

特別報告

ダリアの主要なウイルス・ウィロイドの 診断・防除技術の確立

浅野峻介

Development of Method to Detect and Control Major Viruses and Viroids in Dahlias

ASANO Shunsuke

目次

第1章 緒言

第2章 ダリアのウイルス・ウイロイド検定の省力化技術の確立

- 第1節 マルチプレックス RT-PCR によるトマト黄化えそウイルス，ダリアモザイクウイルスおよびキク矮化ウイロイドの同時検出技術の開発
- 第2節 トマト黄化えそウイルスの植物体内における感染分布の解明
- 第3節 国内のダリア生産圃場におけるトマト黄化えそウイルス，ダリアモザイクウイルスおよびキク矮化ウイロイドの感染状況

第3章 ダリア生産圃場におけるトマト黄化えそウイルスの防除技術の確立

- 第1節 トマト黄化えそウイルスを媒介するアザミウマ類の発消長
- 第2節 防虫ネット被覆によるトマト黄化えそウイルスの防除効果

第4章 ダリアに対するキク矮化ウイロイドの感染性と病原性の解明

- 第1節 ダリアに感染するキク矮化ウイロイドの塩基配列決定
- 第2節 キク矮化ウイロイドのダリアとキクへの感染性の評価
- 第3節 キク矮化ウイロイドの感染がダリアの生育に及ぼす影響
- 第4節 キク矮化ウイロイドの系統と栽培環境がダリアに対する病原性に及ぼす影響

第5章 総合考察

摘要

謝辞

引用文献

第1章 緒言

国内の花き生産額が年々低下している中、ダリア (*Dahlia* spp.) は切り花の生産額が増加傾向にある有望な品目となっている (市村ら, 2011)。ダリアはメキシコからコロンビアに至る中南米原産のキク科植物である。日本に渡来したのは江戸時代末期の1842年と言われており、その当時は天竺牡丹と呼ばれていた (天野, 2018)。奈良県でのダリアの球根生産の歴史は古く、山添村では1925年頃にオランダから輸入した球根を栽培したことが始まりとされており、宇陀市榛原では1950年に始まり、1960~1975年頃にはアメリカへの輸出も行っていた (藤井・有馬, 2012)。ダリアの需要はかつて仏花が主であったが、近年ではブライダルやパーティーなどの業務用需要を中心に、フラワーアレンジメントに欠かせない花材となっている。ダリアの花は大輪から小輪まであり、花色や花形も豊富で、品種の多さも魅力の一つとなっており、現在も多く品種育成が民間企業や公的研究機関によって行われている。ダリアは冷涼な気候を好む植物であるため、夏秋期には奈良県や兵庫県の中山間地域と山形県などの冷涼地に産地が形成されている。これらの地域では、夏秋期の切り花生産とその後の球根生産を組み合わせることによって、労働力の周年活用が図られている。また、近年増加している冬春期の切り花生産は、従来産地ばかりでなく長野県、愛知県、高知県、宮崎県など全国各地に導入されている。

ダリア生産では、糸状菌病であるうどんこ病、斑葉病および菌核病、細菌病である根頭がん腫病による被害は少ない一方で、ウイルス・ウイロイド病による被害が問題となっている。生産現場におけるダリアの増殖は、夏秋期産地では主に球根 (塊根) の分球、冬春期産地では挿し芽によって行われている。そのため、ウイルス・ウイロイドに感染した母株から後代に伝染し、その被害が拡大している。

ダリアへの感染が報告されているウイルス・ウイロイドはキュウリモザイクウイルス (*cucumber mosaic virus*; CMV)、ダリアモザイクウイルス (*dahlia mosaic virus*; DMV)、インパチエンスえそ斑点ウイルス (*impatiens necrotic spot orthospovirus*; INSV)、タバコ条斑ウイルス (*tobacco streak virus*; TSV)、トマト黄化えそウイルス (*tomato spotted wilt virus*; TSWV)、キク矮化ウイロイド (*chrysanthemum stunt viroid*; CSVd)、ダリア

潜在ウイロイド (*dahlia latent viroid*; DLVd)、ジャガイモやせいもウイロイド (*potato spindle tuber viroid*; PSTVd) と多数存在する。これらの中でも国内ではTSWVによるダリア輪紋病とDMVによるダリアモザイク病の被害が深刻とされている (仲ら, 2007a; 末松ら, 1978)。なお、CSVdは国内の花き生産における最重要品目であるキクと共通病害でありながら、ダリアの生産性への影響、生産現場での感染状況に関する情報は整理されていない。

TSWVによるダリア輪紋病の病徴は、葉に黄斑や輪紋、輪紋状のえそ、茎にえそ条斑を生じ、生育が抑制される。球根には、あざ状のえそ条斑を生じる (Albouy, 1995)。7月下旬から8月下旬の高温期には病徴はマスキングされる。虫媒伝染は、アザミウマ類による永続伝播が報告されており、現地圃場での被害の急激な拡大が確認されている。DMVによるダリアモザイク病の病徴は、葉でモザイク、葉脈黄化、萎縮が生じ、生育が抑制される (Albouy 1995)。また、虫媒伝染については、アブラムシによる非永続伝播が報告されている。CSVdは、ポスピウロイド科に属しており、その構造は348~356塩基の1本鎖環状RNAであり感染細胞の核で複製する (Matsushita, 2013; Palukaitis・Symons, 1980)。ダリアへの感染が確認されており、キクに感染するCSVd系統と塩基配列の相同性が高いことが明らかにされている (Nakashima et al., 2007)。

ウイルス・ウイロイド病の防除の基本は、伝染環の遮断であり、近年国内で問題となった *tomato yellow leaf curl virus* によるトマト黄化葉巻病やCSVdによるキク矮化病に対してもこの点に着目した対策が提案されている (愛知県農業総合試験場, 2013; 本多, 2010)。トマト黄化葉巻病に関しては、感染拡大の主要因がタバココナジラミによる虫媒伝染であることから、媒介虫対策に主眼が置かれている。当媒介虫はネオニコチノイド系の殺虫剤に対する抵抗性を獲得していたことから、ネット被覆や栽培の終了後のハウスの蒸し込みによる物理的防除に加え、伝染源となる野良生えや家庭菜園トマトへの注意を促している。一方でキク矮化病に関しては、虫媒伝染が報告されていないため、ハサミでの栽培管理や感染株との接触による汁液伝染での感染拡大対策を重要視している。なお、キクは挿し芽により苗が増殖されるため、親株が感染していると被害が甚大となり、非感染親株の選抜には注意を払う必要がある。ダリアに対しても、上述のように対象となるウイ

ルス・ウイロイド種の特徴と栽培体系を考慮し、重点的に対処すべき点を見極めることによる防除の効率化が望まれる。なお、防除対策を行うべきウイルス・ウイロイド種を明確化するには、国内での感染状況と感染株の症状の整理が前提となる。しかし、これまでの国内での感染状況の調査は一部の地域に限られており（北村，2016；末松ら，1978），苗の流通の広域化が進んだ現在ではより広い範囲での状況の把握が求められる。そこで，第2章では，生産現場で最も問題となる TSWV と DMV に加え，さらなる調査が求められる CSVd を対象として，これらを同時検出できるマルチプレックス RT-PCR を開発した。なお，対象としたウイルス・ウイロイドのうち TSWV はキク，ラナンキュラスなどの植物体内での分布が不均一となることが知られており（Matsuura et al., 2004；Whitefield et al., 2003），検定の際に TSWV が存在しない部位を使用する恐れがあった。そこで，ダリア植物体内における TSWV の分布の傾向を明らかにし，適切な検定部位を探索した。本章の最後には開発した検出法を用いて，国内1道7県で採取したダリアの感染状況およびその症状を明らかにした。

ダリアのウイルス病対策としては，媒介虫の防除による伝染環の遮断が重要である。特に TSWV は媒介虫であるアザミウマ類による感染拡大の程度が大きい（Culbreath et al., 2003；Okazaki et al., 2007）。その媒介種としてヒラズハナアザミウマ（*Frankliniella intonsa*；以下，ヒラズハナ），ミカンキイロアザミウマ（*F. occidentalis*；以下，ミカンキイロ）などが報告されている（Riley et al., 2011）。圃場レベルでの TSWV の感染拡大にアザミウマ類が影響していることは，ダリアに加えタバコ等の様々な作物で報告されている（Asjes・Blom-Barnhoorn, 2001；McPherson et al., 1999；Olatinwo et al., 2008）。これらのことからダリア輪紋病の防除対策として，アザミウマ類の防除による伝染環の遮断が有効と考えられる。そこで，第3章では，殺虫剤の最適な散布時期を提示するため，アザミウマ類の発生消長と TSWV 保毒率の推移を調査した。さらに，防虫ネットの設置による防除効果を明らかにした。

ダリア生産圃場での CSVd の感染は，2005年に日本で初めて確認され（Nakashima et al., 2007），それ以降も報告されている（北村，2016）。しかし，CSVd 感染によるダリアでの病徴の有無は明らかにされていないため，CSVd を防除対象とすべき

か判断できない状況であった。また，CSVd 系統の違いや栽培条件がダリアへの病原性に及ぼす影響は防除対策を構築する上で重要な情報であるが，これまで明らかでない。そこで第4章では接種試験を行い，CSVd 感染がダリアに矮化等の病徴を引き起こすことを明らかにし，さらに感染時期，CSVd の系統，栽培時期，日長条件などが病徴の程度に及ぼす影響を評価した。また，国内の CSVd 系統の塩基配列や CSVd の汁液接種での感染性を調査した。

総合考察では得られた結果から，ダリアのウイルス・ウイロイド病の防除対策を提案し，今後の展望と残された課題を整理した。

第2章 ダリアのウイルス・ウイロイド検定の省力化技術の確立

第1節 マルチプレックス RT-PCR によるトマト黄化えそウイルス，ダリアモザイクウイルスおよびキク矮化ウイロイドの同時検出技術の開発

緒言

国内のダリア生産では，トマト黄化えそウイルス（TSWV）とダリアモザイクウイルス（DMV）による被害が問題となっている（仲ら，2007a；末松ら，1978）。なお，キク矮化ウイロイド（CSVd）については生産圃場での感染状況のさらなる調査が求められている。生産現場でのダリアの増殖は，球根（塊根）の分球や挿し芽といった栄養繁殖で実施されている。親株がウイルス・ウイロイドに感染していると後代に感染拡大することから，ウイルス・ウイロイドに感染していない健全な親株の選抜が必要である。ウイルス・ウイロイド感染株は明瞭な病徴を示さないことがあるが，高感度である RT-PCR を用いた検出方法を導入すれば，選抜の精度は向上する。また，生産地域でのダリアのウイルス・ウイロイドの感染状況を確認することで，地域の実情に応じた効率的な防除対策が可能となる。

