

ダリアのウイルス・ウイロイド病

診断マニュアル



球根増殖コンソーシアム

2019年6月

目次

～はじめに～

1. ウイルス・ウイロイドによるダリアの被害 (P4～6)

- (1) ダリアモザイクウイルス (DMV)
- (2) トマト黄化えそウイルス (TSWV)
- (3) キク矮化ウイロイド (CSVd)
- (4) キュウリモザイクウイルス (CMV)
- (5) タバコ条斑ウイルス (TSV)

2. ウイルス・ウイロイドの防除対策 (P6～8)

- (1) 再汚染対策
- (2) 増殖計画

3. ウイルス・ウイロイドの検定 (P8～13)

- (1) 検定手法
 - 1) シングル RT-PCR 法
 - 2) マルチプレックス RT-PCR 法
 - 3) リアルタイム RT-PCR 法
 - 4) Micro tissue direct RT-PCR 法
 - 5) Tissue blot immunoassay 法
- (2) TSWV の植物体内の分布
 - 1) 葉での分布
 - 2) 茎での分布
 - 3) 球根での分布
- (3) 適切な検定部位

～さいごに～

参考文献

はじめに

本マニュアルは、平成25年度農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業【実用技術開発ステージ】「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」（課題番号 25075C）において、ラナンキュラスとダリアの課題解決に取り組んだ成果のひとつです。

ラナンキュラスとダリアはそれぞれ多彩な花色、質感を有し、今日ではブライダル等のパーティやフラワーアレンジメントに欠かせない花材となっています。また、ラナンキュラスは海外にも輸出され、高い評価を得ています。いずれも国内の育種家が育成した我が国オリジナルの品種が生産および消費の拡大を大きく支えるものとなっています。このような背景から、我が国の花きの産出額が年々低下している中、この2品目の需要は増加しており、産地は市場から生産量の増加を求められています。

ダリアでは夏秋期には奈良県や兵庫県の中山間地域と山形県などの冷涼地に産地が形成されています。これらの地域では、夏秋期の切り花生産とその後の球根生産を組み合わせることによって、労働力の周年活用が図られています。また、近年増加している冬春期の切り花生産は、従来産地ばかりでなく長野県、愛知県、高知県、宮崎県など全国各地に導入されています。

この2品目は、共に「塊根」という根が肥大した形態の球根を持つ球根花きです。球根類はその増殖に年月を要するため、切り花生産面積の急激な増加が困難であるばかりでなく、球根価格が生産費を上昇させています。また、ウイルス・ウイロイドの感染が分球・挿し芽、虫媒等により拡大し、切り花生産効率を低下させ問題となっています。さらに近年は切り花購入後の十分な観賞日数が消費者から求められているため、品質保持技術の確立が重要となっています。

このように、この2品目は同じ課題を抱えていることから、それぞれの品目の研究シーズを蓄積している研究機関が互いの技術・手法を持ち寄り、効率的に課題解決を行う上記のプロジェクトに取り組みました。

本マニュアルは、ダリアのウイルス・ウイロイド病診断技術をマニュアルとして取りまとめたものです。ウイルス・ウイロイドによるダリアの被害、その防除対策および検定方法について紹介しています。ラナンキュラスについても同様のマニュアルを別途作成しています。

本マニュアルがダリアのウイルス・ウイロイド病の蔓延の防止と健全球根の利用拡大に活用されることを期待します。

球根増殖コンソーシアム

研究総括 中村 薫（宮崎県総合農業試験場）

1. ウイルス・ウイロイドによるダリアの被害

ダリアには複数のウイルス・ウイロイドが感染することが知られており、特にダリアモザイクウイルス（DMV）とトマト黄化えそウイルス（TSWV）による被害が大きい。また近年はキク矮化ウイロイド（CSVd）による被害が拡大傾向にある。これらのウイルス・ウイロイドによる病害は、一度感染すると治療が不可能であり、罹病株の抜き取り処分と感染予防を徹底するしか対策がない。感染予防としては、健全な種苗の導入、ハサミなど刃物の消毒、アザミウマ類等のウイルスを媒介する害虫防除が重要である。ダリアで主に問題となるウイルス・ウイロイドの特徴は以下のとおりである。

（1）ダリアモザイクウイルス（DMV : dahlia mosaic virus）

DMVによるダリアモザイク病の病徴は、葉のモザイク症状（写真1）、葉脈黄化（写真2）、稲妻状や斑点などのクロロシス（写真3）、萎縮（写真4）が生じ、植物全体の生育が抑制される。品種、生育ステージ、気温などにより病徴の程度は様々であり、また潜在感染もしくは病徴が軽微な時期が多いため、目視のみでの健全株の選抜は困難である。感染は栽培管理中の汁液または虫媒伝染により起こり、ワタアブラムシ、モモアカアブラムシ、チューリップヒゲナガアブラムシなど16種のアブラムシ類による非永続伝播が報告されている。野外での宿主がダリアに限られるため、健全な種苗を用いることで伝染源を除去できる。



