

# Blueberry red ringspot virus の日本における発生

岩手大学農学部 <sup>いそ</sup>磯 <sup>がい</sup>貝 <sup>まさ</sup>雅 <sup>みち</sup>道

## はじめに

ブルーベリーはツツジ科 (*Ericaceae*) スノキ属 (*Vaccinium*) の低木果樹である。ブルーベリー生産は、欧米そして日本での健康志向の高まりから、世界的に増加している。日本でのブルーベリー栽培は、1994年には栽培面積184 ha、生産量460 tであったが、2005年には栽培面積700 ha、生産量1,400 tとなり急速に増加している。ブルーベリーの世界的な生産量増加の一方で、海外では、ブルーベリーにウイルスが発生し被害を出している (CARUSO and RAMSDELL, 1995)。アメリカおよびカナダ各地では、数億円ものウイルス病被害を出している (JASWAL, 1990)。そのため、海外ではブルーベリーのウイルスに対する研究が活発に行われ、ウイルス病対策がとられている。一方、日本では、ブルーベリーのウイルスに関する研究がほとんどなく、ウイルス病対策はとられていない。

2007年に千葉県木更津市および岩手県滝沢村のブルーベリー樹の果実に赤色輪点あるいは斑入りの病徴、そして、茎・葉に赤色輪点および不定形の赤色斑点の病徴を示す病気が認められた (ISOGAI et al., 2009; 口絵)。これらの症状は、アメリカで発生している blueberry red ringspot disease (BRRD) と酷似しており、その病原ウイルスである *Blueberry red ringspot virus* (BRRV) の発生が疑われた。そこで、調査を開始し、本病気が、BRRVによるものであることを突き止めた。そして、日本でのブルーベリー生産に被害を及ぼすウイルス病の初報告となった (ISOGAI et al., 2009)。

本稿では、日本における BRRV 発生状況、BRRD の特徴、BRDV の特徴、防除、診断について述べる。

なお、BRRV および BRRD とともに日本では未記載であるので、ブルーベリー赤色輪点ウイルスによるブルーベリー赤色輪点病と提案している。

## I 日本における発生状況

2007年に千葉県木更津市と岩手県滝沢村で調査を行

Occurrence of *Blueberry red ringspot virus* in Japan. By Msamichi ISOGAI

(キーワード: *Blueberry red ringspot virus*, ブルーベリー, ウィルス)

ったところ、ハイブッシュブルーベリー (*V. corymbosum*) において、果実に赤色輪点および斑入り、茎・葉に赤色輪点および不定形の赤色斑点を呈する病気が発生した。これら症状は、BRRV に感染したブルーベリーの病徴と酷似していた。千葉県木更津市では、1990年代から本病が発生しており、果実収量への影響が懸念されていた。

そこで、ブルーベリー樹から全核酸を抽出する方法を確立し、新規設計したプライマーで PCR による BRRV 診断法を開発した (後述)。この診断法を用いて、千葉県と岩手県で本病に罹ったブルーベリー樹を検定したところ、BRRV が検出された (ISOGAI et al., 2009)。

さらに2008年、千葉県木更津市および岩手県内3市1村の複数圃場から BRRD 様の症状を呈したブルーベリー樹が観察され、それら葉・茎・果実を用いて BRRV 診断を行った。その結果、すべての葉・茎・果実試料から BRRV が検出され、千葉県木更津市および岩手県内の複数圃場で BRRV による BRRD が発生していることを明らかにした (ISOGAI et al., 2009)。千葉県では、ブルーレイ・ウェイマウス・デューク、岩手県ではデューク・シエラ・ダローに BRRV が発生していることを確認した。また2009年、宮城県で圃場調査を行ったところシエラに BRRV が発生していることを確認した。

## II BRRD の特徴

### 1 地理的分布

1954年、ハイブッシュブルーベリー栽培の盛んなニュージャージー州で、BRRD は接木伝染するウイルス病であることが証明された (HUTCHINSON and VARNEY, 1954)。アメリカで本病が確認されているのは、アーカンザス州・ミシガン州・コネチカット州・マサセチューセッツ州・ニューヨーク州・ノースキャロライナ州・オレゴン州である。また、チェコスロバキアでも1972年に BRRD の発生が報告されている (PAULECHOVA, 1972)。

