

わが国のビックベイン症状を示すレタスから検出されたMirafiori lettuce virus

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	夏秋,啓子 守川,俊幸 夏秋,知英 奥田,誠一
発行元	日本植物病理學會
巻/号	68巻3号
巻号補足	
掲載ページ	p. 309-312
発行年月	2002年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



わが国のビッグベイン症状を示すレタスから検出された Mirafiori lettuce virus

夏秋 啓子^{1*}・守川 俊幸²・夏秋 知英³・奥田 誠一³

ABSTRACT

NATSUAKI, K. T.^{1*}, MORIKAWA, T.², NATSUAKI, T.³ and OKUDA, S.³ (2002). Mirafiori lettuce virus detected from lettuce with big vein symptoms in Japan. Jpn. J. Phytopathol. 68: 309-312.

From lettuce (*Lactuca sativa* L.) with big vein symptoms, two bands were detected by Western blot analysis using antisera to Tobacco stunt virus and Tulip mild mottle mosaic virus (As-TMMMV), respectively. One band reacted to antiserum to Mirafiori lettuce virus (MiLV) stronger than As-TMMMV. Unstable filamentous Ophiovirus-like particles (LBV-O) decorated with As-TMMMV in immunogold labeling were observed along with Lettuce big-vein virus-like rod-shaped particles in diseased plants. Manual inoculation with lettuce sap caused chlorotic local lesions in *Chenopodium quinoa* and systemic infection in lettuce. Along with LBVV, LBV-O was transmitted by *Olpidium brassicae*. LBV-O was identified as MiLV for the first time in Japan. (Received July 8, 2002; Accepted September 13, 2002)

Key words: Ophiovirus, lettuce, Lettuce big-vein virus, Mirafiori lettuce virus.

レタスビッグベイン病は1970年代からわが国各地で発生が知られた土壌伝染性病害である。病原ウイルスとされるレタスビッグベインウイルス (*Lettuce big-vein virus*, LBVV) は不安定な棒状粒子 (320-360×18 nm) で、タバコ矮化ウイルス (*Tobacco stunt virus*, TStV) と血清学的関係があり、*Olpidium brassicae* によって伝搬される¹⁻³⁾。一方、チューリップ微斑モザイクウイルス (*Tulip mild mottle mosaic virus*, TMMMV) はチューリップで発生が報告され、*O. brassicae* によって土壌伝染し、その粒子は複雑に屈曲した糸状で、幅は4-8 nmである^{8,9)}。LBVVは *Varicosavirus* 属⁵⁾ に、TMMMVは *Ophiovirus* 属⁷⁾ に所属する。レタスビッグベイン病の発病機構を調査する過程で、発病株からLBVVの他にTMMMVに類似したウイルスが検出されたので、その概要を報告する。

ビッグベイン症状を示すレタスからのウイルス検出
1999年4月に西日本各地でビッグベイン症状を示すレタスを採集した。これらを、TStV抗血清およびTMMMV抗血清を用いてウエスタンブロット解析を行ったところ、それぞれのウイルス抗血清に反応するタンパク質が認められ

た (Fig. 1. A and C)。ビッグベイン症状のレタスからTStV抗血清で検出される分子量約48 Kのタンパク質は、TStV抗血清がLBVVと強く反応すること²⁾とその分子量が一致することから、LBVVの外被タンパク質と考えられた。一方、TMMMV抗血清に反応したタンパク質は分子量約48 Kであり、分子量約47 KのTMMMVの外被タンパク質より明らかに大きかったが、近縁のウイルス由来と考えてLBV-Oと仮称した。しかし、TStVとTMMMVの両抗血清を混合して用いた場合、LBVVとLBV-Oはほぼ同じ分子量で識別は困難であった (Fig. 1. B. Lane D)。さらに、1999年4月から2000年3月までビッグベイン症状のレタスを圃場で採集、あるいはレタスおよびリーフレタスの市販品を購入して同様に検出を試みたところ、少なくとも4県 (福岡、香川、兵庫、静岡) 産のレタスでLBVVとLBV-Oが同時に検出された。

次に、TMMMVの純化方法⁸⁾に基づいてビッグベイン症状のレタスを部分純化し、酢酸ウラン染色、あるいはTMMMV抗血清を用いたデコレーション法⁶⁾により電子顕微鏡観察した。その結果、LBVVと考えられる棒状粒

