

Ⅲ アザミウマとウイルスと宿主に関する諸特性の解明

Ⅱ章において、アザミウマ保毒虫の発生頻度がTSWVの蔓延の一因となりうることを述べた。そこで本研究では、TSWVの媒介種であるアザミウマの媒介に関する特性、また宿主内のウイルス量とアザミウマによる獲得頻度の関係について解明した。さらに、TSWVの主な伝染源はピーマン果実残渣としたが、低頻度ではあるが雑草種によってはTSWVの感染が確認された (Okazaki et al., 2007)。このことから、ウイルス獲得源として雑草の位置づけを検討した。

1 ミカンキイロアザミウマおよびヒラズハナアザミウマ大分個体群のTSWV媒介能力

大分県豊後大野市大野町を中心とした夏秋ピーマン産地では、1998年にTSWVによる被害が初確認され (吉松ら, 1999)、その後毎年恒常的にこのウイルスによる黄化えそ病が発生した。国内に生息するミカンキイロアザミウマのTSWV媒介能力は、地域によって異なるとされ (Sakurai et al., 2002)、媒介能力を持つ個体が高い頻度の地域では、ウイルス病が問題になる可能性が高いことが予想される。そこで、TSWVが恒常的に発生している豊後大野市のピーマン圃場から採集したミカンキイロアザミウマに加え、竹田市のピーマン圃場および国東市のトルコギキョウ圃場から採集した個体群を対象にTSWV媒介能力をペチュニアリーフディスク法 (Wijkamp and Peters, 1993; 櫻井, 2004; 櫻井, 2006) により調査した。さらに、本県で恒常的に発生しており、TSWV媒介種で近縁種のヒラズハナアザミウマについても同様に調査を行い、既報の個体群の媒介能力と比較した。

(1) 材料および方法

a 供試アザミウマ

ミカンキイロアザミウマは、1998年から2003年にかけてTSWVの発生を確認している大分県豊後大野市大野町のピーマン圃場から採集したミカンキイロアザミウマ2個体群 (小倉木個体群、光昌寺個体群) に加え、2005年にTSWVの発生が確認された竹田市荻町の3個体群 (北原個体群、高城個体群、藤渡個体群)、対照としてこれまでにTSWVの発生が確認されていないトルコギキョウ圃場から採集した国東市国東町の2個体群 (北江A個体群、北江B個体群) を用いた (第7表)。いずれの個体群も花卉を中心に生息していたものを採集したが、小倉木個体群は作付けを終了した圃場に放置されていたピーマン果実残渣で越冬していたものを採集した。

ヒラズハナアザミウマについては、豊後大野市大野町のピーマン圃場から採集した光昌寺個体群に加え、同市イチゴ圃場から採集した2個体群 (三重町川辺個体群、佐伯市木立個体群) の計3個体群を用いた (第8表)。いずれの個体群も花卉に生息していたものをそれぞれ採集した。

これらの個体群は村井・石井 (1982) の方法に従い、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、16L8D条件下において、成虫にはチャの花粉、幼虫にはソラマメ催芽種子を与えて累代飼育した。

第7表 供試したミカンキイロアザミウマ大分個体群

採集場所	寄主/採集部位	採集年月日
豊後大野市 大野町小倉木	ピーマン/果実残渣	2004年2月23日
豊後大野市 大野町光昌寺	ピーマン/花	2004年7月23日
竹田市 荻町北原	ピーマン/花	2005年6月7日
竹田市 荻町高城	ピーマン/花	2005年6月7日
竹田市 荻町藤渡	ピーマン/花	2005年6月7日
国東市 国東町北江A	トルコギキョウ/花	2005年6月13日
国東市 国東町北江B	トルコギキョウ/花	2006年6月2日

第8表 供試したヒラズハナアザミウマ大分個体群

採集場所	寄主/採集部位	採集年月日
豊後大野市大野町 光昌寺	ピーマン/花	2004年7月23日
豊後大野市三重町 川辺	イチゴ/花房	2005年4月19日
佐伯市 木立	イチゴ/花房	2005年4月18日

b 供試ウイルス

TSWV株 (TSWV-Iw) は、2001年に岩手県盛岡市で採集したTSWV感染トマト葉から分離した。本分離株は、ヌクレオカプシドタンパク質のアミノ酸および塩基配列の相同性から、国内の様々な作物に発生したTSWVと遺伝的に近縁であると推定される。

c TSWV媒介試験

孵化直後のアザミウマ1齢幼虫 (0~8時間齢) に、TSWVを汁液接種後7~10日間経過したダチュラ上位葉を24時間摂食させた。供試葉はTSWV用簡易RIPA (STX 39300, Agdia社, U.S.A.) により感染の有無を確認した。その後、ソラマメ催芽種子を餌として $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、16L8Dの条件下で成虫まで飼育した。成虫羽化後4日目にペチュニアリーフディスク法 (Wijkamp and Peters, 1993; 櫻井, 2004) (写真5) によってTSWV媒介試験を行った。ペチュニアの品種は「PoLo blue」 (第一園芸) もしくは「Baccarat blue」 (サカタのタネ) を用い、開花前の株から十分に展開した若い葉を採取して直径6mmのリーフディスクを作成した。各個体群とも40~83頭の成虫を供試し、リーフディスクとともに2mlのマイクロチューブ内に個別に隔離し、24時間後にリーフディスクのみを取り出し水面に浮かべた。48時間後に黒褐色のえそ斑が形成された場合、そのリーフディスクを摂食させた個体をTSWV媒介虫と判定した。えそ斑が不明瞭なリーフディスク

