

トマト退緑萎縮病(TCDVd)総合対策マニュアル



広島県立総合技術研究所農業技術センター

目次

はじめに.....	3
1 TCDVd の発生概要.....	4
2 TCDVd の発生生態.....	6
3 TCDVd の診断マニュアル	
1) 病徴による診断.....	11
2) 遺伝子診断.....	16
4 トマト栽培における TCDVd の防除対策	
1) 発生時の具体的防除対策.....	22
2) 発生後の改植時の具体的防除対策.....	23
3) ウイロイド病終息後の予防対策.....	24
参考文献.....	25
おわりに.....	26

はじめに

平成 18 年、広島県の施設トマトにおいて本邦初となるトマト退緑萎縮ウイルス (TCDVd) が発生し (平成 18 年度広島県病虫害発生予察情報特殊報 5 号)、その後、千葉県施設トマトでも被害が発生しました。広島県の発生施設では、初発 6 ヶ月後には、被害株率が約 15% に達し、甚大な経済的被害が生じました。その後、本ウイルスは、生産者はもとより、植物防疫所をはじめとする関係機関の御協力により根絶することができ、現在、わが国でトマトの被害は確認されておられません。

TCDVd は、我が国が侵入を特に警戒する特定重要病原体であるジャガイモスピンドルチューバーウイルス (PSTVd) の極近縁種であり、両ウイルスは世界的にもトマトに被害を及ぼしています。特に、PSTVd はトマトでの種子伝染率が高く、輸入トマトの種子等を介したウイルス病の我が国への侵入が危惧されます。また近年、法人化による協業経営や企業による農業参入が進められており、トマト等生鮮野菜が大規模施設で栽培されるようになっています。このような経営体において、トマト栽培に壊滅的被害を与える TCDVd の発生は大きな脅威となります。このことから、これら侵入警戒ウイルス病 (TCDVd と PSTVd) のより高精度で簡易な診断・検出方法を開発すると共に、本ウイルスの特性に基づく防除法、予防法を明らかにすることは、植物検疫における水際対策および感染時の防御対策の両面において極めて重要です。

本対策マニュアルは、平成 19 年からの 3 年間で取り組んだ農林水産省「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」における「国内初のトマトウイルス病に対応した診断・防除技術の新規開発」の研究で得られた成果を取りまとめたものです。今後の我が国で新興・再興が危惧されるウイルス病の検疫、防除対策に役立てて頂ければ幸いです。

広島県立総合技術研究所農業技術センター
センター長 森本 浩正

1. TCDVd の発生概要

1) TCDVd とは？

ウイロイドは、ウイルスよりもさらに小さいRNA という核酸だけからなる、世界でもっとも小さな病原体で、植物にしか感染しません。したがって、ウイロイドに感染した植物やその果実を食べても健康への影響はまったくありません。トマト退緑萎縮ウイロイドの学名はトマトクロロティックドワーフウイロイド (*Tomato chlorotic dwarf viroid* ; TCDVd)と呼ばれ、日本への侵入が警戒されているジャガイモの重要病原であるポテトスピンドルチューバーウイロイド *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) に極めて近縁のウイロイドです。TCDVd に感染したトマトは、萎縮、縮葉、結実不良などの激しい症状を現し、著しい被害を受けます。

2) 海外での TCDVd 発生の経緯

TCDVd は、1999 年カナダにおいてオランダから米国経由で輸入されたトマトで初めて確認されました (Singh ら, 1999)。その後、オランダのトマト (Verhoeven ら, 2005)、インドのバーベナ (Singh ら, 2006) 等からも確認され、近年では、米国アリゾナ州の施設トマトで被害が発生しています (Ling ら, 2009) (表-1)。

表-1 トマト退緑萎縮ウイロイドの発生報告

報告年次	宿主	発生地	報告者	塩基数	DBBJ ^a accession number
1999	トマト	カナダ	Singh et al.	360	AF162131
2004	トマト	アメリカ	Verhoeven et al.	360	AY372399
2006	バーベナ	インド	Singh et al.	部分配列	DQ846883
2007	ペチュニア	アメリカ	Verhoeven et al.	359	DQ859013
2008	トマト	日本	Matsushita et al.	359	AB329668
2008	ペチュニア	イギリス	James et al.	359	EF582392, EF582393
2009	ペチュニア	フィンランド	-	-	-
2009	ペチュニア	チェコ	-	-	-
2009	トマト	アメリカ	Ling et al.	-	FJ822877, FJ822878

^a : DNA data bank of Japan (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)

3)国内での TCDVd 発生の経緯

広島県では 2006 年（平成 18 年）7 月にトマト生産経営体において初めて被害発生が認められ（平成 18 年度広島県病害虫発生予察情報特殊法第 5 号）、その後 2007（平成 19 年）年 6 月の栽培終了期には、発病株率 9.4%、抜き取り処分を含めた被害株率は 15.4%に達しました。2007 年 7 月の改植期に発病株残渣はすべて施設外の空き地へ埋没処分し、厚さ 1.5m の覆土を行いました。また、施設内や器具類はすべて有効塩素濃度約 0.1% の塩素系消毒剤による消毒が実施されました。同年 8 月に新たに定植されましたが、その後、2009 年 8 月現在、2 作を通して再発は認められていません。また、埋設跡地に生育するナス科雑草等への感染も確認されておらず、発生園における TCDVd の発生は終息したと判断されます。

一方、千葉県では、2007 年 9 月にトマト生産経営体で発生が認められ（平成 19 年度千葉県病害虫発生予察特殊報第 4 号）、2008 年 7 月の栽培終了時の発病株率は 1%未滿、改植を含む被害株率は 7%に達しました。その後、発病株の除去、有効塩素濃度約 0.1% の次亜塩素酸ナトリウムによる器具消毒、抜き取った発病株の焼却処分等を経て、同年 8 月に新たに定植した作以降 2010 年 1 月末現在まで、本病の発生は確認されておらず、千葉県においても TCDVd の発生は終息したと判断されます。

2. TCDVd の発生生態

1) TCDVd の諸特性

TCDVd は、ポスピウイルス科 (Pospiviroidae)、ポスピウイルス属 (*Pospiviroid*) に属するウイルスで、タンパク質カプシド (外殻) を持たない、359~361 塩基からなる裸の一本鎖環状 RNA 分子で、多くの塩基対を持った棒状の二次構造を有しています。前述のとおり、TCDVd は同属のポテトスピンドルチューバーウイルス (PSTVd) と近縁関係にあり、両者の塩基配列は 85~89% の相同性があります (Singh ら, 1999 ; Matsushita ら, 2008)。

