

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

松濤美文・末次哲雄・諸橋公穂*

横浜植物防疫所国際課

は し が き

1967年、新潟県下で隔離栽培中のオランダ産チューリップ（品種 Lilac Perfection）にエソ病徴を生じた株があった。これは今までにわが国で報告されているものと異なった病徴であったので、調査した結果 Tobacco necrosis virus を分離した。これはオランダで1928年頃原因不明のチューリップのエソ病が多発し、なかでも被害の大きかった品種 Augsta の品種名をとり“Augusta disease”と呼ばれ、非常に恐れられていたものである。

このウイルスは、最初に、英国でSMITHおよびBALD (1935)によってタバコから分離され、その後、アメリカやヨーロッパ諸国にも発生が報告されている。寄生範囲は広く、ナス科、マメ科など37科88種に感染する (KASSANIS, 1964)。伝染は、汁液伝染のほか、藻菌類の1種、*Olpidium brassicae* により、土壌伝染することが TEAKLE (1960) により報告されている。

このように、古くから、広く世界中に分布し、寄生範囲も広く、しかも防除の難しい土壌伝染をする重要なウイルスとされている。

なお、本報告をおこなうに際し、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、本ウイルスの電子顕微鏡写真を撮影して頂いた同所栃原比呂志博士および農林大臣の許可を得て輸入された Tobacco necrosis virus 3系統を分譲下さった秦野たばこ試験場都丸敬一博士に深く感謝の意を表する。

実験材料および方法

1. 材料 隔離検疫中のオランダ産チューリップの中から、従来の Tulip breaking virus とは異なる病徴を現わしている37株をタバコ（品種ホワイトバーレ）、インゲンなどにカーボランダム法により汁液接種をおこなった。このうち、葉脈に細いエソ条斑がきれぎれに生じて

いた1株（品種 Lilac Perfection）から、本ウイルスを分離した。なお、この株の子球を植えたところ、翌春発芽後、葉身に多数の巾0.5mm くらいの細い黄色、または褐色の長さ1～2 mm の条斑をきれぎれに生じた。この条斑は、葉面よりやや陥落しており、日時の経過とともにエソ病徴に変化した。葉縁などの病斑出現の多い部分は萎れ変形した。着蕾はしたが、生育するにつれて、病斑が融合して、乾いたような状態の茶色になり、1ヵ月半後には開花することなく枯死した。

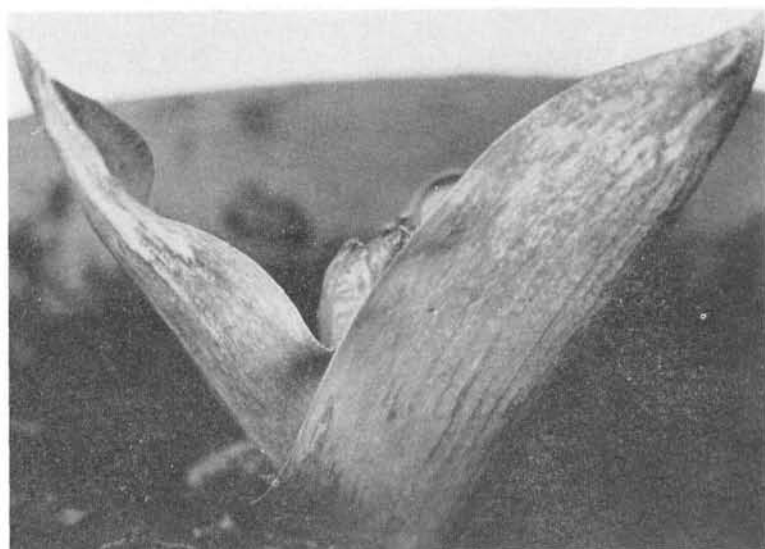
また、本ウイルスを同定するため、秦野たばこ試験場より、アメリカ合衆国産 Tobacco necrosis virus の Cleome bean 系、Flea bean 系および Soy bean 系の3系統の分譲を受け比較した。

2. 接種方法 接種原には、本ウイルスをタバコ（ホワイトバーレ）に接種し、局部病斑を生じた接種葉を使用し、カーボランダム法による汁液接種をおこなった。接種原の磨砕には、0.05M、pH7.6の磷酸緩衝液を用い、これを病葉重の4～5倍重量加えた。一部の植物は全身感染の有無を知るため戻し接種をおこなった。その方法は、接種後30日以上経たものの頂葉部と地下部の汁液をインゲンとフダンソウに接種して、接種葉に生じる局部病斑により判定した。

