

レンゲ萎縮ウイルスの宿主範囲

佐野義孝・笹本有美*・上家浩視**・小島 誠

Yoshitaka SANO, Yumi SASAMOTO*, Hiromi KAMIIE** and Makoto KOJIMA :

Host Range of *Milk vetch dwarf virus*

Experimental host range of *Milk vetch dwarf virus* (MDV) was studied using *Aphis craccivora* as vector. Inoculated plants were assayed by southern hybridization. We confirmed systemic MDV infection in following plant species ; *Nicotiana tabacum* L., *Datura stramonium* L., *Spinacia oleracea* L., *Chenopodium quinoa*, *Stellaria media*, *Arabidopsis thaliana*. In addition, we report on the natural infection of MDV in *Vicia angustifolia* L.

Key words : レンゲ萎縮ウイルス, ナノウイルス, 宿主範囲, *Milk vetch dwarf virus*, Nanovirus, host range

緒 言

レンゲ萎縮ウイルス (*Milk vetch dwarf virus*, MDV) はナノウイルス科 (family *Nanoviridae*) ナノウイルス属 (genus *Nanovirus*) に属する小球形DNAウイルスで、マメアブラムシ *Aphis craccivora* (Koch) により永続的に伝搬され、レンゲ、エンドウ、ソラマメ、ダイズなどのマメ科作物に黄化萎縮症状を引き起こす^{2-5,11)}。ナノウイルスは、約1 kbの複数の環状1本鎖DNAをゲノムとして持っており、MDVでは11種のDNAコンポーネントが同定されている^{7,10)}。MDVの自然界における宿主の多くは越年生マメ科草本であり、ダイズ以外に夏期の感染宿主は知られていないが、アカザ科やナス科植物において、試験的に感染が報告されている^{3,8)}。しかしながら、MDVのゲノム構造が明らかになり、ウイルス感染を遺伝学的手法を用いて診断できるようになったのはごく近年になってからであり、これら初期の知見はいずれも肉眼による病徴観察に基づいている。MDVの発生生態を解明するために過去に報告されたナス科やアカザ科の他、マメ科以外の数種検定植物に接種試験を行い、宿主範囲を調査した結果、いくつかの植物種で新たにMDVの全身感染が認められたのでここに報告する。また1999年5月、新潟市近郊のソラマメ圃場においてウイ

ルス発生調査を行った際、圃場周辺に黄化症を示すカラスノエンドウが観察され、検定の結果MDV感染が確認された。カラスノエンドウにおけるMDVの自然感染は未記載であるので、併せて報告する。

材料および方法

1. ウイルス発生調査

1999年5月12日に新潟市新通地区のソラマメ圃場および周辺の雑草についてウイルス発生調査を行った。同地区においては、例年MDVによるソラマメ黄萎症の発生が観察されており、典型的な黄化萎縮を呈するソラマメの他、その周囲に自生するカラスノエンドウの中から黄化を呈したものを各々採集し、ウイルス検定に供試した。

2. 供試ウイルスおよび接種試験

本試験に供試したウイルス分離株 (MDV-N) は、マメアブラムシをベクターに用いてソラマメで増殖維持したものを接種源とした。接種に際しては、病徴明瞭な罹病ソラマメ葉上で5日間以上獲得吸汁させた無翅マメアブラムシを各検定植物苗上に1株当たり20頭以上放飼し、プラスチック製ケージを被せて5日間以上接種吸汁した。その後、アブラムシを殺虫し、供試植物を2週間以

新潟大学農学部 〒950-2181 新潟市五十嵐2の町 8050 Faculty of Agriculture, Niigata University, Ikarashi 2-8050, Niigata 950-2181

*現在 大阪大学大学院医学系研究科 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2 Present address : Graduate School of Medicine, Osaka University, Yamadaoka 2-2, Suita, Osaka 565-0871

