

宮崎県のランンキュラスにおけるウイルス病の発生実態と診断技術の確立

宮崎県総合農業試験場 ^{かわ}河 ^の野 ^あ垂 ^き希 ^こ子*
 南九州大学 環境園芸学部 ^{かん}菅 ^の野 ^{よし}善 ^あ明

はじめに

ランンキュラス (*Ranunculus asiaticus* L.) はキンポウゲ科ランンキュラス属の植物で、東南ヨーロッパ、南アジアの地中海性気候に属する地域に自生する多年草である。16世紀にイギリスで栽培され始めてから園芸作物として親しまれ、日本には明治中期に渡来したとされる。現在、主に栽培されている品種は、オランダ、アメリカ等で改良され、さらに日本で改良が重ねられた品種であり(大川・吉井, 2005)。花壇用、鉢もの、切り花に広く利用されている。草丈は30~70cmで、花にボリュームがあり、色もバリエーション豊かで、可愛らしく華やかであることから女性に大変人気が高い。

宮崎県では、西臼杵地域を中心に、冷涼な中山間地域で栽培が行われている。栽培面積は2.8ha、産出額は1億3,000万円(2010年)で、近年では西諸県地域、東臼杵地域、中部地域等他の地域にも拡がりつつあり、将来の主力品目となることが期待されている。

ランンキュラスの増殖は、種子もしくは塊根を用いて行われる。種子を用いた実生栽培の作型を大きく分けると、10月に播種し、無加温施設に11月に定植して3月から出荷する暖地向けの作型と、9月に播種し、加温施設に10月に定植して2月から出荷する中山間・高冷地向けの作型があり、一部に10月に播種し、二重トンネル内で栽培して4月から出荷する作型がある。

一方、塊根から栽培する場合、塊根を低温処理(本冷蔵:5℃で3~4週間、芽出し:10℃で5日間以上)した後、9月に定植して11~4月まで出荷する促成栽培と、催芽した後、10月に定植し、無加温栽培で2~4月まで出荷する半促成栽培が一般的である。

切り花栽培では、生産者は収穫終了後の株の塊根を保存し、次作の栽培に利用しており、これを数年間繰り返

している。しかし、栽培を繰り返した塊根から育成した株には、ウイルス感染により葉や花弁にモザイク症状を示しているものが多く、品質の低下や切り花本数の減少など問題点が多い。冬季の主力花き品目としてランンキュラスの産地を発展させていくためにはこれら症状の発生原因を解明し、防除対策を確立していくことが急務となっている。

本稿では、宮崎県のランンキュラスにおけるウイルス病の発生実態調査を行った結果と、主な感染ウイルスとして特定されたランンキュラス微斑モザイクウイルス(*Ranunculus mild mosaic virus*, RanMMV)の診断技術の確立について、これまでの研究成果を紹介したい。なお、本研究の一部は農林水産省・食品産業科学技術研究推進事業実用技術開発ステージ、研究課題名「無病球根の効率的増殖を核とした有望球根切り花の生産流通技術開発」により行われた。

I 宮崎県のランンキュラスに発生しているウイルスの発生状況

1 県内のランンキュラス苗の供給と管理状況

宮崎県のランンキュラスは2001年から県内に本格的に導入された。近年は、県のオリジナル品種の導入が進んでおり、これらの品種については、ウイルスフリーの塊根を生産者が購入している。生産者が購入するまでは、①メリクロン苗の作成・増殖、②メリクロン苗を定植し塊根を養成、③生産者に配布という段階があり、生産者に配られるのはメリクロン苗を作成してから3年目となっている。①のメリクロン苗の増殖は公益社団法人宮崎県バイオテクノロジー種苗増殖センターで行われており、②の塊根の養成は産地で塊根養成用の施設を設けて、産地のJAが特定の生産者に委託している。

オリジナル品種以外にも、ランンキュラスの育種、販売を大規模に手がけている育種家による品種育成と供給が行われている。このような民間の苗は組織培養を行っているものの、ウイルスフリー化を保証しているものではない。しかし、前述のウイルスフリー化した県オリジナル品種の塊根養成と同じ施設内で管理され、生産者に配布されている。

