

チューリップから分離したタバコネクロシウイルス (tobacco necrosis virus) の血清学的性質

山本孝彜・守川俊幸*・名畑清信**・稲垣佳世子*

Takashi YAMAMOTO, Toshiyuki MORIKAWA*, Kiyonobu NAHATA**,
Kayoko INAGAKI*: Serological relationships of
tobacco necrosis virus (TNV) isolates isolated from tulip

Summary

Twenty six isolates of tobacco necrosis virus isolated from tulip in Toyama Prefecture were tested to examine serological relationships among them. Antisera were prepared for the two isolates and serological tests were made either by double diffusion test or ELISA. Isolates were divided into two groups showing no serological relationships. And also one group was subdivided further into two subgroups by spur formation in double diffusion test. These results indicate that three TNV strains different each other in serological properties at least occur in tulip growing area in Toyama Prefecture.

Tobacco necrosis virus (TNV) はチューリップえそ病の病原ウイルスとして球根産地では重要なウイルスの一つであり、わが国においても多くの報告がある^{3,4,6,7,10,12}。富山県下のチューリップから分離された TNV 分離株について諸性状を比較すると、寄主範囲、病原性などいくつかの相違点が認められた。しかしながら、これら分離株間の血清学的な類縁関係については不明な点が多い。各地のチューリップから分離された、あるいは発生している TNV の血清学的な類縁関係を明らかにすることは、ウイルス病の診断、抵抗性品種の育成、発生生態の解明など本病の防除方法を確立する上で重要であると考えられる。

著者らは、この観点から、富山県下でこの10年あまりの間に分離された TNV について、抗血清との反応試験を行い、分離株間の血清学的性質の違いについて調べたので報告する。

試験方法

1. 供試 TNV

チューリップのえそ病株およびウイルス様症状株¹³⁾から採取した26株を用いた(第1表)。これらのうち、試験

番号1~16までの TNV はツルナの接種葉から単一局部病斑分離を2回繰り返して分離した株であり、17~26の10株は、ツルナに接種して保存したものであり、単一局部病斑分離は行っていない。供試株はいずれもツルナに接種して増殖し、小分けして-80°Cの冷凍庫に保存し、以後の試験に用いた。

2. TNV 分離株の寄生性および病原性

試験番号1~15の分離株をアカザ科、マメ科、ナス科、ウリ科など19種類の植物に接種して寄主範囲および病徴を調べた。接種試験は保存のツルナ病葉に10倍量の水道水を加えて磨砕し、カーボランダムと綿球を使用する常法によった。接種植物の育成は20°C~25°Cの温室で行い、アブラムシなどの発生を防ぐため適宜、殺虫剤を散布した。

