

## 核果類から分離された Apple chlorotic leaf spot virus\*

小林 敏 郎・西 尾 健  
加 藤 幹 雄・元 島 俊 治  
横浜植物防疫所

Apple chlorotic leaf spot virus (CLSV) in stone fruits. Toshiro KOBAYASHI, Takeshi NISHIO, Mikio KATO, and Shunji MOROJIMA (Yokohama Plant Protection Station) Res. Bull. Pl. Prot. Japan 17; 1-7 (1981).

**Abstract:** A total of 170 stone fruit plants imported during the last few years were indexed under post-entry quarantine at Yokohama plant protection station in Japan. Indexing by mechanical inoculation with *Chenopodium quinoa* as indicator plant resulted in the isolation of a virus from 18 peach plants (6 varieties), 6 nectarine plants (4 varieties), 1 apricot plant, 3 plum plants (2 varieties) and 1 *Prunus* sp.. These plants were imported from USA, excluding 1 plum from Peru, 1 *Prunus* sp. from France and 1 peach from China. The virus transmitted from stone fruit plants to peach and *Prunus mahaleb* seedlings, but did not to *Malus prunifolia* var. *ringo* and *M. sylvestris* R127407A. Two virus isolates tested infected *C. amaranticolor*, *C. quinoa* and *Celosia cristata* systemically, and they do *Beta vulgaris* var. *cicla*, *Tetragonia expansa* and *Gomphrena globosa* without systemic infection. Very flexuous filamentous particles c. 650-700 × 10nm were observed in partially purified preparations. Thermal inactivation points were 50-55°C, dilution end points were 10<sup>-4</sup>-10<sup>-6</sup> and longevities at room temperature were 6-24 hours. Positive serological reactions were obtained between one isolates tested and antiserum against CLSV by gel-diffusion test. From the above results, the virus was identified as CLSV.

Indexing survey on CLSV of 35 peach trees (11 varieties) and 3 plum trees cultivated in Niigata, Fukushima, Yamanashi and Chiba prefectures in Japan gave a result that 2 peach trees (Okubo and an uncertain variety) were infected with CLSV. CLSV on stone fruit has hitherto not been reported in Japan.

### 緒 言

輸入されたモモ、スモモ、アンズ、オウトウなど核果類の苗木・穂木の隔離検疫において、草本への汁液接種検定によって、1977年以降 *Prunus necrotic ring spot virus* や *Prune dwarf virus* とは異なる一種のウイルスがかなりの頻度で検出された。本ウイルスを電子顕微鏡で観察したところ、ひも状粒子が認められた。わが国の核果類に発生し、汁液伝染するひも状ウイルスは現在までのところ記録が見当たらず同定を試みた。また輸入核果類におけるその検出頻度からみて、わが国の核果類にも発生している可能性が考えられたので、国内で栽培されている核果類についても、発生の有無を調査したのであわせて報告する。試験に際し、比較のための Apple chlorotic leaf spot virus (CLSV) 株とその抗血清を分譲して下された果樹試験場の柳瀬春夫博士、ウイルス・フ

リー検定植物を分譲下された同試験場の山口昭博士、またサンプル収集に当たって御協力いただいた横浜植物防疫所の小名浜、千葉両出張所、新潟支所及び国内課の関係各位に厚く謝意を表する。

### 材料および方法

**ウイルスの分離** 1977~80年大和隔離圃場において隔離栽培した核果類について、各年の新葉を採り草本検定植物に汁液接種した。検定植物は1977年は *chenopodium quinoa* およびキュウリを、1978年以降は *C. quinoa* のみを使用した。分離されたウイルス株のうち、P44 および P89 について、*C. quinoa* 上で2回 single lesion isolation を繰返した後以下の試験に供した。それぞれの来歴を第1表に示した。対照として、果樹試験場から分譲を受けた CLSV の草本分離株 (P205) および CLSV (マルバカイドウ潜在系) 保毒穂木を使用した。

