

Impatiens necrotic spot virus (INSV) によるシクラメンえそ斑紋病 (新称) の発生

栃木県農業試験場環境技術部病理昆虫研究室 後藤 藤 知 昭
宇都宮大学農学部植物病理学研究室 夏 なつ あき ひで 英

はじめに

Impatiens necrotic spot virus (INSV) は、1990年アメリカのアフリカハウセンカで最初に発見され、花き類を中心にえそ症状を引き起こす多犯性のウイルスとして知られている。国内における花き類での発生は、静岡県のパーベナ (入山ら, 1999) を始め、岡山県のシネリア、ペゴニア、アフリカハウセンカ (谷名ら, 2000)、秋田県のトルコギキョウ、インパチエンス、ニューギニアインパチエンス、シクラメン (藤・山本, 2000) の6科7種での発生が相次いで報告されている。ミカンキイロアザミウマで媒介される INSV は、媒介虫の防除が困難なことや花き類の苗等の移動により全国的な発生拡大が懸念されている。

栃木県内での *Tospovirus* の発生は、キクにおける *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) が1997年に発生して以来、トマト、またその施設周辺の雑草における発生が確認され、特にキクにおいては初発生以来、その発生面積も徐々に増加している。

その一方で、2000年11月、シクラメンに TSWV と病徴の類似するえそ症状の株が発生し、病徴や TSWV-O に対するモノクローナル抗体を用いた ELISA 検定の結果、INSV の感染が疑われた。

アメリカでは、INSV と TSWV に混合感染した植物も発見されていることから、今回、病徴的に類似する INSV と TSWV を1回の PCR 反応で同時に検出、識別することができるプライマーを作製し、INSV を特異的に検出した。さらに、シクラメンを栽培する近隣施設では、エキザカム (和名; ペニヒメリンドウ) が栽培され、この一部の株も同様のえそ症状株が発見された。ここでは本県のシクラメンおよびエキザカムに新発生した INSV の RT-PCR 法を用いた同定について紹介する。

Occurrence of Necrotic Spot of Cyclamen Caused by *Impatiens necrotic spot virus* (INSV). By Tomoaki Goro and Tomohide NATSUAKI

(キーワード: シクラメン, えそ斑紋病, *Impatiens necrotic spot virus*)

I 病原ウイルスの検出

1 シクラメンおよびエキザカムの病徴

栃木県で発生したシクラメンのウイルス様症状株の病徴は、葉に斑紋症状を伴うえそが発生し、後に黄化、枯死した (口絵参照)。これらの病徴は、新葉の展開とともに増加したが、夏期の高温によりその病徴はマスクされた。

エキザカムの病徴は、株全体に激しい黄化とえそが見られたが、既報の INSV 感染株に見られるような明瞭なえそ斑紋症状は見られなかった (口絵参照)。

2 汁液接種

接種試験は、*Tospovirus* に感染可能な4科6属の植物を用いて行った。えそおよび斑紋症状を呈するシクラメンおよびエキザカムの感染葉を約5倍量の0.2%亜硝酸ナトリウムを含む0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) で磨砕し、その粗汁液を検定植物に接種した (表-1)。その結果、いずれの植物でも接種葉にクロロシスやネクロシスを生じ、*Nicotiana rustica*, *Petunia hybrida* では、シクラメン感染葉と同様の明瞭なえそ斑紋を生じた。

表-1 INSV (シクラメン, エキザカム) の検定植物での病徴

接種植物/分離株	病 徴 ^{a)}	
	シクラメン	エキザカム
ヒユ科		
センニチコウ	CS, NS/ ^{b)}	CS, NS/-
アカザ科		
<i>Chenopodium amar-anticolor</i>	CS, NS/-	CS, NS/-
<i>C. quinoa</i>	CS, NS/-	CS, NS/D
ウリ科		
キュウリ	NS/	NS, CS/
ナス科		
<i>Nicotiana rustica</i>	CS, NS, NRS/-	CS, NS, NRS/-
<i>N. tabacum</i> cv. <i>xanthi</i>	NS, CS/-	NS, CS/-
トマト	NS, CS/-	NS, CS/-
ペチュニア	CS, NS/-	CS, NS, NRS/-

^{a)} CS: 退緑斑点; NS: えそ斑点; NRS: えそ斑紋; -: 非感染; D: 枯死 ^{b)} 接種葉/上位葉

3 電子顕微鏡観察

Tospovirus は、その粒子が物理的に不安定であることから、超薄切片を作製し、電子顕微鏡で粒子形態を観察した。斑紋症状を示すシクラメン感染葉を2%オスミック酸で固定し、エタノールシリーズで脱水、エポキシ樹脂で包埋後、超薄切片を作製した。

