リンドウこぶ症株で見出されたウイルス様粒子

宇杉 富雄^{1*}・日比野啓行²・田中 稜¹・児玉 勝雄³・竹澤 利和³・千葉 賢一³・岩館 康哉³

ABSTRACT

USUGI, T.¹, HIBINO, H.², TANAKA, M.¹, KODAMA, K.³, TAKESAWA, T.³, CHIBA, K.³ and IWADATE, Y.³ (2010). Virus-like particles observed in plants with gentian tumorous symptoms. Jpn. J. Phytopathol. 76: 21–24.

Gentian tumorous symptoms have been known in Nagano, Iwate and other prefectures since 1985. Previously undescribed virus-like particles were found in gentian (*Gentiana* spp.) plants collected in Iwate Prefecture that had galls or tumors on stems and roots. In transmission electron micrographs of ultrathin sections of tissue from symptomatic plants, virus-like isometric particles about 60 nm in diameter, which had dense cores about 40 nm in diameter with less dense outer shells, were scattered or aggregated in small masses in the cytoplasm of phloem parenchyma cells and in the sieve tubes of galls or tumors. Virus-like particles were observed in stems, crowns and roots but not in leaves and petals. Similar particles were detected by negative staining using uranyl acetate or phosphotungstic acid (pH 7.0) in homogenates of roots fixed with glutaraldehyde.

(Received June 8, 2009; Accepted August 31, 2009)

Key words: virus-like particle, gentian tumorous symptoms, phloem

リンドウこぶ症は1980年代半ばに長野県で初確認されたリンドウの病原不明の生育異常症であるが、今では岩手県などの産地で発生が拡大し、リンドウ栽培上の重要な障害となっている。本症の初期症状は株全体の節間短縮、茎頂部の黄化などによる生育抑制である。その後、短縮した節間表面に不規則な隆起、節位や側枝の基部にこぶが形成される。越冬芽の根頭部は肥厚し癌腫状となり、越冬芽基部も肥厚することがある。根は細根および貯蔵根に多数のこぶができ、やがて細根が脱落するために株が抜けやすくなる。健全苗を圃場に定植すると多くは畦畔から発生し始め、早いものでは定植2年目から節間短縮等の症状が発生する。地上部に症状がなくとも根にこぶが認められる。地上部に症状が認められると翌年は弱小株となり、年々症状が進行し、やがて衰弱し枯死する(児玉ら, 2004)。

リンドウこぶ症は栄養繁殖で後代に受け継がれることが知られていたが(竹澤・阿部, 2005b)、最近、0.4 mm以下の茎頂培養株では発症が認められなくなり、健全株を確保でき

ることが示された(竹澤ら, 2006)。これにより無菌条件下で健全株に発症株の頂芽を接木接種することによりこぶ症が再現されることが確認された(竹澤ら, 2006)。さらにこぶ症は露地栽培においても接木伝染することが示された(千葉ら, 2008)。これらの結果はこぶ症がウイルスによる病害である可能性を示唆している。リンドウに発生するウイルスについては *Clover yellow vein virus*, *Tobacco rattle virus*, *Broad bean wilt virus 2*, *Cucumber mosaic virus*, *Impatiens necrotic spot virus*, *Tomato black ring virus*, *Bean yellow mosaic virus*, *Gentiana carlavirus* および *Gentiana rhabdovirus* が報告されているが、いずれのウイルスによってもこぶ症が発生することはない(Verhoeven *et al.*, 2002; 宇賀ら, 1998; 猫塚ら, 2005; 善林ら, 1989; 吉川ら, 1993)。そこでリンドウこぶ症発症株について超薄切片法およびネガティブ染色法による電顕観察を行った。

試験には、岩手県内で採集した自然発症株および茎頂培養で得られた発症株(茎頂培養において切り出す茎頂部分を大

¹ 中央農業総合研究センター (〒305-8666 茨城県つくば市観音台 3-1-1) National Agricultural Research Center, 3-1-1 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8666, Japan

