

新潟県下のトルコギキョウにおける *Lisianthus necrotic stunt virus* の発生

伊藤由衣¹・小田正之²・棚橋 恵³・佐野義孝^{1*}

(平成23年7月4日受付)

要 約

2009年10月、新潟県のトルコギキョウ (*Eustoma grandiflorum*) にえそ萎縮症状を引き起こすウイルス病が発生した。ウイルス (Nig-09株) 感染葉からトータル RNA を抽出し、各種トンプスウイルスの外被タンパク質 (CP) 遺伝子の全領域を増幅できるプライマーを用いた RT-PCR により、CP 領域を含むおよそ1300bp の cDNA が増幅された。塩基配列を解析し、CP 領域のアミノ酸配列を他のトンプスウイルスと比較した結果、*Lisianthus necrotic stunt virus* の Nag-4株の配列と99%の相同性を示した。また、*Eggplant mottled crinkle virus* (EMCV) と78%の相同性を示した。トルコギキョウへの戻し接種では接種葉に壊死斑が現れ、その数日後上位葉にえそ輪紋症状やえそ斑が生じた。ウイルス感染葉粗汁液を用いた土壌伝染性試験では、物理的な接触により土壌伝染が確認された。宿主範囲の調査ではトルコギキョウと *Nicotiana benthamiana* に全身感染するほか、ナス科やアカザ科の検定植物に局部感染することが確認された。以上のことから、Nig-09株は長野県で発生が報告されている LiNSV であると考えられた。

新大農研報, 64(1):36-41, 2011

キーワード: LiNSV、トンプスウイルス、トルコギキョウ

緒言

トルコギキョウ (*Eustoma grandiflorum*) にえそ症状を引き起こすウイルスとして、キュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus*)、ソラマメウィルトウイルス (*Broad bean wilt virus*)、トマト黄化えそウイルス (*Tomato spotted wilt virus*)、インパチエンスえそ斑紋ウイルス (*Impatiens necrotic spot virus*)、アイリス輪紋ウイルス (*Iris yellow spot virus*)、土壌伝染性のトルコギキョウえそウイルス (*Lisianthus necrosis virus*) などが知られている (藤永, 2007; Iwaki *et al.*, 1987)。2006年には長野県と静岡県でトルコギキョウのえそ萎縮症状株から2種の異なるトンプスウイルスが分離された (Fujinaga *et al.*, 2006)。これまでにトンプスウイルス属によるトルコギキョウの病害は、静岡県と佐賀県、千葉県、長野県で発生が確認された *Tomato bushy stunt virus-nipple fruit* 分離株 (TBSV-Nf) と長野県で報告されている新規のトンプスウイルス LiNSV (仮称) の2種類のみであり、これらはともに土壌伝染病害の特徴を持つ (Fujinaga *et al.*, 2006; 善と藤, 2005)。

2009年10月に新潟市西蒲区巻でトルコギキョウにえそ輪紋症状を引き起こすウイルス病が発生した (図1)。このウイルス分離株 (Nig-09株) は、Koenig *et al.* (2004) がデザインした各種トンプスウイルス属の外被タンパク質 (CP) 遺伝子に対応する degenerate プライマー Cir3/Cir2 を用いた PCR により、CP 領域が増幅されたことから、病原ウイルスは TBSN-Nf か LiNSV のどちらかである可能性が高いと考えられた。

本研究では Nig-09 株の CP 遺伝子領域の塩基配列を決定し、すでに同定されているトンプスウイルス属のウイルスと塩基配列、アミノ酸配列を比較、配列相同性を調査した。加えてトル



図1 Nig-09感染トルコギキョウえそ萎縮症状株

コギキョウでの病徴、実験的宿主範囲、土壌伝染性についても調査した。

材料および方法

1. 供試ウイルス

新潟市西蒲区巻で発見されたえそ萎縮症状を呈するトルコギキョウの汁液を健全な *Nicotiana benthamiana* に汁液接種し、ウイルスの維持、増殖を行った。感染葉は -30℃フリーザーで

