

日本産フリージアに発生する条斑壊疽症状について：病原ウイルスの探索

MAENO, Eriko / 前野, 絵里子

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

73

(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

日本産フリージアに発生する条斑壊疽症状について

ー病原ウイルスの探索ー

指導教授 西尾 健 教授

大学院工学研究科

生命機能学専攻植物医科学領域修士課程

12R7207

マエノエリコ

前野絵里子

論文題目：日本産フリージアに発生する条斑壊疽症状について

－病原ウイルスの探索－

第1章 序論

1. 1 背景および目的	1
--------------	---

第2章 実験材料

2. 1 供試植物	4
2. 2 検定植物	7
2. 3 試薬	8

第3章 実験方法

3. 1 現地調査	14
3. 2 栽培と病徴観察	17
3. 3 汁液接種	17
3. 4 ELISA 検定	18
3. 5 遺伝子学的試験	
3. 5. 1 ISOGEN を用いた RNA 抽出	19
3. 5. 2 RT-PCR	19
3. 5. 3 電気泳動	23
3. 5. 4 シーケンス	23
3. 6 電子顕微鏡 (TEM) 観察	
3. 6. 1 ダイレクト・ネガティブ染色法	24
3. 6. 2 免疫電子顕微鏡法 (IEM 法)	24
3. 6. 3 観察	25
3. 7 ウイルス粒子の精製	
3. 7. 1 FreSV の純化方法	25
3. 7. 2 H1F3 の純化方法	27
3. 8 ウイルス外被タンパク質のウエスタンブロッティング	29
3. 9 ウイルスの物理学的性質試験	30
3. 10 土壌試験	31

第4章 ウイルスの同定と特徴

4. 1 <i>Bean yellow mosaic virus</i>	32
4. 2 <i>Freesia mosaic virus</i>	35
4. 3 <i>Freesia sneak virus</i>	37
4. 4 <i>Freesia leaf necrosis virus</i>	43
4. 5 <i>Cucumber mosaic virus</i>	43
4. 6 H1F3	44
4. 7 球根に発生したアブラムシ	48

第5章 疫学調査

5. 1 CNS 症状と感染ウイルスの関連性

5. 1. 1 定性的調査 49

5. 1. 2 定量的調査 51

5. 2 CNS 症状の程度とウイルス濃度の関連性

5. 2. 1 定性的調査 52

5. 2. 2 定量的調査 53

第6章 ウイルス分布

6. 1 圃場別の感染ウイルスについて 54

6. 2 圃場内のウイルス分布状況 55

第7章 考察

7. 1 FreSV の発見 58

7. 2 H1F3 の発見 60

7. 3 CNS 症状の原因 61

7. 4 防除対策 63

要旨 64

謝辞 65

引用文献 66

参考文献 71

第 1 章 序論

1. 1 背景および目的

近年、花卉類は人々に潤いや安らぎを与えるものとして需要が拡大しており、農業生産が低迷する中で数少ない成長分野である。球根類の生産は、ユリやチューリップを中心に国内で 472ha（農水省 online, 2012）栽培されており、切花需要の増加や多様化にともなって今後成長が期待されている（守川ら, 2004）。

花卉球根類の 1 つであるフリージア（*Freesia refracta*）は、南アフリカ・ケープ地方原産のアヤメ科フリージア属の草本性球根植物である（土井, 1995）。香りが良く、切花としての人気が高い。世界ではオランダ、イタリア、アイルランド、ニュージーランド、インドなどで栽培されている（Fuxe and Wilson, 1985 ; Brunt, 1995 ; Kumer *et al*, 2009 ; Pearson *et al*, 2009）。わが国のフリージア栽培は、球根生産と切花生産に大別することができ、前者は鹿児島県沖永良部島や東京都八丈町の無霜地帯での露地栽培が中心で（土井, 1995）、後者は徳島県阿南市などで栽培されている。また、東京都八丈町では、毎年 3～4 月にフリージア祭りが開催され、約 35 万本の花が咲き誇り、観光客で賑わっている（八丈島観光協会 online, 2014）。

フリージアは、18 世紀半ばにヨーロッパに導入され、交配と選抜が繰り返されてきた（土井, 1995）。オランダでは約 600 品種が栽培されており（Meekes and Verbeek, 2011）、これは、栄養繁殖性の植物であることから球根がウイルスに汚染されると、品種の作出から数年で徐々に球茎および切花の生産性が低下することが原因だと考えられている（土井, 1995 ; 堀田ら, 2008）。特に花卉類は、観賞性に商品価値を求めるため、僅かな病害の発生が品質の著しい低下をもたらすと言われている。よって、防除対策が重要となるが、ウイルスによる植物病害には予防薬・治療薬が無いため、発病株の除去や媒介者の防除が中心となる。しかし、病徴株の除去は、抜き取りの指標となる病徴が品種やウイルスの種類によって異なり、また、病徴が分かりにくいこともあるので、感染株を識別する熟練や莫大な労働力が必要となる（守川ら, 2004）。実際に、フリージアには様々な植物ウイルス *Bean yellow mosaic virus* (BYMV), *Freesia mosaic virus* (FreMV), *Freesia sneak virus* (FreSV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tobacco rattle virus* (TRV), *Freesia streak virus* (FSV), *Freesia leaf necrosis virus* (FLNV) が感染することが報告されており、葉や花卉、球根などで様々な症状 {(葉: 黄化、モザイク、赤紫化) (花卉: ブレーキング) (球根: 壊死)} が確認されている (Brunt, 1968, 1969, 1970 ; 井上 and 光畑, 1983 ; Bellardi and Bertaccini, 1989 ; Brunt, 1995 ; 亀谷ら, 1993 ; 西村, 1998 ; Vaira *et al*, 2009)。中でも現在世界で問題とされているのが、葉に発生する壊疽症状である (Brunt, 1995 ; Vaira *et al*, 2006)。本症状は、葉の先端の退緑斑や条斑から始まり、葉全体に広がる。その後、茶褐色となり壊疽となる。花および球根には症状が見られない (Bouwen, 1994)。開花前に枯死することもあり (Meekes and Verbeek, 2011)、経済的被害を及ぼしている (Vaira *et al*, 2006)。本症状は、

オランダにて 1963 年に初発生し、FLN (Freesia leaf necrosis) と名付けられ、2 年後にはさらに病徴が悪化し、SLN (Severe leaf necrosis) と呼ばれるようになった (van Dorst, 1973; Bouwen, 1994)。SLN は、FreMV と未知の病原体の複合感染によって引き起こされると考えられている (van Dorst, 1973)。そして、その未知の病原体とは菌類ツボカビ門の *Olpidium brassicae* によって土壌伝染する (van Dorst, 1975)。また、Bouwen は、FLN から *C. quinoa* など 3 種検定植物に汁液伝染するウイルスを検出し、部分純化試料中に棒状の varicosavirus 属と思われるウイルスを 10 粒子程度検出した (Bouwen, 1994)。後に、このウイルスは Freesia leaf necrosis virus (FLNV) と命名されたが、病原ウイルスかどうかは明らかにされていない (Vaira et al, 2006)。その他にも、LN および SLN と似た `freesia streak` が、イギリスとドイツで発見されている。freesia streak からは、Freesia streak virus (FSV) が検出されている (Casper and Brunt, 1971)。また、国内でも西日本各地でフリージアにモザイクと激しい壊疽症状を生ずる病気が多発し、FSV が検出された (井上 and 光畑, 1983)。FSV は後にイキシア (*Ixia hybrida*) から検出され、さらに potyvirus 属であると同定された (辻ら, 1993, 1994)。しかし、近年 FSV に関する報告および記載が非常に少なく、ウイルスの性状は明らかではないと思われる。また、FreSV が壊疽症状と関連していると示唆されている報告が 2 件ある。①FreSV と他のウイルス (FreMV, FLNV, BYMV) のいずれかが共存している場合 (Vaira et al, 2006)、②FreSV が感染し FreMV が無感染の場合 (Vaira et al, 2009) である。また、その他にも未知ウイルスが関連しているという報告もある (Meekes and Verbeek, 2011)。しかし、いずれにせよ壊疽症状を呈するフリージアは、これらのウイルスが複合感染していることが殆どである (Vaira et al, 2006)。また、BYMV を除く他のウイルスは戻し接種ができない (Derks and vink-van den Abeele, 1987; Vaira et al, 2006) ことから壊疽症状の原因は現在も明らかにされていない (Meekes and Verbeek, 2011)。

近年、わが国でもフリージアの主要産地である東京都八丈町の複数の生産圃場にてウイルス病が多発し、生産に大きな被害を及ぼしており、2011 年春に東京都島しょ農林水産総合センター八丈事業所からウイルス病の同定依頼があった。実際に病徴観察を行ったところ、葉に緋状の退緑または条斑壊疽症状 (Chlorotic necrotic streak : CNS 症状) を呈する株が多く見られた (図 1)。これは、ヨーロッパで報告されている FLN の症状と非常に似ている。現地では、圃場によっては CNS 症状を呈する株が半分以上を占めるなど、深刻な問題となっており、生産を断念する農家も存在する。そこで、2012 年には現地調査を行い、同年秋に学会報告を行ったところ、徳島県阿南農業支援センターから情報提供の依頼および多量の同定依頼があった。病徴観察の結果、徳島県阿南市産フリージアにも CNS 症状を呈する株が多く見つかり、CNS 症状は日本各地でフリージア生産に被害を及ぼしている可能性が高いことが示唆された。そこで、本研究では、わが国のフリージア生産圃場 (東京都八丈町、徳島県徳島市および阿南市) にて栽培されているフリージア、そして市販のフリージア (鹿児島県産、東京都産) に感染しているウイルスを分離・同定し、CNS 症状との相関関係を明らかにすること、さらに防除対策の確立を目的として研究を行った。

表 1. フリージアの壊疽症状に関連するウイルス

ウイルス名	属	備考
<i>Bean yellow mosaic virus</i> (BYMV) *	potyvirus	複合感染した壊疽症状株から時に分離 (2006)
<i>Freesia mosaic virus</i> (FreMV)	potyvirus	土壌伝染する未知の病原体との複合感染で SLN 症状 (1973)
<i>Freesia sneak virus</i> (FreSV)	ophiovirus	<i>Freesia ophiovirus</i> (FOV) を提案 (2006) 後に FreSV に変更 複合感染した壊疽症状株から頻繁に分離 (2006)
<i>Freesia leaf necrosis virus</i> (FLNV)	varicosavirus	FLN 症状から発見 (1994) FLNV と命名 (2006) 病原ウイルスかどうかは不明 (2006)
<i>Freesia streak virus</i> (FSV) *	potyvirus	ドイツの SLN 症状株から検出 (1971) 西日本のモザイクと激しい壊疽症状株から検出 (1983) 850×13nm のひも状 (1983) アブラムシ非永続伝搬、(1969, 1983) 西日本各地で広く発生 (1993) 宿主範囲が狭い (1993)

* 本研究を行う以前に国内でフリージアへの感染が確認されているウイルス
(Brunt, 1969 ; Casper and Brunt, 1971 ; van Dorst, 1973 ; 井上ら, 1983 ; 亀谷, 1993 ; Bouwen,
1994 ; Vaira *et al*, 2006)



図 1. CNS 症状を呈する東京都八丈町産フリージア
品種：不明

第2章 実験材料

2. 1 供試植物

材料は、東京都八丈町、徳島県徳島市および阿南市の生産圃場にて栽培されている株と、市販球根（鹿児島県産・東京都産）を使用した（表2）。生産圃場にて栽培されている株は、現地調査にて採集または現地の農業試験場から送付して頂き、試験を行った。これらは、CNS 症状だけでなく、葉のモザイク症状や黄化症状など様々な症状を呈する株を提供して頂いた。また、市販球根（鹿児島県産および東京都産）は東京都小金井市内のホームセンターで購入後、大学内でプランターに植えつけ、調査を行った。

表2. 使用した供試フリージア

日時	供試源	株数
2010 年 10 月	市販	500
2011 年 3 月	東京都八丈町（送付）	8
2011 年 10 月	市販	310
2012 年 2 月	東京都八丈町（現地調査）	49
2012 年 10 月	市販	160
2012 年 11 月	徳島県阿南市（送付）	91
2013 年 2 月	東京都八丈町（現地調査）	453
2013 年 10 月	市販	115
2013 年 12 月	徳島県阿南市（送付）	69
2014 年 1 月	徳島県徳島市・阿南市（現地調査）	206



図2. CNS 症状を呈する東京都八丈町産フリージア
品種：ポルトサルート



図 3. CNS 症状を呈する東京都八丈町産フリージア
品種：不明



図 4. CNS 症状を呈する
東京都八丈町産フリージア
品種：ラビットイエロー



図 5. CNS 症状を呈する
徳島県阿南市産フリージア
品種：ブルーヘブン



図 6. 赤紫化症状を呈する東京都八丈町産フリージア
品種：カルガリ



図 7. モザイク症状を呈する
東京都八丈町産フリージア
品種：アラジン

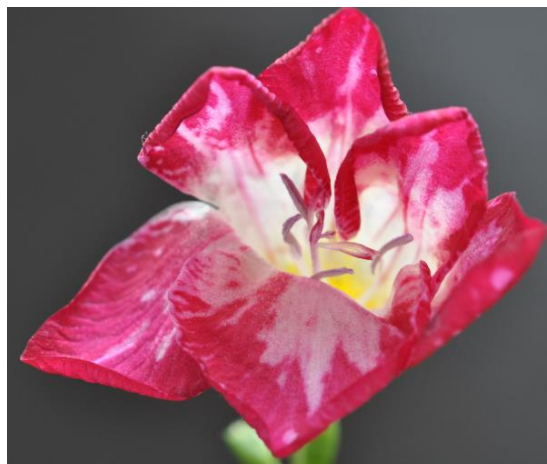


図 8. 花にブレーキング症状を呈する
市販フリージア（鹿児島県産）
品種：不明



図 9. 奇形症状を呈する
徳島県徳島市産フリージア
品種：アラジン



図 10. 茎にストライプ症状を呈する
徳島県徳島市産フリージア
品種：ポルトサルート

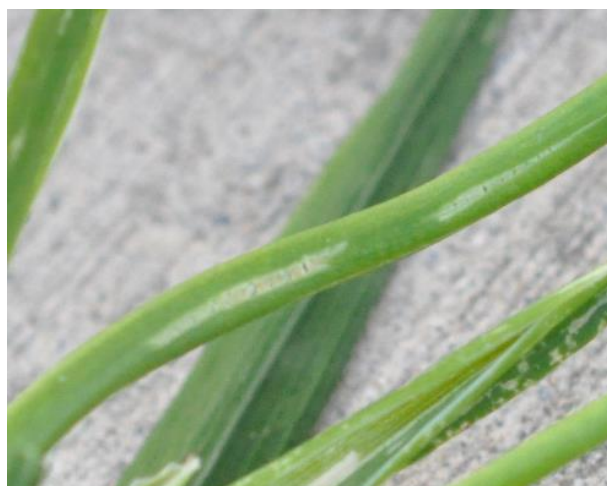


図 11. 茎に壊疽症状を呈する
徳島県徳島市産フリージア
品種：ラビットイエロー

2. 2 検定植物

汁液接種を行うために、8 科 24 種の植物を使用した（表 3）。これらの検定植物は、文献などを参考に、感染が予想される *Nicotiana* 属などの植物を中心に選んだ（大木，2009）。

表 3. 使用した検定植物

科名	種名	和名
Chenopodiaceae アカザ科	<i>Chenopodium quinoa</i>	キノア
	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	アカザ
Solanaceae ナス科	<i>Nicotiana bethamiana</i>	
	<i>Nicotiana occidentalis</i>	
	<i>Nicotiana clevelandii</i>	
	<i>Nicotiana tabacum</i> var. White Burley	
	<i>Nicotiana tabacum</i> var. Xanthi-nc	
	<i>Nicotiana glutinosa</i>	グルチノーザ
	<i>Datura stramonium</i>	シロバナヨウシュチ ヨウセンアサガオ
	<i>Capsicum annuum</i>	トウガラシ
	<i>Solanum lycopersicum</i>	トマト
	<i>Petunia hybrid</i>	ペチュニア
Apiaceae セリ科	<i>Carum foetidum</i>	
Fabaceae マメ科	<i>Phaseolus vulgaris</i>	インゲンマメ
	<i>Vigna unguiculata</i>	ササゲ
	<i>Vicia faba</i>	ソラマメ
Cucurbitaceae ウリ科	<i>Cucumis sativus</i>	キュウリ
Amaranthaceae ヒユ科	<i>Gomphrena globosa</i>	センニチコウ
Asteraceae キク科	<i>Ixeris japonica</i>	オオジシバリ
	<i>Sonchus asper</i>	オニノゲシ
	<i>Cirsium japonicum</i>	ノアザミ
	<i>Taraxacum platycarpum</i>	カントウタンポポ
	<i>Taraxacum officinale</i>	セイヨウタンポポ
Iridaceae アヤメ科	<i>Freesia refracta</i>	フリージア

2. 3 試薬

◆汁液接種および物理学的性質試験用試薬

1. 0.05M リン酸緩衝液 pH7.0

汁液接種および物理学的性質試験の磨砕用緩衝液として使用した。

a: リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4) 6.8g

蒸留水 1,000ml

b: リン酸水素ナトリウム二水和物 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 8.9g

蒸留水 1,000ml

MAGNETIC STIRRER IS-3C (池田理化社製) で攪拌しながら、a に b を注ぎ、pH メーター F-54 (堀場製作所製) で pH7.0 に調節した。その後、1mM エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物: Na-EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{N}_2\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、5mM N,N-ジエチルジチオカルバミド酸ナトリウム三水和物: Na-DIECA { (C_2H_5)₂NCS₂Na $\cdot$ 3H₂O }、5mM チオグリコール酸ナトリウム ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2\text{S}$) を加えた。また、汁液接種時のみ使用直前に活性炭を 10mg/ml になるように加えた。(Vaira *et al*, 2006)

2. 0.1M HEPES 緩衝液 pH7.8

汁液接種の磨砕用緩衝液として使用した。

1M HEPES ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$) 10ml を蒸留水 90ml に溶解し、20mM 亜硫酸ナトリウム (Na_2SO_3)、5mM Na-EDTA、10mM Na-DIECA を加えた。pH を確認した。(Verbeek *et al*, 2013)

◆ELISA 用試薬

1. 0.05M 炭酸緩衝液 pH9.6

コーティング用緩衝液として使用し、これを用いて抗血清を 500 倍または 1,000 倍に希釈した。

炭酸ナトリウム (Na_2CO_3) 1.7g

炭酸水素ナトリウム (NaHCO_3) 2.8g

これらを蒸留水 1,000ml に溶解し、pH を確認した後、アジ化ナトリウム (NaN_3) 0.2g を加えた。

2. リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) + Tween20

主にプレートの洗浄液として使用し、磨砕時や二次抗体反応時にも用いた。

0.02M リン酸緩衝生理食塩水 pH7.4 (PBS) に 0.05% の Tween20 を加えた。PBS は、通常多量に使用するため、10 倍濃度の PBS (10×PBS) を作製し、保存用とした。

■PBS-T

10×PBS 200ml

Tween20 1ml

蒸留水 1800ml

これらを混合し、溶解した。

■10×PBS pH7.4

塩化カリウム (KCl) 2g

リン酸一カリウム/リン酸二水素カリウム 2g

リン酸二ナトリウム/リン酸水素二ナトリウム 12 水 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 29g

塩化ナトリウム (NaCl) 80g

これらを蒸留水 1,000ml に溶解し、pH を確認した後、アジ化ナトリウム 0.2g を加えた。

3. 10%ジエタノールアミン水溶液

基質用緩衝液として使用した。

ジエタノールアミン ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_2$) 100ml を蒸留水 800ml に溶解し、塩酸 (HCl) で pH を 9.8 に調整した後、1,000ml とし、塩化マグネシウム ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 100mg、アジ化ナトリウム 200mg を加えた。また、使用直前に *p*-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物 $\{\text{O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{OPO}(\text{ONa})_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}\}$ を 1mg/ml になるように基質用緩衝液に溶解した。

◆RT-PCR 用試薬

1. 1×TAE

アガロースゲル作成および電気泳動用バッファーとして使用した。

通常多量に使用するため、50 倍濃度の TAE (50×TAE) を作製し、保存用とした。

■1×TAE

50×TAE 20ml を蒸留水 980ml に混合し、溶解した。

■50×TAE

トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン $\{\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3\}$ 60.5g

酢酸 (CH_3COOH) 14.28ml

0.5M Na-EDTA 25ml

これらを蒸留水 200ml で溶解し、最後に目盛が 250ml までメスアップした。

2. 1%または2%アガロースゲル

電気泳動に使用した。

作りたい当該量の1×TAEと、その1%または2%のAgarose S（ニッポンジーン社製）をコルベンで混合し、ラップをして電子レンジで沸騰状況を確認しながら、アガロースを溶解させた。完全に溶解したら60℃程度まで冷やし、ゲルメーカーにゲル板をセットし、アガロースを流し込んだ。コームを挿してラップをかけて冷まし、冷えたら1×TAEに浸して保存した。

