

ネット被覆は TSWV の感染拡大に対して高い効果を示したが (図 3-2-2), 10 月時点で感染を完全に防げなかったのはネットの目目の隙間やネットと地面の隙間から保毒虫が侵入したためと考えられた。そのため、ネット被覆をした際にも殺虫剤の散布は必要であり、特にアザミウマ類の発生が多くなる 6~8 月の散布を重点的に実施すべきである。TSWV は宿主範囲が広いので、野良生えのダリアに加え、雑草を含む他の植物種の除去も防除対策の一つとなる。Okazaki et al. (2007) は、ピーマン圃場において廃棄された TSWV に感染した果実が伝染源となっており、果実を圃場外に持ち出し適切に処分することで発病を著しく抑制できたことから、伝染源の除去が重要としている。

本節で実証した防虫ネット被覆は、ダリア生産での TSWV 対策として有効であることが明らかになった。このことで現地への導入が促進され、ダリア生産の安定化につながる事が望まれる。

## 第 4 章 ダリアに対するキク矮化ウイロイドの感染性と病原性の解明

### 第 1 節 ダリアに感染するキク矮化ウイロイドの塩基配列決定

#### 緒言

ウイロイド (viroid) は 1 本鎖環状 RNA からなる最小の植物病原体であり、1971 年にジャガイモから発見された PSTVd が初めての報告である (Adkar-Purushothama・Perreault, 2020)。ウイロイドの RNA は 246~401 塩基であり、タンパク質をコードしないノンコーディング RNA である (Adkar-Purushothama・Perreault, 2020)。ウイロイドは、植物細胞に感染し、宿主の酵素に依存して RNA から RNA へ増殖・複製する。ウイロイドの塩基配列には 5 つの領域があるモデルが提唱されており、それぞれ左末端領域 (Terminal Left)、病原性領域 (Pathogenicity)、中央保存領域 (Central conserved)、可変領域 (Variable)、右末端 (Terminal right) と呼称されている (Visvader・Symons, 1985)。なお、ウ

イロイドの科は中央保存領域の有無によってポスピウイロイド科とアブサンウイロイド科の 2 つに分類される。

CSVd は、ポスピウイロイド科に属しており、その構造は 348~356 塩基の 1 本鎖環状 RNA である (Matsushita, 2013 ; Palukaitis・Symons, 1980)。CSVd によるキク矮化病は 1945 年にアメリカで発見され、1973 年になって初めて病原が CSVd であることが明らかにされた (Bouwen・Zaayen, 2004)。日本では大沢ら (1977) により初めて確認された。キクでの CSVd による主な病徴は、植物体の矮化と葉の小型化である。CSVd の伝染は、感染株との接触や、手やハサミを介した汁液により生じる (福田ら, 2012 ; Matsushita, 2013)。また、キクでは CSVd の種子伝染により後代への感染が確認されている (Chung・Pak, 2008)。一方で、CSVd の虫媒伝染は確認されていない (Matsushita, 2013)。

CSVd の全塩基配列はオーストラリアで検出された系統で初めて決定された (Haseloff・Symons, 1981)。CSVd には塩基配列が異なる複数の系統が存在し、日本、韓国およびブラジル等で確認されている (Choi et al., 2017 ; Gobatto et al., 2014 ; Matsushita et al., 2007)。なお、CSVd には全長 354, 355, 356 塩基の系統が存在する (Matsushita, 2013)。

日本のキクから分離された CSVd の塩基配列については多数の報告があり、兵庫県 (塩飽ら, 1996)、北海道 (李ら, 1997)、山形県 (兼松ら, 1998)、新潟県 (杉浦・花田, 1998)、福岡県、宮崎県、沖縄県 (花田・酒井, 2001)、静岡県 (土井・加藤, 2004) で確認されている。なお、塩基配列の多型は主に病原性領域に存在する (Matsushita et al., 2007)。

一方でダリアに感染した CSVd の塩基配列に関する報告は Nakashima et al. (2007) に限られている。そこで本節では、ダリアにおける CSVd の病原性評価や RT-PCR 等による検出のための基礎情報を得るため、国内のダリア生産圃場における CSVd の塩基配列を調査した。

#### 材料および方法

##### 1) ダリアに感染した CSVd の塩基配列の取得

第 2 章第 3 節で CSVd の感染が確認されたダリア 94 株のうち 32 株を用いた。採取地域の内訳は、北海道 7 株、秋田県 1 株、山形県 3 株、長野県 4 株、

奈良県2株, 高知県4株, 福岡県10株, 宮崎県1株である。ダリアの中位葉 100 mg から RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて, RNA を抽出した。CSVdの全塩基配列を決定するために, 以下の3組のプライマーを用いて RT-PCR を実施した。CSVd-ZR, CSVd-ZF (5' GGAACCACAAGTAAGTCCCG 3', 5' TGTGGTGCCTCCTGACCCT 3') (Matsushita et al. 2007), CSVd-1P, CSVd-1M (5'CTTAGGACCCAC TCCTGCG 3', 5' CCGCGATCTCGTCGACTTC 3') (李ら, 1997) および 208CSVd-R, 209CSVd-F (5' GGAGAGGTCTTCTGCCCTAGC 3', 5'AGGAGAGGA AGGAACTAAAGGA 3') (Matsushita・Shima, 2015) (図 4-1-1)。逆転写反応は, ReverTra Ace (東洋紡) を用いた。RT バッファー 2 μl, dNTPs (10 mM) 1 μl, リバースプライマー (20 mM) 0.5 μl, RNase inhibitor (1U, TOYOBO) 0.5 μl, 逆転写酵素 (20 μM) 1.0 μlに滅菌蒸留水を加え全体を 9 μl とした。テンプレートとして抽出 RNA を 1 μl加えた。RT 反応は, 42°C30分, 99°C5分を実施した。この RT 産物 1.8 μl, フォワードプライマー (10 mM) 0.6 μlとリバースプライマー (10 mM) 0.6 μl, PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ) 0.2 μl, バッファー 4 μl, dNTPs (10 mM) 1.6 μlに滅菌蒸留水を加え全体を 20 μlとした。PCR 反応

は, 98°C10秒, 60°C5秒, 72°C60秒を 35 回繰り返した。PCR 産物の精製は ExoSAP-IT Express PCR Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific) で行った。1 検体あたり, 2 組以上のプライマーによる PCR 産物をシーケンスした。

### 結果

供試した CSVd 感染株 32 株の中から, 塩基配列が異なる 6 系統が検出された (表 4-1-1)。塩基配列の全長はすべての系統で 354 bp であり, 多型は 7ヶ所で確認された (図 4-1-1)。系統 3 は以前にダリアで検出された系統と同一の配列であり, 系統 1 と 6 は, キクで検出された系統と同一の配列であった。系統 1 は, 5つの地域から検出されており, 最も広く分布していた。なお, 系統 2, 4 および 5 は, 本研究で初めて確認された。

### 考察

国内の生産圃場のダリアに感染した CSVd32 系統の全塩基配列を決定した。これらの CSVd 系統で確

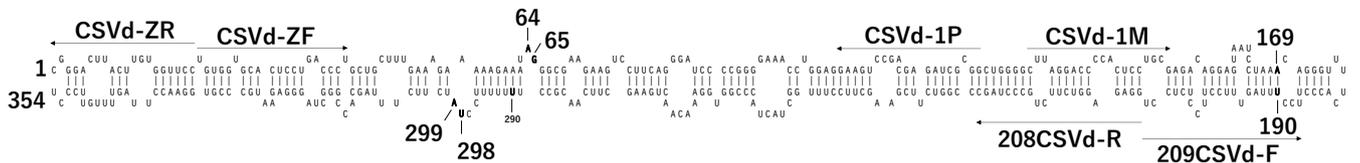


図4-1-1 ダリアから検出されたキク矮化ウイルス (CSVd系統1; LC433628) の推定2次構造  
矢印はCSVdの検出に用いたプライマーを示す。  
太字の数字は多型が認められた塩基を示す。

表4-1-1 国内のダリアから検出されたキク矮化ウイルス (CSVd) の塩基配列の比較

系統番号	地域 (検出数)	検出数	塩基配列の位置							Accession number in GenBank/EMBL/DDBJ	過去に感染が確認された宿主とその引用文献	
			64	65	169	190	290	298	299			
1	北海道 (7)、 秋田 (1)、山形 (3)、 福岡 (1)、宮崎 (1)	13	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	No. KU535580 No. LC433628 (本報告)	キク	Gobatto et al. 2014
2	長野 (4)、福岡 (8)	12	<b>A</b>	<b>G</b>	G	C	T	A	T	No. LC433629 (本報告)	-	
3	福岡 (1)	1	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	A	T	No. AB255879 No. LC433630 (本報告)	ダリア	Nakashima et al. 2007
4	奈良 (1)	1	G	A	<b>A</b>	<b>T</b>	A	A	T	No. LC433631 (本報告)	-	
5	高知 (2)、奈良 (1)	3	G	A	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	A	T	No. LC433632 (本報告)	-	
6	高知 (2)	2	G	A	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	A	<b>A</b>	No. X16408 No. LC433633 (本報告)	キク	Matsushita et al. 2007
7	-	-	<b>A</b>	<b>G</b>	G	C	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	No. AB255880 No. MZ328188	ダリア キク	Nakashima et al. 2007

認められた塩基配列の多型の多くは、病原性領域である 64, 65, 290, 298 および 299 番目の塩基で認められた (表 4-1-1)。他に多型が見られた 169 と 190 番目の塩基は右末端領域であった。これらの塩基配列の多型に関する情報は、プライマーを設計する上で重要である。すなわち、プライマーの設計部位には多型部位を含まないようにするべきである。これまでに、PSTVd, アボカドサンブロッツウイロイド (avocado sunblotch viroid; ASVd) およびカンキツエクソコーティスウイロイド (citrus exocortis viroid; CEVd) では、塩基配列の多型が病徴の程度に影響することが報告されている (Qi・Ding, 2003; Schnell et al., 2001; Visvader・Symons, 1985)。PSTVd の U257A 変異は、トマトに対する病原性を高め、枯死症状を引き起こす (Qi・Ding, 2003)。これらのことから、検出された CSVd 系統間のダリアに対する病原性の差異について関心が持たれる。一方で、キクでの CSVd による病徴の程度は、塩基配列の多型より、品種や環境条件に影響される (Yoon et al., 2012)。系統 7 は本節では検出されなかったが、ダリアとキクの双方から検出されていることから、ダリアとキクの間で CSVd が伝染する可能性が示唆される。同じく、本節でダリアから検出した系統 1 と 6 は以前にキクから検出されており、複数の CSVd 系統で同様の伝染の可能性が考えられる。

## 第 2 節 キク矮化ウイロイドのダリアとキクへの感染性の評価

### 緒言

CSVd の自然環境での感染はダリアやキクに加えて、ペチュニア (*Petunia hybrida*) (Verhoeven et al. 1998), ツルハナス (*Solanum jasminoides*) (Verhoeven et al., 2006), ツルニチニチソウ (*Vinca* sp.) (Nie et al., 2005) や野生ギク (*Chrysanthemum* sp.) (Matsushita et al., 2007) で確認されている。これらの宿主で検出された CSVd には塩基配列が異なるものが多く認められる。また、CSVd の系統によっては感染できる植物種が異なることが報告されている (Matsushita・Penmetcha, 2009)。トマトまたはムラサキカッコウアザミ (*Ageratum houstonianum*) から分離された CSVd の 2 系統を接種した際に、キ

クとトマトでは両系統の感染が確認された一方で、ムラサキカッコウアザミはトマト由来の CSVd に感染しなかった。同様に PSTVd においても KF 440-2 系統は、C259→U259 の 1 塩基置換により、タバコ (*Nicotiana tabacum*) への感染が可能となった (Wassenegger et al., 1996)。このようにウイロイドの塩基配列は感染・複製機構に影響を及ぼすことから、関連する塩基配列を特定するために、転写 RNA を用いた接種試験が広く行われている。なお、CSVd ではプラス鎖の転写 RNA がキクに感染し、病原性を示すことが示されている (Matsushita・Penmetcha, 2009)。一方で、ダリアに対して CSVd の転写 RNA を用いた接種試験の報告はなく、同様の手法での植物体内で CSVd が増幅するかは明らかではない。本節では複数の CSVd 系統を用いて、ダリアに対する転写 RNA の接種源としての実用性を評価し、さらに CSVd の塩基配列がダリアおよびキクへの感染効率に及ぼす影響を考察した。

