

ジャクニチソウのモザイクとカラーブレイキング病 の病原ウイルス

井上成信・前田孚憲・光畑興二

ジャクニチソウにウイルスに起因するモザイク病の多発していることは古くからよく知られており、諸外国では病原ウイルスとして10種が報告されている。我が国ではジャクニチソウにモザイク病が発生することについて既に1932年福士¹¹⁾によって記載されたが、ウイルスの種類については明らかにされていない。その後モザイク病の病原ウイルスとして cucumber mosaic virus (CMV)^{25,30)} と tobacco mosaic virus (TMV)²³⁾ が記載された。しかし TMV についてはジャクニチソウに自然発生したという詳しい報告はみられない。

本報告では、葉にモザイク、花に激しいカラーブレイキングと萎縮を発生したジャクニチソウの病原ウイルスを明らかにしようとした。同定実験の結果、CMV と turnip mosaic virus (TuMV) の2種が検出され、両者が重複感染していることが認められた。ジャクニチソウに TuMV を接種すると、花に斑入りを生ずることについて報告されている⁴²⁾ が、自然発生については明らかでないように思われる。本実験からジャクニチソウの花に激しいカラーブレイキングを起こす病原ウイルスは TuMV であることが認められたので、同時に検出された CMV と併せて、同定試験で得られた性状について報告する。また TuMV 誘導細胞質内封入体の形成についても若干の知見がえられたので、それらの結果についても記述する。

本報 TuMV の血清反応試験に用いた、HiMV に対する抗血清はオランダ国 Lisse, Bulb Research Center の Dr. A. F. L. M. Derks から、IMMV と ISMV の抗血清はイギリス国 Institute of Horticultural Research の Dr. A. A. Brunt から、LMV と PVY 抗血清は米国 Florida 大学 Dr. D. Purcifull から、TuMV 誘導封入体タンパクに対する抗血清は大阪府立大学農学部井上忠男教授から、NYSV 抗血清は農水省農業研究センター亀谷満朗博士から、TuMV 抗血清は農水省九州農業試験場栃原比呂志博士から分譲された。これらの方々には深甚の謝意を表す。

実験材料及び方法

ウイルスの分離：実験に用いたウイルスは広島県福山市で採集したジャクニチソウの葉にモザイクと花に激しいカラーブレイキング (Plate I, 1-2) を生じた病株から分離したも

昭和63年3月31日受理

本研究の結果の一部は昭和58年10月日本植物病理学会関西支部会に於いて発表した。また本研究の一部は昭和59-61年度文部省特定研究経費「各種ストレスに対する植物の応答解析と耐性種の検索」によって行われた¹⁸⁾。

のである。病株には DN 法試料の電顕観察によりひも状ウイルスと球状ウイルスとが重複感染しているのが認められた。前者のウイルスは接種後早期のコカブの全身モザイク病株から分離し、タバコ、*Nicotiana glutinosa* に全身感染する後者の球状ウイルスが存在しないことを確かめて供試ウイルスとした。後者の球状ウイルスは接種した検出植物のうち Samsun タバコに全身感染したモザイク病株から分離した。ひも状ウイルスは *N. clevelandii* で、球状ウイルスはタバコ (White Burley, Samsun) で継代培養し供試した。

汁液接種：汁液接種は病葉に0.1Mりん酸緩衝液 (PB) (pH7.0) を加えて磨碎し、常法のカーボランダム法によって行った。単独ウイルスの感染か否かの判定は必要に応じて、ひも状ウイルスの接種植物ではタバコに戻し接種して全身病徴の発生しないことを確認することにより、また球状ウイルスの接種植物では DN 法によりひも状ウイルスの存在しないことを電顕観察で確認することによって行った。無病徴植物におけるウイルス感染の有無は *Chenopodium amaranticolor* と *C. quinoa* ときにコマツナおよびタバコに戻し接種して判定した。

アブラムシ伝搬：アブラムシ伝搬には健全なタバコ上で飼育したモモアカアブラムシ (*Myzus persicae*) を用いた。1時間絶食させたアブラムシを病葉上に5, 10, 20, 30秒, 5, 10分, 1, 4, 24時間放して獲得吸汁させたのち、健全植物に移して24時間吸汁させた。ひも状ウイルスでは接種源にコマツナのモザイク葉を、接種植物には同じくコマツナを用い、又球状ウイルスでは接種源にタバコ (White Burley, Samsun) のモザイク葉を、接種植物には同じくタバコ (同上) を用いた。

血清反応試験：ウイルス抗原には罹病 *N. clevelandii* 及びコカブの病葉をそれぞれ0.01Mりん酸緩衝液で磨碎し、粗汁液を3,000 rpm 10分間遠心分離した上清を用いた。血清反応は微凝集反応法、寒天ゲル内二重拡散法及び ELISA 法によって行った。ひも状ウイルスに対する微凝集反応試験には当研究室作成又は分譲された bean yellow mosaic virus (BYMV), hipeastrum mosaic virus (HiMV), iris mild mosaic virus (IMMV), iris severe mosaic virus (ISMV), lettuce mosaic virus (LMV), potato virus Y (PVY), narcissus yellow stripe virus (NYSV), tulip breaking virus (TBV), 及び turnip mosaic virus (TuMV) に対する抗血清を用いて行った。ELISA 法は Sandwich 法によって行った。球状ウイルスの血清反応試験は CMV-Y 抗血清を用い、部分純化した試料を寒天ゲル内二重拡散法で行った。又感染植物に形成される細胞質内封入体の推移は TuMV 誘導封入体蛋白質抗血清を用い、ELISA 法によって調べた。

細胞質内封入体の純化：ひも状ウイルスを接種したコマツナの病葉 1 g 当たり、2 ml の 0.5M のりん酸カリウム緩衝液 (pH 7.5), 5 mg の sodium sulfite, 0.5 ml の chloroform, 0.5 ml の carbon tetrachloride を混じた溶液を加えて磨碎し、1,020 xg 5分間遠心分離した。有機溶剤を含む沈殿を病葉重 1 g 当たり 0.5 ml の PB (pH 7.5) に溶解し、1,020 xg 5分間遠心分離し、その上清と前記の上清とを合わせたものを 13,200 xg 15分間遠心分離した。沈殿に当初の病葉 1 g 当たり 0.05M PB (pH 8.2) (0.1% の 2-mercaptoethanol (2-ME) を加用) を 0.2 ml 加えて溶解し、それに最終濃度 5% の Triton X-100 を加えて 4℃ で 1 時間攪はんしたのち、27,000 xg 15分間遠心分離した。その沈殿を 0.1% 2-ME を含む 20mM PB (pH 8.2) (当初の病葉重 100 g 当たり PB 5 ml) に溶解し、30秒間攪はんした。これを上記 27,000 xg 遠心分離と沈殿の溶解後の低速遠心分離 (1,020 xg) を 2 回繰り返す。

