

カボチャモザイクウイルスによる トルコギキョウ輪紋病(新称)および岡山県の トルコギキョウに発生する病原ウイルスの種類*

井上 幸次・粕山 新二

Occurrence of Ring Spot of Russell Prairie Gentian Caused by *Watermelon mosaic virus*,
and Detection of Viruses of Russell Prairie Gentian in Okayama Prefecture

Koji Inoue and Shinji Kasuyama

緒 言

トルコギキョウは岡山県下の花き生産高の上位を占める重要な品目である。ところが、1991年頃から県下各地で様々なウイルス病様症状の発生がみられ問題となっていた。そこで、本県のトルコギキョウに発生する病原ウイルスについて分離、同定を行ったところ、我が国で報告のあるキュウリモザイクウイルス (CMV)^{1, 3)}、ソラマメウイルス (BBWV)¹⁾、インゲンマメ黄斑モザイクウイルス (BYMV)³⁾、トルコギキョウえそウイルス (LNV)¹⁾ が発生していることが明らかになった。また、退緑輪紋症状を呈している株から分離されたウイルスは、トルコギキョウでは未報告のカボチャモザイクウイルス (WMV) であることが明らかになったので、それらの概要を報告する。

本試験を実施するに当たり、現地調査に御協力頂いた農業改良普及センターの各位並びにウイルスの同定に際して有益な御助言や抗血清反応試験に御協力をいただいた山口大学農学部の亀谷満朗博士、日本大学の前田学憲博士、独立行政法人農業技術研究機構畜産草地研究所の御子柴義郎博士、山口県農林部の井上興氏の各位に厚くお礼申し上げます。

材料及び方法

1. 供試ウイルス

本試験で供試したWMV分離株 (No.9309株) は、1993年5月に岡山県笠岡市で採集した葉に明瞭な退緑輪紋症状やえそ輪紋症状を示すトルコギキョウから分離した。ウイルスの分離は原株病葉を約10倍量の0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0、0.1%チオグリコール酸加用) 中で磨砕した汁液を *Chenopodium quinoa* に接種し、形成された単一局部病斑を接種源とし、さらに *C. quinoa* で単一病斑分離を4回繰り返して行った。

また、1992~1998年に県下各地で採集、または鑑定依頼のあったトルコギキョウのウイルス病様症状株を供試して病原ウイルスの分離、同定に供試した。

CMVの系統判別を行うため、1993年の採集株から *C. quinoa* で単病斑分離を3~4回繰り返して得られた分離株 (No.9306、9314、9315、9316、9317、9318、9322、それぞれ第2表の標本番号6、14、15、16、17、18、22から分離) について判別植物への汁液接種を行った。

2. 汁液接種

No. 9309株をカボチャ 'えびす' で増殖させ、上記の緩衝液で磨砕し、12科45種の植物にカーボランダム法で汁液接種して寄主範囲を調べた。なお、トルコギキョウ

* 本報告の一部は平成6年日本植物病理学会関西西部会で報告した。

への接種には、粗汁液を部分純化して接種源とした。

病原ウイルスの同定を目的とした場合には、供試個体の病葉1～2枚を上記の緩衝液で磨砕し、鉢植えの検定植物 (*C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *Nicotiana glutinosa*, タバコ 'バーレー21', ペチュニア, *Datura stramonium*, センニチコウ, ササゲ '黒種三尺' など) に汁液接種した。接種後はガラス室内で3～4週間育成し、接種葉、上位葉の病徴を観察した。

CMVの系統判別には、各分離株を *N. glutinosa* で増殖させ、シロウリ、ユウガオ、カブ '金町小かぶ' などに同様の方法で汁液接種した。

3. 電子顕微鏡観察と血清反応

ウイルス粒子は透過型電子顕微鏡 (JEM 1200EX II) で各個体の病葉から2%リンタングステン酸 (PTA) を用いたダイレクトネガティブ染色法 (以下DN法) により観察した。

血清反応試験はNo. 9309株に対してはWMV抗血清、ズッキーニ黄斑モザイクウイルス (ZYMV) 抗血清、パパイア輪点ウイルス—ウリ科系 (PRSV-W) 抗血清 (以上中央農業総合研究センター保存)、BYMV (クロッカス分離株) 抗血清、クローバ葉脈黄化ウイルス (CIYVV, エビネ分離株) 抗血清 (以上岡山大学資源生物科学研究所保存) を用いた直接または間接ELISA法を行った。抗原には本ウイルスに全身感染したソラマメ葉、または同キュウリ葉の粗汁液を用いた。