TCDVd の磨砕液は 100°C で 10~30 分間煮沸処理しても感染性を示し、高い耐熱性を有しています (表-2)。また、100,000 倍希釈でも感染力を示し、極めて低いウイルス濃度でも感染力を保持しています。TCDVd は乾燥に極めて強く、乾燥した感染トマト汁液は長期間 (50 日以上) 感染力を保持しています (表-3)。一方、トマト磨砕汁液中では比較的早く (1~2 日) 分解し、感染力を失います (Matsushita ら, 2009)。

表-2 TCDVd の耐熱性

処理時間 ^a (分)	発病個体数/供試個 体数
無処理	9/9
10	4/9
20	1/9
30	1/9
40	0/9

^a100°Cでの処理時間

表-3 乾燥罹病トマト汁液におけるTCDVdの保存性

保存期間 ^a (日)	発病個体数/供試個体数
0	3/3
1	2/3
3	1/3
5	2/3
20	3/3
30	3/3
40	3/3
50	3/3

^a 0.05Mリン酸バッファー (pH7.2, 0.1%亜硫酸ナトリウム添加) で10倍希釈した罹病葉汁液1mLを-75°Cで凍結したのちに真空乾燥器で1夜乾燥した。試験に際して1mLの水を加えて再溶解後に接種した

TCDVdはトマトの茎葉，根，花器官等ほぼ全組織中で増殖し（図-1），トマトに激しい症状（病徴）を引き起こします。TCDVdによる代表的なトマトの病徴は，株の萎縮（スタント），節間の短縮，縮葉（エピナスティー），退緑，葉脈えそ，花器官の奇形，結実不良などですが（3 TCDVd診断マニュアルを参考），症状はトマト品種や環境条件によって変化します。また，トマト生育初期に感染した場合ほど減収量が多く，被害が激しい傾向があります（図-2）。

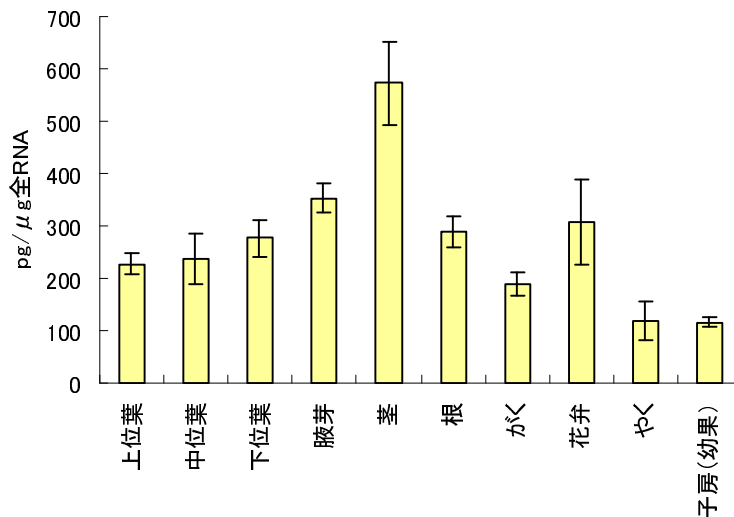


図-1 感染トマト各器官における TCDVd 濃度

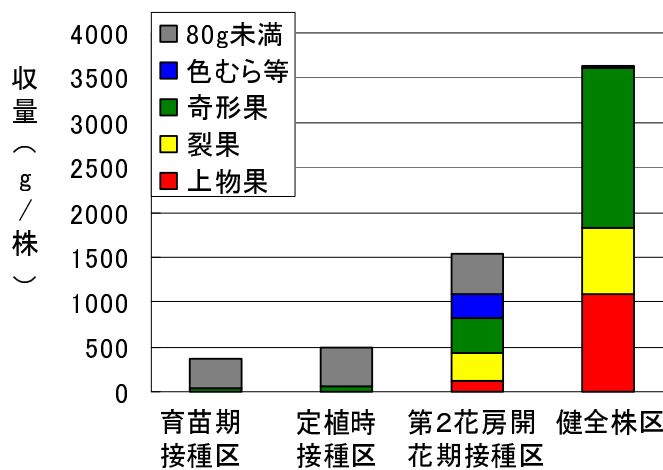


図-2 TCDVd の生育ステージ別感染による減収量 (人工接種, 'ハウス桃太郎')

注) 各生育ステージのトマトに TCDVd を汁液接種し，その後の果実品質および総果実収量を調査

人工接種による潜伏期間は 25~35℃の高温域では，2~3 週間程度と短いですが，低温では長くなり，特に 20℃以下では病徴隠蔽（マスキング）が起こることもあります。

2) TCDVd の宿主範囲

TCDVd の宿主植物はナス科植物が中心で、それ以外にはキク科、クマツヅラ科、キョウチクトウ科の一部に限定されます。ナス科植物で病徴を発現するのはトマト、バレイショおよび *Nicotiana glutinosa* のみで、ペチュニア、ピーマン、ナス等多くの植物では、感染しても病徴を現さない無病徴感染となります（表-4）（Singh ら, 1999, 2008 ; Matsushita ら, 2009）。このことから、無病徴感染宿主（ペチュニアなど）が TCDVd の伝染源になる可能性があり、注意が必要です。

表-4 TCDVdの宿主植物域

接种植物種	感染	病徴
キク科		
アゲラタム	-	
ゴボウ	-	
シュンギク	+	-
キク	-	
ヒマワリ	-	
レタス	-	
ノースポール	+	-
ナス科		
バレイショ	+	+
ピーマン‘みおぎ’	+	-
チョウセンアサガオ	-	
シロバナヨウシュチョウセンアサガオ	+	-
トマト	+	+a
オオセンナリ	+	-
<i>Nicotiana benthamiana</i>	+	-
<i>N. clevelandii</i>	+	-
<i>N. debneyi</i>	+	-
<i>N. glutinosa</i>	+	+b
<i>N. occidentalis</i>	+	-
<i>N. physaloides</i>	+	-
<i>N. rustica</i>	+	-
タバコ‘サムスン’	+	-
タバコ‘キサンチ’	+	-
<i>Physalis floridana</i>	+	-
ペチュニア	+	-
ワルナスビ	+	-
ナス	+	-
ツノナス	+	-
イヌホウズキ	+	-
クマツヅラ科		
バーベナ	+	-
キョウチクトウ科		
ヒメツルニチニチソウ	+	-

a 上位葉の退緑, 黄化, えそを伴う葉巻症状, 植物体全体の萎縮症状

b 花卉の斑入り

網掛け部は海外での報告

3) TCDVd の伝搬方法

TCDVd はトマト汁液を介して手指やハサミで容易に隣接株へ伝染します (表-5)。このため、摘芽、摘葉、誘引、収穫などの作業管理方向に沿って伝染します。また、本ウイロイドは、コナジラミ類等の微小害虫によって媒介されることはないと考えられますが、実験条件下でマルハナバチの受粉活動によって媒介されることが分かっています (図-3) (Matsuura ら, 2010)。また、他のウイロイドと同様、土壌伝染は認められず、トマト罹病残渣を埋没処分した跡地に生育するナス科雑草への感染も確認されていません (表-6)。なお、TCDVd のトマトにおける種子伝染性の有無については、よく分かっていません。

