

Short Report

Chenopodium quinoa を利用した *Tospovirus* 虫媒機構の効率的解析藤晋一¹, 横山咲¹¹ 秋田県立大学 生物資源科学部 生物生産科学科

Chenopodium quinoa を利用した *Tospovirus* の媒介試験方法を開発した。ネギアザミウマ成虫を *C. quinoa* 葉に2日間放飼し、産卵させた。産卵後、新しい *C. quinoa* 葉を加えて、3-4日間維持することで、幼虫を孵化させることができた。孵化した1齢幼虫を、Iris yellow spot virus (IYSV) に感染させた *C. quinoa* 葉で2日間ウイルスを獲得させた後、催芽ソラマメで成虫になるまで飼育した。成虫はさらにインパチェンス葉で接種吸汁を行い、ウイルスの媒介試験を行った。5日後に典型的なウイルス症状が認められ、本試験方法は、*Tospovirus* の媒介試験に有効な手法であることが明らかとなった。本法でネギアザミウマ8個体群とIYSV 6分離株を用いて媒介試験を行った結果、アザミウマ個体群とIYSV系統の違いによる媒介率に有意差は認められなかったが、分離株によっては大きな差が生じた。

キーワード：Iris yellow spot virus, ネギアザミウマ, *Chenopodium quinoa*, 媒介試験

1990年以降、*Tospovirus* の世界的な流行は、施設園芸作物を中心にしばしば壊滅的な被害をもたらしてきた。*Tospovirus* は1980年代まではトマト黄化えそウイルスのみとされてきたが、現在は暫定種も含めて29種が報告されており、国内では8種のウイルスが報告されている。*Tospovirus* は実験的には汁液感染が可能であるが、非常に不安定なウイルスであるため、管理作業等における鎌やはさみ等を介した汁液伝染の可能性は低いとされており、その伝染はアザミウマを介して行われる。*Tospovirus* を媒介するアザミウマは成虫の体長が1mm程度の総翅目害虫で、作物の葉、花を食害することから、重要害虫として位置づけられている。*Frankliniella* 属、*Scirothrips* 属および *Thrips* 属が *Tospovirus* を媒介するが、アザミウマ種により媒介できるウイルス種は異なっている。日本において *Tospovirus* を媒介するアザミウマとしては、日本土着種であるヒラズハナアザミウマ、ネギアザミウマ、海外からの侵入害虫であるミナミキイロアザミウマ、ミカンキイロアザミウマなどが知られている。*Tospovirus* は宿主植物

だけでなく、アザミウマ虫体内でも増殖するウイルスであることから、*Tospovirus* の制御に当たっては、アザミウマの発生生態を考えた防除技術の確立が重要である。特に新たに発見されたウイルス種で媒介アザミウマ種が特定していないウイルスや、海外から侵入が危惧されているウイルス種のうち、日本にそれを媒介するアザミウマ種が存在しない場合、日本に発生しているアザミウマの中に媒介できる種が存在するかどうかを明らかにすることは極めて重要である。そのためには効率的にアザミウマを飼育と媒介試験ができる必要がある。アザミウマの飼育方法としてはソラマメ催芽種子を用いた飼育技術が確立しており、幅広いアザミウマ種に適応可能である(村井2002)。一方で媒介試験については、Wijkamp & Peters (1993)が、村井(2002)の飼育技術を基本にして、ペチュニアのリーフディスクを用いた媒介試験方法が報告しており、この方法が広く利用されてきた。前述したように *Tospovirus* はアザミウマにより媒介されるが、一部のウイルス種を除いて、ウイルスを獲得できるのは1齢と2齢幼虫のみで、その

