

夏秋ピーマン圃場でのトマト黄化えそウイルス (TSWV) と ミカンキイロアザミウマを含めた総合防除の取り組み

—2. 宿主内の TSWV 量とミカンキイロアザミウマによる獲得頻度の

関係および TSWV 保毒虫のモニタリング手法の開発—

大分県農林水産研究指導センター ^{おか}岡 ^{ざき}崎 ^{しん}真 ^{いち}一 ^{ろう}郎

はじめに

大分県の夏秋ピーマン産地では、1996年に産地全域でミカンキイロアザミウマの発生が、また1998年にはTSWVによるピーマン黄化えそ病の発生が確認され、その後本病は県内全域の夏秋ピーマン産地で恒常的に発生し問題となった(吉松ら, 1999)。この原因については、冬期間中に前作のピーマン果実残渣でミカンキイロアザミウマが越冬しており、TSWV保毒虫となって次期作のピーマンに媒介することが主原因であると解説した(岡崎, 2014)。

今回は、TSWVとミカンキイロアザミウマの両者の関係について、実際に様々な濃度でTSWVに感染した植物を用い、ミカンキイロアザミウマによる獲得頻度について検証した。さらに粘着板を用いたTSWV保毒アザミウマのモニタリング手法を検証した試験結果を紹介する。

I 宿主内の TSWV 量とミカンキイロアザミウマによる TSWV 獲得の関係

1 供試アザミウマおよびウイルス

ミカンキイロアザミウマは2004年に大分県豊後大野市のピーマン圃場で採集した個体群からTSWV媒介率が雌雄とも90%以上になるように選抜した系統(櫻井, 2006)を用いた。供試したTSWV株は、2000年に福岡県で自然感染していたパブリカ葉から分離したTSWV-FoPaTs1株(石井ら, 2003)を使用した。本株は、ヌクレオカプシドタンパク質のアミノ酸および塩基配列の相同性から、国内の様々な作物に発生したTSWVと遺伝的に近縁であると推定されている(奥田ら, 2001)。

Integrated Control of Tomato spotted wilt virus (TSWV) and Western Flower Thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande) as a Vector in Spring-Autumn Green Pepper Fields. By Shinichiro OKAZAKI

(キーワード: ウイルス獲得頻度, 黄色粘着板, ミカンキイロアザミウマ, TSWV)

2 ミカンキイロアザミウマ虫体と植物葉での TSWV 定量

TSWVの宿主として、播種14~30日程度経過したダチュラ *Datura stramonium* を用いた。ダチュラはTSWVを汁液接種後、25±1℃, 16L8D条件で4~10日間経過させ、経過日数および採集部位を変えることでTSWV感染程度の異なる葉を準備した(図-1)。各3cm角葉から直径6mmのリーフディスクを生研トレパンで葉の4箇所から抜き取り、リーフディスク1枚をDAS-ELISA用に、3枚を定量RT-PCR(以下、qRT-PCR)の分析用に供試した。

ミカンキイロアザミウマは、ふ化をそろえた1齢幼虫を準備し、リーフディスクを抜き取った残りのダチュラ感染葉を8時間摂食させ、成虫になるまで健全なソラマメ催芽種子を餌に飼育し、DAS-ELISAにより、TSWVの獲得検定を実施した。各1葉からの獲得試験につき36個体のアザミウマ成虫を検定し、吸光度値が健全虫の値と比較して3倍以上を陽性とし、その個体はTSWV保毒虫と見なした。保毒虫率は摂食させた各感染葉で算出し、うち1枚のリーフディスクをDAS-ELISA検定に用いた(図-1)。

TSWVの総RNA量は、ミカンキイロアザミウマに摂食させたダチュラ感染葉から削り抜いたリーフディスク3枚からISOGEN中で抽出し、最終的なRNA溶液量は50μlに調整した。qRT-PCRは、TSWVヌクレオカプシド遺伝領域350-bp断片を増幅させるプライマーLC-TSWV-N3' (5'AAACGACTGCGGAATAC³)、LC-TSWV-N5' (5'GTGGCTCCAATCCTGT³)を用いて実施した。反応条件は、逆転写反応42℃5分間の後、94℃5秒間、60℃10秒間、72℃15秒間を1サイクルとするPCRを50サイクル実施し、各サイクルの最終段階でSYBR Green Iの蛍光強度(波長497nm)を計測した。反応後、機器に付属の解析ソフトウェア(LightCycler Software Ver. 3)を用いて増幅曲線を解析し、second derivative maximum法により閾値サイクル(Ct値)を算出した。TSWVヌクレオカプシド(43ng/μl)(河野敏郎博士より分譲)から抽出したRNAを連続希釈し、検量線を作