写真1 葉のモザイク症状



写真2 葉の葉脈黄化症状



写真3 葉の稲妻状のクロロシス



写真4 葉の萎縮症状

（2）トマト黄化えそウイルス（TSWV : tomato spotted wilt virus）

TSWVによるダリア輪紋病の病徴は、葉に黄斑（写真5、6）や輪紋（写真7）、輪紋状のえそ（写真8）、稲妻状の黄変（写真9）、茎や葉柄にえそ条斑（写真10）、塊根にあざ状のえそ条斑を生じ、生育が抑制されるが、品種、生育ステージ、気温などにより病徴の程度は様々である。また葉の黄斑が複数重なるとモザイク症状（写真11）のようにも見えることがある。盛夏の高温期には葉の病徴が判別しにくいため、葉の病徴が確認しやすい春から初夏の生育初期と秋

の抜き取りを徹底することが大切である。感染は栽培管理中の汁液もしくは虫媒伝染により起こり、アザミウマ類による永続伝播が報告されており、特に虫媒伝染によるダリア生産圃場での被害の拡大が顕著である。宿主範囲は広く、トマト、キク、ナス、ピーマンおよび様々な雑草にも感染するため、周囲に伝染源となる植物の存在を確認する必要がある。



写真5 葉の黄斑症状



写真6 葉の黄斑症状



写真7 葉の輪紋症状



写真8 葉の輪紋状のえそ



写真9 葉の稲妻状の黄変



写真10 茎のえそ条斑



写真11 葉のモザイク症状

(3) キク矮化ウイロイド (CSVd : chrysanthemum stunt viroid)

CSVd は約 350 塩基の環状 1 本鎖 RNA であり、ウイルスのようにタンパク質の殻に包まれていない。ダリアわい化病の病徴は茎の節間伸長の抑制によって、草丈が短くなり、葉、花が小型化する (写真 12) (浅野ら 2018b)。品種により病徴が異なり、花色が濃くなることや、露心花率が高くなることも確認されている (写真 13)。感染は栽培管理中の汁液により起こることが知られているが、虫媒伝染は報告されていない。



写真 1 2 株の矮化症状 (左 : 感染株、右 : 健全株)



写真 1 3 花色の変化と露心 (左・中央 : 感染株、右 : 健全株)

(4) キュウリモザイクウイルス (CMV : cucumber mosaic virus)

ダリアでの症状は葉のモザイク症状や葉がやや細く小型化し、植物全体の生育が悪くなる。ダリアでの感染は比較的少なく、その病徴も DMV より軽微であることが多い。しかし、宿主範囲が広く、アブラムシによる非永続伝搬と刃物での汁液の媒介により感染するためアブラムシ防除を心がけること重要である。

(5) タバコ条斑ウイルス (TSV : tobacco streak virus)

ダリアでの症状は葉に薄い斑点やモザイク症状を生じ、花卉の脱色や奇形が生じる。その病徴は軽微であり、また病徴が現れないことも多く、実用上問題となることは少ない。一方で‘黒蝶’や‘フィダルゴブラッキー’などの黒色系のダリアにおいて TSV の感染により花色が紫がかることが確認されている。また、茎頂培養によるフリー化の成功率が低いことが知られている。

2. ウイルス・ウイロイドの防除対策

(1) 再汚染対策

茎頂培養苗由来の挿し芽苗は多くの時間と労力をかけて作出したものであり、ウイルスの再汚染に注意して、できるだけ長期間、ウイルスフリー株の母本として維持することが重要である。そのため各ウイルスの感染経路をひとつずつ排除してゆく必要がある。ダリアでの感染経路は大きく分けて、作業者の使う刃物とアブラムシ類およびアザミウマ類といった害虫の 2 つである。

ハサミなどの刃物については、茎頂培養で作出した親株や種球を扱うときには必ず、作業前の消毒を習慣づけるようにする。栽培管理や分球で用いているハサミには、汁液だけでなく植物の破片が付着しており、エタノールなどの消毒薬の多くは表面殺菌には有効であるものの、こうした植物破片の内部まで短時間で消毒することはできない。このため、消毒薬を用いる場合には、十分な薬液量で洗い流すとともに、できるだけ長時間、消毒液に浸漬しておく必要がある。確実な方法としては、ホームセンターなどで販売されている小型のガスバーナーを携帯して刃先を火炎消毒すると、植物の破片があっても短時間で作業を繰り返す事ができて便利である。

一方、害虫類については、0.4mm 目以下の防虫ネットで被覆した網室（ネットハウス）に原種株や種球生産株を栽培することが基本となる。刃物の消毒を前提として、害虫による再汚染の状況を調べた結果、CSVd の再汚染は防止できているものの、ダリアが周囲にある産地内の露地圃場では1年目の段階で早くも TSWV と DMV に再汚染されている（表1）。しかし、ダリアが周囲にない産地外では、露地圃場においても DMV の再汚染は見られない。一方、ネットハウスの中では、TSWV、DMV および CSVd のいずれの再汚染も防止できている。

