

ウメ輪紋ウイルス発生地域における媒介虫ア ブラムシ類の特定

木村, 康太 / KIMURA, Kouta

(発行年 / Year)

2014-03-24

(学位授与年月日 / Date of Granted)

2014-03-24

(学位名 / Degree Name)

修士(理工学)

(学位授与機関 / Degree Grantor)

法政大学 (Hosei University)

2013 年度修士論文

指導教授 西尾 健

ウメ輪紋ウイルス発生地域における 媒介虫アブラムシ類の特定

法政大学大学院

工学研究科 生命機能学専攻 植物医科学領域

12R7205

キムラコウタ

木村康太

目次

I. 要旨	2
II. 諸言	4
III. 実験材料及び方法	7
IV. 結果	10
V. 考察	22
VI. 謝辞	24
VII. 引用文献	25

I. 要旨

ウメ輪紋ウイルス発生地域における媒介虫アブラムシ類の特定

木村康太

指導教員 西尾 健

1. 目的

サクラ属の果樹に甚大な被害をもたらすウメ輪紋ウイルス(*Plum pox virus* ; PPV)はアブラムシ類によって非永続的に媒介される。我が国においては、2009 年に東京都青梅市のウメで初めて感染が確認された[1]。本研究では、PPV 発生圃場におけるアブラムシ類の年次変動調査、PPV 陽性アブラムシ種の同定、PPV 発生地域の主要アブラムシ類によるウイルス媒介能の検証を行い、防除対策への知見を得ることを目的とした。

2. 方法

(1) サンプルング

2011 年 4 月から 2012 年 12 月にかけて現地圃場に飛来するアブラムシ類を 2 箇所(PPV 高密度発生地域:青梅市、PPV 未発生地域:立川市)の圃場に設置した黄色粘着板で毎週の誘殺数を計上した。設置期間は 2 日間とし、各地域で週当たり 50 頭を上限にアブラムシ類を採取した。

(2) PPV 陽性アブラムシ種の同定

採取したアブラムシは TRIzol を用いて 1 頭ずつ Total RNA を抽出した。抽出 RNA に含まれるアブラムシの mitochondrial cytochrome c oxidase I (COI)遺伝子領域の塩基配列からアブラムシ種を同定した。またそれらに関して、超高感度の Nested-RT-PCR 法を用いて PPV 陽性虫を検定した。得られた陽性個体数を統計解析し、月ごとの PPV 陽性虫率を算出した。

(3) PPV 媒介試験

現地圃場の調査結果から PPV 媒介虫と疑われるアブラムシ種においては PPV 感染ウメ葉で獲得吸汁後に健全ウメへ接種吸汁させ媒介能を調査した。

3. 結果

(1) アブラムシ類の年次変動と PPV 陽性虫率

黄色粘着板の誘殺数から、2011 年は青梅市、立川市ともに 5~6 月、8 月、11 月にアブラムシ類が多く発生していることが分かった。2012 年は全体的に誘殺数が減少したが、アブラムシ発生の時期的な増減傾向は 2011 年と同様であった。PPV 陽性虫の検定では、両地域においてウイルス陽性虫率は 10 月、11 月に最も高率であり、アブラムシの発生時期と必ずしも一致しなかった(図 1)。

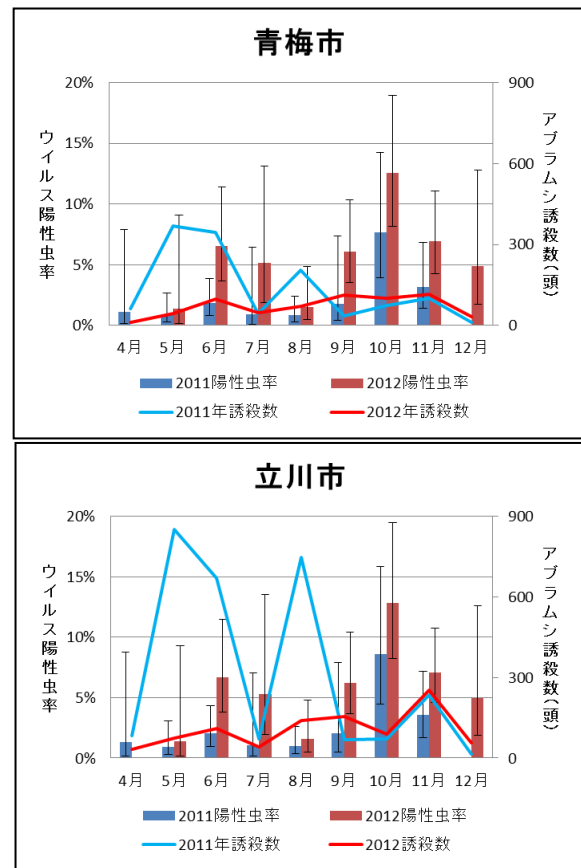


図 1 アブラムシ類の年次変動と月別ウイルス陽性虫率

線グラフ: アブラムシ誘殺数(右軸ラベル)

棒グラフ: ウイルス陽性虫率(左軸ラベル)

※2011 年 12 月と 2012 年 4 月は誘殺数が少なかったため、統計から除いた。

(2) PPV 陽性アブラムシ種の同定

COI 領域の塩基配列から、調査期間中に青梅市では 1476 頭、立川市では 1791 頭のアブラムシを同定した。両地点の主要アブラムシ種は 11 種であり、特に *Aphis craccivora* (マメアブラムシ)、*Aphis gossypii* (ワタアブラムシ)、*Aphis spiraeicola* (ユキヤナギアブラムシ)、*Tinocallis zelkowae* (ケヤキヒゲマダラアブラムシ)が多数誘殺された(表 1)。PPV 陽性虫検定では、青梅市において 55 頭、立川市において 71 頭の PPV 陽性虫を検出した。最も PPV 陽性個体数が多かった種は *A. spiraeicola* であり、両地域において 25%以上を占めた(図 2)。

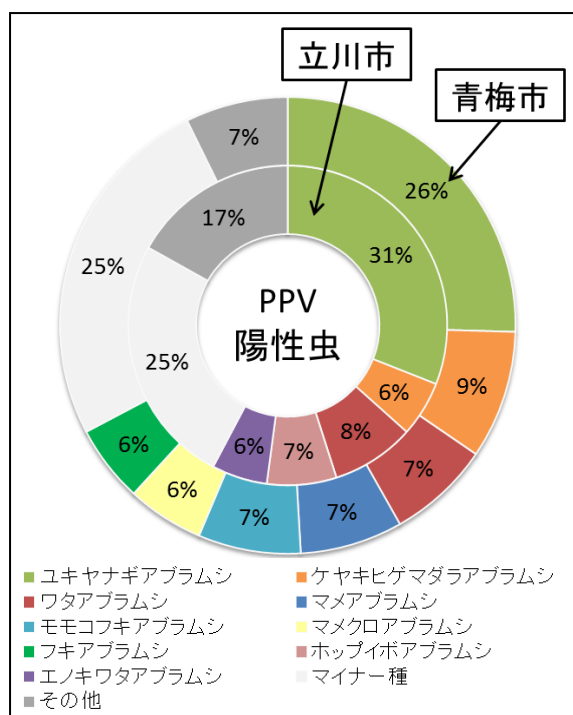


図2 調査期間中の2地域におけるPPV陽性アブラムシ種の割合

外円：青梅市陽性虫、内円：立川市陽性虫

(3) PPV 媒介試験

媒介試験では新たに *Myzus umecola*(ウメコブアブラムシ)と *Rhopalosiphum maidis*(トウモロコシアブラムシ)の媒介能が確認された。現地圃場の優占種である *A. spiraeicola*では効率的な媒介が確認できた(表2)。

表2 PPV 媒介試験による媒介能の評価

学名	和名	PPV 媒介能	発病 株数	接種 株数
<i>Aphis craccivora</i>	マメアブラムシ	○	1	19
<i>Aphis gossypii</i>	ワタアブラムシ	○	1	27
<i>Aphis spiraeicola</i>	ユキヤナギアブラムシ	○	8	61
<i>Melanaphis sacchari</i>	ヒエノアブラムシ	不明	0	15
<i>Rhopalosiphum maidis</i>	トウモロコシアブラムシ	不明	1	29
<i>Myzus umecola</i>	ウメコブアブラムシ	不明	5	41
<i>Myzus persicae</i>	モモアカアブラムシ	○	11	45

表1 調査2地域における2年間の主要なアブラムシ種

学名	和名	PPV 媒介能	誘殺数		合計	
			青梅市	立川市	頭数	%
<i>Aphis spiraeicola</i>	ユキヤナギアブラムシ	○	427	418	845	26
<i>Aphis gossypii</i>	ワタアブラムシ	○	207	199	406	12
<i>Aphis craccivora</i>	マメアブラムシ	○	111	125	236	7
<i>Tinocallis zelkowae</i>	ケヤキヒゲマダラアブラムシ	不明	64	157	221	7
<i>Shivaphis celti</i>	エノキワタアブラムシ	不明	15	167	182	5
<i>Phorodon humuli</i>	ホップイボアブラムシ	○	59	79	138	4
<i>Melanaphis sacchari</i>	ヒエノアブラムシ	不明	56	66	122	4
<i>Rhopalosiphum maidis</i>	トウモロコシアブラムシ	○	70	21	91	3
<i>R. rufiabdominalis</i>	オカボノアカアブラムシ	不明	45	35	80	2
<i>R. padi</i>	ムギクビレアブラムシ	○	32	24	56	2
<i>Lipaphis pseudobrassicae</i>	ニセダイコンアブラムシ	不明	8	55	63	2
	マイナー種		181	263	444	14
	その他(データベース該当なし)		201	182	383	12
合計			1476	1791	3267	100

4. 考察

2年間の調査から *A. spiraeicola* は両地点で最も大量に誘殺され、PPV 陽性個体も多く、媒介効率は *Myzus persicae*(モモアカアブラムシ)に次いで高かった。今回は、海外でPPVの主要媒介種とされる *M. persica* はほとんど誘殺されなかった。このことは、黄色粘着板への誘引効率にアブラムシ種間で差があることが示唆された。水盤トラップ等の他の調査方法も実施する必要があると認められた。PPV 感染拡大のリスクについてはウメの新芽が出てアブラムシ類が大量に発生する春期に加え、ウイルス陽性虫の誘殺が多くみられる秋期にも、殺虫剤を散布するといった防除対策が必要であると考えられる。

5. 謝辞

本研究を行うにあたりご指導いただいた法政大学植物病生態学研究室の鍵和田聡専任講師ならびに直接のご指導を頂いた独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究センターの津田新哉上席研究員、宇杉富雄博士に深く感謝いたします。統計的解析手法に多くのご助言を頂いた同研究員の光永貴之博士、アブラムシの同定をしていただいた宇都宮大学農学部の香川清彦助手、アブラムシサンプルの提供をしていただいた東京都農林総合研究センターの星秀男様、加藤綾奈様に深く感謝いたします。また、研究に関する助言、議論を行っていただきました独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究センター病害虫研究領域の皆様にも厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Maejima K, Hoshi H, Hashimoto M, Himeno M, Kawanishi T, Komatsu K, Yamaji Y, Hamamoto H, Namba S (2010) First report of plum pox virus infecting Japa-nese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 76: 229–231.

