

ランエソ斑紋ウイルスのダニ伝搬様式，分子系統および診断技術に関する研究

<sup>1</sup>近藤秀樹・<sup>2</sup>前田孚憲・<sup>1</sup>野田瑞紀・<sup>1</sup>鈴木信弘・<sup>1</sup>玉田哲男

<sup>1</sup>岡山大学資源生物科学研究所 〒710-0046 岡山県倉敷市中央 2-20-1

<sup>2</sup>日本大学生物資源学部 〒252-8510 神奈川県藤沢市亀井野 1866

**Orchid fleck virus: mite transmission, molecular phylogeny and diagnosis**

<sup>1</sup>Hideki Kondo, <sup>2</sup>Takanori Maeda, <sup>1</sup>Mizuki Noda, <sup>1</sup>Nobuhiro Suzuki and <sup>1</sup>Tetsuo Tamada

<sup>1</sup>Research Institute for Bioresources, Okayama University, Kurashiki, Okayama 710-0046 Japan

<sup>2</sup>College of Bioresource Sciences, Nihon University, Fujisawa 252-8510, Japan.

**Summary**

Orchid fleck virus (OFV) causes necrotic or chlorotic ring spots and fleck symptoms in many orchid species world-wide. The virus has non-enveloped, bacilliform particles of about 40 nm×100–150 nm and has an unusual bipartite negative-sense RNA genome with clear sequence similarities to those of rhabdoviruses. OFV is transmitted by the mite *Brevipalpus californicus* (Banks) in a persistent manner and efficiently transmitted by ether adults or nymphs, but not by larvae. Viruliferous mites retain their infectivity for 3 weeks on a non-host plant. Phylogenetic analyses of the partial nucleocapsid protein (N) gene sequences of 8 OFV isolates from Japan and 6 isolates from different countries revealed two distinct subgroups. All the Japanese isolates with the exception of one isolate from Tokushima Prefecture (CyT1) were grouped together (named subgroup I). This subgroup also included a Germany isolate (023). A second subgroup (named subgroup II) consisted of geographically distinct isolates from Australia, Brazil, Germany (047), South Africa and Japan (CyT1). Based on the sequence information of OFV isolates, we designed primer pairs for detection of OFV using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Two primer pairs (N1F and N1R, N2F and N2R) for detection of all OFV isolates were selected in the conserved sequences of the OFV N gene. These primer pairs can be used in detection of the OFV isolates of both subgroups I and II from infected *Cymbidium* plants. Another primer pairs for specific detection of subgroup I (Nsb1-2F and Nsu1-2R) and subgroup II (Nsb2F and Nsb2R) are based on subgroup-specific nucleotide-stretches of N gene. The specificity of the subgroup-specific primer pairs was tested on selected OFV isolates.

**緒言**

ウイルス病の制御はラン科植物の栽培上重要な課題の一つである。ラン科植物に発生するウイルスは、これまでに少なくとも 28 種以上が記載されている (Zettler *et al.*, 1990)。このうち、シンビジウムモザイクウイルス (CymMV) とオドントグロッサムリングスポットウイルス (ORSV) はラン科植物の主要な病原ウイルスとして世界のラン栽培地域に広く分布する。一方、ポチウイルス、トスポウイルスや複数の球状ウイルスの発生も知られているが (井上, 2001; Gibbs *et al.*, 2000), これらのウイルスのラン科植物における発生分布や被害状況は詳しくわかっていない。

ランエソ斑紋ウイルス (Orchid fleck virus: OFV) は、1969 年にわが国でエソ斑紋症状を示すシンビジウムから分離、命名されたウイルスで、被膜を持たない桿菌状 (40 nm × 100–150 nm) のユニークな粒子形態が特徴である (Chang *et al.*, 1976; Doi *et al.*, 1977) (図 1)。わが国では東京都や神奈川県で、シンビジウム (*Cymbidium* sp.) やデンドロビウム (*Dendrobium* sp.) などの洋ランに OFV の発生が報告されている (Chang *et al.*, 1976)。

