法政大学学術機関リポジトリ
HOSEI UNIVERSITY REPOSITORY

PDF issue: 2025-07-06

バラ黄斑モザイクウイルス(Rose yellow mosaic virus)の媒介生物の探索

Ishizaki, Shunta / 石崎, 駿卓

(出版者 / Publisher)
法政大学大学院理工学研究科
(雑誌名 / Journal or Publication Title)
法政大学大学院紀要. 理工学研究科編
(巻 / Volume)
63
(開始ページ / Start Page)
1
(終了ページ / End Page)
3
(発行年 / Year)
2022-03-24
(URL)
https://doi.org/10.15002/00025423

バラ黄斑モザイクウイルス(*Rose yellow mosaic virus*)の媒介生物の探索

Searching for vectors of *Rose yellow mosaic virus*

石崎駿卓
Shunta Ishizaki
指導教員　津田新哉

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

Rose yellow mosaic virus (RoYMV), as a member of the family *Potyviridae*, infects rose species and shows yellow mosaic symptoms, but its mode of transmission in nature is not yet known. Most potyviruses are transmitted by aphids due to characteristic motifs in both proteins, HC-Pro and coat protein, encoded on the genome, but these are absent in RoYMV. Instead, RoYMV has been found to have a motif in its HC-Pro that are related to rust mite vectors. Therefore, in order to search for the vector of this virus, the possibility of transmission by *Phyllocoptes fructiphilus*, which was found on rose in Japan, newly, was investigated in comparing to *Myzus persicae*. Viruliferous insects were allowed an inoculation access feeding for 1 to 2 weeks to leaf discs prepared from rose and *Chenopodium quinoa*, respectively. The results of RT-PCR tests after 14 days revealed that 45% of *P.fructiphilus* were positive in rose and 93% in *C. quinoa*, although none were detected in *M.persicae*. When viruliferous *P.fructiphilus* was allowed to inoculate access feeding to healthy individual *C. quinoa* plants, 11% of the plants tested were positive for the virus by RT-PCR after 35 days. These results suggest that *P.fructiphilus* may be a possible vector of this virus.

Key Words *: Rose yellow mosaic virus, Potyviridae, Eriophyidae*

１．諸言

バラに感染する植物ウイルスは、未同定のものも含めて世界で 24 種、日本では 3 種が報告されている。国内既報ウイルスの一つにバラ黄斑モザイクウイルス（*Rose yellow mosaic virus*：RoYMV）があるが、その伝染環は不明である（Ohata et al. 2021）。RoYMV はポティウイルス科に分類され、それらの多くは主にアブラムシ類によって媒介される。しかし、本ウイルスには虫媒介助タンパク質の HC-Pro 内にアブラムシ媒介特異的モチーフはなく、一方でフシダニ媒介に機能すると推定されるモチーフが存在している。これまで、我が国のバラに寄生するフシダニ類は未確認であったが、谷口(2019)により国内のバラで *Phyllocoptes* sp.と推定されるフシダニ類が初めて発見された（図 1、仮称:バラフシダニ）。

本研究では、RoYMV の伝染環を明らかにするため、ポティウイルスを媒介するモモアカアブラムシ（*Myzus persicae*）または新たに確認されたバラフシダニを対象に RoYMV の媒介生物の可能性を探る。

図 1．バラで確認された *Phyllocoptes* sp.
（左から成虫・若虫・卵）

２．材料および手法

（1）保毒虫の調整と RoYMV 検定

無保毒のモモアカアブラムシを RoYMV 感染バラ株上で 4 日間獲得吸汁させた。同様に、無保毒のバラフシダニを本ウイルス感染株上に放飼し、世代を繰り返すことで保毒ダニを調整した。遺伝子検定のため、供試した虫体から TRIzol を用いて全 RNA を抽出した。

ウイルス検定は、表 1 に示したプライマーセットを用いて RT-PCR 法、nested RT-PCR 法および RT-qPCR 法を実施した。

表 1. RoYMV 検出系で使用した PCR プライマーセット

対象サンプル	検出系	名称	配列
RoYMV	RT-PCR	RoYMVcF5	GCGATCAAGGCAGCAGGAGT
		RoYMVcR5	TGCACACATAAAGCGCCACA
	nested RT-PCR	RoYMV 6237 F	AGTGAAGAGCACATTTGGAGAGC
		RoYMV 6637 R	GTTGTTGTCGGTTTTGTTCAAGCAT
	RT-qPCR	RoYMV3	ATGTGGCGGCACAAATTTCA
		bw9r	TCCAGGTTCATACCCAGCGA
バラフシダニ	RT-qPCR	Rose mite-d2-rt-1F	TACACGACTCTAGTCGCATGGA
		Rose mite-d2-rt-1R	GGCTAGCAACCTAAGCACATC

