



Title	北海道産ニンニクのウイルス感染に関する疫学的・分子生物学的解析
Author(s)	佐々木, 純
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15225号
Issue Date	2022-12-26
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15225
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/87776
Type	doctoral thesis
File Information	Sasaki_Jun.pdf



北海道産ニンニクのウイルス感染に関する疫学的・分子生物学的解析

Epidemiological and Molecular Biological Analysis of Viral Infection of Garlic Grown 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

佐々木 純

目次

1. 緒言	1
2. 研究史	2
2.1. leek yellow stripe virus (LYSV) および onion yellow dwarf virus (OYDV)	
2.2. alexivirus	
2.3. potyvirus の P1 タンパク質の機能	
3. 本研究の目的	6
4. 第1章 北海道におけるニンニクのもザイク病：症状および地理的分布	7
4.1. 背景	
4.2. 材料と方法	
4.3. 結果	
4.4. 考察	
5. 第2章 北海道で確認した LYSV S型の分子系統解析と宿主への適応について	25
5.1. 背景	
5.2. 第1節 北海道における LYSV-N および LYSV-S のニンニクへの混合感染について	
5.2.1. 材料と方法	
5.2.2. 結果	
5.2.3. 考察	
5.3. 第2節 北海道分離 LYSV-N および LYSV-S の分子系統解析	
5.3.1. 材料と方法	
5.3.2. 結果	
5.3.3. 考察	

5. 4. 第3節 タマネギに対する LYSV の感染と北海道の野生のネギ属植物からの LYSV 検出

5. 4. 1. 材料と方法

5. 4. 2. 結果

5. 4. 3. 考察

5. 5. 第4節 LYSV S型 P1 の RNA サイレンシングサプレッサー活性

5. 5. 1. 材料と方法

5. 5. 2. 結果

5. 5. 3. 考察

6. 総合考察	60
摘要	64
Summary	66
引用文献	68
謝辞	75

略語一覧

LYSV leek yellow stripe virus

OYDV onion yellow dwarf virus

RNAサイレンシング抑制剤 RSS

1. 緒言

北海道におけるニンニクの生産は、1970 年前後までは全国生産一位といわれ、1974 年の栽培面積は約 500ha、生産量約 3,000t（北海道農業協同組合中央会、ホクレン農業協同組合連合会、1988 年）であった。世界の生産量は 2,600 万 t といわれ、その 8 割が中国で生産されている。1980 年以降に中国産ニンニクの輸入増加等に伴い、道内のニンニク生産は激減した。

ニンニクにウイルスが感染すると、収量が減少し、品質が劣化するため、青森県では福地ホワイト系でウイルスフリーのニンニク栽培に積極的に取り組んでおり、一定の成果を上げている。安定的に種苗供給する体制をとった青森県の実産量は日本一になった。

北海道では、中国産の価格上昇などにより、2010 年頃から栽培面積が 39ha と増加に転じ、2020 年には 147ha（農林水産省 野菜生産出荷統計、2021 年）となっている。北海道で栽培されているニンニクは青森県と同じ寒地系品種（福地ホワイト系）が主に栽培されている。独自にウイルスフリー化を行った種球を供給している地域もあり、毎年面積が増加している。

しかし、残念ながら、多くの地域では種球を他府県（主に青森県）から入手せざるを得ない状況にあり、その種球として使用するりん球の多くはすでにウイルスに感染しているものが使われていると考えられる。このため、道内の収量性は反収で 565kg/10a（農林水産省 野菜生産出荷統計、2021 年）と非常に低くなっており、青森県の反収 980 kg/10a（農林水産省 野菜生産出荷統計、2021 年）との差は歴然としている。ニンニクは貴重な露地野菜としても位置付けられる作物であり、今後作付けを振興していくためには、感染しているウイルスを明らかにし、種苗のウイルスフリー化、ウイルス検査法の確立等が急務であった。

20

21

22 2. 研究史

23 2.1. leek yellow stripe virus (LYSV) および onion yellow dwarf virus (OYDV)

24 *Leek yellow stripe virus* (LYSV) は、ニンニク (*Allium sativum* L.) およびネギ属に感染することが
25 知られている *Potyvirus* である (Barg *et al.*, 1994 ; Bos *et al.*, 1978; Bos *et al.*, 1982 ; Delecolle, 1994 ;
26 Sward and Brennan, 1994 ; Van Dijk, 1994) . LYSV によるモザイク病は世界中のニンニク生産地
27 で非常によく見られる病害で、発病したニンニクにはモザイク症状が見られている. 感染したニ
28 ンニクは葉にモザイクや黄色の縞状の症状を示し、りん片で繁殖した次世代は萎縮を示すため、
29 りん茎は小さく奇形となり生産性が低下する. その結果、収量と品質の大幅な低下を招く. この
30 病害は Brierley (1946) により最初に報告されたが、その原因ウイルスは長い間不明であった.
31 本病の病原ウイルスを含むネギ属のモザイク症状に関する病原ウイルスの再検討が行われ (Van
32 Dijk, 1993a; 1993b) , これらの病害は Van Dijk によって、ニンニクのモザイク病を含むネギ属の
33 モザイク症状の病原ウイルスは LYSV, onion yellow dwarf virus (OYDV) , shallot yellow stripe virus
34 (SYSV) , shallot latent virus (SLV) , welsh onion yellow stripe virus (現在 SYSV の 1 系統) であると
35 された.

36 国内では佐古ら (1976, 1977) によって *garlic mosaic virus* (GMV) として初めて報告された.
37 さらに李ら (1979) , 我孫子ら (1980a, 1980b) , 藤田ら (1992) , により、寄主範囲, 物理性,
38 アブラムシによる伝染などの諸性質が明らかにされた. Sumi ら (1993) は、ニンニクから部分
39 精製した棒状ウイルス粒子から得られた cDNA の塩基配列解析からウイルス同定を試みており、
40 続いて Nagakubo ら (1994) によってニンニクから得られた *potyvirus* の 3'末端側の *nuclear inclusion*
41 *protein b* の一部と外被タンパク質の全域の塩基配列が報告されている. その後、免疫電顕法およ
42 びダイレクトティッシュプリント法による血清学的関係やウイルスの諸性質, 3'末端領域の塩基

43 配列の比較などから、GMV には LYSV と OYDV が含まれていたことが示され、Van Dijk の報告
44 とも比較し再定義された (山下ら, 1991, 1995, 1997; 山下, 1998) .

45 ネギ属植物であるタマネギは LYSV の自然宿主とは考えられていないが (Katis *et al.*, 2012 ;
46 Vucurovic *et al.*, 2017) , LYSV 感染によるタマネギの被害も一部の地域で報告されている
47 (Sharhraeen *et al.*, 2008 ; Santosa and Ertunç, 2020) . 日本のニンニク生産地で検出された LYSV は,
48 P1 遺伝子の 200~300 塩基の欠失という特徴から、N 型 (LYSV-N) と S 型 (LYSV-S) に分類で
49 きる (Takaki *et al.*, 2005 ; Yoshida *et al.*, 2012) . また、本州では LYSV-N と LYSV-S の混合感染
50 も報告されている (Takaki *et al.*, 2005) . 北海道で検出された LYSV は、すべてとは言わないま
51 でもほとんどが N 型であるが、まれに N 型と S 型の混合感染も確認されている.

52 LYSV はアブラムシ媒介によって伝播するため、ウイルスフリー種苗を利用する場合に圃場で
53 再度感染してしまうことから、その対策が不可欠である. LYSV の媒介者として報告されている
54 アブラムシは、モモアカアブラムシ、ネギアブラムシなど 10 種程度である (我孫子ら, 1980a ;
55 Abd El-Wahab , 2009 ; Lunello , 2002) . 国内では、ニンニク圃場における有翅アブラムシの飛来消
56 長について青森県 (山下ら, 1991) および北海道 (佐々木ら, 2021) で報告されており、北海道
57 では 5 月下旬から 11 月上旬頃まで有翅アブラムシがニンニク圃場に飛来するリスクがあることが
58 明らかになっている.

59 北海道では LYSV が OYDV よりも多く検出され、他の地域では OYDV が多く検出される. 以
60 前の報告で、北海道のニンニクから検出された OYDV 分離株の多くは、HC-Pro 遺伝子の 5'末端
61 に大きな欠失があり、アブラムシのウイルス感染を支える能力が失われていることが分かった
62 (Kim *et al.*, 2020) . そのため、OYDV のアブラムシ感染には LYSV との混合感染が重要であるこ
63 とが示唆されている (Jayasinghe *et al.*, 2021) .

64 2. 2. allexivirus

65 日本におけるニンニクモザイク病の病原としては、allexivirus も知られている。国内では初め
66 garlic mite-borne mosaic virus（現在は garlic virus C）と提案された（Yamashita *et al.*, 1996）。allexivirus
67 は LYSV や OYDV と異なり、アブラムシではなくチューリップサビダニ媒介で知られる。また、
68 allexivirus 単独での減収は種によって差があるようだが、allexivirus 内での重複感染で重篤化する
69（Cafirune *et al.*, 2006 ; Perotto *et al.*, 2010）。

70 ニンニクのウイルスによる症状は、前述 2 種類の potyvirus（LYSV, OYDV）と allexivirus
71（garlic virus A, B, C, D, X）との混合感染で、よりニンニクのモザイク症状が重篤化する。ニ
72 ンニクにとってこの 3 つが主要なウイルスと考えられている。ニンニクは種球を使用し、1 球か
73 らとれるりん片 4 個程度により増殖される。農作物としては、増殖性が他の作物に比べて極端に
74 悪い。しかも、ウイルスはりん球を通じても拡大するため、一度栽培体系に侵入すると圃場から
75 の除去が難しいことが問題となっている。

77 2. 3. potyvirus の P1 タンパク質の機能

78 potyvirus の P1 タンパク質は、P3 タンパク質と結合し、ウイルスの複製に関与することが報告
79 されている（Merits *et al.*, 1999）。P1 タンパク質と宿主因子の相互作用では、tobacco etch virus の
80 P1 が 60S リボソームサブユニットに結合し、タンパク質の翻訳を促進することが報告されてい
81 る（Martinez and Daros, 2014）。Hu ら（2020）は、3 つの potyvirus の P1 を用いた免疫沈降（IP）実
82 験を行い、LC-MS/MS を用いてシロイヌナズナから P1 結合タンパク質を網羅的に検出した。そ
83 の結果、特に RNA サイレンシングや防御反応に関与する多くのタンパク質を同定した。また、
84 sweet potato mild mottle virus（*Ipomovirus*）の P1 は、RNA サイレンシング経路のキープレイヤーであ

85 る AGO1 タンパク質と結合することが報告されており (Giner *et al.*, 2010) , P1 には RNA サイレ
86 ンシングを妨害する機能があると思われる.

87 一方, P1 自身は RNA サイレンシングサプレッサー (RSS) 活性を持たないが, HC-Pro タンパ
88 ク質の RSS 活性を促進するという報告もある (Kasschau and Carrington , 1998; Valli *et al.*, 2006) . し
89 かし, watermelon mosaic virus の P1 は, 非 potyvirus である cucurbit yellow stunting disorder virus
90 (*crinivirus*) の P25 の RSS 活性を阻害するという報告もあるため (Domingo-Caloap *et al.*, 2021) ,
91 P1 が RSS 活性を促進できるウイルスのタンパク質は HC-Pro に限られるかもしれない. また, 2
92 つの potyvirus 種間で P1 遺伝子を交換しても, P1 は異種 HC-Pro の RSS 活性を補助することが可能
93 である. しかし, plum pox virus (PPV) と tobacco vein mottling virus の P1 配列でハイブリッドウイル
94 スを作製したところ, すべてのハイブリッドウイルスが PPV の天然宿主であるモモに感染でき
95 なかったことから, P1 と HC-pro の組み合わせが potyvirus の宿主特異性を決定している可能性が示
96 唆された (Salvador *et al.*, 2008) .

97 P1 プロテアーゼ活性によるポリタンパク質からの P1 と HC-Pro 間で切断されなかった場合,
98 HC-Pro の RSS 活性はあまり発揮されなかった (Pasin *et al.*, 2014) . 同様に, HC-Pro の RSS 活性
99 は, P1 と HC-Pro を別々のタンパク質として共発現するトランスジェニック植物よりも, P1-HC-
100 Pro 融合タンパク質を発現するトランスジェニック植物の方が強かった (Hu *et al.*, 2020) . ウイ
101 ルスの RSS 活性は潜在的な宿主への感染性を決定するのに重要であると考えられるため
102 (Shimura *et al.*, 2022) , P1 の HC-Pro への作用は potyvirus の進化にとって重要であると思われる.
103 他の potyvirus の P1 タンパク質に関する研究は多いが, ニンニクに感染する potyvirus の P1 遺伝子
104 の機能に関する報告はなく, LYSV や OYDV の P1 タンパク質が他の potyvirus の P1 タンパク質と
105 同様に HC-Pro の RSS 活性を促進するか否かは不明であった.

106 3. 本研究の目的

107 2013 年頃より北海道内各地でニンニクの栽培面積が年々増加している。しかし、ウイルスに
108 よると思われるモザイク症状や条斑症状が多発し、十分な収量が得られない状況にあった。

109 本研究では、北海道内のニンニクに感染するウイルスを明らかにするため、2019 年および
110 2020 年に道内の主要産地の圃場調査を行い、LYSV、OYDV、allexivirus の発生と地理的分布を明
111 らかにした。特に最も発生が多かった LYSV を研究対象とし、P1 遺伝子の欠失から識別した N
112 型と S 型について、分子系統学的解析を行った。次に、LYSV のタマネギへのアブラムシ媒介に
113 よる接種試験やニンニク以外のネギ属植物からの検出を実施した。さらに S 型の P1 遺伝子の
114 RNA サイレンシングサプレッサー活性について解析し、LYSV の異なる寄主への適合について考
115 察した。

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127 4. 第1章 北海道におけるニンニクのモザイク病：症状および地理的分布

128 4. 1. 背景

129 道内で生産されたニンニクの球から Yoshida ら (2012, 2018) により LYSV, OYDV および
130 allexivirus が検出された。これらのウイルスの道内の感染状況や地理的分布について明らかにする
131 ため、道内各地の発生実態について調査を行った。

132

133 4. 2. 材料と方法

134 4. 2. 1. 調査地点および試料採取

135 2019年および2020年に道内7振興局（空知，石狩，後志，檜山，上川，オホーツクおよび十
136 勝）の17市町村（Fig. 1）合計54圃場よりニンニクの葉または個体全体を採取し，合計65検体
137 を以後の試験に供試した。

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

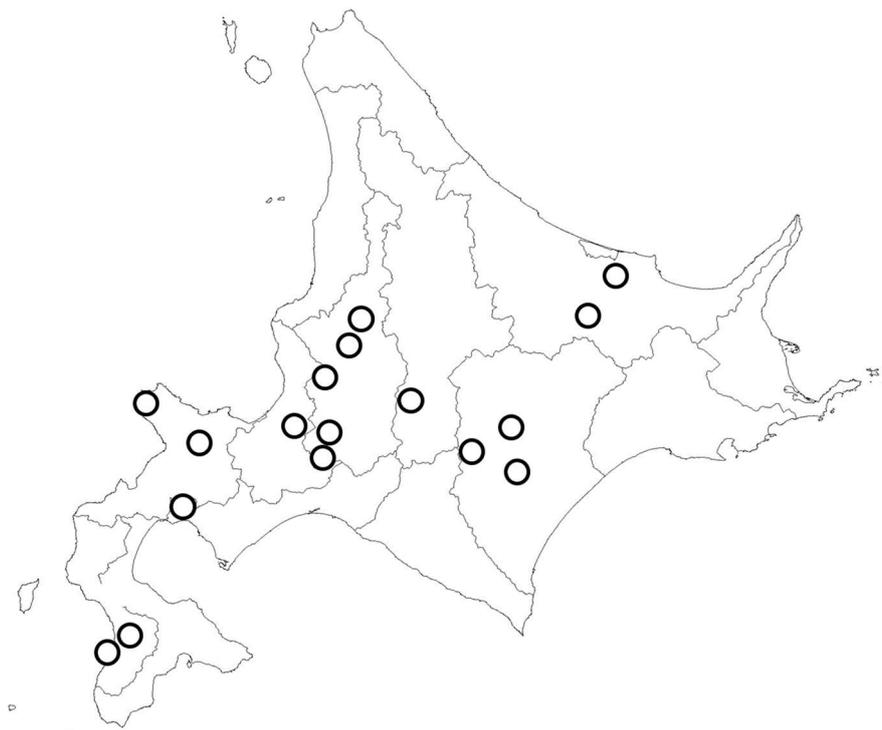
157

158

159

160

161



162

Fig. 1 Municipalities surveyed for garlic cultivation plots in Hokkaido in 2019-2020

163

164

165

166

167

168

169 4. 2. 2. RNA抽出と各ウイルスの検出

170 ニンニク組織からの RNA 抽出には、RN-Sure Plant Mini Kit (株式会社アンテグラル) を使用し、
171 その手順は製品プロトコールに準じた。