3. EtBr 染色液

アガロースゲルの染色液として使用した。

10μg/ml EtBr 10μl と 1×TAE 150ml を混合した。

◆純化用試薬

1. 0.05M リン酸緩衝液 pH7.9

磨砕用緩衝液として使用した。

a：リン酸二水素カリウム 6.8g

蒸留水 1,000ml

b：リン酸水素ナトリウム二水和物 8.9g

蒸留水 1,000ml

攪拌しながら、aにbを注ぎ、pH7.9に調節した。その後、10mM Na-EDTA、10mM Na-DIECA、0.1% 2-メルカプトエタノールを加えた。

2. 0.05M リン酸緩衝液 pH7.0

磨砕用緩衝液として使用した。

a：リン酸二水素カリウム 6.8g

蒸留水 1,000ml

b：リン酸水素ナトリウム二水和物 8.9g

蒸留水 1,000ml

攪拌しながら、aにbを注ぎ、pH7.0に調節した。その後、5mM Na-EDTA、20mM Na-DIECA、0.01% 2-メルカプトエタノールを加えた。

3. 0.01M Tris-HCl 緩衝液 pH7.9 または pH7.0

懸濁用緩衝液として使用した。

トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン 1.21g を蒸留水 900ml に溶解し、pH7.9 または pH7.0 になるように塩酸を加えた。蒸留水で、目盛が 1,000ml までメスアップした。

4. ベントナイト精製

清澄剤として使用した。

マグネシウム-ベントナイト精製方法は図 12 に示した。

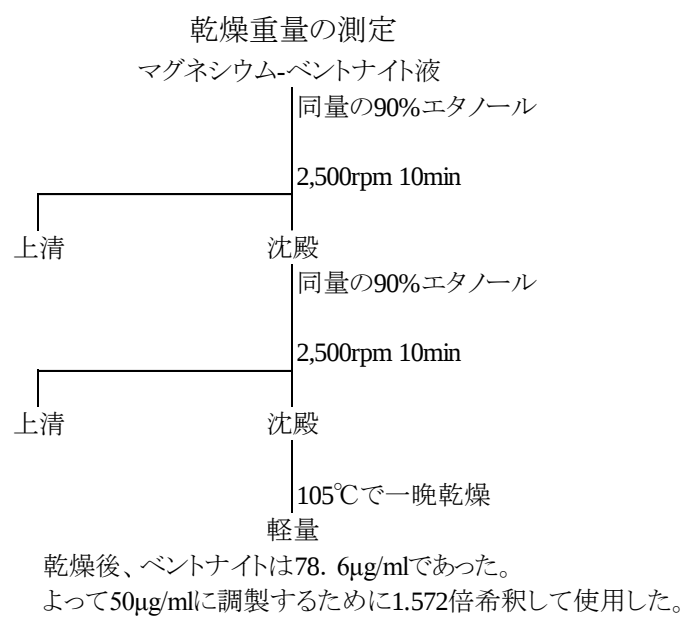
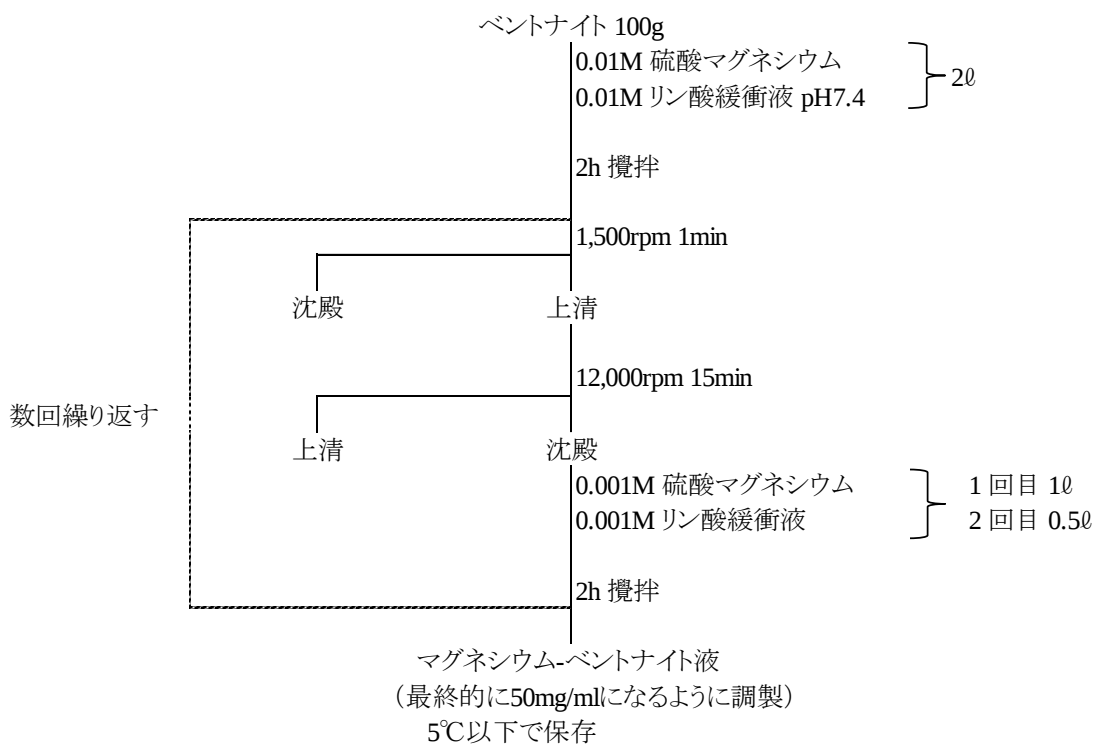


図 12. マグネシウム-ベントナイト精製方法

◆ウエスタンブロッティング用試薬

1. SDS-PAGE 電気泳動用緩衝液

トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 1.5g

グリシン ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$) 7.2g

これらを蒸留水 450ml に溶解し、蒸留水で目盛が 500ml までメスアップした。メスアップ後、ドデシル硫酸ナトリウム : SDS ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$) 0.5g を加え、溶解した。

2. ウエスタンブロッティング用バッファー溶液 (A, B, C)

・A 溶液

トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 3.63g

メタノール (CH_4O) 5ml

これらを蒸留水 70ml に溶解し、蒸留水で目盛が 100ml までメスアップした。

・B 溶液

トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 0.30g

メタノール 5ml

これらを蒸留水 70ml に溶解し、蒸留水で目盛が 100ml までメスアップした。

・C 溶液

トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 0.30g

6-アミノヘキサン酸 0.52g

メタノール (CH_4O) 5ml

これらを蒸留水 70ml に溶解し、蒸留水で目盛が 100ml までメスアップした。

◆*Olpidium* 属菌観察用試薬

1. 酸性フクシン液

染色液として使用した。

酸性フクシン ($\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{Na}_2\text{N}_3\text{O}_9\text{S}_3$) 0.8g

フェノール ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) 20ml

グリセリン $\{\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3\}$ 40ml

蒸留水 20ml

これらを混合し、溶解した (大木, 2009)。

2. ラクトフェノール液

脱色液として使用した。

乳酸 ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$) 20ml

フェノール 20ml

グリセリン 20ml

蒸留水 20ml

これらを混合し、溶解した (大木, 2009)。

第3章 実験方法

3. 1 現地調査

2012年2月および2013年2月に東京都八丈町にて、2014年1月には徳島県徳島市および阿南市にて現地調査を行った。いずれも複数のフリージア生産圃場を訪問し、フリージアおよび栽培土壌の採集、野帳の記録（日付、品種、病徴、栽培管理方法など）、写真撮影を行った。

◆東京都八丈町での調査

1) 2012年2月

フリージア栽培圃場6ヶ所（T, O, Y, S, K, R圃場）を調査した。いずれの圃場でも葉にCNS症状やモザイク症状などを呈する株が多く見られた。病徴株を中心にフリージア20品種49検体、土壌はフリージア10品種の根元から17検体採集した。

2) 2013年2月

フリージア栽培圃場3ヶ所（O, Y, S圃場）を調査した。Y, S圃場ではCNS症状株が多く見られた。一方で、O圃場は健全株が多く見られた。サンプル採集はDisease sampling（DS）およびRandom sampling（RS）の2通りの方法で行った。

DS：CNS症状など何らかの病徴を呈する株を中心に、17品種153検体採集した。

RS：病徴の有無に関わらず、圃場内全体を数メートル間隔で採集した。各圃場100株ずつ計15品種300検体採集した。なお、RSは圃場内での感染ウイルスの分布状況を調査する目的で行った。

土壌は、フリージア8品種の根元から15検体採集した。



図13. 露地栽培を行っている東京都八丈町S圃場



図 14. CNS 症状株が多く見られる
東京都八丈町 S 圃場



図 15. CNS 症状株が抜かれた
東京都八丈町 O 圃場

◆徳島県での調査

1) 2014 年 1 月の調査

フリージア生産圃場 7 ヶ所（徳島市：TOK1, TOK2 圃場、阿南市：A, B, F, H, I 圃場）を調査した。いずれの圃場でも葉に CNS 症状やモザイク症状などの病徴を呈する株が多く見られた。TOK2 圃場では、球根にアブラムシが多量に発生している株もあった（図 18）。病徴株を中心にフリージア 11 品種 206 検体、土壌はフリージア 6 品種の根元から 21 検体採集した。



図 16. ハウス栽培を行っている徳島県徳島市 TOK1 圃場



図 17. CNS 症状株が抜かれた徳島県徳島市 TOK2 圃場



図 18. 球根に多量のアブラムシの発生が観察された徳島県徳島市 TOK2 圃場

◆送付サンプル

東京都八丈町および徳島県阿南市から送付して頂いたサンプルに関しては、大学内の暗室にて写真撮影、野帳の記録（日付、品種、病徴など）を行い、凍結保存して試験を行った。

3. 2 栽培と病徴観察

2010 年～2013 年秋に毎年、東京都小金井市内のホームセンターでフリージアを購入し、プランターに植え付け、翌年 4 月まで大学内東館 5 階の廊下で栽培した（図 19）。5 月には球根を掘り出してクリーンルームで保存し、同年秋に再度また植え付けた。

芽の出始めた時期から随時肉眼観察を行い、葉や花に病徴の見られる株にはラベルをつけ、写真撮影および ELISA 検定を行った。

また、東京都八丈町産フリージアおよび徳島県阿南市産フリージアも、採集した翌年秋まで球根をクリーンルームにて保存し、一部はプランターに植え付け 4 月まで栽培し、写真撮影および ELISA 検定を行った。



図 19. 大学内で栽培しているフリージア

3. 3 汁液接種

病徴観察で明瞭な症状が確認された検体および、ELISA 検定にてウイルス感染が確認された検体を中心に試験を行った。

接種源は、新鮮で病徴を明瞭に現した罹病植物の葉を採取した。氷冷した乳鉢に、採取した病徴葉と接種用緩衝液を入れ、よく磨砕した。接種用緩衝液は、主に 0.05M リン酸緩衝液 pH7.0 (添加剤を含む) を用い、FreSV を接種源とするときのみ 0.1M HEPES 緩衝液 pH7.8 (添加剤を含む) も用いた。これは、*ophiovirus* 属の *Mirafiori lettuce virus* (MiLV) を *C. quinoa* にて汁液接種で継代するのに最適とされている緩衝液であるためである (Verbeek *et al*, 2013)。磨砕液にカーボンランダム（昭和電工社製）を加え、綿棒に磨砕液を染み込ませ、検定植物の葉の表面に軽く擦るように接種した。接種後すぐに、水で汁液及びカーボンランダムを洗い流し、温室内に置いた。適宜観察を行い、病徴を詳しく記録するとともに写真撮影を行った。（大木，2009）

3. 4 ELISA 検定

抗血清は、BYMV（日本植物防疫協会製）、FreMV（BQ Support 社製）、FreSV（Prime diagnostics 社製）、CMV（日本植物防疫協会製）を使用した。ポジティブコントロールは、BYMV、FreMV、FreSV の 3 種ウイルスの複合感染が確認されている東京都八丈町産フリージア（品種：ラビットイエロー）と、CMV 感染が確認されているニチニチソウを使用した。

1) コーティング処理

抗血清を 0.05M 炭酸緩衝液 pH9.6 で 500 倍（BYMV、CMV）または 1,000 倍（FreMV、FreSV）希釈し、希釈液をマイクロプレート（FALCON 社製、NUNC 社製）の各穴に 200 μ l ずつ分注した。分注後、湿らせたキムタオル（日本製紙クレシア製）と一緒にタッパーに入れて、37℃3 時間または 4℃一晩静置した。その後、マイクロプレートを MODEL1575ImmunoWash（バイオ・ラッド・ラボラトリーズ社製）で 8 回洗浄した。

2) 試料処理

乳鉢に、罹病植物とその 20 倍量の PBS-T を入れ、乳棒で磨り潰した。磨砕液をコーティング処理したマイクロプレートに 200 μ l ずつ分注した。分注後、湿らせたキムタオルと一緒にタッパーに入れて、37℃3 時間または 4℃一晩静置した。その後、マイクロプレートを MODEL1575ImmunoWash で 8 回洗浄した。

3) コンジュゲート処理

コンジュゲート液を PBS-T で 500 倍または 1,000 希釈し、希釈液を試料処理したマイクロプレートの各穴に 200 μ l ずつ分注した。分注後、湿らせたキムタオルと一緒にタッパーに入れて、37℃3 時間または 4℃一晩静置した。その後、マイクロプレートを MODEL1575ImmunoWash で 8 回洗浄した。

4) 基質処理～測定

10%ジエタノールアミン水溶液に *p*-ニトロフェニルりん酸二ナトリウム六水和物（1mg/ml）を溶解し、基質溶液を 200 μ l ずつマイクロプレートの各穴に分注した。30～60 分後に吸光度をマイクロプレートリーダーSH-1000（コロナ社製）で測定した。判定は、肉眼観察およびネガティブコントロールの 2 倍以上の吸光度を陽性とした。

3. 5 遺伝子学的試験

3. 5. 1 ISOGEN を使用した RNA 抽出

明瞭な病徴が見られる比較的若い葉を 1~2cm 角程度カミソリで切り取って乳鉢に入れ、液体窒素で粉末になるまで乳棒で磨砕した。融解する前に ISOGEN 1ml を加え、更に磨砕した。磨砕液の全量を RNase free の 1.5ml チューブに回収し、クロロホルム 200 μ l を加え、1 分間ボルテックス (Scientific Industries 社製) にかけた。遠心 (15,000rpm 5min 室温) し、上部の水層を別のチューブに回収し、2-プロパノール (C_3H_8O) 500 μ l を加え、ボルテックスにかけ、室温で 10 分静置した。次に、遠心 (15,000rpm 10min 室温) し、デカンテーションによって得られた沈殿に 70%エタノール (C_2H_6O) 1ml を加え、遠心 (15,000rpm 5min 室温) した。デカンテーションにより上清を捨て、残った上清をマイクロピペッターにより丁寧に取り除き、沈殿を 10 分程度風乾した。沈殿に RNase free water 50 μ l を加え、ピペッピング、ボルテックスにて溶解した。

3. 5. 2 RT-PCR

プライマーは、BYMV 特異的プライマー : BCPF・BCPD (Kumer *et al*, 2009)、FreMV 特異的プライマー : FMV-F・FMV-R、ophiovirus 属特異プライマー : OP1・OP2 (Vaira *et al*, 2003)、ophio-CPf・ophio-CPr、cytorhabdovirus 属特異プライマー : DFf・LVr (Petrzik *et al*, 2012)、nucleorhabdovirus 属 *Sonchus yellow net virus* (SYNV) 特異的プライマー : SY-675・SY-1090 (Vaira *et al*, 2003) を使用した (表 4)。FMV-F・FMV-R は本研究室 4 年の水田が 2013 年に、ophio-CPf・ophio-CPr は本専修の長尾郁弥先生が 2012 年に作製した。ポジティブコントロールは、ELISA 検定にて BYMV、FreMV、FreSV の 3 種ウイルスの複合感染が確認されている東京都八丈町産フリージア (品種 : ラビットイエロー) と、ophiovirus 属の *Tulip mild mottle mosaic virus* (TMMMV) 感染した富山県産チューリップを使用した。cytorhabdovirus 属および *Sonchus yellow net virus* (SYNV) は、感染植物が無かったため、ポジティブコントロールを除いて試験を行った。

表 4. 使用したプライマー一覧

プライマー名	配列 (5' to 3')	想定される DNA 増幅産物量	引用
BCPF	TCTGACCAAGAACAACACTCAA	822bp	Kumer <i>et al</i> , (2009)
BCPD	CTAAATACGAACACCAAGCA		
FMV-F	GGGATAGGATTGTACCCGAGTTG	246bp	水田作製 (2013)
FMV-R	TCAGCGTCAAGTTGCTCTG		
OP1	GGAAGRTATTTYCATAGRGC	136bp	Vaira <i>et al</i> , (2003)
OP2	TGTTTCTCCACTCCWCCTGTT		
Degenerations : R= A/G, Y= C/T, W= A/T			
ophio-CPf	GAAAGCTCAGAAAAATCAGC	958bp	長尾作製 (2012)
ophio-CPr	CCCTGGCTTTAGATCAAGA		
SY-675	GCCCCGATATCGTCAAGTG	416bp	Vaira <i>et al</i> , (2003)
SY-1090	GGCCATGTAATTCAGCGAGG		
DFf	GAYTTYGARAARTGGAAYGG	340bp	Petrzik <i>et al</i> , (2012)
LVr	GAGIACYTGRTTTCICC		
Y= C or T, R= A or G, H= A or C or T, I= inosine			

RT-PCR は、1 step RT-PCR と 2 step RT-PCR の 2 通りの方法で行った。

A : 1 step RT-PCR

PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver. 2 (タカラバイオ社製) を用いて RT-PCR を行った。表 5 の通りにプレミックスを作成した後、PCR チューブに分注し、Template RNA を 0.5 μ l 入れて、サーマルサイクラー (Applied Biosystems 社製) にかけた。反応条件は表 6 の通りである。なお、1 step RT-PCR は OP1・OP2 プライマーでは行わなかったため、反応条件は示さなかった。

表 5. 1 step RT-PCR 用試薬

試薬名／サンプル数	×1 (μl)
PrimeScript 1st step Enzyme Mix	0.4
2×1step buffer	5
20μM Forward primer	0.2
20μM Reverse primer	0.2
DDW	3.7
(Template RNA)	(0.5)
Total	10

表 6. 1 step RT-PCR の反応条件

プライマー	温度	時間	回数
BCPF・BCPD FMV-F・FMV-R	50	30min	1
	94	2min	1
	94	30sec	
	55	30sec	35
	72	1min	
	72	7min	1
	4	∞	
ophio-CPf・ophio-CPr	50	30min	1
	94	2min	1
	94	30sec	
	50	30sec	35
	72	1min	
	72	7min	1
	4	∞	
SY-675・SY-1090	50	30min	1
	94	2min	1
	94	15sec	
	55	30sec	35
	72	30sec	
	72	5min	1
	4	∞	
DFf・LVr	50	30min	1
	94	2min	1
	95	20sec	
	46	20sec	40
	72	1min	
	72	5min	1
	4	∞	

B : 2 step RT-PCR

TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 (タカラバイオ社製) を用いて RT-PCR を行った。

① 逆転写反応

表 7 の通りにプレミックスを作成した後、PCR チューブに分注し、Template RNA を 0.5 μ l 入れて、サーマルサイクラー (42°C 25min、95°C 5min、4°C ∞) にかけた。

表 7. 逆転写反应用試薬

試薬名／サンプル数	1 sample (μ l)
dNTP Mixture	0.5
MgCl ₂	1
10 $\times$ RT Buffer	0.5
20 μ M Reverse primer	0.25
RNase free water	1.875
RNase Inhibitor	0.125
AMV Reverse Transcriptase XL	0.25
(Template RNA)	(0.5)
Total	5

② PCR 反応

表 8 の通りにプレミックスを作成した後、逆転写液の入ったチューブに分注し、サーマルサイクラーにかけた。反応条件は表 9 の通りである。なお、2 step RT-PCR は ophiovirus 属特異プライマー：OP1・OP2 および ophio-CPf・ophio-CPr 以外では試験を行わなかったため反応条件は示さなかった。

表 8. PCR 反应用試薬

試薬名／サンプル数	1 sample (μ l)
DDW	14.375
5 $\times$ PCR Buffer	5
20 μ M Forward primer	0.25
20 μ M Reverse primer	0.25
TaKaRa ExTaq HS	0.125
(Template DNA)	(5)
Total	25

表 9. PCR 反応条件

プライマー	温度	時間	回数
OP1・OP2	94	2min	1
	94	15sec	
	50	30sec	35
	72	30sec	
	72	5min	1
	4	∞	
ophio-CPf・ophio-CPr	95	4min	1
	94	30sec	
	50	30sec	35
	72	1min	
	72	7min	1
	4	∞	

