

Cymbidium Mosaic Virus と Odontoglossum Ringspot Virus の混合抗血清による洋ランの診断

末次 哲雄・松原 芳久

横浜植物防疫所国際課・羽田支所

I. まえがき

洋ランのウイルス病には数種類のウイルスが知られているが、その診断は非常にむづかしい。しかも、貴重な品種の輸出入も多く、ウイルス病の正確な診断は植物検疫、貴重品種の保存方法、栽培中の伝染源の根絶など多くの面からきわめて重要なことである。

一般的にいて、植物ウイルス病診断法として、指標植物の利用や抗血清を用いる血清学的方法が、非常に有効な方法であり、最近多くのウイルスについて研究が進められている。

ランについても WHITE and GOODCHILD (1955), JENSEN ら (1955), HOLLINGS (1956), CORBETT (1960), 井上 (1965) らが *Cymbidium mosaic virus* (CyMV) の指標植物として *Datura stramonium*, *Cassia occidentalis* と *Chenopodium amaranticolor* が、KADO ら (1964) は *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) にセンニチコウ (*Gomphrena globosa*) がそれぞれ利用できることを報告している。わが国では金子、赤羽ら (1964) のカトレア検定結果や井上 (1964, 1965) の詳細な報告がある。

抗血清利用については、NEWTON and ROSBERG (1952) が、ランのウイルス2種類について抗血清を作成することができたと報告して以来、その可能性が開かれた。その後 ZAITLIN ら (1954) はカトレアの Flower breaking 株から抗血清を作製し、重層法による血清学的反応を利用して罹病株を診断し得ると報告し、MURAKISHI ら (1954・1958) はランのウイルスのうち CyMV, ORSV および *Vanda mosaic virus* の3種類を血清学的に区別している。

MOREL (1960) は、生長点培養による *Cymbidium mosaic virus free* のシンビジウム株作出に際して、抗血清を診断に利用したと報告している。

さて、指標植物利用と抗血清利用の両診断法を比較すると、前者は相当な施設を必要とし、その上診断結果が

判明するまでに20日から30日間と言う長時日を要する点が欠点となり、輸出入ランの検査のような迅速性と正確さを同時に要求される場合には不適当な方法と考えられる。

筆者らは、正確でより迅速な診断方法を確立するため、抗血清利用に着目し、ランウイルス病の大半を占めていると言われている CyMV と ORSV の混合抗血清を作製し、その診断能力を調査したので報告する。

調査に際して格別のご指導を頂いた、植物ウイルス研究所小室康雄博士ほか各位、横浜植物防疫所松濤美文防疫管理官、指標植物の栽培、接種に協力を頂いた同所峰岸雄幸技官並びに罹病株など供試材料の一部を提供されたラン愛好家上原正吉氏に謝意を表する。

