

# ダリアに感染するウイルス・ウイロイドの検出技術の開発および国内における発生状況

奈良県農業研究開発センター 浅野 峻介・平山 喜彦・仲 照史  
農研機構 花き研究所 松下 陽介

## はじめに

国内の花き生産額が年々低下している中、ダリア切り花の生産額は増加傾向にあり有望な品目となっている。従来は仏花としての需要が主であったが、近年ではブライダルやパーティー等の業務用需要を中心に、フラワーアレンジメントに欠かせない花材となっている。

ダリアは冷涼な気候を好む植物であるため、夏秋期には奈良県や兵庫県の中山間地域と山形県等の冷涼地に産地が形成されている。これらの地域では、夏秋期の切り花生産とその後の球根生産を組合せることによって、労働力の周年活用が図られている。また、近年増加している冬春期の切り花生産は、従来産地ばかりでなく長野県、愛知県、高知県、宮崎県等全国各地に導入されている。

現在、これらのダリア生産で、ウイルス・ウイロイド病害が問題となっている。生産現場における増殖は、夏秋期産地では主として球根（塊根）の分球、冬春期産地では主として挿し芽によって行われている。そのため、ウイルス・ウイロイドに感染した母株から後代にウイルス・ウイロイドが伝染し、その被害が拡大しやすい。

ダリアへの感染が報告されているウイルス・ウイロイドはキュウリモザイクウイルス (CMV: *Cucumber mosaic virus*)、ダリアモザイクウイルス (DMV: *Dahlia mosaic virus*)、インパチエンスえそ斑点ウイルス (INSV: *Impatiens necrotic spot virus*)、タバコ条斑ウイルス (TSV: *Tobacco streak virus*)、トマト黄化えそウイルス (TSWV: *Tomato spotted wilt virus*)、キク矮化ウイロイド (CSVd: *Chrysanthemum stunt viroid*)、ジャガイモやせいもウイロイド (PSTVd: *Potato spindle tuber viroid*)、*Dahlia latent viroid* (DLVd) と多数存在する (表-1)。これらの中でも日本では TSWV によるダリア輪紋

病と DMV によるダリアモザイク病の被害が深刻である (末松ら, 1977; 仲ら, 2007)。

TSWV によるダリア輪紋病の病徴は、葉に黄斑や輪紋、輪紋状のえそ、茎にえそ条斑を生じ、生育が抑制される。球根には、あざ状のえそ条斑を生じる (LOBENSTEIN et al., 1995)。7月下旬から8月下旬の高温期には病徴はマスキングされる。虫媒伝染について、アザミウマ類による永続伝播が報告されており、現地圃場での著しい被害の拡大が確認されている (浅野ら, 2015)。DMV によるダリアモザイク病の病徴は、葉でモザイク、葉脈黄化、委縮が生じ、生育が抑制される (LOBENSTEIN et al., 1995)。虫媒伝染について、アブラムシによる非永続伝播が報告されている。

また近年、CSVd の感染が確認されており、キクに感染する系統と塩基配列の相同性が高いことが明らかにされている (NAKASHIMA et al., 2007)。しかし、我が国の花き生産における最重要品目であるキクと共通病害でありながら、生産性への影響、生産現場での感染状況は明らかでない。

そこで、生産現場で最も問題となる TSWV と DMV、さらなる調査が必要と考えられる CSVd のマルチプレックス RT-PCR による同時検出技術の開発およびその簡易化を実施し、これを用いて国内各地での感染状況およびその症状を調査したので、その結果を紹介する (ASANO et al., 2015)。

## I マルチプレックス RT-PCR 法の開発

マルチプレックス RT-PCR には既報の TSWV-Rnp, Fnp (瀬尾ら, 2009)、DMV-R1345, F944 (仲ら, 2007) と、今回新たに作製した CSVdD-R, F (ASANO et al., 2015) を用いた (表-2)。RT-PCR 試薬は PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver. 2 (Dye Plus) (TaKaRa) を用いた (表-3)。RT-PCR 試薬の濃度はプロトコールに準じ、3組のプライマーの濃度は  $0.4 \mu\text{M}$  とした。テンプレートには TSWV, DMV, CSVd に単独感染しているダリアから RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) で抽出した total RNA を用いた。反応は  $10 \mu\text{l}$  系で実施し、テンプレートは 1 反応につき  $1 \text{ ng}$  の total RNA を使用した。RT 反応

