

国内産チューリップより分離された Tobacco Necrosis Virus*

松濤 美文**・西尾 健・木村 茂

横浜植物防疫所業務部国際第二課

藤 井 伸 泰

名古屋植物防疫所伏木支所

まえがき

1974年および1975年春、富山県下の輸出用チューリップの栽培地検査に際し、えそ症状を生じる新病害の発生をみた。最初に本病害が発見されたのは、富山県高岡市で、品種は Levant, 面積 1.9a, 発病率 60~70% と激しいものであった。その後の調査では、現在のところ発生面積はわずかであるが、3市町、4品種にその発生が認められている。

罹病チューリップからは、タバコ、インゲン、*Chenopodium amaranticolor* などに局部病斑を生じるウイルスが分離され、調査の結果、このウイルスは Tobacco necrosis virus (TNV) であることが判明した。

TNV は、外国において、数多くの植物から分離されているが (KASSANIS, 1970a), 我国では、神奈川県下で地際の茎にえそ条斑を示すタバコから、長野、岡山県下でタバコ矮化病罹病株の根部から (宇田川・都丸, 1971a, b) 又、宮城、神奈川、静岡、栃木県下でイチゴの根部から (小室ら, 1973; 要, 1974) 分離されている。

TNV によるチューリップの病害は、Augusta disease (Tulip necrosis) と呼ばれ、恐れられており、イギリスでは最も被害の多い病害であるといわれている (MOWAT, 1972)。昭和42年に松濤ら (1971) は、新潟県下で隔離栽培中のオランダ産チューリップの1株から TNV (以下、TNV-DT と呼ぶ) を分離しているが、以後分離されたとの報告はなく、国内産のチューリップから TNV が分離されたのは今回が最初である。

なお、本報告を行なうに際し、TNV-SN 系統 (タバコより分離、宇田川・都丸, 1971a) 抗血清を分譲下さった専売公社中央研究所都丸敬一博士、ならびに試料の採集等に御協力頂いた名古屋植物防疫所伏木支所の各係

官に深甚の謝意を表する。

材料および方法

1. 材 料

永見市柳田で採集されたチューリップ (品種、Joan Crickshank) から、汁液接種にてタバコに分離し累代接種しその接種葉を各種植物への接種源とした。

抗血清作成のための純化材料は、主として接種3~4日後のよく局部病斑を作ったインゲン葉をもちい、収穫後は、 -80°C で純化時まで保存した。

2. 接種方法

よく局部病斑を生じたタバコ葉 (White Burley) に、0.1% チオグリコール酸を含む 0.05% KCN 溶液を 4~5 倍重量加えよく磨砕し、あらかじめカーボランダムをふりかけた各種植物に汁液接種した。各種植物からの戻し接種等ウイルスの存在の有無を確認する際には、*Chenopodium amaranticolor* あるいは *C. quinoa* を用いた。

3. 抗血清作成

純化ウイルスを 0.01M リン酸緩衝液、pH7.0 に溶解し 1 回につき約 2ml を、1 週間から 10 日間おきに、静脈注射 5 回、アジュバントを用いた筋肉注射 1 回を行ない抗血清を得た。この抗血清は重層法による反応で、純化ウイルスに対し抗血清希釈 2,048 倍まで反応した。

実験結果

1. チューリップの病徴および各部からのウイルスの分離

チューリップの病徴は、初め灰白色の凹状の小さな斑点が、葉脈に沿ってとびとびに出る。この斑点は後大きくなり紡錘形の黒褐色えそ斑点となり、このえそが葉脈に沿ってのびえそ条斑となったり、互いに融合したりする (第 2-3 図)。茎にもえそが見られる。激しいもので

* 本報告の概要は昭和51年度日本植物病理学会夏期関東部会において発表した。

** 現在、横浜植物防疫所業務部調査課



第1-5図 1, 2, 3. 罹病チューリップ 4. 子球に出たえそ症状 5. タバコ (White Burley) の局部病斑

は、えそのため葉がひきつれ変形してしまう(第1図)。

採集したチューリップを、病斑を含む葉、球根、根の3部分に分け、各部からのウイルスの分離を試みた。結果は第1表のとおりであり、病斑を含む葉、および根からはすべてウイルスが検出され、球根からは検出されない時もあった。

