

ウメ輪紋ウイルスの病徴の有無と検出の可否及び ウメ感染樹からの検出可能時期に関する調査

藤原裕治・一斗東子¹・星野智士²・齊藤範彦

横浜植物防疫所調査研究部

The Study on Detection of *Plum pox virus* from Symptomatic or Asymptomatic Leaves and on the Detectable Time from Japanese Apricot Tree. Yuji Fujiwara, Touko Itto¹, Satoshi Hoshino² and Norihiko Saito (Research Division, Yokohama Plant Protection Station, 1-16-10 Shin-yamashita, Naka-ku, Yokohama 231-0801, Japan; ¹Yokohama Plant Protection Station, Tokyo Sub-station; ²Yokohama Plant Protection Station, Sapporo Sub-station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* **48**: 59-64 (2012).

Abstract: *Plum pox virus* (PPV) is the most devastating virus associated with stone fruit trees, and its occurrence in the Japanese apricot (*Prunus mume*) was confirmed in Ome, Tokyo, Japan in 2009. Delimiting surveys were then begun, but the ability to detect PPV from symptomatic or asymptomatic leaves and the detectable seasons for the Japanese apricot tree were unknown. Leaf or twig samples were collected monthly from secondary scaffold branches of 3 Japanese apricot trees (10 samples each) infected with PPV from June to December 2009 and from June to November 2010. The samples were tested using DAS-ELISA, immunochromatography, RT-PCR, and RT-LAMP methods. PPV was detected in symptomatic leaves but not detected in asymptomatic leaves from the same tree. PPV was also detected in twig samples where symptomatic leaves had been confirmed. All methods could detect PPV every month, but DAS-ELISA and immunochromatography could not detect PPV in some samples after July and August, respectively. The RT-PCR and RT-LAMP methods could detect PPV consistently. It can be considered that detection surveys should be conducted by July. A symptomatic leaf was divided into a grid of 1 cm square cells, and each grid cell was tested using the immunochromatography and RT-LAMP methods. The results show that the distribution of PPV in a leaf was restricted to the parts that showed symptoms and petiole. These methods can be considered necessary for use when leaves are tested.

Key words: *Plum pox virus*, Japanese apricot, detectable time

緒 言

ウメ輪紋ウイルス (*Plum pox virus*, 以下「PPV」) は、核果類果樹に最も壊滅的な被害を引き起こすウイルスとして (Cambra *et al.*, 2006)、我が国への侵入を警戒していたが、2009年、東京都青梅市のウメ (*Prunus mume*) で本ウイルスの発生が確認され (Maejima *et al.*, 2010)、青梅市及びその周辺における発生調査及び全国における発生調査が開始された。これまで、PPVが人工的な接木接種によりウメに感染することは知られていたが (Hamdorf, 1975; Damsteegt, 2007)、ウメでの自然発生は世界初であり、ウメ感染樹における病徴の有無とPPV検出の可否及び検出可能時期は不明であった。

そこで、発生調査を的確かつ効率的に行うため、PPV自然感染ウメ樹から試料を定期的に採取し、病徴の有無と検出の可否及びPPV検出可能時期について調査を行った。

また、1葉の中でも病徴のない部分からはPPVが検出さ

れない可能性があり、検定に用いる部位が検定結果に大きく影響することが考えられることから、1葉中のPPVの偏在性についても調査を行った。

材料及び方法

1. 供試植物及び調査期間

青梅市内でPPVの感染が確認されたウメ樹3本 (A樹：白加賀、B樹：小向、C樹：持田白) について、それぞれ10本の垂主枝 (A樹：A-1～A-10、B樹：B-1～B-10、C樹：C-1～C-10) を選定し、各垂主枝上の病徴を呈した葉 (以下、「病徴葉」) を、病徴が見られない場合は無病徴葉を、また、葉がない場合は小枝を採取した。試料の採取は、2009年は6月から12月、2010年は6月から11月の間、毎月1回行った。

1葉中のPPVの偏在性に関する調査は、2010年7月に青梅市内のPPV発生調査で採取された病徴が一部に見られるウメの葉を用いた (Fig. 1)。

¹横浜植物防疫所東京支所

²横浜植物防疫所札幌支所



Fig. 1. A leaf, parts of which show symptoms.



