

## 隔離検疫中の中国産ウメ苗木から分離された

### Apple stem grooving virus<sup>1)</sup>

高橋 勤・斉藤 範彦

後藤 正昭・川合 昭

横浜植物防疫所

難波 成任・山下 修一

東京大学農学部

Apple Stem Grooving Virus Isolated from Japanese Apricot (*Prunus mume*) Imported from China. Tutomu TAKAHASHI, Norihiko SAITO, Masaaki GOTO and Akira KAWAI (Yokohama Plant Protection Station, 6-64, Kitanaka-dori, Naka-ku, Yokohama 231, Japan), Shigetou NAMBA, Shuichi YAMASHITA (Faculty of Agriculture, University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 26: 15-21 (1990).

**Abstract:** Apple stem grooving virus (ASGV) was isolated from the symptomless *Prunus mume* imported from China in 1985 under post-entry quarantine at Yokohama plant protection station in Japan. The virus was sap-transmissible to the herbaceous test plants of 16 species in 5 families. When several woody indicator plants were inoculated with the bud from the imported plant of *Prunus mume*, *Malus sieboldii* MO-65 and *Malus scheidckeri* showed necrosis in their tissues adjacent to the inoculated site and Virginia Crab showed stem grooving on their shoots. The thermal inactivation point of the virus, using the sap of inoculated *Chenopodium quinoa*, was 50~60°C (10 min), the dilution end point was  $10^{-4}$ ~ $10^{-5}$ , and infectivity was retained at 15°C for 17~24 days. Very flexuous filamentous particles 600~650 nm were observed in partially purified preparations. The molecular weight (MW) of the coat proteins of the virus was 27,000 daltons. The MW of nucleic acids was  $2.38 \times 10^6$  daltons. Purified virus reacted with antiserum against ASGV by gel-diffusion test and immunosorbent electron microscopy. This is the first report on the isolation of ASGV from *Prunus* spp.

**Key words:** apple stem grooving virus, *Prunus mume*

### 緒 言

1985年、中華人民共和国から輸入され、横浜植物防疫所大和圃場において隔離検疫を行っていた無病徴のウメ苗木（紅梅の一種）から *Chenopodium quinoa* に汁液伝染するウイルスが検出された。本ウイルスの同定を試みたところ、apple stem grooving virus (ASGV) (SEQUERA & LISTER, 1969) と判明した。*Prunus* 属植物に感染するウイルスとしては prune dwarf virus (PDV), prunus necrotic ringspot virus (PNRSV), apple chlorotic leafspot virus (ACLSV) (CADMAN, 1963), plum pox virus (PPV) (KEGLER & SCHADE, 1971) 等が知られているが、ASGV が核果類から検出されたという報告は本報告が初めてである。

試験に際し、ASGV 抗血清を分譲くださった果樹試験場柳瀬春夫博士、種々御指導を賜った東京大学農学部土崎常男教授に厚く謝意を表する。

### 材料および方法

#### ウイルスの分離

隔離検疫中の中国産ウメ (U-42) 苗木 (*Prunus mume*) の新葉をニコチン 2.5% 水溶液で磨砕し、*C. quinoa* へ汁液接種してウイルスを分離した。この感染 *C. quinoa* 上葉をチオグリコール酸 0.1% を含む 0.1 M Na-リン酸緩衝液 pH 7.0 (接種用 Buffer) を用いて *C. quinoa* へ接種し、上葉からウイルスを回収する操作を 2 回繰り返した後、*C. quinoa* でウイルスを継代増殖して各種試験に供した。

1) 本報告の概要は昭和 63 年度日本植物病理学会秋期関東部会において発表した。

### 汁液接種試験

感染 *C. quinoa* 葉を接種用 Buffer で磨砕したものを接種源とし、各種草本植物へ常法により汁液接種した。接種した植物は温室に置き、約1ヶ月間病徴の観察を行った。また、各植物から *C. quinoa* へ戻し接種を行い、感染の有無を確認した。