また、一部の標本、分離株についてCMV抗血清 (日本植物防疫協会製)、BYMV、BBWV抗血清 (中央農業総合研究センター保存) を用いた直接ELISA法を行った。CMV分離株の血清型の判定はCMV抗血清 (血清型Y型; 日本植物防疫協会製) を用いて、二重拡散法 (0.8%アガロース、0.85%NaCl、0.01Mリン酸緩衝液、pH7.0) により行った。さらに試料番号40についてはLNV抗血清 (山口農試から分譲) を用いた二重拡散法を行った。

4. ウイルスの粗汁液中での安定性

分離株 (No.9309株) の罹病葉粗汁液中での安定性は、カボチャの病葉に約10倍量の0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0) を加えて磨砕し、ガーゼで搾汁したものを用いた。検定植物には *C. quinoa* を用いた。

結 果

1. 分離株 (No.9309株) の同定

(1) 病徴

No.9309株が分離された原株の病徴は、葉に径2～6mm、淡黄緑色～白色の明瞭な円形または楕円形、時に半円形または馬蹄形の輪紋が多数みられた (図版I—1)。葉の奇形や萎縮症状、花での症状はみられなかった。

(2) 検定植物の反応

No.9309株はトルコギキョウ 'グローリーパープル' に全身感染して接種葉 (図版I—4)、上位葉 (図版I—5) に原株と類似の退緑輪紋やえそ輪紋が生じ、戻し接種でウイルスが回収された。この他、*N. benthamiana*、カボチャ (図版I—6)、キュウリ、スイカ、メロン、ヒョウタン、カンピョウ、シロウリ、ソラマメ、エンドウ '仏国大莢'、インゲンマメ '本金時'、ゴマなど計5科15種の植物に全身感染して主に葉のモザイク症状や奇形を示した。また、トルコギキョウ 'あずまの霧'、'あずまの桜'、'キング オブ パープル'、'グローリーピンク'、*C. quinoa*、*C. amaranticolor*、インゲンマメ 'マスターピース' などの接種葉に退緑輪紋やえそ斑点などの局部病斑を形成したが、タバコ類、ペチュニア、ヘチマ、センニチコウ、カブ、ツルナなどには病徴を示さなかった (第1表)。

(3) ウイルスの形態

トルコギキョウの病葉をDN法で電子顕微鏡観察したところ、長さ約750nmのやや屈曲したひも状粒子が多数認められた (図版I—2)。また、しばしば封入体の断片が観察された (図版I—3)。棒状や球状の粒子は認められなかった。

(4) 血清反応

本ウイルスは直接、間接ELISA法で、WMV抗血清と陽性反応を示したが、BYMV、CIYVV、PRSV-W、ZYMVの各抗血清とは陰性であった。

(5) ウイルスの安定性

本ウイルスの罹病カボチャ葉粗汁液における安定性は、耐熱性 (10分間) が55～60℃、耐希釈性が 10^{-3} ～ 10^{-4} 、耐保存性が90～100日 (20℃) であった。

2. 県下各地の標本から検出された病原ウイルス

ウイルス病症状を示す病葉の検定植物への汁液接種、電子顕微鏡観察、血清反応試験から同定された病原ウイルスの種類と原株の病徴を第2表にまとめた。以下に病原ウイルス別の病徴の特徴と2、3の諸性質を述べる。

第1表 分離株No.9309に対する各種植物の反応

【全身感染植物】	
リンドウ科	トルコギキョウ (グローリーパープル)
ナス科	<i>Nicotiana benthamiana</i>
ウリ科	カボチャ (えびす, 近成芳香), キュウリ (夏秋節成2号), スイカ (綺王) メロン (アールスフェボリット), ヒョウタン (千成), ユウガオ (白丸), シロウリ
マメ科	ソラマメ (中共), エンドウ (仏国大莢), インゲンマメ (本金時),
ゴマ科	ゴマ (黒ゴマ)
【局部感染植物】	
リンドウ科	トルコギキョウ (あずまの霧, あずまの桜, キング オブ パープル, グローリーピンク)
アカザ科	<i>Chenopodium quinoa</i> , <i>C. amaranticolor</i>
マメ科	インゲンマメ (マスターピース)
【病徴を示さなかった植物】	
ナス科	タバコ (Samsun, Blight Yellow 4), <i>N. glauinosa</i> , <i>N. clevelandii</i> , <i>N. rustica</i> , <i>N. sylvestris</i> , <i>Datura stramonium</i> , <i>Physalis floridana</i> , トマト (ボンデローザ), ベチュニア
ウリ科	ヘチマ, ニガウリ
マメ科	ササゲ (黒種三尺), インゲンマメ (トッブクロップ, テンダーグリーン, セリーナ, グリーンマイルド, キングマーケット, 初みどり, 長うづら, 黒衣笠, 改良大手亡, 山城黒三度, つるなし金時), アズキ (丹波大納言), スイートピー, エンドウ (絹莢), ダイズ (丹波黒)
アカザ科	ハウレンソウ (次郎丸)
ヒユ科	センニチコウ
キク科	ヒヤクニチソウ, シュンギク
アブラナ科	カブ (金町小かぶ), ダイコン (宮重青首)
ツルナ科	ツルナ
ナデシコ科	美女ナデシコ
シソ科	青シソ