Simultaneous Detection of Two Viruses and Viroid in Dahlias and their Distribution in Japanese Dahlias. By Shunsuke ASANO, Yoshihiko HIRAYAMA, Terufumi NAKA and Yosuke MATSUSHITA

(キーワード: ダリア, マルチプレックス RT-PCR, TSWV, DMV, CSVd, 発生状況)

表-1 ダリアへの感染が報告されているウイルス・ウイロイド

ウイルス・ウイロイド	病徴	虫媒伝染	参考
キュウリモザイクウイルス (CMV)	葉に薄いモザイク, 葉が細く小型化.	アブラムシ類	LOBENSTEIN et al. (1995)
ダリアモザイクウイルス (DMV)	葉にモザイク, 葉脈黄化, 萎縮.	アブラムシ類	LOBENSTEIN et al. (1995)
インパチエンスえそ斑点ウイルス (INSV)	葉に黄斑, 輪紋, 輪紋状のえそ.	アザミウマ類	LOBENSTEIN et al. (1995)
タバコ条斑ウイルス (TSV)	葉に斑点. 無病徴感染が主.	アザミウマ類	LOBENSTEIN et al. (1995)
トマト黄化えそウイルス (TSWV)	葉に黄斑, 輪紋, 輪紋状のえそ. 茎にえそ.	アザミウマ類	LOBENSTEIN et al. (1995)
キク矮化ウイロイド (CSVd)	— <sup>a)</sup>	—	NAKASHIMA et al. (2007)
ジャガイモやせいもウイロイド (PSTVd)	—	—	TSUSHIMA et al. (2011)
<i>Dahlia latent viroid</i> (DLVd)	—	—	JACOBUS et al. (2013)

<sup>a)</sup> —は未報告.

表-2 マルチプレックス RT-PCR に使用したプライマーの塩基配列

対象	プライマー名	塩基配列 (5'-3')	増幅サイズ (bp)	引用
TSWV	TSWV-Rnp	ACCCTAAGAAACGACGACTGCG	720	瀬尾ら (2009)
	TSWV-Fnp	TCTTCACCTGATCTTCATTCATT		
DMV	DMV-R1345	ACTTCTGCTAGGACTCA	402	仲ら (2007)
	DMV-F944	AAAAAGAGGCTACCATACCC		
CSVd	CSVdD-R	TCTCCAGGAGAGGAAGGAAACTA	249	ASANO et al. (2015)
	CSVdD-F	GGAGTAAGCCCGTGAACCTTAG		

表-3 マルチプレックス RT-PCR の試薬と条件

RT-PCR 酵素	PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 (Dye Plus) (TaKaRa)
プライマー	TSWV-Rnp, Fnp, DMV-R1345, F944, CSVdD-R, F 各 0.4 μM
RNA	RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)
反応	50℃ (10分) → 94℃ (2分) → (94℃ (30秒) → 60℃ (30秒) → 72℃ (30秒)) × 30 → 72℃ (5分)

を 50℃ で 10 分間行い, 94℃ で 2 分間処理後, PCR は 94℃ 30 秒, 60℃ 30 秒, 72℃ 30 秒を 30 回繰り返し, 72℃ 5 分間の最終伸長を行い, PCR 産物を 1.0% アガロースゲルで電気泳動した。TSWV, DMV, CSVd 感染ダリアからの total RNA を単独, または混合したものをテンプレートとしてマルチプレックス RT-PCR の反応を実施すると, 各ウイルス・ウイロイド由来の DNA 断片が増幅された (図-1)。マルチプレックス RT-PCR の w 検出感度について, テンプレートの希釈系列を用いて比較した結果, TSWV と DMV については, シングル RT-

PCR と同等, CSVd についてはシングル RT-PCR の検出感度の 1/10 程度であった (データ略)。

さらに, 検定の簡便化を図るため RNA 抽出を用いない検定手法である microtissue direct RT-PCR (HOSOKAWA et al., 2006) への適用性を検討した。microtissue direct RT-PCR では, 昆虫針 (有頭シガ昆虫針 3 号; 志賀昆虫普及社) でダリアの主脈を 5 回刺した後, 昆虫針を RT-PCR 反応液に浸漬した (図-2)。つまり針先についた植物汁液をテンプレートとして使用した。その結果, 抽出した total RNA をテンプレートとした場合とバンドパタ