Survey of Virus Diseases on *Ranunculus asiaticus* L. in Miyazaki Prefecture and Development of the Serologic Identification Method. By Akiko KAWANO and Yoshiaki KANNO

(キーワード: ウイルス病害, ランンキュラス, RanMMV, ランンキュラス微斑モザイクウイルス, 血清学的診断)

* 現所属: 宮崎県児湯農林振興局

また、ランタンキュラスの塊根は3年ほどで更新するのが一般的であるが、塊根は安価ではないため、一度にすべての株をウイルスフリー塊根に更新することができず、各生産者の圃場では、更新した塊根と自家増殖した塊根が混在した状態で栽培されている。

2 現地圃場におけるウイルス病の発生実態の調査

本県ではランタンキュラスの導入以来、自家増殖した塊根による栽培が続けられてきたため、花卉や葉にモザイク症状やえそ症状といったウイルス様症状が多く発生するようになっており、さらに塊根が古くなるにつれ、株が萎縮し、収量の減少が見られるようになってきた(口絵①)。

そこで、宮崎県総合農業試験場ではこれらの症状の原因を解明し、防除技術を開発するため、ランタンキュラスに発生するウイルス種について調査を行った。

ランタンキュラスは多くのウイルス種の感染を受ける植物であり、日本国内でランタンキュラスに感染が確認されているウイルスは、キュウリモザイクウイルス(CMV)、ソラマメウイルトウイルス(BBWV)、トマト黄化えそウイルス(TSWV)、インパチェンスえそ斑点ウイルス(INSV)、ランタンキュラス斑紋ウイルス(RanMoV)およびランタンキュラス微斑モザイクウイルス(*Ranunculus mild mosaic virus*, RanMMV)の6種である。国外では、ほかに*Ranunculus mosaic virus*, *Ranunculus leaf distortion virus*, *Ranunculus latent virus* (Ciuffo et al., 2006)、ジャガイモYウイルス(*Potato virus Y*, PVY) (Bellardi et al., 1988) やカブモザイクウイルス(*Turnip mosaic virus*, TuMV) (Hollings, 1957), *Ranunculus white mottle virus* (RanWMV) (Vaira et al., 1997) 等の感染が報告されている(表-1)。なお、RanWMVは植物防疫法の有害

植物に指定されている。

宮崎県内のモザイク症状を示すランタンキュラス葉の電子顕微鏡観察により *Potyvirus* 属に属すると考えられるひも状ウイルス粒子の存在を確認し、このウイルスのゲノムRNAの遺伝子解析の結果、本ウイルスをイタリアで報告されたランタンキュラス微斑モザイクウイルス(RanMMV)と分子同定した(中村・菅野, 2013)。また、2011年にランタンキュラスの葉に輪紋および茎にえそが発生している株で、トマト黄化えそウイルス(TSWV)の感染を確認している(口絵②)。

しかし、現地圃場における主要ウイルスは何か確認できていないことから、葉にモザイク症状を示している株について、2012～13年にかけてウイルス種の調査を行った。

(1) モザイク症状が見られる株のウイルス検定

調査は、2012年に県内の3圃場において葉にモザイク症状が見られる株から葉を1圃場当たり8株ずつ採取し、これまで発生が報告されている6種ウイルスについて検定を行った。CMV, BBWV, TSWV, INSVおよびPVYは血清学的手法(ELISA法)を用い、RanMMVについては、特異的プライマーを用いたRT-PCR法により検定を行った。

(2) 県内5圃場における各種ウイルスの発生状況の調査

2013年は、県内5圃場から検定サンプルの採取を行った。この調査では、圃場におけるウイルスの発生状況を調べるため、症状の有無にかかわらず、無作為に1圃場当たり100株から葉を採取しウイルス検定を行った。検定は2012年と同様の手法で行った。

