

インパチエンスネクロティックスポットウイルス(INSV)による トルコギキョウえそ斑紋病 (新称)

土井 誠²・加藤公彦
(静岡県農業試験場)

Necrotic Spot Disease of Lisianthus Caused by *Impatiens Necrotic Spot Virus* (INSV)

Makoto DOI³ and Kimihiko KATO

摘 要

1998年4月に静岡県内の施設栽培トルコギキョウの葉にえそ斑点やえそ斑紋等の症状が発生した。発病株からウイルスを分離し、得られた分離株の汁液接種によりトルコギキョウで原病徴が再現された。分離株の宿主範囲, ミカンキロアザミウマによる伝搬, 電子顕微鏡観察, 血清反応, ヌクレオキャプシドタンパク質領域の一部の塩基配列について検討した。これらの結果から本ウイルスをインパチエンスネクロティックスポットウイルス (INSV) と同定した。INSVによる病害をえそ斑紋病と命名したい。

トルコギキョウ (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn) は主に切り花として利用されているアメリカ合衆国原産のリンドウ科の作物で, 最近10年間で栽培面積が倍増している。これに伴い, 多種類のウイルス病の発生が報告されている (日本植物病理学会編, 日本植物病名目録, 2000; 内川ら, 2002; 山下ら, 2002; 土井ら, 2003)。

1998年4月に静岡県西部地域の施設栽培トルコギキョウの葉にえそ斑点やえそ斑紋, えそ輪紋等のウイルス病害と考えられる症状が発生した。本病害の病原の諸性質を検討した結果, インパチエンスネクロティックスポットウイルス (INSV) と同定され, さらに, トルコギキョウ主要品種のINSVに対する反応を検討したので報告する。本試験を行うにあたり貴重なINSV分離株を分譲いただいた岡山県農業総合センターの谷名光治氏および井上幸次氏に深謝し上げる。

材料および方法

病原ウイルスの分離

採集した発病株から *Chenopodium quinoa* で2回単病

斑分離を行った後, *Nicotiana benthamiana* で増殖して T1分離株を得た。汁液接種は, 10倍量 (W/V) の 10mMNa₂SO₄含有0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0) を加え, 氷上で冷却した乳鉢中で発病葉を磨碎してカーボランダム法で行った。

原病徴の再現

T1分離株が本病の病原であることを確認するため, 健全なトルコギキョウ (品種 'あずまの調') の葉に汁液接種し, ガラス温室内で約1ヶ月間病徴を観察した。接種には3株供試し, 対照として無接種区を設けた。病徴が再現された株は *C. quinoa* へ戻し接種を行うとともにRT-PCR法により病原ウイルスの存在を確認した。RT-PCRは, RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて発病葉からRNAを抽出し, OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) により行った。プライマーは, INSV特異的プライマーS1INSVとS2INSV (Weeks et al., 1996) を用いた。PCRは95 30秒, 55 30秒, 72 1分を1サイクルとして合計40サイクル行った。

1 本報要旨の一部は, 平成14年度日本植物病理学会大会 (2002年4月4日, 大阪府吹田市) において発表した。

2 現在, 静岡県西部農林事務所

3 Address: Seibu Agriculture and Forestry Office, Higashitamachi 87, Hamamatsu, Shizuoka 430-0915, Japan

2003年5月1日受領

宿主範囲

T1分離株の宿主範囲を調査するため、12科25種の植物に汁液接種し、ガラス温室内で約1ヶ月間病徴を観察した。接種には植物種当たり3～5株を供試した。対照としてINSV(谷名ら, 2001)供試した。

ミカンキイロアザミウマによる伝搬

T1分離株を汁液接種し発病したトルコギキョウ上葉をミカンキイロアザミウマ(*Frankliniella occidentalis*)の卵とともにプラスチックシャーレに入れ、25℃、16時間照明の陽光インキュベータ内で保持した。その後、孵化した幼虫が成虫になるまでの間、トルコギキョウ発病葉を餌として継続的に摂食させることによりウイルスを獲得吸汁させた。羽化成虫を採集し、健全インパチエンス6株に株当たり6～7頭放飼して1週間接種吸汁させた。殺虫剤散布によりアザミウマを除去した後、インパチエンスをガラス温室内で1ヶ月間維持し発病を観察するとともに、INSV抗血清(Agdia)を用いたDIBA法により病原の有無を確認した。対照として健全トルコギキョウ葉で飼育したミカンキイロアザミウマを供試した。