ただ、ネットハウスであっても、ネットの隙間からウイルス保毒虫が侵入することや、雑草や残渣から再生したダリア等があり、そこに TSWV や DMV が感染していることも考えられる。そのためネットハウスにおいてもアブラムシ類とアザミウマ類の定期的防除は必須である。特にこれらの害虫の飛翔や移動が多い春から初夏にかけては、薬剤散布の回数を増やすようにする。図1では中山間産地での TSWV 媒介能力をもつアザミウマ類の発生消長を示している。この産地では4月下旬から発生が確認され始め、6~7月に発生のピークを迎え、12月に発生が確認されなくなった。ミカンキイロアザミウマの発生も確認されたが、ヒラズハナアザミウマが優占している。この場合では野外での発生が多く、ウイルス保毒虫のネットハウス内への侵入リスクが高い6~8月にネットハウス内を重点的に防除すべきである。

上記のように対策をしてもネットハウス内でウイルス感染株が見つかる場合がある。その際は、すぐに感染株を抜き取り、ハウス外で処分する。このことは管理作業や虫媒伝染による伝染源を除去することに加え、翌年に誤って親株として使用しないようにするためである。感染株の抜き取りは、作業自体は単純であるが、その防除効果は高い。露地球根生産圃場5ヶ所の事例では、2013年にウイルス病発病株率が12.6%であったが、同年の発病株の抜き取りにより翌年には5.1%まで低下した。単年の抜き取りでも効果が確認されており、毎年継続して行うことでより高い効果が期待できる。ネットハウス内でも同様に圃場の観察と抜き取りを日常的に実施することを推奨する。

表1 地理的隔離と0.4mm 目ネットによるウイルス再汚染抑止効果

栽培場所	栽培終了時の再汚染状況 (汚染株数/生存株数)		
	TSWV	DaMV	CSVd
露地圃場(産地内)	6/7	2/7	0/7
露地圃場(産地外)	6/6	0/6	0/6
ネットハウス(産地内)	0/9	0/9	0/9

産地内の露地圃場とネットハウスには、ウイルスフリーを確認後に鉢植えした株を、2007年6月6日(産地外の露地圃場は同年7月1日)~11月15日まで配置し、試験終了時に未発蕾の分枝の最上位展開葉をサンプリングしRT-PCRで検定した。

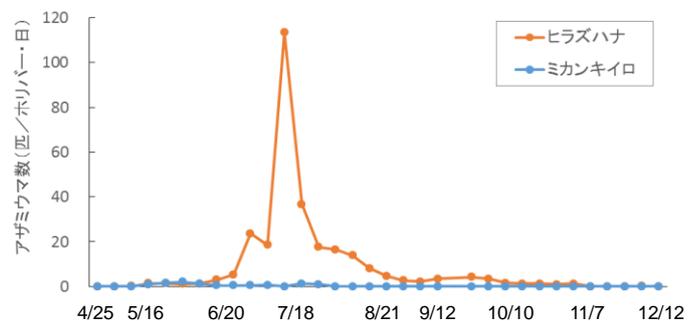


図1 TSWV 媒介能力を持つアザミウマ類の発生消長
2013年に3球根生産圃場で、ホリパーを2枚/圃場設置した

(2) 増殖計画

茎頂培養には多くの時間と費用がかかっているため、再汚染を防止して、できるだけ長期間にわたってフリー化した株を利用することが望ましい。また、ダリアは品種の多様性が特徴でもあり、産地競争力を維持する上でも、その種苗管理が必要である。このため、図2のように、増殖段階を幾つかのステージに分け、その各ステージに応じた再汚染対策と環境制御を準備する必要がある。実験的には、3月に順化を始めて1年間で、ひとつの培養苗から約50個体の挿し芽苗、約200球の原種球を得ることができている。

