

ラッキョウ種球（鱗茎）におけるアイリス黄斑ウイルス（Iris yellow spot virus）の潜在感染と伝染源としての評価

影山智津子¹⁾・増井伸一¹⁾・万年潤哉²⁾

¹⁾農林技術研究所果樹研究センター・²⁾農林大学校

Latent Iris Yellow Spot Virus (IYSV) Infection of Rakkyo Bulbs and Evaluating Sources of Infection

Chizuko Kageyama¹⁾, Shinichi Masui¹⁾ and Junya Mannen²⁾

¹⁾Shizuoka Res. Inst. Agric. and For., Fruits Res. Center, ²⁾Shizuoka Agric. and For. College

キーワード：ラッキョウえそ条斑病, Iris yellow spot virus, IYSV, 種球, 潜在感染

I 緒言

ラッキョウ(*Allium chinense*)えそ条斑病の病原ウイルスであるアイリス黄斑ウイルス (Iris yellow spot virus; IYSV) は、トルコギキョウ(*Eustoma grandiflorum*)などの花き類のほか、ネギ属作物に感染することが知られている³⁵⁾。静岡県西部地域では IYSV の宿主植物であるネギ属作物とトルコギキョウが多く栽培されており、媒介虫であるネギアザミウマ(*Thrips tabaci*)が年間を通して生存することから、地域ぐるみでの防除対策が求められている。本地域で生産されるラッキョウは生食用を中心として1月から5月までの期間に出荷される。ラッキョウの種球は茎頂培養で作成された無病苗を親株として数年毎に更新される。通常2年目以降の種球は防虫ネット等がない露地圃場で自家採種されており、採取時期がネギアザミウマ及びえそ条斑病が多発する5~6月と重なる。さらに採取株の葉身部分には本病斑が多数見られることから、種球部分へ IYSV が移行している可能性が危惧される。IYSV は病斑及びその周辺部からは DAS-ELISA 法で容易に検出されるが、それら以外の部位からは感度の高い RT-PCR 法を用いても、検出されないことがある²⁴⁾。自家採種している種球の IYSV 感染の有無を正確に把握することは、本病の伝染環を知る上で重要な要因である。このため、高感度な検出法である nested-RT-PCR 法によ

り現地採取種球の感染状況を調査し、IYSV の地域での伝染源となる可能性を評価した。

II 材料及び方法

1 ラッキョウ各部位からの IYSV の検出

2010年5月20日に浜松市南区の農家栽培圃場からラッキョウ株を採取し、1株ずつ分球した。これらの株は検定に供試するまで、冷凍庫内(-80℃)で保存した。全 RNA は RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 社製)を用いて、ラッキョウの葉身、鱗茎外側、鱗茎中心部、鱗茎基部、根の各部位 0.05g から抽出した(図1)。これらは病斑の有無別に5株ずつ実施した。

RT-PCR は OneStep RT-PCR Kit(Qiagen 社製)を用いて、50℃30分-95℃15分の後、94℃20秒-55℃40秒-72℃20秒を35サイクル行った。プライマーは IY-NP_Common-F, IY-NP_Common-R⁸⁾を用いた。次に増幅産物の一部を用いて後述の方法により PCR を行った。なお、泳動結果から増幅量の多いものについては10~1000倍に希釈して供試した。PCR は HotStarTaq PCR Kit(Qiagen 社製)を用いて、94℃20秒-55℃40秒-72℃20秒を35サイクル行った。プライマーは、先のプライマーセットによる増幅領域の内側に位置する IY-S_T2R, IY-S_T3R⁸⁾と今回新たに設計した IY-S-210F (5' CCTTTGCTGCCATGACTCTT 3')を用いた。これらのプライマーは、本地域で発生している IYSV の T2 分離株