### 材料および方法

#### 1) CSVd のダリアとキクへの接種

CSVd の転写 RNA は、Matsushita・Penmetcha (2009) に従って作出した。CSVd のプラス鎖 RNA を作出するために、CSVd 系統 1, 2, 5 および 6 に加え、キクから分離された系統 (No. LC062712) を含むベクターをテンプレートとして PCR を実施した。PCR 産物を GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich) で精製し、転写のテンプレートとした。転写は、T7 RiboMAX Express Large Scale Production System (Promega) を使用して 37°C で約 12 時間の処理を行った。DNase I で処理した後、転写 RNA のサイズを電気泳動で確認した。摩砕液での接種源は、CSVd に感染したダリア ‘かまくら’ (CSVd 系統 1), ‘ポートライトペアビューティー’ (CSVd 系統 2) およびキク ‘千都の輝’ (CSVd 系統 6) の感染葉に 10 倍量の 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) を加えて磨砕して作出した。接種は、健全なダリア ‘真心’, ‘ポートライトペアビューティー’ およびキク ‘K01’ に行った。これらの上位葉にカーボランダムを振りかけ、ビニール手袋を装着した指で 2  $\mu$ g の転写 RNA または摩砕液を葉に軽く擦ることで接種した。接種後の植物は、人工気象器内で 25°C, 16 時間日長条件で管理した。接種 3 ヶ月後に各植物の

中位葉をサンプリングし、microtissue direct RT-PCRでCSVdの検定を行った。昆虫針（有頭シガ昆虫針3号）でダリアの中位の小葉の主脈を3回刺した後、昆虫針をRT-PCR反応液に浸漬することで、針先についた植物汁液をテンプレートとして使用した。プライマーはCSVdD-R, CSVdD-F（5' TCTCCAGGAGAGGAAGGAACTA 3', 5' GGAGTAAGCCCGTGGAACTTAG 3'）を用い、PrimeScript One-Step RT-PCR Kit Ver. 2 (Dye Plus)（タカラバイオ）を用いて、RT-PCR反応を行った。試薬の濃度はプロトコールに準じ、プライマーの濃度は0.4 μMとした。反応は10 μl系で実施した。RT反応を50°Cで10分間行い、94°Cで2分間処理後、PCRは94°C30秒、60°C30秒、72°C30秒を30回繰り返して、72°C5分間の最終伸長を行い、PCR産物を2.0%アガロースゲルで電気泳動した。

## 結果

転写RNAおよびCSVd感染植物の摩砕液の接種3ヶ月後に、供試したすべてのCSVd系統がダリアとキクから42.9~100%で検出された（表4-2-1）。転写RNAまたは感染植物の摩砕液の接種源の違いによるダリアとキクでの感染株率はほぼ同等であり、最も

差が認められたのは、系統1のキクでの転写RNA100%と感染植物の摩砕液55.6%であった。ダリアの品種間での感染株率はほぼ同等であった。植物種に関しては、キクはダリアより感染株率がやや低い傾向にあり、キクでは最も低い値である感染率42.9%が2処理区で認められた。CSVd系統の違いによる感染株率への大きな影響は認められず、最も低い値を示したのはダリアではNo. LC062712、キクでは系統5と6であった。

## 考察

これまでにダリアから検出されたCSVdの系統にはキクから検出された系統と異なるものがあり、これらの塩基配列の違いによる植物種ごとの感染性への影響を評価した。本節で用いたすべての系統はダリアとキク双方に高率に感染したことから、これらのCSVd系統間で異なる塩基配列による感染の可否に関わる影響はないと考えられた。さらにCSVdに感染したキクを用いた汁液接種で、ダリアへの感染が認められたことから、キクがダリアに対するCSVdの伝染源となる可能性が示唆された。同様に、ダリアがキクに対するCSVdの伝染源となる可能性も示唆された。

表4-2-1 転写RNAと感染植物の摩砕液を用いたキク矮化ウイルス（CSVd）系統のダリアとキクへの接種

系統	感染報告がある植物種	接種植物	品種	接種源			
				転写RNA		感染植物の摩砕液	
				感染株率		感染株率	植物種 <sup>a</sup>
系統1 <sup>b</sup> (No. LC433628) <sup>c</sup>	ダリア キク	ダリア	ポートライトベアビューティー	100 (4/4) <sup>d</sup>	100 (14/14)	ダリア	
			真心	75.0 (3/4)	75.0 (9/12)		
		キク	K01	100 (4/4)	55.6 (5/9)		
系統6 (No. LC433633)	ダリア キク	ダリア	ポートライトベアビューティー	72.7 (8/11)	100 (14/14)	キク	
			真心	55.6 (5/9)	83.3 (10/12)		
		キク	K01	42.9 (3/7)	62.5 (5/8)		
系統2 (No. LC433629)	ダリア	ダリア	ポートライトベアビューティー	81.8 (9/11)	94.4 (17/18)	ダリア	
			真心	90.0 (9/10)	82.4 (14/17)		
		キク	K01	71.4 (5/7)	75.0 (6/8)		
系統5 (No. LC433632)	ダリア	ダリア	ポートライトベアビューティー	81.8 (9/11)	-	-	
			真心	70.0 (7/10)	-	-	
		キク	K01	42.9 (3/7)	-	-	
- (No. LC062712)	キク	ダリア	ポートライトベアビューティー	42.9 (3/7)	-	-	
			真心	66.7 (4/6)	-	-	

<sup>a</sup>接種源として用いたCSVd感染植物種を示す。

<sup>b</sup>系統の番号は表4-1-2を参照

<sup>c</sup>GenBank/EMBL/DDBJ accession no.

<sup>d</sup>感染株数/接種株数

キク以外に CSVd の自然感染が確認されているペチュニア (Verhoeven et al., 1998), ツルハナス (Verhoeven et al., 2006), ツルニチニチソウ (Nie et al., 2005) および野生ギク (Matsushita et al., 2007) などの植物種からの感染リスクの評価は今後の課題である。また、ブラジルでは CSVd の雑草への自然感染が確認されており (Gobatto et al., 2019), 国内の圃場周辺の雑草での感染状況の解明はこれからの検討事項となる。

転写 RNA での CSVd の接種がダリアへの高い感染性を示したことから、本手法は、ダリアでの CSVd の塩基配列が及ぼす病徴や感染性への影響の評価に有効と考えられた。特にこれまでに報告のない CSVd 系統を人工的に作出することで、より広範な塩基配列の影響を調査することができる。本節で使用した CSVd は 5 系統のみであり、ダリアとキクでの CSVd の感染性が同一であるかを明らかにするにはより多くの CSVd 系統を用いた接種試験による確認が必要と考えられる。

### 第 3 節 キク矮化ウイロイドの感染がダリアの生育に及ぼす影響

#### 緒言

感染植物に病徴を引き起こすウイロイドは、ジャガイモでは PSTVd, トマトでは、ポスピウイロイド属の tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd) や tomato apical stunt viroid (TASVd), tomato planta macho viroid (TPMVd), columnea latent viroid (CLVd) が知られている。これらに感染した植物は葉に黄化等の病徴を示し、経済的な被害が生じるため国外で問題となっている (Singh et al., 2003)。しかし、すべてのウイロイドが病徴を引き起こすわけではなく、トマトに感染するウイロイドの中で mexican papita viroid (MPVd), CEVd, CSVd, CLVd (Singh et al., 2003), pepper chat fruit viroid (PCFVd) (Verhoeven et al., 2009) は生育に影響を及ぼさないことが知られている。ダリアへの感染が報告されているウイロイドは CSVd, PSTVd および DLVd の 3 種であるがそのうち、PSTVd と DLVd はダリアに明瞭な病徴を引き起こさないことが確認されている (Monger, 2018 ; Tsushima et al., 2015 ; Yan et al., 2019)。一方

で CSVd に関しては、DMV 等との複合感染したダリアでの生育の抑制が確認されていたが (Nakashima et al., 2007), CSVd 単独感染での病徴の確認は行われていなかった。

CSVd はキク生産における重要病害の一つであり、キクでは植物体の矮化、葉の小型化、早期開花を引き起こすことが知られている (Matsushita., 2013)。これらの病徴はその他の植物種でも共通しており、マーガレット (*Argyranthemum frutescens*) (Marais・Faure, 2011) で確認されている。CSVd に感染し矮化症状を示したキクでは非感染株よりジベレリンの合成量が減少していたことから (Huh et al., 2006), CSVd は宿主の遺伝子発現に何らかの影響を与えていると考えられる。なお、CSVd を含むウイロイドはタンパク質をコードする領域が認められないことから、ノンコーディング RNA として宿主の遺伝子発現に関与している可能性が指摘されている (Adkar-Purushothama・Perreault, 2019)。

CSVd のダリアへの感染は複数の地域で確認されていたが、ダリアに対する病原性は明らかにされていなかった。そのため、CSVd を防除対象とすべきか明確な根拠がない状態であった。本節では接種試験を行い、CSVd 感染がダリアの生育に及ぼす影響を調査した。

#### 材料および方法

##### 1) CSVd 感染親株からのダリアの栽培

CSVd 系統 2 (LC433629) の転写 RNA の接種をダリア ‘ポートライトペアビューティー’ と ‘真心’ に行い、CSVd 感染株を作出した。なお、転写 RNA の作成および接種は第 4 章第 2 節に従って実施した。これらの CSVd 感染株と非感染株を親株として、穂を採取し、挿し芽を行うことで定植苗を作出した。27 cm ポットに定植後、摘心を行うことで 2 本仕立てにし、ビニルハウス内で、10~30°C, 約 14.5 時間日長で管理した。挿し芽、定植および摘心は ‘ポートライトペアビューティー’ では、2017 年 2 月 13 日、4 月 6 日および 4 月 19 日に、‘真心’ では 2016 年 12 月 7 日、2017 年 2 月 1 日および 3 月 27 日に行った。切り花の収穫は、外花卉が水平に開いた時点で実施した。‘ポートライトペアビューティー’ では CSVd 感染株 13 株、非感染株 13 株、‘真心’ では

CSVd 感染株 10 株, 非感染株 9 株を用いた。

## 2) 定植後に CSVd を接種したダリアの栽培

定植後の CSVd の感染がダリアの生育に及ぼす影響を評価するために, CSVd 系統 2 を用いて接種実験を行った。CSVd 非感染 ‘ポートライトペアビューティー’ の母株から穂を採取し, 2015 年 11 月 18 日に挿し芽を行うことで定植苗を作出した。12 月 28 日に 27 cm ポットに定植し, 2016 年 1 月 16 日に摘心した。1 月 24 日に CSVd 系統 2 の転写 RNA を未展開の上位葉に接種した。2 本仕立てで管理し, 1 回目の切り花の収穫は 2016 年 4 月 15 日に行った。収穫後, 株の基部から側芽を伸長させ, 2 本仕立てで管理した。2 回目の切り花の収穫は, 外花卉が水平に展開した際に実施した。ビニルハウス内で, 10~30°C, 14.5 時間日長下で栽培した。CSVd 接種株 10 株と未接種株 9 株を栽培した。各ダリア植物の上部葉における CSVd の感染を確認するために, 接種 46, 64, 79 および 135 日後に Hosokawa et al. (2006) に従い microtissue direct RT-qPCR を行った。試薬は One Step TB Green PrimeScrip PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (タカラバイオ) を用いた。試薬の濃度はプロトコルに準じ, プライマー CSVd-real F1 (5' TCCGACGAGATCGCGGC 3'), CSVd-real F2 (5' GAAGACCGGGCTAGGGCAGA 3') の濃度は 0.4  $\mu$ M, 反応液量は 10  $\mu$ l で実施した。昆虫針 (有頭シガ昆虫針 3 号) でダリア中位葉の葉柄を 3 回刺した後, 昆虫針を RT-PCR 反応液に浸漬した。すなわち針先についた植物汁液をテンプレートとして使用した。RT 反応を 42°C で 5 分間行い, 95°C で 10 秒間処理後, PCR は 95°C 5 秒, 60°C 34 秒を 30 回繰り返した。

## 3) 切り花の調査

CSVd 感染親株からの栽培試験については, 切り花長, 切り花重, 節数, 葉長, 葉幅, 花径, 花重および開花日を調査した。‘ポートライトペアビューティー’ では, CSVd 感染株の 7 花と非感染株の 8 花について, 管状花と舌状花の数を調査した。管状花は花卉が筒状で小さく, 雌蕊と雄蕊を有し, 舌状花は花卉が平らで大きく, 雌蕊はなく, 退化した雄蕊のみを有する (図 4-3-1) 。‘真心’ では, CSVd 感染株の 24 花と非感染株の 19 花について, 露心花数を調査した。露心花は花の中心部から管状花が露出しているものとした。花卉の色の評価は, 色差計 (Color Reader CR-13, ミノルタ) を用いて CIE の L\* 値, a\* 値および b\* 値を測定した。L\* 値は明るさを, a\*

値は緑~赤味, b\* 値は青~黄味を示す指標である。なお, 花卉が複色である ‘ポートライトペアビューティー’ では, 発色部を調査対象とした。定植後に CSVd を接種した栽培試験については, 切り花長, 切り花重, 節数, 葉長, 葉幅および開花日を調査した。