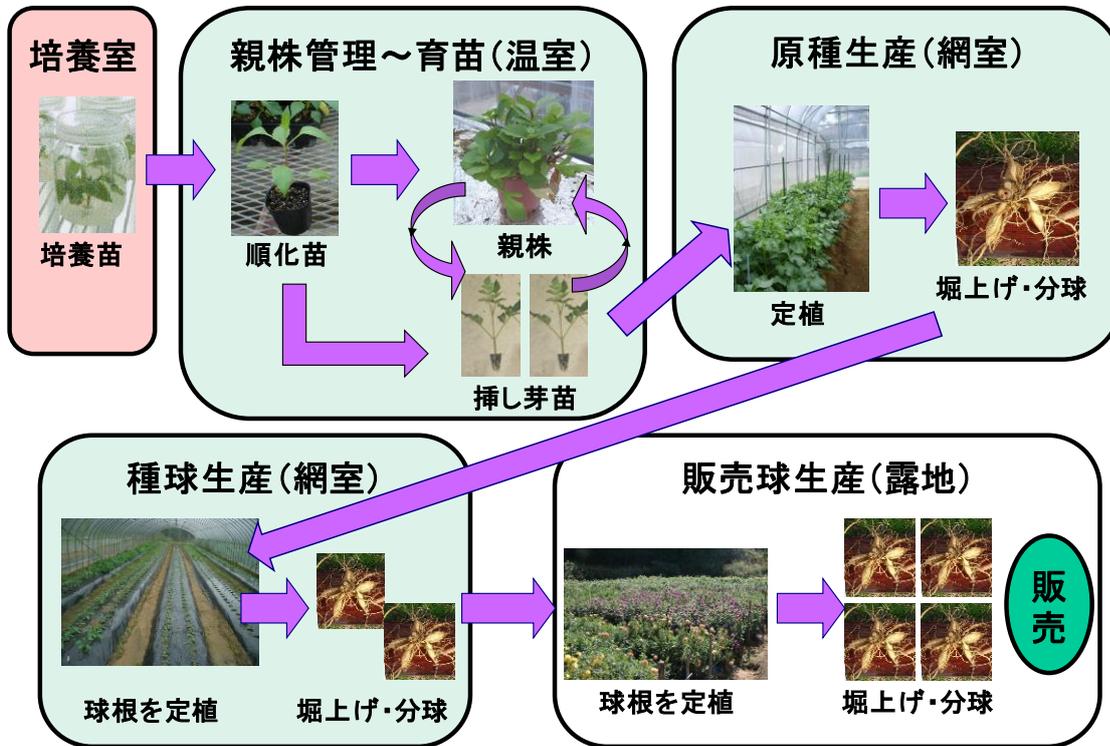


図2 培養苗から球根販売までの増殖フローの例

3. ウイルス・ウイロイドの検定

(1) 検定手法

植物ウイルスの検定には、生物検定、遺伝子診断法 (PCR、LAMP)、抗血清による血清学的手法 (ELISA) などが用いられる。奈良県では、ダリア栽培で問題になる TSWV、DMV および CSVd の3種を対象として、健全株選抜のための検定を実施している。本県で使用している検定法を紹介する。

1) シングル RT-PCR 法 (Asano et al., 2015; 浅野ら 2015)

本法は、RNA から cDNA を合成 (逆転写) し、その後の PCR 反応により各ウイルス・ウイロイド特異的配列を増幅する。試薬は逆転写と PCR 反応を連続して行える One-Step の RT-PCR 酵素を使用している。

試薬	μl
Prime Script 1 Step Enzyme Mix	0.4
2×1 step buffer	5.0
F primer (10μM)	0.4
R primer(10μM)	0.4
水	2.8
template	1.0
total	10.0

・ 試薬 : PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 (Dye Plus) (TaKaRa)

対象	プライマー名	塩基配列 (5'-3')	増幅サイズ (bp)
TSWV	TSWV-Rnp	ACCCTAAGAAACGACGACTGCG	720
	TSWV-Fnp	TCTTCACCTGATCTTCATTCAAT	
DMV	DMV-R1345	ACTTCCTGCTAGGACACTCA	402
	DMV-F944	AAAAAGAGGCTACCATACCC	
CSVd	CSVdD-R	TCTCCAGGAGAGGAAGGAAACTA	249
	CSVdD-F	GGAGTAAGCCCCTGGAACCTTAG	

・ 反応条件

50°C (10分) → 94°C (2分) → (94°C (30秒) → 60°C (30秒) → 72°C (30秒)) × 30 → 72°C (5分) → 4°C (∞)

2) マルチプレックス RT-PCR 法 (Asano et al., 2015; 浅野ら 2015)

本法は、TSWV、DMV、CSVd を一度の PCR で同時検出する手法である。シングル RT-PCR で使用したプライマーを等量混合して使用する。図 3 のようにサイズの異なるバンドが 3 本確認できる。検出感度はシングル RT-PCR と同等である。

試薬	μl
Prime Script 1 Step Enzyme Mix	0.4
2×1 step buffer	5.0
F primer (10μM) TSWV	0.4
R primer(10μM) TSWV	0.4
F primer (10μM) DMV	0.4
R primer(10μM) DMV	0.4
F primer (10μM) CSVd	0.4
R primer(10μM) CSVd	0.4
水	1.2
template	1.0
total	10.0

