

機関番号：12201

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20405024

研究課題名 (和文) コナジラミ伝搬性ウイルス激発のインドネシアに学ぶ総合防除法の確立とわが国への応用

研究課題名 (英文) Research on integrated control methods of whitefly-transmitted viruses in Indonesia and its application to Japan

研究代表者

奥田 誠一 (OKUDA SEIICHI)

宇都宮大学・農学部・名誉教授

研究者番号：90091941

研究成果の概要 (和文)： わが国を含めた世界各地でコナジラミ伝搬性のジェミニウイルスとクリニウイルスによるウイルス病が大問題となっている。特に、露地でトマトやトウガラシを周年栽培しているインドネシアでは激発しているため、その病原ウイルスの解明と防除法の確立を目指した。その結果、わが国およびインドネシアでは未記載のトマトクロロシスウイルスを見出した。また、インドネシアではわが国の病原とは別種のウイルスも見出された。

研究成果の概要 (英文)： Whitefly-transmitted gemini- and criniviruses cause severe problems in the world. Especially economic loss is very big in Indonesia. The purpose of this project is to identify the pathogenic viruses and to develop the integrated control methods. As a result, a new virus, *Tomato chlorosis virus*, was found in both Indonesia and Japan. Also some viruses were different between two countries.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	10,700,000	3,210,000	13,910,000

研究分野：植物病理学・植物ウイルス学

科研費の分科・細目：植物病理学

キーワード：インドネシア、ジェミニウイルス、クリニウイルス、コナジラミ、トマト、トウガラシ、防除

1. 研究開始当初の背景

インドネシアのトマトやトウガラシではコナジラミ伝搬性のジェミニウイルスとクリニウイルスによる病害が大発生し、ほとんど収穫のない畑もある。感染株は黄化して葉が巻いて縮れ、株全体が萎縮する。発病後は結実せずに、収量が激減し、産地全体が壊滅的な被害に陥る。このため、辛い料理の多いインドネシアではトウガラシの値上がりが続いている。このような黄化症状はわが国のトマトでも発生しており、こ

こ数年大問題となっている。両ウイルスは汁液伝染せず、難防除のコナジラミで永続伝搬され、実用的な抵抗性品種もほとんどない。また症状が生理的障害のような黄化のために、なかなか的確に診断もできない。

2. 研究の目的

インドネシアでは年に3回はトマトやトウガラシを露地で植えつけ、周年栽培している。このため、圃場からトマトやトウガラシが姿を消すことがない。このことは、

激発しているジェミニウイルスとクリニウイルスが常に圃場があり、かなりの接種圧となっている。一方、わが国で発生している両ウイルスはそれほど強毒性ではなく、現在インドネシアで発生しているものが劇症系であると推定される。そこで、コナジラミ伝搬性ウイルスの激発しているインドネシアおよび日本において、まず遺伝的に多様な病原ウイルスの変異株を分離して、病原ウイルス遺伝子の機能の解明をめざした。また、インドネシアの露地栽培で各種防除試験を実施し、インドネシアでも通用するような防除対策が立てられれば、わが国でも将来にわたって適用できる防除対策となると考えた。また、安価な診断法の開発を目指した。すなわち、1) 病原ウイルスの遺伝子解析、2) 防除法の確立、3) イン団法の確立、の3つを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 病原ウイルスの分離・同定・遺伝子解析

毎年インドネシアを訪問し、現地の海外共同研究者とともにジェミニウイルスとクリニウイルスによる黄化症状が発生しているトマトおよびトウガラシの圃場にてサンプルを採集する。なお、コナジラミ伝搬性ウイルスが激発するインドネシアで、数百キロごとに離れた地域でサンプルを集める。帰国後、サンプルから核酸抽出し、その塩基配列を決定して同定し、わが国の分離株と比較して所性状を解析する。

(2) 総合的防除方法の検討

インドネシアで実験圃場を設け、多数の抵抗性候補品種の抵抗性検定、コナジラミの飛来を防ぐための障壁植物の種類、高さ、密度、および防虫ネットの高さ、目の細かさ、色、さらには黄色テープなどの誘引資材など、インドネシア産および日本産の資材を多数用いて防除法を検討する。なお、インドネシアでの圃場試験は海外共同研究者が行う。

(3) 診断方法の検討

病原ウイルスの遺伝子解析が進めば、遺伝子診断法が確立できる。しかし、遺伝子診断法は安価とは言い難い。そこでさらに、遺伝子工学的技法を用いて病原ウイルスの外被タンパク質を大腸菌で発現させ、ウサギを免疫することによって抗体を作製し、血清学的手法によるウイルス検出法の確立を目指す。

