HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	スイカ緑斑モザイク病の診断と防除に関する研究
Author(s)	四方, 英四郎; 桑田, 博隆; 小島, 誠; 仙北, 俊弘; 青柳, 明典
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 11(1), 119-128
Issue Date	1978-07-28
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/11909
Type	bulletin (article)
File Information	11(1)_p119-128.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

スイカ緑斑モザイク病の診断と防除に関する研究

四方英四郎・桑田博隆*・小島　誠
仙北俊弘・青柳明典
(北海道大学農学部植物学教室)

(昭和52年9月8日受理)

Studies on Diagnosis and Control of Water-melon Green Mottle Mosaic Disease

Eishiro SHIKATA, Hirotaka KUWATA*, Makoto KOJIMA, Toshihiro SENBOKU and Akinori AOYAGI
(Department of Botany, Faculty of Agriculture Hokkaido University, Sapporo, Japan)

緒　言

昭和43年，千葉・茨城両県下にスイカの"コンニャク病"と呼ばれる新病害が発生し，その病原がキュウリ緑斑モザイクウイルスであることが確認された。その後，本ウイルスは，昭和41年に西日本のハウス栽培キュウリで問題になったキュウリ緑斑モザイクウイルス—キュウリ系統[4]とは異なる系統で，同ウイルスのスイカ系統(CGMMV-W)と同定された[6]。青森県下においても昭和45年頃より，本ウイルスのスイカ系統によるスイカの被害がみられるようになり，重要病害のひとつとなった[2]。筆者らは本病の診断防除の目的で，CGMMV-Wに対する純化法の再検討を行った上，その抗血清を作成し，それらを用いて，2, 3の基礎的実験と血清学的試験を行ったので，その結果を報告する。

本研究を行うにあたり，種々御高配をいただいた青森県農業試験場次長香川寛，環境部長千葉末作，病理科長千葉順逸の諸氏に厚く御礼申し上げる。

材料および方法

ウイルス源ならびに供試植物

青森県西郡木造町筒木坂のスイカ圃場から，明瞭な緑斑モザイク症状を呈しているスイカ葉を採集し，キュウリ(品種 Chicago Pickling)で継代増殖させたウイルス株を供試した。本ウイルス株は *Chenopodium amaranticolor* COSTE et REYN. に局部病斑を生じたが，*Datura stramonium* L. 上には生じなかった。キュウリ(*Cucumis sativus* L.)には明瞭な緑斑モザイク症状を呈した。

精製材料は，接種後15日目のキュウリ茎葉を採り，凍結保存(−30°C)したものを使用した。

一部の実験では，ユウガオ(*Lagenaria siceraria* STANDL.)も用いた。すべての植物は高圧湿熱殺菌土壌を用い，ガラス室内で生育させた。

接種は0.1 M 燐酸緩衝液による磨砕液をカーボランダム法で各植物の子葉に塗抹した。

一部は楊枝による茎への刺し込み接種も行った。

抗原精製

精製に使用した超遠心機は，日立分離用超遠心機(65P)で，分画遠心分離にはRP 60 T，蔗糖密度勾配遠心にはRPS 27の各ローターを用いた。また，蔗糖密度勾配遠心後，各カラムをISCO fractionator (Model 180)で，分画，走査した。ウイルス抗原濃度は日立デジタル分光光度計(624型)を用い，光学的に測定した。

凍結茎葉を磨砕し，抽出用緩衝液(0.01 M EDTAを含む0.1 M 燐酸緩衝液，pH 7.4)を2倍量加え，1時間室温に放置した。その後，クロロホルム・*n* ブタノール等量混合液を搾汁液の1/2量加え，ジュースミキサーで

* 青森県農業試験場病理科
* Department of Plant Pathology, Aomori Prefectural Agricultural Experiment Station, Kuroishi, Japan.

1分間撹拌した。低速遠心 (3,000 rpm, 15分間) 後，水層部を取り，それに4% ポリエチレングリコール (#6000) を加え，1時間撹拌し，遠心管に移し静置した。1時間後，低速遠心 (6,000 rpm, 15分間) し，得られた沈澱を懸濁用緩衝液 (0.001 M EDTA を含む 0.01 M 燐酸緩衝液，pH 7.4) で再浮遊させ，再び濃縮液の 1/2 量のクロロホルム・*n* ブタノール液で清澄化した。さらに，10,000 rpm, 15分間と 30,000 rpm, 60分間の分画遠心後，蔗糖密度勾配遠心により精製した。使用カラムは懸濁用溶媒に溶解させた各蔗糖液 (10, 20, 30, 40%) を 6, 9, 9, 9 mℓ ずつ遠心管に重層し，冷室にて一昼夜静置したものである。このようなカラムに濃縮試料を 2 mℓ ずつ重層し，22,000 rpm, 90分間遠心した。遠心後，カラムを 254 nm で走査し，最大吸収ピーク部分 (フラクション E) (Fig. 1) のみを採取し，懸濁用溶媒で希釈したのち，再び高速遠心で濃縮した。最終沈渣を生理的食塩水で再浮遊させ，免疫源ないし，抗原とした。

