

弱毒ウイルスによるわい性リンドウのウイルス病防除

埼玉県農林総合研究センター 宇賀博之

はじめに

わい性リンドウは、挿し苗で栽培されている鉢物花きである。このわい性リンドウは、長期にわたる栄養繁殖栽培によりウイルス病がまん延して品質および生産性が低下し、産地の存続が危ぶまれた。我が国においてリンドウに発生するウイルスは6種類が報告されているが、わい性リンドウのウイルス病発生実態調査の結果、いずれもアブラムシ伝搬性であるインゲンマメ黄斑モザイクウイルス (BYMV) およびソラマメウルトウイルス 2 (BBWV-2) の2種が感染していることが明らかになった。これらウイルス病の被害回避のため、生長点培養によりウイルスフリー株を育成した。このウイルスフリー株は、ウイルス罹病株と比較して株が大きくなるとともに花数も増加し、その有用性が生産者にも広く理解された。しかし、生産現場に導入されたウイルスフリー株を調査したところ、1年間に約3割がBYMVに再感染することが明らかとなり、ウイルスフリー株の導入だけでは根本的な解決には至らなかった。

栄養繁殖性作物におけるウイルス病の防除法としては、ウイルスフリー株による種苗更新およびウイルスの伝染環の遮断が有効である。しかし、栽培期間の半分程度を屋外で栽培するわい性リンドウにおいて、ウイルスの媒介者であるアブラムシを完全に防除することは困難である。また、次世代の穂木を採取するための親株の選抜は、その選抜時期におけるウイルス病徴のマスクングや管理する株の多さなどから事実上不可能であり、生産現場における有効なウイルス病の防除方法が求められた。このため、弱毒ウイルスを用いた防除法の開発に取り組み、実用性の高いBYMVの弱毒株の選抜に成功した。本稿では、このBYMV弱毒株の諸性質や利用方法などについて紹介する。

I 弱毒株の選抜

わい性リンドウ栽培の主産地である埼玉県川里町の農家圃場において、そのほとんどの株がウイルス症状を呈している集団からは無病徴株および病徴が軽微な株を、また、ほぼ無病徴の集団からはランダムに株を採取した。この中からELISAにより86個体のBYMV感染株を選抜し、これらを接種源として *Chenopodium quinoa* を用

いた単一病斑分離により63分離株を得た。得られた分離株をソラマメに接種し、病徴程度の軽い9分離株を弱毒ウイルス候補株として一次選抜した。これら候補株のリンドウへの感染性や病原性、強毒株に対する干渉効果試験の結果をもとに、弱毒株としてBYMV-B-33株およびB-65株を選抜した(表-1)。

II 弱毒株の特性

1 増殖植物の選定とわい性リンドウへの接種

弱毒ウイルス B-33 株、B-65 株および強毒ウイルス 35-1 株を数種植物に接種し、病徴が明瞭に発現した部位を適宜採取した。これらを抗原試料として間接 (ID)-ELISA を行い吸光度を比較したところ、B-33 株および B-65 株のいずれの弱毒株も、供試したすべての植物において強毒 35-1 株より低く、これら弱毒株は植物体内での増殖量が少ないと考えられた。増殖には、いずれの弱毒株も *Nicotiana benthamiana* またはソラマメが適していた。このうち、植物体の育成や接種の容易さ、生育期間、収穫量などから最適な増殖植物としてソラマメを選定した。

強毒 35-1 株は、ソラマメ感染葉粗汁液を接種源としてわい性リンドウに接種した場合、接種 2 週間後には新葉に明瞭なモザイクを発現し、全株への感染が確認された。一方、弱毒 B-33 株および B-65 株はソラマメ感染葉粗汁液を接種源としてわい性リンドウに接種し、2 か月後に ID-ELISA でウイルス感染の有無を調査したところ '白 2 号' は 30% 程度が陽性反応を示したが、'ホタカ' および 'シンキリシマ' への感染は認められなかった。そこで、ソラマメ全身感染葉粗汁液の分画遠心処理を行い、ウイルス濃度を高めた濃縮液を接種源として用いた。その結果、いずれの品種においても弱毒株の感染率は 90% 以上となった。B-33 株の感染推移を ID-ELISA により経時的に調査した結果、接種 2, 4, 6

