



Title	北海道に発生する carrot motley dwarf に関する病原学的研究
Author(s)	吉田, 直人
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14812号
Issue Date	2022-03-24
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k14812">https://doi.org/10.14943/doctoral.k14812</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/85560">https://hdl.handle.net/2115/85560</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Yoshida_Naoto.pdf



北海道に発生する carrot motley dwarf に関する病原学的研究

Etiological studies on carrot motley dwarf in Hokkaido, Japan

北海道大学 大学院農学院

生産フロンティアコース 博士後期課程

吉田 直人

－目 次－

1. 諸論	1
2. 本研究の目的	17
3. 第 1 章 北海道に発生する CMD の特徴: 症状および病原体の地理的分布	18
3.1. 背景	
3.2. 材料と方法	
3.3. 結果	
3.4. 考察	
4. 第 2 章 CMD に関与するウイルスおよび RNA の遺伝学的特性に関わる解析	33
4.1. 背景	
4.2. 材料と方法	
4.3. 結果	
4.3.1. CtRLV の遺伝学的特性	
4.3.2. CMoV の遺伝学的特性	
4.3.3. CtRLVaRNA の遺伝学的特性	
4.3.4. CaTV1 の分子系統学解析	
4.4. 考察	
5. 第 3 章 CMD に関与するウイルスおよび RNA の病原性に関わる解析	50
5.1. 背景	
5.2. 材料と方法	
5.3. 結果	
5.3.1. 宿主範囲	
5.3.2. 単独・混合感染時の症状の比較	
5.3.3. ニンジンの生育への影響	

5.4.4. 単独・混合感染時の病原体量の比較

5.4. 考察

6. 総合考察	81
摘要	87
Summary	89
引用文献	92
謝辞	104

## 略語一覽

CP	coat protein
CMD	carrot motley dwarf
CMoMV	carrot mottle mimic virus
CMoV	carrot mottle virus
CtRLV	carrot red leaf virus
CtRLVaRNA	CtRLV-associated RNA
MP	movement protein
ORF	open reading frame
RdRP	RNA-dependent RNA polymerase
RNP	Ribonucleoprotein
tlaRNA	Tombusvirus-like associated RNA

## 1. 緒論

### 1.1. Carrot motley dwarf (CMD)

Carrot motley dwarf (CMD) は、ニンジン (*Daucus carota* subsp. *sativus*) の生産における最も重要な病害の一つである。罹病すると葉に斑紋を伴う黄化や赤化が生じて生育が不良となり、根重および種子量の著しい低下を引き起こす (Costa *et al.*, 1975; Howell and Mink, 1979; Stubbs, 1948; Watson, 1960; Watson and Serjeant, 1964) . 本病は 1940 年代にオーストラリアのメルボルンで初めて報告され、ニンジンフタオアブラムシ (*Cavariella aegopodii*, willow-carrot aphid) によって媒介されるウイルス病であることが明らかとなった (Stubbs, 1948) . 現在, 欧州 (Menzel *et al.*, 2008; Morton *et al.*, 2003; Watson, 1960) , 北米 (Howell and Mink, 1974; Krass and Schlegel, 1974; Murant, 1975; Stubbs, 1956) , 南米 (Costa *et al.*, 1975) , オセアニア (Stubbs, 1948; Tang *et al.*, 2009; Waterhouse, 1985) , 南アフリカ (Gungoosingh-Bunwaree *et al.*, 2009) および日本で報告されており (Ohki *et al.*, 1979; 小室・山下, 1956) , これらの国に限らず世界的に広く分布すると考えられている (Koike *et al.*, 2002) . CMD はニンジンの他, パセリ (*Petroselinum crispum*) においても確認されている (Frowd and Tomlinson, 1972; Meunier and Verhoyen, 1987; Naseem *et al.*, 2014) .

本病の病原体は当初, 永続伝搬性の“carrot motley dwarf virus”とされた (Stubbs, 1952) . その後病原体の性状に関わる解析がなされ, アブラムシによって媒介されるウイルスの他, 汁液接種が可能な別種ウイルスの存在が明らかとなり, それぞれ carrot red leaf virus (CtRLV, ニンジン黄化ウイルス) および carrot mottle virus (CMoV, ニンジン斑紋ウイルス) と名付けられた (Watson and Serjeant, 1964) . 病名の‘motley’は, 特有の斑紋症状を示すことに加え, 複数の病原体が関与することも包括することができる (Watson *et al.*, 1964) . このため, CMD は CtRLV と CMoV の混合感染によって引き起こされる, 葉の斑紋症状および萎縮症状を示す病名として用いられてきた.

本病の病原体は上記の 2 種と考えられていたが、分子生物学的な解析手法の発展により、さらに多くの病原体が関与することが明らかとなった。例えば、オーストラリアにおいては、CMoV と同様の遺伝子構造を有する新規の *Umbravirus* 属ウイルスが報告され、carrot mottle mimic virus (CMoMV, ニンジン斑紋ミミックウイルス) と名付けられた (Gibbs *et al.*, 1996b)。1998 年には米国カリフォルニア州において、CMD に関わる新規ウイルス様の病原体が発見された。同 RNA 種は先に報告のあった beet western yellows virus-associated RNA (ST9aRNA; Chin *et al.*, 1993; Falk and Duffus., 1984) と類似することから、carrot red leaf virus-associated RNA (CtRLVaRNA, ニンジン黄化ウイルス随伴 RNA) と命名された (Watson *et al.*, 1998)。さらに近年では CMoV および CMoMV に随伴するサテライト RNA が見出されている (Menzel *et al.*, 2009b)。

本病の媒介者はニンジンフタオアブラムシとされるが、同種に加え、ニンジンアブラムシ (*Semiaphis heraclei*; Ohki *et al.*, 1979; 小室・山下, 1956) やモモアカアブラムシ (*Myzus persicae*; Naseem *et al.*, 2016) によって媒介されるウイルスも確認されている。後者のニンジンフタオアブラムシおよびモモアカアブラムシが媒介するパセリ由来のウイルスについては、分子系統学的にニンジン由来英国株と遠縁であることが示されている (Naseem *et al.*, 2016)。

以上、CMD は 3 種のウイルスまたはウイルス様 RNA, すなわち CtRLV, CMoV または CMoMV および CtRLVaRNA が複合的に感染し、葉の斑紋症状をはじめとする多様な症状を引き起こすウイルス病である。CMD に関与するウイルスおよび RNA は CtRLV の存在下でのみ、アブラムシによって永続的に媒介される。この観点から、本病はその病原体として CtRLV が核となる、ウイルスおよび RNA による複合感染症と定義することができる。

## 1.2. Carrot red leaf virus (CtRLV)

### 1.2.1. 分類

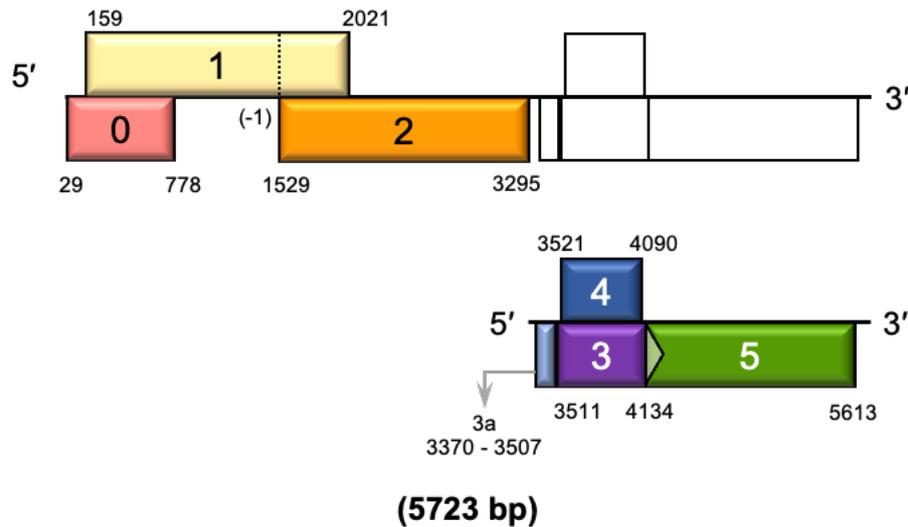
CtRLV はソレモウイルス科 (*Solemoviridae*) のポレロウイルス属 (*Polerovirus*) に属する (Huang *et al.*, 2005; Sömera *et al.*, 2021; Walker *et al.*, 2021; Waterhouse and Murrant, 1981) . 師部組織に局在し (Murrant and Roberts, 1979; Ohki *et al.*, 1979) , セリ科植物に寄生性を有するニンジンフタオアブラムシによって永続的に媒介される (Elnagar and Murrant, 1978a; Waterhouse and Murrant, 1983) . 粒子は正 20 面体で直径 22–25 nm とされるが (Murrant and Roberts, 1979; Waterhouse and Murrant, 1981) , その他にも約 27 nm (Ohki *et al.*, 1979) や約 30 nm (Watson *et al.*, 1964) とする記載もある.

ポレロウイルス属は, 師部組織に局在する特徴を持ち, 現在ジャガイモ葉巻ウイルス (*Potato leafroll virus*, PLRV) をはじめとする 21 種が認められている. これまで, ルテオウイルス属 (*Luteovirus*) およびエナモウイルス属 (*Enamovirus*) とともにルテオウイルス科 (*Luteoviridae*) に分類されていたが, RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP) の機能ドメインに基づく再分類が検討された結果, ルテオウイルス属はトンプスウイルス科 (*Tombusviridae*) に, ポレロウイルス属およびエナモウイルス属はソレモウイルス科へ再編された (Scheets *et al.*, 2020) . これにより, 現在ポレロウイルス属は, エナモウイルス属, ポレモウイルス属 (*Polemovirus*) およびソベモウイルス属 (*Sobemovirus*) の 3 属と共に新たにソレモウイルス科として登録されている.

### 1.2.2. 遺伝学的特性

CtRLV のタイプ株 UK-1 (英国分離株) は全長 5,723 塩基の一本鎖 RNA (+) をゲノムとし (Huang *et al.*, 2005; GenBank accession no. AY695933) , ORF0-ORF5 および ORF3a の合計 7 つの ORF を持つ (Fig. 1) . ORF0, ORF1 および ORF2 はゲノミック RNA から, ORF3a, 3, 4 および 5 はサブゲノミック RNA から翻訳される. ORF2 は ORF1 下流に生じる -1 フレー

ムシフトにより ORF1-2 融合タンパク質として翻訳される。ORF3 と ORF4 はその領域の大半を重複しており,異なるフレームからタンパク質が合成される。ORF5 は ORF3 の終始コードンの読み過ごしにより ORF3 との融合タンパク質として翻訳される。



**Figure 1** Genomic organisation of carrot red leaf virus isolate UK-1 (GenBank accession no. AY695933). The genomic RNA has three ORFs associated with replication (ORF1 and ORF2) and symptomatology (ORF0: RNA silencing suppressor). The subgenomic RNA encodes four proteins associated with virion assembly (e.g. ORF3), movement (e.g. ORF4), aphid transmission (ORF5), and symptomatology (ORF5).

ORF0 はサイレンシングサプレッサー (28.6 kDa) , ORF1 (68.2 kDa) はプロテアーゼおよび VPg をコードする。ORF2 は ORF1 の融合タンパクとして翻訳され (ORF1-2; 116.9 kDa) RNA 複製に関わるタンパク質をコードする。ORF3 は外被タンパク質 (CP; 23.0 kDa) , ORF3a (5.0 kDa) および ORF4 (21.3 kDa) は移行に関わるタンパク質 (MP) をコードしている。ORF5 は ORF3 との融合タンパクとして翻訳され (77.2 kDa) , アブラムシ媒介や粒子の安定性の他, 全身移行に関与する (Peter *et al.*, 2009) .

### 1.2.3. 生物学的特性

本ウイルスがニンジンに引き起こす代表的な症状は、葉の赤化・黄化ならびに萎縮である。CtRLV の単独感染時の生育への影響は比較的小さいが、多くの場合は CMoV が随伴することによる CMD として発生し、この場合は激しい萎縮症状や斑紋を伴う強い赤化・黄化が生じるとされる (Murant, 1974; Waterhouse and Murant, 1982) 。CtRLV の宿主範囲は一部のセリ科植物に限られており、ニンジン、チャービル (*Anthriscus cerefolium*) , コリアンダー (*Coriandrum sativum*) などに感染する (Stubbs, 1948; Watson *et al.*, 1964; Watson and Falk, 1994) 。シャク (cow parsley; *Anthriscus sylvestris*) およびオオハナウド (cow parsnip; *Heracleum lanatum*) も CtRLV に対して感受性を持つことが確認されており (Watson *et al.*, 1964) , Stubbs (1948) は“carrot motley dwarf virus”がアジョワン (*Ajwain, Trachyspermum ammi*) , ドクニンジン (*Conium, Conium maculatum*) および *Apium austral* に感染することを報告している。

本ウイルスは汁液接種では感染しないが、接ぎ木により感染する (Stubbs, 1948) 。種子伝染の有無についても言及されているが、明瞭な証拠は残されていない (Lee *et al.*, 2004; Oka *et al.*, 2014; Watson and Serjeant, 1964; Watson *et al.*, 1964) 。

### 1.2.4. ウイルス系統

ニンジンから分離される CtRLV はパセリには感染しないが、パセリにおいては CtRLV に類似するウイルスが確認されている (Frowd and Tomlinson, 1972; Meunier and Verhoyen, 1987; Naseem *et al.*, 2014) 。本州で報告されている CtRLV もパセリ、ミツバ (*Cryptotaenia canadensis* subsp. *japonica*) およびセロリ (*Apium graveolens*) に対する感染性を持つことから (Ohki *et al.*, 1979; 藤永ら, 2010) , CtRLV には寄生性の異なる複数の系統が存在すると考えられている。

### 1.3. Carrot mottle virus (CMoV) / Carrot mottle mimic virus (CMoMV)

#### 1.3.1. 分類

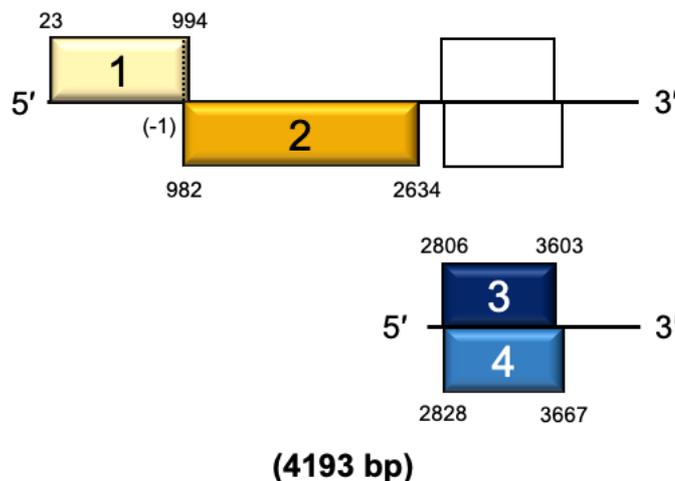
CMoV および CMoMV は共にアンブラウイルス属 (*Umbravirus*) に属する (Gibbs *et al.*, 1996a, 1996b; Menzel *et al.*, 2008; Watson *et al.*, 1964) . 同属は近年トンプスウイルス科のカルバスウイルス亜科 (*Calvusvirinae*) に再編された (Walker *et al.*, 2020) . アンブラウイルス属ウイルスは自身の CP を持たず, 自然条件下においては常にポレロウイルス属またはエナモウイルス属と共存し, これらに粒子化されることでアブラムシにより媒介されるようになる.

#### 1.3.2. 遺伝学的特性

CMoV のタイプ株 Weddel (ドイツ分離株) のゲノムの全長は 4,193 塩基 (Menzel *et al.*, 2008; GenBank accession no. FJ188473) , CMoMV のタイプ株 Australia (オーストラリア分離株) は全長 4,201 塩基である (Gibbs *et al.*, 1996; GenBank accession no. U57305) . 一本鎖 RNA (+) をゲノムとし, いずれも ORF1-ORF4 の合計 4 つの ORF を持つ (Fig. 2) . ORF1 および ORF2 はゲノミック RNA から, ORF3 および 4 はサブゲノミック RNA より翻訳される. ORF2 は ORF1 の下流より -1 フレームシフトにより, 融合タンパク質として翻訳される. ORF3 と ORF4 はコード領域の大半を重複しており, 異なるフレームからタンパク質が合成される. CMoV と CMoMV の ORF1-4 の推定アミノ酸配列の相同性は低く, ORF1 は 33.7–34.5%, ORF2 は 68.1–68.3%, ORF3 は 33.5–34.6%, ORF4 は 57.1–58.2% である (Menzel *et al.*, 2008) .

CMoV または CMoMV の ORF1 (34.2 kDa; 37.0 kDa) および ORF2 は, RNA 複製に関わるタンパク質をコードする. ORF2 は開始コドンを持たず, ORF1 との融合タンパク質として翻訳される (95.9 kDa; 98.2kDa) . ORF3 (28.9 kDa; 28.7 kDa) はウイルスゲノムとともにリボヌクレオタンパク質複合体 (Ribonucleoprotein, RNP) を構成し, 植物体における維管束組織

を介した長距離移行や RNA の安定化に寄与する (Ryabov *et al.*, 1999; Ryabov *et al.*, 2001b; Taliansky *et al.*, 2003) . また核移行シグナルおよび核外抛出シグナルを有し, 核小体のフィブリラリンと相互作用する (Taliansky *et al.*, 2003) . ORF4 にコードされるタンパク質はクモウイルス属 (*Cucumovirus*) の 3a タンパク質と類似性を持ち, 細胞間移行に関わる (30.8 kDa; 28.7 kDa; Ryabov *et al.*, 1998) .



**Figure 2** Genomic organisation of carrot mottle virus isolate Weddel (GenBank accession no. FJ188473). The genomic RNA has two ORFs associated with replication (ORF1 and ORF2). The subgenomic RNA also encodes two proteins associated with cell-to-cell (ORF3) and long-distance movement (ORF4) as well as RNA stability (ORF3).

### 1.3.3. 生物学的特性

アンブラウイルス属ウイルスは自身の CP を持たず, 混合感染するポレロウイルス属またはエナモウイルス属ウイルスに粒子化および媒介を依存する. CMD においても CMoV は CtRLV との共存下でのみアブラムシにより永続的に媒介されるようになる (Elnagar and Murrant, 1978a; Watson *et al.*, 1964; Waterhouse and Murrant, 1983) . CMoV の宿主範囲は CtRLV

とは異なり, *Nicotiana clevelandii* および *N. tabacum* に CtRLV の不在下で単独で全身感染し, キノア (*Chenopodium quinoa*) およびインゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) には局所病斑を生じる (Murant *et al.*, 1969) . CMoV の単独感染個体は, CtRLV の非宿主植物に対する CtRLV + CMoV の混合感染個体を接種源としたアブラムシ接種の他, 汁液接種によっても得ることができる.

アンブラウイルス属ウイルスが感染した植物体には特有の被膜構造が確認されている. CMoV については *N. clevelandii* において約 50 nm の球状のエンベロープ様の構造物が (Murant *et al.*, 1969; 1973) , その他のアンブラウイルス属ウイルスにおいても被膜構造が観察されている (Cookbain *et al.*, 1986; Falk *et al.*, 1979b; Taliansly *et al.*, 2003) . これらは ORF3 によって形成される RNP と考えられており, 感染植物体における長距離移行や RNA の安定化における役割を担う (Ryabov *et al.*, 1998; Ryabov *et al.*, 2001b; Taliansly *et al.*, 2003). なお, CMoV については, RNA 分解酵素 (RNase) に対する耐性を持つことも証明されている (Murant *et al.*, 1985) .

#### 1.3.4. サテライト RNA

アンブラウイルス属のウイルスには, いくつかのサテライト RNA が確認されている (Demler and de Zoeten, 1989; Menzel *et al.*, 2009b; Mulenga *et al.*, 2020) . Groundnut rosette virus (GRV, アンブラウイルス属) がラッカセイに引き起こす groundnut rosette disease においては, サテライト RNA が重要な役割を担うことが示されており, rosette 症状の誘導のみならず, GRV が groundnut rosette assistor virus (GRAV, ポレロウイルス属) により粒子化され, マメアブラムシ (*Aphis craccivora*) によって媒介されるために必須であることが証明されている (Murant *et al.*, 1988; Murant, 1990; Robinson *et al.*, 1999) . 一方, pea enation mosaic virus-2 (PEMV-2, アンブラウイルス属) においては, サテライト RNA が混合感染することにより症状が弱まることがわかっている (Demler *et al.*, 1994) . ニンジンに感染するアンブラウイルス属においても, 全長 745 および 748 塩基のサテライト RNA が CMoMV 感染パセリ (ギ

リシャ産) および CMoV 感染ニンジン (ドイツ産) より見出されているが (Menzel *et al.*, 2009b), CMD におけるこれらのサテライト RNA の役割は不明である。

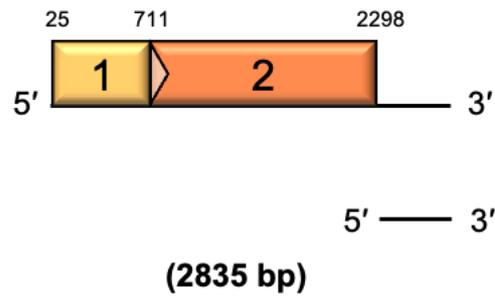
#### 1.4. Carrot red leaf virus-associated RNA (CtRLVaRNA)

##### 1.4.1. 分類

国際ウイルス分類委員会において, subviral agent の polerovirus-associated RNAs に分類される。本グループには CtRVaRNA の他, ST9aRNA および tobacco vein distorting virus-associated RNA (TVDVaRNA; Mo *et al.*, 2011) が登録されているが, 近年 cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV; Campbell *et al.*, 2020) や turnip yellows virus (Gaafar and Ziebell, 2019) への随伴感染が確認されている。これらの RNA 種はその RdRP (ORF1b) にトンプスウイルス科との類似性が見られることから, tombusvirus-like associated RNA (tlaRNA) が総称として提唱されており (Campbell *et al.*, 2020), 本稿においてもそれを採用する。

##### 1.4.2. 遺伝学的特性

CtRLVaRNA のタイプ株である a25 (米国株) は全長 2,835 塩基である。一本鎖 RNA (+) をゲノムとし, 複製関連遺伝子 (ORF1a および ORF1b) と 500 塩基以上の非翻訳領域を持つ (Fig. 3)。tlaRNA の ORF1a および ORF1b はゲノミック RNA より翻訳される。ORF1b からは, ORF1a の終始コドンの読み過ぎしによる融合タンパク質が合成される。tlaRNA の報告当初はサブゲノミック RNA に短い ORF を有することが想定されていたが, tlaRNA 間で共通性が見られないことから, 現在は ORF を持たない非翻訳性のサブゲノミック RNA として機能すると考えられている (Campbell *et al.*, 2020)。また ORF1b にコードされる RdRP において, トンプスウイルス科の旧カーモウイルス属 (*Carmovirus* \*現在はさらに 3 属に細分化されている) が持つモチーフが見出されている (Chin *et al.*, 1993)。CtRLVaRNA を含め tlaRNA のゲノムには CP や MP がコードされていない。



**Figure 3** Genomic organisation of carrot red leaf virus-associated RNA isolate a25 (GenBank accession no. AF020617). The genomic RNA has two ORFs associated with replication (ORF1a and ORF1b). The subgenomic RNA does not encode any proteins.

#### 1.4.3. 生物学的特性

細胞内の増殖は可能であるが (Campbell *et al.*, 2020; Passmore *et al.*, 1993) , 上述のとおり自身のゲノムには複製に関与する遺伝子しか見出されておらず, 自然条件下においてはヘルパーウイルスとなるポレロウイルス属ウイルスにその全身感染やアブラムシ媒介を依存する. 感染時における影響については ST9aRNA (Falk and Duffus, 1984) において詳細に解析されており, 複合感染時にはビート西部萎黄ウイルス (beet western yellows virus, BWYV) の蓄積を高め, その症状も激化させることがわかっている (Passmore *et al.*, 1993; Sanger *et al.*, 1994) . なお, ST9aRNA は CtRLV が感染するニンジンからも検出されている (Adams *et al.*, 2014) .

#### 1.5. その他の病原ウイルス

ニンジンの葉の黄化や赤化を引き起こすその他のウイルスとしては, クロステロウイルス科 (*Closteroviridae*) クロステロウイルス属 (*Closterovirus*) に属するニンジン黄葉ウイルス (carrot yellow leaf virus, CYLV) が知られる. 本ウイルスは日本において初めて報告され

(山下ら, 1976) , その後欧州において確認されている (Adams *et al.*, 2014; Menzel *et al.*, 2009a) .

近年英国において, 内部黒変症状を示すニンジンについて次世代シーケンスを用いた解析が行われ, 前述の CMD に関連するウイルス/RNA の他, CYLV および同属の新種ウイルス (carrot closterovirus-1) , トラドウイルス属 (*Torradovirus*) の新種ウイルス (carrot torradovirus-1) , セクイウイルス属 (*Sequivirus*) に属する parsnip yellow fleck virus (PYFV) および未分類の 2 種が新たに見出され (carrot Ch virus-1 および carrot Ch virus-2) , 新たにコルドウイルス属 (*Chordovirus*) が設けられた (Adams *et al.*, 2014) .

## 1.6. 媒介者

### 1.6.1. ニンジンフタオアブラムシ

CMD に関与するウイルスおよび tlaRNA は, CtRLV 存在下でニンジンフタオアブラムシによって永続的 (循環型) に媒介される (Elnagar and Murant, 1978a; Waterhouse and Murant, 1983) . 本種の無翅虫は体長 1.5-2.8 mm で, 黄緑, 緑色または赤褐色を呈する. 一次寄主をヤナギ科, 二次寄主をセリ科とする. 発生は気象条件に左右され, 冬期の気温が比較的高い場合は翌年の発生が多く, 発生時期の降雨量が多い年は発生量が少なくなる (Dunn, 1965; Dunn and Kempton, 1967) . 世界各国の温暖地域に広く分布し, 本病の他にも PYFV をはじめとする 10 種以上のセリ科に感染性を持つウイルスを媒介する. カルボン ( $C_{10}H_{14}O$ ; 分子量 150.22) に誘引されることから, セリ科から生じる揮発性成分を認識していることが示唆されている (Chapman *et al.*, 1981) .