### 2 病徴

BRRD は、果実には赤色斑点および斑入り、茎・葉には赤色輪点および不定形の赤色斑点を示す。しかし、各部位での病徴は1年を通して観察することはできない。日本では、果実の病徴は、果実成熟期の6~7月ごろ、葉の病徴は、果実収穫の終わった8~9月ごろ、茎の病

徴は、春に顕著に観察される。つまり、BRRDの病徴は葉・茎・果実で顕著に表れる時期が異なっている。アメリカでは、ウドンコ病菌によって葉に赤色斑点が形成されることがあり、その場合、葉の裏面の同じ位置に黒色斑点が形成される (CARUSO and RAMSDELL, 1995)。一方、BRRVによる葉の赤色斑点は、葉の裏面に斑点は形成されない。BRRDの病徴の激しさは、品種、環境条件により異なるが、ミシガン州での試験で、BRRV感染による果実収量減は25%と算出されている (CARUSO and RAMSDELL, 1995)。ラビットアイブルーベリー (*V. ashei*) は、BRRVに対して免疫性あるいは抵抗性であるが、ハイブッシュブルーベリーは感受性の品種が多い。北部ハイブッシュブルーベリー品種であるウェイマウス・ブルーレイ・ブルーター・バーリントン・カボット・コビル・ダロウ・アーリーブルー・ルーベル・シエラ・デュークは、病徴発現する。南部ハイブッシュブルーベリー品種のオーザックブルーは、果実の奇形を伴う激しい病徴が現れる。一方、北部ハイブッシュブルーベリーのジャージーは免疫性、ブルークロップは強い抵抗性を示す。

### 3 伝染・伝搬

BRRDの病原ウイルスであるBRRVは、接木伝染性ウイルスで、汁液伝染せず、媒介生物(ベクター)は不明である (CARUSO and RAMSDELL, 1995)。しかし、カイガラムシ (*Dysmicoccus* sp.) がベクターではないかと推測されている。それは、ニュージャージー州では圃場でBRRVの自然伝搬が確認されているが、ミシガン州では確認できない。そして、カイガラムシがニュージャージー州のハイブッシュブルーベリー圃場に多数存在しているが、ミシガン州では、カイガラムシはほとんど存在していない。これら状況証拠により、カイガラムシがベクターであると推測されているが、カイガラムシを用いたBRRVの伝搬試験は成功していない。また、アブラムシ (*Illinoia pepperi*) による伝搬試験も成功していない。

筆者は、日本のブルーベリー圃場でBRRVの伝染・伝搬に関する調査を行っている。これまでの調査圃場においてBRRDが発生している品種は限定され、隣にBRRVに感受性の別品種が栽培されているにもかかわらず、その品種にはBRRV感染が確認できない (ISOGAI et al., 2009)。そのため、これまでの調査では、BRRVの自然伝搬は観察できていない。しかし、アメリカでは州により自然伝搬が見られる州と見られない州が存在している。これまでは、岩手県・宮城県・千葉県での圃場調査が行われたのみであるため、今後日本の各地でBRRVの発生調査を行う必要がある。

日本でのBRRV感染樹の増加の一因に、BRRV感染株

を母樹とした挿木があると考えている。ブルーベリーの苗木育成は、一般的に挿木法により大量生産を行っている。そのため、母樹がBRRVに感染している場合、それから作られる挿木苗は、BRRVに感染している。実際に、BRRV感染株を母樹としたBRRV感染の挿木苗を確認している。そして、このことは、各圃場でBRRVが発生している品種が限定されることと関連している可能性がある。

## III BRRVの特徴

### 1 分類

BRRVは、カリモウイルス科 (*Caulimoviridae*) ソイモウイルス属 (*Soymovirus*) に所属するウイルスで、44 kDaの外被タンパク質と8,803塩基対からなる二本鎖DNAゲノムをもつ直径42~46 nmの球形ウイルスである (FAUQUET et al., 2005)。BRRVは、塩化セシウム密度勾配遠心分離では1.3 g/cm<sup>3</sup>と1.4 g/cm<sup>3</sup>の浮遊密度をもつ2成分に分離するが、2成分中のウイルス粒子の形態的な差異はない (GILLET and RAMSDELL, 1984)。超薄切片の電子顕微鏡観察で、ウイルス粒子は、核内および細胞質で観察される (KIM et al., 1981)。通常、細胞質では、ウイルス粒子は、カリモウイルス科に特徴的に見られる封入体で観察される。