II. 諸言

古来からウメ(*Prunus mume* Sieb. et Zucc)の花は鑑賞用として親しまれ、水戸偕楽園や吉野梅郷など梅の名所と言われている場所には毎年多くの観光客が訪れている。またウメの果実は梅干しや梅酒に加工されるため、商業価値も高い樹木といえる。しかし近年ウメにとって脅威となり得るウメ輪紋ウイルス(*Plum pox virus*; PPV)が我が国で発見された(Maejima et al. 2010)。

1. PPV について

(1) 病徴

PPV はサクラ属の樹木に感染し、甚大な被害をもたらす植物ウイルスである。感染したウメでは葉に黄色輪紋(図 1a)や斑紋症状(図 1b)、花卉に斑が入るブレーキング症状を引き起こす。果実では未完熟果において白色輪紋や奇形が確認され、果実品質の低下が懸念されている。ウメ以外の病徴として、プラムとアンズでは果実のゆがみや果肉の褐変が発生し、商品価値を低下させる。モモでは葉の退緑斑点や輪紋や葉脈透過、果実のゆがみが発生する。またウイルスは病徴が発現するまで数か月にわたって潜在感染し、病徴部分に局在する(Hadidi et al. 1998)。

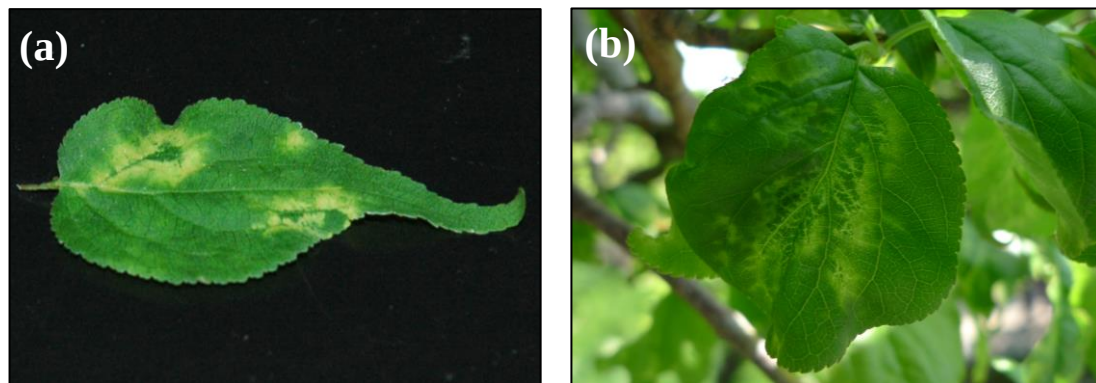


図 1. PPV に感染したウメ葉の病徴写真

(a)黄色輪紋症状 (b)斑紋症状

(2) 性状

病原ウイルスである PPV は *Potyviridae* 科 *Potyvirus* 属に分類され、長さ 660-770nm、幅 12.5-20nm のひも状粒子である(図 2a)。ウイルス粒子はプラス一本鎖 RNA ゲノム(図 3)、分子量約 37kDa の外被タンパク質(coat protein : CP)、分子量約 24KD のゲノム結合タンパク質(viral protein genome-linked : Vpg)から形成される(Fauquet et al. 2005)。粗汁液中の PPV 粒子は 52℃～55℃で 10 分間処理すると感染性を失う(與良 1983)。また粒子以外の特徴として感染葉の細胞質内に potyvirus 特有の風車状封入体が観察できる(図 2b)。

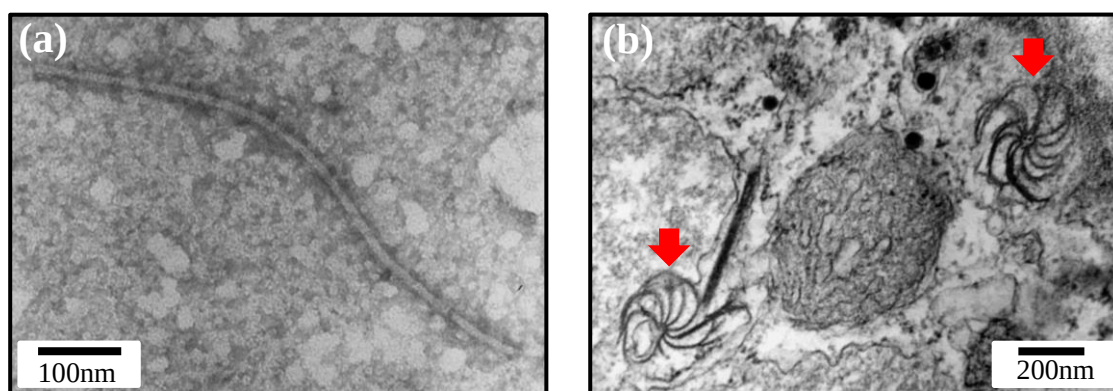


図 2. PPV の電子顕微鏡写真

(a) PPV のひも状粒子。 (b)ウメの感染葉から観察した風車状封入体(赤矢印)。

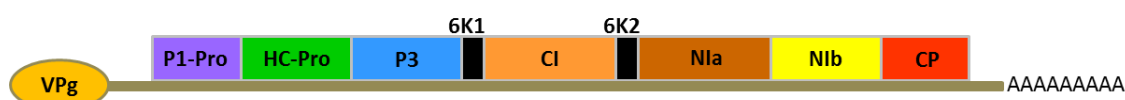


図 3. PPV のゲノム構造

PPV がコードしている遺伝子の名称とその働き。

P1-Pro(first protein) : HC-Pro の機能促進

HC-Pro(helper component) : アブラムシ伝搬性、プロテアーゼ

P3 (third protein) : 病原性、全身感染

CI(cylindrical-shaped inclusion body) : 管状封入体、ヘリカーゼ

NIa(nuclear inclusion body a) : 核内封入体、キャップ構造様タンパク質

NIb(nuclear inclusion body b) : 核内封入体、レプリカーゼ

CP(coat protein) : 外皮タンパク質

(3) 系統

PPV は血清学・分子学的特徴から 8 系統(D、M、Rec、C、CR、W、EA、T)に分類され(Miroslav et al. 2013)、世界的に主要な系統は D、M、Rec 系統である。D 系統は南フランスのアンズから分離され、アメリカ、カナダ、中国など世界的に分布が拡大している。M 系統はギリシャのモモから分離され、ヨーロッパで多く確認されている。加えて M 系統は D 系統よりも媒介昆虫であるアブラムシ類に媒介されやすいことが報告されている(Dallot et al. 1998)。Rec 系統はスロバキアのプラムから分離され、D 系統と M 系統の組み換えによって構成されている(Miroslav et al. 2002)。

(4) 伝搬性

PPV の伝染方法には接木伝染、苗伝染、汁液伝染、虫媒伝染の 4 通りが存在し、種子伝染はしない。人為的過誤を除くと自然条件下では虫媒伝染が主であり、PPV は自身の持つ

媒介介助タンパク質を利用し(Goytia et al. 2006)、20 種類以上のアブラムシによって伝搬される (前島 2010)。PPV を獲得したアブラムシがウイルスを媒介できる時間帯は数十分から数時間である。これは PPV がアブラムシの口針の先端(食溝)に吸着し、すぐに媒介されなくては感染が成立しない非循環型-非永続型の媒介様式の為である(石川 2000)。一般的に非永続型ウイルスでは媒介アブラムシの種類は限定されず、感染植物から吸汁すればウイルスを獲得できると考えられている。しかし *Potyvirus* ではウイルスの媒介介助タンパク質とアブラムシ食溝の親和性によって伝搬効率が異なるため、媒介者特異性が成立する (Wang et al. 1998)。

2. 世界での被害

PPV は1915年にブルガリアのプラムから初めて確認された(Atanasoff et al. 1932)。以降1970年代にはヨーロッパのほぼ全域、1980年代にはエジプトやシリアを含む地中海沿岸、1990年代にはインド、中国、チリ、北アメリカへと分布範囲を拡大している(CABI 2007)。早期にPPVが発生した中央ヨーロッパと東ヨーロッパでの被害は特に甚大であり、過去30年でアンズでは約5000億円、プラムでは約7400億円、モモでは過去20年で約790億円の損失が計上されている。アメリカとカナダではPPV撲滅のために45万本以上のモモが伐採され、産業への直接的な損失で約6億5000万円、調査費用や園地への補償を含めると約110億円が推定されている(Cambra et al. 2006)。

3. 日本での被害

PPV は我が国の植物防疫法に基づき、国内への侵入を警戒している検疫有害動植物に指定されているウイルスである。我が国では2009年4月、東京都青梅市のウメからPPV-D系統が初めて確認された(前島 2009)。以降急速に感染が拡大しており、2013年度には8都府県で新たに1万1593本の感染樹が確認された(農林水産省)。PPVの国内初発生地であり、観梅名所としても知られる青梅市では、まん延防止の為に現在まで2万6000本以上のウメが伐採された。また2013年度に感染が確認された地域には、ウメの収穫量で全国シェア6割を占める和歌山県も含まれており、産業、観光業への被害が懸念されている。

4. PPV 媒介アブラムシ類の疫学的調査

PPV は非循環型-非永続型のウイルスであるため、アブラムシによる感染樹から健全樹への媒介は短時間で行われなくてはならない。そのため主要なベクターは発生地域に分布しているアブラムシの種類によって異なる。東ヨーロッパでは *Brachycaudus helichysii*(ムギワラギクオマルアブラムシ)、*Hyalopterous pruni*(モモコフキアブラムシ)、*Phorodon humuli*(ホップイボアブラムシ)の3種であり、西ヨーロッパと北アメリカでは *Aphis spiraecola*(ユキヤナギアブラムシ)、*Myzus persicae*(モモアカアブラムシ)の2種が主要な媒介種とされている(Gildow et al. 2004)。また同種のアブラムシであってもバイオタイプによってウイルスの媒

介効率は異なる(Lupoli et al. 1995)。*H. pruni*は東ヨーロッパにおいて主要な媒介種であるが、フランスでは媒介が認められなかった。

これら主要な媒介種の発生推移を明らかにすることは防除対策上重要である。アメリカのペンシルバニア州では2年間に亘ってモモ園場を調査し、*A. spiraecola* と *M. persicae* の発生ピークがそれぞれ6月～7月と9月～10月であることを示した (Wallis et al. 2005)。スペインのバレンシア州では2年間に亘ってプラム園場を調査し、調査頭数約6000頭のうち *A. spiraecola* と *Aphis gossypii*(ワタアブラムシ)が80%を占める事や、アブラムシの発生ピークが5月に集中している事が明らかとなっている(Capote et al.2008)。この様に地域ごとで優占となるアブラムシの種類や発生のピークも異なる。しかし、PPV の侵入が近年確認された我が国では、PPV 発生園場において主要ベクターとなるアブラムシ種の特定はされていない。

5. 本研究の目的

本研究では第一に、PPV 発生園場における有翅アブラムシ類を継時的に誘殺、塩基配列から種を同定し、我が国で優占的に発生しているアブラムシの種と発生推移を明らかにすること。第二に、種を同定したアブラムシについて1頭ずつウイルス検定を行い、園場内でPPVを媒介しているリスクの高いアブラムシ種を調査すること。第三に、園場調査から主要なベクターと考えられるアブラムシ類のウイルス媒介能の検証を行う。これらの結果から我が国においてPPVを媒介しているアブラムシ種を特定し、防除対策への知見を得ることを目的とした。

III. 実験材料及び方法

1. PPV 発生園場における優占アブラムシの特定

(1) サンプルング

現地園場におけるアブラムシの年次変動調査は2011年4月から12月、2012年4月から12月の期間、PPV 高密度発生地域として東京都青梅市内のウメ園場(以降：青梅市)と、PPV 未発生地域として東京都立川市内のウメ園場(以降：立川市)の計2ヵ所で行った。有翅アブラムシを誘引する黄色粘着板を各地点に約70cmの高さで四方向に4枚設置し、アブラムシ類の総数を計上した。黄色粘着板の設置期間は2日間とし、これを毎週回収したものを－80℃で保存した。

