

輸入検疫中にダリアより発見された Tomato Spotted Wilt Virus

末 次 哲 雄

横浜植物防疫所国際課

I. はじめに

1965年、当所大和隔離圃場では、アメリカから輸入されたダリアより Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) を検出した。ダリアの病原ウイルスとしては、外国では Dahlia Mosaic Virus (BRIERLEY and SMITH, 1950), Cucumber Mosaic Virus (LAWSON, 1966), Tobacco Ringspot Virus (LAWSON and MILBRATH, 1963) および TSWV (SMITH, 1932) が報告されている。

TSWV は、1919年 BRITTLEBANK によりオーストラリアで A new tomato disease "Spotted wilt" という報告がされており、これが最初の報告のようである。その後、1930年 SAMUEL, BALD and PITTMAN によりオーストラリアで、1932年には SMITH がイギリスで伝染方法、寄主範囲などに関して、くわしく報告している。次いで、アメリカで BERKELEY (1935), AINSWORTH (1936), フィリピンでは SERRANO (1935) が報告している。このように、このウイルスは古くから世界中に分布して大きな害を与えている寄主範囲の広い重要なウイルスである。

しかし、幸いにも未だわが国には侵入していない。そこで、同定中に観察された物理的性質、ウイルス粒子の大きさ、形、各植物上の病徴等を報告する。

本研究を行なうに際し、格別の御指導と御便宜を頂いた植物ウイルス研究所小室康雄博士、同所栃原比呂志博士ならびに当所松濤美文管理官に深く感謝の意を表する。

II. 実験材料および方法

1. 材 料

オランダ、ベルギー、アメリカ合衆国の3国から輸入され隔離検疫中のダリア156品種、193株の茎葉に、それぞれ0.05% KCN液を加えて磨砕汁とし、*Nicotiana glutinosa*、ソラマメ、ペチュニアなどにカーボランダム

ム法で接種した。このうちアメリカ合衆国産 Envy 品種から Cucumber Mosaic Virus (CMU) と混合感染している TSWV を検出した。そこで CMU を除くためソラマメに接種し、その頂葉に生じたエソ病徴部分を *N. glutinosa* に再接種して材料とした。

ダリア上の本罹病株の病徴は5~9月はモザイク病徴で Ring や Spot 状の病徴は現われていなかった。しかし、10月上旬に至り、新葉に径1~2mmのやや黄色の spot 状の病斑が現われ、10月下旬にはまた消えてモザイク病徴のみになった。

2. 接 種 方 法

ウイルスの各植物上への接種は600メッシュのカーボランダムを振りかけて汁液接種した。TSWVの化学的性質については BALD and SAMUEL (1934) や BEST and SAMUEL (1936) がくわしい実験をしているが、このウイルスの緩衝液としては0.05% KCN液が優れておりかつ調整が容易で他のウイルスにも有効な緩衝液であることから、筆者は0.05% KCN液を葉重の3倍量を加えてすりつぶし、汁液接種をおこなった。戻し接種は、発病株については病徴の最も明瞭なとき、また無病徴株については接種後約30日経たもののそれぞれの頂葉の汁液をペチュニアに接種して、接種葉に生じる局部病斑により判定した。

なお、汁液接種するに必要な緩衝液、乳鉢乳棒等はいあらかじめ冷蔵庫で冷却して用いた。

III. 実験結果

1. 物理的性質

罹病 *N. glutinosa* の汁液をそれぞれ処理し、それをペチュニア2~3株、葉数20~30葉にカーボランダム法で接種し、その局部病斑によった。その結果、耐熱性は40~45°C、10分、耐保存性は室温下で2~3時間、耐希釈性は10,000~100,000倍であった。これらの結果は BALD and SAMUEL (1931), SMITH (1932) や BERKE-

LEY (1935) の報告と大体一致する。

2. アブラムシ伝播試験

アブラムシによる伝染はモモアカアブラムシを各々10頭づつ用いて30～90分絶食させたのち、①罹病トマト上で30～120秒吸汁させてから健全トマトに移し2時間放置したもの、②罹病 *Datura stramonium* 上で30～120秒吸汁させたのち健全 *D. stramonium* にうつし2時間放置したもの、③罹病 *N. glutinosa* 上で1～2分、10分、60分吸汁させたのち、健全 *N. glutinosa* にうつし24時間放置したもの等の方法で試験をおこなったがいずれも感染しなかった。SAMUEL, BALD and PITTMAN (1930) がくわしい実験をおこなっているがその結果も感染していない。

