

ウリ類退緑黄化ウイルスおよびキク茎えそウイルスの
虫媒伝搬に関する研究

奥田 しおり

2014

目 次

緒言	1
第 I 章. CCYV 媒介特性および CCYV 抵抗性メロン苗の選抜	8
緒言	8
第 1 節 CCYV の媒介特性	12
材料と方法	12
1) CCYV 経代と保毒および無保毒タバココナジラミの累代飼育 ...	12
2) CCYV 感染メロン苗の供給	12
3) 供試植物およびタバココナジラミからの全 RNA の抽出	16
4) メロン苗の CCYV 感染確認	19
5) 定量 PCR	19
6) CCYV 感染メロンの発病度と CCYV 濃度推移および果実の品質に およぼす影響	23
7) CCYV 感染宿主の CCYV 濃度とそれらを吸汁したタバココナジラ ミ体内 CCYV 濃度の測定	25
8) 保毒タバココナジラミ体内の CCYV 濃度推移	25
9) ビニールハウス内のタバココナジラミ飛翔距離の測定	26
10) 解析方法	27
結果	30
1) メロン発育ステージ毎の CCYV 感染メロンの発病度と CCYV 濃 度の推移およびメロン果実の品質に及ぼす影響	30
2) CCYV 感染宿主とそれを吸汁したタバココナジラミ体内のウイル ス濃度の比較	33
3) CCYV 獲得後のタバココナジラミ体内ウイルス濃度の推移	34
4) ビニールハウス内のタバココナジラミ飛翔距離の測定	38
考察	40
第 2 節 CCYV 抵抗性メロン苗の選抜試験	45

材料と方法	45
1) 供試メロン苗とウイルスの接種	45
2) CCYV 病徴評価及び感染の確認	45
3) CCYV 濃度の定量	46
4) タバココナジラミの選好性試験	47
5) 統計解析	47
結果	48
1) メロン遺伝資源系統の CCYV 感染と病徴程度	48
2) 抵抗性有望系統の CCYV 濃度の定量	54
3) タバココナジラミの選好性試験	57
考察	59
第Ⅱ章.2種の <i>Frankliniella</i> 属アザミウマの CSNV 獲得と伝搬.....	62
緒言	62
材料と方法	64
1) 供試ウイルス株	64
2) ミカンおよびヒラズハナアザミウマの来歴と継代	64
3) アザミウマの TSWV および CSNV の獲得	65
4) 保毒・媒介検定	68
5) 統計処理	69
結果	75
1) ミカンキイロアザミウマ3系統の TSWV の媒介能力	75
2) ミカンキイロアザミウマ3系統の CSNV の媒介能力.....	75
3) ミカンキイロアザミウマ3系統の CSNV 獲得・媒介能力と体内の ウイルス量	75
4) ヒラズハナアザミウマ2系統の CSNV 媒介能力.....	78
5) ヒラズハナアザミウマ2系統の CSNV 獲得・媒介能力と体内ウイ ルス量	78

6) ヒラズハナアザミウマ Hiroshima 系統の雌雄間差異.....	81
考察	83
総合考察	88
要約	98
謝辞	101
引用文献	103
Summary	120

緒 言

九州の農業生産額は約1.7兆円のうち耕種的品目は約1兆円を占め, その中でも野菜は40%, 花きは10%を占める重要産業である(農林水産統計 農林水産省 九州農政局 平成23年農業産出額および生産農業所得(九州)

http://www.maff.go.jp/kyusyu/press/toukei/pdf/h23_sansyutugaku.pdf). しかし, これらの作物は病害虫による多種多様な被害を受けている. 特に, 近年の国際間における農産物貿易の拡大は, 一部の昆虫種において世界的な分布拡大と害虫化を引き起こして (Vierbergen, 1995), それらが媒介する新種あるいは日本未発生の植物ウイルスの発生が多く見られ, 大きな問題となっている.

2004年, 熊本県の施設栽培メロンにおいて葉が黄化する障害が多発し, 翌年にはキュウリに同様の症状が確認された. 本病はクロステロウイルス科 (*Closteroviridae*) の新種のクリニウイルス (*Crynivirus*) と同定され (Okuda et al., 2010), 病原ウイルスは「ウリ類退緑黄化ウイルス (*Cucurbit chlorotic yellows virus*, 以下, CCYV)」, 病名はそれぞれ「メロン退緑黄化ウイルス病」および「キュウリ退緑黄化ウイルス病」と命名された. 現在, 本病発生地域は日本国内では九州全県, 四国および関東に及び, 海外でも中国, 台湾, 南アジアやスーダンで発生が確認されている (Huang et al., 2010; Gu et al., 2011; Hamed et al., 2011; Zeng et al., 2011). CCYVに感染したメロンまたはキュウリの葉は, 発症初期に退緑小斑点が現れ, やがて症状が進むと葉脈沿いに緑色が残る以外は全体が黄化し, 最終的には葉が硬くなり下側に巻き込む. その結果, キュウリでは収量が激減し, メロンでは果実重量や糖度が低下する (行徳ら, 2009).

一方、キクは、我が国では切り花としてもっとも流通している品目であり、国内の5,532haで生産されているが（農林水産省：統計情報：2010年度 http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_kaki/index.html），様々な病害虫の打撃を受け、とくにブニヤウイルス科（*Bunyaviridae*），トスポウイルス属（*Tospovirus*）のトマト黄化えそウイルス（*Tomato spotted wilt virus*，以下TSWV）によるキクえそ病は多くのキク産地に被害を与えてきた（Matsuura et al., 2002）.

Chrysanthemum stem necrosis virus, (CSNV)は、キクの茎および葉にえそを生じさせる新種のトスポウイルスとしてブラジルで報告され（Bezerra et al., 1999）,その後、オランダ（Verhoeven et al., 1996）,イギリス（Munford et al., 2003）およびスロベニアのキク栽培でも同様の被害が認められた（Ravnikar et al., 2003）.

日本では、2006年に広島県三次市の施設栽培のキクにおいてTSWVによるキクえそ病に酷似する病徴を呈した株が確認され、病徴による判別は困難であったが、RT-PCR及び血清学的手法により病原がCSNVであることが示され、和名はキク茎えそウイルスと命名された（Matsuura et al., 2007）.その後、本種は、福岡県、熊本県をふくむ日本各地で発生が確認されるなど発生地域が拡大し（Takeshita et al., 2011）,我が国のキクの生産にとってCSNVの発生は新たな脅威となりつつある。また、ブラジルではCSNVの被害はキクに留まらず、トマトへも被害が広がっていて（Nagata et al., 1998）,日本においても、茨城県においてトマトに、富山県においてガーベラとアスター（桃井, 2011）にCSNVの感染が確認されている。

CCYVとCSNVはいずれも虫媒伝染性ウイルスであるが、媒介昆虫や媒介様式が異なっている。

CCYVが属するクロステロウイルス科クリニウイルス属ウイルスはコナジラミ類（同翅亜目（ヨコバイ亜目） Homoptera）により半永続的に伝搬され（Wiseler et al., 1998）, CCYVはタバココナジラミ *Bemisia tabaci* (Gennadius) のバイオタイプBおよびQによって媒介されることが確かめられている（Okuda et al., 2010）. 最近, 日本ではピレスロイド系薬剤に高い抵抗性をもつバイオタイプQの生息範囲の拡大が問題視されていて（Ueda and Brown, 2006）, それらの薬剤抵抗性をもつタバココナジラミ個体群が作物に定着すると根絶することは難しく, 結果としてCCYVは日本中に急速に広がり, キュウリやメロンの安定生産を脅かすものとなったと考えられる. また, CCYVはウリ科の多くの作物に感染し, その感染率と症状は作物によって異なっているが, キュウリとメロンの感染率は他の作物に比べ非常に高く, また, 病徴も非常に激しいものが観られる（Okuda et al., 2010）.

一方, CSNVとTSWVは同じブニヤウイルス科, トスポウイルス属に属し, 本属すべてのウイルスはアザミウマ類（総翅（アザミウマ）目（Thysanoptera））によって伝搬される.

日本国内の野菜花き類に発生するアザミウマ類は, *Frankliniella*属のミナキイロアザミウマ(*F. occidentalis*)及びヒラズハナアザミウマ(*F. intonsa*)並びに *Thrips* 属のミナミキイロアザミウマ (*T. palmi*) 及びネギアザミウマ (*T. tabaci*) などが挙げられるが, それらが媒介するトスポウイルス属ウイルスは表1の通りである.

これらのアザミウマ類は孵化後間もない1令幼虫が感染植物を吸汁することでトスポウイルスを獲得するが, 保毒直後の幼虫にはウイルス媒介能力はなく, 主に成虫になってからウイルスを媒介する. 一方, 無保毒の成虫が感染植物を吸汁してもウイルスを獲得することはない. 1令幼虫期に獲得されたウイルスは, アザミウマの発育に伴って複製・増殖しながら組織内を移行し, 成虫期

には唾液腺内に保たれるため, アザミウマは終生伝搬能力を保持する (de Assis Filho et al., 2004; Whitfield et al., 2005).

虫媒介性ウイルス病の蔓延を防止するにあたって, 寄主植物および媒介虫体内ウイルスの有無や量を把握し, ウイルスの伝搬経路を明らかにすることが重要である.

前述の通り CCYV の属するクリニウイルス属ウイルスはコナジラミ類によって半永続的に媒介される. クリニウイルスのタイプウイルスでレタスだけでなく 15 科 46 種の広範囲の寄主をもつ *Lettuce infection yellow virus* (以下, LIYV) や CCYV の近縁種の *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (以下, CYSDV) については, タバココナジラミのウイルス獲得や媒介に関するいくつかの研究がなされている (Duffus et al., 1986; Celix et al., 1996). しかし, これらのウイルスを媒介するコナジラミのバイオタイプは A または B であり, 現在, 日本で CCYV の主な媒介種として考えられるバイオタイプ Q とは異なっている. また, CYSDV について寄主植物メロン体内のウイルスの動態が調査されているが (Marco et al., 2003), 新規ウイルスである CCYV に関してこれらの知見は皆無である.

トスポウイルス属ウイルスがその媒介者であるアザミウマ類に獲得, 伝搬される効率が種の組み合わせにより大きく異なる背景については, ウイルスとアザミウマの相互作用が関与していることが指摘されている (Whitfield et al., 2005). また, 媒介アザミウマ類のトスポウイルスの獲得や伝搬能力は, そのアザミウマの系統や原産地で異なることが指摘されている (van de Wetering et al., 1999b; Chatzivassiliou et al., 2002). 特に, Sakurai et al. (2002) は日本国内のミカンキイロアザミウマの TSWV の媒介効率は, その原産地によって 6.1% から 29.2% まで違いがあることを明らかにしている. また, 同属ウイ

ルスのインパチエンスえそ斑紋病の病原ウイルスである *Impatiens necrotic spot virus* (以下, INSV) についても, 日本国内のアザミウマ類 5 種が媒介能力を持つことを報告している (Sakurai et al., 2004).

Frankliniella 属のミカンキイロアザミウマとヒラズハナアザミウマ は花きや野菜を広く加害し, 特にキクの栽培では食害による直接的な被害だけではなく, TSWV の主な媒介虫として問題視されている (Okazaki et al., 2005). また, 海外の報告では CSNV の主な媒介虫はミカンキイロアザミウマと *F. schultzei* (日本未発生) でミナミキイロアザミウマとネギアザミウマらの *Thrips* 属は CSNV を媒介しないとされている (Nagata et al., 2004). しかし, ヒラズハナアザミウマの CSNV 媒介についての報告はまだされていない.

このようにトスポウイルス属ウイルスの媒介虫であるアザミウマ類のウイルス伝搬効率については多くの報告がなされているが, 新規ウイルスである CSNV については未解明の部分が多く残されている.

本研究は, 近年, 日本で発生が確認された 2 種の虫媒介伝染性ウイルス, CCYV および CSNV の媒介機構について基礎的な知見を得ることで, これらウイルスの病理学的特性の一部を解明し, それに基づく新たな防除法を提案することを目的としている.

ウイルス病害の危険を回避するもう一つの重要な手法として, ウイルス抵抗性遺伝資源を探索し, それらを作物の育種素材として活用する方法が挙げられる. これまで CCYV と同属の *Beet pseudo yellows virus* (以下, BPYV) や, CYSDV に抵抗性を持つキュウリやメロンについていくつかの知見がある. なかでも CYSDV は CCYV の近縁種で, キュウリについては野生種や育種系統の中に CYSDV 耐性を示すいくつかの種または系統の報告がある (Aguilar et al., 2006; Eid et al., 2006). また, メロンについても CYSDV ではいくつかの有望系統の報告があり, 育種素材として活用されつつある. 特に, CYSDV 抵抗性系統メロンの一

つである TGR-1551 についてはその抵抗性因子は一つの遺伝子座によって支配されていることが報告されている (Lopez-Sese et al., 2000; Marco et al., 2003). さらに, いくつかのアジア原産のメロンは BPYV 感染に耐性をもつという報告もある (Esteva et al., 1992).

上述の CCYV および CSNV の媒介機構の解明に加え, 本研究では, 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所が保有するインド, パキスタン, バングラデシュにおいて採集したメロン遺伝資源 53 系統を用いて CCYV に対する感染性および病徴を調査することで, CCYV 抵抗性有望系統の探索をおこなった.

植物ウイルスの防除法には, 媒介虫の適切な防除がかかせない. しかし, 前述の通り, タバココナジラミは高度に薬剤抵抗性を発達させ, また, トスポウウイルスの主要な媒介虫であるミカンキイロアザミウマは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への抵抗性を有している (Brodsgaard, 1994). 近年の化学合成農薬の過度の使用によりもたらされた種々の弊害への反省から, 総合的病害虫管理 (Integrated pest management IPM) の概念が提唱され, 推進されており (Smith and Reynolds, 1966), 今日の施設栽培の現場では, コナジラミ類, アザミウマ類についても農薬による化学的防除だけでなく, 物理的防除, 耕種的防除, 天敵などを利用した生物的防除を相互に矛盾が生じないように組み合わせる栽培体系の確立が進められつつある. それらに本研究で得られるウイルス病の病理学的特性の知見を反映させ, 新たな防除法を提案することで, メロン, キュウリ, キクといった施設栽培作物の安定生産に寄与するものと考えられる.

表 1. 国内で発生が確認されたトスポウイルス属ウイルスと主な感染作物および媒介種.

ウイルス名	感染作物	媒介するアザミウマ
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	トマト, ピーマン, ナス, ダリ	<i>Frankliniella occidentalis</i>
	ア, キク, ガーベラ, シネラリ	<i>F. intonsa</i>
	ア, マリーゴールド, アルス	<i>F. bispinosa</i>
	トロメリア他	<i>Thrips tabaci</i> <i>T. setosus</i>
<i>Watermelon silver mottle virus</i>	スイカ, トウガン, ニガウリ,	<i>T. palmi</i>
	キュウリ	
<i>Inpatiens necrotic spot virus</i>	アリストロメリア, トルコギ	<i>F. occidentalis</i>
	キョウ	
<i>Capsicum clorosis virus</i>	ピーマン	?
<i>Chrysanthmum stem necrotic virus</i>	キク, ガーベラ, トマト	<i>F. occidentalis</i> ?

第 I 章. CCYV 媒介特性および CCYV 抵抗性メロン苗の選抜

緒言

ウリ科 *Cucurbitaceae* には多くの果菜, キュウリ *Cucumis sativa* L., カボチャ *Cucurbita maxima* L., ニガウリ *Momordica charantia* L., メロン *Cucumis melo* L., スイカ *Citrullus lanatus* L. などがあり, それらは日本の重要な施設園芸作物である. なかでも, キュウリは約 11,700ha で栽培され, 出荷量も 492,900t になる (農林水産省: 統計情報 2011 年度

http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_yasai/index.html). また, メロンの生産量はキュウリのように多くはないものの, 市場の中では高級果物としてその地位を確立している. しかし, キュウリやメロンの栽培は多くのウイルス病害, すなわち *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Papaya ringspot virus* (PRSV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Melon yellow spot virus* (MYSV), *Beet pseudo-yellows virus* (syn. *Cucumber yellows virus*) (BPYV), *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), *Melon necrotic spot virus* (MNSV) などの脅威にさらされている.

それらのウイルス病の中には, ある特定の昆虫によって媒介されるものが多数あり, 例えば, CMV, PRSV, ZYMV はアブラムシ類によって媒介され (Grafton-Gardwell et al., 1996; Stapleton and Summers, 2002; Alonoso-Prados et al., 2003), MYSV はミナミキイロアザミウマ *Thrips palmi* (Murai T., 2002), BPYV はオンシツコナジラミ *Trialeurodes vaporariorum* (Yamashita et al., 1979; Esteva et al., 1992; Rubio et al., 1999) によって媒介される.

2004年, 熊本県の施設栽培メロンにおいて葉が黄化する障害が多発し, 翌年にはキュウリに同様の症状が確認された. 本病はクロステロウイルス科の新種のクリニウイルスと同定され (Okuda et al., 2010), 病原ウイルスは「ウリ類退緑黄化ウイルス (*Cucurbit chlorotic yellows virus*, CCYV)」, 病名は「メ

ロン退緑黄化病」および「キュウリ退緑黄化病」と命名された。現在, 本病発生地域は日本国内では九州全県, 四国および関東に及び, 海外でも中国, 台湾, 南アジアやスーダンでも発生が確認されている (Huang et al., 2010; Gu et al., 2011; Hamed et al., 2011; Zeng et al., 2011) .CCYVに感染したメロンまたはキュウリの葉は, 発症初期に退緑小斑点が現れ, やがて症状が進むと葉脈沿いに緑色が残る以外は全体が黄化し, 最終的には葉がかたくなり下側に巻き込む。その結果, キュウリでは収量が激減し, メロンでは果実重量や糖度が低下する (行徳ら, 2009) .CCYVが属すクロステロウイルス科クリニウイルス属ウイルスはコナジラミ類により半永続的に媒介され, 感染植物から隔離されたコナジラミ成虫が保有するウイルスは徐々に感染能力を失うことを特徴とし (Wiseler et al., 1998), CCYVはタバココナジラミ *B. tabaci* のバイオタイプBおよびQによって媒介されることが確かめられている (Okuda et al., 2010) .最近, 日本ではネオニコチノイド系薬剤に高い抵抗性をもつバイオタイプQの生息範囲の拡大が問題視されている (Ueda and Brown, 2006) が, それらの薬剤抵抗性をもつタバココナジラミ個体群が作物に定着すると根絶することは難しく, 結果としてCCYVは日本中に急速に広がり, キュウリやメロンの安定生産を脅かすものとなったと考えられる。また, CCYVはウリ科の多くの作物に感染し, その感染率と症状は作物によって異なっているが, キュウリとメロンの感染率は他の作物に比べ非常に高く, また, 病徴も非常に激しいものが観られる (Okuda et al., 2010) .それゆえ, キュウリやメロンを安定生産するにあたって, CCYV防除体系を確立することは重要課題である。

CCYVなどの昆虫媒介性ウイルス病の蔓延を防止するにあたって, 寄主植物および媒介虫体内ウイルスの有無や量を把握し, ウイルスの伝搬経路を明らかにすることが重要である。前述の通り CCYVが属すクリニウイルス属ウイルスはコナジラミ類によって半永続的に伝搬される。一方, 同属でコナジラミ類によって伝搬されるCYSDVについては, 寄主植物メロン体内でのウイルスの動態

が調査されている (Marco et al., 2003) . 新規ウイルスである CCYV についてもこれらの知見を得ることは急務であると考えられる.

本報告は, CCYV 感染宿主であるメロンと媒介虫タバココナジラミを用いて, CCYV の媒介特性についての基礎的な知見を得ようとしたものである.

まず, CCYV に感染したメロンについて基礎的な知見を得るために, CCYV 感染メロンの発育ステージ毎に病徴程度を記録し, リアルタイム PCR を用いてメロン葉の CCYV 濃度を測定した.

また, タバココナジラミによって半永続的に伝搬される CCYV の媒介特性について知見を得ることを目的として, CCYV 感染後のメロン植物体をタバココナジラミに吸汁させ, 植物体およびタバココナジラミ体内の CCYV 濃度を定量することで, 植物体のウイルス濃度とタバココナジラミ体内のウイルス濃度の関係を調べ, さらに, CCYV を吸汁したタバココナジラミ体内の CCYV 濃度を, リアルタイム PCR を用いて経時的に定量した.

加えて, タバココナジラミの飛翔拡散能力を調査するためにビニールハウス内でタバココナジラミの放飼実験を行った.

ウイルス病害の危険を回避するもう一つの重要な手法として, ウイルス抵抗性遺伝資源を探索しそれらを作物の育種素材として活用する方法が挙げられる. これまで CCYV と同属の BPYV や CYSDV に抵抗性を持つキュウリやメロンについていくつかの知見がある. なかでも CYSDV は CCYV の近縁種で, キュウリについては野生種や育種系統の中に CYSDV 耐性を示すいくつかの種または系統の報告があり (Aguilar et al., 2006; Eid et al., 2006), メロンについても CYSDV ではいくつかの有望系統の報告があり, 育種素材として活用されつつある. 特に, CYSDV 抵抗性系統メロンの一つである TGR-1551 についてはその抵抗性因子は一つの遺伝子座によって支配されていることが報告されている

(Lopez-Sese et al., 2000; Marco et al., 2003). また, いくつかのアジア原産のメロンはBPYV 感染に耐性をもつという報告もある (Esteva et al., 1992).

本研究は, 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所が保有するインド, パキスタン, バングラデシュにおいて採集したメロン遺伝資源 53 系統を用いて CCYV に対する感染性および病徴を調査することで, CCYV 抵抗性有望系統の探索をおこなった. また, CCYV 感染性機序解明の基礎的な知見を得ることを目的とし, CCYV 抵抗性有望系統メロン植物体内の RNA 量の増殖や抵抗性有望メロンとタバココナジラミの選好性との関係も調査した.

なお, 本報告は第 1 節で CCYV の媒介特性について, 第 2 節で CCYV 抵抗性メロン苗の選抜試験についてまとめた.

第1節 CCYVの媒介特性

材料と方法

1) CCYV 経代と保毒および無保毒タバココナジラミの累代飼育

CCYV は凍結保存ができないので、常に生体の保毒虫および感染植物を維持しなければならない。そこで、密閉・開閉可能なプラスチックケース（図 I-1-1a）内の CCYV 感染キュウリ（品種：V ロード, 8cm プラスティックポット定植）上で、タバココナジラミ・バイオタイプ Q（以下、タバココナジラミ）を飼育し、新たなキュウリ苗（成葉 1～2 枚展開期）を感染植物に隣接させ、タバココナジラミが自由にキュウリ苗間を移動することで感染を促し、次世代の感染源とした。傷んだ苗や死亡したタバココナジラミは定期的に除去し、CCYV と保毒タバココナジラミを安定的に保持・供給できるようにした。

また、必要に応じて使用する CCYV 無保毒のタバココナジラミは、プラスチックケース内でキャベツ苗（品種：四季彩り, 8cm プラスティックポット定植）を餌として累代飼育をおこなった。これらは熊本県農業研究センター・病害虫研究室で累代飼育されているタバココナジラミを分譲していただいた。

これらのプラスチックケースは 25℃ 恒温 16L8D 日長条件に設定したインキュベーター内に設置した。

2) CCYV 感染メロン苗の供給

1) の方法で CCYV の経代をおこなっているキュウリ苗に成葉 1～2 枚展開期のメロン苗（品種：アールセイヌ, 8cm プラスティックポット定植）を 5～7 日間隣接させタバココナジラミに吸汁させることで、メロン苗の CCYV 感染を促し、CCYV 感染メロンを得た（図 I-1-1b）。それぞれの実験供試前にメロン苗上のタバココナジラミは除去し、苗の根元に nitenpyram 系殺虫剤（製品名：ベストガード）を施用し、メロン苗上に CCYV 保毒タバココナジラミが残存しないようにした。

多数の CCYV 感染メロン苗を同時に必要とする調査（後述の図 I-1-6）, また, 第2節 CCYV 抵抗性メロンスクリーニングなど)では, 多数の供試メロン苗を CCYV 感染源植物体に隣接させなければならない. そこで, プラスティックパイプの1辺2mの立方体型の枠の側面を目合0.4mmのナイロンゴースで覆った, 開閉可能で人の立ち入りができるケージ(図 I-1-2a)を作成し, ガラスハウス内に設置した. ケージ内で CCYV 感染キュウリ(品種:Vロード)苗をプランターで生育させ, そのケージ内にタバココナジラミを放ち, CCYV 感染キュウリを吸汁できるようにし, 新たなキュウリ苗(成葉1~2枚展開期)を感染植物に5~7日間, 隣接させ, タバココナジラミが自由にキュウリ苗間を移動することで感染を促し, 次世代の感染源とした. このケージ内にメロン苗を持ち込むことで, 同時に多数の CCYV 感染メロン苗を得ることを可能にした. その際, 評価対象苗の成葉1枚当たり20~30頭のタバココナジラミが観察された(図 I-1-2b, c). CCYV に感染させたメロン苗上のタバココナジラミは上述の方法で除去した. ケージ内の傷んだ苗や死亡したタバココナジラミは定期的に除去し, CCYV と保毒虫タバココナジラミを安定的に保持・供給できるようにした.