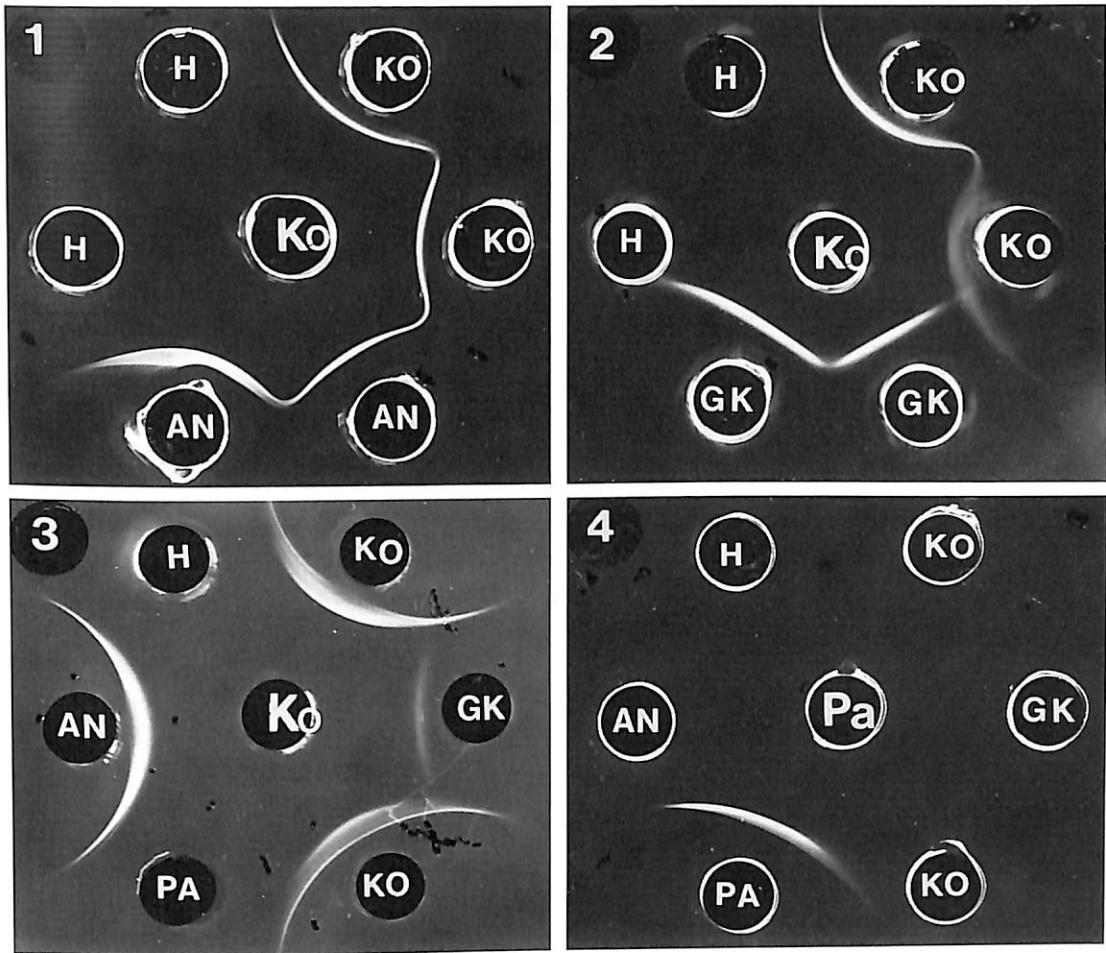
3. ウイルスの純化および抗血清の作製

Koreto-1, Pare-P および TNV-85-GK の3分離株を供試した。ウイルスの純化は、TNV 接種後3~4日目のツルナ接種葉を採取し、2倍量の0.1%チオグリコール酸液を加えて磨砕して、-20°Cに保存した。数日後、室温で融解し、ろ紙でろ過した。ろ液は75,000 xG, 3時間と8,000 xG, 10分間の分画遠心分離を2回繰り返して、10~40%の蔗糖密度勾配(蔗糖は0.01 Mのりん酸緩衝液, pH7.0に溶解)で3時間遠心分離(日立 RPS-25ローター使用)して精製した。純化標品を電子顕微鏡観察した結果、直径27~30 nmの均一な球状粒子が認められた。TNV-85-GK 株では同時に直径17~18 nmの粒子も認められた。純化ウイルスはいずれも紫外部吸収250 nmと265 nm付近にそれぞれ極小値と極大値があり、A260/A280は1.08~1.1であった。

四国農業試験場 Shikoku National Agricultural Experiment Station, Zentsuji, Kagawa 765

*富山県農業技術センター野菜花き試験場 Toyama Vegetable and Ornamental Crops Research Station, Toyama Agricultural Research Center, Tonami, Toyama 939-13

**富山県農業水産部 Division of Agriculture, Forestry and Fishery, Toyama Prefectural Government, Sinsougawa, Toyama 930



第1図 二重拡散法によるタバコネクロシスウイルス (TNV) 分離株の血清反応試験

中央抗体槽

1, 2, 3 Ko:Koreto-1株抗血清

4 Pa:Pare-P株抗血清

外側抗原槽 (純化ウイルス希釈液)

KO:Koreto-1株

AN:Angel-R株

GK:TNV-85-GK株

PA:Pare-P株

H :健全ツルナ葉汁液

第1表 供試タバコネクロシウイルス (TNV)

