

輸入検疫中にチューリップから発見された Tobacco rattle virus について

松 濤 美 文・末 次 哲 雄
横浜植物防疫所国際課

は し が き

1967年、オランダから輸入され、新潟県下で隔離栽培中のチューリップから Tobacco rattle virus を分離同定した。この Tobacco rattle virus (TRV) は、1899年ドイツで BEHERENS により“Tabak Mauche”として最初に記載され、その後、ヨーロッパ、アメリカで発生が報告されている。チューリップでは1941年オランダで、VAN SLOGTEREN および OUBOTER により報告されたのが初めてである。

このウイルスは、寄主範囲が広く、タバコ、ジャガイモ、トマト、マメ類、カブ、チューリップ、ヒヤシンスなど数多くの植物が感染し、SCHMELZER (1957) は153科361種の寄主植物を報告している。また、汁液伝染のほか、*Trichodorus minor*, *T. pachydermis* ほか数多くの *Trichodorus* 属の線虫により伝染し、防除の難しい、重要なウイルスである。

本報告をおこなうに際し有益な御指導を頂いた植物ウイルス研究所小室康雄博士、秦野たばこ試験場都丸敬一博士、電子顕微鏡写真を撮って下さったウイルス研究所栢原比呂志博士、また、アスター系の TRV とスイセン系の TRV の抗血清を分譲して下さいましたウイルス研究所小室康雄博士、同岩木満朗技官ならびに罹病標本を採取された当所国際課、同新潟出張所の各係官に深甚の謝意を表する。

実験材料および方法

材料 隔離検疫中のオランダ産チューリップにモザイクや条斑病徴を生じていたもの58株をタバコ (品種ホワイトパール)、*Nicotiana glutinosa*, ホウレンソウ、*Chenopodium amaranticolor*, およびインゲンにカーボランダム法で汁液接種したところ、TRV らしいウイルスを多数分離することができたが、品種 Golden trophy の1株から分離したウイルスをホウレンソウで保存し、

試料として同定した。

このウイルスのチューリップでの病徴は、幅2~3mmの細長い、黄白色の紡錘形の病斑が葉脈に沿ってきれぎれに続いたものであった。本ウイルスを同定する必要上、植物ウイルス研究所から、アスター系 TRV の分譲を受け、これを *N. glutinosa* に保存して使用し、比較検討した。

接種方法 本ウイルスおよびアスター系 TRV の各植物上への接種は常法による汁液接種によった。緩衝液としては、0.01M, pH7.2 磷酸緩衝液を用い、これを葉重の3倍量加えて磨砕汁とした。戻し接種は、接種後30日以上経たものの頂葉の汁液を同様に処理して *C. amaranticolor* またはタバコ (品種 ホワイトパール) に接種し、接種葉に生じる局部病斑の有無によって全身感染していたかどうか調査した。

接種植物の種類は第1表に示す20種である。

実験結果

1. 各植物への接種 本ウイルスはタバコ、*N. rustica* および *N. glutinosa* では、接種後7~10日で接種葉に3~5mmの褐色のエソ輪紋やエソ斑点または不整形のエソを生じた。アスター系 TRV は、これより早く接種後約5日で、同じような病徴を生じた。その後、*N. glutinosa* では、本ウイルスは頂葉にモザイクを生じ、中葉の葉脈にエソを生じたが、戻し接種ではウイルスの存在が認められなかった。アスター系 TRV は頂葉にエソ病斑を生じ、戻し接種の結果は陽性であった。タバコ、*N. rustica* はいずれのウイルスも全身感染しなかった。

両ウイルスとも、*C. amaranticolor* では接種後4~5日に接種葉に約1mmの白色または黄色の局部病斑を生じ、インゲン、ササゲでは接種後3日に約0.5mmの小型の褐色の局部病斑を生じた。ソラマメでは、本ウイルスは局部病斑のみであったが、アスター系 TRV では局部病斑のほか茎エソを生じた。ただし、上記の各植物

