

[短 報]

サテライト RNA の利用によるメロンモザイク病(CMV)の弱毒ウイルスの作出

萩田 孝志*1 佐々木 純*2 向原 元美*3 柳山 浩之*4

北海道内各地のCMV感染植物133株中6株からサテライトRNAを分離した。得られたサテライトRNAを付加したCMV弱毒株をタバコ1品種およびメロン13品種に接種した結果、モザイク病徴が原株に比べやや軽減した。

農家ほ場においてハウス栽培メロンに弱毒株を接種し、強毒株接種区と生育および収量を比較した。その結果、強毒株接種区は、生育抑制および葉や果実のモザイク病徴が顕著に現れたのに対して、弱毒株接種区は生育抑制もみられず、葉および果実のモザイク病徴がわずかに点在したものの、果実の重量並びに外観品質も強毒株接種区に比べ、明らかに優った。

緒 言

メロンは近年府県への移出特産物として作付けが急増し、1995年の作付け面積が、2,240ha、収穫量が46,800トンに達している。メロン作付けの障害の一つにモザイク病がある。モザイク病に感染すると、葉にモザイクを生じて株全体が萎縮する(写真1)。一方果実では奇形、裂果およびネットの形成不良など商品価値が著しく低下する(写真2)。モザイク病の病原ウイルスは種類も多く、北海道ではこれまで5種類の発生が確認されている。このうち最も発生が多く重要と思われるのはキュウリモザイクウイルス(CMV)である。本ウイルスは野菜類、花類、ほ場周辺の雑草など広範囲の植物に寄生するため、伝染源植物を特定できず、加えてアブラムシ類により非永続的に伝搬されるので、メロンほ場のアブラムシ類防除のみでその感染を防ぐことは困難である。

近年農作物を被害する病害虫に対して、農薬の使用回数を削減し、より安全性の高い農作物の生産が求められている。そのような状況の中で先端技術の活用により弱毒ウイルスを作出し、農薬を用いない新しいウイルス病の防除技術も研究されている。北海道においてもこれまでトマト、ピーマンのモザイク

病(TMV)、トマト条斑病(CMV)およびテンサイそう根病(BNYVV)に対する弱毒ウイルスが作出され、その一部は防除に利用された。なかでもトマト条斑病に対するCMVの弱毒ウイルスはサテライトRNAを利用して作出されたものである。

このようなことから、サテライトRNAを用いたメロンモザイク病(CMV)の弱毒ウイルスの作出を試みた。

方 法

1. CMV感染植物からサテライトRNAの検出

CMV感染植物をタバコ(White Burley)に汁液接種してCMVを増殖させた後、0.5Mクエン酸緩衝液(pH6.5)による抽出、クロロホルムによる有機溶媒処理、超遠心分離法による濃縮を行い部分純化試料とした。次に試料を1%SDS(1%2-メルカプトエタノール添加)を加え、40℃で10分間処理した。4%ポリアクリルアミドゲルで約5.5時間泳動した後、染色しサテライトRNAの有無を調べた。

2. サテライトRNAの付加

二通りの方法で行った。CMV分離株(サテライトRNAを含む)の純化試料および罹病タバコ(Xanthine)葉の病汁液に1%SDS(1%2-メルカプトエタノールを含む)を加え、40℃で10分間処理した。次いで、別のCMV分離株(サテライトRNAを含まない)に感染したタバコ葉の病汁液を等量混合した後、タバコに汁液接種した。接種3~4週間後に採取した上葉からウイルスを部分純化し、電気泳動によりサテライトRNAの有無を調べた。次に、CMV分離株(サテライトRNAを含む)から電気泳動によりサテライトRNAを分離した後、RNA部分のゲルを切り出し、

1997年4月30日受理

*1 北海道立中央農業試験場, 069-13, 夕張郡長沼町(現, 北海道立北見農業試験場, 099-14, 常呂郡訓子府町)

*2 同上(現, 北海道立上川農業試験場, 078-03, 上川郡比布町)

*3 同上

*4 東胆振地区農業改良普及センター(現, 南羊蹄地区農業改良普及センター)

