

指標植物、*Malus hupehensis* のりんご  
高接病病原ウイルスに対する反応

町 田 郁 夫

(青森県りんご試験場)

Reactions of *Malus hupehensis* to the Inoculation of  
Casual Viruses of Apple Topworking Disease

Ikuo MACHITA

Aomori Apple Experiment Station  
Kuroishi, Aomori, 036-03, Japan

## 目 次

I. 緒 言 .....	77
II. 材料及び方法 .....	77
III. 結 果 .....	79
IV. 考 察 .....	86
V. 摘 要 .....	89
引用文献 .....	90
Summary .....	91
写 真 .....	93

## I. 緒 言

リンゴクロロティックリーフスポットウイルス (ACLSV) 普通系、ACLSV マルバ潜在系、リンゴステムピッチングウイルス (ASPV) 及びリンゴステムグルーピングウイルス (ASGV) は、リンゴ高接病の病原ウイルスとして知られているが、これらの検定法の確立は高接病の防除にとって欠かすことができない。

*Malus hupehensis* は、わが国では松中ら(3、4)によって ACLSV や ASPV に対して感受性が高いことが明らかにされてから、これらのウイルスの指標植物として用いられるようになった。当初、この植物では病徴の種類から感染ウイルスの類別ができなかったが、町田・松中(2)は、両ウイルスが発現する病徴に差異が認められること、また、この植物は ASGV に対しても病徴を現すことなど本研究の概要の一部を既に報告した。この点については、GILMERら(1)もこの植物が ASPV に対して特異的な病徴を現すことを報告している。その後、斉藤ら(6)もこの植物で早期に3種のウイルスが検出できることを明らかにし、植物検疫におけるその有用性を示唆した。

本研究では、*M. hupehensis* の ACLSV、

ASPV 及び ASGV の各種系統及び分離株に対する反応を調査した。その結果、この植物が ACLSV の1系統を除くいずれの供試ウイルスに対しても感受性を示すことが明らかになった。また、ACLSV と ASPV が複合感染した場合の反応並びに ASGV の標準指標植物と本指標植物の ASGV に対する感受性の比較などについても検討を加えた。本報告はそれらの結果についてその詳細を取りまとめたものである。

なお、*M. hupehensis* は、わが国では当初 *M. scheideckeri* と称されていたが、最近、その形態とパーオキシダーゼアイソザイムのザイモグラムパターンが本来の *M. scheideckeri* と異なり、*M. hupehensis* と同じであることが判明し、現在の呼称に改訂された(7)。

本研究を行うに当たり、農林水産省果樹試験場長柳瀬春夫博士より貴重なウイルス接種源を譲り受けた。同氏には有益なご指導、ご助言並びに本論文の御校閲も賜った。また、青森県グリーンバイオセンター研究調整監松中謙次郎氏、元青森県畑作園芸試験場次長瀬川一衛氏にも有益なご指導とご助言を賜った。ここに記して謝意を表する。

## II. 材料及び方法

試験 1. 二重芽接ぎ法で接種した ACLSV、ASPV 及び ASGV に対する *M. hupehensis* の反応

### (1)接種源

ACLSV、ASPV 及び ASGV に単独（一部複合）感染している下記の12種類のリンゴ樹を接種源として供試した。ACLSV の接種源は、いずれも農林水産省果樹試験場から譲り受けた。

ASPV と ASGV の接種源は、各ウイルスに単独または複合感染している青森県りんご試験場保存のリンゴ品種及び台木を供試した。これ

らは、いずれも本指標植物(R12740-7A, SPY 227, *M. sieboldii* (MO65), Virginia Crab, *M. platycarpa*, *M. hupehensis*) と ELISA 法によりその感染ウイルスが判定された。

ACLSV : P-203 (普通系、果樹試験場より分譲、リンゴ実生)

P-11 (マルバ潜在系、果樹試験場より分譲、リンゴ実生)

MO-41 (Hopa 系、果樹試験場より分譲)

MO-31 (K14系、果樹試験場より

分譲)

MO-5 (ミツバ潜在系、果樹試験場より分譲、*M. sieboldii* 63)

MO-43 (Jay darling 系、果樹試験場より分譲)

ASPV: A-1 (青森県りんご試験場産、品種‘つがる’)

A-2 (青森県りんご試験場産、品種‘ジョナゴールド’、ASGV と複合感染)

A-3 (青森県りんご試験場産、品種‘ふじ’、ASGV と複合感染)

A-4 (青森県りんご試験場産、品種‘リチャードデリシャス’)

ASGV: A-5 (青森県りんご試験場産、台木‘M. 26’)

A-6 (青森県りんご試験場産、品種‘ふじ’)

(2)接種方法

青森県りんご試験場保存の *M. hupehensis* から休眠期に新しょうを切り取り、これを約2°C で冷蔵保存し、随時、供試した。

*M. hupehensis* へのウイルスの接種は、素焼鉢に植えたりんご実生上での2重芽接ぎ法によった。2重芽接ぎ法では、初めに、*M. hupehensis* の1~2個の芽が着いた休眠枝を高さ約20cm の2年生実生台木に切り接ぎした。その後、*M. hupehensis* の新しょうが伸び始めた約20日後に、1接種源当たり2~3個の休眠芽をそぎ芽接ぎにより接種した。接種は、1区5反復(一部3反復)とし、ASGV の接種源を1984年にのみ、ACLSV と ASPV を1984~1986年の各年1回の計3回、3月下旬~7月上旬の時期に行った。接種個体は、約20°C のガラス室に置き、5月下旬~7月はガラス室を寒冷紗で被覆した。接種個体は、約2か月間定温のガラス室に置いた後、無加温のガラス室へ移した。冬期間は屋外で休眠、越冬させ、2年目と3年目を屋外で

肥培管理した。病徴の観察は、*M. hupehensis* の茎葉部並びに接ぎ木境界部の木質部について行った。

試験2. ASGV の標準指標植物と *M. hupehensis* の ASGV に対する感受性の比較

(1)接種源

ASGV に感染している下記の10樹を供試した。接種源のうち P-208は *Chenopodium quinua* から戻し接種した単独感染樹(11)であり、農林水産省果樹試験場から譲り受けた。その他の接種源は *M. hupehensis* と *M. sieboldii* (MO 65) の茎葉部に病徴を示さず、ELISA 法で陽性反応 (Table 9) を示す青森県りんご試験場保存のりんご品種・台木を供試した。

