

## 23. ポスピウイロイド

- ①ジャガイモやせいもウイロイド : *Potato spindle tuber viroid*
- ②トマト退緑萎縮ウイロイド : *Tomato chlorotic dwarf viroid*
- ③ *Columnea latent viroid*
- ④ *Pepper chat fruit viroid*
- ⑤ *Tomato apical stunt viroid*

※ ポスピウイロイドは、ジャガイモやせいもウイロイド (*Potato spindle tuberviroid*。以下、「PSTVd」という。)を含むポスピウイロイド科ポスピウイロイド属に属するウイロイドで、これまでに10種類が報告されており、ほとんどがナス科植物に感染し、世界的に大きな被害をもたらしている。ここでは、侵入調査の対象となっている *Columnea latent viroid* (以下、「CLVd」という。)、 *Pepper chat fruit viroid* (以下、「PCFVd」という。)、 トマト退緑萎縮ウイロイド (*Tomato chlorotic dwarf viroid*。以下、「TCDVd」という。)、 *Tomato apical stunt viroid* (以下、「TASVd」という。) 及びPSTVdについて記述する。

### ア 調査

#### 【調査対象植物】

- 1) 全種：トマト
- 2) PSTV d：馬鈴しょ

#### 【調査時期】

- 1) トマトでは、定植後1か月以降の栽培期間中に年1回以上調査を実施する。なお、気温25℃以上の条件で明確な病徴（葉の黄化・えそ、葉のねじれ、植物全体の矮化、果実の小型化など）が現れやすいため、できるだけ高温時が望ましい。
- 2) 馬鈴しょでは、萌芽後から収穫時の地上部を対象に栽培期間中に年1回以上調査を実施する。または収穫後の塊茎を対象に1回調査を実施する。なお、地上部を対象とした調査の場合、気温25℃以上の条件で明確な病徴（葉の黄化、小型化、葉の主脈や茎のえそ、植物全体の矮化など）が現れやすいため、できるだけ高温時が望ましい。

#### 【調査方法及び調査内容】

- 1) 調査は、上記の調査対象植物の中から選定した上で、調査地点を設定する。なお、調査地点は各都道府県内で偏りが生じないように留意する。
- 2) 設定した調査地点当たり10株を対象に、エの病徴写真を参考にしつつ、ポスピウイロイドの感染植物に生じる葉の症状（黄化・奇形など）、葉の主脈や茎のえそ症状、植物全体の矮化等がないか、塊茎の調査の場合は奇形、

亀裂等がないかを目視で調査する。

- 3) 感染が疑わしい場合は、発症部位や株全体又は塊茎、周囲の様子等をデジタルカメラ等で撮影した上で、試料を採取し遺伝子診断等を実施する。

#### 【調査に当たっての留意事項】

- 1) ポスピウイロイドによる症状は、生理障害等と見分けることが難しい。  
このため、通常の栽培環境下で平時と異なる発病状況であった場合に、ポスピウイロイドの感染を疑い、試料を採取し遺伝子診断等を実施する。すなわち、病徴写真と比較して、症状が似ている場合であっても、発生の状況が平時と同じ場合は積極的に試料を採取し遺伝子診断等を実施する必要はない。
- 2) 発見のポイント（病徴・標徴）
  - ア) トマト：葉の黄化、ねじれ、小型化、葉の主脈や茎のえそ、植物全体の矮化、果実の小型化（小さいまま成熟すること。）、奇形果等。
  - イ) 馬鈴しょ：葉の黄化、小型化、葉の主脈や茎のえそ、植物全体の矮化等。塊茎の奇形、二次肥大によるこぶ症、亀裂等。