¹ 新潟大学農学部 *ysano@agr.niigata-u.ac.jp

² 新潟県農林水産部 経営普及課

³ 新潟県総合農業研究所 園芸研究センター

保管し、以後の実験に供試した。

2. 汁液接種

1.5cm²の *N. benthamiana* の感染葉に0.1M リン酸緩衝液 pH7.0 (0.1M NaPB) 3 ~ 5mlを加えて乳鉢で磨砕した。宿主範囲の調査では、トルコギキョウ2品種 (パレオシャンパン、ロジーナイエロー) と、*Chenopodium quinoa*, *N. benthamiana*, *Lycopersicon esculentum*, *Solanum melongena* など6科14種の植物にカーボランダムをふりかけ、感染葉粗汁液を含ませた綿棒で擦り付け、汁液接種を行った。

3. 外被タンパク質遺伝子領域の塩基配列

感染葉に ISOGEN (ニッポンジーン) を加え、下記の方法でトータル RNA を抽出した。感染葉の断片約 1 cm² に ISOGEN を 500 μl 加え、乳鉢で十分磨砕したものを、マイクロチューブに移して、クロロホルム 100 μl を加え十分攪拌し 15,000rpm で 15 分間遠心分離した。上清をクロロホルム 100 μl 加えた新しいチューブに移し、同様に攪拌し、15,000rpm で 10 分間遠心分離した。上清を新しいチューブに移し、1/10 容量の酢酸ナトリウムと等量のイソプロパノールを加えて十分攪拌し、10 分以上水中で静置した後、15,000rpm で 15 分間遠心分離し、生じた沈殿に 70% エタノール 100 μl を加え 15,000rpm で 5 分間遠心分離した。上清を捨て、得られた沈殿を 15 μl の滅菌水でけん濁し、その内 1 μl を RT-PCR の鋳型に用いた。

この抽出 RNA を鋳型にして、RT-PCR 法を用いた CP 領域を含む DNA 断片の増幅を行った (図2)。プライマーは、トンプスウイルス属の CP 領域の全長を増幅できる Cir 3 (5'-ARGGTGTTGACGCKCAYGAG-3') Cir 2 (5'-GGTTTATTRACTTGTTSGTATTCAG-3') を用いた (Koenig *et al.*, 2004)。また、トルコギキョウに感染する主要なウイルスであるブニヤウイルス科トスポウイルス属の *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)、*Impatiens necrotic spot virus* (INSV)、*Iris yellow spot virus* (IYSV) の感染の有無を確認するため、それぞれの種特異的なプライマーとして TSWV-709 (5'-GTGTCATACTTCTTTGGGTC-3')、INSV-589 (5'-CCCAAGACACAGGATTTCA-3')、IYSV-837 (5'-GTTTAGAAGACTCACCAATG-3') を用い、相補鎖プライマーとしてトスポウイルス属ユニバーサルプライマー ITOS-R15 (5'-GGGAGAGCAATYGWGKYR-3') を用いた (Uga and Tsuda, 2004)。PCR キットは PrimeScript One-step RT-PCR kit Ver.2.0 (TaKaRa) を使用し、プログラムは 50℃ で 30 分 (逆転写反応)、94℃ で 30 秒 (熱変性) と 58℃ で 30 秒 (アニーリング) と 72℃ で 1 分 (伸長反応) を 35 サイクル、74℃ で 10 分 (伸長反応) で行った。反応後、目的の断片が見られるかどうか電気泳動を行い確認した。

増幅した DNA に染色液を加え、1.0% 低融点ゲル及び TAE バッファー (40mM Tris-acetate pH8.0, 0.1M EDTA) で電気泳動し、泳動後に臭化エチジウムで染色、目的の DNA バンドを切り出した。

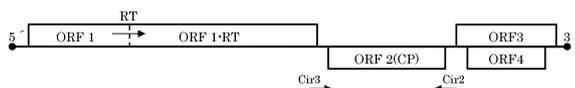


図2 トンプスウイルスの推定される ORF とプライマーの位置

クローニングは、pMD 20 プラスミドベクター (TaKaRa) と *Escherichia coli* JM109 コンピテントセル (TaKaRa) を用いて常法により行い、得られた組換え体からプラスミド抽出し、塩基配列を解析した。配列データは GENETYX ver.10 (株式会社ゼネティックス) で処理後、BLAST で他の近縁なウイルスと配列比較した。