¹ 東京農業大学国際食料情報学部 (〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1) Faculty of International Agriculture and Food Studies, Tokyo University of Agriculture, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502, Japan

² 富山県農業技術センター野菜花き試験場 (〒939-1327 砺波市五郎丸288) Vegetable and Ornamental Crops Experiment Station, Toyama Agricultural Research Center, Tonami 939-13, Japan

³ 宇都宮大学農学部 (〒321-8505 宇都宮市峰町350) Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, Mine-machi, Utsunomiya 321-8505, Japan

* Corresponding author (E-mail: keiko@nodai.ac.jp)

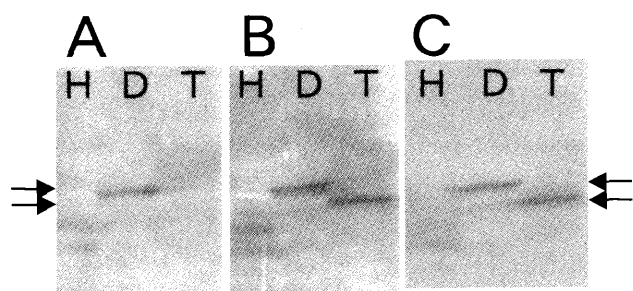


Fig. 1. Western blot analysis of LBV-O and TMMMV with As-TStV (A), As-TMMMV (C), and a mixture of As-TStV and As-TMMMV (B).

H: Healthy lettuce leaf

D: Lettuce leaf with big vein symptoms

T: Flower petal of tulip infected with TMMMV

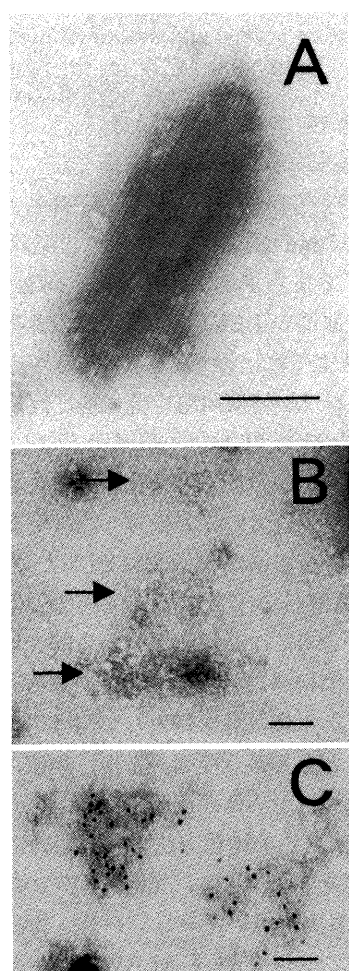


Fig. 2. Electron micrographs of virus particles of LBVV (A), LBV-O (B) and LBV-O reacted with As-TMMMV and labeled with gold particles (C). Bar represents 100 nm. Arrows indicate virus particles.

子に加えて (Fig. 2. A), 幅約 4-8 nm の複雑に屈曲した糸状粒子が少数観察され, TMMMV 抗体に修飾されたこと

より LBV-O の粒子と考えられた. 屈曲した粒子の長さは不定で数 10-数 100 nm であり, LBV-O は *Ophiovirus* 属様の粒子を持つことが示された (Fig. 2. B and C).

さらにレタス発病葉を 4 % (W/V) 活性炭を含む 50 mM リン酸緩衝液 pH 7.0 中で磨砕し, *Chenopodium quinoa* に汁液接種したところ, 約 10 日後に接種葉に退緑斑が形成され, ウエスタンブロット解析によって LBVV と LBV-O の両者が検出されたが, これを *C. quinoa* 上で継代を繰り返すことによって LBVV は検出されなくなった. レタス (グレートレークス) でも低率ながら両者が全身感染した.

***Olipidium brassicae* による伝搬試験** 汚染土壌に播種して発病し, LBVV と LBV-O が混合感染しているレタスを地際部で切除し, 水に挿して発根させたものを伝染源に用いた. これを滅菌土に鉢上げすると同時にネギの根より分離, レタスの根より分離, および土壌より分離した *O. brassicae* (単遊走子の分離株, ササゲまたはマクワウリで維持継代) 4 菌株を接種し, 20 日後にこのレタスの根 (約 0.1 g) を健全レタス (グレートレークス) の地際部に接種した. 1 ヶ月目以降, 接種した 4 菌株中 3 菌株について, ビッグベイン症状が出現し, ウエスタンブロット解析で, LBVV と LBV-O の両ウイルスが感染していることが示された (Table 1). 以上から, レタスに寄生性のある *O. brassicae* の 3 菌分離株によって LBVV だけでなく LBV-O も伝搬されることが確認された.

