



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

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2024-03-05

(Date of Publication)

2025-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3442号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490198>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

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

令和 6 年 1 月

神戸大学大学院農学研究科

浅野峻介

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、現在も多くの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 orthotospovirus ; 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 (末松ら 1978、仲ら 2007a)。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、ポスピウイルス科に属しており、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 (Palukaitis and Symons 1980、Matsushita 2013)。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・ウイルス病の防除の基本は、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 (本多 2010、愛知県農業総合試験場 2013)。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。

ダリアに関しても、上述のように対象となるウイルス・ウイルス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・ウイルス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 (末松ら 1978、北村 2016)、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・ウイルスのうち 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 (Whitefield et al. 2003、Matsuura et al. 2004)、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 (McPherson et al. 1999、

Asjes and Blom-Barnhoorn 2001、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かったため、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 (末松ら 1978、仲ら 2007a)。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 (Matsushita et al. 2010、Song et al. 2013、Hayahi et al. 2018)、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、植物体を磨碎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。

I. 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 100mg 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 $0.4\mu\text{M}$ とした。反応は液量 $10\mu\text{L}$ で実施し、テンプレートの total RNA は 1 反応につき 1ng 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 $0.4\mu\text{M}$ の濃度で用いた。反応は液量 $10\mu\text{L}$ 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 $1.0 \times 10^0 \sim 10^{-7}\text{ng}$ 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。

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3130Genetic 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 249bp 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、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 (Song et al. 2013、Hayahi et al. 2018)。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 (Hosokawa et al. 2006、Hayahi et al. 2018)、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。

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	GGAGTAAGCCCGTGGAACCTTAG		

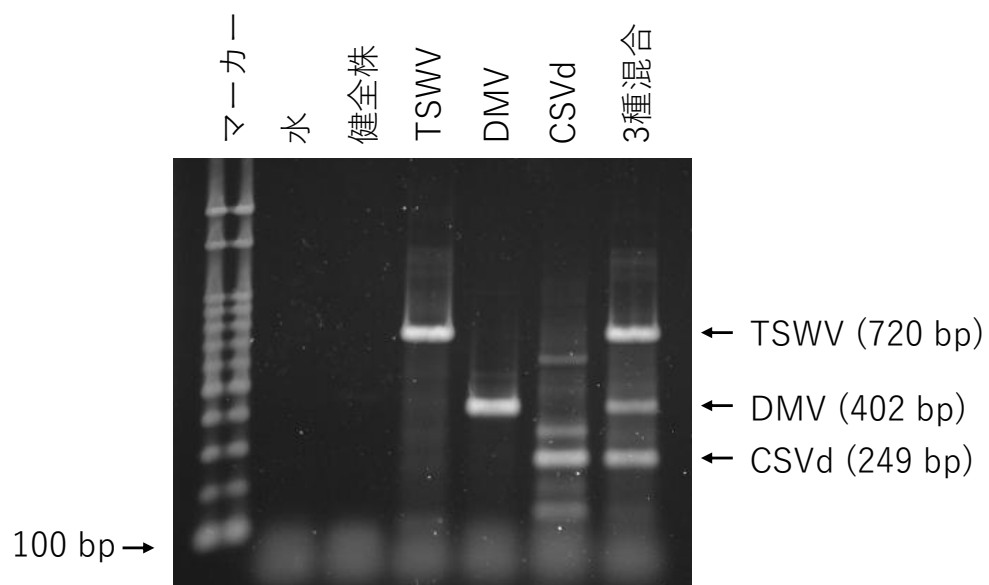


図2-1-1 マルチプレックスRT-PCRによるダリアからのトマト黄化えそウイルス (TSWV)、ダリアモザイクウイルス (DMV) およびキク矮化ウイロイド (CSVd) の同時検出

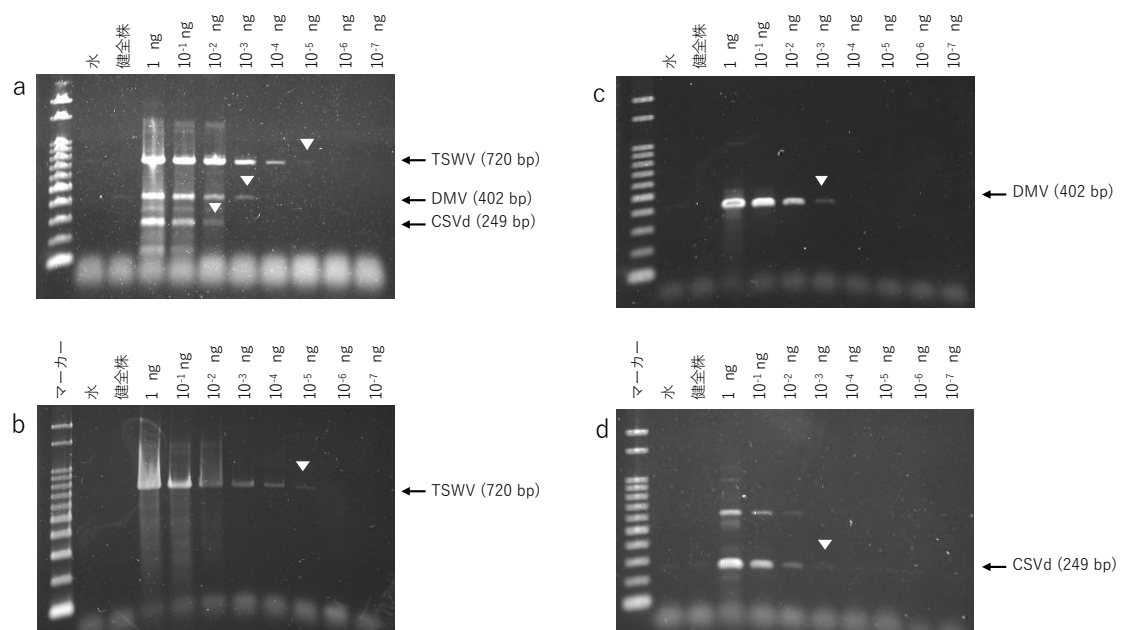


図2-1-2 マルチプレックスRT-PCRとシングルRT-PCR の検出感度の比較
a: トマト黄化えそウイルス (TSWV)、ダリアモザイクウイルス (DMV) 及びキク矮化ウイロイド (CSVd)、b: TSWV、c: DMV、d: CSVd
1~10⁻⁷ngのRNAをテンプレートとして使用した。
矢印は検出限界のバンドを示す。

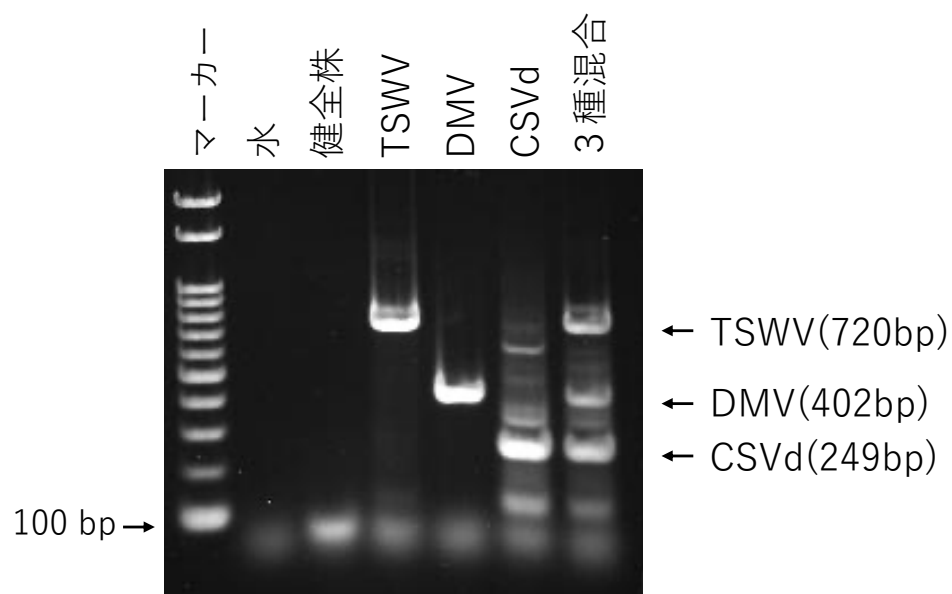


図2-1-3 マルチプレックスmicrotissue direct RT-PCR によるダリアからのトマト黄化えそウイルス (TSWV)、ダリアモザイクウイルス (DMV) およびキク矮化ウイロイド (CSVd) の同時検出

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 100mg 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（Whitefield et al. 2003、Matsuura et al. 2004）。TSWV は、ブニヤウイルス科オルトスポウイルス属に分類されており、同属である melon yellow spot orthotospovirus（Sugiyama et al. 2009）や iris yellow spot orthotospovirus（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の分類されており、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で比較し、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、15cm 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 $0.4\mu\text{M}$ とし、反応は液量 $10\mu\text{l}$ 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 回繰り返し、 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 8.0g、リン酸水素二ナトリウム十二水和物 2.9g、塩化カリウム 0.2g、リン酸二水素カリウム 0.2g、Tween20 0.5ml /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ので、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 x 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（Whitefield et al. 2003、Matsuura et al. 2004）。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 (Quencini 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。

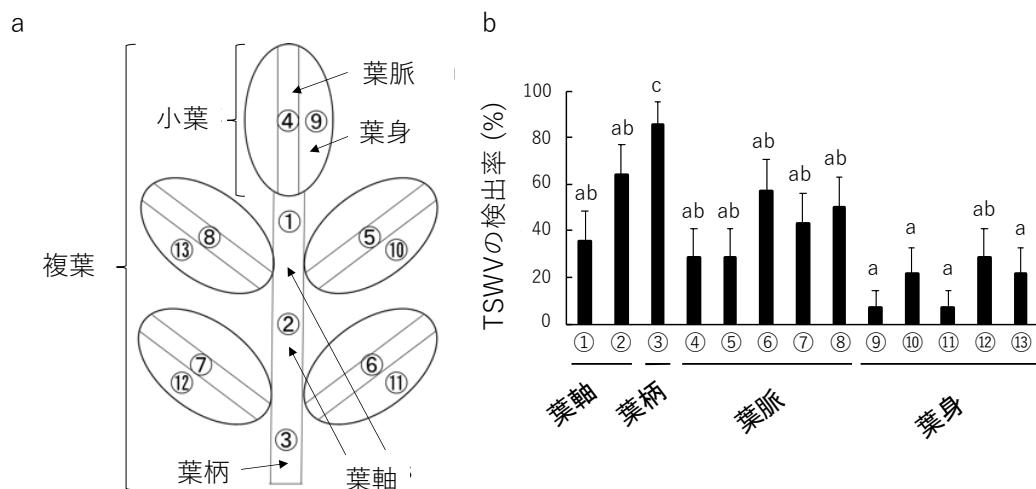


図2-2-1 ダリア複葉の各部位でのTSWVの検出

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

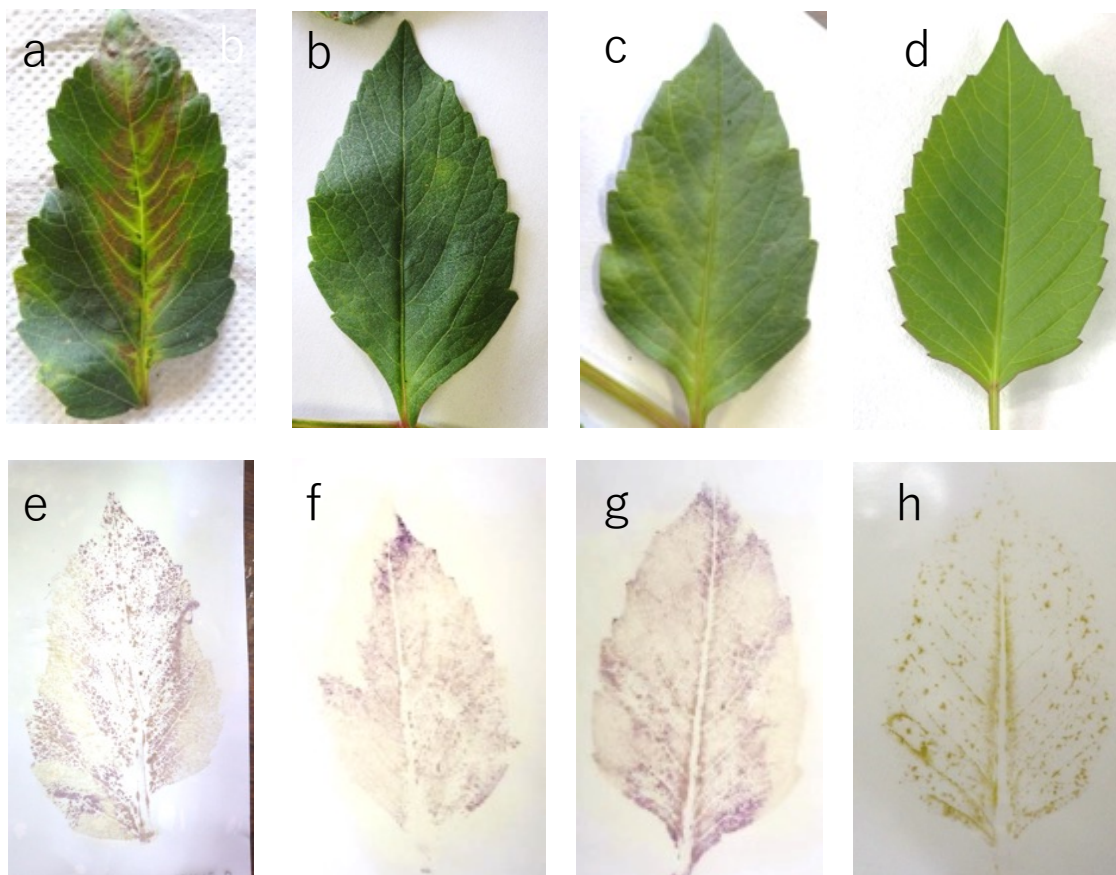


図2-2-2 ダリア小葉でのTSWVの感染分布
 a～c：TSWVに感染した小葉、d：TSWV非感染の小葉、
 e～h：a～dのサンプルでのTSWVの検出結果
 Tissue blot immunoassayによりTSWVを検出。

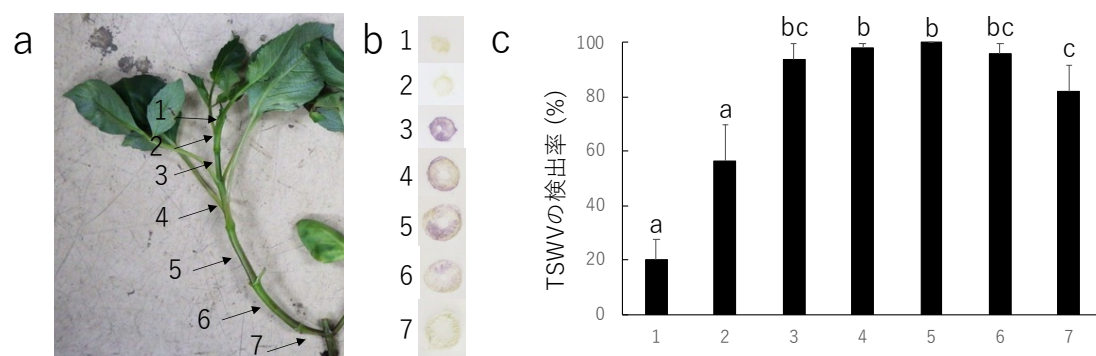


図2-2-3 栄養生長期におけるダリア茎でのTSWVの検出

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

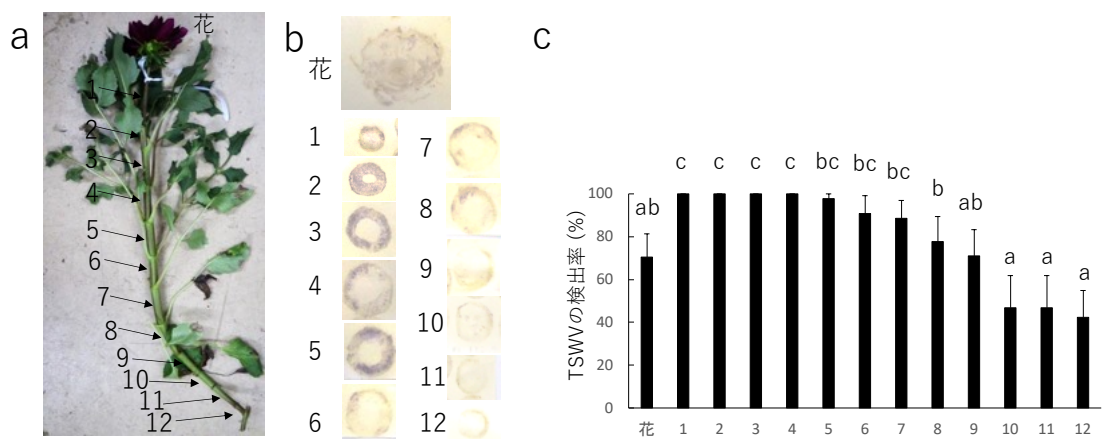


図2-2-4 開花期におけるダリア花および茎でのTSWVの検出
a：検定部位、b：検出結果の例、c：花および茎の節位別でのTSWV検出率
Tissue blot immunoassayによりTSWVを検出。
エラーバーは標準誤差を示す。
異なるアルファベットは部位間で有意差があることを示す (Turkey's WSD、 $p < 0.05$)。
n=9

