

BULLETIN
OF
THE HIROSHIMA PREFECTURAL TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE
AGRICULTURAL TECHNOLOGY RESEARCH CENTER

SEPTEMBER 2009

広島県立総合技術研究所 農業技術センター研究報告

キクに発生するトスポウイルスの診断，発生要因
およびトラップ植物による防除に関する研究

第 85 号
平成21年9月

広島県立総合技術研究所
農業技術センター
(広島県東広島市八本松町原)

キクに発生するトスポウイルスの診断，発生要因
およびトラップ植物による防除に関する研究

キーワード：キク，トスポウイルス，TSWV，CSNV，トラップ植物，バーベナ

松浦 昌平

- 2009 -

目 次

I. 緒言	1
II. キクえそ病の診断技術の開発	6
1. マルチプレックス RT-PCR によるキクからのトマト黄化えそウイルス (TSWV) と キクわい化ウイロイド (CSVd) の同時検出	6
2. RT-LAMP 法によるキクを含む数種作物からの TSWV の迅速検出	11
III. キクに発生した新規トスポウウイルスの同定と診断技術の開発	19
IV. 広島県におけるキクえそ病の発生要因	28
1. 垂直伝搬の様相 —キク親株から挿し穂への感染様相—	28
2. 水平伝搬の様相 —キク栽培圃場での感染様相—	34
V. トラップ植物を用いたキクえそ病の防除技術の開発	39
1. 媒介虫ミカンキイロアザミウマを誘引する植物種の探索	39
2. バーベナのみカンキイロアザミウマ誘引機構の解明	42
3. バーベナの高密度栽植によるキクえそ病の防除効果	45
4. バーベナの低密度栽植によるキクえそ病の防除効果	52
VI. 総合考察	57
VII. 摘要 (英文サマリー)	62
VIII. 謝辞	65
IX. 引用文献	66

I. 緒言

中国原産のキク (*Dendranthema grandiflorum* Kitam., syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.)は、奈良時代に日本に導入され、江戸時代中期頃から変わり者を見抜き、その子孫を育てるといふ育種過程を経て、多様な品種が育成され、栽培が広がった。嵯峨菊や肥後菊等の古典菊は、その典型といえる。明治時代に入ってから、本格的な切花生産が開始され、近年では、西洋品種の導入も相まって、電照栽培など、本格的な商業ベースに乗った栽培が行われ、国内の栽培面積は、6000haを上回る。日本における切花生産では、スタンダード型の輪キクに人気があり約70%を占め、一方、小菊やスプレーキクは、30%程度である。特に、スタンダード型は、葬式需要から圧倒的に白花に人気がある (Shibata, 1994)。

キクに発生するウイルス病(あるいはウイロイド病)は、数種が報告されている (Table 1)。そのうち、キク B ウイルス (*Chrysanthemum virus B* : CVB) は、多くの品種に感染するが、大半の品種は無病徴である。トマトアスパミーウイルス (*Tomato aspermy virus* : TAV) も生育不良などの病徴をもたらし、全国で広く感染していることが知られているが、実際に病徴発現している株は少ない。クリサンセマムクロロティックモットルウイロイド (*Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*: CChMVd) は、葉に退緑などの症状を呈するタイプと無症状のタイプが知られており、近年、日本のキク産地でも被害が拡大している可能性が報告された (Yamamoto and Sano, 2006)。これらの病原体に比して、トスポウイルス属のタイプ種であるトマト黄化えそウイルス (*Tomato spotted wilt virus*: TSWV) によるキクえそ病およびポスピウイロイド属のキクわい化ウイロイド (*Chrysanthemum stunt viroid* :CSVd) によるキクわい化病は、いずれも病徴が激しく現れることが多く、直接的な被害が発生するため切花生産上極めて重要である。

トスポウイルス属 (genus *Tospovirus*) は、種々の動物ウイルスを包含するブンヤウイルス科 (*Bunyaviridae*) の一属であり、アザミウマ類 (総翅目; *Thysanoptera*) によって媒介される植物病原ウイルスである。トスポウイルスの発見の歴史は古く、1915年にオーストラリアで TSWV が始めて報告された。トスポウイルスは、外皮膜を有する径 80~100nm の球状ウ

Table 1 Viruses and viroids in chrysanthemum

virus and viroid	Genus	transmission	symptom
Virus			
<i>Chrysanthemum virus B</i>	<i>Carlavirus</i>	aphids	mottling, often symptomless
<i>Cucumber mosaic virus</i>	<i>Cucumovirus</i>	aphids	chlorotic spots, often symptomless
<i>Tomato aspermy virus</i>	<i>Cucumovirus</i>	aphids	mottling, dwarfing, often symptomless
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	<i>Tospovirus</i>	thrips	chlorotic and necrotic spots
<i>Chrysanthemum stem necrosis virus</i>	<i>Tospovirus</i>	thrips	chlorotic and necrotic spots
Viroid			
<i>Chrysanthemum stunt viroid</i>	<i>Posdiviroid</i>	sap	stunting, often symptomless
<i>Chrysanthemum chlorotic mottle viroid</i>	<i>Pelamoviroid</i>	sap	chlorotic mottling, often symptomless

ウイルス粒子で、ウイルス粒子内にはヌクレオカプシド (N) タンパク質に保護された RNA と RNA 依存 RNA 合成酵素が存在する。トスポウイルスの不活化温度は、40~46°C, 10 分, 希釈限界は、 $2 \times 10^{-2} \sim 10^{-3}$, 保存限界は、2~5 時間と不安定である。トスポウイルスは、3 分節のマイナス鎖の 1 本鎖 RNA を有しており、短いものから S (2.9kbp), M (4.8kbp), L (8.9kbp) RNA と呼ばれている。S RNA には、ウイルス鎖に非構造タンパク質である NSs タンパク質を、ウイルス相補鎖にヌクレオカプシド (N) タンパク質遺伝子をコードしている。N タンパク質は、ウイルスゲノム RNA とヌクレオカプシドを形成し、ウイルス粒子の複製に貢献していると考えられている (Whitfield et al., 2005)。NSs タンパク質は、植物へのウイルス感染に伴う宿主の RNA サイレncing の抑制機能を有している (Takeda et al., 2002)。M RNA には、ウイルス鎖に非構造タンパク質である NSm タンパク質を、ウイルス相補鎖に外皮膜を構成する GN および GC タンパク質の前駆体をコードしている。NSm タンパク質は、ウイルスの植物細胞間移行に関与しており (Kormelink et al., 1994)、一方、GN タンパク質は、アザミウマ類によるウイルス獲得と媒介に深く関わっており、アザミウマ中腸受容体への結合が示唆されている (Sin et al., 2005)。最後の L RNA には、ウイルス相補鎖に RNA 依存 RNA 合成酵素 (RdRp) がコードされており、ウイルス RNA の複製を担っている。

トスポウイルスの分類においては、N タンパク質のアミノ酸配列の相同性が 90% 程度であれば系統 (strain), 90% 以下であれば、媒介アザミウマ種、宿主範囲等を考慮して、別種とされることが多い。トスポウイルス属のタイプ種は TSWV であるが、現在では、N タンパク質の血清学的性質および遺伝子から推定されるアミノ酸配列の相同性から分類される 14 種が記載されている (Table 2)。特に、タイプ種である TSWV の宿主範囲は極めて広く、キク科やナス科を中心に 500 種以上の植物に感染する。

トスポウイルスは、アザミウマ類によって増殖型の永続的方法で媒介され (Ullman et al., 1993, Whijkamp et al., 1993, Tsuda et al., 1996)、現在までに、少なくとも 11 種のアザミウマがトスポウイルス属を媒介することが知られている (Table 2)。アザミウマは、1 齢幼虫がウイルスを吸汁獲得し、蛹から羽化に至る約 10 日の潜伏期間を経た後に、成虫になって始めて媒介能力を保持する。すなわち、中腸から取り込まれたウイルス粒子は、数種の昆虫生体膜を突破し、組織内を増殖しながら唾液腺へ到達する。この唾液腺へのウイルスの移行が、成虫によるウイルス媒介の成否を決定している (Ullman et al., 1997, Whitfield et al., 2005)。アザミウマによるトスポウイルスの媒介は、特異的であり、ウイルス種によって媒介するアザミウマ種は異なる。また、アザミウマ種間でウイルスの媒介効率が異なり、同じアザミウマ種の中でも、個体群間、系統間によって媒介効率が異なることが知られている (Sakurai et al., 2002)。日本では、1970 年代にトマトとピーマンで TSWV の被害が拡大し、その媒介虫は主としてダイズウスイロアザミウマ (*Thrips setosus*) であった。その後、農作物種苗の国際的な流通の拡大に伴って、現在までに、スイカ灰白色斑紋ウイルス (*Watermelon silver mottle virus* : WSMoV) (Hanada et al., 1993)、メロン黄化えそウイルス (*Melon yellow spot virus* : MYSV) (Kato et al., 2000)、インパチェンスえそ斑紋ウイルス (*Impatiens necrotic spot virus* : INSV)

(谷名ら, 2001), アイリス輪紋ウイルス (*Iris yellow spot virus* :IYSV) (土井ら, 2003), トウガラシ退緑ウイルス (*Capsicum chlorosis virus* :CaCV) (奥田ら, 2005) そしてキク茎えそウイルス (*Chrysanthemum stem necrosis virus* :CSNV) の7種のトスポウイルスが発生し, 多くの農作物に被害を及ぼしている。

キクにおける TSWV 被害の初確認は, 1936 年に遡る (Ainsworth, 1936)。また, カナダでは, 1940 年代からキクに TSWV が確認された。日本では, 1993 年に静岡県の栽培ギクで初めて, 本ウイルスによるキクえそ病が発生した (加藤・花田, 2000)。その後, TSWV を高

Table 2 Recognized Tospovirus species and their vectors

Tospovirus species		Thrips vectors
TSWV serogroup		
<i>Groundnut ringspot virus</i>	GRSV	<i>Frankliniella occidentalis</i> <i>F. schultzei</i>
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	TSWV	<i>F. occidentalis</i> <i>F. intonsa</i> <i>F. schultzei</i> <i>F. bispinosa</i> <i>F. fusca</i> <i>Thrips tabaci</i> <i>T. setosus</i>
<i>Tomato chlorotic spot virus</i>	TCSV	<i>F. intonsa</i> <i>F. occidentalis</i> <i>F. schultzei</i>
WSMoV serogroup		
<i>Groundnut bud necrosis virus</i>	GBNV	<i>F. schultzei</i> <i>T. palmi</i> <i>Scirtothrips dorsalis</i>
<i>Watermelon silver mottle virus</i>	WSMoV	<i>T. palmi</i>
<i>Watermelon bud necrosis virus</i>	WBNV	<i>T. palmi</i>
<i>Capsicum chlorosis virus</i>	CaCV	?
Serologically unrelated		
<i>Impatiens necrotic spot virus</i>	INSV	<i>F. occidentalis</i>
<i>Peanut yellow spot virus</i>	PYSV	<i>S. dorsalis</i>
<i>Zucchini lethal chlorotic virus</i>	ZLCV	<i>F. zucchini</i>
<i>Chrysanthemum stem necrosis virus</i>	CSNV	<i>F. occidentalis</i> <i>F. schultzei</i>
<i>Peanut chlorotic fanspot virus</i>	PCFSV	<i>S. dorsalis</i>
<i>Iris yellow spot virus</i>	IYSV	<i>T. tabaci</i>
<i>Melon yellow spot virus</i>	MYSV	<i>T. palmi</i>

Viruses and vectors which occurred in Japan are shaded.

率に媒介するミカンキイロアザミウマ (*Frankliniella occidentalis*) の発生拡大とその定着とが相まって、全国のキク産地で TSWV の被害が発生するようになった。広島県では 1997 年に、沿岸部の江田島市のキク産地で初めて発生し、その後、県北部の山間部の産地でも被害が見られるようになった。TSWV によるキクえそ病の病徴は、品種により異なるが、一般的には葉の退緑斑、退緑輪紋、えそ斑、えそ輪紋、奇形、茎のえそ条斑などで (Matteoni et al., 1989)、切花の品質低下による著しい経済的被害をもたらす。また、TSWV に対するキク品種間の抵抗性には強弱があることが知られている (Allen et al., 1990)。

トスポウウイルスの防除法には、多くの植物ウイルスと同様、媒介虫の農薬による化学的防除、物理的防除、耕種的防除そして天敵等による生物的防除が挙げられる。トスポウウイルスでは、アザミウマの 1 令幼虫がウイルスを獲得し、成虫が媒介するので、いかに保毒成虫を羽化させないかということが防除の鍵となる。化学合成農薬による防除では、TSWV の主要媒介虫であるミカンキイロアザミウマがイミダクロプリドなどのネオニコチノイド系殺虫剤や合成ピレスロイド剤などの多くの農薬に抵抗性を有するため (Brodsgaard, 1994)、限られた有効薬剤の合理的な使用が不可欠である。また近年、本害虫に対する有効農薬の一つであるスピノサッドの抵抗性個体群が海外で報告された (Bielza et al., 2007)。物理的防除法としては、媒介虫が微小害虫であるため、目合いの小さい防虫ネットや太陽光の乱反射素材を充填した被覆資材等を施設開口部に設置することで、害虫の侵入がある程度防止できる。また、紫外線カットフィルムを天井に設置することでもアザミウマ類の侵入阻止効果がある。しかし、目合いの小さい防虫ネットは、施設内温度が上昇するという問題がある。耕種的防除法の主要技術としては、抵抗性品種の利用が挙げられる。しかし、高品質切り花の消費者需要がある中で、ある程度感受性品種を栽培せざるを得ないという現状がある。生物的防除法では、近年ヒメハナカメムシ、ククメリスカブリダニさらにヘアカブリダニなどの捕食性天敵が研究あるいは実用化されており、このような資材を用いた媒介虫の防除によるトスポウウイルス被害の軽減技術も報告されている (Bennison et al., 2002a)。しかし、どの防除法をとってみても完全なものではなく、これらの諸技術を矛盾することなく合理的に組み合わせて使用することが、トスポウウイルスの防除にとって重要といえる。

近年、化学合成農薬の過度の使用がもたらした種々の弊害への反省から、総合的病害虫管理あるいは総合的有害生物管理と訳されるいわゆる IPM (Integrated pest management) の概念が提唱され、推進されている。Smith and Reinolds (1966) によれば、IPM の根本概念である総合防除とは、「あらゆる適切な技術を相互に矛盾しない形で使用し、経済的被害を生じるレベル (経済的被害許容水準: EIL) 以下に有害生物個体群を減少させ、かつその低いレベルに維持するための有害生物個体群管理システム」と定義されている。そして、IPM 技術開発の指針は、細部の変化はあるにしても、最適な経済効果をもたらすという経済的合理性および環境への負荷軽減を両立させる技術として共通認識されている。この考えは、食用作物のみならず、花き生産にも及び始め、環境に配慮した花き生産を認証する制度 MPS (Milieu Programma Sierteelt) が先進国を中心に各国で採用されつつある。

キクは、栄養体繁殖で増殖することが多く、トスポウイルスの感染が一度起こると、産地から完全にウイルスの汚染を撲滅することは、困難と言わざるを得ない。また、トスポウイルスを媒介するアザミウマ類、特にミカンキイロアザミウマは、農薬抵抗性が発達しているだけでなく、頂芽あるいは側芽内部に好んで寄生するため農薬がかかりにくく、極めて防除の難しい害虫である。

本研究は、1) キクの重要病害であるトスポウイルスの感染をいち早く知り、適切な対策が打てるための適確な診断技術の開発、2) 農薬を含めた種々の防除手段を合理的に利用できるようにするための、栄養繁殖を介した垂直伝搬および媒介アザミウマによる水平伝搬の様相といったウイルスの発生要因の解明、そして、3) 農薬のみに依存しない環境負荷の少ない防除技術として、トラップ植物を用いた環境保全型のトスポウイルス防除技術の開発を試みたものである。

II. キクえそ病の診断技術の開発

1. マルチプレックス RT-PCR 法によるキクからのトマト黄化えそウイルス (TSWV) とキクわい化ウイロイド (CSVd) の同時検出

1) 緒言

トマト黄化えそウイルス (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) は、先述のとおり、ブニヤウイルス科トスポウイルス属のタイプ種で、多くの野菜、花き類に被害を及ぼす重要ウイルスである。本ウイルスは、少なくとも 11 種のアザミウマ類で媒介され (Whitfield et al., 2005)、なかでも、ミカンキイロアザミウマの媒介効率が最も高い (Wijkamp et al., 1995)。キクでは、葉や茎にえそ、退緑などの症状を呈し (Matteoni and Allen, 1989)、著しい品質低下をもたらす。1997 年以降、広島県のキク産地では、沿岸部で恒常的に、山間部で散発的に被害が発生している。

キクわい化ウイロイド (*Chrysanthemum stunt viroid*, CSVd) は、ポスピウイロイド科ポスピウイロイド属の 356 ヌクレオチドからなる、高次構造を有する環状 1 本鎖 RNA で、摘蕾、切花作業に伴い接触、刃物伝染する。キクでは、1/2 程度のわい化、花の小形化、退緑などがみられ (Flores et al., 2005)、広島県では、山間部のキク産地で被害が発生している。これらのウイルス、ウイロイドは、いずれもキクの重要病害であり、栄養繁殖を介して親株から挿し穂へと伝染する。従って、被害を軽減するためには、正確な診断に基づいた感染親株の除去、更新が不可欠である。

これまで、TSWV の診断には、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 法や RT-PCR 法が、一方、CSVd の診断には、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、ハイブリダイゼーション法そして RT-PCR 法などが行われているが、これらの病原体を同時に検出する技術は報告されていない。マルチプレックス RT-PCR 法は、一つの PCR 反応で複数のプライマーを使用し、2 種類以上の標的遺伝子を同時に検出する技術で、近年、農業分野においても利用され始めている (Uga and Tsuda, 2005, 下元・竹内, 2006)。

本研究では、健全なキク親株を確保するための簡易かつ高精度なウイルス、ウイロイド診断技術を開発することを目的に、マルチプレックス RT-PCR 法によるキクからの TSWV と CSVd の同時検出技術を検討した。

2) 材料および方法

(1) 供試ウイルス

供試株には、広島県内のキク農家圃場で TSWV (江田島市) と CSVd (庄原市) に自然条件下でそれぞれ単独感染し、黄化えそおよびわい化の病徴を呈したキク‘神馬’および‘町娘’を使用した。供試株の TSWV 感染は、N タンパク質のモノクローナル抗体 (Tsuda et al., 1994)

による DAS-ELISA 法で, CSVd 感染は, 楠ら (1993) および Hooftman et al. (1996) の設計したプライマーを用いた RT-PCR 法で確認した。

(2) 特異的プライマーの設計

TSWV の特異的プライマーは, ネット上で公開されているプライマー設計ソフト Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) を用いて, S RNA の N タンパク質遺伝子の塩基配列 (DDBJ/EMBL/GenBank アクセッション番号 D13926) に基づいて, 324bp の DNA 断片を増幅するように設計した。一方, CSVd のプライマーは, 既報 (アクセッション番号 V01107) の塩基配列に基づいて, 末端保存領域を含む 243bp の DNA 断片を増幅するように設計した (Table 3)。いずれも, 既報の他のウイルス, ウイロイド株の塩基配列と照合し, 3'末端側に変異を含まないようにした。

(3) ツーステップ・マルチプレックス RT-PCR 法

各発病葉 30mg から SV Total RNA Isolation System (Promega 社)を用いて, プロトコールに従って全 RNA を抽出した。単独および混合 (1:1) の RNA 液 5 μ l を鋳型として, Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen 社)およびランダムヘキサマー (5 μ g/ml) を用いて, プロトコールに従って cDNA を合成した。cDNA 液の 2 μ l を鋳型とし, Takara *Ex Taq* (Takara 社)により PCR を行った。PCR 反応は, 全量を 50 μ l で行い, 各プライマーの最終濃度は, 0.2 μ M とし, 94 $^{\circ}$ C, 3 分の変性後, 94 $^{\circ}$ C, 30 秒, 54 $^{\circ}$ C, 30 秒, 72 $^{\circ}$ C, 1 分を 30 サイクル, 最後に 72 $^{\circ}$ C で 10 分伸長反応させた。PCR 産物は, アガロースゲルで電気泳動し, エチジウムブロマイド染色した。

TSWV および CSVd にそれぞれ単独感染し, 発病したキク‘神馬’と‘町娘’から, 前述の方法で全 RNA を抽出し, 健全葉から抽出した全 RNA で 10 倍段階希釈した。各希釈液を混合した RNA 液を鋳型にし, 同様の方法でツーステップ・マルチプレックス RT-PCR 法を行った。

Table 3 Primers used in multiplex RT-PCR for detecting TSWV and CSVd in chrysanthemums

Primer ^a	Sequence	Length (mer)	<i>T_m</i> ($^{\circ}$ C)	Expected size	
				Nucleotide position	(Base pairs)
TSWV324F	5'-GCTTCCTTGGTGTCATACTT-3'	20	54	2247 to 2266 (v) ^b	324
TSWV324R	5'-AACTTCAGACAGGATTGGAG-3'	20	54	2551 to 2570 (vc)	
CSVd243F	5'-GTTAGCCCTTGGAACCTTAG-3'	20	56	326 to 345 (v)	243
CSVd243R	5'-CCAGGAGAGGAAGGAAACTA-3'	20	56	193 to 212 (vc)	

^a TSWV324F and R primers are designed from viral S RNA sequences.

^b v indicates virus (or viroid) sense. vc indicates virus (or viroid) complementary sense.

(4) ワンステップ・マルチプレックス RT-PCR 法

TSWV と CSVd 重複感染キクからの簡易抽出とワンステップ・マルチプレックス RT-PCR 法による両ウイルス、ウイロイドの同時検出を試みた。すなわち、CSVd に感染したキク‘町娘’の苗に、TSWV をカーボランダムにより汁液接種した。TSWV によるキクえそ病の病徴を呈した‘町娘’の発病葉 25mg を 2500 μ l (100 倍量) の TE 緩衝液 (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA) で十分に磨砕し、5000rpm, 5 分間遠心した後、その上清を同じ緩衝液で 10 倍段階希釈した。各希釈液は、65 $^{\circ}$ C, 5 分熱処理し、このうち 1 μ l を用いて、One-Step RNA PCR Kit (AMV) (Takara 社) によりプロトコールに従って、ワンステップ・マルチプレックス RT-PCR 法を行った。プライマーは、最終濃度 0.4 μ M で使用し、PCR の反応条件は前述と同様とした。

3) 結果

TSWV および CSVd にそれぞれ単独感染したキクから抽出した RNA の単独、混合液を鋳型としたツーステップ・マルチプレックス RT-PCR 法では、ともに予想される分子量の DNA 断片が認められ、健全キクからは認められなかった (Fig. 1)。CSVd 感染葉からは、予想される DNA 断片以外に、600bp 付近に明瞭な DNA 断片が検出されたが、目的の DNA 断片と分子量が大きく異なるため、判定の障害にはならなかった。増幅 DNA 断片をゲルから切り出し、精製後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit により塩基配列を決定したところ、324bp 増幅断片は、TSWV の N タンパク質遺伝子と 98.5%、243bp 増幅断片は、CSVd と 97.0% の高い相同性が認められ、目的の遺伝子が増幅されたことが確認された。プライマー対 TSWV324F/TSWV324R を用いた RT-PCR 法では、広島県内の他の地域で採集したキクえそ病発病キク‘精興の秋’、‘秋晴れ’、‘精の曲’および‘金峯’からも目的の増幅 DNA 断片が得られ、TSWV に近縁の INSV cin9902 株 (谷名ら, 2001) に感染した *Nicotiana benthamiana* からは、増幅断片は得られなかった (データ省略)。また、プライマー対 CSVd243F/CSVd243R を用いた RT-PCR 法では、広島県内の他の地域で採集したキクわい化病発病キク‘舟宿’からも目的の増幅 DNA が得られた (データ省略)。このように、本プライマーは、それぞれの病原体に高い特異性を有しており、かつ、異なる地域で採取したキクの TSWV と CSVd 株を検出できるものと推察された。

異なる割合で混合した抽出 RNA 液を鋳型にしたツーステップ・マルチプレックス RT-PCR 法では、CSVd は 10^{-2} 希釈まで、TSWV は 10^{-3} 希釈でも検出できた (Fig.2)。このように、鋳型 RNA 量の比率を変えても、ツーステップ・マルチプレックス RT-PCR 法によって TSWV と CSVd の同時検出が可能であった。ランダムヘキサマーを用いたツーステップ・マルチプレックス RT-PCR 法では、合成した cDNA 液を用いて、他の病原体も検出できる可能性があり、今後の検討を要する。

TSWV と CSVd の重複感染キクからの粗汁液を用いたワンステップ・マルチプレックス RT-PCR 法では、TSWV は 10^{-8} 希釈まで、CSVd は 10^{-5} 希釈まで検出できた (Fig.3)。また、 -35° C で 1 週間凍結した罹病サンプルを使用しても同じ結果が得られた (データ省略)。感染

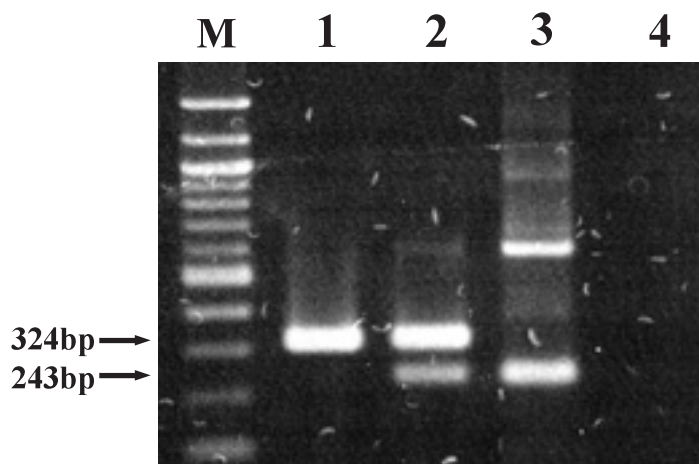


Fig. 1. Two-step multiplex RT-PCR amplification products using one single or a mixture of two species of total RNAs extracted from chrysanthemum leaves infected with TSWV and CSVd. RT was performed using random hexamer primers. Lanes: M, 100-bp ladder marker; 1, TSWV; 2, TSWV and CSVd; 3, CSVd; 4, Healthy chrysanthemum plant.

