

隔離検疫中のオランダ産カンザキアヤメから分離された Arabis Mosaic Nepovirus

田中博道，栗原金光，小原達二，高橋勤，清水憲一*

横浜植物防疫所

Arabis Mosaic Nepovirus Isolated from Algerian Iris (*Iris unguicularis*) Imported from the Netherlands. Hiromichi TANAKA, Kinkou KURIHARA, Tatsuji OHARA, Tsutomu TAKAHASHI, Ken'ichi SHIMIZU (Yokohama Plant Protection Station 5-57, Kitanaka-dori, Naka-ku, Yokohama 231, Japan). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 33: 49-53

Abstract: Arabis mosaic nepovirus (ArMV) was isolated from algerian iris (*Iris unguicularis*) imported from the Netherlands in 1994 under post-entry quarantine at Yokohama plant protection station in Japan. The isolated virus was sap-transmissible to herbaceous plants of 26 species in 11 families. The thermal inactivation point of the virus was 55-65°C (10 min.), the dilution end point was 10^{-3} - 10^{-5} , and infectivity was retained at 20°C for 38-41 days. Spherical particles about 30 nm in diameter were found in purified preparations. The molecular weight of the coat protein of the virus was about 54k. The virus reacted with the antiserum against ArMV by gel-diffusion test. As the above results, the virus was identified as ArMV. This is the first report on the isolation of ArMV from *Iris* spp.

Key words: arabis mosaic nepovirus, *Iris unguicularis*

はじめに

1994年，横浜植物防疫所大和園場で，オランダ産カンザキアヤメ (*Iris unguicularis*) を隔離検疫中，葉に条斑モザイクが生じた。その汁液を電子顕微鏡で観察したところ，ひも状及び球状のウイルス粒子を確認した。当該試料に対し *iris* severe mosaic potyvirus (ISMV) 及び *iris* mild mosaic potyvirus の各抗血清を用いた E L I S A を行ったところ ISMV の抗血清と反応したため，電顕観察で確認されたひも状ウイルス（長さ約750nm）は，ISMV と同定した。

一方，球状ウイルスは，当該ウイルスを単離し，同定を行ったところ，*Iris* 属植物では未報告の *arabis* mosaic nepovirus (ArMV) であることが判明したので，ここに報告する。

本試験を行うに際し，tobacco ringspot nepovirus (TRSV) 抗血清を分譲していただいた神戸植物防疫所伊川谷園場関係各位に厚くお礼を申し上げる。

材料及び方法

ウイルスの分離

1994年に輸入され隔離検疫中のオランダ産カンザキアヤメから *Chenopodium quinoa* に汁液接種を行ってウイルスを分離した。斑紋及び奇形を呈した *C. quinoa* の上葉を接種源としてセンニチコウを用いて単一病斑分離を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

ソルナ，キュウリ等を含む15科37種の植物に汁液接種を行った。各接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0.01Mリン酸緩衝液（pH7.0）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。また，各種植物から *C. quinoa* へ戻し接種を行い感染の有無を確認した。

