

レタスビッグベイン病を媒介する *Olpidium virulentus*

野見山 孝司^{a)}

農研機構 近畿中国四国農業研究センター
[〒721-8514 広島県福山市西深津町 6-12-1]

Olpidium virulentus, the vector of lettuce big-vein disease

Koji NOMIYAMA^{a)}

Western Region Agricultural Research Center, NARO

1. 背景・目的

レタスビッグベイン病は土壌伝染性の難防除ウイルス病害である。本病に罹病したレタス (*Lactuca sativa* L.) は、葉脈周辺が白く退色して葉脈が太くなったように見えるために商品価値が減少するばかりでなく、被害程度がひどい場合には生育不良を引き起こす (図 1)。本病はアメリカで 1934 年に発生が報告され、日本では 1970 年代初頭に和歌山県で初めて確認された (Jagger & Chandler, 1934; 岩木ら, 1978)。冬春レタスの主産地である瀬戸内地域においては



図 1. ビッグベイン病が発病したレタス。

野見山 (2013) より転載。

90 年代以降被害が拡大しており、現在も留意しなければならない重要な土壌病害である (岩本・相野, 2010)。

レタスビッグベイン病の病原ウイルスは土壌に生息する *Olpidium virulentus* (Sahtiy.) Karling によってのみ媒介される。本菌はツボカビ門—ツボカビ綱—フクロカビ目—フクロカビ科に属する絶対寄生菌で、遊走子のう、休眠孢子および遊走子を形成する (図 2a-c)。病原ウイルスを保毒する *O. virulentus* 汚染圃場にレタスが定植されると、土壌中の休眠孢子内に遊走子が分化して放出され、これが最初の伝染源として根に感染する。感染した遊走子は根内で遊走子のうや休眠孢子となり、これらからさらに大量の遊走子が分化し増殖を繰り返す生活環を有する。一つの遊走子が感染・分化した場合には遊走子のうが、二つの遊走子が接合して感染・分化した場合には休眠孢子が形成

a) (現所属) 農研機構 西日本農業研究センター Western Region Agricultural Research Center, NARO
[〒721-8514 広島県福山市西深津町 6-12-1]

されると考えられている。菌の感染・増殖は根でしか起きず、葉や茎など地上部へは移行しない。耐久器官の休眠孢子は宿主植物体が枯死しても土壤中に存在し、次の感染源となる。以前は、*O. virulentus* は *Olpidium brassicae* (Woronin) P.A. Dang. のレタス系統であるとみなされていたが (Tomlinson and Garrett, 1964), 宿主範囲, 形態的特徴, 性の分化ならびに rDNA-ITS 領域の塩基配列の比較に基づき *O. brassicae* とは別種として分けられた (小金澤ら, 2004; Koganezawa et al., 2005; Sahtiyanci, 1962; Sasaya and Koganezawa, 2006). 血清学的特性も両種では異なる (野見山, 2013).

レタスビッグベイン病の関連ウイルスとして、当該症状を引き起こすレタスビッグベインミラフィオリウイルス (*Mirafiori lettuce big-vein virus*, MiLBVV) および罹病株から高頻度に検出されるものの機能未知なレタスビッグベイン随伴ウイルス (*Lettuce big-vein associated virus*, LBVaV) の2種が知られている (Kuwata et al., 1983; Roggero et al., 2000; Lot et al., 2002). いずれのウイルスも *O. virulentus* の菌体内に存在しており、遊走子が植物根に侵入する際に感染すると考えられる (Campbell, 1962). これらのウイルスは休眠孢子内で20年近く活性が保持されることから、一度発生すると根絶することは困難である (Campbell, 1985). *Olpidium virulentus* 自体は植物に対する病原性はないものの、多種類の植物に寄生する菌であり、MiLBVV や LBVaV 以外にも、チューリップ微斑モザイクウイルス、チューリップ条斑ウイルス、タバコえそDウイルスなどの複数種の病原ウイルスを媒介する (小金澤, 2005).

このように *O. virulentus* はウイルス媒介菌としてかねてより広く知られている重要な菌であるが、絶対寄生性で人工培養できないことが研究推進上の難点であり、ジーンバンクにおいてもこれまでに登録はなかった。今回、日本各地のレタスビッグベイン病発生圃場から、MiLBVV と LBVaV の媒介能を有する *O. virulentus* を探索・収集し、ジーンバンク登録したので、ここに報告する。

