

トルコギキョウに発生する2種トンブスウイルスのRT-PCR法による識別検出

伊山幸秀*・守川俊幸*・島 嘉輝・向井 環**・藤永真史***・Muna Ibrahim****・
斎藤(米山) 千温****・大木健広*****・夏秋知英***

Yukihide IYAMA, Toshiyuki MORIKAWA, Yoshiteru SHIMA, Tamaki MUKAI, Masashi FUJINAGA, Muna IBRAHIM,
Chiharu YONEYAMA, Takehiro OHKI and Tomohide NATSUAKI :

Discriminatory detection of two tombusviruses from prairie gentian plants by RT-PCR assay

トルコギキョウに発生する *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) と *Lisianthus necrotic stunt virus* (LiNSV) を識別して診断するためにRT-PCR法による検出法の開発を試みた。両ウイルスとデータベースに登録されているトンブスウイルスの塩基配列から、TBSVを特異的に検出するための相同プライマー (Tombshiz1F), LiNSVを特異的に検出するための相同プライマー (Tombnag2F), トンブスウイルスを検出するための相同・相補プライマー (Tombcom2FとTombcom2R) の4種類を設計した。これらのうち3種類 (Tombshiz1F, Tombnag2FおよびTombcom2R) を混合したRT-PCRでは、TBSV, LiNSVの各々の特異的検出が可能であった。さらに、Tombcom2Fを加えて4種類を混合したRT-PCR法ではTBSV, LiNSVの特異的検出に加えて、この2種以外のトンブスウイルスも検出できる可能性が示された。

Key words : トルコギキョウ, トンブスウイルス, tombusvirus, *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), *Lisianthus necrotic stunt virus* (LiNSV), RT-PCR, *Eustoma grandiflorum*

緒 言

トルコギキョウ (*Eustoma grandiflorum*) には *Cucumber mosaic virus*, *Iris yellow spot virus*など15種類のウイルスが発生することが知られており^{1,2,3,4,6,7,10,11,14,15,16,17,18,19)}、地域によってはこれらウイルス病により大きな被害が生じている。さらに、発生するウイルスの種類によって伝染方法が異なり、防除対応も異なるため、効果的な防除対策を図るには病原ウイルスを迅速に同定する必要がある。こうした中、近年、長野県、佐賀県および静岡県のトルコギキョウ産地において、トンブスウイルス属ウイルスのトマトブッシースタントウイルス *Tomato bushy stunt virus* : TBSVと新種のトルコギキョウえそ萎縮ウイルス *Lisianthus necrotic stunt virus* : LiNSV (仮称) の発生が確認された^{3,19)}。

これらのウイルスは、トルコギキョウにえそ萎縮病を引き起こし、トルコギキョウの切り花栽培において甚大な被害を及ぼしている³⁾。また、本病は土壤伝染性病害で防除が困難であり、切り花用ハウス内で発生した場合、長期にわたって発病が続くため、効果的な防除対策が求められている。一方、花き類では、わずかな病害の発生が商品価値を著しく低下させるため、産地では迅速な病原ウイルスの特定とウイルスの種類に応じた適切な防除対策の実施が必要となっている。

これまで両病原ウイルスの診断は、判別植物を用いた接種検定や血清学的検定によって行われてきた³⁾。しかし接種検定は、多くの時間と労力を要し、迅速な診断が難しい。また、両ウイルスは血清学的に近縁であるため、間接ELISA法やDIBA法で両者を区別することは困難である⁸⁾。そこで、TBSVとLiNSVを同時に診断できる

富山県農林水産総合技術センター園芸研究所 Horticultural Research Institute, Toyama Prefectural Agricultural, Forestry and Fisheries Research Center, Goromaru, Tonami, Toyama 939-1327

*現在 富山県農林水産総合技術センター農業研究所 Agricultural Research Institute, Toyama Prefectural Agricultural, Forestry and Fisheries Research Center, Yoshioka, Toyama 939-8153

