

TYLCV 感染性クローンを利用した簡易接種法による 抵抗性トマト系統の選抜

鈴木良地*・加藤政司・福田至朗・大藪哲也・坂 紀邦

愛知県農業総合試験場 480-1193 愛知県長久手市岩作三ヶ峯

Selection of Resistant Tomato Strains by Simple Inoculation Method Using *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* Infectious Clones

Ryoji Suzuki*, Masashi Kato, Shiro Fukuta, Tetsuya Oyabu and Norikuni Saka

Aichi Agricultural Research Center, Sagamine, Yazako, Nagakute, Aichi 480-1193

Abstract

Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), which causes tomato leaf curl disease, is transmitted by whiteflies. TYLCV tolerant/resistant tomato cultivars have been introduced as effective countermeasures against this serious disease. In the present study, TYLCV infectious clones of the Israel strain and Israel mild strain were used to conduct inoculation tests involving TYLCV tolerant/resistant tomato cultivars/strains, the course of disease symptoms was clarified, and changes in the viral DNA load were quantified using the loop-mediated isothermal amplification method. The inoculation method with infectious clones revealed symptoms and virus growth comparable to those of a conventional inoculation method using whitefly. The results demonstrated that the method could be used for screening tolerant/resistant strains.

Key Words : agroinoculation, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method, resistance evaluation

キーワード : アグロイノキュレーション, LAMP 法, 抵抗性評価

緒 言

Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) によって引き起こされるトマト黄化葉巻病は、世界的に最も重要なトマト病害の一つであり、罹病トマトでは葉の黄化、巻き、小型化、萎縮といった症状を呈し、著しい減収となる。TYLCV はタバココナジラミによって永続的に媒介・伝搬されるため、栽培現場では基本的な対策としてコナジラミの防除が行われている。また、TYLCV に対する抵抗性または耐病性に関しては、現在までに *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-3a*, *Ty-4*, *Ty-5* および *Ty-6* の抵抗性遺伝子が報告されている (Anbinder ら, 2009; Hanson ら, 2000; Hutton・Scott, 2014; Jira ら, 2007, 2009; Zamir ら, 1994)。国内ではこのうち *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3* および *Ty-3a* 遺伝子を導入した品種が耐病性品種として流通している (松永, 2015)。病徴やウイルス増殖の抑制などの TYLCV に対する抵抗性形質の発現は、抵抗性遺伝子の遺伝子型や組合せ、さらに TYLCV 系統によって異なる。従って、抵抗性形質を評価するためには、DNA マーカー検定だけでなく、TYLCV の接種試験を行い、抵抗性形質の発現を確認することが重要となる。また、現

在流通している TYLCV 耐病性品種は、ウイルスの増殖を完全に抑制するものではない (Lapidot ら, 2001)。従って、抵抗性形質は、病徴の発現だけでなく、ウイルス蓄積量も併せて評価する必要がある。

TYLCV は球体が2つ結合した双子型の形状を特徴とするジェミニウイルス科ベゴモウイルス属に分類され、約 2.8 kb の環状一本鎖の DNA ウイルスである。イスラエル系統 (TYLCV-IL) とイスラエルマイルド系統 (TYLCV-Mld) の2系統に大別され、さらに日本に分布する TYLCV は、配列差異により前者が長崎型と土佐型、後者が愛知型と静岡型に分けられている (Ueda ら, 2004, 2005)。

TYLCV はタバココナジラミを介してしかトマトに感染できないため、接種方法としては、タバココナジラミを感染トマトに吸汁させて TYLCV を保毒させ、さらに接種対象トマトとともに一定期間飼育して感染させる方法 (コナジラミ接種法) が一般的である。この方法は保毒虫の確保や管理に多大な労力が必要となうえ、接種圧が不均一になりやすい。このため、Yamaguchi ら (2013) は TYLCV 感染性クローンを組み込んだアグロバクテリウムを利用して、簡易かつ確実に TYLCV を接種する方法 (感染性クローン簡易接種法) を報告している。

本研究では、愛知県での栽培に適した TYLCV 抵抗性トマトを育成するため、愛知県内で発生が確認されている 2

2018年11月12日 受付. 2019年3月6日 受理.

* Corresponding author. E-mail: riyouji_3_suzuki@pref.aichi.lg.jp

系統のTYLCVについて感染性クローンを作出した。さらに感染性クローン簡易接種法を用いて既存品種および育成系統へ接種試験を行い、病徴およびloop-mediated isothermal amplification法(LAMP法)によりウイルス蓄積量を定量した。そして、感染性クローン簡易接種法が抵抗性系統の選抜に適用できることを明らかにした。

材料および方法

1. ウイルス DNA の抽出

2015年6月に愛知県愛西市で、2013年8月に愛知県豊川市で、それぞれ栽培施設内のトマト黄化葉巻病罹病葉を採集した。DNeasy Plant Mini Kit ((株)キアゲン)を用いて全DNAを抽出し、試験に用いるまで -80°C で保存した。TYLCV複製関連タンパク質遺伝子(CI)から設計したC1f(GTCCTGGATTGCAGAGGAAG)およびC1r(CTTCGACCTGGTATCCCCAA)でPCRを行い、CEQ8000(ベックマン・コールター(株))を用いて、得られた695 bpの配列をダイレクトシーケンス法により解読した。

2. 感染性クローンの作出

TYLCV-IL-長崎型およびTYLCV-Mld-愛知型について、既報のTYLCV感染性クローンの報告(Jinら, 2012; Uedara, 2004)に従って、遺伝子間領域(IR: intergenic region)を2つ持つ全長約4.5 kbのTYLCVクローンを作成した。第1表に感染性クローンの作出に用いたプライマー配列を、第1図に感染性クローンの合成の概略を示した。

TYLCV-IL-長崎型については、DNAポリメラーゼKOD-Plus(東洋紡(株))を用いて、プライマー1F/1RIsおよび2FIs/2RでPCRを行い、それぞれ長鎖(約2.7 kb)および短鎖(約1.8 kb)の増幅産物を得た(第1図A)。これらの配列をZero Blunt PCR Cloning Kit(サーモフィッシュサイエンティフィック(株))のpCR-Bluntベクターを用いて大腸菌DH5 α コンピテントセルにクローニングし、Pure Yield Plasmid Miniprep System(プロメガ(株))でプラスミドを精製した後、それぞれのプラスミドをNde IおよびpCR-Bluntベクター上のHind III認識部位で制限酵素処理した。電気泳動後に、ベクター約3.5 kbと長鎖を合わせた約6.2 kbの配列、および短鎖のみの約1.8 kbの配列を、それぞれGel Extraction Kit((株)キアゲン)を用いてゲルから精製した。両配列をLigation high Ver. 2(東洋紡(株))でライゲーションした後(第1図B)、再び大腸菌にクロー

