

II 施設ピーマンにおける発生生態の解明

大分県豊後大野市では、作期を3月から11月とする夏秋作の施設ピーマンが広域で栽培されており、TSWVによるピーマン黄化えそ病が1998年以降発生している。圃場によってはピーマンの定植直後にあたる春期に多発生し、その後の収穫量は大幅に減少するため、生産者の生産意欲を低下させ産地規模拡大を図るうえで大きな障害となっていた。これらピーマン栽培圃場では、1998年以降ミカンキロアザミウマが生育初期から確認されており、現地ではTSWVの主たる媒介種と認識されている。この問題を解決するうえで、冬期間中のTSWV伝染環を遮断することがもっとも効果的な解決手段と考られた。このため、この地域におけるミカンキロアザミウマと雑草の生態学的特性を中心に調査し、ピーマン定植直後にあたる春期において、TSWVが多発生するメカニズムを解明した。

1 夏秋ピーマン圃場における冬期のウイルス伝染環の解明

(1) 材料および方法

a ピーマン圃場における発生実態調査

調査圃場として、豊後大野市大野町光昌寺（以下 光昌寺）、豊後大野市大野町上園（以下 上園）の施設圃場2カ所、豊後大野市大野町小倉木（以下 小倉木）の露地圃場1カ所を選定した。これらの圃場は、3月下旬から11月にかけて夏秋作ピーマンが栽培されており、2002年、2003年のいずれのピーマン生育期間中において、ピーマン植物体およびピーマン花卉に寄生していたミカンキロアザミウマからTSWVが検出された。さらに、両年とも黄化えそ病の発生が確認されなかった豊後大野市大野町片島を対照圃場として選定した。

b 野外における雑草およびピーマン果実残渣のTSWV感染実態調査

雑草と現地圃場に放置されていたピーマン果実残渣を光昌寺、上園および小倉木から定期的に採集した。TSWV検出は、RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction)により行った。RNA抽出とRT-PCRは、常法のプロトコルに従い、それぞれISOGEN (株ニッポンジーン) とGeneAmp Gold RNA PCR kit (アプライドバイオシステムズジャパン株)を用いた。抽出したRNAを鋳型として、特異的プライマーTSWV N gene (TsN-5, 5' TTAAACACACTAAGCAAGCACA 3', 1,899-1,920ヌクレオチド GenBank Accession No. D00645; TsN-3, 5' GCTCTAGAGCAATTGTGTCAATT 3', 2,916-2,899ヌクレオチド)を添加し、42°Cで30分間逆

転写した後に、上流プライマーを添加し94°Cで30秒、50°Cで30秒、72°Cで1分の40サイクルを基本として行った。RT-PCR産物は、1%アガロースゲルに泳動し、エチジウムブロマイド (50 μ g/ml) で着色した後に、UVライト下で観察した。

c 野外でのミカンキロアザミウマのTSWV保毒実態調査

現地圃場の雑草およびピーマン果実残渣は、光昌寺において2002年11月～2003年3月にかけて、上園および小倉木では2004年1月～4月にかけて6～25日間隔でそれぞれ採集した。雑草およびピーマン果実残渣から採集されたミカンキロアザミウマ成虫は、1頭ずつ0.5mlマイクロチューブに移し、-80°Cで保管した。その後、ポリビニルピロリドン2%とBSA0.2%を加用したPBST緩衝液 (0.8% NaCl, 0.02% KH₂PO₄, 0.29% Na₂HPO₄·12H₂O, 0.02% KCl, 0.05% Tween20, pH 7.4) 100 μ lを加えて磨潰し、抗TSWV抗体 ((社)日本植物防疫協会)を用いたDAS-ELISAによってTSWVを検出した。吸光度測定にはImmuno Reader NJ-2001 (Inter Med社、デンマーク)を用い、健全虫の3倍以上の吸光度(A₄₀₅)を示す個体を陽性と判定した。

d 野外でのミカンキロアザミウマの密度推移

冬期間中におけるミカンキロアザミウマの生息場所を明らかにするため、7種の雑草とピーマン果実残渣を小倉木において2004年1月9日～4月21日にかけて6～15日間隔で採集した。これらのサンプルからミカンキロアザミウマ成幼虫を採集した。なお、幼虫についてはソラマメ種子を餌として与え (村井・石井、1982)、成虫に成育させてから種の同定を行った。

