

スターチスに発生した turnip mosaic virus 並びに cucumber mosaic virus について*

飯野尚之**・井上成信・前田孚憲

緒 言

近年各種花き植物の消費の多様化で、スターチスは生け花、ドライフラワーを用途とし、さらに栽培技術の確立に伴って栽培が盛んになってきている。しかし、そのスターチスにもウイルス病が発生し、被害が出て大きな問題となっているが、わが国ではその病原ウイルスに関する詳しい報告はない。

本研究ではビニールハウス栽培のスターチスで、モザイクやえそ症状を起こした病株から2種類の病原ウイルスを分離し、turnip mosaic virus と cucumber mosaic virus を同定したので、それらの性状について報告する。

本研究を行うに当り実験に協力戴いた光畑興二技官に謝意を表する。

実験材料および方法

供試ウイルス 本実験には、井上が1982年11月岡山県倉敷市中島で採集したスターチス（品種不明）で、葉にモザイク、奇形および萎縮症状を示した病株（Plate I, 1,3）から分離したウイルス（分離株 Stat-1）と、同じく井上が1983年3月岡山県笠岡市で採集したスターチス（品種不明）で、葉にモザイク症状を示した病株（Plate I, 6）から分離したウイルス（分離株 Stat-3）を供試した。

Stat-1 は、原株病葉汁液を *Nicotiana clevelandii* に接種し、全身感染した病葉を通して分離した。分離したウイルスは、カブ（時無小蕪）で継代保存し、実験に供試した。また、Stat-3 は、原株病葉汁液を *N. glutinosa* に接種し、全身感染した病葉を通して分離した。分離したウイルスは、タバコ（White Burley）で継代し、実験に供試した。

汁液接種 汁液接種はすべてカーボランダムを用いた常法によって行った。また、感染の有無を確認するための戻し接種試験は、Stat-1 については *Chenopodium amaranticolor* または *C. quinioa* を用い、Stat-3 についてはジュウロクササゲ（黒種三尺）を用いて行っ

昭和62年1月16日受理

*本報告の一部は昭和58年10月の日本植物病理学会関西西部会で発表した¹²⁾。

**現高知県南国病害虫防除所

た。

アブラムシ伝搬 アブラムシは無毒のモモアカアブラムシ (*Myzus persicae*) とワタアブラムシ (*Aphis gossypii*) を用いた。

アブラムシを1時間絶食させたのち、Stat-1では病カブ葉を、Stat-3では病タバコ葉および病カブ葉を、それぞれ30秒、5、10、30分、1、4、24時間ウイルスを獲得吸汁させたのち、健全カブおよびタバコ葉に1株当たり5頭ずつ移し、半日または1日間接種吸汁させた。

ウイルスの純化 Stat-1の純化は、接種2～3週間後の明瞭にモザイク症状が現れたコマツナ葉を用い、Choiら¹⁾が報告したTuMVの純化方法に準じ、次に示す方法によって行った。病葉に0.01M EDTA、0.1%チオグリコール酸を含む0.5Mりん酸緩衝液 (pH7.5) を1:1.2の割合に加え、磨砕して得られた液を1,500×gで10分間遠心し、その上清液に1% Triton X-100、4% PEG、0.1M NaClを加えて0℃で2時間攪拌したのち、5,500×gで15分間遠心した。その沈澱を0.5M ureaを含む0.5Mりん酸緩衝液 (pH7.5) に溶解し、4℃で一夜攪拌したのち、5,500×gで10分間遠心し、さらに65,000×gで90分間遠心してウイルスを沈澱させた。その沈澱を0.5M ureaを含む0.5Mりん酸緩衝液 (pH7.5) に溶解し、4℃で一夜攪拌してから、4,500×gで15分間遠心したのち、10～40%蔗糖密度勾配遠心 (55,000×gで150分間) し、生じたウイルス分画を取り出し、蔗糖を除き精製ウイルスとした。また、Stat-3の純化は、接種5日後のタバコの接種葉を採集し、-20℃で凍結保存したものをを用い、基本的にはTakanami²⁶⁾の方法によって行ったが、PEG (10%) 沈澱およびTriton X-100 (1%) 処理を併用した。

血清反応試験 Stat-1に対する抗血清は、純化ウイルスを家兎に静脈注射1回と Freund's incomplete adjuvant (Difco Lab.) を用いた筋肉注射5回 (ウイルス量計26.6mg) を行うことによって得られた。また、当研究室保存のTuMV抗血清²⁾およびCMV-Y抗血清²⁰⁾を用いて各種血清反応試験を行った。

寒天ゲル内二重拡散法は、0.1%窒化ナトリウムを含む0.005Mホウ酸-EDTA緩衝液 (pH9.0) に濃度0.8%の寒天 (Difco Lab., Agar Noble) を添加溶解したもの²⁵⁾を用いた。また、SDS寒天ゲル内二重拡散法は、0.3%、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) および0.85%塩化ナトリウムを含む水溶液に濃度0.5%の寒天を添加溶解したもの²⁷⁾を用いた。

免疫電顕法は、デコレーション法²¹⁾およびSDN法²³⁾を用いた。

ELISA法は、Clark and Adamsの方法³⁾に準じて行った。

電顕観察 ウイルス粒子は、2%リンタンゲステン酸 (PTA) (pH6.5) および2%酢酸ウラニルを用いたDN法により作成した試料および純化標品につき電顕 (日立HU-12型) 観察した。

