

マルチワクチンを核とした ホオズキのウイルス病 防除マニュアル



国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

目次

1. ホオズキのウイルス病とワクチン.....	1
2. ホオズキのワクチン導入から栽培の流れ.....	2
3. 発病調査—ウイルスの種類判定法—	
1) 試料の採集.....	3
2) ウイルス種の判別方法.....	4
4. ワクチンの選定および導入	
1) ワクチンの選定と入手先.....	5
2) ワクチンの接種方法.....	5
5. ワクチン接種苗の栽培.....	8
6. 防除効果および品質への影響.....	9
7. 備考.....	10
8. 参考資料.....	11

1. ホオズキのウイルス病とワクチン

ホオズキは東アジア原産の植物で、ナス科ホオズキ属に分類され、日本では8月中旬のお盆の時期に観賞用として飾られることが多い花きです。

近年、国内のホオズキ産地においてウイルスによると考えられるモザイク症やえそ症状が多発していました。これまでにホオズキに感染するウイルスは、トマトモザイクウイルス (Tomato mosaic virus, ToMV)、タバコ微斑モザイクウイルス (Tobacco mild green mosaic virus, TMGMV)、キュウリモザイクウイルス (Cucumber mosaic virus, CMV) の3種類が報告されています(参考資料1)。それらウイルスのうち、ToMV および TMGMV は種子による伝染に加え、栽培中の管理作業によって罹病植物から健全植物へと感染が拡大します。さらに、ウイルスに感染した根が栽培終了後に土壤中に残存することによって、次作における感染源となります。特に、ホオズキは地下茎による栄養繁殖によって栽培されるため、親株がウイルスに感染すると、後代までウイルス感染が継続します。したがって、防除が困難なウイルスとして生産現場で対策が急務となっていました。そこで、私たちは ToMV および TMGMV に対する防除手段のひとつとして、両ウイルスのワクチンを開発しました。本マニュアルでは、それら2種のウイルスの同時防除が可能な、マルチワクチンを核としたホオズキのウイルス病防除方法について紹介します。

最後に、本マニュアルは農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業において、数種弱毒ウイルスを用いたホオズキのウイルス病総合防除技術の構築の課題で実施された研究の成果であり、その開発と作成には大分県農林水産研究指導センター、宮崎県総合農業試験場のご担当者および生産者の皆様にご協力いただきました。ここに記してお礼申し上げます。

農研機構九州沖縄農業研究センター
生産環境研究領域 富高保弘

2. ホオズキのワクチン導入から栽培の流れ

ホオズキのワクチン（TMGMV ワクチンおよび ToMV ワクチン）は、強毒の TMGMV および ToMV を熱処理や化学的手法で変異させて作出した病原力の弱いウイルスです。ワクチンを予め苗に接種することで、強毒のウイルスに対して感染しにくくなり、感染したとしても発病が抑制されます。

ホオズキにワクチンを導入するには、以下の手順で実施します。①圃場に発生しているウイルスの種類を明らかにし、導入するワクチンの種類を選定します。②次に種子を消毒して播種し、子葉が展開した時期にワクチンを接種します。③これを親株として通常通り栽培したのちに、地下茎を採取します。④さらに、地下茎あるいは地下茎から育苗した苗を本圃に定植します。⑤その後は、慣行と同様に栽培します。各ステップの手順などについては次のページ以降をご参照ください。

