

わが国のカーネーションウイルス

CaMoV,CaLVおよびCaVMVについて

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	栃原,比呂志 出射,立 矢吹,駿一 福本,文良
発行元	日本植物病理學會
巻/号	41巻4号
巻号補足	
掲載ページ	p. 390-399
発行年月	1975年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



わが国のカーネーションウイルス

— CaMoV, CaLV および CaVMV について —

栢原比呂志*・出射立**
矢吹駿一***・福本文良*

Hiroshi TOCHIHARA*, Takashi IDEI**, Shun-ichi YABUKI*** and
Fumiyoshi FUKUMOTO*: Properties and Distribution
of Three Carnation Viruses in Japan

Abstract

A survey of viruses infecting carnation was made on 116 commercially grown carnation plants (28 cultivars) collected in Japan between 1969 and 1972. Carnation mottle virus (CaMoV), carnation latent virus (CaLV) and carnation vein mottle virus (CaVMV) were found in 66 out of 116, in 51 out of 93 and in 48 out of 105 samples tested, respectively. Carnation etched ring virus and carnation necrotic fleck virus were also found in many of the samples. The survey indicated that these five viruses are the major viral pathogens of carnation in Japan.

CaMoV, CaLV and CaVMV were purified and their particle morphology was examined by electron microscope. Specific antisera to these viruses were obtained using the purified preparations. The host range and the symptomatology were studied by mechanically inoculating these viruses to test plants.

Silene pendula reacted to CaVMV with the formation of distinct necrotic spots in inoculated leaves followed by the appearance of chlorotic and/or necrotic spots in systemically infected leaves. These symptoms were also accompanied by dwarfing. *S. pendula* was more sensitive to CaVMV than any other indicator plant, and its reaction to this virus was usually sufficiently distinct from the reaction to other carnation viruses.

Cuttings of virus-free clonal plants of cultivar "coral" were inoculated with purified CaMoV. In spite of an active virus multiplication in inoculated tissues, few, if any virus was detected in newly developed leaves for a few months, when the plants were inoculated with low concentration of virus or when they were inoculated at an apical portion. However, the number of plants with low virus concentration was smaller in the artificially inoculated plants than in the plants grown in the field.

(Received October 30, 1974)

I. 緒 言

カーネーションにおいてウイルスに起因する病害が多数発生していることはすでに古くから知られているが、初

期の研究は重複感染が多いことへの配慮がほとんどないため不明確なものが多い。しかし Kassanis¹⁾ や Brierley and Smith²⁾ らにはじまる多数の報告によって現在欧米諸国ではカーネーションにおける感染ウ

* 植物ウイルス研究所 Institute for Plant Virus Research, Chiba, Japan.

** 岡山県立農業試験場 Okayama Prefectural Agricultural Experiment Station, Sanyō, Okayama, Japan.

*** 神奈川県立農業総合研究所 Agricultural Research Institute of Kanagawa Prefecture, Hiratsuka, Japan.

イルスの種類が整理され、多くの性質が明らかにされている。一方わが国では6~7年前より茎頂組織培養による無病苗の育成が試みられ始め、それに伴い無病苗であるという検定が必要になった。当時わが国でのカーネーションウイルス病についての研究報告は講演要旨を除けば与良・結城³¹⁾の報告があるにすぎなかった。本報告はわが国カーネーションウイルス病原ウイルスの種類を明らかにし、その検定法を検討する目的で行なったものである。著者の一人矢吹が分担した仕事の一部はすでに報告¹⁸⁾したので、本報告には一部重複がある。

本研究を行なうに当り、コーラルの無病苗を分譲して戴いた静岡県有用植物園、および実験材料の採集に御協力戴いた同園中村秀雄氏と千葉県暖地園芸試験場林 角郎氏に厚く御礼を申し上げる。

II. 実験材料

カーネーションに感染しているウイルスの種類を調べるため、千葉、神奈川、静岡、岡山の各地で、1969~1972年にわたってカーネーション28品種116株を採集した。

実験に主として用いた carnation mottle virus (CaMoV) は千葉で採集したカーネーション (粧, 株番号2) から分離し、*Chenopodium amaranticolor* の1 local lesion を2回通過させ、ビジョナデシコ (不知火) かカーネーション (ジャイアントシャポー) で増殖した。CaMoV の濃度は260 nm の吸光係数 $4.9 \text{ cm}^2/\text{mg}$ ²⁷⁾ を使用し、0.01 M 燐酸緩衝液 (P. B.) pH 7.2 に溶解した純化 CaMoV は等量のグリセリンを添加して氷室 (約-10 C) に保存した。また実験に主として用いた carnation latent virus (CaLV) と carnation vein mottle virus (CaVMV) は神奈川で採集したカーネーション (いずれもピーターフィシャー, 株番号神奈川14と神奈川4) からモモアカアブラムシで分離し、ビジョナデシコで増殖した。なおこれら3種ウイルスの保存株については、カーネーションの主要な病原ウイルスと考えられている carnation ring-spot virus (CaRSV)¹⁶⁾, carnation etched ring virus (CaERV)⁴⁾ および carnation necrotic fleck virus (CaNFV)¹⁷⁾ が重複感染していないことを寄生性で調べ、さらに電顕と光学顕微鏡観察で確認した。

供試した同一系統のコーラル苗は静岡県有用植物園で茎頂組織培養により育成された株から採った挿木苗である。

供試植物の育成および接種試験は、すべてガラス室

(通常冬期18~30 C, 夏期20~30 C) 内で行なった。汁液接種は通常病葉に0.02% KCN を含む0.05 M P.B. pH 7.2 を加えて磨砕し、カーボランダムを用い常法により接種を行なった。