部分純化試料とした。

電気泳動：0.2% SDS を含む10%ポリアクリルアミドゲルにおける電気泳動は Weber and Osborn (1969) の方法に順じて行った。封入体タンパク質標品は0.01Mりん酸ナトリウム、1% SDS、5%β-メルカプトエタノール pH 7.0で100℃ 5分間加熱して、電気泳動試料とした。電気泳動後のゲルはCoomassie brilliant blue R-250 (CBB) を用いて染色した。タンパク質の分子量は既知の分子量の標準タンパク質 (Pharmacia Fine Chemicals) phosphorylase b (94K), bovine serum albumin (67K), ovalbumin (43K), carbonic anhydrase (30K) 及び soybean trypsin inhibitor (20.1K) の移動度と比較して測定した。

電顕観察：ウイルス粒子の電顕観察は DN 法試料について行った。病葉の超薄切片の電顕観察には病葉組織を6%グルタルアルデヒドで前固定してから、1%四酸化オスミウムで固定し、エタノールで脱水後エポン樹脂に包埋して薄切りにし、酢酸ウラニルとクエン酸鉛とで二重染色した試料を用いた。超薄切片の作製には LKB Ultratome, 電顕観察には日立 HU-12を用いた。

実 験 結 果

ヒャクニチソウのモザイク病株から分離された2種の病原ウイルスについて調べたところ、ひも状粒子は turnip mosaic virus, 球状粒子は cucumber mosaic virus と同定されたので、それらの得られた諸性質を次に記述する。

1. Turnip mosaic virus

1) 寄主範囲と病徴

本ウイルスの寄主範囲を Table 1 に示した。11科49種 (53品種) の植物に汁液接種を行ったところ、*N. clevelandii*, ホウレンソウ, ダイコン, コカブ, ゴマ, ヒャクニチソウなど6科14種に全身感染し、タバコ (White Burley, Samsun), *N. rustica*, *C. amaranticolor*, センニチコウなど9科19種に局部感染したが、5科16種には感染しなかった。それらのうち、主な感染植物における病徴は次のごとくである。

ヒャクニチソウ：接種葉には淡い退色斑点を生じ、葉が下垂した。上葉には退色斑点を生じ、葉脈に伸びて星状形となり、又葉脈透化を生じた。のち進展して隣接のものとゆ合し、明瞭なモザイクを生じて、萎縮した (Plate I, 3-left)。品種スカーレットフレームは花卉が赤色で退色性の激しいカラーブレイキングを生じ、発育が悪く、奇形を生じ萎縮した (Plate I, 4-right)。品種カナリーバードは花卉が黄色でカラーブレイキングを生じなかったが、花卉が細く短く、艶がなくなり、全体の発育が悪く奇形を生じ、萎縮した。また花卉の色が白色種では、黄色と同様に花卉に奇形を生じ萎縮するも、カラーブレイキングはみられなかった。

コカブ：接種葉に退色斑点を生じ、その中に小さなえそ斑点を形成するものがあるが、のち退色斑点内にえそ輪点を形成するものが見られた。全身感染し、接種葉の上1, 2番葉には退色斑点を生じ、葉脈上を進展し隣接のものとゆ合してモザイクとなった。上葉には初め退色斑点を生じ、のち明瞭なモザイクを生じた。次第に退色部の発育が悪くなり、葉脈又は葉脈間が膨れ、表面が凸凹のちり面状になり、全体が奇形又は萎縮した。モザイク

ク斑上にえそ斑点を生じるものが見られた。

コマツナ：接種葉に針点状のえそ斑点を生じ，又葉脈上に細いえそを生じた。新葉には初め退色斑点を生じ，次第に葉脈透化となり，のち退色部が広がって濃淡明瞭なモザイクとなって萎縮した。進展した上葉には小さなえそ斑点を生じ，葉脈上を細く伸長して葉脈えそを形成することもあった。

N. clevelandii：接種葉に径約1 mm大のえそ斑点を生じた。上葉には接種5～6日後に初め径1 mm以下の灰白色のえそ斑点またはえそ輪点を生じ，のち褐色～濃褐色になった。またそれらの葉の基部の過半部に葉脈透化を生じ，のち葉脈えそになった。新葉に初め葉脈透化を生じ，それが次第にえそ化してネット様葉脈えそになり，発育悪く萎縮した。

タバコ (White Burley, Samsun)：接種葉に初め1 mm前後のえそ斑点を生じ，のち拡大して5～6 mm大になった。えそ斑点は中心淡褐色，周り濃褐色の輪紋となり，乾燥状態になった。全身感染しなかった。

センニチコウ：接種葉に接種6日後頃からえそ斑点を生じ，のち拡大して4～5 mm大になり，中心灰褐色，周り赤紫色の輪点となった。全身感染しなかった。

Table 1. Host range of Zinnia-isolate of turnip mosaic virus

Systemic susceptible plant species
<i>Brassica rapa</i> , <i>B. rapa</i> var. <i>perviridis</i> , <i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> , <i>B. pekinensis</i> , <i>Chrysanthemum coronarium</i> var. <i>spatosum</i> , <i>Helianthus annuus</i> , <i>Raphanus sativus</i> , <i>Melilotus olba</i> , <i>Nicotiana clevelandii</i> , <i>N. glutinosa</i> , <i>Petunia hybrida</i> , <i>Sesamun indicum</i> (Shirogoma, Kurogoma), <i>Spinacia oleracea</i> , <i>Zinnia elegans</i> .
Local susceptible plant species
<i>Beta vulgaris</i> , var. <i>cicla</i> , <i>Callistephus chinensis</i> , <i>Celosia cristata</i> , <i>Chenopodium amaranticolor</i> , <i>C. quinoa</i> , <i>Cucumis sativus</i> , <i>Cucurbita maxima</i> , <i>C. pepo</i> , <i>Gomphrena globosa</i> , <i>Hyoscyamus nigar</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> *. <i>N. tabacum</i> (White Burley, Samsun), <i>N. rustica</i> , <i>Pisum sativum</i> (Fukkoku-ohzaya)*, <i>Solanum melongena</i> , <i>Tetragonia expansa</i> , <i>Trifolium pratense</i> , <i>Vicia faba</i> , <i>Zea mays</i> .
Insusceptible plant species
<i>Arachis hypogaea</i> , <i>Beta vulgaris</i> , <i>Citrullus lanatus</i> , <i>Cucumis melo</i> var. <i>conomon</i> , <i>Datura stramonium</i> , <i>Dianthus superbus</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Lactuca scariola</i> , <i>Medicago sativa</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Pisum sativum</i> (Sanzyunichi-Kinuzaya), <i>Solanum tuberosum</i> , <i>Trifolium repens</i> , <i>Vigna angularis</i> , <i>V. radiata</i> , <i>V. sesquipedalis</i> .