3 ウイルス病の発生実態調査の結果

(1) モザイク症状が見られる株から検出されたウイルス

2012年の調査では、宮崎県内の3圃場からモザイク症状が見られる株の葉を採取し、前述の5種ウイルスを検定した結果、1株からCMVが検出されたが、その他のウイルスの感染は認められなかった。しかしRT-PCR法の結果からはモザイク症状が見られた24株のすべてからRanMMVが検出された。このうち24株のうち1株は、CMVとの重複感染であることが確認された(表-2)。これらのことより、当産地で発生しているモザイク症状の原因は主にRanMMVによるものであると考えられた。

(2) ウイルスの発生株率の調査

2013年の調査では、県内の5圃場から採取した葉を前述に準じて検定した結果、CMV, BBWV, TSWV,

表-1 ランタンキュラスに発生する各種ウイルス

ウイルス名	媒介虫
キュウリモザイクウイルス (CMV)	
ソラマメウイルトウイルス (BBWV)	
チューリップモザイクウイルス (TuMV)	アブラムシ類
ジャガイモYウイルス (PVY)	
トマト黄化えそウイルス (TSWV)	
インパチェンスえそ斑点ウイルス (INSV)	アザミウマ類
ランタンキュラス斑紋ウイルス (RanMoV)	
ランタンキュラス微斑モザイクウイルス (RanMMV)	
<i>Ranunculus mild mosaic virus</i> (RanMV)	アブラムシ類
<i>Ranunculus leaf distortion virus</i> (RanLDV)	
<i>Ranunculus latent virus</i> (RanLV)	
<i>Ranunculus white mottle virus</i> (RanWMV)	土壌(糸状菌)?

INSVおよびPVYは検出されなかったが、RanMMVは40～89%と高率に感染が認められた。特に症状が見られない株からも、各圃場で17.8～75.6%に達するRanMMVの感染が確認された。このことから、葉にモザイクの症状がなくてもRanMMVに潜伏感染している株が多いことが明らかになった(表-3)。

2013年に調査を行った株をメリクロン苗からの栽培後の経過年数別にRanMMVの感染株率とモザイクの発症株率を見てみると、栽培年数にかかわらず、感染株率は65～69.2%と高かった。しかし、モザイク症状の発症率は、塊根養成1年目は30%と低く、感染が確認さ

表-2 宮崎県のランタンキュラス圃場における数種ウイルスの発生状況

圃場	調査株数	感染株数					
		CMV	BBWV	TSWV	INSV	PVY	RanMMV
1	8	0	0	0	0	0	8
2	8	0	0	0	0	0	8
3	8	1	0	0	0	0	8

表-3 宮崎県のランタンキュラス圃場におけるRanMMVの感染状況

圃場	調査株数	発症株		無発症株		合計感染率
		株数	感染率	株数	感染率	
1	100	26	100	74	18.9	40
2	100	55	100	45	75.6	89
3	100	58	100	42	59.5	83
4	100	34	100	66	40.9	61
5	100	55	100	45	17.8	63

れた株の半数以上は症状を示さなかった。一方、塊根の養成年数が2、3年目と進むに従いモザイク症状の発症率は高くなった(図-1)。これらのことより、RanMMVは、塊根が更新された比較的早い段階で感染しているものの、感染しても症状はすぐには現れないことが示唆された。

II RanMMVの感染による症状の再現

モザイク症状を呈した株からは、主にRanMMVが検出されたことから、RanMMVに感染したランタンキュラスの葉の汁液を、健全な株に接種して症状の再現を行った。接種方法は、0.2gの感染葉を2mlのリン酸バッファを加えて、乳鉢で磨り潰して、カーボランダムによる汁液接種を行った。

汁液接種した株を、人工気象室(15～30℃の変温管理)で栽培したところ、接種約3週間後に接種葉および上位葉にモザイク症状が現れた(口絵③)。このことにより、宮崎県のランタンキュラスに発生している主要ウイルスは、RanMMVであることが明らかになった。

