

称号及び氏名	博士(応用生命科学) 長岡 栄子		
学位授与の日付	平成21年11月30日		
論文名	グラジオラスモザイク病防除に向けた弱毒ウイルス株の開発と 実用化		
論文審査委員	主査	大木	理
	副査	小田	雅行
	副査	小泉	望

論文要旨

栄養繁殖植物であるグラジオラスは主要な花き園芸植物の一つであるが、ウイルス感染が原因で葉や包葉のモザイク、花卉の斑入り、奇形などが観察され生育障害が生じるなど、農業生産において大きな問題となっている。一方、植物ウイルス病の防除法として、弱毒ウイルスを予め接種し後から感染する同種または近縁種の病原ウイルスを防除するウイルスの干渉効果を利用した方法があり、きわめて有効な防除手段と考えられている。また、栄養繁殖植物では一旦導入された弱毒ウイルスは栄養繁殖により高率に伝染することから、弱毒ウイルス導入個体の増殖は容易と考えられる。

本研究では、グラジオラスモザイク病の実用的な防除方法を確立するために、モザイク病の発生実態を調査して主要な病原ウイルスと系統を特定し、それらをターゲットとした弱毒ウイルスの開発、評価ならびに実用化に向けた諸条件を検討した。

第1章 グラジオラスにおけるモザイク病の発生状況と病原ウイルス

京都府内のグラジオラス生産ほ場と市販球茎についてウイルスの発生実態を調査したところ、主要な病原ウイルスは *Potyvirus* 属のインゲンマメ黄斑モザイクウイルス (*Bean yellow mosaic virus*: BYMV) の Pathotype I と IV であり、栽培グラジオラスの大半が感染しており、特に病徴の激しい品種では Pathotype I が多く分離された。また、激しい病徴のグラジオラスでは *Cucumovirus* 属のキュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus*: CMV) の Subgroup I が重複感染していた。

次に、ウイルス多発グラジオラスほ場に隣接して、種子由来のグラジオラス実生苗

を約 40 日間栽培したところ、アブラムシ伝搬によると考えられるウイルス感染が 2% 以下の苗で認められた。また、これらのウイルス感染球茎を翌年に栽培して次代球茎や木子における感染程度を調べたところ、両ウイルスとも栄養繁殖によって高率に感染することが分かった。したがって、グラジオラスにおけるウイルス防除は、罹病性の高い稚苗の時期など育種の初期段階が最も重要であると考えられた。

以上の結果を踏まえて、BYMV の Pathotype I と CMV の Subgroup I を防除のターゲットとし、弱毒ウイルス株の選抜・評価形質として、「病徴が無いこと」、「病原ウイルスに対して高い干渉効果を発揮すること」、「グラジオラス稚苗へ高率に感染すること」、さらに「栄養繁殖によって高率に感染すること」の 4 項目を設定することとした。

第 2 章 弱毒ウイルス株の作出と選抜

BYMV 弱毒ウイルス株の作成には、成功例の多い低温処理法を用いた。グラジオラスから分離した強毒株 IbG を 15°C、90 日間の低温処理し、単病斑分離によって明瞭な弱毒化が確認された 1 株 (BYMV-M11) を選抜した。M11 はソラマメや *Nicotiana benthamiana*、グラジオラス実生苗に病徴をほとんど示さなかった。

CMV については既報の CM95 を用いた。CM95 は強毒株を低温処理後に分節ゲノム RNA 3 を干渉効果が高い分離株と置換して得られた株であり、野菜類において実用性が検証されている。本株はグラジオラス実生苗においても病徴が軽微であったことから、有望な弱毒ウイルスになりうると考えられた。

第 3 章 ウイルス株の識別検出法の確立と干渉効果の評価

弱毒ウイルスの干渉効果の有無は、後から感染する強毒ウイルス株による発病が抑制されるか否かで判断される。栄養繁殖植物では発病が抑制されても強毒株の感染が起これば、栄養繁殖により強毒株が伝染して後代で発病する恐れがある。したがって、栄養繁殖植物の弱毒ウイルスには強毒株による感染が完全に抑制される強力な干渉効果が求められ、それを判定するためにウイルス株の高感度識別検出法の確立が必要となった。そこで、BYMV-M11 と CMV-CM95 について、それぞれの親株または強毒株とのゲノム塩基配列の相違に着目し、遺伝子診断法を開発した。M11 については HC-Pro 領域での変異を利用したプライマーのマッチ、ミスマッチによる RT-PCR 法を、CM95 については RNA 2 の 2b 領域の制限酵素サイトの有無の相違による RT-PCR-RFLP 法を行ったところ、両弱毒ウイルス株は親株あるいは他の強毒株と識別検出できた。

