

キリてんぐ巢病ファイトプラズマの媒介昆虫の探索

西村典夫・中島 智・藤澤一郎・土崎常男・鄭 熙英¹・柿澤茂行*・難波成任*
(鯉淵学園農業栄養専門学校・*東京大学大学院農学生命科学研究科)

A Survey Studying Insects as Vectors for the Paulownia Witches' Broom Phytoplasma

Norio NISHIMURA², Satoshi NAKAJIMA, Ichiro FUJISAWA, Tsuneo TSUCHIZAKI, Hee-young JUNG,
Shigeyuki KAKIZAWA and Shigetou NAMBA

摘 要

水戸地方に発生するキリてんぐ巢病ファイトプラズマ (PWP) について、その媒介昆虫の探索を行った。その結果、クサギカメムシ (*Halyomorpha halys*), ヒメフタテンヨコバイ (*Macrosteles striifrons*), ヒシモンヨコバイ (*Hishimonus sellatus*), ヒシモンモドキ (*Hishimonooides sellatiformis*) によってキリへ伝搬されず、また、PWPを獲得吸汁した各虫の体内からPCR法によりPWPは検出されなかった。キリ樹に多数生息しているミドリヒメヨコバイ (*Empoasca* sp.) は、PWPをキリおよびニチニチソウへ伝搬しなかったが、キリ病葉上で2週間以上獲得吸汁させ、獲得吸汁開始後4週間以上経過したミドリヒメヨコバイから、PCR法により119頭中10頭からPWPが検出された。この結果から、PWPがミドリヒメヨコバイの虫体内で増殖することが確認されたが、キリへの伝搬能については確認出来なかった。

日本各地に栽植されているキリ (*Paulownia tomentosa*) には、てんぐ巢病が多発し大きな被害をもたらしているが、その病原はキリてんぐ巢病ファイトプラズマ (*Paulownia witches' broom phytoplasma*, PWP) で (土居ら, 1967), 媒介昆虫はカメムシ科のクサギカメムシ (*Halyomorpha halys*) と報告されている (塩澤ら, 1979a, b; 中野ら, 1997)。近年、著者らは水戸市の鯉淵学園農業栄養専門学校内およびその近隣に認められるてんぐ巢症状を示すキリ樹から採ったクサギカメムシを用いて、キリやニチニチソウ (*Catharanthus roseus*) へのPWPの伝搬試験を行ったが、感染は認められなかった。また獲得吸汁させたクサギカメムシからも、PCR法でPWPを検出することができなかった。これらのことから、本研究で用いたてんぐ巢症状を示すキリの病原ファイトプラズマは、クサギカメムシ以外の昆虫で媒介される可能性があると考え

られた。PWPは、最新のファイトプラズマの系統分類によれば、“*Candidatus phytoplasma asteris*” の1系統であるが、この種に属する日本産ファイトプラズマには、ミツバてんぐ巢病ファイトプラズマ (*Cryptotaenia japonica witches' broom phytoplasma*, CJWP), タマネギ萎黄病ファイトプラズマ (onion yellows phytoplasma, OYP), クワ萎縮病ファイトプラズマ (mulberry dwarf phytoplasma, MDP) などがあり、媒介昆虫はヒメフタテンヨコバイのほか、ヒシモンヨコバイ、ヒシモンモドキなどのヨコバイ科の昆虫であると報告されている (Nishimura et al., 1998, 西村ら, 2004)。従って、これらファイトプラズマと同一の種に属するPWPも、ヨコバイ科の昆虫により媒介される可能性があると考え、数種ヨコバイ科の昆虫による媒介試験および獲得吸汁した昆虫からPCR法によるPWPの検出試験を行った。その結果、媒介昆虫を特

