

東洋ラン・Cymbidium属植物から分離されたOdontoglossum ringspot Tobamovirus(ORSV)について

誌名	岡山大学資源生物科学研究所報告
ISSN	21864918
著者名	近藤,秀樹 前田,孚憲 井上,成信
発行元	岡山大学資源生物科学研究所
巻/号	1巻1号
巻号補足	
掲載ページ	p. 21-34
発行年月	1992年3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



東洋ラン・*Cymbidium* 属植物から分離された *Odontoglossum* ringspot Tobamovirus (ORSV) について

近藤 秀樹・前田 孚憲・井上 成信

緒 言

Odontoglossum ringspot virus (ORSV) は Jensen&Gold (1951) によって *Odontoglossum grande* にえそ輪紋を生じた病原ウイルスに命名されたが, *Cattleya* や *Cymbidium* を中心として広くラン科植物に発生していることが認められている^{6,13)}。また, わが国では井上 (1966, 1983) が *Cymbidium* から ORSV を分離し報告しており, 日本でも多種属のラン科植物に ORSV の発生が非常に多いことが認められている⁸⁻¹³⁾。

シュンラン, カンラン, スルガランなどを含む東洋ラン・*Cymbidium* 属では, かつて葉にモザイク斑を生じた斑紋を“金砂”と呼び非常に珍重されていたが, 井上(1984, 1990)はこの斑紋が ORSV の感染によって生じたものであることを記載した。さらに, 井上・呂 (1983) は台湾においても ORSV が東洋ランに発生していることを報告している。これらの報告にはウイルスの診断と病徴の記載にとどまり, その病原ウイルスの諸性質についての詳細な記述がなされていなかった。

本報告では, 葉に軽いモザイク症状を示す東洋ランと呼ばれているスルガラン (*Cymbidium ensifolium*: 蕙蘭) およびカンラン (*Cymb. kanran*) から検出されたウイルスについて病原学的研究を行ったところ, ORSV と同定されたので, これらの諸性質についての研究結果を報告するとともに, この東洋ラン分離株と既報の洋ランから分離されている ORSV^{10,11)} および同グループの tobacco mosaic virus (TMV) との比較研究を行ったので, それらの結果についても報告する。

本研究を行うに当たり実験に御協力戴いた光畑興二技官に謝意を表する。

実験材料及び方法

供試ウイルス 本実験には, 葉に軽いモザイク症状を示すスルガラン (*Cymbidium ensifolium*: 蕙蘭, Plate I, 1) から分離されたウイルスを“蕙蘭分離株”とし, カンラン (*Cymb. kanran*: 山吹, Plate I, 2) から分離されたウイルスを“寒蘭分離株”として

供試した。また諸性質の比較を行うために当研究室に保存されている ORSV の Cy-1 分離株¹⁰⁾ および Cy-46 分離株¹¹⁾ と、同グループの TMV 普通系 (TMV-OM) および TMV トマト系 (TMV-L) を用いた。

汁液接種 汁液接種は病葉を0.1Mりん酸緩衝液 (pH 7.0) 中で摩砕し、カーボランダムを用いる常法により行った。宿主範囲の汁液接種にはツルナの病葉を接種源とした。また感染の有無を確認するための戻し接種試験には、*C. quinoa* を用いた。さらに必要に応じて電顕観察によりウイルス粒子の有無を確かめた。

粗汁液中での安定性 ウイルスの罹病葉粗汁液中での安定性は、ツルナの病葉に0.01Mりん酸緩衝液 (pH 7.0) を加えて摩砕し、ガーゼで搾汁したものを用いた。検定植物にはツルナを用いた。

ウイルスの純化 ウイルスの純化は以下に述べる方法で行った。凍結した *C. quinoa* の病葉に2倍量の0.1Mりん酸緩衝液 (0.2% チオグリコール酸加用, pH 7.0) を加えて摩砕し、ガーゼで搾汁したのち、3,000×g, 15分間遠心分離した。水層をとり1% Triton X-100, 0.1M塩化ナトリウムおよび4% PEG 6000を加え、60分間攪拌した後、7,000×g, 15分間遠心分離し、得られた沈澱を0.01Mりん酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁した。同様にして PEG による沈澱と0.1Mりん酸緩衝液による懸濁を再び繰り返したのち、7,000×g, 20分間と、65,000×g, 90分間の分画遠心分離を2回繰り返した。2回目の高速遠心で得られた沈澱を0.01Mりん酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し10~40%のしょ糖密度勾配に重層して、78,000×g, 120分間遠心分離した (Beckman 50.2 Ti)。ウイルス分画を集め0.01Mりん酸緩衝液 (pH 7.0) で希釈して、65,000×g, 90分間遠心分離し、ここで得られた沈澱を0.01Mりん酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し純化ウイルス標品とした。

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) ウイルス外被蛋白質の電気泳動は Laemmli¹⁸⁾ の方法に準じて行った。