表-5 腋芽の摘芽作業による指を介したTCDVd伝染率

	接触回数		
	2回	5回	10回
接触3週間後	2/3	3/3	3/3
接触4週間後	3/3	3/3	3/3

注1) 発病株/接触株

注2) TCDVdに発病したトマト‘ルトガス’から発生する腋芽を指(PVC手袋着用)で摘芽し、その指で健全トマト株の頂芽の茎を強く圧迫した

図-3 TCDVd のクロマルハナバチによる媒介

A: クロマルハナバチ導入 52 日後の周囲健全トマトへの媒介状況, B: RT-PCR による感染の判定

注) ガラス温室内 (36m²) にコンテナ栽培したトマト‘ハウス桃太郎’5 株を中央に、‘ルトガス’をその両側に 10 株配置した。第 1 番花着蕾期に‘ハウス桃太郎’の上位 1~3 葉に TCDVd を汁液接種し、クロマルハナバチ約 50 頭を導入し、気温 20~35℃で栽培

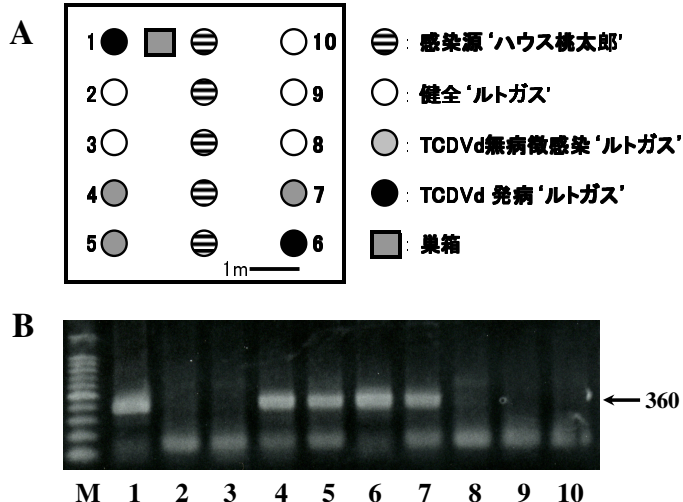


表-6 TCDVd罹病残渣埋没跡地に生育するナス科・キク科雑草のTCDVd感染状況 (2007年10~2008年9月)

植物名	学名	感染株率
ナス科植物		
野良生えトマト	<i>Solanum lycopersicum</i>	0/12
イヌホウズキ	<i>S. nigrum</i>	0/25
ヨウシュチヨウセンアサガオ	<i>Datura stramonium</i>	0/3
キク科植物		
ヨモギ	<i>Artemisia princeps</i>	0/6
ノゲシ	<i>Sonchus oleraceus</i>	0/4

注1) 感染の判定はRT-PCR法による

注2) トマト罹病残渣は幅4m, 深さ3mの穴を掘り埋設後, 約1.5mの覆土を実施

4) TCDVd 汚染器具の消毒

TCDVd に汚染されたハサミや器具類は、3%有効塩素濃度の次亜塩素酸ナトリウム溶液および20%家庭用漂白剤（有効塩素濃度約1%相当）による消毒効果が高いことが分かりました（表-7）。一方、第三リン酸ナトリウム、酸性の薬品、消毒用アルコールの消毒効果は不十分でした。また、植物ウイルスの感染防止に利用されるスキムミルク、シイタケ菌糸体抽出物液剤はこのウイロイドの感染防止に効果を示しませんでした。TCDVd 汚染器具類は、有効塩素濃度 0.5%以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液に 15 秒以上浸漬すると、高い消毒効果が得られます。また、約 0.2%以上の次亜塩素酸ナトリウムでも浸漬時間を長くすることで、消毒効果が期待できます（表-8, 図-4）。

表-7 各種薬品のTCDVdに対する消毒効果

	pH	実験1		実験2		実験3		平均 (%)
		発病	感染	発病	感染	発病	感染	
3% 次亜塩素酸ナトリウム	11.8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0.0
20% 家庭用漂白剤	12.1	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0.0
2%ホルマリン・2% 苛性ソーダ混合	12.7	0/8	1/8	0/8	0/8	-	-	6.3
5% 第三リン酸ナトリウム	13.1	0/8	1/8	1/8	1/8	1/8	2/8	16.7
2.5% 第三リン酸ナトリウム	12.9	4/8	5/8	7/8	7/8	-	-	75.0
酸性電解水	2.4	8/8	8/8	5/8	5/8	-	-	81.3
0.1N 塩酸	1.2	7/8	7/8	3/8	3/8	-	-	62.5
70% イソプロパノール	-	8/8	8/8	7/8	7/8	-	-	93.8
水	6.6	7/8	7/8	6/8	7/8	5/8	6/8	83.3

注) TCDVd汚染メスを各種薬品に15秒間浸漬処理

表-8 次亜塩素酸ナトリウムの濃度とTCDVd消毒効果

次亜塩素酸ナトリウム濃度 (%)	pH	実験1		実験2		実験3		平均 (%)
		発病	感染	発病	感染	発病	感染	
1	11.5	0/8	0/8	1/8	1/8	0/8	0/8	4.2
0.5	11.5	0/8	0/8	0/8	0/8	1/8	1/8	4.2
0.25	11.2	2/8	2/8	1/8	2/8	0/8	0/8	16.7
0.125	10.9	0/8	0/8	1/8	1/8	3/8	3/8	16.7
0.0625	10.6	4/8	4/8	2/8	2/8	-	-	37.5
0.03125	10.3	5/8	5/8	3/8	3/8	-	-	50.0
水	6.6	6/8	6/8	4/8	5/8	7/8	8/8	79.2

注) TCDVd汚染メスを各種薬品に15秒間浸漬処理

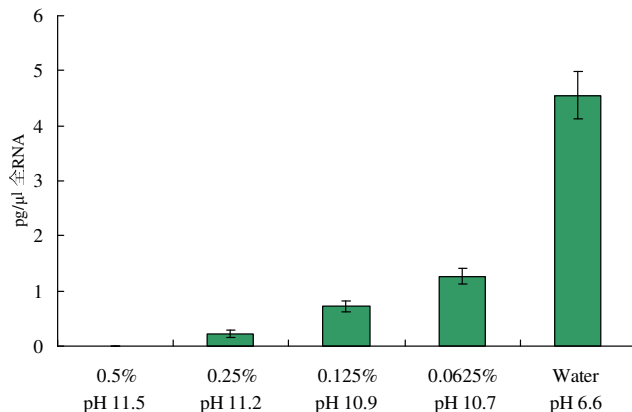


図-4 次亜塩素酸ナトリウムの濃度とTCDVdの分解能力

注) TCDVd 溶液と次亜塩素酸ナトリウムを 15 秒間反応させた後の、未分解 TCDVd の残存量。定量 PCR で測定

3. TCDVd の診断マニュアル

1) 病徴による診断

TCDVd に感染したトマトの病徴は、萎縮（スタント）、節間の短縮、縮葉（エピナスティー）、退緑、奇形、葉脈えそ、花器官の奇形、結実不良（果実の奇形、小型化）などです（図-5～11）。特に、高温時には病徴が激しく、生育は完全に停止します。品種によっては、上位葉の退緑、巻葉症状を呈し、タバココナジラミ媒介性のトマト黄化葉巻病(TYLCV)とよく似ています（図-8,9）。また、TCDVd の感染・発病に対するトマトの抵抗性に顕著な品種間の差異は認められず、感染した場合、多くの品種が被害を受けると考えられます。



