

## 日本に発生したトマト黄化えそウイルス (TSWV) による キク (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) えそ病

加藤 公彦<sup>1)</sup>・花田 薫<sup>2)</sup>  
(<sup>1)</sup>静岡県農業試験場・<sup>2)</sup>九州農業試験場)

**A necrotic disease of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) caused by Tomato spotted wilt virus (TSWV) in Japan.** Kimihiko Kato<sup>1)</sup> and Kaoru Hanada<sup>2)</sup>  
(<sup>1)</sup> Shizuoka Agricultural Experiment Station, Toyoda, Shizuoka 438-0803, Japan. <sup>2)</sup> Kyushu National Agricultural Experiment Station, Nishigoushi, Kumamoto 861-1192, Japan)

A virus-like disease of chrysanthemums occurs in Shizuoka prefecture, Japan. Symptoms of the disease include foliar necrosis and necrotic streaks on the stems. A pathogen isolated from diseased plants was transmitted by *Frankliniella occidentalis*. The pathogen reacted with *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) antiserum in western blots in which a protein the same size as the TSWV nucleocapsid protein (NP) was detected. The pathogen had a broad host range, systemically infecting 23 species from 7 families out of 39 species from 11 families tested. An electron microscopy study of the pathogen using ultrathin sections of systemically infected *Nicotiana rustica* leaves revealed clusters of spherical particles 87 nm in diameter within cisternae of the endoplasmic reticulum and filamentous inclusions in the cytoplasm of infected cells. The NP amino acid sequence of the pathogen shared 97.7% identity with that of TSWV. From these results, the pathogen was identified as TSWV. A wide range of susceptibility to TSWV was found in chrysanthemum cultivars, and susceptibility varied greatly depending on the virus isolate.

**Key words :** chrysanthemum, susceptibility of chrysanthemum cultivars, *Tomato spotted wilt virus*

日本でキク (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) にこれまでに発生報告のあるウイルスは *Chrysanthemum virus B* (栃原, 1968), *Cucumber mosaic virus* (日高・鈴木, 1967), *Tomato aspermy virus* (井上ら, 1967) の3種である。1993年に静岡県西部地域のキクに今までにないウイルス病らしき病徴を示す株が発生した。葉の一部もしくは全体が枯死し、節間にえそ条斑が発生するのが病徴の特色であった (第1図)。この病害は多発すると、ほ場内のほぼ全株に被害が及んだ。本病害の病原の諸性質を検討した結果、トマト黄化えそウイルス (TSWV) であると考えられた。

TSWV は *Tospovirus* 属に属するウイルスである。日本での TSWV の発生は検疫中のダリア (*Dahlia* spp.) が最初の報告で、その後、多くの植物に被害を発生させている (津田, 2000)。TSWV の重要なベクターとして知られるミカンキイロアザミウマ (*Frankliniella occidentalis* Pergande) は1990年に日本に侵入し、薬剤

抵抗性が発達していることや寄主範囲が広いことから園



第1図 キクに発生した新病害の病徴キク品種 '秀芳の力' に発生した葉のえそ症状。

芸作物の重要な害虫となっている（佐伯，1998）。キクでは花卉と葉を加害するため、ミカンキイロアザミウマの防除なしには生産ができないほどである。

本研究では、静岡県に発生したキクの新病害の病原を同定するとともに、栽培上重要となるキク主要品種のTSWV感受性を検討したので、その結果を報告する。

なお、本研究で使用したTSWVのヌクレオキャプシドプロテイン（NP）に対する抗血清は山口大学 亀谷満朗博士より分譲して頂いたものを使用したもので、ここに記して深謝の意を表する。

## 実験材料および方法

### 1. 病原の分離

TSWVのNPに対する抗血清を用いたDIBA法（Hibi and Saito, 1985）で、キクの現地発病株は陽性反応を示したため、病原の分離を行った。キク品種‘翔雲’の現地発病株より、単病斑分離により病原分離株（Tospo-C）を得た。10倍量（w/v）の10mM Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>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砕し、粗汁液を作成した。*Chenopodium quinoa* Wildの葉に、カーボランダムとともに粗汁液を擦り付け接種した。この汁液接種方法を以後の実験でも用いた。*C. quinoa*の葉で3回単病斑分離を行った後、*Nicotiana rustica* L.で病原を増殖し、接種源とした。接種源は-80℃に凍結保存した。本研究にはこの他に、奈良県のトマト（*Lycopersicon esculentum* Mill.）から分離したTSWV分離株（TSWV-N）（小島ら，1976）と静岡県のガーベラ（*Gerbera* spp.）から分離したTSWV分離株（TSWV-G）（加藤ら，1996）を供試した。