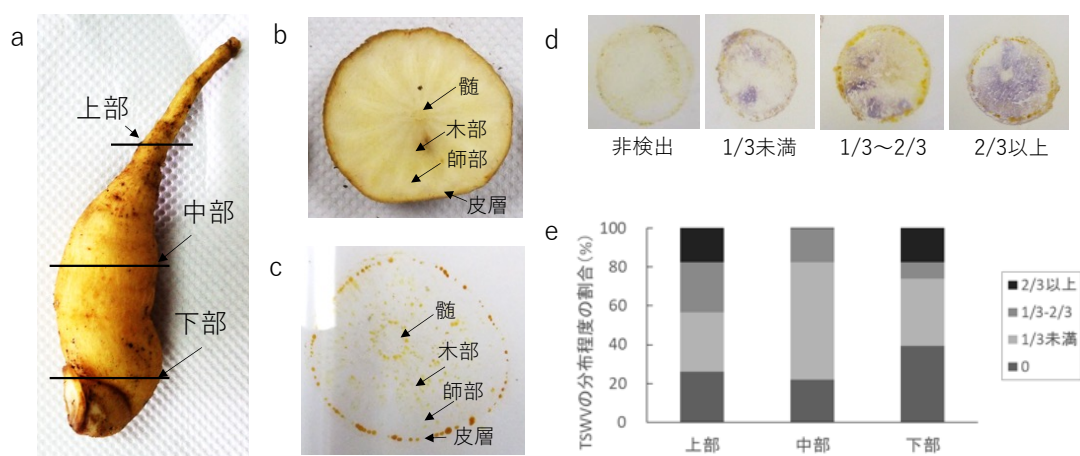


図2-2-5 ダリア球根断面におけるTSWVの分布

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、5: 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

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ィロイドの感染状況

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（末松ら 1978、小畠 1984、仲ら 2007a）。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アザミウマの大発生に伴い、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）、近年では北村ら（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）により静岡県のカキ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、カキでは 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。カキ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・ウィ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・ウィ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、周辺にキクや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。

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。

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
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)	55
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)	47
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)	49
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)	58

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)	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)	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

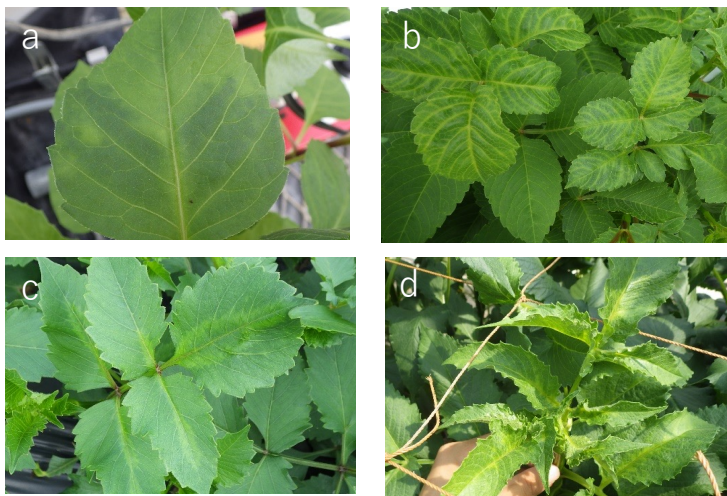


図2-3-2 DMVによるダリアモザイク病の病徴

a：モザイク、b：葉脈黄化、c：稲妻状のクロロシス、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。

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活長

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（津田 2000、Riley et al. 2011）。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 and Blom-Barnhoorn 2001）。

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 1m 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アザミウマ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を 0.5ml チューブに入れ、摩砕液 100ul 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 1mg/ml 溶解した 10%ジエ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 405nm 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動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アザミウマが優占しており、6～7 月に発生のピークを迎える発生活動を示した（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°C 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 and 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。

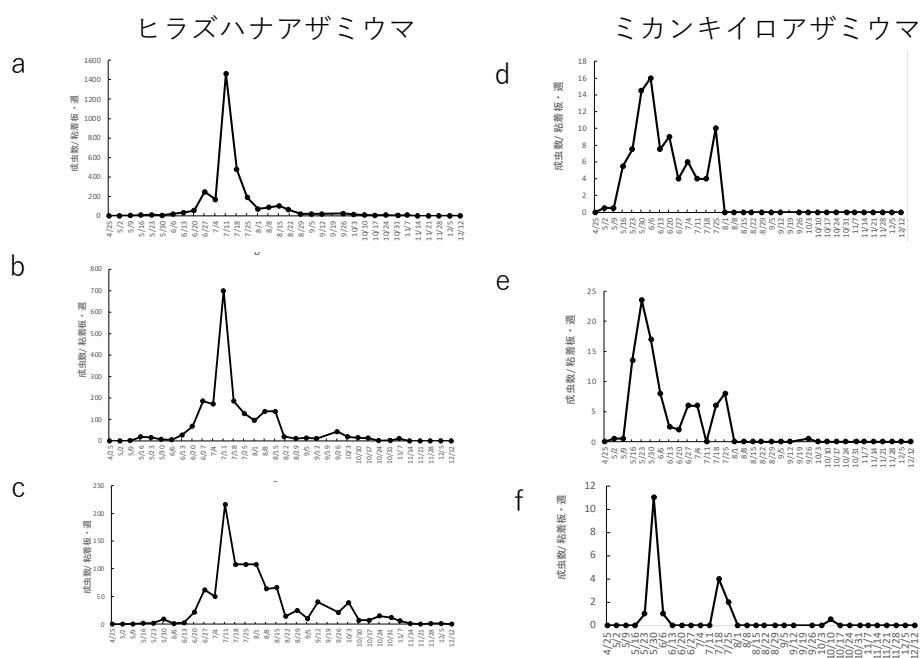


図3-1-1 奈良県のダリア球根生産圃場でのヒラズハナアザミウマと
ミカンキイロアザミウマの発生数の推移（2014年）
a～c：ヒラズハナアザミウマ、d～f：ミカンキイロアザミウマ
青色粘着板に捕捉された成虫数を計測した。
各図は1圃場での調査結果を示している。aとd、bとe、cとfは同一圃場の結果を示す。

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

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 (山口ら 2021、藤森ら 2023)。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 1.2mm、1.3mm であり、0.4mm 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 1m の高さに設置した。粘着版は 2014 年 4 月 11 日にハウスの設置し、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。使用した粘着版の回収は 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 0.4mm 目合ネットを被覆した隔離区 2 ヶ所を設置した (幅 1.5m、長さ 3m、高さ 2m)。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 1.5m 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ルに準じ、TSWV 特異的プライマー 5' GCTTCCCACCCCTTTGATTC 3'、5' ATAGCCAAGACAACACTGATC 3' (Rontenberg et al. 2009) の濃度は $0.4\mu\text{M}$ 、反応液量は $10\mu\text{L}$ 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テンプレートとして使用した。RT 反応を 42°C で 5 分間行い、 95°C で 10 秒間処理後、PCR は 95°C 5 秒、 60°C 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)、発生消長についても同様の傾向を示した。また、ヒラズにおいて 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。

ネット被覆は TSWV の感染拡大に対して高い効果を示したが (図 3-2-2)、10 月時点で感染を完全に防げなかったのはネットの目合の隙間やネットと地面の隙間から保毒虫が侵入したためと考えられた。そのため、ネット被覆をした際にも殺虫剤の散布は必要であり、特にアザミウマ類の発生が多くなる 6~8 月の散布を重点的に実施すべきである。TSWV は宿主範囲が広いため、野良生えのダリアに加え、雑草を含む他の植物種の除去も防除対策の一つとなる。Okazaki et al. (2007) は、ピーマン圃場において廃棄された TSWV に感染した果実が伝染源となっており、果実を圃場外に持ち出し適切に処分することで発病を著しく抑制できたことから、伝染源の除去が重要としている。

本節で実証した防虫ネット被覆は、ダリア生産での TSWV 対策として有効であることが明らかになった。このことで現地への導入が促進され、ダリア生産の安定化につながる事が望まれる。

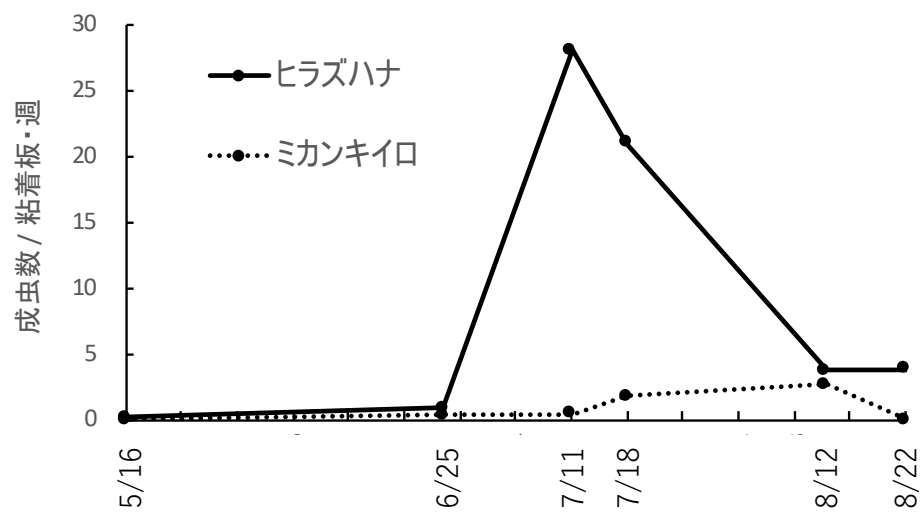


図3-2-1 ダリア切り花圃場におけるアザミウマ類の発生数の推移
青色粘着板に捕捉された成虫数を計測

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。

^ano data

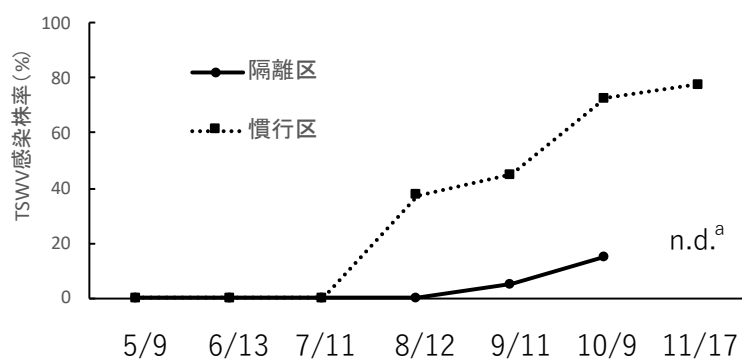


図3-2-2 切り花生産圃場における防虫ネット被覆がダリアのTSWV感染に及ぼす影響
隔離区は0.4mm目合ネットで被覆。

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

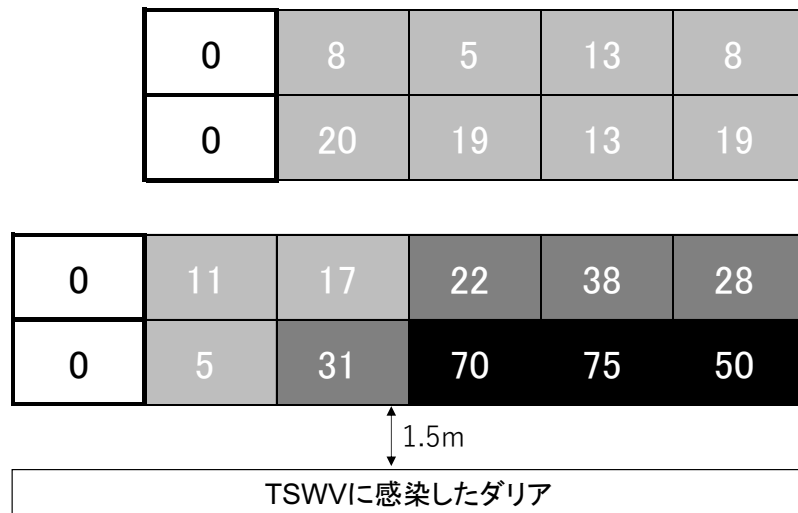


図3-2-3 切り花圃場におけるダリア輪紋病の発生分布

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。

第4章 ダリアに対するキク矮化ウイルス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ルスの塩基配列決定

緒言

ウイルス(viroid)は1本鎖環状RNAからなる最小の植物病原体であり、1971年にジャガイモから発見されたPSTVdが初めての報告である(Adkar-Purushothama and Perreault 2020)。ウイルスのRNAは246~401塩基であり、タンパク質をコードしないノンコーディングRNAである(Adkar-Purushothama and Perreault 2020)。ウイルスは、植物細胞に感染し、宿主の酵素に依存してRNAからRNAへ増殖・複製する。ウイルスの塩基配列には5つの領域があるモデルが提唱されており、それぞれ左末端領域(Terminal Left)、病原性領域(Pathogenicity)、中央保存領域(Central conserved)、可変領域(Variable)、右末端(Terminal right)と呼称されている(Visvader and Symons 1985)。なお、ウイルスの科は中央保存領域の有無によってポスピウイルス科とアブサンウイルス科の2つに分類される。

CSVdは、ポスピウイルス科に属しており、その構造は348~356塩基の1本鎖環状RNAである(Palukaitis and Symons 1980、Matsushita 2013)。CSVdによるキク矮化病は1945年にアメリカで発見され、1973年になって初めて病原がCSVdであることが明らかにされた(Bouwen and Zaayen 2004)。日本では大沢ら(1977)により初めて確認された。キクでのCSVdによる主な病徴は、植物体の矮化と葉の小型化である。CSVdの伝染は、感染株との接触や、手やハサミを介した汁液により生じる(福田ら 2012、Matsushita 2013)。また、キクではCSVdの種子伝染により後代への感染が確認されている(Chung and Pak 2008)。一方で、CSVdの虫媒伝染は確認されていない(Matsushita 2013)。

CSVdの全塩基配列はオーストラリアで検出された系統で初めて決定された(Haseloff and Symons 1981)。CSVdには塩基配列が異なる複数の系統が存在し、日本、韓国およびブラジル等で確認されている(Choi et al. 2017、Gobatto et al. 2014、Matsushita et al. 2007)。なお、CSVdには全長354、355、356塩基の系統が存在する(Matsushita 2013)。

日本のキクから分離されたCSVdの塩基配列については多数の報告があり、兵庫県(塩飽ら、1996)、北海道(李ら、1997)、山形県(兼松ら、1998)、新潟県(杉浦・原田、1998)、福岡県、宮崎県、沖縄県(花田・酒井、2001)、静岡県(土井・加藤、2004)で確認されている。なお、塩基配列の多型は主に病原性領域に存在する(Matsushita et al. 2007)。

一方でダリアに感染したCSVdの塩基配列に関する報告はNakashima et al. 2007に限られている。そこで本節では、ダリアにおけるCSVdの病原性評価やRT-PCR等による検出のための基礎情報を得るため、国内のダリア生産圃場におけるCSVdの塩基配列を調査した。