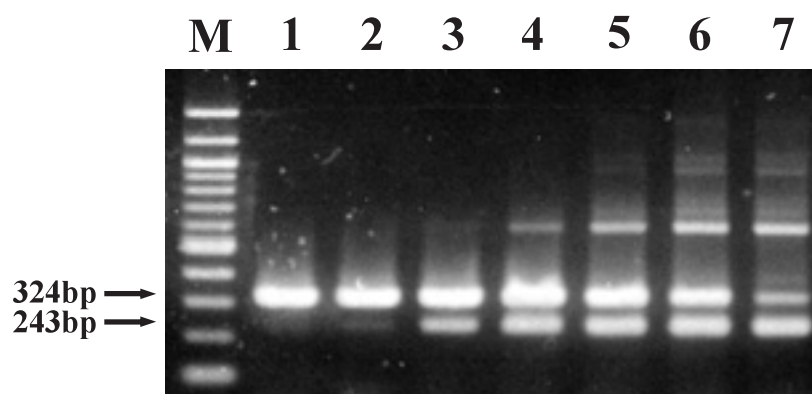


Fig. 2. Two-step multiplex RT-PCR amplification products using a mixture of two species of total RNAs extracted from chrysanthemum leaves infected with TSWV and CSVd. Total RNAs were separately diluted with RNAs from healthy leaves and mixed to create 10^{-2} to 10^{-3} dilutions of TSWV and CSVd. RT was performed using random hexamer primers. Lanes: M, 100-bp ladder marker; 1-3, 10^{-3} to 10^{-1} -fold dilutions of CSVd with 10^0 -fold dilution of TSWV; 4, 10^0 -fold dilution of TSWV and CSVd; 5-7, 10^{-1} to 10^{-3} -fold dilutions of TSWV with 10^0 -fold dilution of CSVd.

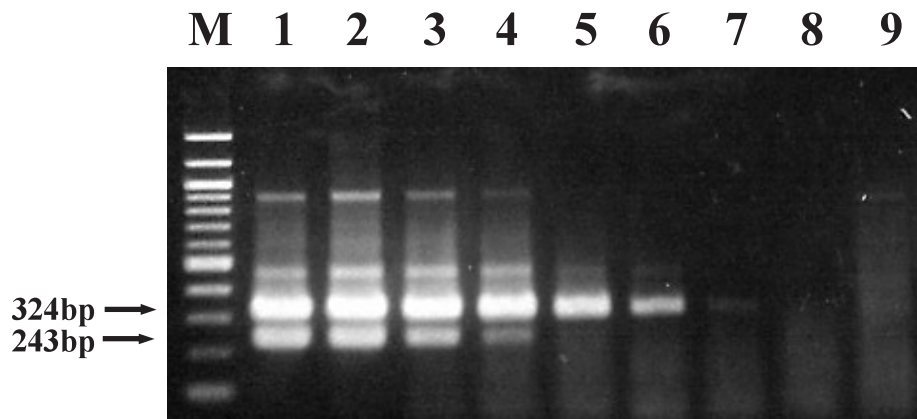


Fig. 3. Detection sensitivity by one-step multiplex RT-PCR using crude sap from TSWV and CSVd co-infected chrysanthemum leaves. A leaf sample (25 mg) was ground with 2500 μ l of extraction buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) and the resultant crude sap was serially diluted up to 10^9 -fold with the same buffer. Approximately, 1 μ l of crude sap, centrifuged and heated at 65°C for 5 min, was used as the template for one-step multiplex RT-PCR.

Lanes: M, 100-bp ladder marker; 1-8, 10^2 to 10^9 -fold dilutions; 9, healthy chrysanthemum plant.

葉からは、450bpと900bp付近に増幅DNA断片が検出されたが、目的の分子量と異なるため、判定の障害にはならなかった。本法による TSWV の検出感度は、同じサンプルを用いたモノクローナル抗体による DAS-ELISA 法の検出限界が 10^5 であったのに対して、約 1000 倍の十分な高さを示した（データ省略）。

4) 考察

Uga (2005) は、各種植物の粗汁液を用いたワンステップ RT-PCR 法で、種々の植物ウイルスが高感度に検出できたと報告し、その理由として、希釈によるタンパク質、多糖類などの PCR 阻害物質の低濃度化、検定キット自体の阻害物質の影響を受けにくい特性等を推察している。本実験でも、容積比 100 倍以上の TE 緩衝液で磨砕した粗汁液を用い、ワンステップ・マルチプレックス RT-PCR 法を行うことで、キクの阻害物質の影響を受けずに、TSWV と CSVd を高感度に同時検出することが可能であった。後に詳しく述べるが、TSWV は、キク組織内で局在することが知られている (Allen et al., 1990, Van de Wetering et al., 1999)。粗汁液を用いた本法では、無病徴の感染キク‘神馬’から TSWV を検出することが可能であったが、その高い検出感度にもかかわらず、感染株でも検出できない部位が見られた（データ省略）。したがって、親株を検定する場合は、複数葉を採取し、混合して検定するなど、ウイルスの局在性を均質化することが必要と考えられる。一方、CSVd は、RT-PCR 法で検出可能な

高濃度感染と Nested RT-PCR 法でないと検出ができない低濃度感染があることが知られており(細川ら, 2003), 多くの品種が低濃度感染している可能性も示唆されている。本法により, 無病徴の感染キク‘レサイバー・サーモン’から CSVd を検出することができたが(データ省略), 低濃度感染株からの検出は行っていない。しかし, 低濃度感染の場合, 発病までに長期間を必要とするため, 挿し穂を用いる切り花栽培における被害回避という視点に立てば, 高濃度感染のみを標的にして問題はないと考えられ, その選別は, 本法で可能と考えられる。

以上のように, 煩雑な核酸の精製を行わず, 感染葉の粗汁液を用いたワンステップ・マルチプレックス RT-PCR 法によって, キクの TSWV と CSVd を同時に高感度検出することが可能であり, 本法は, 切り花生産あるいは親株維持用の挿し穂を採穂するための母株(親株)のより簡便な診断手法として, 公的な指導機関や種苗会社等において利用できるものと考えられる。

2. RT-LAMP 法によるキクを含む数種作物からの TSWV の迅速検出

1) 緒言

広島県では, TSWV はキク以外に, トマト, ピーマンなどの果菜類での発生が毎年散見されており, 一部では大きな経済的被害をもたらしている。前述のとおり, キクでは親株からの挿し穂の採穂という栄養体繁殖を行うため, ウイルス症状を呈さない潜在感染した親株や, 親株育成用の母株のウイルス病診断は, 垂直伝搬を防ぐ上で重要である。また, キク以外の果菜類においては, その病徴がトバモウイルス属やキュウリモザイクウイルス(*Cucumber mosaic virus*: CMV)のようなえそを伴う他のウイルス病と似ているため, 現場で早急な防除対策を講じる上で, 簡易かつ迅速な診断法が必要である。

TSWV の診断には, ウイルス抗体を用いた ELISA 法や Dot immunobinding assay (DIBA) 法, ウイルス核酸を用いた RT-PCR 法等が行われており, これらの手法は, いずれも高い検出感度を有し, 比較的 low 濃度のウイルスを検出することが可能である。しかし, いずれも特殊な機械と実験装置が必要であるため, 試験研究機関以外の場所で行うには多くの制約がある。一方, Tsuda et al. (1992) によって開発された Rapid Immunofilter Paper Assay (RIPA) 法は, 抗体を吸着させたろ紙を用いて, リトマス試験紙的にウイルスを診断する技術で, その後, 改良が加えられ, 現在ではイムノストリップ®などの商品としてウイルス診断ツールとして実用化されている。本法は, 極めて簡便な上に, 検出感度も比較的高く, 信頼できる方法であるが, キク親株における潜在感染のような低濃度ウイルスを検出することは難しい。

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法は, 6 箇所の塩基配列を認識する 4 種のプライマーを用いた, 日本で開発された遺伝子増幅技術である(Notomi et al., 2000)。本法は, 反応特異性が極めて高く, 63°C 程度の一定温度での反応で, 遺伝子増幅の反応副産物であるピロリン酸マグネシウムの生成・沈殿による白濁により, 電気泳動することなく遺伝子増幅の有無を判定できる(Mori et al., 2001)。LAMP 法は, 高い特異性と簡易さ, 迅速性から, 医

療分野を中心に種々病原体の検出に利用されている。また、一部の植物ウイルスの領域においても実用化がなされている (Fukuta et al., 2003)。

そこで、LAMP 法による TSWV の診断技術を確立するために、キクを含む主要な農作物からの、本法による TSWV の検出について検討した。

2) 材料および方法

(1) LAMP プライマーの設計

LAMP プライマーは、Kormerink et al. (1992) が報告した TSWV M 遺伝子の塩基配列 (アクセッション番号 S48091) から、ネット上で公開されているプライマー設計ソフト Primer Explorer を利用して 6 セットを設計した。その結果、NSm 遺伝子領域から選ばれたプライマーが非特異反応もなく、安定した検出結果が得られた (データ省略)。F2 の外側から B2 の外側までの増幅領域は 152bp とし、F3, F2, B2, B3 の 3'側 6 塩基と F1c, B1c の 5'側 6 塩基には Kellmann et al. (1996) の報告した塩基配列 (アクセッション番号 X93603) と照合し、変異が含まれないように設計した (Fig. 4)。なお、増幅領域内に制限酵素サイト *Hinf* I および *Bsm* I を含むようにした。

(2) RT-LAMP 法による各種植物サンプルからの TSWV の検出

ウイルスには、当センター保存の TSWV 広島県江田島市キク分離株、庄原市トマト分離株、東広島市ピーマン分離株を用いた。また、TSWV に近縁の INSV が非特異的な反応として検出されないことを確認するため、INSV Cin9902 株 (岡山農試から分譲) を用いた。

```

661  gat gaacaac accccagaaa act gttgtca gctgcatttg atgtgtagcc aagaatacaa
                                F3
721  gaaagggggtt tcttttggta gtgcatgta ttcttggaca aaagagtttggtgattcacc
                                F2          Loop Fc          F1          Hinf I
781  cagagctgat aaagacaaaa gttgtatggf tatacctcta aacagggcca ttagagctag
                                B1c          Loop B
841  atctcagggcattcattgaag cctgcaagct gataattcct aaaggaaaca gtgagaagca
                                Bsm I          B2c          B3c
901  gataaaaaaaa cagcttaaag aactgagctc aaatcttgag agatcagttg aagaggaaga
  
```

Fig. 4. Nucleotide sequence of TSWV NSm protein gene for designing the inner and outer primers. RNA sequences used for primer design are shown by bold lines. Loop primers are shown by thin lines. The restriction sites for *Hinf* I and *Bsm* I are indicated by boxes. Mutation parts in which the different part between previous studies (Kormelink et al. 1992; Kellmann et al. 1996) are indicated by shaded boxes.

検出用サンプルは、各分離株が分離された植物に汁液接種し、病徴を呈したものをを用いた。すなわち、TSWV キク分離株の発病キク‘神馬’、TSWV ピーマン分離株の発病ピーマン‘ちぐさ’、TSWV トマト分離株の発病トマト‘ハウス桃太郎’、INSV 発病インパチェンス‘インパクト’および各植物の健全葉を用いた。各サンプルは、低温下、等量の水を加えて磨砕し、植物組織 15mg 相当分を SV RNA Isolation System (Promega 社) を用いて全 RNA を抽出し、最終的に 100 μ l の水で溶出した。抽出 RNA は、70 $^{\circ}$ C、5 分間処理した後、RT-LAMP 法の鋳型とした。RT-LAMP 反応は、LAMP method DNA Amplification kit (Eiken 社) を用いて行い、プライマー濃度は、F3 と B3 を 0.2 μ M、FIP と BIP は 1.6 μ M とし、7.5U の AMV reverse transcriptase(Invitrogen 社)を加えた。抽出 RNA 液の 2 μ l を鋳型に 25 μ l の反応液で 63 $^{\circ}$ C、1 時間反応させた。

(3) RT-LAMP 増幅産物の制限酵素による消化

TSWV 発病キクおよびトマトから前述の方法で核酸抽出し、RT-LAMP 法により増幅した LAMP 産物が目的の遺伝子であることを確認した。すなわち、制限酵素 *Bsm* I と *Hinf* I により、増幅 DNA をキットのプロトコールに従って消化した。*Bsm* I では、理論上、228, 219, 210bp のフラグメントが多数、192, 51bp のフラグメントが少数、一方 *Hinf* I では、159bp のフラグメントが多数、126, 47bp のフラグメントが少数現れる。制限酵素消化産物は、アガロースゲル電気泳動により観察した。

(4) RT-LAMP 法によるキクの TSWV の検出感度

LAMP 法による TSWV の検出感度を、モノクローナル抗体を用いた DAS-ELISA 法と比較した。TSWV キク分離株に感染、発病したキク‘神馬’の罹病葉 0.5g を低温下、等量の水で磨砕し、健全葉の磨砕液を用いて段階希釈した。各磨砕サンプル (植物組織 15mg 相当) から、SV RNA Isolation System を用いて、全 RNA を抽出し、100 μ l の水で溶出した。抽出 RNA を 70 $^{\circ}$ C、5 分間処理した後、2 μ l を鋳型に RT-LAMP 法を行った。DNA 増幅の有無は、専用濁度計 LA-200 (Teramecs 社)によって計測した。同時に、同様のサンプルを 10 倍量の PBST, 0.2%BSA, 2%PVP に懸濁し、TSWV モノクローナル抗体による DAS-ELISA 法に供試した。ELISA プレートには、Maxisorp U イムノプレート (Nunc 社) を使用した。TSWV の N タンパク質に対するモノクローナル抗体(Anti-TSWV-O IgG Hyb-277A; Tsuda et al., 1994) を 0.05M 炭酸緩衝液(pH 9.6)で 2 μ g/ml になるように調整し、150 μ l を各ウェルに分注した。37 $^{\circ}$ Cで 3 時間保持した後、プレートを PBST で洗浄した。150 μ l のサンプル抽出液を分注し、4 $^{\circ}$ Cで一晩保持した。健全対照として、健全なキク‘神馬’の葉を使用した。アルカリフォスファターゼ標識した TSWV モノクローナル抗体を、PBST, 2% PVP, 0.2%BSA に 1000 倍希釈したコンジュゲート液を分注後、37 $^{\circ}$ Cで 3 時間保持した。洗浄後、発色基質 (*p*NPP) を 1mg/ml になるように 10%ジエタノールアミン液に溶解し、2 時間反応させた。波長 415nm における吸光度をオートプレートリーダーを用いて測定した。

(5) ループプライマーによる RT-LAMP 反応の高速化

LAMP 反応の高速化を図る目的で、ループプライマーを設計した。すなわち、先に設計し

たプライマーの増幅領域内に、ループプライマーLFc: 5'-TGTC CAAGAATACAT-3' および BF: 5'-TTAGAGCTAGATCTCA-3'を設計した (Fig. 4)。TSWV 発病キク‘神馬’の葉 10mg から、AquaPure RNA Isolation Kit (Bio Rad 社) を用いて全 RNA を抽出し、最終的に 50 μ l の水で溶出した。そのうち 2 μ l を鋳型に、ループプライマーを加えた RT-LAMP 法を行った。ループプライマーの最終濃度は、0.8 μ M とし、反応は濁度測定器 LA-200 で計測した。なお、ループプライマーを加えないものを対照とした。

(6) RT-LAMP 法によるアザミウマからの TSWV の検出

ミカンキイロアザミウマ (東広島市個体群) をソラマメで累代飼育 (25°C, 16h L, 8h D) した。ツバキの花粉を餌として、村井の方法 (1997) で卵を採集した。採集した卵を孵化させ、TSWV に感染し、発病したキクの葉で飼育した。2 令幼虫期に毛筆を用いて幼虫を採集し、再びソラマメを用いて飼育し、羽化させた。羽化成虫を採集し、-35°C で保存した。各成虫を 1 頭ずつ、20 μ l の TE 緩衝液で十分に磨砕し、5000rpm で 5 分間遠心分離した。その上清 2 μ l を鋳型に、前述の方法で RT-LAMP 法に供試した。一方、残り 18 μ l に 132 μ l の PBST, 0.2%BSA, 2%PVP を加え、TSWV のモノクローナル抗体を使用した DAS-ELISA 法に供試した。陰性対照として、ソラマメで飼育した健全ミカンキイロアザミウマ成虫を用い、その 3 倍以上の吸光値を示したサンプルを陽性とした。

3) 結果

TSWV の各分離株に感染し、発病したキク、トマトおよびピーマンから、RT-LAMP 法においてラダー状のバンドの形成が認められた。一方、いずれの植物の健全葉からもバンドは認められなかった。さらに、INSV に発病したインパチェンスからもバンドは形成されなかった (Fig. 5)。RT-LAMP 増幅 DNA 断片を *Bsm* I で消化した結果、キク、トマト由来 TSWV 分離株ともに、約 210 および 220bp 付近に明瞭なバンドが現れた。また、*Hinf* I で消化した結果、約 160bp 付近に明瞭なバンドが現れ、130bp 付近に薄いバンドが現れた (Fig. 6)。これらはいずれも、理論値と一致した。以上から、LAMP 増幅 DNA 産物は、TSWV mRNA セグメントの NSm 遺伝子の目的の領域が増幅されたものと判断された。

RT-LAMP 副産物の白濁を利用した検出方法と、TSWV モノクローナル抗体を用いた DAS-ELISA 法の検出感度を、キク感染葉抽出液を健全葉抽出液で段階希釈して比較検討した結果、モノクローナル抗体を用いた DAS-ELISA 法では、キク感染植物組織の 0.75mg 相当まで検出できたのに対し、RT-LAMP 法では 0.03mg 相当まで検出でき、RT-LAMP 法の検出感度は、DAS-ELISA 法のそれよりも約 25 倍高かった (Fig. 7, 8)。

反応液にループプライマーを加えた結果、濁り始める時間が反応開始後 39 分となり、ループプライマーを加えない場合と比較して、約 14 分間短縮された (Fig. 9)。

ミカンキイロアザミウマに TSWV 感染葉を吸汁させて羽化した成虫を、1 個体ずつ RT-LAMP 法および DAS-ELISA 法に供試した結果、雌雄ともに RT-LAMP 法が DAS-ELISA 法よりも陽性個体数が 3 個体多かった。また、DAS-ELISA 法陽性個体は、すべて RT-LAMP

M 1 2 3 4 5 6 7 8

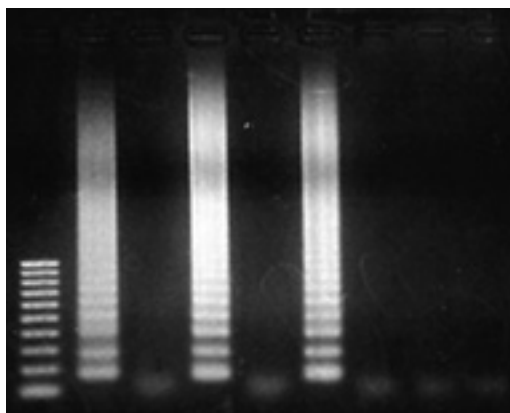


Fig. 5. LAMP assay for TSWV in various crops. M, 100bp ladder marker; 1, TSWV diseased chrysanthemum (cv. Jimba); 2, Healthy chrysanthemum (cv. Jimba); 3, TSWV diseased tomato (cv. House-momotaro) ; 4, Healthy tomato (cv. House-momotaro); 5, TSWV diseased pepper (cv. chigusa) ; 6, Healthy pepper (cv. chigusa) ; 7, INSV isolate Cin9902 diseased impatiens (cv. Impact); 8, Healthy impatiens (cv. Impact) .

M 1 2 3 M M 4 5 6 M

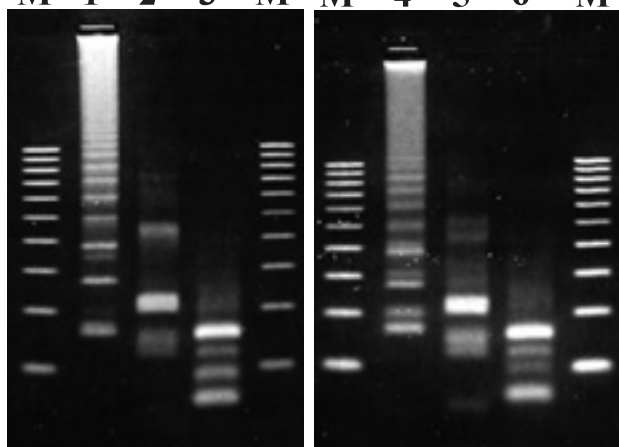


Fig. 6. Restriction analysis of TSWV NSm DNA amplified by RT-LAMP. M, 100bp ladder make; 1, RT-LAMP product derived from TSWV diseased tomato (cv. House-momotaro); 2, LAMP product from infected tomato after digestion with *Bsm* I; 3, LAMP product from infected tomato after digestion with *Hinf* I ; 4, RT-LAMP product derived from TSWV diseased chrysanthemum (cv. Jimba); 5, LAMP product from infected chrysanthemum after digestion with *Bsm* I; 6, LAMP product from infected tomato after digestion with *Hinf* I .

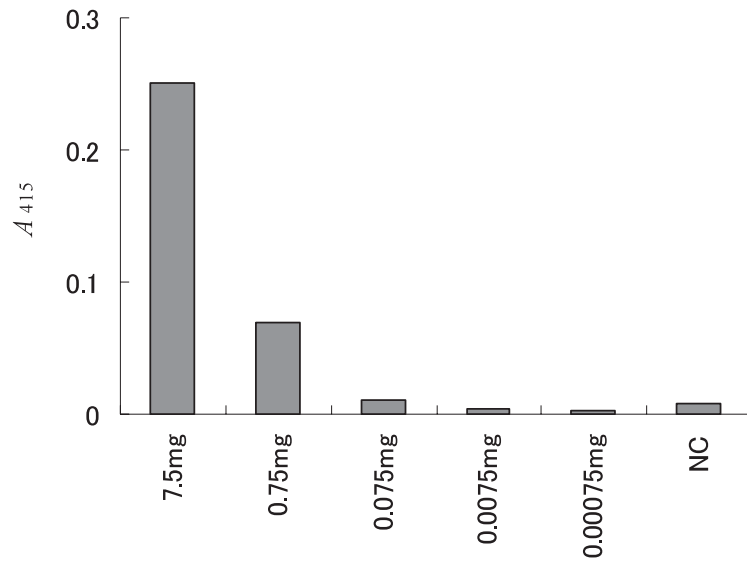


Fig. 7. Sensitivity of DAS-ELISA using monoclonal antibody to detect TSWV from serially diluted extracts from infected chrysanthemum. Numbers indicate weights of infected plant tissue.

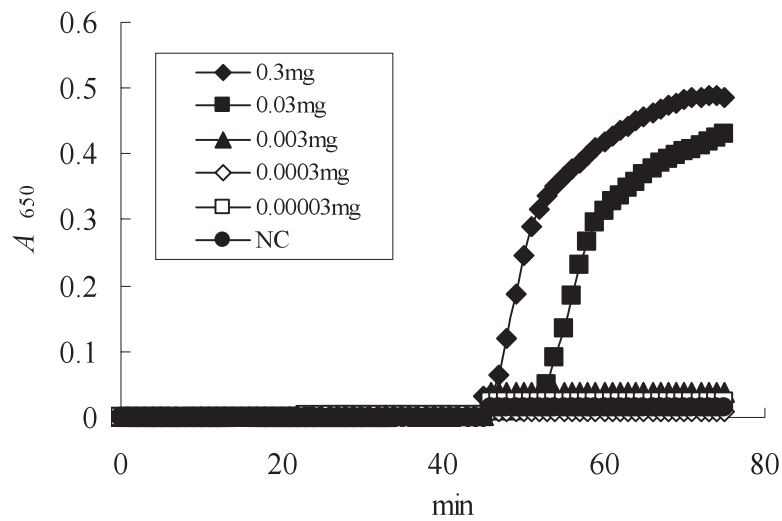


Fig. 8. Sensitivity of RT-LAMP to detect TSWV from serially diluted extracts from infected chrysanthemum. Numbers indicate weights of infected plant tissue.

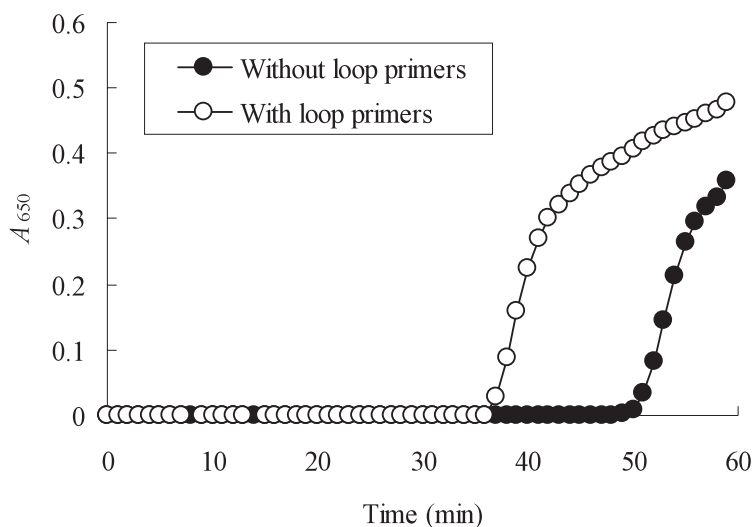


Fig. 9. High speedization of the RT-LAMP reaction by loop primers using extracts derived from TSWV infected chrysanthemum.