#### イ 同定診断手法

ウイロイドは RNA のみで構成される病原体であるため、RT-PCR 等の遺伝子診断法のみが有効であり、ELISA 等抗原抗体反応による検出手法は利用できない。

採取又は送付された試料について、以下の手順 1) 又は 2) どちらかの検出法を用い検定を実施する。なお、初発の際は RT-PCR 検定後に塩基配列を確認する。

なお、試料として馬鈴しょの塊茎を用いる場合は、できる限り芽を含む表皮を採取する。

##### 1) 遺伝子診断（コンベンショナル RT-PCR 法）

ア) 採取したサンプルから RNA を抽出する。RNA 抽出は市販のキット等を用い、キット付属のプロトコルに従い実施する。

イ) 抽出した RNA を鋳型にして RT-PCR を表 1 のプライマーセットを用いて行う。RT-PCR は市販のキット等を用いて行う。

なお、反応液の組成及び反応条件はキット付属のプロトコルを参照する。

ウ) 電気泳動によって増幅産物のサイズが各ウイロイドの予定長の増幅サイズであるか確認する。

表1 ウイロイド検出用プライマー

ウイロイド 名前	塩基配列 (5' -3')	増幅 サイズ※	アニーリング 温度	参考文献
PSTVd, P3	CCGGATCCCTGAAGCGCTCCTCCGAGC	360	60°C	Behjatnia et al. (1996)
TCDVd, P4	TCGGATCCCCGGGAAACCTGGAGCG			
TASVd, TAV-R13	AAGGAAACCCGAAGAAAGGA	282	60°C	Matsushita et al. (2015)
TAV-F13	CCTCACGCGCTTTTCTCTA			
CLVd, CLV-R6	CTCTCCGCCAATCTTTTT	239	60°C	Matsushita et al. (2015)
CLV-F6	GGTCGGAGGATCTTCTGGAG			
PCFVd, PCFV-FW	CGGCCGGGAGTGAAGCTAC	330	60°C	Yanagisawa & Matsushita (2017)
PCFV-RE	TGGAAGAAAAAGCACCTCTG			

※増幅サイズは、分離株により数塩基の差が生じる。

## 2) 遺伝子診断 (リアルタイム RT-PCR)

ア) 1) のア) と同様に核酸抽出を行う。

### イ) SYBR Green法

表2に示すユニバーサルプライマー、PCFVd及びCLVd用プライマーを使用し、市販のキットを用いて検出する。SYBR Green法は、本調査対象のウイロイド5種を網羅的に検出するための検定法である。なお、標的となるウイロイドの種が判明している場合にはイ) SYBR Green法及びウ) TaqMan法のうち、個別のウイロイド特異的プライマー・プローブを用いたリアルタイムRT-PCRのみを行っても問題ない。

表2 SYBR Green法に用いるウイロイド検出用プライマー

ウイロイド	名前	塩基配列 (5' -3')	参考文献
一次検定用ユニバーサル プライマー*	6pospi-F	TCCTGTGGTTCACACCTGACC	Yanagisawa et al. (2017)
	6pospi-R	TTCAGTTGTTCCACCGGGTA	
CLVd	CLV-F 1	AAGAGCAAGAGCGGTCTCAG	Yanagisawa et al. (2017)
	CLV-R 3	AGGAAAGGAAACCCGAAGAA	
PCFVd	PCFV-F 8	CCCGAAGCCCGCTTAGG	Yanagisawa et al. (2017)
	6pospi-R	TTCAGTTGTTCCACCGGGTA	

\*ユニバーサルプライマーはCLVd及びPCFVd以外のPSTVd、TCDVd、TASVdを含む6種のウイロイドを検出可能

### ・判定

Yanagisawa et al. (2017)による SYBR Green法においては、PCR反応後に得られるAmplification Plot及びMelting Curveの2つの結果から、陽性・陰性の判定を行う。なお、文献に記載のメーカー以外の反応試薬を使

用した場合、下記の判定法に変更を要する場合がある。

- ユニバーサルプライマー（6Pospi-F/R）の場合

Amplification Plotにおいて、Ct値が38以内であり、かつ、Melting Curveのピーク値が82°Cから87°C以内である場合には、陽性と判断し、2つの条件のいずれかのみが該当する場合には陰性と判断する。またこの時、Melting Curveの各ウイロイドのピーク値は以下の値に近似するが、同種のウイロイドであっても多くの変異体が存在するため、Melting Curveのピーク値には一定の幅が生じる。これは、CLVd及びPCFVdの場合も同様である。

（各ウイロイドのMelting Curveのピーク値の例）

PSTVd：約86.5°C付近、TASVd：約83.5°C付近、TCDVd：約85°C付近

- CLVd特異的プライマー（CLVd-F1/R3）の場合

Amplification Plotにおいて、Ct値が38以内であり、かつMelting Curveのピーク値が約84.8°C付近である場合には、陽性と判断し、2つの条件のいずれかのみが該当する場合には、陰性と判断する。

- PCFVd特異的プライマー（PCFVd-8/6Pospi-R）の場合

Amplification Plotにおいて、Ct値が38以内であり、かつMelting Curveのピーク値が約84°C付近である場合には、陽性と判断し、2つの条件のいずれかのみが該当する場合には、陰性と判断する。

#### ウ) TaqMan法

SYBR Green法によるユニバーサルプライマーで陽性のサンプルは、以下の表3に示すPSTVd、TCDVd、TASVdの各特異的プライマー・プローブを使用し、ウイロイドの種を特定する。