これまでに用いられている手法は，1つのウイルス・ウイロイド種を対象とした RT-PCR あるいは PCR であるが，複数種を検出するには多大な労力が

必要になる。マルチプレックス PCR は、複数セットのプライマーを同時に1つのPCR反応に用いる手法である。つまり、複数のウイルス・ウイロイド種を同時に検出することで、省力化を図ることができる。マルチプレックス PCR では様々な種を対象とした手法が開発されているが (Hayahi et al., 2018 ; Matsushita et al., 2010 ; Song et al., 2013), ダリアでの使用を想定した報告はない。なお、マルチプレックス PCR の条件検討では、目的の PCR 産物以外のエキストラバンドの有無や、通常の PCR との検出感度を比較する必要がある。RT-PCR のテンプレートとして用いる RNA の抽出法には、植物体を磨砕して高純度かつ高濃度で抽出する手法から簡素化した手法まであり、作業の効率性に大きく影響する。その中でも microtissue direct RT-PCR (Hosokawa et al., 2006) は昆虫針や注射針を検定植物に突き刺し、針先についた植物汁液をテンプレートとする。簡易な手法でありながら、ウイルス・ウイロイドの検出は安定していると報告されている。

本節では、TSWV, DMV および CSVd を対象としたマルチプレックス RT-PCR を開発し、さらにシングル RT-PCR との検出感度の比較、microtissue direct RT-PCR への適応性を検討することでその実用性を評価した。

材料および方法

1) 供試植物と RNA 抽出

TSWV, DMV および CSVd それぞれに単独感染しているダリア‘黒蝶’, ‘織姫’および‘明朗’を2013年に奈良県内のダリア球根生産圃場から採取した。RNA の抽出は、各植物体の中位葉 100 mg を RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて実施した。

抽出した RNA の濃度と純度は Nano Drop ND-1000 spectrometer (Thermo Fisher Scientific) を用いて確認した。なお、ウイルス・ウイロイド種の感染の確認は、仲ら (2007b) に従い抽出 RNA をテンプレートとした RT-PCR により実施した。

2) プライマーの選択と設計

マルチプレックス RT-PCR に用いるプライマーは、TSWV と DMV に対しては既報の TSWV-Rnp, Fnp (瀬尾ら, 2009) と DMV-R1345, F944 (仲ら, 2007b) をそれぞれ用いた。CSVd に対しては、ダリアから分離された CSVd の塩基配列 (GenBank/EMBL/DDBJ accession No. AB255879, AB255880) を用いて作製した CSVdD-R, F を用いた (表 2-1-1)。

3) マルチプレックス RT-PCR とシングル RT-PCR

マルチプレックス RT-PCR には PrimeScript One-Step RT-PCR Kit Ver. 2 (Dye Plus) (タカラバイオ) を用いた。RT-PCR 試薬の濃度はプロトコールに準じ、3組のプライマーの濃度はいずれも 0.4 μ M とした。反応は液量 10 μ l で実施し、テンプレートの total RNA は1反応につき 1 ng 使用した。RT 反応を 50°C で 10 分間行い、94°C で 2 分間処理後、PCR は 94°C 30 秒, 60°C 30 秒, 72°C 30 秒を 30 回繰り返し、72°C 5 分間の最終伸長を行った。PCR 産物は 1.0% アガロースゲルで電気泳動した。シングル RT-PCR は、マルチプレックス RT-PCR と同様の試薬を使用し、1組のプライマーを 0.4 μ M の濃度で用いた。反応は液量 10 μ l で実施した。

4) マルチプレックス RT-PCR の検出感度

マルチプレックス RT-PCR とシングル RT-PCR の検出感度を比較するため、上述の抽出 RNA の 10 倍の希釈系列 $1.0 \times 10^{0-7}$ ng をテンプレートとして用いた。各 RT-PCR は 3 反復で実施した。

表2-1-1 マルチプレックスRT-PCRに使用したプライマーの塩基配列

対象	プライマー名	塩基配列 (5'-3')	増幅サイズ (bp)	引用
TSWV	TSWV-Rnp	ACCCTAAGAAACGACGACTGCG	720	瀬尾ら (2009)
	TSWV-Fnp	TCTTCACCTGATCTTCATTCATT		
DMV	DMV-R1345	ACTTCCTGCTAGGACACTCA	402	仲ら (2007)
	DMV-F944	AAAAAGAGGCTACCATACCC		
CSVd	CSVdD-R	TCTCCAGGAGAGGAAGGAAACTA	249	本報告
	CSVdD-F	GGAGTAAGCCCGTGG AACCTTAG		

5) マルチプレックス microtissue direct RT-PCR

RNA 抽出を省力化するため、上述のマルチプレックス RT-PCR の microtissue direct RT-PCR (Hosokawa et al., 2006) への適応性を検討した。microtissue direct RT-PCR では、昆虫針 (有頭シガ昆虫針 3 号; 志賀昆虫普及社) でダリアの小葉の主脈を 3 回刺した後、昆虫針を RT-PCR 反応液に浸漬した。すなわち針先についた植物汁液をテンプレートとして使用した。TSWV, DMV または CSVd に単独感染しておりかつ無病徴である株それぞれ 10 株を対象として実施した。品種は上述の 1) と同様であり、ウイルス・ウイロイド種の感染は抽出 RNA をテンプレートとし、仲ら (2007b) に従い RT-PCR により確認した。

6) シーケンス

TSWV, DMV および CSVd を対象としたマルチプレックス RT-PCR により得られた増幅産物のダイレクトシーケンスを行った。PCR 産物の精製は ExoSAP-IT Express PCR Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific) で行った。試薬は BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、シーケンサー 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) により実施した。

結果

1) マルチプレックス RT-PCR による TSWV, DMV および CSVd の検出

抽出 RNA をテンプレートとしてマルチプレックス RT-PCR を行ったところ、TSWV, DMV および CSVd それぞれの想定サイズである 720, 402 および 249 bp の PCR 産物が増幅された (図 2-1-1)。CSVd のみを増幅した際はエキストラバンドが 2 本確認されたが、

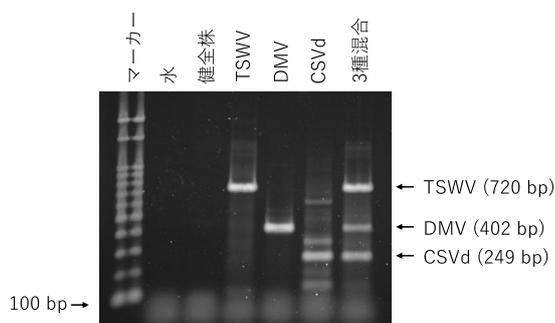


図2-1-1 マルチプレックスRT-PCRによるダリアからのトマト黄化えそウイルス (TSWV)、ダリアモザイクウイルス (DMV) およびキク矮化ウイロイド (CSVd) の同時検出

TSWV と DMV のサイズとは異なった。健全株の抽出 RNA と水をテンプレートとした際には、非特異的なバンドは検出されなかった。得られた PCR 産物の塩基配列を解析したところ TSWV, DMV および CSVd それぞれに 99%を超える高い相同性を示した (HF913777, JX272320 および AB255879)。

2) マルチプレックス RT-PCR の検出感度

マルチプレックス RT-PCR の検出限界は TSWV と DMV については、シングル RT-PCR と同等であり、それぞれ 1.0×10^{-5} と 1.0×10^{-3} ng であった (図 2-1-2)。マルチプレックス RT-PCR の CSVd の検出限界は 1.0×10^{-2} ng であり、シングル RT-PCR の検出限界 1.0×10^{-3} ng より 10 倍検出感度が低かった。

3) マルチプレックス microtissue direct RT-PCR による検出

マルチプレックス microtissue direct RT-PCR は、マルチプレックス RT-PCR と同様に TSWV, DMV および CSVd それぞれの想定サイズの PCR 産物を増幅した (図 2-1-3)。

考察

本節ではマルチプレックス RT-PCR による TSWV, DMV および CSVd の同時検出技術を開発した。本検出法は、ダリアでのウイルス・ウイロイドの発生状況調査や健全株選抜時の検定の省力化に有効である。さらに針先についた植物体の汁液をテンプレートとする microtissue direct RT-PCR での実用性を確認した。これは RNA 抽出を省略できることにより作業時間が大きく短縮され、かつ試薬のコストが低下することから、普及性が高い技術と考えられる。これまでのダリアでのウイルス・ウイロイド検定は一つのウイルス・ウイロイド種を対象としており、TSWV, DMV および CSVd では仲ら (2007b) のプライマーが主に利用されていたと考えられる。マルチプレックス RT-PCR に使用した TSWV, DMV および CSVd のプライマーは目的の増幅サイズの PCR 産物を生成し、互いの増幅サイズを干渉しなかった (図 2-1-1)。なお、TSWV のプライマーはキクでの利用を想定して作出されていたが、ダリアに感染した TSWV を正確に検出できることを確認できた。DMV は DNA ウイルスであるにも関わらず、抽出 RNA をテンプレートとしたマルチプレックス RT-PCR で検出が可能で

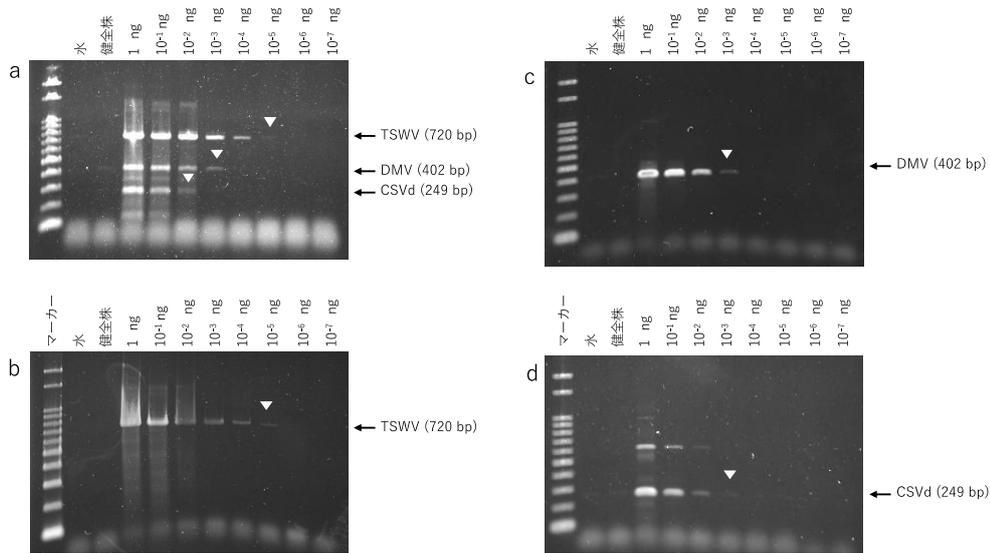


図2-1-2 マルチプレックスRT-PCRとシングルRT-PCRの検出感度の比較
 a: トマト黄化えそウイルス (TSWV)、ダリアモザイクウイルス (DMV) 及びキク矮化ウイロイド (CSVd)、b: TSWV、c: DMV、d: CSVd
 1~10⁻⁷ngのRNAをテンプレートとして使用した。
 矢印は検出限界のバンドを示す。