P-208 (果樹試験場産分離株、りんご実生)

A-5 (青森県りんご試験場産、台木 M. 26)

A-6 (青森県りんご試験場産、品種‘ふじ’)

A-7 (青森県りんご試験場産、品種‘王林’)

A-8 (青森県りんご試験場産、品種‘ガラ’)

A-9 (青森県りんご試験場産、品種‘紅玉’)

A-10 (青森県りんご試験場産、品種‘花祝’)

A-11 (青森県りんご試験場産、品種‘陸奥’)

A-12 (青森県りんご試験場産、品種‘青り3号’)

A-13 (青森県りんご試験場産、*M. prunifolia* var. *ringo*)

(2)ASGV の検定方法

ASGV の検定は、*M. hupehensis* と従来の標準指標植物である Virginia Crab (k-6) 及び *M. sieboldii* (MO 65) を指標植物として用い、鉢植えのりんご実生上での二重芽接ぎ法(試験1)によった。接種は、1区3反復とし、1989年と1990年の各年6月に行い、1991年11月に接ぎ木境界部の木質部における病徴を調査した。また、ASGV の検定は、*M. sieboldii* (MO 65) による検定を1年目に無加温のガラス室内で行った他はすべて屋外で行った。

なお、接種源からの ELISA 法による ASGV

の検定は、1990年5月23日に各接種源から採集した若葉と1990年12月23日に採集した新しょうの樹皮を検定部位として供試した。ELISA法では、農林水産省果樹試験場から譲り受けた P-208 B の抗血清を供試し、間接 (F(ab')<sub>2</sub>)法 (12)で行った。間接法では、初めに、接種源の各検出部位に、10倍量の0.05% Tween 20、2% ポリビニルピロリドン、0.2%卵白アルブミン、0.1%アスコルビン酸加用リン酸緩衝液 (PH 6.0)を加えて磨砕した粗汁液を、低速遠心分離後、予め500倍希釈の F(ab')<sub>2</sub> を吸着させたプレートに入れた。4°Cに1晩静置後、プレートを洗浄し、その後、Conjugate (パーオキシダーゼ結合プロテイン A) と未分画抗血清を *C. quinoa* の葉の粗汁液を加用したリン酸緩衝液 (PH 8.0) でそれぞれ5,000倍、20,000倍になるように希釈した液をプレートに入れた。さらに、4°Cに1晩静置後、プレートを洗浄し、その後、酵素基質を加え、室温に60分静置後、吸

光度を測定した。

### 試験3. 二重切り接ぎ法と二重芽接ぎ法の比較

#### (1)接種源

ウイルスの接種方法としての二重切り接ぎ法と二重芽接ぎ法を比較するために、下記のウイルスに単独または複合感染しているリンゴ実生またはリンゴ品種を接種源として供試した。

ACLSV: P-203、MO-5

ASPV: A-2、A-4

#### (2)接種方法

素焼鉢に植えたリンゴ実生上での二重切り接ぎ法並びに二重芽接ぎ法 (試験1) でウイルスを接種した。二重切り接ぎ法では、接種源の休眠枝切り枝を鉢植えの実生台木へ切り接ぎした後、その上に直ちに *M. hupehensis* の2個の芽が着いた休眠枝を切り接ぎした。接種は、1区3~5反復とし、1991年と1992年の5月に行った。病徴の観察は、寒冷紗で被覆した約23~27°Cのガラス室内または屋外で行った。

## III. 結

### 1. 二重芽接ぎ法で接種した ACLSV, ASPV 及び ASGV に対する *M. hupehensis* の反応

#### (1)ASGV に対する *M. hupehensis* の反応

ASGV の接種個体では、いずれの接種源も茎葉部には病徴を現さなかったが、実生台木との接ぎ木境界部の木質部にライン状のネクロシス (え死) を現し、その発現程度が接種源によって異なった。これらに対して ACLSV の普通系 (P-203)、Hopa 系 (MO-41) 及びミツバ潜在系 (MO-5) の接種個体では、接ぎ木境界部の木質部に病徴が観察されなかった (Table 1)。

#### (2)ACLSV と ASPV に対する *M. hupehensis* の反応

ACLSV の接種個体では、接種源のうち普通系、マルバ潜在系 (P-11)、Hopa 系及び K-14 系 (MO-31) の4系統が、年次によって若干変

## 果

動したが、接種後8~12日から葉に病徴を現した。1984年4月上旬の接種試験では、これらの4系統は、接種後約20~30日で *M. hupehensis* の新しょう先端部の若葉に赤色斑点、えそ斑点、不整形なネクロシス及び奇形などの病徴を現し (Plate I、1a、1b)、このうちマルバ潜在系と

Table 1 Symptoms at the scion-rootstock union induced by ASGV or ACLSV

Isolate	Symptoms <sup>a)</sup>
ASGV	
A-5	N
A-6	(N)
ACLSV	
P-203	O
MO-41	O
MO-5	O

a) N: necrosis, O: no symptoms, ( ): mild symptom.

K-14系の接種個体では新しょう先端部全体が褐変枯死する症状も観察された。接種後2～3か月の後期には、いずれの接種源も、初期に観察された病徴の他に葉の退緑色斑点や樹皮のネクロシスなども現し、接種個体を衰弱させた。4系統の間では発現した病徴の種類にほとんど差がみられなかった。ミツバ潜在系の接種個体では、他の4系統よりも遅く、26日後に葉に病徴が認められ、病徴の発現程度も軽かった。Jay darling系(MO-43)の接種個体は病徴を現さなかった(Table 2、3)。M. hupehensisに病徴を現した5系統の接種個体では、病徴の発現程度が個体によって異なり、特に、ミツバ潜在系の場合、5個体中3個体が無病徴であった。

ASPVの接種個体では、1985年6月と1986年

5月の接種試験で、供試した3接種源がいずれもACLSVの供試系統よりも病徴発現が遅く、接種後12～19日で病徴を現した。1984年4月の接種試験では、供試した3系統がACLSVのミツバ潜在系を除いた4系統とほぼ同時期か、あるいはやや遅れて病徴を現した。ASPVの4接種源は、いずれも初期にM. hupehensisの新しょう上位葉にエピナスステイ(上偏生長)を、また、中～下位葉に赤色斑点を現した(Plate I、3a)。これらの発現程度は個体によって異なった。接種後2～3か月の後期にはこれらの病徴の他に葉のえそ斑点、不整形な退緑色斑点及び樹皮のネクロシスなどの病徴が接種個体で認められた(Table 2、4)。

Table 2 Latent period of ACLSV and ASPV inoculated to *M. hupehensis*

Year	Latent period (days)										
	ACLSV					ASPV				ACLSV+ASPV	
	P-203	P-11	MO-31	MO-41	MO-5	A-1	A-2	A-3	A-4	P-203+A-2	P-203+A-4
1984	8	12	10	9	26	12	12	12	—	—	—
1985	9	— <sup>a)</sup>	—	—	—	—	—	17	12	—	—
1986	11	11	11	—	—	15	—	19	15	9	9

a) Dash : not tested.

