

ラナンキュラスのウイルス病 診断マニュアル



球根増殖コンソーシアム

2019年6月

目次

～はじめに～	．．．．．1
1. ラナンキュラスの栽培とウイルスの発生について	．．．．．2
2. ラナンキュラスに感染するウイルスについて	．．．．．4
3. 国内で問題となっているウイルスについて	．．．．．5
1) RanMMV (ラナンキュラス微斑モザイクウイルス)	
2) TSWV (トマト黄化えそウイルス)	
3) CMV (キュウリモザイクウイルス)	
4) RanLDV (ラナンキュラス奇形葉ウイルス)	
4. 球根の使用年数とウイルス感染の関係について	．．．．．7
5. ウイルス対策マニュアル	．．．．．8
1) 「マルチプレックス RT-PCR」	．．．．．8
～親株診断のための精密なウイルス診断技術～	
1-1) マルチプレックス RT-PCR の原理	
1-2) RNA の抽出	
1-3) PCR の手順	
1-4) 実証試験結果	
2) 「改良 DIBA 法」	
～早期発見のための現場で実施出来る簡易診断法～	．．．．．13
2-1) 改良 DIBA 法の原理	
2-2) 使用試薬の調製	
2-3) 改良 DIBA 法の手順	
2-4) 実証試験結果	
6. おわりに	．．．．．19
7. 参考文献	．．．．．20

はじめに

本マニュアルは、平成25年度農林水産業・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）において、ランンキュラスとダリアの課題解決に取り組んだ成果のひとつです。

ランンキュラスとダリアはそれぞれ多彩な花色、質感を有し、今日ではブライダル等のパーティやフラワーアレンジメントに欠かせない花材となっています。また、ランンキュラスは海外にも輸出され、高い評価を得ています。いずれも国内の育種家が育成した我が国オリジナルの品種が生産および消費の拡大を大きく支えるものとなっています。このような背景から、我が国の花きの産出額が年々低下している中、この2品目の需要は増加しており、産地は市場から生産量の増加、産地開拓を求められています。

この2品目は、共に「塊根」という根が肥大した形態の球根を持つ球根花きです。球根類はその増殖に年月を要するため、切り花生産の栽培面積の急激な増加は困難であるばかりでなく、球根価格が高いことが生産費を上昇させています。また、ウイルスやウイロイドの罹病による切り花生産効率低下が問題となっています。さらに近年は切り花購入後の十分な観賞日数が消費者から求められているため、品質保持技術の確立が重要となっています。

このように、この2品目は同じ課題を抱えていることから、それぞれの品目の研究シーズを蓄積している研究機関が互いの技術・手法を持ち寄り、効率的に課題解決を行う上記のプロジェクトに取り組みました。

本マニュアルは、ランンキュラスのウイルス病診断技術をマニュアルとして取りまとめたものです。国内でランンキュラスに発生しているウイルスの調査結果、最も重要なRanMMV（ランンキュラス微斑モザイクウイルス）を現場で検出できる「改良DIBA法」、さらに主要3ウイルスを同時に精密に検定できる「マルチプレックスRT-PCR法」について紹介しています。

本マニュアルがランンキュラスのウイルス病の蔓延の防止と健全球根の利用拡大に活用されることを期待します。

球根増殖コンソーシアム

研究総括 中村 薫（宮崎県総合農業試験場）

1. ラナンキュラスの栽培とウイルスの発生について

ラナンキュラス(*Ranunculus asiaticus* L.) は、キンポウゲ科の球根植物で、球根は根が変化した「塊根」という形態をしています（これ以降は全て「球根」とする）。アジア南西部および地中海地域が原産とされています。その花は、花卉が幾重にも重なってボリュームがあり、その花色はバラエティが豊富かつ鮮明で透明感があります。これまで春の鉢花として重要な位置を占めてきましたが、近年では切り花としての需要が高まり、かわいらしく華やかな外観と豊富な品種バリエーションからブライダルなど、幅広い場面で利用されています。

ラナンキュラスの切り花促成栽培は主に球根を用いて行われています。吸水後に冷蔵処理した球根を10月に定植し、11月から4月まで地際から次々に伸長し、開花した花茎を切り花として収穫、出荷されます。ラナンキュラスは冷涼な気候を好むことから東日本や中山間地域が主要産地となっており、平成28年の全国生産額は3億9400万円です（宮崎県農産園芸課による各県聞き取り調査）。

また、ラナンキュラスは我が国から海外へ輸出される花き品目として取扱量が第2位と、海外市場にも好評で日本の花き産業において重要な品目となっています。



写真1 ラナンキュラスの栽培状況

一般にラナンキュラスの切り花栽培産地では、球根を購入・栽培し、収穫終了後にその切り下株を養成し地下部に球根を養成します。その後に球根を掘上げ、調整後に貯蔵したものを翌年に再び利用しています。球根は 2～3 作繰り返し利用した後に更新されます。(図 1 参照)



図 1 ラナンキュラスの切り花栽培の流れ

ラナンキュラスのような栄養繁殖を行う植物では、いったん親株がウイルスに感染すると、それから増殖した子株（球根や苗）も感染しています。そのため、ウイルス対策が重要となります。ラナンキュラスでは図のように、切り花栽培に用いた球根（切り下球）から増殖養成した球根を翌年の切り花栽培に利用するため、切り下球の中には栽培期間中にウイルスに感染した球根があり、その増殖利用によるウイルス感染の拡大が問題となっています。しかしながら、ラナンキュラスに感染するウイルスについては、知見が少なく、生産現場の被害程度や対策手段について把握出来ていないのが現状です。

