

輸入検疫中のオランダ産アネモネから分離された Raspberry ringspot virus*

西尾 健・川合 昭・小林 敏郎
横浜植物防疫所

Raspberry ringspot virus detected in anemone imported from Holland. Takeshi NISHIO, Akira KAWAI and Toshiro KOBAYASHI (Yokohama Plant Protection Station) Res. Bull. Pl. Prot. Japan 17: 35-42 (1981)

Abstract: Raspberry ringspot virus (RRV) was isolated from anemone (var. Whirl wind) imported from Holland into Japan in 1977, at Yokohama plant protection station.

The anemone stunted showing ringspot and mottle symptoms on leaves.

The virus was readily sap-transmissible to wide range (34 species in 10 families) of test plant. *Nicotiana rustica* and *Petunia hybrida* were systemically infected showing characteristic ring and line patterns. *Chenopodium quinoa* was systemically infected showing apical necrosis, but *C. amaranthicolor* was not systemically infected.

The virus was transmitted through seeds of *Spinacia oleracea*, but was not transmitted by aphid, *Myzus persicae*. The thermal inactivation point in extracted juice of *N. rustica* was 65~70°C (10 min.), dilution end point was 10^{-4} ~ 10^{-5} , and infectivity was retained at room temperature for 35 days.

Small spherical particles about 30 nm in diameter were found in purified and leaf dip preparations. Purified virus reacted with RRV-English str. antiserum and produced clear single precipitin line in agar gel double diffusion test, but not reacted antisera of Tomato ringspot v., Tomato black ring v., Arabis mosaic v., Cucumber mosaic v. and Tobacco streak v..

No record have been seen that RRV was isolated from plants growing in Japan.

ま え が き

1977年、横浜植物防疫所大和隔離圃場で、オランダから輸入されたアネモネを隔離検疫中、葉に黄色輪紋症状を表わし、後モットル、矮化症状を示したものが1株発見された。この株からは、汁液接種法で数種植物に感染するウイルスが分離された。試験の結果このウイルスは、現在わが国では分離報告のない Raspberry ringspot virus (RRV) であることが判明したのでここに報告する。

RRVは、初めイギリスのスコットランド地方で葉巻症状を呈するキイチゴから分離されたものであるが (CADMAN 1956, HARRISON 1953)、その後イギリス、ヨーロッパ大陸、ソ連およびトルコで、キイチゴ、スグリ、ミザクラ、ブドウなどの果樹類、オランダイチゴ、スイセン (MURANT 1978)、アネモネ (CADMAN 1955)

や、ハコベなどの雑草類 (HARRISON 1958)、等々、多くの植物から分離されている。中でもキイチゴ、オランダイチゴでの被害は大きく、時には壊滅的被害を受けることがあるという (LISTER 1970, MURANT 1970)。

このウイルスは、*Longidorus* 属線虫などによって土壌伝搬される Nepo ウイルスグループの一員である。このグループの一般的性質として、媒介線虫の存在の元に一度発生すると、ウイルスの寄主範囲が広いこと、種子伝染すること、線虫による保持期間が長いことなどから防除が非常に難しいことがあげられ (岩木, 1976)、今後ともこの RRV をはじめとするわが国には未侵入の Nepo ウイルスの侵入には十分な注意が必要であると考える。

報告に当り、RRV English strain 抗血清 (Dr. B. D. HARRISON, Scottish Horticultural Research Institute, Scotland, 作製) を分譲していただいた野菜試験場我孫子和雄技官、Tomato ringspot virus (Tom RSV)、Tomato black ring v. (TBRV)、Arabis mosaic v. (AMV) の各