その後、岡山県、山口県、宮崎県、鹿児島県などで、東洋ラン系のシンビジウム属やエビネ属 (*Calanthe*) の植物で本ウイルスの発生が確認された (近藤ら, 1995, 1996; 井上ら, 1996) (図 1A C)。

OFV に類似したウイルスあるいはウイルス様症状は、アメリカ、オーストラリア、韓国、ドイツ、デンマーク、ブラジルなどの国々で、40 属以上のラン科植物において報告されている (Kitajima *et al.*, 2001)。さらに、オーストラリアでは、ラン科植物 4500 検体の約 1 割から OFV 様粒子が検出されている (Gibbs *et al.*, 2000)。このように、OFV や OFV 類似ウイルスは、前述の CymMV や ORSV と同様ラン科植物の栽培地域に広く発生・分布すると推定され、その栽培管理上、注意を要すウイルスの一つである。しかし、OFV のゲノム構造や伝染経路などは長らく不明であり、診断や防除技術も確立していなかった。

OFV のゲノムに関しては、マイナス鎖の 2 分節 RNA であることを我々が世界に先駆けて発見した (Kondo *et al.*, 2003, 2006) (図 1)。OFV は、動物ラプトウイルス (狂犬病ウイルスなどを含む) や植物ラプトウイルスと共通起

源であるが、分節型というこれまでにないユニークなゲノムを持つことから、OFV をタイプとする新属 *Dicorhabdovirus* の創設を提案した(Kondo *et al.*, 2006) . OFV の伝染経路については、ウイルス罹病株に寄生する昆虫類について調査が行われ、節足動物のオンシツヒメハダニ (*Brevipalpus californicus* (Banks)) (図 1E) が媒介者と判明している (Kondo *et al.*, 2003 ; Maeda *et al.*, 1998) . さらに、ウイルスの診断技術については、ヌクレオキャプシド蛋白質(外被蛋白質に相当する)をコードする (*M*) 遺伝子のプライマーを用いた Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) が可能となっている (Blanchfield *et al.*, 2001) (図 1F) . しかし、用いたプライマーセットはオリゴ dT 配列を含むため検出感度が低く、実用診断には向いていなかった(近藤, 未発表) .

本研究では、まずオンシツヒメハダニによる OFV の伝搬様式を詳細に解析した . さらに、日本産の OFV 分離株について、*N* 遺伝子の部分配列を新たに決定した . 得られた配列情報をもとにした分子系統解析により、OFV は 2 種のサブグループに分けられることが判明した . そこで、このサブグループを同時あるいは特異的に診断できる RT-PCR 用のプライマーの開発をした .

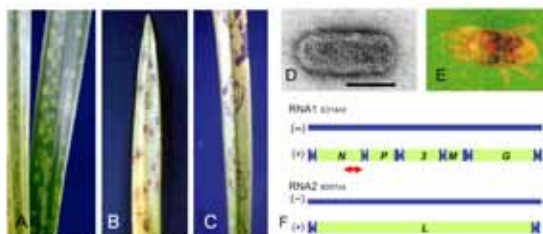


図 1. A-C, OFV 罹病シンビジウム(原株)の病徴 . A, *Cymbidium kanran* の新たな展開葉における斑紋症状 . B ならびに C, *Cym. hosairan* および *Cym. kanran* の古い下位葉におけるえそ輪紋症状 . この輪紋はダニ伝搬されたウイルスの感染部位と推測される . D, OFV ウイルス粒子 . 桿菌状で螺旋コイル構造が観察できる . 棒は 50nm を示す . E, オンシツヒメハダニ(成虫) . F, OFV のゲノム構造 . 2 分節のマイナス鎖 RNA(-) をゲノムに持つ(青線) . RNA1 の赤色矢印は当初の RT-PCR ターゲット領域を示す .