そこで、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, 2013 年度～2015 年度）」（以降「本プロジェクト」と記載する）では、発生ウイルス種の解明と発生程度の確認、ウイルス感染株率低下に向けた新たな技術について開発を行いました。

2. ラナンキュラスに感染するウイルスについて

2019年現在、ラナンキュラスへの感染が報告されているウイルスは表1に示す11種です。そのうち日本で感染が確認されているのは、ソラマメウルトウイルス（BBWV）、キュウリモザイクウイルス（CMV）、インパチエンスえそ斑点ウイルス（INSV）、ラナンキュラス斑紋ウイルス（RanMoV）、ラナンキュラス微斑モザイクウイルス（RanMMV）、ラナンキュラス奇形葉ウイルス（RanLDV）、トマト黄化えそウイルス（TSWV）（50音順）の7種類です。今回の調査ではこの7種類のウイルスについて調査しました。

ラナンキュラスのウイルス病は研究の歴史が浅いため、今後さらに新しいウイルスが見つかる可能性があります。

表1 ラナンキュラスが感染するウイルスとその伝染方法

	ウイルス名	伝染方法
CMV	cucumber mosaic virus (キュウリモザイクウイルス)	アブラムシ類
BBWV	broad bean wilt virus (ソラマメウルトウイルス)	
RanMoV	ranunculus mottle virus (ラナンキュラス斑紋ウイルス)	
RanMMV	ranunculus mild mosaic virus (ラナンキュラス微斑モザイクウイルス)	
RanLDV	ranunculus leaf distortion virus (ラナンキュラス奇形葉ウイルス)	
RanLV	ranunculus latent virus	
TBV	tulip breaking virus (チューリップモザイクウイルス)	
PVY	potato virus Y (ジャガイモ Y ウイルス)	アザミウマ類
TSWV	tomato spotted wilt virus (トマト黄化えそウイルス)	
INSV	impatiens necrotic spot virus (インパチエンスえそ斑点ウイルス)	
RanWHV	ranunculus white mottle virus	土壌伝染

注：■は国内産のラナンキュラスで発生が報告されているウイルスを示す

3. 国内で問題となっているウイルスについて

この章では特に国内で問題となっている3つのウイルスと、新たに発見した1つのウイルスについて説明します

(1) ラナンキュラス微斑モザイクウイルス(RanMMV : ranunculus mild mosaic virus)



写真 2-1 激しいモザイク症状



写真 2-2 薄いモザイク症状

Potyvirus 属の一種であり、アブラムシによって伝播されます。濃淡様々なモザイク症状を示します(写真 2-1, 2-2)が、時期によっては症状が見えにくくなるため、目視での感染の判断が難しくなります。栽培年数(球根の使用年数)が長くなると病徴が激しくなる傾向が見られます。

2012 年から 2014 年までの発生状況調査では、全 1,116 サンプルのうち、59.4%で感染が確認され、調査した 7 種のウイルスのうち、最も広く発生していることが分かりました(表 2)。

表 2 国内ラナンキュラス産地におけるウイルス発生状況調査結果 (2012~2014 年度)

調査年度	調査ほ場数	調査株数	感染株数					
			RanMMV	CMV	BBWV	TSWV	INSV	PVY
2012	3	24	24	1				
2013	5	500	336					
2014	15	592	303			10		
合計	23	1,116	663 (59.4%)	1 (0.09%)		10 (0.9%)		

※1: 2012, 2013 年度の調査では RanMMV のウイルス調査は RT-PCR を用いて、その他 5 種のウイルスは DAS-ELISA 法を用いて調査を実施した。

※2: 2014 年度は RanMMV, CMV, TSWV のウイルス調査は Multiplex-RT-PCR, その他のウイルスは DAS-ELISA 法を用いて実施した。

※3: ほ場でのサンプリング方法に関して、2012 年度はモザイク様など目視で異常を確認できるもののみを採取、2013,2014 年度は異常の有無に関わらずランダムに採取を行った。

(2) トマト黄化えそウイルス (TSWV : tomato spotted wilt virus)



写真 3-1 茎のえそ症状



写真 3-2 葉の輪紋症状

ランキュラスでは、茎や葉柄のえそ症状(写真 3-1)、葉の輪紋症状(写真 3-2)等の特徴的な症状を示します。*Tospovirus* 属の一種であり、アザミウマ類によって伝播されます。宿主範囲が広く、トマト黄化えそ病やキクえそ病などの病原ウイルスとしても知られており、ナス科、マメ科、キク科、ウリ科など 600 種もの植物に感染することが知られています。他品目での影響も大きいことから、特に対策が必要なウイルスです。

(3) キュウリモザイクウイルス(CMV : cucumber mosaic virus)



写真 4 葉の黄化

Cucumovirus 属の一種で、アブラムシ類によって伝播されます。葉に黄化症状を示しますが(写真 4)、感染株の多くは RanMMV との重複感染であり、モザイク症状も併発しているため、目視での診断は困難です。

