

# 萎縮病クワから師管液の採取並びにMLOの検出

|       |               |
|-------|---------------|
| 誌名    | 日本蠶絲學雜誌       |
| ISSN  | 00372455      |
| 著者名   | 川北,弘<br>且原,真木 |
| 発行元   | 日本蠶絲學會        |
| 巻/号   | 62巻2号         |
| 巻号補足  |               |
| 掲載ページ | p. 125-131    |
| 発行年月  | 1993年4月       |

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 萎縮病クワから師管液の採取並びに MLO の検出

川北 弘<sup>1)</sup>・且原真木<sup>1,2)</sup>

1) 蚕糸・昆虫農業技術研究所

2) 岡山大学資源生物科学研究所

(1992 年 9 月 10 日受領)

HIROMU KAWAKITA<sup>1)</sup> and MAKI KATSUHARA<sup>1,2)</sup>: Detection of mycoplasma-like organisms in the phloem sap collected from mulberry trees with dwarf disease.

Mycoplasma-like organisms (MLOs), the pathogens of mulberry dwarf disease, were successfully isolated by stylectomy method (cutting of insect stylets by YAG laser) using a homopterous insect, *Ricania japonica*. The MLOs were detectable in the phloem sap collected from diseased mulberry plants as fluorescent particles stained with 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) under a fluorescence microscope but were not detected in the sap of healthy mulberry plants. The presence of MLOs in the phloem sap was also confirmed by electron microscopy.

On the other hand, two kinds of leafhoppers, vectors of mulberry dwarf MLOs, and other some tested hemipterous insects could not be used for this laser stylectomy. Scanning-electronmicroscopical observation showed that the stylets of these leafhoppers which were not suitable for the stylectomy method were pushed out or broken after laser cutting, whereas stylets of *Ricania japonica* remained firmly in the tissues. (<sup>1)</sup>National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki 305, <sup>2)</sup>present address: Research Institute for Bioresources, Okayama University, Kurashiki, Okayama 710)

クワ萎縮病の病原であるマイコプラズマ様微生物 (MLO) が、ベッコウハゴロモ (*Ricania japonica Melichar*) を用いたスタイルクトミー法 (YAG レーザー光線により昆虫の口針を切断) により採取された。すなわち、この方法で採取した萎縮病クワの師管液を DAPI (4', 6-ジアミジノ-2-フェニールインドール) で染色すると、健全師管液では観察されない蛍光粒子として MLO が観察された。さらに師管液を透過型電子顕微鏡で観察すると、罹病クワ組織内と同形態の MLO が検出された。

一方、萎縮病の媒介昆虫であるヨコバイ類および他の供試した数種の半翅目昆虫は、このレーザー・スタイルクトミー法には利用出来なかった。これら利用不能なヨコバイ類のレーザー切断口針は、一部が脱落するなど著しく変形していたのに対し、師管液が採取されたベッコウハゴロモの口針は、組織内によく挿入されたままの状態が残ることが走査型電子顕微鏡により観察された。

土居ら (1967) はクワ萎縮病などのいわゆる萎黄叢生症状を呈する病植物から、マイコプラズマ様微

本報の一部は、日本蚕糸学会第 62 回学術講演会において発表した。

1) 〒305 茨城県つくば市大わし 1-2

2) 〒710 岡山県倉敷市中央 2 丁目 20-1

生物 (Mycoplasma-like organism; 以下 MLO と略称) を発見し、同時に石家ら (1967) は既知のマイコプラズマ病に効くテトラサイクリン系抗生物質を本病に施用し、発病が抑制されたことから、本病の病原は MLO であることを確認した。

その後 MLO に起因する病植物は諸外国からも相

次いで報告され、現在では200種以上の植物がこの被害を受けていることが知られている。しかし、人工培養の研究は、わが国をはじめ、世界各地の研究者によって精力的にすすめられたが、本病などの病原MLOは人工培養が極めて困難なため、その特性、動態、分類、診断等に関する研究はほとんど進んでいない。

MLOは病植物の師部に局在することが土居ら(1967)の報告以来、異論のない定説であることに着目し、病植物からMLOを含む師管液を採取して研究材料に利用できれば、長い間停滞しているMLO研究を進展される突破口になるものと考え、一連の研究を行っているが、今回クワ萎縮病について師管液中のMLOの検出等に成功したのでその大要を報告する。