#### Infected leaves of *C. quinoa*

add 2~3 vol. of 0.05 M phosphate buffer pH 7.0  
containing 0.02 M 2-mercaptoethanol  
Grind  
Squeeze through cheesecloth

#### Crude sap

add active carbon (4.5 g/100 ml sap)  
and stir  
Centrifuge at 10,000 rpm for 15 min

#### Supernatant

add Mg-bentonite preparation  
(50~70 mg/100 ml supernatant) and stir  
Store in refrigerator for 20 min  
Centrifuge at 10,000 rpm for 15 min

#### Supernatant

add 6% PEG, 0.02 M NaCl and stir  
Store in refrigerator for 2 hrs  
Centrifuge at 10,000 rpm for 15 min

#### Pellet

Resuspend in 0.05 M phosphate buffer pH 7.0  
Centerifuge at 10,000 rpm for 15 min

#### Supernatant

Centrifuge at 30,000 rpm for 3 hrs

#### Pellet

Resuspend in 0.05 M phosphate buffer pH 7.0  
Centrifuge at 10,000 rpm for 10 min

#### Supernatant

Layer on rate sucrose density  
gradient tubes (10-40%)  
Centrifuge at 24,000 rpm for 2 hrs

#### Viral zone

Centrifuge at 30,000 rpm for 90 min

#### Pellet

Resuspend in distilled water

#### Purified virus

Fig. 1. Procedure of purification for U-42

### 木本植物への接種試験

ウメ(U-42)の組織を *Malus* 属6種, *Prunus* 属5種の指標植物へ接木接種し、それらの指標植物に現れる症状を調査した。接木接種の方法は、実生台木を用いた二重接ぎとし、長さ約10 cmの各指標植物穂木にウメ(U-42)を芽接ぎし、同時に、それをそれぞれの指標植物に適合する種類の1年生鉢植え実生苗に切り接ぎした。活着後、指標植物の芽のみを伸長させ、ガラス室またはビニールハウスに置いて1~2年間にわたり病徴の観察を行った。

### ウイルスの純化および抗血清反応

ウイルスの純化は、WATERWORTH & GILMER (1969)の方法を一部改変し、Fig. 1に示す手順に従って感染 *C. quinoa* を供して行った。

抗血清反応は、OHKI & INOUE (1987)の方法によるゲライトゲルを用いたゲル内二重拡散法、MILNE & LUISON (1977)による免疫電子顕微鏡法(ISEM)により調査した。

### 核酸および外被タンパク質の分子量の測定

核酸の分子量の測定は、純化ウイルス試料を常法により SDS-フェノール抽出し、エタノール沈澱によりウイルス核酸を精製し、8 M 尿素変性 2.5% ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動により行った。

外被タンパク質の分子量の測定は、純化ウイルス試料にそれぞれ等量の 0.188 M トリス塩酸緩衝液、GMSB を加え、100°C、2 分間熱処理したものを外被タンパク質試料とし、12% ポリアクリルアミドゲルを用い LAEMMLI(1970)の緩衝系で電気泳動により行った。

## 実験結果

### 1. 草本植物への汁液接種

アカザ科、ナス科等8科29種の草本植物に汁液接種した。結果を Table 1 に示した。病徴を生じた植物はアカザ科3種、ナス科1種で、*C. quinoa* には退緑斑点、奇形、モットル (Fig. 2), *C. amaranticolor* には奇形、モットル、*C. murale* にはエソ斑点、奇形、モットルを生じた。また、*Nicotiana glutinosa* にはモザイク、退緑条斑を生じる場合があった。

