

ブドウえそ果病の研究 第3報

ブドウえそ果病罹病樹およびブドウハモグリダニからの ブドウえそ果ウイルスの検出

綿打享子・村上芳照・功刀幸博・浅利 覚¹

¹ 元果樹試験場

キーワード：ブドウ，ブドウえそ果病，RT-PCR，ブドウハモグリダニ

緒言

ブドウえそ果病は主に巨峰群品種に葉のモザイク症状や果粒のえそ斑を生じる病害で¹⁾，病原はブドウえそ果ウイルス (*Grapevine berry inner necrosis virus*，以下GINV) である^{2,3,4)}。本病は接木伝染のほか自然伝搬することが確認されていたが^{5,6)}，媒介者を特定するために実施した探索試験では，ブドウハモグリダニ *Colomerus vitis* を接種した‘巨峰’でブドウえそ果病の症状が再現されている⁷⁾。

ブドウに感染する数種のウイルスについてはRT-PCRによる遺伝子診断が可能になっている⁸⁾。そこで，本試験では，媒介者探索試験で再現されたモザイク症状がGINVによるものかどうか調査するため，RT-PCRによる検出を試みた。また，えそ果病罹病樹に寄生しているブドウハモグリダニについて，GINVの保毒状況を調査するとともに，本虫存在下の圃場における自然伝搬試験を実施したので報告する。

材料および方法

1. 媒介者探索試験株からのGINVの検出

1993～1997年にかけて媒介者探索試験を実

施した鉢植え‘巨峰’⁷⁾を供試した。供試株の概要については第1表のとおりである。1999年5月および2000年4月にこれらの鉢植え‘巨峰’について，葉のモザイク症状および節間の短縮の有無を観察するとともに，検定部位として葉柄を採取した。

RT-PCRは中畝・今田⁸⁾の方法をもとに行い，RT反応にはRNA PCR Kit (TaKaRa社)を，PCRにはAmplitaq Gold (パーキンエルマー社)を使用した。特異的プライマー (S:5-GATCTCCAGGGTGGAACT-3, AS 5-GGCATCAATAGCAAACGAGGC-3)は，Yoshikawaら⁹⁾の報告をもとに設計した。

2. ブドウハモグリダニからのGINVの検出

2001年4月，旧東山梨郡勝沼町 (現甲州市勝沼町) の現地圃場にGINVに感染している‘サマーブラック’4年生樹を1本定植した。‘サマーブラック’はGINVに感染しても節間の短縮が認められず，症状が軽微であることから，本試験に供試した。同年7月，本病未確認地域である旧北巨摩郡白州町 (現北杜市白州町) から，ブドウハモグリダニによる毛せん状の被害 (以下，“毛せん”) が認められる‘デラウエア’の葉を採取し，実体顕微鏡下で本虫の寄生を確認した。‘サマーブラック’へのブドウハモグリダニの接種は，‘デラウエア’の葉の裏側が‘サマーブラック’の副梢基部に接触するように巻き付け，パラフィルムで固定した。

接種約 2 ヶ月後の 9 月下旬, 3 ヶ月後の 10 月下旬に, “毛せん” が認められた ‘サマーブラック’ の葉を採取し, 実体顕微鏡下でブドウハモグリダニを採取した。また, 12 月下旬に, 実体顕微鏡下で当年枝の芽を分解し, 鱗片下に寄生しているブドウハモグリダニを採取した。ブドウハモグリダニは微小であるため, 検定は複数頭を 1 サンプルとして実施した。1 サンプルあたりの頭数は, 9 月は約 10~200 頭, 12 月は約 200 頭とし, 1.5 mL のマイクロチューブに集め, 検定時まで -80°C で凍結保存した。対照として, 本病未確認地域である旧北巨摩郡白州町 (現北杜市白州町) の ‘デラウエア’ から同時期に採取したブドウハモグリダニを供試した。

各マイクロチューブに ISOGEN (ニッポンジーン) を加え, 常法により抽出した全 RNA を試験に供試した。RT-PCR は植物と同条件とし, 特異的プライマーについては, 旧農林水産省果樹研究所ブドウ・カキ研究部病害研究室 (現独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所ブドウ・カキ研究領域病害研究室: 以下, 果樹研ブドウ・カキ研究部病害研) より分譲をうけたものを使用した。増幅が確認された断片については, 同研究室に依頼し塩基配列の解析を行った。