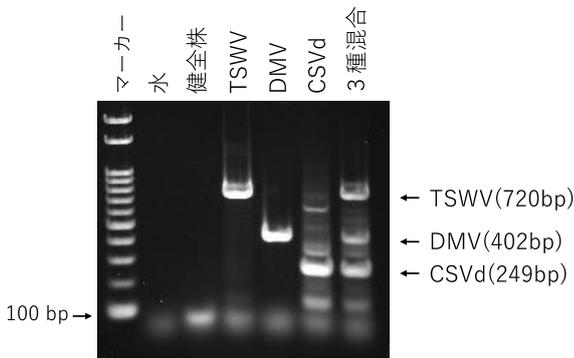


図2-1-3 マルチプレックスmicrotissue direct RT-PCRによるダリアからのトマト黄化えそウイルス (TSWV)、ダリアモザイクウイルス (DMV) およびキク矮化ウイロイド (CSVd) の同時検出

あり、仲ら (2007b) も同様に DMV の検出に抽出 RNA を用いている。このことから DMV の転写 RNA が RT-PCR で安定して増幅されると考えられる。マルチプレックス RT-PCR は複数セットのプライマーが含まれるため、シングル RT-PCR と比べて検出感度が低下する可能性がある。そのため、テンプレートの希釈系列系を用いた検出感度の比較により、実用性が評価されている (Hayahi et al., 2018 ; Song et al., 2013)。本節のマルチプレックス RT-PCR では、CSVd の検出限界はシングル RT-PCR の 10 倍と低下したが (図 2-1-2)、無病徴感染株から CSVd を検出できたため、十分な実用性を有していると考えられ

る。microtissue direct RT-PCR は RNA ウイルスとウイロイドで利用された報告はあるものの (Hayahi et al., 2018 ; Hosokawa et al., 2006)、DNA ウイルスを対象とした事例は認められなかった。このことから、本報告での DMV の検出により、microtissue direct RT-PCR の DNA ウイルスへの適応性が示された。

本節で開発したマルチプレックス RT-PCR はダリアのウイルス・ウイロイド検定の省力化を可能とした。このことは高感度かつ正確な検定方法である RT-PCR の現地への導入を推進すると考えられる。使用が想定されるのは、都道府県の農業試験場と種苗会社であり、各地域での主要なウイルス・ウイロイド種の解明、健全株の選抜での活用が期待される。

第2節 トマト黄化えそウイルスの植物体内における感染分布の解明

緒言

ダリアの増殖は球根 (塊根) の分球や挿し芽といった栄養繁殖により実施されており、ウイルス・ウイロイドに感染していない健全な親株の選抜が求められる。目視に加えて、RT-PCR 等の検出感度が高い手法を用いることで健全株選抜の精度を向上させ

ることができる。RT-PCR 等の検定に用いるサンプル量は約 100 mg と少ないため、ウイルス・ウイロイドが分布する確率が高い部位を採取する必要がある。

ダリアの主要なウイルス・ウイロイドである TSWV, DMV および CSVd の中でも TSWV は様々な植物体内で不均一に分布することが報告されている。キクでは上位葉, ラナンキュラスでは側根での TSWV の検出率が低い (Matsuura et al., 2004 ; Whitefield et al., 2003)。TSWV は、ブニヤウイルス科オルソトスポウイルス属に分類されており、同属である melon yellow spot orthospovirus (Sugiyama et al., 2009) や iris yellow spot orthospovirus (Kritzman et al., 2001) でも同様の傾向が認められる。一方、DMV はカリモウイルス科カリモウイルス属に分類されており、DMV と同属のウイルス種を含めて植物体内での分布に局在性が生じた報告はない。CSVd は、茎頂先端まで分布することが知られており、感染株から茎頂培養での CSVd フリー株の作出が困難である。そのため、低温処理や採取部位の小型化といった組み合わせでフリー株の作出率を向上させる取り組みが行われている (Hosokawa et al., 2004b ; Savitri et al., 2013)。これらのことから、TSWV の分布傾向に合わせたサンプルの採取は DMV と CSVd を検定する際にも問題にならないと考えられる。

奈良県でのダリアのウイルス・ウイロイド検定は、春～秋期に採取可能な植物体の地上部と冬期に採取可能である球根での検定を実施していた。その際に同一株内でも部位によっては TSWV が検出されないことが経験的に知られていたが、詳細な検討は実施されていなかった。そこで、ウイルス・ウイロイド検定の適切な部位を明らかにするため、ダリア植物体内における TSWV の分布の傾向を調査した。TSWV の分布調査の対象としたのは複葉, 小葉, 茎および球根である。ダリアの複葉は生育状況により小葉の枚数が 1, 3 および 5 枚となる。ここでは最も成長が進んだ小葉 5 枚を有する複葉での部位別での TSWV の検出率を調査した。小葉での分布の調査においては、病徴が認められる葉を用いることで、分布の局在性に加え病徴部と TSWV 分布との関連性を確認した。茎については上～下部の分布を茎の伸長期と開花期と比較し、生育ステージによる影響を調査した。球根については、上～下部の断面での分布を調査することで、師部などの部位別での感染動態に関する考察を行った。

材料および方法

1) 供試植物

TSWV に感染したダリア「黒蝶」を 2013 年に奈良県内の球根生産圃場で採取した。TSWV の感染と他のウイルス・ウイロイドの非感染を確認するため、RT-PCR を実施した。TSWV の検出は第 2 章 1 節に従い、CMV, DMV, INSV, TSV, CSVd および PSTVd の検出は Eiras et al. (2001), 仲ら (2007b), および Tsushima et al. (2011) に従って実施した。TSWV 感染ダリアは挿し芽を行い、15 cm ポットで栽培管理を行った。

2) 複葉での TSWV の検出

2013 年 7, 8 月に TSWV に感染した「黒蝶」の中位に位置する無病徴の複葉を採取した。複葉は 5 小葉からなり、葉柄, 葉軸, 小葉の葉身, 小葉の中央の葉脈を対象として第 2 章第 1 節に従い microtissue direct RT-PCR により TSWV の検定を行った。RT-PCR 試薬は PrimeScript One-Step RT-PCR Kit Ver. 2 (Dye Plus) (タカラバイオ) を、プライマーは TSWV-A, B (仲ら, 2007b) を用いた。プライマーの濃度は 0.4 μ M とし、反応は液量 10 μ l で実施した。RT 反応を 50°C で 30 分間行い、94°C で 2 分間処理後、PCR は 94°C 30 秒, 60°C 30 秒, 72°C 30 秒を 35 回繰り返す、72°C 5 分間の最終伸長を行った。複葉 14 枚を供試し、各検定部位の TSWV 検出率を求めた。

3) 小葉, 茎および球根での Tissue blot immunoassay による TSWV の検出

小葉は 2015 年 7 月と 10 月に TSWV 感染ダリア「黒蝶」の病徴を示す 10 中位葉を採取した。茎は 2015 年 6 月に TSWV 感染ダリア「黒蝶」を摘心し、脇芽を伸長させ、栄養成長期と開花期のものをそれぞれ 10 本と 9 本採取した。球根は 2014 年 12 月に TSWV 感染ダリア「黒蝶」から 24 球を採取した。

TSWV の検出は、Tissue blot immunoassay を Whitfield et al. (2003) を改変して実施した。ニトロセルロースメンブレン (GE Healthcare Life Sciences) をプラスチック容器内で展着剤添加リン酸緩衝生理食塩水 (PBST ; 塩化ナトリウム 8.0 g, リン酸水素二ナトリウム十二水和物 2.9 g, 塩化カリウム 0.2 g, リン酸二水素カリウム 0.2 g, Tween20 0.5 ml/ℓ) に

15 分間浸漬し、取り出し乾燥させた。茎と球根はカッターナイフで切除した断面の切り口をニトロセルロースメンブレンに約 5 秒間押し付けた。一方で小葉は汁液が出にくいいため、冷凍庫で凍結後、融解させながらニトロセルロースメンブレン 2 枚で挟み込み強く押し付けた。植物汁液を付着させたニトロセルロースメンブレンはプラスチックの容器内で Blocking One (ナカライテスク) を用いて 20 分間ブロッキング処理を行った。余分な Blocking One を濾紙で取り除き、TSWV 抗体 (コーティング液)

(TSWV 検定用試薬 (DAS-ELISA 法), 日本植物防疫協会茨城研究所) を PBST で 4,000 倍希釈し、30 分間の反応を行った。蒸留水ですすぎ、PBST で 5 分間洗浄した後に二次抗体 (Anti-Rabbit IgG (Fc) Alkaline Phosphatase Conjugate, プロメガ) を PBST で 15,000 倍希釈し、10 分間の反応を行った。20 倍希釈した Blocking One で 5 分間、PBST で 10 分間洗浄し、Alkaline phosphate buffer で 5 分間×2 回洗浄した。表面の余分な液を除去し、BCIP/NBT Liquid Substrate System solution (Sigma-Aldrich) を添加し 1 時間の反応を行い、蒸留水で洗浄した。BCIP/NBT Liquid Substrate System solution を除くすべての反応と洗浄の工程は振とうして室温で実施した。BCIP/NBT Liquid Substrate System solution の反応は静置し、暗黒下、室温で実施した。球根の断面の TSWV の分布の評価は以下の指数に基づき実施した。0 : 非検出, 1 : 断面の 0~1/3 に分布, 2 : 断面の 1/3~2/3 に分布, 3 : 断面の 2/3 以上に分布。

結果

1) 葉での TSWV の分布

複葉での TSWV の microtissue direct RT-PCR による検出率は葉柄で最も高く、次に葉軸、葉脈となり、葉身では低く、葉柄から離れるにしたがって検出率が低下する傾向があった (図 2-2-1)。

