

レギュラトリーサイエンス新技術開発事業  
研究実績報告書

課題番号：2309

我が国の重要な農作物に被害を与えるウイロイド病の侵入リスク管理  
措置の確立

研 究 期 間：平成23年度～平成25年度（3年間）

研究総括者名：松下 陽介

試験研究機関名：独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

## I. 全体計画

### 1. 研究目的

2006年に広島県内でトマト退緑萎縮ウイルス(TCDVd)、2008年に福島県でジャガイモやせいもウイルス(PSTVd)による我が国未発生の病気がトマトで確認された。これらの新規ウイルス病害は、我が国の重要な農作物であるナス科植物を中心として様々な植物に感染しその多くが無病徴感染であることから、海外から輸入された農作物種苗類を介して国内に侵入したと疑われている。このことから、TCDVd及びPSTVd等のウイルスが輸入農作物種苗を介して再び我が国へ侵入することを防ぐため、それらウイルスの感染リスクが高い輸入農作物種苗のリスト及び科学的に裏付けされた検疫措置を確立し、植物防疫行政に貢献することを目指す。

### 2. 研究内容

#### (1) 中課題1：侵入リスクが高いウイルスの各種植物における感染性評価と輸入種苗を介した侵入危険植物のリスト化

##### 1) 小課題1：侵入・再侵入を危惧するウイルスの国内重要品目における被害程度の調査

我が国の農作物に重大な被害を与える恐れのあるウイルスを明らかにするため、国内外で発生したウイルス数種(PSTVd、TCDVd、コルムネアラテントウイルス(CLVd)、トマトアピカルスタントウイルス(TASVd)等)を入手し、我が国の重要品目であるトマトやばれいしょ等の主要作物に接種してその病徴等の被害程度を調査する

##### 2) 小課題2：輸入種苗における各種ウイルスの感染性評価と宿主リストの作成

主要作物で被害程度が大きいウイルスについて、近年の輸入量が増大し、かつ諸外国で無病徴感染が報告されている植物種を対象に接種試験を行い、感染性及びその病徴の程度を調査する。接種1～2か月後にRT-PCR法等により感染の成立を確認し、その後の病態変化等を観察する。得られた感染性等の生物特性データを取りまとめ、各ウイルスの侵入源になりうる危険性の高い輸入種苗をリスト化する。

#### (2) 中課題2：ウイルス検定マニュアル等の開発と検疫措置への貢献

##### 1) 小課題1 輸入種苗に最適なウイルスの検定方法の開発

侵入源に成り得る種苗類を対象にウイルスを接種して感染植物を調整する。RT-PCR法またはLAMP法等を基盤として、健全植物で擬陽性反応を示さないプライマーの選定や反応の諸条件等を確定する。次に、感染植物を葉、茎、塊茎等の組織に分割し、ウイルス検定のための最適部位を定めた新規検定法を開発する。

## 2) 小課題2 ウイロイド汚染種子の検定方法の開発

種子での輸入頻度が高く、かつウイロイドが種子伝染する植物から汚染種子を採取し、種子内の感染部位を特定する。汚染部位が種子表面だけの場合は、RT-PCR法またはLAMP法等を基盤とした非破壊検定法を開発する。また、その様な汚染種子を対象に次亜塩素酸等の薬剤を用いた種子消毒法も開発する。一方、汚染が種子内部にまで及んでいる場合、粉碎法を基にした検定方法を考案する。

## 3) 小課題3 被害程度が大きいウイロイドの検定マニュアルの開発

被害程度が大きいと推定されるウイロイドと輸入量が多く無病徴感染する種苗の組み合わせを対象とした検定マニュアルを開発する。内容は、既発生国の一覧、病徴写真とその解説、サンプリング方法、検定部位、検定に必要な機材および試薬、検定条件、検出結果の判断方法、結果を踏まえた今後の対応策等とし、国際植物防疫条約（IPPC）の植物検疫措置に関する国際基準（ISPM No.27：規制有害動植物のための診断プロトコル）に適した公定分析法案として行政部局に提示する。

### 3. 年次計画

| 項目                                                 | 平成 2 3 年度                     | 平成 2 4 年度 | 平成 2 5 年度 |
|----------------------------------------------------|-------------------------------|-----------|-----------|
| 1. 侵入リスクが高いウイロイドの各種植物における感染性評価と輸入種苗を介した侵入危惧植物のリスト化 |                               |           |           |
| (1) 侵入・再侵入を危惧するウイロイドの国内重要品目における被害程度の調査             | トマト・ばれいしょへの接種試験<br>(中央農研・花き研) |           |           |
| (2) 輸入種苗における各種ウイロイドの感染性評価と宿主リストの作成                 | 輸入種苗への接種試験<br>(中央農研・花き研)      |           |           |
| (3) 輸入量が増大している種子におけるウイロイドの種子伝染率の評価                 | 種子伝染の評価<br>(中央農研・花き研)         |           |           |
| 2. ウイロイド検定マニュアル等の開発と検疫措置への貢献                       |                               |           |           |
| (1) 輸入種苗に最適なウイロイドの検定方法の開発                          | 検定方法の検討<br>(花き研・中央農研)         |           |           |
| (2) ウイロイド汚染種子の検定方法の開発                              | 種子検定法の開発<br>(花き研・中央農研)        |           |           |
| (3) 被害程度が大きいウイロイドの検定マニュアルの開発                       | マニュアルの作成<br>(花き研・中央農研)        |           |           |
| 所要経費(合計)                                           | 10,000 千円                     | 10,000 千円 | 9,800 千円  |

#### 4. 実施体制

| 項目                                                 | 担当研究機関                | 研究担当者                     | エフォート<br>(%)   |
|----------------------------------------------------|-----------------------|---------------------------|----------------|
| 研究総括者                                              | 花き研究所                 | 松下 陽介                     | 30             |
| 1. 侵入リスクが高いウイロイドの各種植物における感染性評価と輸入種苗を介した侵入危険植物のリスト化 | 中央農業総合研究センター          | ○ 津田 新哉                   | 10             |
| (1) 侵入・再侵入を危惧するウイロイドの国内重要品目における被害実態の調査             | 中央農業総合研究センター<br>花き研究所 | △ 津田 新哉<br>富高 保弘<br>松下 陽介 | 前出<br>30<br>前出 |
| (2) 輸入種苗における各種ウイロイドの感染性評価と宿主リストの作成                 | 中央農業総合研究センター<br>花き研究所 | △ 富高 保弘<br>津田 新哉<br>松下 陽介 | 前出<br>前出<br>前出 |
| (3) 輸入量が増大している種子におけるウイロイドの種子伝染率の評価                 | 中央農業総合研究センター<br>花き研究所 | △ 久保田健嗣<br>富高 保弘<br>松下 陽介 | 30<br>前出<br>前出 |
| 2. ウイロイド検定マニュアル等の開発と検疫措置への貢献                       | 花き研究所                 | ○ 松下 陽介                   | 前出             |
| (1) 輸入種苗に最適なウイロイドの検定方法の開発                          | 花き研究所<br>中央農業総合研究センター | △ 松下 陽介<br>佐藤 衛<br>久保田健嗣  | 前出<br>15<br>前出 |
| (2) ウイロイド汚染種子の検定方法の開発                              | 花き研究所<br>中央農業総合研究センター | △ 佐藤 衛<br>松下 陽介<br>富高 保弘  | 前出<br>前出<br>前出 |
| (3) 被害程度が大きいウイロイドの検定マニュアルの開発                       | 花き研究所<br>中央農業総合研究センター | △ 松下 陽介<br>佐藤 衛<br>津田 新哉  | 前出<br>前出<br>前出 |

研究担当者欄について、中課題担当者には○、小課題担当者には△を付すこと。

## Ⅱ. これまでに得られた成果の概要、今後の計画案等

### 1. 中課題1：侵入リスクが高いウイロイドの各種植物における感染性評価と輸入種苗を介した侵入危惧植物のリスト化

#### (1) 成果の概要

| 工程表                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 進捗状況・成果                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>ウイロイド4種（PSTVd、TCDVd、CLVd、TASVd）について、国内の主要作物であるトマト国内主要品種およびばれいしょ‘男爵薯’での病徴および発病までの期間を明らかにする（小課題1関連）。（平成23年度）</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>ウイロイド4種に感染したばれいしょの次世代における病徴を明らかにする。（平成24年度）</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>ウイロイド4種に感染したばれいしょの数世代目における病徴をおよび発病までの期間を明らかにし、感染から数世代目にばれいしょでの被害程度を明らかにする。（平成25年度）</p> | <p>4種の各ウイロイドをトマト30品種に接種し、発現病徴を調査した。いずれのウイロイドに対しても、ほとんどの品種で植物体がわい化、葉が小型化し、退緑や黄化、葉脈の部分えそが現れた。一部、感受性の低い品種が認められた（図1・図2・表1）。※1</p> <p>4種の各ウイロイドをばれいしょ‘男爵薯’の萌芽後の展開葉に各々汁液接種した。その結果、ウイロイドの種類により、地上部及び地下部の発現症状に差はあったが、多くのウイロイド感染個体で亀裂やこぶ状突起を有した塊茎が発生した。地上部症状として、葉の変色、小葉化、茎や葉柄での褐色条斑等が認められ、TASVdでは株の萎縮が顕著であった。（図3・表2）。</p> <p>（平成23年度、24年度）※2</p> <p>PSTVdあるいはTCDVdにそれぞれ感染した第2世代のばれいしょでは、亀裂を有した塊茎が発生、または新たな塊茎が発生しないなどの症状が見られた。（平成24年度）※3</p> <p>4種の各ウイロイドを種子育成ばれいしょに接種した結果、‘男爵薯’における症状と近い症状が見られた（表3）。※4</p> <p>ばれいしょ品種A及び品種Bでの発現症状を調査した結果、TASVdを除く各種ウイロイドの地上部症状は、品種Aでは‘男爵薯’と類似し、塊茎の症状も類似していたがこぶ状突起は軽度であった。また、品種Bでは、茎葉の生育不良や軽度の退緑化が認められ、塊茎での亀裂は少なく、こぶ状突</p> |



|                                                                           |                                                                                                                                                                   |
|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>作出した汚染種子を播種して感染性を RT-PCR 法等で検定し、種子伝染率を算出する（小課題 3 関連）。（平成 25 年度）</p>    | <p>4 種ウイルスの感染宿主であるトマト、ナス、ピーマン、トウガラシ、シシトウ、シュンギク、フレンチマリーゴールド等の各病株から採種して、ウイルス種ごとに種子伝染試験を行った。その結果、供試した一部の植物種において PSTVd および CLVd の種子伝染が認められた。</p> <p>（平成 25 年度）※ 7</p> |
| <p>成果目標：侵入リスクが高いウイルスの各種植物における感染性評価を行い、輸入種苗を介した侵入危険植物をリスト化して検疫業務に貢献する。</p> |                                                                                                                                                                   |