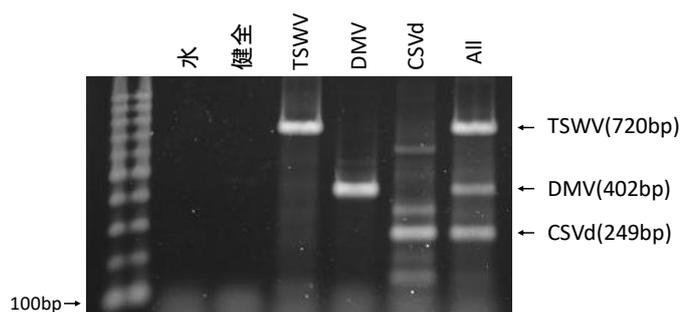


図 3 マルチプレックス RT-PCR による TSWV、DMV および CSVd の検出

3) リアルタイム RT-PCR 法

本法は、RT-PCR による増幅産物を蛍光色素によりサイクル単位で計測する。電気泳動が不要なため省力的あり、またウイルス・ウイロイドの定量も可能である。

試薬	μl
One Step SYBR RT-PCR Buffer 4	5.0
F Primer (10μM)	0.4
R Primer (10μM)	0.4
Takara Ex Taq HS Mix	0.6
Prime Script PLUS Rtase Mix	0.2
ROX Reference Dye II	0.2
水	2.2
template	1.0
total	10.0

・試薬：One Step TB Green PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa)

対象	プライマー名	配列(5' → 3')	引用
TSWV	TSWV N F	GCTTCCCACCCCTTTGATTC	Rotenberg et al. (2009)
	TSWV N R	ATAGCCAAGACAACACTGATC	
DMV	DMV-rd1 F	ACGTTTTTGACCAAATCCTCTCT	浅野(未報告)
	DMV-rd1 R	GAATGCTGTTAGTGAGGGCA	
CSVd	CSVd-RealF1	TCCGACGAGATCGCGGC	松下ら(2006)
	CSVd-RealF1	GAAGACCGGGCTAGGGCAGA	

・反応条件

42°C (5分) → 95°C (10秒) → (95°C (5秒) → 60°C (34秒)) × 30

+ 解離曲線作成用反応 ※解離曲線作成用反応は装置により異なる

4) micro tissue direct RT-PCR 法

本法は Hosokawa et al., 2006 によって、開発された。汁液をテンプレートとして使用することで核酸抽出を省力した手法である。検定法としては、太さ 0.5mm、長さ 40mm の有頭昆虫針 (志賀昆虫普及社製、No.3) を用いて葉脈、葉柄などを刺し、針を直接 PCR 反応液に漬ける (図 4)。上記のシングル RT-PCR、マルチプレックス RT-PCR、リアルタイム RT-PCR のいずれでも実施可能である。ただし、抽出した RNA100ng をテンプレートとして使用する場合と比較して、検出感度が 100~1,000 倍低い点に注意すべきである。

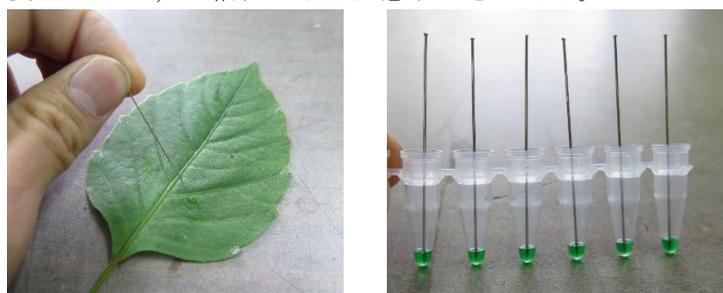


図 4 操作の様子 (左、針刺し 右、PCR 反応液に浸漬)

5) Tissue blot immunoassay 法 (Asano et al., 2017 ; 浅野ら 2018a)

本法は、ニトロセルロースメンブレンに付着したウイルス外皮タンパクを抗体抗原反応により検出する方法である。ウイルスが検出された部分が紫色に発色する (図 5)。発色部位によりウイルスの分布を確認できる。さらには、発色程度によりウイルス濃度を推測できる。本法は平成 31 年 5 月現在 TSWV についてのみ検討した。塊根、茎および葉で実施可能である。

- ①メンブレン (Amersham Protran Premium0.45 μ m NC Nitrocellulose Blotting Membrane..Catalogue No 10600008) を PBST に浸し、15 分間振とう後、ろ紙上で 5 分乾燥させる。
- ②塊根の切り口をメンブレンに押し付ける。
- ③メンブレンを Blocking One (ナカライテスク) に浸し、20 分間振とう。
- ④メンブレンを取り出し、表面の余分な Blocking One をろ紙で除き、PBST で 4000 倍希釈した TSWV 抗体 (コーティング液) (TSWV 検定用試薬 (DAS-ELISA 法)、日本植物防疫協会茨城研究所) に浸し、30 分間振とう。
- ⑤メンブレンを蒸留水ですすぎ、PBST で 5 分間振とう。
- ⑥メンブレンを、PBST で 15000 倍希釈した TSWV 二次抗体 (Anti-Rabbit IgG (Fc) Alkaline Phosphatase Conjugate, Promega) で 10 分間振とう。
- ⑦メンブレンを蒸留水で 20 倍希釈した Blocking One (or 原液の PBSTN) に浸し、5 分間振とう。
- ⑧メンブレンを PBST で 10 分間振とう。
- ⑨メンブレンを AP 緩衝液で 5 分 \times 2 回振とう。
- ⑩メンブレンを取り出し、表面の余分な液をろ紙で軽く吸う。
- ⑪基質発色液 (BCIP/NBT Liquid Substrate system, SIGMA) を 1 メンブレンあたり 4ml いきわたらせる。トレイなどをかぶせて暗黒湿室下で 60 分反応させる。水道水で基質発色液を洗い流し、完全に乾ききらないうちにカメラで撮影してデータを保存する。