図-5 生産施設のトマトで発生した TCDVd の病徴
上) 上位葉の退緑と小型化
下) 株の萎縮と退緑・黄化

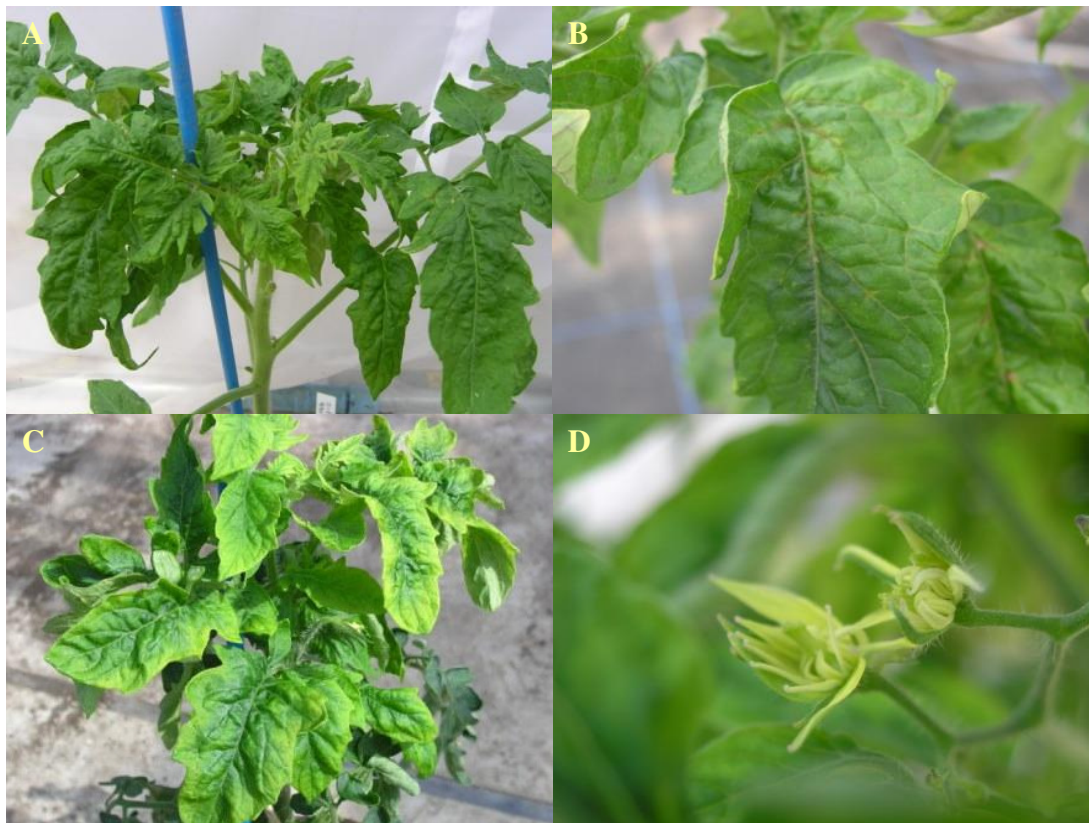


図-6 人工接種したトマト'ルトガス'における TCDVd の病徴
 A: 縮葉, 節間短縮症状, B: 葉脈えそ, C: 葉の奇形とエピナスティー, D: 花器官の奇形