はRIPAにより検定した。

(2) 結果

a ミカンキイロアザミウマ大分個体群のTSWV媒介能力

豊後大野市のピーマン圃場で採種した小倉木個体群の媒介率は雄58.3%、雌14.3%、成虫全体で27.5%、光昌寺個体群は雄73.7%、雌54.8%、成虫全体で62.0%であった(第9表)。同じ豊後大野市大野町内から採集されたにもかかわらず、両個体群のTSWV媒介虫率の間には有意な差が認められた(Fisherの正確確率検定： $P<0.01$)。竹田市荻町のピーマン圃場で採集した北原個体群では雄26.3%、雌11.7%、成虫全体では19.4%、高城個体群では雄22.2%、雌12.8%、成虫全体では16.9%、藤渡個体群では雄19.2%、雌12.0%、成虫全体では15.6%であり、3個体群のTSWV媒介率の間に有意な差は認められなかった(χ^2 適合度検定： $\chi^2=0.328, P=0.8487$)。国東市国東町のトルコギキョウ圃場で採集した北江A個体群では雄54.2%、雌25.0%、成虫全体では35.9%、北江B個体群では雄67.8%、雌51.3%、成虫全体では58.2%であり、両個体群のTSWV媒介率の間に5%水準で有意な差が認められた(Fisherの正確確率検定： $P<0.05$)。7個体群すべてのTSWV媒介率の間でも有意な差異が認められた(χ^2 適合度検定： $\chi^2=61.9367, P<0.01$)。

全個体群での雌雄あわせた平均媒介率は30.9%、最大値は光昌寺個体群の62.0%、最低値は藤渡個体群の15.6%であり、個体群間で媒介率に差異が認められたものの、TSWV発生履歴のある豊後大野市および竹田市と発生履歴のない国東市との個体群間差異は認められなかった。

アザミウマ雌雄間における媒介率を見ると、いずれ

第9表 ミカンキイロアザミウマ大分個体群のTSWV媒介能力

個体群名	項目	TSWV媒介虫率	
		n ^a	%
豊後大野市 大野町小倉木	雄	12	58.3
	雌	28	14.3
	合計	40	27.5
豊後大野市 大野町光昌寺	雄	19	73.7
	雌	31	54.8
	合計	50	62.0
竹田市 荻町北原	雄	38	26.3
	雌	34	11.7
	合計	72	19.4
竹田市 荻町高城	雄	36	22.2
	雌	47	12.8
	合計	83	16.9
竹田市 荻町藤渡	雄	26	19.2
	雌	25	12.0
	合計	51	15.6
国東市 国東町北江A	雄	24	54.2
	雌	40	25.0
	合計	64	35.9
国東市 国東町北江B	雄	28	67.8
	雌	39	51.3
	合計	67	58.2

^a アザミウマ検定数

も雌より雄のほうが高い媒介率を示しており、なかでも小倉木個体群および北江A個体群においては有意な差が認められた(Fisherの正確確率検定：それぞれ $P<0.01, P<0.05$)。

b ヒラズハナアザミウマ大分個体群のTSWV媒介能力

豊後大野市大野町のピーマン圃場で採集した光昌寺個体群のTSWV媒介虫率は、雄78.9%、雌44.4%、成虫全体では58.7%であった(第10表)。豊後大野市三重町のイチゴ圃場で採集した川辺個体群では、雄71.8%、雌58.8%、成虫全体で65.8%、同様にイチゴ圃場で採集した木立個体群では、雄61.4%、雌45.2%、成虫全体では54.7%であった。本県の個体群は、採集された植物の種にかかわらず総じて高い媒介率を示した。

雌雄あわせた平均媒介率は59.7% (54.7~65.8%)であり、ミカンキイロアザミウマのそれと比較しても総じて高い媒介率であったが、3個体群における媒介率の間に有意な差は認められなかった(χ^2 適合度検定： $\chi^2=1.922, P=0.3826$)。

雌雄間での媒介率を見ると、ミカンキイロアザミウマと同様にいずれも雌より雄で高い媒介率を示しており、光昌寺個体群では雌雄間で有意な差が認められた(Fisherの正確確率検定： $P<0.05$)。

第10表 ヒラズハナアザミウマ大分個体群のTSWV媒介能力

個体群名	項目	TSWV媒介虫率	
		n ^a	%
豊後大野市大野町 光昌寺	雄	19	78.9
	雌	27	44.4
	合計	46	58.7
豊後大野市 三重町川辺	雄	39	71.8
	雌	34	58.8
	合計	73	65.8
佐伯市 木立	雄	44	61.4
	雌	31	45.2
	合計	75	54.7

^a アザミウマ検定数

(3) 考察

Sakurai et al. (2002) は、日本全国から採集したミカンキイロアザミウマ9個体群のTSWV媒介虫率を調査し、雌雄あわせた成虫の平均値が19.0%、最大値29.2%、最小値6.1%であることを報告した。同一条件下で得られた本研究の結果と比較すると、竹田市荻町の3個体群は15.6~19.4%であり、全国の平均値と近い値であった。大分県で採集された全個体群の雌雄あわせた平均媒介率は33.6% (最大値：豊後大野市の光昌寺個体群62.0%、最低値：竹田市の荻町藤渡個体群15.6%)であり、個体群間によっては媒介率に大きな差異が認められた。Sakurai et al. (2002) の報告

による最大値は、宮城個体群の29.2%であったのに対して、豊後大野市および国東市の個体群のうち3個体群ではこの値を大きく超えており、大分県の個体群は総じて高い媒介能力を有していることが判明した。国東市では、TSWVの発生が認められていないにもかかわらず、このような高い媒介率を示す個体群が存在することから、地域によっては今後TSWVの発生動向に注意が必要と考えられる。