3. 5. 3 電気泳動

アガロースゲル電気泳動槽 (ADVANCE 社製) にゲルを置き、ゲルの上まで 1×TAE を注ぎ、ピペットでウェルを掃除した。パラフィルムに 6×Loading Dye を 1μl ずつ分注し、サンプルを 1μl ずつ Loading Dye に混合し、サンプル全量をウェルにロードした。端のウェルにはマーカーとして、λHindIII (タカラバイオ社製) または 100bp Ladder (タカラバイオ社製) を 4μl ロードした。85V または 120V で 30~60 分泳動し、終了後に EtBr 染色液に 10 分浸した。その後、ゲル撮影装置 (アトー社製) 内で紫外線を照射し、増幅産物の確認を行い、写真撮影した。

3. 5. 4 シーケンス

1) シーケンスリアクション

PCR 産物 5μl と Illustra ExoProStar 1μl、Illustra Alkaline Phosphatase 1μl を PCR チューブに入れ、ピペッティングで混合した。サーマルサイクラー (37℃ 15min、80℃ 15min、4℃ ∞) にかけた。表 10 の通りにプレミックスを作成した後、PCR チューブに分注し、Template DNA を 3.5μl 加え、サーマルサイクラー {96℃ 3min、(96℃ 15sec、50℃ 5sec、60℃ 4min) × 25cycles、4℃ ∞} にかけた。

表 10. シーケンスリアクション用試薬

試薬名／サンプル数	1 sample (μl)
BigDye terminator v3.1	0.5
5×sequence buffer	1.75
3.2μM primer	0.5
DDW	3.75
(Template DNA)	(3.5)
Total	10

2) エタノール沈殿

1.5ml チューブに DNA 溶液 10μl、99%エタノール 25μl、3M 酢酸ナトリウム (NaOAc) 1μl を混合し、転倒混和し、−80℃で 30 分静置した。遠心 (15,000rpm 30min 4℃) し、ピペットで上清を取り除き、70%エタノール 1ml を加えた。遠心 (15,000rpm 10min 4℃) し、ピペットで上清を取り除いて、5〜10 分風乾した。ホルムアミド 15μl を加えて溶解し、96 穴プレートに溶液を移し、サーマルサイクラー (95℃ 4min) にかけた。反応後、氷水にて急冷した。

3) シーケンサー

ABI3130xl ジェネティックアナライザ (Applied Biosystems 社) で解析した。塩基配列の解析は、ATGC、GENETYX を用いた。解析に用いた既知の塩基配列は NCBI のデータバンクより取得した。

3. 6 電子顕微鏡 (TEM) 観察

3. 6. 1 ダイレクト・ネガティブ染色法 (DN 法)

スライドガラスに染色液*を一滴 (約 50μl) 置き、5mm 角程度に切った植物を浸し、カミソリで刻むようにして植物組織の汁液を染色液中に滲み出させ、これを試料液とした。ピンセットでグリッド (日新 EM 社製) の端をつまみ、支持膜側を下にしてスライドガラス上の試料液に乗せ、すぐにキムワイブにて余分な試料液を吸い取り、風乾後に観察に使用した。

3. 6. 2 免疫電子顕微鏡法 (IEM 法)

◆トラップ法

抗血清を食塩水で 30 倍希釈したものを、湿室処理したシャーレの中のパラフィルム上に 7μl ずつのせ、グリッドを 15 分浸した。別のパラフィルムに蒸留水を 5 滴ずつ準備し、これらでグリッドを洗浄した。スライドガラスに食塩水を一滴 (約 50μl) 置き、5mm 角程度に切った植物を浸し、カミソリで刻むようにして植物組織の汁液を染色液中に滲み出させ、これを試料液とした。試料液をパラフィルム上に 7μl ずつのせ、グリッドを 15 分浸し、

キムワイプにて余分な試料液を吸い取った。別のパラフィルムに蒸留水を 9 滴ずつ準備し、これらでグリッドの洗浄を行い、最後に染色液*1 滴に浸し、風乾後に観察に使用した。(大木, 2009)

◆簡易デコレーション法

スライドガラスに蒸留水を一滴 (約 50 μ l) 置き、5mm 角程度に切った植物を浸し、カミソリで刻むようにして植物組織の汁液を染色液中に滲み出させ、これを試料液とした。グリッドをスライドガラス上の試料液に乗せ、すぐにキムワイプにて余分な試料液を吸い取り、風乾した。抗血清を食塩水で 30 倍希釈したものを、湿室処理したシャーレの中のパラフィルム上に 7 μ l ずつのせ、グリッドを 15 分浸した。別のパラフィルムに蒸留水を 9 滴ずつ準備し、これらでグリッドの洗浄を行い、最後に染色液*1 滴に浸し、キムワイプで余分な液を吸い取り、風乾後に観察に使用した。(大木, 2009)

*染色液は、2%リンタングステン酸 (PTA) pH6.5、2%モリブデン酸アンモニウム pH5.0、2%酢酸ウラニル (UA) pH4.0 を用いた。

3. 6. 3 観察

観察は、H7650 形透過型電子顕微鏡 (日立ハイテクノロジーズ社製) を使用した。ウイルス様粒子が見られたら写真撮影を行い、粒子形状を確認した。

3. 7 ウイルス粒子の精製

3. 7. 1 FreSV の純化方法

FreSV の純化方法は図 20 に示した。

FreSV 感染を確認したフリージア 50g に対して、130ml の 0.05M リン酸緩衝液 pH7.9 (10mM Na-EDTA, 10mM Na-DIECA, 0.1%2-メルカプトエタノールを含む) 中で磨砕し、4 重の無菌ガーゼで濾過した。濾液にベントナイト-マグネシウム 50mg/ml を 1/20 容量加え、攪拌 (30 分 4 $^{\circ}$ C) し、遠心 (8,000rpm 15 分 4 $^{\circ}$ C) した。上清を回収し、TritonX-100 を 0.3%になるように加えて攪拌 (数分 室温) した。さらにポリエチレングリコールを 5%になるように、さらに 0.2M 塩化ナトリウムを加え、攪拌 (1 時間 4 $^{\circ}$ C) し、遠心 (10,000rpm 20 分 4 $^{\circ}$ C) した。得られた沈殿を 20mM リン酸緩衝液 pH7.1 (10mM 亜硫酸ナトリウム, 1mM Na-EDTA, 0.01%2-メルカプトエタノールを含む) で懸濁し、遠心 (8,000rpm 10 分 4 $^{\circ}$ C) した。上清を回収し、20%スクロースを重層にしたショ糖クッションにのせ、超遠心 (30,000rpm 2 時間 4 $^{\circ}$ C) した。得られた沈殿を 0.01M Tris-HCl 緩衝液 pH7.0 で懸濁し、遠心 (8000 $\times$ g 20 分) した。上清を回収し、20%スクロースを重層にしたショ糖クッションにのせ、超遠心 (30,000rpm 2 時間 4 $^{\circ}$ C) した。得られた沈殿を蒸留水で懸濁し、遠心 (10,000 $\times$ g 20 分 4 $^{\circ}$ C) し、上清を純化試料とした。(西尾ら, 1989 ; 守川ら, 1995)

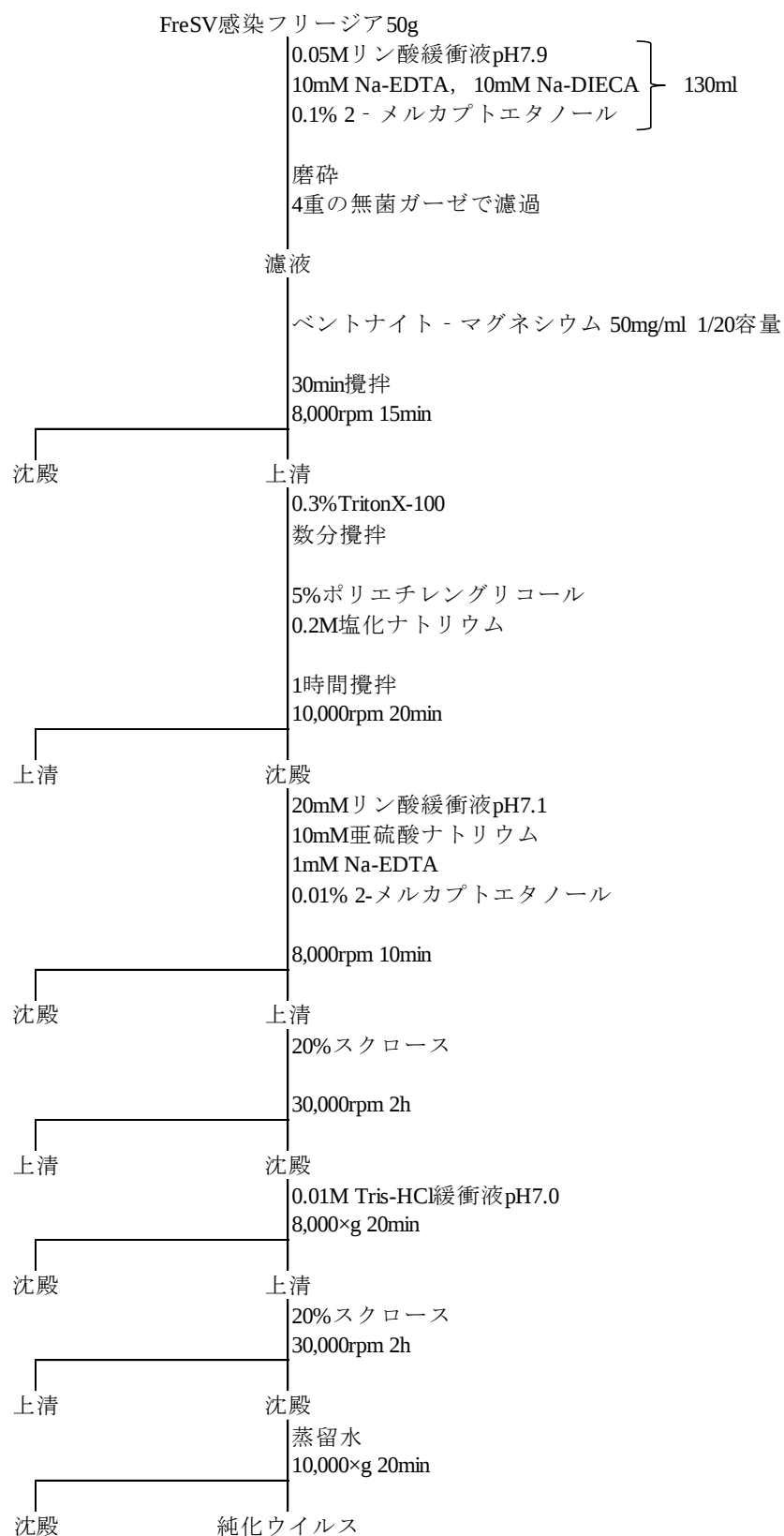


図 20. FreSV の純化方法

3. 7. 2 H1F3 の純化方法

H1F3 の純化方法は図 21 に示した。

H1F3 に感染した *C. quinoa* の接種葉 100g に対して、300ml の 0.05M リン酸緩衝液 pH7.0 (5mM Na-EDTA, 20mM Na-DIECA, 0.01%2-メルカプトエタノールを含む) 中で磨砕し、4 重の無菌ガーゼで濾過した。濾液にベントナイト-マグネシウム 50mg/ml を 1/10 容量加え、攪拌 (15 分 4℃) し、遠心 (12,000rpm 15min 4℃) した。上清を回収し、TritonX-100 を 1% になるように加えて攪拌 (数分 室温) した。さらにポリエチレングリコールを 6%になるように、さら 0.1M 塩化ナトリウムを加えて攪拌 (15 分 4℃) し、静置 (3 時間 4℃) した。次に遠心 (10,000rpm 20min 4℃) し、得られた沈殿を 0.01M Tris-HCl 緩衝液 pH7.9 で懸濁し、静置 (一晚 4℃) し、遠心 (10,000rpm 15 分 4℃) した。上清を回収し、超遠心 (35,000rpm 2h 4℃) し、得られた沈殿を 0.01M Tris-HCl 緩衝液 pH7.9 にて懸濁して、純化試料とした。(西尾ら, 1989 ; Vaira *et al*, 2006)

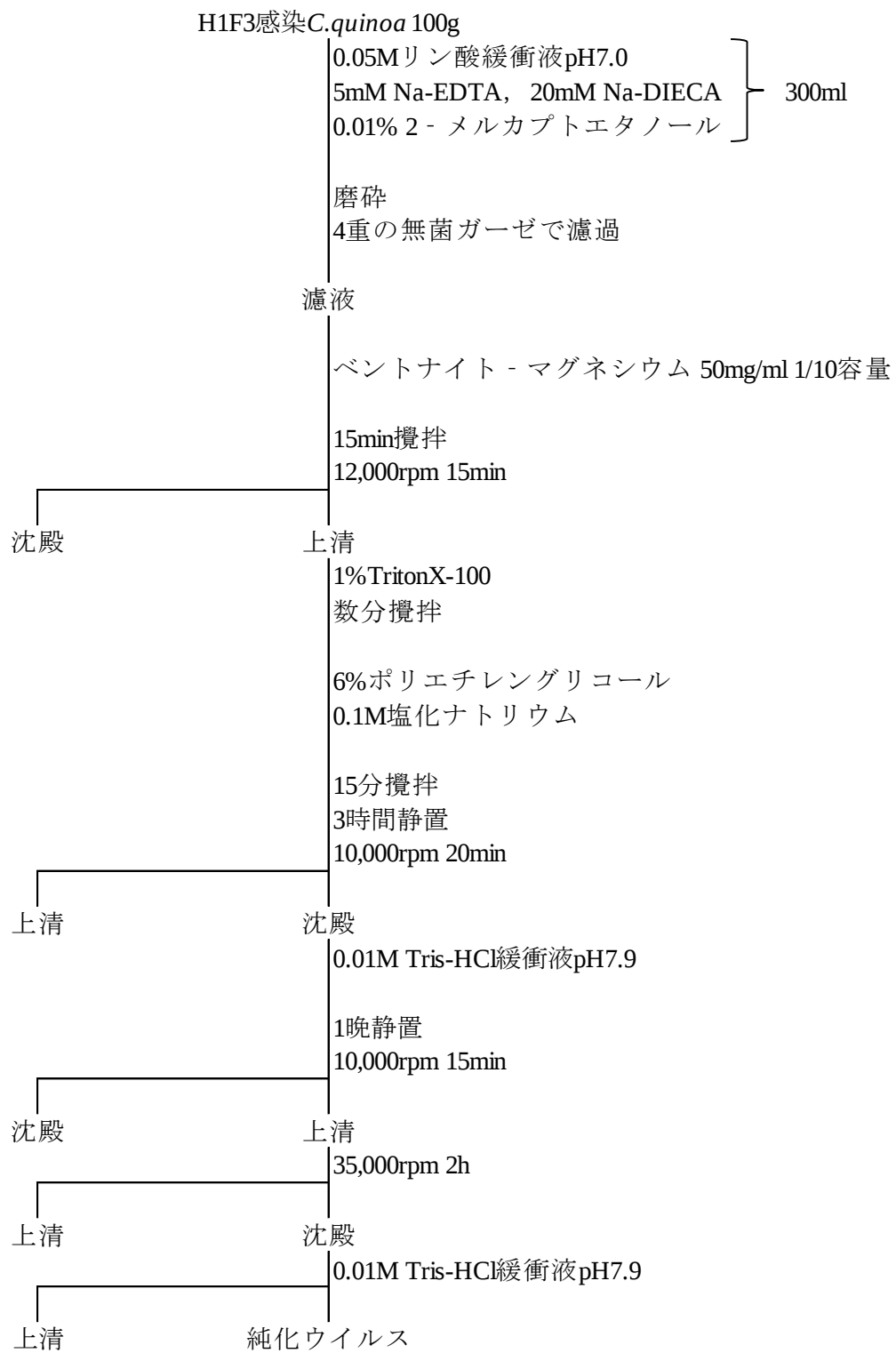


図 21. H1F3 の純化方法

3. 8 ウイルス外被タンパク質のウエスタンブロッティング

1) 泳動サンプルおよびマーカの調製

サンプルは明瞭な病徴が見られる比較的若い葉を 1cm 角程度カミソリで切り取って 1.5ml チューブに入れ、1×サンプルバッファー（アトー社製）120μl を加え、マイクロ乳棒で磨砕した。磨砕液をヒートブロック（TAITEC 社製）にて 95℃ 5 分処理し、氷冷した。分子量マーカは EzStandard PrestainBlue（アトー社製）を使用した。

2) SDS-PAGE（SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動）

電気泳動槽：Page Run（アトー社製）の下部槽に SDS-PAGE 電気泳動用緩衝液を 400ml 注いだ。15%ポリアクリルアミドゲル：e・PAGEL（アトー社製）を泳動槽のプレートホルダーにセットし、プレートホルダーを上部槽に装着し、下部槽に沈めた。上部槽に SDS-PAGE 電気泳動用緩衝液を約 70~80ml 注いだ。1) で調製した泳動サンプル及び分子量マーカをウェルに 20μl ずつロードし、電源装置を泳動装置にセットした。20mA 75 分に設定し、泳動した。

3) ポリフッ化ビニリデン（PVDF）メンブレンへのブロッティング

メンブレンを 100%メタノールに静かに沈め、約 20 秒浸した。つづいてこのメンブレンをウエスタンブロッティング用バッファー溶液の B 溶液に完全に沈め、30 分以上浸透した。A 溶液、B 溶液、C 溶液をそれぞれ角形シャーレに入れ、角形濾紙 2 枚を A 溶液に、1 枚を B 溶液に、3 枚を C 溶液に沈め、5 分以上放置した。電気泳動の終わったゲルを泳動プレートから取り出し、B 溶液に数分（5 分以内）沈めた。ブロッター：poweredBLOTmini（アトー社製）の陽極プレート上に A 溶液を数 ml 垂らした。A 溶液に浸しておいた濾紙を 1 枚取り、液を切って陽極プレートの中央に気泡を入れないように置いた。A 溶液に浸しておいたもう 1 枚の濾紙を、1 枚目の濾紙の上に重ねた（2 枚目）。2 枚目の濾紙の上に B 溶液を数 ml 垂らし、B 溶液に浸しておいた濾紙を重ねた（3 枚目）。3 枚目の濾紙の上に、B 溶液に浸しておいたメンブレンを重ね（4 枚目）、メンブレン上に B 溶液を数 ml 垂らし、B 溶液に浸しておいたゲルを重ねた（5 枚目）。ゲルの上に C 溶液を数 ml 垂らし、C 溶液に浸しておいた濾紙 3 枚を 1 枚ずつ重ねた（6~8 枚目）。これらのサンドイッチ構造の上に静かに拳を置き、強く押し付けてゲルとメンブレンを密着させた。C 溶液を数 ml サンドイッチ構造の上に垂らし、上部カバーを取り付けた。Protein モード、Mini-60min に設定し、通電を開始した。終了後、サンドイッチ構造の上から順に濾紙およびゲルを取り除き、メンブレンを取り出し、軽く風乾した。

4) 検出

メンブレンをメタノールに 30 秒浸し、その後ブロッキング液 25ml に浸し、30~60 分軽く振盪した。ブロッキング液を捨て、TTBS を加えて、5~10 分軽く振盪し洗浄した。TTBS

を捨て、メンブレンを一次抗体液 {FreSV 抗血清 (Prime diagnostics 社製)} 1.7 μ l とともに適当なサイズのハイブリバッグに入れ、一晚振盪した。その後、メンブレンを取り出し、TTBS に浸して 5 分洗浄した。TTBS を捨て、新しい TTBS でもう一度 5 分洗浄した。TTBS を捨て、TBS を加えて 5 分洗浄した。発色試薬として AP Conjugate Substrate Kit (BIO-RAD 社製) 25ml を加え、30 分静置した。バンドが検出されたら、写真撮影及び分子量の大きさの確認を行った。

3. 9 ウイルスの物理学的性質試験

◆耐熱性試験

試験区

A : 磨砕液に 0.05M リン酸緩衝液 pH7.0 を用いた区

① コントロール ②40°C ③45°C ④50°C ⑤55°C ⑥60°C

B : 磨砕液に 0.05M リン酸緩衝液 pH7.0 (添加剤 : 1mM Na-EDTA、5mM Na-DIECA、5mM チオグリコール酸ナトリウム) を用いた区

① コントロール ②40°C ③45°C ④50°C ⑤55°C ⑥60°C

恒温器、温度計、スターラーをセッティングし、恒温器内の水を予め温度区の最低温度まで温めておいた。*C. quinoa* 罹病葉 4g をカミソリでみじん切りに刻み、乳鉢に 2g ずつ分けて、それぞれに磨砕用緩衝液を 20ml ずつ加えた。磨砕後、粗汁液をファルコンチューブに移し、遠心 (5,000rpm 10min 4°C) した。上清を別のファルコンチューブに移し、各区 6 本 (計 12 本) のガラス試験管に分注した。最低温度に温まった恒温器に試験管を入れ、10 分間温めた。10 分経ち次第すぐに氷水に試験管を入れ、急冷させた。温度を上げていき、全ての温度区の熱処理が終了したら、各区の汁液を *C. quinoa* 3 株ずつ、カーボンランダムを用いた汁液接種を行った。3 株中、1 株でも病徴が確認された区を陽性とした。(村山ら, 1962)