次に、これらの識別検出法を使って両弱毒ウイルス株の干渉効果の評価を行った。

BYMV については M11 を 1 次接種したソラマメに強毒株をチャレンジ接種し、その上位葉について RT-PCR 法により強毒株の感染の有無を調べた。その結果、M11 の干渉効果は強毒株の種類で程度が異なり、グラジオラス由来強毒株に対しては完全な干渉効果を示したが、ソラマメ、クローバなど非グラジオラス由来の強毒株に対しては不完全な干渉効果を示すことが明らかとなった。これらのウイルス株のゲノム RNA の塩基配列の比較から、M11 を含むグラジオラス分離株間では相同性が非常に高く、グラジオラス由来株は BYMV 種内の 1 系統を成すと考えられた。一方、M11 による干渉効果

が不完全であった非グラジオラス由来株は、グラジオラス由来株との相同性は低かった。また、M11 の干渉効果の程度と塩基配列の相同性の程度には相関が認められ、M11 の干渉効果には転写後型ジーンサイレンシング (PTGS) が関与する可能性が示された。

CM95 の干渉効果の評価は *Nicotiana rustica* を用いて行った。CM95 を 1 次接種して 3、10 日後に強毒株をチャレンジ接種し、その上位葉から RT-PCR-RFLP 法により強毒株を検出した。その結果、1 次接種 3 日後にチャレンジ接種した場合は強毒株が検出され、3 日間では CM95 が干渉効果を発揮するには不十分であると考えられた。一方、10 日後にチャレンジ接種した場合は、CM95 は完全な干渉効果を示した。CM95 の干渉効果はグラジオラス分離株に対しても認められ、その干渉効果は CM95 感染後一定期間経過した後に発揮されると考えられた。

第 4 章 弱毒ウイルス株 BYMV-M11 の治療的効果

強弱ウイルス株が識別検出できるようになった結果、先に強毒株が感染した植物における弱毒株の 2 次感染の効果を調べることが可能となった。そこで、BYMV 強毒株が感染した *N. benthamiana* への M11 の 2 次感染の有無と、病徴およびウイルス外被タンパク質 (CP) 量を調べたところ、予想に反して M11 が強毒株感染植物に感染し、さらに、上位葉の病徴が軽減し、CP 量が減少することが明らかとなった。GFP 標識した強毒株を用いた実験では M11 処理により上位葉での GFP 発現領域と GFP 量が減少することが明らかとなり、M11 処理による病徴の軽減は上位葉で強毒株が減少したためと考えられた。M11 の強毒株に対する治療効果の機構は明らかでないが、強毒株感染葉に M11 が感染できること、M11 が強毒株よりも早く遠隔移行できる可能性が考えられることから、M11 が先に移行した上位葉で M11 感染により強毒株に対する抵抗性が誘導されていると推察した。

第 5 章 グラジオラスへの弱毒ウイルス導入技術の確立

これまでグラジオラスでは品種を特定したウイルス接種は困難であり、ウイルス病研究に大きな支障を来してきた。そこで、グラジオラス品種を特定して弱毒ウイルスを効率よく導入するために、茎頂培養後の未順化苗を用いたウイルス接種法を検討した。BYMV と CMV について強毒株と弱毒株を供試し、発根培地上での培養期間が異なる未順化苗に対してウイルス液をカーボランダム法により接種した。その結果、いずれのウイルスとも容易に感染し、感染率は培養苗の生育期間が短いほど高率であった。本接種法はグラジオラスの組織培養の工程にウイルス接種を追加した簡便な方法であり、茎頂培養技術を有する研究機関などでは容易に導入できる。

また、M11 が感染したグラジオラス培養苗を数代養成栽培して、各年の球茎ならびにそこに着生する木子における M11 の感染を調べたところ、M11 は高率に垂直伝染した。したがって、弱毒ウイルスを一旦感染させれば、その後は弱毒ウイルス導入球茎を容易に生産・増殖できると考えられた。

本研究では、グラジオラスモザイク病の発生実態に基づいた弱毒ウイルス株の作出・選抜を試み、BYMV-M11 と CMV-CM95 の 2 種の弱毒ウイルス株を確立することに成

功した。これらは病徴がほとんど無く、強毒株に対して高い干渉効果を発揮し、グラジオラス培養苗へ高率に感染し、栄養繁殖によって高率に伝染する非常に有用性が高い弱毒ウイルス株と考えられる。また、弱毒ウイルスの干渉効果の機構や弱毒ウイルス接種による強毒ウイルスの治療的效果についても興味深い知見を得ることができた。さらに、遺伝子診断法は弱毒ウイルスの特異的検出を可能とし、自然界での弱毒ウイルスのモニタリングなどにも適用できると考えられる。