病葉超薄切片像の観察は病葉細片を6%グルタルアルデヒドと1%四酸化オスミウムとで二重固定し、エタノール脱水後、spurr樹脂に包埋して薄切にし、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色し、電顕観察した。

実 験 結 果

1. Turnip mosaic virus (Stat-1分離株)

(a) 寄主範囲と病徴

カブの全身感染葉を接種源として、16科53種の植物に汁液接種を行ったところ、8科20種に全身感染し、8科16種に局部感染した。全身感染した植物はスターチス、ハウレンソウ、シュンギク、ヒマワリ、ヒヤクニチソウ、ハクサイ、コマツナ、カブ、キャベツ、ダイコン、ストック、スイカ(小玉)、ニホンカボチャ、ペポカボチャ、クリムソクローバー、ゴマ、タバコ、*Nicotiana clelandii*, *N. glutinosa*, *N. rustica*で、局部感染した植物はツルナ、ケイトウ、センニチコウ、フダンソウ、*Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, アスター、キュウリ、セイヨウカボチャ、アズキ、エンドウ、シロクローバー、ソラマメ、ササゲ、キンギョソウ、トマト、であった。つぎの9科17種の植物は感染しなかった：ニチニチソウ、ビジョナデシコ、ゴボウ、スイカ(旭人和)、シロウリ、マクワウリ、ユウガオ、トウモロコシ、ダイズ、アルファルファ、リョクトウ、インゲンマメ、タマネギ、*Datura stramonium*, ペチュニア、*Physalis floridana*、ナス、ニンジン。

Stat-1の寄主範囲はやや広く、その主な感受性植物の病徴は以下のとおりである。

スターチス(アーリーブルー)：接種葉にはほとんど病徴を現さなかった。上葉には接種10~14日後直径0.5~1mmの退緑斑点を生じ、のちにモザイクになった(Plate I, 4)。

カブ(時無小蕪)：接種葉に接種3~5日後直径3~5mmの退緑斑を生じ、のちえそ輪紋を生じた。上葉には接種5~7日後葉脈透化および退緑斑点を生じ、後に明瞭なモザイクになった。

カンラン(富士早生甘藍)：接種葉に接種5日後直径2~3mmの退緑斑点を生じた。上葉に接種7日後直径2~3mmの退緑斑点を生じた。

シュンギク(大葉春菊)：接種葉に接種7日後えそ斑を生じ、のちにえそが葉全体にひろがって枯死した。上葉に接種9日後葉脈緑帯を生じ、のちにモザイクになった。

ストック：接種葉に接種2日後えそ斑点を生じた。全身感染したが、上葉には病徴が現れなかった。しかし花弁に明瞭な斑入りを生じた(Plate I, 5)。

クリムソクローバー：全身感染し、上葉に退色斑点およびモザイクを生じ、病徴が進むと病斑が灰白色にえそ化し、発育不良となった(Plate I, 8)。

(b) アブラムシによる伝搬

Stat-1はモモアカアブラムシおよびワタアブラムシによって非永続的に容易に伝搬されることが認められた。

(c) 粗汁液中での安定性

ウイルス源にはカブの病葉を、検定植物には *C. quinoa* を用いた。Stat-1の耐熱性は55~60℃(10分)、耐希釈性は 10^{-3} ~ 10^{-4} 、耐保存性(20℃)は3~5日であった。

(d) ウイルス粒子の形態

病植物のDN法試料および純化標品には、電顕観察により長さ約750nm、幅約13nmのひも状粒子が認められた(Plate II, 1, 2)。

(e) ウイルスの純化

本ウイルスはコマツナの病葉を用い、Choiらの方法¹⁾に準じて行った。純化試料には

電顕観察でひも状粒子が多数認められた (Plate II, 1). 純化ウイルス標品の紫外外部吸収曲線は、259 nm に極大値、245 nm 極小値があり、 $A_{\max}/A_{\min}=1.10$, $A_{260}/A_{280}=1.27$ であった。なお、ウイルスの収量は生葉 100g に対して約1.6mgと推定された。さらに、純化標品を *C. amaranticolor* に汁液接種したところ高い感染性を示した。

(f) 血清反応試験

(1) 微沈降法 Stat-1 抗血清は、microprecipitin test で Stat-1 感染カブ汁液と2048倍希釈、純化ウイルス (1 mg/ml) と1024倍希釈まで反応した。

(2) 寒天ゲル内拡散法 Stat-1 抗血清を用いた SDS 寒天ゲル内二重拡散法では、Stat-1 感染カブ葉および純化ウイルスと2倍希釈まで反応した。なお、健全葉汁液とは反応しなかった。

また、TuMV 抗血清を用いて Stat-1 感染カブ汁液を抗原として、SDS 寒天ゲル内二重拡散法を行ったところ、特異的に沈降線を生じた。この沈降線は、対照に用いた当研究室保存の TuMV (A-23) の沈降線と融合し、spur が形成されなかった (Plate II, 8)。

一方、Stat-1 感染スターチス葉汁液および対照とした健全スターチス葉汁液とを抗原として、TuMV 抗血清と SDS 寒天ゲル内二重拡散法で反応させたところ、病葉汁液とよく反応したが、健全葉汁液抗原とも非特異的な沈降線を生じ、ウイルス特異的の反応と区別できなかった。