### 1.6.2. その他の媒介アブラムシ

関東地方で確認された CtRLV は, ニンジンフタオアブラムシのみならずニンジンアブラムシによる媒介も確認されている (Ohki *et al.*, 1979; 小室・山下, 1956) . 米国産のパセリか

らニンジンフタオアブラムシとモモアカアブラムシにより媒介される CtRLV とそれに随伴して感染する CMoV および CtRLVaRNA が報告されているが、いずれもニンジン由来の株とは遺伝学的特性または宿主範囲が異なることが示されている (Naseem *et al.*, 2016) .

*Cavariella* 属のうち *C. pastinacae* (Watson *et al.*, 1964) と *C. theobaldi* (Murant, 1974) は CtRLV を媒介する能力を持たない. その他に Stubbs (1948) はモモアカアブラムシ, チューリップネアブラムシ (*Dysaphis tulipae*) , *Hyadaphis foeniculi* および *Macrosiphum* 属アブラムシ (Stubbs, 1948) が, Costa *et al.* (1975) はマメクロアブラムシ (*Aphis fabae*) , *Dysaphis aplifolia* およびモモアカアブラムシが CtRLV を媒介しないことを確認している.

## 1.7. ニンジン

ニンジンは世界中で栽培されるセリ科の作物である. 主に根部が食用として用いられ, 生食用のみならず様々な用途に加工されて消費される.  $\beta$ カロテンやカリウムを豊富に含むことから栄養供給において重要な役割を果たし, 1950 年代から 1990 年代にかけて世界の栽培面積および生産量は約 4 倍にまで増加した (Rubatzky *et al.*, 1999) .

栽培種は二年性で, 一年目に根を肥大させて二年目に種子を形成する. ニンジンの祖先種であるノラニンジン (wild carrot; *D. carota* subsp. *carota* や *D. carota* subsp. *maximus* 等) は, 根が白く肥大せず, しばしば花を出芽当年に咲かせる. 多くの栽培ニンジンは 9 対の染色体を持ち ( $2n = 2x = 18$ ) , 推定ゲノムサイズは 473 Mb でおおよそ 32,113 の遺伝子を持つとされる (Iorizzo *et al.*, 2016) . 日本や中国で主に栽培される黒田五寸系の推定ゲノムサイズは 372 Mb であると報告されている (Wang *et al.*, 2018) .

ニンジンの品種は欧州型 (western) と東洋型 (eastern/Asiatic) に分けられる (Rubatzky *et al.*, 1999; 農山漁村文化協会, 2004) . いずれも中央アジアを起源とするが, 東洋型は現在の

カザフスタン, キルギス, タジキスタン, トルクメニスタンおよびウズベキスタンの周辺において発展した一方, 欧州型は中央アジアに加えてトルコ東部において発展したと考えられている (Vavilov, 1992) . 栽培化の歴史は明確ではなく, 紀元前 2000 年から 3000 年頃には種子を香辛料として利用していた (Andrews, 1949; Brothwell and Brothwell, 1969) . 根を可食部として利用し始めたのは 10 世紀以降であり, 中東や欧州を中心に記録が残されている (Mackevic, 1932; Zagorodskikh, 1939) . 現在の主要な品種は橙色を呈するが, 栽培の起源を遡ると原種は紫および黄色であったことがわかっている (Banga, 1963) . 橙色のニンジンが文献上に初めて登場するのは 17 世紀からであり, ノラニンジンと黄色ニンジンとの交配により派生したと考えられている (Banga, 1963; Heywood, 1983; Rubatzky *et al.*, 1999; Small, 1978) . 日本国内においては 17 世紀頃に初めて記載され, 北海道へは 19 世紀に欧米より複数の品種が導入された (北海道野菜史話研究会, 2015; 農山漁村文化協会, 2004) . 現在国内においては欧州型を祖先とする橙色系が主流であるが, 金時人参など東洋型は中国より持ち込まれたものと考えられている.

日本国内のニンジンの主要産地としては, 北海道, 千葉および徳島県が挙げられる. 令和 2 年度のニンジンの国内収穫量 585,900 t のうち, 北海道はその 3 割以上にあたる 183,200 t が生産された (農林水産省, 2021) . 北海道内の令和 2 年度の生産量は, オホーツク管内の斜里町 (23,400 t) および美幌町 (21,700 t) , 十勝管内の音更町 (17,500 t) および幕別町 (15,000 t) , 上川管内の南富良野町 (16,100 t) , 後志管内の真狩村 (10,500 t) , 渡島管内の七飯町 (240 t, 春夏ニンジン 5,600 t) と道東から道南にかけてほぼ全域で作付けされており (農林水産省北海道農政事務所, 2021) , その多くが 4 月から 7 月の間に播種され, 約 100 日程度の生育期間の後に収穫される.

## 1.8. CMD の発生生態と制御

### 1.8.1. 発生や症状に関わる要因

本病を媒介するニンジンフタオアブラムシはヤナギ属植物を一次寄主とするが、同属は病原ウイルスに対して免疫性であることから、これらが直接的な伝染源となることはない。すなわち本病の主要な伝染源は、二次寄主のニンジンまたはノラニンジンならびにセリ科の野草であると考えられている (Howell and Mink, 1977; Murant, 1975; Watson and Serjeant, 1964; Watson and Falk, 1994)。

症状の程度は気温や感染時期に大きく影響を受け (Stubbs, 1948; Watson and Serjeant, 1964)、低温条件下 (15–20°C) で症状が強まるが、気温の上昇 (> 24°C) に伴って緩和または消失する (Koike *et al.*, 2002; Stubbs, 1948)。発生の規模は媒介者の発生活長と密接に関係する。生育の初期段階にアブラムシの飛来がするような作型においては、本病による影響がさらに大きくなる (Stubbs, 1948; Watson and Serjeant, 1964)。一方、アブラムシの発生が少なくなる夏の高温期以降は、本病による影響をほとんど受けない。また、冬期の気温が高いとニンジンフタオアブラムシの発生が多くなり、翌年の発生が多くなることがわかっている (Watson, 1960; Watson and Serjeant 1964)。また米国北西部や英国においては、越冬したニンジン上でアブラムシが生存する可能性が示唆されている (Howell and Mink, 1977; Watson and Serjeant, 1964)。

### 1.8.2. 収量への影響

本病に罹病すると根重が著しく低下する。オーストラリアで行われた試験では殺虫剤の使用により本病の発生が低減し、最終的に総収量が 1.5 倍、規格内収量が 6.6 倍近くまで増加した (Stubbs, 1948)。英国で実施された試験においては、生育初期の感染により根重が 0.4 倍にまで低下した (Watson, 1960; Watson and Serjeant, 1964)。

本病は採種性にも大きな影響を及ぼし、感染した母本は種子量が健全比 9 割近く減少し、さらに母本の定植後の腐敗率も高まる (Stubbs, 1948) .

### 1.8.3. 対策

本病の発生を低減させる方法としては、ウイルスを保毒したアブラムシの低減を目的とした殺虫剤の散布 (Koike *et al.*, 2002; Stubbs, 1948; Watson and Serjeant, 1964) , 圃場に残存した感染株の除去, 前作圃場から距離を設けることなどが挙げられる (Costa *et al.*, 1975; Koike, 2002) . 播種時期を遅らせることにより感染の影響を減らすこともできるが、市場への供給の面から推奨されない (Stubbs, 1948) . いくつかのニンジンの品種は耐病性を有することが示されており、これらの利用により影響を低減することができる (Costa *et al.*, 1979; Koike, 2002; Stubbs, 1948; Watson and Falk, 1994) .

## 1.9. ウイルスとウイルス/RNA 間の相互作用

### 1.9.1. ポレロウイルスとアンブラウイルス間の相互作用

アンブラウイルス属ウイルスは、アブラムシによる媒介をヘルパーとなるポレロウイルスまたはエナモウイルスに依存する。混合感染時にはより激しい症状を誘導するとともに、ヘルパーウイルスの蓄積を高める (Barker, 1989; Mayo *et al.*, 2000; Ryabov *et al.*, 2001a; Zhou *et al.*, 2017) . CMD においても、CtRLV は CMoV との混合感染時に症状が強くなることから、両者の関係は相乗的であると考えられている (Miller *et al.*, 1997; Watson *et al.*, 1964; Waterhouse and Murrant, 1981) . アンブラウイルス属ウイルスは実験的に様々なヘルパーウイルスとの混合感染を成立させることが可能である。例えば CMoV は PLRV または BWYV と *N. clevelandii* において混合感染し、これらヘルパーの蓄積を高める一方で (Barker, 1989) , PLRV と BWYV 両種の媒介者であるモモアカアブラムシによって媒介されるようになることが報告されている (Barker, 1989; Waterhouse and Murrant, 1983) .

ポレロウイルスは単独では汁液接種をすることができないが、アングラウイルスとの共存下で可能となる (Barker, 1989; Falk *et al.*, 1979a; Mayo *et al.*, 2000; Ryabov *et al.*, 2001a) . ただし、一部の組合せに限られる. この現象にはアングラウイルスの ORF4 が関与し、ポレロウイルスが葉肉細胞と師部組織間の移行を補助するためであることが示されている (Ryabov *et al.*, 2001a) .

### 1.9.2. ポレロウイルスと tlaRNA 間の相互作用

tlaRNA は自己複製能力を有するが、アブラムシによる媒介と植物体内の全身感染をポレロウイルス属ウイルスに依存する. 混合感染時の影響は ST9aRNA において詳細に解析されており、BWYV とともに師部組織に局在しながらその蓄積を高め、症状を激化させる (Passmore *et al.*, 1993; Sanger *et al.*, 1994) .

## 2. 本研究の目的

2014年、北海道の十勝およびオホーツク総合振興局管内のニンジン圃場において、葉の黄化や赤化、さらに萎縮症状を示す個体が確認された。同症状は、本州で確認されているニンジン黄化病、また国外で重要病害として知られるCMDに類似していたことから、RT-PCR法による検定を行った結果、CtRLVおよびCMoVが検出された（吉田ら、2015）。これらの試料についてCtRLVaRNAの検出を試みた結果、オホーツク地方の検体からのみ陽性反応が得られた。このことから、北海道においてはCtRLVの単独感染によるニンジン黄化病、またその関連ウイルスまたはRNAとの混合感染によって起こるCMDが発生しており、それぞれの地理的分布が異なる可能性が示された。

本研究では、北海道におけるCMD関連ウイルスおよびRNAの地理的分布を明らかにするため、2021年にかけて圃場の観察や病原体の検定を実施した。さらに、同定された3種の病原体、すなわちCtRLV、CMoVおよびCtRLVaRNAについてその遺伝学的特性および宿主範囲について評価し、国内外の株との比較を行った。最後に、ニンジンをはじめとする各種セリ科植物に対して行った接種試験の結果に基づき、CMDにおけるウイルスおよびRNAの病原学的な役割やこれらの病原体間の関係性について考察した。

### 3. 第1章 北海道に発生する CMD の特徴: 症状および病原体の地理的分布

#### 3.1. 背景

2014年に実施した圃場調査の結果、北海道では CtRLV の単独感染によるニンジン黄化病、さらに CtRLV が CMoV または CtRLVaRNA と混合感染することによって起こる CMD が発生していることが明らかとなった (Fig. 4) . 道内におけるこれらの病原体の地理的分布や感染時の症状について明らかにするため、発生実態の調査を行った.



**Fig. 4** Reddening and yellowing foliage of carrots infected (a) singly with carrot red leaf virus (CtRLV) or (b) triply with CtRLV, carrot mottle virus (CMoV), and CtRLV-associated RNA.

#### 3.2. 材料と方法

##### 3.2.1. 調査地点および試料採取

2014-2021年にかけて、道内7総合振興局管内（空知, 石狩, 胆振, 渡島, 上川, オホーツクおよび十勝）の合計37圃場よりニンジンの葉または個体全体を採取した。ノラニンジンについては、石狩および留萌管内の合計5地点より症状を呈する葉を採取した。ノラニンジン11

個体を含む計 147 検体を採取し、病原体の検出に供試した。新得町および斜里町の一部の圃場においては、圃場中の発生程度やその症状の観察を行った。

採取した葉については直ちに RNA 抽出に用いるか、使用するまで-80°Cで保管した。接種試験に使用するウイルスの接種源は、感染個体から無保毒のニンジンフタオアブラムシを用いて回収し、維持した。

### 3.2.2. アブラムシの採取

圃場調査時に確認されたアブラムシのうち、ニンジン上でコロニーを形成していた 3 種、ニンジンフタオアブラムシ、モモアカアブラムシおよびジャガイモヒゲナガアブラムシ (*Aulacorthum solani*) を採取し、健全なニンジンを用いて保毒状況を確認した後、ウイキョウ (*Foeniculum vulgare*) 上で増殖させた。これらを再度健全なニンジンに移植して飼育した。ハスカップ (*Lonicera caerulea*) よりニンジンアブラムシを採取し、ニンジンへ移植することにより増殖を試みた。

### 3.2.3. RNA 抽出

植物組織からの RNA 抽出には、RNAiso Plus および Fruit-mate™ for RNA Purification (いずれもタカラバイオ株式会社) を使用し、その手順は製品プロトコールに準じた。イソプロパノール沈殿後の RNA ペレットに色素沈着が見られた場合は、RNA Clean & Concentrator-5 (ザイモリサーチ社) により精製した。抽出した RNA 溶液は NanoDrop™ 2000c (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) により濃度および純度を計測し、超純水により最終的に 50 ng/μL に調整した。

### 3.2.4. 病原ウイルスおよび RNA の検出

ウイルスの検出は PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 (タカラバイオ株式会社) を用いて one-step RT-PCR により行った。上記の抽出 RNA 溶液 2 μL を用いて 10 μL の系で反応

させた。反応条件は以下のとおりとした: 逆転写反応として 50°C 30 分, 94°C 2 分の後, 1 サイクル 94°C 30 秒, 60°C 30 秒, 72°C 30 秒の PCR を 35 サイクル。

CtRLV の検出には, Huang *et al.* (2005) が作成した ORF2 領域 624 bp (UK-1 を基準; Huang *et al.*, 2005; GenBank accession no. AY695933) を増幅するプライマーセットを改変して用いた: CL1-mod (5'- AAGGGAGAGCCYCAAAAAC -3') /CL2-mod (5'- MASCTCGACTTTRA-AACC -3') .

CMoV または CMoMV の検出には, Vercruyssen *et al.* (2000) が作成した ORF2 領域 405 bp (Weddel を基準; Menzel *et al.*, 2008; GenBank accession no. FJ188473) を増幅するプライマーセットを改変して用いた: Umbra-NNS-mod (5'- TGGWGTHCACAACAACACTC -3') /Umbra-IBS (5'- AAGGCTTTGTACAACATTGG -3') .

CtRLVaRNA の検出には, 同様に Vercruyssen *et al.* (2000) の報告に基づき, ORF1b から非翻訳領域を含む 487 bp (a25 を基準; Watson *et al.*, 1998; GenBank accession no. AF020617) を増幅するプライマーセット CRLVaRNA-1 (5'- TCTAGTTTCTCTCAAGTTCCA -3') /CRLVaRNA-3 (5'- CCTCACCTRCCAATTATGG -3') を用いた。

2014 年に英国産のニンジンから新たに検出されたトラドウイルス属 (例: ニンジントラドウイルス, carrot torradovirus 1, CaTV1) , クロステロウイルス属 (例: ニンジン黄葉ウイルスおよび carrot yellow leaf virus) , セクイウイルス属 (例: parsnip yellow fleck virus および carrot necrotic dieback virus) およびコルドウイルス属 (例: carrot Ch virus 1 および carrot Ch virus 2) の新規ウイルスも検出対象とした (Adams *et al.*, 2014) . トラドウイルス属ウイルスの検出には, CaTV1 分離株 H6 (Adams *et al.*, 2014) の RNA1 にコードされる RdRP 領域 371 bp (GenBank accession no. KF533719) および RNA2 にコードされる Vp35-Vp26 領域 517 bp (GenBank accession no. KF533720) を検出する同属の特異的検出プライマーを改変したもの, すなわち To-1F-mod (5'- GCWGAYTAYTCMTCYTTTTGATGG -3') /To-1R-mod (5'- GGTACWGCVACHAGRTTGTCATC -3') および To-2F-mod (5'- TGGGATGARKGTGATGT-KCT -3') /To-2R (5'- CWCCAGTCCACCAAYTTRCA -3') を用いた。後者 3 属の検出には, ニ

ンジンに感染性を持つウイルスの配列情報を元に作成した以下のプライマーセットを使用した: CL-7940-F (5'- CTYATGGTT-AARCGCGAYGC -3') /CL-8404-R (5'- GTTMCKKATC-CATGTGTTYG -3') , Sequi-7765-F (5'- GACACAAGCGTGGAATCATG -3') /Sequi-8296-R (5'- CATCTGTCATGGTCACACCA -3') , CCh-5526-F1 (5'- GAGCCTTYATAGAGGAGCT-CC -3') /Ch-6052-R1 (5'- TTRTTMKCAGCRAAGAGAGC -3') . これら 3 属のウイルスの陽性対照には, 人工的に合成した RNA を用いた. すなわち, T7 プロモーターを付与した部分配列の cDNA を合成し (Integrated DNA Technologies) , CUGA® 7 in vitro Transcription Kit (株式会社ニッポンジーン) により転写した RNA を健全なニンジンより抽出した RNA に混合し供試した.

### 3.3. 結果

#### 3.3.1. 北海道における CMD 関連ウイルスおよび RNA の地理的分布

各地より採取した栽培ニンジンおよびノラニンジンについて, CMD 関連ウイルスおよび RNA の検定をおこなった. 2014 年に新たに報告された新規 4 属のウイルス (Adams *et al.*, 2014) については, 2014 年に採取した検体も同様に検定対象とした.

全 147 検体の検定の結果, ほぼ全ての地域において CtRLV の発生が確認された (Table 1) . CMoV も 5 地域の試料から検出されたが (石狩, 十勝, 渡島, 留萌およびオホーツク) , 十勝産の試料においては 34 個体中 1 個体からしか検出されなかった. CtRLVaRNA は局地的に発生し, 沿岸の 3 地域 (オホーツク, 留萌および渡島) のニンジンまたはノラニンジンから検出された. ノラニンジンにおける感染は, 周囲のニンジン圃場の有無に関わらず確認され, 一部の個体は越冬していることがわかった (Fig. 5) . CaTV1 は, オホーツクおよび渡島地方のニンジンからしか検出されず, その検出頻度は低かった (Table 1; Fig. 6) .

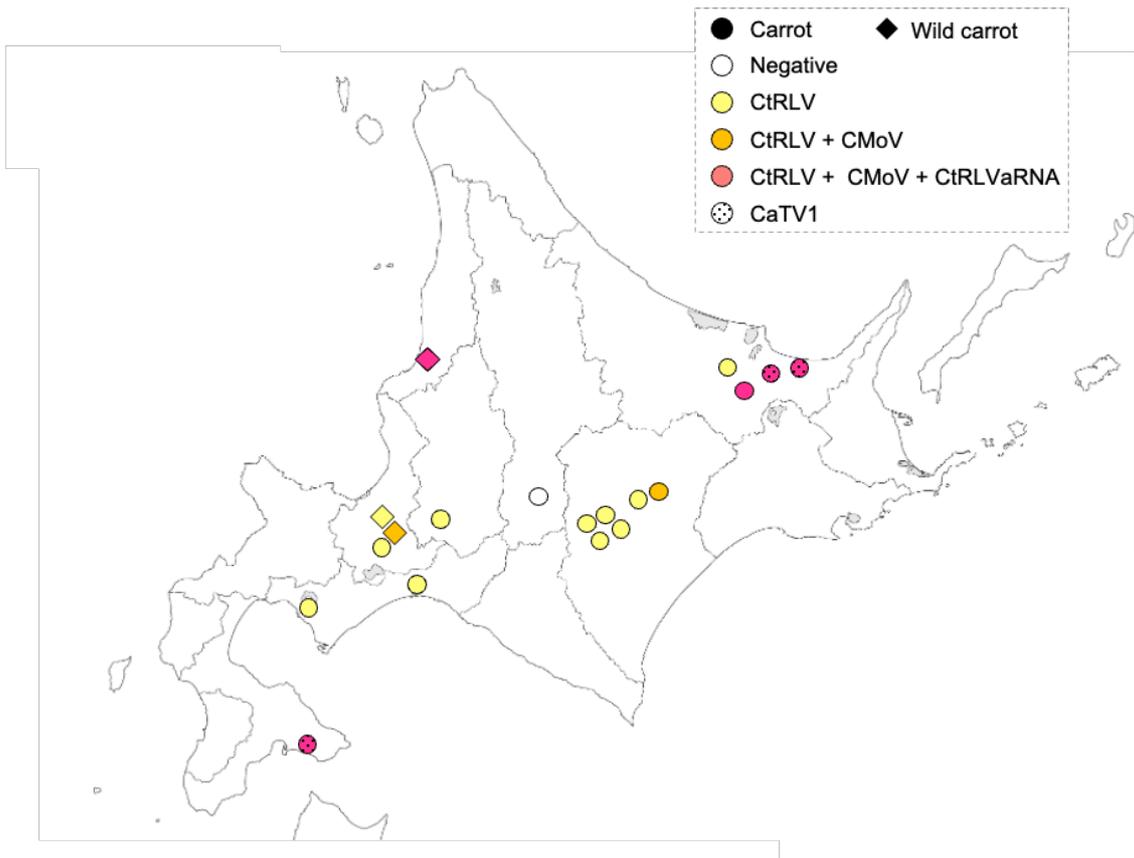
**Table 1** Detection of carrot red leaf virus and its associated viruses from carrots with reddening and yellowing leaf symptom at different districts of Hokkaido (2014 - 2021)

District	Host plant	Total No. of plants tested (No. of fields/spots)	No. of plants detected										Viral combinations selected for experiments (component)		
			CtRLV	CMoV	CMoMV	CtRLVaRNA	CtTaV1	Closteroviruses (CYLV, CtCV1)	Sequiviruses (CNDV, PYFV)	Chordoviruses (CtChV1, 2)					
Okhotsk	carrot	56 (19)	48	24	0	16	8	0	0	0	0	0	0	0	SH (CtRLV + CMoV + CtRLVaRNA), SK2 (CaTV1)
Tokachi	carrot	34 (8)	20	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SN (CtRLV alone)
Oshima	carrot	13 (2)	12	9	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	HK (CtRLV + CMoV), HK2 (CtRLV + CMoV + CtRLVaRNA)
Iburi	carrot	12 (4)	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Ishikari	carrot	2 (1)	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	KT2 (CtRLV + CMoV)
Sorachi	wild carrot	9 (4)	7	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Rumoi	carrot	13 (2)	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Kamikawa	wild carrot	2 (1)	2	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
	carrot	6 (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Abbreviations: CaTV-1, carrot torradovirus 1; CMoMV, carrot mottle mimic virus; CMoV, carrot mottle virus; CNDV, carrot necrotic dieback virus; CtChV-1 or -2, carrot Ch virus 1 or 2; CtCV-1, carrot closterovirus 1; CtRLV, carrot red leaf virus; CtRLVaRNA, CtRLV-associated RNA; CYLV, carrot yellow leaf virus; PYFV, parsnip yellow fleck virus.



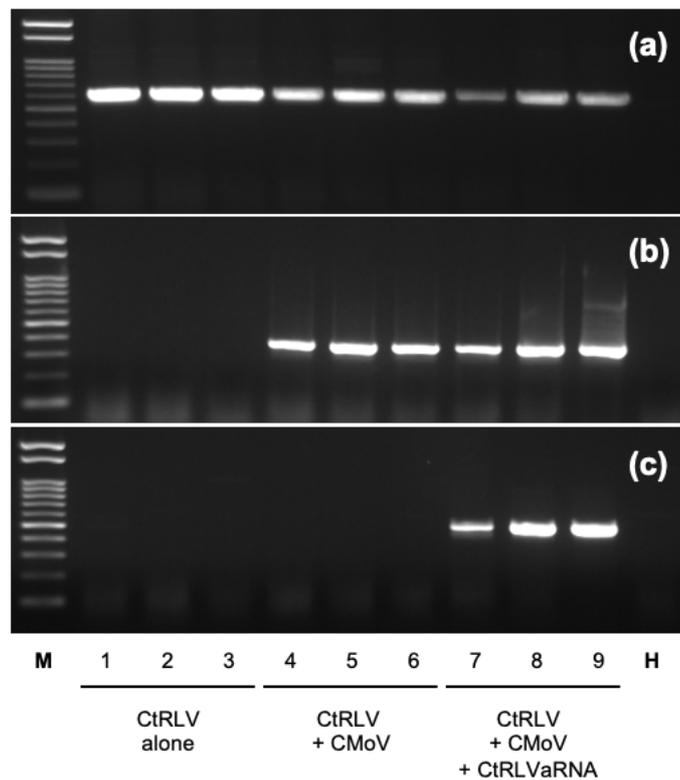
**Figure 5** Overwintered wild carrots infected with carrot red leaf virus (CtRLV) and carrot mottle virus (CMoV). (a) Whole plants and (b) leaves showing reddening symptoms.



**Figure 6** A distribution map of detected viruses and RNA associated with carrot motley dwarf (CMD) in Hokkaido. The field surveys were conducted from 2014 to 2021. CtRLV = carrot red leaf virus, CMoV = carrot mottle virus, CtRLVaRNA = CtRLV-associated RNA, CaTV1 = carrot torradovirus 1.

CMoV の検出個体からは常に CtRLV が検出された (Fig. 7) . 同様に, CtRLVaRNA はほぼ全ての個体において CtRLV および CMoV と混合感染しており, CtRLV への随伴性が示唆された. また, CaTV1 は単独感染も確認されたが, そのほとんどが少なくとも CtRLV と混合感染していた. クロステロウイルス属, セクイウイルス属およびコルドウイルス属ウイルスは検出されなかった. RT-PCR 産物のシーケンス解析により, 検出されたアングラウイルス属ウイルスには CMoMV が含まれなかった.

本調査で採取した検体の内, 構成因子の異なる圃場分離株 SN, HK, KT2, SH および HK2 (Table 1) を以降の試験で用いた.