III. 実験方法および結果

1. ウイルスの寄生性と抗血清の作製

a. CaMoV 汁液接種により寄生性を調べたところ以下の結果を得た。

カーネーション (ジャイアントシャポー): 一部の株には不明瞭なモザイク斑紋を生ずるが無病徴感染株が多い。桃色の品種では稀に花卉に斑入りを生ずる。

ビジョナデシコ (不知火, 石井早生): 新葉に黄斑型のモザイクを生ずるが、多くの株はしだいに病徴が不明瞭になる。高濃度の接種源を用いても全株にモザイクを生ずることは稀である。稀に接種葉にえそ斑点を生ずる。

セキチク (コロラマジアイアント): モザイクを生ずる。

フクロナデシコ: 葉がやや黄化し、小型になるが不明瞭な病徴は生じない。ウイルスは高濃度に増殖する。

C. amaranticolor: 接種4~5日後の接種葉に小型で多数の退緑~えそ斑点を生ずる。稀に上葉に退緑斑を生ずる。1葉に数個のえそ斑点しか生じないほどウイルス濃度が低いものを接種した場合、病徴発現まで日数がかかり (10~20 日) 斑点もやや大型となって CaVMV によるえそ斑点と区別が困難である。しかしこのえそ斑点をさらに *C. amaranticolor* に再接種すると4~5日後に多数のえそ斑点を生じ CaVMV と区別できる。

C. quinoa: 4~5日後接種葉に、約10日後上葉に退緑斑を生ずる。

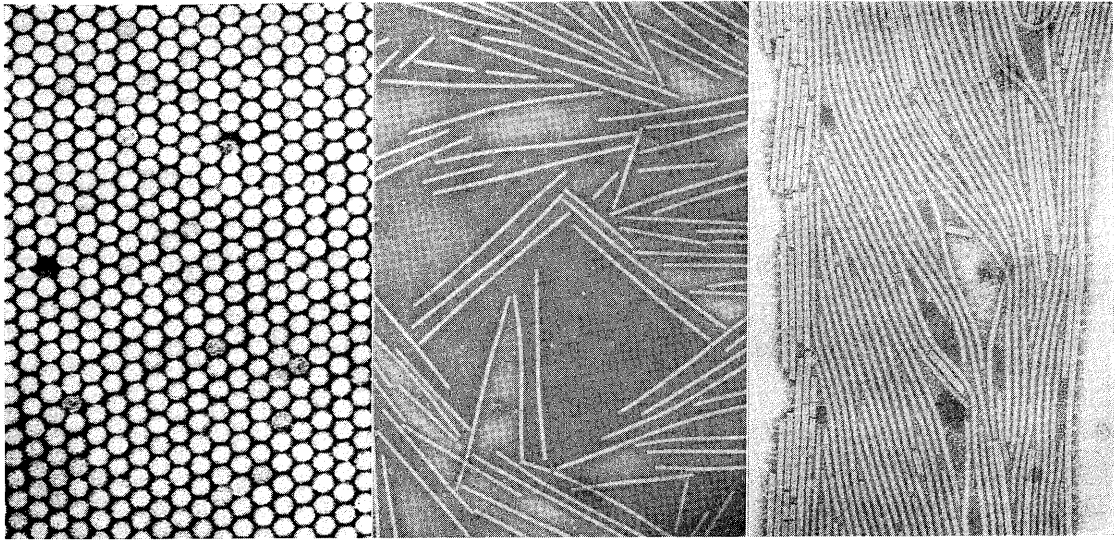
センニチコウ: 7~10日後接種葉にえそ斑点を生ずる。感受性は低く、不明瞭であることも多い。

ツルナ: 極く稀に接種葉に輪点えそを生ずる。全身感染するが無病徴である。

キュウリ、コカブおよびタバコ (Ky-57) には病原性が認められない。

ウイルスの純化は Hollings and Stone¹¹⁾ と Tremaine²⁵⁾ の方法を参考にして以下の方法で行なった。

カーネーション病葉に0.005 M Na-EDTA と0.1% チョグリコール酸を添加した0.1 M P.B. pH 7.4 1容、クロロホルム8/10容およびn-ブタノール2/10容を加え磨砕後分画遠心2回と蔗糖密度勾配 (10~40%) 遠心とでウイルスを純化した。この純化標品に2% 燐タ



第1図 左: CaMoV, 約100,000倍 中: CaLV, 約40,000倍 右: CaVMV, 約60,000倍, 桿状粒子はTMV (凍結保存標品のため長さが揃っていない)

ングステン酸 (KOH で pH 5.6) を同量加え電顕観察したところ直径約27~29 nmの球状粒子のみが観察され (第1図), 遠心機 (日立 UCA-1) による schlieren pattern は対称的な1つのピークを形成した。また最低243~244 nm, 最高260 nmの核蛋白と思われるUV吸収曲線を示した。本標品を0.05 M P.B. pH 7.2で 4×10^{-1} $\mu\text{g/ml}$, 4×10^{-2} $\mu\text{g/ml}$, 4×10^{-3} $\mu\text{g/ml}$ に稀釈し, *C. amaranticolor*に接種したところ, 1葉に平均それぞれ $\gg 400$, >400 , 280個のえそ斑点を生じ高い病原性が認められた。0.01 M P.B. pH 7.2に溶解し同量のグリセリンを添加して氷室 (約 -10°C) に保存した純化標品は, 20カ月で約1/2~1/3に, 37カ月で1/5~1/10に病原性が低下した。一方0.01 M P.B. pH 7.2に溶解して凍結 (-20°C) 保存した試料ではグリセリン添加保存試料に比べて病原性の低下が急速で, 37カ月後には同期間保存したグリセリン添加試料に比べ約1/10に低下した。