ヒラズハナアザミウマのTSWV媒介率は、Wijkamp et al. (1995) で31.8%、Inoue et al. (2004) で30.8%と報告されている。今回の試験において、豊後大野市大野町のピーマン圃場から採集した光昌寺個体群は雌雄合わせても58.7%であり、既報の数値と比較しても高い媒介率を示した。同様にイチゴから採集した個体群についても高い媒介率を示していたことから、本県では広い地域で高いTSWV媒介能力を有する個体群が生息していることが示唆された。ヒラズハナアザミウマは、5月以降ピーマンの花弁部や周辺雑草さらにはイチゴ、キュウリ、トマト、ナス、花き類等の農作物でごく普通に見られる。日本では、ミカンキイロアザミウマがTSWVの主要媒介種とみなされている。しかし、本県個体群が総じてこのような高い媒介能力を有していることを考慮すると、本種もTSWVの蔓延に関与している可能性が考えられる。

供試したミカンキイロアザミウマおよびヒラズハナアザミウマ個体群は、いずれも雌より雄で高いTSWV媒介虫率を示した。ミカンキイロアザミウマにおけるTSWV媒介虫率の雌雄間差は、Sakurai et al. (1998) やvan de Wetering et al. (1998) によって報告されている。この傾向は、今回示唆されたようにヒラズハナアザミウマにも該当すると考えられる。したがって、TSWVおよび媒介アザミウマ種の発生動態を把握し効果的な防除対策を講じるためには、これらの種について雌雄別に調査する必要がある。Higgins and Myers (1992) は、ミカンキイロアザミウマでは密度の低い時期に雄が多く、密度が増加するにつれて雌の割合が高くなることを報告している。ピーマン産地において、潜在的にTSWV媒介虫率が高い雄が多く発生する時期を特定することは防除上重要であると考えられる。

以上のことから、大分県に生息するミカンキイロアザミウマとヒラズハナアザミウマは総じて高いTSWV媒介能力を有しており、本産地で問題となっているTSWV病害の恒常的発生の一因となっていることが示唆された。さらにミカンキイロアザミウマでは、ピーマン由来のみならずTSWV未発生地域の個体群も高い媒介率であったこと、ヒラズハナアザミウマではTSWVに感染しないイチゴから採集した個体群も同様に高かったことから、作物種および地域を問わずこれらアザミウマ種

の徹底防除を推奨する必要がある。ただし、薬剤散布に過度に依存することなく、より効果的にTSWVの蔓延を阻止するためには、圃場レベルで両アザミウマ種の発生消長と媒介率の季節・年次変動を調査し、両種がウイルス伝染環にどのような役割を果たしているのかについて評価する必要がある。

2 ミカンキイロアザミウマによるTSWV獲得源としての雑草の評価

TSWVは接種試験の結果を含めると925種以上の植物で感染が確認されており (Peters, 1998)、圃場周辺に自生する数多くの雑草種からも本ウイルスが検出されている (小畠ら, 1984; 木村ら, 1997; 加藤・片山, 1998; 竹内, 2000; Chatzivassiliou and Boubourakas, 2001; Groves et al., 2001)。一方、ミカンキイロアザミウマの発生が確認されている雑草は、熊本県で16科27種 (行徳・横山, 1999)、静岡県で8科20種 (片山, 2006)、大分県ではII章で示したように10科19種 (Okazaki et al., 2007) と広範囲にわたる。

II章では、非作付け期にあたる冬期において、9科16種の周辺雑草でTSWVを保有したミカンキイロアザミウマの存在を確認した。さらに、この時期に圃場周辺に自生していたイヌホオズキ、ウシハコベ、オオイヌノフグリ、ハキダメギクおよびホトケノザの雑草5種からTSWVを検出した (Okazaki et al., 2007)。このことは、ミカンキイロアザミウマによるTSWVの獲得源として、雑草が重要であることを示唆している。しかしながら、これらの雑草が実際にTSWVの獲得源となり得るのかについての情報はわずかである (Hobbs and Black, 1993; Groves et al., 2001)。そこで、本研究では、日本における代表的な雑草11種を供試して、ミカンキイロアザミウマによるTSWVの獲得と媒介について調査した。

(1) 材料および方法

a 供試虫

ミカンキイロアザミウマは、2004年2月23日に大分県豊後大野市のピーマン圃場で採集した。この個体群からTSWV媒介率が雌雄とも90%以上になるように選抜した系統 (櫻井, 2006) を試験に用いた。この系統を、村井・石井 (1982) の方法に従い、25±1℃、16L8Dの条件下において、成虫にはチャおよびナゼンカの花粉、幼虫にはソラマメ催芽種子を与えて飼育したものを供試した。

b 供試ウイルス株

TSWVは、2000年に福岡県で自然感染していたパプリカ葉から分離したTSWV-FoPaTs 1株 (石井ら, 2003)

を使用した。なお、本株はヌクレオカプシドタンパク質のアミノ酸および塩基配列の相同性から、国内の様々な作物に発生したTSWVと遺伝的に近縁であると推定されている(奥田ら、2001)。

c 供試雑草

第11表にミカンキイロアザミウマの寄生が確認されている雑草のうち、自然条件あるいは人工接種によってTSWVの感染が認められているものを示した。このうち、国内において自然条件あるいは人工接種によってTSWVの感染が認められている雑草9種を供試した。すなわち、キク科のハキダメギク *Galinsoga ciliata* (第1表)、アブラナ科のナズナ *Capsella bursa-pastoris* (竹内、2000)、ナデシコ科のオランダミミナグサ *Cerastium glomeratum* (竹内、2000)、ウシハコベ *Stellaria aquatica* (第1表)、コハコベ *Stellaria media* (木村ら、1997; 竹内、2000)、シソ科のホトケノザ *Lamium amplexicaule* (第1表)、タデ科のギンギン *Rumex japonicus* (加藤・片山、1998)、ゴマノハグサ科のオオイヌノフグリ *Veronica persica* (竹内、2000)、ナス科のイヌホオズキ *Solanum nigrum* (木村ら、1997)である。さらに、TSWV感染の報告はないものの、大分県のピーマン圃場周辺に多く自生しているナデシコ科のミドリハコベ *Stellaria neglecta* およびマメ科のカラスノエンドウ *Vicia angustifolia* の2種についても同様に調査を行った。ミドリハコベは大分県豊後大野市で採集した種子を、その他の雑草については中

