

キュウリにおけるメロン黄化えそウイルス弱毒系統 SA08-8 株の感染率向上技術

下元祥史
(高知県農業技術センター)

Techniques for improving infection rate of the attenuated strain 'SA08-8' of melon yellow spot virus on cucumber plant

By Yoshifumi Shimomoto (Kochi Agricultural Research Center, 1100, Hataeda, Nankoku, Kochi 783-0023, Japan)

キーワード : 湿潤処理, リアルタイム RT-PCR, キュウリ葉位, ウイルス量

緒 言

キュウリ黄化えそ病 (以下, 黄化えそ病) は, メロン黄化えそウイルス (melon yellow spot virus, MYSV : 加藤・花田, 2000 : Kato. et al., 2000) によって引き起こされる病害で, 本病に罹病した葉や果実には, モザイク, 黄化, えそなどの症状が発生する (竹内ら, 2001)。本病による被害は日本各地のキュウリ産地で深刻である (鈴木ら, 2006 : 武山, 2014)。MYSV はミナミキイロアザミウマによって媒介されることから (Kato. et al., 1999 : 竹内ら, 2001), 黄化えそ病の防除対策として本虫の防除が重要である。しかし, 本虫は微小昆虫であるため発見が遅れて防除適期を逸する可能性があることや, 多くの農薬に対して抵抗性を発達させている (城塚ら, 2020 : 鈴木・松田, 2010 : 高木ら, 2018) ことが黄化えそ病の防除を難しくしている。あらかじめ, 植物に病原性を低下させた弱毒ウイルスを接種しておくこと, 同種や近縁のウイルスの感染や増殖が阻害される現象, いわゆる干渉効果が知られており, 弱毒ウイルスの利用は植物におけるウイルス病の効果的な防除方法の一つとなっている (Hull, 2002 : Nishiguchi and Kobayashi, 2011)。筆者らは黄化えそ病の防除を目的に, MYSV 弱毒系統 SA08-8 を作出した。本株を接種したキュウリでは黄化えそ病の発病が大幅に抑制されたことから, 本病の防除手段として有望と考えられる

(Shimomoto. et al., 2021)。但し, 本株の効果的な利用には, あらかじめキュウリに高い割合で感染させる必要があるものの, 感染率は低い状態であった。この解決のため, 本研究では, 本株の感染率向上技術の確立を目標とした。

本研究は(国研)農研機構生物系特定産業技術研究支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」の支援を受けて実施した。ここに記して御礼申し上げる。

材料および方法

1. MYSV 弱毒株感染キュウリの栽培

SA08-8 を接種して感染を確認した本葉 6 葉期のキュウリ 'グリーンラックス' をロックウール培地(クラシック, グロダン)に 3 株/培地で 10 株 (10 株目は 1 株/培地) 定植した。培養液 (OAT ハウス 1 号および 2 号 (OAT アグリオ) を水 100L に 150g および 100g の割合で希釈) を十分量給液して, 最高温度 28°C, 最低温度 20°C に設定したガラス室内で栽培した。本葉約 18 葉期 (培地上面から生長点まで約 1.5m) まで生長したのちは, 主枝の生長点の高さ (1.5m) および葉数 (18 葉程度) を概ね一定に保ちながらつる下ろし栽培を行った。伸長してきた側枝はすべて切除した。

2. MYSV 弱毒株の接種法

SA08-8 感染キュウリ葉を 10 倍量 (重量/容量) の 0.2% 亜硫酸ナトリウムおよび 0.01M β -メルカプトエタノール含有 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0, 以下, 緩衝液) で磨砕して接種用の汁液を作製した。ガラス室内で育成して本葉未展開の子葉期まで生長したキュウリ 'ZQ-7' にカーボランダム (600 メッシュ, ナカライテスク) を振りかけた後, 子葉 2 枚に汁液を接種した。