磁性乳鉢を用いて磨砕した。磨砕液をCMV分離株(サテライトRNAを含まない)に感染したタバコ病汁液と等量混合した後、タバコに接種した。約3週間後に病徴観察を行うとともに、電気泳動によるサテライトRNAの有無を確認した。

3. 弱毒株の接種

タバコ(White Burley)で増殖した各弱毒株を病葉生体重の5倍量の0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0, 0.5%2-メルカプトエタノール添加)を用いて磁性乳鉢中で磨砕した。次にガラス室で駄温鉢を用いて育苗した各種植物の幼苗(本葉1葉期)4~6株の初生葉に汁液接種した。接種約2~4週間後に、病徴観察およびELISAによる感染率を調べた。

4. 現地圃場における試験

試験年次:1994年

場 所:勇払郡追分町春日

供試弱毒株:SH208-20+サテライト783

1区面積:20~40m²(反復なし)

<試験区>

処理	接種時期	供試株数
CMV	6/10	5
SH783	6/10, 7/7	10
無接種	-	5

<耕種概要>

品 種:札幌キング(夏系)

栽培様式:35型ハウス, 立ち作り親づる1本仕立て

播 種:台木(バーネット)5月20日 穂木(札幌キング)5月22日

接 木:呼び接ぎ(6月1日), 胚軸切り6月9日

定 植:6月18日 蜂入れ:7月15日 収穫始:8月23日

株 間:100cm 施肥:なし(前作の残肥による)

前 作:加温半促成メロン

結 果

1. 野外のCMV感染植物からサテライトRNAの探索

北海道内の各地から採集したCMVに感染した植物(メロン, ダイコン, トルコギキョウ, カボチャ, トマト, ピーマン, キュウリ, セルリー, ペピーノ, デルフィニウム, ツユクサ)133株から、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるサテライトRNAの分離を行った。その結果、メロン2株, カボチャ2株, ダイコン2株の合計6株から検出された(表1)。

2. CMV感染タバコへのサテライトRNAの付加

CMV分離株(サテライトRNAを含む)の純化試

表1 ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるサテライトRNAの検出

植 物	供試数	検出数
メロン	65	2
ダイコン	34	2
トルコギキョウ	10	0
カボチャ	5	2
トマト	5	0
ピーマン	4	0
キュウリ	3	0
セルリー	3	0
ペピーノ	1	0
デルフィニウム	1	0
ツユクサ	1	0
合計	133	6

料および病汁液をSDS処理した後、CMV分離株(サテライトRNAを含まない)と混合しタバコに接種した。接種3~4週間後の上葉を材料として、部分純化した試料をポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。その結果、いずれの試料からもサテライトRNAが検出された(写真3)。

3. サテライトRNAを付加したCMV感染タバコの病徴

CMV(サテライトRNAを含まない)に感染したタバコ(White burley)葉に、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離したサテライトRNA部分のゲルを混合した後、乳鉢中で磨砕した。磨砕液をタバコ(Xanthi nc)に接種し病徴観察を行った。その結果、供試したサテライトRNA6分離株いずれにおいても、タバコの病徴は原株とほぼ同じ~やや軽い程度であった(表2, 写真4)。

4. サテライトRNAを付加したCMV弱毒株の病徴発現

表2 サテライトRNAを付加したCMV弱毒株のタバコにおける病徴

処理区	病 徴
49-2 (R60)	+
〃 + RNA5 (107)	±~+
〃 + RNA5 (507)	±~+
〃 + RNA5 (778)	+
〃 + RNA5 (783)	+
〃 + RNA5 (925)	+
〃 + RNA5 (4-1)	±~+

注) 病徴, +:弱 ±:微

1) メロン品種に対する病徴発現

CMV弱毒株にサテライトRNAを付加した3株を各々メロン13品種に接種した後、その病徴発現の程度を調査した。その結果、総じてメロンに対する病徴は軽微であったが、弱いモザイクを示す品種も若