央農業総合研究センターで保存されている種子を用いた。

d 雑草へのTSWV接種

雑草の種子を直径9cmのビニールポットに播種し、25±1℃、16L8D条件下の恒温室において21～35日間育成した。その後、TSWVに感染した *Nicotiana benthamiana* を1%メルカプトエタノールを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)中で磨砕して粗汁液を作成し、カーボランダムを用いて各雑草の葉に汁液接種した。接種7～21日後に、TSWV用簡易RIPA(STX 39300, Agdia社, U.S.A.)によりTSWV感染の有無を判定した。上記の汁液接種で感染しなかった雑草種については、TSWVを獲得させたミカンキイロアザミウマの雄成虫5頭を直径35mmの組織培養用ディッシュ(code 3000-035, イワキ(株))に雑草葉とともに封入し、48時間摂食させることで虫媒接種を行い、上記と同様に簡易RIPAで感染の有無を判定した。

e アザミウマによるTSWVの獲得および媒介

ミカンキイロアザミウマの卵は、村井・石井(1982)の方法に準じ、薄膜フィルム(パラフィルム、Pechiney Plastic Packing社, U.S.A.)を通して水中に産卵させ濾紙(直径55mm、保留粒子径5～6μm)上に回収した。濾紙を直径9cmのガラスシャーレに入れ、上部を薄膜フィルムで覆い、25±1℃、16L8Dの条件下で4日間静置し、アザミウマ1齢幼虫を得た。

第11表 国内においてTSWVの感染報告のある雑草種

科	雑草種	接種様式	引用文献
キク	ヨモギ <i>Artemisia princeps</i>	自然感染	吉松ら; 1999, 竹内; 2000
	コセンダングサ <i>Bidens pilosa</i>	自然感染	加藤・片山, 1998
	オオアレチノギク <i>Conyza sumatrensis</i>	汁液接種, 自然感染	竹内, 2000
	ヒメジョオン <i>Erigeron annuus</i>	自然感染	吉松ら, 1999
	ハキダメギク <i>Galinsoga ciliata</i>	自然感染	吉松ら; 1999, Okazaki et al.; 2007
	チチコグサモドキ <i>Gnaphalium pensylvanicum</i>	汁液接種, 自然感染	木村ら; 1997, 竹内; 2000
	ノボロギク <i>Senecio vulgaris</i>	自然感染	竹内, 2000
	セイタカアワダチソウ <i>Solidago altissima</i>	自然感染	木村ら; 1997, 加藤・片山; 1998
	オニノゲシ <i>Sonchus asper</i>	汁液接種	竹内, 2000
	ノゲシ <i>Sonchus oleraceus</i>	汁液接種, 自然感染	小島ら; 1984, 加藤・片山; 1998, 竹内; 2000
	セイヨウタンポポ <i>Taraxacum officinale</i>	自然感染	加藤・片山, 1998
	オニタビラコ <i>Youngia japonica</i>	自然感染	小島ら; 1984, 竹内; 2000
	アブラナ	カラシナ <i>Brassica juncea</i>	自然感染
ナズナ <i>Capsella bursa-pastoris</i>		自然感染	竹内, 2000
ナデシコ	オランダミミナグサ <i>Cerastium glomeratum</i>	汁液接種, 自然感染	竹内, 2000
	ウシハコベ <i>Stellaria aquatica</i>	自然感染	Okazaki et al., 2007
	コハコベ <i>Stellaria media</i>	自然感染	木村ら; 1997, 竹内; 2000
アカザ	シロザ <i>Chenopodium album</i>	自然感染	木村ら; 1997
	マメ	クズ <i>Pueraria lobata</i>	自然感染
シソ	シロツメクサ <i>Trifolium repens</i>	自然感染	木村ら; 1997
	ホトケノザ <i>Lamium amplexicaule</i>	自然感染	Okazaki et al., 2007
タデ	ギンギン <i>Rumex japonicus</i>	自然感染	加藤・片山, 1998
	スベリヒユ	スベリヒユ <i>Portulaca oleracea</i>	自然感染
アカネ	ヘクソカズラ <i>Paederia scandens</i>	自然感染	木村ら; 1997
	ゴマノハグサ	オオイヌノフグリ <i>Veronica persica</i>	汁液接種, 自然感染
ナス	イヌホオズキ <i>Solanum nigrum</i>	自然感染	木村ら; 1997, Okazaki et al.; 2007

幼虫には簡易RIPAでTSWV感染が確認された雑草8種(第12表)の感染葉を24時間摂食させた。その後、ソラマメ催芽種子を餌として25±1℃、16L8Dの条件下で成虫まで飼育し、以下の実験に用いた。なお、摂食用の感染葉は、各雑草葉の形状に応じて、1.5~3.0cm角とした。

TSWV獲得の検定は、次のようにして行った。後に述べる媒介試験で用いた羽化6日後の成虫を1頭ずつ0.5mlマイクロチューブに移し、-80℃で保管した。その後、ポリビニルピロリドン2%とBSA0.2%を加えたPBST緩衝液(0.8% NaCl, 0.02% KH₂PO₄, 0.29% Na₂HPO₄·12H₂O, 0.02% KCl, 0.05% Tween20, pH 7.4)100μl中で磨潰し、抗TSWV抗体(SRA 39300, Agdia社, U.S.A)を用いたDAS-ELISAによりTSWVを検出した。ネガティブコントロールとして、ソラマメ催芽種子のみで累代飼育した成虫を用いた。吸光度は専用の測定装置(Immunoreader NJ-2001, Inter Med社, デンマーク)を用い、健全虫の3倍以上の吸光度(A₄₀₅)を示す個体を陽性と判定した。

