

琉球大学学術リポジトリ

パパヤから分離されたウイルス：第1報 Papaya ringspot virus について(農学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 与那覇, 哲義, Yonaha, Tetsuyoshi メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4292

パパヤから分離されたウイルス

第1報 Papaya ringspot virus について*

与那覇哲義**

Tetsuyoshi YONAHA: Viruses isolated from
papaya in Okinawa (Japan) 1. Properties
of papaya ringspot virus

はじめに

沖縄におけるパパヤのウイルス病は、現在、南北大東島を除く県内各地に発生し、本病はパパヤの増産を阻害する重要な病害である。これまでの本病に関する研究では、主としてその発生状況、病徴、伝染およびウイルスの物理的性質などが報告されている^{21, 22, 23})。しかしながら病原ウイルスの寄生性やウイルス粒子の形態に関する研究報告はない。

著者は、1972年以来、沖縄各地で採集した病葉から病原ウイルスの分離を行ない、いくつかのウイルス株を得た。本報では、パパヤに激しい奇形葉を生ずるウイルスの物理性およびウイルス粒子の形態についての実験結果を報告する。なお、その他ウイルス分離株との関係については現在実験中であるので後の機会に報告する予定である。

実験材料および方法

1972年那覇市首里赤平町で採集したパパヤの奇形葉病株から汁液接種によりパパヤにうつしてウイルスを分離した。ウイルスはパパヤで増殖し、その病葉を凍結保存して接種原に用いた。

接種試験は、主に4月から10月の間にガラス室内で行なった。汁液接種はパパヤ病葉に0.1Mりん酸緩衝液(pH 7.0)を少量加えて磨砕し、ガーゼでこした汁液の中にカーボランダムをふりかけて混ぜ、これを指で接種植物の葉面に軽く2~3回こすりつけた。接種した植物は約1週間観察した後、パパヤに戻し接種を行ない感染の有無を確かめた。

ウイルスの物理性試験は、ウイルス原としてパパヤ病葉汁液を、また検定植物には本葉5~8枚時のパパヤを用い、常法によって行なった。ウイルス粒子の形態は、パパヤ病葉を用い、dip法、および部分純化標品を2%リタングステン酸(pH 7.0)で逆染色し、JEM-100B電子顕微鏡(日本電子株式会社)で観察した。

ウイルスの精製は、パパヤ病葉に2倍容の0.1Mほう酸緩衝液(0.01M EDTAを含む)pH 8.3を加えて磨砕し、約2時間室内に放置したのちにガーゼでろ過した。このろ液に10%容の四塩化炭素を加えて3分間攪拌し、3,500 rpm, 15分間遠心分離した。上澄みに4%量のポリエチレングリコール

* 本論文の一部は昭和50年10月日本植物病理学会九州部会で発表した。

** 琉球大学農学部農学科

(6,000)を入れて1時間攪拌し, 6,000 rpm, 15分間遠心分離した。この沈澱を0.01 M ほう酸緩衝液(0.001 M EDTAを含む) pH 8.3に溶かし, その後は分画遠心(10,000 rpm, 15分間と30,000 rpm または40,000 rpm, 90分間)を2~3回行なって, その最終ウイルス液を部分純化標品として用いた。

実 験 結 果

1. 寄主範囲と病徴

本ウイルスの寄主範囲は表1に示したようにパパヤのはかうり科の数種植物に限られている。これまでの接種試験の結果, 25°C以上の温度条件下では寄主植物の感染率は高くなり, かつ明瞭な病徴が現われた。しかし, 20°C以下の冬期のガラス室内においては感染し難い例が多かった。