第1表 罹病チューリップ各部からのウイルスの検出

葉の病徴	茎の病徴	供試個体	検定部位	検出個体
激	エソ	3	葉	3
			球根	2
			根	3
中	エソ	4	葉	4
			球根	4
			根	4
軽	—	3	葉	3
			球根	2
			根	3

注) 検出には *C. quinoa* および *C. amaranticolor* を使用

2. 各種植物への接種試験

9科32種植物に汁液接種した。その結果は、第2表のとおりである。ナス科、アカザ科、マメ科など8科23種植物に感染したが、ササゲで1個体えそが葉脈に沿って上葉までのびて、上葉からウイルスが回収されたことがあり、又 *Nicotiana clevelandii* でもまれに上葉からウイルスが回収されたが、普通はこれら2種植物を含むすべての植物で全身感染することはなく、局部病斑を作るだけであった。

Chenopodium amaranticolor, *C. quinoa*, フダンソウ、タバコ、ツルナ、インゲンおよびダイズ(第5-8図)などは感度の高い植物で、接種後2~4日で多数の茶褐色の局部病斑を作る、これらの局部病斑は徐々に拡大する。ササゲ、インゲン、ダイズでは局部病斑を作った後、えそが葉脈に沿って伸びる。ササゲでは茎にえその入るものもあった。*Nicotiana glutinosa*, *Datura stramonium*, *D. tatula* では、接種後4~7日に、小さな局部病斑を作るがこの病斑は拡大することはなかった。

表中には入れなかったが予備試験として行なったチューリップへの戻し接種は、Beauty of Apeldoorn(9個体)およびApeldoorn(8個体)の2品種を用い、純化ウイルスを接種したが、各々1個体が局部病斑を作っただけで、全身的な症状を示したものはなかった。このチューリップへの戻し接種は、現在試験中である。

3. ウイルスの純化

罹病凍結インゲン葉に、0.2Mリン酸緩衝液 pH7.2 を加え磨砕し、ガーゼでろ過、ろ液を8.5%容のn-ブタノール処理し清澄化後、ポリエチレングリコール(PEG, M, W, 6000)でウイルスを沈澱させ、0.01Mリン酸緩衝液に溶解し、続いて分画遠心2回を行ないウイルスを純化した。場合によっては、さらに10~40%のショ糖密度勾配遠心を行なった。ポリエチレングリコール沈澱に際し、PEGおよびNaCl濃度は、あらかじめ予備試験を行ない決定した。PEG 6% (w/v), NaCl 0.4Mで大部分のウイルスは沈澱するが、ここではPEG 8%, NaCl 0.4M(60分~一晚処理)をもちいた。

4. 子球への伝搬

1975年春に採集した罹病株4株から計12個の子球を得て、同年秋に植え付け、翌1976年春に発病の有無を観察した。結果は12個体のうち4個体に典型的なえそ症状があらわれ(第4図)、親球から子球に本病が伝搬することがわかった。

5. 物理的性質

よく病斑の出たタバコ葉を、4~5倍重量の0.1Mリン酸緩衝液 pH7.0 を加え磨砕し、ガーゼでこした後、8,000 rpm, 5分間遠心し清澄化した液を用い物理的性質を検討した。このウイルスは、不活化温度 85~90°C, 10分間、耐希釈性 10^{-8} ~ 10^{-9} , 耐保存性は室温で43日以上であり、丈夫なウイルスであった。

6. 粒子の形状

純化ウイルスを、2%リンタングステン酸でネガティブ染色し、電子顕微鏡で観察したところ、径約28nmの球状粒子が多数観察された、同時に少数ではあったが一回り小型の径約16nmの球状粒子も観察された(第9図)。

7. 血清反応

純化ウイルスを、作成した本ウイルス抗血清、TNV-DT抗血清、および専売公社中央研究所の都丸博士より分譲を受けたTNV-SN抗血清と、寒天ゲル内拡散法(1%寒天)にて反応させたところ、単一の反応帯を作り反応した(第10図)。

考 察

各種植物への接種試験の結果、全身感染する植物が少数の例外を除いてないこと、物理的性質の調査ではかなり丈夫なウイルスであること、粒子は径約28nmの球状粒子でかつSatellite virusと思われる一回り小型の球状粒子を伴うこと(KASSANIS, 1970a, b), TNV-DT