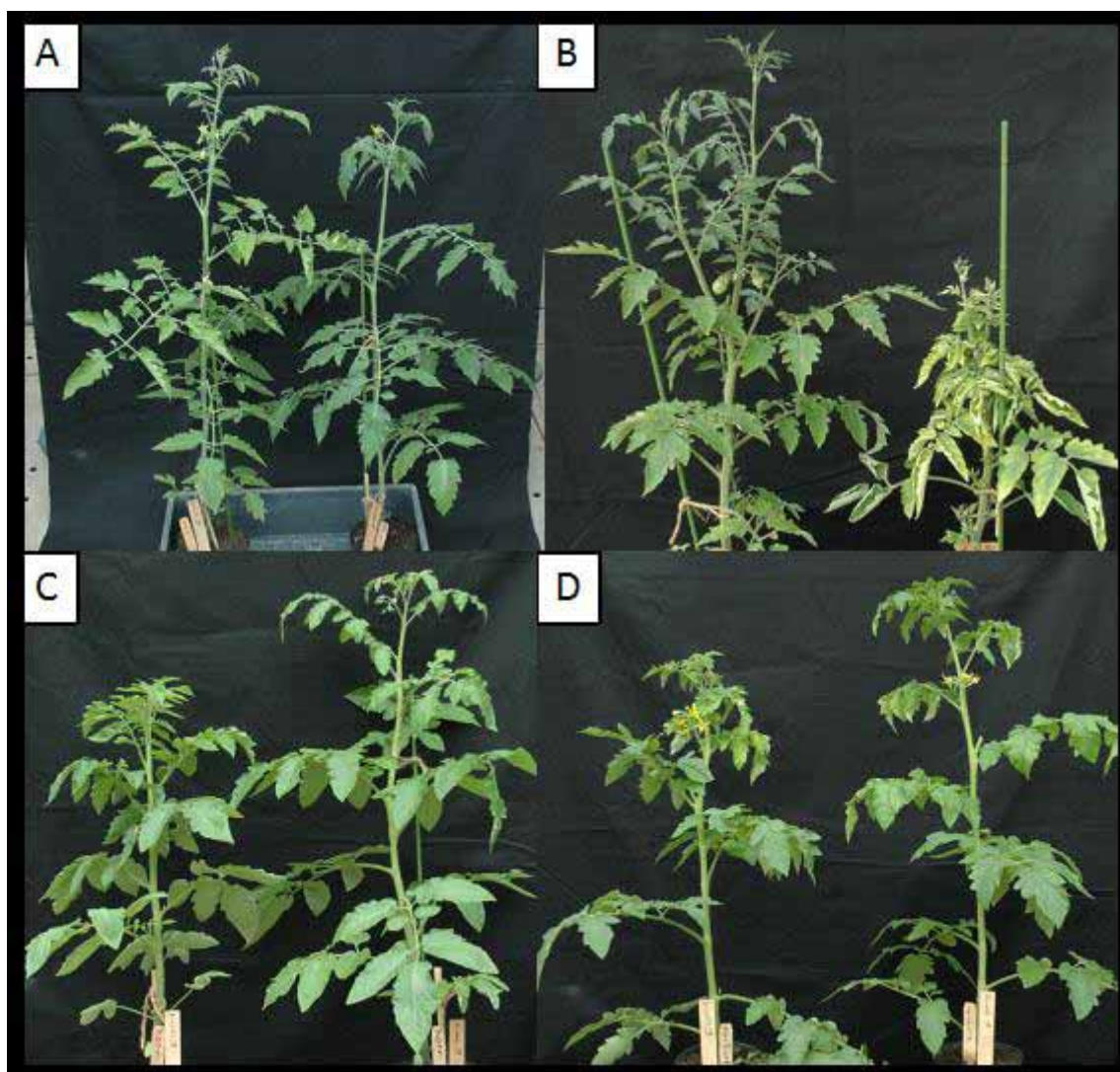
＜成果の概要の補足＞

※ 1：ウイルス 4 種（PSTVd、TCDVd、CLVd、TASVd）を接種したトマト国内主要品種における病徴（小課題 1 関連）

（方法） 4 種のウイルス（PSTVd、TCDVd、CLVd、TASVd）に各々感染したトマト‘ルトガス’葉を接種源とし、トマト 30 品種に汁液接種を行い、各品種の発現病徴を約 50 日間観察・調査した。

（結果） 供試品種に共通する一般的な病徴は、いずれのウイルスに対しても、植物体が激しくわい化し、葉が小さく細葉となって退緑化や黄化、葉脈の部分えそが現れることである。特に、頂部の生長が阻害され、節間伸長が緩慢となるため葉が密集して外観は房状となる（表 1）。その後、頂部が再び伸びて、植物体は細長く生長したが、黄化や退緑した細葉や縮葉のみを着けた。ウイルスに対する感受性に若干の品種間差が認められ、ミニトマト品種（品種 4、品種 8、品種 21）や台木用品種（品種 9、品種 10）では病徴が軽く、ウイルスによってはやや耐病性が認められた（図 1）。

4 種ウイルスの病原性の強弱を‘ルトガス’で調べた。4 種とも接種後約 15～20 日で病徴が発現し始め、葉の退緑化や黄化、葉脈の部分えそ、株のわい化症等の病徴が共通して発現した（図 2）。TASVd は顕著なわい化症と茎でのえそ斑の発生によりその後の成長が停止するなど 4 種の中では最も強い病原性を示した。TCDVd でも顕著な葉の黄化や葉脈のえそ、株のわい化を現したが、茎のえそは認められなかった。一方、PSTVd が現すわい化症等の病徴は、CLVd と同様 4 種の中では軽度で、供試した数品種では果実を着けた。したがって、トマト‘ルトガス’に対する病原性の強弱の順としては、TASVd>TCDVd>CLVd≧PSTVd であった。



1 PSTVd および TCDVd を接種したトマト 4 品種における病徴

A : 品種 8 (左 : TCDVd、右 : PSTVd)、B : 品種 21 (左 : PSTVd、右 : TCDVd)、C : 品種 9 (左 : TCDVd、右 : PSTVd)、D : 品種 10 (左 : TCDVd、右 : PSTVd)

表1 トマトの各ウイロイドに対する反応試験

| 系統・品種 | ウイロイド                          |                                 |                             |                                              |
|-------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------|
|       | PSTVd                          | TCDVd                           | CLVd                        | TASVd                                        |
| 品種1   | 頂部葉で退緑・細葉化。小型の葉脈えそ斑。軽いわい化。     | 頂部葉で退緑・黄化、細葉化。縮葉が目立つ。葉脈えそ斑。わい化。 | 頂部葉での細葉化、顕著な黄化。わい化。         | 頂部葉での縮葉・巻葉が顕著。葉脈のえそ斑。萎縮。葉縁の紫色化。              |
| 品種2   | 頂部葉の退緑・黄化。細葉化。葉脈えそ。軽いわい化。      | 頂部葉の退緑・黄化、細葉化。葉脈えそ斑。わい化。        | 頂部葉の細葉化と顕著な黄化。わい化。          | 顕著な新葉の縮葉・巻葉、細葉化。頂部下の茎表皮条状黒褐色斑。わい化。葉脈えそ斑と赤銅色化 |
| 品種3   | 頂部葉の退緑化・黄化、細葉化。葉脈えそ斑。着果。軽いわい化。 | 頂部葉が黄化、細葉化。葉脈のえそ斑。わい化。          | 頂部葉が顕著な黄化、細葉化。わい化。          | 頂部葉の細葉化と縮葉で退緑化。頂部下の茎と葉柄に小型黒褐色斑。わい化。葉縁の紫色化。   |
| 品種4   | 頂部葉の軽い退緑。まれに葉脈のえそ斑。やや耐病性。      | 稀に頂部葉の退緑・黄化。葉脈えそ斑出ず。ややわい化。      | 頂部葉の黄化顕著。細葉化。軽いわい化。葉脈えそ斑出ず。 | 新葉が軽く波打ち、やや退緑、細葉化。下葉はやや赤銅色化。成長止まる。           |
| 品種5   | 頂部葉の細葉化、軽い退緑。まれに葉脈のえそ斑。やや耐病性。  | 頂部葉は退緑、細葉化。丸いえそ斑が時々発生。          | 頂部葉の軽い黄化、紫色化。時々葉脈にえそ小斑。わい化。 | 新葉が軽く波打ち、やや退緑。葉脈の部分えそ。わい化。葉の退緑。              |

表1 トマトの各ウイルスに対する反応試験(つづき)

| 系統・品種 | ウイルス                              |                             |                              |                                         |
|-------|-----------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------------------|
|       | PSTVd                             | TCDVd                       | CLVd                         | TASVd                                   |
| 品種6   | 頂部葉の細葉化、軽い退緑。上位葉でも葉脈の中型えそ斑。軽くわい化。 | 頂部葉の黄化・細葉化。葉脈えそ斑。わい化。       | 頂部葉の巻葉と細葉化、顕著な黄化や葉脈の紫色化。わい化。 | 頂部葉での縮葉・巻葉・細葉化・退緑化。わい化。葉脈の部分えそ斑。葉脈の紫色化。 |
| 品種7   | 頂部葉の細葉化、退緑。まれに葉脈の小型えそ斑。           | 頂部葉の黄化・細葉化。葉脈に小型えそ斑。わい化。    | 頂部葉の軽い黄化・モザイク。葉脈のえそ斑発生せず。    | 頂部葉での細葉化・退緑化。                           |
| 品種8   | 頂部葉がやや退緑。極めてまれに葉脈のえそ斑。やや耐病性。      | 頂部葉の細葉化・退緑化。まれに葉脈えそ斑。やや耐病性。 | 頂部葉の細葉化と軽い退緑。やや耐病性。          | 上位葉が軽く波打つ。葉脈の軽い紫色化。新葉の細葉化と退緑化。やや耐病性。    |
| 品種9   | 極めてまれに葉脈えそ斑、上位葉でも観察。やや耐病性。        | 頂部葉は退緑・黄化、細葉化。葉脈に条状のえそ斑。    | 頂部葉の細葉化と軽い退緑症状で、葉脈えそ斑発生せず。   | 上位葉が軽く巻く。葉脈の軽い紫色化。茎表皮の黒褐色斑。新葉での退緑化。     |
| 品種10  | 頂部葉に軽い退緑。葉脈のえそ斑観察されず。やや耐病性。       | 頂部葉の退緑。まれに葉脈えそ斑。やや耐病性。      | 頂部葉に軽い退緑。葉脈のえそ斑発生せず。やや耐病性。   | 上位葉が巻く。新葉での退緑化と葉脈の紫色化。やや耐病性。            |