感染した植物の病徴は下記のとおりである。

Table 1. Host range of the virus and the symptoms of infected plants

Susceptible plants	infection
<i>Carica papaya</i> L.	mal
<i>Cucurbita pepo</i> L. var. <i>ovifera</i> Alef.	vc
<i>Cucumis sativa</i> L.	ns
<i>Cucumis melo</i> L. var. <i>conomon</i> Makino	chs
<i>Melothria lukuensis</i> Nakai	m
Non-susceptible plants	
<i>Cucurbita maxima</i> Duch., <i>C. pepo</i> L., <i>Citrullus vulgaris</i> Schrad., <i>Cucumis melo</i> L., <i>Benincasa hispida</i> Cogn., <i>Luffa cylindrica</i> Roem., <i>Momordica charantia</i> L., <i>Lagenaria leucantha</i> Rosby, <i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste & Reyn., <i>C. quinoa</i> Milld., <i>C. murale</i> L., <i>Gomphrena globosa</i> L., <i>Celosia cristata</i> L., <i>Zinnia elegans</i> Jacq., <i>Vinca rosea</i> L., <i>Nicotiana glutinosa</i> L., <i>N. tabacum</i> L., (White Burley, Bright Yellow), <i>Datura stramonium</i> L., <i>D. metel</i> L., <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., <i>Petunia hybrida</i> Vilm., <i>Physalis floridana</i> Rydb., <i>Tetragonia expansa</i> Murr., <i>Phaseolus vulgaris</i> L., <i>Vicia faba</i> L., <i>Vigna sinensis</i> Savi., <i>Pisum sativum</i> L., <i>Glycine max</i> Merr., <i>Sesamum indicum</i> L.	

mal : malformation vc : vein-clearing ns : necrotic spot m : mosaic
chs : chlorotic spot

パパヤ (*Carica papaya* 品種はソロ, 雑交二号) : 接種後12~16日に初め頂葉の脈間が少しふくれあがる rugose 症状を示し, これは後に葉脈透化となるが, まもなく葉の一部あるいは全体が退色する。接種後40~50日には葉肉部や葉脈の退化消失した種々の奇形葉が連続的に形成され, 奇形葉上には濃緑部のふくれ上った blister-like 症状を示す。またほとんどの病葉上には淡褐色の斑点が多数あらわれる(図版 I 2~6)。葉柄は細長く伸びて垂れる。一般に病株は著しく萎縮し, 先端部が欠損したり, 逆に小枝が叢生する。頂葉の初発病に前後して茎に軽い濃緑斑を生ずることもあるが, これは発病後期においては全く形成されない。

カザリカボチャ (*Cucurbita pepo* var. *ovifera* スモールフルーツ混合) : 接種後12~14日で上

葉に vein-clearing 症状を示した。この症状が細脈に拡がると斑紋状に映る (図版 II-3)。4~7 位葉の症状は顕著であるが、次第に軽微となり、まもなく病徴は現われなくなる。古い葉では網目状となった。

キュウリ (*Cucumis sativa* 品種は宝来, 近成山東, 青涼白いぼ) : 接種後12~14日で上葉に初め 2mm位の退色斑点が現われ, のちに病斑は褐変し, やゝ拡大する (図版 II-1)。

シロウリ (*Cucumis melo* var. *conomon* 黒門青縞瓜) : 接種後10~14日で上葉に 0.5~1 mmの退色斑点を多数生じ, のちに病斑の中心部が淡褐色となる (図版 II-2)。

クロミノオキナワスズメウリ (*Melothria liukiensis* 野草) : 接種後20日頃に上葉にモザイク症状を示す (図版 II-4)。

2. ウイルスの物理的性質

パパヤの病葉をウイルス原とし, パパヤ苗を検定植物にして粗汁液中における本ウイルスの不活化限度を調べた。

Table 2. Properties of the virus in extract sap of infected papaya

Thermal inactivation point (10 min)	Room temp	45	50	55	60	65 C
		10/10	7/10	3/10	2/10	0/10
Dilution end point						
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Longevity in vitro (20 C)						
		8/10*	7/10	4/10	0/10	0/10
	0	12	24	48	72 hrs	
	10/10	8/10	8/10	3/10	0/10	

5 to 8 leaves stage of papaya plant were used for the test.