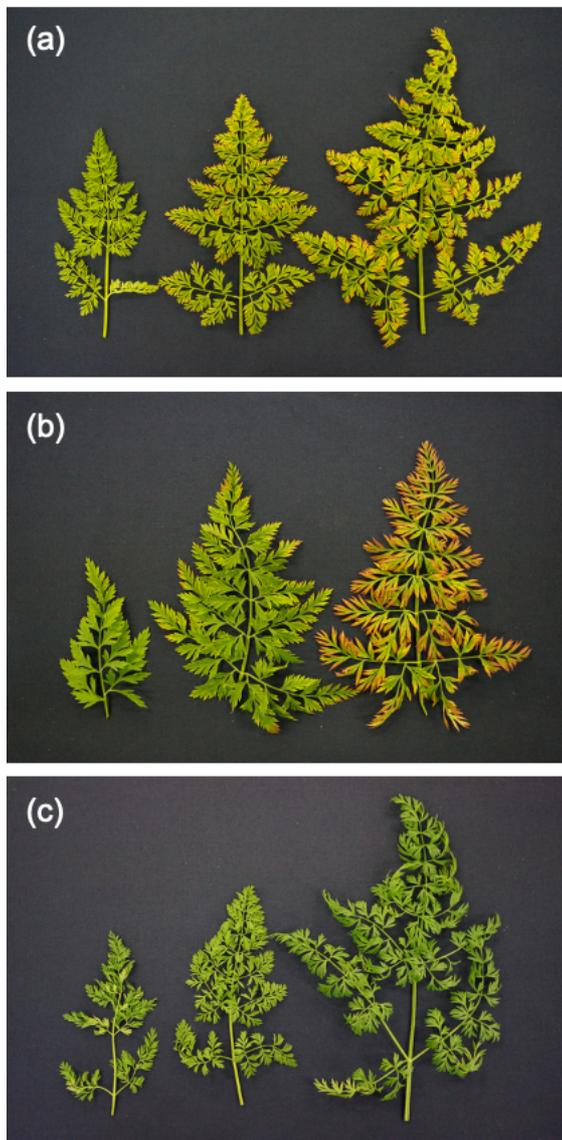


**Figure 7** Agarose gel electrophoresis of the RT-PCR products. (a) Carrot red leaf virus (CtRLV), (b) carrot mottle virus (CMoV), and (c) CtRLV-associated RNA (CtRLVaRNA). PCR products from identical samples are shown in corresponding lanes of panels a, b, and c. H = healthy carrot, M = DNA ladder (0.1-2 kb).

### 3.3.2. 圃場における症状

試料採取圃場における観察結果と検定結果に基づき、CtRLV 単独によるニンジン黄化病、また CtRLV, CMoV および CtRLVaRNA の三重感染による CMD が発生する圃場における症状を以下にまとめた。

単独・混合感染に共通する症状は、下位葉および中位葉の黄化または赤化および新葉の退緑であった (Fig. 8) .



**Figure 8** Upper and lower leaves of carrot plants (a) singly infected with carrot red leaf virus (CtRLV), (b) triply infected with CtRLV, carrot mottle virus (CMoV), and CtRLV-associated RNA (CtRLVaRNA), and (c) uninfected.

感染個体は地上部・地下部ともに小さくなり (Fig. 9) , 生育の初期に感染したと思われる個体には著しい矮化がみられた (Fig. 10) . 症状は 7 月上旬頃から確認され始め, それ以降にはより明瞭となった. 特定の品種には葉に軽微な黄化が生じるだけであった (Fig. 11) .



**Figure 9** Growth reduction of carrot plants infected with carrot red leaf virus (CtRLV) alone.



**Figure 10** A stunted plant infected with carrot red leaf virus (CtRLV), carrot mottle virus (CMoV), and CtRLV-associated RNA (CtRLVaRNA).



**Figure 11** Mild yellowing of foliage of carrots infected with carrot red leaf virus (CtRLV).

ニンジン黄化病の罹病株, すなわち CtRLV の単独感染個体は下位葉の葉縁から赤化や黄化症状が生じていた. 三重感染個体における症状はより激しく, 個体は萎縮し, 斑紋症状が下位葉のみならず上位葉にも観察された. また, 症状の強い個体は下位葉が褐変または枯死していた.

圃場単位でみると, ニンジン黄化病は全面的に激しく発病することではなく, 圃場の入り口や中腹に坪状や点状に散発した. 一方, 三重感染の発生圃場においては圃場全面に激しい発病がみられることが多く, 症状やその程度は個体によって大きく異なった. これらの個体からは全3種の病原が検出されることがほとんどであったが, 稀に2種 (CtRLV と CMoV または CtRLVaRNA) または1種 (CtRLV) しか検出されないことがあった. CaTV1 の感染による特有の症状は本研究においては見出すことができなかった.

なお, 地上部の赤化や黄化は要素欠乏や根部の障害 (腐敗や食害) によっても生じるが, 特に根の腐敗や食害に関連する症状は上位葉に強く生じる傾向にあった (Fig. 12) .

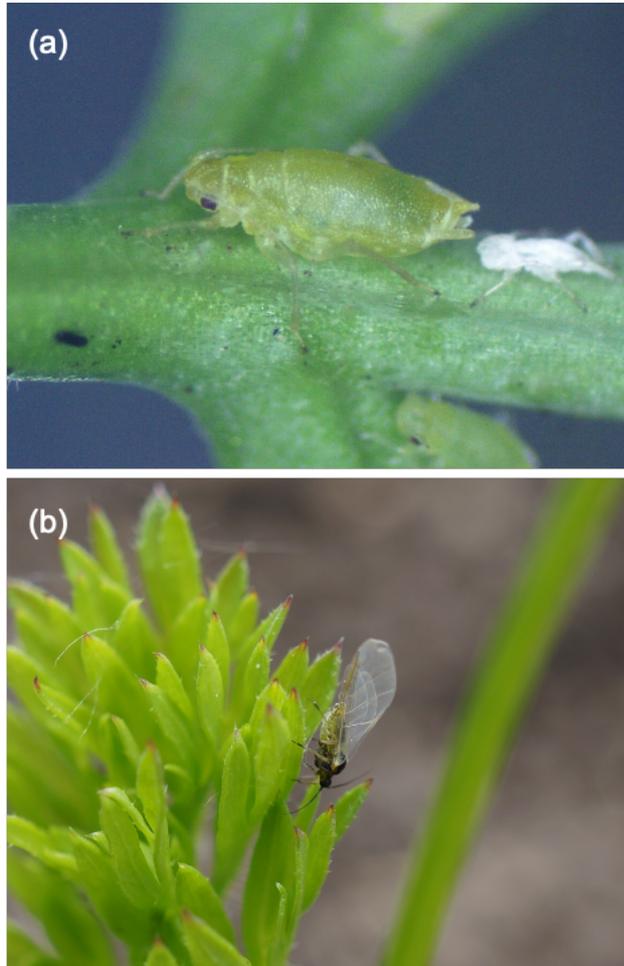


**Figure 12** Yellowing or reddening of younger leaves of carrot plants accompanied by disorders of root. (a) Cracking and blanching; (b) soft rot.

### 3.3.3. アブラムシによる媒介

ほとんどのニンジン圃場でコロニー形成が確認されたニンジンフタオアブラムシ (Fig. 13) , モモアカアブラムシおよびジャガイモヒゲナガアブラムシの 3 種について, 上記圃場分離株をウイルス源とした媒介試験を行った. なお, 北広島市のハスカップより採取したニンジンアブラムシはニンジンに寄生性を示さず死滅したため, 本試験には供試しなかった.

上記 3 種のアブラムシを増殖させた後, ウイルス源 SN (CtRLV) , HK (CtRLV+CMoV) および SH (CtRLV+CMoV+CtRLVaRNA) でアブラムシを増殖させ, 健全なニンジンに移住させることにより接種を行った. その結果, ニンジンフタオアブラムシにおいてのみウイルスまたは RNA の媒介能力が確認され, ウイルス源と同じウイルスまたは RNA が検出された. 回収された 3 圃場分離株 SN, HK および SH は第 3 章の接種試験に用いた.



**Figure 13** *Cavariella aegopodii* (willow-carrot aphid). (a) A late-instar apterous female; (b) an alate on a young carrot plant.

### 3.4. 考察

本調査の結果、北海道では CtRLV の単独感染によるニンジン黄化病が広く発生しているのに対し、CtRLV, CMoV および CtRLVaRNA の三重感染は特定の地域にしか発生していないことが明らかとなった。ニンジン黄化病は圃場内で散発的にみられることが多かったのに対し、三重感染の発生圃場内の感染個体は、遠方より目視で発病が判断できるほど症状が強く、それが圃場全面に見られることがしばしばあった。このことから三重感染は単独感染よりも明らかに病原性が強く、CMoV および CtRLVaRNA の随伴感染が寄与していると考えられた。

CMD 関連因子のほか、CaTV1 もオホーツクおよび渡島地方の栽培ニンジンから検出された。本ウイルスはニンジンフタオアブラムシとモモアカアブラムシの両種により媒介され、チャービルおよび *N. benthamiana* における病原性が確認されている (Rozado-Aguirre *et al.*, 2016)。本ウイルスは、国内ではアシタバ (*Angelica keiskei*) から検出されているが (Tokuda *et al.*, 2019)、本ウイルスのニンジンに対する病原性や、CMD への関与については今後詳細に解析される必要があるだろう。

これまでに CtRLV の媒介者としていくつかのアブラムシ種が報告されている。例えば、本州の関東で確認されたウイルスはニンジンフタオアブラムシに加え、ニンジンアブラムシによる媒介が確認されている (Ohki *et al.*, 1979; 小室・山下, 1956)。また、米国のパセリから分離されたウイルスはニンジンフタオアブラムシとモモアカアブラムシによって媒介された (Naseem *et al.*, 2016)。北海道ではニンジンアブラムシがハスカップに発生することで知られるが (水越, 1988; 田中ら, 1994)、本試験において採取したものについてはニンジンに対する寄生性を全く示さなかった。さらに、ニンジンに寄生性を示したモモアカアブラムシとジャガイモヒゲナガアブラムシについては、媒介能力が確認されなかった。このことから、北海道における CtRLV およびその随伴感染ウイルスまたは RNA の媒介は、ニンジンフタオアブラムシが主体となっていると考えられる。

本病の伝染源は、越冬した栽培ニンジンやノラニンジンとされ (Howell and Mink, 1977; Watson and Falk, 1994) , ニンジンフタオアブラムシがニンジン上で越冬する可能性についても示唆されている (Howell and Mink, 1977; Watson and Serjeant, 1964) . 一方, CtRLV はいくつかの野草も宿主とし, 英国の報告によるとシャクやオオハナウドに (Watson *et al.*, 1964) , オーストラリアにおける報告では“carrot motley dwarf virus”がアジョワン, ドクニンジンおよび *Apium austral* に感染することが示されている (Stubbs, 1948) . このため, これらのセリ科の野草についても伝染源となる可能性がある (Watson and Serjeant, 1964) . このうちシャク, オオハナウド, ドクニンジン, さらにセリ (water dropwort; *Oenanthe javanica*) は北海道内にも広く自生するセリ科の野草である. 本研究において, 発生圃場周辺に自生するセリ (3 圃場) およびオオハナウド (1 圃場) について CtRLV およびポレロウイルスの検定 (プライマーセット PoconF2/PoconR2 を使用; Yoshida and Tamada, 2019) を行ったが, いずれも陰性であった (データ未掲載) . またニンジンの他にニンジンフタオアブラムシが嗜好性を示すセリ科栽培植物または野草は見出すことができなかったことから, 北海道においては栽培ニンジンおよびノラニンジンが主要な伝染源としての役割を担っている可能性が高い. 野草のウイルス保毒状況については, 本病の伝染環について理解を深めるための重要な情報であることからさらに検討する必要がある.

## 4. 第2章 CMDに關与するウイルスおよびRNAの遺傳学的特性に關わる解析

### 4.1. 背景

北海道では CtRLV の単独感染によるニンジン黄化病と, CMoV または CtRLVaRNA との混合感染によって起こる CMD が発生することが明らかとなった. ニンジン黄化病や CMD は本州でも既に報告されているが, 病原体の遺傳的特性についての情報はほとんどない. 本章では, 北海道で発生する病原体の遺傳子配列を決定し, 国内外のウイルス株との分子系統学的な關係について解析を行った.

### 4.2. 材料と方法

#### 4.2.1. ウイルスまたは RNA 源

道内で採取した圃場分離株 SN (CtRLV, 新得町産), HK (CtRLV + CMoV, 函館市産), SH (CtRLV + CMoV + CtRLVaRNA, 斜里町産), KT2 (CtRLV + CMoV, 北広島市産, ノラニンジン由来), HK2 (CtRLV + CMoV + CtRLVaRNA + CaTV1, 函館市産) について, 感染ウイルスのゲノム配列の解析を行った. KS (CtRLV + CMoV + CtRLVaRNA + CaTV1, 小清水町産) については CaTV1 の遺傳子解析にのみ供試した.

#### 4.2.2. シーケンス

各ウイルスおよび RNA の部分配列を Table 2 に示したプライマーを用いた one-step RT-PCR により増幅し, 5'または 3' 末端のプライマーアニール領域を除く配列の決定を行った. 反応試薬およびその系は第 3 章 (3.2.4.) と同じとし, 標的領域の長さに応じて伸長時間を調節した. 得られた cDNA 断片は NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (マッハライ・ナーゲル社) により精製し, pGEM T-Easy vector (プロメガ社) に挿入することでクローン化した.

シーケンス反応は BigDye Terminator v. 3.1 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) を用いて行い, ABI 3730xl DNA analyser (アプライドバイオシステム社) 上で3 または 4 クローンについて解析をした. 上記反応および配列の決定は北海道システム・サイエンス株式会社 に委託した.

#### 4.2.3. 分子系統学解析

得られた塩基配列は MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013) に予め搭載された CLUSTAL W プログラム (Higgins *et al.*, 1994) により解析を行った. GenBank 上の登録配列との比較には BLASTn および BLASTp を用いた.

分子系統解析には PhyML v. 3.0 (Guindon *et al.*, 2010) を使用し, 解析に適用する分子進化モデルは jModelTest v. 2.0 (Darriba *et al.*, 2012) により選択した. 得られた系統樹は FigTree v. 1.4.0 (Rambaut, 2012) により出力した.

**Table 2** PCR primers used for detection and sequencing of viral genomes, and determining partial mRNA sequence of actin gene of carrot

Primer Name	Sequence (5'-3')	Length	Position	Reference
carrot red leaf virus (CtRLV)				
CR-5ter-F	ACAAAACAAAAC	11	1-11 <sup>a</sup>	
CR-P0-F	GGAGATAATCTTGATGCTCTTG	22	16-37	
CR-166-R-seq	CTCGACATTGTACAATTGTAA	21	146-166	
CR-777-F-seq	AAGGTGATTAAGGAACAAGC	20	777-796	
CR-1827-R-seq	ATTCTTGCGAAGTATTCTTC	20	1808-1827	
CL1-mod	AAGGGAGAGCCYCAAAAAC	19	2429-2447	Huang <i>et al.</i> , 2005
CR-P2-R	CGATTTCTAACTTGTCTGAGAC	23	2530-2552	
CL2-mod	MASCTCGACTTTRAAACC	18	3035-3052	Huang <i>et al.</i> , 2005
CR-3093-R-seq	CTCTCCTTAAATATGTGAGAGC	22	3072-3093	
CR-3495-R-seq	GTATTCGTTTACGATTGATTG	21	3475-3495	
OPU-fw-mod	GAGAGCAACAGGAATTAACC	21	3534-3554	Oka <i>et al.</i> , 2012 <sup>i</sup>
CtRLV-3810-F	CAGCAATGGACTACTCAAGGC	21	3810-3830	
OPU-rv-mod	TTGTAGATTGTGCTCGARAG	21	3943-3963	Oka <i>et al.</i> , 2012
CR-4133-F-seq	AATAGGTAGACACGGAACC	19	4133-4151	
CR-4349-R-seq	TCGTCCATGTCCATCTTG	20	4330-4349	
CR-4891-R-seq	ACTGGTGTCCATTCCTAGG	19	4873-4891	
CR-5565-F	CCTAACCTGCATGAGAGAG	20	5565-5584	
CR-5684-R	GCTTCTCCAACGGAGATTC	19	5666-5684	
CR-3ter-R	ACACCGAAATC	11	5713-5723	
carrot mottle virus (CMoV)				
CM-5ter-F	GAAAATCTTACTCATCTCG	19	1-19 <sup>b</sup>	
CM-520-F-seq	CCATGCAGCAAGTAACTCTG	20	520-539	
Umbra-NNS-mod	TGGWGTGCACAACAACCTC	18	1140-1157	Vercruyssen <i>et al.</i> , 2000
CM-1472-F	CGAGAGATCCAAGGTTCAAC	20	1472-1491	
CM-1477-F	GATCCAAGGTTCAACATATGC	21	1477-1497	
Umbra-IBS	AAGGCTTTGTACAACATTGG	20	1525-1544	Vercruyssen <i>et al.</i> , 2000
CM-2485-F	CAGAGTCACGACTTCAAYGAC	21	2485-2505	
CM-2592-R	GAACCTMACCTGYGCTGTAC	20	2573-2592	
CM-3071-F	GTGTTTCGTYCCGCACGTGCCA	21	3071-3091	
CM-3402-F	CGATACAACGTCACAA	16	3402-3417	
CM-3ter-R	GGGCGCGCAGCCGGCTGAC	19	4175-4193	

**Table 2** (continued)

Primer Name	Sequence (5'-3')	Length	Position	Reference
carrot red leaf virus-associated RNA (CtRLVaRNA)				
aR-5ter-F	GGGATTTAGCMKWMACTAGC	20	1-20 <sup>e</sup>	
aR-557-F	CATCACACAACATACGGAC	19	557-575	
aR-684-R	GTGAATCCGATTCACAACC	19	666-684	
aR-839-F	CGGTTAGTTCGGATTACGAC	20	839-858	
aR-994-F	GGCAATAGATGTCTAACCACC	21	994-1014	
aR-1097-R	GTCTTGAAGCTCTCTATCGC	20	1078-1097	
aR-1556-F	GCACATTCCTACTACGAGAA	19	1556-1574	
CRLVaRNA-1	TCTAGTTTCTCTCAAGTTCCA	21	1984-2004	Vercruyssen <i>et al.</i> , 2000
aR-2069-R	TTCCACCATCTTGATTCATC	20	2050-2069	
aR-2391-F	GGAACATAGATCCGAACTCC	20	2391-2410	
CRLVaRNA-3	CCTCACCTRCCAATTATGG	19	2452-2470	Vercruyssen <i>et al.</i> , 2000
aR-2453-R	GGTAATCATTCTCGACTACGC	21	2433-2453	
aR-HK-2543-R	TGGTTATGCCATAGTGACAC	20	2524-2543	
aR-3ter-R	GGGCGGGGTTCTGGTAA	18	2818-2835	
carrot torrado virus 1 (CTaV1)				
To-1F-mod	GCWGAYTAYTCMTCYTTTGATGG	23	RNA1: 4321-4343 <sup>d</sup>	Verbeek <i>et al.</i> , 2012 <sup>j</sup>
To-1R-mod	GGTACWGCVACHAGRTTGTCATC	23	RNA1: 4669-4691	Verbeek <i>et al.</i> , 2012
To-2F-mod	TGGGATGARKGTGATGKCT	20	RNA2: 2941-2960	Verbeek <i>et al.</i> , 2012
To-2R	CWCCAGTCCACCAYTTRCA	19	RNA2: 3439-3457	Verbeek <i>et al.</i> , 2012
carrot necrotic dieback virus (CNDV) and parsnip yellow fleck virus (PYFV)				
Sequi-7765-F	GACACAAGCGTGGAATCATG	20	7624-7643, 7741-7760 <sup>e</sup>	
Sequi-8296-R	CATCTGTCATGGTCCACACCA	20	8135-8154, 8252-8271	
carrot yellow leaf virus (CYLV) and carrot closterovirus 1 (CtCV-1)				
CL-7940-F1	CTCATGGTTAAACGCGACGC	20	7940-7959, 7904-7923 <sup>f</sup>	
CL-8404-R1	GTTCCCGATCCATGTGTTTCG	20	8385-8404, 8349-8368	
CL-8396-F2	ATCGGGAACCTCCGTTGTAAC	20	8396-8415, 8360-8379	
CL-8592-R2	TTCGAGCAGAAGTAGGGAAC	20	8573-8592, 8537-8556	
CL-10074-F	TTGGGTTAGACTTCGGTACGAC	22	10074-10095, 9609-9630	
CL-10771-R	ACGACCACCAAGATTCATGTC	21	10751-10771, 10286-10306	
carrot Ch virus 1 (CtChV-1) and carrot Ch virus 2 (CtChV-2)				
CCh-5526-F1	GAGCCTTYATAGAGGAGCTC	20	5526-5545, 5512-5531 <sup>g</sup>	
CCh-6052-R1	TTRTTMKCAGCRAAGAGAGC	20	6033-6052, 6007-6026	
CCh-6165-F2	AGRCCWAACTTCGATGTGAG	20	6165-6184, 6139-6158	
CCh-6860-R2	GGAGATGTWCCCAWTTTCAGC	20	6841-6860, 6794-6813	
CCh-6841-F3	GCTGARWTGGGWACATCTCC	20	6841-6860, 6794-6813	
CCh-8130-R3	ATCAGCCACCRRTAAGTCGG	20	8111-8130, 8014-8033	
actin gene of carrot				
DC-ac-F	ACTGGAATGGTTAAGGCTGG	20	79-98 <sup>h</sup>	
DC-ac-R	GGACCTGATTCGTCATATTC	20	1121-1140	

<sup>a</sup> The position of primers in the genome of CtRLV strain UK-1 (AY695933)

<sup>b</sup> That of CMoV isolate Weddel (FJ188473)

<sup>c</sup> That of CtRLVaRNA isolate a25 (AF020617)

<sup>d</sup> That of CTaV1 isolate H6 (RNA1: KF533719, RNA2: KF533720)

<sup>e</sup> That of CNDV isolate Anthriscus (EU980442) and PYFV isolate (D14066)

<sup>f</sup> That of CYLV German isolate (FJ869862) and the position of primers in the partial genome of CtCV-1 isolate CUCV\_S8 (KF533697)

<sup>g</sup> That of CtChV-1 isolate CBV-1\_S20 (KF533711) and CtChV-2 isolate CBV-2\_S15 (KF533710)

<sup>h</sup> The position of primers in the partial sequence of actin gene of carrot (X17525)

<sup>i</sup> Oka K, Mochizuki T, Ohki ST, 2012. Detection of carrot red leaf virus-RNA in carrot seeds by multiplex RT-nested PCR. *Journal of General Plant Pathology* **78**, 2-7.

<sup>j</sup> Verbeek M, Tang J, Ward LI, 2012. Two generic PCR primer sets for the detection of members of the genus Torradovirus. *Journal of Virological Methods* **185**, 184-8.

## 4.3. 結果

### 4.3.1. CtRLV の遺伝学的特性

北海道のニンジンから検出された CtRLV (SN, HK, SH および KT2) について, 両末端を除くゲノム配列を決定した (GenBank accession nos. LC434061–LC434064) . その結果, SN, SH および KT2 についてはタイプ系統 UK-1 (Fig. 1; Huang *et al.*, 2005; GenBank accession no. AY695933) と同じ長さの 5,273 bp であると推定された (Fig. 1) . HK については ORF5 の 5' 側にシトシンが 3 塩基含まれたことから, 5,276 bp であると推定された. いずれのウイルス株も ORF0 から ORF5 までの 7 つの ORF を有していた.

各 ORF の推定アミノ酸配列は英国系統 UK-1 と高い相同性を示した. すなわち, ORF0 は 96.8%–98.0%, ORF1 は 98.1%–98.2%, ORF2 は 99.0%–99.1%, ORF3a は 100%, ORF3 は 99.0%–100%, ORF4 は 96.8%–97.9% および ORF5 は 97.1%–98.2% (Table 3) であった. 英国において近年検出されたウイルス株 (Adams *et al.*, 2014) とも高い相同性を示し, 北海道産のウイルスとの相同性は, ORF0 は 92.0%–93.2%, ORF1 は 95.3%–95.8%, ORF2 は 98.5%–99.0%, ORF3a は 100%, ORF3 は 94.2%–99.0% および ORF4 は 94.3%–97.9% であった.

次に, CtRLV の ORF1-2 領域の塩基配列全長を用いて分子系統学解析を行った. その結果, 北海道産のニンジンから検出された CtRLV はいずれもタイプ系統 UK-1 と同じクレードに属した (Fig. 14) . 一方, ギリシャにおいてノラニンジンから検出された wild carrot red leaf virus-RL1 (WCtRLV \*暫定種; GenBank accession no. LT615231) およびヤブジラミ属植物 (*Torilis arvensis* subsp. *a rvensis*) より検出された torilis crimson virus-RL5 (TCrV \*暫定種; GenBank accession no. LT615235) はそれぞれ単系統によるクレードを形成し, いずれもブートストラップ値 100 で支持されていた (Fig. 14a) . このことから, セリ科植物に発生するポレロウイルスには, ニンジンに感染する CtRLV の他, 複数の種または系統が存在することが示唆された. なお, 栽培ニンジンに発生する CtRLV は 2 グループに分けられ, それぞれのクレードはブートストラップ値 69 または 100 で支持された (Fig. 14b) .

米国産のパセリから検出された CtRLV の RdRP 部分配列 (210 bp; GenBank accession no. LN554262; Naseem *et al.*, 2016) との相同性比較の結果, 塩基配列は 71.9%–72.9%, 推定アミノ酸配列で 79.7%であり, 比較的低い相同性を示した.