表1 トマトの各ウイルスに対する反応試験(つづき)

| 系統・品種 | ウイルス                                        |                                     |                                 |                                                    |
|-------|---------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------|
|       | PSTVd                                       | TCDVd                               | CLVd                            | TASVd                                              |
| 品種 11 | 頂部葉の退緑黄化・顕著な葉脈えそ。軽いわい化。                     | 頂部葉の葉縁黄化・細葉化と葉脈えそ。わい化。              | 頂部葉の退緑黄化、細葉化。葉脈えそ現れず、奇形の蕾。わい化。  | 頂部葉の退緑し、縮葉状で外に巻く。葉脈の部分えそ。葉柄や頂部下茎表皮の黒褐色斑。わい化。       |
| 品種 12 | 葉脈の一部に小型えそ条斑。まれに着果。やや耐病性。                   | 頂部葉の退緑・細葉化、展開葉でまれに葉脈えそ。わい化。         | 葉脈の一部に軽いえそ条斑が発生、軽い節間の詰まりと黄化症。   | 縮葉状で外に巻く、細葉化。葉脈の部分えそ。葉柄や頂部下の茎表皮の黒褐色斑。わい化。          |
| 品種 13 | 頂部葉の退緑や細葉化、葉脈に小型えそ斑。                        | 頂部葉の葉縁黄化・細葉化と展開葉での葉脈えそ斑。わい化。        | 頂部葉の黄化と細葉化、葉脈の紫色化。やや耐病性。        | 頂部葉の退緑、葉縁が軽く紫色化。葉脈の部分えそ。頂部下の茎表皮の小型黒褐色斑。わい化。        |
| 品種 14 | 葉はやや波打ち、軽く赤銅色化。やや耐病性。                       | 葉がやや波打ち細葉化、軽く赤銅色化。軽くわい化。            | 新葉の顕著な黄化、時々葉脈の部分えそ、細葉化と黄化。      | 頂部葉の退緑、葉縁が軽く紫色化。顕著な葉脈の部分えそ。頂部下の茎表皮に顕著な黒褐色斑。顕著なわい化。 |
| 品種 15 | まれに葉脈えそ斑。細葉化。                               | 展開葉が軽く赤銅色化するが、軽いわい化。                | 新葉のモットル症状、細葉化、その後時々葉脈の部分えそ、黄化症。 | 頂部葉の細葉化と退緑化、葉縁の部分紫色化。軽いわい化。                        |
| 品種 16 | 頂部葉の退緑。新葉が顕著に糸葉化。葉色が軽く赤銅色化。。軽いわい化、TY12より軽い。 | 頂部葉が細葉化、退緑・黄化。その後赤銅色化。わい化、TY12より軽い。 | 頂部葉の退緑化。その後、葉色が赤銅色化。細葉化。わい化。    | 頂部葉の細葉化と退緑化、葉脈の紫色化。頂部下の茎表皮の黒褐色斑。わい化。               |
| 品種 17 | 頂部葉の葉が細葉化。展開葉は赤銅色化軽いわい化。                    | 頂部葉が細葉化、退緑・黄化。その後赤銅色化し。わい化。         | 頂部葉の退緑化。その後、葉の顕著な赤銅色化。細葉化。株の萎縮。 | 頂部葉の細葉化と退緑化、葉脈の紫色化。頂部下の茎表皮の黒褐色斑。顕著なわい化。            |

表1 トマトの各ウイルスに対する反応試験(つづき)

| 品種名  | ウイルス                            |                                |                                                                      |
|------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
|      | PSTVd                           | TCDVd                          | CLVd TASVd                                                           |
| 品種18 | 葉縁の黄化、細葉化。上位葉でまれに葉脈のえそ条斑。わい化。   | 葉縁の黄化や細葉化。まれに小型葉脈えそ斑。株のわい化と黄化。 | 細葉化と葉縁の退緑化。葉脈の紫色化。株はやや黄化し、軽わい化。頂部節間の詰まり。退緑化や細葉化。まれに葉脈えそ斑。株の赤銅色化とわい化。 |
| 品種19 | 葉の黄化、細葉化。まれに葉脈のえそ条斑。            | 葉縁の黄化や細葉化。小型の葉脈えそ条斑。退緑黄化と軽わい化。 | 葉が退緑化、内側に巻く。細葉化。頂部葉の黄化。頂部節間の詰まり。退緑化や細葉化。まれに葉脈えそ斑。株のわい化。              |
| 品種20 | 葉がやや黄化、細葉化。まれに葉脈のえそ条斑。          | 葉の退緑と細葉化、縮葉。まれに葉脈えそ斑。軽わい化。     | 葉の退緑と細葉化、内側に巻く。頂部葉も黄化して巻く。わい化。節間の詰まり。葉の退緑と細葉化。葉脈の紫色化。軽わい化。           |
| 品種21 | 軽度の細葉化・退緑化、まれに葉脈に小型のえそ斑。やや耐病性。  | 新葉の明瞭な退緑や葉縁黄化、その後黄化症状。株は軽わい化。  | 頂部での節間の軽い詰まり。新葉がやや退緑化。株は軽わい化。やや耐病性。                                  |
| 品種22 | 葉縁の黄化・細葉化。葉脈部のえそ条斑が上位葉に広がる。わい化。 | 葉の細葉化、葉脈えそ斑。黄化症状と株のわい化。        | 新葉が退緑化、細葉化。葉脈が紫色化して葉の赤銅色化。株のわい化。                                     |
| 品種23 | 新葉が顕著に細葉化し、葉縁が紫色化。後期に葉が赤銅色化。    | 新葉の顕著な細葉化、奇形化、株のわい化。葉脈が紫色化。    | 新葉が退緑化、細葉化。葉脈が紫色化して葉の赤銅色化。まれに葉柄の黒褐色斑。わい化。                            |

表1 トマトの各ウイルスに対する反応試験(つづき)

| 品 種 名 | ウイルス                                  |                                     |                                       |                                      |
|-------|---------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
|       | PSTVd                                 | TCDVd                               | CLVd                                  | TASVd                                |
| 品種24  | 葉の退緑化・細葉化。葉脈のえそ条斑。頂葉部の明瞭な黄化。わい化。      | 葉縁の黄化や細葉化。葉脈えそ斑。わい化。                | 頂部葉の細葉化や奇形化。葉は内側に巻く。頂部葉は黄化し、わい化。      | 節間の詰まり。葉縁の黄化や細葉化。株の赤銅色化とわい化。         |
| 品種25  | 頂葉部の葉縁が黄化。症状軽い。                       | 頂葉部の細葉・奇形化及び明瞭な黄化、わい化。              | 葉が細葉化、黄化。株はわい化。                       | 節間の詰まり。頂葉部の細葉・奇形化及び一部葉脈のえそ斑。わい化。     |
| 品種26  | 葉縁の黄化、細葉化。時々葉脈のえそ条斑。                  | 葉縁の黄化や細葉化。葉脈えそ斑。                    | 退緑化、葉が内側に巻き細葉化する。頂部葉の黄化、株のわい化。        | 節間の詰まり。退緑化と細葉化。上部茎での条状黒褐色斑。わい化。      |
| 品種27  | 葉縁の黄化、細葉化。葉脈のえそ条斑が拡大して葉が枯れる。わい化。      | 葉の退緑や細葉化、葉脈えそ斑。株の黄化とわい化。            | 葉縁が退緑化、細葉化。わい化。                       | 節間の詰まり顕著。葉の退緑や細葉化。葉脈のえそ斑。株の赤銅色化とわい化。 |
| 品種28  | 初期に軽い細葉化とモットル症状、その後葉の紫色化。まれに葉脈に小型黄色斑。 | 軽いモットルで細葉化と葉縁の紫色化。その後頂部葉での赤銅色化や奇形化。 | 展開葉での顕著な紫色化が特色。その後展開葉は細葉化、黄化。軽いわい化。   | 新葉の退緑化と葉脈の一部えそ。葉脈の紫色化で株の赤銅色化。軽いわい化。  |
| 品種29  | 新葉の細葉化と葉の軽い暗緑色化。やや耐病性。                | 頂部葉の退緑・わい化及び節間の詰まり、わい化。後期に葉はオレンジ色化。 | 新葉の細葉化と葉の軽い暗緑色化。後期に下葉が軽くオレンジ色化。やや耐病性。 | 頂部節間の軽い詰まり。葉の葉縁がやや退緑化。後期に下葉はオレンジ色化。  |
| 品種30  | 症状は軽く、葉の細葉化と暗緑色化が特徴。やや耐病性。            | 頂部葉の細葉化・モットル化、その後赤銅色化、わい化。          | 頂部葉で葉脈の紫色化で、葉は赤銅色化、細葉化。               | 初期は頂部葉の軽い退緑・紫色化。その後軽い細葉化・赤銅色化。       |



図2 ウイロイド4種（左から PSTVd、TCDVd、CLVd、TASVd）を接種した5週間後のトマト‘ルトガス’の病徴。

※2： ウイロイド4種（PSTVd、TCDVd、CLVd、TASVd）を接種したばれいしょ‘男爵薯’における病徴（小課題1関連）

（方法）4種のウイロイド（PSTVd、TCDVd、CLVd、TASVd）に各々感染したトマト‘ルトガス’葉を接種源とした。ばれいしょ‘男爵薯’の萌芽後の展開葉に各々汁液接種を行い、その後の地上部症状の調査を行うとともに、接種約2ヶ月後に地下部の調査を行った。接種約1か月後の頂部新葉を採取して、ウイロイド感染の有無をRT-PCR検定あるいはトマト‘ルトガス’への戻し接種によって確認した。なお4種ウイロイド試験は温室内ビニルポット試験であるが、PSTVdとTCDVdの試験はハウス圃場においても実施した。

（結果）地下部症状：PSTVd接種株では縦に亀裂のみが数個入った塊茎、亀裂とこぶ状突起が発生した塊茎、亀裂は無くこぶ状突起のあるでこぼこ形状の塊茎、さらには小さくて細長いやせた塊茎等が観察された。TCDVd接種株でも、PSTVdと同様の症状を示す塊茎が観察されたが、亀裂の発生は少なかった。また、CLVdあるいはTASVd接種のいずれの株においても、亀裂のある塊茎、こぶ状突起の塊茎、やせた塊茎等が発生した。TASVd接種株では顕著に矮小化した塊茎が生じた。また、いずれのウイロイド感染でも塊茎ストロン上に部分的亀裂が観察された（表2・図3）。