* Infected plants / Inoculated plants

その結果を表2に示した。表2からこのウイルスの耐熱性(10分)は55~60°C, 耐希釈性は 10^{-3} ~ 10^{-4} , 20°Cにおける耐保存性は2~3間にあった。

3. アブラムシによる伝搬試験

供試した2種アブラムシは小形フラスコ内で3時間絶食させた。モモアカアブラムシ (*Myzus persicae* Sulz.) は, パパヤ病葉を所定時間吸汁させたのち, 健全パパヤに移して24時間加害させた。一方, ワタアブラムシ (*Aphis gossypii* Glover) は, 病原および接種植物ともシロウリを用い, モモアカアブラムシの場合と同じ方法で行なった。接種試験は20°Cの室内で行ない, 接種後の植物は殺虫剤を散布した後にガラス室内に移動し, その発病によって伝搬の有無を検定した。

Table 3. Transmission of the virus by *Myzus Persicae* and *Aphis gossypii*

Aphid	Acquisition feeding time	No. of plants inoculated	No. of plants infected
<i>M. persicae</i>	5 min	10	4
	10	10	5
	20	10	7
	60	10	5
<i>A. gossypii</i>	5	10	2
	10	10	5
	20	10	5
	60	10	5

Aphids were starved for 3 hours. 5 to 10 aphids per one plant were used

その実験結果は表3に示すように本ウイルスはモモアカアブラムシおよびワタアブラムシのいずれによっても、かなり高率に伝搬されることが証明された。とくにワタアブラムシはパパヤを好まず、その吸汁行動は不安定であって、パパヤを供試しての伝搬率はきわめて低下した。

4. ウィルス粒子の形態

パパヤ病葉の dip 法試料でもウイルス粒子は少数ながら検出された。しかし、部分純化試料では比較的多数の粒子が観察された。

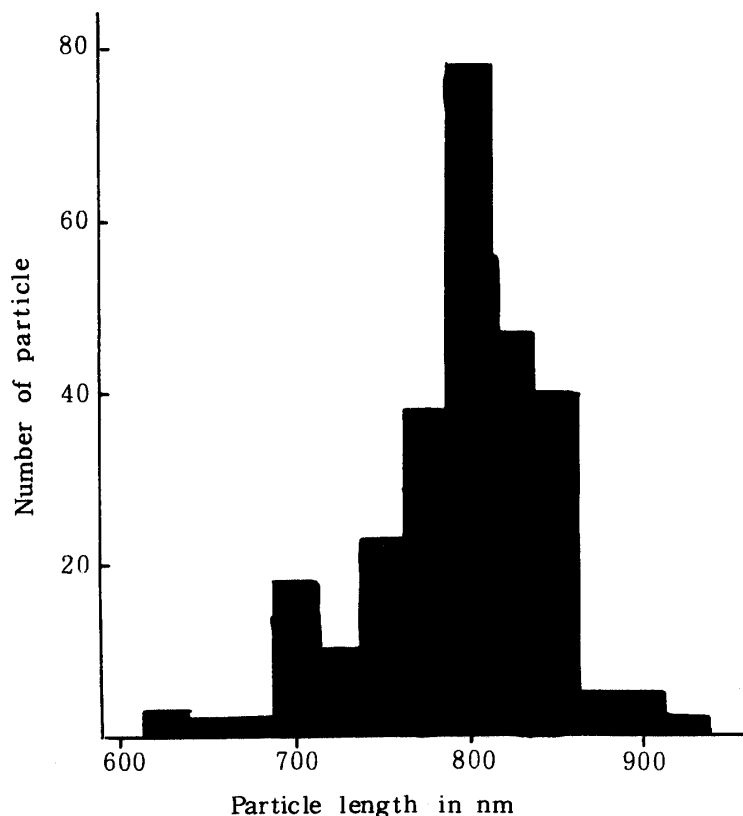


Fig. 1. Length distribution of particle in partially purified preparation

TMVの長さを300nmとし、273個の粒子の長さの分布を示したのが図1である。この図に見るようにウイルス粒子の長さは625~925nmに分布し、なかでも775~850nmに多く、その分布のピークは800nmにある。したがって、ウイルス粒子の形状は長さ約800nm、幅12nmのひも状粒子であると考えられる(図版II-5)。