小葉の汁液は葉脈の中央部を除いてメンブレンに付着しており、ほぼ小葉全体での分布調査ができた。汁液が付着していない部分はメンブレン自体の白色となっている。TSWV は葉脈近辺では安定して分布しており、葉身では特に葉縁で分布しない傾向があった (図 2-2-2)。なお、病徴部では TSWV が安定して検出された。

2) 茎での TSWV の分布

栄養生長期では、茎の上位節は、中位節と下位節に比べて TSWV の検出率が低かった (図 2-2-3)。一方、開花期では、栄養成長期と比べて検出率は上位節では高く、下位節では低い傾向があった (図 2-2-4)。また、花は上位節の茎よりも TSWV の検出率が低かった。

3) 球根での TSWV の分布

TSWV は球根の皮層、師部および木部に主に分布しており、一方で髓での分布は低い傾向にあった (図 2-2-5)。上・中・下位部での TSWV の分布程度

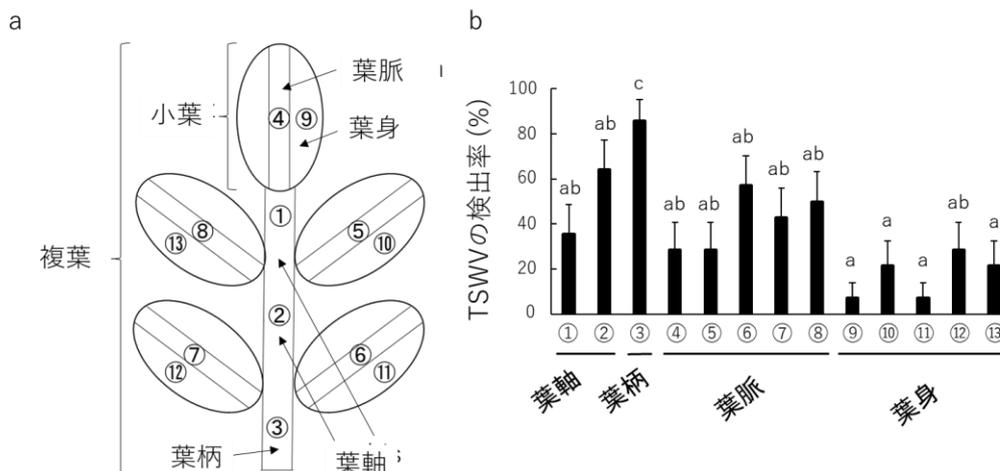


図2-2-1 ダリア複葉の各部位でのTSWVの検出
 a : 検定部位、b : TSWV検出率
 エラーバーは標準誤差を示す。
 異なるアルファベットは部位間で有意差があることを示す (Turkey's WSD、 $p < 0.05$)。
 n=14

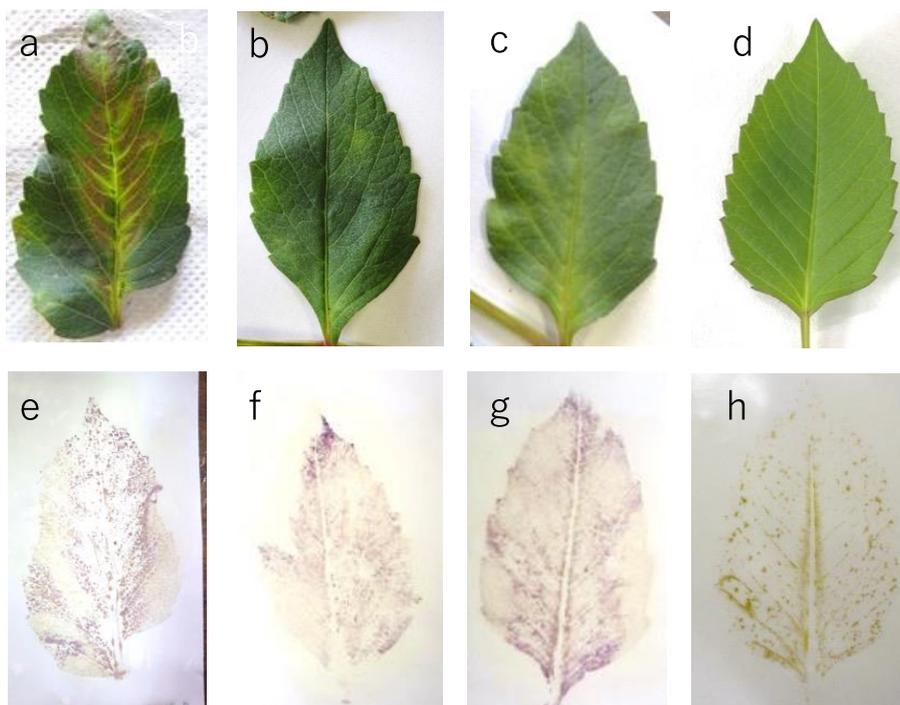


図2-2-2 ダリア小葉でのTSWVの感染分布
 a~c：TSWVに感染した小葉、d：TSWV非感染の小葉、
 e~h：a~dのサンプルでのTSWVの検出結果
 Tissue blot immunoassayによりTSWVを検出。

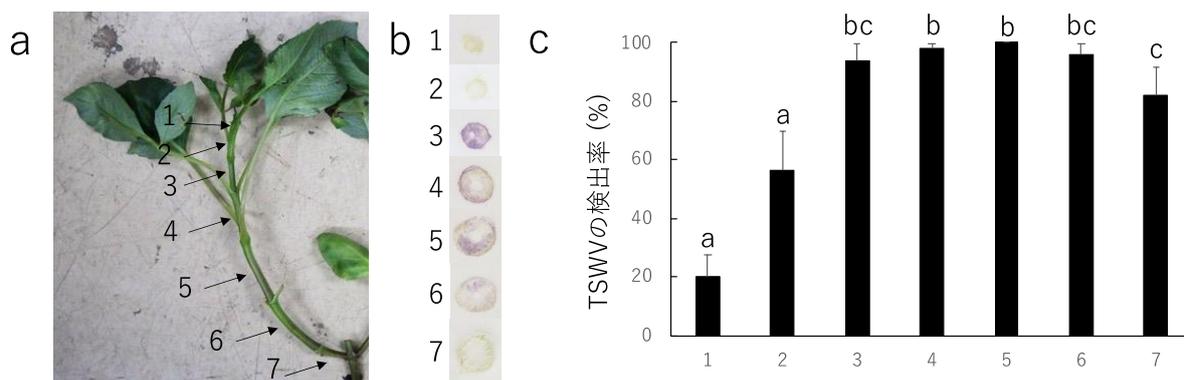


図2-2-3 栄養生長期におけるダリア茎でのTSWVの検出
 a：検定部位、2：茎の節位別でのTSWV検出率
 Tissue blot immunoassayによりTSWVを検出。
 エラーバーは標準誤差を示す。
 異なるアルファベットは部位間で有意差があることを示す (Turkey's WSD、 $p < 0.05$)。
 n=10

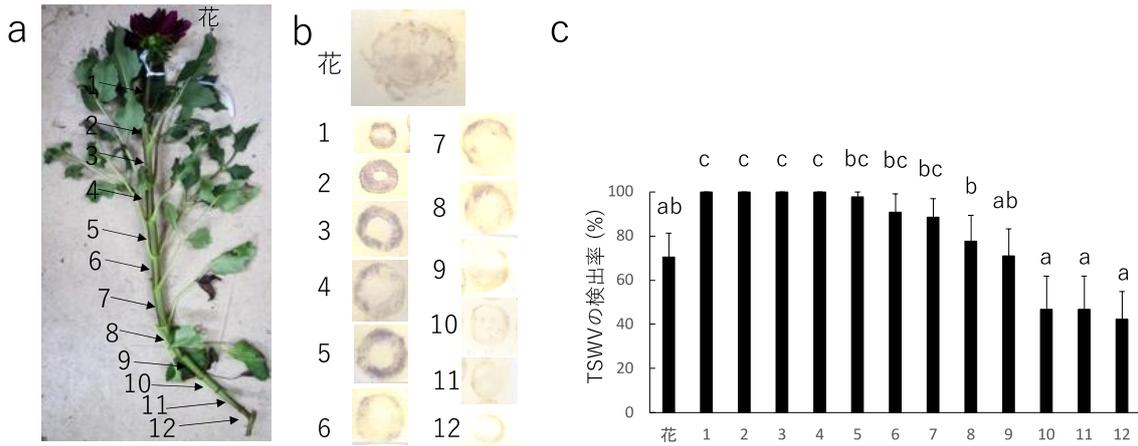


図2-2-4 開花期におけるダリア花および茎でのTSWVの検出
 a：検定部位、b：検出結果の例、c：花および茎の節位別でのTSWV検出率
 Tissue blot immunoassayによりTSWVを検出。
 エラーバーは標準誤差を示す。
 異なるアルファベットは部位間で有意差があることを示す (Turkey's WSD、 $p < 0.05$)。
 n=9

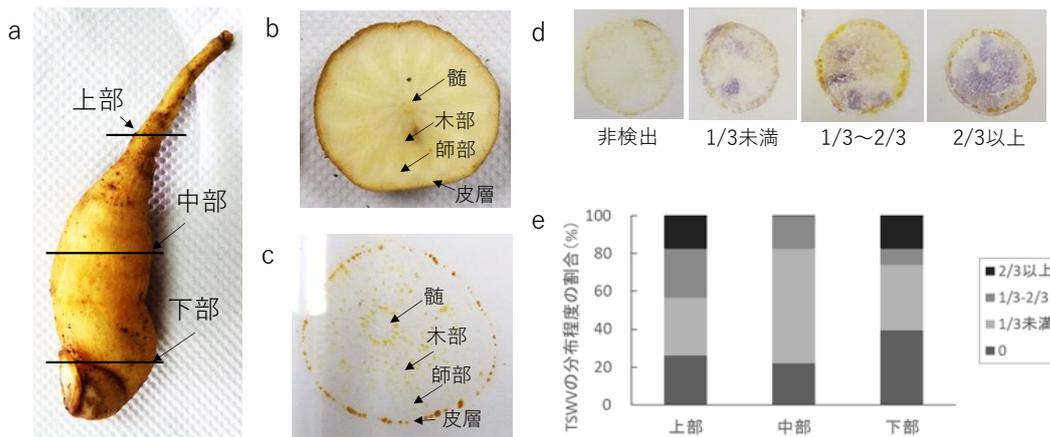


図2-2-5 ダリア球根断面におけるTSWVの分布
 a：球根の検定部位、b：球根断面、c：球根断面のニトロセルロースメンブレンへの付着、
 d：球根におけるTSWVの検出、e：球根の各部位でのTSWVの感染状況
 Tissue blot immunoassayによりTSWVを検出。
 n=24