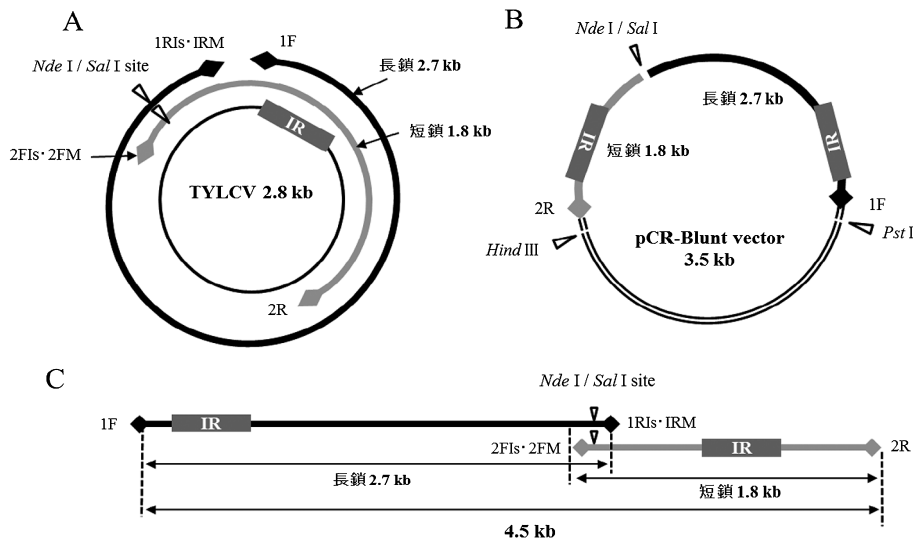
ニングし、プラスミドを精製した。ベクター上のPst IおよびHind III認識部位でプラスミドを制限酵素処理し、同様に処理したバイナリーベクターpRI101-AN(タカラバイオ(株))にライゲーションした後、大腸菌にクローニングし、約4.5 kbのTYLCV-IL-長崎型の感染性クローンpRI-ILを作出した。TYLCV-Mld-愛知型については、プライマー1F/1RMおよび2FM/2Rでそれぞれ長鎖(約2.7 kb)および短鎖(約1.8 kb)を増幅し、以後の手順はNde Iの代わりにSal Iで制限酵素処理した以外は、TYLCV-IL-長崎型と同様に行い、TYLCV-Mld-愛知型の感染性クローンpRI-Mldを作出した。その後、pRI-ILおよびpRI-Mldを導入した大腸菌プラスミドを精製し、ECM 600(BTX(株))を用いて、エレクトロポレーション法でアグロバクテリウム(EHA105)に導入し、接種に用いるまで -80°C で保存した。

3. 感染性クローン簡易接種法によるトマトへの接種

接種対象トマトは、感受性品種として‘ルネッサンス’、‘りんか409’、‘麗容’((株)サカタのタネ)、‘桃太郎ヨーク’ (タキイ種苗(株))および当場の育成系統「DP」を、耐病性品種として、‘TYみそら86’ (みかど協和(株))、‘アニモTY-12’ ((株)武蔵野種苗園, 朝日工業(株))および‘麗旬’ ((株)サカタのタネ)を用いた。また、当場で育成中の抵抗性系統「Mi-1」, 「Mi-2」, 「Mi-3」, 「Re-1」, 「Re-2」, 「Re-3」, 「Re-4」, 「Re-5」, 「Re-6」, 「Re-7」, 「Re-8」, 「Re-9」および「Re-10」も併せて用いた。なお、「Mi-1」から「Mi-3」および「Re-1」から「Re-10」は、それぞれ同一組合せの交配後代である。播種後3週目のトマト苗を最上位部から約10 cmで切断し、挿し穂を作成した。感染性クローンを用いたTYLCVの接種はYamaguchiら(2013)に準じて実施した。すなわち、感染性クローンを導入したアグロバクテリウムを解凍してLB培地を加え、 25°C で培養して増殖させた。培養液を遠心分離して菌体を回収し、接種用バッファー(10 mM MgCl₂, 10 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid, pH 5.2)でOD₆₀₀が1.0になるように希釈し、アセトシリゴン(終濃度200 μM , 富士フィルム和光純薬(株))を添加した。品種・系統ごとに挿し穂をパラフィルムでまとめ、底部をアグロバクテリウム懸濁液10 mLに5分間浸漬させた後、デシケーター内で -0.09 MPa で5分間減圧処理した。その後、バーミキュライトに挿し、培養管内で明期16時間、暗期8時間、 26°C から 28°C の条件下で10日間育苗して発根させ、50穴セルトレイに移してさらに7週

第1表 感染性クローンの作出に用いたプライマー配列

プライマー	配列 (5'-3')	
1F	AGATGTGGTTCCCCATTCTC	Forward (長鎖用)
1RIs	TCAGGCAGCTAAGAGCTCAA	Reverse (IL-長鎖用)
1RM	AGCGATTCTTCGACCTGGTA	Reverse (Mld-長鎖用)
2FIs	CCTCGGATTTACTGCCTGAA	Forward (IL-短鎖用)
2FM	TAAGCGTCATTGGCTGACTG	Forward (Mld-短鎖用)
2R	CTTCCGAATTTGGACGACAT	Reverse (短鎖用)



第1図 感染性クローン合成の概略

Aは環状一本鎖のTYLCV配列および各プライマーの増幅領域（長鎖，短鎖）を示す

Bはベクターに組み込んだTYLCVの長鎖および短鎖配列の配置を示す

CはTYLCVの長鎖および短鎖配列を制限酵素処理およびライゲーションして得られた全長約4.5 kbの合成配列を示す
制限酵素認識部位で一部が重なるように，約2.7 kbおよび約1.8 kbの配列を合成した