## 結果

CSVd 感染親株から栽培した ‘ポートライトペアビューティー’ と ‘真心’ の感染株の切り花長は, 非感染株よりも有意に小さかった (表 4-3-1, 図 4-3-2) 。また, CSVd 感染によって両品種の切り花重, 葉の大きさ, 花径, および花重は減少したが, 節数には影響がなかった。‘真心’ は ‘ポートライトペアビューティー’ よりも CSVd 感染による切り花重の低下程度が大きかった。両品種の感染株の開花日は, 非感染株に比べてやや早かった。両品種で, CSVd 感染による花卉の色, 花の形態への影響が認められた。‘真心’ では, 感染株の花卉は, 非感染株より濃いピンクであった (図 4-3-3a) 。感染株では非感染株より花卉の明度 L\* 値は低く, a\* 値と b\* 値も低かった (表 4-3-2) 。感染株では, 露心花が 30 花中 8 花と高率で確認されたが (図 4-3-3b) , 非感染株では確認されなかった。‘ポートライトペアビューティー’ では, 感染株の花卉は, 非感染株より濃いオレンジ色であった (図 4-3-3c) 。感染株では非感染株より花卉の明度 L\* 値は低く, a\* 値は高く, b\* 値は低かった (表 4-3-2) 。感染株の管状花の割合は 22.9% (管状花数: 571 $\pm$ 4.2 個, 総小花数: 249.7 $\pm$ 7.5 個) であり, 非感染株の 5.6% (管状花数: 13.1 $\pm$ 3.7 個, 総小花数: 235.3 $\pm$ 4.7 個) より高かった。なお, 露心花は, 感染株と非感染株とともに観察されなかった。苗を定植し摘心後に CSVd を接種したダリアでは, 接種後 64, 79 および 135 日目にそれぞれ 20 株中 10, 18 および 20 株で CSVd が検出された (表 4-3-3) 。2 番花の切り花では, CSVd 感染株では切り花長, 葉長および葉幅が非感染株より有意に小さかった (表 4-3-4) 。CSVd 感染株の切り花重は非感染株より 13% 低かった。一方, 1 番花の切り花では CSVd 感染による切り花長, 葉長, 葉幅および切り花重への有意な影響は認められなかった。節数と開花日は 1 番花と 2 番花の切り花とともに CSVd 感染による有意な影響は認められなかった。

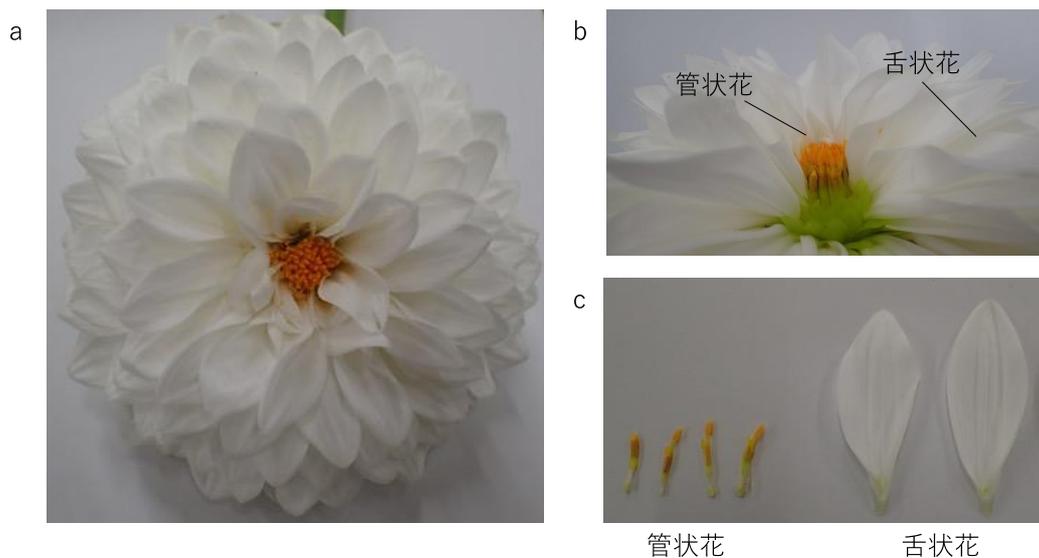


図4-3-1 ダリアの露心花における管状花と舌状花

a：露心花、b：露心花における管状花と舌状花の位置、c：管状花と舌状花  
品種‘かまくら’

表4-3-1 キク矮化ウイロイド (CSVd) の感染がダリアの生育に与える影響 (CSVd感染親株からの栽培)

品種	CSVd感染	切り花長 (cm)	切り花重 (g)	節数	葉長 (cm)	葉幅 (cm)	花径 (cm)	花重 (g)	開花日 <sup>a</sup>	n
ポートライト	感染	58.5 ± 0.4 <sup>b</sup>	231.0 ± 1.3	9.5 ± 0.1	27.7 ± 0.1	24.7 ± 0.2	11.5 ± 0.1	32.1 ± 0.6	45	13
	非感染	80.5 ± 2.2	302.9 ± 6.4	9.4 ± 0.1	31.4 ± 0.5	27.7 ± 0.5	12.5 ± 0.3	35.5 ± 1.8	47	13
	(感染/非感染) <sup>c</sup>	73% *	76%*	101%	88% *	89% *	92% *	90%		
真心	感染	62.6 ± 1.8	112.7 ± 8.8	6.6 ± 0.3	21.6 ± 0.8	16.7 ± 1.2	11.1 ± 0.2	22.2 ± 1.2	41	15
	非感染	82.5 ± 4.0	226.9 ± 15.7	6.4 ± 0.4	32.2 ± 1.5	27.0 ± 1.2	13.7 ± 0.3	40.5 ± 2.5	48	10
	(感染/非感染)	76% *	50%*	100%	67% *	62% *	81% *	55% *		

<sup>a</sup>摘心から開花までの日数

<sup>b</sup>平均 ± 標準誤差

<sup>c</sup>非感染株に対する感染株の割合

\*は5%水準での有意差があることを示す (Student's *t*-tests; *p* < 0.05)

感染区は、CSVdに感染した母株から採種し栽培した。



CSVd感染 CSVd非感染

図4-3-2 キク矮化ウイロイド (CSVd) 感染による  
ダリア‘ポートライトペアビューティー’の矮化症状

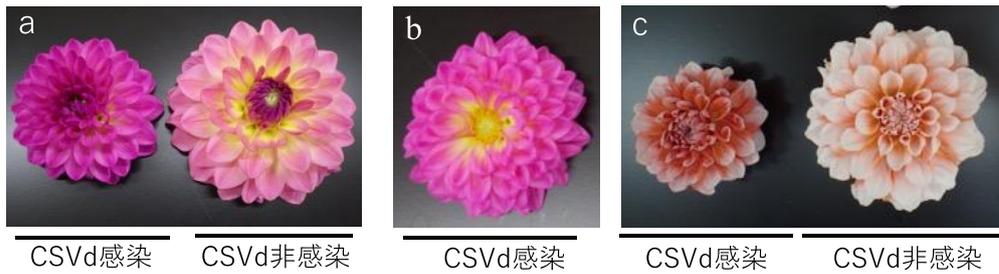


図4-3-3 キク矮化ウイルス (CSVd) 感染によるダリアの花の小型化、花色の変化および露心花 (a) '真心'の花の症状 (b) '真心'の露心花 (c) 'ポートライトペアビューティー'の花の症状

表4-3-2 キク矮化ウイルス (CSVd) の感染がダリアの花弁の色に与える影響 (CSVd感染親株からの栽培)

品種	CSVd感染	L*値	a*値	b*値	n
ポートライト ペアビューティー	感染	71.7 ± 1.2 <sup>a)</sup>	26.9 ± 1.5	30.7 ± 1.7	13
	非感染	76.4 ± 0.5	20.8 ± 1.1	35.8 ± 1.3	13
	<i>t</i> -test	*	*	*	
真心	感染	61.9 ± 1.5	33.4 ± 1.6	-7.5 ± 2.6	10
	非感染	67.6 ± 1.2	27.5 ± 1.4	1.7 ± 1.9	9
	<i>t</i> -test	*		*	

<sup>a)</sup>平均 ± 標準誤差

\*は5%水準での有意差があることを示す (Student's *t*-tests;  $p < 0.05$ )

感染区は、CSVdに感染した母株から採穂し栽培した。

表4-3-3 キク矮化ウイルス (CSVd) 接種後のダリアでの検出率

処理	シュート	感染株数 / 接種株数 <sup>a)</sup>				株数
		46日後 <sup>a)</sup>	64日後	79日後	135日後	
CSVd接種	1	0/10	6/10	9/10	10/10	10
	2	0/10	4/10	9/10	10/10	
CSVd非接種	1	0/9	0/9	0/9	0/9	9
	2	0/9	0/9	0/9	0/9	

<sup>a)</sup>接種後の日数

ダリア 'ポートライトペアビューティー'を用いた。

CSVdの検出は、microtissue direct RT-qPCRを用いた。

ダリアは株あたり、2本のシュートを生育させた。

表4-3-4 苗の定植後のキク矮化ウイロイド (CSVd) の接種がダリアの生育に及ぼす影響

切り花	CSVd感染	切り花長 (cm)	切り花重 (g)	節数	葉長 (mm)	葉幅 (mm)	開花日数 <sup>c</sup> (接種後日数)	株数
1番花	感染	93.2 ± 1.3 <sup>a</sup>	168.3 ± 6.0	9.3 ± 0.4	271.6 ± 5.6	230.6 ± 4.1	73 (65)	10
	非感染	95.6 ± 2.6	175.4 ± 6.8	9.5 ± 0.4	270.7 ± 4.4	233.3 ± 5.2	74 (66)	9
	(感染/非感染) <sup>b</sup>	98%	96%	98%	100%	99%		
2番花	感染	71.5 ± 1.3	128.3 ± 4.2	10.2 ± 0.2	228.7 ± 4.7	205.8 ± 5.7	67 (148)	10
	非感染	86.1 ± 1.7	148.0 ± 8.6	10.5 ± 0.2	253.6 ± 5.6	229.9 ± 7.9	67 (148)	9
	(感染/非感染)	83% *	87%	97%	90% *	90% *		

<sup>a</sup>平均 ± 標準誤差

<sup>b</sup>非感染株に対する感染株の割合

<sup>c</sup>開花日は摘心からの日数とした。

\* は5%水準での有意差があることを示す (Student's t-tests; p < 0.05)。

株あたり2本のシュートを伸長させた。

1番花を収穫後、株元の側芽から2番花を生育させた。

## 考察

CSVd 感染による病徴は、キク (Matsushita, 2013) やマーガレット (Marais・Faure, 2011) で確認されている。同様に、本節の試験によりダリアでも CSVd 感染による生育への影響が確認された。ダリアでの CSVd による症状は、切り花長の減少、葉と花の小型化、花色の変化、露心花率と管状花率の増加であった (表 4-3-1, 図 4-3-1, 図 4-3-2)。CSVd 感染による切り花重の減少の程度は、‘ポートライトペアビューティー’より‘真心’で大きく (表 4-3-1)、品種間で病徴の程度に差が生じることが示唆された。キクについても、CSVd 感染によって引き起こされる矮化の程度は品種に依存し、切り花の長さの減少率は 7.7~51.5%と幅広い (Chung et al., 2005)。短日植物であるキクは CSVd 感染により光応答が乱され、長日条件下でも開花する (Hosokawa et al., 2004a)。同様にダリアでは、CSVd 感染による光応答の攪乱で、管状花の割合の増加や露心花の発生する可能性が考えられた。遺伝子レベルでの CSVd 感染がダリアの光応答を変化させる機構の解明については、より詳細な今後の研究が期待される。

定植後の CSVd の転写 RNA の接種では、9 週間後に約半数の株で CSVd が検出された (表 4-3-3)。前節での接種試験と同様にダリアにおける CSVd の感染効率は高かった。キクでは、転写 RNA の接種後、5 週間で CSVd が検出されたことから (Matsushita・Penmetcha, 2009)、植物種によって CSVd の複製効率が異なることが推察された。CSVd 感染ダリアでは、切り花長の減少は、2 番花では認められたが、1

番花では認められなかった (表 4-3-4)。このことは、CSVd による生育への影響が確認できるのが、感染後約 3~5 ヶ月後であり、早期に目視での CSVd 感染植物を除去することは困難であることを示している。一部のキク品種では、高照度および高温 (25~28°C) 条件下で接種後 20 日から 8 週間以内に矮化症状が現れる (Bachelier et al., 1976 ; Yoon et al., 2012)。したがって、ダリアでも 1 番花の切り花で矮化症状が発生する品種や栽培条件が存在する可能性は否定できない。

以上のことより、CSVd のダリアへの感染が定植前、定植後であっても、ダリアに矮化症状といった経済的被害につながる病徴を引き起こすことが明らかになった。このことから CSVd は防除対象とすべき病原体であると結論づけた。健全株の選抜に RT-PCR を用いる際には TSWV, DMV に加え CSVd を追加することが必要である。

## 第 4 節 キク矮化ウイロイドの系統と栽培環境がダリアに対する病原性に及ぼす影響

### 緒言

前節で CSVd 感染によって引き起こされるダリアの病徴は、植物体の矮化、葉や花の小型化、花色の変化および露心花率の増加であることが明らかとなった。しかし、病原性の確認に用いた CSVd は 1 系統のみであり、栽培条件が病徴に及ぼす影響については検討されていない。

ダリアの多くの品種は、定量的短日植物であり(小西・稲葉, 1964; 1966), 日長が長くなると、植物長、節数および舌状花率が増加する(小西・稲葉, 1964; 岡田・原田, 1955)。また、温度は生育に影響を及ぼし、12~28°Cでの生育温度の上昇により開花の早期化が認められる(Jens・Heins, 1993)。