血清反応試験 各種血清反応試験には本研究室保存の ORSV (Cy-1) および TMV-OM のそれぞれに対する抗血清を用いた。免疫電顕はメッシュ上で抗血清と抗原を30℃で15分間反応させて電顕観察を行った。寒天ゲル内二重拡散法は、1%アジ化ナトリウムを含む0.05%トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) に濃度0.8%の寒天 (Agar Noble, Difco Lab.) を添加溶解したものを用いた。DAS-ELISA は、Clark and Adams⁴⁾ の方法に準じて行った。本法に使用した IgG は健全葉蛋白質のアセトン粉末であらかじめ吸収を行った Cy-1 抗血清より調整し、conjugate はグルタルアルデヒドを用いた常法でアルカリフォスファターゼ標識を行った。

電顕観察 ウイルス粒子は2%リンタングステン酸 (pH 7.0) を用いた DN 法により作製した試料および純化標品につき電顕 (日立 HU-12, H-7000B) 観察した。感染植物の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、エタノール脱水後エポン樹脂に包埋して LKB Ultratome で超薄切片にしたものを、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色して電顕観察を行った。

実 験 結 果

1. 原株での病徴

スルガラン (*Cymbidium* ; 蕙蘭) : 葉に軽いモザイク症状が認められた (Plate I, 1). 花卉における病徴の確認は行っていない.

カンラン (*Cymbidium* ; 山吹) : 葉に退色斑や軽いモザイク症状を示し (Plate I, 2). 花卉には激しい color breaking 症状が認められた.

2. 宿主範囲と病徴

1) 各種感染植物における病徴

ツルナの接種葉を接種源として12科62種の植物に汁液接種を行ったところ、蕙蘭分離株では Table 1 に示したように、2科4種に全身感染し、5科14種の植物では接種葉にのみ感染し、全身感染はしなかった. そのうちタバコ (Samsun), ペチュニア, ケイトウ, ホウレンソウ, シュンギク, ヒマワリ, ヒャクニチソウの4科7種には接種葉に無病徴感染した. その他タバコ (White Burley), トマトなど8科44種には感染しなかった.

蕙蘭分離株が感染した植物における主な病徴は以下のとおりである.

Cattleya : 全身感染したが病徴の確認は行っていない.

Cymbidium : 全身感染して接種後数ヶ月で葉に軽いモザイク斑を形成した (Plate I, 3). 花卉における病徴の確認は行っていない.

タバコ (Samsun NN) : 接種葉に接種後10~14日で0.5~1.0mm大のえそ斑点をごく少数生じた. 全身感染はしなかった.

タバコ (Xanthi nc) : 接種葉に接種後5~7日で1.0~3.0mm大のえそ輪点を生じ、その後えそ斑点となった (Plate I, 5). 病斑の大きさは接種葉位により大きな差が認められた. 全身感染はしなかった.

Nicotiana benthamiana : 接種葉には病徴が見れなかった. 無病徴全身感染したが、ときに軽いモザイクを生じるものもあった.

N. clevelandii : 接種葉には病徴が見れなかった. 全身感染して接種後10~14日で上葉に軽いモザイクや奇形を生じた.

N. glutinosa : 接種葉に接種後5~7日で1mm大のえそ斑点を生じた. 全身感染はしなかった.

ツルナ : 接種葉に接種後3~4日で灰白色のえそ斑点やえそ輪点を生じ、その後二重や三重のえそ輪点になるものもあった (Plate I, 6). 全身感染はしなかった.

Chenopodium amaranticolor, *C. quinoa*, *C. murale* : 接種葉には退色を伴う灰白色のえそ斑点やえそ輪点を生じた. 全身感染はしなかった.

2) 東洋ランと洋ランからの ORSV 4 分離株の寄生性の比較

東洋ランからの2分離株と洋ラン・*Cymbidium* 属からの Cy-1 と Cy-46分離株の寄生性の比較を Table 2 に示した. *N. benthamiana*, *N. clevelandii* では、蕙蘭分離株および Cy-46分離株が無病徴全身感染または軽いモザイク症状を示したのに対し、寒蘭分離株および Cy-1 分離株は全身葉に明瞭なモザイク症状や奇形を生じた (Plate I, 4). タバコ (Samsun NN) では、蕙蘭分離株はごく少数の局部病斑を形成したが、寒蘭分離株は非感染であった. また、ペチュニアでは蕙蘭分離株と Cy-46分離株が接種葉に無病徴感染したが、寒蘭分離株と Cy-1 分離株は局部病斑を形成した. Cy-46分離株は他の3分離株と異なり *Datura stramonium* に局部感染し、ヒャクニチソウでは全身感染した. Cy-1 分

Table 1. Host range of ORSV isolated from *Cymbidium ensifolium* "Keiran"