本文へ入るに先立ち、貴重な助言とご校閲をいただいた蚕糸・昆虫農業技術研究所 生体情報部長 河部 遼博士、同媒介機能研究室長 佐藤 守博士並びに走査型電子顕微鏡観察にご協力下さった同加工利用部 物質変換技術研究室長 塚田益裕博士に深謝する。

### 材料と方法

クワは当研究所の桑園の発生していた典型的な発病株および健全株から新梢を採取して用いた。師管液採取の試験には8種の昆虫を供試した。本病の媒介昆虫ヒシモンヨコバイ (*Hishimonus sellatus* Uhler) およびヒシモンモドキ (*Hishimonoides sellatiformis* Ishihara) は飼育中のものを用いた。クワにも寄生するカメムシ類 (川沢・川村, 1977) のクサギカメムシ (*Halyomorpha mista* Uhler), チャバネアオカメムシ (*Plautia stali* Scott) は桑園に生息していたものを採集し、ミナミアオカメムシ (*Nezara viridula* Linnaeus) は当研究所の増殖機構研究室から分譲していただいたものを用いた。また、ハゴロモ類は、スケバハゴロモ (*Euricania fascialis* Walker), ベッコウハゴロモ (*Ricania japonica* Melichar) およびオアバハゴロモ (*Geisha distinctissima* Walker) を雑木林から採集して用いた。

昆虫の口針を切断する装置は、日本電気(株)製のYAG (イットリウム・アルミニウム・ガーネット)

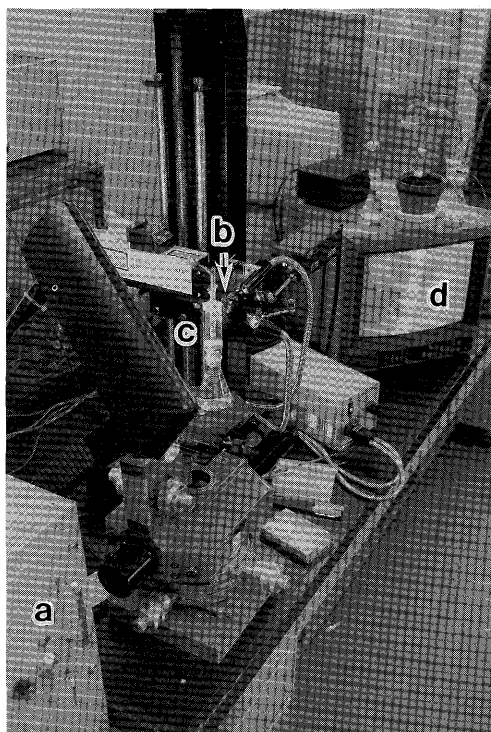


Fig. 1. System of cutting insect stylets by YAG laser.

a : Electric power, b : Discharge aperture of laser beam  
c : Insect and plant, d : Monitor TV.

レーザー発振機 (SL 129 Nd) である (Fig. 1)。

師管液の採取方法は、水を入れた三角フラスコに約20 cmに調整したクワ新梢を挿し、それを厚さ0.3 mm, 直径約2.5 cm, 長さ約10 cmのポリエチレンチューブで覆い、その中へ昆虫を放ちチューブの上下は昆虫の逃亡を防ぐためスポンジで封じた。

虫がクワから師管液を吸汁している様子を70倍に投影するモニターテレビで確認しながら、口針にフォーカスをあわせてレーザー光線を発射して口針を切断した。植物に残った口針断面から溢出してくる師管液はガラスキャピラリーを接触させて採取した。これをレーザー・スタイレクトミー (laser stylectomy) 法と呼んでいる。

師管液中のMLOの検出は、浜田・藤田 (1988) のDAPI (4', 6-ジエミジノ-2-フェニールイン

ドール) 染色法を若干変えた KAWABE ら (1991) の方法で染色を行い、蛍光顕微鏡 (ニコン・オプチフォト-2 + 落射蛍光装置 EFD 2) により観察した。一方、師管液中の MLO の形態観察には、師管液 1 に対し 0.5 M ショ糖を含む 0.1 M, pH 7.3 のカコジレート緩衝液で 12.5% に調整したグルタルアルデヒド溶液を 10 倍加えて 10 分間仮固定したのち低融点のアガロースを加えて固めた。後は常法どおりに試料を作製し、電子顕微鏡 (JEM-100 CX II 型) で観察を行った。