抗血清は純化ウイルスに同量の adjuvant を加え家兎の筋肉に3回注射して作製した。力価は, 沈降反応混合法で2,560倍であった。カーネーション病葉に1/150 M KCN と1/150 M Na-EDTA とを添加した0.5 M P.B. pH 7.6, 1容を加え磨砕搾汁後10,000 $\times g$ 20分遠心分離した上清を抗原2倍液として, 抗原稀釈限界を数種の方法で調べたところ, 沈降反応混合法では32~64倍 (純化ウイルスを抗原とした場合は約3 $\mu\text{g/ml}$) まで, 重層法では128倍まで肉眼で陽性の反応が認められることが多かった。寒天ゲル (組成: 寒天

1%, NaCl 0.85%, 窒化ナトリウム0.02%, 0.02 M P.B. pH 7.0~7.2) 拡散法では, 抗原-抗体間5~7 mmで0.3 ml 用いて4倍まで明瞭な沈降帯を生ずるが8倍では沈降帯がやや不明瞭になる場合が多く, 純化ウイルスでは同条件で50 $\mu\text{g/ml}$ まで明瞭な沈降帯を生じた。

b. CaLV 汁液接種により寄生性を調べたところ以下の結果を得た。

カーネーション (ジャイアントシャボア, アンファンドニュース), ビジョナデシコ, フクロナデシコ: いずれにも顕著な病徴を現わさないが全身感染する。

C. amaranticolor: 接種10~20日後接種葉に退緑斑を生ずる。CaVMVによるものとは異なってえそ斑点とはならず不明瞭であることが多い。高濃度の接種源を用いると全身感染して新葉の2~3枚にモザイクを生じやすい。

C. quinoa: 7~10日後一部の株の接種葉に退緑斑を生ずる。新葉にも10~20日後一部の株に斑点型のモザイクを生ずるがCaVMVやCaMoVより病徴が軽い。しかし無病徴株でも全身感染しており, 抗血清を用いればスライド法で容易に検出できる。

ツルナ: 接種葉に稀に退緑斑を生じ, 10~20日後新葉に不明瞭ではあるがモザイクを生ずる。

センニチコウ, キュウリ, タバコ (Ky-57) には病原性が認められない。

ウイルスの純化は, ビジョナデシコ病葉に0.01 M Na-EDTA, 0.01 M DIECA, 0.2% チョグリコール酸を添加した0.75 M P.B. pH 7.2, 0.5容とクロロホルム

1 容とを加え磨砕後分画遠心 2 回と蔗糖密度勾配 (10~40%) 遠心とでウイルスを純化した。Wetter and Paul²⁹⁾ はエーテル、四塩化炭素、ブタノールなどを使用して純化を行なっているが、本法により目的である抗原としてのウイルスが充分得られたので両者の比較は行なわなかった。純化標品に 2% 燐タングステン酸 (KOH で pH 5.6) を同量加え電顕で観察したところ幅 12~13 nm の紐状粒子のみが観察され、長短粒子が存在したが、約 650 nm の長さの粒子が非常に多かった (第 1 図)。また本ウイルスに感染したビジョナデシコ、フクロナデシコ、カーネーションおよび *C. amaranticolor* を試料とした dip 法による観察でも約 650 nm の粒子が圧倒的に多く、それ以上長い粒子もかなり存在したが短かい粒子は少数しか見られなかった。純化標品は最低 244~245 nm, 最高 260~261 nm の核蛋白と思われる UV 吸収曲線を示した。純化材料としてはフクロナデシコとカーネーションも用いた。ウイルスの収量はフクロナデシコでビジョナデシコと同じかやや多く、カーネーションでは 50% 以上多かった。

抗血清は純化ウイルスに同量の adjuvant を加え家兎の筋肉内に 3 回注射し、さらに採血 7 日前に皮下と静脈内に 1 回注射して作製した。血清の力価は沈降反応混合法で 640 倍であった。病葉に 1/150 M KCN と 1/150 M Na-EDTA を添加した 0.5 M P.B. pH 7.6, 1 容を加え磨砕榨汁後 10,000 ×g 20 分遠心分離した上清を抗原 2 倍液として抗原稀釈限界を調べた。沈降反応混合法ではビジョナデシコで 64 倍まで、カーネーションで 128~256 倍まで、フクロナデシコで 64 倍まで、スライド法ではビジョナデシコで 20~40 倍、カーネーションで 40~160 倍、フクロナデシコで 40~80 倍まで肉眼で陽性の反応が認められ、カーネーションで最も濃度が高い傾向がみられた。

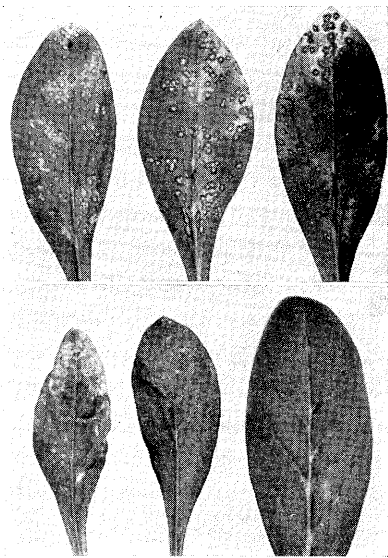
c. CaVMV 汁液接種により寄生性を調べたところ以下の結果を得た。

カーネーション (ジャイアントシャポー, アンファンデュース): 接種 10~20 日後にモザイクを生ずる。株によっては無病徴である。桃色の品種では花卉に斑入りを生じ易い。

ビジョナデシコ (不知火, 石井早生): 接種 10~15 日後にモザイクを生ずる。

セキチク (コロラマジヤイアント, ベビードール): モザイクを生ずる。

フクロナデシコ: 接種 6~10 日後接種葉にえそ斑点を生じ、新葉に退緑~えそ斑点を生ずる。新葉はやや萎縮する (第 2 図)。



第 2 図 CaVMV によるフクロナデシコの病徴, 上: 接種葉 下: 新葉
右 1 葉は健全葉

ムシトリナデシコ: 退緑斑, モザイクなどを生ずる。

C. amaranticolor: 接種 6~20 日後接種葉に退緑~えそ斑点を生ずる。株により感受性に差が大きく多数の斑点を生じて不明瞭であることも多い。一般に明瞭な斑点は展開直後の葉に接種した場合に比較的に出やすく、古い葉では不明瞭な斑点のままで終ることが多い。高濃度の接種源を用いると全身感染するが、新葉 1~2 枚にのみ多数の斑点を生じ、その後展開する葉は無病徴であることが多い。

