

ダリアから分離したジャガイモやせいもウイルス（Potato spindle tuber viroid）のジャガイモに対する病原性及びダリアにおける伝染性

誌名	植物防疫所調査研究報告
ISSN	03870707
著者名	藤原, 裕治 野村, 幸弘 樋渡, 正一 志岐, 悠介 一斗, 東子 浜中, 大輝 齊藤, 範彦
発行元	横浜植物防疫所
巻/号	49号
掲載ページ	p. 41-46
発行年月	2013年3月

ダリアから分離したジャガイモやせいもウイルス (*Potato spindle tuber viroid*) の ジャガイモに対する病原性及びダリアにおける伝染性

藤原裕治・野村幸弘¹⁾・樋渡正一²⁾・志岐悠介³⁾・一斗東子⁴⁾・濱中大輝・齊藤範彦³⁾

横浜植物防疫所調査研究部

Pathogenicity of Potato of *Potato spindle tuber viroid* Isolated from Dahlia and Its Transmissibility in Dahlia. Yuji Fujiwara, Yukihiro Nomura¹⁾, Shoichi Hiwatashi²⁾, Yusuke Shiki³⁾, Touko Itto⁴⁾, Daiki Hamanaka and Norihiko Saito³⁾ (Research Division, Yokohama Plant Protection Station 1-16-10, Shinyamashita, Naka-ku, Yokohama 231-0801, Japan. ¹⁾Moji Plant protection Station, ²⁾Imari Branch, Moji Plant Protection Station, ³⁾Yokohama Plant Protection Station and ⁴⁾Tokyo Sub-Station, Yokohama Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* **49**: 41-46 (2013).

Abstract: *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) was first found in Japan in greenhouse tomato plants cultivated in Fukushima prefecture in 2008. As a result of intensive investigation, it ended as a temporary outbreak. But genetically unrelated PSTVd was newly detected in dahlia plants grown in Yamanashi prefecture in 2009 and 2010. A dahlia isolate of PSTVd was mechanically inoculated on potato plants and all inoculated plants were infected with PSTVd, but no symptoms appeared in the first season. However, growth of infected plants was reduced and tubers of infected plants were small, spindle-shaped, or elongated in the following season. The transmissibility of PSTVd in dahlia plants was then investigated and transmission from plant to plant via contaminated hands and pruning shears was confirmed. PSTVd-infected dahlia plant residues mixed with soil for more than three days did not become a source of infection.

Key words: *Potato spindle tuber viroid*

緒 言

ジャガイモやせいもウイルス (*Potato spindle tuber viroid*、以下「PSTVd」) は、ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) やトマト (*S. lycopersicum*) に感染し大きな被害を引き起こすことが知られ (Diener and Raymer, 1971; Puchta *et al.*, 1990)、我が国への侵入を警戒していたが、2008年8月、福島県いわき市の施設栽培トマトで初めて発生が確認された (Matsushita *et al.*, 2010)。綿密な調査の結果、周囲への感染拡大はなく、一時的発生で終息したが、2009年、山梨県内の花き栽培施設で栽培されたダリア (*Dahlia × hybrida*) 苗からPSTVdが検出された (Tsushima *et al.*, 2011)。2010年2月には横浜植物防疫所においても同施設で栽培中の外観健全なダリア苗がPSTVdに感染していることを確認した。福島県のトマトで発生したPSTVdの塩基配列は、Verhoeven *et al.* (2009) が報告した株 (Accession no.

