

台湾産コチョウラン苗等で発見されるウイルス病様症状の調査

池城隆明・宮國正一郎・藤原裕治¹⁾・金丸俊司・仲井間 寛

岩田雅顕・上地俊有²⁾・安達浩之・大井俊英³⁾・京道聡史

那覇植物防疫事務所・¹⁾横浜植物防疫所調査研究部・²⁾横浜植物防疫所仙台空港分室・

³⁾横浜植物防疫所成田支所

Research of Virus Disease Like Symptoms Discovered in *Phalaenopsis* spp. from Taiwan. Takaaki IKESHIRO, Shoichiro MIYAGUNI, Yuji FUJIWARA, Shunji KANAMARU, Hiroshi NAKAIMA, Masaaki IWATA, Toshiaki KAMIJI, Hiroyuki ADACHI, Toshihide OI, and Satoshi KYODO (Naha Plant Protection Station, 2-11-1 Minatomachi, Naha-shi, Okinawa-ken 900-0001, Japan.¹⁾ Yokohama Plant Protection Station, Research Division, ²⁾ Yokohama Plant Protection Station, Sendai Airport Detached Station, ³⁾ Yokohama Plant Protection Station, Narita Sub-Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 44: 25-30 (2008)

Abstract: Virus disease like symptoms had been found on *Phalaenopsis* spp. and other orchid plants imported from Taiwan. Suspected samples were investigated by electron microscopy, sap inoculation, ELISA, RIPA and LAMP methods. As a result, CymMV and ORSV were detected at high rate. It was confirmed that these two viruses were infected respectively or simultaneously. A chlorotic spot was the most noticeable symptom on infected leaves. Swelling of leaf veins and breaking on petals were also observed. Root samples are available for ELISA and RIPA of CymMV and ORSV.

Key words: *Phalaenopsis*, *Cymbidium mosaic virus*, *Odontoglossum ringspot virus*, RIPA, LAMP

緒 言

外国から輸入される種苗類は、検査後に直接国内の圃場等に植付けられることから、万一それらに病害虫が付着していた場合は、国内でまん延するリスクが高いため、厳重な検疫が必要である。また、苗類の検査では迅速で的確な合否判定が求められるが、多くの苗類における検疫有害植物の検査指標は未整備である。

そこで、近年、台湾から輸入され、ウイルス病様症状が確認される事例が増加しているコチョウラン等のラン科植物苗について、肉眼でのウイルス病様症状の確認による病原ウイルス識別の可否及び検査現場に導入可能な検定法の検討を行った。

材料及び方法

1. 調査期間及び供試植物

2003～2007 年に、那覇港及び那覇空港において輸入検査時にウイルス病様症状が確認された台湾産コチョウラン (*Phalaenopsis* spp.) 苗 49 株、*Oncidium* spp. 苗 5 株及び *Doritenopsis* spp. 苗 3 株、合計 57 株を対象とした。

2. 調査方法

輸入検査時にウイルス病様症状を呈した株について、病徴等のデータを記録後にウイルスの同定を行い、同定結果に基づくウイルス病様症状の類別化を図った。また、サンプリング部位として根からの検出の検討を行った。

(1) ウイルスの同定

症状が現れた葉を供試材料として、電子顕微鏡観察、汁液接種検定、ELISA 検定、RIPA 検定及び LAMP 検定の各検定法によりウイルスの同定を試みた。

1) 電子顕微鏡観察

生葉を横浜植物防疫所大和圃場に送付し、ウイルス粒子の観察を依頼した。試料は、2%PTA (pH 7.0) 溶液を用いたダイレクトネガティブ染色法 (DN 法) により、電子顕微鏡 (HITACHI-H7600) で観察した。

2) 汁液接種検定

生葉または凍結葉 (－80℃保存) を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で磨碎し、常法により行った。検定植物は、*Chenopodium quinoa* 他 5 科 12 種を用い、接種後は、24～26℃の恒温ガラス温室内で、約 1 カ月間観察した。

