

トマト黄化えそウイルス(TSWV)によるトルコギキョウ(Eustoma grandiflorum (Raf.) Shinn.)黄化えそ病

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	黒田,智久 勝部,和則 鈴木,一実
発行元	日本植物病理學會
巻/号	65巻4号
巻号補足	
掲載ページ	p. 490-493
発行年月	1999年8月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



トマト黄化えそウイルス (TSWV) によるトルコギキョウ (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.) 黄化えそ病*

黒田 智久**・勝部 和則***・鈴木 一実**

Tomohisa KURODA**, Kazunori KATSUBE*** and Kazumi SUZUKI**:
Spotted Wilt Disease of Prairie Gentian (*Eustoma grandiflorum* (Raf.)
Shinn.) Caused by Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)*

Abstract

In November 1997, prairie gentian plants with necrotic yellow symptom were found in Iwate Prefecture, Japan. A spherical virus with a diameter of *ca.* 80 nm was isolated. The virus infected 22 plant species of 11 families after mechanical inoculation. By serological tests, the virus was closely related to tomato spotted wilt virus (TSWV). In RT-PCR with TSWV specific primers, a fragment of about 550 bp was amplified. The fragment had a high degree of sequence homology to TSWV-RNA. Based on these results, the virus isolated from prairie gentian was identified as TSWV. This is the first report of TSWV on prairie gentian in Japan.

Key words: prairie gentian, necrotic yellow disease, tomato spotted wilt virus.

トルコギキョウはアメリカ合衆国を原産とする換金性の高い切り花用花き作物である。本邦における栽培面積は1997年時点では444 haであったが、年々増加傾向にある。1997年11月、岩手県金ケ崎町のハウス栽培トルコギキョウにおいて、これまでに記載のないウイルス性の病害が発生した。発病株は、株全体にえそ斑点をともなった激しい黄化症状を呈した。花梗や茎頂は屈曲し、花卉にはえそや奇形が見られた。また、花色が紫色の品種では花卉にかすり状のカラーブレーキングが見られた(Plate I)。症状の激しい株では途中で生育が停止して開花せず、場合によっては枯死した。発生圃場では発病程度に品種間差異が認められ、症状の重い品種(品種; あずまの漣, はまの空)では約90%程度、軽い品種(品種; あずまの空, あずまの調, さとの庄)では約5%程度の発病株率であった。

日本において記載のあるトルコギキョウのウイルス病には、キュウリモザイクウイルス(CMV)、ソラマメウィルトウイルス、インゲンマメ黄斑モザイクウイルスによるモザイク病^{3,7)}、CMVによるえそモザイク病⁵⁾、カボチャモザイクウイルスによるウイルス病²⁾、トルコギキョウえそウイルスによるえそ病³⁾がある。しかし、本病害はその病徴からいずれの記載にも該当しないウイルス病であると考えられた。

現地発病株からの葉片を4%グルタルアルデヒドで固

定後、数滴の2%リンタングステン酸(pH 7.0)中で磨砕し電子顕微鏡で観察した。その結果、直径約80 nmの膜に包まれた球状粒子が観察された。そこで、黄化した葉から*Chenopodium amaranticolor*で単一局部病斑分離を3回繰り返してウイルスを分離し、ササゲ(黒種三尺)で増殖させて以下の実験に供試した。

本ウイルスの宿主範囲については、25°Cの環境調節室で育成した12科23種の検定植物に接種して病徴を観察し、無病徴のものはササゲへの戻し接種を行って感染の有無を調べた(Table 1)。これらのうち、接種した植物のうちの主なものの病徴は以下のとおりである。

