ウキクサに対する数種ウイルスの寄生性

小室 康雄*・岩 木 満 朗*

Yasuo KOMURO and Mitsuro IWAKI: Inoculation experiments of several plant viruses to duck-weed (*Spirodela polyrrhiza*).

I. 緒 言

著者らは前報³⁾において TMV 普通系統がウキクサ上で増殖することを明らかにした。すなわち、ウキクサに対しカーボランダム法で汁液接種すると、日時の経過とともに検出できるウイルス量が多くなる、またウキクサに対する接種源濃度を 10 万倍希釈にしてもわずかに感染をおこし、ウキクサにおける接種後 20 日目の希釈限界は 1 万倍内外であつた。そして TMV を接種したウキクサの接種葉汁液中のウイルスは抗 TMV 血清により中和された。また、接種した葉片を切り離した未接種葉片からも、TMV が検出され、全身感染しているものと思われた。さらにウキクサに対する接種方法は普通のカーボランダム汁液接種法のほかに、小びん中に接種源とカーボランダムとウキクサを入れ強く短時間振とうしてもよいことなどがわかつた。

本論文では TMV の他の系統およびその他数種ウイルスのウキクサ (*Spirodela polyrrhiza*) に対する寄生性の有無を検討した。実験は 1963 年 10 月から 1964 年 6 月の間に農業技術研究所で行なつたものである。

II. 材 料 と 方 法

供試ウイルスは、TMV の系統としては TMV-黄斑系 (1963 年にトマトから分離) と TMV-トマトえそ系 (1963 年にトマトから分離) を用い、その他のウイルスとしては、Cucumber mosaic virus (CMV), Alfalfa mosaic virus (AMV), Turnip mosaic virus (TuMV), Watermelon mosaic virus (WMV), Potato virus X (PVX) を用いた。PVX は 1963 年に男爵ジャガイモから分離した mottle 系である。

ウキクサに対する接種方法は前報において示した振とう法、すなわち、ウキクサと接種源とカーボランダムを小びんに入れ、30 秒間強く振る方法を用いた。

また、ウキクサからのウイルスの回収方法は、接種

したウキクサに生体重の 10 倍の 0.05% KCN 添加リン酸緩衝液を加えて磨砕し、その汁液を接種する方法を用いた。検定は、各ウイルスに対する検定植物 (局部病斑を生ずる植物) に対葉法あるいは半葉法によって汁液接種し、その局部病斑数をとつた。これら接種には、すべて常法によるカーボランダム汁液接種法を用いた。

III. 実 験 結 果

1. TMV の黄斑系、トマトえそ系についての実験

(1) TMV-黄斑系のウキクサに対する接種試験

TMV-黄斑系をウキクサに接種し、10、20 日目のウキクサをインゲン (大手亡) に対葉法により接種し、その局部病斑数によつて、ウキクサ体内のウイルス濃度を調べた。その結果を第 1 表に示す。ウキクサに対する接種源としては、本ウイルスに感染して明瞭なモザイク症状を示しているタバコ葉を用い、その生体重の 10 倍のリン酸緩衝液 (pH 7.0) を添加、磨砕した液を用いた。接種源濃度は、インゲン 1 葉当りに I 区-117.8; II 区-162.7 の局部病斑を生じた。ウキクサからのウイルス回収時 (ウキクサへの接種後 10、20 日目) に平行して接種した対照区としては、TMV-黄斑系罹病トマト葉の 100 倍液を用いた。

第 1 表からみられるように、TMV-黄斑系もウキクサ体内における濃度は低いけれども、増殖しているものと推定される。接種したウキクサにおける病徴は TMV-普通系と同じく発現しなかつた。

(2) TMV-トマトえそ系のウキクサに対する接種

第 1 表 TMV-黄斑系のウキクサに対する接種試験

区	接種後日数	試 験 区	対 照 区
I	20 日	52.6	742
II	10	4.0	>1500
	20	11.2	>1500

* 農林省植物ウイルス研究所

試験 TMV-トマトえそ系をウキクサに接種し、10、20 日目のウキクサ体内の本ウイルス濃度を *Nicotiana glutinosa* で半葉法により調べた。その結果を第2表に示す。ウキクサに対する接種源は、本ウイルスに感染したトマト葉の10倍液を使用し、I区、II区ともに *N. glutinosa* の半葉に200以上の局部病斑を生じた。

第2表の結果から、TMV-トマトえそ系もウキクサ体内で増殖することがうかがわれる。I区において、10日から20日の間に濃度が低下しているが、この原因は明らかでない。病徴は黄斑系と同じく発現しなかつた。