(3) 免疫電顕法 TuMV 抗血清を用いてデコレーション法で、Stat-1 感染カブ葉汁液中のウイルスに対する血清反応を電顕観察したところ、ウイルス粒子の周りにハロー現象が観察された (Plate II, 4)。すなわち、Stat-1 ウイルスは TuMV 抗血清とよく反応した。

(4) ELISA 法によるウイルスの検出 Stat-1 純化標品を用いて ELISA 法によるウイルスの検出限界を調べたところ、ウイルスの検出限界濃度は10~100 ng/ml で、検出感度は極めて鋭敏であった。また、Stat-1 感染スターチス汁液を用いて同様にウイルスの検出希釈限界を調べたところ、Fig. 1 に示したように、 10^{-3} ~ 10^{-4} であった。なお、健全植物汁液との非特異的の反応による発色はほとんどなかった。

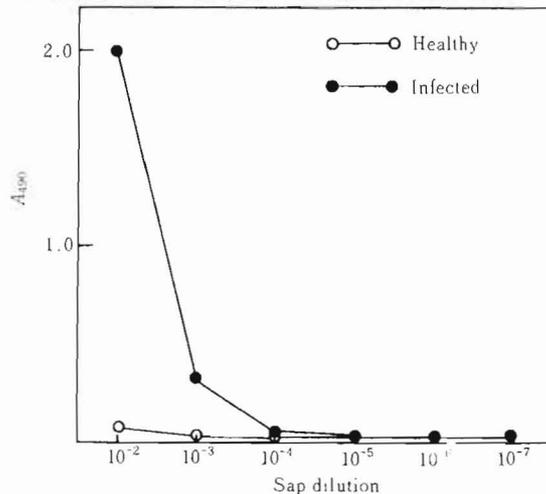


Fig. 1. ELISA absorbance values for Stat-1 (TuMV) in diluted extracts of infected and healthy static leaves.

(9) 病葉超薄切片の電顕観察

Stat-1 感染カブ葉肉細胞の超薄切片を電顕観察したところ、細胞質内にウイルス粒子および封入体が見られた (Plate II, 3). 粒子は細胞質内に散在しており、ときに封入体に櫛歯状に付着しているものも認められた。細胞質内封入体は pinwheel, scroll, laminated aggregate 構造として観察された。また、細胞質には増生した vesicle が多数認められた。

スターチス、カブおよびコマツナなどの病葉からの DN 法試料について電子顕微鏡観察したところ管状封入体の破片が観察された (Plate II, 5)。

2. Cucumber mosaic virus (Stat-3 分離株)

(a) 寄主範囲と病徴

タバコの全身感染葉を接種源として、11科46種の植物に汁液接種を行ったところ、11科29種に全身感染し、6科11種に局部感染した。全身感染した植物はスターチス、ツルナ、センニチコウ、フダンソウ、ハウレンソウ、シュンギク、ヒマワリ、ヒャクニチソウ、コマツナ、カブ、スイカ、シロウリ、マクワウリ、キュウリ、セイヨウカボチャ、ニホンカボチャ、ペポカボチャ、トウモロコシ、アズキ、クリムソクローバー、タバコ、*N. clevelandii*, *N. glutinosa*, *N. rustica*, トマト、ペチュニア、*P. floridana*, ナスで、局部感染した植物はケイトウ、*C. amaranticolor*, *C. quinoa*, ゴボウ、ダイコン、リョクトウ、エンドウ、ソラマメ、ササゲ、ゴマ、*D. stramonium* であった。つぎの3科6種の植物は感染しなかった：レタス、キャベツ、ダイコン、アルファルファ、インゲンマメ、アカクローバー。

Stat-3 の寄主範囲は広く、その主な感受性植物の病徴は以下のとおりである。

スターチス (アーリーブルー) : 接種葉には病徴を現さなかった。上葉には接種17~20日後退緑斑点を生じ、のちに、退緑が広がってモザイクになった (Plate I, 7)。

タバコ (White Burley) : 接種葉に接種3~5日後直径0.5~1cmの退緑斑を生じた。やや遅れて上葉に葉脈透化および退緑斑点を生じ、その後明瞭なモザイクになった。生育が進むと奇形症状も現れた。

セイヨウカボチャ (打木早生赤栗南瓜) : 接種葉に接種5日後退緑斑点を生じ、のちに灰白色えそ輪点またはえそ斑点を生じ、接種葉は早期に枯死した。上葉に接種6~12日後に退緑斑点から葉脈透化を生じ、のちに明瞭なモザイクとなり、さらに萎縮および葉巻き症状を呈した。

ジュウロクササゲ (黒種三尺) : 接種葉に接種2日後えそ斑点を生じた。全身感染はしなかった。

N. glutinosa : 上葉に接種4~6日後退緑斑点を生じて葉脈透化となり、のちに明瞭なモザイクとなった。生育が進むと葉は奇形を生じた。

トマト (栗原トマト) : 上葉に接種9日後初めて葉脈透化を生じ、のちにえそをともなったモザイクとなった。生育が進むと糸葉も現れた。

(b) アブラムシによる伝搬

Stat-3 はモモアカアブラムシおよびワタアブラムシにより非永続的に容易に伝搬されることが認められた。

(c) 粗汁液中での安定性

ウイルス源にはタバコの病葉を、検定植物には黒種三尺ササゲを用いた。Stat-3の耐熱性は60~65℃(10分)、耐希釈性は 10^{-5} ~ 10^{-6} 、耐保存性(20℃)は8~9日であった。

