離株について、塩見ら (1996) の手法に準じてキマダラヒロヨコバイおよびヒメフタテンヨコバイ (*Macrosteles striifrons* ANUFRIEV) による昆虫伝搬試験を行った。ヒメフタテンヨコバイを用いた試験では、検定植物に用いたシュンギクに典型的な萎黄叢生症状が認められたのに対して、キマダラヒロヨコバイを用いた試験では病徴は認められず、PCR 検定の結果も陰性であった。

以上の結果から、2005 年度に岩手県で発生したリンドウてんぐ巣病の病原は、従来知られているキマダラヒロヨコバイ媒介性 '*Ca. P. pruni*' ではなく、ヒメフタテンヨコバイ媒介性の '*Ca. P. asteris*' であることが明らかとなった。また、両者がリンドウに引き起こす病徴の判別は困難であるため (図-2)、新病名とはせず、病原の

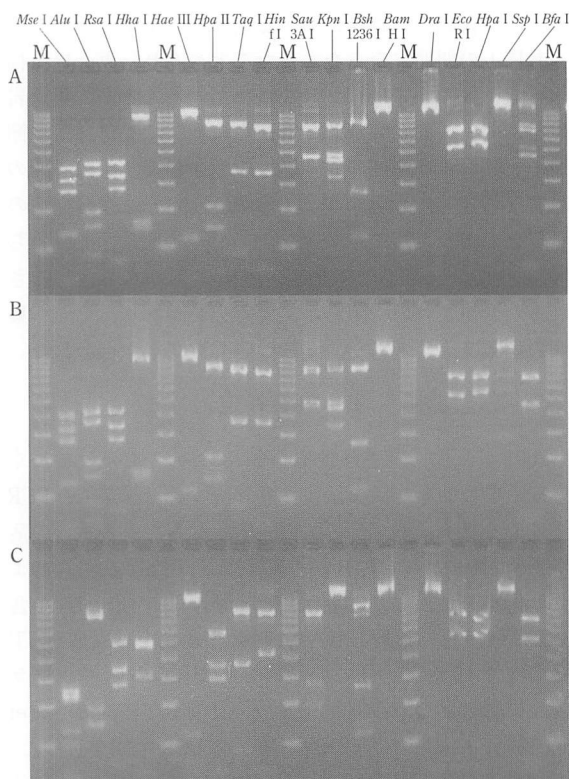


図-1 RFLP 解析による病原ファイトプラズマの同定

A: リンドウてんぐ巣病浄法寺町分離株, B: タマネギ萎黄病佐賀県分離株 ('*Ca. P. asteris*'), C: リンドウてんぐ巣病新潟県分離株 ('*Ca. P. pruni*').



図-2 リンドウてんぐ巣病の病徴

A: 浄法寺町分離株 ('*Ca. P. asteris*'), B: 長野県分離株 ('*Ca. P. pruni*').

追加とすることを提案した。

## おわりに

これまでに国内で発生が報告されている野菜・花き類のファイトプラズマ病のほとんどは、キマダラヒロヨコバイ媒介性かヒメフタテンヨコバイ媒介性のファイトプラズマによるものであり、キマ-媒介性のものは、寒冷地や山間地に発生が多く、ヒメ-媒介性のものは平地で田畑が隣接しているような環境で発生が多いといった違いが見られる。岩手県で初発生した当時のリンドウてんぐ巢病の病原は、リンドウ栽培が主に山間地で行われていたことから、キマ-媒介性であった可能性が高いと思われるが、その後、水田転作の対象としてリンドウ栽培が導入されたことなどから、ヒメ-媒介性ファイトプラズマ感染による発病が増加したと推察される。しかしながら、両者とも昆虫伝搬試験による宿主植物範囲は非常に幅広く、また互いに重複しており、前述したように病徴の差異も少ないことから、発生したファイトプラズマ病の病原がどちらであるかは、今回のように PCR-RFLP 法などによる確認が必要である。また、現在では媒介昆虫の最終的な確認は伝搬試験を行うしか方法がな

いが、近年、東京大学の難波教授らの研究により、ファイトプラズマの主要膜タンパク質が、媒介昆虫の種を決定する要因であることが明らかとなり (SUZUKI et al., 2006), 将来的には、迅速簡易な遺伝子診断法などで、媒介昆虫の種が推定できるようになることが期待されている。