CSVdには多数の系統が存在することが知られており(Choi et al., 2017; Gobatto et al., 2014; Matsushita et al., 2007), 第4章第1節より日本のダリアからは7つの系統が検出され、その多型は主に病原性領域に存在した。CSVdを含むウイロイドの複製と病原性に影響を及ぼす配列を解明するためには、*in vitro* 転写系を用いた逆遺伝学アプローチが広く用いられている(Matsushita・Penmetcha, 2009; Tabler・Sanger, 1985)。CSVdの転写RNAは、ダリアに効率的に感染し、複製することが第4章第2節で確認されており、CSVd系統別での病原性の評価に適した手法と考えられる。また、CSVdに感染したキクは非感染株とは異なり長日条件下でも開花した(Hosokawa et al., 2004a)。このことからCSVd感染はキクの光応答を抑制していると推察されているが、ダリアに関する同様の報告はない。本節では、CSVdの系統、栽培時期および日長条件がCSVd感染ダリアの生育に及ぼす影響について調査した。

## 材料および方法

### 1) CSVdの接種

第4章2節と同様にCSVd系統2(LC433629)、系統1(LC433628)、系統7(AB255880)(表4-1-1)を含むベクターを用いて、転写RNAを作出した。CSVd感染ダリアの摩砕液は、系統2に感染した‘ポートライトペアビューティー’の感染葉をその重量の10倍量の0.01 Mリン酸緩衝液(pH 8.0)で摩砕し、調製した。転写RNA 2 μgまたは摩砕液を手袋を着用した指先に付着させ、カーボランダムをふりかけたダリアの最上位展開葉に擦りつけた。

### 2) 時期別でのCSVd感染ダリアの栽培

CSVd接種源の種類、CSVdの系統、日長、栽培時期がダリアの生育に及ぼす影響を明らかにするために、栽培試験を実施した。ダリア‘真心’の非感染株に、CSVd系統2、系統1または系統7の転写RNA、もしくはCSVd系統2感染ダリアの摩砕液をそれぞ

れ接種し、感染親株を作出した。春季、冬季、夏季試験で、転写RNAの接種由来の感染母株から穂を採取した。また、春季試験ではこれらに加え摩砕液の接種由来の感染母株から穂を採取した。なお、CSVd感染と塩基配列の確認は、第4章第3節に従い、穂の採取前にmicrotissue direct RT-qPCRとダイレクトシーケンシングで行った。

穂の挿し芽は2018年1月(春)、2018年9月(冬)、2019年3月(夏)にCSVd感染および非感染親株から採取して実施した。発根した挿し芽苗の27 cmポットへの定植はそれぞれ2018年3月3日、2018年10月10日、2019年5月11日に実施した。摘心はそれぞれ3月29日、10月18日、5月21日に行い、2本仕立てで管理した。これらのダリアはビニルハウス内で、春季試験では10~30°C(平均19°C)で14.5時間光周期下、冬季試験では10~25°C(平均16°C)で14.5時間日長または暗期中断下(22:00~3:00)、夏季試験では15~35°C(平均26°C)で14.5時間日長または暗期中断下(22:00~3:00)で栽培した。すべての試験で、各系統のCSVd感染株7~12株、非感染株2~12株を栽培した。切り花長、切り花重、節数、葉長、葉幅、花径、花重および開花日を調査した。花については、CSVd感染株で14~20個、非感染株で4~24個を対象に舌状花と管状花の数、露心花数を調査した。

## 結果

接種源の違いが病原性へ及ぼす影響を明らかにするため、感染株の摩砕液または転写RNAを接種し、CSVd感染ダリアを栽培した。その結果、接種源の違いによる生育への有意な差は認められなかった(表4-4-1)。なお、両接種源によるCSVd感染株は非感染株と比べて切り花長、葉長、葉幅、切り花重、花径、花重、露心花率、管状花数と舌状花数に有意差が認められた。

CSVdの系統、日長および栽培時期がダリアの生育に及ぼす影響を明らかにするために、CSVd感染および非感染ダリアを栽培した。3つのCSVd系統の感染は春、冬、夏季試験で切り花長、葉長、葉幅、切り花重を有意に低下させた(表4-4-1、図4-4-1a)。いずれのCSVd系統においても切り花長の低下率に栽培時期による大きな影響は認められず、低下率は27~41%であった(表4-4-1)。一方、切り花重の低

表4-4-1 塩基配列が異なるキク矮化ウィロイド (CSVd) の感染がダリアの生育に及ぼす影響

時期	日長	接種源	CSVd系統	切り花長 (cm)		節数		葉長 (mm)		葉幅 (mm)		切り花重 (g)		開花日数 <sup>a</sup>	株数						
春	14.5 h	植物汁液	2	61.2	65% <sup>b</sup> a <sup>c</sup>	7.7	94%	a	261.5	61% a	223.9	59% a	140.3	37% a	57.2 (5月25日)	97% a	10				
			転写RNA	2	65.1	69% a	8.1	99%	ab	272.9	63% a	226.5	60% a	148.4	39% a	56.5 (5月24日)	96% a	7			
			1	67.5	72% a	8.8	107%	b	322.5	75% b	297.6	79% b	225.2	59% b	58.8 (5月26日)	100% a	10				
			7	68.1	72% a	8.4	102%	ab	343.1	80% b	309.0	82% b	251.5	66% b	60.9 (5月28日)	103% a	11				
			CSVd非感染	94.1	b	8.2	ab	431.0	c	376.6	c	381.0	c	58.9 (5月26日)	a	12					
			冬	14.5 h	転写RNA	2	72.8	60% a	8.1	92%	a	268.8	66% a	223.6	72% a	121.8	40% a	73.7 (12月30日)	98% a	7	
1	77.1	64% a				8.6	98%	a	272.4	67% a	231.3	75% a	140.9	47% a	78.0 (1月4日)	104% a	7				
7	74.3	61% a				8.4	95%	a	253.8	63% a	221.3	72% a	121.6	40% a	75.6 (1月1日)	101% a	7				
CSVd非感染	121.0	b				8.8	a	405.4	b	308.6	b	302.6	b	75.1 (1月1日)	a	4					
暗期中断	転写RNA	2				79.0	65% a	10.0	100%	a	261.9	65% a	224.0	68% a	154.2	53% a	83.1 (1月9日)	98% a	7		
(暗期中断 / 14.5 h)	(109%) *	(123%) *				(97%)	(100%)	(127%) *	(113%) *												
1	80.6	66% a			10.6	106%	a	273.9	68% a	226.9	69% a	157.2	54% a	91.0 (1月17日)	108% a	7					
(暗期中断 / 14.5 h)	(105%)	(123%) *			(100%)	(98%)	(112%)	(117%) *													
7	79.3	65% a			10.5	105%	a	264.3	65% a	228.5	69% a	159.2	55% a	89.7 (1月15日)	106% a	7					
(暗期中断 / 14.5 h)	(107%) *	(125%) *			(104%)	(103%)	(131%) *	(119%) *													
CSVd非感染	121.5	b			10.0	a	405.0	b	330.5	b	291.5	b	84.5 (1月11日)	a	2						
(暗期中断 / 14.5 h)	(100%)	(114%) *			(100%)	(107%)	(96%)	(113%)													
夏	14.5 h	転写RNA			2	67.8	69% a	9.6	101%	a	242.3	66% a	163.1	67% a	96.5	43% a	66.3 (7月26日)	92% a	7		
					1	72.0	73% a	10.1	106%	a	270.5	73% b	180.3	74% a	116.7	52% a	66.7 (7月26日)	92% a	7		
					7	66.3	67% a	10.4	109%	a	244.1	66% a	170.0	70% a	103.8	46% a	67.9 (7月27日)	94% a	7		
					CSVd非感染	98.7	b	9.5	a	369.0	c	244.3	b	225.6	b	72.4 (8月1日)	a	7			
					暗期中断	転写RNA	2	67.8	66% a	10.1	107%	a	243.9	68% ab	160.0	64% a	103.1	48% a	72.0 (8月1日)	100% a	7
					(暗期中断 / 14.5 h)	(100%)	(105%)	(100%)	(98%)	(107%)	(109%)										
		1	68.7	67% a	10.6	113%	a	270.9	76% b	178.5	71% a	117.6	55% a	75.6 (8月4日)	105% a	7					
		(暗期中断 / 14.5 h)	(95%)	(105%)	(100%)	(99%)	(101%)	(113%)													
		7	60.6	59% a	9.9	105%	a	226.9	63% a	155.2	62% a	90.8	42% a	70.5 (7月30日)	98% a	7					
		(暗期中断 / 14.5 h)	(91%)	(95%)	(93%)	(91%)	(87%)	(104%)													
		CSVd非感染	102.4	b	9.4	a	357.7	c	250.9	b	215.7	b	72.1 (8月1日)	a	7						
		(暗期中断 / 14.5 h)	(104%)	(99%)	(97%)	(103%)	(96%)	(100%)													

<sup>a</sup>摘心からの開花日数。

<sup>b</sup>CSVd非感染に対するCSVd感染の割合 (%)。

<sup>c</sup>異なるアルファベットは処理間で有意差があることを示す(Tukey-Kramer 多重比較,  $p < 0.05$ )。

\*は14.5時間日長と暗期中断で有意差があることを示す ( student's *t* test,  $p < 0.05$ )。



転写RNA 摩砕液  
 系統7 系統1 系統2 系統2 非感染  
 CSVd感染



転写RNA 摩砕液 非感染  
 系統7 系統1 系統2 系統2  
 CSVd感染

図4-4-1 春季試験におけるキク矮化ウィロイド (CSVd) による病徴の系統間差

a : CSVd系統感染株と非感染株の植物長の比較、b : 花の形態と色の比較  
 CSVd系統2 : GenBank/EMBL/DBJ accession no. LC433629、系統1 : LC433628、  
 系統7 : AB255880  
 接種源には、CSVdの転写RNAまたはCSVd感染植物の摩砕液を使用した。

下率には、栽培時期によって系統間差が認められた。冬季および夏季試験では CSVd 系統間で有意差はなく、14.5 時間日長および暗期中断下で 45~60%であったのに対し、春季試験では CSVd 系統 2 による切り花重の低下率が 61%となり、系統 1 の 41%および系統 7 の 34%と比べて有意に高かった。さらに、葉長と葉幅の低下率をみると、春季試験において系統間差が認められ、系統 2 による低下率は系統 1 および系統 7 よりも有意に高かった。

次に、花に対する影響を検討したところ、花重、露心花率、管状花数および舌状花数において栽培時期依存的に系統間差が認められた (表 4-4-2)。系統 2 接種区における花重の低下率は、系統 1 および 7 と比較して高く、春季試験では系統 7 と、冬季試験 (14.5 時間日長下) では系統 1 と比較して有意差が認められた。また、CSVd 系統 2 における露心花率は、春季と冬季試験 (14.5 時間日長下) で、系統 1 および系統 7 よりも有意に高かった (表 4-4-2, 図 4-4-1b)。さらに、管状花数は、春季試験において、系統 2 が系統 1 および系統 7 よりも有意に多かった。舌状花数は、春季試験では、系統 2 が系統 1 および系統 7 よりも有意に低く、冬季試験 (14.5 時間日長) では系統 1 接種区よりも有意に低かった。

暗期中断の影響を検討したところ、冬季試験では、14.5 時間日長と比較して、切り花の品質に影響する

切り花長, 切り花重および露心花率等の複数の項目で有意な差が確認された (表 4-4-1, 表 4-4-2). 一方, 夏季試験では, 暗期中断は 14.5 時間日長と比較して生育に有意な影響を与えなかった.