なお、青梅市においては慣行栽培体系として殺虫剤を散布している。2011年には5月14日にフロニカミド(ウララ DF)水和剤、5月30日にジノテフラン(スタークル)顆粒水和剤を、2012年には4月14～16日にアセタミプリド(モスピラン)水和剤、5月19～21日にフロニカミド(ウララ DF)水和剤、6月1～4日にジノテフラン(スタークル)顆粒水和剤を散布した。

(2) 核酸抽出

調査地域の粘着シートから上限 50 頭のアブラムシを回収し、1 頭ずつ 0.2cm ジルコニアビーズを 2 粒加えた 2ml 破砕チューブに入れた。それに 200 μ l の TRIzol Regent(invitrogen) と 75 μ l のクロロホルムを加えマルチビーズショッカー(安井器械)で破砕した。破砕の条件は[振動数 2500rpm、粉碎時間 60 秒、休憩時間 10 秒] $\times$ 2 サイクルで行った。その後遠心機で 15000rpm 4 $^{\circ}$ C で 15 分遠心分離した。その水層 100 μ l を新しい 1.5ml マイクロチューブに移し、さらに 75 μ l の 2-プロパノールと 1 μ l のグリコーゲンを加えた。軽く攪拌した後、15000rpm 4 $^{\circ}$ C で 15 分遠心分離した。沈殿物を失わないように上清を捨て、300 μ l の 70 % エタノールを加えた。軽く攪拌した後、15000rpm 4 $^{\circ}$ C で 15 分遠心分離した。同じく沈殿物を失わないように上清を捨て、遠心乾燥機で完全に乾燥させた後、10 μ l の滅菌蒸留水(DDW) に溶解して調整した。

(3) PCR 法によるアブラムシ DNA の増幅と精製

TaKaRa Ex Taq(TaKaRa)を用いて 0.5 μ l の核酸抽出物、1.5 μ l の dNTP、2 μ l の 10 $\times$ Ex Taq buffer、0.1 μ l の Ex Taq、各プライマー(5 μ M/ μ l)を各 1 μ l、最後に DDW を加え PCR 反応液を 20 μ l に調整した。プライマーセットはアブラムシを種レベルで同定することのできる、mitochondrial cytochrome c oxidase I (COI)遺伝子領域の 658bp を増幅する LCO1490(5'-GGTC AACAAATCATAAAGATATTGG-3')と HCO2198(5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3')を用いた(Folmer et al. 1994)。PCR 反応は 94 $^{\circ}$ C:5 分、[94 $^{\circ}$ C:1 分、45 $^{\circ}$ C:1 分 30 秒、72 $^{\circ}$ C:1 分 30 秒] $\times$ 5 サイクル、[94 $^{\circ}$ C:1 分、50 $^{\circ}$ C:1 分 30 秒、72 $^{\circ}$ C:1 分] $\times$ 35 サイクル、72 $^{\circ}$ C:5 分のプログラムにより行った(Hebert et al. 2003)。反応後、PCR 産物から 4 μ l をとって 36 μ l の DDW で希釈し、LabChip GX(Caliper)で電気泳動を行い、バンドをの有無を確認した。DNA 精製は PCR 反応液から 5 μ l をとって、10 倍希釈した 2 μ l の ExoSAP-IT(usb)を加え、37 $^{\circ}$ C:30 分、80 $^{\circ}$ C:15 分のプログラムにより行った。

(4) シークエンス反応と塩基配列解析

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystem)を用いて 0.5 μ l の DNA 精製物、1 μ l の BigDye terminator v1.1、1.5 μ l の 5 $\times$ sequencing buffer、各プライマー(0.8 μ M/ μ l)を各 1 μ l、最後に DDW を加えシークエンス反応物を 10 μ l に調整した。シークエンス反応は 96 $^{\circ}$ C:1 分、[96 $^{\circ}$ C:10 秒、50 $^{\circ}$ C:5 秒、60 $^{\circ}$ C:4 分] $\times$ 25 サイクルのプログラムにより行った。反応後のシークエンス反応物を Dye Terminator Removal Kit(AB gene)を用いて精製後、遠心乾燥機で完全に乾燥させ 10 μ l の Hi-Di Formamide(Applied Biosystem)で溶解した。サンプルプレートは 3100 Genetic Analyzer(Applied Biosystem)のトレイにセットしシークエンスを行った。塩基配列の解析は CodonCode Aligner(Codon Code Corporation)を用い、NCBI の BLAST 検索で種の同定を行った。同定方法の基準はデータベースに登録されているアブラムシ種との塩基配列の相違が 0.2%以内であるものを同種とした (Footitt et al. 2008)。

2. ウイルス検定

(1) サンプルング・核酸抽出

「Ⅲ-1. PPV 発生圃場における優占アブラムシの特定」の際にサンプルング・核酸抽出したサンプルを調査した。またウイルス検定における対照区として茨城県つくば市を設定し、黄色粘着板で毎週上限 5 頭のアブラムシを回収して同様に調査した。

(2) Nested RT-PCR 法によるアブラムシ 1 頭からのウイルス検定

Primary RT-PCR は PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 (TAKARA)を用い、2μl の核酸抽出物、5μl の 2×1 step buffer、0.4μl の PrimeScript 1 step Enzyme Mix、5μM プライマーを各 0.4μl、最後に RNase free water を加えて 10μl に調整した。プライマーセットは PPV nest P1 (5'-CAGCCTGAATTTACATTGTCCATGG-3')と PPV nest R1 (5'-CATCAACTTCCTCCTCGTCTTCTC-3') を使用した(伊藤 2011)。PCR 反応は 50℃:30 分、94℃:2 分、[94℃ 20sec、60℃ 10sec、72℃ 1min] ×35 サイクルのプログラムで行い、得られた cDNA を 10 倍希釈して secondary PCR に供試した。

secondary PCR は KOD dash(TOYOBO)を用いて行い、DDW で 10 倍希釈した 1μl の cDNA、1μl の 10× buffer、1μl の 10mM dNTPs、0.1μl の KOD Dash、5μM プライマー 各 0.2μl、最後に DDW を加えて 10μl に調整した。プライマーセットは PPV P4 (5'-TGCAGTTCTCAA TATTCGTCTGGC-3')と PPV nest R2 (5'-TCCAAGTTGGGAAAA-3') を用いた(伊藤 2011)。PCR 反応は 94℃ 2min、(94℃ 20sec、60℃ 10sec、72℃ 20sec)×35cycle、4℃ ∞ の条件で行った。

最後に、PCR 産物のうち 4μl を 10 倍希釈して LabChip GX (Caliper Life Science)で電気泳動を行い、バンドの有無を確認した。

(3) 統計解析

時期的な変化推移および調査地区を説明変数とし、現地圃場で調査した PPV 陽性虫数から推定される PPV 陽性虫率と各説明変数に対する関連性およびその信頼性分析は

$$\ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = k + \alpha \cdot month + \beta \cdot place + \varepsilon$$

としてロジスティック回帰分析を適用した。本調査では週単位のサンプルングであったが、週単位での変化推移を説明変数とするとモデルの安定性が著しく低くなり統計処理に不適當であると考えられたため、それぞれ合算して月単位での説明変数とした。統計ソフトには JMP ver.5.1.2(SAS Institute Inc.)を用いて行った。

3. PPV 媒介能の評価

(1) サンプルング

現地圃場の調査結果から優占種としたアブラムシと同一の外部形態と塩基配列を有する種を茨城県つくば市周辺で捕獲した。従来の外部形体に基づく手法で種の同定をするため、標本プレパラートを作製し宇都宮大学農学部の香川清彦助手に同定を依頼した。捕獲したアブラムシは 27℃ の温室において、寄主植物の実生で飼育した(表 1)。

表 1. 媒介試験を行ったアブラムシと飼育植物

学名	和名	飼育植物	品種	販売元
<i>Aphis craccivora</i>	マメアブラムシ	ソラマメ	陵西一寸	みかど協和
<i>Aphis gossypii</i>	ワタアブラムシ	キュウリ	よしなり	サカタのタネ
<i>Aphis spiraeicola</i>	ユキヤナギアブラムシ	ツルニチニチソウ	不明	不明
<i>Melanaphis sacchari</i>	ヒエノアブラムシ	ソルガム	やわらか矮性ソルゴー	タキイ種苗
<i>Rhopalosiphum maidis</i>	トウモロコシアブラムシ	オオムギ	カシマムギ	農研機構
<i>Myzus umecola</i>	ウメコブアブラムシ	ウメ新梢	不明	不明
<i>Myzus persicae</i>	モモアカアブラムシ	ナス	黒秀ナス紫彩	トーホク

(2) 標本プレパラート

飼育しているアブラムシから成虫のアブラムシを選抜し、70 %のエタノールで殺虫した。スライドガラスの中央にネオ・シガラール(志賀昆虫普及社)を 1 滴垂らし、殺虫したアブラムシを乗せ、柄付き針で虫体を整えカバーガラスをかけた。5 分ほど放置しアブラムシの内容物が出たことを確認した後、寄主植物名、採取地、作成日を記入した。プレパラートは 50 ℃ のホットプレートに 2 日間入れ、乾いたらカバーガラスの 4 辺にトップコート塗り完成とした。

(3) PPV 媒介試験

飼育しているアブラムシを面相筆でプラスチック容器に移し、1 時間絶食させた。10 匹の絶食させたアブラムシを PPV が感染しているウメ葉に乗せ、口針の挿入を確認後に 1 分間獲得吸汁させた。その後アブラムシを健全なウメ実生に移し、一晩接種吸汁させた。翌日殺虫剤を用いてアブラムシを駆除し、一ヶ月後に接種したウメでの病徴の有無と血清試験の結果から媒介の成立を判定した。

IV. 結果

1. PPV 発生圃場における優占アブラムシ種の特定

(1) 調査圃場でのアブラムシ発生消長

調査期間中に黄色粘着板へ誘殺されたアブラムシ数は、青梅市において 2011 年に 1165 頭、立川市において 2687 頭が誘殺された。発生消長をみると両地域で 4 月下旬～5 月中旬、6 月上旬～6 月下旬、7 月下旬～8 月上旬に誘殺のピークが認められ(図 4a)、さらに立川市の

み 11 月下旬にもピークが認められた(図 4b)。2012 年は 2011 年と比べ誘殺数が極端に少なく、青梅市では 631 頭(前年比 54.2%)、立川市では 950 頭(前年比 35.4%)の誘殺に留まった。その結果週単位での計上結果では明確な誘殺のピークは認められなかった。しかし、誘殺数の時期的な増減傾向は同様であり、調査圃場におけるアブラムシの発消長は春期と夏期、秋期の一部で多く見られた。