### 材料および方法

#### 供試したウイルス分離株

本研究では、当研究室に保存されている OFV 罹病植物あるいは凍結保存されていた感染葉を用いた . なお、分離株は以下の通りである(表 1) . 東洋ランのシンビジウム分離株 So(近藤ら, 1995), 洋ランのシンビジウム分離株 CyT1, CyT2, Cy88, Cy50, エビネ分離株

Ca192-7 および Ca194-16 (井上ら, 1996), Ca194-17, Ca18 を用いた .

表 1. 本研究で用いた OFV 分離株のリスト

Virus isolate	Geographic origin	Host genus or species
So	Okayama, Japan	<i>Cymbidium</i> sp
CyT1	Tokushima, Japan	<i>Cymbidium</i> sp
CyT2	Tokushima, Japan	<i>Cymbidium</i> sp
Cy88	Okayama, Japan	<i>Cymbidium</i> sp
Cy50	Chiba, Japan	<i>Cymbidium</i> sp
Ca192-7	Miyazaki, Japan	<i>Calanthe triplicata</i>
Ca194-16	Yamaguchi, Japan	<i>Calanthe Hizen</i>
Ca194-17	Yamaguchi, Japan	<i>Calanthe</i> sp
Ca18	Unknown, Japan	<i>Calanthe</i> sp

#### オンシツヒメハダニ伝搬試験

ウイルス伝搬試験に用いたオンシツヒメハダニは、岡山県下で採集された OFV 罹病シンビジウム(品種不明)と愛媛県下の健全シンビジウム(品種不明)より得た . ヒメハダニの維持・増殖は、チャ(*Camellia sinensis*) またはシンビジウム(Kenny Wine color) 葉上で行なった . 伝搬試験の判別植物はツルナ(*Tetragonia expansa*) またはインゲンマメ(*Phaseolus vulgaris* cv. Hon- Kintoki) の実生を用いた . 1 葉あたり十数頭のヒメハダニを放し一定期間接種吸汁させた後、殺ダニ剤(DDVP またはケルセン)を散布し、20~30 日後まで病徴を観察した . 病斑が形成された場合は、電子顕微鏡観察にてウイルス粒子の確認を行った .

#### RT-PCR による *N* 遺伝子断片の増幅

OFV のコードする *N* 遺伝子断片(660 塩基 +3 非翻訳領域)の増幅は、Blanchfield *et al.* (2001)の方法に準じて行なった . 原株あるいは罹病植物葉試料(50~100mg)から全 RNA を抽出した . これを M-MLV (Invitrogen) による逆転写反応の鋳型とし、poly dT/SP6 プライマー (5'-GATTTAGGTG-ACACTATAGTTTTTTTTTTTTTTTTT(A/G/C)-3') を用いて相補的 DNA を作製した . PCR のプライマーは、poly dT/SP6 と mN2 (5'-TGCAGGAATATAGCCGACATGTT-3') のプライマーセットを用いた . PCR 反応には Blend Taq (Takara) を用い、94℃ 2 分間の熱変性後、DNA 変性 94℃ 10 秒、アニーリング 50℃ 20 秒、DNA 伸長 72℃ 1 分のサイクル 30 回の後、72℃ 10 分の伸長反応を行った . PCR 反応液を 1~1.5% アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウム染色により目的配列の増幅を確認した . 塩基配列決定は ABI PRISM TM377 DNA Sequencer (PE Applied Biosystems) を用い、

精製した PCR 産物のダイレクトシーケンシング法で行った。

N 遺伝子配列を用いた分子系統解析は、ClustalW 法による塩基配列の多重整列後、近接結合法を使い系統樹を作成した。なお、系統樹の表示は TreeView で行った。既存の OFV 分離株の配列情報としては、本邦の分離株 So (GenBank/EMBL/DDBJ アクセション: AB244417), オーストラリア分離株 003 (AF343872), 591 (AF343871), ドイツ分離株 023 (AF343870), 047 (AF343875), ブラジル分離株 005 (AF343873), 南アフリカ 053 (AF343874) を用いた。