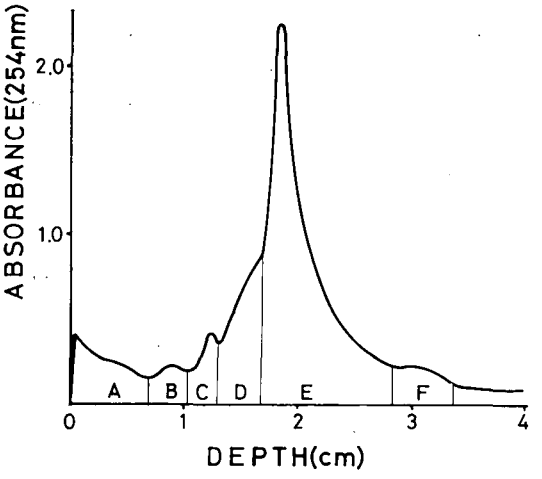


Fig. 1. ISCO scanning pattern of CGMMV-W after sucrose density-gradient centrifugation.

免　　疫

精製ウイルスを以下の要領で家兎に免疫した。第1回，第2回の免疫は等量の Freund's Complete Adjuvant とのエマルジョンを各 2 mℓ ずつ筋肉注射し，3，4回目は精製ウイルスをそのまま各 1 mℓ ずつ静脈注射した。ウイルス濃度は 1，2回目は 2.5 mg，3，4回目は 0.13 mg であった。免疫は1週間間隔とし，最終免疫後，1週間目に採血した。免疫した3羽の家兎からの各抗血清につき，重層法により力価の検定を行った。対照として，免疫前の各正常血清を使用した。抗血清 A は 1:1024，抗血清 B，C はそれぞれ 1:2048 の力価を示し，正常血清とはいずれも反応しなかった。以下の実験には抗血清 B を供試した。

血清反応

抗血清の力価検定は精製ウイルスを抗原として，重層法によって行なった。その他，罹病葉，果実などからのウイルス抗原の検出には，スライド反応，微凝集反応 (Microprecipitin test)，寒天ゲル二重拡散法，免疫学的電子顕微鏡観察 (免疫電顕法 Immune electron microscopy) を行なった。スライド反応は室温条件で行い，対照には抗血清に対しては健全植物汁液，罹病植物汁液には生理的食塩水を加え，同時に観察した。反応の判定は，最初肉眼によっていたが，のち，暗視野双眼実体顕微鏡 (オリンパス model JM を改良したもの) で観察した。微凝集反応では原法のペトリー皿の代りに組織培養用 multi-dish tray (96穴，径 6 mm) を用い，抗原，抗血清各 25 μℓ を微量用ピペットで注入し，流動パラフィンを 25 μℓ 重層して，37°C に静置した。観察はすべて暗視野顕微鏡で行った。寒天ゲル二重拡散法では 9 cm ペトリー皿を用い，0.85% 寒天 (special agar-noble DIFCO Lab.) を 8 mℓ 注入し，ゲルの厚さを 1 mm とした。寒天は 0.1% 窒化ナトリウムを含む PBS に溶かした。ゲル中に 7 mm の穴 (well) を 7 mm 間隔に配列した。反応は湿室状態を保ち，37°C 下で2日間以上静置したのち観察した。免疫電顕法はカーボン補強ホルムバール支持膜上に希釈した抗血清を1滴とり，その中に罹病葉の小片を浸し，そのグリッドを湿室に15分間静置したのち，乾燥させ，2% PTA によるネガティブ染色を施した。

電子顕微鏡観察

精製ウイルス，dip 法による試料は，すべて 2% PTA 染色したのち，電子顕微鏡 (JEM 100 B, 80 kV) で観察した。

結　　果

1) 汚染竹ベラの感染力

スイカをユウガオ台木に接ぐ場合，通常，竹ベラが使用されている。そこで，接木時に使用する竹ベラが一度ウイルスに汚染した場合，その感染力がどのくらい保持されるかをみるため，実験的に汚染竹ベラを連続的に使用して，感染力の保持状況を調べた。CGMMV-W 罹病ユウガオの茎に竹ベラ (楊枝を平らに削ったもの) を刺し，直ちにキュウリ20個体を連続的に刺し込み接種した。接種は子葉の付根から，下方へ約 1～2 cm の深さま

Table 1. Retention of infectivity on small bamboo sticks which stuck into the stem of plants infected with CGMM-W

No. plants inoculated successively	Experiments		
	I	II	III
1	+(10)[1]	+(8)	+(8)
2	+(10)	−	+(8)
3	+(11)	−	+(8)
4	+(13)	+(11)	+(11)
5	+(11)	+(11)	−
6	−	−	+(10)
7	×[2]	+(10)	−
8	×	−	+(11)
9	−	−	−
10	−	+(11)	−
11	−	×	×
12	−	−	+(8)
13	−	−	−
14	×	−	−
15	−	−	−
16	+(10)	+(11)	+(11)
17	×	×	+(10)
18	−	−	−
19	−	−	+(11)
20	+(11)	−	+(10)
Total	7/16	6/18	11/19

1) Days after inoculation when symptom appeared.
2) Test plants died before symptom developed.