(d) ウイルス粒子の形態

Stat-3に感染したスターチス、タバコ、*N. glutinosa*などのDN法試料には電顕観察により、いずれの病植物からも径約30nmの小球形のウイルス粒子が認められた(Plate II, 6)。しかし、試料を2%PTA(pH 6.5)で染色した場合、ウイルス粒子は壊れかかるものが多かった。そこで、病葉試料を0.2%亜硫酸ナトリウムおよび0.3%EDTAを含む水溶液中で磨砕し、酢酸ウラニル染色、あるいはホルマリン固定後、PTA染色した場合にほぼintactな粒子が多く観察された。

(e) ウイルスの純化

Stat-3はタバコの病葉を用い、Takanamiの方法²⁶⁾に準じて純化された。純化標品の紫外部吸収曲線は259nmに極大値、242nmに極小値があり、 $A_{max}/A_{min}=1.35$ 、 $A_{260}/A_{280}=1.68$ であった。さらに、純化標品をジュウロクササゲに汁液接種したところ、多数の局部病斑を形成し、高い感染性を示した。

(f) 血清反応試験

(1) 寒天ゲル内二重拡散法 CMV-Y抗血清を用い、寒天ゲル内二重拡散法によりStat-3純化標品の血清反応試験を行ったところ、特異的な沈降線を生じた。対照に用いたCMV-Y純化標品の沈降線と融合し、spurは形成されなかった(Plate II, 9)。

(2) 免疫電顕法 CMV抗血清を用いてStat-3感染タバコ葉に対してSDN法を行ったところ、明瞭なクランプを形成した(Plate II, 7)。

(3) ELISA法によるウイルスの検出 Stat-3の純化標品を用いて、ELISA法によるウイルスの検出限界濃度を調べたところ、ウイルスの検出限界濃度は1-10ng/mlで検出感度は極めて鋭敏であった。また、Stat-3感染スターチス汁液を用いてウイルスの検出希釈限界を調べたところ、Fig. 2に示されているように、 10^{-5} ~ 10^{-6} であった。なお、健全植物汁液との非特異的の反応による発色はほとんどなかった。

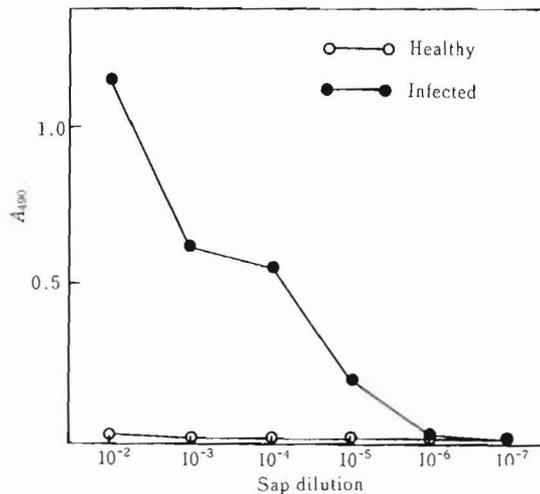


Fig. 2. ELISA absorbance values for Stat-3 (CMV) in diluted extracts of infected and healthy static leaves.

(9) 病葉超薄切片の電顕観察

Stat-3 感染タバコ葉肉細胞に壊死が見られ、細胞質および液胞内に散在するウイルス粒子が認められた。また、小胞内にもウイルス粒子が見られた。

考 察

今までに国外においては、スターチスの病原ウイルスとして、トマト黄化えそウイルス (tomato spotted wilt virus)²⁴⁾、カブモザイクウイルス (turnip mosaic virus, TuMV)^{9, 17, 22)}、キュウリモザイクウイルス (cucumber mosaic virus, CMV)⁹⁾、ソラマメウイルス (broad bean wilt virus)¹⁰⁾、clover yellow vein virus¹⁹⁾、statice virus Y¹⁸⁾、タバコ茎えそウイルス (tobacco rattle virus)⁴⁾ が分離同定されている。しかし、わが国ではこれまでに、スターチスにウイルス病が発生していることが知られていたが、その病原ウイルスの詳細な研究は行われていなかった。

本実験では、スターチス (*Limonium sinuatum*) から2種のウイルスが分離された。その一つ、萎縮を伴ったモザイク症状を生じたスターチスから分離された Stat-1 分離株ウイルスは汁液接種により、ダイコン、カブ、シュンギク、ストックなどに全身感染し、*C. amaranticolor*、タバコなどには局部病斑を生じた。この病原ウイルスは寄主範囲や病徴、伝搬方法、物理性、ウイルス粒子の形態、血清反応、病葉超薄切片の電顕観察などの所見から、既報の TuMV^{13, 22, 28, 30, 31, 32)} のそれらとよく一致しており、Potyvirus 群に属する TuMV と同定された。