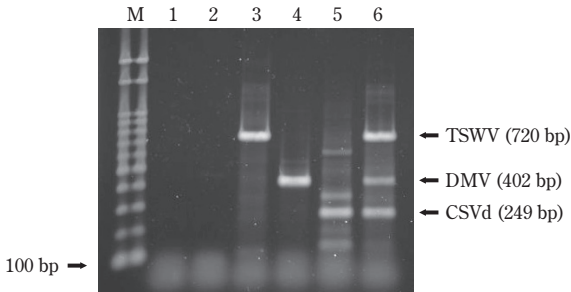


図-1 マルチプレックス RT-PCR によるダリアからのトマト黄化えそウイルス (TSWV)、ダリアモザイクウイルス (DMV) およびキク矮化ウイロイド (CSVd) の同時検出  
M: 100 bp DNA マーカー, 1: 水, 2: 健全,  
3: TSWV, 4: DMV, 5: CSVd, 6: TSWV, DMV  
および CSVd.

ーンが同様であり、各ウイルス・ウイロイド由来の DNA の増幅が確認された。本手法は、RNA 抽出が不要で、作業時間が短かつ検出コストが低いため、生産現場における感染状況調査などサンプル数が多い場合に有用と考えられる。

## II ダリア産地におけるウイルス・ウイロイドの感染状況とその症状

上記のマルチプレックス microtissue direct RT-PCR を用いて、北海道、東北、関西および九州地域の圃場から 2014 年にサンプリングした 299 株について、TSWV, DMV, CSVd の感染状況とその症状を調査した。結果を表-4 に示す。

混合感染も含め、北海道では、CSVd の検出率が 72.2%、DMV が 46.3% であり、TSWV は検出されなかった。東北では、DMV が 40.6%、CSVd が 14.5%、TSWV が 8.3% であった。関西では、TSWV が 31.8%、

CSVd が 1.4%、DMV は検出されなかった。九州では、DMV が 38.8%、CSVd が 5.1%、TSWV は検出されなかった。このように、優占するウイルス・ウイロイド種は地域によって異なっていた。DMV は関西を除く 3 地域で約 40% と高い頻度で検出されていた。唯一検出されなかった関西の圃場では、メリクロン苗由来の株が使用されていたために、苗による持ち込みを回避できているものと考えられた。さらに、DMV は宿主範囲が狭く、野外ではダリア以外の植物での感染は確認されていないため、外部からの感染リスクも低いことも影響していると考えられた。このことから、DMV の防除のためには、健全な苗を使用することが有効であることが示唆された。

TSWV は、DMV とは対照的に宿主範囲が広く、健全な苗を使用しても再汚染のリスクが高い。関西の圃場では、苗を 10 月に定植し、翌年の 2 月から翌々年の 10 月まで長期にわたり収穫する作型であり、周辺にキクヤマトマト等の宿主となり得る植物も栽培されていた。このような条件下で TSWV 感染率が高くなる要因として、アザミウマ類による TSWV の媒介が考えられる。九州では、8 月中旬に定植し 10 月から翌年の 5 月まで収穫する作型である。栽培期間が関西と比較して短く、アザミウマ類の密度が低下する 8 月に定植することから虫媒伝染のリスクは低くなると考えられた。北海道、東北については、4 月に定植し 6 月から 11 月に収穫する作型である。冬季の積雪によって越冬数が少ないことに加え、冷涼な気候によってアザミウマ類の密度が低いことが考えられる。しかし、一部に TSWV 感染率の高い圃場があり、こうした圃場では TSWV 感染株を母株として使用した可能性がある。TSWV については健全な苗の確保とともに、アザミウマ類による再汚染に注意する必要があると考えられた。