で刺し込んだ。Table 1 に示すように，汚染竹ベラによる感染は必ずしも連続的ではなかったが，20番目の個体をも感染させた。

発病は，早いもので，接種後8日目であった。

実験は3反復したが，そのうち2反復（実験 II, III）につき，接種後8日目（一部の植物にのみ発病）に各キュウリの上葉の一部を採り，スライド反応でウイルス抗原の検出を試みた。反応は40倍希釈抗血清と上葉からの搾汁液をそのまま用いた。肉眼による判定の結果，すべてが陽性と判読された。

しかるに，後日，発病が確認された株数は II で6株，III で11株であった（Table 1 参照）。

このことから，常法のスライド反応の肉眼鑑定は，その判読に問題があり，何らかの工夫が必要であると思われた。

2) 汚染竹ベラの消毒

前実験から，接木用竹ベラで少なくとも20回使用したあとも，なお感染力が保持されていたので，汚染竹ベラの消毒薬剤ならびに処理方法を検討した。竹ベラを感染源（罹病ユウガオの搾汁液）に数秒間浸し，その後，各種薬剤に10秒間ないし10分間浸し，水洗後，キュウリに刺した。竹ベラは各処理ごと，植物毎に取り換えた。結果は Table 2 に示した。水酸化ナトリウム，クロム硫酸などは室温条件処理直後で充分効果があり，PA-74（ヨウシュヤマゴボウの抽出成分）を除く他の薬剤も，75°C に加温した場合，効果的であった。

3) スライド反応試験

1)項の実験で，罹病搾汁液を直接スライド反応に用いた場合，反応の判読が困難であることを述べた。そこで罹病ユウガオの葉に等量の生理的食塩水を加え，磨砕，

Table 2. Sterilizing effect of chemicals on the CGMMV-W carrying bamboo sticks

Treatments				No. plants inoculated successively						
Chemicals	Concent-ration	Tem-perature	Period	1	2	3	4	5	6	Total
Na_3PO_4	10%	r.t.[1]	10 sec	+(9)[2]	−	−	+(14)	−	−	2/6
	do.	do.	10 min	−	+(9)	−	−	−	−	1/6
	do.	75°C	10 sec	−	−	−	−	−	−	0/6
	do.	do.	10 min	−	−	−	−	−	−	0/6
NaOH	5%	r.t.	10 sec	−	−	−	−	−	−	0/6
	do.	do.	10 min	−	−	−	−	−	−	0/6
	do.	75°C	10 sec	−	−	−	−	−	−	0/6
	do.	do.	10 min	×	−	−	−	−	−	0/5
SDS	5%	r.t.	10 sec	+(9)	−	+(12)	+(13)	−	+(12)	4/6
	do.	do.	10 min	−	+(11)	+(10)	−	+(10)	−	3/6
	do.	75°C	10 sec	−	−	−	−	−	−	0/6
	do.	do.	10 min	−	−	−	−	−	−	0/6
Tannic acid	1%	r.t.	10 sec	+(8)	+(8)	−	−	−	+(9)	3/6
	do.	do.	10 min	−	+(10)	−	−	−	−	1/6
	do.	75°C	10 sec	−	−	−	−	−	−	0/6
	do.	do.	10 min	−	−	−	−	−	−	0/6
Alkaline cleanser	5%	r.t.	10 sec	+(9)	+(9)	+(10)	+(12)	+(10)	+(9)	6/6
	do.	do.	10 min	−	+(12)	+(8)	+(8)	+(10)	+(9)	5/6
	do.	75°C	10 sec	×	−	−	−	−	−	0/5
	do.	do.	10 min	−	−	−	−	−	−	0/6
Water		100°C	10 sec	−	−	+(11)	+(12)	−	−	2/6
		do.	10 min	−	−	−	−	−	−	0/6
Chlomic acid		r.t.	10 sec	−	−	−	−	−	−	0/6
		do.	10 min	−	−	−	−	×	−	0/5
PA-74	100%	r.t.	10 sec	+(10)	+(10)	+(10)	+(11)	+(10)	−	5/6
	do.	do.	10 min	+(8)	+(10)	+(10)	+(13)	−	+(12)	5/6
	50%	do.	10 sec	−	+(10)	+(10)	+(8)	+(10)	+(11)	5/6
	do.	do.	10 min	+(10)	−	+(12)	+(10)	−	−	3/6
Control	non-treated			+(9)	+(8)	+(10)	+(10)	+(12)	+(9)	6/6
	no inoculation			−	−	−	−	−	−	0/6

1) Room temperature.
2) Days after inoculation when symptom apeared.