TuMV は、アブラナ科を初め他科の多くの植物にも発生し、世界に広く分布していることが知られている^{30, 31)}。Yoshii³²⁾によれば、TuMV は *N. glutinosa* とカンランに対する病原性の差から、ordinary strain と cabbage strain の2つに大別されるとし、カンランに明瞭な病徴を現わす cabbage strain は欧米諸国に発生が多く、日本には ordinary strain の発生が多いとしている。吉井ら³³⁾は、さらに ordinary strain を *N. glutinosa* の病徴の程度によって3群に分けた。また、世界各国で検出された TuMV はその分離株によって、*N. glutinosa* に対する病原性に著しい強弱がある。その病原性の強弱を大別すると、感染しないものから致命的な激しい全身病徴を現わすものまで5段階に分けられ¹³⁾、この病徴の大別はタバコ、カンランなどに対する病原性の有無とともに TuMV 系統の分類の目安とすることができるものと考えられる。Stat-1 は *N. glutinosa* に局部病斑を形成するが全身感染しなかったこと、カンランに全身感染し、軽い症状を示すことから、吉井らの分類に従えば TuMV の ordinary strain の C 群に近いといえる。しかし Stat-1 は栃原²⁸⁾がダイコンのモザイク病とした TuMV (築後10)、井上ら¹⁵⁾がナンキンマメから検出した TuMV および井上ら¹³⁾がアイリスから検出した TuMV とは寄生性において異なるようである。

ダイコンからの TuMV に対する抗血清を用いた血清反応試験では、Stat-1 と homologous な TuMV の沈降線とが融合し、本ウイルスは血清学的に TuMV と極めてよく類似するものであるといえる。

Potyvirus 群に属するウイルスは、感染植物細胞内に管状封入体を形成することが知られている^{5, 6, 11, 14)}。罹病葉の超薄切片像に見られる封入体の構造について、Potyvirus 群

に属するウイルスを、井上¹⁴⁾は3つのタイプに大別し、また、Edwardsonら^{5,6)}は4つのタイプに類別している。Stat-1感染葉の超薄切片像には、pinwheel, scroll, laminated aggregate 構造の管状封入体が観察され、特に laminated aggregate や scroll の発達が顕著であった。アイリスから検出された TuMV の感染葉切片像には上記のような形状の封入体とともに short curved laminated aggregate 構造がみられ¹³⁾、Edwardson らの類別 subdivision IV に属するものが含まれたが、Stat-1 ではこの形状のものは見られなかった。このことから、Stat-1 は、井上¹⁴⁾の分け方では C 群に、Edwardson^{5,6)}の類別法では subdivision III に属し、既報の多くの TuMV のそれと一致している。

一方、葉にモザイクを生じたスターチスから分離された Stat-3 分離株ウイルスは汁液接種により、タバコ、*N. glutinosa*、キュウリに全身感染し、*C. amaranticolor*、ジュウロクササゲ、ソラマメに局部病斑を形成した。この病原ウイルスは寄生範囲や病徴、伝搬方法、物理性、ウイルス粒子の形態、血清反応、病葉超薄切片の電顕観察などの所見から既報の CMV^{7,8)}のそれらとよく一致しており、Cucumovirus 群に属する CMV と同定された。CMV は、ウリ科およびナス科をはじめ多くの植物に発生し、世界に広く分布していることが知られている^{7,31)}。また、CMV には多くの系統が知られている^{7,31)}が、わが国では都丸²⁹⁾がタバコにおける病徴とマメ科植物に対する寄生性から普通系、軽症系、黄斑系、黄色微斑系およびマメ科系の5系統に分け、小室¹⁶⁾は科や属に対する CMV の寄生性の相違から6系統群に分けている。Stat-3 はマメ科植物のアズキとクリムソクローバーに全身感染することと、アブラナ科のコマツナおよびカブに全身感染（潜在的）する点では小室の類別に従うと、マメ・アブラナ系に属するように思われる。しかし本ウイルスはソラマメ、エンドウおよびササゲに全身感染せず、局部病斑のみである点ではマメ・アブラナ科とも違いが見られ、また普通系にも近いように考えられたが、系統を明確にすることはできなかった。

スターチスのモザイク病の診断を目的として、寒天ゲル内二重拡散法により、スターチスにおける TuMV および CMV 検出を行ったところ、TuMV では非特異的反応により検出が不可能であった。そこで、ELISA 法による TuMV の検出を行ったところ、検出限界濃度は $10\sim 100$ ng/ml、罹病葉の検出希釈限界は $10^{-3}\sim 10^{-4}$ であった。同じく CMV では、検出限界濃度が $1\sim 10$ ng/ml、罹病葉の検出希釈限界が $10^{-5}\sim 10^{-6}$ であった。これらの検出限界は、両ウイルスの生物検定による検出限界と同程度の値を示した。以上の結果より、スターチスのモザイク病の診断には ELISA 法が有効であると考えられた。

摘 要

1982年11月と1983年3月岡山県下の栽培ハウスで採集したスターチスのモザイク病株から2種の病原ウイルス、turip mosaic virus と cucumber mosaic virus を分離同定した。

TuMV (Stat-1) は奇形および萎縮をともなったモザイク症状を示したスターチスから分離された。16科53種の植物に汁液接種したところ、スターチス、ダイコンなど8科20種に全身感染し、タバコ、*N. glutinosa*、*C. amaranticolor* など8科16種に局部感染した。本ウイルスはモモアカアブラムシおよびワタアブラムシによって非永続的に伝搬された。粗汁液中での不活化限界は、耐熱性が $55\sim 60^{\circ}\text{C}$ (10分)、耐希釈性が $10^{-3}\sim 10^{-4}$ 、耐保存