172 ウイルスの検出は、まず SuperScript III 逆転写酵素 (サーモフィッシャーサイエンティフィック
173 社) を使用して逆転写反応を行った。上記の RNA 溶液 1 μ L を用いて、random primer (東洋紡社)
174 を 1 μ L, dNTPs Mixture (東洋紡社) を 1 μ L 加え、トータル 11 μ L で 55°C, 30min 反応させ、反応後
175 に 70°C, 15min 処理をして酵素を失活させた。反応終了後に RNaseH (タカラバイオ社) を各サン
176 プルに 1 μ L (2unit) 添加し、37°C, 20min 処理した。得られた反応液を以後の PCR 反応に各 1 μ l 用
177 いた。

178 PCR 反応には TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ社) を使用し、50 μ L の系で反応さ
179 せた。PCR 反応に用いたプライマーペアは Table 1 にまとめて示した。LYSV, OYDV, allexivirus
180 の増幅に加えて、OYDV の HC-Pro 領域の欠失が圃場レベルで見られるか検出を試みた。LYSV
181 のプライマーペアはその増幅サイズにより、N型と S型を識別可能となっている。

182

183

184

185

186

187

188

189

190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210

Table 1 Characteristics of the Primers, PCR Product Size

Target virus	primer pair	Sequence (5'→3')	Target region	Product Size
LYSV	LY5P*	AATCTCAACACAACTTATRC	5'UTR-P1	N-type:950bp
	LY2M	AGTACGTTGCCCTGCTCTGTAG	partial	S-type:720bp
OYDV	OYDV-5-220*	TGGCCTGGATGGTAACGTAA	CP-3'UTR	260bp
	OYDV-3-220	GTGGTACACCCACATTCGGTTGC	partial	
OYDV (HC-Pro)	OYDV-HC5-450**	TAAATCCYGACAAYATAATYGG	HC-Pro	1400bp
	OYDV-HC3-1400	ACCTACATTRTAGTYTTTCATTTTC		
allexivirus	AL-cp5-750***	TGGRCXTGCTACCACAAAYGG	CP-3'UTR	750bp
	AL-cp3-750	CCYTTCAGCATATAGCTTAGC	partial	

*Takaki *et al.* (2005) **Kim *et al.* (2020) ***Chen *et al.* (2004)

211 4. 2. 3. allexivirus の CP-3'UTR 領域の塩基配列解析

212 4.2.2 で得られた allexivirus の CP-3'UTR 領域を標的に RT-PCR で得た増幅産物を、電気泳動後に
213 ターゲットの増幅バンドのゲルを切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega 社)
214 により DNA を回収した。pGEM-T-Vector (Promega 社) にそれぞれライゲーションし、コンピテ
215 ントセルに形質転換した。Blue-white スクリーニングを行い、1 クローンあたり 12 コロニーから
216 PCR 法でインサート DNA を増幅した。増幅産物を電気泳動してその有無を確認し、1 クローン
217 あたり 10~11 コロニーの計 72 断片の DNA について、ゲルを切り出し DNA GEL Extraction kit
218 (NEB 社) を使用して回収した。回収した DNA を受託シーケンス (シグマアルドリッチジャ
219 パン社) に依頼し、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を解析した。

220 さらに新たに 2 振興局 (胆振, 上川) 4 か所のニンニクのりん球から、同様に RT-PCR 法で増
221 幅し、増幅産物をクローニングし、1 クローン各 10 断片計 40 クローンについて同じくダイレク
222 トシーケンスにより塩基配列を決定した。

223 得られた塩基配列は GENETXver.14 (ゼネティックス社) を用いて BLAST 解析により GenBank
224 上の登録配列と比較をした。

225

226 4. 3. 結果

227 2019 年および 2020 年に北海道のニンニクのウイルスについて発生調査を行ったところ、ほぼ
228 すべての圃場で全面的な発生 (Fig. 2) が認められ、その病徴はモザイク症状、黄色条斑や葉の
229 奇形であった (Fig. 3) . 各地より採取したニンニク全 65 検体について検出を行った結果 (Fig.
230 4, Table 2) , 検出されたウイルスは LYSV が最も多く、そのうち 48 検体は N 型のみが検出され
231 たが、2 検体は N 型と S 型が同時に検出された。S 型単独で検出された株は認められなかった。

232 次いで OYDV が検出されたが、HC-Pro 遺伝子の N 末領域が増幅された検体は 5 株のみで、22 株
233 では同領域の増幅が認められなかった。圃場で栽培されている検体においても多くが同領域を欠
234 失していることが確認された。

235 また、allexivirus が道内の圃場の検体から、今回初めて検出された。しかも調査を行った 8 振興
236 局のうち 6 振興局で検出されており、すでに道内に広く分布していた。また、Yoshida ら (2018)
237 の報告したりん球から分離した各分離株との塩基配列の相同性は高く (Table 3, 4, 5, 6) , garlic
238 virus A, garlic virus B, garlic virus C, garlic virus D を本研究で北海道の各生産地で栽培中の検体から
239 確認することができた (Table 7) 。りん球サンプルから得た胆振地方と上川地方の計 4 カ所の結
240 果を加えた allexivirus の発生分布は、オホーツク地方では garlic virus C, 上川地方では garlic virus D,
241 道南地方では garlic virus B, 空知, 石狩, 胆振地方では garlic virus B とその他の混合, 十勝地方で
242 は garlic virus A, garlic virus B, garlic virus C, garlic virus D となった (Fig. 5) 。

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266



267

Fig. 2 Garlic cultivation plots (Tokachi)

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289



290

Fig.. 3 Symptoms of garlic mosaic disease (Mosaic, Yellow streak, Leaf deformity)

291

292

293

294

295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315

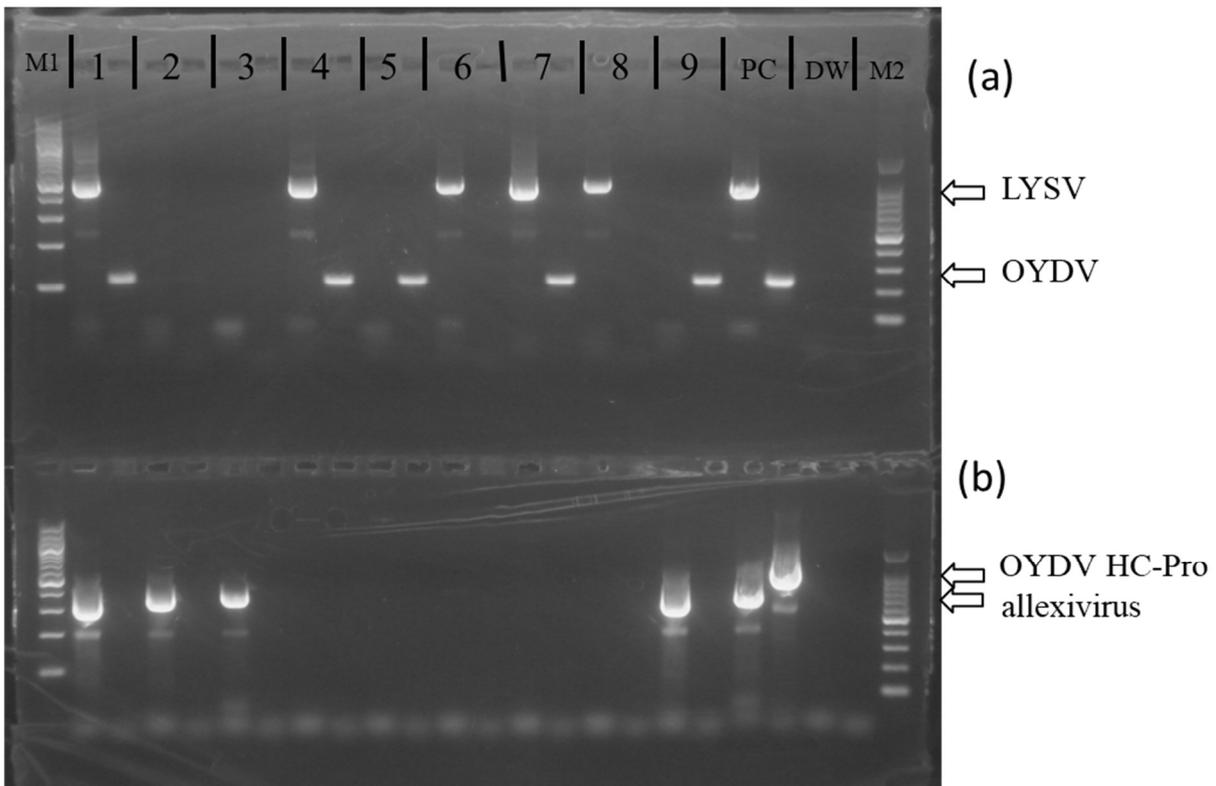


Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of the RT-PCR products.
(a) Leek yellow stripe virus (LYSV), onion yellow dwarf virus (OYDV),
(b) Allexivirus, OYDV HC-Pro. sample (Garlic collected from field samples in hokkaido:1. Tokachi A, 2.Okhotsk A, 3.Okhotsk B, 4.Shiribeshi A, 5.Tokachi B, 6.Kamikawa, 7.Shiribeshi B, 8.Hiyama, 9.Ishikari)
a, b. PC= positive control (Garlic china), DW: distilled water,
M1 = DNA 200 bp ladder, M2=DNA 100 bp ladder.

316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336

Table 2 Detection of LYSV, OYDV, and alllexivirus in garlic field samples from various regions of Hokkaido (2019 - 2020)

District	sample No	No.of plants detected					
		LYSV		OYDV		alllexivirus	
		N-type	S-type	N-type + S-type	HC-Pro deletion	HC-Pro	
Sorachi	9	8	0	0	1	0	3
Ishikari	4	2	0	0	1	0	3
Shiribeshi	9	9	0	0	6	2	0
Iburi	3	2	0	0	1	0	0
Hiyama	5	5	0	0	0	0	1
kamikawa	7	6	0	0	2	0	2
Okhotsk	14	9	0	2	5	2	7
Tokachi	14	7	0	0	6	1	2
Total. No	65	48	0	2	22	5	18

337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357

Table 3 Sequence homology (%) between the CP-3'UTR regions of allexivirus isolated in Hokkaido and those of known garlic virus A sequences

District	No. sequences analyzed	LC097150* hokkaido A-JHKi-3	LC097151* hokkaido A-JHTok-1
Ishikari	5	97~99	97~99
Tokachi	1	98	97

*Yosida *et al.* (2018)

358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378

Table 4 Sequence homology (%) between the CP-3'UTR regions of allexivirus isolated in Hokkaido and those of known garlic virus B sequences

District	No. sequences analyzed	LC097159* hokkaido B-JHOb-3	LC097160* hokkaido B-JHN
Ishikari	6	94~99	94~99
Sorachi	4	95~99	95~99
Hiyama	9	93~97	93~96
Tokachi	4	94~97	94~97

*Yosida *et al.* (2018)

379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399

Table 5 Sequence homology (%) between the CP-3'UTR regions of allexivirus isolated in Hokkaido and those of known garlic virus C sequences

District	No. sequences analyzed	LC097170*	LC097171*
		Miyagi C-JM	Hokkaido C-UR-a
Sorachi	7	97~98	99
Okhotsk A	10	97~98	98
Okhotsk B	10	95~98	96~99
Tokachi	3	80,97	80,98

*Yosida *et al.* (2018)

400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420

Table 6 Sequence homology (%) between the CP-3'UTR regions of allexivirus isolated in Hokkaido and those of known garlic virus D sequences

District	No. sequences analyzed	LC097180* Hokkaido D-JHTok-1	LC097181* Hokkaido D-JHU-1
kamikawa	10	88~89	95~97
Tokachi	3	99	90

*Yosida *et al.* (2018)

421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441

Table 7 Detection of allelixiviruses in the garlic field samples from various regions of Hokkaido

District	GarV-A	GarV-B	GarV-C	GarV-D
Sorachi	—	4	7	—
Ishikari	5	6	—	—
Hiyama	—	9	—	—
kamikawa	—	—	—	10
Okhotsk A	—	—	10	—
Okhotsk B	—	—	10	—
Tokachi	1	4	3	3

- : not detect

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

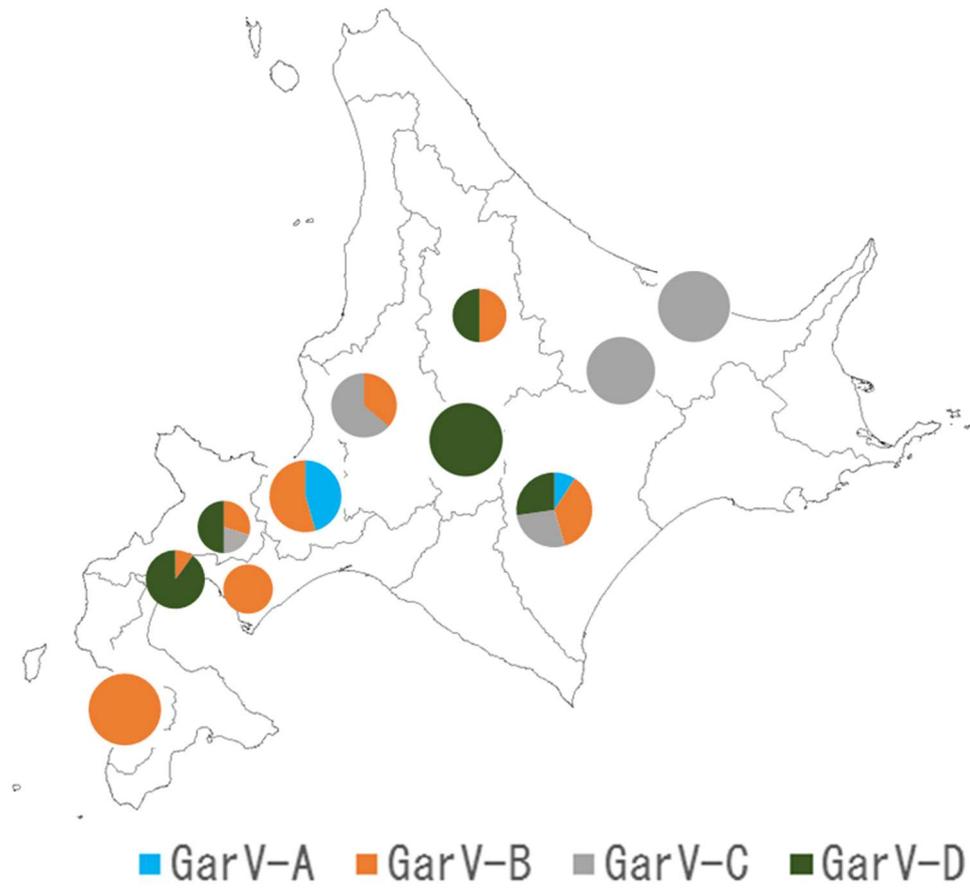


Fig. 5 Distribution of confirmed occurrences of allelixiviruses in Hokkaido

463 4. 4. 考察

464 本調査の結果、ニンニクのモザイク病は北海道内各地に広く蔓延していることが明らかになっ
465 た。現地の生産者は、生理障害によるものと誤認していたケースもよく認められた。種球の多く
466 は寒地系品種といわれる福地ホワイト系が青森県から多く移入されており、長年自家増殖で種苗
467 を維持している地域も少なくなかった。この結果、道内でのニンニク栽培ではウイルスが蔓延し、
468 収量低下を引き起こしていると考えられる。

469 PCRによる検出の結果から、北海道でのニンニクの第一のウイルス優占種はLYSVと考えられ
470 た。また、LYSVはP1遺伝子がN型と欠失のあるS型に大別されるが、北海道におけるニンニ
471 クのLYSVの優占種はN型と考えられた。しかし、2検体のみN型とS型の増幅が同時に認めら
472 れ、これはN型とS型の混合感染と推測された。N型とS型の混合感染については第2章で詳し
473 く解析する。

474 OYDVについては、Kimら(2020)の報告により、りん球からの検出ではHC-Pro領域に欠失
475 がみられることがすでに明らかとなっていたが、圃場の栽培中にサンプルからも同様に確認でき、
476 しかもすでに優先種となっていることが示唆された。また、Jayasingheら(2021)により同領域
477 を欠失したOYDVはアブラムシによる媒介をLYSVに依存していることが示唆されており、実
478 際、LYSVの検出数に比較してOYDVの検出は少なかった。

479 LYSVとOYDVは種球由来の伝搬のほか、アブラムシで媒介され広く蔓延することから、今後
480 ウイルスフリー球の導入を進めていく場合には、種苗増殖の際に再感染を防ぐことは困難である。
481 従って、防虫ネットによる隔離などを徹底していくことが必要と考えられる。

482 allexivirusについては、Yoshidaら(2018)がりん球からすでに検出し、garlic virus A, garlic virus B,
483 garlic virus C, garlic virus Dの4種を明らかにしていたが、本研究でも栽培にんにくから同様に検

484 出し、道内での分布を明らかにした。興味深いのは、地域によって、種に偏りがみられていたこ
485 とである。種球は道外から持ち込まれることが多いが、地域によって供給元となる種苗会社は同
486 じではなく、当然異なったルートで供給されている。おそらくは、allexivirusに感染した種球の由
487 来の発生状況が大きく影響しているのではないかと推測される。また、allexivirusの媒介は種球に
488 よる伝搬のほかに、チューリップサビダニによって媒介することが知られている。本研究での調
489 査と並行してチューリップサビダニの発生調査も行っているところであるが、2022年現在もそ
490 の発生自体を確認できていない（未発表）。少なくとも、allexivirusの道内の発生はチューリップ
491 サビダニの道内での蔓延によるものでは無いと考えられる。