材料および方法

1) ダリアに感染した CSVd の塩基配列の取得

第2章第3節で CSVd の感染が確認されたダリア 94 株のうち 32 株を用いた。採取地域の内訳は、北海道 7 株、秋田県 1 株、山形県 3 株、長野県 4 株、奈良県 2 株、高知県 4 株、福岡県 10 株、宮崎県 1 株である。ダリアの中位葉 100 mg から RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて、RNA を抽出した。CSVd の全塩基配列を決定するために、以下の 3 組のプライマーを用いて RT-PCR を実施した。CSVd-ZR、CSVd-ZF (5' GGAACCACAAGTAAGTCCCG 3'、5' TGTGGTGCCTCCTGACCCT 3') (Matsushita et al. 2007)、CSVd-1P、CSVd-1M (5' CTTAGGACCCCACTCCTGCG 3'、5' CCGCGATCTCGTCGGACTTC 3') (李ら 1997) および 208CSVd-R、209CSVd-F (5' GGAGAGGTCTTCTGCCCTAGC 3'、5' AGGAGAGGAAGGAACTAAAGGA 3') (Matsushita and Shima 2015) (図 4-1-1)。逆転写反応は、ReverTra Ace (東洋紡) を用いた。RT バッファー 2 μ l、dNTPs (10mM) 1 μ l、リバープライマー (20mM) 0.5 μ l、RNase inhibitor (1U、TOYOBO) 0.5 μ l、逆転写酵素 (20 μ M) 1.0 μ l に滅菌蒸留水を加え全体を 9 μ l とした。テンプレートとして抽出 RNA を 1 μ l 加えた。RT 反応は、42°C 30 分、99°C 5 分で実施した。この RT 産物 1.8 μ l、フォワードプライマー (10mM) 0.6 μ l とリバープライマー (10mM) 0.6 μ l、PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ) 0.2 μ l、バッファー 4 μ l、dNTPs (10mM) 1.6 μ l に滅菌蒸留水を加え全体を 20 μ l とした。PCR 反応は、98°C 10 秒、60°C 5 秒、72°C 60 秒を 35 回繰り返した。PCR 産物の精製は ExoSAP-IT Express PCR Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific) で行った。1 検体あたり、2 組以上のプライマーによる PCR 産物をシーケンスした。

結果

供試した CSVd 感染株 32 株の中から、塩基配列が異なる 6 系統が検出された (表 4-1-1)。塩基配列の全長はすべての系統で 354bp であり、多型は 7 ヶ所で確認された (図 4-1-1)。系統 3 は以前にダリアで検出された系統と同一の配列であり、系統 1 と 6 は、キクで検出された系統と同一の配列であった。系統 1 は、5 つの地域から検出されており、最も広く分布していた。なお、系統 2、4 および 5 は、本研究で初めて確認された。

考察

国内の生産圃場のダリアに感染した CSVd 32 系統の全塩基配列を決定した。これらの CSVd 系統で確認された塩基配列の多型の多くは、病原性領域である 64、65、290、298 お

よび 299 番目の塩基で認められた(表 4-1-1)。他に多型が見られた 169 と 190 番目の塩基は右末端領域であった。これらの塩基配列の多型に関する情報は、プライマーを設計する上で重要である。すなわち、プライマーの設計部位には多型部位を含まないようにするべきである。これまでに、PSTVd、アボカドサンブロットウイロイド (avocado sunblotch viroid ; ASVd) およびカンキツエクソコーティスウイロイド (citrus exocortis viroid ; CEVd) では、塩基配列の多型が病徴の程度に影響することが報告されている (Visvader and Symons 1985、Schnell et al. 2001、Qi and Ding 2003)。PSTVd の U257A 変異は、トマトに対する病原性を高め、枯死症状を引き起こす (Qi and Ding 2003)。これらのことから、検出された CSVd 系統間のダリアに対する病原性の差異について関心が持たれる。一方で、キクでの CSVd による病徴の程度は、塩基配列の多型より、品種や環境条件に影響される (Yoon et al. 2012)。系統 7 は本節では検出されなかったが、ダリアとキクの双方から検出されていることから、ダリアとキクの間で CSVd が伝染する可能性が示唆される。同じく、本節でダリアから検出した系統 1 と 6 は以前にキクから検出されており、複数の CSVd 系統で同様の伝染の可能性が考えられる。



図4-1-1 ダリアから検出されたキク矮化ウイルス（CSVd系統1；LC433628）の推定2次構造
矢印はCSVdの検出に用いたプライマーを示す。
太字の数字は多型が認められた塩基を示す。

表4-1-1 国内のダリアから検出されたキク矮化ウイルス（CSVd）の塩基配列の比較

系統 番号	地域（検出数）	検出数	塩基配列の位置							Accession number in GenBank/EMBL/DDBJ	過去に感染が確認された宿主と その参考文献	
			64	65	169	190	290	298	299			
1	北海道 (7)、 秋田 (1)、山形 (3)、 福岡 (1)、宮崎 (1)	13	A	G	A	T	T	T	A	No. KU535580 No. LC433628 (本報告)	キク	Gobatto et al. 2014
2	長野 (4)、福岡 (8)	12	A	G	G	C	T	A	T	No. LC433629 (本報告)	-	
3	福岡 (1)	1	A	G	A	T	T	A	T	No. AB255879 No. LC433630 (本報告)	ダリア	Nakashima et al. 2007
4	奈良 (1)	1	G	A	A	T	A	A	T	No. LC433631 (本報告)	-	
5	高知 (2)、奈良 (1)	3	G	A	A	T	T	A	T	No. LC433632 (本報告)	-	
6	高知 (2)	2	G	A	A	T	T	A	A	No. X16408 No. LC433633 (本報告)	キク	Matsushita et al. 2007
7	-	-	A	G	G	C	T	T	A	No. AB255880 No. MZ328188	ダリア キク	Nakashima et al. 2007

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

緒言

CSVd の自然環境での感染はダリアやキクに加えて、ペチュニア (*Petunia hybrida*) (Verhoeven et al. 1998)、ツルハナス (*Solanum jasminoides*) (Verhoeven et al. 2006)、ツルニチニチソウ (*Vincas* sp.) (Nie et al. 2005) や野生ギク (*Chrysanthemum* sp.) (Matsushita et al. 2007) で確認されている。これらの宿主で検出された CSVd には塩基配列が異なるものが多く認められる。また、CSVd の系統によっては感染できる植物種が異なることが報告されている (Matsushita and Penmetcha 2009)。トマトまたはムラサキカッコウアザミ (*Ageratum houstonianum*) から分離された CSVd の2系統を接種した際に、キクとトマトでは両系統の感染が確認された一方で、ムラサキカッコウアザミはトマト由来の CSVd に感染しなかった。同様に PSTVd においても KF 440-2 系統は、C259→U259 の1塩基置換により、タバコ (*Nicotiana tabacum*) への感染が可能となった (Wassenegger et al. 1996)。このようにウイロイドの塩基配列は感染・複製機構に影響を及ぼすことから、関連する塩基配列を特定するために、転写 RNA を用いた接種試験が広く行われている。なお、CSVd ではプラス鎖の転写 RNA がキクに感染し、病原性を示すことが示されている (Matsushita and Penmetcha 2009)。一方で、ダリアに対して CSVd の転写 RNA を用いた接種試験の報告はなく、同様の手法での植物体内で CSVd が増幅するかは明らかではない。本節では複数の CSVd 系統を用いて、ダリアに対する転写 RNA の接種源としての実用性を評価し、さらに CSVd の塩基配列がダリアおよびキクへの感染効率に及ぼす影響を考察した。

材料および方法

1) CSVd のダリアとキクへの接種

CSVd の転写 RNA は、Matsushita and Penmetcha (2009) に従って作出した。CSVd のプラス鎖 RNA を作出するために、CSVd 系統 1、2、5 および 6 に加え、キクから分離された系統 (No. LC062712) を含むベクターをテンプレートとして PCR を実施した。PCR 産物を GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich) で精製し、転写のテンプレートとした。転写は、T7 RiboMAX Express Large Scale Production System (Promega) を使用して 37°C で約 12 時間の処理を行った。DNase I で処理した後、転写 RNA のサイズを電気泳動で確認した。摩砕液での接種源は、CSVd に感染したダリア‘かまくら’ (CSVd 系統 1) 、“ポートライトペアビューティー” (CSVd 系統 2) およびキク‘千都の輝’ (CSVd 系統 6) の感染葉に 10 倍量の 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) を加えて磨砕して作出した。接種は、健全なダリア‘真心’、“ポートライトペアビューティー” およびキク‘K01’に行った。これらの上位葉にカーボランダムを振りかけ、ビニール手袋を装着した指で 2 μ g の転写 RNA または磨砕液を

葉に軽く擦ることで接種した。接種後の植物は、人工気象器内で 25°C、16h 日長条件で管理した。接種 3 ヶ月後に各植物の中位葉をサンプリングし、microtissue direct RT-PCR で CSVd の検定を行った。昆虫針（有頭シガ昆虫針 3 号）でダリアの中位の小葉の主脈を 3 回刺した後、昆虫針を RT-PCR 反応液に浸漬することで、針先についた植物汁液をテンプレートとして使用した。プライマーは CSVdD-R、CSVdD-F（5' TCTCCAGGAGAGGAAGGAACTA 3'、5' GGAGTAAGCCCGTGGAACCTTAG 3'）を用い、PrimeScript One-Step RT-PCR Kit Ver. 2 (Dye Plus)（タカラバイオ）を用いて、RT-PCR 反応を行った。試薬の濃度はプロトコールに準じ、プライマーの濃度は 0.4 μ M とした。反応は 10 μ l 系で実施した。RT 反応を 50°C で 10 分間行い、94°C で 2 分間処理後、PCR は 94°C30 秒、60°C30 秒、72°C30 秒を 30 回繰り返し、72°C5 分間の最終伸長を行い、PCR 産物を 2.0% アガロースゲルで電気泳動した。

結果

転写 RNA および CSVd 感染植物の摩砕液の接種 3 ヶ月後に、供試したすべての CSVd 系統がダリアとキクから 42.9~100% で検出された（表 4-2-1）。転写 RNA または感染植物の摩砕液の接種源の違いによるダリアとキクでの感染株率はほぼ同等であり、最も差が認められたのは、系統 1 のキクでの転写 RNA 100% と感染植物の摩砕液 55.6% であった。ダリアの品種間での感染株率はほぼ同等であった。植物種に関しては、キクはダリアより感染株率がやや低い傾向にあり、キクでは最も低い値である感染率 42.9% が 2 処理区で認められた。CSVd 系統の違いによる感染株率への大きな影響は認められず、最も低い値は示したのはダリアでは No. LC062712、キクでは系統 5 と 6 であった。

考察

これまでにダリアから検出された CSVd の系統にはキクから検出された系統と異なるものがあり、これらの塩基配列の違いによる植物種ごとの感染性への影響を評価した。本節で用いたすべての系統はダリアとキク双方に高率に感染したことから、これらの CSVd 系統間で異なる塩基配列による感染の可否に関わる影響はないと考えられた。さらに CSVd に感染したキクを用いた汁液接種で、ダリアへの感染が認められたことから、キクがダリアに対する CSVd の伝染源となる可能性が示唆された。同様に、ダリアがキクに対する CSVd の伝染源となる可能性も示唆された。

キク以外に CSVd の自然感染が確認されているペチュニア (Verhoeven et al. 1998)、ツルハナス (Verhoeven et al. 2006)、ツルニチニチソウ (Nie et al. 2005) および野生ギク (Matsushita et al. 2007) などの植物種からの感染リスクの評価は今後の課題である。また、ブラジルでは CSVd の雑草への自然感染が確認されており (Gobatto et al. 2019)、国内の圃

場周辺の雑草での感染状況の解明はこれからの検討事項となる。

転写 RNA での CSVd の接種がダリアへの高い感染性を示したことから、本手法は、ダリアでの CSVd の塩基配列が及ぼす病徴や感染性への影響の評価に有効と考えられた。特にこれまでに報告のない CSVd 系統を人工的に作出することで、より広範な塩基配列の影響を調査することができる。本節で使用した CSVd は5系統のみであり、ダリアとキクでの CSVd の感染性が同一であることを明らかにするにはより多くの CSVd 系統を用いた接種試験による確認が必要と考えられる。

表4-2-1 転写RNAと感染植物の摩砕液を用いたキク矮化ウイルス（CSVd）系統のダリアとキクへの接種

系統	感染報告がある 植物種	接種植物	品種	接種源		
				転写RNA	感染植物の摩砕液	
				感染株率	感染株率	植物種 ^a
系統1 ^b (No. LC433628) ^c	ダリア キク	ダリア	ポートライトベアビューティー	100 (4/4) ^d	100 (14/14)	ダリア
			真心	75.0 (3/4)	75.0 (9/12)	
		キク	K01	100 (4/4)	55.6 (5/9)	
系統6 (No. LC433633)	ダリア キク	ダリア	ポートライトベアビューティー	72.7 (8/11)	100 (14/14)	キク
			真心	55.6 (5/9)	83.3 (10/12)	
		キク	K01	42.9 (3/7)	62.5 (5/8)	
系統2 (No. LC433629)	ダリア	ダリア	ポートライトベアビューティー	81.8 (9/11)	94.4 (17/18)	ダリア
			真心	90.0 (9/10)	82.4 (14/17)	
		キク	K01	71.4 (5/7)	75.0 (6/8)	
系統5 (No. LC433632)	ダリア	ダリア	ポートライトベアビューティー	81.8 (9/11)	-	-
			真心	70.0 (7/10)	-	-
		キク	K01	42.9 (3/7)	-	-
- (No. LC062712)	キク	ダリア	ポートライトベアビューティー	42.9 (3/7)	-	-
			真心	66.7 (4/6)	-	-

^a接種源として用いたCSVd感染植物種を示す。

^b系統の番号は表4-1-2を参照

^cGenBank/EMBL/DDBJ accession no.

^d感染株数/接種株数

第3節 キク矮化ウイルスの感染がダリアの生育に及ぼす影響

緒言

感染植物に病徴を引き起こすウイルスは、ジャガイモでは PSTVd、トマトでは、ポスビウイルス属の tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd) や tomato apical stunt viroid (TASVd)、tomato planta macho viroid (TPMVd)、columnnea latent viroid (CLVd) が知られている。これらに感染した植物は葉に黄化等の病徴を示し、経済的な被害が生じるため国外で問題となっている (Singh et al. 2003)。しかし、すべてのウイルスが病徴を引き起こすわけではなく、トマトに感染するウイルスの中で mexican papita viroid (MPVd)、CEVd、CSVd、CLVd (Singh et al. 2003)、pepper chat fruit viroid (PCFVd) (Verhoeven et al. 2009) は生育に影響を及ぼさないことが知られている。ダリアへの感染が報告されているウイルスは CSVd、PSTVd および DLVd の3種であるがそのうち、PSTVd と DLVd はダリアに明瞭な病徴を引き起こさないことが確認されている (Tsushima et al. 2015、Monger 2018、Yang et al. 2019)。一方で CSVd に関しては、DMV 等との複合感染したダリアでの生育の抑制が確認されていたが (Nakashima et al 2007)、CSVd 単独感染での病徴の確認は行われていなかった。

CSVd はキク生産における重要病害の一つであり、キクでは植物体の矮化、葉の小型化、早期開花を引き起こすことが知られている (Matsushita 2013)。これらの病徴はその他の植物種でも共通しており、マーガレット (*Argyranthemum frutescens*) (Marais and Faure 2011) で確認されている。CSVd に感染し矮化症状を示したキクでは非感染株よりジベレリンの含量が減少していたことから (Huh et al. 2006)、CSVd は宿主の遺伝子発現に何らかの影響を与えていると考えられる。なお、CSVd を含むウイルスはタンパク質をコードする領域が認められないことから、ノンコーディング RNA として宿主の遺伝子発現に関与している可能性が指摘されている (Adkar-Purushothama and Perreault 2019)。

CSVd のダリアへの感染は複数の地域で確認されていたが、ダリアに対する病原性は明らかにされていなかった。そのため、CSVd を防除対象とすべきか明確な根拠がない状態であった。本節では接種試験を行い、CSVd 感染がダリアの生育に及ぼす影響を調査した。