**Table 3** Percentage of identical nucleotides (nt) and amino acids (aa) for seven ORFs of carrot red leaf virus isolates to the reference sequence of the isolate UK-1 (AY695933)

Isolate <sup>a</sup>	ORF0		ORF1		ORF2		ORF3a		ORF3		ORF4		ORF5		GenBank accession no.
	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	
<b>SN</b>	98.3	98.0	98.1	98.2	98.9	99.0	98.6	100	98.9	100	99.1	97.9	96.4	97.8	LC434061
<b>HK</b>	97.5	96.8	97.9	98.1	98.9	99.1	98.6	100	98.9	100	99.1	97.9	96.3	97.1	LC434062
<b>SH</b>	97.9	97.6	97.9	98.1	99.0	99.0	97.8	100	98.9	100	99.1	97.9	96.7	98.2	LC434063
<b>KT2</b>	98.1	98.0	97.9	98.1	99.1	99.1	98.6	100	98.4	99.0	98.8	96.8	96.7	97.6	LC434064
H19	93.6	90.8	96.7	95.8	98.5	99.0	99.3	100	96.8	94.7	97.2	95.2	ND <sup>b</sup>	ND	KF533716
H6	93.7	91.2	96.8	95.8	98.5	98.8	99.3	100	98.7	99.0	99.3	98.9	ND	ND	KF533717
H8	93.6	90.8	96.9	96.1	98.5	99.1	99.3	100	96.8	94.2	97.4	96.3	ND	ND	KF533718
RL1 <sup>c</sup>	93.5	90.8	92.4	90.5	94.6	95.7	69.6	64.4	74.1	69.7	73.7	59.4	68.7	60.0	LT615231
RL5 <sup>d</sup>	63.9	47.1	70.6	60.6	81.6	82.6	87.0	91.1	75.3	71.6	76.0	59.3	65.7	57.4	LT615235
Length <sup>e</sup>	750	249	1863	620	1767	588	138	45	627	208	570	189	1476	491	

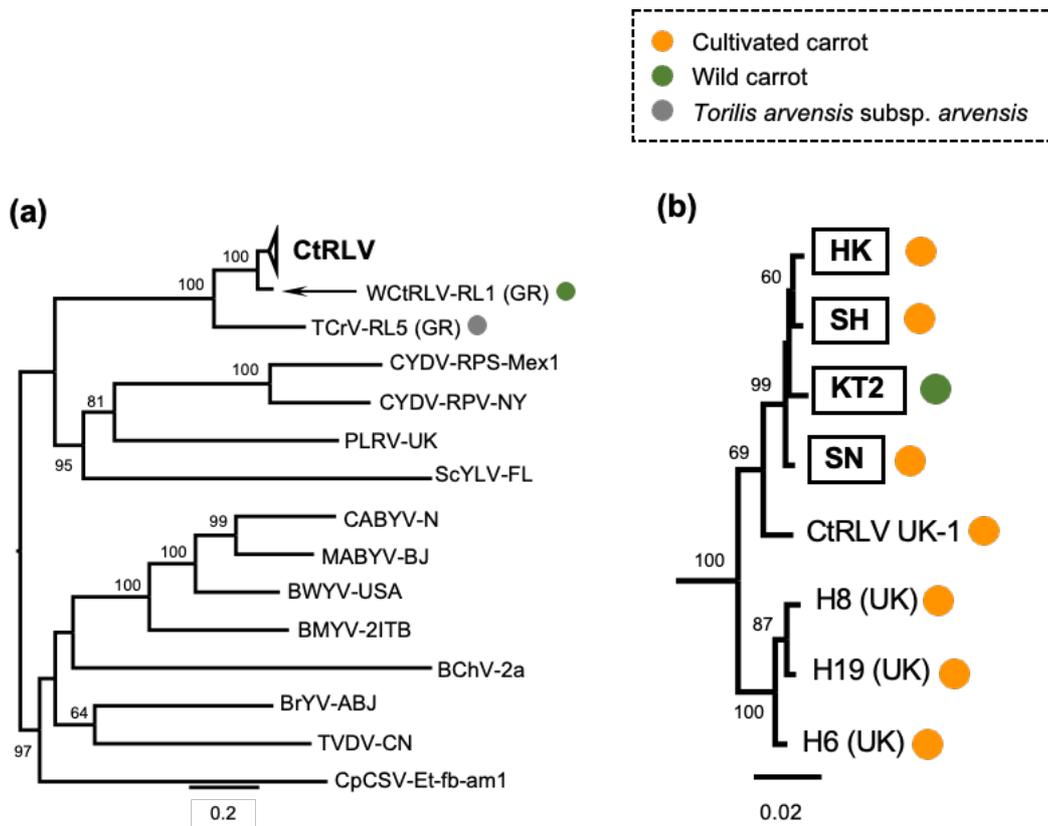
<sup>a</sup> The isolates collected in this study were shown by bold.

<sup>b</sup> ND: no sequence data.

<sup>c</sup> An isolate of wild carrot red leaf virus from Greece (tentative species).

<sup>d</sup> An isolate of torilis crimson leaf virus from Greece (tentative species).

<sup>e</sup> Length of each gene of the isolate UK-1.



**Figure 14** Phylogenetic relationships of carrot red leaf virus (CtRLV) isolates. Bootstrap values equal to or greater than 50% are given above or below each branch. The scale bar represents the number of substitutions per site. (a) Maximum-likelihood tree generated from complete nucleotide sequences of ORF1-2 of CtRLV and other polerovirus species; (b) individual CtRLV isolates in the clade collapsed in (a). Japanese isolates are shown in boxes (for GenBank accession no., see Table 3). Isolation sources were indicated as circles with different colours. The following poleroviruses were used for analysis: CtRLV (UK-1, AY695933; H19, KF533716; H6, KF533717; H8, KF533718), wild carrot red leaf virus (WCtRLV-RL1, LT615231), torilis crimson leaf virus (TCrV-RL5, LT615235), sugarcane yellow leaf virus (ScYLV-FL, AF157029), potato leafroll virus (PLRV-UK, D00530), cereal yellow dwarf virus-RPS (CYDV-RPS-Mex1, AF235168), cereal yellow dwarf virus-RPV (CYDV-RPV-NY, L25299), beet chlorosis virus (BChV-2a, AF352024), chickpea chlorotic stunt virus (CpCSV-ET-fb-am1, AY956384), cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV-N, X76931), melon aphid-borne yellows virus (MABYV-BJ, EU000534), beet western yellows virus (BWYV-USA, AF473561), beet mild yellowing virus (BMVYV-2ITB, X83110), tobacco vein distorting virus (TVDV-CN, EF529624), and brassica yellows virus (BrYV-ABJ, HQ388348). GR: Greece, UK: the United Kingdom.

#### 4.3.2. CMoV の遺伝学的特性

北海道のニンジンから検出された CMoV (HK, SH および KT2) について, 両末端を除くゲノム配列を決定した (GenBank accession nos. LC434065–LC434067) . その結果, いずれについてもタイプ分離株 Weddel (Menzel *et al.*, 2008; GenBank accession no. FJ188473) と比較して挿入または欠失は確認されず, 全長は 4,193 bp であると推定された. これらは, Weddel と同様に 4 つの ORF を有していた (Fig. 2) . 各 ORF の推定アミノ酸配列は同タイプ分離株と高い相同性を示した. すなわち ORF1 は 94.7%, ORF2 は 97.3%–98.2%, ORF3 は 92.5%–93.6%, ORF4 は 98.9%–99.3% であった (Table 4) .

次に, ORF1-2 領域の塩基配列全長を用いて CMoV の分子系統学的な関係について推定した. その結果, 北海道の CMoV はいずれも Weddel と同じクレードに属したが, 英国で報告された S5 (Adams *et al.*, 2014) とは異なるグループに属する可能性が示された (ブートストラップ値 66; Fig. 15) . ギリシャにおいて, ノラニンジンから検出された wild carrot mottle virus-RL1-Um (暫定種, GenBank accession no. LT615232) は単系統によるクレードを形成し, ブートストラップ値 100 で支持された.

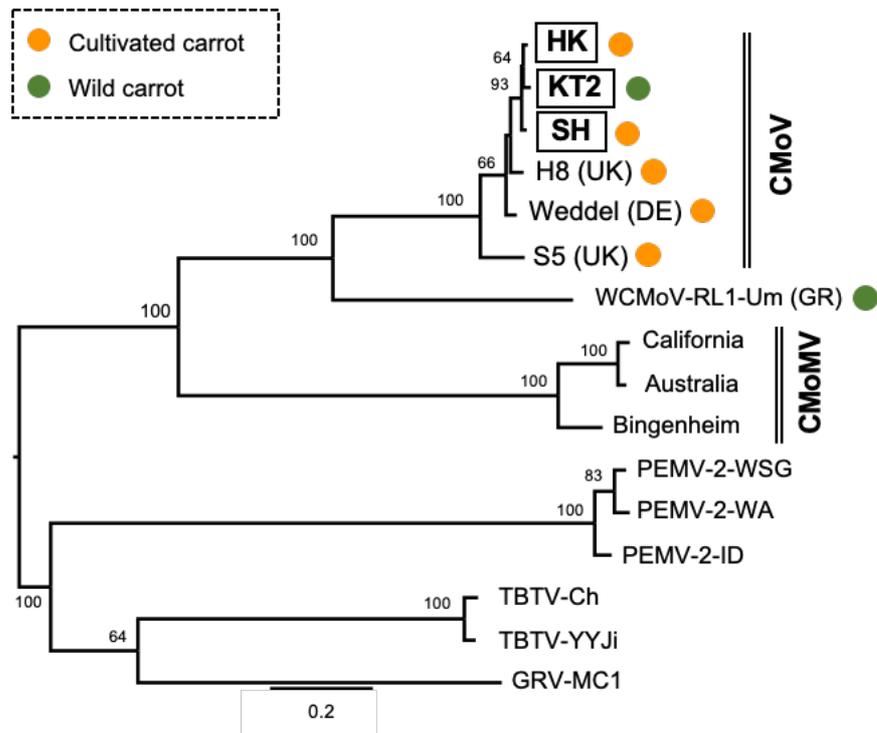
米国産のパセリから検出された CMoV の RdRP の部分配列 (408 bp; GenBank accession no. LN554261; Naseem *et al.*, 2016) との相同性比較の結果, 塩基配列は 75.2%–76.1%, 推定アミノ酸配列は 79.3%–80.7% であった.

**Table 5** Percentage of identical nucleotides (nt) and amino acids (aa) for two ORFs and UTR of carrot red leaf virus-associated RNA isolates to the reference sequence of the isolate a25 (AF020617)

Isolate <sup>a</sup>	ORF1a		ORF1b		UTR		GenBank accession no.
	nt	aa	nt	aa	nt	nt	
<b>SH</b>	86.8	91.2	91.5	96.0	93.0		LC434069
sigma	70.6	68.9	81.7	86.0	67.9		KM486093
alpha	86.5	89.9	91.2	96.0	93.0		KM486095
beta	86.0	89.9	91.2	96.0	93.0		KM486096
RL1-a	84.4	89.9	91.4	95.8	88.5		LT608332
<b>HK2</b>	94.3	95.6	96.7	98.3	94.8		LC434070
a8	86.3	90.4	91.6	95.8	93.0		AF020616
gamma	95.6	97.8	97.5	96.8	97.0		KM486092
Length <sup>b</sup>	687	228	1587	528	537		

<sup>a</sup>The isolates collected in this study were shown by bold.

<sup>b</sup> Length of each gene of the isolate a25.



**Figure 15** Phylogenetic relationships of carrot mottle virus (CMoV). Bootstrap values equal to or greater than 50% are given above or below each branch. The scale bar represents the number of substitutions per site. A maximum-likelihood tree generated from complete nucleotide sequences of ORF1-2 of CMoV; and (b) ORF1a-1b of CtRLVaRNA. Japanese isolates are shown in boxes (for GenBank accession no., see Table 4). Isolation sources were indicated as circles with different colours. The following umbraviruses were used for analysis: CMoV (Weddel, FJ188473; H8, KF533713; S5, KF533714), wild carrot mottle virus (WCMoV-RL1-Um, LT615232), carrot mottle mimic virus (CMoMV; Australia, U57305; California, FJ188471; Bingenheim, FJ188472), groundnut rosette virus (GRV-MC1, Z69910), tobacco bushy top virus (TBYV; Ch, AF402620; YYJi, FN597051), pea enation mosaic virus-2 (PEMV; WSG, U03563; WA, JF713435; ID, JF713436). DE: Germany, GR: Greece, UK: the United Kingdom.

### 4.3.3. CtRLVaRNA の遺伝学的特性

北海道で検出された CtRLVaRNA (SH および HK2) について、両末端を除くゲノム配列を決定した。その結果、いずれも 2,834 bp であることが推定され、米国で報告された a8 および a25 (Watson *et al.*, 1998; GenBank accession nos. AF020616, AF020617) と同様に ORF1a および ORF1b の 2 つの ORF を有していた (Fig. 3; GenBank accession nos. LC434069 and LC434070)。

SH および HK2 の各 ORF のアミノ酸配列の相同性は比較したところ、各 ORF の推定アミノ酸配列は ORF1a は 90.4%、ORF1b は 95.5% であった。SH と a8 または a25 の各アミノ酸配列を比較した結果、ORF1a はそれぞれ 98.2% または 91.2%、ORF1b はそれぞれ 90.4% または 95.5% であった。同様に HK2 と a8 または a25 の各アミノ酸配列を比較した結果、ORF1a はそれぞれ 89.5% または 95.6%、ORF1b はそれぞれ 95.1% または 98.3% であった。米国で報告された alpha, beta および gamma の 3 分離株 (GenBank accession nos. KM486095, KM486096, and KM486092; Campbell *et al.*, 2020) についても SH および HK2 と高い相同性を示し、ORF1a は 89.0%–97.8%、ORF1b は 93.9%–98.5% であった (Table 5)。米国産のパセリから検出された Sigma (GenBank accession no. KM486093; Campbell *et al.*, 2020) は SH および HK2 との相同性が ORF1a においては 70.9% および 71.8%、ORF1b については 86.2% および 86.0% であった。

tlaRNA の ORF1a-ORF1b 領域の遺伝子配列を用いて分子系統解析を行った結果、CtRLVaRNA は 2 つの主要なグループと、Sigma の単系統からなるクレードに分かれることが示され (ブートストラップ値 93–100)、SH および HK2 はそれぞれの主要グループに属した (Fig. 16)。CtRLV や CMoV とは異なり、ギリシャ産のノラニンジンに由来する RL1-a (GenBank accession no. LT608332) は SH と同じグループ I に属した (ブートストラップ値 93)。

英国産のニンジンから検出された CtRLVaRNA H19 の UTR 領域の部分配列 (GenBank accession no. KF533715; Adams *et al.*, 2014) は SH と 96.2%、HK2 と 96.9% と高い相同性を示した。また、sigma と同様に米国産のパセリより検出された CtRLVaRNA の RdRP 部分配列

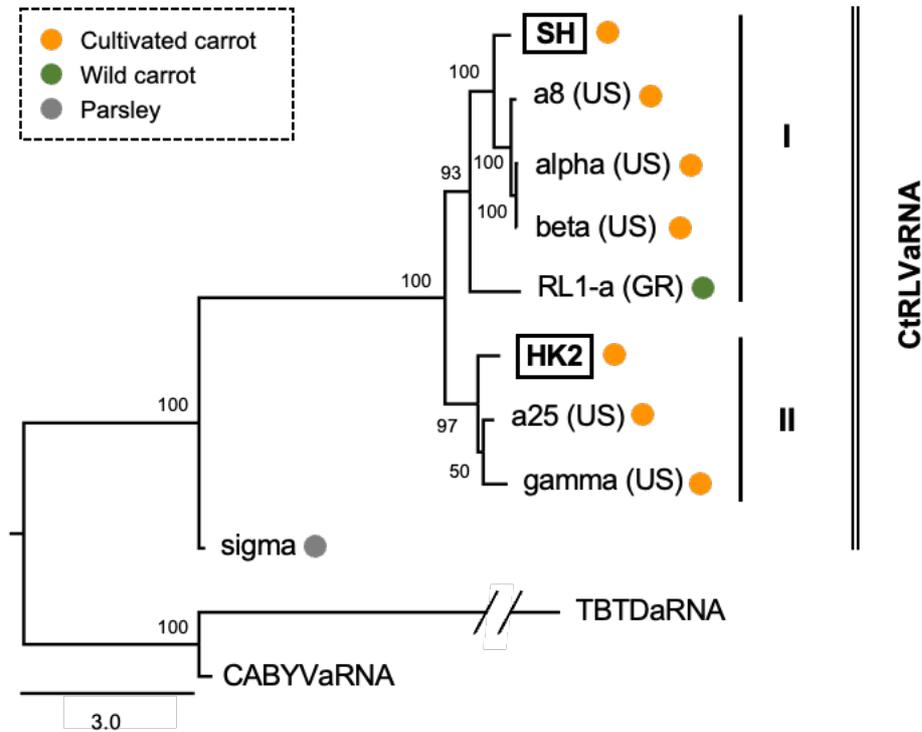
(GenBank accession no. LN554263; Naseem *et al.*, 2016) は、塩基配列では SH と 74.6%, HK2 と 74.4%の相同性を示し、推定アミノ酸では SH と 76.9%, HK2 と 76.0%の相同性を示した。また同株の配列は、sigma と塩基配列において 94.2%, 推定アミノ酸では 97.1%の高い相同性が確認された。

**Table 5** Percentage of identical nucleotides (nt) and amino acids (aa) for two ORFs and UTR of carrot red leaf virus-associated RNA isolates to the reference sequence of the isolate a25 (AF020617)

Isolate <sup>a</sup>	ORF1a		ORF1b		UTR		GenBank accession no.
	nt	aa	nt	aa	nt	nt	
<b>SH</b>	86.8	91.2	91.5	96.0	93.0	93.0	LC434069
sigma	70.6	68.9	81.7	86.0	67.9	67.9	KM486093
alpha	86.5	89.9	91.2	96.0	93.0	93.0	KM486095
beta	86.0	89.9	91.2	96.0	93.0	93.0	KM486096
RL1-a	84.4	89.9	91.4	95.8	88.5	88.5	LT608332
<b>HK2</b>	94.3	95.6	96.7	98.3	94.8	94.8	LC434070
a8	86.3	90.4	91.6	95.8	93.0	93.0	AF020616
gamma	95.6	97.8	97.5	96.8	97.0	97.0	KM486092
Length <sup>b</sup>	687	228	1587	528	537	537	

<sup>a</sup> The isolates collected in this study were shown by bold.

<sup>b</sup> Length of each gene of the isolate a25.



**Figure 16** Phylogenetic relationships of carrot red leaf virus-associated RNA (CtRLVaRNA) isolates. Bootstrap values equal to or greater than 50% are given above or below each branch. The scale bar represents the number of substitutions per site. (a) A maximum-likelihood tree generated from complete nucleotide sequences of ORF1a-1b of CtRLVaRNA. Japanese isolates are shown in boxes (for GenBank accession no., see Table 5). Isolation sources were indicated as circles with different colours. The following toombusvirus-like associated RNAs were used for analysis: CtRLVaRNA (a8, AF020616; a25, AF020617; gamma, KM486092; sigma, KM486093; alpha, KM486095; beta, KM486096; RL1-a, LT608332), cucurbit aphid-borne yellows virus-associated RNA (KM486094), and tobacco bushy top disease-associated RNA (EF529625). GR: Greece, US: the United States.

#### 4.3.4. CaTV1 の分子系統学解析

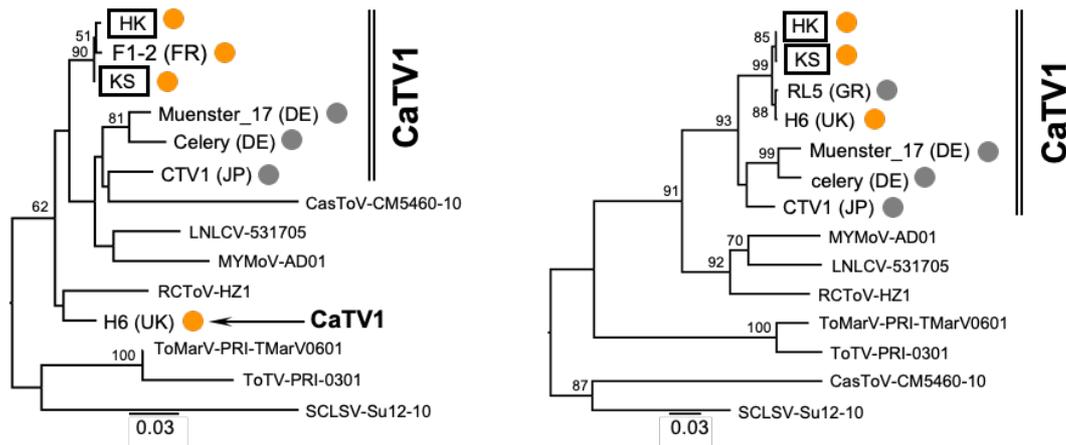
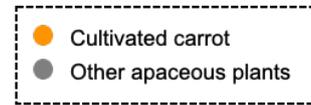
オホーツクおよび渡島管内のニンジンより検出された CaTV1 について、トラドウイルス属特異的プライマー (Verbeek *et al.*, 2012) により得られた RNA1 (RdRP) および RNA2 (Vp35-Vp26) の部分塩基配列を用いて、国内外で報告のあるウイルス株を含めた分子系統解析を行った。

RNA1 に関わる解析の結果、北海道産の CaTV1 はフランス産の F1-2 (GenBank accession nos. KY636379) とともに一つのグループを形成した。一方、英国産の H6 (Adams *et al.*, 2014; GenBank accession no. KF533719) , 日本国内においてアシタバ (*Angelica keiskei*) より検出された CTV1 (Tokuda *et al.*, 2019; GenBank accession no. LC436363) , ドイツ産のセロリ系統 (GenBank accession no. MK063924) はこのクレードには含まれず、明瞭な分類傾向がみられなかった (Fig. 17a) .

RNA2 の分子系統学的関係は RNA 1 のものとは異なり、CaTV1 が単一のクレードを形成し (ブートストラップ値 93; Fig. 17b) , さらに複数のグループに分けられた。北海道産ニンジン由来のウイルス (GenBank accession nos. HK: LC515702 および KS: LC515703) は、英国産ニンジン由来の H6 (Adams *et al.*, 2014; GenBank accession no. KF533720) , さらにギリシャ産ヤブジラミ属植物由来の RL5-Tor (GenBank accession no. LT615234) とともに一つのサブグループを形成した (ブートストラップ値 99) . ドイツ産の雑草由来の Muenster\_17 (GenBank accession no. MN399685) および同国産のセロリ系統 (GenBank accession no. MK063924) がグループを形成し (ブートストラップ値 99) , 国内のアシタバ由来のウイルス CTV1 (Tokuda *et al.*, 2019; LC436364) もさらに別のグループを形成する可能性が示された。

(a) RNA1 partial

(b) RNA2 partial



**Figure 17** Phylogenetic relationships of carrot torradovirus 1 (CaTV1) isolates. Maximum-likelihood trees generated from partial nucleotide sequences of (a) RdRP (RNA1) and (b) Vp35-Vp26 (RNA2) of carrot torradovirus 1 (CaTV1) and other torradovirus species. Bootstrap values equal to or greater than 50% are given above each branch. The scale bar represents the number of substitutions per site. Japanese isolates obtained in this study are shown in boxes (GenBank accession no.; HK, RNA-1: LC515702, RNA-2: LC515704; KS, RNA-1: LC515703, RNA-2: LC515705). Isolation sources were indicated as circles with different colours. The following torradoviruses were used for analysis: CaTV1 (celery strain, RNA-1: MK063924, RNA-2: MK063925; CTV1, RNA-1: LC436363, RNA-2: LC436364; F1-2, RNA-1: KY636379; H6, RNA-1: KF533719, RNA-2: KF533720; Muenster\_17, RNA-1: MN399684, RNA-2: MN399685; RL5-Tor, RNA-2: LT615234), lettuce necrotic leaf curl virus (LNLCV-531705, RNA-1: KC855266, RNA-2: KC855267), motherwort yellow mottle virus (MYMoV-AD01, RNA-1: KM229700, RNA-2: KM229701), squash chlorotic leaf spot virus (SCLSV-SU12-10, RNA-1: KU052530, RNA-2: KU052531), tomato marchitez virus (ToMarV-PRI-0601, RNA-1: EF681764, RNA-2: EF681765), tomato torrado virus (ToTV-PRI-0301, RNA-1: DQ388879, RNA-2: DQ388880), red clover torradovirus 1 (RCToV-HZ1, RNA-1: KY113159, RNA-2: KY113160), and cassava torrado-like virus (CasToV-CM5460-10, RNA-1: MF449530, RNA-2: KC505251). DE: Germany, FR: France, GR: Greece, JP: Japan, UK: the United Kingdom.

#### 4.4. 考察

CtRLV の遺伝学的特性に関わる解析の結果、北海道産のウイルスは互いに類似し、英国産のタイプ株 UK-1（英国南部バークシャー由来）との間に高い相同性が確認された。分子系統学解析においても UK-1 と近縁であることが示されたが、同じ英国の北部に位置するヨークで検出された3ウイルス（H19, H6 および H8）は別個のクレードを形成した。このことは、ニンジンに感染する CtRLV には複数のグループが存在し、英国内ではこれらが地理的に異なる分布域を持つものに対し、北海道ではその内の一部のグループとより強い遺伝学的関連性を有することを示すと考えられた。北海道産のウイルスの起源に関わる情報は見出されていないが、国外に由来すると仮定すると、一部の国や地域から導入された可能性が高い。

CtRLV はニンジン以外のセリ科植物からも検出されているが、米国産のパセリ分離株についてはニンジン分離株と遺伝子配列の相同性が低く、分子系統学的に異なることが示されている（Naseem *et al.*, 2016）。また本解析の結果からも、ギリシャ産のノラニンジン（WCtRLV）およびヤブジラミ属植物由来のウイルス（TCrV）がニンジン由来 CtRLV とは遠縁であり、分子系統学的に独立することが明らかとなった。現在のポレロウイルス属ウイルスの分類基準の一つである「各アミノ酸配列の相同性が 90% <」（D'Arcy and Domier, 2005）に基づくとこれら2種は必ずしも別種とはいえず、同国やその周辺地域において一般的に発生するウイルスであることが明らかとなった場合には、今後 CtRLV の系統の一つとして整理される可能性が高い。

本州においてもニンジンやパセリにおける CtRLV の発生が確認されているが、そのゲノム配列は明らかではない。関東のニンジンから検出されたウイルスは、ニンジンアブラムシによっても媒介され、英国やオーストラリアで報告されたウイルスと宿主範囲が異なる（Ohki *et al.*, 1979）。また、長野県のパセリより検出された CtRLV は、UK-1 と CP のアミノ酸の相同性が 60%程度であった（藤永ら, 2010）。以上のことから、CtRLV には性質の異

なる複数の未知の系統または近縁種が存在すると考えられ、日本国内においてもそれらが各地に存在しているものと推測される。

CMoV におけるゲノム配列の比較および分子系統学的解析の結果、北海道産のウイルスはいずれもドイツ産タイプ株 Weddel (Menzel *et al.*, 2008; GenBank accession no. FJ188473) および英国ヨーク産 H8 (Adams *et al.*, 2014) と類似性が高く、これらと主要なクレードを形成した。一方、同じヨーク産の S5 は配列の類似性が比較的 low、別のクレードを形成する可能性が示された。ギリシャ産のノラニンジン由来のウイルス (WCMoV) も独立したクレードを形成した。また、米国産のパセリ分離株は北海道産の CMoV と相同性が低く、Weddel とも遠縁であることが示されている (Naseem *et al.*, 2016)。このことは、CtRLV と同様に、CMoV においても複数の系統や近縁種が存在するとともに、北海道で発生するウイルスは多様性が低く、欧州株によって形成される主要なグループに分類されるものと考えられた。

CtRLVaRNA に関する解析の結果、同 RNA 種は大きく 2 つグループに分けられ、北海道で検出された 2 圃場分離株 SH および HK2 は各グループ (I および II) にそれぞれ属した。SH と HK2 はそれぞれ北海道の産地の東端と西端に位置するオホーツクと渡島地方のニンジンに由来する。このことは、北海道における CtRLVaRNA はその発生のみならず、遺伝学的特性においても地域性を有する可能性を示すが、後者について明らかにするためにはより多くの CtRLVaRNA を収集して解析を行う必要があるだろう。また、米国産のパセリ株 sigma (Campbell *et al.*, 2020; GenBank accession no. KM486093) は CtRLVaRNA が形成する主要なクレードから独立した。Naseem *et al.* (2016) が報告した米国産パセリ由来の CtRLVaRNA は sigma と高い配列相同性を示したことから、これらは同じ性質を持つとみなされるとともに、米国においてはパセリに感染性を持つ CtRLVaRNA が一般的に発生していると推測された。以上に基づき、CtRLV および CMoV と同様に、CtRLVaRNA においても性質の異なる複数の系統またはその近縁種が存在すると考えられた。なお、sigma は ORF1a から ORF1b の 5'

末端側にかけての領域がキュウリ (cucumber, *Cucumis sativus*) に由来する cucurbit aphid-borne yellows virus-associated RNA (CABYVaRNA, GenBank accession no. KM486094) と類似する. Campbell *et al.* (2020) は同株が特徴的な tlaRNA であるということに留めているが, CtRLVaRNA と CABYVaRNA の相同組替えにより生じたものと考えられる.

