

## 隔離検疫中のオランダ産チューリップから 分離された tulip virus X

藤原 裕治・斎藤 範彦・木村 茂

横浜植物防疫所

Tulip virus X isolated from tulip imported from the Netherlands under post-entry quarantine. Yuji FUJIWARA, Norihiko SAITO and Shigeru KIMURA (Yokohama Plant Protection Station, 5-57, Kitanaka-dori, Naka-ku, Yokohama 231, Japan) Res. Bull. Pl. Pro. Japan 30: 99-103 (1994).

**Abstract:** Tulip virus X (TVX) was isolated from tulip "Parabole" imported from the Netherlands in 1990 under post-entry quarantine at Niigata prefecture in Japan. The virus was identified on the basis of symptomatology in indicator plants, particle morphology and physical and serological properties.

**Key words:** tulip, tulip virus X

### はじめに

1989年秋にオランダから輸入され、新潟県内で隔離検疫中のチューリップに、えそを伴うモザイク症状を呈した株が発見された。当症状株からウイルスを分離し、同定を試みた結果、tulip breaking virus, tobacco necrosis virus の他、*Chenopodium quinoa* に全身感染する我国で報告のないウイルスに重複感染していることが判明した。この未知のウイルスの同定を行ったところ、イギリスの一部地域のみで発生報告のある tulip virus X (TVX) (MOWAT, 1982; MOWAT, 1984) であることが判明したので報告する。

本試験を行うにあたり、TVX 抗血清を分譲していただいたイギリス Scottish Crop Reserch Institute の W.P. MOWAT 博士及び試料の採取に協力していただいた当所新潟支所の担当者に厚くお礼を申し上げる。

### 材料及び方法

#### ウイルス

1990年、新潟県内で隔離検疫を実施したオランダ産チューリップ (品種 Parabole) の中でえそを伴うモザイク症状を呈した株を、*C. quinoa* に汁液接種し、上葉からウイルス (NP 株) を分離した。センニチコウで単

一病斑分離を2回繰り返した後、*C. quinoa* で増殖し、以下の試験に供した。

#### 接種試験

各種植物への汁液接種は、*C. quinoa* 感染葉に0.1% チオグリコール酸を含む0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えて磨砕し、カーボランダムを用いる常法により行った。各種植物の感染の有無は、*C. quinoa* への戻し接種により確認した。

#### 粗液中での安定性

耐希釈性は、*C. quinoa* 感染葉の磨砕搾汁液を3,000 rpm. で15分間遠心分離し、その上清を蒸留水で10倍段階希釈して調べた。

耐保存性は、*C. quinoa* 感染葉に10倍量 (V/W) の蒸留水を加えて磨砕搾汁し、3,000 rpm. で15分間遠心分離した上清を用いた。

耐熱性は、耐保存性と同様に調整した上清を50°C ~90°C で10分間熱処理したものをを用いた。

それぞれの試験は *C. quinoa* へ接種し、全身症状の発現により判定した。

#### ウイルスの純化及び抗血清の作製

ウイルスの純化は、MOWAT (1982) の方法に従った。

Table 1. Symptoms on test plants

Plant	Inoculated leaves	Systemic
Aizoaceae		
<i>Tetragonia expansa</i>	CS	—
Amaranthaceae		
<i>Gomphrena globosa</i>	NS	—
Chenopodiaceae		
<i>Beta vulgaris</i>	CS	CS, CRS
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	CS, NS	CS, VC, Mot, LP
<i>C. quinoa</i>	CS	CS, CRS, Mot, Mal
<i>C. murale</i>	NS	NS, Mal, TN
<i>Spinacia oleracea</i>	(CS)	+
Cucurbitaceae		
<i>Citrulus lanatus</i> (Watremelon) cv. Kinzan	—	—
<i>Cucumis sativus</i> (Cucumber) cv. Suyo	(+)	—
<i>Cucurbita maxima</i> cv. Miyako	—	—
<i>Cucurbita moschata</i> cv. Kongo	—	—
Leguminosae		
<i>Phaseolus vulgaris</i>	—	—
<i>Pisum sativum</i>	(+)	—
<i>Trifolium hybridum</i>	—	—
<i>T. pratense</i>	—	—
<i>T. repens</i>	—	—
<i>Vicia faba</i>	(+)	—
<i>Vigna sinensis</i> cv. Kegon-no-taki	+	—
Solanaceae		
<i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Rutgers	—	—
<i>Nicotiana benthamiana</i>	+	—
<i>N. bigelovii</i>	(+)	—
<i>N. clevelandii</i>	—	—
<i>N. glutinosa</i>	—	—
<i>N. rustica</i>	—	—
<i>N. tabacum</i> cv. Ky 57	—	—
cv. White Burley	—	—
<i>Petunia hybrida</i>	—	—
<i>Physalis floridana</i>	—	—