表3 TaqMan法に用いるウイロイド種識別用プライマー・プローブ

ウイロイド	名前	塩基配列 (5'-3')	参考文献
PSTVd	PS-F1	GTGCCAGCGGYCGAC	Yanagisawa et al. (2017)
	SM-R1	TAGCCGAAGCGACAGCGC	
	P3R	[FAM]CCTGCGGGCGCGAGGAAGGA[TAMRA]	
TCDVd	TC-F3	CGGCAGGGAGCTTGTGGAA	Yanagisawa et al. (2017)
	TC-R2	GCCGAAGCGACAGCGCAAG	
	TC-P2	[FAM]CTTCCTTTGCGGCCACTCGAC[TAMRA]	

TASVd	TA-F3	GAGCTTCTCTCTGGAGACT	Yanagisawa et al. (2017)
	TA-R3	TCGCCCGGAGAGCAAC	
	329Pospi- -P2	[FAM] ACCCGGTGGAWACA[MGB]	

・判定

Yanagisawa et al. (2017)に記載の試薬を用いた場合、Threshold lineをオートからマニュアルに変更し、Threshold lineの値をいずれのウイロイドの場合にも0.128に設定した際、Ct値が38以下の検体を陽性とし、それ以外の場合は全て陰性とする。

なお、他メーカーの反応試薬を使用した場合、判定法に変更を要する場合がある。

ウ 試料採取及び送付時の注意事項

- 1) 試料を採取する宿主植物には、ポスピウイロイドが検出された場合を想定し、試料採取前に目印を付ける。
- 2) トマトについては葉を、馬鈴しょについては葉又は塊茎を採取する。
  - ア) 葉については症状を示す株1株あたり5枚の葉を採取する。ウイロイドは全身感染するため、上位葉であれば発病の有無にかかわらずどの部位でも問題ない。ただし、枯れたような葉は避ける。
  - イ) 馬鈴しょの塊茎については、外観の症状（奇形、二次肥大によるこぶ症、亀裂）があれば、複数個を採取する。なお、収穫直後の塊茎はウイロイド濃度が維持されているため、そのまま検定に使用できる。一方で冷蔵保存中又は保存後の塊茎においては、ウイロイドの濃度低下により偽陰性になるリスクがあるため、萌芽させることが望ましい。
- 3) 本ウイロイドは容易に接触伝搬するため、調査を実施した園地内に病徴を示す株が複数ある場合は、株ごとに手袋を交換し、せん定ばさみ等の器具類は、株ごとに有効塩素濃度1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液等に60秒以上浸漬することにより消毒して使用する。なお、酸性薬品や消毒用アルコールは、当該ウイロイドに対してほとんど効果がないため、使用しない。
- 4) 採取した試料は、試料の確認に必要な事項（採取月日、採取場所、写真等）を記録した試料採取票（別記様式）を添付した上で、ビニール袋に入れ、輸送するまでクーラーボックス等（4℃）に保管する。
- 5) 試料の採取部位、病徴及び採取票に記録した内容等は、調査野帳に記録する。
- 6) 採取した試料は、散逸しないように厳重に梱包し、保冷剤を入れて低温に保った保冷箱等に収容して冷温のまま送付する。

