

## エビネ (*Calanthe* sp.) から分離された Odontoglossum Ringspot Virus

松本 純一・前田 孚憲・井上 成信

Odontoglossum Ringspot Virus Isolated from *Calanthe* sp. in Japan

Jun-ichi MATSUMOTO, Takanori MAEDA and Narinobu INOUE

A rod-shape virus isolated from *Calanthe* sp. showing chlorotic mottle on the leaves, collected in Ibaraki Prefecture, was identified as odontoglossum ringspot virus (ORSV). The isolate, designated as Cal. 92-1T, was transmitted by sap-inoculation to 14 out of 40 species in 6 out of 12 families. The virus particles were rod-shaped, about 310 nm long. In ultrathin sections, the dispersed and aggregated virus particles were observed in the cytoplasm of the cells of the infected leaves of *Chenopodium quinoa*. The virus contained a single protein species of  $M_r$  20,600. The  $M_r$  of the capsid proteins (Cal. 92-1T) was similar to those of three other ORSV isolates (Cy-1, Cy-46, Cy-Kei). Cal. 92-1T isolate and the other isolates reacted with antiserum to the *Cymbidium* isolate (Cy-1), suggesting that Cal. 92-1T was serologically very similar to the other ORSV isolates. Three species of dsRNA were isolated from plants infected with Cal. 92-1T and they were similar to those of three other ORSV isolates.

**Key words:** Odontoglossum ringspot virus, *Calanthe* sp.,  
Identification

### 緒 言

エビネ属植物 (*Calanthe* spp.) はラン科に属する単子葉植物でわが国の山野に自生しており、数種の固有種、およびそれらの種間交雑種が観賞用として栽培されている。しかしエビネ属植物にはウイルス病が広く蔓延しており、わが国ではこれまでに7種のウイルスの発生

が報告されている<sup>7,9,18,25</sup>。最近行ったエビネ属植物のウイルス発生調査において、葉に退緑斑紋を現したエビネ (*Calanthe* sp.) から棒状とひも状のウイルスが検出され、それらのうち棒状ウイルスを *odontoglossum ringspot virus* (ORSV) と同定した。本報では本ウイルスの寄主範囲と病徴、血清学的性質、感染植物の細胞内所見および *Cymbidium* より分離された ORSV 3 分離株との性状の比較などについて述べる。

本実験を行うに当たり協力を戴いた光畑興二技官に謝意を表する。

## 材 料 と 方 法

**1. 供試ウイルス** 本実験で供試した ORSV エビネ分離株 (Cal. 92-1T) は、1992年3月茨城県つくば市で採集した、葉に退緑斑紋を現したエビネ (*Calanthe* sp., Plate I-1) より分離した。ウイルスの分離は原株病葉を0.05 M リン酸緩衝液 (PB), pH 7.0で磨砕して得た汁液を *Nicotiana glutinosa* に接種し、形成された局部病斑から、*N. glutinosa* を用いて単一病斑分離を2回繰り返すことにより行った。ウイルスは *Chenopodium quinoa* あるいはツルナを用いて継代増殖した。また比較のために、洋ラン *Cymbidium* より分離した ORSV の2分離株 (Cy-1, Cy-46)<sup>3,5</sup>、スルガラン (東洋ラン *Cymbidium*, 蕙蘭) より分離した ORSV 1 分離株 (Cy-Kei)<sup>13</sup>、および tobacco mosaic virus 普通系 (TMV-OM) を用いた。

**2. 汁液接種** 汁液接種は *C. quinoa* の接種葉を0.05 M PB, pH 7.0で磨砕し、カーボランダムを用いる常法で行った。接種した植物は温室内において接種後3週間頃までの病徴の有無を観察し、病徴が現れなかったものについては *C. amaranticolor* に戻し接種して感染の有無を確認した。

