

下伊那地区の切り花ダリア産地における ウイルス・ウイロイド感染の現状と非感染苗の確保

北村 嘉邦

信州大学農学部食料生産科学科

要約 下伊那のダリア (*Dahlia variabilis*) 切り花生産圃場におけるウイルスおよびウイロイド感染の現状を明らかにすることを目的として、ダリアに感染することが報告されているキュウリモザイクウイルス (CMV)、タバコ条斑ウイルス (TSV)、ダリアモザイクウイルス (DaMV)、トマト黄化えそウイルス (TSWV) およびキク矮化ウイロイド (CSVd) の感染状況を RT-PCR および RT-nested-PCR によって調査した。その結果、収集した検体の86.7%から CSVd を検出したほか、33.3%から DaMV を、20%から CMV を検出した。一方、TSWV および TSV はいずれの検体からも検出されなかった。また、無病苗の *in vitro* 個体の分譲を目的として、農家より提供を受けた4品種について、茎頂培養を介して *in vitro* 培養系へ植物体を導入し、今回検定した5種類の病原体が検出されない苗を確保した。

キーワード：ウイルス，ウイロイド，切り花ダリア，非感染苗

諸 言

下伊那では、従来生産されていたオキシペタルムが連作障害等で生産不振に陥ったことから、農家とJAみなみ信州が共同して平成17年より切り花ダリアの産地形成に取り組んだ。その結果、現在では下伊那は切り花ダリアの出荷額全国一位を誇る産地となっている。

一般的にダリアは塊根の分球や挿し芽などの栄養繁殖によって増殖、維持される。生産者が種苗を導入する際は、挿し芽苗を種苗会社から導入する¹⁾。また、新品种を導入する際には生産者団体による視察の一環として育種家を訪問し、塊根を購入する。購入した塊根を原種苗として挿し芽を行い、切り花生産に用いる植物体を増殖する。生産圃場において、芽条変異などにより有望な変異体が得られた場合にも挿し芽によって増殖し、生産者オリジナル品種として利用する場合がある¹⁾。種苗会社によって販売されている挿し芽苗は無病化されている場合が多いが、育種家から導入する塊根や、生産者個人レベルで増殖しているオリジナル品種の種苗には、ウイルス等の病原体の感染リスクがある。

ダリアには、ダリアモザイクウイルス (DaMV)、トマト黄化えそウイルス (TSWV)、タバコ条斑ウ

イルス (TSV)、キュウリモザイクウイルス (CMV) などのウイルスおよびキク矮化ウイロイド (CSVd) が感染することがこれまでに報告されている²⁻⁴⁾。これらの病原体について、下伊那の切り花ダリア圃場における感染の実態を報告した資料は見あたらない。今後、切り花生産と生産者オリジナル品種の安定した維持を図る上では、生産圃場における病原体の感染の実態を明らかにし、対策を講じることが重要である。

本報告では、下伊那の切り花ダリア生産圃場において、ダリアに感染することが報告されているウイルスおよびウイロイドの感染状況を調査した結果を報告する。また、将来的に生産者団体が無病苗を維持するシステムを構築する際に無病苗の *in vitro* 個体を分譲することを念頭に置き、農家より提供を受けた4品種について、茎頂培養を介して *in vitro* 培養系へ植物体を導入した。そして、今回検定した5種類の病原体が感染していない苗を確保した。

材料および方法

1. 検定サンプルの収集

平成22年7月に下伊那の切り花ダリア生産圃場の巡回に同行し、モザイク状の病斑や壊死が見られる葉を飯田市および高森町のAからDの4軒の農家の圃場より採取した (図1)。Aでは‘コクチョウ’、‘ネッショウ’、‘ハミルトンジュニア’、‘ミッチャン’、

