

エビネ類に発生する黄色斑紋モザイク病の病原,  
Orchid Fleck Virus について

井上成信・松本純一\*・前田孚憲・光畑興二・  
近藤秀樹・田原望武\*\*

Orchid Fleck Virus, the Causal Agent of a Yellowish  
Fleck Mosaic Disease of *Calanthe*

Narinobu INOUE, Jun-ichi MATSUMOTO\*, Takanori MAEDA,  
Koji MITSUHATA, Hideki KONDO and Mochimu TAHARA\*\*

Orchid fleck virus (OFV) was isolated from *Calanthe* spp. (*Cal. discolor*, *Cal. Bicolor*, *Cal. Hizen*, *Cal. triplicata*, *Cal. longicalcarata*, *Cal. Satsuma*) showing light-green and/or yellowish fleck mosaic on the leaves, which differed from previously known viruses of *Calanthe*. OFV caused systemic infection in *Calanthe*, *Chenopodium quinoa* and *Beta vulgaris* var. *cicla*, and local infection in *C. amaranticolor*, *C. murale*, *Spinacia oleracea*, *Tetragonia expansa*, *Nicotiana tabacum*, *N. clevelandii*, *N. glutinosa*, *N. rustica*, *Vigna unguiculata*. *C. quinoa* and *T. expansa* are useful as indicator hosts and as a source of virus for inoculation, diagnosis and purification. Sap from *C. quinoa* was infective after dilution to  $10^{-3}$  but not  $10^{-4}$ , after 10 min at 45 but not 50°C, and after 1 hr at 20°C but not 2 hrs. For sap inoculation, it is best to use the homogenate of OFV-infected leaves within about 7-8 min after homogenization in summer and within about 15 min in winter. The virus particles were bullet-shape or bacilliform, approximately  $45-50 \times 105-125$  nm in a negatively stained preparations. In ultrathin sections, the viroplasm was observed in the nuclei, and the virus particles and the characteristic spokewheel structures were found both in the nuclei and the cytoplasm. Antiserum (precipitin titer: 1/512) against the present virus

---

Research Institute for Bioresources, Okayama University, Kurashiki 710, Japan

平成7年12月18日受理 (Received December 18, 1995)

本研究の一部は日本石油精製(株)下松精油所の研究助成「エビネのウイルス病に関する研究」によって行われた。また本研究の結果の一部は平成6年10月、日本植物病理学会関西西部会において発表した<sup>15)</sup>。

\*現大阪府立大学農学部, \*\*元山口大学農学部園芸学教室

reacted strongly with the isolates of OFV·Cy-50, similar to that of homologous virus. In agar gel diffusion tests, no spur formation occurred among Cal. 92-7, Cal. 94-16 and OFV·Cy-50. In SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, one major band of  $M_r$  55,000, probably viral nucleocapsid-protein, and three minor proteins were detected, similar to those of OFV·So from *Cymbidium*.

**Key words :** *Calanthe*, Orchid fleck virus, *Calanthe* yellowish fleck disease.

## 緒 言

1988年山口県および宮崎県において、エビネ類の葉に激しい黄色斑紋のモザイクを生じ、観賞価値を著しく落とす病株を採集した。この病気の発生は現地栽培者間ではかなり以前から知られていたようであり、一方この斑紋が特徴的なことから珍種扱いをしていた人もあった。しかしこの斑紋はウイルス病であり、今までに報告されたエビネ類には見られない病徴であることが分かった。それ以来広く調査を行って見ると、このウイルス病は鹿児島県でも同じくエビネ類に発生していることが認められた。これらの病原ウイルスを分離して諸性質を調べたところ、粒子の形態が被膜を持たない弾丸型あるいは短桿菌型であり、さらに寄生性、血清反応、病細胞内所見などの結果から orchid fleck virus (OFV) と同定された。OFV による黄色斑紋モザイク病はエビネ類では新病害であった。研究を始めた頃、このウイルスは汁液接種可能であったが、特に宿主範囲の実験ではその繰り返しを行う度毎に結果に違いが見られることがしばしばあった。これはこのウイルスが非常に不安定であるためであることに原因があると思われた。そこで接種法や純化法などに検討を加えながら実験を数年繰り返して行い、ここによくその諸性質を取り纏められる段階までに至った。

本報にはそのエビネ類に発生する OFV の諸性質について記述し、この病気をエビネ類の黄色斑紋モザイク病とした。さらに病原性に関する汁液接種の条件についても若干の論議を加えた。

本研究を行うにあたり、OFV の分離株を提供下さった元東京大学教授土居養二博士並びに元同大学院生張茂雄博士に謝意を表する。

## 材料および方法

**供試ウイルス：**実験にはエビネ類の葉に黄色斑紋のモザイクを生じた病株から分離した弾丸型あるいは短桿菌型の粒子形態をした宮崎県で採集の Cal. 92-7 分離株および山口県で採集の Cal. 94-14 の分離株ウイルスを主として供試した (Plate I. 2-4)。また比較のため、Chang *et al.*<sup>3)</sup> が報告した OFV (彼らが論文発表した以前に彼から分譲された原株 *Cymbidium* の分割株のウイルス、以下 OFV·Cy-50 と記す) を供試した。採集したエビネ類の病株は温室または温室外に設けた黒色の遮光用寒冷紗張り室に、OFV の病株 *Cymbidium* は温室に保

存し、またウイルスの実験のための継代保存および病葉の生産はツルナの接種葉および *Chenopodium quinoa* を用いて温室で行った。

**汁液接種**：宿主範囲調査のための供試植物はラン科の健全な *Calanthe* (エビネ属), *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Phalaenopsis* の他、タバコ類、マメ類など11科46種(54品種)の植物を用いた。接種試験は病葉を0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で磨砕した汁液にカーボランダムを加え、常法によって行った。汁液接種は、結果の項で示すように、ウイルスの病汁液中での病原性が病葉磨砕後短時間で失われることが分かったので、病原性が高く保持されている磨砕後7~10分以内の病汁液を供試するようにし、その後には新たに磨砕した病葉汁液を接種に用いた。接種結果の判定は、ラン科植物では接種後2~3年間(観察継続中)、草本植物では30~40日頃まで病徴発現の観察により、さらに *C. quinoa* またはツルナへの戻し接種、および必要に応じて粒子の電顕観察を行って確かめた。

**粗汁液中での安定性**：ウイルスの不活化温度、希釈限度および保存限度の試験は汁液接種した *C. quinoa* の病葉汁液を、検定植物には *C. quinoa* を用い、常法によって行った。各温度処理後直ちに氷中に入れて温室に運び、接種を行った。