### 2. 原病徴の再現

単病斑分離により得たTospo-C分離株が本病の原因であることを確認するため、健全なキク品種‘秀芳の力’の葉に汁液接種して、病徴を接種3ヶ月後まで観察した。接種には5株を供試した。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*と*N. rustica*に戻し接種をするとともに、TSWV抗血清を用いたDIBA法により病原の存在を確認した。

### 3. 宿主範囲

Tospo-C分離株の宿主範囲を調査するため、11科39種の植物に汁液接種した。接種には植物種当たり3～6株を供試した。接種葉の病徴は2週間、上葉の病徴は4週間調査し、不鮮明な病徴や無病徴の場合は、*C. quinoa*または*N. rustica*への戻し接種により感染を確認した。

### 4. ミカンキイロアザミウマによる伝搬

Tospo-C分離株を汁液接種し、明瞭な病徴を示すササゲ（*Vigna sinensis* Endl.）感染上葉に孵化直後のミカンキイロアザミウマ1齢幼虫を移し、4日間獲得吸汁させた。その後、健全ササゲで飼育し、羽化した成虫を伝搬試験に用いた。健全なソラマメ（*Vicia faba* L.）とササゲに株当たり2頭ずつ成虫を放飼し、3日間接種吸汁させた。ソラマメとササゲはそれぞれ5株ずつ供試した。農薬散布により殺虫した後、発病を観察した。対照として、獲得吸汁を行わなかったミカンキイロアザミウマを用いた。発病株は*C. quinoa*および*N. rustica*へ戻し接種し、病原の存在を確認した。

### 5. 電子顕微鏡観察

汁液接種によりTospo-C分離株を*N. rustica*に感染させ、その発病上葉を電子顕微鏡観察に用いた。固定、脱水、包埋処理をした後にマイクロトームで薄切片し、2重染色した（Iwaki et al., 1984）。電子顕微鏡観察は日立H-7100で行った。対照として、健全な*N. rustica*を用いた。

### 6. 血清学的特性

Tospo-C分離株の接種により、明瞭な病徴を示す*N. rustica*の感染上葉を用いて、TSWVのNPに対する抗血清との反応をウエスタンブロット法（村松，1996）により調査した。12%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、湿式の転写装置でタンパク質をニトロセルロースメンブレン（Amersham Pharmacia）に転写し、Hibi and Saito（1985）の方法により免疫染色を行った。TSWV抗血清は1,000倍希釈で使用した。ビオチン標識SDS-PAGE standards（Bio-Rad）を分子量マーカーとして用い、検出されたタンパク質の大きさを推定した。

### 7. NP遺伝子の塩基配列の解析

Hanada et al.（1993）の方法に準じ、Tospo-C分離株の*N. rustica*感染葉からヌクレオキャプシドを部分純化した。1% SDSで処理後、ヌクレオキャプシドを1.3%低融点アガロースゲルで電気泳動し、S RNAを回収した。NP遺伝子をクローニングするため、回収したS RNAを鋳型としてRT-PCR法によりS RNAの3'末端から約0.9kbの増幅を行った。既報のTSWVのS RNAの塩基配列（de Haan et al., 1990; Maiss et al., 1991）よりプライマー対（A: 5'-AGAGCAATCGTGTCAATTTT-3', B: 5'-CTGCTTTTAAGCAAGTTCTG-3'）を設計し、RNA PCR Core Kit（Perkin-Elmer）を用いて、Kitに付属しているプロトコールに従いRT-PCRを行った。ただし、PCR反応時のMg<sup>2+</sup>濃度は2 mMとした。Aプライマーを用い、42℃で15分間逆転写

反応を行い、引き続き、GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer) を使用し、Bプライマーを加えた後にDNA変性94°C20秒、アニーリング55°C40秒、DNA伸長72°C20秒を1サイクルとして35サイクルのPCR反応を行った。RT-PCRの増幅産物はpBluescript II SK+ vector (Stratagene) のEcoRVサイトにクローニングした。Dye Primer Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer) を用い、塩基配列を決定した。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。