2. CMV, AMV, TuMV, WMV のウキクサに対する接種試験

一般に寄生性の比較的広いといわれる CMV, AMV についてウキクサに対する寄生性を検討するため、数回にわたってウキクサに対し接種を行ない、接種後20日目におけるそれぞれのウイルスの回収を行なったが結果はいずれも陰性で、CMV, AMV はウキクサ上で増殖しないものと判断された。

つぎに TuMV, WMV について調べた。TuMV ではごくまれに接種後20日目のウキクサから微量のウイルスが検出されることがあつたが、大部分の試験区で回収に成功せず、ウキクサ上で増殖しているものとは判断されなかつた。WMV も接種後20日目のウキクサからのウイルスの回収に成功せず、ウキクサに対する寄生性を認めることができなかった。

3. PVX のウキクサに対する接種試験

(1) ウキクサにおける PVX の経時的濃度比較

PVX をウキクサに接種したのち、3、5、10、15、20 日目のウキクサ体内のウイルス濃度を、センニチコウを用い対葉法によつて調べた。その結果を第3表に示す。ウキクサに対する接種源としては、PVX 罹病タバコ葉の10倍液を使用した。接種源濃度はセンニチコウ1葉あたり、I区-50.5、II区-30.3の局部病斑を生じた。接種したウキクサから PVX の回収を行なう際、平行してセンニチコウに接種を行なつた対照区では PVX 罹病タバコ葉の50倍液を使用した。

第2表 TMV-トマトえそ系のウキクサに対する接種試験

区	接種後日数	
	10 日	20 日
I	174.2	132.1
II	19.6	46.5

実験区により若干のふれがみられるが、接種後日時の経過とともに回収されるウイルス量が多くなり、PVX がウキクサ体内で増殖することは明らかである。I区の3、5、10日の濃度が低いが、これは接種したウキクサを磨砕する際に0.05% KCN を添加せず、0.05M リン酸緩衝液を使用したためと思われる。また、II区において10日から20日に濃度が低下しているがこの原因については明らかでない。

(2) PVX を接種したウキクサにおける病徴の有無と PVX の濃度の比較 PVX を接種した場合、ウキクサ上に病徴が発現してくる。その病徴は、vein-clearing であり、激しい場合には葉片の2/3位まで退緑する。そして病徴はすべての葉片に現われるのではなく、接種直後に現われる1~2個の葉片にのみ発現する。ウキクサにおける潜伏期間は約7日である。

PVX を接種した後、病徴の発現したウキクサと病徴の発現しないウキクサにおける PVX 濃度を、センニチコウを用い、対葉法によつて調べた。その結果を第4表に示した。ウキクサに対する接種源としては PVX 罹病タバコ葉の10倍液を使用した。回収方法はI区の場合は、接種後11日目のウキクサに生体重の10倍の0.05% KCN 添加リン酸緩衝液を加え、磨砕し、その汁液を接種した。II区の場合は、接種後22

第3表 PVX のウキクサに対する接種試験、ウキクサにおける PVX の経時的濃度比較

接種後日数		3	5	10	15	20
I	10 倍対照区	0.3 189	0.1 89	0.4 59	24.2 172	33.2 119
	100 倍対照区	0.4 136	0.1 83	0.4 24	1.7 132	24.1 80
II	10 倍対照区	1.4 69	4.7 87	87.2 127	— —	15.8 84
	100 倍対照区	0 33	0.4 69	3.2 61	— —	1.1 35.5

第4表 PVX を接種したウキクサにおける病徴の有無とそのウイルス濃度の比較

区	病徴の有無	
	有	無
I	127	1.3
II	63	2.5

日目のウキクサを使用した。

第4表にみられるように、病徴を有する個体におけるウイルス濃度が、病徴を有しない個体におけるウイルス濃度よりはるかに高かった。

これは、病徴を発現していない個体が、全く感染していないか、あるいはそこにおけるウイルス濃度が非常に低いためではないかと思われる。この試験によつて上記ウキクサ上の病徴は PVX によるものと推定してよいものと思われる。

(3) 接種後 20 日目のウキクサからの PVX 粒子の観察 PVX 接種後 20 日目の病徴を示したウキクサから dip 法による電顕像で粒子を観察したところ、500m μ 内外のひも状粒子が多数みられた。一方健全なウキクサではこれら粒子は全くみられなかつた。

(4) 抗 PVX 血清を用いての実験 PVX を接種し、病徴を発現したウキクサからの搾汁液に対し、スライド法により抗 PVX 血清との凝集反応を試みたところ、明らかな凝集反応が認められた。