<i>Systemic susceptible plant species.</i>	
Orchidaceae	<i>Cattleya</i> , <i>Cymbidium</i>
Solanaceae	<i>Nicotiana benthamiana</i> *, <i>N. clevelandii</i>
<i>Local susceptible plant species.</i>	
Solanaceae	<i>Nicotiana tabacum</i> (cvs. Samsun*, Samsun NN, Xanthi, Xanthi nc), <i>N. glutinosa</i> , <i>Petunia hybrida</i> *
Aizoaceae	<i>Tetragonia expansa</i>
Amaranthaceae	<i>Gomophrena globosa</i> , <i>Celosia argentea</i> *
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium amaranticolor</i> , <i>C. murale</i> , <i>C. quinoa</i> , <i>Spinacea oleracea</i> *, <i>Beta vulgaris</i>
Compositae	<i>Chrysanthemum coronarium</i> *, <i>Helianthus annuus</i> *, <i>Zinnia elegans</i> *
<i>Non-susceptible plant species.</i>	
Solanaceae	<i>Nicotiana tabacum</i> (cv. White Burley), <i>N. rustica</i> , <i>N. sanderae</i> , <i>Capsicum annuum</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Hyoscyamus niger</i> , <i>Physalis floridana</i> , <i>Solanum melongena</i> , <i>Datura stramonium</i>
Caryophyllaceae	<i>Dianthus barbatus</i>
Compositae	<i>Lactuca sativa</i> , <i>Callistephus chinensis</i>
Cruciferae	<i>Brassica rapa</i> , <i>B. campestris</i> , <i>B. sativa</i> , <i>Raphanus sativas</i>
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i> (cvs. Nanshin, Shougoin), <i>C. melo</i> , <i>Cucurbita moschata</i> , <i>C. pepo</i> , <i>C. maxima</i> , <i>Citrullus lanatus</i> , <i>Lagenaria siceraria</i>
Leguminosae	<i>Glycine max</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> (cvs. Kintoki, Top Crop), <i>Pisum sativum</i> (cvs. Kinusaya, France), <i>Vicia faba</i> , <i>Vigna sesquipedalis</i> , <i>V. angularis</i> , <i>V. radiata</i> , <i>Cassia occidentalis</i> , <i>Trifolium incarnatum</i> , <i>T. pratense</i> , <i>T. repens</i>
Gramineae	<i>Zea mays</i>
Pedaliaceae	<i>Sesamum indicum</i> (cvs. Shiro, Kuro)

* : Latent infection

Table 2. Comparison of host reaction of ORSV isolated from *Cymbidium* orchids

Plant species	Keiran		Cy-46		Kanran		Cy-1	
	I *	S	I	S	I	S	I	S
<i>Nicotiana tabacum</i>								
cv. Samsun NN	WNS**	—	WNS	—	—	—	—	—
cv. Xanthi nc	NS, NRS	—	NS, NRS	—	+	—	NS, NRS	—
<i>N. benthamiana</i>	+	+	+	+	+	Mo	+	Mo
<i>N. clevelandii</i>	+	mo	+	mo	+	Mo	+	Mo
<i>N. glutinosa</i>	NS	—	NS	—	NS	—	NS	—
<i>Datura stramonium</i>	—	—	CS, NS	—	—	—	—	—
<i>Petunia hybrida</i>	+	—	+	—	NS	—	NS	—
<i>C. amaranticolor</i>	WNS, WRS	—	WNS, WRS	—	WNS, WRS	—	+	—
<i>Spinacia oleracea</i>	+	—	+	—	+	—	CS	—
<i>Celosia argentea</i>	+	—	+	—	+	—	WRS	—
<i>Zinnia elegans</i>	+	—	+	+	CS	—	CS	—

* I ; inoculated leaves, S ; non-inoculated tip leaves.

** Symptoms represent : Mo : mosaic, mo : mild mosaic, CS : chlorotic spots, NS : necrotic spots, NRS : necrotic ring spots, WNS : white necrotic spots, WRS : white necrotic ring spot, + : symptomless, — : not infected.

分離株はハウレンソウやケイトウに局部病斑を形成したが、他の3分離株は無病徴であった。

3. 粗汁液中での安定性

病葉粗汁液中での蕙蘭分離株の安定性は、不活化温度が90～95℃(10分)、耐希釈性は 10^{-6} ～ 10^{-7} 、保存限度は試験継続中(現在4ヶ月陽性)である。寒蘭分離株もほぼ同じ安定性を示した。

4. ウイルス粒子の形態

C. quinoa の病葉からの DN 法による試料の電顕観察により、ウイルス粒子の形態を調べた。ウイルス粒子の長さは2,000分の1mmの grating の幅を基準として測定し、その長さの分布を Fig. 1 に示した。蕙蘭および寒蘭分離株の粒子は、長さ約320nm、幅約18nmの棒状粒子であった。比較のために測定した Cy-1, Cy-46分離株および TMV-OM の粒子の長さは約300nmであった。

5. 純化ウイルスの性質

部分純化ウイルス標品を DN 法により電顕観察をしたところ、多くの棒状粒子が観察され、ほとんど夾雑物は認められなかった (Plate II, 3)。

紫外部吸収：蕙蘭分離株の純化ウイルス標品の紫外線吸収曲線は248nmおよび268nmにそれぞれ極小および極大吸収があり、 $A_{\max}/\min=1.09$, $A_{260}/280=1.14$ であった。

ウイルス外被蛋白質の分子量：SDS-PAGE によりウイルス外被蛋白質の分子量を測定した結果、東洋ランからの2分離株では約18,900dalton (d) であった (Plate II, 5)。比較のため調べた Cy-46分離株の分子量も同様に約18,900dであったが、Cy-1分離株の分子量は約19,200dで、前者よりも約300dほど大きかった。

