

トマト黄化葉巻病の幼苗を用いた抵抗性検定

穴井尚子*・中坊昌也**・加藤政司*・福田至朗***・矢部和則*・深谷雅博***

摘要：幼苗を用いたトマト黄化葉巻病の抵抗性検定法開発のためのTYLCV接種条件を検討した。

キャベツで累代飼育したシルバーリーフコナジラミをTYLCV感染トマトと同一ケージ内に7日間入れ保毒化させた。次にそのケージ内に検定用のトマト苗を7日間入れて接種を行う。接種終了10日後にLAMP法によりウイルス濃度を測定するとともに、接種終了30日後に病徴観察を行うことで、抵抗性検定が可能になることが明らかとなった。

キーワード：トマト、トマト黄化葉巻ウイルス、接種方法、シルバーリーフコナジラミ、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法

Seedling Inoculated to Tomato with TYLCV

ANAI Naoko, NAKABO Masaya, KATO Masashi, FUKUTA Siro,
YABE Kazunori and FUKAYA Masahiro

Abstract: In order to development of the test for resistance to tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) used seedling, we investigated inoculation conditions of TYLCV.

TYLCV tomato and silverleaf whitefly of rearing for successive generations by cabbage put in a cage in 7 days, and test plants into the cage in 7 days, and detect virus density by LAMP method 10 days after, and examine lesion 30 days after. We can select resistance one.

Key Words: Tomato, Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) , Inoculation method, Silverleaf whitefly, LAMP method

本研究は「先端技術を活用した農林水産研究高度化事業」により実施した。

*園芸研究部 **環境基盤研究部(現豊田加茂農林水産事務所) ***環境基盤研究部

(2006.9.11 受理)

緒言

トマト黄化葉巻病は、トマト黄化葉巻ウイルス *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) によって引き起こされる病害で、感染したトマトは生育が低下し、収量が減少するため重要病害の一つとなっている¹⁻³⁾。本病は、近年、西日本を中心としたトマト産地に発生が拡大している。愛知県では、長崎県及び静岡県とともに平成8年から発生し⁴⁾、現在では県内のほとんどのトマト産地で発生している。

防除対策としては、防虫ネット利用や罹病株の早期除去、粒剤及び茎葉処理剤の利用等、媒介虫であるシルバーリーフコナジラミの防除を中心に行われている。しかし、シルバーリーフコナジラミは体長が1mm以下と微小であること、TYLCV媒介能力が高いことなどから、完全に防除することが難しい。そのため、トマト黄化葉巻病抵抗性品種の開発が期待されている。現在では、海外を中心にいくつかの抵抗性品種が育成されているが、いずれも加工用トマトの品種であり、日本人の嗜好にあった抵抗性品種の開発が強く望まれている。抵抗性品種の育成には、TYLCVの接種による選抜が有効であり、多検体に対して効率的に接種する方法の開発が必要である。

そこで、本試験では、トマトのTYLCV抵抗性品種の育成を前提に、多くの個体を効率よく接種できる幼苗検定法を開発するため、TYLCV接種条件を検討した。

材料及び方法

シルバーリーフコナジラミの飼育及び保毒虫の育成

シルバーリーフコナジラミは、場内ハウスで栽培しているナスより採取したものをを用いた。シルバーリーフコナジラミの飼育には、キャベツ品種「おきな」を、保毒虫の育成にはトマト品種「ハウス桃太郎」を供試した。飼育は、25℃の温度設定で、4,000lxの照明による16時間明期と8時間暗期の光周期とした陽光定温器内で行った。無毒のシルバーリーフコナジラミは、アクリルケージ(外径15cm×高さ20cm)内で1ヶ月ごとに宿主のキャベツを更新しながら累代飼育した。シルバーリーフコナジラミにTYLCVを保毒させるため、ウイルスが感染したトマトを入れたアクリルケージ内に、無毒の成虫を放飼した。その後保毒した成虫を接種試験に供試した。接種処理後の成虫は、吸虫管で回収し、殺虫した。また接種株にはクロチアニジン粒剤(1g/株)を施用後、ジノテフラン水溶剤3000倍を散布し、残存するシルバーリーフコナジラミを除去した。