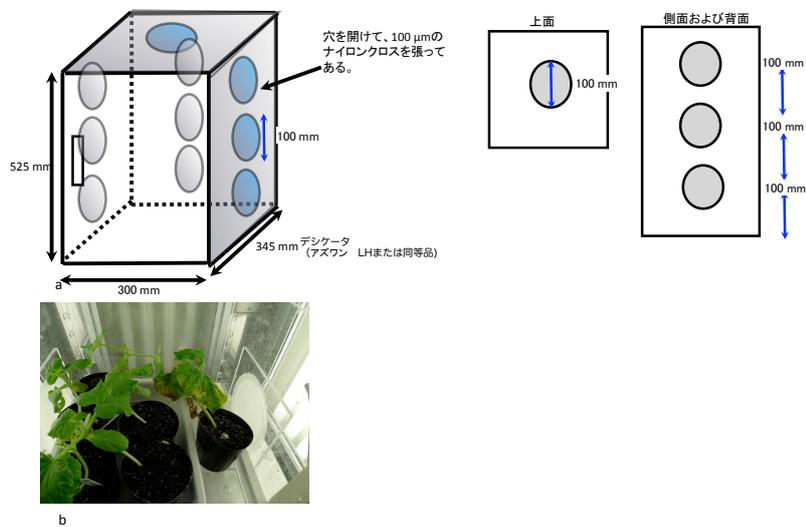


図 I-1-1. タバココナジラミの累代飼育及びウイルスの接種.

a. CCYV 経代と保毒虫および無保毒虫タバココナジラミの累代飼育などに用いたプラスチックケース (525mm×300mm×345mm) アズワン製デシゲーターに穴をあけナイロンクロス (100 μ m) を張り, 通気ができるようにした. b. メロン苗を CCYV 感染キュウリ苗に隣接させ CCYV を接種している様子.



図 I-1-2. CCYV の多量接種の様子.

a. CCYV 接種用ケージ(2m x 2m x 2m), b. CCYV 感染キュウリ (写真奥) にメロン苗 (写真手前) を隣接させ CCYV の感染を促す, c. 保毒コナジラミに吸汁されるメロン苗.

3) 供試植物およびタバココナジラミからの全 RNA の抽出

採取したメロン葉を生検トレパン（直径 6mm）で 3 カ所打ち抜き、メタルビーズと共にマルチビーズショッカー（安井器械：日本）専用チューブ（1.5ml / 本）に入れ、RNA iso Plus（タカラバイオ：日本）500ml とクロロホルム 100ml を注入し、マルチビーズショッカーで粉碎した。これらを遠心分離（7000 rpm, 4° C, 15 min.）することにより上清約 250 μ l を得た。得られた上清と同量のイソプロパノール 250 μ l を加え、十分に攪拌した。その後、遠心分離（15000 rpm, 4° C, 15 min.）を行い、上清を除去して得られた沈殿に 300ml の 80%エタノールを加えた。その後、遠心分離（15000rpm, 4° C, 1 min.）を行い、上清を除去し、得られた沈殿を 5 分間程度減圧乾燥した。抽出した全 RNA は -80° C に保存した（図 I -1-3）。

捕獲したタバココナジラミは 1 頭ごとに攪拌棒付きマイクロチューブ（1.5ml, 商品名：バイオマッシャー：Wako：日本）に入れ、50ml の RNA later® Solutions（ライフテクノロジー：日本）を添加した。タバココナジラミが RNA later® Solutions に十分に浸されていることを確認後、RNA later® Solutions を取り除いた後、250 μ l の Isogen（ニッポンジーン：日本）を注入し、付属の攪拌棒でタバココナジラミを磨砕後、60 μ l のクロロホルムを加えた。これらを十分攪拌の後、遠心分離（15000rpm, 4°C, 5min）することにより、上清約 150 μ l を得た。同量のイソプロパノール 150 μ l と 25%グリコーゲン 4 μ l を加え、十分に攪拌した。その後、遠心分離（15000 rpm, 4° C, 5 min.）を行い、上清を除去して得られた沈殿に 300ml の 80%エタノールを加えた。その後、遠心分離（15000rpm, 4° C, 1 min.）を行い、上清を除去し、得られた沈殿を 5 分間程度減圧乾燥し、20 μ l の滅菌超純水に溶解した。抽出した全 RNA は -80° C に保存した（図 I -1-4）。

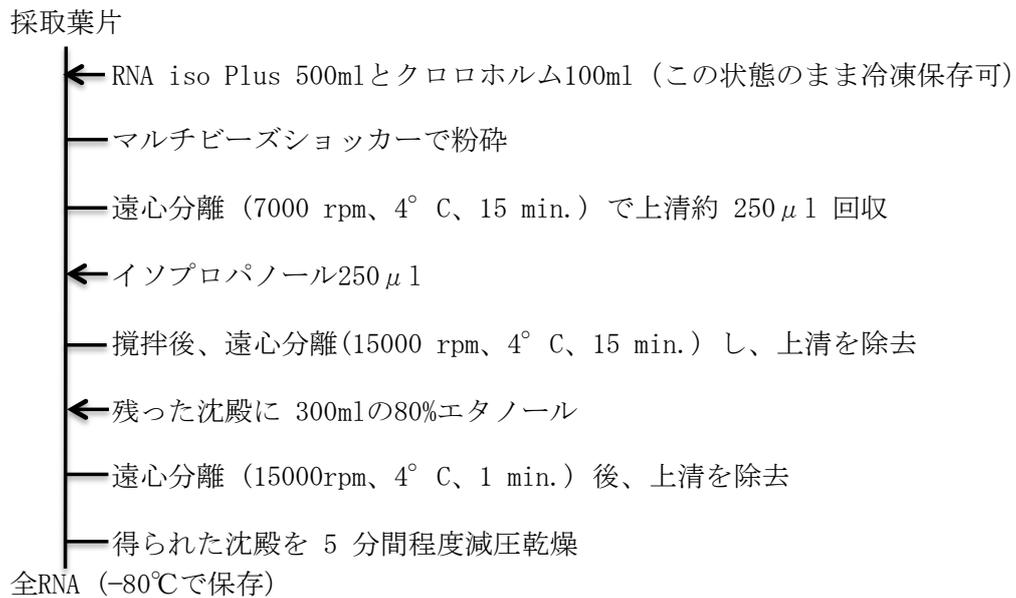


図 I-1-3. メロン葉片からの全RNA抽出.

タバココナジラミ

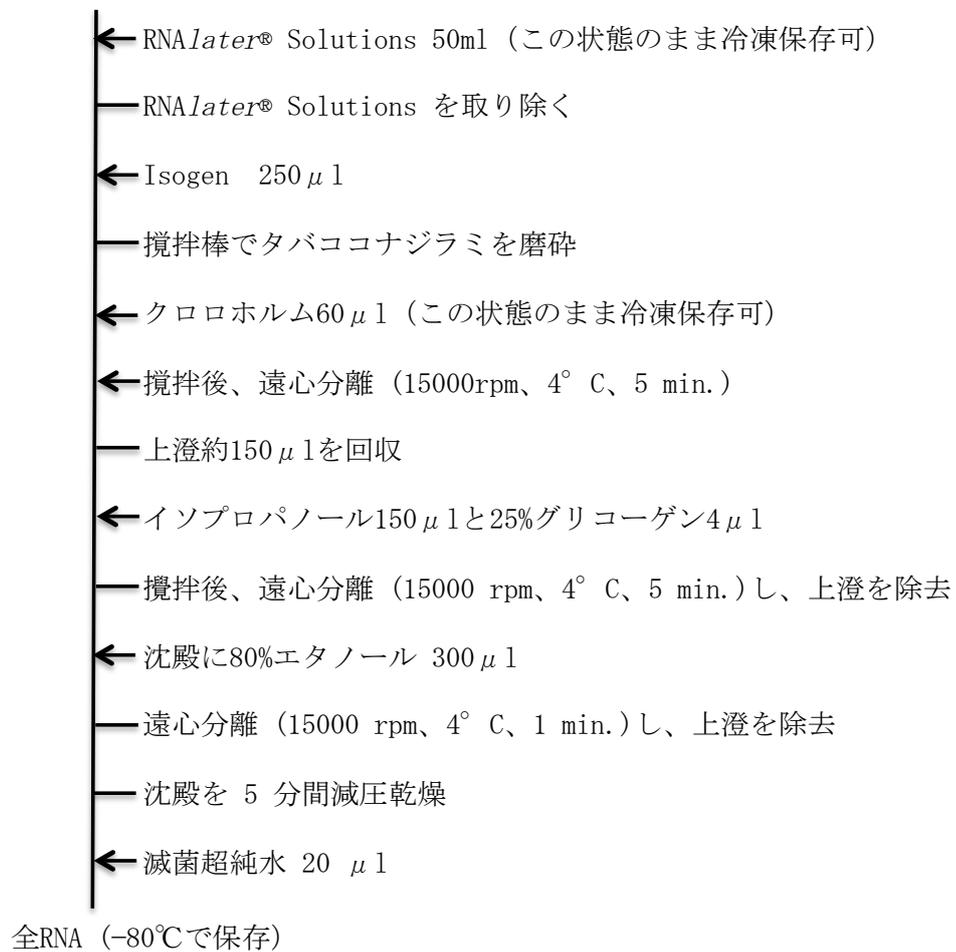


図 I-1-4. タバココナジラミからの全 RNA 抽出.

4) メロン苗の CCYV 感染確認

上述 3) の方法で、メロン葉から抽出した全 RNA を鋳型として、CCYV 特異的プライマー CCYV-HSP-F (5' TGC GTATGTCAATGGTGTATG^{3'})、CCYV-HSP-R (5' ATCCTTCGCAGTGAAAAACC^{3'}) と One Step RT-PCR Kit Ver.2 (Takara, Siga, Japan) を用いて RT-PCR を行った。反応条件は 50°C 30 分間の逆転写反応と 94°C 2 分間の変成反応の後、94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 30 秒、を 1 サイクルとする反応を 35 サイクルおこなったのち、72°C 10 分間の反応をおこなった(図 I-1-5)。PCR 反応後、得られた PCR 増幅産物を 1% アガロースゲルで電気泳動し、泳動後の増幅産物をエチジウムブロマイドで染色し、紫外線照射下で 450bp の DNA 増幅産物を確認することで CCYV 感染の確認とした。

5) 定量 PCR

一般に目的とする遺伝子を定量化するにあたって、コピー数が既知の標準サンプルを用いて絶対数(コピー数)を定量する絶対定量法とサンプル中の遺伝子発現量を相対的に比較する相対定量法があるが、本研究では、メロン葉およびタバココナジラミから抽出した全 RNA 中の CCYV 濃度を定量化するにあたって、メロン葉およびタバココナジラミ中のアクチン遺伝子と目的とする CCYV 遺伝子の比の相対値で表す相対定量法を用いた。

相対定量法では、定量目的遺伝子の他に補正のためにアクチン、ユビキチン、伸長因子などのハウスキーピング遺伝子をリファレンス遺伝子として同時に測定する。(Schaad et al., 2002)。そこで、SYBR (TOYOBO, Tokyo, Japan) のプロトコールを参照に以下の方法を用いて、メロン植物体およびタバココナジラミ体内の CCYV の濃度を定量した。

CCYV 特異的プライマーとして CCYV-RNA1-F1 (5' TGTCTTCACGTCTCGACAC-AAGAC^{3'}) と CCYV-RNA1-R1 (5' ACCTAGCCACTGTTAAGCGTTGAC^{3'}) (GenBank accession number, AB523788) を用いて 138bp の cDNA 断片を得た。

また、リファレンス遺伝子としてメロンアクチン遺伝子特異的プライマー、*C. melo*-actin-F (5' CCTGCTATGTATGTTGCCATCCAG 3') と *C. melo*-actin-R (5' CGTAACCCTCATAGATGGGAACAGTG 3') (GenBank accession number, AB640865) を用いて 121 bp の DNA 断片を得た。タバココナジラミアクチン遺伝子特異的プライマーとして q145bpFw2 (5' TTCCAGCCATCCTTCTGGGTATG 3') と q145bpRev2 (5' CGATACCAGGGTACATGGTGGTAC 3') (GenBank accession number, KC161211) を用いて 145 bp の DNA 断片を得た。CCYV およびメロン葉・タバココナジラミアクチン遺伝子の増幅および増幅産物の定量解析は Roche 製 LightCycler 480 (Roche : スイス) を用いた。反応条件は 61°C 30 分間の逆転写反応と 90°C 2 分間の変成反応の後、94°C 5 分、55°C 10 分、74°C 10 分を 1 サイクルとする反応を 40 サイクルおこなった後、95°C 5 秒、60°C 5 秒の後、0.11°C/sec で 90°C まで加温することで融解乖離曲線を得た (図 I-1-6)。相対定量のデータの解析は LightCycler 480 内蔵プログラム Advanced relative quantification に従った。

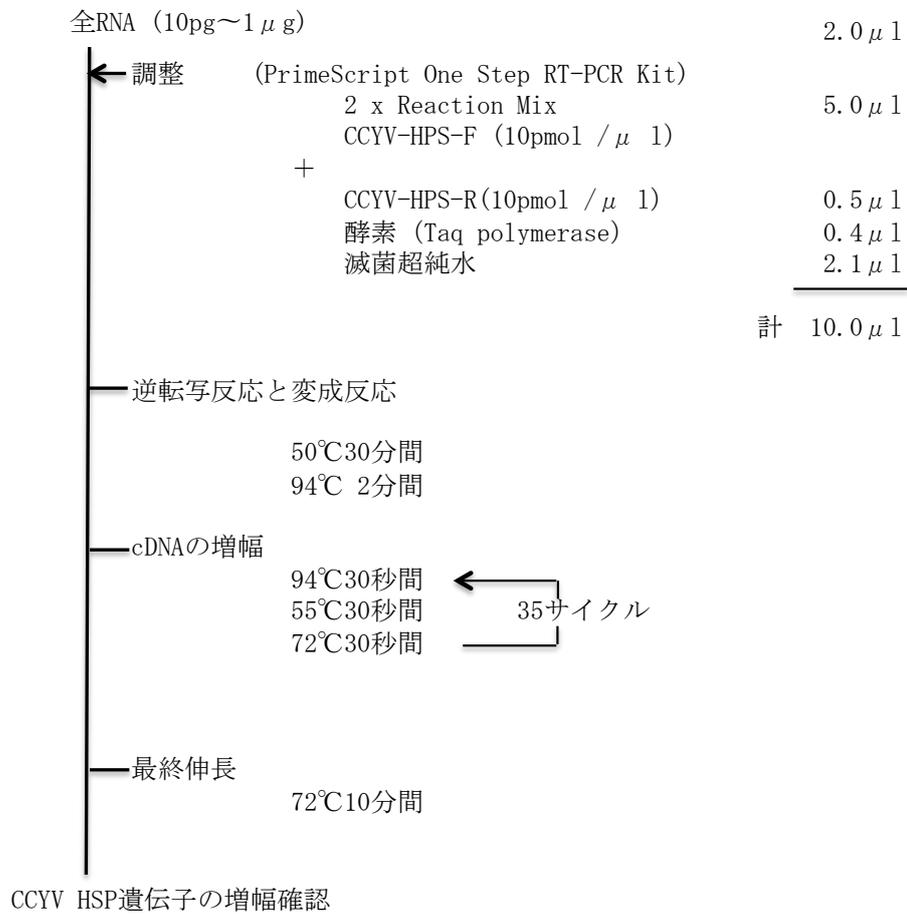


図 I-1-5. CCYV HSP 遺伝子の増幅.

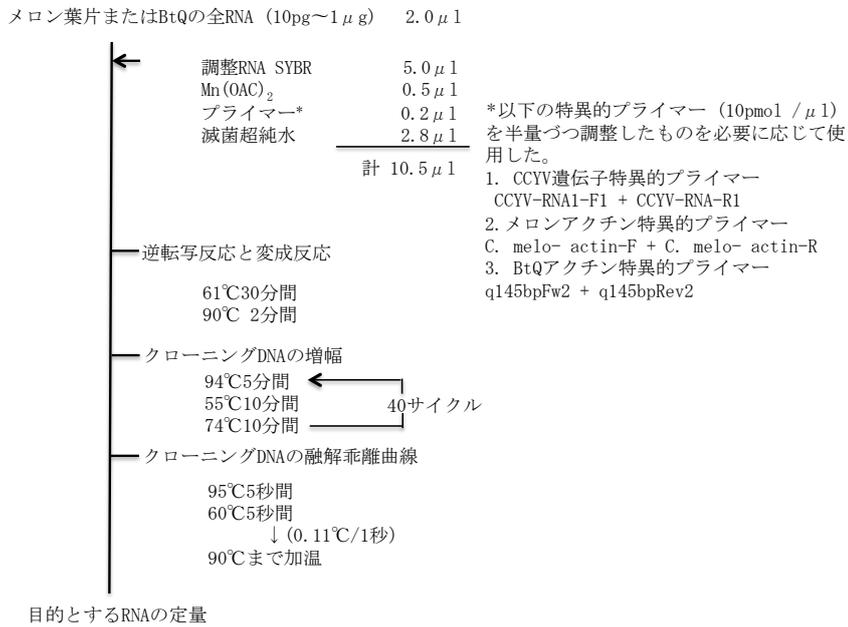


図 I-1-6. LightCycler 480 を用いた定量 PCR.

6) CCYV 感染メロンの発病度と CCYV 濃度推移および果実の品質におよぼす影響

CCYV に感染したメロンの全生育ステージで, CCYV の病徴がどのように進展し, ウイルスが植物体内でどのように移行するかを把握するために以下の調査をおこなった.

2) の多量接種の方法で感染を促し, 4) の方法で感染を確認したメロン苗 24 株と無接種健全メロン (品種名: アールスメイヌ) 24 株を用意し, 農研機構九州沖縄農業研究センター久留米支場内圃場の 2 区画のビニールハウス (縦 34m, 横 8m) に 2010 年 2 月 24 日定植し, 慣行の栽培方法 (図 I-1-7) で栽培管理をおこなった. その後, 収穫までに, 3 月 9 日, 3 月 24 日, 4 月 13 日, 5 月 13 日, 6 月 15 日, 8 月 3 日の 5 回, CCYV 感染区と無接種区の 3~5 株ずつから 3~5 葉ごとに葉片を採取し, その葉の病徴を行徳ら (2009) の指標に従い 0 (無病徴), 1 (退緑小斑点), 2 (黄化面積 1~20%), 3 (黄化面積 20~50%), 4 (黄化が葉全体に広がる) の 5 段階で評価 (図 I-1-8) をおこない, 採取葉片から 3) の方法で全 RNA を抽出し, 5) の方法で抽出した全 RNA 中の CCYV 濃度を測定した.

また, CCYV の感染がメロン果実の品質に及ぼす影響を調査するために, CCYV 感染区と無接種区でメロンは果実収穫時まで栽培し, 慣行栽培管理にしたがって, 受粉から 55 日目にそれぞれの区で果実を収穫し, 果実重と糖度を測定した.

日数 (日)	0	30	60	90	120	140
生育	育苗期	茎葉生育、開花、結実			果実肥大、成熟	
栽培管理	播種	定植	人工授粉	摘果	頂芽摘心	収穫
	人工授粉から55日後に収穫する					

図 I-1-7. メロン（アールセイヌ）生育ステージと主な管理作業.

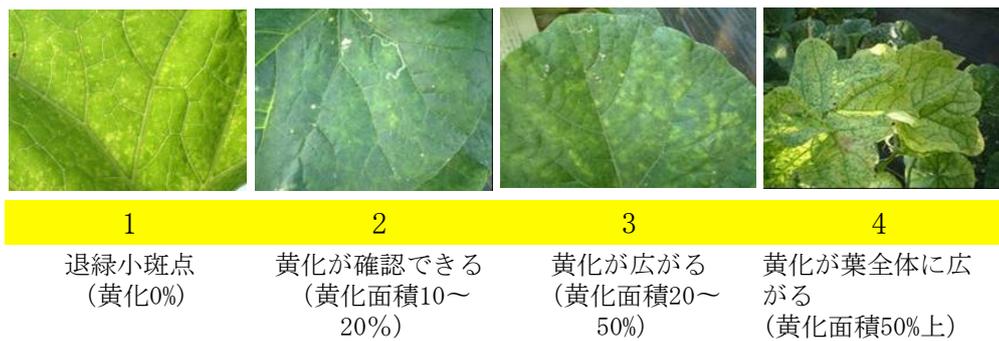


図 I-1-8. CCYV 感染したメロンの病徴度指数（行徳ら, 2009）.

7) CCYV 感染宿主の CCYV 濃度とそれらを吸汁したタバココナジラミ体内 CCYV 濃度の測定

2) の方法で CCYV 感染を促し, 4) の方法で感染を確認したメロン (品種名: アールセイヌ) 苗を 12cm のポットに移植後, プラスティックケースに入れ, 25°C 恒温 14L8D の日長条件下のインキュベーター内に設置した. その後, 1 日, 3 日, 7 日にプラスチックケース内に無保毒タバココナジラミを 10 数頭放ち, 24 時間後, タバココナジラミが吸汁していたメロン葉とその葉上にいたタバココナジラミ 10 頭を回収した. なお, 10 日目にメロン苗がプラスチックケース内で育てるには大きくなりすぎるので, 頂芽を切除し, 14 日目に無保毒タバココナジラミを放ち, 24 時間後メロン葉とその葉上にいたタバココナジラミ 10 頭を回収する際は, メロン葉は植物体からの切除は行わず, 生検トレパンで葉片 3 カ所打ち抜くだけにした. そのため 28 日目にも無保毒タバココナジラミを放ち, 24 時間後メロン葉とその葉上にいたタバココナジラミ 10 頭回収するが, これは, 14 日目に葉片を打ち抜いた葉と同じ葉を吸汁したタバココナジラミ 10 頭を回収することになる (図 I-1-9). これらはメロン苗 3 つを用い 3 反復行なった. 得られたメロン葉とタバココナジラミから 3) の方法で全 RNA を抽出し, 5) の方法で CCYV 由来の RNA 量を定量した.

8) 保毒タバココナジラミ体内の CCYV 濃度推移

CCYV に感染した植物を吸汁したタバココナジラミ体内の CCYV が, タバココナジラミが感染植物から離れた後にどのように推移するか把握するために, 以下の実験をおこなった.

2) の方法で CCYV 感染を促し, 4) の方法で感染を確認したメロン (品種名: アールセイヌ) 苗を用意し, 苗を直径 12cm のポットに移植後, プラスティックケースに入れ 1 ヶ月生育させ, 1) の方法で飼育された CCYV 無保毒のタバココナジラミ約 200 頭を CCYV 感染メロン苗上に 4 日間放飼した. その後, 1 日後, 2 日後, 4 日後, 10 日後, 14 日後に各 8 頭, 計 40 頭のタバココナジラミを

1 頭ずつ回収し、3) の方法で、タバココナジラミ体内の全 RNA を抽出し、5) の方法で CCYV 由来の RNA を定量した。同様の方法で CCYV 無保毒のタバココナジラミ約 100 頭を CCYV 感染メロン苗上に 4 日間放飼した後、3 日後、10 日後に各 24 頭、計 48 頭を回収しタバココナジラミ体内の CCYV 由来の RNA 量を測定する再試験をおこなった。2 つの実験とも、プラスチックケースは 25℃ 恒温 14L8D の日長条件下のインキュベーター内に設置しておこなった。

9) ビニールハウス内のタバココナジラミ飛翔距離の測定

1) の方法で累代飼育した CCYV 無保毒タバココナジラミを吸虫管を用いて回収し、そのうち生存していた 6965 頭をキャベツ苗 4~5 株を設置した 4 個のプラスチックケース内にほぼ当分に放飼し、飛翔距離測定をおこなうビニールハウスにタバココナジラミを生存したまま運べるようにした。

次に、プラスチックケースを久留米支場の縦 34m、横 8m の空のビニールハウスの横壁中央端に設置した (図 I-1-10) 。プラスチックケースからほぼ正面の縦方向に 5m、10m、15m、20m、25m、30m、33m おきに粘着シート設置装置 (図 I-1-10, b, c, d) を設置し、2 枚の黄色粘着シート (商品名: スマイルキャッチ 26cm X 10cm) を粘着板設置面がプラスチックケースに向かい合うように添付した。

最後に、プラスチックケースの扉を開けキャベツ苗の茎を根元から切除しキャベツ苗を枯死させることで、タバココナジラミがハウス内を自由に飛翔できるように促し、1 日後、2 日後、4 日後、7 日後、9 日後に粘着シートを回収しシート上に付着したタバココナジラミを数えた。

なお、外部からのタバココナジラミの侵入を防ぐため、試験開始 1 ヶ月前にハウス内の耕起と除草をおこない、ハウス開口部を閉じた状態で 2010 年 12 月 6 日から試験を開始した。ビニールハウスは灯油ヒータで加温し、ハウス内気温は自動温度計測装置 (サーモクロン DS1921G-F50) で記録した。

1 0) 解析方法

すべての統計解析およびグラフ作成には Mac OSX (Graph Pad Software, CA, USA) の Prism 5 を用いた。

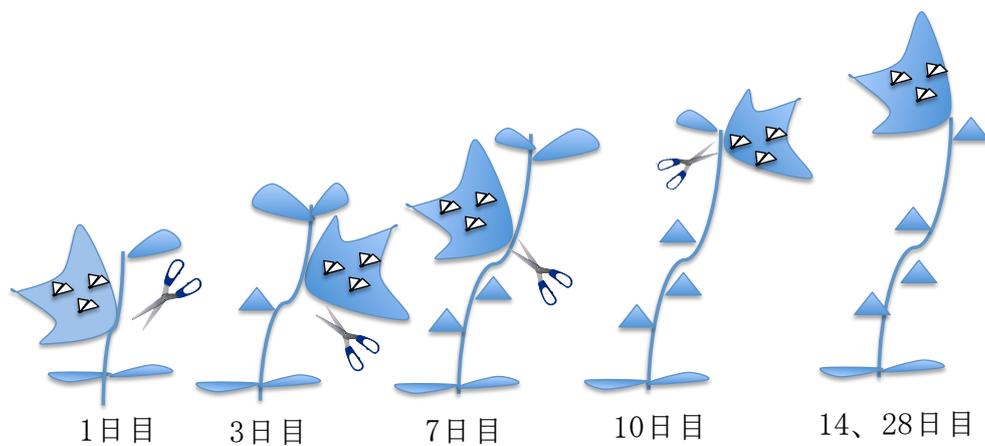


図 I-1-9. CCYV 感染メロン葉とその葉を吸汁したタバコナジラミの採取法.