### 8. TSWV に対するキク品種の感受性

第3表に示したキク8品種の葉に本病原とTSWV-G分離株を汁液接種し、発生する病徴を3ヶ月間観察した。接種は1品種当たり6~8株、1株当たり1葉に行った。

## 実験結果

### 1. 原病徴の再現

単病斑分離により得たTospo-C分離株をキクに戻し接種すると、接種10日後には接種葉にえそ病斑が発生した。全身感染病徴は接種1ヶ月後に発生し、茎のえそ条

斑や葉のえそが観察された。葉と茎に発生するえそ症状は原病徴に類似していた。発病部位を接種源として*C. quinoa*と*N. rustica*に戻し接種すると、それぞれ局部感染と全身感染が観察された。更に、TSWV抗血清を用いたDIBA法で発病部位に陽性反応が認められたことより、発病部位に病原が存在することが確認された。このことより、えそ症状のキクから分離したTospo-C分離株の接種により原病徴が再現されたと考えらる。

### 2. 宿主範囲

接種した11科39種の植物の内、7科23種が全身感染した(第1表)。ダイコンを除き接種した植物には感染が認められたため、本病原の宿主範囲はきわめて広いと考えらる。

### 3. ミカンキイロアザミウマによる伝搬

本病原を獲得吸汁させたミカンキイロアザミウマ成虫を用いた伝搬試験で、接種吸汁させたササゲとソラマメともに供試5株中1株に発病が観察された。戻し接種によりこれらの発病株には病原の存在が確認された。したがって、本病原はミカンキイロアザミウマにより伝搬されると考えられる。

### 4. 電子顕微鏡観察

本病原が感染した*N. rustica*の発病上葉の超薄切片を観察したところ、細胞質の小胞体中に集塊する球状粒子が頻りに観察された。粒子径を調査した結果、100粒子の平均粒子径は87nmであることが判明した。また、細胞質には繊維状構造物も観察され、この繊維状構造物と球状粒子はしばしば同一細胞の細胞質に観察された。これらの細胞病理学的な特徴はTSWVによるもの(Francki and Grivell, 1970; German et al., 1992)に一致していた。

### 5. 血清学的特性

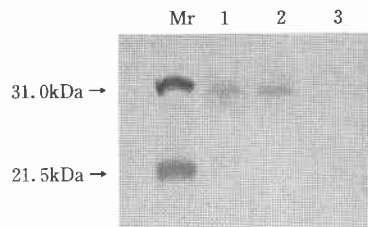
ウエスタンブロット解析により、本病原はTSWV抗血清と反応し、TSWVのNPと同じ大きさのタンパク質

第1表 キクから分離した病原の宿主範囲<sup>a)</sup>

植物名	発病状況	植物名	発病状況
ウリ科		キク科	
キュウリ	L <sup>b)</sup>	ヒャクニチソウ	S
メロン	L	ダリア	S
スイカ	L	キク	S
ユウガオ	L	キンセンカ	S
ニホンカボチャ	L	シュンギク	(S)
ナス科		レタス	L
トマト	S	ガーベラ	S
ピーマン	S	アカザ科	
ナス	S	<i>Chenopodium quinoa</i>	L
ベチュニア	S	<i>Camaranticolor</i>	L
<i>Physalis floridana</i>	S	ハウレンソウ	S
<i>Datura stramonium</i>	S	キョウチクトウ科	
<i>Nicotiana glutinosa</i>	S	ニチニチソウ	S
<i>N. benthamiana</i>	S	ツルナ科	
<i>N. rustica</i>	S	ツルナ	L
タバコ	L	アブラナ科	
マメ科		カブ	L
ササゲ	S	ダイコン	-
インゲン	L	キャベツ	L
ソラマメ	S	セリ科	
ラッカセイ	S	セルリー	L
アズキ	S	ゴマ科	
ダイズ	L	ゴマ	S
ヒユ科			
センニチコウ	S		

<sup>a)</sup> 汁液接種により病原を感染させた。

<sup>b)</sup> S, 全身感染; L, 局部感染; -, 非感染; ( ), ときおり現れる病徴。



第2図 キクより分離した病原のウエスタンブロット解析

TSWVのNPに対する抗血清を1000倍希釈で使用した。Lane Mr, タンパク質分子量マーカー; Lane 1, 本病原感染*Nicotiana rustica*; Lane 2, TSWV-N感染*N. rustica*; Lane 3, 健全*N. rustica*。

が検出された（第2図）。分子量マーカーにより推定したタンパク質の大きさは約30kDaであった。

### 6. NP 遺伝子の解析

RT-PCRにより予想される大きさ（約0.9kbp）の増幅産物が得られた。その増幅産物の塩基配列を解析した結果、本病原のSRNAの3'末端側にORFが存在することが判明した（DDBJ Accession no. AB038341）。このORFにコードされる28.9kDaのタンパク質と既報のTSWVのNP（de Haan et al., 1990）とのアミノ酸配列の相同性は97.7%であった。