ビニールハウス(温度成り行き管理、最低温度5℃)においては、接種してからモザイク症状が現れるまで、1か月以上を要したことから、RanMMVの潜伏期間は、低温では長くなる傾向が見られる。また、RanMMVはpotyvirus属の一種であり、アブラムシ類による虫媒伝染や、剪定等の管理作業に用いたハサミにより汁液伝染するウイルスであることから、潜在感染株が発病に要する期間中に、虫媒あるいは人為的に伝搬されている可能性も大きい。

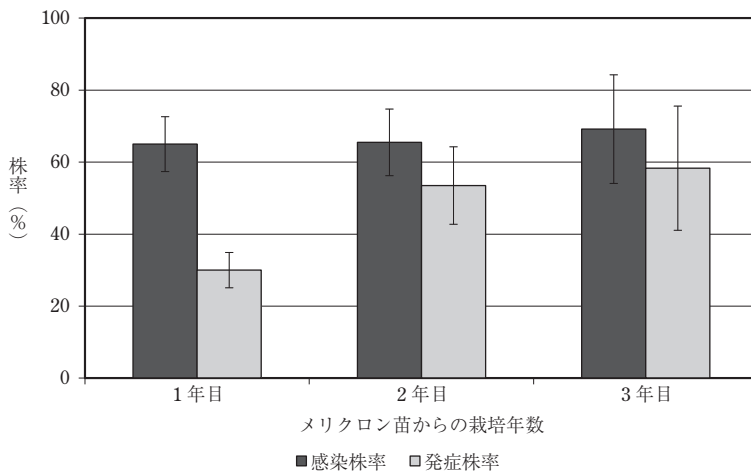


図-1 メリクロン苗の栽培経過年数におけるRanMMVの発生推移

III RanMMV の診断技術の確立

本県のランタンキュラス栽培圃場では、主に RanMMV の発生が認められ、その感染率も高いことから、健全塊根の導入に向けてウイルスフリー苗木育成のための親株の精密なウイルス保毒検査技術の確立と、現地でのまん延防止対策を併せて行っていくことが重要である。まん延防止のためには、ウイルス感染株を早期発見して処分していくことが初期防除のポイントであり、そのためには、現地の普及センターや JA 等で実施可能なウイルスの簡易診断法を確立し、普及させる必要がある。

1 RanMMV 抗血清の作製

植物のウイルス病の診断法として、簡易で高額な機器も不要なことから、DIBA 法や ELISA 法等の血清学的診断法が広く用いられているが、RanMMV については診断用の抗血清がないため、抗血清の作製を行った。(細川ら, 2014)

一般的な植物ウイルスに対する抗血清の作成は、ウイルスの分離、増殖、精製および精製ウイルス標品の家兎への免疫によって行われる。しかしながら、RanMMV を分離するための局部病斑植物を見いだせなかったため、ウイルスの分離ができず、単一ウイルスとして増殖・精製免疫ができなかった。

そこで、抗血清の作成に必要な抗原を大腸菌組換えタンパク質発現系を用いて作成することとした。RanMMV の外被タンパク質 (coat protein: CP) 遺伝子を組換えタンパク質発現用組換え用ベクター (pGEX) に挿入し、目的とするタンパク質が形質転換大腸菌 (BL21) 体内で発現することを確認した。その後、大腸菌内で発現が確認された組換え RanMMV-CP を標品として得るため、大量培養した大腸菌からの組換え CP の精製を Glutathione Sepharose 吸着、PreScission Protease による切断・遊離、SDS-PAGE 分画により行ったところ、予想される組換え CP の分子量約 31 kDa のタンパク質が単一バンドとして得られた。このタンパク質を家兎に免疫し抗血清を作製した。

2 作製した抗血清を用いた血清学的手法による RanMMV の検出

得られた抗血清を用いて、ウェスタンブロッティング法および DIBA 法の二つの血清学的手法による RanMMV の検出を試みた。ウェスタンブロッティング法では RanMMV-CP の分子量に相当する約 31 kDa のタンパク質が RanMMV 感染葉に特異的に単一バンドとして検出された (図-2)。この結果から作製した抗血清は RanMMV に高い特異性を有していると判断した。次に

