

酵素抗体法 (DIBA および ELISA) による ユリ潜在ウイルス (Lily Symptomless Virus) の検出

山本孝彜・中井正樹*・守川俊幸*・
名畑清信**・松本美枝子***・稲垣佳世子*

Takashi YAMAMOTO, Masaki NAKAI*, Tosi-yuki MORIKAWA*,
Kiyonobu NAHATA**, Mieko MATSUMOTO***, Kayoko INAGAKI*:
Detection of lily symptomless virus by dot immunobinding assay
and enzyme-linked immunosorbent assay

Summary

Lily symptomless virus (LSV) was readily detected in the extracts of leaves and bulbs of the lilies by dot immunobinding assay (DIBA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Concentration of this virus was generally higher in the bulbs than in the leaves. In the infected bulbs LSV was evenly distributed and detected in any scales. Thus, these results indicate a possibility to develop a routine indexing system for LSV in the lilies.

ユリ潜在ウイルス (lily symptomless virus, LSV) はユリ類に普遍的に発生し、球根および切り花の安定生産を阻害する。生産地における防除は、病徴を指標とした病株の抜取りが中心であるが、無病徴感染株が多いことや、生育期間が長期間にわたるためアブラムシによるウイルス感染の機会も多く、病株を完全に抜き取ることは困難である^{16,17)}。そのため、良質な種球の維持増殖、育種素材の確保、近年増加しているウイルスフリー植物の増殖などに際しては、精度が高く、しかも簡便なウイルスの診断方法の確立が緊急、不可欠である。そこで、このような目的に合った診断方法として DIBA (dot immunobinding assay) および ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) による血清学的診断方法を検討したので報告する。

本実験を行うにあたり、貴重なユリ品種を分譲していただいた富山県農技センター野菜花き試験場研究員岡崎桂一博士および富山県花卉球根農協に対して感謝の意を表する。

試験方法

1. 供試ユリ潜在ウイルス

当場の保存品種「ふじ」から分離したウイルス標品 Li-21株を用い、タカサゴユリ実生苗に汁液接種して増殖させた後、病葉は保存し(-80°C)、以後の試験に使用した。

2. ウイルスの純化および抗血清の作製

既報¹⁹⁾のように、ウイルスはタカサゴユリ実生苗に接種して、モザイク症状の出現した上位葉を採取し、Asjes²⁾の方法に準じて精製した。抗血清は純化ウイルス約20 mgを3回に分けて、家兎に静脈注射1回、次いで Freund's complete adjuvant を用いた筋肉注射を2回行なって作製した。得られた抗血清の力価は1,024倍(免疫電頭法)であった。

3. DIBA, ELISA および簡易 ELISA

DIBA は日比⁹⁾の方法で行った。抗血清は健全なタカサゴユリの凍結乾燥粉末で2~3回吸収して使用した。ELISA は Clark and Adams⁴⁾の方法に従った。反応板は96穴のマイクロプレート(ダイナテック社)を用い、吸着γ-グロブリン濃度および酵素結合抗体の希釈倍数は1 μg/ml および600倍とした。簡易化 ELISA は岩崎⁹⁾の方法に準じ、検定試料と酵素結合抗体を0.1 ml ずつ同時に反応板の穴に注入して、5°C に1夜静置後、基質を加えて25°C で反応させた。

4. 検定材料

検定に用いたユリ類、スターゲザー、カノコユリなど6品種は、1986年10月に球根外側のりん片1枚を採取して DIBA による検定試料とし、残りを栽植した。翌年

四国農業試験場 Shikoku National Agricultural Experiment Station, Zentsuji, Kagawa 765

*富山県農業技術センター野菜花き試験場 Toyama Vegetable and Ornamental Crops Research Station, Toyama Agricultural Research Center, Tonami, Toyama 939-13

**富山県農業水産部 Division of Agriculture, Forestry and Fishery, Toyama Prefectural Government, Sinsougawa, Toyama 930

***富山県農業技術センター Toyama Agricultural Research Center, Yosioka, Toyama 939

5月28日と7月21日にこれらユリ類の地上部病徴を観察した後、生長点付近の展開葉を1枚採取して、直ちに、或は凍結保存(-80°C)してDIBA およびELISA の検定材料に供試した。10月には球根を掘取り、ELISA による検定試料として用いた。栽培期間中はアブラムシによるウイルス感染を防ぐため適宜殺虫剤を散布した。

