

# 平成 29 年度日本植物病理学会九州部会 第 41 回シンポジウム要旨集

- 1) マンゴー病害（炭疽病および軸腐病）の発生生態と  
防除に関する研究

P 1-4

沖縄県農業研究センター名護支所  
澤岨 哲也 氏  
(座長：中村 正幸 (鹿児島大学農学部))

- 2) アブラナ科ウイルスの時間尺度と拡散経路に関する研究

P 5-9

佐賀大学農学部 (日本学術振興会特別研究員)  
八坂 亮祐 氏  
(座長：富高 保弘 (九州沖縄農業研究センター))

- 3) レタスビッグベイン病に関与する媒介菌および  
2種病原ウイルスの病理学的特性に関する研究

P10-14

農研機構・西日本農業研究センター  
野見山 孝司 氏  
(座長：竹下 稔 (宮崎大学農学部))

## 資料の取り扱いについて

本資料掲載の知見等については、複製、転載および引用にあたって、必ず原著者の了承を得たうえで利用してください。

# マンゴー病害（炭疽病および軸腐病）の発生生態と防除に関する研究

沖縄県農業研究センター名護支所 果樹班

澤岨 哲也

(takushtt@pref.okinawa.lg.jp)

Studies on the Ecology and Control of Anthracnose and Stem-end rot of Mango.

Tetsuya Takushi

Okinawa Prefectural Agricultural Research Center Nago Branch,

4605-3, Nago, Nago-city, Okinawa 905-0012, Japan.

## Abstract

Mango anthracnose and stem-end rot are chronic problems for mango farmers in Okinawa Prefecture. In order to prevent these diseases, an ecological survey of the causal fungi of both diseases was carried out in greenhouses. The findings showed that the causal fungus of each disease has a specific infection process. A systematic application technique using several fungicides in rotation was established for anthracnose by screening effective fungicides for use against the fungi. In addition, removing debris in the field and heat treatment of the fruit peduncle during harvesting were effective for controlling stem-end rot.

## 1. はじめに

マンゴーは沖縄県、鹿児島県および宮崎県などの西南暖地を中心に栽培が盛んに行われており、主要品種「アーウィン」は、独特の甘い香りと鮮紅色の果皮、柔らかい肉質など、外観、品質ともに市場での人気が高く、高値で取引されている。その一方で、市場や消費者に果実を届ける過程において、糸状菌による果実腐敗



マンゴー炭疽病

マンゴー軸腐病

が深刻な問題となっている（澤岨ら，2012）。これらの病害果は、収穫時に外観上健全であっても、輸送中に黒色斑点や軟化腐敗の症状が発症・進行するため、経済的損失だけでなく市場や消費者の信頼、さらには産地ブランドの評価にも大きく影響する。そのため、圃場での根本的な防除技術の確立が求められている。本講演では、沖縄県のマンゴー生産で最重要病害とされるマンゴー炭疽病と軸腐病の2病害の発生生態および防除に関する一連の研究成果について紹介する。

## 2. マンゴー炭疽病菌の潜在感染と感染時期

マンゴーの花芽分化から開花、着果初期における本病の潜在感染を明らかにするために、エタノール浸漬簡易診断法による炭疽病菌の検出と分離を試みた。その結果、外見上健全な頂芽（1月）、花芽（2月）、花序（3月）および幼果（4月）より2種病原菌 *C. gloeosporioides* および *C. acutatum* が高頻度に検出された（表1）。また、分離菌から作出した硝酸塩利用能欠損変異株（*nit* 変異株）をマーカーとした時期別の圃場接種の結果、頂芽、花芽、花序および幼果の各時期に接種したす

すべての枝から潜在感染果実が収穫され、病原菌の感染は1月の出蕾期で既に成立しており、5月の幼果形成期頃に最も潜在化の割合が高いことが明らかになった。このことから、2種炭疽病菌は、開花、結実、果実肥大から収穫に至る長期の過程において、外観上健全な植物部位の組織内で潜伏しながら果実に伝搬し、収穫後の果皮上に病斑を形成することが示された(澤岬ら, 2013a)。以上の生態的知見より、圃場における炭疽病の防除は、出蕾前から予防的に開始することが重要であり、出蕾前(12月下旬)から収穫前(6月下旬)までの防除スケジュールの確立が必要であると考えられた。

表1 潜在感染していた分生子塊から分離された炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* および *C. acutatum* の分離菌数

供試部位	糸満市圃場		うるま市圃場	
	<i>C.g.</i> <sup>a)</sup>	<i>C.a.</i> <sup>b)</sup>	<i>C.g.</i>	<i>C.a.</i>
頂芽	1/3 <sup>c)</sup>	2/3	0/0	0/0
花芽	3/4	1/4	4/6	2/6
花序	2/5	3/5	6/6	0/6
幼果	3/5	2/5	4/5	1/5
計	9/17	8/17	14*/17 <sup>d)</sup>	3/17

a) *C.g.*: *C. gloeosporioides*

b) *C.a.*: *C. acutatum*

c) 分離菌数/分生子塊を形成した試料数

d) アスタリスクは *C.g.* および *C.a.* 間における Mann-Whitney's *U* 検定による有意差 ( $p < 0.01$ ) があることを示す。

### 3. マンゴー炭疽病に対する薬剤体系散布の防除効果

マンゴー炭疽病に登録のある5種殺菌剤に対する病原菌の薬剤感受性を調べた結果、キャプタン、マンゼブ、クレソキシムメチルおよびアゾキシストロビンの4薬剤で2種病原菌の菌叢生育と分生子発芽に対して高い抑制効果が認められた。そこで、これら4薬剤を供試して出蕾前の12月下旬から散布を開始し、収穫前の袋かけ直前(6月下旬)まで計8回の体系散布を実施した。予防剤として作用するキャプタンおよびマンゼブは、薬液による果実の斑点症状や褐色の汚れが明瞭であることから、散布時期を生育期前半の着果前に限定した。一方、治療剤であるクレソキシムメチルおよびアゾキシストロビンは、薬液による汚れや薬害が少なく、収穫前日の散布も可能であることから、散布時期を着果期以降に設定した。その結果、2009~2010年の体系散布区は無散布区と比べて有意に炭疽病の発病を抑制した。また、体系散布区の果実では薬害は認められ