材料および方法

1) CSVd 感染親株からのダリアの栽培

CSVd 系統 2 (LC433629) の転写 RNA の接種をダリア‘ポートライトペアビューティー’と‘真心’に行い、CSVd 感染株を作出した。なお、転写 RNA の作成および接種は第4章第2節に従って実施した。これらの CSVd 感染株と非感染株を親株として、穂を採取し、挿し芽を行うことで定植苗を作出した。27cm ポットに定植後、摘心を行うことで2本仕立てにし、

ビニルハウス内で、10～30℃、約 14.5h 日長で管理した。挿し芽、定植および摘心は‘ポートライトペアビューティー’では、2017 年 2 月 13 日、4 月 6 日および 4 月 19 日に、‘真心’では 2016 年 12 月 7 日、2017 年 2 月 1 日および 3 月 27 日に行った。切り花の収穫は、外花弁が水平に開いた時点で実施した。‘ポートライトペアビューティー’では CSVd 感染株 13 株、非感染株 13 株、‘真心’では CSVd 感染株 10 株、非感染株 9 株を用いた。

2) 定植後に CSVd を接種したダリアの栽培

定植後の CSVd の感染がダリアの生育に及ぼす影響を評価するために、CSVd 系統 2 を用いて接種実験を行った。CSVd 非感染‘ポートライトペアビューティー’の母株から穂を採取し、2015 年 11 月 18 日に挿し芽を行うことで定植苗を作出した。12 月 28 日に 27cm ポットに定植し、2016 年 1 月 16 日に摘心した。1 月 24 日に CSVd 系統 2 の転写 RNA を未展開の上位葉に接種した。2 本仕立てで管理し、1 回目の切り花の収穫は 2016 年 4 月 15 日に行った。収穫後、株の基部から側芽を伸長させ、2 本仕立てで管理した。2 回目の切り花の収穫は、外花弁が水平に展開した際に実施した。ビニルハウス内で、10～30℃、14.5 時間日長下で栽培した。CSVd 接種株 10 株と未接種株 9 株を栽培した。各ダリア植物の上部葉における CSVd の感染を確認するために、接種 46、64、79 および 135 日後に Hosokawa et al. (2006) に従い microtissue direct RT-qPCR を行った。試薬は 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、プライマー CSVd-real F1 (5' TCCGACGAGATCGCGGC 3'), CSVd-real F2 (5' GAAGACCGGGCTAGGGCAGA 3')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) 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テン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。

3) 切り花の調査

CSVd 感染親株からの栽培試験については、切り花長、切り花重、節数、葉長、葉幅、花径、花重および開花日を調査した。‘ポートライトペアビューティー’では、CSVd 感染株の 7 花と非感染株の 8 花について、管状花と舌状花の数を調査した。管状花は花弁が筒状で小さく、雌蕊と雄蕊を有し、舌状花は花弁が平らで大きく、雌蕊はなく、退化した雄蕊のみを有する (図 4-3-1) 。‘真心’では、CSVd 感染株の 24 花と非感染株の 19 花について、露心花数を調査した。露心花は花の中心部から管状花が露出しているものとした。花弁の色の評価は、色差計 (Color Reader CR-13、ミノルタ株式会社) を用いて CIE の L*値、a*値および b*値を測定した。L*値は明るさを、a*値は緑～赤味、b*値は青～黄味を示す指標である。なお、花弁が複色である‘ポートライトペアビューティー’では、発色部を調査対象とした。定植後に CSVd を接種した栽培試験については、切り花長、切り花重、節数、葉長、葉幅および開花日を調査した。

結果

CSVd 感染親株から栽培した‘ポートライトペアビューティー’と‘真心’の感染株の切り花長は、非感染株よりも有意に小さかった（表 4-3-1、図 4-3-2）。また、CSVd 感染によって両品種の切り花重、葉の大きさ、花径、および花重は減少したが、節数には影響がなかった。‘真心’は‘ポートライトペアビューティー’よりも CSVd 感染による切り花重の低下程度が大きかった。両品種の感染株の開花日は、非感染株に比べてやや早かった。両品種で、CSVd 感染による花卉の色、花の形態への影響が認められた。‘真心’では、感染株の花弁は、非感染株より濃いピンクであった（図 4-3-3a）。感染株では非感染株より花弁の明度 L^* 値は低く、 a^* 値と b^* 値も低かった（表 4-3-2）。感染株では、露心花が 30 花中 8 花と高率で確認されたが（図 4-3-3b）、非感染株では確認されなかった。‘ポートライトペアビューティー’では、感染株の花弁は、非感染株より濃いオレンジ色であった（図 4-3-3c）。感染株では非感染株より花弁の明度 L^* 値は低く、 a^* 値は高く、 b^* 値は低かった（表 4-3-2）。感染株の管状花の割合は 22.9%（管状花数：571 $\pm$ 4.2 個、総小花数：249.7 $\pm$ 7.5）であり、非感染株の 5.6%（管状花数：13.1 $\pm$ 3.7 個、総小花数：235.3 $\pm$ 4.7 個）より高かった。なお、露心花は、感染株と非感染株でともに観察されなかった。

苗を定植し摘心後に CSVd を接種したダリアでは、接種後 64、79 および 135 日目にそれぞれ 20 株中 10、18 および 20 株で CSVd が検出された（表 4-3-3）。2 番花の切り花では、CSVd 感染株では切り花長、葉長および葉幅が非感染株より有意に小さかった（表 4-3-4）。CSVd 感染株の切り花重は非感染株より 13% 低かった。一方、1 番花の切り花では CSVd 感染による切り花長、葉長、葉幅および切り花重への有意な影響は認められなかった。節数と開花日は 1 番花と 2 番花の切り花でともに CSVd 感染による有意な影響は認められなかった。

考察

CSVd 感染による病徴は、キク（Matsushita 2013）やマーガレット（Marais and Faure 2011）で確認されている。同様に、本節の試験によりダリアでも CSVd 感染による生育への影響が確認された。ダリアでの CSVd による症状は、切り花長の減少、葉と花の小型化、花色の変化、露心花率と管状花率の増加であった（表 4-3-1、図 4-3-1、図 4-3-2）。CSVd 感染による切り花重の減少の程度は、‘ポートライトペアビューティー’より‘真心’で大きく（表 4-3-1）、品種間で病徴の程度に差が生じることが示唆された。キクについても、CSVd 感染によって引き起こされる矮化の程度は品種に依存し、切り花の長さの減少率は 7.7～51.5% と幅広い（Chung et al. 2005）。短日植物であるキクは CSVd 感染により光応答が乱され、長日条件下でも開花する（Hosokawa et al. 2004a）。同様にダリアでは、CSVd 感染による光応答の攪乱で、管状花の割合の増加や露心花の発生する可能性が考えられた。遺伝子

レベルでの CSVd 感染がダリアの光応答を変化させる機構の解明については、より詳細な今後の研究が期待される。

定植後の CSVd の転写 RNA の接種では、9 週間後に約半数の株で CSVd が検出された（表 4-3-3）。前節での接種試験と同様にダリアにおける CSVd の感染効率は高かった。キクでは、転写 RNA の接種後、5 週間で CSVd が検出されたことから（Matsushita and Kumar 2009）、植物種によって CSVd の複製効率が異なることが推察された。CSVd 感染ダリアでは、切り花長の減少は、2 番花では認められたが、1 番花では認められなかった（表 4-3-4）。このことは、CSVd による生育への影響が確認できるのが、感染後約 3~5 ヶ月後であり、早期に目視での CSVd 感染植物を除去することは困難であることを示している。一部のキク品種では、高照度および高温（25~28℃）条件下で接種後 20 日から 8 週間以内に矮化症状が現れる（Bachelier et al. 1976、Yoon et al. 2014）。したがって、ダリアでも 1 番花の切り花で矮化症状が発生する品種や栽培条件が存在する可能性は否定できない。

以上のことより、CSVd のダリアへの感染が定植前、定植後であっても、ダリアに矮化症状といった経済的被害につながる病徴を引き起こすことが明らかになった。このことから CSVd は防除対象とすべき病原体であると結論づけた。健全株の選抜に RT-PCR を用いる際には TSWV、DMV に加え CSVd を追加することが必要である。

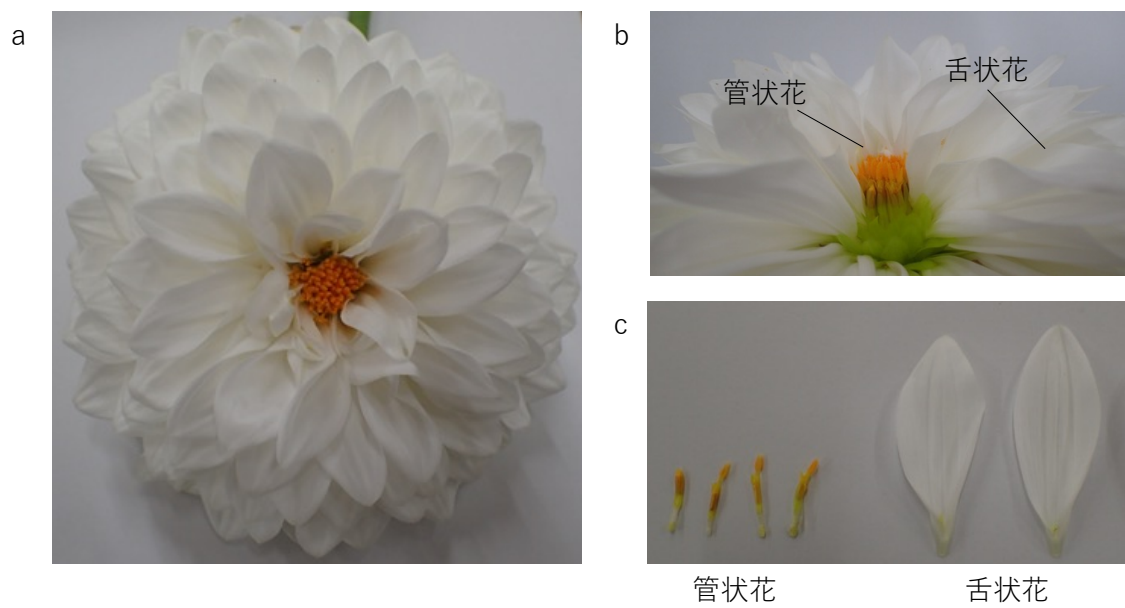


図4-3-1 ダリアの露心花における管状花と舌状花

a：露心花、b：露心花における管状花と舌状花の位置、c：管状花と舌状花
品種‘かまくら’

表4-3-1 キク矮化ウイルス (CSVd) の感染がダリアの生育に与える影響 (CSVd感染親株からの栽培)

品種	CSVd感染	切り花長 (cm)	切り花重 (g)	節数	葉長 (cm)	葉幅 (cm)	花径 (cm)	花重 (g)	開花日 ^a	n
ポートライト ペアビューティー	感染	58.5 ± 0.4 ^b	231.0 ± 1.3	9.5 ± 0.1	27.7 ± 0.1	24.7 ± 0.2	11.5 ± 0.1	32.1 ± 0.6	45	13
	非感染	80.5 ± 2.2	302.9 ± 6.4	9.4 ± 0.1	31.4 ± 0.5	27.7 ± 0.5	12.5 ± 0.3	35.5 ± 1.8	47	13
	(感染/非感染) ^c	73% *	76%*	101%	88% *	89% *	92% *	90%		
真心	感染	62.6 ± 1.8	112.7 ± 8.8	6.6 ± 0.3	21.6 ± 0.8	16.7 ± 1.2	11.1 ± 0.2	22.2 ± 1.2	41	15
	非感染	82.5 ± 4.0	226.9 ± 15.7	6.4 ± 0.4	32.2 ± 1.5	27.0 ± 1.2	13.7 ± 0.3	40.5 ± 2.5	48	10
	(感染/非感染)	76% *	50%*	100%	67% *	62% *	81% *	55% *		

^a摘心から開花までの日数

^b平均 ± 標準誤差

^c非感染株に対する感染株の割合

*は5%水準での有意差があることを示す (Student's *t*-tests; *p* < 0.05)

感染区は、CSVdに感染した母株から採穂し栽培した。



CSVd感染

CSVd非感染

図4-3-2 キク矮化ウイルス（CSVd）感染による
ダリア‘ポートライトペアビューティー’の矮化症状

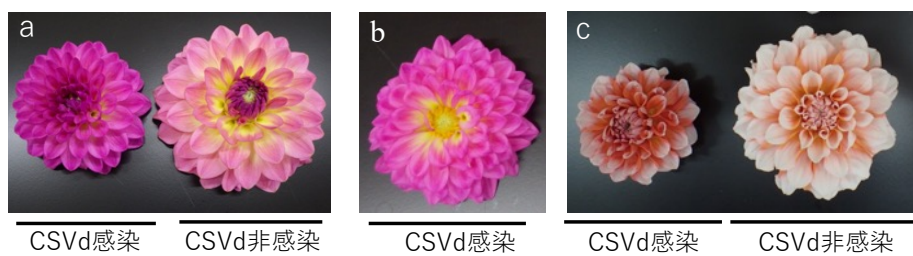


図4-3-3 キク矮化ウイルス（CSVd）感染による ダリアの花の小型化、花色の変化および露心花
 (a) '真心'の花の症状 (b) '真心'の露心花 (c) 'ポートライトペアビューティー'の花の症状

表4-3-2 キク矮化ウイルス (CSVd) の感染がダリアの花弁の色に与える影響
(CSVd感染親株からの栽培)

品種	CSVd感染	L*値	a*値	b*値	n
ポートライト ペアビューティー	感染	71.7 ± 1.2 ^{a)}	26.9 ± 1.5	30.7 ± 1.7	13
	非感染	76.4 ± 0.5	20.8 ± 1.1	35.8 ± 1.3	13
	<i>t</i> -test	*	*	*	
真心	感染	61.9 ± 1.5	33.4 ± 1.6	-7.5 ± 2.6	10
	非感染	67.6 ± 1.2	27.5 ± 1.4	1.7 ± 1.9	9
	<i>t</i> -test	*		*	

^{a)}平均 ± 標準誤差

*は5%水準での有意差があることを示す (Student's *t*-tests; $p < 0.05$)

感染区は、CSVdに感染した母株から採穂し栽培した。

表4-3-3 キク矮化ウイルス（CSVd）接種後のダリアでの検出率

処理	シュート	感染株数 / 接種株数 ^a				株数
		46日後 ^a	64日後	79日後	135日後	
CSVd接種	1	0/10	6/10	9/10	10/10	10
	2	0/10	4/10	9/10	10/10	
CSVd非接種	1	0/9	0/9	0/9	0/9	9
	2	0/9	0/9	0/9	0/9	

^a接種後の日数

ダリア 'ポートライトペアビューティー'を用いた。

CSVdの検出は、microtissue direct RT-qPCRを用いた。

ダリアは株あたり、2本のシュートを生育させた。

表4-3-4 苗の定植後のキク矮化ウイルス（CSVd）の接種がダリアの生育に及ぼす影響

切り花	CSVd感染	切り花長 (cm)	切り花重 (g)	節数	葉長 (mm)	葉幅 (mm)	開花日数 ^c (接種後日数)	株数
1番花	感染	93.2 ± 1.3 ^a	168.3 ± 6.0	9.3 ± 0.4	271.6 ± 5.6	230.6 ± 4.1	73 (65)	10
	非感染	95.6 ± 2.6	175.4 ± 6.8	9.5 ± 0.4	270.7 ± 4.4	233.3 ± 5.2	74 (66)	9
	(感染/非感染) ^b	98%	96%	98%	100%	99%		
2番花	感染	71.5 ± 1.3	128.3 ± 4.2	10.2 ± 0.2	228.7 ± 4.7	205.8 ± 5.7	67 (148)	10
	非感染	86.1 ± 1.7	148.0 ± 8.6	10.5 ± 0.2	253.6 ± 5.6	229.9 ± 7.9	67 (148)	9
	(感染/非感染)	83% *	87%	97%	90% *	90% *		

^a平均 ± 標準誤差

^b非感染株に対する感染株の割合

^c開花日は摘心からの日数とした。

*は5%水準での有意差があることを示す (Student's t-tests; $p < 0.05$)。

株あたり2本のシュートを伸長させた。

1番花を収穫後、株元の側芽から2番花を生育させた。

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

緒言

前節で CSVd 感染によって引き起こされるダリアの病徴は、植物体の矮化、葉や花の小型化、花色の変化および露心花率の増加であることが明らかとなった。しかし、病原性の確認に用いた CSVd は1系統のみであり、栽培条件が病徴に及ぼす影響については検討されていない。