TSWV と同様に広い宿主範囲を持ち、野菜類や花き類で大きな被害をもたらすため、防除が必要なウイルスです。

(4) ランキュラス奇形葉ウイルス (RanLDV : ranunculus leaf distortion virus)

本プロジェクト内の調査で新たに発見されたウイルスで、RanMMV と同じ *Potyvirus* 属の 1 種で、アブラムシ類によって伝播するウイルスです。葉に奇形症状を示し、株全体がわい化する傾向があります(写真 5)。奇形症状は株により異なり、一定ではありません。2015 年の調査で、感染率も高いことが明らかになりました(表 3)。



←写真 5 RanLDV 感染株

表 3 RanLDV の発生状況調査(2015)

年度	調査ほ場数	調査株数	感染株数	感染株率
2015	5	350	88	25.1%

4. 球根の使用年数とウイルスの感染株率の関係について

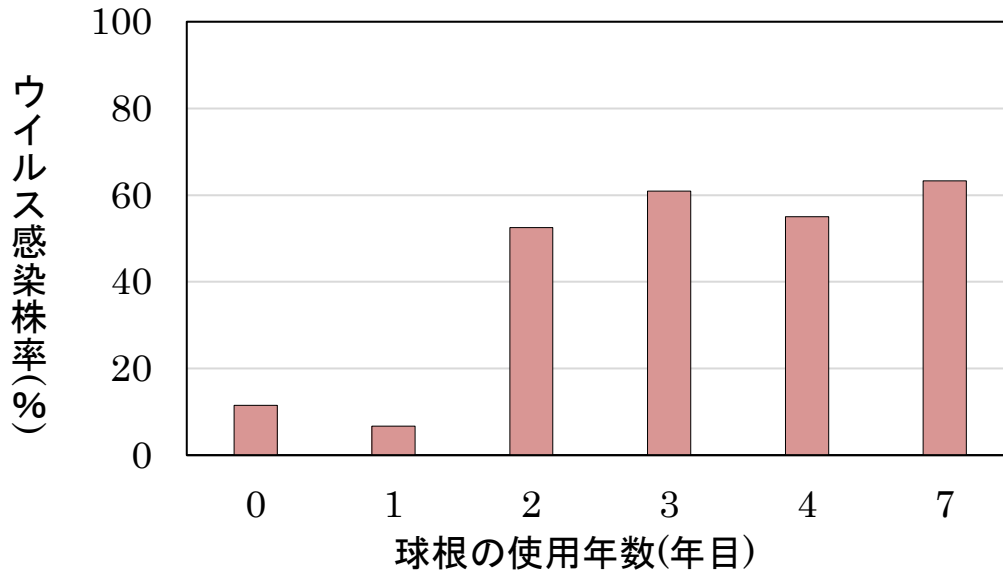


図2 球根使用年数ごとの RanMMV ウイルス感染株率 (2015 年, X産地)

2015 年の調査で、ランキユラスは栽培に使用する球根の使用年数が長い程、ウイルス感染株率が高まることが明らかとなりました (図2)。

ランキユラスは種子からでも栽培できますが、実生栽培では最初の採花時期が春に集中し、切り花収量も少ないため、球根を利用する栽培が一般的です。球根は、種子またはメリクロン苗から 1~2 年かけて養成します。そのため、養成期間中にウイルスに感染している周辺作物に寄生した媒介昆虫の飛来や収穫作業時の刃物の利用などによって蔓延するリスクが高いため、球根の使用年数が長くなるほど、ウイルス感染率が高まったと推測されます。

5. ウイルス対策マニュアル

ウイルスの感染拡大を防ぎ、ウイルスによる被害を低減させるためには、健全な球根への定期的な更新と、ウイルス感染株の早期発見および株の除去による、感染拡大の防止が効果的です。そのためには、安定して健全な球根を提供するための親株床での信頼度の高い診断技術と、生産現場で簡単に組みめる手軽な診断技術の開発が必要です。

そこで、本プロジェクトでは、迅速かつ低コストで検定することが可能な

- ① 健全な球根を供給するための親株のウイルス診断を目的とした、CMV、RanMMV、TSWV を精密かつ同時に検定することの出来る PCR 法(マルチプレックス RT-PCR)
- ② 感染株の早期発見を目的とした、現場で実施可能な診断手法(改良 DIBA 法)を開発しました。以下、その手法について紹介します。

1) 「マルチプレックス RT-PCR」～親株診断のための精密なウイルス診断技術～

RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) は、病原ウイルス固有の遺伝子領域を大量に増幅して検出する方法であり、植物ウイルスの検定に広く使用されている診断方法です。今回は、RT-PCR を応用し、ラナンキュラスの親株のウイルス診断に適した手法に改良しました (Hayahi ら, 2018)。

1-1) マルチプレックス RT-PCR の原理

RT-PCR は RNA 遺伝子を対象とし、目的とするウイルスに特異的なプライマーを使用して検定を行います。一般的に、検出感度は DIBA 法などの血清学的診断法よりも高く、高感度で検出できますが、検定作業が繁雑で、検定に高額な機器や試薬等が必要なため、費用も高額であるなど、労力およびコストがかかります。