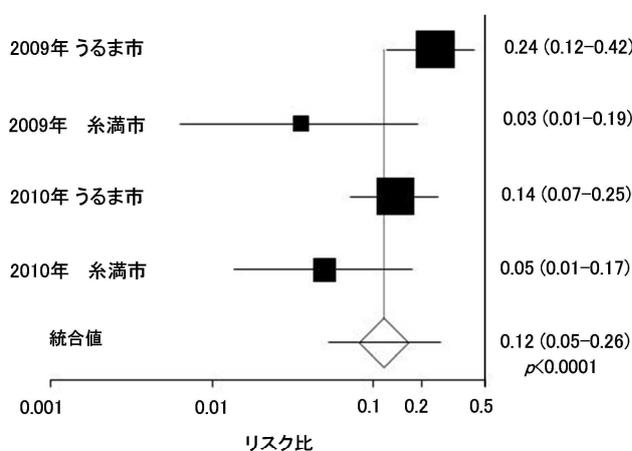


図1 メタ・アナリシス解析によるマンゴー炭疽病に対する薬剤体系散布の防除効果

■は体系散布区と無散布区の発病率の割合(リスク比)を、■の大きさは重み付けの値を、各マーカーの両側の線は95%信頼区間を示す。◇は4試験の総合リスク比を示す。

なかった。この2カ年の結果をメタ・アナリシス解析により統合評価したところ、体系散布区からみた無散布区に対する統合リスク比は0.12(95%信頼区間: 0.05~0.26)で誤差の範囲を含めて1.0未満であり、体系散布区の炭疽病の発病は無散布区に比べて有意に少なく、無散布区の発病率の約12%にまで抑制されることが示された(図1)。以上より、施設マンゴーにおける4薬剤を組み合わせた体系散布は、炭疽病の薬剤防除体系として有効であることが明らかとなった(澤岬ら, 2013b)。

#### 4. マンゴー軸腐病の発生生態と耕種的防除法

本病は病原菌 *Lasiodiplodia theobromae* により引き起こされ、果実の他に果房、緑枝で感染・発病する (澤岨ら, 2013c)。ハウスにおける果房での発病推移と病斑からの分生子飛散消長について調査した結果、3月の開花期以降から果房での発病が増加しながら、収穫期に最も高い発病率を示した。また、分生子飛散では5~7月にかけて激しく増減しながら推移し、特に6月中~下旬に活発な飛散がみられた。また、ハサミによる摘果作業時の果房の切り口が本病の感染をさらに助長することが確認された。このことから、果房病斑上の分生子が重要な伝染源となり、これが大量に飛散することでハウス内に病原菌が蔓延するものと考えられた (澤岨ら, 2005)。そこで、ハウス内の剪定果房を含む枯れ枝残渣除去による防除効果を検討した結果、各生育ステージで無処理と比べて残渣除去区で低い果房発病率が認められた (図2)。以上の結果から、枯れ枝残渣除去は本病の耕種的防除法として有効であることが示唆された (澤岨ら, 2005)。

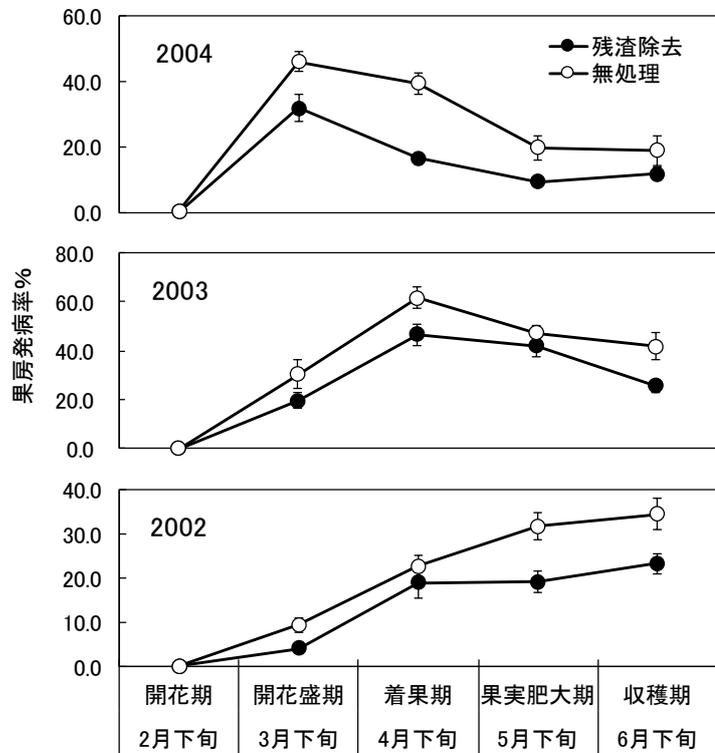
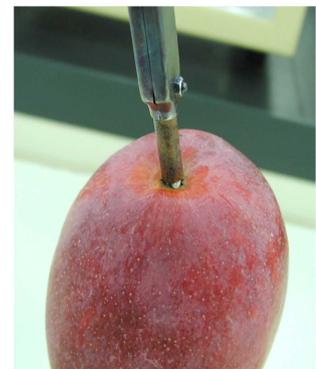


図2 ハウス内の残渣除去による果房の発病抑制効果

#### 5. 果梗部熱処理法によるマンゴー軸腐病の防除

本病は主に収穫時の果梗部切り口から腐敗が進展するため、果梗部を瞬時に殺菌処理できれば防除効果が期待できる。そこで、総合的防除の一手段となる新たな物理的防除法の開発を試みた。まず、熟度の異なるマンゴー果実において果梗から果実内部への病原菌の侵入過程を調べた結果、未熟果実と比べて収穫期の成熟果実で病原菌の侵入は早く、菌接種 12 時間後には果梗から深さ 15mm の果肉部まで達することが判明した。そこで、果梗部に加熱したハンダゴテ先端部 (平面に加工済) を約 10 秒間押しあてる果梗部熱処理法の防除効果を検討した結果、菌接種 3、6 時間後の熱処理で有意に発病が抑制され、接種 24 時間後の熱処理では発病は抑えられなかった。このことから、収穫後 6 時間以内の果梗部熱処理で、より効果的な防除効果が得られることが明らかになった。また、現地実証試験において収穫 3 時間後に果梗部熱処理を実施した結果、無処理と比較して高い発病抑制効果が認められ、果実品質の劣化もみられなかった。以上より、果梗部熱処理法は本病の物理的防除法として有効であると考えられた (澤岨・比嘉, 2014)。