電子顕微鏡観察

T1分離株の接種により発病したトルコギキョウ上葉を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で磨碎し、2%グルタルアルデヒドで固定後、2%リンタングステン酸(pH6.8)で染色し電子顕微鏡観察した。

血清学的性質

T1分離株のINSV(Agdia)、IYSV(Agdia)及びTSWV(日本植物防疫協会)抗血清に対する反応を、トルコギキョウ感染上葉を用いてDAS-ELISA法により調査した。粗汁液の希釈濃度は50倍(w/v)とし、各抗体の希釈濃度はキットに付属のプロトコールに従った。対照としてINSV(サイネリア分離株)(谷名ら, 2001)、IYSV(T2分離株)(土井ら, 2003)及びTSWV(Tospo-C分離株)(加藤ら, 2000)を供試した。

ヌクレオキャプシドタンパク質(N)遺伝子の一部の塩基配列解析

INSVのN遺伝子領域の約90%を増幅するプライマーS1UNIVとS2UNIV(Weeks et al., 1996)を用いてRT-PCRを行い、その増幅産物を1%アガロースゲルで電気泳動して約900bpの特異的増幅断片をゲルから切り出した。それをQIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen)で精製後、pGEM-T Easy vector(Promega)

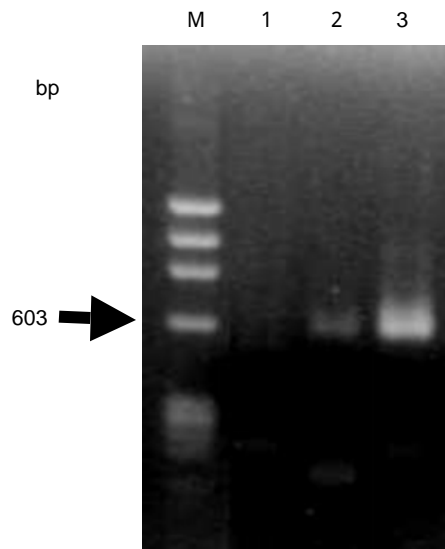
にクローニングした。DNA塩基配列はDye Primer Cycle Sequencing Kit(Perkin-Elmer)を用いて決定した。塩基配列の解析はGENETYX-MACソフトウェア(ソフトウェア開発)により行った。

INSV接種によるトルコギキョウ品種の反応

T1分離株をトルコギキョウ12品種の葉に汁液接種し、発生する病徴をガラス温室内で約1～3ヶ月間にわたり観察した。接種は1品種当たり3株、株当たり2葉に行った。



第1図 T1分離株を接種したトルコギキョウの病徴



第2図 RT-PCR法によるINSV検出
 レーンM：分子量マーカー X174HaeIII
 レーン1：健全トルコギキョウ
 レーン2：INSV接種トルコギキョウ
 レーン3：T1分離株接種トルコギキョウ

結 果
病徴の再現

T1分離株をトルコギキョウに戻し接種すると接種4~7日後には接種葉にえそ斑点が生じた。全身感染病徴は接種7~30日後から発生し、茎のえそ条斑や葉のえそ斑点、えそ斑紋、黄化等が観察され、これらは原病徴と類似していた(第1図)。病徴が再現された株を*C. quinoa*へ戻し接種すると局部感染が観察され、また、RT-PCRでは発病株に特異的な約600bpの

DNA断片が増幅されたことから(第2図)、発病部に病原が存在することが確認された。

宿主範囲

接種した12科25種のうち8科14種に感染したが、全身感染した植物は*Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*(ナス科)、トルコギキョウ(リンドウ科)、インパチエンス(ツリフネソウ科)及びハウレンソウ(アカザ科)の4科5種のみであった(第1表)。T1分離株が全身感染できる宿主は調査した範囲では限られてい