4. 土壌伝染性試験

N. benthamiana 及びトルコギキョウの健全苗をあらかじめプランター (45 × 15 × 15 cm) の片側に 3 株ずつ移植した。1 週間後、根が活着したところでウイルスに感染した *N. benthamiana* 植物体残渣を含む土をプランターの植物の反対側に移した。ポジティブコントロールとして、*N. benthamiana* 健全苗を移植し、直ちに *N. benthamiana* の感染葉を 0.1M NaPB ですり潰した粗汁液を土壌にふりかけた。どちらも 3 週間温室で管理し、RT-PCR を行いウイルス感染の有無を確認した。

結果および考察

トルコギキョウ 2 品種に Nig-09 株を戻し接種を行ったところ、パレオシャンパンでは 9 株中 4 株に、ロジーナイエローでは 7 株中 7 株に感染し病徴が再現された。接種 3 ~ 4 日後に



図3 Nig-09株感染トルコギキョウ萎縮症状株
注) 写真左がパレオシャンパン、右がロジーナイエロー。



図4 プライマー Cir3/Cir2を用いた RT-PCR 結果
M) サイズマーカー: λ-EcoT14 I digest (TaKaRa)
Cir) Nig-09感染葉から抽出した全 RNA の増幅産物

接種葉にモザイク、壊死斑が現れ、その数日後、上位葉にえそ輪紋、退緑斑、モザイクが現れやがてえそ斑になった。また茎の萎縮、花卉の斑入りも生じた。トルコギキョウの品種のほとんどは LiNSV (仮称) に抵抗性を有しておらず、植物体の生育段階や品種によって様々な症状が現れることが報告されている (藤永、2007; Koenig *et al.*, 2004; 善と藤、2005)。今回の接種試験においても 2 品種に、パレオシャンパンでは茎の萎縮、モザイク症状、ロジーナイエローでは退緑症状が激しい傾向が見られた (図 3)。

プライマー Cir3/Cir2 を用いた RT-PCR で約 1.3kbp の DNA 断片が増幅されることが確認され (図 4)、トスポウイルス属のプライマーではどれも感染が確認されなかった。この増幅断片の塩基配列を解析したところ 1290 塩基からなり、内部に単一の ORF が含まれていた。この ORF は 388 アミノ酸からなる 41kDa のタンパク質をコードする (図 5)。Nig-09 株とすでに知られている数種のトンプスウイルス属、トンプスウイルス科のウイルスを CP 領域で配列比較したところ、塩基配列相同性は Nag-4 と 99% で非常に高い相同性を示すことが確認された。次に TBSV-Nf、*Eggplant mottled crinkle virus* (EMCV)

表 1 本ウイルスと *Tombusvirus* 属、*Tombusviridae* 科ウイルスとの CP 領域の塩基・アミノ酸配列相同性 (%)

		aa	nuc
<i>Tombusvirus</i> 属	TBSV-Nf	72	67
	Nag-4	99	99
	Shiz-1	71	68
	EMCV	78	74
<i>Aureusvirus</i> 属	PoLV	44	—
<i>Necrovirus</i> 属	TNV-D	31	—
<i>Machlomovirus</i> 属	MCMV	20	—
<i>Panicovirus</i> 属	PMV	17	—
<i>Avenavirus</i> 属	OCSV	27	—
<i>Dianthovirus</i> 属	CRSV	31	—
<i>Carmovirus</i> 属	CarMV	24	—