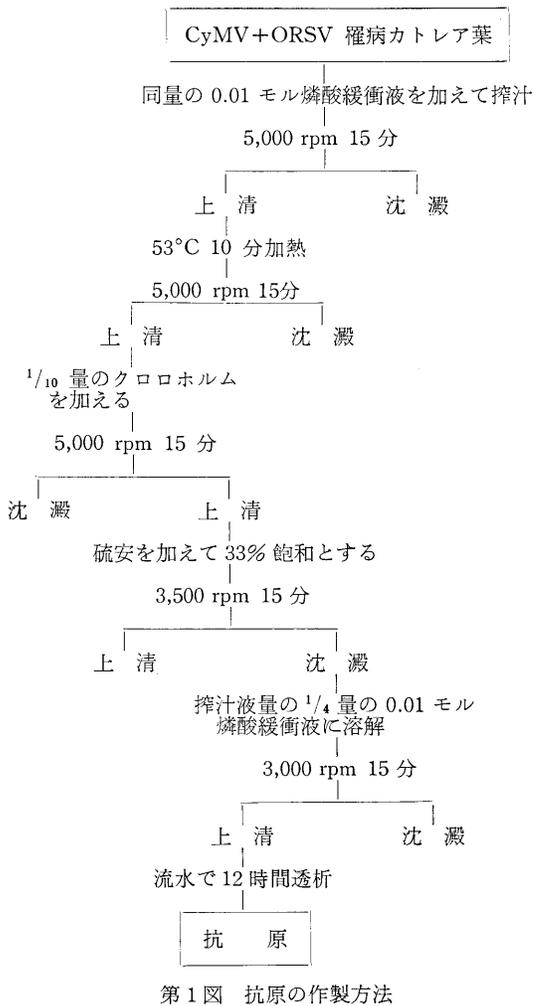
II. 抗血清の作製方法および調査方法

1. 抗原および抗血清の作製方法

抗血清の作製は第1図のように CyMV と ORSV に混合感染しているカトレア葉に同量の pH 7.0, 0.01 モル燐酸緩衝液を加えて破碎搾汁し、53°C 10 分間の加熱処理とクロロホルム処理を行なったあと硫酸塩析し低速遠心分離でウイルスを集めた。これを少量の上記燐酸緩衝液に溶解し、流水で12時間透析して抗原とした。

抗原ウイルスは *Datura stramonium*, *Chenopodium amaranticolor*, *Gomphrena globosa* に接種し CyMV と ORSV に混合感染していることを確認し、*Nicotiana glutinosa* に接種し、*Tobacco mosaic virus* と *Cucumber mosaic virus* が混在していないことを確めた。

この抗原を 5.0 ml づつ4日おきに6回、計 30 ml を家兎の耳静脈内に注射し、最終回の注射から7日後に全採血して抗血清を得た。抗血清の力価は混合法で CyMV, ORSV とともに 2,048 であった。また、実生から育てた無病のカトレア汁液とは、スライド法、混合法のいづれでも反応しなかった。



2. 抗血清の診断能力調査

横浜植物防疫所大和隔離農場で保管している 93 株のカトレアおよびその属間雑種を供試して、スライド法による抗血清の診断能力と指標植物の診断能力を比較調査した。

すなわち、供試株の病徴を記録したのち、各株の葉またはバルブの一部を切り取ってスライド上に 2 カ所ずつ、1 カ所当り 1~2 滴の搾汁液を滴下し、一方の汁液に 15 倍に薄めた抗血清をほぼ同量滴下すると同時に、他方の汁液には対照として生理的食塩水を同量加える。スライドをゆるやかに動かし、5 分間以内に生じた凝集反応で診断した。

一方、実験の都合上、スライド法に使用した汁液ではなく、同じ株ではあるが、他の部分に pH 7.0, 0.01 モル

磷酸緩衝液を加えて汁液をつくり 3 種の指標植物各 2 本ずつにカーボランダム法で接種し、CyMV または ORSV あるいは両者の混合感染の有無を調べた。すなわち、*D. stramonium*, *C. amaranticolor* の接種葉のみ local lesion をつくるものを CyMV 株とし、*C. amaranticolor*, *G. globosa* の接種葉のみに local lesion を生じるものを ORSV 株とし、いづれにも local lesion をつくるものを混合感染株とした。

また、抗血清の精度をより詳しく知るため、CyMV, ORSV 罹病汁液をそれぞれ各濃度に薄めて、上記同様にスライド法と指標植物により調査比較した。

抗血清による診断は、植物体のわずかな一部分を使用するものであるから、罹病株内のウイルスが偏在している場合には、当然診断結果に影響することが考えられるので、罹病株の各部分を混合法による抗血清反応と指標植物によりウイルス濃度分布について予備的調査を行った。

III 調査結果

抗血清と指標植物の診断能力比較調査結果は、第 1 表のとおりである。

第 1 表 抗血清によるスライド法と指標植物による診断との比較

区	病徴	株数	抗血清	
			+	-
指標植物に感染しなかった株	+	16	3	13
	-	20	5	15
	±	0	0	0
	計	36	8	28
CyMV 株	+	6	5	1
	-	15	14	1
	±	2	2	0
	計	23	21	2
ORSV 株	+	8	6	2
	-	13	7	6
	±	1	1	0
	計	22	14	8
CyMV + ORSV 株	+	4	4	0
	-	6	6	0
	±	2	2	0
	計	12	12	0

