

ソラマメウルトウイルスによるエキザカムの萎縮病 (新称)

夏秋啓子*・栗原 潤**・都丸敬一***

(平成 13 年 2 月 28 日受付/平成 13 年 4 月 19 日受理)

要約: 1989 年, 神奈川県でエキザカム (*Exacum affine*) に激しい萎縮と葉巻き症状が発生した。C. *amaranticolor* あるいは C. *quinoa* に接種して得たウイルスにより宿主を調べたところ, 9 科 21 種に感染し, エキザカムでは萎縮症状が再現され, C. *amaranticolor* や C. *quinoa* では接種葉に灰白色斑点を生じた後に全身感染し, ソラマメでは頂葉の枯死が観察された他, 各種のタバコ類にも感染した。電子顕微鏡観察では直径約 27 nm の小球型ウイルス粒子が観察された。また, モモアカアブラムシ (*Myzus persicae*) で非永続的に伝搬された。粗汁液中の安定性は, 耐熱性が 60-65°C (10 分), 耐保存性が 4 日であった。ウイルス粒子はソラマメウルトウイルス (BBWV) に対する抗血清を用いた免疫電子顕微鏡法で捕捉・修飾され, パチョリ微斑モザイクウイルス (PaMMV) に対する抗血清を用いた ELISA 法でも検出された。ウェスタンブロット法では 2 種のウイルス外被タンパク質が検出され, その分子量は約 42,000 と約 26,000 であった。本ウイルスを部分純化したところその収量は感染 C. *quinoa* 葉 50 g あたり 3.6 mg であった。部分純化標品をウサギに免疫し, 抗血清の作製を行ったところ, ELISA 法やウェスタンブロット法に利用可能であった。以上より, 本ウイルスを BBWV の 1 系統と同定し, BBWV によるエキザカムの病害は未報告のため, 病名を萎縮病, 英名を dwarf とすることを提案した。

キーワード: ソラマメウルトウイルス, *Exacum affine*, 萎縮

緒 言

1989 年, 神奈川県厚木市で栽培されていたエキザカム (*Exacum affine*) に葉の萎縮症状が多発した。病株から直径約 27 nm の小球型ウイルス粒子が検出され, 汁液接種では 9 科 21 種の植物に感染した。ウイルスは, アブラムシ伝搬性で, 植物粗汁液中で比較的安定であった。血清学的試験ではソラマメウルトウイルス血清型 (I) と強く反応した。このことから病原はソラマメウルトウイルスと同定され, 病名はエキザカム萎縮病 (dwarf) とすることを提案したので報告する。なお, 本研究の一部は, 1992 年の日本植物病理学会および 1994 年の第 24 回国際園芸学会議で発表した (夏秋ら, 1992, 1994)。

実験材料と方法

分離と宿主域

神奈川県厚木市の花卉農家で採集した萎縮症状を示すエキザカム (*Exacum affine*) から得たウイルス分離株を, *Chenopodium quinoa* を局所病斑宿主に, 主としてタバコ (*Nicotiana tabacum*) を増殖宿主として保存増殖した。感染葉の一部は, -80°C で保存し実験に供試した。

汁液接種は, 感染葉に 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を 5

~10 倍量 (w/v) 加え磨砕搾汁後に行った。試験植物は人工気象器 (20°C) で育成し, 病徴発現は約 1 ヶ月後まで継続して観察した。病徴観察による感染の確認に加えて, 必要に応じて C. *quinoa* への戻し接種も行った。

電子顕微鏡による粒子形状の観察

透過型電子顕微鏡 (日本電子 JEM-100CX) を用い, 2% のりんタングステン酸 (PTA) によるダイレクトネガティブ染色法で行った。

アブラムシによる伝搬

C. *amaranticolor* 上で無毒化したモモアカアブラムシ (*Myzus persicae*) を用い, 1-2 時間の絶食後, 10 分間の獲得吸汁, および 3 時間の接種吸汁を行った。接種源には汁液接種で全身感染した C. *amaranticolor* を, 接種植物として健全 C. *amaranticolor* を用いた。