Fig. 2. The leaf was divided into a grid of 1 cm square cells.

Table 1. Primers used in the RT-LAMP method.

Name	Sequence
PPV3-F3	5'-GGAATTCAGCGCAACCTGA-3'
PPV3-B3	5'-GCGGTGTGTCTCTCTGTG-3'
PPV3-FIP	5'-GAGCTTCACGTGCCCCGTACGCAGACTACAGCCTCGCCAGA-3'
PPV3-BIP	5'-TCCAGATGAAGGCAGCAGCATCCTCTTCTTGTGTTCCGACG-3'

2. 検出方法

採取した葉については、病徴葉の場合は葉身の病徴部分を、無病徴葉の場合は葉身の任意の部分を、また、小枝については樹皮及び休眠芽を試料として必要な量を採り、PPVの検出を試みた。

採取した試料からのPPVの検出は、イムノクロマト法、DAS-ELISA (double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay) 法、RT-LAMP (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification) 法及びRT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) 法で行った。

1葉中のPPVの偏在性に関する調査は、葉を縦横1cm角の格子状に分割し (Fig. 2)、27の葉片及び葉柄からイムノクロマト法及びRT-LAMP法でPPVの検出を行った。

(1) イムノクロマト法及びDAS-ELISA法

イムノクロマト法は市販のキット (2009年: BIOREBA社製、2010年: ニッポンジーン製) を用い、また、DAS-ELISA法も市販の抗血清 (BIOREBA社製) を用い、それぞれの製品のマニュアルに従い実施した。

(2) RT-LAMP法

RT-LAMP法は、PPV特異的プライマー (Table 1、横浜植物防疫所、2009) を用い、試料からの核酸抽出を行わず、試料に昆虫針5号を刺し、その針をRT-LAMP反応液に浸す簡易鋳型調整法で行った。反応はリアルタイム濁度測定装置 (テラメックス社 LA-200) で測定した。

(3) RT-PCR法

試料からの核酸抽出は、カリウム-SDS法 (Dellaporta *et al.*, 1983) で次のとおり行った。ポリエチレン袋 (0.1mm厚、75mm×130mm) に試料0.05gを入れ、小試験管の口等で袋の上から軽く圧搾後、0.6mlの磨砕用Buffer 1 (0.2M Tris-HCl (pH 8.0)、1.0M NaCl、2% 2-メルカプトエタノール) を入れてよく磨砕した。この袋から磨砕液0.5mlを採り、あらかじめ0.6mlの磨砕用Buffer 2 (0.1M EDTA (pH 8.0)、2.5%ラウリル硫酸ナトリウム (SDS)、6.6% ポリビニルピロリドン (PVP) M.W. 40,000) を入れておいた1.5mlマイクロチューブに入れ、アルミブロック内で65°C、10分間処理後、0.34mlの5M酢酸カリウムを加えて激しく攪拌し、氷中に30分間置いた。9,200×gで10分間遠心後、上清0.625mlをあらかじめ0.375mlのイソプロパノールを入れておいた1.5mlマイクロチューブに移し、転倒混和後、氷中に30分間静置した。9,200×gで10分間遠心後、沈澱を70%エタノール0.1mlでリンスし、9,200×gで5分間遠心後、沈澱を減圧乾燥し、最後に0.1mlの蒸留水に懸濁してRT-PCR反応の鋳型とした。

RT-PCR反応は、PPV特異的プライマーである5'-GTCTCTTGACAAGAAGTATAACC-3' (antisense) と5'-GTAGTGGTCTCGGTATCTATCATA-3' (sense) (Hadi and Levy, 1994) を用い、QIAGEN OneStep RT-PCR Kitを使用し、50°C 30min、94°C 15min、(94°C 1min、64°C 1min、72°C 1min) を30サイクル、72°C 10minの条

Table 2. Monthly PPV detection results for tree A (2009).