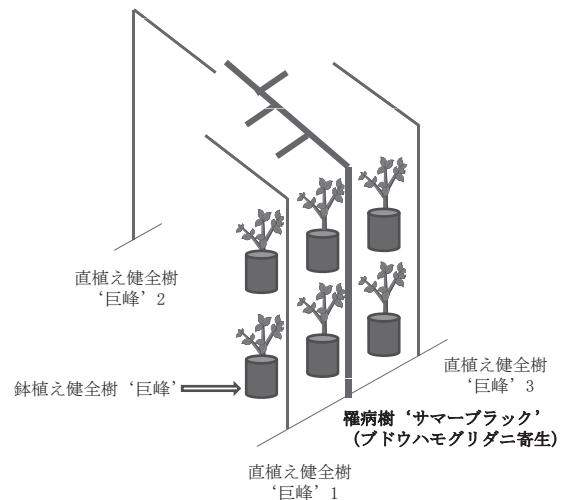
3. ブドウハモグリダニによるブドウえそ果病の自然伝搬

試験場所および罹病樹は前述の試験と同様とした。2002 年 4 月 17 日, ブドウハモグリダニの寄生が確認されている罹病樹 ‘サマーブラック’ 5 年生樹の隣接に, 無病の ‘巨峰’ 4 年生樹 3 本を定植した。無病樹の定植場所は, その後伸長した新梢が罹病樹と接触するような配置とした (第 1 図)。また, 罹病樹の棚下には, 無病の鉢植え ‘巨峰’ 3 年生樹を 6 鉢設置し, 暴露させた。暴露期間は 4 月 17 日~5 月 21 日, 5 月 21 日~6 月 21 日, 6 月 21 日~7 月 26 日, 7 月 26 日~8 月 21 日とし, 約 1 ヶ月ごとに山梨県果樹試験場内で管理している無病の鉢植え樹と交換した。暴露後の鉢は, 山梨県果樹試験場に持ち帰り, 継続して管理した。

定植樹および鉢植え樹について, ブドウハモグリダニの寄生状況を “毛せん” の有無により定期

的に調査した。また, 6 月 21 日には, ‘サマーブラック’ の棚下 50 cm に, 粘着剤 (商品名フジタングル) を塗布した塩化ビニール板 (15 cm×20 cm) を 4 カ所設置した。粘着トラップは概ね 1 ヶ月おきに交換し, 捕殺虫数を実体顕微鏡下で調査した。

罹病樹, 定植樹, 暴露した鉢植え樹については 2002 年 12 月に当年枝を採取し, GINV の感染の有無を調査した。定植樹については, ブドウハモグリダニが芽に寄生している部位の当年枝を 1~4 カ所調査した。特異的プライマーについては, 果樹研ブドウ・カキ研究部病害研より分譲をうけたものを使用した。



第 1 図 えそ果病伝搬試験の模式図

結果および考察

1. 媒介者探索試験株からの GINV の検出

1995~1997 年に実施した媒介者探索試験において, 葉のモザイク症状や新梢節間の短縮が再現された株はブドウハモグリダニを接種した 48 株のうち 4 株であった⁷⁾。1999, 2000 年の調査では, これらの株ではいずれもモザイク症状や新梢節間の短縮がみられ, GINV が検出された。また, ブドウハモグリダニを接種したが, 症状が認められていない 44 株のうち, 1 株から GINV が検出された。

その他の株については, 葉のモザイク症状は認められず, GINV も検出されなかった (第1表).

ブドウハモグリダニが本病の媒介虫であることを証明するためには, 再現された症状が GINV に由来することを示す必要がある. 本試験の結果から, ブドウハモグリダニ接種により再現されたモザイク症状は GINV によるものであることが明らかとなり, ブドウハモグリダニが本病の媒介虫であることが再確認された¹⁰⁾.

ブドウえそ果病の診断方法としては, 接木検定法と間接エライザ法が確立されている. 筆者らは, 間接エライザ法に使用する抗血清を作成するため, ブドウから草本植物 (*Chenopodium quinoa*) への汁液接種を行ったが, ウイルスを感染させることができず, 間接エライザ法の実施が困難であった.

