

ダイコンに見出された種子伝染性球形ウイルス(radish yellow edge 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
著者名	夏秋,知英 山下,修一 土居,養二 與良,清
発行元	日本植物病理學會
巻/号	45巻3号
巻号補足	
掲載ページ	p. 313-320
発行年月	1979年7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



ダイコンに見出された種子伝染性小球形ウイルス ——Radish Yellow Edge Virus——について*

夏秋知英**・山下修一**・土居養二**・與良 清**

Tomohide NATSUAKI**, Shuichi YAMASHITA**, Yoji DOI**, and Kiyoshi YORA** :
Radish Yellow Edge Virus, a Seed-Borne Small Spherical Virus Newly
Recognized in Japanese Radish (*Raphanus sativus* L.)*

Abstract

Radish yellow edge virus (RYEV), a seed-borne small spherical virus, was newly recognized in young seedlings of Japanese radish (*Raphanus sativus* L.). RYEV particles of about 30 nm in diameter were detected in negatively stained dip preparations from infected seedlings, but a few in number. RYEV was transmitted through seed, and the virus was detected in 80-100 % of young seedlings from seeds of all the six cultivars examined. RYEV-infected seedlings usually showed no symptoms, but sometimes showed mild symptoms of yellow edge and dwarfing in their lower leaves. The virus was not transmitted by sap inoculation to Japanese radish, turnip, cabbage, tobacco (cv. Samsun), *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, and *Gomphrena globosa*. The virus was purified by chloroform clarification and three cycles of differential centrifugation followed by sucrose density gradient centrifugation. The purified preparation showed an UV absorption spectrum characteristic of a nucleoprotein. The sedimentation coefficient of the virus measured by analytical centrifugation was about 118S. In thin sections of RYEV-infected leaves, virus particles were observed only in cells of vascular bundles. Inclusion bodies (viroplasms) containing RYEV particles were observed in the cytoplasm of phloem parenchyma cells. Virus particles were observed inside and outside the viroplasms. Phloem necrosis could not be found. Small aggregates of virus particles were also observed in the cytoplasm and plasmodesmata of phloem parenchyma cells, and in xylem vessels. Virus particles similar to those of RYEV were detected in apparently healthy seedlings from seeds of carrot, spinach, leaf beet (*Beta vulgaris* var. *cicla*) and table beet (*B. vulgaris* var. *esculenta* cv. Detroit Dark Red). (Received February 5, 1979)

緒 言

ダイコン (品種: みの早生) の市販種子を播種し、発芽後移植して育てた幼苗に葉縁が黄化し僅かに萎縮する yellow edge 症状を示すものがいくつか認められ、DN法で調べたところ電顕的にウイルス粒子と判定される径 30nm の小球形粒子が見出された。この小球形ウイルスはみの早生種以外のダイコン品種から、また各地の圃場で葉縁が黄化したダイコンあるいは外観健全なダイコンからも検出され、ダイコンが高率に

潜在感染している未記載の種子伝染性ウイルスであることが判明した。これと類似する小球形ウイルスはニンジン、ホウレンソウ、フダンソウ、ビートなどの市販種子から育てた外観健全な幼苗でも見出された⁸⁾。本報告ではこれらの小球形ウイルスのうち、ダイコンで検出されたものについて述べる。

材料と方法

供試したダイコンの市販種子は千葉、埼玉、茨城、長野の各地の種苗店で購入した。また葉縁黄化株は千

* 本研究の概要は日本植物病理学会大会 (昭和53年4月3日) で発表した。

** 東京大学農学部 Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

葉、長野、愛知の諸県で採集した。播種および育苗は10～25℃のガラス室内で行った。ウイルスの種子伝染を確認するため、種子は滅菌したパーミキュライト上で発芽させた。汁液接種は病葉に0.1Mリン酸緩衝液(pH7.2)を加えて摩砕し、カーボランダム法によって行った。アブラムシ伝搬には健全タバコ葉上で飼育したモモアカアブラムシを用いた。ウイルス粒子の検出および接種試験結果の判定にはDN法²⁾を用いた。感染組織の電顕観察には、病葉組織切片を5%グルタルアルデヒドで前固定してから1%オスミック酸で固定し、エタノールシリーズで脱水後エポキシ樹脂に包埋して薄切し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色した試料を用いた。なお、超薄切片の作製にはLKB Ultratome, 電顕観察には日立HU-12, JEM-100Sを用いた。