図-7 人工接種したトマト'ハウス桃太郎'における TCDVd の全身病徴
 株全体の萎縮, 退緑, 黄化症状, 果実の奇形, 小型化

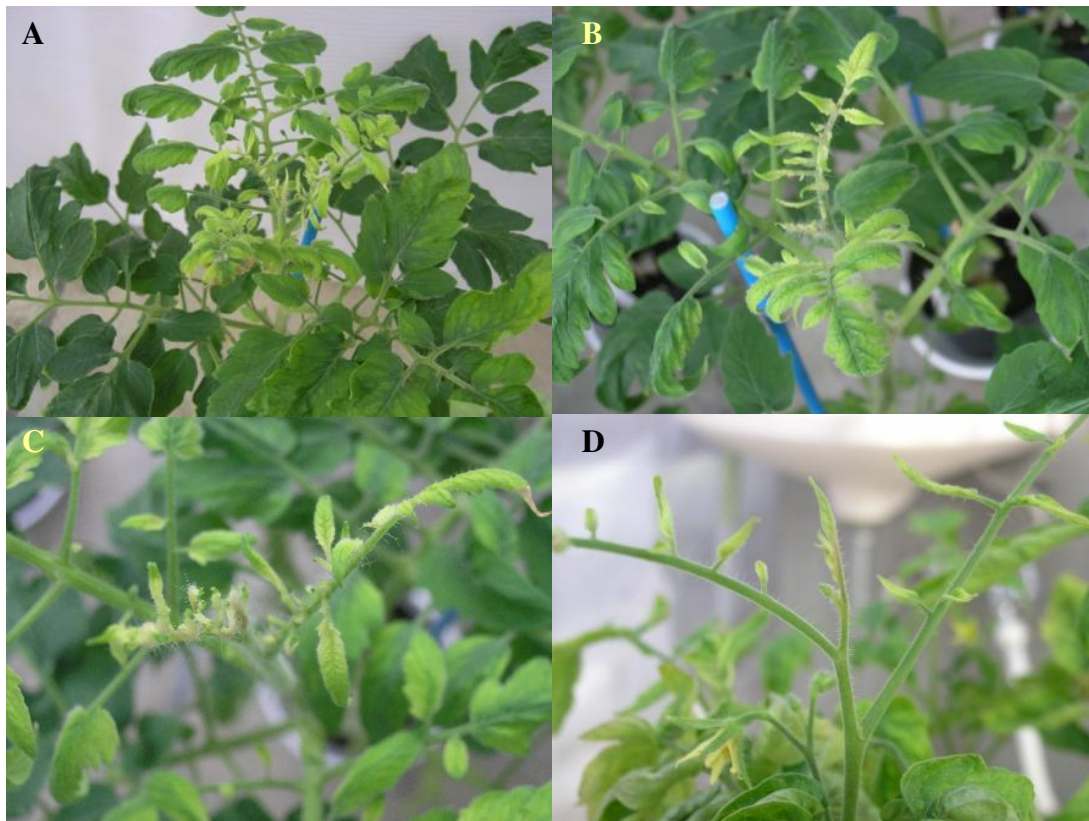


図-8 人工接種したトマト‘ハウス桃太郎’における TCDVd の上位葉病徴
 ABC: 上位葉の退緑, 巻葉および委縮症状, D: 糸状葉



図-9 トマト‘ハウス桃太郎’で発生したト
 マト黄化葉巻病 (TYLCV) の病徴
 注) ‘ハウス桃太郎’など一部の品種では,
 TCDVd の症状は, タバココナジラミによっ
 て媒介される TYLCV の症状と似ていま
 す。が, 虫媒伝染性の TYLCV と異なり,
 収穫・作業管理方向に沿って感染拡大
 することが, 診断の目安となります



図-10 低温期における TCDVd の病徴(人工接種)

左) 'ハウス桃太郎' 株全体の萎縮, 退緑, 黄化, 上位葉の縮葉, 巻葉

右) 'フルティカ' 株全体の萎縮, 上位葉の縮葉

注) 低温(12~20°C)での病徴は比較的軽度で, トマトは少しずつ成長を続けます。

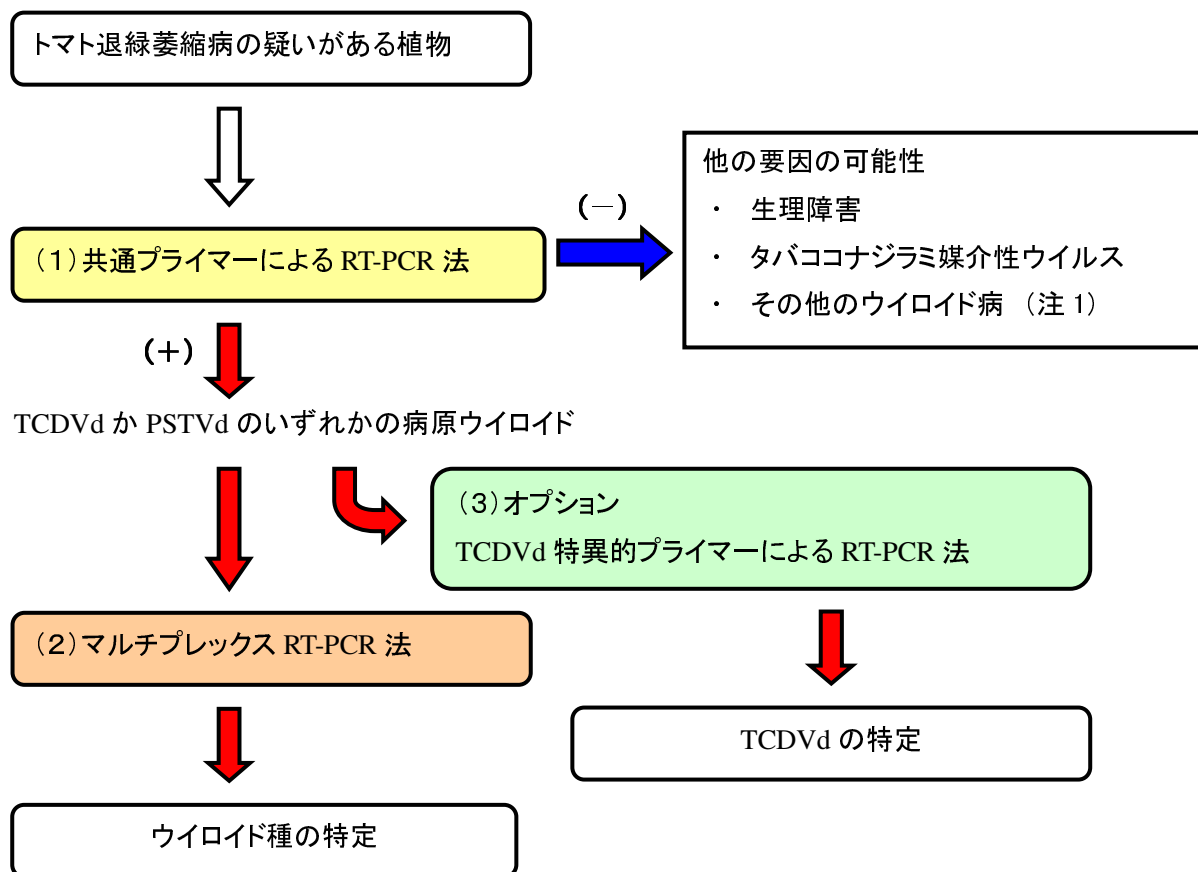


図-11 TCDVdを人工接種したトマト‘ハウス桃太郎’の圃場(施設)での病徴
手前2列がTCDVd発病株, 奥が健全株

2) 遺伝子診断

TCDVd 感染が疑われる植物（トマト，ナス科植物等）は，まず共通プライマーによって RT-PCR 診断を実施します。この共通プライマーは，トマト等ナス科植物に感染するポスピウイルス属のうち，TCDVd および PSTVd のほとんど全ての系統（ストレイン）や株（アイソレート）を安定して検出することができます。陽性反応の場合，マルチプレックス RT-PCR 法を実施し，種の特特定を行います。また，オプションとして，TCDVd の特異的プライマーによる RT-PCR 診断あるいは増幅 DNA 断片のシーケンス解析でも種の特特定ができます。

