

## Helleborus net necrosis virusの人工接種 とクリスマスローズ植栽地での発生調査

清水, 健太 / SHIMIZU, Kenta

---

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学・工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編 / 法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編

(巻 / Volume)

57

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

4

(発行年 / Year)

2016-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00013536>

# *Helleborus net necrosis virus* の人工接種と クリスマスローズ植栽地での発生調査

## ARTIFICIAL INOCULATION AND FIELD SURVEY FOR *HELLEBORUS NET NECROSIS VIRUS*

清水 健太

Kenta SHIMIZU

指導教員 西尾健

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻植物医科学領域修士課程

*Helleborus net necrosis virus* (HeNNV) is considered to be a causal agent of the black death disease of *Helleborus* spp.. There are no scientific reports showing successful transmission of the virus by mechanical and aphid inoculation, so far. In this study, it was shown that HeNNV was transmitted to *Chenopodium quinoa* and *C. amaranticolor* by mechanical inoculation using infected hellebore leaves, and was transmitted to hellebore seedlings by aphid (*Myzus persicae*) inoculation. Relatively high incidence of symptomless infection of the virus was found in a field survey at a park in Tokyo. Thirteen aphid species were recorded at the same field.

**Key Words** : *Helleborus net necrosis virus*, *carlavirus*, *black death*, *Helleborus* spp.

### 1. 目的

クリスマスローズとは、キンポウゲ科ヘレボルス属の観賞用植物であり、近年愛好家が増加している。クリスマスローズではウイルス病が最も重要視されており、日本では *Helleborus net necrosis virus* (HeNNV) の感染が報告されている[3]。HeNNV は *Carlavirus* 属のウイルスで、クリスマスローズの重要病害である黒死病（ブラックデス）の原因ウイルスとされている。現在までの研究報告によると、HeNNV はアブラムシにより非永続伝搬されると考えられているが実証はなく、汁液接種により伝染したという報告はない。そのため、ウイルス伝搬の方法が解明されていない。本研究では、汁液接種試験、アブラムシ接種試験、植栽地での HeNNV の発生調査、感染地に飛来するアブラムシ種の調査を行うことで、伝染方法を明らかにし、効果的な防除対策を確立することを目的とした。

### 2. 材料及び方法

接種源は、東京都内の栽培農家から譲り受けた HeNNV 感染クリスマスローズを供試した（図 1）。汁液接種試験は、6科7属14種の草本植物に接種を行い、接種後は随時病徴観察を行った。検定は ELISA と RT-PCR により行った。また、20株の *Chenopodium quinoa* への接種試験を2回行い、感染率を調査した。

アブラムシ接種試験は、2013年5~11月にクリスマスローズ専門業者から譲り受けたクリスマスローズ実生苗 75

株に接種試験を行った。接種試験にはモモアカアブラムシを使用した。接種後は随時病徴観察を行い、検定は ELISA と RT-PCR により行った。

発生調査は、2015年1月に東京都調布市内の公園で植栽されているクリスマスローズ 581株の葉を採取し、ELISA により検定した。

アブラムシ種の調査は、2015年6~7月に同公園内の植栽地に黄色粘着板（ホリバー）を設置し、捕獲したアブラムシのミトコンドリア DNA の COI 遺伝子領域のシーケンス解析により同定した[4]。さらに、Nested RT-PCR を用いて捕獲したアブラムシの HeNNV 保持を調査した。



図 1. HeNNV 感染クリスマスローズ

### 3. 結果

#### (1) 汁液接種試験

接種2週間後に *C. quinoa*、*C. amaranticolor* の接種葉に退緑斑点、壊疽斑点症状が確認された(図2)。症状が確認された葉を ELISA、RT-PCR で検定したところ、2種とも HeNNV が検出された(図2)。感染率調査では、1回目は35%、2回目は50%の感染率であり、*C. quinoa* の汁液接種による感染率は比較的低いことが確認された。また、2回の試験でどちらも無病徴感染株が確認された。

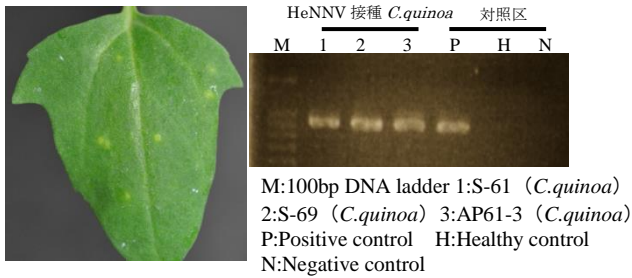


図2. HeNNV を接種した *C. quinoa* と RT-PCR 結果

#### (2) アブラムシ接種試験

接種2週間後にクリスマスローズ実生苗75株を ELISA により検定したところ、2株で陽性が確認された(表1)。また、接種株全てを RT-PCR により検定したところ、ELISA で陽性が確認された株でのみ HeNNV 特異バンドが確認された(図3)。この結果から、低率ではあるものの、HeNNV はモモアカアブラムシによって伝染することが確認された。しかし、継続観察を行っているが、現時点で症状は確認されていない。