実験結果

DN法によるウイルス粒子の検出

数カ所の種苗店から購入したダイコン(みの早生種)の種子を播種し、その幼苗を移植して育てたところ、葉縁が黄化し僅かに萎縮する症状がしばしば認められた(Fig. 4)。萎縮症状はその後次第に軽くなり正常になる例が多かったが、葉縁黄化症状は長い間残ることが多かった。これら幼苗の葉縁黄化葉についてDN法でウイルス粒子の検出を試みたところ、いずれの試料からもcapsid構造を示し電顕的にウイルス粒子と判定される径約30nmの球形粒子が僅かながら検出された(Fig. 5)。この粒子のempty shellとみ

られる粒子もときに見出されたが、ほとんどがfull particleであった。粒子はPTA染色で崩壊せず、比較的安定した性質をもつことが示唆された。滅菌したパーミキュライトの上で種子を発芽させ、生じた幼苗の子葉の中肋をDN法で調べる方法で、この球形粒子はみの早生種のほか5品種(大蔵、花知らず時なし、青首宮重、二年子、信州地大根)の市販種子から育てた幼苗から約80%の高率で検出された(Table 1)。また粒子が検出された苗の中には葉縁黄化症状を示すものも認められた。その場合、葉縁黄化症状を示す個体のほうが外観正常な個体よりも検出される粒子の量は明らかに多かった。

以上の結果から、ここで見出された球形粒子はウイルスであり、植物体内の粒子の量は僅かであるがダイコンで高率に種子伝染し、感染個体はしばしば葉縁黄化症状を示すが、潜在感染することも少なくないと結論された。

接種試験

以上の知見からこの球形ウイルスは種子伝染するものと判定されたが、次にこのウイルスの伝染性について調べた。すなわち、粒子が検出されたダイコン幼苗の摩砕液を用い、ダイコン(みの早生種)、*Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, タバコ(サムスン種)、ササゲ、センニチコウ、ツルナ、カンラン、コカブなどに汁液接種を試みた。また後で述べる純化ウイルス試料を用いて上記の植物に汁液接種を試みた。感染の有無は病徴観察とDN法による粒子の検出とを併用して判定した。しかし、いずれの方法によっても感染は全く認められなかった。このことから、この球形ウイルスは汁液伝染が困難な点でNepovirus群など既知の種子伝染性球形ウイルスのいずれにも該当しないようである。

次にアブラムシによる伝搬を調べた。モモアカアブラムシ5頭を粒子が検出されたダイコン幼苗(みの早生種)上で10日間飼育し、これを粒子が検出されなかったダイコン幼苗(品種:大阪四十日)に移し7日間飼育したのちこれを除き、それから7日後にそのダイコン苗の上葉についてウイルス粒子の有無を調べた。その結果、供試した5個体中3個体で粒子が検出され、そのうち1個体

Table 1. Detection of the small spherical virus in young seedlings from seeds of six radish cultivars

Cultivar	Number of seedlings examined	Number of seedlings infected
Minowase-1*	20	20
Minowase-2	5	4
Minowase-3	5	5
Minowase-4	5	5
Ohkura	5	3
Hanashirazu-Tokinashi	5	5
Aokubi-Miyashige-1*	6	4
Aokubi-Miyashige-2	6	4
Ninengo	6	4
Shinshu-Ji	5	5
Total	68	59

* Numbers show seeds from different nurseries.