Table 3 Symptoms on *M. hupehensis* inoculated<sup>a)</sup> with ACLSV

Isolate	Symptoms <sup>b)</sup>	
	Early <sup>c)</sup> stage of growth	Late <sup>d)</sup> stage of growth
P-203	RS, NS, LN	RS, NS, LN, CLS, BN, TN
P-11	RS, TN, LN	RS, NS, LN, CLS, BN, TN, Mal
MO-31	RS, NS, TN, LN, Mal	RS, NS, LN, CLS, BN, TN, Mal
MO-41	RS, NS, LN, Mal	RS, NS, LN, CLS, BN, TN, Mal
MO-5	RS	RS, CLS
MO-43	O	O

a) Inoculations were made in a growth chamber maintained at a temperature of 20°C in late March to early April, 1984.

b) RS : red leafspot, NS : necrotic leafspot, LN : leaf necrosis, CLS : chlorotic leafspot, BN : bark necrosis, Mal : malformation, TN : top necrosis and O : no symptoms.

c) 20-30 days after inoculation.

d) 2-3 months after inoculation.

Table 4 Symptoms on *M. hupehensis* inoculated<sup>a)</sup> with ASPV

Isolate	Symptoms <sup>b)</sup>	
	Early stage of growth	Late stage of growth
A-1	RS, E	RS, E, NS, BN, (CLS)
A-2	RS, E	RS, E, NS, BN, TN
A-3	RS, E	RS, E, (BN), (NS), (CLS)
A-4	RS, E	RS, E, BN, (NS), (CLS)

a) A-1, A-2 and A-3 were inoculated in a growth chamber maintained at a temperature of 20°C in early April, 1984. A-4 was inoculated in late May, 1985.

b) RS : red leafspot, E : epinasty, NS : necrotic leafspot, BN : bark necrosis, CLS : chlorotic leafspot, TN : top necrosis and ( ) : mild symptom.

Table 5 Symptoms on *M. hupehensis* inoculated<sup>a)</sup> with ACLSV and ASPV

Combination of isolate	Symptoms <sup>b)</sup>	
	Early stage of growth	Late stage of growth
P-203+A-2	RS, NS, TN, BN, (LN), Mal	RS, NS, LN, (CLS), BN, TN, Mal, E
P-203+A-4	RS, NS, TN, BN, LN	RS, NS, LN, (CLS), BN, TN

a) Inoculations were made in May or June, 1986.

b) RS : red leafspot, NS : necrotic leafspot, LN : leaf necrosis, CLS : chlorotic leafspot, BN : bark necrosis, Mal : malformation, TN : top necrosis, E : epinasty, O : no symptoms and ( ) : mild symptom.

Table 6 Symptoms on *M. hupehensis* inoculated with ACLSV one year after inoculation

Isolate	Symptoms <sup>a)</sup>
P-203	CLS, RS, (NS), Mal
MO-31	CLS, RS, Mal
MO-41	CLS, RS, Mal
MO-5	CLS, (RS), Mal
MO-43	O

a) RS : red leafspot, NS : necrotic leafspot, CLS : chlorotic leafspot, Mal : malformation, ( ) : mild symptom and O : no symptoms.

次に、1986年7月に ACLSV 普通系 (P-203) と ASPV の 3 接種源を組み合わせる両者を同時に接種した結果、いずれの組み合わせでも、接種後9日から病徴を現し、ASPV のみを接種した場合よりも明らかに早く病徴を現した。これらの個体では、初期に ACLSV 普通系を単独に接種した場合とほぼ同じ病徴のみを現したが、その後、ASPV の単独接種個体で観察された葉のエピナスティ症状も若干認められた (Table 5)。

1984年の接種個体を休眠、越冬させ、次年度に病徴を観察したところ、ACLSV 3系統 (P-203、MO-31、MO-41) の接種個体では、葉に不整形な退緑色斑点、赤色斑点、軽微なえそ斑点及び奇形などの病徴が観察された。ミツバ潜在系の接種個体では、葉の退緑色斑点が目立って観察された。Jay darling 系は茎葉部に病徴を現さなかった。ASPV の接種個体では、接種当年に接ぎ穂部分 (*M. hupehensis*) が枯死する個体が多かったので、2年目の病徴観察ができなかった (Table 6、Plate II、2)。

## 2. ASGV の標準指標植物と *M. hupehensis* の ASGV に対する感受性の比較

供試したすべての接種源は、いずれの指標植物にも病徴を現したが、病徴の発現程度は接種源と検定期間によって異なった。接種源のうち、P-208、A-5、A-7、A-8、A-9、A-10、A-11及びA-12の接種源は、いずれの指標植物でも接ぎ木境界部の木質部にネクロシスやピッキングなどの病徴を明瞭に現した (Plate II、

3a, 3b)。Virginia Crabでは、他の指標植物と異なり、木質部に grooving 症状も観察された。これらに対して、A-6とA-13の接種源は、検定期間が17か月の場合、いずれの植物でも、他の接種源よりも軽い病徴を現し、無病徴または接ぎ木境界部の木質部におけるピッチング並びに軽微なネクロシスを現した。また、検定期間が29か月の場合、17か月の場合よりも病徴が明瞭になったが、他の接種源よりはその発現程

度がやや軽かった。指標植物の中では、*M. sieboldii* (MO 65) がこれらの接種源に対して他の2種よりも若干病徴が明瞭であった (Table 7, 8)。

接種源のうち、P-208、A-5、A-7、A-8、A-9、A-11及びA-12の7種類の接種個体では、接種後3年目に *M. hupehensis* に開花がみられたが、花卉に異常は認められなかった。

Table 7 Symptoms on Virginia crab, *M. sieboldii* (MO 65) and *M. hupehensis* inoculated with ASGV 17 months after inoculation

Isolate	Symptoms <sup>a)</sup>		
	Virginia Crab	<i>M. sieboldii</i> (MO 65)	<i>M. hupehensis</i>
P-208	N	N, P	P
A-5	N, SG	N	N
A-6	O, P	(N), P	O, P
A-7	N	N, P	N, P
A-8	N	N	N
A-9	N, SG	N, P	N
A-10	N, SG	—	N
A-11	N	N	N, (P)
A-12	N	N	N, P
A-13	O	O, P	O, (P)

a) N : necrosis at the scion-rootstock union, P : stem pitting at the scion-rootstock union, SG : stem grooving, O : no symptoms, Dash : not tested and ( ) : mild symptom.