Table 4 Comparison of frequency in detection of TSWV in the western flower thrips between RT-LAMP and DAS-ELISA

		RT-LAMP			
		Female		Male	
		positive	negative	positive	negative
DAS-ELISA	positive	10	0	7	0
	negative	3	12	3	6

法陽性であった (Table 4)。

4) 考察

本研究で設計した LAMP プライマーを用いて RT-LAMP 法を行った結果、キク、トマトおよびピーマンから特異的に TSWV を検出することができ、また、近縁の INSV は検出されなかった。また、核酸抽出キットを用いた全 RNA 抽出と RT-LAMP 法の組み合わせは、比較的高い検出感度を実現し、N タンパク質に対するモノクローナル抗体を用いた DAS-ELISA 法に比較して、約 25 倍高い検出感度を示した。しかし、検出感度において、先にワンステップ・マルチプレックス RT-PCR 法が DAS-ELISA 法よりも約 1000 倍高い検出感度を示したことと比較すると、感度は劣っていた。この理由として、ワンステップ RT-PCR 法においては、簡易抽出による粗汁液中の核酸を鋳型にすることができたため、抽出核酸の損失が少なかった。

たことが主要因と考えられる。TE 緩衝液による磨砕粗汁液を鋳型にした RT-LAMP 法においては、設計した全てのプライマーで安定した反応を得ることはできなかった（データ省略）。これは、植物中のタンパク質、多糖類あるいはフェノール類などが、LAMP 反応を阻害したことによるものと考えられる。本技術の最大の利点は、迅速性と簡易さにある。反応自体の迅速性は、ループプライマーの利用で高速化が実現できたが、核酸の抽出・精製に時間がかかる点に問題が残された。一方、ミカンキイロアザミウマからの TSWV の検出においては、昆虫の粗抽出液を鋳型にすることで、RT-LAMP 法は、DAS-ELISA 法よりも高感度に TSWV を検出することが可能であった。この原因として、植物と異なり、動物由来の粗汁液においては、LAMP 反応を阻害する物質が少ないのではないかと推察される。アザミウマによる TSWV の伝搬能力は、TSWV 濃度と相関があるため (Inoue et al., 2004)、極端に検出感度が上昇しても、意味を成さないと思われる。しかし、LAMP 法は、DAS-ELISA 法よりも簡便であることから、本法は、TSWV 保毒アザミウマの疫学調査のための有力な手段となり得ると考えられる。

現在のところ、LAMP 法を実施するためのキットは高額であることや、鋳型となる核酸の精製が必要なことから、キクに感染する TSWV の LAMP 法による迅速診断を即実用化することは困難といえる。しかし、将来、さらにプライマーの設計に改良を加え、LAMP 反応阻害物質の低濃度化などの工夫によって、LAMP 法によるキクの TSWV の高感度な迅速診断が可能になるとと思われる。

Ⅲ. キクに発生した新規トスポウイルスの同定と診断技術の開発

1) 緒言

2006年8月、広島県三次市の施設キク栽培農家1戸(10a)において、‘神馬’および‘精の玉’等に TSWV によるキクえそ病に酷似するウイルス性病害と考えられる症状が発生した。発病株率は、70%以上、発病株数は、約30,000株で、大きな経済的損失をもたらした。‘神馬’では、激しい茎のえそ条斑と葉の退緑、えそ斑および輪紋を呈した(Fig. 10)。「精の玉」では、葉柄基部のえそ斑と葉の退緑斑、黄化を呈した。いずれも、病徴は中上位茎葉に生じ、病徴を呈した葉の位置は不規則で、TSWVによるキクえそ病に酷似していた。発病株は、TSWVによるキクえそ病が強く疑われたため、RIPA法(イムノストリップ®, Agdia社)で検定したが、TSWVおよびINSVともに陰性であった。このため、本病害の病原の諸性質を検討した結果、病原は *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) であると考えられた。本研究では、広島県で発生したキクの新病害の病原を同定するとともに、本ウイルスのRT-PCR法による診断技術を開発した。

2) 材料および方法

(1) 病原の分離と原病徴再現

広島県の施設栽培キクに発生した発病株を採取した。罹病キク葉をカーボランダムを用いて *Nicotiana benthamiana* へ汁液接種した。接種葉に生じた退緑斑点の単一病斑を切り取り、*N. rustica* で増殖した。得られたウイルス分離株が本病の病原であることを確認するため、健全なキク‘神馬’の苗(第5~6葉期)の葉に汁液接種し、ガラス温室内で約1ヶ月間病徴を観察した。



Fig. 10. Symptoms of chrysanthemum tospovirus on naturally infected chrysanthemums (cv. Jimba) in Hiroshima.

(2) 宿主範囲

本病原分離株の宿主範囲を調査するために、各種植物へ汁液接種した。本ウイルスの接種により退緑斑を生じた *N. rustica* の接種葉を接種源として汁液接種し、ガラス温室で約1ヶ月間病徴を調査した。接種には、植物種あたり2~3株を供試した。供試した植物種は、トマト‘ハウス桃太郎’、ナス‘千両2号’、ピーマン‘ちぐさ’、キュウリ‘シャープ1’、*N. rustica*, *N. benthamiana*, *N. Tabacum* ‘Bright yellow’, *Chenopodium quinoa* およびペチュニア‘パール’の6属8種とした。接種は、カーボランダムを用いる常法によって行った。

(3) 血清学的性質

検定試料として、本分離株に感染、発病したキク‘神馬’および TSWV キク分離株に感染、発病したキク‘神馬’を使用した。陰性対照として、健全キク‘神馬’を使用した。TSWV モノクローナル抗体および CSNV ポリクローナル抗体に対する反応を DAS-ELISA 法により検討した。ELISA プレートには Maxisorp U イムノプレート (Nunc 社) を使用した。TSWV モノクローナル抗体 (Anti-TSWV-O IgG Hyb-277A, 1mg/ml) および CSNV のポリクローナル抗体 (DSMZ 社) それぞれを 0.05M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) に 500 倍希釈で調整した。なお、サンプル抽出液には、罹病キク葉を 10 倍量の PBST, 2% PVP, 0.2% BSA で十分に磨砕し、遠心した上清を使用した。アルカリフォスファターゼ標識した TSWV および CSNV 抗体は、PBST, 2% PVP, 0.2% BSA に 1000 倍希釈して使用した。その他の方法は、前述と同様とした。

(4) 遺伝子診断と N 遺伝子の塩基配列解析

現地発病キク‘神馬’および‘精の玉’を計10株採取し、発病葉を氷上で冷却した乳鉢中で100倍量の TE 緩衝液で磨砕した。5000rpm, 5分間遠心し、上清を 65°C, 5分間熱処理し、1µl を鋳型として、One-Step RNA PCR Kit (AMV) (Takara 社) によりプロトコールに従って、ワンステップ RT-PCR 法を行った。まず、Uga et al.(2005)が開発した、TSWV と INSV の特異的な上流プライマーと、全てのトスポウイルスに共通して存在する各 RNA 分節の 5'側の 8 塩基を利用した下流プライマー Tos-R15 を用いたワンステップ・マルチプレックス RT-PCR 法を行った。アニーリング温度は、報告に従って 54°C で行い、PCR 反応回数は、30 回とした。次に、トスポウイルスのユニバーサルプライマー対 BR60/65 (Eiras et al., 2001) を用いて、同様の方法でワンステップ RT-PCR 法を行った。本プライマーは、トスポウイルス属のうち、TSWV, TCSV, GRSV, INSV および CSNV の N タンパク質遺伝子領域から 453bp の DNA 断片を増幅する。なお、増幅産物は、アガロースゲル電気泳動を行い、増幅が認められたバンドは、ゲルから切り出し精製した後、ダイレクトシーケンス解析を行った。

(5) CSNV 特異的プライマーによる RT-PCR 検出

CSNV の N タンパク質遺伝子領域の既報の塩基配列 (アクセッション番号 AF067068) をもとに、ネット上で公開されているプライマー設計ソフト Primer 3 を用いて3種類のプライマー対を設計した (Table 5)。TSWV キク分離株, INSV Cin9902 株, CSNV 広島分離株を *N. rustica* へそれぞれ汁液接種し、モザイク症状あるいは退緑斑を呈した上位葉 (あるいは接種葉) 0.5g を 100 倍量の TE 緩衝液で磨砕し、5000rpm, 5分間遠心後、65°C, 5分間熱処理し、

Table 5 Primers used in RT-PCR for detecting *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV)

Primer ^a	Sequence	Length <i>T_m</i>		
		(mer)	(°C)	Nucleotide position
CSNV81v	5'-CGGAATACTCTGCACGACTT-3'	20	55	81 to 100 (v) ^b
CSNV88v	5'-CTCTGCACGACTTGTAACC-3'	20	55	88 to 107 (v)
CSNV197v	5'-GACACAAGCTGGTGAAGTTG-3'	20	55	197 to 216 (v)
CSNV538c	5'-GCCTGAACTAGAGGGTGAGA-3'	20	57	519 to 538 (vc)
CSNV617c	5'-TGAAGCAATGAGAGGGAGAC-3'	20	55	598 to 617 (vc)

^a All primers are designed from N protein gene of viral S RNA sequences.

^b v indicates virus sense. vc indicates virus complementary sense.

Expected sizes were 458bp, 451bp and 421bp for primer pairs of CSNV81v/538c, CSNV88v/538c and CSNV197v/617c respectively.

そのうち 1 μ l を鋳型に One-Step RNA PCR Kit (AMV) (Takara 社) によりプロトコールに従って、ワンステップ RT-PCR 法を行った。なお、陰性対照として健全キク‘神馬’の葉を使用した。PCR 反応は、全量を 50 μ l で行い、各プライマーの最終濃度は、0.4 μ M とし、94°C、30 秒、55°C、30 秒、72°C、1 分を 30 サイクル反応させた。PCR 産物は、アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色した。さらに、これらの設計したプライマー対を用い、CSNV に自然感染したキクからの検出も行った。

(6) 発病株に寄生するアザミウマ種

現地で CSNV に感染し、発病した株の花を任意に 10 花採集し、70%エタノールで攪拌、抽出し、実体顕微鏡下で寄生アザミウマ種の同定を行った。

3) 結果

単病斑分離により得たウイルス分離株をキクへ戻し接種したところ、接種 2 週間後には接種葉に退緑斑点、えそ輪紋、葉脈えそが、接種 3 週間後には茎えそ条斑が観察され、それらは原病徴に類似していた。

分離株を 6 属 8 種の植物へ汁液接種した結果を Table 6 に示した。接種した植物種の中で全身感染した植物は、トマト、ピーマンおよび *N. benthamiana* のみであった。本分離株は、*N. benthamiana* の上位葉に葉脈透化を、ペチュニアの接種葉にえそ斑点を生じるなど、CSNV と類似した宿主範囲と病徴を示した (Fig. 11)。トマト‘ハウス桃太郎’では激しい茎えそ、上位葉のえそ斑点、輪紋、葉脈えそを生じ (Fig. 11)、ピーマンでは、上位葉の退緑斑点、輪紋を生じた。トマト、ピーマンでは植物体のわい化が認められ、一部の株は、枯死した。

本ウイルスに自然感染したキク発病葉を TSWV モノクローナル抗体および CSNV ポリクローナル抗体による DAS-ELISA 法に供試した結果、CSNV 抗体に対して明瞭な反応が認めら

Table 6 Host range and symptomatology as determined for chrysanthemum tospovirus isolate in Hiroshima and *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV)

Plants	Chrysanthemum virus		CSNV*	
	Local	Systemic	Local	Systemic
Chenopodiaceae				
<i>Chenopodium quinoa</i>	NS	-	NS	-
Cucurbitaceae				
<i>Cucumis sativus</i>	NS	-	CL	-
Solanaceae				
<i>Lycopersicon esculentum</i>	NS, NR, CS, CR	NS, NR, CS, CR, VN	NS, NR	CS, VN
<i>Nicotiana benthamiana</i>	CS	VC, M	CS	VC, M, LD
<i>Nicotiana glutinosa</i>	NS, NR	-	NS	-
<i>Nicotiana rustica</i>	CS, CR	-	CS	VC, M
<i>Capsicum annuum</i>	CS, CR	CS, CR, M		
<i>Petunia hybrida</i>	NS	-	NS	-

NS, necrotic spots; CL, chlorotic lesion; NR, necrotic rings; CS, chlorotic spots; CR, chlorotic rings; VN, vein necrosis; VC, vein clearing; M, mosaic; LD, leaf deformation; -, no symptoms.

* Bezerra et al. 1999



Fig. 11. Symptoms of chrysanthemum tospovirus on tomato and petunia by mechanical inoculation.

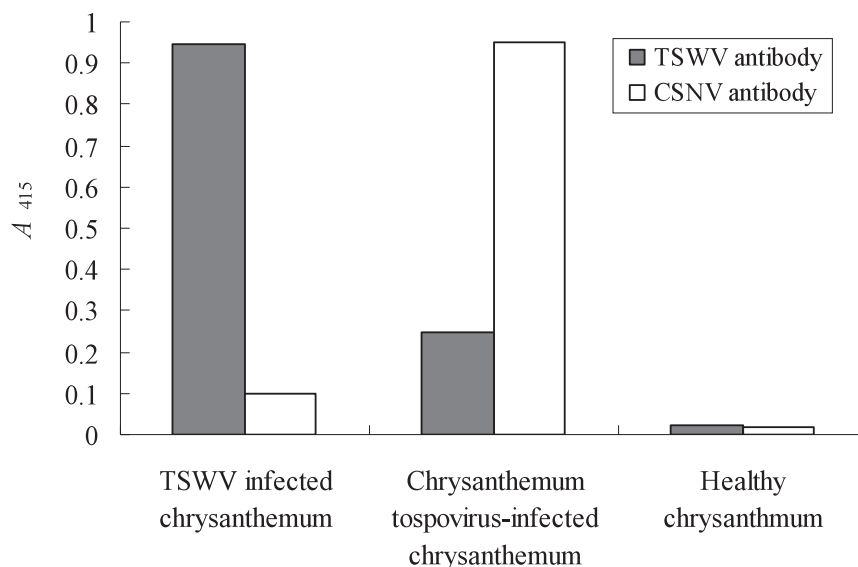


Fig. 12. Serological reaction of TSWV and chrysanthemum tospovirus-infected chrysanthemums in DAS-ELISA format with TSWV and CSNV antibodies.

れ、TSWV 抗体に対して弱い交差反応が認められた。一方、TSWV 感染キクは、CSNV 抗体に交差反応を示した (Fig. 12)。

現地発病キクから、TSWV と INSV の特異的プライマーを用いてマルチプレックス RT-PCR 法による両ウイルスの検出を行った結果、発病葉から、これらウイルスから予想される分子量のいかなる増幅断片も得られなかった (Fig. 13)。一方、トスポウイルスのユニバーサルプライマーで RT-PCR 法を行った結果、トスポウイルス属に予想される約 450bp の増幅 DNA 断片が確認された (Fig. 14)。この増幅断片をダイレクトシーケンスした結果、既報の CSNV のヌクレオカプシド (N) タンパク質遺伝子領域と 98.1%の相同性が確認された (Fig. 15)。

現地のキク発病株の花に寄生していたアザミウマ類は、大部分がミカンキイロアザミウマであり、次いでヒラズハナアザミウマ (*Frankliniella intonsa*) が多く認められた (データ省略)。

既報の CSNV の N タンパク質遺伝子の塩基配列に基づいて特異的プライマーを設計し、*N. rustica* 感染葉から RT-PCR 法による検出を行った結果、いずれのプライマー対を用いても、CSNV 感染葉から予想される分子量のバンドが検出され、TSWV、INSV 感染葉および健全キク葉からバンドは検出されなかった (Fig. 16)。また、これらのプライマーは、全て CSNV に感染したキクからもウイルスを検出できた (データ省略)。

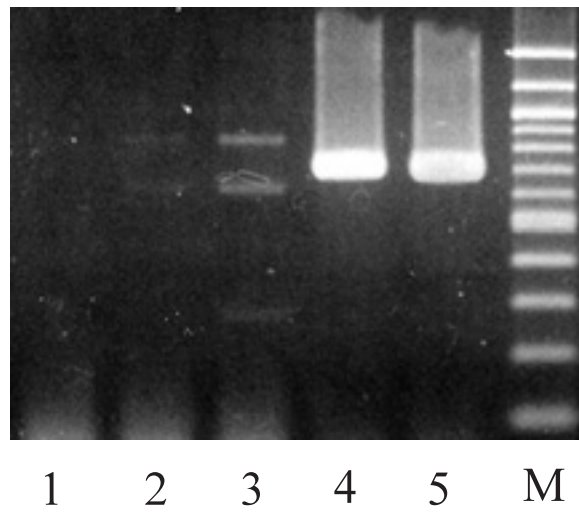


Fig. 13. Tospovirus multiplex RT-PCR amplification products using a TSWV and INSV specific primer sets in total RNAs extracted from chrysanthemum leaves.

Lanes: 1, Healthy chrysanthemum; 2-3, Chrysanthemum tospovirus-infected chrysanthemums; 4-5, TSWV-infected chrysanthemums; M, 100-bp ladder marker.

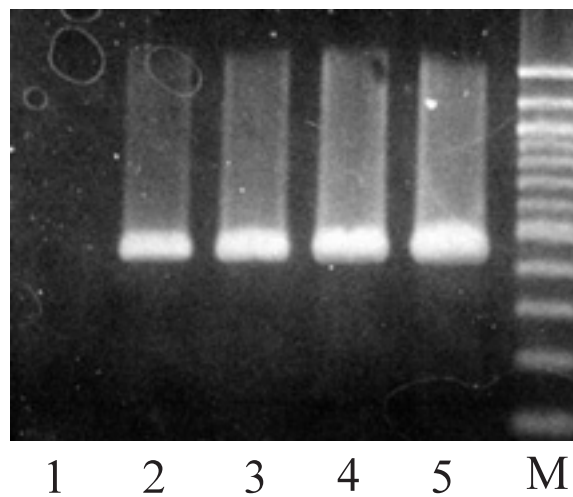


Fig. 14. RT-PCR amplification products using a tospoviral universal primer pair BR60/65 in total RNAs extracted from chrysanthemum leaves.

Lanes: 1, Healthy chrysanthemum; 2-3, Chrysanthemum tospovirus-infected chrysanthemums; 4-5, TSWV infected chrysanthemums; M, 100-bp ladder marker.

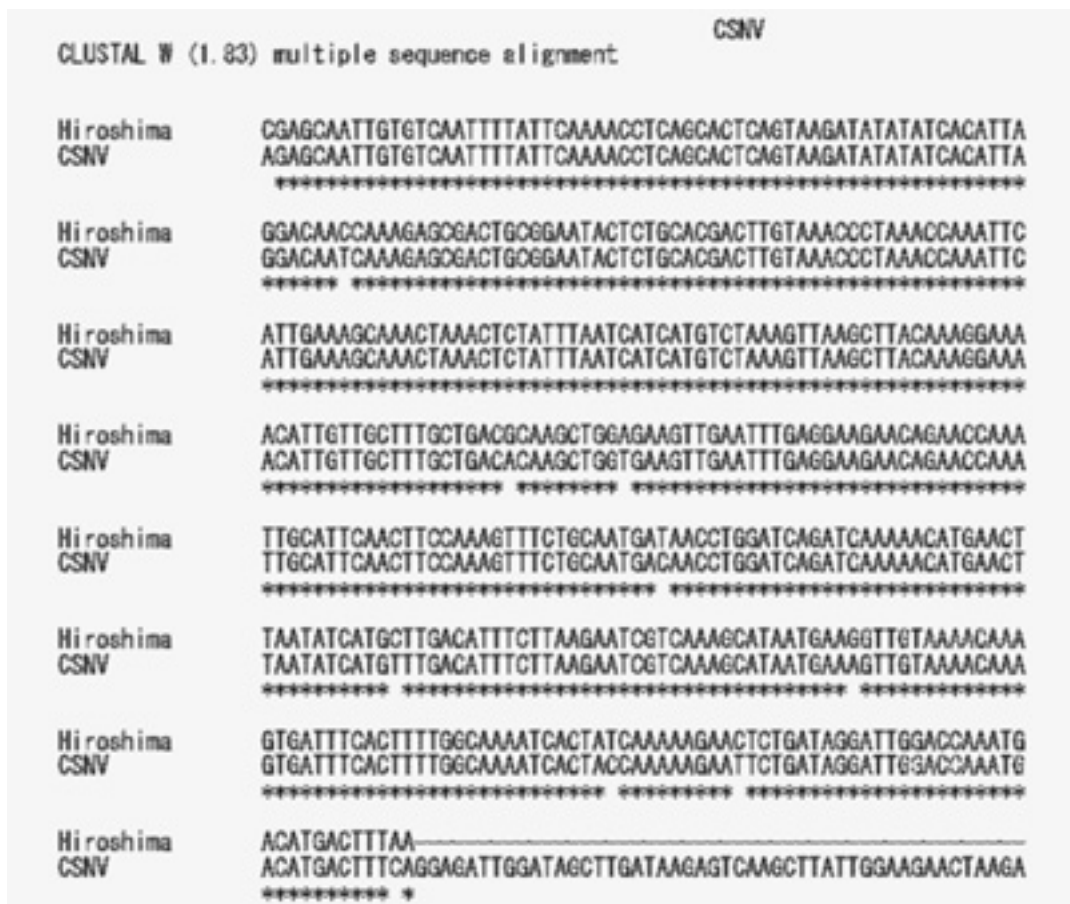


Fig. 15. Sequence of alignment of partial N gene of chrysanthemum tospovirus isolate in Hiroshima and CSNV.

4) 考察

広島県三次市で発生した、キクに退緑斑や茎えそを生じる病害は、その病徴から TSWV によるキクえそ病に酷似したが、本病に対する RIPA 法で陰性反応を示したため、TSWV に類縁のウイルス病であると考えられた。そこで、本ウイルスを分離して、その特性を検討した。この分離株は、ペチュニアにえそ斑点を生じる等、トスポウイルス属に特徴的な病徴を呈し、かつ、その宿主範囲は、既報の CSNV のそれ (Bezerra et al., 1999) に類似していた。また、本分離株は、DAS-ELISA 法で CSNV 抗体と強く反応し、TSWV 抗体と弱い交差反応を示した。これらの結果から、本ウイルスは TSWV ではなく、CSNV か、それに近縁なウイルスであると考えられた。現地での発病キクは、TSWV および INSV のマルチプレックス RT-PCR 法診断で陰性であったことから、これらのウイルスに重複感染していないと考えられた。ユニバーサルプライマーを用いた RT-PCR 法による N 遺伝子の増幅 DNA 断片の塩基配列は、既報の CSNV の配列と極めて高い相同性を示した。以上の結果から、キクに退緑斑や茎えそ

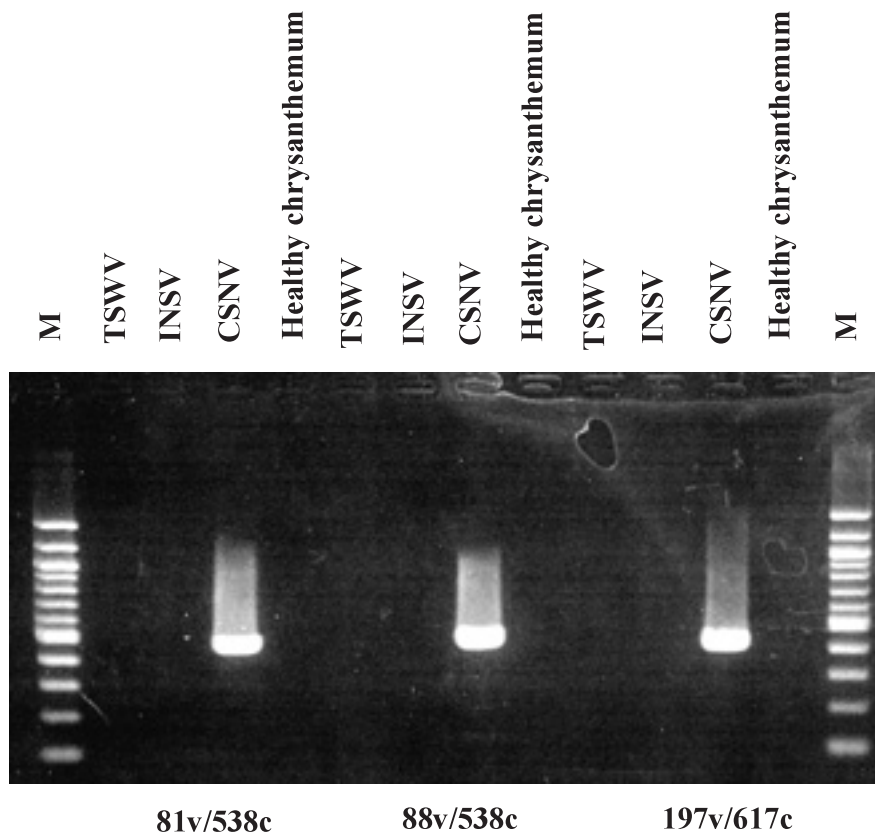


Fig. 16. RT-PCR amplification products from several tospoviral infected *Nicotiana rustica* and healthy chrysanthemum plant using CSNV specific primer pairs designed based on the N protein gene. M, 100-bp ladder marker.