6. 血清反応

免疫電顕法 Cy-1分離株に対する抗血清に対し蕙蘭分離株は反応し、粒子の周りには血清反応によるハローが認められたが、比較のために試料中に混合した TMV-OM とは反応しなかった (Plate II, 1)。また TMV-OM 抗血清では homologous な組合せで反応したが、蕙蘭分離株とは反応しなかった (Plate II, 2)。

寒天ゲル内拡散法 Cy-1分離株の抗血清を用いた寒天ゲル内二重拡散法試験では、蕙蘭分離株と寒蘭分離株は Cy-1 および Cy-46分離株の間に融合する一本の沈降帯を形成し、spur が形成されず、TMV-OM および TMV-L では沈降帯が形成されなかった (Plate I, 7)。TMV-OM の抗血清を用いた場合は、homologous でシャープな沈降帯が形成され、ORSV の4分離株と TMV-L では不明瞭な短い沈降帯が形成され、spur が形成された (Plate I, 8)。

DAS-ELISA Cy-1抗血清の IgG とその conjugate を用いた DAS-ELISA では、蕙蘭および寒蘭分離株は Cy-1分離株と同程度に反応し、Cy-46分離株は若干反応値が低く TMV-OM はほとんど反応が認められなかった (Fig. 2)。ORSV の検出試験では、純化ウイルスを用いた場合は 10^{-4} mg/ml まで検出が可能であった。

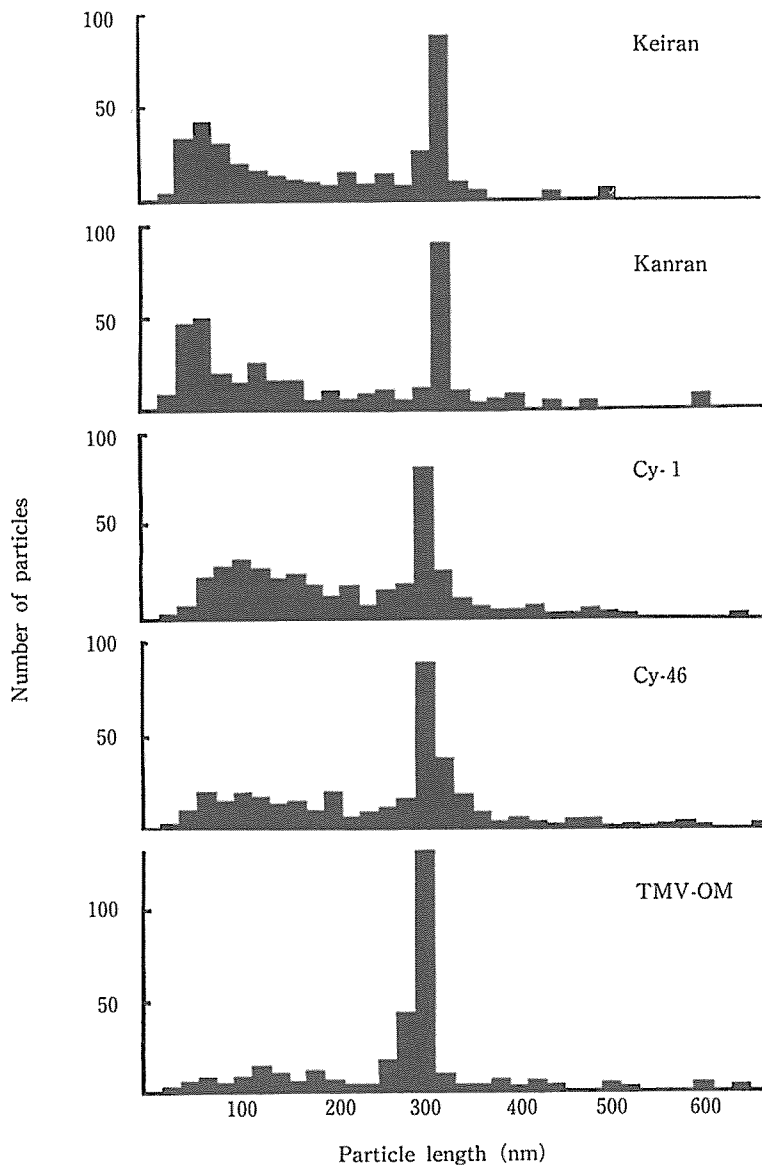


Fig 1 . Length distribution of 4 isolates of ORSV (Keiran, Kanran, Cy-1, Cy-46) and TMV-OM.

7. 罹病葉超薄切片の電顕観察 スルガラン（蕙蘭）の原株の超薄切片について電顕観察を行った。その結果、細胞質内に散在または大集塊するウイルス粒子が認められた (Plate II, 6)。粒子の集塊は交叉し、粒子間に横断面の粒子がスポット状に見られるものもあった (Plate II, 4)。