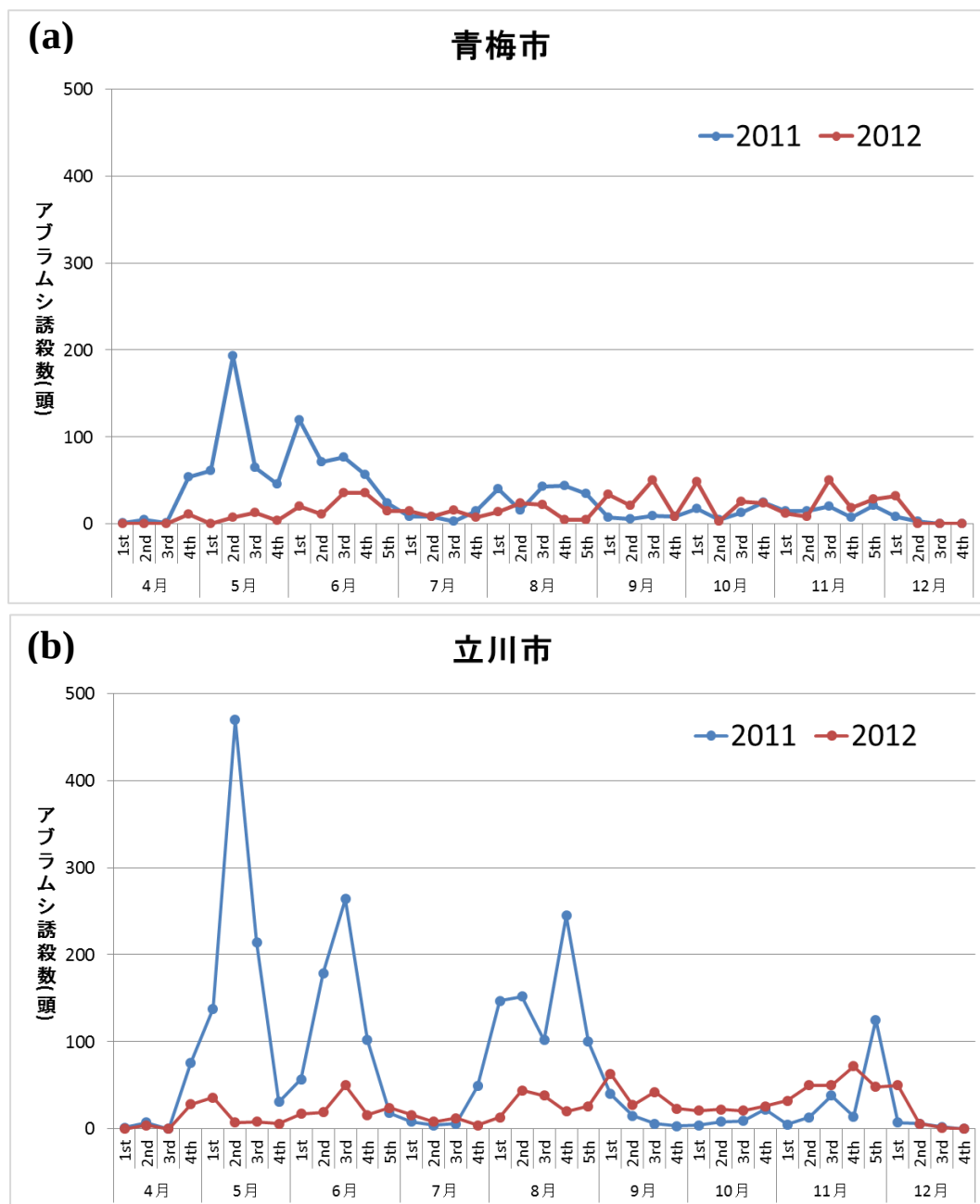


図 4. 調査地域における 2 年間のアブラムシの発生推移

(a) 青梅市(PPV 高密度発生地域)

(b) 立川市(PPV 未発生地域)

縦軸：黄色粘着板で誘殺したアブラムシの頭数

横軸：調査を行った週

(2) 調査圃場での優占アブラムシ種

黄色粘着板に誘殺されたアブラムシの中から、調査期間中に 3267 頭の塩基配列解析を行った。同定したアブラムシの種類は青梅市で 45 種、立川市で 48 種、両地域合計で 64 種であり、既に PPV の媒介能が確認されている種は 13 種であった(表 2)。本研究では塩基配列解析を行った総数の 2 %以上を占めたものを優占アブラムシ種として選抜した(Wallis et al. 2005)。調査年と調査圃場ごとの優占種の発生推移を以下にまとめる。

(a) 2011 年

青梅市では 888 頭のアブラムシを同定した。時期ごとの推移をみると、粘着板誘殺数の多い 5 月～6 月は *Aphis craccivora*(マメアブラムシ)、*A. gossypii*、*A. spiraecola*、*Tinocalis zelkowae*(ケヤキヒゲマダラアブラムシ)の 4 種が優占的であった。次に誘殺数が目立つ 8 月は *A. gossypii*、*A. spiraecola*、*Melanaphis sacchari*(ヒエノアブラムシ)、*Rhopalosiphum maidis*(トウモロコシアブラムシ)の 4 種が優占的であった。その他の時期では 11 月以降に *P. humuli*(ホップイボ)の誘殺が目立った。*A. spiraecola* は年間を通して誘殺された(図 6 a)。

立川市では 982 頭のアブラムシを同定した。粘着板誘殺数の起伏は大きく、誘殺ピークごとにアブラムシ種の棲み分けが確認された。4 月下旬～5 月は *A. gossypii* と *A. spiraecola* が優占的であったが、6 月は *A. craccivora* と *T. zelkowae* に大きく入れ替わった。7 月下旬～8 月は春期に発生したアブラムシに加え *M. sacchari* と *Shivaphis celti*(エノキワタアブラムシ)の 6 種が優先的であった。11 月 *A. gossypii* と *A. spiraecola* を含め多種多様なアブラムシが発生した(図 6 b)。

(b) 2012 年

青梅では 588 頭のアブラムシを同定した。2011 年と比較して粘着板誘殺数に明確なピークは認められず、アブラムシは 6 月と 9 月～10 月初旬、11 月において部分的に発生した。6 月は *A. craccivora*、*A. gossypii*、*A. spiraecola*、*H. pruni*(モモコフキ)の 4 種が優占的であった。9 月～10 月初旬は、そのほとんどが *A. spiraecola* であった。11 月は *A. gossypii*、*P. humuli* と *Rhopalosiphum padi*(ムギクビレアブラムシ)、*Rhopalosiphum rufiabdominalis*(オカボアカアブラムシ)の 3 種が優占的であった。その他の期間では 2011 年と同じく *A. spiraecola* が年間を通して誘殺された(図 7 a)。

立川市では 809 頭のアブラムシを同定した。青梅市 2012 年と同様、粘着板誘殺数に明確なピークは認められなかった。アブラムシは 6 月中旬に部分的に発生した後、8 月上旬～12 月上旬まで緩やかに発生し続けた。6 月中旬は *A. spiraecola* が優占的であった。8 月上旬～9 月は *A. gossypii*、*Lipaphis pseudobrassicae*(ニセダイコンアブラムシ)、*S. celti* の 3 種が優占的に発生していたが、10 月～12 月上旬には *A. spiraecola* と *P. humuli* に入れ替わった(図 7 b)。

表 2. 調査地域で誘殺したアブラムシ種

学名	和名	PPV 媒介能	学名	和名	PPV 媒介能
<i>Acyrtosiphon pisum</i> (Harris)	エンドウヒゲナガアブラムシ		<i>Macrosiphoniella kuwayamai</i> Takahashi**	クワヤマヒゲナガアブラムシ	
<i>Anoea fulvibdominalis</i> (Sasaki)**	オカボキババラアブラムシ		<i>Macrosiphum cumiflorae</i> Shinji**	ヤマボウシヒゲナガアブラムシ	
<i>Aphidounis mali</i> Takahashi**	リンゴネアブラムシ		<i>Macrosiphum euphorbiae</i> (Thomas)**	チューリップヒゲナガアブラムシ	
<i>Aphis craccivora</i> Koch	マメアブラムシ	○	<i>Megoura viciae</i> (Kaltenbach)	ソラマメヒゲナガアブラムシ	○
<i>Aphis fabae</i> Scopoli	マメクロアブラムシ	○	<i>Melanaphis sacchari</i> (Zehntner)	ヒエノアブラムシ	
<i>Aphis frangulae</i> Kaltenbach*	-		<i>Myzus boehmeriae</i> Takahashi*	カラムシコブアブラムシ	
<i>Aphis fukii</i> Shinji	フキアブラムシ		<i>Myzus numecola</i> (Matsumura)	ウメコブアブラムシ	
<i>Aphis glycines</i> Matsumura	ダイズアブラムシ		<i>Myzus persicae</i> (Sulzer)	モモアカアブラムシ	○
<i>Aphis gossypii</i> Glover	ワタアブラムシ	○	<i>Myzus siegesbeckiae</i> Takahashi*	ヒキオコシコブアブラムシ	
<i>Aphis horii</i> Takahashi*	ホリニワトコアブラムシ		<i>Myzus Varians</i> Davidson**	ハンシヨウズルコブアブラムシ	○
<i>Aphis hypericiphaga</i> Pashishenko**	-		<i>Ovatus malisuctus</i> (Matsumura)	-	
<i>Aphis ichigo</i> Shinji*	カヂイチゴアブラムシ		<i>Periphyllus californiensis</i> (Shinji)**	モミジニタイケアブラムシ	
<i>Aphis nasturtii</i> Kaltenbach**	-		<i>Plectrochophorus pseudoglandulosus</i> (Palmer)*	-	
<i>Aphis nerii</i> Boyer de Fonscolombe**	キョウチクトウアブラムシ		<i>Phorodon humuli</i> Schrank	ホップイボアブラムシ	○
<i>Aphis oenotherae</i> Oestlund	マツヨイゲサアブラムシ		<i>Rhopalosiphum maidis</i> (Fitch)	キビクビレアブラムシ	
<i>Aphis rumicis</i> Linne	ギンギンアブラムシ		<i>Rhopalosiphum nymphaeae</i> (Linne)	クワイクビレアブラムシ	
<i>Aphis spiraeola</i> Patch	ユキヤナギアブラムシ	○	<i>Rhopalosiphum padi</i> (Linne)	ムギクビレアブラムシ	○
<i>Aphis sumirei</i> Moritsu*	スミレアブラムシ		<i>Rhopalosiphum rufiabdominalis</i> (Sasaki)	オカボアカアブラムシ	
<i>Brachycaudus helichrysi</i> (Kaltenbach)*	ムギワラギクオマルアブラムシ	○	<i>Schizaphis graminum</i> (Rondani)*	ムギミドリアブラムシ	
<i>Capitophorus elaeagni</i> (Del Guercio)	ゴボウクギケアブラムシ		<i>Semiaphis heraclei</i> (Takahashi)*	ハナウドチビクダアブラムシ	
<i>Capitophorus hippophaes</i> (Walker)**	タデクギケアブラムシ		<i>Shivaphis celti</i> Das	エノキワタアブラムシ	
<i>Cavariella araliae</i> Takahashi**	ウドフタオアブラムシ		<i>Sitobion avenae</i> (Fabricius)*	ムギヒゲナガアブラムシ	
<i>Cavariella japonica</i>	シラネセンキュウフタオアブラムシ		<i>Takecallis arundicola</i> (Clarke)*	タケヒゲナガアブラムシ	
<i>Coloradoa rufomaculata</i> (Essig et Kuwana)*	-		<i>Tinocallis kahawaluokalani</i> (Kirkaldy)**	サルズベリヒゲマダアブラムシ	
<i>Dysaphis plantaginea</i> (Passerini)**	オオバコアブラムシ	○	<i>Tinocallis zelkowae</i> (Takahashi)	ケヤキヒゲマダアブラムシ	
<i>Dysaphis rumecicola</i> (Hori)	ギンギンオマルアブラムシ		<i>Toxoptera aurantii</i> (Boyer de Fonscolombe)	コミカンアブラムシ	
<i>Eumyzus impatiensae</i> (Shinji)*	ホウセンカコブアブラムシ		<i>Toxoptera odinae</i> (van der Goot)	ハゼアブラムシ	
<i>Hayhurstia atriplicis</i> Linnaeus**	-		<i>Toxoptera citricida</i> **	ミカンクロアブラムシ	○
<i>Hyalopteris pruni</i> (Geoffroy)	モモコフキアブラムシ	○	<i>Tuberocephalus momonis</i> Matsumura	サクラコブアブラムシ	
<i>Hyperonymus carduelinus</i> (Theobald)**	ノゲシフクレアブラムシ		<i>Uroleucon erigeronensis</i> (Thomas)*	ヒメムカシヨモギヒゲナガアブラムシ	
<i>Kurisakia querciphila</i> Takahashi**	クスギミツアブラムシ		<i>Uroleucon gobonis</i> (Matsumura)**	ゴボウヒゲナガアブラムシ	
<i>Lipaphis pseudobrassicae</i> (Davis)	ニセダイコンアブラムシ		<i>Uroleucon nigrotibium</i> (Olive)*	-	