各日毎に無保毒タバコナジラミを 10 数頭放ち, 24 時間後, タバコナジラミ 10 頭を回収する. 同時にタバコナジラミに吸汁されたメロン葉を採取する. 10 日目にメロン苗の頂芽を切除する. 14 日目に無保毒タバコナジラミを放ち, 24 時間後にメロン葉とその葉上にいたタバコナジラミ 10 頭回収する際は, メロン葉は植物体からの切除はおこなわず, 生検トレパンで葉片 3 カ所打ち抜くだけにする. その後 28 日目にも無保毒タバコナジラミを放ち, 24 時間後にメロン葉とその葉上にいたタバコナジラミ 10 頭回収する. これは, 14 日目に葉片を打ち抜いた葉と同じ葉を吸汁したこととなる.

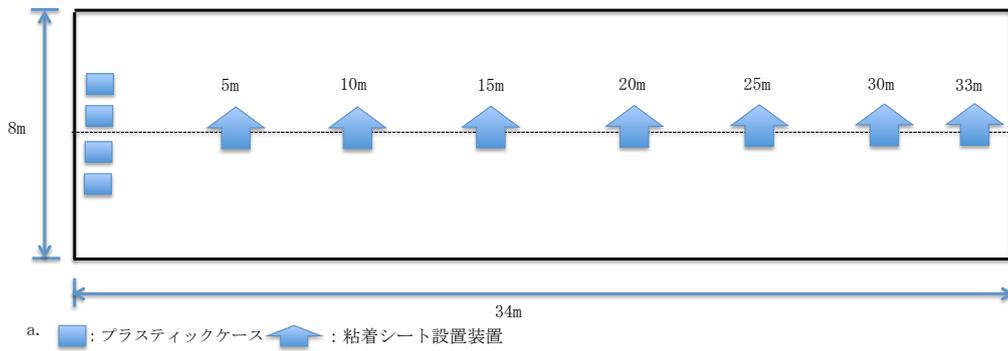


図 I-1-10. タバココナジラミの飛翔実験.

a) タバココナジラミ飛翔実験を行ったビニールハウスへのプラスチックケースと粘着シート設置装置の設置位置, b) 粘着シート設置装置, c) ビニールハウス内に粘着シート設置装置を立てている様子, d) タバココナジラミ放飼の様子.

結果

1) メロン発育ステージ毎の CCYV 感染メロンの発病度と CCYV 濃度の推移およびメロン果実の品質に及ぼす影響

2010年2月24日定植のCCYV感染区では、3月9日調査開始時には全く病徴が認められなかったが、3月24日調査時には、第3葉位に退緑小斑点が観察される個体が認められた。4月13日（交配期）には、下位葉から10数枚までに退緑小斑点が観察され、下位葉では葉の黄化が認められる個体もあった。5月13日には、下位から上位葉に黄斑が認められ、6月15日（収穫時）には、ほとんどの葉が黄化した（表 I-1-1, 図 I-1-11）。

前述の通り、3月9日調査時では、CCYV接種葉のすぐ上の第3葉位にも病徴は認められなかったが、CCYVは微量であるが検出され、その濃度は3月24日、4月13日と徐々に上昇し、5月13日、6月15日と徐々に低下した。同様に、第5葉位でも展葉後まもない3月24日調査時では病徴は認められなかったが、CCYVは検出され、その濃度は4月13日まで上昇し、その後、低下した。メロン交配期にあたる4月13日でメロン植物体の中位葉である第8葉位、10葉位では退緑斑が認められ、高濃度のCCYVがそれぞれ第8葉位で 5.24 ± 1.21 、第10葉位で 3.76 ± 0.66 が検出された。同調査日でメロン植物体の高位葉である第13葉位、15葉位、20葉位では病徴は認められなかったが、CCYVは検出された。その後、5月13日には、第15葉位、20葉位、第25葉位でも病徴が認められ、第15葉位、20葉位ではCCYV濃度が上昇し、第25葉位もほぼ同濃度のウイルスが検出された。前述の通り6月15日には、メロン植物体上の葉はほぼ黄化したが、低葉位から高葉位まで、CCYV濃度は低下する傾向を示し、収穫後にあたる8月3日の調査でも同様の傾向が認められた（表 I-1-1, 図 I-1-11。）。

なお、無接種健全区では、全ての調査日でCCYV感染メロンに観られる病徴は観察されず、ウイルスも検出されなかった。

また、収穫時の果実新鮮重はそれぞれ接種区 2095g, 無接種区 2328g, 糖度はそれぞれ接種区 11.8, 無接種区 14.3 だった。

表 I-1-1. CCYV 非感染および感染メロン苗の発育ステージ毎の病徴度指数とウイルス濃度.

採取日	葉位	採取葉数	病徴度指数		ウイルス濃度	
			無接種	接種	無接種	接種
3月9日	3	5	0	0	n. s	0.057±0.038
3月24日	3	5	0	1±0	n. s	3.12±1.44
	5	5	0	0	n. s	0.0036±0.0025
4月13日	3	3	0	3±0	n. s	6.00±3.46
	5	3	0	2±0	n. s	5.41±2.33
	8	3	0	1.33±0.47	n. s	5.24±1.21
	10	3	0	0.33±0.47	n. s	3.76±0.66
	13	3	0	0	n. s	2.69±2.61
	15	3	0	0	n. s	0.64±0.37
5月13日	20	3	0	0	n. s	0.017±0.017
	3	3	0	4±0	n. s	1.57±0.77
	5	3	0	3.33±0.47	n. s	0.73±0.08
	10	3	0	3.00±0.82	n. s	1.32±0.60
	15	3	0	1.66±0.47	n. s	1.44±0.24
	20	3	0	1.66±0.47	n. s	1.24±0.53
6月15日	25	3	0	1±0	n. s	1.61±0.75
	5	3	0	4±0	n. s	0.27±0.13
	10	3	0	4±0	n. s	0.20±0.02
	15	3	0	4±0	n. s	0.18±0.07
	20	3	0	4±0	n. s	0.12±0.03
8月3日	25	3	0	4±0	n. s	0.10±0.04
	10	3	0	4±0	n. s	0.16±0.06
	15	3	0	4±0	n. s	0.10±0.01
	20	3	0	4±0	n. s	0.12±0.02
	25	3	0	4±0	n. s	0.15±0.09

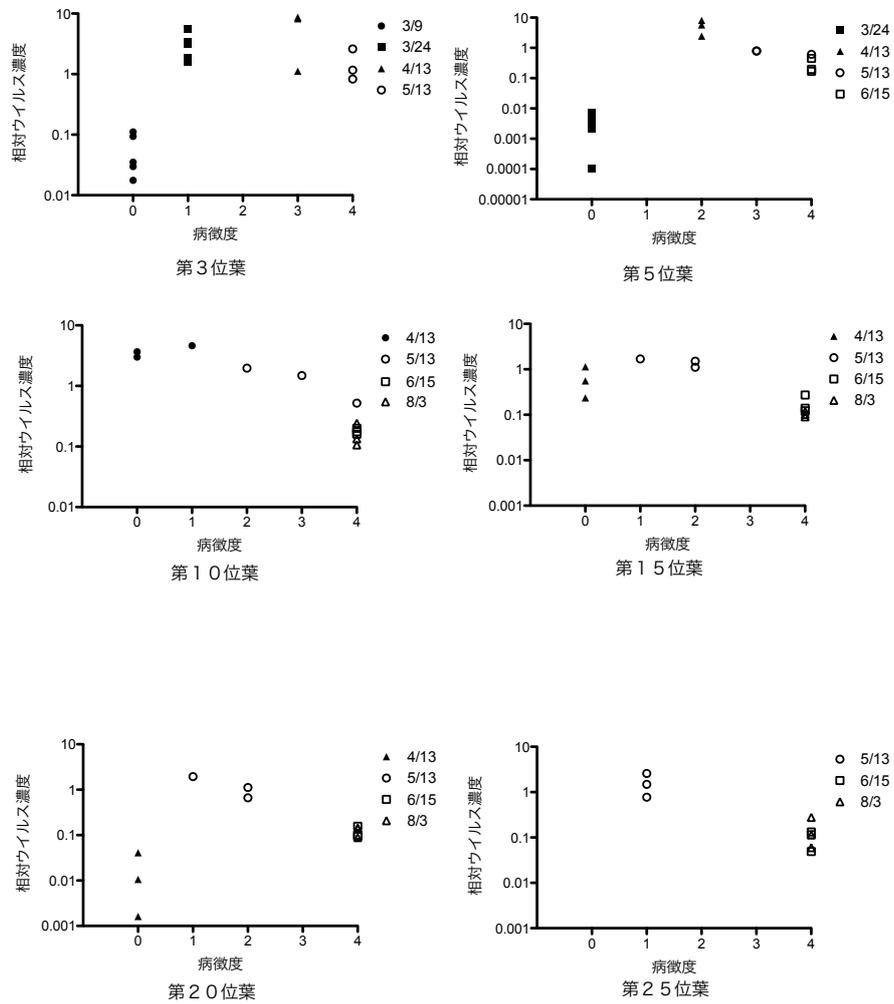


図 I-1-11. CCYV に感染したメロンの葉位ごとの病徴度と CCYV ウイルスの相対濃度.

丸, 三角, 四角のドットは調査日を示す. 調査期間中に病徴度の調査とウイルス濃度の測定が3回以上おこなわれた第3, 5, 10, 15, 20, 25 葉位について調査葉の病徴度と相対ウイルス濃度について示した.

2) CCYV 感染宿主とそれを吸汁したタバココナジラミ体内のウイルス濃度の比較

CCYV 感染メロン葉とそれを吸汁したタバココナジラミ体内の CCYV 相対濃度について図 I-1-12-a, b, c に示した. CCYV 感染メロン葉のウイルス相対濃度は図 I-1-12-a と -c の設置 1 日目採取葉 (第 1 成葉) で, それぞれ, 0.000012, 0.00032 となり, その後設置 3 日目採取葉 (第 2 成葉) で急上昇し 0.037, 0.078 となった. 一方, 図 I-1-12-b の設置 1 日目採取葉 (第 1 成葉) のウイルス相対濃度は前者 2 つに比べ比較的高く, 0.038 となり, その後設置 3 日目採取葉 (第 2 成葉) ではほぼ横ばいの 0.081 となった. 設置 7 日目採取葉 (第 3 成葉) の CCYV 相対濃度は, どの植物体でも, 設置 3 日目採取葉 (第 2 成葉) と比較してあまり変化はなかった. また, どの植物体でも, 設置 14 日目採取葉 (第 4 成葉) では CCYV 相対濃度はやや低下し, 設置 28 日目採取葉 (第 4 成葉) では, 再び上昇した.

CCYV 感染メロン葉を吸汁したタバココナジラミ個体群体内の CCYV 相対濃度は, 図 I-1-12-a, b, c の設置 1 日目採取葉 (第 1 成葉) 上にいた個体群のものは, それぞれ, 0.089 ± 0.041 , 0.23 ± 0.084 , 0.45 ± 0.298 で 10^{-1} 前後となった. その後, 設置 3 日目採取葉 (第 2 成葉) 上にいた個体群のものは図 I-1-12-a, -b で急上昇し, 設置 7 日目採取葉 (第 3 成葉) 上にいた個体群ではほぼ横ばいとなった. 一方, 図 I-1-12-c では, 設置 1 日目採取葉 (第 1 成葉) 上にいた個体群から設置 3 日目採取葉 (第 2 成葉) 上にいた個体群の CCYV 相対濃度はほぼ横ばいとなり, 設置 7 日目採取葉 (第 3 成葉) 上にいた個体群で上昇した. 設置 14 日目採取葉 (第 4 成葉) 上のタバココナジラミ個体群体内の CCYV 相対濃度は図 I-1-12-a でほぼ横ばい, -b, -c, で低下し, 設置 28 日目採取葉 (第 4 成葉) 上では図 I-1-12-a, b, c, 全てで上昇した.

CCYV 感染宿主メロン葉とそれを吸汁したタバココナジラミ体内の CCYV 相対濃度の同調性については, 図 I-1-12-b でメロン葉とタバココナジラミ体内のウイルス相対濃度の上昇および降下がほぼ同調している. 図 I-1-12-a では

設置3日目から14日目, 図 I-1-12-c では, 設置1日目から7日目のそれぞれのウイルス相対濃度の上昇および降下が同調しないが, 概ね, 感染宿主メロン葉の CCYV 相対濃度とタバココナジラミ体内 CCYV 相対濃度には同調性があることが認められた. 横軸にメロン体内のウイルス相対濃度, 縦軸にタバココナジラミ体内のウイルス相対濃度をプロットしたグラフを図 I-1-13 に示した.

3) CCYV 獲得後のタバココナジラミ体内ウイルス濃度の推移

CCYV を獲得後, 寄主植物から離れたタバココナジラミ体内の CCYV 濃度を個体ごとにプロットしたものを図 I-1-14 に示した. ウイルス獲得1日後のタバココナジラミ体内 CCYV 平均相対濃度は 0.118, 獲得14日後の平均相対濃度は 0.002 となり, ほぼ 1/100 になることが明らかになった. ウイルス獲得後のコナジラミ個体群の CCYV 平均相対濃度の標準誤差は, 1 日後, 2 日後, 4 日後, 7 日後, 10 日後, 14 日後ではそれぞれ, 0.031, 0.096, 0.019, 0.168, 0.004, 0.001 となり, ウイルス獲得7日目の個体群のように CCYV 相対濃度の最小値と最大値は約 1000 倍の差が認められた.

これらの結果について, CCYV 獲得後のタバココナジラミ体内ウイルス濃度推移について一般化を試みた. 従属変量 Y の測定値が正規分布しないものに回帰式を当てはめる手法がいくつかあるが, Y 値の標準偏差の逆数をかける手法で, 高い相関係数 ($R=0.87$) となる $Y=10^{(-0.13X-0.80)}$ の回帰式が得られた.

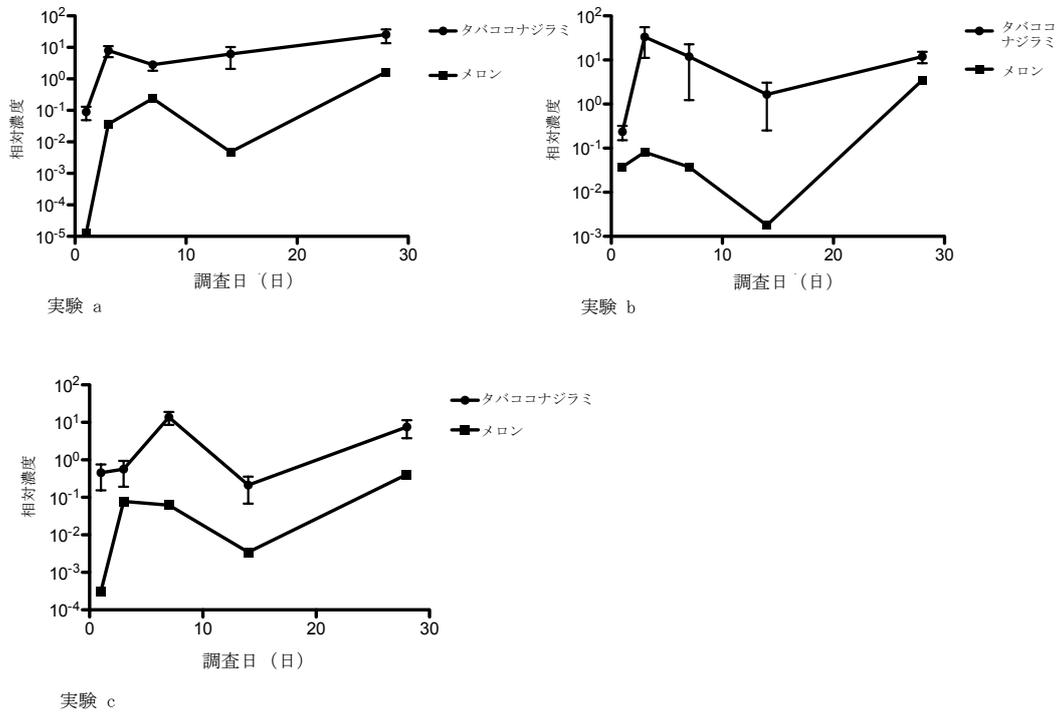


図 I-1-12. CCYV に感染したメロンとそれを吸汁したタバココナジラミ体内のウイルス
相対濃度.

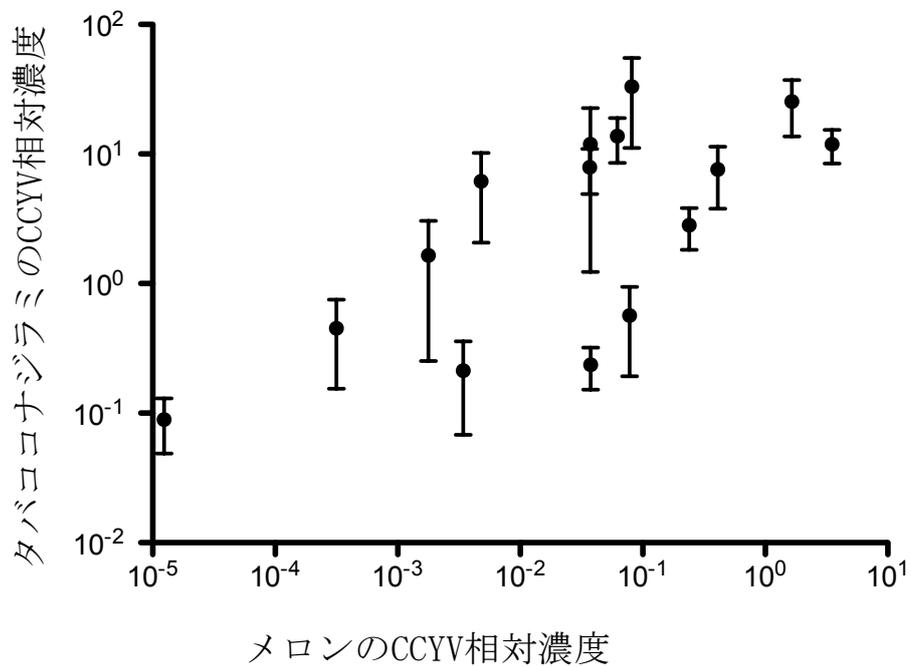


図 I-1-13. CCYV に感染したメロンとそれを吸汁したタバココナジラミ体内のウイルス相対濃度(図 I-1-12-a, b, c を改変).

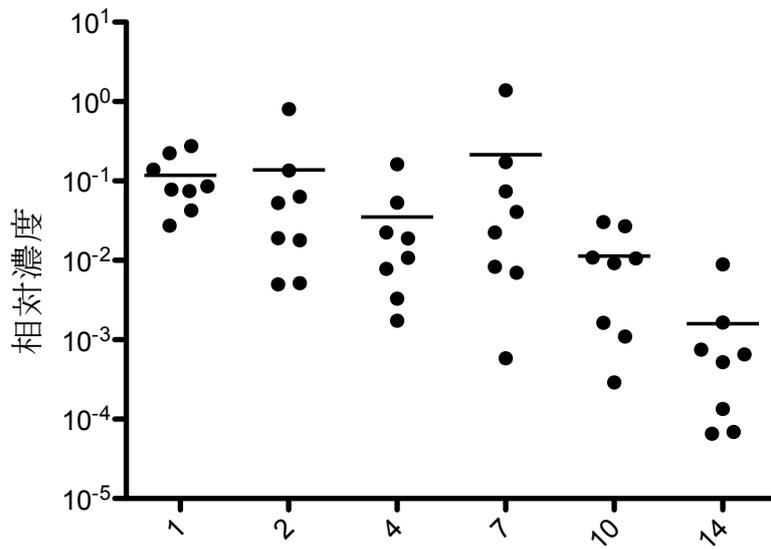


図 I-1-14. CCYV ウイルス獲得後の個々のタバココナジラミが保持するウイルス量の推移.

4) ビニールハウス内のタバココナジラミ飛翔距離の測定

タバココナジラミ放飼後の回収日毎に粘着板に付着していたタバココナジラミ個体数を表 I-1-2 に示した. 放飼実験開始当初は供試キャベツ上にいる個体も観られたが, 3, 4 日後のキャベツ上ではタバココナジラミは観られず, 放飼 1 日目には粘着板に捕獲されるタバココナジラミが観られ, その後, 放飼 2 日目以外すべての回収日でタバココナジラミが捕獲された.

また, 放飼経過日数 1 日後に放飼地点から 25m の粘着板上で 1 頭のタバココナジラミが捕獲され, 7 日後に 30m 地点, 9 日後に 33m 地点で 1 頭ずつ捕獲された.

回収日すべてのタバココナジラミ捕獲数は 93 頭で捕獲虫の 65% (60 頭) は, 放飼地点から 5m の粘着板上だった. なお, すべての放飼虫の捕獲率は放飼虫の 1.3% だった.

調査開始の 12 月 6 日から 13 日までのハウス内気温と湿度の変化を自動温度計測装置で測定した結果を図 I-1-16 に示した. 平均気温 16.3°C, 最高 35.5°C, 最低 6.7 °C だった.

表 I-1-2. タバココナジラミ放飼後の経過日数毎および放飼地点からの距離別の粘着板によるタバココナジラミの捕殺数.

経過日数 (日)	放飼地点から粘着板までの距離 (m)						
	5	10	15	20	25	30	33
1	6	1	0	1	1	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
4	24	7	5	1	0	0	0
7	18	7	3	1	1	1	0
9	12	2	0	1	0	0	1

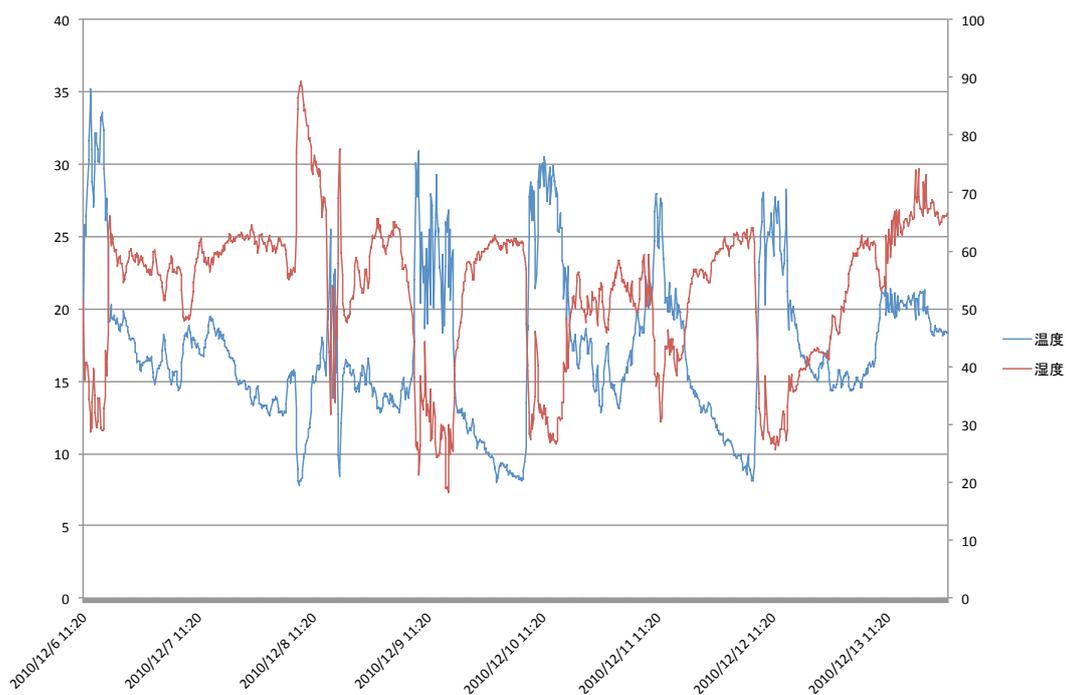


図 I-1-15. 自動温度計測装置 (サーモクロン DS1921G-F50) で記録したビニールハウス内気温と湿度.