4. 研究成果

以上の目的、方法で本研究を開始した。その成果は、病原ウイルスごとに記述する。なお、これまでにわが国では、コナジラミ伝搬性でトマトに黄化症状を示す病原ウイルスとしてトマト黄化葉巻ウイルス (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) とトマトインフェクシャスクロロシスウイルス

(*Tomato infectious chlorosis virus*, TICV) が知られていた。

(1) トマトクロロシスウイルス

今回、インドネシアおよび栃木県で発生していた症状は、クリニウイルスの TICV によるトマト黄化病と酷似していた。しかし、研究を進めた結果、TICV と同じクリニウイルスではあるが別種で、両国でもともに未報告のトマトクロロシスウイルス (*Tomato chlorosis virus*, ToCV) であることが判明した。この ToCV は、TICV や TYLCV などとともに、トマトのエマージングウイルスとして世界的に重要視されている。

トマトの黄化症状 “yellow leaf disorder” はフロリダの温室栽培トマトで 1989 年に最初に報告され、当初は原因不明で、生理病か栄養障害、農薬による薬害などと考えられていた。症状は、最初は下葉から黄化が始まり、徐々に上葉へ移り、しばしば褐色のえそ斑をともなう。花や果実には明白な病徴はないが収量減が生じる。このような黄化症状の病原として 1996 年に TICV が、1998 年に ToCV が正式に報告された。その後すぐに両ウイルスともヨーロッパでも発生が確認され、現在ではエマージングウイルスとして警戒されている。



図. インドネシアの露地トマトで大発生していた ToCV による黄化症状



図 栃木県の水耕栽培トマトハウスで大発生した ToCV による黄化症状

本研究でインドネシアおよび栃木県のトマト栽培地帯で認められた病害では、モザイク症状は全く認められず、下葉から黄化や葉巻、えしの症状を示していた(図を参照)。その症状は2003年に発生したTICVの病徴と酷似していたため、TICV検出用プライマーを用いて遺伝子診断を行ったが、TICVは検出されなかった。しかし、トマトの黄化症状がクロステロウイルス科のクリノウイルス属による可能性が高いと予想されたので、クロステロウイルス科のウイルスを広く検出するHSP検出プライマーを用いて遺伝子解析を行った。その結果、目的の位置に増幅産物が得られ、その塩基配列はわが国で未報告のToCVと高い相同性を示した。一方、TICVとは相同性が低かった。そこで、ToCVのゲノム構造から外被タンパク質を含む3領域において塩基配列を決定し、すでに全塩基が登録されていたフロリダ、スペイン、ギリシャの3分離株と比較した結果、いずれの領域もインドネシア株も栃木株も既報の分離株は高い相同性を示し、特にフロリダ株とは外被タンパク質領域はアミノ酸配列で100%の相同性を示した。このことから、このインドネシアおよび栃木県で発生したトマトの黄化症状の病原ウイルスは、両国では全く新しいToCVで、アメリカから最近侵入してきたのではないかと考えられた。さらに、決定した塩基配列を用い、ToCVを遺伝子診断するために、コピー数の多い外被タンパク質領域に検出用プライマーを設計した。

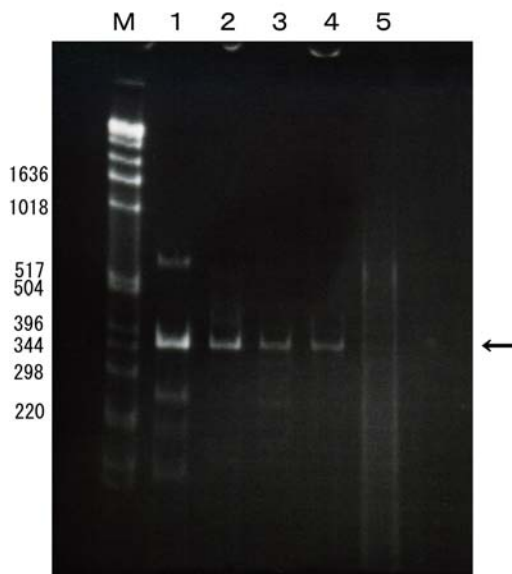


図 設計したToCV検出用プライマーによる検出例(矢印 ←)

次にToCV感染トマトから健全トマトへの

接種実験を行った。媒介昆虫にはオンシツコナジラミおよびタバココナジラミを用いた。接種後、3週間から1ヶ月ほど観察したところ、ToCVによると思われる黄化症状が現れた。作製した検出用プライマーを用いてウイルスの検出を行ったところ、ToCVの感染が確認され、オンシツコナジラミおよびタバココナジラミを用いた。接種後、3週間から1ヶ月ほど観察したところ、ToCVによると思われる黄化症状が現れる媒介が確認された。なお、トマトの品種間差異はほとんど見られず、すべて下葉からの黄化、葉巻、およびえし症状を示した。



