

日本でインゲンより分離されたPeanut Stunt Virusについて

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者	土崎, 常男
巻/号	39巻1号
掲載ページ	p. 67-72
発行年月	1973年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



日本でインゲンより分離された Peanut Stunt Virus について

土 崎 常 男*

Tsuneo TSUCHIZAKI*: Peanut Stunt Virus Isolated from Beans in Japan

Abstract

Four kinds of viruses were isolated from beans showing mosaic symptoms collected from Fukushima prefecture. These were cucumber mosaic virus (CMV), bean common mosaic virus, bean yellow mosaic virus, and a virus previously unreported in Japan. The virus was transmitted by sap and by at least two species of aphids. Host range of the virus was moderately wide, mostly in Leguminosae and Solanaceae. In bean or tobacco juice, infectivity was lost by heating at 55-65°C for 10 minutes, and by aging at 15°C for 5 to 10 days, and by diluting at 10^3 - 10^4 . The virus was purified after clarification of homogenized tobacco leaf tissues with chloroform, by differential centrifugation followed by sucrose density-gradient centrifugation. Electron microscopic examination of purified preparation showed spherical particles of 25-30 nm in diameter. In the serological test, this virus was closely related with peanut stunt virus (PSV), and was distantly related to chrysanthemum mild mottle virus. Antiserum to the virus did not react with Y strain of CMV and two strains of broad bean wilt virus. From these results, this virus was identified as a strain of PSV and I proposed the name of PSV-J for Japanese isolate. This is the first report in occurrence of PSV in other countries than America.

(Received July 22, 1972)

I. 緒 言

1970年夏、福島県農試のインゲン圃場において、葉にモザイクおよび奇形の症状を示す株が多数認められたため、同農試の依頼により、その病原ウイルスの検定を試みた。送付されて来た6本のインゲン病株を、検定植物への汁液接種および dip 法による電顕観察により病原ウイルスの検出を行なったところ、すでに日本でインゲンに発生が報告されている cucumber mosaic virus^{4,5)} (CMV), bean common mosaic virus^{1,4,5)} (BCMV), bean yellow mosaic virus⁵⁾ (BYMV) のほか、日本では未報告と思われるウイルスが検出された。そこでこのウイルスにつき、各種の性質を試験したところ、最近米国でナンキンマメおよびインゲンより検出された peanut stunt virus^{9,10)} (PSV) に相当することが明らかとなった。PSV は Troutman (1966)¹⁰⁾ により米国のバージニア州で、ナ

ンキンマメよりはじめて検出されたウイルスで、その後ワシントン州でインゲンからも検出されている⁹⁾。PSV は径 26-30 nm の球形で、比較的寄主範囲が広くとくにマメ科、ナス科の多くの植物に感染し、汁液およびアブラムシで伝搬される。Mink (1969)⁶⁾ はこのウイルスが CMV と多くの共通する性質を持っているところから、CMV, tomato aspermy virus (TAV), Rawson の chrysanthemum virus (CV-L) との間の血清学的関係を調べ、PSV は TAV, CV-L との間では関係があるが、CMV との間では CMV の strain により関係がある場合とない場合があるとし、この結果から、PSV は CMV group に入るウイルスであるが、現在のところ CMV の 1 strain としてではなく、独立のウイルスとして扱いたいと報告している。

本実験の概要はすでに講演要旨で報告したが¹¹⁾、本論文はその詳細な結果を述べたものである。本実験を行なうにあたり、材料を提供された福島県農試の茨

* 植物ウイルス研究所 Institute for Plant Virus Research, Chiba, Japan.