3. ウイルスの粒子

ウイルス粒子の形をみるためにBLACK, BRAKKE and VATTER (1963) を参考にVAN KAMMEN, HENSTRA and IE (1966) の方法で純化した。材料には *N. rustica* の罹病葉を用いた。すなわち、接種7日後に全葉を切り取り、0.01Mの Na_2SO_3 を含むPH7.0、0.1M 磷酸緩衝液を同量加えて磨砕し、その汁液を4,000Gで25分間の遠心分離をおこなった。この沈澱部分に病葉と同量の0.01M Na_2SO_3 液を加えて懸濁し、冷蔵庫内で50分間放置した。その後この液を4,000G、30分間の遠心分離をおこない、その上清をさらに24,000G、50分間の遠心分離をおこなった。この沈澱物を少量の0.01M Na_2SO_3 液で懸濁し、4,000G、20分間の遠心分離をおこない、つぎに上清を0.01M Na_2SO_3 を含む10～40%のsucrose

液で密度勾配をつくり、水平ロータで90,000G、35分間の超遠心分離をおこなった。これによって生じた沈澱管中の緑色をわずかに含む部分の勾配液を、電子顕微鏡で観察したところ第1図のように80～120m μ の楕円形のウイルス粒子を観察することができた。この結果はBLACK, BRAKKE and VATTER (1963) の報告と一致している。

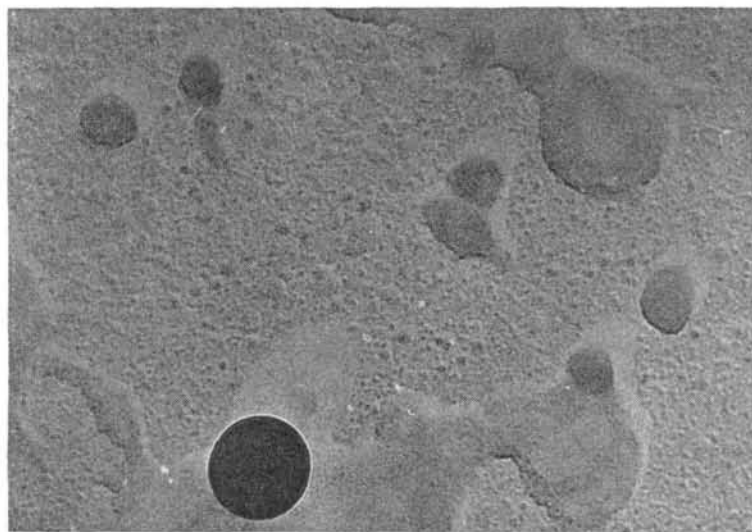
IV. 各種植物への接種

本ウイルスをナス科、マメ科、キク科など9科28種の植物に汁液接種をおこなった。その結果は第1表に示した。

ペチュニアは最も感受性の高い植物であり、接種後30～40時間で接種葉に径1～2mmの水浸状のspotを生じ、72時間くらい経つと、褐色の輪紋状の病斑となる。大きさは生じた局部病斑の数によって異なるが大体2～7mmである。5～7日で接種葉は枯死するが全身病徴は現われなかった。

Nicotiana 属6種はいずれも接種後2～4日で接種葉に径2～3mmの水浸状のspotを生じ、次第に赤褐色の輪紋状斑点となり、その大きさは病斑数によって異なるが大体5～20mmであった。のち5～7日で接種葉は枯死落葉する。

N. glutinosa は接種後7～14日で、局部病斑が生じて間もない時であるが全身にエソ病徴が生じ逐次枯死した。*N. rustica*, *N. tabacum* 中のSamsun種は *N. glutinosa* と同じような病徴であったが、それ程激しくなく、全身に病徴が生じても枯死するまでには日数がか



