

キュウリ緑斑モザイクウイルス(スイカ系)の スイカモザイク罹病株における分布と伝染¹⁾

木谷清美・木曾皓

(四国農業試験場)

緒 言

本邦で、はじめて井上(1966)によって報告されたキュウリ緑斑モザイクウイルス(キュウリ系)〔cucumber green mottle mosaic virus-cucumber strain, 以下CGMMV(C)と略記〕は、1966年徳島を中心とした西日本各地のキュウリ栽培地帯に大きな被害をもたらした。また2年後の1968年には、キュウリ緑斑モザイクウイルス(スイカ系)〔cucumber green mottle mosaic virus-watermelon strain 以下CGMMV(W)と略記〕が(小室ら, 1968), 関東一円のスイカに大発生し、いわゆるスイカのコンニャク病などよばれて大問題となった。ところが1969年には高知県のハウス約51haおよびトンネル栽培のスイカに本病が激発し、その被害は約4千万円といわれ、また香川県においても、県下一円約115haの露地栽培スイカに大発生し、被害は約7千万円にのぼるといわれた。

本病の発生は著しく生産を阻害し、被害も大きいので早急に防除対策を確立する必要に迫られたので、これを緊急課題としてとり上げ、防除方法を考える上に最も重要である伝染機作を究明することとし、まず罹病植物体内におけるウイルスの分布、種子伝染の有無、コンニャク症状果の発生時期などについて検討を行なった。その結果、防除上重要な知見をえたのでその概要を報告する。

なおこの研究については、香川県農業試験場病虫部長上原等氏、高知県農林技術研究所病理研究室主任斉藤正氏のご協力をえた。ここに深く感謝の意をあらわす。また本研究遂行のためにとくに農林省より特別調整費を受けた。関係諸官に厚く御礼申し上げる。

螢光抗体法によるウイルス検定

われわれは、ウイルスの所在を知る方法として、螢光抗体法と電顕観察を用いたが、螢光抗体法については抗血清の作成、処理および観察方法をつぎの通りとした。

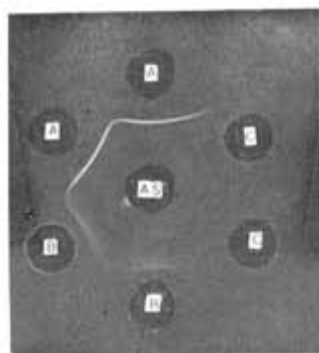
(1) 抗血清の作成

コンニャク症状果の果肉部を取出し、テトロン紗で濾過したのち10,000×g, 20分遠心して上清をえる。上清に1モル磷酸緩衝液を加えてpHを7.0に調整し、65~68℃の湯煎浴中で10分熱処理した後、10,000×g, 20分遠心して上清をえる。上清に中性飽和硫酸液を加えて硫酸濃度を0.4飽和とし、1夜5℃下で放置する。えられた沈澱を10,000×g, 30分の遠心で集め、0.1モル磷酸緩衝液(pH 7.0)に溶解し、5,000×g, 20分の遠心で不溶解物を取除く。上清を105,000×g, 120分遠心してウイルスをペレット状に沈澱させる。このペレットを0.1モル磷酸緩衝液(pH 7.0)に溶

1) Studies on the distribution in an infected watermelon and the transmission of cucumber green mottle mosaic virus (watermelon strain). By Kiyomi KITANI and Akira KISO.

解し、低(10,000 × R, 20分)、高速(105,000 × g, 120分)の分画遠心を繰返すと蛍光色を発するウイルス液がえられる。えられたウイルス液を、10~40%の蔗糖濃度勾配(日立65P, 25SPローター使用)で遠心分離すると純化ウイルス液がえられる。最後のウイルス液を純水で透析し、2,800 × g, 10分遠心してえられた上清を凍結乾燥保存する。