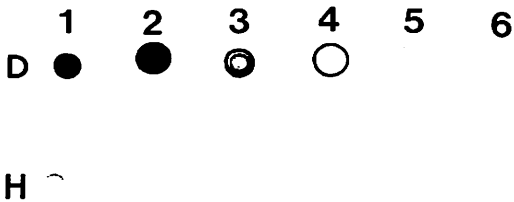
また、ユリ類からのLSVを含むウイルスの検出には育種素材として当場の温室で保存している品種の中からモザイク症状を呈している株を供試した。

ウイルスの検出にあたっては、採取材料(200mg)に10~20倍量の緩衝液を加えて磨砕した後、DIBA の場合には10,000 rpm, 5分間遠心分離を行い、その上清をマイクロピペットまたはガラス毛细管を用い、5μlずつニトロセルロースシートにスポットした。ELISA あるいは簡易ELISA には磨砕液をそのまま使用した。

結 果

1. DIBA の至適条件

タカサゴユリ病葉を用いたLSVの検出は一次抗体液(LSV抗体)5,000~10,000倍希釈、二次抗体液(アルカリ性フォスファターゼ標識一抗ウサギIgG-ヤギIgG)2,000倍希釈の範囲で良好な結果が得られ、病葉汁液は1万倍希釈まで検出できた(第1図)。最適希釈倍数は一次抗体液5,000倍、二次抗体液2,000倍、病葉汁液100倍であった。



第1図 DIBAによるユリ潜在ウイルス(LSV)の検出

D: タカサゴユリ病葉, H: 同健全葉1~6は葉汁液の10¹~10⁶倍希釈を示す一次抗体:5,000倍希釈, 二次抗体:2,000倍希釈

第1表 DIBAによるユリ品種の球根からのユリ潜在ウイルス(LSV)の検出¹⁾

品種	LSV 検出数/調査個体数(%) ²⁾
スターゲザー	24/24(100)
うたげ	34/34(100)
氷見2号	46/180(25.7)
布施の里	145/180(80.6)
内田	109/120(90.8)
白妙	1/16(6.3)

1)試験日:1986年12月

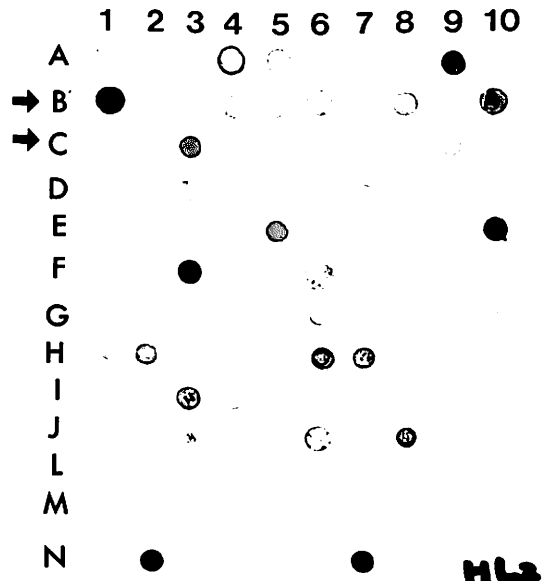
2)LSV 検出数には±の判定も含む, 結果の判定は肉眼観察

2. DIBA によるユリ品種からのLSVの検出

植付前のスターゲザーおよびカノコユリ5品種からりん片を採取して検定した。結果は第1表およびその一部を第2図に示した。LSV感染の有無は赤紫色のスポットを肉眼観察して判定するとともに、第3図に示したようにクロマトスキャナー(波長400nm)測定により判定した。スターゲザー、うたげでは検定したすべての球根からLSVが検出され、内田、布施の里においても80~90%の高い検出率であった。氷見2号では約25%と低く、白妙では6.25%しか検出されなかった。凍結保存した検定材料を用いて反復試験でも結果は同様であった。

供試品種の翌年の病徴は第2表に示したとおりである。スターゲザーでは5月28日、7月21日ともに20%、46%の個体でモザイク病徴が認められたが、他は布施の里が5月28日に13%の値を示した以外は極めて低く、氷見2号、白妙では病徴が観察されなかった。