考察

前述の通り CCYV は、日本だけでなくアジア各地で発生が確認され、多くの産地に多大な被害を与えている。そのため、このウイルスに感染した寄主植物の病徴の進展や植物体内のウイルス量の把握といった基本的な病害特性を把握することは、この病害の蔓延を防止するにあたっての第一歩である。

CCYV の近縁種でコナジラミ類によって媒介される CYSVDV については、寄主植物メロンの他キュウリ、スカッシュ、マロウでウイルスの動態が調査されており、それらすべての寄主植物でウイルス濃度は接種葉の直上に隣接する 1～3 葉位で接種から 1～2 週間後に最高値に達し、その後、劇的にウイルス濃度は降下する。また、病徴はウイルス濃度の上昇にやや遅れて進展することが明らかにされている (Marco et al., 2003)。今回の調査では、ウイルス接種終了日 2 月 24 日に定植し、2 週間後 (3 月 9 日) の接種葉直上の葉 (第 3 位葉) では、病徴の進展は観察されない (病徴度 0) がウイルスはわずかであるが検出され、その約 2 週間後 (3 月 24 日) にウイルス濃度は最高値に達し、病徴の進展にともない、やや下降する傾向が観察された。また、同様の傾向が接種葉から 3 葉位にあたる第 5 葉位でも観察された。これらの結果を上述の Marco et al. (2003) のメロンにおける CYSVDV の動態と比較すると、ウイルス感染後の病徴の発現とウイルス量の増加との関係は同様の傾向が観られるものの、寄主 (メロン) 体内のウイルス量の変化はやや異なることが示唆された。

また、Marco et al. (2003) ではウイルス接種葉から 4 葉位以上の葉ではウイルス量の増加は観察されなかったが、本研究では上位 (第 10, 15, 20) 葉でも、下位葉と同様のウイルス量の増加が観察された。しかし、Marco et al. (2003) の CYSVDV の研究は、本研究がすべての葉で、葉が展開を終了させた時点から病徴とウイルス濃度を測定したのに対し、CYSVDV の調査は接種後 4 週間までに限られていて、上位葉は展開途中であったと考えられるので単純に比較することはできない。

寄主植物体内のウイルス粒子の移動や集積は寄主植物の病徴の進展に影響を与える (Larty et al., 1998; Mahajan 1998; Hämäläinen et al., 2000) ことが解明されている。

本研究では慣行のアールスメロン栽培にならって調査葉の最上位にあたる第 25 位葉直上の頂芽摘心をおこなったが、この葉位葉は他の葉位葉と比べて、病徴の進展およびウイルス量の増加が急速に進んだのは、頂芽摘心により植物体上部に移行するはずのウイルス粒子が第 25 位葉の葉柄部に蓄積されたためと考えられる。

本研究では圃場に生育する CCYV 感染メロンのほぼ全生育ステージで病徴およびステージ毎の上から下位葉毎のウイルス濃度について詳細に把握できた。これらはメロンの栽培体系の中に CCYV 感染予防策を組み入れる上で重要な知見となると考えられる。

例えば、CCYV に感染したメロン幼苗は定植直後にはほとんど病徴を呈していないが、ウイルスは検出され、その数週間後には葉の病徴度は最高値には達していないもののウイルス濃度は最高値に達することが明らかとなった。また、数棟離れたビニールハウスに对照区としてメロン栽培をおこなったが、それらには CCYV による病害は発生しなかった。このことから、CCYV 感染幼苗を定植圃場に持ち込まないことがこの病害防除の大前提であり、圃場に定植される前の幼苗に何らかの合理的かつ経済的なウイルス検出手法を用いることが望まれる。

CCYV の属するクリニウイルスについてタバココナジラミのウイルス獲得や媒介に関するいくつかの研究がなされていて、クリニウイルスのタイプウイルスでレタスだけでなく 15 科 46 種の広範囲の寄主をもつ *Lettuce Infection Yellow virus* (LIYV) や CCYV の近縁種の CYSDV では、感染寄主植物を 24 時間吸汁したタバココナジラミの 80% 以上がウイルス媒介可能な個体となることが明らかにされている (Duffus et al., 1986; Celix et al., 1996) . しか

し, Duffus et al. (1986) や Celix et al. (1996) のウイルス媒介実験は, 十分に病徴を呈した感染寄主植物の葉からウイルスを獲得させたタバココナジラミを用いて媒介能力を調査したものであるため, 無病徴感染植物を吸汁したタバココナジラミの媒介率については知見が十分でない.

今回の調査でタバココナジラミ体内ウイルス濃度は, 吸汁した感染寄主植物のウイルス濃度に同調的であることが明らかになった.

今後は, CCYV 感染寄主は明らかな病徴を呈する前に感染寄主体内のウイルス濃度は高濃度になっていることと, タバココナジラミ体内ウイルス濃度は, 吸汁した感染寄主植物のウイルス濃度に同調的であることの2点の知見をふまえて, CCYV 感染寄主植物のウイルス量とそれを吸汁したタバココナジラミのウイルス獲得量およびウイルス媒介率の相互関係を解明することが重要であると考えられる.

前述の通り, CCYV の属するクリニウイルスは, タバココナジラミによって半永続的に伝搬されることが知られている (Wisler et al. 1998) . LIYV に感染した寄主植物を十分に吸汁したタバココナジラミは約7日間ウイルスの感染能力を保持し (Duffus et al., 1986) , CYSDV を十分に吸汁したタバココナジラミは, 約10日感染能力を保持する (Celix al., 1996) が, それらは時間の経過とともに徐々に低下する. 本研究の調査では CCYV を吸汁したタバココナジラミのウイルス媒介保持能力を確かめるものではなく, CCYV を吸汁したタバココナジラミが, その体内にウイルスを保持する量と期間について定量 PCR を用いて調査したもので, 前述の知見と単純に比較することはできないが, タバココナジラミ体内のウイルス相対濃度の平均値は14日間で約1/100に低下していることから, 前述の感染保持能力の調査と同様の傾向があると考えられる. タバココナジラミ体内のウイルス量はその後のウイルス媒介効率に影響を及ぼすことが予想されるが, 感染寄主植物の吸汁から一定期間経過したタバ

コナジラミの体内ウイルス濃度とウイルス媒介率を比較することは今後の課題である。

本研究で吸汁からの期間が同じタバココナジラミ個体群（ウイルス獲得7日後）であっても、個々の体内ウイルス濃度は約1000倍もの差があること(図 I-1-14)が明らかになった。これらは、タバココナジラミ体内のウイルス濃度の低下速度に個体間差があるのか、あるいは、単に最初の吸汁量に差があるのかは不明であるが、ウイルスを媒介する個体が減少する事実(Wisler et al., 1998; Duffus et al., 1986; Celix et al., 1996)とよく一致しているように思われる。タバココナジラミ体内のウイルス濃度と植物への感染との関係を解析することが今後の課題である。

タバココナジラミの飛翔行動について、Blackmer et al. (1993a, b) によって飛翔開始が誘引される時間帯や気温、照度について、ガラスハウス内で多くの実験が行われ、特に、温度の上昇は飛翔開始に有意に($R^2=0.75$)影響し、 20°C 以下で飛翔開始する個体はほとんど存在しないが、気温の上昇にともない多くの個体が飛翔し始めることが分かっている。またそれらについて成虫日齢また雌雄間差異や寄主植物の質の優劣がタバココナジラミの飛翔開始に与える影響なども調査研究され、寄主植物の条件が悪い(萎れている)とタバココナジラミの多くの個体が飛翔を開始することが分かっている(Blackmer et al., 1993a, b)。

本研究は冬期の加温ビニールハウスを使用したもので、夜温は 10°C 以下に低下するものの、飛翔開始が誘引される朝日のあたる時間帯(8:30から10:00)にはハウス内温度は 20°C 以上になり(図 I-1-15)、タバココナジラミの飛翔開始は十分に誘起されたと考えられる。また、タバココナジラミをビニールハウス内に放飼する際に寄主植物であるキャベツ苗の根元を折って枯らしているので、その点でも十分にタバココナジラミの飛翔開始を誘引されたと考えられる。本研究で、タバココナジラミは寄主植物が存在しない環境下で9日間ほど

生存し、30mほどの距離を移動した個体が存在した。タバココナジラミ成虫の寿命は、寄主植物などの条件によって異なる（Powell and Bellows, 1992）が、今回の調査結果はビニールハウス内に作物が栽培されている寄主植物が十分に存在する環境下では、タバココナジラミが侵入した際には容易にハウス内の隅々へタバココナジラミおよびウイルスの拡散が起これることが示唆された。

本研究で、CCYV感染植物のウイルス濃度、それを吸汁した媒介虫体内のウイルス濃度およびウイルス保毒期間、保毒虫の移動能力といったウイルスの拡散モデルを構築するための基礎的な知見が得られた。今後は、保毒虫のウイルス媒介効率やタバココナジラミの中長距離の移動などを把握することで、精度の高いウイルス拡散モデルを構築し、これまでに確立されているタバココナジラミの防除法と組み合わせることで、ウイルス病害の効率的な蔓延防止策を提案できると考えられる。

第2節 CCYV 抵抗性メロン苗の選抜試験

材料と方法

1) 供試メロン苗とウイルスの接種

メロン苗の CCYV 抵抗性評価には, 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所が保有するインド, パキスタン, バングラデシュにおいて採集したメロン遺伝資源53系統を用いた. また, 対照区としてのメロン苗はアールセイヌを用いた. 1系統あたり4粒の種子を1ポット(直径4cm)に1粒ずつ播種し, 成葉1~2葉期に生長した苗を第1節2)に示したウイルス接種ケージ内に設置し, 第1節2)と同様の方法でウイルス感染を促した(図 I-1-2-a, b, c).

2) CCYV 病徴評価及び感染の確認

ウイルス接種後, 接種ケージの外にメロン苗を移動させ, 第1節2)の方法でメロン苗上に CCYV 保毒タバココナジラミが残存しないようにした. それら評価対象苗をプラスチックポット(高さ18cm 直径12cm)に移植し, 成葉が10~12枚展開する25~30日間, ガラスケースの中で生育させた. 1回の試験で4~5系統の評価を行い, そのつど対照メロン品種であるアールセイヌを同様の方法で用意した.

上記の評価対象53系統およびアールセイヌの病徴の評価方法は, 行徳ら(2010) [(第1節6), 図 I-1-8]に従い評価対象苗の全葉を0から4で評価した. それらの評価をもとに1植物体の病徴程度(病徴度 D)を以下の式 $D = \Sigma (d_i) / n$ (D : 病徴度, d_i : 0~4に区分される病徴程度, n : 評価対象となった葉の枚数)に従って算出した. 前述の通り, 試験は数回に分けて行なわれたので, 対照品種アールセイヌの平均病徴度は0.89から2.02となった. そこで, 別々におこなった試験も病徴度を相対的に比較するために評価対象苗ごとに相対病徴度 (R) を以下の式 $R=100D/D_a$ (D_a : 同時におこなったアールセイヌ3

個体の平均病徴度)に従って算出し, 評価対象系統の平均相対病徴度を算出した. なお, 系統当たり 1 から 3 株を供試した.

評価対象苗が CCYV に感染しているかを確認するために, 評価対象苗の接種葉 (第 1~2 成葉) と上位葉 (第 10~12 成葉) を採取し, 生検トレパン (直径 6mm) で 3 カ所打ち抜き, 第 1 節 3) の方法で全 RNA を抽出し-80°C で保存した (図 I-1-3) .

評価対象メロン系統の接種葉と上位葉から抽出した全 RNA を鋳型として, 第 1 節 4) と同様の方法 (図 I-1-5) で得られた PCR 増幅産物を 0.5%アガロースゲルで電気泳動し, 泳動後の増幅産物をエチジウムブロマイドで染色し, 紫外線照射下で 450bp の DNA 増幅産物を確認することで CCYV 感染を確認とした.

上述の方法ですべての系統を調査したところ, 極めて平均相対病徴度が低い (<50) 9 系統

(JP138317, JP138332, JP132605, JP216154, JP128891, JP129312, JP216751, JP91204, JP216155) が確認されたので, 再度, それらの調査個体数を 3~6 に増やし, 対照品種アールセイヌとして同様の調査を行った.

3) CCYV 濃度の定量

前述の調査から平均病徴度が 0.25 以下で特に CCYV 抵抗性系統として期待される 5 系統 (JP138332, JP216154, JP216155, JP216751, JP91204) について, CCYV 感染後のウイルス濃度を確かめるためにウイルスの定量を以下の方法でおこなった.

第 1 節 2) と同様の方法で上記の 5 系統および対照品種としてアールセイヌに CCYV 接種し, それら苗を直径 12cm のプラスチックポットに移植し, 3 週間後に接種葉 (第 1~2 成葉) と上位葉 (第 5~6 成葉) を, 6 週間後に上位葉 (第 8~10 成葉) を生検トレパン (直径 6mm) で 3 カ所打ち抜き, 葉片から第

1 節 3)の方法で全 RNA を抽出した. それらの CCYV の相対濃度を第 1 節 5) と同様の方法 (図 I-1-6) で測定した.

4) タバココナジラミの選好性試験

タバココナジラミがある系統・品種に対して選好性を持ち, 選択的にそれらを吸汁するとしたら, その系統・品種の CCYV の感染率も高くなる可能性がある. そこで, CCYV 抵抗性が期待できる JP138332, JP216154, JP216751 と対照品種アールセイヌについて, 以下のようにタバココナジラミを放飼する方法で2通りの選好性試験をおこなった. 一つはそれぞれの系統・品種について3個体の第2から3成葉の苗を用意し, それらを前述のウイルス接種ケージの床に完全無作為法に基づいて設置した (広空間放飼区). もう一つは1辺90cmの開閉可能なプラスチックケースの中に, 上述の試験と同様に用意した苗を設置し, 300頭のタバココナジラミを放飼した. プラスチックケースは25°C14Lの恒温機の中に設置した (狭空間放飼区).

どちらの試験とも, 試験開始から7日目にそれぞれの苗の第2成葉上にいるタバココナジラミ個体数を調査した. またそれらの葉の葉面積を算出しタバココナジラミ個体数密度を明らかにするために, それぞれの苗の第2成葉の縦横の長さを測り, Panta1 and NeSmith (1995) のモデル式 ($A = -2.47 + 0.86(L+W)$ A: 葉面積, L: 葉の縦長, W: 葉の横長) にあてはめた.

5) 統計解析

CCYV 濃度と選好性試験の結果の解析は Mac OSX (Graph Pad Software, CA, USA) の Prism 5 を用いて一元配値分散分析をおこない, Dunnett の多重比較法 (Dunnett, 1955; 1964) で平均値を比較した.

結果

1) メロン遺伝資源系統の CCYV 感染と病徴程度

CCYV に感染したメロン葉は退緑小斑点や黄化といった症状が観察され、病徴の激しさは系統によってかなり異なったが、病徴が観られた全ての苗で、その病徴程度は上位葉より下位葉が激しくなり第 1 節 1) と同様の傾向が観察された。供試苗それぞれの病徴度 (D) を算出し、メロン遺伝資源 53 系統および対照品種アールセイヌの平均病徴度 (Da) は 0 から 3.92 になった (表 I-2-1)。前述した通りアールセイヌは数回に分けて試験し、その平均病徴度は 0.72 から 2.02 となり、それらをもとに算出したメロン遺伝資源 53 系統の平均相対病徴度 (Ra) は 0 から 406 となった。

CCYV の病徴が全く観察されなかった JP138317 と JP138332 はそれらの上位葉において RT-PCR による CCYV 特異的配列の増幅は観察されず、JP216154, JP128891, JP129312, JP216751, JP91204 の病徴の程度はごく僅かであったが、接種 (下位) および上位葉において CCYV の増幅が観察された (表 I-2-1)。

遺伝資源メロン 53 系統の平均相対病徴度を原産国別にプロットをとったものを図 I-2-1 に示した。インド原産の系統は病徴度が高低全体に分散しているが、バングラデシュおよびパキスタン原産の系統はインドに比べ低い病徴度を示すことが明らかになった。

平均相対病徴度が 50 以下だった 9 系統で再試験をおこなった結果を表 I-2-2 に示した。JP138332 は初回の試験と比べて高めの相対病徴度 (78.7) を示したが、発芽した 8 系統すべてで対照品種アールセイヌの病徴度 (1.72) より低い値を示した。また、本研究でも JP21154 と JP216751 は病徴をほとんど示さなかった。最初の試験では CCYV 特異的遺伝子の増幅が確認されなかった JP138332 と JP138317 で、JP138332 では供試 6 個体中 2 個体、JP138317 の供試個体すべてで CCYV 特異的遺伝子の増幅が確認された。このように RT-PCR の試

験で程度に差はあるがすべての遺伝資源系統についてCCYVへの感受性があることが明らかになった。

なお, JP128891 は初回の試験で平均相対病徴度が0だったが, この試験では発芽しなかった。

表 I-2-1. CCYV を接種した 53 メロン系統の病徴程度と CCYV 感染性.

JP 番号 ^a	系統名	平均病徴 度 (D/n)	相対平均 病徴度 (R)	CCYV 検出の有無 ^b		原産国
				接種葉	上位葉	
138317	No. 82	0	-	0/3	0/3	PAK
138332	I-10	0	-	0/3	0/3	BAN
216154	Unknown	0	0	2/3	3/3	BAN
128891	Joydebpu1	0	0	1/3	1/3	BAN
129312	Mara Madhu	0	0	0/2	1/3	IND
216751	Pak-6	0	0	2/2	2/2	PAK
91204	MR-1	0	0	0/2	1/2	IND
216155	Unknown	0.23	49	2/3	2/3	BAN
132605	Bangladsh melon	0.26	22	2/2	2/2	BAN
128889	Round melon	0.55	68	2/3	2/3	BAN
216900	I-18	0.83	69	3/3	3/3	IND
128890	Long Melon	0.86	71	3/3	2/3	BAN
216750	Pak-4	0.93	64	3/3	3/3	PAK
216893	Cu-23-2	1.03	83	3/3	2/3	IND
216526	ArkaJeet	1.21	168	2/2	2/2	IND
138596	Bangla Yasei melon 2	1.30	89	3/3	3/3	BAN
216878	B-3	1.34	66	3/3	3/3	BAN
128989	C6-10	1.44	72	3/3	3/3	BAN
129004	C5-4	1.48	74	3/3	2/3	BAN
216879	B-4	1.53	76	3/3	3/3	BAN
129000	C5-5	1.59	80	3/3	3/3	BAN
230874	B-17	1.66	82	3/3	3/3	BAN
128999	C7-3	1.70	86	3/3	3/3	BAN
230875	B-18	1.70	84	3/3	3/3	BAN
216903	I-23	1.70	101	2/3	2/3	IND
216906	I-33	1.70	112	1/1	1/1	IND
216899	I-4	1.71	138	1/3	3/3	IND

続く

表 I-2-1. (続き) .

JP 番号 ^a	系統名	平均病徴 度 (D/n)	相対平均 病徴度 (R)	CCYV 検出の有無 ^b		原産国
				接種葉	上位葉	
128998	C6-5	1.73	87	3/3	3/3	BAN
216876	B-2	1.73	87	3/3	3/3	BAN
216713	Ban-3	1.75	88	3/3	3/3	BAN
129001	C5-3	1.75	88	3/3	3/3	BAN
216886	B-11	1.82	112	1/1	1/1	BAN
216896	Cu-26	1.87	151	2/2	2/2	IND
128888	Unknown	1.89	156	3/3	3/3	BAN
216875	B-1	1.90	96	3/3	3/3	BAN
216905	I-30	1.96	143	0/3	0/3	IND
216897	Cu-38	2.03	164	3/3	3/3	IND
216880	B-5	2.05	101	3/3	3/3	BAN
132606	Bargi	2.11	174	2/3	3/3	BAN

^aJP 番号は農業生物資源ジェンバンクに準じた.

^bRT-PCR により CCYV 感染が確認された個体数/供試個体数.

^cPAK, パキスタン; BAN, バングラデシュ; IND, インド;

表 I -2-2. CCYV 抵抗性が期待できる 9 メロン系統の病徴度と感受性.

JP番号	平均病徴度 (D/n)	相対平均病徴度 (R)	CCYV検出の有無 ^a	
			接種葉	上位葉
216154	0.00	0	1/6	4/6
216751	0.01	0.6	0/6	4/6
216155	0.15	8.6	1/6	1/6
91204	0.17	9.8	4/4	4/4
138332	0.21	12.1	2/5	2/5
138317	0.53	30.4	6/6	6/6
129312	0.57	32.8	5/6	5/6
132605	1.37	78.7	3/3	3/3
128891 ^b	-	-	-	-
アールセイヌ	1.74	100	12/12	12/12

^aRT-PCR により CCYV 感染が確認された個体数／供試個体数

^b 今回の調査では発芽が観察されなかった.

2) 抵抗性有望系統の CCYV 濃度の定量

前述の再試験の病徴度が 0.25 以下になった 5 系統, JP138332, JP216751, JP216154, JP216155, JP91204 について, CCYV に感染した供試苗のウイルス濃度を測定するために定量 PCR の手法を用いた. 供試苗のウイルス濃度は, ウイルス接種から 3 週間後の接種葉 (第 2, 3 成葉) と上位葉 (第 6, 7 成葉) とウイルス接種から 6 週間後の上位葉 (第 9, 10 成葉) について調査した.

CCYV 特異的 RNA 量は基質のアクチン遺伝子特異的 RNA 量との相対値で表されるが, それらを CCYV に感染した対照品種アールセイヌのウイルス濃度を 1 として, それら 5 系統の CCYV 濃度の相対量を図 I-2-2, I-2-3 に示した.

ウイルス接種から 3 週間後 (図 I-2-2) , 4 系統の接種葉および上位葉の CCYV 特異的 RNA の相対量はアールセイヌのものとはほとんど違いはなかったが, JP138332 は接種 (下位) 葉, 上位葉ともに非常に低い値になった. ウイルス接種から 6 週間後 (図 I-2-3) でも, 他の系統がアールセイヌとほぼ同程度の値であるのにも関わらず, JP138332 の上位葉の CCYV 特異的 RNA の相対量はアールセイヌのもの 0.14% 程度になった.

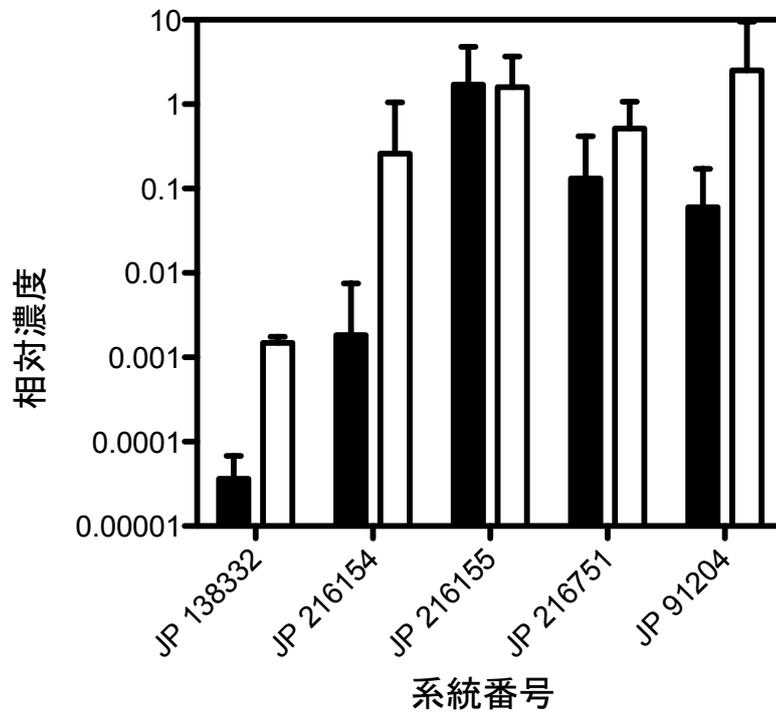


図 I -2-2. CCYV 抵抗性が期待できる 6 系統メロン苗のウイルス接種 3 週間後の葉中のウイルス相対濃度.

黒棒：ウイルス接種葉（第 2, 3 成葉），白棒：上位葉（第 6, 7 成葉），CCYV を接種した対照品種アールセイヌのウイルス濃度を 1 として、これら 5 系統の CCYV 濃度の相対量を示し、各棒上の垂直線は 95%信頼区間を示す。

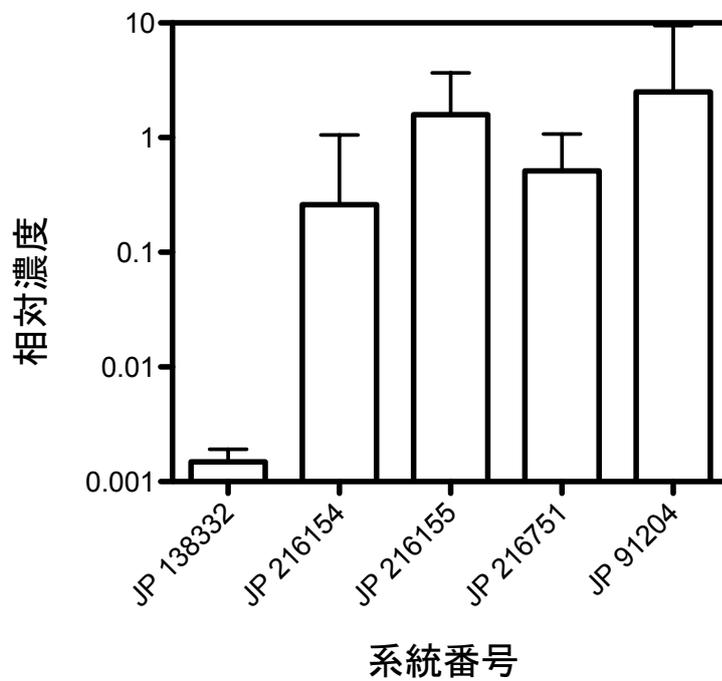


図 I -2-3. CCYV 抵抗性が期待できる 6 系統メロン苗のウイルス接種 6 週間後の葉中のウイルス相対濃度.

CCYV を接種した対照品種アールセイヌの上位葉 (第 9, 10 成葉) のウイルス濃度を 1 として, これら 5 系統 CCYV 濃度の相対量を示し, 各棒上の垂直線は 95%信頼区間を示す.