間育苗した。接種は‘麗旬’のみ4株，他は品種当たり各5株を用いた。

4. コナジラミ接種法

接種対象トマトは，感受性品種として‘麗容’および‘桃太郎ヨーク’を，耐病性品種・抵抗性系統として，‘アニモTY-12’，「Mi-3」および「Re-3」を用い，穴井ら（2005）の方法に準じて接種試験を行った。すなわち，当試験場で累代飼育しているタバココナジラミMED（バイオタイプQ）の成虫をTYLCV-IL-長崎型の感染トマトに24時間放飼し，TYLCVを保毒させた。これらを1株当たり10頭の割合で播種後2週目の接種対象トマトと同一ケージ内で1週間飼育した。その後，吸引ポンプおよび殺虫剤（ミルベメクチン乳剤1,500倍液，レピメクチン乳剤1,000倍液）を用いて，タバココナジラミを完全に除去した。保毒虫の放飼は，25°Cで0.4 mm目防虫ネットで被覆したケージ内で行い，接種後のトマト苗は，明期16時間，暗期8時間，26°Cから28°Cの条件下で50穴セルトレイで育苗管理した。接種は品種当たり5株を用いた。

5. 抵抗性の評価法

感染性クローン簡易接種法については，アグロバクテリウムの影響がなくなる接種後2週目から，またコナジラミ接種法については接種後1週目から，それぞれ1週間ごとに，接種後8週目までの病徴およびウイルス蓄積量を調査した。病徴は，Friedmannら（1998）に従って指標化した。すなわち，上位葉の病徴について，0（病徴なし），1（葉縁部が非常に軽く黄化），2（軽い黄化および葉巻），3（葉が小型化し，広く黄化および葉巻），4（生長が停止し，激しく黄化，葉巻，萎縮）とした。また，ウイルスは，福田ら（2005）のLAMP法による簡易ウイルス検出法を用い

て定量した。すなわち，最上位展開葉を磨砕し，重量比率で500倍量の100 mM Tris-HCl（pH 8.0）で希釈してウイルス試料とした。LAMPプライマー配列は第2表に示した。LAMP反応は，20 mM Tris-HCl（pH 8.8），10 mM KCl，10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，0.1% Tween 20，0.8 M betaine（富士フィルム和光純薬（株）），8 mM MgSO_4 ，1.6 mM dNTPs，0.2 μM F3およびB3プライマー，1.6 μM FIPおよびBIPプライマー，8 units *Bst* DNA polymerase（（株）ニッポンジーン），1 μL のウイルス試料を含む総量25 μL の反応液を調製し，65°Cで60分間行った。リアルタイム濁度計（LA 200，テラメックス（株））でモニタリングしながら，濁度が0.1に達した時間を計測した。また，TYLCV-IL-長崎型の感染葉から抽出した全DNAをTEバッファーで段階希釈してLAMP反応を行い， 10^8 倍希釈したときの反応時間を基準値として検量線を作成した。ウイルス蓄積量はこの基準値に対する相対濃度として算出した。

6. TYLCV 抵抗性遺伝子のDNA マーカー検定

接種対象トマトのDNAを，DNeasy Plant Mini Kitを用いて添付のプロトコルに従って抽出した。国内で流通している耐病性品種のTYLCV抵抗性遺伝子は*Ty-1*，*Ty-2*，*Ty-3*および*Ty-3a*の単独または2遺伝子の組合せであることから（松永，2015），これらの遺伝子型についてDNAマーカー検定を行った。DNAマーカーは，*Ty-1*遺伝子はAT-Ty（福田ら，2010）を，*Ty-2*遺伝子はT0302（Garciaら，2007）を，*Ty-3*および*Ty-3a*遺伝子はP6-25（Jiら，2007）を用いた。

結 果

1. TYLCV 抵抗性遺伝子のDNA マーカー検定

今回供試したトマト品種・系統からは，*Ty-1*，*Ty-2*およ

第2表 TYLCV 検出用の LAMP プライマー配列^z

プライマー	配列 (5'-3')
F3	AACGCCATTCTCTGCTTGA
B3	GAGCCACTGTTTCGAAGT
FIP	ACTACCTCCACCTCAACTGCAAGGAGCAGTGATGAGTTCCC
BIP	ATGAGCAGCCACAGTCTAGGTGGTCCAACACAAGATAGCCA

^z 福田ら (2005)

び Ty-3 遺伝子は検出されず、Ty-3a だけが検出された。耐病性品種・抵抗性系統のうち、'TY みそら 86'、'アニモ TY-12' および '麗旬' は Ty-3a ヘテロ、その他は Ty-3a ホモだった (第3表)。

2. TYLCV ウイルス系統の確立

採取したウイルス DNA の *CI* 遺伝子の部分配列を GenBank のデータベースと比較したところ、愛西市分離株は Accession No. AB110217 (TYLCV-IL-長崎型) と、豊川市分離株は No. AB116633 (TYLCV-Mld-愛知型) と、それぞれ相同性 98.7% および 98.8% で一致した。またマルチプレックス PCR (Ueda ら, 2005) でもそれぞれに特異的なバンドが生じたことから、TYLCV-IL-長崎型および TYLCV-Mld-愛知型の 2 系統のウイルス DNA を抽出したことを確認した。

3. 感染性クローン簡易接種法による病徴の推移

病徴の推移を第3表に示した。TYLCV-IL-長崎型では、接種3週目に感受性品種で病徴が現れはじめ、5週目以降はすべての感受性品種の病徴が最大値の4となった。TYLCV-Mld-愛知型は、4週目で病徴が観察され始めたが、その後の推移は最大でも2だった。なお、育成系統「Re-3」以外の耐病性品種・抵抗性系統については、TYLCV-IL-長崎型および TYLCV-Mld-愛知型ともに、5週目以降は病徴が認められなかった。「Re-3」については、TYLCV-IL-長崎型で7週目以降に病徴1が認められた。また、耐病性品種・抵抗性系統間で、Ty-3a 遺伝子型の違いと病徴に有意な差は見られなかった。