表-1 自然感染わい性リンドウからの BYMV 弱毒性の探索履歴

現地圃場調査株数	25,920 株
現地圃場病徴選抜株数	598
ELISA による感染確認株数	86
単一病斑分離株数	63
ソラマメに対する病原性により選抜した株数	9
リンドウへの感染性により選抜した株数	6
リンドウに対する病原性により選抜した株数	4
リンドウにおける干渉効果により選抜した株数	5
選抜弱毒株名	B-33, B-65

Control of Virus Disease of Dwarf Gentian Plants Using an Attenuated Isolate. By Hiroyuki UGA

(キーワード: わい性リンドウ, 弱毒ウイルス, 防除)

および8週間後の感染率は、それぞれ17%、38%、79%および100%であった。以上のことから、弱毒株をわい性リンドウで利用する場合、少なくとも2か月以上前に接種しなければならないことが明らかとなった。

2 わい性リンドウに対する病原性

強毒35-1株を接種したわい性リンドウは、接種2週間後から新葉にモザイク症状を呈し、なかには黄化を伴う激しい病徴が認められた(口絵-①)。症状の程度は品種間差異がみられ、'白2号'が最も激しく、ついで'ホタカ'、'シンキリシマ'の順であった。一方、弱毒B-33株およびB-65株は、わい性リンドウの一部系統の新葉にごく軽微なモザイク症状を呈したが、その他の品種においては生育期間を通じて無病徴感染であり、生育抑制はなくウイルスフリー株と比較して同等の生育を示した(口絵-②)。わい性リンドウにはBYMVおよびBBWV-2が発生していることは先に述べたが、これら2種ウイルスが重複感染した場合、それぞれの単独感染と比較して、わい性リンドウの生育をより抑制する(庄司, 2002)。また、重複感染したウイルスのいずれもが弱毒株であっても、植物の生育に少なからず影響を及ぼすことが報告されている(小坂・岩崎, 1996; 中山ら, 1994)。しかし、BYMV弱毒株とBBWV-2が重複感染したわい性リンドウの生育は、BBWV-2が単独感染した場合とほぼ同等であった。なお、選抜した両弱毒株の特性に違いがなかったことから、以降の試験ではB-33株を用いた。

3 弱毒株と強毒株の識別

弱毒株の干渉効果試験、圃場における拡散や動態を調べるためには、強毒株との識別技術が必要となる。そこで、モノクローナル抗体を用いた血清反応、判別植物を用いた生物検定およびRT-PCR-RFLP法を検討した。5クローンのモノクローナル抗体を利用して三重抗体サンドイッチ(TAS)-ELISA法を試みたが、弱毒B-33株と強毒35-1株を判別することはできなかった。汁液接種によるトルコギキョウの反応は、弱毒B-33株は生育期間を通じて無病徴感染であったが、強毒35-1株は接種葉およびその上葉に激しいえそ輪紋を生じたことから、両株の識別が可能であった。しかし、弱毒株と強毒株が重複感染している場合には弱毒株の検出ができないこと、また、植物の育成に長期間を要することから実用的ではなかった。一方、RT-PCR-RFLPはプライマーと制限酵素にBY-8549F(5'-TCAATCCGAACAA GAAAAGC-3')、BY-9193R(5'-AGCACGCACAGGAGTCTTAG-3')とHinf IまたはBY-7975F(5'-CAGTTTATTATGCAGCGG-3')、BY-8604R(5'-GTTATCATCAATCTTCCTGC-3')とRsa Iを用いた場合、いずれも弱毒B-33株と強毒35-1株、No.4株との識別が可能であった(図-1)。

