

## チューリップ微斑モザイク病と条斑病

守川 俊 幸

Toshiyuki MORIKAWA:

Studies of tulip mild mottle mosaic and streaking in Hokuriku District

両病害は1969年頃から発生が認められ、当初は電子顕微鏡観察でウイルス粒子が観察されず原因が特定できなかったため、「新型バイラス」あるいは「ウイルス様症状」とも呼称されていた。また、発生が一部の圃場あるいは品種に限られたことから、生理障害とする見方もあり、長らく混乱が続いた。1990年頃には土壌と球根で伝染する2つの異なる病害に起因することが明らかになったものの<sup>2)</sup>、すでに県下全域に発生が拡大していた。その後、両病害とも土壌に生息する *Olpidium brassicae* によって媒介されることが明らかになり、それぞれ微斑モザイク病と条斑病という病名が提案された<sup>3,4)</sup>。また、微斑モザイク病については、*Ophiovirus* 属に属するチューリップ微斑モザイクウイルス (TMMMV: *Tulip mild mottle mosaic virus*) が検出され<sup>5)</sup>、ウイルス診断法も開発されたが<sup>6)</sup>、条斑病の病原ウイルスは明らかになっていない。

現在、チューリップ球根の生産は価格低迷、生産者の高齢化、そしてこれら土壌伝染性の新たなウイルス病の被害拡大という問題を抱えている。厳しい国際競争の中、良質球根の供給地としての地位を確保するためにも、効率的な病害制御技術の確立とその推進が急務となっている。当场では、両病害の発生生態の解明と防除技術の開発に取り組んできた。その内容については順次報告してきたが<sup>7,8,9,10,11,12)</sup>、本稿ではこれら既往の資料や報告には示されていない研究の経緯や実施するにあたっての注意点、そして反省点などを紹介し、今後の研究の参考としたい。

### 1. チューリップ微斑モザイクウイルス(TMMMV)の純化

本病罹病株から検定植物上に分離される病原因子の耐保存性は1~2時間(20℃)であり、極めて不安定な成分であった。このため、純化材料の確保には、まず耐保存性の向上が必要不可欠であった。耐保存性は粗汁液に2-メルカプトエタノールなどの還元剤を添加することによって向上したが、活性炭の添加が最も効果が高かつ

た。一方、純化試料に活性炭を加えるとむしろ感染性が低下することから、活性炭はウイルスを吸着する反面、粗汁液中に含まれるウイルスを分解する酵素や感染阻害物質などを吸着する作用を有し、これにより耐保存性が高まるものと推測した。以降、活性炭を添加して汁液接種することによって材料の確保が進み、ウイルス純化の作業が進展した。とは言え、10gのキノア接種源を20mlの緩衝液で磨砕して接種し、得られるキノア接種葉は30g程度であり、さらに100gの接種葉から得られる純化ウイルスは10~50 $\mu$ gと歩留まりが悪く、純化材料の確保が最も労力を要する作業であった。当初は既往のウイルス純化法に従い闇雲に純化作業を繰り返し、時には植物成分の球状粒子(ルビスコ)を精製してウサギに免疫したこともあった。その後、キノアに対する感染性によって感染因子を追跡しながら、緩衝液組成、澄清化に用いる有機溶媒の種類に検討を加えたが、ショ糖密度勾配遠心後の感染性は広い分画に分布し、それぞれの感染性は低くかった。後に本ウイルスが多分子性であり、各分子が異なる分画に分れていたためであることが明らかとなった(分画を混合すると著しく感染性が高まる)。ひとまず、全分画を電子顕微鏡で観察し、ウイルスと思われる粒子を探す作業を繰り返した結果、ある日、複雑に屈曲したひも状の粒子が発見された。さかのぼって、以前に観察済みの試料数点を再度観察してみると、同様な粒子が観察された(つまり、以前から存在していたのに見えなかった)。本ウイルスが当時知られていた植物ウイルスにはない形態であったせいもあるが、日常、目に見えるものすべてを認識できていないことを示すものである。以降、精製条件に検討を加え、本粒子を純化することができるようになった。なお、本ウイルスの純化の成否は、他のウイルスにも共通するが、いかにウイルス濃度の高い接種葉を得るかにかかっており、純化手順よりもむしろ温室でのキノア栽培条件や接種条件の方が重要であると考えている。

