

IV TSWV保毒虫のモニタリング手法開発

粘着板は、捕殺されたアザミウマを種ごとに判別することが可能で(千脇ら、1994)、設置した一定期間でのアザミウマ捕殺数をリアルタイムで把握できることから、防除対策を講じるうえできわめて実用的な資料である(Boissot et al., 1998; Riley and Pappu, 2004)。アザミウマ保毒虫の発生推移もしくは発生量を明確にすることによって、TSWVの発生を事前に予測することができる。さらには、アザミウマを対象とした現地圃場での薬剤散布適期等を把握できれば、ウイルス被害を最小限に抑制できるかもしれない。本研究では、この粘着板を用いて、成虫の捕殺による発生消長のみならず、捕殺されたアザミウマ成虫からウイルス保毒虫が検出できるか検討した。

1 粘着板に捕殺されたミカンキイロアザミウマ死亡虫体からのTSWV検出頻度

アザミウマ保毒虫の死亡虫体からのTSWV検出は、DAS-ELISA (Cho et al., 1988)もしくはRT-PCR (Tsuda et al., 1994)を用いることで可能であると報告されている。さらに、ペチュニアリーフディスク法 (Wijkamp and Peters, 1993; 櫻井、2004; 櫻井、2006)を用いることによって、アザミウマのウイルス媒介虫率を検定でき、アザミウマ種もしくは種内の個体群によって媒介能力を把握することができる。しかし、これらの検定では生存しているアザミウマ個体もしくは冷凍保存した個体しか扱うことはできない。粘着板は捕殺されたアザミウマを種ごとに判別できるほか、設置した一定期間内のアザミウマ捕殺数を把握でき効率的に回収することが可能である。これらのアザミウマ死亡虫体から、ウイルスが検出できればTSWVの発生を事前に把握することができ、防除対策を講じるうえで重要な知見となりうる。本研究では、粘着板に捕殺されたミカンキイロアザミウマ保毒虫からDAS-ELISAおよびRT-PCRにより、まずウイルス検出が可能かどうか、捕殺により死亡してからどのくらいの期間まで検出可能かについて調査した。さらには、実際にTSWVの発生が認められた現地圃場で粘着板を設置し、その有効性について検討した。

(1) 材料及び方法

a 粘着板に捕殺されたアザミウマ保毒虫からのTSWV抗原抗体反応

TSWVを保毒し媒介能を有するミカンキイロアザミウマ成虫を、青色粘着板 (HORIVER, アリスタライフサイエンス(株))に付着させ、各5℃、15℃、25℃、35℃±0.2℃、16L8D、湿度40%条件下(IQ820, 株ヤマト機

器)で静置した(写真7)。すべてのアザミウマは、粘着板に付着させてから1日以内に死亡していた。アザミウマ捕殺直後、2日後、5日後、10日後、15日後、20日後に各トラップから雌雄成虫それぞれ10頭を剥がし、0.5mlマイクロチューブに1個体ずつ封入し、-80℃で保管した後に、先に述べたDAS-ELISAに従い検定を実施した。吸光度値(A_{405})は室温条件で30分後に測定した。ミカンキイロアザミウマ健全成虫の吸光度値は、ネガティブコントロールとして同様の条件で測定した。