EU862231) の配列と一致するが (Matsushita *et al.*, 2010)、ダリアで発生したPSTVd (accession no. AB623143; Tsushima *et al.*, 2011) の配列とは異っており、両者の発生に関連性はなかった。PSTVdのダリアでの感染確認は世界で初めてであることから、国内の植物病理学の専門家等による技術検討会が開催され、当該PSTVdのジャガイモに対する病原性を調査する必要があるとの意見が出された。このため、ジャガイモ苗にダリアから分離されたPSTVdを接種し、病原性の調査を実施した。また、PSTVdは汁液で伝染し、トマトにおいては管理中の作業で容易に接触伝染することが知られているが (Verhoeven *et al.*, 2004)、ダリアにおけるPSTVdの伝染性に関して、手や器具を介した接触伝染については不明であることから、調査を実施した。さらに、PSTVdが感染したダリアを土壌中に埋没した場合、その残渣が伝染源となり得るかについて調査を実施した。

¹⁾門司植物防疫所

²⁾門司植物防疫所伊万里出張所

³⁾横浜植物防疫所

⁴⁾横浜植物防疫所東京支所

E-mail: fujiwarayj@pps.maff.go.jp

材料及び方法

1. ジャガイモに対する病原性の調査

(1) 供試ウイルス

ダリア (品種: 古都) から分離した PSTVd をトマト (品種: Rutgers) で増殖し、病徴が現れた葉を接種源として用いた。

(2) 供試ジャガイモ

2010年、独立行政法人種苗管理センターから、ばれいしょ及びさとうきび調査用種苗配布規程第5条の規定に基づき、ウイルスフリーのジャガイモ10品種 (男爵薯、紅丸、トヨシロ、ホッカイコガネ、コナフブキ、さやか、とうや、メイクイン、ニシユタカ、デジマ) の塊茎 (ミニチューバー) の配布を受け、各品種6塊茎を10号及び12号の鉢に植え付けた。2011年は、2010年に収穫した塊茎を植え付け次代植物について調査を行った。

(3) 汁液接種及びPSTVd感染の有無の確認

汁液接種は、PSTVd感染トマト葉に緩衝液 (0.1% Na_2SO_3 加用0.05M PB pH7.1) を加えて磨砕し、本葉4~5葉期の葉にカーボランダムを用いた常法により行った。接種は各品種4株に行い、2株は対照区 (以下「健全株」) とした。接種した株及び健全株はガラス温室内で管理した。

PSTVd感染の有無の確認は、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法で行った。P3及びP4プライマー (Behjatnia *et al.*, 1996) を用い、QIAGEN社のOneStep RT-PCR Kitを使用した。試料からの核酸の調製は、ジャガイモの葉に昆虫針 (5号) を刺し、刺した針をPCR反応液に浸す簡易鋳型調製法で行った。RT-PCR反応は、50℃30分、95℃15分、(94℃30秒、62℃30秒、72℃1分) を40サイクル、72℃10分の条件で行った。

(4) 病原性の調査

RT-PCR法によりPSTVdの感染が確認されたジャガイモ (以下「感染株」) 及び健全株について、草丈の測定を行い、一部は、茎幅の測定も行った。生育中の地上部の病徴及び収穫した塊茎の病徴を調査すると共に、塊茎の重量の測定を行った。

2. ダリアにおけるPSTVdの伝染性の調査

(1) ダリア実生苗

市販の切花用ダリア種子 (ポンポンミックス: フランス産) を播種し、生育した苗の約4割について前述のRT-PCR法によりPSTVdの検定を行い (ただし、ダリアの葉に刺した昆虫針を緩衝液 (0.1M Tris-HCl) 50 μl を入れたマイクロチューブの中で約5秒間強く振動後、この液から1 μl を取り、RT-PCRの鋳型とした。以下、同じ。)、陰性を確認し調査に供した。

(2) 手を介した伝染

ダリア実生苗5株を供試し、最初にPSTVd感染ダリア苗 (品種: ラベンダージャイアンツ) の葉及び茎を素手で軽く擦り、次に実生苗の葉及び茎を軽く擦る操作を1つの苗について10回行った。苗はガラス温室内で管理し、RT-PCR法によりPSTVd感染の有無を調査した。

(3) 剪定鋏を介した伝染

ダリア実生苗5株を供試し、最初にPSTVd感染ダリア苗 (品種: ラベンダージャイアンツ) の葉柄及び茎の先端部を剪定鋏で切り、次に汁液が付着した刃の部分で実生苗の葉柄を切る操作を各株2~6回行った。苗はガラス温室内で管理し、RT-PCR法によりPSTVd感染の有無を調査した。