地上部症状：PSTVd接種株では、接種1か月後に新葉が小型化し、葉縁が赤色あるいは黄色に変色して上側に巻き、葉柄は茎に対して鋭角的に展開し、株の成長は悪化した。また、茎や葉柄に褐色の条斑が生じた。TCDVd接種株でも同

様の症状が観察されたが、株の萎縮や葉の退緑は軽度であった。CLVd 接種株でもほぼ同様であった。一方、TASVd 接種株では新葉が激しく小型化し、他のウィロイドに比べ株の萎縮や茎葉の退緑黄化症状も顕著であった（表 2・図 3）。

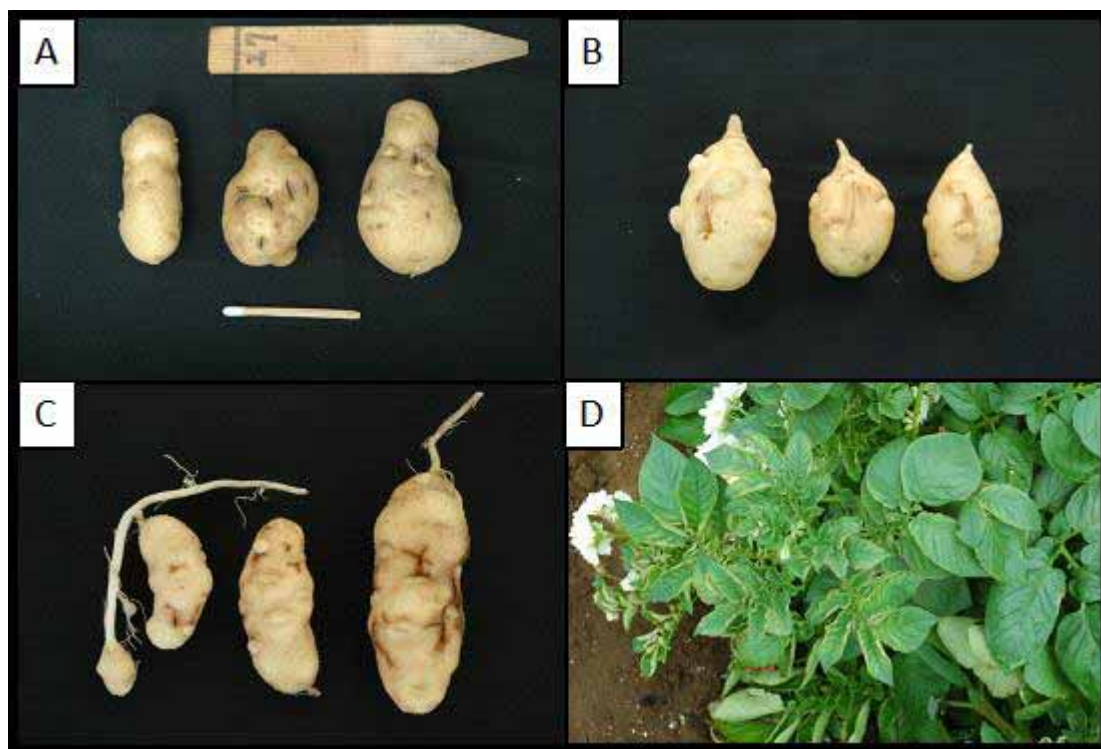


図 3 PSTVd、TCDVd、CLVd を接種したばれいしょ‘男爵薯’における病徴。地下部：PSTVd (A)、TCDVd (B)、CLVd (C)、地上部：PSTVd 感染株

表2 ばれいしょ‘男爵薯’における4種ウィロイドの反応試験

| 症状  | ウィロイド                                                                                                                     |                                                                                                    |                                                                                                           |                                                                                                                           |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     | PSTVd                                                                                                                     | TCDVd                                                                                              | CLVd                                                                                                      | TASVd                                                                                                                     |
| 地上部 | <ul style="list-style-type: none"> <li>・頂部葉の小葉化・退緑化</li> <li>・葉縁の赤色化</li> <li>・茎と葉柄に褐色条斑</li> <li>・葉の上方への巻きあがり</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>・頂部葉やや退緑化</li> <li>・葉縁の部分退緑化</li> <li>・茎と葉柄に褐色条斑</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>・頂部葉の小葉化・退緑化</li> <li>・葉縁の赤色化</li> <li>・茎と葉柄に褐色条斑</li> </ul>       | <ul style="list-style-type: none"> <li>・頂部葉の小葉化・黄化</li> <li>・株の黄化と萎縮</li> <li>・葉の上方への巻き上がり</li> <li>・茎と葉柄に褐色条斑</li> </ul> |
| 地下部 | <ul style="list-style-type: none"> <li>・ストロンの亀裂</li> <li>・塊茎の亀裂</li> <li>・こぶ状突起</li> <li>・やせいも</li> </ul>                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>・ストロンの亀裂</li> <li>・塊茎の亀裂</li> <li>・こぶ状突起</li> </ul>         | <ul style="list-style-type: none"> <li>・ストロンの亀裂</li> <li>・塊茎の亀裂</li> <li>・こぶ状突起</li> <li>・やせいも</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>・ストロンの亀裂</li> <li>・塊茎の亀裂</li> <li>・こぶ状突起</li> <li>・矮小さいも</li> </ul>                |

注1) 試験は温室内ビニルポット(径27センチ)を用いて実施した。接種当代における試験結果である。

※3：2種のウィロイド（PSTVd、TCDVd）をそれぞれ接種したばれいしょ‘男爵薯’の第2世代における病徴（小課題1関連）

（方法）前年度 PSTVd あるいは TCDVd を‘男爵薯’に各々接種して得られたウィロイド保毒第2世代の塊茎、さらに次世代の保毒第3世代の塊茎のそれぞれ15個体を種いもとしてハウス圃場に播き、各株の地上部及び地下部における発現病徴を約3か月間の間観察した。

（結果）ウィロイドを保毒したいずれの種いもも、塊茎の未萌芽や萌芽の遅延が生じた。また、萌芽しても根の発育が悪く、茎の伸長は停滞した。まれに生育した株では、顕著な葉の小葉化、葉縁の黄化や赤色化が生じ、株は萎縮した。これらの株から得られた次世代の塊茎には、亀裂やこぶ状突起などウィロイド感染特有の病徴が観察された。

※4：4種のウィロイド（PSTVd、TCDVd、CLVd、TASVd）をそれぞれ接種した種子育成ばれいしょにおける病徴（小課題1関連）

（方法）4種のウィロイド（PSTVd、TCDVd、CLVd、TASVd）にそれぞれ感染したトマト‘ルトガス’葉を接種源とした。種子から育成したばれいしょ18株が産生した径2～3センチの全イモを5区分に分けて種いもとした。ビニルポットに1個の種イモを播き付け、萌芽後の展開葉3～4枚に接種した。温室内ビニルポット試験で、各株の地上部及び地下部における発現病徴を約3か月間観察した。

(結果) 地上部症状：PSTVd に感染すると頂部の葉が小型化し、葉縁は赤色化あるいは黄色化して上側にやや巻いた。節間の伸長が緩慢で、株全体としてすくみ症を呈した。また、茎や葉柄に褐色斑が生じ、まれに細長く条状の大型斑になった。茎には部分亀裂が生じた。TCDVd 感染でも PSTVd と同様の症状が観察されたが、株のすくみ症あるいは葉の退緑は PSTVd に比べ軽度であった。また、茎の褐色条斑や部分亀裂がまれに認められた。CLVd 感染でも、頂部位葉の小型化や葉縁の退緑化が生じたが、茎や葉に生じる褐色条斑は少なく、株全体の退緑化も軽度であった。TASVd 感染では、頂部位葉が顕著に小型化し、時には芽枯れが生じた。株全体の退緑黄化症が顕著に現れ、茎の亀裂や株の萎縮が明瞭で、4 種ウイロイドの中で病原性が最も強かった (表 3)。

地下部症状：いずれのウイロイドに感染してもストロンの亀裂が観察された。また、亀裂のある塊茎、こぶ状突起のある塊茎、それらの症状が混合する塊茎などが生じた。PSTVd に感染すると、亀裂塊茎の発生頻度が高く、亀裂も顕著で、株によっては産生されたすべての塊茎に亀裂が観察された。また、こぶ状突起も明瞭で、発育肥大の悪いやせいもが生じた。TCDVd 感染や CLVd 感染では亀裂やこぶ状突起の発生頻度が低く、その症状も軽度であった。一方、TASVd 感染では、産生される子いもは小さく、亀裂やこぶ状突起を有する小さいものが多数生じた (表 3)。

表3 種子育成ばいれいしょにおける4種ウィロイドの反応試験

| 症状  | ウィロイド        |              |              |                      |
|-----|--------------|--------------|--------------|----------------------|
|     | PSTVd        | TCDVd        | CLVd         | TASVd                |
| 地上部 | ・頂部葉の小葉化と退緑化 | ・頂部葉の小葉化と退緑化 | ・頂部葉の小葉化と退緑化 | ・頂部葉の小葉化と退緑黄化        |
|     | ・葉縁の部分赤色化    | ・葉縁の部分赤色化    | ・葉縁の退緑化      | ・葉の上方への巻き上がり         |
|     | ・茎の部分亀裂      | ・茎の部分亀裂      |              | ・葉縁の部分赤色化<br>・茎の部分亀裂 |
| 地下部 | ・ストロン亀裂      | ・ストロン亀裂(軽)   | ・ストロン亀裂      | ・ストロン亀裂              |
|     | ・亀裂          | ・亀裂(軽)       | ・亀裂(軽)       | ・亀裂                  |
|     | ・こぶ状突起       | ・こぶ状突起(軽)    | ・こぶ状突起(軽)    | ・こぶ状突起               |
|     | ・やせいも        | ・やせいも        | ・やせいも        | ・矮小さいも               |

注1) 各処理区4株の接種当代における調査結果である。(軽)は程度が軽いあるいは頻度が少ないの意である。

注2) 径約3センチの種イモをビニルポット(径27センチ)に播き、2～3週後の萌芽展開葉3～4枚に各ウィロイドを汁液接種し、播きつけ85日後に収穫した。22～25℃の温室隔離試験である。

※5： 4種のウィロイド(PSTVd、TCDVd、CLVd、TASVd)をそれぞれ接種したばれいしょ品種A及び品種Bにおける病徴(小課題1関連)