**3. ウイルスの純化** ウイルスの純化は次に述べる手順で行った。病斑が十分に現れた *C. quinoa* の凍結葉に2倍量0.1 M PB, pH 7.0 (0.1%チオグリコール酸を含む) を加えて磨砕した。これを二重のガーゼで搾汁した後、7,000×g で15分間遠心分離した。上清をとり、2% Triton X-100を加え15分間、次に0.1 M 塩化ナトリウム、4%ポリエチレングリコール (PEG 6,000) を加えてさらに60分間攪拌した後、7,000×g で15分間遠心分離して得られた沈殿を0.1 M PB, pH 7.0に再懸濁した。これを7,000×g で15分間遠心分離した上清を上記と同様に再度 Triton X-100処理、PEG 沈殿を行った後、その試料を20%ショ糖クッションに重層し75,000×g で15分間遠心分離した。得られた沈殿を0.1 M PB, pH 7.0に再懸濁し、7,000×g で15分間遠心分離した。その上清を塩化セシウム-ショ糖密度勾配に重層し125,000×g で3時間遠心分離<sup>17)</sup>し、得られたウイルス画分を回収した。

**4. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)** ウイルス外被タンパク質の SDS-PAGE (4%濃縮ゲル, 15%分離ゲル) は Laemmli<sup>16)</sup>の方法に準じて行った。

**5. 血清反応試験** 各種の血清反応試験には ORSV・Cy-1 分離株の抗血清<sup>3)</sup>を用いた。寒天ゲル内二重拡散法は0.8% 寒天 (Difco, Noble Agar, w/v), 1%アジ化ナトリウム (w/v), 0.85%塩化ナトリウム (w/v) を加えたゲルを用いた。直接二重酵素結合抗体法 (DAS-ELISA) は Clark and Adams<sup>2)</sup>の方法によって行った。

**6. 電顕観察** DN 法によるウイルス粒子の電子顕微鏡 (日立 H-7,000B) 観察は2%リンタングステン酸 (PTA, pH 7.0) あるいは2%酢酸ウラニル (UA, pH 7.0) で逆染色した試

料について行った。感染 *C. quinoa* の超薄切片の電顕観察は病葉の細片を6%グルタルアルデヒドと1%四酸化オスミウムで二重固定し、エタノールシリーズで脱水後、エポキシ樹脂に包埋した試料をガラスナイフで薄切し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色して行った。

7. 2本鎖RNA (dsRNA) の分析 ウイルス感染に特異的な dsRNA は Valverde *et al.*<sup>23)</sup> の方法に従い、感染 *C. quinoa* から抽出した。dsRNA 試料の分析は6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (6% PAGE) により行い、ゲルは常法により銀染色した。

## 結 果

### 1. 寄主範囲と病徴

本ウイルスに感染した *C. quinoa* の局部病斑葉を接種源として12科40種の植物に汁液接種を行ったところ、Table 1 に示すようにエビネ属のタカネ (*Calanthe discolor* var. *bicolor*), *Cymbidium* sp., *N. benthamiana*, *N. clevelandii* の2科4種の植物に全身感染し、5科10種の植物に局部感染した。主な感染植物の病徴は次のとおりであった。

タカネ (*Calanthe discolor* var. *bicolor*) : 接種1ヶ月後に、葉脈に沿って退色斑を生じた。しかし病徴は軽くえそ斑は生じなかった。

Table 1. Host range of ORSV (Cal. 92-1T) isolated from *Calanthe* sp.

<i>Systemic susceptible plant species</i>	
Orchidaceae	<i>Calanthe</i> sp., <i>Cymbidium</i> sp.
Solanaceae	<i>Nicotiana benthamiana</i> , <i>N. clevelandii</i> *
<i>Local susceptible plant species</i>	
Solanaceae	<i>N. tabacum</i> (Samsun*, Xanthi nc), <i>N. glutinosa</i>
Aizoaceae	<i>Tetragonia expansa</i>
Amaranthaceae	<i>Gomphrena globosa</i> , <i>Celosia cristata</i>
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium amaranticolor</i> , <i>C. quinoa</i> , <i>Beta vulgaris</i> , <i>Spinacea oleracea</i>
Compositae	<i>Zinnia elegans</i> *
<i>Non-susceptible plant species</i>	
Solanaceae	<i>N. tabacum</i> (White Burley, Samsun NN), <i>N. rustica</i> , <i>Hyoscyamus niger</i> , <i>Solanum melongena</i> , <i>Datura stramonium</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i>
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i> , <i>Cucurbita maxima</i> , <i>C. pepo</i>
Cruciferae	<i>Brassica campestris</i> subsp. <i>rapa</i> , <i>B. rapa</i> nothovar., <i>Raphanus sativus</i>
Leguminosae	<i>Pisum sativum</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Vicia faba</i> , <i>Vigna angularis</i> , <i>V. radiata</i> , <i>V. sinensis</i> , <i>Trifolium repens</i> , <i>T. pratense</i> , <i>T. incarnatum</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Medicago sativa</i> , <i>Cassia occidentalis</i> , <i>Astragalus sinicus</i>
Caryophyllaceae	<i>Dianthus superbus</i>
Gramineae	<i>Zea mays</i>
Pedalicaceae	<i>Sesamum indicum</i>

Infection was confirmed by inoculation to *C. amaranticolor*.