Table 8 Symptoms on Virginia crab, *M. sieboldii* (MO 65) and *M. hupehensis* inoculated with ASGV 29 months after inoculation

Isolate	Symptoms <sup>a)</sup>		
	Virginia Crab	<i>M. sieboldii</i> (MO 65)	<i>M. hupehensis</i>
P-208	—	N	N
A-5	—	N	N
A-6	(N), P	N	(N)
A-7	N, SG	N	N
A-8	N	N	N
A-9	N, SG, P	N	N
A-10	N, SG	—	—
A-11	N	N	N
A-12	N, SG	N	N
A-13	(N)	(N), P	P

a) See Table 7.



Table 9 Detection of ASGV from inocula by an indirect ELISA

Isolate	Absorbance 492nm <sup>a)</sup>	
	Young leaves <sup>b)</sup>	Dormant scion bark
P-208	0.72	0.84
A-5	0.59	0.46
A-6	0.45	0.29
A-7	0.82	0.19
A-8	0.27	0.44
A-9	0.65	—
A-10	0.27	—
A-11	0.19	0.39
A-12	0.18	0.26
A-13	0.40	—
Healthy	0.08±0.007	0.08±0.005

a) Results were regarded as positive for test samples if the absorbance was equal or more than twice that of healthy sample.  
Dash : not tested.

b) Samples were collected in May 23, 1990.

Table 10 Reactions of *M. hupehensis* inoculated with ACLSV (P-203) by double grafting and double budding

Observation date	Days after inoculation <sup>a)</sup>	Symptoms <sup>b)</sup>	
		Double grafting	Double budding
May 18	21	RS (1/4) <sup>c)</sup>	O
20	23	RS, NS (3/4)	O
21	24	RS, NS (3/4)	LN, NS (1/4)
22	25	RS, NS, LN (4/4)	LN, NS (1/4)
24	27	RS, NS, LN, D (4/4)	LN, NS (2/4)
26	29	RS, NS, LN, D (4/4)	LN, NS (2/4)
30	33	RS, NS, LN, D (4/4)	RS, NS, LN, Mal (2/4)
June 2	36	RS, NS, LN, D (4/4)	RS, NS, LN, Mal (4/4)
6	40	D (4/4)	RS, NS, LN, Mal, TN (4/4)

a) Inoculations were made in the field in April 27, 1992.

b) RS : red leafspot, NS : necrotic leafspot, LN : leaf necrosis, Mal : malformation, TN : top necrosis, O : no symptoms and D : dieback.

c) trees infected/trees inoculated.

Table 11 Reactions of *M. hupehensis* inoculated with ACLSV (MO-5) by double grafting and double budding

Observation date	Days after inoculation <sup>a)</sup>	Symptoms <sup>b)</sup>	
		Double grafting	Double budding
May 26	29	RS, Mal (1/4) <sup>c)</sup>	O
30	33	RS, Mal (2/4)	O
June 6	40	RS, Mal (4/4)	RS (1/3)
12	46	RS, Mal (4/4)	RS, (NS), Mal (1/3)
18	52	RS, Mal (4/4)	RS, (NS), Mal (1/3)

a) Inoculations were made in the field in April 27, 1992.

b) RS : red leafspot, Mal : malformation, O : no symptoms and ( ) : mild symptom.

c) trees infected/trees inoculated.

3. 二重切り接ぎ法と二重芽接ぎ法の比較

(1) ACLSV

1992年4月下旬に屋外で ACLSV 普通系 (P-203) を接種し、病徴を観察した結果、二重切り接ぎ法による接種個体では、*M. hupehensis* の発芽または展葉とほぼ同時の接種後21~23日で葉に赤色斑点やえそ斑点などの病徴を現し、接種後25日ですべての個体で病徴が観察されるようになった。27日後には *M. hupehensis* の発芽展葉部分が褐変枯死する個体もみられ、40日後にすべての接種個体で発芽展葉部分が褐変枯死した。これらの個体では新しょうが伸長しなかった。二重芽接ぎ法による接種個体では、接種後24日で1個体が、また、27日で2個体が病徴を現し、その後、二重切り接ぎ法よりも遅く、接種後36日ですべての個体で病徴が観察されるようになった。この場合、接種した4個体中3個体で新しょうが伸長した (Table 10)。

同時期に屋外でミツバ潜在系 (MO-5) を接種した試験では、二重切り接ぎ法の場合、接種後29日で葉に赤色斑点と奇形を現し、40日ですべての個体が同じ病徴を現した (Plate II, 1a, 1b)。二重芽接ぎ法による接種個体では、3個体

中1個体が接種後40日で病徴を現したが、他の2個体は病徴を現さなかった (Table 11)。

次に、1991年4月下旬に寒冷紗で被覆した高温 (23~27°C) のガラス室内で ACLSV 普通系 (P-203) を接種した結果、二重切り接ぎ法による接種個体では、接種後9日で *M. hupehensis* の若葉にえそ斑点を現し、接種後14日ですべての接種個体が新しょう葉に退緑斑点と奇形を現した。この際、3個体で開花がみられ、これらの花では花卉にもえそ斑点と奇形が観察された (Plate I, 2a, 2b)。二重芽接ぎ法による接種個体では、接種後10日で1個体が、また、11日で2個体が葉にえそ斑点を現し、その後、二重切り接ぎ法よりも遅く、接種後33日ですべての接種個体で葉に病徴を現した。この場合も2個体で開花がみられ、これらの花では花卉に、二重切り接ぎ法と同様にえそ斑点と奇形が観察された (Table 12, 13)。ガラス室内での試験の場合、2方法によるいずれの接種個体でも、新しょうの伸長がみられ、また、屋外の場合と異なり、接ぎ穂 (*M. hupehensis*) 部分が褐変枯死することはなかった。