1 現在 韓国慶北大学校・農業生命科学大学 応用生物化学部

2 Address: Koibuchi College of Agriculture and Nutrition, Mito, Ibaraki 319-0323, Japan
2007年5月11日受領
2007年6月21日登載決定

定することは出来なかったが、若干の知見を得ることができた。

材料および方法

供試昆虫としては、カメムシ科のクサギカメムシ、ヨコバイ科のヒメフタテンヨコバイ、ヒシモンヨコバイ、ヒシモンモドキ、ミドリヒメヨコバイ (*Empoasca* sp.) を用いた。クサギカメムシはラッカセイとダイズの種子、ヒメフタテンヨコバイはイネ幼苗、ヒシモンヨコバイおよびヒシモンモドキはクワ実生苗、ミドリヒメヨコバイはコウゾ幼苗をそれぞれ用いて、いずれも定温定照箱の中で飼育した。クサギカメムシは野外から採集した成虫が産んだ卵から孵化した幼虫を用いた。ヒメフタテンヨコバイ、ヒシモンヨコバイ、ヒシモンモドキは既報 (Nishimura et al., 1998; 西村ら, 2004) の実験に用いたものと同じである。ミドリヒメヨコバイは野外のコウゾから採集したものを供試した。試験に用いたキリは、温室中で種子から発芽・育成した数葉から10数葉期の鉢植えの実生苗を用いた。その他の実験に用いた植物も鉢植えとして温室中で実験に供試した。温室は害虫の発生を防ぐため、適宜、殺虫剤を散布した。獲得吸汁源として用いたPWP感染キリは、水戸市鯉淵町の鯉淵学園農業栄養専門学校の校内およびその近くの畑地に栽植されているてんぐ巣症状を示す典型的なファイトプラズマ病を示すキリを用いた。いずれも樹齢10年以上の成木で、1本の木の中に黄化叢生した枝葉と外観健全な枝葉とが混在していた。黄化叢生葉および外観健全葉から、ファイトプラズマの16SrRNA遺伝子を特異的に増幅するプライマーを用いて、PCRでPWPの検出を試みたところ、黄化叢生葉からはPWPが検出されたが、外観健全葉からは検出されなかったため、獲得吸汁源として黄化叢生枝を用いた。獲得吸汁は、野外の発病キリから黄化叢生した枝葉を切り取り、水を入れた小瓶に挿して昆虫飼育箱に入れ、その中へ供試虫を放つ方法で行った。獲得吸汁時間が長い場合は、順次新しい黄化叢生枝葉に取り替え吸汁させた。ミドリヒメヨコバイおよびクサギカメムシで、特に長時間獲得吸汁させる場合は、野外のキリ病樹の黄化叢生した枝葉に、寒紗を袋状にかぶせ、その中に無毒虫を一定期間放飼して獲得吸汁させた。接種吸汁は、各供試昆虫にPWPを獲得吸汁させた後、クサギカメムシはキリで、ヒメフタテンヨコバイはイネで、ヒシモンヨコバイおよびヒシモンモドキはクワで、ミドリヒメヨコバイは

コウゾで、それぞれ所定時間飼育後、昆虫飼育箱中の鉢植えした数本の接種用植物へ放飼する方法で行った。

PCRに用いたプライマーは、ファイトプラズマ16SrRNA遺伝子のうち、ファイトプラズマ特異的な領域を増幅するもの (SN910601, SN920204) で、用いた反応液やPCR反応条件等は既報 (Namba et al., 1993a) に従った。また、16SrRNA遺伝子の塩基配列の解析については、既報 (Namba et al., 1993b) に従った。

結果および考察

1. クサギカメムシによるPWPの伝搬およびPCR法による虫体からのPWPの検出

クサギカメムシが、鯉淵学園およびその近くのキリに発生するPWPを伝搬するか否かについて試験を行った。実験はクサギカメムシの3齢幼虫をPWP感染キリ枝葉で5~14日間獲得吸汁させた後、様々な期間維持・飼育後、健全なキリまたはニチニチソウに1~29日間接種吸汁させた。接種吸汁後100日間以上温室内に置き、発病の有無を観察した。その結果、接種した125株のキリおよび47株のニチニチソウではいずれも発病せず、伝搬は認められなかった (第1表)。また、PWPを6~21日間獲得吸汁させた後、獲得吸汁開始後28~37日を経過したクサギカメムシ48頭について、PCR法によりPWPの検出を試みたが、いずれの虫からも検出されなかった (第2表)。この結果から、本研究に供試したPWPは、クサギカメムシにより獲得吸汁されず、伝搬もされないことが分かった。