ダリアの多くの品種は、定量的短日植物であり（小西・稲葉 1964、小西・稲葉 1966）、日長が長くなると、植物長、節数および舌状花率が増加する（小西・稲葉 1964、岡田・原田 1955）。また、温度は生育に影響を及ぼし、12~28°Cでの生育温度の上昇により開花の早期化が認められる（Jens and Heins 1993）。

CSVd には多数の系統が存在することが知られており（Choi et al. 2017、Gobatto et al. 2014、Matsushita et al. 2007）、第4章第1節より日本のダリアからは7つの系統が検出され、その多型は主に病原性領域に存在した。CSVd を含むウイロイドの複製と病原性に影響を及ぼす配列を解明するためには、*in vitro* 転写系を用いた逆遺伝学アプローチが広く用いられている（Tabler and Sanger 1985、Matsushita and Kumar 2009）。CSVd の転写 RNA は、ダリアに効率的に感染し、複製することが第4章第2節で確認されており、CSVd 系統別での病原性の評価に適した手法と考えられる。また、CSVd に感染したキクは非感染株とは異なり長日条件下でも開花した（Hosokawa et al. 2004a）。このことから CSVd 感染はキクの光応答を抑制していると推察されているが、ダリアに関する同様の報告はない。本節では、CSVd の系統、栽培時期および日長条件が CSVd 感染ダリアの生育に及ぼす影響について調査した。

材料および方法

1) CSVd の接種

第4章2節と同様に CSVd 系統2 (LC433629)、系統1 (LC433628)、系統7 (AB255880)（表4-1-1）を含むベクターを用いて、転写 RNA を作出した。CSVd 感染ダリアの摩砕液は、系統2に感染した‘ポートライトペアビューティー’の感染葉をその重量の10倍量の0.01 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) で摩砕し、調製した。転写 RNA 2 μ g または摩砕液を手袋を着用した指先に付着させ、カーボランダムをふりかけたダリアの最上位展開葉に擦りつけた。

2) 時期別での CSVd 感染ダリアの栽培

CSVd 接種源の種類、CSVd の系統、日長、栽培時期がダリアの生育に及ぼす影響を明らかにするために、栽培試験を実施した。ダリア‘真心’の非感染株に、CSVd 系統2、系統1ま

たは系統 7 の転写 RNA、もしくは CSVd 系統 2 感染ダリアの摩砕液をそれぞれ接種し、感染親株を作出した。春季、冬季、夏季試験で、転写 RNA の接種由来の感染母株から穂を採取した。また、春季試験ではこれらに加え摩砕液の接種由来の感染母株から穂を採取した。なお、CSVd 感染と塩基配列の確認は、第 4 章第 3 節に従い、穂の採取前に microtissue direct RT-qPCR とダイレクトシーケンシングで行った。

穂の挿し芽は 2018 年 1 月（春）、2018 年 9 月（冬）、2019 年 3 月（夏）に CSVd 感染および非感染親株から採取して実施した。発根した挿し芽苗の 27cm ポットへの定植はそれぞれ 2018 年 3 月 3 日、2018 年 10 月 10 日、2019 年 5 月 11 日に実施した。摘心はそれぞれ 3 月 29 日、10 月 18 日、5 月 21 日に行い、2 本仕立てで管理した。これらのダリアはビニルハウス内で、春季試験では 10～30℃（平均 19℃）で 14.5 時間光周期下、冬季試験では 10～25℃（平均 16℃）で 14.5 時間日長または暗期中断下（22:00～3:00）、夏季試験では 15～35℃（平均 26℃）で 14.5 時間日長または暗期中断下（22:00～3:00）で栽培した。すべての試験で、各系統の CSVd 感染株 7～12 株、非感染株 2～12 株を栽培した。切り花長、切り花重、節数、葉長、葉幅、花径、花重および開花日を調査した。花については、CSVd 感染株で 14～20 個、非感染株で 4～24 個を対象に舌状花と管状花の数、露心花数を調査した。

結果

接種源の違いが病原性へ及ぼす影響を明らかにするため、感染株の摩砕液または転写 RNA を接種し、CSVd 感染ダリアを栽培した。その結果、接種源の違いによる生育への有意な差は認められなかった（表 4-4-1）。なお、両接種源による CSVd 感染株は非感染株と比べて切り花長、葉長、葉幅、切り花重、花径、花重、露心花率、管状花数と舌状花数に有意差が認められた。

CSVd の系統、日長および栽培時期がダリアの生育に及ぼす影響を明らかにするために、CSVd 感染および非感染ダリアを栽培した。3 つの CSVd 系統の感染は春、冬、夏季試験で切り花長、葉長、葉幅、切り花重を有意に低下させた（表 4-4-1、図 4-4-1a）。いずれの CSVd 系統においても切り花長の低下率に栽培時期による大きな影響は認められず、低下率は 27～41%であった（表 4-4-1）。一方、切り花重の低下率には、栽培時期によって系統間差が認められた。冬季および夏季試験では CSVd 系統間で有意差はなく、14.5 時間日長および暗期中断下で 45～60%であったのに対し、春季試験では CSVd 系統 2 による切り花重の低下率が 61%となり、系統 1 の 41%および系統 7 の 34%と比べて有意に高かった。さらに、葉長と葉幅の低下率をみると、春季試験において系統間差が認められ、系統 2 による低下率は系統 1 および系統 7 よりも有意に高かった。

次に、花に対する影響を検討したところ、花重、露心花率、管状花数および舌状花数において栽培時期依存的に系統間差が認められた（表 4-4-2）。系統 2 接種区における花重の低

下率は、系統 1 および 7 と比較して高く、春季試験では系統 7 と、冬季試験（14.5 時間日長下）では系統 1 と比較して有意差が認められた。また、CSVd 系統 2 における露心花率は、春季と冬季試験（14.5 時間日長下）で、系統 1 および系統 7 よりも有意に高かった（表 4-4-2、図 4-4-1b）。さらに、管状花数は、春季試験において、系統 2 が系統 1 および系統 7 よりも有意に多かった。舌状花数は、春季試験では、系統 2 が系統 1 および系統 7 よりも有意に低く、冬季試験（14.5 時間日長）では系統 1 接種区よりも有意に低かった。

暗期中断の影響を検討したところ、冬季試験では、14.5 時間日長と比較して、切り花の品質に影響する切り花長、切り花重および露心花率等の複数の項目で有意な差が確認された（表 4-4-1、表 4-4-2）。一方、夏季試験では、暗期中断は 14.5 時間日長と比較して生育に有意な影響を与えなかった。

考察

ダリアでの CSVd 感染による矮化等の症状は前節で明らかにしたが、症状の程度に関与する要因の検討は行っていない。本節では、CSVd の系統と栽培条件が及ぼす影響を評価した。本節で用いた 3 つの CSVd 系統の感染は、春・冬・夏季試験で植物体の矮化を引き起こした（表 4-4-1）。切り花長の低下率は、すべての試験で約 30～40% の範囲であり、これは前節の結果と同等であった。これらの結果は、CSVd の感染が幅広い時期でダリア生産に重大な被害を与え、CSVd が重要な病原体であることを示している。春季試験では、系統 2 の切り花重、葉長および葉幅は、系統 1 と系統 7 よりも有意に低かった（表 4-4-1）。一方、夏季と冬季試験では、3 つの CSVd 系統間で切り花重、葉長および葉幅に有意差はなかった。それゆえ、CSVd 塩基配列の差による切り花重および複葉長・幅への影響は栽培時期に依存する可能性が考えられた。花径の低下率の CSVd 系統間差はすべての試験で認められなかった（表 4-4-2）。一方で系統 2 の花重は、系統 1 と系統 7 よりも低くなる傾向があった。さらに、春季と冬季試験では 14.5 時間日長下で、系統 2 の露心花率は他の 2 系統よりも有意に高かった（表 4-4-2）。露心花の発生の増加は、系統 2 で管状花数が多く、舌状花数が少ないことと一致していた。これらの症状の差から、CSVd 系統 2 は、系統 1 および系統 7 よりも病原性が高いと考えられる。PSTVd、ASVd および CEVd などのいくつかのウイロイドでは、塩基配列の違いが病原性と関連することが報告されている（Qi and Ding 2003、Visvader and Symons 1985、Schnell et al. 2001）。PSTVd の高病原性株は、感染トマトに重度の矮化と枯死を引き起こす（Qi and Ding 2003）。一方、CSVd では、キクでの病徴の程度は、塩基配列の違いではなく、品種差や環境条件との関連することが示されている（Yoon et al. 2012）。本節で得られた結果は、CSVd の塩基配列の違いが病原性の程度に影響することを示した最初の事例である。病原性領域における系統 2 に特有の 2 つの塩基置換（U298→A298 および A299→U299）が、病原性の高さに関与すると考えられる。一方、系統 1 と系統 3 の間の 2 つの置換（A169→G169 および U190→C190）は病原性に影響し

ないと推察される。

冬季試験では、暗期中断は CSVd 感染植物で切り花長、切り花重、花径や花重を有意に増加させ、露心花率を低下させた（表 4-4-2）。したがって、暗期中断は CSVd 感染によるダリア症状を緩和するのに有効である。一方で暗期中断下では開花日が 14.5 時間よりも約 7 日遅くなり、収穫に必要な日数が増加することは念頭に置く必要がある。ダリアの冬季栽培では暗期中断は 14.5 時間日長と比較して切り花長や切り花重、節数を増加させ、露心花率を低下させる（角川・仲 2013）。それゆえ CSVd 非感染ダリアと同様に、CSVd 感染ダリアの冬季栽培においても日長条件が生育に同様の影響を及ぼしたと考えられる。一方、夏季試験での暗期中断は CSVd 感染株の管状花数、舌状花数および切り花長に影響しなかった。このことから、暗期中断の効果は温度に影響を受けることが示唆された。ダリアでは、温度が管状花数や舌状花数に影響することが報告されている（岡田・原田 1955）。また、平均気温の上昇は健全なダリアの開花日数を減少させる（Jens and Heins 1993）。したがって、夏季試験では、高温による管状花数の割合の低さや開花日数の短縮が、暗期中断による CSVd 感染ダリアの管状花数の割合や切り花長の増加を妨げる要因と推察された。

キクは短日植物であるが、CSVd 感染で光応答が攪乱され、長日条件下でも開花するようになる（Hosokawa et al. 2004a）。ダリアでは 12 時間日長などの短日条件では露心花率が増加することから（角川・仲 2013）、ダリアでの CSVd 感染においても光応答性の変化が露心花率の増加を引き起したと考えられる。なお、冬季試験での暗期中断が露心花率を低下させたことから、CSVd 感染は日長反応性を完全に喪失させるのではなく、弱めたと推察される。

接種時の転写 RNA の CSVd の構造は直鎖状のみであり環状の CSVd は含まれない。しかし、直鎖状の CSVd が非対称ローリングサークル機構（Flores et al. 2005）により植物内で直鎖状から環状となり複製されたと考えられる。なお、第 4 章 2 節の結果から転写 RNA のダリアへの感染効率は、植物摩砕液に含まれる CSVd）と同等であった。さらに本節で転写 RNA の CSVd の感染がダリアに植物摩砕液と同程度の症状を引き起こしたことから（表 4-4-1）、転写 RNA 由来の CSVd はダリアにおける病原性を評価する有効な方法であることが明らかになった。

本節では、3 つの CSVd 系統が栽培期間中にダリアの生育に悪影響を与えることが示された。そのうちの 1 つの系統は、植物重量、葉のサイズ、および花の形態において重度の症状を引き起こした。CSVd 系統間の病原性の違いは、ダリアの生育に関わる遺伝子の発現機構の解明に寄与すると考えられる。日長条件も CSVd 感染ダリアの生育に影響を与え、冬季栽培では、暗期中断は CSVd 感染ダリアの切り花長の減少および露心花の発生を抑制する有効な方法となりうる。本試験は CSVd の塩基配列と栽培条件が CSVd 感染ダリアの生育に及ぼす影響を明らかにした最初の報告である。

表4-4-1 塩基配列が異なるキク様化ウイルス (CSVd) の感染がダリアの生育に及ぼす影響

時期	日長	接種源	CSVd系統	切り花長 (cm)		節数		葉長 (mm)		葉幅 (mm)		切り花重 (g)	開花日数*		株数			
春	14.5 h	植物汁液	2	61.2	65% ^b a [*]	7.7	94% a	261.5	61% a	223.9	59% a	140.3	37% a	57.2 (5月25日)	97% a	10		
			転写RNA	2	65.1	69% a	8.1	99% ab	272.9	63% a	226.5	60% a	148.4	39% a	56.5 (5月24日)	96% a	7	
			1	67.5	72% a	8.8	107% b	322.5	75% b	297.6	79% b	225.2	59% b	58.8 (5月26日)	100% a	10		
		7	68.1	72% a	8.4	102% ab	343.1	80% b	309.0	82% b	251.5	66% b	60.9 (5月28日)	103% a	11			
		CSVd非感染	94.1	b	8.2	ab	431.0	c	376.6	c	381.0	c	58.9 (5月26日)	a	12			
		冬	14.5 h	転写RNA	2	72.8	60% a	8.1	92% a	268.8	66% a	223.6	72% a	121.8	40% a	73.7 (12月30日)	98% a	7
1	77.1	64% a			8.6	98% a	272.4	67% a	231.3	75% a	140.9	47% a	78.0 (1月4日)	104% a	7			
7	74.3	61% a			8.4	95% a	253.8	63% a	221.3	72% a	121.6	40% a	75.6 (1月1日)	101% a	7			
CSVd非感染	121.0	b		8.8	a	405.4	b	308.6	b	302.6	b	75.1 (1月1日)	a	4				
暗期中断	転写RNA	2		79.0	65% a	10.0	100% a	261.9	65% a	224.0	68% a	154.2	53% a	83.1 (1月9日)	98% a	7		
		(暗期中断 / 14.5 h)		(109%) *	(123%) *	(97%)	(100%)	(127%) *	(113%) *									
		1		80.6	66% a	10.6	106% a	273.9	68% a	226.9	69% a	157.2	54% a	91.0 (1月17日)	108% a	7		
		(暗期中断 / 14.5 h)		(105%)	(123%) *	(100%)	(98%)	(112%)	(117%) *									
		7		79.3	65% a	10.5	105% a	264.3	65% a	228.5	69% a	159.2	55% a	89.7 (1月15日)	106% a	7		
		(暗期中断 / 14.5 h)		(107%) *	(125%) *	(104%)	(103%)	(131%) *	(119%) *									
夏	14.5 h	暗期中断		CSVd非感染	121.5	b	10.0	a	405.0	b	330.5	b	291.5	b	84.5 (1月11日)	a	2	
				(暗期中断 / 14.5 h)	(100%)	(114%) *	(100%)	(107%)	(96%)	(113%)								
				転写RNA	2	67.8	69% a	9.6	101% a	242.3	66% a	163.1	67% a	96.5	43% a	66.3 (7月26日)	92% a	7
				1	72.0	73% a	10.1	106% a	270.5	73% b	180.3	74% a	116.7	52% a	66.7 (7月26日)	92% a	7	
7		66.3		67% a	10.4	109% a	244.1	66% a	170.0	70% a	103.8	46% a	67.9 (7月27日)	94% a	7			
CSVd非感染		98.7	b	9.5	a	369.0	c	244.3	b	225.6	b	72.4 (8月1日)	a	7				
暗期中断		転写RNA	2	67.8	66% a	10.1	107% a	243.9	68% ab	160.0	64% a	103.1	48% a	72.0 (8月1日)	100% a	7		
			(暗期中断 / 14.5 h)	(100%)	(105%)	(100%)	(98%)	(107%)	(109%)									
			1	68.7	67% a	10.6	113% a	270.9	76% b	178.5	71% a	117.6	55% a	75.6 (8月4日)	105% a	7		
			(暗期中断 / 14.5 h)	(95%)	(105%)	(100%)	(99%)	(101%)	(113%)									
			7	60.6	59% a	9.9	105% a	226.9	63% a	155.2	62% a	90.8	42% a	70.5 (7月30日)	98% a	7		
			(暗期中断 / 14.5 h)	(91%)	(95%)	(93%)	(91%)	(87%)	(104%)									
			CSVd非感染	102.4	b	9.4	a	357.7	c	250.9	b	215.7	b	72.1 (8月1日)	a	7		
			(暗期中断 / 14.5 h)	(104%)	(99%)	(97%)	(103%)	(96%)	(100%)									