に大きな差は認められず、いずれの部位も半数以上の個体で TSWV の分布面積は断面の 1/3 未満となり局在性が高かった。

考察

本節では、ダリアでの TSWV の部位別での分布を microtissue direct RT-PCR と Tissue blot immunoassay を用いて明らかにした。ダリアでも TSWV の分布は不

均一であり、これまでに報告があったキクとラナンキュラスと同様の傾向であった (Matsuura et al., 2004 ; Whitefield et al., 2003)。複葉での TSWV の検出率は葉柄から離れるに従って低下し、小葉の葉身で最も検出率が低くなった (図 2-2-1)。同様の結果が小葉での Tissue blot immunoassay での検出でも認められ、葉縁部で最も TSWV が分布しない傾向があった (図 2-2-2)。ただし、病徴部には TSWV が安定して分布しており、病徴が明らかな場合は葉身の病徴部で検定するのは適切である。なお、病徴部にウイ

ルスが分布する傾向は同じオルソトスポウイルス属である melon yellow spot orthotospovirus (Sugiyama et al., 2009) と同様である。葉身での分布が不均一になる原因について、ペチュニアに関しては TSWV の移行がリグニンやフェノール物質の蓄積により抑制されている可能性が示唆されており (Quccini et al., 2007), ダリアでも同様の反応によって TSWV の葉脈から葉身への移行が抑制されている可能性がある。病徴が明瞭なサンプルでも分布の不均一性が確認されていたことから、潜在感染しているサンプルの場合には分布の不均一性がさらに高まる可能性があり、今後の検討が必要である。茎では、栄養生長期と開花期では TSWV の分布の傾向が異なり、茎の伸長と老化が影響していると考えられた (図 2-2-3, 図 2-2-4)。栄養生長期で上位節での検出率が低かった原因は、茎の伸長が TSWV の増殖と移行より早いため、あるいは上位節での増殖と移行が植物体側の防御反応により抑制されている可能性が考えられる。一方、開花期については茎の伸長が止まるため、TSWV の分布が上位へ移行したと考えられるが、花での検出率は上、中位節より低かった。キクでも TSWV の濃度は花芽より中位葉で高くなっており (Matsuura et al., 2004), 本試験と同様に上位節ほど分布しない傾向を示している。開花期において上、中位節と比較して下位節で検出率が低かった原因として、TSWV が光合成同化産物と共に転流によって老化した下位節から上位節へ移動した可能性が考えられる (Hipper et al., 2013)。茎における光合成同化産物の転流についての知見は少ないが、キクの茎で葉と同様に転流が行われていることが確認されている (Adachi et al., 1999)。球根では、TSWV の分布の局在性が特に顕著であり、断面では分布している面積割合が $1/3$ 未満となる個体が半数以上であった (図 2-2-5)。TSWV は主に師管を通じて長距離移動し、そこから細胞間移行により移動・増殖するが、球根ではこの効率が低いと考えられた。

本節での TSWV の分布傾向を考慮すると、分布が最も不均一であった球根はウイルス検定時のサンプリング部位として不適切と考えられる。一方で、複葉、小葉については、検出率が高かった葉柄、葉軸および葉脈がそれぞれ検定部位として適しており、茎については、栄養生長期では中位節が、開花期では上位節が適していると考えられる。なお、サンプリングの容易さと上位と下位での分布の不均一さを考慮すると中位の複葉の葉柄が最も検定部位として

適切と結論づける。なお、ダリアに感染する他の主要なウイルス・ウイロイドでは分布の局在性が報告されたものはないため、TSWV の分布に合わせた検定部位を採用しても問題はないと考える。本節はダリアの部位別での TSWV の分布を調査した初めての報告であり、TSWV の分布の傾向に基づいた検定部位の最適化が、検出の精度の向上に寄与すると考える。

第 3 節 国内のダリア生産圃場におけるトマト黄化えそウイルス、ダリアモザイクウイルスおよびキク矮化ウイロイドの感染状況

緒言

TSWV の国内での初確認は 1965 年にアメリカ合衆国から輸入され隔離検疫中であったダリアからであり (末次, 1969), その後、北海道と奈良県のダリア産地での発生が報告されている (小島, 1984; 仲ら, 2007a; 末松ら, 1978)。TSWV は宿主範囲の広さから他の品目にも感染を拡大させており、国内での品目ごとの初発生は、トマトでは 1972 年に奈良県、ピーマンでは 1972 年に兵庫、タバコでは 1975 年に沖縄県と岩手県で確認されている (津田, 1994)。なお、1994 年以降は TSWV の高効率媒介虫であるミカンキイロの大発生に伴い、TSWV はキク、トマトおよびピーマンを中心にその分布を全国に拡大させた (花田, 1999)。

DMV の国内での感染は 1967 年にダリアで初めて報告されている (土居ら, 1967)。ダリア生産圃場での感染は、末松ら (1978), 仲ら (2007a), 近年では北村 (2016) により確認されている。TSWV とは対照的に宿主範囲の狭さから他の植物種での感染や被害の報告は生産圃場では認められていない (Brunt, 1971)。

CSVd は、日本では大沢ら (1977) により静岡県の子葉で初めて確認された。ダリアでの感染は 2005 年に奈良県で初めて確認され (Nakashima et al., 2007), その後の報告は 2010 年の長野県に限られる (北村, 2016)。一方、キクでは 1980 年代から全国的に発生し、感染株の矮化症状による被害が確認されている。キクに関する報告は多く、三重県 (花田

ら, 1982), 香川県 (楠ら, 1993), 兵庫県 (塩飽ら, 1996), 熊本県 (森山ら, 1996), 北海道 (李ら, 1997), 山形県 (兼松ら, 1998), 新潟県 (杉浦・花田, 1998), 福岡県, 宮崎県, 沖縄県 (花田・酒井, 2001), 静岡県 (土井・加藤, 2004), 福島県, 新潟県, 茨城県, 栃木県, 群馬県, 神奈川県, 三重県, 岡山県, 香川県, 福岡県 (Matsushita et al., 2007), 秋田県 (山本, 2008) など全国各地で CSVd の感染が確認されている。

本節では重点的に対処すべきウイルス・ウイロイド種を明らかにするため, 2013~2017年に北海道, 東北, 信越, 関西, 四国および九州の8道県のダリア産地での感染状況と病徴の有無を調査した。また, 各ウイルス・ウイロイドの無病徴感染株の存在状況を整理することで, 健全株選抜時の RT-PCR 等の有用性を考察した。

材料および方法

1) 検定用ダリアの採取

2014~2017年に8道県のダリア生産圃場から計464株を採取した。その内訳は, 北海道では2014年9月18日に55株, 秋田県では2014年9月10日に47株, 山形県では2014年9月10日に49株, 長野県では2015年10月15日に58株, 奈良県では2014年3月7日, 高知県では2017年1月15日に9株, 福岡県では2014年4月15日に80株, 2016年1月23日に28株, 宮崎県では2014年2月6日に52株, 2016年1月30日に17株である。採取の際に病徴を記録した。

2) ダリアのウイルス・ウイロイドの検定

第2章1節で記述した microtissue direct マルチプレックス RT-PCR を用いて TSWV, DMV および CSVd の検定を行った。検定部位として中位の複葉の葉柄を用いた。

結果

8道県の生産圃場のダリアからは TSWV, DMV および CSVd が高率に検出された (表 2-3-1)。これらのうち2種の複合感染はいずれも確認され, DMV と CSVd の複合感染が最も多かった。一方で3種の複合

感染は確認されなかった。全地域での複合感染を含めた感染株率は, TSWV は 6.3%, DMV は 32.3%, CSVd は 19.8%であった。なお, 非検出は 49.1%であった。優占するウイルス・ウイロイド種は, 奈良県で TSWV, 秋田県, 山形県, 長野県, 福岡県および宮崎県で DMV, また, 北海道で CSVd となり, 地域により異なった。

感染株の病徴は, TSWV 単独感染では, 黄斑+輪紋と黄斑が多く, 一部で黄斑+モザイク, モザイクが確認された (図 2-3-1)。DMV 単独感染では, 葉脈黄化とモザイクが多く, クロロシス, 縮葉, 葉脈黄化+モザイク, 葉脈黄化+矮化も認められた (図 2-3-2)。CSVd 単独感染では, 長野県と高知県で明瞭な矮化症状が確認された (図 2-3-3)。2種の複合感染株では, 複合感染に特異的な病徴は認められず, いずれかのウイルス・ウイロイドの単独感染で確認される病徴と同じであった。単独感染での無病徴感染株の割合は, DMV と CSVd で高くそれぞれ 44.8%と 74.6%であり, 一方で TSWV は 11.5%であった。

考察

本節の調査は, 国内の広範な地域の生産圃場でのウイルス・ウイロイドの感染状況と病徴を整理した初めての報告となる。調査したすべての地域において, TSWV, DMV または CSVd のいずれかの感染が高率に確認されたことから, ダリア生産圃場でのウイルス・ウイロイドの対策の必要性が明確となった。地域によって優占する種は異なっていたが, DMV が最も多くの地域で高頻度で検出された (表 2-3-1)。唯一検出されなかった奈良県では, 茎頂培養由来の株が使用されていたために, 苗による持ち込みを回避できたと推察される。さらに, DMV は宿主範囲が狭く, 野外ではダリア以外の植物での感染は確認されていないため, 外部からの感染リスクが低いことが影響していると考えられた。このことから, DMV の防除には, 健全な苗の利用が有効であることが示唆された。

TSWV は, DMV とは対照的に宿主範囲が広く, 健全な苗を使用しても再汚染のリスクが高い。奈良県では, 苗を10月に定植し, 翌年の2月から翌々年の10月まで長期にわたり収穫する作型であり, 周辺にキクヤトマトなどの宿主となり得る植物も栽培されていた。このような条件下で TSWV 感染株率が高くな

る要因として、アザミウマ類による TSWV の媒介が考えられる。長野県、福岡県および宮崎県は、8月中旬に定植し10月から翌年の5月まで収穫する作型である。栽培期間が奈良県と比較して短く、アザミウマ類の密度が低下する8月に定植することから虫媒伝染のリスクは低くなると考えられた。北海道、秋田県および山形県は、4月に定植し6～11月に収