①ウイルス種の調査
ワクチンの選定



②種子を消毒して播種し、子葉
展開期にワクチンを接種



⑤慣行に従い栽培



④地下茎/苗を定植



③通常通り栽培後、
地下茎を採取

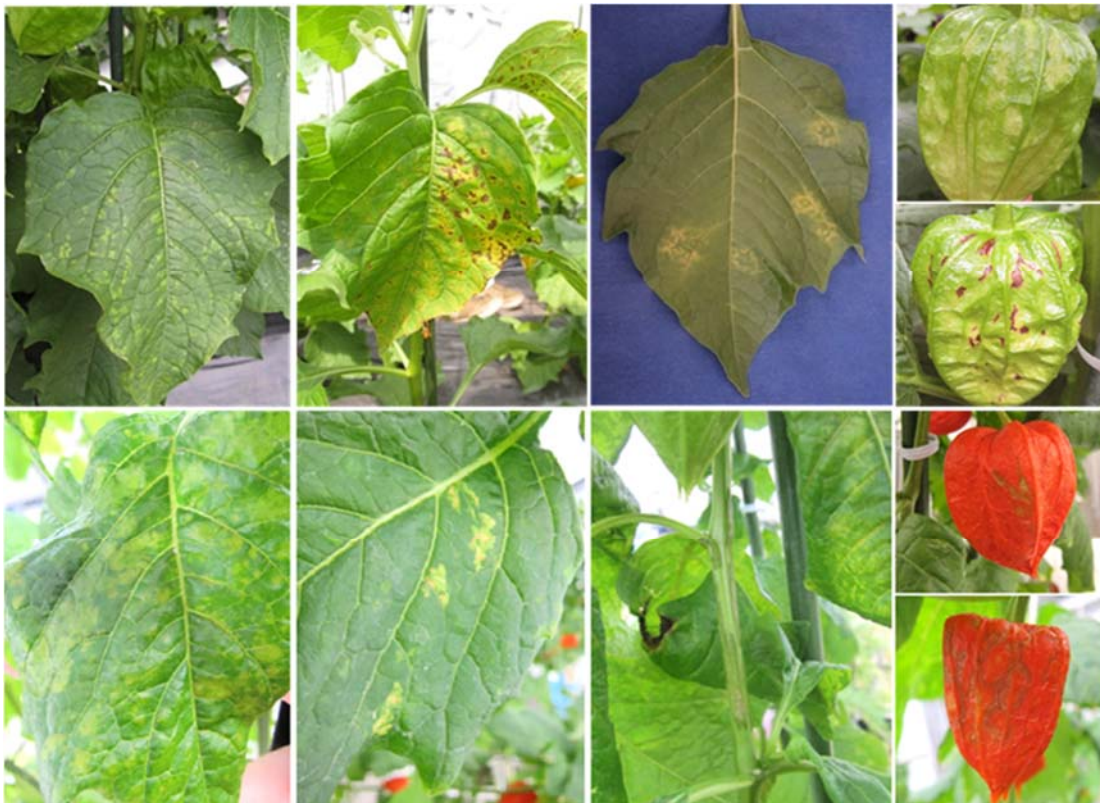


3. 発病調査—ウイルスの種類の見分け方—

ホオズキの主要産地におけるウイルス病の発生調査によって、ToMV および TMGMV が発生していることが明らかとなりました。また、それらのウイルスは地域によって分布が異なり、片方のウイルスだけが発生している圃場や両方のウイルスが発生している圃場がありました。そこで、ワクチンの種類を選定するため、まず初めに圃場に発生しているウイルスの種類を調べる必要があります。検定の手順を以下に示します（参考資料2）。

1) 試料の採取

本圃あるいは親株床で栽培中のホオズキがウイルスに感染しているかどうかを調べるとともに、ウイルスの種類を特定するため、下図のような葉やがくにえそ症状やモザイク症状を示す株を中心として採集します。



上段は TMGMV 感染株の症状、下段は ToMV 感染株の症状

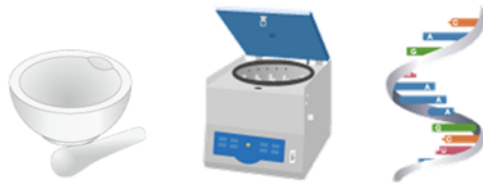
2) ウイルス種の判別方法

採集した試料における ToMV あるいは TMGMV の感染の有無を調べます。手法は逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法で実施します (下図)。

※手法の詳細は、本資料の「7.備考」および参考資料 2 を参照。

RNA抽出

圃場から採集した葉から核酸 (RNA)抽出します。



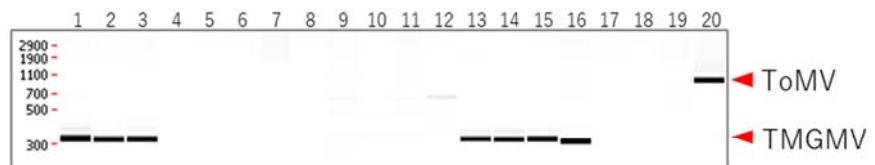
RT-PCR

このRNAを用いて、TMGMVおよびToMVを対象としたRT-PCRを実施します。



電気泳動

RT-PCR終了後、溶液を電気泳動し、TMGMV(311bp)あるいはToMV(1018bp)のバンドの有無を調べます。



例) RT-PCR法によるホオズキサンプルの検定結果
1~3および13~16はTMGMV陽性, 20はToMV陽性を示す。

※モザイクやえそ症状を示している葉を検定したにも関わらず、TMGMVおよびToMVがいずれも検出されなかった場合には、他のウイルスの感染が疑われます。

4. ワクチンの選定および導入

1) ワクチンの選定と入手

ワクチンの選定：

ウイルス種判別結果	対策
両ウイルスが検出されなかった場合	→ 苗にワクチンを接種しない
TMGMV が検出された場合	→ 苗に TMGMV ワクチンのみを接種
ToMV が検出された場合	→ 苗に ToMV ワクチンのみを接種
TMGMV と ToMV が検出された場合	→ 苗に TMGMV と ToMV ワクチンの両方を接種