等の症状を起こす病原ウイルスは、CSNVと同定された。キクでのCSNVの発生報告は、わが国で初めてであるので、本病を「キク茎えそ病」と命名した。

CSNVは、1994年にブラジルのキク栽培で初めて被害が確認され (Bezerra et al., 1999), 同じころ、オランダにおいても、同様の被害が認められた (Verhoeven et al., 1996)。また、ブラジルでは、トマトへも被害が波及した。その後、本ウイルスは、イギリスおよびスロベニアのキク栽培で被害が発生した (Mumford et al., 2003)。

ブラジルにおいて、本ウイルスは、ミカンキイロアザミウマおよび同属の *Frankliniella schultzei* (日本未発生) によって高率に媒介され、これら2種が主要媒介虫である可能性が高いと報告された (Nagata et al., 2000)。本研究において、現地発病キクにおける寄生アザミウマ種は、ミカンキイロアザミウマであった。従って、広島県のキク施設で二次感染をもたらした

た媒介虫は、ミカンキイロアザミウマであると推察される。本ウイルスは、ネギアザミウマによって媒介されないことが確認されているが (Nagata et al., 2000), ミカンキイロアザミウマと同属のヒラズハナアザミウマの媒介能力は不明である。ヒラズハナアザミウマは、主にキクの開花後に飛来侵入するため、事実上媒介種として問題になることは少ないと思われるが、キクの栄養成長期でも散見されることがあるため、本害虫の CSNV 媒介能力を明らかにする必要がある。

これまで、CSNV に特異的なプライマーの報告はなく、本ウイルスを遺伝子診断する場合、塩基配列を決定し、その相同性から判断する以外方法がなかった。そこで、数種の特異的プライマーを設計し、RT-PCR 法を行った結果、いずれのプライマーも CSNV を特異的に検出し、近縁の TSWV, INSV および健全キクからは、非特異的反応を含め、いかなる増幅断片も検出されなかった。このように、キクの粗汁液を用いたワンステップ RT-PCR 法によって、キクから特異的に CSNV の検出が可能になり、本技術は、現地発病株の診断および植物検疫現場における診断業務において利用可能と考えられる。

本ウイルスは、前述のとおり TSWV によるキクえそ病と病徴が酷似しているため、TSWV として見過ごされているケースが多いと予想され、すでに日本国内で広く発生している可能性も考えられる。事実、2007 年以降関東地域を中心に、いくつかの自治体で本病の病害虫発生予察情報特殊報が発表された。キクは、栄養繁殖作物であるため、一度産地にウイルス病が侵入すると、根絶するのは極めて多難を要することは TSWV の事例が示すとおりである。今後、本ウイルスを産地に定着させず、根絶するために十分注意を払う必要がある。特に、日本での本病の発生実態、主要感染ルート、伝染環、品種の感受性など不明な点が多いため、これらを明らかにし、その知見に基づいた防除対策を構築することが急務と考えられる。

IV. 広島県におけるキクえそ病の発生要因

1. 垂直伝搬の様相 -キク親株から挿し穂への感染様相-

1) 緒言

キクは、親株の冬至芽や地上芽から挿し穂を採穂する栄養体繁殖によって増殖することが多いため、ウイルス感染した親株からの垂直伝搬は、重要なウイルスの第一次伝染源になると考えられる。TSWV に潜在感染したキク親株から挿し穂への栄養繁殖を介した伝染効率を明らかにすることは、本病の第一次伝染源を特定するという視点から重要である。また、本病を予防するために、潜在感染親株の的確な診断に基づいた除去と更新は重要と考えられる。特に、低温期では、ウイルス感染したキク親株は、病徴を呈さないことが多く、正確な親株感染の診断のためには、ウイルスの局在部位を特定することが重要である。

本研究では、無病徴の感染親株における TSWV の局在性と、ウイルス局在に起因する感染親株から挿し穂へのウイルスの垂直伝染率を調査した。

2) 材料および方法

(1) 感染植物

2001年9月および2002年9月に、広島県江田島市のキク産地で、キクえそ病に自然感染、発病した‘精の館’、‘神馬’を6株採取し、地上部30cm以下の切り下株を根ごと1/2000aワグネルポット(まさ土:バーク堆肥=1:1,IB化成2g/l添加)へ移植し、無加温ガラス温室内で、親株として栽培した。アザミウマ類の寄生を防ぐために、各植物はゴース(目合い112 μ m:NBCインダストリー社)で覆った。これらの品種は、現地での発病株率が10~20%と比較的高いため感受性品種とみなした。

(2) 挿し穂、根の採取

2002年および2003年の1~5月まで、各株地上部から新たに発生する本葉6枚の側芽茎葉を挿し穂として、親株あたり2~4個体をランダムに採取した。また、各親株の根を流水で裸出させ、株あたり2~4箇所の根(0.1g単位)を採取した。採取した挿し穂は、頂芽、上位(上位1~2葉)、中位(上位3~4葉)、下位(上位5~6葉)茎葉に分割し、-30 $^{\circ}$ Cで保存した。挿し穂の各部位におけるTSWVのNタンパク質の蓄積量を、DAS-ELISA法により調査した。ELISAプレートにはMaxisorp U イムノプレート(Nunc社)を使用し、健全対照の吸光度に分散の3倍量を加えた値を超えたサンプル(茎葉では0.020,根では0.022)を陽性とした。

(3) 挿し穂からの高感度ウイルス検出

2003年4月に採取した挿し穂は、低濃度のウイルスを検出するために、DAS-ELISA法の他に、同じサンプルをより検出感度の高いRT-PCR法と増幅DNAのハイブリダイゼーション法の組み合わせに供試した。すなわち、挿し穂を等量の水で低温下で十分に磨砕し、組織

50mg 相当量から RNeasy Plant Mini Kit(Qiagen 社)によりプロトコールに従って全 RNA を抽出した。cDNA の合成は、AMV 逆転写酵素 (Gibco 社)を用いて、42°C, 1 時間で行った。その後、*Taq* DNA polymerase (Gibco 社) を用いて PCR を行った。プライマーは、TSWV の MRNA の NSm 遺伝子領域の塩基配列に基づいて、藤ら (1998) が設計したプライマーを使用した。PCR 反応は、96°C, 3 分の変性後、96°C, 1 分、52°C, 1 分、72°C, 2 分を 35 サイクル行い、最後に 72°C, 10 分伸長反応させた。増幅した PCR 産物の 1 μ l をニトロセルロース膜(Boehringer 社) にスポットし、ドットブロットハイブリダイゼーション法を行った。GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (Amersham 社) を用いて精製した TSWV の NSmDNA 断片をプローブとし、Dig DNA labeling kit (Boehringer 社) を用いてジコキシゲニン標識した。プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションは、68°C 下、ハイブリダイゼーションバッファー (0.02% SDS, 5 \times SSC, 0.5% blocking reagent, 0.1% N-lauroylsarcosine-Na) 中で行い、洗浄後、CPSD®を基質として、3 時間露光した。

(4) 感染挿し穂の栽培

2003 年 4 月に、感染親株から採穂した挿し穂のうち、DAS-ELISA 法および RT-PCR 法検出に使用しなかった挿し穂をオキシベロンで発根後、プランタ (60cm \times 20cm \times 15cm) に移植した。自然光下、アザミウマフリーの無加温ガラス室で着蕾期の 9 月まで栽培し、Mattoni et al. (1989) の TSWV 病徴記述を参考に、発病の有無を調査した。無発病株については、9 月に上中下位葉を株あたり計 9 葉採取し、9 葉を混合して TSWV の DAS-ELISA 法に供試した。

3) 結果

TSWV 感染親株から採取した挿し穂の部位別の TSWV 陽性率は、両品種、両年ともに、頂芽で低く推移し、下位茎葉では高く推移する傾向を示した(Fig. 17)。分割した茎葉の少なくとも 1 ヶ所以上の部位でウイルスが検出された陽性挿し穂の比率は、2002 年の‘精の館’で 25.0~38.5%，2003 年の‘精の館’で 16.7~39.1%そして 2003 年の‘神馬’で 36.8~47.1%であった。4 月以降 (平均気温 13°C, 第 3 世代挿し穂期)、5~10%の挿し穂が病徴を呈した (Fig. 17)。陽性個体のウイルス N タンパク質蓄積量は、いずれの品種、年度ともに、頂芽で低く推移する傾向を示したが、上~下位茎葉間では判然とした差は認められなかった (Fig. 18)。一方、親株の根では、ほとんどの採取時期で、50%以上の高い TSWV 陽性率を示した (Fig. 19)。

2003 年 4 月に採穂した挿し穂を DAS-ELISA 法および RT-PCR 法とハイブリダイゼーション法の組み合わせに供試した結果、TSWV の陽性挿し穂の割合は、両手法ともに完全に一致した (Table 7)。また、同じ時期に同じ親株から独立に採穂した挿し穂を発根し、栽培した結果、両品種とも、30.0%の株が着蕾期までに発病し、残りの株は、正常に生育、開花した。また、これらの正常株は、DAS-ELISA 検定の結果、すべて TSWV 陰性であった。挿し穂の破壊的な検定による陽性挿し穂率と栽培による発病率に有意差は認められなかった (Table 7)。

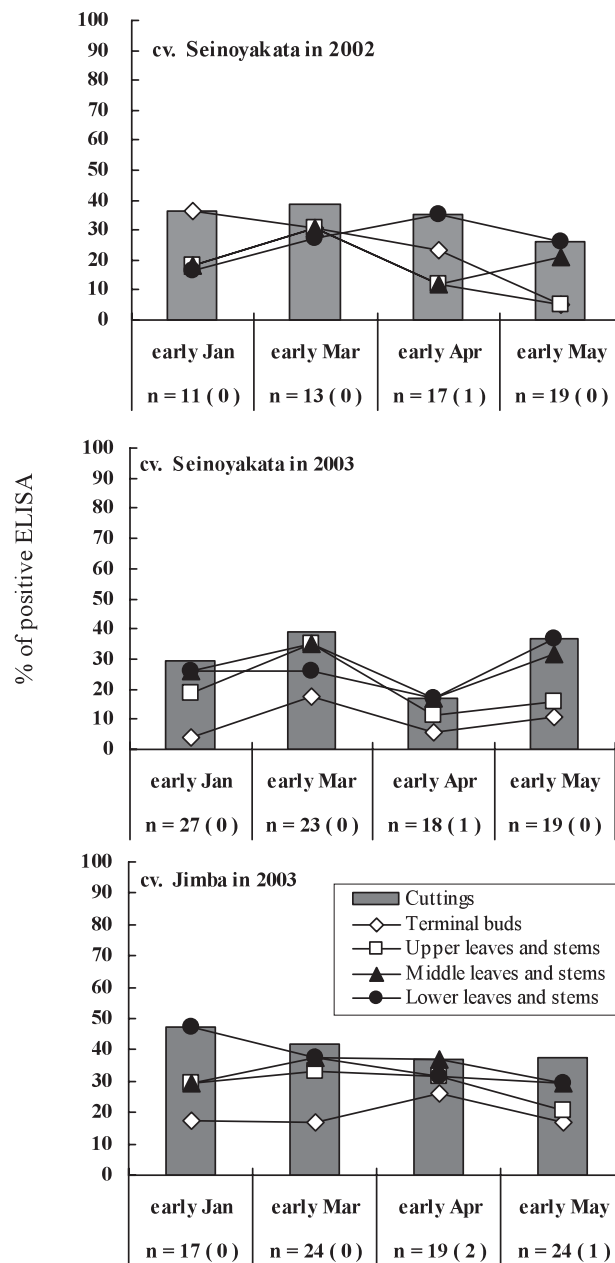


Fig. 17. Seasonal change in percentage of each part of rootless cuttings, collected from infected stock plants, that tested positive by DAS-ELISA for TSWV. Cuttings were collected from infected stock plants and divided into four parts. Localization of TSWV was determined in each part of the cuttings by DAS-ELISA and detection rate is indicated as a percentage. Columns represent the percentage of cuttings in which TSWV was detected in at least one part of the cutting. The numbers in parentheses represent the numbers of cuttings showing symptoms at collection time.

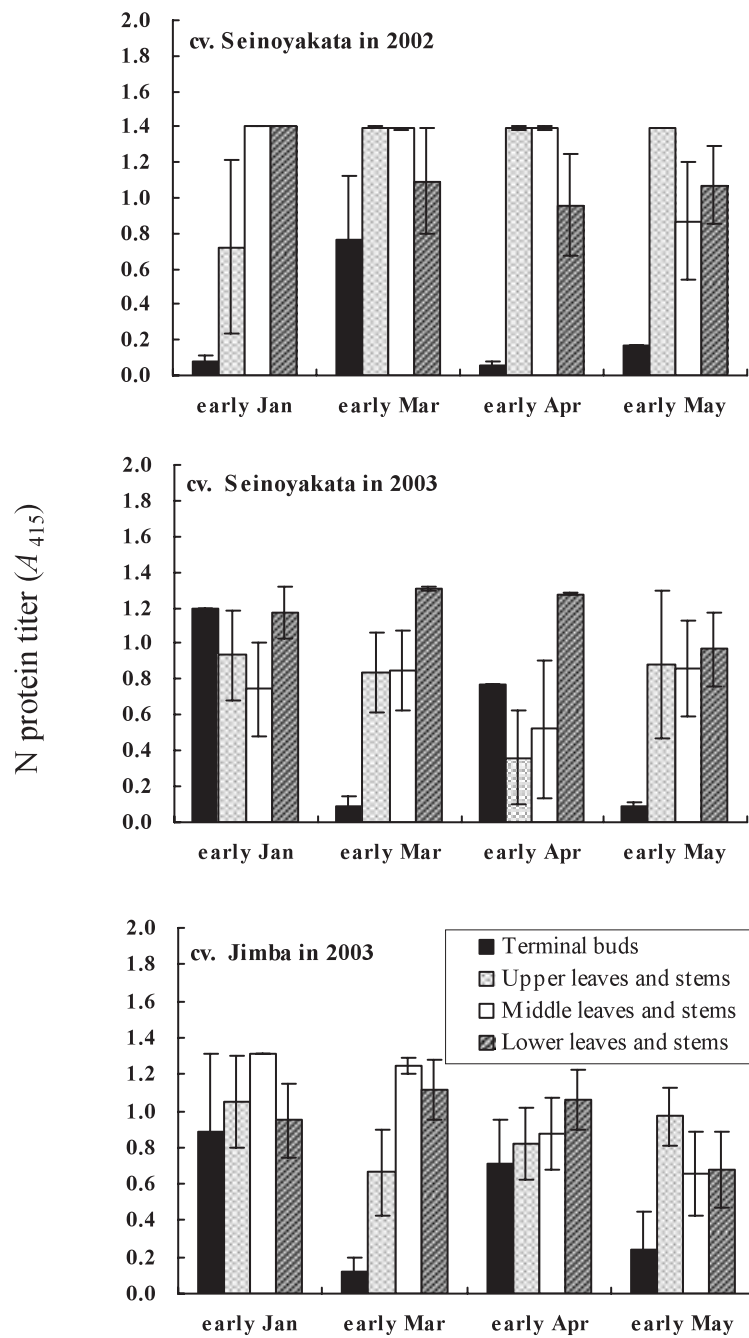


Fig. 18. Seasonal virus contents in ELISA positive individuals of sections of cuttings collected from infected stock plants.

Four parts of each cutting were determined by DAS-ELISA and average of N protein titer is displayed. Mean value and standard error of absorbance readings by DAS-ELISA are also given.

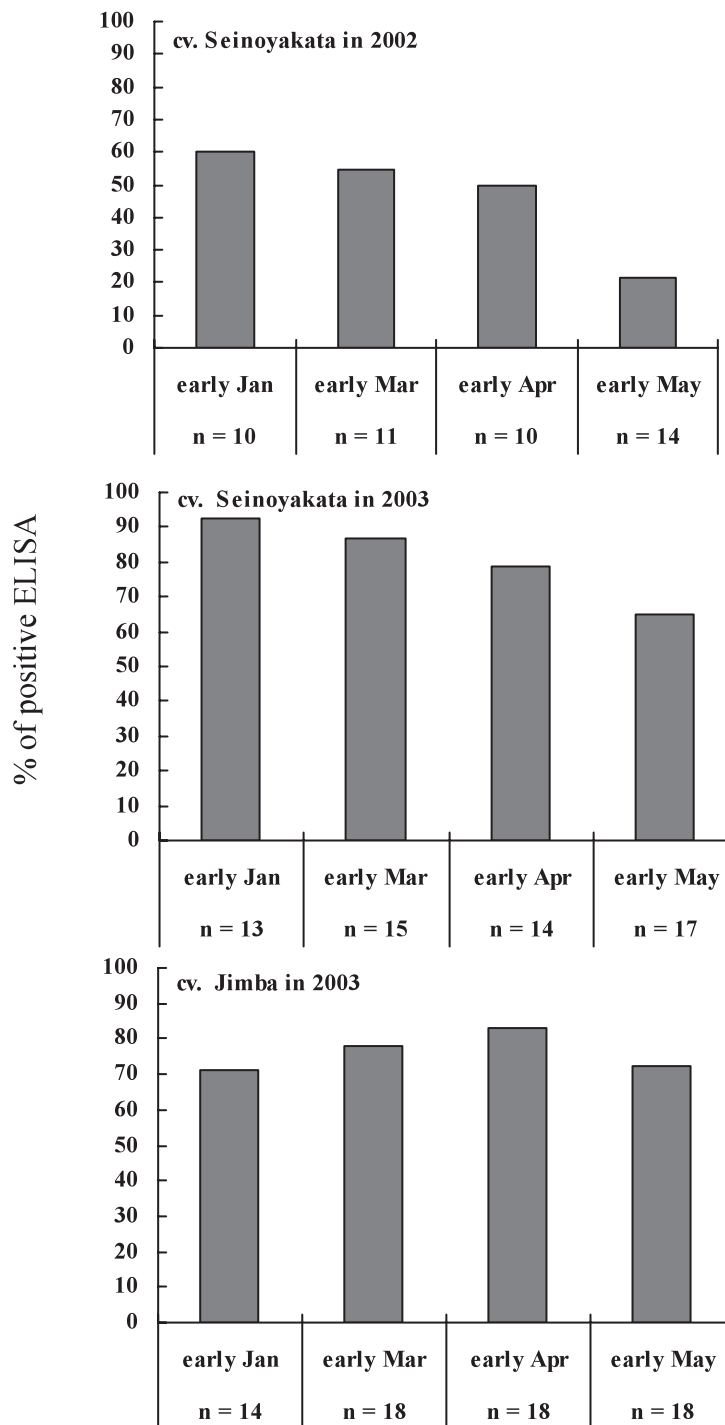


Fig. 19. Seasonal change in percentage of roots, collected from infected stock plants, that gave positive ELISA. Samples were collected from infected stock plants and determined by DAS-ELISA.

Table 7 Comparative frequency of symptom expression by cultivation and detection of TSWV in cuttings collected from infected stock plants

Cultivars	Symptom expression frequency by cultivation ^a	Detection frequency ^b	
		DAS-ELISA	RT-PCR combined with dot blot hybridization
Seinoyakata	6/20 ^{c a d}	3/18 ^{c a}	3/18
Jimba	6/20 ^a	7/19 ^a	7/19

^a Third generation cuttings, except those subjected to DAS-ELISA and RT-PCR, were rooted and cultivated.

^b The same cutting samples were subjected to DAS-ELISA and RT-PCR combined with dot blot hybridization.

^c The number of cuttings which expressed symptoms after transplanting/The number of cuttings cultivated.

^d Percentages in the same line that are followed by same letters are not significantly different according to 2×2 contingency table test ($p > 0.3$ for cv. Seinoyakata, $p > 0.6$ for cv. Jimba.).

^e The number of cuttings in which TSWV was detected/The number of cuttings tested.

4) 考察

これまで、キク植物体内における TSWV の局在性に関しては、Allen et al. (1990) と Van de Wetering et al. (1999) による研究がある。しかし、キク親株およびそれから採穂した挿し穂における TSWV の局在性およびウイルス感染親株から挿し穂へのウイルス伝染効率を調査した事例はない。本実験から、キク親株およびそれから採穂した挿し穂において、TSWV は不規則に局在していることが判明した。TSWV 陽性挿し穂における N タンパク質蓄積量は、無病徴の場合でも高かった。このことから、潜在感染した親株が、アザミウマ幼虫による TSWV の獲得源になり得る可能性が示唆される。キクにおける病徴発現の有無がアザミウマ幼虫によるウイルス獲得効率に影響するのか否かは、アザミウマの放飼による無病徴感染株からのウイルス獲得実験を行い、確かめる必要がある。ウイルス感染親株から採穂した挿し穂では、下位茎葉における TSWV の検出率が、その他の部位と比較して、挿し穂の世代、採穂時期に関わらず高い傾向が認められた。この結果は、親株あるいは挿し穂のウイルス検定は、どの時期に行っても問題はないが、偽陰性判定を避けるためには、下位葉を中心に複数葉を採取、混合し、検定することが適切であることを示唆している。一方、親株の根では、TSWV 検出率が採取時期に関係なく、地上部茎葉より高いことがわかった。したがって、親株における TSWV の潜在感染を検定する場合、植物体を破壊的に検定することが可能な場合は、根を検定するのが最適と考えられる。

これまで、RT-PCR 法と PCR 産物のハイブリダイゼーション法により、ELISA 法よりも高い感度でウイルス検出が可能であることが報告されている (藤ら, 1998 ; 奥田ら, 2005)。したがって、今回、挿し穂内の低濃度ウイルスの存在を確認する目的で、RT-PCR 法とハイブリダイゼーション法の組み合わせによる検定に供試した。その結果、モノクローナル抗体を

用いた DAS-ELISA 法および RT-PCR 法とハイブリダイゼーション法の組み合わせによって TSWV の陽性反応を示した挿し穂サンプルは、完全に一致した。また、これらの手法によるウイルス検出率と実際の栽培による発病率の間に有意差は認められなかった。これらの結果から、モノクローナル抗体を用いた挿し穂の DAS-ELISA 法による TSWV 検定の信頼性は高く、感染親株から採穂した挿し穂でも、ELISA 陰性の個体は、ウイルスフリーであるか、少なくともその切花世代においては、発病には至らないほどの低濃度のウイルスしか存在しないものと推察される。

本実験から、挿し穂世代、採穂時期に関わらず、TSWV 感染キク親株から採穂した挿し穂への伝染効率は、約 20~50%であることが判明した。この伝染効率は、親株にアザミウマが寄生している状況下では、さらに高まることも予測される。Ochoa et al. (1996) は、ウイルスフリー認証を得たキク挿し穂を本圃に定植することで、TSWV の初期被害が軽減できると報告している。本実験の結果は、ウイルス感染親株からの採穂が、本圃における TSWV の主要な第一次伝染源となることを示しており、感染親株の除去および更新が本病の防除において重要であることを示唆している。

2. 水平伝搬の様相 -キク栽培圃場での感染様相-

1) 緒言

広島県の露地ギク栽培では、前年の採花後の切り下株を親株床へ伏せこみ、翌年生育する冬至芽を採穂し、親株とする。また、伏せこみ株自体を親株とし、地上部側芽から生育する茎葉を採穂する場合もある。露地秋ギク栽培圃場では、生育中期から着蕾期ころに TSWV の被害が多発することが多い。そこで、露地ギク栽培圃場でのウイルス病被害発生の要因を明らかにすることを目的に、親株の TSWV 感染率を調査し、さらに、本圃定植後のミカンキイロアザミウマの発生量およびキクえそ病発生量を経時的に調査した。

2) 材料および方法

(1) 親株の TSWV 感染率

2000 年、広島県沿岸部の江田島市のキク生産農家圃場で調査を行った。キク親株圃場から‘冰山’、‘栄冠’および‘神馬’の挿し穂（展開葉約 3 枚）をそれぞれ約 50 個体任意に採集し、-20℃で保存した。各挿し穂は、10 倍量の抽出用緩衝液（PBST, 0.2%BSA, 2%PVP）で十分に磨砕し、そのうち 150 μ l を TSWV モノクローナル抗体による DAS-ELISA 法に供試した。なお、健全キク‘松葉菊’を陰性対照として、その 10 倍以上の吸光度を示したサンプルを陽性とした。また、‘冰山’の挿し穂は、DAS-ELISA 法以外に、RT-PCR 法にも供試した。すなわち、挿し穂サンプルの一部（約 25mg）から、RNeasy plant mini kit(Qiagen 社)で全 RNA を抽出した。cDNA は、M-MLV 逆転写酵素を用い、プロトコールに従って合成した。PCR 反応は、*Ex-taq* (Takara 社) を用い、プロトコールに従って行った。プライマーは、TSWV の MRNA

の NSm 遺伝子塩基配列に基づいて、藤ら (1998) が設計したプライマーを使用した。アニーリング温度は、52°Cで行い、35 サイクルで反応させた。PCR 産物は、アガロースゲル電気泳動し、457bp の特異的バンドを検出した。

(2) アザミウマ類調査

上記3品種の親株床および本圃(各圃場は100m以上は離れている)から定期的に品種あたり約200頂芽をランダムに採集し、70%エタノールでアザミウマ類を攪拌、抽出した。実体顕微鏡下でアザミウマ種を同定しながら計数した。この時、成虫および2令幼虫は-80°Cで保存した。保存した各アザミウマは、1頭ずつ150 μ lの抽出用緩衝液で磨砕し、TSWVのモノクローナル抗体によるDAS-ELISA法に供試し、保毒虫検定を行った。なお、ソラマメで飼育した健全なミカンキイロアザミウマを陰性対象とした。

(3) キクえそ病発病調査

上記3品種の親株床および本圃において、定期的にキクえそ病の発生を全株(親株床:約200株,本圃:約2000~5000株)について、Matteoni et al. (1989)の病徴記載に基づいて、目視により調査した。

3) 結果

キク‘冰山’の親株から採集した挿し穂のTSWV陽性率は、DAS-ELISA法およびRT-PCR法、いずれの手法を用いても6.0%(3/50)と等しかった。また、両手法により陽性反応を示した挿し穂個体は、完全に一致した(Table 8)。

広島県沿岸部の露地秋ギクの各品種における親株のTSWV感染率は、0~8.2%であった(Table 9)。露地秋ギク栽培では、ミカンキイロアザミウマ、ヒラズハナアザミウマおよびネギアザミウマ(*Thrips tabaci*)の寄生が確認された。ミカンキイロアザミウマは、発生量が比較的多く、TSWV保毒虫も認められたが、ヒラズハナアザミウマおよびネギアザミウマは、栽培期間中3頭/100芽以下と少なく、保毒虫も認められなかった(Table 9)。

Table 8 Comparative frequency of detection of TSWV in chrysanthemum cuttings cv. Hyozan collected from stock plant field using RT-PCR and DAS-ELISA

		RT-PCR	
		Positive	Negative
DAS-ELISA	Positive	3	0
	Negative	0	47

Fifty cuttings were collected from asymptomatic stock plants of cv. Hyozan in stock plant field in Hiroshima Prefecture.