4 干渉効果

弱毒B-33株を接種した'ホタカ'、'シンキリシマ'および'白2号'の3品種のわい性リンドウから挿し芽を採取して挿し苗をし、発根後の個体に精製した強毒35-1株を2.5、5、10、20および40 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でチャレンジ接種した。接種2か月後に強毒35-1株の感染率をRT-PCR-RFLP法で調査した。その結果、弱毒B-33株を接種しておいたリンドウにおける強毒35-1株の感染率は、いずれの接種濃度においてもウイルスフリー株への接種より大幅に低かった(表-2)。B-33株を接種していたリンドウの一部には強毒35-1株が重複感染したが、35-1株の単独感染リンドウよりその病徴程度は軽微であった。以上のことから、弱毒B-33株は実用上有効な干渉効果を有すると考えられた。

5 他作物への影響

わい性リンドウ以外の作物に対する弱毒B-33株の病原性を調べるために、BYMVの主要な宿主であるマメ科作物のソラマメ、インゲンマメおよびエンドウ、並びにリンドウ科のトルコギキョウに接種して生育状況を調査した。その結果、いずれの作物においても生育、収量および品質ともウイルスフリー株とほぼ同等であったことから、弱毒B-33株は主要作物に対してほとんど悪影響を及ぼさないと考えられた。しかし、弱毒B-33株とBBWV-2が重複感染したトルコギキョウでは茎葉

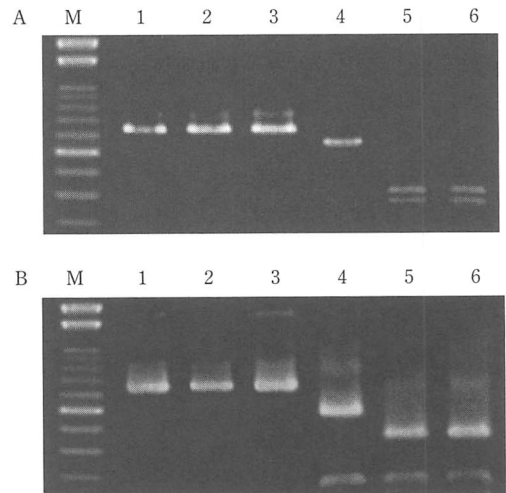


図-1 RT-PCR-RFLPによるBYMV弱毒株と強毒株の識別

レーン1～3: RT-PCR産物。レーン4～6: 制限酵素処理産物。レーン1, 4: 弱毒B-33株接種リンドウ。レーン2, 5: 強毒35-1株接種リンドウ。レーン3, 6: 強毒No.4株接種リンドウ。レーンM: 100 bp ladder markers。A: BY-8549F, BY-9193R, Hinf Iの組み合わせ。B: BY-7975F, BY-8604R, Rsa Iの組み合わせ。

表-2 BYMV-35-1株を濃度別に接種した場合のBYMV弱毒B-33株のわい性リンドウにおける干渉効果^{a)}

二次接種ウイルス35-1株の濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	強毒35-1株が感染した わい性リンドウ個体数	
	B-33感染株	対照
2.5	1	4
5	0	12
10	2	13
20	2	18
40	6	17

^{a)} 各処理区とも20個体を供試した。

の伸長が抑制され、枯死する株も認められたため、他種ウイルスとの重複感染には注意が必要であった。

III 弱毒株の実用化

1 弱毒接種リンドウの増殖

弱毒B-33株のソラマメ感染葉粗汁液を接種源としたわい性リンドウへの接種効率は、極端に低く実用的ではなかった。また、分画遠心処理液を用いた場合の感染率は大きく向上したが、接種源の調整および接種には多大な労力がかかる。そこで、栄養繁殖の特性を利用し弱毒株を接種したリンドウの挿し苗増殖を試みた。弱毒B-33株を接種したわい性リンドウを網室において6年間継代栽培した結果、‘ホタカ’、‘シンキリシマ’および‘白2号’のいずれの品種においても病徴程度および生育量は接種当代の株と同じであった。また、弱毒B-33株を接種したわい性リンドウから無菌植物を育成し、組織培養による継代保存を行った(口絵-③)ところ、少なくとも3年間は培養期間中にウイルスが不活化することなく、弱毒B-33株を接種したリンドウを容易に増殖することが可能であった。さらに、これら培養株を定期的に順化して観察した結果、病徴発現程度は網室で栽培を続けていた感染株と同傾向であり、生育はウイルスフリー株と同等であった。以上のことから、各作ごとに弱毒株を接種する必要がなく、通常のウイルスフリー株の増殖と同様に弱毒株を接種したわい性リンドウの大量増殖が可能であった。