3) ELISA 検定

シンビジウムモザイクウイルス (*Cymbidium mosaic virus*: 以下「CymMV」)、オドントグロッサムリングスポットウイルス (*Odontoglossum ringspot virus*: 以下「ORSV」) (日本植物防疫協会)、キュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus*: 以下「CMV」) (Agdia)、トマト黄化えそウイルス (*Tomato spotted wilt virus*: 以下「TSWV」) (BIOREBA) 及び *Tospovirus* group (BIOREBA) の抗血清を用いて、DAS-ELISA を実施した。吸光度は、マイクロプレートリーダー (東ソー MPR-A4iII) で測定し、健全株の 2 倍以上の吸光度を示した株を陽性とした。

表 1. CymMV-RT-LAMP 法 (福田、2005)

試料	0.1 g + 2 ml 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)
↓	
磨碎	
↓	
遠心	10,000 rpm × 1 分
↓	
上清	1 μ l + 反応液
↓	
インキュベート	65°C × 1 時間
↓	
判定	

表 2. CymMV の LAMP プライマー (福田、2005)

F3	5'-TCCAAGAGTGCTACCCTGC-3'
B3	5'-CGAAGGCATAGAAGAAGTCA-3'
FIP	5'-TTGGCTACAAAGATCTGCGC TTTCTGCCCTACGAAACCTG-3'
BIP	5'-TGGTGTGGAAATCTGATGCTGGC CTCCTGGAACCCAGCCCTTG-3'
F-Loop	5'-AAGAGCGGCGCGACGGACAT-3'
B-Loop	5'-TAACGATDCCGCCGCCAA-3'

表 3. RT-LAMP 反応液

12.5	2×LAMP 試薬
4.0	プライマーミックス
1.25	100 mM DTT
0.2	RNase Inhibitor (40 units/ μ l)
1.0	Bst DNA polymerase (8 units/ μ l)
0.5	AMV reverse transcriptase (2.5 units/ μ l)
1.0	鋳型 (植物磨砕液)
4.55	蒸留水
25.0 (μ l)	

4) RIPA 検定

CymMV 及び ORSV を対象とした「蘭のウイルス病診断薬」キット (日本植物防疫協会) を用いて、検定を実施した。

5) LAMP 検定

福田 (2005) の CymMV-RT-LAMP 法の報告に従い (表 1~3)、Loopamp RNA 増幅試薬キット (栄研化学) を使用し、検定を行った。判定は、LAMP 反応による DNA の増幅に伴う白濁を、リアルタイム濁度測定装置 (MORITEX Realloop-30) で測定した。

(2) 根からの検出の検討

ラン苗の場合、葉の一部を切り取り検定に供試すると商品価値を損なうこと、病株の根には多量のウイルス粒子が含まれている (井上、2001) ことから、供試苗の損傷を最小限に抑えるとともに効果的な検出のため、根を用いた検出が可能か CymMV 及び ORSV を対象に ELISA 検定及び RIPA 検定により検討した。

(3) ウイルス病様症状の類別化

症状別に整理し、検出ウイルスとの相関を調査した。

結 果

1. 各検定法による同定結果

(1) 電子顕微鏡観察

DN 法で観察した結果、幅 13 nm、長さ 400~500 nm のひも状粒子及び 15×300 nm の棒状粒子が多数観察された (図 1)。その形状及び大きさからそれぞれ、*Potexvirus* 属及び *Tobamovirus* 属のウイルスの可能性が高いことが示唆された。

(2) 汁液接種

汁液接種の結果、*C. quinoa*、センニチコウ及びツルナ等に病徴が確認された。主な病徴は、*C. quinoa* の退緑斑点、センニチコウの赤色斑点及びツルナの退緑輪紋等であった。*C. quinoa* における病徴及び病徴発現時期の違いにより、単病斑分離を行い、ウイルスを分離した。分離株の検定植物における病徴及び寄主範囲から CymMV、ORSV 及びその他 2 種の未同定ウイルスの感染が示唆された。

(3) ELISA 検定

CMV、TSWV、*Tospovirus* group を対象とした検定では全て陰性となり、一部の株で、CymMV 及び ORSV の陽性反応が確認された。

(4) RIPA 検定

ELISA 検定で CymMV 及び ORSV の陽性反応が確認された株を、RIPA 検定に供試したところ、その結果は、ELISA 検定のものと一致し、約 20 分間で判定が可能であった (図 2)。