Table 3. Slide test of CGMMV-W

		Reciprocal dilution of antigen[1]								
		2	4	8	16	32	64	128	512	1024
Reciprocal dilution of antiserum	16	+[2](+)[3]	+(+)	+(+)	+(+)	−(+)	−(−)	−(−)	−(−)	−(−)
	32	+(+)	+(+)	+(+)	−(+)	−(+)	−(−)	−(−)	−(−)	−(−)
	64	+(+)	+(+)	+(+)	−(+)	−(+)	−(−)	−(−)	−(−)	−(−)

1) Supernatant after low-speed centrifugation from extract of *L. siceraria* plants 3 weeks after inoculation.
2) Reading result with the naked eye.
3) Reading result with the drak-field microscope (×16).

Table 4. Slide test of CGMMV-W (blind test)*

No. plants tested	Investigators			
	A	B	C	D
1	−[2](−)[3]	−(−)	−(−)	+(−)
2	−(−)	−(−)	−(−)	+(−)
3	−(−)	−(−)	−(−)	−(−)
4[1]	+(+)	−(+)	+(+)	−(+)
5	−(−)	−(−)	−(−)	−(−)
6	−(−)	−(−)	−(−)	+(−)
7	+(+)	−(+)	+(+)	+(+)
8	−(−)	−(−)	−(−)	+(−)
9	−(−)	−(−)	−(−)	−(−)
10	−(−)	+(−)	−(−)	−(−)
11	−(−)	−(−)	+(−)	−(−)
12	−(−)	−(−)	−(−)	−(−)
13	−(−)	−(−)	−(−)	−(−)
14	−(−)	−(−)	−(−)	−(−)
15	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)
16	−(−)	−(−)	−(−)	−(−)
17	−(−)	−(−)	−(−)	−(−)
18	−(−)	+(−)	−(−)	−(−)
19	+(+)	−(+)	+(+)	+(+)
20	−(−)	−(−)	−(−)	−(−)
21	−(−)	−(−)	−(−)	−(−)
22	−(−)	−(−)	−(−)	−(−)
23	−(−)	−(−)	−(−)	+(−)
24	−(−)	−(−)	+(−)	−(−)
Probability	24/24 (24/24)	19/24 (24/24)	22/24 (24/24)	18/24 (24/24)

* Antigen and antiserum were diluted to 1:8.
1) Plants (Gothic number) are affected with the virus.
2) The reactions were read by the naked eye.
3) The reactions were read under the dark-field microscope (×16).

搾汁した液を低速遠心 (3,000 rpm, 15分間) し，その上清を反応に供した。Table 3 に示すように，肉眼による判定よりも，暗視野顕微鏡 (16倍) による判定の方がより明瞭確実であった。

反応は，はじめ全面に微絮状凝集体が現われ，次第に周辺に集まった (Plate I-A, B)。また，目隠しテストの一例を挙げると，Table 4 のように，肉眼による検定結果は，検定者により多少のふれがあったが (的中率 75～100%)，暗視野顕微鏡による検定ではまったく誤読はなかった。

4) 微凝集反応試験

Microprecipitin test の原法[14] を若干修正し，multi-dish tray と暗視野顕微鏡を用いることで，より簡便で精度の高い血清反応が得られた。また，使用抗血清量を一滴 25 μℓ 以下に抑えることができた。抗原として，粗汁液あるいは精製ウイルスいずれを用いた場合も，微絮状凝集物が観察された (Plate I-D, E)。一般に，抗原がある程度希釈されると反応が明瞭であった。例えば，Table 5 に示した反応の場合，40 倍希釈汁液のシリーズが暗視野顕微鏡下でもっとも明瞭であった。Table 5 は罹病キュウリの粗汁液を用いた場合の結果で，10 倍希釈液で 4096 倍希釈抗血清まで反応した。一方，精製ウイルスでは 2048 倍希釈抗血清まで反応した (Table 6)。

5) 寒天ゲル二重拡散法試験

0.85% 寒天ゲル中では，抗原ウイルス粒子の移動度がきわめて低く，沈降帯は抗原 well のごく近傍に生じた。そこで，ウイルス粒子を切断し，移動しやすくするため，同寒天に 0.5% LIS (3,5-diiodosalicylic acid, lithum salt) を添加した[12]。LIS 処理により，1本の沈降帯はそれぞれの well の中央に生じた。抗原 well に病汁液を入れた場合，16 倍希釈抗血清まで反応が認められ，精製ウイルス抗原 (2.6 mg/mℓ または 0.3 mg/mℓ) を入れた場合，64 倍希釈抗血清まで反応が認められた

Table 5. Microprecipitin test of CGMMV-W in crude sap

		Reciprocal dilution of antiserum											
		2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096
Reciprocal dilution of antiserum	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−
	40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−
	80	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−
Control[1]		−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

1) The antigen was a 10-fold diluted healthy sap.