（トマト退緑萎縮病診断のフロー）

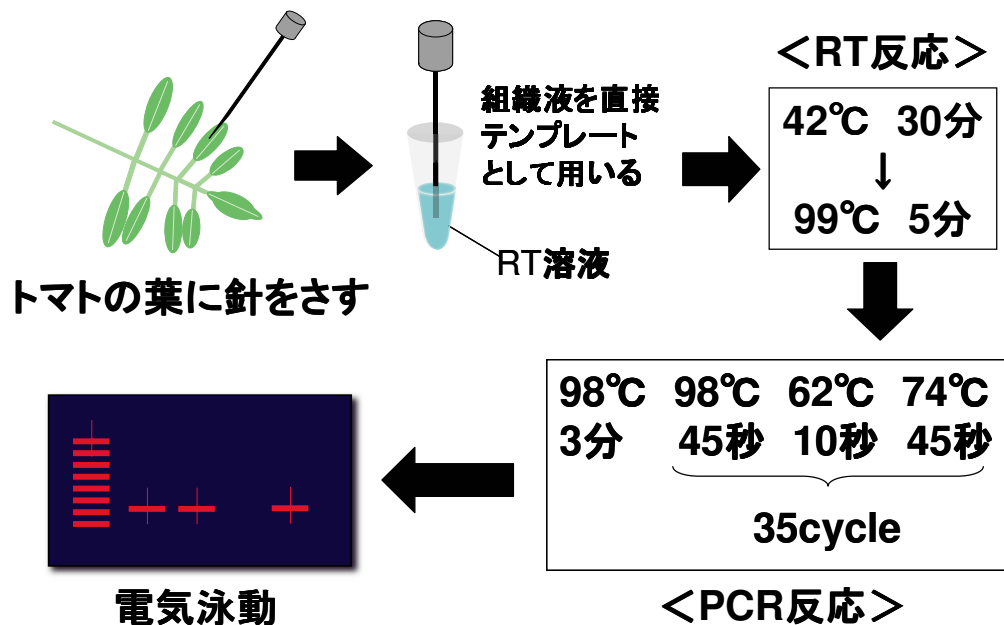


(注1) ポスピウイルス属には 10 種が含まれ，そのうち *Tomato planta macho viroid* (TPMVd), *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd), *Tomato apical stunt viroid* (TASVd), *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Columnnea latent viroid* (CLVd) の 6 種がトマトに感染し被害をもたらします。なお，TCDVd, PSTVd 以外のトマトでの感染は，日本では未確認です。

核酸の調整(ダイレクトティシューーRT-PCR 法)

この方法は、植物体から核酸を抽出、精製することなく、対象サンプル（葉、茎、花、果実など）に注射針を刺して、付着した組織液を RT-PCR 反応の鋳型とする簡便な方法で、多数の検体を検定する際に有効です。

感染が疑われるトマト（またはその他植物）の葉や茎に注射針を突き刺し、直接 RNA の鋳型とします。なお、検定対象となる葉や茎は老化したものは避け、なるべく新しい組織を使用します。また、PCR 反応には、植物由来の阻害物質の影響を受けにくい KOD Dash（または KOD FX）DNA ポリメラーゼ®を使用してください。



(1) 共通プライマーによる TCDVd, PSTVd の検出

共通プライマー（P3/P4；表-9）は、トマトに感染するポスピウイロイド属 6 種のうち、TCDVd と PSTVd を特異的に安定して検出します。本プライマー対で陽性反応の場合は、いずれかのウイロイドに感染していることとなります。種を特定するためには、事項（2）のマルチプレックス RT-PCR 法等を実施してください。

ア. プライマー

TCDVd, PSTVd 共通プライマーのケース

表-9 TCDVd, PSTVd 共通プライマー

プライマー名	用途	配列(5'-3')	位置
P3	Reverse primer	CCGATCCCTGAAGCGCTCCTCCGAGC	68-95
P4	Forward primer	TCGGATCCCCGGGAAACCTGGAGCG	84-111

注) P3+P4 primer: Behjatnia et al. 1996 *Phytopathology* 86, 880-886.

イ. 反応液の組成

逆転写反応液組成

dNTPs (10 mM) (TOYOBO)	2 μ l
RT バッファー (TOYOBO)	1 μ l
RNase 阻害剤 (1 U) (TOYOBO)	0.5 μ l
逆転写酵素 RverTra Ace [®] (20 μ M) (TOYOBO)	0.5 μ l
Reverse primer (20 μ M)	0.5 μ l
RNase フリー水	4.5 μ l
全 RNA (鑄型)	1 μ l
<hr/>	
合計	10 μ l

PCR 反応液組成

KOD Dash バッファー (TOYOBO)	1 μ l
DNA ポリメラーゼ KOD Dash (TOYOBO)	0.1 μ l
dNTPs (2 mM) (TOYOBO)	1 μ l
Forward primer (20 μ M)	0.1 μ l
水	6.8 μ l
逆転写 (RT) 産物 (鑄型 cDNA, Reverse primer 含む)	1 μ l
<hr/>	
合計	10 μ l

ウ. 方法・反応条件

葉を注射針で数回突き刺し、RT 反応液に 10 秒程度漬け、直接 RNA の鑄型とします。逆転写反応は、上記反応液で 42°C で 30 分を行い、99°C で 5 分間処理で反応を停止した後、4°C で保存します。逆転写反応完了後、逆転写産物 1 μ l を用い、上記 PCR 反応液により PCR 法を行います。

PCR 反応は、98°C で 3 分の変性処理後、98°C で 45 秒、62°C で 10 秒、74°C で 45 秒を 1 サイクルとして 35 サイクルを行い、最後に 74°C で 5 分間反応後、4°C で保存します。

エ. 判定

PCR 完了後、PCR 産物とローディング色素を 1 滴ずつ混合し、1% アガロースゲルに注入し、1 \times TBE (または TAE) バッファーを使用して電気泳動を行います。電気泳動後、UV 光を使用して色素を発光させ、増幅バンドの有無を確認します。

図-12 に示すように、TCDVd、PSTVd 共通プライマー (表-9) を用いた場合は、TCDVd および PSTVd において、370bp 付近 (レーン 1~3) に予測通りのサイズに対応する明瞭な特異的バンドが確認されます。このように、共通プライマーを用いた場合は、TCDVd および PSTVd を検出することができますが、両ウイルスの区別はできません。一方、オプション (P18 参照) の TCDVd 特異的プライマーを用いた場合は、TCDVd のみを検出することができます。

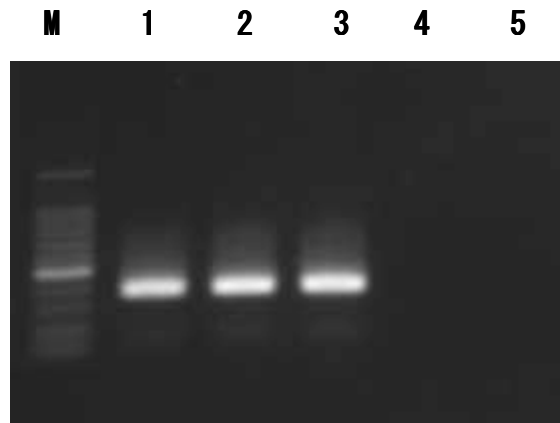


図-12 共通プライマーによる TCDVd および PSTVd の検出
M: 100bp マーカー, 1: PSTVd 感染葉, 2: TCDVd 感染葉, 3:
PSTVd・TCDVd 混合感染葉, 4: 無接種トマト, 5: 水

(2) マルチプレックス RT-PCR 法による TCDVd と PSTVd の同時検出

(平成 21 年 6 月 2 日, 特許出願 No 2009-133144)

マルチプレックス RT-PCR 法は 1 回の PCR 反応で複数の標的遺伝子を増幅する技術で, この方法により, TCDVd と PSTVd を同時に識別しながら検出することが可能です。