幼虫が蛹を経由して成虫になるまでの期間、虫体内で増殖し、成虫になってウイルスを媒介することが可能となる。したがって、ウイルスを獲得させたアザミウマを効率的に準備するためには、卵あるいは孵化幼虫を容易に準備できる技術が必要である。採卵方法としては、パラフィルムなどの薄膜フィルムを通して水中に産卵させ、花粉上で孵化させる技術（村井・石井 1982）が一般に用いられているが、薄膜フィルムの作製には経験とコツを要する、本方法はヒラズハナアザミウマ、ミカンキイロアザミウマ、ネギアザミウマ、ヒラズハナアザミウマで利用可能とされているが、アザミウマ個体群によっては、容易に産卵しない個体群も存在する。特にネギアザミウマでは個体群によっては、この採卵方法が難しい場合が多く、採卵植物としてダイズ葉を利用する方法もある（桜井未発表）。しかしながら、そのためにはダイズの栽培する必要がある。ネギアザミウマは、Iris yellow spot virus (IYSV) を媒介することが知られており、タマネギ、ネギ、ニラ、トルコギキョウにおいてその発生が問題となっている。IYSV のアザミウマ伝搬試験方法としては、Inoue et al (2010) が、*Nicotiana benthamiana* をウイルス獲得植物として利用し、リーフディスクとしてインパチェンスを用いる方法が報告されている。我々も本法を用いた媒介試験を試みたが、*N. benthamiana* 葉上での死虫率が高く十分な媒介試験が行えなかった。一方で、獲得させるウイルス量を定量的にとらえることも重要であると考え、ウリ科に感染する *Tospovirus* 以外にウイルス分離植物として広く利用され、局部病斑を形成する *Chenopodium quinoa* (図 1) を用いて、ウイルスの獲得が行えれば、様々な *Tospovirus* 種の媒介試験に応用可能と考えた。そこで、本研究では *C. quinoa* を利用した *Tospovirus* 虫媒機構の効率的解析を開発したので、ここに報告する。

材料および方法

供試アザミウマ

試験には、秋田県鹿角市、能代市（浅内、須田）、神奈川県平塚市、長野県松代市、三重県松阪市、香川県高松市、高知県南国市で採集された個体群を用

いた。これらアザミウマは、催芽ソラマメを用いて、25℃のインキュベーター内（明期 16 時間、暗期 8 時間）で飼育した。



図1 *C. quinoa*に形成したIYSVによる局部病斑

供試ウイルス

試験には、佐賀県のタマネギから分離された SgOniD1 株（ブラジル型）、千葉県のアルストロメリアから分離された CbAlsD1 株（オランダ型）香川県のトルコギキョウから分離された香川株 1,2（ブラジル型）、神奈川県の新野から分離された神奈川株（オランダ型）および長野県のトルコギキョウから分離された長野株（オランダ型）を用いた。これらウイルス感染葉は、-80℃で保存し、感染 *C. quinoa* 葉は 0.1M リン酸緩衝液（pH 7.2 10mM Na₂SO₃ 含有）を用いた汁液接種により作製した。

C. quinoa 葉を用いた孵化幼虫の調整

タイトタッパーに水で湿らせたコンフォートタオルを入れ、その上に *C. quinoa* 葉を置いた。そこにネギアザミウマ成虫 50 頭を入れた後、*C. quinoa* 葉の上にコンフォートタオルを置いた。*C. quinoa* 葉への産卵は、25℃のインキュベーター内（明期 16 時間、暗期 8 時間）で行った。2 日後アザミウマ成虫を取り除き、産卵した *C. quinoa* 葉を新鮮な *C. quinoa* 葉で挟む形で置き、さらにコンフォートタオルを置いて、産卵時と同様の飼育条件で 3-4 日間静置した。

アザミウマのウイルス獲得

汁液接種によりえそ症状を呈した IYSV 感染 *C. quinoa* 葉を産卵試験と同様の方法でタイトタッパ

一上に準備した。孵化した1齢幼虫は、実体顕微鏡下で、水で濡らした絵筆を用いて、1頭ずつ IYSV 感染 *C.quinoa* 葉に移した。ウイルス獲得に供した幼虫の個体数は、*C.quinoa* 葉1枚あたり最大50頭とした。ウイルスの獲得は、産卵時と同様の飼育条件で2日間静置して行った。ウイルスを獲得させた幼虫はソラマメを入れたタイトッパーに移し、成虫になるまで同様のインキュベーター内で維持した。