Table 12 Reactions of *M. hupehensis* to ACLSV (P-203) by double grafting and double budding

Observation date	Days after inoculation <sup>a)</sup>	Symptoms <sup>b)</sup>	
		Double grafting	Double budding
April 30	9	NS (2/4) <sup>c)</sup>	O
May	1	NS (3/4)	NS (1/4)
	2	NS (4/4)	NS (2/4)
	5	NS, CLS, Mal (4/4)	NS (2/4)
	8	NS, CLS, Mal (4/4)	NS, CLS, Mal (2/4)
	10	NS, CLS, Mal (4/4)	NS, CLS, Mal (2/4)
	21	NS, CLS, RS, MaL (4/4)	NS, CLS, RS, Mal (2/4)
	23	NS, CLS, RS, MaL (4/4)	NS, CLS, RS, Mal (4/4)
	26	NS, CLS, RS, MaL (4/4)	NS, CLS, RS, Mal (4/4)
	30	NS, CLS, RS, Mal (4/4)	NS, CLS, RS, NLS (4/4)
	June 9	49	—

a) Inoculations were made in a growth chamber maintained at a temperature of 23~27°C in April 21, 1991.

b) RS : red leafspot, NS : necrotic leafspot, Mal : malformation, O : no symptoms and Dash : not observed.

c) trees infected/trees inoculated.

## (2) ASPV

1991年4月下旬に屋外で ASPV の A-4 を接種した結果、二重切り接ぎ法による接種個体では、接種後29日から葉にエピナスティを現し (Plate I, 3b)、接種後48日で葉に赤色斑点とえそ斑点を、また、樹皮にネクロシスを現した。二重芽接ぎ法による接種個体では、二重切り接ぎ法よりも明らかに遅く、接種後79日で葉に赤色斑点とえそ斑点を認めたに過ぎなかった (Table 14)。二重切り接ぎ法の場合、すべての接種個体で *M. hupehensis* に開花がみられたが、花卉に異常は認められなかった。また、いずれの方法による接種個体でも、接ぎ穂部分に新しょうの伸長がみられた。

同時期に、寒冷紗で被覆した高温のガラス室内で接種源 A-2 を接種した試験では、二重切

り接ぎ法の場合、接種後16日で新しょう葉にエピナスティが現れ、26日ですべての個体が同じ病徴を現した。接種後30日では、樹皮のネクロシスが観察され、その後、赤色斑点やえそ斑点なども現した。この際、接種した4個体中2個体で *M. hupehensis* に開花がみられたが、花卉に異常は認められなかった。二重芽接ぎ法では、二重切り接ぎ法よりも遅く、接種後30日で1個体が葉に病徴を軽く現した。その後、次第に病徴を現す個体が増え、49日ですべての接種個体が病徴を現した。この場合、二重切り接ぎ法よりも葉のエピナスティが軽く現れた (Table 13, 15)。

ガラス室内での接種試験では、二重切り接ぎ及び二重芽接ぎによるいずれの接種個体でも、接ぎ穂部分に新しょうの伸長がみられた。

Table 13 Symptoms on petals of *M. hupehensis* inoculated<sup>a)</sup> with ACLSV or ASPV

Isolate	Symptoms <sup>b)</sup>	
	Double grafting	Double budding
ACLSV		
P-203	NS, Mal	NS, Mal
ASPV		
A-2	O	—

a) Inoculations were made in a growth chamber maintained at a temperature of 23°-27°C in April 21, 1991.

b) NS : necrotic leafspot, Mal : malformation, O : no symptom and Dash : not testetd.

Table 14 Reactions of *M. hupehensis* inoculated with ASPV (A-4) by double grafting and double budding

Observation date	Days after inoculation <sup>a)</sup>	Symptoms <sup>b)</sup>	
		Double grafting	Double budding
May	10	O	O
	21	E (2/5) <sup>c)</sup>	O
	30	E (4/5)	O
June	9	E, RS, BN, TN (4/5)	O
	20	E, RS, NS, BN, TN (5/5)	O
July	10	—	NS, (RS) (3/5)

a) Inoculations were made in the field in April 22, 1991.

b) E : epinasty, O : no symptoms, ( ) : mild symptom, RS : red leafspot, NS : necrotic leafspot, BN : bark necrosis and Dash : not observed.

c) trees infected/trees inoculated.

Table 15 Reactions of *M. hupehensis* inoculated with ASPV (A-2) by double grafting and double budding

Observation date	Days after inoculation <sup>a)</sup>	Symptoms <sup>b)</sup>	
		Double grafting	Double budding
May	7	E (2/4) <sup>c)</sup>	O
	10	E (2/4)	O
	12	E (3/4)	O
	17	E (4/4)	O
	21	E, (BN) (4/4)	(E) (1/4)
	26	TN, RS, NS, E, BN (4/4)	(E), BN, (TN), RS, NS (2/4)
	30	TN, RS, NS, E, BN (4/4)	TN, BN, (E), RS, NS (3/4)
June	9	—	TN, BN, (E) (4/4)

a) Inoculations were made in a growth chamber maintained at a temperature of 23°-27°C in April 21, 1991.

b) RS : red leafspot, NS : necrotic leafspot, TN : top necrosis, O : no symptoms, E : epinasty, BN : bark necrosis, ( ) : mild symptom and Dash : not observed.

c) trees infected/trees inoculated.

#### IV. 考 察

*M. hupehensis* の ACLSV に対する反応について、松中ら(3)は、この植物が ACLSV の普通系、マルバ潜在系及びミツバ潜在系に対して感受性を示すことを明らかにした。また、GILMERら(1)も、わが国で *M. hupehensis* が *M. sheideckeri* とされていた時に、この植物が ACLSV に対して感受性であることを既に報告している。

本試験の結果、供試した6系統中5系統が *M. hupehensis* に病徴を現した。5系統のうち Hopa 系と K-14系は、これまで検討されていなかったもので、今回の試験結果から新たに *M. hupehensis* に病徴を現すことが判明した。また、ミツバ潜在系は、従来の ACLSV の木本指標植物では病徴が一時的にしか観察されないことからその検出が難しかった(8)。しかし、本試験の結果、他の系統よりも軽症ではあるが、特に二重切り接ぎ法で接種すると明瞭に病徴を現すことから、その検出が可能と考えられた。このように本試験の結果から *M. hupehensis* が ACLSV に対して高い感受性を示すことが明らかにされた。