**ウイルスの純化**：ウイルスの純化は次のような方法によって行った。接種したツルナまたは *C. quinoa* の病葉に重量比3倍の0.1 M リン酸緩衝液(0.1%チオグリコール酸を含む、pH 7.0)を加えて磨砕し、二重のガーゼで搾汁し、11,000×g 10分間遠心分離した。水層をとり2% Triton X-100を加えて15分間攪拌し、ポリエチレングリコール6,000を6%量加えて1時間攪拌した後、11,000×g 20分間遠心分離して得られた沈殿を0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁して11,000×g 10分間遠心分離した。その上清に1% Triton X-100を加えて15分間攪拌したのち、30%ショ糖クッションに重層して85,000×g 1時間遠心分離し得られた沈殿を0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 5 ml で懸濁して11,000×g 10分間遠心分離した。その上清を30%ショ糖クッションに重層し、37,000×g 1時間遠心分離した。得られた沈殿を0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 2 ml に懸濁し、10~40%ショ糖密度勾配に重層して、87,000×g 1時間遠心分離した。2つのバンドを生じた(Plate III-1)が、上層バンドには壊れた粒子が、下層バンドには弾丸型または短桿菌型粒子が存在したので、この下層バンドの画分を0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で希釈して50,000×g で1時間遠心分離し、その沈殿を0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解して11,000×g 10分間遠心分離し、その上清を純化標品とした。

**電顕観察**：ウイルス粒子は、はじめ病葉細片を2%四酸化オスミウム液の微滴内で擦り潰して5分間固定し、この液をコロジオン膜を張ったグリットにのせ、1分後に余分の液をろ紙に吸い取り、これを2%リンタングステン酸液または2%酢酸ウラニルにより30~60秒間逆染色し、電顕観察(日立 H-7100型)を行った。病組織の超薄切片の電顕観察には、病葉の小片を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、エポキシ樹脂に包埋して薄切りにし、その切片を酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色した試料について行った。

**SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)**：ウイルス外被蛋白質の電気泳動は Laemmli<sup>21)</sup>の方法に準じて行った。

## 結 果

## 1. 自然発生したエビネ類の病徴

OFVは山口県、宮崎県、鹿児島県の各地に栽培されているエビネ、タカネ、ヒゼン、サツマ、ツルラン、オナガエビネなどから分離された。このウイルス病の発生は庭や庭園のような屋外に栽培されているところに多いようであったが、場所性があった。症状はエビネ属の種類や品種により、また葉の成熟度や感染後の経過日数などにより若干の違いが見られたが、それらの典型的な病徴は次の通りであった。

成熟した古い葉には、葉脈間に幅約1mm、長さ1～7mm大の退色斑を現わしているのが特徴であった(Plate I-1~4)。また退色斑が拡大して隣接のものと同融合したとみられる直径3～7mm大、時に大きいもので10～15mm大の不定形退色斑を生じて明瞭なモザイク症状を現わすものもあった(Plate I-1, 2)。退色斑は淡緑色、緑黄色あるいは黄色の明瞭な斑紋モザイクを呈したが、えそ斑を伴うものも見られた。退色斑内の葉脈は細く緑色に残ってネット症状を呈した。3～4月頃の観察時では、新葉には殆ど症状が見られなかったが、昨年生長した葉にはじめ長形の淡い退色斑が現われ(Plate I-4)、また濃淡がネット状に見えるものもあった。タカネでは上記の症状に加え葉先や葉の縁が枯れるものも見られた。

## 2. 宿主範囲と病徴

供試ウイルス Cal. 92-7および Cal. 94-16分離株の宿主範囲の結果はほぼ同じであったので、前者の Cal. 92-7分離株の宿主範囲の試験結果を第1表に示した。本ウイルスの宿主範囲は、接種した11科46種(54品種)の中、5科12種の植物に感染が認められた。そのうち、エビネ類、*C. quinoa* およびフダンソウに全身感染し、*C. amaranticolor*、*C. murale*、ホウレンソウ、ツルナおよびササゲに明瞭な局部病斑を形成した。検定植物の生育がよく、また接種条件のよいときにはタバコ(White Burley, Samsun)、*Nicotiana rustica*、*N. glutinosa* および *N. clevelandii* などの接種葉にも局部病斑を形成した。主な宿主植物における病徴を以下に記述する。

エビネ：接種葉では脈間に淡緑色または緑黄色斑、のち長形の黄色斑を生じた(Plate I-5)。全身感染の最初の病徴は接種した翌年に生育した葉が充分展開成熟したころ、葉脈間に長形の退色斑が現われ(Plate I-6)、のち黄緑化するモザイクとなった。病徴の進行については現在なお観察中である。

*C. quinoa*：接種後8～13日目頃、はじめ0.5～0.7mm大の淡い退色斑点を生じ、やや拡大して中心が淡褐色～褐色の局部斑点となった(Plate I-8)。全身感染し、接種後18～25日目頃はじめわき芽の葉に退色斑点を生じ、ときに斑点がのびて葉脈透化症状を呈するものも見られた。わき芽の新葉は淡い退色斑点の集まりによるモザイクを生じて湾曲し、発育が悪くなった。上部の葉にも退色斑点あるいは葉脈透化を生じて湾曲し、また萎縮した(Plate I-9)。冬期あるいは接種源など条件の悪いときには全身感染がみられないこともあった。

フダンソウ：接種後9～11日目頃、接種葉に1mm大の退色斑点を生じ、のち黄色斑点となった(Plate II-1)。また退色斑点は中心がえそ化した。全身感染し、接種葉の上3～5番目葉に明瞭な退色斑点を生じた。しかしその後発生した葉では症状が軽くなり、さらに上葉には病徴が見られないことが多かった。無病徴葉からのウイルスの回収はできなかった。

Table 1. Host range of orchid fleck virus (Cal. 92-7) from *Calanthe*.

<i>Systemically-susceptible plants</i>	
Orchidaceae	<i>Calanthe</i> ,
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> , <i>Beta vulgaris</i> var. <i>cicla</i> ,
<i>Locally-susceptible plants</i>	
Chenopodiaceae	<i>C. amaranticolor</i> , <i>C. murale</i> , <i>Spinacia oleracea</i>
Solanaceae	<i>Nicotiana clevelandii</i> , <i>N. glutinosa</i> , <i>N. rustica</i> <i>N. tabacum</i> (White Burley, Samsun)
Leguminosae	<i>Vigna unguiculata</i>
Aizoaceae	<i>Tetragonia expansa</i>
<i>Insusceptible plants</i>	
<i>Astragalus sinicus</i> , <i>Brassica rapa</i> , <i>B. rapa</i> var. <i>perviridis</i> , <i>Capsicum annuum</i> var. <i>angulosum</i> , <i>Celosia cristata</i> , <i>Cucurbita maxima</i> , <i>C. pepo</i> , <i>Cucumis melo</i> var. <i>conomon</i> , <i>Cucumis sativus</i> , <i>Datura stramonium</i> , <i>Freesia refracta</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Gomphrena globosa</i> , <i>Helianthus annuus</i> , <i>Lactuca scariola</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Medicago sativa</i> , <i>Petunia hybrida</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>Raphanus sativus</i> , <i>Sesamum indicum</i> , <i>Solanum melongena</i> , <i>Trifolium incarnatum</i> , <i>Trifolium pratense</i> , <i>Trifolium repens</i> , <i>Vigna angularis</i> , <i>Vicia faba</i> , <i>Zea mays</i> , <i>Zinnia elegans</i>	
Orchidaceae: <i>Cymbidium</i> *, <i>Dendrobium</i> *, <i>Phalaenopsis</i> *, <i>Cattleya</i> *	

\* : Tests have been carried out since 1962/or 1993 and still continuing, but the symptoms have not been observed yet.