受理日 2015年10月30日

採択日 2016年1月28日

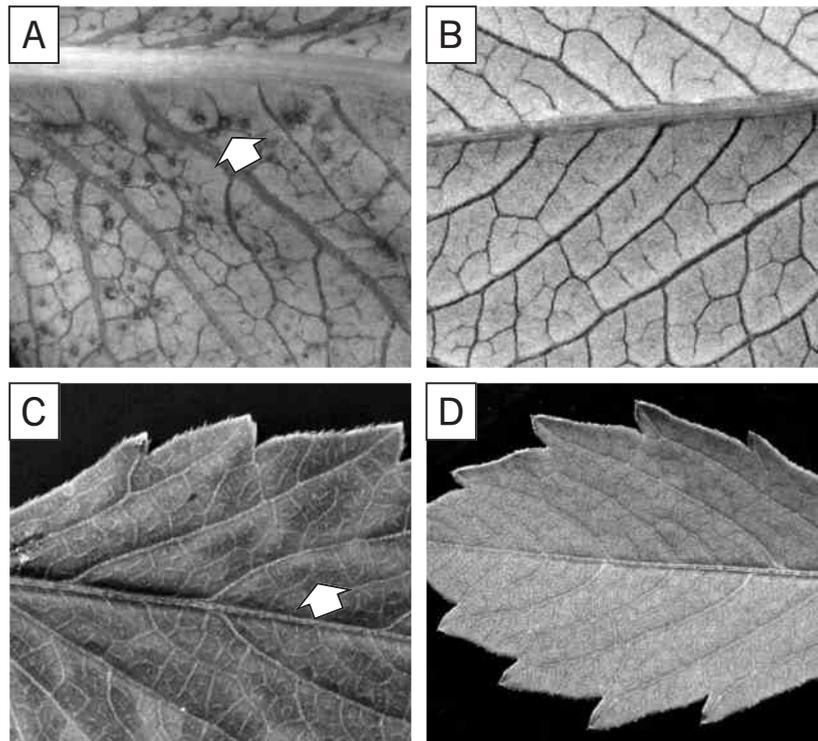


図1. 収集した検体の一部

- A: 背軸面に褐変(矢印)が見られる‘コクチョウ’の葉。
 B: ‘コクチョウ’の健全葉の背軸面。
 C: 向軸面にモザイク状の病斑(矢印)が見られる‘ネッショウ’の葉。
 D: ‘ネッショウ’の健全葉の向軸面。

‘ムーンワルツ’および‘ユキグニ’の検体を、Bでは‘コクチョウ’と‘ネッショウ’の検体を、CおよびDでは‘コクチョウ’の検体を採取した(表1)。

2. 病原体の検定

収集した検体について、CMV, DaMV, TSV, TSWV および CSVd の感染の有無を検定した。Microtissue direct RT-PCR 法⁹⁾を応用し、病原体感染の有無を検定した。収集した検体に注射針を刺した後、注射針の先端を逆転写反応液に数秒間浸漬し、逆転写反応を行った。反応液をテンプレートとして RT-PCR および RT-nested-PCR を行い、PCR 産物の増幅の有無を確認した。テンプレートの添加処理として、葉に挿入した注射針を浸漬した点以外の逆転写反応、RT-PCR および RT-nested-PCR は既報⁹⁾に準じて行った。RT-PCR の反応条件は 94°C 30 秒の熱変性、55°C 2 秒のアニーリング、74°C 30 秒の伸長反応を 30 サイクルとした。各病原体のゲノム部分配列を増幅するプライマーについては、既報⁹⁾と同一のものを用いた(表2)。RT-PCR で検出された場合に高保毒、RT-nested-PCR にて検出された場合を低保毒とし、RT-nested-PCR にて検出されなかった場合は非感染と判定した。