表3 サテライト RNA を付加した CMV 弱毒株のメロン品種に対する病徴と感染率

メロン品種	病徴 (感染率)		
	507 株	778 株	107 株
キングナイン	± (67)	—~± (100)	—~± (67)
クルーガー	± (83)	±~+ (100)	+ (67)
ティファニー	±~+ (83)	± (100)	—~± (83)
アンデス	±~+ (83)	± (100)	±~+ (83)
天恵	± (83)	—~± (100)	—~± (67)
カロテ	±~+ (83)	—~± (83)	+ (67)
キングメルティ	±~+ (67)	—~± (100)	—~± (67)
クインシー	± (100)	±~+ (100)	—~± (100)
バーディーレッド	± (83)	—~± (100)	—~± (83)
北紅クイーン	*	—~± (83)	—~± (67)
夕張キング	*	± (100)	—~± (100)
クレスト秋冬系	*	—~± (100)	± (67)
サッポロキングER	*	—~± (100)	±~+ (100)

注) 病徴, +: 弱 ±: 微 —: 無 *: 未試験

表4 サテライト RNA を付加した CMV 弱毒株接種によるメロン生育に及ぼす影響

処理	調査株数	草丈 (cm)	葉数 (枚)	モザイク病徴程度別割合 (%)				
				無	微	弱	中	強
CMV	5	186.0	21.0	0	0	0	20	80
SH783	10	197.6	24.4	100	0	0	0	0
無接種	5	212.5	24.0	100	0	0	0	0

注) 調査日, 7月20日

表5 サテライト RNA を付加した CMV 弱毒株接種による葉および果実の病徴発現程度

処理	調査株数	葉のモザイク程度別割合 (%)					調査果実数	果実のモザイク程度別割合 (%)			
		無	微	弱	中	強		-	+	++	+++
CMV	5	0	0	0	0	100	8	0	38	38	25
SH783	10	40	40	0	0	20	20	15	85	0	0
無接種	15	80	0	0	20	0	9	100	0	0	0

注1) 果実モザイク程度, -: なし +: 点在 ++: 全体 +++: 激しい
2) 調査日, 8月23日

表6 サテライト RNA を付加した CMV 弱毒株接種によるメロン果実に及ぼす影響

処理	調査果実数	一果重 g (同左比)	果径 (cm)		ネット		糖度	外観規格別割合 (%)					
			縦	横	密度	盛上り		特秀	秀	優	良	A	B
CMV	8	1,868 (80)	18.4	14.2	2.44	2.44	7.8	0	0	0	0	75	25
SH783	20	2,260 (97)	19.4	15.6	2.60	2.98	9.8	0	0	5	40	55	0
無接種	9	2,324 (100)	19.2	15.3	2.83	3.00	8.0	0	0	22	78	0	0

注) ネット, 0: 不良 ~3: 良

干認められた。このうち778サテライト RNA を付加した株は他の株に比べ、メロンへの感染率も高く弱毒株として有望と思われた (表3)。

次に、783 サテライト RNA を付加した CMV (SH783) 株の現地ほ場におけるメロン (品種: 札幌キング) の生育および病徴発現に及ぼす影響を調べ

た。その結果、着果期頃 (7月20日) の生育は CMV 強毒株接種区において、生育抑制およびモザイク病徴が顕著に見られた。一方、SH783接種区の場合、無接種とほぼ同程度であった (表4)。また、収穫期 (8月23日) においては、CMV 強毒株接種区では葉および果実のモザイク程度が強く現れ、果実の重量並び

表7 サテライトRNAを付加したCMV弱毒株の
台木用品種に対する病徴と感染

台木用品種	病徴 (感染率)		
	507株	778株	107株
メロン (健脚)	± (100)	± (100)	±~+ (100)
〃 (強栄)	± (100)	-~± (100)	±~+ (100)
〃 (バネット)	*	+ (100)	±~+ (100)
カボチャ (金剛)	- (0)	±~+ (33)	*
〃 (しらきく)	±~+ (33)	±~+ (17)	*
〃 (新土佐)	- (0)	- (0)	*