(5) LAMP 検定

ELISA 検定で陽性反応が確認された株の生葉を供試したところ、CymMV の遺伝子の増幅が確認された。サンプリングから検出までの所要時間は約 2 時間であった (図 3)。

2. 根からの検出の検討

根を試料として、CymMV 及び ORSV を対象に ELISA 検定及び RIPA 検定を実施した結果、葉と同一の結果が得られ、根からの検出も可能であることが確認

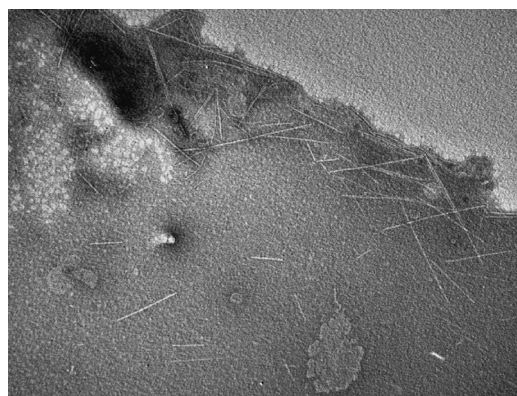


図 1. 電子顕微鏡観察によるウイルス粒子画像
(*Phal.* LIUCHIDA RED LIP × *Phal.* SU'S RED LIP)

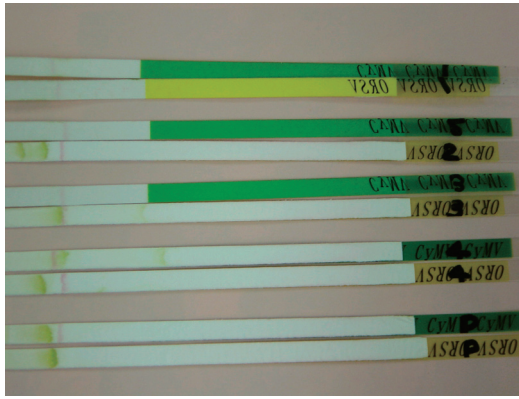


図2. RIPA 検定結果

された。

3. ウイルス病様症状の類別化

本試験で供試したコチョウラン苗等 57 株で確認されたウイルス病様症状（図 4）のうち、最も多いのは退緑斑で、その他にくぼみ斑、葉脈の隆起、葉縁の切れこみ、えそ斑点、退緑輪紋等であった。その主なウイルス病様症状を以下に示す。

A: 葉の退緑斑

これらの退緑斑株から検出されたウイルスは図 5 のとおりであり、CymMV の単独感染 (30%)、CymMV と ORSV の重複感染 (25%)、ORSV の単独感染 (5%) の他に未同定ウイルス・非検出等 (40%) が確認された。

A-1: 退緑斑（図 6-A～G）

淡黄色～黄緑色の明瞭な退緑斑及び退緑輪紋または不整形の退緑斑で、葉裏の病徴が比較的明瞭であり、葉の基部周辺に最も多く観察された（図 6-A, B）。葉の中位まで病徴が進展したものあるいは葉裏全面にわたって病徴が発現した株も確認された（図 6-C, D, E）。*Oncidium* 属では、葉全体が黄色退緑斑（モザイク）症状を呈した株も確認された（図 6-F）。*Doritenopsis* 属では、