**現在 研波農林振興センター Tonami Agricultural and Forestry Promotion Center, Saiwai-cho, Tonami, Toyama 939-1386

***長野県野菜花き試験場 Nagano Vegetable and Ornamental Crops Experiment Station, Omuro, Nagano 381-1211

****宇都宮大学農学部 Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, Mine-machi, Utsunomiya, Tochigi 321-8505

*****静岡県農林技術研究所 Shizuoka Research Institute of Agriculture and Forestry, Tomigaoka, Iwata, Shizuoka 438-0803

*****中央農業総合研究センター National Agricultural Research Center, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8666

マルチプレックスRT-PCR法を検討した。

材料および方法

1. 塩基配列の解析とプライマーの設計

えそ萎縮病罹病トルコギキョウから分離されたTBSV-Shiz-1株 (Accession no. AB244054)⁵⁾ とLiNSV-Nag-4株 (AB244055)⁵⁾ の他に、TBSV-nipplefruit株 (AY579432), TBSV-statice株 (AJ249740), TBSV-pepper株 (U80935), TBSV-cherry株 (M21958), *Artichoke mottled crinkle virus* (X62493), *Pelargonium necrotic spot virus* (AJ607402), *Pear latent virus* (AY100482) を加えて塩基配列の比較を行った。そして、TBSVまたはLiNSVに特異的な領域、トンブスウイルスに保存性の高い領域をそれぞれ抽出し、PCRプライマーを設計した。

2. 供試ウイルス

TBSVとLiNSVの検定試料には、静岡県で得られたTBSV-Shiz-1株あるいは長野県で得られたLiNSV-Nag-4株⁵⁾ を接種したトルコギキョウの上位葉および健全葉を用いた。

また、TBSV, LiNSV以外のトンブスウイルスの検出について検討するため、TBSV-nipplefruit株¹²⁾, TBSV-cherry株, *Grapevine Algerian latent virus* (GALV-nipplefruit株)¹³⁾, *Melon necrotic spot virus* (MNSV-Ch株) をそれぞれ*Nicotiana benthamiana*に接種し、その感染葉を供試した。

さらに、本法を用いたトルコギキョウウイルス病の診断を行なうために、長野県内の現地ほ場で、えそ、奇形、モザイク等の症状を示したトルコギキョウを採集し、展開葉を試料として用いた。

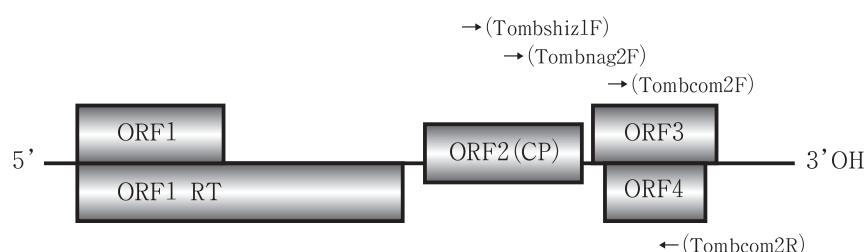
3. RT-PCR法

全RNAは、各ウイルスの感染葉 (0.1 g) からISOGEN (ニッポンジーン) を用いてメーカーのマニュアルに従って抽出し、200 μl のDEPC処理水に溶解し用いた。抽出した全RNAを錆型として、One step RNA PCR Kit (タカラバイオ) を用いRT-PCRを行った。反応液は、最終濃度が 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 0.8 U/μl RNase Inhibitor, 0.1 U/μl AMV RTase XL, 0.1 U/μl AMV-Optimized Taq, 各プライマー 0.4 μM, 1 × One Step RNA PCR Bufferとなるように調製した。反応液 24.5 μl に錆型RNA 0.5 μl を加え、逆転写反応は50°C 30分、逆転写酵素の不活化を94°C 2分、PCR反応を変性 94°C 30秒、アニーリング55°C 30秒、ポリメラーゼ伸長反応72°C 1分を1サイクルとし、30サイクル行った。RT-PCR産物 (5 μl) は2.0%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムプロマイドで染色した。

結果および考察

1. プライマーの設計

塩基配列の比較解析の結果から、4種類のプライマーを設計した (第1図、第1表)。トンブスウイルス共通のプライマーセット (Tombcom2F, Tombcom2R) は、p19タンパク質のコード領域に設計され、306塩基対のDNA断片の増幅が見込まれる。TBSVあるいはLiNSVに特異的なプライマー (Tombshiz1F, Tombnag2F) は、外被タンパク質のコード領域に設計され、それぞれをTombcom2Rと共に用いることにより、632塩基対あるいは463塩基対のDNA断片の増幅が見込まれる。