### 7. TSWV に対するキク品種の感受性

キクより分離したTospo-C分離株を接種した接種葉の発病程度には品種間差異が認められ、葉にえそ斑点が発生するのみの発病程度が軽い品種から葉全体が枯死する激しい病徴を示す品種まで存在した（第2表）。全身感染病徴は供試8品種中3品種のみに認められた。一方、TSWV-G分離株の接種でも接種葉の発病程度には品種間差異が認められたが、Tospo-C分離株の接種に比較すると発病程度が大幅に軽く、4品種は接種葉に病徴を示さなかった。また、TSWV-G分離株の接種により全身感染病徴を示す品種はなかった。これらの結果より、TSWVに対するキクの感受性には品種間差異があり、またTSWVは分離株によってキクへの病原性に大きな差異があることが判明した。

## 考 察

本病の病原であるTospo-C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り伝搬された。この伝染方法はTSWVの伝染方法（German et al., 1992）と同一である。また、本病原の宿主範囲は奈良県のトマトに発生したTSWV-N分離株の宿主範囲（小島ら、

1976）に類似していた。更に、電子顕微鏡観察により判明した本病原の細胞病理学的特徴はTSWVのものに一致した上に、ウエスタンブロット解析により、本病原感染植物からTSWV抗血清に反応する約30kDaのタンパク質が検出された。これらの実験結果により、本病原はTSWVである可能性が高いが、*Melon yellow spot virus*（Kato et al., 2000）を除きtospovirusは同一の粒子形態を持つ上に、tospovirusの中には*Tomato chlorotic spot virus*や*Groundnut ringspot virus*のようにTSWVとほぼ同じ大きさのNPを持ち、かつTSWV抗血清と反応するウイルスがある（de Avila et al., 1993）ため、これらの結果のみではTSWVであるとは断定できない。tospovirusはNPのアミノ酸配列の類似性に基づき分類され、その相同性が90%以上で同一種とされている（Goldbach and Kuo, 1996）。そこで、TSWVのNPのアミノ酸配列と本ウイルスのものを比較した結果、97.7%の相同性が認められたため、本ウイルスはTSWVであると結論づけられる。TSWVによるキクの病害は本邦初報告であるので、本病をキクえそ病と提唱したい。

キク8品種へのTSWVの接種試験により、TSWVに対するキクの感受性には品種間差異があることと、TSWVのキクへの病原性は分離株により大きく異なることが明らかになった。このことはガーベラでも認められており（Kaminska, 1994）、またキクのTSWV感受性には品種間差異があることはAllen et al.（1990）によっても報告されている。現地では本病がキクに多発すると収穫皆無になることがあるが、このような激発はキクに強い病原性を持つTSWV分離株がTSWVに強い感受性を持つキク品種に感染し、発病に適する温度で栽培されたときに起こると推察される。逆に感受性が低い品種を栽培すれば被害は軽減されると考えられる。しかし、

第2表 TSWV分離株のキク品種に対する病原性<sup>a)</sup>

品種名	接種葉の発病		接種葉の発病程度		全身感染病徴	
	Tospo-C	TSWV-G	Tospo-C	TSWV-G	Tospo-C	TSWV-G
秀芳の力	6/6 <sup>b)</sup>	0/8	+++ <sup>c)</sup>	-	2/6 <sup>d)</sup>	0/8
黄秀芳の力	5/6	0/8	+++	-	1/6	0/8
翔雲	4/6	2/8	++	±	0/6	0/8
桂月	4/6	0/8	+	-	1/6	0/8
精興黄金	2/6	0/8	±	-	0/6	0/8
寒金城	6/6	3/8	++	+	0/6	0/8
寒精雪	5/6	2/8	+++	±	0/6	0/8
エリアス	2/4	N	±	N	0/4	N

