

学位論文要旨

氏名: 鍛冶原 寛

題目:

Japanese yam mosaic virus (JYMV) 弱毒系統を用いたヤマノイモモザイク病の防除と JYMV の分子遺伝学的解析

Control of mosaic disease in yam plants with mild strains of *Japanese yam mosaic virus* and molecular genetics of the virus

山口県のイチョウイモやジネンジョの栽培ほ場において、ヤマノイモモザイクウイルス (JYMV) によるモザイク病が発生している。本病は、葉上にモザイク症状を引き起こし、収量性を大きく低下させるなど、生産上の大きな生産阻害要因として、問題となっている。

本論文では、本病の防除方法として JYMV の弱毒系統の利用法、および全国に分布する JYMV の多様性について明らかにした。また、ヤマノイモマイルドモザイクウイルス (YMMV) を高感度で検出するプライマーを設計し、JYMV と YMMV の同時検出法を確立した。

イチョウイモに感染する JYMV の弱毒ウイルスをイチョウイモ現地栽培ほ場より探索した結果、葉上のモザイク症状が軽微な JYMV 感染イモを見出し、そのイモから弱毒ウイルス T-3 を分離した。また、JYMV 強毒ウイルスを高温処理により弱毒化することを試みたが、成功しなかった。

弱毒ウイルス T-3 を感染させたイチョウイモに、JYMV の媒介虫であるアブラムシを用いて、人為的に強毒ウイルスを接種させることを試みたが、強毒ウイルスの感染は全く認められなかった。一方、ウイルスフリーイチョウイモには高率に強毒ウイルスの伝搬が認められたことから、T-3 の干渉効果が認められた。また、現地ほ場において T-3 感染イチョウイモを 6 年間連続して栽培しても、強毒ウイルスに感染したイチョウイモはほとんど認められなかった。その収穫イモは、T-3 ウイルスを保有していないイモと比較して、有意に大きく、高い収量性が認められた。

ジネンジョにおいて、イチョウイモ由来の JYMV を低温処理して作出した弱毒ウイルス YMO6 を利用した。弱毒ウイルス YMO6 を感染させたジネンジョを、現地栽培ほ場で連続 3 年間栽培させた結果、YMO6 保有ジネンジョでは、強毒ウイルスの感染は、ほとんど認められなかったのに対し、ウイルスフリージネンジョのすべてが、栽培 1 年目で強毒ウイルスに感染したことから、YMO6 の高い干渉効果が認められた。YMO6 保有ジネンジョの収穫イモでは、強毒ウイルスに感染している慣行と比較して、総アスコルビン酸含量、DPPH ラジカル活性が高く、品質が優れていた。

JYMV の弱毒系統として T-3 と YMO6 を選抜し、T-3、YMO6 と強毒系統 Y のゲノムの塩基配列を比較した。しかしながら、干渉効果に関与すると思われる塩基配列を特定することはできなかった。

山口県内のジネンジョ栽培ほ場からモザイク症状のジネンジョ葉を採取し、JYMV を精製した。精製した JYMV の系統を調査するため、既知 JYMV の塩基配列から設計した CP 領域を増幅するプライマーと制限酵素を用いて、RT-PCR-RFLP を実施し、それぞれを比較したところ、少なくとも 2 種類の JYMV 系統 (タイプ A とタイプ B) が存在していることが分かった。これらの系統は、イチョウイモ由来の強毒系統 Y とは、塩基配列が異なっていた。

全国 12 カ所から採取したジネンジョの JYMV 強毒系統に感染した葉を用いて、それぞれの JYMV 強毒系統の CP 領域と UTR 領域の塩基配列を決定し、制限酵素 (*Tsp509I*) による特定領域断片 (241bp) の RFLP 解析、および CP 領域の一部 (400bp) の塩基配列解析

によって、国内に分布する JYMV の多様性を検討した。その結果、10 ほ場の JYMV の RFLP パターンが JYMV 弱毒系統 (T-3 および YMO6) と同一であった。両系統を判別するためには、新たな PCR-RFLP 標的領域を探索する必要があることが分かったため、CP 領域の塩基配列解析を実施し、新たなプライマーの設計、および特異的な部分を消化する制限酵素 *Hae*III を選定した。それらを用いた RT-PCR-RFLP により、全国の JYMV と弱毒系統 (T-3 および YMO6) との判別が可能となった。

塩基配列に基づいて、系統樹を作成した結果、JYMV は大きく 3 つのクラスタに分類され、さらにその中でも分岐が見られることが明らかになった。この結果により、JYMV が多様な系統を含むことが示唆された。このことから、JYMV の各系統に対する干渉効果の有無について検討する必要がある。

日本で栽培されているヤマノイモ (ジネンジョ、イチョウイモ、ダイジョ) を対象に、RT-PCR 法による JYMV と YMMV の同時検出法を検討した。プライマーは、JYMV 検出用に CP 領域の 241bp、YMMV 用に CP 領域と NIb 領域の 174bp が増幅できるものを設計した。これらプライマーを用い、2007 年に県内の栽培ヤマノイモを対象に、同時検出法により JYMV と YMMV の感染状況を調査した。その際の RNA 抽出は、カーボネートバッファーを利用した直接吸着法で行った。その結果、ダイジョのすべてが YMMV の単独感染、イチョウイモとジネンジョのすべてが JYMV に感染しており、JYMV の単独感染がそれぞれ 16.7%、42.1% であり、JYMV と YMMV の重複感染は 83.3%、57.9% であった。栽培ほ場での、JYMV の弱毒系統 T-3 保有イチョウイモでの YMMV の感染率は 60.0%、弱毒系統 YMO6 保有ジネンジョでの YMMV の感染率は 48.6% (2007 年)、47.1% (2008 年) であった。これら重複感染ヤマノイモの葉上のモザイク程度は、単独感染と同様に軽微であった。