ワクチンの入手先：

(国研) 農研機構九州沖縄農業研究センター (連絡先は巻末に記載) に、お問い合わせください。

2) ワクチンの接種方法

ワクチンを接種する苗は、乾熱消毒でウイルスを不活化した種子から育成した実生苗を用いることが重要です (参考資料 3、4)。このワクチン接種苗を生育させて親株にすることで、その地下茎からワクチン接種苗を効率的に生産することができます。なお、上記の実生苗ではなく地下茎から生育させた苗にワクチンを接種する場合には、前頁のウイルス種判別の検定を行って、接種する苗がウイルスに感染していないことを予め確認する必要があります。

ワクチンの接種方法には、苗の数が 100 株未満の少ない場合の小規模接種法と 100 株以上の多い場合の大規模接種法の 2 通りがあります。

(1) 小規模接種法

本法は、ワクチンを接種する苗の数が少ない場合に有効な手法です。



ワクチン感染葉の粗汁液とカーボランダム（600メッシュ）を用意する。
※カーボランダムは三角フラスコなどに移し、2重にしたガーゼでフラスコの口を覆う。



実生苗にカーボランダムを振りかける。
葉の表面に薄く、均一に振りかける。



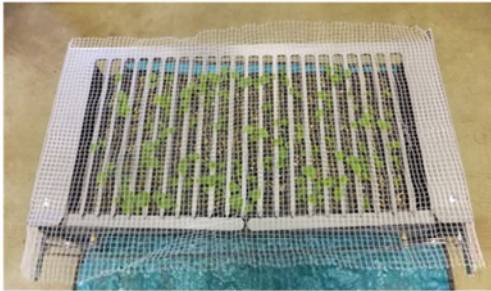
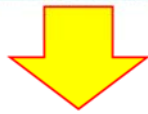
綿棒や指を粗汁液に浸し、次にカーボランダムを振りかけた葉を軽く擦る。
一枚の葉に接種したあと、再度綿棒や指を粗汁液に浸して接種する。
接種後、直ちに灌水して、日陰に1日程度静置する。

(2) 大規模接種法

ワクチンを接種する苗が多い場合にはコンプレッサー等を使用した大規模接種が可能です。この方法でワクチンを接種した場合、感染率は96%以上です。



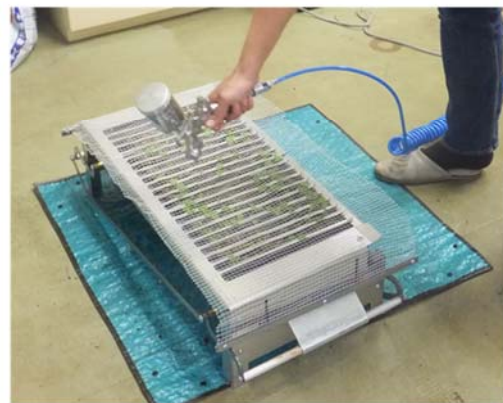
育苗トレイにホオズキを播種して、本葉1～2枚展開期まで育苗する。



苗の固定器に育苗トレイをセットする。
※固定器の入手先。
(株式会社微生物化学研究所、受注生産)



ワクチン感染葉の粗汁液を8000xgで5分間遠心し、その上清をワクチン接種器のカップに入れる。上清50mlあたり0.3gのカーボランダムを入れる。手元の圧力計が0.3MPaになるように圧力を調整する。ワクチンは、128穴トレイ1枚当たり、約100ml必要。



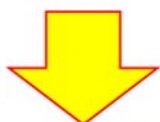
苗から15cm上にノズルの先端がくるように噴霧器を持ち、トレイの右から左へと一定のスピードで動かして接種する。接種後すぐに灌水し、日陰で1日養生する。