また、*C. foetidum*, *Beta vulgaris* 等5科12種の植物に無病徴感染した。

**Table 1.** Herbaceous host range of isolate U-42

Species	Symptoms
<i>Chenopodium quinoa</i>	CS, Def
<i>C. amaranticolor</i>	Def, Mo
<i>C. murale</i>	NS, Fef, Mo
<i>C. foetidum</i>	+
<i>Beta vulgaris</i>	+
<i>Nicotiana glutinosa</i>	M, VC
<i>N. clevelandii</i>	+
<i>N. rustica</i>	-
<i>N. debneyi</i>	-
<i>N. sylvestris</i>	-
<i>N. tabacum</i> "white burley"	-
<i>N. tabacum</i> "KY-57"	-
<i>Petunia</i> sp.	+
<i>Datura stramonium</i>	+
<i>Physalis floridana</i>	+
<i>Lycopersicon esculentum</i>	+
<i>Gomphrena globosa</i>	+
<i>Vigna sinensis</i>	+
<i>Vicia faba</i>	+
<i>Glycine max</i>	+
<i>Phaseolus vulgaris</i>	-
<i>P. radiatus</i>	-
<i>Pisum sativum</i>	-
<i>Cucumis sativum</i>	+
<i>Raphanus sativus</i>	-
<i>Braisa campestris</i> "santousai"	-
<i>Zinnia elegans</i>	-
<i>Dianthus chinensis</i>	-
<i>Calendula officinalis</i>	-

CS: chlorotic spot, Def: deformation, Mo: mottle  
 NS: necrotic spot, M: mosaic, VC: vein clearing  
 +: symptomless infection, -: not infected

## 2. 木本植物への接種試験

結果は Table 2 に示す通りである。

Virginia Crab では、接種一年半後表皮を剥ぐと木質部に明瞭なステム・グルーピングを生じた (Fig. 3)。

*Malus sieboldii* MO-65 では、接種 4~5 ヶ月後、接種部をナイフで削ると接芽と隣接する木質部に黒褐色のエソが観察された (Fig. 4)。接種 8 ヶ月後には接種部周辺が陥没し、外観上も異状が観察された。

*Malus scheideckeri* では、接種 3 ヶ月後に接種部およびその周辺に、黒褐色の陥没がみられた (Fig. 5)。  
*Prunus* 属検定植物に対しては、何ら病徴は生じな



Fig. 2. Symptoms on *C. quinoa* inoculated with U-42.

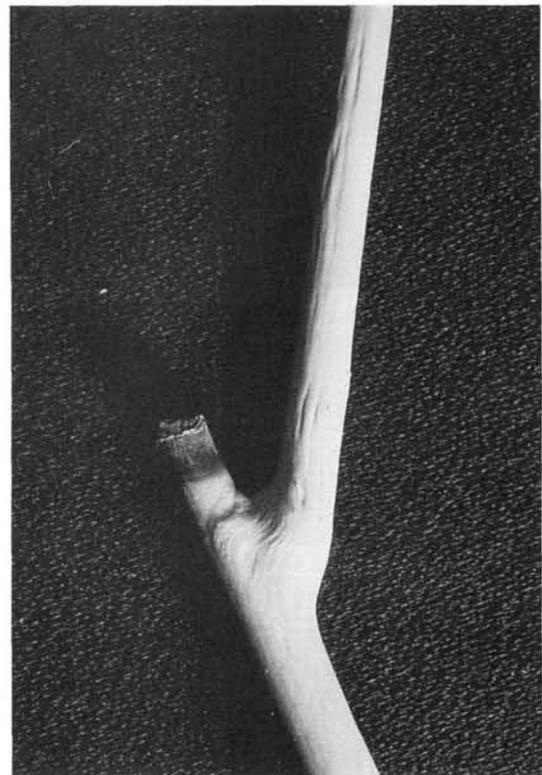


Fig. 3. Stem grooving on Virginia Crab about 1.5 year after inoculation.

