タバコ巻葉病ウイルスによるスイカズラ (*Lonicera japonica* Thunb.) の葉脈黄化症状*

尾崎武司**・小島博文***・井上忠男**

Takeshi OSAKI**, Hirofumi KOBATAKE*** and Tadao INOUE** : Yellow Vein Mosaic of Honeysuckle (*Lonicera japonica* Thunb.), a Disease caused by Tobacco Leaf Curl Virus in Japan.

Abstract

A study was made of yellow vein mosaic of honeysuckle (*Lonicera japonica* Thunb.), characterized by yellow net symptoms which are often accompanied by enations along veins on the undersurface of the leaves.

The disease was not mechanically transmissible, but was transmitted by a whitefly, *Bemisia tabaci* Gen. and by grafting the diseased plant to healthy honeysuckle and to five solanaceous species. The symptoms that appeared on some solanaceous plants were very similar to those induced by infection with tobacco leaf curl virus (TLCV). The disease was transmitted from artificially infected tomato to healthy honeysuckle which developed yellow vein mosaic indistinguishable from the original diseased honeysuckle.

Electron microscopic examination of a partially purified virus preparation from diseased, but not from healthy leaves, showed the presence of polyhedral particles, about 18 nm in diameter, that usually occurred as paired structures, 15-20 × 25-30 nm, in negatively stained preparation. Virus-like particles were found in nuclei of phloem cells of infected tissue in ultrathin sections. The changes in the nuclei including segregation of the granular and fibrillar regions of the nucleoli and the appearance of fibrillar rings were also found.

In agar gel diffusion tests, partially purified virus preparations from naturally infected honeysuckle reacted positively with antiserum against TLCV (NL-3 isolate), although spurs were formed with the homologous antigen. They did not react either with antisera to arabis mosaic or cucumber mosaic viruses.

The results obtained here suggest that the causal agent of yellow vein mosaic disease of honeysuckle is a virus identical to or a strain of TLCV which is known to induce yellow dwarf disease on tomato and leaf curl disease on tobacco in Japan. An aleyrodid, *Bemisia lonicerae* Takahashi, a common species in Japan, is usually found on naturally grown honeysuckle and may be a vector of TLCV.

(Received November 20, 1978)

緒 言

スイカズラ (*Lonicera japonica* Thunb.) の葉脈黄化,あるいはモザイク症状は接木で伝搬される病害

として古くから報告されているが^{2,15,23}、汁液接種ができないこと^{2,15}から、病原ウイルスの諸性質はほとんど知られていない。一方、トマト黄化萎縮病の病原ウイルスは寄主範囲、病徴⁸、伝搬様式⁹、粒子

* 本報告の要は昭和51年度植物病理学会関西部会で発表した。

** 大阪府立大学農学部 College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka, Japan

*** 奈良県農業試験場 Nara Prefectural Agricultural Experiment Station, Kashiwara, Nara, Japan.

形態¹⁰⁾、血清反応¹¹⁾などからタバコ巻葉病ウイルス (tobacco leaf curl virus, TLCV) と同じか、ごく近縁のものと考えられているが、発生生態に関してはなお不明な点が多い。

筆者らはトマト黄化萎縮病の伝染源植物の探索のために、ウイルス様症状を呈する数種の植物からタバココナジラミ (*Bemisia tabaci* Gen.) 接種により TLCV の分離を試み、スイカズラの葉脈黄化株から TLCV を分離した。また、スイカズラに普通に寄生する *Bemisia lonicerae* Takahashi (スイカズラコナジラミ—宮武頼夫氏仮称) も TLCV をよく伝搬し、新しい媒介虫であることが判った。本報はこれらの結果について述べるものである。

なお従来、*B. tabaci* の和名はワタコナジラミとして使用されていたが、宮武 (私信) はタバココナジラミとするよう提唱しているので、以後はこの和名を用いたい。