3. 非感染苗の確保

切り花生産圃場より‘コクチョウ’、‘ネッショウ’、‘ムーンワルツ’および‘ユキグニ’のシュート、19 から 26 本の分譲を受けた。この際、外見に病徴が見られない、健全な個体からシュートを採取した。茎頂分裂組織の表面を殺菌⁷⁾した上で葉原基 1 対とともに摘出し、さらに無菌条件下で発根させたキャベツの実生から得た根端の切断面に置床⁸⁾し、生育を補助した。キャベツ根端に置床した茎頂分裂組織は修正 Knop 培地^{7,9)}上で培養し、展葉を確認した後に修正 MS 培地^{7,10)}に継代した。培養個体は一貫して 23°C、12 時間日長、昼白色蛍光灯によって照度 1600 lx に設定したインキュベーター内で管理した。再生個体が 2 から 3 対の葉を展開した時点で、上述の方法と同様に病原体感染の有無を検定した。

結果および考察

1. 病原体の検定結果

供試した検体のうち、‘コクチョウ’および‘ユキグニ’の各 1 検体を除き、今回検定対象としたウイルスあるいはウイロイドの感染が認められた(表

表1 各農家の圃場から採取した検体およびその病原体検定の結果

| 検体No. | 農家 | 品種 | 病原体 | | | | |
|-------|----|-----------|-----|------|-----|------|------|
| | | | CMV | DaMV | TSV | TSWV | CSVd |
| 1 | A | コクチョウ | z+ | + | - | - | + |
| 2 | | ネッショウ | - | ++ | - | - | + |
| 3 | | ハミルトンジュニア | - | - | - | - | + |
| 4 | | ミッチャン | - | - | - | - | + |
| 5 | | ムーンワルツ | - | + | - | - | + |
| 6 | | ユキグニ | - | - | - | - | - |
| 7 | B | コクチョウ | - | - | - | - | + |
| 8 | | | + | - | - | - | + |
| 9 | | | - | - | - | - | + |
| 10 | | | + | - | - | - | + |
| 11 | | | - | - | - | - | + |
| 12 | | ネッショウ | - | ++ | - | - | + |
| 13 | | | - | + | - | - | ++ |
| 14 | C | コクチョウ | - | - | - | - | + |
| 15 | D | コクチョウ | - | - | - | - | - |

z : ++, RT-PCR で検出, +, RT-nested-PCR で検出, -, RT-nested-PCR で検出されず。

表2 各病原体の検定に用いたプライマー

| 病原体 | Sence (5'-3') | Antisence (5'-3') | 用いたステップ |
|------|-----------------------|------------------------|---------------|
| CMV | AAACCTGGATACACGTTTCAC | GTTAGCTTGGACTCCAGATG | RT-PCR |
| | TATTACCCTAAAGCCACCAA | CCGAAAGATCGTACAACAAT | RT-nested-PCR |
| DaMV | AAAAAGAGGCTACCATACCC | ACTTCCTGCTAGGACACTCA | RT-PCR |
| | ACAAAGGTGCTGTAACCAGT | CATAGTGGCCTTCTTCAGAG | RT-nested-PCR |
| TSV | CCCATAATACCGTGAACACT | CCTGTTACTCCATCAACCAT | RT-PCR |
| | GTTTACCAGTACCGATTCCA | AGACGGAAAAACTTCGTCTC | RT-nested-PCR |
| TSWV | TCTGCCCCACTATACCAAACC | CCTTCCTCTTCCTCTTCAACTG | RT-PCR |
| | GTCAGGGGACAATAACTG | CTGCTTCTCACTGTTTCC | RT-nested-PCR |
| CSVd | CAACTGAAGCTTCAACGCCTT | AGGATTACTCCTGTCTCGCA | RT-PCR |
| | CCAATCTTCTTTAGCACCG | AGTGGGGTCTTAAGCCCCAA | RT-nested-PCR |

1)。特に CSVd は調査した検体の86.7%から検出され、うち1検体が高保毒であり、感染が拡大していることが示唆された。DaMV は調査した検体の33.3%から検出され、うち2検体が高保毒であった。CMV は調査した検体の20%から検出され、いずれも低保毒であった。TSV および TSWV はいずれの検体からも検出されなかった。