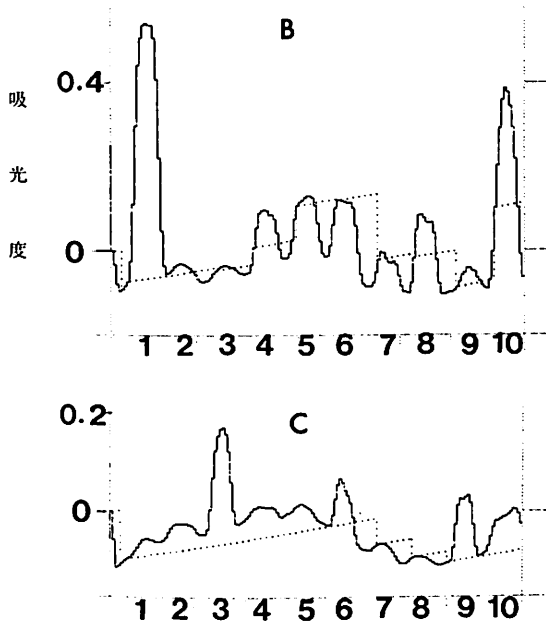
病徴調査後、各品種20個体(20個体に満たない品種は全個体)についてDIBAによりLSVの検出を試みた。第3表に示すように、スターゲザーは5月28日採取葉で100%、7月21日では82%近い個体からLSVが検出された。同様にうたげでは30%と20%、氷見2号では15%、10%であった。布施の里および内田では5月採取葉ではそれぞれ20%と10%であったが7月採取葉からは検出されなかった。白妙では5月、7月採取葉とも検出され



第2図 DIBAによるカノコユリのおりん片からのユリ潜在ウイルス(LSV)の検出

N列: タカサゴユリの病葉および健全葉汁液 品種: 氷見2号

なかった。LSV が検出された品種では7月採取葉よりも5月採取葉の方が検出率が高かった。前年植付け前の球根からの検出率と比較すると、スターゲザーではほぼ同じであったが、うたげ、内田、布施の里では著しく低



第3図 第2図におけるB列(上)およびC列(下)のクロマトスキャナー(波長400nm)による検量図

第2表 供試品種におけるモザイク症状株の割合(1987)

品種	5月28日	7月21日
スターゲザー	4/20(20.0) ¹⁾	4/13(46.2)
うたげ	1/34(2.9)	0/34(0)
氷見2号	0/180(0)	0/180(0)
布施の里	23/175(13.1)	1/175(0.6)
内田	2/120(1.2)	2/170(1.2)
白妙	0/16(0)	0/16(0)

1) モザイク症状株数/調査株数, ()内の数字は%

第3表 DIBAによるユリ品種の葉からのユリ潜在ウイルス(LSV)の検出

品種	5月28日 ¹⁾	7月21日
スターゲザー	18/18(100) ²⁾	9/11(81.8)
うたげ	6/20(30.0)	4/20(20.0)
氷見2号	3/20(15.0)	2/20(10.0)
布施の里	8/20(40.0)	0/20(0)
内田	2/20(10.0)	0/20(0)
白妙	0/16(0)	0/16(0)