* : no symptom, but was recovered.

2) アブラムシ伝搬

本ウイルスはモモアカアブラムシ (*Myzus persicae*) により非永続的に伝搬された。アブラムシはコカブの病葉上では，30秒間の探り挿入のみならず10秒間あるいは5秒間といった非常に短い時間の探り挿入でもウイルスを獲得し移された。

3) 物理性

罹病 *N. clevelandii* 葉粗汁液中での本ウイルスの不活化温度は60～65℃10分，希釈限度は 10^{-4} ～ 10^{-5} ，保存限度は20℃で4～8日であった。

4) ウイルス粒子

DN 法試料について電顕観察したところ、本ウイルスの粒子は長さ約750 nm、幅約12 nm のひも状であった (Plate II, 2).

5) 血清反応

Potyvirus 群ウイルス, BYMV, HiMV, LMV, IMMV, ISMV, NYSV, PVY, TBV, TuMV に対するそれぞれの抗血清を用いて血清反応試験を行ったところ、本ウイルスは TuMV 抗血清とよく反応し、BYMV-G 抗血清と弱い反応がみられたが、他の7抗血清とは反応しなかった。その結果、本ウイルスは血清学的には TuMV と深い類縁関係にあることが認められた。

6) 病葉超薄切片の電顕観察

罹病ヒャクニチソウ、コマツナ及び *N. clevelandii* 葉の超薄切片の電顕観察像には細胞質内に散在又は小集塊したウイルス粒子と共に細胞質内封入体が認められた (Plate II, 3, 5-7, Plate III, 1)。細胞質内封入体は pinwheels, circulars, laminated aggregates, bundles, tubes などの構造を示した。Pinwheel の翼片は直線形またはゆるく湾曲した長い多重層板の断面層として見られた。さらに単独あるいは pinwheel に接する1重又は多重の環状構造も見られた。Pinwheel は分枝が湾曲し、正常な風車状構造を示し、中心にリングを形成した。また環状封入体を縦割りにした長い tube 構造もみられた。封入体の分枝と分枝との間あるいは環状構造の内外にウイルス粒子の断面と思われる球状体が見られた。

病徴の若い葉の切片を観察してみると、封入体は細胞壁に直立して形成されるものや、endoplasmic reticulum (ER) に直立しているものが多く見られた (Plate II, 5)。それらには多層のものは少なかった。また plasmodesmata の近くにみられるものがあった。病徴の進んだ成熟葉では封入体は細胞質内に散在または集塊し、それらの翼片は幾層にもなっているものと、その一端が環状構造のものが多かった。細胞質内には多数の、大小の小胞体の形成がみられた (Plate II, 7)。

DN 法試料について観察したヒャクニチソウ、コカブ、*N. glutinosa* など多くの病葉から細胞質内封入体の破片が観察されたが、その多くは管状構造であった (Plate II, 4)。それらの封入体には管状側面に対し、斜めの平行直線微細構造が認められ、その線間隔は約 5.0nm であった。

7) TuMV 接種コマツナにおけるウイルス活性の推移、細胞質内封入体形成の推移並びにアブラムシによる獲得

接種源に *N. clevelandii* を用い、病葉に 0.1M PB pH 7.0 を10倍量加えて磨碎し、コマツナに接種した。接種後2日又は3日おきに新葉をとり、ウイルス活性及び細胞質内封入体形成の推移を、さらにアブラムシによる獲得について調べた。ウイルス活性は新葉2枚をとり、5倍量のりん酸緩衝液 (pH 7.0) で磨碎し、カーボランダムを用いた常法によってタバコ (White Burley) の半葉に接種し、他の半葉には対照としてあらかじめ別に接種しておいたコマツナの病徴明瞭な病葉を同様に磨碎し接種した。ウイルス活性率は対照

区に対する検定区の局部病斑数であらわした。細胞質内封入体の形成は TuMV 誘導封入体蛋白質抗血清を用い、病葉を 5 倍の純水で磨碎した試料を ELISA 法で調べた。アブラムシによる獲得試験は同コマツナの病葉を接種源に、新葉を切りとってアブラムシを放ち、5 分間獲得吸汁させたのち、健全コマツナに移して 4 時間後に殺虫し、発病を調べた。アブラムシ伝搬は接種源としたコマツナの 1 株当たり 15 株の検定コマツナを用い、その検定植物 1 株当たり 2 匹のアブラムシを放った。アブラムシの獲得率はその合計発病株であらわした。それらの結果は Fig. 1 に示した。

外部病徴の発現は接種 8 日後に認められた。一方ウイルス活性は接種 6 日後には陰性で、病徴発現日と同じ接種後 8 日目から認められた。その後ウイルス活性は徐々に高くなり、接種 15 日、18 日後にはかなり高くなった。細胞質内封入体タンパク質の ELISA 反応値はウイルス活性と同じ接種 8 日後から認められ、その後検定を終了した接種 31 日後まで徐々に増加した。そのような結果、細胞質内封入体は外部病徴が認められ、またウイルス活性が認められたほぼ同じ時期に形成されていることが認められた。即ち細胞質内封入体はコマツナ葉内では外部病徴が認められたときには既に形成が始まって存在することを示している。それらの感染植物を接種源としてモモアカアブラムシによるウイルスの獲得を調べた結果、ウイルス活性発現より 2 日遅い接種 10 日後からウイルスが獲得されて伝搬され、接種後の経過とともに増加した。

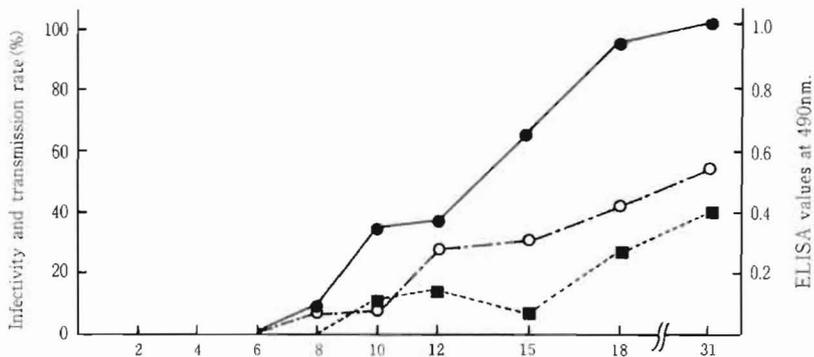


Fig. 1. Changes in infectivity of TuMV (●-●), ELISA values for TuMV cylindrical inclusion (○-○) and transmission rate by aphid (■-■) from infected *Brassica rapa* var. *perviridis* at various time intervals after inoculation.