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505 5. 第2章 北海道で確認した LYSV S 型の分子系統解析と宿主への適応について

506 5.1. 背景

507 第1章でニンニクから N 型と混合感染した形で検出された LYSV S 型について、十勝管内でも
508 同様に N 型と S 型が混合感染した事例も認められた。これら北海道では優占種ではない S 型に
509 ついて、分子系統学的解析を行った。また、アブラムシによる接種試験を行い、タマネギがリザ
510 ーバーとなる可能性を検討した。さらに、S 型についてタマネギや野生のネギ属植物からの検出
511 を試み、宿主範囲を調査した。最後に、S 型が持つ欠失のある P1 タンパク質の
512 RNA サイレンシング活性について解析した。

513

514 5.2. 第1節 北海道における LYSV-N および LYSV-S のニンニクへの混合感染について

515 5.2.1. 材料と方法

516 5.2.1.1. 植物

517 ここで用いる北海道産ニンニクは、福地ホワイト系 (FW) に由来する。第1章での調査で得
518 られたオホーツク産と 2019 年および 2020 年にウイルスフリー球を導入した圃場で調査した十勝
519 産を用いた。

520

521 5.2.1.2. 全 RNA の抽出

522 TRIzol Reagent (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) を用いて、ニンニクの葉から全
523 RNA を抽出した。必要に応じて、NucleoSpin RNA (タカラバイオ株式会社) を用いてカラムを
524 通してさらに精製した。

525

526 **5. 2. 1. 3. RT-PCR**

527 RT-PCRは1ステップまたは2ステップとした。2ステップの場合、まず AMV 逆転写酵素 (株
528 式会社ニッポン・ジーン) を用いて cDNA を合成した。次に、cDNA の配列を Takara Ex Taq (タ
529 カラバイオ株式会社) で増幅した。1ステップ RT-PCR には、Takara One Step RNA PCR kit (AMV)
530 (タカラバイオ株式会社) を使用した。Nested-PCR では、1回目の PCR 反応混合物 1 μ L を2回目
531 の PCR 反応液に添加した。全ての PCR は、製造元の仕様に従って行った。第2章で用いる全て
532 のプライマー配列を Table 8 に示した。

533

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546

547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567

Table 8 Primers used in Chapter 2

Primer name	Primer sequence (5' → 3')	PCR purpose	Reference
LY5P	F: AATCTCAACACAACTTATRC R: AGTACGTTGCCTGCTCTGTAG	Amplification of P1 partial sequence	Takaki <i>et al.</i> (2005)
S-263F S-696R	F: ATAGTAAAGCCTTGTGTGCA R: GACCAAAGACGGATCTGGT	P1 nested-PCR	Sasaki <i>et al.</i> (2022)
LYSV-5-275 LYSV-3-275	F: TTCTCTTTAAAAMTTGAGGAATTCCC R: TGACCAAAGACGGATCTGGT	P1 nested-PCR	Sasaki <i>et al.</i> (2022)
LY-HC3-1200	R: TTTTCCAAAATRA TTKMCCWGCAGTA	With LYS P, amplification of entire P1 gene	Sasaki <i>et al.</i> (2022)
LY-TokN-P1-5-Sm LY-TokN-P1-3-Flag-Sc	F: CTCCCGGATGGCTAGAGTATTCAAAATCTG R: CGCGAGCTCTCACYYGTCATCGTCCCTTGTAGTCATAAATGTTCCGAGTTCGGATAAC	Cloning in pBE2113	Sasaki <i>et al.</i> (2022)
LY-TokoS-P1-5-Sm LY-TokoS-P1-3-Sc	F: CTCCCGGATGACAACAACATCGATGAC R: CGCGAGCTCTCACTTGTCACTCGTGGTCCCTTGTAGTCATAGTGTTCGAGTTTGGATTTCATC	Cloning in pBE2113	Sasaki <i>et al.</i> (2022)
LYSV-5-130 LYSV-3-130	F: ACTCCATCATACGTTTTTGGAG R: CACCAATTGCAAGTAGTGCATTC	Amplification of P1 partial sequence	Sasaki <i>et al.</i> (2022)
LYSV-3-nest-200	R: GAAATTCCTCAAKTTTAAAGAGAG	P1 nested-PCR	Sasaki <i>et al.</i> (2022)

568 5. 2. 2. 結果

569 第1章で得られたオホーツク地方の分離株の他に、十勝地方のFWニンニクからLYSVの分離
570 株を確認し、低頻度ではあるがLYSV-NとLYSV-Sの混合感染を複数検出した（Fig. 6）。十勝
571 管内では、近年FWのウイルスフリーのニンニク種苗が生産者に配布されている。配布する種苗
572 の数とサイズを確保するため、通常では種苗は圃場で2年以上栽培されるが、その2年間にアブ
573 ラムシによって再びウイルスに感染することが多く、完全にウイルスフリーの種苗を作ることは
574 隔離しない限り不可能である。2019年と2020年に十勝管内のウイルスフリーのニンニク種苗の
575 供給を受けている同じ圃場でLYSVの感染を調査した結果、2019年は調査した40個体のうち3
576 つの混合感染が検出された。しかし、2020年には、毎年ウイルスフリーの種苗が流通するため
577 か、同じ圃場で調査した60個体中、混合感染は検出されず（Table 9）、2020年には周辺に
578 LYSV-S感染源植物が存在しなくなったことが示唆された。

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609

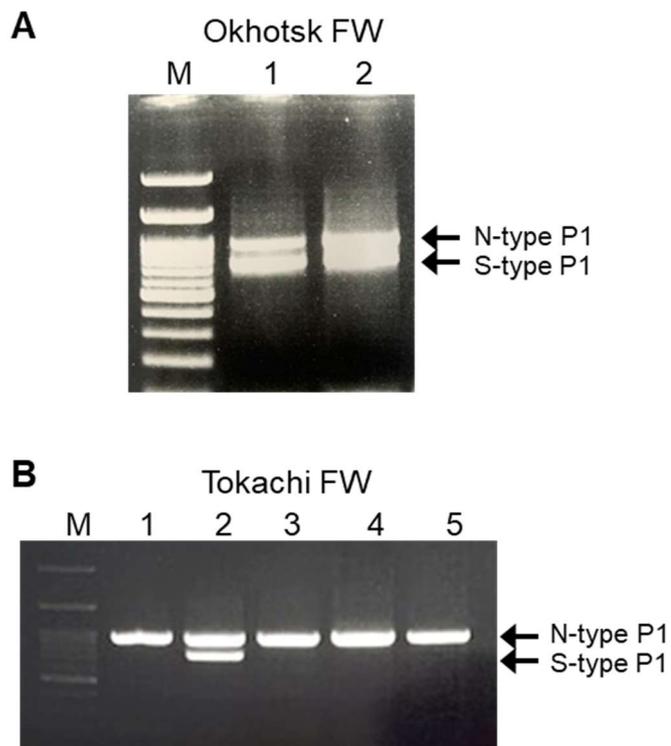


Fig. 6 Representative gels show N- and S-type of P1 from LYSV isolates indicating mixed infection in garlic plants (var. Fukuchi-White [FW]) from Okhotsk (A) and Tokachi (B) regions in Hokkaido. Primer pair LY-5P/LY-2M was used for RT-PCR. M, 100 bp DNA ladder (A, B).

Table 9 Detection of LYSV-N and LYSV-S in Tokachi garlic cultivation fields by PCR method in a survey of garlic strains

Year	No. of garlic plants infected with LYSV with N- and S-type PI			
	LYSV-positive (total tested)	N-type	S-type	N+S
2019	23 (40)	20	0	3
2020	20 (60)	20	0	0

Notes: Primer pair LY5P/LY2M was used for the first-round PCR, S-263F/S-696R for nested-PCR. New virus-free seedlings are introduced to regions every year.

631 5. 2. 3. 考察

632 北海道で分離された LYSV のほとんどが N 型の PI を持っていたことから、北海道のニンニク
633 に感染している LYSV は、LYSV-N が主体となっていると考えられた。それに対して、LYSV-S
634 は単独では検出することができず、オホーツク地方および十勝地方において LYSV-S は LYSV-N
635 混合感染していると考えられる事例がわずかに認められた。十勝地方のウイルスフリー種苗の供
636 給を受けている圃場では年次によって検出の有無に違いがあること、道内での検出自体もわずか
637 であることから、圃場内で定着や蔓延しているとは考えにくい。何らかの LYSV-S 感染源植物が
638 持ち込まれるか、あるいは周辺に存在し、アブラムシにより伝搬されて感染した可能性が推測さ
639 れた。LYSV についてさらに解析を進めるため、分子系統解析を実施し、さらにタマネギへのア
640 ブラムシ伝搬試験や野生のネギ属植物からの検出を実施することとした。

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652 5.3. 第2節 北海道分離 LYSV-N および LYSV-S の分子系統解析

653 5.3.1. 材料と方法

654 5.3.1.1. 植物

655 これまでに得られた、オホーツク産および十勝産ニンニク由来の LYSV-N と LYSV-S と比較す
656 るため、沖縄産、アメリカ産、中国産のニンニクおよびラッキョウ (*Allium chinense*) を供試した。
657 アメリカ産ニンニク、中国産ニンニク、ラッキョウは市場で購入した。

658

659 5.3.1.2. 全 RNA の抽出

660 TRIzol Reagent (サーモフィッシュャーサイエンティフィック社) を用いて、ニンニクの葉から全
661 RNA を抽出した。必要に応じて、NucleoSpin RNA (タカラバイオ株式会社) を用いてカラムを
662 通してさらに精製した。

663

664 5.3.1.3. RT-PCR

665 RT-PCR は 1 ステップまたは 2 ステップとした。2 ステップの場合、まず AMV 逆転写酵素 (株
666 式会社ニッポン・ジーン) を用いて cDNA を合成した。次に、cDNA の配列を Takara Ex Taq (タ
667 カラバイオ株式会社) で増幅した。1 ステップ RT-PCR には、Takara One Step RNA PCR kit (AMV)
668 (タカラバイオ株式会社) を使用した。全ての PCR は、製造元の仕様に従って行った。プライ
669 マー配列は Table 8 に示した。

670

671 5.3.1.4. 系統解析

672 LYSV の P1 領域の塩基配列と GenBank の塩基配列を用い、OYDV の 2 つの分離株 (GenBank
673 accessions, KJ451436 および NC_005029) をアウトグループとして解析を行った。アライメントは、
674 アミノ酸配列により、ソフトウェア mafft v7.429 (Katoh and Standley, 2013) を用いて作成した。系
675 統樹の再構築の前に、ソフトウェア RDP5 (Martin *et al.*, 2021) を用いて組換え解析を行い、配列
676 中に組換え部位を含む可能性のある分離株はすべて廃棄した。系統樹は MrBayes v3.2.7 (Ronquist
677 and Huelsenbeck, 2003) の Bayes 法を用いて、ガンマ分布の部位間速度変動と不変部位の割合を持
678 つ一般的な時間可逆モデルの下で推論された。マルコフ連鎖モンテカルロ法によるサンプリング
679 は 3,000,000 回の繰り返しで行われ、3,000 ステップごとにサンプリングを行った。最初の 25% の
680 サンプルはバーンインとして廃棄された。得られた合意樹は、R パッケージの ggtree (Yu *et al.*,
681 2017) を用いて可視化した。遺伝的分化は分子分散分析 (AMOVA) を用いて分析し、ヌクレオ
682 チド多様性はソフトウェア Arlequin v3.5.2 (Excoffier and Lischer, 2010) を用いて算出した。P1 領域
683 にわたるヌクレオチドの類似性は、ソフトウェア SimPlot v3.5.1 (Lole *et al.*, 1999) を用いて分析し
684 た。LYSV チュニジア分離株 2.1 (MH890561) をクエリー配列として用いた。類似度は Kimura
685 (2 パラメータ) モデルで推定し、100 nt のウィンドウサイズと 10 nt のステップサイズでクエリ
686 ーに対してプロットした。Brazil+Tunisia clade (KP236097, KP236101, KP236102, KP236103,
687 MH890559) と China+Japan clade (AB636327, MN059500, MN059520, MN059534, MN059543) か
688 ら 5 株が組み入れられた。また、LYSV-N と LYSV-S の代表株として、本研究で P1 塩基配列が決
689 定された株も含まれる。

690

691 5. 3. 2. 結果

692 オホーツク地方の混合感染ニンニクから LYSV の N 型 (オホーツク N) と S 型 (オホーツク S)
693 の両方のウイルス RNA を含む全 RNA を分離し, P1 遺伝子を PCR で増幅した後, 塩基配列を決
694 定した (LYSV の模式図を Fig. 7 に示す). また, 日本の他の地域 (沖縄) で栽培されたニンニ
695 クおよび輸入ニンニク (アメリカおよび中国産) から分離した LYSV-N および LYSV-S (それぞ
696 れ N 型 P1 および S 型 P1) の P1 遺伝子の塩基配列を決定した. そして, これらの配列と
697 GenBank データベース上の多数の P1 遺伝子の配列を用い, 系統樹を作成した (Fig. 8). Fig. 9
698 に, 関係する部分にフォーカスするため, いくつかのクレードを折りたたみ, 簡略化した系統樹
699 を示した. この系統樹では, オホーツク産ニンニクの混合感染に由来する N 型 P1 (オホーツク
700 N) と S 型 P1 (オホーツク S) は明らかに異なるグループに配置されており, S 型 P1 は LYSV-N
701 と LYSV-S の混合感染の N 型 P1 には由来していないことが分かった. 次に, N 型 P1 と S 型 P1
702 の P1 配列の集団変異を AMOVA で調べたところ, この 2 つの型は 41.6% ($P < 0.001$) と有意に異
703 なることが分かった. さらに, N 型 P1 (mean 0.413, SD 0.198) の塩基多様度は, S 型 P1 (mean
704 0.313, SD 0.149) よりも高いことが明らかになった. これらの結果は, S 型 P1 がアブラムシの媒
705 介によって外部から LYSV-N 感染ニンニクに新たに持ち込まれたことを示唆している. また, 系
706 統樹から, N 型 P1 の 2 つのクレード (Brazil+Tunisia クレード, China+Japan クレード) は, S 型 P1
707 に見られる共通の欠失はなく, 様々な長さの短いストレッチの配列を有していたが, 進化的に独
708 立し S 型 P1 と姉妹群を形成していた (Fig. 8 および Fig. 9). これらの結果は, 異なる N 型 P1
709 クレードは, P1 欠失が発生する前の S 型 P1 の祖先集団である可能性を示唆している.

