ダイコンモザイク病ウイルスに関する研究

III. ハナヤサイ・モザイク・ウイルスの形態

栴 原 比 呂 志*

Hiroshi TOCHIHARA: Studies on the viruses of Japanese
radish mosaic diseases.

III. Morphology of cauliflower mosaic virus.

I. 緒 言

cauliflower mosaic virus group のウイルスについてはアメリカで Tompkins¹⁴⁾ が 1937 年に報告して以来、すでに多くの報告がある他、イギリス (Caldwell²³⁾), ソ連 (Vlasov¹⁵⁾), オーストラリア (Day²³⁾) からも報告されている。しかしわが国では 2~3 類似のウイルスについての報告はあるが、まだその存在が確認されていなかった。最近東京および千葉で採集した、カンラン、ヨウシュナタネおよびダイコンからハナヤサイ・モザイク・ウイルスと考えられるウイルスを分離し、電子顕微鏡で形態の観察を行なつたので報告する。

実験を行なうに当たり、飯田俊武室長ならびに小室康雄技官から絶えずご指導を戴いた。また電子顕微鏡の使用に際しては佐藤憲太郎氏にご協力を戴いた。深謝の意を表する。

II. 供試ウイルス

1960 年 4 月 東京都南多摩郡町田で採集したカンラン 2 株 (病徴は vein-clearing) とヨウシュナタネ 14 株 (病徴は vein-clearing, 萎縮, 黄斑が単独あるいは重複), '60 年 5 月千葉県検見川で採集したダイコン 2 株 (病徴は萎縮, 1 株はダイコン P ウイルス¹¹⁾) とハナヤサイ・モザイク・ウイルスの重複感染株であつたので、70°C 10 分の熱処理で P ウイルスを除いた) について、コカブ (金町), カンラン (葉深), ハクサイ (チャーフとチトセ), ササゲ (黒種十六), アカザ, タバコ (Bright yellow), *N. glutinosa* にそれぞれ汁液接種を行なつた。これらウイルス分離株はすべて寄主範囲および各種植物上での病徴 (チトセハクサイではわずかに異なつた) がよく一致した。またスライド法によ

る抗ダイコン P ウイルス血清¹²⁾ との反応試験はすべて陰性の結果であつた。カンラン 2 株, ヨウシュナタネ 2 株, ダイコン 2 株については、耐熱性の試験を行なつたが、70°C 10 分で活性が認められ、80°C 10 分で不活性化された。これらの結果から 18 株は同じウイルスによるものと判断し、本実験にはカンランから分離したウイルスをコカブに接種し、その葉汁を 75°C 10 分熱処理した処理汁液をカンランまたはコカブに接種して、継代保存したものを供試した。

接種試験はすべてガラス室 (最高 39°C, 最低 14°C, 通常 20~30°C) および "19°C" の低温ガラス室 (通常 18~20°C, 4~6 月の夜間は 14~18°C) で行なつた。接種は接種葉にカーボランダム粉末を振りかけ、接種液を脱脂綿に含ませて、こすりつけ接種を行なつた。

III. 供試ウイルスの諸性質

(1) 寄主範囲および病徴 罹病コカブ葉に水を加えて乳鉢ですりつぶし、その汁液を接種した。発病しなかつた植物からは、接種後 25~30 日を経てコカブに戻し接種を行なつたが、いずれも陰性の結果が得られた ( ) は品種、分数は発病株数/接種株数を示す)。

〔全身感染したもの〕

カンラン (葉深, 10/10, 8/10, 8/10): 接種後 10~20 日で新葉に vein-clearing を生ずる。日を経るにしたがい vein-banding を生ずることも多くなり、ときに葉の裏にいぼ状の enation や黄褐色のえそ斑点を生ずる。夜間 15~17°C に温度が下がる時期は、昼間 19°C の低温室でもまた 30°C 以上になるガラス室でも、明瞭に病徴がでて、その後病徴はよく持続するが、夜間 19~24°C までしか下がらなくなつた 6 月中旬~7 月のガラス室では、一度明瞭にでた病徴がまも