e ピーマン苗トラップを用いたTSWVの自然感染調査

TSWVの自然感染を調査するために、ピーマン苗を小倉木の露地に定植した。ピーマン苗は、豊後大野市大野町共同育苗センターで育成された現地慣行品種である播種82日後の「さらら」を用いた。定植時の苗草丈は約25cm程度、本葉7～9枚程度であり、播種82日後にあたる2004年4月7日に50cm間隔で10株定植した。これらの苗は、2004年5月18日に回収し、DAS-ELISA (抗TSWV抗体、(社)日本植物防疫協会)によってTSWV感染の有無を調査した。

(2) 結果

a 雑草およびピーマン果実残渣でのTSWV感染実態調査

光昌寺、上園および小倉木でそれぞれ雑草14種77

サンプル、9種29サンプルおよび7種28サンプルを採集し、RT-PCRで調査した結果、それぞれ3.9%、20.6%および14.3%の株がTSWVに感染していた(第1表)。感染が確認された雑草種は、キク科のハキダメギク *Galinsoga ciliata*、ゴマノハグサ科のオオイヌノフグリ *Veronica persica*、シソ科のホトケノザ *Lamium amplexicaule*、ナス科のイヌホオズキ *Solanum nigrum*、ナデシコ科のウシハコベ *Stellaria aquatica* の5科5種であった。なかでもウシハコベは、いずれの圃場でも高頻度(12.5~80.0%)でTSWVが検出された。しかし、雑草種全体で見るとその他の8科12種の雑草からはTSWVが検出されず、感染種は限定されていた。

一方、圃場に放置されていたピーマン果実残渣からは、TSWVが高頻度で検出され、光昌寺、上園および小倉木において、感染率はそれぞれ100%、94.6%および82.9%であった(第1表)。雑草全体の感染率と比較しても、各圃場ともピーマン果実残渣の感染率が極めて高く、いずれの圃場においても果実が腐敗するまで高頻度でTSWVに感染していた。3圃場全体で見た結果、ピーマン果実残渣でのTSWV感染率は、雑草種全体での感染率より有意に高かった(Fisherの正確確率検定: $P < 0.01$)。

b ミカンキイロアザミウマのTSWV保毒実態調査

施設圃場である光昌寺では、圃場内に放置されてい

たピーマン果実残渣において、2003年2月10日までミカンキイロアザミウマ成幼虫の生息が確認された(第2表 表中ではミカンキイロアザミウマ成虫のみを示す)。2月25日以降は、圃場内のすべての果実が腐敗したため、ピーマン果実残渣に成虫の生息は認められなかった。果実残渣に生息していたミカンキイロアザミウマのTSWV保毒率は、15.8~100%であった。ミカンキイロアザミウマ成虫は、2002年11月12日から2003年3月25日の間に圃場内および周辺に自生していた5科12種の雑草から採集され、そのうち11種からTSWV保毒虫が検出された(第2表)。雑草から採集された成虫の保毒率は、14.3~52.6%で推移していた。調査期間を通じて、ミカンキイロアザミウマは生息植物を変遷していたものの、TSWV保毒虫率は低下することなく推移した。

施設圃場である上園では、光昌寺同様に圃場内の放置されていたピーマン果実残渣において、2004年3月1日までミカンキイロアザミウマが生息していた(第3表)。この圃場では、冬期間を通じて25.0~66.7%のミカンキイロアザミウマ成虫がTSWVを保毒しており、調査期間中の保毒虫率は緩やかに減少する傾向を示した。ミカンキイロアザミウマは、3月時点において4科4種の雑草で生息が確認されたものの、保毒虫が確認されたのは3月8日にウシハコベから採集された個体のみであった。

露地圃場の小倉木では、ピーマン果実残渣は2004年

第1表 休耕期間におけるピーマン圃場周辺雑草およびピーマン果実残渣でのTSWV感染状況(2002-2004年)