4. 感染性クローン簡易接種法によるウイルス蓄積量の推移

ウイルス蓄積量の推移を第4表に示した。TYLCV-IL-長崎型では、すべての感受性品種で3週目に急激なウイルス蓄積量の上昇が見られた。耐病性品種・抵抗性系統でも、3週目以降に比較的高濃度のウイルスが検出されたが、育成系統「Mi-2」は全期間を通じてウイルス蓄積量が極めて低かった。TYLCV-Mld-愛知型については、「りんか409」および「DP」を除いた感受性品種で3週目に急激にウイルス蓄積量が上昇した。耐病性品種・抵抗性系統では、品種系統間および個体差が大きかったが、3週目または4週目以降にウイルスの増殖が確認された。また、耐病性品種・抵抗性系統間で、Ty-3a 遺伝子型の違いとウイルス蓄積量に有意な差は見られなかった。

5. 感染性クローン簡易接種法およびコナジラミ接種法の比較

1) 感染率

LAMP 法によりウイルスが検出された株を陽性として感染率を算出し、第5表に感染性クローン簡易接種法およびコナジラミ接種法の感染率の推移を示した。感染性クローン簡易接種法では、感受性品種は接種3週目から、耐病性品種および抵抗性系統では接種3週目から6週目で感染率が100%になった。コナジラミ接種法では、感受性品種および耐病性品種が接種1週目から100%の感染率を示したが、抵抗性系統は接種5週目から7週目で感染率が100%になった。

2) 病徴

第2図に感染性クローン簡易接種法およびコナジラミ接種法による病徴の推移を示した。コナジラミ接種法は感染性クローン簡易接種法より1週間早い接種2週目から感受性品種で病徴が生じた。接種4週目以降は、接種法の違いによる差はなかった。

3) ウイルス蓄積量

第3図に感染性クローン簡易接種法およびコナジラミ接種法によるウイルス蓄積量の推移を示した。感染性クローン簡易接種法では、すべての品種・系統で接種3週目にウイルス蓄積量が上昇した。コナジラミ接種法では、すべての品種・系統で接種1週目からウイルスが検出された。また、接種3週目以降は、接種法の違いによる差はなかった。

考 察

接種圧をコントロールすることが困難なコナジラミ接種法に代わる TYLCV 接種技術として、感染性クローンによる接種法が開発されている (Al Abdallat ら, 2010; Picó ら, 2001)。しかし、シリンジを使ったアグロイノキュレーション法では、感染率は100%ではなかった (Picó ら, 2001)。それに対して、Yamaguchi ら (2013) の感染性クローン簡易接種法は、トマトの挿し穂をアグロバクテリアの菌液に浸漬させ、さらに減圧処理を行うことで、100%のウイルス感染率を示した。コナジラミ接種法では、接種圧、植物体の状態および栽培環境が発現する病徴の程度に大きく影響するが (Lapidot ら, 2000)、この簡易接種法は接種圧が均一で、接種後はセルトレイで一律管理することでウイルスの感染時期を完全に揃えることができるた

第3表 感染性クローン簡易接種法による病徴の推移

品種・系統名	TYLCV-II-長崎型 ^z								TYLCV-Mid-愛知型 ^z								DNA マーカー検定 ^y	
	2週	3週	4週	5週	6週	7週	8週	2週	3週	4週	5週	6週	7週	8週				
感受性品種																		
ルネッサンス	0	0	0	3 a	4 a	4 a	4 a	4 a	0	0	1	1	1	1	1	1	ty-3/ty-3	(感受性)
りんか409	0	0	0	2	4 a	4 a	4 a	4 a	0	0	0	0	0	0	2	2	ty-3/ty-3	(感受性)
麗容	0	1	3 a	4 a	4 a	4 a	4 a	4 a	0	0	1	1	1	0	0	0	ty-3/ty-3	(感受性)
桃太郎ヨーク	0	2	4 a	4 a	4 a	4 a	4 a	4 a	0	0	0	1	2	1	1	1	ty-3/ty-3	(感受性)
DP	0	0	4 a	4 a	4 a	4 a	4 a	4 a	0	0	1	1	1	1	1	1	ty-3/ty-3	(感受性)
耐病性品種・抵抗性系統																		
TYみそら86	0	0	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0	0	1	0	0	0	0	0	Ty-3a/ty-3	(抵抗性ヘテロ)
アニモTY-12	0	0	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0	0	0	0	0	0	0	0	Ty-3a/ty-3	(抵抗性ヘテロ)
麗旬	0	0	1 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0	0	1	0	0	0	0	0	Ty-3a/ty-3	(抵抗性ヘテロ)
Mi-1	0	0	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0	0	1	0	0	0	0	0	Ty-3a/Ty-3a	(抵抗性ホモ)
Mi-2	0	0	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0	0	0	0	0	0	0	0	Ty-3a/Ty-3a	(抵抗性ホモ)
Mi-3	0	0	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0	0	0	0	0	0	0	0	Ty-3a/Ty-3a	(抵抗性ホモ)
Re-1	0	0	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0	0	1	0	0	0	0	0	Ty-3a/Ty-3a	(抵抗性ホモ)
Re-2	0	0	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0	0	0	0	0	0	0	0	Ty-3a/Ty-3a	(抵抗性ホモ)
Re-3	0	0	0 b	0 b	0 b	0 b	1 b	1 b	0	0	1	0	0	0	0	0	Ty-3a/Ty-3a	(抵抗性ホモ)
Re-4	nt ^x	nt	nt	0 b	0 b	0 b	nt	nt	nt	nt	nt	0	0	nt	nt	nt	Ty-3a/Ty-3a	(抵抗性ホモ)
Re-5	nt	nt	nt	0 b	0 b	0 b	nt	nt	nt	nt	nt	0	0	nt	nt	nt	Ty-3a/Ty-3a	(抵抗性ホモ)
Re-6	nt	nt	nt	0 b	0 b	0 b	nt	nt	nt	nt	nt	0	0	nt	nt	nt	Ty-3a/Ty-3a	(抵抗性ホモ)
Re-7	nt	nt	nt	0 b	0 b	0 b	nt	nt	nt	nt	nt	0	0	nt	nt	nt	Ty-3a/Ty-3a	(抵抗性ホモ)
Re-8	nt	nt	nt	0 b	0 b	0 b	nt	nt	nt	nt	nt	0	0	nt	nt	nt	Ty-3a/Ty-3a	(抵抗性ホモ)
Re-9	nt	nt	nt	0 b	0 b	0 b	nt	nt	nt	nt	nt	0	0	nt	nt	nt	Ty-3a/Ty-3a	(抵抗性ホモ)
Re-10	nt	nt	nt	0 b	0 b	0 b	nt	nt	nt	nt	nt	0	0	nt	nt	nt	Ty-3a/Ty-3a	(抵抗性ホモ)