本調査を行った平成22年時点では、一部の種苗会社から販売されている切り花ダリア生産用の挿し芽苗を購入する際には、病原体の感染リスクについて免責を求める書類にサインする必要がある。また、生産者が育種家から病原体フリー化処理を受けていない原種苗を直接入手し、切り花生産に供することもある¹⁾。病原体フリー化されていない苗を導入することで、生産圃場に病原体が継続して持ち込まれている可能性がある。

今回検定した5種類の病原体のうち、CSVd と TSV は難除去性の病原体であるとされている^{6,11)}。今回の検定ではこれらのうち CSVd が高確率で検出されており、CSVd フリー個体の確保が重要な課題であることが示唆された。また、TSV の感染が拡大する前に、非感染個体を確保することにも留意すべきであろう。

6 検体で CSVd と CMV または DaMV、1 検体で CSVd、CMV および DaMV が重複感染していた。今回の調査で収集したような、目視にて何らかの病徴が確認することができる植物体には、複数種の病原体が感染していることが疑われる。ダリアでは CSVd と DaMV が重複感染した場合、挿し芽の発根率が低下することが報告されている⁶⁾。種苗会社が取り扱わない、育成されたばかりの品種や生産者オリジナル品種の増殖、維持には、これらの病原

表3 茎頂培養の結果得られた再生個体数および非感染個体数

| 品種 | シュート数 | 再生個体数 ^z (%) | 非感染個体数 ^y (%) |
|--------|-------|------------------------|-------------------------|
| コクチョウ | 21 | 7 (33.3) | 7 (100) |
| ネッショウ | 21 | 9 (45.0) | 3 (33.3) |
| ムーンワルツ | 19 | 4 (26.3) | 1 (25.0) |
| ユキグニ | 26 | 6 (23.1) | 3 (50.0) |

z : (再生個体数) / (シュート数) * 100で算出。

y : (非感染であった個体数) / (再生個体数) * 100で算出。

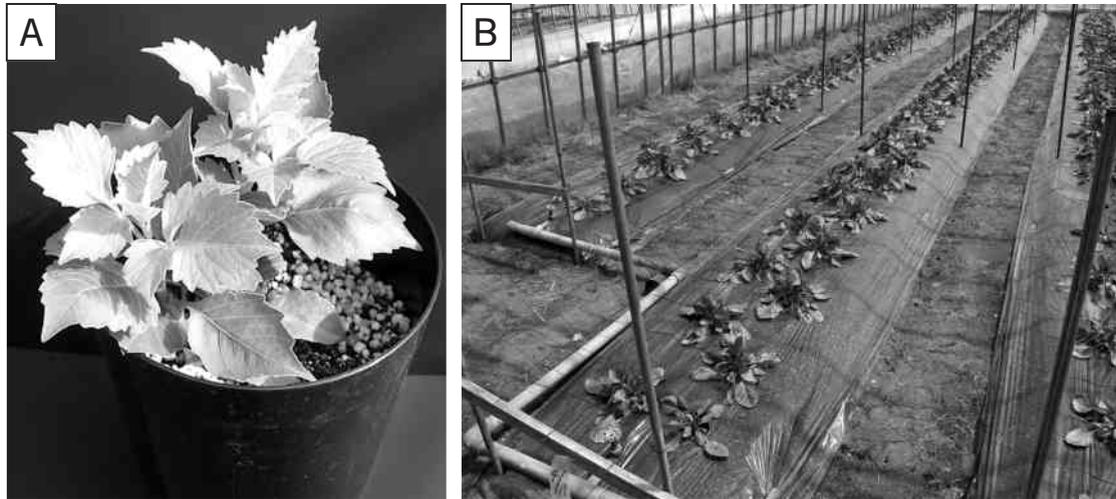


図2. 得られた非感染個体と生産現場での利用

A : 'ユキグニ' の非感染個体。

B : 'ネッショウ' 非感染個体を定植した農家の圃場。

体に感染していない個体を原種苗として確保することが重要であろう。今回の結果は、生産圃場レベルでは比較的高い頻度で CSVd と DaMV を保毒する個体が存在することを示唆する。新品種導入の際には、生産圃場と異なる場所で原種苗を管理、増殖し、切り花生産に用いる挿し芽苗のみを生産圃場に持ち込むなどの工夫が必要であろう。