第1表 本ウイルスおよびアスター系 TRV の各種植物への接種結果

| 接 種 植 物 | 本ウイルス | | | アスター系 | | |
|---------|----------------------------------|------------|------|-----------|---|------|
| | 病 | 徴 | 戻し接種 | 病 | 徴 | 戻し接種 |
| ナス科 | タバコ (ホワイトパーレ) | L, L | — | L, L | — | — |
| | <i>Nicotiana rustica</i> | L, L | — | L, L | — | — |
| | <i>N. glutinosa</i> | L, L, M, N | — | L, L, N | + | + |
| | ナス | — | — | — | — | — |
| | <i>Physalis floridana</i> | — | — | M | + | + |
| | トマト (世界一) | — | — | M | + | + |
| | <i>Datura tatula</i> | — | — | — | × | × |
| キク科 | <i>D. stramonium</i> | — | — | N | + | + |
| | サイネリヤ | L, L | + | — | — | — |
| | キンセンカ | — | — | — | — | + |
| アカザ科 | レタス | — | + | — | — | — |
| | <i>Chenopodium amaranticolor</i> | L, L | — | L, L | — | — |
| 十字花科 | ホウレンソウ (バイキング) | L, L, M | + | L, L, M | + | + |
| | ハナヤサイ | — | — | — | — | — |
| | カンラン (サクセッション) | — | — | — | — | — |
| マメ科 | 体菜 | — | — | — | — | — |
| | 小松菜 | — | — | — | — | — |
| | インゲン (大手芒) | L, L | — | L, L | — | — |
| マメ科 | ササゲ (黒種16) | L, L | — | L, L | — | — |
| | ソラマメ (早生) | L, L | — | L, L, stN | — | — |

(注) L, L: Local lesion, M: モザイク, N: えそ病徴, stN: 茎えそ

+: 戻し接種陽性, —: 病徴なしまたは戻し接種陰性, ×: 戻し接種せず

の頂葉を戻し接種した結果はいずれも陰性であった。ホウレンソウでは、各ウイルスとも、白色または淡緑色の局部病斑を生じたのち、頂葉にモザイクを生じ、かつ全身感染をしていた。

本ウイルスは、アスター系 TRV の感染しなかったサイネリア、レタスのうち、サイネリアでは局部病斑を生じ、全身病徴は生じなかったが、戻し接種の結果は陽性であった。またレタスでは無病徴であったが、全身感染していた。

逆に、アスター系 TRV は、本ウイルスに感染しなかった *Physalis floridana*、トマト、*Datura stramonium* にモザイク病徴、またはエソ病徴を現わし、戻し接種の結果も陽性であった。キンセンカでは、無病徴であったが全身感染していることがわかった。

2. 物理的性質 本ウイルスおよびアスター系 TRV に感染しているホウレンソウに0.01M, pH7.2 磷酸緩衝液を葉重の4倍量加えて搾汁しこれを5倍液として、常法により処理したのち、*C. amaranticolor* に汁液接種し、接種葉に生じる局部病斑によって測定した。その結

果耐熱性は、本ウイルス65~70°C、アスター系 TRV 75~80°C、耐希釈性は、本ウイルス1~10万倍、アスター系10~100万倍であり、耐保存性は、ともに6~11日であった。

3. ウィルス粒子の形態 本ウイルス粒子の形を見るために、SEMANKI (1966) および都丸、中田 (1967) の純化方法を参考に部分純化をおこなった。まず、タバコ (サムソン) に接種し、4~5日後に局部病斑を生じた接種葉を-20°Cで一昼夜凍結し、葉重の1.5倍の量の0.1%チオグリコール酸を含む0.2M, pH7.5 磷酸緩衝液を加えて磨碎し、その汁液をクロロホルム、*n*-ブタノール処理および凍結処理したのち、分画遠心を反復して、ウィルスの純化をおこなった。これを電子顕微鏡で観察したところ、190m μ および90m μ に長さの山をもつ、巾20~25m μ の長短2型の短桿状 (第6図) のウィルス粒子を確認した。この結果は、小室・吉野・一戸 (1968) のアスター系 TRV とほぼ一致している。

4. 血清反応 血清反応を調べるために、まず、アスター系 TRV の抗血清を作った。方法は前記の部分純化



第1図 TRV チューリップ (品種 Golden Trophy) の病徴



第2図 タバコ (ホワイトバレー) 接種葉の局部病徴

法に準じて行ない、さらに、一部はこのウイルス液を DEAE セルローズカラムに通して純化精製し、罹病葉重の1/100に濃縮した。これを4~5 ml ずつ、7~8日おきに4回19 ml をウサギの耳静脈に注射し、最終回の注射から7日後に全採血をおこない抗血清をえた。