1) 試料採取年: 1987年

2) LSV 検出数(±の判定も含む)/調査株数, ()内の数字は%, 結果の判定は肉眼観察

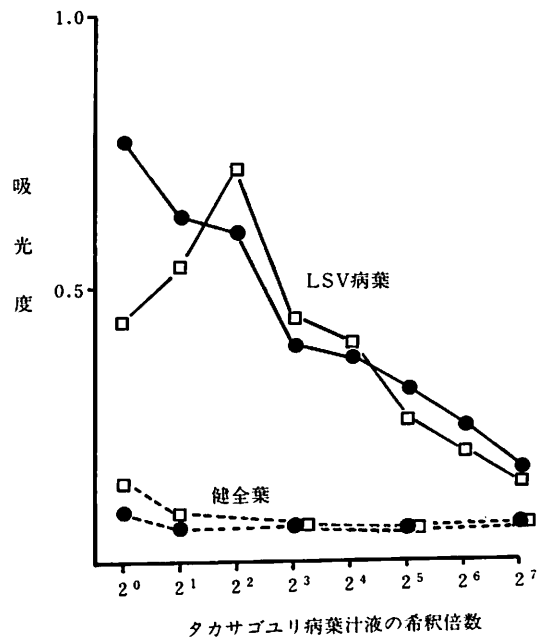
く, それぞれ30, 11, 25%程度の検出率であった。

3. ELISA および簡易ELISAによる検出

タカサゴユリ病葉汁液を2倍ずつ段階希釈してLSVの検出限界を調べた。第4図に示すように、両法とも病葉汁液128倍希釈まで検出可能であり、4倍希釈から128倍希釈までの間では両法のELISA値にほとんど差がなかったが、1倍および2倍希釈では簡易法が低かった。

4. ELISAによるユリ品種からのLSVの検出

葉およびりん片からウイルスの検出を試みた。供試葉は5月28日と7月20日に採取し、冷凍保存(-80°C)した。第4表に示すように、葉では、スターゲザーの検出率が最も高く、5月および7月採取葉とも全株からLSVが検出された。次いでうたげ、氷見2号、布施の里の順で高く、内田、白妙では検出されなかった。うたげ、氷見2号では7月採取葉より5月採取葉で検出率が高く、布施の里ではこの逆であった。供試60個体中、5月採取葉では陰性で、7月採取葉で陽性と判断されたものが5個体あったが、この逆は2個体であった。りん片からの検出率はスターゲザーを除く全ての品種で葉より高く、うたげ、布施の里では90%および80%であり、内田、氷見2号ではそれぞれ50%、40%であった。白妙においても1個体から検出された。葉とりん片での検定結果が食い違った20個体のうち、16個体がりん片検定で



第4図 ELISAおよび簡易化したELISAによるユリ潜在ウイルス(LSV)の検出

●: 通常のELISA
□: 簡易化したELISA
実線は病葉, 破線は健全葉

第4表 ELISAによるユリ品種からユリ潜在ウイルス (LSV) の検出

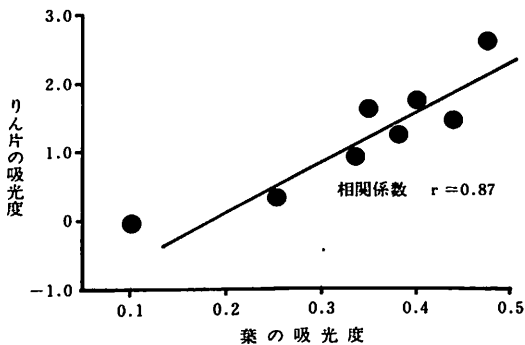
品種	試料採取日 ¹⁾ および採取部位	供試材料の吸光度 ²⁾										LSV感染株 /調査株(%)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
スター	5/28葉	0.68	0.53	0.24	0.50	0.78	0.50	0.22	0.85	0.31	0.73	10/10(100)	
ゲザー	7/20葉	0.47	0.71	0.18	0.50	0.27	1.23	0.93	0.80				8/8 (100)
	10/27隣	0.94	0.08	0.04	0.44	0.20	1.32	1.56	1.21	1.41	0.62		
うたげ		0.33	0.07	0.07	0.09	0.04	0.09	0.03	1.23	0.70	0.01	3/10(30.0)	
		0.22	0.21	0.20	0.11	0.09	0.13	0.04	0.33			6/8 (75.0)	
		0.07	0.45	0.69	0.83	0.62	0.22	0.76	0.28	1.15	0.60	9/10(90.0)	
氷見2号		0.07	0.09	0.10	0.08	0.73	0.09	0.05	0.06	0.05	0.12	3/10(30.0)	
		0.05	0.05	0.10	0.06	0.37	0.08	0.07	0.24			3/8 (37.5)	
		0.03	0.03	0.15	0.03	0.76	0.05	0.03	0.04	0.17	0.73	4/10(40.0)	
布施の里		0.62	0.36	0.00	-0.05	-0.05	0.03	0.01	0.01	0.00	0.00	2/10(20.0)	
		-0.02	-0.04	0.00	-0.05	0.01	0.01	-0.03	-0.04			0/8 (0)	
		0.47	0.47	0.57	0.02	0.51	0.83	0.51	0.07	0.13	0.29	8/10(80.0)	
内田		0.00	-0.03	0.05	-0.02	-0.02	-0.03	0.01	0.03	-0.02	0.07	0/10 (0)	
		-0.01	0.01	0.06	0.00	0.00	-0.05	-0.01	0.03			0/8 (0)	
		0.03	0.34	0.04	0.01	0.30	0.13	0.50	0.07	0.06	0.36	5/10(50.0)	
白妙		-0.01	-0.02	0.00	0.00	-0.05	0.03	0.01	0.01	0.01	-0.02	0/10 (0)	
		-0.02	-0.10	0.00	-0.02	-0.01	0.00	-0.01	0.02			0/8 (0)	
		0.02	0.02	0.01	0.00	0.02	0.02	0.01	0.02	0.01	0.30	1/10(10.0)	