b 定量RT-PCRによる捕殺されたアザミウマ保毒虫からの検出

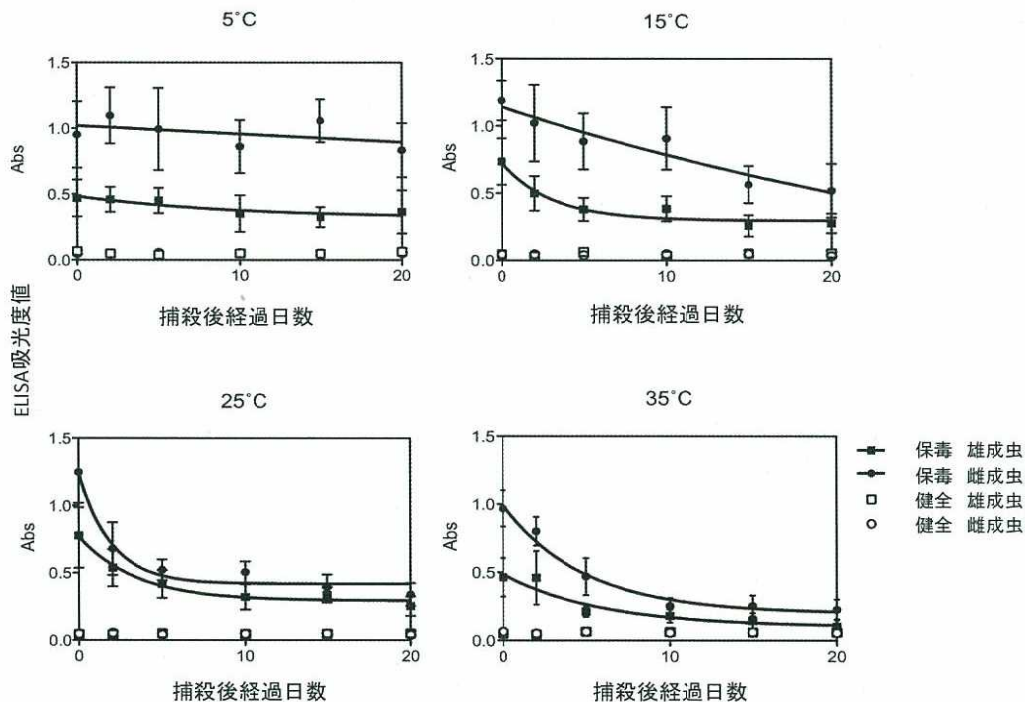
DAS-ELISAによる検出試験と同様に、青色粘着板に付着させたTSWV保毒雌成虫を25℃、湿度約50%の条件に静置し、捕殺直後、1日後、3日後、7日後、14日後にアザミウマ保毒成虫5、6頭について、III章の3節で用いたプライマーLC-TSWV-N3' (5' AAACGACTGCGGAATAC^{3'}), LC-TSWV-N5' (5' GTGGCTCCAATCCTGT^{3'})を用いてqRT-PCRを行い、TSWVでのRNAの定量を行った。qRT-PCRは、SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II (タカラバイオ(株))とLight Cycler (Roche Applied Science社、U.S.A)を用いて実施した。反応条件についてはIII章の3節で行った条件と同じであるため、ここでは省略する。定量化はLightCycler Software Version. 3 (Roche Applied Science社)を用いて増幅曲線を解析し、second derivative maximum法により閾値サイクル(Ct値)を算出した。TSWV感染ダチュラ (*D. stramonium*)から抽出したRNAを段階希釈し、Ct値とウイルスRNA濃度との検量線を作成した。この検量線を用いて、捕殺直後のウイルスRNA濃度の平均を100とした相対濃度を算出した。

c 統計処理

統計処理および曲線回帰はPrism 5 for macOSX (GraphPad Software社)を用いて解析した。

d 圃場試験

試験は、TSWVの発生が認められた大分県豊後大野市の休耕期圃場で実施した。施設圃場(光昌寺)では2002年11月26日~12月24日にかけて、露地圃場(小倉木)では2004年2月23日~3月23日にかけて青色粘着板 (HORIVER, アリスタライフサイエンス(株))を地上高30cmの位置で3カ所に設置し6~15日間隔で交換した(いずれの圃場ともII章で調査した圃場と同一の場所)。粘着板3枚に捕殺されたすべてのミカンキイロアザミウマ成虫は、持ち帰り実体顕微鏡下で丁寧に剥がした。-80℃で保管した後に各個体をDAS-ELISAで



第5図 各温度条件における粘着板に捕殺されたミカンキロアザミウマ雌雄保毒虫のELISA吸光度値の推移

a プロットの垂直バーは95%信頼区間を示す。

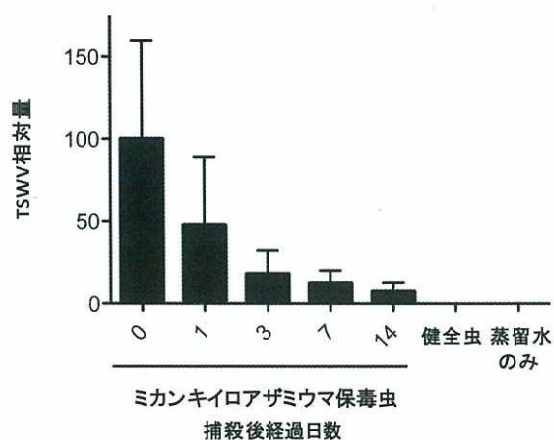
b ソリッドラインは、以下の方程式に従った回帰曲線による $y = (y_0 - y_1) * \exp(-K * x) + y_1$; y_0, y_1 , および K は粘性係数値。