粗汁液中での安定性

接種源として, C. *quinoa* の感染葉汁をりん酸緩衝液 (0.1 M, pH 7.0) で 10 倍に希釈して用いた。耐熱性試験では, 接種源を 50, 55, 60, 65, 70, 75°C で 10 分間加熱後, ただちに冷却して接種した。耐保存性試験では, 接種源を 20°C で 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 日保存後, 接種した。接種は, 各々 C. *amaranticolor* 3 株, 各株 3 葉に行った。

血清学的検出

* 東京農業大学国際食料情報学部国際農業開発学科

** 長野県営農技術センター

*** 東京農業大学

V. Lisa 博士 (イタリア国立応用植物ウイルス研究所) から分譲された、I 型の血清型であるソラマメウィルトウイルス (*Broad bean wilt virus*, BBWV) に対する抗血清 (As-BBWV-1) を用いて免疫電子顕微鏡法 (Immunosorbent electron microscopy, ISEM) (MILNE *et al.*, 1975) を行った。抗血清は 1,000 倍に希釈した。

また、*Fabavirus* 属ウイルスで BBWV と極めて近縁のパチヨリ微斑モザイクウイルス抗血清 (As-PaMMV, 東京農業大学熱帯作物保護学研究室製作, Natsuaki *et al.* 1994) とキュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus*; CMV) に対する抗血清 (AS-CMV-Agdia) を用いて ELISA 法 (Koenig, 1981) による検出も行った。ウェスタンブロット法によるウイルス外被タンパク質の検出

Laemmli (1970) の方法に準じた SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) によって感染葉から分離したウイルスの外被タンパク質を、セミドライプロテイング (日本エイドー社) によりゲルからニトロセルロース膜に転写 (定電流 180 mA, 30 分) した。分子量スタンダードには SDS-PAGE Molecular Weight Standard (Broad range) (Bio Rad Laboratories, USA) を用いた。一次抗体として、As-PaMMV を用いた。

ウイルスの部分純化と抗血清の作製

本ウイルスを *C. quinoa* に汁液接種後、3~5 日目に接種葉を、7~10 日目に非接種上位葉を採取し、 -20°C で保存した。部分純化は主として Xu ら (1988) の方法に基づいて行った。超遠心分離は Beckman L8-M 超遠心分離機と 45Ti および SW28 ローターを使用した。得られた標品は、ダブルビーム分光光度計 (日立 U-2000) を用い紫外線波長 260 nm での吸光度を測定し、BBWV の外被タンパク質の固有吸光係数 $E_{260\text{ nm}} = 5.0$ からウイルス濃度を計算した。

得られた部分純化ウイルス標品 (1 mg/ml) を、免疫補助剤として等量のフロインド完全アジュバント (Freund complete adjuvant; FCA) またはフロインド不完全アジュバント (Freund incomplete adjuvant; FICA) と混合し、2 羽のウサギ (品種ニューージーランドホワイト) に免疫して抗血清を得た。接種は、1 週間間隔で 5 回の筋肉注射で行い、初回免疫から第 3 回免疫までは FCA を、第 4 回および第 5 回免疫には FICA を用いた。最終回として部分純化ウイルス標品を静脈注射し、1 週間後に採血した。実験には健全 *C. quinoa* 成分を吸収してから、抗血清 (As-BBWV-E) として供試した。

結果と考察

発生状況と宿主域

エキザカム (*E. affine*) はリンドウ科に属する 2 年草で、ベニヒメリンドウとも呼ばれる非耐寒性植物である。葉は長さ約 3 cm で広卵型、青紫色または白色の花は香気があり、夏季の鉢花として需要が大きい。