そこで今回は、ほ場での感染株率が高い RanMMV、宿主範囲が広く、他品目においても被害の大きい CMV および TSWV の 3 種のウイルスを同時に、効率よく検出できるマルチプレックス RT-PCR を確立しました。この手法を用いることで検定時間および検定コストを通常の RT-PCR の約 3 分の 1 に軽減することが出来ます。

1-2) RNA の抽出

RNA の抽出については、ここでは宮崎県で使用している試薬について紹介しています。各抽出試薬のプロトコールに準じて実施して下さい。

(1) サンプリング

症状の見られる葉を採取します。症状が見られない場合には、できるだけ若い葉を採取して下さい。また、葉柄でも検定は可能です。

なお、宮崎県内では、ランキュラスの症状は2～3月には症状が現れにくい傾向が見られます。親株の選抜を行う場合には、11～2月までに達観でウイルス症状の有無を確認しておくことをお勧めします。

(2) 抽出

【使用試薬】 ISOGEN(ニッポンジーン), クロロホルム, 2-プロパノール,
80%エタノール

- ① 乳鉢に葉 0.5～1g と ISOGEN 500μl を入れ、乳棒で磨砕します

(POINT)

- ・摩擦熱により RNA が分解しないよう、液体窒素を加えて磨砕、あるいは乳鉢を氷上に置いて磨砕します。
- ・ISOGEN は揮発性を有する劇物のため、作業はドラフト内で実施します。

- ② 1.5ml チューブに磨砕液を加え、100μl のクロロホルムを添加し、十分混和します

- ③ 12,000rpm で1分間遠心分離します

- ④ 上清を回収(約 200μl)して、新たな 1.5ml チューブに移し、
回収した上清と等量の 2-プロパノールを加え、5回程度転倒混和します

- ⑤ 12,000rpm で15分間遠心分離します

- ⑥ 上清を除去し、80%エタノールを 500μl を加えます

※抽出した RNA はチューブの底に付着しています。

上清を除去するときには、RNA が一緒に除去されないように注意して下さい。

- ⑦ 数回転倒混和を行い、12,000rpm で1分間遠心分離します

- ⑧ 上清を除去し、十分乾燥させ、-20℃以下で保存します

※80%エタノールなどの各試薬が残ると、RT-PCR の反応に影響します。

低圧乾燥機やチューブ用加温機等を使用し、十分乾燥させて下さい

- ⑨ PCR の反応液に添加する時は 50～100μl の蒸留水か TE に溶解したものを使用します

1-3) PCR の手順

【使用キット】 PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 (Dye Plus)

Takara Bio Inc. (型番) RR057A

(1) 特異的プライマー

今回の試験では 3 種ウイルスの特異的プライマーを作成しました (表 4)。各種のプライマーは、1 種類のウイルスを検出する RT-PCR でも使用できます。

表 4 3 種ウイルスの特異的プライマー

プライマー名	プライマーの塩基配列	増幅産物の大きさ (bp)	検定ウイルス
CMV sub I CPF CMV sub I CPR	CGACTTAA(C/T)AAGACGTTAGCA TCAGACTGGGAGCACTCCAGA	536	CMV (subgroup I)
CMV sub II CPF CMV sub II CPR	(A/G)CT(C/T)AATA(A/G)AAC(C/T)CTGCCA CTAAGTCGGGAGCATCCGTGAGA	536	CMV (subgroup II)
ranmmv-F ranmmv-R	GATGTTTCGTACACCAAGC GCGATGGCCTCAAACTATC	657	RanMMV
TsCP3' TsCP5'	AGAGCAATTGTGTCAAATTTT CTGCTTTAAGCAAGTTCTGC	950	TSWV

(2) RT-PCR

宮崎県では逆転写反応と PCR を同一チューブ内で実施できる PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 (Dye Plus) を使用しています。プライマーはそれぞれ最終濃度が 0.4 μ M になるよう調整します。

表 5 RT-PCR の反応液組成

試薬名	量/サンプル
PrimeScript 1 step Enzyme Mix	0.5 μ l
2 \times 1 step Buffer (Dye Plus)	6.25 μ l
プライマー混合液	2 μ l
dH ₂ O	1.75 μ l
抽出 RNA サンプル	2 μ l

※プライマーとサンプルを除くすべての試薬がキットに含まれています。

反応サイクルは以下の通りです。

52 $^{\circ}$ C \times 30 分 \rightarrow 94 $^{\circ}$ C \times 2 分 \rightarrow {94 $^{\circ}$ C \times 30 秒 \rightarrow 52 $^{\circ}$ C \times 30 秒 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C \times 1 分} \times 40 サイクル
 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C \times 5 分 (\rightarrow 保存 4 $^{\circ}$ C)

(3) 電気泳動

RT-PCR 実施後は、電気泳動を行い、バンドの有無と位置を確認します（写真 6）。ウイルスの種類によってバンドの位置が異なります。重複感染している場合は、複数のバンドが現れるので、重複感染を 1 回で確認することが出来ます。写真 6 の 1~3 レーンは、各ウイルスが単独感染しているため、それぞれ異なる位置にシングルバンドが現れ、何のウイルスに感染しているか把握することができます。4~7 レーンでは、複数のバンドが現れ、各々複数のウイルスが重複感染していることが分かります。