(方法) 4種のウィロイド(PSTVd、TCDVd、CLVd、TASVd)に各々感染したトマト‘ルトガス’葉を接種源とした。各ばれいしょの萌芽後の展開葉に各々汁液接種を行い、その後の地上部症状の調査を行うとともに、接種約2か月後に地下部の調査を行った。接種約1か月後の頂部新葉を採取して、ウィロイド感染の有無をトマト‘ルトガス’への戻し接種によって確認した。いずれも温室内ビニルポット試験である。

(結果)

(1) ばれいしょ品種A

地上部症状：各ウィロイドの感染株の症状は、‘男爵薯’における症状と類似していた。すなわち、PSTVd、TCDVd及びCLVdの各感染株では、新葉が小型化・退緑化し、葉柄は茎に対して鋭角的に伸長した。草丈の成長は不良で、株は萎縮した。また、茎での亀裂や褐色の条斑が生じた。一方、TASVd接種株では新葉が激しく小型化・黄化し、茎での亀裂や葉柄のえ死などが生じて、他のウィロイドに比べ株の萎縮や茎葉の黄化症状が顕著であった(表4・図4)。

地下部症状：地上部と同様に‘男爵薯’における症状と類似していた。PSTVd、

TCDVd、CLVd の各感染株では、塊茎での縦横の亀裂がよく観察されたが、塊茎でのこぶ状突起は‘男爵薯’より軽度であった。また、小さく細長いやせた塊茎が観察された。TASVd 感染株では顕著に矮小化した塊茎に亀裂やこぶ状突起が観察された。また、いずれのウィロイド感染でも塊茎ストロン上に部分的亀裂が観察された（表 4・図 4）。

表4 ばいれしょ品種Aにおける4種ウィロイドの反応試験

| 症状  | ウィロイド        |              |              |                 |
|-----|--------------|--------------|--------------|-----------------|
|     | PSTVd        | TCDVd        | CLVd         | TASVd           |
| 地上部 | ・株の萎縮        | ・株の萎縮        | ・株の萎縮        | ・株の激しい萎縮        |
|     | ・頂部葉の小葉化・退緑化 | ・頂部葉の小葉化・退緑化 | ・頂部葉の小葉化・退緑化 | ・頂部葉の小葉化・退緑化    |
|     | ・茎の亀裂・褐色条斑   | ・茎の亀裂・褐色条斑   | ・茎の亀裂・褐色条斑   | ・茎の亀裂<br>・葉柄のえ死 |
| 地下部 | ・ストロンの亀裂     | ・ストロンの亀裂     | ・ストロンの亀裂     | ・ストロンの亀裂        |
|     | ・塊茎の亀裂       | ・塊茎の亀裂       | ・塊茎の亀裂       | ・塊茎の亀裂          |
|     | ・こぶ状突起(軽度)   | ・こぶ状突起(軽度)   | ・こぶ状突起(軽度)   | ・こぶ状突起          |
|     | ・やせいも        | ・やせいも        | ・やせいも        | ・矮小さいも          |

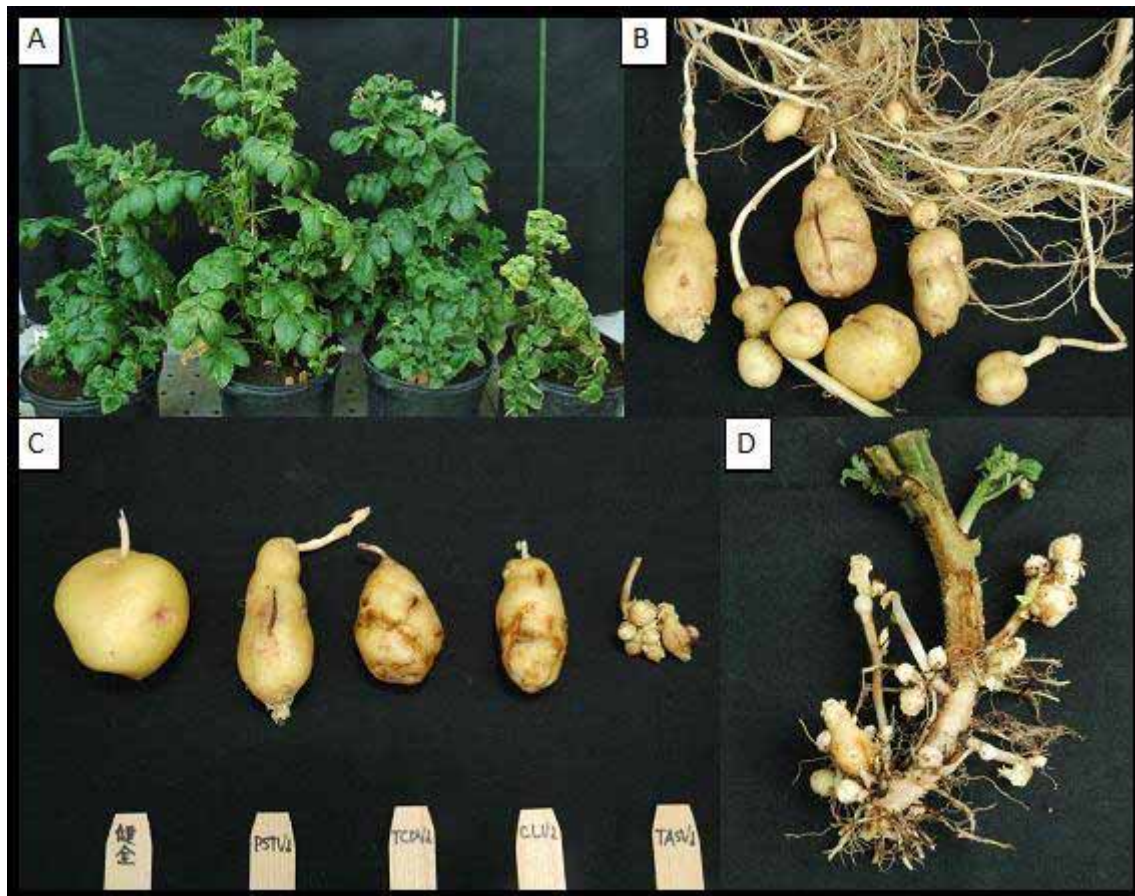


図4 ばれいしょ品種 A における感染病徴。 A) 右から順に TASVd、PSTVd、TCDVd、CLVd 等感染株、B) PSTVd 感染株の塊茎、C) 右から順に TASVd、CLVd、TCDVd、PSTVd、健全等各株の塊茎、D) TASVd 感染株の塊茎。

(結果)

## (2) ばれいしょ品種 B

地上部症状：各ウイロイド感染の症状は‘男爵薯’及び品種 A に比べ軽度であった。PSTVd 感染株では、草丈の伸長がやや劣り、まれに側枝頂部葉の退緑黄化が観察された。また、茎での亀裂もまれであった。TCDVd あるいは CLVd 感染の場合も、草丈の伸長がやや不良となったが、頂部葉の退緑化は軽微であった。一方、TASVd 感染株では、頂部葉の小型化・黄化が顕著で、茎での亀裂や葉柄のえ死がまれに発生し、株は著しく萎縮し、4 種ウイロイドの中で最も激しい症状を現した(表 5・図 5)。

地下部症状：PSTVd、TCDVd 及び CLVd の各感染株では、塊茎での亀裂は少なく、小さかった。また、細長い塊茎が多かった。これら感染株でのこぶ状突起の発生は軽度で、ストロンの亀裂は観察されなかった。一方、TASVd 感染

株では、亀裂やこぶ状突起を有する矮小塊茎が多数生じたが、‘男爵薯’や品種Aに比べ症状は軽度であった（表5・図5）。

表5 ばいれしょ品種Bにおける4種ウィロイドの反応試験

| 症状  | ウィロイド                                                                                           |                                                                                             |                                                                                             |                                                                                                                |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     | PSTVd                                                                                           | TCDVd                                                                                       | CLVd                                                                                        | TASVd                                                                                                          |
| 地上部 | <ul style="list-style-type: none"> <li>・草丈の伸びやや不良</li> <li>・側枝葉の一部退緑化</li> <li>・茎の亀裂</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>・草丈の伸びやや不良</li> <li>・頂部葉の軽度な退緑化</li> </ul>           | <ul style="list-style-type: none"> <li>・草丈の伸びやや不良</li> <li>・頂部葉の軽度な退緑化</li> </ul>           | <ul style="list-style-type: none"> <li>・株の萎縮と黄化</li> <li>・頂部葉の小葉化</li> <li>・茎の亀裂・褐色条斑</li> </ul>               |
| 地下部 | <ul style="list-style-type: none"> <li>・亀裂(少)</li> <li>・こぶ状突起(軽度)</li> <li>・細長いも</li> </ul>     | <ul style="list-style-type: none"> <li>・亀裂(少)</li> <li>・こぶ状突起(軽度)</li> <li>・細長いも</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>・亀裂(少)</li> <li>・こぶ状突起(軽度)</li> <li>・細長いも</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>・亀裂</li> <li>・ストロン亀裂(軽度)</li> <li>・こぶ状突起(軽度)</li> <li>・矮小さいも</li> </ul> |

