

種馬鈴しょにおける *Tobacco rattle virus* の発生調査

福 島 恵 介・浅 井 昌 記・平 間 亮 一・

高 橋 正*・谷 口 正 伸*・野 中 啓 一**

横浜植物防疫所・*名古屋植物防疫所・**門司植物防疫所

Survey of *Tobacco rattle virus* on seed potatoes in Japan. Keisuke FUKUSHIMA, Masaki ASAI, Ryoichi HIRAMA, Masashi TAKAHASHI*, Masanobu TANIGUCHI* and Keiichi NONAKA** (Yokohama Plant Protection Station, 5-57, Kitanakadori, Naka-ku, Yokohama 231-0003, Japan, *Nagoya Plant Protection Station and **Moji Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 40: 149-151 (2004).

Abstract: A survey of *Tobacco rattle virus* (TRV) was carried out on seed potatoes in Japan. The surveyed varieties of seed potato were 'Dejima' and 'Nishiyutaka' grown in Aomori prefecture, Nagano prefecture and Okayama prefecture. Diagnosis of symptoms, ELISA, and sap inoculation testing with *Chenopodium quinoa* were used in this survey. Leaves of potatoes grown 20 cm above the soil were tested in ELISA and sap inoculation. In the result, TRV was not detected from the surveyed potatoes.

Key words: *Tobacco rattle virus*, seed potato, Dejima, Nishiyutaka, sap inoculation, ELISA

緒 言

Tobacco rattle virus (以下 TRV) は、*Tobravirus* に属する長短 2 種類の粒子で構成される棒状ウイルスである。寄主範囲は非常に広範囲にわたり、50 科 400 種以上の单子葉、双子葉植物に感染する。*Paratrachodorus* 属及び *Trichodorus* 属センチュウによって土壌伝染し、媒介センチュウは日本では *P. minor* が、欧米では *P. allius*, *P. pachydermus*, *T. primitivus* など数種が知られている（與良ら，1983）。分布はヨーロッパ各国、南北アメリカ大陸各国、中国などほぼ全世界にわたり (ROBINSON and HARRISON, 1989)、我が国でも、アスター、スイセン等の草花類の他、タバコ、ダイズなどで確認されている（土崎ら，1993）。

本ウイルスの馬鈴しょでの発生はヨーロッパ、北アメリカ各国で確認されている。その症状は、馬鈴しょの品種やウイルスの系統によって異なる。茎葉には萎

縮やしわ、小型化などの変形症状やモットル症状、*Potato aucuba mosaic virus* や *Potato mop-top virus* による症状に類似した黄色斑紋を現し、塊茎表面には弓状もしくは環状のえそを、塊茎内部には弓状のえそを現す (STEVENSON, 2001)。

我が国の馬鈴しょには TRV の発生報告はないものの、TRV は広い寄主範囲を持つこと、我が国には媒介する線虫が存在することから馬鈴しょにも発生する可能性がある。発生した場合、塊茎伝染することや塊茎に病徴を生じ馬鈴しょ生産に大きな影響を与えると考えられることから、青森、長野及び岡山県産の種馬鈴しょについて TRV 調査を行った。

調査塊茎及び調査方法

調査対象

平成 14 年度種馬鈴しょ検疫に申請のあった種馬鈴しょの次代塊茎のうち、青森県弘前市産デジマ 50 塊

Table 1. Variety and producted area of surveyed seed potato.

Area	Variety	Number of sample
Hirosaki city, Aomori pref.	Dejima	50
Chino city, Nagano pref.	Nishiyutaka	60 (each 30 samples from 2 fields)
"	Dejima	58 (each 29 samples from 2 fields)
Oku country, Okayama pref.	Dejima	65 (each 5 samples from 13 fields)

茎、長野県茅野市産ニシユタカ 60 塊茎及びデジマ 58 塊茎、岡山県邑久郡産デジマ 65 塊茎 (Table 1) について調査を行った。

調査方法

調査は植え付け後の馬鈴しょの茎葉に現れる病徴の確認と、ELISA 検定及び汁液接種検定を用いて行った。なお、草丈が約 20 cm のころ十分に展開した上葉 2~3 枚を採取し、ELISA 検定及び汁液接種検定の試料とした。

1. 病徴調査

青森県産塊茎は横浜植物防疫所大和圃場、長野県産塊茎は名古屋植物防疫所港陽検査場、岡山県産塊茎は門司植物防疫所伊川圃場で路地植えまたは鉢植えにした。各塊茎は 2~3 週間浴光させ芽出した後植え付け、発芽後草丈 20 cm 程度に生育した時期から 1 週間ごとに約 1 カ月間病徴の観察を行った。

2. ELISA 検定

ELISA 検定に使用する抗血清には馬鈴しょからの分離株にも反応する Agdia 社製の TRV 抗血清を使用し、ELISA は付属のマニュアルに従って行った (Fig. 1)。抗血清の希釈や使用した緩衝液及びプレート洗浄液は、抗血清に付属のマニュアルどおりに作成し使用した。また、ELISA プレートには Thermolab-systems 社製 Flat bottom microtiter plates Immulon 1B を使用した。