5. 本ウイルスの同定

パパヤの汁液伝染性ウイルスとしては、papaya ringspot virus (distortion ringspot virus, faint mottle ringspot virus)^{4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 17, 19, 24}、papaya mosaic virus^{4, 6, 7, 9, 24}、tomato spotted wilt virus²⁰、アエルトリコのmosaic virus¹およびIsabella mosaic virus²、インドのmosaic disease³およびpapaya leaf reduction virus¹⁸、ハワイのmosaic disease¹³、アフリカのpapaya decline virus¹⁵、パキスタンのshredded leaf disease^{10, 11}のほか、実験的に寄生性の認められているtobacco ringspot virus¹⁶などが外国で報告されている。

上記のウイルスと本ウイルスとをその寄主範囲およびパパヤの病徴の点で比較してみると、もっとも近似のものはpapaya ringspot virusであるが、papaya mosaic virus, tomato spotted wilt virus および tobacco ringspot virus は、その寄主範囲やウイルス粒子の形状によって、本ウイルスとは明らかに別種である。しかし、その他のウイルスとの異同は明確でない。

papaya ringspot virus と本ウイルスとを比べてみると、両ウイルスは、パパヤの病徴や寄主範囲が類似し、いずれもアブラムシによって非永続的に伝搬する。またウイルス粒子の形態は長さ800nm¹² および780nm⁹とほぼ一致している。

しかし、本ウイルスはスイカやchenopodium amaranticolorには感染しない。またキュウリおよびシロウリでの病斑は、これまで報告されたウイルスのモザイク症状とは相違している。ウイルスの耐保存性はpapaya ringspot virusの8時間に比べ、本ウイルスの2~3日は比較的長い方に属する。

以上のように本ウイルスとpapaya ringspot virusとは若干の相違があるが、両ウイルスは重要な点で共通性があるので、本ウイルスは、papaya ringspot virusと近縁関係のものと考えられる。

考 察

沖縄に発生するパパヤのウイルス病は、1954年に沖縄本島北部の名護市においてその発生が初めて認められた。その後数年間で県内各地にまん延した。しかし、南北大東島では1976年2月現在でも本病は発生していない。

自然発病株の病徴は、葉の奇形が顕著な病株とモザイク状で一部奇形葉を生ずる病株があり、最近では後者の病株が多く見られる。そして、いずれの病株においても茎や葉柄や果実に濃緑色の斑紋および輪紋を生ずる。このようなパパヤ病株は、諸外国のパパヤ病徴とも多くの点で類似している。

著者が本病に関する調査実験を行なった1961~1963年においては、茎、葉柄や果実の病斑は観察されていない²²。ところが、この病徴については津止(1971)²¹によって詳細に記述されている。これは、おそらくウイルスの種類あるいは系統の差異によるものではないかと推察される。

本ウイルスが最も近い関係にあるpapaya ringspot virusは、一般に茎や果実の病斑が顕著である。一方、papaya leaf reduction virusは茎、葉柄、果実には病斑は現われないうのである。本ウイルスによっても茎や葉柄には病斑は現われな。また現在までの実験では病株が著しく萎縮し、