本研究で検討した課題の多くは栄養繁殖植物に共通であり、本研究の成果はグラジオラス以外の栄養繁殖植物における弱毒ウイルスの研究にも有用と考えられる。

審査結果の要旨

栄養繁殖植物であるグラジオラスは主要な花き園芸植物の一つであるが、ウイルス感染による生育障害が大きく、農業生産において大きな問題となっている。一方、植物ウイルス病の防除法として弱毒ウイルスを予め接種する方法があり、有効な防除手段と考えられている。そこで本研究では、グラジオラスモザイク病の実用的な防除方法を確立するために、モザイク病の発生実態を調査して主要な病原ウイルスと系統を特定し、それらをターゲットとした弱毒ウイルスの開発、評価ならびに実用化に向けた諸条件を検討した。

第1章では、京都府内のグラジオラス生産ほ場と市販球茎について発生実態を調査したところ、主要な病原ウイルスはインゲンマメ黄斑モザイクウイルス (BYMV) の Pathotype I とキュウリモザイクウイルス (CMV) の Subgroup I であることが分かった。また、ほ場ではアブラムシ伝搬によるウイルス伝染は2%以下であること、両ウイルスとも栄養繁殖によって高率に伝染することが明らかになった。以上の結果から本研究では BYMV の Pathotype I と CMV の Subgroup I を防除のターゲットとし、弱毒ウイルス株の選抜・評価形質として、「病徴が無いこと」、「病原ウイルスに対して高い干渉効果を発揮すること」、「グラジオラス稚苗へ高率に感染すること」、さらに「栄養繁殖によって高率に伝染すること」の4項目を設定することとした。

第2章では、低温処理法を用いて BYMV の弱毒株 BYMV-M11 を選抜し、CMV については既報の CM95 を用いることにした。両ウイルス株とも弱毒性が確認され、有望な弱毒ウイルスになりうると考えられた。

第3章では、弱毒株のウイルスの干渉効果の大きさを判定するためにゲノム塩基配列の相違に着目し、両弱毒ウイルス株を親株あるいは他の強毒株と識別検出できる高感度識別検出法を開発し、これらの識別検出法を使って両弱毒ウイルス株の干渉効果の評価を行った。

BYMV については M11 を 1 次接種したソラマメに強毒株をチャレンジ接種して強毒株の感染の有無を調べた結果、干渉効果は強毒株の種類で程度が異なり、グラジオラス由来強毒株に対しては完全な干渉効果を示したが、非グラジオラス由来の強毒株に対しては不完全な干渉効果を示すことが明らかとなった。これらのウイルス株の塩基配列の比較から、グラジオラス由来株は BYMV 種内の 1 系統を成すと考えられた。また、干渉効果の程度と塩基配列の相同性の程度には相関が認められ、干渉効果には転写後型ジーンサイレンシングが関与する可能性が示された。CM95 の干渉効果の評価は *Nicotiana rustica* を用いて行った。CM95 を 1 次接種した後に強毒株をチャレンジ接種し、その上位葉から強毒株を検出した。その結果、3 日間では CM95 が干渉効果を発揮するには不十分で、10 日後にチャレンジ接種した場合には完全な干渉効果を示すことが分かった。

第 4 章では、予め BYMV 強毒株が感染した *N. benthamiana* への M11 の 2 次感染の有無と病徴およびウイルス外被タンパク質 (CP) 量を調べたところ、予想に反して M11 が感染し、さらに上位葉の病徴が軽減し、CP 量が減少することが明らかとなった。GFP 標識した強毒株を用いた実験から、M11 処理による病徴の軽減は上位葉で強毒株が減少したためと考えられた。

第 5 章では弱毒株のグラジオラスへの接種法を検討した。発根培地上での培養期間が異なる未順化苗に対してウイルス液をカーボランダム法により接種したところいずれのウイルスとも容易に感染し、感染率は培養苗の生育期間が短いほど高率であった。また、M11 が感染したグラジオラス培養苗を数代養成栽培して感染を調べたところ、球茎ならびに木子に高率に垂直伝染した。

本研究では、グラジオラスモザイク病の発生実態に基づいた弱毒ウイルス株の作出・選抜を試み、BYMV-M11 と CMV-CM95 の 2 種の弱毒ウイルス株を確立した。これらは病徴がほとんど無く、強毒株に対して高い干渉効果を発揮し、グラジオラス培養苗へ高率に感染し、栄養繁殖によって高率に伝染する非常に実用性が高い弱毒ウイルス株と考えられる。また、弱毒ウイルスの干渉効果の機構や弱毒ウイルス接種による強毒ウイルスの治療的効果についても興味深い知見を得た。遺伝子診断法は自然界での弱毒ウイルスのモニタリングなどにも適用できると考えられる。本研究で検討した課題の多くは栄養繁殖植物に共通であり、本研究の成果は他の栄養繁殖植物における弱毒ウイルスの研究にも有用と考えられる。以上の成果は植物病理学、植物ウイルス学などの基礎的分野ばかりでなく、植物保護学分野にも寄与するところが大きい。よって学力確認の結果と合わせて、博士 (応用生命科学) の学位を授与することを適当と認める。