C. quinoa: 接種 6~10 日後接種葉に、10~15 日後新葉に退緑斑を生ずる。

ツルナ: 全身感染するが無病徴である。

センニチコウ, タバコ (Ky-57), キュウリおよびコカブには病原性が認められない。

ウイルスの純化は、ビジョナデシコ病葉に 0.01 M KCN と 0.01 M Na-EDTA を添加した 0.4 M P.B. pH 7.6, 1.2~1.8 容とクロロホルム 9/10 容, *n*-ブタノール 1/10 容とを加え磨砕後分画遠心 2 回と蔗糖密度勾配 (10~40%) 遠心とでウイルスを純化した。0.4 M P.B. の代りに、0.5 M NaCl を添加した 0.2 M P.B. を用いても純化標品が得られた。チオグリコール酸, アスコルビン酸, 亜硫酸ソーダー, エーテルと *n*-ブタノールの混液, 四塩化炭素, ポリエチレングリコールなどの利用も検討したが、上記の方法で最もよい結果

が得られた。

純化標品は最低 245~247 nm, 最高 260~263 nm の核蛋白と思われる UV 吸収曲線を示し, $OD_{260}=0.06$ と 0.006 の試料で *C. amaranticolor* の接種葉 1 葉当たり 10~200 と 10~30 程度のえそ斑点を生じた。純化標品に比較のため TMV (凍結保存標品のため長さが不揃い) を混ぜ、さらに同量の 2% 隣タングステン酸 (KOH で pH 5.6) を加えて電顕による観察を行なったところ、長さは不揃いであったが幅 12~13 nm の紐状粒子のみが観察された (第 1 図)。CaVMV 感染植物葉中にはウイルス粒子が少ないため通常の dip 法では多数の粒子を観察するには不便である。そこで純化操作の第 1 回超遠心—低速遠心後の試料を用いて粒子の長さを測定したところ多数の粒子を容易に観察することができ、長さ約 750 nm (700~800 nm) の粒子が最も多かった。

抗血清は純化ウイルスを家兎の静脈に 2 回、さらに同量の adjuvant を加えたものを筋肉内に 2 回注射して作製した。抗血清の力価は沈降反応混合法で 512 倍であった。カーネーションおよびビジョナデシコ病葉に 1/150 M KCN と 1/150 M Na-EDTA を添加した 0.4 M P.B. pH 7.6~7.8, 1 容を加え磨碎搾汁後 10,000 ×g 20 分遠心した上清を抗原 2 倍液として抗原稀釈限界を調べた。沈降反応混合法で 64~256 倍稀釈まで肉眼で陽性の反応が認められたが、スライド法では遠心前の粗汁液も含めて試験したが 2~8 倍稀釈で不明瞭な凝集を起しただけで検定的手段として利用できるほど明瞭な反応を示さなかった。

2. カーネーションから分離されるウイルス

わが国のカーネーションにおけるウイルスの感染状況をj知る目的で、各地のカーネーションについて、モザイク、輪点、条斑などウイルス病と思われる症状を示す 87 株 (内コーラル 22 株) と無病徴株を 29 株 (内コーラル 12 株) 採集した。採集地は千葉 47 株、神奈川 31 株、岡山 13 株、静岡 25 株で 28 品種が含まれている。この 116 株について *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, ビジョナデシコ (不知火か石井早生), カーネーション (ジャイアントシャボン), セキチク (コロラマジヤイアントかベビードール) およびセンニチコウに汁液接種し、dip 法による紐状粒子の電顕観察と、CaMoV, CaLV および CaVMV の 3 種抗血清による試験を行なった。血清試験はカーネーション葉に 1/150 M KCN と 1/150 M Na-EDTA を添加した 0.4 M P.B. pH 7.6~7.8 を同量加え磨碎搾汁後 10,000 ×g 20 分遠心した上清を抗原とした。スライド法と寒天ゲル

拡散法ではこの抗原を原液で、沈降反応混合法では原液を水で 2 倍と 5 倍に稀釈して使用した。抗 CaMoV 血清は沈降反応混合法と寒天ゲル拡散法で、抗 CaLV 血清は沈降反応混合法とスライド法で、抗 CaVMV 血清は沈降反応混合法でそれぞれ試験を行なった。寒天ゲルの組成は 1% 寒天, 0.85% NaCl, 0.01% 窒化ナトリウム, 0.02 M P.B. pH 7.2 で、抗原—抗体間のきよりは 5~7 mm とし、5~10 C においた。沈降反応混合法では 30 C 2 時間後 4~8 C に 1 夜おいて判定した。

これらの諸試験は 116 の全株については行なっておらず、接種試験は *C. amaranticolor* に 116 株, *C. quinoa* に 29 株, ビジョナデシコに 105 株, カーネーションに 23 株, セキチクに 51 株, センニチコウに 88 株それぞれに行ない、dip 法による電顕観察は 106 株、血清試験は抗 CaMoV 血清で 99 株 (内 55 株陽性), 抗 CaLV 血清で 78 株 (内 47 株陽性), 抗 CaVMV 血清で 83 株 (内 28 株陽性) についてそれぞれ行なった。またこれらの試験は 1969 年 2 月~1973 年 1 月にわたって行なったものである。1 の項に記した 3 種ウイルスの性質を基にして、試験の結果から感染状況を判断すると、CaMoV は 116 株中 66 株, CaLV は 93 株中 51 株, CaVMV は 105 株中 48 株から分離された。また重複感染株も多く、これら 3 種ウイルスとも感染しているかどうか判定できた 90 株中 9 株に 3 重感染が認められた。そしてこれら 3 種ウイルスが 1 種も分離されなかったのは 4 株にすぎなかった。この 4 株中 3 株は無病徴であるが残りの 1 株は CaERV によると思われる輪紋症状を示していた。また無病徴株 3 株中 1 株には電顕で CaNFV と思われる組状粒子が観察された。コーラルは 34 株取扱ったが *C. amaranticolor* の接種葉に多数のえそ斑点を生じ、抗 CaMoV 血清と反応して CaMoV と判定したものは 4 株にすぎなかった。