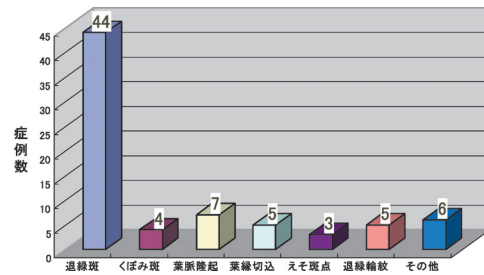


図4. 確認されたウイルス病様症状

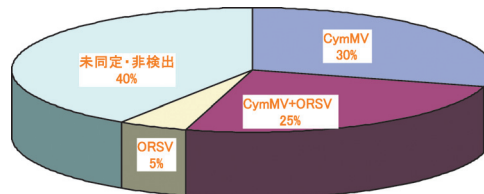


図5. 退緑斑株から検出されたウイルス

葉全面の濃緑斑が見られた（図 6-G）。

A-2: くぼみを伴う退緑斑（図 7-A～C）

葉の表側に多く、くぼみを伴う退緑斑（図 7-A）、退緑条斑（図 7-B）または、不整形の退緑輪紋（図 7-C）が葉脈に沿って観察された。

B: 葉脈の隆起またはコルク化（図 7-A, 図 6-G）

複数の葉脈（平行脈）の隆起またはコルク化が見られた。

C: 花のブレーキング症状（図 7-F）

紫～ピンクの有色系の花卉で観察され、花卉の切れこみ等の奇形症状も確認された。

D: その他（生理障害）

葉の表側に幅広い横縞の退緑斑（図 7-D）や、境界が明瞭な黄色条斑が見られた株も確認された（図 7-E）。

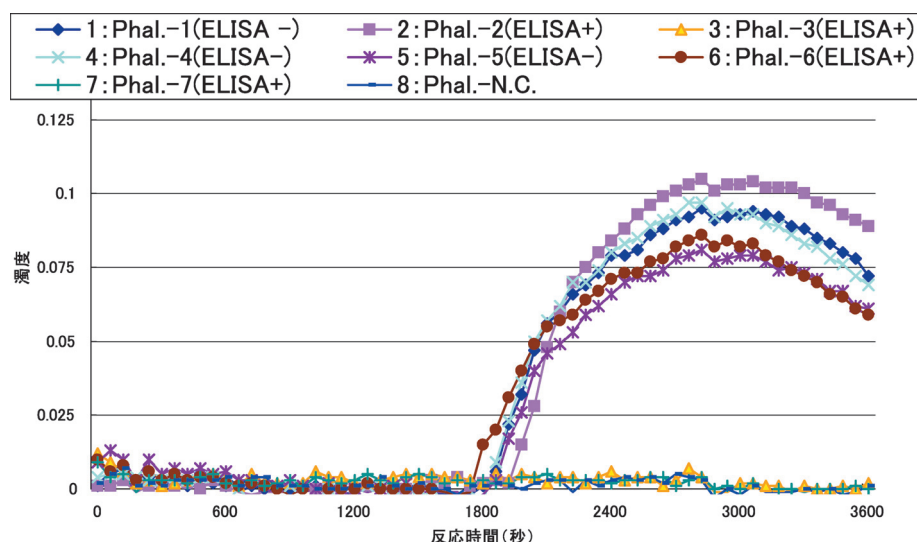


図3. CymMV リアルタイム RT-LAMP

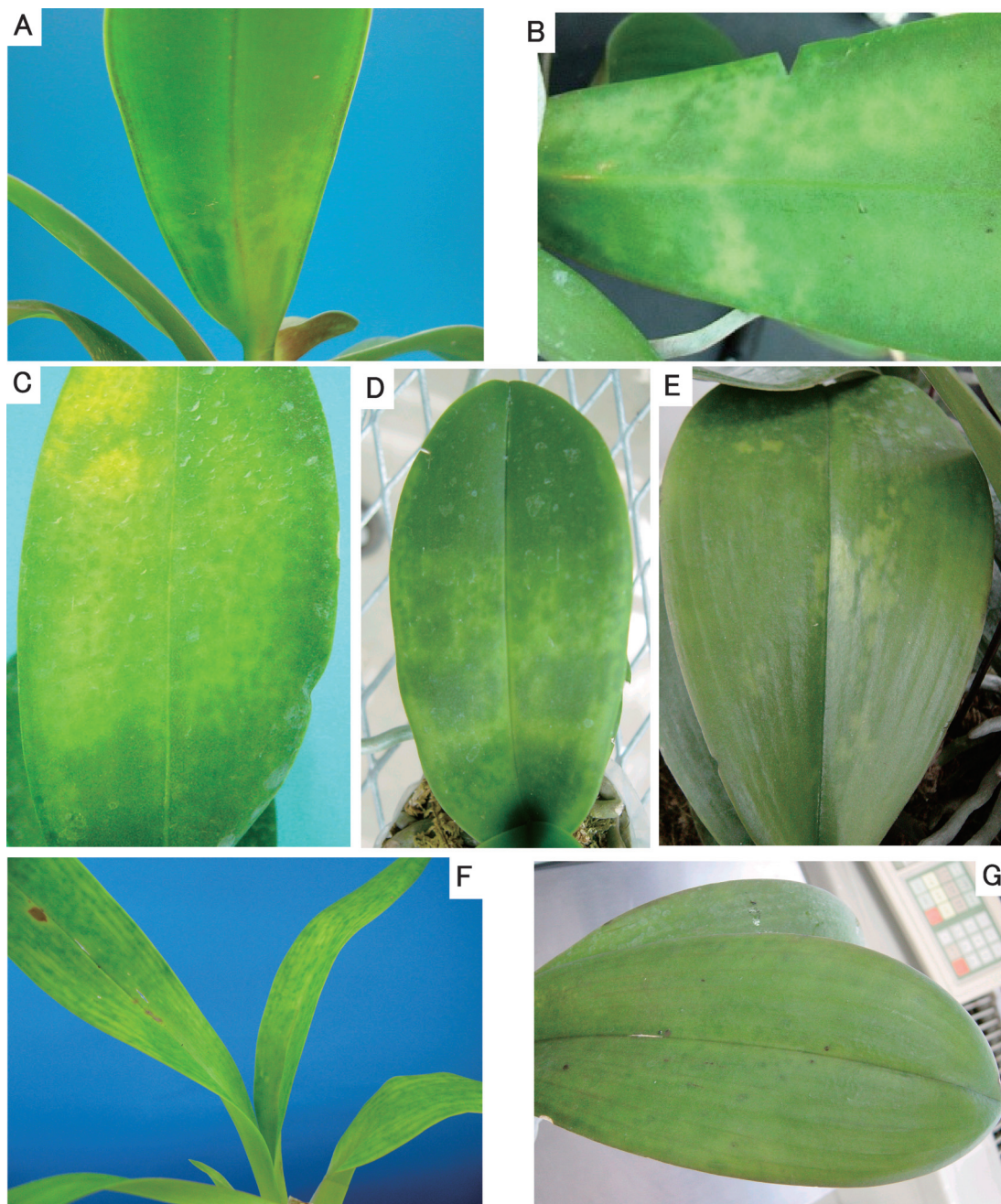


図6. 台湾産コチョウラン苗等で発見された退緑斑・モザイク症状

- A. 葉裏 基部周辺の退緑斑: CymMV (*Phal.* Brother Sara Gold)
- B. 葉裏 基部～中位の退緑斑: CymMV+ORSV (*Phal.* Ginrei×Abendron)