\*: Latent infection

*Cymbidium* sp.: 接種1ヶ月後に、葉全体に退色斑を生じた。接種に小苗を用いたため現在着花に至らず、花の病徴はまだ確認していない。

*N. benthamiana*: 全身感染し、接種約2週間後に上葉にモザイクを生じた。

*N. clevelandii*: 無病徴全身感染であった(上葉からウイルスが回収された)。

タバコ (*Xanthi nc*): 接種1週間後に接種葉に1~2mmの白色のえそ斑点を生じた。全身感染しなかった。

*N. glutinosa*: 接種1週間後に接種葉に白色のえそ斑点を生じた。全身感染しなかった。

*Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*: 接種3日後に接種葉に径2mmほどのえそ斑点を生じた(Plate I-2)。*C. amaranticolor*では日が経つと斑点が大きくなり周りに赤いハローを生じた。ともに全身感染しなかった。

ソルナ: 接種3日後に接種葉に針点状の白色のえそ斑点を生じた(Plate I-3)。全身感染しなかった。

センニチコウ: 接種1週間後に接種葉に赤色のえ死斑点を生じた。全身感染しなかった。

ケイトウ: 接種1週間後に接種葉に退緑輪紋を生じた。全身感染しなかった。

他の植物: フダンソウではえそ斑点、ハウレンソウでは退緑斑点を、それぞれの接種葉に生じた。タバコ (*Samsun*)、ヒャクニチソウは接種葉にのみ無病徴感染した。

また次の植物を含む7科28種の植物: タバコ (*White Burley*, *Samsun NN*)、*N. rustica*, ナス, トマト, *Datura stramonium*, *Hyoscyamus niger*, キュウリ, セイヨウカボチャ, ペポカボチャ, コマツナ, ダイコン, *Cassia occidentalis*, インゲンマメ, エンドウ, ソラマメ, クリムソクローバ, ササゲ, ナデシコ, トウモロコシ, ゴマには感染しなかった。本ウイルスの各種植物に対する反応を *Cymbidium* から分離された ORSV 4 分離株について実験した近藤ら<sup>13)</sup>の結果と比較し, Table 2 に示した。

Table 2. Symptoms on selected hosts inoculated with Cal. 92-1T and other four ORSV isolates

Host species	Isolates of ORSV				
	Cal. 92-1T	Cy-1 <sup>a)</sup>	Cy-46 <sup>a)</sup>	Cy-Kei <sup>a)</sup>	Cy-Kan <sup>a)</sup>
<i>Nicotiana benthamiana</i>	1/M <sup>b)</sup>	1/M	1/s	1/s	1/M
<i>N. clevelandii</i>	1/s	1/M	1/m	1/m	1/M
<i>Datura stramonium</i>	-/-	-/-	CS,NS/-	-/-	-/-
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	WNS/-	1/-	WNS,WRS/m	WNS,WRS/-	WNS,WRS/-
<i>Spinacea oleracea</i>	CS/-	CS/m	1/-	1/-	1/-
<i>Celosia argentea</i>	CRS/-	WRS/-	1/-	1/-	1/-
<i>Zinnia elegans</i>	1/-	CS/-	1/s	1/-	CS/-

Infection was confirmed by back inoculation to *C. amaranticolor*.