には葉縁黄化症状も認められ、この小球形ウイルスのアブラムシ伝搬性が示唆された。

後で述べるように、この小球形ウイルスは感染組織で維管束に局在して認められるが、このことから上記の接種試験の結果は納得できるように思われた。しかしアブラムシ伝搬性については結論を下すまでにさらに詳細な試験が必要である。

ウイルス粒子の存在様式

感染組織内でのこの小球形ウイルスの存在を確かめるため、ダイコン幼苗の葉縁黄化葉の超薄切片を電顕観察した。供試葉では細胞の壊死はあまり認められなかったが、電顕的にみてDN法の結果と対応する小球形ウイルス粒子が、節部柔細胞の細胞質に形成された電子密度のやや高い均質な球状の封入体、すなわち viroplasm の内部と表面に多数認められ、その周囲にしばしば核酸様の繊維を含む vesicle の増生が観察された。またウイルス粒子の小集塊が節部柔細胞の細胞質、原形質連絡糸、ならびに導管内に認められた (Fig. 6-15)。このような所見は葉肉細胞や表皮細胞では認められず、本ウイルスは維管束局在性であると結論された。これに類似する viroplasm をつくる維管束局在性の小球形ウイルスにはイネわい化ウイルス³⁾、rice tungro virus⁴⁾、anthriscus yellows virus⁷⁾ などがあるが、本ウイルスとそれらのウイルスとは増殖様式が類似していることが示唆された。

本ウイルスの野外での発生状況

本ウイルス感染組織に特異的に観察される電顕所見を手がかりとして、本ウイルスの野外での発生状況を

調べた。その結果、千葉県八千代市、長野県伊那市、大町市、愛知県渥美町などで採集した葉縁黄化症状を示すダイコン葉 (Fig. 16) の切片試料でこの特異的 viroplasm が見出され、またDN法によって径30 nmの小球形粒子が検出された。またこれらの地域で採集したモザイク症状を示すダイコンに、本ウイルスと turnip mosaic virus (TuMV) とに重複感染しているものが認められた (Fig. 17)。すなわち、本ウイルスはかなり広い地域に発生しているものと考えられる。

ウイルス粒子の純化

本ウイルスの性状を調べるため、Fig. 1 に示す方法でその純化を試みた。その結果、本ウイルスは蔗糖密度勾配遠心で単一のバンドに純化された (Fig. 2)。

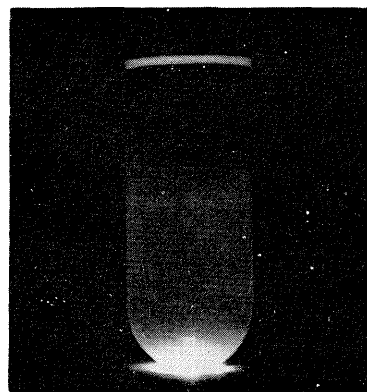


Fig. 2 A band of RYEV particles formed by sucrose density gradient centrifugation.

Frozen Leaves

homogenized in 1.5 volume of 0.05 M phosphate buffer (pH 7.6) containing 0.1 % thioglycolic acid

Expressed Sap

added chloroform in a concentration of 20 %

Differential Centrifugation (3 cycles)

centrifuged at 8,000 rpm for 10 min and at 40,000 rpm for 90 min

Sucrose Density Gradient Centrifugation (2 cycles)

final suspension was layered onto 10-40 % linear sucrose density gradients in the same buffer and centrifuged at 24,000 rpm for 150 min

Purified Virus Preparation

Fig. 1 Procedure for purification of RYEV.

収量は低かったが、この純化試料中には電顕観察で capsid 構造をもつ径30nmの小球形粒子が多数認められた (Fig. 18)。さらに分析用超遠心による沈降パターンから、この試料がほぼ単一成分の粒子を含むこと、その沈降係数が約118Sであることが認められた (Fig. 3)。また、この純化試料は max. 260nm, min. 241nm の波長の核タンパクの紫外線吸収スペクトルを示した。すなわち、この小球形粒子がウイルスであることが理化学的性状からも確認された。