物理性

C. quinoa 感染葉に9倍量（V/W）の蒸留水を加

*現在，名古屋植物防疫所

Table 1 Symptoms on herbaceous plants

Plant	Inoculated leaves	Systemic
Polygonaceae		
<i>Fagopyrum esculentum</i>	+	+
Aizoaceae		
<i>Tetragonia expansa</i>	CS, NS	M, Dw
Caryophyllaceae		
<i>Gypsophila elegans</i>	+	+
Chenopodiaceae		
<i>Beta vulgaris</i>	+	+
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	CS	CS, Df
<i>C. capitatum</i>	+	+
<i>C. foetidum</i>	+	+
<i>C. murale</i>	CS	Df, Mo, TN
<i>C. quinoa</i>	NS, NRS	Df, Mo
<i>Spinacia oleracea</i> cv. Ajidama	+	+
cv. Rido	+	+
Amaranthaceae		
<i>Amaranthus tricolor</i>	+	+
<i>Celosia argentea</i>	+	+
<i>C. cristata</i> L.	+	+
<i>Gomphrena globosa</i>	NS	-
Cruciferae		
<i>Brassica campestris</i> var. <i>rapa</i> cv. Kanamachi-kokabu	+	+
Leguminosae		
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Kentucky Wonder	-	-
<i>Vicia faba</i>	-	-
<i>Vigna sinensis</i> cv. Kurodane-sanjaku	CS	Df
cv. Kegon-no-taki	CS	Df
Balsaminaceae		
<i>Impatiens balsamina</i>	+	+
Cucurbitaceae		
<i>Cucumis sativus</i> cv. Suyo	CS	+
cv. Hokushin	CS	+
Convolvulaceae		
<i>Calonyction aculeatum</i>	-	-
Solanaceae		
<i>Capsicum annuum</i>	-	-
<i>Datura stramonium</i>	-	-
<i>Lycopersicon esculentum</i>	-	-
<i>Nicotiana benthamiana</i>	+	+
<i>N. clevelandii</i>	+	+
<i>N. debneyi</i>	+	+
<i>N. glutinosa</i>	-	-
<i>N. occidentalis</i>	+	+
<i>N. rustica</i>	+	+
<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	+	+
cv. White Burley	+	+
<i>Petunia hybrida</i>	+	M
<i>Physalis floridana</i>	-	-
Scrophulariaceae		
<i>Antirrhinum majus</i>	+	+
Compositae		
<i>Dahlia</i> sp.	-	-
Gramineae		
<i>Zea mays</i> cv. Honey Bantam	-	-
Iridaceae		
<i>Belamcanda chinensis</i>	-	-

CS: chlorotic spot, Dw: dwarf, M: mosaic, Ma: malformation, Mo: mottle, NS: necrotic spot, NRS: necrotic ringspot, TN: top necrosis, +: symptomless infection, -: no infection.

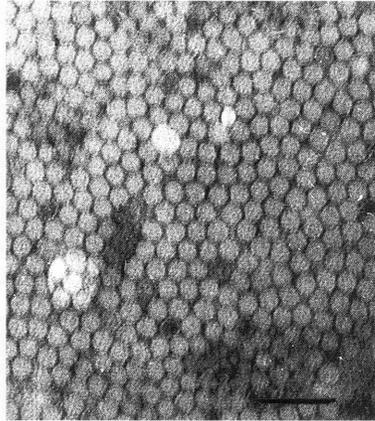


Fig. 1 Electron micrograph of purified virus preparation. Bar represents 100 nm.

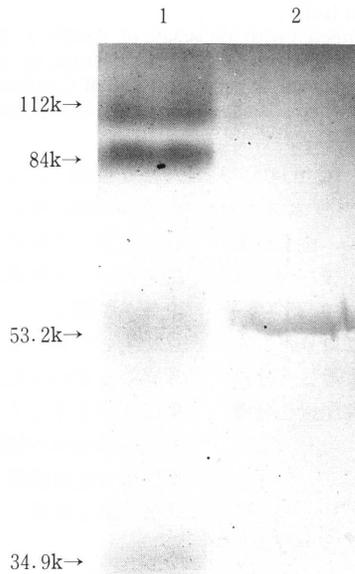


Fig. 2 SDS-PAGE of viral coat protein. Lane 1, Marker proteins: phosphorylase B (112k), bovine serum albumin (84k), ovalbumin (53.2k), carbonic anhydrase (34.9k); Lane 2, viral coat protein.

えて磨砕し、遠心分離 (900×g, 15分間, 4°C) して得られた上清を用い、耐熱性及び耐保存性を調べた。耐熱性は40~80°Cで5°C間隔でそれぞれ10分間熱処理した後、耐保存性は20°Cに設定した恒温器に所定の期間静置した後、それぞれ*C. quinoa*へ接種し調査した。

また、耐希釈性については*C. quinoa*感染葉を磨砕し、遠心分離 (900×g, 15分間, 4°C) して得られた上清を蒸留水で10段階希釈したものを*C. quinoa*へ接

種し調査した。

ウイルスの純化

純化の方法は藤原ら (1993) の方法を一部改変して行った。すなわち、*C. quinoa*感染葉に2倍量 (V/W) の0.1%チオグリコール酸を含む0.05Mリン酸緩衝液 (pH7.0) を加えて磨砕搾汁後、最終濃度8%になるようにn-ブタノールを加えて4°Cで30分間攪拌し、遠心分離 (10,000×g, 20分間, 4°C) した。