供試株 116 株中には CaERV によると思われる輪紋症状を示す株が 15 株 (コーラル 14 株, スケニア 1 株) 含まれていた。しかし検定植物としてムシトリナデシコを用い⁴⁾, またフィロキシン染色³⁾ による X 体の観察を行なったが、CaMoV を重複感染させても安定して同じ型の病徴が発現するとは限らず、X 体も高い頻度では観察できず、また無病徴株からも分離されるので、簡易にそして誤りなく感染の有無を判断することができず、そのため本報告から省いた。また CaNFV も電顕観察およびカーネーションとビジョナデシコの病徴から、感染株がかなりあることが認められたが、すでに詳細な報告¹⁷⁾ があり、また重複感染の可能性が

高いまま電顕観察と少数のカーネーションとビジョナデシコへの接種だけでは感染株を見落すことも多いと考えて省いた。センニチコウに接種した 88 株中 1 株 (ピーターフィシャー, 株番号 13) からは全身感染するウイルスが分離された。本ウイルスはペチュニア, タバコ, セキチク, *C. amaranticolor* などにも全身感染し, 球状粒子が観察されることから, はじめ CaRSV ではないかと考えたが, アブラムシで伝染することから broad bean wilt virus ではないかと考えている。しかしこれ以上の実験は行っていない。

3. CaVMV に対する数種検定植物の感受性

C. amaranticolor は多数のウイルスに対して感受性があるので, 検定植物としてよく利用されるが,

CaVMV に対してはかならずしも感受性が高くなく, えそ斑点の出現も不安定であり, CaMoV が重複感染している株では検出が困難となる。またビジョナデシコは明瞭なモザイクを生じ他の主要なカーネーションウイルスによる病徴とは異なり区別できる点すぐれているが, フクロナデシコの方が感受性が高いように思われたので, 近年検定植物として用いられている *C. quinoa*¹⁶⁾ も加え, この 4 種植物について汁液接種で感受性の比較を行なった。供試植物は *C. amaranticolor*: 13~17 葉, *C. quinoa*: 8~12 葉, ビジョナデシコ 12~15 葉, フクロナデシコ 10~15 葉の段階に生育した株を用いた。3 回行なった実験の結果は第 1 表の如くでフクロナデシコが最も感受性が高かった。

第 1 表 CaVMV に対する 4 種植物の感受性

実験 番号	ウイルス濃度	植 物				
		ビジョナデシコ	フクロナデシコ	<i>C. amaranticolor</i>	<i>C. quinoa</i>	
1	2×10^{-2}	3/4	6/6	20		
	5×10^{-3}	3/4	6/6	4		
	1.3×10^{-3}	2/4	5/6	1		
	3×10^{-4}	0/4	3/6	0		
	8×10^{-5}	0/4	0/6	0		
2	2×10^{-2}	8/8	12/12	58		
	5×10^{-3}	6/8	12/12	27	20	6/6
	1.3×10^{-3}	2/8	12/12	5	4	6/6
	3×10^{-4}	2/8	9/12	1	2	6/6
	8×10^{-5}	0/8	4/12	0	0	2/6
3	2×10^{-2}	4/4	6/6	72	30	6/6
	5×10^{-3}	5/6	6/6	28	17	6/6
	1.3×10^{-3}	4/6	6/6	8	5	6/6
	3×10^{-4}	2/6	6/6	2	2	5/6
	8×10^{-5}	0/6	5/6	0	0	4/6
	2×10^{-5}	0/6	3/6	0	0	0/6

注. カーネーションモザイク葉 (実験 1 はフクロナデシコ接種葉) に 9 倍量の 0.05 M P.B. pH 7.2 を加え磨砕搾汁したものをウイルス濃度 1/10 とし, P.B. で希釈して 4 種植物に同時に接種した。整数は 1 葉当りのえそ斑点数で, 分数は発病株数/接種株数を示す。

4. コーラルにおける CaMoV の増殖

2. 項で記したようにコーラル以外の 27 品種 82 株からは高率 (76%) に CaMoV が分離されたが, コーラルでは *C. amaranticolor* と血清法で容易に検出できるほど高濃度にウイルスを含んでいた株は 4 株にすぎなかった。また同じ株でも時期を異にして調査すると, 高濃度に含まれていた株でも, 数カ月後には *C.*

amaranticolor にほとんどえそ斑点を生じないほどウイルス濃度が極端に変動していることがあり, この現象はコーラルにおいて顕著であった。またコーラルを接種源として *C. amaranticolor* に汁液接種すると, 接種 10~20 日後に CaVMV によるえそ斑点と区別がつかない斑点を少数生ずることがしばしばあった。このえそ斑点を再度 *C. amaranticolor* に接種すると