TSWV媒介の試験は、ペチュニアリーフディスク法(Wijkamp and Peters, 1993; 櫻井, 2004; 櫻井, 2006)によって行った。試験には羽化4, 5日後の成虫を用いた。ペチュニアの品種は「Baccarat Blue」(サカタのタネ)を用い、開花前の株から十分に展開した若い葉を採取して直径6mmのリーフディスクを作成した。羽化4日後のアザミウマ成虫1頭をリーフディスクとともに2mlのマイクロチューブ内に入れ、24時間後にリーフディスクのみを取り出し、蒸留水を注入した直径1.0mmの48穴マイクロプレート(code 1830-048, イワキ(株))に浮かべた。羽化5日後にも同じチューブに新たなリーフディスクを入れ、同様に24時間後にマイクロプレートに浮かべた。いずれかの

リーフディスクにおいて48時間後に黒褐色のえそ斑点が形成された場合、TSWV媒介虫と判定した。えそ斑点が不明瞭なリーフディスクは、前述の簡易RIPAにより感染の有無を判定した。上記のTSWVの獲得試験および媒介試験は、いずれも各雑草種で20~48個体を供試し、2反復で行った。データの統計解析は、雑草種間の違いについてχ²適合度検定で行った。

(2) 結果

a 雑草のTSWV感染性

供試した11種の雑草うち、ナズナ、ウシハコベおよびギシギシは汁液および虫媒接種いずれにおいてもTSWVに感染しなかった。残りの8種の雑草では第12表に示した病徴が観察された。オランダミミナグサ、コハコベおよびイヌホオズキは汁液接種によって全身感染したのに対し、ハキダメギク、ミドリハコベおよびオオイヌノフグリは汁液接種では感染せず、虫媒接種した場合のみ全身感染した(写真6)。また、カラスノエンドウおよびホトケノザはいずれも虫媒接種により、接種葉のみで局部感染が確認された。各雑草の病徴については、汁液接種したオランダミミナグサ、コハコベおよびイヌホオズキ、虫媒接種したハキダメギクで、上位葉に黄化、退緑、わい化などの症状が認められ、虫媒接種したミドリハコベ、カラスノエンドウ、ホトケノザおよびオオイヌノフグリでは、えそ斑点もしくはえそ症状が接種葉もしくは上位葉に局部的に観察された。

b 感染雑草からのTSWV獲得率および媒介率

ミカンキイロアザミウマ成虫による感染雑草葉からのTSWV獲得率および媒介率は、オランダミミナグサを摂食させた場合が最も高く、それぞれ85.4%、

第12表 TSWVを接種した11種雑草の病徴

科	雑草種	接種	病徴 ^a (接種葉/展開葉)
キク	ハキダメギク <i>Galinsoga ciliata</i>	虫媒	ChI/ChI,Y
アブラナ	ナズナ <i>Capsella bursa-pastoris</i>	虫媒	-/- ^b
ナデシコ	オランダミミナグサ <i>Cerastium glomeratum</i>	汁液	ChI/CS,Y
	ウシハコベ <i>Stellaria aquatica</i>	虫媒	-/-
	コハコベ <i>Stellaria media</i>	汁液	ChI/ChI
	ミドリハコベ <i>Stellaria neglecta</i>	虫媒	-/NS
マメ	カラスノエンドウ <i>Vicia angustifolia</i>	虫媒	RSn/-
シソ	ホトケノザ <i>Lamium amplexicaule</i>	虫媒	LLn,Y/-
タデ	ギシギシ <i>Rumex japonicus</i>	虫媒	-/-
ゴマノハグサ	オオイヌノフグリ <i>Veronica persica</i>	虫媒	N/N,RSn
ナス	イヌホオズキ <i>Solanum nigrum</i>	汁液	RSc/N,S,u,Y

^a ChI: 退緑, CS: 退緑斑点, LLn: えそ斑点(局部病斑), N: えそ, NS: えそ斑点, RSc: 退緑輪点, RSn: えそ輪点, Stu: わい化, Y: 黄化。
^b - (バー) は、感染しなかったことを示す。

76.4%であった(第13表)。同様に、コハコベおよびイヌホオズキをTSWV獲得源とした場合も高い割合で本ウイルスを獲得し媒介した。一方、ミドリハコベからのTSWV獲得率および媒介率は0%であり、カラスノエンドウ、ホトケノザおよびオオイヌノフグリにおいてもTSWV獲得率および媒介率は10%未満であった。ハキダメギクはそれらの中間的な値(獲得率: 35.6%、媒介率: 29.9%)を示した。TSWV獲得率および媒介率は、8種の雑草種間でともに有意な差が検出された(獲得率: $\chi^2=317.936$, $P<0.0001$, 媒介率: $\chi^2=257.214$, $P<0.0001$)。なお、データを示さなかったが、雑草8種におけるTSWVの獲得率および媒介率は雌雄間で差異が認められなかった(獲得率: $\chi^2=2.3198$, $P=0.1277$, 媒介率: $\chi^2=0.0242$, $P=0.8765$)。

(3) 考察

TSWVをはじめとするトスポウイルスを媒介するアザミウマ類にとって、雑草は重要な越冬場所であると同時にウイルスの獲得源になっていることが示唆されている(Cho et al., 1995; Groves et al., 2001)。Groves et al. (2001)は、TSWVに感染したコハコベから採集したミカンキイロアザミウマと*Frankliniella fusca* (Hinds)が、ペチュニアリーフディスク法(Wijkamp and Peters, 1993)によって本ウイルスを媒介したと報告している。

TSWVの主たる媒介種であるミカンキイロアザミウマは寄主範囲が極めて広く(村井, 1991)、数多くの雑草種で冬期に生息が確認され、幼虫の増殖も認められている(Stewart et al., 1989; 片山, 2006)。さらに、春先では冬期間に生殖休眠するヒラズハナアザミウマより早く発育する(片山, 2006)ため、4~6月に開花する雑草の花では本種の高い寄生密度が認められる(行徳・横山, 1999; 片山, 2006)。このことから、この時期の雑草はミカンキイロアザミウマの増