試験 番号	分離株 ¹⁾ (採集株)	分離年	採集場所 (チューリップ品種)
1	TNV-Tul-1	1985	富山県砺波市 (Gerbrand Kieft)
2	TNV-Tul-2	1985	砺波市 (Gerbrand Kieft)
3	Koreto-1	1987	高岡市是戸
4	入善-GK	1987	下新川郡入善町 (Gerbrand Kieft)
5	入善-Frq	1987	下新川郡入善町 (Frasquita)
6	保存株-2	1977	高岡市是戸 (Tender Beauty)
7	保存株-5	1977	高岡市是戸 (Easter Parade)
8	保存株-7	1977	高岡市是戸 (Parade)
9	保存株-9	1977	高岡市是戸 (Purissima)
10	Angel-R	1987	砺波市 (Angelique)
11	BVZ-R	1987	砺波市 (Ben van Zanten)
12	BVZ-B	1987	砺波市 (Ben van Zanten)
13	小林	1985	高岡市是戸 (Golden Parade)
14	Pare-P	1987	砺波市 (Parade)
15	MWR-P	1987	砺波市 (Merry Widow Record)
16	TNV-85-GK	1985	高岡市 (Gerbrand Kieft)
17	小林 A (MW)	1985	高岡市是戸 (Merry Widow)
18	小林-RNR-1	1985	高岡市是戸 (Renown)
19	TNV-NYR	1985	高岡市
20	小林-RNR-2	1985	高岡市是戸 (Renown)
21	TNV-森田-2	1985	砺波市庄下 (Lucky Strike)
22	TNV-88-1	1988	砺波市
23	TNV-88-2	1988	砺波市五郎丸
24	TNV-88-3	1988	砺波市
25	TNV-88-4	1988	砺波市
26	TNV-88-5GK	1988	砺波市五郎丸 (Gerbrand Kieft)

1) 試験番号1~16はツルナの接種葉から単一局部病斑分離した株, 17~26は原寄主からツルナに接種して増殖, 保存した株。

抗血清は純化ウイルス約20 mgを3回に分けて, 家兎に静脈注射1回, 次いで Freund's complete adjuvant を用いた筋肉注射を2回行なって作製した。得られた抗血清の力価は重層法で, Koreto-1株および Pare-P株は2,048倍希釈以上であった。

4. 血清反応試験

寒天ゲル内二重拡散法および ELISA で行った。寒天ゲルの組成は粉末寒天 (Noble Agar, Difco) 0.8%, フジ化ナトリウム 0.05%, EDTA 5 mM とした。ELISA の手技は Clark and Adams (1977) ²⁾ の方法に従った。反応板は96穴のプレート (ダイナテック社) を用い, 吸着 γ-グロブリン濃度および酵素結合抗体の希釈倍数は

1 μg/ml および 1,000倍とした。検定材料は純化ウイルスあるいは -80°C に凍結保存したツルナ病葉に 0.01 M リン酸緩衝液 (pH7.0) を加えて磨砕した汁液を使用した。

結 果

1. TNV 分離株の寄生性および病原性

TNV-Tul-1 など15分離株について試験した結果, 第2表に示したようにインゲン, ササゲ, *Nicotiana debney*, *N. rustica* において分離株間で寄生性および病原性に違いが認められた。試験番号1~9にまとめた9分離株ではツルナ, インゲンおよび *Nicotiana rustica* の接種葉に明瞭なえそ斑点を生じ, *Nicotiana debney* にも同様の病徴を示す株が認められた。ササゲには1株の試験例であるが接種葉に激しい葉脈えそを生じた。しかし, いずれの接種植物でも全身感染は認められなかった。

一方, 試験番号10~15にまとめた6分離株ではツルナ接種葉には明瞭なえそ斑点を生じたが, インゲン接種葉にはごく少数の小さいえそ斑点を生じ, ササゲにも軽いえそ斑点, 葉脈えそ症状を生じた。*N. rustica* および *N. debney* には感染しない株が多かったが, まれに軽いえそ斑点, えそ斑紋を生じる株があった。