和名を確認できないアブラムシは「-」とした

*は青梅市でのみ誘殺されたアブラムシ種 **は立川市でのみ誘殺されたアブラムシ種

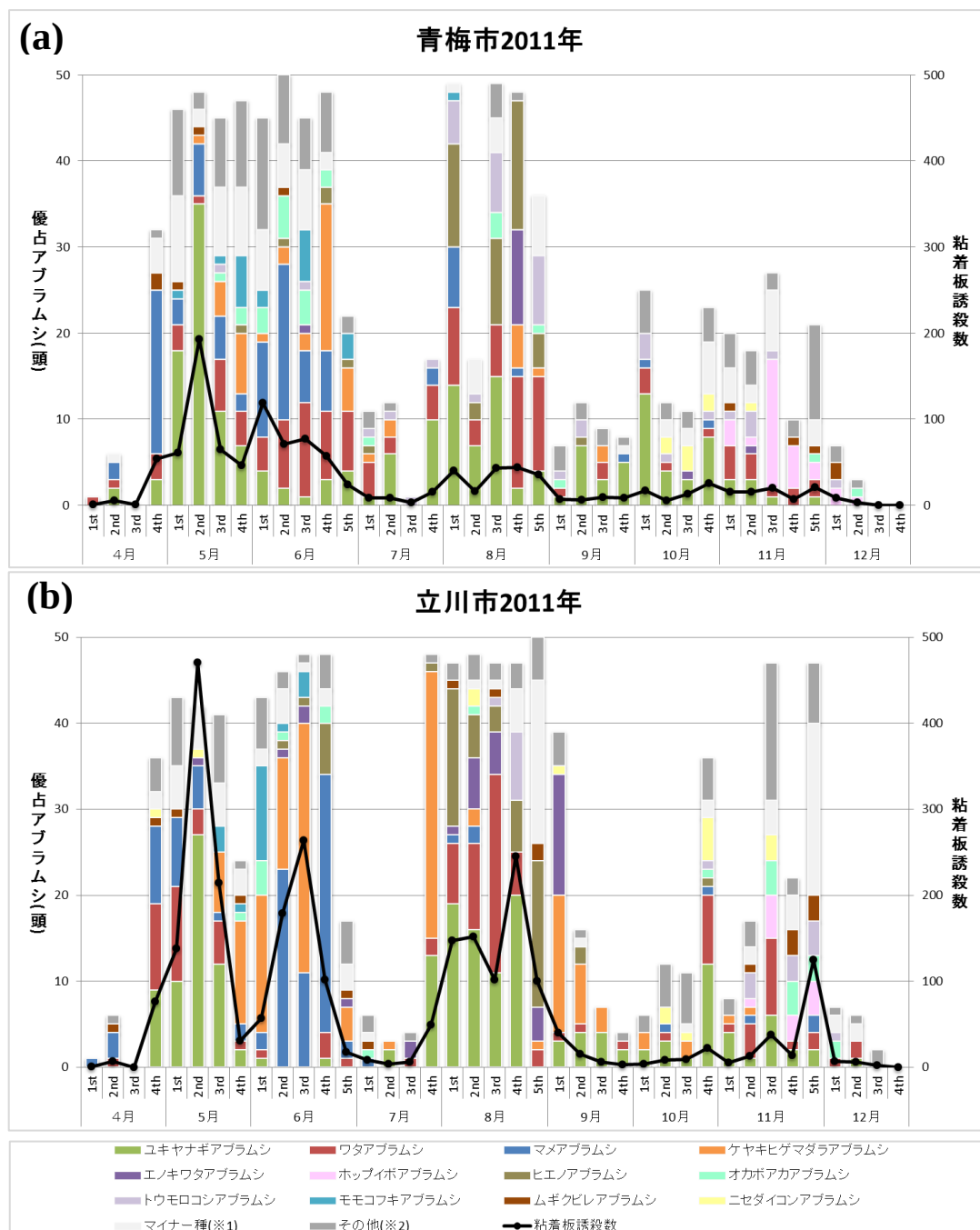


図 6. 調査地域における 2011 年の優占アブラムシの発生推移

(a) 青梅市(PPV 高密度発生地域)

(b)立川市(PPV 未発生地域)

棒グラフ：同定した優占アブラムシの頭数(左ラベル)。

線グラフ：黄色粘着板で誘殺したアブラムシの頭数(右ラベル)。

(※1)：総数が 2%未満のアブラムシ種をまとめたもの。

(※2)：BLAST 検索でヒットしなかったサンプル、データベース塩基配列差異が 0.2%以上であり種の同定まで至らなかったサンプル。

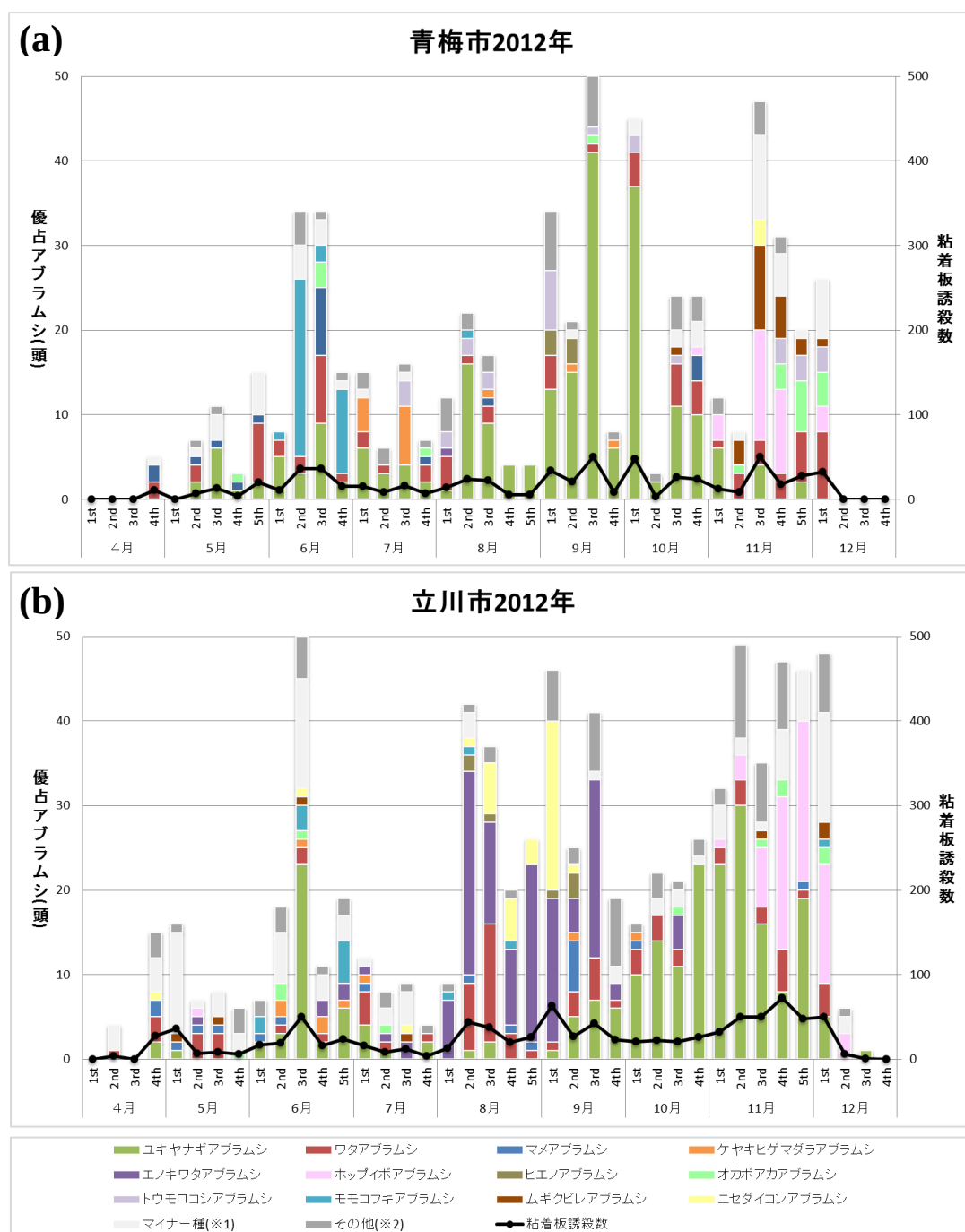


図 7. 調査地域における 2012 年の優占アブラムシの発生推移

(a) 青梅市(PPV 高密度発生地域)

(b)立川市(PPV 未発生地域)

棒グラフ：同定した優占アブラムシの頭数(左ラベル)。

線グラフ：黄色粘着板で誘殺したアブラムシの頭数(右ラベル)。

(a)～(b)の結果を統合すると、調査圃場における優占アブラムシの発生推移は 1 年目と 2 年目で大きく異なった。青梅市では 2011 年に少なくとも 7 種のアブラムシによって優占種が構成されていたにもかかわらず、2012 年にはほとんどが *A. spiraeola* によって構成されていた(図 6a, 7a)。立川市においても 2011 年は誘殺ピークごとに発生しているアブラムシ種は多様であったが、2012 年は *A. spiraeola* や *S. celti* など一部のアブラムシ種に限定された(図 6b, 7b)。その一方で、調査年ごとの優占アブラムシ発生推移には類似する傾向が見られた。2011 年では青梅市と立川市の両圃場において、春期には *A. craccivora*、*A. gossypii*、*A. spiraeola*、*T. zekowae* が、夏期には *A. gossypii*、*A. spiraeola*、*M. sacchari* が優占種として一致し、9 月以降に *A. spiraeola* が継続して誘殺される傾向も同じであった(図 6)。2012 年は 8 月上旬～9 月にかけてのみ青梅市と立川市の優占種は異なったが、それ以外では 11 月以降に *P. humuli* が優占種となることや年間を通じて *A. spiraeola* が誘殺される傾向は同じであった(図 7)。

塩基配列解析から本研究で優占種とされるアブラムシ種は 12 種類であった(表 3)。優占 12 種のうち青梅市と立川市の両地域において 2011 年、2012 年とも 2%以上の優占率を占めた種は *A. spiraeola*、*A. gossypii*、*A. craccivora*、*R. rufiabdominalis*、*H. pruni* の 5 種であった。他の 7 種はいずれかの調査地域か調査年に 2%未満の優占率が存在した。優占種の中でも特に *A. spiraeola*、*A. gossypii* は年次変動が少なく、両地域で毎年 10%以上の優占率を示した(図 5)。また調査期間中に最も誘殺されたアブラムシは総数の約 26%(845 頭)を占めた *A. spiraeola* であった。