科	種名	調査場所 ^a		
		施設		露地
		光昌寺	上園	小倉木
ナス	ピーマン果実(残渣) <i>Capsicum annuum</i>	11(11) ^b	35(37)	34(41)
	ピーマン果実のTSWV感染率(%)	100%	94.6%	82.9%
キク	ヨモギ <i>Artemisia princeps</i>	0(5)	0(1)	...
	アレチノギク <i>Conyza bonariensis</i>	0(5)	0(1)	0(2)
	ハキダメギク <i>Galinsoga ciliata</i>	1(14)
	チチコグサ <i>Gnaphalium japonicum</i>	0(10)
	ジシバリ <i>Ixeris stolonifera</i>	0(3)
	ノゲシ <i>Sonchus oleraceus</i>	0(1)	0(1)	...
ナデシコ	オランダミミナグサ <i>Cerastium glomeratum</i>	0(1)	...	0(4)
	ウシハコベ <i>Stellaria aquatica</i>	1(8)	4(5)	3(9)
アブラナ	スカシタゴボウ <i>Rorippa islandica</i>	0(2)
マメ	カラスノエンドウ <i>Vicia angustifolia</i>	0(2)	0(3)	...
ケマンソウ	ムラサキケマン <i>Corydalis incisa</i>	0(2)
カタバミ	カタバミ <i>Oxalis corniculata</i>	...	0(1)	0(1)
シソ	ホトケノザ <i>Lamium amplexicaule</i>	...	1(7)	0(4)
オオバコ	オオバコ <i>Plantago asiatica</i>	0(5)
スベリヒユ	スベリヒユ <i>Portulaca oleracea</i>	0(1)
ゴマノハグサ	オオイヌノフグリ <i>Veronica persica</i>	0(2)	1(6)	1(6)
ナス	イヌホオズキ <i>Solanum nigrum</i>	1(18)	0(4)	...
	雑草のTSWV感染率(%)	3.9%	20.6%	14.3%

^a 調査期間は、光昌寺および小倉木で2002年11月25日~2003年3月12日、上園で2004年3月1日~3月23日とした。

^b TSWV感染が確認されたサンプル数で、括弧内は検定サンプル数。

^c ...は、植物が未確認であることを示す。

2月23日まで残存しており、果実残渣にはミカンキイロアザミウマ成虫の生息が確認された(第4表)。ピーマン果実は、3月1日時点で完全に腐敗し、その後圃場内のすべての果実が消失したため、成虫の生息は認められなかった。これら果実残渣に生息していたミカンキイロアザミウマのTSWV保毒率は、0~33.3%であった。ミカンキイロアザミウマ成虫は7科10種の雑草から採集され、この地点では比較的多くのアザミウマ個体数が得られた。雑草から採集されたミカンキイロアザミウマ成虫のTSWV保毒率は、8.9~29.1%であった。ミカンキイロアザミウマのTSWV保毒率は、2004年4月7日まで低下することなく推移していたが、4月21日ではシロツメクサのみから採集され、この時点における保毒率は4月7日以前の数値と比較して低下していた。

対照区の豊後大野市大野町片島では、作付け期においてTSWVの発生が確認されなかった。2か年とも冬期間を通じてTSWVに感染したピーマン果実および雑草、さらには保毒したミカンキイロアザミウマともに確認されなかった(Okazaki et al., 2007)。

c 野外でのミカンキイロアザミウマ密度推移

露地圃場である小倉木において、ピーマン果実残渣と5科6種の雑草で生息していたミカンキイロアザミウマ成幼虫の密度推移について調査した(第5表)。2004年2月23日までは果実残渣のみで成幼虫が認められた。雑草では2月10日に、ホトケノザ*Lamium amplexicaule*、カラスノエンドウ*Vicia angustifoli*、ヨモギ*Artemisia princeps*の発生が確認されたものの、この時点では雑草でミカンキイロアザミウマは成幼虫とも

第2表 雑草およびピーマン果実残渣におけるTSWVを保有したミカンキイロアザミウマ成虫の推移
豊後大野市光昌寺(2002-2003年)