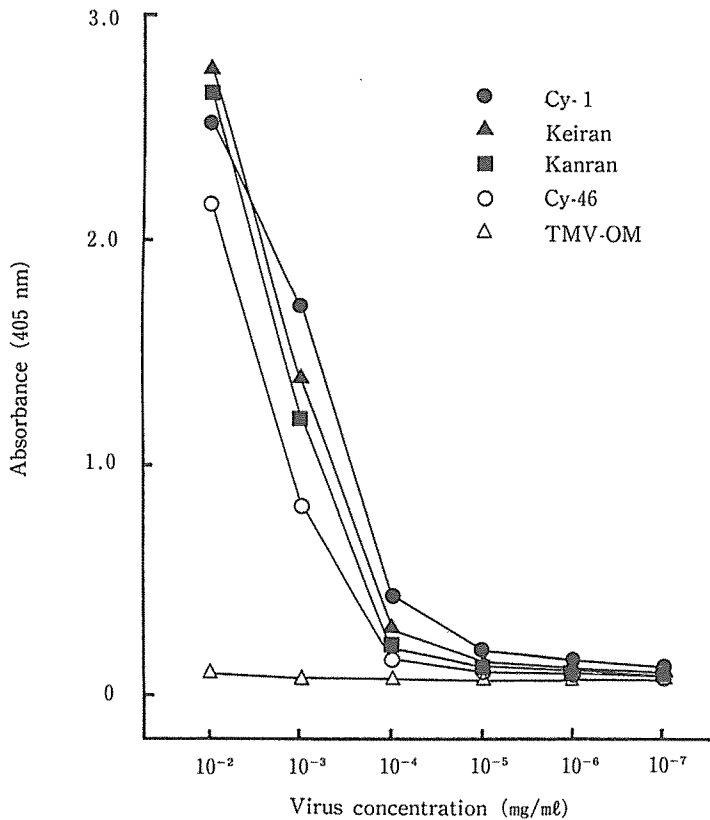


Fig 2 . Detection of 4 isolates of ORSV (Cy-1 , Keiran, Kanran, Cy-46) and TMV-OM in purified preparation by DAS-ELISA, using anti-Cy-1 IgG.

考 察

Odontoglossum ringspot virus (ORSV) は、世界の多くの地域で発生が認められている⁶⁾ が、アメリカではラン科植物から分離される Tobamovirus 群のウイルスを TMV の orchid strain (TMV-O) とした記載もある^{5,15,17,19)}。TMV-O の名称は TMV 抗血清と反応したことから名付けられたようであるが、タバコに全身感染しないなどの寄生性に違いがあることや血清学的には ORSV に類似しており、TMV-O は ORSV と同じか、その系統であると考えられている^{6,17)}。しかし ORSV と TMV-O を比較した報告はあまり見られず、ORSV の系統についても明確にされていない。

Cymbidium 属・東洋ランのスルガラン（蕙蘭）とカンラン（寒蘭）から分離された棒状ウイルスは、主にナス科やアカザ科などに感染が認められ、その宿主範囲や病徴、粗汁液中での安定性、血清反応、罹病葉超薄切片でのウイルスの存在様式などから Tobamovir-

us グループに属する ORSV であると同定した。寄生性について見ると、東洋ラン分離株は *N. clevelandii* に全身感染し、Xanthi nc タバコ、*N. glutinosa*、*C. amaranticolor*、フゲンソウ、センニチコウおよびツルナなどに局部感染するとともに、Samsun タバコに接種葉に無病徴感染し、*Datura stramonium* に感染しないなど Paul *et al.* (1965) が報告した ORSV とよく一致している。しかし Jensen & Gold (1951) が報告した ORSV は、Xanthi タバコや *N. glutinosa* に感染しないので、その寄生性を異にした。また、井上 (1983) が報告した Cy-46 分離株は *Datura stramonium* への感染をのぞけば、その他の寄生性において蕙蘭分離株に非常に類似していた。さらに Kado *et al.* (1968) が報告した TMV-O の 5 系統のうちの "02,07" 分離系や、Corbett (1967) の報告した TMV-O は、タバコや *N. glutinosa* などのナス科における寄生性が東洋ランの 2 分離株と類似しているが、Izadpanah *et al.* (1968) が報告した TMV-O はセンニチコウに全身感染、*Cassia occidentalis* に局部感染し、Samsun タバコや *N. glutinosa* に感染しないので、これと東洋ランの 2 分離株とは寄生性が大きく異なっている。

ラン科に発生する Tobamovirus 群の粒子長は 275~325nm の範囲で報告されている⁶⁾が、そのうち ORSV の粒子長の多くは 300nm と報告されている^{2,3,11,20-22)}。しかし、東洋ランから分離した ORSV の粒子長は約 320nm であり、粒子長が 300nm とされている ORSV や TMV^{1,26)} より若干長く、粒子長が 314nm、317nm²⁵⁾、325nm²⁴⁾ と報告されている ORSV や粒子長が 320nm⁵⁾、324nm¹⁵⁾ などと報告されている TMV-O とはその粒子長において近似していることが認められた。

SDS-PAGE による外被蛋白質の分子量は、東洋ランからの 2 分離株と Cy-46 分離株が約 18,900d であり、Cy-1 分離株がそれよりも約 300d 大きく、ORSV の分離株間に差があることが認められた。ORSV 外被蛋白質は実際は 157 個のアミノ酸から構成され、その分子量が 17,598d と算出されている⁷⁾。しかし SDS-PAGE においては同グループに属する CGMMV や TMV で電気泳動度における易動度の異常性が指摘されていること²³⁾や、SDS-PAGE の荷電や泳動条件によりその分子量が異なってくるので、求める分子量はあくまでも見かけ上の分子量に過ぎない。そこで ORSV 外被蛋白質の分離株間での比較をより詳細に行うためにはペプチドマッピングやアミノ酸シーケンスなどを行う必要がある。