表 3. 調査地域における 2 年間の優占アブラムシ種

学名	和名	PPV 媒介能	青梅市		立川市		両地域合計	
			2011	2012	2011	2012	頭数	%
<i>Aphis spiraeola</i>	ユキヤナギアブラムシ	○	201	226	190	228	845	26
<i>Aphis gossypii</i>	ワタアブラムシ	○	129	78	118	81	406	12
<i>Aphis craccivora</i>	マメアブラムシ	○	92	19	106	19	236	7
<i>Tinocallis zekowae</i>	ケヤキヒゲマダラアブラムシ	不明	50	14	148	9	221	7
<i>Shivaphis celti</i>	エノキワタアブラムシ	不明	14	1	37	130	182	5
<i>Phorodon humuli</i>	ホップイボアブラムシ	○	29	30	13	66	138	4
<i>Melanaphis sacchari</i>	ヒエノアブラムシ	不明	50	6	59	7	122	4
<i>Rhopalosiphum rufiabdominalis</i>	オカボアカアブラムシ	不明	25	20	24	31	100	3
<i>Rhopalosiphum maidis</i>	トウモロコシアブラムシ	○	41	29	21	0	91	3
<i>Hyalopterus pruni</i>	モモコフキアブラムシ	○	20	35	19	14	88	3
<i>Rhopalosiphum padi</i>	ムギクビレアブラムシ	○	10	22	17	18	67	2
<i>Lipaphis pseudobrassicae</i>	ニセダイコンアブラムシ	不明	8	3	16	39	66	2
マイナー種 (※1)			97	52	97	72	318	10
その他 (※2)			122	53	117	95	387	12
合計			888	588	982	809	3267	100

2. ウイルス検定

(1) 調査圃場でのウイルス陽性虫率

塩基配列解析を行ったアブラムシ 3276 頭についてウイルス検定を行い、ウイルス陽性個体は 126 頭であった。陰性区として設定したつくば市では調査期間中に 352 頭のアブラムシを検定し、全て陰性であった。

調査圃場におけるウイルス陽性個体数を月別にまとめ、統計解析を用いて月ごとのウイルス陽性虫率を算出した。青梅市では、2011年4月～9月のウイルス陽性虫率が0.8%～1.8%程度と低率であったが、10月には7.7%、11月には3.1%と、アブラムシの誘殺数が多い春期から夏期よりも誘殺数が減少した秋期以降に高率となった(図8 a)。2012年は春期～夏期にもウイルス陽性虫率の上昇がみられ、6月には6.5%、7月には5.2%であった。秋期は10月に12.6%、11月に7.0%と、前年より高率となった(図8 a)。立川市においても2011年4月～9月のウイルス陽性虫率は0.9%～2.0%程度と低率であり、10月には8.6%、11月には3.5%と、秋期以降に高率となる傾向は一致した(図8b)。2012年は同じく春期～夏期にウイルス陽性虫率が上昇し、6月には6.7%、7月には5.3%であった。秋期は10月に12.8%、11月に7.1%と、青梅市よりも高率であった(図8b)。

各年の調査結果からウイルス陽性虫率の変動は季節によるところが大きく、調査圃場ごとの差はほとんど無かった。2011年では10月、11月を含む秋期のみ高率であった。2012年では秋期に加え、6月、7月の春期～夏期にかけても高率であった。また2012年は全体的にウイルス陽性虫率が2011年と比較して高かった。

(2) ウイルス陽性であったアブラムシ種

2011年に青梅市では17頭のアブラムシからウイルスを検出した。ウイルス陽性虫率の高い10月には *Aphis fukii*(フキアブラムシ)が目立った。11月には *P. humuli*、*Tuberocephalus momonis*(サクラコブアブラムシ)、*S. celti* の3種が占める割合が大きく、圃場で優占的に発生しているアブラムシ種がそのまま検出されることはなかった(図9a)。立川市では23頭からウイルスを検出し、PPV 高密度発生地域である青梅市の圃場よりも多数のウイルス陽性虫率が検出された。10月には *A. spiraecola*、*A. gossypii*、が半数を占め、11月には *A. gossypii*、*P. humuli* が多く検出された(図9b)。

2012年に青梅市では38頭のアブラムシからウイルスを検出した。春期～夏期と秋期のうち、6月は *H. pruni* が、7月には *A. spiraecola* が陽性個体のすべてを占めた。ウイルス陽性虫率が10%を越えた10月は *A. craccivora*、*A. gossypii*、*A. spiraecola* の3種で構成され、11月は多種多様なアブラムシから検出された(図9c)。立川市では48頭からウイルスを検出し、6月には *H. pruni* を含む5種類以上のアブラムシが、7月には *A. gossypii*、*A. spiraecola* が陽性個体となった。秋期には *A. spiraecola* が半数以上を占め、10月には陽性となったサンプルの全てが *A. spiraecola* であった。11月には *A. spiraecola* に加え、*P. humuli* と *T. momonis* からわずかに検出された(図9d)。

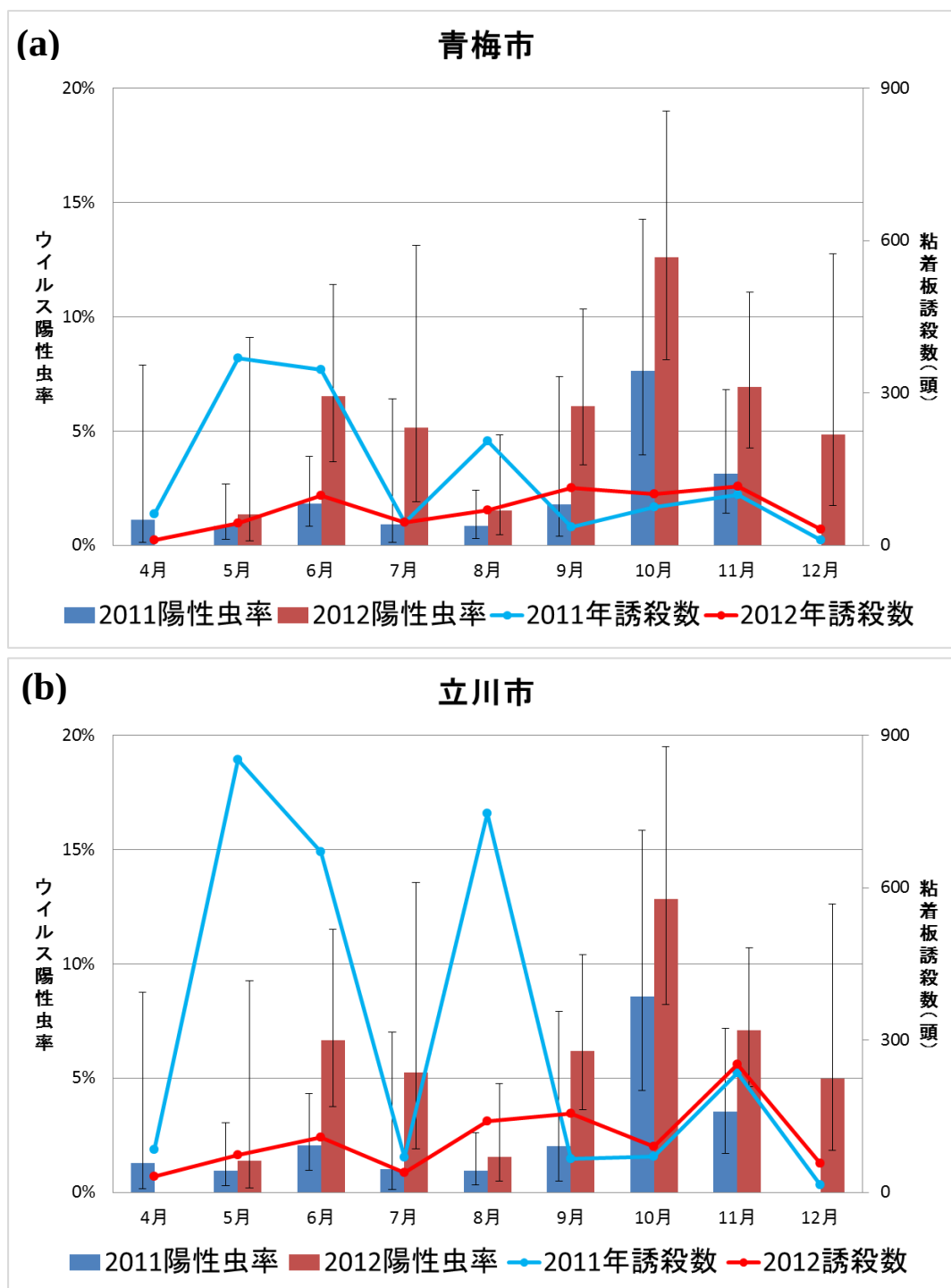


図 8. 調査期間中の各地域における月ごとのウイルス陽性虫率

(a) 青梅市(PPV 高密度発生地域)

(b) 立川市(PPV 未発生地域)

棒グラフ：ウイルス陽性虫率の推移(左ラベル)。

線グラフ：黄色粘着板で誘殺したアブラムシの頭数(右ラベル)

2011 年 12 月と 2012 年 4 月は誘殺数が少なかったため、統計から除いた。

図中のバーは信頼水準 95%を示す。

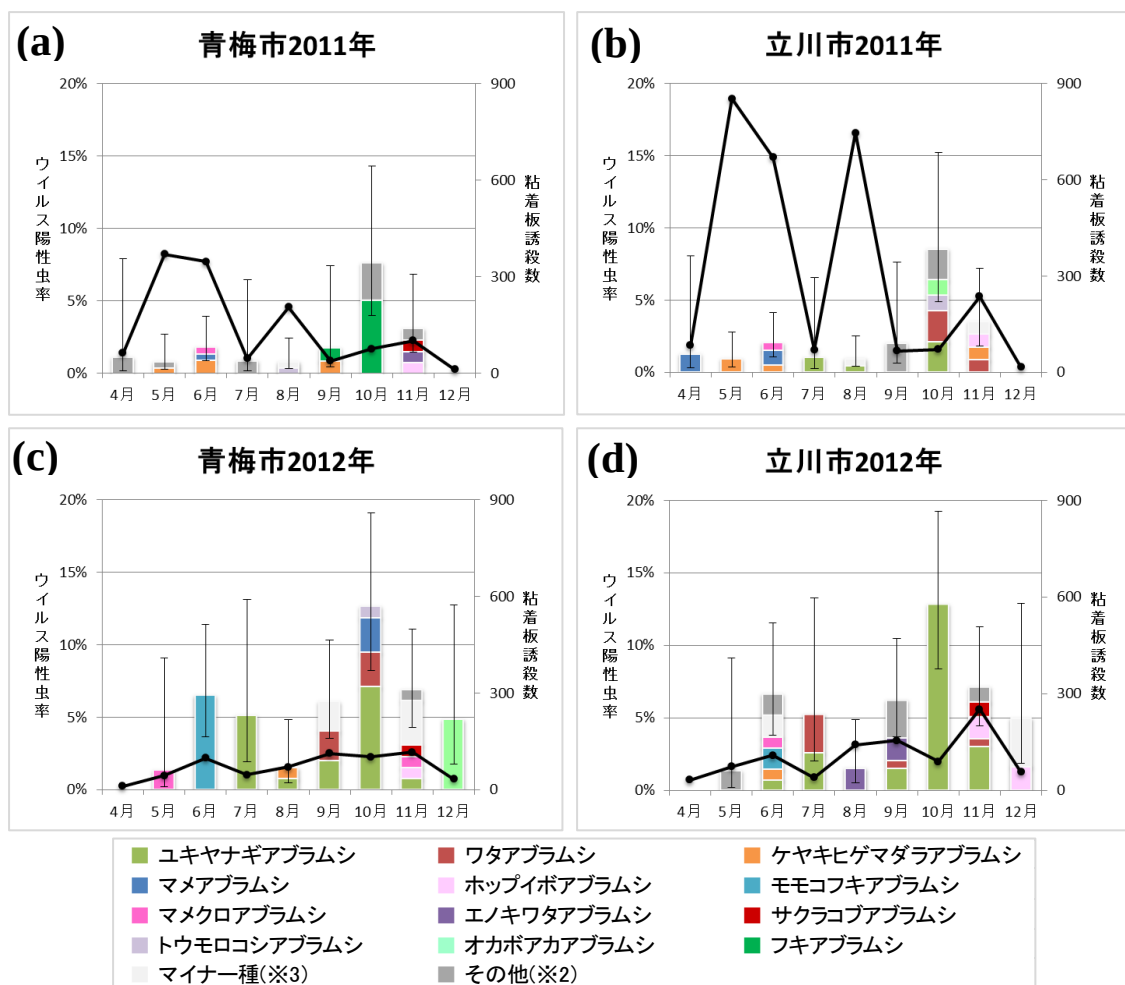


図9. 年次別の調査地域におけるアブラムシ種別のウイルス陽性虫率

- (a) 青梅市 2011 年(PPV 高密度発生地域) (b) 立川市 2011 年(PPV 未発生地域)
(c) 青梅市 2012 年 (d) 立川市 2012 年