表1. アブラムシ接種試験結果

接種日 (2013年)	接種株数	RT-PCR 陽性株 <sup>※</sup>	ELISA 陽性株 <sup>※</sup>
5月16日	15株	0/15	0/15
9月25日	20株	0/20	0/20
10月15日	10株	2/10	2/10
10月30日	20株	0/20	0/20
11月27日	10株	0/10	0/10
計	75株	2/75	2/75

※陽性株数/接種株数

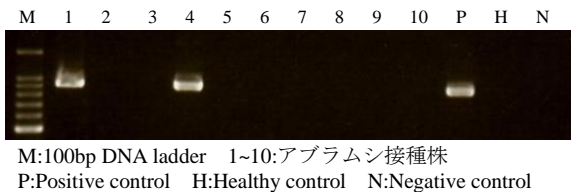


図3. アブラムシ接種試験の RT-PCR 結果

#### (3) クリスマスローズ植栽地の HeNNV 発生調査

2015年1月に東京都調布市内の公園内の2箇所(S園とH園)に植栽されているクリスマスローズ581株の検定を行ったところ、76株で感染が確認された。うち、H園は330株中1株、S園はさらに2箇所に分けて検定し、S園①では128株中42株、S園②では123株中33株で陽性が確認された(表2)。しかし、黒死病症状が確認された株は、76株中9株と少数であった。検定結果から、感染株はS園に植栽されているクリスマスローズに多く見られたが、無病徴感染株が多く確認された(図4)。園地の栽培履歴によると、S園の植栽地では、クリスマスローズが植えられてから数年後に黒死病様症状が確認されており、その後、抜根処理されているにも関わらず、現在も感染が確認されていることから、アブラムシ等のベクターによるウイルスの自然伝搬が推測された。

表2. 公園で採取したクリスマスローズの検定結果

	採取株数	黒死病症状株数 <sup>※</sup>	ELISA 陽性株数 <sup>※※</sup>
H園	330株	0/330	1/330
S園①	128株	3/128	42/128
S園②	123株	6/123	33/123

※症状株数/採取株数 ※※陽性株数/採取株数

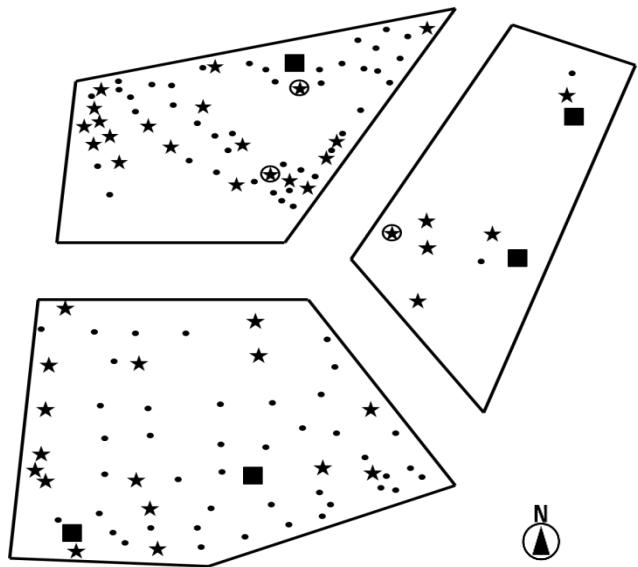


図4. S園①のクリスマスローズの植栽図

★: 黒死病症状株 ★: 無病徴感染株、  
●: 健全株、■: 樹木

#### (4) 感染地に飛来するアブラムシ種調査

アブラムシ接種による伝搬が確認されたこと及び感染地においてウイルスの自然伝搬が推測されたことから、感染株が多く確認されたS園において飛来するアブラムシ種を調査した。黄色粘着板は2015年6月から7月にかけて計5回行い、55頭の有翅アブラムシが捕獲された。これらをミトコンドリアDNAのCOI領域のシーケン