果梗部熱処理の様子

#### 6. おわりに

マンゴー炭疽病と軸腐病の病原菌は、剪定後の果房や緑枝、葉などの残渣上で長期間生存する

ことが確認されており（澤岬ら，2005；澤岬，2015），いずれも圃場では残渣が重要な伝染源になっていると考えられる．薬剤体系散布による防除効果をより効果的に発揮させるためにも，残渣除去による耕種的防除を積極的に行うことで，薬剤のみに依存しない総合的な防除管理を実施することが重要である．また，本県の市場流通においては，出荷後から本土市場到着までに2～3日ほどかかり，消費者に届くにはそれ以上の日数を必要とする．さらに流過程では，ほぼ常温下で輸送が行われており，これらも病害多発の要因となっている．このことから，島嶼性に即した鮮度保持技術ならびに流通システムの構築も今後の重要課題であると考えられる．

## 引用文献

- 1) 澤岬哲也ら（2005）．マンゴー軸腐病の発生生態と耕種的防除法．日植病報 71: 223. (講要)
- 2) 澤岬哲也ら（2012）．沖縄県から出荷したマンゴー果実における炭疽病の発病推移および圃場採集した果実における2種病原菌の分離頻度．熱帯農業 5 : 20-24.
- 3) 澤岬哲也ら（2013a）．施設マンゴー果実における炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* および *C. acutatum* の潜在感染とその感染時期．日植病報 79 : 142-149.
- 4) 澤岬哲也ら（2013b）．マンゴー炭疽病菌の薬剤感受性および薬剤体系散布の防除効果．熱帯農業 6 : 81-88.
- 5) 澤岬哲也ら（2013c）．狭義の *Lasiodiplodia theobromae* によるマンゴー軸腐病（新称）．日植病報 79 : 15-19.
- 6) 澤岬哲也・比嘉 淳（2014）．果梗部熱処理法によるマンゴー軸腐病の防除．九病虫研会報 60 : 48-52.
- 7) 澤岬哲也（2015）．異なる温度条件下における罹病枯死葉上のマンゴー炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* の生存期間．九病虫研会報 61: 16-19.

# アブラナ科ウイルスの時間尺度と拡散経路に関する研究

佐賀大学農学部 日本学術振興会特別研究員

八坂 亮祐

[st9522@cc.saga-u.ac.jp](mailto:st9522@cc.saga-u.ac.jp)

Study on the timescales and migration routes of the viruses infecting Brassicaceae plants

Ryosuke Yasaka

Laboratory of Plant Virology, Department of Applied Biological Sciences,  
Faculty of Agriculture, 1-banchi, Honjo-machi, Saga 840-8502, Japan

## Abstract

The timescales and migration routes of animal viruses including influenza virus and human immunodeficiency virus have frequently been studied for the vaccine production. In contrast, although these studies are necessary for plant viral disease control and virus-resistant plant production, few studies have been reported for plant viruses. In this study, the timescales and migration routes of two viruses infecting Brassicaceae plants, cauliflower mosaic virus (CaMV, a circular ds DNA molecule of 8kb) and turnip mosaic virus (TuMV, ss RNA molecule of 9.8kb), were assessed. Sequence-based phylogenetic and population genetic analyses were done including estimating the substitution rates and divergence times. The evolution and migration of these viruses correlated well to the agricultural history and human immigration.

## 1. はじめに

今日世界的に生鮮野菜類の移動が増加しており、植物ウイルスを含む病原体の侵入問題が深刻化・表面化してきている。今後近隣地域からの保毒媒介昆虫の飛来だけでなく、遠方地域から輸入される汚染種苗などによる病原体侵入の機会が増加することが予想される。従って、より地球規模での包括的な病原体の危機管理体制が求められるようになり、病原体が「いつ」、「どこの国からどこの国へ」拡散したのか、即ち時間尺度と拡散経路の解明が必要となる。

生物の進化過程を分子時計という観点から、ゲノム情報から時間尺度（共通祖先と分岐した年代）を推定できるようになった。最近では、時間尺度の解析に加え、拡散経路の解析も可能となった(Drummond et al., 2012; Duchêne et al., 2014)。今日行われているインフルエンザウイルスの流行予測からワクチン製造の一連の技術は、進化的研究が基盤となっている。本研究は、将来の植物ウイルスの抵抗性品種の開発や流行予測などの防除技術開発を見据え、アブラナ科ウイルスの時間尺度と拡散経路に関して修士課程から博士課程在学中に研究を行ったので、その一部について解説する。

## 2. 時間尺度および拡散経路解析

時間尺度および拡散経路解析は、用いる塩基配列の分離株集団から、まず組換え体を

除き，1) 各分離株間の塩基置換（変異）を比較後，2) 塩基置換数と採集年を基に進化速度を推定し，3) 進化速度を基に分岐年代（時間尺度）を推定後，4) 分岐年代と採集地情報を基に拡散経路を推定する（図 1）。1) - 3) は BEAST (Drummond et al., 2012)，4) は SPREAD (Bielejec et al., 2011) および Google Earth を用いて解析した。