◆耐希釈性試験

試験区

① 10^{-1} 倍 (コントロール) ② 10^{-2} 倍 ③ 10^{-3} 倍 ④ 10^{-4} 倍

磨砕液は、0.05M リン酸緩衝液 pH7.0 (添加剤 : 1mM Na-EDTA、5mM Na-DIECA、5mM チオグリコール酸ナトリウム) を用いた。

C. quinoa 罹病葉 2g をカミソリでみじん切りに刻み、罹病葉の量に対して 10 倍の量の磨砕用緩衝液 20ml で磨砕し、この粗汁液を 10^{-1} 倍区とした。 10^{-2} 倍区は、 10^{-1} 倍希釈液 1 : 蒸留水 9 の割合で希釈した。以後同様に希釈した。各区の希釈液を *C. quinoa* 3 株ずつ、カーボンランダムを用いた汁液接種を行った。3 株中、1 株でも病徴が確認された区を陽性とした。(村山ら, 1962)

◆耐保存性試験

試験区

A：室温で保存処理した区

① コントロール ②1時間 ③3時間 ④24時間 ⑤48時間

B：4℃で保存処理した区

① コントロール ②1時間 ③3時間 ④24時間 ⑤48時間

磨砕液は、0.05M リン酸緩衝液 pH7.0（添加剤：1mM Na-EDTA、5mM Na-DIECA、5mM チオグリコール酸ナトリウム）を用いた。

C. quinoa 罹病葉 2g をカミソリでみじん切りに刻み、磨砕用緩衝液 20ml で磨砕した。粗汁液を各区 5 本の 1.5ml チューブに分注し、室温または 4℃で保存した。*C. quinoa* 3 株ずつ、カーボンランダムを用いた汁液接種を行った。3 株中、1 株でも病徴が確認された区を陽性とした。（村山ら，1962）

3. 10 土壌試験

FreSV は、フリージアの根に寄生する土壌菌類の *Olpidium brassicae* によって媒介されると知られている（Vaira *et al*, 2006）。よって、国内でも土壌伝染が起きているかを調べるために、土壌伝染性試験および *Olpidium brassicae* の観察を行った。

◆土壌伝染性試験

2012 年および 2013 年 2 月に東京都八丈町での現地調査で採集した土壌、2012 年 10 月に徳島県阿南市の圃場から送付して頂いた土壌を、大学内でポットに移しフリージアの種（Thompson&Morgan 社製）を 2～3 粒ずつ蒔いた。随時病徴観察を行い、フリージアは ELISA 検定または RT-PCR にて FreSV の感染の有無を調べた。

◆ウイルス媒介菌類の観察

東京都八丈町および徳島県阿南市の FreSV 感染が確認された圃場から採集したフリージア、および東京都八丈町産の土壌を用いて大学内で栽培したインゲンの根に土壌菌類の *Olpidium brassicae* が寄生しているかどうかを観察した。

まず、根を流水でよく洗った。つづいて、根を 2～3cm の長さに切断してビーカーに入れ、根が浸る程度に酸性フクシン液を入れ、ガスバーナーで 2 分加熱した。すぐに根を取り出して、ラクトフェノール液を入れたビーカーに入れて濯いだ。新しいラクトフェノール液で 2～3 回脱色し、根をスライドガラスに移してラクトフェノール液で封入し、細胞内の休眠孢子や遊走子嚢を正立顕微鏡（ZEISS 社製）にて観察した。（大木，2009）

第4章 ウイルスの同定と特徴

本研究では、5 種ウイルス (BYMV, FreMV, FreSV, FLNV, CMV) の調査を行い、BYMV, FreMV, FreSV, CMV の 4 種ウイルスに加え未報告のウイルス H1F3 が検出された。また、徳島県徳島市 TOK2 圃場の球根に発生したアブラムシ同定を行ったので、本章 (4. 7) に結果を示した。

4. 1 *Bean yellow mosaic virus*

BYMV は、主に BYMV 抗血清を用いた ELISA 検定にて検出を行い、フリージア 278/524 検体で感染が確認された。また、BYMV 特異プライマー : BCPF・BCPD を用いた RT-PCR 検定では 19/28 検体で感染が確認された。性状についての調査を行い、結果を以下に示した。

1) 汁液接種の結果

BYMV の汁液接種の結果は表 11 に示した。

3 属 8 種の検定植物へ汁液接種を行ったところ、2 属 5 種の植物に病徴が見られた。*C. quinoa* および *C. amaranticolor* は、接種 7 日後あたりから接種葉に退緑斑点を生じ (図 22, 23)、後に葉全体が壊死した。*N. benthamiana* は上葉に葉脈緑帯を生じた (図 25)。また、*N. occidentalis* の接種葉にモザイク症状 (図 24)、*N. clevelandii* の接種葉に黄化症状を時々生じた。*Freesia refracta* の実生に戻し接種を行ったが、病徴は確認されなかった。感染性は ELISA 検定にて確認を行い、病徴が見られた植物は全て陽性反応が確認された。また、これらの結果は文献に掲載されている情報と戻し接種が成功しなかったことを除けば、ほぼ一致した。

表 11. BYMV の汁液接種結果

検定植物	病徴 (上葉/接種葉)	感染性
<i>Chenopodium quinoa</i>	—/CS	+
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	—/CS	+
<i>Nicotiana benthamiana</i>	VB/—	+
<i>Nicotiana occidentalis</i>	(—/M)	(+)
<i>Nicotiana clevelandii</i>	(—/Y)	(+)
<i>Nicotiana tabacum</i> var. Xanthi-nc	—/—	—
<i>Nicotiana glutinosa</i>	—/—	—
<i>Freesia refracta</i>	—/—	—

病徴・・・CS : chlorotic spot, VB : vein banding, M : mosaic, Y : yellow, — : 無病徴,

() : 時々見られる病徴

感染性・・・+ : 感染, — : 無感染, () : 時々感染



図 22. *C. quinoa* に見られる退緑斑点症状
(接種 8 日目)



図 23. *C. amaranticolor* に見られる
退緑斑点症状 (接種 12 日目)



図 24. *N. occidentalis* に見られる
モザイク症状
(接種 25 日目)



図 25. *N. occidentalis* に見られる葉脈緑帯症状
(接種 25 日目)

2) 電子顕微鏡観察結果

BYMV 感染を ELISA 検定および RT-PCR 検定にて確認した東京都八丈町産フリージア (品種: ラビットイエロー) を、BYMV 抗血清を用いた簡易デコレーション法により 2% リンタングステン酸 (PTA) pH6.5 染色し、TEM 観察した。その結果、抗血清に明瞭に修飾されたひも状粒子が多数観察された (図 26)。58 粒子について、その長さを測定した結果、650nm から 868nm に分布し、ピークは 741-780nm、平均は約 760nm であった (図 28)。これらのウイルス粒子の形状は BYMV の形状とほぼ一致した。なお、BYMV は FreMV と同じ potyvirus 属のウイルスで、両者が複合感染している場合は DN 法では 2 種ウイルスの識別が不可能なため、免疫電子顕微鏡観察 (簡易デコレーション法) にて観察を行った。その結果、BYMV 抗体に修飾されたウイルス粒子と、修飾されないウイルス粒子が見られた (図 27)。

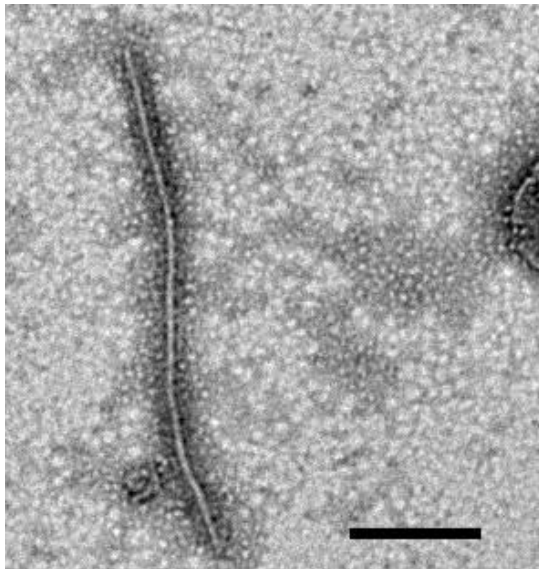


図 26. BYMV 抗体による SSEM 法
※Bar は 200nm

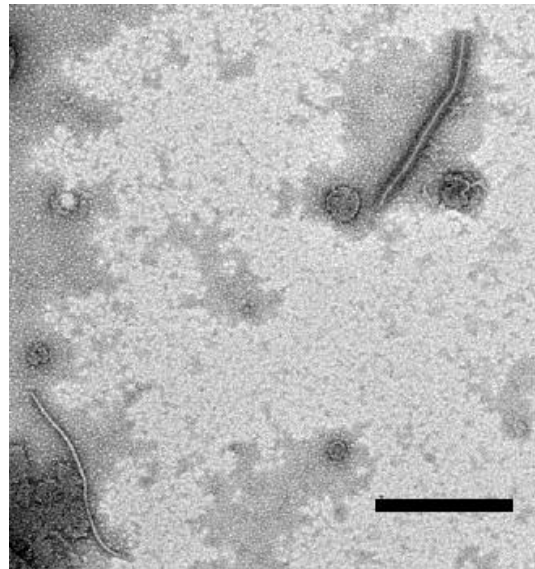


図 27. BYMV 抗体による SSEM 法
BYMV と思われる粒子 (右上) と
FreMV と思われる粒子 (左下)
※Bar は 200nm

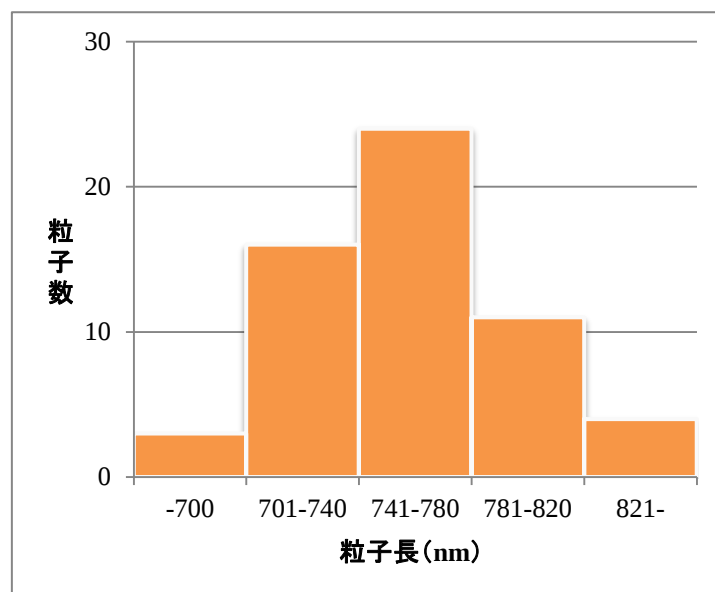


図 28. BYMV の粒子長

4. 2 *Freesia mosaic virus*

FreMV は、主に FreMV 抗血清を用いた ELISA 検定にて検出を行い、フリージア 361/524 検体で感染が確認された。また、FreMV 特異プライマー：FMV-F・FMV-R を用いた RT-PCR 検定では 13/28 検体で感染が確認された。性状についての調査を行い、結果を以下に示した。なお、本ウイルスは、今回国内で初めて感染が確認された。

1) 汁液接種の結果

FreMV の汁液接種の結果は表 12 に示した。

3 属 5 種の検定植物へ汁液接種を行ったところ、いずれの植物にも病徴は見られなかった。感染性は ELISA 検定にて確認を行い、*C. quinoa*、*N. benthamiana*、*N. occidentalis* は時々感染が確認された。また *C. quinoa* の接種葉は、RT-PCR においても感染が確認された。現在までに世界で FreMV 感染が確認されている植物は *Freesia refracta* および *Alstroemeria saturne* (Brunt, 1995) のみであり、今回感染確認された *C. quinoa*、*N. benthamiana*、*N. occidentalis* は、本研究にて初めて感染が確認された。*Freesia refracta* の実生に戻し接種を行ったが、病徴および感染性は確認されなかった。

表 12. FreMV の汁液接種結果

検定植物	病徴 (上葉/接種葉)	感染性
<i>Chenopodium quinoa</i>	—/—	(+)
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	—/—	—
<i>Nicotiana benthamiana</i>	—/—	(+)
<i>Nicotiana occidentalis</i>	—/—	(+)
<i>Freesia refracta</i>	—/—	—

病徴・・・—：無病徴

感染性・・・+：感染，—：無感染，()：時々感染

2) 電子顕微鏡観察結果

FreMV 感染を ELISA 検定および RT-PCR 検定にて確認した東京都八丈町産フリージア (品種：ラビットイエロー) を、FreMV 抗血清を用いた簡易デコレーション法により 2% リンタングステン酸 (PTA) pH6.5 染色し TEM 観察したところ、抗血清に明瞭に修飾されたひも状粒子が多数観察された (図 29)。58 粒子について、その長さを測定した結果、736nm から 868nm に分布し、ピークは 801-820nm、平均は約 810nm であった (図 30)。これらのウイルス粒子の形状は FreMV の形状とほぼ一致した。

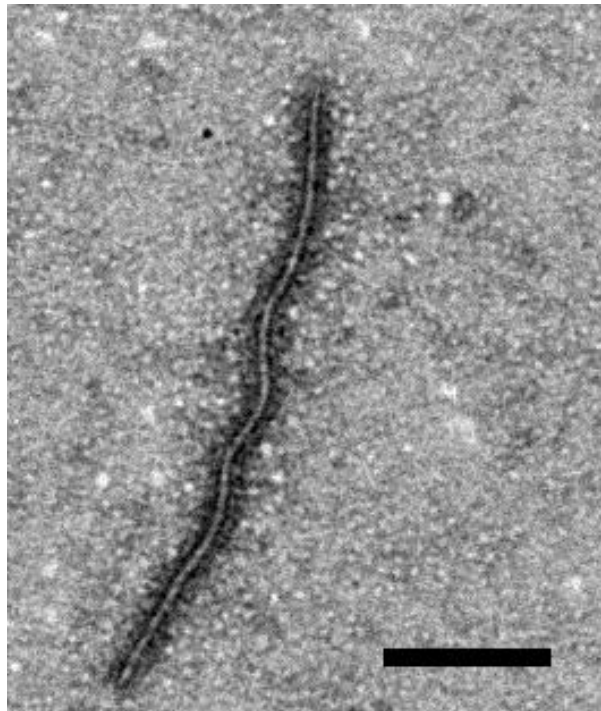


図 29. FreMV 抗体による SEM
※Bar は 200m

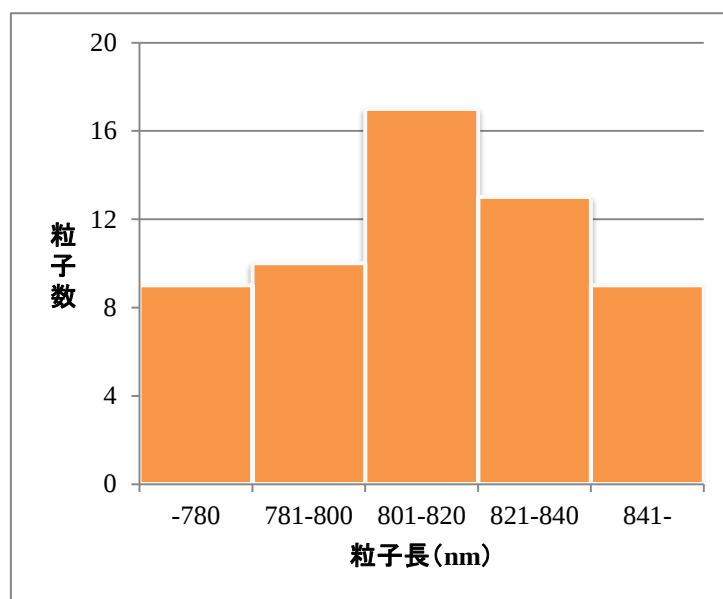


図 30. FreMV の粒子長

4. 3 *Freesia sneek virus*

FreSV は、主に FreSV 抗血清を用いた ELISA 検定にて検出を行い、フリージア 113/524 検体で感染が確認された。また、ophiovirus 属特異プライマー：OP1・OP2 を用いた RT-PCR 検定では 7/8 検体、ophio-CPf・ophio-CPr を用いた RT-PCR では 44/83 検体で感染が確認された。性状についての調査を行い、結果を以下に示した。なお、本ウイルスは、今回国内で初めて感染が確認された。

1) 汁液接種の結果

FreSV の汁液接種の結果は表 13 に示した。

0.05M リン酸緩衝液 pH7.0 (添加剤を含む) を磨碎緩衝液として 3 属 6 種の検定植物へ汁液接種を行ったところ、いずれの植物にも病徴は見られなかった。感染性は ELISA 検定にて確認を行い、*C. quinoa*、*N. benthamiana*、*N. occidentalis*、*N. clevelandii* は時々感染が確認された。現在までに FreSV 感染が確認されている植物は *Freesia refracta*、*C. quinoa*、*C. amaranticolor*、*N. occidentalis*、*N. hesperis* (Vaira et al, 2006 ; Meekes and Verbeek, 2011) のみであり、*N. benthamiana*、*N. clevelandii* は本研究にて初めて感染が確認された。また、0.1M HEPES 緩衝液 pH7.8 (添加剤を含む) を磨碎緩衝液として *C. quinoa* に汁液接種を行ったが、病徴は見られなかった。感染性については今後試験を行う予定である。*Freesia refracta* の実生に戻し接種を行ったが、病徴および感染性は確認されなかった。

表 13. FreSV の汁液接種結果

検定植物	病徴 (上葉/接種葉)	感染性
<i>Chenopodium quinoa</i>	—/—	(+)
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	—/—	—
<i>Nicotiana benthamiana</i>	—/—	(+)
<i>Nicotiana occidentalis</i>	—/—	(+)
<i>Nicotiana clevelandii</i>	—/—	(+)
<i>Freesia refracta</i>	—/—	—

病徴・・・—：無病徴

感染性・・・+：感染，—：無感染，()：時々感染

2) 電子顕微鏡観察結果

FreSV 感染を ELISA 検定および RT-PCR 検定にて確認した東京都八丈町産フリージア(品種:ポルトサルート)を、FreSV 抗血清を用いたトラップ法を行い、2%酢酸ウラニル(UA) pH4.0 染色して TEM 観察したところ、環状のウイルス様粒子が観察された(図 31)。

なお、FreSV 感染フリージアを純化した後に 2%リンタングステン酸(PTA) pH6.5 または 2%モリブデン酸アンモニウム pH5.0 染色し TEM 観察を行ったが、ウイルス粒子は観察されなかった。これらの染色剤によって、ウイルス粒子が崩壊したと推察された。

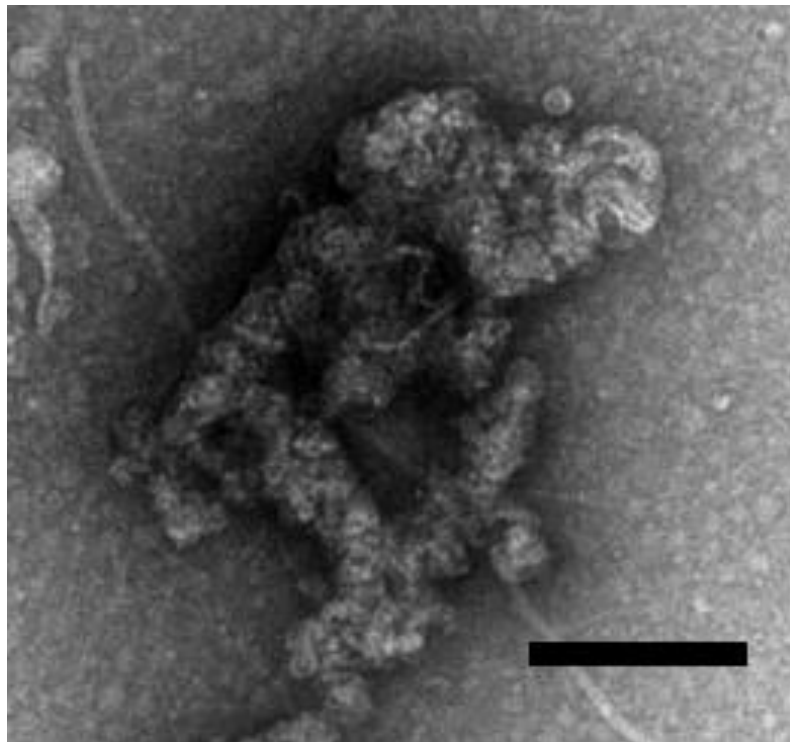


図 31. FreSV 抗体による SSEM
※Bar は 250nm

3) ウェスタンブロット法の結果

FreSV 感染を ELISA 検定および RT-PCR 検定にて確認した東京都八丈町産フリージア(品種：ラビットイエローおよびアレキサンダー)をウェスタンブロッティングした。その結果、約 48kDa の特異タンパク質が検出された(図 32)。

FreSV の外被タンパク質の分子量は 48.4kDa と報告されているので (Vaira *et al*, 2012)、今回検出された外被タンパク質は FreSV の外被タンパク質であると考えられる。