この純化ウイルスを抗原として、Freundの complete adjuvant 法と静脈注射法(木村, 1965)の併用で兎に注射し抗血清をえた。すなわち、純化ウイルスを蒸留水に溶解し、Lowry法(福島・菅原, 1966)で蛋白濃度を測定し、20mg/1mlの抗原液を作成した。この抗原液1mlに complete adjuvant (DIFCO Laboratories in U.S.A.) 1mlを加えた adjuvant法で2週間隔で2回筋肉および皮下注射し、その後5mg/1mlの抗原液を静脈注射法で1週間隔で2回耳に注射を行ない、常法(木村, 1965)により全採血して抗血清をえた。えられた抗血清の力価と特異性は、それぞれ純化した本病のウイルス、CGMMV(C)およびTMVを用いて各抗原150γ/mlでアガロース2重拡散沈降反応法と沈降反応混合法(木村, 1965)で行なった。純化ウイルスを用いて、complete adjuvant法で作成した本病ウイルスの抗血清の特異性を、アガロース2重拡散法で検定した結果を第1図に、沈降反応混合法で行なった抗血清の力価を第1表に示した。すなわち、本ウイルス抗血清は、供試した抗血清の濃度ではCGMMV(W)とは極めて強く反応し、CGMMV(C)およびTMVとの反応にもとづく沈降線は極めて弱かった。また抗血清の力価は、沈降反応混合法で1:1024であった。



第1図 CGMMV(W)抗血清と類縁ウイルスとのアガロース2重拡散沈降反応
AS: CGMMV(W)抗血清(32倍希釈液)
A: CGMMV(W)抗原, B: TMV(O)抗原, C: CGMMV(C)抗原。

(2) 蛍光標識抗体調整法および蛍光観察法

蛍光標識に使用するCGMMV(W)抗体は、前述の方法でえた家兎抗血清を用い、9%飽和硫酸塩析法によりγ-グロブリン分画をえ、セファデックスを用いて脱塩したのち、Visking透析チューブに封じ、同じくセファデックスで濃縮して抗体をえた。えられた抗体は伊藤の方法で蛍光色素(fluorescein isothiocyanate結晶, BBL製)を標識し、セファデックス-G 25およびDEAEセルロースで処理して精製抗体をえた(伊藤, 1966)。えられた抗体は1mlずつに分注して-20℃で凍結するか、終末0.1%になるようにNaN₃を加えて4℃に保存し、適宜供試した。

切片作成法と蛍光染色法および標識切片の観察法は木谷らの方法(木谷ら, 1967)に従って行なった。また蛍光抗体法では、蛍光標識抗体の特異性の確認が重要であるから、ウイルス抗原と蛍光標識抗体による抗原抗体反応の

第1表 CGMMV(W)抗血清の沈降反応混合法試験と類縁ウイルスとの関係

抗血清	抗原(150γ/ml)	抗血清希釈倍数										
		2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰	2 ¹¹
CGMMV(W)	CGMMV(W)	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	±
	CGMMV(C)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	TMV(O)	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

結果みられる特異的蛍光確認のため、対照試験として、①無接種植物の組織、器官切片をラベル抗体で染色するものと、②蛍光色素を結合しない抗血清で37℃、60分間病組織切片を前処理し、0.01M 磷酸緩衝生理食塩水(pH 7.4)でよく洗ったのち、標識抗体で再び同様処理した場合の兩者について観察を行なった。その結果 fluoescen isothiocyanate を結合させた標識抗体を用いて無接種スイカ葉切片を染色し、また CGMMV(W) 抗血清を用いて CGMMV(W) 接種スイカ葉切片にまず前処理した後、標識抗体液で染色すると、前者の場合は抗原抗体反応の結果みられる輝黄緑色の特異的蛍光は全く認められず、後者の場合には特異的蛍光は大いに減じ、ほとんど認められない。これらのことから実験でえられた輝黄緑色の特異的蛍光は、CGMMV(W) 抗原と標識抗体との間におこった抗原抗体反応による結果であると考えられる。

発病株におけるウイルスの分布

接種に用いたスイカ(品種・F₁近成1号)は、ウスプルン1,000倍液で3時間、ついで第3磷酸ソーダー10%液で20分種子消毒し、催芽後、殺菌土壌に播種した。本葉が2~3枚展開時に子葉にカーボランダム法(日高ら, 1960)で純化ウイルスを接種し、25~30℃の隔離温室で管理した。親蔓の本葉が10枚着葉した時、初期病徴葉、完全発病葉、無病徴葉の葉柄、巻ひげ、開花前の雌花の幼果(直径約5mm)および雄ずいを採集し、蛍光抗体用材料とした。