### 2 宿主範囲

BRRVは、機械的接種により感染する草本植物がない (KIM et al., 1981)。宿主範囲としては、自然宿主であるスノキ属植物のブルーベリー、クランベリー (*V. macrocarpon*) が知られている (CARUSO and RAMSDELL, 1995)。

### 3 血清学

BRRVの精製ウイルス粒子をフロイントアジュバントでエマルジョンにし、ウサギに注射してもBRRVに対する抗体は産生されない (KIM et al., 1981)。エマルジョンを作成する前に、0.5% (v/v) のホルムアルデヒドで固定するとBRRVに対する抗体は産生されるが、圃場の感染樹を診断できる抗体は得ることができない (GILLET and RAMSDELL, 1984; GLASHEEN et al., 2002)。

## IV 防 除

BRRVは、正確な診断法が確立していない(後述)。さらに、ベクターが不明であるためベクター制御ができない。そのため、アメリカでは、外部病徴から判断し、BRRV感染が疑われる樹を直ちに除去している (CARUSO and RAMSDELL, 1995)。また、挿木苗を生産する場合、その母樹がBRRV感染していないことに注意を払っている。

表-1 Blueberry red ringspot virus の PCR 検定用プライマー

プライマー	配列	アニール温度
BR-RT1	5'-GTTGATGATATTATTATATTTTCAG-3'	55℃
BR-RT2	5'-GTTCCGAAGAAGACTGATATTGAG-3'	55℃
BR-RT3	5'-CATGGAATGGACTTCTATG-3'	55℃

## V PCR による遺伝子診断方法の開発

これまでブルーベリーの BRRV 診断は、①草本植物への機械的接種試験による生物検定ができないこと、② BRRV 診断に使用できる特異性が高い抗体を作成できないこと、③ PCR 検定方法が開発されていないことから、外部病徴で診断する以外になかった。

そこで筆者は、ブルーベリー樹からの全核酸抽出法を確立し、新規に設計したプライマーを用いた PCR による BRRV の遺伝子診断法を開発した (ISOGAI et al., 2009)。以下に、ブルーベリー樹からの全核酸抽出方法と PCR 検定用プライマーについて述べる。

### (1) ブルーベリー樹からの全核酸抽出方法

BRRV に感染したブルーベリー樹の外部病徴は、葉・茎・果実で、病徴が顕著になる時期が 1 年を通してそれぞれ異なっている。そのため、病徴を呈している葉・茎・果実のどの部位でも全核酸を抽出して PCR 検定を行える方法が求められる。しかし、ブルーベリーの果実と葉は、多糖類・ポリフェノールを多く含んでいるため、PCR の反応阻害を引き起こしてしまう。そこで、数種の抽出緩衝液を試験して開発を行った。以下に、方法を述べる。

ブルーベリーの葉・茎・果実の病徴部分約 20 mg をマイクロチューブにとり、ペッスルなどを用い、500  $\mu$ l の抽出緩衝液 (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25 mM EDTA, 2M 塩化ナトリウム, 2% (w/v) CTAB, 2% (w/v) ポリビニルピロリドン, 2% (v/v) 2-メルカプトエタノール) で摩砕する。摩砕液を 60℃ で 15 分間静置後、遠心分離する。その上清をクロロフォルム抽出後、エタノール沈殿により核酸を沈殿させる。ここまでの精製では、試料中に PCR 反応阻害物質が含まれており、良好な PCR 反応は得られない。そこで、より精度を高めるため、この核酸試料を 100  $\mu$ l の 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 で懸濁し、QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) を使用してシリカゲルメンブランによる精製を行う。これにより、PCR 反応の

