

新潟砂丘地における有翅アブラムシの発生消長とダイコンのモザイク病について (第3報) ダイコンから分離されたキュウリモザイクウイルスについて

佐野義孝・関川正規・小島 誠

Yoshitaka SANO, Masaki SEKIKAWA and Makoto KOJIMA : Seasonal incidence of winged aphids and radish mosaic disease on the dune in Niigata

(3) Cucumber mosaic virus isolated from radish plants

Summary

An isolate of cucumber mosaic virus (CMV-R83) was obtained from a radish plant showing severe mosaic symptom on the dune in Niigata. The plant was doubly infected with CMV and turnip mosaic virus which is usually detected from mosaic diseased plants in the fields. In general, CMV was rather difficult to infect radish plants by common inoculation with crude sap. CMV-R83 isolate, however, was able to easily infect some radish cultivars with no symptom, when concentrated preparations from the infected tobacco leaves were used as inoculum. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect the virus from radish plants collected from the fields revealed that CMV was distributed in both radish plants with or without symptoms. However, infection frequency and concentrations of CMV were much higher in plants showing severe mosaic than the symptomless ones. The considerable relationship between radish mosaic disease and CMV was discussed.

秋ダイコンは新潟砂丘地における主要作目の一つであり、スイカの裏作として8月から11月にかけて大規模に栽培されている。

本地域におけるダイコンモザイク病の主な病原は、カブモザイクウイルス (TuMV) とキュウリモザイクウイルス (CMV) であることを既に報告した³⁾。すなわち、激しいモザイク症状を示すダイコンのほとんどは TuMV と CMV との重複感染かまたは TuMV の単独感染によるものであり、CMV 単独感染株の場合には、通常無病徴かまたは極めて弱い症状を示すだけである³⁾。これらのウイルスはいずれもアブラムシにより非永続的に伝播される。また、このうち CMV は40数科の植物を宿主多犯性のウイルスであり、TuMV の宿主範囲はダイコン・カブなどのアブラナ科植物にほぼ限られる⁵⁾。TuMV は、単独でもダイコンに激しいモザイク症状を引き起こすので、本病の主要な病原であることが明らかである。

一方、CMV は TuMV と重複して検出される場合が多いが、ダイコンに対する病原性は不明な点が多い。

本研究では、モザイク病と CMV との関係を明らかに

するために、重複感染株から分離した CMV の1分離株を用いて、ダイコンに接種試験を試みた。また、ダイコン圃場における CMV 感染の実態を明らかにするために、圃場から様々な症状を示したダイコン株を採集し、間接酵素結合抗体法 (間接 ELISA) による検定を試みた。なお、本研究を行なうに当たり、抗血清の作成に御協力下さった新潟県園芸試験場中臣康範・宮川正通両氏に対し心よりお礼申し上げる。

材料および方法

1 供試ウイルスおよび接種試験

本試験に供試したウイルス (CMV-R83) は、1983年に圃場 (新潟市) で採集したモザイク病感染ダイコンの1株から分離した。この採集株は激しいモザイク症を呈し、TuMV との重複感染が確かめられたので汁液接種したタバコの上位葉を採取してまず TuMV を除去した。分離した CMV はタバコ (KY-57) に再び接種して、26°C で5日間増殖させた後、接種葉を採取して、2~5倍量の0.01Mりん酸緩衝液 (pH8.0) とともに乳鉢で磨砕し、搾汁した粗汁液をカーボランダム法により、ダイコン (宮重、夏みの早生2号、新生理想) を始めとする各種検定植物に接種し、病徴の発現を検討した。接種植

物はすべてガラス室内で管理し、1~2週間後に上位葉の一部を採取して、寒天ゲル内簡易二重拡散法⁶⁾によりウイルスの検出を試みた。

2 抗血清の作成と ELISA 試験

Lot らの方法⁴⁾にしたがい、接種5日後のタバコ接種葉を0.5M クエン酸緩衝液 (pH6.5) とともに磨砕し、クロロフォルムによる清澄化とポリエチレングリコール (重合度6,000) による濃縮の後、分画遠心およびしょ糖密度勾配遠心によりウイルスを精製した。

この精製 CMV 試料 (1.3~2.0mg/ml) を数回に亘って家兎に免疫して、力価 1/1024 (重層法) を示す抗血清を得た。

抗血清からのγグロブリンの精製、アルカリフォスファターゼ conjugate の調整、および ELISA (直接法) の手順は Clark & Adams の方法¹⁾ に準拠した。また、ヤギ抗ウサギ抗体 conjugate (Helix Biotech 社) を用いた間接 ELISA⁷⁾ を行ない、そのウイルス検出感度を直接法と比較した。