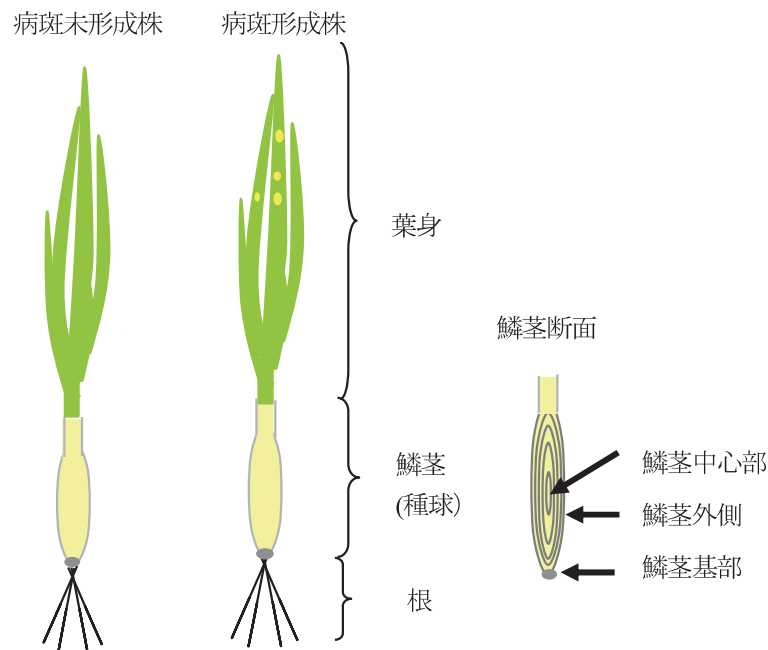


図1 検出に供試したラッキョウ部位

(オランダ系統と相同性が高い, 以下 T2 系統) 及び T3 分離株 (ブラジル系統と相同性が高い, 以下 T3 系統) ¹⁾, を同時に識別することができる. トルコギキョウでは系統により病原性が異なることが報告されているため ¹⁹⁾, 系統と検出頻度との関連についても検討した.

2 ラッキョウ種球の IYSV 感染の有無とネギアザミウマの有無が IYSV の増殖に及ぼす影響

1 と同じロットのラッキョウ種球を冷蔵庫内(4°C)で保存し, 2010 年 9 月に 3.5 号ポットに定植し, 隔離温室内 (5~35°C) で育成した. 無病株は, 浜松市農業バイオセンターで茎頂培養により育成した苗を同様に栽培して用いた.

2011 年 2 月に, 現地採取株及び無病株を 5 株ずつ人工気象器内 (25°C14 時間明条件, 22°C10 時間暗条件) の別々の飼育箱に入れ, ネギアザミウマ成虫を株当たり 4 頭放飼した. 対照として, 現地で採取した 5 株にネギアザミウマを放飼しない区を設けた. 供試したネギアザミウマは 2009 年 5 月に浜松市南区のラッキョウ栽培圃場より採取し, 25°Cの人工気象器内でソラマメにより 3 週間ごとに継代している個体群を用いた. なお, これらのネギアザミウマ個体群から一部の個体を抽出して上述の方法により nested-RT-PCR を行ったところ, IYSV は検出されなかった. ネギアザミウマ放飼 50 日後にラッキョウの葉身を採取し, DAS-ELISA 法で IYSV を検出した. さらに各飼育箱に供試個体を置いたまま, 新たに現地採取種球からの栽培株を 5 株ずつ追加し, 40 日後に葉を採取し,

同様に IYSV を検出した.

III 結果及び考察

1 ラッキョウ各部位からの IYSV の検出

農家圃場から採取した株の葉身, 鱗茎の外側や中心部, 鱗茎基部, 根について, nested-RT-PCR 法により検出を試みたところ, 全ての部位から IYSV が検出された (図 2, 図 3). また, IYSV の T2 系統, T3 系統が, 一つの株の同じ部位に混在して検出された. なお, 増幅部位(778~783bp)の塩基配列のシーケンスを実施し, 今回検出された T2 系統が T2 分離株 ¹⁾ (アクセッション no.AB121025) に対し塩基配列の相同性が 98.3~98.6%, T3 系統が T3 分離株 ¹⁾ (同 no.AB121026) に対し 98.1~98.2%と高いことを確認した.

一部の株では IYSV が検出されない部位もあったが, 病斑の有無にかかわらず高頻度で IYSV が検出された (図 3). 病斑形成株の葉身 (病斑部), 鱗茎外側, 中心部, 根及び病斑未形成株の葉身では, T2 系統, T3 系統のどちらか 1 系統が検出されたが, 病斑未形成株の鱗茎外側と中心部では, 両系統が混在していることが多かった (図 3).