注 1) TBSV-Nf(*Tomato bushy stunt virus nipplefruit isolate*), Nag-4, Shiz-1, EMCV (*Eggplant mottled crinkle virus*), PoLV(*Pothos latent virus*), TNV-D(*Tobacco necrosis virus strain D*), MCMV(*Maize chlorotic mottle virus*), CarMV(*Carnation mottle virus*), OCSV(*Oat chlorotic stunt virus*), PMV(*Panicum mosaic virus*), CRSV(*Carnation ringspot virus*)
 注 2) Shiz-1は静岡で分離された TBSV-Nf。

```

AGGGTGTGACGCTCAGCAGCCAGCATCCTTGACTCTGCGCAGCTTGACCAAGTGAAC 60
Cir3 →
AAAGCAATGGAGATGGTTACACGCAATCGTAATAATGTGTGGCAGTTAGCAAGAACAG 120
    M E M V T R N R N N V L A V S K K Q
TTAGCATCTATGGTGCAACAGCAGCTATGGGTGCGATAGGAAATATGTGAACAGAAT 180
    L A S M A A T A A M G A I G N Y V K Q N
GGAGTGACGATGATTAAGATGCGGTGACGCTGGGTAAGCGATCCGCTCTGCCAGG 240
    G V T M I K D A V T L G T K A I R S A R
AATCGTAGGAAGAAGGAATCAGCAGGAGTAGTACACGTAAGTGGTACAGGTGGGGCC 300
    N R R K K G N Q Q E I V H V G G T G G A
ATGATGGCCCGGTGGCAGTGTCTAGCAACATCGCGCAAGCCTAAGTTGGCCGGT 360
    M M A P V A V A S R Q L I G S K P K F A G
CGTACTTCTGGATCTGTACAGTCAACCCAGCTGAGTACCTGACACAAGTCAACAAC 420
    R T S G S V T V T H R E Y L T Q V N N S
TCAAATTTACAGTCAATGGGGTATGTCGGCAATTTGTTGCAGCTTAACCCGCTTAA 480
    S N F T V N G G I V G N L L Q L N P L N
GGGACACTCTTTTCATGGTTACCGCCATAGCGTCAAACCTTGATCAGTACGCTTCAAC 540
    G T L F S W L P A I A S N F D Q Y V F N
AGCGTGGTGTACTACATATTGCCCTATGCGGACCAAGTGGTGGTGGTGGTGGTGG 600
    S V V L H Y V P L C G T S E V G R V A M
TACTTTGATAAGGACTCGGAGGATCCTGAACCTGCTGATAGAGTGGAGTGTAGCTAAC 660
    Y F D K D S E D P E P A D R V E L A N F
AGTGTGCTTAAAGAACCCGCCATGGCGGAAGCATGCTCAGGGTACCCGTCGATAAG 720
    S V L K E T A P W A E A L L R V P V D K
GTTAAGAGATACTGCGAGTACAGTACCGTAGTACCGCAAGCTTATCGACCTGGGCA 780
    V K R Y C D D S T V V D R K L I D L G Q
TTGGCCCTTGGCAGATATGGTGGCCTGGAGCTAACCCCTGTTGGGGATGTGTTGTG 840
    L G L A T Y G G A G A N P V G D V F V S
TACAGCGTGACACTTTACTTCCCAACCAACAAGTCCCTATTATCTACAAGCAGCTA 900
    Y S V T L Y F P Q P T S S L L S T R Q L
AACTTGGCAGGCGGTCTGGCTGGGAGTGTGGGCTGGCTACATATTGTCAAGCAACA 960
    N L A G G L A G S A G P G Y I I V S T T
CCACCGCTTAAACAATTACGTTTCGCTCCAGGCACTTCCCTTGTGGCGGAAACCTTC 1020
    P T V L T I T F R S T G T F L V A G T F
CGAGACACAGGAGTGTCCGCTCCTGGGTAGTACAGGGAGTATTGGGATTAACACAAAC 1080
    R D T G V S V L G S T G S I G I N S Q T
ACACTGCACAGTAGGACTTGGCAGCTTCTTTTATTAAGTACTGTACTGTGTCAGCTCT 1140
    T L D T V G L A T S F F I N C T V S A L
CCTGCTACCATCACATATAGCTTACAGGATAACATCTGCTACTGTACAATGCACACGG 1200
    P A T I T Y T S T G I T S A T V Q C T R
GCCGTTAGGGCAACACCACTTCACTTGCCTTAGGGCTCTTGAAGTACCAATCTCTAT 1260
    A V R A N T T S L L *
GGACACTGAGTACGAACAATCAACAAACC 1290
    → Cir2
    
```

図 5 シークエンス解析された Nig-09 の CP 領域の配列データ
 注 1) ATG は開始コドン、TAG は停止コドンである。
 2) 下線部はプライマー配列。