2. 二重拡散法による血清反応

第2表に示した15分離株について Koreto-1株から作製した抗血清を用い二重拡散法で試験した。結果は第2表に示したように, 9株では反応が認められたが, 6株は反応しなかった。次に, Koreto-1株抗血清と反応しなかった分離株のうち, Pare-P株から抗血清を作製して7分離株について検定した結果, Koreto-1株抗血清と反応した株は Pare-P株抗血清とは反応せず, Pare-P株抗血清と反応した株は Koreto-1株抗血清とは反応しなかった。さらに, 第1表に示した TNV-85-GK株 (試験番号11) については, Koreto-1株抗血清と反応したが, Koreto-1株の沈降帯とは spur を生じた (第1図)。血清反応の違いとタバコ類, マメ類などにおける病徴, 病原性の違いとは一致しなかった。

3. ELISA による TNV 分離株の検定

Koreto-1株抗血清および Pare-P株抗血清を用いて作製した酵素結合抗体は, 精製ウイルスは 0.5 μg/m 挽まで, ツルナ病葉汁液では 1,000倍希釈まで検出できた (第2図)。これらの酵素結合抗体を用いて, 第1表に示した26株を検定した。その結果を第3表に示した。Koreto-1株抗血清 (酵素結合抗体) とは, 強く反応する株, 反応しない株および常に陽性反応を示すものの, ELISA 値が 0.12~0.2の範囲内の弱い反応を示す株があった。Pare-P株抗血清 (酵素結合抗体) とでは, Koreto-1株抗血清と反応しなかった株は本抗血清と反応し, Koreto-1株

第2表 チューリップから分離したタバコネクロシウイルスの数種植物に対する反応および血清反応

供試 分離株 ¹⁾	原寄主 の病徴 ²⁾	接種植物(接種葉) ²⁾					血清反応(二重拡散法) ³⁾	
		ツルナ	イツ ンゲナシ (<small>ニ</small>)	ササゲ (三尺)	<i>Nicotiana debneyi</i>	<i>Nicotiana rustica</i>	Koreto-1 抗血清 との反応	Pare-P 抗血清 との反応
1 TNV-Tul-1	Nl, Ns	Nl	Nl, Vn	Vn	Nl	Nl	-	+
2 TNV-Tul-2	Nl, Ns	Nl	Nl		Nl	Nl	+	-
* 3 Koreto-1	Nl, Ns	Nl	Nl, Vn		Nl	Nl	+	-
4 入善-GK	Nl, Ns	Nl	Nl			Nl	-	
5 入善-Frq	Nl, Ns	Nl	Nl			Nl	+	-
<hr/>								
6 保存株-2	Nl, Ns	Nl	Nl	nl		Nl	+	
7 保存株-5	Nl, Ns	Nl	Nl			Nl	+	
8 保存株-7	Nl, Ns	Nl	Nl	nl		Nl	+	
9 保存株-9	Nl, Ns	Nl	Nl	nl		Nl	+	
<hr/>								
10 Angel-R	Vld(B)	Nl	nl	nl	-	-	+	-
11 BVZ-R	Vld(B)	Nl	nl	nl	-	-	-	+
12 BVZ-B	Vld(B)	Nl	nl	nl, vn	-	-	-	
13 小林	Vld(A)	Nl	nl		nl	nl	+	
* 14 Pare-P	Vld(A)	Nl	nl	nl	-	-nr	-	+
15 MWR-P	Vld(A)	Nl	nl	nl, vn	-	-	-	