710

711

712

713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733

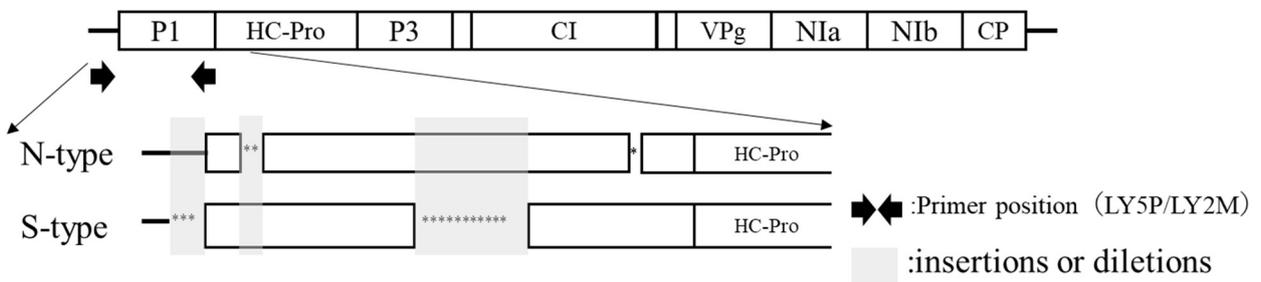


Fig. 7 Schematic representation of the genomic organization of LYSV

734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754

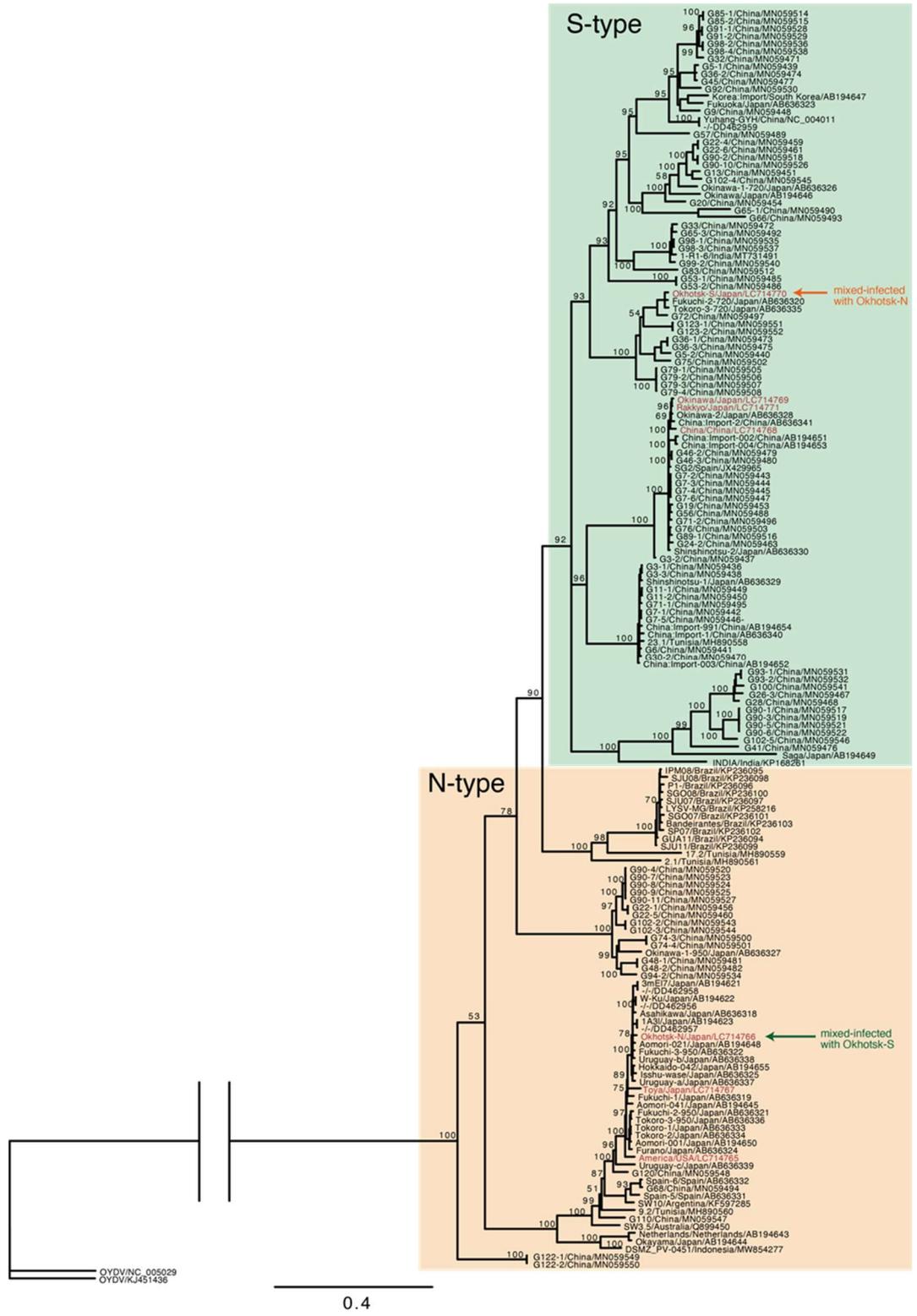


Fig. 8 Phylogenetic relationships of leek yellow stripe virus (LYSV). This tree inferred from the P1 region of using the Bayesian method in the MrBayes program. Node value indicate percent of posterior probability (only $\geq 50\%$ are shown). Two isolates of OYDV (KJ451436 and NC_005029) were used as outgroup taxa. Labels in red indicate sequences obtained in this study.

755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775

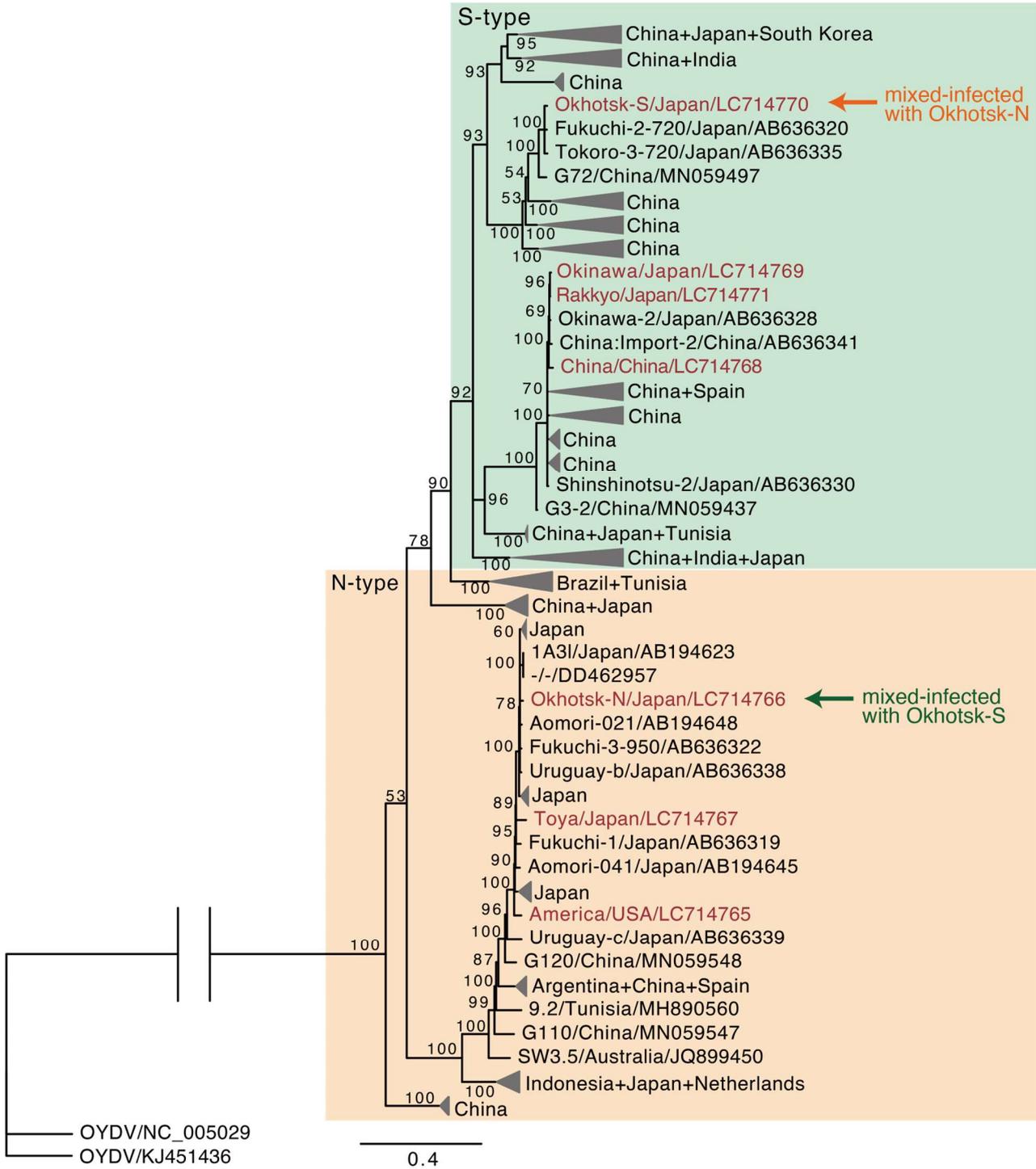


Fig. 9 Phylogenetic relationships of leek yellow stripe virus (LYSV). This tree inferred from the P1 region of LYSV using the Bayesian method in the MrBayes program. Node values indicate posterior probability (only those $\geq 50\%$ are shown). Triangles denote collapsed clades, with countries of collection. The original tree is shown in Fig.8 . OYDV isolates (KJ451436 and NC_005029) were used as outgroups. Labels in red indicate sequences obtained in this study. Note that the LYSV isolate from garlics in Okinawa (labeled as Okinawa) are almost identical to the LYSV isolate from rakkyo (*Allium chinense*) in Okinawa (labeled as Rakkyo).

776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796

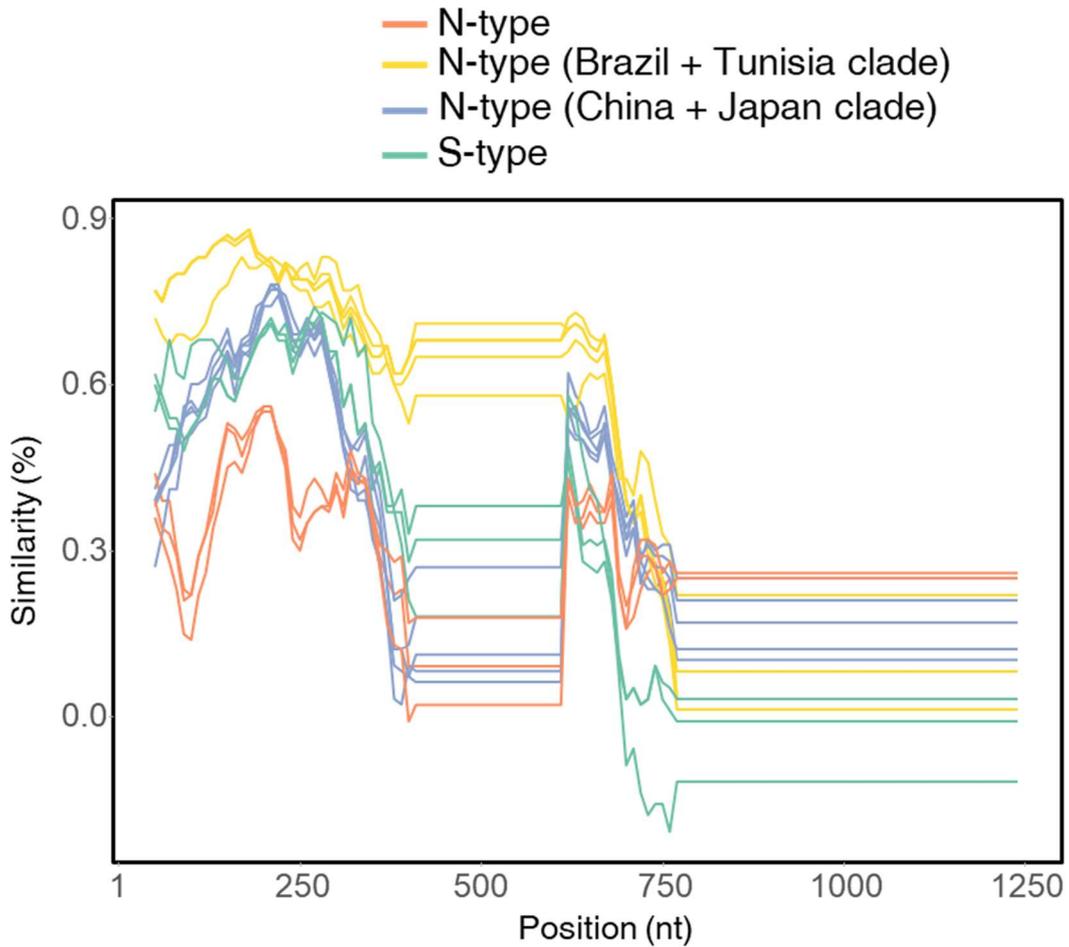


Fig. 10 Similarity plot of nucleotide sequences for the P1 region of LYSV against that of N-type P1 of LYSV Tunisian isolate 2.1 (GenBank accession; MH890561). Nucleotide similarities were estimated using the Kimura (two-parameter) model, a window size of 100 nt, and a step size of 10 nt. Five P1 sequence from Brazil + Tunisia clade (KP236097, KP236101, KP236102, KP236103, MH890559) and China + Japan clade (AB636327, MN059500, MN059520, MN059534, MN059543) were included. New sequences from the isolates in this study were also included as representative N- and S-type P1.

797 5. 3. 3. 考察

798 北海道オホーツク地方で採取された少数のニンニクから混合感染した形で得られた LYSV-N
799 (オホーツク-N) と LYSV-S (オホーツク-S) について, 両者の進化的関係を明らかにするため
800 にベイズ法による系統解析を行ったところ, LYSV-N (オホーツク-N) と LYSV-S (オホーツク-S)
801 は異なるグループに属することが樹形から示された. このことから, オホーツク-S の S 型 P1 が
802 オホーツク-N の N 型 P1 から defective interfering RNA として圃場で発生した可能性は低いと考えら
803 れる. また, この系統樹と集団変異検定から, Yoshida ら (2012) が以前に最尤法を用いて示し
804 たように, S 型 P1 が N 型 P1 から進化したことが示唆された. さらに, LYSV-N が北南米やヨー
805 ロッパなど世界的に分布しているのに対し, LYSV-S はアジア諸国などより限られた地域に分布
806 しているようである. この分布から, LYSV-S は祖先の LYSV-N がアジア諸国の宿主に適応する
807 ことで出現した可能性が考えられる. また, S 型 P1 の塩基配列多様性が N 型 P1 のそれと比べて
808 低いこともこの仮説を支持している. さらに, S 型 P1 クレードと姉妹群にある N 型 P1 クレード
809 (Brazil+Tunisia クレード, China+Japan クレード) の存在は, P1 領域の欠失が起こる前の祖先の
810 LYSV-N 集団が存在したことを示唆している. さらに, これらの進化的に異なる N 型 P1 分離株
811 の S 型 P1 分離株に対する塩基類似度を SimPlot を用いて調べたところ, 異なる N 型 P1 クレード
812 (Brazil+Tunisia クレード, China+Japan クレード) の分離株は, 他の N 型 P1 分離株ではなく S 型
813 P1 分離株との類似度がさらに高く, 特に P1 領域の最初の核酸から 250 番の塩基位置付近が高か
814 った (Fig. 10) . Bampi ら (2015) は, ブラジル LYSV 分離株が LYSV-S の祖先である可能性を
815 報告しており, 我々の結果と一致している. また, チュニジア LYSV 分離株の P1 配列はブラジ
816 ル LYSV 分離株の P1 配列と姉妹関係にあることから, チュニジア LYSV 分離株も LYSV-S の祖
817 先となりうることが明らかになった (Fig. 8) .

818 5. 4. 第3節 タマネギに対する LYSV の感染と北海道の野生のネギ属植物からの LYSV 検出

819 5. 4. 1. 材料と方法

820 5. 4. 1. 1. 植物

821 アメリカ産ニンニク, 中国産ニンニク, タマネギ 7 品種 (札幌黄 (SY), フレッシュレッド,
822 平安型球黄, 北の大地, ネオ・アース, フォーカス, 貝塚早生黄) の種子は, 市場で購入したも
823 のである. また, タマネギ (品種: SY) の苗は, 北海道の商業販売者から購入した. 野生のネ
824 ギ属植物 (ノビル (*Allium macrostemon*), アサツキ (*Allium schoenoprasum* var. *foliosum*), ギョウジ
825 ヤニンニク (*Allium victorialis* subsp. *platyphyllum*)) およびラッキョウ (*Allium chinense*) とワケギ
826 (*Allium fistulosum* var. *caespitosum*) は, 野外および市場からそれぞれ採取・購入した.

827

828 5. 4. 1. 2. 全 RNA の抽出

829 TRIzol Reagent (サーモフィッシュャーサイエンティフィック社) を用いて, ニンニクの葉から全
830 RNA を抽出した. RNA-seq には NucleoSpin RNA (タカラバイオ株式会社) を用いてカラムを通
831 してさらに精製した.

832

833 5. 4. 1. 3. RT-PCR

834 RT-PCR は 1 ステップまたは 2 ステップとした. 2 ステップの場合, まず AMV 逆転写酵素 (株
835 会社ニッポン・ジーン) を用いて cDNA を合成した. 次に, cDNA の配列を Takara Ex Taq (タ
836 カラバイオ株式会社) で増幅した. 1 ステップ RT-PCR には, Takara One Step RNA PCR kit (AMV)
837 (タカラバイオ株式会社) を使用した. Nested-PCR では, 1 回目の PCR 反応混合物 1 μ L を 2 回目

838 の PCR 反応液に添加した。全ての PCR は、製造元の仕様に従って行った。プライマーは、first-
839 PCR に LY-5P/LY-2M, Nested-PCR に LYSV-5-278/LYSV-3-278 を用い、その配列は Table 8 に示した。

840

841 5. 4. 1. 4. アブラムシによる媒介試験

842 Jayasinghe *et al.* (2021) の方法に若干の修正を加え、アブラムシの媒介試験を行った。モモアカ
843 アブラムシの個体は、25°C で 16 時間/8 時間 (明/暗) の *Nicotiana tabacum* 植物上で飼育した。アブ
844 ラムシをシャーレに集め、3 時間飢餓状態とした後、LYSV-S を接種したタマネギ (接種後 14 日
845 目) に 5 分間、吸汁させた。その後、12 匹のアブラムシを LYSV-N 接種ニンニク (アメリカ産)
846 に移し、24 時間後に農薬を散布して殺虫した (Fig. 11) 。接種 20 日後に LYSV の伝播を、
847 Nested-RT-PCR でチェックした。

848

849

850

851

852

853

854

855

856

857

858

859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879

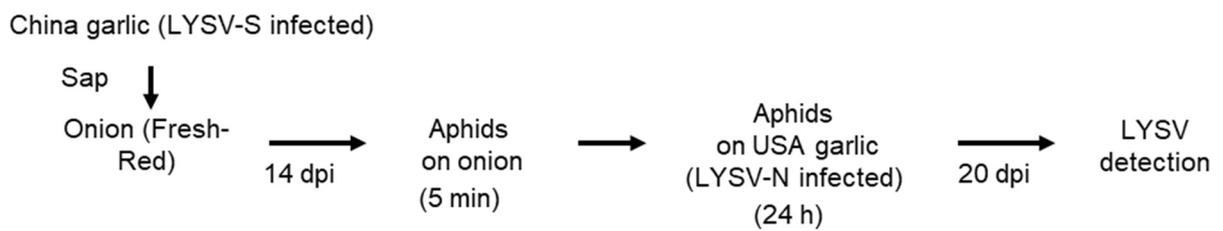


Fig. 11 Flow for aphid transmission of LYSV with S-type P1 (LYSV-S) to garlic infected with LYSV with N-type P1 (LYSV-N). Steps for aphid transmission and detection of LYSV-S to LYSV-N-infected garlic. Sap from garlic (China garlic) infected with LYSV-S was used to mechanically inoculate onion variety Fresh-Red (FR), then 14 days postinoculation (dpi), aphids were allowed to feed for 5 min on FR and transferred to another garlic (USA garlic), which was infected with LYSV-N, after 24 h, the aphids were then killed with a pesticide spray. At 20 dpi, garlic samples were processed for PCR to detect the N- and S-types of P1.