また昆虫の口針構造は、常法にしたがって固定・脱水し、臨界点乾燥のち金で蒸着を行い、走査型電子顕微鏡 (JEOL-JSM-5300 LV 型) を用いて観察し、比較検討した。

## 結 果

師管液はまず本病の媒介昆虫であるヒシモンヨコバイおよびヒシモンモドキを用いて採取を試みた。これらの昆虫はチューブ内に放すと新梢からすぐに吸汁を開始し、口針を切断した直後は師管液が滲出こともあった。しかし、ほとんどは口針が切断され

ると植物の組織外に押し出されたり、その断面はばらばらに分散した状態になり、数百頭余り切断したヨコバイ類の口針では、一度も師管液を採取することができなかった。つぎにカメムシ類を用いて検討を行った。これらの昆虫はいずれも新梢上で 1 週間以上生存したが、その間はチューブの周囲を徘徊しているのみで、クワ新梢に口針を挿入する吸汁摂食行動は全くみられず、したがって師管液の採取に不適當と判断した。

クワに寄生する吸汁性昆虫としては上記のほかに、ハゴロモ類の成虫が 7 月下旬ごろから発生する (菊地, 1973)。著者らはこの虫に注目し当研究所の桑園をくまなく探索したが、雑草の除去あるいは薬剤による害虫防除が徹底しているためか、1 頭も見つけることができなかった。そこで雑木林で探索したところ、タラノキ (*Aralia elata* Seem.) およびウド (*Aralia cordata* Thunb.) に寄生しているものが見いだされた。これらの植物には 3 種のハゴロモの寄生がみられ、とくにアオバハゴロモとベッコウハゴロモの寄生数が圧倒的に多く (Fig. 2, 3), スケバハゴロモは少数例であった。体長はいずれも翅



Fig. 2. A homopterous insect *Geisha distinctissima* feeding angelica tree *Aralia elata*.



Fig. 3. A homopterous insect *Ricania japonica* feeding angelica tree *Aralia cordata*.

端まで9～11 mmの範囲の大きさで(石原, 1981), ヒシモンヨコバイやヒシモンモドキより2～3倍大きい。師管液の採取を生息数の多かったアオバハゴロモから試みたところ, この虫はFig. 2にみられるように前翅を常にたたんだ状態で樹液を吸汁するため, 前翅が邪魔して口針がみえないのでレーザー・スタイレクトミー法には不向きであった。これに比べ, スケバハゴロモとベッコウハゴロモは前翅をほぼ水平に開いて吸汁し, 口針はモニターテレビ上へ明瞭に投影され, レザー・スタイレクトミー法に適していると思われた。スケバハゴロモでは充分検討できなかったが, ベッコウハゴロモは口針を切断すると, その瞬間に師管液の滲出がみられ, その様相を実体顕微鏡で観察するとFig. 4 Aのように無色透明な水玉状の液で, それは急速に大きくなり流出してくることが観察された。この液をマイクロガラスキャピラリーに採取したが, 1本の新梢から数時間で10  $\mu$ l程度採取できる場合や1日かけても全く採れない場合があった。

採取された師管液をDAPIで染色し, MLOの有無を蛍光顕微鏡で観察した結果, 罹病クワ新梢から採取した師管液は, DAPA染色液とMLDのDNAとが結合して発する蛍光粒子が多数観察され(Fig. 4), これらの粒子は, 黄萎病イネの師管液にみられる蛍光粒子(KAWABEら, 1991)と同様のもの

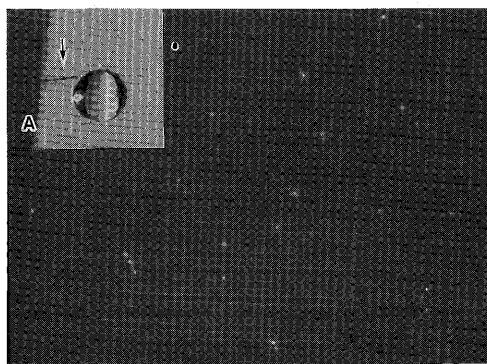


Fig. 4. Fluorescent particles of MLO in phloem sap collected from MLO-infected mulberry (DAPI staining).  
A: Phloem sap overflowed from cutting stylet.  
Arrow: stylet.