*摘心からの開花日数。

^bCSVd非感染に対するCSVd感染の割合 (%)。^c異なるアルファベットは処理間で有意差があることを示す (Tukey-Kramer 多重比較、 $p < 0.05$)。^aは14.5明期と暗期中断で有意差があることを示す (student's t test、 $p < 0.05$)。



図4-4-1 春季試験におけるキク矮化ウイルス（CSVd）による病徴の系統間差

a： CSVd系統感染株と非感染株の植物長の比較、b： 花の形態と色の比較

CSVd系統2： GenBank/EMBL/DBJ accession no. LC433629、系統1： LC433628、
系統7： AB255880

接種源には、CSVdの転写RNAまたはCSVd感染植物の摩砕液を使用した。

表4-4-2 塩基配列が異なるキク矮化ワイロイド（CSVd）の感染がダリアの花に及ぼす影響

時期	日長	接種源	CSVd系統	花径 (cm)	花重 (g)	露心花率 (%)	管状花数	舌状花数	花数					
春	14.5 h	汁液	2	12.0	87% a ^b	20.7	58% a	83% (15/18) a	120.8	123% ab	87.9	61% a	18	
			転写RNA	2	11.5	83% a	19.3	54% a	100% (14/14) a	148.3	151% a	56.3	39% a	14
			1	11.8	86% a	26.4	73% ab	22% (4/18) b	123.8	126% bc	135.9	94% b	18	
			7	12.7	92% ab	33.0	92% b	0% (0/20) c	105.6	107% c	140.0	97% b	20	
			CSVd非感染	13.8	b	36.0	c	0% (0/24) c	98.5	c	144.8	b	24	
冬	14.5 h	転写RNA	2	11.8	88% a	20.4	65% a	42.9% (6/14) a	110.7	103% a	108.1	65% a	14	
			1	12.4	93% ab	27.4	88% b	0% (0/14) b	94.4	88% a	146.7	89% bc	14	
			7	11.9	89% a	22.8	73% ab	0% (0/14) b	98.1	91% a	122.8	74% ab	14	
			CSVd非感染	13.4	b	31.3	b	0% (0/8) ab	107.8	a	165.3	c	8	
			暗期中断	転写RNA	2	12.2	87% a	26.9	76% a	0% (0/14) a	89.4	95% a	153.7	67% a
			(暗期中断 / 14.5 h)	(103%)	(132%) *	*	(81%) *	(142%) *						
			1	12.0	85% a	29.4	83% a	0% (0/14) a	79.1	84% a	168.0	73% b	14	
			(暗期中断 / 14.5 h)	(97%)	(107%)		(84%) *	(115%) *						
			7	12.6	89% ab	32.3	91% a	7.1% (1/14) a	84.0	89% a	155.3	68% a	14	
			(106%) *	(142%) *		(86%)	(126%) *							
			CSVd非感染	14.1	b	35.5	a	0% (0/4) a	94.3	87% a	228.8	c	4	
			(暗期中断 / 14.5 h)	(105%)	(113%)		(87%)	(138%) *						
	夏	14.5 h	転写RNA	2	9.7	90% a	11.9	80% a	0% (0/14) a	160.3	140% a	113.7	60% a	14
				1	10.2	94% ab	13.6	91% a	0% (0/14) a	149.1	130% a	144.6	77% ab	14
7				9.8	90% ab	12.9	87% a	7% (1/14) a	180.2	158% a	125.3	66% a	14	
CSVd非感染				10.9	b	14.9	a	0% (0/14) a	114.3	a	188.6	b	14	
暗期中断				転写RNA	2	9.6	91% ab	12.6	102% a	0% (0/14) a	172.1	116% a	117.5	69% a
			(暗期中断 / 14.5 h)	(99%)	(106%)		(107%)	(103%)						
			1	9.6	91% ab	13.2	106% a	0% (0/14) a	152.8	103% a	142.1	84% ab	14	
			(暗期中断 / 14.5 h)	(94%)	(97%)		(102%)	(98%)						
			7	9.5	90% a	12.4	100% a	7% (1/14) a	159.4	107% a	131.9	78% ab	14	
			(暗期中断 / 14.5 h)	(97%)	(96%)		(88%)	(105%)						
			CSVd非感染	10.6	b	12.4	a	0% (0/12) a	148.4	a	169.7	b	12	
			(暗期中断 / 14.5 h)	(97%)	(83%)		(130%)	(90%)						

^a総花弁数に対する管状花の割合（％）。

^b異なるアルファベットは処理間で有意差があることを示す(Tukey-Kramer 多重比較またはRyan法、 $p < 0.05$)。

*は14.5明期と暗期中断で有意差があることを示す (student's t testまたはカイ2乗検定、 $p < 0.05$)。

第5章 総合考察

ダリアは切り花の生産額が増加傾向にある有望な品目でありながら、重要病害であるウイルス・ウイロイド病に対する防除対策の検討が不十分であった。新たな産地の形成や、品種の多様化による苗の流通量の増加などに伴い、ウイルス・ウイロイドの分布域はさらに拡大していく恐れがある。ダリアでのウイルス・ウイロイドの発生状況については TSWV、DMV および CSVd に関して報告されているが、広範な地域での調査はこれまでに実施されていなかった。また、キクでの重要病害である CSVd については、ダリアへの感染が報告されているが (Nakashima et al. 2007)、その病原性の詳細は明らかでなかった。このため、警戒すべきウイルス・ウイロイド種を明確に提示できず、生産者にとっても対策が困難となっていた。ダリアでのウイルス・ウイロイド種の検出に主に用いられる RT-PCR は単独種を対象としたものであり、複数種の検出は労力とコストの増加により導入が進まないことが懸念されていた。さらにウイルス・ウイロイド病の対策の基本は伝染環の遮断であり、ダリア生産においても同様と考えられるが、明確な対応指針を打ち出すためには現地での効果の実証が不可欠である。本研究では、このようなダリアのウイルス・ウイロイド病対策に関する課題を解決するために、ダリア生産でのウイルス・ウイロイドの発生状況と病原性を解明し、さらに診断技術の開発と防除技術の実証を行なった。以下で、本研究の成果の生産現場での活用とその意義、および残された課題について論じる。

診断技術に関しては、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、さらに針先についた植物汁液をテンプレートとして用いる microtissue direct 法への適応性を確認した。本手法はウイルス・ウイロイドの発生状況調査、診断および健全株の選抜への利用が考えられ、省力・低コスト化によって全国の農業試験場や種苗会社での利用が進むことが想定される。本手法は 2015 年に論文により公表されていたが (Asano et al. 2015)、その後もダリアのウイルス・ウイロイド病の診断に関する問い合わせがあったことから、本手法の周知が十分ではない状況であった。そこで、各都道府県の農業試験場や民間種苗会社での利用を促進するために、ダリアのウイルス・ウイロイド病診断マニュアル (奈良県農業研究開発センター 2019) を作成し、HP 上で公開している。技術の普及には論文や専門誌だけでなく、表現が容易かつインターネット上で確認できる媒体を活用する重要性が増していると考ええる。

RT-PCR での検定部位の最適化を行うため、ダリアでの TSWV の分布を調査した。キク等の植物と同様に TSWV の分布の不均一性が確認され、TSWV は葉および茎では先端への移行性が悪く、茎では組織の老化に伴い検出されなくなる傾向が認められた。この結果から、検定部位として最適なのは中位葉の葉柄と結論づけた。なお、球根では TSWV の分布の不均一性が最も高く、検定部位として不適切であった。この結果を受けて、当センターではダリア親株のウイルス検定を球根で実施することを中止し、葉柄での検定に変更することで検出の精度の向上を図っている。ダリアでの TSWV の分布の不均一性は経験的に知られて

いたが、仮説を実証したことですべきことが明確になった好事例と言えよう。

国内での TSWV、DMV および CSVd の感染状況と病徴との比較を実施した。これらのウイルス・ウイロイドは国内に広域に分布していたことから、いずれの種も対策が必要と考えられた。優占種は地域によって異なったものの、苗の移動や品種の遷移により今後に変化していく可能性がある。病徴が確認された株からは TSWV、DMV または CSVd のいずれかの感染が確認されたことから、これらがダリアに影響を及ぼす主要なウイルス・ウイロイドであることが明らかになった。なお、無病徴感染の割合が高い DMV と CSVd は TSWV と比較して感染株率が高かったことから、このような特性を持ったウイルス・ウイロイド種の感染の拡大には今後も注意が必要である。CSVd 感染による病徴は主として植物体の矮化であり、生育不良と見分けがつきにくい。しかし、生産者は生育状況に違和感を持っており、そこからウイルス・ウイロイドの関与を疑い、感染種の特定に至った。このように生産者の疑問やニーズに寄り添う意識を持って試験研究に取り組むことで新たな知見を得られると考える。なお、TSV と CMV はダリアでの感染と病徴が報告されているが（仲ら 2007b）、生産現場での影響は大きくないと推察された。その要因が、病徴が軽微であるためか、低い感染株率によるものか、さらなる調査が必要である。本研究では、広域な発生状況調査を行うことで対象とするウイルス・ウイロイド種を明確化し、同時検出技術開発による省力化、さらに検出率の高い部位を明示することでウイルス・ウイロイドの検出系に関して系統立てて整理を行なった。ウイルス・ウイロイド検定の際に一つ一つの作業に意味を持たせることで現場への適切な手法の導入を推進できると考える。

ダリアにおけるウイルス・ウイロイド病の防除対策として、伝染環の遮断が挙げられる。現地での実証試験でアザミウマ類による TSWV 媒介能が高かったことから、アザミウマ類の発生には注意が必要である。その対策として優占アザミウマ類の発消長に基づいた殺虫剤の散布に加え 0.4mm 目合ネットが有効であることが明らかになった。アザミウマ類は様々な殺虫剤に対する抵抗性を発達させており、殺虫剤のみに頼った防除はリスクが伴う。健全な親株を安定的に確保することが重要であるため、ネット被覆は特に親株生産圃場に導入することで防除の効率は高まる。なお、球根生産圃場では生産した球根の一部を翌年の作付けに使用しているため、発病株の抜き取りは現作に加え、翌作の伝染源の減少につながる。ダリアの現地調査の結果からも発病株の抜き取りは感染株を減少させるのに有効と考えられている（Asano et al. 2019）。ただし、本法の課題としてすべての発病株を抜き取れないことや潜在感染株の存在が挙げられる。さらなる効果を得るには、発病株率が高い品種を優先的に茎頂培養由来等の健全苗に切り替えることが現実的と考えられる。なお、TSWV はアザミウマ類により媒介されるため、産地内での感染拡大リスクを考慮する必要がある。そのため産地全体での抜き取りを推進する必要がある、効果の有効性を示す結果を示すことができれば作業の必要性により説得力を増すと考える。

ウイルス・ウイロイドの伝染源の除去の理想は茎頂培養由来の苗を毎年導入していくことであるが、導入コストを考えると実現は困難である。そのため、親株圃場での健全株の維

持に注力することで効率的に効果が得られる。親株にウイルス・ウイロイドの感染が疑われる際は、購入苗や栽培圃場での生育が良好な株を新たな親株として早期に切り替えるべきである。対応が遅れると被害の拡大が進み、対策も困難となることから継続的な圃場の観察が重要である。それに加え、親株の更新時期を3年に1回のように定期的に行うことも、被害の発生、拡大リスクの低減に有効と考えられる。また、TSWV の伝染源として栽培植物に加えて雑草を考慮する必要がある。本研究ではダリアでの感染状況のみを調査対象としたため、圃場周辺の雑草での TSWV の感染状況の把握は今後の検討事項となる。

CSVd の感染がダリア生産上の問題となる矮化症状を引き起こすことが明らかになり、防除の対象にするべきと結論づけた。生産圃場の調査では、CSVd 感染株で明瞭に矮化症状を示す株だけでなく矮化症状を示さない潜在感染株もしくは生育不良と区別できない株が確認されたことから、目視のみによる健全株の選抜は困難と考えられる。そのため、健全株の選抜には RT-PCR などの検出技術を用いることで選抜の精度は高まる。なお、CSVd はキクにおいて茎頂の先端まで分布することから (Hosokawa et al. 2004b)、感染株から茎頂培養により CSVd を除去することは困難とされている。ダリアでは茎頂における CSVd の詳細な分布は明らかにされていないが、茎頂培養による CSVd が完全に除去されない事例が報告されている (仲ら 2007b)。茎頂のさらに一部分を用いる超微小茎頂培養や低温条件と茎頂培養を組み合わせる手法がウイルス・ウイロイドフリー株の作出に利用されている (Hosokawa et al. 2004b、Savitri et al. 2013)、技術的および労力的障壁が高く普及には至らないと思われる。

栽培管理については、汁液接種による CSVd のダリアへの感染効率が高かったことから、ハサミでの作業や株同士の接触によって感染拡大する可能性がある。CSVd の消毒にはバーナーによる熱処理が効果の安定性から最も有効と考えられる (愛知県農業総合試験場 2013)。一方で消毒液については次亜塩素酸で効果が認められるものの、処理時間が長く、作業効率を考えると実用的ではない。キクでは CSVd 感染による矮化の程度および CSVd の感染率に品種間差があることが明らかにされており (Yoon et al. 2012)、ダリアにおいても同様の品種間差の評価が今後行われることを期待している。キクと同様に抵抗性品種や耐病性品種の存在が明らかになれば (Omori et al. 2009、Matsushita et al. 2012)、ダリアにおいても CSVd 抵抗性育種へ活用されることが考えられる。

CSVd 系統間の違いについては、感染効率と病原性について評価した。感染効率については供試した 5 系統の CSVd に関してはいずれも高率での感染が確認され、感染の可否に関わるレベルでの系統間差は認められなかった。ここではキクでの感染が報告された系統も含まれており、キクとダリアの間で CSVd が伝染する可能性が示唆された。生産者の段階でダリアとキクを同一圃場で栽培していることはほとんどないと思われるが、苗生産農家では、栽培管理時にダリアとキクの間での CSVd の伝染リスクを考慮する必要がある。さらに CSVd の感染が確認されているキク以外の植物種とダリアの間での伝染が生じるか、今後のさらなる調査が望まれる。病原性に関しては、供試した 3 系統の CSVd すべてが植物体に矮

化症状を引き起こした。切り花長の減少の程度に系統間差は認められなかったが、切り花重や露心花の発生に差が認められた。現場の対応としては、病原性に系統間差が認められたが、いずれの系統も商品性を低下させるレベルの矮化症状を引き起こしたことから、あらゆる CSVd 系統に対策するのが妥当と言える。また、春、夏、冬のいずれの時期も CSVd 感染株は矮化症状を示したことや定植後の CSVd 感染でも 2 番花の切り花で矮化症状を示したことから、作型に関わらず警戒が必要である。

本研究では、ダリア生産におけるウイルス・ウイロイドの防除対策を確立させるため、発生状況の解明、防除対象種の特特定、診断技術の開発および防除技術の実証を行った。生産現場での防除対策には費用対効果が求められ、重要なウイルス・ウイロイド種を限定し集中した対策を行うことが求められる。本研究により明確な根拠ができたことで現地の指導への説得力が増すと考えられる。ウイルス病の発生は長期間にわたる問題であり、被害が減少して対策が不十分になった時に再び顕在化してくる。理想はウイルス・ウイロイド病対策が通常管理に組み込まれることで、ウイルス・ウイロイド病の発生がないあるいはわずかという状況である。継続した注意喚起と初期対応の呼びかけを行えるよう、現場に最も近い普及事務所で今回の情報が活用されることが望まれる。これらの対策が継続的に実施されることで、ウイルス・ウイロイド病の被害が低減されることを期待している。

摘要

ダリアはブライダルなどの業務用需要を中心に切り花の生産額が増加傾向にある有望な品目である。ダリア栽培での主要な病害はウイルス・ウイロイド病であり、挿し芽や球根の分球といった栄養繁殖によって感染した母株から後代に伝染し、その被害が拡大する。特に TSWV と DMV による被害が深刻とされ、CSVd については病原性を含めさらなる調査が求められていた。しかし、これらに対する防除対策を進めるための根拠となる情報が不十分であった。そこで本研究では、ダリア生産でのウイルス・ウイロイドの発生状況と病原性を解明し、さらに診断技術の省力化を図り、実証試験を実施することで防除技術の確立を目指した。