* 本報告の概要は1978年度日本植物病理学会大会において発表した。

抗血清を分譲していただいた植物ウイルス研究所岩木満朗博士、本試験を行なうに際し終始親切な御指導をいただいた当所、松濤美文博士に心よりお礼申し上げる。

材料および方法

1. ウイルス

1977年春、オランダより輸入されたアネモネ（品種 Whirl wind 10株中の1株）から汁液接種で、*Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, センニチコウなど数種植物に感染するウイルスが分離された。この感染 *C. quinoa* の上葉をさらに *C. quinoa* に接種し、上葉からウイルスを回収する操作を二回くり返し、その後センニチコウに接種しその上葉を再びセンニチコウに接種し、このセンニチコウでウイルスを継代増殖して各種試験に供試した。場合によっては、*C. quinoa* の単一局部病斑をとり増殖したものも用いた。

2. 接種試験

各種植物への汁液接種は、よく病徴の出たセンニチコウに0.1% チオグリコール酸を含む0.05% KCN 溶液を4~5倍重量加えて磨砕し、カーボランダムを用いる常法により実施した。

アブラムシ伝搬試験は、十字花植物で継代増殖したモモアカアブラムシを罹病ペチュニアに放飼して用いた。

各種植物からの戻し接種など、ウイルスの存在の有無を確認する際には、*C. quinoa* を用いた。

3. ウイルスの純化および抗血清反応

ウイルスの純化は次のとおり実施した。全身感染した *C. quinoa* の地上部組織に、1% メルカプトエタノールを含む0.1~0.2M のリン酸緩衝液 (pH 7.0) を当量加え磨砕搾汁し、この汁液に同容量のクロロホルムと n-ブタノールをそれぞれ加えよく振った後、5,000 rpm で5分間遠心し水層を取り60~90分間4°Cで放置した。さらに8,000 rpm で15分間遠心し、その上清に NaCl (0.2 M) およびポリエチレングリコール #6,000 (8%) を加え2時間以上放置した後、8,000 rpm で30分間遠心しウイルスを沈澱させた。この沈澱物を0.01M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解後、分画遠心を2~3回くり返しウイルスを純化した。

抗血清は、この純化ウイルス (0.01M リン酸緩衝液に溶解) を家兎に約1週間おきに静脈注射を4回実施し作成した。作成した抗血清は重層法による反応で、純化ウイルスに対し抗血清希釈1024倍まで反応した。

抗血清反応にはこの他、RRV 抗血清 (我孫子技官より)、Tom RSV, TBRV, AMV 抗血清 (岩木博士より) と当所にて作成した Cucumber mosaic v. (CMV) およ

び Tobacco streak v. (TSV) 抗血清を使用した。

寒天ゲル内拡散法には、0.01M トリス緩衝液 (pH 7.6), 0.01% NaN_3 , 0.85% NaCl, 1% 寒天よりなる寒天ゲルを用いた。

4. 電子顕微鏡観察

純化ウイルス試料および病植物からのウイルス粒子の観察には2% リンタングステン酸を用いたネガティブ染色法によった。病植物の超薄切片は、罹病葉組織細片を2~4% グルタルアルデヒドで1時間、その後1% オスミウム酸で2~3時間二重固定後、エタノールで脱水し、エポキシ樹脂に包埋した後薄切して作成し、酢酸ウラニール、クエン酸鉛で二重染色して電顕観察した。

実験結果

1. 罹病アネモネの病徴

本ウイルスを分離したアネモネは、*Anemone hupehensis* var. *japonica* (和名: シュウメイギク) の Hybrid で品種名は Whirl wind である。

春、新葉に明瞭な黄色輪紋症状 (第1図) が認められた。その後夏に展葉する葉は、ほぼ無病徴であった。秋口になって頂葉にぼんやりしたモットル症状と、健全なものに比べわずかな Stunt 症状が認められた。本ウイルスは黄色輪紋症状を示す葉と、モットル症状の頂葉の双方から容易に分離することができた。