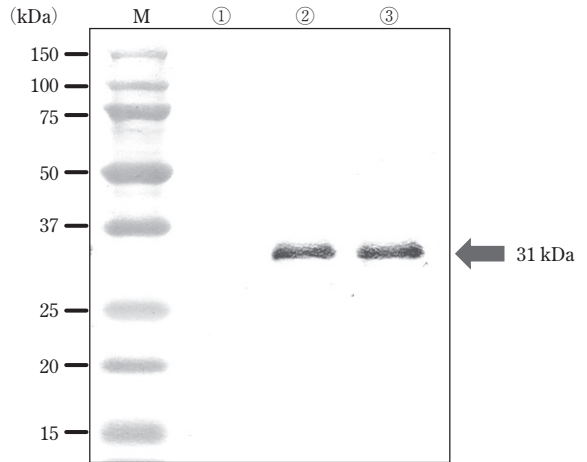


図-2 ウェスタンブロッティング法による RanMMV の検出
M: サイズマーカー, ①: 健全葉, ②・③: 感染葉。
一次抗体: 抗組換え RanMMV-CP 2,000 倍。
二次抗体: AP 標識抗ウサギ IgG 抗ヤギ IgG 2,000 倍。
矢印は検出されたバンドを示す。

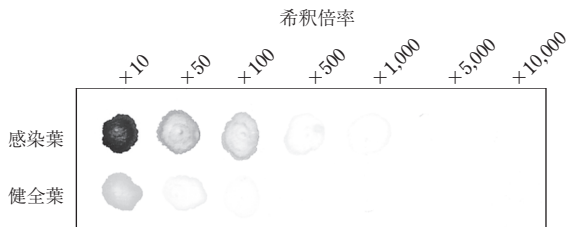


図-3 DIBA 法による RanMMV の検出
ランタンキュラス葉に 10 容の TTBS (0.02% 2-Me 含む) を加え乳鉢・乳棒で磨砕し、10 K rpm × 5 分間遠心後の上清を原液 (× 10) とし、希釈後、4 μL スポットした。
一次抗体: 抗組換え RanMMV-CP 2,000 倍。
二次抗体: AP 標識抗ウサギ IgG 抗ヤギ IgG 2,000 倍。

DIBA 法により RanMMV の検出を行ったところ、ウェスタンブロッティング法と同様に感染葉試料に特異的な呈色反応が認められ、その反応は 1,000 倍希釈試料まで認められた (図-3)。この結果から、作製した抗血清を用いた DIBA 法により、RanMMV の検定・診断が可能であることが確認され、血清学的手法による RanMMV の検出法を確立した。

本県では DIBA 法を用いたキュウリのウイルス診断が普及センターや JA で普及しており、KGMMV・MYSV の診断キットと、実施手順をわかりやすく解説した診断マニュアルを用いて、キュウリ緑斑モザイク病・キュウリ黄化えそ病の迅速な診断を実施している。RanMMV

についても DIBA 法によるウイルス診断を普及できるまでの体制を整えていく予定である。

おわりに

ランンキュラスは、市場における人気が高い品目であり、本県の花き栽培および中山間地域の振興のために重要な品目である。このため、県内におけるランンキュラス生産者が今後とも安定して生産を維持していくためには、ウイルス病の防除対策は避けることのできない作業である。特に、種苗の供給体制の中で、RanMMV、CMV、BBWV、TSWV 等のウイルス病感染株を除去できるシステム作りは重要であり、メリクロン苗で行えるウイルスの検出感度が高い検定方法を確立していくことが急務である。

また、生産圃場におけるウイルス病のまん延防止対策は、健全な種苗供給体制作りと並行して行っていくことが必要である。生産者にウイルス病発生の実態を認識してもらうとともに、圃場におけるウイルス病を早期発見することで、初期防除を迅速に行うことが可能になる。