3 圃場から採集したダイコンの ELISA 検定

ダイコンモザイク病と CMV の関係を明らかにするために、圃場から様々な症状を示すダイコン株を採集し、ELISA 検定を試みた。

検定に際しては、圃場においてランダムに100株のダイコンを選び、1株毎にモザイク症状の有無および程度を記録した後、全ての株から本葉の一部を採取し、ELISA による CMV の検定を試みた。症状の程度については、①無病徴、②軽微なモザイク、または葉脈透明、③明瞭なモザイク、および④激しいモザイクと縮葉、の4段階に分けて記録した。

結 果

1 各種検定植物における病徴

R83を汁液接種したタバコ (エムシー, KY-57) および *Nicotiana glutinosa* では、1週間から10日後に上位葉に激しいモザイク病徴が現われ、葉身は著しい奇形を呈した (図版 I-c)。トマト、ナス、カボチャ、キュウリ、ヒョクニチソウ、およびセンニチコウも全身感染を示し、いずれも上位葉にモザイク症状が観察された。また、ソラマメ、ササゲ、インゲン、*Chenopodium amaranticolor*、ゴマ、スイカでは接種葉に局部病斑が形成された。これらの検定植物における病徴は CMV の普通系²⁾ によく一致した。

ダイコンへの戻し接種

第1~2本葉が展開したダイコン苗の子葉を含む全ての葉に接種を行ない、R83の病原性を検討した。1試験当たりそれぞれ10~15株を供試し、10日~2週間後に1株

毎に接種葉と上位葉から試料を採取し、寒天ゲル内拡散法で検定を試みた。

実験当初、ウイルスを接種した後、ガラス室で1週間以上保持して、明瞭な病徴が現われたタバコ葉を接種源に供試したが、数回行なった実験の結果は全て陰性であった。

この理由として、R83はダイコンから分離されたウイルスであるにもかかわらずダイコンに感染しにくいと推測され、病原性を確認するには、より感染性の高い、高濃度の接種源が必要と考えられた。

そこで、26°Cの人工気象器に5日間保ったタバコ苗の接種葉を供試したところ、ダイコン (宮重) への接種がはじめて可能となった。

それゆえ、以後の試験にはこの方法で調製した汁液を接種源とした。その結果、宮重のほかにも、新生理理想および夏みの早生2号のダイコン苗で、いずれも高率な感染を認めた。しかし、感染株のほとんどは明瞭な病徴を示さなかった。まれに一部の感染株で軽微な退緑斑が観察されたが、圃場でのモザイク症状とは明らかに異なっており、このような感染株もその後は健全株とほぼ同等の生育を示した (図版 I-a)。一方、同一の感染株を寒天ゲル内拡散法で経時的に検定したところ、結果にふれが生じたので、感染株におけるウイルスの濃度はきわめて低いと推察された。

2 ELISA の至適条件

検定に先立ち、直接法および間接法におけるそれぞれの至適条件を検討した。その結果、図1に示すように直接法では coating 抗体 2μg/ml, conjugate 1,000倍、間接法では一次抗体 0.5μg/ml, conjugate 1,000倍が