木忠雄氏, また抗血清を提供された米国のノースカロライナ州立大学の T. T. Hebert 氏, 植物ウイルス研究所の栃原比呂志氏, ウィルスを提供された同研究所の岩木満朗氏, さらに有益な御助言を賜った同研究所の斎藤康夫氏に深謝申し上げる次第である。

II. 実験材料および方法

実験に使用したインゲンの病株は福島県農試より送付された6株(A~F)で, 葉の病徴はA, Bがモザイクと奇形, C~Fがモザイクのみを示していた。

汁液接種は0.1Mりん酸緩衝液(pH 7.0)を用い, カーボラダム法で行なった。伝搬試験では, 約1時間絶食後のアブラムシを, 病植物体上で数分間吸汁させ, 健全植物に1本あたり5-20頭ずつ移し1晩置いた。

抗血清はウサギに純化ウイルスを静脈, 筋肉注射をそれぞれ2回行なって作製した。血清学的関係を試験したウイルスはCMVのY strainとbroad bean wilt virus (BBWV)の2系統とである。BBWVの2系統は岡山大学井上忠男氏がエンドウから, 植物ウイルス研究所の岩木満朗氏がスイセンからそれぞれ分離したもので, とともに岩木満朗氏より分譲を受けた。一方抗血清は抗CMV-Y血清, 抗chrysanthemum mild mottle virus (CMMV)血清, 抗PSV血清で, 抗CMMV血清は植物ウイルス研究所の栃原比呂志氏, 抗PSV血清はノースカロライナ州立大学のT. T. Hebert氏よりそれぞれ譲り受けたものである。血清学的試験は, 寒天ゲル沈降法と補体結合反応法で行

なった。

III. 結 果

1. 罹病インゲン6株よりのウイルス検出

送付された罹病インゲン6株の葉を検定植物へ汁液接種するとともに, 接種後発病した植物につき, dip法による電顕観察を行なった。検定植物の選定ならびにウイルスの種類の評定規準は井上(1968)³⁾に基づいた。その結果を第1表に示した。

その結果, 従来日本でインゲンより検出されているCMV, BCMV, BYMVのほか, 未知ウイルスが検出された。すなわち, 病葉を固定することなくdirect negative染色法で電顕観察すると, 径25-30nmの球形粒子が認められる場合があった。その中でとくにE株を接種源としたとき, インゲン, ササゲなどは感染するが, トウモロコシ, カボチャには感染が起らなかった。これはCMV以外の球形ウイルスがE株に存在していることを示すものと考えられた。

そこでこのウイルス(以下本ウイルスと称す)につき各種の性質を調べた。

2. 本ウイルスの諸性質

(1) 寄主範囲および病徴

E株を接種し発病したタバコ(BCMVはタバコに感染しないので, 本ウイルスのみが感染していると考えられる)を接種源として, 各種の植物に汁液接種を行なった。感染が起った植物とその病徴を第2表に示した。

この結果は本ウイルスがマメ科, ナス科の多くの植

第1表 インゲンのモザイク株からのウイルス検出

検 定 植 物	分 離 株					
	A	B	C	D	E	F
インゲン(茶 白)	S ^{a)} ひも, 球 ^{b)}	S ひも	S ひも, 球	S ひも	S ひも, 球	S ひも
ササゲ(ブラックアイ)	L, S ひも, 球	L, S ひも	L, S ひも, 球	L, S ひも	L, S ひも, 球	L, S
エンドウ(30日網さや)	S 球	S なし	S ひも	S なし	S 球	S なし
タバコ(ブライトイエロー)	S	S	S	S	S	S
トウモロコシ(ゴールデンク ロスバンタム)	S	S	S	S	—	S
カボチャ(錦 甘 露)	S なし	S なし	S なし	S なし	—	S なし
判 定 ^{c)}	CMV	CMV	CMV	CMV	BCMV	CMV
	BCMV	BCMV	BYMV	BCMV	Unknown V.	BCMV
	Unknown V.		Unknown V.			

a) S: 全身感染, L: 局部感染.

b) 全身感染葉の dip 法による電顕観察で認められる粒子.

c) CMV: cucumber mosaic virus, BCMV: bean common mosaic virus, BYMV: bean yellow mosaic virus, Unknown V.: 未知ウイルス.