2. 非感染苗の確保

各品種とも、23.1%から45.0%の個体が再生し、うち病原体検定結果が陰性であるものが25.0%から100%であった(表3; 図2 A)。なお、本調査では茎頂培養に供したシュートの病原体感染の有無は調査していない。目視で健全なシュートを供したため、茎頂培養前の段階で非感染であったものも複数含まれている可能性がある。

本調査で茎頂培養に供したシュートの数は必ずしも多くはないが、比較的高い率で非感染個体が得られている。圃場に導入した後であっても、早い段階で茎頂培養個体を得ることで、病原体非感染個体を原種苗として確保できる可能性が高い。前述のとおり、ダリアの増殖は主に栄養繁殖に依るため、数個

体の非感染個体を得ることができれば、営利生産レベルに苗を増殖することは容易である。本調査で得た非感染苗の一部も、増殖した上で農家に分譲している(図2 B)。

おわりに

本調査では、下伊那の切り花ダリア生産圃場の広範囲に CSVd の感染が拡大し、一部で CMV および DaMV の感染が見られることが明らかになった。病原体の感染は、植物本来の生理生態反応や形質を損なう場合がある。今回感染が確認された CSVd の場合、感染によってキクの日長反応性が変化する例が報告されている¹²⁾。また、本調査では検出されなかったが、TSV はダリアの花色発現に影響を及ぼす。具体的には、ダリアに数多く見られる複色花品種に TSV が感染した場合、単色花を咲かせるようになるほか、'コクチョウ' のような濃色品種では花卉の退色を引き起こす¹³⁾。ダリアという品目が持つ本来の生理生態、品種本来の形質を安定して引き出すために、植物体への病原体感染の有無には注意

を払う必要がある。

下伊那の切り花ダリアの生産では、2から3年に一回改植し、植物体を更新する。つまり、病原体の蔓延を防止するためには、改植時に用いる苗の無病化が有効である。数年前までは、一部の種苗会社から販売されている切り花ダリア生産用の挿し芽苗を購入する際には、病原体の感染リスクについて免責を求める書類にサインする必要があった。更新に用いる植物体に病原体の感染リスクが存在し、憂慮すべき状態であったが、現状では病原体フリーであることが保証されている苗が流通している。問題は種苗会社が商品化していない新品種と生産者オリジナル品種である。

ダリアの場合、種苗会社による育種以外に、個人育種家による育種が活発に行われており、種苗会社が商品化していない品種を生産者が独自に導入し、挿し芽増殖後に切り花生産に供する場合も多い。奈良県では生産者団体が無病苗を維持し、原種苗として用いるシステムを構築する取り組みがなされている¹⁴⁾。長野県においても同様のシステムを立ち上げることで、種苗会社が商品化していない品種の無病化と早期導入、生産者オリジナル品種の無病苗の維持に寄与すると考えられる。

今後は、全国一位の切り花ダリア生産地の維持に向けて、切り花ダリアの生産者団体による、無病化および *in vitro* 無病苗の維持システムの立ち上げや、大学と提携した技術講習の実施などの取り組みが必要であると考えられる。

謝 辞

病原体検定用の検体収集を行う際、JA みなみ信州の坂巻勲氏、下伊那農業改良普及センター（当時）の安藤忠幸氏、JA みなみ信州花卉部会ダリア専門班の皆様にご多大なご協力を頂いた。ここに記して謝意を表す。