一方, ブドウに感染するウイルスのうち, *Vitivirus* 属の *Grapevine virus A*, *Grapevine virus B*, *Closterovirus* 属の *Grapevine leafroll associated virus 3* については, RT-PCR による遺伝子診断が可能となり⁸⁾, エライザ法にかわる手法として注目されていたが, 本試験でも RT-PCR による GINV の遺伝子診断が可能となった. 遺伝子診断は, 本病の検定手法である接木検定と比較すると, ①指標樹の準備が不要, ②作業が簡便で短時間で結果が得られる, ③多数の検体を扱うことができる, ④葉や葉柄, 当年枝のいずれの部位も検定できる, といった利点がある. これらのことから, RT-PCR による遺伝子診断は, ブドウえそ果病の新たな診断法として有効であると考えられた.

2. ブドウハモグリダニからの GINV の検出

2001年7月, ブドウハモグリダニの寄生葉を, ‘サマーブラック’の副梢基部に巻き付け接種した結果, 接種6日後には‘サマーブラック’の成葉および副梢の葉にブドウハモグリダニの被害である“毛せん”が認められ, その後も“毛せん”の発生は続いた.

長田¹¹⁾は, 本虫の被害葉を6月に接種すると, 4~6日後に“毛せん”が形成され, その後は若葉へ移動することを確認しているが, 今回のブドウハモグリダニ接種についても, 同様の傾向がみら

れた.

本病罹病樹である‘サマーブラック’について, 9月に葉の“毛せん”内からブドウハモグリダニを採取したが, その生息密度は高く, また, 12月の当年枝の芽では, 鱗片と毛じの間にハモグリダニが集団で寄生している様子が確認された. 本病未確認地域から採取した‘デラウエア’についても, 寄生状況は同様であった.

罹病樹である‘サマーブラック’について, 9月および10月には葉から, 12月には当年枝の芽から採取したブドウハモグリダニについて GINV の保毒状況を調査した結果, 頭数の多少にかかわらず, いずれの時期も GINV のものと思われる増幅断片が検出された. また, 4°Cで8~10ヵ月間冷蔵保存していた当年枝の芽に寄生していたブドウハモグリダニについても, GINV のものと思われる増幅断片が検出された. 一方, えそ果病未確認地域の‘デラウエア’について, 罹病樹と同時期に採取したブドウハモグリダニでは, GINV のものと思われる増幅断片は検出されなかった (第2表, 第2図).

“毛せん”内に寄生していたブドウハモグリダニから検出された増幅断片について, 果樹研ブドウ・カキ研究部病害研に依頼し, 塩基配列を解析した結果, 増幅された断片は GINV のものであることが確認された (データ省略).

これらのことから, GINV を保持していないブドウハモグリダニは罹病樹に寄生することで GINV を獲得し, 伝搬に関与することが示された.

ウイルスを伝搬するサビダニの一種にチュウリップサビダニがある. チュウリップサビダニは *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) を伝搬し, 保毒虫から WSMV が検出されている¹²⁾. また, ニンニクモザイクウイルス (*Garlic mosaic virus*, GMV) についても, 幼虫および成虫が GMV を伝搬し, GMV を保持していることが確認されている¹³⁾.

今回の検定では, 成幼虫を区別せず複数頭を検定した. このため, 発育ステージにおける GINV の保毒状況や, ウイルスの保持期間などについては明らかにできなかった. 伝搬様式の詳細については, 今後の検討が必要である.