**Table 2.** The symptoms on some woody indicator plants inoculated with U-42.

Indicator plants	Symptoms
<i>Malus pumila</i> "Virginia Crab"	stem grooving
<i>Malus pumila</i> "Spy227"	—
<i>Malus pumila</i> "Lord Lambourne"	—
<i>M. sieboldii</i> "MO65"	necrosis of tissue adjacent to inserled site
<i>M. scheideckeri</i>	necrosis of tissue adjacent to inserled site
<i>M. platycarpa</i>	—
<i>Prunus serrulata</i> "Shirofugen"	—
<i>Prunus serrulata</i> "Kwanzan"	—
<i>P. armeniaca</i> "Tilton"	—
<i>P. persica</i> "GF305"	—
<i>P. hybrid</i> "Shiro plum"	—



**Fig. 4.** Necrosis on tissue of MO-65 adjacent to inoculated site about 4 months after inoculation.



**Fig. 5.** Necrosis on tissue of *M. scheideckeri* adjacent to inoculated site about 3 months after inoculation.

かった。

### 3. 物理的性質

物理的性質の調査は、*C. quinoa* 罹病葉に10倍容量の0.01 M リン酸緩衝液を加えて磨碎し、それをガーゼでろ過したものを原液として用いた。

その結果、耐熱性は50~60℃、耐希釈性は $10^{-4}$ ~ $10^{-5}$ 、耐保存性は15℃で17~24日であった。

### 4. ウィルス粒子の形態

純化標品を酢酸ウラニルによってネガティブ染色し、電子顕微鏡観察した結果、屈曲に富み600~650 nmに

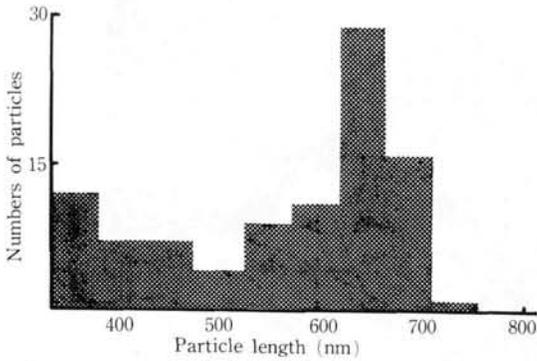


Fig. 6. Histogram of particle length.

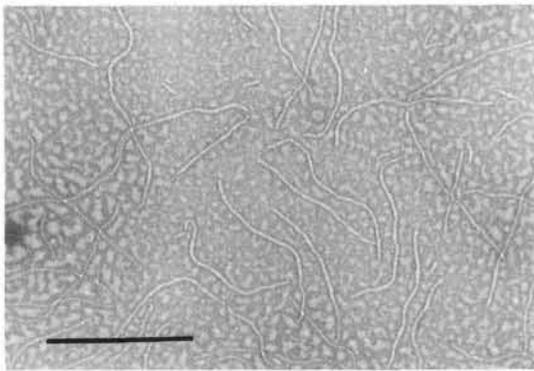


Fig. 7. Virus particles from a purified preparation. Bar represents 500 nm.

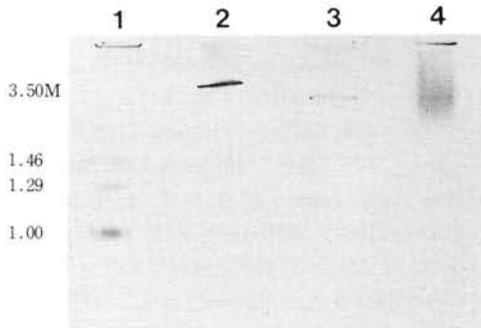


Fig. 8. Electrophoresis of U-42 RNA in 8M-Urea 2.5% polyacrylamide gel. 1, asparagus virus 2 RNAs 1-3, 1.46, 1.29  $\times 10^6$  and 1.00  $\times 10^6$  daltons respectively (1.46 M, 1.29 M and 1.00 M); 2, turnip mosaic virus RNA 3.50  $\times 10^6$  daltons (3.50  $\times 10^6$  M); 3, U-42 RNA; 4, citrus tatter leaf virus RNA.