- C. 葉裏 全面的退緑斑・葉縁の切込: CymMV (*Phal.* hybrids)
- D. 葉表 基部～中位の退緑斑: CymMV+ORSV (*Phal.* Hybrids) 061010
- E. 葉表 全面的退緑斑: CymMV+ORSV (*Phal.* Hybrids) 061010
- F. 葉全面の明瞭な黄色モザイク: CymMV+ORSV (*Oncidium* hybrids)
- G. 葉全面の黄化・濃緑斑・葉脈の隆起: 未同定ウイルス (*Doritenopsis* King Shings Rose)

考 察

ランに発生するウイルスは、約30種以上とされ(福田, 1998; BRUNT, *et al.*, 1996; LOEBENSTEIN, *et al.*, 1995)、その内、コチョウランに感染するウイルスは、CymMV及びORSV以外にCMV、*Calanthe mosaic virus* (CalMV)、*Impatiens necrotic spot virus* (INSV)

等の8種が報告されている(井上, 2001)。

今回の調査において、*Phalaenopsis* 属、*Doritenopsis* 属及び *Oncidium* 属苗で、ウイルス病様症状が確認され、各検定法によりCymMV及びORSVが検出された。CymMV及びORSVは、世界中に広く分布し、ラン類の葉にモザイクや激しいえそ斑を生じ経済的被害が大きいウイルスである。CymMVのコチョウランにお