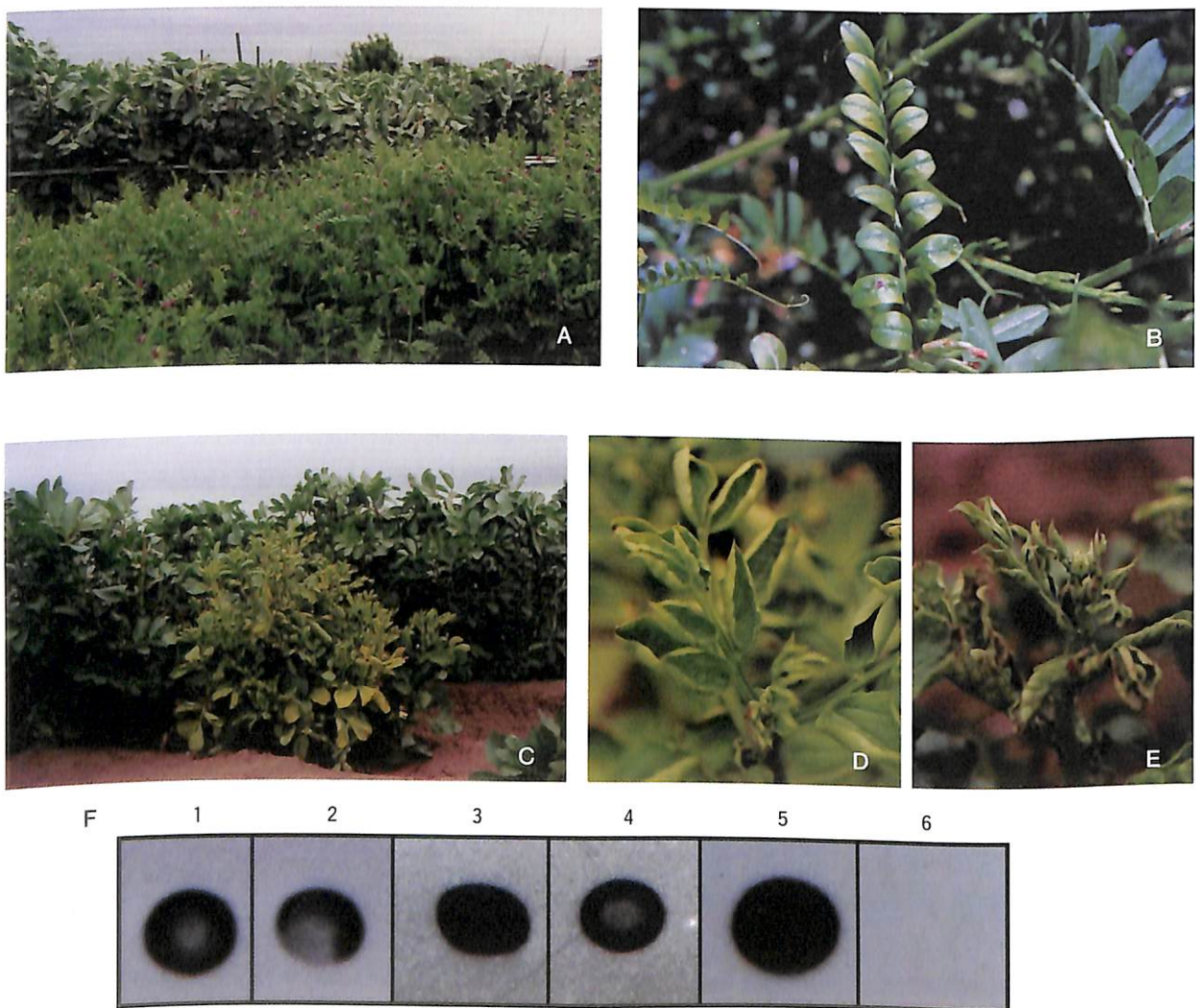
**現在 東頸城農業改良普及センター 〒942-0314 新潟県東頸城郡浦川原村顕聖寺19 Present address : Higashi-kubiki Agricultural Extension Center, Kenshoji 19, Uragawara, Higashi-kubiki, Niigata 942-0314

上生育させた後、葉組織を採取し、核酸を抽出し、ハイブリダイゼーション及びPCRでウイルス感染を検定した。植物組織からのDNA抽出法およびMDV外被タンパク遺伝子 (MDV-C9) に特異的なプローブとDNAプライマーを各々用いた遺伝子診断の手順は既報に準拠した⁷⁾。ドットプロットハイブリダイゼーションおよびサザンハイブリダイゼーションにはアマシヤムバイオサイエンス社製Hybond™-N+メンブレンおよび ECL Direct Labelling and Detection Systemを、PCR増幅にはタカラバイオ社製*TaKaRa Ex Taq* ポリメラーゼを使用した。

結果および考察

1. ウイルス発生調査

調査結果を第1図に示した。この日行った調査ではソラマメ圃場においてMDVによると思われる黄萎症株が散見された。典型的な罹病ソラマメ8株とその周辺から黄化を示したカラスノエンドウ5株を採集した。ドットプロットハイブリダイゼーション検定の結果、ソラマメでは8株すべてから、カラスノエンドウは5株中2株からMDV-DNAが検出された。第1図-Fには陽性のもの各2株の結果をコントロール (MDV罹病および健全ソラマメ) とともに示した。圃場における罹病ソラマメの