*C. amaranticolor* : 接種後10~14日目頃, はじめ淡い退色斑点を生じ, その中心が淡褐色化したえそ斑点となる局部病斑となった. のちえそ斑点の周りがリング状に赤色化した斑点となった. 下部の接種葉では, 葉が黄色化してくるとえ死斑点の周りが緑色に残り, また緑色部が葉脈に沿って長く伸びるものも見られた. そのような状態になった接種葉はまもなく落下した. 上葉には症状が見られず, またウイルスの回収もできなかった. OFV・Cy-50分離株では上記類似の退色斑点~淡褐色の局部斑点を生じたが, エビネからの本ウイルスに比べ著しく少なかった.

ホウレンソウ : 接種葉に, はじめ1 mm 大の退色斑点を生じ, のち黄白色斑点となったが, 中心淡褐色の斑点となるものも見られた. 全身感染は見られなかった.

ツルナ : 接種葉に局部病斑を生じたが, 接種後病斑形成までの日数が夏期高温時と冬の低温時とで異なり, 6月~9月中旬頃には7~10日間, 11月~翌年3月頃には11~18日間の潜伏期間を経て病斑を形成した. はじめは径約0.5 mm 大の退色斑点を生じたが, 次第に中心が淡褐色のえそ斑点となった (Plate I-7). 斑点はやや拡大して融合し, のち組織え死を起こした. 夏期高温時には退色斑点が早くえ死斑となった. 下部の接種葉では葉が黄色化すると, 退色斑点の周りが緑色に残る緑色斑点となった. 全身感染せず, 上葉からウイルスの回収もできなかった. OFV・Cy-50分離株でもツルナの接種葉に局部病斑を生じた (Plate I-10) が, エビネからの分離株による病斑に比べやや不明瞭であるように思われた.

ササゲ : 品種黒種三尺では, 9月頃に *C. quinoa* の病葉汁液を接種したとき, 接種後15~19日目頃ははじめ0.5~1 mm 大のえそ斑点を生じ, のち1~2 mm 大の斑点となった. 葉がやや古くなるとえそ斑点の周りが退色した2~3 mm 大の斑点となった. 全身感染せず, 上葉か

らウイルスの回収もできなかった。赤種三尺では、はじめ小退色斑点、次に中心にえそ斑点を生じ、のちえそ斑点が集合したえそ斑となった。OFV・Cy-50も同様に局部病斑を形成したが、少数であった。

タバコ・*N. clelandii*：接種葉に退色斑点を生じ、次第にえそ化してきた (Plate II-2)。冬期には感染しにくいようで、病斑数が少なかった。全身感染はしなかった。

*Cymbidium*：シンビジウム (マリリン・モンロー) の苗50本に接種を数回に分けて試みたが、本ウイルス (Cal. 92-7) の感染は接種後2～3年経過してもまだ見られていない。しかしOFV・Cy-50は低率 (10%) ながら感染し、接種後5～6ヵ月で発病して原株の病徴と同じ退色斑/えそ斑症状が現われた (Plate II-3)。

### 3. 粗汁液中における安定性

本ウイルスの粗汁液中での安定性は、*C. quinoa* の病葉汁液を用い、*C. quinoa* を検定植物にした実験では、不活化温度が45～50°C (10分)、希釈限度が $10^{-3}$ ～ $10^{-4}$ 、20°C での保存限度が1～2時間であった。

### 4. 汁液接種の条件とウイルスの病原性

#### 1) 病葉磨砕後の経過時間と病原性

前項のように、ウイルスが非常に不安定であることが認められたので、病葉磨砕後の経過時間と接種源としての供試可能な病原性との関係を知っておくことが必要となった。これは宿主範囲などの試験で検定植物が多数の場合、接種に時間がかかり、その後半には接種源中の病原性の低下または消滅が進むことが分かったからである。

**4月の接種試験例：**接種21日後のツルナ病葉を5倍量の0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で磨砕し、ツルナに接種した。形成された局部病斑数を調べたところ、磨砕直後から10分後までの間の汁液を用いたとき、局部病斑数は多くて+++ (計数困難)、5分後+++、10分後++、15分後には+と半減し、20分後には+ (1葉当たり10～30個台) と著しく少なくなった (Plate I-7)。

**8月の接種試験例：**接種21日後のツルナ病葉を前記と同じように磨砕してツルナに接種したところ、磨砕から7分経過頃までの汁液による局部病斑数が著しく多く、8～10分経過のものから急に低下した。

**OFV・Cy-50分離株の例 (7月接種)：**ツルナ病葉を前記と同じように磨砕しツルナに接種したところ、局部病斑数はCy・92-7よりやや少なく、一葉当たり磨砕直後では平均120.5個、20分後には6.5個、30分後には0.5個と減少した。

Cal. 92-7分離株では、以上のような試験を数回行った結果、接種条件によって若干の長短はあったが、接種時期が夏期高温時では、病葉の磨砕後7分頃までのもの、長くても10分以内のものを、また晩秋から4月頃では、搾汁後15分経過頃までのものをそれぞれ接種に供試すると、高い病原性を保持する病汁液を接種したことになり、よい結果が得られるようであった。以上の磨砕後の供試可能時間は一応の目安であり、接種源に用いる病斑の状態、試験時期、接種植物の苗令などいろいろな諸条件によって変動があるので、粒子に被膜のないOFVの宿主範囲のような実験は1年を通じて何回も繰り返して行うことが必要のように思われた。

## 2) 病葉磨砕緩衝液の温度

病葉磨砕時のりん酸緩衝液について、9月室温(30°C)に置いたものと冷蔵庫からのものを用いた比較を、検定植物ツルナに接種して行ったところ、磨砕直後に接種した場合には、両者とも同じく多数の局部病斑を形成した。磨砕直後に接種する場合には、磨砕用緩衝液を冷やす必要がないという結果が得られた。