2. 各種植物への汁液接種試験

結果は第1表のとおりである。

11科43種植物に接種したところ、10科34種植物に感染し、寄主範囲はきわめて広い。

主な植物での病徴は次の様である。*N. rustica* では、接種後5日目頃に退緑あるいはえそ輪紋を接種葉に作った後、上葉に退緑斑あるいは黄色のモザイク病徴を表わすが、さらに後期になると病徴のない一見健全に見える葉が展開した。しかしこの葉からもウイルスは回収された。ペチュニアでは、接種後5日目頃に退緑あるいはえそ輪紋を接種葉に作った後、上葉に Vein clearing, えそ症状を生じ、時には Line pattern 症状 (第2図) を表わした。*C. quinoa* では、接種4~5日目頃に接種葉にえそ斑を作りその1~2日後には頂葉にえそが表われしおればじめ (第3図)、その後えそは順次株の根元方向に進行し、株は枯死した。*C. amaranticolor* では、*C. quinoa* と同様に接種葉にえそ斑を生じるが、斑点のサイズは小さく、また全身感染することはなかった。センニチコウでは、接種後10日目頃に接種葉に退緑斑を生じ、その後上葉に Vein cleaning, 頂葉のねじれ、えそ症状を表わす (第4図)。インゲンマメ (江戸川) では、

第1表 各種植物への汁液接種試験結果

植 物 名	接種葉の病徴	上葉の病徴	上葉からの戻し接種**
<i>Nicotiana tabacum</i> var. White Burley	NRS	CRS, NRS, N, LP	+
<i>N. rustica</i>	CRS, NRS	CRS, NRS, N, M	+
<i>N. glutinosa</i>	CRS, NRS	—	+
<i>N. clevelandii</i>	NS	N, St	+
<i>Datura tatula</i>	CRS	—	—
<i>D. stramonium</i>	CRS	—	—
<i>Physalis floridana</i>	CS	M, N	+
<i>Petunia hybrida</i>	CRS, NRS	VC, N, LP	+
トマト (<i>Lycopersicum esculentum</i>)	CS	—	—
ジャガイモ (<i>Solanum tuberosum</i>)			
タルマエ実生	NS	—	—
農林一号実生	NS	—	—
A-6 Virus Free	NS	—	—
<i>Chenopodium quinoa</i>	NS	N, 枯死	+
<i>C. amaranticolor</i>	NS	—	—
ホウレンソウ (<i>Spinacia oleracea</i>)	NS	—	+
フダンソウ (<i>Beta vulgaris</i>)	NS	VC	+
インゲンマメ (<i>Phaseolus vulgaris</i>)			
大手 芒	NS	—	—
江戸川	—	M, CS	+
エルボン	CS	M, N	+
ケンタッキーワンダー	NS	—	—
ササゲ (<i>Vigna sinensis</i>)			
黒ダネ三尺	NS	M, N	+
ブラックアイ	NS	M	+
ダイズ (<i>Glycine max</i>)	—	VC	+
キュウリ (<i>Cucumis sativum</i>)			
四 葉	—	M	+
青長地這	—	M	+
シカゴピククリン	CS	M	+
センニチコウ (<i>Gomphrena globosa</i>)	CS, NS	VC, N ねじれ	+
ハゲイトウ (<i>Amaranthus tricolor</i>)	NS	頂葉枯死	+
ツルナ (<i>Tetragonia expansa</i>)	NRS	N	+
ハコベ (<i>Stellaria media</i>)	—	St	+

無病徴感染した植物： エンドウ (*Pisum sativum*), ペポカボチャ* (*Cucumis pepo*), ハツカダイコン* (*Raphanus sativus*), ナデシコ (*Dianthus barbatus*), セキチク (*D. chinensis*), カイザイク (*Ammobium alatum*), コスモス* (*Cosmos bipinnatus*), キンセンカ (*Calendula officinalis*), マリーゴールド (*Tagetes patula*), ヒャクニチソウ (*Zinnia elegans*), シソ (*Perilla frutescens*), サルビア (*Salvia coccinea*)