図2 *C. quinoa*の食害痕と孵化幼虫

アザミウマによるウイルス媒介試験

成虫となったアザミウマを1頭ずつインパチェンス葉(タキイ F1 テンポレッド テンポラベンダー)および水でしめらせたグラスファイバーフィルター(アドバンテック GA55)とともに48ml容スチロールねじ瓶に入れ、2日間摂食させることにより、ウイルスを媒介させた。2日後に葉を回収し、再度新たなインパチェンス葉を入れ、同様に方法で媒介試験を行った。回収したインパチェンス葉は、5日間インキュベーター内で維持し、病徴の有無を観察した。

ELISAによるウイルス検定

IYSV 感染の有無は、ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) を用いて行った。IYSV 特異的抗体は Agdia 社製を使用した。IYSV の感染は、健全植物を対照として、3倍以上の吸光度を示した個体を陽性としたまた、2回のインパチェンスによる媒介試験のいずれかで感染が確認されれば、ウイルスを媒介したものとみなした。

結果

C. quinoa 葉を用いた孵化幼虫の調整

C.quinoa 葉にアザミウマを放飼した結果、多数の食害痕が形成され(図2)、*C.quinoa* 葉でアザミウマを十分に維持できることが明らかとなった。食害痕が激しいため、そのまま幼虫が孵化するまでの維持は困難であり、しばしば、*C.quinoa* 葉が腐敗することがあったが、新鮮な *C.quinoa* 葉を追加することで、孵化後の幼虫は、新鮮葉を摂食することができた。

ウイルス媒介試験

はじめに孵化幼虫が *C.quinoa* 葉で摂食することの影響を評価するために、健全葉で孵化幼虫を接触させたところ死虫率は9%で、*C.quinoa* 葉を用いたウイルス獲得に影響を及ぼさないことが明らかとなった。そこで、アザミウマ個体群と、IYSV 分離株の間で、ウイルスの媒介試験を行った。その結果、インパチェンス葉に *Tospovirus* 感染に特徴的な症状が出現し(図3)、ELISA 法においてもウイルスが検出された。



図3 インパチェンスに発生したウイルス症状

試験結果に基づいて、媒介率を算出したところ、媒介率は低い組み合わせで0%、高い組み合わせでは、媒介率が70%を超えていた(図4)。アザミウマ個体群と IYSV 系統の違いによる媒介率に有意差($p<0.05$)は認められなかった。しかしながら、分離株によっては大きな差が生じ、特に長野県の個体群では、分離株により0-40%の媒介率の違いが認められた。