阻害は、ほとんど見られなくなる。

### (2) PCR プライマー

これまで BRRV の PCR 検定に関する報告がなく、新規にプライマーを設計した。筆者は、BRRV ゲノムの逆転写酵素遺伝子の RT モチーフと RNase H モチーフに注目してプライマーを設計した。その結果、BR-RT1 と BR-RT2 のプライマー (表-1) を用いた場合に、BRRV 特異的に目的とする単一増幅産物 (602 塩基対) が得られることを突き止めた。さらに、感度を上げるため、解析した BRRV 分離株の塩基配列データから、BR-RT3 (表-1) を作製した。現在、BR-RT2 と BR-RT3 のプライマーペアを用いた PCR 検定で、より高感度に BRRV 特異的な単一の増幅産物 (259 塩基対) が得られる。

## おわりに

現在、岩手県、宮城県、千葉県で圃場調査を行い、それらすべての県で BRRV の発生を確認している。そして、これら 3 県の調査では、BRRV の自然伝搬は観察されていない。しかし、アメリカでは、ニュージャージーでは自然伝搬が確認されているが、ミシガン州では観察されておらず、州による違いがある (CARUSO and RAMSDELL, 1995)。そのため、日本でも自然伝搬の可能性を否定できない。引き続き日本各地のブルーベリー圃場で BRRV の調査を行う必要がある。そして、日本でも BRRV の発生を抑えるために、圃場からの BRRV 感染樹の除去、および BRRV に感染していない母樹からの挿木苗増殖を行う必要がある。その際、目視による外部病徴から BRRV 感染を判断するのではなく、本稿で紹介した PCR による BRRV の遺伝子診断方法が有効な手段となる。

海外では、ブルーベリーに BRRV を加えた 8 種類のウイルスが病気を引き起こし、ブルーベリー樹の枯死や果実生産の低下による甚大な被害が報告されている (CARUSO and RAMSDELL, 1995)。そして、ウイルス検定、ウイルスフリー苗の普及、ベクターのコントロールを行

っている。一方、我が国では、近年急速にブルーベリー生産が増加しているが、ウイルス対策は行われていない。筆者は、これまでに岩手県のブルーベリー圃場から海外で報告のない新ウイルスを分離している。今後、海外で発生しているブルーベリーのウイルスはもちろん、日本特有のウイルスも視野に入れ、我が国独自のブルーベリーのウイルス病に対する調査・研究を推進する必要がある。

### 引用文献

1) CARUSO, F. L. and D. C. RAMSDELL (1995) : Compendium of blue-

- berry and cranberry diseases. Disease compendium series. APS Press, St. Paul, p. 58 ~ 59.  
 2) FAUQUET, C. M. et al. (2005) : Virus taxonomy. In : 8th report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press, Amsterdam, p. 390 ~ 391.  
 3) GILLET, J. M. and D. C. RAMSDELL (1984) : Phytopathology **74** : 862 (Abst).  
 4) GLASHEEN, B. M. et al. (2002) : Arch. Virol. **147** : 2169 ~ 2186.  
 5) HUTCHENSON, M. T. and E. H. VARNEY (1954) : Plant Dis. Rep. **38** : 260 ~ 262.  
 6) ISOGAI, M. et al. (2009) : J. Gen. Plant Pathol. **75** : 140 ~ 143.  
 7) JASWAL, S. A. (1990) : Can. Plant Dis. Survey **70** : 113 ~ 117.  
 8) KIM, K. S. et al. (1981) : Phytopathology **71** : 673 ~ 678.  
 9) PAULECHOVA, K. (1972) : Biologia **27** : 791 ~ 793.

### (新しく登録された農薬 21 ページからの続き)

かき : カキノヘタムシガ, チャノキイロアザミウマ : 収穫 30 日前まで  
 キャベツ : アオムシ, コナガ, アブラムシ類 : 収穫 7 日前までは  
 かいさい : アオムシ, コナガ, アブラムシ類 : 収穫 7 日前までは  
 だいこん : アオムシ, コナガ, アブラムシ類 : 収穫 14 日前まで  
 たかな : アオムシ, コナガ : 収穫 21 日前まで  
 チンゲンサイ : アオムシ, コナガ, マメハモグリバエ : 収穫 7 日前まで  
 しゅんぎく : マメハモグリバエ : 収穫 14 日前まで  
 茶 : チャノホソガ, チャノキイロアザミウマ, チャノミドリヒメヨコバイ : 摘採 14 日前まで  
 シクラメン : ミカンキイロアザミウマ : 発生初期