3. ポリエチレン袋の被覆による弱毒株のキュウリでの感染率変化

SA08-8 感染つる下ろし栽培キュウリのうち任意の 1 株の生長点から数えて 10 葉目の一部を切除し, 接種源とした。接種後は 25°C, 16 時間明条件, 8 時間暗条件, 相対湿度約 70% に設定した恒温室内に 3 日間静置した。静置期間中, 湿潤処理を目的に一部のキュウリ株をポリエチレン袋で被覆して密閉する区を設けた (ポリエチレン区)。その他は対照区として被覆無しで栽培した (無処理区)。その後ガラス室内で約 30 日間育成し, SA08-8 のヌクレオカプシドタンパク質遺伝子 (N 遺伝子) を増幅させるように設計したプライマー N-F (5' - GTCTACCGTTGCTAAGTTGAC-3') および N-R (5' - GAGTGAAGTTAAATCCTTCAG-3') を用いた RT-PCR (Shimomoto. et al., 2021) で感染を確認した。なお, 感染確認時のキュウリの本葉数は概ね 5 葉以上で, 上位から 3 葉目の一部を採取して感染確認に供試した。試験は 3 回実施し, ポリエチレン区および無処理区の株数は, 1 回目は 10 および 10, 2 回目は 11 および 12, 3 回目は 12 および 10 とした。

4. 弱毒株感染キュウリの異なる葉位を接種源に用いた場合の感染率

任意の 8 株の SA08-8 感染つる下ろし栽培キュウリの生長点から 3, 6, 9, 12 および 15 葉目の全体を採取後, 葉内でのウイルスの偏在が試験結果に影響することを避けるため, 各葉を 5mm 角以下の大きさに剃刀で細かく裁断して十分に混ぜた。裁断した葉の一部を採取後, キュウリに汁液接種した。接種株は各葉につき 10 株を供試した。接種後の株をポリエチレン袋に入れて密閉後, 恒温室内で約 3 日間, その後はガラス室内で約 30 日間栽培

して前述と同様に RT-PCR で感染を確認した。

5. 葉位毎のウイルス量

リアルタイム RT-PCR により葉位毎に SA08-8 の相対定量を行った。プライマーは SA08-8 の N 遺伝子定量用として N-F および N-R, キュウリのアクチン遺伝子のメッセンジャー RNA (mRNA, DDBJ アクセション番号 DQ641117) を内在性コントロール遺伝子に用いることとし, actinF3 (5' - CGAACGGGAAATTGTCCGTG-3') および actinR3 (5' - CCGATGGTGATGACTTGTCC-3') を設計した。接種試験のために裁断した葉の一部から ISOSPIN Plant RNA (ニッポンジーン) を用いて全 RNA を抽出後, 逆転写反応を行った。反応液の組成は N-R と actinR3 をそれぞれ終濃度で 0.2 μ M, 抽出した RNA 溶液 1 μ L, PrimeScript RT-PCR Kit (タカラバイオ) 添付の 5 \times PrimeScript Buffer 2 μ L, RNase Inhibitor 0.25 μ L, PrimeScript RTase 0.25 μ L, 10mM each dNTP Mixture 0.5 μ L, これに RNase Free dH₂O を適量加えて 10 μ L とし, T100 サーマルサイクラー (バイオ・ラッド ラボラトリーズ) で 42°C 15 分, 95°C 5 分の反応を行った。その後, 逆転写反応物 1 μ L, THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡) 10 μ L および N-F, N-R または actinF3, actinR3 をいずれも終濃度 0.3 μ M になるように加え, 殺菌蒸留水で 20 μ L としたのち, LightCycler 96 システム (日本ジェネティクス) を用いて, 95°C 30 秒の反応後, 95°C 5 秒, 60°C 30 秒の反応を 40 回繰り返すリアルタイム PCR を行った。算出された SA08-8 の N 遺伝子およびキュウリのアクチン遺伝子の mRNA それぞれの葉位毎の平均 Ct 値 (3 ウェルの平均値) から, 比較 Ct 法 (Δ Ct 値 = SA08-8 の N 遺伝子の平均 Ct 値 - アクチン遺伝子の mRNA の平均 Ct 値) により葉位毎の SA08-8 の相対定量を行った。なお, あらかじめ比較 Ct 法を用いる前提となる N-F および N-R, actinF3 および actinR3 それぞれのプライマーセットを用いたリアルタイム RT-PCR の増幅効率を調査した結果, ほぼ同じであった (データ省略)。

6. 統計処理

湿潤条件の試験では 3 回の試験結果を合計してフィッシャーの正確確率検定で統計処理を行った。異なる葉位のキュウリ葉を接種源に用いて接種試

験を行った試験は、算出された感染率をアークサイン変換後、Tukey-Kramer 法による多重検定を行った。葉位ごとの相対 SA08-8 量については Tukey-Kramer 法による多重検定を行った。いずれの処理も EZR (Kanda, 2013) で実施した。