8) 細胞質内封入体タンパク質

SDS-PAGE によって TuMV 誘導細胞質内封入体タンパク質の分子量は 68K と計算された (Plate III, 4)。

2. Cucumber mosaic virus

1) 寄主範囲と病徴

本ウイルスの寄主範囲を調べるため、10科42種 (47品種) の植物に汁液接種を行ったと

ころ、8科25種；タバコ (White Burley, Samsun), *N. glutinosa*, *N. rustica*, *N. clevelandii*, *Petunia hybrida*, *Hyoscyamus niger*, トマト, ナス, キュウリ, カボチャ, セイヨウカボチャ, ペポカボチャ, ホウレンソウ, フダンソウ, アズキ, クリムソンクローバー, スイートクローバー, ヒャクニチソウ, シュンギク, ヒマワリ, ダイコン* (*:無病徴以下同) コマツナ*, センニチコウ, ケイトウ, トウモロコシに全身感染し, 8科15種: エンドウ (佛国大莢, 三十日絹莢), ソラマメ, インゲンマメ (黒三度, トップクローブ), ササゲ (黒種三尺, 赤種三尺), リョクトウ, *Datura stramonium*, *C. amaraniticolor*, *C. quinoa*, ビート, コカブ, ハクサイ, ゴマ (シロ, クロ), ダリア, アスター*, コカブに局部感染した。カンランとルーサンには感染しなかった。それらのうち主な感染植物における病徴を次ぎに示す。

ヒャクニチソウ: 接種葉に1 mm大の淡い退色斑点を生じたが, その輪かくは不明瞭であった。新葉には淡い退色斑点または vein clear を生じ, のち軽いモザイクとなった (Plate I, 3-middle)。花には特徴的な症状は見られなかったが, 品種 (スカーレット, エクスクイジート) によっては軽い斑入りを生ずるものがあった。萎縮は見られなかった (Plate I, 5-left)。

タバコ: 接種葉に淡い退色斑点を生じた。全身感染し, 初め新葉に vein clear を生じ, のち明瞭なモザイクとなった。初期の病徴発生葉では退色部が拡大し, 葉の全面が退色することもあった。上葉ではモザイクを生じて萎縮したが, 緑色部がひぶくれ症状を現わすものも見られた。

N. glutinosa: 接種葉に径5~6 mm大の退色斑点を生じた。全身感染し, 上葉には初め退色斑点及び vein clear を生じた。のち退色部が広い濃淡明瞭なモザイクとなって奇形を生じ, 萎縮した。緑色部が膨れる部位も見られた。

2) アブラムシ伝搬

本ウイルスはモモアカアブラムシ (*Myzus persicae*) により非永続的に伝搬された。

3) ウイルス粒子

DN 法試料について調べたところ, 本ウイルスの粒子は径30 nm の球状であった。

4) 血清反応試験

ゲル内拡散法: 寒天ゲル内二重拡散法により CMV-Y 抗血清と反応した。Spur は形成されなかった。

中和試験: 汁液接種を行ったヒャクニチソウの病葉を50倍量の0.01M PB pH 7.0で磨碎し, 3,000 rpm で10分間遠心分離した。その上清に CMV-Y 抗血清を終末10又は20倍希釈になるように混合し, 35℃に20分間保ったのち, 3,000 rpm で10分間遠心分離し, その上清を検定植物のヒャクニチソウ, *N. glutinosa* 及び *C. amaraniticolor* に接種した。その結果ヒャクニチソウ, *N. glutinosa* には感染せず, また *C. amaraniticolor* では感染しないか, 1葉当たり1~2個の局部病斑 (対照=200個以上) を形成したに過ぎず, 本ウイルスは CMV-Y 抗血清と反応し, 中和されたことを示した。

5) 病葉超薄切片の電顕観察

全身感染したヒャクニチソウの病葉の超薄切片を電顕観察したところ、ウイルス粒子は細胞質内に散在又は液胞内に結晶集塊するのが見られた。結晶集塊は整然と結晶配列した集塊が幾つも寄せ集まって大きな集塊になるものが多かった (Plate III, 2-3)。中には大集塊の中に一辺7個の粒子からなる六角形を創造できる集塊もみられた (Plate III, 2)。葉緑体の中には大きな澱粉粒が存在した。

考 察

今までにヒャクニチソウに発生するウイルスとして、bidens mottle virus²⁸⁾, cucumber mosaic virus^{25, 33, 35)}, curly top virus³⁶⁾, potato virus X³⁹⁾, tobacco leaf curl virus^{32, 34)}, tomato spotted wilt virus^{15, 37)}, zinnia mild mottle virus³¹⁾, zinnia mosaic virus²²⁾, zinnia vein banding virus^{2, 3)}, zinnia yellow net disease^{4, 38)}の10種が報告されている。わが国ではヒャクニチソウにおけるモザイク病の病原ウイルスとしてCMV^{25, 30)}とTMV²³⁾が記載されているに過ぎない。しかしTMVについてはヒャクニチソウから自然発生したウイルスを検出同定したという報告はみられない。TMVが接種によってヒャクニチソウに感染するということが報告されている^{29, 42)}。

本報告では葉にモザイクと萎縮、花に激しいカラーブレイキングを生じたヒャクニチソウの病株から病原ウイルスとして混合感染した径30 nmの球状ウイルスと長さ750 nmのひも状ウイルスの2種類が検出された。同定実験を行った寄主範囲、アブラムシ伝染、ウイルス粒子の形態、物理性、血清反応、病葉切片の電顕観察などの結果から、ひも状粒子はTuMV、球状粒子はCMVと同定された。

TuMVは既に多科の多くの植物に発生し、世界に広く分布し、又病原性の異なる多くの系統の存在することが知られている^{16, 20, 21, 40, 41, 44)}。わが国ではダイコンから検出されるものには*N. glutinosa*やカンランに無病徴または無感染のordinary strainが多いといわれている⁴⁴⁾が、*N. glutinosa*やハクサイに感染する系統も知られている⁴⁰⁾。TuMVは分離株により、とくに*N. glutinosa*に対する病原性に著しい強弱があり、感染しないものから、全身感染して明瞭な病徴を現すもの、さらに致命的な全身病徴を現すものまでであることが知られている^{20, 40, 41)}。本ウイルスは*N. glutinosa*に病原性があり、全身感染して退色斑点 (Plate I, 7) やえそ斑を生じ、またカンランやハクサイにも全身感染し、後者ではモザイクや萎縮を生ずる (Plate I, 6)。この点では本ウイルスは欧米諸国に多いcabbage strainあるいはTuMV築後10分離株^{20, 40)}に類似している。しかし本ウイルスは*C. amaranticolor*, *C. quinoa*およびソラマメには局部感染するが、全身感染しない点で、それらの系統と寄生性を異にしている。又寄主範囲においては本ウイルスはアイリスやスターチスのような花き植物から分離されたものとも違いがみられる。しかし本ウイルスはTuMV抗血清と強く反応したことから、TuMVであると同定された。TuMVにも今までに報告された多くの系統あるいは分離株があり、それぞれ寄主範囲と病徴を異にするものがあり、分類上の立場からTuMVの系統関係を明確にわかりやすく整理する必要があるように思われる。