**汁液接種** 木本の葉を接種源としたときは、2.5%の

\* 本報告の概要は1980年度日本植物病理学会大会において発表した。

第 1 表 供試ウイルス株

ウイルス株	分離源			分離年
	種類	品 種	輸出国	
P44	モ	モ Dwarf Red Heaven	USA	1977
P89	スモモ	Cochecho	USA	1977

ニコチン溶液、草本を接種源としたときは、0.05% KCN 加用 0.1% チオグリコール酸溶液を、それぞれ葉重の 5~10 倍容加えて磨砕し、カーボランダムを用いる常法によった。各種植物からの戻し接種等感染性の有無は、*C. quinoa* に接種して確認した。

**木本へのつぎ木接種** ウイルスが検出された核果類数個体を、1977 年 8 月モモおよびマハレブ (*Prunus maha-leb*) 実生に、1979 年 2 月温室内で萌芽中のモモ実生、マ

ルバカイドウ(ウイルス・フリー：果樹試より譲り受け)およびロシアリンゴ R127407A へ芽つぎし、伝染の有無と病徴の出現を調べた。伝染の有無は新葉を *C. quinoa* へ汁液接種することによって確かめた。

## 実験結果

### 1. 輸入隔離栽培中の核果類からのウイルスの検出

結果は第 2 表に示したように、オウトウからは検出されなかったが、モモ、ネクタリン、アンズ、スモモなどからウイルスが検出された。産出国はアメリカ合衆国のほか、フランス、ペルー、中国であった。ウイルスが検出されたモモの数個体は明らかな斑葉モザイク病の症状を示すものがあつたほかは、多くは特定症状は認められなかった。1977 年の検定で核果類 13 個体から分離されたウイルスは、①*C. quinoa* 上にいずれも同様症状を生

第 2 表 隔離検定におけるウイルスの検出結果

(1977—1980 大和隔離圃場)

種 類	検定本数	検出本数	輸 出 国
オウトウ	39	0	USA 0/22, * カナダ 0/1, イギリス 0/3 西ドイツ 0/2, イタリア 0/1, ブルガリア 0/10
モモ	61	18	USA 17/56, ニュージーランド 0/4, 中国 1/1
ネクタリン	21	6	USA 6/17, ニュージーランド 0/4
アンズ	8	1	USA 1/6, ニュージーランド 0/1, カナダ 0/1
スモモ	29	4	USA 3/21, ニュージーランド 0/4, ペルー 1/1 メキシコ 0/1, イギリス 0/1, 西ドイツ 0/1
アーモンド	2	0	USA 0/2
<i>Prunus</i> spp.	11	1	USA 0/8, フランス 1/3

\* 検出本数/検定本数

第 3 表 保毒樹から木本植物へのつぎ木接種

穂木	接 種 源	試 験 I*		試 験 II**		
		モモ	マハレブ	モモ	マルバカイドウ	R127407A
P19	モモ			2/2	0/3	0/3
P28	モモ	2/2***	0/2	2/2	0/3	0/3
P36	モモ			1/2	0/3	0/3
P39	モモ	2/2	1/2	2/2	0/3	0/3
P44	モモ	0/2	0/2	0/2	0/3	0/3
P49	ネクタリン	0/3	0/1	0/2	0/3	0/3
P54	ネクタリン	1/2	1/1	1/2		0/6
P89	スモモ			1/2	0/3	0/3
P103	<i>Prunus</i> sp.			2/2	0/3	0/3
CLSV	リンゴ			0/4	2/2	3/6

\* 1977. 8. 31 芽つぎ 1979. 3. 24 *C. quinoa* で検定\*\* 1979. 2. 26 芽つぎ 1979. 4. 17 *C. quinoa* で検定

\*\*\* ウイルス検出本数/検定本数

じ、同時に接種したキュウリには、いずれもウイルスによる症状が認められなかった、②シロフゲン検定ではいずれの個体とも陰性であった、③うち電顕観察した2個体(P44, P89)については、接種した *C. quinoa* にいずれもひも状ウイルスが観察されたことから、いずれも同一のウイルスと考えられた。1978年以降は *C. quinoa* に生じた症状によって本ウイルスとした。