## エ 病徴写真等

### 1) 宿主植物における病徴

#### ア) トマト



図1、2、3 CLVdに感染したトマト（防疫指針委託事業成果）  
上位葉の小型化、黄化、退緑



図4 CLVdに感染したトマト（植物防疫所原図）  
上位葉の小型化



図5、6、7、8 PCFVdに感染したトマト（防疫指針委託事業成果）  
上位葉の小型化、黄化



図9、10 PCFVdに感染したトマト（植物防疫所原図）  
上位葉の小型化、巻葉、退緑



図 11、12 PCFVd に感染したトマト（植物防疫所原図）  
退緑、えそを伴う葉巻症状



図 13 左：PCFVd に感染したトマト 右：健全なトマト（植物防疫所原図）  
上位葉の小型化、植物全体の萎縮



図 14、15 TCDVd に感染したトマト（防疫指針委託事業成果）  
 上位葉の退緑、黄化、えそを伴う葉巻症状、植物全体の萎縮症状



図 16 左、中： TCDVd に感染したトマト 右：健全なトマト（植物防疫所原図）  
 株の萎縮、葉の黄化、奇形



図 17、18、19 TASVd に感染したトマト（防疫指針委託事業成果）  
葉の奇形、黄化、えそ



図20 TASVdに感染したトマト（植物防疫所原図）  
葉の奇形、退緑



図 21、22 PSTVd に感染したトマト（防疫指針委託事業成果）  
巻葉、葉の黄化、縮葉（葉がちぢれること）



図 23 PSTVd に感染したトマト（植物防疫所原図）  
巻葉、葉の黄化、縮葉（葉がちぢれること）



図 24、25 PSTVd に感染したトマト（植物防疫所原図）  
 上位葉の縮葉（葉がちぢれること）



図 26 PSTVd に感染したトマト（植物防疫所原図）  
 卷葉、縮葉（葉がちぢれること）、えそ、退緑



図 27 PSTVd に感染したトマト (植物防疫所原図)  
縮葉 (葉がちぢれること) 及び葉の主脈のえそ



図 28 左 : PSTVd に感染したトマト 右 : 健全なトマト (植物防疫所原図)  
株の萎縮、巻葉、縮葉 (葉がちぢれること)、えそ、退緑



図 29 PSTVd に感染したトマト（植物防疫所原図）  
 卷葉、縮葉（葉がちぢれること）、えそ、退緑

イ) 馬鈴しょ



図 30、31 PSTVd に感染した馬鈴しょ（植物防疫所原図）  
 上位葉の小型化、卷葉、退緑、縮葉



図 32 PSTVd に感染した馬鈴しょ (植物防疫所原図)  
巻葉、退緑、えそ



図 33 PSTVd に感染した馬鈴しょ (植物防疫所原図)  
塊茎の小型化、奇形



図 34 左：健全な馬鈴しょ 右： PSTVd に感染した馬鈴しょ（植物防疫所原図）  
塊茎の奇形、こぶ症、亀裂



図 35 左：健全な馬鈴しょ 右： PSTVd に感染した馬鈴しょ（植物防疫所原図）  
塊茎の細長化



図 36 左：健全な馬鈴しょ 右： PSTVd に感染した馬鈴しょ（植物防疫所原図）  
塊茎の細長化

## オ 対象病害の解説

学名：ポスピウイルス (*pospiviroid*) 属

*Columnnea latent viroid* (CLVd), *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd),  
*Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd), *Tomato apical stunt viroid*  
(TASVd), *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd)

英名、和名等：TCDVd (トマト退緑萎縮ウイルス)

PSTVd (ジャガイモやせいもウイルス)

その他については和名なし

分布及び宿主植物：

(植物防疫法施行規則別表2-2 (一部改正 [令和四年三月農林水産省令・一八号] 版) から抜粋)

	発生国	宿主植物 * (種子伝染が知られているもの)
PSTVd	インド、中華人民共和国、パキスタン、バングラデシュ、アフガニスタン、イスラエル、イラン、トルコ、イタリア、ウクライナ、英国、オーストリア、オランダ、カザフスタン、ギリシャ、クロアチア、スペイン、スロベニア、チェコ、ドイツ、フランス、ベラルーシ、ベルギー、ポーランド、マルタ、モンテネグロ、ロシア、ウガンダ、エジプト、ガーナ、ケニア、ナイジェリア、アメリカ合衆国、コスタリカ、ミニカ共和国、ベネズエラ、ペルー、メキシコ、オーストラリア、ニュージーランド	アボカド、いぬほおずき、おおせんなり、しまほおずき、せんなりほおずき、たまさんご、つるはななす、とうがらし、トマト、はりなすび、ばれいしよ、ペピーノ、カリブラコア属、ケストルム属、ダリア属、ブルグマンシア属及びペチュニア属等 * (とうがらし、トマト、はりなすび、ばれいしよ及びペチュニア属)
CLVd	イタリア、英国、デンマーク、ドイツ、フランス、マリ、アメリカ合衆国、カナダ、コスタリカ	グロキシニア(シーマニア)・ギムノストマ、グロキシニア(シーマニア)・ネマタントデス、グロキシニア(シーマニア)・ブルプラスケンス、コルムネア・エリトロファエア、ソラム・ストラモニーフォルム、とうがらし、トマト、ネマタンツス・ウエッツティニ、ブルンフェルシア・ウンドウラタ * (とうがらし及びトマト)
TASVd	インドネシア、イスラエル、イタリア、オーストリア、オランダ、クロアチア、スロベニア、ドイツ、フィンランド、フランス、ベルギー、ポーランド、ガーナ、チュニジア、セネガル、コートジボワール	たまさんご、つるはななす、トマト、ケストルム属及びブルグマンシア属 * (トマト)
TCDVd	インド、英国、スロベニア、チェコ、フィンランド、フランス、アメリカ合衆国、メキシコ、ハワイ諸島	とべら、トマト、なす、ひめつるにちにちそう、カリブラコア属、パーベナ属及びペチュニア属 * (トマト、なす及びペチュニア属)
PCFVd	タイ、オランダ、カナダ	とうがらし及びトマト * (とうがらし、トマト)