物に感染を起すとともに、その他数科の植物にも感染し、その寄主範囲がかなり広いことを示している。主な植物での病徴を詳記すると、インゲンでは接種した10品種(茶白、トップクropp、大手亡、黒江戸川、

第2表 インゲン (E株) から分離されたウイルスの寄主範囲

供試植物	病徴 ^{a)}	
	接種葉	上葉
マメ科		
インゲン	CS	M, Mal, St
エンドウ		M
ササゲ	CS, NS	M, CS, Mal, CCS
ソラマメ	CS	CCS
ダイズ		M
ナンキンマメ		M
ルーピン		M
ホワイトクローバー		M
アルサイクローバー		M
ラジノクローバー		M
レンゲ		M
サブタラニアクローバー		M
ナス科		
タバコ	CS, CRS	M
<i>Nicotiana glutinosa</i>		CS, M
<i>N. clevelandii</i>		M
トマト		M, Mal
トウガラシ		M
<i>Datura stramonium</i>		M
ベチュニヤ		M
アカザ科		
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	NS	—
<i>C. quinoa</i>	CS, NS	CS
ホウレンソウ		CS, N
ゴマ科		
ゴマ	NS	—
ツルナ科		
ツルナ	NS	—
ヒユ科		
センニチコウ	NS	M, RS

a) CS: chlorotic spot, CCS: concentric chlorotic spot, M: mosaic, Mal: malformation, N: necrosis, NS: necrotic spot, RS: ring spot, St: stunt, CRS: chlorotic ring spot, —: no infection

江戸川つるなし、マントル、大丸うずら、金時、マスターピース、つる有尺5寸)すべてに感染し、いずれも上葉にモザイク、縮葉、奇形が認められたが(図版A)、接種葉の退緑斑点は不鮮明であった。しかし初生葉が十分展開していない若いインゲンに汁液接種すると、接種葉が枯死落葉後、上葉も枯死し、株は萎凋状態となり、遂には株全体も枯死してしまった。ササゲでは接種した3品種(黒種三尺、赤種三尺、ブラックアイ)とも接種葉に同心円状の退緑斑点、上葉にモザイク、退緑斑点が現われた(図版C)。ナンキンマメの病徴は軽く、上葉にモザイクを現わしたが、株が萎縮することはなかった(図版B)、タバコでは接種葉に退緑斑点、または退緑輪点が、上葉にモザイクが現われた(図版D)。

感染しなかった植物としては、アズキ、アルファルファ、ナス、ビート、フダンソウ、カボチャ、キュウリ、マスクメロン、カブ、ダイコン、カンラン、コマツナ、レタス、ヒャクニチソウ、トウモロコシであった。

(2) アブラムシ伝搬および粗汁液中の不活化限界

モモアカアブラムシ (*Myzus persicae*)、マメアブラムシ (*Aphis craccivora*) を用いて、非永続的な伝搬を試みた。その結果を第3表に示した。

この結果は本ウイルスは伝搬率が低いけれども、モモアカアブラムシ、マメアブラムシによって非永続的に伝搬されることを示している。

罹病したインゲンまたはタバコ葉を10倍量の0.1Mりん酸緩衝液ですりつぶした汁液につき不活化限界を試験したところ、耐熱性(10分)55-65°C、耐希釈性1,000-10,000倍、耐保存在(15°C)5-10日であった。

(3) 純化およびウイルス粒子の形態

本ウイルスを接種したタバコ(ブライトイエロー)の接種葉または上葉を凍結後、生体重と等量の0.5Mくえん酸緩衝液(0.1%チオグリコール酸を含む、pH 6.5)を加え、ホモジナイザーで攪拌し、ガーゼでしぼった後、1/4量のクロロホルムを加えて15分間攪拌した。その液を2,500 rpm 15分、10,000 rpm 15分と2回低速遠心分離してその上清を得た。この上清を29,000 rpm 150分超遠心分離し、沈澱を0.01Mくえん酸緩衝液(pH 6.5)で溶かした後、10,000 rpmで10分低速遠心分離し、その上清を得た。この分画遠心を3回くり返した後、最後の沈澱を0.005Mくえん酸緩衝液(0.001M, Na-EDTAを含む、pH 6.5)に溶かした。このウイルスを含む液を10-50%しよ糖密度勾配(ウイルスを溶かしたと同じ液中)により遠心分離(24,000 rpm, 4時間)を行なった。一般にウイルスは