## 2. チューリップ微斑モザイクウイルスの診断

何羽目だったかは思い出せないが、ウサギでの免疫に成功し、ウイルス抗血清を得ることができた。次に、これを利用した血清学的診断法の開発を行った。当初はELISA法を用いていたが、現在では簡便化したTBIA法 (Tissue blot immunoassay)<sup>5)</sup> を用いている (第1図)。TBIA法は定量性に欠けるものの、植物体でTMMMVは偏在して分布しているため、感染の有無を知るには、茎横断面を検出部位としたTBIA法の検出精度が最も高い。加えて、簡便化したTBIA法は、以下の点で優れている。まず、ELISA検定作業で最も労力を要する磨砕するという手間が省けること、次に、特別な機器を必要とせず、抗血清や試薬の消費量が少ないことが上げられる。さらには、生産者が自ら発生状況を確認しながら現地でプロットングできること、これを郵送してもらって検定することが可能なこと、試料を押しつけた後のニトロセルロースシートは乾燥後4℃または-20℃で保存すれば長期間 (1年以上) 保存が可能なこと、複数のウイルス抗血清を混合処理して複数ウイルスを同時検出できること等々の利点があり、広範囲なウイルス発生状況を知るのに実用的な検定法となっている。現在、本県花卉球根農業協同組合では、本法を用いてチューリップやユリのウイルス検定を多数実施している。

ウイルス検定法を開発するにあたって、迅速性を利点とする場合がある。簡易化TBIA法も抗血清の濃度を高め、37℃でインキュベーションすることにより、数時間で判定することが可能であるが、実際にはそのような短時間で判定を求められる場面は少ない。むしろ、分あるいは時間単位で束縛されることは、雑多な日常業務に支障をきたすことの方が多い。本法は処理時間にかなりの幅を持たせてある。作業時間の制約を受けないほうが、柔軟な実験計画をたて易いのが本当であり、数千という検体を一度に検定する場合はなおさらである。実際に、

1. ニトロセルロース膜に植物断面を押しつける
2. ブロッキング液：3～5%スキムミルクを含むTBS (pH7.4) に10-60分間浸漬 (浸漬後は洗浄しない)
3. 1/10,000～100,000抗血清, 1/10,000AP標識抗ウサギIgG-ヤギIgG (Sigma, A-3687), 0.5%BSA, 2%PVPを含むTBSに4℃一晩～2日間浸漬
4. TBSTで2回, TBSで1回以上洗浄 (各5～30分間)
5. 基質で発色
6. 脱イオン水で洗浄

(3. ブロッキング液をTBSTで5倍程度に希釈し、これに抗血清とConjugateを加えても可)

第1図 簡便化したTBIA法の手順

めんどろな技術は使わないし、使ってもらえない。無論、検出精度が高いことが最も重要な要件ではあるが、フレキシビリティのある簡易な技術が役に立つと感じる。

## 3. 発生生態の解明と防除

血清学的診断法が開発されるまでの間、土壌や球根での伝染、薬剤防除などの試験では、その「伝染」や「効果」は発病の有無で評価していた。このため、供試する品種は花の病徴が明瞭な‘Parade’を主に用いていた。ところが、‘Parade’はポットでの球根肥大が悪く、下垂球 (ドロッパー) を形成しやすいという欠点がある上、球根腐敗病に弱く、しばしばポットごと腐敗して新生球根が回収できないことがあった。またTMMMVの球根伝染率が低いと、翌々年発病した条斑病を見て、微斑モザイク病は条斑病に変わる?という現象を観察することにもなった。加えて、年によっては圃場の植え付け作業を優先するあまり、ポット試験が最後の作業となり、11月に植え付けることがあった。このような年の翌春は発病せず、データが得られなかった。その後、腐敗が少なくポット栽培に適した品種の選定、10月中の植え付け、血清学的診断法の活用によって精度の高い評価が実施できるようになった。

試験の積み重ねによって、少しずつ改善され、ようやく見えてくることはあるものの、供試品種の選定や植え付け時期が重要な点は、現在明らかになった品種抵抗性の差異、媒介菌の生態を考えれば当然のことである。品種特性、土壌中に生息すると予測されたウイルス媒介者の動きについて、もっと深くイメージできていればと反省される。

## 4. 媒介者

TMMMVの媒介者は土壌に生息する *Olpidium brassicae* であることが証明されたのは、1997年であったが、薬剤防除試験の結果から1993年には媒介者が *O. brassicae* であろうと予測していた。また、本県では *O. brassicae* によって媒介されるタバコネクロシスウイルスによる「えそ病」について膨大な研究蓄積があった<sup>1)</sup>。にもかかわらず、媒介者の解明に年数を要したのは供試する *O. brassicae* の維持・増殖が思うようにできなかったことが最大の理由である。

*O. brassicae* は絶対寄生菌であるため、植物の根で増殖させる必要がある。そこで、寄主植物の選定と栽培条件を検討した。本病汚染土壌に各種植物を播種し、*O. brassicae* の寄生の有無を調査してみると、本菌の宿主として有名なレタス、タバコ、トマト、キャベツには

寄生が全く認められないか、ごくわずかであった（後に、本菌には寄生性の分化があることが明らかになった）。その後、多種植物への寄生性を検討し、最終的にはササゲやマクワウリを用いて、菌の単離あるいは増殖が行えるようになった（なお、マクワウリを用いる最大の理由は、自家採種が容易な点にある）。