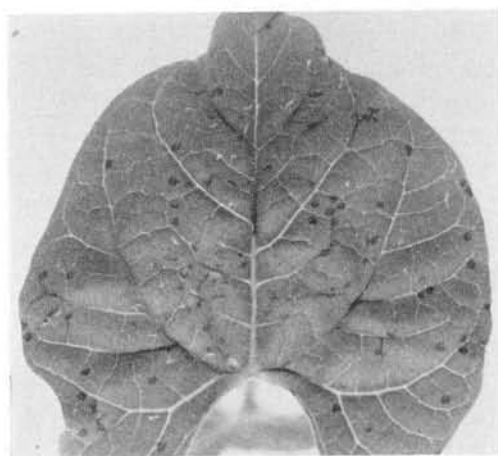
実験結果

1. 各植物への接種結果 本ウイルスをナス科11種、ユリ科2種、十字花科4種、マメ科5種の7科26種の植物に汁液接種した結果は第1表のとおりである。十字花科とテッポウユリを除いていずれも接種葉に局部病斑を作ったが、マメ科の一部とチューリップが枯死した以外は全身病徴を現わさず、また戻し接種を試みた植物はすべて、全身感染をしていなかった。このことについて、SMITH および BALD (1935) はタバコ、*N. glutinosa* からカウビーなどでは接種葉に局部病斑を生じるが、全身感染しないことを報告し、KASSANIS (1949)も接種葉に局部病斑を生じて全身感染しないことを報告している。また BAWDEN および KASSANIS (1947) は *Pri-*

* 現在 横浜植物防疫所塩釜出張所



第1図 TNV罹病チューリップ（品種 Lilac Perfection）



第2図 インゲン接種葉の病徴

mula obconica では無病徴で全身感染することを報告しているが、著者の1人である KASSANIS (1949) は例外として扱っている。

インゲンは、最も感受性の高い植物であり接種後20～24時間で接種葉に径1～2 mmの褐色の斑点を生じ、約48時間後葉脈にエソを生じた。それは次第にひろがり4～5日後には、葉柄から茎にエソを生じ、5～7日で接種葉は枯死し、間もなく、茎エソのため株全体が枯死した。ササゲ、カウピーは局部病斑の数が、インゲンに比較すると非常に少ないが、1個の病斑でたちまち葉柄から葉柄にエソを生じ、接種葉はしおれ、次第に茎エソを現わし枯死した。接種後5～10日で株全体が枯死したため、戻し接種は、試験をすることができなかった。

キウリ、ユウガオは接種後2～3日で多くの1～2

mmの白色の局部病斑を生じ、接種葉は次第にしおれはじめ7～8日後には同葉は枯死した。

センニチコウは、接種後3～4日で、接種葉に1～2 mmの白色の局部病斑を生じ、次第に大きくなり、枯死した。

アカザ科の3種はいずれも感受性が高かった。フダンソウは、本ウイルスについては、インゲンと同じようにすぐれた検定植物であり、接種後20～24時間で、接種葉に径1～2 mmの褐色の局部病斑を生じ、それは次第に大きくなり、本葉は5～7日後に枯死した。*Chenopodium amaranticolor* は接種後2日くらいで、接種葉に水浸状の局部病斑を生じ、5～7日後に同葉は枯死した。

ホウレンソウは、接種3～4日後に接種葉に水浸状の局部病斑を生じ、本葉は間もなく枯死した。タバコおよび同属は、感受性の高い植物であるが、なかでも *N. rustica* はとくに本ウイルスのすぐれた検定植物と考えられる。本植物では接種後2～3日で0.5～1 mmの茶色な局部病斑を生じ、病斑の多いときは5～7日で接種葉は枯死した。病斑は日数の経過とともに次第に大きくなり、数個の病斑でも2～3週間後には接種葉は枯死した。*N. glutinosa* は、接種後4～7日間で0.2～1 mmの局部病斑を生じたが、その病斑は *N. rustica* のように進行性のものではなかった。*Physalis floridana*, *Datura stramonium*, *D. tatula*, トウガラシおよびトマトは接種3～4日後に茶色の局部病斑を生じたが、いずれも病斑数は少数であった。コマツナ、キャベツ、山東菜、体菜は感染しなかった。