第3表 インゲン (E株) から分離されたウイルスのアブラムシ伝搬

供試アブラムシ	1植物あたりの頭数	獲得吸汁植物	接種吸汁植物	発病数/接種数
モモアカアブラムシ	5—6	サ サ ゲ	サ サ ゲ	3/29
	10—20	ホワイト・クローバー	ホーレンソウ	1/8
マメアブラムシ	5—6	インゲン	インゲン	0/13
	10—20	ホワイト・クローバー	サ サ ゲ	2/7

単一のバンドに集まるが、ときに2-5のバンドが現われることがあった。この場合、各バンドとも感染性が認められた。また第1回のしよ糖密度勾配遠心後認められた単一のバンドから得られたウイルスを、同じ条件でさらにしよ糖密度勾配遠心を行なうとしばしば数本のバンドが現われた。得られた純化ウイルスは高い病原性を示し、これを電顕観察すると、径25-30nmの球形粒子が多数観察された(図版E)。しかし純化ウイルスを固定せず、りんタングステン酸で染色し、電顕観察すると、しばしば崩壊しかけた粒子の存在が認められた。

(4) 血清学的試験

純化した本ウイルスをウサギに注射して作製した抗血清の力価は補体結合反応で320倍であったが、健全植物とも80倍まで反応したので、実験には健全植物で吸収した抗血清を使用した。この吸収抗血清とBBMVの2系統の間で血清学的関係を補体結合反応で調べたところ、本ウイルスとは320倍まで反応したのに対し、BBMV 2系統、健全植物とは反応しなかった。つぎに本ウイルスとCMV-Y、CMMV、PSVの間の血清学的関係をこれら3ウイルスの抗血清を用いて、寒天ゲル拡散法により試験した。その結果、本ウイルスとPSV、CMMVの抗血清の間で、バンドが形成された。しかしバンドの位置、状態などから、本ウイルスはPSVと血清学的に密接な関係にあるが、CMMVとは血清学的にやや遠い関係にあることが示された。一方本ウイルスと抗CMV-Y血清の間ではバンドは形成されず、またCMV-Yと本ウイルスの抗血清の間でもバンドは形成されず、本ウイルスとCMV-Yとは血清学的に関係がないことが示された。

IV. 論 議

わが国においてインゲンより検出されるウイルスとして、BCMV、BYMV、CMVはすでに報告されているが^{1,4,5)}、本実験においてもこれら3種ウイルスが種

々の組合せで混合感染していることが明らかとなり、これら3種ウイルスが日本で広く発生していることが示された。

本実験において、新たに検出されたウイルスは寄主範囲がかなり広く、径25-30nmの球形で、アブラムシで非永続的に伝搬されることから、当初BBMVではないかと考えたが、BBMVが本ウイルス抗血清と反応しないことから否定され、日本では未報告のウイルスであろうと考えられた。最近米国でナンキンマメおよびインゲンより検出されたPSVは、寄主範囲、病徴、その他の点で本ウイルスと共通する点を多く持っていたので、ノースカロライナ州立大学のT. T. Hebert氏より抗PSV血清をゆずり受け試験したところ、本ウイルスがPSVと血清学的に関係があることが明らかとなった。本ウイルスと米国で報告されたPSV 2系統^{2,8)}とを比較してみると、寄主範囲では本ウイルスがアルファルフア、キュウリ、ハクニチソウに感染しない点は異なるけれども、多くのマメ科、ナス科の植物に感染し、病徴もよく類似している点でよく一致している。ただし、ナンキンマメでは本ウイルスによる病徴はPSVに比べ軽いようである。粗汁液中の不活化限界は耐熱性、耐希釈性はほぼ一致しているが、耐保存性は本ウイルスが5-10日(15C)であるのに対しPSVは4-48時間(25C)と異なっている。しかしこれは保存温度が異なっていたために出た差と考えられる。アブラムシ伝染性、粒子の形態も本ウイルスとPSVとは一致している。さらに本ウイルスがPSVと血清学的に密接な関係にあること、またPSVとTAV、CV-L、CMVの間でみられる血清学的関係⁶⁾と、本ウイルスとCMV、CMMV(CV-Lと同一のウイルスと考えられる)の間で見られる血清学的関係とよく一致していることなどから、本ウイルスはPSVと同一ウイルスと考えられ、本ウイルスをPSVと同一とした。米国で報告されたPSVにはバージニア州で検出されたPSV-Eと、ワシントン州で検出された