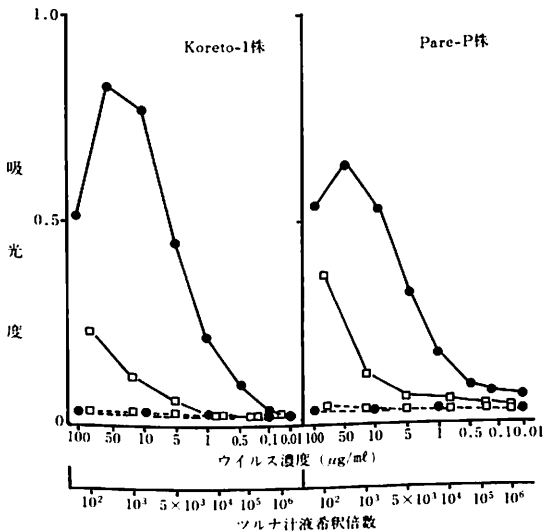
- 1) * : 抗血清作製株
 2) 病徴: Nl(nl): えそ斑点, Ns(ns): えそ条斑, Nr(nr): えそ斑紋, Vn(vn): 葉脈えそ, Vld: ウイルス様症状, (A)は蕾に斑点が入る症状, (B)は葉に黄色条斑が入る症状, -: 感染せず, ()内の小文字は軽い病徴
 3) 抗原液はツルナ病葉汁液

抗血清と反応した株とは反応しなかった。しかしながら、試験番号18, 19株のように両抗血清と反応した株もあった。

考 察

本実験の結果、富山県のチューリップ栽培地帯では血清学的に異なる、少なくとも3系統のTNVが発生していることが明らかになった。血清学的性質が異なる2系統と、これらとは血清学的類縁関係のない1系統である。

TNVは病原性、寄生性の異なる多くの系統があり、血清型についてもA, D二つの異なった系統の存在が報告されている^{1,5)}。名畑ら(1988)¹¹⁾は、富山県高岡市のチューリップに発生したTNVは二重拡散法でタバコのTNV-A型抗血清と反応したが、イチゴからのTNV-Fv抗血清およびタバコからのTNV-SN抗血清とは反応しなかったことを報告している。一方、松崎ら(1977)⁷⁾は富山県氷見市のチューリップから分離したTNVについて調べ、上述のTNV-SN抗血清およびオランダ産チューリップより分離したTNV-DT株の抗血清と反応したことを報告している。わが国のチューリップにおけるTNVの発生は1976年4月、名畑ら(1978)¹⁰⁾によって初めて明かにされたものであるが、上述の二つの報告から考えると、えそ病の発生当時から血清学的に類縁関係のない系統、即ち宇田川ら(1971)¹²⁾が作製したTNV-SN抗血清に対して反応するTNVと、反応しないTNV



第2図 ELISAによるタバコネクロシウイルス(TNV)の検出

- 左: Koreto-1株, 右: Pare-P株
 ●: 実線はウイルス液, 破線は緩衝液
 □: 実線はツルナ病汁液, 破線は健全葉汁液

第3表 チューリップから分離したタバコネクロシウイルス (TNV) の血清学的性状

ELISA による検定	Koreto-1 抗血清と ¹⁾ 反応する (0.5以上)	Koreto-1 抗血清と僅か に反応する (0.12~0.2)	Koreto-1 抗血清と 反応しない (0.07以下)
Pare-P 抗血清と反 応しない (0.08以下)	2 TNV-Tul-1 ○3 Koreto-1 ²⁾ 8 保存株-7 9 保存株-9 10 Angel-R 13 小林 *17 小林 A(MW) ⁴⁾ *24 TNV-88-3 *25 TNV-88-4	5 入善-Frq 6 保存株-2 7 保存株-5 15 MWR-P 16 TNV-85-GK ³⁾ *21 TNV-森田-2 *22 TNV-88-1 *23 TNV-88-2 *26 TNV-88-5GK	
Pare-P 抗血清と反 応する (0.4以上)	*18 小林-RNR-1 *19 TNV-NYR		1 TNV-Tul-1 11 BVZ-R ○14 Pare-P *20 小林-RNR-2

1) () 内の数字は405 nm での吸光度 (0.1以上は陽性, 0.1未満は陰性)

2) ○: 抗血清作製株

3) 二重拡散法では Koreto-1 株の沈降帯とスパーを生じる

4) *: 原寄主からツルナに接種し増殖した株で単一局部病斑分離を行っていない

5) 試験番号4および12の2株は試験を行っていない

が発生していたと推察される。本試験では名畑ら、松壽らおよび TNV-SN 株などの抗血清との反応試験は行っていないが、1977年に著者の一人、名畑が採集した TNV の保存株-2, 5 または保存株-7, 9 株のどちらかは採集時期や場所から名畑らの報告の系統に相当するものと思われる。一方、松壽らの報告の TNV は本試験の Pare-P 株に代表される系統の TNV とも推察されるが、寄生性、病原性、純化ウイルスが Satellite virus 粒子を含むことなどの点では、本試験の TNV-85-GK 株に類似している。

