

島根県下におけるチュウリップウイルス病に 関する研究 (第2報)

山本昌木[※]・石田昭夫^{※※}・益子道生^{※※※}・門脇義行^{※※※※}

Masaki YAMAMOTO, Akio ISHIDA, Michio MASHIKO
and Yoshiyuki KADOWAKI

Studies on Virus Diseases of Tulip in Shimane Prefecture (2)

はじめに

従来、わが国では、チュウリップを侵すウイルスには、チュウリップモザイクウイルス (TV) だけが知られていたが、最近筆者らの研究室などにおいて、この外のウイルスが関与することが明らかにされた。そこで今回は、チュウリップ以外の植物から分離されたウイルスのチュウリップでの病徴、感受体の生育や球根収量に及ぼす影響、健全球根とウイルス罹病球根との血清学的判定などを検討したので、現在までに得られた結果について報告する。稿を起すに当たり、種々御教示賜わった農林省ウイルス研究所小室康雄技官、日本専売公社都丸敬一博士、血清学的手技を指導していただいた島根県衛生研究所鹿田細菌科長、たばこ種子を恵与された日本専売公社にそれぞれ感謝申し上げる。

チュウリップモザイクウイルス以外のウイルスのチュウリップに対する病原性

I. 1962年12月健全チュウリップ (品種ウイリアムピット) の球根に、モザイク症状を示したダイコン葉汁液 (CMVと考えられるが系統不明—CMVR) を接種し病徴をしらべた。対照区には TV 罹病球根汁液を接種したものと健全区とを設けた。接種には生体重の5~10倍量の蒸留水を加え磨砕し500メッシュのカーボラダムとともに脱脂綿でなすりつけた。

接種後約2か月を経過したところからCMV接種区では、チュウリップ葉に周辺不明りょうな黄斑を生じ、その後10日経過すると、葉全体が淡緑色~黄緑色となり、このころから健全区との間に生育の差を生じ始めた。黄斑出現後約40日で、葉先は淡褐色のボトリチス病の症状に似た枯れ方が認められた。開花した花卉は軟弱で、色彩は不鮮明、ごく軽い増色型の breaking を示すものが多か

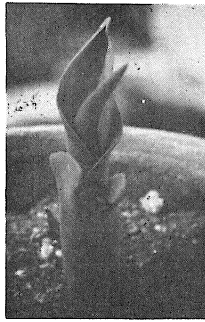
った。株全体の枯死は、健全区およびTV接種区より1~2週間早かった。

II. 脈間モザイクを起こしたダイコン葉 (RI), 葉脈透明化を起こしたダイコン葉 (R II) およびモザイク症状の明らかなキュウリ葉 (CI) の汁液をチュウリップ球根 (12月16日)、萌芽期 (1月22日) および二葉展開期 (3月18日) にそれぞれ接種した。品種はウイリアムピットとクララバットである。なおこれらのウイルスはいずれもソラマメ葉に局部壊疽を生じた。各区3~10個体用いた。

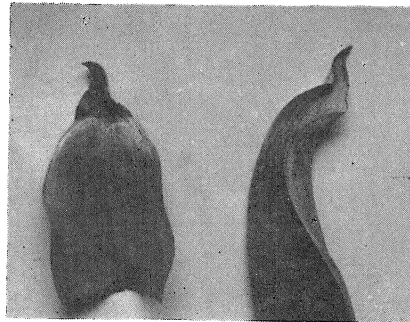
葉の病徴 ウイリアムピットでは球根接種のRI, R II 接種区では、葉に濃緑色の条がはいり、球根接種区のCIでは生育期の進むにつれ、葉全体がやや褪色し、周辺のはっきりしない濃淡の斑点を生じ、地上部草丈約10cmになると、株全体が横に広がり、葉のねじれたものが見られた。ウイリアムピットの場合、出蕾期前ごろより、葉先から枯れ込み、健全区より葉の枯れ込みは約10日早かった。クララバットの場合、RI, R II およびCI球根接種区では葉に不鮮明な濃緑色の条が認められたが、葉先の枯れ込みはウイリアムピットのように著しくなかった。また葉の病徴は本品種の場合TVによるものと区別し難い。