(4) 土壌中の残渣からの伝染

PSTVd感染ダリアの地上部及び地下部を数cm~10cmの大きさに切り、10号鉢の土壌に混入し、混入直後、3日後、10日後、21日後及び31日後にダリア実生苗各2株を植え付けた。苗はガラス温室で管理し、RT-PCR法によりPSTVd感染の有無を調査した。

結 果

1. ジャガイモに対する病原性の調査

(1) 感染当代植物の調査 (2010年)

汁液接種から1ヶ月以上経過後にRT-PCR法によりPSTVd感染の有無を調査した。その結果、10品種各4株すべての感染を確認した。その後、地上部について病徴の観察を行ったが、PSTVdの影響と考えられる病徴は認められなかった。また、草丈についても健全株との差は認められず、さらに、収穫した塊茎の形及び大きさにも差は無かった。

(2) 次代植物の調査 (2011年)

PSTVd感染株から収穫した塊茎を各品種3~4塊茎、対照として健全株から収穫した塊茎を各品種1~2塊茎植え付け、生育した次代植物について調査を行った。男爵薯、紅丸、トヨシロ、ホッカイコガネ、コナフブキ、さやかの6品種については、植え付けから62日後に株の草丈 (地上部の高さ) 及び茎の最も太い部分の幅を測定した。PSTVd感染株の対健全株比 (感染株の平均/健全株の平均) は、草丈では、男爵薯74.5%、紅丸63.1%、トヨシロ83.3%、ホッカイコガネ23.3%、コナフブキ95.8%、さやか76.6% (Table 1)、茎の太さでは、男爵薯80.5%、紅丸61.7%、トヨシロ73.8%、ホッカイコガネ35.9%、コナフブキ86.1%、さやか82.1% (Table 3) となり、品種によって差があるが、矮化や茎が細くなる影響が認められた (Fig. 1)。とうや、メイクイン、ニシユタカ、デジマの4品種については、出芽から60日後に草丈 (鉢底からの高さ) を測定した。PSTVd感染株の対健全株比 (同上) は、とうや57.4%、メイクイン90.4%、ニシユタカ84.7%、デジマ81.9%であった (Table 2)。これら10品種について、全生

Table 1: Influence of PSTVd on the height of potato plants.

Cultivar	Height of PSTVd infected plants (cm) (a)	Height of control plants (cm) (b)	(a) / (b) (%)
Irish Cobbler (Dansyakuimo)	97.0	130.3	74.5
Benimaru	88.7	140.5	63.1
Toyoshiro	106.7	128.0	83.3
Hokkaikogane	31.5	135.0	23.3
Konafubuki	125.0	130.5	95.8
Sayaka	100.3	131.0	76.6

The height of plant is the height of the above ground part of 62 days after planting.
(a): average of three plants, (b): average of two plants

Table 2: Influence of PSTVd on the height of potato plants.

Cultivar	Height of PSTVd infected plants (cm) (a)	Height of control plants (cm) (b)	(a) / (b) (%)
Touya	59.4	103.5	57.4
May Queen	66.9	74.0	90.4
Nishiyutaka	116.5	137.5	84.7
Dejima	136.0	166.0	81.9

The height of plants is the height from the bottom of the pot 60 days after germination.
(a): average of three or four plants, (b): average of one or two plants

Table 3: Influence of PSTVd on the width of stem of potato plants.

Cultivar	Width of stem of PSTVd infected plants (cm) (a)	Width of stem of control plants (cm) (b)	(a) / (b) (%)
Irish Cobbler (Dansyakuimo)	1.2	1.5	80.5
Benimaru	0.8	1.4	61.7
Toyoshiro	1.0	1.4	73.8
Hokkaikogane	0.5	1.3	35.9
Konafubuki	1.0	1.2	86.1
Sayaka	1.1	1.3	82.1

Width of the stem is the widest measurement in plants 62 days after planting.
(a): average of three plants, (b): average of two plants



Fig. 1: Growth of potato plants 78 days after planting.