本研究を行なうにあたり、コナジラミの同定をしていただき、有益な御助言を賜った大阪市立自然史博物館研究員宮武頼夫氏に深謝する。

実験材料および方法

コナジラミ伝搬試験に用いた病スイカズラは1976年、奈良県宇陀郡で採集し、鉢植えとして温室内に保存したものである。また、トマト黄化萎縮病株は1975年奈良県宇陀郡で採集した株 (研究室保存記号 NL-3)、ならびに1976年和歌山県橋本市で採集した株 (同, W-1) であり、いずれもトマトに継代接種して保存したものをを用いた。

汁液接種は 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0, 0.5% 亜硫酸ナトリウムを含む) を用いてカーボランダム法で行なった。伝搬試験に用いた *B. tabaci* は前報⁸⁾と同じ由来の虫を健全ナス上で継代飼育したもので、*B. lonicerae* は奈良県宇陀郡で採集した蛹から羽化した成虫を健全スイカズラ上に移して3代飼育し無毒化したものである。接種は前報⁸⁾に準じて行なった。各種の接種試験に用いた検定植物は温室内で育て、適宜殺虫剤散布を行なった。

ウイルス粒子の電顕 (JEM 100U) 観察に用いた試料は TLCV の純化法¹⁰⁾に準じて、病スイカズラから部分純化したものである。超薄切片像の電顕観察はスイカズラ病葉の細片を6%グルタルアルデヒドと1%四酸化オスミウムで2重固定し、エタノール脱水後、エポン樹脂に包埋し、薄切後酢酸ウラニルとクエン酸鉛で2重染色したのについて行なった。

血清学的試験は抗血清として TLCV¹¹⁾ (黄化萎縮病 NL-3 分離株)、CMV (ペポカボチャ分離株) および arabis mosaic virus (Dr. Hollings より分譲) 各抗血清を、抗原として病スイカズラからの部分純化ウイルス液を用い、ミクロプリシピティンテストと寒天ゲル拡散法により行なった。寒天ゲルは0.5%粉末寒天、0.1% NaNO₃、0.85% NaCl の組成のものをを用い、抗原、抗体間の距離は5mmとし、室温に置き反応を調べた。

実験結果

1. 寄主範囲と病徴 罹病スイカズラは鮮明な葉脈黄化あるいは黄斑モザイク症状を呈し、葉裏には葉脈の一部の濃緑化と盃状小葉の増生がみられた (Plate I, 1-3)。

罹病葉粗汁液を用いた汁液接種試験で供試ウイルスは8科18種の植物 (Table 1 に示す植物と *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, センニチコウ) に感染しなかったが、*B. tabaci* による接種ではトウガラシを除いて供試したすべてのナス科植物に感染がみられた (Table 1)。また、健全スイカズラへは接木接種により供試5個体全部に、*B. tabaci* 接種により8個体中3個体に原寄主と同じ病徴が現われた。おもな植物での症状は下記のとおりである。

トマトでは接種後15-20日目に葉の黄化症状がみられ、その後葉脈に沿った部分は濃緑色となり、脈間は黄化して葉縁は葉裏に巻き込みちりめん状を呈し、株は萎縮して典型的な黄化萎縮症状となった。 (Plate I, 4)。タバコ各品種では接種後20日目頃より葉に葉脈透化症状がみられ、その後、縮葉、巻葉、ちりめん状の症状となった。このような葉の葉裏の葉脈の一部は濃緑色となってやや肥大したが、盃状小葉の増生にはいたらなかった。また、病株は萎縮して茎葉の屈曲もみられた (Plate I, 5)。 *Nicotiana glutinosa* と *Datura stramonium* でも縮葉、巻葉などの症状がみられ、前者ではちりめん状の縮葉が、後者では脈間の黄化症状がとくに顕著であった (Plate I, 6)。ナスでは病徴が認められなかったが、トマトへの戻し接種の結果、潜在感染していることが確かめられた。トウガラシとナス科以外の供試植物には感染が認められなかった。以上の寄主範囲と病徴はトマト黄化萎縮病の和歌山分離株⁸⁾のそれに近いものであった。なお、和歌山分離株を *B. tabaci* により健全スイカズラに接種した結果、10株中2株に採集株と同じ症状が現われた。

Table 1. Transmission test of the virus from honeysuckle to various plant species by the whitefly, *Bemisia tabaci*.