花卉の病徴 4月12日開花最盛期に調査した。ウイリアムピットでは、TVによって起こるいわゆる典型的 breaking でなく、増色型や褪色型のいずれか一方の breaking を示した。増色型の場合、TVによる増色型と異なり、健全部と増色部との境界は不鮮明な breaking である。この型はRI, R IIの萌芽期接種区でわずかに観察された。褪色型 breaking の場合も、TVにより起こる breaking のように褪色部と健全部との境界が明らかでない。また花卉の褪色した部分も健全部と比べて淡いピンク色である。この breaking はRI, R II, CIによる球根接種区およびCIによる萌芽期接種区で観察された。クララバットでは、褪色型 breaking のみを認め、TVによるもののような典型的や増色型 brea-

※ 植物病学研究室 ※※ 日本農業株式会社
※※※ 京都大学農業研究施設 ※※※※ 島根県安来病害虫防除所



第1図 CMV を接種したチュウリップ葉上の黄斑



第2図 CMV 接種チュウリップ葉先の病徴



第3図 ウイルスに罹病したチュウリップ花弁病徴

a, b TV罹病チュウリップ典型的 breaking
c CMV罹病チュウリップ軽い増色型breaking
d 健全花弁

king は認められなかった。増色型を示す場合も、TV によるものとは異なり、淡いピンク色であった。この型は、R II の球根接種区と C I の萌芽期接種区でそれぞれ観察された。

Ⅲ. 1963年モザイク症状を示すキュウリ（四葉）…… C₁、モザイク症状を示すダイコン（宮重）……R₁、C₁を接種したチュウリップの球根……C₂、R₁を接種したチュウリップの球根……R₂をチュウリップ（品種クラバット）の球根にそれぞれ接種した。各区25球ずつ使用した。対照区としてTV接種区と無接種区とを設けた。

C₁接種区は健全区に比し、やや緑色を欠き、接種後約1か月（草丈0.5~1.5 cm）で葉先が赤紫色に変色した。12月初旬、約半数の個体は、緑色の濃淡を生じた。12月中旬、接種区には、明らかな褪色部を認め、1月25日ごろには典型的なモザイク症状を示した。12月中旬、necrotic spot または necrotic streak などの necrosis を示したものは、褪色型の症状を示すものに比べて約1 cm生育が遅れた。2月28日（接種後132日）ごろになると、大部分の necrotic spot は、necrotic streak となり、この区でも全身の褪色が認められた4月10日（開花期）necrosis を起こしたものの蕾は、大きくならず白色となり、開花せず、いわゆる blind を生じた。この区は健全区に比し、著しく草丈が劣った。またこの区の褪色型 breaking はTVによるものとは著しく異なる汚ピンク色であった。

R₁接種区は、健全区に比し草丈がわずかに劣り、開花期の breaking はC₁に類似した。

C₂接種区は、3月21日（接種58日）、わずかに褪色を示し、C₁接種区と同様、褪色だけを示すものと necrosis を伴うものとの二つの型を示したが、両者ともC₁区に比して病徴軽微であった。