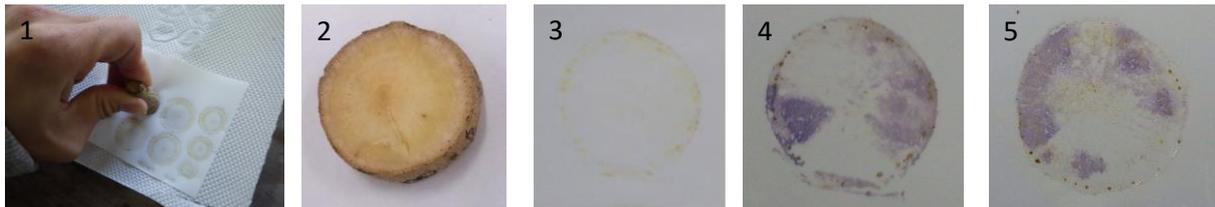


図5 Tissue blot immunoassay によるダリア球根からの TSWV の検出状況
1. メンブレンへの押し付け 2. 球根の断面 3. 発色前 4, 5. 陽性株

<PBS緩衝液 (Phosphate-buffered saline (PBS) pH7.4) >		
NaCl	塩化ナトリウム	8.0g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	リン酸水素二ナトリウム十二水和物	2.9g
KCl	塩化カリウム	0.2g
KH ₂ PO ₄	リン酸二水素カリウム	0.2g
水 (DW)		1000ml

<PBST緩衝液>		
PBS		1000ml
Tween20	ツイーン20 (商品名)	0.5ml

<PBSNT >		
PBST		1000ml
スキムミルク	免疫化学用特効試薬 (ナカライテスク)	20g

<AP緩衝液 (Alkaline phosphate buffer (AP) pH9.5) >		
Tris base	トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (ナカライ)	12.1g
NaCl	塩化ナトリウム	5.8g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	塩化マグネシウム六水和物	1.0g
NaN ₂	アジ化ナトリウム	0.2g
水 (DW)		800ml

1N HCl で pH9.5 に調整し、水を加えて 1000ml にする。

アジ化ナトリウムは毒性が高いので手袋、マスクを着用して調整する。

(2) TSWV の植物体内での分布

TSWV を含むトスポウイルス属は植物体内での分布が不均一であることが知られている。TSWV ではダリアを初め、キク、ジャガイモなどでそのような分布の傾向が確認されている。ウイルス検定では主に RT-PCR、ELISA、イムノストリップなどを使用するが、検定部位が 1cm 四方程度と小さく、感染植物であってもウイルスが存在していない部位をサンプリングすることで検定の結果が誤って陰性となる可能性がある。ダリアでも TSWV の植物体内の分布が調査されており (Asano et al., 2017; 浅野ら 2018a)、その傾向を理解した上でサンプリングすることが重要である。

1) 葉での分布

複葉について潜在感染株の中位葉を対象に micro tissue direct RT-PCR を行った結果、TSWV の検出率は高い順に葉柄、葉脈、葉軸となり、葉身ではやや低い傾向にある (図 6)。小葉について Tissue blot immunoassay による TSWV の分布調査でも葉脈近辺では安定して分布しており、葉身では不均一になる傾向がある (図 7)。また、病徴部と TSWV の分布はほぼ一致しており、病徴が見られる場合は、その部位でウイルス検定を行う。

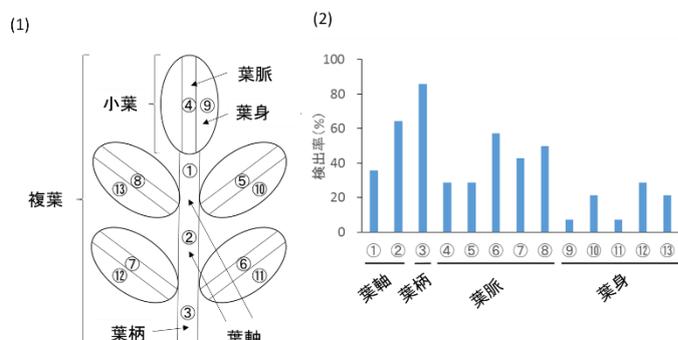


図 6 ダリア複葉の各部位での TSWV の検出
1: 検定部位, 2: TSWV 検出率 (n=14)