供試分離株では Koreto-1 株およびこの株と spur を生じる株が多かったが、これらの系統はチューリップに明瞭なえそ症状を示すため、分離頻度が高まったものと考えられる。一方、Pare-P 株に代表される系統はチューリップの花弁、葉などにウイルス様の斑紋や黄色条斑を現した個体から分離したもので、明瞭なえそ症状は示さない。このような系統の圃場での分布や役割については明かでないが、今後チューリップでの症状と関連し、明かにしていく必要がある。また、本試験の供試株の中には2株ではあるが Koreto-1 株および Pare-P 株の抗血清と反応する株が見られた。これらはいずれもウイルス様症状を示したチューリップから採集し、ツルナに接種して増殖した試料であり、圃場において両系統の TNV に感染していたものと推察される。

現在、TNV はほとんどのチューリップ球根産地で発生しており⁸⁾、軽視できない病害として定着している。その診断方法として ELISA の適用が試みられ、球根や根から確実にウイルスを検出できることが報告されてい

る⁸⁾。本病の防除にとって、このような精度の高い診断方法の普及は不可欠であるが、本報告で明かにしたように、今後は、栽培地で発生するウイルスの血清学的性質の違いなどを考慮した診断方法の確立が必要であろう。

摘 要

富山県下のチューリップから採集したタバコネクロシウイルス (TNV) 26株について二重拡散法および ELISA により血清学的類縁関係を調べた結果、供試分離株には血清学的に類縁関係のない二つの群が存在した。さらに一つの群の分離株は二重拡散法で沈降帯が spur を形成する2つのグループに分けることができた。富山県下のチューリップ栽培地では、血清学的性質の異なった、少なくとも、3系統の TNV が発生しているものと考えられる。

引用文献

- 1) Babos, P and Kassanis, B. (1968) Serological relationships and some properties of tobacco necrosis virus strains. J. gen. Microbiol. 32: 1~144.
- 2) Clark, M. F. and Adams, A. N. (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34: 475~483.
- 3) 土井養二・多川 閃・都丸敬一・与良 清 (1969) 矯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. 日植病報 35: 359~360.

- 4) 要 司・岸 国平 (1973) イチゴから検出された tobacco necrosis virus および tobacco mosaic virus について. 日植病報 39:134.
- 5) Kassanis, B (1970) Tobacco necrosis virus. C. M. I./A. A. B. Descriptions of plant viruses No. 14, 4pp.
- 6) 小室康雄・岩木満朗・牧野秋雄 (1973) 宮城県亶理地方におけるイチゴ根部の tobacco necrosis virus による感染. 日植病報 39:134.
- 7) 松濤美文・西尾 健・木村 茂・藤井伸泰 (1977) 国内産チューリップより分離された Tobacco necrosis virus. 植防研報 14:17-23.
- 8) 宮川正通・中臣康範・中井正樹・小島 誠 (1985) ELISA によるチューリップえそ病病原ウイルス tobacco necrosis virus の検出. 北陸病虫研報 33:92-95.
- 9) 名畑清信 (1984) チューリップの主な病害. 植物防疫 38:464-468.
- 10) 名畑清信・岩木満朗・草葉敏彦 (1978) Tobacco necrosis virus によるチューリップえそ病の発生. 富山農試報 11:21-24.
- 11) 名畑清信・草葉敏彦・向島博行 (1988) チューリップウイルス病の発生生態と防除に関する研究. 富山県農技セ研報 2:1-132.
- 12) 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観察. 秦野たばこ試報 70:71-79.
- 13) 山本孝猪・守川俊幸・稲垣佳世子・松本美枝子・名畑清信 (1989) チューリップに発生したウイルス様症状 (1)病徴および伝染経路. 日植病報 55:101.

(1990年7月5日受領)