検定し、健全虫と比較して吸光度値 (A_{405}) が3倍以上の値を示したものを陽性と判定し、回収時点ごとの保毒虫率を算出した。同様に、粘着板交換時点において圃場内のピーマン果実残渣および雑草に生息していた成虫を採集し、DAS-ELISAによって保毒虫率を算出したうえで、粘着板のそれと比較した。

(2) 結果

a 粘着板に捕殺されたアザミウマ保毒虫からの TSWV 抗原抗体反応

粘着板に捕殺されたミカンキロアザミウマ保毒虫のELISA吸光度値は日数経過とともに緩やかに減少し、その減少度合いは保存温度が高くなるに従って大きくなる傾向を示した (第5図)。粘着板に付着し死亡してから20日経過した雌成虫のELISA吸光度平均値は、捕殺直後と比較して5°Cで88%、15°Cで44%、25°Cで27%そして35°Cで24%まで減少していた。雄成虫のELISA吸光度値は、いずれの温度条件下においても雌成虫の値より低く、温度条件による減少度合いも雌成虫と同様の傾向であった。粘着板を5°C条件下に静置した場合は、吸光度値の減少は非常に緩やかであった。一方で、粘着板を15°Cかそれ以上の条件に静置した場合には、吸光度値の減少は初期の5日後までに急激に減少した。しかし、その後はいずれの温度条件下でも緩やかに減少した (第5図)。温度条件が25°Cかそれ以下では、捕殺20日後時点におけるアザミ



第6図 粘着板に捕殺されたミカンキロアザミウマ保毒虫体内のTSWV相対値

a 捕殺直後の平均値を100とした。

b プロットの垂直バーは95%信頼区間を示す。

c および健全虫および蒸留水のみは TSWV 相対値はいずれも0であった。

ウマ雌雄保毒虫の吸光度値は、95%の個体が健全虫と比較して明らかに高かった。しかし、35°C条件では雌雄ともに捕殺10日後かそれ以降の吸光度値は、健全虫の値と比較して極めて近似値となった。

b 粘着板に捕殺された保毒アザミウマ体内の TSWV 定量化

粘着板に捕殺された TSWV 保毒アザミウマについて、虫体内 RNA 量が時間経過に伴ってどの程度減少するか

を第6図に示した。RNA量の平均値は捕殺1日後に約半数値まで急激に減少したものの、捕殺3日後以降は緩やかに減少した。捕殺14日後における保毒虫のRNA量平均値は、捕殺直後のそれと比較して7.3%まで減少した。捕殺直後もしくは1日後では、すべての保毒アザミウマからqRT-PCRによってTSWVが検出された。一方で、3、7および14日後に回収した保毒アザミウマからは、qRT-PCRによってもTSWVが検出されない個体が認められた。

c 現地圃場における保毒アザミウマ捕殺調査

TSWVを保毒したミカンキイロアザミウマは、ピーマン休耕期の施設圃場及び露地圃場において確認された(第14表)。ミカンキイロアザミウマ保毒虫率は、各調査時点で異なっており、施設圃場における粘着板捕殺虫からの保毒虫率は設置期間2002年11月26日～12月12日に46.2%、2002年12月12日～24日に16.0%であったのに対して雑草等から採集した成虫では2002年12月12日時点で29.2%、12月24日時点で27.3%だった。一方露地圃場における粘着板捕殺虫からの保毒虫率は15.4～26.7%であったのに対して雑草等から採集した成虫では12.1～29.1%であった。いずれの調査時点においても保毒虫率の変化は認められたものの、粘着板捕殺虫の保毒虫率が直接採集したそれと比較しても大きく下回ることにはなかった。なお、TSWV感染ピーマンが確認されなかった施設圃場(豊後大野市大野町片島)では、保毒虫を確認することはなかった。