Leaves of cuttings were homogenized and subjected to RNA extraction RT-PCR and DAS-ELISA using monoclonal antibody.

Table 9 Effects of latent infection with TSWV in stock plants and the abundance of vector thrips on the incidence of disease in chrysanthemum production fields in 2000

	Stock plant fields			Production fields					
	4 Apr.	26 Apr.	16-May	31-May	15-Jun	13-Jul	8 Aug.	1 Sept.	12 Oct.
Cultivar Hyozan									
Infected stock plants ^a	3/50								
Adult <i>F. occidentalis</i> ^b	2	8		0	9	8	48	0	
Adult <i>F. intonsa</i> ^b	2	0		0	1	1	1	0	
Adult <i>T. tabaci</i> ^b	3	3		0	3	1	1	0	
Larval thrips ^b	0	6		15	59	139	6	1	
ELISA-positive thrips ^c in									
Adult <i>F. occidentalis</i>	0/1	0/4			0/17	0/9	3/85		
2 nd instar larval thrips						1/29	0/25		
Incidence of disease	0	0		0	0.3	7	25.4	43.1	
Cultivar Jimba									
Infected stock plants	0/35								
Adult <i>F. occidentalis</i>	0	0	0			5	23	27	
Adult <i>F. intonsa</i>	0	0	0			0	0	0	
Adult <i>T. tabaci</i>	0	0	2			1	0	0	
Larval thrips	0	0	0			76	5	86	
ELISA-positive thrips in									
Adult <i>F. occidentalis</i>						0/9	0/79	1/52	
2 nd instar larval thrips						0/28	0/13	0/16	
Incidence of disease	0	0	0			0	0.1	0.3	2.3
Cultivar Eikan									
Infected stock plants	4/49								
Adult <i>F. occidentalis</i>	0	0	0		1	1	1	2	
Adult <i>F. intonsa</i>	0	0	0		1	0	0	0	
Adult <i>T. tabaci</i>	0	0	0		6	0	0	0	
Larval thrips	0	0	2		1	6	0	2	
ELISA-positive thrips in									
Adult <i>F. occidentalis</i>					0/2	0/3	0/1	0/3	
2 nd instar larval thrips					0/1	0/2		0/1	
Incidence of disease	0	0	0		0	0	0	0.7	1

^a No. of cuttings with positive DAS-ELISA/no. of cuttings from asymptomatic stock plants tested.

^b No. of adult thrips of *F. occidentalis*, *F. intonsa*, *T. tabaci* and larval thrips per 100 buds.

^c No. of ELISA-positive thrips/No. of thrips tested.

‘冰山’では、親株の TSWV 潜在感染率が 6.0%と比較的高く、本圃では、ミカンキイロアザミウマが高密度（最大 48 頭/100 芽，最大保毒虫率 3.5%）で推移した。その結果、本圃でのキクえそ病の発生株率は、7月中旬から急増し、着蕾期の9月上旬には、43.1%と著しく増加した。また、‘神馬’では、潜在感染親株は検出されなかったが、本圃において媒介虫が高密度（最大成虫数 27 頭/100 芽，最大保毒虫率 1.9%）で推移した。最終的に、圃場内で局地的にキクえそ病が発生した（最終発病株率 2.3%）。‘栄冠’では、親株の TSWV 潜在感染率は 8.2%と比較的高かったが、本圃初期からの薬剤散布により、ミカンキイロアザミウマは低密度（最大成虫数 2 頭/100 芽，保毒虫率 0%）で推移した。その結果、本圃での最終的なキクえそ病の発生株率は、1.0%に留まり、低かった（Table 9）。

4) 考察

キク圃場において、作期を通して最も多くの寄生が見られたアザミウマ種は、ミカンキイロアザミウマであり、ヒラズハナアザミウマおよびネギアザミウマの発生は少なかった。このことから、寄生幼虫の大部分がミカンキイロアザミウマであったと推察される。また、8月以降、キクえそ病の増加に伴って、ミカンキイロアザミウマの保毒虫が約 3%程度の割合で検出された。これらの事実は、広島県沿岸部の露地秋ギク栽培では、ミカンキイロアザミウマが TSWV の主要媒介虫であることを示唆している。

‘冰山’においては、約 6%の親株が TSWV に潜在感染しており、本圃への移植後、ミカンキイロアザミウマの多寄生により、着蕾期までの発病株率は約 7 倍に増加した。このことから、親株の潜在感染による本圃への感染挿し穂の持ち込みが第一次伝染源となり、本圃でミカンキイロアザミウマの多発による二次感染の結果、キクえそ病が多発したものと考えられる。‘神馬’においては、親株での TSWV 感染は、検出されなかった。本品種における本圃でのミカンキイロアザミウマの発生は、比較的多かったが、最終的に 2.3%の発病株率で作を終了した。この発病は、圃場外縁部に局地的に発生しており、他の圃場からの保毒虫の飛び込みが主要因であったと推察される。このように、親株の潜在感染率が低い場合、本圃でミカンキイロアザミウマの多寄生を受けても、第一次伝染源としてのウイルスの持ち込み量が少ないため、キクえそ病が激発に至らなかったと推察される。‘栄冠’においては、約 8%の高い親株感染率であったにもかかわらず、着蕾期の発病株率は、約 1%と少なかった。このことは、親株の潜在感染率が高くても、本圃でのミカンキイロアザミウマ発生量が少ない場合、ウイルス発病が顕在化しにくいことを示唆している。本品種における最終的なキクえそ病の発病株率は、親株での潜在感染率よりも明らかに低かった。このことは、TSWV に潜在感染していても、最後まで発病に至らない株が存在していたことが考えられる。また、ミカンキイロアザミウマの寄生がウイルスの媒介のみならず、TSWV の発病にも関係している可能性も示唆された。この点については、ウイルス感染株への放飼実験などにより、今後解明する必要がある。ミカンキイロアザミウマは、採花後のキク切り下株、親株の芽や葉柄基部で成虫あるいは幼虫の発育ステージで越冬し、翌年の主要な発生源となっていると報告されてい

る（片山・池田，1995）。また，春先のキク親株で，既にキクえそ病の発病が確認され，それらが TSWV 保毒アザミウマ発生の温床となっていることが示されている（片山ら，2000）。このように，親株床ですでにミカンキイロアザミウマによる二次感染が拡大しているケースも考慮に入れる必要がある。

以上から，TSWV 感染親株からの採挿による感染苗の本圃への持込みを第一次伝染源として，本圃でのミカンキイロアザミウマの多寄生による二次感染が，着蕾期頃までのキクえそ病の大発生をもたらす要因となっていることが明らかとなった。このことは，キクえそ病を防除する上で，健全な親株を確保することが重要であり，また，親株床および本圃において，ミカンキイロアザミウマを低密度に管理することが，二次感染防止に不可欠であることを示唆している。

V. トラップ植物を用いたキクエそ病の防除技術の開発

1. 媒介虫ミカンキイロアザミウマを誘引する植物種の探索

1) 緒言

近年、化学合成農薬の多施用による諸種の弊害、すなわち、薬剤抵抗性害虫の出現、天敵相の破壊に伴う誘導多発性（リサーチェンス）、農薬残留および野生生物への悪影響等の反省から、化学農薬一辺倒の防除の改善が求められている。農薬のみに依存しない防除技術としては、前述のとおり、物理的防除、耕種的防除そして種々天敵等の利用を含む生物的防除が挙げられる。こうしたなか、高次の機能を有する植物種や、その揮発性成分を巧みに利用して害虫を防除する試みが始められている。その基本概念となるのが、IPM 技術の一つとして提唱された Push-pull 戦略である（Cook et al., 2007）。これは、作物から忌避植物等を利用して、害虫を追い出す（プッシュ）効果と、トラップ植物等により害虫を引き寄せる（プル）効果を合理的に組み合わせることで、作物上の害虫を低密度に管理する技術である。実際には、イギリスの Cook et al. (2007) がケニアにおいて行った事例が有名である。トウモロコシに寄生するメイガやヤガ類の茎穿孔性害虫をモラセスグラス、ハギ属植物などを忌避植物として、一方、ナピエグラスやスーダングラスをトラップ植物とし、トウモロコシ（あるいはソルガム）畑への畝間混作（Intercropping）や外周への栽植等の配置を行うことで防除することに成功した。特に、モラセスグラスにおいては、チョウ目害虫の忌避の他に、寄生蜂のコマユバチ類を誘引することが明らかにされた。さらに、トラップ植物であるスーダングラス（ソルガムの近縁種）も同様に天敵増殖（バンカー植物）効果を有していることがわかった。現在は、東アフリカにおいて数千の農家が、これら Push-pull 戦略を実践している。この成功事例は、アフリカの開発途上国における合成農薬を購入する余裕のない農民を救済するという必然の結果、現地導入に至ったのだが、日本のような先進国においても、化学合成農薬の多用に起因する諸種の問題、食の安全への希求、さらに景観形成といった視点から、将来特に重要な技術分野になることが予想される。従って、アザミウマとそれが媒介するトスポウイルス病の防除においても、このような概念に立脚した防除技術を開発することは重要と思われる。

これまで、ペチュニアなどいくつかの植物種がミカンキイロアザミウマを効果的に誘引することが報告されている（Allen and Matteoni, 1991）。また、‘ピンクパフェ’などのバーベナ（*Verbena × hybrida*）は、ミカンキイロアザミウマを誘引し、その作用機構としてバーベナ花の主要揮発性物質である、シス型リナロールオキシドピラノイドの有する高い誘引作用が関連していると報告されている（Bennison et al., 1998, Hopper et al., 1999）。また、近年、Warnock et al. (2000) は、‘タピアンラベンダー’などの数種のバーベナ品種がミカンキイロアザミウマを誘引し、トラップ植物として利用可能であると報告している。このように、バーベナは

ミカンキイロアザミウマの誘引作用を保持しているが、一方で、ミカンキイロアザミウマが増殖しやすい植物でもあるため、トラップ植物として利用するためには、バーベナでのアザミウマの増殖を抑制させる技術が不可欠となる。したがって、アザミウマ類の誘引効果は、バーベナと同等かそれ以上で、かつ、アザミウマ類が増殖しにくい植物種が見つければ理想的である。そこで、トラップ植物を利用したキクえそ病の防除技術を開発する目的で、ミカンキイロアザミウマの誘引性に優れた植物種を、バーベナを含む数種の花き類の中から探索した。

2) 材料および方法

農業技術センター内の1aの鉄骨ハウスに、ミカンキイロアザミウマの誘引作用を有するバーベナが属するクマツヅラ科を中心に、キク科、バラ科などの園芸花き植物計17種(Table 10)をプランタ(60cm×20cm×15cm)に4株ずつ移植し、ランダムに配置し栽培した。なお、1植物種あたりプランタは2個とした。全植物は地上部を一度切り戻した後、ほとんどの供試植物種が開花期を迎えた9月下旬に、ソラマメで飼育したミカンキイロアザミウマの飼育用ケースの蓋を開けて施設内6箇所に配置し、成虫を自由に移動分散させた。放飼7日後に、各植物の花あるいは花房を10花(花房)ランダムに採取し、70%エタノールでアザミウマ類を攪拌、抽出し、実体顕微鏡下で種を同定しながら計数した。なお、ヒラズハナアザミウマは自然発生条件とした。

3) 結果

供試した植物種のうち、バーベナ‘ファンシーパフェ’からミカンキイロアザミウマ成虫が10花房あたり6頭検出され、最も寄生数が多かった。しかし、その他の植物種においては、ランタナで1頭検出された以外、全く検出されなかった。一方、ヒラズハナアザミウマは、バーベナ‘ファンシーパフェ’で10花房あたり100頭と最も多く検出され、ブルーデージーとバーベナ‘タピアン’の検出頭数が13頭とそれに次いで多かった。供試植物のうち、マーガレットを含む8種からは、花棲性アザミウマ類は検出されなかった(Table 10)。

4) 考察

バーベナは、ミカンキイロアザミウマを誘引するだけでなく、長期にわたり開花すること、匍匐性があることなど、カバークロープとしても有用である。これらのことから、バーベナがトラップ植物として、ミカンキイロアザミウマの防除に利用できる可能性が示唆されている。しかし、一方で、バーベナは、ミカンキイロアザミウマの格好の増殖場所でもある。したがって、バーベナと同様の誘引効果を保持し、しかも、アザミウマが増殖しない植物種があれば理想的である。今回、バーベナと同等あるいはそれを上回る誘引効果のある植物種を探索する目的で実験を行った。しかし、結局のところ、最もミカンキイロアザミウマを誘引した植物は、バーベナ‘ファンシーパフェ’であり、それ以外に顕著な誘引作用を保持する植

Table 10 Attraction of thrips to various ornamentals.

Plant species	Common name or cultivar name	Flower dwelling thrips	
		<i>Frankliniella occidentalis</i>	<i>F. intonsa</i>
Asteraceae			
<i>Asteriscus maritimus</i>	Gold coin	0	2
<i>Chrysanthemum frutescens</i>	Margaret	0	0
<i>Felicia amelloides</i>	Blue daisy	0	13
<i>Gamolepis chrysanthemoides</i>	African bush-daisy	0	7
<i>Inula spiroefolia</i>	-	0	0
<i>Helianthus helianthoide</i>	Himehimawari	0	0
Cleomaceae			
<i>Cleome spinosa</i>	Cleome	0	3
Convolvulaceae			
<i>Evolvulus pilosus</i>	American blue	0	0
Goodeniaceae			
<i>Scaevola aemula</i>	Scaebola	0	3
Onagraceae			
<i>Fuchsia hybrida</i>		0	0
Plumbaginaceae			
<i>Ceratostigma plumbaginoides</i>		0	0
Rosaceae			
<i>Alchemilla molis</i>	Lady's Mantle	0	0
Scrophulariaceae			
<i>Otacanthus caeruleus</i>	Blue cat's eye	0	0
Verbanaceae			
<i>Verbena hybrida</i>	cv. Fancy parfait	6	100
<i>Lantana camala</i>	Lantana	1	6
<i>Verbena hybrida</i>	cv. Tapian	0	13
<i>Duranta repens</i>	Duranta	0	5

The number of thrips/10 flower clusters

Plant species in which flower dwelling thrips were detected were listed.

物種は認められなかった。今回の実験で、ペチュニアは供試しなかったが、本植物は、ミカンキイロアザミウマを誘引する（Allen et al., 1991）と同時に、茎葉に粘性の分泌物が付着しているため幼虫の寄生が少なく、増殖率が低いと考えられる。したがって、今後はペチュニアのトラップ植物としての可能性を評価する必要がある。本実験において、バーベナ‘ファンシーパフェ’が最もミカンキイロアザミウマの誘引数が多く、本植物種がミカンキイロアザミウマとそれが媒介するトスポウイルスの発生を抑制する有望なトラップ植物となりうる可能性が示唆された。

2. バーベナのみカンキイロアザミウマ誘引機構の解明

1) 緒言

バーベナは、みカンキイロアザミウマを誘引することから、トラップ植物としての利用が期待される。前節において、みカンキイロアザミウマを良く誘引する植物種を探索した結果、バーベナの誘引効果が最も高かった。これまでに、バーベナの主要な揮発性物質であるシス型リナロールオキシドピラノイドが誘引機構の一部を担っていると報告された (Pow et al., 1998)。しかし、誘引作用のないトランス型しか生産しないバーベナ品種でもみカンキイロアザミウマの誘引性は認められており、未だ不明な点が残される。そこで、バーベナ‘ファンシーパフェ’のみカンキイロアザミウマ誘引機構を解明する目的で、花の揮発性物質の分析を行うとともに、検出された各物質のみカンキイロアザミウマ誘引能力を評価した。

2) 材料および方法

(1) バーベナ揮発性物質の分析

農業技術センター内のガラス温室でプランタ栽培したバーベナ‘ファンシーパフェ’の花房を 100ml のビンに詰め、そのヘッドスペースガスを SPME (固層マイクロ抽出) に吸着させ、GC-MS 分析 [(Agilent 6890N gas chromatograph, Agilent 5973N Mass Selective Detector, カラム : DB-WAX (60m×0.25mm)] に供試した。揮発性物質は、DB-WAX カラムで分離し、保持時間および GC-MS データとの比較により同定した。温度設定は、3°C/分の比率で 60~230°C とし、注入温度および検出温度は 250°C とした。

(2) 揮発性物質によるみカンキイロアザミウマの誘引

GC-MS 分析において、検出頻度が高かった物質 (ピーク面積 2%以上) については、その人工合成標品を用いてみカンキイロアザミウマの誘引実験に供試した。すなわち、ガラス温室内 (6m×6m) にプラスチック製のコンテナ (25cm×25cm×37cm) を 25 個配置し、トマト‘ハウス桃太郎’を 9 月に定植し、栽培した。10 月上旬に、ソラマメで飼育したみカンキイロアザミウマを十分量放飼し、数世代にわたり増殖させた。翌年の 3 月に、みカンキイロアザミウマ密度が十分に高くなったのを確認し、ガラス温室の 4 方向の壁面の高さ 1.8m の位置に、青色粘着トラップ (ホリバー®; アリスタライフサイエンス社) をトマトから 0.5m 離して設置した。各トラップの上部に各種揮発性物質の 1% 溶液を 2ml 入れたスクリーバイアルを設置した。トラップは、1 日ごとに回収し、回収と同時に新たなトラップを設置した。各揮発性物質の配置は、1 日ごとに時計まわりに回転させて、合計 3 反復となるように実験した。また、揮発性物質溶液は、常に 2ml となるように 1 日ごとに補給した。対照として、水を入れたスクリーバイアルを設置した。回収したトラップは、実体顕微鏡下でみカンキイロアザミウマ誘殺数を調査した。

3) 結果

バーベナ花房から検出された主要な揮発性物質は、トランス型リナロールオキシドピラノイドであり、シス型リナロールオキシドピラノイドは、その約 1/5 程度であった。次いで、ヘキサデセナルや 4,8-ジメチル-1,3,7-ノナトリエンが多く検出された。また、リモネン、オシメン、 γ -テルピネンといった精油成分も多く検出された(Table 11)。

各揮発性物質によるミカンキイロアザミウマの誘引効果を調査した結果を Fig. 20 に示した。イソプロピルミリスレートが僅かに忌避性を示す傾向が見られたものの、ミカンキイロアザミウマの誘殺数は、すべての供試揮発性物質において対照区と有意差は認められなかった。

4) 考察

Bennison et al. (1998) は、バーベナにミカンキイロアザミウマ誘引作用があることを報告し、その後、オルファクトメータを用いたミカンキイロアザミウマ成虫の選好性実験から、バーベナ花で生産される成分の中のシス型リナロールオキシドピラノイドに誘引作用があり、トランス型ではほとんどないことが報告された (Pow et al., 1998, Hooper et al., 1999)。このことは、ミカンキイロアザミウマの触覚に異性体を識別する受容体が存在することを示唆している。そしてさらに、シス型の生産量の少ないバーベナの‘タピアンピンク’や‘シッシングハ

Table 11 Volatiles produced by flower of verbena cv. Fancy Parfait according to gas chromatography-mass spectrometry

Compound	Retention time (min)	Peak area (%)
Limonene	11.8	1.0
Ocimene	13.0	0.5
γ -Terpinene	13.7	0.2
4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatriene	15.9	8.7
Pentadecane	23.9	3.7
Linalool	25.9	0.2
<i>cis</i> -Linalool oxide pyran	29.1	5.5
<i>trans</i> -linalool oxide pyran	34.2	26.8
Dodecyl acetate	38.5	0.9
Isopropyl myristate	43.5	1.2
<i>cis</i> -3-Hexenyl benzoate	46.3	1.1
Hexadecenal	47.9	10.0
Benzyl benzoate	60.7	0.7

Only compounds with a peak area > 0.2% are listed.

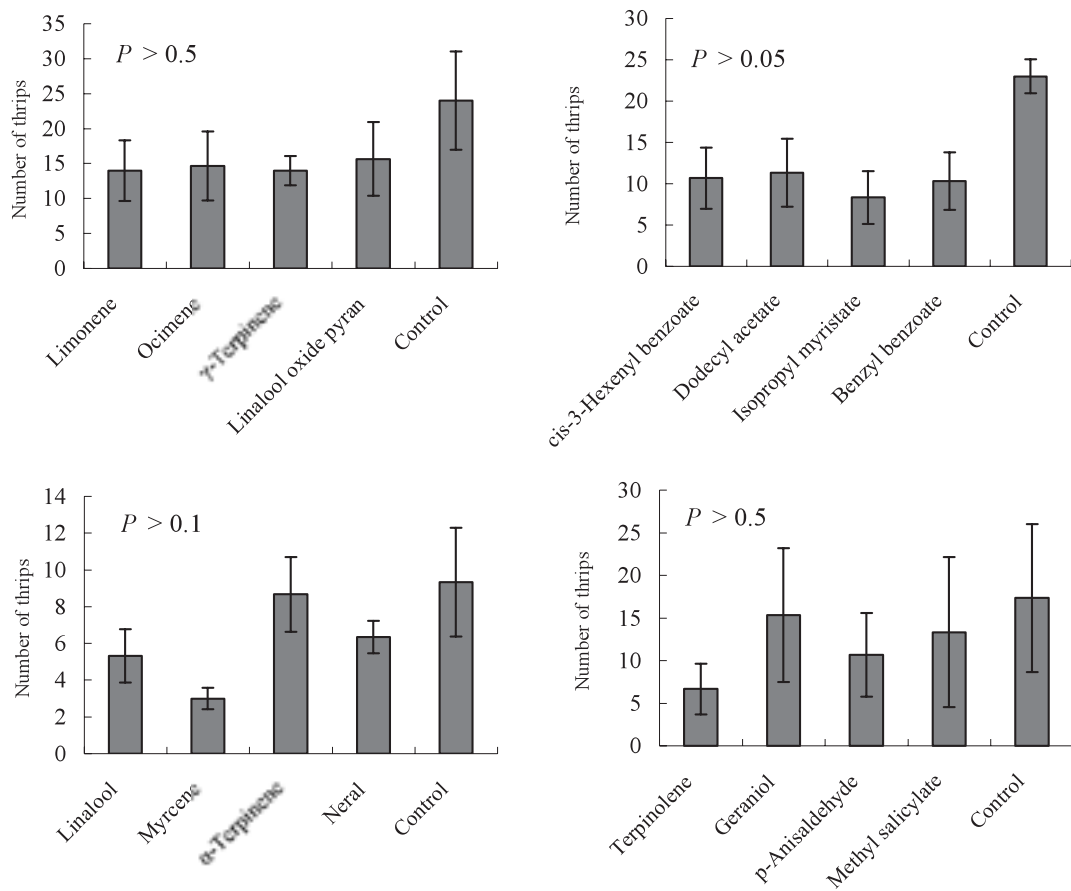


Fig. 20. Mean number ($n=3$) of adult western flower thrips caught in blue sticky traps with volatile chemicals originating from verbena flower.