今回紹介した県内のランンキュラスにおける主要発生種の把握と、その診断を容易にする抗血清の作出は、現地の農業改良普及センターや JA で行うことが可能な簡易診断技術の普及に道を開いたものである。

花き類生産はランンキュラス以外にも栄養繁殖性の種苗供給を行っている品目が多く、ウイルス病のまん延が問題となっている。このランンキュラスのウイルス病の研究によって、診断技術などを含む防除対策技術が普及し、他の花き品目の今後の防除対策の確立に波及していくことを期待したい。

引用文献

- 1) BELLARDI, M. G. et al. (1988): *Phytopathol. Mediterr.* **27**: 157 ~ 162.
- 2) CIUFFO, M. et al. (2006): *Archives of Virology* **151**: 1235 ~ 1241.
- 3) HOLLINGS, M. (1957): *Ann. Appl. Biol.* **45**: 44 ~ 61.
- 4) 細川秀子ら (2014): 平成 26 年度日本植物病理学会大会プログラム・講演要旨予稿集, 日本植物病理学会, 東京, p. 131.
- 5) 中村琢也・菅野善明 (2013): *日植病報* **79**: 73 ~ 74.
- 6) 大川 清・古井敏江 (2005): ランンキュラス 球根類の開花調節, 今西英雄 編, 農文協, 東京, p. 219 ~ 223.
- 7) VAIRA, A. M. et al. (1997): *Archives of Virology* **142**: 2131 ~ 2146.

登録が失効した農薬 (26.9.1 ~ 9.30)

掲載は、種類名、登録番号：商品名（製造者又は輸入者）登録失効年月日。

〔殺虫剤〕

- ジメトエート乳剤
4806：ホクコージメトエート乳剤（北興化学工業）14/9/4
- CYAP 粉剤
10411：ヤシマサイアノックス粉剤（協友アグリ）14/9/25
- クロルピリホスメチル乳剤
14747：日産レルダン乳剤 25（日産化学工業）14/9/24
- イミダクロプリド・シフルトリン液剤
20244：テガール液剤 AL（バイエル クロップサイエンス）14/9/27
- 20245：ムシムシ液剤 AL（レインボー薬品）14/9/27
- ペルメトリン乳剤
22236：花ベジタ（住化グリーン）14/9/10
- DCIP・D-D くん蒸剤
22251：プラズマ油剤（エス・ディー・エス バイオテック）14/9/10

〔殺虫・殺菌剤〕

- シラフルオフェン・MEP・カスガマイシン・フサライド粉剤
20242：フルセット粉剤 DL（北興化学工業）14/9/27

〔除草剤〕

- MCPA ナトリウム塩水溶液
10388：石原粉状 MCP 水溶液（石原産業）14/9/25

●シアン酸塩水溶液

15870：石原シアンサンソーダ（石原産業）14/9/28

●インダノファン・ピラゾスルフロンエチル・プロモブチド 粒剤

21553：協友キリフダエースジャンボ（協友アグリ）14/9/21

●クロメプロップ・フェントラザミド・ベンスルフロンメチル水和剤

22239：ロングキック L フロアブル（デュボン）14/9/10

22241：ロングキックフロアブル（デュボン）14/9/10

●クロメプロップ・フェントラザミド・ベンスルフロンメチル粒剤

22243：ロングキックジャンボ（デュボン）14/9/10

22245：ロングキック 1 キロ粒剤 51（デュボン）14/9/10

22247：ロングキック 1 キロ粒剤 75（デュボン）14/9/10

●クロメプロップ・ダイムロン・フェントラザミド・ベンスルフロンメチル粒剤

22250：ロングキック D1 キロ粒剤 51（デュボン）14/9/10

●ジメテナミド P・プロマシル粒剤

22971：クサスッカリ（レインボー薬品）14/9/28

〔殺菌・植調剤〕

- トリシクラゾール・プロヘキサジオンカルシウム塩粉剤
19340：ビームビビフル粉剤 5DL（クミアイ化学工業）14/9/27