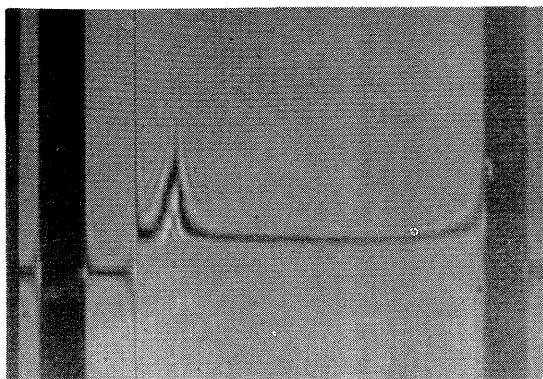


Fig. 3 Schlieren pattern of sedimentation of purified RYEV, 3 min after reaching a speed of 32,000 rpm.

考 察

本研究の結果から、ダイコンで新たに見出された小球形ウイルスは、伝染性、寄主範囲などについて今後解明すべき点が多く残されているが、明らかにダイコンを侵す種子伝染性のウイルスであり、ダイコンにおいて普通は潜在感染するが、ときに葉縁黄化の病徴を示すと考えられた。本ウイルスは明らかに未記載ウイルスであるので、ダイコン葉縁黄化ウイルス (radish yellow edge virus: RYEV) と命名したい。

わが国ではダイコンを侵すウイルスとして、TuMV^{5,11)}, cucumber mosaic virus^{1,11)}, cauliflower mosaic virus¹¹⁾, radish mosaic virus¹²⁾, broad bean wilt virus¹³⁾, beet western yellows virus¹⁰⁾ が報告されており、また種子伝染性小球形ウイルスとしては Nepovirus 群などのウイルスが報告されている⁹⁾。しかし RYEV はこれらのいずれにも該当しない。著者らは本研究に引続いて各種作物の市販種子について調べたところ、RYEV と同様に高率に種子伝染する小球形ウイルス (径28-30nm) がニンジン (品種：時なし五寸、鮮紅三寸、ひとくち、ピッコロ、国分鮮紅

三寸)、ホウレンソウ (品種：日本大葉、西洋大葉、平安日吉丸)、フダンソウ、食用ビート (品種：デトロイトダークレッド) に潜在感染していることを見出した⁸⁾。これらのウイルスと RYEV との関係については現在検討中である。最近、英国で報告された beet cryptic virus⁶⁾ はビートに潜在感染する種子伝染性小球形ウイルスであり、著者らがフダンソウや食用ビートで見出した小球形ウイルスと酷似しており、同じものではないかと考えられる。

摘 要

1. ダイコン (みの早生種) の市販種子を播種したところ、発芽後移植した幼苗に yellow edge 症状が観察され、DN法で径30nmの小球形ウイルスが少数見出された。
2. 本ウイルスはみの早生種以外に5品種のダイコンの市販種子から育てた幼苗からも検出され、これらの品種でも高率に種子伝染しているものと考えられた。
3. 本ウイルスは汁液接種できなかったが、モモアカアブラムシによる伝搬が示唆された。
4. 病葉切片では、篩部柔細胞の細胞質中に形成された viroplasm の内外にウイルス粒子が多数認められた。また viroplasm の周囲にしばしば特殊な小胞 (vesicle) の増生が認められた。さらにウイルス粒子の小集塊が原形質連絡系や導管内に認められ、本ウイルスの維管束局在性が示された。
5. 超薄切片法とDN法で本ウイルスの野外における発生状況を調べたところ、本ウイルスがかなり広い地域に発生していることが判明した。
6. 本ウイルスは分画遠心と蔗糖密度勾配遠心により純化され、沈降係数は約118Sと測定された。
7. 以上の所見から、本ウイルスはダイコンを侵す未記載ウイルスであると考え、ダイコン葉縁黄化ウイルス (radish yellow edge virus) と命名した。