(3) 考察

本研究では、アザミウマ死亡個体中におけるTSWVヌクレオカプシドタンパク質を対象とした抗原抗体反応を指標として、日数の経過に伴ってどの程度減少するか調査した。捕殺されてから最初の5日目までは、粘

着板を置いた温度条件が高くなるに従い吸光度値の減少度合いも大きくなった。しかし捕殺7日後以降では、吸光度値はすべての温度条件で緩やかに減少していった。ELISA吸光度値を見ると、25℃より低い条件では捕殺20日後までは健全虫の値と比較して明らかに高い値を示した。一方で、アザミウマ虫体内におけるTSWVのRNA量をみると、捕殺1日後に半数値まで減少した。この原因として、一般にRNAはタンパク質より不安定であることから、捕殺されたアザミウマ虫体内のTSWVのRNAゲノムは、アザミウマ死後急速に不活化するためと考えられる。

TSWVは植物の汁液中では凍結乾燥をしないと急激に感染性を失う(Barradas and Silberschmidt, 1973; 福本・栃原, 1981)が、ヌクレオカプシドタンパク質分子とRNA粒子断片は、検出可能なレベルで比較的長期間残存すると考えられた。本研究で用いた粘着板は保存性物質を含んでいなかったが、今後は粘着板の粘性物質に保存性物質を加えることによって、ウイルスの検出限界日数が長くなることも可能と考えられる。

圃場において保毒アザミウマの発生のモニタリング調査を実施することは、作物へのウイルス感染の危険性を予測することが可能となる(Zen et al., 2009)。粘着板は、アザミウマ成虫を捕殺するため実際に広域圃場のあらゆる場面で活用されている(Boissot et al., 1998; Riley and Pappu, 2004; Yudin et al., 1987)。本研究において、TSWVの発生が認められた施設圃場に粘着板を設置し、捕殺されたミカンキイロアザミウマからTSWVが検出できることを確認した。いずれの調査時点においても、捕殺されたアザミウマの保毒虫率が直接採集した成虫の数値と比較して大きく下回ることにはなかったが、調査時点によって若干の差異が認められた。粘着板に捕殺されたアザミウマは、通常の肉眼調査や植物体からの採集と比較して、日時

第14表 圃場に設置した粘着板捕殺アザミウマからのTSWV保毒虫検出頻度

A ピーマン休耕期施設圃場 (豊後大野市光昌寺)			
粘着シート捕殺虫からの検出		採集虫からの検出 ^a	
粘着シート設置期間	TSWV保毒虫率 (%)	採集年月日	TSWV保毒虫率 (%)
2002年11月26日～12月12日	46.2 (13) ^b	2002年12月12日	29.2 (48)
2002年12月12日～12月24日	16.0 (25)	2002年12月24日	27.3 (44)

B 休耕期露地圃場 (豊後大野市小倉木)			
粘着シート捕殺虫からの検出		採集虫からの検出 ^a	
粘着シート設置期間	TSWV保毒虫率 (%)	採集年月日	TSWV保毒虫率 (%)
2004年2月23日～3月1日	25.4 (193) ^b	2004年3月1日	12.1 (256)
2004年3月1日～3月8日	15.4 (13)	2004年3月8日	21.3 (122)
2004年3月8日～3月17日	26.7 (80)	2004年3月17日	16.4 (213)
2004年3月17日～3月23日	22.2 (36)	2004年3月23日	29.1 (79)

^a 圃場内雑草に生息していた成虫を採集した。

^b 括弧内の数値は、検定した虫数。

的、空間的により広い範囲での保毒虫が捕殺されていることが一因として考えられる。さらに今回の試験は、夏秋ピーマン休耕期にあたる冬期間に実施しており、比較的低温条件での調査結果であったため、TSWVが検出されやすい条件であったかもしれない。今後は、作付け期間中において、春～秋期にあたる高温度条件等で実証することも検討する必要がある。さらには、発消長モニタリングと併せてウイルス病の蔓延防止対策としての発生予察手法の一項目として活用できるか検討することも重要となる。