図 発生圃場の雑草でみられるコナジラミ

本病は葉の黄化や葉巻症状を起し、症状が進展し生理障害、特に苦土欠乏症に似た症状となる。また、容易にコナジラミで媒介されるので、2008年、2009年、2010年の調査において圃場全体で発生している例が多数認められたしかし、本症状は生理障害と極めて酷似しており、生産現場においては本病の発生に気づかずに見逃している可能性が高いと考えられる。

ToCVは、オンシツコナジラミ *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)、タバココナジラミ *Bemisia tabaci* (Gennadius) バイオタイプA、バイオタイプB、bandedwinged whitefly (*Trialeurodes abutilonea*) によって媒介されると報告されている。またタバココナジラミ・バイオタイプQも本病原ウイルスを媒介することが確認された。このため、ToCVの防除では、タバココナジラミに併せてオンシツコナジラミを対象とした防除を行う必要性が生じている。

栃木県ではTYLCVの発生によるタバココナジラミ類の防除対策として、コナジラミ類を施設に「入れない、増やさない、出さない」ための対策がとられてきた。すなわち、施設開口部への防虫ネット(目合い0.4mm以下)の展張はコナジラミ類のハウス内への侵入抑制に有効であった。また、コナジラミ類に

よる ToCV や TYLCV の感染を絶つ取り組みとしては、ほ場から「出さない」対策として、栽培終了時の施設内の高温処理（むし込み）の徹底が必要である。これら防除対策については、トマトでの ToCV に対しても有効であると考えられる。すなわち、ToCV を対象としたコナジラミ類の防除を行う場合は、現時点で防除効果の認められる薬剤の輪播散布を行う必要であろう。

インドネシアでは露地栽培であるので、障壁植物の検討をジェミニウイルス病防除と併せて検討した。その結果、ナスがコナジラミを誘引するので有効であることが判明した。

ToCV の検出・診断には現在は RT-PCR による遺伝子診断法しかないため、大量のサンプルを安価に検定することは出来ない。そこで、組換え DNA 技法で ToCV の外被タンパク質を大腸菌で生産し、ウサギに注射して抗血清を作成し、血清学的手法で簡易に検出できるようにする必要がある。本研究では残念ながらそこまで進まなかったため、今後の研究課題である。

このように、ToCV は新しいウイルス病としてインドネシアおよび栃木県内で広く発生していることが判明し、群馬県でも発生が確認された。さらに、ToCV の発生は日本農業新聞でも取り上げられ、農業上注目を浴びた。

(2) *Pepper yellow leaf curl Indonesia virus*

前述のように、コナジラミ伝搬性でトマトに広く発生して黄化症状を示すウイルスには TYLCV と TICV、さらに ToCV がある。今回の研究でインドネシア各地のトマトとトウガラシの黄化症状株を採集して遺伝子解析したところ、ToCV と TICV 以外に *Pepper yellow leaf curl Indonesia virus* (PepYLCIDV) が広範囲に発生していることが判明した。PepYLCIDV はジェミニウイルスの DNA ウイルスで、インドネシアのトウガラシやトマトで葉の黄化や葉巻症状、株全体の萎縮などの症状を引き起こしていた。このウイルスを媒介するタバココナジラミがインドネシアで大量発生しており、露地栽培では駆除は難しいと考えられた。また、各種抵抗性品種の栽培実験を行ったが、実用的なウイルス抵抗性品種は存在しなかった。



この様な状況の中、インドネシアのボゴール大学の共同研究者が弱毒ウイルス (GM1) を選抜した。

表.GM1を分離した農場でのデータ

採集地	1圃場の弱毒病徴のサンプル数	ウイルスが検出されたサンプル
Cisarua	108	T10, T16, T17, T33, T34, T38, T42, T105(GM1), T122, T131, T134, T145, dan T146
Ciloto	144	
Megamendung1	180	
Megamendung2	108	
Sukagalih1	144	
Cikajang	24	
Taman Nasional	106	
Pangrango	126	
Sukagalih2	162	
Megamendung3		
Total	1102	T33, T105(GM1), T122, T131, T134, dan, T146