* 農林省農業技術研究所

なく軽くなり、のちに病徴がかくれた。しかし 19°C の定温室に移したところ、7~10 日で再び病徴があらわれた。いぼ状の enation は夜間の気温が 20°C を下らない時期ではほとんど生じなかつた。19°C の定温では一度はげしくでた病徴が、しだいに軽くなり、一部の個体では病徴がかくれたが、ほとんどの個体では軽い病徴が持続した (図版第 4 図)。

ハナヤサイ (房州早生, 13/15, 11/13): 接種後 10~20 日で最初新葉に vein-clearing があらわれるが、それに続いて葉柄や主に裏面の葉脈に沿つていぼ状の enation を生ずる。葉はやや萎縮し vein-banding やえそ斑点も生ずる。夜間 20°C を下らない高温の時期には、いぼ状の enation はほとんどあらわれず、vein-clearing や vein-banding の病徴も低温におけるより不明瞭であり、まもなく病徴がかくれる。温度と病徴の関係ははぼカンランの場合と同じである (図版第 5 図, 第 7 図)。

ダイコン (亀戸, 10/10, 10/10): 接種後 10~20 日で新葉に vein-clearing および vein-banding を生ずる。幼苗ではしだいに萎縮し枯死する株も多いが、一般にはかなり生育を続け、病徴が軽くなる株もある。しかしカンランで病徴がかくれるような高温 (平均気温 30~33°C, 最低気温 23~24°C) でも病徴はかれない。ときにえそ斑点を生ずる。

コカブ (金町, 10/10, 10/10, 10/10): 接種後 10~20 日で新葉に黄色を帯びた vein-clearing や黄色斑点を生ずる。ときにこの黄色斑点がえ所に転ずるほか、葉脈えそも生ずる。株はしだいに萎縮黄化し、まもなく枯死する。カンランで病徴がかくれるような高温でも、発病後日を経るにしたがい新葉は黄緑色となり、うちわ状あるいは棒状に萎縮することが多く、し

だいに弱つてまもなく枯死する。しかし低温に置かれた場合より生存期間は長くなる。さらに高い温度 (平均気温 30~33°C, 最低気温 23~24°C) でも病徴はかれない (図版第 6 図)。

ハクサイ (チーフー, 7/7): vein-clearing や mosaic を生ずることが多い、褐色や黒褐色の斑点や条のえそも生ずる。新葉がしだいに黄白色となつて萎縮しまもなく枯死する株が多い。

ハクサイ (チトセ, 4/7): vein-clearing や mosaic を生ずる。ときに褐色や黒褐色の斑点や条状のえそも生ずるが、チーフーハクサイより病徴が軽い。

〔感染しなかつたもの〕

ササゲ (黒種十六, 0/10), ソラマメ (房州早生, 0/5), タバコ (Bright yellow, 0/5), *N. glutinosa* (0/5), アカザ (0/5), シュンギク (0/7), キュウリ (落合節成, 0/6)。

(2) 耐熱性 罹病コカブ葉に 10 倍量の水を加えて乳鉢ですりつぶし、ガーゼでこして、その汁液を 1,500 G 5 分遠心分離し、その上清を内径 3 mm の薄肉試験管に入れ、所定温度の湯に 10 分間浸した後、水で冷した。この処理汁液と、対照として無処理汁液とを、コカブに接種して病原性をみた (第 1 表)。75°C 処理区では全株発病をみたが、70°C 以下の処理区と対照区とがほとんど同時に発病したのに比べ 75°C 処理区は 2 回の試験とも発病が 4~5 日遅れた。75°C 処理汁液ではウイルスの相当な部分が活性を消失しているものと推定される。

(3) 耐稀釈性 はげしい病徴を示したコカブ葉とカンラン葉とをそれぞれ磨砕搾汁し、1,500 G 5 分遠心分離した上清を原液とした。これに蒸留水を加えて所定の稀釈液を作り、コカブ (本葉 4~5 枚) に接種

第 1 表 耐 熱 性

	対 照	55	60	65	70	75	80°C	実 験 期 日	
1	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	0/10	'60	17/V
2	6/6			6/6	5/5	6/6	0/6	'60	16/VI

(注) 分数は発病株数/接種株数を示す。

第 2 表 耐 稀 釈 性

稀釈倍数		100	1,000	5,000	10,000	20,000	100,000	実 験 期 日	
供試植物	コ	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	0/5	'60	29/VI
	カ	5/5	5/5	5/5	4/5	1/5	0/5	'60	29/VI