第1表 媒介者探索試験供試株の病徴とGINVの検出（1999, 2000年）

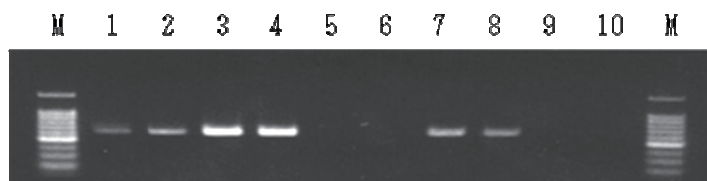
接種年	供試虫	株数	1999年		2000年	
			発症 ^z	GINV ^y	発症	GINV
1993	フタテンヒメヨコハ ^イ	2	0	0	0	0
	ハダ ^ニ 類	1	0	0	0	0
	ハダ ^ニ ・チャノキイロアサ ^{ミウマ}	2	0	0	0	0
	コナジラミ類	1	0	0	0	0
1994	ワタアブ ^{ラムシ}	7	0	0	0	0
	アブ ^{ラムシ} 類	4	0	0	0	0
	ブト ^{ウハモグ} リダ ^ニ	1	0	0	0	0
	ワタアブ ^{ラムシ} ・フタテンヒメヨコハ ^イ	1	0	0	0	0
	フタテンヒメヨコハ ^イ	3	0	0	0	0
	チャノキイロアサ ^{ミウマ}	2	0	0	0	0
	カンザ ^{ワハダ} ニ	2	0	0	0	0
1995	ワタアブ ^{ラムシ}	3	0	0	0	0
	ブト ^{ウハモグ} リダ ^ニ	19	1	1	1	2
	ブト ^{ウハモグ} リダ ^ニ	14	2	2	2	2
1996	ブト ^{ウハモグ} リダ ^ニ	14	1	1	1	1

^zモザイク症状，新梢節間の短縮が発症した株数^yRT-PCRによるGINV検出株数

第2表 時期別に採取したブドウハモグリダニからのGINVの検出（2001年）

採取時期	品種	採取部位	頭数	GINV ^z
9月下旬		葉（毛せん内）	100	+
10月下旬		〃	10	+
		〃	30	+
	サマーブラック ^y	〃	50	+
		〃	100	+
		〃	200	+
12月下旬		休眠芽	200	+
9月下旬		葉（毛せん内）	100	-
10月下旬	デラウエア ^x	〃	100	-
		〃	200	-
12月下旬		休眠芽	200	-

^zRT-PCRにより検出^yブドウえそ果病罹病樹^xブドウえそ果病未発生地域に植栽



第2図 ブドウハモグリダニからのGINVの検出

- 1, 2: えそ果病サマーブラック寄生個体 100頭 (9月採取)
- 3, 4: えそ果病サマーブラック寄生個体 200頭 (10月採取)
- 5, 6: 健全デラウエア寄生個体 100頭 (9月採取)
- 7: えそ果病サマーブラック葉柄 8: えそ果病巨峰葉柄
- 9: 健全デラウエア葉柄 10: 健全巨峰葉柄

第3表 ブドウハモグリダニによる被害拡大状況 (2002年)

調査月日	葉に形成された毛せん ^z					棚下の 粘着トラップ 捕殺虫数 (頭)
	サマーブラック ^y	隣接樹 ^y			棚下の 鉢植え巨峰	
		巨峰1	巨峰2	巨峰3		
5月21日	+	-	-	-	-	※ ^x
6月21日	+	-	-	-	※	※
7月26日	++	+	-	-	-	0
8月21日	++	+	+	+	-	0
9月15日	++	+	+	+	-	0

^z- なし + わずかに発生 ++ 発生多い

^yサマーブラックと隣接樹は棚上で新梢が接触、鉢植え樹は新梢の接触なし

^x未調査

第4表 えそ果病罹病樹から健全樹へのブドウハモグリダニの移動とえそ果病の伝搬(2002年)

試験区		設置期間 ^z	供試 ^y 株数	ハモグリダニ 寄生株数 ^x	えそ果病 発現株数	GINV 検出株数 ^w
植付け	罹病樹との 位置関係					
直植え	隣接	2002. 4/17~	3	3	2	3
鉢植え	棚下	2002. 4/17~5/21	6	0	0	0
鉢植え	棚下	2002. 6/21~7/26	6	0	0	1
鉢植え	棚下	2002. 7/26~8/21	6	0	0	0

^z2002. 5/21~6/21設置巨峰は枯死

^y供試品種は巨峰 (直植え樹は樹齢4年生、鉢植え樹は3年生)

^x毛せんの発生を調査

^w結果母枝を供試し、RT-PCRにより調査

3. ブドウハモグリダニによるブドウえそ果病の自然伝搬

ブドウハモグリダニが寄生している‘サマーブラック’では、展葉初期からブドウハモグリダニの被害である“毛せん”が認められたが、その程度は低かった。6月の調査でも、5月と同様に“毛せん”の発生程度は低かった。7月の調査では‘サマーブラック’の“毛せん”は増加し、隣接して定植した‘巨峰’1にもわずかに“毛せん”が認められた。8月の調査では、定植した‘巨峰’3樹全てに“毛せん”が認められた。被害が多い部位は、いずれの樹も‘サマーブラック’と新梢が接触する部位であり、‘巨峰’1および2では、これらの部位に葉のモザイク症状および新梢節間の短縮が認められた。棚下に設置した粘着トラップには虫体は捕捉されず、各時期に暴露した鉢植え樹にも、“毛せん”は見られなかった(第3表)