第2章ではダリアにおけるウイルス・ウイロイド検出法の省力化と精緻化、さらに主要なウイルス・ウイロイドの発生状況の解明を目的とした。主要なウイルス・ウイロイドである TSWV、DMV および CSVd のマルチプレックス RT-PCR 法による同時検出技術を開発した。それぞれの PCR 産物のサイズは 720、402 および 249bp 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、RNA 抽出を省略できることで作業時間を大きく短縮した。

上述の3種ウイルス・ウイロイドの中で TSWV のみがキク等の植物体で不均一に分布することが報告されている。そこで、適切なサンプリング部位を提示するため、ダリアの植物体内での TSWV の分布を調査した。複葉での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。小葉においても同様の傾向を示し、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。茎では、栄養成長期と開花期では分布の傾向が異なっていた。栄養生長期では、茎の上位節は、中位節と下位節に比べて検出率が低かった。一方、開花期では、栄養成長期と比べて検出率は上位節で高く、下位節で低い傾向があった。球根では TSWV は球根の皮層、師部および木部に主に分布していた。しかし、球根断面での TSWV の分布面積は 1/3 未満となる個体が半数以上であり局在性が高かった。これらのことと検体採取の作業性を考慮すると中位の複葉の葉柄が検定部位として最も適切と考えられる。

第3章ではウイルス媒介虫対策による TSWV の防除技術の確立を目的とした。奈良県のダリアの露地球根生産圃場における媒介能を持つ主要なアザミウマ類がヒラズハナアザミウマであることを明らかにした。その発生のピークは7月上旬であり、栽培期間を通じて TSWV を保毒していることが明らかになった。このことから、殺虫剤の散布はヒラズハナの発生の増加時期である5、6月に実施するのが適切と考えられた。施設切り花生産圃場では、アザミウマ類の TSWV の保毒が確認され、感染株率は80%に達したことからアザミウマ類による TSWV の媒介能力は高いと考えられた。なお、物理的防除である0.4mm 目合のネット被覆による TSWV の感染拡大の抑制効果は高く、有効な防除手段となることを実証した。

第4章では、ダリアから検出された CSVd の塩基配列や感染性といった基礎情報に加え、今まで明らかにされていなかった病原性について評価を行った。国内のダリアから検出された CSVd の系統はいずれも全長が 354bp であり、既報のダリアから検出された系統に加え、これまでに報告がなかった系統および既報のキクから検出された系統が確認された。これらの塩基配列の多型の多くは病原性領域で確認された。ダリアまたはキクから検出された CSVd 系統をダリアとキクに汁液接種した結果、いずれの組み合わせでも感染率は高く、感染性に系統間差は認められなかった。このことから、ダリアとキクとの間で CSVd が伝搬する可能性が示唆された。接種試験により CSVd のダリアの生育に対する影響を調査した。その結果、植物体の矮化、露心花の発生および花色の変化が認められた。これらは商品性の低下に直結することから CSVd は防除対象とすべき病原体であると結論づけた。なお、CSVd 系統間で病原性に違いが認められ、CSVd 系統2では他の2系統と比べて、露心花率が高く、切り花重も低い傾向にあった。なお、日長は CSVd 感染ダリアの生育に影響を及ぼし、冬季試験では暗期中断処理は、14.5 時間日長と比べて露心花率は低く、切り花長は長かった。

本研究によって、国内のダリア生産における主要なウイルス・ウイロイド種が TSWV、DMV および CSVd であることを特定し、これらの省力的な診断技術を確立した。本技術により発生状況の調査や診断および健全株の選抜が推進されることを期待する。また、TSWV 主要な感染拡大の要因がアザミウマ類による媒介であり、その媒介虫の発生活性を明らかにした。その対策として殺虫剤の適切な散布時期を提示し、防虫ネット被覆が有効であることを実証した。CSVd は本研究により防除対象に新たに加えられ、塩基配列や感染性といった対策の基礎となる情報についても整理を行った。今後、これらの知見がダリア生産の現場で活用されることを期待する。

謝辞

本論文をまとめるにあたり、神戸大学大学院農学研究科教授の土佐幸雄博士には筆者を快く受け入れてくださり、懇切丁寧なご指導とご校閲を賜った。ご多忙の中多くの時間を割いてくださり、全体を俯瞰した視点で改善点を指摘いただいたおかげで本論文を完成させることができた。また、筆者が同大学3回生で初めて研究に携わった当時に研究の面白さ、厳しさ、そして取り組む姿勢を言葉だけでなく行動でもご教示いただいた。このことが研究の取り組み方の根幹となった。ここに深厚なる感謝の意を表する。また、神戸大学大学院農学研究科教授の中屋敷均博士、准教授の池田健一博士には貴重なご助言とご鞭撻を賜った。厚く御礼申し上げる。

元奈良県農業研究開発センター指導研究員（現 龍谷大学農学部講師）の平山喜彦博士には実績のない筆者に本研究を実施する機会を寛大な心でご配慮いただいた。また、本センターでの研究の開始時から実験手法のみならず現場への活用に必要な視点のご指導をいただいた。同所長の國本佳範博士、副主査の井村岳男氏には、試験の遂行に当たり適切なお助言と心のこもった叱咤激励をいただいた。同部長の仲 照史博士にはダリアの栽培とウイルス・ウイロイドの検出に関するご指導、研究の進め方に関する多大なお助言を賜った。奈良県農業研究開発センター総括研究員の竹中 勲氏、同指導研究員の虎太有里氏、同主任研究員の辻本直樹氏、奈良県中部農林振興事務所主査の今村剛士氏、奈良県南部農林振興事務所主任主事の芳田侃大氏には、共同研究者として本研究を支えていただいた。厚く御礼申し上げる。

農研機構植物防疫部門上級研究員の松下陽介博士には、本研究の開始時に2ヶ月間の研修を受け入れてくださり、ウイルス・ウイロイドの検出技術と論文の執筆方法について懇切丁寧にご指導いただいた。また、研究開始の動機となる貴重なご意見をいただいた。心より感謝申し上げます。

本研究の一部は農林水産省 農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業 実用技術開発ステージ「無病球根の効率的増殖を核とした有望球根切り花の生産流通技術開発（課題番号 25075C）」の一環で実施した。この事業の責任者である宮崎県総合農業試験場部長の中村 薫博士には貴重なご助言を賜った。厚く御礼申し上げます。

奈良県北部農業振興事務所課長の印田清秀氏、奈良県農業水産振興課主任主査の山本文氏、同主査の倉田 淳氏をはじめ普及指導員の方々には、現地試験の実施に際しご協力と有益なお助言をいただいた。深く感謝の意を表する。

奈良県農業研究開発センター指導技能員の中谷智博氏、同指導技能員の吉田 弘氏、尾崎 忍氏、隠地真子氏、萩原庸暢氏、船戸安世氏、山中祥子氏、元奈良県農業研究開発センター指導技能員の松本友和氏、奈良県植物防疫協会試験員の上田加奈氏には、試験の実施に当たり、多大なお協力をいただいた。皆様方に厚く御礼申し上げます。

本論文を執筆にあたり奈良県農業研究開発センター所長の國本佳範氏、研究開発部長の仲 照史氏には特段のご配慮をいただいた。同科長の吉村昭信氏、副主査の井村岳男氏、主任主事の藤森颯太氏、主事の堀浩太郎氏には本論文を執筆中に多大なお気遣いをいただいた。深く感謝の意を表する。

最後に研究生生活を理解し、支えてくれた家族に心から感謝の意を表する。

引用文献

- Adachi, M., Kawabata, S., and Sakiyama, R. 1999. Changes in carbohydrate content in cut chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) 'shuho-no-chikara' stems kept at different temperatures during anthesis and senescence. *J Jpn Soc Hort Sci.* 68: 505-512.
- Adkar-Purushothama, C. R., and Perreault, J. P. 2019. Current overview on viroid-host interactions. *WIREs RNA.* 11: e1570.
- 愛知県農業総合試験場. 2013. ウイロイドによって引き起こされるキク矮化病の蔓延防止マニュアル 農業の新技術 102. <https://www.pref.aichi.jp/nososi/seika/singijutu/singijiyutu102.pdf>
- Albouy, J. 1995. Dahlia. In *Virus and Virus-like Diseases of Bulb and Flower Crops* ed. Lobenstein, G., Lawson, R. H., and Brunt, A. A. pp. 265-273. Hoboken: John Wiley & Sons.
- 天野良紀. 2018. 切り花用. 最新農業技術花卉編. 10: 39-44.
- 青木克典, 高橋宏基. 1995. 岐阜県におけるミカンキイロアザミウマの発生状況と防除対策. 関西病虫研報. 37: 25-26.
- Asano, S., Matsushita, Y., Hirayama, Y. and Naka, T. 2015. Simultaneous detection of Tomato spotted wilt virus, Dahlia mosaic virus and Chrysanthemum stunt viroid by multiplex RT-PCR in dahlias and their distribution in Japanese dahlias. *Lett Appl Microbiol.* 61: 113-120.
- Asano, S., Hirayama, Y., Takenaka, I. and Naka, T. 2019. Occurrence of Tomato spotted wilt virus (TSWV), seasonal abundance of thrips vectors, and evaluation of TSWV control measures in dahlia fields. 関西病虫研報. 61: 69-74.
- Asjes, C. J., and Bloom-Barnhoorn, G. L. 2001. Control of aphid-vectored and thrips-borne virus spread in lily, tulip, iris and dahlia by sprays of mineral oil, polydimethylsiloxane and pyrethroid insecticide in the field. *Ann Appl Biol.* 139: 11-19.
- Asjes, C. J., and Blom-Barnhoorn, G. J. 1997. Incidence and control of thrips-borne tomato spotted wilt virus in dahlia in the Netherlands. *Acta Hort.* 430: 99.
- Bachelier, J. C., Monsion, M., and Dunez, J. 1976. Possibilities of improving detection of chrysanthemum stunt and obtention of viroid-free plants by meristem-tip culture. *Acta Hort.* 59: 63-70.
- Bouwen, I., and van Zaayen, A. 2004. Chrysanthemum stunt viroid. p. 218-223 In: A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles and J. S. Semancik (eds.), *Viroids*. CSIRO, Collingwood, Melbourne.

- Brunt, A. A. 1971. Some hosts and properties of dahlia mosaic virus. *Ann Appl Biol.* 67(33): 357-368.
- Chatzivassiliou, E. K. 2008. Management of the spread of Tomato spotted wilt virus in tobacco crops with insecticides based on estimates of thrips infestation and virus incidence. *Plant Dis.* 92: 1012-1020.
- Choi, H., Jo, Y., Yoon, J. Y., Choi, S. K., and Cho, W. K. 2017. Sequence variability of Chrysanthemum stunt viroid in different chrysanthemum cultivars. *PeerJ.* 5: e2933.
- Chung, B. N., Lim, J. H., Choi, S. Y., Kim, J. S., and Lee, E. J. 2005. Occurrence of Chrysanthemum stunt viroid in Chrysanthemum in Korea. *Plant Pathol J.* 21: 377-382.
- Chung, B. N., and Pak, H. S. 2008. Seed Transmission of Chrysanthemum stunt viroid in Chrysanthemum. *Plant Pathol J.* 24: 31-35.
- Culbreath, A. K., Todd, J. W., and Brown, S. L. 2003. EPIDEMIOLOGY AND MANAGEMENT OF TOMATO SPOTTED WILT IN PEANUT. *Annu Rev Phytopathol.* 41: 53-75.
- Culbreath, A. K., Todd, J. W., and Brown, S. L. 2003. Epidemiology and management of tomato spotted wilt in peanut. *Annu Rev Phytopathol.* 41: 53-75.
- 土井 誠, 加藤公彦. 2004. 静岡県で発生したキクわい化ウイルス (CSVd) の塩基配列とキク品種の病徴. *関西病虫研報.* 46: 11-14.
- 土居養二, 与良 清, 明日山秀文. 1967. ウイルス感染葉における virion の動静—ダイア・モザイク・ウイルス (DMV) およびカリフラワー・モザイク・ウイルス (CAMV) について. *日植病報.* 33(2): 95.
- Eiras, M., Resende, R. O., Missiaggia, A. A., and De Avila, A. C. 2001. RT-PCR and dot blot hybridization methods for a universal detection of Tospoviruses. *Fitopathol Bras.* 26: 170-175.
- 藤井祐子, 有馬毅. 2012. 奈良県のダリア・球根・切り花・苗生産への取り組み支援. *奈良農総セ研報.* 43: 71-74.
- 藤森颯太, 小林 甫, 今村剛士, 淵上彩花. 2023. 奈良県の促成イチゴにおけるスピノサドの殺虫効果が低いヒラズハナアザミウマの発生. *関西病虫研報.* 65: 102-103.
- 藤永真史, 古畠修一, 米山千温, 宮本賢二, 宮坂昌実, 小木曾秀紀. 2007. タマネギ栽培地周辺におけるネギアザミウマの誘殺消長と IYSV 保毒虫率の推移および防虫ネット利用による施設内への侵入防止効果. *関東東山病害虫研究会報.* 54: 89-92.
- 福田至朗, 栗山幸子, 平野哲司, 服部裕美, 中村恵章, 大石一史. 2012. 根を介したキクわい化ウイルスの接触伝染. *関西病虫研報.* 54: 47-51.
- Gobatto, D., Chaves, A. L. R., Harakava, R., Marque, J. M., Daròs, J. A., and Eiras, M. 2014. Chrysanthemum stunt viroid in Brazil: Survey, identification, biological and

- molecular characterization and detection methods. *J Plant Pathol.* 96: 111-119.
- Gobatto, D., de Oliveira, L. A., Franco, D. A. S., Velasquez, N., Daros, J. A., and Eiras, M. 2019. Surveys in the chrysanthemum production areas of Brazil and Colombia reveal that weeds are potential reservoirs of chrysanthemum stunt viroid. *Viruses.* 11: 355. <https://doi.org/10.3390/v11040355>
- 八谷和彦. 1991. ヒラズハナアザミウマのアズキ圃場および雑草地における発生消長. 北海道立農試集報. 62: 55-61.
- 花田 薫, 栃原比呂志, 橋本純治, 沖村 誠, 川田穰一. 1982. わが国のキクから分離されたキク矮化ウイルス. 日植病報. 48: 131.
- 花田 薫. 1999. 西日本におけるトマト黄化えそウイルス (TSWV) の発生動向とその特徴. 植物防疫. 53(8): 10-13.
- 花田 薫, 酒井淳一. 2001. 九州・沖縄で発生したキクわい化ウイルスの塩基配列. 九病虫研会報. 47: 43-45.
- Haseloff, J., and Symons, R. H. 1981. Chrysanthemum stunt viroid: primary sequence and secondary structure. *Nucleic Acids Res.* 9: 2741-2752.
- Hayahi, S., Matsushita, Y., Kanno, Y., Kushima, Y., Teramoto, S., and Takeshita, M. 2018. Field survey of Ranunculus mild mosaic virus, Tomato spotted wilt virus and Cucumber mosaic virus infections in Ranunculus asiaticus L. in Japan by newly developed multiplex RT-PCR. *Eur J Plant Pathol.* 150: 205-212.
- Hipper, C., Brault, V., Ziegler-Graff, V., and Revers, F. 2013. Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. *Front Plant Sci.* 154: 1-24.
- Hobbs, H. A., Black, L. L., Story, R. N., Valverde, R. A., Bond, W. P., Gatti, J. M., Scaffer D. O., and Johnson, R. R. 1993. Transmission of tomato spotted wilt virus from pepper and three weed hosts by *Frankliniella fusca*. *Plant Dis.* 77: 797-799.
- 本多健一郎. 2010. トマト黄化葉巻病の総合防除マニュアル作成. 植物防疫. 64(10): 19-21.
- Hosokawa, M., Otake, A., Ohishi, K., Ueda, E., Hayashi, T., and Yazawa, S. 2004a. Elimination of chrysanthemum stunt viroid from an infected chrysanthemum cultivar by shoot regeneration from a leaf primordium-free shoot apical meristem dome attached to a root tip. *Plant Cell Rep.* 22: 859-863.
- Hosokawa, M., Ueda, E., Ohishi, K., Otake, A., and Yazawa, S. 2004b. Chrysanthemum stunt viroid disturbs the photoperiodic response for flowering of chrysanthemum plants. *Planta.* 220: 64-70.
- Hosokawa, M., Matsushita, M., Uchida, H., and Yazawa, S. 2006. Direct RT-PCR method for detecting two chrysanthemum viroids using minimal amounts of plant tissue. *J Virol Methods.* 131: 28-33.
- Huh, E. J., Lee, S. K., Chung, B. N., Lee, I. J., Choi, S. Y. 2006. Changes of growth and