(1) CMV (えそモザイク病)

本ウイルスは県下各地のトルコギキョウから最も高率に検出された。生育初期から開花期にかけて発生がみられ、葉や茎のえそ斑点、葉脈えそ、頂部の黄化、奇形、縮れ、モザイク、花弁のプレーキングなどの症状を示した(図版I—7、8)。7分離株は、いずれもシロウリには全身感染してモザイク症状を示したが、ユウガオやカブに寄生性を示さなかった。また、二重拡散法では、供試した3分離株 (No.9306、9312、9322) はいずれもCMV—Y分離株 (中央農業総合研究センターから分譲) と沈降帯が融合した。

(2) BYMV (モザイク病)

本ウイルスは1993、1997年に熊山町、成羽町などの標本から低率ながら検出された。葉に細かなモザイクやねじれ、時にえそ斑点やえそ輪紋を生じていたが、葉脈えそや頂部の黄化を生じない点でCMVによるえそモザイク病と異なっていた(図版I—9)。

(3) LNV (えそ病)

1998年5月に倉敷市の水耕栽培のトルコギキョウから検出された。発生圃場では約30%の株で発病がみられ、えそ斑点、萎縮、奇形などを呈し、激しい場合は枯死し

た(図版I—10、11)。本ウイルスは径約30nmの球状粒子で、タバコ (パーレー21)、*N. rustica*、*D. stramonium*、*C. quinoa*、*C. amaranticolor*、ササゲ '黒種三尺'、ツルナの接種葉に局部感染してえそ斑点を生じた。*N. clevelandii* の接種葉にはえそ斑点を生じた後、全身感染して上位葉にえそ、萎縮症状を生じて枯死した。二重拡散法による血清反応試験では、抗LNV血清と明瞭な沈降帯を生じ、LNV山口株の沈降帯と完全に融合した。

(4) BBWV (モザイク病)

本ウイルスは1993年に山陽町、笠岡市の2地点の標本から検出された。葉にアザミ葉状のえそ輪紋、茎えそ、ねじれなどを生じた。

考 察

我が国のトルコギキョウに発生する病原ウイルスには7種が知られている^{1, 2, 3, 5, 6, 7)}が、病原ウイルスの種類によって媒介者や伝染方法が異なるため、ウイルス病の防除対策には病原を明らかにする必要がある。岡山県ではトルコギキョウの生産を拡大した当初から各地でウイルス病症状が発生し問題となっていたが、病原ウイルスの種類についてはこれまで未調査であった。