第1図 TSWV の電子顕微鏡写真

第1表 各種植物への汁液接種結果

接 種 植 物	病 徴		戻 し 接 種
	接 種 葉	全 身	
ナス科	タバコ (ホワイトバーレ)	NS,NR (StN), (NS)	+
	" (ブライトイエロー)	NS,NR (NS)	+
	" (サムソン)	NS,NR NS	+
	<i>Nicotiana sylvestris</i>	NS,NR O	+
	<i>N. rustica</i>	NS,NR NS	+
	<i>N. glutinosa</i>	NS,NR NS	+
	トマト (固定世界一)	(NS) NS,StN,Wilt	+
	<i>Datura stramonium</i>	GS NS	+
	<i>D. tatula</i>	GS NS	+
	ジャガイモ (雲仙)	NS NS	+
アカザ科	<i>S. demissum</i> A6	NS NS	+
	<i>Physalis floridana</i>	GS NS	+
マメ科	ベチュニア	NS O	
	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	NS O	
ウリ科	ソラマメ	NS StN,NS	+
	エンドウ (白絹さや)	NS StN	+
	インゲン (大手芒)	(NS) O	*-
	ササゲ	NS,NR NS, StN	+
十字科	カウビー	NS,NR NS, StN	+
	キウリ (四葉)	WS O	*-
キク科	カボチャ	WS O	*-
	キャベツ	O O	
ヒユ科	山東菜	O O	
	ダーリア	NS StN, NS	
ユリ科	センニチコウ	NS NS	+
	テツボウユリ	O O	
ヒガンバナ科	ヒアシンス	O O	
	アマリリス	GS GS	+

註: NS: エソ斑点, NR: 輪紋エソ, StN: 茎エソ, Wilt: 萎凋, GS: 緑色斑点,
 Ws: 白色斑点, O: 無病徴, ()時に発病, 戻し接種は接種された植物の頂葉
 ※ は接種葉, 頂葉の2カ所からの戻し接種

かった。*N. tabacum* のうちホワイトバーレとブライトイエローの接種葉以外の病徴は接種葉の葉柄にエソが生じ、その後、このエソが茎に発生し、のち頂葉にもエソ病徴が生じた。しかし、この全身病徴が現われることは非常に稀であった。*N. sylvestris* には全身病徴は生じなかった。

トマトでは、接種後4〜7日で接種葉に不明瞭な局部病斑が現われることがあるが普通は生じない。その後、中・頂葉にエソ斑点を生じ、葉は次第に赤味を帯びて萎れ、いわゆる Spotted wilt や Bronzy wilt となり、最

後には枯死した。

ジャガイモでは、接種後6〜7日で接種葉に茶色の2〜3mmの局部病斑を生じ、接種葉は間もなく落葉し、20〜30日後に全身に褐色の斑点を生じ、次第に枯死した。

ここに供試したマメ科のなかでは、ソラマメが最も感染しやすく、接種後3〜4日で、接種葉に径2〜3mmの不明瞭な褐色の斑点を生じ、その大きさは、病斑数によって異なるが、1つの病斑でも接種葉全体に広がり、これを枯死させる。さらに1〜2週間後に頂葉や茎にエソ

が生じ、株全体が枯死した。

ササゲ、カウピーでは、接種後6~7日で接種葉に不明瞭な径1~2mmの緑色の斑点を生じ、次第に大きさ4~5mmの褐色の斑点となり、葉脈や茎にエソを生じ、頂葉にもエソ斑点を生じて枯死した。

エンドウは、接種後6~7日で接種葉に径約1mmの小さな褐色の局部病斑を生じ、7~10日後に接種葉の葉柄にエソを生じ、2週間くらい経つと茎にエソが生じて枯死した。

インゲンでは、まれに接種後6~7日に、葉種葉に径1~2mmの褐色の輪点や輪紋を生じたが、ペチュニアに戻し接種を試みたところ、接種葉、頂葉ともにウイルスを検出できなかった。

キウリ、カボチャはともに接種葉に接種後5~7日で径1~2mmの白色の局部病斑を生じたが、ペチュニアへの戻し接種では、接種葉、頂葉ともにウイルスを検出できなかった。

キャベツ、山東菜では、病徴は全く生じなかった。

ユリ、ヒアシンズでは、病徴は全く生じなかった。

センニチコウは接種後10日くらいで接種葉に径約5mmの不整形の褐色斑点を生じ、20日くらい後には頂葉にもエソ斑点を生じた。

アマリリスでは接種後20~30日で接種葉に楕円形の緑白色の斑点を生じ、時により、接種葉は萎凋した。3~6ヶ月後に全身に緑白色の斑点や赤味を帯びた斑点を生じ、発病葉の中には枯死するものがあった。