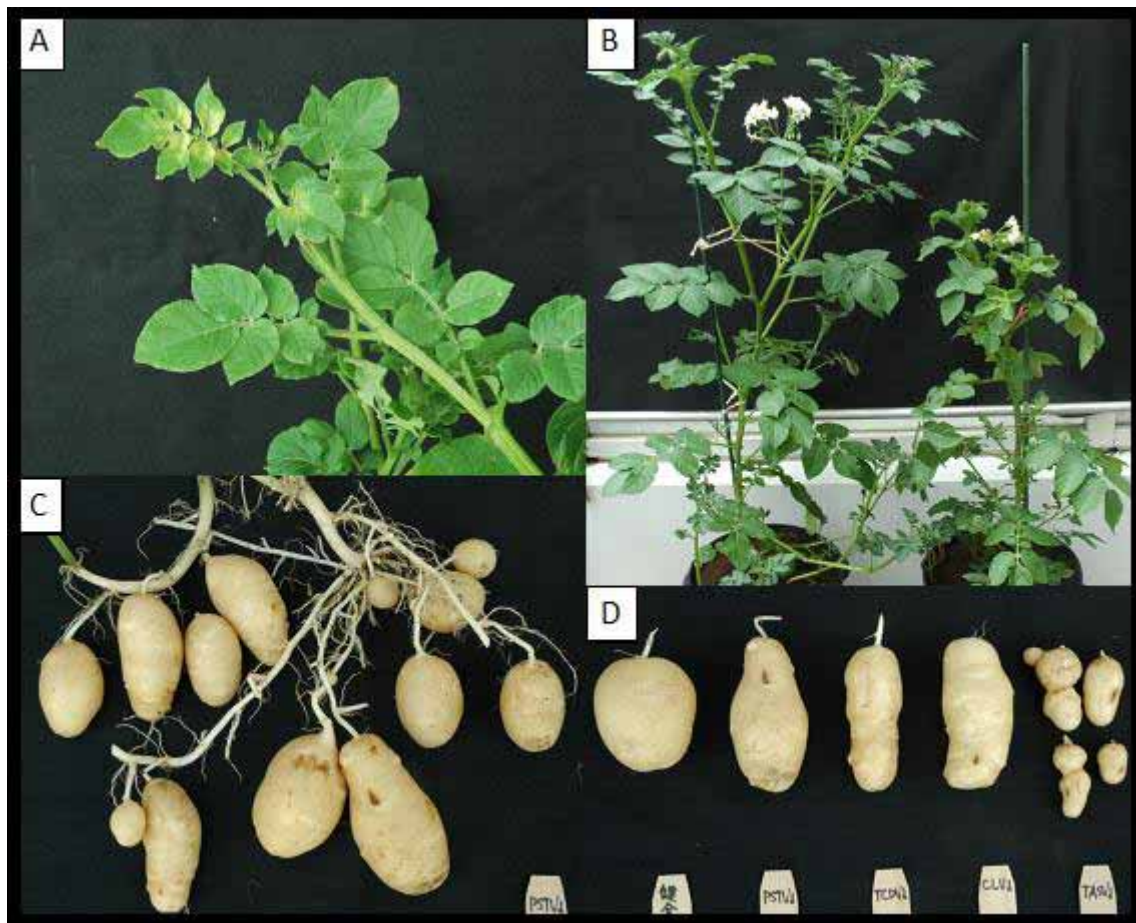


図5 ばれいしょ品種Bにおける感染病徴。A) PSTVd株の葉身基部の黄化、B) 健全株(左)とTASVd株(右)、C) PSTVd株の塊茎、D) 右から順にTASVd、CLVd、TCDVd、PSTVd、健全等各株の塊茎。

※6：ウイロイド4種（PSTVd、TCDVd、CLVd、TASVd）を接種した野菜・花きにおける感染性調査（小課題2関連）

（方法）ウイロイド4種（PSTVd、TCDVd、CLVd、TASVd）にそれぞれ感染したトマト‘ルトガス’の葉をリン酸バッファーで磨砕した液を接種源として用いた。近年の輸入量が増大し、かつ諸外国においてPSTVdで無病徴感染が報告されている植物科に属する野菜および花きの植物種を接種対象とした。接種1～2か月後に接種個体の上位葉をサンプリングし、RT-PCRによって感染の有無を確認した。また、RT-PCRで陽性となった一部個体はトマト‘ルトガス’に接種試験を行い、病徴を確認した。また、キク‘ボニーゼン’のPSTVd反応試験は、PSTVd罹病シュンギクへの接木を行って調べた。

接種対象植物の基準を以下に示す。

1. PSTVd の宿主となる植物と同じ科の植物であること。  
または PSTVd、TCDVd、CLVd、TASVd のいずれかのウイロイドで宿主植物としての報告があるもの。
2. 種子及び苗の輸入検査順位が上位であるもの。
3. 今後、輸入増加が見込まれるもの。例、トルコギキョウ（1990 年から増加）
4. ラン類、観葉植物、水草はトマト等の重要作物と同時に苗育苗される可能性が低いので除外する。
5. 球根類（チューリップなど）はほとんどが単子葉類であり、これまでに単子葉類でのウイロイド感染例はない。また、球根類は接種可能となる時期が非常に短いことから、接種試験に必要な期間は4，5年～10年近くの期間を要すると考えられるため除外する。

（結果）4種のウイロイドを数種の野菜および花き類にそれぞれ接種試験を行ったところ、野菜では4種のウイロイドの全てがトウガラシ、ピーマン、シシトウ、ナス、シュンギクにそれぞれ感染した。花き類では全てのウイロイドがペチュニア、ダリア、キンセンカ、フレンチマリーゴールド、アフリカンマリーゴールドに感染し、TASVd および CLVd はヒマワリに、TCDVd と CLVd はロベリアにも感染した。また、TASVd または CLVd に感染したキンセンカでは茎のえそや葉のえそが観察された。PSTVd は汁液接種ではキクに感染しなかったが、接木接種では感染が認められた（表6・図6）。

表6 野菜類・花き類におけるウイロイド各4種の感染の有無および病徴

| 植物科 ・ 植物種       | 感染の有無 |       |       |      |
|-----------------|-------|-------|-------|------|
|                 | PSTVd | TCDVd | TASVd | CLVd |
| <b>シュウカイドウ科</b> |       |       |       |      |
| ベゴニア            | -     | -     | -     | -    |
| <b>キキョウ科</b>    |       |       |       |      |
| ロベリア            | -     | +     | +     | -    |
| キキョウ            | -     | -     | -     | -    |
| <b>ナデシコ科</b>    |       |       |       |      |
| カスミソウ           | -     | -     | -     | -    |
| カーネーション         | -     | -     | -     | -    |
| <b>アカザ科</b>     |       |       |       |      |
| フダンソウ           | -     | -     | -     | -    |
| テンサイ            | -     | -     | -     | -    |
| ハウレンソウ          | -     | -     | -     | -    |
| <b>キク科</b>      |       |       |       |      |
| 宿根アスター          | -     | -     | -     | -    |
| キンセンカ           | +     | +     | +     | +    |
| アスター            | -     | -     | -     | -    |
| キク              | -     | -     | -     | -    |
| コスモス            | -     | -     | -     | -    |
| ダリア             | +     | +     | +     | +    |
| シュンギク           | +     | +     | +     | +    |
| ヒマワリ            | -     | -     | -     | -    |
| レタス             | -     | -     | -     | -    |
| アフリカンマリーゴールド    | +     | +     | +     | +    |
| フレンチマリーゴールド     | +     | +     | +     | +    |
| ヒャクニチソウ         | -     | -     | -     | -    |
| <b>マメ科</b>      |       |       |       |      |
| スイートピー          | -     | -     | -     | -    |
| <b>リンドウ科</b>    |       |       |       |      |
| トルコギキョウ         | -     | -     | -     | -    |
| <b>シソ科</b>      |       |       |       |      |
| サルビア            | -     | -     | -     | -    |
| <b>イソマツ科</b>    |       |       |       |      |
| スターチス           | -     | -     | -     | -    |
| <b>ナス科</b>      |       |       |       |      |
| トウガラシ           | +     | +     | +     | +    |
| ペチュニア           | +     | +     | +     | +    |
| ナス              | +     | +     | +     | +    |
| <b>ゴマノハグサ科</b>  |       |       |       |      |
| キンギョウソウ         | -     | -     | -     | -    |
| トレニア            | -     | -     | -     | -    |
| <b>スミレ科</b>     |       |       |       |      |
| パンジー            | -     | -     | -     | -    |



図6 CLVdに感染したキンセンカ（左）とTASVdに感染したキンセンカ（右）

※7：ウイロイド4種（PSTVd、TCDVd、CLVd、TASVd）について、感染宿主となった植物種について作出された汚染種子を用いて種子伝染評価（小課題3関連）

（方法）いずれの植物においても温室内自然交配で種子を得た。採取種子はいずれも4℃の定温室で保存した。種子伝染試験は、試験種子を健全土に直接播種し、発芽苗を30～40日育成して、ウイロイド感染の有無をPCR検定により調べた。また、PCR検定が陽性の苗の一部をトマト‘ルトガス’へ戻し接種してウイロイド感染の確認を行った。

（結果）供試した一部の植物種においてPSTVdおよびCLVdの種子伝染が認められた。品種4及び品種5のPSTVd種子伝染苗の症状を調べた結果、播種45日後では、ウイロイド感染特有の葉の細葉化・退緑化などは明瞭でなかったが、55日後では、品種5での頂部位葉の退緑や黄化が、品種4では明瞭なすくみ症が観察された（図7）。



図7 種子伝染トマト苗の症状（全株感染株）。品種5の播種後45日（A）と同55日（B）及び品種4の播種後45日（C）と同55日（D）。

## 2. 中課題2：ウイロイド検定マニュアル等の開発と検疫措置への貢献

### (1) 成果の概要

| 工程表                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 進捗状況・成果                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>PSTVd、TCDVd、CLVd、TASVd の4種ウイロイドがそれぞれ感染した侵入源になりうる危険性の高い農作物種苗の感染植物を調整する。また、これらウイロイドの特異的検出に適したRT-PCR法用のプライマーの候補をデザインする（小課題1関連）。（平成23年度）</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>準備した感染植物体および設計したプライマーを元にRT-PCR等を実施して、擬陽性反応を示さないプライマーの選定や反応の諸条件等を確定する（小課題1関連）。（平成24年度）</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>感染植物を葉、茎、塊茎等の組織に分割し、ウイロイド検定のための最適部位を定めた新規検定法を開発する（小課題1関連）。（平成25年度）</p> | <p>人工合成したウイロイドRNAをトマトに接種して、4種ウイロイドそれぞれに感染植物を調整した。※1</p> <p>またRT-PCR法用のプライマーの候補をデザインした。さらに設計したCLVd特異的プライマーによりCLVdを特異的に検出することができた（図8）。（平成23年度）</p> <p>※2</p> <p>TASVd特異的プライマーの選定はTASVdを検出することはできたが、PSTVdやCLVdも検出されることが判明した（図9）。※3</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>既報のRT-PCRプライマーの配列を参考に、各ウイロイドを接種した感染植物の検定を行った。その結果、PSTVdおよびTCDVdはP3+P4プライマーにより、またTASVdとCLVdは今回考案した特異的プライマーによりそれぞれ特異的な陽性反応を得ることができた。偽陽性は認められなかった。また、得られたcDNAバンドはダイレクトシーケンス法により塩基配列が解析できることを確認した（図10）。（平成24年度）</p> <p>※4</p> <p>また、上記のプライマーの配列を参考に、リアルタイムPCRを行ったところ、4種ウイロイドの内PSTVd・TCDVd・TASVdは同時に検出できた。さらに陽性コントロールRNAを開発し、このリアルタイムPCR法で利用できることを確認した。また、このRNAはトマトへの感染性はないことを示した。この各4種ウイロイドに感染したトマトおよびばいれしょにおける検定最適部位は主に葉を用いた場合に検出漏れはないと判断</p> |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>種子での輸入頻度が高く、かつウイロイドが種子伝染する植物から汚染種子を採取し、種子内の感染部位を特定する。汚染部位が種子表面だけの場合は、RT-PCR 法または LAMP 法等を基盤とした非破壊検定法を開発する（小課題 2 関連）。（平成 24 年度）</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>汚染が種子内部にまで及んでいる場合を想定して、粉碎法を基にした検定方法を考案する（小課題 2 関連）。（平成 25 年度）</p> <p>被害程度が大きいと推定されるウイロイドと輸入量が多く無病徴感染する種苗の組み合わせを対象とした検定マニュアルを開発する（小課題 3 関連）。（平成 25 年度）</p> | <p>した。また、ばれいしょ塊茎における感染部分を結果、塊茎全体に感染していることが判明したことから、特定の領域への偏在はないと判断した。（平成 25 年度）</p> <p>TCDVd または PSTVd に感染したトマトおよびペチュニアの開花時における胚珠組織の切片を組織化学的に解析した。その結果、TCDVd は母株由来の柔組織までで留まっていたが、PSTVd は胚珠組織内部にまで侵入していた（図 11）。またはペチュニアの種子切片を作製した結果、PSTVd は胚内部まで侵入していた（図 12）。（平成 24 年度）※ 5・※ 6</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>PSTVd においては種子内部への汚染が懸念されたことから、非破壊検査ではなく破壊検査が必要であると判断した。PSTVd 汚染トマト種子から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR を用いて検出を実施した。その結果、PSTVd の波形が確認され、一方で健全種子からは波形は確認されなかった。よって、種子を破壊した後にリアルタイム RT-PCR を用いた種子からの診断は可能であると判断した（平成 25 年度）。</p> <p>植物防疫において侵入警戒を要するポスボウイロイドに関するハンドブックを作成した。各ウイロイドの概要や発生生態、発生事例、病徴、種子伝染、検出マニュアル等を作成した。（平成 25 年度）</p> |
| <p>成果目標：ウイロイド検定マニュアル等の開発して植物検疫措置へ貢献する。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