註：病徴+は Necrosis, Mosaic などのウイルス様病徴のあったもの、-はそれを認められないもの；±はウイルス様病徴とも無病徴とも断定できないもの

第2表 抗血清によるスライド法と指標植物による診断精度の比較

区	診断法	粗汁液	薄 め た 培 率											
			2	4	8	16	32	64	128	256	512	1,024	2,018	4,096
CyMV 株	抗血清	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	±	±	-	-	-
	<i>D. stramonium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
ORSV 株	抗血清	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	±	-	-	-	-
	<i>C. amaranticolor</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>G. globosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

第3表 罹病株内のウイルスの分布および濃度

ウイルス	検定方法	葉 1			葉 2				バルブ		新芽
		先端	基部	バルブ	先端	中部	基部	バルブ	1	2	
CyMV	抗血清	卅	+	+	-	+	+	+	-	-	+
	<i>D. stramonium</i>	卅	+	卅	±	±	+	+	±	+	+
ORSV	抗血清	卅	+	+	卅	-	-	-	+	+	-
	<i>G. globosa</i>	卅	卅	卅	卅	卅	±	+	卅	+	+

すなわち、肉眼による病徴診断は抗血清、指標植物何れの診断法よりも、信頼度が低い結果を得た。抗血清のスライド法による診断は指標植物による診断結果に近いものとなり、有用な診断手段であることを示した。しかし、指標植物に感染しなかった供試株 36 株のうち、抗血清反応は 8 株陽性を、CyMV 株 23 株中 2 株は陰性を、ORSV 株 22 株中 8 株は同じく陰性を示し、両ウイルス混合感染株 12 株のみが両診断法とも一致した結果になった。結局、指標植物によりウイルス病と診断された 57 株中抗血清では 47 株が罹病株と診断されたに止まった。

抗血清と指標植物の診断精度調査結果は第2表のとおりで、抗血清では CyMV、ORSV とも罹病汁液を 128 倍に薄めるまでは診断し得たのに対し、指標植物では、CyMV で 1,024 倍まで、ORSV 4,096 倍以上まで診断し得ることが判明し、スライド法による抗血清診断の方が可成り精度が低いことを示した。

罹病株内のウイルス分布および濃度についての予備的調査では、第3表のとおりに、混合法による血清学的検出、指標植物による検出のいずれでも、同一株の供試部分によりウイルス濃度にかなり開きがあることを示唆する結果となった。

IV. 考 察

ZAITLIN ら (1954) は、電気泳動法と電子顕微鏡観察により 2 種類のウイルス粒子が認められるカトレアの Flower color breaking 株から抗血清を作製し、CyMV 並びに ORSV の病徴を示す各々のランの汁液と反応したと報告しているので、筆者らの混合抗血清と同様の抗体を持つものであらうと考えられる。

また、彼らはクロロホルム処理後低速遠心分離して植物成分を除いたカトレア汁液を、重層法で反応させた結果、供試株 28 株中病徴から罹病株と推察した 6 株はすべて陽性を、健全株とした 14 株はすべて陰性を、罹病の有無不明株 8 株のうち 7 株は陽性を、1 株は陰性をそれぞれ示したと報じている。次にラン栽培者が診断した 99 株について調査しているが、罹病あるいは健全株と診断された 90 株のうち 69% は血清反応結果と一致し、診断不可能とされ 9 株のうち 7 株が血清反応陽性であったとしている。診断結果と血清反応結果が異なるものが 28 株あったわけであるが、そのうち 15 株は罹病株とされて血清反応陰性、13 株は健全株とされて血清反応陽性という結果を得ている。

以上引用した ZAITLIN らの結果は、筆者らのスライ

ド法より鋭敏と考えられる重層法を利用している点や、診断能力を比較するに当って一部電子顕微鏡観察を併用したほかはすべて病徴診断のみにより、供試株すべてを指標植物などで診断して比較していない点など、筆者らの方法とは異なる方法で得た結果である。しかし、両者の結果が傾向としてよく類似していること、すなわち、抗血清診断が肉眼による診断よりすぐれている点、抗血清診断が他の診断法に完全に符合しないけれども極めて近い結果を得ている点など、共に抗血清診断の有用性を示すものであろう。

ただ、ZAITLIN らは病徴診断結果の 69% しか抗血清診断が一致しなかった例を報告しているが、筆者らの結果では指標植物による診断の結果の 82% 強が抗血清診断結果と一致し、抗血清診断の有用性をより一層明らかにしたと言ってよいのではあるまいか。