結果および考察

1. 接種後のキュウリ株の被覆の有無

3回の試験いずれでも、ポリエチレン区のキュウリは無処理区より感染率が高く、3回の試験を合計した場合の感染率はそれぞれ 78.8%および 50.0%で、被覆の有無と感染率に関連が認められた(表 1)。今回、ポリエチレン袋でキュウリを密閉することで袋内部の相対湿度は外部よりも高かったことは容易に予想される。岩井(1993)はウイルス接種後の植物に対して加湿処理を行うと、植物のウイルス感受性が高まり、局部病斑を形成する植物では安定した病斑数が発生すると述べている。今回の試験でも、SA08-8 接種後のキュウリにおいては高湿度条件に維持することによって SA08-8 に対する感受性および増殖性が高まったと考えられた。

2. 接種後のキュウリ株の被覆の有無

生長点から 12 葉目を接種源に用いた場合に平均感染率は 90%と最も高く、3および 6 葉目との間に有意差が認められた。 ΔCt 値は下位葉ほど低く、統計処理においても 12 および 15 葉目の ΔCt 値は他の葉位より有意に低かった(図 1)。この結果は、12 および 15 葉目の弱毒株の量が他の葉位より多かったことを示している。

以上の結果から、12 葉目程度を用いることで弱毒株の感染率を高めることができ、その理由は上位葉よりウイルス量が多いためと考えられた。大木(2009)および花田(2012)は植物ウイルスを接種する際の接種源としてウイルス感染植物の下位葉を避け、上位葉を使用すべきと述べているが、SA08-8 感染キュウリに関しては異なる結果となった。この理由については今後明らかにしたい。

今回明らかにした SA08-8 の感染率向上に関する知見は弱毒株利用による黄化えそ病防除の実用化に大きく貢献すると考えられる。また、濃縮等により弱毒株の濃度を高めることで更に感染率を向上させることができる可能性が示唆されたことから、今後の SA08-8 の実用場面での適用に期待したい。

摘要

メロン黄化えそウイルス弱毒株 SA08-8 をキュウリに高い確率で感染させるための技術の検討を行い、以下の知見を得た。

1. 接種後 3 日間、ポリエチレン袋で覆って接種植物を湿潤処理することで感染率は向上した。
2. RT-PCR による解析の結果、SA08-8 感染キュウリの生長点から 3, 6, 9, 12 および 15 葉目を接種源に用いた場合の SA08-8 のキュウリでの平均感染率は 21.2, 53.8, 80.0, 90.0 および 81.3%で、上位葉より下位葉が接種源に適していた。
3. リアルタイム RT-PCR による解析の結果、SA08-8 の蓄積量は 3 葉目 < 6 葉目 < 9 葉目 < 12, 15 葉目であった。
4. 本研究により 2 つの弱毒株感染率向上技術が確立された。

第1表 メロン黄化えそウイルス弱毒株SA08-8を接種したキュウリの管理法の違いによる感染率の比較

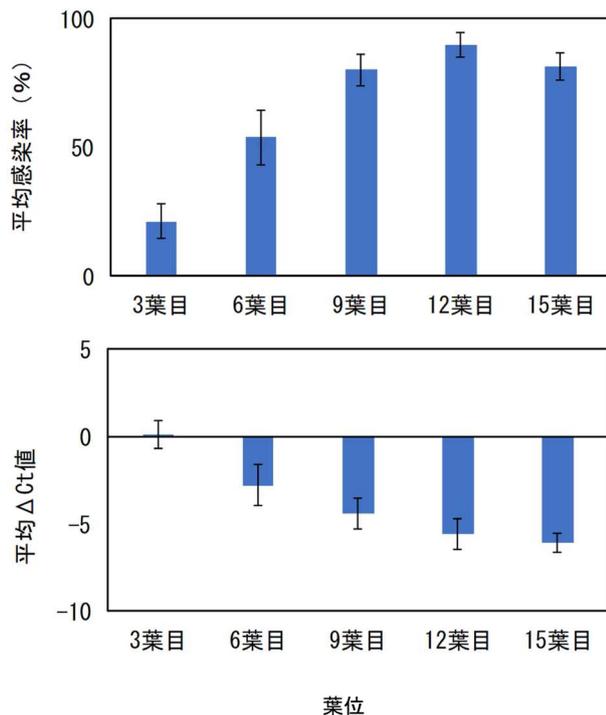
反復	ポリエチレン区 ^{a)}			無処理区 ^{b)}		
	供試株数	感染株数	感染率 (%)	供試株数	感染株数	感染率 (%)
試験1	10	9	90.0	10	5	50.0
試験2	11	7	63.6	12	3	25.0
試験3	12	10	83.3	10	8	80.0
合計	33	26	78.8*	32	16	50.0*