この抗血清とスイセン系 TRV 抗血清 (岩木・小室、



第3図 *C. amaranticolor* 接種葉の局部病徴

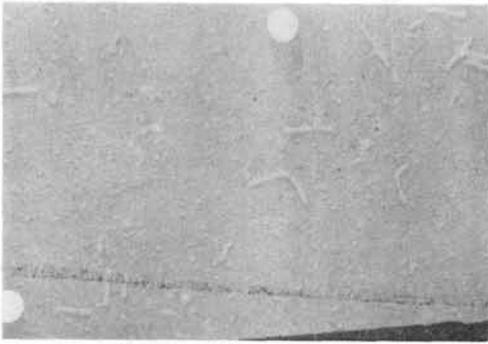


第4図 ササゲ接種葉の局部病徴

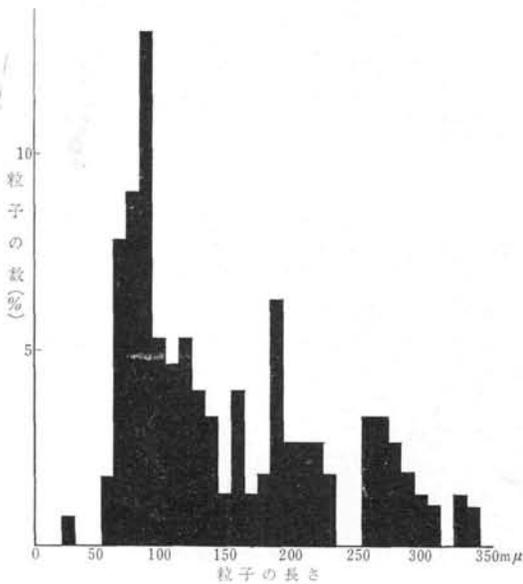


第5図 ソラマメ接種葉の局部病徴

1968) を用いて、*n*-ブタノール処理後2回の分画遠心で葉重の1/10量に濃縮した本ウイルス、アスター系 TRV および標準区として、両ウイルスと同一処理をおこなった健汁液を用いて、ゲル内拡散法、重層法、混合法およびスライド法の4方法により血清反応を調べた。その結果はいずれの血清反応においても、本ウイルスはアスタ



第6図 ウイルス粒子の形態



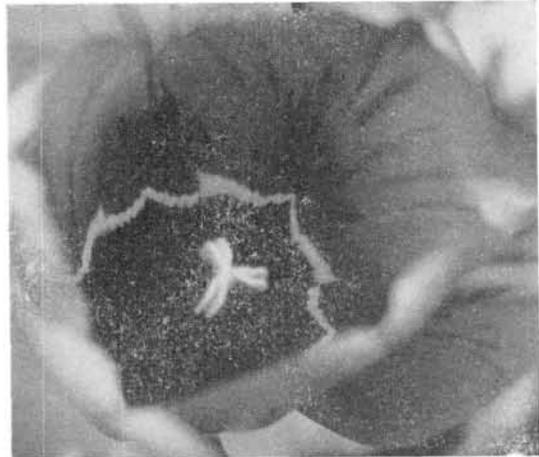
第7図 ウイルス粒子の長さの分布

一系 TRV 抗血清とは反応せず、スイセン系 TRV とはよく陽性反応を生じた。一方、アスター系 TRV は、スイセン系 TRV 抗血清とは、重層法で健全汁液と、わずかながら陽性反応を生じたが、これは、健全汁液の清澄が不十分であったためであろう。

5. 接種検定と TRV 抗血清による診断の差異 前記、実験材料の項で説明したチューリップ発病株58株の汁液を、スイセン系 TRV 抗血清を用いた寒天ゲル内拡散法によって調べ、ウイルスを分離するときに、各検定植物に接種した結果と比較した。発病チューリップ汁液としては、葉重と同量の0.01M, pH7.2の磷酸緩衝液を加えて搾汁したものを用いた。対照として、健全なチューリップの汁液を同様に処理して使用した。接種検定の結果、モザイク病徴(濃淡モザイク)のものうち2株、エソ条斑病徴(モザイクを生ぜず葉脈エソを生じているもの)のものうち9株、黄色条斑病を生じていたもの