穫する作型である。冬季の積雪によってアザミウマ類の越冬数が少ないことに加え、冷涼な気候によって密度が低いことが考えられる。しかし、一部に TSWV 感染株率の高い圃場があり、こうした圃場では TSWV 感染株を母株として使用した可能性がある。TSWV の対策には健全な苗の確保とともに、アザミウマ類による再汚染に注意する必要があると考えられた。

表2-3-1 各地域におけるトマト黄化えそウイルス (TSWV)、ダリアモザイクウイルス (DMV) およびキク矮化ウイロイド (CSVd) の検出状況および症状

地域	症状	TSWV	DMV	CSVd	TSWV DMV	TSWV CSVd	DMV CSVd	TSWV DMV CSVd	非検出	合計
北海道	黄斑	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	黄斑 + 輪紋	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	黄斑 + モザイク	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	モザイク	0	2	0	0	0	1	0	0	3
	葉脈黄化	0	2	0	0	0	6	0	0	8
	葉脈黄化 + モザイク	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	葉脈黄化 + 矮化	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	クロロシス	0	0	0	0	0	3	0	0	3
	縮葉	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	矮化	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	無病徴	0	2	22	0	0	8	0	8	40
	合計		0 (0)	7 (12.7)	22 (40.0)	0 (0)	0 (0)	18 (32.7)	0 (0)	8 (14.5)
秋田	黄斑	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	黄斑 + 輪紋	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	黄斑 + モザイク	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	モザイク	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	葉脈黄化	0	10	0	0	0	0	0	0	10
	葉脈黄化 + モザイク	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	葉脈黄化 + 矮化	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	クロロシス	0	3	0	0	0	0	0	0	3
	縮葉	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	矮化	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	無病徴	0	6	2	0	0	1	0	25	34
	合計		0 (0)	19 (40.4)	2 (4.3)	0 (0)	0 (0)	1 (2.1)	0 (0)	25 (53.2)
山形	黄斑	0	0	0	2	0	0	0	0	2
	黄斑 + 輪紋	5	0	0	0	1	0	0	0	6
	黄斑 + モザイク	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	モザイク	0	2	0	0	0	0	0	0	2
	葉脈黄化	0	3	0	0	0	2	0	0	5
	葉脈黄化 + モザイク	0	3	0	0	0	0	0	0	3
	葉脈黄化 + 矮化	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	クロロシス	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	縮葉	0	2	0	0	0	0	0	0	2
	矮化	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	無病徴	0	6	6	0	0	1	0	16	29
	合計		5 (10.2)	16 (32.7)	6 (12.2)	2 (4.1)	1 (2.0)	3 (6.1)	0 (0)	16 (32.7)
長野	黄斑	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	黄斑 + 輪紋	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	黄斑 + モザイク	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	モザイク	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	葉脈黄化	0	4	0	0	0	3	0	0	7
	葉脈黄化 + モザイク	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	葉脈黄化 + 矮化	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	クロロシス	0	3	0	0	0	0	0	0	3
	縮葉	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	矮化	0	0	6	0	0	2	0	0	8
	無病徴	0	11	3	0	0	0	0	26	40
	合計		0 (0)	18 (31.0)	9 (15.5)	0 (0)	0 (0)	5 (8.6)	0 (0)	26 (44.8)

表2-3-1続き 各地域におけるトマト黄化えそウイルス (TSWV)、ダリアモザイクウイルス (DMV) およびキク矮化ウイルス (CSVd) の検出状況および症状

地域	症状	TSWV	DMV	CSVd	TSWV DMV	TSWV CSVd	DMV CSVd	TSWV DMV CSVd	非検出	合計
奈良	黄斑	6	0	0	0	0	0	0	0	6
	黄斑 + 輪紋	10	0	0	0	0	0	0	0	10
	黄斑 + モザイク	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	モザイク	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	葉脈黄化	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	葉脈黄化 + モザイク	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	葉脈黄化 + 矮化	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	クロロシス	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	縮葉	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	矮化	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	無病徴	3	0	1	0	0	0	0	47	51
合計	21 (30.4)	0 (0)	1 (1.4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	47 (68.1)	69
高知	黄斑	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	黄斑 + 輪紋	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	黄斑 + モザイク	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	モザイク	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	葉脈黄化	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	葉脈黄化 + モザイク	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	葉脈黄化 + 矮化	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	クロロシス	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	縮葉	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	矮化	0	0	9	0	0	0	0	0	9
	無病徴	0	0	0	0	0	0	0	0	0
合計	0 (0)	0 (0)	9 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	9
福岡	黄斑	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	黄斑 + 輪紋	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	黄斑 + モザイク	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	モザイク	0	9	0	0	0	0	0	0	9
	葉脈黄化	0	5	0	0	0	3	0	0	8
	葉脈黄化 + モザイク	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	葉脈黄化 + 矮化	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	クロロシス	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	縮葉	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	矮化	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	無病徴	0	22	9	0	0	2	0	57	90
合計	0 (0)	37 (34.3)	9 (8.3)	0 (0)	0 (0)	5 (4.6)	0 (0)	57 (52.8)	108	
宮崎	黄斑	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	黄斑 + 輪紋	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	黄斑 + モザイク	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	モザイク	0	4	0	0	0	0	0	0	4
	葉脈黄化	0	4	0	0	0	0	0	0	4
	葉脈黄化 + モザイク	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	葉脈黄化 + 矮化	0	3	0	0	0	0	0	0	3
	クロロシス	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	縮葉	0	3	0	0	0	0	0	0	3
	矮化	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	無病徴	0	5	1	0	0	0	0	49	55
合計	0 (0)	19 (27.5)	1 (1.4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	49 (71.0)	69	
合計	黄斑	6	0	0	2	0	0	0	0	8
	黄斑 + 輪紋	15	0	0	0	1	0	0	0	16
	黄斑 + モザイク	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	モザイク	1	17	0	0	0	1	0	0	19
	葉脈黄化	0	28	0	0	0	14	0	0	42
	葉脈黄化 + モザイク	0	4	0	0	0	0	0	0	4
	葉脈黄化 + 矮化	0	3	0	0	0	0	0	0	3
	クロロシス	0	7	0	0	0	3	0	0	10
	縮葉	0	5	0	0	0	0	0	0	5
	矮化	0	0	15	0	0	2	0	0	17
	無病徴	3	52	44	0	0	12	0	228	339
合計	26 (5.6)	116 (25.0)	59 (12.7)	2 (0.4)	1 (0.2)	32 (6.9)	0 (0)	228 (49.1)	464	

数字は株数を示し、括弧内の数字は割合 (%) を示す。

TSWV、DMVおよびCSVdの検出はmicrotissue direct マルチプレックスRT-PCRで実施した。



図2-3-1 TSWVによるダリア輪紋病の病徴
a：黄斑、b：輪紋、c：壊疽状の輪紋、d：モザイク

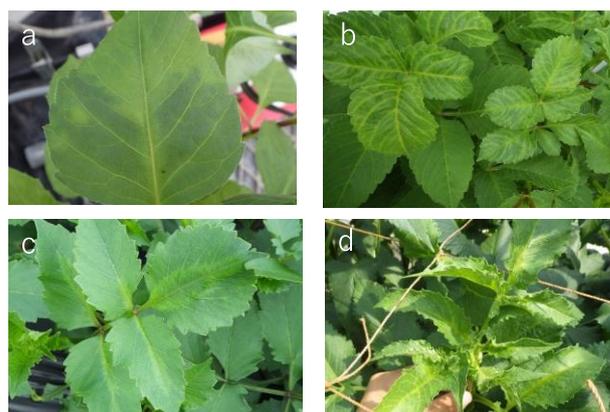


図2-3-2 DMVによるダリアモザイク病の病徴
a：モザイク、b：葉脈黄化、c：稻妻状のクロロシス、d：縮葉



図2-3-3 CSVdによるダリアの矮化症状
植物長が短い状態で出蕾している。

CSVd は、北海道で最も高い感染株率を示し、他の多くの地域でも確認された。キクでの報告 (Matsushita, 2013) によれば、虫媒伝染はなく汁液により伝染することから、感染株を母株とした増殖や管理作業によって感染拡大したと考えられる。しかし、ダリアでの CSVd の汁液接種による感染効率は報告されておらず、さらなる調査が必要である。

TSWV と DMV 感染株の病徴は、既報と同様であり、症状と検出されたウイルス種とは明瞭な相関が見られた。TSWV の主要な症状は、黄斑と輪紋であり、少数の株でモザイクが確認された。DMV については、モザイクと葉脈黄化が主であり、少数の株

で縮葉が確認された。TSWV と DMV, TSWV と CSVd および DMV と CSVd の複合感染も確認されたが、複合感染に特有の症状は確認されなかったことから、単独感染時の病徴を参考にすれば問題はないと考えられる。また、CSVd 感染株では、長野県と高知県で明瞭な矮化症状が認められた。Nakashima et al. (2007) は CSVd 感染株で矮化症状株が存在することを報告したが、いずれも CMV, DMV, TSV または TSWV と複合感染していた。このことから、CSVd 単独感染時のダリアの生育への影響の解明は課題として残されていた。なお、ダリアの切り花は栽培期間中に3~4回の収穫が行われるため、現地圃場では周辺の株との切り戻しの時期が異なると矮化症状による生育差の判別がつきにくくなる。長野県と高知県での矮化症状が確認できたのは、切り戻しの時期が同一であった CSVd 感染株と健全株が近接していたためである。そのため、他の地域で無病徴と判定した CSVd 感染株にも矮化症状を示していた株が混在している可能性は否定できない。CSVd のダリアに対する病徴の解明のため、接種試験での生育評価が必要であり、CSVd を防除の対象とすべきかの結論が待たれる。

無病徴感染株は、TSWV と比較して、DMV と CSVd で高く、これらの健全株の選抜は目視のみでは困難となるため、RT-PCR 等の高感度での検出方法を用いた選抜方法が有用と考えられる。目視のみでの選抜を行う際には、CSVd の病徴は矮化であることから、周辺の健全株との生育差に基づく判断が必要になる。そのため、切り花生産圃場から親株を選抜する際には生育期間を通じて健全である株を記録することが妥当である。

なお、調査の対象外とした TSV と CMV については、葉にモザイク症状を示すものの DMV ほど明瞭ではないことが報告されている (Albouy, 1995)。病徴を示した株のうち、対象としたウイルス・ウイロイドが検出されなかった株が存在しなかったことから、TSV と CMV がダリアの生産に及ぼす影響は小さいと考えられる。また、INSV は国内のダリアでの感染報告はないものの、その症状は TSWV と類似している (Albouy, 1995)。しかし、黄斑や輪紋を示すすべての株からは TSWV が検出されたことから、INSV によるリスクは低いと考えられる。