まだ果実の着生した例がなく、その病斑の形成は不明である。

なおまた本ウイルスの病株は先端部が *rosette* 病状を示す特長がある。この点では、与那覇 (1962)²²⁾ の供試ウイルスおよび Ishii (1963)¹³⁾ の *mosaic disease* と類似するが、*mosaic disease* は茎や果実に濃緑斑を生ずる。津止 (1971)²¹⁾ の供試ウイルスは、モモアカアブラムシのウイルス獲得吸汁時間が最短30分間で比較的長い。またワタアブラムシによる伝搬試験の結果は陰性であり、本ウイルスとは相違点がある。

最近、Cook (1972)⁸⁾ によれば前述したパパヤウイルスの多くは *papaya ringspot virus* であると述べている。これらの中にはウリ科植物に寄生せず、アブラムシ伝搬も認められていない *papaya decline virus* も含まれていて、疑問もある。

摘 要

1. 1972年沖縄県那覇市首里赤平町で採集したパパヤの激しい奇形葉病株からウイルスを分離し、その寄生性、伝染およびウイルス粒子の形態などについて実験を行なった。
2. パパヤにおける本病の病徴は、連続的に奇形葉を形成し、病葉上に隆起した濃緑斑および淡褐色の斑点を多数生ずる。病株は著しく萎縮し、先端部に小枝が叢生する。葉柄は細長く伸びるが、濃緑色の斑紋は現われない。
3. 本ウイルスは、パパヤのほか、カザリカボチャに葉脈透化、キュウリにえそ斑点、シロウリに退色斑点およびクロミノオキナワズズメウリにモザイク状の全身病徴を示したが、その他の供試植物は感染しなかった。
4. 本ウイルスは、モモアカアブラムシによる非永続的伝搬が認められた。ウイルスの耐熱性 (10分) 55~60°C、耐希釈性 10^{-3} ~ 10^{-4} および20°Cにおける耐保存性は2~3日にあった。
5. パパヤ病葉を用いて、dip法および部分純化標品の逆染色試料について電顕観察を行ない、長さ約800 nm、幅12 nmのひも状粒子が検出された。
6. 本ウイルスは、既知パパヤウイルスのうち、若干の相違点はあるが *papaya ringspot virus* に最も近い。

謝 辞

本研究を行なうに当たり、御指導下さった琉球大学農学部教授田盛正雄博士ならびに北海道大学農学部教授四方英四郎博士に深く感謝申し上げる。また本研究の一部は文部省科学研究費によった。記して深謝の意を表す。

引 用 文 献

1. Adsuar, J. 1947 Studies on virus diseases of papaya (*Carica papaya* L.) in Puerto Rico. I. Transmission of papaya mosaic. II. Transmission of papaya mosaic by green citrus aphid (*Aphis spiraecola* Patch). III. Properties studies of papaya mosaic virus, J. Agri. Univ. Puerto Rico, 31:248-264
2. ————. 1972 A new virus disease of papaya (*Carica papaya* L.) in Puerto Rico,