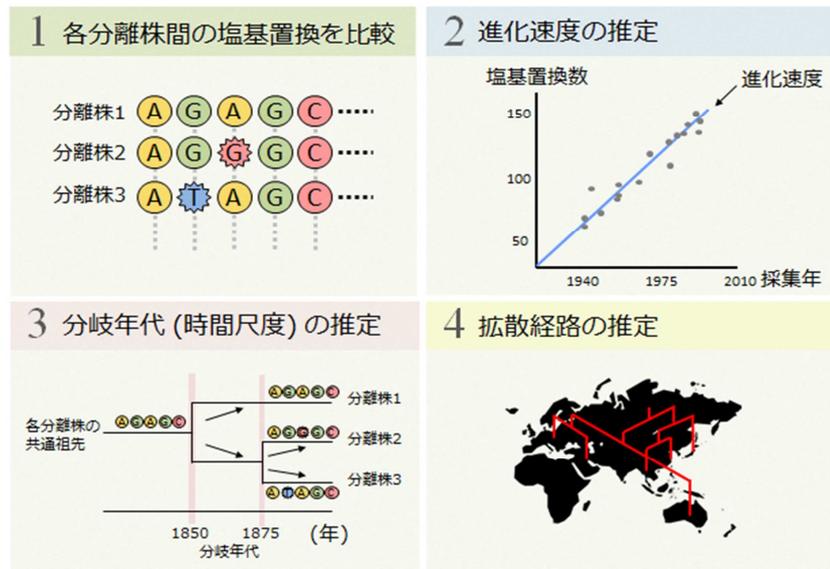


図 1. 時間尺度と拡散経路の推定方法

### 3. アブラナ科植物に感染するウイルス

アブラナ科植物に感染するウイルスとしては，主にカリフラワーモザイクウイルス (CaMV), カブモザイクウイルス (TuMV) そしてキュウリモザイクウイルス (CMV) が挙げられる．これらウイルスに感染したアブラナ科作物にはモザイク，黄化およびえそ症状等が認められ，収量低下が引き起こされる．症状によってどのウイルスが感染しているかを判断するのは難しく，時に複数のウイルスが混合感染している場合も認められている (Ohshima et al., 2002; Martín & Elena, 2009).

#### A. カリフラワーモザイクウイルス

CaMV はアブラムシにより半永続的に媒介され，CaMV 粒子は 2 本鎖環状 DNA をゲノムに持っている (図 2). 日本，イラン，ギリシャおよびトルコで CaMV 様症状を示すダイコン，キャベツおよびカブ植物などを 67 株採集した．カブを用いて CaMV の単一病斑分離を行った後，増殖宿主に接種し，ダイレクトシーケンス法およびクローニング法により，CaMV 全ゲノム構造を決定した．さらに国際塩基配列データベースで全塩基配列が公開されている 9 分離株，塩基配列の一部が公開されている 21 分離株を加えて CaMV の分子進化解析を行った．なお，ウイルスの時間尺度と拡散経路の解析には，数十分離株以上と多くの塩基配列情報が必要とする．

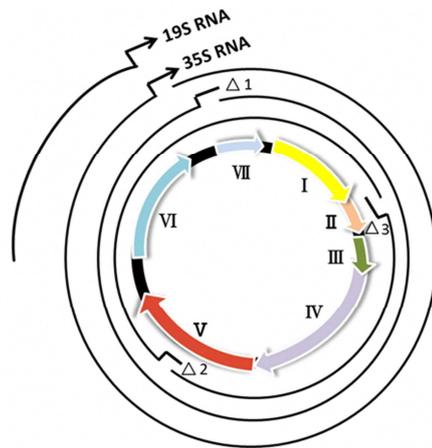


図 2. カリフラワーモザイクウイルスのゲノムマップ

CaMV について最も近い共通祖先までの時間 (TMRCA) を算出すると、オープンリーディングフレーム (ORFs) I-V および ORF VI では 491 年および 431 年となった。さらに拡散経路を解析すると、ORFs I-V では、トルコからギリシャそしてイランへ、ORF VI ではギリシャからトルコ、トルコからイランへ拡散したことが示唆された (図 3)。以上は、植物の 2 本鎖 DNA ウイルスについて初めて時間尺度と拡散経路の解析をした結果である (Yasaka et al., 2014)。



図 3. CaMV の拡散経路

## B. カブモザイクウイルス

TuMV はアブラムシにより非永続的に媒介され、TuMV 粒子は 1 本鎖 RNA をゲノムとして持っている (図 4)。オーストラリアおよびニュージーランドで TuMV 様症状を示す *Hirschfeldia incana*, *Rapistrum rugosum* およびカブ植物など 32 株を採集した。キノアを用いて TuMV の単一病斑分離を行った後、増殖宿主に接種した。その後、ダイレクトシーケンス法により、全ゲノム構造を決定した。なお国際塩基配列データベースに全塩基配列が公開されている 197 分離株を TuMV の進化解析に用いたが、ほとんどの塩基配列は、私の所属研究室が以前登録した配列である。

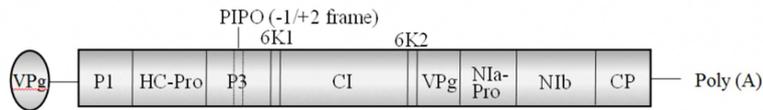


図 4. カブモザイクウイルスのゲノムマップ

TuMV の TMRCA は 610-806 年と推定された (Yasaka et al., 2015). 病原性や進化的背景を考慮すると, ゲノム型サブグループ毎に TuMV の拡散経路は異なることが予想されたため, それぞれ拡散経路の推定をした. basal-B2 サブグループの分離株を用いて解析すると, ドイツからオーストラリアおよびニュージーランドへの拡散が認められ, オーストラリアへの拡散は約 70-83 年前, ニュージーランドへの拡散は約 32-45 年前であった. world-B2 および world-B3 サブグループの分離株を用いて解析すると, world-B2 サブグループではイギリスおよびドイツからオーストラリアへ, world-B3 サブグループではイギリスからオーストラリアおよびニュージーランドへの拡散が認められ, オセアニア両国への拡散時期は約 20-42 年前と推定された (図 5).