棒グラフ：ウイルス陽性虫率の推移(左ラベル)。

線グラフ：黄色粘着板で誘殺したアブラムシの頭数(右ラベル)

(※3)：両地域合計におけるウイルス陽性頭数の割合が2%未満のアブラムシ9種(*A. glycines*、*A. naturii*、*A. rumicis*、*H. carduellinus*、*L. pseudobrassicae*、*M. mumecola*、*M. sacchari*、*R. padi*、*U. erigeronensis*)をまとめたもの。

以下の計算に基づき種別のウイルス陽性虫率を算出した。

$$p1(n) = P(n) \times \frac{x1(n)}{X(n)}$$

全体保毒虫率 $P(n)$ 各種保毒虫率 $p1(n)$ 全体誘殺数 $X(n)$ 各種誘殺数 $x1(n)$

Nested-RT-PCR 法によって検出されたウイルス陽性のアブラムシは 21 種であり、優占アブラムシとした 12 種も含まれた(表 4)。調査期間中に最もウイルス陽性個体数が多かった種は *A. spiraecola* であり、36 頭が検出された。次に多かった種は *A. gossypii* であり、10 頭が検出された。調査年と調査地域ごとに比較しても、2011 年の青梅市は *T. zelkowae* と *A. fukii* が主要なアブラムシ種であったものの、2011 年の立川市と 2012 年の両地域では *A. spiraecola* と *A. gossypii* が高いシェアを占めた(図 9)。

4. PPV 媒介能の評価

優占種としたアブラムシ 12 種のうち捕獲に成功した 5 種(*A. craccivora*、*A. gossypii*、*A. spiraecola*、*M. sacchari*、*R. maidis*)と、*M. persicae*、*Myzus mumecola*(ウメコブアブラムシ)、の計 7 種で罹病ウメから健全ウメへの媒介試験を行った。最も媒介効率が高かった種は海外でも PPV の主要媒介種として知られる *M. persicae* であり、24.4%であった。調査圃場において誘殺数とウイルス陽性個体数の多かった *A. spiraecola* は 13.1%で 2 番目に媒介効率が高かった。*A. craccivora* と *A. gossypii* では、媒介は認められたものの、それぞれ 5.3%、3.7%と低効率であった。また、*M. sacchari* では媒介が認められなかった。*M. mumecola* と *R. maidis* の 2 種は今まで PPV の媒介能が確認されていなかったが、今回の試験で新たに媒介が確認された。*M. mumecola* は 41 株中 5 株(12.2%)で感染が確認され、一定の媒介能を示した。*R. maidis* では 29 株中 1 株(3.4%)で媒介が認められた。

M. mumecola は塩基配列情報がデータベースに無かったため、立川市とつくば市で捕獲したものを外部形態から同定し、それぞれのミトコンドリア COI 遺伝子領域 658bp を DNA Data Bank of Japan に登録した(Accession: AB738877.1、AB738876.1)。

表 4. 調査地域におけるウイルス陽性アブラムシ種

アブラムシ名	アブラムシ名	PPV 媒介能	青梅市		立川市		両地域合計	
			2011	2012	2011	2012	合計	%
<i>Aphis spiraecola</i>	ユキヤナギアブラムシ	○	0	14	4	18	36	29
<i>Aphis gossypii</i>	ワタアブラムシ	○	0	4	3	3	10	8
<i>Tinocallis zelkowae</i>	ケヤキヒゲマダラアブラムシ	不明	4	1	3	1	9	7
<i>Aphis craccivora</i>	マメアブラムシ	○	1	3	3	0	7	6
<i>Phorodon humuli</i>	ホップイボアブラムシ	○	1	1	1	4	7	6
<i>Hyalopterus pruni</i>	モモコフキアブラムシ	○	0	4	0	2	6	5
<i>Aphis fabae</i>	マメクロアブラムシ	○	1	2	1	1	5	4
<i>Shivaphis celti</i>	エノキワタアブラムシ	不明	1	0	0	4	5	4
<i>Tuberocephalus momonis</i>	サクラコブアブラムシ	不明	1	1	0	2	4	3
<i>Rhopalosiphum maidis</i>	トウモロコシアブラムシ	不明	1	1	1	0	3	2
<i>Rhopalosiphum rufiabdominalis</i>	オカボアカアブラムシ	不明	0	1	2	0	3	2
<i>Aphis fukii</i>	フキアブラムシ	不明	3	0	0	0	3	2
マイナー種(※3)			1	5	3	3	12	9
その他(※2)			3	1	2	10	16	13
合計			17	38	23	48	126	100

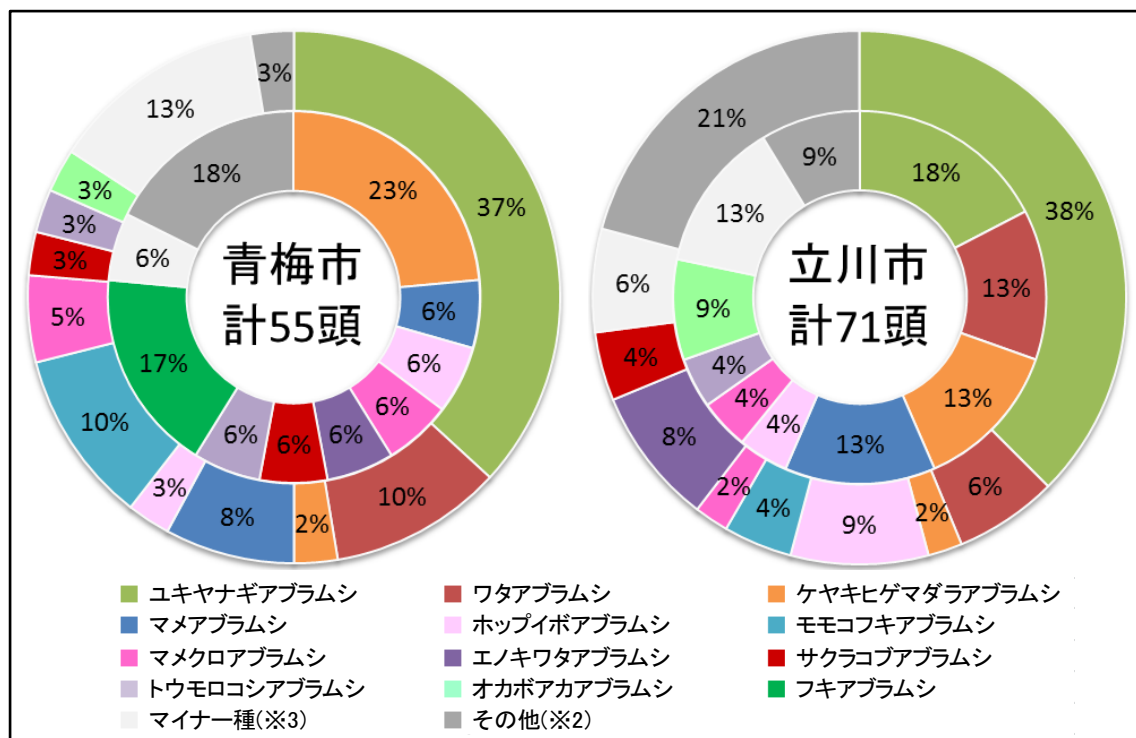


図 9. 調査地域におけるウイルス陽性アブラムシの割合

内円：2011 年のウイルス陽性虫

外円：2012 年のウイルス陽性虫

表 5. PPV 媒介試験結果

学名	アブラムシ名	PPV 媒介能	発病 株数	接種 株数	媒介率
<i>Myzus persicae</i>	モモアカアブラムシ	○	11	45	24.4%
<i>Aphis spiraecola</i>	ユキヤナギアブラムシ	○	8	61	13.1%
<i>Myzus umecola</i>	ウメコブアブラムシ	不明	5	41	12.2%
<i>Aphis craccivora</i>	マメアブラムシ	○	1	19	5.3%
<i>Aphis gossypii</i>	ワタアブラムシ	○	1	27	3.7%
<i>Rhopalosiphum maidis</i>	トウモロコシアブラムシ	不明	1	29	3.4%
<i>Melanaphis sacchari</i>	ヒエノアブラムシ	不明	0	15	0.0%

V. 考察

2011 年のアブラムシ発生消長では、春期と夏期、秋期の一部で誘殺ピークがみられた。しかしウイルス検定では、春期～夏期のウイルス陽性虫率が 0.8～2.0%程度と低率である一方、秋期は 3.1～8.5%であった。これらのことからアブラムシの誘殺数が少ない秋期にも PPV 感染拡大の危険性があることが示唆された。2011 年の秋期には *A. gossypii*、*A. spiraecola*、*P. humuli* が優占種として挙げられた (図 6)。そして実際にウイルス陽性個体数が多かった種は *A. fukii*、*A. gossypii*、*A. spiraecola*、*T. zelkowae* であり、秋期に発生しているアブラムシ種とウイルス陽性個体数が多かった種として *A. gossypii* と *A. spiraecola* が一致した。

2012 年のアブラムシ発生消長は明確ではなかったものの、傾向は 2011 年と同様であり、春期と夏期と秋期に誘殺ピークがみられた。ウイルス検定では、ウイルス陽性虫率が春期に 5.2～6.7%、秋期には 7.0～12.8%まで上昇した。2012 年は春期と秋期に発生しているアブラムシの PPV 媒介リスクが高いと思われる。春期は *A. spiraecola* と *H. pruni* の 2 種、秋期は *A. gossypii*、*A. spiraecola*、*P. humuli* の 3 種が優占種として挙げられた(図 7)。そして実際にウイルス陽性個体数が多かった種は *A. gossypii*、*A. spiraecola*、*P. humuli*、*H. pruni* の 4 種であり、秋期に発生しているアブラムシ種とウイルス陽性個体数が多かった種が完全に一致した。*A. gossypii* と *A. spiraecola* は 2 年連続で秋期に発生し、ウイルス陽性個体数も多いことから、特に PPV 媒介のリスクが高い種であると思われる。