ダリアの実生では、接種後10~20日で接種葉に径1~3mmの褐色斑点を生じ、その後、葉柄から茎エソを生じ、次第に全身に褐色斑点が現われ、枯死するものもあった。また、株によっては、不明瞭な緑色の輪紋病徴を生じるものもあった。

V. 考 察

Tomato spotted wilt virus はダリアのウイルス病として報告されている他のウイルス、Cucumber mosaic virus (CMV), Dahlia mosaic virus (DMV) Tobacco ringspot virus (TRSV) とは物理的性質が非常に異なっている。CMV は、AINSWORTH (1935) によれば耐熱性は 60°C 10 分、耐保存性は 3~4 日、ウイルス粒子は SILL, BURGER, STAHMANN and WALKER (1952) によると 35m μ の球状である。DMV は BRIERLEY and SMITH (1950) によると耐熱性は 85~90°C、耐希釈性は 3,000 倍、耐保存性は 28~35 日である。TRSV は HENDERSON and WINGARD (1931) によれば耐熱性は 60 分、耐希釈性は 1,000~10,000 倍、ウイルス粒子は DESJARDINS, SENSENEY and HESS (1953) によれば

20~40m μ の球状であり、STEERE (1956) によれば 24~28m μ の球状である。然るに、TSWV は耐熱性は BALD and SAMUEL (1931) によれば 42°C、BERKELEY (1935) によれば 45°C であり、耐保存性は BALD and SAMUEL (1931) によれば 3~6 時間、SMITH (1932) によれば 30 分~2 時間である。耐希釈性は SMITH (1957) によると 10,000~100,000 倍である。ウイルス粒子の大きさは BLACK, BRAKKE and VATTER (1963) によれば 85~120m μ の楕円形、VAN KAMMEN, HENSTRA and IE (1966) によれば 80~120m μ の楕円形である。一方、ダリアから分離した本ウイルスは耐熱性は 40~45°C、耐保存性は 2~3 時間、耐希釈性は 10,000~100,000 倍、ウイルスの粒子は 80~120m μ の楕円形で、前記 TSWV の各報告と全く同じである。また、TSWV の各植物上の病徴はペチュニアでは 2~3 日で接種葉に褐色の Spot を生じ、*N. glutinosa* については、接種葉に Local lesion を生じ、のち全身にエソ病徴を生じることを SMITH (1932)、BERKELEY (1935) が報告している。ダリアについては SMITH (1932) によると、同心円状の輪紋を生じ、トマトは SMITH (1932)、BERKELEY (1935) によれば Spotted wilt や Bronzy wilt を生じるとしている。エンドウは WHIPPLE (1936) によれば接種葉に局部病斑を生じ、のち茎にエソを発生すると報告している。以上の各報告と、本ウイルスを接種して、生じた病徴とは、全く同じであった。

このように、TSWV は古くから問題になっているウイルスで寄主範囲は広く、SMITH (1957) は 21 科 110 種の植物に感染することを記載しているが、筆者がおこなった 9 科 28 種の植物への接種試験の結果もほとんどの記載の中に含まれ、病徴も非常によく似ている。伝染方法については、SAMUEL, BALD and PITTMAN (1930)、SMITH (1932) は、TSWV が *Thrips tabaci* で伝染することを報告しているが、筆者はその試験をまだおこなっていない。しかし、広い寄主範囲、特徴のある物理的性質、同じくそのウイルス粒子の形等より、本ウイルスは Tomato spotted wilt virus であると考えられる。

摘 要

1965 年隔離検疫中のアメリカ合衆国産ダリア Envoy 品種の黄色斑点病徴葉から Tomato spotted wilt virus 検出し、同定中に観察された各植物上の病徴、物理的性質を質、ウイルス粒子の大きさ形などを調査した。その結果は次のとおりである。

1. このウイルスは CMV と混合感染していたので、ソラマメに接種して、その頂葉に生じたエソ病徴部を *N. glutinosa* に再接種して単独に取り出した。

2. 28種の植物に汁液接種し、24種が感染した。特にペチュニア、*N. glutinosa*, *N. tabacum* トマト、アマリリス、ソラマメ、エンドウなどの病徴が激しく、かつ特徴のある病徴であった。