4. PVX と TMV のウキクサに対する重複接種試験

前記3にあげた実験から PVX がウキクサに対し寄生性を持つことが明らかになった。また前報³⁾および本報1の実験から TMV の3系統もウキクサに寄生性のあることが確認された。TMV によつてはウキクサ上になんら病徴がみられなかつたが、PVX では vein-clearing がみられた。タバコ、トマトなどでは TMV, PVX に重複感染するとえそ症状の現われること¹⁾⁴⁾⁵⁾が明らかになっているので、ウキクサがこの両ウイルスに重複感染した場合の病徴を確認するため、以下の実験を行なつた。

PVX と TMV を常法でウキクサに重複接種し、その病徴の観察を行なつた。接種後7日目頃から vein-clearing の病徴が認められたが、とくにえそ症状などの特異の病徴はみられなかつた。この病徴は前記 PVX を単独接種してみられるそれと同じであつた。

つぎに、これらウキクサ上で TMV, PVX の両ウイルスが共に増殖しているかどうかを確認するため以下の実験を行なつた。すなわち TMV, PVX を接種し、接種後 10, 20 日目のウキクサにおける各ウイルス濃度を、センニチコウとインゲン(大手亡)を用いて対葉法で調べた。その結果を第5表に示した。ウキクサに対する接種源は、TMV 罹病タバコ葉、PVX 罹病タバコ葉、水をそれぞれ 1, 1, 10 の比で混合磨砕した液を用いた。その接種源濃度は、TMV では I 区 (*N. glutinosa* で検定)-200 以上、II 区 (大手亡で検

第5表 PVX と TMV のウキクサに対する重複接種試験

区	接種後数日	ウイルス名	試験区	対照区
I	20日	T M V	56.8	>200
		P V X	38.0	53.9
II	10	T M V	34.1	155
		P V X	11.7	54
	20	T M V	170.1	56
		P V X	41.2	124

定)-1500 以上の局部病斑を生じた。一方、PVX についてはセンニチコウで検定したところ、I 区-45.8, II 区-500 以上の局部病斑を生じた。ウキクサからのウイルス回収の際に平行して接種した対照区としては、TMV ではタバコのモザイク葉の 5,000 倍液を、PVX ではタバコにモザイクを生じた葉の 50 倍液を用いた。第5表から明らかなように供試ウキクサ上では PVX と TMV がともに増殖していることは明らかである。

IV. 考 察

TMV-普通系がウキクサ体内で増殖することは、前報³⁾で明らかになったが、さらに本実験によつて TMV の他の系統、すなわち TMV-黄斑系、TMV-トマトえそ系も同じくウキクサ体内で増殖することが明らかになった。しかし、ウキクサ体内におけるウイルス濃度は普通系に比べると劣つていた。病徴は普通系と同じく発現しなかつた。これらの実験によつて、TMV がウキクサ体内で増殖すること、すなわち TMV がウキクサに対し寄生性のあることが一層確実となつた。

一般に寄生性が広いといわれている CMV と AMV, さらに TuMV, WMV についても、ウキクサに対し数回汁液接種試験を行なつたが、寄生性を確認できなかった。したがつてこれらのウイルスはウキクサ体内において増殖できないものと推定される。

一方、前述の各種実験から PVX がウキクサ体内で増殖することも明らかになった。PVX の寄主として従来知られているナス科植物、アカザ、センニチコウ、さらにクリムソン・クローバー (*Triforium incarnatum*⁶⁾), レッド・クローバー (*Triforium pratense*²⁾) などのほかに、ウキクサも加える必要があると思う。PVX の寄主として単子葉植物ではこれが初めてであり、この結果から PVX が単子葉植物にも寄生する可

能性も十分あるものと推定される。

また、TMV ではウキクサに寄生しても病徴を発現しなかつたが、PVX により病徴が現われた。病徴の現われた個体は、接種しても病徴を示さないものに比べてウイルス濃度ははるかに高いことは、観察した vein-clearing などの病徴が PVX によるものであるとする1つの根拠になるものと考えられる。しかし、接種したウキクサの1個体のすべての葉片に病徴を現わさない点などについては今後さらに調べる必要がある。これらの結果から、TMV と PVX がそれぞれウキクサ上で増殖することが確かめられたが、これらウイルスを同時に重複接種しても、両ウイルスがそれぞれウキクサ上で増殖し得ることも明らかになった。