子葉の表面にカーボランダム法でウイルスを接種すると、5~7日で新葉に病徴が現われたが、その時期に子葉を観察すると、病徴は現われていないにもかかわらず細胞に特異蛍光がみられ、海綿状組織、柵状組織は変形して、どの細胞にも特異的蛍光が観察された(図版Ⅱの12, 13)。

葉における病徴をみると、最初は、わずかに淡黄色の病斑が現われるが、この発病部位の切片を観察すると、小維管束と大維管束およびそれに接した柔細胞に、ウイルス抗原によるものと思われる黄緑色の特異的蛍光がみられ、その蛍光は葉の表裏の海綿状組織と柵状組織において表皮細胞に向って広がっているのが観察された(図版Ⅰの1, 2)。

なお、特異的蛍光がみられた細胞では、細胞質以外に葉緑体でも、強い特異的蛍光が観察された(図版Ⅰの3, 4)。

モザイク症状を示す完全発病葉では、小維管束を中心とした周囲の柵状組織や海綿状組織に特異的蛍光が強かったが(図版Ⅰの2)、とくにモザイク症状の病徴を示す部位の表裏の表皮細胞では、ほとんど、どの細胞にも特異的蛍光がみられた(図版Ⅰの5)。

まだ病徴の現われない葉の葉柄では、形成層や内生篩部には特異的蛍光が観察されたが、外生篩部や柔細胞では特異的蛍光はみられなかった。しかし導管中にはしばしばウイルスと思われる特異的蛍光が観察された(図版Ⅱの8)。

巻ひげでは、中心部に存在する篩部、内鞘および柔組織、さらに表皮細胞とその直下の細胞でも、それぞれウイルスと思われる強い特異的蛍光があらわれた(図版Ⅱの9, 10)。

葉、茎および巻ひげなど毛茸細胞にみられる特異的蛍光は顕著で、毛茸を構成する2~3個の細胞にはウイルス集塊と思われる強い特異的蛍光がみられた(図版Ⅱの11)。

開花前の雌花の幼果では、果皮や果肉の部分には特異的蛍光はみられなかったが、維管束部では、特異的蛍光が観察された(図版Ⅱの14)。また雄ずいについてみると、花粉では、強い黄色の自家蛍光のみであったが、その花粉集団をとりまく周囲の細胞には、特異的蛍光が観察された(図版Ⅱの15, 16)。

接種株におけるウイルスの移行

定植後のスイカは、蔓のほふくによる隣接株との接触伝染が考えられるので、親蔓および子蔓の展開葉にウイルスを接種した場合の株内のウイルス移行を検討した。すなわち、親蔓の本葉が8~10枚、子蔓の本葉が6~8枚の時、それぞれの蔓の中央附近の本葉3枚にウイルスをカーボンダム法で接種した。ウイルスの移行は、親蔓接種区は子蔓、子蔓接種区は親蔓について病徴の出現とウイルス粒子の確認をdip法による電顕観察(土居ら, 1969)で行なった。

親蔓と子蔓の完全展開葉にそれぞれ接種したウイルスの移行は比較的早いようで(第2図参照), 25~30℃下では5日後に、親蔓接種区では子蔓に、子蔓接種区では親蔓にウイルスの検出および発病がみられた。

種子伝染と根部伝染

スイカ(F₁近成1号)およびユウガオ(かちどき)の種子を第3燐酸ソーダの10%液で20分消毒後、十分水洗して乾燥させた種子を、ウイルスの0.5%液に浸漬し、沓紙上に拾い上げ、15cmビニール鉢の殺菌土壌に5粒ずつ、合計80鉢播種した。管理は25~30℃の隔離ガラス室で行ない、病徴と電顕観察で伝染の有無を確認した。