3. ペチュニアは感受性の高い植物で、接種後30～40時間で、接種葉に局部病斑を発生した。その大きさは径2～7mmの褐色輪紋状で、接種葉は枯死落葉した。接種葉以外には、病徴は現わなかった。

4. *N. glutinosa* は接種後2～4日で接種葉に局部病斑を生じ、のち病斑は次第に大きくなり、5～20mmの赤褐色の輪紋斑点となった。さらに7～14日後、茎ならびに接種葉以外の葉にエソ病斑を生じて枯死した。

5. *N. tabacum* ホワイトバーレでは接種後2～4日間で、接種葉に局部病斑を生じる。その病徴は *N. glutinosa* に似ているが大きくなりず接種葉以外にはめったに病徴は現わさない。

6. トマトは感受性の高い植物であった。しかし、接種葉上の局部病斑はまれにしか生じなかった。全身病徴は、特徴のある Spotted wilt や Bronzy wilt であり、感染した植物はこのため枯死した。

7. アマリリスは接種後20～30日で接種葉に緑白色の斑点を生じた。さらに3～6ヶ月後に、全身に多くの濃赤褐色の斑点や、緑白色の斑点を発生し、時によると、この発病葉は枯死することがあった。

8. 供試したマメ科の中ではソラマメが最も感染しやすかった。すなわち、接種後3～4日で接種葉に径2～3mmの褐色の局部病斑を生じ、7～14日後に、頂葉および茎にエソが生じ、次第に枯死した。

9. エンドウは接種後6～7日で接種葉に径約1mmの褐色の病斑を生じ、7～14日で茎にエソが発生して枯死した。

10. 耐熱性は40～45°C、耐希釈性は10,000～100,000倍、耐保存性は2～3時間であった。また、ウイルス粒子の形は楕円形で大きさは80～120mμであった。

11. 以上の寄主範囲、物理的性質およびウイルス粒子の形より、本ウイルスは Tomato spotted wilt virus であると考えられる。

文 献

AINSWORTH, G.C. (1935) Mosaic disease of the cucumber. *Ann. Appl. Biol.*, **22**: 55-67.
 AINSWORTH, G.C. (1936) Detection of spotted wilt virus in chrysanthemum. *Nature, London*, **137**: 868.
 BALD, J.G., and G. SAMUEL (1931) Investigations on spotted wilt of tomatoes II. *Aust. Counc. Sci. and Ind. Res. Bull.*, **53**: 5-24.

BALD, J.G. and G. SAMUEL (1934) Some factors affecting the inactivation rate of the virus of tomato spotted wilt. *Ann. Appl. Biol.*, **21**: 179-190.
 BERKLEY, G.H. (1935) Occurrence of spotted wilt on tomatoes in Ontario. *Sci. Agri.*, **15**: 387-392.
 BEST, R.J. and G. SAMUEL, (1936) The effect of various chemical treatments on the activity of viruses of tomato spotted wilt and tobacco mosaic. *Ann. Appl. Biol.*, **23**: 759-780.
 BLACK, L.M., M.K. BRAKKE, and A.E. Vatter, (1963) Purification and Electron Microscopy of Tomato spotted wilt virus. *Virology*, **20**: 120-130.
 BRIERLEY, P. and F.F. SMITH (1950) Some vectors, hosts and properties of Dahlia mosaic virus. *Plant Dis. Rept.*, **34**: 363-370 (*R.A.M.* **31**: 121).
 BRITTLEBANK, C.C. (1919) A new tomato disease "spotted wilt". *Jour. of Agr. Vict.*, **17**: 231-235.
 DESJARDINS, P.R., C.A. SENSENEY and G.E. Hess, (1953) Further studies on the electron microscopy of purified tobacco ringspot virus. *Phytopath.* **43**: 686-690.
 HEDERSON, R.G. and S.A. WINGARD (1931) Further studies on tobacco ringspot in Virginia. *J. Agric. Res. Bull.*, **188** (*R.A.M.* **11**: 132).
 LAWSON, R.H. and J.A. MILBRATH (1963) A ringspot virus from Dahlia. *Phytopath.* **53** 1137-1145.
 LAWSON, R.H. (1966) Oakleaf chlorosis symptomatic of cucumber mosaic virus infection in dahlia. *Phytopath.* **56**: 343-344.
 SAMEUL, G., J.G. BALD, and H.A. PITTMAN (1930) Investigations on spotted wilt of tomatoes. *Aust. Counc. Sci. Ind. Res. Bull.* **44**: 1-60.
 SERRANO, F.B. (1935) Pineapple yellow-spot in the Philippines. *Philipp. J. Sci.*, **58**: 481-493.
 SMITH, K.M. (1931) Studies on potato virus disease VIII. On a ringspot virus affecting Solanaceous Plant. *Ann. Appl. Biol.* **18**: 1-15.
 SMITH, K.M. (1932) Further experiments with a ringspot virus, its identification with spotted wilt of tomato. *Ann. Appl. Biol.*, **19**: 305-330.
 SMITH, K.M. (1957) A textbook of plant virus disease. *Lond.* 2nd., pp. 652
 SILL, W.H., W.C., BURGER, M.A. STAHMANN, and J. WALKER (1952) Electron microscopy of cucumber I. *Phytopath.*, **42**: 420-422.
 STEERE, R.L. (1956) Purification and properties