第1図 トンブスウイルスのゲノム構造および設計したプライマーの位置

第1表 設計したプライマーの種類と塩基配列

名 称	塩 基 配 列	対 象	予想されるPCR 産物の大きさ ^{e)}
Tombshiz1F ^{a)}	5'- TTGAGGTGCTTGACCAGTCTCACTC-3'	TBSV ^{c)}	632bp
Tombnag2F ^{a)}	5'-TACAATGTACACGGGCCGTTAG-3'	LiNSV ^{d)}	463bp
Tombcom2F ^{a)}	5'-GGGTGGTGAACGTGGAATGGAGGA-3'	トンブスウイルス全般	306bp
Tombcom2R ^{b)}	5'-GGGCCGAATACTATAGGTACATCCG-3'	トンブスウイルス全般	-

a) 相同プライマー

b) 相補プライマー

c) TBSV : *Tomato bushy stunt virus*d) LiNSV : *Lisianthus necrotic stunt virus*

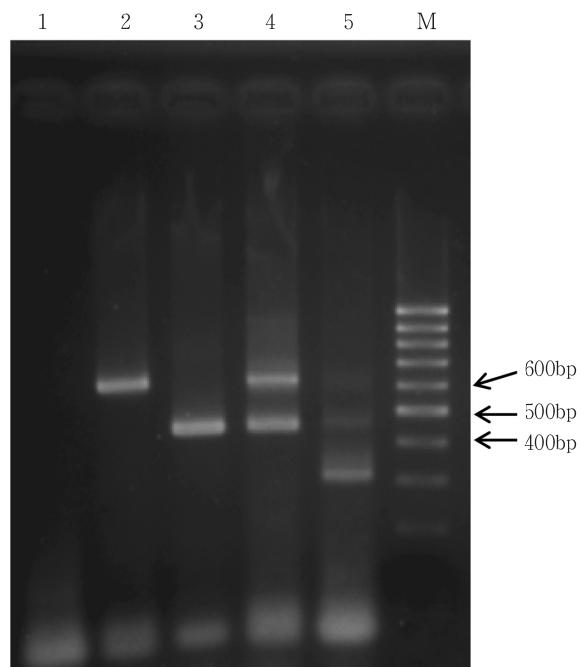
e) 相補プライマーとしてTombcom2Rを用いた場合

2. 4種プライマーを用いた病原ウイルスの検出

TBSV-Shiz-1株の試料に対して相同プライマーに Tombshiz1F, 相補プライマーにTombcom2Rを用いた場合, または, 相同プライマーにTombshiz1Fと Tombnag2F, 相補プライマーにTombcom2Rを用いて RT-PCRを行った場合, 630bp付近に増幅断片が予想どおりに認められた。しかし, 相同プライマーに Tombnag2F, 相補プライマーにTombcom2Rを用いた RT-PCRではDNA断片の増幅は認められなかった。一方, LiNSV-Nag-4株の試料について, 相同プライマーに Tombnag2F, 相補プライマーにTombcom2Rを用いた場合に460bp付近に増幅断片が認められたが, Tombshiz1FとTombcom2Rの組み合わせではDNA断片の増幅は認められなかった(データ省略)。これらの結果により, Tombshiz1FとTombcom2RのプライマーセットのTBSVに対する特異性およびTombnag2FとTombcom2RのプライマーセットのLiNSVに対する特異性が確認された。

次に, TBSVとLiNSVの混合試料を用い, 異なるプライマーの組み合わせでRT-PCRを行ったところ, Tombshiz1FとTombcom2Rを用いた場合は600bp付近に, Tombnag2FとTombcom2Rを用いた場合は460bp付近に, Tombshiz1FとTombnag2FとTombcom2Rの3種のプライマーを用いた場合は600bp付近と460bp付近の2ヶ所に増幅断片が認められた(第2図)。これは, Tombshiz1F, Tombnag2F, Tombcom2Rの3種のプライマーを混合しても, TBSVとLiNSVのどちらとも検出可能であることを示している。よって, 3種のプライマーを用いたマルチプレックスRT-PCRにより, 2種ウイルスの識別が可能であると考えられた。

さらに, Tombshiz1F, Tombnag2F, Tombcom2FおよびTombcom2Rの4種のプライマーを混合し, TBSV-Shiz-1株の感染葉から抽出したRNA, LiNSV-Nag-4株か