- ibid, 56:397-402
3. Capoor, S. P. and P. M. Varma 1958 A mosaic disease of papaya in Bombay, Indian J. Agri. Sci., 28:225-233
 4. Conover, R. A. 1962 Virus diseases of papaya in Florida, (Abst.) Phytopath. 52:6
 5. ————. 1964 Distortion ringspot, A severe virus disease of papaya in Florida, Florida Sta. Hort. Soc., 77: 440-444
 6. ————. 1964 Mild mosaic and faint mottle ringspot, two papaya virus diseases of minor importance in Florida, ibid, 77: 444-448
 7. Cook, A. A. and G. M. Milbrath 1971 Virus diseases of papaya on Oahu(Hawaii) and identification of additional diagnostic host plant, Pl. Dis. Repr., 55: 785-788
 8. ————. 1972 Virus diseases of papaya, Teck. Bull. Flo. Agri. Exp. Stn., 750, 19pp.
 9. De Bokx, J. A. 1965 Host and electron microscopy of two papaya virus, Pl. Dis. Repr., 49: 742-746
 10. Faruqi, M. and M. Rafi-Uz-Zaman 1972 Shredded leaf disease of the papaya tree, Pakistan J. Sci. Ind. Res., 15: 205-207
 11. ————, ———— 1973 Abnormal formation of leaf, flower and fruit of papaya suffering from virus infection, ibid, 16: 49-53
 12. Herold, F. and J. Weibel 1962 Electron microscopic demonstration of papaya ring-spot virus, Virology, 18: 302-311
 13. Ishii, M. and O. V. Holtzmann 1963 Papaya mosaic disease in Hawaii, Pl. Dis. Repr., 47: 947-951
 14. Jensen, D. 1949 Papaya virus diseases with special reference to papaya ringspot, Phytopath., 39: 191-211
 15. Kulkarni, H. Y. 1970 Decline viruses of pawpaw(*Carica papaya* L.) in East Africa, Ann. appl. Biol., 66: 1-9
 16. McLean, D. and E. Olson 1962 Symptoms of tobacco ringspot virus on papaya, Pl. Dis. Repr., 46: 882
 17. Purcifull, D. E. 1972 Papaya ringspot virus, C M I/A A B Descriptions of plant virus, No. 84, 3pp.
 18. Singh, A. B. 1969 A new virus disease of *Carica papaya* in India, Pl. Dis. Repr., 53: 267-269
 19. Story, G. E. and R. S. Halliwell 1969 Identification of distortion ringspot virus disease of papaya in Dominica Republic, Pl. Dis. Repr., 53: 757-760
 20. Trujillo, E. and D. Gonsalves 1967 Tomato spotted wilt virus in papaya(Abst.), Phytopath., 57: 9
 21. 津止健市 1971 沖縄県に発生するパパイヤのモザイク病について、琉球農試報告、9: 43-54
 22. 与那覇哲義 1962 沖縄におけるパパイヤのモザイク病に関する研究 1. 病徴、物理的性質および伝染方法、沖縄農業、1: 37-44
 23. ———— 1974 パパヤから分離された3種ウイルスについて、同上、12: 1-8
 24. Zettler, F. W., J. R. R. Edwardson and D. E. Purcifull 1968 Ultramicroscopic

differences in inclusions of papaya mosaic virus and papaya ringspot virus correlated with differential aphid transmission, *Phytopath.*, 58: 332—335

Summary

Virus disease of papaya was found in 1954, in the northern part of Okinawa Island. After then the disease was widely spread throughout the Okinawa, Miyako and Yaeyama Islands in the several years. But no occurrence in the Minami-Daito and Kita-Daito Islands.

This virus isolated from severe distortion leaves in papaya collected in Okinawa was identified as papaya ringspot virus.

Host range, Physical properties, aphid transmission and electron microscopic studies are described in this paper.

The virus was transmitted by sap inoculation and also by *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* in non-persistent manner. By the sap inoculation, 5 species in 2 families plant infected out of 34 species in 10 families tested. The infected plants were papaya, fancy gourd, cucumber, pickling melon and *Melothria liukuensis*.

The virus inactivated in ten minutes between 55 C and 60 C, and after 2—3 days at 20 C. Dilution end point was between 10^{-3} and 10^{-4} . Flexuous filaments particles of about 800 nm long were observed in the partially purified preparation under the electron microscope by the direct negative staining method.