ア. プライマー

表-10 TCDVd/PSTVd マルチプレックス RT-PCR 用プライマー

プライマー名	用途	配列(5'-3')	位置
PS+TCV-R	Reverse primer	TCAGGTGTGAACCACAGGAA	18-37
PSTVd-F	Forward primer	TGGCAAAGGCGCGGTG	115-131
TCDVd-F	Forward primer	CTTCCTTTGCGGCCACT	206-223

イ. 反応液の組成

逆転写反応液組成

dNTPs (10 mM) (TOYOBO)	2 μ l
RT バッファー (TOYOBO)	1 μ l
RNase 阻害剤 (1 U) (TOYOBO)	0.5 μ l
逆転写酵素 RverTra Ace [®] (20 μ M) (TOYOBO)	0.5 μ l
マルチプレックスリバープライマーPS+TCV-R (20 μ M)	0.5 μ l
RNase フリー水	4.5 μ l
全 RNA (鑄型)	1 μ l
合計	10 μ l

PCR 反応液組成

KOD Dash バッファー (TOYOBO)	1 μ l
DNA ポリメラーゼ KOD Dash (TOYOBO)	0.1 μ l
dNTPs (2 mM) (TOYOBO)	1 μ l
マルチプレックスプライマーPSTVd-F (10 μ M)	0.1 μ l
マルチプレックスプライマーTCDVd-F (10 μ M)	0.1 μ l
水	6.7 μ l
逆転写 (RT) 産物 (鑄型 cDNA, プライマーPS+TCV-R 含む)	1 μ l
合計	10 μ l

ウ. 反応条件

本法においても、葉を注射針で突き刺すダイレクトティッシュ-RT-PCR 法の適用が可能です (注 2)。逆転写反応は、上記反応液を 42°C で 30 分行い、99°C、5 分で反応を停止した後、4°C で保存します。逆転写反応完了後、逆転写産物 1 μ l を用い、上記 PCR 反応液により PCR 法を行います。

PCR 反応は、98°C で 3 分の変性処理後、98°C で 45 秒、62°C で 10 秒、74°C で 45 秒を 1 サイクルとして 35 サイクル行い、最後に 74°C で 5 分間反応後、4°C で保存します。

(注 2) TCDVd と PSTVd が同一株に混合感染している場合、一方のバンドが濃くなる可能性があります。

エ. 判定

PCR 完了後、PCR 産物とローディング色素を 1 滴ずつ混合し、1% アガロースゲルに注入して 1 \times TBE (または TAE) バッファーを使用して電気泳動を行います。電気泳動後、UV 光を使用して色素を発光させ、増幅バンドの有無を確認します。

図-13 に示すように、TCDVd と PSTVd の混合では、TCDVd 及び PSTVd の双方のバンド (191bp および 281bp) が確認され (レーン 1)、PSTVd 単独では PSTVd に特異的バンドに (281bp) のみ

が（レーン 2）、TCDVd 単独では TCDVd に特異的なバンド（191bp）のみが（レーン 3）確認されます。一方、健全トマト（レーン 4）および水（レーン 5）では、そのいずれのバンドも確認されません。

このように、上記のマルチプレックスフォワードプライマーの TCDVd-F および PSTVd-F ならびにマルチプレックスリバースプライマー PS+TCV-R を用いたマルチプレックス RT-PCR により、TCDVd と PSTVd の存在を同時に、かつ明瞭に識別することができます。

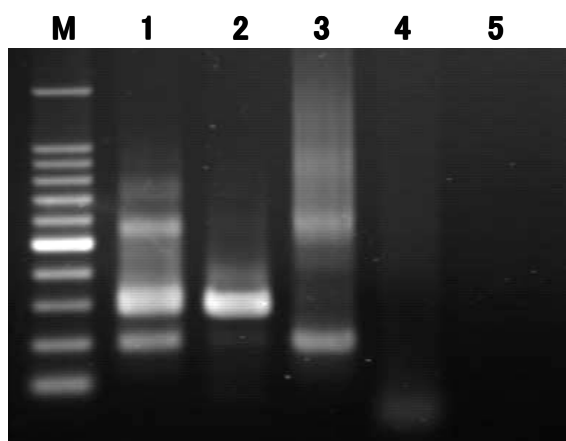


図-13 マルチプレックス RT-PCR 法による TCDVd と PSTVd の同時検出

M:100bp マーカー, 1:TCDVd・PSTVd 混合, 2:PSTVd 単独, 3:TCDVd 単独, 4:健全トマト, 5:水

(3) オプション: 特異的プライマーによる TCDVd の検出

TCDVd の感染のみを特異的に検出する方法（他のウイロイドは検出できません）をオプションとして例示しました。

TCDVd 特異的プライマーのケース

表-11 TCDVd 特異的プライマー

プライマー名	用途	配列(5'-3')	位置
T1F	Reverse primer	ACAACCTGAAGCTCCCGAGAA	272-291
T2R	Forward primer	CTGTTTCGCCTTCCACAAG	153-135

本プライマー対を用いた場合、TCDVd では 241bp 付近に特異的バンドが確認されますが、PSTVd は検出されません（データ省略）。PCR 反応は、98℃で 3 分の変性処理後、98℃で 45 秒、62℃で 10 秒、74℃で 45 秒を 1 サイクルとして 35 サイクル行い、最後に 74℃で 5 分間反応後、4℃で保存します。その後の判定はこれまでと同様に行います。

4. トマト栽培における TCDVd の防除対策

1) 発生時の具体的防除対策

- 栽培期間中は定期的に圃場の見回りを徹底し、発病株の早期発見に努めてください。疑わしい症状の株（病徴写真を参考）が見つければ、速やかに関係機関（注3）へ相談してください。

（注3）各都道府県の農業改良普及センター，病害虫防除所等

- 発病株は根こそぎ抜き取り，ビニール袋等に入れて施設外に持ち出し，地中深くに埋没処分するか焼却処分します（注4）。TCDVd の潜伏期間は通常2～3週間以上なので，病徴はなくても発病株に隣接する株はすでに感染している可能性があるため，できるだけ多く同時に処分してください。摘葉等による残渣は通路に放置せず同様に処分してください。

（注4）法令に基づき適切に実施してください。

- 収穫，摘葉用のハサミや刃物は，畝ごとなど一定の間隔で消毒してください。消毒液には有効塩素濃度0.5%以上の次亜塩素酸ナトリウム等を使用し，15秒以上浸漬してください（注5）。酸性薬品や消毒用アルコールは，このウイロイドに効果がほとんどありません。

（注5）これらの薬品は，強アルカリ性なので，皮膚や目に付着しないよう注意してください。作物への薬害を避けるため，消毒した刃物等は必ず水洗いしてください。

- 収穫，摘芽，摘葉，誘引などの管理作業には，使い捨て手袋を使用し，畝ごとなど一定の間隔で新しいものに取り替えてください。

- ウイロイド感染を拡げないように，器具類，カート（荷車）などの移動器具は施設内の決められた場所に割り当て，発生場所から無発生場所へ移動させないようにしてください。また，作業終了後に洗浄，消毒を行ってください。