Mirafiori lettuce virus との比較 従来, レタスビッグベイン症状を示したレタスからは LBVV のみが病原として検出されと考えられてきた. しかし, 本研究で, レタスビッグベイン症状を示した多くのレタスには, LBVV に加えて TMMMV と血清学的に関係のある *Ophiovirus* 属様のウイルス (LBV-O) が重複して感染していることが明らかになった. 海外でも最近, レタスビッグベイン症状のレタスで *Ophiovirus* 属ウイルスと考えられる Mirafiori lettuce virus (MiLV) が LBVV と重複感染していることが報告されている^{4,11)}. そこで, R. G. Milne 博士より MiLV 抗血清の分与を受け, LBV-O との異同についてウエスタンブロットによって比較したところ, レタスおよび *C. quinoa* の LBV-O 感染葉はともによく MiLV 抗血清と反応した (Fig. 3). なお, TMMMV 抗血清は TMMMV と LBV-O によく反応するが, MiLV 抗血清は TMMMV とは弱くしか反応しなかった. このような MiLV と TMMMV の血清学的な類縁関係は既往の報告¹¹⁾と一致し, さらにレタスでの発生状況, *C. quinoa* への感染性, 粒子形状, タンパク質分子量, *O. brassicae* による土壌伝染性など LBV-O と MiLV は極めて類似した性質を

Table 1. Transmission of LBVV and LBV-O by several isolates of *Oplidium brassicae*^{a,b)}

Isolates of <i>O. brassicae</i> (origin)	Big vein symptom development (1 month p.i. ^{d)})	Western blot analysis ^{c)} LBVV/LBV-O	Detection of <i>O. brassicae</i> in inoculated lettuce roots
WOms-3 (Welsh onion)	+	+ / +	+
LBms-11 (lettuce)	+	+ / +	+
7ms-1 (soil)	+	+ / +	+
ES5ms-1 (soil)	—	— / —	—
—	—	— / —	—

a) Source of inoculation; lettuce doubly infected by LBVV and LBV-O.

b) +, positive; —, negative

c) LBVV and LBV-O were detected by As-TStV LBVV was detected by As-TStV and As-TMMMV, respectively. Three lettuce plants were used for each test 1 month after inoculation.

d) p.i. = post inoculation

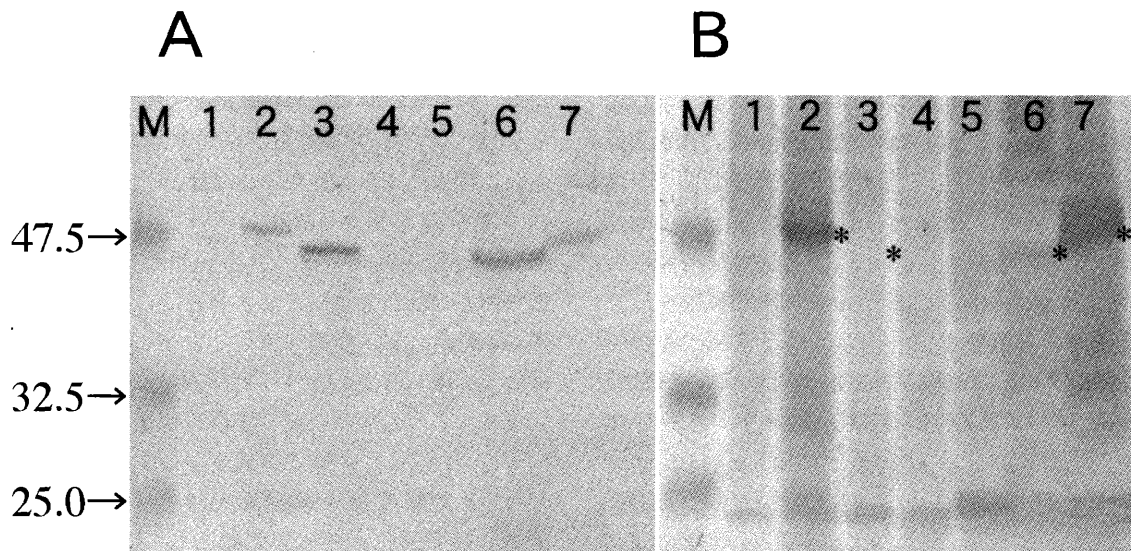


Fig. 3. Western blot analysis of LBV-O and TMMMV with As-TMMMV (A) and As-MiLV (B). Stars in B indicate the same positions of bands detected in A.