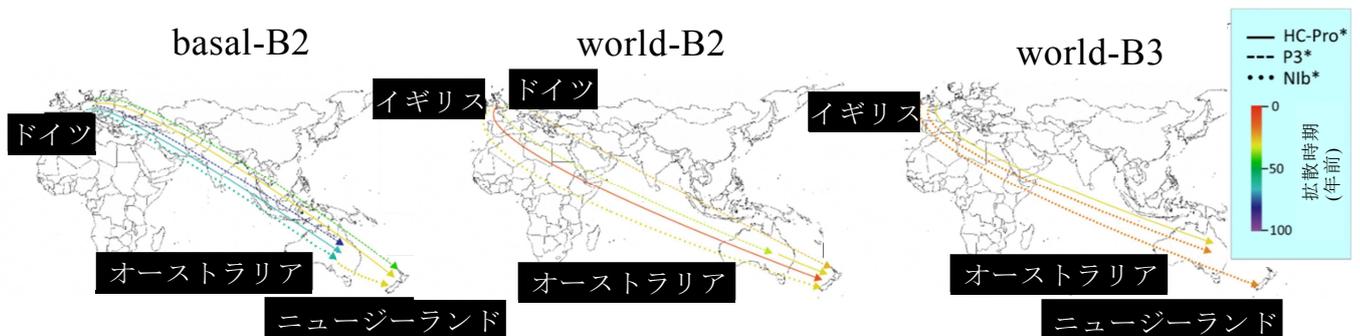


図 5. TuMV の拡散経路

#### 4. おわりに

両ウイルスの拡散時期と拡散経路は, 人類の移動とそれらの国々での農業の発展の時間尺度と一致していた. 植物ウイルスの進化の歴史を紐解くには, 宿主植物, 媒介昆虫などウイルスを取り巻く様々な環境を包括的に理解する必要がある. 以前は侵入が不可能な環境条件であっても, 環境変動によって侵入に有利になる場合があり, 予期しないウイルスが出現することもある. また貿易が国際的に益々盛んになってきており, 罹病植物が様々な国に持ち込まれる機会が増えており, 我が国においても, 1980 年から 2010 年の間に農作物の輸入額が約 6 倍に増加している (浅見, 2014). このような時代背景もあり, 植物ウイルスの世界的拡散にはより一層の注意が必要と思われる. 「過去から学び, 未来に生かす」ことが進化的研究の意義の一つであり, 進化の謎を解き明かすだけで終わってはいけない.

#### 5. 謝辞

博士論文を遂行にするにあたり終始ご指導を賜りました佐賀大学農学部教授大島一里博士に心から感謝致します. また佐賀大学農学部准教授草場基章博士, 鹿児島大学教授

岩井久博士，琉球大学教授田場聡博士ならびに佐賀大学農学部准教授徳田誠博士には多大なるご助言を賜りました。心から厚く御礼申し上げます。

#### 引用文献

1. 浅見満 (2014) 日本の農産物貿易の現在と課題. 中央学院大学商経論叢, 16, 39–49.
2. Bielejec F, Rambaut A, Suchard MA, Lemey P (2011) SPREAD: spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics. *Bioinformatics*, 27, 2910–2912.
3. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol*, 29, 1969–1973.
4. Duchêne S, Holmes EC, Ho SYW (2014) Analyses of evolutionary dynamics in viruses are hindered by a time-dependent bias in rate estimates. *Proc Roy Soc B*, 281, 20140732.
5. Martín S & Elena SF (2009) Application of game theory to the interaction between plant viruses during mixed infections. *J Gen Virol*, 90, 2815–2820.
6. Nguyen HD, Tomitaka Y, Ho SY, Duchêne S, Vetten HJ, Lesemann D, Walsh JA, Gibbs AJ, Ohshima K (2013) *Turnip mosaic potyvirus* probably first spread to Eurasian brassica crops from wild orchids about 1000 years ago. *Plos One*, 8, e55336.
7. Ohshima K, Yamaguchi R, Hirota R, Hamamoto T, Tomimura K, Tan Z, Sano T, Azuhata F, Walsh JA, Fletcher J, Chen J, Gera A, Gibbs A (2002) Molecular evolution of *Turnip mosaic virus*: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *J Gen Virol*, 83, 1511–1521.
8. Ohshima K, Matsumoto K, Yasaka R, Nishiyama M, Soejima K, Korkmaz S, Ho SY, Gibbs AJ, Takeshita M (2016) Temporal analysis of reassortment and molecular evolution of *Cucumber mosaic virus*: Extra clues from its segmented genome. *Virology*, 487, 187–197.
9. Yasaka R, Nguyen HD, Ho SYW, Duchêne S, Korkmaz S, Katis N, Takahashi H, Gibbs AJ, Ohshima K (2014) The temporal evolution and global spread of *Cauliflower mosaic virus*, a plant pararetrovirus. *Plos One*, 9, e85641.
10. Yasaka R, Ohba K, Schwinghamer MW, Fletcher J, Ochoa-Corona FM, Thomas JE, Ho SY, Gibbs AJ, Ohshima K (2015) Phylodynamic evidence of the migration of *Turnip mosaic potyvirus* from Europe to Australia and New Zealand. *J Gen Virol*, 96, 701–713.

# レタスビッグベイン病に関与する媒介菌および2種病原ウイルスの 病理学的特性に関する研究

農研機構 西日本農業研究センター  
野見山 孝司  
nomiyama@affrc.go.jp

Phytopathological Studies on Fungal Vector *Olpidium* and the Two Pathogenic Viruses  
Involved in Lettuce Big-Vein Disease  
Koji Nomiyama  
Western Region Agricultural Research Center, NARO,  
6-12-1 Nishifukatsu, Fukuyama, Hiroshima 721-8514, Japan

## Abstract

Big-vein disease of lettuce is a serious soilborne virus disease and induces chlorosis along leaf veins. Although the disease is involved in the two viruses *Mirafiori lettuce big-vein virus* and *Lettuce big-vein associated virus* and the fungal vector *Olpidium virulentus*, research on the viruses and the fungus is difficult because they are difficult to deal with. In this symposium, I introduce some phytopathological characteristics of the fungus and the two viruses clarified from my research until now.