² 農業生物資源研究所 (〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2) National Institute of Agrobiological Sciences, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

³ 岩手県農業研究センター (〒024-0003 岩手県北上市成田 20-1) Iwate Agricultural Research Center, 20-1 Narita, Kitakami City, Iwate 024-0003, Japan

* Corresponding author (E-mail: usugit@affrc.go.jp)

きくすることによりわざと発症させた株), 健全株としては茎頂培養で得られた健全苗を使用した。自然発症株では茎, 葉, 花卉, 根頭および根から試料を採取した。茎では節間が短縮したもので茎表面に不規則な隆起が見られるものを用い, 表皮から髓部におよぶ部分を切り出し, 葉ではやや黄化した葉の葉脈を中心とした部分, 根頭部では大きく癌腫状に肥大したこぶの部分をそれぞれ切り出し用いた。根では多数のこぶが生じた細根を用いた。花卉では部位は特定しなかった。茎頂培養苗を用いた場合には, 側枝基部に生じた典型的なこぶ, 茎に生じた隆起部分や無症状部分, 空気中に露出した根で生じたこぶ, 培地中の無症状の細根などから試料を作製した。試料は3%グルタルアルデヒド (GA) および1%オスミウム酸 (Dalton 液) により二重固定した後, スーパー樹脂に包埋した。超薄切片を酢酸ウラニル (UA) およびクエン酸鉛で二重染色し, 電顕観察を行った。

2005年に採集した自然発症株 (品種: 踊り子, 安代の秋およびジョパンニ) の電顕観察を行ったところ, 茎, 根頭および根の篩部柔細胞および篩管細胞において直径約 60 nm の球状のウイルス様粒子 (VLP) が散在あるいは小集塊として観察された。VLP には直径約 40 nm で高電子密度の中心核, 中心核を取り巻く低電子密度の殻部分, さらにその周囲はやや電子密度の高い不明瞭な凹凸が認められた (Fig. 1-A)。しかし健全株 (品種: イーハトーヴォ) では VLP は全く観察されなかった (データ省略)。発症株の茎, 葉, 花卉, 根頭および根を調べたところ, 茎, 根頭および根で VLP が検出された (Fig. 1-B) が, 葉および花卉では検出されなかった (データ省略)。根における VLP の検出頻度は茎に比べて高く, 電顕観察による VLP 検出に好適な部位と思われた。そこで4発生地 (岩手県石鳥谷町, 盛岡市, 松尾村および衣川村) から5品種 (踊り子, 早生5, 安代の秋, ジョパンニおよびセブテンパーブルー) の発症リンドウを採取し根を調べたところ, 3品種 (踊り子, 安代の秋およびジョパンニ) において VLP が検出された (データ省略)。残る2品種については篩部組織を含む試料が得られなかった。また, 2008年に2地点 (盛岡市および北上市) の発生圃場から採取した合計7個体の外観健全リンドウ (品種: イーハトーヴォ) の茎部分を電顕観察したところ, いずれの試料についても VLP は認められなかった (データ省略)。

茎頂培養で得られた発症苗 (品種: 踊り子) について電顕観察を行った。その結果, 茎の隆起部, 側枝の基部に生じた典型的なこぶ (Fig. 1-C) および空気中に露出した根に生じたこぶで VLP が確認された。しかし, 同個体にもかかわらず無症状の茎, 培地中における無症状の細根では VLP は認められなかった (データ省略)。