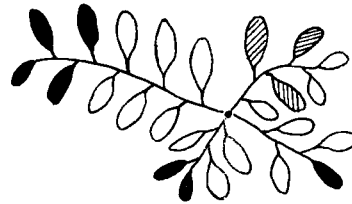
根からの伝染試験は、砂耕した幼苗を本葉2枚頃に掘り上げ根を水洗し、無傷根と断根した傷根とをウイルスの0.5%液に浸漬し、直ちに取出してビニール鉢の殺菌土に1本ずつ移植して発病の有無を観察した。管理は25~30℃の隔離ガラス室で行なったが、処理後15日までに発病しなかった株については、根および地上部の一部について感染の有無を電顕観察で確認した。

種子伝染と根部伝染の試験結果は第2表に示した。すなわち、スイカ種子による伝染率は約2%, ユウガオ種子による伝染率は約4%であった。発芽後本葉が3~4枚展開時に典型的なモザイク症状が現われ、健全株とは明らかに区別ができた。一方、根部伝染、すなわち無断根苗および断根苗を用いた接種試験では発病がみられなかった。

調査事項		発病個体数 / 供試個体数		発病 (%)
		スイカ	ユウガオ	
伝染方法				
種子伝染		9 / 400 (2.25)	15 / 400 (3.75)	
根部伝染 (ユウガオ)	無断根	0 / 50		
	断根	0 / 50		



親蔓接種区



子蔓接種区

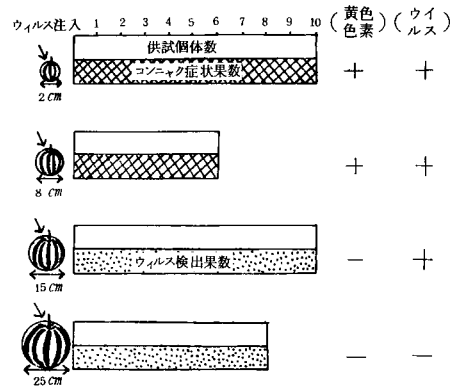
第2図 親蔓と子蔓の完全展開葉にウイルスを接種した時のウイルスの移行と発病
斜線はウイルス接種葉、黒塗は25~30℃下で5日後にウイルスと病徴が検出された部位を示す。

果実の大きさとコンニャク症状果発生との関係

無病地に栽植したスイカ株上で結実している直径2, 8, 15および25cmの果実をえらんで、それぞれの果梗部の数か所に0.01M燐酸緩衝液(pH 7.0)に溶解させたウイルスを、マイクロ注射器(容量0.5ml)を用いて、

合計 0.1~0.2 ml 宛注入した。完熟期に果実を採取し、コンニャク症状の有無、果肉部と果皮との間にみられる黄色色素帯発生の有無などを調査し、さらに電顕観察によるウイルスの確認を dip 法で行なった。

果実の大きさとコンニャク症状果発生との関係を見ると(第3図)、肥大期にある幼果は、こぶし大(直径約8~10 cm)までにウイルスの感染をうけると、全果がコンニャク症状を呈して黄色色素の沈着およびウイルス粒子が確認された。しかし直径15 cm以上の果実では、ウイルス感染によるコンニャク症状果は認められず、黄色色素の沈着もなく、外観的には健全果と区別がつか難かった。しかしウイルス粒子は確認された。



第3図 果実の大きさとコンニャク症状果発生との関係

考 察

カーボランダム法で子葉にウイルスを接種すると、接種した子葉には病徴は現われませんが、内部の細胞には特異蛍光がみられ、ウイルスが増殖していることが推測された。

BLACK はヨコバイ類によって伝播される26種のウイルス病のうち23種は、ウイルスが篩管部に注入されて発病するといひ(SCHNEIDER, 1965), 石井ら(1970)は稲萎縮病でもツマグロヨコバイによって、ウイルスが篩管部に注入された後、篩部を下降して生長点付近に移行し、増殖するものと推定した。

われわれの行なった実験によると、まだ病徴の現われない葉の葉柄では篩部や形成層の部分で強い特異的蛍光が観察されたが、これも維管束部を通じてウイルス合成の場から他の場所へのウイルスの転流が行なわれているものと考えられる。

初発病徴がみられた葉切片では、維管束を中心として、葉の表裏の表皮細胞にむかって特異的蛍光が観察されたが、これは、接種した子葉で増殖したウイルスが篩管部を下り、導管を上がって葉の維管束部から葉肉細胞部分に運ばれて増殖しつつある事実を示しているものと考えられる。