殖源として重要と考えられる。

今回供試した雑草11種のうち、オランダミミナグサ、コハコベおよびイヌホオズキの3種では、ミカンキイロアザミウマのTSWV獲得率と媒介率が特に高かった(いずれも獲得率70%以上、媒介率60%以上)ことから、これらの雑草種はミカンキイロアザミウマにとって効率的なTSWV獲得源であり、TSWV伝染環において重要な役割を果たしていると考えられる。また、ハキダメギクにおけるTSWVの獲得率と媒介率も約30%であったことから、TSWVの獲得源として注意すべき雑草種と考えられる。一方、ホトケノザ、オオイヌノフグリおよびカラスノエンドウでは獲得率と媒介率は低く(いずれも10%未満)、今後さらに調べる必要があるが、TSWVの伝染環における重要度は低いかもしれない。ミドリハコベでは、オランダミミナグサやコハコベと同じナデシコ科であるにもかかわらず、TSWVの獲得は認められなかった。

TSWVの獲得率が高かった雑草種では黄化、退緑およびわい化といった全身症状が発現したのに対して、TSWV獲得率が低かった雑草種ではえそ、えそ輪紋およびえそ斑点のような局所的な病徴のみが観察された。全身症状が発現した雑草種では宿主内のウイルス濃度が高かった可能性があることから、雑草内におけるウイルスの濃度さらには局在がアザミウマの獲得率にどの程度影響するのか調査する必要がある。今後は各雑草種における摂食量や生存率等についても詳細な調査が必要である。

TSWVの蔓延防止策としてこれまでに、感染株の持ち込み防止(花田, 1999)、II章で述べた罹病残渣の除去、アザミウマ類と周辺雑草の防除(片山, 2006)が奨励されており、なかでも片山(2006)はミカンキイロアザミウマの越冬場所となる周辺雑草の管理が重要であると指摘している。本研究において、日本で広く見られる雑草の中に、TSWV獲得源として重要な雑草が数

第13表 各雑草種からのミカンキイロアザミウマTSWV高媒介系統によるTSWV獲得および媒介率

科	雑草種	接種葉 (摂食部位)	TSWV獲得率 ^a (%)	TSWV媒介率 ^a (%)
キク	ハキダメギク <i>Galinsoga ciliata</i>	展開葉	35.6 (87) ^b	29.9 (87) ^b
ナデシコ	オランダミミナグサ <i>Cerastium glomeratum</i>	展開葉	85.4 (89)	76.4 (89)
	コハコベ <i>Stellaria media</i>	展開葉	72.6 (62)	61.3 (62)
	ミドリハコベ <i>Stellaria neglecta</i>	展開葉	0 (64)	0 (64)
マメ	カラスノエンドウ <i>Vicia angustifolia</i>	接種葉	3.4 (89)	3.2 (95)
シソ	ホトケノザ <i>Lamium amplexicaule</i>	接種葉	6.8 (44)	6.8 (44)
ゴマノハグサ	オオイヌノフグリ <i>Veronica persica</i>	展開葉	1.2 (84)	1.2 (84)
ナス	イヌホオズキ <i>Solanum nigrum</i>	展開葉	73.6 (87)	60.9 (87)

^a 8種の雑草間において、TSWV獲得率および媒介率はいずれも有意差が認められた(χ^2 test, $P<0.0001$)。

^b 括弧内の数値は、検定したアザミウマ個体数。

種確認されたことから、雑草防除がTSWVによる被害を抑制するうえで有効な手段のひとつと考えられる。

3 宿主内のTSWV量とミカンキイロアザミウマによる獲得の関係

TSWVを保毒したミカンキイロアザミウマの出現頻度は、ウイルスを獲得できる1齢幼虫期から初期の2齢幼虫期と限られた期間において、どの程度TSWV感染植物を摂食したか、すなわちTSWV粒子を体内に取り込んだ量に依存すると考えられている(Wijkamp and Peter, 1993)。しかしながら、植物体内のウイルス量がアザミウマのウイルス獲得頻度にどのように影響するかについては、十分に調査されていない。

本研究では、TSWVに感染した植物を用いて様々なウイルス濃度でのミカンキイロアザミウマによる獲得頻度について検証し、これら両者の関係を明らかにした。

(1) 材料及び方法

a 供試アザミウマ

ミカンキイロアザミウマは、2004年2月23日に大分県豊後大野市小倉木のピーマン圃場で採集した。この個体群はIII章の1節で述べたように、大分県の個体群の中で最も高いTSWV媒介率を示したものである。この個体群からTSWV媒介率が雌雄とも90%以上になるように選抜した系統(櫻井, 2006)を本研究に用いた。この系統を、村井・石井(1982)の方法に従い、25±1°C、16L8Dの条件下において、成虫にはチャおよびサザンカの花弁、幼虫にはソラマメ催芽種子を与えて飼育したものを供試した。

b 供試ウイルス株

供試したTSWV株は、2000年に福岡県で自然感染していたパブリカ葉から分離したTSWV-FoPaTs 1株(石井ら, 2003)を使用した。なお、本株はヌクレオカプシドタンパク質のアミノ酸および塩基配列の相同性から、国内の様々な作物に発生したTSWVと遺伝的に近縁であると推定されている(奥田ら, 2001)。

c ミカンキイロアザミウマ虫体と植物葉でのTSWV定量

試験にはまずTSWVを播種14~30日程度経過したダチュラ *Datura stramonium* を用いた。ダチュラ葉にはTSWVに感染した *Nicotiana benthamiana* を1%メルカプトエタノールを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)中で磨砕して粗汁液を汁液接種した。その後25±1°C、16L8D条件の人工気象室内で4~10日間経過させた。ダチュラは、接種経過日数、採集部位等を変えることでTSWV感染程度の異なる葉を準備し、それぞ