Left: PSTVd infected plants, right: control plants

①: Irish Cobbler (Dansyakuimo), ②: Benimaru, ③: Toyoshiro, ④: Hokkaikogane, ⑤: Konafubuki, and ⑥: Sayaka

育期間に渡って病徴の観察を行ったが、茎頂部の小葉の内巻きや直立等の症状は観察されなかった。

収穫した塊茎の影響を調査した結果、男爵薯、紅丸、トヨシロ、ホッカイコガネ、コナフブキ、さやか及びニシユタカ

では塊茎が細くなる「やせいも」症状が確認された (Fig. 2)。また、男爵薯、紅丸、トヨシロ及びニシユタカでは、目が盛り上がり肥大した症状も確認された (Fig. 2①②③⑦)。一方、ホッカイコガネ (Fig. 2④)、デジマ及びとうやでは塊茎の形

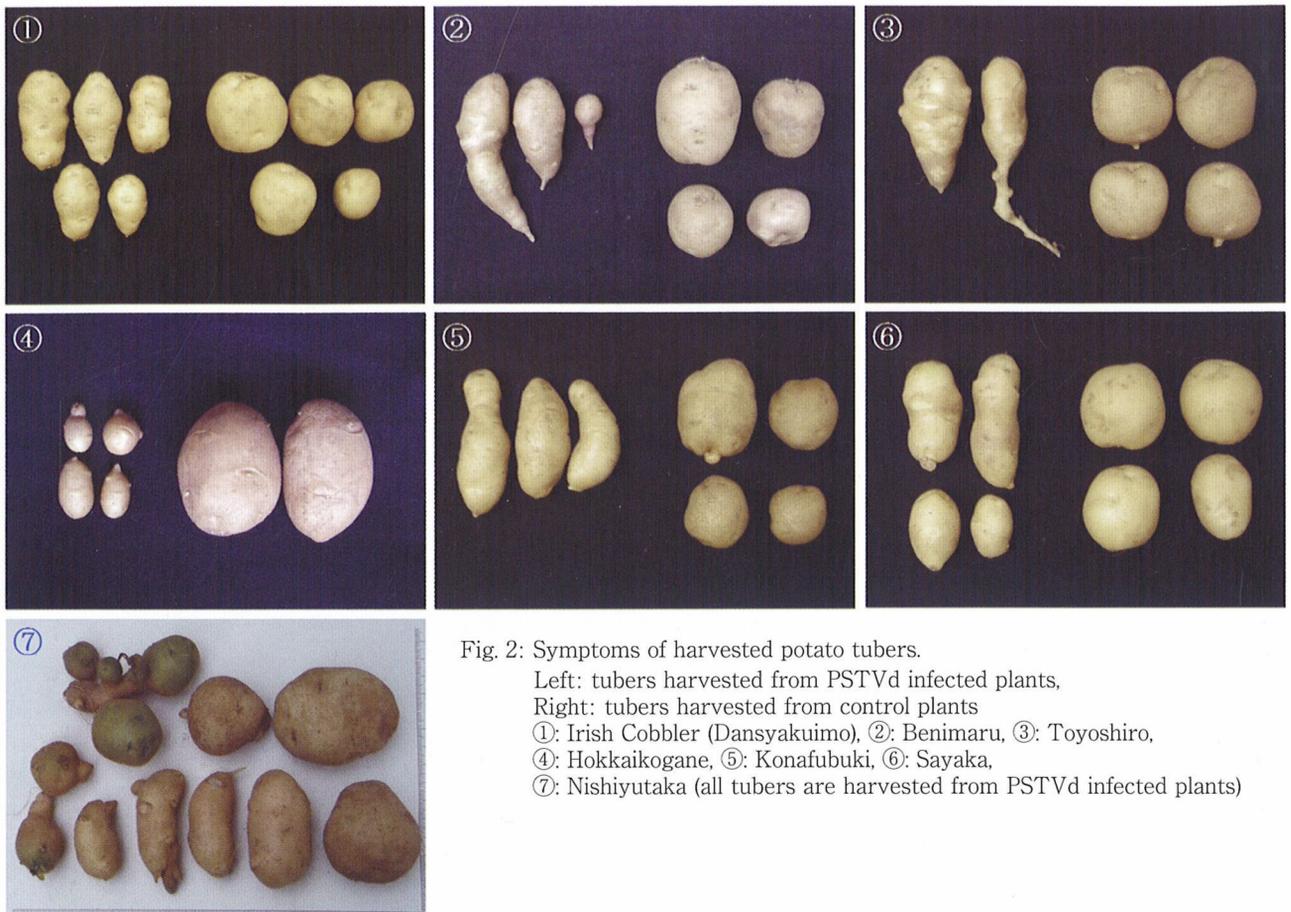


Fig. 2: Symptoms of harvested potato tubers.
 Left: tubers harvested from PSTVd infected plants,
 Right: tubers harvested from control plants
 ①: Irish Cobbler (Dansyakuimo), ②: Benimaru, ③: Toyoshiro,
 ④: Hokkaikogane, ⑤: Konafubuki, ⑥: Sayaka,
 ⑦: Nishiyutaka (all tubers are harvested from PSTVd infected plants)

Table 4: Influence of PSTVd on the yield of tubers.

Cultivar	Weight of tubers of PSTVd infected plants (cm) (a)	Weight of tubers of control plants (cm) (b)	(a) / (b) (%)
Irish Cobbler (Dansyakuimo)	290.0	525.0	55.2
Benimaru	120.0	500.0	24.0
Toyoshiro	356.7	500.0	71.3
Hokkaikogane	16.7	510.0	3.3
Konafubuki	306.7	410.0	74.8