^z 表中の値は平均値を、アルファベットは異符号間で有意差を示す (Tukey-Kramer法, p<0.05)

^y Ty-3aの検定は, Jiら (2007) のDNA マーカー P6-25を用いた

^x nt = not tested

第4表 感染性クロロソーン簡易接種法によるウイルス蓄積量の推移

品種・系統名	TYLCV-JL-長崎型 ^z										TYLCV-Mid-愛知型 ^z																	
	2週	3週	4週	5週	6週	7週	8週	2週	3週	4週	5週	6週	7週	8週	2週	3週	4週	5週	6週	7週	8週							
感受性品種																												
ルネッサンス	1.E+02	9.E+05	1.E+07 a	4.E+06 a	4.E+06	7.E+05	4.E+05	8.E-01	4.E+05	2.E+05	4.E+05	1.E+05	4.E+05	2.E+06	1.E+02	9.E+05	1.E+07 a	4.E+06 a	4.E+06	7.E+05	4.E+05	8.E-01	4.E+05	2.E+05	4.E+05	1.E+05	4.E+05	2.E+06
りんか409	0.E+00	7.E+05	2.E+05	7.E+04	1.E+06	2.E+06 a	1.E+06	3.E+02	0.E+00	1.E+00	1.E+06	1.E+06	3.E+02	0.E+00	0.E+00	7.E+05	2.E+05	7.E+04	1.E+06	2.E+06 a	1.E+06	3.E+02	0.E+00	1.E+00	1.E+06	1.E+06	3.E+02	0.E+00
麗容	1.E+01	1.E+05	2.E+05	3.E+05	6.E+05	4.E+05	3.E+05	1.E+00	3.E+05	8.E+05	3.E+05	1.E+05	1.E+00	3.E+05	1.E+01	1.E+05	2.E+05	3.E+05	6.E+05	4.E+05	3.E+05	1.E+00	3.E+05	8.E+05	3.E+05	1.E+05	1.E+00	3.E+05
桃太郎ヨーク	2.E+01	1.E+05	3.E+05	4.E+05	2.E+06	9.E+05	1.E+06	1.E+00	5.E+04	3.E+05	1.E+06	1.E+06	1.E+00	5.E+04	2.E+01	1.E+05	3.E+05	4.E+05	2.E+06	9.E+05	1.E+06	1.E+00	5.E+04	3.E+05	1.E+06	1.E+06	1.E+00	5.E+04
DP	6.E+02	3.E+04	5.E+05	5.E+05	4.E+05	1.E+05	3.E+05	0.E+00	1.E+01	8.E+05	3.E+05	8.E+05	0.E+00	1.E+01	6.E+02	3.E+04	5.E+05	5.E+05	4.E+05	1.E+05	3.E+05	0.E+00	1.E+01	8.E+05	3.E+05	8.E+05	0.E+00	1.E+01
耐病性品種・抵抗性系統																												
TYみそら86	0.E+00	1.E+00	2.E+03 b	6.E+02 b	3.E+02	5.E+02 b	5.E+03	0.E+00	0.E+00	1.E+04	1.E+04	4.E+03	0.E+00	0.E+00	0.E+00	1.E+00	2.E+03 b	6.E+02 b	3.E+02	5.E+02 b	5.E+03	0.E+00	0.E+00	1.E+04	1.E+04	4.E+03	0.E+00	0.E+00
アニモTY-12	1.E+00	2.E+03	2.E+03 b	4.E+03 b	1.E+04	3.E+04 b	1.E+04	6.E+00	1.E+00	1.E+04	1.E+04	1.E+04	1.E+00	1.E+00	1.E+00	2.E+03	2.E+03 b	4.E+03 b	1.E+04	3.E+04 b	1.E+04	6.E+00	1.E+00	1.E+04	1.E+04	1.E+04	1.E+00	1.E+00
麗旬	0.E+00	0.E+00	7.E+02 b	4.E+03 b	6.E+03	5.E+04 b	1.E+04	0.E+00	1.E+01	5.E+04 b	1.E+04	1.E+04	0.E+00	0.E+00	0.E+00	0.E+00	7.E+02 b	4.E+03 b	6.E+03	5.E+04 b	1.E+04	0.E+00	1.E+01	5.E+04 b	1.E+04	1.E+04	0.E+00	0.E+00
Mi-1	0.E+00	0.E+00	6.E+02 b	2.E+02 b	2.E+01	3.E+03 b	4.E+03	1.E+00	0.E+00	3.E+03 b	4.E+03	4.E+03	1.E+00	0.E+00	0.E+00	0.E+00	6.E+02 b	2.E+02 b	2.E+01	3.E+03 b	4.E+03	1.E+00	0.E+00	3.E+03 b	4.E+03	4.E+03	1.E+00	0.E+00
Mi-2	0.E+00	0.E+00	0.E+00 b	0.E+00 b	1.E+00	0.E+00 b	0.E+00	0.E+00	0.E+00	0.E+00	0.E+00	0.E+00	0.E+00	0.E+00	0.E+00	0.E+00	0.E+00 b	0.E+00 b	1.E+00	0.E+00 b	0.E+00	0.E+00	0.E+00	0.E+00	0.E+00	0.E+00	0.E+00	0.E+00
Mi-3	0.E+00	1.E+03	2.E+03 b	3.E+03 b	2.E+03	4.E+03 b	2.E+04	1.E+00	1.E+03	4.E+03 b	2.E+04	2.E+04	1.E+00	1.E+03	0.E+00	1.E+03	2.E+03 b	3.E+03 b	2.E+03	4.E+03 b	2.E+04	1.E+00	1.E+03	4.E+03 b	2.E+04	2.E+04	1.E+00	1.E+03
Re-1	1.E+01	4.E+01	1.E+02 b	4.E+01 b	1.E+01	1.E+02 b	2.E+02	8.E+00	0.E+00	1.E+02 b	2.E+02	2.E+02	1.E+00	1.E+03	4.E+01	4.E+01	1.E+02 b	4.E+01 b	1.E+01	1.E+02 b	2.E+02	8.E+00	0.E+00	1.E+02 b	2.E+02	2.E+02	1.E+00	1.E+03
Re-2	0.E+00	0.E+00	5.E+01 b	8.E+01 b	2.E+02	1.E+03 b	3.E+02	2.E+00	0.E+00	1.E+03 b	3.E+02	3.E+02	0.E+00	0.E+00	0.E+00	0.E+00	5.E+01 b	8.E+01 b	2.E+02	1.E+03 b	3.E+02	2.E+00	0.E+00	1.E+03 b	3.E+02	3.E+02	0.E+00	0.E+00
Re-3	1.E+00	7.E+02	9.E+02 b	8.E+02 b	8.E+03	1.E+04 b	2.E+04	1.E+00	1.E+00	1.E+04 b	2.E+04	2.E+04	1.E+00	1.E+00	1.E+00	7.E+02	9.E+02 b	8.E+02 b	8.E+03	1.E+04 b	2.E+04	1.E+00	1.E+00	1.E+04 b	2.E+04	2.E+04	1.E+00	1.E+00
Re-4	nt ^y	nt	nt	4.E+03 b	2.E+02	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt ^y	nt	nt	4.E+03 b	2.E+02	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Re-5	nt	nt	nt	7.E+03 b	9.E+02	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	7.E+03 b	9.E+02	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Re-6	nt	nt	nt	4.E+03 b	2.E+03	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	4.E+03 b	2.E+03	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Re-7	nt	nt	nt	4.E+03 b	5.E+03	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	4.E+03 b	5.E+03	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Re-8	nt	nt	nt	2.E+04 b	8.E+04	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	2.E+04 b	8.E+04	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Re-9	nt	nt	nt	2.E+04 b	2.E+03	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	2.E+04 b	2.E+03	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Re-10	nt	nt	nt	4.E+03 b	1.E+03	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	4.E+03 b	1.E+03	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt

^z表中の値は平均値を、アルファベットは異符号間で有意差を示す (Tukey-Kramer 法, $p < 0.05$)^y nt = not tested

第5表 感染性クロン簡易接種法およびコナジラミ接種法の感染率の比較

感染性クロン簡易接種法

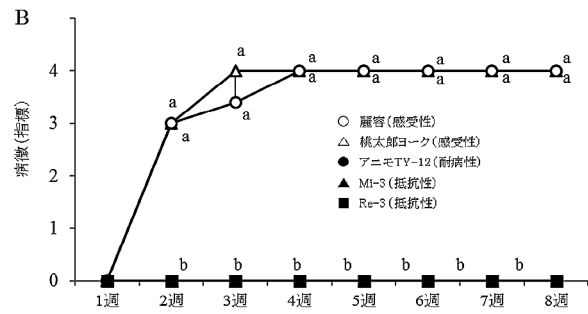
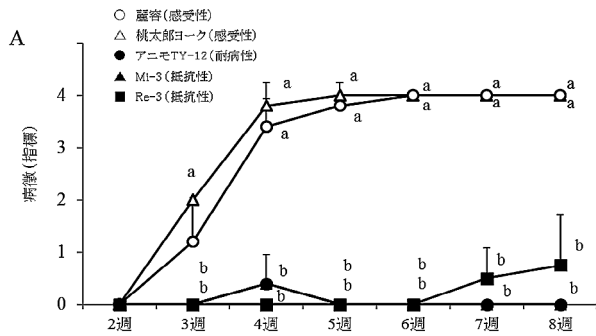
	1週	2週	3週	4週	5週	6週	7週	8週
麗容 (感受性)	nt ^z	40 (2/5) ^y	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)
桃太郎ヨーク (感受性)	nt	60 (3/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)
アニモ TY-12 (耐病性)	nt	60 (3/5)	60 (3/5)	60 (3/5)	40 (2/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)
Mi-3 (抵抗性)	nt	20 (1/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)
Re-3 (抵抗性)	nt	0 (0/5)	60 (3/5)	80 (4/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)

コナジラミ接種法

	1週	2週	3週	4週	5週	6週	7週	8週
麗容 (感受性)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)
桃太郎ヨーク (感受性)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)
アニモ TY-12 (耐病性)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)
Mi-3 (抵抗性)	80 (4/5)	80 (4/5)	80 (4/5)	80 (4/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)
Re-3 (抵抗性)	60 (3/5)	60 (3/5)	80 (4/5)	80 (4/5)	60 (3/5)	80 (4/5)	100 (5/5)	100 (5/5)

^z nt = not tested

^y LAMP 法により TYLCV が検出された割合 (%) を示す 括弧内は陽性株数 / 供試株数

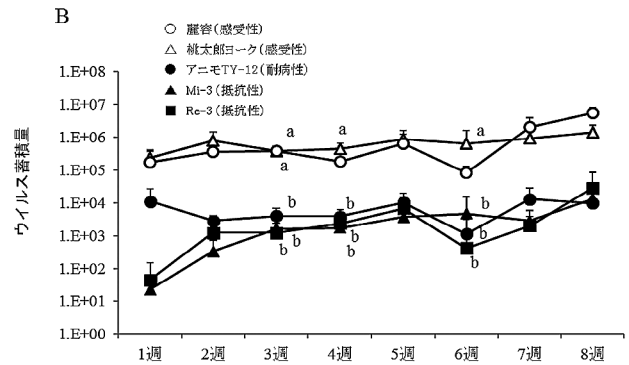
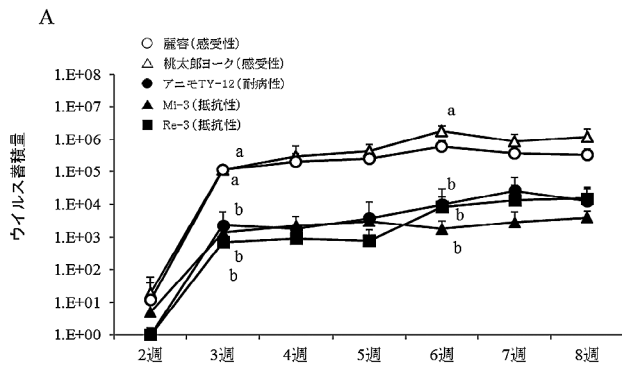