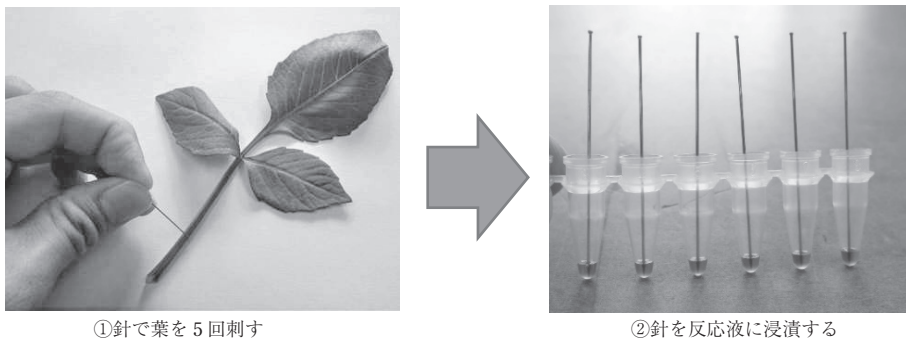


図-2 microtissue direct RT-PCR の作業手順  
針はシガ昆虫針 3 号を使用。

表-4 各地域における、トマト黄化えそウイルス (TSWV)、ダリアモザイクウイルス (DMV) およびキク矮化ウイロイド (CSVd) の検出状況および症状

地域	症状	検出されたウイルス・ウイロイド <sup>a)</sup>								
		TSWV	DMV	CSVd	TSWV DMV	TSWV CSVd	DMV CSVd	TSWV DMV CSVd	非検出	合計
北海道	黄斑	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	黄斑+輪紋	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	黄斑+モザイク	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	モザイク	0	2 (3.7) <sup>b)</sup>	0	0	0	1 (1.9)	0	0	3 (5.6)
	葉脈黄化	0	3 (5.6)	0	0	0	9 (16.7)	0	0	12 (22.2)
	葉脈黄化+モザイク	0	0	0	0	0	2 (3.7)	0	0	2 (3.7)
	葉脈黄化+矮化	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	縮葉	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	無病徴	0	2 (3.7)	21 (38.9)	0	0	6 (11.1)	0	8 (14.8)	37 (68.5)
	合計	0	7 (13.0)	21 (38.9)	0	0	18 (33.3)	0	8 (14.8)	54 (100)
東北	黄斑	0	0	0	2 (2.1)	0	0	0	0	2 (2.1)
	黄斑+輪紋	5 (5.2)	0	0	0	1 (1.0)	0	0	0	6 (6.3)
	黄斑+モザイク	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	モザイク	0	10 (10.4)	0	0	0	0	0	0	10 (10.4)
	葉脈黄化	0	3 (3.1)	0	0	0	2 (2.1)	0	0	5 (5.2)
	葉脈黄化+モザイク	0	5 (5.2)	0	0	0	0	0	0	5 (5.2)
	葉脈黄化+矮化	0	0	0	0	0	3 (3.1)	0	0	3 (3.1)
	縮葉	0	2 (2.1)	0	0	0	0	0	0	2 (2.1)
	無病徴	0	12 (12.5)	8 (8.3)	0	0	0	0	43 (44.8)	63 (65.6)
	合計	5 (5.2)	32 (33.3)	8 (8.3)	2 (2.1)	1 (1.0)	5 (5.2)	0	43 (44.8)	96 (100)
関西	黄斑	7 (10.1)	0	0	0	0	0	0	0	7 (10.1)
	黄斑+輪紋	9 (13.0)	0	0	0	1 (1.4)	0	0	0	10 (14.4)
	黄斑+モザイク	2 (2.9)	0	0	0	0	0	0	0	2 (2.9)
	モザイク	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	葉脈黄化	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	葉脈黄化+モザイク	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	葉脈黄化+矮化	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	縮葉	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	無病徴	3 (4.3)	0	0	0	0	0	0	47 (68.1)	50 (72.5)
	合計	21 (30.4)	0	0	0	1 (1.4)	0	0	47 (68.1)	69 (100)
九州	黄斑	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	黄斑+輪紋	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	黄斑+モザイク	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	モザイク	0	5 (6.3)	0	0	0	0	0	0	5 (6.3)
	葉脈黄化	0	2 (2.5)	0	0	0	0	0	0	2 (2.5)
	葉脈黄化+モザイク	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	葉脈黄化+矮化	0	2 (2.5)	0	0	0	0	0	0	2 (2.5)
	縮葉	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	無病徴	0	21 (26.3)	3 (3.8)	0	0	1 (1.3)	0	46 (57.5)	71 (88.8)
	合計	0	30 (37.5)	3 (3.8)	0	0	1 (1.3)	0	46 (57.5)	80 (100)

a) TSWV, DMV および CSVd はマルチプレックス microtissue direct RT-PCR により検出。

b) ウイルス・ウイロイド検出株数 (ウイルス・ウイロイド検出率 (%))。

CSVdは、北海道で72.2%と高い感染率を確認したが、キクでの報告(MATSUSHITA, 2013)によれば、虫媒伝染はなく汁液により伝染することから、感染株を母株とした増殖や管理作業によって感染拡大したと考えられる。しかし、ダリアでのCSVdの汁液接種による感染効率は報告されておらず、さらなる調査が必要である。