PPV 媒介試験では *M. persicae* が 22.4%で最も高い媒介効率を示したが、同じ PPV-D 系統をモモからモモへ媒介させた場合には 63%の媒介率が報告されており(Gildow et al 2004)、海外の結果と比べると *M. persicae* の効率は低かった。*A. spiraecola* の媒介効率は 13.1%であり、本研究では *M. persicae* に次いで高かった。*A. gossypii* は北アメリカやヨーロッパでの実験結果では非効率的なベクターとして報告されており(Labonne et al 1995)、本研究においても 3.7%と低率であった。それ以外のアブラムシ種では、*M. mumeicola* と *R. maidis* の 2 種で新たに PPV の媒介能が確認された。*M. mumeicola* ではウメへの寄生性が知られており、3 月～4 月の展葉期に大量に発生する。本研究の圃場調査では 14 頭のみ誘殺され、PPV 陽性個体は検出されなかった。しかし媒介試験では 12.2%と *A. spiraecola* に続く媒介効率の高さを示したため、春先の行動や有翅虫の発生パターンをより詳細に調査する必要性が認められた。*R. maidis* は本研究において優占種と認められたが、ウメには寄生せず、媒介試験においても 3.4%の媒介率であるため、非効率的なベクターであると考えられる。*M. sacchari* ではウイルス陽性個体は確認されたが、実験的には PPV を媒介しなかった。PPV を含む *potyvirus* は媒介者特異性が確認されている。これはウイルス粒子が媒介されるために必要な工程とされている、アブラムシ口針先端への吸着ができないためと考えられている(Uzest et al. 2007)。*M. sacchari* は PPV に感染した植物を吸汁していることは分かったが、PPV の媒介能は確認されなかった。このため媒介アブラムシではないと思われる。

2 年間の圃場調査と PPV 媒介試験の結果から、*A. gossypii* は秋期に多く発生していることと、ウイルス陽性個体数が多かったこと、実験的に PPV が媒介されたことから、PPV 発生

圃場で媒介に関与している可能性が疑われた。しかしながら PPV の媒介効率が低かったため、主要な媒介アブラムシ種ではないと推察された。*A. spiraecola* は PPV 媒介リスクの高い秋期に多く発生していることに加え、ウイルス陽性個体数も多く、PPV 媒介試験においても 13.1% と一定の媒介効率を示した。このことから、*A. spiraecola* は東京都青梅市で発生した PPV の主要媒介アブラムシ種であることが示唆された。ウイルス検定の結果から *A. fukii*、*T. zelkowae*、*H. pruni*、*P. humuli* の 4 種もウイルス陽性個体が多かった。しかしながら、Nested RT-PCR 法によるウイルス検定は非常に高感度な手法であることから、陽性であった個体が必ずしも PPV を媒介するとは限らない点に留意しなくてはならない。PPV は非永続型非循環型のウイルスであるためアブラムシに獲得されて数時間で感染性は失われる。一方、ウイルス検定では人工的に作製した保毒虫から PPV を 24 時間後に検出することが可能である。よって Nested-RT-PCR 法では既に PPV の感染性を失ったアブラムシや *M. sacchari* の様にウイルスを獲得することはできるが媒介することができないアブラムシ種もウイルス陽性虫として検出するため、ウイルス陽性虫が全て PPV 媒介虫と判定は出来ない。この 4 種のようなアブラムシ種については、別途 PPV 媒介試験を行うことによって媒介能と媒介効率を確認することが必須である。

また今回の調査では海外で PPV の主要媒介アブラムシ種とされる *M. persicae* がほとんど誘殺されなかった。このことは、黄色粘着板への誘引効率にアブラムシ種間で差があることを示唆している。*A. spiraecola* では黄色水盤トラップと緑色水盤トラップを設置した場合、黄色水盤トラップでは緑色水盤トラップに比べ、3 倍の頭数が誘引されることが知られている(Avinent et al. 1991)。本研究では *A. spiraecola* が最も誘殺されたが、黄色粘着板への感受性がアブラムシごとに異なることが考えら、水盤トラップ等の他の調査方法も実施する必要が認められた。秋期にウイルス陽性個体数が増加する現象については一部のアブラムシでは越冬のため宿主転換で秋期にウメに戻ってくる種や、逆にウメから二次宿主へ移動する種が存在するため、その時期に PPV 感染ウメの緑枝から吸汁する有翅アブラムシの割合が増えることに起因しているのであろうと推察される(石川 2000)。現に、秋期の PPV 感染ウメ緑枝からのウイルス検定において陽性反応が認められている(前島、私信)。感染樹伐採後にウイルス陽性虫が検出されることについてもウメ以外の感染樹の存在を考慮し現地での PPV 感染植物の発生生態を解明する必要がある。

我が国において PPV を撲滅するために感染樹を伐採することは必須であるが、これ以上の感染拡大を防ぐために PPV の媒介アブラムシを駆除することも重要である。今回の研究では慣行防除として春期に 3 回殺虫剤を散布した青梅市の圃場では、立川市の圃場と比較して、発生するアブラムシの数を約半数まで抑制できることが示された。我が国の主要 PPV 媒介種を含むアブラムシ発生のピークは 5 月初旬、6 月中旬、8 月下旬であるため、ピークをむかえる 2 週間前を目安として殺虫剤散布を行う必要がある。また、今回のウイルス検定の結果から、多くの PPV 陽性個体が確認された 10 月、11 月のピークに合わせた殺虫剤散布も望ましいことが認められた。

今後の課題としては、日本において PPV が発生してからの経緯が短いため、多くのことがまだ謎の状態である。従って、PPV が発生した現地圃場でのウイルス検定等の調査は継続していくべきだと考える。またより正確に PPV の感染拡大リスクを評価する為、現地圃場で PPV の媒介能が疑われるアブラムシ種については PPV 媒介試験を行い、媒介効率の調査をする必要がある。このような PPV のベクターに関することなど疫学的知見を集積することが、我が国において PPV を撲滅するための一助となると思われる。それらのデータからアブラムシ類の最適な防除時期を見つけることが感染拡大を防ぎ、PPV を撲滅するための対策につながるであろう。

VI. 謝辞

本研究を行うにあたりご指導いただいた法政大学応用植物医科学研究室の西尾健教授、同大学植物病生態学研究室の鍵和田聡専任講師、ならびに直接のご指導を頂いた独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究センターの津田新哉上席研究員、宇杉富雄博士に深く感謝いたします。統計的解析手法に多くのご助言を頂いた同研究員の光永貴之博士、アブラムシの同定をしていただいた宇都宮大学農学部の香川清彦助手、アブラムシサンプルの提供をしていただいた東京都農林総合研究センターの星秀男様、加藤綾奈様に深く感謝いたします。また、研究に関する助言、議論を行っていただきました独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究センター病害虫研究領域の富高保弘主任研究員、久保田健嗣研究員、川部眞登研究員、ならびに環境保全型病害虫防除技術開発共同実験棟の皆様に厚く御礼申し上げます。

VII. 参考文献

- Atanasoff D (1932) Plum pox. A new virus disease. *Yearbook University of Sofia. Faculty of Agriculture and Silviculture* 11: 49-69.
- Avinent L, Hermoso A, Llacer G (1991) comparison of traps for capture of alate aphids (Homoptera, Aphidinea) in apricot tree orchard. *Agronomie*, 11: 613-618.
- Cambra M, Capote N, Myrta A, Llácer G (2006) *Plum pox virus* and the estimated costs associated with sharka disease. *European and Mediterranean Plant Protection Organization*, 36: 202-204.
- Capote N, Perez-Panades J, Monzo C, Carbonell E, Urbaneja A, Scorza R, Cambra M (2008) Assessment of the diversity and dynamics of Plum pox virus and aphid populations in transgenic European plums under Mediterranean conditions. *Transgenic Research*, 17: 367-377.
- Dallot S, Labenne G, Bueglin M, Quiot-Douine L, Quiot J.B, Candresse, T. (1998) Peculiar plum pox potyvirus D-populations are epidemic in peach trees. *Acta Horticulturae*, 472: 355-365.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294-299.
- Footitt R, Maw H, Von dohlen C, Hebert P (2008) Species identification of aphids (Insecta: Hemiptera:Aphididae) through DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources*, 8: 1189–1201.
- Gildow F, Damsteegt V, Stone A, Schneider W, Luster D, Levy L (2004) Plum Pox in North America: Identification of Aphid Vectors and a Potential Role for Fruit in Virus Spread. *Phytopathology*, 94: 868-874.
- Goytia E, Calvino L, García B, Abella D, Moya J (2006) Production of plum pox virus HC-Pro functionally active for aphid transmission in a transient expression system. *Journal of General Virology*, 87: 3413–3423.

- Hebert P, Cywinska A, Ball S, deWaard J (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *The Royal society*, 270: 313-321.
- Labonne, G., M. Yvon, J. B. Quiot, L. Avinent, and G. Llacer (1995) Aphids as potential vectors of plum pox virus: comparison of methods of testing and epidemiological consequences. *Acta Horticulturae*, 386: 207-218.
- Lupoli R, Labonne G, Yvon M (1992) Variability in the transmission efficiency of potyviruses by different clones of *Aphis gossypii*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 5: 291-300.
- Maejima K, Hoshi H, Hashimoto M, Himeno M, Kawanishi T, Komatsu K, Yamaji Y, Hamamoto H, Namba S (2010) First report of plum pox virus infecting Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 76: 229–231.
- Miroslav G, Veronique M J, Gerard L, Zdeno S, Otakar K, Jean-Bernard Q (2002) A natural population of recombinant Plum pox virus is viable and competitive under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 843–853.
- Miroslav G, Yuri P, Lukáš P, Alžbeta, Yuri, Tatiana Z, Zdeno S, Mariano C, Thierry C (2013) Characterization of Sour Cherry Isolates of Plum pox virus from the Volga Basin in Russia Reveals a New Cherry Strain of the Virus. *PHYTOPATHOLOGY*, 103: No. 9, 972-979
- Uzest M, Gargani D, Drucker M, Hebrard E, Garzo E, Candresse T, Fereres A, Blanc S (2007) A protein key to plant virus transmission at the tip of the insect vector stylet. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 104: 17959-17964.
- Wallis C, Fleischer S, Luster D, Gildow F (2005) Aphid (Hemiptera: Aphididae) Species Composition and Potential Aphid Vectors of Plum Pox Virus in Pennsylvania Peach Orchards. *Entomological Society of America*, 98: 1441-1450.
- Wang R.Y, Powell G, Hardie J, Pirone P.T (1998) Role of helper component in vector-specific transmission of potyvirus. *Journal of General Virology*, 79: 1519-1524.
- Centre for Agricultural Bioscience International (2007) *Distribution Maps of Plant Diseases*. Centre for Agricultural Bioscience International, 4, No.392.

Fauquet C, Mayo M, Maniloff J, Desselberger U, Ball L (2005) *Virus Taxonomy*. Elsevier Academic Press, 821-825.

Hadidi A, R K Khetarpal, Koganezawa H (1998) *Plant Virus Disease Control*. The American Phytopathological Society Press, 616-628.

石川統 (2000) 『アブラムシの生物学』 東京大学出版会 184-185, 187-193, 276-278.

伊藤陽子・宇杉富雄・星 秀男・小谷野伸二・小野 剛・濱田博幸・津田新哉(2011).『ウメ輪紋ウイルス発生地域におけるウイルス保毒アブラムシ有翅虫の検出とリスク評価の試み』 平成23年度日本植物病理学会大会 411

前島健作, 萱野佑典, 姫野未沙子, 濱本 宏, 山次康幸, 難波成任 (2009) 『Plum pox virus (プラムポックスウイルス) の国内における発生』 植物防疫, 63: No.9, 42-46 .

前島健作, 難波成任 (2010) 『本邦におけるplum pox virusの発生』 第10回植物ウイルス病研究会レポート, 45-54.

與良 清、斉藤康夫、土居養二、井上忠男、都丸敬一 (1983) 『植物ウイルス辞典』 朝倉書店, 576-577.

農林水産省 『ウメ輪紋ウイルス（プラムポックスウイルス）の防除について』
http://www.maff.go.jp/j/syouan/syokubo/keneki/k_kokunai/ppv/ppv.html (2014/02/21 アクセス)