第2図 病徴の推移の比較

A : 感染性クロン簡易接種法, B : コナジラミ接種法

TYLCV-IL-長崎型を接種後の病徴指標の平均値を示す (エラーバーは標準誤差)

異なる符号間で5%有意差あり (Tukey-Kramer法)



第3図 ウイルス蓄積量の推移の比較

A : 感染性クロン簡易接種法, B : コナジラミ接種法

TYLCV-IL-長崎型を接種後のウイルス蓄積量の平均値を示す (エラーバーは標準誤差)

異なる符号間で5%有意差あり (Tukey-Kramer法)

め、トマトの品種・系統間の抵抗性を詳細に評価できると考えられる。本研究でも、供試した感受性品種のすべての個体から TYLCV が検出されており、感染性クローン簡易接種法は高い感染率を示す方法であることを確認できた。なお、本研究は、この簡易接種法を用いて TYLCV-IL-長崎型および TYLCV-Mld-愛知型の病徴およびウイルス蓄積量の推移を明らかにした最初の報告である。

本研究では、ウイルスの定量をリアルタイム PCR 法ではなく、LAMP 法で行った。LAMP 法は PCR 法とは異なり、DNA 増幅阻害の影響を受けにくい *Bst* DNA polymerase を使用しているため、必ずしも精製 DNA を必要とせず、単純に葉を磨碎してバッファで希釈しただけでも十分に DNA を検出できる (Fukuta ら, 2013)。また、検出感度が高く、反応時間が 1 時間程度と早いことも LAMP 法の特徴である。これによって、試料の調製から結果の判定まで PCR 法よりも省力かつ短時間で実施できることから、大量の検体を分析することができる。これまでもコナジラミを用いた接種試験および野外試料において、LAMP 法による TYLCV の感染確認およびウイルスの定量が行われているが (穴井ら, 2005; 加藤ら, 2007)、本研究では、さらに感染性クローン簡易接種法でも、LAMP 法によるウイルス定量が可能であることが明らかとなった。

感染性クローン簡易接種法では、感受性品種の病徴が TYLCV-IL 系統で激しく、また耐病性品種・抵抗性系統では両ウイルス系統ともに明確な病徴は現れなかった。一方で、ウイルス蓄積量は、ウイルスの系統を問わず、耐病性品種・抵抗性系統の多くでウイルス増殖が確認された。Yamaguchi ら (2013) は、TYLCV-Mld 系統の感染性クローンをを用いた接種試験で、耐病性品種では病徴がほとんど生じないか、または消失した後でも、ウイルスが増殖し続けることを報告している。これについては、TYLCV 耐病性品種ではウイルスは増殖するが病徴は生じない事実と一致している。しかし、当場で育成した「Mi-2」は、同一組合せの交配後代である「Mi-1」および「Mi-3」と比較して、TYLCV の 2 系統に対して接種期間中のウイルス蓄積量が極めて低かった。本研究では、国内で流通している耐病性品種に導入されている TYLCV 抵抗性遺伝子 *Ty-1*、*Ty-2*、*Ty-3* および *Ty-3a* の検定を行い、「Mi-2」はこのうち *Ty-3a* をホモで持つことが明らかとなっている。しかし、TYLCV 抵抗性はこれらの遺伝子以外にも複数の質的・量的遺伝子が関与しており、同一の交配後代といえども遺伝的には多様であると考えられる。今後、多くの個体の抵抗性形質と遺伝子型を調査するとともに、*Ty-3a* 以外の抵抗性遺伝子についても検定する必要がある。なお、本研究では *Ty-3a* ヘテロまたはホモの品種・系統間で病徴およびウイルス蓄積量に差が認められなかったことから、*Ty-3a* 遺伝子が完全優性である可能性が示唆された。感染性クローン接種法に関しては、自然環境下における抵抗性を打破する可能性があり、抵抗性系統のスクリーニングには不向き、または

コナジラミ接種法を補完するに過ぎないとの指摘がある (Kheyr-Pour ら, 1994; Picó ら, 2001)。しかし、本研究では、感染性クローン簡易接種法とコナジラミ接種法の比較を行い、接種 4 週日以降の病徴およびウイルス蓄積量に差がないことが確認できた。このことから、感染性クローン簡易接種法はコナジラミ接種法に代替可能であり、抵抗性系統のスクリーニングに活用できると考えられた。なお、本研究のコナジラミ接種法では、接種 2 週目で病徴が確認され、コナジラミ接種法の病徴発現が接種 2~3 週間とされていることと一致した (Friedmann ら, 1998)。

感染性クローンは法令に基づいて厳重に管理する必要があり、また、接種後の植物体はオートクレーブなどで不活化処理を行わなければならないという制約はある。しかし、感染性クローン簡易接種法は、コナジラミ接種法よりも省力的で、均一な接種を可能とする優れた方法である。本研究では、愛知県に分布する TYLCV の感染性クローンを作出し、簡易接種法でもコナジラミ接種法と同等の病徴発現とウイルス増殖を確認した。また、LAMP 法により、感染性クローンを接種した耐病性品種・抵抗性系統のウイルス蓄積量を詳細に評価した。今後、これらの技術を活用することで、TYLCV 抵抗性育種を加速化できると考えられる。

摘 要

Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) はコナジラミによって媒介され、トマト黄化葉巻病を引き起こす。この甚大な病害の効果的な対策として、TYLCV 耐病性のトマト品種が導入されている。本研究では、イスラエル系統およびイスラエルマイルド系統の TYLCV 感染性クローンをを用いた接種試験により、耐病性および抵抗性を有するトマト品種・系統について、病徴および loop-mediated isothermal amplification 法により定量したウイルス蓄積量の推移を明らかにした。その結果、感染性クローンによる接種法は従来のコナジラミ接種法と同等の病徴およびウイルス増殖を示し、耐病性および抵抗性系統のスクリーニングに活用できることが明らかとなった。

引用文献

- Al Abdallat, A. M., H. S. Al Debei, H. Asmar, S. Misbeh, A. Quraan and A. Kvarnheden. 2010. An efficient *in vitro*-inoculation method for *Tomato yellow leaf curl virus*. *Virology Journal* 7: 84. DOI: 10.1186/1743-422X-7-84. <<http://www.virology.com/conrent/7/1/84>>.
- 穴井尚子・中坊昌也・加藤晋朗・福田至朗・深谷雅博・矢部和則. 2005. トマト黄化葉巻ウイルス (TYLCV) 接種条件の検討と愛知県での発生ウイルス系統に対する海外育成抵抗性品種の抵抗性検定. 関西病虫研報. 47: 99-101.
- Anbinder, I., M. Reuveni, R. Azari, I. Paran, S. Nahon, H.