880 5. 4. 2. 結果

881 すでに述べたように、LYSV はネギ属の植物に感染することが報告されているが、ニンニクと
882 ネギ以外はほとんど詳細な解析が行われていない。タマネギは感染しない品種が多いとされてい
883 るため、北海道で盛んに栽培されているタマネギに着目した。各タマネギ品種に、N 型 P1 を持
884 つ LYSV (LYSV-N USA) または S 型 P1 を持つ LYSV (LYSV-S China) を含む LYSV に感染した
885 ニンニク葉の汁液を機械的に接種した。接種したタマネギ 7 品種 (札幌黄 (SY) , フレッシュ
886 レッド (FR) , 平安型球黄, 北の大地, ネオ・アース, フォーカス, 貝塚早生黄) のうち, SY
887 と FR の 2 品種では, 非接種葉の上部に OYDV が PCR で検出された。LYSV と OYDV の共感染
888 がアブラムシ媒介実験の結果に影響を及ぼさないように, OYDV は汁液から除去されている必
889 要がある。LYSV は接種後 30 日まで継続して検出されたのは FR のみであった (Table 10) 。次に,
890 LYSV-S China の汁液を接種した FR 植物における OYDV は接種後 2 週間で検出されなくなったが,
891 LYSV は検出されたため (Table 10 および Fig. 12) , LYSV-S 感染 FR を接種源として LYSV-N
892 USA 感染ニンニクに対するアブラムシによる LYSV 感染実験を行った。その結果, ニンニクは
893 LYSV-N と LYSV-S の両方に低率ながら感染し (2/12) した。アブラムシによる感染で LYSV-S は
894 タマネギに感染し, さらにニンニクへ伝染する可能性があることが実験的に示された (Fig. 13) 。
895 北海道で栽培されたタマネギから LYSV を検出できるかどうかを調べるため, 市販の SY タマネ
896 ギ苗を購入し, PCR 法で LYSV 感染の有無を検査した。検査した苗のうち 40 本中 1 本に Nested-
897 PCR によって LYSV-S が検出された (Fig. 14) 。しかし, 今回の検出は Nested-PCR で検出した
898 微量なウイルスレベルであり, アブラムシの感染によってタマネギからニンニクに LYSV-S が持
899 ち込まれたとは考えにくい。北海道ではアサツキ (*Allium schoenoprasum* var. *foliosum*) やギョウジ
900 ヤニンニク (*Allium victorialis* subsp. *platyphyllum*) が広く自生しており, 販売や栽培も行われている。

901 本州では、ノビル (*Allium macrostemon*) , ワケギ (*Allium fistulosum* var. *caespitosum*) , ラッキョウ
902 (*Allium chinense*) が野生または栽培されている. これらの野生のネギ属植物が LYSV の保毒源と
903 なりうるかどうかを検討するため, 日本各地で採取したこれらの植物について LYSV に感染して
904 いるか検出を試みた. その結果, 本州ではシングル PCR (Nested-PCR なし) によりノビル, アサ
905 ツキ, ラッキョウ, ワケギ, ギョウジャニンニクなどの野生のネギ植物から LYSV が検出された.
906 しかし, 北海道ではアサツキ (2 地点から各 4 検体) およびギョウジャニンニク (5 地点から各 4
907 検体) では Single-PCR で LYSV が検出されず, アサツキ (北海道滝川産) 1 株から Nested-PCR で
908 LYSV-S が検出されたのみであった. 本州産のノビル, ワカメ, ラッキョウ, アサツキなどのネ
909 ギ属植物と比較して, 北海道のアサツキとギョウジャニンニクで LYSV が検出されなかったのは,
910 使用した PCR プライマーに起因するのではないかと考えた. そこで, 滝川産の野生のアサツキ 4
911 個体から RNA を抽出し, 一括して RNA-seq に供し, すべてのウイルス配列を解析した. その結
912 果, 合計 23,636,713 個のペアエンドリードが得られ, 平均 Q30 は 89.6%であった. LYSV にマッ
913 ピングされたリードはなく, また他のニンニクウイルス (*allexivirus*, *OYDV*, *garlic latent virus*,
914 *garlic common latent virus*, *shallot yellow stripe virus*) のゲノムにマッピングされたリードも少なかった.
915 つまり, 北海道の野生のネギ属植物は, これらのウイルスの保毒源にはなっていないと考えられ
916 る. 一方, 本州では, これらのネギ属の野生植物からシングル PCR で容易に LYSV が検出され
917 たので, ニンニクへのアブラムシ感染の保毒源となっている可能性がある.

918

919

920

921

922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942

Table 10 Detection of LYSV and OYDV in onion cultivars Sapporo-Yellow (SY) and Fresh-Red (FR) at different days after mechanical inoculation (dpi) with sap from virus-infected garlic tissues(china,USA)

Inoculum	Onion	Plant no.	Virus detection ^a										
			10 dpi			20 dpi			30 dpi				
			LYSV	OYDV	LYSV	OYDV	LYSV	OYDV	LYSV	OYDV	LYSV	OYDV	
China garlic	SY	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
		3	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	FR	1	-	(+)	+	-	+	-	+	-	+	-	-
		2	-	(+)	+	-	+	-	+	-	+	-	-
		3	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
USA garlic	SY	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	FR	1	+	(+)	+	-	+	-	+	-	+	-	-
		2	+	(+)	+	-	+	-	+	-	+	-	-
		3	+	(+)	+	-	+	-	+	-	+	-	-

^aViruses were detected by one-step RT-PCR (35 cycles). +: positive; -: negative; (+): faint bands.

943

944

945

946

947

948

949

950

951

952

953

954

955

956

957

958

959

960

961

962

963

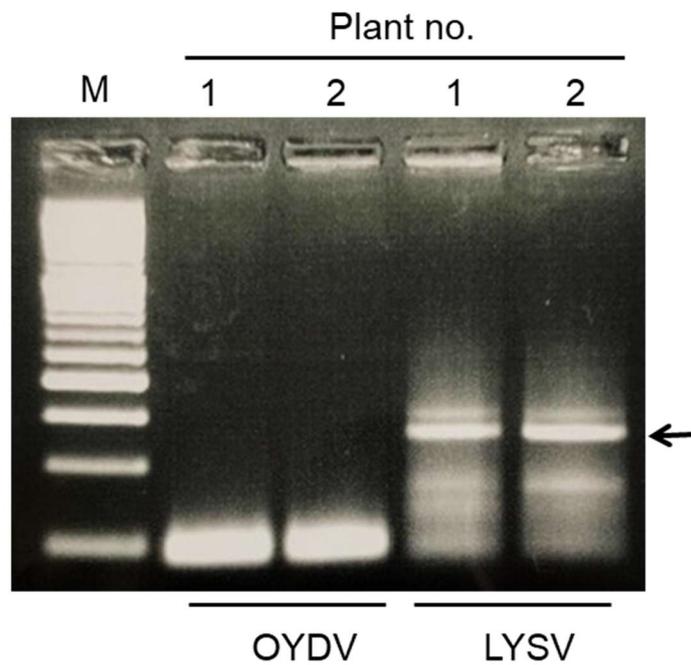


Fig. 12 Detection by PCR of LYSV from onion (cv. Fresh-Red) mechanically inoculated with the sap from China garlic infected with LYSV-S. At 21 days after inoculation, the partial sequence of LYSV was PCR-amplified from the upper leaf using primer pair LYSV-5-130/LYSV-3-130. The detected bands (arrow) were excised and sequenced to confirm the S-type P1 sequence. OYDV was not detected in this onion at 21 days postinoculation. M, 50 bp DNA ladder.

964

965

966

967

968

969

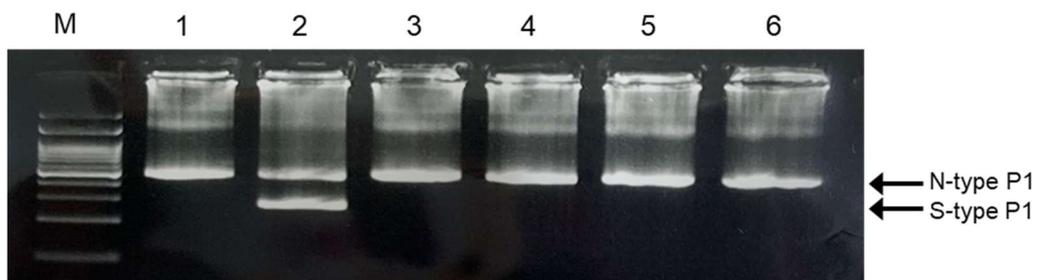
970

971

972

973

974



975

976

977

978

979

980

981

982

983

984

Fig. 13 Aphid transmission of LYSV with S-type P1 (LYSV-S) to garlic infected with LYSV with N-type P1 (LYSV-N) and RT-PCR detection of S- and N-type P1 transmitted by aphids. Representative result of PCR detection. Primer pair LY-5P/LY-2M was used for the first-round RT-PCR, and primer pair LYSV-5-278/LYSV-3-278 was used for the Nested-PCR. Among 12 plants, two had a mixed infection with both P1 types as confirmed by sequencing of the excised P1 bands. M, 100 bp DNA ladder.

985

986

987

988

989

990

991

992

993

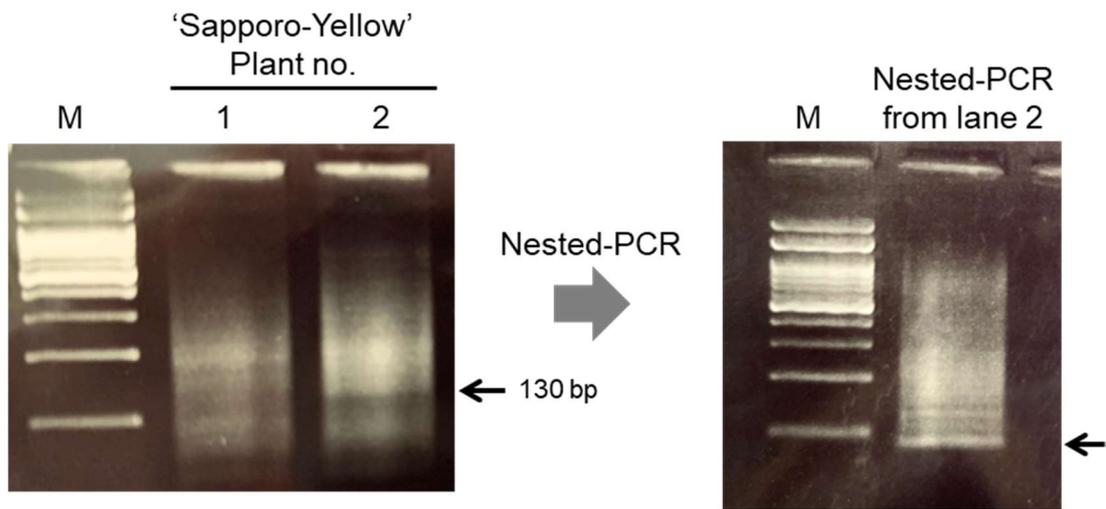
994

995

996

997

998



999 Fig. 14 Detection of LYSV by Nested-PCR from commercial onion seedlings 'cv:Sapporo-Yellow'.
1000 LYSV was detected as a faint band (arrow, left gel) by the first-round RT-PCR using primer pair L-
1001 YSV5-130/LYSV3-130, but a distinct band was detected at the expected position (arrow, right gel)
1002 by the Nested-PCR using primer pair LYSV 5-nest200/ LYSV3-130. The band was excised and Se-
1003 quenced, revealing that LYSV actually had S-type P1. M, 100 bp DNA ladder.

1001

1002

1003

1004

1005

1006 5.4.3. 考察

1007 接種試験の結果から、LYSV-S はアブラムシによりタマネギに感染し、さらにニンニクへ伝染
1008 する可能性があることが実験的に示された。また、市販されていたタマネギ（品種：札幌黄）の
1009 苗から、わずかに検出することができた。しかし、ネギ属植物としては北海道で広く栽培されて
1010 いるタマネギが、ニンニクの LYSV-S の感染源となっているかという点については、今回の検出
1011 は Nested-PCR で検出した微量なウイルスレベルであり、アブラムシの感染によってタマネギか
1012 らニンニクに LYSV-S が持ち込まれたとは考えにくい。少なくとも現段階では北海道でタマネギ
1013 が LYSV の保毒源であることを特に懸念する必要はないものと思われる。しかし、LYSV-S がタ
1014 マネギで十分に高い力価を示す場合、LYSV-S 感染タマネギから LYSV-N 感染ニンニクへのアブ
1015 ラムシ感染が起こることが証明された。LYSV に非常に感受性の高いタマネギ品種を選択した場
1016 合は、タマネギからニンニクに LYSV が感染しないように注意する必要があると考えられる。

1017 北海道では寒冷地のため 4～5 月にタマネギが植えられ、ニンニク畑の近くにタマネギが植え
1018 られることがある。LYSV は Table 10 に示すようにタマネギの一部の品種にも感染するため、ニ
1019 ンニクから LYSV を根絶するためには、タマネギへの LYSV 感染の可能性を検討する必要がある
1020 かもしれない。

1021 野生のネギ属植物からの LYSV の検出の結果、北海道ではニンニクで LYSV-N が主に検出され
1022 るのみで野生のネギ属植物からはほとんど検出されなかった。それに対して、本州や沖縄のノビ
1023 ル、ワカメ、ラッキョウ、アサツキなどの野生のネギ属植物は LYSV-S が容易に検出され、広く
1024 分布していることがあきらかになった。北海道では野生のネギ属植物は冬に一度枯れてしまう。
1025 また、ニンニクと同じ地域で栽培されているネギ属植物としては、北海道ではタマネギの栽培面
1026 積が大きい。道内で栽培されている主要なタマネギ品種に LYSV は感染することができない。

1027 一方、本州や沖縄では冬でも栽培されている作物があり、ニンニク畑の周辺では野生のネギ属
1028 植物も繁茂していることから、周年でLYSV-S感染植物が広く存在していると思われる。

1029 以上のことから、北海道で検出されたLYSV-NとLYSV-Sの混合感染は、道内のタマネギや野
1030 生のネギ属植物などが伝染源とはなっておらず、LYSV-Nの感染集団に外部からLYSV-Sが持ち
1031 込まれたためであると考えられる。例えば、ニンニク生産者が本州、あるいは海外からLYSV-S
1032 に感染したニンニクなどを持ち込んで、北海道で栽培していたことなどが推測される。

1033

1034

1035

1036

1037

1038

1039

1040

1041

1042

1043

1044

1045

1046

1047

1048 5. 5. 第4節 LYSV S型 P1 の RNA サイレンシング サプレッサー 活性

1049 5. 5. 1. 材料と方法

1050 5. 5. 1. 1. RNA サイレンシング サプレッサー アッセイ

1051 RNA サイレンシング サプレッサー (RSS) 活性は, Kim ら (2020) , Shimura ら (2022) の方法
1052 により解析した. HC-Pro および FLAG タグ付き P1 タンパク質をコードする DNA 断片を XbaI お
1053 よび SacI サイト間で pBE2113 プラスミドにクローニングし, それらの各プラスミドでアグロバ
1054 クテリウムを形質転換させた. 各菌体培養物の濃度は, *N. benthamiana* を用いたアッセイでは
1055 OD₆₀₀=1.0 に, タマネギを用いたアッセイでは 0.2 に調整した. 次に, *N.benthamiana* の葉またはタ
1056 マネギの表皮に, 緑色蛍光タンパク質 (GFP) コンストラクト, P1 および HC-Pro のコンストラ
1057 クト (1 : 1 : 1 比) の混合細菌懸濁液を処理した. GFP 蛍光は, *N.benthamiana* ではアグロインフ
1058 イルトレーション後 5 日目 (dpa) , タマネギでは 2 dpa に UV 光下で評価した. タマネギ表皮の
1059 GFP 蛍光強度は, LAS AF (Leica) を用いて定量した. P1 の発現を確認するために, P1 コンスト
1060 ラクトを有するアグロバクテリウムインフィルトレーションした *N. benthamiana* 葉組織の全タン
1061 パク質抽出物を 10%SDS-PAGE で分離し, 抗 FLAG モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロ
1062 ット分析により P1-FLAG を検出した.