試験1 シルバーリーフコナジラミの獲得吸汁期間と保毒虫率

シルバーリーフコナジラミを保毒させるため、TYLCVが感染したトマトへの放飼期間を検討した。試験は、Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法⁵⁾でTYLCVの感染を確認した本葉1.5葉期のトマト10株を用

いた。各株を直径10cmのポットに植え、それにアクリルケージ(外径8.5cm×高さ10cm)を被せ、その中に無毒の成虫15頭/株を放飼した。放飼開始から1、3、5、8日及び11日後に、各株から成虫を1~2頭ずつ吸虫管で回収した。同様の試験を2回行った。TYLCVの保毒虫率は、各株の上位葉を用いたLAMP法で調査した。

試験2 接種期間と感染判定時期

TYLCV保毒シルバーリーフコナジラミを無毒のトマト苗に放飼し、接種期間と感染率について検討した。試験は、1日区と2日区ではトマトを1回につき10株、7日区では5株を供試してそれぞれ3回実施した。

トマトを、直径10cmのポットに播種し、子葉が展開した後、株ごとにアクリルケージ(外径8.5cm×高さ10cm)を被せ、その中にウイルスが感染したトマトで1日以上吸汁保毒させた成虫10頭/株を、1日、2日及び7日間放飼した。接種期間の温度は、1日区と2日区では接種期間中25℃、その後20℃に1日置き、以降25℃で管理した。7日区は全期間25℃で管理した。TYLCVの感染は、病徴の観察及び各株の上位葉を用いたLAMP法で調査した。

試験3 TYLCV抵抗性品種のリアルタイムLAMP法を用いた検定

TYLCV抵抗性品種として「ATHYLA」、「TY-75」、「ToviKing」及び罹病性品種として「ハウス桃太郎」を供試した。

トマトは、直径10cmのポットに播種し、子葉が展開した株を供試した。ポリエステルゴースを張ったケージ(縦60cm×横36cm×高さ50cm)を2区設け、各品種7株ずつ計28株入れ、5日以上吸汁保毒させた成虫を10頭/株となるよう計280頭ずつ放飼し、1週間吸汁させた。

接種終了後10日目に、各株の上位葉を用い、リアルタイムLAMP法で濁度0.1に達する時間を測定した。測定時には、TYLCV認識配列を持った既知濃度のプラスミドを標準ウイルス液として用い、各株のウイルス濃度を推測した。

試験4 集団接種での感染源の株元切断

感染源のトマト及びキャベツを株元から切断する区と、切断しない区を設定した。試験はセルトレイ(128穴セルトレイを半載したもの)で育苗中の1葉期の「ハウス桃太郎」の苗を各区64株で2回行った。

ゴースを張ったケージ(縦60cm×横36cm×高さ50cm)内に、あらかじめ用意しておいたTYLCVに感染した5葉期のトマト1株と、1ヶ月間シルバーリーフコナジラミを飼育し、約400頭の成虫が寄生した5葉期のキャベツ2株を入れ、1週間置いて獲得吸汁させた。その後、切断区は感染源のトマト及びキャベツを株元から切断した。切断する区、切断しない区とも、感染源のトマト及びキャベツはそのままケージ内に残した。その後、両区ともケージ内にセルトレイで育苗中の検定用のトマト苗を入れ、1週間接種を行った。接種終了直後に感染源のトマト及びキャベツは除去した。接種終了後21日目に、病徴観察及び各株の上位葉をLAMP法で調査した。

試験結果

試験1 シルバーリーフコナジラミの獲得吸汁期間と保毒虫率

獲得吸汁期間1日で平均60%の保毒率を示した。さらに獲得吸汁期間が長くなるほど、シルバーリーフコナジラミの保毒虫率は高くなり、獲得吸汁期間5日で平均75%、8日で平均82%となったが、それ以上期間を長くしても保毒虫率は高くならなかった(表1)。