3) タバココナジラミの選好性試験

CCYV 接種用の大型ケージを用いた広空間放飼区では, JP215164 と JP216751 苗の第 2 成葉上に存在したタバココナジラミの個体数に有為差は検出されなかった ($P>0.05$) が, アールセイヌのものよりかなり少なくなった (表 I-2-3). それぞれの苗の第 2 成葉の推定葉面積はかなり異なっているので, それぞれの品種系統の推定葉面積からタバココナジラミの個体数密度を算出したところ, JP216154 のタバココナジラミの個体数密度は最も低くなり, アールセイヌが最も高くなったが, 有為差は検出されなかった ($P>0.05$). 1 辺 90cm のプラスチックケースの中に 300 頭のタバココナジラミを放飼した狭空間放飼区の実験でも上述の結果と同様の結果が得られた. 第 2 成葉上のタバココナジラミ個体数密度は 4 つの供試系統・品種間に有為差は検出されなかったが, JP216154 と 216751 の第 2 成葉上のタバココナジラミ個体数はアールセイヌより有為に低くなった ($P<0.05$).

表 I -2-3. 接種ケージ内に設置したメロン第2成葉上のタバココナジラミの平均個体数および個体数密度.

JP番号	平均葉面積 (cm ²) ^a	第2成葉上のタバココナジラミの平均個体数 ^b	タバココナジラミの平均密度 (タバココナジラミ個体数/cm ²) ^b
138332	63.3	10.00±3.46	0.16±0.047
216154	35.5	3.33±2.31	0.089±0.033
216751	26.5	2.67±3.05	0.11±0.096
アールセイヌ	86.7	20.33±13.65	0.235±0.157

^a葉面積(A)は以下の式に従って算出した。 $A = -2.47 + 0.86(L+W)$ L:葉縦長 W:葉横長.

^bDunnett の多重比較により対照品種アールセイヌと他の系統について有為差は検出されなかった。 $p > 0.05$.

表 I -2-4. 1辺90cmのプラスチックケース内に設置したメロン第2成葉上のタバココナジラミの平均個体数および個体数密度.

JP番号	平均葉面積 (cm ²) ^a	第2成葉上のタバココナジラミの平均個体数 ^b	タバココナジラミの平均密度 (タバココナジラミ個体数/cm ²) ^b
138332	87.1	11.66±6.81	0.139±0.096
216154	53.1	1.00±0.00*	0.019±0.002
216751	21.8	1.00±0.00*	0.055±0.027
アールセイヌ	101.4	13.67±6.81	0.136±0.075

^a葉面積(A)は以下の式に従って算出した。 $A = -2.47 + 0.86(L+W)$ L:葉縦長 W:葉横長.

^b*は Dunnett の多重比較により対照品種アールセイヌと他の系統について有為差は検出された。 $p < 0.05$.

考察

CCYV はタバココナジラミのバイオタイプ B または Q によって媒介されるクロステロウイルス科の新種のクリニウイルスと同定され、12 種のウリ科作物が感染することが確かめられているが、その感受性は種によって異なり、メロンやキュウリは感受性が高いが、*Cucumis anguria* や *Cucumis zeyheri* は組織的な病徴は示さず、感受性は低いことが報告されている (Okuda et al., 2010). しかし、両者ともメロンと交雑しない (Skálová et al., 2007) ことが明らかにされている。

メロンおよびキュウリ苗の病害抵抗性について、CCYV の近縁種である CYSDV や BPYV ではいくつかの有望系統の報告があり、育種素材として活用されつつある。また、CYSDV 抵抗性系統メロンの一つである TGR-1551 についてはその抵抗性因子は一つの遺伝子座によって支配されていることが報告されている (Lopez-Sese et al., 2000; Marco et al., 2003). 本研究に先立って、TGR-1551 の CCYV 接種実験をおこなったが、アールセイヌとほぼ同程度の退緑黄化の病徴を呈した。なぜ、TGR-1551 がもつ CYSDV への抵抗性機序が CCYV に対して有効に働かなかったかは不明ではあるが、この結果から CCYV と CYSDV は近縁種にもかかわらず、TGR-1551 がもつ CYSDV 抵抗性因子は CCYV の病徴程度やウイルス増殖に影響を及ぼさないことが分かる。

本研究は 53 系統のインド、パキスタン、バングラデシュ由来のメロン遺伝資源について CCYV 抵抗性について特定を試みたものである。CCYV に感染したメロン苗の病徴の程度の差は非常に大きく、典型的な病徴を呈するものから、ほとんど病徴を呈しないものまでであった。また興味深い点では、商業品種であるアールセイヌが日本国内で CCYV の深刻な被害を受けている (行徳ら, 2009) にもかかわらず、その苗の病徴程度は本研究で用いた 53 系統の中で中程度のレベルであったことである。

CCYV の感染の確認は 53 系統の全ての遺伝資源系統について RT-PCR の手法を用いて調査し、CCYV 抵抗性が有望視される系統については CCYV の増幅程度

を定量 PCR の手法 (Schaad et al., 2002; Gachon et al., 2004; Gil-Salas et al., 2007) を用いて調査した. 定量 PCR の結果は, ほとんどまたは全く病徴を呈しない 4 系統, JP216154, JP216155, JP216751, JP91204 でも CCYV 濃度は対照品種アールセイヌとほぼ同程度であることが示された. また, JP216154, JP216751, JP91204 の 3 系統はウイルス接種葉では他の系統とほぼ同程度の CCYV 濃度であるが, 上位葉ではウイルス濃度が比較的強く抑えられることが明らかになった. 一方, JP138332 の CCYV 濃度は接種から 3 週間後および 6 週間後でも他の系統に比べて著しく強く抑えられることが確認された.

植物のウイルス抵抗性とは, 抵抗性植物は病徴に関連したウイルス濃度を低減させる特性を持つと定義される. 一方, ウイルス耐性とは, ウイルス濃度が高くても顕著な病徴を呈しないことと定義されている (Fraser, 1990; Palukaitis et al., 2008). この観点から考えると JP138332 は CCYV に対して顕著な抵抗性を示し, 一方, 他の系統は CCYV に対して耐性を示すといえる.

ウイルス耐性植物ではそれらを吸汁した媒介虫によって他の植物の感染を促すことになってしまうので, 虫媒介性ウイルス病を制御する観点では, ウイルス抵抗性植物は耐性植物より有効に活用されると考えられる (Lapidot et al., 2001).

CCYV はタバココナジラミの吸汁によってのみ感染するので, 一時に多品種・系統の生物検定をおこなうことが比較的難しかった. しかし, 本研究の接種ケージシステムを用いることで, 一時におおよそ 100 から 200 苗の 90% を CCYV に感染させることが可能となった. この接種システムを用いて, JP138332 の抵抗性形質を商業品種に導入する育種プログラムが独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所において進行中である. また, 抵抗性遺伝子を商業品種に導入するにあたって, 抵抗性遺伝子の遺伝子座上の位置を特定することは重要である. Park et al. (2007) は, TGR-1551 の CYSDV 抵抗性遺伝子に関与する量的遺伝子の 8 つの RAPD マーカーを見いだした. JP138332 の

CCYV 抵抗性遺伝子に関して同様なマーカーを特定することで育種事業の飛躍的発展が期待される。

タバココナジラミはメロン系統の TGR-1551 に対して吸汁や産卵数の低下など忌避的な行動を示す (Soria et al., 1999; Aguilar et al., 2006; Lopez-Sese et al., 2000; Skálová et al., 2007)。タバココナジラミの放飼試験において, JP216154 と JP216751 はコントロールのアールセイヌより葉面積が小さいため, タバココナジラミの個体数はアールセイヌより有為になかったが, タバココナジラミ個体数密度については両方で差はなかった。JP216154 と JP216751 に観られた CCYV に対する耐性は, タバココナジラミ個体数がコントロールのアールセイヌに比べて低いことに起因していると考えられる。一方, JP138332 上のタバココナジラミ個体数および密度はアールセイヌと差はなく, JP138332 の CCYV 抵抗性は媒介虫であるタバココナジラミの選好性とは関係がないと考えられる。媒介虫タバココナジラミ選好性と CCYV 抵抗性の関係を解明することは, 本病に対するウリ科作物の抵抗性についてだけでなく, 本病の疫学的知見として重要である。

施設園芸のウイルス病を防除しようとする際に, ウイルス媒介虫への過剰な殺虫剤散布がおこなわれるときがある。その結果, ウイルス媒介虫の殺虫剤抵抗性個体群の増加を促すこともある (Horowitz et al., 2005)。このように防除の難しい虫媒介性ウイルス病の防除は, 被害を最小限に抑えるために, ウイルス抵抗性品種と媒介虫の物理的・化学的防除を組み合わせた植物病害の総合防除 (IDM) の戦略を押し進めなければならない (Pappu et al., 2009)。他の既存の病害防除戦略の中に CCYV 抵抗性メロンを導入することで, CCYV の総合的防除がいつそう進められることが期待される。

第Ⅱ章. 2種の *Frankliniella* 属アザミウマの CSNV 獲得 と伝搬

緒言

キクは、我が国では切り花としてはもっとも流通している品目のひとつであり、国内の 5,532ha で生産されている（農林水産省：統計情報：2010 年度 http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_kaki/index.html）。しかし、キクは様々な病害虫の打撃を受け、とくに *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) によるキクえそ病は多くのキク産地に被害を与えてきた (Matsuura et al., 2002)。

キク茎えそ病 (*Chrysanthemum stem necrosis virus*, CSNV) は、キクの茎および葉にえそを生じさせる新規ウイルスとしてブラジルで報告され (Bezerra et al., 1999), その後、オランダ (Verhoeven et al., 1996), イギリス (Munford et al., 2003) およびスロベニアのキク栽培でも同様の被害が認められた (Ravnikar et al., 2003)。

日本では、2006年に広島県三次市の施設栽培のキクにおいて *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) によるキクえそ病に酷似する病徴を呈した株が確認され、病徴による判別は困難であったが、RT-PCR 及び血清学的手法により CSNV であることが示された (Matsuura et al., 2007)。その後、本種は、福岡県、熊本県を含む日本各地で発生が確認されるなど発生地域が拡大している (Takeshita et al., 2011)。そのため、我が国のキクの生産にとって CSNV の発生は新たな脅威となりつつある。また、CSNV の被害はキクに留まらず、ブラジルではトマトへも被害が広がっており (Nagata et al., 1998), 日本においても、茨城県においてトマトに、富山県においてガーベラとアスター (桃井, 2011) に CSNV の感染が確認されている。

CSNV と TSWV は同じ *Bunyaviridae* 科トスポウウイルス属に属し、本属のすべてのウイルスはアザミウマ類によって伝搬される。アザミウマ類は孵化後間もない1令幼虫が感染植物を吸汁することでトスポウウイルスを獲得するが、保毒した幼虫にはウイルス媒介能力はなく、成虫になってからウイルスを媒介する。一方、無保毒の成虫が感染植物を吸汁してもウイルスを獲得することはない。1令幼虫期に獲得されたウイルスはアザミウマの発育に伴って複製・増殖しながら組織内を移行し、成虫期には唾液腺内に保たれるため、アザミウマは終生伝搬能力を保持する (de Assis Filho et al., 2004; Whitfield et al., 2005)。

日本国内の花き野菜類に特に大きな被害を与えているアザミウマ類として、*Frankliniella* 属のミカンキイロアザミウマ (*F. occidentalis*) 及びヒラズハナアザミウマ (*F. intonsa*) 並びに *Thrips* 属のミナミキイロアザミウマ (*T. palmi*) 及びネギアザミウマ (*T. tabaci*) などが挙げられる。

ミカンキイロアザミウマとヒラズハナアザミウマ は花きや野菜を広く加害し、特にキクの栽培では食害による直接的な被害だけではなく TSWV の主な媒介虫として問題視されている (Okazaki et al., 2005)。また、海外の報告では CSNV の主な媒介虫はミカンキイロアザミウマと *F. schultzei* (日本未発生) でミナミキイロアザミウマとネギアザミウマらの *Thrips* 属は CSNV を媒介しないとされている (Nagata et al., 2004)。しかし、ヒラズハナアザミウマの CSNV 媒介についての報告はまだされていない。

トスポウウイルス属のウイルスがその媒介者であるアザミウマ類に獲得、伝搬される効率が種の組み合わせにより大きく異なる背景については、ウイルスとアザミウマの相互作用が関与していることが指摘されている (Whitfield et al., 2005)。また、媒介アザミウマ類のトスポウウイルスの獲得や伝搬能力は、そのアザミウマの系統や原産地で異なることが指摘されている (van de Wetering et al., 1999b; Chatzivassiliou et al., 2002)。特に, Sakurai et al. (2002) は日本国内のミカンキイロアザミウマの TSWV の媒介効率は、その原産地によ

って6.1%から29.2%まで違いがあることを明らかにしている。また、同属ウイルスのインパチエンスえそ斑紋病の病原ウイルスであるインパチエンスネクロティックスポットウイルス (*Impatiens necrotic spot virus*, INSV) についても、日本国内のアザミウマ類5種の媒介能力を報告している (Sakurai et al., 2004)。

このようにトスポウイルス属ウイルスの媒介虫であるアザミウマ類のウイルス伝搬効率については多くの報告がなされているが、新規ウイルスであるCSNVについては未解明の部分が多く残されている。

そこで、本研究では日本国内で重要害虫とされる *Frankliniella* 属のミカンキイロアザミウマとヒラズハナアザミウマについて、ミカンキイロアザミウマ3系統とヒラズハナアザミウマ2系統のCSNVの獲得や伝搬効率について調査した。

材料と方法

1) 供試ウイルス株

本研究では2006年8月に広島県のキクから分離されたCSNVの広島株 (HiCh06A) を用いた (Matsuura et al., 2007)。-80°Cで凍結保存したHiCh06Aの局部病斑分離株を0.1Mリン酸バッファー (pH 7.0) とカーボンランダムを用いて *Datura stramonium* に汁液接種後、温室内で育成し、ウイルス獲得源として用いた。また、TSWVは福岡県のキクから分離された株 (FuTs) を同様に用いた。

2) ミカンおよびヒラズハナアザミウマの来歴と継代

本研究では、Aomori, Shimane, TsHの3系統のミカンキイロアザミウマを用いた。Aomori, Shimane系統は青森県のキクと島根県のガーベラからそれぞれ採集し、累代飼育したものを独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 (以下、農研機構) 東北農業研究センター櫻井民人博士より譲渡していただ

いた。なお, Aomori 系統と Shimane 系統の TSWV 媒介効率はそれぞれ 25.8%, 6.1% であった (Sakurai et al., 2002)。TsH は人為的に作出した TSWV を高率に媒介する系統であり, その媒介効率は 90%以上とされるものを大分県農林水産研究指導センター岡崎真一郎博士から譲渡していただいた。ヒラズハナアザミウマは, 福岡県と広島県のビニールハウス育成のガーベラからそれぞれ採集し, 累代飼育したもので, Fukuoka 系統は農研機構九州沖縄農業研究センター久留米支場(当時)柏尾具俊氏, Hiroshima 系統は広島県農業技術センター松浦昌平博士より譲渡していただいた。それぞれのアザミウマは, Murai et al. (2001) の方法を参考に, 両切りのガラス管 (直径 12cm 高さ 8cm) の底を 40 μ m mesh ナイロンゴースで覆い, 上面は伸縮性のあるプラスチックフィルム(商品名: パラフィルム, Pechiney Plastic Packaging, Inc., USA) で覆った容器内に芽だしインゲンを餌として設置し 25°C16L の恒温器内で累代飼育をおこなった (図 II-1)。

3) アザミウマの TSWV および CSNV の獲得

孵化直後のミカンキイロアザミウマとヒラズハナアザミウマ幼虫に TSWV および CSNV を汁液接種後 7~10 日間経過したダチュラ上位葉を餌として与え (図 II-2), その後, 幼虫を芽だしインゲンで成虫まで飼育し, 後述のリーフディスク検定に供試した。生物検定には羽化後 4 日以内の成虫を用いた。上記の飼育は 25°C16 時間日長に設定した恒温器内でおこなった。



図Ⅱ-1. アザミウマ類の累代飼育法.

Murai et al. (2001)の方法を参考に芽だしインゲン豆を餌にしてアザミウマを飼育する様子. アザミウマはプラスチックフィルム越しの水盤に産卵するので, 水中の卵を濾過することでろ紙上に卵を集められる. 卵から孵化したアザミウマに芽だしインゲン豆(表皮を取り除く)を与え成虫まで飼育できる.



図Ⅱ-2. アザミウマにウイルスを獲得させている様子.

ウイルスを汁液接種後 7~10 日間経過したダチュラ上位葉を孵化したばかりのアザミウマ幼虫に 5 日間吸汁させる.

4) 保毒・媒介検定

ミカンキイロアザミウマおよびヒラズハナアザミウマ成虫の CSNV および TSWV の媒介効率を調査するリーフディスク検定(Wijkamp and Peters 1993 ; 櫻井 2004)は以下の方法でおこなった.

ペチュニア (*Petunia hybrida*) (品種名 : バカラミックス) 苗の十分に展開した若い葉から生検トレパン (貝印) を用いて, 直径 6mm の葉片を打ち抜きリーフディスクとし, それを 1 枚ずつ 1.5ml のマイクロチューブに入れ, 前述の方法でウイルスを獲得させたアザミウマを 1 頭ずつマイクロチューブ内に放飼し, 24 時間そのリーフディスクを摂食させた. その後, リーフディスクのみを取り替え, さらに 24 時間アザミウマに摂食させた (図 II-3). リーフディスクは 0.1%液体肥料 (商品名 : ハイポネクス) 希釈水溶液の水面に 2 日間浮かべ (図 II-4), 病徴の進展を促した. これらはすべて 25°C16 時間日長に設定した恒温器内でおこなった.

リーフディスクは同一のアザミウマ個体に吸汁させた 2 枚を一組とし, マルチビーズショッカー (安井器械 : 日本) 専用チューブ (1.5ml / 本) に専用メタルビーズとともに入れ, 500 μ l PBST (3.2 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM KH₂PO₄, 1.3 mM KCl, 135 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4) を注ぎ, マルチビーズショッカーを用いて細かく粉砕した. また, 48 時間ペチュニアリーフディスクを吸汁させたアザミウマは 1 頭ずつ 0.5ml のマイクロチューブに捕獲し, 100 μ l PBST を注ぎ, ペッスルを用いてアザミウマを十分にすり潰した.

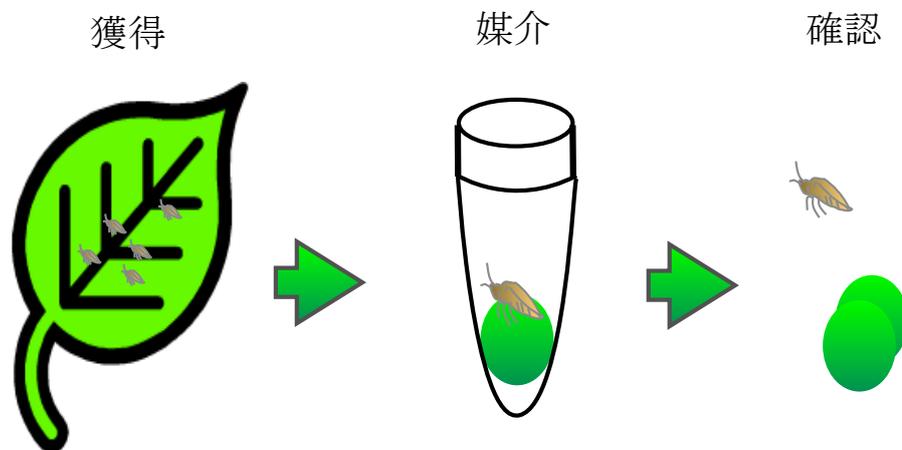
リーフディスクおよびアザミウマの懸濁液を遠心分離し, それぞれの上澄を供し抗 TSWV (日本植物防疫協会) および抗 CSNV (DSMZ) の IgG 抗体を用いた DAS-ELISA 法 (表 II-1) によってリーフディスクのウイルスの感染およびアザミウマのウイルス獲得の判定を試み, マイクロプレートリーダー 550 型

(Bio-Rad Laboratories, California, USA) の値が, 対照とした健全葉片および健全虫の 3 倍の ELISA 値を示したものを陽性とした.

それらの試験の結果をもとに、調査アザミウマ個体を、ウイルスを獲得して、媒介した個体（獲得・媒介虫）、ウイルスを獲得したが媒介しなかった個体（獲得・無媒介虫）およびウイルスを獲得せず、媒介しなかった個体（無獲得・無媒介虫）に分別した（表Ⅱ-2）。

5) 統計処理

χ^2 検定, t-検定, および分散分析は Prism 5 for macOSX (GraphPad Software 社: USA) を用いて解析した。また, 分散分析の多重比較は Tukey's multiple comparison test を採用した。

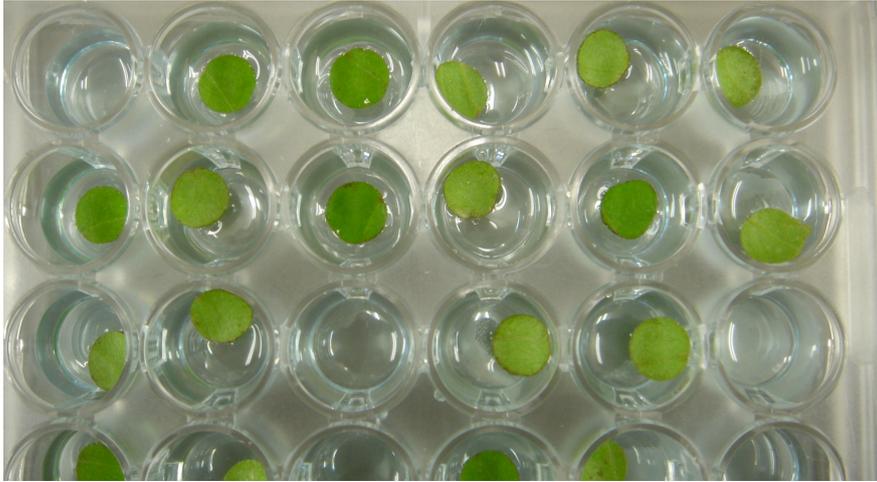


CSNV を感染させた *Datula stramonium* で孵化直後の幼虫を約5日間飼育する。その後、幼虫の餌をソラマメ芽だしに変えて成虫まで育てる。

ペチュニアリーフディスクをいれた 1.5ml チューブにアザミウマを1頭放飼して、24時間摂食させる。リーフディスクを回収し、新しいリーフディスクを投入し、24時間摂食させる。

リーフディスク2枚とアザミウマについて CSNV 抗血清(DSMZ)を用いて DAS-ELISA を行う。

図Ⅱ-3. ペチュニアリーフディスクを用いたアザミウマ類のトスポウイルス媒介と獲得の試験方法。



図Ⅱ-4. アザミウマに吸汁させたペチュニアリーフディスクにおける病徴の進展.

マイクロチューブ内でアザミウマ成虫に 24 時間摂食させた後に 0.1%液体肥料水溶液の水面に 2 日間ペチュニアリーフディスクを浮かべ、病徴を進展させた.

表 II-1. DAS-ELISA 法による TSWV および CSNV ウイルスの検出方法.

I. 試料

抗体

- ・ TSWV 日本植物防疫協会より購入.
- ・ CSNV DSMZ(ドイツ細胞バンク)より購入.

試薬

炭酸バッファー (0.05M pH9.6)

- ・ Na_2CO_3 (無水) 0.80g (0.015M)
- ・ NaHCO_3 1.47g (0.035M)

500ml の蒸留水に溶解し, 冷蔵する.

PBST (0.02M pH7.4)

- ・ NaCl 8.0g
- ・ KH_2PO_4 0.2g
- ・ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g
- ・ KCl 0.2g

1000ml の蒸留水に溶解した後, Tween20 を 0.5ml 加える.

ジエタノールアミン溶液 (0.01M pH9.8)

- ・ Diethanol amine 48.5ml
- ・ 蒸留水 400ml

よく混合し, 1N HCl (約 30ml) で pH9.8 に調整する. 蒸留水で 500ml に調整した後,

- ・ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 50mg
- ・ NaN_3 0.1g を加える.

II. 器具

- ・ マイクロタイタープレート (96 穴) (住友ベークライト MS-8696F: 日本)
- ・ マルチチャンネルマイクロピペット (20 μ l ~ 200 μ l 用)
- ・ マイクロチップ (20 μ l ~ 200 μ l 用)
- ・ マイクロプレートリーダー (吸光値測定用)
- ・ 冷蔵庫 (4~10°C, プレート保管用)

恒温器 (37°C 常温, 抗体吸着, インキュベーション用)

III. 手順

- ・ 1. コーティング液 (一次抗体) をカーボネート緩衝液で所定濃度に希釈し, マイクロプレートの各穴に 200 μ l ずつ分注する.
- ・ 2. 37°C で 3 時間または 4°C で 1 晩静置する.
- ・ 3. マイクロプレートのコーティング液を捨てる
- ・ 4. PBST を適量入れ, 捨てるという操作 (洗浄) を 4 回繰り返す (試料準備)
- ・ 5. 検定試料を 0.1g 程度とり, 10 倍量の PBST で磨砕し, マイクロチューブに入れる. この際, ネガティブコントロールとポジティブコントロールを用意し同様に処理する.
- ・ 6. 遠心分離 (10,000 rpm 1 min 程度)
- ・ 7. 上澄みを 200 μ l ずつ分注する.
- ・ 8. 37°C で 3 時間または 4°C で 1 晩静置する.
- ・ 9. マイクロプレートを PBST で 4 回 洗浄する.
- ・ 10. コンジュゲート液 (二次抗体) を PBST で所定濃度に希釈し, マイクロプレートの各穴に 200 μ l ずつ分注する.
- ・ 11. 37°C で 3 時間または 4°C で 1 晩静置する.
- ・ 12. マイクロプレートを PBST で 4 回洗浄する.
- ・ 13. P-ニトロフェニルリン酸 2 ナトリウム (基質) をジエタノールアミ

- ン 溶液 20ml に溶解する.
- . 14. 200 μ l ずつ分注する.
 - . 15. 光が入らないようにアルミホイルをかぶせ, 室温に置く.
 - . 16. 30 分後, 405 nm の吸光度値を測定する.
 - . 17. 1回目の測定で十分発色が得られていない場合は, 120分後, もう一度 405 nm の吸光度値を測定する (結果判定).