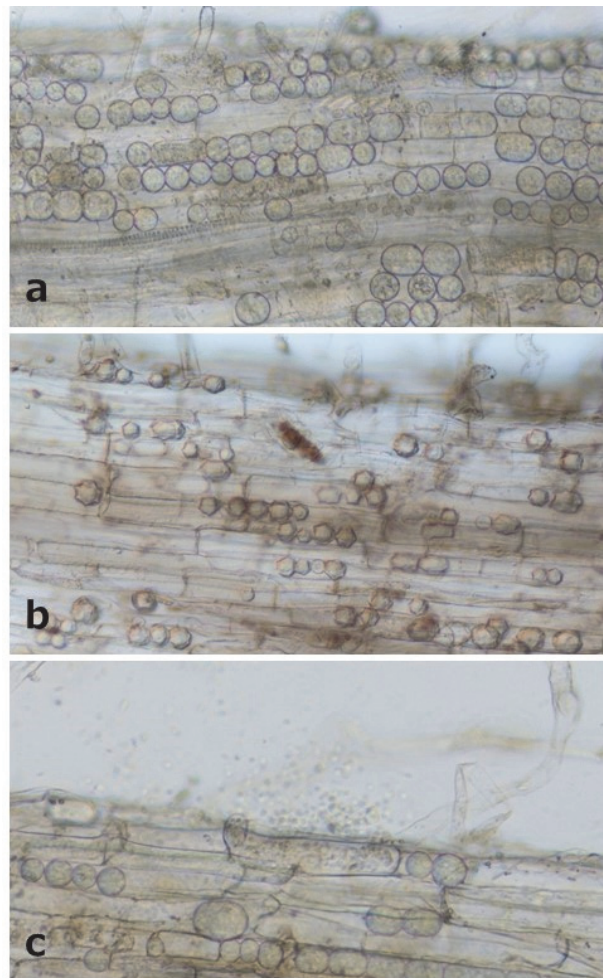


図2. *Olpidium virulentus* の形態.

a. 遊走子のう (球形または楕円形: 20–200 μm , 内部に遊走子を多数形成); b. 休眠孢子 (球形または楕円形: 20–30 μm , 星形の中膜を有する三膜構造); c. 遊走子のうから放出される遊走子 (球形: 2–4 μm , 1本の尾形べん毛で遊泳). 野見山 (2013) より転載.

2. 材料および方法

1) 分離源の土壌

2003年から2004年にかけてレタスビッグベイン病の発病が確認された5地域（香川県観音寺市、兵庫県南あわじ市、徳島県阿波市、岡山県岡山市および千葉県館山市）のレタス圃場より土壌を採取した。また、2006年には、本病の発病が認められていない当センター内のハダカムギ圃場（香川県善通寺市）からも土壌を採取した。

2) 単遊走子の分離

300 g用イチゴパックに滅菌海砂（水洗により脱塩済み）を詰め、レタス（品種；シスコ（タキイ種苗）、以下同じ）を約3週間育苗（5株/パック）し、採取した土壌（生土）15–20 gを株元に接種した。接種約3週間後に細根2–3 cmを掘り上げて、水洗して砂や土壌を洗い落とし、顕微鏡下（倍率200倍）で*O. virulentus*の寄生を確認した。遊走子のうがまばらに形成された部位を探し出し、実体顕微鏡下で両刃カミソリを用いて、遊走子が詰まった遊走子のうが1個だけの領域約0.5 mmを切り出した。さらに位置を変えて顕微鏡下で他の遊走子のうが存在しないことを確認した後、ピンセットでつまみとり、滅菌海砂を詰めた50 mLコニカルチューブで栽培した播種1–2週後のレタス苗の地際部に滅菌水で洗い落としとして接種した。遊走子のうから放出された遊走子が根に遊泳して感染しやすいように接種時には砂表面まで灌水した。接種約2週間後に細根を掘り上げて、*O. virulentus*の感染を確認し、単遊走子のう分離株とした。一連の栽培は人工気象器内（20°C、明期10時間、暗期14時間）で行い、灌水には水道水を用いた。砂で栽培することにより根から簡単に砂粒子を洗い落とすことができ、顕微鏡観察での確認が容易になる。単遊走子のう分離に関してはLin et al. (1970)の文献も参考になる。

3) ウイルス媒介能の評価

MiLBVVおよびLBVaVを保毒していない単遊走子のう分離株を、根に*O. virulentus*は寄生しておらず、ウイルスのみ感染した挿し芽レタスに接種することにより、ウイルス媒介能を評価した（夏秋ら、2002）。両ウイルス汚染土壌で40–50日間栽培して発病が確認されたレタスの地際部を片刃カミソリで切断し、若葉3枚程度残して外葉をはぎ取り、切り口からの白濁液を流水中で洗い落とす。この挿し穂を水道水を満たした15 mLコニカルチューブに挿して約2週間発根させることにより、根に*O. virulentus*がないウイルス感染レタスを調製した。挿し芽レタスを滅菌海砂に定植し、さらに約2週間栽培して十分発根させた後、単遊走子のう分離株を接種して約1か月間栽培した。根を掘り上げて水道水に約15分間浸漬して遊走子を放出させ、滅菌海砂（滅菌土も可）で育苗した検定用のレタスに接種した。接種後40–50日間栽培したレタスの若葉からRNAを抽出し、RT-PCRによりウイルス感染の有無を確認した。