R₂接種区は、R₁と同様葉の病徴は明らかでなかつ

た。花卉では周辺部のみ赤色を残し、全体褪色するものもあった。

TV接種区は、開花期にすべて典型的な breaking を認めた。

検定植物に対する接種試験

前項Ⅰに用いたウイルスを種々の検定植物に接種した結果は、第1表に示すとおりである。

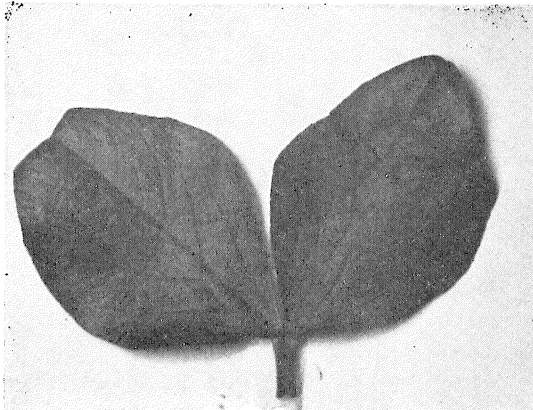
第1表 モザイク症状を示すダイコン葉汁液を
検定植物に接種した結果

検 定 植 物	症 状
ダイコン	モザイク 全身症状
ソラマメ	褐色局部壞疽
ハウレンソウ	モザイク
ヒャクニチソウ	モザイク
キュウリ	モザイク
トウモロコシ	—
インゲンマメ	—
ササゲ	—
<i>Nicotiana glutinosa</i>	モザイク 全身症状
アカザ	—
ツクサ	—

第1表に示すように、ダイコンではモザイク症状を呈し、全身が萎縮し、ソラマメでは接種葉上に1週間後に褐色局部壞疽斑点を生じた（第4図）。

ハウレンソウ、キュウリ、*Nicotiana glutinosa* では全身モザイク症状を示した。ヒャクニチソウでは新葉にモザイクを認めた。しかし、トウモロコシ、インゲンマメ、ササゲなどは実験の範囲では病徴を認めなかった。

Ⅱに用いたウイルスを検定植物（キュウリ—四葉、メロン、マクワウリ、シロウリ、スイカ、ヘチマ、トマ



第4図 ダイコンより分離したウイルスをソラマメに接種，局部壊疽斑点を生じたもの。

第2表 CMV罹病ウイルスの検定植物への接種試験結果

接種源株番号	21		53		63		89	
	発病 接種 状況	全 接 種 身	発病 接種 状況	全 接 種 身	発病 接種 状況	全 接 種 身	発病 接種 状況	全 接 種 身
キュウリ	4/4	m	9/4	—	9/6	—	9/4	—
メロン	9/2	—	9/1	—	9/2	—	9/1	—
マクワウリ	3/3	m	2/2	m	3/3	m	9/3	—
シロウリ	3/3	m	4/4	m	3/3	m	3/4	m
スイカ	3/4	ns	3/4	ns	m	—	—	—
ヘチマ	3/4	—	3/4	c	3/4	c	3/4	m
トマト	3/2	m	3/2	m	9/1	—	9/1	—
ニコチアナ・タバカム (ホワイト・パーレー)	9/1	—	9/1	—	9/1	—	9/1	—
ニコチアナ・キサンチ	3/4	m	9/1	—	9/1	—	9/1	—
ニコチアナ・グ ルチノーザ	3/4	vc	3/4	vc	9/1	—	9/1	—
ダイコン	5/7	m	4/4	m	9/6	m	5/6	m
カンラン	9/8	m	5/6	m	3/4	m	5/6	m
ホウレンソウ	4/6	m	3/4	m	4/6	m	9/3	—
コマツナ	4/4	m	3/4	m	3/4	m	3/6	m
アマトウガラシ	3/6	m	9/4	—	9/4	—	9/3	—
トウガラシ	3/6	m	5/6	m	9/4	—	9/6	—
サイトウ	9/2	—	9/2	—	9/2	—	9/2	—
ササゲ(黒三尺)	9/2	—	9/2	—	9/2	—	9/1	—
ササゲ(赤三尺)	9/2	—	9/2	—	9/2	—	9/1	—
ソラマメ	3/2	ll	3/1	ll	3/1	ll	9/1	—
ツユクサ	3/4	m	9/1	—	9/1	—	9/1	—
ヒャクニチソウ	3/2	m	2/2	m	2/2	m	2/2	m
センニチコウ	9/1	—	9/1	—	9/1	—	9/1	—

N. B. 表中数字は 発病株数/接種株数

病徴 m モザイク ns 壊疽 c クロロシス ll 局部病徴
vc 葉脈透明化
6月20日 接種, 6月27日 調査
株番号
21 ウィリアムビット R I 53 ウィリアムビット C I
63 クララバット C I 89 ウィリアムビット R II