北海道産の CaTV1 の RNA1 および RNA2 の部分配列情報を用いた解析の結果, RNA1 と RNA2 から示された分子系統学的関係が異なった. RNA1 の解析においては使用した遺伝子領域における属内の類似性が高かったことが結果に影響を与えた可能性が高く, 多くの分離株と十分な配列長を元に解析を行う必要があるだろう. 一方, RNA2 の結果からは, CaTV1 が 2 つ以上のグループに分けられることが示され, CaTV1 において複数のグループが存在することが示唆された.

以上, 本章では北海道産の CMD に関連するウイルスおよび RNA のゲノム配列について相同性の比較および分子系統学的解析を行い, いずれの病原体も欧米のニンジン由来の株と高い類似性を持つことを明らかにした. これらの病原体の起源を示す明確な根拠は見出されていないが, いずれも欧米株との共通の祖先から比較的最近分化したものと考えられる. 北海道における欧州型ニンジンの栽培の発展がこれらの国々と深く関連していることに鑑みても, 欧米諸国にその起源を有すると推測された.

## 5. CMD に関与するウイルスおよび RNA の病原性に関わる解析

### 5.1. 背景

北海道に発生する CMD 関連ウイルスおよび RNA が, 欧米株と遺伝学的に類似することが明らかとなった. これまでニンジンに発生する CtRLV と CMoV について, その宿主範囲, 病原性, 血清学的特性等の報告がなされているが, それらを遺伝的な同定と併せて評価された例はない.

そこで本章では, 北海道のニンジンに発生する CtRLV, CMoV および CtRLVaRNA の宿主範囲を明らかにするとともに, CtRLV の単独感染 (ニンジン黄化病) と CMD, すなわち CtRLV + CMoV の二重感染または CtRLV + CMoV + CtRLVaRNA の三重感染について, 病原性の観点から比較を行った.

### 5.2. 材料と方法

#### 5.2.1. ウイルス接種

接種源としては, 主に圃場分離株 SN (CtRLV + CMoV), HK (CtRLV + CMoV) および SH (CtRLV + CMoV + CtRLVaRNA) を使用した. また, SH からイノンドを介することにより CtRLVaRNA を脱落させた二重感染個体 SH<sup>CM-</sup> (CtRLV + CtRLVaRNA), さらに SH から CMoV および CtRLVaRNA を脱落させた SH<sup>Ct</sup> (CtRLV) についても一部試験に供試した. これらの 3 圃場分離株には, 前述のトラドウイルス属, クロステロウイルス属, セクイウイルス属およびコルドウイルス属の存在は RT-PCR で確認されず, また感染植物体からの dsRNA の分離を行い (Balijja *et al.*, 2008) 電気泳動によりその他のウイルスの有無を確認したが, パーティティウイルス科 (*Partitiviridae*), ダーナウイルス亜科 (*Durnavirales*) に属するニ

ニンジン潜伏ウイルス (carrot temperate virus 1-4, CteV1-4) を除き, その他のウイルスの存在が確認されなかった.

接種の際には, 健全なニンジン上で維持したニンジンフタオアブラムシを各ウイルス接種源に 48 時間以上吸汁させた後, 植物体 1 個体に対して無翅虫 5 頭を用いて接種を行った. 5 日間吸汁させたのち, シペルメトリン (商品名, ゲットアウト WDG; 住友化学株式会社) を散布することにより殺虫した.

### 5.2.2. 宿主範囲

宿主範囲の調査には, セリ科に属する以下の 14 属 17 種の植物種を用いた: ニンジン, チャービル, コリアンダー, マツバゼリ (*Cyclospermum leptophyllum*), イノンド (*Anethum graveolens*), クミン (*Cuminum cyminum*), ミツバ, イタリアンパセリ (*Petroselinum crispum* var. *neapolitanum*), パセリ (*P. crispum* および *P. crispum* subsp. *Tuberosum*), アニス (*Pimpinella anisum*), キンサイ (またはスープセロリ; *A. graveolens* var. *secalinum*), セルリアック (*A. graveolens* var. *rapaceum*), ウイキョウ, ラベージ (*Levisticum officinale*), パースニップ (*Pastinaca sativa*), セントウソウ (*Aegopodium decumbens*). セントウソウの種子はホクレン長沼研究農場において, マツバゼリの種子は岡山県倉敷市の道路脇より採取した. 各植物の種子はバーミキュライトの上で発芽させた後, くみあい園芸培土 (ホクサン株式会社) およびポットエース (片倉コープアグリ株式会社) を等比で混合したものに移植した. 接種は各植物種 3 個体に対して 2-4 葉期に行い, 再現性の確認のため, 各植物 3 回以上試験を実施した. 症状の確認およびウイルスの検出は殺虫後 1, 4, 6 週間後に実施し, 6 週間後の結果を示した. 供試植物は 23°C, 14 時間日長, 17°C, 10 時間暗黒条件で栽培した. 接種個体からのウイルス検出は, 前章 3.2.4. で示した one-step RT-PCR 法とともに, 後述のプライマー (Table 6; 5.2.4.) を用いた One Step TB Green PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (タカラバイオ株式会社) により行った. 反応は 10  $\mu$ L の系で行い, 各プライマーを最終濃度 4  $\mu$ M となるように調整した. One-step RT-qPCR は StepOnePlus Real-Time PCR System (サーモ

フィッシャーサイエンティフィック社) 上で行い, 反応条件は以下のとおりとした: 逆転写反応として 42°C 5 分, 95°C 10 秒, その後 1 サイクル 95°C 5 秒, 60°C 30 秒の PCR を 40 サイクル.

### 5.2.3. 栽培試験

ニンジン黄化病または CMD の罹病による農業形質への影響を明らかにするため, 屋内外でそれぞれ栽培試験を行った. いずれの試験も「向陽二号」(タキイ種苗株式会社) を用いて行った.

屋内試験は 2016 年ホクレン長沼研究農場の人工気象室において実施した. 園芸培土およびポットエースを等比で混合したものを 15 cm の深型のポリポットに充填し, 種子を 1 ポットあたり 3 粒播種した. 間引きした後, 二葉期に接種を行った. 播種 100 日後, 無接種区および 3 接種区の各 10 個体について, 根重, 根長, 根周および葉数について評価した.

屋外試験は 2019 年, ホクレン長沼研究農場の柵圃場 (2.0 m×8.0 m, 火山性土) で実施した. 6 月 11 日に播種し, 各区について 6 畝を設け, それぞれの区は交互に設置した. 畝間は 30 cm, 株間は 12 cm とした. 二葉期となる 7 月 8 日に, 各ウイルス源を保毒させたアブラムシ約 10 頭が寄生した葉片に小分けし, 全ての有翅虫をピンセットにより物理的に死滅させた後, 各ニンジン個体上に固定することにより接種を行った. 3 時間後, 植物体にアブラムシが移住したことを確認した後, 殺虫剤を散布した. 以後, 1 週間おきにシベルメトリンおよびスピロテトラマト (商品名, モベントフロアブル; バイエル クロップサイエンス株式会社) を散布した. ニンジンは播種 90 日後の 9 月 19 日に全株を掘り上げ, 根重, 根長, 葉重および葉数を計測した. 圃場両端の畝および出芽不良やネキリムシ類による食害により 10 個体を下回った畝を評価対象から除外し, 最終的に各接種区の 5 畝の両端株を除く約 10 株を評価対象とした. なお, 接種区中の非感染株, また病害以外の要因に起因するとみられる生育不良株 (根が肥大しない等) は評価から除外した. 収穫物は高温高压滅菌により処理した後, 同研究農場内の堆肥盤に搬出することにより処分した.

#### 5.2.4. リアルタイム PCR による病原体量の比較

単独・混合感染時の各病原体の RNA 量を比較するため、3 種のウイルス接種源 (SN, HK, SH) をニンジン (向陽二号) 12 個体に対して接種した。接種は保毒させた無翅虫 5 頭により行った。接種開始日から 14 日後および 28 日後に、上位第 2 葉および第 3 葉を採取し、それらを混合して定量試験に供試した。試料は液体窒素により磨砕し、Fruit-mate RNA purification および RNAiso Plus により RNA を抽出後、RNA clean & concentrator (Zymo Research) のカラム上で Dnase I を処理・精製した。得られた精製 RNA の内、1 $\mu$ g を PrimeScript II first strand cDNA Synthesis kit (タカラバイオ株式会社) による逆転写に供試した。RNA 10 ng に相当する cDNA を PowerUp SYBR Green Master Mix (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) を使用し、StepOnePlus Real-Time PCR System (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) 上で解析した。反応は 10  $\mu$ L の系で行い、各プライマーを最終濃度 300 nM となるように調整した。qPCR の反応条件は以下のとおりとした: 95°C 20 秒の後、1 サイクル 95°C 3 秒、60°C 30 秒の PCR を 40 サイクル。病原体量の解析に用いたプライマー情報は Table 6 に記した。病原体量は検量線法により算出し、14 日後の値を基準とした相対値 (平均値  $\pm$  標準誤差) として示した。

CtRLVaRNA による CtRLV または CMoV への影響を明らかにするため、ニンジンに対して SH<sup>Ct</sup> または SH<sup>CM-</sup> を、ミツバに対して HK および SH を同様に接種し、接種 28 日後に症状の比較と併せて、ウイルスと RNA 量の定量を行った。

**Table 6** Primer used for quantitative real-time PCR

virus/RNA	Target		Primer name	Sequence (5' - 3')	Length	Product size (bp)	E (%)
	region						
CtRLV	ORF3		CtRLV-RT-F	CCACATATGGACTCACCAAG	20	177	101.8
			CtRLV-RT-R	TTGTTCGTGGGTACCAGAG	20		
CMoV	UTR-ORF3/ORF4		CMoV-RT-F2	GGCAATTCATGACATTCAG	20	167	99.7
			CMoV-RT-R2	TGTGGGTAAGCGTATTGGTG	20		
CtRLVaRNA	ORF1b		CtaRNA-RT-F	AGGCGATAGAGAGCTTCAAG	20	146	101.3
			CtaRNA-RT-R	CGTTACGAATCTGGAGTCC	20		

The mean reaction efficiency rates ( $E$ ) of each primer set were determined using eight-point serial dilutions of cDNA, and calculated by the following equation:  $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ , which were expressed as percentages.

### 5.2.5. 統計解析

統計分析ソフト'R' (<http://www.r-project.org/>) により解析を行った.

感染による根重, 根長, 根周, 葉重および葉数への影響についてはチューキー・クレーマー検定を採用し, 各群の差を検定した.

各病原体の蓄積量の統計的な差は, 同一接種群の 2 時期 (接種 14 日後および 28 日後) の値に対しては対応のある t 検定, 同時期の接種群間の差については, CiRLV はチューキー・クレーマー検定を, その他の 2 群間の差の比較については対応のない t 検定により検定を行った. いずれの検定においても有意水準を  $p < .05$  とした. 蓄積量については, ノンパラメトリック手法, すなわちウィルコクソンの符号順位検定 (対応のある t 検定に対応), ウィルコクソンの順位和検定 (対応のない t 検定に対応) および Steel-Dwass 検定 (チューキー・クレーマー検定に対応) による解析も行ったが, 同様の結果となったため, 本稿ではパラメトリック手法による解析結果のみを示した.

## 5.3. 結果

### 5.3.1. 宿主範囲

各種セリ科植物に対し、構成ウイルスまたは RNA の異なる 3 圃場分離株 (SN, HK および SH) を接種し、経時的に症状の観察とウイルスの検出を行った。特に接種 1 週間後においては、症状の有無に関わらずほぼ全ての検定植物からウイルスが検出されたことから、接種 6 週間後の症状の有無と、新たに生じた上位葉の検定の結果を Table 7 に示した。

評価の結果、ニンジン、チャービル、コリアンダー、クミン、マツバゼリおよびイノンドにおいて全身症状が確認された。症状を呈する個体からは CtRLV が検出されたが、いずれの植物種においても各圃場分離株によって生じる症状が異なった。特に SH を接種したマツバゼリおよびイノンドは症状が極めて軽微で、それらの個体からは微量の CtRLV しか検出されなかった。また、HK または SH を接種したイノンドからは CMoV は検出されず、非宿主であることが明らかとなった (Table 7)。

ミツバにおいては CtRLV の全身感染や症状は確認されなかったが、接種 6 週間後の上位葉より、CMoV または CtRLVaRNA が検出された。イタリアンパセリおよびアニスは、CMoV にのみ無症状で感染した。

以上より、北海道のニンジンで発生する CMD 関連ウイルスおよび RNA はセリ科植物の中でも限られた種にしか感染せず、さらに CtRLV, CMoV および CtRLVaRNA の宿主範囲は一致しないことが明らかとなった。

**Table 7** Comparative host range of carrot red leaf virus and its associated agents

Common name	Plant species	CtRLV <sup>a</sup>	CMoV	CtRLVaRNA	Symptom
ニンジン, carrot	<i>Daucus carota</i>	+	+	+	+
チャービル, chervil	<i>Anthriscus cerefolium</i>	+	+	+	+
コリアンダー, coriander	<i>Coriandrum sativum</i>	+	+	+	+
クミン, cumin	<i>Cuminum cyminum</i>	+	+	+	+
マツバゼリ, slender celery	<i>Cyclosporum leptophyllum</i>	+ <sup>a</sup>	+	+	+ <sup>b</sup>
イノンド, dill	<i>Anethum graveolens</i>	+ <sup>a</sup>	-	+	+ <sup>b</sup>
ミツバ, Japanese parsley	<i>Cryptotaenia canadensis</i> subsp. <i>Japonica</i>	-	+	+	-
イタリアンパセリ, Italian parsley	<i>Petroselinum crispum</i> var. <i>neapolitanum</i>	-	+	-	-
アニス, anise	<i>Pimpinella anisum</i>	-	+	-	-
キンサイ (またはスーパセロリ), Chinese celery	<i>Apium graveolens</i> var. <i>secalinum</i>	-	-	-	-
セルリアック, celeriac	<i>Apium graveolens</i> var. <i>rapaceum</i>	-	-	-	-
ウイキョウ, fennel	<i>Foeniculum vulgare</i>	-	-	-	-
ラベージ, lovage	<i>Levisticum officinale</i>	-	-	-	-
パースニップ, parsnip	<i>Pastinaca sativa</i>	-	-	-	-
パセリ, parsley	<i>Petroselinum crispum</i>	-	-	-	-
Root parsley	<i>Petroselinum crispum</i> subsp. <i>tuberosum</i>	-	-	-	-
セントウソウ	<i>Aegopodium decumbens</i>	-	-	-	-

Results at six weeks post inoculation are shown.

CtRLV = carrot red leaf virus, CtRLVaRNA = CtRLV-associated RNA.

<sup>a</sup> CtRLV accumulation was substantially reduced when inoculated with the virus/RNA combination SH (CtRLV + CMoV + CtRLVaRNA).

<sup>b</sup> SH-inoculated plants developed mild yellow mottling on lower leaves.

### 5.3.2. 単独・混合感染時の症状の比較

CtRLV は CMoV との二重感染時により強い症状を生じることが報告されているが (Watson *et al.*, 1964; Waterhouse and Murrant, 1981) , CtRLVaRNA との三重感染を含めて比較された例はない. 本研究において, CtRLV の単独感染, CMoV または CtRLVaRNA との二重または三重感染が得られたことから, これらをニンジン, チャービル, コリアンダー, クミン, マツバゼリおよびイノンドに接種し, その症状を比較した. 代表的な症状を Table 8 および Fig. 18 から Fig. 22 に示した.

SN (CtRLV) を接種した感受性植物は, いずれも下葉の葉脈間の黄化または赤化を伴う葉巻症状を生じた. ニンジンにおいては, 同一品種の中でも黄化しか示さない個体が確認された. 感受性植物のうち, コリアンダーおよびクミンは感受性が高く, 接種個体が激しく萎凋し, 2ヶ月以内に枯死した.

HK (CtRLV + CMoV) を接種した植物は SN と同様に, 下葉の葉脈間の黄化または赤化を生じた. ニンジンおよびマツバゼリにおいては SN と比較して病徴の進展が早まるとともに, 赤化の程度がわずかに強まり, 軽微な斑紋症状を伴うことがあった. チャービルおよびコリアンダーにおいては葉脈間の領域にしばしば壊死がみられ, 葉巻症状が若干弱まった. チャービルにおいては接種2週間後に葉脈に沿った白化がみられ, この症状はニンジンにも稀にみられた.

SH (CtRLV + CMoV + CtRLVaRNA) が引き起こす症状は, 植物種や個体間で大きく異なっていた. ニンジンにおいては SN および HK 接種時よりも明らかに生育が不良となり, 接種2週間以内に上位葉に斑紋 (green mottling) が生じ, その後に黄化や赤化が急激に進展した. 下位葉は生育が進むにつれて順次枯死した. または, 葉巻症状も比較的強く, 初記載のとおり葉柄は S 字型に湾曲した (Stubbs, 1948) .

チャービルおよびコリアンダーにおいても SH 接種時に斑紋症状を伴う葉の症状が生じたが, 萎縮の程度は個体によって異なった. 萎縮程度が軽い個体は, 下位葉に強い赤化を伴う葉巻症状がみられていても, 上位葉においては葉巻症状が消失することが多かった. このよ

うな個体の上位葉からは、しばしば CtRLV が検出されなくなった。一方、個体全体が萎縮し、葉巻症状が全身に認められる個体の上位葉からは CtRLV が検出された。

マツバゼリにおいては SN および HK を接種時に強い赤化・葉巻症状および萎縮がみられたが、SH 接種時には極めて弱い黄化の斑紋症状しか生じなかった。生育抑制も見られず、上位葉からは CMoV および CtRLVaRNA が検出されたが、CtRLV は微量しか検出されなかった。

イノンドも同様に、SN および HK 接種時に赤化葉巻症状が生じ、CtRLV のみが検出された。一方、SH 接種時には軽微な症状しか認められなくなり、そのような個体からは CtRLVaRNA と微量の CtRLV が検出された。イノンドは CMoV の非宿主であることが明らかとなったことから、SH を接種したイノンドからアブラムシを用いて CtRLV + CtRLVaRNA で構成されるウイルス源を回収し (SH<sup>CM-</sup>)、感染時の症状を観察した。ニンジンへの接種の結果、葉縁の赤化や黄化の程度が明らかに強まったが、斑紋症状は確認されなくなった (Fig. 22)。チャービルにおける症状も同様であったが、より鮮やかな赤化が生じ (Fig. 23)、株の萎縮程度は若干弱まった。

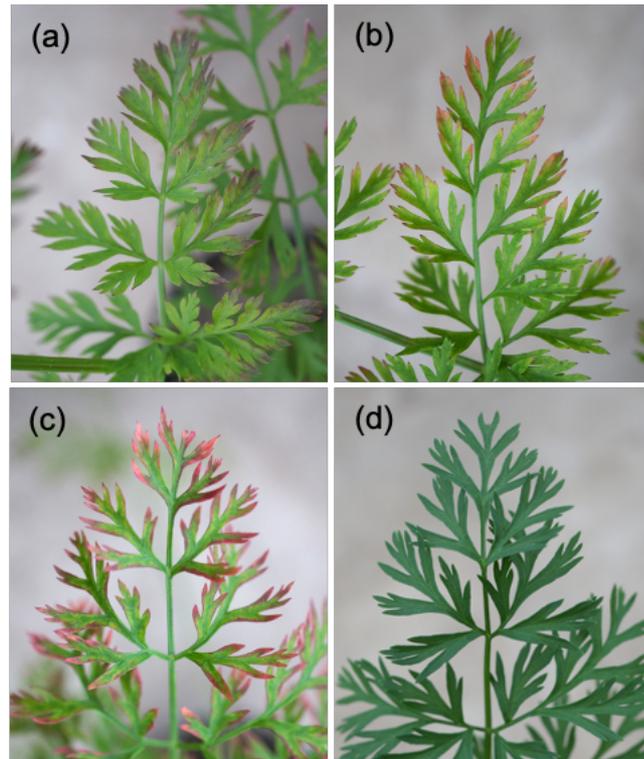
**Table 8** Symptoms on apiaceous plants induced by three virus-RNA combinations composed of three components associated with carrot motley dwarf in different combinations

Plant species (common name)	Symptom		
	SN (CtRLV)	HK (CtRLV + CMoV)	SH (CtRLV + CMoV + CtRLVaRNA)
<i>Daucus carota</i> (carrot)	Rd, LR, [St]	Rd, LR, [Mt]	Rd, LR, Mt, PB, St
<i>Anthriscus cerefolium</i> (chervil)	Rd, LR, St	Rd, [LR], NS, St, Mt, VB	Rd, NS, Mt, VB, PB, [St]
<i>Coriandrum sativum</i> (coriander)	Rd, LR, St	Rd, [LR], NS, St, [Mt]	Rd, NS, Mt, [St]
<i>Cuminum cyminum</i> (cumin)	Rd, LR, St	Rd, LR, St	Rd, LR
<i>Cyclospermum leptophyllum</i> (slender celery)	Rd, LR, St	Rd, LR, St	[Mt]
<i>Anethum graveolens</i> (dill) <sup>a</sup>	Rd, LR	Rd, LR	[Mt]

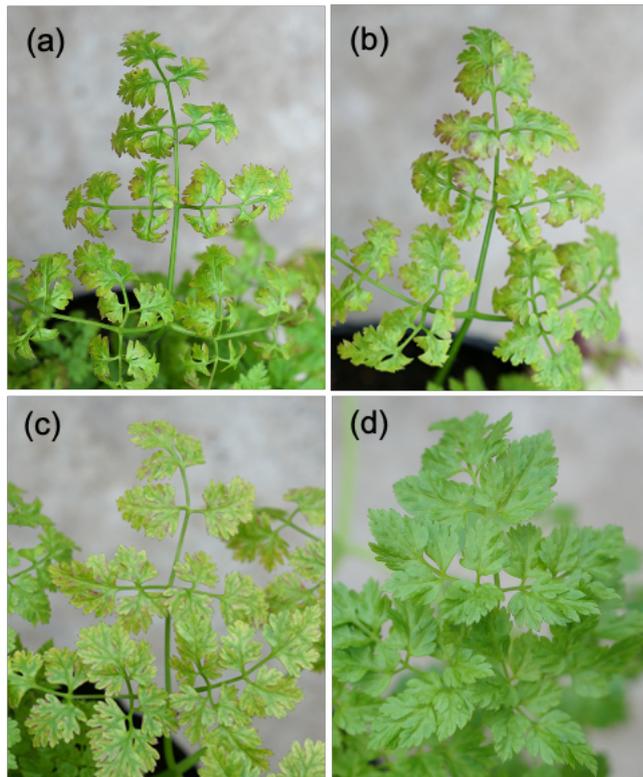
Abbreviations: CtRLV, carrot red leaf virus; CMoV, carrot mottle virus; CtRLVaRNA, CtRLV-associated RNA; Rd, leaf reddening or yellowing; LR, leaf rolling; St, stunting; NS, necrotic spot on leaves; Mt, mottling on leaves; PB, bending of petiole; VB, vein banding.

Milder symptoms were indicated by square brackets.

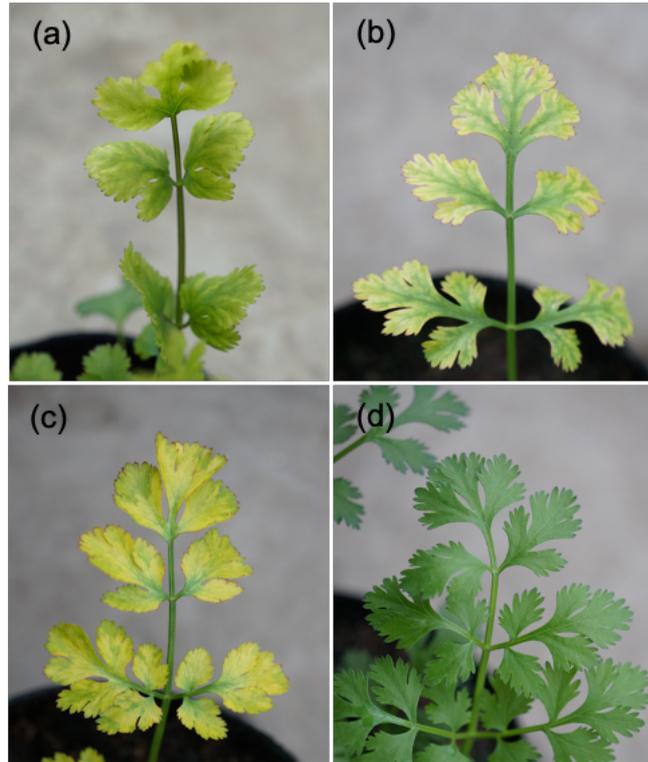
<sup>a</sup> The plant species is not a host for CMoV.