- 1) 試料及び採取日：各品種とも上列が1987年5月28日，中列が同年7月20日でいずれも葉。下列はりん片で10月27日採取。
 2) 405nmにおける吸光度，吸光度0.1以上が陽性 (LSV 感染株)

第5表 ELISAによるユリ潜在ウイルス (LSV) 罹病ユリ球根のりん片から LSV の検出

試料 ¹⁾ (球根)	りん片数	吸光度 ²⁾				
		1.0以上	0.99~0.51	0.50~0.31	0.30~0.21	0.2以下
1	15	1	11	2	1	0
2	11	1	5	5	0	0
3	30	0	18	8	4	0

- 1) 品種：1，3はうたげ，2はスターゲザー
 2) 405nmにおける吸光度，0.1以上が陽性 (LSV 感染りん片)



第5図 ELISAによる葉とりん片の吸光度の比較 (品種：スターゲザー)

LSV 感染株と判断された。葉における吸光度とりん片における吸光度を個体毎に比較した結果，第5図のように，高い正の相関関係が認められ，葉よりもりん片における

吸光度の方が著しく高かった。さらに，LSV 感染株の球根を用いて，りん片を検定した結果，第5表に示したように，すべてのりん片から LSV が検出された。

5. モザイク症状を示したユリ類からのウイルス検出

育種材料として保存しているユリ類のうち，明瞭なモザイク症状を現した9種類，11個体について ELISA，電子顕微鏡観察，各種植物への汁液接種により病原ウイルスを調査した。その結果，第6表に示したように，7個体からは LSV，3個体からは Potyvirus 群に属すると考えられる長さ700~800 nm のひも状ウイルス，1個体からはキュウリモザイクウイルスが検出された。

考 察

ユリ潜在ウイルス¹⁾の検出方法とし，DIBA および ELISA について検討した結果，両法ともきわめて検出精度が高く，葉および球根から容易にウイルスが検出でき，診断に利用できることが判明した。供試したスターゲザーおよびカノコユリ5品種では感染率に明確な差があり，また，カノコユリ品種では，地上部に病徴を現わさない個体でも球根からはウイルスが検出され，LSV 保毒率の高いことが明らかになった。

DIBA は特別な機械を必要とせず，迅速かつ簡便な検出方法であり，ニトロセルロースシートに試料を吸着させた後，2時間以内には結果の判定が可能であった。また，試料スポット後は，ブロック液や洗浄液中で数日間

第6表 モザイク症状を示したユリ類からウイルスの検出

ユリ類 (品種)	病徴	ELISAによる		電子顕微鏡観察		接種試験
		LSVの検出		PVY様粒子	LSV粒子	
1. ヤマユリ	モザイク, えそ条斑	- ¹⁾		+	-	-
2. ヤマユリ	モザイク	-		+	-	-
3. ハカタユリ	モザイク	-		-	-	+(CMV)
4. オリエンタル	モザイク	+		-	+	-
ハイブリッド(ふじ)	モザイク					
5. オリエンタル	モザイク	+		-	+	-
ハイブリッド(ふじ)						
6. サクユリ	モザイク	+		-	+	-
7. 交配系統	モザイク	-		+	-	-
8. オリエンタル	モザイク	+		-	+	-
ハイブリッド(スターゲーザー)						
9. シンテッポウユリ	モザイク	+		-	+	-
(銀河)						
10. テッポウユリ	モザイク	+		-	+	-
(ジョージア)						
11. アジアティック	モザイク	+		-	+	-
ハイブリッド						
(スターリングスター)						
12. カノコユリ(白妙)	- (健全株)	-		-	-	-