ト、ダイコン—宮重、ホウレンソウ、カンラン、コマツナ、アマトウガラシ、トウガラシ、ササゲ(黒三尺、赤三尺)、ソラマメ、ヒャクニチソウ、センニチソウ、ツユクサ、タバコ (*Nicotiana tabacum*—White Barley, *N. xanthi*, *N. glutinosa*) に接種したところ、第2表のような結果を得た。本実験に供試した CMV の系統は Brierley らの Cucumber Virus I の病徴とほぼ一致し、タバコ上の病徴は日高・都丸らの普通系とほぼ一致する。



第5図 C1ウイルスをチュウリップ球根に接種したものをさらにソラマメに再接種したもの(局部壊疽)



第6図 R I をチュウリップ球根に接種したものをツユクサに再接種(モザイク症状)

つぎに前項Ⅲに用いたウイルスの C1 接種区で、同一接種源に対し、2種類の病徴(壊疽型、褪色型)を示したので、種々の検定植物に C1 罹病球根汁液を接種しその病徴を調査した結果は第3表に示すとおりである。現在までのところ、この中には2種類の異なったウイルスが混在するとはいい切れないようである。

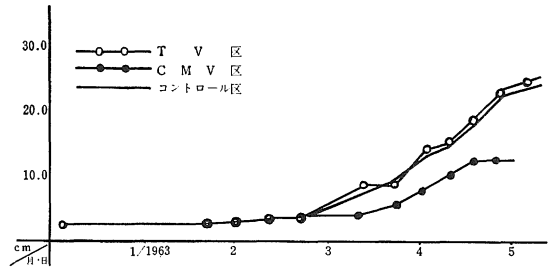
第3表 CMVC₁の種々の検定植物に対する接種試験結果

検 定 植 物	病状	壊疽型	褐色型
キ ュ ウ リ	s	3/4	3/4
マ ク ワ ウ リ	s	3/2	3/2
シ ロ ウ リ	s	3/3	3/2
メ ロ ン	s	3/1	3/2
ヘ チ マ	s	3/1	3/1
ダ イ コ ン	s	4/4	4/4
ホ ウ レ ン ソ ウ	s	3/4	3/3
コ マ ツ ナ	s	3/4	3/4
サ サ ゲ (黒三尺)		9/2	9/2
" (赤三尺)		9/2	9/1
カ ン ラ ン	s	4/4	4/4
ヒ ャ ク ニ チ ソ ウ	s	3/2	3/2
<i>N. Xanthi</i>	s	3/1	3/1
<i>N. tabacum</i> (W.Burley)	s	3/1	4/4
<i>N. glutinosa</i>	s	3/1	3/1
ツ ユ ク サ		9/1	9/1
セ ン ニ チ コ ウ		9/1	9/1
ソ ラ マ メ	ll	5/6	5/6

N.B. ll 局部壊疽 S 全身症状

ウイルスの接種時期を異にした場合チュウリップの草丈や病徴発現に及ぼす影響

I. 球根を定植前 TV をウイリアムピットに接種すると、典型的 breaking を現わした。ダイコンから分離したウイルスを接種したものは定植前、着蕾前区いずれも増色型 breaking を示したが、着蕾後接種したものは、TV 接種区、CMVR 接種区いずれも病徴を示さなかった。第7図に示すように、CMVR 接種区は3月10日ごろから健全区、TV 接種区と明らかに差を生じ、開花期にはまったくその生育を中止した。