塩澤ら (1979a, 1979b) は、クサギカメムシがPWPをキリ実生苗およびニチニチソウへ伝搬すること、獲得吸汁したクサギカメムシ体内でPWPが電顕観察されることを報告した。しかしその後、塩澤ら (1993) は、クサギカメムシの1齢幼虫にPWPを獲得吸汁させ、それから生育した各世代の虫につきPCR法でPWPの検出を行ったところ、2~4齢幼虫からは検出されるが、5齢幼虫および成虫からは検出されないとしており、クサギカメムシ体内におけるPWPの増殖能については必ずしも明らかでない。また、中野ら (1997) は、当該実験で用いたクサギカメムシにより、報告内で供試したPWPがニチニチソウに伝搬され、クサギカメムシからもPCRによりPWPが検出されると報告している。しかし、ニチニチソウから検出されたファイトプラズマの16SrRNA遺伝子の配列は既報 (Namba et al., 1993b) の配列と差異が認められたと報告している。

これらの過去の報告と異なり、本実験では、PWPはクサギカメムシで伝搬されず、虫体内からもPWPは検出されなかった。この理由として本実験で用いたPWPが、クサギカメムシにより伝搬されないPWPの系統であるか、あるいは実験に用いたクサギカメムシがPWPを伝搬しない系統であることなどが考えられるが、本研究ではその理由は明らかにすることはできなかった。

2. 各種ヨコバイによるPWPの伝搬およびPCR法による虫体からのPWPの検出

CJWP, OYP及びMDPなどのファイトプラズマを媒介することが知られているヒメフタテンヨコバイ、ヒシモンヨコバイ、ヒシモンモドキを各々用いて、PWPの伝搬試験と虫体からPWPの検出を行った。これら3種ヨコバイはキリに対する嗜好性が低く、2~3日以上キリを吸汁させると多くの個体が死亡するため、獲得吸汁と接種吸汁時間をともに短くして試験を行った。その結果、3種ヨコバイはいずれもPWPを

キリおよびニチニチソウへ伝搬しなかった(第3表)。なお西村らはPWP感染キリで獲得吸汁させたヒシモンヨコバイの虫体内からPCRにより8頭中1頭からPWPが検出されたと報告(西村ら, 1995b)したが、今回の試験では検出されなかった(第4表)。これらの結果から、供試した3種ヨコバイは、野外ではPWPを媒介しないと推測された。

西村ら(1994)は、CJWPがヒメフタテンヨコバイによりキリへ伝搬され、キリが発病すると報告した。しかしその後、CJWPに感染したキリから、ヒメフタテンヨコバイによりキリおよびミツバへ戻し接種できないとも報告(西村ら, 1995a)した。これらの結果を総合すると、ヒメフタテンヨコバイは接種吸汁でCJWPをキリへ感染させることができるが、感染したキリからは獲得吸汁でCJWPを虫体内へ獲得出来ない、すなわち、ヒメフタテンヨコバイは虫体内でCJWPを増殖する能力を持っているにも関わらず、感染キリからCJWPを獲得できないことを示している。この理由