また、新展開葉での初発病徴部分の切片では、柵状、海綿状細胞のクロロプラストで、特異的蛍光が部分的に観察される場合がしばしば認められた。TMVに感染したタバコ葉のクロロプラストからのTMVの存在や分離が報告された実例もあるので(LEYON, 1953; BOARDMAN & ZAITLIN, 1958; MATSUSHITA, 1965), CGMMV(W)の感染葉のクロロプラストの中にもウイルスが存在するのかもしれない。

完全発病葉では、柵状、海綿状組織および表皮細胞に特異的蛍光が観察されたが、とくに葉の表裏の表皮細胞での特異的蛍光は強かった。

巻ひげや毛茸の細胞では、特異的蛍光は顕著で、ウイルスの濃度が高いことが認められたが、このような現象はTMVや(村山ら, 1965; 高橋・平井, 1963), CGMMV(C)で(木谷ら, 1967)も報告されている。

このように、ウイルスが表皮細胞や巻ひげ、あるいは毛茸の細胞に多量に存在することは、接

触伝染の可能性が高いことを示唆するもので、極めて重要なことと考えられる。

CGMMV(C)では花粉の中にもウイルスの存在を暗示させるような報告がみられるが(木谷ら, 1966; 徳島農試, 1968), CGMMV(W)では花粉には特異的蛍光は観察されなかった。これは、花粉自体の発する輝黄色の強い自家蛍光のために特異的蛍光が阻害されて観察されなかったのか、ウイルス抗原の存在がなかったためによるものであるかは明らかでない。しかし、花粉集団の周囲の細胞では強い特異的蛍光が観察されるので(図版Ⅱの16)、雄ずいや雌ずいの細胞でのウイルスの存在を否定することはできないようで、さらに検討してみる必要がある。

開花前の雌花に附着している幼果では、果皮や果肉の部分ではみられなかった特異的蛍光が、維管束部で観察された(図版Ⅱの14)。これもウイルスが維管束を通じて移動しているものと考えられるが、これらのウイルスが果実の肥大にともなって、果肉細胞で増殖し、コンニャク症状を起因するのではないかと考えられる。

親蔓や子蔓の展開葉にウイルスを接種した場合、そのどちらにウイルスを接種しても、接種しない蔓の葉にかなり早く病徴があらわれる。これは合成されたウイルスは維管束を通じて、かなり速やかに移行するためであろう。このことは第2次伝染を考える上に重要なことであると思われる。

トマトのTMV,あるいはキュウリのCGMMV(C)は、種子の表面に附着し、あるいは内部に潜在していて種子伝染を行なうといわれているが(森, 1958; TAYLOR, 1961; BROADBENT, 1965; 都築・小室, 1967; VAN KOOT, 1959; 木谷ら, 1966; 井上, 1967; 西・西沢, 1967; 徳島農試, 1968), われわれが、スイカおよびユウガオの種子を用いて種子伝染の有無を検討した結果では、いずれも2~4%範囲で伝染することが認められた。この結果からみると、伝染率は高くはないが、防除上注意すべきことと考えられる。なお種子内部に潜在するかもしれないウイルスによる伝染については確認していないので検討する必要がある。

根部におけるCGMMV(W)の感染は、根部の断根の有無にかかわらず認めることができなかった。しかし、井上ら(1967)は根部に対する汁液接種により、CGMMV(C)が根部感染を行なうことを認めているので、さらに検討する必要がある。

本病の致命症は、果実がコンニャク症状果になることであるが、果実の大きさが大人のこぶし大位までにウイルスの感染をうけると、すべてコンニャク症状果となるが、それ以上の大きさになってから感染をうけると、外観上でもまた内部の果肉部でも健全果とほとんど区別のつかない場合が多かった。しかし、電子顕微鏡で観察するとウイルス粒子が確認されるので、これらの果実の取扱いに対しては、十分な注意が必要と思われる。