4~5日後に多数のえそ斑点を生じ、また抗 CaMoV 血清と反応することからこのえそ斑は CaMoV によることは間違いない。CaMoV の濃度が極端に低い場合このような現象が見られることはすでに明らかにされている¹⁰⁾。コーラルで通常観察される極端な低濃度株と稀にある高濃度株の混在現象の一端を明らかにしようとして次の実験を行なった。高さ15~20 cm 程度に生育したウイルスフリーのコーラル(同一系統)挿木苗の4葉(2対葉)に濃度が異なる CaMoV を接種し、一定期間後接種葉および新葉の一部を採り、それに0.02% KCN を添加した0.05 M P.B. pH 7.0を加えて磨砕し、50倍と2,000倍(葉重当り)に希釈して *C. amaranticolor* に接種を行ないウイルスの濃度を調べた。接種葉は3日と6日後に葉の先端部分を約半分、1度に2葉採り、基部の約半分は最後まで残した。ウイルス濃度は *C. amaranticolor* 葉2~4枚に生ずるえそ斑点数から推定したので誤差が大きいと思われるが、予備試験からこの枚数でウイルス濃度を大まかに推定することは可能であると考えたので、生じたえそ斑点数により0~5の6段階に分けてウイルス濃度

を記載した。50倍希釈区の実験結果は第2~4表で対照として用いた実生カーネーション(ジャイアントシャボア)では、試験に用いた最低濃度(0.02 µg/ml)でも接種3日後の接種葉に、また9日後の新葉にそれぞれウイルスは高濃度に増殖しており、これに比べコーラルでは増殖速度がはるかに遅かった。しかし200 µg/ml と2 µg/ml 接種区では接種6日後の接種葉ですでにかなり増殖しており、また上葉についても日数は要したが多数の株で高濃度に増殖した。とくに高濃度のウイルスを接種した区でその傾向が強かった。200 µg/ml を上位葉に接種した区(第2表、株番号11~15)では接種葉でウイルスがよく増殖したにもかかわらず5株中3株は新葉にウイルスの増殖が認められなかった。この3株については400 µg/ml のウイルスを再度接種したところ40日後の調査で新葉にウイルスが高濃度に増殖していた。2,000倍希釈区でも50倍希釈区とはほぼ同じ結果が得られたが、50倍区に比べえそ斑点数は少なかった。しかしその差は希釈倍数の差に比べるとはるかに小さかった。この原因はカーネーションに含まれる感染阻害物質²⁵⁾がかなり影響しているも

第2表 コーラルにおける CaMoV の増殖(1)

株番号	ウイルス濃度 (µg/ml)	接 種 後 の 日 数									
		3	6	6	9	12	22	32	42	52	116
		接 種 葉		新 葉							
1	200	0	2	0	0	0	0	4	4	3	5
2		1	3	0	0	0	4	5	5	4	4
3		0	1	0	0	0	1		0	0	0
4		0	1	0	0	0		0	4	3	4
5		0	2	0	0	0	4	4	4	4	3
6		0	3	0	0	0	2	5	4	4	3
7		1	3	0	0	0	1	5	5	5	3
8		0	1	0	0	0	4	5	5	4	5
9		0	3	0	0	0			5	5	4
10		1	3	0	0	0	0	5	5	5	3
11	200	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1
12		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
13		0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
14		1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
15		1	3	0	0	0	0	3	4	5	4
16	200	3	5	3	3	5	5	5	5	5	5

注. 株番号1~10は下位葉に、11~15は上位葉に接種した。株番号16は対照区で実生カーネーション(ジャイアントシャボア)4株を混合した。0~5の数字はえそ斑点数の程度を示す。

第3表 コーラルにおける CaMoV の増殖 (2)

株番号	ウイルス濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	接種後の日数					
		3	6	9	22	42	62
		接種葉	新葉				
1	200	2	0	0	5	5	
2		2	5	0	5	5	5
3		1	2	0	5	5	5
4		4	5	0	5	5	5
5		1	2	0	1	5	5
6	2	1	1	0	5	3	5
7		4	5	0	1	5	5
8		0	4	2	5	5	5
9		1	2	0	1	5	5
10		0	1	1	3	5	5
11		0	1	0	4	5	5
12		0	3	0	3	4	5
13		4	4	0	5	5	5
14		0	1	0	5	5	5
15		1	2	1	3	5	5
16	0.02	0	1	1	1	5	4
17		0	1	0	0	2	2
18		0	0	0	0	3	3
19		1	1	2	1	5	5
20		0	1	1	0	5	5
21	2	5	5	5			
22	0.02	5	5	5			

注. 株番号 21, 22 は対照区でカーネーション (ジャイアントシャポー) 4 株をいずれも混合した。0~5 の数字はえそ斑点数の程度を示す。

のと考えている。

IV. 考 察

カーネーションに感染している主要なウイルスとして欧米では, CaMoV¹⁶⁾, CaLV³⁰⁾, CaVMV¹⁶⁾, CaRSV¹⁶⁾, および CaERV^{4,9)} が知られており, その他 arabis mosaic virus⁶⁾, carnation Italian ringspot virus¹⁵⁾, キュウリモザイクウイルス²²⁾, turnip crinkle virus¹⁴⁾, sowbane mosaic virus¹³⁾, alfalfa mosaic virus⁸⁾, tobacco ringspot virus⁸⁾ などがカーネーションから分離されている。一方わが国のカーネーションについては, 今回の調査では CaMoV, CaLV および CaVMV がいずれも高率に感染しており, とくにヨー

第4表 コーラルにおける CaMoV の増殖 (3)

株番号	ウイルス濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	接種後の日数							
		3	6	9	22	42	62	120	
		接種葉	新葉						
1	2	2	5	0	0	5	1	5	
2		0	5	1	1	5	5	5	
3		1	0	0	0	1	1	5	
4		0	4	0	0	2	1	5	
5		1	0	0	3	1	5	5	
6		2	4	0	1	1	2	4	
7		2	1	0	0	0	1	5	
8		2	5	0	0	0	1	5	
9		1	4	0	0	0	1	5	
10		1	4	0	0	0	0	4	
11	0.02	0	1	0	0	0	1	2	
12		0	0	0	0	0	1	2	
13		0	0	0	0	0	1	2	
14		0	0	0	0	0	0	1	
15		0	0	0	0	0	4	5	
16		0	0	0	0	0	1	5	
17		0	0	0	0	0	1	1	
18		0	0	0	0	0	1	4	
19		0	1	0	0	0	1	1	
20		0	1	0	0	0	1	1	
21	0.02	4	2	0	5				