OFV の遺伝子診断を行うため、新たに OFV の共通プライマーセット, N1F/N1R および N2F/N2R, ならびにサブグループに特異的なプライマーセット, Nsb1-2F/Nsb1-2R (サブグループ I) および Nsb2F/Nsb2R (サブグループ II) をデザインした (Kondo *et al.*, 投稿準備中)。

#### 電子顕微鏡観察

ウイルス粒子の観察は、試料を銅グリッドにのせ、2% (w/v) 酢酸ウラニル(UA, pH 6.5) により逆染色を行った後、透過型電子顕微鏡 (日立 H-7100B) にて行った。

### 結果

#### ヒメハダニによるウイルス伝搬試験

本研究では、シンビジウムより得られた保毒オンシツヒメハダニを用い、OFV の伝搬様式を詳しく調べた。ウイルス罹病シンビジウム上で飼育したヒメハダニの成虫を判別植物に3日間放飼した後、約20日後にOFV感染特有の黄色斑が確認され、病斑部からは電子顕微鏡観察でOFV粒子が検出された。同様に罹病シンビジウム上で飼育したヒメハダニの成虫は35頭中24頭がウイルスを伝搬し、その伝搬率は約68.6%であった(データ省略)。また、ウイルスの接種吸汁の時間については、ヒメハダニを葉上に約10分間の放飼ではウイルスは伝搬されなかった(データ省略)。しかし葉上に30分間放飼した場合、ウイルスは伝搬され、6時間、24時間とその時間が長くなると、1葉あたりに形成される病斑数は6倍、27倍と多くなった(データ省略)。なお、健全シンビジウムより得たウイルスフリーのヒメハダニでOFVの獲得試験を行ったが、今のところ実験は成功していない。

オンシツヒメハダニは卵、幼虫、第一若虫、第二若虫を経て成虫となる。そこで、ステージの違いによるウイルスの伝搬を調べた(表

2)。その結果、第一若虫ではウイルスは伝搬されず、第二若虫は成虫と同様にウイルスを伝搬した。また、ウイルス保毒ヒメハダニを健全なチャ葉上で3週間飼育した場合、このダニはウイルスを伝搬し、電子顕微鏡観察で体内からウイルス粒子が検出された。このことから、ウイルスの伝搬様式は循環型または増殖型であると推定された。なお、本ウイルスが経卵伝搬するかは不明である。

オンシツヒメハダニによる草本植物への伝搬試験では比較的多くの植物に伝搬された(表3)。ラン科植物ではエビネ、シンビジウム、デンドロビウムに伝搬され、接種吸汁を行った葉では局部病斑を呈し、数ヶ月後全身に典型的なOFVの症状が認められた。

さらに、キョウチクトウ科のツルニチソウ (*Vinca major*) およびアオイ科トロロアオイ (*Hibiscus manihot*) にも伝搬され、局部病斑や葉脈のえそ症状を呈し、時に全身感染へと移行した(表1)。その他キク科アキノノゲシ (*Lactuca laciniata*)、ヒユ科イヌビユ (*Amaranthus lividus*)、ヒルガオ科アサガオ (*Pharbitis nil*)、トウダイグサ科エノキグサ (*Acalypha australis*)、マメ科エビスグサ (*Cassia tora*)、インゲンマメ、アオイ科ムクゲ (*Hibiscus syriacus*)、ミカン科ハッサク (*Citrus hassaku*)、ナス科ヨウシュチョウセンアサガオ (*Datura stramonium*) においても、ウイルスは伝搬されて、接種吸汁葉に黄色斑

表2. オンシツヒメハダニのステージの違いとOFVの伝搬性

Stage	Exp. I		Exp. II	
	No. lesions	No. mites	No. lesions	No. mites
Larva	4	0	12	0
Nymph	32	177	ND	
Adult	5	218	7	52

Groups of mites at each stage on the infected *Cymbidium* leaves were transferred to leaves of *Tetragonia expansa*, and then the mites were killed by spraying insecticide 3 days after transfer. ND=no data.