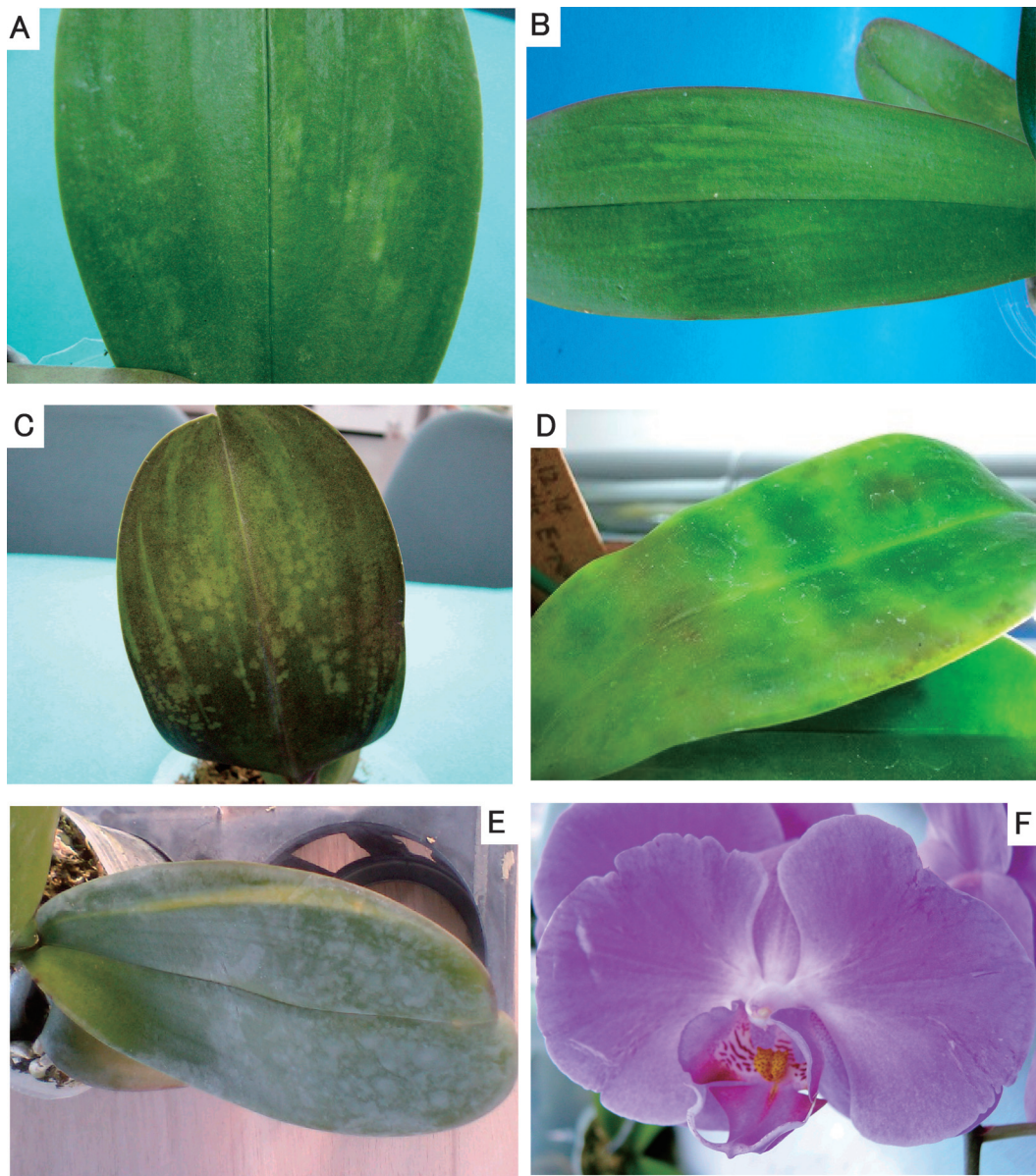


図 7. 台湾産コチョウラン苗等で発見されたその他のウイルス病様症状

- A. 葉表 くぼんだ退緑斑・葉脈の隆起: CymMV+ORSV (*Phal.* Yukimai×White Dream)
- B. 葉表 くぼんだ退緑条斑: CymMV+ORSV (*Phal.* TAISCO KOCHIDIAN×MUSASHINO)
- C. 葉裏 くぼんだ退緑輪紋: CymMV+ORSV (*Phal.* Yukimai×White Dream)
- D. 葉表 幅広の条斑: 生理障害 (*Phal.* Little Emperor)
- E. 葉表 明瞭な黄色条斑 (キメラ): 生理障害 (*Phal.* Hybrids)
- F. 花 ブレーキング・奇形 図 6-G 株の花弁: 未同定ウイルス (*Doritenopsis* King Shings Rose)