* 印は全身感染しなかったもの

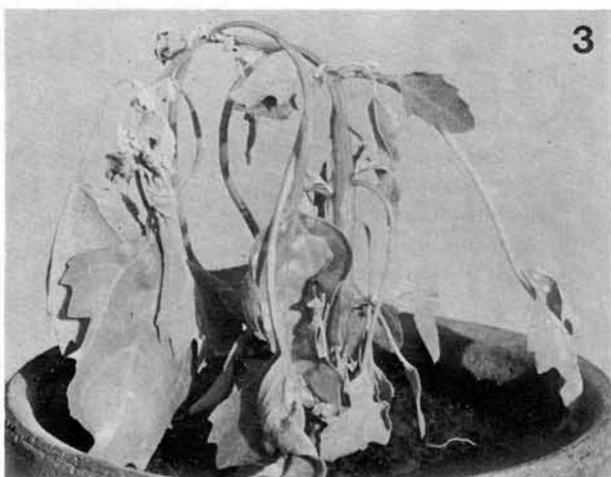
感染しなかった植物： サントウサイ (*Brassica campestris*), ダイコン (*Raphanus sativus*), コマツナ (*Brassica sp.*), レタス (*Lactuca sativa*), ソラマメ (*Vicia faba*), ライムギ (*Secale cereale*), *Sorghum sp.*, イネ (*Oryza sativa*), トウモロコシ (*Zea mays*)

NRS: Necrotic Ring Spot. CRS: Chlorotic Ring Spot. N: Necrosis, LP: Line Pattern, M: Mosaic, St: Stunt, NS: Necrotic Spot, CS: Chlorotic Spot, VC: Vein Clearing —: 無病徴