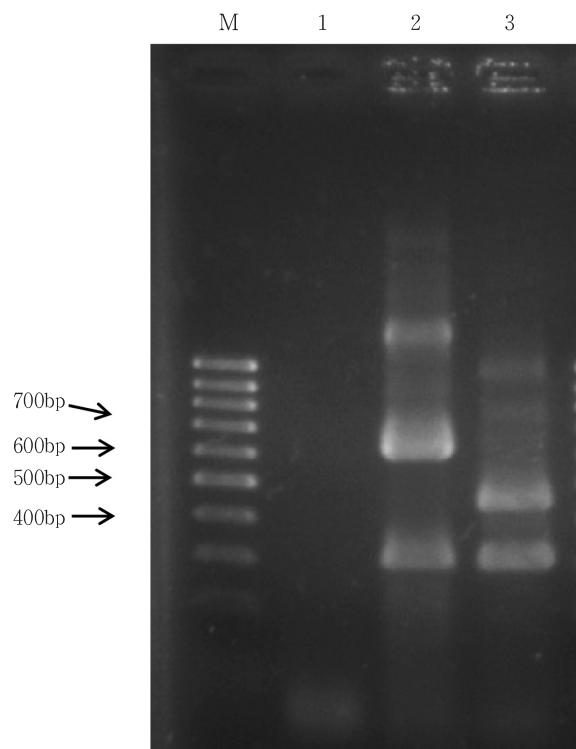


第2図 RT-PCR法によるTBSVとLiNSVの検出

- 注1) プライマーセット, レーン1, 5 : Tombshiz1F, Tombnag2F, Tombcom2FとTombcom2R, レーン2 : Tombshiz1FとTombcom2R, レーン3 : Tombnag2FとTombcom2R, レーン4 : Tombshiz1F, Tombnag2FとTombcom2R
 2) レーン1 : DEPC-処理水, レーン2~5 : TBSV-Shiz-1 感染葉とLiNSV-Nag-4感染葉から抽出した全RNAの混合物, M : 100bp DNAラダー(シグマアルドリッヂ)

ら抽出したRNAの各々についてマルチプレックス RT-PCRを行ったところ, 共通プライマーによって増幅される断片と各々の特異的プライマーによって増幅される断片が同時に検出された(第3図)。

トンブスウイルス属のTBSV-nipplefruit株, TBSV-cherry株, GALV-nipplefruit株およびカルモウイルス属であるMNSV-Ch株について4種プライマーを混合したマルチプレックスRT-PCRを行った結果, TBSV-



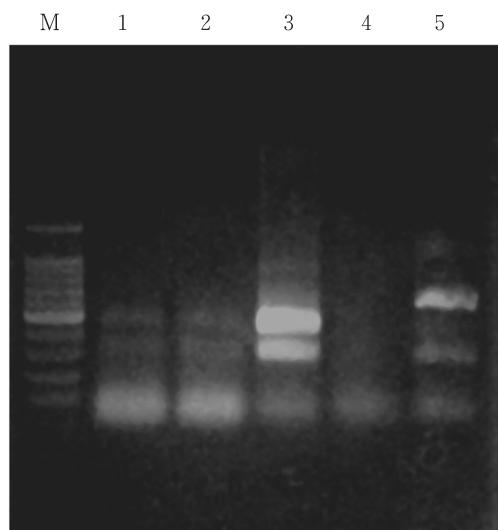
第3図 マルチプレックスRT-PCR法によるTBSVとLiSVの検出

注) レーン1:トルコギキョウ健全葉, レーン2: TBSV-Shiz-1感染葉, レーン3: LiNSV-Nag-4感染葉, M: 100bp DNAラダー

nipplefruit株では、TBSVに特異的な増幅を示すバンドとトンブスウイルスに共通なバンドが認められ、TBSV-cherry株とGALV-nipplefruit株ではトンブスウイルスに共通なバンドのみが認められ、MNSV-Ch株では共通プライマーによるDNA断片の増幅が認められなかった（データ省略）。これは、TBSV-cherry株とその他のTBSV株の間には、Tombshiz1Fと対応する塩基配列25塩基のうち16塩基で相違があるためと考えられる。TBSV-cherry株は、外被タンパク質遺伝子領域の解析の結果から、TBSVとは別種とすべきとする報告⁹⁾がある。

また、長野県千曲市の現地ほ場で採集したトルコギキョウについて、4種のプライマーを用いたRT-PCRを行ったところ、ウイルス症状を示した株の試料から、共通プライマーによって増幅される断片と特異的プライマーによって増幅される断片が同時に検出され、そのバンドパターンからLiNSVであると診断された（第4図）。

以上のように、本研究で示した4種のプライマーを組



第4図 本法を用いたトルコギキョウウイルス病の診断

注) レーン1, 2:千曲市上山田採集株, レーン3:千曲市雨宮採集株, レーン4:健全株, レーン5: TBSV-Shiz-1感染株, M: 100bp DNAラダー

み合わせて用いることにより、トルコギキョウに発生するTBSVおよびLiNSVの特異的検出が可能であった。加えて、この2種以外のトンブスウイルスを検出できる可能性も示された。さらに、現地ほ場で発病したトルコギキョウのウイルス診断にも適用可能である結果が得られた。最近になって、青森県津軽地域のトルコギキョウ栽培ほ場のトルコギキョウから*Sikte waterborne virus*が検出されたように¹⁸⁾、TBSVやLiNSV以外のトンブスウイルスによるウイルス病の発生拡大が懸念されている。このような問題に対応していくためにも、ウイルスの識別検出技術はより重要性を増している。今後、トルコギキョウのウイルス病の発生生態の研究を進め、より効果的な防除技術を構築していくために、本研究で開発した手法が活用されることを期待する。