寄主植物	2002				2003					
	11/12	11/26	12/12	12/24	1/8	1/23	2/10	2/25	3/11	3/25
ピーマン果実(残渣)	25(7) ^a	39(14)	3(2)	19(3)	35(18)	9(4)	4(4)	* ^b	*	*
イヌホオズキ	... ^c	...	1(1)	6(1)	4(1)	3(1)
オランダミナグサ	9(3)	0(0)	2(2)	...	0(0)
ヒメムカシヨモギ	3(0)	6(3)	4(2)	...
チチノグサモドキ	38(15)	...	9(3)
オオアレチノギク	4(1)
ウシハコベ	6(1)	0(0)	7(5)	...
チチノグサモドキ	15(6)
カラスノエンドウ	1(1)
ヨモギ	1(0)	0(0)
ハハコグサ	4(2)	...
ノボロギク	3(1)	...
ハナイバナ	4(2)
TSWV保毒虫率(%) ^d	28.0	35.9	46.2	16.0	45.2	40.0	42.9	45.5	52.6	50.0

^a 採集したミカンキイロアザミウマ成虫数。括弧内は、DAS-ELISA法によって検出された保毒虫数。

^b *は、ピーマン果実が完全に腐敗消失したことを示す。

^c ...は、ほ場において植物サンプルが採集されなかったことを示す。

^d 調査時点でのピーマン果実残渣および雑草種全体におけるTSWV保毒虫率を示す。

第3表 雑草およびピーマン果実残渣におけるTSWVを保有したミカンキイロアザミウマ成虫の推移
豊後大野市上園(2004年)

寄主植物	2004						
	1/9	2/10	2/23	3/1	3/8	3/17	3/23
ピーマン果実(残渣)	5(3) ^a	6(4)	6(1)	4(1)	* ^b	*	*
ウシハコベ	... ^c	15(3)	1(0)	...
オオアレチノギク	4(0)	...
ムラサキケマン	2(0)	...
ホトケノザ	1(0)
TSWV保毒虫率(%) ^d	60.0	66.7	16.7	25.0	20.0	0	0

^a 採集したミカンキイロアザミウマ成虫数。括弧内は、DAS-ELISA法によって検出された保毒虫数。

^b *は、ピーマン果実が完全に腐敗消失したことを示す。

^c ...は、ほ場において植物サンプルが採集されなかったことを示す。

^d 調査時点でのピーマン果実残渣および雑草種全体におけるTSWV保毒虫率を示す。

第4表 雑草およびピーマン果実残渣におけるTSWVを保有したミカンキイロアザミウマ成虫の推移
豊後大野市小倉木 (2004年)

寄主植物	2004									
	1/9	1/20	2/10	2/23	3/1	3/8	3/17	3/23	4/7	4/21
ピーマン果実(残渣)	2(0) ^a	3(1)	9(2)	47(14)	* ^b	*	*	*	*	*
ヨモギ	14(2)	...	8(0)	16(4)	4(2)	...
カラスノエンドウ	44(5)	...	17(5)	12(3)	22(4)	...
ホトケノザ	195(25)	122(26)	...	29(10)	17(5)	...
スマレ	3(0)	...	8(3)
オオアレチノギク	7(0)
ノゲシ	5(0)
ナズナ	35(4)	14(1)
ウシハコベ	17(2)	6(4)	15(5)	...
オオイヌノフグリ	7(1)	2(1)	8(2)	...
シロツメクサ	56(5)
TSWV保毒虫率(%) ^d	0	33.3	22.2	29.8	12.5	21.3	14.4	29.1	27.3	8.9

^a 採集したミカンキイロアザミウマ成虫数。括弧内は、DAS-ELISA法によって検出された保毒虫数。

^b *は、ピーマン果実が完全に腐敗消失したことを示す。

^c ...は、ほ場において植物サンプルが採集されなかったことを示す。

^d 調査時点でのピーマン果実残渣および雑草種全体におけるTSWV保毒虫率を示す。

第5表 雑草およびピーマン果実残渣におけるミカンキイロアザミウマ成虫の推移
豊後大野市小倉木 (2004年)