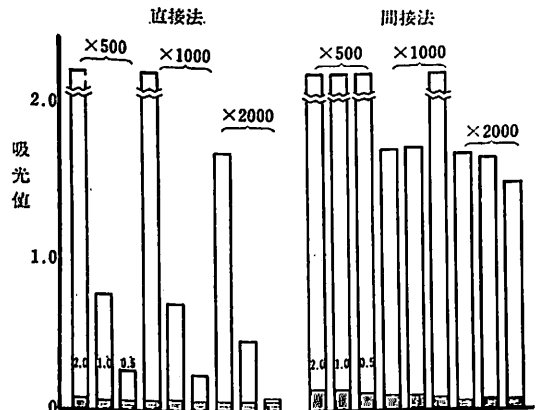


図1 ELISA の至適条件

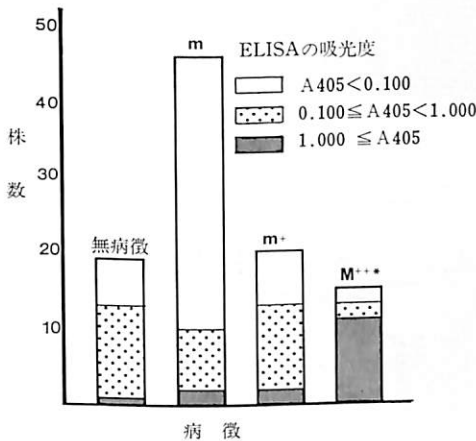
各ヒストグラムは様々な抗体・conjugate 希釈条件下における、CMV 感染タバコ葉 (白色部) と健全タバコ葉 (ドット部) の ELISA の吸光度 (A405nm) を示す。図中の×500, 1000, 2000 は conjugate の希釈度を、また 2.0, 1.0, 0.5 は抗体の濃度 (μg/ml) を示す。

各々の至適条件と判定された。この至適条件の元では直接法および間接法のいずれにおいても、部分精製のウイルス濃度として数 ng/ml まで検出することが可能であった。しかし、直接法に比べ間接法で反応の特異性がより高く、少量の抗体で検定が可能のため、以後のウイルス検定には間接法を用いることにした。

3 圃場から採集したダイコンの ELISA 検定

検定の結果を、調査個体の病徴の程度別に類別して図2に示す。モザイク症状の有無にかかわらず CMV は検出され、特に激しいモザイク株からの検出は 13/15 株と最も高い値が得られた。この際、1.0 以上の高い吸光度を示す個体が他のグループに比べて著しく多く、ウイルス濃度が相対的に高いことが示唆された。モザイク症状が中程度あるいは軽い株からも CMV は検出されたが、病徴の程度が軽くなるにしたがって、検出頻度も全体的な吸光度も次第に低下した(図2)。

一方、無病徴の株からも高率(13/19 株)に CMV は検出されたが、その吸光度から判断して、ウイルス濃度はかなり低いと推定された。



* m … 極く軽微なモザイク。
 m+ … 中程度のモザイク症を呈した株
 M++ … 激しいモザイクと縮葉を呈した株

図2 圃場のダイコンの ELISA 試験結果
 m … 極く軽微なモザイク、または葉脈透明を呈した株
 m+ … 中程度のモザイク症を呈した株
 M++ … 激しいモザイクと縮葉を呈した株

考 察

本実験に用いた CMV-R83 株は、TuMV と重複感染して激しいモザイク症状を示すダイコン株から分離され、各種検定植物における病徴から CMV-普通系²⁾と判定された。

しかし、本ウイルスは単独でダイコンに感染し難く、

感染しても明瞭なモザイクを生じないことから、ダイコンに対する病原性は低いと考察される。それゆえ、本ウイルスをダイコンに戻し接種するには高濃度の接種源を必要とし、26°Cの人工気象器に5日間保ったタバコ苗の接種葉を用いることにより、ダイコンへの接種が可能となった。タバコ葉中の CMV 濃度は経時的に推移し、接種葉では接種3~8日後に最高値に達するとされている⁸⁾。

一般圃場から採集したダイコン葉身を用いて、ELISAによる検定を試みたところ、CMV はモザイク症状の有無にかかわらずダイコンに感染し、激しい症状を示す罹病株ほど感染率が高まり、ウイルス濃度も高まることが明らかになった。CMV はダイコンに無病徴感染すること、TuMV が単独でモザイク症状を引き起こすことから、圃場のモザイク株は TuMV の単独感染か、あるいは CMV との重複感染によるものと考えられる。

以上のことから、CMV と TuMV との重複感染により、モザイク症状が一層激しくなり、CMV 単独感染の場合に比べて CMV の濃度も高まることが推定された。

摘 要

1 1983年、一般圃場において激しいモザイク症を示したダイコン株を採集し、病原の同定を行なったところ、CMV と TuMV の重複感染であることが判明した。

2 この重複感染株より CMV (R83) を分離した。本ウイルスをタバコで増殖の後、ダイコン3品種を含む各種検定植物に汁液接種し、その病徴を観察した。

3 各種検定植物における病徴から、本ウイルスは CMV の普通系に属すると判定された。しかし、ダイコンには感染しにくく、また感染してもモザイク症状は見られなかったため、本ウイルスはダイコンに対しては病原性が低いと考えられた。

4 圃場でランダムに採集したダイコン葉を間接 ELISA により検定した結果、CMV はモザイク症状の有無にかかわらず感染していることが明らかになった。しかし、特に激しい症状を示す株において、CMV の検出頻度と ELISA 値がともに高く、TuMV との重複感染による影響が考えられた。