第1図 圃場におけるMDV感染植物の病徴と検定例

A；新潟市新道地区のソラマメ圃場と周辺に自生するカラスノエンドウ，B；同地点で観察されたカラスノエンドウの黄萎症，C；黄萎症を呈したソラマメ，DおよびE；罹病株の近影，F；MDV-C9プローブによるドットハイブリダイゼーション，1および2；黄萎症ソラマメ株，3および4；黄萎症カラスノエンドウ株，5；MDV罹病ソラマメ，6；健全ソラマメ

病徴は特徴的であり、株全体の黄化に加えて、新梢部が著しく萎縮・粗剛化し、時に壞疽を伴う（第1図-C, D, E）。これに対し、ウイルス感染が確認されたカラスノエンドウ株（第1図-B, F-3）における症状は比較的軽微であり、罹病ソラマメほど極端な黄化萎縮を呈していなかった。カラスノエンドウにおけるウイルス検出結果が5株中2株となったのは、調査時点で多くの株が開花・結莢期に入っていたため、生育後期に自然黄化した株が含まれていたものと考えられる。カラスノエンドウはマメアブラムシにとって主要な寄生宿主のひとつであり、春先から初夏にかけて非常にしばしば着生が見られる。今回MDVの自然感染が確認されたことから、カラスノエンドウが重要なウイルス源である可能性が示唆される。本病害防除を図る上での一助に供したい。

2. 接種試験

接種試験に供試した各種植物のサザンハイブリダイゼーションによる検定結果を第1表および第2図に示した。各植物苗は1試験あたり3～5株を用い、1株でも陽性反応のあったものは(+)とした。

カラスノエンドウではMDV接種株に黄化萎縮症が観察され（第2図A）、ハイブリダイゼーションにより罹

病ソラマメ（陽性コントロール）と同程度の高いレベルのウイルスDNAが検出された（第2図E-1）。マメ科では、他にアルファルファ（品種：タチワカバ）やコマツブウマゴヤシでMDVによる全身感染と黄化萎縮症が観察されたが、シロツメクサとムラサキツメクサではウイルス感染は認められなかった。

マメ科以外では、ナス科のタバコとシロバナヨウシュチョウセンアサガオに無病徴感染することが確認された。タバコでは供試した2品種のうち、Samsun NNにおいてはサザンハイブリダイゼーションで陰性であったが、より高感度のPCR検定でウイルスDNAが検出された。なお今回供試した植物のうち、タバコ苗においてはマメアブラムシの着生が極めて悪く、放飼1～2日後には大半が死亡または逃亡したため、吸汁接種を数回にわたり繰り返し行った。タバコにおけるMDV-N分離株の感染増殖はきわめて低濃度であると考えられる。一方、アカザ科のハウレンソウと *Chenopodium quinoa*, アブラナ科の *Arabidopsis thaliana* やナデシコ科のコハコベ (*Stellaria media*) にもウイルス感染が見られ、特にハウレンソウでは激しい黄化萎縮症が観察された（第2図B）。また、サザンハイブリダイゼーションの結果、カラスノエンドウやソラマメなどマメ科宿主と同程度のウイルスDNAが感染ハウレンソウ組織から検出された

第1表 マメアブラムシを用いた接種により調査したMDV-N分離株の宿主範囲

	病徴	検定結果	
		ハイブリダイゼーション	PCR
マメ科			
カラスノエンドウ	+	+	+
アルファルファ 品種タチワカバ	+	+	NT ^{a)}
コマツブウマゴヤシ	+	+	NT
シロツメクサ	-	-	-
ムラサキツメクサ	-	-	-
ナス科			
タバコ 品種：Samsun	-	+	+
品種：Samsun NN	-	-	+
シロバナヨウシュチョウセンアサガオ	-	+	NT
アカザ科			
ハウレンソウ 品種：オータム	+	+	NT
<i>Chenopodium quinoa</i>	-	+	NT
ナデシコ科			
コハコベ	-	+	+
アブラナ科			
<i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>Landsberg erecta</i>)	-	+	+

a) Not tested



第2図 接種試験に供試した植物の病徴および検定例

A ; MDV感染カラスノエンドウ (左) および健全対照 (右) (接種46日後, 枠内は感染株の拡大図) B ; MDV感染ほうレンソウ (左) および健全対照 (右) (接種21日後), C ; MDV感染*Arabidopsis thaliana* (左) および健全対照 (右) (接種39日後), D ; MDV感染コハコベ (左) および健全対照 (右) (接種14日後), E ; サザンハイブリダイゼーションによるMDV-DNAの検出, 1 および 2 ; MDV感染および健全カラスノエンドウ, 3 および 4 ; MDV感染および健全*Arabidopsis*, 5 および 6 ; MDV感染および健全ほうレンソウ, 7 および 8 ; MDV感染および健全コハコベ, 9 ; MDV感染ソラマメ (コントロール)