PSV-Wの2系統があるが、わが国で検出されたPSVは寄主範囲その他の点で米国の2系統と異なるところがあり、新しい系統と考えられる。以上のことから本ウイルスをPSVのJ系統(PSV-J)と呼ぶことにしたい。

本ウイルスの純化のさい、しよ糖密度勾配遠心後、数本のバンドが形成されることがあった。こうした現象はPSV-Wでも報告されており、Minkら(1969)⁹⁾はこれはウイルスの崩壊の結果起ったのであろうと推察した。しかし本実験でバンドが数本生ずる場合、余分のバンドは、1本のバンドのみ生ずる場合の位置よりも、しよ糖密度の高い部分に現われ、しかも病原性が認められた。このことは余分のバンドがウイルスの集合の結果生じたものであることを示していると考えられるが、何故このような集合が起るのかは明らかでない。

日本で検出されたPSVはナンキンマメで軽い病徴しか現わさなかった。これに対し、米国のPSVはナンキンマメにはげしい病徴を現わし、圃場での被害もいちじるしいと報告されている¹⁰⁾。この差異は使用したナンキンマメの品種の違いによるものか、あるいはPSV-Jがナンキンマメに軽い病徴しか現わさない系統であるためなのかは明らかでないが、このことは今後実験を行なわねばならない問題であると考えられる。

1971年夏、千葉県、茨城県からモザイク病徴を示すナンキンマメ数株を採集し、ウイルスの種類を調べたが、PSVは検出されなかった。このように現在のところ日本でPSVはあまり広く発生していないと推察されるが、PSVは寄主範囲が広く、アブラムシで伝搬されるウイルスであるところから、今後十分に警戒する必要がある。

V. 摘 要

1. 福島県農試圃場より採集したインゲンモザイク病6株を用い、検定植物への汁液接種、dip法による電顕観察により病原ウイルスを調べたところ cucumber mosaic virus (CMV), bean common mosaic virus, bean yellow mosaic virus の3種ウイルスと、日本で未報告と思われるウイルス1種が検出された。

2. 本ウイルスの寄主範囲はかなり広く、マメ科植物12種、ナス科植物7種、アカザ科植物3種、ゴマ科、ツルナ科、ヒユ科の植物各1種に感染が認められた。

3. 本ウイルスは低率ではあるがモモアブラムシ、マメアブラムシで非永続的に伝搬された。また粗汁液中の不活限界は耐熱性(10分)55-65°C、耐希釈性1,000-10,000倍、耐保存性(15°C)5-10日であった。

4. 本ウイルスはクロロホルム処理、分画遠心分離、しよ糖密度勾配遠心分離により純化され、純化ウイルスを電顕観察すると径25-30nmの球形粒子が認められた。

5. 本ウイルスは peanut stunt virus (PSV) と血清学的に密接な関係にあることが認められたが、chrysanthemum mild mottle virus とは血清学的にやや遠い関係にあることが示された。一方本ウイルスは、broad bean wilt virus, CMV-Y strain とは血清学的な関係は認められなかった。