of tobacco ringspot virus. *Phytopath.*, **46**: 60-69.
VAN KAMMEN, A., S. HENSTRA, and T.S. Ie (1966) Morphology of tomato spotted wilt

virus. *Virology*, **30** (3): 574-577.
WHIPPLE, O.C. (1936) Spotted wilt of garden pea. *Phytopath.*, **26**: 918-920.

Summary

Tomato Spotted Wilt Virus Detected from Imported Dahlia in Postentry Quarantine

By

Tetsuo SUETSUGU

Import Section, Yokohama Plant Protection Station

During the postentry quarantine of dahlias imported from the United States, one virus was isolated in 1965 from one plant (var. Envy) showing obscure yellow spots on the leaves. In order to determine the identity of this virus, studies were made on the host range, physical properties and the shape of the virus particles. Results are summarized as follows.

1. As the dahlia plant was concurrently infected with cucumber mosaic virus, sap of dahlia leaves was first inoculated on broad bean that is immune to CMV. The virus of unknown identity was recovered in *Nicotiana glutinosa* from necrotic lesions developed on younger leaves of broad bean.

2. Of 28 species of plants inoculated mechanically, 24 proved to be susceptible to this virus. Among them, *Petunia* sp., *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum*, *Hippeastrum* hybrids, tomato, broad bean and garden pea showed the most characteristic symptoms.

Petunia sp.: Very sensitive indicator for this virus. Local lesions of brown circular spots of 2-7 mm in diameter developed within thirty to forty hours after inoculation. Inoculated leaves were usually killed and defoliated but no systemic symptom was observed.

N. glutinosa: Very susceptible to this virus. Local lesions appeared in two to four days and gradually increased in size and eventually developed into concentric reddish-brown spots of ca. 5-20 mm in diameter. Systemic symptoms were seen after about 7-14 days, leading to the lethal systemic necrosis.

N. tabacum: Local lesions developed within 2-4 days. Symptoms were similar to those on *N. glutinosa* but the plants rarely became systemically infected.

Tomato: Very susceptible to this virus. Local lesions, however, were rarely seen within 4-7 days. Wilting or bronzing of the leaves were very characteristic and the infected plants were usually killed later.