## 引用文献

- 1) IRPCM (2004): Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 1243 ~ 1255.
- 2) 小池賢治ら (1973): 北陸病害虫研報 21: 111 ~ 115.
- 3) 児玉勝雄ら (2004): 園芸学会東北支部平成 16 年度大会研究発表要旨: 51 ~ 52.
- 4) LEE, I. M. et al. (1998): Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 1153 ~ 1169.
- 5) ——— (2004): Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 1037 ~ 1048.
- 6) 宮原和夫ら (1982): 日植病報 48: 551 ~ 554.
- 7) NAKASHIMA, K. et al. (1991): Appl. Environ. Microbiol. 57: 3570 ~ 3575.
- 8) NAMBA, S. et al. (1993): Int. J. Syst. Bacteriol. 43: 46 ~ 467.
- 9) 奥田誠一ら (1972): 日植病報 38: 215 (講要).
- 10) OKUDA, S. et al. (1997): Plant Dis. 81: 301 ~ 305.
- 11) SCHNEIDER, B. et al. (1995): Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology, Vol.1 Academic Press, San Diego, p. 369 ~ 380.
- 12) 塩見敏樹 (1988): 関西病虫研報 30: 31 ~ 36.
- 13) ——— (1996): 日植病報 62: 258 ~ 260.
- 14) SUZUKI, S. et al. (2006): Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 4252 ~ 4257.
- 15) 田中 穰ら (1997): 日植病報 63: 503 (講要).
- 16) ——— (2006): 同上 72: 191 ~ 194.

(新しく登録された農業 32 ページからの続き)

しきみ: クスアナアキゾウムシ: —  
 にしきぎ: ケムシ類: —  
 しゃりんばい: シンクイムシ類: —  
 だいおうしょう: シンクイムシ類: —  
 さかき: ハマキムシ類: —  
 さつき: ハマキムシ類: —  
 さんごじゅ: ワタノメイガ: —  
 稲: ニカメイチュウ, ヒメトビウンカ, カメムシ類, イネハモグリバエ, イネヒメハモグリバエ, フタオビコヤガ, イネツトムシ: 収穫 21 日前まで  
 稲: ニカメイチュウ, 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)  
 麦類: ムギアカタマバエ, ヒメトビウンカ: 収穫 7 日前まで (空中散布)  
 麦類: アブラムシ類: 収穫 7 日前まで (無人ヘリコプターによる散布)  
 だいず: マメシンクイガ, ダイズサヤタマバエ, シロイチモジマダラメイガ, マメヒメサヤムシガ, カメムシ類: 収穫 21 日前まで (空中散布)  
 だいず: ダイズサヤタマバエ, シロイチモジマダラメイガ, ダイズサヤムシガ, カメムシ類: 収穫 21 日前まで (無人ヘリコプターによる散布)  
 かんぎつ: ケシキスイ類, コアオハナムグリ, アザミウマ類: 収穫 14 日前まで (無人ヘリコプターによる散布)  
 水田作物, 畑作物 (休耕田) ヨシ, オギ, ススキ, セイタカアワダチソウ等の多年生雑草が優占している休耕田: カメムシ類: —

## ● MEP 乳剤

21950: 協友スミチオン乳剤 70 (協友アグリ) 07/04/11  
 MEP: 70.0%  
 茶: コカモンハマキ, ツマグロアオカスミカメ: 摘採 21 日前まで  
 茶: ナガチャコガネ幼虫: 10 月 ~ 12 月 (摘採 90 日前まで)

## 「殺虫・殺菌剤」

### ● エトフェンプロックス・イミノクタジン酢酸塩・トリシクラゾール・メプロニル粉剤

21942: ラテラワイド粉剤 DL (クミアイ化学工業) 07/04/04  
 エトフェンプロックス: 0.50%, イミノクタジン酢酸塩: 1.0%, トリシクラゾール: 0.50%, メプロニル: 3.0%  
 稲: いもち病, ツマグロヨコバイ, コブノメイガ, カメムシ類, イネツトムシ, 紋枯病, 穂枯れ (ごま葉枯病菌): 収穫 14 日前まで

### ● クロチアニジン・ベンスルタップ・バリダマイシン・フェリムゾン・フサライド粉剤

21943: ハスラー S 粉剤 DL (住化武田農薬) 07/04/04  
 クロチアニジン: 0.50%, ベンスルタップ: 2.0%, バリダマイシン A: 0.30%, フェリムゾン: 2.0%, フサライド: 1.5%  
 稲: いもち病, 紋枯病, ごま葉枯病, 穂枯れ (ごま葉枯病菌), ウンカ類, ツマグロヨコバイ, カメムシ類, コブノメイガ, フタオビコヤガ: 収穫 21 日前まで

(37 ページに続く)