ORSV の Cy-1 分離株の抗血清を用いた寒天ゲル内二重拡散法では、東洋ランからの 2 分離株は homologous と融合した一本の沈降帯を形成したので、既報の ORSV^{10,11)} と共通抗原を持ち、血清学的に一致した。TMV-OM の抗血清を用いた場合には、東洋ランからの 2 分離株は homologous の沈降帯に対して spur を形成し、TMV-OM とは異種抗原が存在し遠縁関係にあることがわかり、この ORSV と TMV との血清学的関係は Paul *et al.* (1965, 1975) や井上 (1983) の報告を支持するものであった。

ORSV の Cy-1 分離株に対する IgG とその conjugate を用いて DAS-ELISA によりウイルスの検出を行った結果、ORSV の 4 分離株とはよく反応し、TMV-OM とは全く反応しないことから、東洋ランからの 2 分離株は血清学的に Cy-1 及び Cy-46 と類縁性が高く、TMV-OM とは大きな差が認められ、これは Adams and Allison (1981) が報告している TMV-O や TMV の関係と類似している。また ORSV を特異的に検出できるので、その検出や診断において DAS-ELISA が有効であると考えられた。

摘 要

葉に軽いモザイク症状を示す東洋ラン・*Cymbidium* 属のスルガラン（蕙蘭）およびカンラン（寒蘭）から分離されたウイルスは両者とも ORSV と同定された。そこで“蕙蘭”から分離された ORSV を中心にその諸性質を調べ、さらに既報の洋ラン・*Cymbidium* 属から分離された ORSV Cy-1 および Cy-46 分離株^{10,11)} との比較研究を行った。

本ウイルスは汁液接種を行った12科62種の植物のうち *Cattleya*, *Cymbidium*, *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii* に全身感染し、*N. glutinosa*, *Chenopodium quinoa*, ツルナなど5科14種に局部感染した。寄生性においては蕙蘭分離株は Cy-46 分離株に非常に類似していた。蕙蘭分離株のツルナの病葉粗汁液中における安定性は、耐熱性90～95℃、耐希釈性 10^{-6} ～ 10^{-7} 、耐保存性4月以上（試験継続中）であった。

DN 法試料の電顕観察では蕙蘭分離株および寒蘭分離株の粒子は約320nmの棒状であり、罹病 *C. quinoa* から得た純化ウイルスの紫外部吸収曲線は248nmおよび268nmにそれぞれ極小と極大吸収があり、 A_{260}/A_{280} は1.14であった。SDS-PAGE による外被タンパク質の分子量は約18,900dであり Cy-46 分離株と等しく、Cy-1 分離株はそれより約300d大きかった。

感染植物の超薄切片には、ウイルス粒子が細胞質内に散在または大集塊として認められた。

免疫電顕法では東洋ラン分離株は Cy-1 抗血清とよく反応した。Cy-1 抗血清を用いた寒天ゲル内二重拡散法では、東洋ラン分離株は Cy-1 および Cy-46 との間に融合する一本の沈降帯を形成し、TMV 普通系の抗血清に対しては、homologous と東洋ラン分離株の間に spur が形成された。東洋ラン分離株は Cy-1 および Cy-46 とは血清学的に同一抗原であり、TMV 普通系との間には異種抗原が存在し遠縁関係にあることが認められた。また DAS-ELISA では、東洋ラン分離株は Cy-1 および Cy-46 と同様に高い反応値を示したが、TMV 普通系とは全く反応しなかった。

引 用 文 献

1. Adams, E. B. and Allison, A. V. 1981. The specificity of ELISA for strains of TMV. *Phytopathology* 71 : 103.
2. Brandes, J. and Bercks, R. 1965. Gross morphology and serology as a basis for classification of elongated plant viruses. *Advan. Virus Res.* 11 : 1-24.
3. Brandes, J. and Wetter, C. 1959. Classification of elongated plant viruses on the basis of their particle morphology. *Virology* 8 : 99-115.
4. Clark, M. F. and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. gen. Virol.* 34 : 475-483.
5. Corbett, M. K. 1967. Some distinguishing characteristics of the orchid strain of tobacco mosaic virus. *Phytopathology* 57 : 164-172.
6. Edwardson, J. R. and Zettler, F. W. 1986. *Odontoglossum ringspot virus*. p233-247, in : *The Rod-Shaped Plant Viruses*. Comprehensive Virology (Van Regenmortel, M. H. V. and