Sayaka	310.0	475.0	65.3
Touya	46.8	302.0	15.5
May Queen	71.5	98.0	73.0
Nishiyutaka	253.3	322.5	78.5
Dejima	78.3	547.0	14.3

(a): average of three or four plants, (b): average of one or two plants

状に異常はなかったが、小形化した。1株当たりの塊茎の重量を測定した結果、PSTVd感染塊茎の対健全塊茎比は、男爵薯55.2%、紅丸24.0%、トヨシロ71.3%、ホッカイコガネ3.3%、コナフブキ74.8%、さやか65.3%、とうや15.5%、メークイン73.0%、ニシユタカ78.5%、デジマ14.3%となった (Table 4)。

2. ダリアにおける PSTVd の伝染性の調査

(1) 手を介した伝染

PSTVd感染ダリア苗を触り、次にダリア実生苗を触る操作を実施後、ガラス温室内で管理した苗について、112日後、154日後及び313日後にRT-PCR法により感染の有無を調査した。その結果、いずれの検定日においても供試した5株中2株でPSTVdの感染が確認された (Table 5)。

(2) 剪定鋏を介した伝染

PSTVd感染ダリア苗を剪定鋏で切り、次にダリア実生苗を切る操作を実施後、ガラス温室内で管理した苗について、

Table 5: Transmission from PSTVd-infected dahlias to dahlia seedlings via contaminated hands and pruning shears.

Examination	Results of RT-PCR		
	112 days ¹⁾	154days	313days
2 places cutting ²⁾	-	-	-
3 places cutting	-	-	-
4 places cutting	nt	+	+
5 places cutting	+	+	+
6 places cutting	-	-	-
Hands (1) ³⁾	-	-	-
Hands (2)	+	+	+
Hands (3)	+	+	+
Hands (4)	-	-	-
Hands (5)	-	-	-

¹⁾days after examination, ²⁾number of cuts with pruning shears.