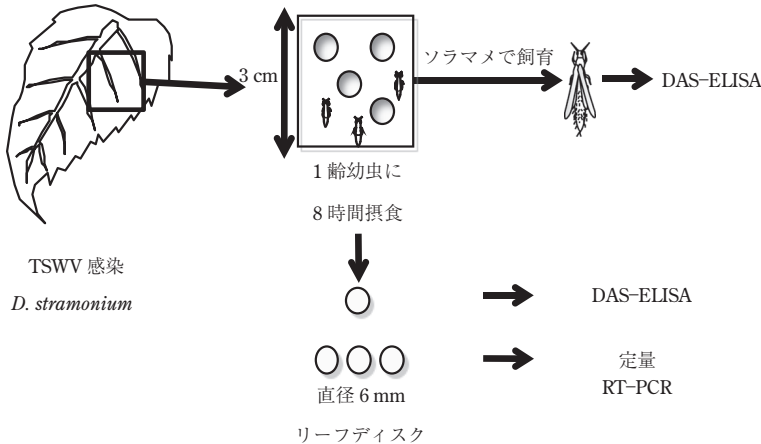


図-1 TSWV 感染ダチュラ *Datura stramonium* で葉のミカンキロアザミウマの摂食およびウイルス検出の概要図

成して得られた Ct 値から葉片中のヌクレオカプシドを推定した。

3 ダチュラ *Datura stramonium* 内の TSWV 定量化

TSWV に感染したダチュラ葉の ELISA 吸光度値は、0.01 ~ 2.755 (Abs) で平均値 1.042 ± 0.6408 (S.D.) であった。TSWV ヌクレオカプシドから抽出した RNA の連続希釈を用いて RT-PCR or qRT-PCR を行った結果、希釈倍率と Ct 値の間で高い相関が得られた ($r^2 = 0.95$)。これにより、TSWV に感染したダチュラ葉中の TSWV ヌクレオカプシドタンパク質濃度 (以下、qRT-PCR 値) を推定した。なお、TSWV 感染ダチュラ葉の Ct 値はすべて TSWV ヌクレオカプシドから抽出した RNA の希釈範囲であった。TSWV 感染ダチュラリーフディスク葉中の qRT-PCR 値の最大値は 2.47×10^3 ng/cm² 葉であり、最小値は 1.39×10^{-2} ng/cm² 葉であった。また、同一のリーフディスクから検出された ELISA 吸光度値と qRT-PCR 値の対数値の間に相関が認められた (図-2)。

4 ミカンキロアザミウマによる TSWV 獲得頻度

アザミウマ保毒虫率は 0 ~ 94.4% であり、ELISA 吸光度値および qRT-PCR 値が高くなるに従って保毒虫率も高くなっていく傾向を示した。保毒虫率は、食餌させたダチュラ葉片の ELISA 吸光度値が 1.0 Abs 以上となった場合に急激に高くなる傾向を示した (図-3)。同様に、qRT-PCR による葉片中の qRT-PCR 値が 1.29×10^2 ng/cm² 以上の値となった場合においても、保毒虫率は急激に高くなる傾向を示した。一方で、ELISA 吸光度値が 0.01 以下もしくは qRT-PCR 値が 0 となった場合、保毒した個体は認められなかった。

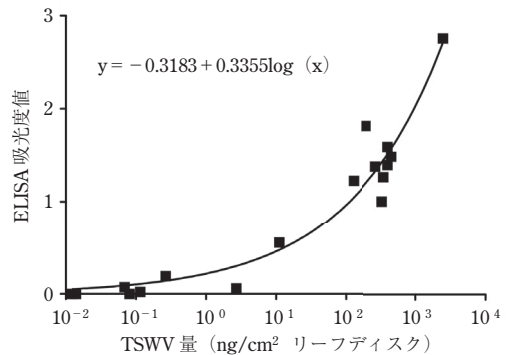


図-2 TSWV 感染ダチュラ *Datura stramonium* 葉での ELISA 吸光度値と TSWV ヌクレオカプシドタンパク質濃度との関係

II TSWV 保毒虫のモニタリング手法の開発

1 粘着板に捕殺されたミカンキロアザミウマ死亡虫体からの TSWV 検出頻度

TSWV を保毒し媒介能を有するミカンキロアザミウマ成虫を、青色粘着板 (ホリバーシート) に付着させ、各 5°C, 15°C, 25°C, 35°C ± 0.2°C, 16L8D, 湿度 40% 条件下で恒温室内に静置した。すべてのアザミウマは、粘着板に付着させてから 1 日以内に死亡していた。アザミウマ捕殺直後、2 日後、5 日後、10 日後、15 日後、20 日後に各トラップから雌雄成虫それぞれ 10 頭を剥がし、-80°C で保管した後に DAS-ELISA で検定した。吸光度値 (Abs) は室温条件で 30 分後に測定した。ミカンキ