引 用 文 献

- 1) 土居養二・小室康雄・與良 清・明日山秀文 (1951). 日植病報 15: 173-174.
- 2) 土居養二・鳥山重光・與良 清・明日山秀文 (1969). 同上 35: 180-187.
- 3) 土居養二・山下修一・楠木 学・荒井 啓・與良 清 (1975). 同上 41: 228-231.
- 4) Favali, M. A., Pellegrini, M., and Bassi, M. (1975). Virology 66: 502-507.
- 5) 石山信一・三沢正生 (1943). 日植病報 12: 116-130.
- 6) Kassanis, B., White, R. E., and Woods, R. D. (1977). Phytopath. Z. 90: 350-360.
- 7) Murrant, A.F. and Roberts, I. M. (1977). Ann. appl. Biol. 85: 403-406.
- 8) 夏秋知英・山下修一・土居養二・與良 清 (1978). 日植病報 45: 84 (講要)

- 9) Neegaard, P. (1977). Seed Pathology. Macmillan Press Ltd., London and Basingstoke, pp. 71-117.
- 10) 大木 理・土居養二・與良 清 (1977). 日植病報 43 : 373 (講要).
- 11) 栃原比呂志 (1965). 農技研報 C18 : 1-52.
- 12) 栃原比呂志 (1968). 日植病報 34 : 129-136.
- 13) 與良 清・土居養二・明日山秀文 (1969). 同上 35 : 122-123 (講要).

Explanation of Plates

Plate I

- Fig. 4 Yellow edge and dwarfing symptoms on leaves of a RYEV-infected seedling of Japanese radish (*Raphanus sativus* cv. Minowase).
- Fig. 5 RYEV particles in dip preparation. $\times 70,000$
- Fig. 6 Phloem tissue of RYEV-infected leaf, showing inclusion bodies (viroplasms) and vesicles in parenchyma cells. $\times 3,500$
- Fig. 7 Large viroplasm in phloem parenchyma cell. $\times 18,000$
Insert shows a part of the viroplasm containing RYEV particles. $\times 33,000$

Plate II

- Fig. 8 Same as Fig. 7. $\times 16,000$
- Fig. 9 Viroplasms in phloem parenchyma cell. $\times 12,000$
- Fig. 10 Host cell wall depressed by viroplasm. $\times 30,000$
- Fig. 11 RYEV particles passing through plasmodesmata. $\times 35,000$
- Fig. 12 Viroplasm and vesicles in phloem parenchyma cell. $\times 27,000$

Plate III

- Fig. 13 Same as Fig. 12. $\times 18,000$
- Fig. 14 RYEV particles on the cell wall of xylem vessel. $\times 4,000$
- Fig. 15 High magnification of a part in Fig. 14. $\times 35,000$
- Fig. 16 Yellow edge symptom on lower leaf of radish collected in field.
- Fig. 17 Phloem cell of radish leaf infected with both RYEV and turnip mosaic virus, showing viroplasms and cytoplasmic inclusions. $\times 30,000$
- Fig. 18 RYEV particles in purified preparation. $\times 200,000$

Abbreviations

Vi : viroplasm ; Ve : vesicle ; CW : cell wall ; IN : cytoplasmic inclusion body by turnip mosaic virus