表 II-2. リーフディスクとアザミウマの ELISA 試験の結果から供試アザミウマのトスポウウイルスの獲得及び媒介の分類方法.

		アザミウマの ELISA	
		陽性 ^{a)}	陰性
リーフディス	陽性	獲得・媒介虫 (VT)	-
クの ELISA	陰性	獲得・無媒介虫 (VNT)	無獲得・無媒介虫 (NV)

^{a)} マイクロプレートリーダーの値が対照とした健全葉片および健全虫の 3 倍の ELISA 値を示したものを陽性とした.

結果

1) ミカンキイロアザミウマ 3 系統の TSWV の媒介能力

ミカンキイロアザミウマ 3 系統 (TsH, Aomori, Shimane) の個体群の CSNV 媒介能力を調査することに先立って, それら 3 系統の TSWV の媒介能力を調査したところ, 媒介虫の割合は, TsH で 96%, Aomori で 21%, Shimane で 10%であった.

2) ミカンキイロアザミウマ 3 系統の CSNV の媒介能力

表 II-3 は, 上述の 3 系統のミカンキイロアザミウマの CSNV 獲得および伝搬能力を示した. ミカンキイロアザミウマ 3 系統の CSNV 獲得個体群の割合は, TsH で 71%, Shimane で 89%, Aomori で 79% (Chi-square test, $p=0.16$) であった. また, CSNV を伝搬した個体群の割合は, TsH で 46%, Shimane で 61%, Aomori で 44% (Chi-square test, $p=0.77$) であった. 3 系統の中で特に伝搬効率が高い系統は見いだされなかった.

なお, CSNV の獲得が確認できなかったアザミウマ個体の吸汁したペチュニアリーフディスクについて, CSNV 抗体反応が陽性になるものは全く存在しなかった.

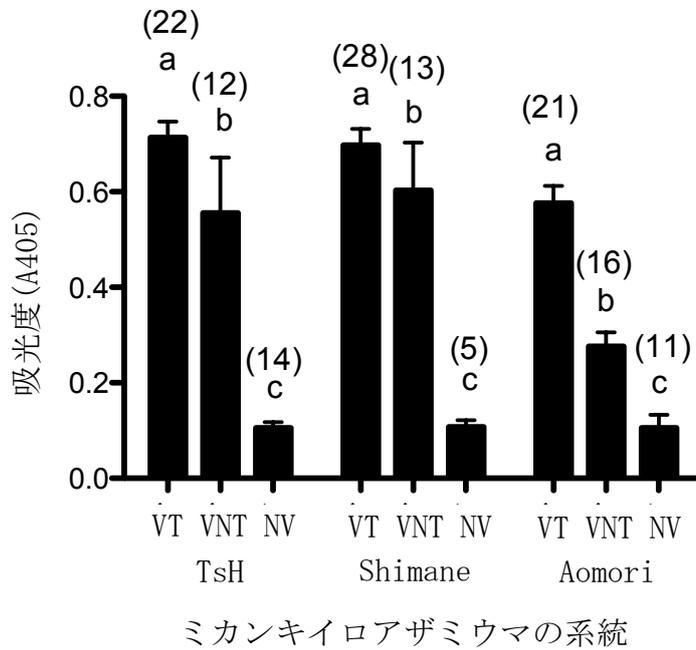
3) ミカンキイロアザミウマ 3 系統の CSNV 獲得・媒介能力と体内のウイルス量

図 II-5 は, 上述の試験で得られた, TsH, Shimane, Aomori, 3 系統のミカンキイロアザミウマ体内のウイルス量をウイルスの獲得・媒介能力別に ELISA 値で示したものである. 3 系統とも, 獲得・媒介虫 > 獲得・無媒介虫 > 無獲得・無媒介虫の順に ELISA 値は低くなり, それぞれの平均値に有為差が認められた (Tukey's multiple comparison test, $p < 0.05$).

表 II-3. 3 系統のミカンキイロアザミウマの CSNV 獲得および伝搬能力.

系統名	供試験個体数	割合 ^{a)}		
		獲得・媒介虫 (VT)	獲得・無媒介虫 (VT)	無獲得・無媒介虫 (VT)
TsH	48	46%	25%	29%
Shimane	46	61%	28%	11%
Aomori	48	44%	35%	21%

^{a)}CSNV に感染させたダチュラ葉をミカンキイロアザミウマ幼虫に 5 日間吸汁させ、図 II-3 の方法でペチュニアリーフディスクを用いてウイルスの獲得・媒介を調査し、それらを表 II-2 の通り分類した.



図Ⅱ-5. ミカンキイロアザミウマ3系統のCSNV獲得・媒介能力と体内のウイルス量.

VT:獲得・媒介虫, VNT:獲得・無媒介虫, NV:無獲得・無媒介虫でグラフ上の括弧内の数値がそれぞれの個体数を示す. エラーバーは95%信頼区間を示し, グラフ上の異なる英小文字はTukeyの多重比較で有意差 ($p < 0.05$) があることを示す.

4) ヒラズハナアザミウマ 2 系統の CSNV 媒介能力

表 II-4 に, Hiroshima および Fukuoka の 2 系統のヒラズハナアザミウマの CSNV 獲得および伝搬能力を示した. Hiroshima 系統の 65%, Fukuoka 系統の 94% の個体が CSNV の獲得に失敗し, ウイルス獲得虫は Hiroshima 系統で 35%, Fukuoka 系統で 6%にとどまった. また, CSNV の媒介に成功した個体が観察されたのは Hiroshima 系統の 2 個体のみで, Fukuoka 系統ではウイルスを媒介する個体は観察されなかった.

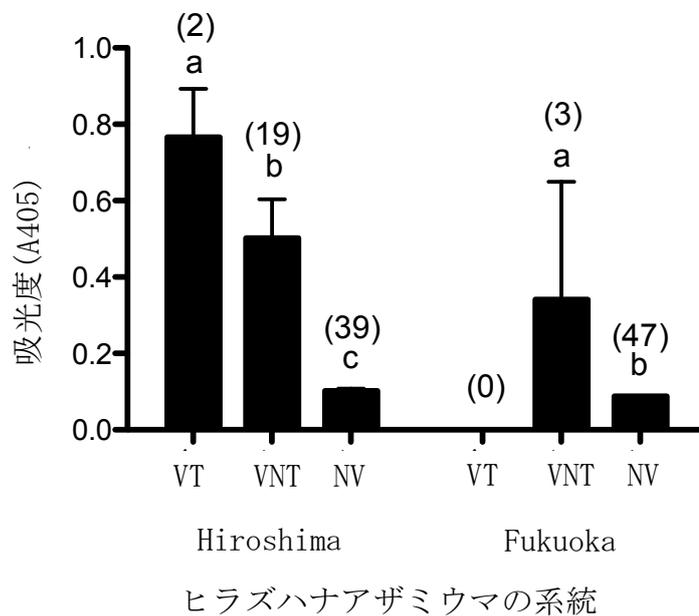
5) ヒラズハナアザミウマ 2 系統の CSNV 獲得・媒介能力と体内ウイルス量

図 II-6 は, 上述の試験で得られた, Hiroshima, Fukuoka, 2 系統のヒラズハナアザミウマ体内のウイルス量をウイルスの獲得・媒介能力別に ELISA 値で示したものである.. Hiroshima 系統の ELISA 値は獲得・媒介虫 > 獲得・無媒介虫 > 無獲得・無媒介虫の順になり, それぞれの平均値に統計的有為差が認められた (Tukey's multiple comparison test, $p < 0.05$). 上述の通り, Fukuoka 系統には媒介虫は存在しなかったが, ELISA 値は, 獲得・無媒介虫 > 無獲得・無媒介虫の順になり両者には統計的有為差が認められた (t test, $p < 0.001$).

表 II-4. 2 系統のヒラズハナアザミウマの CSNV 獲得および伝搬能力.

系統名	供試験個体数	割合 ^{a)}		
		獲得・媒介虫 (VT)	獲得・無媒介虫 (VT)	無獲得・無媒介虫 (VT)
Hiroshima	60	3%	32%	65%
Fukuoka	50	0%	6%	94%

^{a)}CSNV に感染させたダチュラ葉をヒラズハナアザミウマ幼虫に 5 日間吸汁させ, 図 II-3 の方法でペチュニアリーフディスクを用いてウイルスの獲得・媒介を調査し, それらを表 II-2 の通り分類した.



図Ⅱ-6. ヒラズハナアザミウマ2系統のCSNV獲得・媒介能力とヒラズハナアザミウマ体内ウイルス量.

VT:獲得・媒介虫, VNT:獲得・無媒介虫, NV:無獲得・無媒介虫でグラフ上の括弧内の数値がそれぞれの個体数を示す. エラーバーは95%信頼区間を示し, グラフ上の異なる英小文字はTukeyの多重比較で有意差 ($p < 0.05$) があることを示す.

6) ヒラズハナアザミウマ Hiroshima 系統の雌雄間差異

表 II-5 には, ヒラズハナアザミウマ Hiroshima 系統の CSNV 獲得および伝搬能力の雌雄間差異を示した. 雌のウイルス獲得虫の個体群の割合は雄の個体群よりわずかに高かったが, 両者に有為差はなかった (Chi-square test, $p=0.184$). 一方, ウイルス媒介虫は雌にのみに観察され雄成虫でウイルスを媒介する個体はいなかった. 図 II-7 には, 上述の CSNV 抗体反応に基づいたヒラズハナアザミウマ個体群の CSNV 獲得・媒介能力ごとにヒラズハナアザミウマ Hiroshima 系統体内の CSNV 抗体の ELISA 値を雌雄別に示した. CSNV の ELISA 値をウイルス獲得虫と無媒介虫で比較したところ雌雄間の個体群で有為差はなかった (t test, $p=0.65$).

表 II-5. ヒラズハナアザミウマ Hiroshima 系統の CSNV 獲得・伝搬能力の雌雄間差異.

雌雄	供試験個体数	割合 ^{a)}		
		獲得・媒介虫 (VT)	獲得・無媒介虫 (VT)	無獲得・無媒介虫 (VT)
♂	24	0%	25%	75%
♀	36	6%	36%	58%

^{a)}CSNV に感染させたダチュラ葉をヒラズハナアザミウマ幼虫に 5 日間吸汁させ, 図 II-3 の方法でペチュニアリーフディスクを用いてウイルスの獲得・媒介を調査し, それらを表 II-2 の通り分類した.

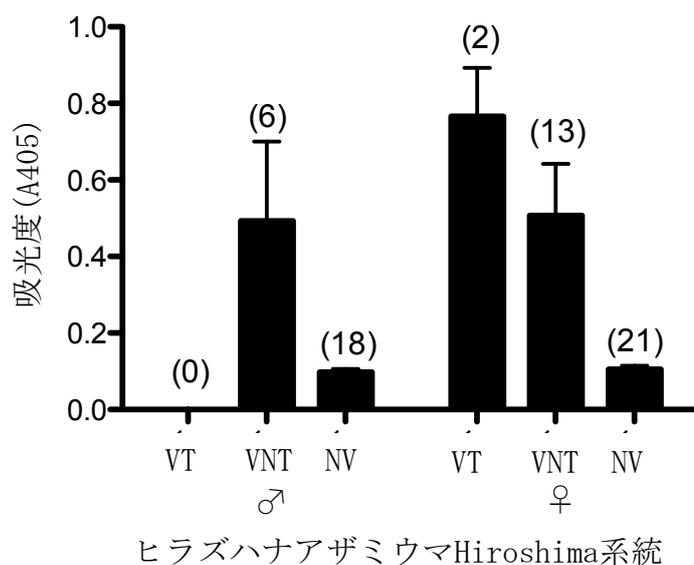


図 II-7. ヒラズハナアザミウマ Hiroshima 系統の雌雄の CSNV 獲得・媒介能力と体内のウイルス量.

VT:獲得・媒介虫, VNT:獲得・無媒介虫, NV:無獲得・無媒介虫でグラフ上の括弧内の数値がそれぞれの個体数を示す. エラーバーは 95%信頼区間を示す.

考察

本研究で用いた Aomori 及び Shimane の媒介率は櫻井ら (2002) の結果とほぼ同じ値となり, 供試した系統の TSWV の媒介能力は遺伝的にほぼ固定されていると考えられる. また, 本研究では Aomori 系統は Shimane 系統よりやや高い傾向がみられたが, 統計的有意差は認められなかった (chi-square test, $p=0.93$). TsH 系統は他の 2 系統に比べてかなり高い TSWV ウイルスの伝搬能力を持つことがあらためて確認された. それら, TSWV の媒介効率が異なる TsH, Aomori, Shimane 3 系統のミカンキイロアザミウマによる CSNV 獲得および媒介の実験から, ミカンキイロアザミウマの TSWV 媒介能力と CSNV 媒介能力には全く関連性がないことが明らかになった. TSWV と CSNV のヌクレオカプシドの (N) 遺伝子領域の相同性は 90% 以下であり, トスポウウイルスの種分類の基準において両者は別種とされている (Bezerra et al., 1999) が, TSWV と CSNV は宿主特異性や *N. benthamiana* などの指標植物に対する病徴の共通性などから近縁種であると考えられている (Bezerra et al., 1999; Takeshita et al., 2011). そのため, ミカンキイロアザミウマの TsH 系統のように TSWV ウイルスを極めて高率に獲得・媒介するように人為的に選抜された系統では, CSNV についても他の Aomori, Shimane などの系統に比べて, 高い媒介効率を示すと予想された. しかし, 今回の結果から, 地理的な由来と人為的な由来を異にするミカンキイロアザミウマ 3 系統による CSNV の獲得および媒介効率に差はなく, CSNV の媒介効率の高低は TSWV のそれとは全く無関係であることが示唆された.

また, 獲得・媒介虫, 獲得・無媒介虫または無獲得・無媒介虫に分別したそれらの ELISA 値は, TsH, Aomori, Shimane の 3 つのすべての系統で獲得・媒介虫 > 獲得・無媒介虫 > 無獲得・無媒介虫の順に並んでおり, ミカンキイロアザミウマ体内の CSNV 量を反映しているものと考えられる. これらの結果は, 他のトスポウウイルス媒介アザミウマ体内のウイルス量と同様の傾向を示している (Sakurai et al., 2004), CSNV についてもアザミウマ虫体内ウイルス量の

多少が、ウイルスの植物感染への有無を決定していると考えられる。ミカンキイロアザミウマは幼虫期間に十分に TSWV のウイルス粒子を摂食した個体のみ成虫期に TSWV を植物に媒介することが可能であるとされており (Wijkamp, 1996), 本研究においても孵化して間もない幼虫に 5 日間十分に感染植物を吸汁させ、ウイルス粒子の獲得量が媒介能力の制限要因にならないようにした。それゆえこれらの試験結果から、供試した 3 つのミカンキイロアザミウマ全系統について、CSNV が媒介され得るのに十分なウイルス量を基にして明らかにされたと言える。また、CSNV 媒介の限定要因は、ミカンキイロアザミウマそれぞれの系統がもつ TSWV 媒介能力より、ウイルス媒介をしなかった個体群のウイルス獲得量の少なさから、個々のアザミウマの CSNV の獲得量が重要であることが判明した。

トスポウイルスのゲノム構造は、分子量の異なる S RNA (約 3000 nt), M RNA (約 5000 nt) および L RNA (約 9000 nt) の 3 つの 1 本鎖 RNA 分節から成り、S RNA と M RNA はウイルス鎖とウイルス相補鎖にそれぞれ遺伝子がコードされているアンビセンス構造で、L RNA のみマイナス鎖構造である (Whitfield et al., 2005)。それらのウイルス粒子は、少なくとも 4 つの構造タンパク質、L (putative RNA polymerase), G_N および G_C (membrane glycoproteins), N (nucleocapsid) を発現させる遺伝子が L, M, および S RNA 鎖にコードされている (図 II-8)。TSWV の M RNA にコードされた G_M , G_C 遺伝子由来のグリコプロテインは媒介虫の中腸上皮細胞上の受容体に結合し、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる (Bandla et al., 1998; Medeiros et al., 2000) とされている。CSNV の伝搬機序は正確には明らかにされていないが、CSNV の G_M , G_C グリコプロテインについても媒介者体内でのウイルスの増幅を手助けする TSWV のそれと似たような役割を持つと考えられる。また、ミカンキイロアザミウマの TSWV の媒介効率については、媒介虫であるミカンキイロアザミウマ虫体内の中腸細胞内の受容

体の密度が、TSWV の媒介能力を決定づけ、TSWV 高媒介系統である TsH 系統はその中腸細胞内に多量の TSWV 受容体を保持していると考えられる。

それらの知見から、本研究で明らかになったように TsH 系統は TSWV を効率的に媒介するのに対し CSNV はさほど媒介しないという、TsH 系統の TSWV 媒介に極めて特化した性質を利用し、TSWV と CSNV それぞれの媒介虫体内の受容体の特異性を示すことができたなら、CSNV の伝搬機序の解明への一助となりうるであろう。

ミカンキイロアザミウマの生活史の中で、その体内に取り込まれた TSWV と CSNV 粒子の変動にどのような違いがあるのか報告したものがある。Nagata et al., (2004) は、TSWV および CSNV をミカンキイロアザミウマの孵化後間もない幼虫に吸汁させ、成虫になるまでの虫体内のウイルス抗体の ELISA 値を測定した。それによると、TSWV を吸汁したミカンキイロアザミウマ体内のウイルス抗体の ELISA 値は、幼虫期には高い値を示すがその後、蛹期に急激に低下し、成虫期に再び急激に増加する。一方、CSNV を吸汁したミカンキイロアザミウマ体内のウイルス抗体の ELISA 値は、幼虫期から成虫期まで高い値で保たれている。アザミウマ虫体内に取り込まれた TSWV 粒子は中腸内細胞に取り込まれ体内組織中に広がり、最終的に唾液腺周囲に集まるとされている (Nagata et al. 1999)。今後、CSNV に関しても媒介虫体内での複製や移動に関するより詳細な研究が求められる。

ヒラズハナアザミウマの TSWV の媒介効率は、日本および海外からの報告で、ほぼ 30%とされている (Wijkamp et al., 1995; Inoue et al., 2004)。本研究では、ヒラズハナアザミウマの Hiroshima 系統で CSNV の媒介に成功した個体はごく僅かで、ウイルスの獲得に成功した個体も全体の約 30%ほどであった。また、Fukuoka 系統については、ウイルス媒介虫は観察されなかった。これらの結果は、現段階ではヒラズハナアザミウマは CSNV の主な媒介者ではないことを示している。しかし、Hiroshima と Fukuoka 系統でウイルス獲得虫の割合を比べてみると、Hiroshima 系統はかなり高いことがわかり (chi-square test

$p < 0.01$), ヒラズハナアザミウマの CSNV 獲得能力には系統間差異がある可能性が指摘される. CSNV を吸汁させたヒラズハナアザミウマ Hiroshima 系統の獲得・媒介虫 > 獲得・無媒介虫 > 無獲得・無媒介虫に分別される個体群の ELISA 値は, ミカンキイロアザミウマのそれらと全く同じ傾向を示し, 一定量以上の CSNV を獲得したものがウイルス媒介虫になりうることが明らかとなった. 今後, ヒラズアザミウマの CSNV 獲得および伝搬能力の系統間差異などのさらなる研究が必要である.

ヒラズハナアザミウマの INSV 媒介について, 雄が雌よりも効率的にウイルスを媒介すると報告されている (Sakurai et al., 2004). このような伝搬能力の雌雄間差異はミカンキイロアザミウマの TSWV の媒介効率についても報告されており, TSWV 高媒介系統のミカンキイロアザミウマは, 低媒介系統のものとは比べて, 雌雄間差異は小さくなるとしている (van de Wetering et al., 1999a).

本研究では, CSNV の媒介に成功したヒラズハナアザミウマは Hiroshima 系統の雌 2 頭のみと僅かで, 雌雄間差異について論じることは難しい. しかし, 獲得・無媒介虫個体群の CSNV 量を示す ELISA 値は雌雄同等の値となっていて, ヒラズハナアザミウマの CSNV の媒介能力は性差がないことを示している.

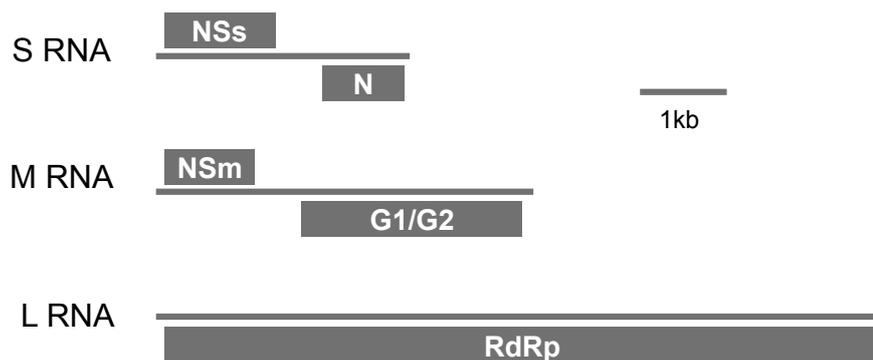
TSWV と CSNV は生物学的特性や分子系統分類的観点からも極めて近縁な種である. しかし, 今回の試験で, 世界中に分布し多種多様な施設野菜花き類を加害するミカンキイロアザミウマの体内でウイルス増幅様式に違いがあることが示された. また, 本研究でミカンキイロアザミウマが CSNV の主な媒介者であることが明らかにされた.

TSWV については, 作物圃場周囲の雑草が TSWV の伝染源および媒介虫アザミウマ類の生息域になっており (Chamberlin et al., 1992; Okazaki et al., 2007), 約 1100 種の植物が TSWV の宿主とされ (Parrella et al., 2003), TSWV に感染した植物は媒介虫であるアザミウマ類のウイルス獲得源になっている (Stobbs et al., 1992) ことが指摘されている. 一方, 新規ウイルスである CSNV

については発生地域周囲の雑草中の宿主やウイルス伝染環については未解明の部分が多い。

CSNVの主な宿主であるキクの栽培とミカンキイロアザミウマ防除の取り組みとして、ミカンキイロアザミウマ抵抗性品種の探索(de Kogel et al., 1998)や、キクの施肥方法を改良してミカンキイロアザミウマ個体群を減少させる方法(Chau et al., 2005)などが挙げられる。

これらの知見を組み合わせながら、CSNV 媒介虫の媒介様式やウイルスの伝染環を詳細に解明し、具体的な防除に役立てることが、キク栽培における効果的な CSNV 防除戦略の確立に結びつき、CSNV の拡散防止につながるであろう。



NSs: Non-structural protein

N: Nucleocapsid protein NSm: Non-structural protein

G1/G2: Glycoprotein RdRp: RNA dependent RNA polymerase

図 II-8. トスポウウイルス属ウイルスの構造

総合考察

CCYV はクロステロウイルス科クリニウイルス属に分類されるが, 日本で発生するウリ科に感染するクリニウイルス属ウイルスとしては, キュウリ黄化ウイルス (*Cucumber yellows virus* CuYV) が古くから知られている

(Yamashita, 1979). CuYV は, オンシツコナジラミ *Trialeurodes vaporariorum* によって媒介され, ウイルスゲノム解析により *Beet pseudo-yellows virus* (BPYV) と同一種であることが明らかにされている. 本種はウリ科作物のキュウリ, メロン, カボチャ, スイカに感染する他, トマト, タバコ (*Nicotiana tabacum*), ホウレンソウ, テンサイ等の多くの作物に感染する (善林, 1984). また, 日本では未発生 of クリニウイルス属ウイルスである CYSDV は地中海沿岸諸国や北アメリカで発生し, タバココナジラミのバイオタイプ A および B (主に B) によって媒介される (Wiseler et al., 1998). CYSDV の寄主範囲はウリ科植物に限定されると考えられていたが, 近年, アルファルファ, レタス, サヤインゲンといくつかの雑草に感染することが報告されている (Wintermantel et al., 2009).

クリニウイルス属ウイルスの媒介虫はコナジラミ類であるが, 日本では本州以西に, スイカズラやサツマイモ等に在来系統のタバココナジラミ (バイオタイプ JpL) が生息し (宮武, 1980), また, 沖縄などの南西諸島にこれらとは別系統のタバココナジラミ (バイオタイプ Naura) の分布が報告されている (大泰司・岡田, 1996; Lee and De Barro, 2000). これら在来のタバココナジラミは農作物で大発生することはなく農業生産上の重要害虫とはされなかった.