れの感染葉を3cm角に切り取った(第2図)。その葉から直径6mmのリーフディスクを生研トレパン(BP-60F, カイイングストリーズ(株))で葉の4カ所から抜き取り、リーフディスク1枚をDAS-ELISA用に、3枚を定量RT-PCRの分析用に供試した。

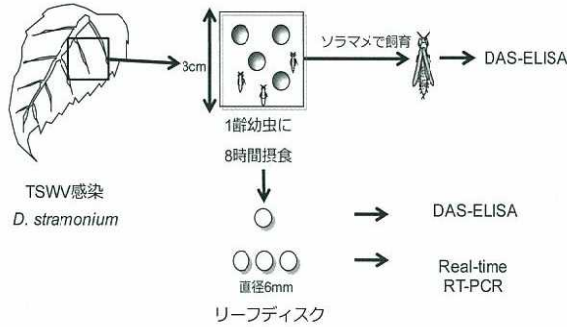
ミカンキイロアザミウマ卵は濾紙(直径55mm、保留粒子径5~6μm)で漉し、その濾紙を直径9cmのガラスシャーレに入れ、上部を薄膜フィルムで覆い、25±1°C、16L8Dの条件下で4日間静置し、アザミウマ1齢幼虫を得た。1齢幼虫にはそれぞれリーフディスクを抜き取った残りのダチュラ感染葉を8時間摂食させ、その後成虫になるまで健全なソラマメ催芽種子を餌に飼育した。

ミカンキイロアザミウマによるTSWV獲得の検定は、抗TSWV抗体(SRA 39300, Agdia社, U.S.A)を用いたDAS-ELISAによって行い、羽化数日内の成虫を1頭ずつ0.5mlマイクロチューブに移し-80°Cで保管したものを供試した。サンプルはポリビニルピロリドン2%とBSA0.2%を加えたPBST緩衝液(0.8% NaCl, 0.02% KH₂PO₄, 0.29% Na₂HPO₄·12H₂O, 0.02% KCl, 0.05% Tween20, pH 7.4)100μl中で磨潰し、ネガティブコントロールとして、ソラマメ催芽種子のみで累代飼育した成虫を用いた。吸光度は専用の測定装置(Immunoreader NJ-2001, Inter Med社、デンマーク)を用い、健全虫の3倍以上の吸光度(A₄₀₅)を示す個体を陽性と判定した。

各1葉からの獲得試験につき36個体のアザミウマ成虫を検定し、ELISA吸光度値は健全虫のネガティブコントロール値を差し引いたものとした。吸光度値は、健全虫の値と比較して3倍以上を陽性とし、その個体はTSWV保毒虫と見なした。保毒虫率は摂食させた各感染葉で算出し、うち1枚のリーフディスクをPBST緩衝液500μl中で磨潰し、DAS-ELISA検定に用いた(第2図)。

TSWVの総RNA量は、ミカンキイロアザミウマに摂食させたダチュラ感染葉から削り抜いたリーフディスク3枚からISOGEN(株ニッポンジーン)中で抽出し、最終的なRNA溶液量は50μlに調整した。定量RT-PCR(以下qRT-PCR)は、TSWVヌクレオカプシド遺伝領域350-bp断片を増幅させるプライマーLC-TSWV-N3'(5' AAACGACTGCCGAATAC^{3'}), LC-TSWV-N5'(5' GTGGCTCCAATCCTGT^{3'})により、SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II(タカラバイオ(株))とLight Cycler(Roche Applied Science社, U.S.A)を用いて実施した。反応条件は、逆転写反応42°C 5分間の後、94°C 5秒間、60°C 10秒間、72°C 15秒間を1サイクルとするPCRを50サイクル実施し、各サイクルの最終段階でSYBR Green Iの蛍光強度(波長497nm)を計測した。反応後、機器に付属の解析ソフトウェア(LightCycler

Software Ver. 3 (Roche Applied Science社)) を用いて増幅曲線を解析し、second derivative maximum法により閾値サイクル (Ct値) を算出した。TSWVヌクレオカプシド (43ng/ μ l) (河野敏郎博士より分譲) から抽出したRNAを連続希釈し、検量線を作成して得られたCt値から葉片中のヌクレオカプシドを推定した。

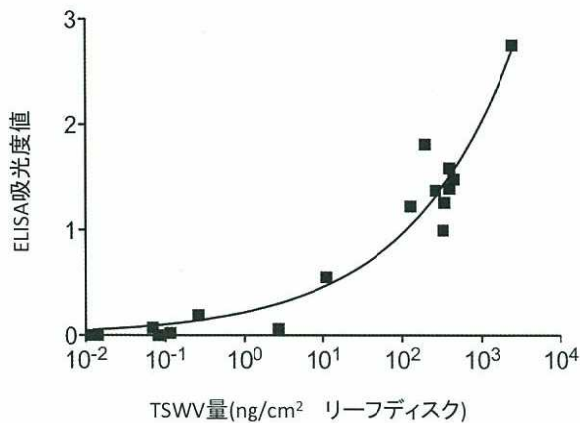


第2図 TSWV感染ダチュラ *Datura stramonium* 葉のミカンキイロアザミウマへの摂食およびアザミウマ虫体内からのウイルス検出の概要図

(2) 結果

a ダチュラ *Datura stramonium* 内のTSWV定量化

TSWVに感染したダチュラ (*Datura. Stramonium*) 葉のELISA吸光度値は、0.01~2.755 (Abs) で平均値 1.042 ± 0.6408 (S.D.) であった。TSWVヌクレオカプシドから抽出したRNAの連続希釈を用いてリアルタイムPCRを行った結果、希釈倍率とCt値の間で高い相関が得られた ($r^2=0.95$)。これにより、TSWVに感染したダチュラ葉中のヌクレオカプシド濃度を推定した。なお、TSWV感染ダチュラ葉のCt値はすべてTSWVヌクレオカプシドから抽出したRNAの希釈範囲であった。TSWV感染ダチュラリーフディスク葉中のTSWVヌクレオカプシ