(注) 分数は発病株数/接種株数を示す。

第3表 耐 保 存 性

保 存 期 間										実 験 期 日
0	2	4	6	8	11	15	20	25	35日	
5/5	5/5	6/6	6/6	11/11	6/6	6/6	5/5	5/5	0/5	'60 17/V

（注） 分数は発病株数/接種株数を示す。

して病原性をみた。結果は 20,000 倍まで感染が認められたが、カンラン葉汁では 5,000 倍液以上は 100 倍液に比べ発病がかなり遅れ、コカブでも同じ傾向がみられた。しかし同稀釈液ではコカブの方が発病がわずかに早い傾向がみられたので、カンランよりコカブ葉汁の方がウイルス濃度が高かったものと考えられる（第2表）。

（4）耐保存性 罹病コカブ葉に 10 倍量の蒸留水を加えて磨砕搾汁し、1,500 G 5 分遠心分離した上清を試験管に入れて 22°C に保存した。所定期間後、コカブに接種して病原性をみた。結果は 25 日まで病原性が認められた（第3表）。

IV. アブラムシによる伝染

健全カンランで飼育したダイコンアブラムシ（無翅胎生雌虫）と健全コカブで飼育したモモアカアブラムシ（無翅胎生雌虫）とを供試した。ダイコンアブラムシは 3 時間絶食させたのち、罹病カンラン葉上に約 20 分置き、それをカンラン（葉深）、ダイコン（亀戸）、コカブ（金町）に 1 株当たり 10~15 匹ずつ移して 1 日放置後、一部を健全カンランに移したのち、TEPP を散布して残りのアブラムシを殺した。モモアカアブラムシは 2 時間絶食させたのち、罹病コカブ葉上に約 10 分置き、それをコカブ（金町）とダイコン（亀戸）に 1 株当たり 5 匹ずつ移して 1 日放置後、一部を健全コカブに移したのち、TEPP を散布して残りのアブラムシを殺した。供試植物は 19°C の定温室においた。結果は第4表のごとく、すべて高率の伝染が行なわれ、発病株の病徴は汁液接種を行なった場合と同じであつた。保毒ダイコンアブラムシを健全カンラン上に 1 日おいたのちに移したカンラン（1 株 10 匹で 5 株）と保毒モモアカアブラムシを健全コカブ上に 1 日おいたのちに移したコカブ（1 株 5 匹で 5 株）とはともに発病しなかつた。

第4表 アブラムシによる伝染

植 物	カンラン	コカブ	ダイコン	実験期日
アブラムシ				
ダイコン アブラムシ	10/10	6/6	6/6	'60 17/VI
モモアカ アブラムシ		11/12	6/6	'60 1/VII

（注） 分数は発病株数/接種株数を示す。

第1図 純 化 操 作

第5表 純化ウイルスの病原性

稀釈倍数	10	100	500	1,000	5,000	10,000	50,000	実験期日
純化ウイルス	5/5	6/6	5/5	6/6		5/7	0/6	
対 照			6/6	5/5	4/6	4/5	0/5	'60 16/VI

(注) 分数は発病株数/接種株数を示す。

V. ウイルスの純化ならびにウイルス粒子の電子顕微鏡観察

(1) 純 化 罹病コカブ葉を室温(22~25°C)で第1図の操作により純化した。この操作で得られた沈澱物は無色半透明で、水に溶解すると蛋白光を帯びた白色を呈する。この濃縮ウイルス液を病原性の試験、電子顕微鏡による形態の観察、紫外線吸収の測定、抗血清との反応試験に用いた。

(2) 純化標品の紫外線吸収 第1図の操作で純化した標品を原汁量(葉重の1/2重量が搾汁されたものとした)に稀釈し、光電光度計(日立 EPU 2 型、液層 10 mm)で紫外線吸収を測定した結果、260 m μ に吸収の極大を示した(第2図)。

(3) 純化標品の病原性 純化ウイルス液を水で稀釈し(稀釈倍数は葉汁の1/2重量が搾汁されたものとした)、コカブ(本葉4~5枚)に接種して病原性をみた結果、高い病原性が認められた(第5表)。対照には純化操作の最初の操作である1,500 G 5分の遠心分離を行なった上清を用いた。