<sup>a)</sup>: Data from Kondo *et al.* (1992)

<sup>b)</sup>: CS: chlorotic spot, CRS: chlorotic ringspot, l: latent,

M: mosaic, NS: necrotic spot,

s: latent systemic infection, WNS: white necrotic spot, WRS: white ringspot, -: no infection

## 2. ウイルス粒子

感染植物の DN 法試料を電顕観察したところ、棒状粒子が確認され (Plate I-4), そのうち215個の粒子長を測定したところ、全体の約79.1%が250-350 nm の範囲にあり、ピークは約310 nm であった (Fig. 1A). また比較のために同時に測定した ORSV・Cy-1 分離株の粒子長のピークも約310 nm であった (Fig. 1B)

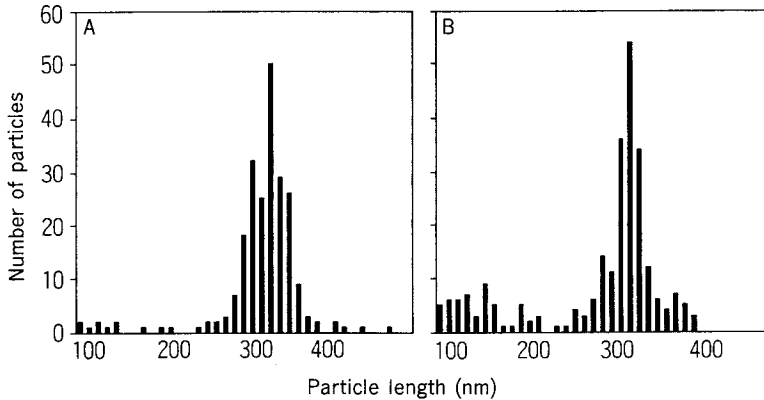


Fig. 1. Particle length distributions of two isolates of ORSV. A: the isolate of Cal. 92-1T, B: the isolate of Cy-1.

## 3. ウイルス外被タンパク質の分子量

SDS-PAGEにより Cal. 92-1T の外被タンパク質の分子量を調べ、これを洋ラン *Cymbidium* からの ORSV 2 分離株 (Cy-1, Cy-46), 同じく東洋ラン *Cymbidium* からの ORSV 1 分離株 (Cy-Kei) と比較を行った。その結果、Cal. 92-1T は 1 種類のタンパク質からなり、その分子量は約20,600であった。この値は Cy-46, Cy-Kei と同じであったが、Cy-1 では約20,900で、他の 3 分離株よりわずかに大きかった (Plate I-6)。

## 4. 血清反応試験

ORSV 抗血清 (Cy-1 分離株) を用いた免疫電顕法<sup>19)</sup>では、Cal. 92-1T のウイルス粒子に抗体の付着が認められた (Plate I-4)。同じ ORSV 抗血清を用いて行った寒天ゲル内二重拡散法では Cal. 92-1T を含めたすべての ORSV 分離株が明瞭な沈降帯を形成し、その沈降帯はすべての分離株間で互いに融合した。しかし TMV-OM は反応しなかった (Plate II-1)。さらに ORSV・Cy-1 分離株に対する IgG を用いた DAS-ELISA でも、すべての ORSV 分離株は反応し、それらの反応の程度に差が見られなかったが、TMV-OM とは反応しなかった (Fig. 2)。

## 5. 感染植物の細胞内所見

*C. quinoa* 感染葉の超薄切片では細胞質内に多数の棒状粒子が散在あるいは集塊しているのが観察された。またウイルス粒子の横断面と思われるスポット状の像も観察された (Plate II-2 ~ 4)。

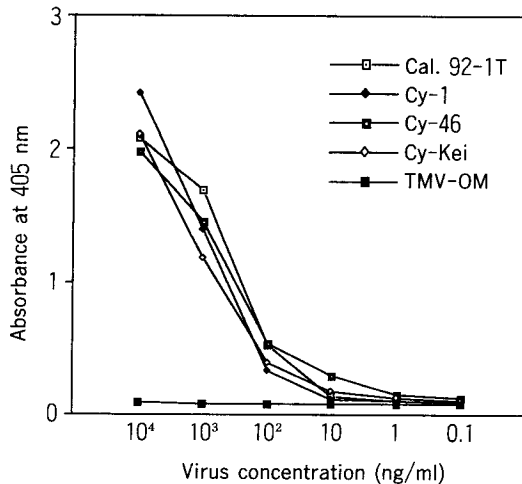


Fig. 2. Serological comparison of four isolates of ORSV (*Cal.* and *Cymb.*) by DAS-ELISA using anti-Cy-1-IgG.