性が3～5日(20℃)であった。ウイルス粒子は長さ約750 nm, 幅約13nmのひも状であった。罹病コマツナの病葉から得られた本ウイルスの純化標品の紫外外部吸収曲線は259 nmに極大値, 245 nmに極小値があり, $A_{\max}/A_{\min}=1.10$, $A_{260}/A_{280}=1.27$ であった。本ウイルスは免疫電顕法およびSDS 寒天ゲル内二重拡散法による血清反応試験でTuMV抗血清とよく反応した。また純化ウイルスを家兎に注射することによって力価2048倍(微沈降反応法)の抗血清が得られた。作成した抗血清を用いて, ELISA法によりスターチスからのウイルスの検出を行ったところ, 検出希釈限界は 10^{-3} であった。感染植物細胞の超薄切片像には, ウイルス粒子とともにpinwheel, scroll, laminated aggregateの構造の細胞質内封入体が認められた。

CMV (Stat-3) はモザイク症状のスターチスから分離された。11科46種の植物に汁液接種したところ, スターチス, タバコ, *N. glutinosa*, カボチャなど11科29種に全身感染し, ササゲやゴマなど6科11種に局部感染した。本ウイルスはモモアカアブラムシおよびワタアブラムシによって非永続的に伝搬された。粗汁液中での不活化限界は, 耐熱性が60～65℃(10分), 耐希釈性が 10^{-5} ～ 10^{-6} , 耐保存性が8～9日(20℃)であった。ウイルス粒子は径約30 nmの球状であった。罹病タバコ葉から得られた純化標品の紫外外部吸収曲線は, 259 nmに極大値, 242 nmに極小値があり, $A_{\max}/A_{\min}=1.35$, $A_{260}/A_{280}=1.68$ であった。本ウイルスは, 寒天ゲル内二重拡散法およびSDN法による血清反応試験で, CMV-Y抗血清とよく反応し, 沈降線はCMV-Yのそれと融合し, spurが形成されなかった。CMV-Y抗血清を用いてELISA法によるウイルスの検出を行ったところ, 10^{-5} 希釈まで可能であった。

引用文献

1. Choi, J. K., Maeda, T. and Wakimoto, S. (1977). An improved method for purification of turnip mosaic virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 43 : 440-448.
2. Choi, J. K., Maeda, T. and Wakimoto, S. (1978). Serological properties of turnip mosaic virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*. 44 : 14-21.
3. Clark, M. F. and Adams, A. M. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. gen. Virol.* 34 : 475-483.
4. Dijkstra, J. and van Dijke, H. D. (1981). Line pattern in *Limonium latifolium* caused by tobacco rattle virus. *Neth. J. Pl. Path.* 87 : 35-44.
5. Edwardson, J. R. (1974). Some properties of the potato virus-Y group. *Fla. Agric. Exp. Stn. Monogr.* 4. Gainesville pp. 398.
6. Edwardson, J. R., Christie, R. G. and Ko, N. J. (1984). Potyvirus cylindrical inclusion-subdivision-IV. *Phytopathology* 74 : 1111-1114.
7. Francki, R. I. B., Randles, J. W. and Hatta, T. (1969). Cucumber mosaic virus. C.M.I./A.A.B. Descriptions of plant viruses. No. 213. 6 pp.
8. Gibbs, A. T. and Harrison, B. D. (1970). Cucumber mosaic virus. C.M.I./A.A.B. Descriptions of plant viruses. No. 1. 4 pp.
9. Hein, A., Koenig, R., Lesemann, D. E. und Querfurth, G. (1976). Kohlschwarzringflecken-Virus und Gurkenmosaik-Virus in Statice-Kulturen in Süddeutschland. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz.* 83 : 229-233.