1063

1064 5. 5. 1. 2. 全 RNA の抽出

1065 TRIzol Reagent (サーモフィッシュャーサイエンティフィック社) を用いて, ニンニクの葉から全
1066 RNA を抽出した. 必要に応じて, NucleoSpin RNA (タカラバイオ株式会社) を用いてカラムを
1067 通してさらに精製した.

1068

1069 5. 5. 1. 3. RT-PCR

1070 RT-PCRは1ステップまたは2ステップとした。2ステップの場合、まず AMV 逆転写酵素 (株
1071 式会社ニッポン・ジーン) を用いて cDNA を合成した。次に、cDNA の配列を Takara Ex Taq (タ
1072 カラバイオ株式会社) で増幅した。1ステップ RT-PCR には、Takara One Step RNA PCR kit (AMV)
1073 (タカラバイオ株式会社) を使用した。Nested-PCR では、1回目の PCR 反応混合物 1 μ L を2回目
1074 の PCR 反応液に添加した。全ての PCR は、製造元の仕様に従って行った。プライマー配列は
1075 Table 8に示した。

1076

1077 5. 5. 2. 結果

1078 potyvirus の P1 は、HC-Pro の RSS 活性を促進することが報告されているが、P1 自体が RSS 活性
1079 を有するという報告はない。LYSV は長さの異なる N 型と S 型の P1 を持つため、まず P1 自体が
1080 本当に RSS 活性を持たないのか、N 型と S 型の P1 がそれぞれ HC-Pro の RSS 活性を促進できるの
1081 かについて解析した。LYSV の RSS 能力は主に HC-Pro によって決定されると考えられているが、
1082 もし P1 の HC-Pro 補助活性が N 型と S 型で異なるなら、P1 の欠失はかなり重要だと考えられた。

1083 まず、*N. benthamiana* のアグロインフィльтраーションを用いた従来法の RSS 活性を測定した。
1084 HC-Pro は強い RSS 活性を持ち、LYSV-S 由来の HC-Pro (O-HC) の *N. benthamiana* における活性は、
1085 LYSV-N 由来の HC-Pro (K-HC) のそれよりも弱かった (Fig. 15A) 。一方、N 型 P1 や S 型 P1 は、
1086 他の potyvirus の P1 と同様に RSS 活性をほとんど持たないか、持っても極めて弱いことがわ
1087 かった (Fig. 16A) 。P1 と K-HC を共発現させた場合、P1 を含まない 2 つのパッチは K-HC の
1088 RSS 活性によって同程度の GFP 強度で観察されると想像されるが、実際に S 型 P1 を用いたアグ

1089 ロフィルトレーションパッチはN型 P1 を用いたパッチよりもやや強い GFP 強度を持つことを示
1090 した (Fig. 16B) .

1091 したがって, *N. benthamiana* では N型 P1 も S型 P1 も RSS 活性がほとんどないことを考えると,
1092 S型 P1 は N型 P1 よりも強く HC-Pro の RSS 活性を促進しているように思われた. 同様に, O-HC
1093 を S型 P1 と共発現させても, RSS 活性はわずかに上昇した (Fig. 17) . *N. benthamiana* における
1094 P1 タンパク質の発現は, ウェスタンブロット解析により確認した (Fig. 18) .

1095 次に, タマネギを用いた同様のアグロインフィルトレーションアッセイを行ったが, その理
1096 由は 2つある. 1つ目は, これまでの研究から, ウイルスタンパク質の RSS 活性を検出するため
1097 には, 可能であれば宿主または近縁の植物を用いることが必要と考えた (Kim *et al*, 2020 ; Shimura
1098 *et al*, 2022) . 次に, Shan ら (2018) の報告から, S型 P1 が N型 P1 から進化した可能性があること
1099 考えた. 彼らは, plum pox virus の P1 の N末端部分をトリミングすることで, ウイルスの複製能
1100 力が高まり, 非宿主植物 (キュウリ) に感染できるようになったことを報告している. そこで,
1101 別のアッセイ植物を用いて, 異なる RSS 活性を検出できないかと考えた. タマネギを用いたア
1102 グロインフィルトレーションアッセイの結果, HC-Pro は *N. benthamiana* で示されたように強い
1103 RSS 活性を示した (Fig. 15B, 15C) . 一方, 予想に反して, タマネギの表皮細胞では, P1 が単
1104 独で強い RSS 活性を持ち, S型 P1 は N型 P1 よりもかなり強い活性を示した (Fig. 16C, 16D) .
1105 P1 と HC-Pro を共発現させた場合, 相加的あるいは相乗的な RSS 活性はほとんど観察されず, タ
1106 マネギにおける P1 単独の活性と同程度であった.

1107

1108

1109

1110
 1111
 1112
 1113
 1114
 1115
 1116
 1117
 1118
 1119
 1120
 1121
 1122
 1123
 1124
 1125
 1126
 1127
 1128
 1129
 1130

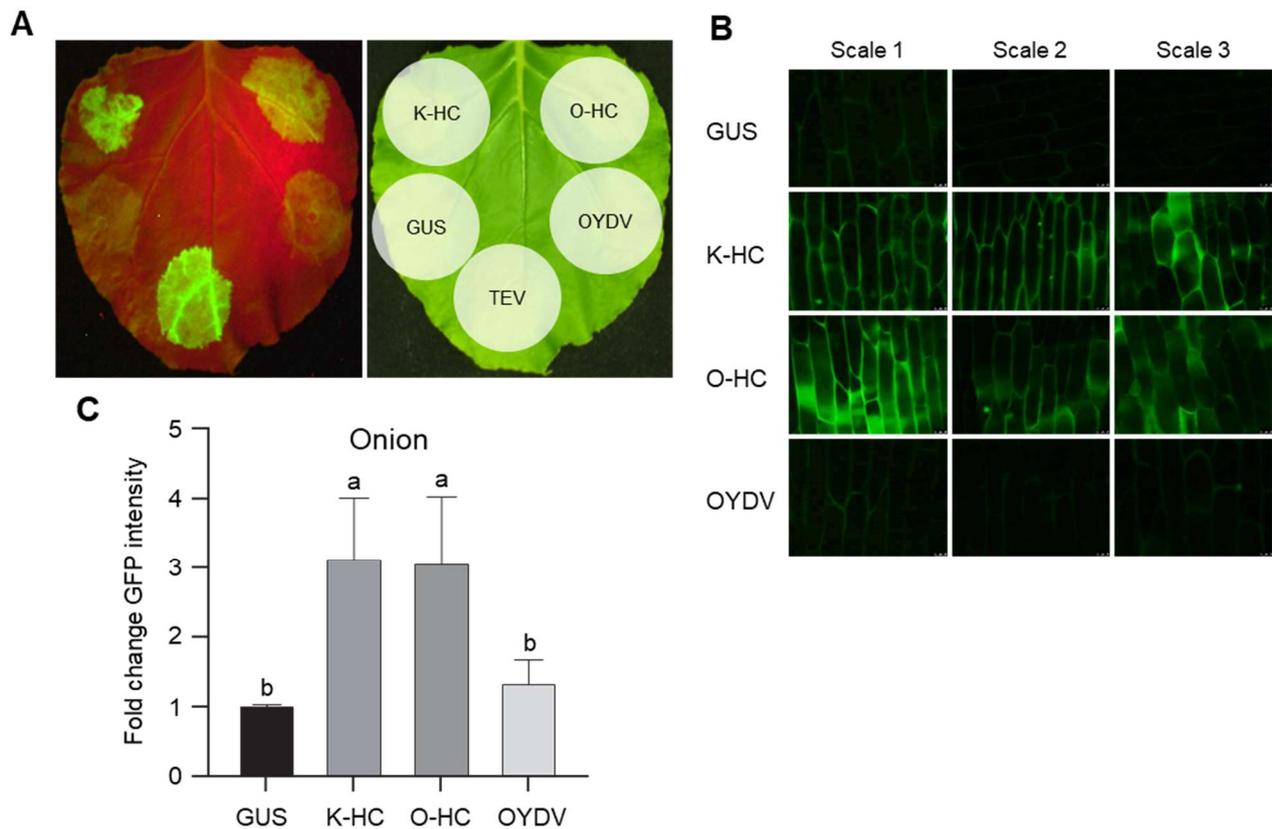


Fig. 15 RNA silencing suppressor activity of LYSV HC-Pro (K-HC derived from LYSV-N; O-HC from LYSV-S). (A) RSS activity of HC-Pro in *Agrobacterium*-infiltrated leaves of *N. benthamiana*. Two HC-Pro proteins (K-HC and O-HC) were tested. HC-Pro proteins from LYSV, OYDV or tobacco etch virus (TEV) were co-expressed with GFP in agroinfiltrated leaves. RSS activity of the HC-Pro was assessed by comparing the intensity of GFP at 5 days post agroinfiltration (dpa). N-terminal-truncated HC-Pro from OYDV that lacks RSS activity (Kim *et al.*, 2020) and GUS were used as negative controls. TEV HC-Pro was included as a positive control. (B, C) RSS activity of HC-Pro in onion epidermis at 3 dpa. HC-Pro proteins were co-expressed with GFP in onion epidermal tissues after agroinfiltration. GFP images of three different onion scales (Scale 1 to 3) are shown. (C) Mean fold-change in GFP intensity in onion tissues when the value of GUS was set to 1.0. GFP intensity was calculated by LAS AF software (Leica). Fold-change values were log-transformed then compared using Tukey's multiple comparison test ($P < 0.05$). Different letters above bars indicate a significant difference.

1131
1132
1133
1134
1135
1136
1137
1138
1139
1140
1141
1142
1143
1144
1145
1146
1147
1148
1149
1150
1151

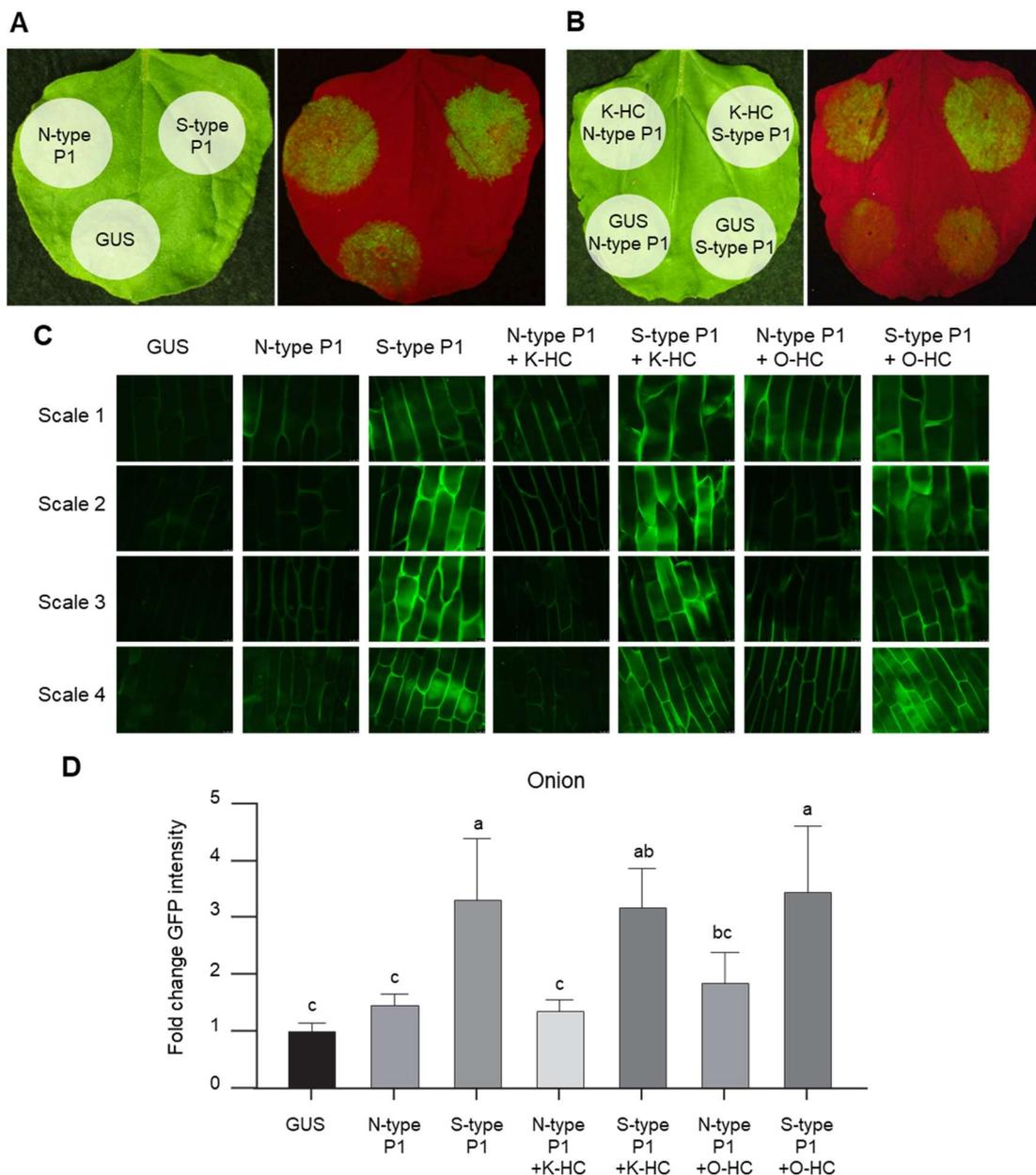


Fig. 16 RNA silencing suppressor activity of LYSV P1 protein (S-Type and N-Type). (A) RSS activity of P1 proteins in *Agrobacterium*-infiltrated *N. benthamiana* leaves. Either N- or S-type P1 was co-expressed with GFP in leaves transfected by agroinfiltration. The RSS activity was assessed by comparing GFP intensity at 5 dpa. GUS was used as a negative control. (B) Effect of co-expression of P1 and HC-Pro on RSS activity at 5 dpa. HC-Pro from LYSV-N (K-HC) was co-expressed with P1 and GFP after agroinfiltration. GUS was used as a negative control. (C) RSS activity of P1 in agrobacterium-infiltrated onion epidermal tissues at 3 dpa. P1 and GFP were co-expressed with or without K-HC in onion tissues by agroinfiltration. GFP images of four different onion scales (Scale 1 to 4) are shown. (D) Mean fold-change in GFP intensity in onion tissues when the value of GUS was set to 1.0. GFP intensity was calculated by LAS AF software (Leica). Fold-change values were log-transformed then compared using Tukey's multiple comparison test ($P < 0.05$). Different letters above bars indicate a significant difference.

1152

1153

1154

1155

1156

1157

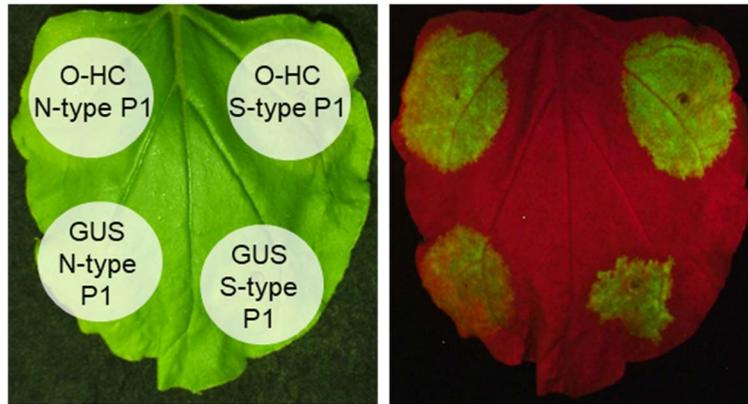
1158

1159

1160

1161

1162



1163

1164

1165

1166

1167

1168

1169

1170

1171

1172

Fig. 17 RSS activity of LYSV P1 proteins (N-Type and S-Type) in the presence of LYSV-S-derived HC-Pro (O-HC). *N. benthamiana* leaves were coinfiltrated with *Agrobacterium* suspensions carrying GFP, O-HC and P1 at the same ratio ($OD_{600} = 0.6$). GUS was used as a negative control. Image with GFP fluorescence was taken at 5 days post agroinfiltration.

1173
1174
1175
1176
1177
1178
1179
1180
1181
1182
1183
1184
1185
1186
1187
1188
1189
1190
1191
1192
1193

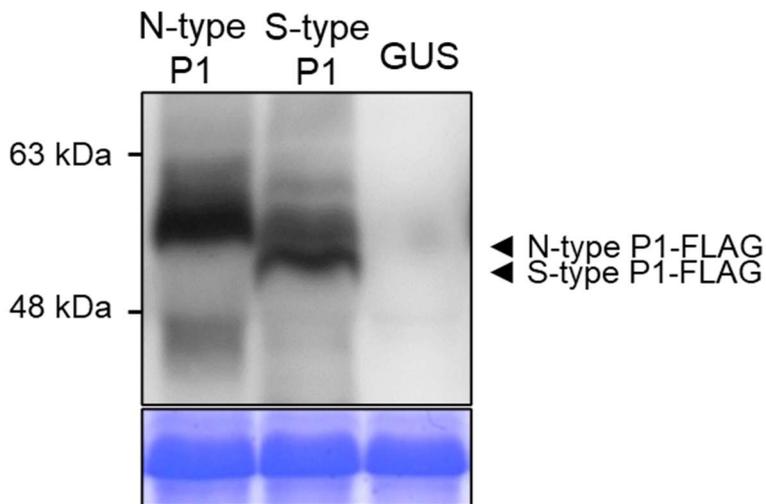


Fig. 18 LYSV P1 (N- and S-type) expression in leaves of *N. benthamiana* infiltrated with *Agrobacterium* containing the P1 constructs. Total proteins were extracted from agroinfiltrated patches in Fig. 15A, and FLAG-tagged P1 proteins (N- and S-type) were detected by western blots using anti-FLAG monoclonal antibody. GUS indicates the control infiltrated with *Agrobacterium* containing plasmid pBE2113. CBB staining of Rubisco large subunit is shown as a loading control.