1989 年、神奈川県厚木市の花卉農家で温室栽培中のエキザカム (品種ロビック) に激しい萎縮症状が発生した (図



図 1 エキザカムに認められた激しい萎縮と葉巻き症状

1)。萎縮株は生育が止まり、葉は先端が小さく尖り、やや内側に巻く。また、花数が激減し商品としての価値を失う例が多かった。この萎縮症状の病原を検討するため、エキザカム病葉から汁液接種で *C. amaranticolor* あるいは *C. quinoa* に接種してウイルス分離株 (BBWV-E と仮称) を得た。

この分離株を 13 科 40 種の植物に汁液接種を行ない、宿主域を調査した。その結果、9 科 21 種の植物に感染が認められた。すなわち、エキザカムでは、草丈約 10 cm の品種ロビック 28 株に接種したところ、21 株に接種後 3 週間以降に接種葉には輪紋が生じ、全身的には激しい萎縮症状が観察され原病徴が再現された。品種ミゼット (接種 18 株) およびチロリアン (接種 8 株) でも接種 3 週間ないし 4 週間後に、ミゼット 8 株に萎縮症状が、チロリアン 4 株には接種葉に輪紋があらわれた後、萎縮症状が認められた。*C. amaranticolor* では接種後約 1 週間で接種葉に灰白色斑点を呈し、2 週間後には上葉に灰白色病斑に巻葉症状を伴った全身感染となった。*C. quinoa* では接種 5 日後で接種葉に灰白色斑点を生じ、10 日後には上葉にも灰白色病斑を呈するが、最終的に枯死する株も多かった。ソラマメ (*Vicia faba*) では接種葉にえそ斑点を、上葉にもえそを生じて頂葉から枯死した。輪紋症状がツルナ (*Tetragonia expansa*) に、萎縮症状がホウレンソウ (*Spinacia oleracea*)、フダンソウ (*Beta vulgaris*)、ペチュニア (*Petunia hybrida*) などで観察された。*Nicotiana glutinosa* では接種後約 10 日目に接種葉に同心円状の白色輪紋を呈し、また *N. tabacum* cv. Samsun では接種後 10~20 日に黄色い輪紋が全身に出現したが、無病徴全身感染の場合も多くあった。*N. benthamiana* は、接種 14 日後に全身的に退緑斑あるいは稲妻状の病斑を生じた。また、*N. clevelandii* では接種後 20 日目に接種葉に輪紋が観察され、さらに上葉に軽微なモザイクを呈する株もあったが、無病徴全身感染の株も認め

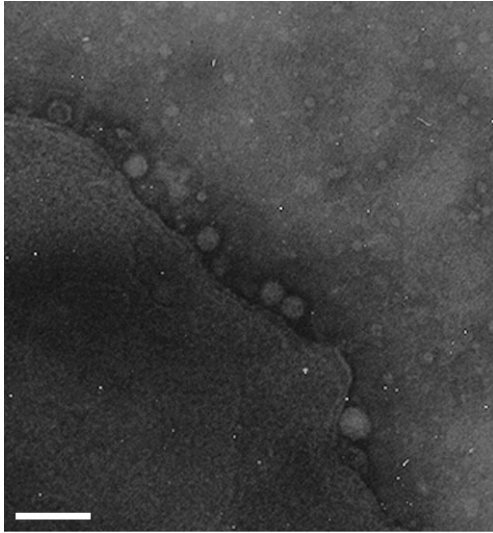


図 2 エキザカムから PTA 染色で検出された小球形ウイルス粒子。Bar=100 nm.

られた。*N. rusutica* では接種 14 日後に接種葉にえそ斑を生じた後、無病徴全身感染し *N. occidentalis* は接種葉、上葉とも無病徴感染した。その他の感染植物は、ピーマン (*Capsicum annuum*)、センニチコウ (*Gomphrena globosa*)、インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*)、エンドウ (*Pisum sativum*)、フィザリス (*Physalis floridana*)、ナス (*Solanum melongena*)、ヒヤクニチソウ (*Zinnia elegans*) であった。本実験の範囲で病徴が観察されず、戻し接種でも病斑が形成されなかったのは、キュウリ (*Cucumis sativus*)、ニホンカボチャ (*Cucurbita moschata*)、シロバナナチョウセンアサガオ (*Datura stramonium*)、レタス (*Lactuca sativa*)、トマト (*Lycopersicon esculentum*)、*Nicotiana repanda*、ダイコン (*Raphanus sativus*)、ゴマ (*Sesamum indicum*)、ジャガイモ (*Solanum tuberosum*)、ジウロクササゲ (*Vigna sesquipedalis*) であった。