引用文献

- 1) 土井 誠・加藤公彦 (2002) *Iris yellow spot virus* (IYSV) によるトルコギキョウえそ輪紋病（新称）およびインパチェ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）。日植病報 68: 231 (講要).
- 2) 土井 誠・善正二郎・奥田 充・中村宏子・加藤公彦・花田 薫 (2003) *Iris yellow spot virus* (IYSV) によるトルコギキョウ (*Eustma grandiflorum*) えそ輪紋病。日植病報 69: 181~188.

- 3) 藤永真史・守川俊幸・土井 誠・米山千温・Muna Ibrahim・小木曾秀紀・宮本賢二・宮坂昌実・大木健広・亀谷満朗・夏秋知英 (2006) トルコギキョウのえそ萎縮症状株から分離された二種のトンブスウイルス. 日植病報 72: 109~115.
- 4) 花田 薫・岩木満朗 (1985) トルコギキョウえそウイルスの諸性質について. 日植病報 52: 153 (講要).
- 5) Ibrahim, M., Natsuaki, T., Fujinaga, M., Morikawa, T., Yoneyama, C., Doi, M., Asad, A. and Okuda, S. (2006) Nucleotide sequence of two tombusviruses isolated from lisianthus. 日植病報 72: 41 (講要).
- 6) 井上幸次・粕山新二・畠本 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).
- 7) Iwaki, M., Hanada, K., Maria, E. R. A. and Onogi, S. (1987). Lisianthus necrosis virus, a new necrovirus from *Eustoma russellianum*. Phytopathology 77: 867~870.
- 8) 伊山幸秀・守川俊幸・藤永真史・Muna Ibrahim・米山千温・大木健広・向井 環・島 嘉輝・夏秋知英 (2006) トルコギキョウに発生している2種tombusvirusを識別するための特異的抗血清の作製およびRT-PCR法による識別・診断法の開発. 日植病報 72: 252~253 (講要).
- 9) Koenig, R., Verhoeven, J. T., Fribourg, C. E., Pfeilstetter, E. and Lesemann, D. E. (2004) Evaluation of various species demarcation criteria in attempts to classify ten new tombusvirus isolates. Arch. Virol. 149: 1733~1744.
- 10) 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 (*Eustma grandiflorum* (Raf.) Shinn.) 黄化えそ病. 日植病報 65: 490~493.
- 11) 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).
- 12) Ohki, T., Uematsu, S., Lesemann, D. E., Honda, Y., Tsuda, S. and Fujisawa, I. (2005) Characterization of *Tomato bushy stunt virus* newly isolated from nipplefruit (*Solanum mammosum*) in Japan. J. Gen. Plant Pathol. 71: 74~79.
- 13) Ohki, T., Uematsu, S., Nakamura, Y., Lesemann D. E., Honda, Y., Tsuda, S. and Fujisawa, I. (2006) Characterization of *Grapevine Algerian latent virus* isolated from nipplefruit (*Solanum mammosum*) in Japan. J. Gen. Plant Pathol. 72: 119~122.
- 14) 竹内繁治・古谷眞二 (1993) トルコギキョウ (*Eustma grandiflorum*) におけるインゲンマメ黄斑ウイルスの発生. 高知農技セ研報 2: 1~6.
- 15) 内川敬介・上田重文・大貫正俊・花田 薫 (2002) Tomato yellow leaf curl virusによるトルコギキョウ葉巻病 (新称) の発生. 日植病報 68: 50 (講要).
- 16) 山下一夫・福井要子 (2002) トルコギキョウから分離されたトバモウイルスはYocai mosaic virus (YoMV) である. 日植病報 68: 235 (講要).
- 17) 山下一夫・杉山 悟 (1998) トルコギキョウから分離されたカブモザイクウイルス (TuMV) およびトマトモザイクウイルス (ToMV) について. 日植病報 64: 605~606 (講要).
- 18) 山下一夫・牛腸拓朗・菅野善明・加藤直幹・藤永真史・忠 英一・杉山 悟 (2008) 青森県のトルコギキョウに発生したTombusvirusについて. 北日本病虫研報 59: 236 (講要).
- 19) 善正二郎・藤 晋一 (2006) 佐賀県のトルコギキョウに発生したTomato bushy stunt virus (TBSV). 日植病報 72: 28 (講要).

(2009年11月27日受理)