本菌の増殖には温度と湿度などの環境条件も重要である。本菌は比較的低温性の菌であり、菌の発育には15～20℃が適しているが、栽培温度については20℃前後とし、植物の生育量を確保する必要があった。なお、*O. brassicae* 遊走子で伝播するため、多湿条件が増殖に好ましいと考えがちであるが、常時多湿は根痛みを生じやすいため、結果的には本菌の増殖に適しておらず、宿主の栽培に適した灌水量で十分に菌の増殖も図れることが明らかになった。以上のように、*O. brassicae* を増殖するには菌と宿主植物の生育のバランスを保つことが重要である。その他、*Pythium* 菌の混入を避けるなど、本菌を分離・増殖する上での細かな注意点は多々あるが、実際に携わって会得すべきことが多いと考えられる。なお、秋に媒介試験を実施するには、夏から菌の培養を進めておく必要がある。よって、随時20℃前後に設定できる空間が必要不可欠であり、TMMMVの媒介試験が成功したのはグロスキャビネットが整備された翌年であった。

さて、*O. brassicae* を用いた媒介試験を実施しながら、常に気になることがある。まず、本菌は純粋培養出来ないため、細菌など他の微生物が随伴している状態で試験を行っていることである。つまり目に見えない *O. brassicae* 以外の何者かがウイルスを媒介しているのではないかという不安が常にある。次に、供試している *O. brassicae* がウイルスフリーであると断定できない点があげられる。寄生根を磨砕して各種植物に汁液接種して Necrovirus の保毒の有無を確認することや、チューリップほか数種植物に遊走子接種して病変を観察してはいるものの、いかなるウイルスも保毒していないことを証明することは到底困難であると感じている。以上の2点は、今後の大きな宿題である。

#### おわりに

ウイルスの純化、血清診断、発生生態と防除、媒介者についての試験を行う過程で、感じたことについて述べた。露地作物で土壌伝染性のウイルス病を薬剤で制御しているという例は殆どない。チューリップの場合も同様に、徹底した圃場と品種の衛生管理<sup>1)</sup>、そして抵抗性品種の採用<sup>11)</sup> あるいは遅植えによる感染回避<sup>12)</sup> といった耕種的な防除対策が中心となる。持続的な安定生産を实

現するには、土壤中の媒介菌の動態を捉え、望ましい輪作法を考えるとともに、品種構成を含めた栽培様式そのものの変更も必要となろう。そのためには、知らなければならぬことが数多く残されている。条斑病については病原ウイルスの同定すらできていない。今後、急ぎ残された課題を明らかにするとともに、新しい切り口からの病害制御技術開発を常に意識して研究に取り組む必要があると考えている。

#### 引用文献

- 1) Milne, R. G., Garcia, M. L. and Grau, O. (2000) Genus *Ophiovirus*. In *Virus Taxonomy*, 627-631, Academic Press, New York.
- 2) 守川俊幸・大浦佳世子・山本孝彦・野村良邦・松本美枝子・名畑清信 (1995) 富山県で発生の認められたチューリップウイルス様症状について. 富山農技セ研報 16: 55-66.
- 3) Morikawa, T., Nomura, Y., Yamamoto, T. and Natsuaki, T. (1995) Partial characterization of virus-like particles associated with tulip mild mottle mosaic. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 61: 578-581.
- 4) 守川俊幸・築尾嘉章 (1996) チューリップ微斑モザイク症状の発生に及ぼす輪作作物、土壌の水分や薬剤処理の影響. 日植病報 62: 630.
- 5) 守川俊幸 (1997) チューリップの微斑モザイク症状 - 発生生態と防除 -. 植物防疫 51: 620-623.
- 6) 守川俊幸・築尾嘉章・夏秋知英 (1997) チューリップ微斑モザイク病 (新称) の媒介者. 日植病報 63: 504.
- 7) 守川俊幸・多賀由美子・築尾嘉章 (1998) チューリップ球根の貯蔵温度が微斑モザイク病の発生に及ぼす影響. 日植病報 64: 401-402.
- 8) 守川俊幸・多賀由美子 (2002) チューリップ条斑病 (新称) の媒介者. 平成14年度日本植物病理学会大会講演要旨予稿集.
- 9) 守川俊幸 (2002) チューリップ微斑モザイク病と条斑病 (仮称). 植物ウイルス病研究会レポート 6: 21-30.
- 10) 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.
- 11) 多賀由美子・守川俊幸・築尾嘉章 (2000) 微斑モザイク病に対するチューリップの品種間差異の比較. 日植病報 66: 146.
- 12) 多賀由美子・守川俊幸・築尾嘉章 (2001) 整畦植込

み機を用いた遅植えによるチューリップ微斑モザイク病の防除. 日植病報 67:160.

イク病の病徴発現. 園芸学会雑誌. 70:(別冊1) 401.

13) 棚橋 恵・山口吉博 (2001) チューリップ微斑モザ

---