ACLSV が *M. hupehensis* に現す病徴について、これまでは茎葉部にのみ現すことが報告されていた(1、2、3、4、6、9)が、一部(普通系)の系統について調査した結果、花弁にも病徴を現すことが明らかになった。花弁の病徴は、ASPV と ASGV を接種した個体ではみられないので、ACLSV 感染の指標として有用と考えられる。

病徴の系統間差異について、普通系、マルバ潜在系、Hopa 系及びK-14系の4系統は初期と後期のいずれの調査時期にもよく似た病徴を現した。このことからこれらの系統は病徴による区別が困難と考えられる。ミツバ潜在系は、病徴を軽く現す点で他の系統と区別されるが、病徴の種類が重複しているため、他の4系統の場合と同様に、病徴で他の系統と区別することは難しい。

GILMERら(1)は、*M. hupehensis* が ASPV に対して、epinasty-decline 症状を現し、ASPV の指標植物として十分なものであるとしている。

本試験の結果、供試した接種源はいずれも

*M. hupehensis* に病徴を現した。その際、いずれの接種個体でも初期に葉のエピナスティと赤色斑点が観察され、その後、その他の斑点症状や樹皮のネクロシスなどを現し、衰弱した。葉のエピナスティは ACLSV の接種個体では観察されず、ASPV 接種個体に特異的に認められた。これらのことから *M. hupehensis* は ASPV に対して感受性を示し、しかもその際に現れる病徴には特異性のあることがわかった。本試験の結果は GILMER ら(1)の報告とほぼ一致するものである。

前述のように、ASPV が *M. hupehensis* に現す病徴は ACLSV と異なっていた。ACLSV の主要系統の場合、初期にエピナスティ症状はみられず、先端部の若葉から赤色斑点、えそ斑点及び不整形なネクロシスなどの病徴が観察された。さらに病徴の潜伏期間も ASPV より短い傾向がみられた。このように、ACLSV と ASPV は *M. hupehensis* に現す病徴が異なるので、病徴の種類によって両者の区別が可能と考えられる。

ASPV の指標植物については、柳瀬・山口(10)が各地より集めた18系統のミツバカイドウ (*M. sieboldii*) へ ASPV 分離株の芽接ぎ接種試験を行い、その結果、これまでの標準指標植物である Virginia Crab や SPY227 よりも優れた系統 (MO-65) を選抜している。この植物は、ASPV の潜伏期間が温室内で20~30日と短く、葉に明確なえそ斑点を現すので病徴の見分けが容易である。また、温室内で接種当年であれば ACLSV と ASGV の影響を受けないため ASPV のみの検出も可能である。ASPV の潜伏期間は、これまでの指標植物の場合、GILMER ら(1)は Virginia Crab が mild isolate に対して病徴を現すまで32~34か月を要し、SPY227 がそれよりも短く6~10か月であるとしている。

これらに対して、*M. hupehensis* における

ASPV の潜伏期間は、約20°Cのガラス室内で芽接ぎ接種した場合が12~19日であり、23~27°Cのガラス室内で切り接ぎと芽接ぎにより接種した場合が16日と30日であった。このことから、この植物での ASPV の潜伏期間は、*M. sieboldii* (MO65) よりもやや短いか、同程度と考えられる。

しかし、*M. hupehensis* では、約20°Cのガラス室内で ASPV と ACLSV を同時に接種すると、ASPV 感染を示す病徴がほとんどみられなくなった。このことは、潜伏期間が ACLSV の方が短いことによると推察されるが、そのような場合、ACLSV の検出はできても、ASPV の検出は困難になることが予想される。

*M. hupehensis* の ASGV に対する反応について試験1で検討した結果、接種源によって程度差はみられたもののいずれの接種源も実生台木との接ぎ木境界部の木質部に病徴を現した。このことから、*M. hupehensis* は ASGV に対しても感受性を示すことが明らかになった。これについては斎藤ら(6)も ASGV をこの植物へ直接接種する方法で検討し、その結果、短期間で接ぎ木部え死の病徴が出現することを報告している。

ASGV の標準指標植物 (Virginia Crab, *M. sieboldii* (MO65)) と *M. hupehensis* の ASGV に対する感受性を比較したところ、いずれの指標植物でも供試したすべての接種源の検出が可能であった。しかし、病徴の発現程度は接種源によって異なり、試験3で供試した接種源のうち8種類の接種源はいずれの植物でも検出が容易であったものの、残りの2種類の接種源は病徴の発現程度が軽く、その検出がやや難しかった。指標植物の中では *M. sieboldii* (MO65) が若干ながら病徴を明瞭に現した。これらのことから、ASGV に対する感受性は、Virginia Crab と *M. hupehensis* がほぼ同等とみなされ、*M. sieboldii* (MO65) が前2者と同等または前2者

よりも若干優ように考えられた。また、今回の試験結果から ASGV には病原性の異なる系統が存在することが示唆された。このことは、MINKら(5)も既に報告している。病原性の弱い系統については、検定期間を3年程度にすれば、その検出が確実にできると考えられる。

二重切り接ぎと二重芽接ぎの2方法で *M. hupehensis* ヘウイルスを接種し、その反応を比較したところ、ACLSV 普通系を接種した場合、屋外とガラス室内のいずれの試験でも、二重切り接ぎの方が早く病徴を現した。また、屋外の試験では、病徴の発現程度も明らかに重かった。ミツバ潜在系を接種した場合は、二重切り接ぎの方が病徴を早くかつ明瞭に現した。さらに、ASPV の場合も同様の結果であった。これらのことから、二重切り接ぎ法は二重芽接ぎ法よりも病徴を早くかつ激しく現すことがわかった。このことは二重切り接ぎの方が接種されるウイルスの濃度が高いために生じたと推察される。また、この試験結果から、ACLSV のミツバ潜在系については、二重切り接ぎの方がその検出に適していると考えられた。しかし、二重切り接ぎ法では、特に ACLSV 普通系を接種した屋外の試験の場合、接種個体の発芽または展葉とほぼ同時に病徴が現れ、その後、すべての接種個体の接ぎ穂部分が枯死した。このため発芽前に病徴が激しく現れたり、病徴の調査が遅れたりすると、接ぎ穂部分の枯死によりその観察ができなくなることも考えられる。その点、二重芽接ぎ法では、病徴の発現程度は比較的軽い、確実に病徴を観察することができた。