病斑未形成株でも葉身からは通常の RT-PCR 法でも IYSV が比較的容易に検出されたことから, IYSV の濃度が高いと考えられる (図 2A). 同様に病斑形成株の葉身, 鱗茎外側, 根でも通常の RT-PCR 法で容易に検出される

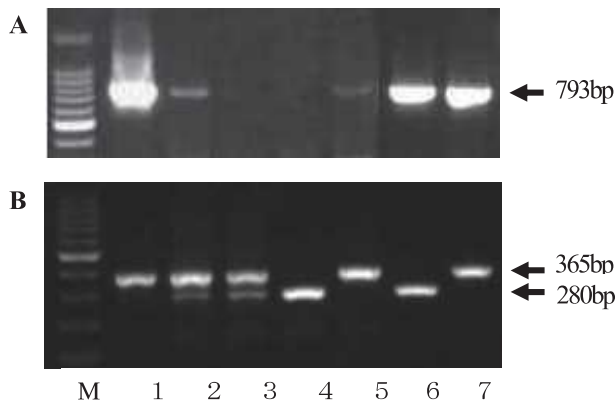


図2 RT-PCR (A) およびnested-RT-PCR (B) による病斑未形成のラッキョウ株各部位からのIYSVの検出
M 100bp ラダー 1 葉身 2 鱗茎外側 3 鱗茎中心部
4 鱗茎基部 5 根 6 対照：T2系統(280bp)
7 対照：T3系統(365bp)
RT-PCR後、1、6、7のみ1000倍希釈したサンプルをnested-PCRに供した

(データ未掲載) ことから IYSV の濃度が高いと考えられる。また、IYSV の濃度が高い部位は nested-PCR のサンプルを希釈して使用したため、混在していても濃い方の系統のみが検出された可能性が考えられる。

これらの結果から、病斑無し株では葉身が病斑を形成するまでに至らなくても IYSV が感染、増殖しており、根や鱗茎へは葉身から移動していると考えられる。病斑の有無やウイルス濃度と系統との関連については、サンプル数が少ないため、明らかにならなかった。

IYSV の高感度な検出方法として、アルストロメリア (*Alstroemeria* sp.) から RT-PCR 産物をナイロン膜にアルカリプロットティングしサザンハイブリダイゼーションする方法⁴⁾ や越冬中のニラ株の各部位から nested-RT-PCR 法により検出した事例²⁾ が報告されている。いずれも、外観上健全な株からも IYSV が検出されており、今回の検出に用いた nested-RT-PCR 法でも、ラッキョウの種球となる外観上健全な部位から IYSV が検出され、このことは IYSV の共通的特徴と考えられた。

2 ラッキョウ種球の IYSV 感染の有無とネギアザミウマの有無が IYSV の増殖に及ぼす影響

現地採取種球の育成株に株当たり 4 頭の無毒ネギアザミウマを放飼したところ、50 日後に 1/5 の株から DAS-ELISA 法で IYSV が検出された。さらに、新たな現地種球の栽培株を同じ飼育箱に追加したところ、その 40 日後には追加した株の全てから IYSV が検出された(表 1)。対照として、現地採取株にネギアザミウマを放飼しない場合や無病株にネギアザミウマを放飼した場合には、IYSV

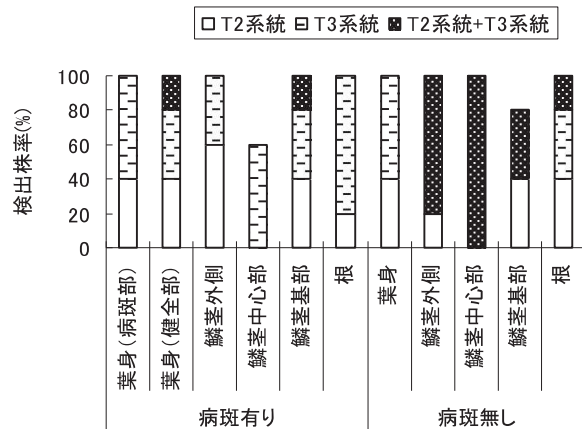


図3 Nested-RT-PCR法によるラッキョウ各部位からのIYSVの検出

病斑有り(病斑形成株)、病斑無し(未形成株)とも5株ずつ供試した

表1 ラッキョウ種球の IYSV 感染の有無とネギアザミウマ放飼の有無が IYSV の検出に与える影響

種球の由来	ネギアザミウマ放飼	IYSV陽性株数 ^{a)}			
		開始株 ^{b)}		追加株 ^{c)}	
		開始前	50日後	開始前	40日後
無病株	有	0	0	0	0
現地採取株	有	0	1	0	5
現地採取株	無	0	0	0	0