CS: chlorotic spot, CRS: chlorotic ringspot, NS: necrotic spot,  
 TN: top necrosis, Mot: mottle, VC: vein clearing, LP: line pattern,  
 Mal: malformation  
 +: symptomless infection, —: not infected, ( ): sometimes infected

凍結 *C. quinoa* 感染葉に 0.01M EDTA を含む 0.067 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えて磨碎搾汁し、低速遠心分離後、上清に 8% 量 (W/V) のポリエチレングリコール (M.W. 6,000) 及び NaCl を 0.2 M になるように加えてウイルスを濃縮し (2 回)、2 回の分画遠心分離後、さらに 10~40% のショ糖密度勾配遠心分離を行いウイルスを純化した。

純化ウイルスをウサギの背部皮下に 4 回、耳静脈に 2 回注射し、重層法で力価 512 倍の抗血清を得た。

### 抗血清反応

本ウイルスと分譲を受けた TVX 抗血清の反応をデコレーション法 (MILNE and LUISONI, 1977) により電子顕微鏡で観察し、さらに TVX 抗血清と本ウイル

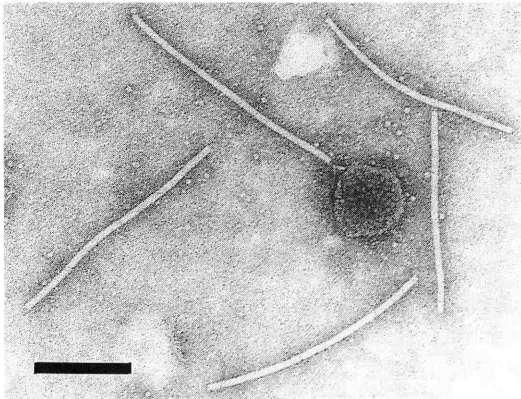


Fig. 1. Electron micrograph of virus particles in the dip preparation of infected *Chenopodium quinoa*. Bar represents 200 nm.

ス抗血清の関係を寒天ゲル内二重拡散法 (ゲル組成: 0.02 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS), 0.8% 寒天, 0.04%  $\text{NaN}_3$ ) で調べた。

## 結果及び考察

### 寄主範囲

本ウイルスを 6 科 27 種の植物に接種したところ 6 科 11 種の植物に感染した (Table 1)。アカザ科の *C. quinoa* では、接種葉に退緑斑点や退緑輪紋を生じ、上葉に退緑斑やモットル症状、小葉化、裏側への巻き、奇形葉等の症状がみられた。*C. amaranticolor* では接種葉に退緑斑点やえそ斑点を生じ、上葉では退緑斑、モットル症状、葉のねじれ等の症状がみられた。*C. murale* では接種葉、上葉にえそ斑点を生じ、激しい場合には頂部え死を起こした。ハウレンソウ、フダンソウにも全身感染した。ヒユ科のセンニチコウは接種葉にえそ斑点、ツルナ科のツルナでは退緑斑点を生じたが、共に全身感染はしなかった。マメ科では、ササゲの接種葉に無病徴感染し、エンドウとソラマメの接種葉にも時々無病徴感染した。その他ナス科の *Nicotiana benthamiana* の接種葉に無病徴感染し、*N. bigelovii* 及びウリ科のキュウリ (品種: 四葉) の接種葉にも時々無病徴感染した。他の植物には感染しなかった。

### 粗汁液中での安定性

検定植物に *C. quinoa* を用い、*C. quinoa* 粗汁液中での本ウイルスの安定性を調査したところ、耐熱性は  $70^{\circ}\text{C}\sim 75^{\circ}\text{C}$ 、耐希釈性は  $10^{-9}\sim 10^{-10}$ 、 $20^{\circ}\text{C}$  での耐保存性は 40 日以上であった。