次に、高温のガラス室内で ACLSV 普通系を接種した試験では、いずれの方法でも屋外よりも早く、また軽く病徴が現れた。これらのこと

はいずれも高温の影響によるものと推察される。また、ASPV の接種試験で、二重切り接ぎ法では特異的な病徴が明瞭に認められたが、二重芽接ぎ法では、特に試験1の結果と比較すると、その発現が不明瞭であった。このことは、接種時期、ガラス室内の温度及び気象条件などが影響したためと推察されるが明らかでない。

以上のように、本試験の結果から、*M. hupehensis* は ACLSV の1系統には反応を示さなかったが、わが国で台木として使用されているマルバカイドウやミツバカイドウに病徴を現し、高接病を起こす ACLSV、ASPV 及び ASGV の各系統に感受性を示すことが明らかになった。特に ACLSV と ASPV に対してはその検出感度が従来の指標植物と同等若しくはそれよりも高いと考えられる。また、ASGV についても従来の指標植物とほぼ同等にその検出が可能と考えられた。これらのことから、*M. hupehensis* は ACLSV、ASPV 及び ASGV の指標植物として有用と考えられる。この植物を指標植物として利用すると、1種類の植物で3種類のウイルスの検定が可能になるので、ウイルスフリー化個体の選抜を目的としたウイルス検定には特に有用である。

接種時の環境条件が *M. hupehensis* の病徴発現に及ぼす影響について、今回の試験結果から、春期から夏期にかけての約20°C定温と23~27°Cのガラス室内並びに4月下旬~6月上旬の屋外の条件で、*M. hupehensis* が ACLSV、ASPV または ASGV に対して病徴を現すことがわかった。しかし、その他の接種時期や温度条件が病徴発現に及ぼす影響については未検討である。この点は今後の課題として残されている。

## V. 摘 要

*M. hupehensis* のリンゴクロロティックリーフスポットウイルス (ACLSV)、リンゴステム

ピットィングウイルス (ASPV) 及びリンゴステムブルーピングウイルス (ASGV) に対する反

応を明らかにするために、ACLSV の各種系統、ASPV 及び ASGV を *M. hupehensis* へ接ぎ木接種し、その反応を調査した。

20°C 定温のガラス室内で二重芽接ぎ法により ACLSV, ASPV 及び ASGV の合計12分離株を *M. hupehensis* へ接種したところ、ASGV の接種個体では、*M. hupehensis* の茎葉部に病徴が認められず、実生台木との接ぎ木境界部の木質部にライン状のネクロシス症状を現した。この症状は ASGV 接種によるものと考えられ、その発現程度が接種源によって異なった。ACLSV の接種個体では、普通系とマルバ潜在系を含む 5 系統が病徴を現し、このうちミツバ潜在系は他の系統よりも症状が軽かった。他の 4 系統は、接種後 8～12 日で新しょう先端部の若葉から赤色斑点、えそ斑点及び不整形なネクロシスなどの病徴を現し、その後、葉の退緑色斑点、樹皮のネクロシス及び新しょう先端部の褐変枯死などを現した。ASPV の接種源はいずれも *M. hupehensis* に病徴を現した。その場合、ACLSV よりもやや遅く、初期に上位葉のエピナスティと葉の赤色斑点を現した。その後、葉のえそ斑点や樹皮のネクロシスなども現したが、葉のエピナスティは ASPV 接種個体に特異的に認められた。ACLSV と ASPV を同時に接種したところ、ACLSV は検出できたが、病

徴による ASPV の検出は困難になった。これらのことから、*M. hupehensis* は ACLSV, ASPV 及び ASGV に対して感受性を示すことが明らかになった。

次に、ASGV の10分離株を *M. hupehensis*, Virginia Crab 及び *M. sieboldii* (MO 65) へ二重芽接ぎ法で接種し、それらの ASGV に対する感受性を比較したところ、接種源によって検出に難易がみられたが、いずれの指標植物でも供試分離株の検出が可能であった。供試植物の中では *M. sieboldii* (MO 65) が若干明瞭に病徴を現した。このことから、ASGV の検出感度は *M. hupehensis* と Virginia Crab が同等とみなされ、*M. sieboldii* (MO 65) が前 2 者と同等または前 2 者よりも若干優るように考えられた。

次に、ウイルスの接種方法としての二重芽接ぎ法と二重切り接ぎ法を比較したところ、ACLSV と ASPV のいずれの場合も二重切り接ぎ法の方が病徴を早くかつ激しく現した。ACLSV のミツバ潜在系については二重切り接ぎ法の方がその検出に適していると考えられた。

以上のような *M. hupehensis* の ACLSV, ASPV 及び ASGV に対する反応結果は、この植物が各ウイルスの指標植物として有用であることを示した。

## 引用文献

1. GILMER, R. M., G. I. MINK, J. R. SHAY, R. F. STOUFFER and R. C. McCRUM (1971). Latent viruses of apple. I. Detection with woody indicators. *Search Agriculture* 1 (10) : 9-15.
2. 町田郁夫・松中謙次郎 (1987). ACLSV の各種系統、ASPV 及び ASGV の木本指標植物 *Malus scheideckeri* に発現する病徴について。日植病報 53 : 93. (講要)
3. 松中謙次郎・瀬川一衛・山口 昭 (1976). リンゴ潜在ウイルスに関する研究 第3報 指標植物としての *Malus scheideckeri* Zabel について。日植病報 42 : 70. (講要)
4. 松中謙次郎・瀬川一衛 (1978). リンゴ潜在ウイルスに関する研究 第5報 *Malus scheideckeri* Zabel の単為生殖性実生のウイルス感受性。日植病報 44 : 389. (講要)
5. MINK, G. I., J. R. SHAY, R. M. GILMER and R. F. STOUFFER (1971). Latent viruses of apple. II. Symptoms in woody indicators and strain variations. *Search Agriculture* 1 (10) : 9-15.
6. 斎藤範彦・夏井 勉・大谷朋男 (1988). *Malus scheideckeri* による高接ぎ病の早期検定。植物研報 24 : 33-37.
7. 佐藤 耕・石山正行 (1990). りんご試保存の *Malus sheideckeri* について。園芸要旨。平2東北支部 : 1-2.
8. YANASE, H. (1974). Studies on apple latent viruses in Japan. The association of apple topworking disease with apple latent viruses. *Bull. Fruit Tree Res. Stn. Japan.* C 1 : 47-109.
9. YANASE, H., YAMAGUCHI, A., MINK, G. I. and SAWAMURA, k. (1979). Back transmission of apple chlorotic leafspot virus (type strain) to apple and productin of apple topworking disease symptoms in Maruba Kaidou (*Malus prunifolia* Bork. var. ringo Asami). 日植病報 45 : 369-374.
10. 柳瀬春夫・山口 昭 (1982). リンゴステムピッチングウイルスのための新しい指標植物、ミツバカイドウ MO-65. *Bull. Fruit Tree Res. Stn. Japan.* C 9 : 69-77.
11. YANASE, H. (1982). Back-transmission of apple stem grooving virus to apple seedlings and induction of symptoms of apple topworking disease in Mitsuba Kaidou (*M. sieboldii*) and Kobano Zumi (*M. sieboldii* var. *arborescens*) rootstocks. *Acta Horticulture* 130 : 117-122.
12. 柳瀬春夫・仲谷房治・宗形 隆・町田郁夫 (1986). 酵素結合抗体法の直接二抗体サンドイッチ法並びに間接法 (F(ab')<sub>2</sub>法) による apple chlorotic leafspot virus 及び apple stem grooving virus の各種系統の検出。 *Bull. Fruit Tree Res. Stn. Japan.* A 13 : 69-81.