a) DAS-ELISA 法による判定

b) 開始株 5 株、飼育箱内に株あたり 4 頭の無毒のネギアザミウマを放飼

c) 50 日後に新たな 5 株を飼育箱内に追加

は検出されなかった(表 1)。

この結果から IYSV 潜在感染株のウイルス量の増加は、ネギアザミウマの共存下で起こることが示された。現地圃場から採取した種球に微量に存在した IYSV は、成育とともに葉身に移動し、ネギアザミウマの吸汁により IYSV を獲得した保毒虫が増殖するとともに、保毒虫の加害によって植物体内のウイルス量も増加し、DAS-ELISA 法で検出されるレベルにまで達すると考えられた。このことから自家採種した種球は伝染源の 1 つであることが示された。伝染源となる種球に対しては無病苗を使用し、ウイルス増殖要因となるネギアザミウマを防除することで、

IYSV によるえそ条斑病を防除することができる。しかし、本地域はネギ属作物が年間を通して栽培され、近隣の他作物から IYSV を保毒したネギアザミウマが飛来する環境下にある^{6,7)}。現地採取した種球の育成株にネギアザミウマを接種し、50 日後では IYSV の検出率が 20%であったが、新たな株をこの中に追加すると 40 日後には 100% の検出率となった(表 1)。この間に、IYSV を獲得したネギアザミウマの伝搬力が急激に高まっていることが推察される。無病苗を栽培してもネギアザミウマの発生を抑制しなければ、やがて感染が広がることが予想されるため、ネギアザミウマの防除がより重要であることが示唆された。

IV 摘要

静岡県西部地域のラッキョウ栽培では 5 月以降、ネギアザミウマが多発し、それらが媒介するアイリス黄斑ウイルス (Iris yellow spot virus: IYSV) によるラッキョウえそ条斑病も急激に増加する。ラッキョウ栽培では 5~6 月に種球を自家採種するため、種球の IYSV 感染状況を調査した。nested-RT-PCR 法による高感度検出で、病斑未発生部位からも高頻度で IYSV が検出された。また、これらの種球を栽培し、飼育箱に無毒ネギアザミウマとともに入れ、その後の IYSV の感染を DAS-ELISA 法で検定した結果、ネギアザミウマを放飼した場合のみ IYSV が検出され、本虫無放飼及び無病苗を用いた場合には IYSV は検出されなかった。以上から、IYSV はラッキョウ栽培圃場から採取した種球に潜在感染し、これらを種球として栽培すると、ネギアザミウマの加害により周囲の株への感染が拡大するため、自家採種の種球が IYSV の伝染源の 1 つとなりうることが示唆された。

謝辞

本試験の実施にあたり、ラッキョウの茎頂培養苗を提供いただいた浜松市農業バイオセンターの諸氏に厚く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 土井ら(2003) : Iris yellow spot virus (IYSV)によるトルコギキョウ(*Eustoma grandiflorum*)えそ輪紋病. 日植病報 69, 181~188.
- 2) 福田ら(2007) : 栃木県の各種 Allium 属植物におけるアイリスイエロースポットウイルス(IYSV)の発生状況. 関東東山病虫研報 54, 43~46.
- 3) Kritsman, A. et al. (2001) : Distribution and Transmission of Iris yellow spot virus. *Plant disease* 85, 838~842.
- 4) 奥田ら(2005) : アイリスイエロースポットウイルス (IYSV) によるアルストロメリア条えそ病(新称)とウイルスの分布解析. 日植病報 71, 119~122.
- 5) Pozzer, L. et al. (1999) : Characterization of a Tosopovirus Isolate of Iris Yellow Spot Virus Associated with a Disease in Onion Fields in Brazil. *Plant disease* 83, 345~350.
- 6) 斉藤ら(2010a) : 静岡県浜松市沿岸地域のネギ属作物における Iris yellow spot virus (IYSV) の感染状況. 関東東山病虫研報 57, 19~21.
- 7) 斉藤ら(2010b) : ネギアザミウマと Iris yellow spot virus (IYSV) のタマネギ収穫残査における発生. 関東東山病虫研報 57, 23~25.
- 8) 末廣典子ら(2006) : 静岡県で分離されたアイリスイエロースポットウイルス(IYSV)2 分離株の S-RNA セグメントの塩基配列解析. 日植病報 72, 278 (講要).
- 9) 内山ら(2008) : IYSV によるトルコギキョウえそ輪紋病と媒介虫の発生活長と IYSV の 2 分離株間の病原性差異. 日植病報 72, 215 (講要).