(4) 形 態 純化標品の稀釈液をコロジオン支持膜上に滴下し、真空中で乾燥させ、白金パラジウム合金で shadowing して検鏡したところ、大きさのそろつた一見球状の粒子が多数認められ、他の粒子状物や夾雑物はほとんど認められなかつた。この球状粒子の大きさは、polystyrene latex(径 188 m μ)*およびダイコン P ウイルス¹¹⁾と比較した結果、直径 10~13 m μ 位と考えられる。図版第1図と第3図の写真で、ウイルス粒子のあいだに直径約 50 m μ の塊りが多数みられるが、純度の高いウイルス標品の水溶液を拾数時間放置するとこのものが増えることと、一部の塊り(図版第1図)ではウイルス粒子が凝着している様子が観察されることから、これはウイルス粒子の集合体のように思われる。図版第2図のウイルス標品は純化操作で熱処理をはぶいた他はすべて図版第1図および

第2図 紫外線吸収

第3図のウイルス標品と同じ操作を同時に平行して行なつたもので、ウイルス粒子の塊りはほとんどみられなかつた、この標品は紫外線吸収、病原性、遠心分離の際の沈澱物の量、電子顕微鏡観察などからみて、純度がやや低いものと考えられた。

VI. 各種抗血清との反応

純化ウイルスを 0.85% NaCl 溶液で原汁量に稀釈したものと、罹病コカブ葉に2倍量の 0.85% NaCl 溶液を加えて磨砕搾汁し 10,000 G 15分遠心分離した上清とを、それぞれ抗原として、抗ダイコン P ウイルス血清¹²⁾、抗ダイコン R ウイルス血清¹³⁾(沈降反応での力価は $\times 2560$)、抗キュウリ・モザイク・ウイルス血清(クロロホルム処理、塩析、分画遠心で半純化したウイルス汁液を家兎に注射して得たもので、沈降反応での力価は $\times 2560$)のそれぞれ 10倍および 50倍の溶液に対し、等量混合法による沈降反応試験(37°C 2時間、ついで 5°C 24時間)を行なった結果はいずれも陰性であつた。

VII. 考 察

本ウイルスを Tompkins¹⁴⁾の cauliflower mosaic virus と比較すると、アブラナ科に広く病原性が強い

* 脚注 この monodisperse polystyrene latex は Dow Chemical Company の好意により、同社の Physical Research Laboratory からわけて頂いた。

こと、ハナヤサイでの病徴、またタバコやソラマメに病原性がないことなどで一致する。耐熱性は Tompkins のウイルスは 75°C で不活性化されるが、本ウイルスの不活性化温度はやや高い。しかし 75°C 処理区で発病が遅れることから、 75°C では相当部分のウイルスが不活性化されていることが推定され、したがって両者のちがいはわずかであると考えられる。耐稀釈性は供試植物や栽培環境が異なれば当然異なるが、本ウイルスはカンランやハナヤサイよりコカブにおいてより濃度が高く、汁液接種によつて発病しやすいようである。これが事実であれば、Tompkins のウイルスの耐稀釈性との差も当然予想される方向のずれであつて、同一ウイルスで起りうる範囲の変化と考えられる。耐保存性も両者でやや異なるが、これも重大なちがいでない。Pound⁷⁾ は cauliflower mosaic virus によるカンランの病徴を観察して、 16°C と 20°C では発病に日数を要するが、病徴は持続する、しかし 24°C と 28°C では病徴は現われてまもなくかくれることを報告した。本ウイルスはカンランでは 19°C の定温で病徴が軽くなるが持続し、最低気温がこれ以下であれば一般に病徴は明瞭で持続し、また最低気温が約 20°C で平均気温が $27\sim 30^{\circ}\text{C}$ では発病後まもなく病徴がかくれる。この点も cauliflower mosaic virus とほぼ一致するとみてよいと思われる。

cauliflower mosaic virus のアブラムシによる伝搬は、Tompkins がモモアカアブラムシ、ニセダイコンアブラムシ、ダイコンアブラムシの3種のアブラムシによつて伝搬されることを報告し、Caldwell²⁾ や Hamlyn⁵⁾ はアブラムシが短時間の吸汁で保毒し、また伝搬することを確かめている。さらに Severin¹⁰⁾ は詳細な実験を行ない、13種のアブラムシが伝搬すること、non-persistentであることを確かめた。本ウイルスも、ダイコンアブラムシとモモアカアブラムシとが短時間の吸汁で保毒し、伝搬した。そしていずれの場合も non-persistent であつた。turnip mosaic virus 群に属するダイコンPウイルスやダイコンRウイルスの抗血清と反応を示さなかつた点は Larson⁴⁾ の結果と一致した。以上の諸点からみて、本ウイルスは Tompkins の cauliflower mosaic virus と同じか、あるいはきわめて類似のウイルスであろうと考える。