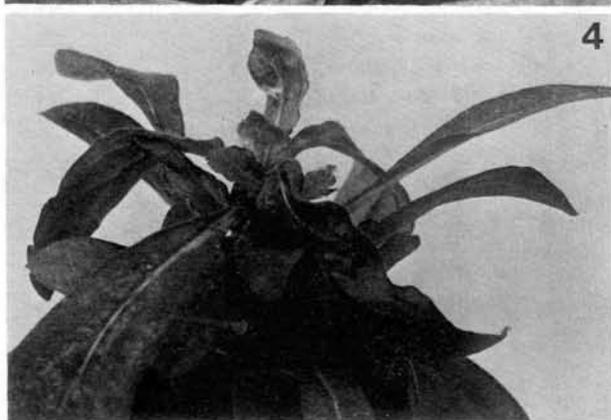
** + : ウイルスを回収できた。 — : 回収できなかった。



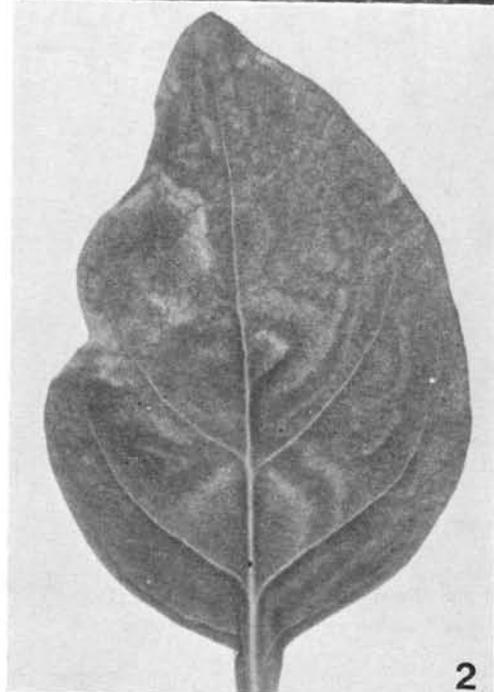
1



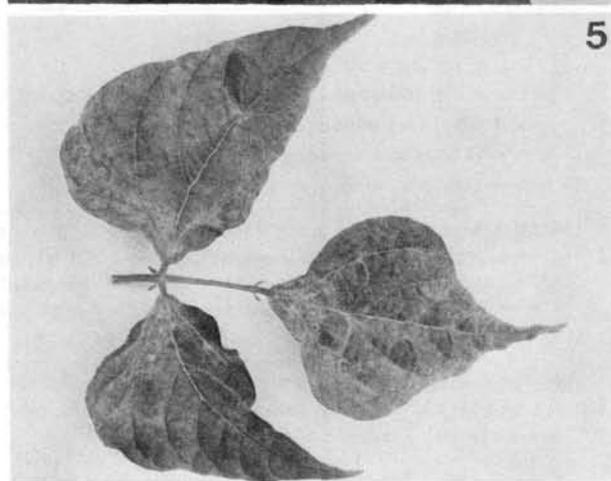
3



4



2



5

- 第1図 アネモネ原株の春の新葉に表われた黄色輪紋症状。
 第2図 ペチュニア上葉の Line pattern 症状 (接種約20日目)。
 第3図 *C. quinoa* の頂葉枯死およびしおれ (接種約10日目)。
 第4図 センニチコウ上葉のねじれ (接種約20日目)。
 第5図 インゲンマメ (江戸川) 上葉のモザイク症状 (接種約30日目)。

接種葉は無病徴であったが接種20日目頃に、上葉に退緑斑やモザイクを生じた(第5図)。接種試験全般を通じていえることは、本ウイルスは気温に対して鋭敏に反応する様であり、秋～春にかけて温室内が20°C前後の時病徴をよく発現したが、夏の高温時には全く病徴を発現しなかった。

3. アブラムシ伝搬試験

絶食したモモアカアブラムシを罹病ペチュニア上で2～5分間吸汁させた後、ペチュニア、*N. rustica* および *C. quinoa* 各5個体に1個体あたり5～7匹移し、24時間後に殺虫した試験区および罹病ペチュニアに2～3日間放飼した後、4～5日間同様の3種植物に放飼後殺虫した試験区を設けた。いずれの試験区においても、3種植物に発病が認められず、また戻し接種によってウイルスを確認することもできなかった。以上より本ウイルスは、モモアカアブラムシによって伝搬されないことがわかった。

4. 種子伝染試験

罹病植物の種子を殺菌土壌に播種し、幼植物の病徴を観察するとともに、3～5個体をひとまとめにし磨砕して1検体として、*C. quinoa* に接種し、ウイルスの有無を調査した。*Physalis floridana*, ツルナ, インゲンマメ(4品種), ササゲ, ソラマメ, エンドウ, ホウレンソウ, マリーゴールド, シソ, センニチコウ, ヒャクニチソウ, サルビアについて調査した。いずれの植物も無病徴であったが、ホウレンソウで25検体中13検体で本ウイルスが検出され、種子伝染することが確認された。

5. 物理的性質

全身感染した *C. quinoa*, *N. rustica*, ペチュニアに1.5～4倍重量の0.1Mリン酸緩衝液または水を加え磨砕後ガーゼでこし、8,000rpm、5分間遠心分離しその上清を各種試験に用いた。結果は第2表のとおりである。*N. rustica* では、耐保存性35日まで、耐希釈性 10^{-4} ～

10^{-5} 、耐熱性は65～70°C、10分間であった。

6. ウィルス粒子

C. quinoa 接種葉のダイレクトネガティブ染色法による電顕観察および純化ウイルス試料の観察の結果、径約30nmの小型球状粒子が多数観察された。

純化ウイルスを10～40%のショ糖密度勾配液(0.01Mリン酸緩衝液pH7.2)に重層し、2,4000rpm(日立RPS-25ローター)で120分間超遠心すると、メニスカスから約9.5mmと約22mmの位置に明瞭なバンドが観察された(第6図)。

このバンド部分を集めた標品の紫外線吸収曲線は、いずれも核蛋白によると思われる吸収曲線を示した。下層バンド標品では、吸収極大260nm, 吸収極小240nm, $A_{260}/A_{280}=1.65$ で、電顕観察ではコントラストの高い粒子が認められ(第7-a図)、また上層バンド標品では中空の粒子が多数認められた(第7-b図)。