## 6. dsRNA の分析

ウイルス感染に特異的な dsRNA を抽出し、6% PAGE で泳動したところ、Cal. 92-1T では2本のメジャーバンドと1本のマイナーバンドが認められた。この3本のバンドは同時に泳動した ORSV 3 分離株でも認められた。分子量の最も大きいメジャーバンド dsRNA-1 の移動度はすべての ORSV 分離株で同じであり、 $4.0 \times 10^6$  と推定された<sup>14)</sup>。また分離株間で dsRNA-2 の濃度ならびに dsRNA-3 の移動度に若干の差が認められた (Plate 1-7)。

## 考 察

わが国のエビネ属植物に発生するウイルスとしては、これまでに cymbidium mosaic virus (CyMV)<sup>7)</sup>, ORSV<sup>7)</sup>, cucumber mosaic virus<sup>4)</sup>, clover yellow vein virus<sup>8)</sup>, bean yellow mosaic virus<sup>9)</sup>, turnip mosaic virus<sup>18)</sup>などが知られている。1992年に茨城県で採集された葉に退緑斑紋を示したエビネから検出された棒状ウイルスは、粒子の形態、寄主範囲、感染植物の細胞内所見、血清試験より ORSV と同定された。

ORSV は CyMV とともに世界中で多属のラン科植物に発生が認められている主要な病原ウイルスである<sup>20,26)</sup>。エビネ属植物においてもわが国だけでなく、台湾<sup>6)</sup>、インドネシア<sup>10)</sup>、韓国<sup>1)</sup>でも発生が認められている。しかしそれらエビネ属植物に発生する ORSV についての諸性質は詳しく調べられていなかった。

本ウイルスは *N. clevelandii* に全身感染するが、無病徴である点が ORSV 洋ラン *Cymbidium* 分離株 (Cy-1, Cy-46)、同じく東洋ラン *Cymbidium* 分離株 (Cy-Kei) と異なっていた。その他の植物に対する反応については、病徴の現われ方に若干の違いが見られるもののほぼ同じであった。

本ウイルスの粒子長は約310 nm であり、ORSV 東洋ラン *Cymbidium* 2 分離株 (約320 nm)<sup>13)</sup> よりやや短く、ORSV 洋ラン *Cymbidium* 2 分離株 (約300 nm)<sup>3,5,13)</sup> よりやや長く測定

された。ORSV の粒子長については300 nm<sup>5,20,21)</sup>, 314 nm, 317 nm<sup>24)</sup>, 325 nm<sup>22)</sup>との報告がある。本研究では ORSV エビネ分離株と同時に ORSV・Cy-1 分離株の粒子長についても測定したが、この Cy-1 の粒子長も約310 nm であった。このことから ORSV の粒子長は約300-320 nm 前後であり、電子顕微鏡の測定精度や試料の作製方法などによって多少の誤差が生じたのではないかと考えられた。

ORSV・Cy-1 抗血清を用いて、ゲル内二重拡散法と DAS-ELISA により本ウイルスと他の ORSV 3 分離株との血清反応を比較したところ、供試したすべての分離株間での血清学的な差異は見られなかった。また同時に供試した TMV-OM はほとんど反応しなかった。この結果は Paul *et al.*<sup>20,21)</sup>, 井上<sup>5)</sup>, 近藤ら<sup>13)</sup>の結果と一致し、エビネから分離された ORSV も血清学的に TMV とは異なることが示された。

SDS-PAGE による外被タンパク質の分子量は Cy-1 分離株が他の分離株よりもわずかに大きな値(約20,900)を示したのに対して、エビネ分離株と Cy-46, Cy-Kei 分離株はほぼ同一の分子量(約20,600)であった。エビネ分離株以外の ORSV の分子量については近藤らの報告<sup>13)</sup>と若干異なるが、同様の結果が得られた。外被タンパク質遺伝子の塩基配列から算出された ORSV・Cy-1 分離株の分子量は約17,000<sup>11)</sup>となっており、SDS-PAGE で得られた値と大きく異なるが、これは SDS-PAGE で算出される分子量が見かけのものに過ぎないことによるものと考えられた。また近藤らは、外被タンパク質のペプチドマッピングおよび外被タンパク質の subgenomic dsRNA を用いた RNase protection assay により、Cy-1 分離株は外被タンパク質のアミノ酸配列およびその遺伝子の塩基配列レベルでも他の分離株と異なっていること、さらに *Cymbidium* に対する病原性でも他の分離株と異なっていることを報告している<sup>14,15)</sup>。本研究では上記の2つの試験を行っていないが、外被タンパク質の分子量からみて、供試した ORSV エビネ分離株は Cy-1 以外の ORSV 分離株と差異がないように思われた。