考察

ダリアでの CSVd 感染による矮化等の症状は前節で明らかにしたが, 症状の程度に関与する要因の検討は行っていない. 本節では, CSVd の系統と栽培条件が及ぼす影響を評価した. 本節で用いた 3 つの CSVd 系統の感染は, 春・冬・夏季試験で植物体の矮化を引き起こした (表 4-4-1). 切り花長の低下率は, すべての試験で約 30~40%の範囲であり, これは前節の結果と同等であった. これらの結果は, CSVd の感染が幅広い時期でダリア生産に重大な被害を与え, CSVd が重要な病原体であることを示している. 春季試験では, 系統 2 の切り花重, 葉長お

よび葉幅は, 系統 1 と系統 7 よりも有意に低かった (表 4-4-1). 一方, 夏季と冬季試験では, 3 つの CSVd 系統間で切り花重, 葉長および葉幅に有意差はなかった. それゆえ, CSVd 塩基配列の差による切り花重および複葉長・幅への影響は栽培時期に依存する可能性が考えられた. 花径の低下率の CSVd 系統間差はすべての試験で認められなかった (表 4-4-2). 一方で系統 2 の花重は, 系統 1 と系統 7 よりも低くなる傾向があった. さらに, 春季と冬季試験では 14.5 時間日長下で, 系統 2 の露心花率は他の 2 系統よりも有意に高かった (表 4-4-2). 露心花の発生の増加は, 系統 2 で管状花数が多く, 舌状花数が少ないことと一致していた. これらの症状の差から, CSVd 系統 2 は, 系統 1 および系統 7 よりも病原性が高いと考えられる. PSTVd, ASVd および CEVd などのいくつかのウイロイドでは, 塩基配列の違いが病原性と関連することが報告されている (Qi・Ding, 2003; Schnell et al., 2001; Visvader・Symons, 1985). PSTVd の高病原性株は, 感染トマトに重度の矮化と

表4-4-2 塩基配列が異なるキク矮化ウイロイド (CSVd) の感染がダリアの花に及ぼす影響

時期	日長	接種源	CSVd系統	花径 (cm)	花重 (g)	露心花率 (%)	管状花数	舌状花数	花数					
春	14.5 h	汁液	2	12.0	87% a <sup>b</sup>	20.7	58% a	83% (15/18) a	120.8	123% ab	87.9	61% a	18	
			転写RNA	2	11.5	83% a	19.3	54% a	100% (14/14) a	148.3	151% a	56.3	39% a	14
			1	11.8	86% a	26.4	73% ab	22% (4/18) b	123.8	126% bc	135.9	94% b	18	
			7	12.7	92% ab	33.0	92% b	0% (0/20) c	105.6	107% c	140.0	97% b	20	
			CSVd非感染	13.8	b	36.0	c	0% (0/24) c	98.5	c	144.8	b	24	
冬	14.5 h	転写RNA	2	11.8	88% a	20.4	65% a	42.9% (6/14) a	110.7	103% a	108.1	65% a	14	
			1	12.4	93% ab	27.4	88% b	0% (0/14) b	94.4	88% a	146.7	89% bc	14	
			7	11.9	89% a	22.8	73% ab	0% (0/14) b	98.1	91% a	122.8	74% ab	14	
			CSVd非感染	13.4	b	31.3	b	0% (0/8) ab	107.8	a	165.3	c	8	
			暗期中断	転写RNA	2	12.2	87% a	26.9	76% a	0% (0/14) a	89.4	95% a	153.7	67% a
		(暗期中断 / 14.5 h)		(103%)		(132%) *		*	(81%) *		(142%) *			
		1	12.0	85% a	29.4	83% a	0% (0/14) a	79.1	84% a	168.0	73% b	14		
		(暗期中断 / 14.5 h)		(97%)		(107%)		(84%) *		(115%) *				
		7	12.6	89% ab	32.3	91% a	7.1% (1/14) a	84.0	89% a	155.3	68% a	14		
		(106%) *		(142%) *		(86%)		(126%) *						
	CSVd非感染	14.1	b	35.5	a	0% (0/4) a	94.3	87% a	228.8	c	4			
	(暗期中断 / 14.5 h)		(105%)		(113%)		(87%)		(138%) *					
夏	14.5 h	転写RNA	2	9.7	90% a	11.9	80% a	0% (0/14) a	160.3	140% a	113.7	60% a	14	
			1	10.2	94% ab	13.6	91% a	0% (0/14) a	149.1	130% a	144.6	77% ab	14	
			7	9.8	90% ab	12.9	87% a	7% (1/14) a	180.2	158% a	125.3	66% a	14	
			CSVd非感染	10.9	b	14.9	a	0% (0/14) a	114.3	a	188.6	b	14	
			暗期中断	転写RNA	2	9.6	91% ab	12.6	102% a	0% (0/14) a	172.1	116% a	117.5	69% a
		(暗期中断 / 14.5 h)		(99%)		(106%)		(107%)		(103%)				
		1	9.6	91% ab	13.2	106% a	0% (0/14) a	152.8	103% a	142.1	84% ab	14		
		(暗期中断 / 14.5 h)		(94%)		(97%)		(102%)		(98%)				
		7	9.5	90% a	12.4	100% a	7% (1/14) a	159.4	107% a	131.9	78% ab	14		
		(暗期中断 / 14.5 h)		(97%)		(96%)		(88%)		(105%)				
	CSVd非感染	10.6	b	12.4	a	0% (0/12) a	148.4	a	169.7	b	12			
	(暗期中断 / 14.5 h)		(97%)		(83%)		(130%)		(90%)					

<sup>a</sup>総花弁数に対する管状花の割合 (%)。

<sup>b</sup>異なるアルファベットは処理間で有意差があることを示す (Tukey-Kramer 多重比較または Ryan 法,  $p < 0.05$ ).

\*は 14.5 明期と暗期中断で有意差があることを示す (student's  $t$  test または カイ 2 乗検定,  $p < 0.05$ ).

枯死を引き起こす (Qi・Ding, 2003). 一方, CSVd では, キクでの病徴の程度は, 塩基配列の違いではなく, 品種差や環境条件と関連することが示されている (Yoon et al., 2012). 本節で得られた結果は, CSVd の塩基配列の違いが病原性の程度に影響することを示した最初の事例である. 病原性領域における系統 2 に特有の 2 つの塩基置換 (U298→A298 および A299→U299) が, 病原性の高さに関与すると考えられる. 一方, 系統 1 と系統 3 の間の 2 つの置換 (A169→G169 および U190→C190) は病原性に影響しないと推察される.

冬季試験では, 暗期中断は CSVd 感染植物で切り花長, 切り花重, 花径や花重を有意に増加させ, 露心花率を低下させた (表 4-4-2). したがって, 暗期中断は CSVd 感染によるダリア症状を緩和するのに有効である. 一方で暗期中断下では開花日が 14.5 時間よりも約 7 日遅くなり, 収穫に必要な日数が増加することは念頭に置く必要がある. ダリアの冬季栽培では暗期中断は 14.5 時間日長と比較して切り花長や切り花重, 節数を増加させ, 露心花率を低下させる (角川・仲, 2013). それゆえ CSVd 非感染ダリアと同様に, CSVd 感染ダリアの冬季栽培においても日長条件が生育に同様の影響を及ぼしたと考えられる. 一方, 夏季試験での暗期中断は CSVd 感染株の管状花数, 舌状花数および切り花長に影響しなかった. このことから, 暗期中断の効果は温度に影響を受けることが示唆された. ダリアでは, 温度が管状花数や舌状花数に影響することが報告されている (岡田・原田, 1955). また, 平均気温の上昇は健全なダリアの開花日数を減少させる (Jens・Heins, 1993). したがって, 夏季試験では, 高温による管状花数の割合の低さや開花日数の短縮が, 暗期中断による CSVd 感染ダリアの管状花数の割合や切り花長の増加を妨げる要因と推察された.

キクは短日植物であるが, CSVd 感染で光応答が攪乱され, 長日条件下でも開花するようになる (Hosokawa et al., 2004a). ダリアでは 12 時間日長などの短日条件では露心花率が増加することから (角川・仲, 2013), ダリアでの CSVd 感染においても光応答性の変化が露心花率の増加を引き起こしたと考えられる. なお, 冬季試験での暗期中断が露心花率を低下させたことから, CSVd 感染は日長反応性を完全に喪失させるのではなく, 弱めたと推察される.

接種時の転写 RNA の CSVd の構造は直鎖状のみで

あり環状の CSVd は含まれない. しかし, 直鎖状の CSVd が非対称ローリングサークル機構 (Flores et al., 2005) により植物内で直鎖状から環状となり複製されたと考えられる. なお, 第 4 章 2 節の結果から転写 RNA のダリアへの感染効率は, 植物摩砕液に含まれる CSVd と同等であった. さらに本節で転写 RNA の CSVd の感染がダリアに植物摩砕液と同程度の症状を引き起こしたことから (表 4-4-1), 転写 RNA 由来の CSVd はダリアにおける病原性を評価する有効な方法であることが明らかになった.

本節では, 3 つの CSVd 系統が栽培期間中にダリアの生育に悪影響を与えることが示された. そのうちの 1 つの系統は, 植物重量, 葉のサイズおよび花の形態において重度の症状を引き起こした. CSVd 系統間の病原性の違いは, ダリアの生育に関わる遺伝子の発現機構の解明に寄与すると考えられる. 日長条件も CSVd 感染ダリアの生育に影響を与え, 冬季栽培では, 暗期中断は CSVd 感染ダリアの切り花長の減少および露心花の発生を抑制する有効な方法となりうる. 本試験は CSVd の塩基配列と栽培条件が CSVd 感染ダリアの生育に及ぼす影響を明らかにした最初の報告である.

## 第 5 章 総合考察

ダリアは切り花の生産額が増加傾向にある有望な品目でありながら, 重要病害であるウイルス・ウイロイド病に対する防除対策の検討が不十分であった. 新たな産地の形成や, 品種の多様化による苗の流通量の増加などに伴い, ウイルス・ウイロイドの分布域はさらに拡大していく恐れがある. ダリアでのウイルス・ウイロイドの発生状況については TSWV, DMV および CSVd に関して報告されているが, 広範な地域での調査はこれまでに実施されていなかった. また, キクでの重要病害である CSVd については, ダリアへの感染が報告されているが (Nakashima et al., 2007), その病原性の詳細は明らかでなかった. このため, 警戒すべきウイルス・ウイロイド種を明確に提示できず, 生産者にとっても対策が困難となっていた. ダリアでのウイルス・ウイロイド種の検出に主に用いられる RT-PCR は単独種を対象としたものであり, 複数種の検出は労力とコストの増加により導入が進まないことが懸念されていた. さらにウイルス・ウイロイド病の対策の基

本は伝染環の遮断であり、ダリア生産においても同様と考えられるが、明確な対応指針を打ち出すためには現地での効果の実証が不可欠である。本研究では、このようなダリアのウイルス・ウイロイド病対策に関する課題を解決するために、ダリア生産でのウイルス・ウイロイドの発生状況と病原性を解明し、さらに診断技術の開発と防除技術の実証を行った。以下で、本研究の成果の生産現場での活用とその意義、および残された課題について論じる。

診断技術に関しては、マルチプレックス RT-PCR による TSWV, DMV および CSVd の同時検出技術を開発し、さらに針先についた植物汁液をテンプレートとして用いる *microtissue direct* 法への適応性を確認した。本手法はウイルス・ウイロイドの発生状況調査、診断および健全株の選抜への利用が考えられ、省力・低コスト化によって全国の農業試験場や種苗会社での利用が進むことが想定される。本手法は2015年に論文により公表されていたが (Asano et al., 2015), その後もダリアのウイルス・ウイロイド病の診断に関する問い合わせがあったことから、本手法の周知が十分ではない状況であった。そこで、各都道府県の農業試験場や民間種苗会社での利用を促進するために、ダリアのウイルス・ウイロイド病診断マニュアル (奈良県農業研究開発センター, 2019) を作成し、HP 上で公開している。技術の普及には論文や専門誌だけでなく、表現が容易かつインターネット上で確認できる媒体を活用する重要性が増していると考えられる。

RT-PCR での検定部位の最適化を行うため、ダリアでの TSWV の分布を調査した。キク等の植物と同様に TSWV の分布の不均一性が確認され、TSWV は葉および莖では先端への移行性が悪く、莖では組織の老化に伴い検出されなくなる傾向が認められた。この結果から、検定部位として最適なのは中位葉の葉柄と結論づけた。なお、球根では TSWV の分布の不均一性が最も高く、検定部位として不適切であった。この結果を受けて、当センターではダリア親株のウイルス検定を球根で実施することを中止し、葉柄での検定に変更することで検出の精度の向上を図っている。ダリアでの TSWV の分布の不均一性は経験的に知られていたが、仮説を実証したことですべきことが明確になった好事例と言えよう。

国内での TSWV, DMV および CSVd の感染状況と病徴との比較を実施した。これらのウイルス・ウイロイドは国内に広域に分布していたことから、いず

れの種も対策が必要と考えられた。優占種は地域によって異なったものの、苗の移動や品種の遷移により今後も変化していく可能性がある。病徴が確認された株からは TSWV, DMV または CSVd のいずれかの感染が確認されたことから、これらがダリアに影響を及ぼす主要なウイルス・ウイロイドであることが明らかになった。なお、無病徴感染の割合が高い DMV と CSVd は TSWV と比較して感染株率が高かったことから、このような特性を持ったウイルス・ウイロイド種の感染の拡大には今後も注意が必要である。CSVd 感染による病徴は主として植物体の矮化であり、生育不良と見分けが付きにくい。しかし、生産者は生育状況に違和感を持っており、そこからウイルス・ウイロイドの関与を疑い、感染種の特定に至った。このように生産者の疑問やニーズに寄り添う意識を持って試験研究に取り組むことで新たな知見を得られると考える。なお、TSV と CMV はダリアでの感染と病徴が報告されているが (仲ら, 2007b), 生産現場での影響は大きくないと推察された。その要因が、病徴が軽微であるためか、低い感染株率によるものか、さらなる調査が必要である。本研究では、広域な発生状況調査を行うことで対象とするウイルス・ウイロイド種を明確化し、同時検出技術開発による省力化、さらに検出率の高い部位を明示することでウイルス・ウイロイドの検出系に関して系統立てて整理を行った。ウイルス・ウイロイド検定の際に一つ一つの作業に意味を持たせることで現場への適切な手法の導入を推進できると考える。