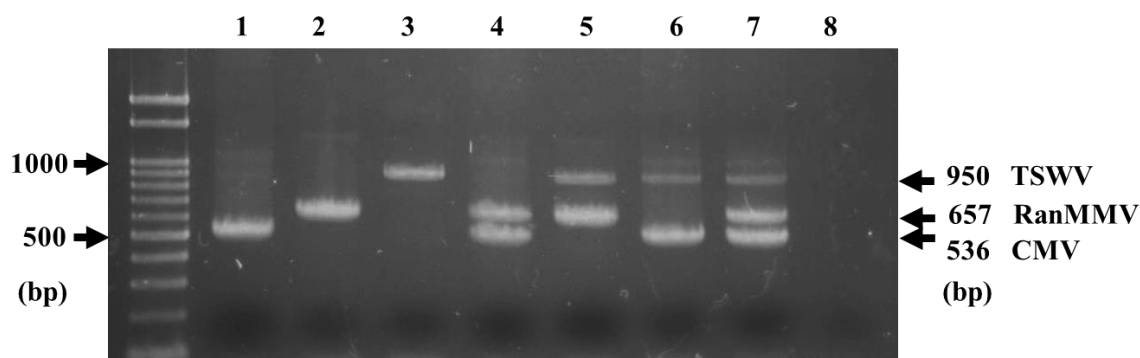


写真 6 マルチプレックス RT-PCR によるウイルス検定の結果（Hayahi ら，2018）

1 : CMV 2 : RanMMV 3 : TSWV 4 : CMV+RanMMV 5 : RanMMV+TSWV
6 : CMV+TSWV 7 : CMV+RanMMV+TSWV 8 : 健全株 9 : 水

※使用機器：サーマルサイクラー（ASTECC，型番：PC-801）

泳動装置（Mupid-exU ADVANCE）

※使用試薬：ラダー（Gene Ladder 100（Wako）），

エチジウムブロマイド（Ethidium Bromide Solution（Bio-Rad））

※泳動条件：TAE 1.5%ゲルを使用し、100V で 30 分間泳動した

※染色条件：0.5μg/ml に調整したエチジウムブロマイドに、遮光状態で 25 分間浸漬した

1-4) 実証試験結果

2015年2地域13ほ場の計581から葉を採取し、調査しました。

本実証試験の結果(表6)から、ランンキュラス栽培ほ場におけるウイルス感染率が非常に高く、対策が必要であることが確認されました。

表6 2地域におけるランンキュラス生産ほ場のウイルス感染株率調査(Hayahiら,2018)

地域	ほ場	サンプル数	感染株率		
			RanMMV	TSWV	CMV
東北	A	39			
	B	20			
	C	30	11 (36.7)*		
九州	D	60	27 (45.0)		
	E	60	14 (23.3)		
	F	22			
	G	120	77 (64.2)		1 (0.8)
	H	69	23 (33.3)		
	I	40	21 (52.5)		
	J	59	1 (1.7)		
	K	24	7 (29.2)	11 (45.8)	
	L	19	17 (89.5)		
	M	19	2 (10.5)		
			581	200 (34.4)	11 (1.9)

*括弧内は感染株率(%)

2) 改良 DIBA 法 ～早期発見のための現場で実施可能な簡易診断法～

DIBA (Dot immuno-binding assay) 法は血清学的診断法の 1 つですが、宮崎県では、手順を簡素化し、より短時間で実施できる「改良 DIBA 法」を現場に普及しています。野菜類のウイルスの早期発見手法として各地域の農業改良普及センターや JA で既に取り組みされており、生産現場で有効な診断法として成果を上げています（櫛間ら，2017）。

2-1) DIBA 法の原理と改良 DIBA 法

(1) DIBA 法とは

DIBA 法は抗原抗体反応を使用した診断法です。植物の汁液を塗布したニトロセルロースメンブレン(NCM)を 1 次抗体と 2 次抗体に浸漬し、発色剤を処理することで特定のウイルスの有無を判定します。

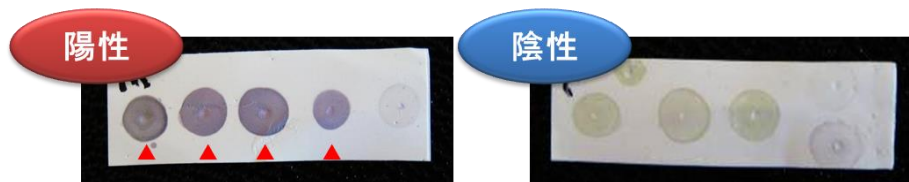


写真 7 DIBA 法の検定結果

植物がウイルスに感染していた場合、図 3 のように汁液に含まれたウイルスが NCM に付着し①、そのウイルスに 1 次抗体（抗ウイルス抗体）が結合します②。さらに、その 1 次抗体に 2 次抗体（酵素標識抗体）が結合し③、2 次抗体の酵素の働きで、添加した発色剤（基質・発色剤）が反応して濃紫色を呈する④ことで、ウイルスの有無を判定することが出来ます（写真 7）。