## 3) 接種源植物

本ウイルスは *C. quinoa* とツルナの接種葉によく感染するので、これらを汁液接種のための接種源植物に用いることができる。その場合、ツルナでは接種後1ヵ月経過したものでもよいが、夏期には病斑のえそ化が進み易いので、えそ化する前接種後20~25日頃までのものを用いることが望ましかった。また接種源植物にはツルナより病斑のえそ化による損傷が少ない *C. quinoa* (Plate I-8, 9) を用いる方がよく、また接種後30~40日経過したものでもよいことが認められた。いずれも局部病斑葉を用いる場合、病斑にえそ化が進まず古くない状態のものを用いることが望ましいことが分かった。

## 5. ウイルス粒子

ウイルス粒子は、四酸化オスミウムで固定したDN法試料を2%リンタングステン酸(PTA)あるいは酢酸ウラニルで染色して電顕観察したところ、被膜のない弾丸型ときに僅少の短桿菌型が混在して見られた(Plate II-5)。その大きさは弾丸型で長さ105~120 nm, 短桿菌型で長さ110~125 nm, 幅約45~50 nmであった。純化したウイルス粒子では弾丸型の他に粒子先端のドームを欠ぐものも多く見られ、本粒子は壊れ易いようであった(Plate II-6, 8)。

## 6. 血清反応

エビネからの Cal. 94-16分離株の純化ウイルスを家兎に注射して得られた抗血清は微滴反応法で部分純化ウイルスと512倍まで反応した。本抗血清を用い、Cal. 94-16, Cal. 92-7, OFV・Cy-50の3分離株(部分純化試料)の血清反応を寒天ゲル内二重拡散法で調べたところ、いずれの分離株も明瞭な沈降帯を生じ、それらのいずれも完全に融合した(Plate II-9)。また本抗血清を用いた間接ELISA試験では、抗原として純化ウイルスを供試した Cal. 94-16, Cal. 92-7, OFV・Cy-50分離株間で反応差が認められなかった(Fig. 1)。

## 7. ウイルス外被蛋白質の分子量

本ウイルスの純化標品をSDS処理して得た粒子構造蛋白質の分子量をSDS-PAGEにより調べた。Plate III-2に示すように4本のバンドが認められたが、淡い3本はマイナーバンドで、本ウイルス粒子の構造蛋白質の分子量は約55 Kと計測された。

## 8. 罹病細胞超薄切片の電顕観察

本ウイルス感染葉の超薄切片像の電顕観察では、核内の仁近くに viroplasm 封入体の形成が見られ、その内部にウイルス粒子が散在または小集塊するものと、viroplasmの内外に side-by-side 配列し、さらに何層かになった大きなウイルス粒子集塊が見られた(Plate III-3)。さらに細胞内や核内に、核膜由来の膜系に包まれた特徴のある車軸状に配列して形成された

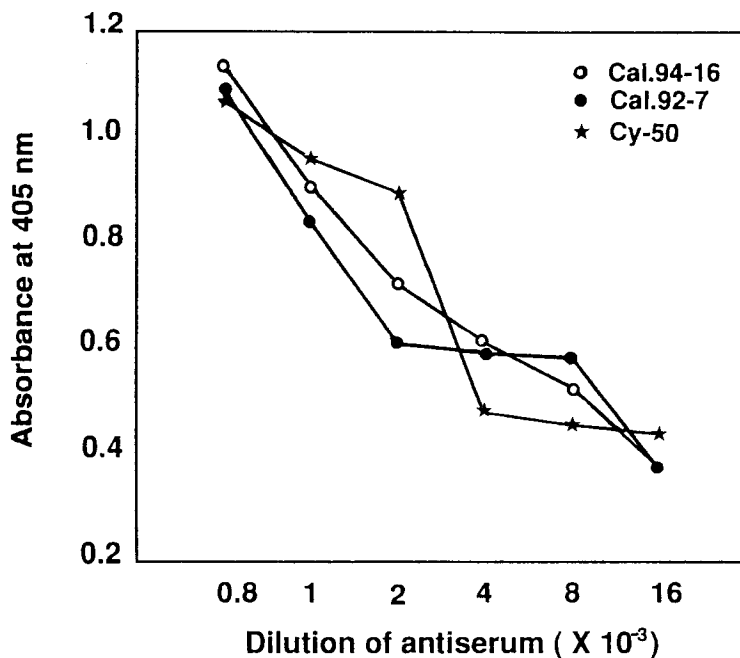


Fig. 1 Serological relationship of three isolates of orchid fleck virus (Cal. 94-16, Cal. 92-7, and OFV · Cy-50) by I-ELISA, using Cal. 94-16 antiserum.

ウイルス粒子の集塊が観察された (Plate III-4)。細胞質内には車軸状配列以外の大集塊の粒子は見られず、散在する場合が多く見られたが、円形状の膜系の外側に粒子の一端が吸着して直角に立ち並んだ粒子像およびその内側に車軸状に配列した粒子集団も観察された (Plate III-5, 6)。DN 法試料の電顕観察では上記車軸状配列膜が潰されたと見られる粒子の先端のドーム近くに膜様組織が接して存在するものも見られた。

### 考 察

エビネ類には今までに bean yellow mosaic virus<sup>4,9,11,12,27</sup>、clover yellow vein virus<sup>10,13</sup>、cucumber mosaic virus<sup>4,5,10,12,14</sup>、cymbidium mosaic virus<sup>4,5,10,12,16,32,33</sup>、odontoglossum ringspot virus<sup>4,5,10,28,36</sup>、turnip mosaic virus<sup>29</sup>、未同定の carlavirus<sup>34</sup> および potyvirus<sup>12</sup> の発生が報告されている。それらのウイルスによる病気と異なる葉に黄色斑紋モザイクを生じたエビネ類が発見された。この病原ウイルスは粒子の形態が弾丸型あるいは短桿菌型で被膜を持たず、また宿主範囲、OFV·Cy-50との血清反応が陽性、感染細胞の核内に viroplasm やウイルス粒子が形成されることの細胞内構造所見などの結果から、orchid fleck virus (OFV)<sup>3,6,20</sup> と同定された。OFV は Chang *et al.*<sup>3</sup> が *Cymbidium* から検出して記載して以来 *Angulorea*, *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Odontoglossum*, *Oncidium*, *Pescatorea*, *Phalaenopsis*, *Zygopetalum* から検出されている<sup>3,4,5,20</sup> が、エビネでは未記録であった。