2 圃場における防除効果

弱毒B-33株を接種したわい性リンドウの‘ホタカ’、‘シンキリシマ’および‘白2号’の3品種を3か年にわたり現地圃場で栽培した。その結果、わずかに品種間差異が認められたものの、全般的に生育は良好で株張りも良く、花数が増加するなどウイルス病の防除効果が認められた。1999年に行った試験栽培株の卸売市場における価格を見積もったところ、弱毒B-33株を接種したわい性リンドウは無接種株と比較して最大60%高かった。また、弱毒B-33株を接種したわい性リンドウを複数

年にわたり継代栽培したところ、少なくとも3か年まではウイルス病防除効果が持続することが明らかとなった(口絵-④)。さらに、BYMV-B-33株を接種したわい性リンドウにBBWV-2が重複感染した場合の生育への影響は、BBWV-2の単独感染株と同等であった。以上のことから、現地圃場ではBYMVおよびBBWV-2の2種ウイルスの発生がみられるが、BYMV弱毒B-33株は単独でもその利用価値が高いと判断した。

おわりに

我が国における弱毒ウイルスを利用したウイルス病の防除技術は、多くの作物で研究されている(亀谷, 1994)。弱毒ウイルスの必要条件として弱病原性や干渉作用、安定性などが求められる(本田, 1997; 亀谷, 1989)が、これらはいずれも研究段階においてクリアされるべき課題である。一方、弱毒株の接種方法あるいは弱毒接種株の増殖は、実用上最大のウイークポイントと考えられる。特に、種子繁殖性作物が対象となる場合、弱毒ウイルスの接種にかかる労力の負担が大きいため、機械を用いた大量接種法が考案されている(佐山, 1996)。栄養繁殖性植物においても多量の植物への接種と感染植物の増殖が求められ、弱毒ウイルスを接種したわい性リンドウは挿し苗による増殖が容易で、スムーズに苗の供給が行うことができるという利点があり、実用化における負担は最小限になると考えられる。

以上のように、本試験で用いたB-33株は栄養繁殖性わい性リンドウのBYMVによるウイルス病を制御する効果的な弱毒株であった。しかし、ウイルス病の発生の少ない年次や品種あるいは栽培農家においては、未接種株と比較して同等あるいはわずかな品質の低下が認められたことから、使用に当たっては、弱毒ウイルスの効果がウイルス病の予防であるという十分な説明と理解が必要となる。また、長期にわたる栽培期間中にBBWV-2が自然感染することから、種苗更新は2年に1回程度行うことが妥当と考えられた。

本研究成果は、農林水産省の地域先端補助事業において、中央農業総合研究センター本田要二郎博士、大村敏博博士、小林有紀博士(現 北海道農業研究センター)および萩原恭二博士との共同研究で得られたものである。また、本研究を行うに当たり、モノクローナル抗体を分譲していただいた近畿中国四国農業研究センターの笹谷孝英博士に感謝申し上げる。

引用文献

- 1) 本田要二郎 (1997): 農業技術 52: 447 ~ 449.
- 2) 亀谷満朗 (1989): 農及園 64: 159 ~ 164.
- 3) — (1994): 同上 69: 137 ~ 142.
- 4) 小坂能尚・岩崎真人 (1996): 植物防疫 50: 499 ~ 503.
- 5) 中山喜一ら (1994): 関東病虫研報 41: 115 ~ 118.
- 6) 庄司俊彦 (2002): 同上 49: 63 ~ 64.
- 7) 佐山春樹 (1996): 植物防疫 50: 20 ~ 25.