トマト(大型福寿): 接種葉はえそを伴って黄化し、その後脱落した。上葉の黄化は激しく、茎や葉柄にはえそやえそ条斑が見られた。

ペチュニア: 接種葉にえそ斑点が現れたが、全身感染はしなかった。

ササゲ(黒種三尺): 接種葉に退緑斑点を生じ、場合によってはえそになることもあった。上葉には細かい退緑斑が現れ、葉脈えそを生じることもあった。

C. amaranticolor: 接種葉に退緑斑点を生じ、全身感染はしなかった。

スイカ(瑞祥): 接種葉に直径3~5 mmのえそ斑点を生じ、全身感染はしなかった。

* 本研究の概要は平成10年度日本植物病理学会大会で講演発表した。

** 岩手生物工学研究センター Iwate Biotechnology Research Center, Kitakami 024-0003, Japan

*** 岩手県農業研究センター Iwate Agricultural Research Center, Kitakami 024-0003, Japan

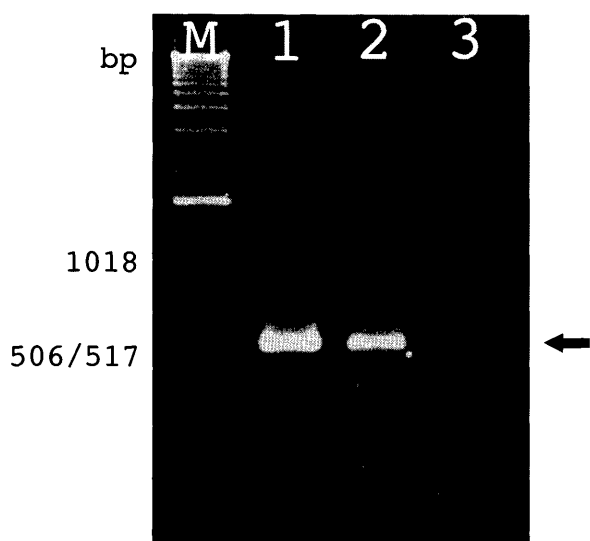


Fig. 1. Detection of TSWV from different parts of infected prairie gentian by RT-PCR. Samples of the reaction mixture were subjected to 0.8% agarose gel electrophoresis. Lane M, DNA size marker (Gibco-BRL); lane 1, infected flower; lane 2, infected leaf; lane 3, healthy leaf.

また、分離ウイルスのトルコギキョウ幼苗(あずまの漣)への戻し接種試験では、接種 20 日後に株が黄化し、花卉のカラーブレイキングは接種 100 日後に再現された (Plate I)。原病徴の再現されたトルコギキョウ葉からは電子顕微鏡で直径約 80 nm の球状粒子が観察された。

粗汁液中の安定性についてはササゲの接種葉を 10 倍容の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で磨砕し、 $12,000 \times g$ で 5 分間遠心後の上清を試料原液とし、ペチュニアへの接種により検定した。耐熱性は各温度で 10 分間処理し、耐希釈性はリン酸緩衝液による 10 倍段階希釈液で調べた。また、耐保存性試験では、試料原液をそれぞれ 1, 2, 4, 8, 12, 24 時間 20°C で処理した。耐熱性試験では 35°C 処理の感染性は確認されたが、 40°C 処理した試料では局部病斑が現れず感染性が認められなかった。同様に希釈限界は 10^{-2} まで、保存限界は 2 時間目まで感染性が認められた。よって、耐熱性は $35\sim 40^{\circ}\text{C}$ 、耐希釈性は $10^{-2}\sim 10^{-3}$ 、耐保存性は 2~4 時間であると考えられた。

血清試験は直接 ELISA 法で反応の有無を調べた。CMV およびトマト黄化えそウイルス (TSWV) 普通系を検出するための市販のキット (日本植物防疫協会) を用い、キットの説明書に従って抗血清、抗原液を希釈し行った。ササゲの接種葉あるいは感染トルコギキョウ葉を供試したところ、TSWV の抗体を用いた場合のみ明瞭な反応が見られた。

既報の TSWV の S RNA の NSs タンパク質遺伝子の塩基配列^{4,6)} から、TS-F (5'-TTCTCATTTCAAGCTGAGCC-3') と TS-R (5'-GGCAAAGTCTATCTTCCAGG-3')

Table 1. Host range and symptomatology of TSWV isolated from prairie gentian

Plants	Symptoms ^{a)}
Aizoaceae	
<i>Tetragonia expansa</i>	Cs/— ^{b)}
Amaranthaceae	
<i>Amaranthus tricolor</i>	Cs/M
<i>Gomphrena globosa</i>	Ms/M, Ns
Apocynaceae	
<i>Catharanthus roseus</i>	Ms/N, Ns, VN
Chenopodiaceae	
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Cs/—
<i>C. quinoa</i>	Cs/—
<i>Spinacia oleracea</i> (cv. Magic)	Ns/N, Y
Compositae	
<i>Zinnia elegans</i>	Ns/M
Cruciferae	
<i>Brassica campestris</i> (cv. Kanamachi)	—/—
Cucurbitaceae	
<i>Citrullus battich</i> (cv. Zuishou)	Ns/—
<i>Cucumis sativus</i> (cv. Sagami hanjiro)	Ns/—
Gentianaceae	
<i>Eustoma grandiflorum</i> (cv. Azumanosazanami)	N/Ns, Y
Leguminosae	
<i>Vicia faba</i> (cv. Wase)	Ns/—
<i>Vigna sesquipedalis</i> (cv. Kurodanesanjaku)	Cs, Ns, VN/Cs, VN
Pedaliaceae	
<i>Sesamum indicum</i>	Ns/—
Solanaceae	
<i>Capsicum annuum</i> (cv. Kyoyutaka)	N/M
<i>Datura stramonium</i>	Cs/M
<i>Lycopersicon esculentum</i> (cv. Oogatafukuju)	Ns, Y/N, VN, Y
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Cs/Y
<i>N. glutinosa</i>	Ns/N, VN
<i>N. tabacum</i> (cv. Bright yellow)	Ns/—
<i>Petunia hybrida</i>	Ns/—
Scrophulariaceae	
<i>Antirrhinum majus</i>	N/Y

a) Cs, chlorotic spot; M, mosaic; N, necrosis; Ns, necrotic spot; VN, vein necrosis; Y, yellowing; —, no symptom.

b) Inoculated/noninoculated leaves.