第3図 TSWV感染ダチュラ *Datura stramonium* 葉のELISA吸光度とTSWVヌクレオカプシド濃度との関係

- a 対数回帰 $y = -0.3183 + 0.3355 \log(x)$
- b X軸はELISA吸光度値、Y軸はTSWV相対量を示す。
- c TSWVヌクレオカプシドタンパク質総量は、標準的なヌクレオカプシド精製を行なうqRT-PCRにより積算した。

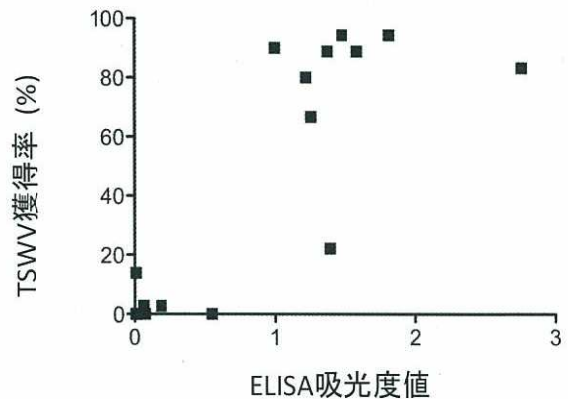
ドタンパク質最大値は 2.47×10^3 ng/cm² 葉であり、最小値は 1.39×10^{-2} ng/cm² 葉であった。また、同一のリーフディスクから検出されたELISA吸光度値とqRT-PCR値は対数係数的に相関が認められた。

b ミカンキイロアザミウマによるTSWV獲得頻度

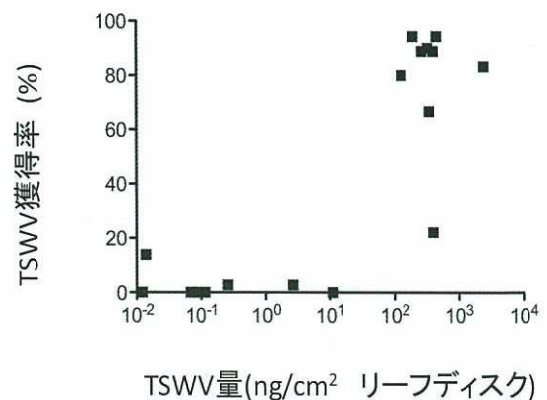
アザミウマ保毒虫率は0~94.4%であり、ELISA吸光度値およびqRT-PCR値が高くなるに従って保毒虫率も高くなっていく傾向を示した。

保毒虫率は、食餌させたダチュラ葉片のELISA吸光度値が1.0Abs以上となった場合にほぼ最大値となった(第4図)。同様に、qRT-PCRによる葉片中のTSWVヌクレオカプシドタンパク質が 1.29×10^2 ng/cm² 以上の値となった場合においても、保毒虫率は急激に高くなる傾向を示した。一方で、ELISA吸光度値が0.01以下もしくはqRT-PCR値が0となった場合、保毒した個体は認められなかった。

A



B



第4図 ミカンキイロアザミウマによるTSWV獲得率とTSWV感染ダチュラ葉中のELISA吸光度値 (A) およびqRT-PCRに基づくTSWVヌクレオカプシドタンパク濃度 (B) との関係

- a TSWVヌクレオカプシドタンパク質総量は、第9図と同様の手法で推測した。

(3) 考 察

ミカンキイロアザミウマは1齢幼虫期から初期の2齢幼虫期間のみTSWVを獲得することができる(Ullman et al., 1992)。保毒虫になる確率は、1齢幼虫期間中でのTSWV粒子の摂食量と密接に関係しているが、その他いくつかの要因がウイルス獲得率に影響していると考えられる(Whitfield et al., 2005)。ウイルス獲得可能期間Acquired accession period(以下AAP)は、これまでにTSWVの獲得能力を評価する目的で調査されてきた。Wijkamp et al. (1996)によると、ミカンキイロアザミウマの最大AAPは、1齢幼虫が十分に感染した葉を摂食した場合に1280分とされている。これと同様に、植物体内中のTSWV総量もまたウイルス獲得頻度に影響していると考えられた。このことから本研究では、ミカンキイロアザミウマのTSWV獲得頻度と植物体内中のTSWV量との関係について調査を行った。TSWVの獲得に用いたダチュラ葉中のTSWV量は、DAS-ELISAおよびqRT-PCRによる二つの手法を用いて測定した。ELISAによる吸光度値は、qRT-PCRによるTSWVのRNA量と対数的に相関が認められたが、植物体内のTSWV量を計測する際には、より広い範囲でウイルス相対量を測定できるqRT-PCRが妥当と考えられる。

ミカンキイロアザミウマによって摂食されたTSWV粒子は、まず中腸細胞壁に定着し、その後ウイルスは筋肉細胞と血体腔へと分散し、最終的に唾液腺に到達する(van de Wetering et al., 1995)。ウイルス感染に対する中腸バリアは、2齢幼虫期および成虫期には発達しており、この時期以降は感染葉を摂食してもウイルスを獲得できない(Nagata et al., 1999; Moritz et al., 2004)。本研究において、摂食させた葉中のTSWV量がある一定の値を超えた場合において、その保毒虫率は90%以上と獲得能力のほぼ上限まで達した。一方で、TSWV量が一定量以下の値を示した場合では、保毒虫になる個体はごくわずかであった。これらの結果は、ある一定量以上のTSWV粒子を摂食したミカンキイロアザミウマは確実に保毒虫になることを意味している。保毒虫になるためには、一定量以上のTSWV粒子の取り込みにより中腸バリアを超えることが必要と考えられる。このミカンキイロアザミウマ虫体内におけるTSWV増殖と蓄積のメカニズムに関しては、今後とも調査する必要があるだろう。