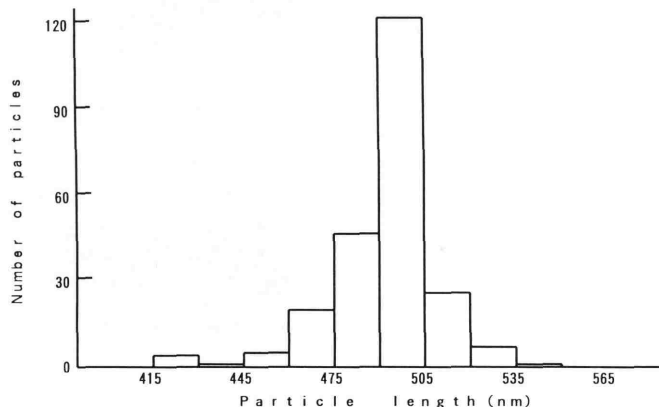


Fig. 2. Length of 233 virus particles in leaf extract from *Chenopodium quinoa*.

## ウイルス粒子

*C. quinoa* 罹病葉を用いて DIP 法により 2% リンタングステン酸 (PTA, pH 5.0) でネガティブ染色し電顕観察した結果, ひも状粒子が多数観察された (Fig. 1)。233 粒子についてその長さを測定した結果, 415 nm から 550 nm に分布し, ピークは 490 nm から 505 nm にあった (Fig. 2)。純化ウイルス試料を LAEMMLI (1970) の方法に従いポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った結果, 外被タンパク質と考えられる明瞭なバンドが 1 本形成され, その分子量は約 22,600 ダルトンであった (Fig. 3)。

本ウイルスと W.P. MOWAT 博士から分譲を受けた TVX 抗血清の反応を免疫電顕法で調べたところ, 本ウイルス粒子は明瞭に TVX 抗血清に修飾されたが, potato virus X (PVX) 粒子は修飾されなかった (Fig. 4)。作製した本ウイルス抗血清は, 抗血清 1 ml に *C. quinoa* 葉 1 g の磨砕液を加え, 37°C に 2 時間置き, 15,000 rpm で 20 分遠心分離を行う操作を 3 回繰り返

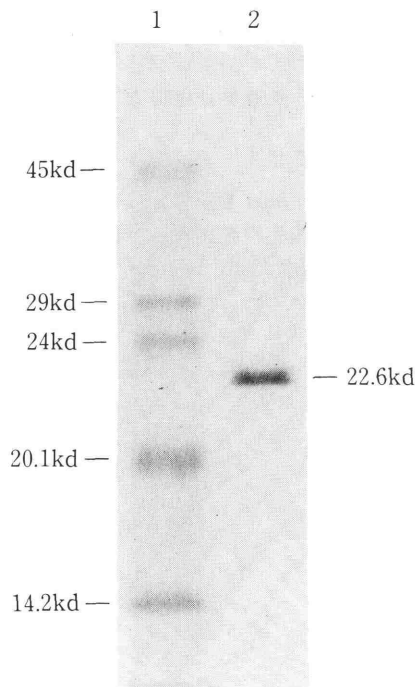


Fig. 3. SDS-PAGE of viral coat protein. Lane 1, marker proteins: egg albumin (45 kd), carbonic anhydrase (29 kd), trypsinogen (24 kd), trypsin inhibitor (20.1 kd),  $\alpha$ -lactalbumin (14.2 kd); Lane 2, viral coat protein.

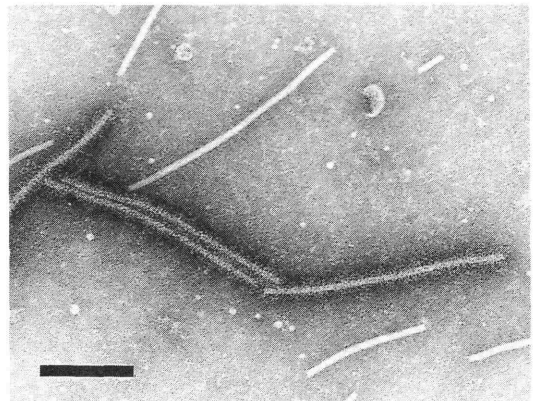


Fig. 4. Immunoelectron micrograph of NP particles decorated with TVX antibodies and nondecorated PVX particles. Bar represents 200 nm.