## 1. はじめに

レタスビッグベイン病は、菌が媒介する土壌伝染性のウイルス病害であり、罹病葉の葉脈周縁部が退色して太くなったように見える特異的な病徴を呈することから名付けられた(図1)。汚染圃場に健全苗を定植して30日間程度が経過すると、新葉にビッグベイン症状が現れ始め、生育するにつれて全身に進展する。罹病株はビッグベイン症状以外にも葉が厚く波打ち、ひどい場合には生育不良で結球しなくなる。本病はアメリカで1930年代に初めて確認された後(Jagger and Chandler, 1934)、世界各地に広まっている。国内では1970年代に和歌山県で初めて報告された(岩木ら, 1978)。その後、1990年代に瀬戸内地域(兵庫県, 香川県, 徳島県)や千葉県などの主要な冬春レタス産地での発生が問題となっている。その特徴的な外観から商品価値がなくなるのみならず、連作するにつれて土壌の汚染程度が高まってゆが、有効な防除法がほとんどないために対策に苦慮している。



図1. ビッグベイン症状を呈したレタス。

病原関連ウイルスとしてオフィオウイルス科のレタスビッグベインミラフィオリウイルス

(*Mirafiori lettuce big-vein virus*, 以下 MiLBVV) およびバリエーション科のレタスビッグベイン随伴ウイルス (*Lettuce big-vein associated virus*, 以下 LBVaV) の2種が知られている。ビッグベイン症状は MiLBVV の感染によって引き起こされるのに対して (Roggero *et al.*, 2000), LBVaV の関与は長い間わからなかったが, 近年になって葉のえそ斑点症状に関与していることが報告された (Verbeek *et al.*, 2013)。これらのウイルスはツボカビ門の *Olpidium virulentus* によってのみ媒介される (Campbell, 1962; Tomlinson and Garrett, 1962)。媒介菌 *O. virulentus* は絶対寄生菌であり, 星形の休眠孢子, 滑らかな球形・楕円形の遊走子のう, 1本の尾型べん毛で水中を遊泳する遊走子の3つの形態を取って植物根内や土壌中に生息している (図2)。両ウイルスは機械接種が困難であり, 媒介菌は人工培養できないことから, 生理生態学的に未解明な部分が多く, 病害防除上のボトルネックとなっている。

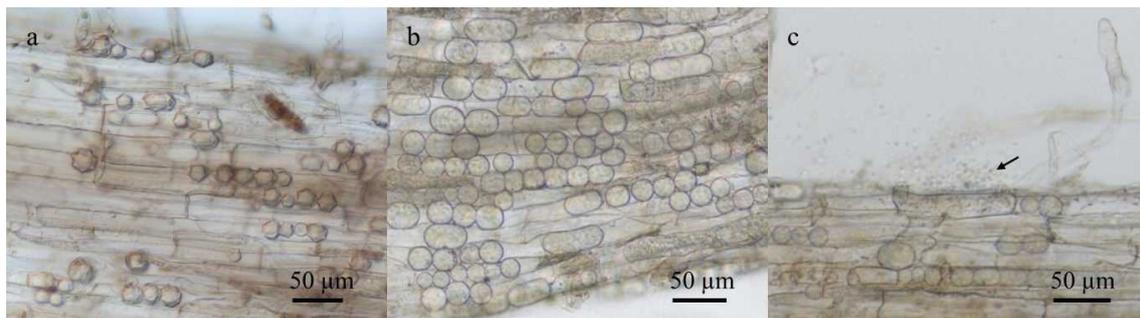


図2. *Olpidium virulentus* の三形態。(a) 休眠孢子。(b) 遊走子のう。(c) 遊走子 (矢印, 遊走子のうから放出された状態)。

今回のシンポジウムでは, 植物病理学的観点から本2種ウイルスと媒介菌の特性解明に関して取り組んだ研究として, 1) 血清学的研究を行うために *O. virulentus* 休眠孢子に対する抗体を作製したこと, 2) その抗体を利用して, 土壌中の本菌密度と発病程度との関係性について解明したこと, 3) オルピディウム属菌のウイルス媒介能を評価するために, 接木植物を用いて *O. virulentus* の近縁種が両ウイルスの媒介能を有すると実証したことについて紹介する。

## 2. *Olpidium virulentus* 休眠孢子的精製および抗休眠孢子抗体の作製

*Olpidium virulentus* の血清学的診断を行うに当たり, 休眠孢子を認識する抗体を作出するためには, 抗原となる休眠孢子を大量に必要とするが, *O. virulentus* は培地では生育できないため, 感染レタス根からの休眠孢子的精製法を開発した。まず, 感染根をセルラーゼとペクチナーゼで酵素処理した後, 密度の違いを利用した沈降分離, 二度の段階的密度勾配遠心分離により, 生根1gから休眠孢子  $2.5 \times 10^5$  個が回収され, 休眠孢子的精製が可能となった (図3)。精製休眠孢子をウサギに免疫することにより, ポリクローナル抗体が得られた。作製した抗休眠孢子抗体の反応特異性を直接免疫染色法により評価した。この手法は, 二次抗体に標識したアルカリフォスファターゼの作用で形成される試料表面の紫色色素により抗原抗体反応の有無を判別できる (Takeuchi *et al.*, 1999)。その結果, *O. virulentus* 休眠孢子的にのみ反応が確認され, 本抗体は高い種特異性を有していた (図4)。また, 本抗体はウェスタンブロットでは *O. virulentus* 休眠孢子的に由来する 30.5 kDa と 29.0 kDa の二種のタンパク質と特異的

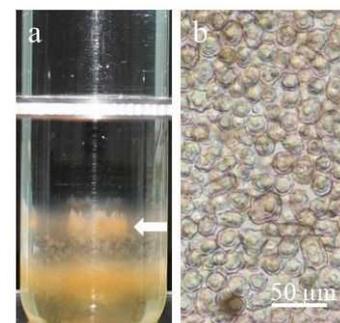


図3. 精製された休眠孢子。(a) 段階的密度勾配遠心分離後の休眠孢子塊 (矢印)。(b) 顕微鏡像。

に反応した (図5).