次にこぶ症株 (品種: イーハトーヴォおよび早生3) の根および隆起した茎の一部を用いて磨砕液を作製し電顕観察した。生試料を用いた場合にはウイルス様粒子は検出されなかったもので, 2%GA 中 4°C で2日間固定した試料小片をごく少量の水で磨砕した液をメッシュ (コロジオン膜を張りカーボン蒸着) 上にのせ, 2%リンタングステン酸 (PTA, pH 7) あるいは2%UA でネガティブ染色し電顕観察した。その結果, 根を用いた場合にはいずれの染色法によっても VLP が観察されたが, 茎では検出できなかった。PTA 染色では VLP の中心にやや電子密度の高い約 50 nm の核部分, その周囲には 5–10 nm の不均一な厚さを示す低電子密度の殻部分, さらにその周囲には不明瞭な物質の存在が観察された (Fig. 1-D)。殻部分は粒子によって形状が一定せず, PTA により変性しているように思われた。UA 染色では中心に約 40 nm の電子密度の高い中心部があり, その周囲には厚さ約 5 nm の低電子密度の殻部分, さらにその周囲には不明瞭な物質の存在が認められ, これらを含めた場合の粒子の直径は 60–70 nm であった (Fig. 1-E)。また UA 染色の場合には中心に高電子密度部分が認められず, 表面が凹凸感のある直径約 70 nm の粒子も同時に観察された (Fig. 1-F)。健全株の根では VLP は認められなかった (データ省略)。

以上の結果, リンドウこぶ症の自然発症株や茎頂培養苗において茎, 根頭および根の発症部で VLP が観察され, 健全株では見出されないことが明らかになった。光学顕微鏡観察の結果, 発症株の茎には健全株に見られない篩部の異常な細胞増生と木部肥大が観察されている (阿部・竹澤, 2005)。本試験において VLP が観察された茎篩部組織は茎隆起部直下を観察しているの茎篩部の異常増生部位を観察したものと思われる。さらに発症株にもかかわらず葉や花卉では VLP が観察されなかったこと, また茎頂培養苗ではあるが根や茎の無症状部では VLP が認められなかったことは, VLP が発症部に偏って存在していることを示している。

本試験において観察された VLP はその形態および篩部局在性から *Reoviridae* に属するウイルスと類似している (Uyeda and Milne, 1995)。*Reoviridae* に属する植物ウイルスの多くは単子葉植物に感染するが, 双子葉植物に感染するのは *Wound tumor virus* (WTV) および *Tobacco leaf enation virus* だけである (Black, 1945; Rey *et al.*, 1999)。特に WTV は感染植物の根にリンドウこぶ症と類似したこぶを引き起こすが, WTV がリンドウに感染し, こぶ症を引き起こすことは報告されていない。PTA 染色による電顕観察において WTV は GA 固定することなくウイルス粒子の観察が可能で, 粒子表面にははっきりとした capsomere の存在が認められるが, VLP では GA 固定が必要であるばかりでなく, capsomere の存在を

Fig. 1. Transmission electron micrograph of virus-like particles from gentian plant with tumorous symptoms. A–C. Ultrathin sections. D–F. Homogenate of root fixed with 2% glutaraldehyde.

A. Particles in phloem parenchyma cell of stem. Bar=100 nm. B. Particles in sieve tube of root. Bar=500 nm.

C. Particles observed in tumor cell of stem tumor. Bar=500 nm. D. Particles stained with 2% phosphotungstic acid. Bar=100 nm.

E, F. Particles stained with 2% uranyl acetate. Bar=100 nm.

確認することは困難であった (Black, 1970). これらの結果から VLP は未記載のウイルスではないかと考えられる. 今後, リンドウこぶ症株からの二本鎖 RNA の検出, VLP の純化を行い粒子構成成分の解明, 既報ウイルスとの血清関係などの諸性質を詳細に明らかにすることにより VLP の分類学位置が確定されるものと考えられる.

リンドウこぶ症の病原についてはいまだ明らかにされていない. 発症株の根からグラム反応陽性細菌が高密度で分離されることや, 組織学的観察からこぶ部分に細菌塊の存在が認められている (門田ら, 2006; 加来ら, 2006). これらの細菌接種によるこぶ症の再現には成功していないが, こぶ組織中から高濃度のオーキシン様物質が検出されており (竹澤・阿部, 2005a), 微生物がこぶ症の発生に一定の役割を果たしていることも考えられている. 本試験においては細菌の存在を確認することは出来なかったが, 今後さらに詳細な観察を行い, VLP との関係を調べる必要があろう. 一方, こぶ症は接木接種可能であり, 0.4 mm 以下の茎頂培養で無症状化されるが (千葉ら, 2008; 竹澤ら, 2006), これらの結果はこぶ症はウイルス病である可能性を示唆している. 本試験で見出された VLP はこぶ症発症株において特異的に観察されること, また発症部の節部組織に偏って存在していることを考慮すると, VLP がこぶ症発現に強く関与しているものと考えられる. 今後, VLP の諸性質の解明, 媒介生物の探索等を詳細に行う必要があろう.