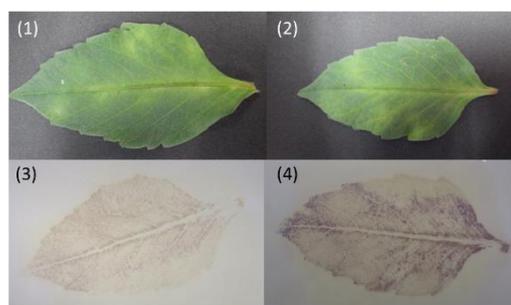


図 7 ダリア小葉での TSWV の感染分布
1、2: TSWV に感染した小葉, 3、4: 1、2 のサンプルでの TSWV の検出結果
Tissue blot immunoassay により TSWV を検出

2) 茎での分布

茎では感染株の栄養生長期および開花期での節位別の TSWV の検出率が Tissue blot immunoassay により調査されている。栄養生長期では、上位節は、中位および下位節と比べて TSWV の検出率が低い (図 8)。一方、開花期では上位節で検出率が高く、下位節ほど検出率が低くなっており (図 9)、生育ステージによって TSWV の分布が異なっている。この要因について栄養成長期では茎の伸長が TSWV の増殖や移行より早いいため、もしくは上位節での増殖・移行が植物体側の防御反応により抑制されているためと考えられている。一方、開花期では茎の伸長が止まることで、TSWV が上位へ移行しやすくなったと推察される。また、開花期で上・中位節と比較して下位節で検出率が低かったことに関しては、光合成同化産物と共にウイルスが転流により老化した下位節から上位の活性が高い部位へ移動した可能性が考えられる。

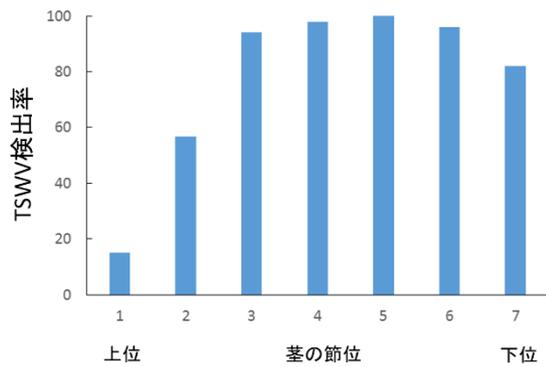


図8 栄養生長期におけるダリア茎での TSWV の検出
Tissue blot immunoassay により TSWV を検出。(n=10)

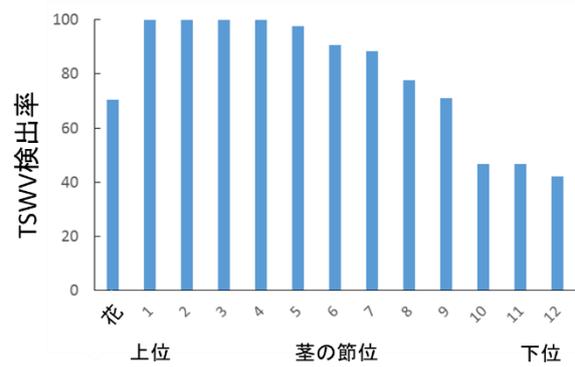


図9 開花期におけるダリア花および茎での TSWV の検出
Tissue blot immunoassay により TSWV を検出。(n=9)

3) 球根での分布

球根の横断面での TSWV の分布を Tissue blot immunoassay により調査した結果、TSWV は球根の表皮、皮層、師部、木部、維管束に主に分布している一方で、髄での分布は少ない傾向にある (図10)。上・中・下位部について TSWV の分布程度に大きな差はみられない。横断面の分布の程度については、半数以上の個体で TSWV の分布面積は断面の 1/3 未満であり、分布の不均一性は非常に高い。

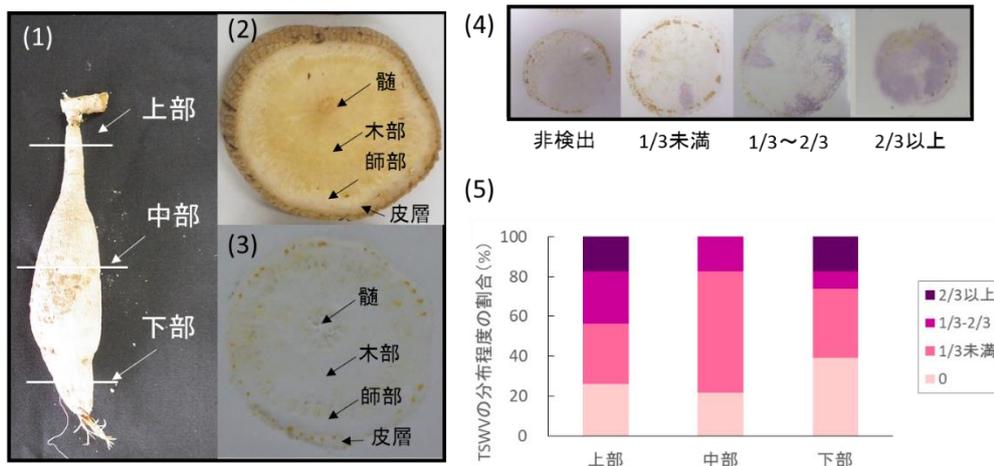


図10 ダリア球根断面における TSWV の分布

1: 球根の検定部位, 2-3: 球根断面図とニトロセルロースメンブレンへの付着の様子,

4: 球根における TSWV の検出事例, 5: 球根の各部位での TSWV の感染割合

Tissue blot immunoassay により TSWV を検出 (n=23)