本節では、TSWV, DMV および CSVd が国内の生産圃場で幅広く感染していることに加え主要な病徴を明らかにしたことで、ウイルス・ウイロイド対

策の重要性が明確になった。ここでの情報に基づき生産圃場での感染株の抜き取り、健全株の選抜が推進されることを期待する。

第3章 ダリア生産圃場におけるトマト黄化えそウイルスの防除技術の確立

第1節 トマト黄化えそウイルスを媒介するアザミウマ類の発生消長

緒言

ダリアに限らず球根生産の経営では、病害虫に汚染されていない球根を供給することが重要である。特に、ウイルス病は農薬処理により防除できないため、ウイルスに感染していない球根を安定供給できる体制の構築が求められる。

奈良県のダリア球根生産では TSWV に引き起こされるダリア輪紋病による被害が最も顕著である (仲ら, 2007a)。ダリア輪紋病の病徴は、葉では黄斑、輪紋、輪紋状のえそ及び稲妻状の黄変、茎や葉柄ではえそ条斑、塊根ではあざ状のえそ条斑を生じ、生育が抑制され枯死することもある (Albouy, 1995)。TSWV は、ブニヤウイルス科オルソトスポウイルス属に分類されており (de Haan et al., 1991)、その宿主範囲は広く、ダリアを含む 1,000 種以上の植物種での感染が報告されている (Parrella et al., 2003)。アザミウマ類により虫媒伝染し、その媒介種としてヒラズハナアザミウマ (*Frankliniella intonsa*; 以下、ヒラズハナ)、ミカンキイロアザミウマ (*F. occidentalis*; 以下、ミカンキイロ)、ダイズウスイロアザミウマ (*Thrips setosus*)、ネギアザミウマ (*T. tabaci*) などが報告されている (Riley et al., 2011)。アザミウマ類による TSWV の獲得は、若齢幼虫のみであり、潜伏期間を経た後、老齢幼虫と成虫が永続的にウイルスを伝搬する (Riley et al., 2011; 津田, 2000)。なお、アザミウマ類での TSWV の経卵伝染は確認されていない。植物汁液中では、TSWV の感染性が顕著に低下することが知られ (Culbreath et al., 2003)、ダリアでも植物同士の接触や管理作業での感染拡大の可能性は低いと考えられる。圃場レベルでの TSWV の感染拡大にアザミウマ類が影響してい

ることは、タバコ等の様々な作物で報告されており (McPherson et al., 1999 ; Olatinwo et al., 2008), ダリアにおいても, 殺虫剤散布でのアザミウマ類の防除により, TSWV の感染拡大の抑制効果が確認されている (Asjes・Blom-Barnhoorn, 1997)。

これらのことからダリア輪紋病の防除対策として, アザミウマ類の防除による伝染環の遮断が有効と考えられる。そこで, 本節では殺虫剤の散布適期を探るため, アザミウマ類の発生活長と TSWV 保毒率の推移を調査した。

材料および方法

1) 球根生産圃場におけるアザミウマ類の発生活長

奈良県内の球根生産圃場 3ヶ所で 2014 年 4~12 月に, 青色粘着板 (257 mm×100 mm, アリスタライフサイエンス) を用いてアザミウマ類の発生活長量を調査した。圃場の中央部と周縁部に各 1 枚の粘着板を地面から 1 m の高さに設置した。調査期間中は概ね 1 週間間隔で粘着板を回収, 設置した。粘着板に付着したアザミウマ類のうち TSWV 媒介能を有するヒラズハナとミカンキイロを計数した。なお, 種の同定は井村 (2011) に従って実体顕微鏡下で行った。

2) アザミウマ類からの TSWV の検出

青色粘着板に付着したミカンキイロとヒラズハナからの TSWV の検出は Okazaki et al. (2007) に従って DAS-ELISA (double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay) により行った。TSWV 抗体 (コーティング液, agdia) を炭酸バッファーで 500 倍に希釈し, エライザプレートのウェルに 100 μ l ずつ分注した後, 4°C で一晩静置した。液を捨て, PBST で 3 回洗浄した。粘着板から剥がしたアザミウマ類を 0.5 ml チューブに入れ, 摩砕液 100 μ l を加えて摩砕した。これをウェルに全量分注し, 4°C で一晩静置した。液を捨て, PBST で 3 回洗浄した。TSWV 抗体 (コンジュゲート液, 日本植物防疫協会) を PBST で 500 倍に希釈し, ウェルに 100 μ l ずつ分注し, 37°C で 2 時間静置した。液を捨て, PBST で 5 回洗浄した。P-ニトロフェニルリン酸 2 ナトリウムを 1 mg/ml 溶解した 10% ジェタノールアミン溶液をウェルに 200 μ l ずつ分注した。1 時間後に 405 nm の吸光度を測定した。2014 年の 5~11 月に捕獲したミカンキイロとヒラズハナを 1

個体ずつ検定した。

結果

5~11 月の調査期間を通じてヒラズハナまたはミカンキイロの発生が確認された (図 3-1-1)。3 圃場すべてでヒラズハナが優占種であり, 発生量はミカンキイロの約 30 倍であった。ヒラズハナは 5 月上旬に発生が確認され, 6~7 月に発生のピークを迎え, 12 月上旬に発生が確認されなくなった。ミカンキイロは 5 月上旬に発生が確認され, 5 月下旬に発生のピークを迎え, その後 7 月にも小さなピークが確認され, 10 月下旬に発生が確認されなくなった。TSWV の検出はヒラズハナでは 5~11 月で 6 月を除き確認された (表 3-1-1)。その検出率は 10 月と 11 月に 10% 前後と高い傾向があり, その他の時期では 1% 程度であった。一方で, ミカンキイロは捕獲数が少なかったが, 5 月と 8 月にいずれも 1 匹から TSWV が検出された。

考察

生産圃場における TSWV の虫媒伝染リスクの評価は, 防除対策の構築に役立つと考えられる。本節では, 奈良県のダリアの球根生産圃場における TSWV を媒介するアザミウマ類の発生活長と保毒状況を明らかにした。奈良県の球根生産圃場ではヒラズハナが優占しており, 6~7 月に発生のピークを迎える発生活長を示した (図 3-1-1)。2008 年に調査した際にも本種が優占しており (未発表), 奈良県のダリア生産圃場では種の構成に大きな変動はなかったと言える。

ヒラズハナの発生活長の特徴となる 6~7 月の発生のピークと, その後に減少に転じる傾向は他の報告と同様であった (八谷, 1991 ; 村井, 1988 ; 新山・佐藤, 2000)。ヒラズハナの産卵から羽化までの発育零点は 11~12°C, 有効積算温度は約 130 日度である。また成虫の平均寿命は 20°C で 88 日, 25°C で 52 日であり, 15°C で 180 日以上である (村井, 1988)。また世代の違いと思われるピークが認められなかったことから, それぞれの生育ステージが混在していたと考えられる。なお, 露地での越冬態は未交尾雌成虫とされており (村井, 1988), 5 月に確認された

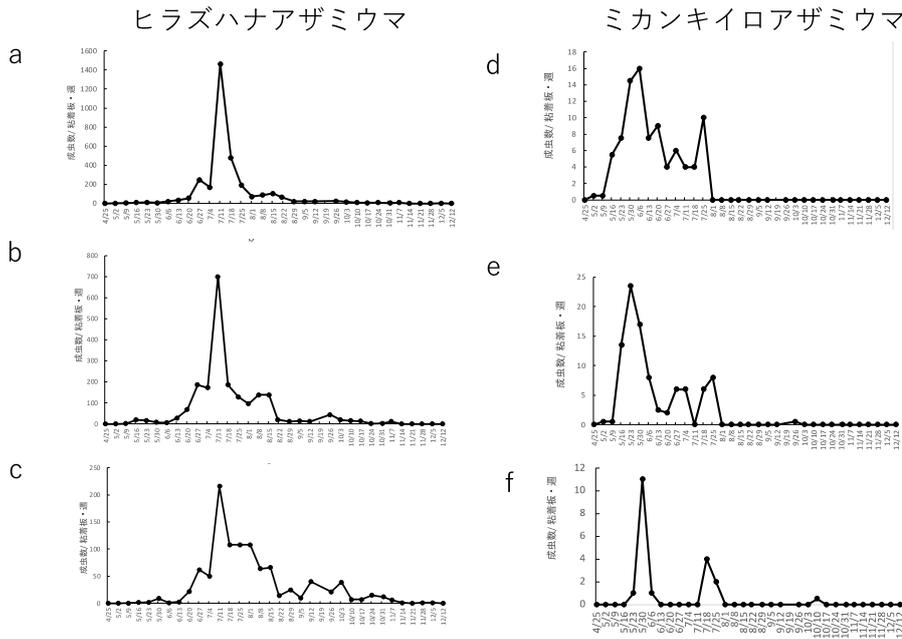


図3-1-1 奈良県のダリア球根生産圃場でのヒラズハナアザミウマとミカンキイロアザミウマの発生数の推移 (2014年)
 a~c: ヒラズハナアザミウマ, d~f: ミカンキイロアザミウマ
 青色粘着板に捕捉された成虫数を計測した。
 各図は1圃場での調査結果を示している。aとd、bとe、cとfは同一圃場の結果を示す。

表3-1-1 粘着板に捕捉されたアザミウマ類のトマト黄化えそウイルス (TSWV) の保毒状況

アザミウマ類	圃場	5/2	5/9	5/16	6/20	7/23	8/21	9/12	10/10	11/7
ヒラズハナ	a	0/2 ^a	0/5	1/14	0/30	0/29	1/45	1/33	3/26	0/12
	b	-	0/3	0/35	0/20	0/27	0/10	0/10	2/37	0/6
	c	-	0/1	0/3	0/20	1/28	0/28	1/47	2/27	13/72
	合計	0/2	0/9	1/52	0/70	1/84	1/73	2/90	7/90	13/90
ミカンキイロ	a	0/1	0/1	0/11	0/18	0/1	0/1	-	-	-
	b	1/1	0/1	0/27	0/2	0/3	-	-	-	-
	c	-	-	-	-	0/2	1/6	-	-	-
	合計	1/2	0/2	0/38	0/20	0/6	1/7	-	-	-

^aTSWV保毒アザミウマ数/調査数

個体は越冬明けの個体と考えられる。終息時期については、年次変動が認められることがあり (村井, 1988), 本試験では12月が終息時期となったが, 1年間のみの調査であることから変動する可能性を考慮する必要がある。