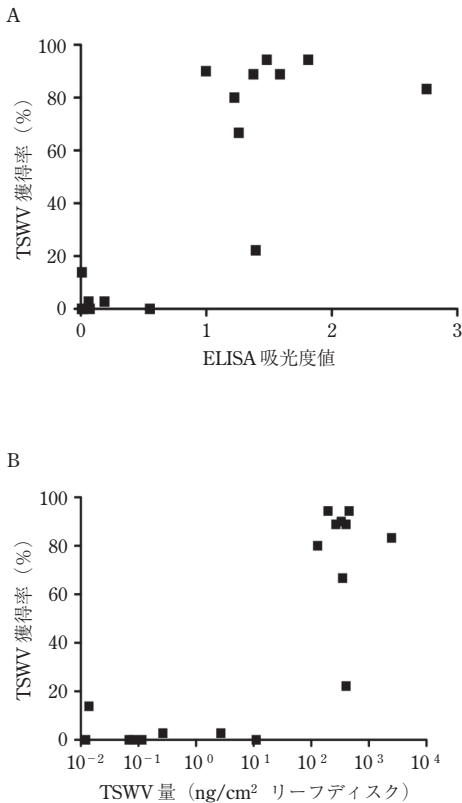


図-3 ミカンキイロアザミウマによる TSWV 獲得率と TSWV 感染グチュラ葉中の ELISA 吸光度値 (A) および qRT-PCR に基づく TSWV ナucleオカプシドタンパク質濃度 (B) との関係

ロアザミウマ健全成虫の吸光度値は、ネガティブコントロールとして同様の条件で測定した。

2 粘着板に付着されたアザミウマ保毒虫からの TSWV 抗原抗体反応

粘着板に捕殺されたミカンキイロアザミウマ保毒虫の ELISA 吸光度値は日数経過とともに緩やかに減少し、その減少度合いは保存温度が高くなるに従って大きくなる傾向を示した (図-4)。粘着板に付着し死亡してから 20 日経過した雌成虫の ELISA 吸光度平均値は、付着直後と比較して 5℃で 88%, 15℃で 44%, 25℃で 27%そして 35℃で 24%まで減少していた。雄成虫の ELISA 吸光度値は、いずれの温度条件下においても雌成虫の値より低く、温度条件による減少度合いも雌成虫と同様の傾向であった。粘着板を 5℃条件下に静置した場合には、吸光度値の減少は非常に緩やかであった。一方で、粘着板を 15℃かそれ以上の条件に静置した場合には、吸光度

値の減少は初期の 5 日後までに急激に減少した。しかし、その後はいずれの温度条件下でも緩やかに減少した。温度条件が 25℃かそれ以下では、付着 20 日後時点におけるアザミウマ雌雄保毒虫の吸光度値は、95%の個体が健全虫と比較して明らかに高かった。しかし、35℃条件では雄雌ともに付着 10 日後かそれ以降の吸光度値は、健全虫の値と比較して極めて近い値となった。

3 圃場レベルでの実証

試験は、TSWV の発生が認められた大分県豊後大野市のピーマン圃場で休耕期に実施した。施設圃場では 2002 年 11 月 26 日～12 月 24 日にかけて、露地圃場では 2004 年 2 月 23 日～3 月 23 日にかけて青色粘着板を地上高 30 cm の位置で 3 箇所を設置し 6～15 日間隔で交換した。粘着板 3 枚に捕殺されたすべてのミカンキイロアザミウマ成虫は、実体顕微鏡下でていねいに剥がして DAS-ELISA で検定した。吸光度値 (A_{650}) が、健全虫と比較して 3 倍以上の値を示したものを陽性と判定し、回収時点ごとの保毒虫率を算出した。同様に、粘着板交換時点において圃場内のピーマン果実残渣および雑草に生息していた成虫を採集し、DAS-ELISA によって保毒虫率を算出したうえで、粘着板のそれと比較した。