10. Hein, A., Lesemann, D. E. und Querfurth, G. (1977). Das Broad bean wilt-Virus in *Limonium*-Kulturen in Süddeutschland. *Phytopath. Z.* 89 : 340-346.
11. Hollings, M. and Brunt, A. A. (1981). Potyvirus group. C.M.I./A.A.B. Descriptions of plant viruses. No. 245. pp 7.
12. 飯野尚之・井上成信. (1984). スターチスから分離された CMV と TuMV について. *日植病報* 50 : 116-117 (講要)
13. 井上成信・光畑興二. (1978). アイリスから分離された turnip mosaic virus. *農学研究* 57 : 1-16.
14. 井上忠男. (1973). 細胞質内封入体からみた bean yellow mosaic virus の特徴. *農学研究* 54 : 155-177.
15. 井上忠男・井上成信. (1974). Turnip mosaic virus の一系統によるナンキンマメ輪紋モザイク病. *農学研究* 50 : 51-60.
16. 小室康雄. (1973). 野菜のウイルス. 誠文堂新光社. 東京. 300 pp.
17. Laird, E. F. Jr. and Dickson, R. C. (1972). Turnip mosaic virus virus-vector relationships in field-grown statice, *Limonium perezii*. *Pl. Dis. Repr.* 56 : 722-725.
18. Lesemann, D. E., Koenig, R. and Hein, A. (1979). Statice virus Y— a virus related to bean yellow mosaic and clover yellow vein viruses. *Phytopath. Z.* 95 : 128-139.
19. Lawson, R. H., Brannigan, M. D. and Foster, J. 1985. Clover yellow vein virus in *Limonium sinuatum*. *Phytopathology* 75 : 899-906.
20. 前田孚憲・脇本哲・井上成信. (1983). 日本において分離されたキュウリモザイクウイルスの血清学的性質. *日本植病報* 49 : 10-17.
21. Miline, R. G. and Luisoni, E. (1977). Rapid immune electron microscopy of virus preparations. Pages: 265-281 in : *Methods in Virology*. K. Maramorosch and H. Koprowski, eds. Academic Press. New York.
22. Niblett, C. L., Paulus, A. O. and Semancik, J. S. (1969). A mosaic disease of statice caused by turnip mosaic virus. *Phytopathology* 59 : 1166-1167.
23. Ohki, S. T., Shohara, K. and Inouye, T. (1980). A simple sero-electron microscopical technique (SDN method) for detection and diagnosis of cucumber mosaic virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 46 : 51-53.
24. Plant disease survey for the twelve months ending 30th June, 1953. Twenty-third annual report N. S. W. department of agriculture. Biological branch. Division of Science Services (1954). pp. 38 (*R. A. M.* 34 : 285, 1955).
25. 匠原監一郎. (1980). 寒天ゲル内二重拡散法による植物ウイルス病の診断. *植物防疫* 34 : 106-110.
26. Takanami, T. (1981). A striking change in symptom on cucumber mosaic virus-infected tobacco plants induced by a satellite RNA. *Virology* 109 : 120-126.
27. 寺見文宏・大木理・尾崎武司・井上忠男. (1984). 簡易二重拡散法診断セットの各種ウイルスへの適用. *日植病報* 50 : 437 (講要).
28. 栃原比呂志. (1965). ダイコンのモザイク病を起因するウイルスの同定並びに血清学的比較研究. *農技研報 C* 18 : 1-52.
29. 都丸敬一・宇田川晃. (1972). わが国のタバコに発生するウイルスの種類・系統の判別法. *植物防疫* 26 : 251-256.
30. Tomlinson, J. A. (1970). Turnip mosaic virus. C.M.I./A.A.B. Descriptions of plant Viruses. No. 8. 4 pp.
31. 與良清・斎藤康夫・土居養二・井上忠男・都丸敬一編 (1983). *植物ウイルス事典*. p. 150. 朝倉書店, 東京.

32. Yoshii, H. (1963). On the strain distribution of turnip mosaic virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 28 : 221-227.
33. 吉井甫・杉浦巳代治・岩田唯孝. (1963). ダイコンモザイクウイルスに関する研究. 九州病害虫研究会特別報告第1号. pp. 26, plate 4.

Turnip Mosaic Virus and Cucumber Mosaic Virus Infecting Statice (*Limonium sinuatum*)

Naoyuki LIND, Narinobu INOUE and Takanori MAEDA

Summary

Two viruses, turnip mosaic virus (TuMV) and cucumber mosaic virus (CMV) were found from statices (*Limonium sinuatum*) cultivated at Okayama prefecture in 1982-1983, showing leaf symptoms of mosaic with malformation and stunt, or mosaic.

TuMV was transmitted by sap inoculation to 36 of 53 species from 9 to 16 families. The virus was also transmitted readily by aphids, *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*, in the non-persistent manner. Sap from diseased *Brassica rapa* was infective after 10 min. at 55°C but not 60°C, after dilution to 10^{-3} but not 10^{-4} , or after 3 days at 20°C but not 5 days. Filamentous particles, ca. 13×750 nm, were found in both leaf extracts and purified preparations. Ultraviolet absorption spectrum of the virus had an A_{260}/A_{280} ratio of 1.27. The virus reacted with TuMV-antiserum in immunoelection microscopy and SDS-immunodiffusion tests. In ultrathin sections of diseased plant leaf tissues, the inclusions of pinwheels, circulars, laminated aggregates and bundles were observed in the cytoplasm of the infected cells.

CMV was transmitted by sap inoculation to 40 of 46 species from all 11 families examined. The virus was also transmitted readily by aphids, *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*, in the non-persistent manner. Sap from diseased tobacco was infective after 10 min. at 60°C but not 65°C, after dilution to 10^{-5} but not 10^{-6} , or after 8 days at 20°C but not 9 days. Small spherical virus particles, ca. 30 nm in diameter, were found in both leaf extracts and purified preparations. Ultraviolet absorption spectrum of the virus had an A_{260}/A_{280} ratio of 1.68. The virus reacted with CMV-Y antiserum in serological direct negative staining method and serological agar gel diffusion test.

Explanation plates

Plate I

1. Statice naturally infected with TuMV, showing mosaic, malformation and stunt.
2. Systemic symptoms on *N. clevelandii* infected with TuMV, showing necrotic ringspots, vein necrosis and mosaic
3. Mosaic symptoms on statice leaf naturally infected with TuMV.
4. Systemic mosaic symptoms induced by TuMV on statice leaves.
5. Flower color breaking induced by TuMV on stock.
6. Statice naturally infected with CMV, showing mosaic.
7. Systemic mild mosaic symptoms induced by CMV on statice leaf
8. Systemic symptoms induced by TuMV on crimson clover, showing chlorotic spots, mosaic and white necrosis
9. Systemic symptoms induced by CMV on crimson clover, showing mosaic.

