

サツマイモウイルス病の診断法について

宇杉 富雄¹⁾・古谷 真二²⁾・中野 正明³⁾・林 隆治

¹⁾現在熱帯農業研究センター沖縄支所・²⁾高知県農林水産部・

³⁾現在熱帯農業研究センター・九州農業試験場)

Diagnosis of sweet potato viral diseases. Tomio USUGI¹⁾, Shinji KOTANI²⁾, Masaaki NAKANO³⁾ and Takaharu HAYASHI (¹⁾Present address; Okinawa Branch of Tropical Agriculture Research Center, Ishigaki, Okinawa 907. ²⁾Division of Agriculture, Forestry and Fisheries of Kochi Prefecture, Kochi 780. ³⁾Present address; Tropical Agriculture Research Center, Tsukuba, Ibaraki 305. Kyushu National Agricultural Experiment Station, Chikugo, Fukuoka 833)

わが国のサツマイモに発生するウイルス病には斑紋モザイク病と葉巻病が知られていたが、近年、塊根部の帯状粗皮症の発生が各地で問題になっている³⁾。本病の防除対策として茎頂培養によるウイルスフリー化が行われているが保毒個体の茎葉部に病徴が現れないことが多いために得られた苗がウイルスフリーであるかどうかを検定する必要がある。

そこで筆者らは *Ipomoea setosa* 等による生物検定、ELISA および免疫電顕法による検定を行い、その精度について相互比較を行った。ここにその結果を報告する。

材料および方法

本試験において使用した接種源および血清試験の抗原はサツマイモ (品種:土佐紅, ことぶき1号および高系14号) で帯状粗皮症状を示した塊根から得た蔓をポット植えとし、温室内で育成したものである。

I. setosa による検定では播種後約1ヵ月経過した苗を用いた。本葉1~2枚を残して茎を切り、この切り口にサツマイモの葉柄または葉身をつけた中~下位部の蔓、蔓先および葉身をつけた葉柄を割り接ぎした。さらにポリエチレン袋で4日間覆った後、温室内(最低20℃)に置き、その後に伸長する腋芽の葉に現れる病徴を観察した。

汁液接種によるウイルスの検定ではサツマイモ葉を20倍量の0.1M リン酸緩衝液(0.1%チオグリコール酸, pH8.0)で磨砕し、カーボランダムを加えた後、子葉期のアサガオに接種した。

ELISA は中野ら(1984)²⁾が作製した抗サツマイモ斑紋モザイクウイルス(SPFMV)血清および宇杉ら(1989)が作成した抗C血清³⁾を用い、Clark and

Adams (1977)の方法¹⁾に準じて行った。抗原にはサツマイモ葉を20倍量のPBS-tween(2%PVP, 2.6mMKCl添加)で磨砕したものをを用い、マイクロプレートへのcoatingには2.5μg/mlのγ-グロブリン, conjugateはSPFMVでは800倍希釈液, Cでは400倍希釈液を用いた。基質液添加後2時間で水を対照とし吸光度(405nm)を測定し、健全葉における平均吸光度に1.25を乗じた値以上を示したものを反応陽性とした。

免疫電顕法(SSEM-PAG法)は第1図のとおり行った。

結 果

生物検定法

I. setosa に数種の穂木を接木接種し、病徴およびその発現時期、発病率について調査した。中~下位部の蔓を穂木とした場合、vein clearingが約10日間で発現するものが多く、蔓先や葉身付葉柄を用いた時よりも病徴の発現が早かった。葉身付葉柄を接種した場合は他よりも病徴発現が遅かった。本方法は活着率も高く(96%)、また発病率も高かった(100%)。ほとんどの *I. setosa* は接種後およそ20~25日で葉にネクロシスが現れ、やがて枯死した(第1表)。

I. setosa の育成期間を短縮するため、子葉期の *I. setosa* の胚軸に切れ込みを入れ、ここに蔓の薄片を埋め込み接種する方法を試みた。その結果、上記方法と比較して検出率が66.7%と悪かった。

また、三角フラスコで水挿し発根させたサツマイモの蔓先に子葉期のキダチアサガオ(*Ipomoea nil*)の胚軸を割り接ぎする方法を試みた。この場合、穂木の活着は良好であったが、穂木の生育が悪く、病徴の発現が遅れ、かつ不明瞭で、検出率は21%であった。

第1図 SSEM-PAG 法の手順

- メッシュの抗体処理……Tris Buffer (0.05 M pH7.2) で抗血清を1,000倍に希釈し、パラフィルム上に滴下し、そこにメッシュを裏向けにして浮かべる。保湿、室温で30分放置
- 水 洗……………処理メッシュを水に浮かべ、スターラーでゆっくり回転させ、数秒間洗浄
- 試料の磨砕……0.02 M Phosphate Buffer saline (pH7.4) + 0.05% Tween 20 + 2% Polyvinylpyrrolidone (Mw; 30,000) + 0.2% Alubmin from eggs の混合液に使用直前に 0.01 M Sodium N, N-diethylthiocarbamate を溶解させた液 (20倍量) で磨砕
- 抗原抗体反応……………磨砕液をパラフィルム上に適量滴下、その表面に余分な水分を除いたメッシュを浮かべ、4時間。(室温) または1昼夜 (冷蔵庫) 乾燥を防ぎながら静置。
- 水 洗……………水面にメッシュが軽く触れるようにして反復 (5~6回) 洗浄
- 抗原抗体反応……………0.02 M Tris Buffer saline (pH7.5) + 1% Alubmin from blood. Bovine powder, fraction V 液 (BSA-TBS) で抗血清を1,000倍に希釈し、パラフィルム上に適量滴下。その表面にメッシュを約20分間浮かべる。
- 洗 浄……………0.02 M Tris Buffer saline (pH7.5) + 0.05% Tween 20液 (TTBS) で洗浄。
- プロテイン A……………1% BSA-TBS で25倍に希釈したプロテイン A 金コロイド (PAG; Janssen 社, Protein AG 金コロイド処理 10; 和光, 電顕用) をパラフィルム上に滴下し、それにメッシュを10分間浮かべる。
- 洗 浄……………TTBS で洗浄
- 水 洗
- 2% PTA 染色
- 電子顕微鏡観察