1) +: ウイルス(粒子)が検出された。-: ウイルス(粒子)が検出されなかった。

は保存できた。むしろ、このように十分洗浄した方が非特異反応が少なく、好結果が得られた。検定試料は葉では遠心分離する必要があるが、球根では磨砕試料を静置し、その上清を用いる方法が簡便であった。試料を凍結保存しておき、使用時に融解しても好結果が得られた。シート上に1 cm 位の間隔で試料をスポットすれば、1 回に100~120点の検定ができ、また試料を定量的にスポットすればウイルスの定量も可能と考えられる。

ELISA は DIBA に比べると手順がやや複雑であったが、試料を遠心分離する必要もなく、定量的に結果を判定できる点で、汎用性があるように思われた。γ-グロブリンをコーティングしたマイクロプレートを準備しておけば2日で結果が判定できた。簡易化した方法でも精度が変わらず、今後、試料と酵素結合抗体との反応温度を上げることにより検定時間が短縮できるものとする。

DIBA および ELISA におけるタカサゴユリ病葉を用いた検出限界は DIBA の方が高かった。これは DIBA では酵素標識した二次抗体を使用するため、ウイルス濃度が低い場合でも反応が増幅され、強い発色スポットとなったものと推察される。しかし、実際の検定においては、両方法の間で検出感度に違いはないようであった。したがって、LSV の診断にあたっては、試料の数、診断時間、定量性などを考慮して目的に応じて使い分けられれば良いと思われる。

ELISA による LSV の検出はスカシユリなど Asiatic hybrid に属する品種^{3,5,14,15)}食用ユリ⁹⁾などで試みられ、好

結果を得ている。本試験におけるスターゲーザーおよびカノコユリ5品種を用いての検出結果では、品種間および同一品種でも葉と球根では検出率が大きく異なった。スターゲーザーはタモトユリとカノコユリの交配種¹⁸⁾と考えられており、カノコユリに比べてウイルス病には非常に弱い。このような品種は Asiatic hybrid などの品種と同じく葉、球根いずれにおいてもウイルス濃度が高く、検出部位や検出時期の違いによらず罹病植物から安定してウイルスが検出できるものと思われる。一方、カノコユリはウイルス病に強い品種であるが、球根の罹病率はうたげ、布施の里、内田ではいずれも50%以上ときわめて高かった。しかしながら、葉における病徴発現は少なく、ウイルス検出率も球根からに比べてかなり低かった。カノコユリ品種では、球根と地上部茎葉間ではウイルスの移行速度が速やかでなく、また、茎葉におけるウイルス増殖量もきわめて少ないものと推察される。したがって、確実な診断を行うには、今後、検定試料の採取時期や採取部位について詳細に検討する必要がある。一方、この茎葉におけるウイルス濃度の低さは、圃場内におけるウイルス伝染率の低さにもつながっていると考えられる。

DIBA および ELISA による球根からのウイルス検出が可能になったことは、ウイルスフリー球根の維持、増殖などにはきわめて実用的で便利な方法である。ユリ類の繁殖方法はりん片繁殖が普及しているが^{16,17)}、繁殖前に球根を検定できれば、ウイルスフリー苗を効率的に生

産することが可能であり、また、りん片培養などでは親球根を入念に検定しておけばウイルスフリー種苗を大量に得られる。また、用途によってはウイルス濃度の高い球根だけを除けばよい場合もある。

保存9品種のモザイク株における病原ウイルスの調査ではLSVがもっとも多く検出された。わが国のユリ類に発生するウイルスとしては本ウイルスのほかキュウリモザイクウイルス(CMV)^{8,11,12)}、チューリップモザイクウイルス(TBV)^{5,13,14,15)}およびカンキツタターリーフウイルス(CTLV)⁷⁾が報告されている。生産地における病原ウイルスの発生調査は、テッポウユリ¹¹⁾、スカシユリなど Asiatic hybrid^{5,15)}、食用ユリ⁵⁾などで行われているにすぎないが、新潟、北海道などの産地でもLSVが最も多発生しており、ユリ類での本ウイルスの重要性が明確になりつつあるように思われる。