第1表 クサギカメムシによるPWPの伝搬

獲得吸汁 日数 ^{a)}	獲得吸汁 開始後日数	接種吸汁 日数 ^{b)}	接種吸汁 頭数 ^{c)}	接種植物	発病株数 / 接種株数
5	21~23	5~7	2	キリ	0 / 30
6	25~27	1~16	2~3	キリ	0 / 52
7	7~12	21~29	2~3	キリ	0 / 43
7	7~21	7	2	ニチニチソウ	0 / 14
14	14~35	6~8	2	ニチニチソウ	0 / 33

a) 3 齢幼虫を使用, b) 植物は数株ずつ鉢植えし集団接種, c) 植物 1 株当たりの頭数

第2表 PWPを獲得吸汁させたクサギカメムシからのPCR検出

獲得吸汁日数 ^{a)}	獲得吸汁開始後日数	検定頭数	検出頭数
6~7	33~37	20	0
14~21	28~35	28	0

a) 3 齢幼虫を使用

第3表 ヒメフタテンヨコバイ・ヒシモンヨコバイ・ヒシモンモドキによるPWPの伝搬

媒介虫	獲得吸汁 時間	獲得吸汁 開始後日数	接種吸汁 日数	接種植物	発病株数 / 接種株数
ヒメフタテン ヨコバイ	3時間~5日	21~40	1~10	キリ	0 / 117
				ミツバ	0 / 230
				ニチニチソウ	0 / 32
ヒシモン ヨコバイ	1~3日	20~70	1~3	キリ	0 / 51
				ニチニチソウ	0 / 10
ヒシモン モドキ	1~2日	21~44	1~3	キリ	0 / 12
				ニチニチソウ	0 / 6

として、ヒメフタテンヨコバイはキリを2～3日間以上吸汁すると死亡するため、虫体内でCJWPが増殖するための十分量のCJWPを感染キリから獲得吸汁する前に、死亡するためではないかと推察された。この結果は、ヒメフタテンヨコバイ、ヒシモンヨコバイ、ヒシモンモドキ等のいずれの昆虫種も、その体内でCJWPを増殖する能力を持つにも関わらず、キリにおける吸汁行動の時間的制限がキリからCJWPの伝搬制限要因になっていると考えられる。

3. ミドリヒメヨコバイによるPWPの伝搬およびPCRによる虫体からのPWPの検出

塩澤・土崎（1992）は、関東一円のキリで観察される吸汁性昆虫を調査し、キリ樹上で世代が送れる昆虫種としてクサギカメムシ、ミドリヒメヨコバイ、ヒメイトカメムシ、ツマグロオオヨコバイの4種をあげている。鯉淵学園とその近隣に植栽されているキリのでんぐ巣症状の枝葉でも、これら吸汁性昆虫が観察されたが、個体数ではミドリヒメヨコバイが最も多く観察されたことから、ミドリヒメヨコバイを供試してPWPを伝搬するかどうかについて、様々な条件で試験した。すなわち獲得吸汁期間は1～29日、接種吸汁

期間は1～11日と広い幅を設定した。なお、獲得吸汁期間が7日以下の場合には、切り取ったPWP感染枝葉を昆虫飼育箱内に置き、ミドリヒメヨコバイをそこに放飼し、獲得吸汁期間を14日以上に設定した試験の場合には、野外のキリの黄化叢生枝葉に寒冷紗を袋状に被せ、その中にミドリヒメヨコバイを放飼して獲得吸汁させた。伝搬試験では、キリおよびニチニチソウへの伝搬を試みたが、両植物とも感染は認められなかった（第5表）。次に、PWPを獲得吸汁したミドリヒメヨコバイからPWPのPCR検出を試みた。その結果、キリ病枝上で14日以上獲得吸汁させ、獲得吸汁開始後28日以上経過したミドリヒメヨコバイで、119頭中10頭（8.4%）からPWPが検出された（第6表）。これらの増幅されたDNA断片の塩基配列を調べたところ、PWPの16SrRNA遺伝子と同一であることが確認された。この結果は、ミドリヒメヨコバイは獲得吸汁日数と獲得吸汁開始後日数が長時間の場合、8.4%と低率ではあるが、罹病キリからPWPを獲得して虫体内で増殖することが分かった。この様にミドリヒメヨコバイはファイトプラズマ罹病キリからPWPを獲得するにも関わらず、本試験ではキリおよびニチニチソウへ