注. 株番号 21 は対照区でカーネーション (ジャイアントシャポー) 4 株を混合した。

ロッパで問題にされている CaRSV は分離されなかった。このほか CaERV と CaNFV も普遍的に感染していることが推定され, これまでの報告^{17,18,23)} とあわせ考えると, わが国カーネーションの主要なウイルスは CaMoV, CaLV, CaVMV, CaERV および CaNFV の 5 種と考えて差支えないように思われる。

CaMoV に対するビジョナデシコの反応は接種葉にえそ斑点を生ずる株と全身感染して無病徴〜モザイクを生ずる株が認められた。これはすでに報告²¹⁾ があるようにビジョナデシコの遺伝的な個体差によると考えている。CaMoV の同定には抗血清を用いる寒天ゲル拡散法と検定植物を用いる方法とが利用され比較されているが^{2,5,11,20)} 本研究によっても従来の報告とほぼ同じ結果が得られ, *C. amaranticolor* の感受性は非常に高く $4 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ で 1 葉当り 280 のえそ斑点

を生じた。また凍結保存は病原性の低下を招くことがすでに指摘されているが²⁶⁾、 -20°C での凍結保存で病原性が大幅に低下するのに反し、グリセリンを添加して氷室(約 -10°C)に保存すると病原性の変化が比較的少なく頻繁に使用する試料を保存する方法としてはすぐれていると考えている。

CaLVの検定植物としては *C. quinoa* が夏期には顕著な病徴が出にくいと利用できると報告されている¹²⁾。条件が同じではないが本実験では顕著な病徴を出さない株も多く、また CaVMV や CaMoV の感染による病徴とも類似しているため *C. quinoa* はすぐれた検定植物とはいえない。CaLVは、一般的には CaVMV や CaNFV に比べ組織内にウイルス粒子数が多いので dip 法による電顕観察を行えば、粒子数と形態から CaLV の同定がほぼ可能であり、検定植物と組合せることでほぼ間違いなく判定できると考えている。さらに抗血清を用いればスライド法で容易に判定できるので最も簡便である。CaLV についてはわが国におけるカーネーションウイルス病の最初の報告²¹⁾(症状の記載と講演要旨を除けば)で、すでにわが国に存在することが確認されているが、この報告は考察で可能性が指摘されているようにビジョナデシコとアカザでの病徴や粒子の長さなどから考えて CaLV と CaVMV が重複感染しているものを取扱っている可能性が高い。

CaVMV に対する *C. amaranticolor* の感受性については異なった報告^{7,28)}があることからもうかがえるが、本実験によっても *C. amaranticolor* の個体による感受性のばらつきが大きく、すでに指摘されているように¹⁶⁾ 感受性も *C. quinoa* に劣った。フクロナデシコは *C. quinoa* よりさらに感受性が高く、CaMoV や CaLV による病徴とは異なった特長ある症状を示すので CaVMV の検定植物としては *C. amaranticolor*、*C. quinoa*、ビジョナデシコなどに比べフクロナデシコはすぐれていると考えている。CaVMV の形態については病葉中に粒子数が少ないことから初期の研究では観察に成功していないが、Weintraub and Ragetli²⁸⁾は部分純化して多数の粒子を観察した。本実験でも通常の dip 法では極く少数の紐状粒子しか観察されないため、部分純化を行なって観察したところ極めて多数の粒子を容易に観察することができた。純化法については種々検討を加え、電顕観察からかなり純度の高い標品を得たと考えている。CaVMV 純化についての最近の報告^{16,24)}と本法とは本質的には大差がない方法であり、実験終了後でもあったので比較試

験は行っていない。

コーラルに濃度の異なる CaMoV を接種した場合、低濃度のウイルスを接種すれば圃場でみられるような増殖性の低い株が得られ、また高濃度のウイルスを接種すれば発病初期ではウイルス濃度が高く、そしてしだいに低濃度になって落着く株が多くなるのではないかと考えて実験を行なったが、期待したよりはるかに高い増殖がみられた。しかし高濃度のウイルスを接種した区の方がより早くそして高い増殖がみられ、低い濃度($0.02\text{ }\mu\text{g/ml}$)を接種した15株のうち8株は120日(5株は62日)後でも極めて低い濃度(1~2)のウイルスを含んでいるにすぎなかった(第3,4表)。しかし15株中6株には高濃度(4~5)のウイルスを含んでおり、これは一般圃場で観察されるより高率である。これには環境などの諸条件による影響の差も考えられるが、 $0.02\text{ }\mu\text{g/ml}$ の濃度でも *C. amaranticolor* の接種葉1葉当たり100~200以上のえそ斑点を生ずる濃度であり、この濃度でコーラルには接種6日後の接種葉から漸く分離できる程度の増殖が起っているにすぎないが、実生カーネーション(ジャイアントシャポー)では接種3日後ですでに高い増殖が認められることから、さらに低い濃度でもコーラルに感染すると思われる。接種濃度が低いほど新葉からウイルスが検出されるまでの期間が長く、そして濃度が低い株が多くなる傾向が認められることから、さらにうすい濃度のウイルスを接種すると圃場でみられるような *C. amaranticolor* での検出限界線上を示すようなウイルス濃度の低い株が高率に出現するのではないかと考えたが分譲をうけたウイルスフリー苗を使い切ったので実験を行っていない。第2表に示した如くコーラルに高濃度のウイルス($200\text{ }\mu\text{g/ml}$)を上位葉と下位葉に接種した場合、接種葉ではかなりの増殖が認められるにもかかわらず、上位葉に接種した株では接種116日後でも5株中3株については新葉からウイルスが分離できなかった。念のためこれら3株に再度ウイルスを接種すると全身感染したことから遺伝的に異なった株が混在していたとは考えられず、下位葉に接種した株では10株中9株で新葉にウイルスが高濃度に増殖していること、しかし実生カーネーションに比べればはるかに増殖移行が遅いこと、局部病斑植物の接種葉に生ずるウイルスによる病斑の形態は葉位が上位ほど輪郭が鮮明で下位になるほど不明瞭であることが多い。この現象は下位葉ほどウイルスの局在化に対して寄主側の作用が弱いことを示すものだと考えられる。これらのことを考慮に入れて判断すると、コーラルでは感染部位で

