

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	松浦 昌平
題 目	キクに発生するトスポウウイルスの診断，発生要因およびトラップ植物による防除に関する研究 (Study on diagnosis, occurrence factor and control by trap crop of tospoviruses in chrysanthemums)
<p>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 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 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，母株の簡易な診断手法として利用できると考えられた。</p> <p>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，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 1 オーダー高かった。以上から，RT-LAMP 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。</p> <p>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，経済的損失を生じた。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 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，<i>Chrysanthemum stem necrosis virus</i>(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 による特異的診断が可能となった。</p> <p>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 伝染率は高く，主要な第 1 次伝染源であると考えられた。</p> <p>露地ギク栽培における TSWV の発生動態を調査した。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，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 1 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。</p> <p>トラップ作物によるキクえそ病の防除効果を検討した。バーベナをキクに対して約 20%の割合でキク栽培温室へ混植した。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抑制され，TSWV 発生が開花期まで無処理の 20%以下に減少した。以上から，バーベナ栽植がキクの TSWV 発生を長期に抑制できることを明らかにした。</p>	

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	Shohei MATSUURA
題 目	Study on diagnosis, occurrence factor and control by trap crop of tospoviruses in chrysanthemums (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)
<p>Multiplex RT-PCR method was developed for detecting <i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV) and <i>Chrysanthemum stunt viroid</i> (CSVd) simultaneously from chrysanthemum. One-step multiplex RT-PCR, using crude sap of chrysanthemum leaves co-infected with TSWV and CSVd, was sufficiently sensitive to detect TSWV at dilutions of up to 10^{-8}-fold and CSVd up to 10^{-5}-fold. 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.</p> <p>Total RNA of plants were extracted, and RT-LAMP was carried out. As the result, the amplification product was confirmed from chrysanthemum, tomato and pepper infected with TSWV. The sensitivity of TSWV detection of the RT-LAMP and DAS-ELISA was compared using serial diluted plant tissue of infected chrysanthemum. As a result, RT-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 using RT-LAMP.</p> <p>In August 2006, necrotic streaks on stems, leaf distortions, chlorotic and necrotic spots and rings on leaves were observed on chrysanthemums. The disease was observed on the premises of 1 grower in Hiroshima Prefecture and its incidence reached 70%. <i>Frankliniella occidentalis</i> was the main thrips species found in association with diseased plants. Laboratory assays (serology, PCR) and pathogenicity tests confirmed the presence of <i>Chrysanthemum stem necrosis virus</i> in symptomatic chrysanthemums. This is the first report of CSNV in Japan.</p> <p>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.</p> <p>A high density of <i>Frankliniella occidentalis</i>, the predominant vector, in the presence of latently infected stock plants resulted in a high incidence of 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.</p> <p>The effect of verbena as a trap crop on the occurrence of western flower thrips and the incidence of TSWV in chrysanthemums were investigated. Verbena cultivars were cultivated alongside chrysanthemum in a greenhouse in the proportion of c. 20% of the chrysanthemum plants. Verbena plants attracted vector thrips and markedly suppressing TSWV incidence on chrysanthemums until flowering. Our results suggest that cultivation of verbena as a trap crop may be useful in integrated pest management programs as a control for TSWV in chrysanthemums.</p>	

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	松浦 昌平
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 岩井 久
	副査 佐賀大学 教授 大島 一里
	副査 佐賀大学 准教授 草場 基章
	副査 琉球大学 教授 諸見里 善一
	副査 鹿児島大学 教授 津田 勝男
審査協力者	
題目	キクに発生するトスポウウイルスの診断，発生要因およびトラップ植物による防除に関する研究 (Study on diagnosis, occurrence factor and control by trap crop of tospoviruses in chrysanthemums)
<p>キク (<i>Dendranthema grandiflorum</i> Kitam., syn. <i>Chrysanthemum morifolium</i> Ramat.) は、古くから重要な花き類の1つであり、現在の国内栽培面積は6,000haを上回る。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トマト黄化えそウイルス (<i>Tomato spotted wilt virus</i>: TSWV) などのトスポウウイルス属によるキクえそ病、およびキクわい化ウイロイド (<i>Chrysanthemum stunt viroid</i>: CSVd) によるキクわい化病は症状が激しく現れることが多く、切花生産上極めて重要である。本研究は、キクの重要病害であるトスポウウイルスの早期検出と正確な診断技術の開発、栄養繁殖による垂直伝搬や媒介虫アザミウマによる水平伝搬などの発生生態の解明、ならびに、環境への負荷の少ない技術として媒介虫トラップ植物を用いた防除技術のモデルを開発し提案しようとしたものである。得られた知見は以下のとおりである。</p> <p>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 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 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、母株の簡易診断法として利用できると考えられた。</p>	

LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)は4種類のプライマーと鎖置換型DNA合成酵素を用いて標的とする遺伝子領域を増幅する技術であり(Notomi et al., 2000)、一定温度で反応が進行するためPCRで必要となる設備負担が少なく反応時間も15~60分と短く、迅速診断が可能である。TSWVのLAMPプライマーを設計し、キクを含む数種感染作物から全RNAを抽出後、RT-LAMP反応を行った。その結果、キク、トマト、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1オーダー高かった。以上から、RT-LAMPを用いた、キクを含む数種作物のTSWVの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、甚大な経済的損失を生じた。トスポウウイルスのユニバーサルプライマーを用いたRT-PCRにより罹病株から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、日本では未発生だった*Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV)と高い相同性を示した。宿主範囲など種々の生物学的性質を調査し、本病原ウイルスをCSNVと同一し、病名を「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による特異的診断が可能になった。

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検出率は約20~50%で、感染親株の根においては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伝染率は高く、主要な1次伝染源であると考えられた。

露地キクにおけるTSWVの発生動態を調査した。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、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1次伝染源とし、媒介虫の多発による2次感染の結果、えそ病が大発生することがわかった。

以上の発生生態に基づき、トラップ作物によるキクえそ病の防除効果を検討した。バーベナを、キク栽培温室で、キクに対して約20%の割合で混植した。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抑制され、えそ病の発生は開花期まで無処理の20%以下に減少した。以上から、バーベナ栽植が本病の発生を長期に抑制できることを明らかにした。

以上のように、本研究は、トスポウウイルス属によるキクえそ病の総合防除を目標として、遺伝子診断法の開発、発生生態の解明ならびに環境保全型防除技術の開発を試みたものである。これらは、国内外における先駆的研究であり、開発された種々の技術は、各地の試験研究機関で採用・検討されている。ことに、本邦初記載となったCSNVは、その後2年間に列島の茨城県以西で流行が拡大しており、示された知見は防除現場において広く利用されている。このように、本研究は、植物防疫上の応用面における貢献が極めて高いものと評価される。

よって、本論文は、博士(農学)の授与に十分な価値があるものと判定した。

学力確認結果の要旨	
学位申請者 氏 名	松 浦 昌 平
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 岩 井 久
	副査 佐賀大学 教授 大 島 一 里
	副査 佐賀大学 准教授 草 場 基 章
	副査 琉球大学 教授 諸 見 里 善 一
	副査 鹿児島大学 教授 津 田 勝 男
審査協力者	
実施年月日	平成 2 0 年 1 2 月 2 6 日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input type="radio"/> 口答 <input checked="" type="radio"/> 筆答 	
<p>主査、副査及び審査協力者は、平成20年12月26日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>また、筆答により外国語(英語)の学力を確認した。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が大学院博士課程修了者と同等以上の学力ならびに識見を有するものと認め、博士(農学)の学位を与えるに十分な資格を有するものと認めた。</p>	

学位申請者
氏 名

松 浦 昌 平

[質問 1]

マルチプレックスPCRによる検出において、プライマーがポリメラーゼの取り合いをするために、期待される増幅産物が得られないことは無いのか？

[回答 1]

そのような現象が起り得るが、今回の系では問題なかった。

[質問 2]

ツーステップ・マルチプレックスPCRでウイロイド(CSVd)を検出した際に、予想された243bp増幅断片の外に600bp程度の断片が認められたとあるが、これは2回重複して増幅されたものではないか？

[回答 2]

目的のDNA断片と分子量が大きく異なり、判定の障害にならなかったのも、配列を確かめなかったが、たぶん2回増幅した結果生じた断片だと思う。ウイロイドの場合、植物体内で擬似環状構造をとるため、一巡した後に複製を繰り返し、整数倍サイズの断片を生ずることがある。

[質問 3]

RT-LAMPの感度はDAS-ELISAに比べ25倍高かったということだが、一般にモノクローナル抗体は特異性の高さが長所であるが感度が低くなる傾向があるのではないか？検出限界という点ではポリクローナル抗体に劣るのではないか？

[回答 3]