- Fraenkel-Conrat, H., eds). Plenum Press, New York.
7. Hennig, B. 1972. D-287, in : Atlas of Protein Sequence and Structure, Volume 5 (Dayhoff, M. O., ed). National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C.
8. 井上成信. 1964. ランのウイルス病について. (I), *Cymbidium* に発生するウイルス病. 日本蘭協会誌 10 : 6~10.
9. 井上成信. 1965. ランのウイルス病について. (II), *Cymbidium* に発生するウイルス病. 日本蘭協会誌 11 : 1~6.
10. Inouye, N. 1966. A virus disease of *Cymbidium* caused by odontoglossum ringspot virus. Ber. Ohara Inst. landw. Biol. Okayama Univ. 13 : 149-159.
11. 井上成信. 1983. *Cymbidium* から分離された odontoglossum ringspot virus の1系統の性質. 農学研究 60 : 53~67.
12. 井上成信. 1984. 花卉植物のウイルス. 遺伝 38 : 201~214.
13. 井上成信. 1990. ランの病害. 植物防疫 44 : 177-181.
14. 井上成信・呂 理桑. 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.
15. Izadpanah, K., Thompson, M. R. and Thornberry, H. H. 1968. Orchid virus : Characterization of a type of tobacco mosaic virus isolated from *Cattleya* plants with infectious blossom necrosis. Phytopath. Zeit. 63 : 272-286.
16. Jensen, D. D. and Gold, H. A. 1951. A virus ringspot of *Odontoglossum* orchid : symptoms, transmission and electron microscopy. Phytopathology 41 : 648-653.
17. Kado, C. I., Van Regenmortel, M. H. V. and Knight, C. A. 1968. Studies on some strains of tobacco mosaic virus in orchids. I. Biological, chemical and serological studies. Virology 34 : 17-24.
18. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacterial phage T₄. Nature 227 : 680-685.
19. Lawson, R. H. 1970. Virus-induced color-breaking in *Cattleya* orchid flowers. Amer. Orchid Soc. Bull. 39 : 395-400.
20. Newton, N. and Rosberg, D. W. 1952. Electronmicroscope studies of a new orchid virus complex. Phytopathology 42 : 79-82.
21. Paul, H. L. 1975. Odontoglossum ringspot virus. CMI/AAB. Descriptions of Plant Viruses. 155 : p4.
22. Paul, H. L., Wetter, C., Wittmann, H. G. and Brandes, J. 1965. Untersuchungen am Odontoglossum ringspot virus, einem Verwandten des Tabakmosaik-Virus. I. Physikalische, chemische, serologische und symptomatologische Befunde. Z. Vererbungsl. 97 : 186-203.
23. Sano, Y., Nozu, Y. and Inoue, H. 1978. Anomalous mobility of cucumber green mottle mosaic virus protein in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biochem. 84 : 1041-1049.
24. Thornberry, H. H. and Philippe, H. R. 1964. Orchid disease : *Cattleya* blossom brown necrotic streak. Plant Dis. Repr. 48 : 936-940.
25. Van Regenmortel, M. H. V., Hahn, J. S. and Fowle, L. G. 1964. Internal calibration of electron micrographs with an orchid virus. S. African J. Agr. Sci. 7 : 159-164.
26. Zaitlin, M. and Israel, H. W. 1975. Tobacco mosaic virus (type strain). CMI/AAB. Descriptions of Plant Viruses, 151 : p5.

Host Range and Properties of Odontoglossum Ringspot Tobamovirus (ORSV) Isolated from Miniature Cymbidium in Japan

Hideki KONDO, Takanori MAEDA and Narinobu INOUE

Summary

Odontoglossum ringspot virus (ORSV) was isolated from miniature Cymbidium (*Cymb. kanran* and *Cymb. ensifolium* "Keiran"), showing mild mosaic symptoms on their leaves. The virus was transmitted by inoculation with sap to 18 of 62 species in 6 of the 12 families tested. Systemic infection occurred in *Cattleya*, *Cymbidium*, *Nicotiana benthamiana* and *N. clevelandii*. In *Tetragonia expansa* sap, the virus was infective at a dilution of 10^{-6} but not 10^{-7} , after heating at 90°C for 10 min but not at 95°C, and after 4 months at 20°C (this test is being continued).

Rod shaped particles, c. 18×320 nm, were found in *Chenopodium quinoa* sap. Ultraviolet absorption spectrum of the virus showed an A_{260}/A_{280} ratio of 1:1.14. The virus had a single coat protein with mol. wt. 18,900 daltons. In comparison the coat proteins of ORSV Cy-1 and Cy-46, isolated from *Cymbidium*, were about 19,200 and 18,900 daltons, respectively.

In ultrathin sections of leaf tissues from diseased plants, virus particles were observed to aggregate in the vacuole and cytoplasm.

The virus reacted with Cy-1 antiserum in immunoelectron microscopy. A test using agar gel diffusion indicated that ORSV and TMV ordinary strain are distantly related. In DAS-ELISA, using an antiserum against Cy-1, 4 isolates of ORSV in purified preparation were detected at a dilution of 10^{-4} but not 10^{-5} . However, TMV ordinary strain could not be detected in this way.

Explanation of plates

Plate I.

1. *Cymbidium ensifolium* (cv. Keiran) infected with ORSV, showing mild mosaic.
2. *Cymbidium kanran* infected with ORSV, showing chlorosis and mild mosaic.
3. Systemic symptoms on a leaf of *Cymbidium* infected with ORSV, showing mild mosaic.
4. Systemic symptoms induced by ORSV-Kanran on *N. clevelandii*, showing mosaic.
5. Local lesions of ORSV-Keiran on an inoculated leaf of *N. tabacum* cv. Xanthi nc, 14 days after inoculation.
6. Local lesions of ORSV-Keiran on an inoculated leaf of *Tetragonia expansa*, 4 days after inoculation.
- 7, 8. Agar-gel diffusion tests.
Oas : ORSV Cy-1 antiserum, Tas : TMV ordinary strain antiserum, 1 and 46 : ORSV Cy-1 and Cy-46, Ka and Ke : ORSV isolated from *Cymbidium ensifolium* (Keiran) and *Cymb. kanran*, OM : TMV ordinary strain, L : TMV tomato strain.