5. ワクチン接種苗の栽培

ワクチンを接種した親苗を慣行に従って栽培したのち、地下茎を採取します。その後、地下茎あるいは地下茎から育成した苗を本圃に定植し、慣行に従って栽培します。



ワクチンを接種した苗（親株）を通常通り栽培する。
※ワクチン接種苗は健全苗と比べて根の張りが若干弱いことがあります
が、生育に影響はありません。



親株から地下茎を採取して、低温（4~10℃）で貯蔵もしくはポットで育苗する。

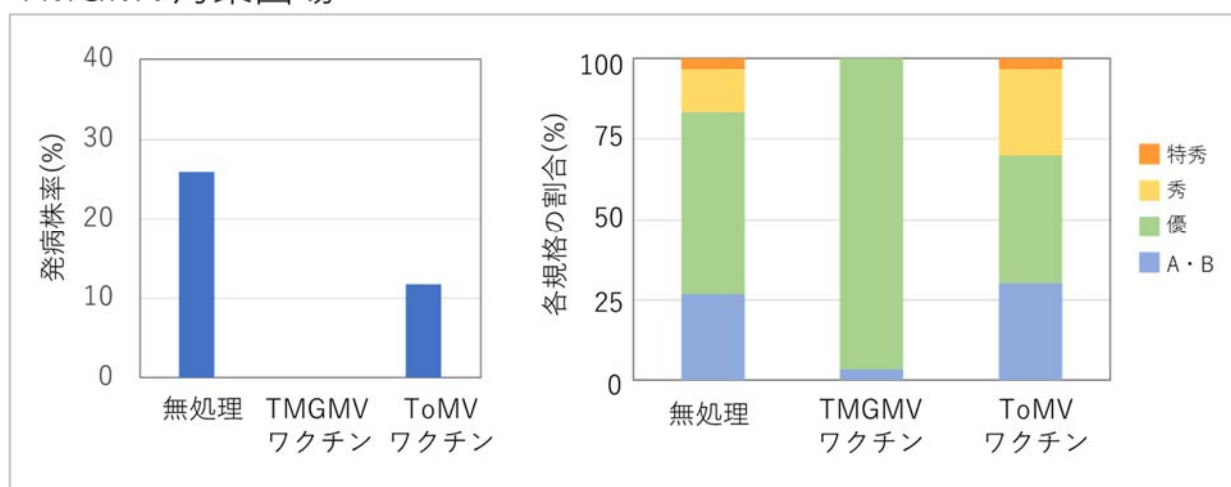


地下茎もしくは地下茎から育成した苗を定植し、その後は慣行に従って栽培する。

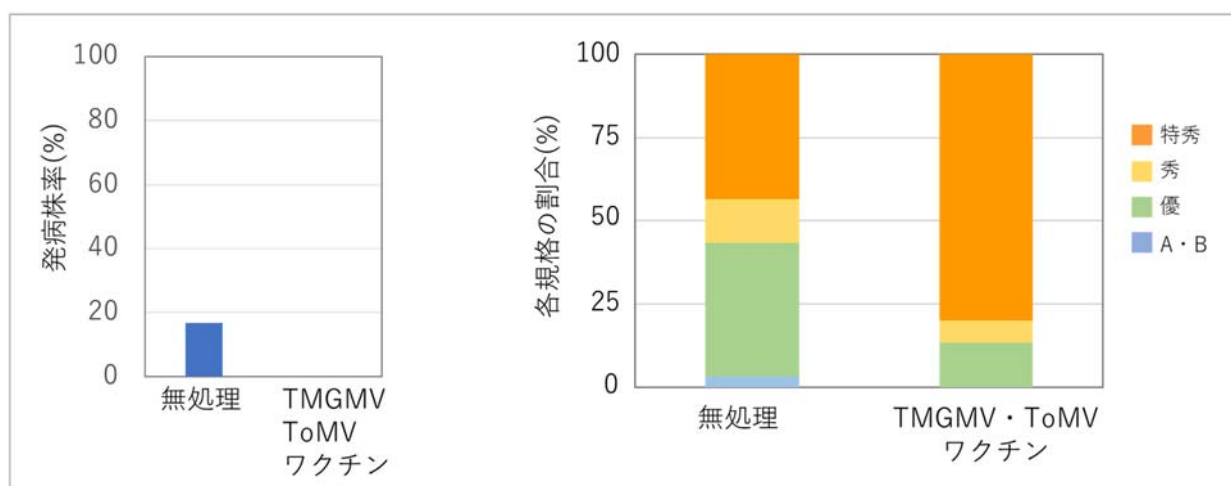
6. 防除効果および品質への影響

上記の方法で準備したワクチン接種苗を慣行に従って栽培し、収穫時にホオズキの発病株の割合および品質への影響を調査した事例を以下に示しています。TMGMV 汚染圃場あるいは TMGMV および ToMV 汚染圃場でワクチン接種苗を栽培すると、ワクチンを接種していない苗を栽培した場合と比べて発病株率が減少し、品質が向上します（参考資料 3, 5）。