7. 血清学的試験

純化ウイルスを各種抗血清と寒天ゲル内拡散法で反応させたところ、RRV抗血清と反応し単一の沈降帯を作ったが、TomRSV, TBRV, AMV, CMV および TSVの各抗血清とは反応しなかった(第8図)。また、作成した本ウイルス抗血清およびRRV抗血清と純化ウイルスを同時に寒天ゲル内拡散法にて反応させたところ、連続する一本の沈降帯を作った(第9図)。

8. 感染細胞の電子顕微鏡観察

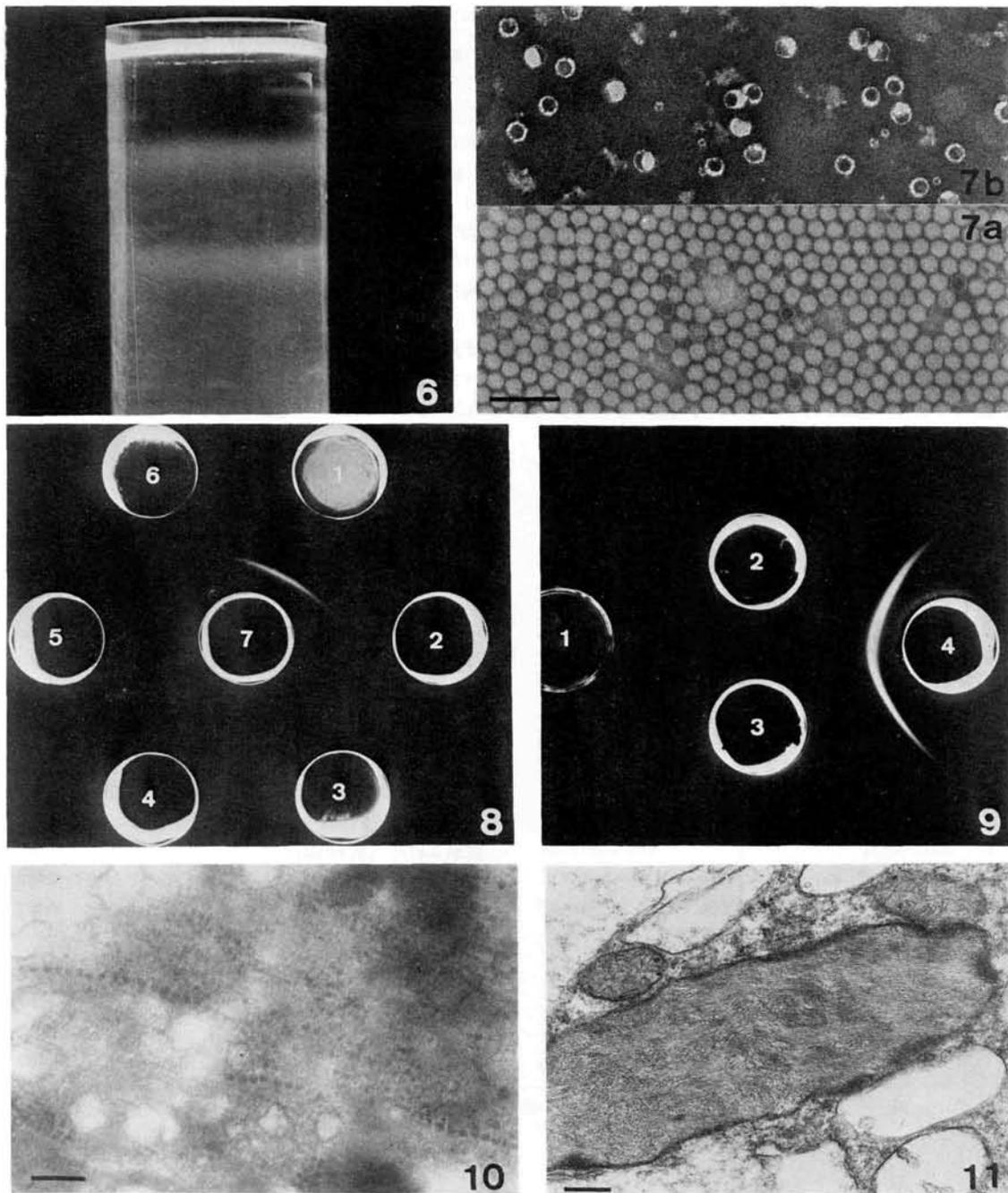
全身感染しえそ症状を示す *C. quinoa* 葉組織内のえ死した葉肉細胞内で一列に並んだ径約25nmの球状粒子が観察された(第10図)。