注) 弱毒株接種後のキュウリを恒温室で3日間、ガラス室で約30日間育成後、弱毒株の感染を調査した。

a) 接種後のキュウリをポリエチレン袋に入れて密閉して恒温室で育成した。

b) 接種後のキュウリを密閉なしで恒温室で育成した。

* フィッシャーの正確確率検定により被覆の有無と感染率に関連があることを示す ($p < 0.05$)。



第1図 メロン黄化えそウイルス弱毒株 SA08-8 感染キュウリの各葉位から調製した接種源による弱毒株感染率(上段)および各接種源における弱毒株の量(下段)

- 注1) 葉位は生長点から数えた。
 2) 感染率は8株から採取した葉それぞれの汁液をキュウリ10株に接種して、平均感染率を算出した。異なるアルファベット間ではアークサイン変換後の Tukey-Kramer 法により有意差あり ($p < 0.05$)。
 3) 弱毒株量はアクチン遺伝子のメッセンジャーRNAを内在性コントロール遺伝子として使用した比較 Ct 法によるリアルタイム RT-PCR で SA08-8 のヌクレオカプシドタンパク質遺伝子を定量した。8株の平均値。異なるアルファベット間では Tukey-Kramer 法により有意差あり ($p < 0.05$)。
 4) バーは標準偏差を示す。

引用文献

- 花田薫(2012):植物ウイルスの特性とその保存について. 微生物遺伝資源利用マニュアル, 31:1~66.
- Hull, R. (2002): Matthews' plant virology, fourth edition. Academic Press, San Diego 1056pp.
- 岩井久(1993):植物体による伝搬. 植物病原性微生物研究法(脇本哲ら編), ソフトサイエンス社, 東京:185~191.
- Kanda, Y. (2013): Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics. Bone marrow Transplantation, 48: 452~458.
- 加藤公彦・花田薫(2000):メロン黄化えそウイルスの SRNA の特性. 日植病報, 66:252~254.
- Kato, K., K. Hanada and M. Kameya-Iwaki (1999): Transmission mode, host range and electron microscopy of a pathogen causing a new disease of melon (*Cucumis melo*) in Japan. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn., 65: 624~627.
- Kato, K., K. Hanada and M. Kameya-Iwaki (2000): Melon yellow spot virus: A distinct species of the genus *Tospovirus* isolated from melon. Phytopathology, 90: 422~426.
- Nishiguchi, M. and K. Kobayashi (2011): Attenuated plant viruses: preventing virus diseases and understanding the molecular mechanism. J. Gen. Plant Pathol., 77: 221~229.
- 大木理(2009):植物ウイルス同定の基礎. 日本植物防疫協会, 東京, 130pp.
- Shimomoto, Y., K. Ishikawa, T. Okada, T. Oki, K. Hayashi, K. Yano, Y. Morita and S. Takeuchi (2021): Isolation and characterization of an attenuated strain of an Orthotospovirus, melon yellow spot virus. J. Gen. Plant Pathol., 87: 300~306.
- 城塚可奈子・金子修治・柴尾 学(2020):大阪府内におけるアザミウマ類の薬剤殺虫効果の現状と新たな防除体系. 日本農薬学会誌, 45:1~6.
- 鈴木 誠・松田広子(2010):神奈川県のカキ黄化えそ病発生地域から採集したミナミキイロアザミウマの薬剤感受性. 関東東山病虫研報, 57:119~121.
- 鈴木 誠・岡本昌広・鯉沼咲衣・山口元治・植草秀敏(2006):ミナミキイロアザミウマの発生消長とキュウリ黄化えそ病の発病との関係. 関東東山病虫研報, 53:41~46.
- 高木素紀・後藤 舞・久恒和雅・草野尚雄・鹿島哲郎(2018):茨城県の施設キュウリにおけるミナミキイロアザミウマ *Thrips palmi* Karny に対する薬剤感受性. 関東東山病虫研報, 65:115~117.
- 竹内繁治・奥田 充・花田 薫・川田洋一・亀谷満朗(2001):メロン黄化えそウイルス(Melon yellow spot virus)によるキュウリ(*Cucumis sativus*)の黄化えそ病. 日植病報, 67:46~51.
- 武山桂子(2014):愛知県におけるキュウリ黄化えそ病の発生生態. 関西病虫研報, 56:95~97.