抗血清の診断能力調査において、指標植物に感染しなかった 36 株のうち、8 株が抗血清反応陽性と言う結果を得、一見抗血清診断の方が精度が良いように思われる。しかし、抗血清診断の精度調査において、明らかに指標植物による診断の方がはるかに精度が高い結果を得ている。次に、罹病株内のウイルスの分布と濃度についての調査において、感染時期や感染部位と関連させて調査していないため断定することはできないが、同一株でも部分によってウイルス濃度に相当な差異があることを示唆する結果を得ている。

以上の考察から、抗血清反応のみ陽性であったものや、指標植物による診断結果と喰い違ったものについては、抗血清診断の精度が低いことに起因する場合や、調査方法で述べたように両診断法の供試部位が異なるため、ウイルスの偏在に起因している場合などが想像される。また、血清反応のみ陽性であったものについては、抗血作製の際に、供試した指標植物には感染し得ない他のウイルスが混在していて、抗体を生産していたことも考えられる。

これらを総合してみると、筆者らの CyMV と ORSV 混合抗血清によるスライド法での診断法は、指標植物による診断法より、その精度が低けれども、肉眼による病徴診断よりはるかに正確に罹病株を検査識別でき、その上、本法は操作が容易で短時間内に結果が判明する利点もあり、植物検疫上利用価値が高いと考えられる。

なお、本抗血清によっても、混合法あるいは重層法により診断すれば、操作上複雑さが加わるが、診断精度を向上させることは可能であろうと考えている。

V. 摘 要

洋ランのウイルス病の肉眼による病徴診断は非常にむづかしく、指標植物による診断は施設と長時間を要し、植物検査上適当ではないので、正確でより迅速な診断法を確立するため、Cymbidium mosaic virus (CyMV) と Odontoglossum ringspot virus (ORSV) の混合抗血清を作製し、その診断能力を調査した。

1) 抗原は、CyMV と ORSV の混合感染カトレア葉に同量の pH 7.0, 0.01 M 磷酸緩衝液を加えて搾汁し、53°C 10 分間加熱後クロロホルム処理し、硫酸塩析法でウイルスを集めた。これを少量の磷酸緩衝液に溶解し、流水で 12 時間透析したものをを用いた。

2) 抗血清は、家兎の耳静脈内に上記抗原を 5.0 ml あて 4 日おきに 6 回、計 30 ml 注射し、最終回の注射後 7 日目に全採血して作製した。力価は混合法により CyMV, ORSV とも 2,048 で健全カトレア汁液とは反応しなかった。

3) 抗血清の診断能力すなわちスライド法による凝集反応と *Datura stramonium*, *Chenopodium amaranticolor*, *Gomphrena globosa* などの指標植物の接種葉上の局部エソ発現による診断能力とを比較調査した。

93 株のカトレアおよびその属間雑種を調査した結果、指標植物により CyMV, ORSV の何れかの単純感染株あるいは両ウイルスの混合感染株と診断された 57 株中、82% 強の 47 株が抗血清反応によってもウイルス罹病株と診断できた。また肉眼による病徴診断は他の何れの診断結果よりも著しく信頼度が低い結果となった。

4) CyMV, ORSV 各々の罹病汁液を各濃度に薄めて、このスライド法と指標植物による診断法と比較調査したところ、抗血清では両ウイルス共に 128 倍まで診断可能であったのに対し、指標植物では CyMV で 1,024 倍、ORSV で 4,096 倍以上まで診断可能であった。

5) CyMV および ORSV 各罹病株について、抗血清の混合法と指標植物による方法でウイルスの分布と濃度を調査した結果、同一罹病株内でも部分によってウイルス濃度に相当な差異があることを示唆する結果を得た。

6) 指標植物による診断結果と抗血清による診断結果が喰い違った株があったが、これは両診断法の精度の違いや、実験の都合上、両診断法に使用した汁液は、同一株のものではあるが、各々ことなる部分からの汁液を供試したため、ウイルスの偏在に起因していることなどが考えられる。