粒子形状

エキザカム原病株、あるいは、汁液接種によって得られた *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, エキザカムなどを電子顕微鏡で観察したところ、いずれにも直径約 27 nm の小球形ウイルス粒子が観察された (図 2)。ウイルス粒子は、ときに多数が凝集しており、中空粒子も認められた。他のひも状ウイルスなどは認められなかった。

アブラムシによる伝搬

1 本あたり 10 頭のアブラムシで接種した *C. amaranticolor* 6 株中 3 株の上葉用に感染が認められたため、本ウイルスはアブラムシによって非永続的に伝搬すると考えられた。

粗汁液中での安定性

加熱処理を行わなかった希釈汁液は *C. amaranticolor* 上に 50 個以上の局所病斑 (接種葉 1 葉あたり平均、以下同じ) を形成したのに対し、50°C、55°C、60°C ではそれぞれ 46 個、6 個、1 個の局所病斑を形成し、65°C 以上では感染が認められなかったため、本ウイルスの耐熱性は 60~65°C (10 分) であった。

調製直後および 1 日保存後の希釈汁液は *C. amaranticolor* 上に 50 個以上の局所病斑 (接種葉 1 葉あたり平均、以下同じ) を形成したのに対し、保存 2 日後、3 日後、4 日後はそれぞれ 83 個、15 個、12 個の局所病斑を形成し、保存 5 日後以降は感染が認められなかったため、本ウイルスの耐保存性 (20°C) は 4 日であった。

血清学的検出

ISEM により、エキザカム病株、各種の接種株から抗体で捕捉・修飾されたウイルス粒子が観察され、本ウイルスが BBWV と血清学的に関係があることが示された。しかし、ELISA 法により CMV の検出を行ったが陰性であり、CMV との混合感染は無いと考えられた。

ウェスタンブロット法によるウイルス外被タンパク質の検出

本ウイルスに全身感染した *C. quinoa* および *N. tabacum* から作製した試料では、ウイルス由来のバンドが 2 本検出された。その分子量は、約 42,000 と約 26,000 であった。なお、比較のために同様に検出した PaMMV の外被タンパク質とは、バンドの数と位置に違いは見られなかった。また、健全 *C. quinoa* および *N. tabacum* ではバンドは認められなかった。

ウイルスの部分純化および抗血清の作製

部分純化の結果、50 g の感染葉組織あたり 3.6 mg のウイルス標品を得た。また PTA 染色による電子顕微鏡観察で、直径約 27 nm の小球形ウイルス粒子が崩壊することなく部分純化されていることが確認された。作製した抗血清 (As-BBWV-E) は、健全 *C. quinoa* 成分との非特異反応があり、健全成分による十分な吸収が必要であったが、1,000 倍以上に希釈した時、ELISA 法で健全 *C. quinoa* 葉の 2 倍以上の吸光度を示し、感染 *C. quinoa* 葉からのウイルス検出が可能であった。また、ウェスタンブロット法にも利用可能であった。

同定

本研究では、激しい萎縮症状を示すエキザカムから分離したウイルスが、多くの科にわたる広い宿主域を有し、健全エキザカムへの戻し接種によって原病徴も再現されることを示した。粒子は直径約 27 nm の小球型であった。機械的伝搬に加えて、アブラムシでも非永続伝搬した。耐熱性は 60~65°C、耐保存性は 4 日と比較的安定であった。ソラマメウルトウイルス (*Broad bean wilt virus*, BBWV) およびパチヨリ微斑モザイクウイルス (*Patchouli mild mosaic virus*, PaMMV) と血清学的に関係があり、2 種の外被タンパク質を有し、その分子量は、約 42,000 と約 26,000 であった。さらに部分純化を行い、部分純化標品を用いて抗血清を作製した。