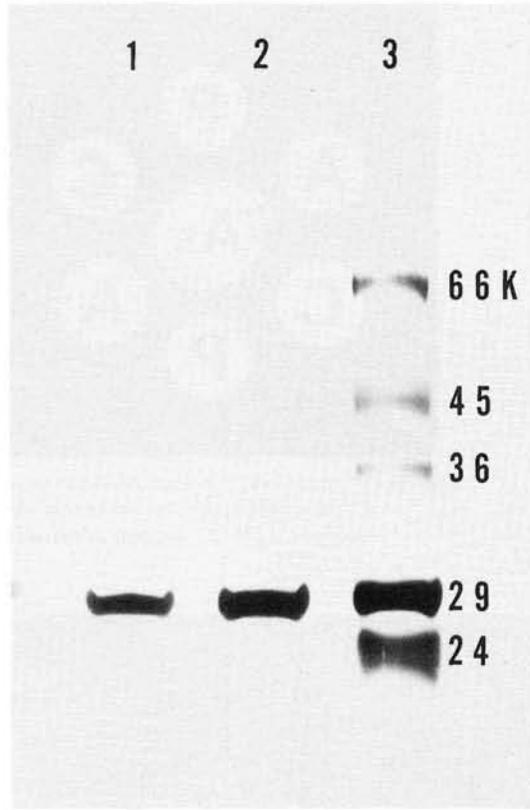


Fig. 9. Electrophoresis of U-42 coat protein in 12% polyacrylamide gel. 1, U-42 coat protein; 2, CTLV coat protein; 3, Marker proteins were as follows: bovine serum albumin 66,000 daltons (66K); egg albumin (45K); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36K); carbonic anhydrase (29K) and trypsinogen (24K).

粒子長のピークのある (Fig. 6) ヒモ状粒子を確認した (Fig. 7)。

### 5. 核酸および外被タンパク質の分子量

Fig. 8, Fig. 9 に示すとおり、核酸の分子量は約  $2.38 \times 10^6$  ダルトン、外被タンパク質の分子量は、約 27,000 ダルトンと判明した。また、核酸試料は R-Nase-A 処理により分解された。

### 6. 免疫学的性質

SDS ゲル内二重拡散法により調査したところ、本ウイルスは、ASGV 抗血清、citrus tatter leaf virus (CTLV) 抗血清 (西尾ら, 1989) と反応し、同時に供

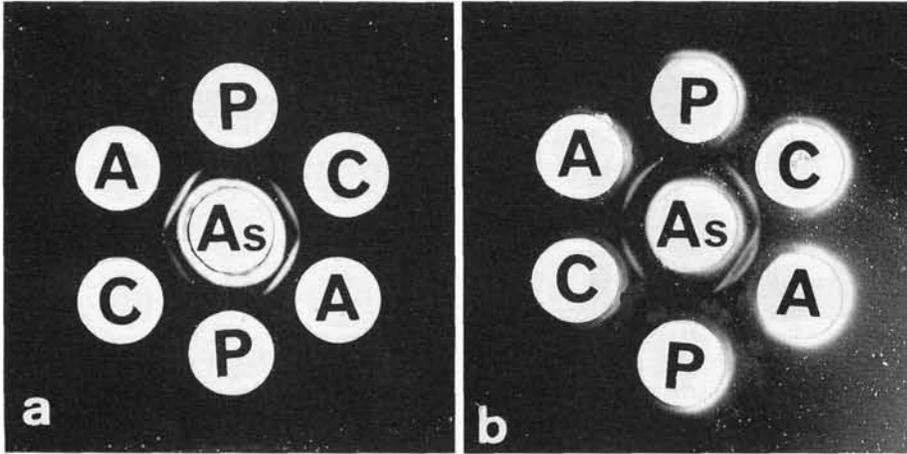


Fig. 10. Reactions in SDS-immunodiffusion tests. Wells contain a-As; ASGV antiserum, b-As; Citrus tatter leaf virus antiserum, A; purified preparation of U-42, C; purified preparation of CTLV, P; purified preparation of potat virus T.