のプライマーペアを設定し、RT-PCR を試みた。まず、分離したウイルスを接種したトルコギキョウ感染葉および健全トルコギキョウ葉からフェノール/クロロホルム抽出と塩化リチウム沈殿法によって全 RNA 試料を調製し、RNA PCR Kit (TaKaRa) を用い、キットの説明書に従って RT-PCR を行った。なお PCR の条件としては、 94°C 40 秒、 55°C 1 分、 72°C 1 分を 1 サイクルとし合計 30 サイクル行った。その結果、感染葉試料からは予想される約 550 塩基対の単一の DNA 断片が増幅されたが、健全トルコギキョウ

Plate I

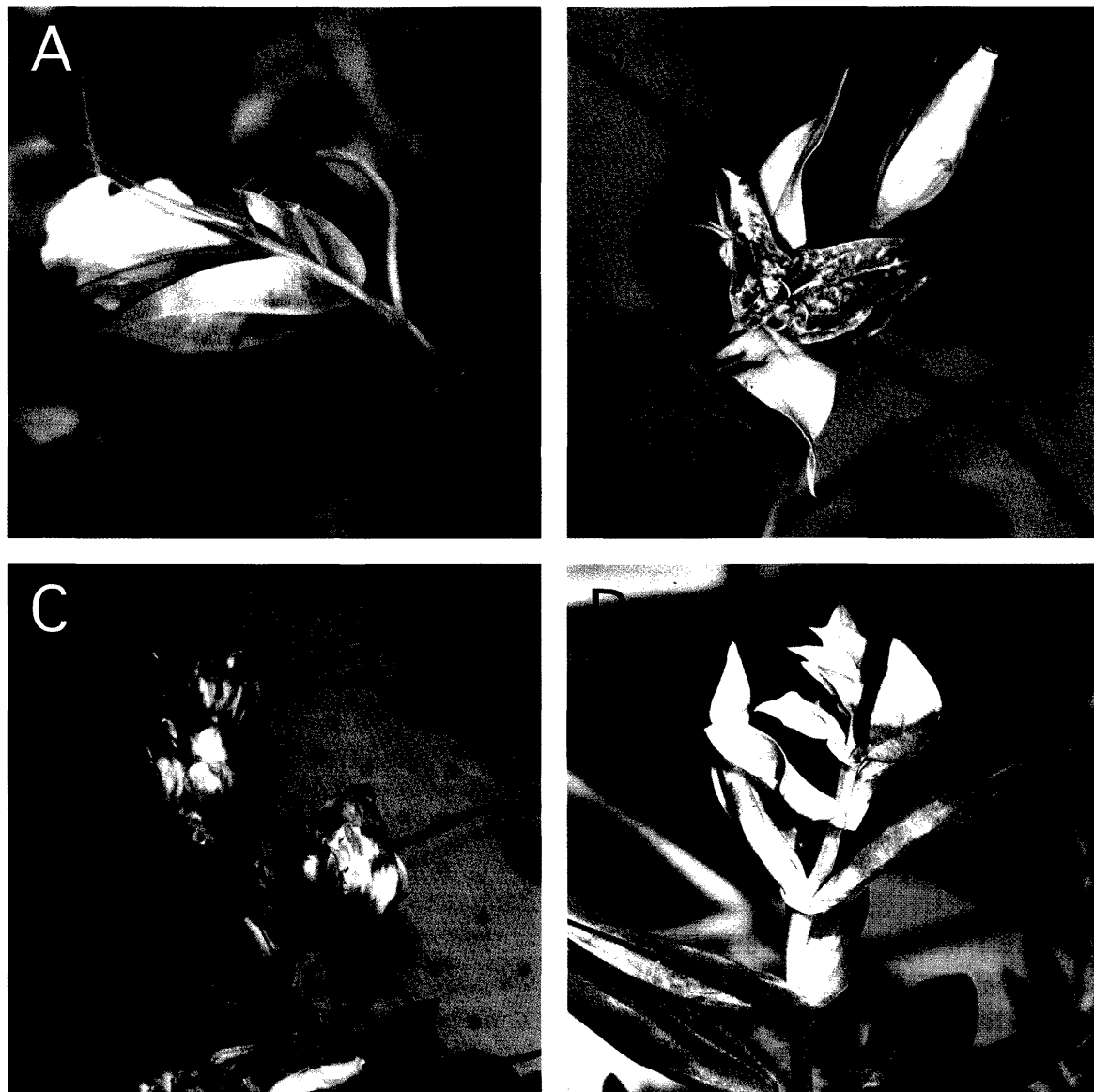


Plate I Symptoms of naturally occurring spotted wilt disease on prairie gentian (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.) (A-C). A, Severe yellowing and distortion of upper leaves ; B, Necrosis and malformation of leaves ; C, Flowers with color breaking, malformation and necrosis. (D) Necrotic yellow symptoms on prairie gentian, which appeared 20 days after inoculation with TSWV isolated from prairie gentian.

葉試料からは DNA 断片は増幅されなかった (Fig. 1)。さらに, PCR 増幅産物を pUC 18 の *Sam* I 部位にクローニングし塩基配列を調べたところ, 既報の TSWV-D⁶ と 95%, TSWV-10⁶ とは 94%, TSWV-Bulgarian⁴⁾ とは 96% の高い相同性が認められた。

以上の結果から, トルコギキョウに黄化, えそ症状を起こす病原ウイルスはトマト黄化えそウイルスと同定された。TSWV は 1915 年にオーストラリアのトマトから分離された Tospovirus グループのタイプウイルスで¹⁾, 日本では 1970 年にダリアで初めて発生が確認された⁸⁾。Tsuda *et al.*⁹⁾ はヌクレオキャプシドの血清学的関係と S RNA のハイブリダイゼーションの結果から, 日本産 TSWV を普通系とスイカ系に分類した。その後, スイカ系については S RNA のヌクレオキャプシドタンパク質遺伝子の塩基配列から Yeh and Chang¹¹⁾ の報告したスイカ灰白色斑紋ウイルスに改められた¹⁰⁾。本研究におけるトルコギキョウ分離株は, ウリ科植物に全身感染しないこと, TSWV の普通系の抗血清とよく反応することから TSWV 普通系に属する分離株であると考えられた。

トルコギキョウから TSWV が分離・同定された報告はこれまでに見あたらない。よって, 本病をトルコギキョウ黄化えそ病 (spotted wilt disease of prairie gentian) と命名することを提案したい。

本研究を行うに当たり, 貴重な助言をいただいた農林水産省農業研究センター本田要八郎博士に厚く御礼申し上げる。