本ウイルスと血清学的に関係が認められたソラマメウルトウイルス (*Broad bean wilt virus*, BBWV) (BRUNT *et al.*, 1996) は世界各地に分布し、寄主域は極めて広く、ヒユ科、アカザ科、アブラナ科、マメ科、ナス科、ユリ科など、双子葉植物および単子葉植物におよんでいる。また、容易に機械的伝搬され、モモアカアブラムシ (*Myzus persicae*)、マメアブラムシ (*Aphis craccivora*) など各種アブラムシ

シによっても非永続伝搬される。ウイルス粒子は小球形（直径 約 25~27 nm）で、T, M, B の 3 粒子からなり、T 粒子は中空である。また、2 種類の外被タンパク質を有する。BBWV と PaMMV はともに *Fabavirus* 属に所属し共通点が多くあるが、PaMMV の方が宿主域が狭く病徴も穏やかで、血清学的にも違いが見られる。しかし、近年、BBWV と PaMMV の核酸の塩基配列を比較した研究によると、両ウイルスは相同性が極めて高いことが明らかになった (IKEGAMI, *et al.* 1998)。

以上から、エキザカムから分離したウイルスの広い宿主域と比較的明瞭な病徴、粒子形状、粗汁液中での耐性、アブラムシ伝播性、外被タンパク質の数と分子量、血清反応などに基つき、本ウイルスを BBWV の一系統であると同定した。特に、ソラマメ、各種のタバコ類を含む多くの植物での明瞭な病徴は BBWV の特色と考えられる。しかし、レタスなど BBWV の宿主として知られている植物でも感染しない例もあった。また、BBWV には 2 種の血清型が知られているが本研究では血清型の決定には至っておらず、今後はその血清型について検討する必要がある。

本ウイルスによるエキザカムの萎縮症状は、発生地において 1989 年に初めて観察され、大きな被害が生じた。いずれも、エキザカム苗を購入して温室栽培していた複数の農家での発生であったため、苗の育成中に感染した可能性が考えられる。また、ロビック、ミゼット、チロリアンの 3 品種について接種試験を行ったところ、ロビックでの病徴が一番激しかったため、品種の感受性も影響したと考えられる。なお 1990 年以降、本症状の大発生は見られていない。しかし今後も、苗の育成時を含めアブラムシによる伝播を警戒する必要がある。

なお、BBWV によるエキザカムのウイルス病は日本では報告が無いため、病名を萎縮病、英名を dwarf とした。

謝辞：本研究を遂行するにあたって、倉田義和氏（東京農業大学農学科学生、当時）にはウイルスの宿主域調査、増殖などについて多大な協力を頂いたので、ここに記して感謝の意を表する。

引用文献

- 1) 夏秋啓子・倉田義和・都丸敬一 (1992). ソラマメウルトウイルスによるエキザカム萎縮病 (新称). 日本植物病理学会報 58 : 615 (講演要旨)
- 2) 夏秋啓子・栗原 潤・都丸敬一 (1994). Exacum dwarf, a new disease in Japan caused by broad bean wilt virus. 第 24 回国際園芸学会議講演要旨集 pp 204.
- 3) MILNE, R.G. and LUISONI, E., (1975). Rapid high-resolution immune electron microscopy of plant viruses. *Virology* 68 ; 270-274.
- 4) KOENIG, R. (1981) Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. *J. Gen Virol.* 55 : 53-62.
- 5) LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-683.
- 6) K.T. NATSUAKI, K. TOMARU, S. USHIKU, Y. ICHIKAWA, Y. SUGIMURA, T. NATSUAKI, S. OKUDA, M. TERANAKA (1994). Characterization of two viruses isolated from patchouli in Japan. *Plant Disease* 78 : 1094-1097.
- 7) Xu, Z.G., COCKBAIN, A.J., WOODS, R.D. and GOVIER, D.A. (1988) The serological relationships and some other properties of isolates of broad bean wilt virus from faba bean and pea in China. *Ann. appl. Biol.* 113 : 287-296.
- 8) BRUNT, A.A., CRABTREE, K., DALLWITZ, M.J., GIBBS, A.J., WATSON, L. and ZURCHER, E.J. (eds.) (1996). Plant Viruses Online : Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version : 20th August 1996. URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>
- 9) IKEGAMI, M., KAWASHIMA, H., NATSUAKI, T. and SUGIMURA, N. (1998). Complete nucleotide sequence of the genome organization of RNA2 of patchouli mild mosaic virus, a new favavirus. *Arch. Virol.* 142 : 2431-2434.