予備的に、DAS-ELISAにおいて、両抗体を比較したところ、モノクローナル抗体の方がポリクローナル抗体よりも高い検出限界を示した。選抜したクローンの性能が良かったと言えるが、もう一つ、トスポウイルスは他のウイルスに比べて高純度の精製標品を得るのが難しい。そのために常法で作成したポリクローナル抗体は感度が低い。DAS-ELISAにはモノクローナル抗体の方が適している。

[質問 4]

新規ウイルスCSNVのゲノムの塩基配列は、ブラジルで記載されたウイルス株と98%の相同性がある。本ウイルスの由来がブラジルにあると見て良いのか？

[回答 4]

ブラジル由来と考える。キクの輸入ルートと本ウイルスの初記載記録を合わせると、CSNVの侵入ルートは、ブラジル→ベトナム→中国→日本と考えられる。

[質問 5]

キク親株から次世代挿し穂への栄養体繁殖を介した伝染率を調べる試験で、親株では、採取時期に関係なく根の方が地上部茎葉よりもTSWVの検出率が高いことが示されているが、この試験では、同じ個体の組織を継続して調査したのか？

[回答 5]

その都度異なった親株の根を流水で裸出させ、株あたり2~4箇所の根を方向などは考慮せずに採取した。理想的には部分採取したあと覆土しつつ同じ個体を追跡調査すべきだったのかも知れないが、1月~5月の間の4期に、毎回10個体以上を供試し、いずれの時期も50%以上が陽性だったので問題ないと思う。

[質問 6]

親株から挿し穂への伝染率は20~50%であり、残りの挿し穂がウイルスフリーであるのかウイルスが極低濃度で存在するのかわ不明だが、極低濃度の場合は時間とともにウイルスが衰退するのではないかと推論している。その根拠は何か？

[回答 6]

明言は避けるべきだが、最近、植物における免疫機構の一種であるRNAサイレンシングが注目されている。極微量のコピー数のウイルス核酸が侵入した場合に、一種の酵素作用で、ウイルスの複製型2本鎖RNAが分解されていく現象である。

[質問 7]

ミカンキイロアザミウマは、キク、トマトやピーマンなどでの食害やウイルス媒介が著しいが、その名前の因むカンキツに対して病虫害はどの程度あるのか？

[回答 7]

実はこの昆虫のカンキツへの病虫害はほとんど認められていない。研究者の間では、むしろ、ハナアザミウマと名前を変えるべきだと主張する人もいる。たまたま最初にカンキツから記載されたので、このような命名が成された。

[質問 8]

本論文で媒介虫として話題に上っているのは、ミカンキイロアザミウマとヒラズハナアザミウマだけであるが、野外での媒介昆虫は他にもあるのではないかと？

[回答 8]

アザミウマの種類は500種近くある。しかしトスポウイルスを媒介できるのは僅かに11種である。しかもそれら媒介虫とウイルス種の特異性が高い。TSWVとCSNVのいずれも、媒介虫はミカンキイロアザミウマと考えて良い。

[質問 9]

ミカンキイロアザミウマを誘引するバーベナ品種の花房から検出された揮発性成分の人工合成標品には、強い誘引作用が認められる物質がなかった。これについては、ハナアザミウマで、単体で効果の無い物質の混合物に誘引効果が認められた例がある。今回も各種合成標品を様々な比率で混合する試験ができたと思う。

[回答 9]

確かに、単独では機能しないが、複数物質の混合によるシナジー効果はあると考える。また、アザミウマには色彩や花の形を認識する能力もあることが認められており、それらも含めて、今後の検討課題にしたい。忌避効果としては、紫外線をカットするとアザミウマの「目が見えなくなる」。これを利用したハウス用UVカットフィルムが広く普及している。

[質問10]

本論文では、親株がTSWVに潜在感染している場合に、本圃に移植後、ミカンキイロアザミウマが多発生すると、えそ病も多発生し、親株の潜在感染率よりも高くなることから、本虫が媒介だけでなく発症にも関係していることを示唆した。TSWVに感染した部分にアザミウマが集まる傾向があるのだろうか？

[回答10]

アザミウマは新芽に着生する傾向があるが、いくつかの研究報告ではTSWV感染部位には例え病徴が出ていなくても集まる傾向が観察された。感染部位から誘引物質が出ている可能性がある。感染植物は早晚貧栄養状態になるので、TSWVが早期に分散するための生存戦略と解釈する研究者もいる。また局部病斑が無数に集合して全身感染のようになるネギ属のトスポウイルス *Iris yellow spot virus* のように、多数の保毒虫による吸汁接種が発病に結びつき易い可能性もある。