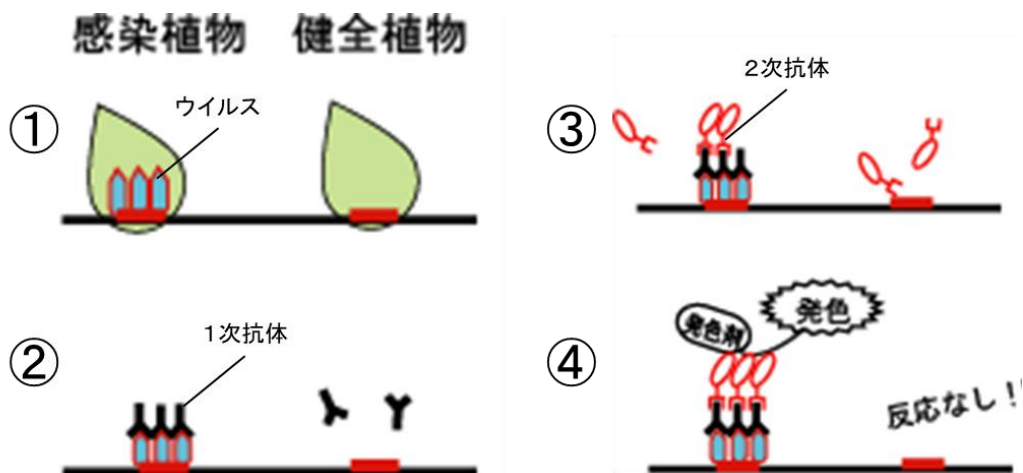


図 3 DIBA 法の原理

(2) 改良 DIBA 法とは

DIBA 法は 1 次抗体と 2 次抗体をそれぞれ別々に処理する必要がありましたが、宮崎県では、1 次抗体と 2 次抗体を混合した「1+2 次抗体」を使用する改良 DIBA 法を開発しました。1 次抗体と 2 次抗体を同時に処理することで、検定にかかる時間を短縮できます。従来の DIBA 法の検定時間は約 1 時間 30 分でしたが、その時間を 3 分の 2 に短縮し、約 1 時間でウイルスの検定をすることを可能にしました。

今回は、ほ場での感染株率が最も高く、最重要ウイルスであると考えられる RanMMV の改良 DIBA 法を確立しました。以下、手法について紹介します。

2-2) 使用試薬の調製

使用する試薬は、

- ① NCM 前処理液
- ② 磨砕液 (TBST)
- ③ 1+2 次抗体
- ④ ブロック液
- ⑤ 洗浄液 (TBST)
- ⑥ 発色剤 (基質・発色剤) です。

(1) NCM 前処理液 (TBS)

トリス (2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパジオール) 2.4g と塩化ナトリウム (NaCl) 29.2g を蒸留水 1000ml に溶解し、pH7.5 に調整する。

(2) 磨砕液 (TBST)

(1) で作成した TBS1000ml に対し、Tween20 を 0.5ml 添加する。

(3) 1+2 次抗体

【1 次抗体】

・南九州大学が作製した抗体を使用しています。

作成情報については参考文献 (河野ら,2014) を参照してください。

【2 次抗体】

・アルカリホスファターゼ標識ウサギヤギ抗体 (ナカライテスクなど)

【抗体希釈液】 (2) の TBST 50ml に、ポリビニルピロリドン 1g と牛血清アルブミン 0.1g を溶解する。

これらを抗体希釈液 2ml に、1 次抗体 4 μ l, 2 次抗体 0.5 μ l を溶かす。

(4) ブロック液

(1) で作成した②TBST 50ml に、ポリビニルピロリドン 1g と牛血清アルブミン 1g を溶解する。

(5) 洗浄液 (TBST) : (2) の磨砕液と同じもの。

(6) 発色剤 (基質・発色剤) : SigmaFast BCIP/NBT タブレット 1錠を蒸留水 10ml に溶解したものを使用する。

2-3) 改良 DIBA 法の手法

~~準備~~



【試薬】

- ① 磨砕液 (TBST)
- ② 1+2 次抗体
- ③ ブロック液
- ④ 洗浄液 (TBST)
- ⑤ 発色剤 (発色剤はアルミ箔でボトルを覆う, 遮光パックに入れるなどして光を当てないように保存します)

■材料■

NCM (Nitro cellulose membrane, Bio-Rad 社など, 孔径 0.45 μ m), RanMMV 感染葉 (ポジコン), 健全葉 (ネガコン), 検定する葉, ハサミ, パラフィルム, 遮光ができるトレイ, シャーレ(2枚以上), 爪楊枝(サンプル数), ピンセット, キムタオル

■留意点■

- ① 葉はできるだけ新鮮なものを使用し, 病徴のある部分を使用するようにして下さい。
- ② TBS 処理をした NCM は素手で触らないようにして下さい。
- ③ 判定を行うにあたり, 色を比較する必要があります。そのため, 陽性反応を示す葉および健全葉が必要です。可能な限り準備をしてください。

■手順■

(前処理)