Table 6. Microprecipitin test of CGMMV-W in purified preparation

		Reciprocal dilution of antiserum											
		2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096
Reciprocal dilution of antigen	orginal[1]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	−
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	−
	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	−	−
	16	+	+	+	+	+	+	+	+	±	−	−	−
	32	+	+	+	+	+	+	+	±	−	−	−	−
	64	+	+	+	+	+	+	±	−	−	−	−	−

1) The antigen was purified preparation of CGMMV-W (3 mg/mℓ).

Table 7. Serological detection of CGMMV-W antigen in the affected watermelon fruits

Serological reactions		by Slide test[1]		by Microprecipitin test[2]	
Antiserum used		undiluted	×8	undiluted	×8
Antigen	from rind	20[3]	40	160	160
	from inner part	10(±)	10(−)	20	20

1) The reactions were read by the naked eye.
2) The reactions were read under the dark-field microscope.
3) Dilution end point of the antigen used.

(Plate I-G, H)。

6) 免疫学的電子顕微鏡観察

常法に従って dip した試料に比べ，抗血清と反応させた場合，抗原ウイルス粒子の周囲は濃く染り，粒子の凝集が顕著であった (Plate I-J)。

7) スイカ果肉，果皮からのウイルス抗原検出

青森県西津軽郡鰺ケ沢町産の本ウイルス罹病スイカ果実につき，その果皮部分と果肉部分に分け，血清学的に抗原ウイルスの検出を試みた。双方とも，10倍量の生理的食塩水を加え，磨砕，低速遠心 (3,000 rpm, 15分間) した上清を抗原とした。最初は，比較的濃い抗血清 (原血清と8倍希釈) を用い，スライド反応と微凝集反応とを比較した。Table 7 は肉眼判読によるスライド反応の結果と1時間後の微凝集反応の結果であるが，暗視野顕微鏡を用いた微凝集反応の方がより明瞭であり，肉眼鑑定によるスライド反応は，葉の場合と同様，判読の困難な場合が多かった。

次に，微凝集反応により，抗原，抗血清をそれぞれ

Table 8. Serological detection of CGMM-W antigen in the affected watermelon fruits by means of microprecipitin test*

		Reciprocal dilution of antiserum											
		undil.	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
Reciprocal dilution of antigen from the rind of the fruit	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−
	20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−
	40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−
	80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−
	160	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
	320	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−
	640	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−
Reciprocal dilution of antigen from inner part of the fruit	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−
	20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
	40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
	80	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−
	160	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−
	320	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	640	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

* The reactions were read under the dark-field microscope.

Table 9. Application of the dark-field slide test for the detection of CGMMV-W antigen from plants at the early stage of infection

No. plants tested	Days after inoculation	Days required to develop symptom	Investigators					Virus particles (dip)
			A	B	C	D	E	
I	2	7	+[1](−)[2]	−(−)	−(−)	−(−)	−(−)	−
II	4	10	−(−)	−(−)	−(−)	−(−)	−(−)	−
III	6	11	−(−)	−(+)	−(+)	−(+)	+(+)	+
IV	8	10	−(+)	−(+)	+(+)	−(+)	−(+)	+
V*	10	9	−(+)	−(+)	+(+)	−(+)	−(+)	+
VI	12	13	−(+)	+(+)	+(+)	−(+)	+(+)	+
VII*	14	10	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+

* Plants V and VII showed the symptoms before test.
1) The reactions were read by the naked eye.
2) The reactions were read under the dark-field microscope.

希釈し，その終末点により，果皮と果肉を比較した。Table 8 に示すように，抗原濃度としては，果肉に対して果皮部分の方が若干高いように思われる。

8) いつ頃からウイルス抗原は植物体内で検出できるか

接種時の葉位を揃えるため2日おきに，ユウガオを播種し，現われた子葉に2日ごとにつぎつぎに接種し，最初の植物を接種してのち2週間目に実験を行なった。すなわち，接種後，2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 日目の各7株から上葉を採り，生理的食塩水を加え磨砕した。低速遠心(3,000 rpm, 15分間) 後の上清を抗原としてスライド反応試験に供した。抗原，抗血清とも 16 倍希釈のものを用いた。スライド反応と同時に，供試抗原の電顕観察で，粒子の有無を調べた。スライド反応は5人の検定者によ

り，別々に行われ，その結果をまとめた。肉眼判読では，検定者により多少の誤読がみられた。また，接種後12, 14日目の試料についてのみ，辛うじて陽性と判読された。一方，スライド反応を暗視野顕微鏡（16倍）で観察したところ，最初の検定者Aが接種後8日目以降を陽性と判読した他は，4検定者とも，接種後6日目以降をすべて陽性と判読した（Table 9)。

一方，電顕観察の結果も，接種後6日目以降の個体から，ウイルス粒子の検出ができた。この実験の時点では接種後10日目と14日目（個体番号VとVII）の両株が発病していたが，他の個体はまだ病徴が出現していなかった。