寄主植物	齢期 ^a	2004										
		1/9	1/20	1/29	2/10	2/23	3/1	3/8	3/17	3/23	4/7	4/21
ピーマン果実(残渣)	成虫	0.1 ^b	0.3	0.7	1.6	1.5	0
	幼虫	1.4	1.4	1.0	2.5	0.1	0
ホトケノザ	成虫	0	2.7	4.9	2.6	4.2	3.9	0.5	0
	幼虫	0	0	0	0.1	2.8	0.5	0.2	0
カラスノエンドウ	成虫	0	0.3	0	0	5.7	2.0	2.2	0
	幼虫	0	0	0	0	4.0	0	2.7	0
ヨモギ	成虫	0	0.6	0	0	1.5	2.3	0.3	0
	幼虫	0	0	0	0	2.8	3.6	2.3	0
オオイヌノフグリ	成虫	0.3	0	0	0.7	0.2	0.8	0
	幼虫	0	0	0	1.4	2.4	6.2	0
ウシハコベ	成虫	0	0	0.9	2.6	0	0
	幼虫	0	0	3.0	5.8	0.3	0
ナズナ	成虫	0	3.5	1.4	0.7	0
	幼虫	0	2.3	0.3	1.3	0
シロツメクサ	成虫	0	1.2	2.9
	幼虫	0	1.0	0.3

^a 幼虫はソラマメで成虫まで飼育し、ミカンキイロアザミウマであることを確認した。

^b 寄主植物から採集されたアザミウマの株当たり平均個体数を示す。ただし、ピーマン果実は1果当たり、シロツメクサは1花当たりの平均個体数。

^c ...は、調査ほ場において未確認。

第6表 ピーマン苗トラップにおけるTSWV感染状況 豊後大野市小倉木 (2004年)

TSWV感染株率(%) ^a			病徴 ^b	
2004/4/7 (定植時)	4/21 (14日後)	5/18 (41日後)	展開葉	果実
0	0	60	萎縮, 黄化, えそ輪紋	—

^a 10株当たりの感染率を示す。感染の確認はDAS-ELISA法によって行った。

^b 2004年5月18日時点での病徴であり、肉眼観察により調査した。

生息していなかった。その後、他の雑草種が発生し生育進展するのに伴って、雑草からもミカンキイロアザミウマの生息が確認されはじめた。ミカンキイロアザミウマ成虫は、3月8日まで主にホトケノザ *Lamium amplexicaule* で生息が確認されたが、それ以降はカラスノエンドウ *Vicia angustifoli*、ヨモギ *Artemisia princeps* およびオオイヌノフグリ *Veronica persica* でも確認された。幼虫は3月8日まで雑草では確認されなかったものの、3月17日以降は成幼虫の生息が確認された。ミカンキイロアザミウマは、さらにウシハコベ *Stellaria aquatica* およびナズナ *Capsella bursa-pastoris* へと分散し、4月21日時点ではシロツメクサ *Trifolium repens* の開花した花部位のみで確認された。

d ピーマン苗トラップを用いたTSWV自然感染調査
 ピーマン苗トラップ10株のうち6株において、ウイルス症状特有のえそ輪紋および黄化症状が定植41日後にあたる5月18日に確認された(第6表)。これらの症状は、黄化えそ病の典型的な病徴であった。さらにこれらの病徴部位から、DAS-ELISAによっていずれもTSWVが確認された。

(3) 考察

大分県豊後大野市は九州中部の中山間部に位置している。気候は比較的温暖であり、冬期でも降雪することは極めて希である。この地域では、スイートコーン、サツマイモ、サトイモ、タバコおよびレタス等の畑作地帯であるほか、施設ではスイートピー、ホオズキ等の観賞用花き類、ピーマン、イチゴ等の果菜類が主に栽培されている。今回の試験では、本地域ピーマン圃場において冬期間のTSWV感染実態を明らかにするために、ミカンキイロアザミウマ保毒虫の推移とピーマンの残渣および雑草におけるウイルス感染頻度を調査した。

ピーマンは夏秋栽培作であり、通常は3月から11月にかけて栽培される。そのため、苗が定植される初春期において、施設周辺にはTSWVに感染する作物は存在しない。しかしながら、ピーマンは育苗期にはTSWVに感染していなかったにもかかわらず、施設に定植して間もなくTSWVに感染する事例がこれまでに多く認められた。