わが国で報告された cauliflower mosaic virus 類似のウイルスとしては、西⁶⁾ のダイコンから分離したウイルス、大島⁷⁾ のワサビダイコンのモザイク病のウイルスがある。沢村⁸⁾ のイヌガラシのモザイク病のウイ

ルスは耐熱性は高いが、寄主範囲や汁液の耐保存性などで大きく異なる。これら諸ウイルスと本ウイルスとの類縁関係については今後の研究にまたねばならない。

Day³⁾ はオーストラリアで cauliflower mosaic virus を純化して電子顕微鏡観察し、ウイルス粒子は径 $50\text{ m}\mu$ の球状粒子であると報告している。この結果は本実験の結論と大きく異なる。これは両方のウイルスが現在の分類方法ではともに cauliflower mosaic virus 群に入るものでありながら、実は全く異なるということかも知れない。しかし一方図版第1図および第3図でみられる粒子の集合塊と考えたものが Day のウイルス粒子とほぼ同じ大きさであることから、Day がこの塊をウイルス粒子とみなしていることも考えられる。Day の純化標品の病原性がやや低いことからみて、あるいは凝着しない粒子の方を落してすてていることもあり得よう。この点の検討は今後にまたなければならぬ。

なおウイルス粒子の形態については、使用した電子顕微鏡の作動が不良なため、一応球状の粒子であるということ以上は不明であるが、ウイルス粒子相互の凝着状態などからみて、形態はむしろ多面体であろうと考えている。

VIII. 摘 要

東京都南多摩郡で採集したカンランのモザイク症状株から分離したウイルスについて実験を行ない、次の結果を得た。これと同種と考えられるウイルスは、ほかにダイコンとヨウシュナタネからも得られている。

(1) このウイルスはアブラナ科作物各種に病原性が強く、他の科の植物には病原性が認められなかつた。

(2) カンラン、ハナヤサイでは vein-clearing や vein-banding、いぼ状の enation、えそ斑点などの病徴があらわれ、これは低温では持続したが、最低気温が 20°C を下らない時期には、一度発現した病徴がまもなくかくれた。ダイコン、コカブでは mosaic や萎縮があらわれ、この病徴は高温においてもかくれることなく持続した。

(3) 耐熱性は $75\sim 80^{\circ}\text{C}$ 10分、耐稀釈性は 20,000 $\sim$ 10,000倍、耐保存性は 22°C で 25 $\sim$ 35日であつた。

(4) モモアカアブラムシとダイコンアブラムシとにより容易に伝搬され、non-persistent 型であつた。

(5) 熱処理 $\rightarrow$ クロロホルム処理 $\rightarrow$ 硫酸による塩析

および分画遠心の反復操作により、ウイルスを純化した。ウイルス粒子とみなされるものは、直径約 10~13 μ の球状粒子で多面体と推定され、この粒子の大きさは Day の報告と著しく異なつた。純化標品は 260 μ に紫外線吸収の極大があり、また接種試験で高い病原性を示した。

(6) 抗ダイコン P ウイルス血清、抗ダイコン R ウイルス血清、抗 CMV 血清とは反応しなかつた。

(7) 本ウイルスは諸外国で知られている cauliflower mosaic virus (Tompkins, 1937) と同じか、あるいはきわめて類似したウイルスであると考える。

(1960. 9. 10 受理)