スライド反応，電顕観察いずれによっても，接種後4日迄はウイルスを検出できなかったが，病徴発現前の接種後6日目の個体からも，ウイルスを検出することができた。

考　　察

青森県下のスイカ栽培は昭和40年頃より盛んになり，栽培面積は年々増加した。しかるに昭和43年に千葉県でその発生がはじめて報告された，CGMMV-Wが，青森県にも昭和45年頃から確認され，漸次増加し，昭和48年には作付面積の43.6%までに達した[2]。本ウイルスはCGMMV-C, TMV-Tなどとは血清学的に異なり，むしろTMV-OMに近いものであることが明らかにされている[8,11]。植物ウイルス病の診断には血清学的手法がもっとも多く使われているが[7,13]，西日本におけるキュウリ緑斑モザイク病，千葉県におけるスイカ緑斑モザイク病の診断にもスライド反応が多く使われ[3,5]，その有効なことも知られている。しかしながら，本実験の結果からみると，CGMMV-Wの検出には，若干の細かい諸条件を満たした上での使用が望ましいようである。本ウイルスのスライド反応自体は，PVXなどに見られる典型的な絮状沈澱ではないため，粗汁液をガーゼで濾して直接用いても肉眼で判読することはかなり困難がある。少なくとも澱粉粒を除去（低速遠心か濾過）した汁液を用い，反応を暗視野条件でルーペを用いるか，とくに暗視野双眼顕微鏡（16～40倍）で拡大して判読することにより，正確な結果を期待できる。CGMMV-C, CGMMV-Wでの試験成績をみると，スライド反応では，病徴出現前の植物（潜伏期中）からの抗原検出は困難であるとされているが[3,5]，上記条件下では，接種後6日目（平均10～13日目に病徴が出現し始める）の個体から，抗原ウイルスの検出が可能であった。また，室内で診断作業として，組織培養用multidish trayを用いた微凝集反応によって良い結果が得られた。微凝集反応は抗血清が少量で済むこと，同時に多量の試料を扱えること，乾燥の心配がなく，また暗視野顕微鏡で観察するので，より判読が正確になるなどの利点がある。原法[14]のペトリー皿を用いた微凝集反応より，trayを使用した方が，操作が容易であり，抗血清もより少量で済む[10]。また，電顕の普及に伴い，ウイルス病診断の一助として，dip法によるウイルス粒子の直接観察が一般化している現在，より診断の精度を上げるため，抗血清を用いた免疫電顕法[1,9]の普及が望まれる。

摘　　要

1. CGMMV-W接種後15日目のキュウリの茎葉（凍結材料）を用い，PEG沈澱法，分画遠心法，蔗糖密度勾配遠心法によりウイルス抗原を精製した。

2. 家兎を用い，Adjuvant使用による2回の筋肉注射，更に2回の静脈注射により，抗血清を得た。抗血清の力価は1:1024～1:2048であった（重層法による)。

3. 罹病ユウガオの茎に刺し込んで汚染した接木用竹ベラを，連続的にキュウリに刺し込み，感染力の持続を調べたところ，連続的ではないが，20個体目にもなお感染が認められた。

4. ウイルス汚染竹ベラをアルカリ液（5%水酸化ナトリウム）またはクロム硫酸で処理（室温10秒間）することにより，ウイルスの感染は抑えられた。そのほか，Na_3PO_4, SDS, タンニン酸なども加温（75°C）して使用した場合，消毒効果は認められたが，PA-74（ヨウシュヤマゴボウの抽出成分）は効果が認められなかった。

5. 粗汁液を用いたスライド反応は，その判読がやや困難で，検定者により判読にふれが出た。しかるに，低速遠心後の上清を抗原として使用し，スライド反応を暗視野顕微鏡で観察したところ，正確な判読ができ，かつ検定者によるふれもなかった。

6. 組織培養用multi-dish trayを用いた微凝集反応（microprecipitin test）を考察した。

暗視野顕微鏡で観察することにより，判読はより正確になり，使用抗血清も少量で済んだ。

7. 0.5% LIS (3, 5-diiodosalicylic acid, lithum salt)を含む0.85%寒天ゲルを用いた二重拡散法で，粗汁液，精製標品いずれを抗原とし用いた場合でも，1本の沈降帯が観察された。

8. 免疫学的電顕観察で容易にウイルス抗原の検出ができた。

9. 罹病スイカの果肉，果皮いずれからもウイルス抗原が検出された。微凝集反応の結果，果皮部分が果肉部分より抗原濃度が若干高かった。

10. 接種後，日を追ってユウガオからウイルス抗原の検出をスライド反応（暗視野条件下）によって試みたところ，接種後6日目（未発病）以降，すべて陽性であった。すなわち，条件次第で潜伏期中のウイルス抗原の検出がスライド反応でも可能であることが分った。