電子顕微鏡による観察では、*Tospovirus* に特徴的な外被膜に包まれた直径約80~120 nmの球状粒子が確認された(図-1)。

4 RT-PCR による検出

Tospovirus 属のウイルスは、外被膜に覆われた球状粒子で、内部に3種の1本鎖RNAをゲノムに持っている。このウイルスゲノムは、3分節の1本鎖RNAでそれぞれL-RNA、M-RNA、S-RNAと呼ばれている。L-RNAはウイルスの複製酵素、M-RNAは外被膜上の2種の糖タンパク質(スパイク)と非構造タンパク質、S-RNAはヌクレオカプシド(N)タンパク質と非構造タンパク質をそれぞれコードしている。今回、INSVを特異的に検出する目的の他に、全国的に発生が問題となっているTSWVの同時検出を目的としてINSVのNL-07(De Haan et al., 1992)とTSWVのCPNH9(De Haan et al. 1990)のNタンパク質をコードする領域から1組のディジェネレートプライマーを作製し、INSVの遺伝子間領域にINSV特異的プライマーを作製した(表-2)。

感染葉からの全RNAの抽出は、Chang et al. (1993)の方法を一部改変して行った(図-2)。凍結した感染葉約0.1gを磨砕後、抽出用緩衝液を加え、クロロホルム抽出を行い、塩化リチウムで沈殿した。再度、クロロホルム抽出を行った後、エタノール沈殿でRNAを濃縮し、cDNAの合成を行った。cDNAの合成は、ランダ

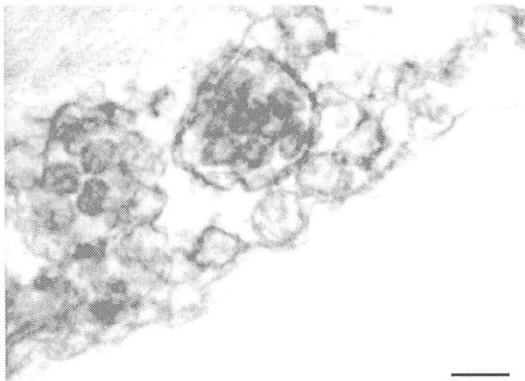


図-1 シクラメン感染葉の超薄切片によるINSV粒子の電子顕微鏡写真(Bar=100 nm)

ムプライマーを用いてFirst-strand cDNA synthesis kit (Amersham Pharmacia Biotech) で行った。

PCR反応は、INSVに特異的なプライマー(INSV-SP)およびINSVとTSWVに共通なディジェネレートプライマー(Tospo-F & Tospo-R)を用いて、94°Cで5分間熱変性後、94°Cで1分間、56°Cで1分間、72°Cで1分間として30サイクル行い、最後の伸長反応を72°Cで5分間とした。PCR産物は1.5%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色で増幅断片を検出した。

INSV特異的プライマー(INSV-SP)およびINSVとTSWVに共通なディジェネレートプライマー

表-2 RT-PCRに用いたプライマー配列

	部位 ^{a)}		プライマー配列
	INSV	TSWV	
INSV-SP ^{b)}	2031	—	5'-AAGCAAACCAAGCTCAAATCTC-3'
Tospo-F ^{b)}	2125	2057	5'-CTGTARTGKTCATWGCARCA-3'
Tospo-R ^{b)}	2567	2496	5'-GAYATGACYTTCMGAA-GRCTTGAT-3'

^{a)} 数字はINSV (accession no. X 66972)、TSWV (accession no. D 00645)のS-RNAと一致する。^{b)} INSVとTSWVの検出は、INSV-SP、Tospo-F & Tospo-Rを用い、RFLP解析には、Tospo-F & Tospo-Rを用いた。