ダリアにおけるウイルス・ウイロイド病の防除対策として、伝染環の遮断が挙げられる。現地での実証試験でアザミウマ類による TSWV 媒介能が高かったことから、アザミウマ類の発生には注意が必要である。その対策として優占アザミウマ類の発生消長に基づいた殺虫剤の散布に加え 0.4 mm 目合ネットが有効であることが明らかになった。アザミウマ類は様々な殺虫剤に対する抵抗性を発達させており、殺虫剤のみに頼った防除はリスクが伴う。健全な親株を安定的に確保することが重要であるため、ネット被覆は特に親株生産圃場に導入することで防除の効率は高まる。なお、球根生産圃場では生産した球根の一部を翌年の作付けに使用しているため、発病株の抜き取りは現作に加え、翌作の伝染源の減少につながる。ダリアの現地調査の結果からも発病株の抜き取りは感染株を減少させるのに有効と考えられて

いる (Asano et al., 2019)。ただし、本法の課題としてすべての発病株を抜き取れないことや潜在感染株の存在が挙げられる。さらなる効果を得るには、発病株率が高い品種を優先的に茎頂培養由来等の健全苗に切り替えることが現実的と考えられる。なお、TSWV はアザミウマ類により媒介されるため、産地内での感染拡大リスクを考慮する必要がある。そのため産地全体での抜き取りを推進する必要がある。その効果の有効性を示す結果を示すことができれば作業の必要性により説得力を増すと考える。

ウイルス・ウイロイドの伝染源の除去の理想は茎頂培養由来の苗を毎年導入していくことであるが、導入コストを考えると実現は困難である。そのため、親株圃場での健全株の維持に注力することで効率的に効果が得られる。親株にウイルス・ウイロイドの感染が疑われる際は、購入苗や栽培圃場での生育が良好な株を新たな親株として早期に切り替えるべきである。対応が遅れると被害の拡大が進み、対策も困難となることから継続的な圃場の観察が重要である。それに加え、親株の更新時期を3年に1回のように定期的に行うことも、被害の発生、拡大リスクの低減に有効と考えられる。また、TSWV の伝染源として栽培植物に加えて雑草を考慮する必要がある。本研究ではダリアでの感染状況のみを調査対象としたため、圃場周辺の雑草での TSWV の感染状況の把握は今後の検討事項となる。

CSVd の感染がダリア生産上の問題となる矮化症状を引き起こすことが明らかになり、防除の対象にするべきと結論づけた。生産圃場の調査では、CSVd 感染株で明瞭に矮化症状を示す株だけでなく矮化症状を示さない潜在感染株もしくは生育不良と区別できない株が確認されたことから、目視のみによる健全株の選抜は困難と考えられる。そのため、健全株の選抜には RT-PCR などの検出技術を用いることで選抜の精度は高まる。なお、CSVd はキクにおいて茎頂の先端まで分布することから (Hosokawa et al., 2004b)、感染株から茎頂培養により CSVd を除去することは困難とされている。ダリアでは茎頂における CSVd の詳細な分布は明らかにされていないが、茎頂培養による CSVd が完全に除去されない事例が報告されている (仲ら, 2007b)。茎頂のさらに一部分を用いる超微小茎頂培養や低温条件と茎頂培養を組み合わせる手法がウイルス・ウイロイドフリー株の作出に利用されているが (Hosokawa et al., 2004b ; Savitri et al., 2013)、技術的および労力的障

壁が高く普及には至らないと思われる。

栽培管理については、汁液接種による CSVd のダリアへの感染効率が高かったことから、ハサミでの作業や株同士の接触によって感染拡大する可能性がある。CSVd の消毒にはバーナーによる熱処理が効果の安定性から最も有効と考えられる (愛知県農業総合試験場, 2013)。一方で消毒液については次亜塩素酸で効果が認められるものの、処理時間が長く、作業効率を考えると実用的ではない。キクでは CSVd 感染による矮化の程度および CSVd の感染率に品種間差があることが明らかにされており (Yoon et al., 2012)、ダリアにおいても同様の品種間差の評価が今後行われることを期待している。キクと同様に抵抗性品種や耐病性品種の存在が明らかになれば (Matsushita et al., 2012 ; Omori et al., 2009)、ダリアにおいても CSVd 抵抗性育種へ活用されると考えられる。

CSVd 系統間の違いについては、感染効率と病原性について評価した。感染効率については供試した5系統の CSVd に関してはいずれも高率での感染が確認され、感染の可否に関わるレベルでの系統間差は認められなかった。ここではキクでの感染が報告された系統も含まれており、キクとダリアの間で CSVd が伝染する可能性が示唆された。生産者の段階でダリアとキクを同一圃場で栽培していることはほとんどないと思われるが、苗生産農家では、栽培管理時にダリアとキクの間での CSVd の伝染リスクを考慮する必要がある。さらに CSVd の感染が確認されているキク以外の植物種とダリアの間での伝染が生じるか、今後のさらなる調査が望まれる。病原性に関しては、供試した3系統の CSVd すべてが植物体に矮化症状を引き起こした。切り花長の減少の程度に系統間差は認められなかったが、切り花重や露心花の発生に差が認められた。現場の対応としては、病原性に系統間差が認められたが、いずれの系統も商品性を低下させるレベルの矮化症状を引き起こしたことから、あらゆる CSVd 系統に対策するのが妥当と言える。また、春、夏、冬のいずれの時期も CSVd 感染株は矮化症状を示したことや定植後の CSVd 感染でも2番花の切り花で矮化症状を示したことから、作型に関わらず警戒が必要である。

本研究では、ダリア生産におけるウイルス・ウイロイドの防除対策を確立させるため、発生状況の解明、防除対象種の特異性、診断技術の開発および防除技術の実証を行った。生産現場での防除対策には費

用対効果が求められ、重要なウイルス・ウイロイド種を限定し集中した対策を行うことが求められる。本研究により明確な根拠ができたことで現地の指導への説得力が増すと考えられる。ウイルス病の発生は長期間にわたる問題であり、被害が減少して対策が不十分になった時に再び顕在化してくる。理想はウイルス・ウイロイド病対策が通常管理に組み込まれることで、ウイルス・ウイロイド病の発生がないあるいはわずかという状況である。継続した注意喚起と初期対応の呼びかけを行えるよう、現場に最も近い普及事務所で今回の情報が活用されることが望まれる。これらの対策が継続的に実施されることで、ウイルス・ウイロイド病の被害が低減されることを期待している。

## 摘要

ダリアはブライダルなどの業務用需要を中心に切り花の生産額が増加傾向にある有望な品目である。ダリア栽培での主要な病害はウイルス・ウイロイド病であり、挿し芽や球根の分球といった栄養繁殖によって感染した母株から後代に伝染し、その被害が拡大する。特に TSWV と DMV による被害が深刻とされ、CSVd については病原性を含めさらなる調査が求められていた。しかし、これらに対する防除対策を進めるための根拠となる情報が不十分であった。そこで本研究では、ダリア生産でのウイルス・ウイロイドの発生状況と病原性を解明し、さらに診断技術の省力化を図り、実証試験を実施することで防除技術の確立を目指した。

第2章ではダリアにおけるウイルス・ウイロイド検出法の省力化と精緻化、さらに主要なウイルス・ウイロイドの発生状況の解明を目的とした。主要なウイルス・ウイロイドである TSWV、DMV および CSVd のマルチプレックス RT-PCR 法による同時検出技術を開発した。それぞれの PCR 産物のサイズは 720、402 および 249 bp である。さらに針先についた植物体の汁液をテンプレートとする microtissue direct RT-PCR での実用性を確認し、RNA 抽出を省略することで作業時間を大きく短縮した。

上述の3種ウイルス・ウイロイドの中で TSWV のみがキク等の植物体で不均一に分布することが報告されている。そこで、適切なサンプリング部位を提示するため、ダリアの植物体内での TSWV の分布を

調査した。複葉での検出率は葉柄で最も高く、次に葉軸、葉脈となり、葉身では低く、葉柄から離れるにしたがって検出率が低下する傾向があった。小葉においても同様の傾向を示し、葉脈近辺では安定して分布しており、葉身では特に葉縁で分布しない傾向があった。茎では、栄養成長期と開花期では分布の傾向が異なっていた。栄養生長期では、茎の上位節は、中位節と下位節に比べて検出率が低かった。一方、開花期では、栄養成長期と比べて検出率は上位節で高く、下位節で低い傾向があった。球根では TSWV は球根の皮層、師部および木部に主に分布していた。しかし、球根断面での TSWV の分布面積は 1/3 未満となる個体が半数以上であり局在性が高かった。これらのことと検体採取の作業性を考慮すると中位の複葉の葉柄が検定部位として最も適切と考えられる。

第3章ではウイルス媒介虫対策による TSWV の防除技術の確立を目的とした。奈良県のダリアの露地球根生産圃場における媒介能を持つ主要なアザミウマ類がヒラズハナアザミウマであることを明らかにした。その発生のピークは7月上旬であり、栽培期間を通じて TSWV を保毒していることが明らかになった。このことから、殺虫剤の散布はヒラズハナアザミウマの発生の増加時期である5、6月に実施するのが適切と考えられた。施設切り花生産圃場では、アザミウマ類の TSWV の保毒が確認され、感染株率は 80% に達したことからアザミウマ類による TSWV の媒介能力は高いと考えられた。なお、物理的防除である 0.4 mm 目合のネット被覆による TSWV の感染拡大の抑制効果は高く、有効な防除手段となることを実証した。

第4章では、ダリアから検出された CSVd の塩基配列や感染性といった基礎情報に加え、今まで明らかにされていなかった病原性について評価を行った。国内のダリアから検出された CSVd の系統はいずれも全長が 354 bp であり、既報のダリアから検出された系統に加え、これまでに報告がなかった系統および既報のキクから検出された系統が確認された。これらの塩基配列の多型の多くは病原性領域で確認された。ダリアまたはキクから検出された CSVd 系統をダリアとキクに汁液接種した結果、いずれの組み合わせでも感染率は高く、感染性に系統間差は認められなかった。このことから、ダリアとキクとの間で CSVd が伝搬する可能性が示唆された。接種試験により CSVd のダリアの生育に対する影響を調査し

た。その結果、植物体の矮化、露心花の発生および花色の変化が認められた。これらは商品性の低下に直結することから CSVd は防除対象とすべき病原体であると結論づけた。なお、CSVd 系統間で病原性に違いが認められ、CSVd 系統2では他の2系統と比べて、露心花率が高く、切り花重も低い傾向にあった。なお、日長は CSVd 感染ダリアの生育に影響を及ぼし、冬季試験では暗期中断処理は、14.5 時間日長と比べて露心花率は低く、切り花長は長かった。

本研究によって、国内のダリア生産における主要なウイルス・ウイロイド種が TSWV, DMV および CSVd であることを特定し、これらの省力的な診断技術を確立した。本技術により発生状況の調査や診断および健全株の選抜が推進されることを期待する。また、TSWV 主要な感染拡大の要因がアザミウマ類による媒介であり、その媒介虫の発生活長を明らかにした。その対策として殺虫剤の適切な散布時期を提示し、防虫ネット被覆が有効であることを実証した。CSVd は本研究により防除対象に新たに加えられ、塩基配列や感染性といった対策の基礎となる情報についても整理を行った。今後、これらの知見がダリア生産の現場で活用されることを期待する。

## 謝辞

本論文をまとめるにあたり、神戸大学大学院農学研究科教授の土佐幸雄博士には筆者を快く受け入れてくださり、懇切丁寧なご指導とご校閲を賜った。ご多忙の中多くの時間を割いてくださり、全体を俯瞰した視点で改善点を指摘いただいたおかげで本論文を完成させることができた。また、筆者が同大学3回生で初めて研究に携わったときに研究の面白さ、厳しさ、そして取り組む姿勢を言葉だけでなく行動でもご教示いただいた。このことが研究の取り組み方の根幹となった。ここに深厚なる感謝の意を表す。また、神戸大学大学院農学研究科教授の中屋敷均博士、准教授の池田健一博士には貴重なご助言とご鞭撻を賜った。厚く御礼申し上げます。

元奈良県農業研究開発センター指導研究員（現龍谷大学農学部講師）の平山喜彦博士には実績のない筆者に本研究を実施する機会を寛大な心でご配慮いただいた。また、本センターでの研究の開始時から実験手法のみならず現場への活用に必要な視点の

ご指導をいただいた。同所長の國本佳範博士、副主幹の井村岳男氏には、試験の遂行に当たり適切なお助言と心のこもった叱咤激励をいただいた。同部長の仲 照史博士にはダリアの栽培とウイルス・ウイロイドの検出に関するご指導、研究の進め方に関する多大なお助言を賜った。奈良県農業研究開発センター総括研究員の竹中 勲氏、同指導研究員の虎太有里氏、同主任研究員の辻本直樹氏、奈良県中部農林振興事務所主査の今村剛士氏、奈良県南部農林振興事務所主任主事の芳田侃大氏には、共同研究者として本研究を支えていただいた。厚く御礼申し上げます。

農研機構植物防疫部門上級研究員の松下陽介博士には、本研究の開始時に2ヶ月間の研修を受け入れてくださり、ウイルス・ウイロイドの検出技術と論文の執筆方法について懇切丁寧にご指導いただいた。また、研究開始の動機となる貴重なご意見をいただいた。心より感謝申し上げます。