Weil, B. (1962)はCMV, potato stem mottle virus, TMV, TuMVを接種したヒャクニ

チソウの寄主反応について調べ、TuMVに感染した植物では葉に生育障害とモザイクを、花には激しいカラーブレイキングを生じることを報告している。Blaszczak, W. (1968) もまた TuMV を接種した病ヒャクニチソウでは花にカラーブレイキングを生じることを述べている。本報告でも TuMV を接種したヒャクニチソウでは、花に萎縮と奇形を生じるとともに、赤やピンク色をした花弁には激しいカラーブレイキングを生じた。また葉にはモザイクを生じて生育が悪く、萎縮を生じた。一方 CMV に感染したヒャクニチソウでは葉にモザイクを生じたが、花に著しい症状は現れなかった。しかるに CMV と TuMV とが混合感染した植物ではそれらの相乗作用によって CMV または TuMV の単独感染のものより、著しい発育障害と萎縮、花に激しいカラーブレイキングを生じた (Plate I, 5-right)。赤花種では花弁の色が、TuMV 単独感染では少し薄くなった (Plate I, 4-right) のに対し、CMV と TuMV とが混合感染した株では赤色が濃くなり (Plate I, 5-right)、花の色彩にも 2 種ウイルスの重複感染による相乗作用のあることが認められた。このように CMV はヒャクニチソウの花に目立つ斑入りを生じないが、TuMV がヒャクニチソウに感染すると、激しいカラーブレイキングを生じることから、本報のヒャクニチソウの花の斑入りは TuMV に起因することが認められた。そこで TuMV のヒャクニチソウにおける病名を花の斑入り病 (Flower color breaking disease) と呼びたい。

Potyvirus 群に属するウイルスは細胞質内封入体の形成を誘導する (Edwardson, J. R. (1966ab, 1974) が、本ウイルスの罹病葉の超薄切片像にも細胞質内に pinwheels, laminated aggregates や circulars などの形状の封入体が認められた。これらの封入体の形状は Edwardson, J. R. (1974, 1984) の分類によれば Potyvirus Subdivision III に属するものに一致している。又 TuMV の分離株によっては、感染病葉の超薄切片像に long flat laminated aggregates 構造の他に、short curved laminated aggregates 構造 (Subdivision IV) の pinwheel が認められている^{8,20)}。本ウイルスに感染した病葉超薄切片では後者の形状は見られず、Subdivision III に属する形状のみであった。これらの封入体は病徴初期の病葉には細胞壁に直立してみられるものが多く、また小胞体 (ER) に直立して形成されるものが見られる。病徴の進んだ細胞では封入体は細胞質内に散在または集塊し、circular になるものと封入体の翼片が長く伸び、また幾層にもなった湾曲の少ないものが見られた。Potyvirus 誘導封入体が細胞壁に直立して形成されることは Krass, C. J. & Ford, R. E. (1969), Gardner, W. S. (1969), Lawson, R. H. & Hearon, S. S. (1971), Lawson, R. H. et al. (1971) によって報告されている。本報 TuMV 誘導封入体もまた他の Potyvirus 群ウイルスによるそれらと同様のことが観察され、これらの封入体の形成は細胞壁及び ER に関係が深いように思われた。本ウイルス誘導による封入体は感染後の植物に外部病徴が現れ、又ウイルス活性が認められた時、既に形成されていることが明らかになった。このことはウイルス粒子が増殖したのち封入体が形成されるものではなく、ウイルス粒子形成の初期に既にウイルス遺伝情報により形成が開始されるもののように思われた。

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析で、5 種の Potyvirus 群ウイルスの細胞質内封入体蛋白質の分子量は $67\sim 71 \times 10^3$ であると報告されている^{14,44)}。本 TuMV の封入体蛋白質の分子量はそれと同じ 68×10^3 であった。

球状ウイルスは CMV と同定されたが、その性質は CMV の ordinary strain に近いも

のと考え^{10,13)}. CMV はヒャクニチソウに感染すると花に目立つ病徴を現さないが、葉にモザイクを起こす原因となる。

摘 要

葉に激しいモザイク、花にカラーブレーキングと激しい萎縮を生じたヒャクニチソウから混合感染した2種の病原ウイルスを検出し、それらは turnip mosaic virus (TuMV) と cucumber mosaic virus (CMV) と同定された。

TuMV は接種を行った11科49種の植物のうち、ヒャクニチソウ、ダイコン、コカブ、*N. clevelandii*, ゴマなど6科14種に全身感染し、タバコ、*N. rustica*, *C. amaranticolor*, センニチコウなど9科19種に局部感染したが、5科16種には感染しなかった。本ウイルスはモモアカアブラムシによって非永続的に伝搬した。ウイルス粒子は約12 X 750 nm で、不活化温度が60~65°C, 希釈限度が 10^{-4} ~ 10^{-5} , 保存限度が4~8日であった。本ウイルスはTuMV 抗血清と反応し、BYMV 抗血清と弱い反応がみられたが、Potyvirus 群に属するHiMV, LMV, IMMV, ISMV, NYSV, PVY, TBV それぞれに対する抗血清とは反応しなかった。DN 法試料中には線間隔約5.3 nm に直線微細構造のある封入体の破片が観察された。

TuMV に感染した病葉超薄切片の電顕観察では細胞質内に散在又は小集塊したウイルス粒子とともに細胞質内封入体が認められた。その封入体は若い感染葉では細胞壁に直立して形成されるものが多く、病徴の進んだ葉では細胞質内に散在あるいは集塊するものが多かった。封入体の形状は laminated aggregates と circulars のものが多く、又幾層にもなっていた。その細胞質内封入体タンパク質の分子量は68Kであった。

TuMV を接種したコマツナにおけるウイルス活性の推移、細胞質内封入体形成の推移、およびアブラムシの獲得について調べた。外部病徴は接種後8日目に認められ、ウイルス活性も病徴発現日と同じ接種8日後に認められた。また細胞質内封入体タンパク質はELISA 法で調べたが、ウイルス活性と同じ接種8日後から認められた。その後、ウイルス活性および封入体形成は徐々に増加した。それらの病葉を接種源としてモモアカアブラムシによるウイルスの獲得を調べた結果、ウイルス活性発現より2日遅い接種10日後から陽性となり、ウイルスが移された。