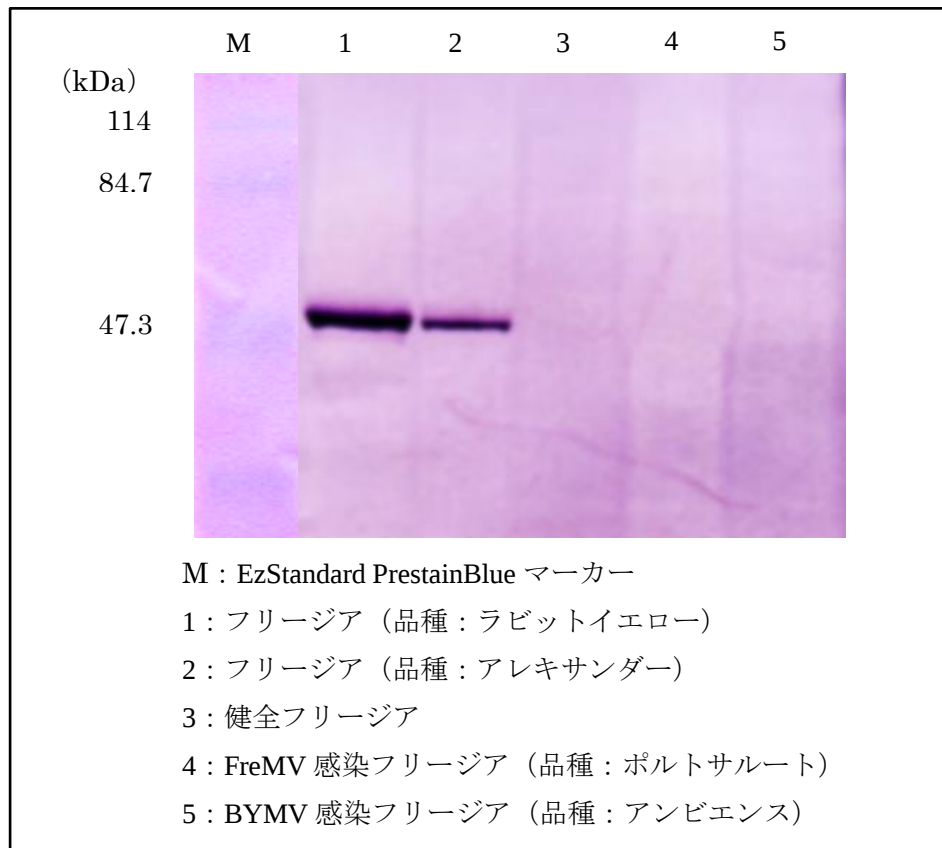


図 32. ウェスタンブロッティングの結果

4) RT-PCR 検定の結果

ELISA 検定にて FreSV 感染が確認された東京都八丈町産フリージアを、*ophiovirus* 属特異プライマー (OP1・OP2) を用いた RT-PCR を行った。ポジティブコントロールは、富山県園芸研究所から提供して頂いた *ophiovirus* 属の 1 種である *Tulip mild mottle mosaic virus* (TMMMV) に感染したチューリップを使用した。その結果、ポジティブコントロールおよびフリージアから 136bp の増幅産物が見られた (図 33)。

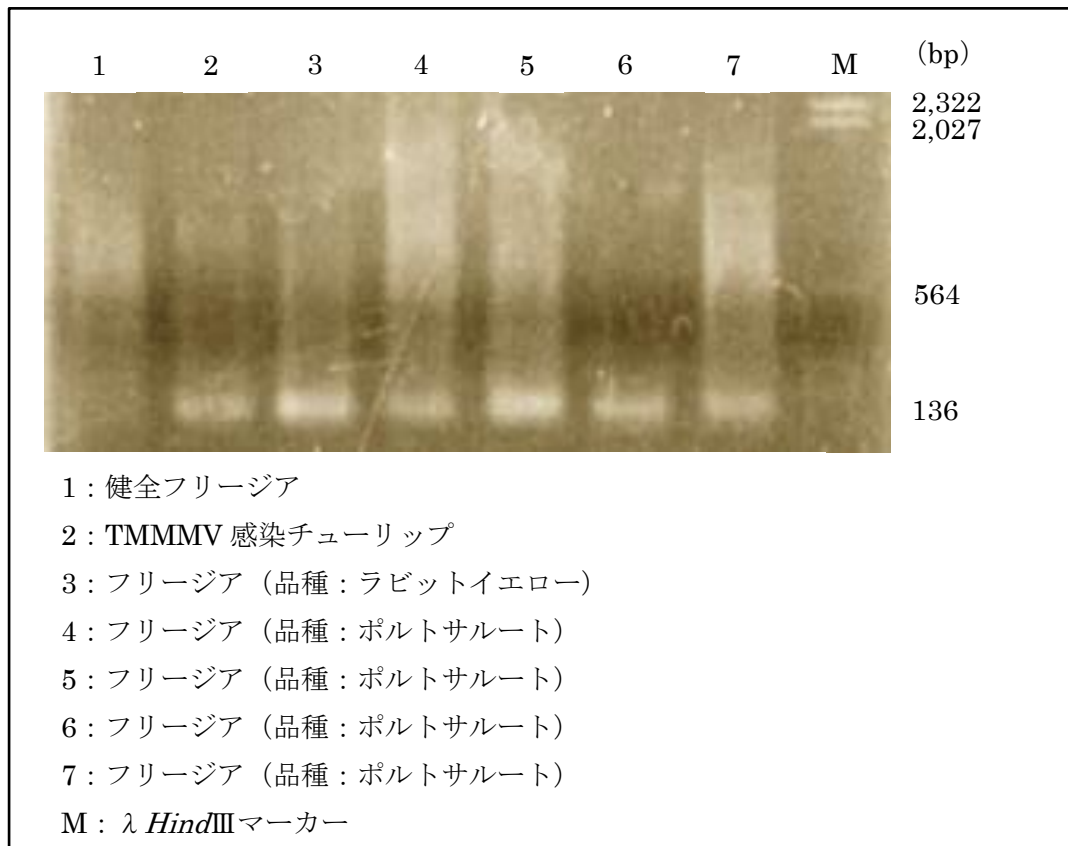


図 33. OP1・OP2 プライマーを使用した RT-PCR 検定結果

また、外被タンパク質領域の塩基配列を読むため、独自に ophiovirus の外被タンパク質領域を増幅する ophiovirus 属特異プライマー : ophio-CPf・ophio-CPr を設計した。(長尾 2012) フリージアは、東京都八丈町産フリージアおよび徳島県阿南市産フリージアを使用した。ポジティブコントロールは、TMMMV 感染チューリップを使用した。その結果、ポジティブコントロールおよびフリージアから 958bp の増幅産物が見られた (図 34)。

シーケンスを行ったところ、オランダ、イタリア、アメリカで報告されている FreSV と塩基レベルでは 99%、アミノ酸レベルでは 100%の相同性を示した。

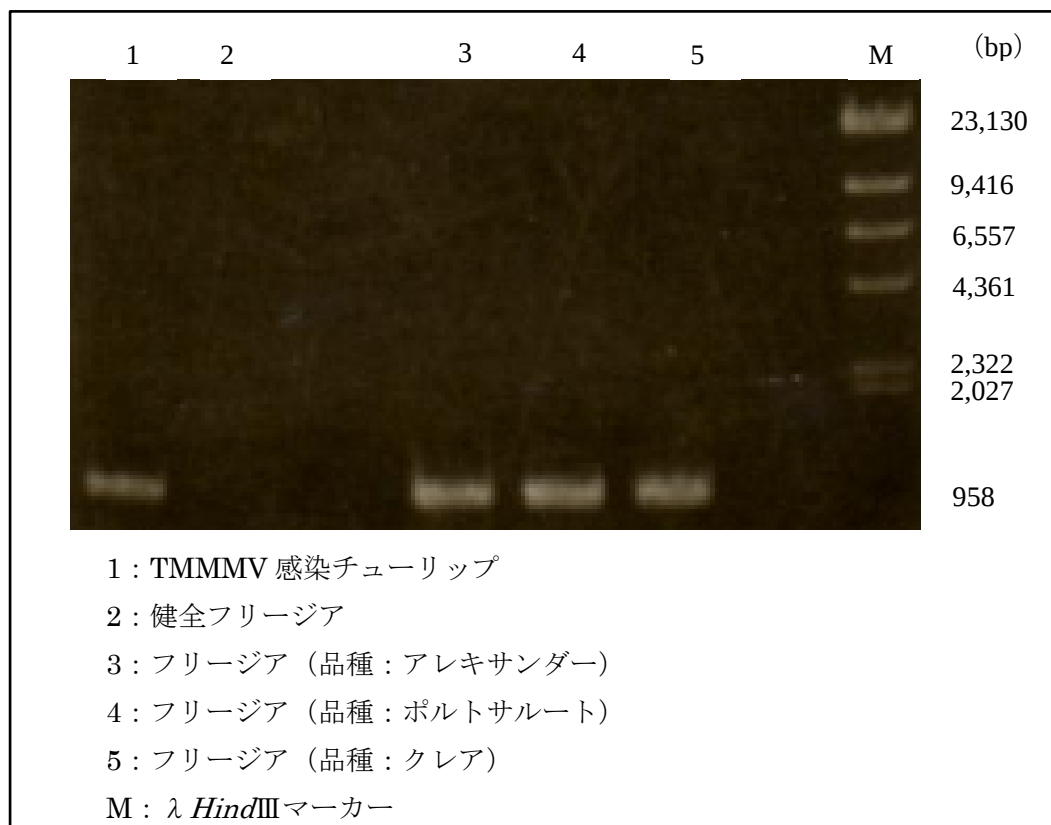


図 34. ophio-CPf・ophio-CPr プライマーを使用した RT-PCR 検定結果

5) 土壌試験

◆土壌伝染性試験

病徴観察では、東京都八丈町 O 圃場から採集した土壌に播種したフリージアに播種から約 3 ヶ月後に、壊疽症状が見られた (図 35)。その他の株の病徴は、全て健全であった。東京都八丈町の土壌に播種したフリージアは、播種から約 3 ヶ月後に RT-PCR 検定 (ophiovirus 属特異プライマー : ophio-CPf ・ ophio-CPr) を行ったが、全て陰性であった。また、徳島県阿南市の土壌に播種したフリージアは、播種から約 5 ヶ月後に ELISA 検定を行ったが、全て陰性であった。



図 35. FreSV 感染土壌に播種したフリージアに見られる壊疽症状

◆ウイルス媒介菌類の観察

FreSV 単独感染株が多く確認されている徳島県阿南市 I 圃場の土壌中のフリージアの根を観察したところ、*Olpidium brassicae* の遊走子嚢と思われる構造物が観察された (図 36)。また、汚染土壌で栽培したインゲンの根からは観察されなかった。



図 36. FreSV 感染圃場で栽培されたフリージアの根に見られる *Olpidium brassicae*

4. 4 Freesia leaf necrosis virus

FLNV は、本研究室 4 年の水田が主に調査を行った。varicosavirus 属の *Lettuce big vein virus* (LBVV) 特異プライマー：LBV-F1・LBV-R1、R2-S3・R2-C3（表 14）を用いた RT-PCR 検定を行った。東京都八丈町産フリージア 27 検体で調査を行ったが検出されなかった。

表 14. 使用した LBVV 特異プライマー一覧

プライマー名	配列 (5′to3′)	想定される DNA 増幅量	引用
LBV-F1	CTCCACGCTCAAGATGTTTCGC	634bp	滝本ら (2004)
LBV-R1	CTGGATGGACTCAGGCTTGG		
R2-S3	AGCTCTGAACAACGACATG	469bp	
R2-C3	CTTGATATGCTCCGGTT		

4. 5 Cucumber mosaic virus

CMV は、壊疽症状の原因としての報告はないが、CMV 抗血清を用いた ELISA 検定を行った。徳島県徳島市および阿南市産フリージア 192 検体を調査したところ、徳島市 TOK2 圃場産の 2 検体（品種：ラビットイエロー）から CMV が検出された。これらの検体の病徴は、葉の CNS 症状および茎の白斑症状であった（pp6 図 11）。また、いずれも BYMV および FreMV の複合感染であった。

4. 6 H1F3

東京都八丈島産フリージア（品種：ポルトサルート）の茎に壊疽症状（図 37）を呈した株を、*C.quinoa* に汁液接種を行ったところ、BYMV 感染 *C.quinoa* とは異なる壊疽斑点症状が見られた（図 38）。BYMV, FreMV, FreSV の 3 種ウイルスの ELISA 検定および RT-PCR 検定を行ったが、いずれも陰性だった。また、本研究室 4 年の水田が varicosavirus 属 *Lettuce big vein virus* (LBVV) 特異プライマーにて RT-PCR を行ったが、陰性であった。よって、このウイルスを H1F3 と名付け、未報告のウイルスとして調査を行った。



図 37. 茎に壊疽症状を呈する東京都八丈町産フリージア
品種：ポルトサルート



図 38. *C. quinoa* に見られた壊疽斑点症状
(接種 10 日目)

1) 汁液接種の結果

H1F3 の汁液接種の結果は表 15 に示した。

8 属 24 種の検定植物へ汁液接種を行ったところ、*C. quinoa* のほか、*C. amaranticolor* の接種葉に壊疽斑点が見られた。また、*C. quinoa* への汁液接種は、夏季（7～9 月）は不可能であった。*Freesia refracta* の実生に戻し接種を行ったが、病徴は確認されなかった。

表 15. H1F3 の汁液接種結果

検定植物	病徴（上葉/接種葉）
<i>Chenopodium quinoa</i>	－/NS
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	－/NS
<i>Nicotiana bethamiana</i>	－/－
<i>Nicotiana occidentalis</i>	－/－
<i>Nicotiana clevelandii</i>	－/－
<i>Nicotiana tabacum</i> var. White Burley	－/－
<i>Nicotiana tabacum</i> var. Xanthi-nc	－/－
<i>Nicotiana glutinosa</i>	－/－
<i>Datura stramonium</i>	－/－
<i>Cassia annuum</i>	－/－
<i>Solanum lycopersicum</i>	－/－
<i>Petunia hybrid</i>	－/－
<i>Carum foetidum</i>	－/－
<i>Phaseolus vulgaris</i>	－/－
<i>Vigna unguiculata</i>	－/－
<i>Vicia faba</i>	－/－
<i>Cucumis sativus</i>	－/－
<i>Gomphrena globosa</i>	－/－
<i>Ixeris japonica</i>	－/－
<i>Sonchus asper</i>	－/－
<i>Cirsium japonicum</i>	－/－
<i>Taraxacum platycarpum</i>	－/－
<i>Taraxacum officinale</i>	－/－
<i>Freesia refracta</i>	－/－

1) ウイルスの純化及び電顕観察

H1F3 感染 *C.quinoa* をベントナイトや TritonX-100 を用いて部分純化を行い、2%モリブデン酸アンモニウム pH5.0 染色して TEM 観察を行った。その結果、桿菌状のウイルス様粒子（約 170nm×60nm）が見られた（図 39）。なお、本ウイルス様粒子は、2%リンタングステン酸（PTA）pH6.5 または 2%酢酸ウラニル（UA）pH4.0 染色して TEM 観察を行った時には観察されなかった。

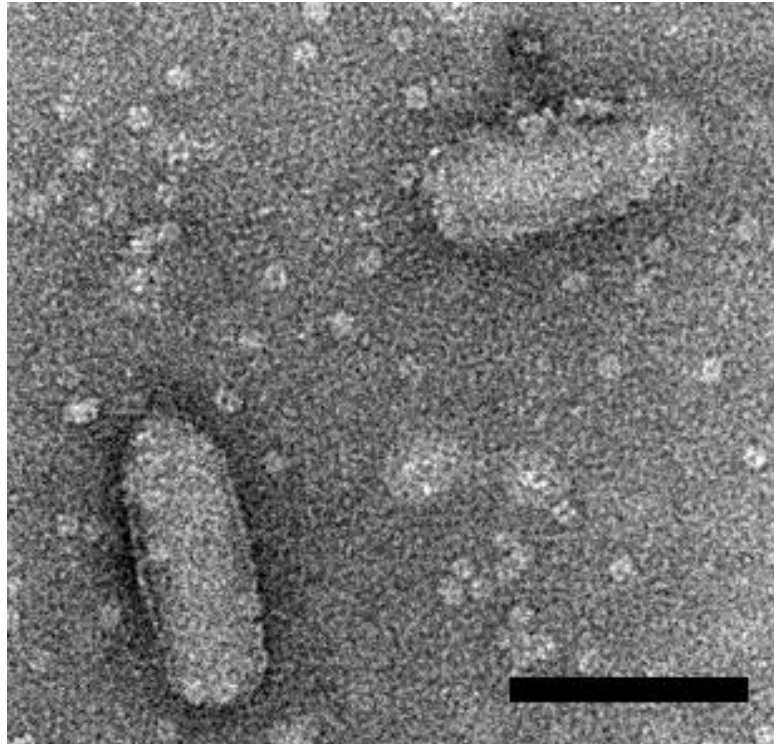


図 39. H1F3 部分純化試料中に見られた桿菌状粒子
※Bar は 100nm

2) RT-PCR

H1F3 は、粒子の形状から rhabdoviridae 科のウイルスであると仮定し、cytorhabdovirus 属 特異プライマー：DFf・LVr および nucleorhabdovirus 属 *Sonchus yellow net virus* (SYNV) 特異プライマー：SY-675・SY-1090 を用いた RT-PCR を行った。しかし、非特異と思われる増幅産物が多数見られた。また、目的のサイズの増幅産物が得られなかった。よって今後は、ポジティブコントロールを手に入れることも含め、再検討する必要がある。

また、本研究室 4 年の水田が varicosavirus 属の *Lettuce big vein virus* (LBVV) 特異プライマー：R2-S3・R2-C3 を用いた RT-PCR を行ったが、陰性であった。

4) 物理学的性質試験の結果

◆耐熱性試験結果

表 16 に耐熱性試験結果を示した。本ウイルスの耐熱性は、45～50℃の間であることが分かった。

表 16. 耐熱性試験結果

磨砕液	対照区	40℃	45℃	50℃	55℃	60℃
0.05M リン酸緩衝液 pH7.0	+	+	+	—	—	—
0.05M リン酸緩衝液 pH7.0 (添加剤を含む)	+	+	+	—	—	—

◆耐希釈性試験結果

表 17 に耐希釈性試験結果を示した。本ウイルスの耐希釈性は 10^{-1} ～ 10^{-2} の間であることが分かった。

表 17. 耐希釈性試験結果

磨砕液	10^{-1} (対照区)	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
0.05M リン酸緩衝液 pH7.0 (添加剤を含む)	+	—	—	—

◆耐保存性試験結果

表 18 に耐保存性試験結果を示した。本ウイルスの耐保存性は、4℃で 48 時間以上、室温で 3～24 時間であることが分かった。

表 18. 耐保存性試験結果

温度	対照区	1 時間	3 時間	24 時間	48 時間
4℃	+	+	+	+	+
室温	+	+	+	—	—

※磨砕液は、0.05M リン酸緩衝液 pH7.0（添加剤を含む）を使用した。

5) H1F3 の調査結果まとめ

東京都八丈町産フリージア（品種：ポルトサルート）に感染する H1F3 の調査結果を表 19 にまとめた。フリージアの病徴観察では茎に壊疽症状が観察された。汁液接種による宿主範囲調査の結果、8 属 24 種の検定植物のうち *C. quinoa* および *C. amaranticolor* のみに病徴が見られた。本ウイルスは宿主範囲が狭いことが分かった。物理学的性質試験結果は、耐熱性が 45～50℃、耐希釈性が $10^{-1} \sim 10^{-2}$ 、耐保存性は 4℃で 48 時間以上、室温では 3～24 時間であり、比較的弱いウイルスであることが分かった。また、部分純化試料を用いた電子顕微鏡観察の結果、長さ約 170nm、幅約 60nm の桿菌状粒子が観察された。しかし、本ウイルスは東京都八丈町産フリージア 1 農家 1 品種からしか検出されていないことから、本研究で問題としている CNS 症状との関連性は低いと考えられる。今後、本ウイルスの発生実態の解明が必要と考えられる。

表 19. H1F3 の調査結果まとめ

病徴観察	宿主範囲	物理学的性質			粒子形状
		耐熱性	耐希釈性	耐保存性	
茎：壊疽 葉：不明 花：不明	狭い	45～50℃	$10^{-1} \sim 10^{-2}$	4℃：48 時間以上 室温：3～24 時間	桿菌状 長さ約 170nm 幅約 60nm

4. 7 球根に発生したアブラムシ

2014 年 1 月の徳島県徳島市での現地調査にて、TOK2 圃場では生育不良のフリージアの球根に多量のアブラムシが確認された（図 40）。農林水産省横浜植物防疫所に形態同定の依頼を行ったところ、オカボアカアブラムシ（*Rhopalosiphum rufiabdominale*）と同定された。本アブラムシは、キュウリやトマトの根に寄生することが知られている（松本，2008）。今後、遺伝子同定も行い、さらに原因や被害の実態および防除対策を検討する必要がある。