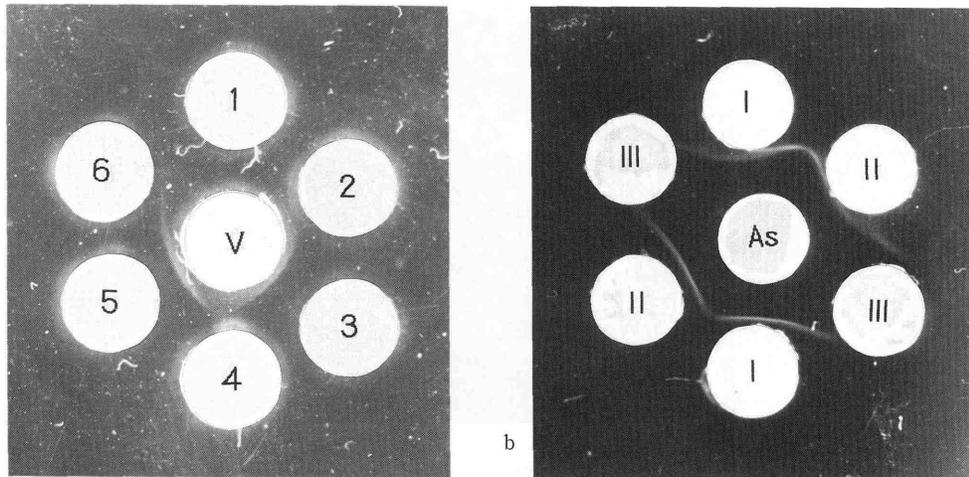


Fig. 3 Reactions in agar gel double diffusion test.

- a, Wells contain V: sap of *C. quinoa* infected with iris isolate of ArMV, 1: TRSV antiserum, 2: TRSV antiserum, 3: GFLV antiserum, 4: RpRSV antiserum, 5: ArMV antiserum, 6: ToRSV antiserum.
 b, Wells contain As: ArMV-Tu (Tulip isolate) antiserum, I: sap of *C. quinoa* infected with iris isolate of ArMV, II: sap of *C. quinoa* infected with strawberry isolate ArMV, III: sap of healthy *C. quinoa*.

この上清にポリエチレングリコール (M. W. 6,000) を 8% (W/V) になるように、塩化ナトリウムを 0.4 M になるように加えて 4°C で 60 分間攪拌後、遠心分離 (10,000×g, 20 分間, 4°C) した。この沈殿を 0.1% ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム, 0.25% 2-メルカプトエタノール, 1% ポリビニルピロリドンを含む 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 6.5) に懸濁し、分画遠心後、その上清を 10~40% ショ糖密度勾配遠心分離を行い純化試料を得た。

血清反応試験

C. quinoa 感染葉粗汁液と TRSV, ArMV-Tu (チューリップ分離株), grapevine fanleaf nepovirus (GFLV), tomato ringspot nepovirus (ToRSV), raspberry ringspot nepovirus (RpRSV) の各抗血清を、寒天ゲル内二重拡散法 (ゲル組成: 0.01 M リン酸緩衝液, pH 7.0, 0.8% Agar, 0.85% NaCl, 0.04% Na₃) で反応させた。

結 果

寄主範囲

汁液接種した 15 科 37 種の植物のうち 11 科 26 種の植物に感染し、本ウイルスは、寄主範囲が広いことを示した (Table 1)。*C. quinoa* では、接種葉にえ死斑点ま

たはえ死輪点、上葉にモットル及び奇形を生じた。*C. amaranticolor* では、接種葉に退緑斑点、上葉に退緑斑点及び奇形を生じた。ツルナでは、接種葉に退緑斑点及びえ死斑点、上葉に軽微なモザイクを生じ、株全体が萎縮した。センニチコウでは、接種葉にえ死斑点を生じたが、上葉からはウイルスは検出されず、全身感染しなかった。ササゲでは接種葉に退緑斑点、上葉に奇形を生じた。ナス科の *Nicotiana* 属植物では、*N. glutinosa* は感染しなかったが、それ以外の植物は無病徴で全身感染した。ペチュニアでは、接種葉は無病徴であったが、上葉に軽微なモザイクを生じた。