しかし我々がエビネからの OFV について学会で発表した<sup>15)</sup>時をほぼ同じくして山下ら<sup>35)</sup>も学会でエビネの明瞭なえそ輪紋症状株から OFV を検出して発表した。本研究のエビネの病斑は彼らの示したえそ輪紋症状の病斑と異なり、山口・宮崎・鹿児島県内で採集した OFV に起因するすべてのエビネ類には葉脈間に長形の淡緑色～黄色斑紋およびそれらの融合によるモザイク症状が現われ、またえそ斑点を伴うものもあった (Plate I, 1~4) が、えそ輪紋症状は見られなかった。そこで OFV によるエビネの病気を黄色斑紋モザイク病とすることにした。

本報のウイルス分離株は汁液接種によってエビネ類の他、他科の *C. quinoa* およびフダンソウに全身感染し、*C. amaranticolor*, ツルナ, ササゲ, タバコ, *N. glutinos*, *N. clevelandii* などに局部病斑を形成した。このような寄生性は著者ら<sup>20)</sup>が先に報告した東洋ラン *Cymbidium* から分離した OFV-So 株<sup>20)</sup>のそれとタバコ類を除いてほぼ同じであった。Chang *et al.*<sup>3,5)</sup>が日本および韓国で分離した OFV はいずれの分離株も *C. quinoa* には局部感染のみで、全身感染せず、ササゲやツルナに感染しなかったとしているので、彼らの OFV の分離株についての報告と本ウイルスとは寄生性において若干の違いがあるように思われた。しかし、Chang 博士から分譲された OFV (*Cymbidium* 病株, Cy-50) を用いて本ウイルスとの病原性の比較実験を行ったところ、OFV・Cy-50 もツルナ (Plate I-10), ササゲに局部感染することが認められ、彼らの報告データと違いが見られた。この結果の差については明らかではないが、彼らは接種源に *Cymbidium* の病葉を用い、本研究では局部病斑が多数形成された *C. quinoa* やツルナの病葉 (Plate I, 7A, 8, 9 様病斑葉) を接種源に用いたことも 1 つの原因であるかもしれず、また実験で示した接種の諸条件の影響も関係あるものと思われた。しかし、ツルナには本ウイルスは接種葉に多数の局部病斑を生じたが、OFV・Cy-50 では局部病斑の出現がやや遅く、また形成数も少ない場合が多かった。*Cymbidium* (品種マリリン・モンロー) への接種では、OFV・Cy-50 は感染して原株病斑と同じ退色斑/えそ斑症状を現わした (Plate II-3) が、本ウイルス (Cy-92-7) の感染は接種後 2~3 年経過しても病徴がまだ見られず、さらに他の感染植物においても局部病斑の出現に違いがあるなど、両ウイルス分離株間の寄生性には若干の違いが見られた。

Chang *et al.*<sup>3,5)</sup>の報告によれば、OFV の汁液接種は夏期 30°C 以上の高温条件下のみで成功したとしているが、本ウイルスの分離株 (Cal. 92-7, Cal. 94-16) は冬期温室の温度が 13~25°C の条件下でもよく感染し、両分離株間の温度条件に対する病原性の発現が異なるようであった。しかし、本ウイルスの汁液接種による潜伏期間は *C. quinoa* やツルナに接種したとき、夏期では 7~10 日、冬期では 14~20 日で夏期の約 2 倍の日数を要し、温度によってウイルスの増殖が大きく影響されることが認められた。ウイルスの病葉汁液中での病原性は、不活化温度が 50°C 以下、耐保存性が 1~2 時間でかなり不安定なウイルスであった。そこで宿主範囲など汁液接種する場合の病葉磨砕後の供試可能な時間についてツルナと *C. quinoa* の局部病斑数で調べたところ、夏期 (6~9 月頃) では 8~10 分、冬期では 15~20 分経過すると急に低下することが認められた (Plate I-7) ことから、汁液接種には病葉を磨砕してから夏期では 7 分頃まで、冬期では 15 分頃までのものを供試することが重要であると思われた。宿主範囲など病原性に関する実験において多数の検定植物を用いる場合、夏期では接種源病葉を磨砕後 7 分経過すると新たに磨砕液を作製して接種に供するべきであると考えた。勿論接種源病植物に *C. quinoa* の接種葉および全身感染葉またはツルナの接種葉を用いるとよい。そ

れら局部感染の接種葉を接種源に用いる場合には、病徴の新しいものがよく、あまり古くなったものは病原性が落ちてくることを知っておかなくてはならない。また検定植物に接種するときには、最初と最後に *C. quinoa* へ接種し、その局部病斑数によって接種源汁液の信頼度を判断することが大切である。このような汁液接種には、用いる接種源植物の種類、供試時の苗令、発病の程度(発病後の経過日数)、接種植物の苗令、検定時の温度などの環境条件が感染するか否かに大きく影響することが分かった。

本ウイルス粒子はDN法試料で弾丸型あるいは短桿菌型の形態をなし、その大きさが45~50×105~125 nmであり、*Cymbidium* から検出されたOFVの40×150 nm<sup>3,4)</sup>あるいは40×120~150 nm<sup>20)</sup>、他のラン科植物から分離された未同定ウイルスの176×83 nm<sup>26)</sup>より小さく、Begtrup<sup>2)</sup>およびLesemann and Doraiswamy<sup>25)</sup>がラン科植物で観察した未同定のウイルス粒子の大きさとほぼ同じであった。純化したウイルスでは粒子端のドーム部分を欠く形態のものが多く見られたが、これは粒子端が崩壊したものと思われ、その先端部分が壊れやすいことを物語っているようであった。また本ウイルスの構造蛋白質の分子量はSDS-PAGEで55 Kであり、この値は著者らが先に報告した*Cymbidium* からの分離株<sup>18,19)</sup>と同じであった。さらにCal. 94-16分離株に対する抗血清を用いた血清反応では、ELISA法で本報ウイルス分離株Cal. 94-16, Cal. 92-7およびOFV・Cy-50間で差が認められず、また寒天ゲル内二重拡散法でもそれら3分離株の沈降帯が融合した。

本ウイルスは感染細胞の核内に viroplasm およびウイルス粒子が形成されること、膜に包まれた車軸状に配列した粒子集塊が見られることの細胞内所見は*Cymbidium* からのOFVの病細胞<sup>3,5,6,20)</sup>およびランに発生する未分類の植物ラウドウイルス様粒子の感染細胞で報告されている<sup>1,7,8,17,24,25,31,35)</sup>所見とも類似していた。宮崎県では庭木の株元に栽培されている多数のエビネにこの病気が蔓延していた。さらに木に吊り下げられた*Den. Formidible*にも黄色退色斑紋が発生している株を発見した(Plate II-4)。この*Den. Formidible*の病株からも同じくOFVが検出された。このような発生状況から、なにかの媒介者によって伝搬された可能性が想像された。