Plants tested	symptoms	virus recovery
<i>Nicotiana tabacum</i> cv.		
Bright yellow	Lc, St	..
Samsun NN	Lc, St	+
Xanthi	Lc, St	+
Xanthi nc	Lc, St	..
<i>N. glutinosa</i>	Lc, St	+
<i>Datura stramonium</i>	Vc, Y, Lc	+
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Y, Lc, St	+
<i>Solanum melongena</i>	0	+
<i>Capsicum annuum</i>	—	—
<i>Lonicera japonica</i>	Vc, M	..
<i>Glycine max</i>	—	—
<i>Vigna sesquipedalis</i>	—	—
<i>Phaseolus vulgaris</i>	—	—
<i>Cucumis sativus</i>	—	—
<i>Citrullus vulgaris</i>	—	—
<i>Zinnia elegans</i>	—	—
<i>Beta vulgaris</i>	—	—
<i>Raphanus sativus</i>	—	—

Lc : leaf curling, St : stunting, Vc : vein clearing, Y : yellowing, M : mosaic, 0 : no symptom
 — : negative + : positive, .. : not tested

2. *Bemisia lonicerae* による伝搬 病スイカ
 ブラ上で24~48時間放飼して獲得吸汁させた *B. lonicerae* 20~25頭を、本葉3~4葉期の検定植物に移して24~48時間放飼して接種吸汁させ、供試ウイルスの伝搬の有無を調べた。結果は Table 2 に示すとおりである。

表から明らかなように、植物の種類により伝搬率に多少の差は認められたが、*B. lonicerae* は供試ウイルスを *B. tabaci* と同程度に伝搬する能力をもつことが判った。また Table 3 に示すように *B. lonicerae* は TLCV (NL-3 分離株) もかなり高率に伝搬した。

以上の結果から *B. lonicerae* はトマト黄化萎縮病の新しい媒介虫であることが判明した。

Table 2. Transmission of the virus from honeysuckle to some species of solanaceous plants by the whitefly, *Bemisia lonicerae*

Plants tested	Transmission
<i>Nicotiana tabacum</i> cv.	
Samsun NN	4/10*
Xanthi nc	2/10
<i>N. glutinosa</i>	2/5
<i>Datura stramonium</i>	3/5
<i>Lycopersicon esculentum</i>	5/10

* No. of infected plants/No. of inoculated plants.

Table 3. Transmission of the NL-3 isolate of TLCV by the whitefly, *Bemisia lonicerae*.

Plants tested	No. of insects per plants	Aquisition access time	Inoculation access time	Transmission
<i>Lycopersicon esculentum</i>	25 - 30	48 ^h	48 ^h	5/15*
<i>Datura stramonium</i>	25 - 30	24	24	8/15

* No. of infected plants / No. of inoculated plants.

3. 電顕観察 1) 粒子形態 スイカズラ病葉からの部分純化ウイルス試料を1%グルタルアルデヒドで1時間固定後、2%酢酸ウラニルで逆染色して電顕観察したところ、TLCV¹⁰⁾で観察されたと同様な形態の直径約15~20nmの小型球形粒子が多数認められた。これらの粒子はしばしば対に結合した状態でみられ、対粒子の巾は15~20nm、長さは25~30nmであった(Plate I, 7)。なお健全スイカズラからの濃縮液中にはこのような粒子は検出されなかった。

2) 超薄切片像 野外で採集したスイカズラ病葉の超薄切片観察では、師部細胞の核内に、健全植物試料には見出されない径約15~20nmの小球形粒子の集塊が認められた(Plate I, 8-9)。これらの粒子は、その直径より部分純化試料中にみられる対粒子が、あらゆる向きで切断されたものと考えられた。このような核内の仁はしばしば肥大し、仁の構成成分は電子密度の高い顆粒状部分と、やや低い繊維状部分に分離している像が得られた(Plate II, 10-16)。

