インパチエンスネクロティックスポットウイルスによるシネラリアえそ斑紋病

谷名 光治^{1*}・井上 幸次¹・伊達 寛敬¹・奥田 充²・花田 薫²・那須 英夫¹・粕山 新二¹

ABSTRACT

TANINA, K.^{1*}, INOUE, K.¹, DATE, H.¹, OKUDA, M.², HANADA, K.², NASU, H.¹ and KASUYAMA, S.¹ (2001). Necrotic spot disease of cineraria caused by *Impatiens necrotic spot virus*. Jpn. J. Phytopathol. 67: 42-45.

In February 1999, cineraria (*Senecio* × *hybridus*) plants with necrotic ring spot were found in Okayama Prefecture, Japan. A spherical virus with a diameter of ca. 85~120 nm was isolated. The virus infected seven plant species of four families after mechanical inoculation. In serological tests, the virus was closely related to *Impatiens necrotic spot virus* (INSV). In RT-PCR with INSV-specific primers, a fragment of about 900 bp was amplified. The fragment had a high degree of nucleotide sequence homology with the S RNA of INSV. Based on these results, the virus isolated from cineraria was identified as INSV. This is the first report of INSV on cineraria in Japan.

(Received May 29, 2000; Accepted September 19, 2000)

Key words: cineraria, necrotic spot disease, *Impatiens necrotic spot virus*.

シネラリア (*Senecio* × *hybridus*) は、カナリア諸島原産のキク科の花き作物で、冬から春にかけて鉢ものとしての需要が大きい。1999年2月、岡山県中北部のハウス栽培シネラリアにウイルス性の病害が発生した。シネラリアのウイルス病は日本において記載がないが、病徴および原株からの汁液接種による判別植物の反応からウイルス病であると考えられた。このシネラリアから分離されたウイルスの諸性質を検討した結果、本病は *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) によることが判明したのでここに報告する。

シネラリア原株の病徴 岡山県で発生したシネラリアのウイルス性病害の病徴は、株全体にえそ斑紋を伴う激しい黄化や萎縮症状 (Plate I-1) を呈し、開花後の花卉には奇形やカラーブレイキング (Plate I-2) が見られるものであった。

接種植物の反応 シネラリア原株の黄化した葉の汁液をペチュニアに接種し、接種葉の局部病斑から単一病斑分離を1回行ってウイルスを分離した後、*Nicotiana benthamiana* で増殖させ分離株 Cin9902 を得た。最低気温を 15°C に設定

したガラス室内で育成した7科14種の検定植物に、Cin9902をカーボランダム法で汁液接種し、約1か月にわたり病徴を観察した。これらの植物における病徴を Table 1 に示した。接種植物のうち、特徴的な病徴は以下のとおりである。

シネラリア：接種7日後に接種葉にえそ斑紋 (Plate I-5) を生じ、やがて全身感染した (Table 1)。これらの病徴は原株と同様のものであった。

インパチエンス：全身感染してえそ輪紋やえそ斑点を生じ、株は萎縮した。

ペチュニア：接種葉にえそ斑点 (Plate I-3) が現れたが、全身感染はしなかった。

N. benthamiana：上位葉に激しいモザイクを生じ (Plate I-4)、やがて株が萎凋し、枯死した。

病原の同定 Cin9902 の接種により原病徴が再現されたシネラリア葉片を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で磨砕し、2% グルタルアルデヒド固定、2% リンタングステン酸 (pH 7.0) 染色の後、電子顕微鏡で観察した。その結果、直径 85~120 nm の膜に包まれた球状粒子が観察

¹ 岡山県農業総合センター農業試験場 (〒709-0801 岡山県赤磐郡山陽町) Agricultural Experiment Station, Okayama Prefectural General Agriculture Center, Sanyo-cho, Okayama 709-0801, Japan

² 九州農業試験場 (〒861-1192 熊本県菊池郡西合志町須屋) Kyushu National Agricultural Experiment Station, 2421, Suyu, Nishigoushi, Kikuchi, Kumamoto 861-1192, Japan

* Corresponding author (E-mail: kouji_tanina@pref.okayama.jp)

Table 1. Responses of test plants after mechanical inoculation with the virus isolated from diseased cineraria

Plant species	Symptoms ^{a)}
<i>Nicotiana tabacum</i> (cv. Burley 21)	—/—
<i>N. clevelandii</i>	RSn, NS/N, Y, Stu
<i>N. benthamiana</i>	—/N, Y, Stu
<i>Datura stramonium</i>	—/—
<i>Capsicum annuum</i> (cv. Senryo)	—/—
<i>Petunia</i> × <i>hybrida</i> (cv. Glitters Select)	NS/—
<i>Lycopersicon esculentum</i> (cv. Ponderosa)	RSn/—
<i>Chenopodium quinoa</i>	NS/—
<i>Tetragonia expansa</i>	—/—
<i>Phaseolus vulgaris</i> (cv. Honkintoki)	—/—
<i>Vigna unguiculata</i> (cv. Kurodanesanjaku)	—/—
<i>Senecio</i> × <i>hybridus</i>	RSn, NS/N, Y
<i>Impatiens walleriana</i>	—/RSn, NS, Str
<i>Begonia semperflorens</i>	—/—

Inoculum source was isolated from single lesion on diseased cineraria (Cin9902).

a) Inoculated/upper leaves

NS, necrotic spot; RSn, necrotic ringspot; N, necrosis; Str, streak; Y, yellowing; Stu, stunt; —, no symptom.