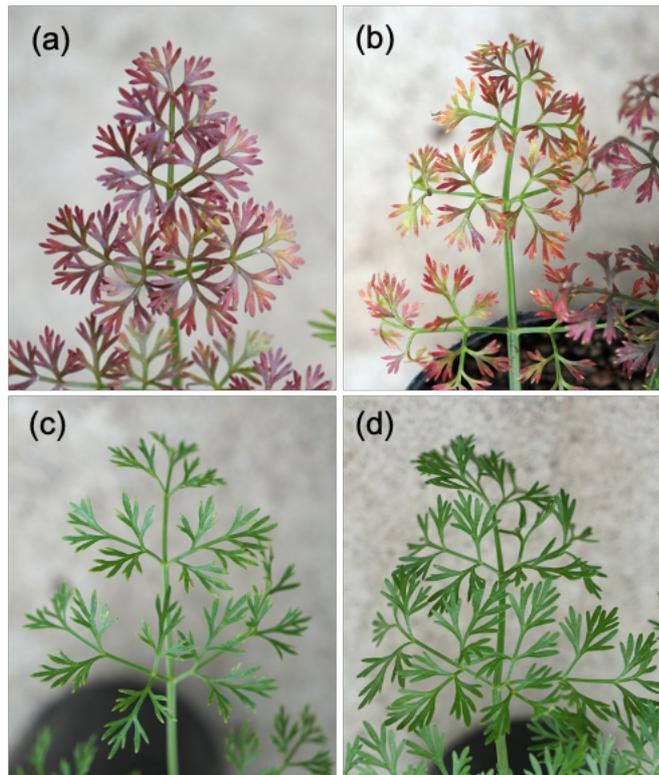
**Figure 18** Symptoms in carrot leaves induced by three virus-RNA combinations: (a) SN, carrot red leaf virus (CtRLV) alone; (b) HK, CtRLV + carrot mottle virus (CMoV); (c) SH, CRLV + CMoV + CtRLV-associated RNA; (d) healthy.



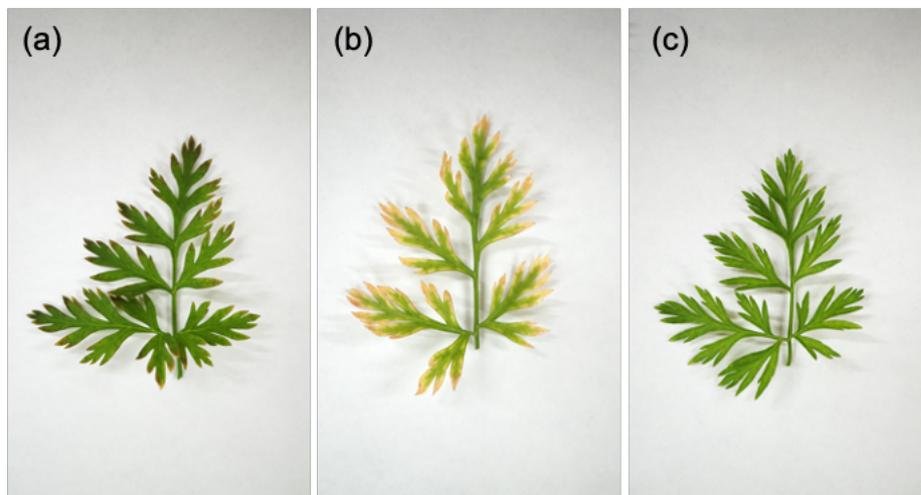
**Figure 19** Symptoms in chervil leaves induced by three virus-RNA combinations: (a) SN, carrot red leaf virus (CtRLV) alone; (b) HK, CtRLV + carrot mottle virus (CMoV); (c) SH, CRLV + CMoV + CtRLV-associated RNA; (d) healthy.



**Figure 20** Symptoms in coriander leaves induced by three virus-RNA combinations: (a) SN, carrot red leaf virus (CtRLV) alone; (b) HK, CtRLV + carrot mottle virus (CMoV); (c) SH, CRLV + CMoV + CtRLV-associated RNA; (d) healthy.



**Figure 21** Symptoms in slender celery leaves induced by three virus-RNA combinations: (a) SN, carrot red leaf virus (CtRLV) alone; (b) HK, CtRLV + carrot mottle virus (CMoV); (c) SH, CtRLV + CMoV + CtRLV-associated RNA; (d) healthy.



**Figure 22** Symptoms on carrot leaflets induced by (a) single infection with carrot red leaf virus alone (CtRLV; SH<sup>CR</sup>); (b) double infection with CtRLV and CtRLV-associated RNA (CtRLVaRNA; SH<sup>CM</sup>); (c) a healthy leaflet.



**Figure 23** Vivid reddening in chervil leaves induced by virus-RNA combination SH<sup>CM-</sup> (carrot red leaf virus + CtRLV-associated RNA).

### 5.3.3. ニンジンの生育への影響

接種試験の結果, 特にニンジンには CtRLV とその関連ウイルスや RNA の混合感染により, 生育により大きな影響を受けることが明らかとなった. 次に, 感染によるニンジンの生育への影響についてより詳細な評価を行うため, 人工気象室と隔離圃場において栽培試験を実施した.

人工気象室における試験の結果, 一根重が無接種区で平均 153.4 g, SN 接種区 (CtRLV) が 165.9 g, HK 接種区 (CtRLV + CMoV) が 150.7 g であったのに対し, SH 接種区 (CtRLV + CMoV + CtRLVaRNA) では 100.8 g となり, SH とそれ以外の間に統計学的な差が確認された (いずれも  $p < .01$ ). 根長においても同じ傾向がみられ, 無接種区は 16.3 cm, SN は 15.5 cm, HK は 15.3 cm であったのに対し, SH 接種区では 12.3 cm となり, SH とそれ以外の間に統計学的な差が確認された (いずれも  $p < .01$ ). 根周は無接種区で 16.3 cm, SN で 17.3 cm, HK で 15.9 cm および SH 接種区で 14.9 cm となり, SN と SH の間にのみ差が検出された ( $p < .01$ ). 一方, 葉数は感染により増加し, 無接種区で 10.6 枚であったのに対し, SN で 12.1 枚, HK で 12.7 枚および SH 接種区で 12.6 枚となり, 無接種区と HK または SH の間に差があることがわかった (いずれも  $p < .05$ ; 無接種区と SN 接種区間は  $p = .16$ ).

人工気象室内のニンジンは総じて生育が良好であり, 主に養分供給が十分であったことや生育に好適な外気温であったことにより, 感染による影響が判別しにくい条件であったと推測された. そこで次に, ホクレン長沼研究農場の隔離圃場において屋外栽培試験を行った.

接種の成否を判断するため, 接種 18 日後に達観で発病調査を行った結果, ほぼ全ての接種個体において葉の赤化症状が確認された. 無接種区には収穫日まで症状が確認されず, 接種時のコンタミネーションはなかったと判断した. 播種 90 日後に全個体を掘り上げ, 得られた無接種区の合計 60 個体, SN 接種区 53 個体, HK 接種区 52 個体, SH 接種区 59 個体について, 根重, 根長, 葉長および葉数について比較した.

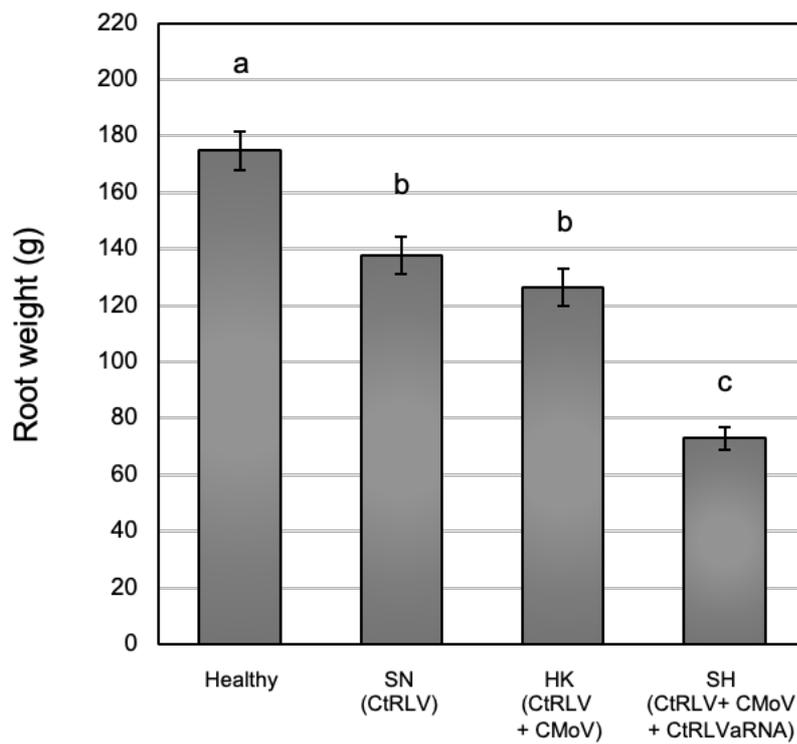
根重は健全で平均 175 g であったのに対し, SN 接種区は 138 g (健全比 -21%) HK 接種区は 126 g (-28%), また SH 接種区は 73 g (-58%) であった (Fig. 24). SN 接種区と HK 接種区の間を除き ( $p = .62$ ) 全ての接種区間で差が確認されたことから ( $p < .00001$ ), 単独・混合感染のいずれによっても根重が減少し, 特に三重感染時に著しく減少することが明らかとなった.

根長は根重と同様の傾向を示し, 健全で平均 162 cm であったのに対し, SN 接種区は 145 cm (健全比 -11%) HK 接種区は 148 cm (-9%), また SH 接種区は 120 cm (-26%) であった (Fig. 25). SN 接種区と HK 接種区の間を除き ( $p = .54$ ), 全ての接種区間で差が認められたことから ( $p < .0001$ ), 根重同様に単独・混合感染のいずれによっても根長が減少し, 減少は三重感染時に顕著に生じることが明らかとなった.

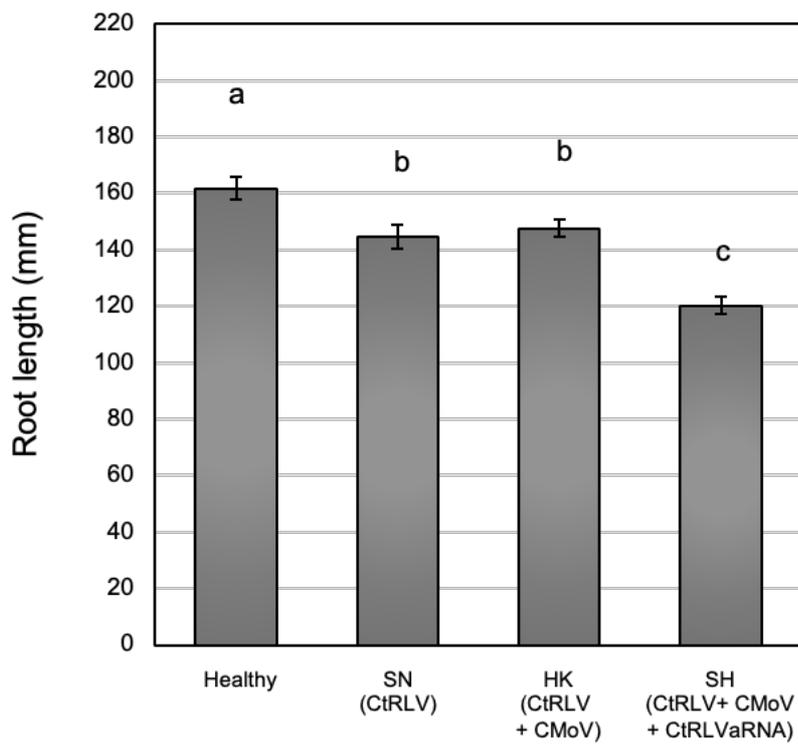
葉重は健全で平均 51 g であったのに対し, SN 接種区で 42 g (-19%), HK 接種区で 33 g (-35%), また SH 接種区は 28 g (-46%) であり (Fig. 26), いずれの接種区において無処理区との差が確認された ( $p < .01$ ). また, SN と HK 間 ( $p = .16$ ), HK と SH 間においては差が認められなかったが ( $p = .51$ ), SN と SH 間には差が確認された ( $p < .01$ ). このことから地下部の評価結果と同様に, 地上部についても感染の影響を受け, 特に三重感染時には著しく生育量が減少することが示された.

葉数については屋外試験においては, 差がみられなかった ( $p > .10$ ).

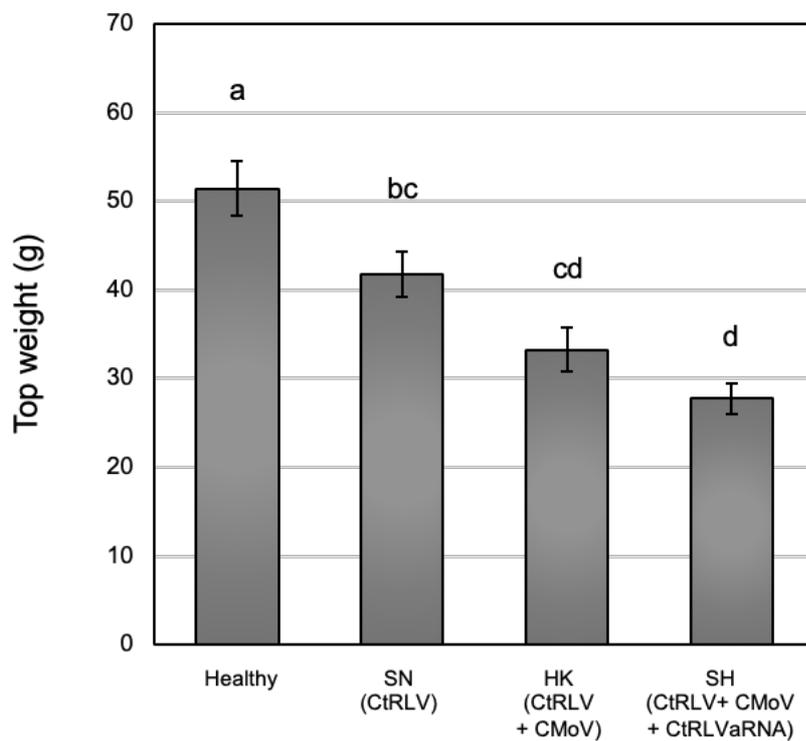
その他に裂根, 分岐根, 変形などの異常も確認されたが, 無接種区を含め全区において同頻度で確認された.



**Figure 24** Effect of infection by carrot red leaf virus and its associated virus/RNA on carrot root weight. The means ( $\pm SE$ ) were calculated from more than 50 plants at 90 days after sowing. Lowercase letters above the bars indicate significant differences between the means ( $p < .0001$ ; Tukey HSD).



**Figure 25** Effect of infection by carrot red leaf virus and its associated virus/RNA on carrot root length. The means ( $\pm SE$ ) were calculated from more than 50 plants at 90 days after sowing. Lowercase letters above the bars indicate significant differences between the means ( $p < .0001$ ; Tukey HSD).



**Figure 26** Effect of infection by carrot red leaf virus and its associated virus/RNA on carrot top weight. Lowercase letters above the bars indicate significant differences between the means ( $p < .0001$ ; Tukey HSD).

#### 5.4.4. 単独・混合感染時の病原体量の比較

CtRLV, CMoV および CtRLVaRNA の相互作用について知見を得るため, 3 圃場分離株を接種したニンジン葉中の CtRLV, CMoV および CtRLVaRNA の RNA 量を接種 14 日後および接種 28 日後に定量・比較した.

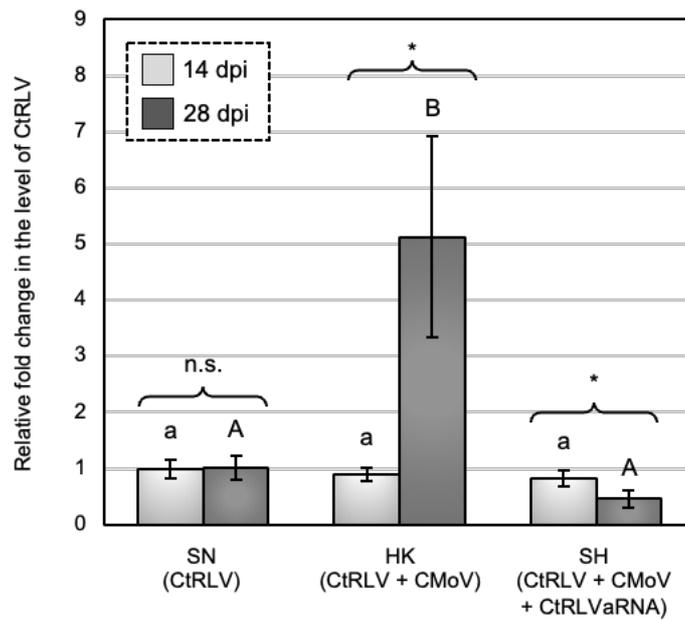
CtRLV の定量の結果, 接種 14 日後においては SN, HK および SH の間で差は確認されなかったが (いずれも  $p > .10$ ), 接種 28 日後に HK 接種のウイルス量平均値が SN ( $p = .02$ ) または SH ( $p = .009$ ) と比較して高くなった. 各接種群内の接種 14 日後および 28 日後の 2 時点の定量値を比較したところ, SN では変化がなかった一方 ( $p > .10$ ), HK は 5.7 倍に増加し ( $p = .03$ ), SH においては 0.6 倍 ( $p = .03$ ) に減少した (Fig. 27) .

CMoV の定量の結果, いずれの時点でも HK および SH のウイルス量平均値の間には差はなかったが (いずれも  $p > .10$ ), 接種群内では接種 14 日後から 28 日後にかけて RNA 量が増加した (いずれも  $p < .01$ ; Fig. 28) .

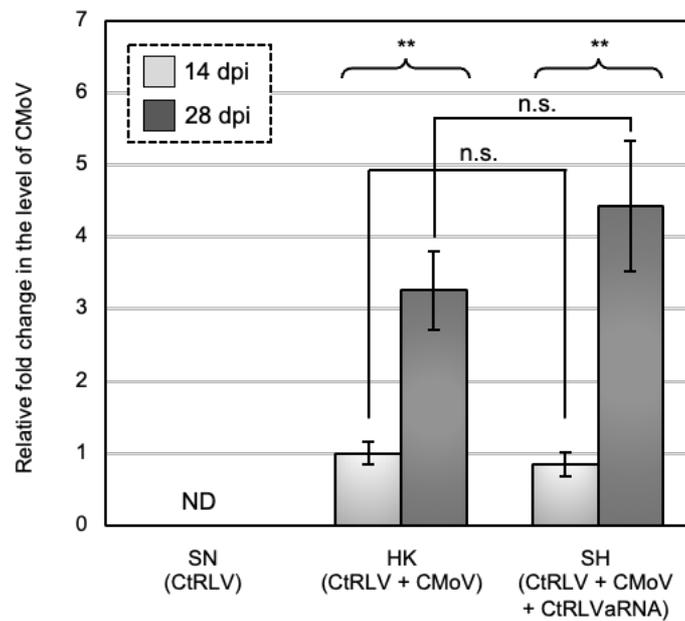
CtRLVaRNA の蓄積量について, SH 接種個体群から得られた接種 14 日目および 28 日目の定量値を比較したが, 差は確認されなかった (Fig. 29) .

SH を接種したイノンドより回収した SH<sup>CM-</sup> と SH<sup>CR</sup> について, 同様に接種を行い, 接種 28 日後の CtRLV 量を比較した結果, SH<sup>CM-</sup> 接種区の蓄積量は約 10 倍多かった ( $p = .004$ ; Fig. 30) .

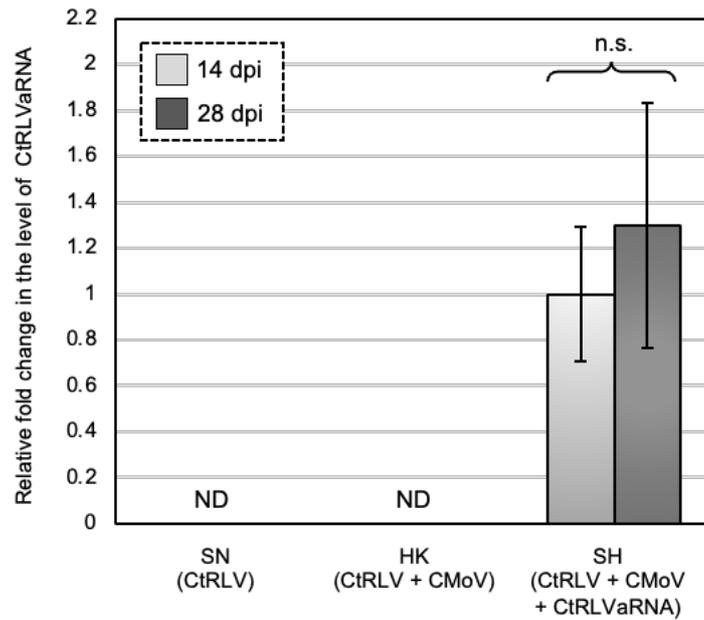
CtRLVaRNA による CMoV への影響を明らかにするため, ミツバに対して HK または SH を接種して得られた CMoV 単独および CMoV + CtRLVaRNA の二重感染個体について, CMoV 量の比較を行った. 28 日後に検定を行った結果, 二重感染個体における平均蓄積量が単独感染個体比で 1/4 となったが, 両接種群ともに個体間差が大きく, 差は明瞭ではなかった ( $p = .39$ ) .



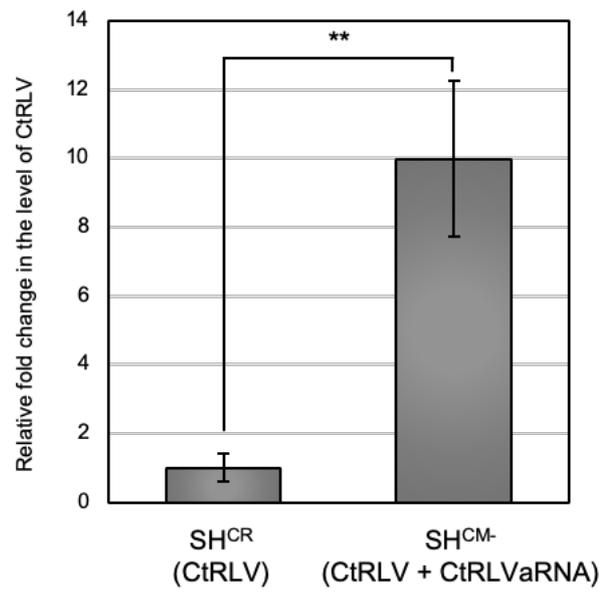
**Figure 27** Relative fold changes of carrot red leaf virus (CtRLV) in systemically infected leaves of *Daucus carota* inoculated with three virus-RNA combinations (SN: CtRLV alone, HK: CtRLV + CMoV, SH: CtRLV + CMoV + CtRLVaRNA), which was examined by quantitative real-time reverse transcription PCR. The means ( $\pm$  SE) were calculated from the RNA levels of 12 individual plants at 14 and 28 days post-inoculation (dpi). Asterisks indicate a significant difference between two values of each time point (level of significance: \* $p < .05$ , n.s. not significant; paired t test). Letters above the bars indicate significant differences between means ( $p < .05$ ; Tukey HSD).



**Figure 28** Relative fold changes of carrot mottle virus (CMoV) in systemically infected leaves of *Daucus carota* inoculated with three virus-RNA combinations (SN: CtRLV alone, HK: CtRLV + CMoV, SH: CtRLV + CMoV + CtRLVaRNA), which was examined by quantitative real-time reverse transcription PCR. The means ( $\pm SE$ ) were calculated from the RNA levels of 12 individual plants at 14 and 28 days post-inoculation (dpi). Asterisks indicate a significant difference between two values of the same inoculation groups from each time point (paired t test) or between two values of each group at the same time point (unpaired t test). Level of significance: \*\*  $p < .01$ , n.s. not significant.



**Figure 29** Relative fold changes of carrot red leaf virus-associated RNA (CtRLVaRNA) in systemically infected leaves of *Daucus carota* inoculated with three virus-RNA combinations (SN: CtRLV alone, HK: CtRLV + CMoV, SH: CtRLV + CMoV + CtRLVaRNA), which was examined by quantitative real-time reverse transcription PCR. The means ( $\pm SE$ ) were calculated from the RNA levels of 12 individual plants at 14 and 28 days post-inoculation (dpi). No significant difference was observed between two values of each time point (n.s. not significant; paired t test).



**Figure 30** Relative fold changes of carrot red leaf virus (CtRLV) in systemically infected leaves of *Daucus carota* inoculated with SH<sup>CR</sup> (CtRLV alone) or SH<sup>CM-</sup> (CtRLV + CtRLVaRNA), which was examined by quantitative real-time reverse transcription PCR. The means ( $\pm$  SE) were calculated from the RNA levels of 5 individual plants at 28 days post-inoculation (dpi). Asterisks indicate a significant difference between two values (\*\*  $p < .01$ ; unpaired t test).