- Shlomo, L. Chen, M. Lapidot and I. Levin. 2009. Molecular dissection of *Tomato leaf curl virus* resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *Theor. Appl. Genet.* 119: 519–530.
- Friedmann, M., M. Lapidot, S. Cohen and M. Pilowsky. 1998. A novel source of resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* exhibiting a symptomless reaction to viral infection. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123: 1004–1007.
- 福田至朗・穴井尚子・加藤政司・吉村幸江・深谷雅博・矢部和則・大矢俊夫・神戸三智雄. 2005. 簡易な鋳型調整による loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を用いたトマト黄化葉巻ウイルスの検出. *関西病虫研報.* 47: 37–41.
- Fukuta, S., M. Tamura, H. Maejima, R. Takahashi, S. Kuwayama, T. Tsuji, T. Yoshida, K. Itoh, H. Hashizume, Y. Nakajima, Y. Uehara and Y. Sirako. 2013. Differential detection of *Wheat yellow mosaic virus*, *Japanese soil-borne wheat mosaic virus* and *Chinese wheat mosaic virus* by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification reaction. *J. Virol. Methods* 1089: 348–354.
- 福田至朗・吉川友紀・田中哲司・加藤政司・山田真人. 2010. 「Athyla」由来のトマト黄化葉巻病抵抗性遺伝子 *Ty-1* に連鎖する共優性 DNA マーカーの開発. *愛知農総試研報.* 42: 7–13.
- Garcia, B. E., E. Graham, K. S. Jensen, P. Hanson, L. Mejía and D. P. Maxwell. 2007. Co-dominant SCAR marker for detection of the begomovirus-resistance *Ty-2* locus derived from *Solanum habrochaites* in tomato germplasm. *Tomato Genetic Cooperative Report* 57: 21–24.
- Hanson, P. M., D. Bernacchi, S. Green, S. D. Tanksley, V. Muniyappa, A. S. Padmaja, H. Chen, G. Kuo, D. Fang and J. Chen. 2000. Mapping a wild tomato introgression associated with *Tomato yellow leaf curl virus* resistance in a cultivated tomato line. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125: 15–20.
- Hutton, S. F. and J. W. Scott. 2014. *Ty-6*, a major begomovirus resistance gene located on chromosome 10. *Tomato Genetic Cooperative Report* 64: 14–18.
- Ji, Y., M. S. Salus, B. van Betteray, J. Smeets, K. S. Jensen, C. T. Martin, L. Mejía, J. W. Scott, M. J. Havey and D. P. Maxwell. 2007. Co-dominant SCAR markers for detection of the *Ty-3* and *Ty-3a* loci from *Solanum chilense* at 25 cM of chromosome 6 of tomato. *Tomato Genetic Cooperative Report* 57: 25–28.
- Ji, Y., J. W. Scott, D. J. Schuster and D. P. Maxwell. 2009. Molecular mapping of *Ty-4*, a new *Tomato yellow leaf curl virus* resistance locus on chromosome 3 of tomato. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 134: 281–288.
- Jin, F. M., J. Xue, Z. Q. Liu and J. J. Wang. 2012. The infectious clone construction of *Tomato yellow leaf curl virus* isolate from Tianjin. *Asian J. Plant Sci.* 11: 246–250.
- 加藤政司・大藪哲也・福田至朗・穴井尚子・矢部和則. 2007. LAMP 法による幼苗検定法を利用した黄化葉巻病抵抗性トマト系統の育成. *園学研.* 6: 335–340.
- Kheyr-Pour, A., B. Gronenborn and H. Czosnek. 1994. Agroinoculation of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) overcomes the virus resistance of wild *Lycopersicon* species. *Plant Breed.* 112: 228–233.
- Lapidot, M., M. Friedmann, M. Pilowsky, R. Ben-Joseph and S. Chen. 2001. Effect of host plant resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) on virus acquisition and transmission by its whitefly vector. *Phytopathology* 91: 1209–1213.
- Lapidot, M., O. Goldray, R. Ben-Joseph, S. Cohen, M. Friedmann, A. Shlomo, S. Nahon, L. Chen and M. Pilowsky. 2000. Breeding tomatoes for resistance to tomato yellow leaf curl begomovirus. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 30: 317–321.
- 松永 啓. 2015. 果菜類における病虫害抵抗性育種の現状と展望. *植物防疫.* 69: 334–341.
- Picó, B., M. Ferriol, M. J. Díez and F. N. Viñals. 2001. Agroinoculation methods to screen wild *Lycopersicon* for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*. *J. Plant Pathol.* 83: 215–220.
- Ueda, S., T. Kimura, M. Onuki, K. Hanada and T. Iwanami. 2004. Three distinct groups of isolates of *Tomato yellow leaf curl virus* in Japan and construction of an infectious clone. *J. Gen. Plant Pathol.* 70: 232–238.
- Ueda, S., S. Takeuchi, M. Okabayashi, K. Hanada, K. Tomimura and T. Iwanami. 2005. Evidence of a new *Tomato yellow leaf curl virus* in Japan and its detection using PCR. *J. Gen. Plant Pathol.* 71: 319–325.
- Yamaguchi, H., J. Ohnishi, K. Miyatake, T. Nunome, A. Ohyama, S. Negoro and H. Fukuoka. 2013. A simple, efficient agroinoculation soaking procedure for *Tomato yellow leaf curl virus*. *J. Gen. Plant Pathol.* 79: 243–248.
- Zamir, D., I. Ekstein-Michelson, Y. Zakay, N. Navot, M. Zeidan., M. Sarfatti, Y. Eshed, E. Harel, T. Pleban, H. van-Oss, N. Kedar, H. D. Rabinowitch and H. Czosnek. 1994. Mapping and introgression of a *Tomato yellow leaf curl virus* tolerance gene, *TY-1*. *Theor. Appl. Genet.* 88: 141–146.