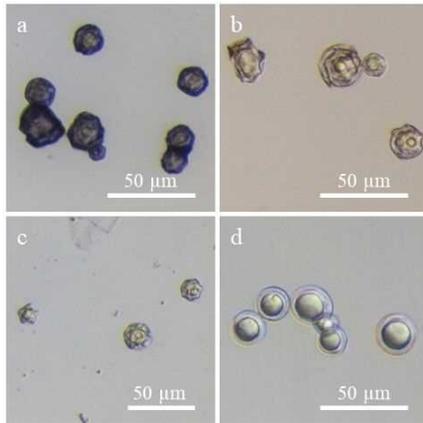


図4. *Olpidium*属菌の直接免疫染色像。  
(a) *O. virulentus* (抗休眠孢子抗体処理あり).  
(b) *O. virulentus* (同処理なし).  
(c) *O. brassicae*. (d) *O. bornovanus*.

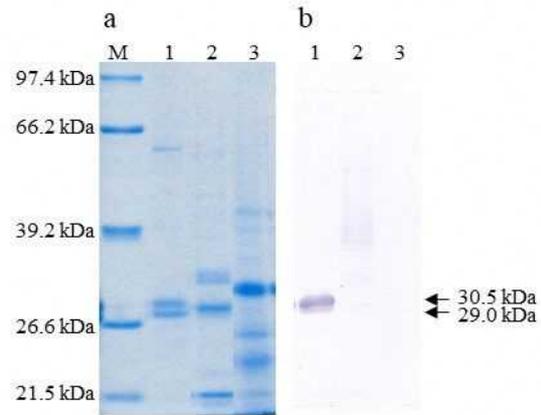


図5. *Olpidium*属菌の SDS-PAGE (a) およびウェスタンブロット (b). (1) *O. virulentus*. (2) *O. brassicae*. (3) *O. bornovanus*. (M) 分子量マーカー.

### 3. *Olpidium virulentus* の土壌中休眠孢子密度とレタスビッグベイン病の発病程度との関係解明

土壌病害であるレタスビッグベイン病は、ウイルスを保毒した *O. virulentus* の土壌中の休眠孢子密度が発病程度と関連していると考えられる。しかしながら、*O. virulentus* は絶対寄生菌であるために希釈平板法では計測できず、休眠孢子密度と発病程度との関係はよくわかっていなかった。そこで抗休眠孢子抗体を用いた DAS-ELISA 法により、罹病感染根内の *O. virulentus* 休眠孢子数の定量法を開発した。さらに、休眠孢子数を計測した罹病感染根を接種源に用いて、休眠孢子数を任意に調整した汚染土壌を作製し、土壌中菌密度と本病の発病程度との関係性を解明した。まず、ジルコニアビーズで精製休眠孢子を破碎し、100 μL 当たり 10–10<sup>4</sup> 個の希釈系列を DAS-ELISA 法に供試すると S 字曲線データが得られた (図6 a)。この S 字曲線を logit-log 変換法により直

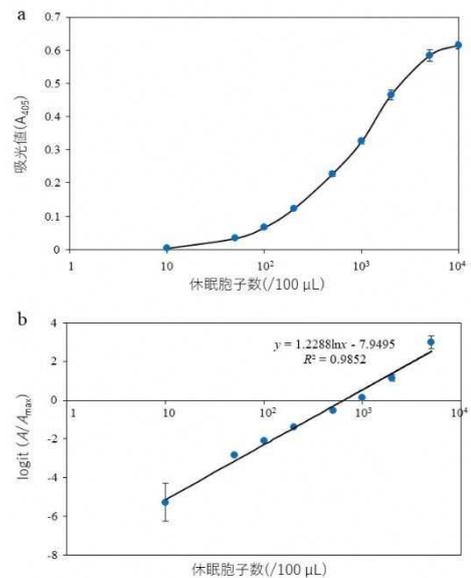


図6. 精製休眠孢子的 DAS-ELISA.  
(a) logit-log 変換前. (b) 同変換後.

線化し、休眠孢子数を把握するための検量線とした (図6 b)。同様に破碎した罹病感染根を供試し、検量線に内挿することにより、根内の休眠孢子数を推定した。さらに、定量法により休眠孢子数を計測した罹病感染根を接種源に用いて、土壌中の休眠孢子密度を調整し、土壌中菌密度と発病程度との関係を調査した。その結果、土壌 1 g 当たり休眠孢子 10<sup>2</sup> 個から発病が確認され、菌密度の増加に伴って発病株率も上昇するのに対し、休眠孢子 10

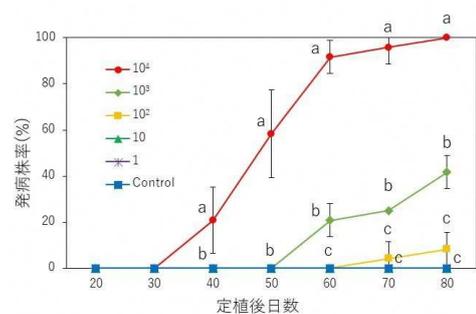


図7. 土壌中の休眠孢子密度 (1/g 土) と発病株率との関係。グラフ内の異なるアルファベットは有意差あり。

(図7).