罹病樹、定植した‘巨峰’1~3、暴露試験に供試した鉢植えの‘巨峰’18樹について、12月に当年枝を採取し、GINVの感染の有無を調査した結果、罹病樹、定植した‘巨峰’1~3、6月21日~7月21日に暴露した鉢植え‘巨峰’1樹からGINVが検出された。5月21日~6月21日に暴露した株は枯死したため、調査ができなかった(第4表)。

ブドウハモグリダニは、風や歩行により移動し、被害が多くなる時期では、新梢上を歩行する様子がみられる¹¹⁾。今回の試験では、寄生樹の棚下に設置した粘着トラップには虫体が捕捉されず、各時期に暴露した鉢植え樹には、“毛せん”は見られなかった。“毛せん”がみられなかった原因は不明であるが、暴露試験を行った2002年は気象が高温少雨で経過したため、鉢植え樹の葉は硬く、ブドウハモグリダニの加害や増殖に好適な条件ではなかったと推察される。

一方、棚面で新梢が接触するような状況では、ブドウハモグリダニの被害は隣接樹まで拡大した。生育期後半になり、ブドウハモグリダニの密度が高まると、ブドウハモグリダニは主に歩行により健全樹に移動し、短期間のうちにGINVを伝搬すると考えられた。

ブドウえそ果病が発生した当初、健全な‘巨峰’を定植しても数年後に再度発病する事例が報告された^{5,6)}。本病の多発地域では‘甲斐路’や‘甲州’、‘デラウェア’などの無病徴品種がGINVに感染している割合が高く¹⁴⁾、ブドウハモグリダニの発生も多いことから⁷⁾、健全樹を定植しても、数年のうちに再度発病したと思われる。

ブドウハモグリダニに対しては、特に休眠期の石灰硫黄合剤による防除効果が高く¹¹⁾、生育期については、酸化フェンダスズ水和剤(2011年製造販売中止)、ピリダベン水和剤の有効性が確認されている(功刀ら、未発表)。ブドウハモグリダニが本病の媒介虫であることが確認されて以来、多発地域では石灰硫黄合剤によるブドウハモグリダニの休眠期防除が徹底され、それに伴い、本病の発生は減少している。しかし、無病徴感染樹の‘甲斐路’、‘甲州’、‘デラウェア’等の主要品種も多く存在しているため、今後もブドウハモグリダニの防除を徹底し、本病の発生に注意を払っていく必要がある。

摘要

ブドウえそ果病の媒介者探索試験において、ブドウハモグリダニ(*Colomerus vitis*)を接種した‘巨峰’にモザイク症状および新梢節間の短縮が再現された。この症状がブドウえそ果ウイルス(*Grapevine berry inner necrosis virus*, 以下GINV)によるものかどうか明らかにするため、RT-PCRによるGINVの検出を試みた。また、えそ果病罹病樹に寄生しているブドウハモグリダニについて、時期別にGINVの保毒状況を調査した。さらに、ブドウハモグリダニの移動とGINVの伝搬について知るため、圃場における自然伝搬試験を実施した。

1. ブドウハモグリダニを接種した48株のうち葉のモザイク症状および節間の短縮が再現された‘巨峰’4株からRT-PCRによりGINVが検出された。また、ブドウハモグリダニを接種したが、症状が再現されなかった44株のう

ち1株からGINVが検出された。他の虫を接種した株では、えそ果病の症状は再現されず、GINVも検出されなかった。

2. ブドウえそ果病罹病樹に寄生しているブドウハモグリダニについて、9月および10月の被害葉、12月の当年枝の芽からブドウハモグリダニを採取した。いずれの時期でもブドウハモグリダニからGINVが検出された。
3. ブドウハモグリダニの寄生が確認されているえそ果病罹病樹と、健全樹を隣接するように定植した。健全樹には、定植した年にブドウハモグリダニの被害が確認され、GINVが伝搬された。