<sup>a)</sup> Tospo-CとTSWV-Gはキクとガーベラよりそれぞれ分離した。汁液接種の3ヶ月後に病徴を調査した。

<sup>b)</sup> 数字は発病葉数/接種葉数で、Nは未調査である。

<sup>c)</sup> +++、接種葉が枯死；++、接種葉が枯死または部分的な枯死；+、接種葉が部分的な枯死；±、接種葉に局部病斑；-、無病徴。

<sup>d)</sup> 数字は全身感染病徴発生株数/接種株数で、Nは未調査である。

現在の一輪ギクの主力品種‘秀芳の力’はTSWV感受性が高いので、本病を防除するために、商品価値が高くTSWV感受性が低い品種の育成が望まれる。

### 摘 要

静岡県のキクにウイルス病らしき病害が発生した。葉のえそと茎のえそ条斑が特徴的な病徴であった。発病株から分離した病原はミカンキイロアザミウマにより伝搬された。本病原はトマト黄化えそウイルス (TSWV) 抗血清とウエスタンブロット法で反応し、TSWVのヌクレオキャプシドプロテイン (NP) と同じ大きさのタンパク質が検出された。本病原の宿主範囲は広く、11科39種の植物のうち、7科23種の植物に全身感染した。*N. rustica* の発病上葉の超薄切片観察では、細胞質の小胞体中に集塊する平均粒子径87nmの球状粒子と繊維状構造物が感染細胞の細胞質に観察された。本病原とTSWVのNPのアミノ酸配列の相同性は97.7%であった。これらの結果により、本病原はTSWVであると同定された。キクのTSWV感受性には大きな品種間差異があることと、TSWVは分離株によりキクへの病原性が異なることが明らかになった。

### 引 用 文 献

- Allen, W. R., J. A., Matteoni and A. B., Broadbent (1990) Susceptibility of cultivars of florist's chrysanthemum to tomato spotted wilt virus. *Can. J. Plant Pathol.* 12: 417-423.
- de Avila, A. C., P., de Haan, M. L. L., Smeets, R. de O., Resende, R., Kormelink, E. W., Kitajima, R. W., Goldbach and D., Peters (1993) Distinct levels of relationships between tospovirus isolates. *Arch. Virol.* 128: 211-227.
- de Haan, P., L., Wagemakers, D., Peters and R., Goldbach (1990) The S RNA segment of tomato spotted wilt virus has an ambisense character. *J. Gen. Virol.* 71: 1001-1007.
- Francki, R. I. B. and C. J., Grivell (1970) An electron microscope study of the distribution of tomato spotted wilt virus in systemically infected *Datura stramonium* leaves. *Virology* 42: 969-978.
- German, T. L., D. E., Ullman and J. W., Moyer (1992) Tospoviruses: diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 315-348.
- Goldbach, R. and G., Kuo (1996) Introduction. *Proceedings of the international symposium on tospoviruses and thrips of floral and vegetable crops. Acta Horticult.* 431: 21-26.
- Hanada, K., S., Tsuda, M., Kameya-Iwaki and H., Tochihara (1993) Distinct properties of nucleocapsid of a watermelon isolate of tomato spotted wilt virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 59: 500-506.
- Hibi, T. and Y., Saito (1985) A dot immunobinding assay for the detection of tobacco mosaic virus in infected tissues. *J. Gen. Virol.* 66: 1191-1194.
- 日高 醇・鈴木洋子 (1967) キクより分離されたキュウリモザイクウイルスの1系統. *九病虫研究会報* 13: 33-35.
- 井上忠男・麻谷正義・光畑興二 (1967) キクから分離される Tomato aspermy virus. *日植病報* 33: 93 (講要).
- Iwaki, M., Y., Honda, K., Hanada, H., Tochihara, T., Yonaha, K., Hokama and T., Yokoyama (1984) Silver mottle disease of watermelon caused by tomato spotted wilt virus. *Plant Dis.* 68: 1006-1008.
- Kaminska, M. (1994) The response of gerbera to infection with tomato spotted wilt virus. *Acta Horticult.* 377: 159-164.
- 加藤公彦・亀谷満朗・花田薫 (1996) トマト黄化えそウイルス (TSWV) によるガーベラえそ輪紋病 (新称). *日植病報* 62: 614 (講要).
- Kato, K., K., Hanada and M., Kameya-Iwaki (2000) *Melon yellow spot virus*: a distinct species of the genus *Tospovirus* isolated from melon (*Cucumis melo* L.). *Phytopathology* 90: 422-426.
- 小島博文・尾崎武司・吉岡昭夫・井上忠男 (1976) Tomato spotted wilt virusによるトマトの黄化えそ病. *日植病報* 42: 287-294.
- Maiss, E., L., Ivanova, E., Breyel and G., Adam (1991) Cloning and sequencing of the S RNA from a Bulgarian isolate of tomato spotted wilt virus. *J. Gen. Virol.* 72: 461-464.
- 村松正實編 (1996). ラボマニュアル遺伝子工学, 第3版. 丸善株式会社 (東京), pp.277.
- 佐伯 勇 (1998) わが国における発生の経緯と発生分布. *植物防疫* 52: 170-171.
- 栃原比呂志 (1968) キクから分離された3種ウイルス. *日植病報* 34: 201 (講要).
- 津田新哉 (2000) トマト黄化えそウイルス. *農業および園芸* 75: 90-96.