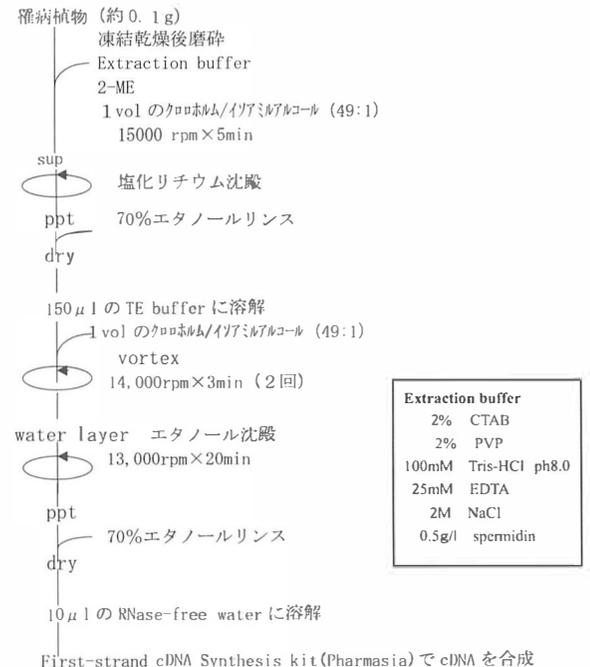


図-2 罹病植物からのRNA抽出方法及びcDNAの合成

(Tospo-F & Tospo-R) を同時に用いた RT-PCR 検定では、供試したシクラメンおよびエキザカムからは約 540 bp と約 440 bp の 2 本の増幅断片が、また、TSWV キク分離株を接種した *N. rustica* からは約 440 bp の断片のみが検出された (図-3)。以上より、シクラメンおよびエキザカムに発生したえそ斑紋症状を引き起こす病原ウイルスを INSV によるものと同定した。

今回 INSV の発生が確認された圃場では、シクラメンの他エキザカムなど数種類の鉢物が栽培されていることから、他の植物においても INSV が発生していたことも考えられる。さらに、供試したシクラメンとエキザカムは、隣接したハウスで発生したものであり、媒介虫であるミカンキロアザミウマの施設間での移動や野外に生育する花き類等への伝搬も考えられ、これを伝染源としたウイルスの地域的な広がりも懸念される。

5 塩基配列解析

INSV 特異的プライマーで増幅された産物は、pGEM T Easy Vector (Promega) にクローニング後、蛍光式シーケンサー (島津 DJSQ-1000) を用いて塩基配列を決定した。シクラメン株からの 537 bp の塩基配列 (図-4) とアミノ酸配列 (図-5) を、オランダで報告される INSV NL-07 (De Haan, P. et al., 1992)、藤・山本 (2000) により報告される秋田株とその相同性を比較した結果、塩基配列で 99.1%、アミノ酸配列で NL-07 と 98.8%、秋田株と 98.3% の高い相同性が見られ (表-3)、TSWV キク分離株や他の *Tospovirus* 属ウイルスとの相同性は低く、本ウイルスが INSV であることが確認された。

6 RFLP 解析

INSV と TSWV はミカンキロアザミウマで媒介されるためこれら 2 種のウイルスの混合感染も考えられ

る。そこで、INSV と TSWV に共通なディジェネレートプライマーを用いて増幅した約 440 bp の断片の RFLP 解析を行った。ディジェネレートプライマーで増幅された産物は、制限酵素 *EcoR* I, *Hae* III, *Rsa* I, *Sau* 3A I で切断し、INSV と TSWV を RFLP により解析したところ、今回使用した 4 種類の制限酵素で INSV と TSWV では異なるパターンを示した (図-6)。現在のところ、本県において混合感染した株や両ウイルスが同時に発生している圃場は発見されていないが、今後 INSV の発生拡大に伴って、このような株が発見さ



図-4 INSV (NL-07) と栃木株の塩基配列の比較

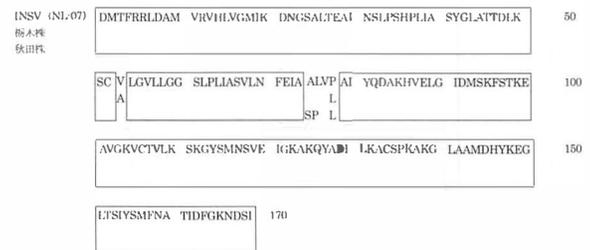


図-5 INSV (NL-07) と栃木株および秋田株のアミノ酸配列

表-3 INSV と TSWV の塩基配列およびアミノ酸配列の比較

比較した株	塩基配列 (%)	アミノ酸配列 (%)
栃木株 ^{a)} /INSV (accession no. X 66972)	99.1	98.8
栃木株/秋田株 ^{c)}	—	98.3
栃木株 ^{b)} /TSWV (accession no. D 00645)	60.2	56.4

^{a)} : 比較した領域は、PCR 反応での INSV 特異的バンド (537 bp) を用いた。^{b)} : 比較した領域は、PCR 反応で INSV と TSWV に共通なバンド (440 bp) を用いた。^{c)} : 藤・山本 (2000)。