第4表 PWPを獲得吸汁したヒメフタテンヨコバイ・ヒシモンヨコバイ・ヒシモンモドキからのPCR検出

媒介虫	獲得吸汁時間	獲得吸汁開始後日数	検定頭数	検出頭数
ヒメフタテンヨコバイ	20時間～1日	18～34	36	0
ヒシモンヨコバイ	1～3日	20～41	46	0
ヒシモンモドキ	1日	18～38	45	0

第5表 ミドリヒメヨコバイによるPWPの伝搬

獲得吸汁日数	獲得吸汁開始後日数	接種吸汁日数	植物1株当たり頭数	接種植物	発病株数 / 接種株数
1～7	18～40	1～10	1～10	キリ	0 / 47
				ニチニチソウ	0 / 41
14～29	23～39	2～11	2～11	キリ	0 / 112
				ニチニチソウ	0 / 40

第6表 PWPを獲得吸汁させたミドリヒメヨコバイからのPCR検出

獲得吸汁時間	獲得吸汁開始後日数	検定頭数	検出頭数
20時間～7日	17～38	184	0
14日	21	57	0
14日	28～31	48	9
25～28日	32～39	71	1
野外病キリより採集 ^{a)}		95	1

a) 獲得吸汁開始後日数は不明

伝搬しなかった。この理由として、ミドリヒメヨコバイは接種吸汁でキリへPWPを感染させる能力がない、本試験で1株の植物に接種吸汁させた虫の頭数が少なすぎた、或いは発病までに長期の日数が必要であるなどが考えられる。この様に本試験からは、ミドリヒメヨコバイがPWPの媒介虫であることは証明出来なかった。

一般に昆虫媒介性の病原体では、病原体が同一種の系統の場合、共通の昆虫もしくは近縁の昆虫で媒介される媒介虫特異性があることが知られている。PWPは“*Ca. phytoplasma asteris*”に属するOYP, MDPなどのファイトプラズマは、いずれもヨコバイ目,ヨコバイ科の昆虫で媒介されるのに対し、PWPはカメムシ目,カメムシ科の昆虫で媒介されるとされてきた。この事実はファイトプラズマと媒介昆虫との関係を研究する上で貴重な情報であり、大変興味深い。本実験ではクサギカメムシが媒介するとの結果が得られず、それ以上研究を展開することは出来なかった。いずれにしても、昆虫媒介性の病原体は一般にその植物に多数発生している昆虫が媒介者となることが多い。例えばクワ萎縮病ファイトプラズマは桑園で多数発生するチマダラヒメヨコバイで、場合によ

り媒介されることがあると報告されており (Jiang et al., 2005), 吸汁条件等によっては依然としてミドリヒメヨコバイが、PWPの媒介虫である可能性はあり、今後さらに検討する必要がある。

引用文献

- 土居養二ら (1967) 日植病報 33 : 259 - 266.
Jiang, H. et al. (2005) JGPP 71 : 370 - 372.
中野陽子ら (1997) 日植病報 63 : 502.
Namba, S. et al. (1993a) Phytopathology 83 : 786 - 791.
Namba, S. et al. (1993b) Int. J. Syst. Bacteriol. 43 : 461 - 467.
西村典夫ら (1994) 日植病報 60 : 746.
西村典夫ら (1995a) 日植病報 61 : 611.
西村典夫ら (1995b) 日植病報 61 : 611.
Nishimura, N. et al. (1998) Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 64 : 474 - 477.
西村典夫ら (2004) 日植病報 70 : 22 - 25.
塩澤宏康・土崎常男 (1992) 関東病虫研報 39 : 259 - 260.
塩澤宏康ら (1979a) 日植病報 45 : 130 - 131.
塩澤宏康ら (1979b) 日植病報 45 : 556.
塩澤宏康ら (1993) 日植病報 59 : 308.