ーストピンク'も成虫を誘引することから、それ以外の誘引物質も機能している可能性が示唆された (Hooper et al., 1999)。本実験で、バーベナ'ファンシーパフェ'の花房から生産される主要な揮発性物質は、リナロールオキシドピラノイドであり、既報と一致した。しかし、そのシス、トランス比は約 1:5 であり、ミカンキイロアザミウマの誘引作用のないトランス型が明らかに多かった。また、4,8-ジメチル-1,3,7-ノナトリエンとヘキサデセナールが比較的多く検出された。ミカンキイロアザミウマの誘引作用を有するシス型が少なかったことから、本品種において、それ以外の誘引物質もミカンキイロアザミウマに作用している可能性が示唆された。

バーベナ'ファンシーパフェ'により生産される揮発性物質のうち、比較的検出量の多かった成分を個別に粘着トラップと組み合わせた方法で、ミカンキイロアザミウマの誘引能力を評価した結果、リナロールオキシドを含むいずれの揮発性物質も顕著な誘引効果は示さなかった。また、ミカンキイロアザミウマに対して誘引性が報告されている *p*-アニスアルデヒド

(Teulon et al., 1993)も対照と有意差はなかった。本実験において、リナロールオキシド等の誘引物質がミカンキイロアザミウマを誘引しなかった原因として、1) Pow et al. (1998)が、オルファクトメータという選択的な方法を用いたのに対し、本方法が非選択的方法であったため、顕著な効果が現れなかったこと、2) リナロールオキシドピラノイドのシス、トランス比を 1:1 にしたこと、3) 揮発性物質の効果以上に、粘着トラップの色彩の影響が強く出てしまったこと、などが考えられる。特に、3) について、林ら (1998) は、ミカンキイロアザミウマに対する揮発性物質の誘引効果は、色彩による誘引効果よりも明らかに劣っていると報告している。今後は、オルファクトメータなどの選択的方法によって、各香り成分の誘引能力を評価する必要がある。また、本実験において、検出されたバーベナの揮発性物質は、ほとんどが特殊なものではなく、広く植物種に存在する一般的なものばかりであったため、ミカンキイロアザミウマの誘引機構には、物質単独ではなく、複数の物質が複合的に作用している可能性も考えられる。したがって、各揮発性物質を混合した場合の誘引能力についても評価が必要であると考えられる。

3. バーベナの高密度栽植によるキクえそ病の防除効果

1) 緒言

トラップ植物とは、作物から害虫を誘引することで、作物の被害を回避する植物であり、それを利用した防除技術は、IPM 技術の一つとして農業生態系において半翅目 (Hemiptera) あるいは甲虫目 (Coleoptera) を中心にいくつかの成功事例が報告されている (Hokkanen, 1991)。特に、忌避植物の栽植と組み合わせた Push-pull 戦略において、アフリカにおけるトウモロコシ、ソルガムでの成功事例は前述のとおりである。また、害虫を誘引し、結果としてそれが媒介する病原体を抑制した事例には、イネにおいて、早期移植したイネにより、*Nephotetti virescens* を誘引することでイネツングロウイルスの被害を抑制したこと (Saxena et al., 1988)、また、近年では、トマトの周囲にカボチャを栽植することでタバココナジラミを誘引し、それが媒介するトマト黄化葉巻病ウイルス (TYLCV) の発病を抑制できたという報告がある (Schuster, 2004)。

バーベナは、ミカンキイロアザミウマを誘引することから、トラップ作物として利用できる可能性が示唆されている (Bennison et al., 1998, Warnock et al., 2004)。本研究において、バーベナ‘ファンシーパフェ’がミカンキイロアザミウマを誘引することが明らかになり、本害虫が媒介するキクえそ病防除のためのトラップ植物として利用できる可能性が示唆された。そこで、施設電照キク栽培において、トラップ植物としてバーベナを栽植することで、ミカンキイロアザミウマの寄生とそれが媒介するキクえそ病の発生を抑制できるかをモデル的に実証する目的で、キクの畝側面にバーベナを栽植して検討を行った。トラップ植物を効果面、経済面で有効に機能させるための望ましい占有面積は、対象害虫により異なり、一概には言えないが、栽培作物の 10%程度が適切と認識されている (Hokkanen, 1991)。そこで、効果の

有無を明確にするため、占有率 10%を基準とした場合、トラップ植物をキクに対して約 17～25%という比較的高密度に栽植して実験を行った。

2) 材料および方法

(1) 実験 1

実験は、2003～2004年に、農業技術センター内の東西に 5m 離れて隣接する構造の全く同じ 0.9a の加温鉄骨ビニルハウス (6m×15m) 2 棟で行った。各ハウスの中央部に、1.5m×5m の畝を設置した。キク‘神馬’の挿し穂を健全な親株から採穂し、発根して苗を準備した。2003年 9月 16日に、苗を区当たり 96 株移植 (株間 20cm, 4 条植え) した。施肥量は、元肥で N:P:K=2.5, 2.0, 2.3kg/a とし、灌水はエバーフローで行った。実験中に化学合成農薬は散布しなかった。キクは、移植 14 日後に摘心し、その後、夜間中断電照栽培 (PM10:00～AM2:00) を行った。夜温は 15°C とし、12 月 25 日に電照を打ち切った。その結果、着蕾期および開花期はそれぞれ 2004 年の 1 月中旬および 2 月上旬となった。

バーベナ‘ファンシーパフェ’および‘ピンクパフェ’を 1 対 1 の割合で、IB 化成肥料を 2g/L 施肥した土壌 (まさ土: バーク堆肥=1:1) を含むプランタ (60cm×20cm×15cm) に 8 月 27 日に移植し、キクの畝から 0.5m 離れた両側の位置に、畝に沿って、計 24 株をキクの移植 4 日後に配置した。すなわち、キクとバーベナの株数比率は、4:1 とした (Fig. 21)。

TSWV キク分離株を *N. rustica* に汁液接種し、その罹病葉を入れたプラスチックケースにミカンキイロアザミウマ成虫を放飼し、25°C, 16 時間照明下で飼育した。孵化した次世代の 2 令幼虫 100 頭を毛筆を用いて 9cm ポットで栽培した健全キク‘神馬’へ放飼した。このキクをポットごと、2003 年 10 月 1 日に各実験区の中央部へ静置し、ウイルスと媒介虫の接種源とした。その後、約 2 週間の間隔で、各区から、キク頂芽 24 個をランダムに採取し、70% エタノールでミカンキイロアザミウマを攪拌、抽出し、実体顕微鏡下で成幼虫別に計数した。TSWV によるキクえそ病の発病は、Matteoni et al. (1989) の病徴記載に従って肉眼観察した。

(2) 実験 2

2004～2005 年に、前年と同様のハウスで実験を行った。各ハウスの中央部に畝を設置し、4 区画に分割した (1 区 3.75m², 1.5m×2.5m)。9 月 15 日、各区にキク‘神馬’48 株を移植した。11 月 1 日に摘心し、その後 3 本に仕立てた。施肥管理は、2003 年と同様とし、電照打ち切りは 12 月 27 日とした。その結果、着蕾期および開花期は、それぞれ 1 月中旬および 2 月中旬となった。実験ハウス内に侵入したヒラズハナアザミウマおよびネギアザミウマを防除するために、2004 年 11 月 29 日および 12 月 21 日にイミダクロプロリド水和剤を全区に散布した。

実験 1 で、バーベナ‘ピンクパフェ’は TSWV 感染による病徴を呈したため、2004 年は、‘ファンシーパフェ’のみを使用した。バーベナ‘ファンシーパフェ’を 8 月 10 日にプランタ (60cm×20cm×15cm) へ 2 株ずつ移植した。9 月 24 日にキクの畝から 0.5m 離れた両側の位置に、畝に沿って区当たりプランタ 4 個を配置した。キクとバーベナの栽植比率は、6:1 とした。10 月 1 日、各区の中央のキク 2 株に TSWV を汁液接種した。10 月 12 日に病徴を現し

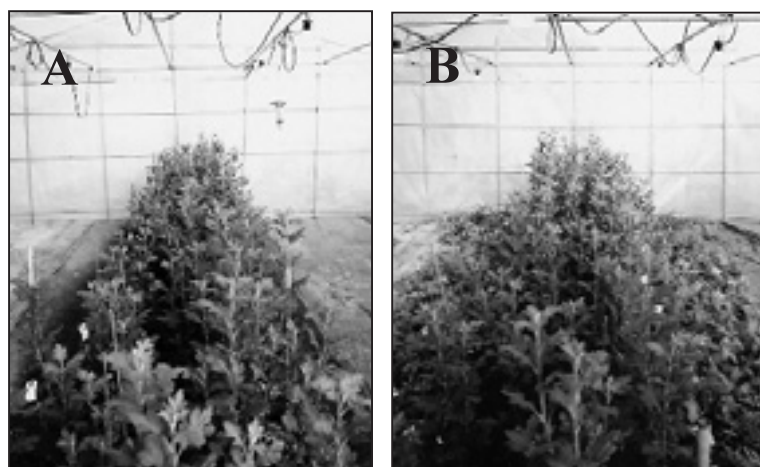


Fig. 21. Trap crop experiment in 2003-2004. A: untreated control plot, B: trap crop plot. Verbena cv. Pink Parfait and Fancy Parfait were grown alongside chrysanthemum (cv. Jimba) plants at a ratio of 1 : 4 in trap crop plot.

た接種株に計 200 頭（雌雄比 9 : 1）のミカンキイロアザミウマ成虫を放飼し，次世代幼虫が出現する 10 月下旬まで 2 週間ゴース（目合い 112 μ m）被覆を行った。その後，被覆を除去し，アザミウマを自由に移動分散させた。

各区から，約 2 週間間隔で，キク頂芽 12 個をランダムに採取した。また，任意のバーベナ 10 花房を白い板にたたき出し，ミカンキイロアザミウマ成虫数を計数し，速やかにもとの場所へ戻した。その他の調査は，前年と同様に行った。

3) 結果

2003~2004 年，バーベナは両品種とも日長に影響されることなく開花した。バーベナの花房数は，アザミウマ放飼 30 日後には，株当たり 2.0 花房となり，60~120 日後には株当たり 2.4~5.9 花房で推移した。無処理区におけるミカンキイロアザミウマ成虫数は，放飼 56 日後から増加し，97 日後には頂芽当たり 0.50 頭に達した。一方，トラップ植物区においては，ミカンキイロアザミウマ成虫数は，放飼 111 日後までキク頂芽当たり 0.08 頭以下で推移した。2004 年 2 月上旬のキク開花期（放飼 120~130 日後）における花当たりミカンキイロアザミウマ成虫数は，無処理区およびトラップ植物区で，それぞれキク花当たり 0.65 頭および 0.68 頭とほぼ同等であった（Fig. 22A）。アザミウマ幼虫数は無処理区およびトラップ植物区でアザミウマ放飼 56 日以降，それぞれ頂芽当たり 1.4~4.2 頭および 0.1~1.0 頭で推移した（Fig. 22B）。両実験区とも，キクえそ病の発病は，接種源近傍から始まった。無処理区におけるキクえそ病の発病株率は，放飼 56 日後より急増した。一方，トラップ植物区においては，最終

調査期まで接種源近傍に発病は留まった。最終的に、2月上旬の開花期のキクえそ病発病株率は、無処理区で91.7%，トラップ植物区で12.5%となった(Fig.23)。放飼60日後において、約25%のバーベナ‘ピンクパフェ’が退緑斑や輪紋などのTSWV感染による症状を呈した(データ省略)。

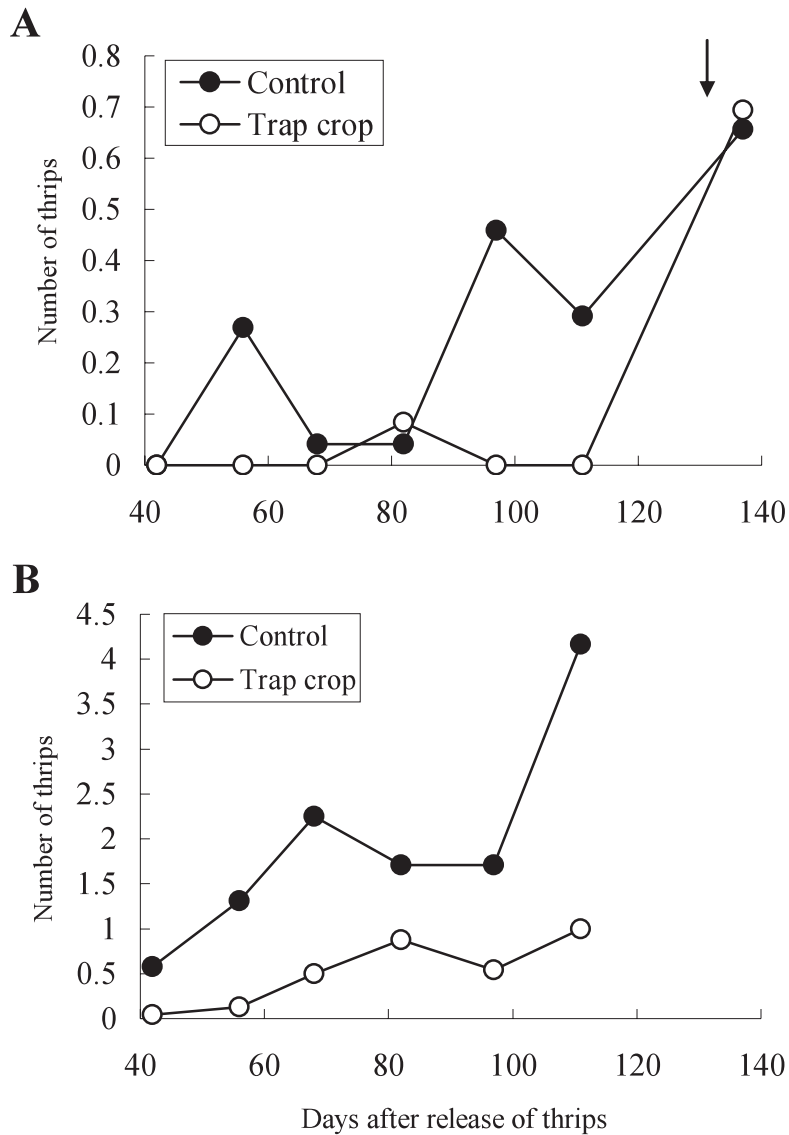


Fig. 22. Mean number of thrips per terminal bud on chrysanthemums grown in a plot of the trap crop and untreated control in 2003-2004. A Adult western flower thrips. B Larval thrips. The ratio of verbena plants to chrysanthemum plants was 1: 4. Arrow indicates time of chrysanthemum flowering.

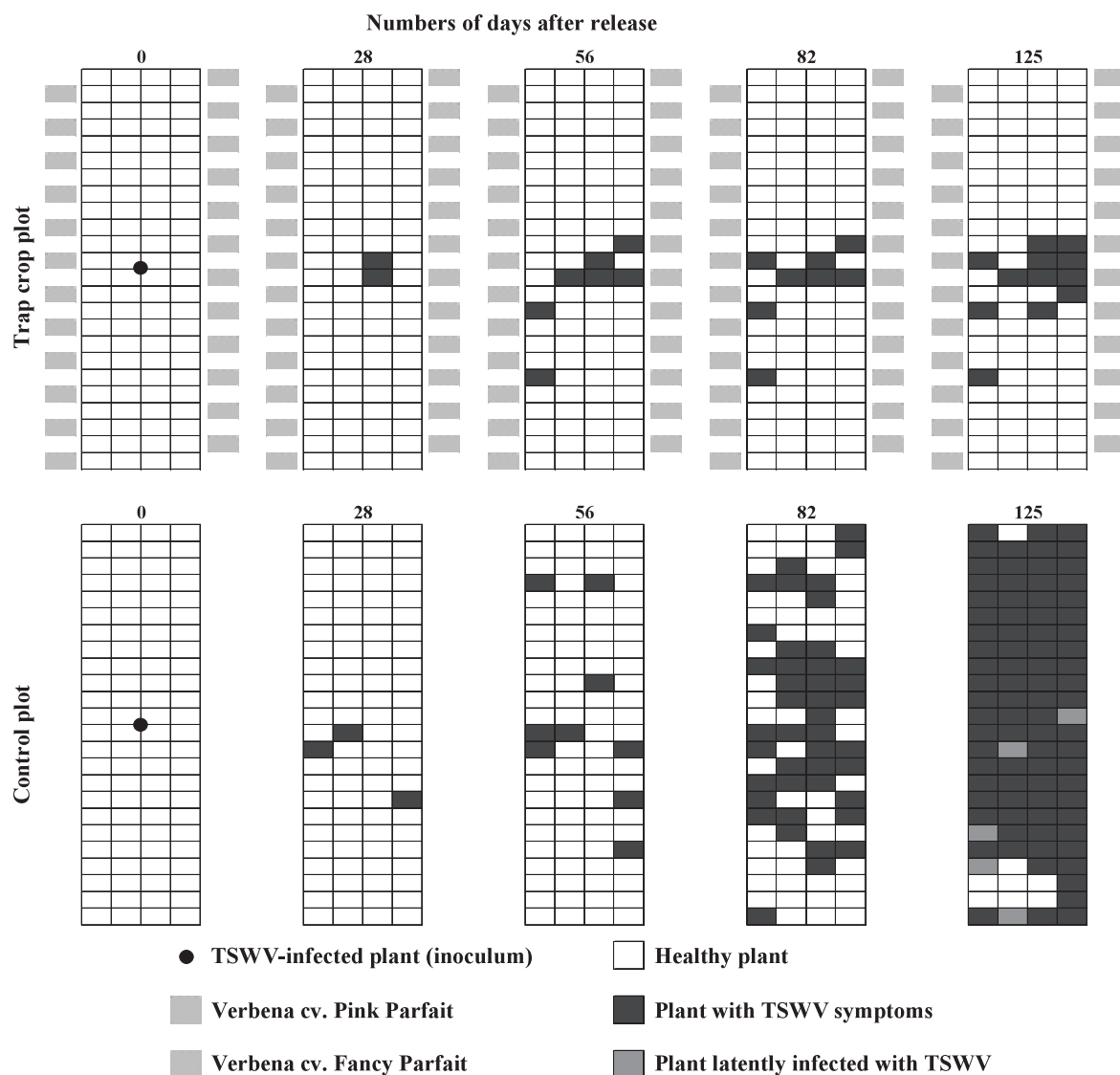


Fig. 23. Spatial patterns of TSWV spread on chrysanthemums in plots of the trap crop and untreated control in 2003-2004 at various times after the release of viruliferous western flower thrips.

2004～2005年、アザミウマ放飼20日後にバーベナ花房数は、株当たり3.1花房となった。放飼80日後の2005年1月には、株当たり11.6花房に達した。無処理区において、キクのミカンキイロアザミウマ成虫数は、放飼69日後から増加し始め、98日後の着蕾期まで、頂芽当たり0.4～1.2頭で推移した。一方、トラップ植物区においては、着蕾期まで頂芽当たり0.2頭以下で推移した。2005年2月中旬のキク開花期（放飼110～120日後）における花当たりミカンキイロアザミウマ成虫数は、無処理区およびトラップ植物区でそれぞれキク花当たり

1.4 頭および 0.8 頭であった (Fig. 24A)。無処理区におけるキクのアザミウマ幼虫数は、放飼 29 日以降に増加し、放飼 98 日後まで頂芽当たり 0.9~2.8 頭で推移した。トラップ植物区においては、放飼 98 日後まで頂芽当たり 0.1~1.0 頭で推移した (Fig.24B)。バーベナにおけるミカンキイロアザミウマ成虫数は、放飼 51 日以降増加し、98 日後には花房当たり 26 頭以上

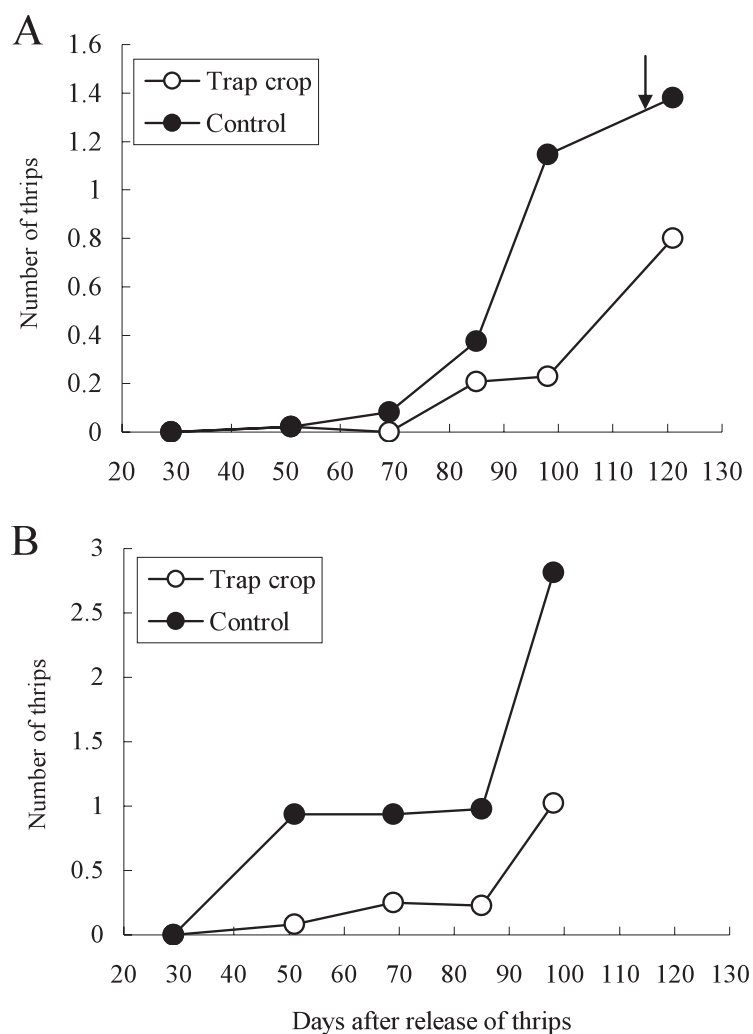


Fig. 24. Mean number of thrips per terminal bud on chrysanthemums grown in plots of the trap crop and untreated control in 2004-2005. A Adult western flower thrips. B Larval thrips. The ratio of verbena plants to chrysanthemum plants was 1: 6. Arrow indicates chrysanthemum flowering.

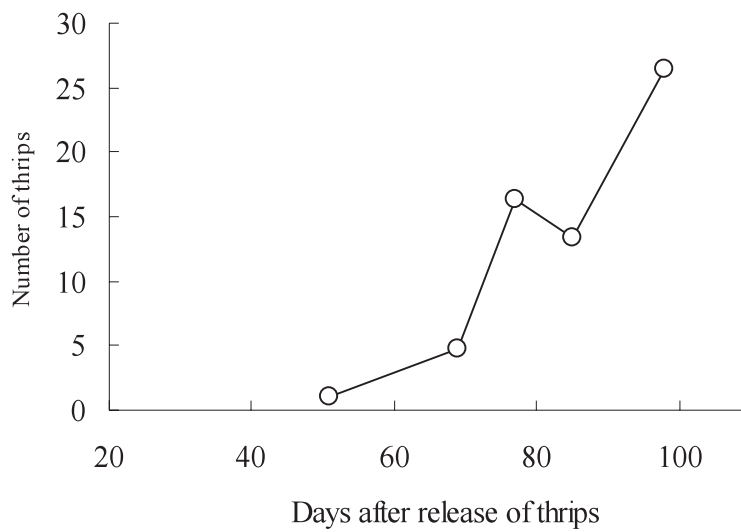


Fig. 25. Mean number of adult western flower thrips per flower cluster on the verbena trap crop besides chrysanthemum plants in 2004-2005.

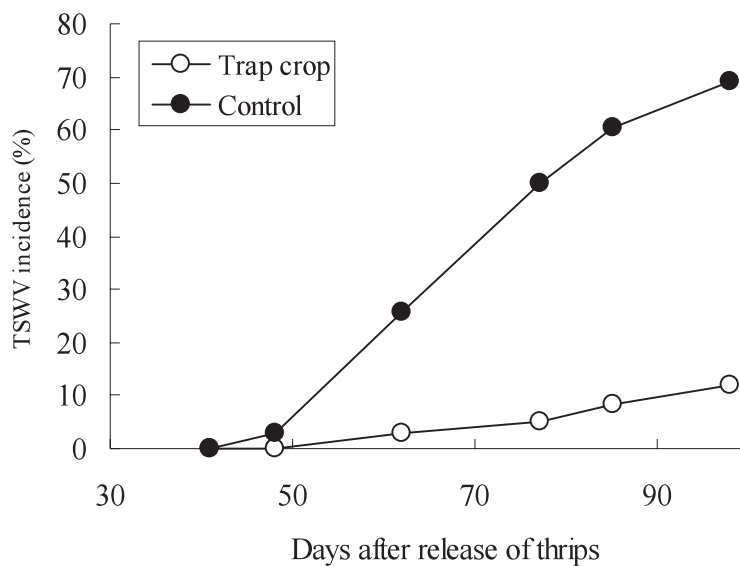


Fig. 26. Incidence of TSWV symptomatic chrysanthemum plants in plots of the trap crop and untreated control in 2004-2005.