摘 要

蛍光抗体法(直接法)によって、キュウリ緑斑モザイクウイルス(スイカ系)(CGMMV(W))に感染したスイカの葉、葉柄、子葉、巻ひげ、毛茸および幼果におけるウイルスの分布および伝染に関する2~3の基礎試験を行なった結果、つぎの所見をえた。

- 1 特異的蛍光は、葉では柵状、海綿状の両組織、通導組織、表皮細胞、毛茸で観察され、特に表皮と毛茸中のウイルスの濃度は高く、接触伝染の可能性が暗示された。
- 2 葉緑体、葉柄、巻ひげ、開花前の雌花の幼果の維管束部でも特異的蛍光はみられたが花粉にはみられなかった。
- 3 種子伝染はスイカで2%, ユウガオで4%であった。
- 4 無断根苗も断根苗も根を通したウイルスの感染はみられなかった。

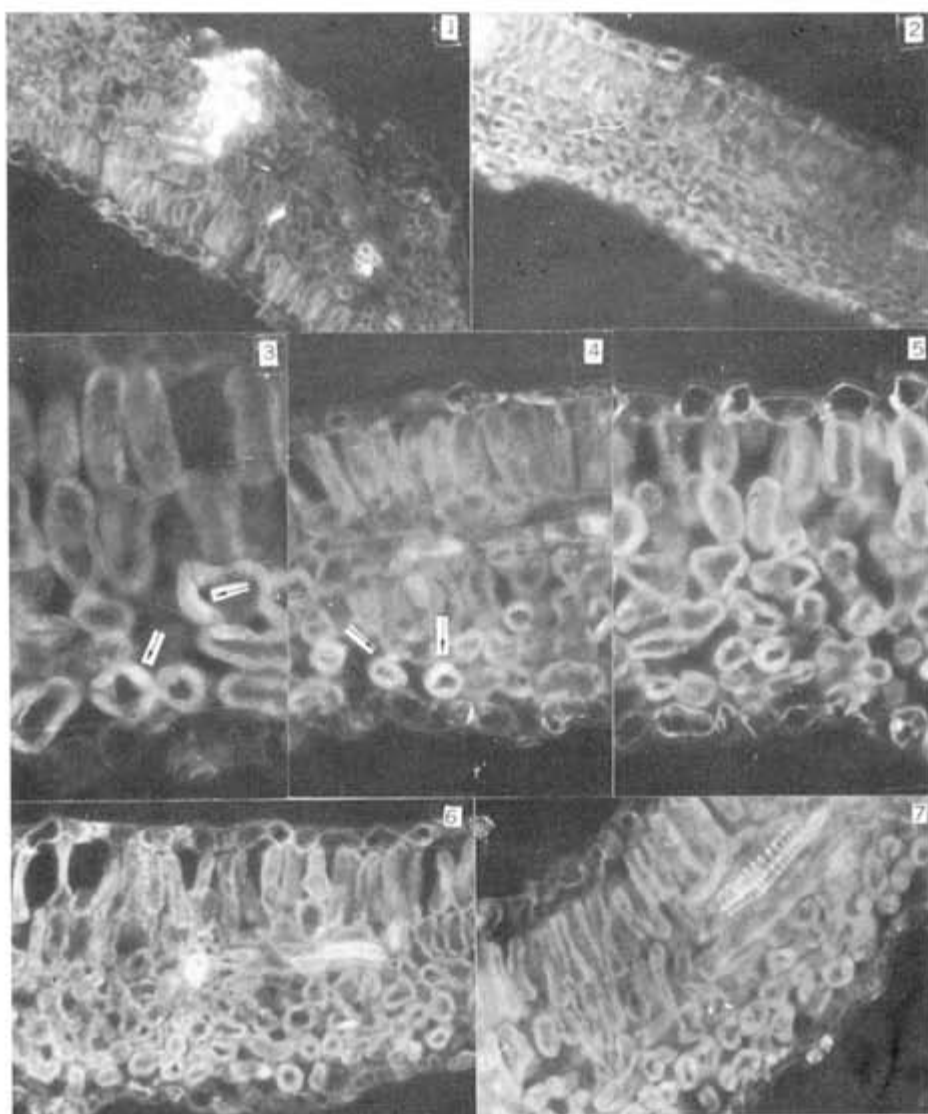
- 5 親蔓と子蔓の完全展開葉に接種したウイルスの移行は早いようで、25～30℃下では5日後に、親蔓接種区は子蔓に、子蔓接種区は親蔓にウイルスの検出および発病がみられた。
- 6 肥大期にある幼果は、こぶし大になるまでにウイルスが注入されると、注入果は全部がコンニャク症状を示したが、こぶし大より大きい幼果では、症状は軽微で、黄色色素の沈着はみられず、健全果との区別は困難であった。しかし、ウイルスは検出された。