ORSV は多種属のラン科植物で発生が報告されており、*Cymbidium* と *Cattleya* では花の斑入り (flower color breaking) の原因となる<sup>3,12,22)</sup>。Cy-1 分離株と Cy-46 分離株とでは *Cymbidium* における病徴に若干の違いが生じることが報告されているが<sup>13)</sup>、本研究では ORSV の感染がエビネの花にどのような影響を与えるかは接種したエビネに花の着生を見たのち観察する予定である。また Cy-1 分離株のような系統がエビネにも発生しているかを調査する必要がある。

## 摘 要

1992年に採集した退緑斑紋を示すエビネから棒状ウイルスとひも状ウイルスが検出され、この棒状ウイルスはその諸性質から odontoglossum ringspot virus (ORSV) と同定された。本ウイルスは汁液接種により供試した12科40種のうち、6科14種に感染した。DN 法試料の電顕観察では長さ約310 nm のウイルス粒子が観察された。本ウイルスの感染 *Chenopodium quinoa* 細胞中には散在あるいは大集塊したウイルス粒子が観察された。ウイルス外被タンパク質の分子量は約20,600であり、*Cymbidium* からの ORSV 2 分離株とはほぼ同じであったが、他の1つ *Cymbidium* からの Cy-1 分離株は上記の分離株よりわずかに大きかった(約20,900)。本ウイルスと他の ORSV 分離株はいずれも寒天ゲル内二重拡散法、直接二重酵素結

合抗体法 (DAS-ELISA) で Cy-1 分離株の抗血清とよく反応したが、同じ抗血清に対して tobacco mosaic virus 普通系とは反応しなかった。ORSV エビネ分離株はウイルス感染に特異的な二本鎖 RNA の電気泳動でも他の ORSV と同様の泳動パターンを示した。以上、ORSV エビネ分離株は既報の ORSV 分離株と血清学的に同じであり、それらと近似の系統と考えられた。

**キーワード** : odontoglossum ringspot virus, エビネ属植物, 同定。

## 引用文献

1. Chang, M. U., Chun, H. M., Baek, D. H. and Chung, J. D. 1991. Studies on the viruses in orchids in Korea 2. Dendrobium mosaic virus, odontoglossum ringspot virus, orchid fleck virus, and unidentified potyvirus. Korean J. Plant Pathol. 7: 118-129.
2. Clark, M. F. and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34: 475-483.
3. Inouye, N. 1966. A virus disease of *Cymbidium* caused by odontoglossum ringspot virus. Ber. Ohara Inst. landw. Biol., Okayama Univ. 13: 149-159.
4. 井上成信・前田孚憲・光畑興二, 1982, エビネから分離された cucumber mosaic virus. 農学研究 60: 1-11.
5. 井上成信, 1983, *Cymbidium* から分離された odontoglossum ringspot virus の 1 系統の性質. 農学研究 60: 53-67.
6. 井上成信・呂 理榮, 1983, 台湾のラン科植物におけるウイルス病の発生調査. 農学研究 60: 91-110.
7. 井上成信, 1986, エビネに発生するウイルスの基礎知識. 自然と野生ラン 5: 71-79.
8. Inouye, N., Maeda, T. and Mitsuhata, K. 1988. A strain of clover yellow vein virus isolated from *Calanthe* sp. Acta Horticulturae 234: 61-68.
9. 井上成信・前田孚憲・光畑興二, 1991, エビネ属植物から検出されるウイルス. 日植病報 57: 94 (講演要旨).
10. 井上成信, 1993, インドネシアのランに発生するウイルスについて. 日植病報 59: 65 (講演要旨).
11. Isomura, Y., Matumoto, Y., Murayama, A., Chatani, M., Inouye, N. and Ikegami, M. 1991. Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the odontoglossum ringspot virus coat protein gene. J. Gen. Virol. 72: 2247-2249.
12. Jensen, D. D. 1959. Virus diseases of orchids. In "The Orchids" (Withner, C. L., ed.), 431-458. The Ronald Press Company, New York.
13. 近藤秀樹・前田孚憲・井上成信, 1992, 東洋ランから分離された odontoglossum ringspot tobamovirus (ORSV) について. 岡大資生研報 1: 21-34.
14. 近藤秀樹・前田孚憲・井上成信, 1993, *Cymbidium* 属植物から分離された odontoglossum ringspot virus (ORSV) 分離株間の性状の比較. 日植病報 59: 64 (講演要旨).
15. 近藤秀樹・前田孚憲・井上成信, 1993, *Cymbidium* 属植物から分離された ORSV 分離株間での RNase protection assay による性状比較. 日植病報 59: 737 (講演要旨).
16. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacterio-