表1 獲得吸汁期間による保毒虫率の推移

獲得吸汁期間(日)	LAMP法陽性虫数/供試虫数(保毒虫率%)		
	平均		
1	7/10(70)	8/15(53)	62
3	5/10(50)	12/15(80)	65
5	9/10(90)	9/15(60)	75
8	9/10(90)	11/15(73)	82
11	8/10(80)	11/15(73)	77

注)濁度計によるLAMP法で検定し、30分以内に白濁したものを陽性とした。

試験2 接種期間と感染判定時期

接種期間1日区の接種終了後24日目の発病株率は平均90%であった。また、接種期間2日区では接種終了後18日目に、7日区では接種終了10日目に発病株率が100%となった。

LAMP法による検定結果では、接種期間1日区では接種終了後6日目に73%の株が陽性となり、12日目には90%

が陽性となった。接種期間2日区では、接種終了後6日目に97%の株が陽性となり、12日目にはすべて陽性となった。接種期間7日区では接種終了後10日目にすべての株が陽性となった(表2)。

試験3 TYLCV抵抗性品種のリアルタイムLAMP法を用いた検定

接種終了後10日目の観察では、各品種供試14株中、罹病性品種のハウス桃太郎では11株で、TY-75及びToviKingでは2株で葉巻症状が見られたが、ATHYLAではみられなかった。また、30日目にはハウス桃太郎では12株で、TY-75及びToviKingでは3株で、ATHYLAでは4株で葉巻症状が見られた(表3)。

各品種供試14株中、罹病性品種のハウス桃太郎では12株がLAMP法による検定で陽性となったのに対し、ATHYLA及びTY-75では9株、ToviKingでは3株が陽性であった(表4)。

各品種陽性株のリアルタイム濁度測定装置での濁度0.1に到達した時間の平均は、ハウス桃太郎では32.4分、ATHYLAでは43.9分、ToviKingでは55.2分、TY-75では43.7分であり、ウイルス濃度は、ハウス桃太郎では102.6pg/ μ l、ATHYLAでは100.3pg/ μ l、ToviKingでは10-1.9pg/ μ l、TY-75では100.4pg/ μ lと推測できた(図1)。

試験4 集団接種での感染源の株元切断の検討

発病株率及びLAMP法による検定での陽性株率は、接種開始時に感染源のTYLCV感染トマト株及びシルバーリーフコナジラミ寄生キャベツ株を切断せずに接種期間中そのままケージ内に置いた区の方が、接種時にこれらの株

表2 接種期間による発病株率の推移

接種期間 ¹⁾	発病株率(%) ^{2,3)}			LAMP法陽性株率(%) ²⁾			
	10日後	18日後	24日後	6日後	10日後	12日後	18日後
1日	⁴⁾	87	90	73		90	90
2日		100	100	97		100	100
7日	100		100		100		

注 1)接種期間の温度は、1日区と2日区では接種期間中25℃、その後20℃に一日置き、以降25℃で管理した。

7日区は全期間25℃で管理した。

2)調査日は接種終了後日数。数値は3回の平均。

3)葉巻、黄化の両症状が併発している株を、発病株とした。

4)未調査

表3 品種による葉巻株数の差異

接種終了後日数	ATHYLA	TY-75	ToviKing	ハウス桃太郎
10日	0(0%)	2(14.3%)	2(14.3%)	11(78.6%)
21日	0(0%)	3(21.4%)	2(14.3%)	12(85.7%)
30日	4(28.6%)	3(21.4%)	3(21.4%)	12(85.7%)