本研究の一部は農林水産省 農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業 実用技術開発ステージ「無病球根の効率的増殖を核とした有望球根切り花の生産流通技術開発（課題番号 25075C）」の一環で実施した。この事業の責任者である宮崎県総合農業試験場部長の中村 薫博士には貴重なご助言を賜った。厚く御礼申し上げます。

奈良県北部農業振興事務所課長の印田清秀氏、奈良県農業水産振興課主任主査の山本正文氏、同主査の倉田 淳氏をはじめ普及指導員の方々には、現地試験の実施に際しご協力と有益なお助言をいただいた。深く感謝の意を表す。

奈良県農業研究開発センター指導技能員の中谷智博氏、同指導技能員の吉田 弘氏、尾崎 忍氏、隠地真子氏、萩原庸暢氏、船戸安世氏、山中祥子氏、元奈良県農業研究開発センター指導技能員の松本友和氏、奈良県植物防疫協会試験員の上田加奈氏には、試験の実施に当たり、多大なお協力をいただいた。皆様方に厚く御礼申し上げます。

本論文の執筆にあたり奈良県農業研究開発センター所長の國本佳範氏、研究開発部長の仲 照史氏には特段のご配慮をいただいた。同科長の吉村昭信氏、副主幹の井村岳男氏、主任主事の藤森颯太氏、主事の堀 浩太郎氏には本論文を執筆中に多大なお気遣いをいただいた。深く感謝の意を表す。

最後に研究生活を理解し、支えてくれた家族に心から感謝の意を表す。

## 引用文献

- Adachi, M., Kawabata, S., and Sakiyama, R. 1999. Changes in carbohydrate content in cut chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) 'shuho-no-chikara' stems kept at different temperatures during anthesis and senescence. *J Jpn Soc Hort Sci.* 68: 505-512.
- Adkar-Purushothama, C. R., and Perreault, J. P. 2020. Current overview on viroid-host interactions. *WIREs RNA.* 11: e1570.
- 愛知県農業総合試験場. 2013. ウイロイドによって引き起こされるキク矮化病の蔓延防止マニュアル農業の新技术 102. <https://www.pref.aichi.jp/nososi/seika/singijutu/singijiyutu102.pdf>.
- Albouy, J. 1995. Dahlia. In *Virus and Virus-like Diseases of Bulb and Flower Crops* ed. Lobenstein, G., Lawson, R. H., and Brunt, A. A. pp. 265-273. Hoboken: John Wiley & Sons.
- 天野良紀. 2018. 切り花用. 最新農業技術花卉編. 10:39-44.
- 青木克典, 高橋宏基. 1995. 岐阜県におけるミカンキイロアザミウマの発生状況と防除対策. 関西病虫研報. 37:25-26.
- Asano, S., Matsushita, Y., Hirayama, Y. and Naka, T. 2015. Simultaneous detection of Tomato spotted wilt virus, Dahlia mosaic virus and Chrysanthemum stunt viroid by multiplex RT-PCR in dahlias and their distribution in Japanese dahlias. *Lett Appl Microbiol.* 61: 113-120.
- Asano, S., Hirayama, Y., Takenaka, I. and Naka, T. 2019. Occurrence of Tomato spotted wilt virus (TSWV), seasonal abundance of thrips vectors, and evaluation of TSWV control measures in dahlia fields. 関西病虫研報. 61: 69-74.
- Asjes, C. J., and Blom-Barnhoorn, G. J. 1997. Incidence and control of thrips-borne tomato spotted wilt virus in dahlia in the Netherlands. *Acta Hort.* 430: 625-632.
- Asjes, C. J., and Bloom-Barnhoorn, G. L. 2001. Control of aphid-vectored and thrips-borne virus spread in lily, tulip, iris and dahlia by sprays of mineral oil, polydimethylsiloxane and pyrethroid insecticide in the field. *Ann Appl Biol.* 139: 11-19.
- Bachelier, J. C., Monsion, M., and Dunez, J. 1976. Possibilities of improving detection of chrysanthemum stunt and obtention of viroid-free plants by meristem-tip culture. *Acta Hort.* 59: 63-70.
- Bouwen, I., and van Zaayen, A. 2004. Chrysanthemum stunt viroid. p. 218-223 In: A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles and J. S. Semancik (eds.), *Viroids*. CSIRO, Collingwood, Melbourne.
- Brunt, A. A. 1971. Some hosts and properties of dahlia mosaic virus. *Ann Appl Biol.* 67(33): 357-368.
- Chatzivassiliou, E. K. 2008. Management of the spread of Tomato spotted wilt virus in tobacco crops with insecticides based on estimates of thrips infestation and virus incidence. *Plant Dis.* 92: 1012-1020.
- Choi, H., Jo, Y., Yoon, J. Y., Choi, S. K., and Cho, W. K. 2017. Sequence variability of Chrysanthemum stunt viroid in different chrysanthemum cultivars. *PeerJ.* 5: e2933.
- Chung, B. N., Lim, J. H., Choi, S. Y., Kim, J. S., and Lee, E. J. 2005. Occurrence of Chrysanthemum stunt viroid in Chrysanthemum in Korea. *Plant Pathol J.* 21: 377-382.
- Chung, B. N., and Pak, H. S. 2008. Seed Transmission of Chrysanthemum stunt viroid in Chrysanthemum. *Plant Pathol J.* 24: 31-35.
- Culbreath, A. K., Todd, J. W., and Brown, S. L. 2003. Epidemiology and management of tomato spotted wilt in peanut. *Annu Rev Phytopathol.* 41: 53-75.
- de Haan, P., Kormelink, R., de Oliveira Resende, R., van Poelwijk, F., Peters, D., and Goldbach, R. 1991. Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. *J Gen Virol.* 72(9): 2207-2216.
- 土井 誠, 加藤公彦. 2004. 静岡県で発生したキクわい化ウイロイド (CSVd) の塩基配列とキク品種の病徴. 関西病虫研報. 46:11-14.
- 土居養二, 与良 清, 明日山秀文. 1967. ウイルス感染葉における virion の動静-ダイヤ・モザイク・ウイルス (DMV) およびカリフラワー・モザイク・ウイルス (CAMV) について. 日植病報. 33(2):95.
- Eiras, M., Resende, R. O., Missiaggia, A. A., and De Avila, A. C. 2001. RT-PCR and dot blot hybridization methods for a universal detection of Tospoviruses. *Fitopathol Bras.* 26: 170-175.
- Flores, R., Hernández, C., Alba, A. E. M. D., Daròs, J. A.,

- and Serio, F. D. (2005). Viroids and viroid-host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43(1): 117-139.
- 藤井祐子, 有馬 毅. 2012. 奈良県のダリアー球根・切り花・苗生産への取り組み支援. *奈良農総セ研報*. 43:71-74.
- 藤森颯太, 小林 甫, 今村剛士, 瀧上彩花. 2023. 奈良県の促成イチゴにおけるスピノサドの殺虫効果が低いヒラズハナアザミウマの発生. *関西病虫研報*. 65:102-103.
- 藤永真史, 古嶋修一, 米山千温, 宮本賢二, 宮坂昌実, 小木曾秀紀. 2007. タマネギ栽培地周辺におけるネギアザミウマの誘殺消長と IYSV 保毒虫率の推移および防虫ネット利用による施設内への侵入防止効果. *関東東山病虫研報*. 54:89-92.
- 福田至朗, 栗山幸子, 平野哲司, 服部裕美, 中村恵章, 大石一史. 2012. 根を介したキクわい化ウイロイドの接触伝染. *関西病虫研報*. 54:47-51.
- Gobatto, D., Chaves, A. L. R., Harakava, R., Marque, J. M., Daròs, J. A., and Eiras, M. 2014. Chrysanthemum stunt viroid in Brazil: Survey, identification, biological and molecular characterization and detection methods. *J Plant Pathol.* 96: 111-119.
- Gobatto, D., de Oliveira, L. A., Franco, D. A. S., Velasquez, N., Daros, J. A., and Eiras, M. 2019. Surveys in the chrysanthemum production areas of Brazil and Colombia reveal that weeds are potential reservoirs of chrysanthemum stunt viroid. *Viruses*. 11: 355. <https://doi.org/10.3390/v11040355>.
- 八谷和彦. 1991. ヒラズハナアザミウマのアズキ圃場および雑草地における発生消長. *北海道農試集報*. 62:55-61.
- 花田 薫, 栃原比呂志, 橋本純治, 沖村 誠, 川田穰一. 1982. わが国のキクから分離されたキク矮化ウイロイド. *日植病報*. 48:131.
- 花田 薫. 1999. 西日本におけるトマト黄化えそウイルス (TSWV) の発生動向とその特徴. *植物防疫*. 53(8):10-13.
- 花田 薫, 酒井淳一. 2001. 九州・沖縄で発生したキクわい化ウイロイドの塩基配列. *九州病虫研報*. 47:43-45.
- Haseloff, J., and Symons, R. H. 1981. Chrysanthemum stunt viroid: primary sequence and secondary structure. *Nucleic Acids Res.* 9: 2741-2752.
- Hayahi, S., Matsushita, Y., Kanno, Y., Kushima, Y., Teramoto, S., and Takeshita, M. 2018. Field survey of Ranunculus mild mosaic virus, Tomato spotted wilt virus and Cucumber mosaic virus infections in Ranunculus asiaticus L. in Japan by newly developed multiplex RT-PCR. *Eur J Plant Pathol.* 150: 205-212.
- Hipper, C., Brault, V., Ziegler-Graff, V., and Revers, F. 2013. Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. *Front Plant Sci.* 154: 1-24.
- Hobbs, H. A., Black, L. L., Story, R. N., Valverde, R. A., Bond, W. P., Gatti, J. M., Scaffer D. O., and Johnson, R. R. 1993. Transmission of tomato spotted wilt virus from pepper and three weed hosts by *Frankliniella fusca*. *Plant Dis.* 77: 797-799.
- 本多健一郎. 2010. トマト黄化葉巻病の総合防除マニュアル作成. *植物防疫*. 64(10):19-21.
- Hosokawa, M., Otake, A., Ohishi, K., Ueda, E., Hayashi, T., and Yazawa, S. 2004a. 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 Rep.* 22: 859-863.
- Hosokawa, M., Ueda, E., Ohishi, K., Otake, A., and Yazawa, S. 2004b. Chrysanthemum stunt viroid disturbs the photoperiodic response for flowering of chrysanthemum plants. *Planta.* 220: 64-70.
- Hosokawa, M., Matsushita, M., Uchida, H., and Yazawa, S. 2006. Direct RT-PCR method for detecting two chrysanthemum viroids using minimal amounts of plant tissue. *J Virol Methods.* 131: 28-33.
- Huh, E. J., Lee, S. K., Chung, B. N., Lee, I. J., Choi, S. Y. 2006. Changes of growth and gibberellin contents in chrysanthemum by infection of Chrysanthemum stunt viroid. *Hort Environ Biotech.* 47: 366-370.
- 市村一雄, 湯本弘子, 渋谷健市, 望月寛子. 2011. 主要切り花品目の異なる季節における花持ちの調査. *花き研報*. 11:49-65.
- 井村岳男. 2011. 野菜栽培で問題になるアザミウマの見分け方. *植物防疫特別増刊号*. 14:11-14.
- Jens, J. B., and Heins, R. D. 1993. Modeling temperature and photoperiod effects on growth and development of dahlia. *J Am Soc Hortic Sci.* 118: 36-42.
- 兼松誠司, 日高 操, 村山 徹, 石黒 潔. 1998. 山形県寒河江市で分離されたキクわい化ウイロイドについて. *北日本病虫研報*. 49:73-75.
- 片山晴喜. 1998. ミカンキイロアザミウマ