³⁾seedling number nt : not tested, +: PSTVd positive, -: PSTVd negative



Fig. 3: Soil mixture of PSTVd-infected dahlia plants.
①: before mixture, ②: after mixture

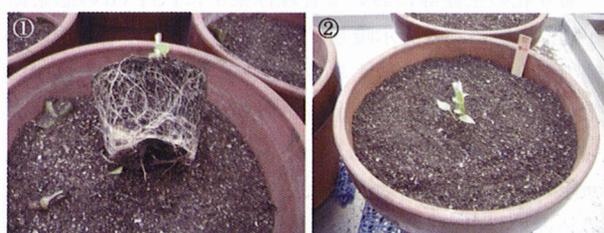


Fig. 4: Planting of dahlia seedling in soil.
①: before planting, ②: after planting

Table 6: Transmission from PSTVd-infected dahlia plant residues mixed in soil to dahlia seedlings.

Time to planting of dahlia seedlings	No. of seedlings	Results of RT-PCR		
		76 days ¹⁾	118 days	277 days
Immediate	2	0/2 ²⁾	0/2	1/2
3 days	2	0/2	0/2	0/2
10 days	2	0/2	0/2	0/2
21 days	2	0/2	0/2	0/2
31 days	2	0/2	0/2	0/2

¹⁾days after soil mixture of PSTVd infected dahlia plant residues

²⁾no. of PSTVd positive / no. of testing

手を介した伝染の調査と同じ日にRT-PCR法により感染の有無を調査した。その結果、112日後の検定では葉の採取ができた4株中1株（葉柄5か所を切った株）、154日後及び313日後の検定では供試した5株中2株（葉柄4か所及び5か所を切った株）でPSTVdの感染が確認された（Table 5）。

(3) 土壌中の残渣からの伝染

PSTVd感染ダリアの地上部及び地下部を土壌に混入し（Fig. 3）、根が十分に伸びたダリア実生苗（Fig. 4①）を混入直後、3日後、10日後、21日後及び31日後に各2株計10株植え付け（Fig. 4②）、最初の植え付けから76日後、118日後及び277日後に、RT-PCR法により感染の有無を調査した。その結果、最初の2回の検定では、PSTVd感染株は確認されなかったが、3回目の検定において、土壌混入直後に植え

付けた2株中1株でPSTVdの感染が確認された（Table 6）。

考 察

ダリアから検出されたPSTVdを国内で栽培されている代表的なジャガイモ10品種に汁液接種した。中原ら（1997）は、ドイツから導入したPSTVd-Iを北海道で栽培されているジャガイモ7品種に接種し、感染当代から病徴を現したことを報告している。一方、西尾ら（1980）は、カナダから導入したPSTVd-S及びPSTVd-Mを男爵薯に接種したが接種当代の症状は認められなかったとしている。本調査でもダリアから検出されたPSTVdは容易にジャガイモに感染したが、接種当代では症状は認められず、西尾らの結果と同じであった。しかし、次代植物では、品種によって差があるものの、10品種すべてで矮化症状が確認され、6品種では茎が細くなる

ことが確認された。また、塊茎では「やせいも」症状や小形化の症状が認められ、収量の減少も確認された。特に、男爵薯、紅丸、ホッコイコガネ、とうや及びデジマで影響が顕著であり、ダリアからこれらの品種に感染が拡大した場合、大きな被害が出ることが予想される。

現在、ダリアにおけるPSTVd感染の影響は明らかになっていないことから、ダリア生産者に対するPSTVdの防除指導においては説明が難しい状況にある。しかし、本調査の結果、ジャガイモへ感染が拡大した場合に大きな被害が出ることを予想されることから、本調査の結果はダリア生産者に対する防除指導を徹底する必要があることの根拠となるものと考えられる。