引用文献

1. BALL, E. M. and BRAKKE, M. K.: Leaf-dip serology for electron microscopic identification of plant viruses, *Virology*, **36**: 152–155. 1968
2. 千葉未作： 青森県におけるスイカウイルス病の発生の現状，抗植物ウイルス剤現地研究会講演要旨集，5–11. 1975
3. 深津量栄・長井雄治： スイカ緑斑モザイク病の病徴と診断法，千葉県農業関係技術会議資料，**44**: 13–35. 1969
4. 井上忠男・井上成信・麻谷正義・光畑興二： キュウリ緑斑モザイクウイルスに関する研究，農学研究，**51**: 175–207. 1967
5. 木谷清美・木曽 皓・鄭鳳朝： 血清を利用したキュウリ新ウイルス病（キュウリ・緑斑モザイク・ウイルス）の簡易診断法，四国植物防疫研究，**1**: 37–46. 1966
6. 小室康雄・栃原比呂志・深津量栄・長井雄治・米山信吾： スイカにおけるキュウリ・緑斑モザイル・ウイルス—スイカ系の発生および果実における肉質劣変との関係，日植病報，**37**: 34–42. 1971
7. MATTHEWS, R. E. F.: Serological techniques for plant viruses, *Method in Virology*, **3**: 201–241. 1967
8. NOZU, Y., TOCHIHARA, H., KOMURO, Y. and OKADA, Y.: Chemical and immunological characterization of cucumber green mottle mosaic virus (watermelon strain) protein, *Virology*, **45**: 577–585. 1971
9. 四方英四郎・土田一郎・小島 誠： 植物ウイルスの電子顕微鏡による同定—leaf dip serology—，日植病報，**40**: 118. 1974
10. 四方英四郎・季 淳 炯・小島 誠・仙北俊弘： Microprecipitin test について，日植病報，**42**: 386–387. 1976
11. 栃原比呂志・小室康雄： キュウリ緑斑モザイクウイルス系統間の寄生性と血清学的関係およびわが国への侵入した経路についての一考察，日植病報，**40**: 52–58. 1974
12. UYEDA, I., KOJIMA, M. and MURAYAMA, D.: Purification and Serology of bean yellow mosaic virus, *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **41**: 192–203. 1975
13. VAN REGENMORTEL, M. H. V.: Plant virus serology, *Adv. Virus Res.*, **12**: 207–271. 1966
14. VAN SLOGTEREN, D. H. M.: Serological microreactions with plant viruses under paraffin oil, *Proc. 2nd Conf. Potato Virus Diseases*, 51–54. 1955

Summary

1. Viral antigen was purified from cucumber plants infected with CGMMV-W by sucrose density-gradient centrifugation following clarification by a chloroform and *n*-butanol mixture, concentration by PEG precipitation and differential centrifugation.

2. Purified preparations emulsified with Freund's complete adjuvant were intramuscularly injected twice into rabbits and additional two intravenous injections were made. Antisera obtained had titers 1/1024 or 1/2048 by ring precipitin tests.

3. Successive inoculations were made by puncturing 20 cucumber seedlings with a small bamboo stick, immediately after it had stuck into the stem of diseased *Lagenaria siceraria* plants. Infection occurred until 20th plants, though infections did not occurred successively.

4. A small bamboo stick immersed into extracts of diseased *L. siceraria* plants were sterilized by chemical treatments with chlomic acid or 5% NaOH solutions for 10 seconds at room temperature. Other chemicals such as Na_3PO_4, SDS, and tannic acid were also effective when used at high temperature (75°C).

5. Detection of serological reactions by slide tests was rather difficult when crude extracts was used as a virus source. Reaction, however, was clearly detected when the supernatant of low speed-centrifugation of crude extracts was used as antigen. More precise detection was made by using a dark field microscope.

6. Microprecipitin test was modified by using multi dish trays instead of petri-dishes. Only each of 0.025 mℓ of antigen and antiserum was sufficient for this tray. Detection of reactions became more sensitive under the dark field microscope.

7. A clear precipitin line between CGMMV

antigen and its antisera was observed in immuno double diffusion tests by using agar containing 0.5% LIS (3, 5-diiodosalicylic acid lithium salt).

8. The CGMMV antigens attached by its specific antibodies were easily detected under an electron microscope by leaf dip serology.

9. The CGMMV antigen from the affected watermelon fruits was also detected by microprecipitin test. Titer of the antigen from the rind of the fruit was slightly higher than that of inner part of the fruits.

10. The CGMMV antigen from the *L. siceraria* plants without any symptom 6 days after inoculation was able to detect by slide test under the dark field microscope. These plants developed symptom 10 to 13 days after inoculation.

Explanation of plates

A-B. Serological reactions of CGMMV-W by slide test under the dark-field microscope.

A. Strong reaction after mixing both a 4-fold diluted sap from the affected *L. siceraria* plants and the 8-fold diluted antiserum.

B. Moderate reaction after mixing both a 16-fold diluted sap from the affected *L. siceraria* plants and the 16-fold diluted antiserum.

C. Control. No reaction occurred in this mixture after mixing both a 4-fold diluted sap from the affected *L. siceraria* plants and saline.

D-F. Serological reactions of CGMMV-W by means of microprecipitin test under the dark-field microscope.