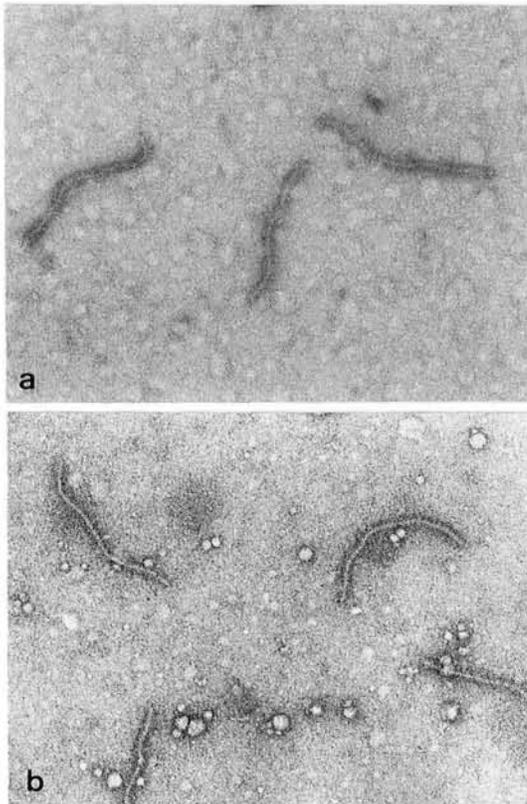


Fig. 11. a, U-42 particle was trapped and decorated with antibodies against ASGV. b, U-42 particle was trapped and decorated with antibodies against CTLV.

した CTLV K-1 株(西尾ら, 1982)と連続した沈降帯を形成した(Fig. 10)。また, 本ウイルスは, ISEM において, ASGV 抗血清および CTLV 抗血清に修飾されることが確認された (Fig. 11)。

## 考 察

*Prunus* 属植物から分離される汁液伝染性ウイルスとしては, PDV, PNRSV, ACLSV, PPV 等が知られており, このなかでヒモ状ウイルスは ACLSV, PPV がある。今回分離されたウイルスの粒子形態は ACLSV, PPV に似ていたが, 草本植物および木本植物に対する病原性はこれらとは異なった。そして, *C. quinoa*, *N. glutinosa* 等草本検定植物上での病徴は ASGV による病徴に極めて似ていた(LISTER, 1970)。また, 本ウイルスにより Virginia Crab に生じたステム・グルーピング症状, *Malus sieboldii* MO-65 および *Malus scheideckeri* に生じたえ死症状は, de SEQUEIRA(1967), 柳瀬・山口(1982), 町田・松中(1987)が報告した ASGV の症状と極めて似ていた。ウイルス粒子の形態は長さ約 600~650 nm の屈曲にとんだヒモ状粒子で報告されている ASGV の粒子形態と一致する。核酸・外被タンパク質の分子量は, 吉川・高橋(1987)が, ASGV の核酸の分子量を  $2.25 \times 10^6$  ダルトン, 外被タンパク質の分子量を 27,000 ダルトンと報告しているが, 本ウイルスの核酸, 外被タンパク質の分子量はこの報告とほぼ一致していた。

さらに免疫電顕法, ゲル内二重拡散法により ASGV

抗血清と反応することが確認された。以上のことから本ウイルスを ASGV と同定した。

ASGV はリンゴ高接病の病原ウイルスの一つと考えられ(柳瀬, 1977), また, ナンにも広く無病徴感染していることが知られている(元島ら, 1983)が, *Prunus* 属植物から検出されたという報告は本報告が初めてである。今後はリンゴ・ナンから分離される ASGV 株と本ウイルス株の違いについて接種試験等を行い, 調査を行う必要がある。

また, 西尾ら(1989)は, CTLV が ASGV 抗血清に反応したことを報告し, CTLV は ASGV と血清学的類縁関係のあることを示したが, 本試験においても, 本ウイルスは CTLV 抗血清に反応することが確認された。このため, ASGV と CTLV の関係についてもさらに詳しく調査する必要がある。