図 40. TOK2 圃場の球根に発生したオカボアカアブラムシ

第5章 疫学調査

FreMV および FreSV は、これまでに戻し接種が成功した報告がなく、接種試験による病徴の再現は困難と考えられ、各ウイルス感染株と症状との関連性を疫学的に調査した。本研究では、定性的調査に加え、信頼性を高めるために定量的調査（統計解析）を行った。なお、統計解析は本専修の黒川哲治先生に御指導して頂いた。

5. 1 CNS 症状と感染ウイルスの関連性

5. 1. 1 定性的調査

圃場別の主な症状とウイルスの感染状況を表 20 に示した。本調査では、2013 年東京都八丈町産フリージア 252 検体、2012 年徳島県阿南市産フリージア 91 検体、市販フリージア 55 検体、計 398 検体で調査を行った。主な症状を CNS 症状、その他の症状、無症状の 3 種類に分けた。その他の症状とは、モザイク、黄化、奇形など CNS 以外の症状を呈した株全てのことである。東京都八丈町、徳島県阿南市ともに、主な症状が同じで、かつ感染ウイルスの傾向が似ている圃場ごとに、データをまとめた。東京都八丈町 S, Y 圃場と徳島県阿南市 A, B, C, D, E, F, G, H 圃場は、ともに CNS 症状が多いが、感染ウイルスの傾向が異なる。S, Y 圃場は 81%が BYMV と FreMV の複合感染で、16%が FreMV 単独感染である。一方、A-H 圃場は 44%が FreMV と FreSV の複合感染で、33%が FreMV の単独感染である。また、東京都 O 圃場と市販は、ともに無症状株が多いが、感染ウイルスの傾向が異なる。O 圃場は、68%が BYMV 単独感染で、18%が FreMV 単独感染である。一方、市販は 62%が FreMV 単独感染で、33%が BYMV と FreMV の複合感染である。

表 20. 圃場別の主な症状とウイルス感染状況

産地	圃場	調査株数	主な症状とその株数	ELISA検定による感染株数（感染率：％）						
				単独感染			複合感染			
				BYMV	FreMV	FreSV	BYMV FreMV	BYMV FreSV	FreMV FreSV	BYMV FreMV FreSV
東京都 八丈町	S, Y	116	CNS 症状 87（75%）	3/116 (3)	18/116 (16)	0/116 (0)	94/116 (81)	0/116 (0)	0/116 (0)	1/116 (0.9)
	O	136	無症状 102（75%）	92/136 (68)	24/136 (18)	9/136 (7)	7/136 (5)	1/136 (0.7)	1/136 (0.7)	0/136 (0)
徳島県 阿南市	A-H*	79	CNS 症状 65（82%）	1/79 (1)	26/79 (33)	0/79 (0)	5/79 (6)	2/79 (3)	35/79 (44)	8/79 (10)
	I	12	その他の症状** 8（67%）	0/12 (0)	0/12 (0)	12/12 (100)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)
市販		55	無症状 52（95%）	0/55 (0)	34/55 (62)	0/55 (0)	18/55 (33)	0/55 (0)	0/55 (0)	0/55 (0)

*A-H : A, B, C, D, E, F, G, H 圃場

**その他の症状株 : CNS 以外の症状（モザイク、黄化など）を呈する株

また、フリージア 455 検体の ELISA 検定の結果と、感染ウイルス別の各症状の割合をグラフに示した（図 41）。本調査は、2012 年および 2013 年東京都八丈町産フリージア 309 検体、2012 年徳島県阿南市産フリージア 91 検体、市販フリージア 55 検体、計 455 検体のデータを用いた。症状は、CNS 症状、その他の症状（CNS 以外の症状）、無症状の 3 つに分けた。このグラフから分かるように、3 種ウイルスが単独感染している場合より、2 種または 3 種ウイルスが複合感染している場合の方が、CNS 症状を示す割合が大きいことが分かる。特に、FreMV と FreSV の 2 種ウイルス複合感染の場合と、BYMV も加えた 3 種ウイルスの複合感染の場合は、100%の株が CNS 症状を示していることが分かる。

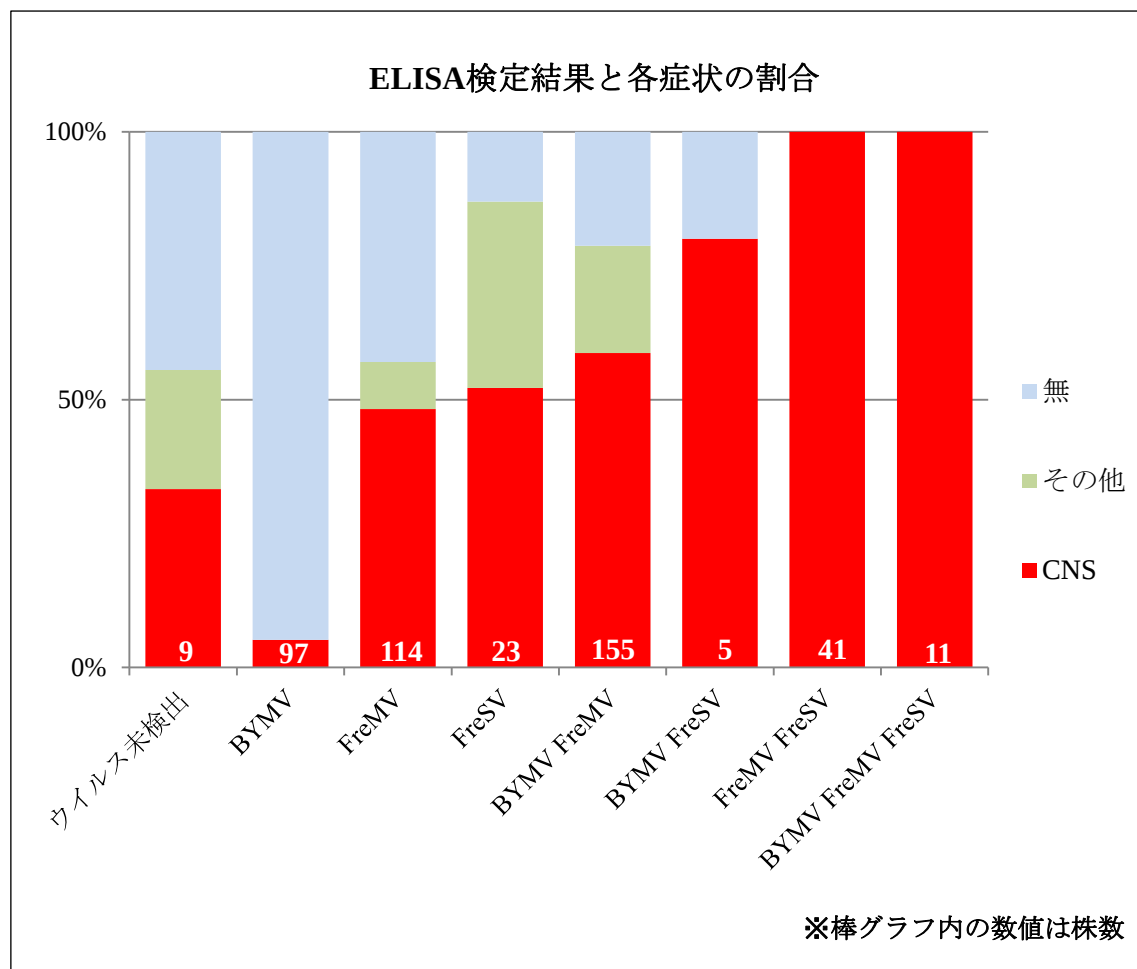


図 41. ELISA 検定結果と各症状の割合

5. 1. 2 定量的調査

ELISA 検定によって得たフリージア 455 検体の 3 種ウイルス感染の有無と CNS 症状の有無の関係を多項ロジット分析にて統計解析し、感染ウイルスと CNS 症状の発症し易さの関連性について調査した。3 種ウイルスが単独感染および複合感染した場合の計 7 通りのウイルスの組み合わせデータを用いたが、統計解析を行った結果、有意と判断されたウイルスの組み合わせ計 3 通り（BYMV 単独感染、BYMV および FreSV の複合感染、BYMV および FreMV の複合感染）のデータを示した（図 42）。グラフ内の数値は多項ロジットモデルでの解析結果を数値換算して解釈した数値であり、無症状の場合と比較して、各ウイルスが感染した時に CNS 症状の発症のしやすさが何倍高くなるかを示している。本解析結果からは、フリージアに BYMV が単独感染すると無症状の時と比較して約 0.05 倍 CNS 症状を発症しやすくなる。また、無症状の時と比較して BYMV および FreSV が複合感染すると約 24.5 倍、BYMV および FreMV が複合感染すると約 45.2 倍 CNS 症状を発症しやすくなる。以上の結果から、単独感染よりも 3 種ウイルス相互間の複合感染が CNS 症状を引き起こす可能性を高めることが考えられる。

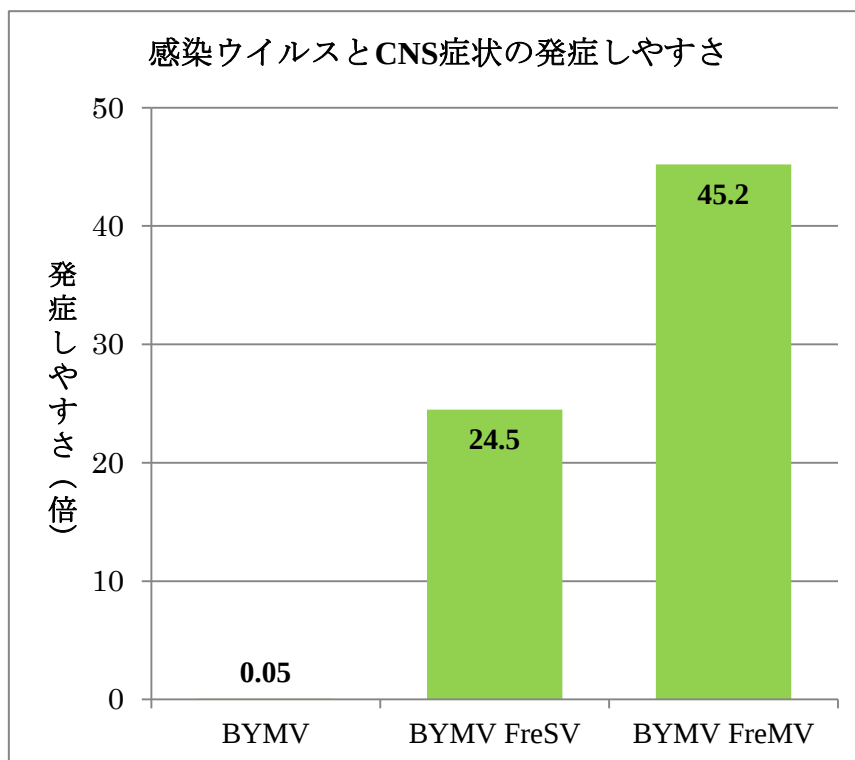


図 42. 多項ロジット分析による感染ウイルスと CNS 症状の発症しやすさの関連性

5. 2 CNS 症状の程度とウイルス濃度の関連性

5. 2. 1 定性的調査

ELISA 検定によって得た徳島県阿南市産フリージア 67 検体の 3 種ウイルス濃度と CNS 症状の程度の間を調査した (図 43)。CNS 症状の程度を目視で判断し、無:0、軽:1、中:2、重:3 の 4 段階に区別し (グラフ横軸)、それぞれの株について ELISA 検定で得られた吸光度をウイルス濃度 (グラフ縦軸) として、両者の関連性を調べた。BYMV は、感染株が 9 株と少なく、また、症状の程度と関係なく様々な濃度で感染しており、CNS 症状との関連性は低い可能性が考えられる。FreMV および FreSV は、CNS 症状が激症化するほどウイルス濃度が高い株が多く、CNS 症状との関連性があると考えられる。また、CNS 症状が激症化するほど複合感染株が多く、複合感染と CNS 症状が関連している可能性も考えられる。

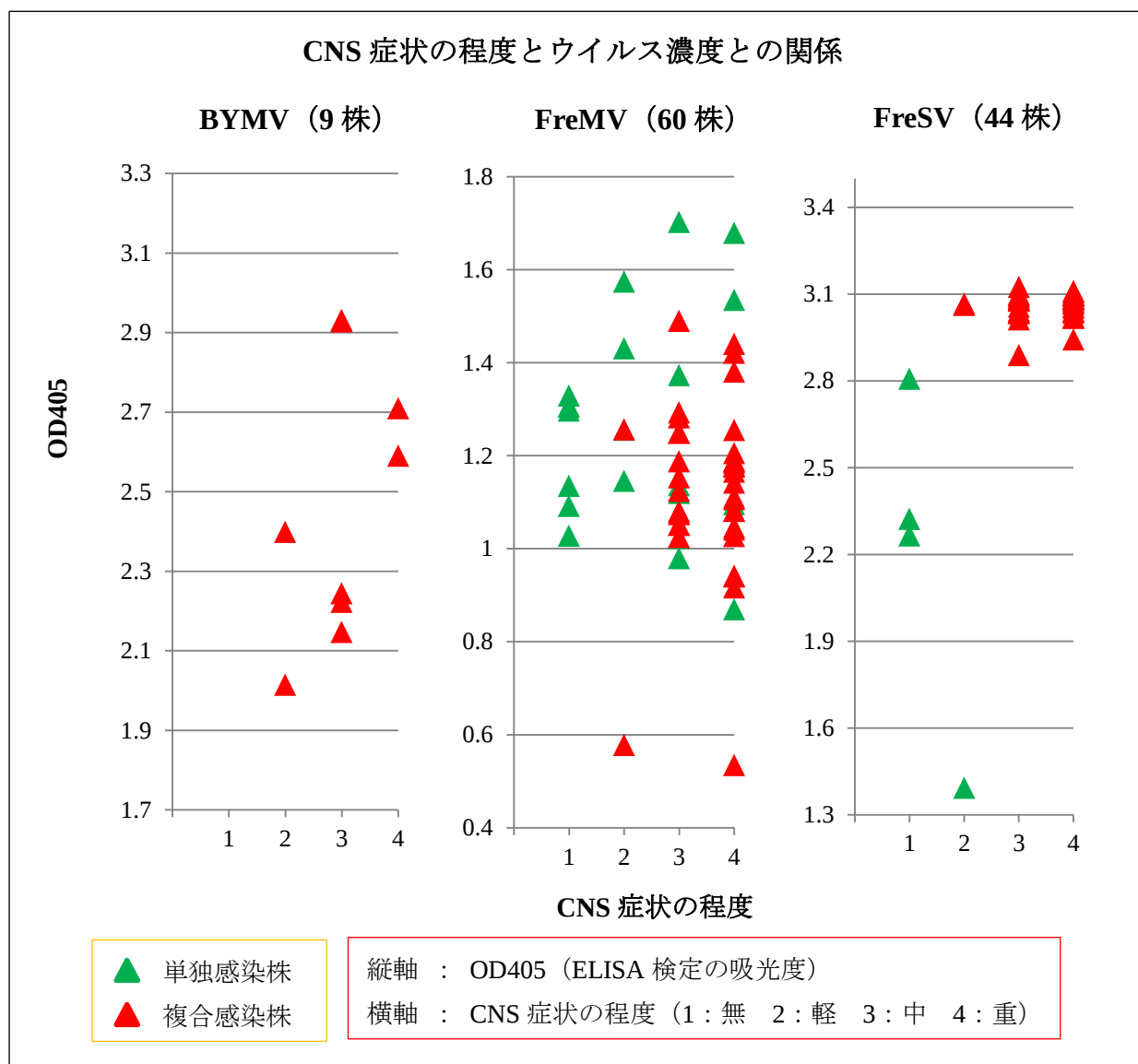


図 43. CNS 症状の程度とウイルス濃度の関連性

5. 2. 2 定量的調査

ELISA 検定によって得た徳島県阿南市産フリージア 67 検体の 3 種ウイルス濃度と CNS 症状の程度の間を順序ロジット分析にて統計解析し、ウイルス濃度と CNS 症状の激症化の関連性について調査した。CNS 症状の程度は目視で判断し、無：0、軽：1、中：2、重：3 の 4 段階に区別し、それぞれの株について ELISA 検定で得られた吸光度をウイルス濃度として、両者の関連性を調べた。3 種ウイルスが単独感染および複合感染した場合の計 7 通りのウイルスの組み合わせデータを用いたが、統計解析を行った結果、有意と判断されたウイルスの組み合わせ計 3 通り (BYMV、FreMV それぞれの単独感染、FreMV および FreSV の複合感染) のデータを示した (図 44)。グラフ内の数値は順序ロジットモデルでの解析結果を数値換算して解釈した数値であり、ウイルス濃度が微小変化 (ex.1%) した際に、CNS 症状の激症化の程度が何倍高くなるかを示している。本解析結果からは、フリージアに BYMV が単独感染すると約 6.9 倍 CNS 症状が激症化しやすくなる。また FreMV が単独感染すると約 13 倍、FreMV および FreSV が複合感染すると約 18.6 倍 CNS 症状が激症化しやすくなる。以上の結果から、単独感染よりも 3 種ウイルス相互間の複合感染が、CNS 症状が激症化する可能性を高めることが考えられる。

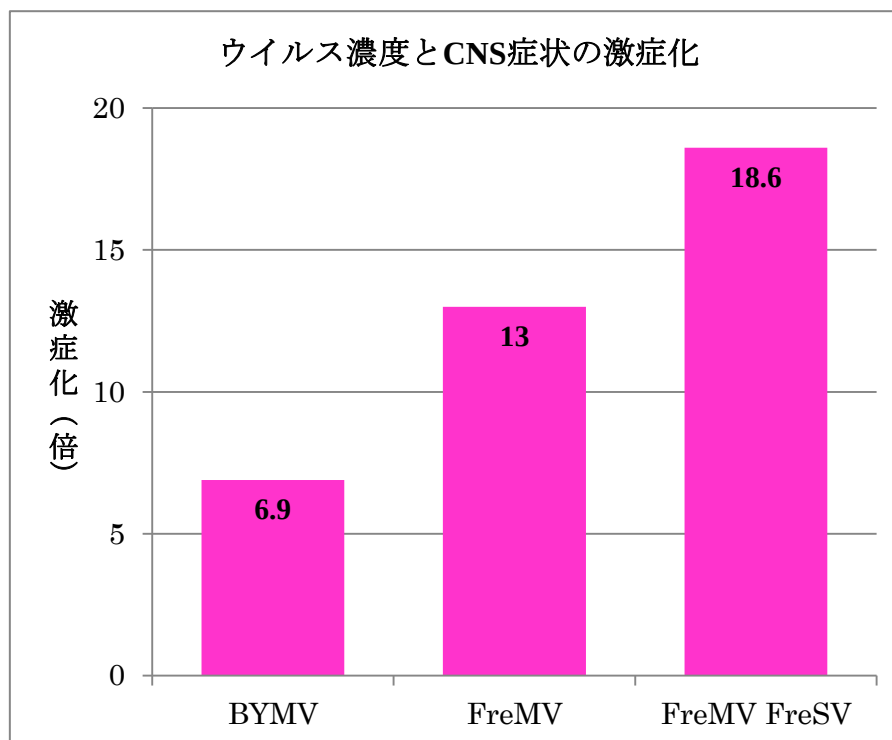


図 44. 順序ロジット分析によるウイルス濃度と CNS 症状の激症化の関連性

第6章 ウイルス分布

6. 1 圃場別の感染ウイルスについて

東京都八丈町 6 圃場と徳島県阿南市 10 圃場について、各圃場のウイルス感染率を示した(表 21)。ウイルス感染に関しては、ELISA 検定のデータを用いた。

圃場によってウイルス感染率の傾向に差が見られた。徳島県阿南市 D, E, F, G 圃場は、FreMV 単独感染株が多く、徳島県阿南市 C, I, J 圃場は、FreSV 単独感染株が多い傾向にある。また、東京都八丈町 T, Y, S, K, R 圃場は、BYMV および FreMV 複合感染株が多く、徳島県阿南市 B 圃場は FreMV および FreSV 複合感染株が多い傾向にある。また、徳島県阿南市 A 圃場は 3 種ウイルスいずれも感染率が高く、O 圃場は BYMV 単独感染株が多い傾向にある。

表 21. 圃場別のウイルス感染率

地名	圃場名	ELISA 検定による感染株数 (感染率 : %)			
		BYMV	FreMV	FreSV	
東京都 八丈町	T	12/13 (92)	13/13 (100)	2/13 (15)	
	O	103/150 (69)	42/150 (28)	20/150 (13)	
	Y	140/160 (88)	156/160 (98)	0/160 (0)	
	S	166/171 (97)	166/171 (97)	1/171 (1)	
	K	5/8 (63)	7/8 (88)	0/8 (0)	
	R	5/7 (71)	7/7 (100)	0/7 (0)	
徳島県 阿南市	A	11/22 (50)	14/22 (64)	19/22 (86)	
	B	0/20 (0)	15/20 (75)	16/20 (80)	
	C	0/10 (0)	3/10 (30)	9/10 (90)	
	D	0/11 (0)	11/11 (100)	4/11 (36)	
	E	0/17 (0)	17/17 (100)	7/17 (41)	
	F	7/17 (41)	15/17 (88)	1/17 (6)	
	G	2/24 (8)	23/24 (96)	1/24 (4)	
	H	6/14 (43)	13/14 (93)	8/14 (57)	
	I	0/18 (0)	0/18 (0)	18/18 (100)	
	J	0/6 (0)	2/6 (33)	6/6 (100)	