TMGMV汚染圃場



TMGMV・ToMV汚染圃場



※ホオズキの各規格は、大分県の等級表を基に調査した。図中の特秀、秀、優、A・Bは、それぞれ特秀品、秀品、優品、AおよびB品を示す。

7. 備考

< 核酸抽出用試薬 >

RNeasy Plant Mini Kit (株式会社キアゲン)

< RT-PCR 用試薬 >

TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV) (タカラバイオ株式会社)

表 ウイルス検出に用いるプライマーセット

対象ウイルス	プライマー名	塩基配列(5'-3')	Tm 値 (°C)	増幅サイズ (bp)	文献
TMGMV	TMGMV-F	AACAGCAATTTGCGGATGCC	60	311	参考資料 2
	TMGMV-R	ACTAGCAGTCTCAAAGCCTG	60		
ToMV	ToMV-F	GTATGTTTGCTTAGTCGGTC	58	1018	参考資料 2
	ToMV-R	GTCCAGTACCTCTTACTAGT	58		
CMV	CMV-F4	TTGAGTCGAGTCATGGACAAATC	66	378	参考資料 6
	CMV-F3	AACACGGAATCAGACTGGGAG	64		

表 RT-PCR 溶液の調整

試薬	容量
10xOneStep RNA PCR buffer	5 μ l
25mM MgCl ₂	10 μ l
10mM dNTP Mixture	5 μ l
RNase Inhibitor	1 μ l
AMV RTase XL	1 μ l
AMV-Optimized Taq	1 μ l
Forward Primer (20 μ M)	1 μ l
Reverse Primer (20 μ M)	1 μ l
Template RNA	X (1 μ g 相当量)
RNase Free dH ₂ O	Y μ l
Total	50 μ l

表 RT-PCR の条件

ステップ	逆転写反応 (RT)	サイクル数
1	5 0°C 3 0分	1 サイクル
2	9 4°C 2分	
	ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)	
1	9 4°C 3 0秒	4 0 サイクル
2	5 0°C 3 0秒	
3	7 2°C 6 0秒	

8. 参考資料

1. 全国農村教育協会編, インターネット版日本植物病害大事典, p650.
2. 米田恵美ら, 大分県のホオズキにおけるウイルス病の発生実態, 2017, 九州病害虫研究会報, 63:23-29.
3. 米田恵美ら, ホオズキのモザイクおよびえそ症状に対するタバコ微斑モザイクウイルスおよびトマトモザイクウイルス弱毒株の発病抑制効果, 2018, 九州病害虫研究会報, 64:ページ未定.
4. 米田恵美ら, ホオズキのモザイク病に対する種子乾熱処理の防除効果, 第 96 回九州病害虫研究会, 2018, 講演要旨集, p7.
5. 臼井真奈美ら, ホオズキのトバモウイルスに対する弱毒ウイルスの防除効果, 第 94 回九州病害虫研究会, 2017, 講演要旨集, p6.
6. Lin et al., Molecular population genetics of cucumber mosaic virus in California: evidence for founder effects and reassortments, *Journal of Virology*, 78:6666-6675.

マルチワクチンを核としたホオズキのウイルス病防除マニュアル

本マニュアルは、平成 27～29 年度に実施した農林水産省：「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」における「数種弱毒ウイルスを用いたホオズキのウイルス病総合防除技術の構築」の成果をとりまとめたものです。

本マニュアルの複製・転載を希望される場合は、下記の発行機関までご連絡ください。また、本マニュアルは、可能な限り最新の情報を掲載し、情報の正確性には万全を期していますが、掲載された情報をご利用になったことによるいかなる損害についても責任を負いかねます。ご指摘、訂正事項等がございます場合は、下記までご連絡ください。

【研究実施担当機関】

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
大分県農林水産研究指導センター
宮崎県総合農業試験場

【編集および発行】

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
九州沖縄農業研究センター
〒861-1192 熊本県合志市須屋 2421
TEL：096-242-1150（代表）
編集責任者：生産環境研究領域 富高保弘