ミカンキイロの発生ピークは5~7月であり, この傾向は他の報告と概ね同様であった (青木・高橋 1995; 森下, 2005)。ミカンキイロの産卵から羽化までの発育零点は9.5℃とヒラズハナよりやや低く, 有効積算温度は約194日度である (片山, 1998)。な

お, ミカンキイロは成虫あるいは幼虫で越冬することが知られている (片山, 2006)。本種は短日条件でも休眠しないため, 越冬植物上で産卵や発育を行っている。ダリアの球根生産圃場では冬期にダリアの植物体がないため, 周辺雑草での越冬の可能性が考えられる。

ヒラズハナおよびミカンキイロの TSWV の保毒が栽培期間を通じて確認されたことから, 虫媒伝染の対策を行う必要がある。効率的な殺虫剤の散布時期は, ヒラズハナの発生の増加時期である5, 6月と考

えられた。なお、ダリアの球根の定植時期は5、6月であることから、植物体が小さいため殺虫剤の付着も良い時期となる。また、TSWV はオニノゲシ、ハキダメギクおよびオランダミミナグサなどの雑草に感染し、これらが重要な伝染源となることが知られている (Hobbs・Black, 1993 ; 岡崎, 2011)。本節でアザミウマ類が獲得した TSWV の由来がダリアであるか雑草であるかは明らかでない。このことから周辺雑草の TSWV の感染状況の調査による主要な伝染源の明確化が今後の課題として残されている。

第2節 防虫ネット被覆によるトマト黄化えそウイルスの防除効果

緒言

TSWV は管理作業による接触伝染の効率が低いことが知られており (Culbreath et al., 2003), ダリア生産においても TSWV の主要な対策は媒介虫であるアザミウマ類の防除等による伝染環の遮断となる。国内のダリアの球根および切り花生産圃場では、圃場全面で TSWV に感染する事例が確認されており、アザミウマ類による虫媒伝染の可能性が疑われた。TSWV 媒介能を持つヒラズハナとミカンキイロは殺虫剤に対する抵抗性を発達させている (藤森ら, 2023 ; 山口, 2021)。これらに対して効果が期待できる薬剤が少なく、今後も感受性の低下が進むと考えられる。そのため、殺虫剤に頼らない防除方法の導入が求められており、TSWV 等のアザミウマ類媒介性のウイルス病についても、ネット被覆による物理的防除が検討されている (藤永ら, 2007)。ヒラズハナとミカンキイロの成虫の体長はそれぞれ 1.2 mm, 1.3 mm であり、0.4 mm 目合のネットはアザミウマ類の侵入対策に用いられ、高い侵入防止効果が確認されている (桑原ら, 2013)。

そこで、現地での実用性を明らかにするため、施設栽培における防虫ネット被覆による TSWV の感染抑制効果を評価した。

材料および方法

1) 切り花生産圃場におけるアザミウマ類の発生消長

奈良県内の施設の切り花生産圃場 1ヶ所で 2014 年 5~8 月に第 3 第 1 節と同様の手法で青色粘着板を用いてアザミウマ類の発生消長量を調査した。ハウスの中央部と周縁部に各 1 枚の粘着板を地面から 1 m の高さに設置した。粘着板は 2014 年 4 月 11 日に設置し、その後の設置および回収は月に 1 または 2 回の間隔で実施した。なお、種の同定は井村 (2011) に従って実体顕微鏡下で行った。

2) アザミウマ類からの TSWV の検出

青色粘着板に付着したヒラズハナとミカンキイロからの TSWV の検出は第 3 章第 1 節と同様の DAS-ELISA 法で行った。同一の日に回収した粘着板に付着したアザミウマ類 6~13 個体をまとめて TSWV の検定を行った。なお、検定はヒラズハナとミカンキイロを分けて実施した。使用した粘着板の回収は 2014 年 6 月 25 日, 7 月 11, 18 日, 8 月 22 日に行った。

3) ダリア切り花生産圃場でのネット被覆と TSWV の感染および発病調査

2014 年 4 月 11 日に施設切り花生産圃場内に 0.4 mm 目合ネットを被覆した隔離区 2ヶ所を設置した (幅 1.5 m, 長さ 3 m, 高さ 2 m)。各隔離区にはそれぞれダリア 12 株と 8 株が含まれている。TSWV 感染ダリアは栽培ハウスから 1.5 m の距離で生育していた。RT-PCR による TSWV の感染調査は、隔離区とネット被覆がない慣行区でそれぞれ 20 株と 40 株を対象とした。調査は 2014 年 5 月 9 日, 6 月 13 日, 7 月 11 日, 10 月 9 日, 11 月 17 日に実施した。目視での TSWV による黄化えそ病の発病調査は 2014 年 8 月 12 日に行い、ネット被覆区と対照区を合わせて 588 株で実施し、位置別での発病株率を算出した。

4) ダリアからの TSWV の検出

TSWV の検出は Hosokawa et al. (2006) に従い microtissue direct RT-qPCR により行った。One Step TB Green PrimeScrip PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (タカラバイオ) を用いた。試薬の濃度はプロトコールに準じ、TSWV 特異的プライマー 5' GCTTCCCACCCCTTTGATTC 3', 5' ATAGCCAAGACA AACTGATC 3' (Rotenberg et al., 2009) の濃度は 0.4 μ M, 反応液量は 10 μ l で実施した。昆虫針 (有頭シガ昆虫針 3 号, 志賀昆虫普及社) でダリア

中位葉の葉柄を3回刺した後、昆虫針をRT-PCR反応液に浸漬した。すなわち針先についた植物汁液をプレートとして使用した。RT反応を42℃で5分間行い、95℃で10秒間処理後、PCRは95℃5秒、60℃34秒を30回繰り返した。

結果

切り花生産圃場でのヒラズハナの発生は6月に確認され始め、7月にピークとなった(図3-2-1)。ミカンキイロは7月に発生が確認され始めたものの、その後の発生量の増加は認められなかった。アザミウマ類のTSWV保毒はヒラズハナでは6月および7月に確認され、一方、ミカンキイロでは認められなかった(表3-2-1)。慣行区でのダリアのTSWV感染は8月に初確認され、その時点での感染株率は40%と急激に感染が拡大しており、最終調査日である11月には感染株率は80%に達した(図3-2-2)。一方のネット被覆がされている隔離区では感染は9月に初確認されたものの、いずれの時点でも感染株率は慣行区よりも大幅に低かった。8月の発病株率の圃場内での分布は、ハウス外の伝染源に近いハウスサイド側で高く、ハウスの中心部ほど低くなる傾向が認められた(図3-2-3)。

考察

ウイルス病対策の基本は伝染環の遮断であり、ダリア生産におけるTSWVの防除に関しても同様と考えられた。そこで現地のTSWV発生圃場を対象として、防虫ネットの被覆によるアザミウマ類媒介での感染拡大の抑制効果を評価した。

ダリアの切り花生産圃場でのアザミウマ類の優占種は前節で示した球根生産圃場と同様にヒラズハナであり(図3-2-1)、発消長についても同様の傾向を示した。また、ヒラズハナにおいてTSWVの保毒が6月下旬~7月中旬に確認され(表3-2-1)、ダリアへの感染が短期間で急激に拡大したことから(図3-2-2)、アザミウマ類のTSWVの媒介能力は非常に高いことが明らかとなった。なお、伝染源付近で特にTSWVの感染株率が高く(図3-2-3)、ハウス外のTSWV感染株から保毒したアザミウマ類が関与したと考えるのが妥当である。他の作物においても

TSWVの感染拡大には媒介虫であるアザミウマ類が関わっており(Chatzivassiliou, 2008; Matsuura et al., 2002)、アザミウマ類の数が少ない条件でも圃場全体に感染が拡大した事例が報告されている。

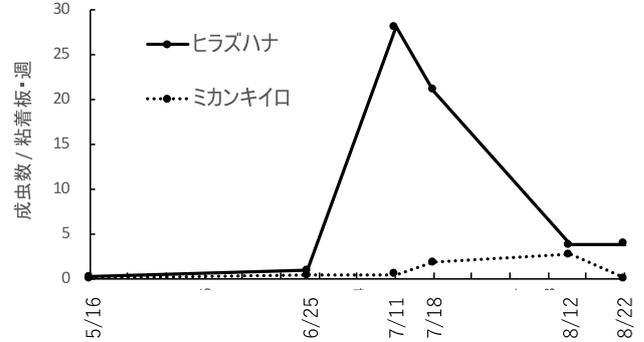


図3-2-1 ダリア切り花圃場におけるアザミウマ類の発生数の推移
青色粘着板に捕捉された成虫数を計測

表3-2-1 切り花生産圃場におけるアザミウマ類からのTSWVの検出

種	6/25	7/11	7/18	8/22
ヒラズハナ	検出	検出	検出	非検出
ミカンキイロ	非検出	n.d. ^a	n.d.	n.d.

TSWVの検出は、青色粘着板に付着したアザミウマ6~13匹をまとめてDAS-ELISAで実施した。

^a no data

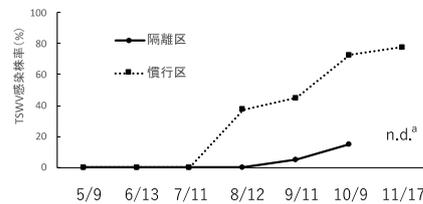


図3-2-2 切り花生産圃場における防虫ネット被覆がダリアのTSWV感染に及ぼす影響
隔離区は0.4mm目合ネットで被覆。
隔離区、慣行区についてそれぞれ20株、40株を調査。
TSWVはmicrotissue direct RT-qPCRで検定。
^a no data

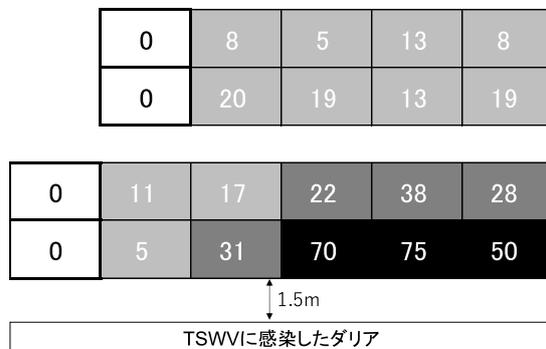


図3-2-3 切り花圃場におけるダリア輪紋病の発生分布
2014年8月12日に目視により調査を実施。
数字は感染株率(%)であり、区画の色の濃さは感染株率の高さを示す。
太字で囲まれた区画が0.4mm目合ネットを被覆した隔離区。
区画あたりのダリア株数はネット被覆は4~6株、慣行区は21~40株。