Secondary scaffold branch	Symptoms	June				July				August				September				October				November				December			
		E	I	P	L	E	I	P	L	E	I	P	L	E	I	P	L	E	I	P	L	E	I	P	L	E	I	P	L
A-1	+																	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
A-2	-																					t	t	t	t	t	t	t	t
A-3	-																					t	t	t	t	t	t	t	t
A-4	+																					t	t	t	t	t	t	t	t
A-5	-																					t	t	t	t	t	t	t	t
A-6	-																					t	t	t	t	t	t	t	t
A-7	-																					t	t	t	t	t	t	t	t
A-8	-																	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
A-9	+																	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
A-10	+																	t	t	t	t	t	t	t	t	s	t	t	t

E: ELISA; I: immunochromatography; P: RT-PCR; L: RT-LAMP; t: twigs (bark and dormant buds) (Otherwise: leaves); Colored cells: positive; White cells: negative.

Table 3. Monthly PPV detection results for tree B (2009).

Secondary scaffold branch	Symptoms	June				July				August				September				October				November				December			
		E	I	P	L	E	I	P	L	E	I	P	L	E	I	P	L	E	I	P	L	E	I	P	L	E	I	P	L
B-1	-																					t	t	t	t	t	t	t	t
B-2	-																					t	t	t	t	t	t	t	t
B-3	+																					t	t	t	t	t	t	t	t
B-4	+																					t	t	t	t	t	t	t	t
B-5	-																					t	t	t	t	t	t	t	t
B-6	+																					t	t	t	t	t	t	t	t
B-7	-																					t	t	t	t	t	t	t	t
B-8	-																					t	t	t	t	t	t	t	t
B-9	+																					t	t	t	t	t	t	t	t
B-10	-																					t	t	t	t	s	t	t	t

E: ELISA; I: immunochromatography; P: RT-PCR; L: RT-LAMP; t: twigs (bark and dormant buds) (Otherwise: leaves); Colored cells: positive; White cells: negative.

件で行った。

結 果

1. 病徴の有無と検出の可否

(1) 2009年採取試料

A 樹は、選定した10本の垂主枝のうち4本に病徴葉が存在し、月ごとに採取した病徴葉及び小枝からPPVが検出されたが、小枝ではPPVが検出されない試料もあった(A-9の9月及び12月)。また、A-4及びA-9の垂主枝では6月の時点では病徴が確認されず、採取した無病徴葉からPPVは検出されなかった。病徴葉が存在しなかった残りの6垂主枝から採取した無病徴葉及び小枝からはPPVは検出されなかった(Table 2.)。B 樹は、10垂主枝のうち4垂主枝に病徴葉が存在し、月ごとに採取した病徴葉及び小枝からPPVが検出されたが、小枝ではPPVが検出されない試料もあった(B-4の12月)。病徴葉が存在しなかった残りの6垂主枝からも3試料(B-2の12月、B-5の10月、B-8の11月)でPPVが検出されたが、他の試料からはPPVは検出されなかった(Table 3.)。C 樹は、10垂主枝のすべてに病徴葉が存在し、採取した病徴葉及び小枝から

PPVが検出された(Table 4.)。

(2) 2010年採取試料

A 樹は、5垂主枝に病徴葉が存在し、採取した病徴葉及び小枝からPPVが検出された。また、A-2の垂主枝では8月に採取した葉に軽い病徴が確認され、PPVが検出された。病徴葉が存在しなかった残りの4垂主枝から採取した葉及び小枝からはPPVは検出されなかった(Table 5.)。B 樹は、病徴葉が存在する垂主枝が7に増加した。B-5を除く6垂主枝では採取したすべての月の病徴葉及び小枝からPPVが検出された。B-5の垂主枝には病徴葉が少数しか存在せず、8月及び9月は無病徴葉を採取したため、PPVは検出されなかった。病徴葉が存在しなかった残りの3垂主枝からも2試料(B-7の6月、B-10の8月)でPPVが検出されたが、他の試料からはPPVは検出されなかった(Table 6.)。C 樹は、10垂主枝のすべてで病徴葉が存在し、採取した葉及び小枝からPPVが検出された(Table 7.)。

2. 各種検定法によるPPV検出可能時期

(1) ELISA 法

病徴葉がすべての垂主枝に存在するC 樹においては、

Table 4. Monthly PPV detection results for tree C (2009).