第7図 TV, CMVRを接種したチュウリップの生育状況

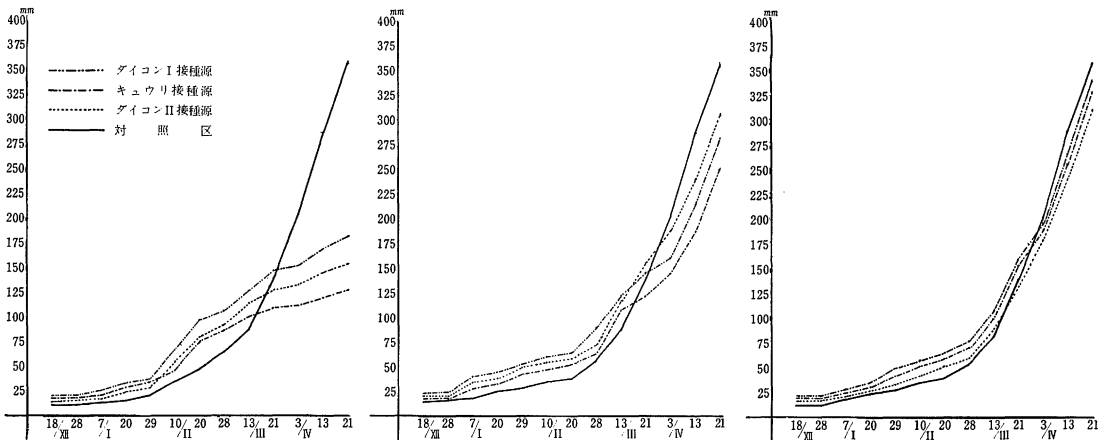
II. 球根(ウイリアムピット)植付後、12月中旬芽が出始めてから、開花最盛期を過ぎる4月下旬まで約10日ごとに草丈を測定した。第8図に示すように、接種時期が早ければ、チュウリップ初期の生長は健全区よりもむしろ良好であるが、二葉展開期(3月中旬)ごろから草丈生長は著しく低下し、球根接種区では、開花期の草丈は、健全区の約 1/2 となった。萌芽期接種区でも、健全区よりかなり劣るようであったが、二葉展開期接種区では接種源と関係なく、健全区とほとんど差を認めなかった。

III. CMVC₁ 接種区は、対照区と比べ、初期生育はわずかに上回り、5~6 cm に達してから生育が悪くなり、4月10日開花期では8~9 cm 対照区との間に差があった。対照区に対する草丈比は 100 : 77 となった。

CMVC₂ 接種区は3月21日以降生育悪く、3月21日で1.0~1.5 cm 開花期(4月10日)では7~8 cm それぞれ対照区より劣っており、対照区との草丈比は 100 : 79 であった。

CMVR₁ 接種区は3月30日以降生育悪く、4月10日開花期には約4 cm の差が対照区との間に生じた。

CMVR₂ 接種区と対照区との間に差が認められない。TV 接種区ではわずかに対照区に劣る。



a. 球根接種区 b. 萌芽期接種区 c. 二葉展開期接種区

第8図 CMV のチュウリップ草丈に及ぼす影響(品種ウイリアムピット)

第4表 チュウリップ球根発育に及ぼすウイルスの影響

	TV接種区			CMVR接種区			健全区
	定植前	着蕾前	着蕾後	定植前	着蕾前	着蕾後	
一球当り平均体重	10.8	12.3	10.8	6.6	11.9	11.5	11.5
健全区に対する比 (%)	95	107	95	57	103	104	100

第5表 チュウリップ球根発育に及ぼすウイルスの影響

接種時期	接種源	品 種	
		ウイリアムピット	クララバット
球根接種区	CMVR I	71	48
	CMVR II	62	57
	CMVC I	59	73
萌芽期接種区	CMVR I	78	40
	CMVR II	71	49
	CMVC I	75	37
二葉展開期接種区	CMVR I	96	71
	CMVR II	92	79
	CMVC I	93	72

N.B. 数字は罹病株の子球重 (g) × 100
健全球の子球重 (g)
6月17日調査

チュウリップ球根発育に及ぼすウイルスの影響

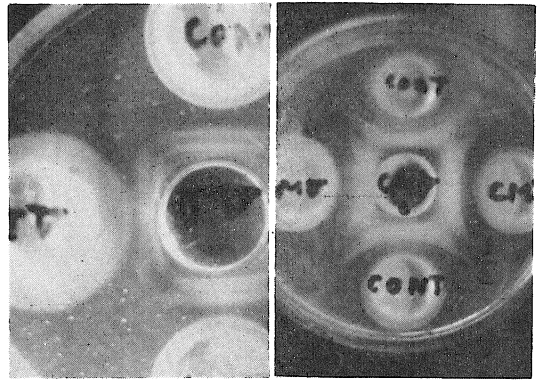
I. 第4表に示すように、CMVR区では、定植前に接種した場合、一母球当りの球根生産量は、健全区に比較して30~40%の減少を認めたと、TV接種区と健全区とは大差を認めなかった。