注) ()内は%

表4 品種と陽性株数

	ATHYLA	TY-75	ToviKing	ハウス桃太郎
陽性株数	9	9	3	12
陽性株率(%)	64.3	64.3	21.4	85.7

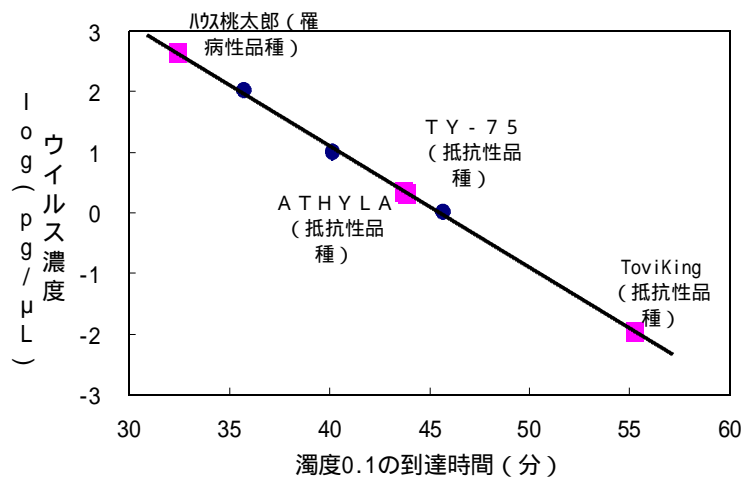


図1 品種によるウイルス濃度の差異

注) 濁度はリアルタイム濁度測定装置 LA-200 (TERAMECS社製) で測定。保毒虫回収後10日目調査。

◆は標準ウイルス液 (10⁰pg/μL, 10¹ pg/μL, 10²pg/μL)。

表5 トマトへの感染に及ぼす感染源の株元切断の影響

試験区	反復	調査株数	発病株数 ¹⁾	LAMP陽性株数 ²⁾
株元切断 有		64	38(59.3%)	57(89.1%)
		60	45(75.0%)	54(90.0%)
株元切断 無		64	46(71.9%)	61(95.3%)
		61	50(82.0%)	60(98.4%)

注 1) 葉巻、黄化の両症状が併発している株を、発病株とした。

2) 反復 は、発病株以外をLAMP法で検定し、発病株とLAMP法陽性株を合計した。

反復 は、全株をLAMP法で検定した。

を株元から切断する区に比べてやや高くなった(表5)。

考 察

1 TYLCV接種法の検討

個別接種では、接種期間及び温度条件を変えて検討した結果、ポット植えトマト苗(子葉期)に、TYLCV保毒シルバーリーフコナジラミを10頭/株ずつ放飼した場合、接種期間を2日とし、接種中25、接種後24時間を20、その後25で管理するか、接種期間を7日とし、全期間25で管理することにより、TYLCVの感染率が100%になることが明らかとなった。また、LAMP法による検定結果から、LAMP検定により感染の有無を調査するには、接種終了後から10日以上経ってから検定を行う必要があると考えられた。

個別接種で100%感染させる接種条件は掴んだが、育種段階の多数の個体を1株ずつ接種し選抜していくことは、多大な手間がかかってしまい育種現場に適用するには難しいことから、個別接種の結果を参考にして集団接

種法の検討を行った。

シルバーリーフコナジラミ成虫が1ヶ月で約2.6~4.4倍に増殖する⁶⁾ことから、ゴースを張ったケージ内に、TYLCV感染トマト株と接種に必要な頭数(10頭/株)のシルバーリーフコナジラミが寄生したキャベツ株を入れ、7日間獲得吸汁させることで、吸虫管を使って一定数の成虫を放虫しなくても集団接種でき、接種法の簡素化をはかることが可能であった。また、トマト株及びキャベツ株は茎を切断せずに利用することによって、感染率を向上させることができた。

2 リアルタイムLAMP法によるウイルス検定

TYLCV抵抗性品種の開発は、多くの研究機関で行われており、海外ではいくつかの品種が既に育成されている。しかし、その抵抗性品種は症状が出にくいものの、ウイルスに感染することが確認されている^{7,8)}。日本でも消費者嗜好にあった抵抗性品種の開発が進められているが、いずれもウイルスに感染することが知られている。

TYLCV集団接種終了後10日目のLAMP法による調査の結果、抵抗性品種は罹病品種に比べウイルス濃度が低く、特に陽性株率の低いToviKingはATHYLAに比べ低いウイル