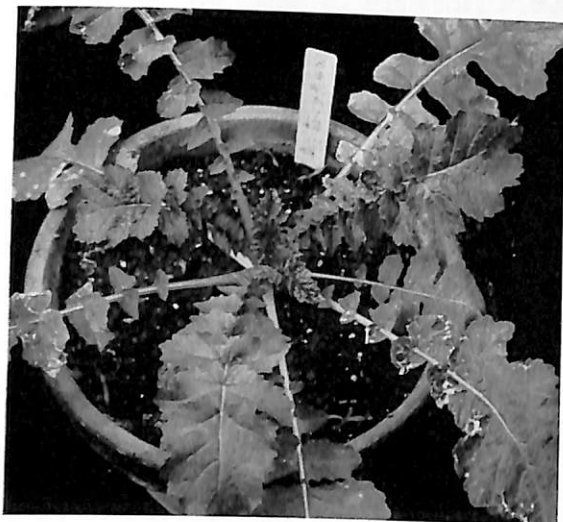
引用文献

- 1) Clark, M. F. and Adams, A. N. (1977) J. gen. Virol. 34: 475~483.
- 2) 日高 醇・都丸敦一 (1960) 秦野たばこ試報 46: 125~134.
- 3) 小島 誠・横倉 明 (1980) 北陸病虫研報 28: 61~65.
- 4)

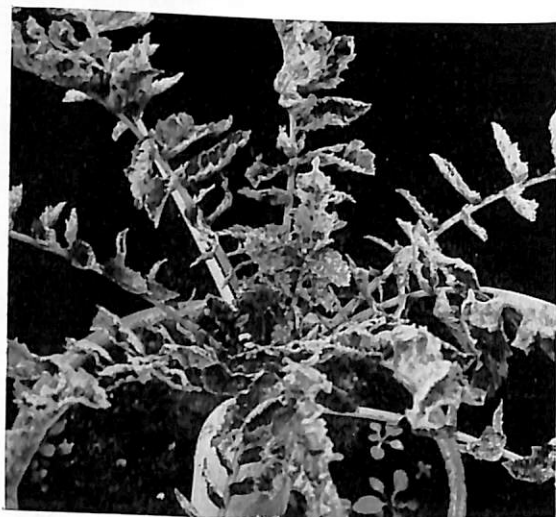
Lot, H., Marrou, J., Quiot, J.B. and Esvan, C. (1972) Ann. Phytopathol. 4: 25~38. 5) 植物ウイルス研究所学友会編 (1984) 野菜のウイルス病 (養賢堂). 6) 匠原監一郎 (1980) 植物防疫 34: 106~110. 7) Somowiyarjo, S., Sako, N. and No-

naka, F. (1985) Ann. Phytopathol. Soc. Japan 51: 569~575. 8) 都丸敬一 (1967) 秦野たばこ試報 58: 19~26.

(1986年7月20日受領)



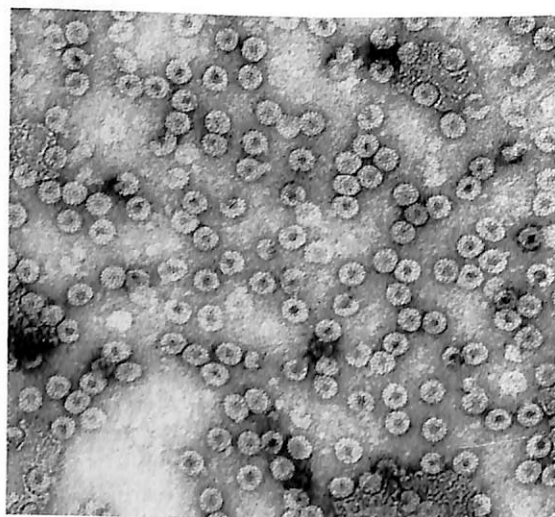
a



b



c



d

図版説明

- a 接種48日後の CMV-R83 単独感染株 (宮重総太り) の病徴。
 b CMV-R83 と TuMV との重複感染株の激しいモザイク症状 (宮重総太り)。
 c CMV-R83 を接種した *Nicotiana glutinosa* の病徴 (接種29日後)。
 d 部分精製した CMV-R83 の電顕像 (酢酸ウラン染色), 10万倍。