Secondary scaffold branch	Symptoms	June				July				August				September				October				November				December			
		E	I	P	L	E	I	P	L	E	I	P	L	E	I	P	L	E	I	P	L	E	I	P	L	E	I	P	L
C-1	+																					t	t	t	t	t	t	t	t
C-2	+		nt				nt		nt		nt		nt		nt		nt				nt	t	t	t	t	t	t	t	t
C-3	+																					t	t	t	t	t	t	t	t
C-4	+		nt				nt		nt		nt		nt		nt		nt				nt	t	t	t	t	t	t	t	t
C-5	+																					t	t	t	t	t	t	t	t
C-6	+		nt				nt		nt		nt		nt		nt		nt				nt	t	t	t	t	t	t	t	t
C-7	+																					t	t	t	t	t	t	t	t
C-8	+		nt				nt		nt		nt		nt		nt		nt				nt	t	t	t	t	t	t	t	t
C-9	+																					t	t	t	t	t	t	t	t
C-10	+		nt				nt		nt		nt		nt		nt		nt				nt	t	t	t	t	s	t	t	t

E: ELISA; I: immunochromatography; P: RT-PCR; L: RT-LAMP; t: twigs (bark and dormant buds) (Otherwise: leaves); Colored cells: positive; White cells: negative; nt: not tested.

Table 5. Monthly PPV detection results for tree A (2010).

Secondary scaffold branch	Symptoms	June				July				August				September				October				November			
		E	I	P	L	E	I	P	L	E	I	P	L	E	I	P	L	E	I	P	L	E	I	P	L
A-1	+																	t	t	t	t	t	t	t	t
A-2	±																					t	t	t	t
A-3	+																	t	t	t	t	t	t	t	t
A-4	+																					t	t	t	t
A-5	-																					t	t	t	t
A-6	-																					t	t	t	t
A-7	-																					t	t	t	t
A-8	-																	t	t	t	t	t	t	t	t
A-9	+																	t	t	t	t	t	t	t	t
A-10	+																					t	t	t	t

E: ELISA; I: immunochromatography; P: RT-PCR; L: RT-LAMP; t: twigs (bark and dormant buds) (Otherwise: leaves); Colored cells: positive; White cells: negative.

Table 6. Monthly PPV detection results for tree B (2010).

Secondary scaffold branch	Symptoms	June				July				August				September				October				November			
		E	I	P	L	E	I	P	L	E	I	P	L	E	I	P	L	E	I	P	L	E	I	P	L
B-1	+																	t	t	t	t	t	t	t	t
B-2	+																					t	t	t	t
B-3	+																					t	t	t	t
B-4	+																					t	t	t	t
B-5	+																					t	t	t	t
B-6	+																					t	t	t	t
B-7	-																					t	t	t	t
B-8	-																					t	t	t	t
B-9	+																					t	t	t	t
B-10	-																					t	t	t	t

E: ELISA; I: immunochromatography; P: RT-PCR; L: RT-LAMP; t: twigs (bark and dormant buds) (Otherwise: leaves); Colored cells: positive; White cells: negative.

2009、2010年ともすべての月でPPVが検出されたが、8月から11月の一部の病徴葉及び小枝からは検出されなかった (Table 4, 7)。A樹においては2009年8月以外のすべての月で、B樹においてはすべての月でPPVを検出す

ることができたが、7月以降の一部の病徴葉及び小枝では検出できなかった (Table 2, 3, 5, 6)。

(2) イムノクロマト法

C樹においては、2009年は7月から9月までの試料の

Table 7. Monthly PPV detection results for tree C (2010).