と 77% の高い相同性を示した。アミノ酸配列相同性についても Nag-4 と 99% で非常に高い相同性を示し、次に TBSV-Nf、EMCV とそれぞれ 72%、78% の相同性を示した (表 1) (Anju and Liu, 2010; C. Heinze *et al.*, 2004; Fujinaga *et al.*, 2006; Raymond *et al.*, 2000; Ohki *et al.*, 2005)。第 8 回国際ウイルス分類委員会によりトンプスウイルス属の種の分類基準は、外被タンパク質においてアミノ酸配列相同性が 87% 未満であると示唆されており、これに従うと Nig-09 株は LiNSV と同一種であると考えられる (C. M. Fauquet *et al.*, 2005)。

土壌菌による土壌伝染性試験では *N. benthamiana*、トルコギキョウともに病徴が現れず感染が確認されなかった (それぞれ 9 株中 0 株、9 株中 0 株感染)。ポジティブコントロールでは試験 3 週間後に病徴が現れ、75% の割合で感染が確認された (12 株中 9 株感染)。今回の実験では菌媒介による土壌伝染は確認できなかったこと、及びポジティブコントロールでウイルスの感染が見られたことから、Nig-09 株は物理的な接触により土壌伝染すると考えられる。これは、TBSV-Nf、LiNSV と同じ土壌伝染方法である。

5 科 13 種の植物に Nig-09 株の接種試験を行ったところ、全身感染したのはナス科の *N. benthamiana*、ナスのみであり、他の検定植物では接種葉に局部感染した。トンプスウイルス属の TBSV-Nf は *N. benthamiana*、トマト、ピーマン、*Datura stramonium*、センニチコウ、ホウレンソウに全身感染し、LiNSV (Nag-4 株) は *N. benthamiana* にのみ全身感染することが報告されており (Fujinaga *et al.*, 2006)、本ウイルスは Nag-4 と宿主範囲がほぼ同じであるがナスに全身感染する点で異なることがわかった (表 2、図 6)。

実験的宿主範囲の特徴や、CP のアミノ酸配列相同性から Nig-09 株は LiNSV (仮称) であると考えられた。トンプスウイルス

表2 宿主範囲

学名(品種)	接種葉	上位葉
<i>Chenopodium quinoa</i>	CS ^a , NS ^b	—
<i>C. amaranticolor</i>	CS, NS	—
<i>Spinacia oleracea</i> (しなの)	NS	—
<i>Nicotiana tabacum</i>	CS, NS	—
<i>N. occidentalis</i>	NS	—
<i>N. benthamiana</i>	CS, NS	St ^c , M ^d
<i>Lycopersicon esculentum</i> (ホーム桃太郎)	CS	—
<i>Capsicum annuum</i> (ハイグリーン)	CS	—
<i>Solanum melongena</i> (紫泉)	CS	St
<i>Datura stramonium</i>	CS	—
<i>Gomphrena globosa</i>	CS, NS	—
<i>Tetragonia teragonoides</i>	CS, NS	—
<i>Antirrhinum majus</i>	CS	—
<i>Vigna unguiculata</i>	CS, NS	—

a) 退緑斑、b) 壊死斑、c) 萎縮、d) モザイク、— 無病徴



図6 Nig-09株感染ナス萎縮株

属のウイルスは粒子構造が極めて安定であり、ほとんどの種が物理的な接触により土壌伝染することが知られている (C. M. Fauquet *et al.*, 2005)。さらに、ヨーロッパの河川や、農業用水からも発見されている (R. Koenig *et al.*, 2004)。本ウイルスがこれらのウイルスのように河川から農業用水を伝って感染した可能性も示唆される。LiNSV は、これまで長野県内でのみ発生が確認されており (Fujinaga *et al.*, 2004; 伊山ら, 2009; 宮坂ら, 2008)、今回の報告が長野県以外で初めての発生例となる。Nig-09 株が長野県から新潟県へ侵入したのか、あるいは新潟県内に元々存在していたのかは不明であるが、長野県外で発生が確認されたことから感染のさらなる拡大が懸念される。