本論文のご校閲を賜った中央農業総合研究センター津田新哉博士に厚くお礼申し上げる.

引用文献

- 阿部 潤・竹澤利和 (2005). リンドウ「こぶ症」株における茎組織の特徴. 北日本病虫研報 56: 65-69.
- Black, L. M. (1945). A virus tumor disease of plants. *Am. J. Bot.* 32: 408-415.
- Black, L. M. (1970). Wound tumor virus. *CMI/AAB. Descr. Pl. Viruses* No. 34.
- 千葉賢一・小野田和夫・安部 潤・岩館康哉・竹澤利和 (2008). リンドウ「こぶ症」の接ぎ木伝染. 北日本病虫研報 59: 74-76.
- 門田育生・篠塚弘亮・永坂 厚・加来久敏 (2006). リンドウ「こぶ症」発症株の根部から分離された細菌がリンドウの生育に与える影響. 日植病報 72: 56. (講要)
- 加来久敏・篠塚弘亮・永坂 厚・門田育生 (2006). リンドウの自然発生「こぶ症」の組織学的観察. 日植病報 72: 56-57. (講要)
- 児玉勝雄・内藤善美・千葉賢一・勝部和則・藤原一道・梅沢学 (2004). 岩手県におけるリンドウこぶ症の発生状況について. 園芸学会東北支部平成 16 年度大会研究発表要旨 51-52. (講要)
- 猫塚修一・浜田博幸・勝部和則 (2005). インパチエンスネクロティックスポットウイルス (INSV) によるリンドウえそ斑紋病 (新称). 日植病報 71: 183-184.
- Rey, M. E. C., D'Andrea, E., Calvert-Evers, J., Paximadis, M. and Boccardo, G. (1999). Evidence for a Phytoreovirus associated with tobacco exhibiting leaf curl symptoms in South Africa. *Phytopathology* 89: 303-307.
- 竹澤利和・阿部 潤 (2005a). リンドウ「こぶ症」のこぶ組織内成分の解析. 北日本病虫研報 56: 70-73.
- 竹澤利和・阿部 潤 (2005b). 組織培養手法によるリンドウ「こぶ症」の解析. 北日本病虫研報 56: 74-78.
- 竹澤利和・千葉賢一・岩館康哉・阿部 潤 (2006). リンドウこぶ症の接木伝染性および茎頂培養による無症状化. 北日本病虫研報 57: 68-71.
- 宇賀博之・庄司俊彦・笹谷孝英・御子柴義郎・本田要八郎 (1998). 埼玉県の栄養繁殖性わい性リンドウから分離されたクロウバ葉脈黄化ウイルス (CIYVV). 日植病報 64: 422-423. (講要)
- Uyeda, I. and Milne, R. G. (1995). Introduction: Genomic organization, diversity and evolution of plant reoviruses. *Seminars in Virology* 6: 85-88.
- Verhoeven, J. Th. J., Ding, Y. M., Lesemann, D.-E., Van der Vlugt, R. A. A. and Roenhorst, J. W. (2002). Virus infection in *Gentiana* species. *ISHS Acta Hort.* 568: X International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants.
- 吉川信幸・阿部美紀子・高橋 壮 (1993). 岩手県から分離されたキュウリモザイクウイルスについて. 日植病報 59: 762-763. (講要)
- 善林六朗・花田 薫・河野 勉・庄司俊彦・亀谷満朗・栃原比呂志 (1989). ソラマメウィルトウイルスに起因する鉢栽培リンドウの葉枯れ. 関東病虫研報 36: 124-125.