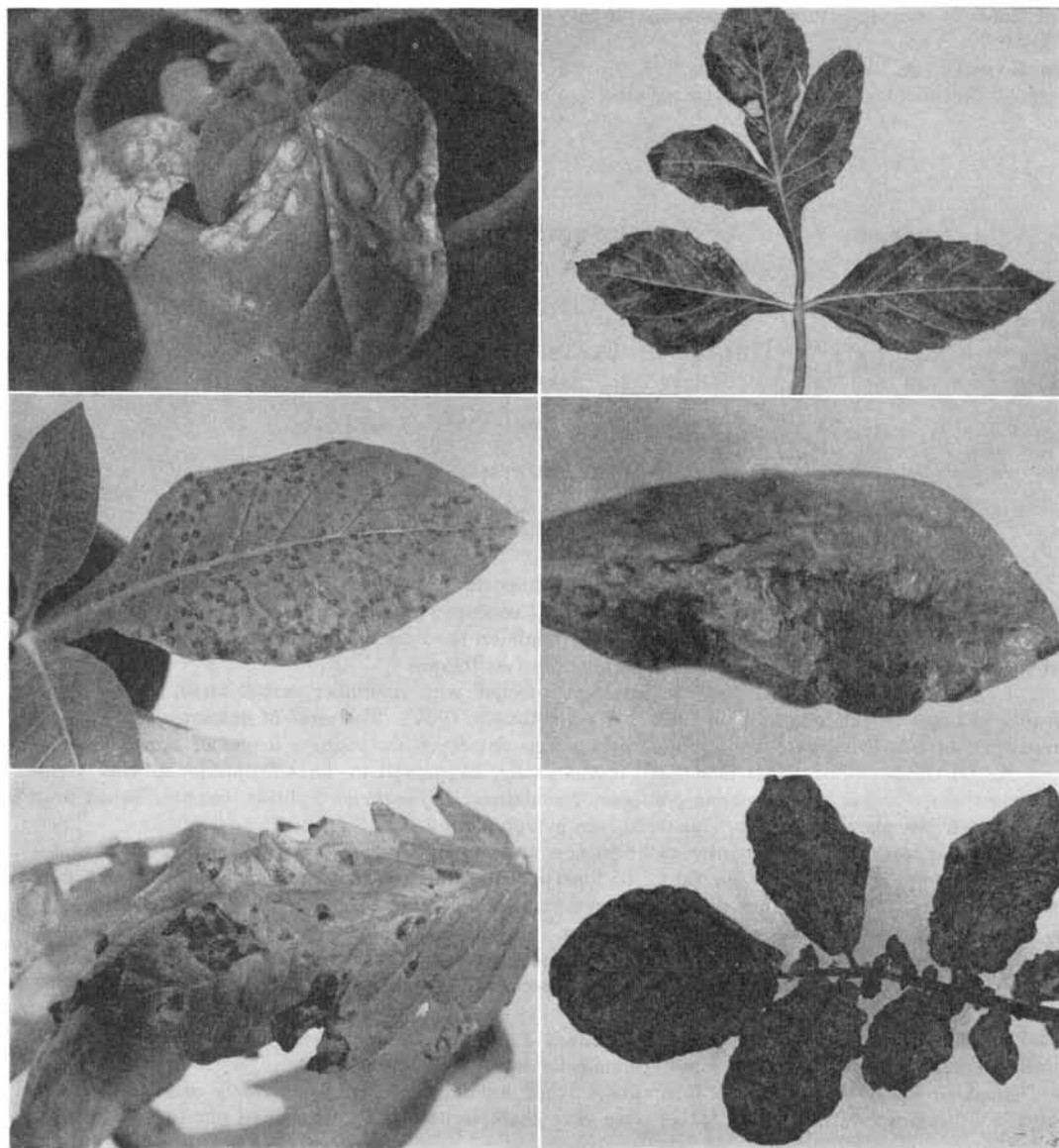
Hippeastrum hybrid: Inoculated leaves showed pale yellow or white spots within 20-30 days. Systemic symptoms of numerous pale yellow or white spots and blood-red necrotic spots appeared after about three to six months. Affected leaves rarely succumbed to the infection.

Broad bean: The most susceptible among the leguminous plants tested. Local lesions of brown circular spots of ca. 2-3 mm in diameter developed within 3-4 days. Systemic necrosis appeared only in younger leaves and stems within 7-14 days. Affected plants gradually succumbed to the infection.

Garden pea: Local lesions of brown spots of ca. 1 mm in diameter developed within 6-7 days, followed by stem necrosis after 7-14 days. Infected plants were usually killed.

3. The virus had the thermal inactivation point of 40-45°C, dilution end-point of 1:10,000-100,000 and the longevity of 2-3 days at room temperature. The virus particles were found to be ellipsoids of 80-120 m μ in length.

4. From the results obtained, the virus was identified to be tomato spotted wilt virus heretofore unrecorded in Japan.



図版説明

Tomato spotted wilt virus を接種した植物の病徴

左上から グルチノーザ・タバコ接種葉の局部病徴

タバコ（ホワイット・パーレー）接種葉の局部病徴

トマトの全身病徴

右上から ダーリア接種葉の局部病徴

ベチュニア接種葉の局部病徴

ジャガイモの全身病徴