Plate I

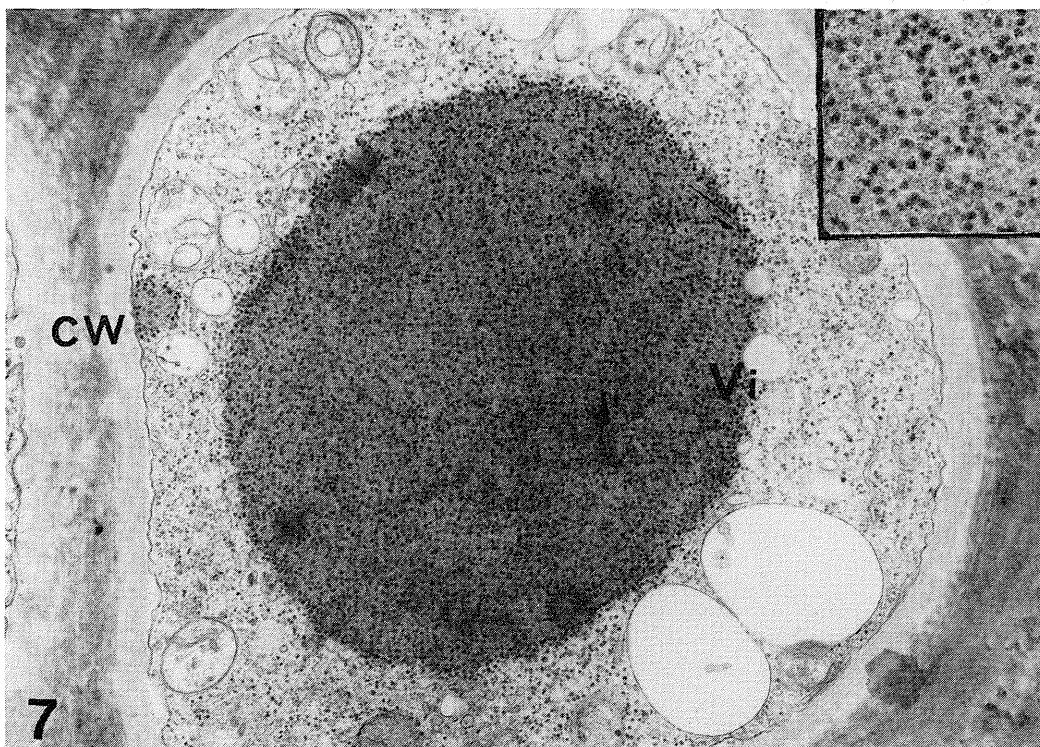
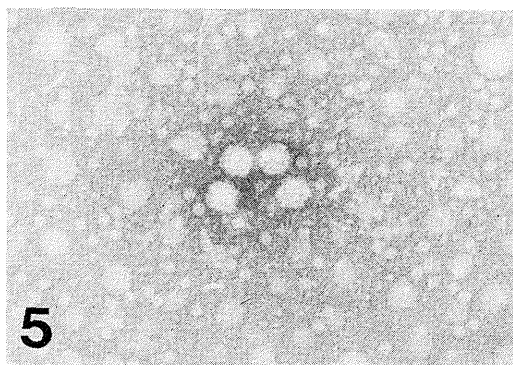
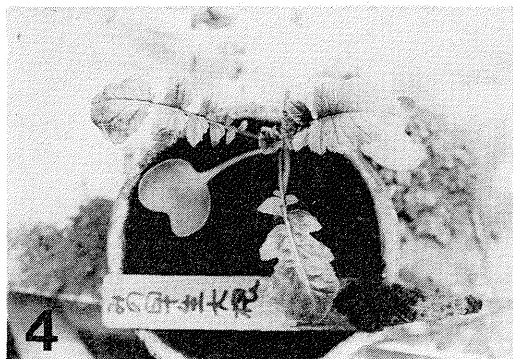