参考文献

Anju Gulati-Sakhuja, Hsing-Yeh Liu .2010 . Complete

- nucleotide sequence and genome organization of *Calibrachoa mottle virus* (CbMV)- A new species in the genus *Carmovirus* of the family *Tombusviridae*. *Virus Research* **147** 216-223
- C. Heinze, V. Wobbe, D.-E. Lesemann, D. Y. Zhang, P. Willingmann and G. Adam. 2004. *Pelargonium necrotic spot virus*: a new member of the genus *Tombusvirus*. *Arch Virol* **149**: 1527-1539
- C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L. A. Ball .2005 . Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press : 907~935
- Fujinaga, M., Morikawa, T., Doi, M., Yoneyama, C., Ibrahim, M., Ogiso, H., Miyamoto, K., Miyasaka, M., Ohki, T., Kameya-Iwaki, M. and Natsuaki, T. 2006 . Two tombusviruses isolated from lisianthus [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.] with necrotic stunt. *Jpn. J. Phytopathol.* **72**:109-115
- 藤永真史. 2007. トルコギキョウに発生するウイルス病の被害実態と防除対策. 農耕と園芸 2007. 5月号 P160~164
- 藤永真史・小木曾秀紀・宮本賢二・宮坂昌実・塚田晃久・佐藤勇人・守川俊幸・米山千温・夏秋知英. 2007. 長野県内のトルコギキョウに発生しているウイルス病の発生実態. 関東東山病害虫研究会報 第54集: 85~88
- 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
- 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 . 2009. トルコギキョウに発生する2種トンプスウイルスのRT-PCR 法による識別検出. 北陸病虫研報58:19~23
- 宮坂昌実・藤永真史・宮本賢二・小野佳枝・松本悦夫. 2008. トルコギキョウにおける新規 *Tombusvirus* (LiNSV : 仮称) に対する主要品種の抵抗性評価. JGLOBAL:JSTPlus, 園芸学会東海支部研究発表要旨 pp.21
- R. Koenig, J. Th. J. Verhoeven, C. E. Fribourg, E. Pfeilstetter, and D. E. Lesemann .2004 . Evaluation of various species demarcation criteria in attempts to classify ten new tombusvirus isolates. *Arch Virol* **149**: 1733-1744
- Raymond Louie, M. G. Redinbaugh, D. T. Gordon, J. J. Abt and R. J. Anderson .2000 . *Maize necrotic streak virus*, a New Maize Virus with Similarity to Species of the Family *Tombusviridae*. Publication no. D-2000-0824-01R
- Takehiro Ohki・Seiji Uematsu・Dietrich-Eckhardt Lesemann・Yohachiro Honda・Shinya Tsuda・Ichiro Fujisawa .2005 . Characterization of Tomato bushy stunt virus newly isolated from nipplefruit (*Solanum mammosum*) in Japan. *JGen Plant Pathol* **71**:74-79
- Hiroyuki Uga and Shinya Tsuda .2004 . A One-Step Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction System for the Simultaneous Detection and Identification of Multiple Tospovirus Infections. *Phytopathology* **95**:166 -171
- 善正二郎・藤 晋一. 2005. 佐賀県のトルコギキョウに発生した Tomato bushy stunt virus(TBSV). Abstracts Presented at the Meeting of the Kyushu Division, Kumamoto, October 6-7.

First Report of Lisianthus Necrotic Stunt Virus on *Eustoma grandiflorum* in Niigata Prefecture.

Yui ITO¹, Masayuki ODA², Megumu TANAHASHI³ and Yoshitaka SANO^{1*}

(Received July 4, 2011)

Summary

During October 2009, lisianthus plants [*Eustoma grandifloru* (Raf.) Shinn.] showing severe necrotic stunt symptoms were found in Maki, Niigata city. From infected leaves, we isolated causal virus and named Nig-09. The virus reproduced necrotic spots on healthy lisianthus plants after mechanical inoculation. A reverse transcription (RT)-PCR assay employing degenerate primers for amplifying entire coat protein (CP) gene of several tombusviruses yielded a 1300 bp product that was cloned and sequenced. Sequence identity at the nucleotide level was 99% with Nag-4 isolate of Lisianthus necrotic stunt virus (LiNSV), a novel tombusvirus recently found in Nagano prefecture. This is the first report of LiNSV incidence other than in Nagano prefecture.

Bull.Facul.Agric.Niigata Univ., 64(1):36-40, 2011

Key words : LiNSV, tombusvirus, *Eustoma grandiflorum*

¹ Faculty of agriculture, Niigata University

² Agricultural Management Promotion Division, Niigata Prefecture

³ Niigata Agricultural Research Institute, Horticultural research Center