引用文献

1. Ie, T.S. (1970). Tomato spotted wilt virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 39.
2. 井上幸次・粕山新二・畑本 求 (1995). トルコギキョウから分離されたカボチャモザイクウイルス (WMV2) について. 日植病報 61: 274 (講要).
3. 岩木満朗・Maria, E.R.A.・花田 薫・小野木静夫・善林六朗 (1985). トルコギキョウに発生した3種のウイルス. 日植病報 51: 355 (講要).
4. Maiss, E., Ivanova, L., Breyel, E. and Adam, G. (1991). Cloning and sequencing of the S RNA from a Bulgarian isolate of tomato spotted wilt virus. J. Gen. Virol. 72: 461-464.
5. 松尾和敏・太田孝彦 (1992). キュウリモザイクウイルスによるトルコギキョウえそモザイク病 (新称). 日植病報 58: 113 (講要).
6. Qiu, W.P., Geske, S.M., Hickey, C.M. and Moyer, J.W. (1998). Tomato spotted wilt tospovirus genome reassortment and genome segment-specific adaptation. Virology 244: 186-194.
7. 竹内繁治・古谷真二 (1992). トルコギキョウ (*Eustoma grandiflorum*) におけるインゲンマメ黄斑モザイクウイルス (BYMV) の発生. 日植病報 58: 616-617 (講要).
8. 津田新哉 (1994). 我が国に発生するトマト黄化えそウイルスとその特性. 植物防疫 48: 497-501.
9. Tsuda, S., Hanada, K., Minobe, Y., Kameya-Iwaki, M. and Tomaru, K. (1993). Tomato spotted wilt virus isolates in Japan are grouped into two strains. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 59: 626-634.
10. Tsuda, S., Kameya-Iwaki, M., Hanada, K., Tomaru, K. and Minobe, Y. (1996). Grouping of five tospovirus isolates from Japan. Acta Hort. 431: 176-185.
11. Yeh, S.D. and Chang, T.F. (1995). Nucleotide sequence of N gene of watermelon silver mottle virus, a proposed new member of the genus *Tospovirus*. Phytopathology 85: 58-64.

(平成 11 年 2 月 24 日受付; 平成 11 年 4 月 30 日受理)