第2表 供試したトルコギキョウ標本及び検出された病原ウイルス

試料番号	採集年月日	採集場所	病徴 ^{a)}	検出されたウイルス
1	92. 6.24	御津郡御津町	NS,VN,Mal,YM	CMV
2	92. 6.26	和気郡佐伯町	NS,StN	CMV
3	92. 6.26	赤磐郡山陽町	NS,VN,Mal,YM	CMV
4	92. 7. 1	笠岡市	NS,StN,VN,YM,Mal	CMV
5	93. 5.20	赤磐郡山陽町	nr,mal	BBWV
6	93. 5.21	英田郡美作町	NS,VN,YM,Mal	CMV
7	93. 5.21	英田郡美作町	ns,YM,Mal,St	CMV
8	93. 5.21	英田郡美作町	VN,Y,Mal,St,	CMV
9	93. 5.18	笠岡市	CS,CR	WMV2
10	93. 5.28	赤磐郡山陽町	NS,VN,Y,Mal	CMV
11	93. 6. 3	和気郡熊山町	M,mal	BYMV
12	93. 6. 7	笠岡市	StN,Y,Mal,W	BBWV
13	93. 6.18	赤磐郡山陽町	NS,VN,Mal,Y,St	CMV
14	93. 6.22	御津郡御津町	NS,VN,Mal,Y	CMV
15	93. 7.12	高梁市	NS,VN,Mal,Y	CMV
16	93. 7.29	赤磐郡山陽町	NS,VN,Mal,Y	CMV
17	93. 7.30	川上郡川上町	StN,VN	CMV
18	93. 7.30	川上郡成羽町	NS,VN,Mal,CB	CMV
19	93. 7.30	川上郡成羽町	NR,NS	BYMV
20	93. 7.30	川上郡成羽町	M	検出されず
21	93. 7.30	川上郡成羽町	ns,M,mal	BYMV
22	93. 7.	苫田郡奥津町	NS,VN,Mal	CMV
23	94. 6.10	赤磐郡山陽町	NS,Mal	未同定
24	94. 6.29	邑久郡邑久町	NS,VN,Mal,YM	CMV
25	94. 6.29	邑久郡邑久町	NS,VN,CB	CMV
26	94. 6.29	邑久郡邑久町	StN,VN,Mal	CMV
27	94. 6.29	邑久郡邑久町	NS,m,CB	CMV
28	95. 7.20	阿哲郡神郷町	NS,VN,Mal,Y	CMV
29	95. 7.20	阿哲郡神郷町	NS,CS,Mal,Y	CMV
30	95. 7.20	阿哲郡神郷町	VN,YM	CMV
31	95. 7.26	苫田郡鏡野町	YM,St	検出されず
32	95. 7.26	苫田郡鏡野町	StN,VN,Y,St	CMV
33	96.11.29	玉野市	NS,Mal	検出されず
34	97. 5.29	未詳	Y,NS	CMV
35	97. 5.29	未詳	M	BYMV
36	97. 7.29	上房郡賀陽町	Y,Mal	CMV
37	98. 1.19	玉野市	NS (白色)	検出されず
38	98. 3.12	玉野市	NS,VN,St	検出されず
39	98. 3.12	玉野市	NS,VN	検出されず
40	98. 5.12	倉敷市 (2株)	CS,NS,NRS,Mal,DW	LN (2株とも)
41	98. 6. 3	美星町	CS (白色),Mal	検出されず
42	98. 6. 3	美星町 (2株)	CS,NS,Y,Mal	CMV (2株とも)

a) M:モザイク、Y:黄化、YM:黄色モザイク、VN:葉脈えそ、St:萎縮、NS:えそ斑点、CS:退緑斑点、CR:退緑斑紋、NR:えそ輪紋、Mal:葉の奇形・ねじれ、CB:花弁のカラーブレイキング、StN:茎えそ、W:萎凋、小文字は軽い症状を示す。

1993年5月に笠岡市で葉に淡黄緑色～白色の明瞭な円形または楕円形の輪紋を示す株から分離されたウイルスは、検定植物への汁液接種、電子顕微鏡観察、血清反応試験の結果からカボチャモザイクウイルス(WMV)¹⁾と同定した。本ウイルスは日本国内においてはウリ科、マメ科、ラン科植物への寄生が確認されているが、トルコギキョウを含むリンドウ科では未報告である。本病はトルコギキョウで既報のCMVによるえそモザイク病²⁾や、BYMV³⁾、BBWV⁴⁾によるモザイク病、LNVによるえそ病⁵⁾、トマト黄化えそウイルスによる黄化えそ病⁶⁾、トマト黄化葉巻ウイルスによる黄化葉巻病⁷⁾などとは明らかに病徴が異なっていた。本ウイルスはトルコギキョウに対しては汁液接種でやや感染しにくい傾向がみられたが、罹病カボチャ葉粗汁液を部分純化して接種すると、接種葉と上位葉に特徴的な輪紋症状が再現できた。以上のことから、本病をトルコギキョウ輪紋病(ring spot of russell prairie gentian)と命名することを提案したい。

1992～1998年の7年間で最も検出頻度の高かった病原ウイルスはCMVで、本県での病徴も既報と一致するものであり、えそモザイク病と診断された。本研究で供試したCMV分離株はいずれも血清型がY型、寄生性は普通系と判断された。この結果は、関東地方においてトルコギキョウから分離したCMVがラゲナリア系に属するとした亀谷の報告¹⁾とは異なったが、長崎県における松尾らの報告³⁾とよく一致した。このことから、CMVの伝染源としては圃場周辺の雑草や多くの作物の罹病株からアブラムシ類によって伝搬されたものと考えられた。また、BYMV、BBWVも低率ながら本県におけるトルコギキョウの病原ウイルスとなっていることが確認された。これらはマメ科植物を中心に圃場の周辺に広範囲に分布している可能性が高く、アブラムシ類によって伝搬されることから、先述のWMVと併せて、アブラムシ類の防除がきわめて重要であることを示している。