1995年に発刊されたICTV第6次報告Virus Taxonomy<sup>38)</sup>には、ラウドウイルス科に5属が設定され、そのうち植物ウイルスは2属であるが、他に未分類で所属が明らかにされていない短桿菌型あるいは弾丸型のウイルスが61種記載されている。ラン科植物では未分類の同様の粒子形態をなすウイルスとしてcolmanara mosaic virus<sup>6)</sup>、*Dendrobium leaf streak virus*<sup>31)</sup>、*Laelia red leafspot virus*<sup>30)</sup>、orchid fleck virus<sup>3,4,20)</sup>、*Phalaenopsis chlorotic spot virus*<sup>38)</sup> (*Phalaenopsis necrosis virus*<sup>24,25)</sup>) および未同定ウイルス<sup>16,36,37)</sup>が報告されている。これら未分類のウイルスは病原性や理化学的性質を集約的に詳しく調べる必要があり、それによってはじめてこれらウイルスが別種か同種または系統かを明確にできるものと思われる、このことは分類上急がねばならない今後の重要な課題である。

## 摘 要

1988年以来、山口・宮崎・鹿児島県で発生が認められたエビネ類(エビネ、タカネ、ヒゼン、サツマ、ツルラン、オナガエビネ)の葉に淡緑色~黄色斑紋のモザイク病の病原ウイルスを調べたところ、orchid fleck virusと同定された。本ウイルスは11科46種(54品種)の植

物に汁液接種を行ったところ、エビネに感染して原株と同様の病斑を生じた他、*C. quinoa*, フダンソウに全身感染し、*C. amaranticolor*, *C. murale*, ホウレンソウ, ツルナ, ササゲ, タバコ, *N. clevelandii*, *N. glutinosa*, *N. rustica* の5科12種の植物に局部感染が認められた。本ウイルスの粒子はDN法試料で被膜のない弾丸型であり、またときに短桿菌型も存在したが、その大きさは長さが約105~125 nm, 幅約45~50 nmであった。病葉の粗汁液を用いた希釈限度は $10^{-3}$ ~ $10^{-4}$ , 不活化温度は45~50°C, 保存限度は1~2時間であった。ウイルスの汁液接種には、接種源植物として*C. quinoa* またはツルナがよく、病葉磨砕後夏期では7分以内、冬期では15分以内の病汁液を供試すると接種検定により結果が得られることが認められた。純化ウイルスを家兎に注射して、微量法で力値512倍の抗血清が得られた。本抗血清は*Cymbidium* から分離されたOFV・Cy-50とよく反応し、寒天ゲル内二重拡散法ではCal. 92-7, Cal. 94-16およびOFV・Cy-50の沈降帯が完全に融合した。ウイルスの構造蛋白質の分子量は約55 Kであった。病細胞の超薄切片の電顕観察像には、核内に viroplasm が認められ、その内部や周辺に層状に集塊あるいは散在した粒子が認められた。さらに核内や細胞質内に膜に包まれた車軸状の粒子集塊も見られた。OFVによる本病をエビネ類黄色斑紋モザイク病とした。

キーワード：エビネ類 (*Calanthe*), ランえそ斑紋ウイルス, エビネ黄色斑紋モザイク病

## 引用文献

1. Ali, S., Lawson, R. H. and Ishii, M. 1974. A bacilliform virus in white-streaked *Dendrobium phalaenopsis* flowers. Amer. Orchid Soc., Bull. 43: 529-533.
2. Begtrup, J. 1972. Structure of a bacilliform virus in *Dendrobium* as revealed by negative staining. Phytopath. Z. 75: 268-273.
3. Chang, M. U., Arai, K., Doi, Y. and Yora, K. 1976. Morphology and intracellular appearance of orchid fleck virus. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 42: 156-167.
4. Chang, M. U., Chun, H. H., Baek, D. H. and Chung, J. D. 1991. Studies on the viruses in orchids in Korea. 1. Bean yellow mosaic virus, cucumber mosaic virus, cymbidium mild mosaic virus and cymbidium mosaic virus. Korean J. Plant Pathol. 7: 108-117.
5. Chang, M. U., Chun, H. H., 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.
6. Doi, Y., Chang, M. U. and Yora, K. 1977. Orchid fleck virus CMI/AAB. Descriptions of Plant Viruses. No. 183: pp 3.
7. Düvel, D. und Peters, K. R. 1971. Virusähnliche Partikel in *Dendrobium antennatum*. Gartenwelt 3: 52-54.
8. 井上成信. 1977. ラン科植物 *Colmanara* から分離された短桿形ウイルスについて, 日植病学報 43: 373-374.
9. 井上成信. 1984. 花卉植物のウイルス, 遺伝“特別号ウイルス”, 38: 201-214.
10. 井上成信. 1986. エビネに発生するウイルスの基礎知識, 自然と野性ラン 5: 71-79.

11. 井上成信・井上忠男, 1972. *Calanthe* (キエビネ) から分離されたインゲン黄斑モザイクウイルス類似のウイルスについて, 日植病報 38: 211.
12. 井上成信・前田孚憲, 1991. エビネから検出されたウイルス, (花卉植物ウイルスの命名並びに分類基準の確立), 平成元~2年度 科研(総合研究A)「植物ウイルス・ウイロイドの命名および分類基準の確立に関する総合研究」研究成果報告 157-159.
13. Inouye, N., Maeda, T. and Mitsuhata, K. 1988. A strain of clover yellow vein virus isolated from *Calanthe* sp. *Acta Horticulturae* 234: 61-68.
14. 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.
15. 井上成信・松本純一・前田孚憲・光畑興二・近藤秀樹・田原望武, 1994. エビネの新病害, 黄色斑紋モザイク病の病原ウイルス, 日植病報 60: 785, (講演要旨).
16. 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.
17. 近藤秀樹・前田孚憲・井上成信, 1995. 東洋ランから分離されたランえそ斑紋ウイルス (OFV) の細胞内存在様式, 日植病報 61: 526, (講演要旨).
18. 近藤秀樹・前田孚憲・光畑興二・井上成信, 1994. 東洋ランから分離された orchid fleck virus の理化学的ならびに血清学的性質, 日植病報 60: 785, (講演要旨).
19. 近藤秀樹・前田孚憲・I Wayan Gara・井上成信, 1995. Orchid fleck virus (OFV) の構造タンパク質, 日植病報 61: 275, (講演要旨).
20. 近藤秀樹・松本純一・前田孚憲・井上成信, 1995. 東洋ラン (*Cymbidium* sp.) から分離された orchid fleck virus について, 岡大資生研報 3: 151-161.
21. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227: 680-685.
22. Lawson, R. H. and Brannigan, M. 1986. Virus diseases of orchids. Pages 2-49 in *Handbook of Orchid Pests and Diseases* (revised edition). American Orchid Society, West Palm Beach, Florida.
23. Lawson, R. H. and Ali, S. 1975. Ultrastructure of white-streaked *Dendrobium Phalaenopsis* orchid flower infected with a rhabdovirus. *J. Ultrastruct. Res.* 53: 345-353.
24. Lesemann, D. and Begtrup, J. 1971. Elektronenmikroskopischer Nachweis eines bazilliformen virus in *Phalaenopsis*. *Phytopath. Z.* 71: 257-269.
25. Lesemann, D. and Doraiswamy, S. 1975. Bullet-shaped virus-like particles in chlorotic and necrotic leaf lesions of orchids. *Phytopath. Z.* 83: 27-39.
26. Lesemann, D. und Doraiswamy, S. 1975. Nachweis und elektronenmikroskopische Charakterisierung von "langen" bullet-förmigen Viruspartikeln in kultivierten Orchideen. *Phytopath. Z.* 84: 201-214.
27. 松本純一・前田孚憲・井上成信, 1992. エビネから分離された bean yellow mosaic virus の諸性質, 日植病報 59: 65, (講演要旨).
28. 松本純一・前田孚憲・井上成信, 1995. エビネ (*Calanthe* sp.) から分離された odontoglossum ringspot virus, 岡大資生研報 3: 163-174.
29. 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: 333-334.
30. Peters, K. R. 1977. Orchid viruses: a new rhabdovirus in *Laelia* red leafspot. *J. Ultrastruct. Res.* 58:

166-171.

31. Petzold, H. 1971. Der electronenmikroskopische Nachweis eines bacilliformen virus an blattflecken-kranken Dendrobien. *Phytopath. Z.* 70 : 43-52.
32. 田中秀平・西井博行・亀谷満朗・Sommariva, P. 1994. タイの施設栽培ランにおけるウイルス病の発生状況. *日植病報* 60 : 400 (講演要旨).
33. 占部慎治・前田孚憲・井上成信. 1992. エビネから分離された cymbidium mosaic virus (CyMV) について. *日植病報* 59 : 64-65. (講演要旨).
34. 山本孝猪・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.
35. 山下修一・長井雄治・山本 浩・日比忠明. 1994. エビネ (*Calanthe* sp.) のえそ輪紋症状から検出されたランえそ斑紋ウイルス (orchid fleck virus, OFV) について. *日植病報* 60 : 753. (講演要旨).
36. Zettler, F. W., Ko, N. -J., Wisler, G. C., Elliott, M. S. and Wong, S. -M. 1990. Viruses of orchids and their control. *Plant Dis.* 74 : 621-626.
37. Zettler, F. W., Wisler, G. C., Elliott, M. S. and Ko, N. -J. 1987. Some new, potentially significant viruses of orchids and their probable means of transmission. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 56 : 1044-1051.
38. Murphy, F. A. *et al.* (eds). 1995. *Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Springer-Verlag, Wien New York. (Arch. Virology Supplement 10 : pp 586).

### Explanation of plates

#### Plate I.

- 1-2. Symptoms of naturally infected *Calanthe Satsuma* (1), and *Cal. triplicata* (2) (Cal. 92-7 isolate) with orchid fleck virus (OFV), showing yellowish fleck and mosaic.
- 3-4. Symptoms of naturally infected *Calanthe Hizen* (Cal. 94-16) with OFV, showing yellowish fleck (3) and mild light-green fleck (4).
- 5, 6. Symptoms of *Calanthe* hybrids (*Cal. sieboldii* × *Cal. Kozu*) inoculated with Cal. 92-7 (5) and Cal. 94-16 (6) of OFV.
7. Local lesions of OFV (Cal. 92-7) in inoculated leaves of *Tetragonia expansa*, 21 days after inoculation. (Sign showing quantity of local lesions; A: +++, B: ++, C: +)
8. Local lesions of OFV (Cal. 92-7) in inoculated leaf of *Chenopodium quinoa*.
9. Systemic symptoms of OFV (Cal. 92-7) in *C. quinoa*.
10. Local lesions of OFV (Cy-50) in inoculated leaves of *Tetragonia expansa*.

#### Plate II.

1. Local lesions of OFV (Cal. 92-7) in inoculated leaf of *Beta vulgaris* var. *Cicla*.
2. Local lesions of OFV (Cal. 92-7) in inoculated leaf of *Nicotiana clevelandii*.
3. Systemic symptoms of OFV (Cy-50) in *Cymbidium* leaf.
4. Symptoms of naturally infected *Den. Formidible*, found at the same place as OFV were occurring in *Calanthe*.
5. Particles of OFV (Cal. 92-7) in leaf-dip preparation from naturally infected *Calanthe* leaf stained with 2% sodium phosphotungstate, pH 7.0, after prefixation with 1% osmium tetroxide. Bar represents 100 nm.
- 6-8. Purified OFV particles stained with uranyl acetate. Bars represent 100 nm.
9. Gel diffusion serological test. Relationship among OFV-isolates of Cal. 92-7 (7), Cal. 94-16 (16) and Cy-50 (50). H: Healthy sap. AS: OFV (Cal. 94-16)-antiserum.

#### Plate III.

1. Sucrose density-gradient column after centrifugation of OFV (Cal. 94-16)
2. SDS-PAGE of viral protein of orchid fleck virus. Lane M: Marker proteins, lane O: OFV (Cal. 94-16).
- 3-6. Electron micrographs of ultrathin sections of the mesophyll cells of plants infected with OFV. Bars represent 500 nm.
  - 3: *C. quinoa* infected with Cal. 94-16 isolate.
  - 4-6: *T. expansa* infected with Cal. 92-7 isolate.  
C: cytoplasm, CW: cell wall, arrows: spoked wheel-like structure with virus particles.  
V: virus particles, VP: viroplasm, N: nucleus.

Plate I.