II. CMV罹病株にできた子球重と健全株にできた子球重を比較した。

ウイリアムピットでは、球根接種区と萌芽期接種区の罹病株では、健全株の子球重の約50~60%にとどまった。しかし、二葉展開期接種区の株の子球重は、健全区のものとの間にほとんど差が認められなかった。

クララバットでもウイリアムピットと同様に二葉展開期では、対照区との間に差を認めることができなかった。

III. 5月下旬掘り上げた球根の収量は、対照区100に比較してCMVC₁区は52, CMVC₂区55, CMVR₁は89, CMVR₂は96, TVは90という指数を示した。チュウリップモザイクウイルスは健全区に比し、やや発育が劣る程度であったが、これ以外のウイルスの場合、非常に収量が悪くなる場合とそれほど収量が低下しない場合とがあるようである。



第9図 チュウリップウイルスの血清反応 TV罹病球の判定

第10図 チュウリップウイルスの血清反応 CMV罹病球の判定

血清学的実験

TVの純化法は村山らの方法を若干変更したものを用い、CMVの純化はScottの方法を参考にした。抗原抗体反応は寒天ゲル内拡散法でOuchterlony法を用いた。

TVクララバットに病徴を示したものの汁液を蒸留水とともに草丈3~4cmのウイリアムピットの球根に接種、病徴を示したものの球根を掘り上げ、24時間凍結、等量のM/10りん酸かん衝液(pH 6.98)とともに磨砕し、ガーゼでこし、粗汁液を3,500 r.p.mで30分間遠心分離した上澄液を1日間凍結したのち融解し、3,500 r.p.mで遠心分離した上清に飽和硫酸溶液を加えて%飽和とし冷室(10°C)で30分間放置した後3,500 r.p.mに30分間遠心分離した沈殿に原汁液の3/10量の生理的食塩水を加えて溶解後3,500 r.p.m 30分間遠心分離した上澄をとってこの操作を繰り返す、8,000 r.p.m 20分間の遠心を行ない、その上清液を免疫源とした。

CMVウイリアムピットの罹病球根を10倍量の蒸留水とともに磨砕し、ガーゼ搾汁し、この汁液をWhite Barleyの葉にカーボランダム法で接種し、7日後収穫24時間凍結し、磨砕汁液を遠心(7,500 r.p.m 20分間)した上澄を免疫源として用いた。0.5M拘織酸かん衝液(pH 6.5, チオグリコール酸とクロロホルム1:1を含む)でホモジェナイズし3,000 r.p.m 10分間遠心、上澄液を0.005Mほう酸かん衝液pH 9.0で20分間透析、3/10量に濃縮、7,500 r.p.m 15分間(10°C)、この上澄液を免疫源として使用。これらの材料にウイルス存在を確認するために、ソラマメ葉に純化液を接種し、local lesionの発現をしらべた。

このようにして得られた免疫源を生後4~5月(体重1.5~2.0 kg)の家兔の耳縁静脈に注入。初回1cc、次回より2cc、3~4日おきに20回。力価上昇後頸動脈より全採血し、室温で1日間放置してから抗血清を作製。

TV, CMVを含むキュウリップ球根を3/10量の生理的食塩水とともに磨砕、搾汁した粗汁液を7,500r.p.mで15分間遠心した上清液を抗原として用いた。ゲル内拡散法(Ouchterlony法)で抗原抗体反応を行なった。すなわち0.05%の粉末寒天溶液を1ℓ加熱溶解後殺菌剤としてMercetat 100mgを加えた。写真撮影の場合は1ℓ当り200mgのmethyl orangeを添加した。N/10 NaOHでpH 7.0に調整したものを直径16cmペトリ皿に5cc流し込み、固化後直径1.6cm、厚さ0.1cmのガラスリングを数個置き、さらに寒天溶液を15cc注入固化後ガラスリングを取り除き、くぼみの中に抗原または抗体を入れ、室温に1昼夜放置後28°Cの定温器に入れ観察、抗体は原液を2倍に希釈したものを用いた。