NCM は NCM 前処理液に 5 分間浸漬させます。その後, 乾燥させて検定に使用します。なお, 乾燥させた NCM は半年以上保存することが可能です。

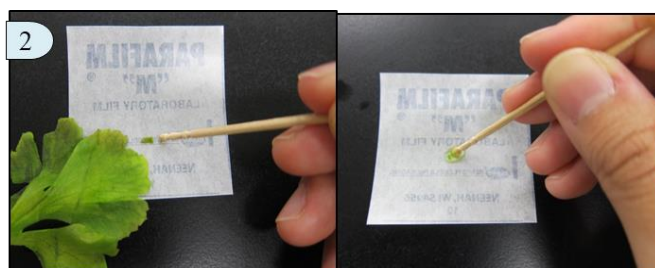
(1) NCM を 2ml チューブに入る大きさにカットします



大きさの目安は 8mm×25mm です。

※TBS 処理した NCM は素手で触らないようにして下さい。

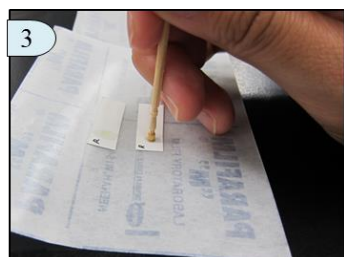
(2) サンプルを磨砕します



パラフィルム上でサンプルを小さく切りとり、磨砕液を 1 滴(約 10 μ l)垂らして、爪楊枝の頭を使って磨砕します。

※サンプルを磨砕した後の液色が濃すぎると判定がしづらくなるため、液色が濃い場合には磨砕液を多めに垂らして適度に希釈します。

(3) NCM にサンプル磨砕液を塗布します



そのまま爪楊枝を使用してサンプル液を NCM に付着させます。

その後 5 分程度風乾します。



左の写真のように 1 枚の NCM に数サンプル塗布することが出来ます。TBST 磨砕液のにじみが隣のサンプルと繋がっても検定内容として隣のサンプルと混ざりません。

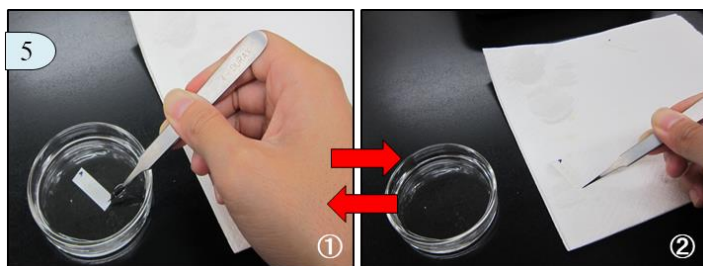
(4) ブロック液を添加し、15 分間静置します



添加した汁液が十分乾燥したらブロック液を上から添加します。

ブロック液で NCM 表面全体が覆われるように添加し、15 分間静置します。

(5) 洗浄液 (TBST) で洗浄します (繰り返し 5 回)



ブロック液をキムタオルなどで軽く拭き取り、洗浄液で洗い落とします。シャーレに適量入れた洗浄液で洗い(①)、キムタオルで拭き取る(②)という作業を 5 回繰り返します。

※抗体液の劣化を防ぐため、ブロック液は十分洗浄して下さい。

(6) 1+2 次抗体に浸漬します (約 37°C×30 分間)



洗浄した NCM を 1+2 次抗体に浸漬します。
その後、チューブを 37°C に設定したインキュベーターに 30 分間入れ、反応を促進します。

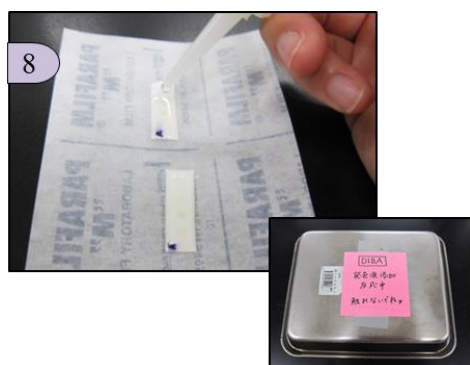
インキュベーターがない場合は、体温と同程度ですので、チューブを胸ポケットに入れても反応させることができます。夏季は室温で十分に反応します。

(7) 洗浄液 (TBST) で洗浄します・・・方法は手順 5) に準ずる

1+2 次抗体を洗浄液で洗い流します。

なお、洗浄液は発色に影響するため、キムタオルでしっかり拭き取ります。

(8) 発色剤を処理し、暗条件下で 15~30 分静置します



NCM に発色液を添加します。

下の写真のように皿等で NCM を覆って遮光し、15 分間静置します。

本技術は比色判定のため、ポジコン (感染葉) およびネガコン (健全葉) の発色具合と比較して判定を行います。ポジコンと同様に発色している、あるいは、ネガコンよりも濃い紫色を呈している場合に陽性と判定することが可能です (写真 8)。

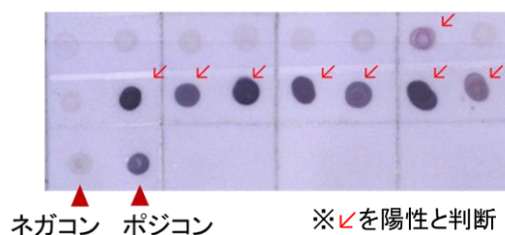


写真 8 DIBA 法の比色判定 (例)

※NCM サイズ 8mm×25mm の場合、サンプル数はおおよそ 5~10 検体です。

2-4) 実証試験結果

2014年12月に宮崎県内の主要産地で葉を採取し、改良DIBA法で検定を行いました。

ラナンキュラスは葉の形状等によって、ウイルス症状か否かが判定しづらい場合がありますが(写真9)、今回の結果では、達観で症状の見受けられる株だけでなく、判定しにくい見かけ健全株でも検出することが出来ました(表7)。