また、本ウイルスを分離したアネモネの原株の黄色輪紋症状葉中では球状粒子は認められなかったが、維管束部の細胞の葉緑体中にひも状ウイルス粒子様の糸状物質の集塊が認められた(第11図)。しかし、このものとRRVとの関連は明らかでない。

第2表 物理的性質

供試植物	使用液	試験	耐保存性	耐希釈性	耐熱性(10分間)
<i>C. quinoa</i>	P. B	I	28日まで	10^{-4} ～ 10^{-5}	65～70°C
	P. B	II	28日まで		
	D. W	I	23日まで		
<i>N. rustica</i>	P. B	I	35日まで	10^{-4} ～ 10^{-5}	65～70°C
	P. B	II	28日まで		
	D. W	I	7日まで		
ペチュニア	P. B	I	25日まで	10^{-4} ～ 10^{-5}	60～65°C

P. B: 0.1Mリン酸緩衝液, pH 7.4, D. W: 水, 検定植物は、*C. quinoa* を2鉢ずつ使用。



第6図 ショ糖密度勾配遠心後 (10~40%, 24,000rpm 2時間) に生じた2本のバンド

第7図 a: 下のバンドに含まれるコントラストの高い粒子。b: 上のバンドに含まれる中空の粒子 bar=100nm

第8図 抗血清反応。1: RRV, 2: AMV, 3: TomRSV, 4: TBRV, 5: TSV, 6: CMV 各抗血清, 7: 純化した本ウイルス

第9図 抗血清反応。1: 健全 *C. quinoa* 汁液, 2: RRV 抗血清, 3: 作成した本ウイルス抗血清, 4: 純化した本ウイルス

第10図 罹病 *C. quinoa* 葉のえ死細胞中に見られた球状粒子の列。bar=100 nm

第11図 アネモネ原株の黄色輪紋症状葉の維管束細胞中に認められた葉緑体中の糸状物質。bar=300 nm

考 察

分離ウイルスは、線虫による伝搬試験は実施していないが、寄主範囲が広く、数種検定植物で輪紋症状を呈し、アブラムシによっては伝搬されず種子伝染することなど、Nepoウイルスの特徴を有し、かつ物理的諸性質もほぼ Nepoウイルスの諸性質に一致すること (HARRISON and MURANT 1977, MURANT 1970)、および RRV 抗血清とゲル内拡散法にて反応し単一のシャープな沈降帯を作ることから Raspberry ringspot virus であると同定した。

本ウイルスを分離したアネモネ原株の病徴は、明瞭な黄色輪紋症状、不鮮明な Mottle、矮化症状であったが、これらの症状が本ウイルス単独の病徴であるか否かは、アネモネへの戻し接種を実施していないので今のところ不明である。

病植物切片の電顕観察で、アネモネ原株より球状ウイルス粒子を確認できなかったが、これはアネモネ中ではウイルスの濃度が低いこと、細胞中で集塊を作りにくく細胞質中に散在しリポソームとの区別がつかず確認しにくいこと、などの理由によると思われる。また罹病アネモネ葉細胞の葉緑体中に観察されたひも状ウイルス様物質の集塊は、RRV 感染に伴う葉緑体の変成かどうかなど不明である。