Secondary scaffold branch	Symptoms	June				July				August				September				October				November			
		E	I	P	L	E	I	P	L	E	I	P	L	E	I	P	L	E	I	P	L	E	I	P	L
C-1	+																					t	t	t	t
C-2	+																					t	t	t	t
C-3	+																					t	t	t	t
C-4	+																					t	t	t	t
C-5	+																					t	t	t	t
C-6	+																					t	t	t	t
C-7	+																					t	t	t	t
C-8	+																					t	t	t	t
C-9	+																					t	t	t	t
C-10	+																					t	t	t	t

E: ELISA; I: immunochromatography; P: RT-PCR; L: RT-LAMP; t: twigs (bark and dormant buds) (Otherwise: leaves); Colored cells: positive; White cells: negative.

半分からは検出を行わなかったが、2009年、2010年ともすべての月でPPVが検出された (Table 4, 7.)。しかし、2010年8月から10月の一部の病徴葉からは検出されず、特に、2010年9月は10試料中7試料でPPVを検出できなかった (Table 7.)。A樹及びB樹においてもすべての月でPPVを検出することができたが、8月以降一部の病徴葉及び小枝で検出されず、特に2010年9月では病徴葉11試料 (B-5を除く) 中8試料で検出できなかった (Table 2, 3, 5, 6.)。

(2) RT-PCR法及びRT-LAMP法

すべての樹において、2009年、2010年とも両手法によりすべての月で安定してPPVを検出することができた (Table 4, 7.)、A樹では8月以降の一部の病徴葉及び小枝で検出されなかった (Table 2, 5.)。B樹では、2009年12月の小枝の試料からは一部検出されなかった (Table 3.)。

3. 1葉中のPPVの偏在性に関する調査

イムノクロマト法及びRT-LAMP法による検定結果は、Fig. 3、Fig. 4及びTable 8. のとおりである。イムノクロマト法では病徴が認められた19葉片すべてから、RT-LAMP法では15葉片からPPVが検出された。しかし、病徴が全く認められなかった8葉片からは両手法でPPVは検出されず、1枚の葉の中でもPPVが病徴の部分に偏在していることが確認された。葉柄からは両手法でPPVが検出された。

考 察

PPVはセイヨウスモモ等の感染樹内で偏在することが知られている (Ferri Bodin *et al.*, 2002)。今回のウメの調査でも、A樹やB樹のように感染樹であっても病徴葉が存在しない亜主枝から採取された無病徴葉や小枝からはPPVが検出されず、ウメにおいても感染樹内でPPVが偏在していることが示唆された。このことから、発生調査の際には、病徴葉を採取することが重要と考えられた。次に、6月から10月までの葉及び10月から12月の小枝試料から

Grid Number	Reaction results			
1	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	+
2	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	—
3	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	—
4	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	—
5	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	+
6	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	+
7	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	+
8	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	—
9	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	+
10	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	+
11	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	+
12	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	—
13	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	—
14	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	+
15	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	+
16	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	+
17	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	+
18	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	+
19	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	—
20	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	—
21	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	+
22	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	+
23	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	+
24	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	+
25	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	+
26	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	+
27	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	+
28	PPV Lot 130822	BIOREBA	BIOREBA	+

Fig. 3. PPV detection results for each grid cell using immunochromatography.