6. 以上の結果から本ウイルスをPSVと同定し、PSVのJ系統(PSV-J)と呼ぶことにした。PSVが米国以外の国で検出されたのはこれが最初である。

引用文献

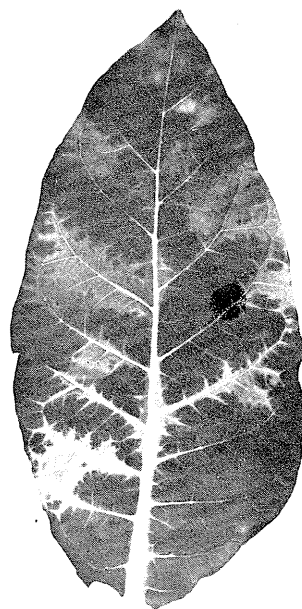
- 1) 赤井重恭・吉谷啓作(1961). 日植病報 26: 227 (講要).
- 2) Echandi, E. and Hebert, T. T. (1971) Phytopathology 61: 328-330.
- 3) 井上忠男(1968). 農学研究 52: 11-29.
- 4) 井上忠男・井上成信(1963). 文部省科研総合研究昭37成績資料: 23-45.
- 5) 井上忠男・井上成信(1966). 同上 昭39, 40年成績資料: 30-41.
- 6) Mink, G. I. (1969). Phytopathology 59: 1889-1893.
- 7) Mink, G. I., Hebert, T. T. and Silbernagel, M. J. (1967). *Ibid.* 57: 1400.
- 8) Mink, G. I., Silbernagel, M. J. and Saksena, K. N. (1969). *Ibid.* 59: 1625-1631.
- 9) Silbernagel, M. J., Mink, G. I. and Saksena, K. N. (1966). *Ibid.* 56: 901 (Abstr.).
- 10) Troutman, J. L. (1966). *Ibid.* 56: 587 (Abstr.).
- 11) 土崎常男(1971). 日植病報 37: 401 (講要).

図 版 説 明

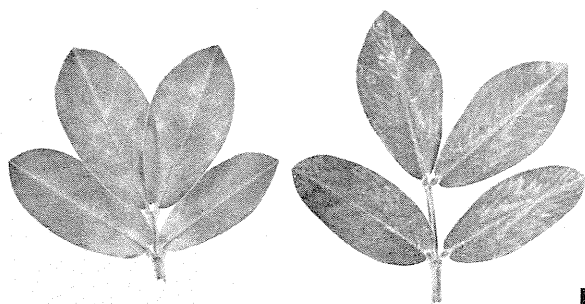
A, B, C, D) インゲン (E 株) から分離されたウイルスによる各種植物の病徴, A: インゲン (トップクローブ), B: ナンキンマメ (在来種, 品種名不明), C: ササゲ (ブラックアイ), D: タバコ (ブライトイエロー), E: インゲン (E 株) から分離されたウイルスの純化試料 (225,000 倍)



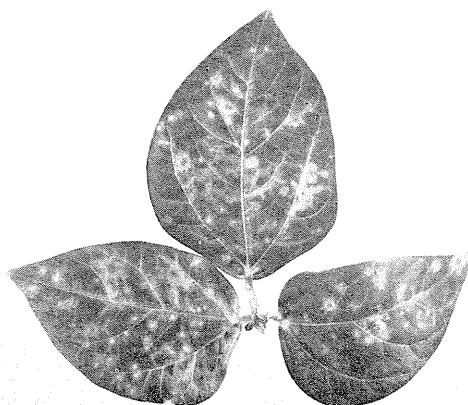
A



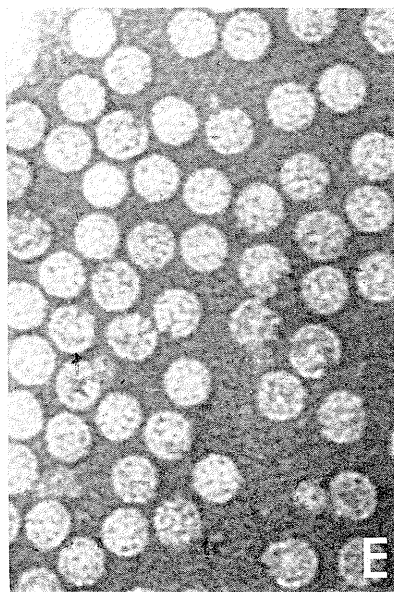
D



B



C



E