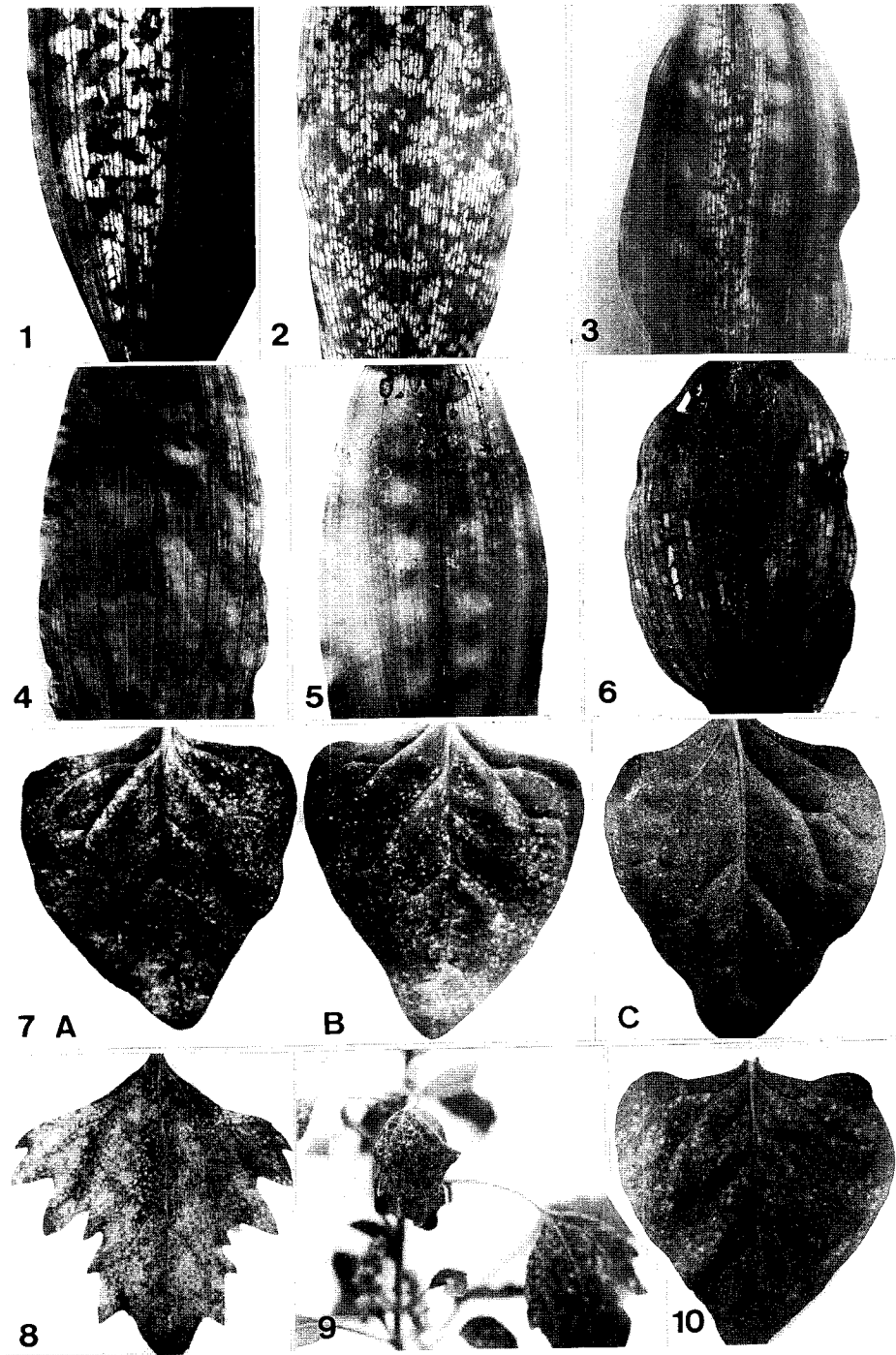


Plate II.

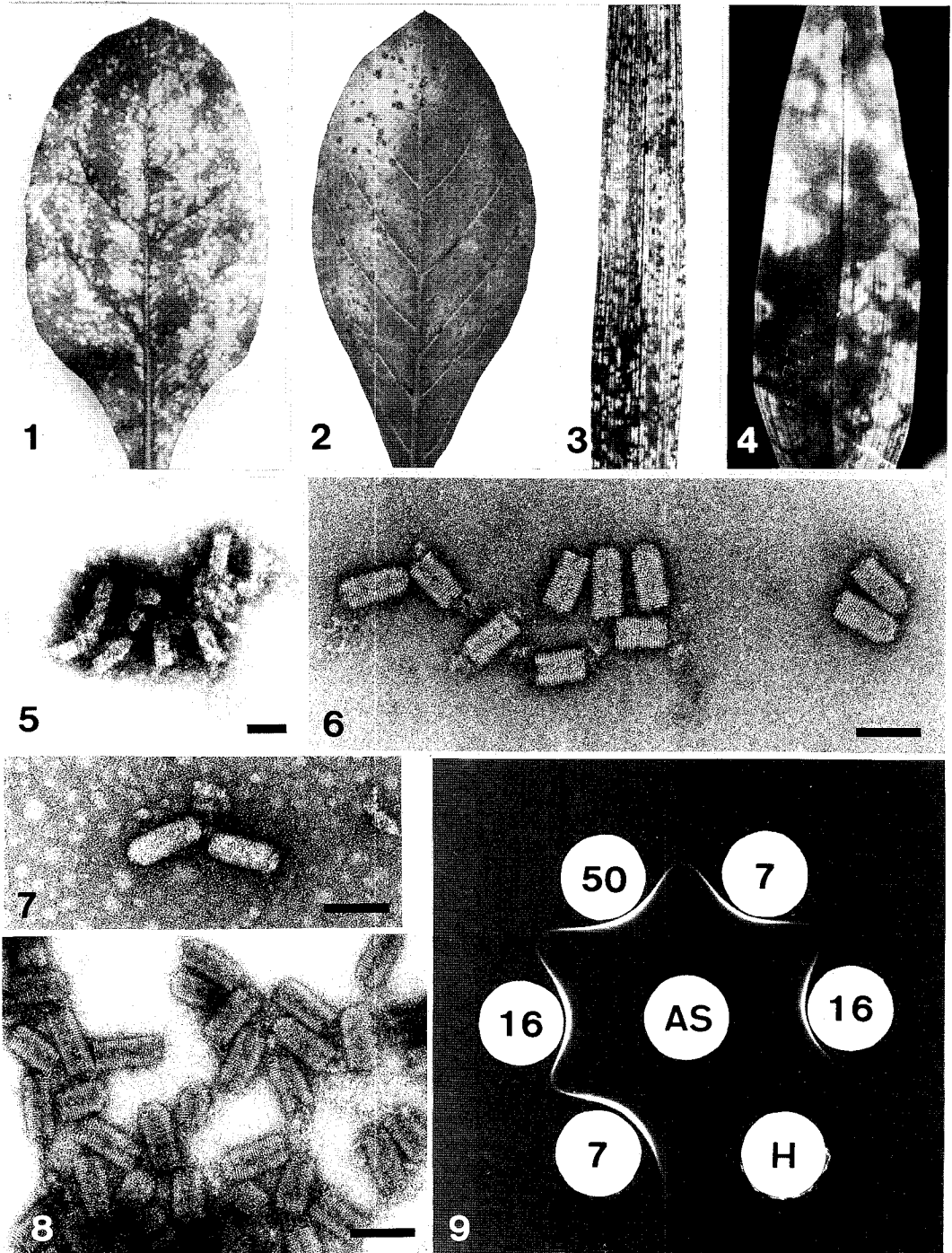




Plate III.