引用文献

- 1) Broadbent, L. and Jinsley, T. W. (1953). *Plant. Pathol.* 2: 88~92.
- 2) Caldwell, J. and Prentice, I. W. (1942). *Ann. appl. Biol.* 29: 366~373.
- 3) Day, M. F. and Venables, D. G. (1960). *Virology* 11: 502~505.
- 4) Larson, R. H., Matthews, R. E. F. and Walker, J. C. (1950). *Phytopath.* 40: 955~962.
- 5) Hamlyn, B. M. G. (1955). *Plant. Pathol.* 4: 13~16.
- 6) 西泰道, 木村俊彦, 西沢正洋 (1959). 九州農試彙報 5: 359~368.
- 7) 大島信行, 田中一郎 (1954). 日植病報 18: 145~146.
- 8) Pound, G. S. and Walker, J. C. (1945). *Jour. Agr. Res.* 70: 255~278.
- 9) 沢村健三 (1957). 日植病報 22: 19.
- 10) Severin, H. H. P. and Tompkins, C. M. (1948). *Hilgardia* 18: 389~404.
- 11) 枋原比呂志 (1959). 日植病報 24: 287~295.
- 12) 枋原比呂志 (1959). 日植病報 24: 296~301.
- 13) 枋原比呂志 (1960). 日植病報 25: 20.
- 14) Tompkins, C. M. (1937). *Jour. Agr. Res.* 55: 33~46.
- 15) Vlasov, Y. I. (1959). *Proc. Lenin. Acad. agric. Sci.* 24: 43~44.

Summary

1. From cabbage and rape plants showing mosaic, collected in the vicinity of Tokyo during April 1960, several virus isolates were obtained; also from radish plants showing stunting. All of these virus isolates were tested, and found to be similar. The experiments reported here were made using a cabbage virus isolate.

2. Host range: (susceptible: showing vein-clearing, vein-banding, mosaic, and/or necrotic-spots): *Brassica rapa* var. *glabra*, *B. pekinensis* (two subvarieties), *B. oleracea* var. *capitata*, *B. oleracea* var. *botrytis*, and *Raphanus sativus* var. *acanthiformis*.

(Not susceptible): *N. tabacum*, *N. glutinosa*, *Vigna sesquipedalis*, *Vicia faba*, *Cucumis sativus*, *Chrysanthemum coronarium*, and *Chenopodium album*.

At high temperatures, symptoms on cabbage and cauliflower (vein-clearing, vein-banding, and/or warty enations) rapidly became masked. Symptoms on turnip and radish (vein-clearing, vein-banding and/or stunting), however, were conspicuous and persistent, without regard to temperature.

3. Properties: Dilution end-point in extracted leaf juice was 1: 20,000~100,000. Thermal inactivation point was between 75~80°C in 10 minutes treatment. Longevity of the virus in crude juice was between 25~35 days at 22°C.

4. Aphid transmission: The virus was readily transmitted by aphids, *Myzus persicae* and *Brevicoryne brassicae*. The mode of transmission was of non-persistent type.

5. Purification: Attempts were made to obtain a purified virus preparation, using diseased turnip leaves. The final procedure adopted was as follows; treatment at 64~65°C for 10 min. → shaking with chloroform → repeated salting-out by ammonium sulfate, and cycles of differential centrifuging. The final product in solution was almost colorless, and it showed a maximum absorption at 260 μ , and a high infectivity in inoculation tests (infective at a dilution of 10^4 of the final preparation in solution).

6. Electron microscopy: Examination of the purified virus preparation revealed the presence of uniformly-sized spherical particles of about 10~13 μ in diameter. The preparation was found to be almost free from other particulate matter. The shape of the particles was thought to be polyhedral rather than spherical, judged from their mode of aggregation.

7. Serological tests: Precipitation reaction between this virus and the antisera against radish P virus, radish R virus, or cucumber mosaic virus, turned out to be negative.

8. It is considered that this virus ought to be identified as the cauliflower mosaic virus described by Tompkins (1937), although the size of the virus particle was found to be different from that reported by Day et al. for the Australian cauliflower mosaic virus.

(National Institute of Agricultural Sciences, Nishigahara, Tokyo)

図版説明 1～3：ハナヤサイ・モザイク・ウイルス（第3図の白い円は径 $188\text{ m}\mu$ の latex），
 4：罹病カンラン（d）と健全カンラン（h），5：罹病ハナヤサイ，（e）：いぼ状の enation，
 6：罹病コカブ（黄斑を生じた病葉），7：罹病ハナヤサイ，（e）：いぼ状の enation，（n）：えそ