CMV は接種を行った10科42種のうち、タバコ、*N. glutinosa*, キュウリ、ヒャクニチソウなど8科25種に全身感染し、エンドウ、ソラマメ、ゴマなど8科15種に局部感染した。本ウイルスはモモアカアブラムシによって非永続的に伝搬された。ウイルス粒子は径約30 nm の球状で、CMV-Y 抗血清とよく反応し、また中和された。CMV 感染病葉超薄切片の電顕観察では細胞質内に多数の散在するウイルス粒子と液胞内に大きなウイルス粒子の結晶集塊が認められた。

文 献

1. Blaszcak, W. 1868. Wirus mozaiki Rzepy (*Marmor brassicae* H.) i jego wplyw na plonowanie Rzepy i Gorczycy. Roczn. Nauk roln., Ser. A. 94 : 629-640. (R. A. M. 48 : 489, 1969)

2. Dwardash Shreni, V. C. 1980. Studies on virus diseases of *Zinnia elegans* Jacq. Ph. D. Thesis, Aligarh Muslim University, Aligarh, India, pp. 241.
3. Dwardash Shreni, V. C., Singh, B. P. and Srivastava, K. M. 1983. Effect of zinnia vein banding virus on growth and flowering of *Zinnia elegans* Jacq. *New Botanist*. 10 : 7-10.
4. Dwardash Shreni, V. C., Srivastava, K. M. and Singh, B. P. 1979. Vein yellowing of *Ageratum conyzoides* whitefly transmitted disease from India. *New Botanist*. 6. 97-102.
5. Edwardson, J. R. 1966a. Electron microscopy of cytoplasmic inclusions in cells infected with rod-shaped viruses. *Amer. J. Bot.* 53 : 359-363.
6. Edwardson, J. R. 1966b. Cylindrical inclusions in the cytoplasm of leaf cells infected with tobacco etch virus. *Science* 153 : 883-884
7. Edwardson, J. R. 1974. Some properties of the potato virus-Y group. *Fla. Agric. Exp. Stn. Monogr.* 4 : 1-398.
8. Edwardson, J. R. and Christie, R. G. and Ko, N. J. 1984. Potyvirus cylindrical inclusion. Subdivision-IV. *Phytopathology* 74 : 1111-1114.
9. Edwardson, J. R. and Puricifull, D. E. 1970. Turnip mosaic virus-induced inclusions. *Phytopathology* 60 : 85-88.
10. Francki, R. I. B., Randles, J. W. and Hatta, T. 1969. Cucumber mosaic virus. CMI/AAB. Descriptions of Plant Viruses. No. 213 : 1-6.
11. 福土貞吉 1932. 園芸作物のモザイク病. *実際園芸* 113 : 83-90.
12. Gardner, W. S. 1969. Ultrastructure of *Zea mays* leaf cells infected with Johnson-grass strain of sugarcane mosaic virus. *Phytopathology* 59 : 1903-1907.
13. Gibbs, A. T. and Harrison B. D. 1970. Cucumber mosaic virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses. No. 1 : 1-4.
14. Hiebert, E. and McDonald, J. G. 1973. Characterization of some proteins associated with viruses on the potato Y group. *Virology*. 56 : 349-361.
15. Ie, T. S. 1970. Tomato spotted wilt virus. CMI/AAB. Descriptions of Plant Viruses. No. 39 : 1-4.
16. 飯野尚之, 井上成信, 前田学憲 1987. スターチスに発生した turnip mosaic virus と cucumber mosaic virus について. *農学研究* 61 : 171-184.
17. 井上成信 1986. 植物ウイルスと宿主・Vector との相互関係. —Potyvirus 群ウイルスについて—農業生物シンポジウム 生物間相互作用 p. 1-8.
18. 井上成信, 前田学憲 1987. 植物ウイルスに対する花き植物の反応. 昭和59-61年度文部省特定研究成果報告書 各種ストレスに対する植物の応答解析と耐性種の検索. 72-80.
19. 井上成信, 光畑興二 1983. ヒヤクニチソウの葉にモザイクと花の斑入りを生じた病原ウイルスについて. *日植病報*. 50 : 116 (1984).
20. 井上成信, 光畑興二 1978. アイリスから分離された turnip mosaic virus. *農学研究* 57 : 1-16.
21. 井上忠男, 井上成信 1974. Turnip mosaic virus の一系統によるナンキンマメ輪紋モザイク病. *農学研究* 50 : 51-60.
22. Labri, M. R. A., Khan, T. A., Husain, S. I. and Mahmood, K. 1985. Interaction of zinnia mosaic virus with root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on *Zinnia elegans*. *Pak. J. Nematol.* 3 : 17-21.
23. 河村貞之助, 野村健一, 小室康雄 監修 1976. 花と花木の病害虫 博友社 373 pp.
24. Krass, C. J. and Ford, R. E. 1969. Ultrastructure of corn systemically infected with maize dwarf mosaic virus. *Phytopathology* 59 : 431-439.