- Frankliniella occidentalis* (PERGANDE) の発育と産卵に対する温度の影響. 日本応用動物昆虫学会誌. 41(4):225-231.
- 片山晴喜. 2006. 花き類圃場周辺の雑草におけるミカンキイロアザミウマの発生消長. 植物防疫. 60(9):406-409.
- 北村嘉邦. 2016. 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. 信州大学農学部紀要. 52:27-32.
- 小島博文. 1984. 奈良県におけるトマト黄化えそ病の発生生態とその防除. 関西病虫研報. 26:23-28.
- 小西国義, 稲葉久仁雄. 1964. ダリアの促成および抑制栽培に関する研究 (第1報). 園芸学会雑誌. 33(2):171-180.
- 小西国義, 稲葉久仁雄. 1966. ダリアの促成および抑制栽培に関する研究 (第3報) 日長が花芽分化および発達に及ぼす影響. 園芸学会雑誌. 35(1):73-79.
- Kritzman, A., Lampel, M., Raccach, B., and Gera, A. 2001. Distribution and transmission of Iris yellow spot virus. *Plant Dis.* 85: 838-842.
- 楠 幹生, 寺見文宏, 寺内英貴, 十河和博. 1993. 逆転写-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) によるキク矮化ウイロイドの検出. 関西病虫研報. 35:7-12.
- 桑原克也, 高橋まさみ, 蓼沼 優. 2013. 施設キュウリにおける赤色防虫ネットを用いたミナミキイロアザミウマおよびタバココナジラミの侵入抑制効果. 関東東山病虫研報. 60:107-109.
- 李世訪, 畑谷達児, 古田和義, 堀田治邦, 佐野輝男, 四方英四郎. 1997. 北海道におけるキク矮化病の発生と電気泳動法およびハイブリダイゼーション法によるキク矮化ウイロイドの検出. 北日本病虫研報. 48:113-117.
- Marais, A., and Faure, C. 2011. First report of Chrysanthemum stunt viroid in various cultivars of *Argyranthemum frutescens* in France. *Plant Dis.* 95: 1196.
- Matsushita, Y., Tsukiboshi, T., Ito, Y., and Chikuo, Y. 2007. Nucleotide sequences and distribution of Chrysanthemum Stunt Viroid in Japan. *J Jpn Soc Hortic Sci.* 76: 333-337.
- Matsushita, Y., and Penmetcha, K. K. 2009. In vitro-transcribed Chrysanthemum stunt viroid RNA is infectious to chrysanthemum and other plants. *Phytopathology.* 99(1): 58-66.
- Matsushita, Y., Usugi, T., and Tsuda, S. 2010. Development of a multiplex RT-PCR detection system for Potato spindle tuber viroid and Tomato chlorotic dwarf viroid. *Eur J Plant Pathol.* 182: 165-170.
- Matsushita, Y., Aoki, K and Sumitomo, K. 2012. Selection and inheritance of resistance to Chrysanthemum stunt viroid. *Crop Protection.* 35: 1-4.
- Matsushita, Y. 2013. Chrysanthemum stunt viroid. *JARQ.* 47: 237-247.
- Matsushita, Y., and Shima, Y. 2015. Effect of low temperature on the distribution of Chrysanthemum stunt viroid in Chrysanthemum morifolium. *Phytoparasitica.* 43: 609-614.
- Matsuura, S., Hoshino, S., Hayashi, H., Kohguchi, T., Hagiwara, K., and Omura, T. 2002. Effects of latent infection of stock plants and abundance of thrips on the occurrence of Tomato spotted wilt virus in chrysanthemum fields. *J Gen Plant Pathol.* 68: 99-102.
- Matsuura, S., Ishikura, S., Shigemoto, N., Kajihara, S., and Hagiwara, K. 2004. Localization of Tomato spotted wilt virus in chrysanthemum stock plants and efficiency of viral transmission from infected stock plants to cuttings. *J Phytopathol.* 152: 219-223.
- McPherson, R. M., Pappu, H. R., and Jones, D. C. 1999. Occurrence of Five Thrips Species on Flue-Cured Tobacco and Impact on Spotted Wilt Disease Incidence in Georgia. *Plant Dis.* 83: 765-767.
- Monger, W. A. 2018. Dahlia latent viroid and Potato spindle tuber viroid in Dahlia plants in the UK. *New Dis Rep.* 38(1): 8.
- 森下正彦. 2005. カキ園におけるミカンキイロアザミウマの多発要因. 関西病虫研報. 47:15-20.
- 森山美穂, 杉浦広幸, 清田洋次, 花田 薫. 1996. 熊本県のキクから検出されたキク矮化ウイロイド. 九州病虫研報. 42:45-47.
- 村井 保. 1988. ヒラズハナアザミウマの生態と防除に関する研究. 島根農試研報. 23:1-73.
- Nakashima, A., Hosokawa, M., Maeda, S., and Yazawa, S. 2007. Natural infection of Chrysanthemum stunt viroid in dahlia plants. *J Gen Plant Pathol.* 73: 225-227.
- 仲 照史, 前田茂一, 角川由加. 2007a. 茎頂培養株を親株とした挿し芽増殖によるダリア種球生

- 産. 奈良農総セ研報. 38:23-30.
- 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. 2007b. 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. 奈良農総セ研報. 38:17-22.
- 奈良県農業研究開発センター. 2019. ダリアのウイルス・ウイロイド病診断マニュアル. [https://www.pref.miyazaki.lg.jp/documents/44689/44689\\_20190624121204-1.pdf](https://www.pref.miyazaki.lg.jp/documents/44689/44689_20190624121204-1.pdf).
- Nie, X., Singh, R. P., and Bostan, H. 2005. Molecular cloning, secondary structure, and phylogeny of three pospiviroids from ornamental plants. *Can J Plant Pathol.* 27: 592-602.
- 新山徳光, 佐藤正彦. 2000. ヒラズハナアザミウマの発生生態と夏秋トマトにおける防除に関する研究. 秋田農試研報. 41:17-29.
- 岡田正順, 原田 宏. 1955. ダリヤの舌状花及び管状花比に対する日照時間及び温度の影響に就いて. 園芸学会雑誌. 23(4):259-263.
- Okazaki, S., Okuda, M., Komi, K., Yoshimatsu, H., and Iwanami, T. 2007. Overwintering Viruliferous *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) as an Infection Source of Tomato spotted wilt virus in Green Pepper Fields. *Plant Dis.* 91: 842-846.
- 岡崎真一郎. 2011. ピーマンを加害するトマト黄化えそウイルス (TSWV) 媒介者ミカンキイロアザミウマの総合的防除に関する研究. 大分農林水研セ研報. 4:1-45.
- Olatinwo, R. O., Paz, J. O., Brown, S. L., Kemerait, R. C. Jr., Culbreath, A. K., Beasley, J. P. Jr., and Hoogenboom, G. 2008. A Predictive Model for Spotted Wilt Epidemics in Peanut Based on Local Weather Conditions and the Tomato spotted wilt virus Risk Index. *Phytopathology.* 98: 1066-1074.
- Omori, H., Hosokawa, M., Shiba, H., Shitsukawa, N., Murai, K. and Yazawa, S. 2009. Screening of *Chrysanthemum* Plants with Strong Resistance to *Chrysanthemum Stunt Viroid*. *J Japan Soc Hort Sci.* 78: 350-355.
- 大沢高志, 森田 儔, 森 喜作. 1977. キクウイルス病の防除に関する研究 2, 指標植物への接木接種によるウイルスの検定. 日植病報. 43:372-373.
- Palukaitis, P., and Symons, R. H. 1980. Purification and characterization of the circular and linear forms of *Chrysanthemum stunt viroid*. *J Gen Virol.* 46: 477-489.
- Parrella, G., Gognalons, P., Gebre-Selassie, K., Vovlas, C., and Marchoux, G. 2003. An update of the host range of Tomato spotted wilt virus. *J Plant Pathol.* 85: 227-264.
- Qi, Y., and Ding, B. 2003. Inhibition of cell growth and shoot development by a specific nucleotide sequence in a noncoding viroid RNA. *Plant Cell.* 15: 1360-1374.
- Quecini, V., Lopes, M. L., Pacheco, F. T. H., and Ongarelli, M. G. 2007. Tomato spotted wilt virus triggers specific and shared defense mechanisms in hypersensitive and susceptible Solanaceae hosts. *Physiol Mol Plant Pathol.* 70: 189-197.
- Riley, D. G., Joseph, S. B. V., Srinivasan, R., and Diffie, S. 2011. Thrips vectors of Tospoviruses. *J Integr Pest Manag.* 1: 1-10.
- Rotenberg, D., Krishna, K. N. K., Ullman, D. E., Montero-Astua, M., Willis, D. K., German, T. L., and Whitfield, A. E. 2009. Variation in Tomato spotted wilt virus titer in *Frankliniella occidentalis* and its association with frequency of transmission. *Phytopathology.* 99: 404-410.
- Savitri, W. D., Park, K. I., Jeon, S. M., Chung, M. Y., Han, J. S., and Kim, C. K. 2013. Elimination of *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) from meristem tip culture combined with prolonged cold treatment. *Hort Environ Biotechnol.* 54(2): 177-182.
- Schnell, R. J., Kuhn, D. N., Olano, C. T., and Quintanilla, W. E. 2001. Sequence diversity among avocado sunblotch viroids isolated from single avocado trees. *Phytoparasitica.* 29: 451-460.
- 瀬尾直美, 佐藤英典, 板橋 建, 中村茂雄. 2009. 混合プライマーを用いた RT-PCR によるキクに感染する 5 種ウイルス・ウイロイドの検出. 北日本病虫研報. 60:288.
- 塩飽邦子, 山元義久, 岩井豊通. 1996. キクわい化ウイロイド (*Chrysanthemum Stunt Viroid*) 遺伝子のクローニングと全塩基配列. 兵庫農技研報 (農業). 44:1-4.
- Singh, R. P., Ready, M. F. M., and Nie, X. 2003. Viroids of solanaceous speices. p. 125-133 In: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J. W., and Semancik, J. S. (eds.), *Viroids*. CSIRO, Collingwood, Melbourne.
- Song, A., You, Y., Chen, F., Li, P., Jiang, J., and Chen, S.

2013. A multiplex RT-PCR for rapid and simultaneous detection of viruses and viroids in chrysanthemum. *Lett Appl Microbiol.* 56: 8-13.
- 末松俊彦, 佐藤 裕, 仙北俊弘, 四方英四郎. 1978. 北海道におけるダリアのウイルス病. 北海道大学農学部邦文紀要. 11(2):138-147.
- 末次哲雄. 1969. 輸入検疫中にダリアより発見された tomato spotted wilt virus. *植防研報.* 7:50-56.
- 杉浦広幸, 花田 薫. 1998. 新潟県の大輪ギクに発生したキクわい化ウイロイドによる病害. *園芸学会雑誌.* 67(3):432-438.
- Sugiyama, M., Yoshioka, Y., and Sakata, Y. J. 2009. Effect of temperature on symptom expression and viral spread of Melon yellow spot virus in resistant cucumber accessions. *J Gen Plant Pathol.* 75: 381-387.
- 角川由加, 仲 照史. 2013. ダリア冬春切り作型における電照方法が開花と切り花品質に及ぼす影響. *奈良農総セ研報.* 44:42-44.
- Tabler, M., and Sanger, H. L. 1985. Infectivity studies on different potato spindle tuber viroid (PSTV) RNAs synthesized in vitro with SP6 transcription system. *EMBO J.* 4: 2191-2199.
- 津田新哉. 1994. わが国に発生するトマト黄化えそウイルスとその特性. *植物防疫.* 48(12):497-501.
- 津田新哉. 2000. トマト黄化えそ病. *農業および園芸.* 75(1): 90-96.
- Tsushima, T., Murakami, S., Ito, H., He, Y. H., Raj, A. P. C., and Sano, T. 2011. Molecular characterization of Potato spindle tuber viroid in dahlia. *J Gen Plant Pathol.* 77: 253-256.
- Tsushima, T., Matsushita, Y., Fuji, S., and Sano, T. 2015. First report of Dahlia latent viroid and Potato spindle tuber viroid mixed infection in commercial ornamental dahlia in Japan. *New Dis Rep.* 31: 11.
- Verhoeven, J. T. J., Arts, M. S. J., Owens, R. A., and Roenhorst, J. W. 1998. Natural infection of petunia by chrysanthemum stunt viroid. *Eur J Plant Pathol.* 104: 383-386.
- Verhoeven, J. T. J., Jansen, C. C. C., and Roenhorst, J. W. 2006. First Report of Potato virus M and Chrysanthemum stunt viroid in *Solanum jasminoides*. *Plant Dis.* 90: 1359.
- Verhoeven, J. T. J., Jansen, C. C. C., Roenhorst, W. J., Flores, R., and de la Pena, M. 2009. Pepper chat fruit viroid: Biological and molecular properties of a proposed new species of the genus Pospiviroid. *Virus Res.* 144: 209-214.
- Visvader, J., and Symons, R. H. 1985. Eleven new sequence variants of citrus exocortis viroid and the correlation of sequence with pathogenicity. *Nucleic Acids Res.* 13: 2907-2920.
- Wassenegger, M., Spieker, R. L., Thalmeir, S., Gast, F. U., Riedel, L., and Sanger, H. L. 1996. A single nucleotide substitution converts potato spindle tuber viroid (PSTVd) from a noninfectious to an infectious RNA for *Nicotiana tabacum*. *Virology.* 226: 191-197.
- Whitfield, A. E., Campbell, L. R., Sherwood, J. L., and Ullman, D. E. 2003. Tissue blot immunoassay for detection of Tomato spotted wilt virus in *Ranunculus asiaticus* and other ornamentals. *Plant Dis.* 87: 618-622.
- 山口貴大, 小林 甫, 藤田奈都. 2021. 奈良県のイチゴに発生するアザミウマ 2 種に対する各種殺虫剤の殺虫効果. *関西病虫研報.* 65:102-103.
- 山本英樹. 2008. 秋田県におけるキクのウイルス・ウイロイドの発生状況. *秋田農試研報.* 48: 99-120.
- Yan, C., Yin, H., Xia, F., Deng, C., Li, Y., and Zhang, Y. 2019. First Report of Dahlia Latent Viroid Infecting Dahlia in China. *Plant Dis.* <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-19-1774-PDN>.
- Yoon, J. Y., Baek, E., and Palukaitis, P. 2012. Are there strains of Chrysanthemum stunt viroid?. *J Plant Pathol.* 94: 697-701.