- 受粉にマルハナバチを利用している場合は，ハチを介した施設内外での遠隔感染が発生する恐れがあります。直ちにハチの使用を中止し，ホルモン処理や振動による受粉方法に切り替えてください（注6）。

（注6）マルハナバチによるTCDVdの伝搬効率は，手やハサミによる汁液伝染と比べると大変低いですが，遠隔の飛火感染を引き起こします。

2) 発生後、改植時の具体的防除対策

- 栽培用の培地（椰子殻，ロックウール等）は，次亜塩素酸ナトリウムで消毒後，地域の法令，条例に基づいて適切に処分してください。
- 被害植物残渣はすべて，地中深くに埋没処分するか焼却処分してください（注4）。野外には放置しないでください。
- 改植時には，施設内の構造物，コンクリート，器具類やカート類をすべて十分に洗浄し，その後消毒を行ってください。植物体が付着した器具類は灌水チューブ類も含め改植時に更新することが望ましいですが，再利用する場合は洗浄，消毒してください。消毒には，有効塩素濃度0.5%以上の次亜塩素酸ナトリウム等で処理してください（注7）。

（注7）これらの薬品は，強アルカリ性なので，皮膚や目に付着しないよう注意してください。次亜塩素酸ナトリウムは鉄などの金属類を腐蝕させますので，処理後によく水洗してください。有効塩素濃度0.2%以上の次亜塩素酸ナトリウムでも消毒効果がありますが，その場合は一定時間（最低でも数分間以上が望ましい）処理してください。
- TCDVd は土壌伝染しないので，土耕栽培の場合，この病害を対象とした土壌消毒の必要はありませんが，念のため罹病残根が十分に腐熟してから改植してください（注8）。

（注8）腐熟期間の目安は，条件により異なりますが3ヶ月以上です。
- 新たに導入するトマト種子や苗は管理の徹底した信頼できる種苗会社から購入してください。育苗中は頻繁に見回り，苗での発生に注意してください。

3) ウイロイド病終息後の予防対策

- 定期的に圃場（施設）の見回りを徹底し，再発に注意してください。疑わしい株が見つかった場合は，速やかに関係機関（注3）に連絡してください。
- 圃場（施設）衛生や施設周辺の除草を徹底し，感染源になる可能性がありますので施設内に不必要な観葉植物類を栽培したり持ち込んだりしないようにしてください。
- 施設の出入りに際しては，手や靴の消毒・洗浄を行い，作業着は頻繁に洗濯を行うよう心がけてください。
- 技術指導者の方は，施設内外の作物，雑草感染のモニタリングを継続し，再発を監視するようにしてください。疑わしい株が見つかった場合は，直ちに病害診断を実施してください。

参考文献

- Behjatnia, S. A. A. et al. (1996) New *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato leaf curl geminivirus* strains from wild *Solanum* sp. *Phytopathology*, 86, 880-886.
- Singh, R. P. et al. (1999) *Tomato chlorotic dwarf viroid*: an evolutionary link in the origin of pospiviroids. *J. Gen. Virology*, 80, 2823-2828.
- Singh and Dilworth (2008) Tomato chlorotic dwarf viroid in the ornamental plant *Vinca minor* and its transmission through tomato seed. *Eur. J. Plant Pathol.*, 123, 111-116.
- Matsushita, Y. et al. (2008) First report of a *Tomato chlorotic dwarf viroid* disease on tomato plants in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.*, 74, 182-184.
- 松下陽介・津田新哉 (2008) トマト退緑萎縮病の発生とその特徴—本邦のトマトで発生した新規ウイロイド病—. *植物防疫*, 62, 461-464.
- Matsushita, Y. et al. (2009) Host range and properties of *Tomato chlorotic dwarf viroid*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 124, 349-352.
- Matsuura, S. et al. (2009) Transmission of *Tomato chlorotic dwarf viroid* by bumblebees (*Bombus ignitus*) in tomato plants. *Eur. J. Plant Pathol.*, 126, 111-115.
- Ling, K. S. et al. (2009) First report of *Tomato chlorotic dwarf viroid* in greenhouse tomatoes in Arizona. *Plant Dis.* 93, 1075.

研究事業名

農林水産省新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業

研究課題名「国内初のトマトウイロイド病に対応した診断・防除技術の新規の開発」

(平成 19～21 年)

実施体制 (参画研究者一覧)

中核機関 :

広島県立総合技術研究所農業技術センター 松浦昌平 (研究総括者)
清水佐知子

共同機関 :

(独) 農業・食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究センター
津田新哉
宇杉富雄

(独) 農業・食品産業技術総合研究機構花き研究所
松下陽介

協力機関 :

千葉県農林総合研究センター 小塚玲子
弘前大学農学部 佐野輝男 (研究アドバイザー)

おわりに

平成 18 年、広島県および千葉県のとまと栽培施設において発生したとまと退緑萎縮ウイルス (TCDVd) は、激しい二次感染を引き起こし、最終的に大きな経済的被害をもたらしました。本ウイルスが海外で初確認されたのは 1999 年で、防除対策に直結する十分な研究は、国内外を問わずほとんど蓄積されていませんでした。そのため、罹病株の埋没処分や施設内消毒などの封じ込め作戦は、どれも既知のウイルス病やウイルス病における知見を参考とした推測の域を出ないものでした。幸い、次作以降の再発は確認されず、撲滅に成功したことから、生産者を含め関係者一丸となって立てた対策は、結果的に概ね正しかったと思われます。

近年、種苗の国際間の貿易はますます多様化しています。また、一方で、病原体に対して脆弱な単一遺伝子の作物で構成される大規模生産システムが増加しています。このことから、今後もこのような新興の作物病原体による人為的？被害が発生する機会は増えるのではないかと危惧されます。

「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」で、本ウイルスのより簡便な診断手法を開発するとともに、病原体の保存性や伝搬様式などの化学、生物的諸性質そして有効な消毒薬などを明らかにすることができました。したがって、万一、再発した場合でも、明確な根拠を持って本病原に対処できるようになったものと考えています。とまとの安定生産のために、この対策マニュアルが多くの関係者の皆様に有効に活用して—もつとも、このマニュアルが本棚に眠っていることを祈るばかりですが—いただければ幸いです。

広島県立総合技術研究所農業技術センター
生産環境研究部
副主任研究員 松浦 昌平 (研究総括者)

トマト退緑萎縮病(TCDVd)総合対策マニュアル

2010年2月

編集・発行：広島県立総合技術研究所農業技術センター

〒739-0151 広島県東広島市八本松町原 6869

電話：082-429-0521(代表) FAX：082-429-0551