

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 5 日現在

機関番号：12201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660039

研究課題名(和文) トマト黄化葉巻病のリカバリー機構解明と新規防除法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a novel method for curing from tomato yellow leaf curl disease

研究代表者

西川 尚志 (Nishigawa, Hisashi)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号：60361614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：トマト黄化葉巻病はトマト黄化葉巻ウイルス(TYLCV)による病気で、トマト栽培に大きな被害を与えている。ウイルス病であるため、一度感染してしまうと治療することはほぼ不可能である。しかし、高温時にまれに罹病植物から病徴のない葉が出る現象(リカバリー)が見られる。そこで、この現象を人工的に促進することが出来れば新たな防除法となるかもしれない。そこで、本研究では生育温度を高温にすることでリカバリーを引き起こすことが出来るのか検討したところ、30℃において、約半数の植物がリカバリーを起こした。また、リカバリーを起こしてもウイルスがいなくなるわけではないことが確認された。

研究成果の概要(英文)：Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) is a causal agent of tomato yellow disease and lead to devastating crop loss. Curing this disease is almost impossible but sometimes "recovery" can be seen at a high temperature. "Recovery" is a phenomenon that show no symptoms with new leaves from plants that show symptoms. Therefore, it may be possible to establish a novel method to cure virus-infected plants. In this experiments, about half number of tomato plants showed recovery at 30℃. But the recovered leaves showed accumulation of viral genomic DNA, suggesting that "recovery" is not the result of disappearance of the virus.

研究分野：植物病理学

キーワード：トマト黄化葉巻ウイルス リカバリー

1. 研究開始当初の背景

トマト黄化葉巻病はエマージングウイルスとして世界中で最重要病害となっており、日本での発生は現在 38 都府県に及び、トマト生産量日本一の熊本県でも 70%以上の圃場で発生が見られる。防除法は現在のところ媒介昆虫であるタバココナジラミの駆除のみであるが、防虫効果があるとされる目合い 0.4mm のネットを使用するとハウス内は高温になり、作業性や着果率の低下などの理由で徹底されていない。さらに、薬剤耐性を持つタバココナジラミ(バイオタイプ Q)がすでに 43 都府県に広く分布しており、その防除は非常に困難なものとなっている。

一方で、一度 TYLCV に罹病し、激しい病徴を示したトマト苗でも低頻度ながら、健全な腋芽を伸長し、健全植物と同様に生育するものが見られる(リカバリー、下の写真)。



TYLCV に近縁なウイルス感染からのリカバリーはいくつかの植物で報告されており、RNA サイレンシングと呼ばれる抵抗性反応が関与すると考えられている。最近、このリカバリー状態での遺伝子発現の状態がトウガラシで詳細に解析され、発現が増減する遺伝子のホモログがトマトでも予測されている(Góngora-Castillo ら、2012)。また、RNA サイレンシングは温度の影響も受けることから、リカバリーとの関連も考えられる。これらのデータを踏まえ、リカバリーの誘導を意図的にコントロールすることが出来れば、トマト栽培における革新的な治療法となることが期待される。

2. 研究の目的

現在、TYLCV の感染を防ぐ抵抗性のトマト品種はなく、発病を抑える耐病性の遺伝子(Ty-1 や Ty-3 など)を持つ品種がいくつか育成されている。しかし、無病徴ではあるものの、ウイルスの増殖を防ぐことはできないため、媒介虫(タバココナジラミ)による二次伝染源となることが危惧されている。また、

媒介虫の防除も徹底されていないのが現状であり、実際に媒介虫の生息域の拡大に伴い、ウイルス病が広がりつつあり、その対策は急務となっている。

このような状況の中、TYLCV による激しい病徴からリカバリーしたトマトでは、どう見ても病徴が回復し、しかもウイルスの再感染を防いでいるように思われるため、この現象を利用すれば防除法の確立につながる可能性がある。そこで、リカバリーによる病徴の回復を意図的に引き起こすことが実用化につながるのではないかという可能性を考え、リカバリーという現象が起こる条件等を検討することを目的とした。

<引用文献>

Góngora-Castillo E, Ibarra-Laclette E, Trejo-Saavedra DL, Rivera-Bustamante RF. (2012) Transcriptome analysis of symptomatic and recovered leaves of geminivirus-infected pepper (*Capsicum annuum*). *Virology* 9:295.

3. 研究の方法

まず、TYLCV の感染性クローンを作製した。TYLCV 罹病トマトの葉よりトータル DNA を抽出し、ファージ由来のポリメラーゼを使用し、TYLCV の環状 1 本鎖 DNA をコンカテマー化した 2 本鎖 DNA を増幅させた。次に、2 コピーつながったゲノム DNA を得るため、このコンカテマー化した DNA を制限酵素で部分消化し、クローニングベクターに導入した。さらにこの導入断片をバイナリーベクターにクローニングし、アグロバクテリウムを用いてトマトの葉に接種(アグロインフィルトレーション)した。

リカバリーを引き起こす実験を行うため、まずは TYLCV 発病トマトを用意する必要がある。そこで、TYLCV の感染性クローンをを用いて感受性トマトに接種し、通常の栽培温度(24)で栽培した。

発病を確認したトマト苗を高温(30 および 35 の各インキュベーター)に移し、どの温度でリカバリーが起こるのを観察した。

4. 研究成果

バイナリーベクターに導入した 2 コピーの TYLCV のクローンを感受性トマトに接種したところ、接種 3 週間後ぐらいから新葉で黄化、葉巻といった典型的な病徴が観察されたこ

とから、感染性クローンの作成に成功したといえる(図1)。また、これらの罹病植物を今後の実験に用いた。



図1 TYLCV が感染し発病した葉黄化と葉巻の病徴が認められる

次に、人為的にリカバリーを誘導することが出来るのか、またその温度の検討を試みた。まず、トマトに TYLCV の感染性クローンを接種し、発病を確認した植物を 30 および 35 の人工気象器に移したところ、いくつかの植物からは病徴のなくなった葉の展葉が見られたことから、リカバリーが確認できた。しかし、高温条件であったためか、若干生理障害が見られたため、より最適な日照条件や栄養条件などの検討が必要であると考えられた。

そこで、今度は 30 に温度を限定し、再度罹病植物を移したところ、17 日後には 8 株中 2 株でリカバリーが確認された(図2)。45 日後ではさらに 2 株のリカバリーが確認できた。



図2 リカバリーした葉見た目は健全の葉と同じ

以上のことから、30 においてはリカバリーは一定の割合で発生するものの、その頻度は約 50%と低く、高温に移行するだけでは実用的な防除法とはならないものと考えられた。

また、これらのリカバリーした植物から

は PCR によりウイルスが検出されたことから(図3)リカバリーではウイルスの移行が抑えられないことが示唆された。

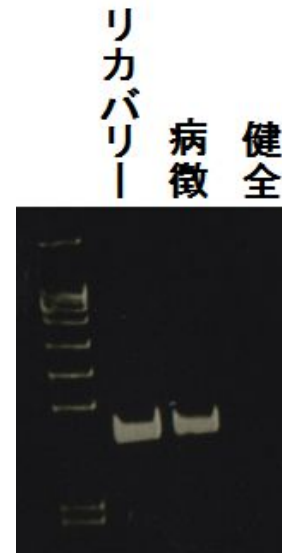


図3 葉からのウイルスの検出
リカバリーした葉でもウイルスが検出された

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西川 尚志 (NISHIGAWA Hisashi)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号：60361614

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：