D. A typical reaction after mixing both purified virus preparation (0.3 mg/mℓ) and the 16-fold diluted antiserum.

E. A clear reaction occurred after mixing 40-fold diluted sap from the affected cucumber plants with the 4-fold diluted antiserum.

F. Control. No reaction occurred in this mixture after mixing 40-fold diluted sap from the affected cucumber plants with saline.

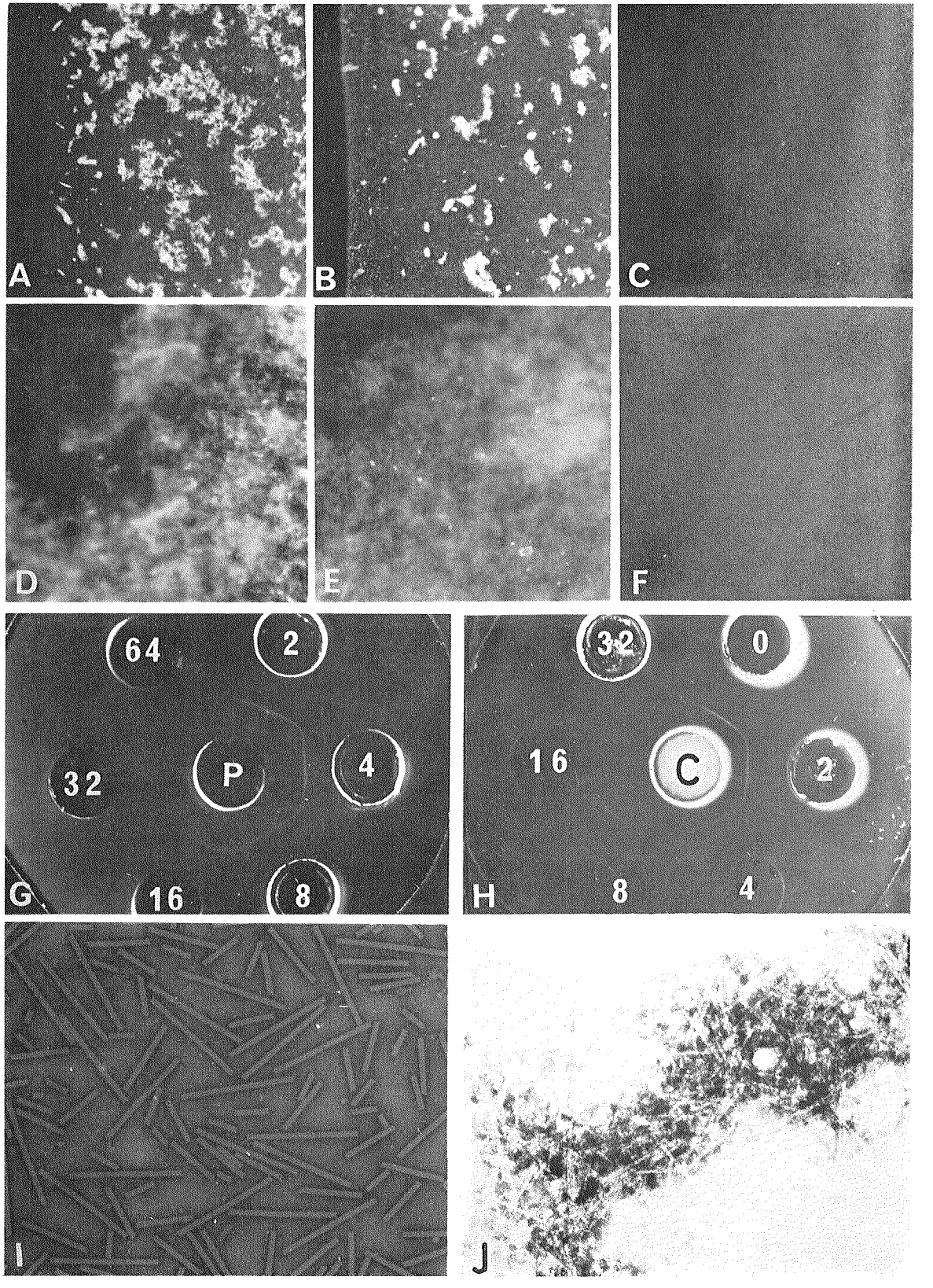
G-H. Serological reactions of CGMMV-W by means of agar gel double diffusion test using 0.85% agar containing 0.5% LIS.
The numbers on perpheral wells mean the reciprocal of antiserum dilution.

G. Purified preparation (0.3 mg/mℓ) as antigen (P) was used.

H. 2-fold diluted sap from the affected cucumber plants as antigen (C) was used.

I. An electron micrograph of purified preparation of CGMMV-W.
PTA stain. ×52,000

J. An electron micrograph of leaf-dip preparation mixed with antiserum against CGMMV-W showing a relatively large antigen-anoibody complex.
PTA stain. ×36,000


A
B
C
D
E
F
64
2
32
P
4
16
8
G
32
0
16
C
2
8
4
H
I
J