第1表 T1分離株の宿主範囲と病徴

科名	植物	品種	病徴(接種葉/上葉) ^{a)}	
			T1	INSV ^{b)}
アカザ科	<i>Chenopodium quinoa</i>		NS/ -	NS/ -
	<i>C. amaranticolor</i>		NS/ -	
	ハウレンソウ	タイタン	(CS/CS,Y)	
ナス科	<i>Nicotiana benthamiana</i>		- / M,CS,Y	CS/Y,N
	<i>N. glutinosa</i>		- / M	
	<i>N. rustica</i>		- / -	(CS/ -)
	<i>N. tabacum</i>		- / -	
	<i>Datura stramonium</i>		CS/ -	NS,Rsn/ -
	ペチュニア		NS/ -	
	トマト	瑞健	- / -	
リンドウ科	トルコギキョウ		NS/N,NS,Str	- / -
ウリ科	キュウリ	霜知らず地這	- / -	
	ペボカボチャ	バターナッツ	- / -	
マメ科	ソラマメ		N/ -	
	ササゲ		CS/ -	
アブラナ科	ダイコン	景德	- / -	- / -
	ハクサイ	青海	- / -	- / -
	キャベツ		- / -	
	センニチコウ		NS/ -	
ゴマ科	ゴマ	白ゴマ	(NS) -	
キク科	レタス	極早生シスコ	- / -	
	キク	秀芳の力	NS/ -	
シソ科	シソ		- / -	
セリ科	ニンジン	大型五寸	- / -	- / -
ツリフネソウ科	インパチエンス		NS / Rsn,NS	- /Rsn,NS,Str

a) CS=退緑斑点, M=モザイク, N=えそ, NS=えそ斑点, Y=黄化, Rsn=えそ輪紋, Str=茎えそ, ()=時に見られる病徴, - =無病徴

b) サイネリアからの分離株(谷名ら, 2001)

第2表 T1分離株のミカンキロアザミウマによる媒介^{a)}

ウイルス獲得処理の有無	発病株数/供試株数	検出株数 ^{b)} /供試株数
あり	5/6	5/6
なし	0/3	0/3

a) 健全インパチエンス1株当たり成虫6~7頭を放飼した

b) INSV抗血清を用いたDIBA法により検定した

た。

ミカンキイロアザミウマによる伝搬

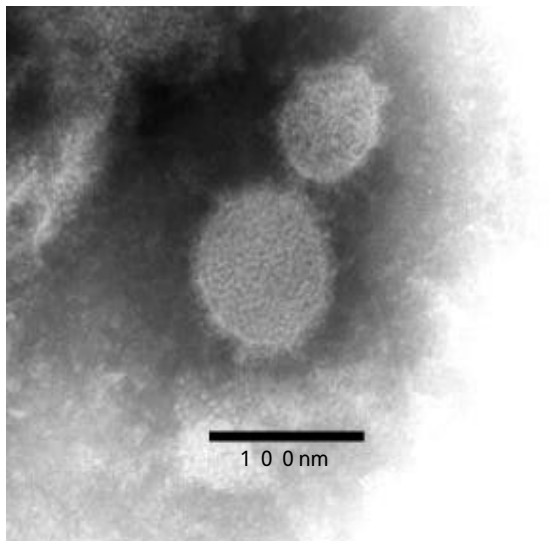
T1分離株を獲得吸させたミカンキイロアザミウマを放飼したインパチエンスの6株中5株で発病が認められた(第2表)。また、これら発病株はすべてINSV抗体に対してDIBA法で陽性反応を示した。これらのことから、T1分離株はミカンキイロアザミウマにより伝搬されることが確認された。

電子顕微鏡観察

T1分離株の接種により発病したトルコギキョウ上葉から直径70~130nm(平均93nm)の被膜を持つ球状粒子が観察された(第3図)。この粒子の形態はトスポウウイルスで報告されているものとよく類似していた。

血清学的性質

DAS-ELISA検定において、T1分離株はINSV抗体とのみ明瞭な反応が認められ、TSWV及びIYSV抗体とは反応しなかった(第3表)。



第3図 T1分離株の電子顕微鏡写真

N遺伝子の一部の塩基配列解析

RT-PCRにより増幅された約900bpのDNA断片について塩基配列を解析した結果、ウイルス相補鎖にN遺伝子をコードすると考えられるORFが検出された。この701bpについて塩基配列及び推定アミノ酸配列を既報のINSV(de Haan P. et al., 1992)と比較した結果、塩基配列で99.1%、アミノ酸配列で99.6%の相同性であった。また、秋田県のトルコギキョウから検出されているINSV(藤ら, 2000)とはアミノ酸配列で99.1%の相同性であった(第4表)。

トルコギキョウ品種の反応

T1分離株を接種したトルコギキョウ12品種すべてにおいて、接種葉にはえそ斑、えそ輪紋等の症状が発生したが、全身感染については品種間差が認められ、‘つくしの雪’では全身感染しなかった(第5表)。