4. 血清学的試験 供試したNL-3抗血清はスイカズラ病葉からの部分純化ウイルス液(OD₂₆₀≐2)とマイクロプリシピティンテストで16倍、寒天ゲル内拡散法で4倍希釈まで反応した。寒天ゲル内拡散法で、供試ウイルスはNL-3と同様に明瞭な沈降帯を生じたが、両ウイルス間にはspurを生じた。以上の結果より供試ウイルスはNL-3と血清学的な性質は多少異なるが、両者間には血清学的関連があることが確かめられた。なお、arabis mosaic virus および CMV の各抗血清と供試ウイルスとの間には血清反応は認められなかった。

考 察

トマト黄化萎縮病は現在までに近畿、中国、四国地方での発生が確認されており、地域によっては大きな被害が認められている⁸⁾。また、タバコ巻葉病は盛岡以南の各地で発生し⁵⁾、年により集団発生する例も報告されている^{20, 24)}。両病の病原はともに tobacco leaf curl virus (TLCV) と考えられている^{8, 9, 10, 11)}。

TLCV はとくに東南アジア、アフリカ、南米などの熱帯地方でタバコ、トマト、トウガラシなどに多発し、大きな被害をもたらしている。これらの地方ではTLCVの伝染源植物として *Ageratum conyzoides*^{13, 14, 17)}, *Vernonia cinerea*^{7, 17)}, *Crotalaria juncea*^{13, 14)}, *Euphorbia hirta*¹⁴⁾, *Sida shombifolia*

^{14, 17)}, *Withania somnifera*¹²⁾などの植物が挙げられているが、スイカズラが伝染源植物であるとの報告はない。

スイカズラの葉脈黄化症状がウイルス病であることを最初に報告したのは Woods ら²³⁾で、その後 Corp²⁾と Schmelzer¹⁵⁾は病原ウイルスが接木で伝搬されることを確認したが、病原ウイルスの同定には至っていない。Teplonkhara¹⁹⁾はスイカズラが arabis moaic virus の新しい寄主植物であることを報告しているが、Schmelzer¹⁵⁾はスイカズラ病葉からの汁液接種は不可能であるとしている。本報告でも数種植物への汁液接種試験の結果は陰性であり、arabis mosaic virus 抗血清との間には血清反応が認められなかったので、本症状には arabis mosaic virus は関与していないものと考えられる。

本報のウイルスはタバココナジラミ伝搬性であること、タバコ類には特徴ある巻葉、萎縮などの症状を、トマトには典型的な黄化萎縮症状をあらわすこと、粒子は15~20×25~30nmのdimer typeであること、さらにTLCV(NL-3分離株)との間に血清学的関連が認められたことから、トマト黄化萎縮病の病原と同じくTLCVと同定して差支えないと考えられる。なお、供試ウイルスがスイカズラ病葉の核内に局在する点は、TLCVの他の寄主細胞内での所在様式¹⁰⁾と同じであったが、前者では後者にはほとんどみられない仁構成成分の分離現象がしばしばみられた。この現象はKimら⁴⁾がbean golden mosaic virus(コナジラミ伝搬性)感染インゲン葉で観察した結果と酷似していた。これがコナジラミ伝搬性ウイルスに感染した細胞内で起こる普遍的な病変であるか否かについては、今後さらに検討する必要がある。

従来、TLCVには病原性の異なる多くの系統が存在し、またattenuationなどの病原性変異が一般的に起こることが報告されている^{7, 21)}。筆者らもトマト黄化萎縮病株から、病徴と病原性を異にする数種の分離株を得ているが⁸⁾、本報のウイルスはこれらの分離株とは寄主範囲、病徴を多少異にしている。桐山⁶⁾はわが国に発生するタバコ巻葉病には症状の異なるいくつかの株があるが、これは環境条件の相違によるもので、系統によるものではないと述べている。本報の分離株と既報のトマトからの分離株などとの間にみられる病原性の差異が系統によるものか否かについては今後さらに検討しなければならない。

これまで国外ではTLCVの媒介虫として *Aleurotracheles socialis*, *Bemisia tabaci*, *B. tuberculata*