4 現地圃場における保毒アザミウマ捕殺調査

TSWV を保毒したミカンキイロアザミウマは、ピーマン休耕期の施設圃場および露地圃場において確認された (表-1)。ミカンキイロアザミウマ保毒虫率は、各調査時点で異なっており、施設圃場における粘着板捕殺虫からの保毒虫率は設置期間 2002 年 11 月 26 日～12 月 12 日に 46.2%, 2002 年 12 月 12 日～24 日に 16.0%であったのに対して雑草などから採集した成虫では 2002 年 12 月 12 日時点で 29.2%, 12 月 24 日時点で 27.3%だった。一方露地圃場における粘着板捕殺虫からの保毒虫率は 15.4～26.7%であったのに対して雑草などから採集した成虫では 12.1～29.1%であった。いずれの調査時点においても保毒虫率の変化は認められたものの、粘着板捕殺虫の保毒虫率が直接採集したそれと比較しても大きく下回ることにはなかった。

おわりに

ミカンキイロアザミウマは 1 齢幼虫期間のみ TSWV を獲得することができる (ULLMAN et al., 1992)。本研究において、摂食させた葉中の TSWV 量がある一定の値を超えた場合において、その保毒虫率は 90%以上と獲得能力のほぼ上限まで達した。その一方で、TSWV 量が一定量以下の値を示した場合では、保毒虫になる個体はごくわずかであった。これらの結果は、ある一定量以上

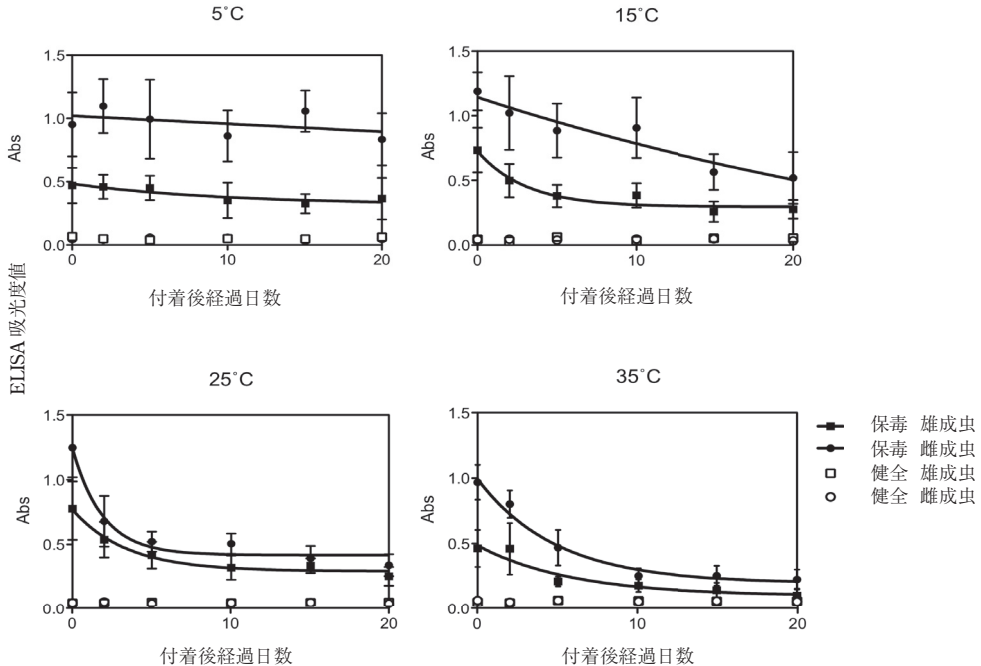


図-4 各温度条件における粘着板に付着させたミカンキイロアザミウマ雌雄保毒虫のELISA吸光度値の推移

のTSWV粒子を摂食したミカンキイロアザミウマは確実に保毒虫になることを意味している。アザミウマが保毒虫になる確率は、1齢幼虫期間中でのTSWV粒子の摂食量と密接に関係しているが、その他いくつかの要因がウイルス獲得率に影響していると考えられる(Whitfield et al., 2005)。ウイルス獲得可能期間 Acquisition Access Period (以下AAP)は、これまでにTSWVの獲得能力を評価する目的で調査されてきた。Wijkamp et al. (1996)によると、ミカンキイロアザミウマの最大AAPは、1齢幼虫が十分に感染した葉を摂食した場合に1,280分とされている。本研究ではこれと同様に、植物体内中のTSWV総量もまたウイルス獲得頻度に影響していることが示唆された。

またアザミウマを付着させてから最初の5日目までは、粘着板を置いた温度条件が高くなるに従い吸光度値の減少度合いも大きくなった。しかし付着7日後以降では、吸光度値はすべての温度条件で緩やかに減少していった。ELISA吸光度値を見ると、25°Cより低い条件では付着20日後までは健全虫の値と比較して明らかに高い値を示した。本研究で用いた粘着板は保存性物質を含んでいなかったが、今後は粘着板の粘着性物質に保存性物質を加えることによって、ウイルスの検出限界日数が長くなることも可能と考えられる。