- phage T4. *Nature* 227: 680-685.
17. 前田孚憲・井上成信. 1993. 植物ウイルスの精製法の検討. *日植病報* 59: 739 (講演要旨).
  18. 松本純一・前田孚憲・井上成信・田原望武. 1993. エビネから分離された turnip mosaic virus (TuMV) について. *日植病報* 59: 65-66 (講演要旨).
  19. Milne, R. G. and Luisoni, E. 1977. Rapid immune electron microscopy of virus preparations. *In* "Methods in Virology, Vol. 6" (Maramorosch, M. and Koprowski, H., eds.), 265-281. Academic press, New York.
  20. Paul, H. L. 1975. Odontoglossum ringspot virus. CMI/AAB. Descriptions of Plant Viruses. No. 155. pp 4.
  21. Paul, H. L., Wetter, C., Wittmann, H. G. and Brandes, J. 1965. Untersuchungen am Odontoglossum ringspot virus, einem Verwandten des Tabakmosaic-Virus. I. Physikalische, chemische, serologische und symptomatologische Befunde. *Z. Vererbungsl.* 97: 186-203.
  22. Thornberry, H. H. and Philippe, H. R. 1964. Orchid disease: Cattleya blossom brown necrotic streak. *Plant Dis. Repr.* 48: 936-940.
  23. Valverde, R. A., Nameth, S. T. and Jordan, R. L. 1990. Analysis of doublestranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease* 74: 255-258.
  24. Van Regenmortel, M. H. V., Hahn, J. S. and Fowle, L. G. 1964. Internal calibration of electron micrographs with an orchid virus. *S. African J. Agr. Sci.* 7: 159-164.
  25. 山本孝彦・石井正義. 1981. エビネ (*Calanthe discolor* Lind) に発生したモザイク病. *四国植防* 16: 75-79.
  26. Zettler, F. W., Ko, H. J., Wisler, G. C., Elliott, M. S. and Wong, S. M. 1990. Viruses of orchids and their control. *Plant Disease* 74: 621-626.

**Explanation of plates**

**Plate I.**

1. Symptoms in *Calanthe* sp. naturally infected with odontoglossum ringspot virus (ORSV/Cal. 92-1T), and cymbidium mosaic virus showing chlorotic mottle.
2. Necrotic local lesions in *Tetragonia expansa* inoculated with ORSV (Cal. 92-1T).
3. Chlorotic local lesions in *Chenopodium quinoa* inoculated with ORSV (Cal. 92-1T).
4. ORSV (Cal. 92-1T) particles stained with in UA leaf dip preparation from infected plants. Scale bar represents 100 nm.
5. Particles of ORSV (Cal. 92-1T) decorated with ORSV-antiserum (Cy-1) at a 1/100 dilution for 30 min before negative staining.
6. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of coat protein subunit of ORSV. Lane M: molecular weight marker proteins containing (from top) phosphorylase b (97,400), bovine serum albumin (66,200), ovalbumin (45,000), carbonic anhydrase (31,000), soybean trypsin inhibitor (21,500), and  $\alpha$ -lactalbumin (14,000). Lane 1: ORSV Cy-1, lane 2: Cal. 92-1T, lane 3: Cy-46, lane 4: Cy-Kei coat proteins.
7. Polyacrylamide gel electrophoresis of double-stranded RNAs (dsRNA) of ORSV and other viruses. Lane 1: arabis mosaic virus, lane 2: cucumber mosaic virus Y strain, lane 3: Cy-1, lane 4: Cal. 92-1T, lane 5: Cy-46, lane 6: Cy-Kei.