第1表 *Ipomoea setosa* によるサツマイモウイルスの検出

サツマイモ株 No.	穂木(サツマイモ)の形態	接 種 後 経 過 日 数 と 病 徴							
		8日	9日	10日	11日	12日	13日	20日	24日
1	葉柄 (1本) 付蔓	—	—	VC	VC	VC	VC	VC, N	VC, N
2	“	—	—	VC	VC	VC	VC	VC	枯, VC, N
7	“	—	—	VC	VC	VC	VC	VC	枯, VC
12	“	*	*	*	*	*	—	VC	VC, N
4	葉身 (1枚) 付蔓	*	*	*	*	—	VC	VC, N	全枯
6	“	—	—	—	—	VC	VC	VC, N	枯, VC, N
8	“	*	*	*	—	—	VC	VC	枯, VC, N
9	“	—	VC	VC	VC	VC	VC	VC	枯, VC, N
14	“	—	—	VC	VC	VC	VC	VC, N	VC, N
15	“	*	*	*	*	*	—	VC, N	全枯
3	葉身 (2枚) 付蔓	—	—	—	VC	VC	VC	VC, N	VC, N
5	“	*	*	*	—	VC	VC	VC	枯, VC, N
10	“	—	—	—	VC	VC	VC	VC	全枯
13	“	*	*	*	*	—	—	VC, N	全枯
16	蔓先 (展開葉4~5枚)	*	*	*	—	VC	VC	VC, N	全枯
17	“	—	—	—	VC	VC	VC	VC, N	全枯
18	“	*	*	*	*	*	—	VC	枯, VC
19	“	—	—	—	—	VC	VC	VC, N	全枯
20	“	*	*	*	*	—	VC	VC	VC, N
21	“	—	—	—	—	VC	VC	VC	枯, VC
1	葉身付葉柄	—	—	—	—	—	—	VC	VC, N
4	“	—	—	—	—	—	—	VC, N	枯, VC, N
6	“	—	—	—	—	—	—	VC	VC
ウイルス検出率 (%)		0	4.7	21.7	34.8	56.5	69.7	100	100

VC; 葉脈透過, N; えそ, 枯; 葉の枯死, 全枯; 側枝全体の枯死, *; 葉が小さく観察不能

第2表 サツマイモウイルス検出時における ELISA と SSEM-PAG 法との精度比較

ウイルス	ELISA	SSEM-PAG 法
SPFMV	15/25 ¹⁾	24/25
C分離株	10/25	19/22

¹⁾反応陽性個体数/供試個体数

下位葉を用い子葉期のアサガオに汁液接種し、ウイルスの検出効率を調べたが、検出率は25%で低かった。

ELISA による検定

I. setosa 検定で陽性を示したサツマイモ (品種:土佐紅) の下位葉および *I. setosa* のモザイク葉を用い ELISA で抗 SPFMV 血清に対する反応を調査した。その結果、*I. setosa* 葉では全個体が陽性の反応を示したが、サツマイモ葉では陰性であった。

SSEM-PAG 法による検定

サツマイモ (品種:高系14号, ことぶき1号) の下位葉をとり、SSEM-PAG 法によるウイルスの検定を行い ELISA による検定結果と比較した。SSEM-PAG 法では抗 SPFMV 血清を用いた場合、金粒子が多く付着しているウイルス (Mo) およびわずかに金粒子が付着するウイルス (VC) とまったく金粒子が付着しないウイルス (C) が観察された⁴⁻⁶⁾。抗C血清では検出されるほとんどのウイルスがCであった。ELISA と SSEM-PAG 法によるウイルスの検出率を比較したのが第2表

である。SSEM-PAG 法ではいずれのウイルスにおいても ELISA より高い検出率が認められた。

考 察

本試験の結果、サツマイモウイルスの検定は *I. setosa* への接木接種法がきわめて有効であることが判明した。帯状粗皮症の病原ウイルスは斑紋モザイクウイルス強毒系統であり、*I. setosa* に vein clearing を引き起こすことが知られているので、*I. setosa* による検定法は帯状粗皮症の検定法として極めて有効と考えられる⁶⁾。しかし、帯状粗皮症の病原ウイルスの他に *I. setosa* に vein clearing を引き起こすひも状ウイルス (SPFMV 普通系統, M) が存在することに留意する必要があるであろう。また、免疫電顕法や ELISA は *I. setosa* による検定法よりも感度は劣るがウイルスの種類を同定するうえで有効な方法であると思われる。

引 用 文 献

- 1) CLARK, M. F. and ADAMS, A. N. (1977) J. Gen. Virol. 34 : 476-483.
- 2) 中野正明・岩崎真人・新海昭 (1984) 九病虫研究会報 30 : 30-32.
- 3) 新海昭・松田勲男・岩橋哲彦 (1980). 日植病報 46 : 67 (講要).
- 4) 宇杉富雄・中野正明・新海昭 (1987) 日植病報 53 : 420 (講要).
- 5) 宇杉富雄・中野正明・林隆治 (1989) 日植病報 55 : 530 (講要).
- 6) 宇杉富雄・中野正明・大貫正俊・林隆治 (1990) 日植病報 56 : 印刷中 (講要).

(1990年4月26日 受領)