## 2. 数種木本植物へのつぎ木接種

第3表に示したように、試験Iでモモ、マハレブ実生に本ウイルスの伝染が認められ、試験IIにおいてはモモ実生には高率に伝染が認められたが、マルバカイドウ、R127407Aには核果類からの伝染は認められなかった。逆にリンゴのCLSV(マルバ潜在系)はマルバカイドウ、R127407Aに伝染が認められたが、モモ実生には認められなかった。伝染が認められたモモ、マハレブの

第4表 *C. quinoa* から木本植物へ戻し接種

ウイルス株	モモ実生*	リンゴ実生*
P44	0/1**	
P89	0/4	0/6
CLSV	0/1	0/4

\* モモ実生へは1979年2-4月、リンゴ実生へは5月に呼びつきし、9月に *C. quinoa* で検定

\*\* ウイルス検出本数/つぎ木本数

うち No. 28 のモモの芽をついだモモ実生には、1979年の新葉に暗緑色モットル、輪紋がみられた(第1図)がこれ以外のモモ実生、マハレブ実生には特定の症状はみられなかった。リンゴからのCLSVは、マルバカイドウでは生育がやや抑制され、R127407Aは葉に退緑斑点、奇形を生じた。

P44, P89 および CLSV (P205) について、各ウイルス罹病 *C. quinoa* をモモ実生、リンゴ実生へ呼びつきにより戻し接種を試みたが、いずれも伝染は認められなかった(第4表)。

## 3. 草本植物への接種試験

*C. quinoa* を接種源とし、アカザ科、ナス科など7科22種の草本植物へ汁液接種した。その結果を主な植物について第5表に示した。供試3ウイルス株(P44, P89, CLSV P205)とも、*C. amaranticolor* (第2図)、*C. quinoa*、ケイトウ(第4図)に全身感染し、フダンソウ、ツルナに局部病斑(第5図)を生じ、センニチコウには無病徴で局部感染がみられた。第5表に示した以外の植物、*Nicotiana tabacum* (White Burley)、*N. glutinosa*、*N. clevelandii*、*N. rustica*、ペチュニア、*D. stramonium*、トウガラシ、ダイズ、インゲン(大手芒)、ササゲ(Black eye、けごんの滝)、ソラマメ、ユリ実生には3ウイルス株とも感染が認められなかった。キュウリなどでウイルス株間に寄生性の差がみられた以

第5表 主な草本植物への接種試験結果

植 物	P44		P89		CLSV (P205)	
	接 種 葉	上 葉	接 種 葉	上 葉	接 種 葉	上 葉
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	N*	CS, R, L	N	CS, R, L	N	CS, R, L
<i>C. quinoa</i>	N	CS, R, L	N	CS, R, L	N	CS, R, L
フダンソウ ( <i>Beta vulgaris</i> var. <i>cicla</i> )	N	—	N	—	N	—
ツルナ ( <i>Tetragonia expansa</i> )	N	—	N	—	N	—
センニチコウ ( <i>Gomphrena globosa</i> )	+	—	+	—	+	—
ハゲイトウ ( <i>Amarantus tricolor</i> )	○	○	+	—	+	—
ケイトウ ( <i>Celosia cristata</i> )	+	VC, M	+	VC, M	+	VC, M
キュウリ ( <i>Cucumis sativus</i> )						
四 葉	—	—	+	—	—	—
Chicago Pickling	—	—	—	—	—	—
カボチャ ( <i>Cucurbita maxima</i> )						
Butter cup	●	—	●	—	●	—
ジャガイモ ( <i>Solanum tuberosum</i> )						
農林1号 実 生	●	●	—	—	+	—
タルマエ 実 生	—	—	+	—	—	—