## Reactions of *Malus hupehensis* to the Inoculation of Causal Viruses of Apple Topworking Disease

Ikuo MACHITA

Aomori Apple Experiment Station  
Kuroishi, Aomori, 036-03, Japan

### Summary

Reactions of *Malus hupehensis* to inoculations of apple stem grooving virus (ASGV), apple chlorotic leafspot virus (ACLSV) and apple stem pitting virus (ASPV) were investigated.

The inoculations by a double budding method induced peculiar symptoms on *Malus hupehensis* to each of these viruses. Thus, 1) ASGV induced necrosis at the graft union, 2) four ACLSV-isolates, each derived from either of the type strain, Maruba strain and two other sources, induced severe symptoms of red spot, necrotic spot and necrosis on young leaves, whereas the isolate ACLSV-MO 5 from *M. sieboldii* induced mild symptoms, and 3) ASPV induced epinasty and red leafspots on young leaves. Latent periods of the four ACLSV-isolates did not differ, each ranged from 8 to 12 days. The period was longer in ACLSV-MO5 and ASPV.

Combined inoculations of ACLSV and ASPV into *M. hupehensis* resulted in the symptoms peculiar to ACLSV.

No clear differences were detected in sensitivity to ASGV between *M. hupehensis* and the two standard indicator plants, *M. sieboldii*, and Virginia Crab. However, the symptoms differed according to the ASGV-isolates.

In regard to the inoculation methods, symptoms induced by the double grafting method were severer than by the double budding one for the inoculation of ACLSV and ASPV. In order to detect ACLSV-MO 5, the double grafting method was superior to the double budding one.

Since *M. hupehensis* was sensitive to all ACLSV, ASPV and ASGV with a basic symptom to each of them, it was considered to be an ideal as the indicator plant of these viruses.

## Explanation of plate

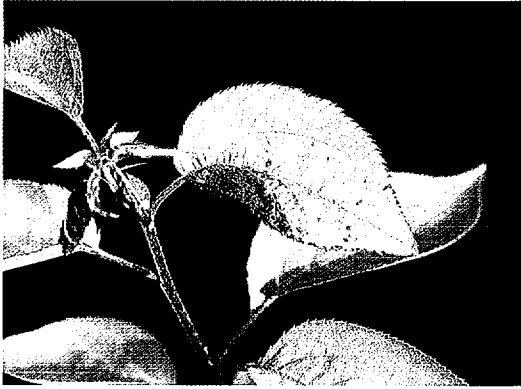
### Plate I

1. Symptoms on leaves and shoots of *M. hupehensis* inoculated with ACLSV (P-203) by the double budding method.
  - a. red spots and necrosis on leaves.
  - b. necrotic spots and necrosis on leaves and top necrosis on a shoot.
2. Symptoms on petals of *M. hupehensis* inoculated with ACLSV (P-203).
  - a. healthy petals.
  - b. malformed petals with necrotic spots.
3. Symptoms on leaves of *M. hupehensis* inoculated with ASPV (A-1 and A-4).
  - a. epinasty and red spots by the double budding method.
  - b. epinasty induced by the double grafting method.

### Plate II

1. Symptoms on leaves of *M. hupehensis* inoculated with ACLSV (MO-5).
  - a. a healthy plant.
  - b. malformed leaves with red spots induced by the double grafting method.
2. Symptoms on leaves of *M. hupehensis* inoculated with ACLSV (P203), one year after inoculation.
3. Symptoms on *M. hupehensis* inoculated with ASGV (A-5).
  - a. necrosis at the scion-rootstock unions.  
left, a healthy plant; and right, an inoculated plant.
  - b. pitting at the scion-rootstock union.

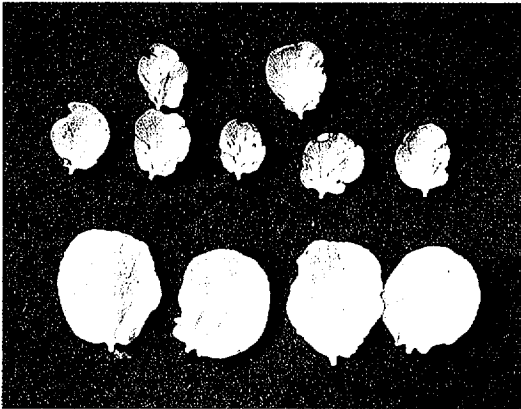
Plate I



1 a



1 b



2 b

2 a



3 a



3 b

Plate II



1 a



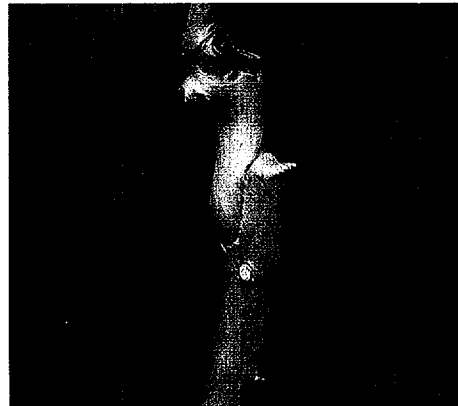
1 b



2



3 a



3 b