4種類の方法でPPVの検出を行った結果、各手法ともすべての月でPPVを検出することが可能であることが判明したが、ELISA法は7月以降、イムノクロマト法は8月以降の一部の試料でPPVを検出できなかった。現在、PPVの発生が確認された東京都内においては緊急防除が実施されており、防除区域内及びその周辺地域での発生調査、そして、全国での発生調査で採取された試料の検定は、最初にイムノクロマト法で行い、陽性及び疑陽性となった試料についてRT-LAMP法による確認検定が行われている。イムノクロマト法では初夏から8月にかけての試料からもPPV

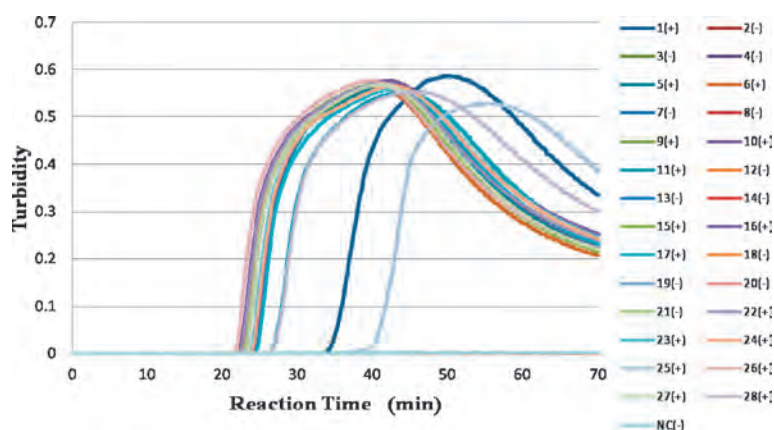


Fig. 4. PPV detection results for each grid cell using RT-LAMP.

Table 8. PPV detection results from a leaf divided into a grid of 1 cm square cells.

Grid number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Symptoms	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Immuno-chromatography	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
RT-LAMP	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Colored cells (+): positive; White cells (-): negative.

を検出できることが判明したが、確実にPPVを検出するためには、発生調査は7月までに行うことが適当と考えられた。

次に、1葉中のPPVの偏在性について調べた結果、PPVが病徴の部分に偏在していることが確認された。RT-LAMP法よりもイムノクロマト法で検出された葉片数が多かったが、これは、①RT-LAMP法では針刺しによる簡易鋳型調整法で行ったことにより、病徴が一部にしか存在しない葉片において、確実に病徴部分を刺していなかった、②イムノクロマト法では病徴が葉片の一部にしかない場合でも磨砕することによりPPVが検出されたためと考えられる。これらのことから、PPVの検定を行う場合は、葉の中の確実に病徴が現れている部分を用いるか葉柄を用いる必要があり、さらに、病徴が不明瞭な葉について、針刺しによる簡易鋳型調整法でRT-LAMP法を行う場合は、数カ所針刺しを行う必要があると考えられた。

謝 辞

本調査に当たり、毎月の試料採取にご協力いただいた東京都産業労働局農業振興事務所西多摩農業改良普及センターの職員の皆様に感謝申し上げます。

引用文献

- Ferri Bodin, M., E. Costes, J.-B. Quiot, and F. Dosba (2002) Systemic spread of *Plum pox virus* (PPV) in Mariana plum GF 8-1 in relation to shoot growth. *Plant Pathol.* **51**: 142-148.
- Cambra, M., N. Caporte, A. Myrta, and G. Llacer (2006) *Plum pox virus* and the estimated costs associated with sharka disease. *OEPP/EPPO Bulletin* **36**: 202-204.
- Damsteegt, V. D., R. Scorza, A. L. Stone, W. L. Schneider, K. Webb, M. Demuth, and F. E. Gildow (2007) *Prunus* host range of *Plum pox virus* (PPV) in the United States by aphid and graft inoculation. *Plant Dis.* **91**: 18-23.
- Dellaporta, S. L., J. Wood, and J. B. Hicks (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* **1**: 19-21.
- Hamdorf, G. (1975) Further studies about the host range of sharka (plum pox) virus. *Acta Hort.* **44**: 155-162.
- Maejima, K., H. Hoshi, M. Hashimoto, M. Himeno, T. Kawanishi, K. Komatsu, Y. Yamaji, H. Hamamoto, and S. Namba (2010) First report of *Plum pox virus* infecting Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* **76**: 229-231.
- 横浜植物防疫所 (2009) RT-LAMP法を用いた *Plum pox virus* の検出について. 植物防疫所病害虫情報No. **88**: 8.