はかなり増殖するが比較的移行が悪く、特に上位葉ではウイルスが増殖しても極めて移行しにくいために第2表にみられるような結果が生じたと考えるのが妥当であるように思われる。しかし実験は1回しか行っていないのでさらに確認する必要がある。

V. 摘 要

Carnation mottle virus (CaMoV), carnation latent virus (CaLV) および carnation vein mottle virus (CaVMV) について寄生性を調べ、ウイルスを純化して抗血清を作製した。フクロナデシコは CaVMV に対して特長ある病徴を生じ感受性も高く検定植物として利用できる。CaLV は抗血清によるスライド法で容易に検出できた。また *C. amaranticolor* は CaMoV に対して感受性が高く、 4×10^{-3} $\mu\text{g/ml}$ の濃度で1葉に280個のえそ斑点を生じた。カーネーション28品種について3種ウイルスの感染状況を調査したところ CaMoV は116株中66株、CaLV は93株中51株、CaVMV は105株中48株から分離された。コーラルからは CaMoV が容易に分離できる株は少なく、感染していても極めて低い濃度しか含まれていない株が多数存在した。コーラルに CaMoV を接種すると他種カーネーションに比べ、より長期間ウイルスの全身感染がみられないか、あるいは感染しても低いウイルス濃度を維持した。しかし圃場でみられるような極めて低いウイルス濃度を示す株を高率に得ることはできなかった。

引 用 文 献

- 1) Brierley, P. and Smith, F. F. (1957). *Phytopathology* 47: 714-721.
- 2) Devergne, J.-C. et Cardin, L. (1967). *Ann. Epiphyties* 18: n° H.-S. 85-103.
- 3) Fujisawa, I., Rubio-Huertos, M. and Matsui, C. (1971). *Phytopathology* 61: 681-684.
- 4) Hakkaart, F. A. (1968). *Neth. J. Pl. Path.* 74: 150-158.
- 5) Hakkaart, F. A. and van Olphen, M. (1971). *Ibid.* 77: 127-133.
- 6) Hakkaart, F. A., van Hoof, H. A. and Maat, D. Z. (1972). *Ibid.* 78: 15-18.
- 7) Hollings, M. (1957). *Plant Pathology* 6: 133-135 (R.A.M. 37: 219-220, 1958).
- 8) Hollings, M. and Stone, O. M. (1960). *Rep. Glasshouse Crops Res. Inst. for 1959*: 65-76 (R.A.M. 40: 265, 1961).
- 9) Hollings, M. and Stone, O. M. (1961). *Ibid.* for 1960: 94-95 (R.A.M. 41: 270-271, 1962).
- 10) Hollings, M. and Stone, O. M. (1962). *Ibid.* for 1961: 100-102 (R.A.M. 42: 74, 1963).
- 11) Hollings, M. and Stone, O. M. (1964). *Ann. appl. Biol.* 53: 103-118.
- 12) Hollings, M. and Stone, O. M. (1965). *Plant Pathology* 14: 66-68.
- 13) Hollings, M. and Stone, O. M. (1967). *Rep. Glasshouse Crops Res. Inst. for 1966*: 92-102 (R.A.M. 47: 39, 1968).
- 14) Hollings, M. and Stone, O. M. (1969). *Zentbl. Bakt. Parasikde.* 123: 237-248.
- 15) Hollings, M., Stone, O. M. and Bouttell, G. C. (1970). *Ann. appl. Biol.* 65: 299-309.
- 16) Hollings, M. and Stone, O. M. (1970, 1971). *C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses* No. 7, 21, 78.
- 17) Inouye, T. and Mitsuhata, K. (1973). *Berichte des Ohara Instituts für Landwirtschaftliche Biologie* 15: 195-205.
- 18) 神奈川県農業試験研究機関共同研究報告 (1972). 3: 12-40.
- 19) Kassanis, B. (1955). *Ann. appl. Biol.* 43: 103-113.
- 20) Kemp, W. G. (1967). *Can. Plant Dis. Surv.* 47: 89-93.
- 21) Kemp, W. G. (1971). *Can. J. Plant Sci.* 51: 289-297.
- 22) Lovisolo, O., Conti, M. e Luisoni, E. (1968). *Phytopath. Med.* 7: 71-76.
- 23) 森田 壽・中川秀雄・肥田和夫 (1973). *静岡農試研報* 18: 103-119.
- 24) Poupet, A. et Marais, A. (1973). *Ann. Phytopathol.* 5: 265-271.
- 25) Ragetli, H. W. J. (1957). *Tijdschr. o. Pl. ziekten* 63: 245-344.
- 26) Tremaine, J. H. (1970). *Virology* 42: 611-620.
- 27) Waterworth, H. E. and Kaper, J. M. (1972). *Phytopathology* 62: 959-964.
- 28) Weintraub, M. and Ragetli, H. W. J. (1970). *Virology* 40: 868-881.
- 29) Wetter, C. und Paul, H. L. (1961). *Phytopath. Z.* 43: 207-212.
- 30) Wetter, C. (1971). *C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses* No. 61.
- 31) 与良 清・結城 惇 (1965). *日植病報* 30: 156-160.