試料は生葉または凍結葉を用い、約 10 倍量の磨砕緩衝液を加え Erich Pollahne 社製 Leaf Juice Press

で磨砕した。磨砕液は 2 時間冷蔵庫内で静置した後、上清をプレートに分注した。また、陽性対照区に Agdia 社製 TRV positive control の 4 倍希釈液及び 16 倍希釈液、陰性対照区に種苗管理センターより分譲を受けたウイルスフリーのデジマの生葉を用いた。

3. 汁液接種検定

汁液接種検定は調査塊茎のうち青森県産及び長野県産馬鈴しょについて行った。接種はカーボランダムを用いる常法により行った。検定植物には *Chenopodium quinoa* を 1 検体当たり 1 本使用し、凍結保存していた試料は約 10 倍量の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で磨砕した。陽性対照区として TRV に罹病したグラジオラス葉を用い、陰性対照区として種苗管理センターから分譲を受けたウイルスフリーのデジマの生葉を用いた。

結 果

1. 病徴調査

馬鈴しょの TRV による特徴的な病徴である株の萎縮、弓形の黄色斑紋に留意しながら、病徴を観察した結果、れん葉等の症状を呈した株が数株見られたものの、TRV によると考えられる症状は見られなかった。

2. ELISA 検定

基質溶液を分注後、1 時間後の反応状態をマイクロプレートリーダーを用い 405 nm の吸光値を測定した。陰性対照区の数値の 2 倍以上を示すものを陽性と判定した結果、すべての検体で陰性であった。

Coat plate: Pipette 100 μ l of coating antibody diluted by coating buffer into each well.

↓ Incubate the plate for 17 hours in a refrigerator (4°C).

Wash plate: Empty the wells, and wash the plate with PBS-T, 3 times.

↓ Dry the plate for 2 days in the refrigerator (4°C).

Dispense samples: Dispense 100 μ l of the prepared samples (extracted into extraction buffer) into each well.

↓ Incubate the plate for 2 hours in the humid box (17°C).

Wash plate: Empty the wells, and wash the plate with PBS-T, 3 times.

↓

Add enzyme conjugate: Pipette 100 μ l of enzyme conjugated antibody diluted by ECI buffer into each well.

↓ Incubate the plate for 2 hours in a humid box (17°C).

Wash plate: Empty the wells, and wash the plate with PBS-T, 3 times.

↓

Add PNP solution: Dispense 100 μ l of PNP solution (dissolved in PNP buffer at a concentration of 1 mg/ml) into each well.

↓ Incubate the plate for 1 hour at room temperature

Examine the wells visually, and measure on a plate reader at 405 nm.

Fig 1. Protocol of ELISA

Table 2. Result of diagnosis of symptoms, ELISA and sap inoculation test.

	Diagnosis of symptoms	ELISA	Sap inoculation test
50 samples of Dejima from Aomori pref.	—*	—	—
60 samples of Nishiyutaka from Nagano pref.	—*	—	—
58 samples of Dejima from Nagano pref.	—*	—	—
65 samples of Dejima from Okayama pref.	—*	—	NT**

*No symptoms considered to be infected with TRV.

**Not tested.

3. 汁液接種検定

接種後、1 カ月間定期的に観察した結果、すべての検体で無病徴であった。一方、陽性対照区は接種後 5 日目までに接種葉に激しい局部病徴（えそ斑点）を現した後、次第に下垂し接種葉はすべて落葉した。また、陰性対照区は無病徴であった。

考 察

以上の結果をまとめると Table 2 のとおりになる。病徴調査では TRV による典型的な症状が見られず、ELISA 検定では陰性だった。TRV は汁液接種で *Chenopodium quinoa* に馬鈴しょに感染する系統を含む多くの系統が局部病斑生じるとされている (KUPPA *et al.*, 1981) が、今回の調査では局部病斑及び全身病徴は見られなかった。以上より今回調査した平成 14 年度産種馬鈴しょの青森、長野、岡山県産のデジマ、ニシユタカには TRV の感染はなかったと考えられる。しかし、本邦でも TRV は他の多くの植物で報告されていること、またセンチュウによって媒介されるため、アブラムシなどによる媒介と異なりその伝播状況を把握しづらいことから、今後引き続き調査を行うと

もに、調査範囲を種馬鈴しょのみならず、一般馬鈴しょに拡大することも必要ではないかと考えられる。一方で、現在国内の馬鈴しょの生産品種数は 40 品種を超える。品種によって TRV に対する感受性が異なることも十分考えられるため、各品種の茎葉・塊茎上の病徴について検討する余地がある。さらに、TRV にはその感染性、血清型から分けられた多くの系統が報告されており (ROBINSON and HARRISON, 1989)、本邦で報告されている TRV の馬鈴しょに対する感染性も調査する必要がある。

引 用 文 献

- KUPPA, A., A. T. JONES and B. D. BAILISS (1981): *Ann. Appl. Biol.* **98**: 243–254.
 與良 清ら (1983): 植物ウイルス事典, 朝倉書店, pp. 516–518.
 ROBINSON, D. J. and B. D. HARRISON (1989): AAB Descriptions of Plant Viruses, Association of Applied Biologists, No. 346.
 土崎常男ら (1993): 原色作物ウイルス病事典, 全国農村教育協会, pp. 188–189.
 STEVENSON, WALTER R., eds. (2001): Compendium of Potato Diseases, 2nd Ed., APS Press, pp. 71–72.