Fig. 5. DAPI staining of phloem sap collected from healthy mulberry (No fluorescent particle).

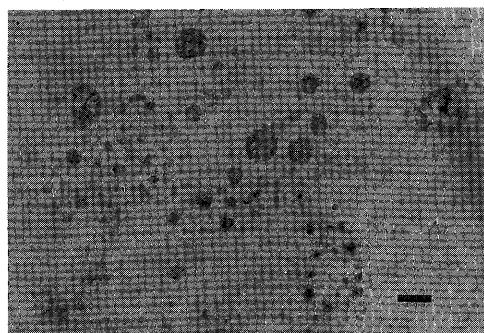


Fig. 6. Electron micrographs of MLO particles in phloem sap collected from diseased mulberry. Bar: 500 nm.

と考えられた。これに対し, 健全クワ新梢から採取した師管液は淡い不鮮明な粒子がみえる場合もあったが, ほとんどは何もみえない暗黒の視野であった(Fig. 5)。

さらに師管液におけるMLOの形態を電子顕微鏡で観察したところ, その粒子は罹病クワの組織内と同様の形態を示すMLOであることが確認された(Fig. 6)。

以上のように本病から師管液の採取に成功し, 採取にはベッコウハゴロモの口針が適することを明らかにした。師管液の採取に媒介昆虫のヨコバイ類では困難な理由を究明するため, レザー・スタイレクトミー法によって切断された口針を走査型電子顕微

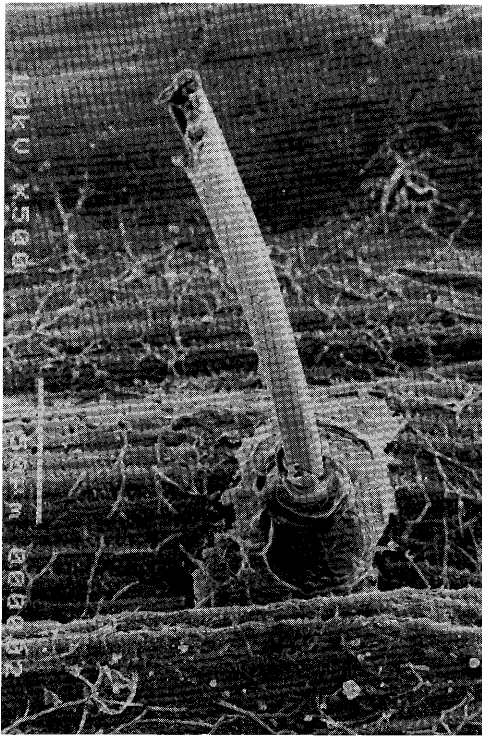


Fig. 7. Scanning electron micrographs of a styllet of *Ricania japonica*.

鏡で比較検討を行った。切断されて植物側に残っている口針の状態を観察すると、ベッコウハゴロモの口針は、2本のまとまった滑らかな柱で構成されているが (Fig. 7)、ヒシモンヨコバイやヒシモンモドキの口針は、4本の柱から成りレーザー光線で切断されるとそのうちの何本かは脱落や分散などの損傷している所見が多くみられた (Fig. 8)。したがって、師管液採取の適否は、昆虫の口針構造の違いによるものと判断された。

#### 考 察

昆虫の口針をレーザー光線で切断し、植物から師管液を採取した事例はアブラムシによる BARLOW and McCULLY (1972) の実験が最初であろう。この時のエネルギー源はルビーの結晶が用いられた。

KAWABE ら (1991) の試験ではトビイロウンカの口針切断にローダミンの色素レーザーを用いたが、

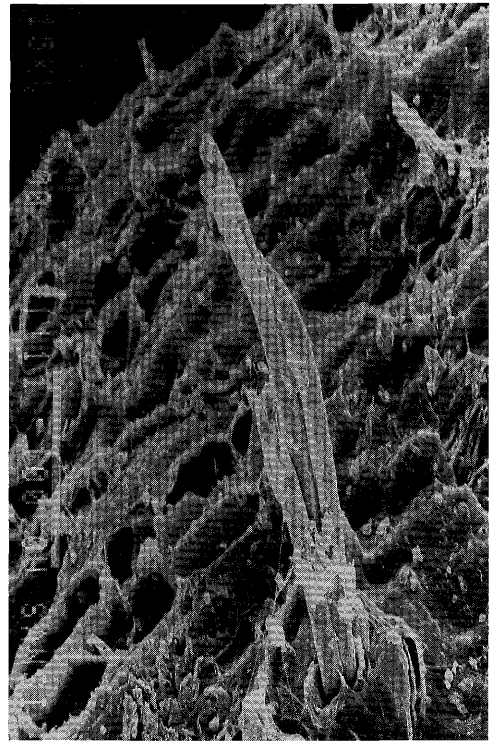


Fig. 8. Scanning electron micrographs of a styllet of *Hishimonoides sellatiformis* cut by laser.