引用および参考文献

- 1) 坂巻 勲：ダリア，長期栽培に対応した肥培管理・灌水管理で高品質生産．最新農業技術花卉．5：29-36．2013．
- 2) 井上忠男・井上成信：ダリヤに発生した Tomato spotted wilt virus（キク科植物のウイルスに関する研究 第3報）．農学研究．54：79-90．1972．
- 3) 末松俊彦・佐藤 裕・仙北俊弘・四方英四郎：北海道におけるダリアのウイルス病．北海道大農紀要．11：138-147．1978．
- 4) Nakashima, A., M. Hosokawa, S. Maeda and S. Yazawa: Natural infection of *Chrysanthemum stunt viroid* in dahlia plants. Journal of General Plant Pathology. 73: 225-227. 2007.
- 5) Hosokawa, M., Y. Matsushita, H. Uchida and S. Yazawa: Direct RT-PCR method for detecting two chrysanthemum viroids using minimal amounts of plant tissue. Journal of Virological Methods. 131: 28-33. 2006.
- 6) 仲 照史・藤井祐子・細川宗孝・中島明子・浅尾浩史・岡田恵子・前田茂一：ダリアの茎頂培養が生育とウイルス保毒程度に及ぼす影響．奈良県農業総合センター研究報告．38：17-22．2007．
- 7) Kitamura, Y., M. Hosokawa, C. Tanaka and S. Yazawa. Identification and sterilization of epiphytic bacterial flora near hydrangea shoot apical meristems. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 77: 418-425. 2008.
- 8) Hosokawa, M., A. Otake. Y. Sugawara, T. Hayashi and S. Yazawa. Rescue of shoot apical meristems of chrysanthemum by culturing on root tips. Plant Cell Reports. 22: 443-448. 2004.
- 9) Ringe, F and J. P. Nitsch. Conditions leading to flower formation excised Begonia fragments cultured *in vitro*. Plant Cell Physiology. 9: 639-652. 1968.
- 10) Murashige T. and F. Skoog. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15: 473-497. 1962.
- 11) Hosokawa, M., A. Otake, K. Ohishi, E. Ueda, T. Hayashi and S. Yazawa. Elimination of chrysanthemum stunt viroid from an infected chrysanthemum cultivar by shoot regeneration from a leaf primordium-free shoot apical meristem dome attached to a root tip. Plant Cell Reports. 22: 859-863. 2004.
- 12) Hosokawa, M., E. Ueda, K. Ohishi, A. Otake and S. Yazawa. Chrysanthemum stunt viroid disturbs the photoperiodic response for flowering of chrysanthemum plants. Planta. 220: 64-70. 2004.
- 13) Deguchi, A., F. Tatsuzawa, M. Hosokawa, M. Doi and S. Ohno. Tobacco streak virus (strain dahlia) suppresses post-transcriptional gene silencing of *flavone synthase II* in black dahlia cultivars and causes a drastic flower color change. Planta. 242: 663-675. 2015.
- 14) 藤井祐子・有馬 毅：奈良県のダリア—球根・切

**Present State of the Infection Spread of Viruses and Viroid in Dahlia Plants
for Cut Flower Production in Shimoina Area and Securing
Pathogen-Uninfected Plants**

Yoshikuni KITAMURA

Department of Food Production Science, Faculty of Agriculture,
Shinshu University

Summary

The present state of the infection spread of viruses and viroid in dahlia (*Dahlia variabilis*) plants for cut flower production in Shimoina area was investigated. Infection of cucumber mosaic virus (CMV), dahlia mosaic virus (DaMV), tobacco streak virus (TSV), tomato spotted wilt virus (TSWV) and chrysanthemum stunt viroid (CSVd) was detected by RT-PCR and RT-nested-PCR. CSVd, DaMV and CMV were detected in 86.7%, 33.3% and 20% of the collected samples, respectively. TSV and TSWV were not detected in any of the samples. Intending to provide pathogen-uninfected plants to farmers, a shoot tip culture was conducted with 4 cultivars provided from them. Regenerated plants of all 4 cultivars that were free of any pathogens investigated in this study were acquired successfully.

Key words : cut dahlia flower, pathogen-uninfected plants, viroid, virus