および *Trialeurodes natalensis* が報告されているが、*B. tabaci* 以外は媒介虫であることが疑問視されている。山内ら²⁵⁾は本邦の TLCV は *T. vaporariorum* (= *T. natalensis*) で伝搬されないと報告し、筆者らは *B. tabaci* が媒介虫であることを確認したが⁹⁾、本報の実験でさらに *B. loniceræ* も TLCV の媒介虫であることが明らかになった。*B. loniceræ* は1957年 Takahashi¹⁸⁾により記載されたもので、自然寄主としてスイカズラとジゴクノカマノフタが挙げられているが、日本でしか確認されておらず、その発生生態もほとんど判っていない。しかし *B. loniceræ* は *B. tabaci* と同程度の伝搬能力をもち、野外でのウイルス伝搬にも重要な役割を占めている可能性が考えられるので、今後は病害の発生に両虫がどのように関与しているか、さらに詳しく調査検討する必要がある。

Pruthi ら¹⁴⁾はインドのタバコ畑では *B. tabaci* の密度が非常に高いと述べている。しかし、わが国のタバコあるいはトマトでのコナジラミの密度はこれまでに筆者らが観察した範囲内では極めて少ないようであるので、わが国の *B. tabaci* はこれらの植物で世代を繰り返し難いのではないかと考えられる。Costa ら³⁾および Bird ら¹⁾は各国で報告されている *B. tabaci* の寄主範囲がかなり異なることから、*B. tabaci* に多くの race が存在することを示唆している。わが国に発生する *B. tabaci* がタバコあるいはトマトに必ずしも好んで寄生しないのは race が外国で報告されているものとは異なるためかもしれない。

スイカズラは永年性の木本植物であることから TLCV と *B. loniceræ* の自然越冬植物になっていると考えられ、黄化萎縮病と巻葉病の重要な伝染源植物である可能性が強い。筆者らのこれまでの観察でも両病の発生は山間部の栽培地で多く認められることと、これらの圃場の周辺にはスイカズラの黄化症状株がしばしば認められること(未発表)より、病害の発生と病

スイカズラの自生との間には密接な関連のあることが推察される。

摘 要

スイカズラ (*Lonicera japonica* Thunb) の葉脈黄化～モザイク症状株からコナジラミ伝搬性のウイルスを分離して諸性質を調べた。

病原ウイルスは、罹病葉粗汁液を用いた汁液接種試験では伝搬されなかったが、タバココナジラミ (*Bemisia tabaci*) 接種により5種のナス科植物に感染し、タバコには特徴ある巻葉、萎縮などの症状を、トマトには典型的な黄化萎縮症状をあらわした。また黄化萎縮病和歌山分離株 (W-1) は *B. tabaci* 接種により、健全スイカズラに葉脈黄化症状を再現した。

スイカズラ病葉からの部分純化ウイルス試料中には直径約15～20nmの小球形粒子とともに、これらが対に結合したとみられる15～20×25～30nmの対粒子が認められた。スイカズラ病葉の超薄切片観察では、師部細胞の核内に径約15～20nmのウイルス様粒子の集塊がみられ、このような核ではしばしば仁構成成分の分離現象が観察された。また供試ウイルスの部分純化液は黄化萎縮病奈良分離株 (NL-3) 抗血清との間に陽性の反応を呈したが、arabis mosaic virus と CMV 各抗血清とは反応しなかった。

以上の結果から、供試ウイルスはトマト黄化萎縮病の病原と同じく、TLCVと 同定して差支えないものと考えた。

なおスイカズラに寄生する *Bemisia loniceræ* Takahashi は供試ウイルスと TLCV を *B. tabaci* と同程度に伝搬する能力をもち、TLCV の新しい媒介虫であることが明らかとなった。スイカズラは永年性の木本植物であることから TLCV と媒介虫 *B. loniceræ* の越冬植物と考えられ、トマト黄化萎縮病とタバコ巻葉病の重要な伝染源植物の一つであろうと推察された。