M: Prestained protein marker (NEB; 47.5 K, 32.5 K and 25 K)

1: Healthy lettuce leaf

2: Lettuce leaf with big vein symptoms

3: Flower petal of tulip infected with TMMMV

4: Healthy tulip leaf

5: Healthy *C. quinoa* leaf

6: *C. quinoa* leaf inoculated with TMMMV

7: *C. quinoa* leaf inoculated with sap of lettuce leaf with big vein symptoms

示すので、LBV-OはMiLVと同定した。わが国のレタスにおけるMiLVの発生はこれまで報告がないため、ウイルス和名をミラフィオリレタスウイルスとしたい。わが国で発生するレタスのビッグベイン症状へのMiLVの影響についてはさらに研究する必要があるが、従来はLBVVのみが病原とされていたレタスビッグベイン症状の発生生

態や防除対策についてMiLVの発生を含めて考究する必要があると考えられた。

なお、本研究の一部はすでに日本植物病理学会大会で口頭発表¹⁰⁾した。また本研究の一部は、文部科学省の学術フロンティア推進事業および農林水産省の指定試験事業の支援を得て行った。本研究を行うにあたり、タバコ矮化ウ

イルス抗血清を分譲して頂いた明治大学農学部桑田 茂博士およびミラフィオリレタスウイルス抗血清を分譲していただいたイタリア植物ウイルス研究所の R. G. Milne 博士に篤く御礼申し上げる。また、実験の遂行に多大な協力を頂いた金子真紀さん、鈴木恭子さん、鈴木薫さん、伊藤幸子さん、岸 慎太郎さんにも感謝する。

引用文献

1. Kuwata, S. and Kubo, S. (1981). Rod-shaped particles found in tobacco plants infected with tobacco stunt agent. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 47: 264-268.
2. Kuwata, S., Kubo, S., Yamashita, S. and Doi, Y. (1983). Rod-shaped particles, a probable entity of lettuce big vein virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 49: 246-251.
3. Kuwata, S. and Kubo, S. (1986). Tobacco stunt virus. AAB Descriptions of Plant Viruses, No. 313.
4. Lot, H., Campbell, R. N., Souche, S., Milne, R. G. and Roggero, P. (2002). Transmission by *Olpidium brassicae* of *Mirafiori lettuce virus* and *Lettuce big-vein virus*, and their roles in lettuce big-vein etiology. *Phytopathology* 92: 288-293.
5. Mayo, M.A. (2000). Genus *Varicosavirus*. In *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (van Regenmortel, M.H.V. *et al.*, eds.). pp. 521-523, Academic Press, New York.
6. Milne, R.G. (1993). Solid phase immune electron microscopy of virus preparations. In *Immuno-Gold Electron Microscopy* (Hyatt, A.D. and Eaton, B.T., eds.). pp. 25-70, CRC Press, Boca Raton.
7. Milne, R.G., Garcia, M. and Grau, O. (2000). Genus *Ophiovirus*. In *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (van Regenmortel, M. H. A. *et al.*, eds.). pp. 627-631, Academic Press, New York.
8. Morikawa, T., Nomura, Y., Yamamoto, T. and Natsuaki, T. (1995). Partial characterization of virus-like particles associated with tulip mild mottle mosaic. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 61: 578-581.
9. 守川俊幸・築尾嘉章・夏秋知英 (1997). チューリップ微斑モザイク病 (新称) の媒介者. *日植病報* 63: 504 (講演要旨).
10. 夏秋啓子・金子真紀・夏秋知英・鈴木 薫・守川俊幸・奥田誠一 (2000). ビッグベイン症状を示すレタスから検出されるチューリップ微斑モザイクウイルス類似のウイルス様粒子. *日植病報* 66: 146 (講演要旨).
11. 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.