\* N: Necrotic lesions, CS: Chlorotic spots, R: Chlorotic rings, L: Line pattern, VC: Vein clearing, M: Mosaic, +: Symptomless, virus detected by inoculation tests, —: No infection detected, .: Not tested

外, 3 ウイルス株はほぼ共通の性質を示した。*C. quinoa* の病徴は, 接種後 4~5 日で接種葉に, はじめ組織が周囲より少しへこんだ 1~3mm の白緑色斑を生じ, 次第にその部分はえ死する (第 3 図)。感染ウイルスが多い場合, 葉は凋れ, 葉全体が枯れあがる。夏には局部病斑は周囲に小さな斑点をともなった茶褐色え死斑となりやすい。全身感染し上葉に黄色斑紋, 輪紋, 線状斑を生じる。*C. amaranticolor* もほぼ同様の症状を示した。

#### 4. 粗汁液中のウイルスの安定性

各ウイルス株罹病 *C. quinoa* 葉 10g に蒸留水 100ml を加え, 磨砕した後ガーゼでしぼった液の原液 (耐希釈性については 10 倍液とした) を使用し, ウイルスの安定性を調べた。結果を第 6 表に示した。耐希釈性で P89 が他 2 ウイルス株より高い値をしめしたほか, いずれも同様の性質を示した。

第 6 表 粗汁液中のウイルスの安定性

ウイルス	耐希釈性	耐保存性*	耐熱性**
P44	$10^{-4}$ — $10^{-5}$	6—24 hr	50—55°C
P89	$10^{-5}$ — $10^{-6}$	6—24	50—55°C
CLSV (P205)	$10^{-4}$ — $10^{-5}$	6—24	50—55°C

\* 室温下, \*\* 10 分間処理

#### 5. ウイルス粒子の形態

YANASE (1974) の CLSV 純化法に準じ (蔗糖密度勾配遠心分離を行わず) 罹病 *C. quinoa* 葉から, ウイルスを部分純化し, リンタングステン酸で陰染色しウイルス粒子を観察した。各ウイルス株とも屈曲に富んだ, 大きき約 650~700×10nm のひも状ウイルス粒子 (第 4 図) が観察された。

#### 6. 抗血清反応

部分純化した P44 ウイルスを超音波処理 (28 KHz/5 分間) し抗原とし, 0.02% sodium dodecyl sulphate, 0.025%  $\text{NaN}_3$  を含む 0.8% 寒天 (0.01M リン酸緩衝液 pH 7.8) (SIMMONDS & CUMMING: 1979 を改変) を使用した寒天ゲル内拡散法で, 抗 CLSV 血清に対する反応を調べた。健全 *C. quinoa* 葉を同様処理して対照とした。結果は第 5 図に示すように, P44 ウイルスは抗 CLSV 血清に対し, 抗原より 1 本の沈降帯を形成した。

#### 7. 国内産核果類からのウイルスの検出

国内で栽培されている核果類が本ウイルスを保毒しているかどうかを知るため, 1979 年 6~7 月に新潟, 福島, 千葉, 山梨各県内に栽植されているモモ 11 品種 35 本,

第 7 表 国内産モモ及びスモモからのウイルスの検出 (1979)