第2表 各種植物の病徴

植 物 名	病 徴		上葉からの 戻し接種
	接種葉	上 葉	
<i>Nicotiana tabacum</i> var. White Burley	LL	-	-
<i>N. rustica</i>	LL	-	-
<i>N. glutinosa</i>	LL	-	-
<i>N. clevelandii</i>	LL	(St)	(+)
<i>Physalis floridana</i>	-	-	-
<i>Datura tatula</i>	LL	-	-
<i>D. stramonium</i>	LL	-	-
<i>Ptunia hybrida</i>	LL	-	-
トマト (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	LL	-	-
トウガラシ (<i>Capsicum annuum</i>)	-	-	-
<i>Chenopodium quinoa</i>	LL	-	-
<i>C. amaranticolor</i>	LL	-	-
フダンソウ (<i>Beta vulgaris</i>)	LL	-	-
ホーレンソウ (<i>Spinacia oleracea</i>)	LL	-	-
ササゲ (<i>Vigna sinensis</i>)	LL, VN	(VN)	(+)
インゲン (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	LL, VN	-	-
エンドウ (<i>Pisum sativum</i>)	-	-	-
ソラマメ (<i>Vicia faba</i>)	LL	-	-
ダイズ (<i>Glycine max</i>)	LL, VN	-	-
カブ (<i>Brassica campestris</i>)	-	-	-
サントウサイ (<i>Brassica</i> spp.)	-	-	-
ハツカダイコン (<i>Brassica</i> spp.)	-	-	-
コマツナ (<i>Brassica</i> spp.)	-	-	-
シュンギク (<i>Chrysanthemum coronarium</i>)	-	-	-
レタス (<i>Lactuca sativa</i>)	-	-	-
ヒヤクニチソウ (<i>Zinnia elegans</i>)	LL	-	-
ハゲイトウ (<i>Amaranthus tricolor</i>)	LL	-	-
センニチコウ (<i>Gomphrena globosa</i>)	LL	-	-
ナデシコ (<i>Dianthus barbatus</i>)	LL	-	-
セキチク (<i>D. chinensis</i>)	LL	-	-
ツルナ (<i>Tetragonia expansa</i>)	LL	-	-
キュウリ (<i>Cucumis sativum</i>)	LL	-	-