＜成果の概要の補足＞

※1：PSTVd、TCDVd、TASVd、CLVd にそれぞれ感染した植物体の作製（小課題1 関連）

（方法）コンタミおよび変異体を除くために人工合成した各ウイロイドの RNA を接種した植物体の作製を行った。各ウイロイドに感染したトマトから total RNA を抽出して RT-PCR を行い、T7 プロモーター配列の直下に各ウイロイドの全長配列の cDNA をもつクローンを作製した。クローンを鋳型として RNA を転写し、トマト‘ルトガス’に接種して感染個体を作製した。それらの植物体を以下の RT-PCR の試験に用いた。

用いた各ウイロイド情報は次のとおり；

- ・ PSTVd (358bp)：福島株 (DDBJ accession no. EU862231)
- ・ TCDVd (359bp)：広島株 (DDBJ accession no. AB329668)
- ・ TASVd (364bp)：イスラエル系統 (DDBJ accession no. AM777161)
- ・ CLVd (374bp)：オランダ系統 (DDBJ accession no. AY372392)

※TASVd および CLVd は横浜植物防疫所から分譲されたもの。

（結果）人工合成した RNA をトマトに接種した結果、ウイロイド接種した株と同様の病徴を示した。

※2：CLVd 特異的プライマーの選定（小課題1 関連）

（方法）CLVd はポスピウイロイド共通プライマー (Verhoven et. al., 2004) では検出できないため、既報の pCLV4+pCLVR4 または pCLV6+pCLVR6 (Spieker et. al., 1996) の使用を検討したが、pCLV4+pCLVR4 を使用した direct RT-PCR (RNA 抽出を省略した方法) の結果、バンドが非常に薄く、判定困難であった。また、pCLV6+pCLVR6 を使用した場合は全くバンドを確認することができなかった。そこで、CLVd 特異的プライマーの選定を試みるため、12 のプライマーセットを作製し、RT-PCR を行った。サンプルには4種のウイロイドに感染したトマトを用いた。

（結果）CLV-R6+CVL-F6 のセットでは図8のように、332bp のバンドの箇所に CLVd を検出することができ、PSTVd、TCDVd、TASVd は検出されなかった。また、健全トマトではバンドは見られなかったことから、トマトにおいて偽陽性は生じないと判断された。

CLVd 特異的プライマーの塩基配列

CLV-R6 (5'-CTC TTC CGC CCA ATC TTT TT-3')

CLV-F6 (5'-GGT CGG AGG ATC TTC TGG AG-3')

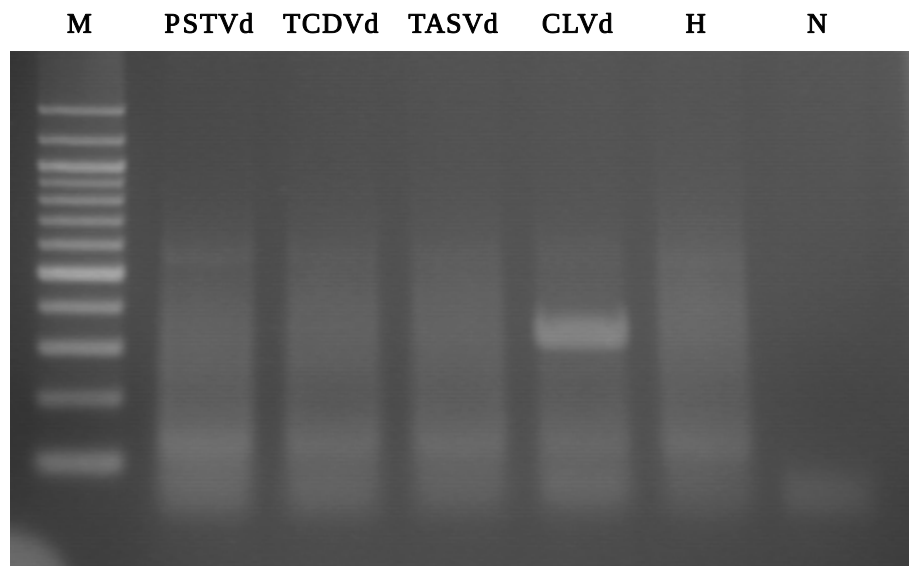


図8 CLVd 特異的プライマーによる RT-PCR の泳動結果 (トマト)  
アニーリング温度は 62℃

※3 : TASVd 特異的プライマーの選定 (小課題1 関連)

(方法) これまで TASVd 検出用の特異的プライマーはなく、ポスピウイルス共通プライマーが用いられている。そこで、ポスピウイルス共通プライマーを用いて direct RT-PCR を試みたが、検出感度が悪く、偽陽性との区別が困難であった。そこで、TASVd 検出用プライマーの選定し、13 のプライマーセットを作製し、RT-PCR を行った。サンプルには4種のウイルスに感染したトマトを用いた。

(結果) TAV-R13+TAV-F13 のセットでは図9のように、282bp の箇所に TASVd のバンドを確認することができ、健全トマトからのバンドは見られなかった。しかし、TCDVd は検出されなかったが、PSTVd および CLVd も検出されたため、TASVd 特異的プライマーではないが、direct RT-PCR で用いることができ、偽陽性はなかった。なお、このプライマーセット以外はすべて、健全トマトの偽陽性が見られたため、検出プライマーとして用いることはできなかった

TASVd プライマーの塩基配列

TAV-F13 (5'-AAG GAA ACC CGA AGA AAG GA-3')

TAV-R13 (5'-CCT CAC GCG CTT TTT CTC TA-3')

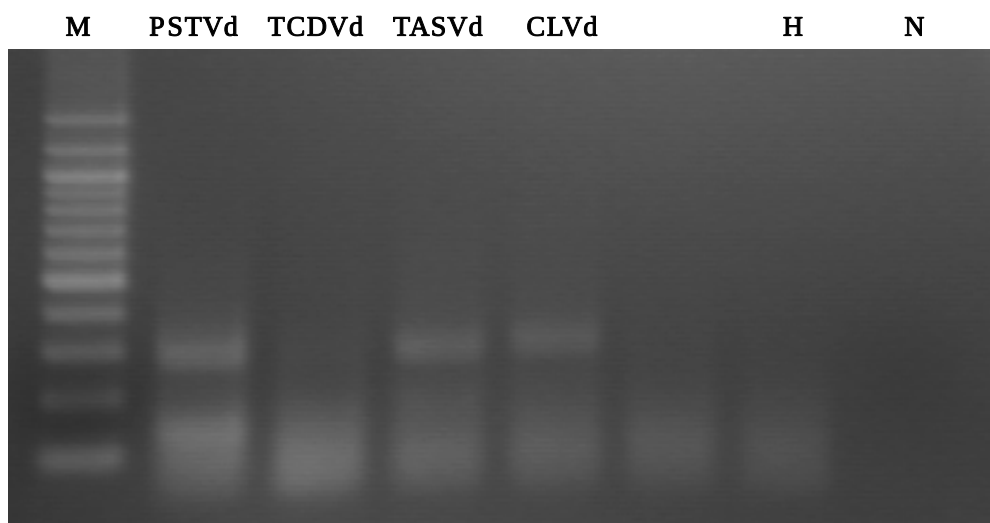


図9 TASVd プライマーによる RT-PCR の泳動結果（トマト）  
アニーリング温度は 60℃

※4：ダイレクトシーケンスによる塩基配列の確認（小課題1 関連）

（方法）既報の PSTVd および TCDVd 検出用プライマーセット P3+P4、今回新たに考案した TASVd 検出用プライマーセット TAV-F13/R13、および CLVd 検出用プライマーセット CLV-F6/R6 をそれぞれ用いて、得られた cDNA 増幅産物のダイレクトシーケンスを行った。サンプルはそれぞれのウイロイドに感染したトマト‘ルトガス’の葉を用いた。

（結果）プライマーセット P3+P4、TAV-F13/R13、CLV-F6/R6 をそれぞれ用いた RT-PCR の増幅産物は、ダイレクトシーケンスによって塩基配列が解析できた（図10）。よって、これらのプライマーセットによるダイレクトシーケンスは可能であることが示された。