種類	新潟	福島	千葉	山梨
モモ	2*/8	0/10	0/9	0/8
スモモ				0/3

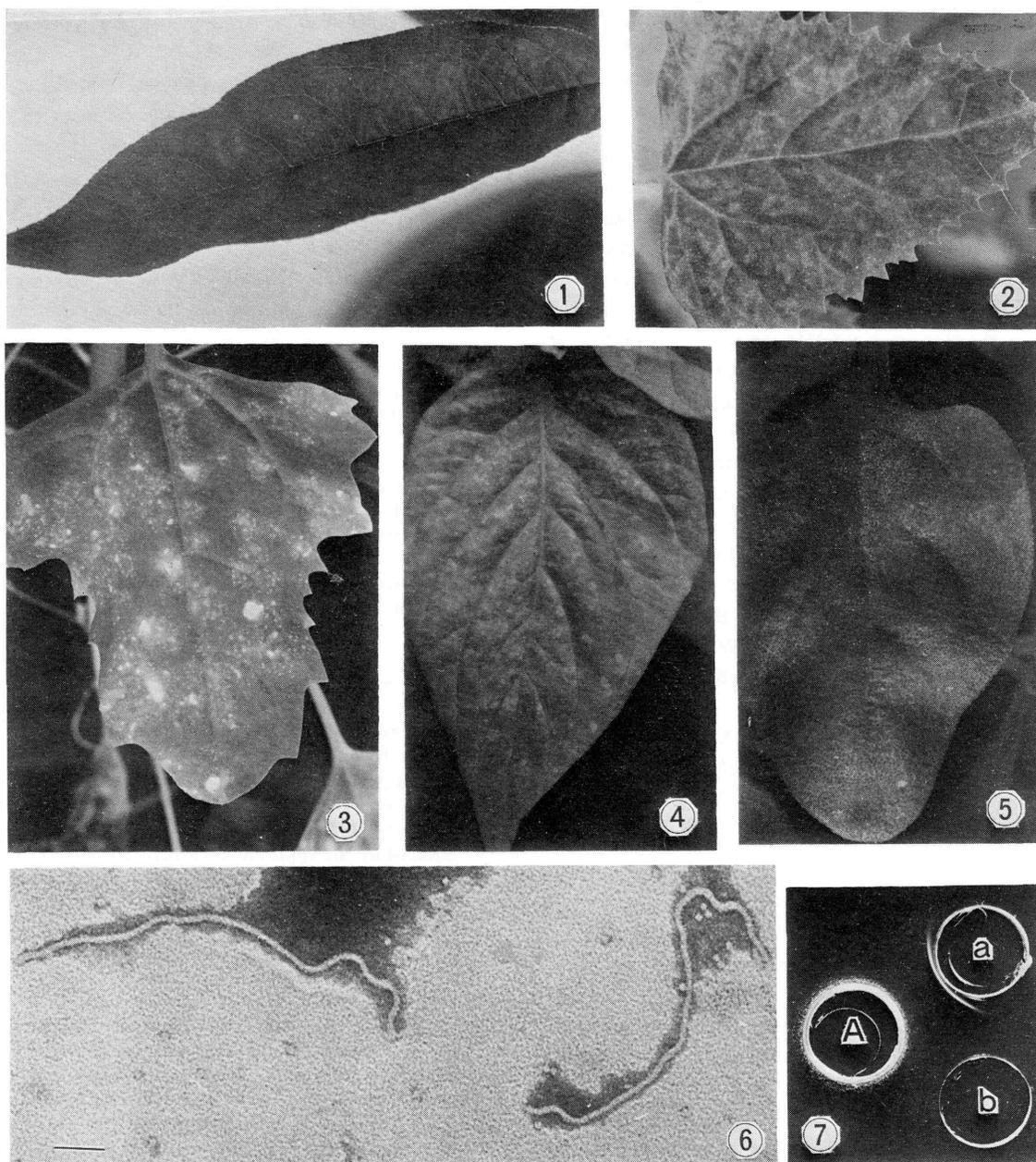
数字・ウイルス検出本数/検定本数

\*: 大久保 1, 品種不明 1

スモモ 3 本の葉を採集し, *C. quinoa* を用いて検出を試みた。その結果第 7 表に示すように, 新潟県下のモモの大久保, 品種不明各 1 個体から, *C. quinoa* に外国産ウイルスと同様症状を示すウイルスが検出され, 大久保から検出されたウイルスについては, 屈曲の多いひも状粒子であることを確認した。これによって, わが国栽培のモモにも本ウイルスが分布していることが明らかとなった。