## 5.4. 考察

### 5.4.1. 宿主範囲

各種植物を用いた接種試験の結果、北海道産の CtRLV, CMoV および CtRLVaRNA の宿主範囲は、セリ科の特定の種に限られることが示された。特に CtRLV の宿主範囲はオーストラリア、英国および米国で報告されたものとはほぼ一致したが、本州産の CtRLV とはパセリ、セロリ（本研究ではキンサイを使用）およびミツバへの感染性の点で異なった（Ohki *et al.*, 1979）。このため、北海道において発生している CtRLV は、本州産のものとは宿主範囲をはじめとする諸性質が異なると考えられた。また、CtRLV に対する感受性は植物種で異なり、コリアンダーやクミンのように反応が強く、萎凋して枯死に至る植物種の存在が明らかとなった。これら植物の反応がポレロウイルス属に対する一般的な反応か、さらには CtRLV のみに対する反応なのかは、ポレロウイルス属に対する宿主応答を理解する上で重要な解析対象となり得ると考えられる。

イタリアンパセリ、アニスおよびミツバは CtRLV の非宿主植物である一方、無症状に CMoV が全身感染した。そのうちミツバは CtRLVaRNA の宿主でもあり、ミツバにおいては CtRLVaRNA が CMoV とともに全身感染することがわかった。CMoV および CtRLVaRNA の二重感染が実験的に確認されたのは今回が初めての例である。CtRLVaRNA は単細胞内での複製は可能であるが、感染植物体内の全身移行をすることはできない（Passmore *et al.*, 1993; Falk *et al.*, 1999; Campbell *et al.*, 2020）。一方、アンブラウイルス属ウイルスが ORF3 および ORF4 にコードするタンパク質は、ウイルス RNA の全身および細胞間の移行を補助するとともに、RNA の安定性にも寄与することが知られている（Ryabov *et al.*, 1998; 2001b）。このことから、ミツバで確認された二重感染は、CtRLV の不在下で CMoV が CtRLVaRNA の全身感染を補助したことによるものと考えられた。また、この観察結果は、CtRLVaRNA の全身感染には、CtRLV または CMoV のいずれかが存在すれば良いことを示す。

CMoV の単独また CtRLVaRNA との二重感染はアブラムシ媒介能を持たず、自然条件下では感染当代植物とともに消滅すると推測される。しかし、同属ウイルスは、共通の宿主であれば様々なポレロウイルスと混合感染を成立させる (Barker, 1989; Mayo *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2017) 。これらの混合感染はアブラムシにより回収・媒介されるようになることから (Waterhouse and Murrant, 1983) , 自然条件下においても生存が可能であると推測される。このことから、アンブラウイルス属ウイルスの単独感染または tlaRNA との混合感染個体上に、感染性を有するポレロウイルス属ウイルスが感染した際、新たな組み合わせの複合感染症が生じる可能性があるだろう。

#### 5.4.2. CMD に関与する病原因子間の関係

圃場分離株 SN (CtRLV) または HK (CtRLV + CMoV) を接種したニンジンにおける症状、また病原体の蓄積量を比較すると、症状は HK の方が強く、CtRLV の蓄積も高められることが示された。アンブラウイルス属ウイルスの感染によるポレロウイルス属ウイルスへの影響としては、症状の激化や (Mayo *et al.*, 2000; Ryabov *et al.*, 2001a; Zhou *et al.*, 2017) , 蓄積量の増加 (Barker, 1989; Zhou *et al.*, 2017) 師部組織から葉肉細胞への移行の促進が報告されている (Ryabov *et al.*, 2001a; Zhou *et al.*, 2017) 。このことから、CtRLV と CMoV の混合感染時においても、同様の現象が生じているものと考えられた。しかし、HK を接種した 12 個体から得られた個々の定量値をみると、2 個体において、CMoV が急激に増加した一方で CtRLV がその他の個体と比較して 1/10 程度にまで減少していることが確認された (データ未掲載) 。これらのことから、CtRLV との CMoV の関係は総じて相利的であると考えられるが、これらが感染植物体内で拮抗的に影響し合う可能性については、現段階では完全に否定することができない。Barker (1989) は、PLRV は CMoV との混合感染時にその蓄積が高まったが、時間の経過とともに単独と同レベルにまで低下したことを観察している。このため、CMoV が混合感染することによる効果は、個体やその生育ステージ、さらには植物種によっても変わり得る可能性がある。

これまでに報告された tlaRNA のうち, ST9aRNA がその病原性について詳細に解析されている. ST9aRNA は, ナズナ (*Capsella bursa-pastoris*) において BWYV による症状を強め, その蓄積についても高める一方 (Passmore *et al.*, 1993; Sanger *et al.*, 1994), ヘルパーである BWYV の CP や MP を利用することにより, 自身を維持する戦略をとることがわかっている. これらのことから, ST9aRNA と BWYV との関係は相利的であると考えられている (Passmore *et al.* 1993). CtRLVaRNA は自然条件下においてはほぼ常に CtRLV と CMoV と共存しており, これは過去の米国における観察結果と一致する (Watson *et al.*, 1998). すなわち, CtRLVaRNA は自然条件下において共存するウイルス/RNA 種の構成の点で, アンブラウイルス属ウイルスを伴わない ST9aRNA と異なっている. この特徴から, CtRLV と CMoV の関係に加え, CtRLV と CtRLVaRNA, CMoV と CtRLVaRNA 間, さらにこれら三者間の関係性についてそれぞれ解析する必要性があると考えた.

CtRLV と CtRLVaRNA の関係を明らかにするため, 三重感染株 SH から CtRLV の単独感染株 (SH<sup>CR</sup>) および CtRLV-CtRLVaRNA の二重感染株 (SH<sup>CM-</sup>) を作出し, ニンジンに接種したところ, 二重感染時により強い症状が生じ, CtRLV の蓄積も高まることがわかった. 元の圃場分離株 SH とは異なり斑紋症状を伴わなかったこと, また Sanger *et al.* (1994) による観察結果に基づくと, 症状の激化の原因は CtRLVaRNA の混合感染により維管束組織内の CtRLV が増加したことによるものと考えられた. このため, CtRLV と CtRLVaRNA の関係についても, BWYV と ST9aRNA と同様に相利的である可能性が高い. HK または SH を接種したニンジンにおける CMoV の量は同等であったとともに, ミツバを用いて CtRLVaRNA による CMoV への影響について解析を試みたが, 症状や蓄積において明瞭な変化はみられなかった. 本研究の結果からは, CMoV が CtRLVaRNA に対し植物体内の移行能力を付与していることしか確認することができず, 両者は片利的な関係であると推測される.

CMoV または CtRLVaRNA が持つ CtRLV との関係性は、三重感染時に大きく変化した。例えば、マツバゼリにおいては SN や HK 接種時には強い萎縮、赤化、葉巻症状が生じた一方、SH 接種時には生育が健全株と変わらなくなり、葉には軽微な黄化・斑紋症状しか生じず、さらにそこからは CMoV と CtRLVaRNA しか検出されなくなった。同様の現象がチャービル、またニンジンにおいても稀に確認され、上位葉において CtRLV が検出されず、CtRLVaRNA および CMoV のみが検出されることがあった。これらの観察結果は CtRLV と CMoV または CtRLVaRNA との個々の相利的な関係性が、三重感染条件下においては CtRLVaRNA と CMoV との間に生じる相互作用によって衰退または消失することを示し、チャービル、コリアンダーおよびマツバゼリに確認された三重感染時における萎縮症状の緩和は、CMoV と CtRLVaRNA との間の相互作用による CtRLV に対する拮抗作用によるものであると考えられた。この作用の程度は植物種によって大きく異なり、特にマツバゼリにおいて顕著に現れるものと推測された。なお、イノンドについても SH 接種当代には軽微な症状しかみられなくなったが、同植物種は CMoV の非宿主であることから、この原因については本研究の結果からは明らかではなく、さらなる解析と観察が必要である。

ニンジンにおいては、SH 接種時に最も強い症状が生じたが、定量試験の結果からこの症状の激化は CtRLV の増加に起因するものではないことが示された。CtRLV の蓄積量の増加や症状の激化は CMoV または CtRLVaRNA のいずれかとの二重感染時にも確認され、特に CtRLV + CtRLVaRNA との二重感染時に顕著であった。これらのことから、CtRLVaRNA は二重感染時に CtRLV の維管束組織における蓄積を変化させ、間接的に症状の激化に関与すると考えられた。一方、三重感染時には CMoV の補助により CtRLVaRNA が CtRLV と同様に葉肉細胞へ移行し、このことにより CtRLVaRNA が症状に対して直接的に影響を及ぼすようになるものと推測された。ニンジンにおける CtRLVaRNA の病原性についてより詳細に評価するためには、CMoV 単独感染および CMoV + CtRLVaRNA の二重感染個体を作成し、それらの比較を行う必要があるだろう。

以上より、CMD に関与する病原体間の関係は二重感染時と三重感染時で変化し、さらには宿主植物種にも影響を受けると考えられた。

#### 5.4.3. ニンジンの生育への影響

本病の発生には年次間差があるが、特に生育初期における感染が多かった年は著しい生育不良が起こる (Stubbs, 1948; Watson, 1960; Watson and Serjeant, 1964) . 本試験においては、播種 1 ヶ月後のおおよそ 2 葉期に接種を行ったため、感染による影響が顕著に現れる条件であったと考えられる。

屋内外で実施した両試験において、SH 接種個体は SN または HK 接種個体と比べて明らかに感染による影響が強く、根重、根長および葉重の著しい減少が確認された。このことから、CtRLV + CMoV + CtRLVaRNA の三重感染は、CtRLV 単独のみならず CtRLV + CMoV の二重感染よりも大きな経済的損失を生じ得ることがわかった。過去に英国やオーストラリアで報告された“carrot motley dwarf virus”は CtRLV と CMoV の二重感染により構成されると考えられており、CtRLV の単独感染は大きく影響を及ぼさないとされていた。しかし、本試験の結果から単独感染によっても減収すること、また、二重感染時の影響は単独感染時のものと大きく変わらず、三重感染時に過去の報告と類似する様な顕著な影響が生じることが示された。このことから、CMD の報告当初に確認された特徴的な症状は、主に三重感染によって生じていたものと推察される。

## 6. 総合考察

ニンジンの葉が赤化・黄化する現象は、既に北海道において広く認知されていた。しかし、明瞭な症状がみられるのは気温が低下し始める収穫期（8月）以降であることから、一種の生理的な要因によるものとみなされてきた。北海道のニンジンに発生するウイルス病についてはこれまで調査がなされたことがなく、このことも本病が長く見過ごされてきた原因であろう。本試験の結果、これらの症状が CtRLV の感染によって起こるニンジン黄化病、またその関連ウイルスまたは RNA が混合感染することによる複合感染症 CMD であることがわかった。アブラムシによって媒介されるポレロウイルス属（またはルテオウイルス属）は冷涼な気象における農業生産において、しばしば大きな被害を与える。本試験の結果から、本属ウイルスによる病害がニンジンにおいても北海道において広く発生しており、潜在的に影響を及ぼし続けてきたことが裏付けられた。

### 6.1. 病原体の由来について

北海道のニンジンに発生するポレロウイルスとその関連ウイルスおよび RNA の遺伝学的特性や生物学的特性に関わる解析を行った結果、北海道産の病原体は日本国内よりもむしろ欧米のものと類似し、共通の祖先を持つことが示された。本州においては、CMoV の他にも CMoMV が発生することがわかっているが（藤永ら, 2010; 山城ら, 2015）、本研究においては CMoMV が確認されなかった。CMoMV は、国外ではこれまでにオーストラリア、ニュージーランド、米国およびドイツで確認されているが、英国における発生の報告はない。これらのことから、北海道と本州ではウイルスの由来や発生状況が異なり、北海道の病原体は英国に強い関連性を持つと推測された。北海道において欧米に類似する病原体が発生する理由としては、母本の移動をはじめとする感染株の持ち込み、または種子伝染が考えられる。特に生

産地の拡大に伴う種子生産用の母本の移動は、実際にオーストラリアにおいて過去に大きな被害をもたらした (Stubbs, 1948) .

日本におけるニンジン栽培の歴史をさかのぼると、400 年前ほど前には中国から導入され、多様な色の東洋型のニンジンが栽培されていたとされる (農山漁村文化協会, 2004) . 欧州型のニンジンの栽培は 1800 年代より始まり、複数の欧米の品種が導入され、自家採種や自然交雑を繰り返し、北海道を含めて各地に土着した (農山漁村文化協会, 2004; 北海道野菜史話研究会, 2015) .

北海道における栽培の歴史は明らかではないが、江戸時代には既にアイヌ民族が栽培・利用していた記録が残されている。明治時代の初期には欧米の品種が持ち込まれ、採種も試みられており、その後明治後期から大正時代にかけて栽培面積が急速に拡大した。この産地形成の過程に、欧米からニンジンの母本が持ち込まれ、仮にそれを用いた採種用として使用されたのであれば、それが起源となった可能性が高く、欧米株との高い類似性について説明がつく。道内の病原体の分布をみると、主要な生産地域の一つである十勝では、ほぼ全ての地域で CtRLV の単独感染であり、三重感染はニンジンの栽培実績に関わらず、沿岸地域に見られた。このように、病原体の地理的分布は、本病が北海道のニンジン栽培発展の歴史とも密接に関係すると考える。北海道産のウイルスおよび RNA の多様性が極めて低いことから、これらは特定の地域から複数の経路で導入され、栽培ニンジンまたはノラニンジンに定着し拡大し、現在に至ったものと推察される。なお、農林水産省植物防疫所により実施される輸入植物検査病菌・害虫発見記録の調査においても、フランス産ニンジンに *Cavariella* 属アブラムシの寄生が確認されていることから (農林水産省植物防疫所, 2016) , 輸入時に作物体に寄生し、国内に持ち込まれた可能性も否定することはできない。

種子伝染の可能性は、ポレロウイルス属ウイルスの種子伝染がこれまでに確認されていないことに鑑みると、可能性は低いようである (Costa *et al.*, 1975; Howell and Mink, 1979; Krass and Schlegel 1974; Stubbs, 1948) . 一方, Watson *et al.* (1964) は CtRLV の種子伝染の可能性について述べており, Lee *et al.* (2004) および Oka *et al.* (2014) は市販種子から CtRLV を

検出している。このことから、種子伝染の可能性についても今後慎重に検討をする必要があるだろう。

## 6.2. ニンジン黄化病と CMD

日本国内で用いられる“ニンジン黄化病”また複合感染症 CMD の和名やその病原についても、今後検討の余地がある。筆者らはこれまでに、北海道のテンサイに黄化症状を引き起こすポレロウイルスについて同様の解析を行い、従来病原と考えられてきた BWYV が宿主範囲や遺伝学的特性の異なる 2 種の別種ウイルス、すなわちビート黄葉ウイルス (beet leaf yellowing virus, BLYV) とアブラナ萎黄ウイルス (brassica yellows virus, BrYV, 2 系統) が関与していることを明らかにした。またこのことに基づき、病名を“テンサイ西部萎黄病”から新たに BLYV による“テンサイ黄化病”と変更することを提案した (吉田ら, 2017; Yoshida and Tamada, 2019)。病原体として BWYV が長く用いられてきた要因は、BWYV は宿主範囲が広く 23 科 150 種以上の植物に感染する (Duffus, 1973, 1977; Brunt *et al.*, 1996; D’Arcy and Domier, 2005) という文献上の情報が信じられてきたことに加え (吉田・玉田, 2019)、病原体の特性について多面的な解析がなされてこなかったことにあると考えられる。北海道における BWYV と同様に、CtRLV やその関連ウイルスまたは RNA についても、性質の異なる複数系統の存在が示されてきたのにも関わらず、これらの遺伝学的特性および生物学的特性についてはこれまで併せて解析が行われてこなかった。

日本国内で用いられている CtRLV によるニンジン黄化病は、アブラムシによって永続的に媒介されること、またその症状が“carrot motley dwarf virus”と類似することに基づき命名された (小室・山下, 1956)。その後、症状を示す個体について電子顕微鏡による観察がなされ、球形の粒子を有するルテオウイルス属 (現ポレロウイルス属) ウイルスの関与が示された (Ohki *et al.*, 1979)。この際、アンブラウイルス属ウイルスの存在が確認されなかったこと

から“CtRLVの単独感染=ニンジン黄化病”と整理されている。国内においては以降の報告がほとんどない。現在、分子生物学的手法による病原体の同定技術が広く普及し、一般的に利用できるようになった。今後本州で発生するウイルスについて、そのゲノム配列や宿主範囲などの諸特性について検討がなされ、本州産と北海道産の CtRLV の性質が異なることが明らかとされた場合、これらを区別するための病名を新たに検討する必要があるだろう。

CtRLV の単独感染は国外においても確認されているが、その影響は限定的であるとされており、特に明瞭な症状を示す CMD（すなわち CtRLV と CMoV または CtRLVaRNA との混合感染）にのみ焦点が当てられている。一方、CMD の構成要素について明確な定義がなされている訳ではなく、CMoV との二重感染または CtRLVaRNA との三重感染を含めるのかは明確ではない。本研究の接種試験の結果、二重または三重感染では、その病原性が明確に異なることが示された。CtRLV が CMoV または CtRLVaRNA と二重感染した時に生じる症状はむしろ CtRLV による単独感染と類似するが、これらが三重感染した際にはじめて“carrot motley dwarf virus”による症状が現れることが示された。すなわち CMD に特徴付けられる「斑紋・萎縮症状」は三重感染時に生じる。三重感染によって生じる症状は圃場中でも明確に単独感染と区別することができる一方、CtRLV と CMoV または CtRLVaRNA との二重感染時の症状は CtRLV の単独感染時のものと類似するため区別は容易ではない。以上に基づき、日本国内における CtRLV、CMoV および CtRLVaRNA の三重感染を示す病名を新たに設け「ニンジン斑紋萎縮病」とすることを提案した。二重感染はニンジン黄化病を構成する病原体の組合せとして整理するのが妥当であると筆者は考えている。

### 6.3. 北海道における対策について

北海道のニンジン栽培におけるニンジン黄化病およびニンジン斑紋萎縮病による影響は、極めて大きいことが示された。留意すべき点として、ニンジン斑紋萎縮病が未だ一部の地域のみであるが、局所的に発生していることが挙げられる。接種試験の中で、混合感染株（例え

ば, HK または SH) を CtRLV の単独感染個体に対して接種をすると, その個体は容易に混合感染の状態となる (データ未掲載) . このことは, 現在特定の地域にしか確認されていない三重感染が, 将来的に全道的に広がる恐れがあることを示唆する. 北海道における本病の認知度は依然として低く, 対策も講じられていないことが多い. 二重感染または三重感染が道内において拡大することを未然に防ぐとともに, 発生地域における被害を低減させるためにも, 早急な対策が望まれる.

本病の対策としては発病株の除去, 発生圃場からの物理的隔離, 殺虫剤の散布等が示されている (Koike *et al.*, 2002) . その内, 殺虫剤の有効性は英国において古くから実証されており, 飛来が認められてから約 1 週間後とさらにその 2 または 3 週間以内の散布が発生の低減に効果的であることが示されている (Dunn and Kempton, 1967; Watson and Serjeant, 1963) . 労働性を考慮しても殺虫剤を用いた対策は比較的講じやすく, 特に北海道においては鱗翅目害虫 (例えばヨトウガ, *Mamestra brassicae*) の防除を兼ねるような薬剤が受け入れられ易い. また, 種子処理剤の有効性も示されており, 特にチオメトキサムの種子処理は, 茎葉散布と同等以上の効果が示されていることから (Jukes *et al.*, 2016; O' Driscoll *et al.*, 2019) , 今後検討されるべき対応策であると考えられる.

上述のとおり, 殺虫剤の散布はアブラムシの飛来時期に基づいて行うことで, より大きな効果を得ることができる. 筆者が十勝管内新得町において 2015 年から 2016 年に行った圃場調査では, 黄化や赤化症状の発生の程度は播種日が早いほど激しくなることを確認している. すなわち, 4 月下旬から 5 月下旬までに播種をした 4 圃場は発病が圃場内に坪状また全面に確認された一方, 6 月中旬以降に播種をした 5 圃場は個体単位で散発的にみられるか, 無発生であった. また, ホクレン長沼研究農場において 2017 年から 2019 年に実施したアブラムシの飛来時期に関わる調査の結果, いずれの年も 5 月下旬から 6 月上旬にはニンジン圃場への飛来が確認され, 7 月以降はアブラムシの数が減少した. 英国では, 2 月からの積算気温に基づきアブラムシの飛来時期の予測や, 飛来個体数の計測が行われており, 興味深いことに筆者が確認した上記の北海道の発生状況と類似性が認められた (Syngenta, 2021) . このこと

から, 英国で実施された試験から得られた殺虫剤による防除方法やその時期に関わる知見については, 北海道においても適用し易いと考えられる. 一方, オホーツク管内においては, 十勝地方や長沼町における観察結果とは異なり, 7月下旬においてもニンジン上に多数の無翅胎生虫が確認されたことから (いずれも未発表), 北海道においてはニンジンフタオアブラムシの発生時期が一樣ではない可能性が高い. 北海道において本病に対する対策方法やその時期について検討する際は, 各地域におけるアブラムシの発生時期を把握し, 地域単位で効果的な対策を考える必要があるだろう.

以上, 本研究では北海道に発生するニンジン黄化病や CMD に関与する病原体について, 地理的分布, 病因学的な役割および病原体間の相互作用について評価した. これまでに CtRLV または CMoV の単独感染, CtRLV または CMoV の混合感染について, そのアブラムシ媒介性 (Elnagar and Murant, 1978a; 1978b) やウイルス学的特性 (Murant *et al.*, 1985) について解析されてきたが, CtRLV の単独, CMoV との二重感染, CtRLVaRNA との三重感染に関する比較解析を行ったのは本研究が初めての例である. これら三者は共存しながらも時に拮抗し, 環境 (宿主や気象) に適応しながらその関係性を柔軟に変化させることが示された. 近年, ニンジンには, CaTV1 をはじめとして様々なウイルスや tlaRNA が発生することが明らかとなった (Adams *et al.*, 2014). これらの病原性や発生生態, さらに CMD における役割についても, 今後検討されるべきである.

ニンジン斑紋萎縮病におけるこれらのウイルス-ウイルス/RNA 間, ウイルス/RNA-宿主間, さらに媒介者であるアブラムシを含めた相互作用, すなわち病原-宿主-媒介者間の関係については研究対象として興味深い. 今後, 様々なウイルスや RNA 構成物ならびに宿主植物を用いた解析により, 複合感染症 CMD への理解をより深めることができると考える.

## 摘要

1) 北海道において、 CtRLV の単独感染によるニンジン黄化病, または CtRLV + CMoV/CtRLVaRNA の二重感染, またはこれらの三重感染, すなわち CMD が発生していることが明らかとなった. 三重感染は一部の地域に局所的に発生しており, しばしば CaTV1 が混合感染していた.

2) 三重感染発生圃場の症状は単独感染の発生圃場と比較すると明らかに異なり, 圃場全面に激しい症状が確認されることが多かった.

3) 北海道に発生する CtRLV はニンジンフタオアブラムシにより媒介され, CMoV や CtRLVaRNA は CtRLV の存在下でのみ同種に媒介されたが, モモアカアブラムシおよびジャガイモヒゲナガアブラムシには媒介されなかった.

4) 北海道に発生する CMD 関連ウイルスまたは RNA は, その遺伝学的特性および宿主範囲が国内で報告された株よりむしろ英国や米国で発生するものと類似し, 国外の株と共通の起源を持つと考えられた.

5) CMD 関連ウイルスまたは RNA の宿主範囲や病原性を明らかにするため, 3 種の圃場分離株 SN (CtRLV) , HK (CtRLV + CMoV) および SH (CtRLV + CMoV + CtRLVaRNA) を用いて接種試験を行った結果, これらはいずれもセリ科植物の中でも限られた種にしか感染しないことが明らかとなった.

6) 感受性植物の症状は, CtRLV の単独感染時, CtRLV + CMoV の二重感染時は類似したが, CMD に特徴付けられる葉の斑紋症状や株の萎縮症状は CtRLV + CMoV + CtRLVaRNA の三重感染時にのみ生じた.

7) CMoV または CtRLVaRNA は, その媒介や感染を依存するヘルパーウイルスである CtRLV との二重感染時に症状を強め, その蓄積を高めたことから, これら 2 種はそれぞれ CtRLV と相利的な関係にあると考えられた.

8) 三重感染時には CMoV と CtRLVaRNA との間に生じる相互作用により CtRLV の感染が抑制されることが明らかとなった.

## Summary

### Etiological studies on carrot motley dwarf in Hokkaido, Japan

Naoto Yoshida

Carrot motley dwarf (CMD) is caused by mixed infection of carrot red leaf virus (CtRLV) with either carrot mottle virus (CMoV) or carrot mottle mimic virus, and additional infection with CtRLV-associated RNA (CtRLVaRNA). In this study, the author investigated the viruses or virus-like RNA isolated from carrots focusing on the symptoms in Hokkaido, the northern island of Japan.

#### I. Carrot motley dwarf in Hokkaido: symptoms and distribution

The field surveys conducted from 2014 to 2021 revealed that three types of infections mainly occurred in Hokkaido: single infection with CtRLV, which was most prevalent; double infection with CtRLV and CMoV; and triple infection with CtRLV, CMoV, and CtRLVaRNA. The fields with the three agents were severely affected, with diseased plants showing mottling. The triple infection was found only in the coastal areas. On the other hand, in the fields where disease incidence was low and sporadic, CtRLV was often found alone in plants with mild symptoms.

The virus/RNA-associated with CMD in Hokkaido was transmitted only by willow-carrot aphid (*Cavariella aegopodii*) only in the presence of CtRLV, but not with green peach aphid (*Myzus persicae*), fox-grove aphid (*Aulacorthum solani*).

## **II. Genetic characterisation of virus/RNA-associated with CMD**

The nearly complete genomic sequences of CtRLV, CMoV, and CtRLVaRNA in Hokkaido were determined from the cloned RT-PCR products, except for the short regions of the 5' and 3' termini where the primers annealed. The nucleotide sequences of CtRLV were 5,723 nt in length for samples SN, SH, and KT2 and 5,726 nt for HK (GenBank accession nos. LC434061-LC434064), and all seven ORFs of the four isolates showed high identity to the type strain UK-1 in the deduced amino acid sequence (> 96.8% for each ORF). The nucleotide sequences of the three Japanese isolates of CMoV (HK, SH, and KT2; GenBank accession nos. LC434065-LC434067) were 4,193 nt in length, and their genomic organisation consisting of four ORFs was identical to that of non-Japanese isolates. The deduced amino acid sequences of individual ORFs of the Japanese isolates resembled those of the German isolate Weddel (> 92.5% for each ORF). Both Japanese isolates of CtRLVaRNA (SH and HK2; GenBank accession nos. LC434069 and LC434070, respectively) were 2,834 nt in length, and the genomic organization containing the two ORFs was identical to that of American isolates a8 and a25, and also showed high amino acid identity to them (> 91.2% for both ORFs). The results indicated that CMD-associated virus/RNA occurring in Hokkaido shared common origins with foreigners.

## **III. Host range and pathogenicity of CMD-associated virus/RNA**

Aphid inoculation of plants of 17 species from 14 genera was conducted using three virus-RNA combinations (SN: CtRLV alone, HK: CtRLV + CMoV, SH: CtRLV + CMoV + CtRLVaRNA) to determine whether mixed infection by CMoV and CtRLVaRNA can affect the disease symptoms and the host range of CtRLV. Systemic infections of CtRLV and its associated virus and/or RNA were observed in plants of the following six species: carrot (*Daucus carota* subsp. *sativus*), chervil (*Anthriscus cerefolium*), coriander (*Coriandrum sativum*), dill (*Anethum graveolens*), cumin

(*Cuminum cyminum*), and slender celery (*Cyclospermum leptophyllum*), in which symptoms varied greatly according to plant species. Double infection with CMoV and CtRVL<sub>a</sub>RNA was observed in Japanese parsley (*Cryptotaenia canadensis* subsp. *Japonica*) without any symptoms. This indicated that host range of virus and RNA isolated in Hokkaido were also similar to those of western countries.