1194 5. 5. 3. 考察

1195 potyvirus の P1 は、HC-Pro の RSS 活性を促進することはあっても、それ自体に RSS 活性がある
1196 とは、これまで考えられていなかった。しかし、*N. benthamiana* の代わりにタマネギをアッセイ
1197 植物として RSS 活性を調べたところ、P1 は明らかな RSS 活性を持っていた (Fig. 16C, 16D) 。
1198 このとき、N 末端側半分を欠失した P1 (S 型 P1) は、HC-Pro と同等の RSS 活性を有していた。
1199 実は、Shan ら (2018) は以前、PPV の P1 の C 末端半分に融合した HC-Pro が *Cucumis sativus* で
1200 RSS 活性を持つことを報告しており、完全な P1 に融合した HC-Pro は RSS 活性を持たないことが
1201 分かっている。この実験では、HC-Pro だけでなく、短い P1 部分にも独自の RSS 活性があったこ
1202 とが考えられる。さらに、P1 の N 末端半분을切り詰めると、PPV の非宿主であるキュウリに感
1203 染できることが示され、P1 が potyvirus の宿主範囲を決定する重要な役割を担っていることが示
1204 唆された。ウイルスの RSS は、ウイルスが宿主を交代する際に重要な役割を果たす (Shimura *et al*,
1205 2022) 。 potyvirus では、HC-Pro に加えて P1 も RSS として機能することから、必要に応じて P1 が
1206 N 末端をトリミングすることで、新たな RSS 活性を発揮することが示唆され、この新規 RSS の
1207 活性化が potyvirus の宿主適応の駆動力となっている可能性が考えられた。

1208 P1 の N 末端をトリミングするとウイルス宿主適応に大きく影響するという Shan ら (2018) の
1209 知見は、あくまで実験的な実証であった。一方、我々の結果は、LYSV の野外分離株の P1 を解
1210 析して得られたものであり、Shan ら (2018) による仮説を証明するものであった。第 2 節で示し
1211 たように、北海道では LYSV-N のみが観察され、P1 が欠失した LYSV-S は本州や沖縄に広く分布
1212 している。本州や沖縄の LYSV-S は、P1 が RSS 活性を持つ S 型であるため、異なる植物に素早
1213 く適応し、多くのネギ属植物に感染している可能性がある。この考えを支持する良い観察結果が
1214 一つある。沖縄ではニンニクとラッキョウ (*Allium chinense*) が同じ時期、同じ地域で栽培されて

1215 いるので、ラッキョウがLYSVに感染しているかについて調査したところ、Fig. 8とFig. 9の系
1216 統樹に示すように、ラッキョウから分離したLYSVは沖縄のニンニクから分離したLYSVと同一
1217 であることが判明し、ニンニク由来のLYSVはラッキョウにも感染し、逆にラッキョウはニンニ
1218 ク由来のLYSVにも感染する可能性が示唆された。

1219

1220

1221

1222

1223

1224

1225

1226

1227

1228

1229

1230

1231

1232

1233

1234

1235

1236 6. 総合考察

1237 北海道におけるニンニクの栽培は、2010年頃までは栽培自体が非常に少なく、ウイルスの存
1238 在こそ知られていたが、その種類については不明な部分が多く、栽培期間中の発生状況の調査な
1239 どはこれまで行われてこなかった。2013年以降は栽培面積が年々増加してはいるが、国内の主
1240 産地である青森県から入手した種球に頼らざるを得ず、しかも本来は種球用に増殖されたもので
1241 はない種が使われているのが現状である。ウイルスフリー化によりニンニクの収量が大幅に増加
1242 することは知られているが、生産現場では十分理解されているとは言えず、またウイルスによる
1243 モザイク症状は生理障害と認識されているというのが現状であった。北海道のニンニクの収量性
1244 は青森県の6割程度（農林水産省 野菜生産出荷統計，2021）という現状を打破するため、生産
1245 団体が自らウイルスフリー種苗の生産を行って、各生産者へ供給する取り組みが十勝地方などで
1246 進められている。

1247 本研究では、これまで明らかではなかった北海道内のニンニク栽培の現場で発生しているニン
1248 ニクのウイルスを明らかにした。ウイルスフリー種球を安定して生産するためには、これらのウ
1249 イルスの検査体制が不可欠である。本試験で明らかにしたウイルスとその遺伝子配列情報を元に
1250 北大、ホクサン（株）、（地独）北海道総合研究機構による共同研究で実施している FITC-before
1251 Array 法による新たな検出法の開発を進めている（古田ら，2022）。また、ニンニクのウイルス
1252 フリー種苗供給がなかなか進まなかった理由の一つには、ウイルスの除去にかかる労力的、経済
1253 的なコストに難しさがあった。上記の新規検出技術の導入やアスコルビン酸ナトリウムなどを利
1254 用したウイルスフリー化の効率化（志村ら，2016）の普及により、種苗の供給が促進されるこ
1255 とを期待したい。また、allexivirus の発生を明らかにしたが、前述のとおり現在の道内の種球の多
1256 くは allexivirus の発生が問題となっている青森県の生産物に依存していることから、当初からそ

1257 の蔓延が危惧されていたところである。幸い、同ウイルスの媒介虫であるチューリップサビダニ
1258 は道内に定着するには至ってはいないようであるが、種球の移入が続く限りチューリップサビダ
1259 ニが侵入・定着するリスクは高いと考えられ、今後も十分な警戒が必要と考えられる。

1260 LYSV について、S 型の LYSV が一部のタマネギ品種を含むネギ属植物に広く感染することが
1261 明らかになった。ニンニクは、さび病などネギ属に共通する病害が知られており、青森県ではネ
1262 ギとニンニク間でさび病菌が互いに伝染源となっていることが知られている。北海道内にはタマ
1263 ネギの大産地があるため、地域によっては以前よりタマネギとニンニクの生産者を意図的に分け
1264 て隣接して栽培されないように配慮しているケースもある。LYSV は、現在北海道で栽培されて
1265 いるタマネギ主力品種には感染しにくいと考えられるので、直ちに何らかの取り組みが必要な状
1266 況では無い。しかし、道内には野生のアサツキをはじめとするネギ属植物が存在している。また、
1267 特に近年の温暖化やビニールハウスの強度や除雪能力が向上していることから、道内でも越冬ハ
1268 ウスでアブラムシを含め越冬することも珍しくない状況にあり、今後も警戒は必要と考えられる。

1269 OYDV について、HC-Pro 領域の一部が欠失している株がすでに圃場レベルで優先種になって
1270 いることが明らかになった。Kim ら (2020) は、短い HC-Pro は通常の長い HC-Pro に比べて RSS
1271 活性が低下しており、LYSV との混合感染を利用して生存している可能性を示唆している。さら
1272 に Jayasinghe ら (2021) は、短い HC-Pro をもつ OYDV は、LYSV と同時感染した場合のみアブラ
1273 ムシにより感染することを確認している。以前より、病害虫診断でニンニクからウイルスを検出
1274 した場合には、LYSV より OYDV の検出率が低いことは経験していたが、今回の圃場からの
1275 OYDV の検出数でも同様で、実際に OYDV が LYSV との混合感染を利用する形で生存している
1276 ことを示している。また、RSS 活性が低下しているとすると、ニンニクにおけるその病徴は緩和

1277 されることになり，病徴によるウイルス感染株の抜き取りの際には判別しにくくなることから，
1278 その点では問題となる．

1279 今後の課題としては，北海道のニンニクのウイルスについての知見を，道内のニンニク生産振
1280 興にどのように役立てるか，ウイルスフリー球による栽培体系を普及させていくかがあげられる．
1281 先に述べた FITC-before Array 法のニンニクのウイルス検査キットの利用・普及については，ホク
1282 サン（株）による事業化で対応する予定である．現地圃場へ赴いた車内で実施も可能な検出方法
1283 となっており，ウイルスフリー化のチェックはもちろんのこと，現地での抜き取りの確認などに
1284 も活用できる方法として普及を目指している．

1285 ニンニクのウイルスフリー化については，ホクサン（株）や赤平オーキッド（株）などが事業
1286 として取り組みを進めている．ウイルスフリー球の栽培体系については，十勝管内の JA 十勝清
1287 水は JA 池田および JA 足寄とのニンニクの広域生産体制をとり，（株）植物育種研究所，赤平オ
1288 ーキッド（株），タイのバイテク企業らとプロジェクトチームをつくり，清水町内に「にんにく
1289 ファクトリー」を設置し，隔離施設でウイルスフリー球の生産を進めている（石井，2022）．ま
1290 た，JA ところでは，「ところピンクにんにく」を地理的表示（GI）保護制度へ 2022 年 3 月に登
1291 録し，今後はウイルスフリー化に取り組むことを公表している（川上，2022）．他にも空知と十
1292 勝管内の大規模生産法人で同様の取り組みが進められている．このように北海道におけるニンニ
1293 ク生産への動きは様々な形で進んでいる．いずれもウイルスフリー種苗の利用を前提に生産が進
1294 められており，にんにくのウイルス対策の必要性が生産現場にも浸透してきたと考えている．

1295 ウイルスフリー球の利用より，*allxivirus* は媒介虫であるチューリップサビダニは道内で定着は
1296 していないことから，種球から同ウイルスを除去できれば将来的には駆除できると考えられる．
1297 しかし，当面は種球消毒などによるチューリップサビダニ対策は実施する必要があるだろう．

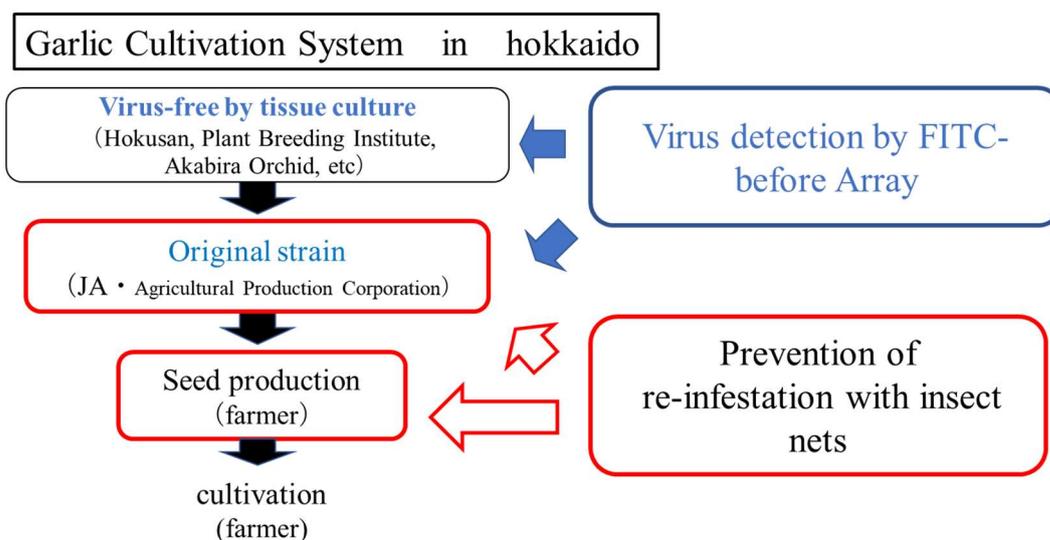
1298 LYSV については、ウイルスフリー種苗をそのまま栽培するだけでは、既存のニンニク圃場から
 1299 アブラムシによる伝搬によって再度感染してしまう。北大、ホクサン（株）、（地独）北海道総
 1300 合研究機構の共同研究における試験では年 30%程度の再感染率を示していたことから（未発
 1301 表）、数年の栽培で 100%の感染になると推定されている。ウイルスフリーの栽培体系において
 1302 は採種まではアブラムシ用の防虫ネットによる被覆が必須と考えている。将来、栽培面積がさら
 1303 に拡大した場合には、ジャガイモやナガイモで行われている距離的な隔離による集団採種などの
 1304 手法を取り入れる必要がある。OYDV は北海道では多くの場合、LYSV に依存する形でニンニク
 1305 間において伝搬していると考えられることから、同様の対策で十分と考えられる。我々が進めて
 1306 いるニンニクの栽培体系のモデルを Fig. 19 に示した。

1307 本研究の結果は、ニンニクのウイルス感染に関する疫学的・分子生物学的解析として重要な情
 1308 報になるとともに、北海道におけるニンニクの生産振興の一助になると考えられる。

1309

1310

1311



1312

1313

1314

1315

1316

1317

1318

Fig. 19 Cultivation system with virus-free seed management

1319 摘 要

1320 1) 北海道に発生するニンニクのモザイク症状や黄色条斑症状からウイルスを検出し, leek yellow
1321 stripe virus (LYSV) , onion yellow dwarf virus (OYDV) , allexivirus を検出した. これらのウイルス
1322 が道内のニンニク栽培圃場で広く蔓延していることが明らかになった.

1323

1324 2) 北海道におけるニンニクのウイルスの優占種は LYSV であり, 次いで OYDV, allexivirus の順で
1325 あった. LYSV の P1 遺伝子は N 型タイプが優占種であったが, わずかながら N 型と S 型の混合
1326 感染が認められた. OYDV は HC-Pro 領域に欠失のあるタイプが圃場でも優先していた.

1327 Allexivirus については, garlic virus A, garlic virus B, garlic virus C, garlic virus D の感染を明らかにし,
1328 道内での地理的分布を明らかにした.

1329

1330 3) 北海道で分離した LYSV-N (オホーツク-N) と LYSV-S (オホーツク-S) の系統進化学的解析
1331 を行った結果, これらは異なるグループに属することが示された. また, この系統樹と集団変異
1332 検定から, S 型 P1 が N 型 P1 から進化したことが示唆された.

1333

1334 4) LYSV-S はタマネギ感染し, そのタマネギから LYSV-N 感染ニンニクへのアブラムシ感染が起
1335 こることを明らかにした.

1336

1337 5) 北海道のネギ属の野生植物からは, LYSV の検出例はごくわずかで, これらがウイルスの保
1338 毒源にはならないと考えられた. しかし, 本州産のネギ属の野生植物からは容易に LYSV が検出
1339 され, これらは保毒源となる可能性があると考えられた.

1340

1341 6) LYSV-S の P1 は, HC-Pro と同等の RNA サイレンシング サプレッサー (RSS) 活性を有してい
1342 た. HC-Pro だけでなく, 短い P1 部分にも独自の RSS 活性があった P1 は短くなることによって
1343 RSS 活性を強くし, これを原動力としてウイルスは宿主範囲を拡大できるようになると考えた.

1344

1345

1346

1347

1348

1349

1350

1351

1352

1353

1354

1355

1356

1357

1358

1359

1360

1361
1362
1363
1364
1365
1366
1367
1368
1369
1370
1371
1372
1373
1374
1375
1376
1377
1378
1379
1380
1381

Summary

Epidemiological and Molecular Biological Analysis of Viral Infection of Garlic Grown in Hokkaido, Japan

Jun Sasaki

In this study, we conducted field surveys in the major production areas on Hokkaido in 2019-2020 to identify viruses in garlic, and to investigate infections of leek yellow stripe virus (LYSV), onion yellow dwarf virus (OYDV) and allexiviruses. Molecular phylogenetic analysis, was conducted to characterize LYSV isolates. In addition, the infectivity of LYSV to several allium plants was studied. Finally, RNA silencing suppressor activity of the P1 of the S-type was analyzed.

I . Garlic mosaic disease in Hokkaido, Japan: symptoms and geographic distribution

We confirmed the occurrence of garlic viruses in Hokkaido (2019-2020) in most of the fields, where we observed mosaic symptoms, yellow streak spots and leaf deformities. The most common virus detected was LYSV, and in most cases, only type N was detected. In only two samples, we found mixed infection of type N and type S. OYDV was the second abundant virus, but the N-terminal region of the HC-Pro was deleted in most of isolates analyzed. Allexiviruses were detected for the first time in the fields of Hokkaido suggesting that they are already widely distributed in the area. They were identified as garlic virus A, garlic virus B, garlic virus C, or garlic virus D.