抗血清を利用したウイルス病診断の実用化の困難性の一つは、抗血清の供給であるが、本ウイルスは増殖、純化が容易であり、質の良い抗血清が十分準備できる。本試験で用いたDIBA及びELISAの手法は、機械化やシステム化が可能であり、今後、生産組織などにおけるLSVの圃場診断技術として利用でき、ユリ類の品質向上に大きく寄与できるものと考えられる。

摘 要

DIBA および ELISA によりユリ類の葉、りん片からユリ潜在ウイルス (LSV) を容易に検出することが出来た。これらの方法を用いてスターゲザー、カノコユリ5品種におけるLSV感染の有無を検定した。LSV濃度は一般的に、葉よりりん片の方が高く、カノコユリでは茎葉に病徴を示さない個体でも球根からは高率にウイルスが検出された。罹病球根ではすべてのりん片からウイルスが検出できた。育種母本として保存しているユリ類9種類11個体のモザイク症状株について病原ウイルスを調査した結果、LSVが最も多く、7個体から検出された。

引 用 文 献

- 1) Allen, T. C. (1972) Lily symptomless virus. C. M. I./A. A. B. Descriptions of Plant Viruses No. 96, 4pp.
- 2) Asjes, C. J. (未発表, Allen, T. C. (1972) Lily symptomless virus. C. M. I./A. A. B. Descriptions of Plant Viruses No. 96, 4pp より引用).
- 3) Beijersbergen, J. C. M. and Hulst, C. T. C. van der (1980) Application of enzymes during bulb tissue

- extraction for detection of lily symptomless virus by ELISA in *Lilium* spp. Neth. J. Pl. Path. 86: 277~283.
- 4) Clark, M. F. and Adams, A. N. (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34: 475~483.
- 5) 萩田孝志・児玉不二雄・赤井 純 (1989) 北海道におけるユリのウイルス病. 日植病報 55: 1~8.
- 6) 日比忠明 (1984) DIBA 法による植物ウイルスの検出法. 植物防疫 38: 380~384.
- 7) 井上成信・前田孚憲・光畑興二 (1979) ユリから分離された Citrus Tatter Leaf Virus. 日植病報 45: 712~720.
- 8) 岩木満朗・小室康雄 (1969) 内田カノコユリのえそ斑症状から分離されるウイルスについて. 関東虫研報 16: 66.
- 9) 岩崎真人・山本孝彥・勝部利弘・稲葉忠興 (1987) 簡易化した酵素結合抗体法 (ELISA) によるキュウリモザイク病の診断. 四国植防 22: 57~62.
- 11) 川田稔一・阿部定夫 (1966) テッポウユリにおけるキュウリモザイクウイルスの保毒率とその諸性質について. 園芸試験場報告 A 5: 194~206.
- 12) 前田孚憲・井上成信 (1983) テッポウユリから分離されたキュウリモザイクウイルスの性質. 農学研究 60: 69~80.
- 13) 前田孚憲・井上成信・光畑興二 (1984) ユリ類から分離されたチューリップモザイクウイルスの1系統. 農学研究 60: 135~146.
- 14) 宮川正通 (1987) スカシユリウイルス病の血清学的手法の簡易診断法. 今月の農業 31: 88~99.
- 15) 新潟園試 (1983) 花きの病害に関する試験. 昭和58年度新潟園試試験成績書.
- 16) 西井謙治 (1980) カノコユリの優良系統およびウイルスフリー株の獲得とその増殖(1). 農業および園芸 55: 322~326.
- 17) 西井謙治 (1980) カノコユリの優良系統およびウイルスフリー株の獲得とその増殖(2). 農業および園芸 55: 440~444.
- 18) 清水基夫 (1987) 日本のユリー原種とその園芸種. 誠文堂新光社, 東京, 182pp.
- 19) 山本孝彥・名畑清信・松本美枝子 (1986) 花き球根類に発生するウイルスの血清学的診断方法. 日植病報 53: 108.

(1990年7月4日受領)