引用文献

- BOARDMAN, N.K. & M. ZAITLIN (1958) : *Virology*, 6 : 758—768.
- BROADBENT, L. (1965) : *Ann. Appl. Biol.*, 56 : 177—205.
- 土居養二・鳥山重光・与良清・明日山秀文(1969) : 日植病報, 35 : 180—187.
- 日高醇・平井篤造・村山大記・与良清(1960) : 植物ウイルス病—実験法と種類—. 東京, 朝倉書店, pp. 3—6.
- 副島正美・菅原潔(1966) : 化学と生物, 4 : 37—44.
- 井上忠男(1966) : 植物防疫, 20 : 375—378.
- 井上忠男・井上成信・麻谷正義・光畑興二(1967) : 農学研究, 51 : 187—197.
- 伊藤道夫(1966) : 蛋白質・核酸・酵素, 9 : 1268—1273, 10 : 25—29, 103—107, 351—355, 438—443.
- 石井正義・安尾俊・山口富夫(1970) : 農事試験場報告, No. 14 : 20—22.
- 木谷清美・木曾皓・鄭鳳朝(1966) : 四国植物防疫研究, No. 1 : 37—46.
- 木谷清美・木曾皓・山本孝彜(1967) : 四国農業試験場報告, No. 17 : 1—12.
- 木村一郎(1965) : 蛋白質・核酸・酵素, 9 : 48—50, 296—302.
- 小室康雄・栃原比呂志・深津量栄・長井雄治・米山伸吾(1968) : 日植病報, 34 : 377 (講要).
- VAN KOOT, Y. & H.J.M. VAN DORST (1959) : *T. Pl. ziekten*, 65 : 257—271.
- LEYON, H. (1953) : *Exptl. Cell Res.*, 4 : 362—370.
- MATSUSHITA, K. (1965) : *Plant & Cell Physiol.*, 6 : 1—6.
- 森寛一(1958) : 日植病報, 23 : 41.
- 村山大記・横山竜夫・川村明美・川島豊作(1965) : 日植病報, 30 : 131—135.
- 西泰道・西沢正洋(1967) : 九州農業試験場報告, 13 : 89—111.
- SCHNEIDER, I.H. (1965) : *Adv. Virus Res.*, 11 : 163—215.
- 高橋壮・平井篤造(1963) : 日植病報, 28 : 198—200.
- TAYLOR, R.H., R.C. GROGAN & K.A. KIMBLE (1961) : *Phytopath.*, 51 : 837—842.
- 徳島農試(1968) : 昭和42年度作物病害に関する試験成績書. pp. 101—106.
- 都築仁・小室康雄(1967) : 農及園, 42 : 57—58.

(1971年1月29日 受領)

図版 I



図版 I 1, 2 初期病徴出現時にみられる特異的蛍光

3, 4 葉緑体にみられる特異的蛍光(矢印)

5 完全発病葉にみられる特異的蛍光

6, 7 完全発病葉にみられる特異的蛍光

図版 II 8 無病徴葉の葉柄にみられる特異的蛍光

9 巻ひげの表皮細胞とその直下の柔細胞にみられる特異的蛍光

10 同上 拡大

11 毛茸にみられる特異的蛍光

12 ウイルスを接種した子葉(無病徴)にみられる特異的蛍光

13 同上 拡大

14 開花前の幼果(直径約5mm)の維管束にみられる特異的蛍光

15 雄ずいにみられる特異的蛍光(下矢印) 上矢印は花粉での自家蛍光

16 花粉集団附近の細胞にみられる特異的蛍光(矢印は蛍光)