RRV は、主要な他の数種の Nepo ウイルスに較べて耐熱性がわずかに高く 65~70°C であること (MURANT, 1970)。C. quinoa では、局部病斑を生じた後全身感染し、頂葉のえそを起すが、C. amaranticolor では、局部病斑を生ずるだけで全身感染しないこと (MURANT, 1978, DEBROT 1964, MURANT et al 1968, HARRISON 1958) などが特徴としてあげられる。

このような特徴はあるにせよ、Nepo ウイルスはお互いに寄主範囲、主な検定植物上での病徴、物理的性質、粒子の形状が似ており、これらは同定の際の決め手となりやすく、血清反応が最も重要である (MURANT 1978)。

このため Nepo ウイルスの同定には、是非とも血清学的試験を実施する必要があるが、RRV 抗血清を含め得る限り多種の Nepo ウイルス抗血清を検査同定のために常備する必要があると考える。

摘 要

1977年オランダから輸入され隔離栽培中のアネモネ (品種 Whirl wind) に、葉に黄色輪紋症状を表わし、後モットル、矮化症状を示したものが10株中の1株に認められ、これから汁液接種にて数種植物に感染するウイ

ルスが分離された。

このウイルスを11科43種植物に接種したところ10科34種植物に感染し寄主範囲は広く、*Nicotiana rustica*、パチュニアでは特徴ある輪紋症状や Line pattern 症状を示し全身感染した。*Chenopodium quinoa* には全身感染し頂葉の枯死が認められたが、*C. amaranticolor* では全身感染せず局部病斑を作っただけであった。

ホウレンソウで種子伝染したが、モモアカアブラムシでは伝搬されなかった。

N. rustica 汁液中での耐熱性は 65~70°C、耐希釈性は 10^{-4} ~ 10^{-5} 倍、耐保存性は室温で 35日までであった。

ウイルス粒子は、径約 30nm の小型球状であった。

純化ウイルスを各種抗血清と寒天ゲル内拡散法で反応させたところ、Tomato ringspot v., Tomato black ring v., Arabis mosaic v., Cucumber mosaic v., および Tobacco streak v. の各抗血清とは反応せず、Raspberry ringspot v. (English strain) 抗血清と反応し単一の沈降帯を作った。

以上のことから、このウイルスは我国での発生報告のない Raspberry ringspot virus であると同定した。

引用文献

- CADMAN, C.H. (1955) 1954-5 2nd annual Rep. Scott. hort. Res. Inst., pp. 24-27 (Rev. appl. Mycol. **35**: 349-350)
- CADMAN, C.H. (1956) Studies on the etiology and mode of spread of Scottish raspberry leaf curl disease. J. hort. Sci. **31**: 111-118
- DEBROT, E.A. (1964) Studies on a strain of raspberry ringspot virus occurring in England. Ann. appl. Biol., **54**: 183-191
- HARRISON, B.D. (1958) Further studies on raspberry ringspot and tomato black ring, soil-borne viruses that affect raspberry. Ann. appl. Biol. **46**: 571-584
- HARRISON, B.D. and A.F. MURANT (1977) Nepovirus group. CMI/AAB Descriptions of plant viruses No. 185
- 岩木満朗 (1976) 我が国に存在する線虫伝搬性ウイルス、植物防疫, **30**: 194-197.
- LISTER, R.M. (1970). Nematode-borne viruses as pathogens in strawberry, In Virus diseases of small fruits and grapevines. Univ. Calif. division of Agric. Sciences, Berkeley, Calif., U.S.A., pp. 32-42
- MURANT, A.F. (1970) Soil-borne viruses and diseases in *Rubus. ibid.*, pp. 132-148
- MURANT, A.F. (1978) Raspberry ringspot virus CMI/AAB Descriptions of plant viruses.

No. 198.
MURANT, A.F. C.E. TAYLOR and J. CHAMBERS.
(1968) Properties, relationships and transmission of a strain of raspberry ringspot virus

infecting raspberry cultivars immune to the common Scottish strain. *Ann. appl. Biol.* **61**: 175-186