6. 2 圃場内のウイルス分布状況

2013 年 2 月の東京都八丈町での現地調査で行った Random sampling (RS) の調査結果を図 45, 46, 47 に示した。S、O、Y 圃場にて病徴の有無に関係なく等間隔で各 100 サンプルずつ採集し (S 圃場 : No.1~100, O 圃場 : No.101~200, Y 圃場 : No.201~300)、3 種ウイルス (BYMV, FreMV, FreSV) の ELISA 検定を行い、そのデータを以下の分布図に示した。

S 圃場は 97/100 株 (97%)、Y 圃場は 96/100 株 (96%) が BYMV および FreMV の複合感染株であった。よって、これら 2 種ウイルスのアブラムシ伝染が圃場内で起きている可能性が高いと考えられる。また O 圃場は、92/100 株 (92%) が BYMV 単独感染株であり、他の 2 圃場との間に差が見られた。しかし、O 圃場は 7 株が BYMV および FreMV の複合感染であるため、今後 FreMV もアブラムシ伝染によって圃場全体に蔓延する可能性がある。また、FreSV は O 圃場で 1 株のみ検出された。O 圃場では、Disease sampling にて FreSV 感染株が 13 株確認されており、土壌伝染が起こる可能性も考えられる。Random sampling は、圃場内の感染ウイルスの分布状況を調査する目的で行ったが、分布の傾向は特に見られなかった。

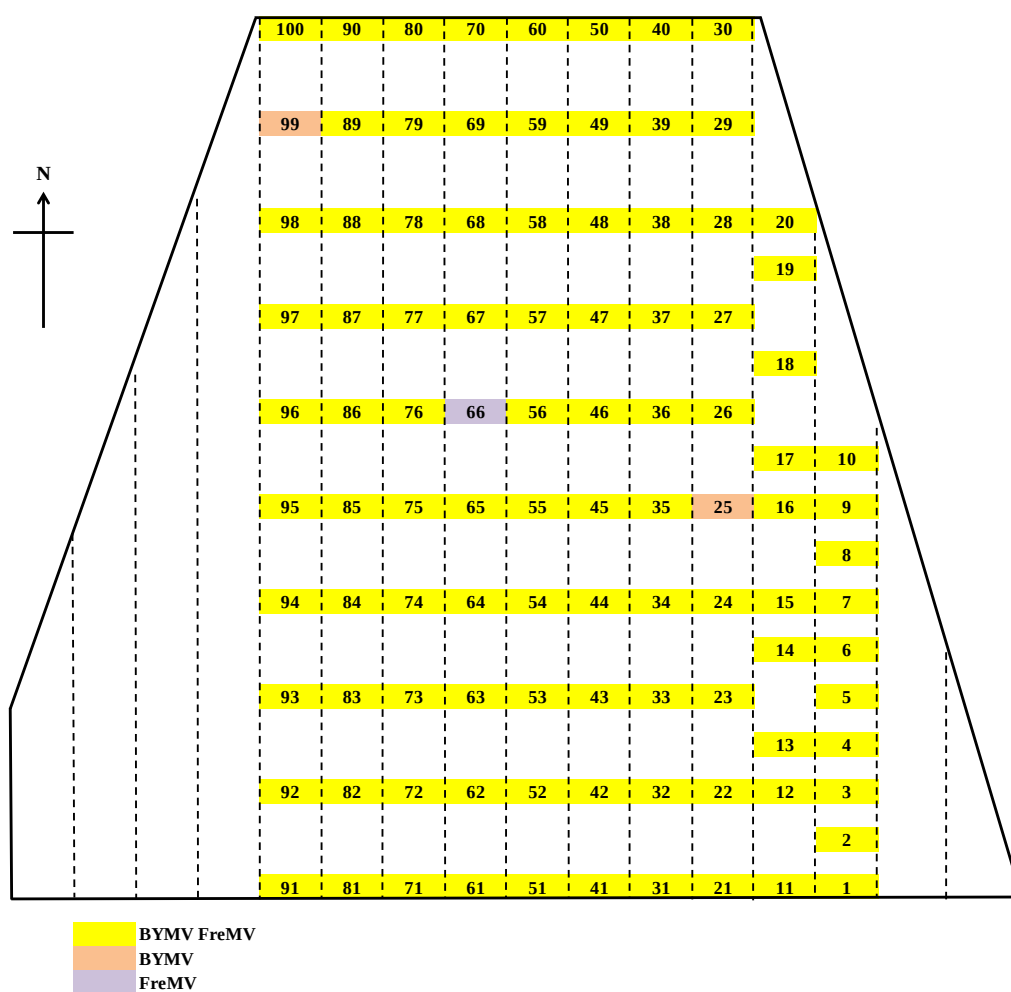


図 45. 東京都八丈町 S 圃場のウイルス分布

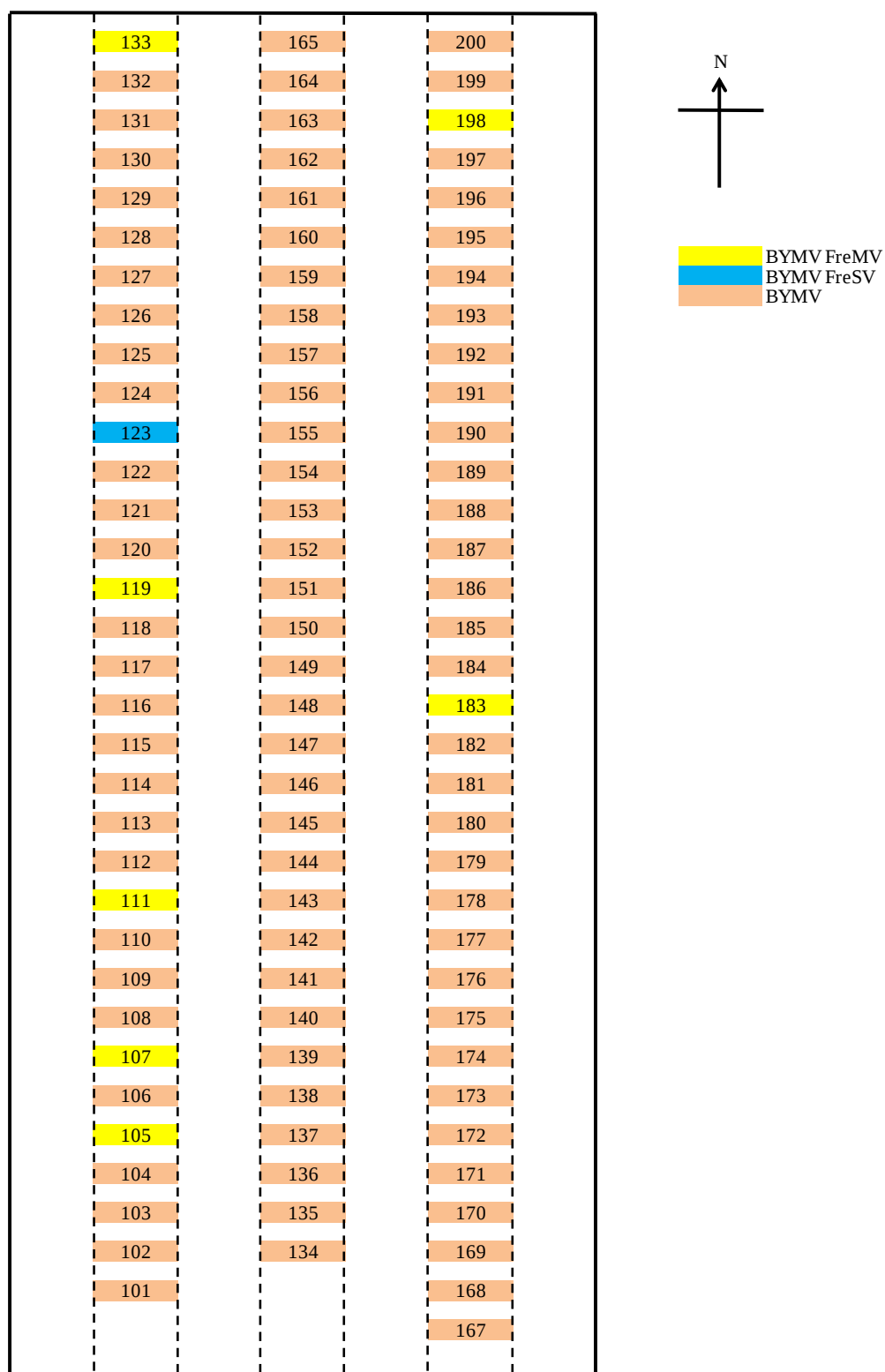


図 46. 東京都八丈町 O 圃場のウイルス分布

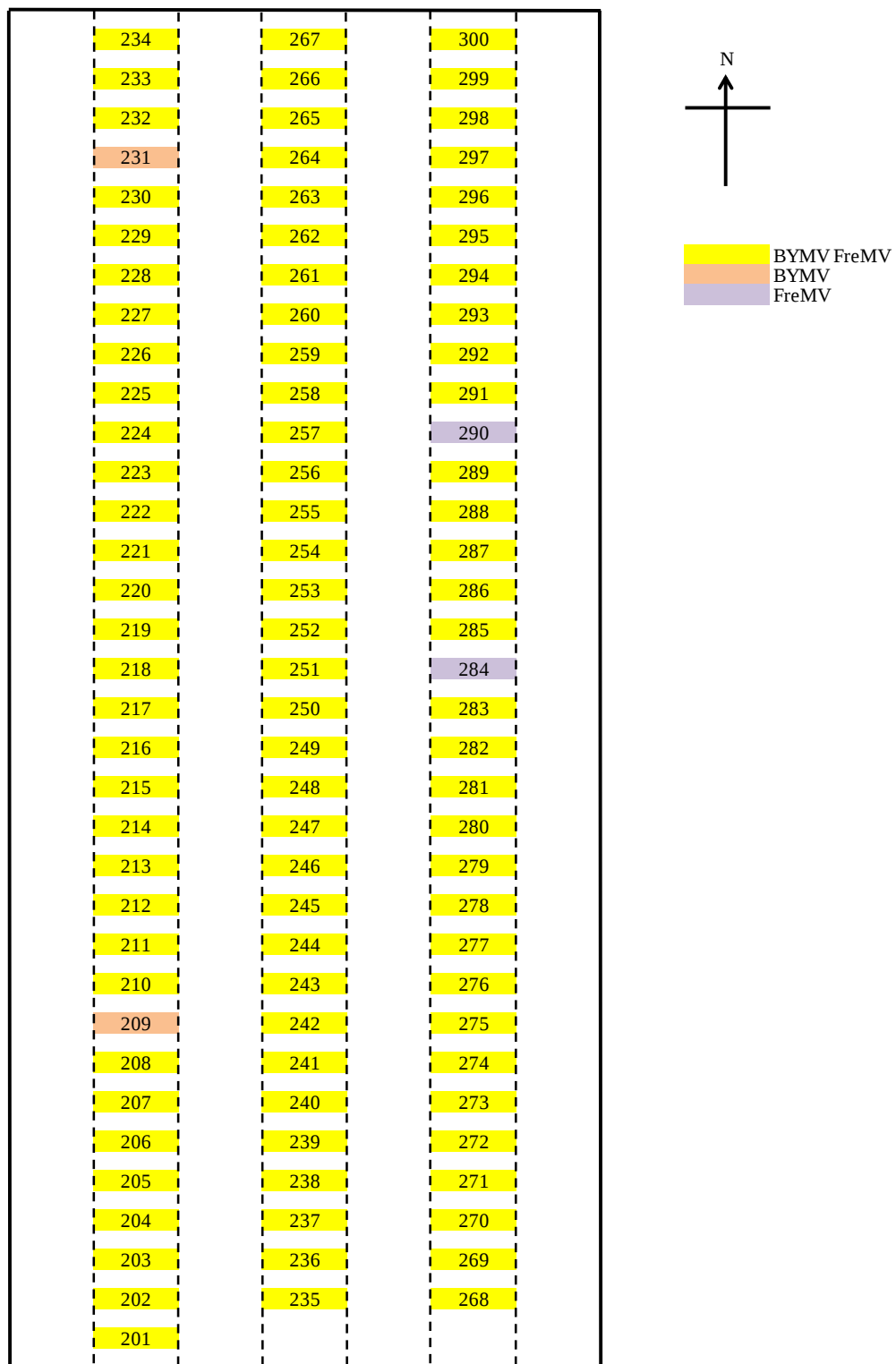


図 47. 東京都八丈町 Y 圃場のウイルス分布

第7章 考察

7. 1 FreSV の発見

FreSV は、本研究にて国内で初めて検出された。本ウイルスは、現在までにイタリア (Vaira *et al*, 2006 ; Meekes and Verbeek, 2011)、アメリカ (Vaira *et al*, 2009)、ニュージーランド (Pearson *et al*, 2009)、オランダ (Meekes and Verbeek, 2011)、ブルガリア (Bobev and Taphradjiiski, 2013)、韓国 (Jeong *et al*, 2014) でフリージアへの感染が報告されている。本研究では、市販フリージアからは検出されなかったが、国内の主要生産圃場である東京都八丈町および徳島県阿南市ともに発生が確認されている。また、徳島県では調査を行った株全てが FreSV 感染している圃場 (阿南市 : I, J 圃場) もあることから、圃場内でウイルスが伝染している可能性が考えられる。実際に、I 圃場のフリージアの根を観察したところ、FreSV の媒介菌類である *Olpidium brassicae* の遊走子嚢と思われる構造物が複数観察された。しかし、これらは形態観察しか行っていないことから、今後 RT-PCR 検定、遊走子嚢のサイズや休眠胞子のサイズと形態を調べ、正確に同定する必要がある。また、FreSV 感染圃場の土壌を使用した土壌伝染試験では、結果が全て陰性であったことから、国内での圃場内伝染は実証できなかった。考えられる原因として、*Olpidium brassicae* の生育適温が 15~20℃である (守川, 2005) にも関わらず、播種するまで土壌を 4℃で保存していたことなどが考えられる。よって、圃場から土壌を採集したら 15~20℃に土壌を保存し、迅速にポットに植え付けて試験を行う必要があると考えられる。さらに、現在までの試験では汚染土壌にフリージアの種子を播種していたが、この方法では苗立枯病、タネバエ等が発生して失敗する場合があります、一定量の生育を確保した植物苗に分離源土壌を接種する方が失敗は少ないと言われている (守川, 2005)。よって、健全土壌にて一定期間生育した実生フリージアを、後に汚染土壌に移植する方法が推奨される。海外ではイタリアおよびオランダでフリージアの土壌試験が行われており、陽性反応を得て圃場内伝染を実証している (Vaira *et al*, 2006 ; Meekes and Verbeek, 2011) 。さらに国内でも本研究で調査を行った 16 圃場中 13 圃場で FreSV が検出されていることから、圃場内感染が起こる可能性が極めて高いと考えられる。ophiovirus は容易に土壌伝染し、さらに *Olpidium brassicae* の休眠胞子内で 20 年以上の耐久性があり、単独感染での病原性以外に、他のウイルスとの相乗効果の可能性もあることから非常に危険である (Vaira *et al*, 2006)。土壌伝染によって、他の植物種に宿主を拡大することも予測される。実際に、南アフリカではユリ科ラシュナリア属で球根植物の 1 種であるラシュナリア (*Lachenalia*) から FerSV が検出されている (木村, 1994 ; Vaira *et al*, 2007)。また、varicosavirus 属も *Olpidium brassicae* によって土壌伝染することが知られている (Roggero *et al*, 2003)。実際に、フリージアからも varicosavirus 属の FLNV が検出されている (Vaira *et al*, 2006)。レタスのビッグベイン病は、varicosavirus 属の *Lettuce big vein virus* (LBVV) と ophiovirus 属の *Milafiori lettuce virus* (MiLV) の 2 種ウイルスが複合感染することが多く、原因を解明することに難航した (Roggero *et al*, 2000, 2003)。フリージアでもよく似た状況が発生している (Meekes and Verbeek, 2011)。

FLNV に病原性があるかどうかは疑問視されているが、FreSV との相乗作用の可能性はある (Vaira *et al*, 2006)。よって、FreSV 感染率が高い圃場での Random sampling なども含めた調査が大いに必要であると考えられる。

CNS 症状と FreSV の関連性を考えると、本研究では FreSV 単独感染では約半数のフリージアが CNS 症状を示し、BYMV および FreMV と 2 種ウイルスまたは 3 種ウイルス複合感染すると、ほぼ全ての株が CNS 症状を示すことが分かっている。本ウイルスのフリージアへの戻し接種は、本研究を含め世界各国でも成功していない。また、海外の土壌伝染試験では FreSV の土壌伝染は確認できたが、壊疽症状の再現はされていない。よって、症状との確実な関連性は明らかではなく、コッホの原則を満たすためには更なる試験が必要である (Vaira *et al*, 2006 ; Meekes and Verbeek, 2011)。本研究では FreSV の部分純化が成功していない。イタリアでは汁液接種した *C. quinoa* で純化を行っている (Vaira *et al*, 2006)。本研究でも FreSV の *C. quinoa* への感染は時々確認できたが、FreSV 特有の淡緑の局部病斑 (Vaira *et al*, 2006) は確認できず、フリージアから直接純化を行った。高濃度の接種源で戻し接種を行うことも検討する必要がある、純化方法についても今後更なる検討が必要となる。

FreSV に関しては今後更なる試験が必要となるが、現時点で防除を行う必要性は非常に高いと考えられる。よって、防除対策を提案すると、ウイルスフリーの球根および ELISA などによりウイルス感染の少ないロットを使用し、また土壌消毒を行うことが重要であると考えられる。

7. 2 H1F3 の発見

H1F3 は、東京都八丈町 O 圃場の品種：ポルトサルートから検出された。汁液接種での病徴や 3 種ウイルスの ELISA および RT-PCR の結果から未報告のウイルスである可能性が高いと考えられる。また、汁液接種による病徴再現が夏季は不可能であることや物理学的試験の結果から比較的弱いウイルスであることが推測される。粒子の形状が桿菌状であることから *rhbdoviridae* 科のウイルスである可能性が高いと考え、RT-PCR を行った。プライマーは、*cytorhabdovirus* 属特異プライマーおよび *nucleorhabdovirus* 属 SYNV 特異プライマーにて試験を行ったが結果が陰性であった。よって、今後 *nucleorhabdovirus* 属特異プライマーなどを設計し、再度試験を行う必要がある。さらに、*rhbdoviridae* 科のウイルスであれば、超薄切片を行うことで *cytorhabdovirus* 属か *nucleorhabdovirus* 属を同定することができるので、本試験も行うことが必要である。なお、*rhbdoviridae* 科のウイルスがフリージアより検出されたという報告はない。

また、その他にも FLNV である可能性があると考え、本研究室 4 年の水田が *varicosavirus* 属特異プライマーを使用した試験を行ったが陰性であった。しかし、本ウイルスは Bouwen が報告した *varicosavirus* 属との共通点がある。*C. quinoa* への汁液接種の際に観察される病徴が壊疽斑点であること、そして夏季には汁液接種で感染しないことである (Bouwen, 1994)。よって今後、も *varicosavirus* 属である可能性も含め、プライマー設計に加え純化方法および電子顕微鏡観察も再度検討する必要があると考えられる。

本ウイルスは、CNS 症状の原因となっている可能性は低いと考えられているものの、茎に壊疽症状を呈することから、切花として出荷されるフリージアにとって損害が大きいと考えられる。よって、逸早くウイルスを同定し、防除対策を考えることが重要である。

今後の課題として、純化では今までベントナイト-マグネシウムを 1/10 容量加えることで、殆どの植物体の余分な構造物を沈殿に凝縮させ、植物の色素も取り除かれていた。よって、この時にウイルスも沈殿に回収されていた可能性が考えられる。今後は、ベントナイト-マグネシウムを少量ずつ加えていき、ウイルスを上清に回収できるようにするべきである。また、ベントナイト-マグネシウムを加える時以外にも、毎回純化試料を *C. quinoa* に汁液接種することで感染性の有無を調べる必要があると考えられる。さらに、試験を行う際は健全 *C. quinoa* を同量用意し、コントロールとして同時に試験を行う必要がある。そして、最適な純化方法を確立したら、純化産物を SDS-PAGE および核酸抽出・泳動を行い、タンパク質および核酸の分子量を調べたり、電子顕微鏡観察を行ったりすることで同定できると考える。本ウイルスの媒介経路を明らかにするために、アブラムシ接種試験および土壌伝染試験を行う必要がある。また、仮に *rhbdoviridae* 科のウイルスである可能性を考えると、ウンカおよびヨコバイも媒介者としての可能性が考えられ (Redinbaugh *et al*, 2002)、急速に病害が蔓延する可能性が考えられることから、本ウイルスの同定を行う必要があると考えられる。