引 用 文 献

1. Bird, J. and Maramorosch, K. (1978). Adv. in Virus Res. 22: 55-110.
2. Corp, V. H. (1949). Phytopathology 39: 502 (Abstr.).
3. Costa, A. S. (1969). In "Virus, Vectors and Vegetation" (K. Maramorosch ed.) pp. 95-119. Wiley, New York.
4. Kim, K. S., Shock, T. L. and Goodman, R. M. (1978). Virology 89: 22-33.
5. 桐山 清, 西村紀子 (1969). 盛岡たばこ試報 4: 85-97.
6. 桐山 清 (1972). 日植病報 38: 323-332.
7. McClean, A. P. D. (1940). Sci. Bull. Dept. Agr. S. Africa 225: 1-70.
8. 尾崎武司・小島博文・井上忠男 (1976). 植物防疫 30: 458-462.

9. 尾崎武司・小島博文・井上忠男 (1977). 日植病報 43 : 372 (講要).
10. 尾崎武司・井上忠男 (1978). 同上 44 : 167-178.
11. 尾崎武司・井上忠男 (1978). 同上 44 : 385 (講要).
12. Phatak, H. C. and Raychaudhuri, S. P. (1967). Science and Culture 33 : 234-235.
13. Pruthi, H. S. and Samuel, C. K. (1939). Indian Jour. Agr. Sci. 9 : 223-275.
14. Pruthi, H. S. and Samuel, C. K. (1942). Ibid. 12 : 37-57.
15. Schmelzer, K. (1962). Phytopath. Z. 46 : 105-138.
16. Storey, H. H. (1932). Rhodesian Agr. J. 29 : 186-192.
17. Storey, H. H. (1935). E. African Agr. J. 1 : 148-153.
18. Takahashi, R. (1957). Ins. Matsu. 21 : 12-21.
19. Teploukhova, T. N. (1974). Trudy Vsesoyuznogo Nauchno-Insledovatel'skogo Instituta Zashchity Rasleniĭ 41 : 88-87. (Rev. Plant Path. 55 : 990).
20. 津曲彦寿 (1967). 日植病報 33 : 311-312.
21. Vasudeva, R. S. and Sam Raj, J. (1948). Phytopathology 38 : 364-369.
22. Wolf, F. A., Whitcomb, W. H. and Mooney, W. C. (1949). J. Elisha Mitchell Sci Soc. 65 : 38-47.
23. Woods, M. W. and DuBuy, H. G. (1943). Phytopathology 33 : 637-655.
24. 山口洋一・福留信明・田中行久・吉田 茂 (1976). 鹿児島たばこ試報 20 : 145-147.
25. 山内淳司・井本征史・日比忠明・小室康雄 (1976). 日植病報 42 : 424-430.

Explanation of plates

Plate I

1. A naturally infected honeysuckle plant showing vein mosaic symptom.
2. Ditto.
3. Honeysuckle leaves showing enations along veins on the under surface.
- 4-6. The symptoms that appeared on several kinds of plants induced by infection with the virus derived from honeysuckle.
4. Tomato plant showing yellow dwarf symptom.
5. Tobacco plant (cv. Bright Yellow) showing leaf curl symptom.
6. *Datura stramonium* showing yellows and leaf curl symptoms.
7. Electron micrograph of partially purified virus preparation negatively stained with 2 % uranyl acetate. Bar represents 100 nm.
8. A nucleus of sieve element containing clumps of virus particles. Bar represents 500 nm.
9. A high magnification of a portion of Fig. 8. Bar represents 500 nm.

Plate II

Electron micrographs of ultrathin sections showing changes in the nuclear structure of phloem cells of diseased honeysuckle leaves. Bar represents 500 nm.

10. Hypertrophy of nucleoli and segregation of nucleolar component are shown.
11. The granular (G) and fibrillar (F) regions of the segregated nucleolus.
12. A high magnification of nucleolus from Fig. 11.
13. A nucleus showing the fibrillar (F) and granular (G) regions of the nucleolus.
14. The large and sharply segregated nucleolus is observed. The granular (G) region is more electron dense than the fibrillar (F) region.
15. A high magnification of a nucleus containing the granular (G) and fibrillar (F) regions. A fibrillar ring (FR) is also shown.

Plate I

Plate II