次に、ダリアにおけるPSTVdの伝染性については、手や鉢を介して伝染が起こることが確認された。このことは、ダリア切り花の生産等において管理作業中にPSTVdの感染拡大が起こり得ることを示唆しているものであり、手の洗浄や鉢等の消毒を適切に実施する必要があると考える。土壌中に混入したPSTVd感染組織からの伝染について、Seigner *et al.* (2008) は、PSTVd 感染 ツルハナナス (*Solanum jasminoides*) の葉の一部1gをトマトが生育する鉢に慎重に埋め込み、4週間後及び8週間後のRT-PCR検定で感染は確認されなかったことを報告し、土壌中に混入した植物残渣が主な感染源とならないことを示しているが、根が傷ついた場合は違うかもしれないとしている。今回の調査では、最初に土壌中にPSTVd感染ダリア組織を混入し、その中に4号鉢で育成し、根が十分に生長したダリア実生苗を鉢から抜き、植え込んだ。検定の結果、PSTVd感染ダリア組織を混入した直後に植え付けたダリア2株中1株が、118日後までの検定では陰性であったが、277日後の検定で陽性となった。これは、苗を鉢から抜き取る際又は土壌への植え込み中に根が傷つき、さらに残渣表面のPSTVdを含んだ汁液に接触し、極低濃度で感染したためではないかと考えられる。しかし、3日後以降に植え付けた株からはPSTVdは検出されず、土壌中への残渣混入から数日を経過し、PSTVdを含んだ汁液に接触する可能性が無い状況になれば、土壌中の残渣からPSTVdが伝染する可能性は低いと考えられる。

引用文献

Behjatnia, S. A. A., I. B. Dry, L. R. Krake, B. D. Condé, M. I. Connelly, J. W. Randles and M. A. Rezaian (1996) New

Potato spindle tuber viroid and Tomato leaf curl gemini-virus strains from a wild *Solanum* sp.. *Phytopathology* **86**: 880-886.

Diener, T. O., and W. B. Raymer (1971) Potato spindle tuber 'virus'. *CMI/AAB Description of Plant Viruses* 66.

Matsushita, Y., T. Usugi and S. Tsuda (2010) Development of a multiplex RT-PCR detection and identification system for *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. *Eur J Plant Pathol* **128**: 165-170.

中原健二・畑谷達児・木村郁夫・四方英四郎 (1997) 日本で栽培されているジャガイモ品種のpotato spindle tuber viroidに対する反応と遺伝子診断. 北日本病虫研報**48**: 69-74.

西尾 健・加藤幹雄・小林敏郎・釵持秀禱・及川 巖・松濤美文 (1980) 検疫中のジャガイモからのPotato spindle tuber viroid検出法の検討. 植防研報**16**: 1-9.

Puchta, H., T. Herold, K. Verhoeven, A. Roenhorst, K. Ramm, W. Schmidt-Puchta and H. L. Sanger (1990) A new strain of potato spindle tuber viroid (PSTVd-N) exhibits major sequence differences as compared to all other PSTVd strains sequenced so far. *Plant Molecular Biology* **15**: 509-511.

Seigner, L., M. Kappen, C. Huber, M. Kistler and D. Kohler (2008) First trials for transmission of Potato spindle tuber viroid from ornamental Solanaceae to tomato using RT-PCR and an mRNA based internal positive control for detection. *Journal of Plant Diseases and Protection* **115**: 97-101.

Tsushima, T., S. Murakami, H. Ito, Y.-H. He, A. P. C. Raj and T. Sano (2011) Molecular characterization of *Potato spindle tuber viroid* in dahlia. *J Gen Plant Pathol* **77**: 253-256.

Verhoeven, J. T. J., C. C. C. Jansen and T. M. Willemsen (2004) Natural infections of tomato by *Citrus exocortis viroid*, *Columnea latent viroid*, *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. *Eur J Plant Pathol* **110**: 823-831.

Verhoeven, J. T. J., M. Botermans, and J. W. Roenhorst (2009) First report of *Potato spindle tuber viroid* in Cape Gooseberry (*Physalis peruviana*) from Turkey and Germany. *Plant Disease* **93**: 316-316.