## 摘 要

1. 1985年, 中華人民共和国から輸入され隔離栽培を行っていたウメ苗木(紅梅の一種)から *C. quinoa* に汁液伝染するウイルスが検出され, 本ウイルスの同定を試みた。

2. 8科29種の草本検定植物に汁液接種した結果, *C. quinoa* には退緑斑点, 奇形, モットル, *C. amaranticolor* には奇形, モットル, *C. murale* にはエソ斑点, 奇形, モットルを生じた。また, *N. glutinosa* にはモザイク, 退緑条斑を生じる場合があった。無病徴感染した植物は5科12種であった。

3. 木本植物への接ぎ木接種試験の結果, Virginia Crab には, 接種一年半後木質部に明瞭なグルーピングを生じ, *Malus sieboldii* MO-65 では, 接種4~5カ月後, 接種部に黒褐色のエソが観察された。また, *Malus scheideckeri* では, 接種3カ月後に接種部およびその周辺に, 黒褐色の陥没がみられた。

4. 本ウイルスの耐熱性は50~60°C, 耐希釈性は $10^{-4}$ ~ $10^{-5}$ , 耐保存性は, 15°C で17~24日であった。ウイルス粒子の形態は屈曲にとんだヒモ状粒子で, 粒子長は約600~650 nm であった。

5. PAGE で分子量を測定したところ, 核酸の分子量は約 $2.38 \times 10^6$  ダルトン, 外被タンパク質の分子量は, 約27,000 ダルトンであった。

6. 免疫電顕法およびゲル内二重拡散法を用いた血清学試験を行ったところ, 本ウイルスは ASGV 抗血清および CTLV 抗血清と陽性反応を示した。

7. 以上の結果から, 本ウイルスを ASGV と同定し

た。

## 引用文献

- CADMAN, C.H. (1963) Affinities of viruses infecting fruit trees and raspberry. *Plant Dis. Reprtr.* **47**: 459-462
- KEGLER, H. and C.SCHADE (1971) Plum pox virus. In C.M.I./A.A.B., *Descriptions of Plant Viruses* No. 70
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- LISTER, R.M. (1970) Apple stem grooving virus. In C.M.I./A.A.B., *Descriptions of Plant Viruses* No. 31
- 町田郁夫・松中謙次郎(1987) ACLSV の各種系統, ASPV および 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** (1): 93 (講要)
- 元島俊治・加藤幹雄・西尾 健・小林敏郎(1983) 隔離検疫中のナンから分離された汁液伝染性ウイルス. *植防研報* **19**: 29-37
- 西尾 健・川合 昭・加藤幹雄・小林敏郎(1982) 輸入検疫中の中国及び台湾産カンキツから分離された汁液伝染性 Closterovirus. *植防研報* **18**: 11-18
- 西尾 健・川合 昭・高橋 勤・難波成任・山下修一(1989) カンキツタタリーフウイルスの純化ならびに諸性質. *日植病報* **55**: 254-258
- OHKI, S.T. and T. INOUE (1987) Use of gelrite as a gelling agent in immunodiffusion tests for identification of plant virus antigens. *日植病報* **53**: 557-561
- SEQUEIRA, O.A. De (1967) Studies on a virus causing stem grooving and graft-union abnormalities in Virginia Crab apple. *Ann. Appl. Biol.* **60**: 59-66
- SEQUEIRA, O.A. De and LISTER, R.M. (1969) Purification and relationships of Some filamentous viruses from apple. *Phytopathology* **59**: 1740-1749
- WATERWORTH, H.E. and R.M. GILMER (1969) Dark green epinasty of *Chenopodium quinoa*, a syndrome induced by a virus latent in apple and pear. *Phytopathology* **59**: 334-338
- 柳瀬春夫(1977) リンゴウイルス病の種類と我が国の現状. *植物防疫* **31**: 403-408
- 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. *果樹試験場報告 C*, 第9号: 66-77
- 吉川信幸・高橋 壮(1987) Apple chlorotic leaf spot virus および apple stem grooving virus の核酸と外被タンパク質. *日植病報* **53**: 423 (講要)