いくつかの雑草種では、植物の汁液をそのままELISAで検定すると擬陽性反応が出ることがあるが、RT-PCRでは擬陽性反応はまず起こらない。このことから、本研究では雑草からのTSWV検出は、RT-PCRを用いた。

冬期間中にピーマン施設内で見つかったいくつかの雑草種ではTSWV感染が確認されており、なかでもウシハコベは比較的高頻度で感染していた。近縁種のコハ

コベでは、TSWVの感染源として国内外で多く報告されている(Bitterlich and MacDonald, 1993; Merlik et al., 1996; 木村ら, 1997; Merlik and Mokra, 1998; 竹内, 2000; Groves et al., 2001)。しかし、この地域においてウシハコベは2月下旬から3月上旬に発生していること、さらに本種は一年生雑草であることから、ウシハコベは二次的にTSWVに感染したものと考えられる。その他の雑草でのTSWV感染率は、総じて低いか認められなかったことから、この地域において雑草がTSWV感染源として果たす役割は低いと考えられた。一方で、施設圃場および露地圃場に放置されていたピーマン果実残渣は、高頻度でTSWVに感染していた。驚くべきことに、TSWVは果実が緑色から熟して赤色となる前の3月上旬まで検出された。さらに、これら果実残渣に生息していたミカンキイロアザミウマ虫体からもTSWVが検出された(写真4)。果実ではミカンキイロアザミウマ幼虫の寄生も確認されており、これら幼虫を採集して、健全なソラマメ種子で成虫まで飼育してからTSWVが検出された(Okazaki et al., 2007)。よって、ミカンキイロアザミウマはTSWVに感染したピーマン果実残渣からウイルスを獲得したことが強く示唆された。

ミカンキイロアザミウマの密度推移を見ると、最初ピーマン果実に生息し増殖、2月下旬～3月上旬に果実が腐敗してからホトケノザへ移動し、その後は随時発生した他の雑草へ分散していった。4月上旬に定植したピーマン苗トラップでは、高頻度でTSWVに感染しており、ミカンキイロアザミウマはまずピーマン果実残渣でTSWVを獲得し、周辺雑草へ分散、これらの雑草に生息していた本種が次期作となる定植直後のピーマンに加害し、TSWVを媒介したと考えられる(第1図)。

これまでの報告において、いくつかの雑草種では冬期間中にミカンキイロアザミウマの生息が確認されている(Latham and Jones, 1997; McPherson et al., 2003; Mertelik et al., 1996)。本研究でも、施設および露地圃場内の数種の雑草において、ミカンキイロアザミウマの生息は確認された。しかしながら、豊後大野市のピーマン圃場周辺に発生していた雑草では、TSWV感染頻度はピーマン果実残渣と比較しても低かった。また雑草種によっては、TSWVを保毒したミカンキイロアザミウマの生息が確認されたにもかかわらず、TSWV感染が確認されなかった(Okazaki et al., 2007)。このことはTSWVを保毒したミカンキイロアザミウマが、TSWVに感染したピーマン果実から周辺雑草に分散し、ウイルスを媒介したためと考えられる。ただし雑草種によっては、TSWVに感染するとウイルスの獲得源として高い潜在性を有する種があることを明らかにしたため(岡崎ら, 2009)、これらの詳細はIII章

の2節で述べたい。

ミカンキイロアザミウマは、TSWVに感染したピーマン果実残渣において果実が腐敗するまで高密度に成幼虫の棲息が確認された。このことから、本研究では冬期間中の主たるTSWVの伝染源をピーマンの果実残渣と特定し、これらを作付け終了後に地域内で一斉に除去する対策を講じることを推奨した（詳細は総合考察）。

Maris et al. (2004) は、ミカンキイロアザミウマがTSWVに感染した植物体に有意に誘引されることを報告している。この地域に生息しているミカンキイロアザミウマ個体群も同様に、TSWVに感染したピーマン果実への選好性が高いことも考えられ、このような特性が本地域内で冬期間中に効率よくTSWVの伝染環が繋がっていた原因のひとつかもしれない。今後、これらの現象について原因を解明していく必要がある。