粘着板は、アザミウマ成虫を捕殺するため実際に広域圃場のあらゆる場面で活用されている(Boissot et al., 1998; Riley and Pappu, 2004)。本研究において、TSWVの発生が認められた施設圃場に粘着板を設置し、付着されたミカンキイロアザミウマからTSWVが検出できることを確認した。いずれの調査時点においても、捕殺されたアザミウマの保毒虫率が直接圃場から採集した成虫の数値と比較して大きく下がることはなかったが、調査時点によって若干の差異が認められた。粘着板に捕殺されたアザミウマは、通常の肉眼調査や植物体からの採集と比較して、日時的、空間的により広い範囲での保毒虫が捕殺されていることが一因として考えられる。Zen et al. (2008)は、圃場においてIYSVを保毒したネギアザミウマの発生モニタリング調査を実施しており、このことはTSWVにおいても、その感染の危険性について反映することが可能と考えられる。今回の試験では、夏秋ピーマン休耕期にあたる冬期間に実施しており、比較的低温条件での調査結果であったため、TSWVが検出されやすい条件であったかもしれない。今後は、作付け期間中において、春～秋期にあたる高温条件などで実証することも検討する必要がある。さらには発生消長モニタリングと併せて、発生予察の一手法として利用できないか検証することも必要となろう。実際に

表-1 圃場に設置した粘着板捕殺アザミウマからの TSWV 保毒虫検出頻度

A ピーマン休耕期施設圃場 (豊後大野市光昌寺)

粘着シート捕殺虫からの検出		採集虫からの検出 ^a	
粘着シート設置期間	TSWV 保毒虫率 (%)	採集年月日	TSWV 保毒虫率 (%)
2002 年 11 月 26 日～12 月 12 日	46.2 (13) ^b	2002 年 12 月 12 日	29.2 (48)
2002 年 12 月 12 日～12 月 24 日	16.0 (25)	2002 年 12 月 24 日	27.3 (44)

^a 圃場内雑草に生息していた成虫を採集した。^b 括弧内の数値は, 検定した虫数。

B ピーマン休耕期露地圃場 (豊後大野市小倉木)

粘着シート捕殺虫からの検出		採集虫からの検出 ^a	
粘着シート設置期間	TSWV 保毒虫率 (%)	採集年月日	TSWV 保毒虫率 (%)
2004 年 2 月 23 日～3 月 1 日	25.4 (193) ^b	2004 年 3 月 1 日	12.1 (256)
2004 年 3 月 1 日～3 月 8 日	15.4 (13)	2004 年 3 月 8 日	21.3 (122)
2004 年 3 月 8 日～3 月 17 日	26.7 (80)	2004 年 3 月 17 日	16.4 (213)
2004 年 3 月 17 日～3 月 23 日	22.2 (36)	2004 年 3 月 23 日	29.1 (79)

^a 圃場内雑草に生息していた成虫を採集した。^b 括弧内の数値は, 検定した虫数。

2015 年に大分県のピーマンなどで *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) が生育初期に多発生し問題となった経緯がある (大分県農林水産研究指導センター平成 27 年度病害虫発生予察特殊報第 2 号, 2015) ため, Tospovirus 属で広く活用できる技術の構築が重要である。

引用文献

- 1) BOISSOT, N. et al. (1998): Environ.Entomol. 27: 1437 ~ 1443.
- 2) 石井貴明ら (2003): 福岡農総試研報 22: 56 ~ 60.
- 3) 岡崎真一郎 (2014): 大分農林水産研研報 4: 1 ~ 45.
- 4) 奥田充ら (2001): 九病虫研会報 47: 21 ~ 24.
- 5) 大分県農林水産研究指導センター平成 27 年度病害虫発生予察特殊報第 2 号 (2015): 3pp.
- 6) RILEY, D. G. and H. R. PAPPU (2004): J. Econ. Entomol. 97: 1648 ~ 1658.
- 7) 櫻井民人 (2006): 北日本病虫研報 57: 185 ~ 187.
- 8) Ullman, D. E. et al. (1992): Phytopathology 82: 1333 ~ 1342.
- 9) WHITFIELD, A. E. et al. (2005): Annu. Rev. Phytopathol. 43: 459 ~ 489.
- 10) WIJKAMP, I. et al. (1996): Ann. Appl. Biol. 129: 303 ~ 313.
- 11) 吉松英明ら (1999): 九農研 61: 74.
- 12) ZEN, S. et al. (2008): J. Plant Pathol. 90: 511 ~ 515.