となった(Fig. 25)。無処理区におけるキクえそ病の発病株率は、放飼 48 日後以降から増加し、98 日後の着蕾期において、69%の発病株率となった。一方、トラップ植物区では、発病株率は低く推移し、98 日後には 12.0%であった(Fig. 26)。また、キクえそ病発病株の圃場内空間分布は、2003 年の実験結果とほぼ同様であった（データ省略）。

4) 考察

これまでに、鉢植え栽培キクにおいて、バーベナ‘シッシングハーストピンク’や‘タピアンピンク’を混植することで、ミカンキイロアザミウマを誘引し、トラップ植物として利用できる可能性が示唆されている（Bennison et al., 1998）。また、バーベナ‘タピアンラベンダー’が他品種よりもよくミカンキイロアザミウマを誘引するという報告がある（Warnock et al., 2004）。しかし、バーベナをトラップ植物として栽植し、キクへの寄生数を減少させることにより、ミカンキイロアザミウマが媒介する TSWV の抑制効果を調査した報告はない。本実験で、トラップ植物区において、キクのミカンキイロアザミウマの発生は、対照区に比べ着蕾期まで少なく推移し、結果として、本害虫が媒介するキクえそ病の発生は、トラップ植物区で開花期まで対照区の 13~18%に抑制された。ミカンキイロアザミウマによる TSWV の吸汁感染時間は短く、5 分程度でも感染可能であると報告されている（Wijkamp et al., 1996）。このことから、キク株上で羽化したミカンキイロアザミウマ成虫が羽化後、比較的早い段階でバーベナへ移動していると考えられる。トラップ植物区のキク株におけるミカンキイロアザミウマ密度は、キク開花後に急増した。これは、バーベナ株上で増殖したアザミウマの一部が開花後のキクに戻ったためと推測される。Bennison et al. (2002b) は、キク‘スイングタイム’の花がミカンキイロアザミウマに対して強い誘引作用を保持していると報告しており、開花したキクがミカンキイロアザミウマにとって高い誘引効果を有することが考えられる。したがって、今後、バーベナ株上で媒介虫アザミウマが増殖しない方法を検討する必要がある。

以上から、施設電照ギク栽培における高密度のバーベナ栽植は、キクのミカンキイロアザミウマを着蕾期まで誘引し、その結果として、本虫が媒介するキクえそ病の発生を開花期まで抑制できることが明らかとなった。

4. バーベナの低密度栽植によるキクえそ病の防除効果

1) 緒言

前節において、バーベナをキクの畝に沿って高密度に栽植することで、キク株上のミカンキイロアザミウマが誘引され、その結果、キクえそ病の発生が抑制されることを明らかにした。トラップ植物の適切な占有面積は、一般には栽培作物の 10%程度と考えられている（Hokkanen, 1991）。トラップ植物の栽培面積は、少ないほど経済合理性は増加する。特に、広島県沿岸部のキク産地のように比較的狭い農地で栽培する場合においては重要である。しかし、トラップ植物の栽植割合が減れば、当然その効果も低下すると予想される。そこで、

農業生産場面において実践可能な栽植密度で、キクえそ病の発生を抑制できるかどうかを明らかにすることを目的で、トラップ植物の占有率 10%を基準とした場合、それよりも比較的 low 密度でのバーベナ栽植が、施設電照キクにおけるミカンキイロアザミウマとキクえそ病の発生に及ぼす影響を調査した。

2) 材料および方法

実験施設として、農業技術センター内の 0.9 アールの鉄骨ハウス 2 棟を用いた。各施設を十字型に 4 分割し、農業用ビニルで隔壁を設け、隣接する区へバーベナの揮発性成分が拡散するのを防いだ。各区の中央に 1.3m×4m の畝を設置した。2005 年 10 月 4 日、各区にキク‘神馬’の苗を条間 20cm、株間 20cm の 4 条植で、80 株を定植した。トラップ植物区には、プラスチック製のコンテナ (25cm×25cm×37cm) にバーベナ‘ファンシーパフェ’を移植し、10 月 4 日に、キクの畝から 1m 離れた位置に区当たり 6 株を配置した。キクとバーベナの比率は、13.3 : 1 とした。バーベナを配置しない区を無処理区とした。実験状況を Fig. 27 に示した。夜温は、15°C とし、夜間中断電照 (PM10:00~AM2:00) で栽培した。実験は、ランダム配置による 4 連制で行った。10 月 7 日に、各区中央のキク 2 株の上位 3 葉に TSWV キク分離株を汁液接種した。接種葉にキクえそ病の病徴が現れた 10 月 24 日に、接種株に 200 頭 (雌雄比 9:1) のミカンキイロアザミウマを放飼し、11 月 4 日までゴース (112 μ m 目合い) 被覆



Fig. 27. Chrysanthemum growing in 2005-2006. Verbena cv. Fancy Parfait was grown alongside chrysanthemum plants at a ratio of 1: 13.3. Experiment was carried out in a randomized block design with four replications.

した。11月下旬から1月中旬まで、約2週間おきに、各区からキク頂芽をランダムに20個採取し、70%エタノールでアザミウマを攪拌、抽出した。抽出したアザミウマは、成幼虫を合わせて実体顕微鏡下で計数した。トラップ植物におけるミカンキイロアザミウマの発生量は、任意のバーベナ10花房を白い板にたたき出し、見取り調査した。キクえそ病の発病は、全株について前述のとおり調査した。各処理区におけるミカンキイロアザミウマ発生量およびキクえそ病発病株率は、*t*-検定で比較した。

3) 結果

無処理区におけるミカンキイロアザミウマの発生量は、放飼72日後まで、頂芽当たり0.2~0.39頭で推移した。一方、トラップ植物区においては、0.05~0.15頭で推移した。放飼72日後のミカンキイロアザミウマ発生量に区間で有意差が認められた ($p < 0.05$, Fig. 28)。バーベナ花房上のミカンキイロアザミウマ成虫数は、放飼56日以降増加し、72日後には花房当たり0.7頭になった(Fig. 29)。無処理区におけるキクえそ病の発生株率は、放飼32日以降急増し、96日後には80.1%に達した。一方、トラップ植物区においては、同様に32日後から増加したが、その程度は緩慢であり、96日後には41.7%となった。放飼85日後および96日後に区間で発病株率に有意差が認められた (85日後, $p < 0.05$; 96日後, $p < 0.01$) (Fig. 30)。

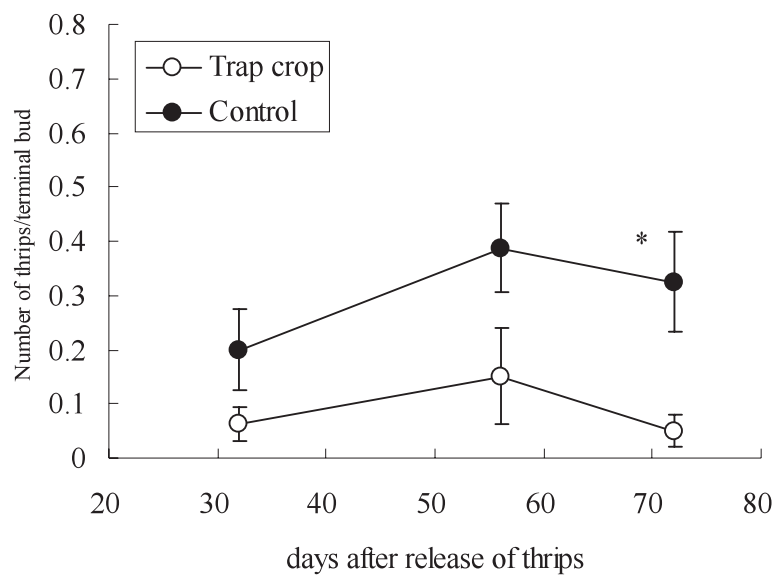


Fig. 28. Mean number of thrips per terminal bud on chrysanthemums grown in plots of the trap crop and untreated control in 2005-2006. The ratio of verbena plants to chrysanthemum plants was 1: 13.3. Bars indicate the standard error of four replications. Asterisk indicate a significant difference at $p < 0.05$ (*) in Student's *t*-test.

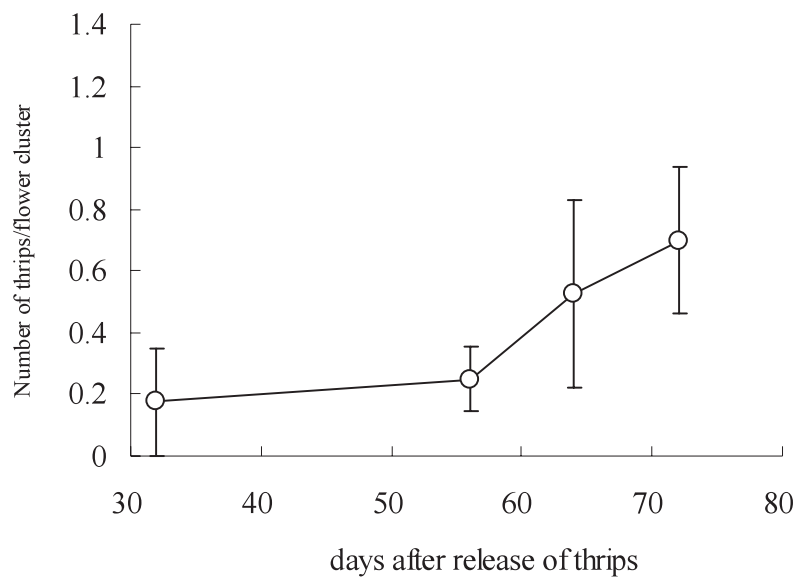


Fig. 29. Mean number of adult western flower thrips per flower cluster on the verbena trap crop beside chrysanthemum plants in 2005-2006.

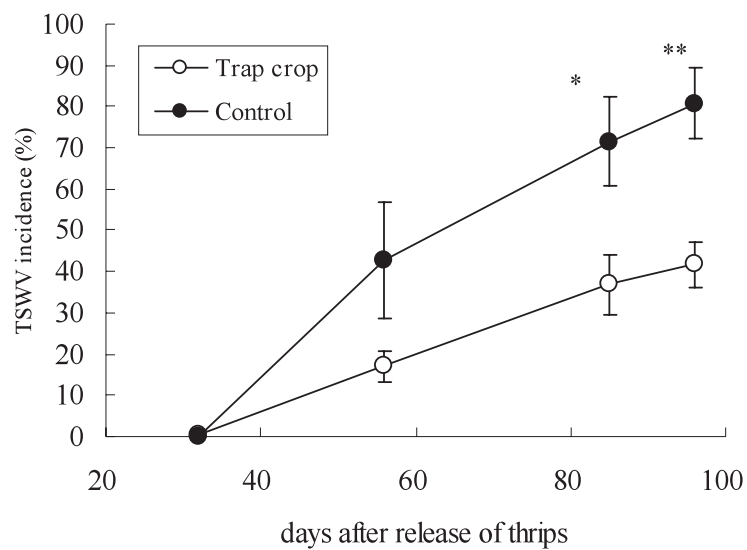


Fig. 30. Incidence of TSWV-symptomatic chrysanthemum plants in plots of the trap crop and untreated control in 2005-2006. Bars indicate the standard error of four replications. Asterisks indicate a significant difference at $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**) in Student's t -test.

4) 考察

トラップ植物を低密度で栽植することで、キクのみカンキイロアザミウマの発生を作期を通し無処理区の約15~40%に抑制した。キクでの寄生密度が抑制された結果、トラップ植物区におけるキクえそ病の発生は、無処理区の40~52%に抑制された。この抑制程度は、高密度でバーベナを栽植した場合と比較して低く、その程度は、媒介虫発生量の抑制程度から説明しうるものであった。前節と同様、本実験でもバーベナ株上でみカンキイロアザミウマの増殖が認められた。今後は、バーベナへの農薬または天敵の施用など、トラップ植物上での媒介虫の増殖を抑制する技術の開発が必要と考えられる。本実験では、トラップ植物の高密度での栽植実験の場合と同様、キクとトラップ植物の距離は近く、混作 (Intercropping) に近い栽植配置とした。トラップ植物を最少の密度で効果を発揮させるための栽植距離および配置方法について、さらに検討が必要である。また、これまでのようなモデル的実験ではなく、現地の施設キク圃場内外へバーベナを栽植し、アザミウマ誘引効果およびキクえそ病防除効果を実証する必要がある。

VI. 総合考察

近年、キク栽培において、種々のウイルス（ウイロイド）病が発生し、問題となっている。特に、アザミウマ類によって媒介される TSWV などのトスポウイルス属は、症状が激しく経済的被害が大きい。本研究は、キクに発生するトスポウイルスの被害を、適確な診断と発生要因に基づく防除により、軽減できるようにすることを目的に実施した。そして、将来の実用化の可能性を見据えて、環境負荷の少ない防除技術として、トラップ植物を用いた防除技術の開発を試みた。

キクでは、挿し穂による栄養体繁殖を行うことが多いため、親株がキクえそ病あるいはキク茎えそ病に感染している場合、挿し穂へウイルスが垂直伝搬することが予想され、挿し穂用の親株や親株養成用の母株（親株）のウイルス病診断に基づいた感染親株の除去、更新は、感染拡大を防止する上で極めて重要である。また、このような親株の感染は、低濃度ウイルスの無病徴感染が予想され、可能な限り検出感度の高い診断手法が要求される。本研究では、近年発達が目覚ましい遺伝子診断を基盤とした診断技術の開発を行った。キクでは、先述のとおり、親株の潜在感染を検出することが、第一次伝染源の除去という視点から重要となる。そこで、マルチプレックス RT-PCR を用いた、TSWV およびキクのもう一つの重要病原体であるキクわい化ウイロイド（CSVd）の同時検出技術の開発を行った。その結果、TE 緩衝液による植物体からの核酸の簡易抽出と、それを鋳型にしたワンステップ・マルチプレックス RT-PCR 法により、一回の反応で両病原体を検出することを可能にした。また、その検出感度は、粗汁液を鋳型核酸として用いるにも関わらず、DAS-ELISA 法の約 1000 倍という十分に高いものであった。本法は、高い検出感度を有しているため、キクで重要となる潜在感染株からの病原体の検出に利用できるものと考えられる。近年、ウイロイドの検定において、注射針等を用いて鋳型 RNA を植物組織から持ち出すダイレクト RT-PCR 法が開発され、利用されている（Hosokawa et al., 2006）。このような簡易な核酸抽出技術と併用させることで、さらに検定の時間短縮が可能となると考えられ、技術確立に向けた今後の検討を要する。親株あるいは挿し穂組織内において、TSWV はランダムに局在する。したがって、より正確な診断を行うため、同一株から複数葉のサンプルを採取し、混合して検定することで、偽陰性判定を回避する必要がある。TSWV、CSVd はともに、極低濃度でキクに感染することが知られており（藤ら, 1998, 細川ら, 2003）、本法で、それらの低濃度感染株を検定できるかどうかは不明である。しかし、植物には、RNA サイレncing のようなウイルス核酸を衰退させる免疫機構の存在が知られており（Takeda et al., 2002）、そのような極低濃度のウイルスあるいはウイロイドに感染した挿し芽が、将来切花栽培期間中に発病に至るのかわかっていない。少なくとも本法は、次世代挿し穂の生育中に発病を引き起こすレベルの病原体濃度であれば、ウイルスの局在性を均質化しながら検定することで、正確に親株感染を診断できるものと考えられる。

LAMP 法は、同一温度で標的遺伝子を増幅し、電気泳動せずに DNA 増幅に伴う副産物の沈殿（濁り）で増幅の有無を判断でき、その簡便さから近年注目されている遺伝子増幅技術の一つである。本研究では、より簡便、かつ高感度なキクエそ病の診断技術を開発することを目的に、本法による TSWV の検出を検討した。その結果、LAMP 法により、キクの他、数種果菜類から TSWV を特異的に検出できた。また、LAMP 法によるキクからの TSWV の検出感度は、DAS-ELISA 法よりも約 25 倍高かった。さらに、ループプライマーを加えることで、反応の高速化が実現できた。しかし、直接キク組織の粗汁液を鋳型とした RT-LAMP 法では、安定した検出結果は得られず、正確な検定のためには、鋳型となる RNA の精製が不可欠であった。したがって、本技術をより実用的なものにするためには、より多くの候補からの最適プライマーの探索、さらに、感染植物粗汁液の希釈倍数を上げること等による、LAMP 反応阻害物質の影響を回避する方法についてさらに検討する必要がある。これらの問題が解決し、将来、キットの低コスト化が実現されれば、本技術は、十分に現場で利用できるものと考えられる。一方、LAMP 法を用いて、保毒ミカンキイロアザミウマ 1 頭から TSWV を高感度に検出することができた。その際、核酸を精製することなく、アザミウマの磨砕粗汁液を直接鋳型としても十分高い感度で検出できた。アザミウマによるトスポウウイルスの媒介が成立するためには、十分な量のウイルス粒子が唾液腺へ到達しなければならない。したがって、保毒虫を検定する場合、唾液腺におけるウイルスの有無を調べるのが重要で、アザミウマ体内から低濃度のウイルスを検出することはあまり意味をなさないが、将来、キットが低コスト化された場合、ELISA 法よりも簡便な本法は、TSWV 保毒虫の簡易かつ高精度の疫学的調査に利用できるものと考えられる。

以上のように、キクの TSWV 検出法における二種類の遺伝子診断技術、すなわちマルチプレックス RT-PCR 法と RT-LAMP 法の応用を検討し、いずれも一定の成果を認め、特に、マルチプレックス RT-PCR 法は実用性の高い技術として確立することができた。今後、本手法が公的調査機関のみならず種苗会社やキクの産地などで利用されることを期待する。

キクに被害を及ぼすトスポウウイルスは、TSWV と CSNV だけで、INSV は現在のところ、人工接種による発病の記述のみで、自然感染は報告されていない (Daughtrey et al., 1997)。2006 年の夏、TSWV の特異的プライマーで検出されないキクエそ症状株が広島県内のキク生産施設で発生した。分離した病原体の諸性質を検討した結果、日本で未発生のトスポウウイルスである CSNV であることを明らかにした。CSNV は、南米の栽培ギクで初めて発見され、その後、ヨーロッパにも被害が拡大した。本ウイルスによるキクの症状は激しく、今後、多くの産地で被害が顕在化する可能性がある。本ウイルスは、ミカンキイロアザミウマおよび *F. schultzei* で高率に媒介されると報告されている (Nagata et al., 2000)。*F. schultzei* は、日本で未発生であることから、日本での本ウイルスの主要媒介虫は、ミカンキイロアザミウマであると推察される。本ウイルスは、血清学的に TSWV と近縁であり、キクでの発生生態は、TSWV と類似したものと推察されるが、栄養繁殖を介した垂直伝搬様相、発病の品種間差異、発病に好適な温度条件や潜伏期間など不明な点が多い。また、日本では広く観察され、南米やヨ

ヨーロッパではほとんど問題にならないミカンキイロアザミウマと同属のヒラズハナアザミウマによる媒介能力も不明である。今後は、本ウイルスをキク産地に定着させずに、撲滅させるために、CSNVの疫学的調査が不可欠であるといえる。

キクえそ病を合理的に防除するためには、本ウイルスの垂直および水平伝搬様相等のウイルス病発生要因を明らかにすることが重要である。本ウイルスは、キクの親株から挿し穂へと栄養繁殖により垂直伝搬することが予想されるため、その伝染様相を調査した。まず、感染した親株から採穂した挿し穂内および挿し穂間におけるTSWVの局在性をDAS-ELISA法で検討した。その結果、本ウイルスは、挿し穂内にランダムに局在しているものの、下位茎葉に比較的高い頻度で検出されることがわかった。また、感受性キク品種において、ウイルス感染した親株から採穂した挿し穂のTSWV陽性率は挿し穂世代（時期）に関係なく約20～50%程度であり、その割合は、より高感度の検出法、すなわちRT-PCR法とハイブリダイゼーション法の組み合わせを行った場合でも同様であった。さらに、挿し穂を発根させ、開花期まで栽培した場合のキクえそ病の発病率もほぼ同等の割合であった。これらの事実から、キクえそ病感受性品種において、TSWVに感染した親株から次世代挿し穂へのTSWVの栄養体繁殖を介した伝染率は、約20～50%程度であると推定された。残りの挿し穂がウイルスフリーであるのか、あるいはウイルスが極低濃度で存在するのかは不明であるが、たとえ極微量のウイルスが存在したとしても、RNAサイレンシングのような植物のウイルス核酸を衰退させる免疫機構（Takeda et al., 2002）によって、それらは少なくとも一世代程度では、発病には至らないのではないかと推察される。親株から挿し穂への垂直伝搬効率は、親株が媒介アザミウマの寄生を受けている場合には、さらに上昇することが予測され、一方、抵抗性品種の場合は、低下することが予測される。しかし、無病徴のTSWV感染親株から約3割程度の比率で挿し穂へとウイルスが伝搬すること自体、十分に高い伝染率と考えられ、これらの結果は、感染親株からの採穂によるウイルス伝染が、主要な第一次伝染源となっていることを傍証するものといえる。一方、TSWV感染親株の根からは、採取時期に関係なく、地上部よりも高頻度にTSWVが検出された。このことから、親株検定においては、偽陰性を回避する上で、地上部よりも根をELISA検定する方が適していると考えられる。地上部茎葉を検定する場合は、少なくとも同一株から任意の複数葉を採取し、混合して検定することが、偽陰性を回避するのに必要と考えられる。以上のように、TSWV感染親株のウイルス診断に基づいた除去、更新がその後の発生防止に重要であり、特に現場圃場では、発病の見られた品種およびその近隣で栽培された品種は、たとえ無病徴でも親株として利用しないことが、ウイルス病伝染環を遮断する上で重要であると考えられる。

露地秋ギク栽培におけるキクえそ病の水平伝搬様相を、広島県沿岸部のウイルス汚染キク圃場で調査した。その結果、春先（3～4月）に親株が数%レベルでTSWVに潜在感染し、そこから採穂した挿し穂苗を本圃へ定植することが、本病の主要な第一次伝染源となること、そして、本圃でミカンキイロアザミウマが多発した場合、二次感染により着蕾期までにキクえそ病の大発生を引き起こすことを明らかにした。このことは、潜在感染親株の除去および

本圃での徹底したアザミウマの低密度管理の双方が、キクえそ病被害の軽減に不可欠であることを示している。片山ら（2000）は、春先にキク親株床ですでにキクえそ病の発病が確認され、また、TSWVに発病したキク親株床が保毒ミカンキイロアザミウマの温床になっていると報告した。広島県沿岸部では、キク冬至芽や地上芽で越冬したミカンキイロアザミウマは、3月頃から羽化し、移動分散を開始する。したがって、この時期に的確に媒介虫を防除することが、キクえそ病のその後の二次感染の防止に重要と考えられる。

化学合成農薬が病害虫防除の主役になってまもなく、抵抗性害虫の出現、リサーチェンスと呼ばれる特定害虫勢力の増大、食品残留そして野生生物への悪影響といった種々の弊害が現実問題となり、1980年代から化学農薬一辺倒の防除の改善策が打ち出され始めた。そして、その基本理念として、総合防除（IPM）の概念が提唱され、病害虫の防除にあたっては、複数の防除手段が講じられるのが一般的になっている。すなわち、そこでは、必ずしも農薬を否定するわけではなく、天敵等に影響の少ないBT剤、IGR剤のような殺虫スペクトラムの狭い農薬が選択される。また、農薬以外に、各種防除手段が考慮される。すなわち、物理的防除手段では、防虫ネット、紫外線カットフィルム、太陽熱の利用など、耕種的防除手段として、作期の変更、抵抗性品種の利用など、そして、生物的防除手段として天敵、天敵増殖植物（バンカー植物）、トラップ植物、忌避植物の利用などが挙げられる。しかしながら、これらの諸技術は、無秩序に利用するのではなく、作物と病害虫の生態的特性に基づいた合目的な利用であることが重要である。また、生産者にとっては、環境負荷軽減効果に加えて、経済的合理性が満たされなければならない（鈴木、2005）。これらの諸技術は、安全な農作物への希求から、主に食用作物に適応されることが多かった。しかし、近年、MPS制度に見られるように、花き類生産においても、環境に配慮した栽培体系が環境面および消費者ニーズに適合することから重要視されてきている。このような背景において、他生物の行動に影響を及ぼす化合物（Semiochemical）の農業利用、すなわち、トラップ植物、忌避植物あるいは天敵増殖植物（バンカー植物）といった高次の機能を有する植物種を直接圃場に栽植して、害虫に影響を及ぼすPush-pull戦略の応用が注目され始めている。本研究では、トスポウウイルス防除におけるPush-pull戦略の構築への足がかりとして、トラップ植物を利用したキクえそ病の防除の可能性について検討を行い、その防除モデルの実証を試みた。まず、葡萄性を有する種々の花き類から、ミカンキイロアザミウマを効果的に誘引する植物を探索した。その結果、種々花き類の中で、バーベナ‘ファンシーパフェ’が比較的高い誘引作用を保持していることを明らかにした。バーベナ花房の揮発性物質を分析した結果、既報のミカンキイロアザミウマ誘引物質であるリナロールオキシドピラノイドが多く検出されたものの、誘引能力の高いシス型の量は、比較的少なかった。このことから、本物質以外の揮発性物質も誘引作用に関わっていることが示唆された。そこで、バーベナ花房で生産される揮発性物質それぞれのミカンキイロアザミウマ誘引性を、人工合成標品と粘着トラップの組み合わせにより評価したが、誘引の鍵となる物質を特定することはできなかった。今後は、各物質の混合による誘引作用の評価など、バーベナによるミカンキイロアザミウマ誘引のメカニズムを明らか

にする必要がある。バーベナはミカンキイロアザミウマの誘引性を保持しているが、媒介虫が増殖するという欠点を併せ持つ。したがって、バーベナと同等、もしくはそれ以上の誘引作用を保持し、かつ、ミカンキイロアザミウマが増殖しにくい植物種の探索が、今後必要と考えられる。

施設電照ギク栽培において、トラップ植物としてバーベナを、メイン作物に対する占有率約10%を基準とした場合の、高あるいは低栽植密度でキクと混植し、ミカンキイロアザミウマおよびそれが媒介するキクえそ病の発生抑制効果を検討した。その結果、バーベナを高密度に栽植した場合、その誘引作用によりキクに寄生するミカンキイロアザミウマの発生量が着蕾期まで低く推移し、本害虫が媒介するキクえそ病の発生は、開花期まで抑制された。一方、バーベナを低密度で栽植した場合でも、同様の効果が認められたが、高密度栽植と比較するとその効果はマイルドであった。以上のように、施設電照ギク栽培において、バーベナを栽植することでキクえそ病の発生を抑制することができ、その効果は、バーベナの栽植密度に依存した。この技術は、忌避植物と組み合わせることで、さらに効果を高められる可能性がある。しかし、一方で、誘引されたミカンキイロアザミウマは、バーベナ株上で増殖し、その一部が開花期のキクに再び移動する現象が認められた。従って、本技術を将来実用化するには、トラップ植物へ天敵あるいは選択性の高い農薬等を施用して利用する等の、媒介虫を増やさない技術の開発が必要と考えられる。本技術によるキクえそ病の防除効果は、モデル実験的に実証することができたが、現地圃場での試験は行っていない。現地での実証試験では種々問題点が露呈される可能性もある。トラップ植物は、他害虫や、場合によっては標的害虫をも過度に誘引する副作用事例も知られている。今後は、キク生産圃場において、本技術が効果面、経済面ともに有効な技術となり得るかを、他の諸防除技術と体系的に連動しながら評価していく必要がある。