II . Molecular phylogenetic analysis of LYSV S-type identified in Hokkaido and its adaptation to the host

1382 LYSV N- and S- type P1 sequences were present in the same plant and that they belong to different evolutionary
1383 phylogenetic groups. To investigate how LYSV with S-type P1 (LYSV-S) could have invaded LYSV with N-type P1
1384 (LYSV-N)-infected garlic, we examined wild *Allium* spp. plants in Hokkaido and found that LYSV was almost
1385 undetectable. On the other hand, in Honshu, LYSV-S was detected with a high frequency in *Allium* spp. other than
1386 garlic, suggesting that the LYSV-S can infect a wider host range of *Allium* spp. compared to LYSV-N. Because the P1
1387 proteins of potyviruses have been reported to promote RNA silencing suppressor (RSS) activity of HC-Pro proteins,
1388 we analyzed whether the same was true for P1 of LYSV. In onion, contrary to expectation, the P1 protein itself had
1389 RSS activity. Moreover, the RSS activity of S-type P1 was considerably stronger than that of N-type P1, suggesting
1390 that LYSV P1 may be able to enhance its RSS activity when the deletion is in the N-terminal half and that acquiring S-
1391 type P1 may have enabled LYSV to expand its host range.

1392

1393

1394

1395

1396

1397

1398

1399

1400

1401

1402

1403 引用文献

1404

1405 Abd El-Wahab, A. S. 2009. Aphid-transmission efficiency of two main viruses on garlic in Egypt, Onion yellow
1406 dwarf virus (OYDV-G) and Leek yellow stripe virus (LYSV-G). *Acad. J. Entomol.* 2: 40 -42.

1407 我孫子和雄, 渡辺康正, 西康道. 1980 a. ニンニクのモザイク病に関する研究, I 病原ウイルス. 野
1408 菜試験場報告 A.7 :139 -147.

1409 我孫子和雄, 渡辺康正, 西康道. 1980 b. ニンニクのモザイク病に関する研究, II 汁液接種によるウ
1410 イルス検定における数種の要因について. 野菜試験場報告 A.7 :149 -154.

1411 Bampi, D., Mituti, T., Pavan, M. A., Hammond, J., and Krause-Sakate, R. 2015. Leek yellow stripe virus isolates
1412 from Brazil form a distinct clade based on the P1 gene. *J. Plant Pathol.* 97 :457 -463.

1413 Barg, E., Lesemann, D. -E., Vertten, H. J., and Green, S. K. 1994. Identification, partial characterization, and
1414 distribution of viruses infecting *Allium* crops in south and southeast Asia. *Acta Hortic.* 358 : 251 -258.

1415 Bos, L., Huijberts, N., Huttinga, H., and Maat, D. Z. 1978. Leek yellow stripe virus and its relationships to onion
1416 yellow dwarf virus; characterization, ecology and possible. *Neth. J. Plant Pathol.* 84 : 185 -204.

1417 Bos, L. 1982. Viruses and virus diseases of *Allium* species. *Acta Hortic.* 127 : 11 -29.

1418 Brierley, P., and Smith, F. F. 1946. Reaction of onion varieties to yellow dwarf virus and three similar viruses isolated
1419 from shallot, garlic and narcissus. *Phytopathology* 36 : 292-296.

1420 Cafune, E. E., Perotto, M. C., and Conci, V. C. 2006. Effect of two *Allexivirus* isolates on garlic yield. *Plant Dis.*
1421 90 : 898 -904.

- 1422 Domingo-Calap, M. L., Chase, O., Estapé, M., Moreno, A. B., and López-Moya, J. J. 2021. The P1 Protein of
1423 Watermelon mosaic virus Compromises the Activity as RNA Silencing Suppressor of the P25 Protein of Cucurbit
1424 yellow stunting disorder virus. *Front. Microbiol.* 12 : 622.
- 1425 Excoffier, L., and Lischer, H. E. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population
1426 genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10 : 564-567.
- 1427 藤田隆, 近藤亨, 倉光助, 澤村健三, 原田幸雄. 1993. 青森県のニンニクモザイク 株から分離さ
1428 れたニンニクモザイクウイルス (GMV) およびニンニク潜在ウイルス (GLV) の 2, 3 の性質.
1429 日本植物病理学会報 42 : 101 (講要) .
- 1430 古田和義, 佐々木純, 増田 税. 2022. FDA-Array 法によるニンニクウイルスの野外診断. 日本植
1431 物病理学会報 88 : 225 (講要) .
- 1432 Giner, A., Lakatos, L., García-Chapa, M., López-Moya, J. J., and Burgyán, J. 2010. Viral protein inhibits RISC
1433 activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs. *PLoS Patho.* 6 : e1000996.
- 1434 和文雑誌 北海道農業協同組合中央会, ホクレン農業協同組合連合会 編. 1988. にんにく. 昭
1435 和 63 年北海道野菜地図 : 54-55 .
- 1436 Hu, S. F., Wei, W. L., Hong, S. F., Fang, R. Y., Wu, H. Y., Lin, P. C., Sonobar, N., Wang, H. P., Sulistio, M.,
1437 Wu, C. T., Lo, H. F., and Lin, S. S. 2020. Investigation of the effects of P1 on HC-pro-mediated gene silencing
1438 suppression through genetics and omics approaches. *Bot. Stud.* 61 : 1-18.
- 1439 和文雑誌 石井博之. 2022. 北海道 JA 十勝清水町～にんにく産地の復活を目指して誕生した特
1440 産品「十勝清水にんにく」～. 野菜情報 7月号 : 34-39.

- 1441 Jayasinghe, W. H., Kim, H., Sasaki, J., and Masuta, C. 2021. Aphid transmissibility of onion yellow dwarf virus
1442 isolates with an N-terminal truncated HC-Pro is aided by leek yellow stripe virus. *J. Gen. Plant Patho.* 87 : 178
1443 - 183.
- 1444 Katis, N. I., Maliogka, V. I., and Dovas, C. I. 2012. Viruses of the genus *Allium* in the Mediterranean region. *Adv.*
1445 *Virus Res.* 84 : 163-208.
- 1446 Katoh, K., and Standley, D. M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7 : improvements in
1447 performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30 : 772 - 780.
- 1448 Kasschau, K. D., and Carrington, J. C. 1998. A counterdefensive strategy of plant viruses : suppression of
1449 posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95 : 461-470.
- 1450 和文雑誌 川上和則. 2022. 組合長に聞く. ニューカントリー 7月号 : 28-29.
- 1451 Kim, H., Aoki, N., Takahashi, H., Yoshida, N., Shimura, H., and Masuta, C. 2020. Reduced RNA silencing
1452 suppressor activity of onion yellow dwarf virus HC-Pro with N-terminal deletion may be complemented in mixed
1453 infection with another potyvirus in garlic. *J. Gen. Plant Patho.* 86 : 300 - 309.
- 1454 Lole, K. S., Bollinger, R. C., Paranjape, R. S., Gadkari, D., Kulkarni, S. S., Novak, N.G., Ingersoll, R., Sheppard,
1455 H. W., and Ray, S. C. 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-
1456 infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J. Virol.* 73 : 152 - 160.
- 1457 Messiaen, C.M., Lot, H., and Delecolle, B. 1994. Thirty years of France's experience in the production of disease-free
1458 garlic and shallot mother bulbs. *Acta Hortic.* 358 : 275 - 279.
- 1459 Lunello, P., Ducasse, D. A., Helguera, M., Nome, S. F. and Conci, V. C. 2002. An Argentinean isolate of Leek
1460 yellow stripe virus from leek can be transmitted to garlic. *J. Plant Pathol.* 84 : 11-17.

- 1461 Martin, D. P., Varsani, A., Roumagnac, P., Botha, G., Maslamoney, S., Schwab, T., Kelz, Z., Kumar, V., and Murrell,
1462 B. 2021. RDP5 : A computer program for analyzing recombination in, and removing signals of recombination
1463 from, nucleotide sequence datasets. *Virus Evol.* 7 : veaa087.
- 1464 Martínez, F., and Daròs, J. A. 2014. Tobacco etch virus protein P1 traffics to the nucleolus and associates with the
1465 host 60S ribosomal subunits during infection. *J. Virol.* 88 : 10725 - 10737.
- 1466 Merits, A., Guo, D., Järvekülg, L., and Saarma, M. 1999. Biochemical and genetic evidence for interactions between
1467 potato A potyvirus-encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replication complex. *Virology* 263 :
1468 15 - 22.
- 1469 Nagakubo, T., Kubo, M., and Oeda, K. . 1994. Nucleotide sequences of the 3' regions of two major viruses from
1470 mosaic-diseased garlic: molecular evidence of mixed infection by a potyvirus and carlavirus. *Phytopathology*
1471 84 : 640 - 645.
- 1472 Pasin, F., Simón-Mateo, C., and García, J. A. 2014. The hypervariable amino-terminus of P1 protease modulates
1473 potyviral replication and host defense responses. *PLoS Patho.* 10 : e1003985.
- 1474 Perotto, M. C., Carrune, E. E., and Conci, V. C. 2010. The effect of additional viral infections on garlic plants
1475 initially infected with Allexiviruses. *Eur. J. Plant Pathol.* 126 : 489 - 495.
- 1476 Ronquist, F., and Huelsenbeck, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models.
1477 *Bioinformatics* 19 : 1572-1574.
- 1478 佐古宣道. 1976. ニンニクのウイルス病(予報)その発生とウイルス様粒子の検出. 日本植物病理学
1479 会報 42 : 101 (講要) .
- 1480 佐古宣道, 長尾記明. 1977. ニンニクのウイルス病(第2報)ニンニクモザイク病 葉の微細構造.
1481 日本植物病理学会報 43 : 114 (講要) .

- 1482 Salvador, B., Saenz, P., Yangüez, E., Quiot, J.B., Quiot, L., Delgadillo, M. O., García, J. A., and Simón-Mateo, C.
1483 2008. Host-specific effect of P1 exchange between two potyviruses. *Mol. Plant Patho.* 9 : 147-155.
- 1484 Santosa, A. I., and Ertunç, F. 2020. Serological and molecular detection of Leek yellow stripe virus infecting onion
1485 (*Allium cepa* L.) and leek (*Allium ampeloprasum* L.) in Ankara, Turkey. *Plant Prot. Bull.* 60 : 49-56.
- 1486 佐々木大介, 古川勝弘. 2021. 2020年の北海道内ニンニク圃場における有翅アブラムシの飛来消長.
1487 北日本病害虫研究会報 42 : 64 -65.
- 1488 Shahraeen, N., Lesemann, D. E., and Ghotbi, T. 2008. Survey for viruses infecting onion, garlic and leek crops in
1489 Iran. *Eppo. Bull.* 38 : 131-135.
- 1490 Shan, H., Pasin, F., Tzanetakis, I. E., Simón-Mateo, C., García, J. A., and Rodamilans, B. 2018. Truncation of a P1
1491 leader proteinase facilitates potyvirus replication in a non-permissive host. *Mol. Plant Patho.* 19 : 1504-1510.
- 1492 和文雑誌 志村華子, 増田 税, 大森康弘, 大沢陽子, 佐野慎亮. 2016. アスコルビン酸 (ビ
1493 タミンC) 誘導体の抗ウイルス剤としての利用. 植物防疫 70 : 437-438.
- 1494 Shimura, H., Kim, H., Matsuzawa, A., Akino, S., and Masuta, C. 2022. Coat protein of partitiviruses isolated from
1495 mycorrhizal fungi functions as an RNA silencing suppressor in plants and fungi. *Sci. Rep.* 12 : 7855.
- 1496 Sumi, S., Tsuneyoshi, T., and Furutani, H. 1993. Novel rod shaped viruses isolated from garlic, *Allium sativum*,
1497 possessing a unique genome organization. *J. Gen. Virol.* 74 : 1879 - 1885.
- 1498 Sward, R. J., and Brennan, A. P. 1994. Diagnosis and control of Allium virus diseases in Victoria , Australia. *Acta*
1499 *Hortic.* 358 : 295 -298.
- 1500 Takaki, F., Sano, T., Yamashita, K., Fujita, T., Ueda, K., and Kato, T. 2005. Complete nucleotide sequences of
1501 attenuated and severe isolates of Leek yellow stripe virus from garlic in northern Japan : Identification of three
1502 distinct virus types in garlic and leek world-wide. *Arch. Virol.* 150 : 1135-1149.

- 1503 Valli, A., Martín-Hernández, A. M., López-Moya, J. J., and García, J. A. 2006. RNA silencing suppression by a
1504 second copy of the P1 serine protease of Cucumber vein yellowing ipomovirus, a member of the family
1505 *Potyviridae* that lacks the cysteine protease HCPro. *J. Virol.* 80 : 10055-10063.
- 1506 Van Dijk, P. 1993 a. Survey and characterization of potyviruses and their strains of *Allium* species. *Neth. J. Plant*
1507 *Pathol.* 99 : 1 -48.
- 1508 Van Dijk, P. 1993 b. Carlavirus isolates from cultivated *Allium* species represent three viruses. *Neth. J. Plant Pathol.*
1509 99 : 233 - 257.
- 1510 Van Dijk, P. 1994. Virus diseases of shallot and garlic in Java, and prospects for their control. *Acta Hortic.* 369 : 134
1511 - 143.
- 1512 Vučurović, I., Nikolić, D., Radović, N., Vučurović, A., Ristić, D., Krstić, B. and Stanković, I. 2017. Incidence and
1513 distribution of *Leek yellow stripe virus* in *Allium* crops in Serbia. *Pestic. Fitomed.* 32 : 145-155.
- 1514 山下一夫, 石谷正博, 及川健. 1991. ニンニクにおけるニンニクモザイクウイルス及びニンニク
1515 潜在ウイルスのアブラムシ伝染. 北日本病害虫研究会報 42 : 64-65.
- 1516 山下一夫, 酒井淳一, 花田薫. 1995. ニンニクから分離したリーキイエローストライプウイルス
1517 (LYSV) とニンニクモザイクウイルス (GMV) との関係. 日本植物病理学会報 61 : 273
1518 (講要) .
- 1519 Yamashita, K., Sakai, J., and Hanada, K. 1996. Characterization of a new virus from garlic (*Allium sativum* L.),
1520 garlic mite-borne mosaic virus. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 62 : 483 -489.
- 1521 山下一夫, 花田薫, 岩井久. 1997. ニンニクから分離した Onion yellow dwarf virus について. 日本
1522 植物病理学会報 63 : 195-196 (講要) .

- 1523 山下一夫. 1998. 青森県内のニンニクに発生するウイルスと発生状況. 日本植物病理学会報
1524 64 : 411-412 (講要) .
- 1525 李龍雨, 山崎昇三, 尾崎武司, 井上忠男. 1979. ニンニクに見出される2種のひも状ウイルス, ニ
1526 ンニク潜在ウイルス (garlic latent virus) ならびにニンニクモザイクウイルス (garlic mosaic
1527 virus) . 日本植物病理学会報 45 : 727-734.
- 1528 Yoshida, N., Shimura, H., Yamashita, K., Suzuki, M., and Masuta, C. 2012. Variability in the P1 gene helps to refine
1529 phylogenetic relationships among leek yellow stripe virus isolates from garlic. *Arch. Virol.* 157 : 147-153.
- 1530 Yoshida, N., Shimura, H., and Masuta, C. 2018. Alexiviruses may have acquired inserted sequences between the CP
1531 and CRP genes to change the translation reinitiation strategy of CRP. *Arch. Virol.* 163 : 1419-1427.
- 1532 Yu, G., Smith, D. K., Zhu, H., Guan, Y., and Lam, T. T. Y. 2017. ggtree : an R package for visualization and
1533 annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Methods Ecol. Evol.* 8 : 28-36.
- 1534 農林水産省統計情報 野菜生産出荷統計 . 2021. [[https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=](https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&lid=00000126-9467)
1535 [1&layout=datalist&lid=00000126-9467](https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&lid=00000126-9467)] (参照 2022. 8. 1) .
- 1536
- 1537
- 1538
- 1539
- 1540
- 1541
- 1542
- 1543

1544 謝辞

1545

1546 研究を遂行するに当たり、北海道大学大学院農学研究院 増田税教授には、終始懇切なご指導
1547 を賜り、深甚なる感謝の意を表す。

1548 本文についてご校閲を賜った北海道大学大学院農学研究院 近藤則夫教授並びに志村華子講師
1549 に衷心より深く感謝の意を表す。

1550 本研究を遂行するに当たり、北海道大学大学院農学研究院 川久保修佑氏, Hangil Kim 氏 東京
1551 農業大学助教 Ok-Kyung Kim 博士, 福地にんにく R&S 代表 山下一夫氏から絶大なご援助とご支援
1552 をいただき感謝の意を表す。

1553 また、本研究を行うに当たり適切な助言とご協力をいただいた（地独）道立総合研究機構農業
1554 研究本部花・野菜技術センター場長 堀田治邦博士, ホクサン（株）古田和義氏, （地独）道総
1555 研農研本部原子力環境センター駐在 美濃健一氏, （地独）道総研農研本部北見農業試験場 柳
1556 田大介氏, （地独）道総研農研本部花・野菜技術センター 藤根統博士, 田縁勝洋氏, 多大なる
1557 ご協力をいただいた同センター 進藤直子氏, 元同センター 坂本香織氏に厚く感謝申し上げます。

1558 加えて現地調査等でご協力を頂いた北海道農政部生産振興局技術普及課中央農業試験場駐在上
1559 席普及指導員 斯波肇氏はじめ各普及センター各位に深くお礼申し上げます。

1560

1561