LL: Local Lesion, VN: Vein Necrosis, St: Stunt

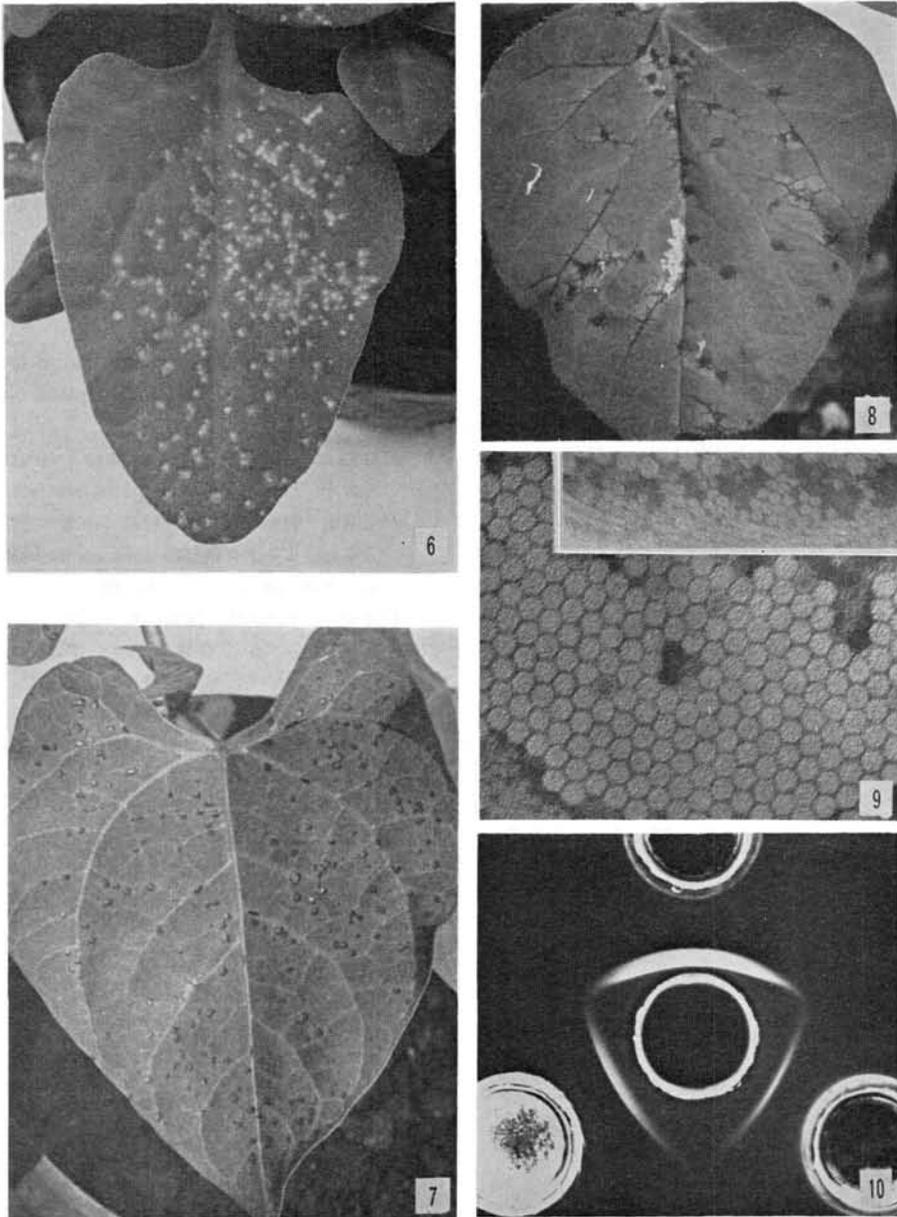
-: 病徴なし又は戻し接種陰性, +: 戻し接種陽性, (): まれに出る

および TNV-SN 抗血清と陽性反応することなどから本ウイルスは Tobacco necrosis virus であると同定した。

チューリップでの TNV の伝搬様式は、接触伝搬、親球から子球への球根伝搬および土壌伝搬が知られている。我々の予備試験においても同様であったが、チューリップへの汁液接種では、本病を再現することは困難であるとされており (MOWAT, 1970, 1972)、接種伝搬は、圃場では重要なものではない。又、球根伝搬は重要なものであるが、この伝搬様式によって流行がおこるとは考えにくい。一方、土壌伝搬では、その主役をなすも

のは、土壌中に生息するそう菌類の一種である *Olpidium* 菌であることがタバコなどで証明されている (宇田川・都丸, 1971b)。チューリップでもこの *Olpidium* 菌が重要な役割を演じているものと考えられており (MOWAT, 1971)、圃場では最も重要な伝搬様式であると思われる。

今回の富山県下での TNV によるチューリップのえそ病害の発生では、高率にまた集中的に発病の認められる圃場があり、土壌伝搬があったのではないかと想像される。



第6-10図 6. ツルナの局部病斑 7. インゲンの局部病斑 8. ダイズの局部病斑 えそが葉脈にのびている 9. 純化 TNV 粒子と Satellite Virus 粒子 10. 寒天ゲル内拡散反応 中央; ウイルス 上; 本ウイルス抗血清 左下; TNV-SN 抗血清 右下; TNV-DT 抗血清

TNV-DT と、本ウイルスとを比較してみると、マメ科のインゲン、ササゲに対する病原性に差が認められる。即ち TNV-DT では、これら植物で局部病斑を作った後えそが葉脈から葉柄、茎にまわり枯死する（松澤ら、1971）が、本ウイルスは局部病斑を作った後葉脈に

えそをおこし接種葉は落葉し、たまに茎にえそが入ることはあるが、全体が枯死することはない。TNV は、数多くの系統が存在することが知られており（KASSANIS, 1971a）、本ウイルスは TNV-DT とは若干系統を異にすると思われる。