考察

本病の病原であるT1分離株は汁液伝染可能で、かつミカンキイロアザミウマによって伝搬された。この伝染方法はINSVの伝染方法(Daughtrey et al., 1997)と同一である。また、本病原の宿主範囲は、既報のINSVのもの(谷名ら, 2001)に類似していた。さらに、電子顕微鏡で観察されたウイルス粒子の特徴は、INSVが属するトスポウウイルス属のものに一致した。その上、T1分離株はDAS-ELISA法においてINSV抗体とのみ強く反応し、TSWV抗体およびIYSV抗体とは反応が認められなかった。これらの結果をさらに確認するために行ったN遺伝子領域の解析により、アミノ酸配列の相同性が既報のINSV(de Haan et al., 1992; 藤ら, 2000)と99%以上であることが判明した。以上の結果から、トルコギキョウにえそ斑点、えそ斑紋等の症状を起こす病原ウイルスをINSVと同定した。わが国において、トルコギキョウからのINSVの検出は藤ら(2000)によって報告されているが、戻し接種はなされておらず、病名も未記載である。このため、本病をトルコギキョウえそ斑紋病と命名することを提案

第3表 INSV, TSWV, IYSVに対する抗血清を用いたDAS-ELISAによるT1分離株の検定結果

抗体	ウイルス				健全対照
	T1	INSV	TSWV	IYSV	
INSV	1.434 ^{a)}	1.383	0.012	0.010	0.014
TSWV	0.008	0.011	1.484	0.005	0.011
IYSV	0.009	0.014	0.009	1.357	0.013

a) 405nm吸光値(3反復平均)

第4表 T1分離株と既報のINSVのヌクレオキャプシドタンパク質領域の塩基およびアミノ酸配列の比較^{a)}

INSV分離株 (Accession No.)	相同性 (%)	
	相同性 (%)	アミノ酸配列
INSV NL-07 (X66972)	99.1	99.6
INSV - 秋田 ^{b)}	-	99.1

a) 701塩基および233アミノ酸について比較した

b) 藤ら (2000)

第5表 T1分離株の汁液接種によるトルコギキョウ品種の反応

品種名	病徴(接種葉/上葉) ^{a)}	備考 接種日
キュートピンク	NS,Rsn/N,NS,Str,CB	8月26日
キュートホワイト	NS/N,NS,RsnStr,CB	8月26日
キュートブルーピコティ	NS,Rsn/NS,Str	8月26日
キュートピンクピコティ	NS/N,NS,Rsn,Str,CB	8月26日
リネーションブルー	NS/NS,N,CB	8月26日
リネーションピンク	NS/NS,N,CB	8月26日
つくしの薫	NS/NS,Str,CB	8月26日
つくしの雪	NS/ -	8月26日
キングオブスノー	(NS)/NS,N,Str	1月13日
あずまの調	NS/N,NS,Str	1月13日
あずまの波	NS/NS,N,Str	1月13日
彩の波	NS/NS,N,CB	1月13日

a) N = えそ斑紋, NS = えそ斑点, Rsn = えそ輪紋,

Str = 茎えそ, CB = 花色変異,

() = 時に見られる病徴, - = 無病徴

したい。

トルコギキョウ12品種へのINSVの汁液接種試験によりINSVに対するトルコギキョウの感受性には品種間差があることが明らかとなった。このことから、今後はINSVに対する感受性の低い品種の育成が望まれる。

本ウイルスはバーベナで我が国での初発生が報告(入山ら, 1999)されて以降, 多種類の花きで本ウイルスによる被害が相次いで発生している(谷名ら, 2001; 藤ら, 2000; 久保ら, 2002)。本ウイルスのベクターであるミカンキイロアザミウマはすでに全国的に分布しており, 今後の発生拡大には十分な注意が必要である。

引用文献

Daughtrey, M. L. et al. (1997) Plant Disease 81 : 1220 - 1230 .

土井誠ら (2003) 日植病報 69 : 181 - 188.

藤晋一・山本英樹 (2000) 北日本病虫研報 51 : 122 - 125.

入山敬一ら (1999) 日植病報 65 : 379 (講要).

加藤公彦・花田薫 (2000) 九病虫研会報 46 : 61 - 65.

久保周子ら (2002) 関東病虫研報 49 : 59 - 62.

日本植物病名目録 (2000) 日本植物病理学会編. 日本植物防疫協会. 東京. 220 pp.

谷名光治ら (2001) 日植病報 67 : 42 - 45.

内川敬介ら (2002) 日植病報 68 : 50 (講要).

山下一夫・福井要子 (2002) 日植病報 68 : 235 (講要).

de Haan, P. et al. (1992) FEBS Lett. 306 : 27 - 32.

Weekes, R. J. et al. (1996) Acta Horticulture 431 : 159 - 166.