ウンカ・ヨコバイ類あるいはさらに大型のハゴロモ類には YAG レーザーの方が出力の調整や使用法が簡便な点などから優れた装置といえよう。

クワにおいてカメムシ類は1週間以上の生存が認められたが、吸汁摂食行動は全く見られなかった。小瀧 (1991) はチャバネアオカメムシの摂食行動を 25°C, 15 明・9 暗の条件下で調査したところ、明より暗の方が活発な傾向を示したと伝えているので、師管液の採取を昼夜逆の条件にすればカメムシ類の利用にも検討の余地がある。

ハゴロモ類は本州から沖縄などの西南暖地まで広く分布し、各種の植物に寄生するようであるが (石原, 1981), 著者らの観察ではウコギ科のタラノキおよびウド以外の樹種にはみられなかった。タラノキは MLO に感染するとの報告があり (李ら, 1983), その媒介昆虫およびクワとの関係を明らか

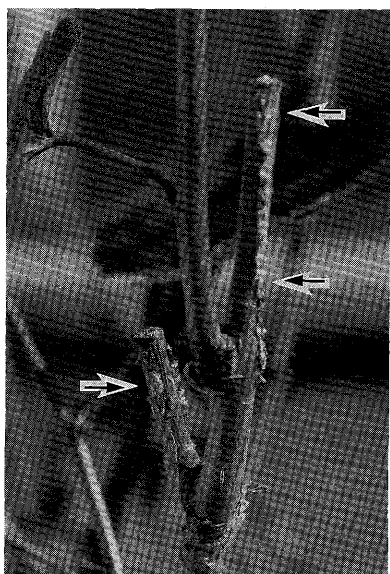


Fig. 9. Overwintering eggs of *Ricania japonica* laid on dead mulberry twigs. Arrows : eggs (white-colored portion)

にしておくことは、近年桑園が山間地に多いことから重要であろう。

ハゴロモ類のうち発生数が多く、吸汁性が安定していると思われたアオハハゴロモは、前翅を事前に切除するなどの工夫によっては、ベッコウハゴロモより効率的な師管液採取の可能性が示唆された。ハゴロモ類は1化性で5月上旬にふ化し、7月下旬ごろから成虫がみられ、卵はクワの枯れ枝に10数粒並べて産卵し、そのまま越冬する(菊地, 1973)。著者らはクワ苗でベッコウハゴロモを飼育し、産卵は生より枯れ枝の細い部位に産下することを確認し(Fig. 9)、現在卵の保存および休眠覚醒について調査し、周年飼育できる可能性を検討している。師管液の採取は極めて微量で、1枝条から10 $\mu$ l採取されることは少なく、通常はイネと同様に2~3 $\mu$ l程度で、とくに本研究では実験材料の都合で切り枝を用いたが、長時間の師管液採取には限度があり、ポット植えであればその採取量はさらに増加することが期待できる。

植物の師管は葉で同化された養分を生長点や子実などに送りこむ重要な器官で、そこに転流する師管

液の組成を明らかにすることは、MLOの研究のみならず、植物の栄養学、生理学、さらには農学研究の広い分野にわたる重要な研究課題と考えられる。

KAWABE ら(1980)はイネの師管液中の糖は、しょ糖のみで17%含まれることを明らかにし、茅野ら(1988)はイネのほか、コムギやトウモロコシから師管液を採取して、タンパク質、アミノ酸、無機イオンなどの組成を明らかにし、しょ糖が10~20%含まれ、pHは8.0、浸透圧は15気圧程度と報じている。