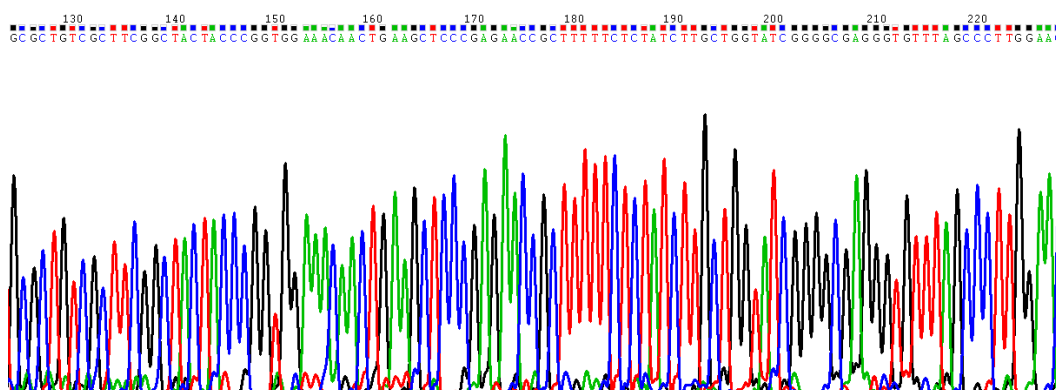


図10 プライマーセット P3+P4 によって増幅された PSTVd cDNA のダイレクトシーケンスによる塩基配列の波形

※5：トマトの花芽形成組織における TCDVd および PSTVd の組織内分布の差異（小課題2 関連）

（方法）TCDVd に感染したトマトから得られた種子 120 粒を播種しても種子伝染は確認されない。一方、PSTVd はトマトでの種子伝染率が 2～23%に達すると報告されている。そこで、両ウイルスにおける種子伝染の相違を明らかにするために、花芽分化から種子形成に至るまでの生殖組織の時系列変化において生じる二つのウイルスの感染分布の変遷を組織化学的に比較解析した。トマトの生殖組織における TCDVd および PSTVd の組織内分布を調べるためにそれぞれのウイルスに単独感染したトマト‘ルトガス’の開花時の花芽を採取して FAA で固定し、パラフィン切片を作製した。次に、*in situ* hybridization 法を用いて、組織内における TCDVd または PSTVd の局在を顕微鏡下で観察した。

（結果）TCDVd は、感染トマトの花芽形成期の初期において雄ずいで観察されたが、未分化の胚珠や胎座では認められなかった（データ略）。花芽形成期の後期および開花期では胎座に感染していたが、胚珠までには侵入していなかった（図 1 1）。一方、PSTVd 感染トマトでは、開花期で胚珠や胎座、雄ずいにまで及び、さらに受粉後は胚珠等の生殖組織にまで達していることが観察された。このことから、PSTVd 感染トマトにおいて起こる種子伝染は、種子表面の汚染に加え胚珠等の次世代組織にまで侵入していることが原因であろうと推察された。

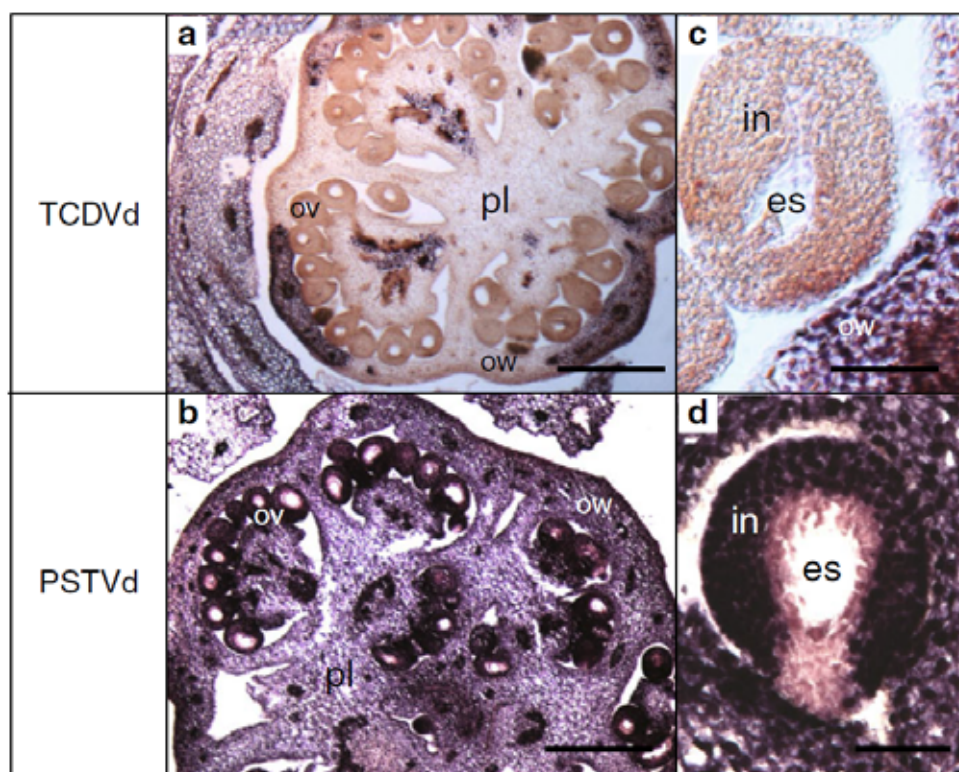


図 11 開花期トマト‘ルトガス’の生殖組織における TCDVd (a,c) および PSTVd (b,d) の感染分布（紫色に染色されている部分がウイロイド感染組織）es; 胚のう、in; 珠皮、pl; 胎座、ov; 胚珠、ow; 子房壁  
バー: a=500 $\mu$ m、b=500 $\mu$ m、c=50 $\mu$ m、d=50 $\mu$ m

※6：ペチュニアの種子内部における PSTVd の組織内分布（小課題 2 関連）

（方法）現在までのデータでは、ペチュニアにおいて、PSTVd は高率に種子伝染することが示されている。そこで、ペチュニアの種子における PSTVd の組織内分布を調べるため、それぞれのウイロイドに感染したペチュニアの種子を採取し、トマトと同様に *in situ* hybridization 法を用いて顕微鏡観察した。

（結果）健全ペチュニアの種子では、胚や胚乳組織において PSTVd のシグナルは認められなかったのに対し（図 1 2 A）、PSTVd に感染したペチュニアの種子では胚と一部の胚乳組織でウイロイドが観察された（図 1 2 B）。この結果は、表 1 0 の PSTVd の高い種子伝染率の実態を表しているものと思われた。

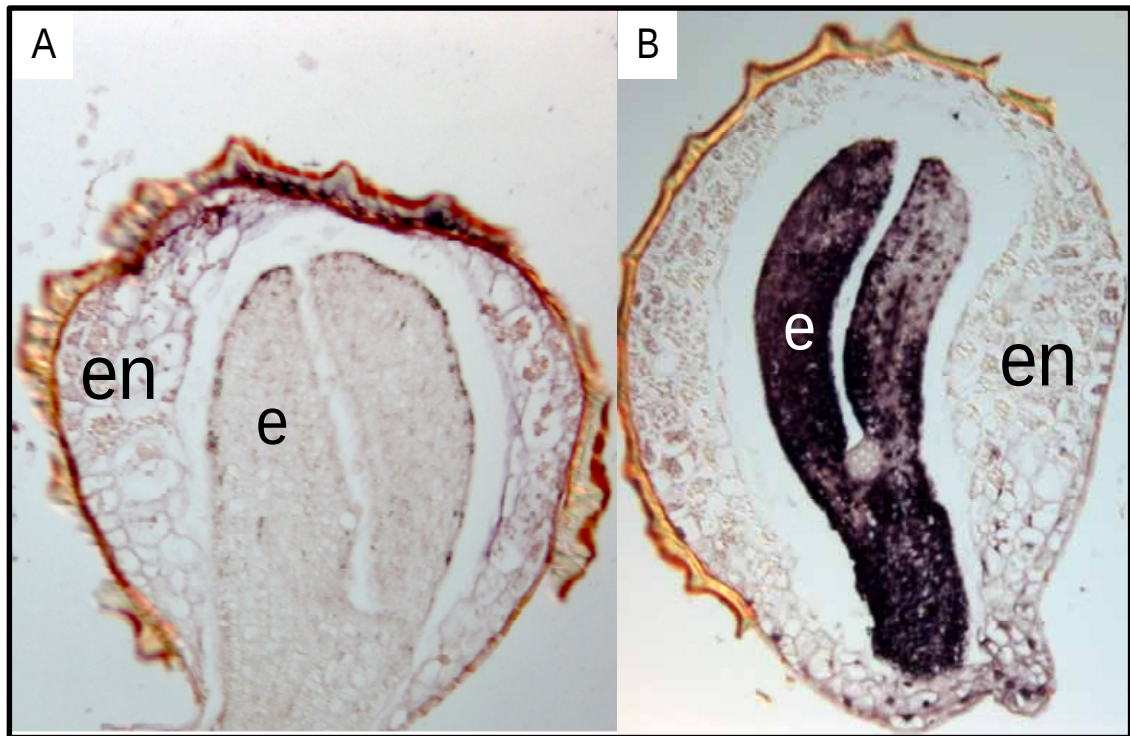


図 1 2 健全ペチュニアの種子切片 (A) と PSTVd に感染したペチュニアの種子切片 (B) (紫色に染色されている部分がウイロイド感染組織)  
en; 胚乳、e; 胚

別添

## 論文、特許等の実績等

### 学術論文

| タイトル、著者名、学会誌名、巻、ページ、発行年月                                                                                                                                                                  | 機関名             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Histopathological study of Potato spindle tuber viroid in reproductive organs of Petunia through each developmental stage. Yosuke Matsushita, Shinya Tsuda Phytopathology. In press. 2014 | 農業・食品産業技術総合研究機構 |
|                                                                                                                                                                                           |                 |
|                                                                                                                                                                                           |                 |

### 口頭発表

| タイトル、発表者名、学会等名、発表年月 | 機関名 |
|---------------------|-----|
|                     |     |
|                     |     |
|                     |     |

### 出版図書

区分:①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

| 区分 | 著書名、(タイトル)、著者名、出版社名、発行年月 | 機関名 |
|----|--------------------------|-----|
|    |                          |     |
|    |                          |     |
|    |                          |     |

国内特許権等

| 特許権等の名称 | 発明者 | 権利者<br>(出願人等) | 特許権等の種類 | 番号 | 出願年月日 | 取得年月日 | 機関名 |
|---------|-----|---------------|---------|----|-------|-------|-----|
|         |     |               |         |    |       |       |     |
|         |     |               |         |    |       |       |     |
|         |     |               |         |    |       |       |     |

国際特許権等

| 特許権等の名称 | 発明者 | 権利者<br>(出願人等) | 特許権等の種類 | 番号 | 出願年月日 | 取得年月日 | 機関名 |
|---------|-----|---------------|---------|----|-------|-------|-----|
|         |     |               |         |    |       |       |     |
|         |     |               |         |    |       |       |     |
|         |     |               |         |    |       |       |     |