- gibberellin contents in chrysanthemum by infection of Chrysanthemum stunt viroid. Hort Environ Biotech. 47: 366-370.
- 市村一雄, 湯本弘子, 渋谷健市, 望月寛子. 2011. 主要切り花品目の異なる季節における花持ちの調査. 花き研報. 11: 49-65.
- 井村岳男. 2011. 野菜栽培で問題になるアザミウマの見分け方. 植物防疫特別増刊号. 14: 11-14.
- Jens, J. B., and Heins, R. D. 1993. Modeling temperature and photoperiod effects on growth and development of dahlia. J Am Soc Hortic Sci. 118: 36-42.
- 兼松誠司, 日高 操, 村山 徹, 石黒 潔. 1998. 山形県寒河江市で分離されたキクわい化ウイルスについて. 北日本病虫研報. 49: 73-75.
- Kassanis, B. 1952. Some effects of high temperatures on the susceptibility of plants to infection with viruses. Ann Appl Biol. 39(3): 358-369.
- 片山晴喜. 1998. ミカンキイロアザミウマ *Frankliniella occidentalis* (PERGANDE)の発育と産卵に対する温度の影響. 日本応用動物昆虫学会史. 41(4): 225-231.
- 片山晴喜. 2006. 花き類圃場周辺の雑草におけるミカンキイロアザミウマの発消長. 植物防疫. 60(9): 406-409.
- 北村嘉邦. 2016. 下伊那地区の切り花ダリア産地におけるウイルス・ウイルス感染の現状と非感染苗の確保. 信州大学農学部紀要. 52: 27-32.
- 小畠博文. 1984. 奈良県におけるトマト黄化えそ病の発生生態とその防除. 関西病虫研報. 26: 23-28.
- 小西国義, 稲葉久仁雄. 1964. ダリアの促成および抑制栽培に関する研究 (第1報). 園芸学会雑誌. 33(2): 171-180.
- 小西国義, 稲葉久仁雄. 1966. ダリアの促成および抑制栽培に関する研究 (第3報) 日長が花芽分化および発達に及ぼす影響. 園芸学会雑誌 35(1): 73-79.
- Kritzman, A., Lampel, M., Raccach, B., and Gera, A. 2001. Distribution and transmission of Iris yellow spot virus. Plant Dis. 85: 838-842.
- 楠 幹生, 寺見文宏, 寺内英貴, 十河和博. 1993. 逆転写-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)によるキク矮化ウイルスの検出. 関西病虫研報. 35: 7-12.
- 桑原克也, 高橋まさみ, 蓼沼 優. 2013. 施設キュウリにおける赤色防虫ネットを用いたミナミキイロアザミウマおよびタバココナジラミの侵入抑制効果. 関東東山病害虫研究会報. 60: 107-109.
- 李 世訪, 畑谷達児, 古田和義, 堀田治邦, 佐野輝男, 四方英四郎. 1997. 北海道におけるキク矮化病の発生と電気泳動法およびハイブリダイゼーション法によるキク矮化ウイルスの検出. 北日本病虫研報. 48: 113-117.
- Marais, A., and Faure, C. 2011. First report of Chrysanthemum stunt viroid in various cultivars of Argyranthemum frutescens in France. Plant Dis. 95: 1196.

- Matsushita, Y., Tsukiboshi, T., Ito, Y., and Chikuo, Y. 2007. Nucleotide sequences and distribution of Chrysanthemum Stunt Viroid in Japan. *J Jpn Soc Hortic Sci.* 76: 333-337.
- Matsushita, Y., Usugi, T., and Tsuda, S. 2010. Development of a multiplex RT-PCR detection system for Potato spindle tuber viroid and Tomato chlorotic dwarf viroid. *Eur J Plant Pathol.* 182: 165-170.
- Matsushita, Y., Aoki, K and Sumitomo, K. 2012. Selection and inheritance of resistance to Chrysanthemum stunt viroid. *Crop Protection.* 35: 1-4.
- Matsushita, Y. 2013. Chrysanthemum stunt viroid. *JARQ.* 47: 237-247.
- Matsushita, Y., and Shima, Y. 2015. Effect of low temperature on the distribution of Chrysanthemum stunt viroid in Chrysanthemum morifolium. *Phytoparasitica.* 43: 609-614.
- Matsuura, S., Hoshino, S., Hayashi, H., Kohguchi, T., Hagiwara, K., and Omura, T. 2002. Effects of latent infection of stock plants and abundance of thrips on the occurrence of Tomato spotted wilt virus in chrysanthemum fields. *J Gen Plant Pathol.* 68: 99-102.
- Matsuura, S., Ishikura, S., Shigemoto, N., Kajihara, S., and Hagiwara, K. 2004. Localization of Tomato spotted wilt virus in chrysanthemum stock plants and efficiency of viral transmission from infected stock plants to cuttings. *J Phytopathol.* 152: 219-223.
- McPherson, R. M., Pappu, H. R., and Jones, D. C. 1999. Occurrence of Five Thrips Species on Flue-Cured Tobacco and Impact on Spotted Wilt Disease Incidence in Georgia. *Plant Dis.* 83: 765-767.
- Monger, W. A. 2018. Dahlia latent viroid and Potato spindle tuber viroid in Dahlia plants in the UK. *New Dis Rep.* 38(1): 8.
- 森下正彦. 2005. カキ園におけるミカンキイロアザミウマの多発要因. *関西病虫研報.* 47: 15-20.
- 森山美穂, 杉浦広幸, 清田洋次, 花田 薫. 1996. 熊本県のキクから検出されたキク矮化ウイルス. *九病虫研会報.* 42: 45-47.
- 村井 保. 1988. ヒラズハナアザミウマの生態と防除に関する研究. *島根県農試研報.* 23: 1-73.
- 仲 照史, 前田茂一, 角川由加. 2007a. 茎頂培養株を親株とした挿し芽増殖によるダリア種球生産. *奈良農総セ研報.* 38: 23-30.
- 仲 照史, 藤井祐子, 細川宗孝, 中島明子, 浅尾浩史, 岡田恵子, 前田茂一. 2007b. ダリアの茎頂培養が生育とウイルス保毒程度に及ぼす影響. *奈良農総セ研報.* 38: 17-22.
- Nakashima, A., Hosokawa, M., Maeda, S., and Yazawa, S. 2007. Natural infection of Chrysanthemum stunt viroid in dahlia plants. *J Gen Plant Pathol.* 73: 225-227.

- 奈良県農業研究開発センター. 2019. ダリアのウイルス・ウイロイド病診断マニュアル.
https://www.pref.miyazaki.lg.jp/documents/44689/44689_20190624121204-1.pdf.
- Nie, X., Singh, R. P., and Bostan, H. 2005. Molecular cloning, secondary structure, and phylogeny of three pospiviroids from ornamental plants. *Can J Plant Pathol.* 27: 592-602.
- 新山徳光, 佐藤正彦. 2000. ヒラズハナアザミウマの発生生態と夏秋トマトにおける防除に関する研究. *秋田農試研究報告.* 41: 17-29.
- 岡田正順, 原田 宏. 1955. ダリヤの舌状花及び管状花比に対する日照時間及び温度の影響に就いて. *園芸学会雑誌.* 23(4): 259-263.
- Okazaki, S., Okuda, M., Komi, K., Yoshimatsu, H., and Iwanami, T. 2007. Overwintering Viruliferous *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) as an Infection Source of Tomato spotted wilt virus in Green Pepper Fields. *Plant Dis.* 91: 842-846.
- 岡崎真一郎. 2011. ピーマンを加害するトマト黄化えそウイルス (TSWV) 媒介者ミカンキイロアザミウマの総合的防除に関する研究. *大分農林水研センター研報.* 4: 1-45.
- Olatinwo, R. O., Paz, J. O., Brown, S. L., Kemerait, R. C. Jr., Culbreath, A. K., Beasley, J. P. Jr., and Hoogenboom, G. 2008. A Predictive Model for Spotted Wilt Epidemics in Peanut Based on Local Weather Conditions and the Tomato spotted wilt virus Risk Index. *Phytopathology.* 98: 1066-1074.
- Omori, H., Hosokawa, M., Shiba, H., Shitsukawa, N., Murai, K. and Yazawa, S. 2009. Screening of Chrysanthemum Plants with Strong Resistance to Chrysanthemum Stunt Viroid. *J Japan Soc Hort Sci.* 78: 350-355.
- 大沢高志, 森田 儔, 森 喜作. 1977. キクウイルス病の防除に関する研究 2, 指標植物への接木接種によるウイルスの検定. *日植病報.* 43: 372-373.
- Palukaitis, P., and Symons, R. H. 1980. Purification and characterization of the circular and linear forms of Chrysanthemum stunt viroid. *J Gen Virol.* 46: 477-489.
- Parrella, G., Gognalons, P., Gebre-Selassie, K., Vovlas, C., and Marchoux, G. 2003. An update of the host range of Tomato spotted wilt virus. *J Plant Pathol.* 85: 227-264.
- Qi, Y., and Ding, B. 2003. Inhibition of cell growth and shoot development by a specific nucleotide sequence in a noncoding viroid RNA. *Plant Cell.* 15: 1360-1374.
- Quecini, V., Lopes, M. L., Pacheco, F. T. H., and Ongarelli, M. G. 2007. Tomato spotted wilt virus triggers specific and shared defense mechanisms in hypersensitive and susceptible Solanaceae hosts. *Physiol Mol Plant Pathol.* 70: 189-197.
- Riley, D. G., Joseph, S. B. V., Srinivasan, R., and Diffie, S. 2011. Thrips vectors of Tospoviruses. *J Integr Pest Manag.* 1: 1-10.
- Rotenberg, D., Krishna, K. N. K., Ullman, D. E., Montero-Astua, M., Willis, D. K., German, T. L., and Whitfield, A. E. 2009. Variation in Tomato spotted wilt virus titer in

- Frankliniella occidentalis and its association with frequency of transmission. *Phytopathology*. 99: 404-410.
- Savitri, W. D., Park, K. I., Jeon, S. M., Chung, M. Y., Han, J. S., and Kim, C. K. 2013. Elimination of Chrysanthemum stunt viroid (CSVd) from meristem tip culture combined with prolonged cold treatment. *Hort Environ Biotechnol*. 54(2): 177-182.
- Schnell, R. J., Kuhn, D. N., Olano, C. T., and Quintanilla, W. E. 2001. Sequence diversity among avocado sunblotch viroids isolated from single avocado trees. *Phytoparasitica*. 29: 451- 460.
- 瀬尾直美, 佐藤英典, 板橋 建, 中村茂雄. 2009. 混合プライマーを用いた RT-PCR によるキクに感染する 5 種ウイルス・ウイロイドの検出. *北日本病虫研報*. 60: 288.
- 塩飽邦子, 山元義久, 岩井豊通. 1996. キクわい化ウイロイド(Chrysanthemum Stunt Viroid) 遺伝子のクローニングと 全塩基配列. *兵庫農技研報(農業)*. 44: 1-4.
- Singh, R. P., Ready, M. F. M., and Nie, X. 2003. Viroids of solanaceous speices. p. 125-133 In: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J. W., and Semancik, J. S. (eds.), *Viroids*. CSIRO, Collingwood, Melbourne.
- Song, A., You, Y., Chen, F., Li, P., Jiang, J., and Chen, S. 2013. A multiplex RT-PCR for rapid and simultaneous detection of viruses and viroids in chrysanthemum. *Lett Appl Microbiol*. 56: 8-13.
- 末松俊彦, 佐藤 裕, 仙北俊弘, 四方英四郎. 1978. 北海道におけるダリアのウイルス病. *北海道大学農学部邦文紀要*. 11(2): 138-147.
- 末次哲雄. 1969. 輸入検疫中にダリアより発見された tomato spotted wilt virus. *植防研報*. 7: 50-56.
- 杉浦広幸, 花田 薫. 1998. 新潟県の大輪ギクに発生したキクわい化ウイロイドによる病害. *園芸学会雑誌*. 67 (3): 432-438.
- Sugiyama, M., Yoshioka, Y., and Sakata, Y. J. 2009. Effect of temperature on symptom expression and viral spread of Melon yellow spot virus in resistant cucumber accessions. *J Gen Plant Pathol*. 75: 381-387.
- 角川由加, 仲 照史. 2013. ダリア冬春切り作型における電照方法が開花と切り花品質に及ぼす影響. *奈良農総セ研報*. 44: 42-44.
- Tabler, M., and Sanger, H. L. 1985. Infectivity studies on different potato spindle tuber viroid (PSTV) RNAs synthesized in vitro with SP6 transcription system. *EMBO J*. 4: 2191-2199.
- 津田新哉. 1994. わが国に発生するトマト黄化えそウイルスとその特性. *植物防疫*. 48(12): 497-501.
- 津田新哉. 2000. トマト黄化えそ病. *農業および園芸*. 75(1): 90-96.
- Tsushima, T., Murakami, S., Ito, H., He, Y. H., Raj, A. P. C., and Sano, T. 2011. Molecular

- characterization of Potato spindle tuber viroid in dahlia. *J Gen Plant Pathol.* 77: 253-256.
- Tsushima, T., Matsushita, Y., Fuji, S., and Sano, T. 2015. First report of Dahlia latent viroid and Potato spindle tuber viroid mixed infection in commercial ornamental dahlia in Japan. *New Dis Rep.* 31: 11.
- Verhoeven, J. T. J., Arts, M. S. J., Owens, R. A., and Roenhorst, J. W. 1998. Natural infection of petunia by chrysanthemum stunt viroid. *Eur J Plant Pathol.* 104: 383- 386.
- Verhoeven, J. T. J., Jansen, C. C. C., and Roenhorst, J. W. 2006. First Report of Potato virus M and Chrysanthemum stunt viroid in *Solanum jasminoides*. *Plant Dis.* 90: 1359.
- Verhoeven, J. T. J., Jansen, C. C. C., Roenhorst, W. J., Flores, R., and de la Pena, M. 2009. Pepper chat fruit viroid: Biological and molecular properties of a proposed new species of the genus *Pospiviroid*. *Virus Res.* 144: 209-214.
- Visvader, J., and Symons, R. H. 1985. Eleven new sequence variants of citrus exocortis viroid and the correlation of sequence with pathogenicity. *Nucleic Acids Res.* 13: 2907-2920.
- Wassenegger, M., Spieker, R. L., Thalmeir, S., Gast, F. U., Riedel, L., and Sanger, H. L. 1996. A single nucleotide substitution converts potato spindle tuber viroid (PSTVd) from a noninfectious to an infectious RNA for *Nicotiana tabacum*. *Virology.* 226: 191-197.
- Whitfield, A. E., Campbell, L. R., Sherwood, J. L., and Ullman, D. E. 2003. Tissue blot immunoassay for detection of Tomato spotted wilt virus in *Ranunculus asiaticus* and other ornamentals. *Plant Dis.* 87: 618-622.
- 山口貴大, 小林 甫, 藤田奈都. 2021. 奈良県のイチゴに発生するアザミウマ 2 種に対する各種殺虫剤の殺虫効果. *関西病虫研報.* 65: 102-103.
- 山本英樹. 2008. 秋田県におけるキクのウイルス・ウイロイドの発生状況. *秋田農試研究報告.* 48: 99-120.
- Yan, C., Yin, H., Xia, F., Deng, C., Li, Y., and Zhang, Y. 2019. First Report of Dahlia Latent Viroid Infecting Dahlia in China. *Plant Dis.* <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-19-1774-PDN>
- Yoon, J. Y., Baek, E., and Palukaitis, P. 2012. Are there strains of Chrysanthemum stunt viroid?. *J Plant Pathol.* 94: 697-701.