Exacum Dwarf, a New Disease Caused by *Broad Bean Wilt Virus*

By

Keiko T. NATSUAKI*, Jun KURIHARA** and Keiichi TOMARU***

(Received February 28, 2001/Accepted April 19, 2001)

Summary : Exacum (*Exacum affine*) is an ornamental plant, which is popular as a pot flower in summer in Japan. In several glasshouses of growers in Kanagawa prefecture in 1989, high incidence of symptoms such as severe dwarf, upward rolling of leaves, and reduced number and size of flowers was observed.

Host range of the pathogen was tested with the inocula obtained by manual inoculation from diseased exacum to *Chenopodium amaranticolor* and *C. quinoa*. Plants of 21 species in 9 families including exacum were infected. Inoculated exacum showed systemic dwarf symptom, sometimes with ring spots, about 3 weeks after inoculation. *C. amaranticolor* showed chlorotic local lesions followed by systemic downward leaf curling and chlorosis. *C. quinoa* showed chlorotic local lesions followed by severe systemic chlorosis. Broad bean showed apical necrosis. *N. tabacum* cv. Samsun and *N. occidentalis* were also infected.

Electron microscopic observation of leaf dips of infected plants stained with 2% phosphotungstic acid (PTA, pH 6.0) revealed isometric particles with a diameter of approximately 27 nm. *Myzus persicae* transmitted the pathogen from systemically infected *C. amaranticolor* to healthy *C. amaranticolor* after 1 hr starving, 10 min of acquisition period and 3 hr of inoculation period.

Thermal inactivation point was between 60 and 65°C and longevity in vitro was up to 4 days. Virus particles were trapped and decorated by Immuno-sorbent electron microscopy with antiserum to *Broad bean wilt virus* (BBWV) -serotype I (gift from Dr. V. Lisa). *Cucumber mosaic virus* was not detected by ELISA.

Molecular weights of the coat proteins were estimated by Western blotting with antiserum to patchouli mild mosaic virus which is closely related to broad bean wilt virus. Two coat protein bands with molecular weights of approximately 42,000 and 26,000 were observed.

The virus was partially purified by the modified method described by Xu *et al.* (1988) and the yield was 3.6 mg/50 g of fresh infected *C. quinoa*. With partially purified virus, antiserum (As-BBWV-E) to the virus was produced by a series of immunization to rabbits. As-BBWV-E could detect the virus by ELISA and Western blotting.

Based upon the results, the virus, which caused severe dwarf in exacum was identified as a strain of *Broad bean wilt virus* (BBWV). Though patchouli mild mosaic virus (PaMMV) shares similar characters with BBWV and is serologically related to BBWV, PaMMV has narrower host range with mild symptoms on some plants. Since BBWV has two serotypes, analysis of the serotype of the virus isolated from exacum is necessary. The disease of exacum caused by BBWV has not been reported in Japan and it was named as dwarf (Ishuku byo).

Key Words : *Broad bean wilt virus*, *Exacum affine*, dwarf

* Department of International Agricultural Development, Faculty of International Agriculture and Food Studies, Tokyo University of Agriculture

** Nagano Agricultural Technique and Training Center

*** Tokyo University of Agriculture