表3. オンシツヒメハダニによるOFVの伝搬試験

Family	Species	Symptoms	
		Local	System
Orchidaceae	<i>Calanthe</i> sp.	CS, YS	YNeM, N
	<i>Cymbidium</i> sp.	CS, YS	YS, N
	<i>Dendrobium</i> sp.	CS	YS, YM
Amaranthaceae	<i>Amaranthus lividus</i>	YS	-
Apocynaceae	<i>Vinca major</i>	YS, VN (StemN, VN)	
Compositae	<i>Lactuca laciniata</i>	NS	-
Convolvulaceae	<i>Pharbitis nil</i>	NS, NRS	-
Euphorbiaceae	<i>Acalypha australis</i>	YS	-
Leguminosae	<i>Cassia tora</i>	NS	-
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	YS, VN	-
Malvaceae	<i>Hibiscus manihot</i>	NS	(VN)
	<i>H. syriacus</i>	YS	-
Rutaceae	<i>Citrus hassaku</i>	YRS	-
Solanaceae	<i>Datura stramonium</i>	YS	-

CS: chlorotic spot, YS: yellow spot, NS: necrotic spot, NRS: necrotic ring spot, VN: vein yellowing, VN: vein necrosis, N: necrosis, StemN stem necrosis, YNeM: yellow net mosaic.

点やえそ斑点が形成された (表 3) .

### N 遺伝子を用いた分子系統解析

本邦に発生する OFV 8 分離株について, Blanchfield *et al.* (2001)の方法に準じて, N 遺伝子の部分塩基配列 (660 塩基) を新たに決定した (徳島県と同じ場所で採集した CyT1 株と CyT2 株は, 同一配列であったことから, 以下では同じ株とする). これらの塩基配列と既報の分離株の塩基配列情報をもとに分子系統樹を作成したところ, OFV は 2 つのサブグループに分かれた (図 2). 一つのグループは徳島県で採集された CyT1 (CyT2) 株を除くすべての日本産分離株とドイツ株 023 を含んでいた. もう一つのグループは, CyT1 (CyT2) 株, ドイツ株 047 とオーストラリア, ブラジル, 南アフリカなどの外国産分離株を含んでいた. このように, 本研究では OFV に 2 つのサブグループが存在することを明確にできたので, 前者をサブグループ I, 後者をサブグループ II と命名した (図 2).

N 遺伝子の塩基配列レベルでの相違は, 同一サブグループの分離株間では 1.4% 以下であったのに対して, 2 つのサブグループの分離株間では 16.1 ~ 16.8% であった. しかし, アミノ酸配列レベルでは, グループ内で 1.4% 以下, グループ間でも 2.7 ~ 4.1% の違いで, アミノ酸配列レベルではサブグループ間で大きな差は認められなかった. なお, 2 つのサブグループ間の塩基置換は, アミノ酸置換を伴わないコドン第 3 番目の塩基に集中していた.

### サブグループ特異的判別法の開発

本研究では, サブグループ I 分離株が多数検出され, さらに諸外国で発生しているサブグループ II タイプの分離株についてもわが国ではじめて確認した. そこで, RT-PCR により 2 つのサブグループを同時にあるいは特異的な判別できるプライマーの検討を行った. まず OFV の両グループを共に検出できる新規プライマーセット N1F/N1R および N2F/N2R をデザインした. これらを用いた RT-PCR では, シンビジウムのウイルス感染葉からサブグループ I (So 株, Cy88 株) とサブグループ II (CyT1 株, CyT2 株) のいずれも検出可能であった (図 3, 305bp と 398bp の増幅バンド).