(第2図E-5)。ウイルス感染*A. thaliana*においては株全体の軽い萎縮が観察されたが(第2図C), 接種期間中マメアブラムシの増殖が見られたため, これがウイルス感染によるものか, アブラムシによる吸汁加害によるものか, 判然としなかった。

以上, 本調査結果のうち, マメ科, ナス科およびアカザ科におけるMDVの寄生性は既報の井上ら³⁾ および玉田⁸⁾の知見とよく一致した。すなわちナス科のタバコとシロバナヨウシュチョウセンアサガオ^{3,8)}の他, アカザ科のほうレンソウにも全身感染が認められるがマメ科の

シロツメクサおよびムラサキツメクサには感染しない³⁾。また今回あらたにナデシコ科のコハコベおよびアブラナ科の*A. thaliana*にMDVの全身感染が確認された。MDVと同じGenus *Nanovirus*に属し, 媒介虫特性や血清学的性質がMDVに近縁な*Faba bean necrotic yellows virus* (FBNYV)においても, マメ科植物以外のナデシコ科, アブラナ科などの植物で実験的に感染が確認されているほか, 一部のヒユ科雑草 (*Amaranthus blitoides*)で自然感染が確認されている¹⁰⁾。また, MDVと媒介様式や感染宿主がよく似たダイズ矮化ウイ

ルス (*Soybean dwarf virus*, SbDV)では、マメ科宿根草 (シロツメクサやムラサキツメクサなどのクローバー類) がウイルス源であることが知られているが、MDVはこれらには感染しない。MDVの媒介虫としてはマメアブラムシ以外には知られていなかったが、最近、新たにソラマメヒゲナガアブラムシ *Megoura viciae japonica*, エンドウヒゲナガアブラムシ *Acyrtosiphon pisum* およびワタアブラムシ *Aphis gossypii* がMDV-N分離株を媒介することが判明した⁹⁾。このうちワタアブラムシは、蔬菜類全般に広い寄生性を持つことから、MDVはその増殖サイクル、特に夏季においてマメ科以外の雑草や蔬菜類に寄生する可能性が考えられる。自然感染宿主 (ウイルス源) の探索調査については今後も継続して行ってきたい。

引用文献

- 1) Franz, A., Makkouk, K. M. & Vetten, H. J. (1997) Host range of faba bean necrotic yellows virus and potential yield loss in infected faba bean. *Phytopath. medit.* 36 : 94-103.
- 2) 日野稔彦・井上忠男・井上成信・光畑興二 (1967) レンゲ萎縮ウイルス. *農学研究* 52 : 1-9.
- 3) 井上忠男・井上成信・光畑興二 (1968) レンゲ萎縮ウイルスによるエンドウおよびソラマメの萎黄病. *日植病報* 34 : 28-35.
- 4) 松浦 義 (1953) 紫雲英の萎縮病に就いて. *日植病報* 17 : 65-68.
- 5) Mayo, M. A. (2002) A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Archives of Virology* 147 : 1655-1656.
- 6) Ramirez, C., Ramirez, C., Vega J., Timchenko, T. & Gronenborn, B. (2002) *Arabidopsis thaliana* as a model host for studying Nanovirus-plant interactions. *Abstracts of 12th International Congress of Virology in Paris* : 410.
- 7) Sano, Y., Wada, M., Hashimoto, Y., Matsumoto, T. & Kojima, M. (1998) Sequences of ten circular ssDNA components associated with the *Milk vetch dwarf virus* genome. *Journal of General Virology* 79 : 3111-3118.
- 8) 玉田哲男 (1979) ダイズ矮化ウイルス, レンゲ萎縮ウイルスおよび Bean leaf roll virus の比較. *日植病報* 45 : 120-121.
- 9) 玉村和也・佐野義孝・松本継男 (2002) レンゲ萎縮ウイルス (*Milk vetch dwarf virus*, MDV) のアブラムシ媒介特性. *日植病報* 68 : 238.
- 10) Timchenko, T., Katul, L., Sano, Y., de Kouchkovsky, F., Vetten, H. J. & Gronenborn, B. (2000) The master Rep concept in Nanovirus replication : identification of missing genome components and potential for natural genetic reassortment. *Virology* 274 : 189-195.
- 11) Van Regenmortel, M. H. V. et al. (eds.) (2000) Genus *Nanovirus*. *Virus Taxonomy* : 303 - 309. Academic Press.

(2003年4月30日 受領)