のうち11株計22株が検定植物上に TRV と思われる病徴を生じた。しかしながら、抗血清ではモザイク病徴株から3株、エソ条斑病徴株から13株、黄色条斑株から18株、計34株が陽性反応を生じた。

CADMAN および HARRISON (1959)によると、TRV には、増殖型と非増殖型があり、本試験では、検定植物で検出されなかった非増殖型が抗血清により検出されたため、このような差が生じたものと思われる。しかし、実験数が少ないので、今後さらに詳しく調査する必要がある。



第8図 TRV 罹病チューリップ(品種 Apeldorn)の花弁の病徴

本ウイルス分離チューリップ株の花弁上の病徴は見る事ができなかったが、後日、隔離栽培中の品種 Apeldorn の葉に、黄色の紡錘形の病徴を縦に点々と生じ、花弁に第8図のような増色形のブレーキングを現わす TRV 感染株が発見された。これはチューリップブレーキングウイルスのものと比較して、巾が細く、少数でしかもきれぎれになっていた。これがこのウイルスによるブレーキングの特徴ではないかと思われる。

考 察

チューリップのウイルス病で、わが国で、報告されているものは、山口(1958, 1961 a, b)による Tulip breaking virus および高橋、大内、嘉儀(1963)による Cucumber mosaic virus の2種である。このほか外国では、Tobacco necrosis virus (KASSANIS, 1949), Tulip white streak virus (SMITH, 1957) およびオランダでの Tobacco rattle virus (VAN SLOGTEREN and OUBUTER, 1941) の3種がある。

チューリップから分離された本ウイルスは、比較試験

に用いたアスター系 TRV と、寄主範囲にわずかの差はあるが都丸、中田 (1967) の報告とほぼ一致している。

本ウイルス粒子は、 $190\text{m}\mu$ と $90\text{m}\mu$ に山をもつ長短2型の短桿粒子であったが、NIXON および HARRISON (1959)、都丸・中田 (1967)、岩本・小室 (1968) らの報告している TRV の特徴と一致している。抗血清反応では、本ウイルスはスイセン系の TRV 抗血清とは陽性反応を示したが、アスター系 TRV 抗血清とは全く反応を示さなかった。このことについては、VAN HOOF, MAAT および SEINHORST (1966) が系統間には血清学的類縁関係のないものもあること、また、岩本・小室 (1968) もアスター系 TRV とホルムスサムソン系 TRV とは、全く血清学的類縁関係のないことを報告していることから本ウイルスとアスター系 TRV は異なったウイルスではなく、血清学的に類縁関係がないものと考えられる。

以上、本ウイルスは、比較試験に用いたアスター系 TRV とは多少異なる点もあるが、寄主範囲および病徴、ウイルス粒子の形態、抗血清反応などから Tobacco rattle virus と考える。

摘 要

1967年隔離検疫中のオランダ産チューリップ (品種 Golden Trophy) の細長い黄白色の病斑がきれぎれに生じていた株から、Tobacco rattle virus と思われるウイルスを分離した。このウイルスを各植物に接種し、その病徴、物理的性質、ウイルス粒子の形態、血清学的関係などを調査した。

1. ナス科、キク科、アカザ科、十字花科およびマメ科の5科20種の植物に汁液接種した。局部病斑を生じたのは、タバコ (ホワイトパーレ)、*Nicotiana rustica*、サイネリア、*Chenopodium amaranticolor*、インゲン、ササゲ、ソラマメで、局部病斑とモザイクを生じたものは、*N. glutinosa* とハウレンソウで、*N. glutinosa* はさらにエソ病斑も生じた。このうち、全身感染したものはサイネリヤ、ハウレンソウおよび無病徴のレタスであった。

2. 本ウイルスの、耐熱性は $65\sim 70^{\circ}\text{C}$ 、耐希釈性は1万 \sim 10万倍、耐保存性は6 \sim 11日であった。

3. ウイルス粒子は $190\text{m}\mu$ と $90\text{m}\mu$ の2つに山をもつ、巾 $20\sim 25\text{m}\mu$ の短桿状粒子であった。