(4) 適切な検定部位

ダリアの部位別での TSWV の分布傾向を考慮すると、分布が最も不均一であった球根はウイルス検定時のサンプリング部位として適切でないと考えられる。複葉については、検出率が高かった中位葉の葉柄、葉軸、葉脈が検定部位として適している。また茎については、栄養成長期では中位節、開花期では上位節が適している。

～さいごに～

ダリアの生育及び品質を低下させるウイルス・ウイロイド病の対策として、感染株の除去、健全株の選抜、再汚染の防止が挙げられる。これらを実行するにあたり、ウイルス・ウイロイド病の目視での診断および潜在感染株の検定手法が必要となる。目視での診断の際は、主要なウイルス・ウイロイド病には様々な病徴があることに注意する。また、親株の選抜には高感度の RT-PCR を用いたウイルス・ウイロイド検定をすることで、潜在感染株を誤って使用することを防止できる。マルチプレックス RT-PCR は TSWV、DMV、CSVd の 3 種を検定するときに、リアルタイム RT-PCR は 1 種のウイルス・ウイロイドを検定するときに使用すると効率的である。検定の際、ウイルス・ウイロイドを検出しやすい部位からサンプリングすることで検出漏れを減らすことができる。労力をかけて選抜した健全親株については、再感染を防ぐように虫媒伝染対策のネット被覆、殺虫剤散布、汁液伝染対策のハサミの消毒を推奨する。これらの対策を実施することで、ウイルス・ウイロイド病被害の低減を目指していただきたい。

参考文献

- 浅野ら, 2015. ダリアに感染するウイルス・ウイロイドの検出技術の開発および国内における発生状況. 植物防疫. 69(12) : 12-16.
- Asano et al., 2015 Simultaneous detection of Tomato spotted wilt virus, Dahlia mosaic virus and Chrysanthemum stunt viroid by multiplex RT-PCR in dahlias and their distribution in Japanese dahlias. Letters in Applied Microbiology. 61 : 113-120.
- Asano et al., 2017. Distribution of *Tomato spotted wilt virus* in dahlia plants. Letters in Applied Microbiology. 64 : 297-303.
- 浅野ら, 2018a. ダリアにおけるトマト黄化えそウイルスの植物体内分布. 植物防疫. 72(2) : 28-32.
- 浅野ら, 2018b. ダリアにおけるキク矮化ウイロイドの感染による病徴. 平成 30 年度日本植物病理学会大会 プログラム・講演要旨予稿集 : 78.
- Hosokawa et al., 2006. Direct RT-PCR method for detecting two chrysanthemum viroids using minimal amounts of plant tissue. Journal of Virological Methods. 131 : 28-33.
- 松下ら, 2006. リアルタイム PCR を用いたキクわい化ウイロイドの定量. 日本植物病理学会報. 73(1) : 38.

研究事業名 農林水産業・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」
(平成 25～27 年度) 課題番号 25075C

実施体制 (名称は研究期間当時のもの)

代表機関 宮崎県総合農業試験場 (研究総括者 中村 薫)
共同研究機関 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 花き研究所
南九州大学 環境園芸学部
秋田県農業試験場
山形県庄内総合支庁産業経済部農業技術普及課産地研究室
奈良県農業研究開発センター
普及・実用化支援組織
宮崎県農政水産部営農支援課
(有) 綾園芸
山形県農業総合研究センター園芸試験場
山形県庄内総合支庁産業経済部農業技術普及課産地研究室

「ダリアのウイルス・ウイロイド病診断マニュアル」に関わった担当者

中課題「ウイルス等病害防除技術の開発」責任者：

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 花き研究所 松下 陽介

小課題「ダリアのウイルス・ウイロイド検定技術開発」責任者： 松下 陽介

小課題「ダリアのウイルス・ウイロイド防除技術開発」責任者：

奈良県農業研究開発センター 浅野 峻介 (執筆者)

同 平山 喜彦

「ダリアのウイルス・ウイロイド病診断マニュアル」

令和元年（2019年）6月

球根増殖コンソーシアム

作成 奈良県農業研究開発センター
〒633-0046 奈良県桜井市池之内 130-1
電話：0744-47-4491 FAX：0744-47-4851

編集 宮崎県総合農業試験場
〒880-0212 宮崎県宮崎市佐土原町下那珂 5805
電話：0985-73-2121（代表） FAX：0985-73-2127

注) マニュアル利用の免責事項

本マニュアルの利用により、万が一利用者の方に何らかの不都合や損害が発生したとしても、当コンソーシアムは何らの責任を負うものではありません。