近年、過激化する野菜、果実、観賞用植物等の国際流通に伴い、新興の植物ウイルス、ウイロイドの侵入に歯止めがかからないのが現状である。広島県をみても、2000年以降、CSNVを含む各種トスポウウイルスの被害拡大、タバココナジラミによって媒介されるトマト黄化葉巻病ウイルス (*Tomato yellow leaf curl virus*; TYLCV) の広域的な発生、また同じくトマト栽培における、トマト退緑萎縮ウイロイド (*Tomato chlorotic dwarf viroid*; TCDVd) による発生園での壊滅的被害が挙げられる。特に、TYLCVの発生は、従来のシルバーリーフコナジラミに変わって、本ウイルスを媒介する薬剤抵抗性の発達したタバココナジラミ新系統であるバイオタイプQの定着に負うところが大きい (Matsuura et al., 2008)。いずれの場合においても、単一遺伝子による大規模モノカルチャーが持つ病原体に対する脆弱性を露呈したものと見えるかもしれない。トスポウウイルスをはじめ、これらの病原による被害を抑え、農作物の安定生産を行うためには、農薬も含め、種々防除手段の合理的な体系的利用を講じることが何より重要であることは本論文でも述べてきたことであるが、一方で、農業生態系における遺伝子の多様性を増加させ、病原体や媒介虫に対する緩衝作用を高めることにより、いわば共存的な方向性をも模索していかなければならないのではと考える。

VII. 摘要（英文サマリー）

TSWV および CSVd の特異的プライマーを設計し、キク発病葉から全 RNA を抽出し、マルチプレックス RT-PCR 法を行ったところ、RNA の単独、混合ともに予想される分子量の増幅 DNA が認められた。両病原に重複感染したキク粗汁液を鋳型にワンステップ・マルチプレックス RT-PCR 法を行った結果、TSWV は 10^{-8} 、CSVd は 10^{-5} 希釈まで検出できた。以上から、キクの TSWV と CSVd を同時に高感度検出することが可能であり、親株の簡易な診断手法として利用できると考えられた。

TSWV の LAMP プライマーを設計し、キクを含む各作物から全 RNA 抽出後、RT-LAMP 反応を行った。その結果、キク、トマトおよびピーマンから増幅産物が得られた。LAMP 法と DAS-ELISA 法の検出感度を比較したところ、LAMP 法が約 25 倍高かった。以上から、RT-LAMP 法を利用した、キクを含む数種農作物の TSWV 診断が可能と考えられた。

2006 年、広島県の施設キクで、茎えそ、葉の退緑などの症状が発生し、経済的被害を生じた。罹病株をトスポウウイルスのユニバーサルプライマーを用いて RT-PCR 法を行った結果、増幅断片が得られた。この断片の塩基配列を解析したところ、*Chrysanthemum stem necrosis virus*(CSNV)と高い相同性を示した。本病原ウイルスを CSNV と同定し、「キク茎えそ病」と命名した。また、本ウイルスを特異的に検出するプライマーを設計し、RT-PCR 法による特異的診断が可能となった。

TSWV 感染キク親株におけるウイルス局在性および親株から挿し穂への伝染率を調査した。TSWV は、感染親株から採穂した挿し穂内で局在し、その検出頻度は下位茎葉で高く、頂芽で低かった。感染親株から採穂した挿し穂でのウイルス検出率は、約 20~50%で、感染親株の根においては、検出率は 50%以上であった。以上から、感染キク親株から挿し穂への TSWV 伝染率は比較的高く、主要な第一次伝染源であると考えられた。

露地ギク栽培における TSWV の被害発生要因を調査した。その結果、親株が潜在感染し、本圃でミカンキイロアザミウマが多発した場合、着蕾期までにキクえそ病が大発生することを明らかにした。一方、親株が感染しても、本圃で媒介虫の発生が少ない場合、キクえそ病は顕在化しにくいことが判明した。以上から、親株の潜在感染を第一次伝染源とし、本圃で媒介虫の多発による二次感染の結果、キクえそ病が大発生することがわかった。

トラップ植物によるキクえそ病の防除効果を検討した。施設においてバーベナをキクに対して約 7~25%の割合でキクと混植した。その結果、バーベナにミカンキイロアザミウマが誘引されることで、媒介虫の発生が着蕾期まで低密度で推移し、TSWV の発生が抑制された。以上から、トラップ植物バーベナの栽植が、キクの TSWV 発生を抑制し、総合防除の一手段として利用できる可能性が示唆された。

Summary

Studies on diagnosis, occurrence factor and control by trap crop of tospoviruses in chrysanthemums

Multiplex RT-PCR method was developed for detecting *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) and *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) simultaneously from chrysanthemum. Two-step multiplex RT-PCR using random hexamer primers and specific primer sets detected the RNAs of the virus and viroid separately and simultaneously in extracts of TSWV and CSVd-infected chrysanthemum leaves. One-step multiplex RT-PCR, using crude sap of chrysanthemum leaves co-infected with TSWV and CSVd, was also sufficiently sensitive to detect TSWV at dilutions of up to 10^{-8} -fold and CSVd up to 10^{-5} -fold, respectively. The results suggest this method to be able to detect these pathogens in chrysanthemum stock plants; if adopted, it could markedly reduce the dispersal of these diseases via cuttings.

LAMP primers was designed on the basis of nucleotide sequence of NSm protein gene and RT-coupled LAMP was carried out using total RNA extracted from several crops. As the result, the amplification product was detected in the electrophoresis from chrysanthemum, tomato and pepper infected with TSWV. The amplification product was not detected from each healthy crop and INSV infected Impatiens. The sensitivity of TSWV detection by the turbidity of the RT-coupled LAMP by-product and DAS-ELISA by monoclonal antibody was compared using serial diluted plant tissue of infected chrysanthemum. As a result, RT-coupled LAMP permitted the detection of a lower concentration of TSWV than DAS-ELISA. It seemed to be possible to carry out sensitive and quick diagnosis of TSWV from several crops by the nucleic acid amplification using RT-coupled LAMP.

In August 2006, necrotic streaks on stems, chlorotic and necrotic spots and rings on leaves, and leaf distortions were observed on chrysanthemum cvs. Jimba and Seinotama in greenhouses of one grower in Hiroshima Prefecture. As determined by mechanical inoculation, host range and symptomatology of the isolate were similar to those described previously for *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), including necrotic spots on *Petunia hybrida*. This virus reacted strongly with CSNV antiserum (DSMZ, Braunschweig, Germany) by indirect DIBA, and cross-reacted weakly with a monoclonal antibody of TSWV using DAS-ELISA. No amplification was observed from extracts of symptomatic plants by multiplex RT-PCR using TSWV and *Impatiens necrotic spot virus* specific primer sets, indicating that the diseased chrysanthemums were not doubly infected with these viruses. However, a DNA fragment of approximately 450 bp was amplified in samples by RT-PCR using tospovirus universal primers, BR60/65. The nucleotide sequence of the amplified fragment had 98.1%

identity with the corresponding region of the CSNV nucleocapsid protein gene. The above results indicate that the virus associated with a stem necrosis disease of chrysanthemums in Hiroshima is an isolate of CSNV. To our knowledge, this is the first report of CSNV in Japan.

Localization of TSWV in susceptible chrysanthemum stock plants and transmission efficiency of TSWV from latently infected stock plants to cuttings under thrips-free conditions were investigated using DAS-ELISA, RT-PCR combined with dot blot hybridization, and by cultivation. TSWV localized in symptomless stock plants and cuttings taken from them, and its detection frequency, was relatively high in the lower leaves and stems, but low in terminal buds of cuttings. The detection rate of TSWV in cuttings taken from infected stock plants ranged from ca. 20 - 50%. The detection rate of TSWV in the roots of stock plants was greater than 50% in most periods. These results indicate that transmission efficiency from infected chrysanthemum stock plants to cuttings is fairly high and thus may become a major source of secondary infection in production fields or glasshouses. Our results also suggest that several lower leaves should be subjected to ELISA to detect infection in stock plants and cuttings.

A high density of *Frankliniella occidentalis*, the predominant vector, in the presence of latently infected stock plants resulted in a high incidence of TSWV disease in the chrysanthemum production field. The incidence of disease was low when the vector thrips were not abundant in spite of the presence of latently infected stock plants. These results suggest that an infestation of the vector thrips causes severe secondary spread of TSWV originating from latently infected stock plants in chrysanthemum production fields.

The effect of verbena as a trap crop on the occurrence of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, and the incidence of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in chrysanthemums were investigated. Verbena cvs. Pink Parfait and/or Fancy Parfait were cultivated alongside chrysanthemum cv. Jimba in a greenhouse. Verbena plants attracted vector thrips, reducing western flower thrips colonization of chrysanthemum until flower bud initiation, and markedly suppressing TSWV incidence on chrysanthemums until flowering. Significant quantities of linalool oxide pyran were produced by the flower of cv. Fancy Parfait; and the ratio of cis-linalool oxide pyran, an attractant for vector thrips, to the trans-type was approximately 1:5. Our results suggest that cultivation of verbena as a trap crop may be useful in integrated pest management programs as a control for thrips-transmitted TSWV in chrysanthemums.

Ⅷ. 謝辞

本研究は、主として1999年から2007年にかけて著者が広島県立総合技術研究所農業技術センターに在職中の成績をまとめたものである。本研究を遂行し、まとめるにあたり、直接指導を頂いた鹿児島大学農学部教授岩井久博士に対して心から感謝申し上げる。また、稿を起すにあたり、ご指導を頂いた鹿児島大学農学部津田勝男博士、佐賀大学農学部大島一里博士、草場基章博士、琉球大学農学部諸見里善一博士に深く感謝申し上げる。本研究を推進する上で貴重なご意見を頂いた独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構中央農業研究センター大村敏博博士、津田新哉博士、九州沖縄農業研究センター奥田充博士、静岡県農林技術研究所土井誠氏に感謝の意を表す。また、媒介虫の調査でご協力を賜った、広島県立総合技術研究所農業技術センター星野滋氏、キクの栽培においてご助言を賜った同センター梶原真二氏、石倉聡氏、香り成分の分析においてご協力を賜った大洋香料株式会社古賀晴信氏に、感謝の意を表す。本研究の遂行にあたりご指導、ご助言を頂いた広島県立総合技術研究所農業技術センター次長林英明氏、同センター生産環境研究部長長久逸氏および副部長香口哲行氏には敬意と謝意をささげる。さらに、同研究部の諸氏にここに改めて厚くお礼を申し上げます。

Ⅸ. 引用文献

- Ainsworth, G. D. (1936). Detection of spotted wilt virus in chrysanthemums. *Nature* 137: 868.
- Allen, W. R., J. A. Matteoni and A. B. Broadbent (1990). Susceptibility of cultivars of florist's chrysanthemum to tomato spotted wilt virus. *Can. J. Plant Pathol.* 12: 417-423.
- Allen, W. R. and J. A. Matteoni (1991). Petunia as an indicator plant for use by growers to monitor for thrips carrying the tomato spotted wilt virus in greenhouses. *Plant Dis.* 75: 78-82.
- Bennison J. A., E. M. Pow, L. J. Wadhams, K. A. Maulden, L. R. Wardlow and J. H. Buxton (1998). Improving biological control of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, on greenhouse ornamentals. Proceedings of the 6th International Symposium on Thysanoptera, Antalya, Turkey. Pp 19-24.
- Bennison, J., K. Maulden, I. Barker, J. Morris, N. Boonham, P. Smith and N. Spence (2002a). Reducing spread of TSWV on ornamentals by biological control of western flower thrips. In Thrips and Tospovirus: Proceedings of the 7th International Symposium on Thysanoptera (R. Marullo and L. Mound eds.). Australian National Insect Collection, Canberra.
- Bennison J., K. Maulden, S. Dewhirst, E. Pow, P. Slatter and L. Wadhams (2002b). Towards the development of a push-pull strategy for improving biological control of western flower thrips on chrysanthemum. In Thrips and Tospovirus: Proceedings of the 7th International Symposium on Thysanoptera (R. Marullo and L. Mound eds.). Australian National Insect Collection, Canberra, pp 199-206.
- Bezerra, I. C., R. de O. Resende, L. Pozzer, T. Nagata, R. Kormelink and A. C. De Avila (1999). Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. *Phytopathology* 89: 823-830.
- Bielza, P., V. Quinto, J. Contreras, M. Torne, A. Martin and P. J. Espinosa (2007). Resistance to spinosad in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), in greenhouse of south-eastern Spain. *Pest Manage. Sci.* 63: 682-687.
- Brodsgaard, H. F. (1994). Insecticide resistance in European and African strains of western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) tested in a new residue-on-glass test. *J. Econ. Entomol.* 87: 1141-1146.
- Cook, S. M., Z. R. Khan and J. A. Pickett (2007). The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Annu. Rev. Entomol.* 52: 375-400.
- Daughtrey, M. L., R. K. Jones, J. W. Moyer, M. D. Daub and J. R. Baker (1998). Tospovirus strike the greenhouse industry, INSV has become a major pathogen on flower crops. *Plant Dis.* 81: 1220-1230.
- 土井 誠・善 正二郎・奥田 充・中村宏子・加藤公彦・花田 薫 (2003). Iris yellow spot virus

- (IYSV) によるトルコギキョウ (*Eustoma grandiflorum*) えそ輪紋病. 日植病報 69: 181-188.
- Eiras, M., R. O. Resende, A. A. Missiaggia and A. C. De Avila (2001). RT-PCR and dot blot hybridization methods for a universal detection of tospoviruses. *Fitopatol. Bras.* 26: 170-175.
- Flores, R., C. Hernandez, E. Martinez de Alba, J. Daros and F. Di Serio (2005). Viroids and viroid-host interactions. *Ann. Rev. Phytopathol.* 43: 117-139.
- 藤 晋一・大石一史・中前 均. (1998). イムノキャプチャーRT-PCR によるキクえそ病の診断. 関西病虫研報. 40: 111-112.
- Fukuta, S., S. Kato, K. Yoshida, Y. Mizukami, A. Ishida, J. Ueda, M. Kanbe and Y. Ishimoto (2003). Detection of tomato yellow leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification reaction. *J. Virol. Methods.* 112: 35-40.
- Hanada, K., S. Tsuda, M. Kameya-Iwaki and T. Tochiwara (1993). Distinct properties of nucleocapsid of a watermelon isolate of Tomato spotted wilt virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* 59: 500-506.
- 林 英明・細田昭男・星野 滋・村井 保・片山晴喜・今井利宏. (1998). 色彩および匂いトラップによるミカンキイロアザミウマ, ハナアザミウマの誘引について. 第8回天敵利用研究会講演要旨 P13.
- Hokkanen H. M. T. (1991). Trap cropping in pest management. *Annu. Rev. Entomol.* 36: 119-138.
- Hooftman, R., M. J. Arts, A. M. Shamloul, A. Van Zaayen and A. Hadidi (1996). Detection of chrysanthemum stunt viroid by reverse transcription-polymerase chain reaction and by tissue blot hybridization. *Acta Hort.* 432: 120-128.
- Hooper, A. M., J. A. Bennison, M. C. Luszniak, J. A. Pickett, E. M. Pow and L. J. Wadhams (1999). *Verbena × hybrida* flower volatiles attractive to western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Pestic. Sci.* 55: 660-662.
- Hosokawa, M., Y. Matsushita, H. Uchida and S. Yazawa (2006). Direct RT-PCR method for detecting two chrysanthemum viroids using minimal amount of plant tissue. *J. Virol. Methods* 131: 28-33.
- 細川宗孝・植田恵美・大石一史・矢澤 進(2003).キクスタントウイロイドの感染によるキクの開花に対する日長反応性の攪乱. 園学雑 72 別 2 : 447.
- Inoue, T., T. Sakurai, T. Murai and T. Maeda (2004). Specificity of accumulation and transmission of tomato spotted wilt virus (TSWV) in two genera, *Frankliniella* and *Thrips* (Thysanoptera: Thripidae). *Bull. Entomol. Res.* 94: 501-507.
- 片山晴喜・池田二三高 (1995). 静岡県西部地域におけるミカンキイロアザミウマの越冬実態. 静岡農試研報 40: 63-73.
- 片山晴喜・土井 誠・小林久俊・加藤公彦 (2000). 静岡県内のキク及び雑草におけるミカンキイロアザミウマの発生及びトマト黄化えそウイルス (TSWV) 保毒状況. 関西病虫研報 42: 9-14.
- 加藤公彦・花田 薫 (2000). 日本に発生したトマト黄化えそウイルス (TSWV) によるキク (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) えそ病. 九病虫研会報 46: 61-65

- Kato, K., K. Hanada and M. Kameya-Iwaki (2000). *Melon yellow spot virus*: a distinct species of the genus *Tospovirus* isolate from melon. *Phytopathology* 90: 422-426.
- Kormelink, R., P. De Haan, C. Meurs, D. Peters and R. Goldbach (1992): The nucleotide sequence of the M RNA segment of tomato spotted wilt virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segment. *J. Gen. Virol.* 73: 2795-2804.
- Kormelink, R., M. Storms, J. VanLent, D. Peters and R. Goldbach (1994). Expression and subcellular location of the NSm protein of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), a putative viral movement protein. *Virology* 200:56-65.
- 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ロイドの検出. 関西病虫研報 35: 7-12.
- Loomans, A.J.M. and T. Murai (1997). Culturing thrips and parasitoids. *In* Thrips as Crop Pests. pp. 477-503, CAB International, London.
- Matsuura, S. and S. Hoshino (2008). Comparative spatial dispersal of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) vectored by B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* in tomato glasshouses. *Phytoparasitica* 36: 42-51.
- Matteoni, J. A. and W. R. Allen (1989): Symptomatology of tomato spotted wilt virus infection in florist's chrysanthemum. *Can. J. Plant Pathol.* 11: 373-380.
- McPherson, R.M., H. R. Pappu and D. C. Jones (1999). Occurrence of five thrips species on flue-cured tobacco and impact on spotted wilt disease incidence in Georgia. *Plant Dis.* 83: 765-767.
- Mori, Y., K. Nagamine, N. Tomita and T. Notomi (2001). Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 289: 150-154.
- Mound, L. A. (1996): The thysanoptera vector species of tospoviruses. *Acta Hort.* 431: 298-307.
- Munford, R. A., B. Jorvis, J. Morris and A. Blockley (2003). First report of Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV) in the UK. *Plant Pathol.* 52: 779.
- Nagata, T. and A. C. De Avila (2000). Transmission of Chrysanthemum stem necrosis virus, a recently discovered Tospovirus, by two thrips species. *J. Phytopathol.* 148: 123-125.
- Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino and T. Hase (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28: e63.
- Ochoa, M.D.L., E. Zavaleta-Mejia, N.R.M. Johansen, G.A.Herrera and E. Cardenas Soriano (1996). Effect of using certified virus-free cuttings, mulching and floating covers on chrysanthemum production (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev cv. Polaris) and incidence of tospoviruses. *Int. J. Pest Manage.* 42: 161-164.
- 奥田 充・花田 薫・植松清次・福本文良・三平東作・海老原克介・岩波 徹(2005). アイリスイエロースポットウイルス (IYSV) によるアルストロメリア条えそ病 (新称) とウイルスの分布解析. 日植病報 71: 119-122.

- 奥田 充・竹内繁治・古味一洋・岩波 徹 (2005). *Capsicum chlorosis virus* によるピーマン退緑斑紋病 (新称). 日植病報 71: 235.
- Pow, E. M., A. M. Hooper, M. C. Luszniak, J. A. Pickett, L. J. Wadhams and J. A. Bennison (1998). Novel strategies for improving biological control of western flower thrips on protected ornamentals-attraction of western flower thrips to verbena plants. The 1998 Brighton conference-Pests & diseases. 5B-5: 417-422.
- Sakurai, T., T. Inoue and T. Murai (2002). Intraspecific variation in transmission of TSWV by *Frankliniella occidentalis* results from distinct virus accumulation. In Thrips and Tospovirus: Proceedings of the 7th International Symposium on Thysanoptera (R. Marullo and L. Mound eds.). Australian National Insect Collection, Canberra, pp51-57.
- Saxena, R. C., H. D. Justo and E. L. Palanginan (1988). Trap crop for *Nephotetti virescens* (Homoptera: Cicadellidae) and tungro management in rice. *J. Eco. Entomol.* 81: 1485-1488.
- Schuster, D. J. (2004). Squash as a trap crop to prevent tomato from whitefly-vectored tomato yellow leaf curl virus. *Int. J. Pest Manage.* 50: 281-284.
- 下元祥史・竹内繁治 (2006). ウリ科作物に発生する 3 種ポテウイルスのマルチプレックス RT-PCR による同時検出. 日植病報 72: 146-149.
- Shibata, M. (1994). Chrysanthemum. In Horticulture in Japan. Ed. by organizing committee X X I Vth International Horticultural Congress Publication Committee. pp 135-139.
- Sin, S., B. C. McNulty, G. G. Kennedy and J. W. Moyer (2005). Viral genetic determinants for thrips transmission of Tomato spotted wilt virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 5168-5173.
- Smith, R. F. and H. T. Reynolds (1966). Principles, definitions and scope of integrated pest control. In: Proceedings of the FAO symposium on integrated pest control, FAO, Rome. pp. 11-17.
- 鈴木芳人(2005). IPM の環境保全問題. 茨城県病虫研報 44: 1-8.
- Takeda, A., K. Sugiyama, H. Nagano, M. Mori, M. Kaido, K. Mise, S. Tsuda and T. Okuno (2002). Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of *Tomato spotted wilt virus*. *FEBS Letters.* 532: 75-79.
- 谷名光治・井上幸次・伊達寛敬・奥田 充・花田 薫・那須英夫・粕山新二(2001). インパチエンスネクロティックスポットウイルスによるシネラリアえそ斑紋病. 日植病報 67: 42-45.
- Teulon, D. A. J., D. R. Penman and P. M. J. Ramakers (1993). Volatile chemicals for thrips (Thysanoptera: Thripidae) host finding and applications for thrips pest management. *J. Econ. Entomol.* 86: 1405-1415.
- Tsuda, S., M. Kameya-Iwaki, K. Hanada, Y. Kouda, M. Hikata and K. Tomaru (1992). A novel detection and identification technique for plant viruses: rapid immunofilter paper assay (RIPA). *Plant Dis.* 76: 466-469.
- Tsuda, S., I. Fujisawa, J. Ohnishi, D. Hosokawa and K. Tomaru (1996). Localization of tomato

- spotted wilt tospovirus in larvae and pupae of the insect vector thrips setosus. *Phytopathology* 86: 1199-1203.
- Tsuda, S., K. Hanada, I. Fujisawa, M. Kameya-Iwaki and K. Tomaru (1994). The demonstration of strain specific antigenic determinants on nucleocapsid of tomato spotted wilt virus by monoclonal antibodies. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 60: 216-220.
- Uga, H. (2005). Use of crude sap for one-step RT-PCR-based assays of *Bean yellow mosaic virus* and the utility of this protocol for various plant-virus combinations. *J. Gen. Plant Pathol.* 71: 86-89.
- Uga, H. and S. Tsuda (2005). A one-step reverse transcription-polymerase chain reaction system for the simultaneous detection and identification of multiple tospovirus infections. *Phytopathology* 95: 166-171.
- Ullman, D.E., T. L. German, J.L. Sherwood, D.M. Westcot and F.A. Cantone (1993). Tospovirus replication in insect vector cell: immunocytochemical evidence that the nonstructural protein encoded by the S RNA of tomato spotted wilt tospovirus is present in thrips vector cells. *Phytopathology* 83: 456-463.
- Ullman, D. E., J. L. Sherwood and T. L. German (1997). Thrips as vectors of plant pathogens. In: Lewis, T. (ed.), *Thrips as Crop Pests*, pp. 539-565. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Van de Wetering, F., K. Postuma, R. Goldbach and D. Peters (1999). Assessing the susceptibility of chrysanthemum cultivars to tomato spotted wilt virus. *Plant Pathol.* 48: 693-699.
- Verhoeven, J. T. J., J. W. Roenhorst, I. Cortes and D. Peters (1996). Detection of a novel tospovirus in chrysanthemum. *Acta Hort.* 432: 44-54.
- Warnock, D. F. and R. Loughner (2004). Verbena cultivars differently attract adult western flower thrips. *Acta Hort.* 638: 89-93.
- Whitfield, A. E., D. E. Ullman and T. L. German (2005). Tospovirus-thrips interactions. *Ann. Rev. Phytopathol.* 43: 459-489.
- Wijkamp, I., J. Van Lent, R. Kormelink, R. Goldbach and D. Peters (1993). Multiplication of tomato spotted wilt virus in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. *J. Gen. Virol.* 74: 341-439.
- Wijkamp, I., N. Almarza, R. Goldbach and D. Peters (1995). Distinct level of specificity in thrips transmission of tospoviruses. *Phytopathology* 85: 1069-1074.
- Wijkamp, I., J. Van Lent, R. Kormelink, R. Goldbach and D. Peters (1993). Multiplication of tomato spotted wilt virus in its vector, *Frankliniella occidentalis*. *J. Gen. Virol.* 74: 341-349.
- Wijkamp, I., F. Van De Wetering, R. Goldbach and D. Peters. (1996). Transmission of tomato spotted wilt virus by *Frankliniella occidentalis*; median acquisition and inoculation access period. *Ann. Appl. Biol.* 129: 303-313.
- Yamamoto, H and T. Sano (2006). An epidemiological survey of Chrysanthemum chlorotic mottle viroid in Akita Prefecture as a model region in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* 72:387-390.

広島県立総合技術研究所農業技術センター研究報告 第85号

平成21年9月15日 印刷

平成21年9月15日 発行

編集
発行

広島県立総合技術研究所農業技術センター

〒739-0151 広島県東広島市八本松原 6869

TEL (082) 429 - 0522

印刷所

山脇印刷株式会社

〒725-0003 広島県竹原市新庄町 29

TEL (0846) 29-1535(代)

BULLETIN
OF
THE HIROSHIMA PREFECTURAL TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE
AGRICULTURAL TECHNOLOGY RESEARCH CENTER
NO.85

Studies on Diagnosis, Occurrence Factor and Control by Trap Crop
of Tospoviruses in Chrysanthemums

Shohei MATSUURA

Hiroshima Prefectural Technology Research Institute
Agricultural Technology Research Center
(Higashihiroshima, Hiroshima Prefecture, 739-0151 Japan)
September 2009