チューリップ（レコード）は接種2～3日後に、接種

第1表 接種植物の病徴

接 種 植 物	病 徴	戻し接種	
		上葉部	地下部
〔ナス科〕			
タバコ (ホワイトパーレ)	L.L	—	—
〃 (サムソン)	L.L	—	—
〃 (232)	L.L	—	—
<i>Nicotiana glutinosa</i>	L.L	—	—
<i>N. rustica</i>	L.L	—	—
<i>Physalis floridana</i>	L.L	—	—
<i>Datura tabula</i>	L.L	—	—
<i>D. stramonium</i>	L.L	—	—
トウガラシ (ハツ房)	L.L	—	—
トマト (世界一)	L.L	—	—
<i>N. sylvestris</i>	L.L	—	—
〔ユリ科〕			
チュエリッパ (レコード)	L.L (枯死)		
テッポウユリ	—		
〔十字花科〕			
コマツナ	—		
キャベツ (サクセッション)	—		
山東 菜	—		
体 菜	—		
〔ウリ科〕			
キウリ (落合)	L.L		
ユウガオ	L.L		
〔ヒユ科〕			
センニチコウ	L.L		
〔アガザ 〕			
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	L.L		
フダンソウ	L.L		
ホーレンソウ (バイキング)	L.L		
〔マメ科〕			
インゲン (大手芒)	L.L (茎エソ, 枯死)		
ササゲ (黒種16)	L.L (茎エソ, 枯死)		
ソラマメ	L.L		
エンドウ	L.L		
カウビー	L.L (茎エソ, 枯死)		

(注) L.L: Local lesion, —: 病徴なし

第3図 *N. rustica* 接種葉の局部病徴

葉に茶褐色の紡錘状の局部病斑を生じ、それは次第に大きくなり、5～7日後には、全株とも枯死したため戻し

接種試験をおこなうことはできなかった。テッポウユリには病徴は生じなかった。

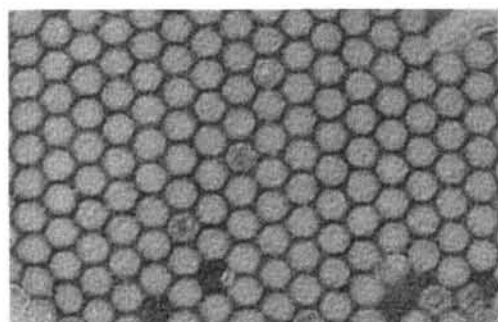
別に、アメリカ産の3系統の TNV をタバコ (ホワイトパーレ), *N. glutinosa*, 山東菜, *C. amaranticolor*, インゲン, ユウガオに接種して比較した。その結果、いずれも、山東菜には病徴を生ぜず、ほかの植物については、本ウイルスと同じ病徴を生じ、インゲンは枯死した。

2. 物理的性質 局部病斑を生じた *N. rustica* の接種葉を4日間-25°Cで凍結し、0.05% KCN を含む0.05 M, pH7.6 の磷酸緩衝液を同量加えて摩砕し、これを二重にしたガーゼで搾汁した後4,000 rpm 10分の遠心分離を行ない、その上清を2倍汁液とし、各々処理したのち、フダンソウにカーボランダム法で接種し、局部病斑の有無により物理的性質を調査した。その結果、耐熱性は、90～95°C, 10分、耐希釈性は1,000～10,000倍であり、耐保存性は、室温下で29～32日であった。

3. 血清反応 血清反応を調べるため、本ウイルスの抗血清を作った。その方法は、CAMPBELL および FRY (1966) と UYEMOTO, GROGAN および WAKEMAN (1968) の純化法を参考にして部分純化をおこなった。まず抗原として、*N. rustica* およびインゲンに本ウイルスを接種し、接種3～4日後に病斑のよく生じている接種葉をとり、これに0.1%のチオグリコール酸を含む0.05M, pH7.6 磷酸緩衝液を当量加えて搾汁し、*n*-ブタノール処理をしたあと分画遠心法と蔗糖液密度勾配法により純化した。これをウサギに1～5 ml ずつ耳静脈注射とアジュバンド法による筋肉注射をおこなって抗血清を得た。この抗血清を2倍に希釈して、寒天ゲル内拡散法で反応を調べた。この時の各ウイルス液は、インゲンに接種し、その接種葉の病葉重と同重量の0.05 M, pH7.6 磷酸緩衝液を加えて搾汁し、低速遠心機にかけて得た上清を用いた。その結果、本抗血清は、抗原として用いた本ウイルスのほか、秦野たばこ試験場から分譲を受けたアメリカ産 Tobacco necrosis virus の3系統のうち、Soy bean および Cleome bean の両系統とは陽性反応を生じたが、Flea bean 系統とは反応しなかった。また、本抗血清は標準区として用いた健全なインゲン葉汁液ともわずかながら反応したが、これは抗血清作製のため抗原として用いたものの純化が十分でなかったためにインゲンの健全蛋白と反応したものと考えられ、反応帯の形およびその場所と容易に区別できる。