注) 病徴, +:弱 ±:微 -:無 *:未試験

にネット等の外観品質も大きく低下した。これに対して、SH783接種区の場合、葉および果実のモザイクが僅かに点在する程度で、果重並びにネット等の外観品質も強毒株接種区に比べ、明らかに優れた(表5,6)。

以上のことから、SH783株は葉および果実のモザイク発現程度は、無接種に比べ若干強かったものの、CMV強毒株に比べ明らかに弱かった。

2) 台木用品種に対する病徴発現

CMV弱毒株にサテライトRNAを付加した3株を各々台木用メロン3品種に接種し、その病徴発現の程度を調査した。その結果、いずれの弱毒株も感染率が高く、その病徴は微~弱であった。なかでも507および778サテライトRNAを付加したCMV株は軽微であった。これに対して台木用カボチャに対する感染率は低く、なかでも「新土佐」に対しては、供試したいずれの株も全く感染しなかった。感染した株の病徴は微~弱であった(表7)。

考 察

CMVの弱毒株は今日までトマトで作出され^{1) 4) 5) 6)}防除効果も認められている。CMVの弱毒株の作出方法の一つにサテライトRNAを利用する方法がある。CMVは通常分子量の異なる4つのRNAから成り立っているが、なかには最も分子量の小さい5番目のRNA(サテライトRNA)を含むものもある。このサテライトRNAの機能として、ウイルスの増殖量を抑制し、その病徴を軽減させることが明らかにされ^{2) 3)} 7), トマトではこれを利用した弱毒株が作出されている^{4) 6)}。そこで本試験では、メロンのモザイク病の病原ウイルス(CMV)に対して、サテライトRNAを利用した弱毒株の作出を試みた。

はじめに道内各地のCMVに感染した各種植物からサテライトRNAの探索を行った。その結果、検出された植物は供試11種中メロン、ダイコンおよびカボチャの3種のみであった。しかしながら、植物の種類

によるサテライトRNAの分離率の差異が何に起因するのかわからない。

サテライトRNAは常に病徴を軽減させるのではなく、植物の種類やウイルスの系統によって病徴発現に変化を生じるとされている^{2) 7)}。分離したサテライトRNAを付加した弱毒株のなかには、タバコおよびメロンの病徴をやや弱めたものも認められたが、一般的に大きな変化は無かった。しかしながら、一般に言われるように、この病徴の抑制がサテライトRNAによるウイルス増殖の抑制に起因するかは、ウイルス濃度の定量を行っていないので明らかでない。

次に農家ほ場において弱毒株の実用性を評価するための試験を行った。強毒CMVの接種区は葉に強いモザイク病徴を生じ、草丈、葉数とも無接種に比べ明らかに劣った。これに対して、弱毒株接種区は、接種1ヵ月後までは病徴が出現せず、草丈、葉数とも無接種とほぼ同程度であったものの、接種2ヵ月では20%が強いモザイクを生じた。このモザイク病徴が弱毒株の増殖により病徴がより強く発現したためか、或いは弱毒株の干渉効果が弱かったことから、外部からの強毒CMVの感染により生じたためか明らかでない。果実に対しては、強毒CMV接種区では収穫した全てにモザイク症状が現れ、良以上の規格品はなかった。一方、弱毒株接種区の場合、85%の果実にモザイク症状の点在が認められたものの、良以上の規格品が45%で品質的に強毒株接種区に優れた。メロンは定植から収穫までの生育期間が長いので、強毒CMVの感染を防ぐための干渉効果も長期間持続することが要求される。また、表5からも明らかのように、弱毒株接種により葉にモザイク病徴を現した株が40%であったにもかかわらず、果実では85%が発病した。このことからメロンの場合、葉における病徴が弱い場合でも、果実にモザイクが点在し商品価値を損なうことが多い。

弱毒株が干渉効果を発揮し強毒CMVを防除するためには、メロン生育の全期間にわたり病徴を出現し

ない程度にまで弱毒ウイルスの増殖が必要である。しかしながら、このわずかに増殖した弱毒ウイルスが果実にモザイクを点在させた場合、弱毒ウイルスとしての実用性は無くなる。メロンは他のウリ科やナス科作物に比べ、CMV感染による病徴発現が強い。従って、今後できる限り病原性が弱く、干渉効果の持続期間が長い弱毒株の作出が要求される。