3. 結果

単遊走子のう分離に当たっては、土壌を接種してから2週目では遊走子のうの形成が不十分で見

つけにくく、4週目では多く感染しすぎて単分離しにくかったため、好適な3週目に行った。単遊走子のう分離株の獲得効率は20–40%であった。得られた単遊走子のう分離株から、レタスに接種してもMiLBVVおよびLBVaVのどちらも検出されない(感染しない)ウイルスフリーの10株を選抜した。ウイルス媒介能を評価した結果、これらはいず

表1. ジーンバンク登録した *Olpidium virulentus* とそのウイルス媒介能

MAFF 番号	株名	採取地	ウイルス媒介能	
			MiLBVV	LBVaV
150501	AW-1	兵庫県南あわじ市	+(有)	+
150502	CH-1	千葉県館山市	+	+
150503	OK-1	岡山県岡山市	+	+
150504	TK-1	徳島県阿波市	+	+
150505	TY-1	香川県観音寺市	+	+
150506	AW-2	兵庫県南あわじ市	+	+
150507	CH-2	千葉県館山市	+	+
150508	TK-3	徳島県阿波市	+	+
150509	TY-2	香川県観音寺市	+	+
150510	ZN-1	香川県善通寺市	+	+

れもMiLBVVとLBVaVを媒介することを確認し、ジーンバンクに登録した(表1)。なお、各株は、休眠孢子が多数形成された植物根を掘り上げて風乾し、紙に包んでポリ袋に入れた状態で4℃下に保管することにより数年間は保存可能で、この乾燥根少量(約2cm)を株元に覆土接種することで復元できる。*Olpidium*属菌の基本的取り扱いについては守川(2005)の文献を参照されたい。

4. 考察

MiLBVV および LBVaV のどちらも保毒していない今回のジーンバンク登録株はいずれも両ウイルスの媒介能を有していることが確認された。レタス圃場土からレタスを用いて取得した9株(ZN-1以外)は、そもそも両ウイルスとの親和性ならびに両ウイルスの媒介性が高いものとして選抜されたと考えられる。*Olpidium virulentus*は多種類の植物に寄生することから(Koganezawa et al., 2005)、栽培植物が異なる土壌を分離源としたり、分離に供試する植物を変えたりすることによって、ウイルス媒介能の異なる菌株を分離できる可能性がある。今後の探索ではこの点も考慮して進めていきたい。

5. 謝辞

兵庫県立農林水産技術総合センターの西口真嗣氏、小林尚司博士、徳島県立農林水産総合技術支援センターの米本謙悟氏、岡山県農林水産総合センターの桐野菜美子氏、松岡静江氏、千葉県農林総合研究センターの海老原克介氏には現地の調査・土壌採取にご協力頂いた。ここに記して深謝の意を表す。

6. 参考文献

- Campbell, R.N. (1962). Relationship between the Lettuce big-vein virus and its vector, *Olpidium brassicae*. *Nature* 195: 675–677.
- Campbell, R.N. (1985). Longevity of *Olpidium brassicae* in air-dry soil and persistence of the

- lettuce big-vein agent. Can. J. Bot. 63: 2288–2289.
- 岩木満朗・中野昭信・家村浩海・栃原比呂志 (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. 日本植物病理学会報 44: 578–584.
- 岩本豊・相野公孝 (2010). レタスビッグベイン病の総合防除. 植物防疫 64: 229–234.
- 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. 日本植物病理学会報 70: 307–313.
- 小金澤碩城 (2005). ウイルス媒介者としての *Olpidium* と *Polymyxa*. 植物防疫 59: 251–255.
- Koganezawa, H., Inoue, H. and Sasaya, T. (2005). Host specificity and multiplication of eight isolates of *Olpidium brassicae* sensu lato and its related *Olpidium* sp. Bull. Natl. Agric. Res. Cent. West. Reg. 4: 39–59.
- Kuwata, S., Kubo, S, Yamashita, S. and Doi, Y. (1983). Rod-shaped particles, a probable entity of lettuce big vein virus. Ann. Phytopath. Soc. Japan 49: 246–251.
- Lin, M.T., Campbell, R.N., Smith, P.R. and Temmink, J.H.M. (1970). Lettuce big-vein virus transmission by single-sporangium isolates of *Olpidium brassicae*. Phytopathology 60: 1630–1634.
- 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.
- 守川俊幸 (2005). *Olpidium* 属菌の実験取り扱い方法. 植物防疫 59: 78–81.
- 夏秋啓子・守川俊幸・夏秋知英・奥田誠一 (2002). 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*. 日本植物病理学会報 68: 309–312.
- 野見山孝司 (2013). レタスビッグベイン病の媒介菌オルピディウム菌の休眠孢子を認識するポリクローナル抗体の作製. 植物防疫 67: 379–382.
- Roggero, P., Ciuffo, M., Vaira, A.M., Accotto, G.P., Masenga, V. and Milne, R.G. (2000). An *Ophiiovirus* isolated from lettuce with big-vein symptoms. Arch. Virol. 145: 2629–2642.
- Sahtiyanci, S. (1962). Studien über einige wurzelparasitäre Olpidiaceen. Arch. Mikrobiol. 41: 178–228.
- Sasaya, T. and Koganezawa, 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.