4. ウィルスの粒子 ウィルス粒子の形をみるために、接種3～4日後の *N. rustica* の接種葉局部病斑から前述の方法で部分純化をおこなって電子顕微鏡でウィルス粒子を観察したところ第4図のように25～30μm の

球状の粒子を確認した。



第4図 ウイルス粒子の形態

考 察

現在、わが国で報告されているチューリップのウイルス病としては、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 がある。外国ではこのほか、SLOGTEREN および OUBOTER (1941) による Tobacco rattle virus および KASSANIS (1949) による Tobacco necrosis virus が報告されている。また、このほか、SMITH (1957) による Tulip white streak virus の記載がある。

チューリップから分離した本ウイルスは、物理的性質が、SMITH および BALD (1935) の報告している TNV の結果に比較すると、耐希釈性は同じであるが、耐保存性の29~32日、耐熱性の90~95°Cの結果が、彼らが報告している20日、72°Cよりいずれも高い。しかし、FULTON (1950) は TNV の5系統を用いて試験を行なった結果では耐熱性は系統によって異なり86~96°Cであること報告している。また耐保存性については、BAWDEN (1941) は TNV 罹病汁液を室温下においておくと2~3ヵ月間は感染性のあることを報告している。これに比較すると本ウイルスの耐保存性は短い。しかし、物理的性質をみると、一般のウイルスより強いことがわかる。本ウイルスで作った抗血清は TNV 3系統のうち、Flea bean 系とは反応を生じなかったが、ほかの2系統とは反応を生じた。この点については、KASSANIS (1949) や BABOS および KASSANIS (1963) も TNV の系統間で、血清学的には類縁関係がないことがあることを報告している。本ウイルス粒子は球状で20~30m μ であり、SMITH および BALD (1935) が限外濾過法 (Elford method of ultrafiltration) での測定値20~30m μ や KASSANIS (1964) の測定 (negative stain 法) 値26~30m μ とほぼ一致している。

TNV を伝搬させる *Olpidium brassicae* 菌による伝

染試験はおこなっていないが、寄主範囲およびその病徴、物理的性質、血清反応、ウイルス粒子の形態からみて、チューリップから分離した本ウイルスは、Tobacco necrosis virus と考える。

本ウイルスは、わが国ではタバコ矮化病の根に寄生していることが土居・多川・都丸・与良 (1969) によって報告されているが、現在非常に局所的な発生である。そのため、これ以上の侵入を防ぐよう努力する必要がある。

摘 要

1967年隔離検疫中のオランダ産チューリップ (品種 Lilac Perfection) の葉の葉脈にエソ条斑を生じている株からウイルスを分離した。

このウイルスを7科28種に接種したところ、感染しなかったのはテッポウユリと十字花科4種で、ほかはいずれも接種葉に局部病斑を生じた。なかでもチューリップ、インゲン、ササゲ、カウピーでは激しい局部病斑を生じ、葉柄、茎にエソを生じて枯死した。インゲンは、とくに感受性の高い植物で接種後早ければ24時間で、接種葉に褐色の斑点の局部病斑を生じ、次いで葉脈から葉柄、茎にエソが現われ株全体が枯死した。本ウイルスと TNV の Cleome bean, Soy bean, Flea bean の各系統をタバコ (ホワイタバコ), *Nicotiana glutinosa*, 山東菜, *Chenopodium amaranticolor*, インゲン, ユウガオに接種したが、いずれも接種葉に局部病斑を生じ、インゲンは枯死した。

本ウイルスの耐熱性は90~95°C、耐希釈性は1,000~10,000倍、耐保存性は室温下で29~30日であり、粒子は大きさ20~30m μ の球状であった。部分純化して作製した抗血清は寒天ゲル内拡散法でアメリカ産 TNV の Cleome bean 系および Soy bean 系とは陽性反応を生じたが、Flea bean 系とは反応を生じなかった。

以上の寄主範囲、その病徴、物理的性質、ウイルス粒子の形ならびに抗血清による反応から、本ウイルスは Tobacco necrosis virus であると考えられる。

引用文献

- BABOS, P. and B. KASSANIS (1963) Serological relationships and some properties of tobacco necrosis virus strains. J. gen. Microbiol., **32**: 135~144.
- BAWDEN, F.C. (1941) The serological reactions of viruses causing tobacco necrosis. Brit. J.