4. 部分純化したアスター系 TRV を用いて作製した抗血清と本ウイルスは反応を生じなかったが、スイセン系 TRV 抗血清と陽性反応を生じた。

5. 以上の寄主範囲、ウイルス粒子の形態および血清

学的関係などから本ウイルスは Tobacco rattle virus と考える。

引用文献

- CADMAN, C.H. and HARRISON, B.D. (1959) Studies on the properties of soil-borne viruses of the tobacco-rattle type occurring in Scotland. *Ann. appl. Biol.*, **49**: 542 \sim 556.
- 岩木満朗・小室康雄 (1968) スイセンから分離されたウイルス、第3報 Tobacco rattle virus について (講要), *日植病報*, **34**: 346.
- KASSANIS, B. (1949) A necrotic disease of forced tulips caused of tobacco necrotic virus. *Ann. Appl. Biol.*, **36**: 14 \sim 17.
- 小室康雄・吉野正義・一戸稔 (1968) アスター黄色輪紋病株からの Tobacco rattle virus の分離とその病畑土壌からの *Trichodorus minor* の検出 (講要), *日植病報*, **34**: 201 \sim 202.
- NIXON, H.L. and B.D. HARRISON (1959) Electron microscopic evidence on the structure of the practicles of tobacco rattle virus. *J. gen. Microbiol.*, **21**: 582 \sim 590.
- SCHMELZER, K. (1957) Untersuchungen über den Wirtspflanzenkreis des Tabak Mauche Virus. *Phytopath. Z.*, **30**: 281 \sim 314.
- SEMANCIK, J.S. (1966) Purification and properties of two isolate of tobacco rattle virus from pepper in California. *Phytopath.*, **56**, 1190 \sim 1193.
- SMITH, K.M. (1957) A textbook of plant virus disease. (2nd ed.), London.
- 高橋実・大内昭・嘉儀隆 (1963) チューリップ等のモザイク病のウイルスに関する研究。植物ウイルスの分類学的研究、文部省科学研究費、昭和37年度成績報告会資料、92 \sim 100.
- 都丸敬一・中田和男 (1967) わが国におけるタバコの新ウイルス病タバコ茎えそ (Tobacco rattle disease). 秦野たばこ試報, **58**: 89 \sim 100.
- VAN HOOF, H.A., D.Z. MAAT and J.W. SEINHORST (1966) Virus of the tobacco rattle virus group in Northern Italy: Their vectors and serological relationships. *Neth. J. Pl. Path.*, **72**: 253 \sim 258.
- VAN SLOGTEREN, E. and M.P. DE BRUYN OUBOTER (1941) Onderzoekingen over virusziekten

- in Bloembolgewassen. II. Tulpen, 1. Meded. Landbouwhogeschool, 4: 54.
- 山口昭 (1958) チューリップモザイク病に関する研究 I. 日植病報, 23: 240~244.
- 山口昭 (1961^a) チューリップモザイク病に関する研究 II. 日植病報, 26: 131~136.
- 山口昭 (1961^b) チューリップモザイク病に関する研究 III. 日植病報, 26: 137~140.

Summary

Tobacco Rattle Virus Detected from Imported Dutch Tulip

Mifumi MATSUNAMI and Tetsuo SUETSUGU
Import Section, Yokohama Plant Protection Station

During the quarantine of tulips from the Netherlands in 1967, one virus similar to tobacco rattle virus was isolated from one plant (var. Golden Trophy) showing pale yellow streak patterns on the leaves. Identity of this virus was studied by its host range, physical properties, particle shape and serological reaction.

Twenty species of herbaceous hosts were mechanically inoculated. Tobacco (White Burley), *Nicotiana glutinosa*, *Senecio cruenta*, *Phaseolus vulgaris*, *Vigna sinensis* and *Vicia faba* developed local lesions on inoculated leaves. *N. glutinosa* and *Spinacea oleracea* produced local lesions as well as systemic mosaic symptoms. Systemic infection occurred in *Senecio cruenta* and *Spinacia oleracea*. Lettuce was systemically infected but showed no symptoms. The virus had the thermal inactivation point of 90-95°C, dilution end-point of 1:10,000-100,000 and longevity of 6-11 days at room temperature. Electronmicroscopy showed the distribution of two modal length of the virus particles. The shorter particles had a mode of 90 m μ and the longer ones had a mode of 190 m μ . The width was 20-25 m μ in average. Serologically, this virus did not react with TRV-aster strain but reacted positively with TRV-narcissus strain in agar diffusion, ring test, precipitation reaction and slide test. From the results obtained, the virus was identified to be tobacco rattle virus.