した(中野, 私信)後, アフィゲルプロテイン A-MAPS II キット (BIO-RAD 社) により IgG を純化した。この IgG 及び TVX 抗血清と純化ウイルスを寒天ゲル内二重拡散法で反応させた結果, 連続する 1 本の沈降帯を生じた (Fig. 5)。

これまでにチューリップに感染することが報告されているひも状のウイルスには, Potyvirus グループの tulip breaking virus, Carlavirus グループの lily symptomless virus (BRUNT, 1979), Potexvirus グループの TVX, PVX (MOWAT, 1982) 及び Clostero-

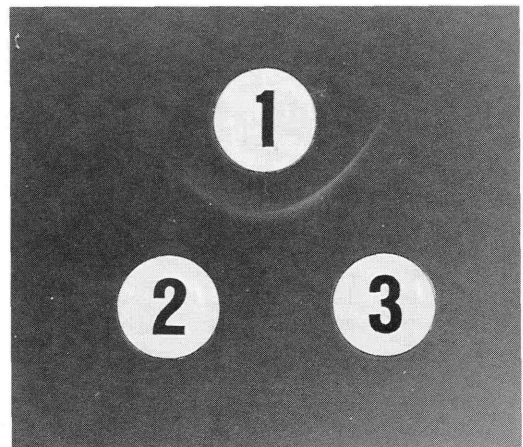


Fig. 5. Reactions in agar gel double diffusion test. Wells contain 1: purified preparation of NP. 2: TVX antiserum. 3: antiserum to NP.

virus グループの tulip severe mosaic virus (ASJES, 1984; 長尾ら, 1988) がある。

本ウイルスは、粒子の形態および外被タンパク質の分子量から Potexvirus グループに属すると考えられるが、アカザ科に全身感染し、タバコに感染しないことなど寄生性の点で PVX とは異なる。一方、TVX (MOWAT, 1982) とはツルナ、キュウリ、トマト及びエンドウでの感染性が一部異なるが、アカザ科に全身感染、ヒユ科のセンニチコウに局部感染し、ナス科のタバコ、ペチュニア、*N. glutinosa*、マメ科のインゲンマメ、アカクローバー、シロクローバー等に感染しない点で寄主範囲はほぼ一致する。また、粗汁液中での安定性、外被タンパク質の分子量等が TVX の性質とほぼ一致したこと、さらに TVX 抗血清に反応したことから本ウイルスを tulip virus X と同定した。

MOWAT (1982) は、TVX がチューリップの花弁に増色性の条斑、葉に楕円形の退緑斑やえそ斑を現すとしている。今回本ウイルスを分離したチューリップ標本は、本ウイルスの他、tulip breaking virus 及び tobacco necrosis virus に重複感染していたため、本ウイルスのチューリップ上での症状は確認できなかった。現在、チューリップへ汁液接種を行い、その影響

を調査中である。また、今回作製した抗血清を用いた簡易検定法についても検討中である。

## 引用文献

- ASJES, C.J. (1984) Jaarverslag van het Laboratorium voor Bloembollenonderzoek 1983, pp. 117.
- BRUNT, A.A. (1979) Virus diseases. In Diseases of Bulbs. Reference book HPD 1, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Her Majesty's Stationary Office, London, pp. 25-32.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- MILNE, R.G. and E. LUISONI (1977) Rapid immunoelectron microscopy of virus preparations. *Methods in Virology* **6**: 265-281.
- MOWAT, W.P. (1982) Pathology and properties of tulip virus X, a new potexvirus. *Ann. f. ppl. Biol.* **101**: 51-63.
- MOWAT, W.P. (1984) Tulip virus X. CMI/AAB Description of Plant Viruses, No. 276.
- 長尾記明・西尾 健・小林敏郎 (1988) オランダに発生するチューリップシビアモザイクウイルス感染葉の電顕観察, 植防研報 **24**: 57-61.