25. 小室康雄, 明日山秀文 1955. キュウリモザイク病ウイルスに関する研究 II. 東京付近における各種植物のモザイク症状株からの分離. 日植病報. 20 : 77-82.
26. Lawson, R. H. and Hearon, S. S. 1971. The association of pinwheel inclusions with plasmodesma. Virology 44 : 454-456.
27. Lawson, R. H., Hearon, S. S. and Smith, F. F. 1971. Development of pinwheel inclusions associated with sweet potato russet crack virus. Virology 46 : 453-463.
28. Logan, A. E., Zettler, F. W. and Chritie, S. R. 1984. Susceptibility of *Rudbeckia*, *Zinnia*, *Ageratum* and other bedding plants to bidens mottle virus. Plant Disease, 68 : 260-262.
29. Okada, Y., Nozu, Y. and Ohno, T. 1969. Demonstration of the universality of the genetic code in vivo by comparison of the coat proteins synthesized in different plants by tobacco mosaic virus RNA. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 63 : 1189-1195.
30. 奥浦正弘 1951. 胡瓜モザイク病の寄主植物. 日植病報. 15 : 167.
31. Padma, R., Phatak, H. C., Singh, S. and Verma, V. S. 1974. Studies on zinnia mild mottle virus. Horticultural Research 14 : 55-56. (R. P. P. 54 : 431, 1975)
32. Padmanabhan, C. and Pathmanabhan, G. 1978. A leaf curl disease of *Zinnia elegans* Jacq. Current Research No. 6. : 100-101.
33. Prasad, R. N. and Raychaudhuri, S. P. (1961) Mosaic disease of *Zinnia elegans* Jacq. Indian Phytopath. 14 : 123-126.
34. Sastry, K. S. 1984. Strains of tomato leaf curl virus and its perpetuation under field conditions. Jour. Turkish Phytopath. 13 : 87-90. (R. P. P. 64 : 315, 1985)
35. Sastry, K. S., Sastry, K. S. M. and Singh, S. J. 1974. Studies on a virus causing mosaic disease on *Zinnia elegans*. Indian Journal of Mycol. and Pl. Path. 3 : 165-168.
36. Severin, H. H. P. and Freitage, J. H. 1933. List of ornamental flowering plants naturally infected with curly top or yellows diseases in California. Plant Dis. Repr. 17 : 1-2.
37. Smith, K. M. 1985. Some disease of ornamental plants caused by the virus of tomato spotted wilt. J. Royal. Hort. Soc. 60 : 304-310.
38. Srivastava, K. M., Singh, B. B., Dwadash Shreni, V. C. and Srivastava, B. N. 1977. Zinnia yellow net disease-transmission, host range, and agent-vector relationship. Plant Dis. Repr. 61 : 550-554.
39. Suteri, B. D. and Bala, S. 1980. A mosaic disease of *Zinnia elegans* Jacq. Science and Culture 46 : 94-95. (R. P. P. 60 : 237, 1981)
40. 栃原比呂志 1965. ダイコンのモザイク病を起因するウイルスの同定並びに血清学的比較研究. 農技研報 C18 : 1-52.
41. Tomlinson, J. A. 1970. Turnip mosaic virus CMI/AAB. Descriptions of Plant Viruses. No. 8 : 4 pp.
42. Weil, B. 1962. Virusbedingte Blütenfarbbrechungen bei einjährigen Sommerblumen. Phytopath. Z. 44 : 334-350.
43. Yeh, S. -D. and Gonsalves, D. 1984. Purification and immunological analyses of cylindrical-inclusion protein induced by papaya ring spot virus and watermelon mosaic virus 1. Phytopathology 74 : 1273-1278.
44. Yoshii, H. 1963. On the strain distribution of turnip mosaic virus. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 28 : 221-227.

Viruses causing Mosaic and Flower Color Breaking

Diseases of *Zinnia elegans*

Narinobu INOUE, Takanori MAEDA and Koji MITSUHATA

Summary

Two viruses, TuMV and CMV, were isolated from *Zinnia elegans*, showing severe color breaking in the flowers and mosaic in the leaves.

TuMV generally resembled the cabbage strain of TuMV in host range, symptomatology and other properties, but characteristic chlorotic spots produced systemically in *N. glutinosa*, and mosaic, malformation and stunt were appeared in *Brassica pekinensis*. Severe color breaking and stunt were produced in the flowers of *Z. elegans*, as well as mosaic in the leaves. In ultrathin sections of the infected plant leaf tissues, cylindrical cytoplasmic inclusions were presented in the cytoplasm of the cells. It was first observed attached perpendicularly to the walls of the infected cells. The TuMV-inclusion contained a single species of protein with a molecular weight of 68,000. In *Brassica rapa* var. *peviridis* inoculated with TuMV, the infectivity of the virus and the proteins of TuMV-inclusions by ELISA were recognized, from 8 days after inoculation. They were the same days found the symptoms in the leaves. When the inoculated plant was used as inoculum, the virus was transmitted by *Myzus persicae*, from 10 days after inoculation.

CMV was identified by host range, aphid transmission, virus particles, serology and other properties. It resembled the ordinary strain of CMV. CMV caused mosaic in the leaves in *Zinnia elegans* and no symptoms or rarely faint color breaking in the flowers.

Explanation of plates

Plate I

- 1-2. Symptoms of mosaic and flower color breaking in *Zinnia elegans* naturally infected with both of TuMV and CMV.
3. Systemic symptoms in *Zinnia elegans* var. "Scarlet-flame" infected with TuMV or CMV. left : TuMV, middle : CMV, right : both of TuMV and CMV.
4. Flower symptoms in *Zinnia elegans* var. "Scarlet-flame" inoculated with TuMV (right), showing color breaking and stunt, and healthy (left).
5. Flower symptoms in *Zinnia elegans* var. "Scarlet-flame" inoculated with CMV and TuMV. left : CMV. right : color breaking, stunt and malformation with a mixture of TuMV and CMV.
6. Systemic symptoms in *Brassica rapa* infected with TuMV, showing mosaic and malformation.
7. Systemic symptoms in *N. glutinosa* infected with TuMV, showing chlorotic spots.

Plate II

1. TuMV particles in sap from *Zinnia elegans* stained with 2% aqueous phosphotungstic acid, pH 6.5. Bar represents 200 nm.
2. Membrane-associated aggregates of particles in sap stained with 2% aqueous phosphotungstic acid, pH 6.5. Bar represents 200 nm.
3. Aggregates of TuMV particles in the cytoplasm of *Zinnia elegans*. Bar represents 300 nm.
4. Tubular inclusion induced by TuMV in crude sap of *N. clevelandii* stained with 2% aqueous phosphotungstic acid, pH 6.5. Bar represents 200 nm.
5. Cytoplasmic inclusions occurred perpendicularly to cell wall in the cytoplasm of *N. clevelandii* infected with TuMV. Bar represents 500 nm.
- 6-7. Pinwheels and laminated aggregates of cytoplasmic inclusions in the cytoplasm of *Brassica rapa* (6) and *N. clevelandii* (7), and vesicles occurred in the cytoplasm (7). Bar represents 500 nm.

Plate III

1. Pinwheels and laminated aggregates of cytoplasmic inclusions in the cytoplasm of *N. clevelandii* infected with TuMV. Bar represents 500 nm.
- 2-3. Crystalline aggregates of virus particles in vacuoles from *N. clevelandii* (2) and *Zinnia elegans* (3) infected with CMV. Bar represents 200 nm (2) and 300 nm (3).
4. Polyacrylamide gel electrophoresis of sodium dodecyl sulphate-dissociated protein in TuMV cytoplasmic inclusion preparation. Marker proteins (Mr. in thousands) are soybean trypsin inhibitor C (20.1K) ; carbonic anhydrase (30K) ; ovalbumin (43K) ; bovine serum albumin (67K) and phosphorylase b (94K).