1998年に倉敷市でえそ斑点、萎縮、奇形を示す株から分離されたウイルスは、その寄主範囲、接種植物の反応、粒子形態、血清反応からLNVと同定された。本ウイルスは千葉県、山口県、長野県、北海道のごく一部の産地でのみ発生が確認されており、土壤中の*Olpidium*菌が媒介するとされている⁸⁾。本県での発生は実生苗を用いた水耕栽培の一圃場のみで、本ウイルスの伝染源は不明であるが、土壌伝染することから今後の発生に注意が必要であろう。

供試標本の中には本試験方法では病原ウイルスが検出されないものもいくつかみられた。ウイルス病様症状には生理的な要因や薬害などウイルスに起因しない場合もあるが、未知で検出困難な病原ウイルスの発生も想定さ

れるので、今後は検出手法の改良などでそれらに対応していく必要がある。

摘 要

1992～1998年に岡山県下各地のトルコギキョウに発生する病原ウイルスの種類を検定植物への汁液接種、電子顕微鏡観察、血清反応試験により同定した。

1. 葉に淡黄緑色～白色の明瞭な円形または楕円形、時に半円形または馬蹄形の輪紋を示す株から分離されたウイルスは、カボチャモザイクウイルスと同定した。本ウイルスによるトルコギキョウの病害は未報告なので、本病をトルコギキョウ輪紋病(ring spot of russell prairie gentian)と命名することを提案する。
2. 病原ウイルスの種類別ではキュウリモザイクウイルスが最も検出率が高く、ウイルス病の多くはえそモザイク病であることが明らかとなった。
3. インゲンマメ黄斑モザイクウイルス、ソラマメウイルス、トルコギキョウえそウイルスはいずれも検出頻度は低かったが、本県でのトルコギキョウの病原ウイルスとして確認された。

引用文献

1. 亀谷満朗(1988) トルコギキョウのウイルス病, 植物防疫, 42: 151—154.
2. 黒田智久・勝部和則・鈴木一実(1999) 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, 日植病報, 65: 490—493.
3. 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).
4. Purcifull, D., Hiebert, E. and Edwardson, J. (1984) watermelon mosaic virus 2. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, No. 293.
5. 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).
6. 内川敬介・大貫正俊・田中俊憲・道添英昭・平田憲二・難波信行・早田栄一郎(2000) TYLCVによるトルコギキョウの葉巻症状, 九州病虫研報, 46: 149(講要).
7. 山下一夫・福井要子(2000) トルコギキョウから分離されたクロバ葉脈黄化ウイルス, 日植病報, 66: 263(講要).

Summary

Causal viruses were detected from russell prairie gentian (*Eustoma grandiflorum*) by sap-inoculation test, electron microscopy and serological test in Okayama Prefecture in 1992-1998.

1. The virus isolated from prairie gentian with chlorotic or whitish ring spots on leaves was identified as *Watermelon mosaic virus* (WMV). This is the first report of WMV on russell prairie gentian in Japan. Therefore, the common name of 'ring spot' ('Rinmon-byo' in Japanese) was proposed.
2. Cucumber mosaic virus (CMV) was detected widely and most frequently from russell prairie gentian. *Bean yellow mosaic virus*, Broad bean wilt virus and *Lisianthus necrosis virus* were rarely detected. The survey indicated that CMV is the major viral pathogen of russell prairie gentian in Okayama Prefecture.

図版説明

図版 I

1. No. 9309株が分離された原株の輪紋症状
2. No. 9309株の粒子 (バー: 500nm)
3. No. 9309株の封入体の断片 (バー: 500nm)
4. No. 9309株の接種葉に現れた退緑輪紋 (トルコギキョウ 'グローリーパープル')
5. No. 9309株の接種上位葉に現れた退緑輪紋 (同上)
6. No. 9309株のカボチャ 'えびす' におけるモザイク症状
7. CMVによるえそモザイク病の葉の黄化、奇形
8. CMVによるえそモザイク病の花弁のブレーキング
9. BYMVによる葉のモザイク、ねじれ
10. LNVによるえそ病の病徴
11. LNVによるえそ病 (頂葉の黄化、えそ、萎縮症状)
12. BBWVによる葉のアザミ葉状の退緑斑