謝 辞 本試験を行うにあたり、弱毒株を提供していただいた山形県園芸試験場田中 孝氏並びに本稿の校閲を頂いた北海道立中央農業試験場病虫部長児玉 不二雄博士に厚く御礼申し上げます。

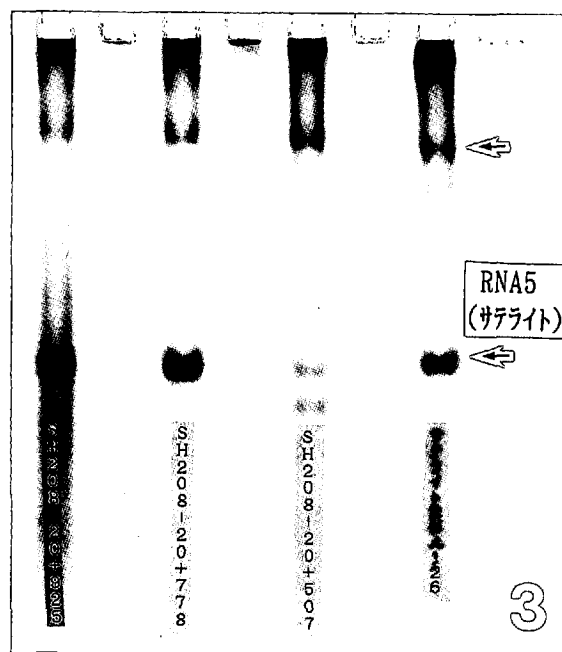
引用文献

- 1) 岩木満朗, 善林六朗, 花田薫, 渋川三郎, 栃原比呂志. "キュウリモザイクウイルス (CMV) の弱毒システムを用いた CMV によるトマトモザイク病の防除". 日植病報. 52,745-751(1986).
- 2) Masuta,C.;Kuwata,S.;Takanami,Y. "Disease modulation on several plants by cucumber mosaic virus satellite RNA (Y strain)". Ann.Phytopathol.Soc.Japan. 54,332-336 (1988).
- 3) Nakashima,K.;Ehara,Y. "Two satellite RNAs found in cucumber mosaic virus strain Y". Ann.Phytopathol.Soc.Japan. 55,579-585(1989).
- 4) 佐山春樹, 佐藤貞一, 小湊正幸, 夏秋知英. "弱毒キュウリモザイクウイルス (CMV) によるトマトの CMV 防除". 日植病報. 57,461(1991). (講演要旨)
- 5) 辻 英明, 本蔵良三, 中村茂雄. "弱毒ウイルスによるトマトの CMV 防除法の検討". 北日本病虫研報. 41,207(1990). (講演要旨)
- 6) Yoshida,K.;Goto,T;Iizuka,N. "Attenuated isolates of cucumber mosaic virus produced by satellite RNA and cross protection". Ann. Phytopathol. Soc. Japan. 51,238-242(1985).
- 7) 吉田幸二, 後藤忠則, 飯塚典男. "トマトのえそ病状発現とキュウリモザイクウイルスのサテライト RNA との関係". 北海道農試研報. 148,57-64(1987)

* Hokkaido Central Agricultural Experiment Station, Naganuma, Hokkaido, 069-13, Japan(present;Hokkaido Prefectural Kitami Agricultural Experiment Station, Kunneppu, Hokkaido, 099-14,Japan)

Production of CMV Attenuated Isolates in Melon Using Satellite RNAs

Takashi HAGITA*, Jun SASAKI, Motomi MUKOHARA, and Hiroyuki YANAGIYAMA



写 真

1. CMVによる葉のモザイク病徴 (品種：夕張キング)
2. CMVによる果実のモザイク病徴 (品種：夕張キング)
3. ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるサテライト RNA の分離
4. サテライト RNA を付加した CMV 弱毒株のタバコ (Xanthi nc) の病徴
 左：弱毒株 49-2(R60)
 右：弱毒株 49-2(R60) + サテライト RNA