一部改正[令和四年三月農林水産省令・一八号]版

分散：

### 1) 自然分散

接触 (機械的) 伝搬、種子伝搬、栄養繁殖体による伝搬、花粉伝搬及びベクターによる伝搬が知られている。アブラムシ類 (ジャガイモヒゲナガアブラムシ (*Macrosiphum euphorbiae*)、モモアカアブラムシ (*Myzus persicae*)) による虫媒伝搬はジャガイモ葉巻ウイルス (*Potato leafroll virus*) や *Velvet tobacco mottle virus* と混合感染した場合に生じる。また、トマトの授粉に利用されるクロマルハナバチにより伝搬する。

### 2) 人為分散

接触（機械的）伝搬、接木伝搬、種子伝搬、栄養繁殖体による伝搬及び花粉伝搬が知られている。ハサミ、ナイフ等の器具、人の手などを介して栽培作業により感染拡大する。

### 3) 種子伝染

CLVd：トマト、とうがらしで種子伝染が確認されている。

PCFVd：トマト、とうがらしで種子伝染が確認されている。

PSTVd：トマト、とうがらし、ペチュニア等で種子伝染が確認されている。

TCDVd：ペチュニアで種子伝染が確認されている。トマトでの種子伝染は議論が分かれている。

TASVd：トマトで種子伝染が確認されている。

防除：本ウイロイドの防除には感染していない植物の作出及び増殖、ほ場の衛生管理が有効である。感染が確認された植物は、早期に根こそぎ抜き取り、栽培中の他の植物と接触しないようビニール袋等に入れてほ場外に持ち出し、地中深く埋没又は焼却する。薬剤による有効な防除方法は報告されていない。道具類の消毒には、有効塩素濃度 0.5%以上の次亜塩素酸ナトリウムに15秒以上浸漬することが有効である。

### <参考文献>

Behjatnia et al. (1996) New Potato Spindle Tuber Viroid and Tomato Leaf Curl Geminivirus Strains from a Wild *Solanum* sp. *Molecular Plant Pathology* 86(8):880-886.

花田薫 (2021) 世界最小の植物病原であるウイロイドの特性と保存法. 微生物遺伝資源利用マニュアル (44) 農業・食品産業技術総合研究機構遺伝資源研究センター

広島県立総合技術研究所農業技術センター (2010) トマト退緑萎縮病 (TCDVd) 総合対策マニュアル

蚊爪竜一・大石盛伝・本蔵洋一 (2018) .ペチュニア種子からの Tomato chlorotic dwarf viroid 検出に関する検討. 植物防疫所調査研究報告 (植防研報) 54: 89-93.

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業研究センター (2021)

令和2年度 国際基準を踏まえた防疫指針策定のための調査委託事業報告書 (令和3年2月8日)

Matsushita et al. (2015). Host ranges of Potato spindle tuber viroid, Tomato chlorotic dwarf viroid, Tomato apical stunt viroid, and Columnea latent viroid in horticultural plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 141(1) 193 - 197.

- Matsushita・Tsuda (2016). Seed transmission of potato spindle tuber viroid, tomato chlorotic dwarf viroid, tomato apical stunt viroid, and Columnea latent viroid in horticultural plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 145(4):1007-1011.
- 農林水産省(2013)Columnea latent viroid (CLVd) に関する病害虫リスクアナリシス報告書 (2021改訂)
- 農林水産省(2013)Pepper chat fruit viroid に関する病害虫リスクアナリシス報告書(2015改訂)
- 農林水産省(2013)Potato spindle tuber viroid (ジャガイモやせいもウイロイド) に関する病害虫リスクアナリシス報告書 (2021改訂)
- 農林水産省(2013)Tomato apical stunt viroid (TASVd) に関する病害虫リスクアナリシス報告書(2015改訂)
- 農林水産省(2013)Tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd) (トマト退緑萎縮ウイロイド) に関する病害虫リスクアナリシス報告書(2015改訂)
- Yanagisawa et al. (2017). Development of a comprehensive detection and identification molecular based system for eight pospiviroids. *Eur. J. Plant Pathol.* 149(1):11-23.
- Yanagisawa・Matsushita (2017). Host ranges and seed transmission of Tomato planta macho viroid and Pepper chat fruit viroid. *Eur. J. Plant Pathol.* 149(1):211-217.