V. 摘 要

1. TMV-黄斑系および TMV-トマトえそ系(ともに1963年トマトから分離)はウキクサ体内で TMV-普通系と同様増殖することが明らかになった。しかしウキクサ上にはなんら病徴は認められなかつた。

2. CMV, AMV, TuMV, WMV はウキクサに対し数回の接種試験を行なつたが、寄生性は認めることができなかった。

3. PVX がウキクサ上で増殖することが以下の実験により明らかとなつた。

i) ウキクサに対し接種すると、接種後日時の経過とともに検出されるウイルス量が多くなつた。

ii) ウキクサに PVX を接種すると接種後1週間内外で多くの個体に vein-clearing の病徴が現われた。その病徴のある個体でのウイルス濃度は病徴のない個体のウイルス濃度よりはるかに高かつた。

iii) 病徴のある個体から電子顕微鏡(dip法)によつて粒子を観察したところ約 500 m μ のひも状粒子が多くみられた。一方、健全ウキクサについてはこれら粒子は全く観察されなかつた。

iv) 病徴のあるウキクサからの搾汁液は、抗 PVX 血清とスライド法により明らかな凝集反応を示した。

4. TMV-普通系と PVX をウキクサに重複接種したところ、両ウイルスともウキクサ体内で増殖していることが明らかになった。そして病徴は PVX を単独に接種した場合とほぼ同様であつた。

(1964. 8. 8 受理)

引 用 文 献

1. Blood, H. L. (1928). *Phytopathology* 18 : 311.
2. Goth, R. W. and Wilcoxson, R. D. (1961). *Ibid.* 51 : 132~133.
3. 小室康雄・岩木満朗 (1964). *日植病報* 29 : 48~51.
4. Stover, W. G. (1928). *Phytopathology* 18 : 154.
5. Vanterpool, T. C. (1926). *Ibid.* 16 : 311~331.
6. Willis, C. B. and Larson, R. H. (1960). *Ibid.* 50 : 659.

Summary

Multiplication of ordinary strain of tobacco mosaic virus (TMV) on the duck-weed (*Spirodela polyrrhiza*) was reported in the preceding paper (Komuro and Iwaki 1964). This paper deals with the results of inoculation experiments of several plant viruses and virus strains to the duck-weed.

1. Yellow strain and tomato streak strain of TMV, both isolated from tomato in 1963, were also proved to multiply on the duck-weed without symptom as in the case of ordinary strain of TMV.

2. On the other hands, cucumber mosaic virus, alfalfa mosaic virus, turnip mosaic virus, and also watermelon mosaic virus were not able to multiply on the same weed even in repeated inoculation experiments.

3. Potato virus X (PVX) was ascertained to multiply on the duck-weed from the following experimental results.

i) Quantity of PVX recovered from the inoculated duck-weeds on the 3rd day and 5th day after inoculation was small, but it became larger on the 10th and 20th day after inoculation.

ii) Vein-clearing sometimes appeared on the fronds of inoculated duck-weed, and the virus was recovered in larger quantities from the fronds showing vein-clearing than from those having no symptoms.

iii) Particles, about 500 m μ in length, were observed in the juice of fronds inoculated with PVX under an electron microscope, while no such particles were recognized in the juice of healthy

fronds.

iv) Juice from duck-weed having vein-clearing symptom showed the precipitation reaction when it was mixed with PVX-antiserum.

4. Ordinary strain of TMV, and PVX both multiplied on the duck-weed, when these two viruses were inoculated at the same time, and the fronds of duck-weed showed vein-clearing, as in the inoculation with PVX alone.

(National Institute of Plant Virus Research Nishigahara, Tokyo)

文 献 紹 介

数種ウイルスの感染力におよぼす磷酸塩とほう酸塩の影響

Tomlinson, J.A.: Effect of phosphate and borate on the infectivity of some viruses. Nature 200 (4901): 93-94, 1963.

これまで各種ウイルスの純化に関する実験を行なってきたが、純化に用いる buffer の種類が病原性のある純化ウイルスを得る上で大きな影響をおよぼしていることがわかった。たとえば、cucumber mosaic virus では phosphate buffer を用いて純化に成功したが、lettuce mosaic virus の場合は phosphate buffer では純化に失敗し、borate buffer を用いることにより成功した。そこで数種ウイルスの純化に phosphate buffer と borate buffer を用

い、ウイルスの感染力におよぼす影響を比較する実験を行なった。用いたウイルスは球状ウイルスとして、cucumber mosaic virus と arabis mosaic virus を、桿状ウイルスとして lettuce mosaic virus, turnip mosaic virus, potato virus X であった。実験の結果、球状ウイルスではどちらの buffer を用いても高い感染力を持つ純化ウイルスを得ることができたが、桿状ウイルスでは borate buffer を用いたときのみ高い感染力を有していた。phosphate buffer を用い純化する操作で、桿状ウイルスが感染力を失うのは butanol 処理後であった。しかしこのような処理で感染力を失った標本を電子顕微鏡で観察したところ正常な形と大きさを持った粒子が多数見られた。(土崎 常男)