（2）媒介試験

①リーフディスクを用いた媒介試験

健全バラまたはキノアから作製したリーフディスクに RoYMV 獲得モモアカアブラムシまたはバラフシダニを 1～2 週間接種吸汁させた。その後、リーフディスクを半分に切り分け、片方は RNA を抽出し RT-PCR 法さらに nested RT-PCR 法を用いてウイルス検定を行った。もう一方は約 10 倍量の 0.1M リン酸緩衝液（pH7.0）もしくは 2.5%ニコチンバッファーで粗汁液を調整し検定植物のキノアへ汁液接種してウイルスの感染性を調査した。

②植物体を用いた媒介試験

健全バラまたはキノアの株上に RoYMV 獲得モモアカアブラムシまたはバラフシダニを 1～2 週間接種吸汁させた。その後、それらをマクラロイド系殺虫剤で処理し、接種株を経過観察しながら接種 14 日目から 1 週間ごとに昆虫針 RT-PCR 法でウイルス感染を検定した。

３．結果

（1）RoYMV 保毒検定試験

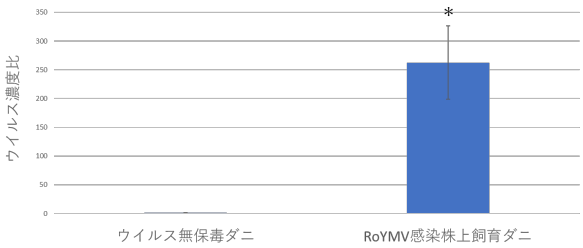
RoYMV を獲得させたモモアカアブラムシまたはバラフシダニのウイルス保毒検定を実施したところ、前者は 1 頭から、後者は 5 頭からウイルスが検出された（表 2）。

表 2. 獲得吸汁後の RoYMV 保毒頭数

保毒虫	検出系	抽出頭数				
		1頭	5頭	10頭	20頭	30頭
モモアカアブラムシ	RT-PCR	+	nt	nt	nt	nt
	nested RT-PCR	+	nt	nt	nt	nt
バラフシダニ	RT-PCR	−	−	+	+	+
	nested RT-PCR	−	+	+	+	+

＋：陽性　－：陰性　nt：not tested

次に、バラフシダニ 1 頭からのウイルス検出を可能にするため RT-qPCR 法を開発した。この検出法を用いて、無保毒ダニと RoYMV 感染バラ上で飼育した保毒ダニ体内のウイルス量を比較した。ΔΔCt 法に基づき、内部標準遺伝子 28S rDNA を 1 とした時のウイルス量をそれぞれ産出し、それらを t 検定で評価した。その結果、無保毒区と保毒区間で明らかな有意差が認められた（図 2）。さらに、RoYMV 感染株上の飼育ダニにおける保毒率を算出したところ、80%(8/10)であった。



保毒率	0% (0/20)	80% (8/10)

図 2. 無保毒ダニと RoYMV 感染株上飼育ダニの RT-qPCR 法による体内ウイルス量の比較と保毒率

体内濃度は、内部標準遺伝子 28S rDNA を 1 とした時のウイルス測定値を保毒量とした。Bar は標準誤差を示す。値は 1 頭抽出サンプル×3 反復の平均値を示す。*: $p<0.05$ 各保毒率は、無保毒ダニで 20 頭抽出サンプル×4 反復の nested RT-PCR 法、RoYMV 感染株上飼育ダニで 1 頭抽出サンプル×10 反復の RT-qPCR 法の陽性数から算出した。

（2）媒介試験

①リーフディスクを用いた媒介試験

RoYMV 獲得モモアカアブラムシを接種吸汁させたリーフディスクでは検出感度の高い nested RT-PCR 法でも本ウイルスは検出されなかった。一方、バラフシダニを接種したリーフディスクでは nested RT-PCR 法で検出され、その粗汁液を接種したキノア接種葉でも退緑斑点症状が認められた（表 3 および図 3）。しかし、上位葉での病徴発現や接種葉からの RoYMV 検出はされなかった。

表 3. リーフディスクを用いた RoYMV 媒介試験におけるウイルス検出率

獲得源	接種した微小昆虫	接種植物	RoYMV 検出枚数/試験枚数			合計
			1回目	2回目	3回目	
RoYMV 感染バラ	モモアカアブラムシ	キノア	0%(0/3)	0%(0/4)	0%(0/5)	0%(0/10)
		バラ	0%(0/5)	0%(0/5)	0%(0/5)	0%(0/15)
	バラフシダニ	キノア	100%(5/5)	100%(5/5)	80%(4/5)	93%(14/15)
		バラ	45%(5/11)	44%(4/9)	45%(9/20)	45%(18/40)