### 「殺菌剤」

●メトコナゾール水和剤  
 22527 : ワークアップフロアブル (北興化学工業) 09/12/02  
 22528 : リベロフロアブル (北興産業) 09/12/02  
 メトコナゾール : 18.0%  
 小麦 : 赤さび病, うどんこ病, 雪腐小粒菌核病, 赤かび病 : 収穫 14 日前まで  
 大麦 : 赤かび病 : 収穫 14 日前まで (無人ヘリコプターによる散布)  
 ●フルジオキシニル水和剤  
 22532 : メダリオン水和剤 (シンジェンタジャパン) 09/12/02  
 フルジオキシニル : 50.0%  
 西洋芝 (ベントグラス) : 葉腐病 (ブラウンパッチ), 炭疽病 : 発病初期  
 ●銅水和剤  
 22533 : コサイド 3000 (デュボン) 09/12/02  
 22534 : クミアイコサイド 3000 (クミアイ化学工業) 09/12/02  
 22535 : MIC コサイド 3000 (三井化学アグロ) 09/12/02  
 22536 : 丸和コサイド 3000 (丸和バイオケミカル) 09/12/02  
 22537 : ホクサンコサイド 3000 (北海三共) 09/12/02  
 水酸化第二銅 : 46.1%  
 ばれいしょ : 疫病 : —  
 トマト : 疫病 : —

かんぎつ : かいよう病 : 発芽前, 黒点病 : —  
 茶 : 赤焼病, もち病, 炭疽病 : 摘採 14 日前まで  
 野菜類 : 軟腐病, 黒腐病 : —  
 ぶどう : べと病 : —  
 おうとう : 褐色せん孔病 : 収穫後  
 にんじん : 黒葉枯病 : —  
 アスパラガス : 茎枯病 : —  
 ●イミノクタジン酢酸塩液剤  
 22541 : MIC ベフラン液剤 25 (三井化学アグロ) 09/12/02  
 イミノクタジン酢酸塩 : 25.0%  
 麦類 (小麦を除く) : 雪腐大粒菌核病, 紅色雪腐病 : 根雪前  
 麦類 (小麦を除く) : 紅色雪腐病, 条斑病, 斑葉病, 網斑病, 斑葉病, なまぐさ黒穂病 : は種前  
 小麦 : 雪腐大粒菌核病, 紅色雪腐病 : 根雪前  
 小麦 : 赤かび病 : 収穫 14 日前まで  
 小麦 : 紅色雪腐病, 条斑病, なまぐさ黒穂病 : は種前  
 りんご : モニリア病, 腐らん病 : 展葉期  
 りんご : 腐らん病 : 休眠期  
 りんご : 斑点落葉病, 褐斑病, 輪紋病, すず点病, すず斑病, 黒星病 : 収穫前日まで  
 りんご : 紫紋羽病 : 苗木植付前  
 ぶどう : 晩腐病, 褐斑病, 黒とう病 : 休眠期  
 ぶどう : 黒とう病, 枝彫病 : 収穫 60 日前まで  
 日本なし : 黒斑病 : 休眠期  
 西洋なし : 黒斑病 : 休眠期  
 もも : 縮葉病 : 休眠期  
 みかん : 貯蔵病害 (青かび病), 貯蔵病害 (緑かび病), 貯蔵病害 (黒腐病), 貯蔵病害 (白かび病) : 収穫前日まで  
 かんぎつ (みかんを除く) : 貯蔵病害 (青かび病), 貯蔵病害 (緑かび病), 貯蔵病害 (黒腐病), 貯蔵病害 (白かび病) : 収穫前日まで  
 マルメロ : 腐らん病 : 展葉期  
 かりん : 腐らん病 : 展葉期  
 アスパラガス : 茎枯病 : 収穫終了後 (冬期まで)  
 りんどう : 花腐菌核病, 葉枯病 : —  
 ●プロベナゾール粒剤  
 22542 : ホクコーファーストオリゼ箱粒剤 (北興化学工業) 09/12/16

(53 ページに続く)