ス解析により同定したところ、13種のアブラムシが確認された(表3)。また、捕獲されたアブラムシのHeNNV保持は確認されなかった(表3)。

#### 4. 考察

今回の試験により、HeNNVは汁液接種により伝染することが確認された。しかし汁液接種試験の結果から、その宿主範囲は狭く感染率も低いことが確認された。アブラムシ接種試験の結果から、モモアカアブラムシによって媒介されることが確認されたが、75株中2株と低率であったこと、感染地でのアブラムシ調査ではモモアカアブラムシが捕獲されていないことから、モモアカアブラムシとは別に、HeNNVを媒介するアブラムシ種が存在する可能性が考えられた。そのため、捕獲されたアブラムシのウイルス保持調査や、同定されたアブラムシ種を用いたアブラムシ接種試験を行う必要がある。

植栽地でのHeNNV発生調査では、S園における感染株が75株と多数確認されたものの、黒死病様症状が確認された株は9株と少数であり、無病徴感染株が多数確認された。この結果から、今回調査した植栽地においてHeNNVが潜伏感染したクリスマスローズが感染源となり、アブラムシ等のベクターによって感染拡大している可能性が考えられた。このように、植栽地ではウイルスが潜伏した無病徴感染株が存在している可能性が高いため、無病徴感染株の早期発見には、イムノクロマトといった圃場レベルで使用できる、簡易で迅速的な診断法が必要である。

HeNNV(黒死病)は初期感染から症状の発現まで最低4ヶ月以上の潜伏期間があると考えられている[1,2]。しかし、2013年10月にアブラムシ接種を行い、感染が確認された株は2015年12月現在も症状が確認されていない。また、上述の植栽地に多数の無病徴感染株が存在することから、黒死病の症状発現には、原因とされているHeNNVだけでなく別の要因、別のウイルス、クリスマスローズの生育段階、品種、生育環境、気象などが関わっている可能性も考えられるため、

クリスマスローズやクリスマスローズに感染する他のウイルスに関してさらなる研究を行う必要がある。

本研究の結果を踏まえてHeNNV(黒死病)の効果的な防除対策を提言すると、次の通りである。①アブラムシ伝染の可能性が高いため、温室内等で発生するアブラムシは必ず駆除する。②黒死病様症状が確認された株は伝染源になるため、早急に抜き取り焼却処分する。③血清診断などにより無病徴感染株を早期に検出して処分する。

#### 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所の西尾健教授に深く感謝し、御礼申し上げます。また、クリスマスローズ植栽地での調査において、ご指導していただいた東京都公園協会の川村東文様に深く感謝申し上げます。また、本研究を行うにあたり、ご指導、ご助言をいただいた堀江博道様、川合昭様、前野絵里子様、永吉秀光様、吉澤祐一郎様に深く御礼申し上げます。

#### 参考文献

- 1) Eastwell, K.C. *et al.* : Helleborus net necrosis virus : A New Carlavirus Associated with 'Black Death' of Helleborus spp, Plant Disease, Vol.93, pp.332-338, 2009
- 2) Naktuinbouw : Black Death Helleborus netnecrosevirus not always deadly, 2012
- 3) Shiraishi, T. *et al.* : First report of Helleborus net necrosis virus isolated from hellebores with black death syndrome in Japan, J Gen Plant Pathol, Vol.77, pp.269-272, 2011
- 4) 木村康太 : 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, 2013

表3. 捕獲されたアブラムシ種

学名	和名	頭数	HeNNV 保持※
<i>Tinocallis zelkowae</i>	ケヤキヒゲマダラアブラムシ	24	0/24
<i>Brachycaudus rumexicolens</i>		8	0/8
<i>Aphis spiraeicola</i>	ユキヤナギアブラムシ	6	0/6
<i>Mollitrichosiphum tenuicorpus</i>	シイニセケクダアブラムシ	5	0/5
<i>Aphis gossypii</i>	ワタアブラムシ	2	0/2
<i>Brachycaudus helichrysi</i>	ムギワラギクオマルアブラムシ	2	0/2
<i>Toxoptera aurantii</i>	コミカンアブラムシ	2	0/2
<i>Hyalopterus pruni</i>	モモコフキアブラムシ	1	0/1
<i>Melanaphis bambusae</i>	タケノアブラムシ	1	0/1
<i>Neophyllaphis podocarpi</i>	マキシンハアブラムシ	1	0/1
<i>Sarucallis kahawaluokalani</i>	サルスベリヒゲマダラアブラムシ	1	0/1
<i>Tetraneura nigriabdominalis</i>	オカボノクロアブラムシ	1	0/1
<i>Ceratovacuna graminum</i>		1	0/1

※陽性頭数/捕獲頭数