写真9 健全葉の様子

表7 改良DIBA法を使用した現地実証試験結果

品種名	養成年数	調査株数	達観※	改良DIBA法
ちほの恋	切り下1年目	20	11	20
アベロン	切り下2年目	20	1	3
サンキュラスピーチ	切り下3年目	20	13	13
ピュアホワイト	切り下4年目	20	11	20
アミアン	切り下5年目	20	19	19

※ 症状による判断

6. おわりに

ランキュラスのウイルスの感染は、生育及び品質を低下させ、生産者の所得に影響を及ぼします。健全な苗を導入すること、そして、ウイルス感染株を早期に除去することがとても重要になります。

マルチプレックス RT-PCR 法は、ウイルスに感染していない健全な苗の供給のための親株の検定方法として確立された手法です。DIBA 法をはじめとする血清学的診断法と比較するとより精密に検定することが可能であり、高い精度が求められる育苗施設での親株の診断に有効です。また、一般的に PCR 法は実施に経費がかかりますが、今回確立した手法は、3 種のウイルスを同時に検定することが出来るため、検定費用を約 3 分の 1 に減らすことができ、検定時間も短縮することが可能です。

一方、RanMMV を検出することのできる DIBA 法は、ウイルス感染株の早期発見を目的として確立された手法です。高額な実験機材等が不要で、農業改良普及センターなどの試験研究機関以外の施設でも簡単に検定をすることが可能です。また、PCR などの遺伝子診断法と比較すると、低コストで検定することができるため、ほ場での早期診断、蔓延防止にも有効です。

今回検定の対象としたウイルスをはじめ、ランキュラスに感染することが知られているウイルスの多くは、虫媒で伝染することが知られていますが、複数年球根を利用することが一般的な栄養繁殖性のランキュラス栽培では、栽培期間中の管理作業等でウイルス汚染を広げる可能性があります。

日本の花き産業の中で、海外からも注目を集め、重要な位置を占めるランキュラスの産地化を図るためには、種苗生産の場はもちろん、切り花生産の農家段階においても、産地全体のウイルスフリー化を推進していく必要があります。

今回開発した 2 つのウイルス検定技術を適所で活用し、ウイルス被害の低減を図りましょう。

7. 参考文献

- Hayahi S. et al. (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.
- 櫛間義幸 (2017) : 改良 DIBA 法を用いたキュウリ黄化えそ病・緑斑モザイク病の診断キット. *植物防疫*, 71, 735-739.
- 河野亜希子, 菅野善明 (2014) 宮崎県のランキュラスにおけるウイルス病の発生実態と診断方法の確立. *植物防疫*, 68, 668-672.
- 中村薫ら (2014) 挿し芽期間の温度がランキュラス挿し穂の発根と定植後の生育開花および塊根形成に及ぼす影響. *園学研*, 13, 113-117.
- 永友佑樹ら (2013) : ランキュラスにおいて異なる種子冷蔵処理期間が生育開花に及ぼす影響. *園学研*, 12 (別 2), 236.
- Turina et al. (2006) Characterization of four viral species belonging to the family Potyviridae isolated from *Ranunculus asiaticus*. *Phytopathology* 96, 560-566.
- 花田ら (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, 312-315.
- Fujimori (1996) ; A potyvirus isolated from *Ranunculus asiaticus* L. *Bulletin of the College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University* 53, 1-8.
- 牛山ら (1989) ; オイランソウ, ランキュラス, ペチュニアから検出されたウイルス. *神奈川園芸試験場研究報告* 第, 38, 43-49

研究事業名 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
研究課題名「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」
(平成 25～27 年度) 課題番号 25075C

実施体制 (名称は研究期間当時のもの)

代表機関 宮崎県総合農業試験場 (研究総括者 中村 薫)
共同研究機関 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 花き研究所
南九州大学 環境園芸学部
秋田県農業試験場
山形県庄内総合支庁産業経済部農業技術普及課産地研究室
奈良県農業研究開発センター

普及・実用化支援組織

宮崎県農政水産部営農支援課
(有) 綾園芸
山形県農業総合研究センター園芸試験場
山形県庄内総合支庁産業経済部農業技術普及課産地研究室

「ランキュラスのウイルス病診断マニュアル」に関わった担当者

研究総括者：宮崎県総合農業試験場	中村 薫
中課題「ウイルス等病害防除技術の開発」責任者：	
独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 花き研究所	松下 陽介
小課題「ランキュラスのウイルス病害検定技術開発」責任者：	
南九州大学 環境園芸学部	菅野 善明
小課題「ランキュラスのウイルス等病害防除技術開発」責任者：	
宮崎県総合農業試験場	櫛間 義幸
同 担当：宮崎県総合農業試験場	照屋 亜希子 (旧姓 河野) 早日 早貴 (執筆者) (旧姓 大坪)

「ランキュラスのウイルス病診断マニュアル」

令和元年（2019年）6月

編集 宮崎県総合農業試験場

〒880-0212

宮崎県宮崎市佐土原町下那珂 5805

電話：0985-73-2121（代表） FAX：0985-73-2127

注) マニュアル利用の免責事項

本マニュアルの利用により、万が一利用者の方に何らかの不都合や損害が発生したとしても、当コンソーシアムは何らの責任を負うものではありません。