- Exp. Path., **22**: 59~70.
- BAWDEN, F.C. and KASSANIS, B. (1947) *Primula obconica*, a carrier of tobacco necrosis viruses. Ann. appl. Biol., **34**: 127.
- 土居養二・多川閃・都丸敬一・与良清 (1969) 矮化病罹病タバコ根に見出された tobacco necrosis virus (TNV) の1系について (講要), 日植病報 **35**: 358.
- CAMPBELL, R.N. and P.R. FRY (1966) The natures of associations between *Olpidium brassicae* and lettuce big-vein and tobacco necrosis virus. Virology, **29**: 222~233.
- FULTON, R.W. (1950) Variants of the tobacco necrosis virus in Wisconsin. Phytopath., **40**: 298~305.
- KASSANIS, B. (1949) A necrotic disease of forced tulips caused by tobacco necrosis virus. Ann. Appl. Biol., **36**: 14~17.
- KASSANIS, B. (1964) Properties of tobacco necrosis virus and its association with satellite virus. Ann. Inst. Phytopath. Benaki (n.s.), **6**: 7~26.
- 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, 92~100.
- SMITH, K.M. and J.G. BALD (1935) A description of necrotic virus affecting tobacco and other plants. Parasitology, **27**: 231~245.
- SMITH, K.M. (1957) A textbook of plant virus disease (2nd ed.), 591~593 London.
- TEAKLE, D.S. (1960) Association of *Olpidium brassicae* and tobacco necrosis virus. Nature, **188**: 431~432.
- UYEMOTO, J.K., R.G. GROGAN and J.R. WAKEMAN (1968) Selective activation of satellite virus strains by strains of tobacco necrosis virus. Virology, **34**: 410~418.
- VAN SLOGTEREN, E. and M.P. DE BRUYN OUBOTER (1941) Onderzoekingen ouer virusziekten in Bloembolgewassen. II. Tulpen. I. Meded. Landbouwhoges. Wageningen, **45**, Verh. **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 Necrosis Virus Detected from Imported Dutch Tulip

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

During the quarantine of imported Dutch tulip bulbs in 1967, one virus was recovered from one plant (var. Lilac Perfection) showing necrotic streaks on the leaves. By mechanical inoculation, this virus infected 23 out of 28 species of hosts including tobacco, *Phaseolus vulgaris* etc. Symptoms consisted mainly of necrotic lesions, often in considerable numbers, on the inoculated leaves. *Tulipa* spp., *Phaseolus vulgaris* and *Vigna sinensis* produced severe necrotic lesions on the leaves and leaf stalks and usually demolished in progressive decline. Lily and four species of *Brassica* plant were immune to this virus. *Phaseolus vulgaris* is a sensitive indicator for this virus. Under optimum conditions, brown necrotic lesions appear in

24 hours. They spread along the veins and the plants are killed by subsequent severe stem necrosis.

This virus and all the three strains of tobacco necrosis virus, i.e. TNV-Cleome bean, TNV-Soy bean, TNV-Flea bean, developed similar local necrotic lesions in inoculated leaves of tobacco (White Burley), *Nicotiana glutinosa*, *Brassica pekinensis* var. *dentata*, *Chenopodium amaranticolor*, *Phaseolus vulgaris* and *Lagenaria leucantha*. Thermal inactivation point of this virus is 90-95°C, dilution end-point 1:1,000-10,000 and longevity 29-32 days at room temperature. The virus particle was found to be spherical and 20-30 m μ in diameter. An antiserum was prepared by a partially purified antigen frpm infected *Nicotiana rustica* and *Phaseolus vulgaris*. This antiserum reacted positively with TNV-Cleome bean and TNV-Soy bean in agar gel diffusion test. No reaction was obtained with TNV-Flea bean.

From the results obtained, the virus was identified to be tobacco necrosis virus.