本研究を進めるにあたり、RT-PCRによる罹病樹およびブドウハモグリダニからのGINV検出法についてご助言いただき、実験の一部を共同研究して下さった独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所品種育成・病害虫研究領域の中畝良二博士に心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 西島 隆・矢野 龍・寺井康夫・西尾 健 (1984). ブドウ巨峰系品種に発生するモザイク病(仮称). 日植病報 50:433-434
- 2) 柳瀬春夫(1985). ブドウより分離されたひも状ウイルスの純化. 日植病報 51:362
- 3) 柳瀬春夫・寺井康夫(1987). ブドウモザイク症状株から分離されたウイルスのブドウへの戻し接種および同症状の再現. 日植病報 53:423
- 4) 寺井康夫・柳瀬春夫(1992). ブドウモザイク症状株から分離されたウイルスの戻し接種による「巨峰」果実の病徴の再現およびブドウえそ果病への病名変更. 日植病報 58:617-618
- 5) 田中寛康(1984). ブドウ品種巨峰のモザイク症状について. 日植病報 50:133
- 6) 寺井康夫(1989). ブドウモザイク病の自然伝搬. 日植病報 55:536
- 7) 功刀幸博・浅利 覚・寺井康夫・新海 昭 (1997). ブドウハモグリダニによるブドウえそ果病の伝搬. 日植病報 63:504
- 8) 中畝良二・今田 準(1998). RT-PCRによるブドウウイルスの検出. 日植病報 64:427
- 9) Yoshikawa N, Iida H, Goto S, Magome H, Takahashi T, and Terai Y (1997). Grapevine berry inner necrosis, a new trichovirus: comparative studies with several known trichoviruses. Archives of Virology. 142: 1351-1363
- 10) 宮下享子・中畝良二・功刀幸博・浅利 覚・今田 準(1999). ブドウハモグリダニ接種によりブドウえそ果症状を発現した苗からのRT-PCRによるブドウえそ果ウイルスの検出. 日植病報 65:381
- 11) 長田 巖(1970). ブドウハモグリダニの生態について. 山梨果試研報. 38-51
- 12) SINHA, R. C., and Y. C. PALIWAL. (1976). Detection of Wheat Streak Mosaic Virus in Vector Mites with Fluorescent Antibodies. Phytopathology. 66:570-572
- 13) 山下一男(1992). チューリップサビダニ (*Aceria tulipae*)によるニンニクモザイクウイルスの伝搬. 日植病報 58:621
- 14) 功刀幸博・寺井康夫・柳瀬春夫(1991). 現地圃場におけるブドウモザイク病の感染状況. 日植病報 57:449

**Studies on the Grapevine Berry Inner Necrosis Virus Disease:3,
Detection of *Grapevine Berry Inner Necrosis Virus* from
Diseased Grapevines and the Grapevine Erineum Mite,
*Colomerus vitis***

Kyoko WATAUCHI, Yoshiteru MURAKAMI, Yukihiro KUNUGI and Satoru ASARI¹

Yamanashi Fruit Tree Experiment Station, 1204 Ezohara, Yamanashi-shi, 405-0043, Japan

¹Former Yamanashi Fruit Tree Experiment Station

Summary

Grapevine berry inner necrosis virus (GINV) was successfully transferred from infected grapevines to virus-free grapevines on transmission trials under controlled conditions. Various patterns of yellow discoloration on leaves and shorting internodes were observed in some of the grapevines. To certain the transmission of GINV, all grapevines were individually checked in RT-PCR. Grape erineum mites were collected from the naturally infected grapevine, and checked in RT-PCR. To search for the relationship between the moving of Grape erineum mite and the spread of GINV, transmission trial under the field condition was carried out.

1. Grape erineum mites were settled on 48 grapevines. GINV was detected in 4 grapevines, showing typical symptoms on the transmission trials using Grape erineum mites. GINV was detected in one of 44 grapevines which did not show symptoms. GINV was not detected in grapevines on transmission trials using the cotton aphid, *Arborida apicals*(Nawa), yellow tea thrips, *Scirtothrips dorsalis*.
2. GINV was detected from Grape erineum mites collected from infected grapevine on leaves in September and October and buds in December.
3. In the spring, virus-free grapevines were planted next to the infected grapevine which has been attacked by Grape erineum mites. Under these conditions, Grape erineum mites moved easily from the infected grapevine to virus-free grapevines and transmitted GINV in the same year.