しかし, 1989年にタバココナジラミのバイオタイプ B が海外から侵入し, トマトなどのナス科作物を中心に減収や品質低下などの問題がおき, 1996年に *Tomato yellow leaf curl virus* (以下, TYLCV) の侵入後は, その媒介虫として深刻な問題となった. さらに, スペインを原産とするバイオタイプ Q が侵入し (Ueda and Brown, 2006), 東北地方から九州までの広い地域に分布が拡大

し、日本で確認された寄主植物は 30 科 64 種 (飯田ら, 2009) におよんでいる。なお、現在、日本国内の栽培圃場における CCYV の主な媒介種はタバココナジラミのバイオタイプ Q とされている (樋口, 2006) 。

これらのことから、CCYV は媒介虫の種やバイオタイプがウリ科作物で問題となった既知のクリニウイルス属ウイルスである BPYV や CYSDV とは異なることが明らかである。

また、海外から日本に侵入したタバココナジラミのバイオタイプは、緒言で述べた通り高度な薬剤抵抗性を有し広範囲の寄主植物をもつ難防除害虫で、農産物への被害を拡大させてきた。それ故、それらによって媒介される新規ウイルスである CCYV は、日本国内に急速に広まったと考えられ、新規ウイルスである CCYV の病害の発生生態や媒介様式についての基礎的な知見を得て、それに基づく防除策を構築することが急務である。

そこで、本研究の第 1 章 1 節では、1) ウイルスに感染した寄主植物 (メロン) の発育全ステージを通して、寄主植物の葉の発病程度とウイルス量、2) 感染寄主植物とそれを吸汁したタバココナジラミ体内のウイルス量、3) ウイルスを保毒し、寄主植物から隔離されたタバココナジラミのウイルス量の推移について調査した。また、4) ビニールハウス内でタバココナジラミの飛翔距離を調査した。

CCYV が感染したキュウリやメロンの病徴は、展開した下位葉にのみ黄化が顕著に現れ、上位葉にほとんど病徴が見られないことが最大の特徴とされた (行徳ら, 2009) 。今回の 1 節-1) のメロン発育ステージ毎の CCYV 感染メロンの発病度の調査では、下位葉から徐々に病徴が現れ、黄化が進み、中位から上位葉にも徐々に病徴が現れる様子を数値化することができた。また、CCYV に感染したメロン葉中のウイルスは、幼苗の移植から約 2 週間後のごく初期の発育ステージにおいて、葉には病徴が観察されない時点からリアルタイム PCR によって検出され、病徴程度が低い (病徴度 1 から 2) 段階で、ウイルス濃度が最高値に

達することが明らかとなった。CCYVに感染した幼苗は、病徴がわずかししか観察されないにも関わらず、高濃度のウイルスを保持し、後の生育ステージで顕著な症状を呈するといったことは疫学的観点から重要な知見である。これらの結果は本病の防除対策として、育苗期から定植直後の感染を防止し、感染苗の定植圃場への持ち込みを防ぐことの重要性を示唆している。

育苗施設へのタバココナジラミ成虫の侵入を防ぐために防虫ネットなどの物理的資材を用いることは有効な措置と考えられる。タバココナジラミ成虫の通過を80%以上阻止するためには、0.4mm以下の目合いが必要とされる(松浦, 2005; 渡邊, 2006) が、施設内の温度上昇は苗の生育へ悪影響を及ぼすので、循環扇の設置や天井部位に遮光ネットを展開するなどの対策が必要である。

また、最近、タバココナジラミバイオタイプQに効果が高いとされるジノテフラン粒剤とニテンピラム粒剤といったネオニコチノイド系の薬剤を苗の定植前に施用することでCCYVの発生を抑制できることが明らかになっている(森田ら, 2013)。

さらに、近年開発された遺伝子増幅法である Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法を用いた CCYV の検出法も開発されている(奥田, 2010)。LAMP法は定温(60~65℃)かつ短時間(60分以内)で反応をおこなえる遺伝子増幅法であり、迅速・簡易な遺伝子診断法として近年普及しつつある。上述の通り、CCYV感染苗は明らかな病徴を呈していなくても高濃度のウイルスを保持するので、LAMP法によるCCYVの検出による感染苗の判別法を確立することで、感染苗の定植圃場への持ち込み防止が期待できる。

本研究で、ウイルス感染植物を吸汁したタバココナジラミは、感染植物体内のウイルス量に応じたウイルスを獲得し、その後、徐々にウイルス量を減らしながらも、2週間ほどウイルスを体内に保持することが明らかとなった。また、寄主植物が存在しない環境下でも10日ほど生存し、施設ハウス内の最長距離を移動することも観察された。これらの結果から、一度、CCYV感染苗とタバコ

コナジラミが定植圃場に持ち込まれると容易にウイルスの蔓延が起こりうる
ことが予測される。

圃場定植後のウイルス蔓延防止策として、施設内の発病株は見つけしだい抜き取り、株に残ったタバココナジラミが飛散しないよう注意しながら、適切な処理をおこなう。上述の防虫ネットや、タバココナジラミの飛翔行動繁殖行動を阻害する光反射シート（長塚，2000）を設置する。タバココナジラミを強く誘引する黄色粘着板光反射シート（三宅ら，1991）を用いて、その個体数を推定し、市販されている天敵寄生蜂チチュウカイツヤコバチ *Eretmocerus mudus* や微生物農薬ボーベリア・バシアーナなどを上述のネオニコチノイド系薬剤の液剤とともに相互に矛盾がないように使用し、タバココナジラミの個体数を低密度に抑えるなどが挙げられる。

しかし、CCYVに感染したメロン・キュウリは発病時期が早いほど被害が大きくなる（行徳，2008；彌富・小野，2011）ので、圃場定植時のCCYV感染苗の持ち込み防止と同時期のタバココナジラミの侵入防止を徹底することを最優先課題とするべきである。また、過剰な薬剤散布による弊害を防ぐためにも、今後は、寄主植物の発育ステージが進んだ段階でのCCYVの感染性や感染後の植物の発育や収量への影響やCCYV保毒タバココナジラミのウイルス媒介効率といった調査・研究も必要であろう。

気象条件の中で風力やその向きは昆虫の拡散に影響を与えることが古くから知られていて（Glick, 1939；Johnson, 1969；Pedgley, 1982），タバココナジラミの飛翔行動や中長距離の移動拡散についてはByrne et al. (1998)によって野外調査結果を用いた拡散モデルが作成されている。アリゾナ州の調査では、タバココナジラミは南西方向に吹く季節風によって2キロメートル以上も移動することが解明されている。キュウリ・メロンのウリ科作物産地では、これらの周年栽培が行われているので、栽培終了時にハウスを密閉し作物渣を熱処理するなどの適切な処分は、ウイルスや保毒タバココナジラミの拡散防止に重要である。

ウイルス病害を回避する重要な手法として、ウイルス抵抗性品種の利用が挙げられる。緒言で述べたように、海外ではBPYVとCYSDVに抵抗性を示すキュウリやメロンが報告されている (Park et al., 2006; Eid et al., 2006) 。しかし、本研究に先立って、国内外のメロン24品種・系統のCCYVに対する感受性を調査したところ、全品種・系統の葉に本病に特徴的な退緑斑および黄化症状が認められ、CCYVが検出された (データ省略) 。そこで、本研究の第I章2節では独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所が保有するインド、パキスタン、バングラデシュにおいて採集したメロン遺伝資源53系統を調査対象とし、CCYV抵抗性遺伝資源の探索を試み、CCYVの感染に際してそのウイルス濃度を顕著に低減させるJP138332を見いだすことができた。現在、JP138332の抵抗性形質を商業品種に導入する育種プログラムが野菜茶業研究所において進行中で、これらが耐病性品種として開発され、早急にメロン栽培のCCYV防除体系の中に組み込まれることが望まれる。

主に観賞用植物であるキクでは、食害痕や病徴といった外観を損なう病害虫の被害は、経済的に大きな打撃となる。*Bunyaviridae*科トスポウイルス属であるTSWVのキクにおける被害、キクえそ病の初確認は、1936年に遡るが (Ainsworth, 1936)、日本では、1993年に静岡県のカキ栽培キクで初めて、TSWVによるキクえそ病が確認された (加藤・花田, 2000) 。その後、TSWVの主な媒介虫であるミカンキイロアザミウマの発生拡大にともなって、全国のキク産地で発生するようになった (Matsuura et al., 2002) 。また、CSNVは、キクの茎および葉にえそを生じさせる新規ウイルスとしてブラジルで報告され (Bezerra et al., 1999)、その後、日本では、2006年に広島県三次市の施設栽培のキクにおいて発生が確認され (Matsuura et al., 2007)、国内での発生地域は拡大しつつある。

虫媒介性ウイルスの総合防除を確立する上で、防除対象となるウイルスを媒介する昆虫の媒介様式や媒介効率の知見は重要であるが、前述の通り、トスポウイルスのアザミウマ類の媒介様式については詳細に研究されている (de Assis Filho et al., 2004; Whitfield et al., 2005). また、ウイルスによって媒介するアザミウマの種が異なる特異性や、アザミウマ種間でウイルスの媒介効率が異なり、同じアザミウマ種間でも、個体群間、系統間で媒介効率が異なることが知られている (van de Wetering et al., 1999b; Chatzivassiliou et al., 2002; Sakurai et al., 2002; 2004). しかし、日本で発生した CSNV について、媒介するアザミウマ種や媒介効率については未解明であった。

CSNV の日本で最初の発生地である広島県三次市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、次いでヒラズハナアザミウマが多く見られた (松浦, 2009) という報告があり、また、海外の報告の CSNV の主な媒介虫はミカンキイロアザミウマと *F. schultzei* (日本未発生) でミナミキイロアザミウマとネギアザミウマらの *Thrips* 属は CSNV を媒介しないとされている (Nagata et al., 2004). それらの知見から、本研究では、*Frankliniella* 属のミカンキイロアザミウマとヒラズハナアザミウマについて、ミカンキイロアザミウマ 3 系統とヒラズハナアザミウマ 2 系統の CSNV の獲得や伝搬効率について調査した。

TSWV と CSNV のヌクレオカプシドの (N) 遺伝子領域の相同性は 90% 以下であり、トスポウイルスの種分類の基準において両者は別種とされている (Bezerra et al., 1999) が、TSWV と CSNV は宿主特異性や *N. benthamiana* などの指標植物に対する病徴の共通性などから近縁種であると考えられている (Bezerra et al., 1999; Takeshita et al., 2011). そのため、ミカンキイロアザミウマの TsH 系統のように TSWV を極めて高率に獲得・媒介するように人為的に選抜された系統では、CSNV についても他のミカンキイロアザミウマの系統に比べて、高い媒介効率を示すと予想されたが、ミカンキイロアザミウマの系統による TSWV の媒介効率の高低は、CSNV のそれとは全く無関係であることが明らかにされ

た。また、ヒラズハナアザミウマの CSNV の媒介率は極めて低く、現段階の日本における CSNV の主な媒介虫は、ミカンキイロアザミウマであることが明らかになった。

前述の通り、アザミウマ類のトスポウイルス属ウイルスの媒介効率は同じアザミウマ種間でも、個体群間、系統間で媒介効率が異なることが知られている。岡崎ら(2005)は、大分県の TSWV 病害の多発する地域およびその周辺地域で TSWV の寄主植物であるピーマンとトルコギキョウから、ミカンキイロアザミウマを採取し、本研究と同様の媒介試験をおこなったところ、Sakurai et al. (2002) が示した日本全国から採集したミカンキイロアザミウマ 9 個体群の TSWV 媒介虫率の平均値 19.0%と比較して、極めて高い媒介効率の個体群(大分県で採集された全個体群の雌雄あわせた平均媒介率は 33.6%, 最大値は豊後大野市の光昌寺個体群の 62.0%)が生息し、また、TSWV 発生地域ではない国東市でも高媒介個体群が存在することを見いだした。

どのような要因で、アザミウマ類のトスポウイルス属ウイルスの媒介効率が、同じアザミウマ種間でも、個体群または系統間で違いが生じるかについては不明な部分が多く残されている。

CSNV の主たる媒介虫であるミカンキイロアザミウマの系統ごとの TSWV の媒介効率の高低は、CSNV のそれとは全く無関係であることが解明されたので、CSNV 病害の発生が確認された場合は発生地域およびその周辺地域の TSWV および CSNV の寄主植物、または、寄主でない植物で発生したミカンキイロアザミウマについて、TSWV および CSNV の媒介効率について調査・分析することで、その後の TSWV および CSNV の発生動向についての疫学的に重要な知見が得られるだけでなく、二つのウイルスのミカンキイロアザミウマの媒介効率を比較することで、上述の不明点を解明する手がかりが得られるかもしれない。

2章のとおり、ヒラズハナアザミウマの CSNV の媒介効率は極めて低く、松浦(2009)によると、CSNV の発生地域でヒラズハナアザミウマは、キクの開花期

の花部分に多く散見されるものの、現時点では CSNV の実質的な媒介虫ではないと予想される。しかし、本研究の Fukuoka と Hiroshima の 2 系統の CSNV 獲得率には大きな差があるので、今後、CSNV の発生地域ではヒラズハナアザミウマについても CSNV 媒介効率の調査が必要であろう。

また、ヒラズハナアザミウマはミカンキイロアザミウマに比べて発育零点が高く（片山，2006），短日条件ではミカンキイロアザミウマとは異なり生殖休眠する（村井，1988）。これら生活史形質の違いから、通常冬期から春期にかけてまずミカンキイロアザミウマが優占種となり、その後種間競争により夏期ではヒラズハナアザミウマが優占していく（片山，2006）。このため、CSNV 発生地域のヒラズハナアザミウマも発生状況によっては、CSNV 病害の伝搬に何らかの影響を及ぼすと考えられる。

トスポウイルス属ウイルスの蔓延を防止するにあたって、圃場周辺の雑草が、媒介するアザミウマ類にとって重要な越冬場所であると同時にウイルスの獲得源になっている（Cho et al., 1995; Groves et al., 2001; 片山，2006）ので、周辺雑草の防除が奨励されている。ミカンキイロアザミウマの寄主範囲は極めて広く（村井，1991），数多くの雑草種で冬期に生息が確認され、幼虫の増殖も認められている（Stewart et al., 1989; 片山，2006）。また、TSWV は約 1100 種の植物を宿主とし、その中には圃場周辺でよく見られる雑草もふくまれている（片山，2006; Okazaki et al., 2007）。しかし、新規ウイルスである CSNV については、雑草の宿主についての知見は乏しい。CSNV の伝搬環を明らかにする上で、CSNV の雑草宿主の探索は今後の最重要課題の 1 つである。

片山(2006)によって静岡県のカキ圃場での TSWV の発生とミカンキイロアザミウマ保毒虫の発生生態が調査され、実際に防除対策を講じたことから被害

許容水準以下まで減少した事例が示すように、虫媒介性ウイルスの蔓延を防止するためには、ウイルス媒介虫個体群のモニタリング手法の開発が重要である。

粘着板は、アザミウマ類やコナジラミ類を捕殺するために実際の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; Yudin et al., 1987). Zen et al. (2009)は、佐賀県のトルコギキョウ圃場において、粘着板で捕殺されたネギアザミウマから IYSV 保毒虫を検出した。また、Okazaki et al. (2011)は、黄色粘着板で捕殺され、時間経過や保管温度が異なるミカンキイロアザミウマについて、リアルタイムPCR法を用いて、TSWV 保毒の有無やウイルスの定量をおこない、圃場において保毒アザミウマの発生のモニタリング調査をする上での基礎的知見を得た。奥田ら(2010)は保毒からの時間経過が異なるタバココナジラミから LAMP 法で CCYV の検出をおこない、保毒から 14 日経過し、体内ウイルス濃度が低下したタバココナジラミからも CCYV の検出が可能であることを明らかにした。これらのように、近年、発達が目覚ましいリアルタイムPCR や LAMP 法などの遺伝子増幅法技術は、ウイルスに感染した植物宿主だけでなく、媒介虫体内のウイルスの検出や濃度測定を可能にしている。

さらに近年、虫媒介性ウイルスに感染した宿主植物が、ウイルス媒介虫の産卵数や寿命などの生活史形質や選好性に影響を及ぼすという報告がされている(Marie et al., 2004; Min et al., 2007)。TSWV に感染したピーマンと健全なピーマンとでミカンキイロアザミウマの産卵選好性を比較したところ、雌成虫は TSWV に感染したピーマンを有意に選び、産卵された幼虫の生存率も健全宿主のものより有意に高いとされる(Marie et al., 2004)。また、タバココナジラミバイオタイプ B を TbCSV に感染したタバコ上で生育させたところ、健全植物上で飼育したものより有意に産卵数が増加した(Jiu et al., 2007)。これらウイルスに感染した宿主植物と媒介虫の相互作用については、媒介虫の動態に直接の影響を及ぼすことなので、更なる研究が必要であろう。

化学合成農薬に過剰に頼りすぎた害虫防除がもたらした弊害への反省から、総合的害虫管理（IPM, Integrated pest management）の概念が提唱されている。Smith and Reinolds(1966)によれば、IPMの基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なく使用し、経済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。同様に、病害についても、Integrated disease management (IDM)の概念により病害をコントロールすることが提唱されている。

本研究で得られた結果は、CCYVおよびCSNVの防除体系を確立するにあたって、「あらゆる適切な技術を相互に矛盾なく使用する」上で重要なウイルスの発生活長モデルを構築するために最も基礎的な知見にあたりと考えられる。これらを既知の媒介虫個体群動態のデータや圃場に作付けされた作物の栽培体系に重ね合わせ、より精密な植物病害ウイルスの発生活長モデルを構築することにより、侵入害虫によってもたらされた新規ウイルスが問題となっている施設栽培作物の総合防除体系を確立することが期待できる。

要 約

CCYVに感染した植物の病徴進展と植物体内のウイルス量を把握することを目的として、CCYVを虫媒接種したメロン（品種：アールスメイト）苗を慣行栽培に従って育成し、生育初期（第3, 5葉位）、中期（第10, 15葉位）、後期（第20, 25葉位）の葉の病徴程度を観察し、定量RT-PCRを用いて葉中のCCYV由来のRNAを測定することで、病徴の進展とCCYVの動態の関係を解析した。その結果、全発育ステージの葉において、病徴が観察されない、または、わずかな病斑が観察される時からCCYVが検出され、中程度の病徴を呈するときにCCYV濃度は最高値に達し、病徴の進展にともなって、CCYV濃度は低下した。

タバココナジラミによって半永続的に媒介されるCCYVの媒介特性について知見を得ることを目的として、種々の感染ステージのCCYV感染植物体（メロン）の葉をタバココナジラミに吸汁させ、植物体およびタバココナジラミ体内のCCYV濃度を定量することで、植物体のウイルス濃度とタバココナジラミ体内のウイルス濃度を比較した。また、ウイルスを獲得したタバココナジラミを感染植物体から隔離して飼育し、その後の体内のCCYV濃度を測定した。その結果、感染植物体のウイルス濃度とそれを吸汁したタバココナジラミ体内のウイルス濃度には同調性が認められた。また、感染植物から隔離したタバココナジラミ体内のCCYV濃度は徐々に低下し、獲得から14日目のウイルス量は1日目の約1/100になった。一方、吸汁後の隔離期間が同じ個体群の中でもばらつきが認められた。

タバココナジラミの近距離の飛翔拡散能力についての知見を得ることを目的として、全長35mのビニールハウス内に6965頭のタバココナジラミを放飼し、放飼地点から一定間隔に設置した粘着シートに捕殺されるタバココナジラミの個体数を数日おきに9日間調査した。全ての回収日でタバココナジラミが捕獲され、総捕獲数は93頭で、捕獲率は放飼虫の1.3%であった。捕獲虫の65%

(60頭)は、放飼地点から5mの粘着シート上だったが、放飼9日後に33mの地点でも1頭の捕獲が確認された。

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所が保有するインド、パキスタン、バングラデシュを原産国とするメロン遺伝資源53系統について、タバココナジラミで同時に多個体のメロン苗をCCYVに感染させ、CCYVに対する感染性および病徴を調査することで、CCYV抵抗性有望系統の探索を行った。その結果、JP番号138332, 216154, 216155, 216751, 91204は、RT-PCRにおいて接種葉および上位葉からCCYVが検出されたものの病徴が比較的軽かった。この5系統について、調査苗数を増やし、同様の感染試験を行い、定量PCRでCCYV相対濃度を測定したところ、JP138332を除く全ての系統について、対照品種(アールセーナ)と同程度のCCYV相対濃度を測定した。一方、JP138332は非常に低い値を示し、育種素材として特に有望であった。

タバココナジラミの吸汁選好性が、抵抗性候補メロン系統間の感染性に影響しているかを確かめるために、JP138332, 216154, 216751と対照品種(アールセーナ)について、タバココナジラミの放飼試験を行った。JP138332上で観察されたタバココナジラミ個体数および個体数密度は、対照品種(アールセーナ)上のそれと有為差はなく、JP138332のCCYV抵抗性は媒介虫であるタバココナジラミの選好性とは関係がないことが示唆された。

ミカンキイロアザミウマによるCSNVの媒介効率の系統間差を解析するため、TSWV媒介効率の異なるミカンキイロアザミウマ3系統を用いて、CSNVの獲得・媒介試験を行った。人為選抜により作出したTSWVを高率に媒介する(媒介率90%以上)TsH系統と、TSWVの媒介効率が低いAomori, Shimane系統の1令幼虫をCSNVに感染させたダチュラ葉上でそれぞれ5日間飼育し、CSNVを十分に獲得させた後、芽出しソラマメで成虫まで飼育し、ペチュニアリーフディスクを用いた媒介検定を行った。また、それらに供試したアザミウマとペチュニアリーフディスクについて、DAS-ELISA法を用いたウイルス濃度の測定を行な

った。その結果、ミカンキイロアザミウマ3系統のTSWVの獲得・媒介効率とCSNVの獲得・媒介効率とは全く関連性がないことが示唆された。

ヒラズハナアザミウマのCSNVの獲得および媒介の可否を確かめるために、Hiroshima, Fukuokaの2系統のヒラズハナアザミウマを用いて獲得・媒介試験を行った。その結果、Hiroshima系統は、35%の成虫がCSNVを獲得したが、媒介した個体は3%だった。Fukuoka系統は、6%の成虫がCSNVを獲得したが、媒介した個体はなかった。これらの結果から、現段階ではヒラズハナアザミウマはCSNVの主要な媒介者ではないことが示唆された。ミカンキイロアザミウマとヒラズハナアザミウマ個体群のCSNV獲得・媒介能力ごとの体内のELISA値は、いずれも獲得・媒介虫>獲得・無媒介虫>無獲得・無媒介虫の順に低くなり、虫体内ウイルス量がウイルスの植物感染への有無を決定していることが示唆された。

謝 辞

本論文をとりまとめるに際して、懇切丁寧にご指導、ならびにご校閲を賜った鹿児島大学連合大学院農学研究科 岩井久教授, 大島一里教授, 津田勝男教授に対して厚くお礼申し上げます。また, 本論文の周密なるご校閲を賜りました諸見里善一教授, 草場基章准教授に心よりお礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センター大貫正俊博士, 酒井淳一博士を筆頭に, 皆様には多くのご助言を賜った。ここに厚くお礼申し上げます。

農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センター 坂田好輝博士及び野菜茶業研究所杉山充啓氏には, 南アジアのメロン系統を分譲と抵抗性系統選抜の試験設計などに多くのご助言を賜り, また, 調査にご協力いただいた。九州大学大学院農学研究科 竹下稔助教にはCCYV, メロン及びタバコナジラミのプライマーを設計していただくとともに, ウイルス定量について多くのご助言を賜った。熊本県農業研究センター 行徳裕氏には, タバコナジラミを分譲していただき, タバコナジラミの累代飼育について多くのご助言を賜った。元 農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センター久留米拠点の池田広博士および, 同拠点の大和陽一博士には久留米拠点でおこなったCCYV感染メロンの生態調査・試験において試験圃場の提供および調査にご協力いただいた。また, 久留米拠点の農業大学校実習生皆様には圃場試験にご協力いただいた。

ここに厚くお礼申し上げます。

大分県農林水産研究指導センター 岡崎真一郎博士にはミカンキイロアザミウマ (TsH 系統) を, 広島県農林水産研究センター 松浦昌平博士には, ヒラズハナアザミウマ (Hiroshima 系統) を提供していただき, CSNV 獲得伝搬の試験設計について多くのご助言を賜った。

元 農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センター久留米拠点の柏尾具俊氏には、ヒラズハナアザミウマ (Fukuoka 系統) を提供いただき、農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センター 櫻井民人博士にはミカンキイロアザミウマ (Aomori 系統及び Shimane 系統) を提供していただくとともに、アザミウマ類の累代飼育方法および実験手法についてご助言を賜った。

ここに厚くお礼申し上げます。

本研究をまとめるにあたっては、東京大学大学院理学研究科生体制御研究室 福田裕穂教授、遠藤暁詩特任助教をはじめとする研究室の皆様にも多くの便宜をはかっていただいた。

ここに厚くお礼申し上げます。

最後に本研究を進めるにあたり、様々な面で支援してくれた夫の農業・食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究センター 奥田充と息子の耕太郎に感謝する。

引用文献

Aguilar, J.M., Abad, J. and Aranda, M.A. (2006). Resistance to *Cucurbit yellow stunting disorder virus* in cucumber. *Plant Dis.* 90: 583-586.

Ainsworth, G.D. (1936). Detection of spotted wilt virus in chrysanthemums. *Nature* 137: 868.

Alonso-Prados, J.L., Luis-Arteaga, M., Alvarez, J.M., Moriones, E., Batlle, A., Lavina, A., García-Arenal, F., and Fraile, A. (2003). Epidemics of aphid-transmitted viruses in melon crops in Spain. *Eur. J. Plant Pathol.* 109: 129-138.

Bandla, M.D., Campbell, L.R., Ullman, D.E. and Sherwood, J.L. (1998). Interaction of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV) glycoproteins with a thrips midgut protein, a potential cellular receptor for TSWV. *Phytopathology* 88: 98-104.