そこで、インドネシア各地から採集した強毒株の PepYLCIDV の塩基配列を決定し、弱毒株と比較した。その結果、V1、C4 の後半や C1 に大きな変異が見られたため、これらが弱毒に関与している可能性があると考えられた。C1 (Rep) は複製に関係するタンパク質であるため、この遺伝子に変異が起こると複製能力が落ちるため、弱毒化する可能性があると思われる。一方、V2、C2、C3 には大きく変異した部分は見られなかったため、これらは弱毒化に関与していないと思われた。V2 には、転写後遺伝子サイレンシングサプレッサーという機能があり、この遺伝子に病原決定因子があると報告されているが、本研究では目立った変異は見られなかったため、GM1 では V2 タンパク質が弱毒化に関係している可能性は低いと考えられた。しかし、GM1 の C1 (Rep) の C 末端側は *Sunn hemp leaf distortion virus* との相同性が高かったことから、GM1 とウイルス間で組換えが起きた可能性が考えられた。また、同じジェミニウイルスである *Tomato leaf curl virus* (ToLCV) は、外被タンパク質をコードしている V1 以外のタンパク質がそれぞれ病徴発現に関与しており、宿主因子との間で複雑な相互作用をすることが知られている。そのため、GM1 も各遺伝子の変異が弱毒化に関与している可能性が考えられた。

(3) ダイズで見出されたコナジラミ伝搬性ウイルス

2010 年にインドネシアを訪問した際に、トマトとトウガラシ以外でダイズでもモザイク・黄化・萎縮を伴う病害が多発し問題となっていた。そこで感染葉を電子顕微鏡観察したところ、約 650nm のひも状粒子が検出されたため、ポティウイルスまたはカルラウイルスによるウイルス病であると推測された。RT-PCR の結果から、カルラウイルスで日本では未発生でコナジラミ伝搬性の

Cowpea mild mottle virus (CPMMV) であることが判明した。ウイルスゲノム RNA の 3'末端から ORF3 までの塩基配列を決定し、DNA データベース中の他の CPMMV 分離株と比較したところ、ORF6 は南米株との相同性が塩基配列で 89%、アミノ酸で 93% と近縁だったが、アフリカ株はそれぞれ 64%、57% と遠縁であった。同様に ORF5 (CP) も南米株とは塩基配列で 87%、アミノ酸配列で 97%、アフリカ株は 79%、94% を示した。また、3'末端の非翻訳領域は南米株と 100%、アフリカ株と 88% の相同性を示した。よって、インドネシア株は南米の分離株に近いと考えられた。なお、本ウイルスでは全塩基配列の報告は世界中で 1 例のアフリカ株しかなく、早急に全塩基配列を決定して報告すべきと考える。



図 CPMMV を接種して発病したダイズの苗

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① 福田 充・廣田知記・夏秋知英 (2011). 栃木県に発生した Tomato chlorosis virus によるトマト黄化病. 植物防疫 65 卷 8 月号掲載予定 査読無
- ② 福田 充・森島正二・和氣貴光・廣田知記・夏秋知英 (2010) 栃木県での Tomato chlorosis virus (ToCV) の発生状況と感受性の品種間差異. 関東病虫研報 57:27~29. 査読有
- ③ Hirota, T., Natsuaki, T., Murai, T., Nishigawa, H., Niibori, K., Goto, K., Hartono, S., Suastika, G. and Okuda, S. (2010). Yellowing disease of tomato caused by Tomato chlorosis virus newly recognized in Japan. Journal of General Plant Pathology 76(2): 168-171.

査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 松原祥子・Wuye Ria Andayani・Sedyo Hartono・大川 篤史・夏秋知英 (2011.3.28). インドネシアにて発生した *Cowpea mild mottle virus* インドネシア分離株の塩基配列解析. 平成 23 年度日本植物病理学会大会 (東京農工大学)
- ② Suastika, G., Hartono, S., Nishigawa H. and Natsuaki, T. (2010.11.14~18). YELLOWING DISEASE OUTBREAKS IN TOMATO IN INDONESIA ASSOCIATED WITH INFECTION OF *TOMATO CHLOROSIS VIRUS* AND *TOMATO INFECTIOUS CHLOROSIS*. ISSAAS International Congress, Bali, Indonesia.
- ③ 廣田知記・夏秋知英・村井保・Sedyo Hartono・西川尚志・奥田誠一 (2009.3.26~28). *Tomato chlorosis virus* の発生. 平成 21 年度日本植物病理学会大会 (山形大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥田 誠一 (OKUDA SEIICHI)
宇都宮大学・農学部・名誉教授
研究者番号: 90091941

(2) 研究分担者

夏秋 知英 (NATSUAKI TOMOHIDE)
宇都宮大学・農学部・教授
研究者番号: 10134264

村井 保 (MURAI TAMOTU)
宇都宮大学・農学部・教授
研究者番号: 90284091

西川 尚志 (NISHIGAWA HISASHI)
宇都宮大学・農学部・准教授
研究者番号: 60361614