ス濃度を示すことが認められた。この結果は、同時に行った病徴観察とは異なったが、30日目に行った観察結果とはほぼ合致した。すなわち、リアルタイムLAMP法を利用することにより、早い検定段階から罹病状態を正確に判別できることが明らかとなった。

これらのことから集団接種法とリアルタイムLAMP法を組み合わせることによって、TYLCV抵抗性の精度の高い選抜が可能であると考えられ、図2に示すような抵抗性検定法の手順を作成した。この方法によれば、簡易なTYLCV抵抗性検定が可能であり、すでに現場ではTYLCV抵抗性品種の育成系統において、この抵抗性検定を利用し抵抗性品種の選抜を実施している。

しかし、本接種法での感染率は100%に達しておらず、接種をエスケープする個体も若干みられるという問題点が残っている。この接種漏れについては、育種段階にあわせた抵抗性選抜を複数回行うことで少なくしていけると考えられる。さらに、個体又は系統数がかなり絞られた最終的な選抜時には、集団接種に加え個別接種で抵抗性を確認することで解決できると考えられる。高度抵抗性品種を育成するためには、精度の高い選抜世代を重ね、抵抗性遺伝子を集積することが重要であるが、本検定法を利用した選抜を実施することによって強い抵抗性品種が育成されることが期待される。

1ヶ月間シルバーリーフコナジラミを飼育したキャベツ2株とTYLCV感染トマト1株を、同一ケージ内に入れる。

7日間 ↓ **コナジラミの保毒化**

ケージ内に、本葉1葉期の検定用トマト(128穴セルトレイ半数程度)を入れる。

7日間 ↓ **接種**

コナジラミの回収及び殺虫後、育苗する。

10日間程度 ↓ **育苗**

LAMP法による検定により、ウイルス濃度の測定を行う。

20日間程度 ↓ **育苗**

観察による発病調査を行う。

症状が見られず、ウイルス濃度の低い株を選抜する。

図2 トマト黄化葉巻病の幼苗を用いた抵抗性検定法の手順

引用文献

- Ilana Michelson, Dani Zamir, Henryk Czosnek. Accumulation and Translocation of Tomato Yellow Leaf curl Virus (TYLCV) in a *Lycopersicon esculentum* Breeding Line Containing the *L. chilense* TYLCV Tolerance Gene *Ty-1*. *Phytopathol.* 84, 928-933(1994)
- B. Pico, M. Ferriol, M. Diez and F. Nuez. Developing Tomato breeding lines resistant to tomato yellow leaf curl virus. *Plant Breeding.* 118, 537-542(1999)
- Favi Vidavsky, and Henryk Czosnek. Tomato Breeding Lines Resistant and Tolerant to Tomato Yellow Leaf Curl Virus Issued from *Lycopersicon hirsutum*. *Phytopathol.* 88, 910-914(1998)
- 加藤公彦, 大貫正俊, 藤晋一, 花田薫. 日本でトマトに発生したtomato yellow leaf curl virus. *日植病報.* 64, 552-559(1998)
- Shiro Fukuta, Shinro Kato, Keiko Yoshida, Yuko Mizukami, Akira Ishida, Junnichi Ueda, Michio Kanbe, Yoshiyuki Ishimoto. Detection of tomato yellow leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification reaction. *Journal of Virological Methods.* 112, 35-40(2003)
- 穴井尚子, 深谷雅博. LAMP法と黄化葉巻病常発地を活用した抵抗性トマト選抜法 2. LAMP法を利用した幼苗検定法の開発 コナジラミのキャベツでの増殖率の検討. 平成17年度単年度成績書. (2005)
- 穴井尚子, 中坊昌也, 加藤晋朗, 福田至朗, 深谷雅博, 矢部和則. 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(2005)
- 加藤政司, 大藪哲也, 中坊昌也, 福田至朗, 矢部和則. トマト黄化葉巻病抵抗性品種の形態的特性と常発産地ほ場における抵抗性. *園学雑.* 74別1, 297(2005)