次に各サブグループに特異的な配列情報をもとにプライマーセットをデザインし, 同様に RT-PCR をおこなった. その結果,

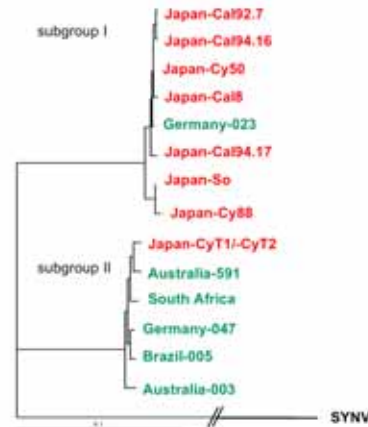


図 2. OFV N 遺伝子の部分塩基配列を用いた分子系統樹. この系統樹は本研究で決定した本邦の 7 分離株と既報の 7 分離株の N 遺伝子の配列情報をもとに作成した. 赤字は日本産, 緑は外国産分離株を示す. スクネラウイルスの sonchus yellow net virus (SYNV) は outgroup .

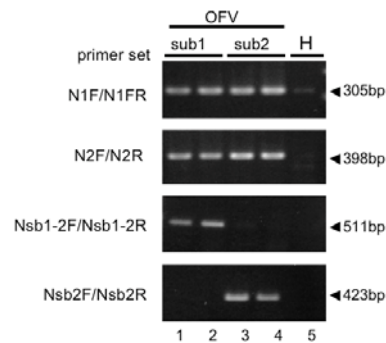


図 3. RT-PCR を用いた OFV の検出例. 罹病シンビジウム葉の全 RNA を鋳型として, OFV N 遺伝子の RT-PCR を行った. 上段の 2 つは OFV の共通プライマーセット (N1F/N1R, N2F/N2R), 下段はサブグループ I (sub1) および II (sub2) の特異的なプライマーセットを用いた. Lane 1: So 株; lane 2: Cy88 株; lane 3: CyT1 株; lane 4: CyT2 株; lane 5: 健全葉. 右はそれぞれの増幅バンドのサイズを示す.

サブグループ I に特異的なプライマーセット Nsb1-2F/Nsb1-2R では, サブグループ I の分離株でのみ 511bp の増幅バンドが検出さ, サブグループ II ではバンドは認められなかった (図 3). 一方, サブグループ II に特異的なプライマーセット Nsb2F/Nsb2R では, サブグループ II の分離株で 423bp バンドが増幅されたが, サブグループ I ではバンドは認められなかった. 以上から, 上記プライマーセットを用いることにより, サブグループを特異的に判別できた.

### 考 察

本研究では, OFV によるウイルス病の制御を目指し, ウイルスの媒介生物による伝搬の様式を解明するとともに, RT-PCR による遺伝

子診断技術の確立を目指した。

OFV のオンシツヒメハダニによる伝搬様式は、永続的であり、循環型か増殖型であると考えられた。一方、OFV は感染葉汁液の機械的接種も可能であるが、汁液中では非常に不安定であることが知られている (Chang *et al.*, 1976; 近藤ら, 1995; 井上ら, 1996)。このことから、圃場レベルの OFV の伝染は、主にオンシツヒメハダニによって行われると推測された。そこで、本ウイルス病の蔓延を防ぐためには、ヒメハダニの発生に注意し、その防除を適正に行うことが重要であると考えられた。

ところで、ヒメハダニによる OFV 媒介試験では、比較的多くの草本植物へウイルスが伝搬された。特にトロロアオイやムクゲといった、我が国でオンシツヒメハダニが発生するフヨウ属の仲間にも (江原, 1993), ウイルスが媒介された。さらに、ブラジルでは、同じフヨウ属 (*Hibiscus*) のハイビスカスやヒメフヨウに OFV 類似ウイルスが発生している (Kitajima *et al.*, 2003)。そこで、我が国でも OFV や類似ウイルスのフヨウ属植物における発生調査が必要であろう。さらに、今後はヒメハダニによるウイルス伝搬機構について、詳細な研究を進める必要がある。