#### 8. 同定

核果類に発生し, 汁液伝染するひも状ウイルスとして Plum pox virus (PPV) (KEGLER & SCHADE: 1971), CLSV (=Raspberry bushy dwarf virus, CADMAN: 1963, 1965), Tobacco mosaic virus (TMV) (GILMER: 1967) が知られている。今回分離されたウイルスは, その粒子形態が著しく屈曲に富み, 長さ約 650~700nm であることから, PPV および TMV とは明らかに異なり, CLSV 粒子の特徴を有している。なお, 粒子形態は調べられていないが汁液伝染するウイルスとして, *Prunus latent virus-1* (岸ら: 1973), 逆にひも状ウイルスであるが汁液伝染が認められていない Peach yellow leaf virus (難波ら: 1980) がある。*Prunus latent virus-1* はマメ科に寄生性を有するなど, 本ウイルスとは寄生性において大きく異なっており, Peach yellow leaf virus は汁液伝染せず, その粒子形態も約 1500nm と本ウイルスより長く, いずれも本ウイルスとは明らかに異なっている。本ウイルスは粗汁液中の安定性, 草本への接種試験結果などいずれも対照とした CLSV とほぼ同様の性質を示し, 抗 CLSV 血清に特異反応が認められたことから, CLSV であると同定した。ただ, *Prunus* 属保毒のウイルスと, *Malus* 属保毒の CLSV は, それぞれ交互の寄主への伝染が認められず, 木本植物へのつぎ木伝染試験結果からは, 核果類のウイルスが CLSV であるかどうかは確認が得られなかった。しかし, この点については *Prunus* 属と *Malus* 属との間の接木不親和性によることのほか, 両属に保毒されるウイルスの間には biological type が存在し, 両属に保毒されるウイルスは交互には感染しにくい (DUNEZ et al: 1972) ことも考えられる。なお,



第 1~7 図

1. 保毒モモをつぎ木したモモ実生新葉の暗緑色モットル，輪紋症状
2. *C. amaranticolor* の上葉の症状
3. *C. quinoa* の局部病斑
4. ケイトウ (*Celosia cristata*) の上葉の症状
5. ツルナ (*Tetragonia expansa*) の接種葉の Necrotic ring spots
6. ウイルス粒子 (P 44), scale=100 nm
7. 抗血清反応 A: 抗 CLSV 血清, a: P 44 分離株, b: 健全葉汁液

両属から分離された CLSV 株間に、血清学的差異が認められている (CHAIREZ & LISTER: 1973) が、今回の点について確認まで至らなかった。

## 考 察

Apple chlorotic leaf spot virus (CLSV) は、比較的最近まで *Malus* 属植物の潜在性ウイルスと考えられてきた。しかし、*Prunus* 属植物に広く分布し (CROPLEY: 1969, HANSEN & GILMER: 1976)、スモモ (*Prune*) の bark split 症状の病原であるとみられたり (DUNEZ et al: 1972)、モモの葉に暗緑色モットル (CROPLEY: 1968)、アンズにおけるつぎ木不親和 (DUNEZ et al: 1972) の原因となるといわれる。このほか、スモモのある品種では果実の奇形 (pseudo plum pox) にも関係があるという (HANSEN & GILMER: 1976)。一方でアンズ、モモには病徴を生じないという記述 (HANSEN & GILMER: 1976) もある。本試験では、保毒核果類をつぎ木した多くのモモ実生は特定の症状は観察されなかったが、No. 28 のモモをつぎ木したモモ実生 2 個体に第 1 図に示した様な暗緑色 mottle, 不明瞭な輪紋がみられた。この症状が本ウイルスによるものかどうか、戻し接種が成功しなかったため厳密には明らかでない。CLSV が核果類にどのような影響をおよぼすのか、さらに今後の検討が重要である。

また、本調査により、わが国のモモにも CLSV の発生があることが判明したが、検疫上からもモモを含め他核果類における本ウイルスの国内での発生状況をよく調査し、把握しておく必要がある。

## 摘 要

1. 1977~80年に輸入され隔離検疫した核果類のうち、モモ 6 品種 18 本、ネクタリン 4 品種 6 本、アンズ 1 本、スモモ 2 品種 3 本、*Prunus* sp. 1 本から *Chenopodium quinoa* に汁液伝染する 1 ウイルスが分離され、同定を図った。これらの輸出国は、アメリカ合衆国、ペルー、フランス、中国であった。