された (Plate I-6). これらの結果から病原はトスポウイルスに類似のものと考えられたので、トマト黄化えそウイルス (TSWV) (日本植物防疫協会) および INSV (日本サノフィ社) を検出するための市販の ELISA 用キットを用いて血清試験を行った。その結果、Cin9902 を接種した *N. clevelandii* の上位葉の汁液は抗 INSV 血清とよく反応したが、抗 TSWV 血清との反応は認められなかったことから、Cin9902 は INSV であると考えられた。

ELISA の結果をさらに確認するために、既報の INSV の塩基配列⁴⁾ をもとに S RNA のヌクレオキャプシド (N) タンパク質遺伝子を含む部分を増幅するように設計したプライマーペア: IS-F (TAACACAACACAAAGCAAACC) および IS-R (CCAAATACTACTTTAACC GCA) を用いて、RT-PCR を試みた。まず、分離したウイルスを *C. quinoa* (Plate I-7) および *N. clevelandii* (Plate I-8) に接種し、その感染葉からフェノール/クロロホルム抽出と塩化リチウム沈殿法によって得た全核酸試料を鋳型として、RNA PCR Core Kit (PE ABI) を用いて RT-PCR を行った。逆転写反応は 42°C で 30 分間行った。PCR は 96°C 40 秒、45°C 60 秒、72°C 90 秒を 1 サイクルとし、合計 40 サイクル行った。その結果、両植物の感染葉試料から、予想される約 900 bp の単一の DNA 断片が増幅された (Fig. 1)。PCR 増幅産物を pBluescript SK の EcoRV 部位にクローニングし塩基配列を決定した。BLAST プログラムを用い

Fig. 1. Detection of INSV from infected *Chenopodium quinoa* and *Nicotiana clevelandii* by RT-PCR. Samples of the reaction mixture were subjected to 1% agarose gel electrophoresis. Lane M, DNA size marker (Gibco-BRL); lane 1, infected leaf of *C. quinoa* for INSV; lane 2, infected leaf of *N. clevelandii* for INSV; lane 3, infected leaf of *C. quinoa* for TSWV; lane 4, infected leaf of *N. clevelandii* for TSWV. Arrowhead indicates expected size.

て本配列の相同性検索を行ったところ、既報の INSV⁴⁾ と高い相同性を示した。また、塩基配列から DNASIS (日立ソフトウェアエンジニアリング) を用いて読み枠 (ORF) を検索したところ、ウイルス相補鎖に 262 アミノ酸より成る N タンパク質をコードすると考えられる ORF が検出された。本ウイルスの N タンパク質の推定アミノ酸配列を INSV のものと比較したところ、99% の相同性が認められた。また、同じサンプルを用いて TSWV 検出用のプライマーペア⁵⁾: TsCP5' (CTGCTTTAAGCAAGTTCTGC) および TsCP3' (TCTCGTTACACAGTTTAAAA) を用いて同様に RT-PCR を行ったが、小さい DNA 断片が増幅されただけで、想定される約 950 bp の大きさの DNA 断片は増幅されなかった。

以上の結果からシネラリアにえそ斑紋、黄化症状を起こす病原は INSV と同定された。INSV は 1990 年にアメリカのインパチエンスからはじめて分離されたトスポウイルス属に属するウイルスである³⁾。日本では 1999 年に静岡県のパーベナで ELISA 検定によって検出されたが、戻し接種には成功していない²⁾。本研究によってシネラリアに発生したえそ斑紋症状は INSV によることが明らかとなったので、本病をシネラリアえそ斑紋病と命名することを提案したい。我国で INSV による病害を確認したのは本報が

最初である。なお、シネラリア原株と同じ場所で採集した、葉にえそ斑紋を示していたインパチエンスからも、直接 ELISA 法および RT-PCR で INSV が検出された。INSV は、外国ではこれまで多くの作物、特に花きや数種の野菜での発生が報告されていることから¹⁾、今後、我が国でも花き栽培が盛んになるにつれ、INSV による病害の発生拡大が懸念される。

引用文献

1. Daughtrey, M.L., Jones, R.K., Moyer, J.W., Daub, M.E. and Baker, J.R. (1997). Tospoviruses strike the greenhouse industry, INSV has become a major pathogen on flower crops. *Plant Dis.* 81: 1220-1230.
2. 入山敬一・平田久笑・大島研郎・難波成任 (1999). バー

ベナから検出された impatiens necrotic spot virus (INSV). *日植病報* 65: 379 (講要).

3. Law, M.D. and Moyer, J.W. (1990). A tomato spotted wilt-like virus with a serologically distinct N protein. *J. Gen. Virol.* 71: 933-938.
4. Law, M. D., Speck J. and Moyer, J.W. (1991). Nucleotide sequence of the 3' non-coding region and N gene of the N RNA of a serologically distinct tospovirus. *J. Gen. Virol.* 72: 2597-2601.
5. Tsuda, S., Fujisawa, I., Nakano, M., Hanada, K., Kameya-Iwaki, M., Hidaka, S. and Tomaru, K. (1994). Nucleotide sequence of N protein gene and 3'-terminal regions of tomato spotted wilt virus-O strain. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 60: 375.

Explanation of Plate

Plate I

1. Necrosis and malformation on original diseased cineraria plant (*Senecio × hybridus*).
2. Color breaking and malformation of flowers on cineraria plant.
3. Necrotic spots on leaves of *Petunia × hybrida* mechanically inoculated with the virus isolated from diseased cineraria plant.
4. Severe yellowing and distortion on upper leaves of *Nicotiana benthamiana* inoculated with the virus.
5. Necrotic spots on a leaf of cineraria inoculated with the virus.
6. Clustered virions with outer membranes observed with electron microscopy.
7. Necrotic spots on leaf of *Chenopodium quinoa* inoculated with the virus.
8. Necrotic spots on leaves of *N. clevelandii* inoculated with the virus.

Plate I