診断技術については、OFV に対する抗血清を用いた間接 ELISA 法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), DIBA 法 (Dot Immunobinding Assay), ウエスタンプロット法などが可能である (Kondo *et al.*, 2008; 近藤ら, 未発表)。しかし、今のところ、当研究室以外で OFV 抗血清の入手は困難であり、診断操作も煩雑である。そこで、より迅速・正確である RT-PCR による遺伝子診断技術の検討を行った。すでに述べたように、当初デザインしたプライマーは (Blanchfield *et al.*, 2001), 実用診断には向いておらず、また 2 つのサブグループを網羅的に検出できる有効なプライマーが必要であると考えられた。そこで、OFV の *N* 遺伝子の 2 領域にプライマー (N1F/N1R および N2F/N2R) を設定し、罹病シンビジウム検体でその有効性を実証した。今後はこのプライマーセットを他のラン科植物でも検証し、本遺伝子診断技術の普及を進めたい。

これまでに RT-PCR による遺伝子診断により、オーストラリア、ドイツ、ブラジル、コスタリカ、南アフリカのラン科植物から OFV が検出され (Blanchfield *et al.*, 2001; Freitas-Astúa *et al.*, 2003), 本ウイルス病は世界のラン栽培地域に広く分布することが

示唆されている。この調査では、分離株のほとんどはサブグループ II に属し、サブグループ I の株は日本産 So とドイツ産 024 に限られた (Blanchfield *et al.*, 2001; Kitajima *et al.*, 私信)。今回のわが国における調査では、ほとんどの分離株は、So 株と同じサブグループ I であったが、徳島県の CyT1 (CyT2) 株はサブグループ II であった。なお、徳島県では別の地域のシンビジウムからもサブグループ II のウイルスが検出されている (未発表データ)。

以上から、サブグループ I のウイルスはわが国を中心とした限定された地域で検出され、サブグループ II のウイルスは世界的に分布すると推定された。特に、徳島県でサブグループ II の発生が確認されたことから、他の地域でも本サブグループの発生が懸念される。今後、わが国のラン科植物全般に於ける OFV の発生状況の調査や、その分離株についてサブグループのタイピングが必要であると考えられる。同時に、ラン科植物の栽培が盛んなアジアの各地域やハワイ州などにおける調査も必要である。さらに、OFV の 2 種のサブグループ間で、ゲノム構造、病原性や伝搬性など病原学的な特性に差異が認められるか興味を持たれる。

## 謝 辞

本研究の一部は井上成信博士との共同研究により行われ、さらに、Ida Bagus Andika 博士には有益なご助言をいただいた。オンシツヒメハダニの同定には、鳥取大学名誉教授 江原昭三博士にご協力いただいた。OFV 徳島分離株の採集にあたっては、徳島県立農林水産総合技術支援センター 広田恵介氏にご協力いただいた。なお、本研究の一部は文部科学省の科学研究補助費 (若手研究 B, 基盤研究 C) の援助で行われた。以上、ここに記して感謝申し上げます。

## 引用文献

- Blanchfield, A.L., Mackenzie, A.M., Gibbs, A., Kondo, H., Tamada, T. and Wilson, C.R. (2001). Identification of *Orchid fleck virus* by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and analysis of isolate relationships. *J Phytopathol* 149, 713-718.
- Chang, M.U., Arai, K., Doi, Y. and Yora, K. (1976). Morphology and intracellular appearance of orchid fleck virus. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 42, 156-167.
- Doi, Y., Chang, M. U. and Yora, K. (1977).