#### 4. *Olipidium brassicae*が有するLBVaV およびMiLBV 媒介能の解明

レタスビッグベイン病の媒介菌 *O. virulentus* の近縁種として、アブラナ科植物を宿主とする *O. brassicae* が存在する。これら2種の *Olipidium* 属菌は、古くは同一種 *O. brassicae* 内の異なる系統であると考えられていたが、形態、植物寄生性、rDNA-ITS 領域の塩基配列の違いなどから、現在では別種に分けられている (小金澤ら, 2004; Sahtiyanci, 1962; Sasaya and Kognezawa, 2006)。その一方、*O. brassicae* のウイルス媒介能に関しては詳しくわかっていない。そこで、ビッグベイン病関連ウイルスである LBVaV および MiLBV を対象として、*O. brassicae* がこれらのウイルスを媒介できるのか評価した。両 *Olipidium* 属菌の植物寄生性に関して、*virulentus* はレタスに多感染するが、キャベツにはほとんど感染できない。対照的に、*O. brassicae* はキャベツで大量に増殖するものの、レタスには感染できない(表1)。そこで接ぎ木を用いて、レタスからキャベツへのウイルスの感染を試みた。LBVaV または MiLBV に単独感染したレタスと健全キャベツの地際部で表皮を薄く剥ぎ、両植物の根を残したまま寄せ接ぎを行ったところ(図8)、2か月後に両ウイルスがレタスからキャベツへ移行して感染したことが RT-PCR により確認された。次に、ウイルス感染した寄せ接ぎキャベツに *O. brassicae* を接種して増殖させた。このウイルス感染キャベツから放出された *O. brassicae* を健全キャベツ苗へ接種すると、LBVaV 感染キャベツは軽微なモザイク症状を呈する一方(図9)、MiLBV 感染キャベツは無病徴であったが、両ウイルスともに RT-PCR により検出され、*O. brassicae* がこれらのウイルス媒介能を有することが実証された。

表1. 2種 *Olipidium* 属菌の植物寄生性

	アブラナ科		非アブラナ科		
	キャベツ (春波)	ハクサイ (良慶)	キク科 レタス (シスコ)	マメ科 ササゲ (黒種三尺)	ウリ科 マクワウリ (銀泉)
<i>Olipidium brassicae</i>	+++ <sup>a</sup>	+++	-	+	-
<i>Olipidium virulentus</i>	-	-	+++	+++	+++

<sup>a</sup>感染程度 +++: 甚, ++: 中, +: 少, -: 感染なし

LBVaV 感染キャベツは軽微なモザイク症状を呈する一方(図9)、MiLBV 感染キャベツは無病徴であったが、両ウイルスともに RT-PCR により検出され、*O. brassicae* がこれらのウイルス媒介能を有することが実証された。



図8. キャベツ(左)とレタス(右)の寄せ接ぎ。



図9. LBVaV 感染キャベツでのモザイク症状。

#### 5. おわりに

菌媒介性ウイルス病害の

研究を行うためには、植物-媒介菌-ウイルスの三者間での複雑な関わりを一つずつ解きほぐしていく必要があるが、菌の培養やウイルスの機械接種が困難な種が多く、古くから知られている病気にもかかわらず研究の進展が遅いのが実情である。今回の一連の研究を通して、*Olipidium* 属菌の血清学的差異やウイルス媒介能、土壤中の媒介菌密度と発病程度との関係、新たな宿主でのウイルス感染などの有益な知見が得られた。これらの成果は植物病理学の最終目標である(レタスビッグベイン病)の防除にすぐに結びつくものではないが、これまでに培った伝統的な手法に加えて、遺伝子やタンパク質をより詳細に扱える新たな技術も併用しながら媒介菌およびウイルスの生理生態を解明してゆき、防除技術の開発を目指して研究を進めたい。なお、ここに紹介した研究内容の詳細については、Nomiyama *et al.* (2013, 2015), 野見山ら (2011) の文献を参考にしてください。

## 引用文献

- Campbell, R. N. (1962). Relationship between the Lettuce big-vein virus and its vector, *Olpidium brassicae*. *Nature* 195: 675–677.
- 岩木満朗・中野昭信・家村浩海・柄原比呂志 (1978). わが国におけるレタスビッグベイン病の発生とその土壌伝染. *日植病報* 44: 578–584.
- Jagger, I. C. and Chandler, N. (1934). Big vein, a disease of lettuce. *Phytopathology* 24: 1253–1256.
- 小金澤碩城・高山智光・笹谷孝英 (2004). *Olpidium brassicae* sensu lato アブラナ科系統と非アブラナ科系統の休眠孢子形成の差異. *日植病報* 70: 307–313.
- Nomiyama, K., Osaki, H., Sasaya, T. and Ishikawa, K. (2013). Preparation and characterization of polyclonal antibody against resting spores of *Olpidium virulentus*, fungal vector of lettuce big-vein disease. *J. Gen. Plant Pathol.* 79: 64–68.
- Nomiyama, K., Sasaya, T., Sekiguchi, H., Tomioka K., Osaki, H., Takeshita, M., Takehara, T., Furuya, N. and Tsuchiya, K. (2015). DAS-ELISA quantification of resting spores of *Olpidium virulentus* in roots and correlation between resting spore density in soil and severity of lettuce big-vein disease. *J. Gen. Plant Pathol.* 81: 243–248.
- 野見山孝司・井上博喜・大崎秀樹・石川浩一 (2011). *Olpidium brassicae* によるレタスビッグベイン病関連ウイルスの媒介. *日植病報* 77: 192. (講要)
- Roggero, P., Ciuffo, M., Vaira, A. M., Accotto, G. P., Masenga, V. and Milne, R. G. (2000). An *Ophiovirus* isolated from lettuce with big-vein symptoms. *Arch. Virol.* 145: 2629–2642.
- Sahtiyanci, S. (1962). Studien über einige wurzelparasitäre Olpidiaceen (in German with English summary). *Arch. Mikrobiol.* 41: 187–228.
- Sasaya, T. and Kognezawa, H. (2006). Molecular analysis and virus transmission tests place *Olpidium virulentus*, a vector of *Mirafiori lettuce big-vein virus* and tobacco stunt virus, as a distinct species rather than a strain of *Olpidium brassicae*. *J. Gen. Plant Pathol.* 72: 20–25.
- Takeuchi, S., Hikichi, Y., Kawada, Y. and Okuno, T. (1999). Direct immunostaining assay, a new simplified technique for detection tobamoviruses from seeds of green pepper. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 65: 189–191.
- Tomlinson, J. A. and Garrett, R. G. (1962). Role of *Olpidium* in the transmission of big vein disease of lettuce. *Nature* 194: 249–250.
- Verbeek, M., Dullemans, A. M., van Bekkum, P. J. and van der Vlugt, R. A. A. (2013). Evidence for *Lettuce big-vein associated virus* as the causal agent of a syndrome of necrotic rings and spots in lettuce. *Plant Pathol.* 62: 444–451.