Plate II.

1. Electron micrograph of a preparation of ORSV-Keiran and TMV ordinary strain (TMV-OM) particles mixed with Cy-1 antiserum. TMV-OM particles did not decorate at all. Bar represents 100nm.
2. Electron micrograph of a preparation of ORSV-Keiran and TMV-OM particles mixed with TMV-OM antiserum. ORSV-Keiran particles did not decorate at all. Bar represents 100nm.
3. Purified ORSV-Keiran particles negatively stained. Bar represents 150nm.
4. Virus particles dispersed in the cytoplasm. Bar represents 250nm.
5. SDS-PAGE ; lane 1 : MW marker proteins, 2 : ORSV-Keiran (18.9Kd), 3 : Cy-1 (19.2Kd), 4 : ORSV-Kanran (18.9Kd), 5 : Cy-46 (18.9Kd).
6. Virus particles aggregate in the cytoplasm and the vacuole. Bar represents 400nm.

Plate I.

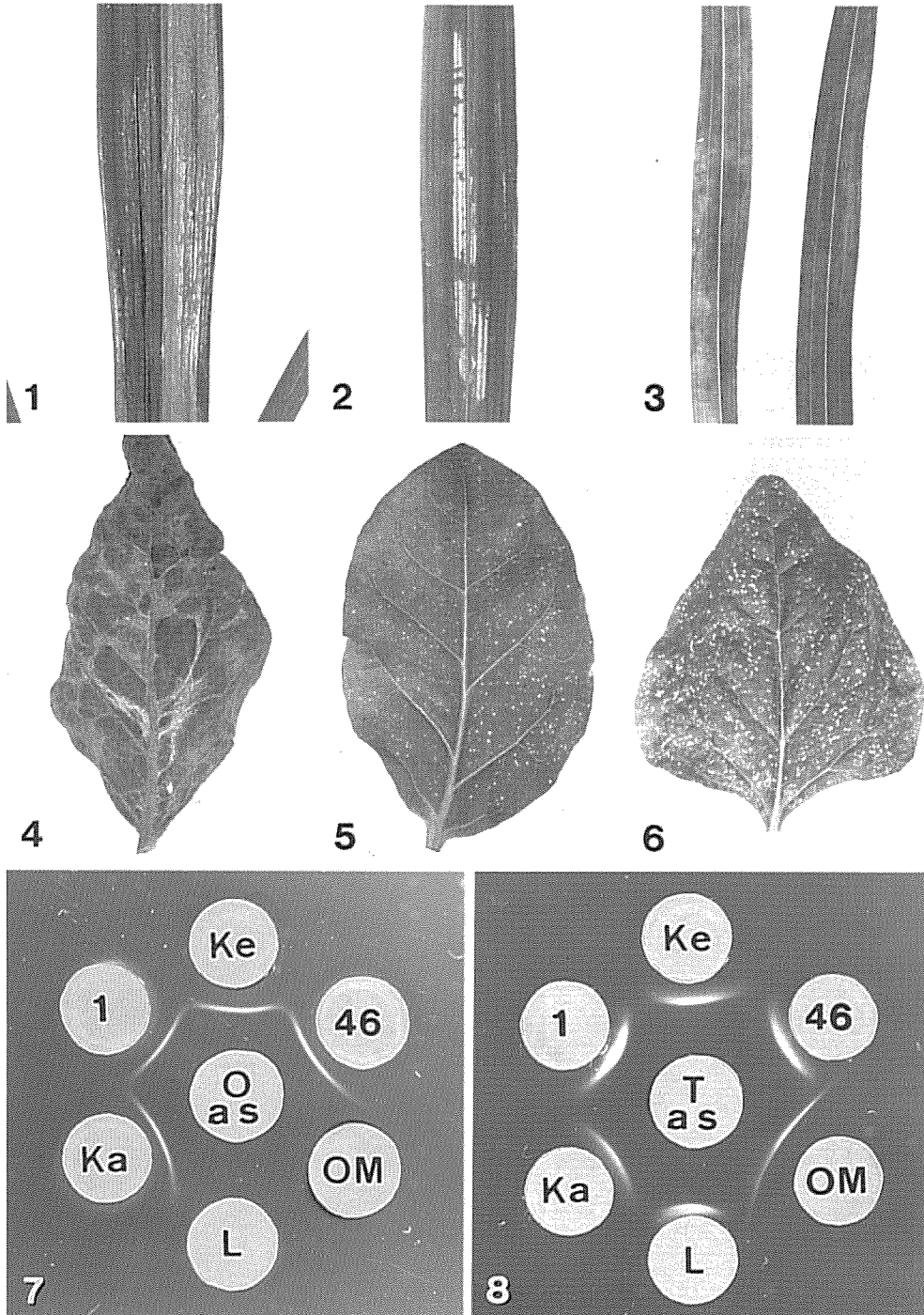


Plate II.