図 版 説 明

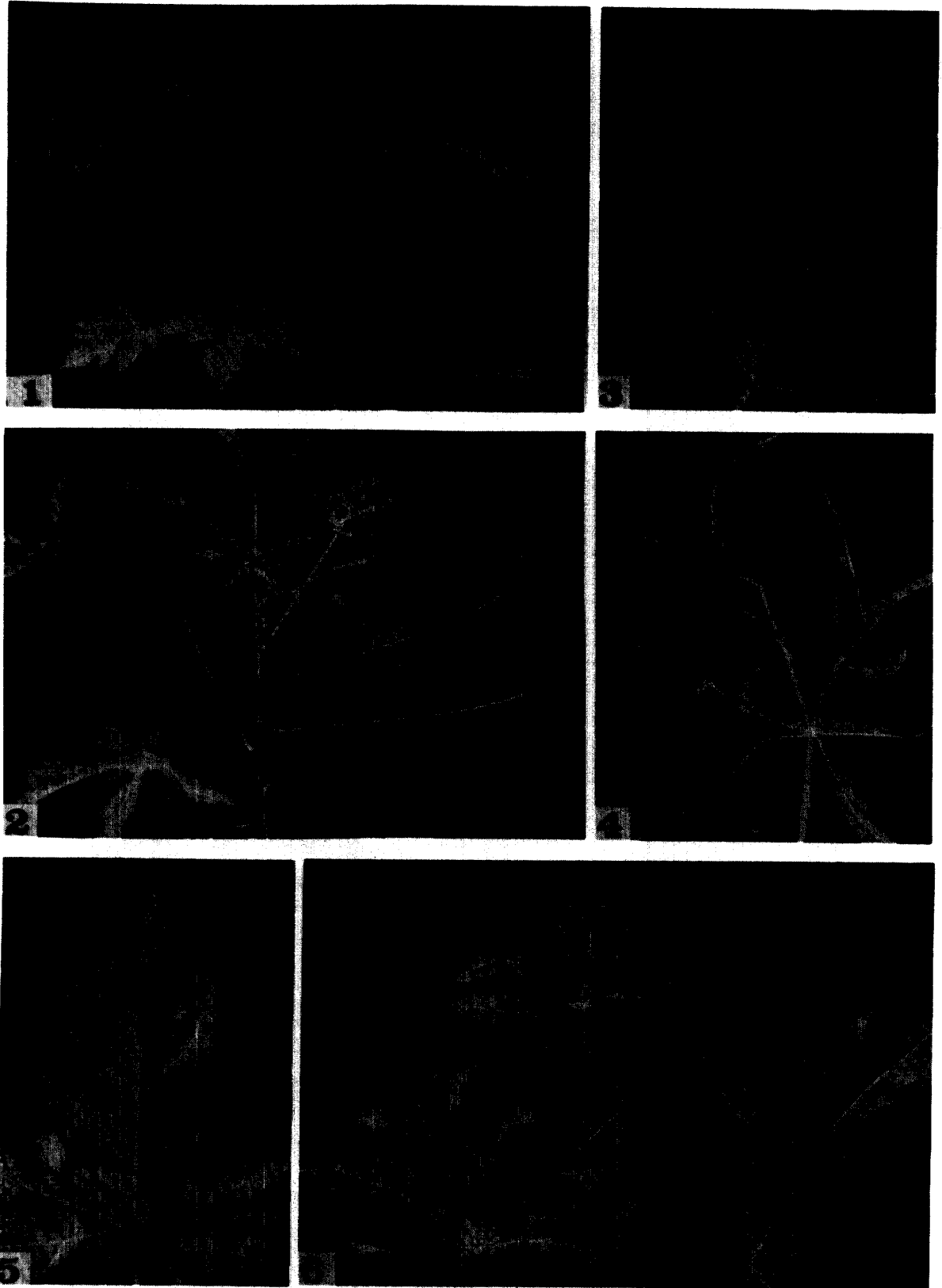
図版 I

1. 健全パパイヤ株
2. 接種発病したパパイヤ株
3. 葉肉部や葉脈の退化消失したパパイヤ葉
4. 同 上
5. パパイヤ病葉上の淡褐色斑点
6. 濃緑部がふくれ上ったパパイヤ奇形葉

図版 II

1. キュウリ上葉のえそ斑点
2. シロウリ上葉の退色斑点
3. カザリカボチャ上葉の vein-clearing 症状
4. クロミノオキナワスズメウリ上葉のモザイク症状
5. ウイルスの電顕像 (一線, 200 nm)

図版 I



図版Ⅱ