**Plate II.**

1. Gel-diffusion serological tests. Relationship among ORSV isolates of Cal. 92-1T (1T), Cy-1 (1), Cy-46 (46), Cy-Kei (K), and tobacco mosaic virus OM strain (OM). Center well contains antiserum to ORSV (Cy-1, AS).
- 2-4. Thin section of leaf cells of *C. quinoa* infected with ORSV (Cal. 92-1T), showing dispersed and aggregated virus particles.

Plate I.

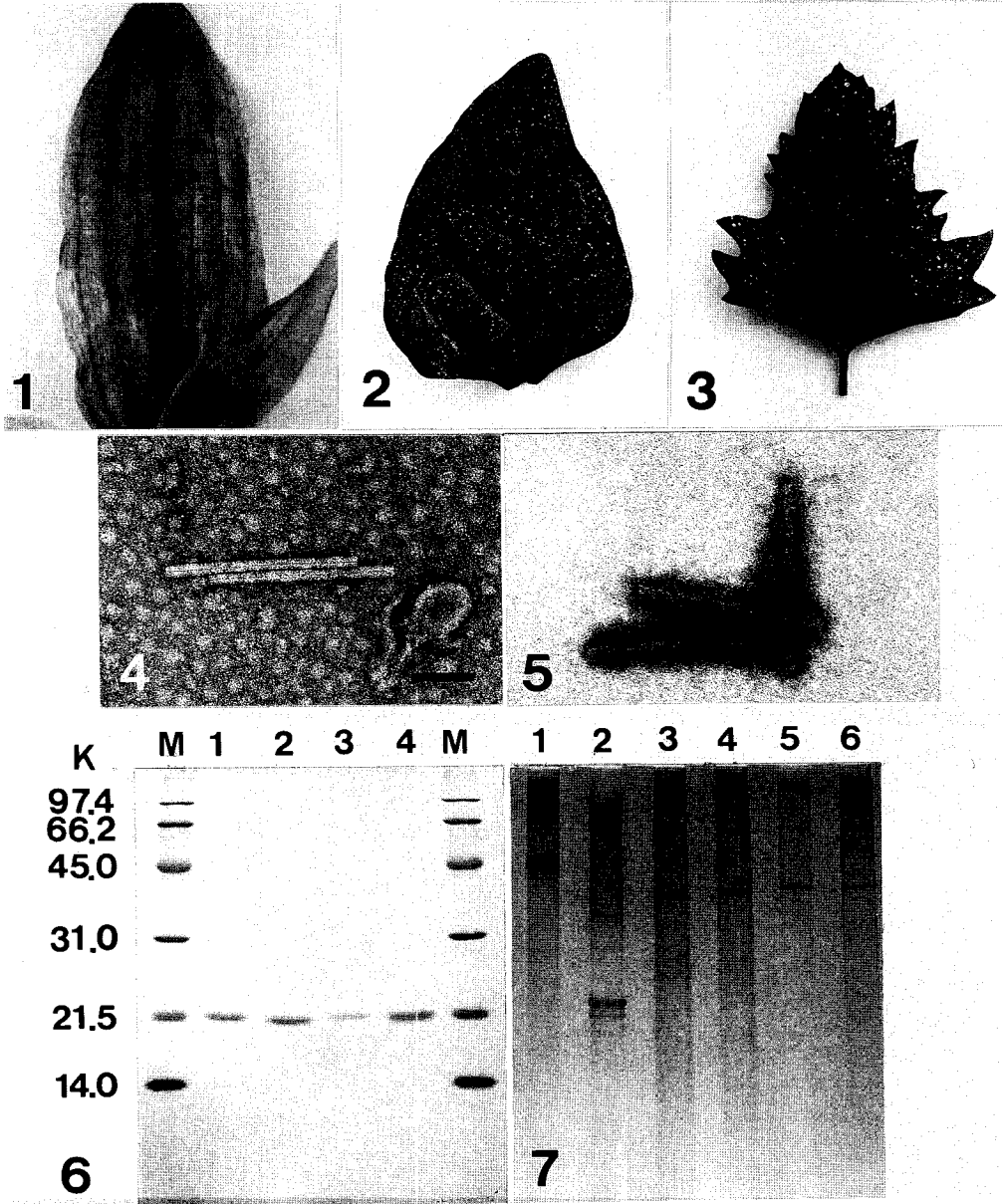


Plate II.