その結果、第9図に示すように、健全球とTV罹病球との間に明らかな差異が認められた。この模式図のうちでVの符号がウイルスの反応源と考えられ、P₁、P₂、P₃などはキュウリップたんばくに由来するものと考えられる。CMV罹病球搾汁を抗体としたもので健全球抗原CMV抗原との反応線は連続していないので、健全球とCMV罹病球とは異なるものと思われるが、CMVウイルスに由来する特殊な反応線は確認されない。したがって、CMV罹病球の血清反応による判定は現在のところ困難と思われる。

摘 要

1. キュウリやダイコンにモザイク症状を示すウイルスはキュウリップに病原性を有する。
2. これらのウイルスのキュウリップの葉や花弁に対する病徴は、いくつかの型に分けられるようである。

3. これらのウイルスは、検定植物に対する接種試験の結果、キュウリモザイクウイルス(CMV)に属するものと考えられ、BrierleyのCucumber Virus IまたはCMVの普通系と考えられるが、系統の詳細については今後の検討を待ちたい。
4. キュウリップモザイクウイルス(TV)はキュウリップ草丈生長にそれほど大きい影響を与えないが、キュウリモザイクウイルス(CMV)はキュウリップの生育を著しく阻害する場合が多い。またこのウイルスは球根収量も大きく減少させる。
5. CMV, TVともに着蕾後感染したものは、その当年キュウリップ上に病徴を現わさない。
6. 血清学的に、キュウリップ健全球とTV罹病球とは明らかに判定できるが、CMV罹病球と健全球またはTV罹病球との判定は現在のところ困難である。

引用文献

1. Ainsworth, G. C. : Ann. Appl. Biol. 25 : 867—869, 1938
2. Brierley, P. : Phytopathology 30 : 171—174, 1940
3. Brierley, P. : Phytopathology 30 : 250—257, 1940
4. 小室康雄 : 日植病報 26 : 70, 1961
5. 小室康雄 : 日植病報 28 : 131—138, 1955
6. 小室康雄・明日山秀文 : 日植病報 20 : 77—82, 1955
7. 大内 昭・高橋 実 : 日植病報 28 : 87, 1963
8. 山口 昭 : 日植病報 23 : 240—244, 1958
9. 山口 昭 : 植物防疫 26 : 137—141, 1961
10. 山本昌木・石田昭夫 : 島根農大研報 12 (A) : 20—23, 1964

Summary

This paper deals with the results of investigations on Tulip viruses, with special reference to tulip plants infected with Cucumber mosaic virus (CMV). Judging from the artificial inoculations of CMV which was isolated from *Cucumis sativus* and *Raphanus sativus*, tulip plants might have a possibility of becoming the susceptible of the virus. Tulip plants which were inoculated with CMV before planting tubers showed purplish-red color on the leaf-tip after the growing of plant height was about 10 mm.

The symptoms of tulip plants infected with CMV may be grouped into three different types. And these symptoms were clearly discriminated from those of TV infected ones. Cucumber mosaic virus induced the low yield of tulip bulbs. Petals infected with CMV showed pale pink color. The cucumber mosaic virus of these investigations may be identified as Cucumber Virus I (Brierley) or Ordinary strain of CMV (Hidaka et al).

By an artificial inoculations, CMV and TV checked the growth and bulb yield of tulip plants. This tendency was remarkable in the case of CMV.

By means of serological investigations, distinct difference was proved between the tulip bulbs infected with TV and other bulbs (healthy bulbs and those infected with CMV). However, further investigations may be required on the difference between the healthy bulbs and CMV infected ones.