7) 以上の結果から、筆者らの CyMV と ORSV 混合抗血清のスライド法による診断は、指標植物による診断法より精度が低いけれども、肉眼による病徴診断よりはるかに正確に罹病株を検査識別することができ、その上、本法は操作が容易で短時間内に結果が判明する利点もあり、植物検疫上利用価値が高いと考える。

VI. 引用文献

- CORBETT, M. K. (1960) Purification by density-gradient centrifugation, electron microscopy and properties of cymbidium mosaic. *Phytopath.*, **50**: 3463~51.
- HOLLINGS, M. (1959) Host range studies with fifty-two plant viruses. *Ann. Appl. Biol.*, **47**: 98~108.
- 井上成信 (1964) ランのウイルス病について (I) *Cymbidium* に発生するウイルス病, 日本蘭協会誌, **10** (1): 6~10.
- 井上成信 (1965) ランのウイルス病について (II) *Cymbidium* に発生するウイルス病, 日本蘭協会誌, **11** (1): 1~6.
- JENSEN, D. D., and A. H. GOLD (1955) Hosts, transmission and electron microscopy of *Cymbidium* mosaic virus with special reference to *cattleya* leaf mosaic. *Phytopath.*, **45**: 327~334.
- KADO, C. I., and D. D. JENSEN (1964) *Cymbidium* mosaic virus in phalaenopsis. *Phytopath.*, **54**: 974~977.
- 金子二久・赤羽広人 (1964) 輸入洋ランのウイルス検定すすむ, 横浜植物防疫ニュース, No. 258: 4.
- MOREL, G. M. (1960) Producing virus-free cymbidium. *Am. orchid soc. Bull.*, **29**: 495~497.
- MURAKISHI, H. H., and M. ISHII (1954) Comparative studies with six isolates of orchid virus in Hawaii (Abst.). *Phytopath.*, **44**: 499~500.
- MURAKISHI, H. H. (1958) Serological and morphological relationships among orchid virus. *Phytopath.*, **48**: 137~140.
- Newton, N., and D. W. Roseberg (1952) Electron microscope studies of new orchid virus complex. *Phytopath.*, **42**: 79~82.
- WHITE, N. H., and D. J. GOODCHILD (1955) Mosaic or black streak disease of cymbidium and other orchid hybrids. *J. Australian Inst. Sci.*, **21**: 36~37.
- ZAITLIN, N., A. H. SCHECHTMAN, J. B. BALD and S. G. WILDMAN (1954) Detection of virus in *cattleya* orchids by serological methods. *Phytopath.*, **44**: 314~318.

Summary

Studies on the Serological Detection of *Cymbidium* Mosaic Virus and *Odontoglossum* Ringspot Virus in Orchids

By

Tetsuo SUETSUGU and Yoshihisa MATSUBARA

Yokohama Plant Protection Station

For the rapid and reliable diagnosis of the two common viruses of orchids, cymbidium mosaic virus (CyMV) and odontoglossum ringspot virus (ORSV), the use of a divalent antiserum was evaluated in comparison with the detection by herbaceous indicators. The summarized results are as follows.

(1) *Cattleya* leaves infected with both CyMV and ORSV were extracted with 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0), heated to 53°C for 10 minutes, shaken with chloroform and precipitated by ammonium sulfate. The precipitated virus was collected by low centrifuge, dissolved into a small amount of phosphate buffer and then dialyzed for 12 hours in the flowing tap water. Five ml of this virus preparation was intravenously

injected into a rabbit every 5 days. Antiserum was obtained 7 days after the sixth injection. By the precipitation test, the titre of this antiserum was 2,048 for both CyMV and ORSV.

(2) In the slide agglutination test, this antiserum reacted with 47 out of 57 cattleyas and intergeneric hybrids that were found to be contaminated with either or both of the two viruses by the inoculation indexing.

(3) In the slide test, the dilution end-point of infected cattleya extract was 1:128 for both viruses, whereas in the inoculation indexing, the extract could be diluted to 1:1,024 for CyMV and 1:4,096 for ORSV.

(4) The serological method here described do not fully compare with the detection by sensitive herbaceous indicators. However, it provides a rapid and much more reliable diagnosis than the visual inspection and will be favorably adopted in the plant quarantine inspection.