Bezerra, I.C., Resende, R.de O., Pozzer, L., Nagata, T., Kormelink, R. and de Avila, A.C. (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.

Blackmer J.L. and Byrne D.N. (1993a). Flight behavior of *Bemisia tabaci* in a vertical flight chamber: effect of time of day, sex, age and host quality. *Physiol. Entomol.* 18: 223-232.

Blackmer J.L. and Byrne D.N. (1993b). Environmental and physiological factors influencing phototactic flight of *Bemisia tabaci*. *Physiol. Entomol.* 18: 336-342.

Boissot, N., Reynaud, B., and Letourmy, P. (1998). Temporal analysis of western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) population dynamics on Reunion Island. *Environ. Entomol.* 27: 1437-1443.

Byrne N.D., Rathman R.J., Orum T.V. and Palumbo J.C. (1996). Localized migration and dispersal by the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*. *Oecologia* 105: 320-328.

Celix, A., Lopez-Sese, A., Almarza, N., Gomez-Guillamon, M.L. and Rodriguez-Cerezo, E. (1996). Characterization of cucurbit yellow stunting disorder virus, a *Bemisia tabaci* transmitted closterovirus. *Phytopathology* 86: 1370-1376.

Chamberlin, J.R., Todd, J.W., Beshear, R.J., Culbreath, A.K. and Demski, J.W. (1992). Overwintering hosts and wingform of thrips, *Frankliniella* spp., in Georgia (Thysanoptera: Thripidae): Implications for management of spotted wilt disease. *Environ. Entomol.* 21: 121-128.

Chatzivassiliou, E.K., Peters, D. and Katis, N.I. (2002). The efficiency by which *Thrips tabaci* populations transmit *Tomato spotted wilt virus* depends on their host preference and reproductive strategy. *Phytopathology* 92: 603-609.

Chau, A., Heinz, K.M., and Davies, J.F.T. (2005). Influence of fertilization on population abundance, distribution and control of *Frankliniella occidentalis* on chrysanthemum. Entomol. Exp. Appl. 117: 27-39.

Cho, K., Eckel, C.S., Walgenbach, J.F. and Kennedy, G.G. (1995). Overwintering of thrips (Thysanoptera: Thripidae) in North Carolina. Environ. Entomol. 24: 58-67.

de Assis Filho, F.M., Deom, C.M. and Sherwood, J.L. (2004) Acquisition of *Tomato spotted wilt virus* by adults of two thrips species. Phytopathology 94: 333-336.

de Kogel, W.J., van der Hoek, M., Dik, M.T.A., van Dijken, F.R., and Mollema, C. (1998). Variation in performance of western flower thrips population on a susceptible and a partially resistant chrysanthemum cultivar. Euphytica 103: 181-186.

Duffus, J.E., Larsen, R.C. and Liu, H.Y. (1986). Lettuce infectious yellows virus - A new type of whitefly-transmitted virus. Phytopathology 76: 97-100.

Dunnnett C.W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. J. Am. Statist. Ass. 50:1096-1121.

Dunnnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20:482-491.

Eid, S., Abou-Jawdash, Y., El-Mohtar, C., Sobh, H., and Havey, M. (2006). Tolerance in cucumber to *Cucurbit yellow stunting disorder virus*. Plant Dis. 90: 645-649.

Esteva, J. and Nuez, F. (1992). Tolerance to a whitefly-transmitted virus causing muskmelon yellows disease in Spain. Theor. App. Genet. 84: 693-697.

Fraser, R. S. S. (1990). The genetics of resistance to plant viruses. Annu. Rev. Phytopathol. 28: 179-200.

Gachon, C., Mingam, A. and Charrier, B. (2004). Real-time PCR: what relevance to plant studies? J. Exp. Bot. 55: 1445-1454.

Gil-Salas, F.M., Morris, J., Colyer, A., Budge, G., Boonham, N., Cuadrado, I.M. and Janssen, D. (2007). Development of real-time PCR assays for the detection of *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV) and *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) in the whitefly vector *Bemisia tabaci*. J. Virol. Methods 146: 45-51.

Glick P.A. (1939). The distribution of insects, spiders, and mites in the air (technical bulluetin 673). pp. 1-151. US Department of Agriculture, Washington.

Gu, Q. S., Liu, Y. H., Wang, Y. H. and Huangfu, W. G. (2011). First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* in cucumber, melon, and watermelon in China. *Plant Dis.* 95: 73.

Grafton-Cardwell, E. E., Perring, T. M., Smith, R. F., Valencia, J. and Farrar, C. A. (1996). Occurrence of mosaic virus in melon in the Central Valley of California. *Plant Dis.* 80: 1092-1097.

Groves, R. L., Walgenbach, J. F., Moyer J. W. and Kennedy, G. G. (2001). Overwintering of *Frankliniella fusca* (Thysanoptera: Thripidae) on winter annual weeds infected with *Tomato spotted wilts virus* and patterns of virus movement between susceptible weed hosts. *Phytopathology* 91:891-899.

行徳 裕 (2008). メロンおよびキュウリ退緑黄化病(仮称)の発生と防除対策. *植物防疫* 62:424-426.

行徳 裕・岡崎真一郎・古田明子・衛藤友紀・溝辺真・久野公子・林田慎一・奥田 充 (2009). 新規クリニウイルスによるメロン退緑黄化病(新称)の発生. *日植病報* 75: 109.

Hämäläinen, J. H., Kekarainen, T., Gebhardt, C., Watanabe, K. N. and Valkonen, J. R. T. (2000). Recessive and dominant genes interfere with the vascular transport of *Potato virus A* in diploid potatoes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13: 402-412.

Hamed, K., Menzel, W., Dafalla, G., Gadelseed, A.M.A. and Winter, S. (2011). First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* infecting muskmelon and cucumber in Sudan. *Plant Dis.* 95: 1321.

樋口聡志(2006). 熊本県におけるタバココナジラミ バイオタイプ Q の発生状況と薬剤の殺虫効果. *今月の農業* 50:84-88.

Horowitz, A.R., Kontsedalov, S., Khasdan, V., and Ishaaya, I. (2005). Biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* and their relevance to neonicotinoid and pyriproxyfen resistance. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 58: 216-225.

Huang, L.H., Tseng, H.H., Li, J.T., and Chen, T.C. (2011). First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* infecting Cucurbits in Taiwan. *Plant Dis.* 94: 1168.

飯田博之・北村登史雄・本多健一郎・水澤靖弥・鎌田 茂・大野 徹・広瀬拓也 (2009). タバココナジラミバイオタイプ Q の寄種範囲. *関病虫研報* 51: 75-77.

Inoue, T., Sakurai, T., Murai, T. and Maeda, T. (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.

Jiu M., Zhou X.-P., Tong L., Xu J., Yang X., Wan F.-H., Liu S.-S. (2007) Vector-virus mutualism accelerates population increase of an invasive whitefly. PLoS ONE 2 e182.

Johnson, C.G. (1969). Migration and dispersal of insects by flight. Metheun, London. 766pp.

片山晴喜 (2006). ミカンキイロアザミウマ *Frankliniella occidentalis* (Pergande) の発生生態と防除に関する研究. 静岡農試特報 27:63pp.

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.

Lapidot, M., Friedmann, M., Pilowsky, M., Joseph, B.R. and Cohen, S. (2001). Effect of host plant resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) on virus acquisition and transmission by its whitefly vector. *Phytopathology* 91: 1209-1213.

Lartey, R.T., Ghoshroy, S., and Citovsky, V. (1998). Identification of an *Arabidopsis thaliana* mutation (*vsm1*) that restricts systemic movement of tobamoviruses. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11: 706-709.

Lee, M.L. and Barro P. J. D. (2000). Characterization of different biotype of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera; Aleyrodidae) in South Korea based on 16S ribosomal RNA sequences. *Korean J. Entomology* 30: 125-130.

Lopez-Sese, A. I., and Gomez-Guillamon, M. L. (2000). Resistance to *Cucurbit yellowing stunting disorder virus* (CYSDV) in *Cucumis melo* L. HortScience 35: 110-113.

Mahajan, S.K., Chisholm, S.T., Whitham, S.A., and Carrington, J.C. (1998). Identification and characterization of a locus (*RTMI*) that restricts long distance movement of tobacco etch virus in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 14: 177-186.

Maris P.C., Joosten, N.N., Goldbach, R.W., and Peters, D. (2004). *Tomato spotted wilt virus* improves host suitability for its vector *Frankliniella occidentalis*. Phytopathology 94: 706-711.

Marco, C.F., Aguilar, J.M., Abad, J., Gomez-Guillamon, M.L., and Aranada, M. A. (2003). Melon resistance to *Cucurbit yellow stunting disorder virus* is characterized by reduced virus accumulation. Phytopathology 93: 844-852.

松浦 明・田村真理子・志摩五月(2005). シルバーリーフ コナジラミに対する防虫ネットの目合いと侵入防止 効果との関係. 九病虫研会報 51:64-68

Matsuura, S., Hoshino, S., Hayashi, H., Kohguchi, T., Hagiwara, K., and Omura, T. (2002). Effects of latent infection of stock plants and abundance of thrips on the occurrence of *Tomato spotted wilt virus* in chrysanthemum fields. J. Gen. Plant Pathol. 68: 99-102.

Matsuura, S., Kubota, K., and Okuda, M. (2007). First report of *Chrysanthemum stem necrosis virus* on chrysanthemum in Japan. *Plant Dis.* 91: 468.

松浦昌平 (2009) キクに発生すると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 広島総研農セ研報 85: 70pp

Medeiros, R. B., Ullman, D. E., Sherwood, J. L., and German, T. L. (2000). Immunoprecipitation of a 50-kDa protein: a candidate receptor component for tomato spotted wilt tospovirus (*Bunyaviridae*) in its main vector, *Frankliniella occidentalis*. *Virus Res.* 67: 109-118

宮武頼夫 (1980). 日本産コナジラミ類総目録. *Rostria* 32: 291-330.

三宅律幸・加藤昌章・山下重樹 (1991). 色彩の相違によるタバココナジラミの誘因効果について. *関西病虫研報* 33:84

桃井 千巳 (2011). アスター, トルコギキョウで発生した CSNV による新病害 (茎えそ病). *植物防疫* 65: 538-541

森田茂樹・石井貴明・柳田裕紹・國丸謙二 (2013). タバココナジラミが媒介するウリ類退緑黄化ウイルスに対する数種薬剤の媒介抑制効果. *福岡農総試研報* 32. 29-32.

Mumford, R. A., Jarvis, B., Morris, J. and Blockley, A. (2003). First report of *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) in the UK. *Plant Pathol.* 53: 779.

村井保 (1988). ヒラズハナアザミウマの生態と防除に関する研究. 島根農試
研報 23: 73pp

村井保 (1991). IOBC 国際会議に出席して一特にミカンキイロアザミウマの
問題をめぐって. 植物防疫 45:117-119.

Murai, T. and Loomans, A. J. M. (2001). Evaluation of an improved method
for mass rearing of thrips and a thrips parastoid. Entomol. Exp. App.
101: 281-289.

Murai, T. (2002). The pest and vector from the East: Thrips palmi. In
R. Marullo & L. Mound (Eds.), Thrips and Tospovirus. Proceedings of the
7th international symposium on thysanoptera. pp19-32. Canberra:
Australian National Insect Collection

Nagata, T. Resende, R. de. O. Kitajima, E. W. Costa, H. Inoue-Nagata, A.
K. and Avila, A. C. de. (1998). First report of natural occurrence of
zucchini lethal chlorosis tospovirus on cucumber and chrysanthemum stem
necrosis tospovirus on tomato in Brazil. Plant Dis. 82: 1403.

Nagata, T., Inoue-Nagata, A. K., Smid, H. M., Goldbach, R., and Peters,
D. (1999). Tissue tropism related to vector competence of *Frankliniella*
occidentalis for tomato spotted wilt tospovirus. J. Gen. Virol. 80:
507-515.

Nagata, T., Almeida, A.C.L., Resende, R.O. and Avila, A. C. de (2004). The competence of four thrips species to transmit and replicate four tospoviruses. *Plant Pathol.* 53: 136-140.

長塚 久 (2000). 光反射シートによるコナジラミ類およびアザミウマ類の行動抑制. *植物防疫* 54: 359-362.

農林水産省：統計情報 2011 年度

http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_yasai/index.html (平成 26 年 1 月アクセス確認済み)

岡崎真一郎・櫻井民人 (2005). ミカンキイロアザミウマおよびヒラズハナアザミウマ大分個体群のトマト黄化えそウイルス媒介虫率. *九病虫研会報*. 51: 60-63.

Okazaki, S., Okuda, M., Komi, K., Yoshimatsu, H., and Iwanami, T. (2007). Overwintering viruliferous *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) as an infection source of *Tomato spotted wilt virus* in green pepper fields. *Plant Dis.* 91: 842-846.

Okuda, M., Okazaki, S., Yamasaki, S., Okuda, S., and Sugiyama, M. (2010). Host range and complete genome sequence of Cucurbit chlorotic yellows virus, a new member of the genus Crinivirus. *Phytopathology* 100: 560-566.

奥田充・鍛冶原寛 (2010). LAMP 法を用いたウリ類退緑黄化ウイルス検出のためのサンプル調整処理の検討. *九病虫研会報* 56: 110 (講要)

大泰司誠・岡田忠虎 (1996). タバココナジラミの防除に関する研究. 生理, 生態の解明. 農林水産技術会議事務局. 研究成果 311:8-24

Palukaitis, P. and Carr, J.P. (2008). Plant resistance responses to viruses. J. Plant Pathol. 90: 153-171.

Pappu, H.R., Jones, R.A.C. and Jain, R.K. (2009). Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. Virus Res. 141: 219-236.

Park, S.O., Crosby, K.M. and Mirkov, T.E. (2007). Detection of loci for cucurbit yellow stunting disorder virus resistance in *Cucumis melo* L. Acta Hortic. 763: 207-214.

Parrella, G., Cognalons, P., Gebre-selassie, K., Vovlas, C., and Marchoux, G. (2003). An update of the host range of *Tomato spotted virus*. J. Plant Pathol. 85: 227-264.

Pedgley D.E. (1982) Windborne and pests and diseases: meteorology of airborne organisms. Ellis Horwood, Chichester. 250pp

Powell, D.A., and Bellows, T.S. Jr. (1992a). Adult longevity and population growth rates for *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hom., Aleyrodidae) on two host plant species. J. Appl. Entomol. 113: 68-78.

Powell, D.A., and Bellows, T.S. Jr. (1992b). Preimaginal development and survival of *Bemisia tabaci* on cotton and cucumber. *Environ. Entomol.* 21: 359-363.

Rubio, L., Soong, J., Kao, J., and Falk, B.W. (1999). Geographic distribution and molecular variation of isolates of three whitefly-borne closteroviruses of cucurbits: lettuce infectious yellows virus, cucurbit yellow stunting disorder virus, and beet pseudo-yellows virus. *Phytopathology* 89: 707-711.

Ravnikar, M., Vozelj, N., Mavriè, I., Svirgelj, S.D., Zupanèiè, M. and Petroviè, N. (2003). Detection of *Chrysanthemum stem necrosis virus* and *Tomato spotted wilt virus* in chrysanthemum. Abstracts 8th International Congress of Plant Pathology ICPP, Christchurch (NZ).

Riley, D.G. and Pappu H.R. (2004). Tactics for management of thrips (Thysanoptera: Thripidae) and tomato spotted wilt virus in tomato. *J. Econ. Entomol.* 97: 1648-1658.

Sakurai, T., Inoue, T., and Murai, T. (2002). Intraspecific variation in transmission of TSWV by *Frankliniella occidentalis* results from distinct virus accumulation. *Thrips and Tospoviruses: Proceedings of the 7th International Symposium on Thysanoptera* pp. 51-57.

Sakurai, T., Inouye, T., and Tsuda, S. (2004) Distinct efficiencies of *Impatiens necrotic spot virus* transmission by five thrips vector species

(Thysanoptera: Thripidae) of tospoviruses in Japan. Appl. Entomol. Zool. 39: 71-78.

櫻井民人 (2004). トマト黄化えそウイルス媒介虫の判定精度におけるペチュニア品種間差. 北日本病虫研報. 55: 194-196.

Schaad, N.W., and Frederick, R.D. (2002). Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. Can. J. Plant Pathol. 24: 250-258.

Skálová, D., Dziechciarková, M., Lebeda, A., Navrátilová, B., and Křístková, E. (2007). Interspecific hybridization of *C. anguria* × *C. zeyheri*, *C. sativus* × *C. melo* and *C. sativus* × *C. metuliferus* with the use of embryo cultures. Acta Hortic. 731: 77-82.

Soria, C., Lopez-Sese, A. I., and Gomez-Guillamon, M. L. (1999). Resistance *Cucumis melo* against *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyroidae). Environ. Entomol. 28: 831-835.

Stapleton, J. J. and Summers, C. G. (2002). Reflective mulches for management of aphids and aphid-borne virus diseases in late season cantaloupe (*Cucumis melo* L. var. *cantalupensis*). Crop Prot. 21: 891-898.

Stewart, J. W., Cole C. and Lumms P. (1989). Winter survey of thrips (*Tysanoptera: Thripidae*) from certain suspected and confirmed hosts of tomato spotted wilt virus in South Texas. J. Entomol. Sci. 24: 392-401.

Stobbs, L.W., Broadbent, A.B., Allen, W.R. and Stirling, A. L. (1992). Transmission of tomato spotted wilt virus by the western flower thrips to weeds and native plants found in southern Ontario. *Plant Dis.* 76: 23-29.

Takeshita, M., Nagai, N., Okuda, M., Matsuura, S., Okuda, S., Furuya, N., and Tsuchiya, K. (2011). Molecular and biological characterization of *Chrysanthemum stem necrosis virus* isolates from distinct regions in Japan. *Eur. J. Plant Pathol.* 131: 9-14.

Ueda, S. and Brown, J. (2006). First report of the Q biotype of *Bemisia tabaci* in Japan by mitochondrial cytochrome oxidase sequence analysis. *Phytoparasitica* 34: 405-411.

van de Wetering, F., van der Hoek, M., Goldbach, R. and Peters, D. (1999a). Differences in tomato spotted wilt virus vector competency between males and females of *Frankliniella occidentalis*. *Entomol. Exp. Appl.* 93: 105-112.

van de Wetering, F., van der Hoek, M., Goldbach R., Mollema, C., and Peters, D. (1999b). Variation in tospovirus transmission between populations of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Bull. Entomol. Res.* 89: 579-588.

Verhoeven, J. Th. J., Roenhorst, J. W., Cortes, I., and Peters, D. (1996). Detection of a novel tospovirus in chrysanthemum. *Acta Horticult.* 432: 44-51.

渡邊丈夫 (2006). シルバーリーフコナジラミ対策の防虫ネット比較試験. 今月の農業 50: 18-21

Whitfield, A. E., Ullman, D. E. and German, T. L. (2005). Tospovirus-thrips interactions. Annu. Rev. Phytopathol. 43: 459-489.

Wijkamp, I. and Peters, D. (1993). Determination of the Median latent period of two tospoviruses in *Frankliniella occidentalis*, using a novel leaf disk assay. Phytopathology 83: 986-991.

Wijkamp, I., Almarza, N., Goldbach, R., and Peters, D. (1995). Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. Phytopathology 85: 1069-1074.

Wijkamp, I., Wetering, F., van de Goldbach, R. and Peters, D. (1996). Transmission of tomato spotted wilt virus by *Frankliniella occidentalis*; median acquisition and inoculation access period. Ann. Appl. Biol. 129: 303-313.

Wintermantel W. M., Hladky L. L., Cortez, A. A., and Natwick, E. T. (2009a). A new expanded host range of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* includes three agricultural crops. Plant Dis. 93: 685-690.

Wisler G. C., Duffus, J. E., Liu, H. Y. and Li, R. H. (1998). Ecology and Epidemiology of Whitefly-Transmitted Closteroviruses. Plant Dis. 82: 270-280.

Yamashita, S., Doi, Y., Yora, K., and Yoshino, M. (1979). *Cucumber yellows virus*: its transmission by the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), and the yellowing disease of cucumber and muskmelon caused by the virus. Ann. phytopathol. Soc. Jpn. 45: 484-496.

彌富道男・小野 誠 (2011). 抑制キュウリにおける退緑黄化病が個葉光合成と収量に与える影響. 九農研発表要旨集 72:173.

Yudin, L. S., Mitchell W.C. and Cho, J.J. (1987). Color preference of thrips (*Thysanoptera: Thripidae*) with reference to aphids (*Homoptera: Aphididae*) and leafminers in Hawaiian lettuce farms. J. Econ. Entomol. 80: 51-55.

Zen, S., Okuda, M., S. Fuji, S. and Iwanami, T. (2009). The seasonal occurrence of viruliferous onion thrips (*Thrips tabaci*) and the incidence of Iris yellow spot virus disease on *lisinanthus* (*Eustoma grandiflorum*). J. Plant Pathol. 90: 495-499.

Zeng, R., Dai, F. M. W., Chen, J. and Lu, J. P. (2011). First report of Cucurbit chlorotic yellows virus infecting melon in China. Plant Dis. 95: 354.

善林 六朗・嶋崎 豊・渋川 三郎 (1984) . キュウリ黄化病に関する研究 埼玉県園芸試験場研究報告 13. 11-40.

Summary

Symptom development of *Cucurbit chlorotic yellow virus* (CCYV)-infected melon (*Cucumis melo* var. Earl's seinu) plants and virus accumulation in the plants were analyzed throughout the growth stage. CCYV was inoculated to melon seedlings using sweet potato whitefly (*Bemisia tabaci*) biotype Q. Symptom severity was determined by visually checking the plants in the 3rd, 5th, 10th, 15th, 20th, 25th true leaf stage, and total RNA was extracted from their leaves to quantify the amount of viral RNA using quantitative RT-PCR. As the result, relative accumulation of CCYV RNA showed the highest values in undeveloped asymptomatic or slight symptomatic leaves and they decreased as their symptom developed.

In order to identify characteristics of CCYV transmission by *B. tabaci* in a semipersistent manner, correlation between virus accumulations in CCYV-infected leaves in various growth stages and those in *B. tabaci* that suck the plants were investigated. In addition, time course assay to quantify the amount of CCYV RNA in *B. tabaci* was conducted after a plenty acquisition period. As the result, virus concentrations in infected leaves and *B. tabaci* on them were well synchronized. Relative accumulation of CCYV RNA in *B. tabaci* gradually decreased after they were separated from infected plants, and in 14 days, their average values were approximately 1 percent of initial virus concentrations although the values at each sampling period were much varied among individuals.

Experiments to determine the ability of flight and diffusion of *B. tabaci* were conducted. Six thousands nine hundreds and sixty five whiteflies were released in a edge of a greenhouse (approximately 38 m in length), in which sticky traps were set at 5 m-interval from the edge,

and the numbers of whiteflies caught on the sticky traps were counted every one to three days after releasing.

Ninety-three whiteflies, which occupied 1.3% of the total released, were captured. Sixty-five percent of trapped whiteflies were observed on sticky traps set in the shortest distance (5m) from the released point; however, in 9 days after whiteflies released, one whitefly was captured on a trap, 33m away from the released point.

Fifty-three melon (*Cucumis melo*) accessions that originated from India, Pakistan and Bangladesh were evaluated for resistance to CCYV. Accessions, JP 138332, JP 216154, JP 216155, JP 216751 and JP 91204, showed no or faint symptoms, although CCYV was detected from the non-inoculated upper leaves by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The five accessions were subjected to quantitative RT-PCR to analyze relative accumulation of CCYV RNA. All accessions except JP 138332 had levels of CCYV RNA accumulation comparable to the commercial variety, 'Earl's Seine', which was used as a control. JP 138332 showed a much lower CCYV RNA accumulation. The preferences of *B. tabaci* to the five accessions were evaluated. Numbers of *B. tabaci* biotype Q on JP 138332 did not differ from 'Earl's Seine', suggesting that its resistance to CCYV was not due to preference. Consequently, five accessions are of interest for development of resistant varieties. In particular, JP 138332 possesses a promising resistant trait for CCYV, which might be associated with inhibition of virus multiplication.

The vector competence of *Frankliniella occidentalis* for *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) was evaluated. Three vector strains with distinct competences for *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) transmission were investigated, including an artificially selected strain

(TsH) that has a particularly high competence (>90%). Newly hatched larvae of *F. occidentalis* were given an acquisition access period of 5 days on CSNV-infected *Datura stramonium* leaves, and reared to maturity. Their transmission efficiencies were examined using a leaf disk assay using *Petunia x hybrida* leaves. Following the leaf disk assay, the virus accumulation in the vectors was examined via a double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay of their bodies. The results showed that the CSNV acquisition and transmission efficiency of the TsH strain did not differ from those of the others, indicating that the competence of *F. occidentalis* as a vector for CSNV is not related to that for TSWV.

The CSNV transmission and acquisition efficiencies of two *F. intonsa* strains (Hiroshima and Fukuoka) were also evaluated. In Hiroshima strain, 35 % of adults were viruliferous, but only two transmitters (3 %) were observed. In Fukuoka strain, 6 % were viruliferous, and no transmitters were observed. These results indicate that *F. intonsa* cannot be a major vector for CSNV. The accumulation of CSNV in the adults of *F. occidentalis* and *F. intonsa* evaluated using DAS-ELISA showed a significant difference in ELISA values among transmitter, viruliferous non-transmitter, and non-viruliferous individuals. These results clearly demonstrated that only transmitters that accumulated a threshold quantity of virus can transmit CSNV to plants.