しょ糖はMLOの培地組成を検討するうえで極めて重要な要素であり、杉浦ら(1975)はウエスタンX・MLOの培地の浸透圧は0.9Mのしょ糖がMLOの保持に良好な結果を示し、本病のMLO分離培地の検討では、0.7Mのしょ糖がMLOの形態保持に効果的であった(川北, 1978)。また、MLOの病原性検定には試料の摩砕液に0.5Mのしょ糖を常用している(川北, 1990)。これらの知見は、師管液に含まれるしょ糖とほぼ似たような濃度であったことが、MLOの保持に好結果をもたらしたものと考えられる。

KAWABE ら(1980)はイネの師管液をツマグロヨコバイでは採取できなかったが、トビイロウンカで成功し、採取の成否は昆虫の口針構造の違いによることを指摘した。その点クワに用いた昆虫の口針と極めて似ており、媒介昆虫のヨコバイ類による師管液の採取は不適当といえる。

DAPI染色液は、動物の培養細胞を汚染したマイコプラズマの検出に用いられ、(RUSSELL *et al.*, 1975)、また、MLOではSEEMÜLLER (1976)がナシ decline の組織切片から検出を試みたのが最初であろう。しかし、夾雑物のない師管液の染色に比べ、組織片の場合はMLOとその他の物質とが混在しているので明確に識別するには、さらに検討を要すると思われた。その点、師管液中のMLOの検出にはDAPI染色液は優れた効果を発揮し、本法はMLOによる萎黄叢生病類の簡易診断の一助になると考えられる。

以上のように萎縮病クワからベッコウハゴロモの口針を利用した師管液の採取法を確立し、師管液中におけるMLO粒子をDAPI染色による蛍光顕微鏡観察によって検出し、電顕でこの粒子がMLOであ

ることを確認した。今後、師管液を用いた MLO の増殖法、的確な診断に役立つ抗体の作成など、越えなければならない多くの障害はあるが、この成果が MLO 研究を進展させ、ひいては人工培養法確立の端緒になることが期待される。

### 引用文献

- BARLOW, C. A. and M. E. McCULLY (1972) : The ruby laser as an instrument for cutting the stylets of feeding aphids. *Can. J. Zool.*, **50**, 1497-1498.
- 茅野充男・林 浩昭・藤原 徹 (1989) : 師管による物質転流と生長 *化学と生物* **26**, 318-324.
- 浜田新七・藤田哲也 (1988) : DAPI 蛍光測定法 生体の科学 **39**, 400-402.
- 石原 保 (1981) : 朝比奈正二郎ほか監修 原色昆虫大図鑑 第3巻 北隆館 東京 pp 129-131.
- KAWABE, S., T. FUKUMORI and M. CHINO (1980) : Collection of rice phloem sap from stylets of homopterous insects severed by YAG laser. *Plant cell Physiol.*, **21**, 1319-1327.
- KAWABE, S., H. KAWAKITA, K. NAKASHIMA and M. KATSUHARA (1991) : Detection of mycoplasma-like organisms in phloem sap collected from rice plants with yellow dwarf disease. *Ann. phytopath. Soc. Japan*, **57**, 274-277.
- 川北 弘 (1978) : 植物寄生性マイコプラズマ様微生物の培養と病原性の解明に関する研究 農林水産技術会議事務局 研究成果 (112) pp 123-124.
- 川北 弘 (1990) : クワ萎縮病病原 (MLO) の長期保存 *日植病報* **56**, 99.
- 川沢哲夫・川村 満 (1977) : 原色図鑑 カメムシ百種 全国農村教育協会 東京 1-301 pp.
- 菊地 実 (1973) : 蚕桑病虫害事典 全養連蚕糸の光編集部 東京 pp 129-132.
- 李 準 璋・山下修一・土居養二・与良 清 (1983) : 薬用植物ウイルス病の研究 3. オダマキ, フクジュソウなどのウイルス病ならびにヌルデ, タラノキ, センキュウなどの MLO 病について *日植病報* **49**, 83.
- RUSSELL, W. C., Carol NEWMAN and D. H. WILLIAMSON (1975) : A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cell infected with mycoplasmas and viruses. *Nature*, **253**, 461-462.
- SEEMÜLLER, E. (1976) : Fluoreszenzoptischer direktnachweis von mykoplasmaähnlichen organismen im phloem pear-decline und triebsuchtkranker bäume? *Phytopath. Z.*, **85**, 368-372.
- 杉浦巳代治・塩見敏樹・奈須壮兆 (1975) : ウェスタン・X・マイコプラズマ様微生物 (WXM) の培地組成の検討 *日植病報* **41**, 299.