Plate II

1. Negatively stained TuMV particles of purified preparation. Bar represents 200 nm.
2. Negatively stained TuMV particles in leaf dip preparation. Bar represents 200 nm.
3. Pinwheels and laminated aggregates (arrows) of cytoplasmic inclusion bodies in the cytoplasm of *Brassica rapa*. Bar represents 400 nm
4. TuMV particles of purified preparation after decoration with TuMV-antiserum. Bar represents 200 nm.
5. Fragment of striated 'pinwheel' lamellae and virus particle in negatively stained sap from *Brassica rapa*. Bar represents 100 nm.
6. Negatively stained CMV particles of partially purified preparation. Bar represents 50 nm.
7. Electron micrograph of preparation of CMV particles mixed with CMV-Y-antiserum. Bar represents 100 nm.
8. Gel diffusion serological test. As : TuMV-antiserum, S : TuMV isolate from statice, T : TuMV isolate from *Raphanus sativus*, H : Sap of healthy *Brassica rapa*.
9. Gel diffusion serological test. As : CMV-Y-antiserum, S : CMV isolate from statice, Y : CMV-Y

Plate I

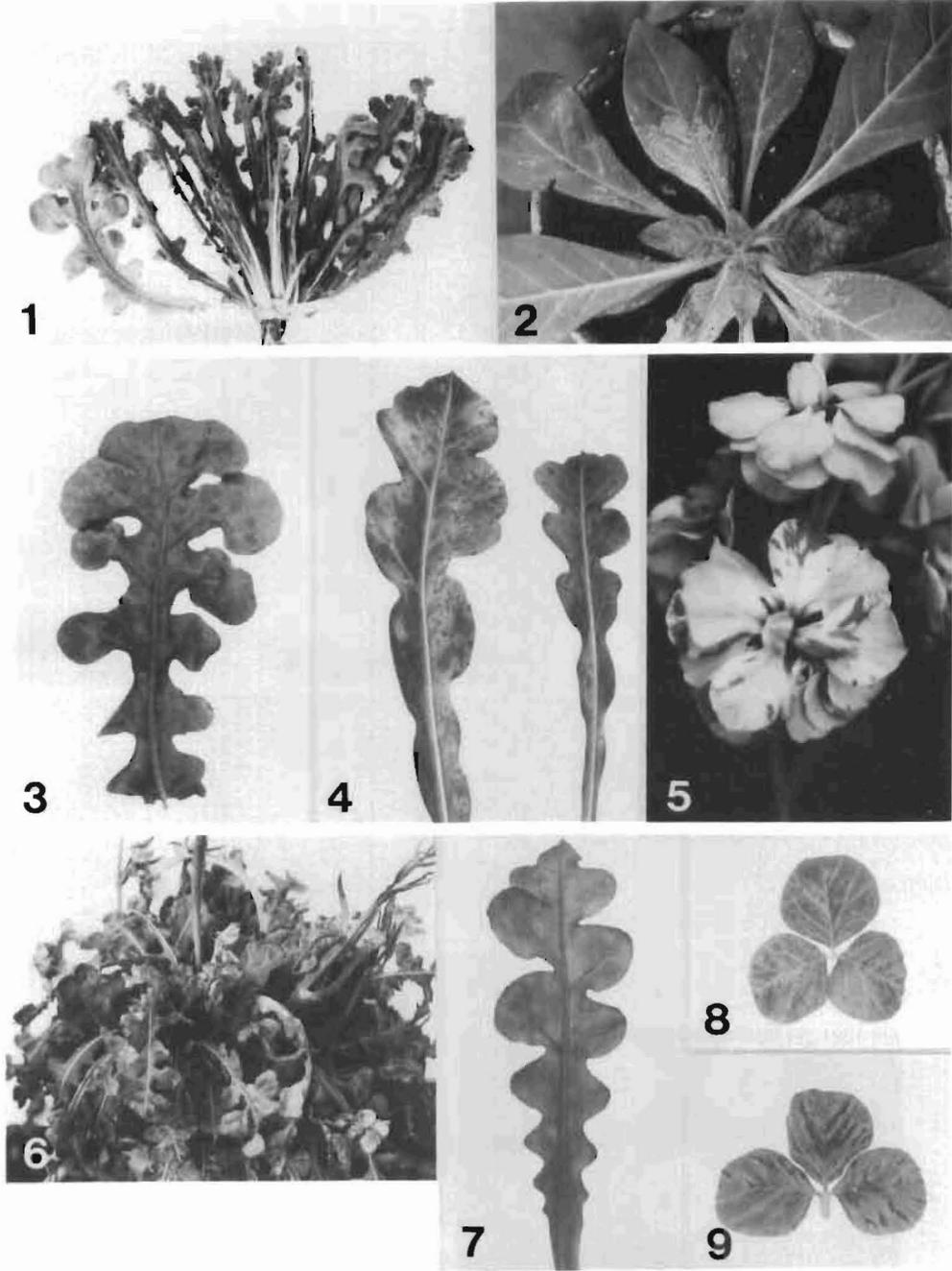


Plate I