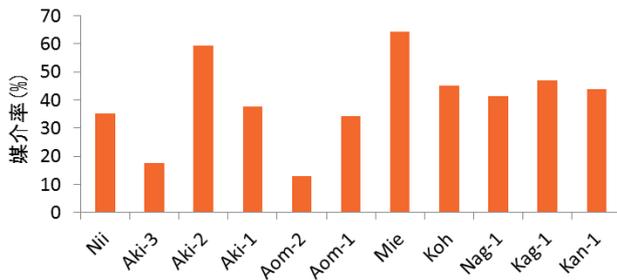


図4 アザミウマ個体群の違いによる媒介率

Kan: 神奈川, Kag: 香川, Nag: 長野, Koh: 高知, Mie: 三重

考察

ウイルスが全身感染せず、局部感染する *C.quinoa* 葉を用いた媒介試験を試みたところ、インパチェンス葉でのウイルス感染に成功し、本方法が利用可能であることが明らかとなった。採卵に用いた *C.quinoa* 葉がしばしば腐敗することがあったが、タイトッパー中のコンフォートタオルの水を固く絞ることと、産卵にはできるだけ肉厚な *C.quinoa* 葉を用いることに留意すれば、十分、斉一に孵化幼虫を準備できることが明らかとなった。実際の媒介試験では、個体群と IYSV 系統の間での有意な差は認められなかったことから、ネギアザミウマの媒介率は、IYSV の系統に依存しないことが示唆された。しかし採集した分離株により媒介率に差が生じており、個体群によっては、分離株が媒介率に大きく影響しているものも存在した。同一地域で採集されたネギアザミウマ個体群とウイルス分離株の間で高い媒介率を示す傾向は認められなかった(長野県, 香川県)。一方で本ウイルスが未発生である、秋田県能代市浅内の個体群では高い媒介率を示した。本個体群は、海外から侵入したと考えられている産雄性生殖型の個体群であり、IYSV が海外からの侵入ウイルスであることを考えるとこの高い媒介効率は理解できる結果である。一方で本結果から、今後能代市のネギ産地に本ウイルスが侵入した場合、爆発的に被害が拡大する可能性があるため警戒が必要である。

IYSV にはオランダ型とブラジル型の 2 系統が存在し、日本では、2 系統が同一圃場さらには同一株で発生している (Fuji et al 2105)。本ウイルスはアザミウマ体内でも増殖可能であり、ウイルスの拡散において、アザミウマがいずれかの系統を選択的に

獲得する能力を有していれば、その後の発生におけるアザミウマの影響力は高い。加えて、両系統を同時に獲得した場合、アザミウマ体内で組み換えが起こり新たな系統が発生する可能性がある。これらの可能性を調査する上で、獲得させるウイルス量を調節できる *C.quinoa* 葉の利用は非常に有効であると考えられる。

謝辞

本研究は平成 27 年度学長プロジェクト研究費(創造的研究)によって行われた。

文献

- Fuji, S., Zen, S., Sato, I., Kishi, H., Furuya, H., Okuda, M. (2015) Population dynamics of iris yellow spot virus in onion fields and lisianthus greenhouses in Japan. *Plant Pathology*, 64, 808-816
- Inoue, T., Murai, T., Natsuaki, T. (2010) An effective system for detecting Iris yellow spot virus transmission by *Thrips tabaci* *Plant Pathology*, 59, 422-428.
- 村井 保 (2002) 「ソラマメ催芽種子による汎用的害虫飼育法」『植物防疫』55(7) 305-309.
- 村井 保, 石井卓爾 (1982) 「花粉による訪花性アザミウマ類の簡易飼育法」『応用動物昆虫学会』26, 149-154.
- Wijkamp, I., Peters, D. (1993) Determination of Median Latent Period of Two Tospoviruses in *Frankliniella occidentalis*, Using a Novel Leaf Disk Assay. *Phytopathology*, 83, 986-991.

〔平成 28 年 7 月 20 日受付〕
〔平成 28 年 7 月 31 日受理〕

An effective system for detecting Iris yellow spot virus transmission by *Thrips tabaci* using *Chenopodium quinoa* leaves.

Shin-ichi Fuji, Saki Yokoyama

Department of Bioresource Science, Faculty of Bioproduction Science, Akita Prefectural University

We developed an effective system for detecting Iris yellow spot virus (IYSV) transmission by *Thrips tabaci* using *Chenopodium quinoa* leaves. Adult thrips were placed on *C. quinoa* leaves for 2 days to spawn. After spawning, newly formed *C. quinoa* leaves were added, and the first set of larvae was hatched after 3–4 days of maintenance. The hatched larvae underwent acquisition feeding for IYSV on infected *C. quinoa* leaves for 2 days and were then maintained on germinated broad bean seeds until adulthood. Adult thrips underwent inoculation feeding for IYSV on impatiens leaves. Typical IYSV symptoms appeared, and the virus was detected by ELISA. We performed a transmission test using eight thrips populations and six IYSV isolates. IYSV transmission rates did not show a relationship with thrips populations or virus strains.

Keywords: Iris yellow spot virus, *Thrips tabaci*, *Chenopodium quinoa*, *Tospovirus*, Vector transmission