ける病徴は、品種、栽培条件及び他のウイルスとの重複感染などにより異なるが、淡黄色～黄緑色の葉脈に沿った帯状斑やリング状斑を生じる「退緑斑型」、葉の表面に斑点状にへこみを生じ、黒褐色～黒色のえそ斑点に進展する「陥没斑型」に大別される (福田、1998; 井上、2001)。同様に本調査の結果においても、退緑斑症状株の多くから CymMV が多数検出されたことから、退緑斑は CymMV に起因するものと考えられた。また、くぼみ斑や葉脈の隆起症状株から CymMV 及び ORSV の感染が確認されたことから、これらの症状は重複感染に

よるものと考えられた。ORSV のみが検出された株は、不整形の退緑斑を呈し、CymMV の症状と比較して判然としないものであった。*Oncidium* 属からは、葉の全面の明瞭な黄色モザイクが株全体に認められた株から、CymMV 及び ORSV が検出された。また、*Doritenopsis* 属からは全面の黄化、濃緑斑及び葉脈の隆起症状を呈する株が確認され、汁液接種及び RIPA 検定の結果から、CymMV 及び ORSV 以外のウイルスに感染していることが示唆された。現在、そのウイルスの同定中である。

本試験において、CymMV はすべての検定法で、ORSV は汁液接種、ELISA 検定及び RIPA 検定で検出可能であった。これらの検定法の中で、検査現場に導入しやすい検定法を簡易性、迅速性及びコスト面から総合的に考慮した結果、RIPA 検定が最も有効であると考えられた。

RIPA 検定は簡易な方法であるが、その精度を維持するために、次の点に注意することが必要である。1) 検定前にキットを常温に戻しておく。2) 検定前に抗体感作着色ラテックス液チューブをタッピングして懸濁する。3) 磨砕は磨砕液が軽く緑色になる程度に行う。4) ろ紙の磨砕液への浸漬は、チューブ底まで付けない。5) 磨砕液に浸けたろ紙の先端をハサミで切り落とす。

ウイルスの検定におけるサンプリング部位として根からの検出を検討した結果、ELISA 検定及び RIPA 検定によりウイルスが検出されたことから、CymMV または ORSV の病徴と思われる場合は、根を用いることにより、葉を損傷することなく検定が可能であることが判明した。

なお、ウイルス病様症状と類似した生理障害・個体変異（キメラ等）との区別をするため、検査現場の目視検査におけるウイルス病様症状の検査ポイントは、次のとおりである。1) 葉齢が 4～5 葉期の葉の葉裏を集中的に検査すること。2) くぼみを伴った退緑斑。3) 葉脈の隆起。

今後とも、検査時におけるウイルス様症状の画像等のデータ集積を進めるとともに、未同定のウイルスについ

ては、同定作業を継続し、検出技法を検討していくことにしている。

摘 要

2003～2007 年に那覇港及び那覇空港に輸入された台湾産コチョウラン苗等を対象にウイルス病様症状が確認された 57 株を供試材料として汁液接種、電子顕微鏡観察、ELISA 検定、RIPA 検定及び LAMP 検定を行った結果、CymMV 及び ORSV が高率に検出された。これらのウイルスは、単独あるいは重複感染していた。ウイルス病様症状は、退緑斑が最も多く確認され、その他葉脈の隆起、退緑輪紋及び花弁のブレーキングも確認された。根からも ELISA 検定及び RIPA 検定で検出可能であった。

引用文献

- BRUNT, A. A., K. CRABTREE, M. J. DALLWITZ, A. J. GIBBS, and L. WATSON (1996) Viruses of Plants Description and List from the VIDE Database CABI INTERNATIONAL.
- 福田至朗 (2005) RT-LAMP 法によるシンビジウムモザイクウイルス (CymMV) の検出. 植物防疫 59(4): 5-9.
- 福田輝明 (1998) 洋ランの病害虫防除 家の光協会.
- 井上成信 (2001) 原色 ランのウイルス病 診断・検定・防除 農文教.
- LOEBENSTEIN, G., R. H. LAWSON, and A. A. BRUNT (1995) Virus and Virus-like Disease of Bulb and Flower Crops, John Wiley & Sons: 409-420.