- Orchid fleck virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses 183.
- 江原昭三. (1993). II.ハダニの概説と検索. pp200-216. 日本原色植物ダニ図鑑. 江原昭三編. 全国農村教育協, 東京.
- Freitas-Astúa, J., Moreira, L., Rivera, Carlos Rodríguez, C. M. and Kitajima, E. W. (2002). First Report of Orchid fleck virus in Costa Rica. *Plant Disease* 86, 1402.
- Gibbs, A., Mackenzie, A., Blanchfield, A., Cross, P., Wilson, C., Kitajima, E.W., Nightingale, M. and Clements, M. (2000). Viruses of orchids in Australia; their identification, biology and control. *Aust Orchid Rev* 65, 10-21.
- 井上成信. (2001). 原色ランのウイルス病診断・検定・防除. 農山漁村文化協会, 東京. pp196.
- 井上成信・松本純一・前田孚憲・光畑興二・近藤秀樹・田原望武. (1996). エビネ類に発生する黄色斑紋モザイク病の病原 orchid fleck virus について. 岡大資生研報 4, 119-135.
- Kitajima, E.W., Chagas, C.M. and Rodrigues, J.C.V. (2003). *Brevipalpus*-transmitted plant virus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. *Exp Appl Acarol* 30, 135-160.
- Kitajima, E.W., Kondo, H., Mackenzie, A., Rezende, J.A.M., Gioria, R., Gibbs, A. and Tamada, T. (2001). Comparative cytopathology and immunocytochemistry of Japanese, Australian and Brazilian isolates of Orchid fleck virus. *J Gen Plant Pathol* 67, 231-237.
- Kondo, H., Maeda, T. and Tamada, T. (2003). Orchid fleck virus: *Brevipalpus californicus* mite transmission, biological properties and genome structure. *Exp Appl Acarol* 30, 215-223.
- Kondo, H., Maeda, T. and Tamada, T. (2008). Identification and characterization of structural proteins of orchid fleck virus. *Archives of Virology*, published online doi: 10.1007/s00705-008-0268-6.
- 近藤秀樹・松本純一・前田孚憲・井上成信. (1995). 東洋ラン (*Cymbidium*) から分離された orchid fleck virus (OFV) について. 岡大資生研報 3, 151-161.
- 近藤秀樹・前田孚憲・光畑興二・井上成信. (1996). 東洋ランにおけるウイルスの発生調査. 岡大資生研報 4, 149-162.
- Kondo, H., Maeda, T., Shirako, Y. and Tamada, T. (2006). Orchid fleck virus is a rhabdovirus with an unusual bipartite genome. *J Gen Virol* 87, 2413-2421.
- Maeda, T., Kondo, H., Mitsuhashi, K. and Tamada, T. (1998). Evidence that orchid fleck virus is efficiently transmitted in a persistent manner by the mite, *Brevipalpus californicus*. *Abst. 7th International Congress of Plant Pathology*, Edinburgh, Scotland. 1.13.18.
- Zettler, F.W., Ko, N.J., Wisler, G.C., Ellioit, M.S. and Wong, S.M. (1990). Viruses of orchids and their control. *Plant Dis* 74, 621-626.

### 摘要

OFVは世界のラン栽培地域に広く発生すると考えられている。OFVの伝搬機構は不明であったが、オンシツヒメハダニが本ウイルスを媒介し、実験室レベルではアオイ科をはじめ複数の植物種に伝搬されることが明らかになった。その伝搬様式は永続型で、循環型か増殖型であると考えられた。我が国でも本ウイルスが広く分布すると考えられているが、今回 OFV 7分離株を新たに同定し、そのN遺伝子の部分塩基配列を決定した。OFVの分子系統解析では、塩基配列レベルで2つのサブグループの存在が示唆された。日本産の分離株は徳島分離株以外はサブグループIであり、徳島分離株とほとんどの外国産分離株はサブグループIIであった。OFVの遺伝子診断を行うために、RT-PCR用プライマーのデザインを行った。二つのグループに属す分離株を共に検出できるユニバーサルプライマーセットと、それぞれのサブグループに特異的なプライマーセットについて検証し、ウイルス罹病シンビジウム個体よりウイルスの検出が可能であることを示した。