2. 本ウイルスは、つぎ木によって、モモ、マハレブ実生へ伝染したが、マルバカイドウ、R127407A には伝染が認められなかった。

3. 本ウイルスは、*C. amaranticolor*, *C. quinoa*, ケイトウに全身感染し、フダンソウ、ツルナ等に局部病斑を形成した。供試したナス科の多くの植物、マメ科植物数種には感染が認められなかった。

4. 本ウイルスの粒子形態は、大きさ約 650~700 nm の屈曲に富んだ棒状で、耐熱性 50~55°C (10 分間)、

耐保存性 6~24 時間、耐希釈性  $10^{-4}$ ~ $10^{-6}$  であった。また寒天ゲル内拡散法で、Apple chlorotic leaf spot virus (CLSV) の抗血清に反応帯を形成した。

5. 以上 3 および 4 の性質は対照として供試した CLSV のそれとはほぼ一致しており、本ウイルスは CLSV であると同定した。

6. 国内で栽培されるモモ 11 品種 35 本、プラム 3 本について調査したところ、新潟県下のモモの久久保および品種不明各 1 本からも本ウイルスが検出され、わが国のモモにも本ウイルスが発生していることが判明した。

## 引用文献

- CADMAN, C.H. (1963) Affinities of viruses infecting fruit trees and raspberry. *Plant Dis. Repr.* **47**: 459~462
- CADMAN, C.H. (1965) Filamentous viruses infecting fruit trees and raspberry and their possible mode of spread. *Plant Dis. Repr.* **49**: 230-232
- CHAIREZ, R. and R.M. LISTER (1973) Soluble antigens associated with infection with apple chlorotic leaf spot virus. *Virology* **54**: 506-514
- CROPLEY, R. (1968) Comparison of some apple latent viruses. *Ann. appl. Biol.* **61**: 361-372
- CROPLEY, R. (1969) Apple chlorotic leaf spot (supplment) *In* Virus diseases of apples and pears. *Tech. Commun. Bur. Hort. E. Malling* **30** Supplement Nos 2/3/4 pp. 10-13
- DUNEZ, J., C. MARENAUD, R. DELBOS and M. LANSAC (1972) Variability of symptoms induced by the apple chlorotic leaf spot (CLSV) - A Type of CLSV probably responsible for bark split disease of prune trees. *Plant Dis. Repr.* **56**: 293-295
- GILMER, R.H. (1967) Apple chlorotic leaf spot and tobacco mosaic viruses in cherry. *Plant Dis. Repr.* **51**: 823-825
- HANSEN, A.J. and R.M. GILMER (1976) Apple chlorotic leaf spot and other filamentous virus infections in *Prunus*. *In* Virus diseases and noninfectious disorders of stone fruits in North America, *Agriculture Handbook* No. 437. Agricultural Research Service USDA, Washington, D.C. pp. 206-208
- KEGLER, H. and C. SCHADE (1971). Plum pox virus *In* C.M.I./A.A.B., *Descriptions of Plant Viruses* No. 70
- 岸 国平, 高梨和雄, 我孫子和雄 (1973) 核果類のウイルス病に関する研究 V 核果類から分離された一種の汁液伝染性潜在ウイルスについて. *園試報* **A12**: 209-215
- 難波成任, 山下修一, 土居養二, 與良 清 (1980) モ

- モ黄葉病 (新称) 株から見出された Closterovirus,  
モモ黄葉ウイルス (Peach yellow leaf virus, 新称)  
について. 日植病報 **46**: 59 (講要)
- SIMMONDS, D.H. and B.G. CUMMING (1979)  
Detection of Lily symptomless virus by im-  
munodiffusion. *Phytopath.* **69**: 1212-1215
- 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, Ser. C,*  
No 1: 47-109