物理性

C. quinoa 葉清澄液中での耐熱性は 55~65°C, 耐保存性は 38~41 日, 耐希釈性は 10⁻³~10⁻⁵ であった。

ウイルス粒子

純化試料を 2% リンタングステン酸溶液 (pH 7.0) を用いたネガティブ染色法で電子顕微鏡観察した結果、中空の粒子を含む直径約 30 nm の球状粒子が確認された (Fig. 1)。この純化試料について SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (大村 1993) を行った結果、バンドが 1 本検出され、その分子量は約 54 k (Fig. 2) であった。

血清反応

寒天ゲル内二重拡散法による5種類の抗血清との反応では、TRSV、GFLV、RpRSV、ToRSVの各抗血清とは沈降帯を形成せず、ArMVの抗血清とのみ沈降帯を形成した (Fig. 3a)。さらに、本ウイルス感染C. quinoa葉及びオランダイチゴより分離されたArMV (藤原ら 1993, 農林水産省指令8横植第530号) 感染C. quinoa葉の2種類の粗汁液を用いてArMV-Tu (チューリップ分離株) の抗血清と反応させたところ、連続した沈降帯を形成した (Fig. 3b)。

考 察

*Iris*属植物から分離された汁液伝染性の球状ウイルスは、broad bean wilt fabavirus (BRUNT, 1975), cucumber mosaic cucumovirus (BRUNT, 1975), iris necrotic ring virus (YASUKAWA *et al.*, 1991), TRSV (BRUNT, 1975 ASJES, 1979) が知られている。本ウイルスは、寄主範囲、物理的性質、粒子の形態及び外被タンパク質の分子量からNepovirus属と考えられた (HARRISON *et al.*, 1977)。上記のウイルスの中でNepovirus属はTRSVのみであるが、TRSVがタバコ及び*Nicotiana clevelandii*に病徴を現すこと、外被タンパク質の分子量は57kであること (STACE-SMITH, 1985)、寒天ゲル内二重拡散法でTRSVの抗血清とは反応しなかったことから、本ウイルスはTRSVとは異なるものであると考えられた。これに対し、寄主範囲、物理的性質 (MURANT, 1970) 及び外被タンパク質の分子量 (岩木 1983) がArMVの記載と一致し、寒天ゲル内二重拡散法でオランダイチゴから分離されたArMVと連続した沈降帯を形成したことから、本ウ

イルスをArMVと同定した。

今後は、カンザキアヤマの健全苗に本ウイルスを接種し単独感染による病徴を確認する必要がある。

引用文献

- ASJES, C. J. (1979) Viruses and virus diseases in Dutch bulbous irises (*Iris hollandica*) in the Netherlands. *Neth. J. Pl. Path.* 85: 269-279
- BURNT, A. A. (1975) Viruses and virus diseases of irises in Britain. *Acta Hort.* 47: 45-50
- 藤原祐治・星野智士・斎藤範彦・栗原金光・大門輝男 (1993) イギリス産オランダイチゴから分離された arabis mosaic virus. 植防研報29: 53-56
- HARRISON, B. D. and MURANT, A. F. (1977) Nepovirus Group. CMI/AAB Descriptions of plant viruses No. 185
- 岩木満朗 (1983) 植物ウイルス事典 (興良 清ら編) pp. 198-199 朝倉書店. 東京.
- MURANT, A. F. (1970) Arabis mosaic virus. CMI/AAB Descriptions of plant viruses No. 16
- 大村敏博 (1993) 植物病原性微生物研究法 (脇本 哲 監修) pp. 196-199 ソフトサイエンス社
- STACE-SMITH, R. (1985) Tobacco ringspot virus. CMI/AAB Descriptions of plant viruses No. 309
- YASUKAWA, K., OSAKI, T. and INOUE, T. (1991) Necrotic ring disease of Japanese iris (*Iris kaempferi* Sieb.), a new disease caused by Japanese iris necrotic ring virus. *Bull. Univ. Osaka Pref. Ser. B.* 43: 21-28