7. 3 CNS 症状の原因

本研究では、CNS 症状の原因は BYMV、FreMV、FreSV の 2 種または 3 種ウイルスの複合感染が CNS 症状と強く関連しているという結果が得られた。定性的調査では、BYMV は単独感染の場合、殆どの株が無病徴であり BYMV 単独と CNS 症状との関連性は低いと考えられる。しかし、FreMV および FreSV は単独感染でも約半数が CNS 症状株であり、さらに両者が同時に複合感染すると全て CNS 症状を呈するという結果が得られた。よって、フリージアの CNS 症状は、3 種ウイルスの中でも、特に FreMV および FreSV が関連している可能性が高いと考えられる。今後、植物体内の各ウイルス濃度の割合によって CNS 症状がどのように変化するかなどもより一層試験する必要がある。

フリージアの CNS 症状すなわち LN 症状および SLN 症状は、1970 年代からヨーロッパを中心に調査が行われてきた (van Dorst, 1973)。しかし、今日に至っても未だに原因は明らかにされていない。その理由は、FreMV および FreSV が戻し接種できないことから、コホの原則を満たすことができない (Meekes and Verbeek, 2011)。また、本研究においては両者に加え BYMV も戻し接種できない。近年、特にイタリア、オランダで同様の試験が行われている。Vaira らは、様々な病徴の見られる 102 検体のフリージアの電子顕微鏡感察を行った。その結果、FreSV の粒子が壊疽症状株から多く観察された。しかし、壊疽症状株から potyvirus 属 (BYMV、FreMV) や varicosavirus 属が同時に検出されることから、明確な結論は得られなかった (Vaira *et al*, 2006)。また、複合感染している各ウイルスの濃度は調べられていない。本研究では、徳島県産フリージア 67 検体の症状の程度と各ウイルスの濃度の関連性を調査した。今後は、さらに多くの検体で本調査を行う必要がある。また、フリージアは同一検体であっても葉によって CNS 症状の程度が全く異なることもある。健全葉と激しい CNS 症状葉が同一検体で見られることも多々ある。よって、同一検体内で複数ヶ所からウイルス検出を行い、各ウイルスの濃度がどのように異なるかなども調査を行う必要がある。そして、ウイルス検出は今までは ELISA にて行っていたが、高感度と言われている RT-PCR (相野, 2010) にて行うことも検討する必要がある。

また、Meekes らは 3 種ウイルス (BYMV、FreMV、FreSV) のいずれも検出されない壊疽症状株が複数あることから未知ウイルスの存在を示唆した (Meekes and Verbeek, 2011)。本研究でも、定性的な調査において 9 株は CNS 症状株にも関わらずウイルスが未検出であった。また、東京都八丈町および徳島県阿南市産の CNS 症状株を汁液接種した際に BYMV、FreMV、FreSV、H1F3 ではないと思われる病徴を呈する株がいくつか確認された。例えば、東京都八丈町産および徳島県阿南市産フリージア 品種：エンパイアを *N. benthamiana* に汁液接種した際に上葉および接種葉に激しい壊疽症状が見られた (図 48)。3 種ウイルス抗血清を用いた ELISA 検定では BYMV のみに反応し、varicosavirus 属特異プライマーを用いた RT-PCR でも陰性を示した。未知ウイルスの可能性も検討しながら今後研究を進める必要がある。未知ウイルスに関しては、電顕観察にて粒子を観察することが重要であると考えられる。そのためには、部分純化法の検討や染色液の選択、および電顕観察の熟練が重要である。

その他にも、最近は報告がないが *Freesia streak virus* (FSV) もフリージアの病原ウイルスとして知られている (Brunt, 1968, 1969, 1970; Casper and Brunt, 1971; 井上 and 光畑, 1983)。今後も FSV の情報収集および調査を行う必要がある。FSV は potyvirus 属と報告されていることから (辻ら, 1993, 1994)、電顕観察において見られるひも状粒子が、本当に BYMV または FreMV であるか入念に調べる必要もある。そして、varicosavirus 属に関しても、今後プライマーの再検討および電顕観察の染色液や固定液の検討を行い、引き続き試験を行うべきである。

現在までにイタリア、オランダ以外にも世界各地で壊疽症状株は確認されている。1985 年にはクロアチアで (Plese, 1985)、1994 年にはハンガリーで (Nemethy, 1994)、2010 年には韓国 (Choi *et al*, 2010) で壊疽症状株が発見されている。よってフリージアの CNS 症状株の報告はないが、世界各地のフリージア生産地で蔓延している可能性が十分に考えられる。今後も原因の解明を行う必要が大いにある。国内のフリージア栽培が盛んである鹿児島県沖永良部島などでの調査も行うことを検討すべきである。



図 48. *N.benthamiana* に見られる壊疽症状
(接種 15 日目)

7. 4 防除対策

本研究では、CNS 症状の原因は、3 種ウイルス (BYMV, FreMV, FreSV) 相互間の複合感染によると考えられた。よって、防除対策として主に以下の 3 つを提案する。①ウイルスフリー球根および ELISA などによりウイルス感染の少ないロットを使用すること②BYMV および FreMV は、アブラムシ伝染する可能性が高いこと (Brunt, 1995) から、徹底したアブラムシ防除を行うこと③FreSV は、土壌中の *Olpidium brassicae* によって伝染すること (Vaira et al, 2006) から、土壌消毒を行うことが考えられる。

また、本研究でフリージアを提供して頂いた東京都八丈町 6 圃場および徳島県阿南市 10 圃場について、圃場によってウイルス感染の傾向が異なっていたので、各圃場について考えられる防除対策を提案する。徳島県阿南市 A、B、C、H、I、J 圃場は、調査を行った株の 9~10 割が FreSV に感染していた。よって圃場内で土壌伝染が起きている可能性が高いと考えられる。また、東京都八丈町 T、O、S 圃場、徳島県阿南市 D、E、F、G 圃場も半数以下ではあるが FreSV が検出されている。これらの圃場内は、現在は土壌伝染が起きていないとしても、今後起こる可能性があると考えられる。よって、太陽熱消毒や蒸気消毒が防除方法として考えられる (豊田, 2010)。しかし、徳島県阿南市では熱消毒を行っても FreSV 感染しているフリージア生産圃場もあり、消毒方法に関しては今後更なる検討が必要である。また、徳島県 C、I、J 以外の圃場は、BYMV または FreMV、もしくは双方が 9~10 割感染している。そして、Random sampling の結果からも東京都 S、O、Y 圃場は、圃場全体に BYMV または FreMV、もしくは双方が感染していることが分かる。実際に、徳島県の圃場ではハウス内のフリージアの葉にジャガイモヒゲナガアブラムシ (*Acyrtosiphon solani*) が発生していることが確認されており、媒介者となっている可能性がある。よって、農薬のみでなくシルバーマルチなど光反射資材を用いてアブラムシ防除を徹底して行うことなども行う必要がある (豊田, 2010)。また、ウイルスとの関連性は現段階では解明されていないが、徳島市 TOK2 圃場は球根にオカボアカアブラムシ (*Rhopalosiphum rufiabdominale*) の発生が起きていることから、土壌消毒を推奨する。

要旨

フリージアの葉に見られる壊疽症状は、約 40 年以上前から欧州を中心に世界各地で見られている。我が国でも、主要産地である東京都八丈町をはじめ、徳島県徳島市および阿南市でも縞状の退緑または条斑壊疽（Chlorotic necrotic streak : CNS 症状）などの症状を示す病害が問題となっているが、原因は明らかにされていない。そこで、日本国内で栽培されているフリージアに感染しているウイルスを分離・同定し、CNS 症状との関連性を明らかにすることを目的に調査を行った。その結果、*Bean yellow mosaic virus* (BYMV) に加え国内未発生の *Freesia mosaic virus* (FreMV) および *Freesia sneak virus* (FreSV) が多くの株で検出された。一方で、varicosavirus 属の *Freesia leaf necrosis virus* (FLNV) は検出されなかった。検出された 3 種ウイルスと CNS 症状の関連性を定性的調査および定量的調査（統計解析）を行ったところ、2 種または 3 種ウイルスの複合感染が CNS 症状を引き起こしている可能性が高いと示唆された。また、茎に壊疽症状を示す東京都八丈島産フリージア（品種：ポルトサルート）からは未同定のウイルス（H1F3）が検出された。本ウイルスは ELISA にて BYMV、FreMV、FreSV の 3 種ウイルスに陰性を示し、RT-PCR では FLNV を含めた 4 種ウイルスに陰性を示した。部分純化を行ったところ桿菌状のウイルス様粒子が認められたが、同定には至っていない。

謝辞

本研究を行うにあたって、フリージアを御提供賜り、御助言してくださった竹内純先生（現 東京都農林総合研究センター）、建本聡先生（徳島県阿南農業支援センター）、フリージア生産者の方々、チューリップを御提供賜りました桃井千巳先生（富山県園芸研究所）、アブラムシ同定にあたって御助言してくださった病虫害同定診断の御担当の皆様（横浜植物防疫所）に深く御礼申し上げます。

また、本研究を進めるにあたり、懇切丁寧な御指導、御激励してくださった西尾健教授に謹んで感謝し、御礼申し上げます。

また、御指導、御助言を賜りました川合昭先生、延原愛先生、長尾郁弥先生、遠藤三千雄先生、黒川哲治先生、そして検定植物や温室の管理をしてくださった永吉秀光先生に深く御礼申し上げます。

そして、共に研究生活を過ごした応用植物医科学研究室の皆様にも心より感謝いたします。

引用文献

- (1) 相野公孝 (2010) 植物診断, pp261 *in* 植物病理学, 眞山滋志・難波成任 (編), 文永堂, 東京
- (2) Bellardi,M.G. and Bertaccini,A. (1989) Virus diseases of freesia in Italy. *Adv. Hort. Sci.* 3 : 29-32
- (3) Bobev,S.G. and Taphradjiiski,O.I. (2013) First report of freesia sneak virus associated with foliar necrosis of freesia refracta in Bulgaria. *Plant Disease* 97 : 1,514.3
- (4) Bouwen,I. (1994) Freesia leaf necrosis : some of its mysteries revealed. *Acta Horticulturae* 377 : 311-318
- (5) Brunt,A.A. (1968) Freesia streak virus (FSV) . *Ann. Rep. Glasshouse Crops Res. Inst.*1967 : 101
- (6) Brunt,A.A. (1969) Freesia streak virus (FSV) . *Ann. Rep. Glasshouse Crops Res. Inst.*1968 : 104-105
- (7) Brunt,A.A. (1970) Freesia. *Ann. Rep. Glasshouse Crops Res. Inst.*1969 : 131-132
- (8) Brunt,A.A. (1995) Freesia, pp274-280 *in* Virus and virus-like diseases of bulb and flower crops, Loebenstein,G., Lawson,R.H., and Brunt,A.A., (eds.) , John Wiley and Sons, Chichester
- (9) Casper,R. and Brunt,A.A. (1971) Das freesia streak virus – ein in deutschland neues freesienvirus. *Nachrichtenbl.Deutsch.Pflanzenschutzd.* (Braunschweig) 23 : 89-90
- (1 0) Choi,H.I., Lim,H.R., Song,Y.S., Kim,M.J., Choi,S.H., Song,Y.S., Bae,S.C. and Ryu,K.H. (2010) The complete genome sequence of freesia mosaic virus and its relationship to other potyviruses. *Archives of Virology* 155 : 1183-1185
- (1 1) Derks,A.F.L.M. and vink-van den Abeele,J.L. (1987) Leaf-yellowing in combination with corm necrosis in freesia caused by bean yellow mosaic virus: factors involved in syndrome development. *Neth.J.Pl. Path.*93 : 159-166

- (12) 土井元章 (1995) フリージア, pp170-174 in 花卉園芸, 今西英雄 (編), 文永堂, 東京
- (13) Foxe,M.J. and Wilson,U.E. (1985) Investigation of virus infection of freesia. *Acta Horticulturae* 164 : 291-295
- (14) 八丈島観光協会 (2014) 第 44 回八丈島フリージア祭り
http://hachijo.gr.jp/html/event_page/2014furi/index.html (2014 年 2 月 20 日)
- (15) 堀田治邦・佐々木純・竹内徹 (2008) ユニバーサルプライマーによる球根花き病原ウイルスの診断. 新しい研究成果 北海道地域 : 138-140
- (16) 井上成信・光畑興二 (1983) フリージャから分離された *freesia streak virus* について. *Ann.Phytopath.Soc.Japan* 49 : 113-114
- (17) Jeong,M.I., Choi,Y.J., Joa,J.H., Choi,K.S. and Chung,B.N. (2014) First report of *freesia sneak virus* in commercial *freesia hybrida* cultivars in Korea. *Plant Disease* 98 : 162
- (18) 亀谷満朗 (1993) フリージア, pp562-564 in 原色作物ウイルス病事典, 土崎常男・栃原比呂志・亀谷満朗・柳瀬春夫 (編), 全国農村教育協会, 東京
- (19) 木村三千雄 (1994) ラシュナリア, pp2,660 in 園芸植物大事典, 小学館, 東京
- (20) Kumar,Y., Hallan,V. and Zaidi,A.A. (2009) Identification and characterization of *bean yellow mosaic virus* infecting *freesia*. *J.Plant Biochemistry & Biotechnology* 18 : 253-255
- (21) 松本嘉幸 (2008) オカボアカアブラムシ, pp124 in アブラムシ入門図鑑, 全国農村教育協会, 東京
- (22) Meekes,E.T.M. and Verbeek,M. (2011) New insights in *freesia* leaf necrosis disease. *Acta Horticulturae* 901 : 231-236
- (23) 守川俊幸 (2005) *Olpidium* 属菌の実験取り扱い方法. 植物防疫 59 : 26-29
- (24) 守川俊幸・築尾嘉章・野村良邦 (2004) チューリップ病害の病原及び発生生態に関する研究. 富山県農業技術センター研究報告 21 : 1-141

- (2 5) 守川俊幸・野村忠邦・山本孝狹・夏秋知英 (1995) Partial characterization of virus-like particles associated with tulip mild mottle mosaic. 日植病報 61 : 578-581
- (2 6) 村山大記・下村徹・平井篤造 (1962) 物理的性質の実験, pp591-593 in 植物病理実験法, 明日山秀文・向秀夫・鈴木直治 (編), 日本植物防疫協会, 東京
- (2 7) Nemethy,Z.I. (1994) Survey on virus diseases of bulbous flowers in Hungary. Acta Horticulturae 377 : 267-274
- (2 8) 西村十郎 (1998) フリージア pp545 in 日本植物病害大事典. 岸國平 (編), 全国農村教育協会, 東京
- (2 9) 西尾健・川合昭・高橋勤・難波成任・山下修一 (1989) カンキツタターリーフウイルスの純化ならびに諸性質. 日植病報 55 : 254-258
- (3 0) 農林水産省 (2012) 平成 24 年産花き生産出荷統計 球根類計
<http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001114666> (2014 年 2 月 20 日)
- (3 1) 大木理 (2009) 植物ウイルスの汁液接種・免疫電子顕微鏡法によるウイルス同定・ウイルス媒介菌類の観察・酸性フクシン液・ラクトフェノール液 pp32-37, 49-52, 73-74, 118-119 in 植物ウイルス同定の基礎. 日本植物防疫協会, 東京
- (3 2) Pearson,M.N., Cohen,D., Cowell,S.J., Jones,D., Blouin,A., Labas.B.S.M., Shiller,J.B. and Clover,G.R.G. (2009) A survey of viruses of flower bulbs in New Zealand. Australasian Plant Pathology.38 : 305-309
- (3 3) Petrzik,K. (2012) Bioinformatic analysis of the L polymerase gene leads to discrimination of new rhabdoviruses. Journal of Phytopathology 160 : 377-381
- (3 4) Plese,N. (1985) Virus infection of freesias in Croatia. Acta Bot. Croat.44 : 7-10
- (3 5) Redinbaugh,M.G., Seifers,D.L., Meulia,T., Abt,J.J., Anderson,R.J., Styer,W.E., Ackerman,J., Salomon,R., Houghton,W., Creamer,R., Gordon,D.T. and Hogenhout,S.A. (2002) Maize fine streak virus, a new leafhopper-transmitted rhabdovirus. Phytopathology 92 : 1167-1174

- (3 6) Roggero,P., Lot,H., Souche,S., Lenzi,R. and Milne,R.G. (2003) Occurrence of mirafiori lettuce virus and *lettuce big-vein virus* in relation to development of big-vein symptoms in lettuce crops. *European Journal of Plant Pathology* 109 : 261-267
- (3 7) Roggero,P., Ciuffo,M., Vaira,A.M., Accotto,G.P., Masenga,V. and Milne,R.G. (2000) An ophiovirus isolated from lettuce with big-vein symptoms. *Archives of Virology* 145 : 2629-2642
- (3 8) 滝本勇治・氏原和人・権藤昭博・原田節也・大矢慎吾・東正昭・石川浩一・西村範夫 (2004) レタスの土壌伝染性病害発生抑制技術の開発. プロジェクト研究成果シリーズ 425 : 1-109
- (3 9) 豊田秀吉 (2010) 物理的防除法 pp292-293, 296 in 植物病理学, 眞山滋志・難波成任 (編), 文永堂, 東京
- (4 0) 辻俊也・前田孚憲・井上成信 (1993) イキシアに発生した斑入り病の病原ウイルス (*freesia streak virus* : FSV). *日植病報* 59 : 737
- (4 1) 辻俊也・前田孚憲・井上成信 (1994) *Freesia streak potyvirus* の外被タンパク質遺伝子および3'末端非翻訳領域の塩基配列. *日植病報* 60 : 782
- (4 2) Vaira,A.M., Kleynhans,R. and Hammond,J. (2007) First report of freesia sneak virus infecting *lachenalia* cultivars in South Africa. *Plant Disease* 91 : 770
- (4 3) Vaira,A.M., Accotto,G.P., Costantini,A. and Milne,R.G. (2003) The partial sequence of RNA1 of the ophiovirus *ranunculus white mottle virus* indicates its relationship to rhabdoviruses and provides candidate primers for an ophiovirus-specific RT-PCR test. *Archives of Virology* 148 : 1037-1050
- (4 4) Vaira,A.M., Hansen,M.A., Murphy,C., Reinsel,M.D. and Hammond,J. (2009) First report of freesia sneak virus in *freesia* sp.in Virginia. *Plant Disease* 93 : 965
- (4 5) Vaira,A.M., Lisa,V., Costantini,A., Masenga,V., Rapetti,S. and Milne,R.G. (2006) Ophioviruses infecting ornamentals and a probable new species associated with a severe disease in freesia. *Acta Horticulturae* 722 : 191-199

- (4 6) Vaira,A.M., Gago-zachert,S., Garcia,M.L., Guerri,J., Hammond,J., Milne,R.G., Moreno,P., Morikawa,T., Natsuaki,T., Navarro,J.A., Pallas,V., Torok,V., Verbeek,M. and Vatten,H.J. (2012) Ophioviridae. pp743 in Virus taxonomy-nineth report of the international committee on taxonomy of viruses, King,A.M., Adams,M.J., Carstens,E.B. and Lefkowitz,E.J. (eds.), Elsevier academic press
- (4 7) van Dorst,H.J.M. (1973) Two new disorders in freesias. Neth.J.Pl.Path.79 : 130-137
- (4 8) van Dorst,H.J.M. (1975) Evidence for a soilborne nature of freesia leaf necrosis. Neth.J.Pl.Path.81 : 45-48
- (4 9) Verbeek,M., Dullemans,A.M., van Bekkum,P.J. and van der Vlugt,R.A.A. (2013) Evidence for *lettuce big-vein associated virus* as the causal agent of a syndrome of necrotic rings and spots in lettuce. Plant Pathology 62 : 444-451

参考文献

- (1) 桑田茂・久保進 (1981) Rod-shaped particles found in tobacco plants infected with tobacco stunt agent. 日植病報 47 : 264-268
- (2) 桑田茂・久保進・山本修一・土居養二 (1983) Rod-shaped particles, a probable entity of lettuce big vein virus. 日植病報 49 : 246-251
- (3) 柴森弘巳 (2000) 伊豆諸島におけるフリージアのウイルス病発生実態. 日植病報 66 : 144-145
- (4) van der Wilk,F., Dulleman,A.M., Verbeek,M. and van den Heuvel,J.F.J.M. (2002) Nucleotide sequence and genomic organization of an ophiovirus associated with lettuce big-vein disease. Journal of General Virology 83 : 2869-2877
- (5) van Dorst,H.J.M. and Peters,D. (1988) Experiences with the freesia leaf necrosis agent and its presumed vector, *olpidium brassicae*. pp315-322 in Developments in Applied Biology 2, viruses with fungal vectors, Cooper,J.I. and Asher,M.J.C. (eds.), AAB Wellesbourne
- (6) Vetten,H.J., Lesemann,D.E. and Dalchow,J. (1987) Electron microscopical and serological detection of virus-like particles associated with lettuce big vein disease. J.Phytopathology 120 : 53-59