Inoculation tests using carrot plants demonstrated that CMoV or CtRLV<sub>a</sub>RNA enhanced both disease severity and RNA accumulation of the helper CtRLV, indicating that in general the relationships between CtRLV and CMoV or CtRLV<sub>a</sub>RNA were synergistic. However, in the presence of both CMoV and CtRLV<sub>a</sub>RNA, distinct symptoms such as systemic mottling and stunting developed, while the enhancement of CtRLV accumulation was abolished. These results imply that CMoV and CtRLV<sub>a</sub>RNA antagonises CtRLV cooperatively despite their dependence on CtRLV for aphid transmission. The triple infection, but not the double infections, is involved in the development of the conspicuous mottling typical for CMD, which reduced root weight by more than 50% compared to those of healthy ones.

## 引用文献

- Adams, I. P., Skelton, A., Macarthur, R., Hodges, T., Hinds, H., Flint, L. *et al.* (2014) *Carrot yellow leaf virus* is associated with carrot internal necrosis. *PLoS One*, 9, e0109125.
- Andrews, A. C. (1949) The carrot as a food in the classical era. *Classical Philology*, 44: 182-196.
- Balijja, A., Kvarnheden, A. and Turchetti, T. (2008) A non-phenol-chloroform extraction of double-stranded RNA from plant and fungal tissues. *Journal of Virological Methods*, 152, 32-37.
- Banga, O. (1963) *Main types of the western carotene carrot and their origin*. W. E. J. Tjeenk Willink, Zwolle, Netherlands.
- Barker, H. (1989) Specificity of the effect of sap-transmissible viruses in increasing the accumulation of luteoviruses in co-infected plants. *Annals of Applied Biology*, 115, 71-78.
- Brothwell, D. R., Brothwell, P. 1969. *Food in antiquity: A survey of the diet of early peoples*. Thames and Hudson, London, UK.
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L. and Zurcher, E. J. (1996) Plant viruses online: descriptions and lists from the VIDE database.  
[<http://bio-mirror.im.ac.cn/mirrors/pvo/vide/refs.htm>].
- Campbell, A.J., Erickson, A., Pellerin, E., Salem, N., Mo, X., Falk, B.W. *et al.* (2020) Phylogenetic classification of a group of self-replicating RNAs that are common in co-infections with poleroviruses. *Virus Research*, 276, 97831.
- Chapman, R. F., Bernays, E. A. and Simpson, S. J. (1981) Attraction and repulsion of the aphid, *Cavariella aegopodii*, by plant odors. *Journal of Chemical Ecology*, 7, 881-888.
- Chin, L-S., Foster, J. L. and Falk, B. W. (1993) The beet western yellows virus ST9-associated RNA shares structural and nucleotide sequence homology with Carmo-like viruses. *Virology*, 192, 473-482.

- Cockbain, A. J., Jones, P. and Woods, R. D. (1986) Transmission characteristics and some other properties of bean yellow vein-banding virus, and its association with pea enation mosaic virus. *Annals of Applied Biology*, 108, 59-69.
- Costa, A. S., Nagai, H., Costa, C. L., Kitajima, E. W. and Matuo, A. (1975) Studies on the yellowing or reddening of carrot in Brazil. *Summa Phytopathologica*, 1, 5-18. [in Portuguese]
- D'Arcy, C. J. and Domier, L. L. (2005). *Luteoviridae*. In: Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L. A., eds. *Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV*. London, UK: Elsevier/Academic Press, 891-900.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. and Posada, D. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772.
- Demler, S. A. and de Zoeten, G. A. (1989) Characterization of a satellite RNA associated with pea enation mosaic virus. *Journal of General Virology*, 70, 1075-1084.
- Demler, S. A., Rucker, D. G., Nooruddin, L. and Zoeten, G. A. (1994) Replication of the satellite RNA of pea enation mosaic virus is controlled by RNA 2-encoded functions. *Journal of General Virology*, 75, 1399-1406.
- Duffus, J. E. (1973) The yellowing viruses of beet. *Advances in Virus Research*, 18, 347-386.
- Duffus, J. E. (1977) Aphids, viruses and the yellow plague. In: Harris, K. F. and Maramorosh, K. (Eds.) *Aphids as Virus Vectors*. New York, NY, USA: Academic Press, pp. 361-383.
- Dunn, J. A. (1965) Studies on the aphid, *Cavariella aegopodii* Scop. "I. on willow and carrot". *Annals of Applied Biology*, 56, 429-438.
- Dunn, J. A. and Kempton, D. P. H. (1967) Effect of the timing of insecticide applications on infestation by *Cavariella aegopodii* Scop. on carrots. *Annals of Applied Biology*, 60, 33-42.
- Elnagar, S. and Murrant, A.F. (1978a) Relations of carrot red leaf and carrot mottle viruses with their aphid vector *Cavariella aegopodii*. *Annals of Applied Biology*, 89, 237-244.

- Elnagar, S. and Murant, A.F. (1978b) Aphid-injection experiments with carrot mottle virus and its helper virus, carrot red leaf. *Annals of Applied Biology*, 89, 245-250.
- Falk, B. W., Duffus, J. E. and Morris, T. J. (1979a) Transmission, host range, and serological properties of the viruses that cause lettuce speckles disease. *Phytopathology*, 69, 612-617.
- Falk, B. W., Morris, T. J. and Duffus, J. E. (1979b). Unstable infectivity and sedimentable ds-RNA associated with lettuce speckles mottle virus. *Virology*, 96, 239-248.
- Falk, B. W., Duffus J. E. (1984). Identification of small single- and double-stranded RNAs associated with severe symptoms in beet western yellows virus-infected *Capsella bursa-pastoris*. *Phytopathology*, 74, 1224-1229.
- Falk, B.W., Tian, T. and Yeh, H.H. (1999) Luteovirus-associated viruses and subviral RNAs. In: Vogt, P.K. and Jackson, A.O. (Eds.) *Satellites and Defective Viral RNAs*. Berlin, BER: Springer, pp. 159-175.
- Frowd, J. A. and Tomlinson, J. A. (1972) The isolation and identification of parsley viruses occurring in Britain. *Annals of applied biology*, 72, 177-188.
- Gaafar, Y. Z. A. and Ziebell, H. (2019) Two divergent isolates of turnip yellows virus from pea and rapeseed and first report of turnip yellows virus-associated RNA in Germany. *Microbiology Resource Announcements*, 8, e00214-19.
- Gibbs, M. J., Cooper, J. I. and Waterhouse, P. M. (1996a) The genome organization and affinities of an Australian isolate of carrot mottle umbravirus. *Virology*, 224, 310-313.
- Gibbs, M. J., Ziegler, A., Robinson, D. J., Waterhouse, P. M. and Cooper, J. I. (1996b) Carrot mottle mimic virus (CMoMV): a second umbravirus associated with carrot motley dwarf disease recognised by nucleic acid hybridisation. *Molecular Plant Pathology On-line*, 1111gibbs.
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. and Gascuel, O. (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systemic Biology*, 59, 307-321.

- Gungoosingh-Bunwaree, A., Menzel, W., Winter, S., Vally, V., Seewoogoolam, R., Beni Madhu, S. P. and Vetten, H. J. (2009) First report of carrot red leaf virus and carrot mottle virus, causal agents of carrot motley dwarf, in carrot in Mauritios. *Plant Disease*, 93, 1218.
- Heywood, V. H (1983) Relationship and evolution in the *Daucus carota* complex. *Israel Journal of Botany*, 32 51-65.
- Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acid research*, 22, 4673-4680.
- Howell, W. E. and Mink, G. I. (1974) Carrot motley dwarf in the Pacific Northwest. *Plant Disease Reporter*, 58, 766.
- Howell, W. E. and Mink, G. I. (1977) The role of weed hosts, volunteer carrots, and overlapping growing seasons in the epidemiology of carrot thin leaf and carrot motley dwarf viruses in central Washington. *Plant Disease Reporter*, 61, 217-222.
- Howell, W. E., Mink, G. I. (1979) Effect of carrot thin leaf and motley dwarf viruses on carrots. *Plant Disease Reporter*, 63, 989-993.
- Huang, L. F., Naylor, M., Pallett, D. W., Cooper, J. I. and Wang, H. (2005) The complete genome sequence, organization and affinities of carrot red leaf virus. *Archives of Virology*, 150, 1845-1855.
- Iorizzo, M., Ellison, S., Senalik, D., Zengm P., Satapoomin, P., Huang, J. *et al.* (2016) A high-quality carrot genome assembly provides new insights into carotenoid accumulation and asterid genome evolution. *Nature genetics*, 48, 657-666.
- Jukes, A., Collier, R. H. and Elliott, M. (2016) FV 445 Carrots: optimising control of willow-carrot aphid and carrot fly. AHDB Final Report.

- Koike, S. T., Nunez, J. J. and Falk, B. W. (2002) Diseases caused by viruses and phytoplasmas. In: Davis, R. M. and Raid, R. N. (Eds.) *Compendium of Umbelliferous Crop Diseases*. St Paul, MN: APS Press, pp. 51-59.
- Krass, C. J. and Schlegel, D. E. (1974) 'Motley dwarf' virus disease complex of California carrots. *Phytopathology*, 64, 151-152.
- Lee, B. Y., Lim, H. R., Choi, J. Y. and Ryu, K. H. (2004) Development of molecular detection of three species of seed-transmissible viruses useful for plant quarantine. *Plant Pathology Journal*, 20, 302-307.
- Mayo, M., Ryabov, E., Fraser, G. and Taliansky, M. (2000) Mechanical transmission of *Potato leafroll virus*. *Journal of General Virology*, 81, 2791-2795.
- Menzel, W., Maiss, E. and Vetten, H. J. (2008) Complete nucleotide sequence of a carrot isolate of carrot mottle virus from Germany. *Archives of Virology*, 153, 2163-2165.
- Menzel, W., Goetz, R., Lesemann, D. E. and Vetten, H. J. (2009a) Molecular characterization of a closterovirus from carrot and its identification as a German isolate of *Carrot yellow leaf virus*. *Archives of Virology*, 154, 1343-1347.
- Menzel, W., Maiss, E. and Vetten, J. H. (2009b) Nucleotide sequence of a satellite RNA associated with carrot motley dwarf in parsley and carrot. *Virus Genes*, 38: 187-188.
- Meunier, S. and Verhoyen, M. (1987) Carrot motley dwarf disease on carrot and parsley in Belgium. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent*, 52, 1019-1025.
- Miller, W. A. Koev, G. and Mohan, B. R. (1997) Are there risks associated with transgenic resistance to luteoviruses. *Plant Disease*, 81, 700-710.
- Mo X. H., Chen, Z. B., Chen, J. P. (2011) Molecular identification and phylogenetic analysis of a viral RNA associated with the Chinese tobacco bushy top disease complex. *Annals of Applied Biology*, 158, 188-193.

- Morton, A., Spence, N. J., Boonham, N. and Barbara, D. J. (2003) Carrot red leaf associated RNA in carrots in the United Kingdom. *Plant Pathology*, 52, 795.
- Mulenga, R. M., Miano, D. W., Kaimoyo, E., Akello, J., Nzuve, F. M., Simulundu, E. *et al.* (2020) First Report of Ethiopian tobacco bushy top virus and Its Associated Satellite RNA Infecting Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) in Zambia. *Plant Disease*, 105, 516.
- Murant, A. F., Goold, R. A., Roberts, I. M. and Cathro, J. (1969) Carrot mottle—a persistent aphid-borne virus with unusual properties and particles. *Journal of General Virology*, 4, 329-341.
- Murant, A. F. Roberts, I. M. and Goold, R. A. (1973) Cytopathological changes and extractable infectivity in *Nicotiana clevelandii* leaves infected with carrot mottle virus. *Journal of General Virology*, 21, 269-283.
- Murant, A. F. (1974) Carrot mottle virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, 137.
- Murant, A. F. (1975) Occurrence of mottle and red leaf components of carrot motley dwarf disease in British Columbia. *Canadian Plant Disease Survey*, 55, 103-105.
- Murant, A. F. and Roberts, I. M (1979) Virus-like particles in phloem tissue of chervil (*Anthriscus cerefolium*) infected with carrot red leaf virus. *Annals of Applied Biology*, 92, 343-346.
- Murant, A. F., Waterhouse, P. M., Raschké, J. H. and Robinson, D. J. (1985) Carrot red leaf and carrot mottle viruses: observations on the composition of the particles in single and mixed Infections. *Journal of General Virology*, 66, 1575-1579.
- Murant, A. F., Rajeshwari, R., Robionson, D. J. and Raschké, J. H. (1988) A satellite RNA of groundnut rosette virus that is largely responsible for symptoms of groundnut rosette disease. *Journal of general virology*, 69, 1479-1486.
- Murant, A. F. (1990) Dependence of groundnut rosette virus on its satellite RNA as well as on groundnut rosette assistor luteovirus for transmission by *Aphis craccivora*. *Journal of General Virology*, 71, 2163-2166.

- Naseem, M. T., Ashfaq, M., Khan, A. M., Kiss, Z., Akhtar, K. P. and Mansoor, S. (2016) Transmission of viruses associated with carrot motley dwarf by *Myzus persicae*. *Journal of Plant Pathology*, 98, 581-585.
- O' Driscoll, A., James, L., White, S., Kaye, D., Ellis, S. and Pickering, F. (2019) FV 461 A review of novel strategies to manage viruses in UK crops. AHDB Final Report.
- Ohki, S., Doi, Y. and Yora, K. (1979) Small spherical virus particles found in carrot plants infected with carrot red leaf virus. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 45, 74-76.
- Oka, K., Mochizuki, T. and Ohki, S.T. (2012) Detection of carrot red leaf virus-RNA in carrot seeds by multiplex RT-nested PCR. *Journal of General Plant Pathology*, 78, 2-7.
- Passmore, B. K., Sanger, M., Chin, L. S., Falk, B. W. and Bruening, G. (1993) Beet western yellows virus-associated RNA: an independently replicating RNA that stimulates virus accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 10168-10172.
- Peter, K. A., Gildow, F., Palukaitis, P. and Gray, S. M. (2009) The C terminus of the polerovirus p5 readthrough domain limits virus infection to the phloem. *Journal of Virology*, 83, 5419-5429.
- Rambaut, A. (2012) FigTree v. 1.4.0. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Robinson, D. J., Ryabov, E. V., Raj, S. K., Roberts, I. M. and Taliansky, M. E. (1999) Satellite RNA is essential for encapsidation of groundnut rosette umbravirus RNA by groundnut rosette assistor luteovirus coat protein. *Virology*, 254, 105-114.
- Rozado-Aguirre, Z., Adams, I., Collins, L., Fox, A., Dickinson, M. and Boonham, N. (2016) Detection and transmission of Carrot torrado virus, a novel putative member of the *Torradovirus* genus. *Journal of Virological Methods*, 235, 119-124.
- Rubatzky, V. E., Quiros, C. F. and Simon, P. W. (1999) Introduction: geographic origins and world importance. In: Rubatzky, V. E., Quiros, C. F. and Simon, P. W. (Eds.) *Carrots and related vegetable Umbelliferae*. CABI Publishing Wallingford UK. pp. 1-16.

- Ryabov, E. V., Robinson, D. J. and Taliansky, M. E. (1998) A plant virus-encoded protein facilitates long-distance movement of heterologous viral RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 1212-1217.
- Ryabov, E. V., Oparka, K. J., Santa Cruz, S., Robinson, D. J. and Taliansky, M. E. (1999) Intracellular location of two groundnut rosette umbravirus proteins delivered by PVX and TMV vectors. *Virology*, 242, 303-313.
- Ryabov, E. V., Fraser, G., Mayo, M. A., Barker, H. and Taliansky, M. (2001a) Umbravirus gene expression helps Potato leafroll virus to invade mesophyll tissues and to be transmitted mechanically between plants. *Virology*, 286, 363-372.
- Ryabov, E. V., Robinson, D. J. and Taliansky, M. (2001b) Umbravirus-encoded proteins both stabilize heterologous viral RNA and mediate its systemic movement in some plant species. *Virology*, 288, 391-400.
- Sanger, M., Passmore, B., Falk, B. W., Bruening, G., Ding, B. and Lucas, W. J. (1994) Symptom severity of beet western yellows virus strain ST9 is conferred by the ST9-associated RNA and is not associated with virus release from the phloem. *Virology*, 200, 48-55.
- Scheets, K., Miller, W. A. and Sömera, M. (2020) Abolish the family *Luteoviridae* (*Tolivirales*) and move its genera to the families *Tombusviridae* (*Tolivirales*) and *Solemoviridae* (*Sobelivirales*) [https://ictv.global/ictv/proposals/2020.026P.R.Abolish\\_Luteoviridae.zip](https://ictv.global/ictv/proposals/2020.026P.R.Abolish_Luteoviridae.zip)
- Small, E. (1978) A numerical taxonomic analysis of the *Daucus carota* complex. *Canadian Journal of Botany*, 56, 248-276.
- Stubbs, L. L. (1948) A new virus disease of carrots: its transmission, host range, and control. *Australian journal of scientific research*, 1, 303-332.
- Stubbs, L. L. (1956) Motley dwarf virus disease of carrot in California. *Plant Disease Reporter*, 40, 763-764.

- Syngenta UK (2021) Willow-carrot aphid, AHDB Pest Bulletin. On-line material [<https://www.syngenta.co.uk/ahdb-pest-bulletin>]
- Taliansky, M., Roberts, I. M., Kalinina, N., Ryabov, E. V., Raj, S. K. *et al.* (2003) An umbraviral protein, involved in long-distance RNA movement, binds viral RNA and forms unique, protective ribonucleoprotein complexes. *Journal of Virology*, 77, 3031-3040.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
- Tang, J., Quinn, B. D. and Clover, G. R. G. (2009) First report of carrot red leaf virus-associated RNA co-infecting carrot with carrot red leaf virus and carrot mottle mimic virus to cause carrot motley dwarf disease in New Zealand. *Australasian Plant Disease Notes*, 4, 15-16.
- Tokuda, R., Nishikawa, M., Hosoe, N., Nijo, T., Iwabuchi, N., Yoshida, T. *et al.* (2019) Complete genome sequence of a carrot torradovirus 1 isolate, obtained from *Angelica keiskei* in Japan. *Microbiology Resource Announcements*, 8, e00110-19.
- Vavilov, N. I. (1992) *Origin and geography of cultivated plants*. Cambridge University Press, New York, New York, USA.
- Verbeek, M., Tang, J. and Ward, L. I. (2012) Two generic PCR primer sets for the detection of members of the genus *Torradovirus*. *Journal of Virological Methods*, 185, 184-188.
- Vercruyssen, P., Gibbs, M., Tirry, L. and Höfte, M. (2000) RT-PCR using redundant primers to detect the three viruses associated with carrot motley dwarf disease. *Journal of Virological Methods*, 88, 153-161.
- Walker, P. J., Siddell, S. G., Lefkowitz, E. J., Mushegian, A. R., Adriaenssens, E. M., Alfenas-Zerbini, P. *et al.* (2021) Changes to virus taxonomy and to the international code of virus classification and nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology*, 166, 2633-2648.

- Wang, F., Wang, G. L., Hou, X. L., Li, M. Y., Xu, Z. S. and Xiong, A. S. (2018) The genome sequence of 'Kurodagosun', a major carrot variety in Japan and China, reveals insights into biological research and carrot breeding. *Molecular Genetics and Genomics*, 293, 861-871.
- Waterhouse, P. M. and Murrant, A. F. (1981) Purification of carrot red leaf virus and evidence from four serological tests for its relationship to luteoviruses. *Annals of Applied Biology*, 97, 191-204.
- Waterhouse, P. M. and Murrant, A. F. (1982) Carrot red leaf virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, 249.
- Waterhouse, P. M. and Murrant, A. F. (1983) Further evidence on the nature of the dependence of carrot mottle virus on carrot red leaf virus for transmission by aphids. *Annals of Applied Biology*, 103, 455-464.
- Waterhouse, P. M. (1985) Isolation and identification of carrot red leaf virus from carrot and dill growing in the Australian Capital Territory. *Australasian Plant Pathology*, 14, 32-34.
- Watson, M. A. (1960) Carrot motley dwarf virus. *Plant Pathology*, 9, 133-134.
- Watson, M. and Serjeant, E. P. (1964) The effect of motley dwarf virus on yield of carrots and its transmission in the field by *Carvariella aegopodiae* Scop. *Annals of Applied Biology*, 53, 77-93.
- Watson, M., Serjeant, E. P. and Lennon, E. A. (1964) Carrot motley dwarf and parsnip mottle viruses. *Annals of Applied Biology*, 54, 153-166.
- Watson, M. T. and Falk, B. W. (1994) Ecological and epidemiological factors affecting carrot motley dwarf development in carrots grown in the Salinas Valley of California. *Plant Disease*, 78, 477-481.
- Watson, M. T., Tian, T., Estabrook, E. and Falk, B. W. (1998) A small RNA resembling the beet western yellows luteovirus ST9-associated RNA is a component of the California carrot motley dwarf complex. *Phytopathology*, 88, 164-170.

- Yoshida, N. and Tamada, T. (2019) Host range and molecular analysis of *Beet leaf yellowing virus*, *Beet western yellows virus*-JP and *Brassica yellows virus* in Japan. *Plant Pathology*, 68, 1045-1058.
- Zagorodskikh, P. (1939) New data on the origin and taxonomy of the cultivated carrot. *Comptes Rendus (Doklady), Academy of Science, USSR* 25, 522-525.
- Zhou, C. J., Zhang, X. Y., Liu, S. Y., Wang, Y., Li, D. W., Yu, J. L. *et al.* (2017) Synergistic infection of BrYV and PEMV 2 increases the accumulations of both BrYV and BrYV-derived siRNAs in *Nicotiana benthamiana*. *Scientific Reports*, 7, 45132.
- 小室康雄, 山下 功. (1956) バイラスによるニンジン黄化病に関する研究. *日本植物病理学会報*, 20, 155-160.
- 田中静幸, 柿崎昌志, 渡辺久昭, 峰岸恒弥, 松井文雄, 村松裕司ら. (1994) ハスカップ新品種「ゆうふつ」の育成について. *北海道立総合研究機構農業試験場集報*, 67, 29-41.
- 藤永真史, 小木曾秀紀, 本井 浩, 夏秋知英. (2010) レッドリーフ症状のパセリから分離された2種ウイルスについて. *日本植物病理学会報*, 76, 189. (講演要旨)
- 農林水産省 (2021) 作物統計調査令和 2 年産指定野菜(秋冬野菜等)及び指定野菜に準ずる野菜の作付面積、収穫量及び出荷量農林水産統計. [[https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou\\_yasai/attach/pdf/index-4.pdf](https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_yasai/attach/pdf/index-4.pdf)]
- 農林水産省植物防疫所 (2016) 平成 28 年 (2016 年) 植物検疫統計 [<http://www.pps.go.jp/TokeiWWW/Pages/report/download.xhtml?jsessionid=0E8A7BB6F0710D20184476DE1A5C452A?indexId=002621>]
- 農林水産省北海道農政事務所 (2021) 令和元年~2 年北海道農林水産統計年報. [<https://www.maff.go.jp/hokkaido/toukei/kikaku/nenpou/r1-r2sougou/attach/pdf/r1-r2sougou-85.pdf>]
- 農山漁村文化協会 編 (2004) 『野菜園芸大百科 第 2 版 ニンジン/ゴボウ/ショウガ』. 農山漁村文化協会.
- 北海道野菜史話研究会 編 (2015) 『北海道野菜史話』. 小南印刷.

- 水越 亨. (1988) ハスカップ (和名クロミノウグイスカグラ) の害虫相について. *北海道立総合研究機構農業試験場集報*, 57, 49-59.
- 山城 都, 青木久美, 伊村 務, Wang, W. Q., 西川尚志, 夏秋知英. (2015) 栃木県における carrot motley dwarf disease の発生. *日本植物病理学会報*, 81, 279. (講演要旨)
- 山下修一, 大木 理, 土居養二, 与良 清. (1976) ニンジンで見出された2種の黄化性ウイルスについて. *日本植物病理学会報*, 42, 382-383. (講演要旨)
- 吉田直人, 丹羽昌信, 玉田哲男. (2015) 北海道におけるニンジン黄化病の発生について. *日本植物病理学会報*, 81, 279. (講演要旨)
- 吉田直人, 丹羽昌信, 玉田哲男. (2017) 北海道産ビート西部萎黄ウイルス (BWYV) 分離株の特徴: ウイルス名の変更について. *植物病理学会報*, 83, 74. (講演要旨)
- 吉田直人, 玉田哲男. (2019) テンサイ黄化病の病原ウイルス (ビート黄葉ウイルス) の特性. *北農*, 86, 315-321.

## 謝辞

植物ウイルス学研究に携わることになった 2009 年以来, 北海道大学農学部植物病原学研究室の増田 税教授には, 公私ともに終始有益なご指導ご鞭撻を賜った。また, 本論文の執筆に際しても, 懇切丁寧にご指導いただいた。ここに深甚なる感謝の意を表する。

植物病理学研究室の近藤則夫教授, 作物生理学研究室の志村華子講師には, 詳細に本文の校閲の労をとられた。心より感謝申し上げたい。また, 植物病原学研究室の中原健二講師には, 植物ウイルス学に関して広くご指導いただいた。拝謝申し上げたい。

現職について間もない 2014 年から 4 年間, 元北海道立農業試験場および元岡山大学資源植物科学研究所の玉田哲男博士には顧問として日々ご指導頂いた。本研究に携わる貴重な機会を賜ったとともに, この経験が植物病理学への関心をさらに深めるきっかけとなった。常に同じ目線で協働頂いたそのご姿勢に対し, 衷心から感謝の意を表したい。

ホクレン農業協同組合連合会農業総合研究所の野津 裕氏, 宮田英明氏, 大山耕二氏, 森生元太郎氏, 村岡知彦氏および川野恭平氏には, 本研究を遂行する上での便宜を計っていただいた。また, 川口武泰氏, 田中宏樹氏, 丹羽昌信氏, 本村洋一氏には試料の採取にご協力いただき, 清水遥人氏, 二井本ちさと氏, 徳安美香氏には圃場調査の補助や検定植物の維持等にご協力いただいた。北海道大学農学部植物病原学研究室のキム・ハンギル博士, 松永 航博士には分子生物学的解析手法に関わる種々ご指導とご援助を頂いた。また, 2018 年からは元国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構の松本直幸博士に英文作成のご指導や, 公私ともに幅広くご助言をいただいた。これらの全ての方々のご協力なしには本研究を遂行することができなかった。ここに深甚なる感謝の意を表する。

最後に日々支えてくれた綾香, 茉弥そして両親に感謝したい。