Plate I

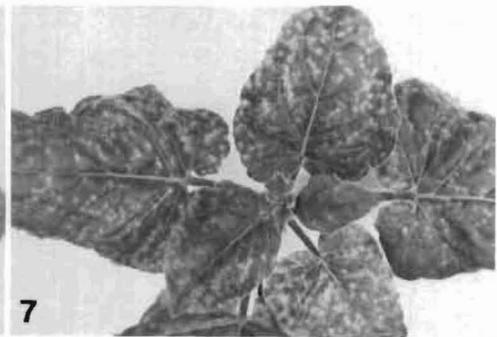
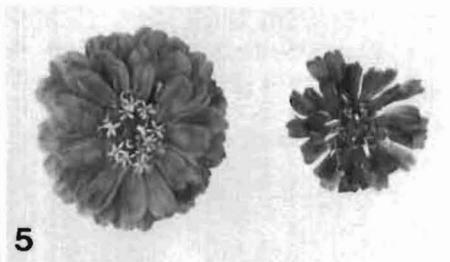
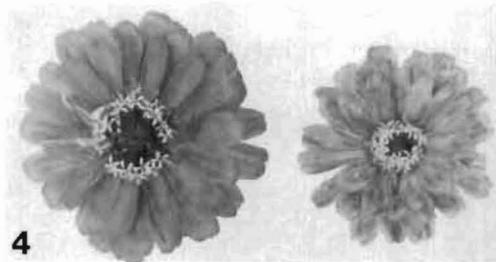
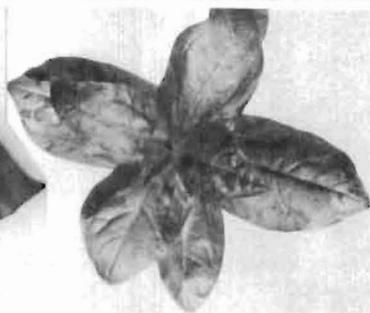
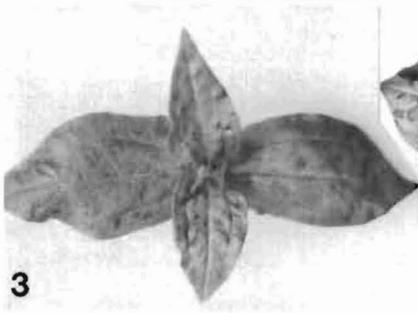
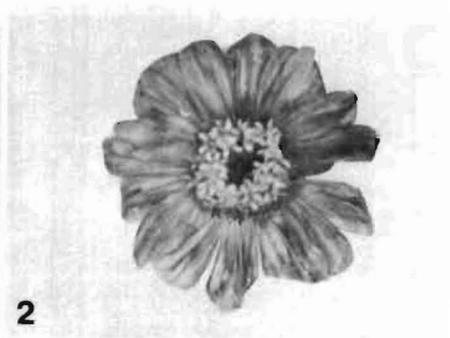
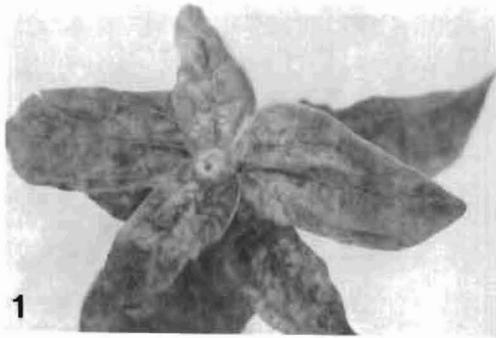


Plate II

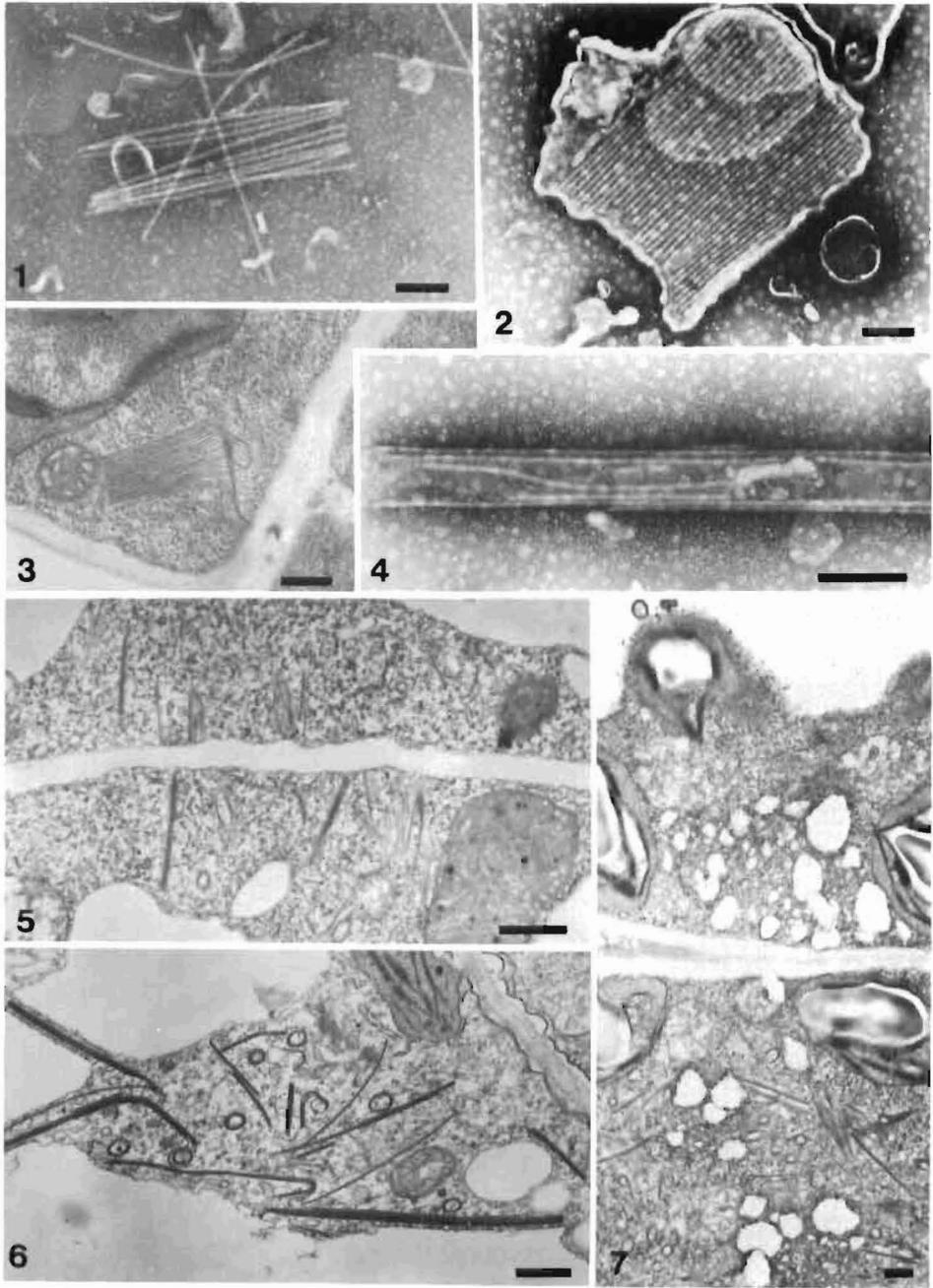


Plate III