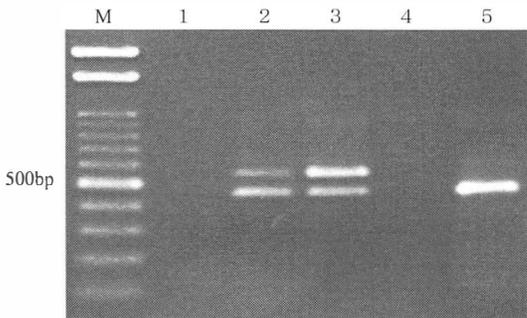


図-3 ディジェネレートプライマーを用いた INSV と TSWV の RT-PCR による検出

M: 100 bp DNA ラダー, 1: 健全シクラメン, 2: 罹病シクラメン, 3: 罹病エキザカム, 4: 健全タバコ, 5: TSWV 罹病タバコ。

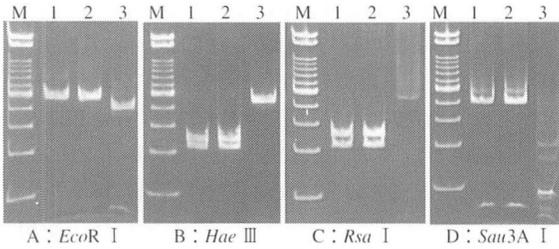


図-6 INSV と TSWV の RT-PCR 産物の RFLP 解析
 M: 100 bpDNA ラダー, 1: INSV 罹病シクラメン,
 2: INSV 罹病エキザカム, 3: TSWV 罹病タバコ

れることも予想される。

本県における *Tospovirus* の発生は、1997 年に TSWV によるキクエそ病が発生して以来、現在もその発生は続いているが、野菜類での発生はトマトでの初発以来、目立った発生には到っていない。診断も他県と同様、モノクローナル抗体を用いた血清学的診断法を中心に行っているが、PCR-RFLP 法によりこれら両ウイルスを同時に検出でき、INSV と TSWV が混合感染しているかどうかを区別できることから有効な手段であると考えられる。

II 防除対策

INSV を始め、TSWV に対する実用的抵抗性品種についてはまだ育成されていないため (本田・津田, 1999), INSV の防除は、伝染源となるウイルス感染植物の除去と媒介虫であるミカンキイロアザミウマの防除が有効と考えられる。

一般的な防除法としては、以下の方法が有効と考えられている。

- 1 発病株は、焼却または土中に埋めて処分する。
- 2 アザミウマの侵入を防止するために、施設開口部に防虫ネットを張る。
- 3 近紫外線除去フィルムや反射マルチを利用し、アザミウマを物理的に忌避する。
- 4 ミカンキイロアザミウマは、花粉を好むため、出荷までに老化するむだ花はビニール袋等に摘み取り密封して処分する。

5 施設内外の雑草や花き類、出荷予定のない花き類は、アザミウマの増殖場所となるので除去する。

6 外部からの苗の移動等による持ち込みを防止するために、アザミウマが寄生する植物を施設内に入れないようにする。

7 青色粘着トラップを施設内に設置し、アザミウマの発生量をモニタリングして、薬剤散布時期を決める。

おわりに

現在、栃木県内における INSV の発生は、2000 年 11 月のシクラメンおよびエキザカムでの初発以来、大きな被害には到っていない。また、その後の発生もごく軽微であり、県内全域に INSV がまん延するといったこともないようである。秋田県では、シクラメン、トルコギキョウ、インパチエンス、ニューギニアインパチエンスから RT-PCR 法を用いて INSV が検出されている。今回報告したディジェネレートプライマーを用いた RT-PCR 法でも INSV と TSWV を識別しながら検出できるので、今後発生が予想される花き類に適用できると考えられる。

シクラメンでの INSV の発生は、現在のところ秋田県、栃木県のみであるが、INSV は病徴発現が TSWV に比べて遅く (藤・山本, 2000), また、多犯性のウイルスであることからシクラメンやその他鉢物の流通を介して、全国的な発生拡大が懸念されている。

今回は、シクラメンに発生した INSV を RT-PCR 法を用いて検出し、TSWV との同時検出が可能であることを中心に報告した。しかし、*Tospovirus* に属するウイルスには世界中で 12 種のウイルスが報告されており、INSV や TSWV ばかりでなく、他のウイルスの検出法を確立しておく必要がある。

引用文献

- 1) CHANG, S. et al. (1993): Plant Mol. Biol. reporter. 11: 113~116.
- 2) DE HAAN, P. et al. (1990): J. Gen. Virol. 71: 1001~1007.
- 3) ——— et al. (1992): FEBS Lett. 306: 27~32.
- 4) 入山敬一ら (1999): 日植病報 65: 379 (講要).
- 5) 谷名光治ら (2000): 同上 66: 147 (講要).
- 6) 藤 晋一・山本英樹 (2000): 北日本病虫研報 51: 122~125.
- 7) 本田要八郎・津田新哉 (1999): 農耕と園芸 24: 122~126.