摘 要

1974年および1975年春、富山県下のチューリップに、葉に紡錘形のえそ斑あるいはえそ条斑を生じる病害の発生をみた。この罹病チューリップの病斑を含む葉、球根および根からウイルスが分離された。このウイルスを9科32種植物に汁液接種したところ、ナス科、アカザ科、マメ科などの8科23種植物に感染したが、少数の例外を除いて、全身感染するものはなく局部病斑をつくるだけであった。タバコ、*Chenopodium amaranticolor*、インゲン、ツルナなどは感度の高い植物であった。ウイルスの物理的性質は、不活化温度85~90°C、10分間、耐希釈性 10^{-8} ~ 10^{-9} 、耐保存性は室温で43日以上であった。純化ウイルスの電子顕微鏡観察では、径約28nmの球状粒子が認められ、又、少数ではあったが一回り小型の径約16nmの球状粒子も認められた。この小型粒子はSatellite virusと思われる。又、純化ウイルスは、寒天ゲル内拡散法で、本ウイルス抗血清、TNV-DT（オランダ産チューリップより分離）およびTNV-SN（国内のタバコより分離）抗血清と反応し、単一の反応帯を作った。以上のことから、本ウイルスは、Tobacco necrosis virus であると同定した。

引用文献

宇田川晃・都丸敬一 (1971a) わが国のタバコから分

離されたタバコネクロシスウイルス。I. ウイルスの同定および感染葉組織の電子顕微鏡的観察。泰野たばこ試験場報告。70 : 71-79.

宇田川晃・都丸敬一 (1971b) わが国のタバコから分離されたタバコネクロシスウイルス。II. *Olpidium brassicae* による伝播。感染がタバコの生育におよぼす影響およびタバコにおける発生分布。泰野たばこ試験場報告。70 : 81-89.

要 司 (1974) イチゴの根から分離されたタバコネクロシスウイルスについて。神奈川県園芸試験場研究報告。22 : 78-84.

KASSANIS B. (1970) Tobacco necrosis virus. C. M.I./A.A.B., Description of plant viruses. No. 14.

KASSANIS B. (1970) Satellite virus. C.M.I./A.A.B. Description of plant viruses. No. 15.

小室康雄・岩本満朗・牧野秋雄 (1973) 宮城県亘理地方におけるイチゴ根部の tobacco necrosis virus による感染(講要)日植病報。39 : 134.

松濤美文・末次哲雄・諸橋公穂 (1971) 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。植防研報。9 : 45-49.

MOWAT W.P. (1970) Augusta disease in tulip—a reassessment. Ann. appl. Biol. 66: 17-28.

MOWAT W.P. (1972) A necrotic disease of tulip caused by tomato bushy stunt virus. Pl. Path. 21: 171-174.

SUMMARY

Studies on Tobacco Necrosis Virus Isolated
from Tulip Plants in JapanMifumi MATSUNAMI, Takeshi NISHIO and Shigeru KIMURA
Second Import Section, Yokohama Plant Protection StationNobuhiro FUJII
Fushiki Branch, Nagoya Plant Protection Station

A necrotic disease of tulip, which showed necrotic streaks and spindle-shaped necrotic spots on leaves, occurred in Toyama prefecture, Japan, in Spring 1974 and 1975. The virus isolated from roots and necrotic leaves of the diseased tulips. By mechanical inoculation, the virus infected 23 species of plants belonging to 8 families, including Solanaceae, Chenopodiaceae and Leguminosae, out of 32 species of 9 families tested. All the infected leaves showed a necrotic local lesions on inoculated leaves, but no systemic infection except *Nicotiana clevelandii* and *Vigna sinensis*. The virus rarely recovered from upper part of these two plants. Tobacco plants, *Chenopodium amaranticolor*, *Phaseolus vulgaris* and *Tetragonia expansa* were more sensitive to this virus.

Thermal inactivation point of the virus in extracted juice is 85–90°C, for 10 min., dilution end-point is 10^{-8} – 10^{-9} , and longevity *in vitro* at room temperature is over 43 days.

By electronmicroscopic observations of the purified virus preparations, spherical particles of about 28 nm in diameter were observed, and then only a few amount of smaller spherical particles of about 16 nm in diameter, which were considered to be a satellite virus, were also observed.

Purified virus reacted positively with homologous antiserum, TNV-DT (isolated from Dutch tulip) and TNV-SN (isolated from Japanese tobacco) antisera in agar gel double diffusion test.

From those results, it is concluded that the virus is Tobacco Necrosis Virus. This is the first time to isolate TNV from tulips in Japan.