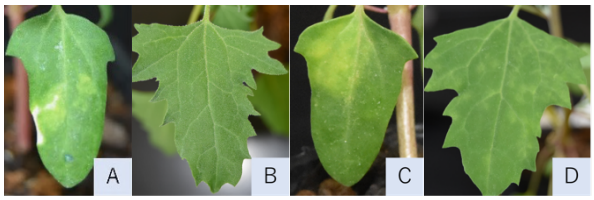


図 3. バラフシダニ接種で陽性リーフディスクの粗汁液を接種したキノアで認められた退緑斑点症状（左から陽性リーフディスクを汁液接種したキノア接種葉(A)とその上位葉(B)・ RoYMV 感染粗汁液を接種したキノア接種葉(C) とその上位葉(D)）

②植物体を用いた媒介試験

RoYMV 保毒モモアカアブラムシを接種したキノアは接種葉および上位葉とも病徴を示さなかった（図 4A）。一方、保毒バラフシダニを接種したキノア接種葉は吸汁痕と退緑症状が認められ、nested RT-PCR 法によって陽性反応が検出された（図 4B）。さらに上位葉には軽微な退緑斑点が認められた（図 4C）。また、バラフシダニを接種吸汁させたバラ葉は昆虫針 RT-PCR 法で陽性が検出されたが、原病徴は確認できなかった(図 4D)。

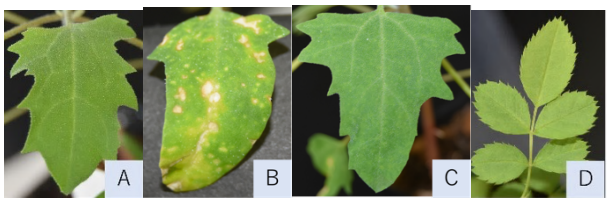


図 4. RoYMV 保毒虫をそれぞれ接種吸汁させたキノアとバラ（左からモモアカアブラムシによるキノア接種葉(A)・バラフシダニによるキノア接種葉(B)とその上位葉(C)・バラフシダニにより接種吸汁させたバラ株葉(D)）

表 4. 植物株を用いた RoYMV 媒介試験におけるウイルス検出率

獲得源	接種した微小昆虫	接種植物	RoYMV 検出株数/試験株数
RoYMV 感染バラ	モモアカアブラムシ	キノア	0%(0/3)
		バラ	nt
	バラフシダニ	キノア	11%(1/9)
		バラ	50%(2/4)

４．考察

アブラムシとフシダニの微小昆虫に着目して RoYMV の媒介生物を探索した。感染バラにおけるモモアカアブラムシの獲得吸汁で RoYMV の保毒が確認されたが、バラおよびキノアへの媒介は認められなかった。アブラムシ媒介の可能性は Lockhart(2011)らおよび大畑(2017)により試されたがいずれも確認されなかった。一方、バラフシダニによる媒介試験では RoYMV の保毒、接種吸汁したバラまたはキノアのリーフディスクおよび植物体のそれぞれで RoYMV が検出された。しかし、一連の検出系が nested RT-PCR 法であり接種葉上に残存した媒介に用いたバラフシダニ体内の RoYMV を検出した可能性が排除できなかった。また、フシダニ接種吸汁後のバラでは未だに未だに病徴発現が認められておらず、フシダニ接種吸汁後のキノア株では病徴発現こそ見られたものの 1 株のみと少ない状況である。現時点でベクターとして確定するまでには至っていない。

今後は、キノアを用いた媒介試験を反復することでその可能性を追求する必要がある。媒介生物が確定した後には獲得吸汁時間および接種吸汁時間等の基本的な媒介様式を調査しなければならない。それらを踏まえ RoYMV の自然界における伝染環を解明する必要がある。

参考文献

1) Lockhart, B. *et al*. Identification and partial characterization of six new viruses of cultivated roses in the USA. (2011) Acta Horticulturae 901:139-147
2) Mollov, D. *et al*. Complete nucleotide sequence of rose yellow mosaic virus, a novel member of the family *Potyviridae*. (2013) Arch Virol 158:1917-1923
3) Ohata, Y. et al. First isolation of rose yellow mosaic virus in Japan. (2021) J Gen Plant Pathol 87:295-299
4) 大畑悠太，バラに感染するウイルス病調査と *Rose yellow mosaic virus* について(2017) 2017 年度卒業論文
5) 谷口文昭，植物ウイルス媒介が疑われるバラ寄生性フシダニの探索(2019) 2019 年度卒業論文