今回の調査で病徴を示した株は、すべてTSWVもしくはDMVに感染していた。このことから、日本におけるダリア栽培で重要なウイルスはこの2種ウイルスであると考えられた。病徴について、各ウイルスで報告されたものと同様であり、症状と検出されたウイルス種とは明瞭な相関が見られた。TSWVの主要な症状は、黄斑と輪紋であり(口絵①)、少数の株でモザイクが確認された。DMVについては、モザイクと葉脈黄化(口絵②)が主であり、少数の株で縮葉が確認された。TSWVとDMV、TSWVとCSVdおよびDMVとCSVdの複合感染も確認されたが、複合感染に特有の症状は確認されなかった。

一方で、CSVd感染株にウイロイド特異的な病徴は確認されなかった。NAKASHIMA et al. (2007)はCSVd感染株でわい化症状株が存在することを報告したが、いずれもTSV、CMV等のウイルスと複合感染していた。このことから、CSVd単独感染時のダリアの生育への影響についてさらなる調査が必要である。

## おわりに

本稿で紹介したマルチプレックス microtissue direct

RT-PCRは、汁液をテンプレートとする簡便な検定方法であるが、TSWV、DMVおよびCSVdを潜在感染株から検出できた。このことから本手法は、ウイルス・ウイロイドの感染状況を調査するための簡便かつ高感度な手法であるといえる。増殖に使用する健全親株を選抜する際には、潜在感染株の除去も求められる。今回の調査での潜在感染株率はTSWVが11.5%であったのに対し、DMVは50.7%と高かった。このことから、特にDMV感染の多い地域では、目視だけでなく潜在感染を検出できる手法を用いた健全親株の選抜が必要となろう。

本研究成果は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業「無病球根の効率的増殖を核とした有望切り花の生産流通技術開発(課題番号21017)」において得られたものである。

## 引用文献

- 1) 浅野峻介ら(2015): 関西病虫研報 57:143(講要).
- 2) ASANO, S. et al. (2015): Lett. Appl. Microbiol 61 (2): 113 ~ 120.
- 3) HOSOKAWA, M. et al. (2006): J Virol Methods 131: 28 ~ 33.
- 4) JACOBUS, Th. J. V. et al. (2013): J Gen Virol 94: 711 ~ 719.
- 5) LOBENSTEIN, G. et al. (1995): Virus and Virus-like Diseases of Bulb and Flower Crops, John Wiley & Sons, Hoboken, p.265 ~ 273.
- 6) MATSUSHITA, Y. (2013): JARQ 47 (3): 237 ~ 242.
- 7) 仲 照史ら(2007): 奈良農総セ研報 38: 17 ~ 22.
- 8) NAKASHIMA, A. et al. (2007): J. Gen. Plant Pathol. 73: 225 ~ 227.
- 9) 瀬尾直美ら(2009): 北日本病虫研報 60: 288(講要).
- 10) 末松俊彦ら(1977): 北大農研邦文紀要 11 (2): 138 ~ 147.
- 11) TSUSHIMA, T. et al. (2011): J. Gen. Plant Pathol. 77: 253 ~ 256.

## 発生予察情報・特殊報 (27.10.1 ~ 10.31)

各都道府県から発表された病害虫発生予察情報のうち、特殊報のみ紹介。発生作物：発生病害虫(発表都道府県)発表月日。都道府県名の後の「初」は当該都道府県で初発生の病害虫。

※詳しくは各県病害虫防除所のホームページまたはJPP-NET (<http://www.jpnp.net/>)でご確認下さい。

- トルコギキョウ：えそ輪紋病(鳥取県)10/1
- チャ：ヒサカキワタフキノナジラミ(埼玉県：初)10/8

- トマト、なす：タバコノミハムシ(静岡県：初)10/15
- モモ：果実赤点病(広島県：初)10/20