Plate II

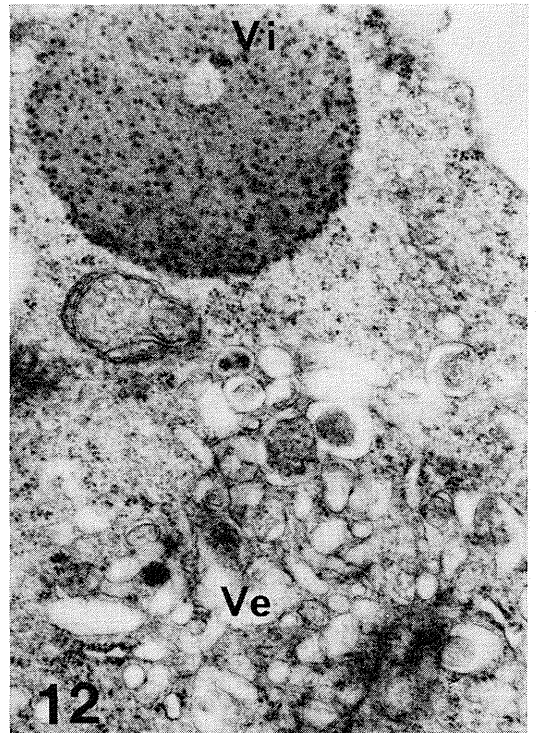
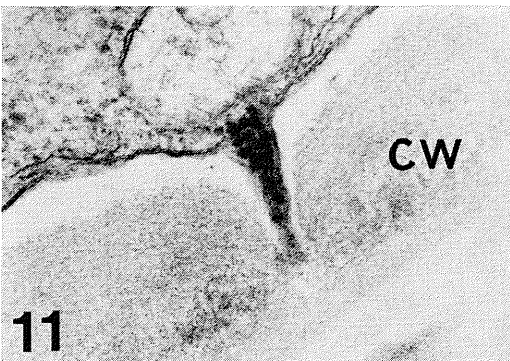
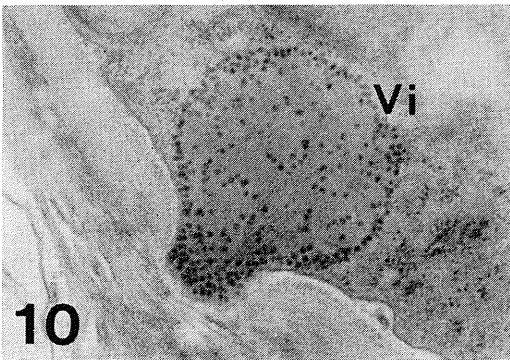
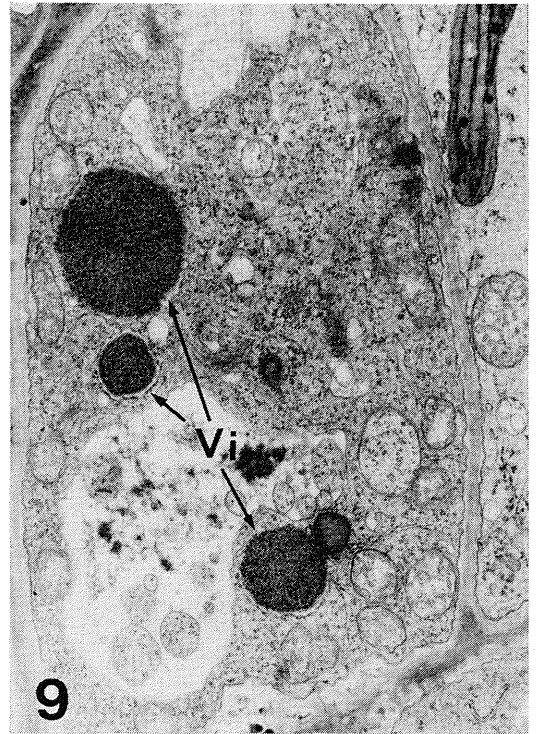
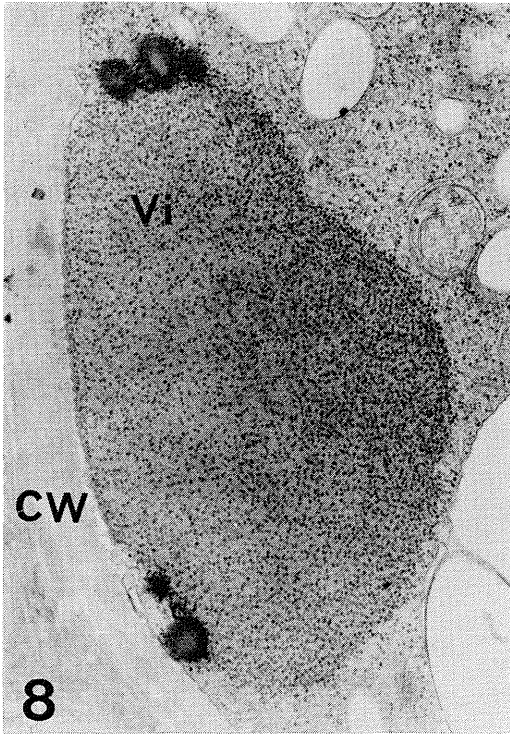


Plate III

