

## 血清学的手法によるチューリップ微斑モザイク症状の診断

守川 俊幸・野村 良邦\*・築尾 嘉章

Toshiyuki MORIKAWA, Yoshikuni NOMURA\* and Yoshiaki CHIKUO :  
Diagnosis of tulip mild mottle mosaic by ELISA and TBIA.

### Summary

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and tissue blot immunoassay (TBIA), were applied for detection of tulip mild mottle mosaic associate (TMMA) from tulips. In ELISA, successful results were obtained, when Tris-HCl (0.05M, pH8.0) or carbonate buffer (0.05M, pH9.6), containing 0.1% 2-mercaptoethanol, 2% PVP, 0.5% BSA and 5% activated charcoal were used as an extraction buffer. The antigen of TBV or LSV were detected uniformly within tulip bulbs by TBIA, while that of TMMA was detected weakly and locally within tulip bulbs by both methods.

1979年頃から富山県のチューリップ球根栽培地帯で、病原が不明のウイルス様症状が発生し、問題となっている。本症状は土壌と球根で伝染し<sup>9,10,13)</sup>、発生面積は拡大傾向にあることから、早急な防除対策の確立が求められている。本症状は微斑モザイク症状 (Mild mottle mosaic) と条斑症状 (Streaking) の2つに分けられ、それぞれ異なるウイルス様の病原が関与しているものと推察されている<sup>10)</sup>。

球根類のウイルス病は、球根で伝染するものが多く、一般的な防除対策として、感染株の除去、媒介者の防除またはウイルスフリー苗の供給などがあげられる。チューリップの場合は、ユリなど一部の球根類で実用化されつつあるウイルスフリー苗の供給は実用化されておらず、もっぱら感染株の除去と媒介者の防除に頼らざるを得ないのが現状である。

発病株の除去あるいは健全な種球根の維持増殖を行うには、精度が高くしかも簡便なウイルス診断法の確立が望まれる。チューリップの幾つかのウイルス病は、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA法)による血清学的診断技術が確立されている<sup>1,5,6,15)</sup>。しかし、ウイルス様症状の場合には、抗原とすべき病原の正体が不明であるため、血清学的診断方法を確立することが困難であった。ところが近年、微斑モザイク症状については、感染植物に特異的に見られる粒子 (Tulip mild

mottle mosaic associated particles, 特異的粒子)が純化され、これに対する抗血清が作成された<sup>9)</sup>。そこで、本抗血清を用いてELISA法やTissue blot immunoassay (TBIA法)による微斑モザイク症状の診断を試みた。本研究の一部は既に報告<sup>7,8)</sup>したが、ここにその結果を取りまとめたので報告する。

### 材料および方法

#### 検定材料

ELISA法による検出至適条件の検討には、微斑モザイク症状特異的感染因子 (分離株 Harcro-A) を接種した *Chenopodium quinoa* 葉と健全葉を用いた。実際の診断試験には、砺波市内のウイルス様症状発生圃場から採集した汚染土壌 (病土) や一般栽培圃場に植え付けて発病の認められた株および無病徴株を供試した。対照には当該栽培圃場で栽培した健全株、条斑症状株、Tulip breaking virus (TBV) 感染株や Lilly symptomless virus (LSV) 感染株、さらに Tobacco necrosis virus (TNV: Pare-P, Koreto-1 の2分離株)<sup>12)</sup> を接種したツルナの葉や LSV に感染したユリの球根を用いた。また、TBIA法には当該の栽培圃場で採取したチューリップのウイルス病様の異常株を随時供試した。なお、供試品種については第3~5表、第2~6図に示した。

#### 抗血清およびγ-グロブリン

本試験に用いた抗血清は、特異的粒子を抗原として先に作製したもの (抗TMMA血清)<sup>9)</sup> を用いた。また、TBIA法による検定試験には、このほかに対照として抗TBV血清<sup>6)</sup>、抗LSV血清<sup>11)</sup> および抗Cucumber

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

\* 東北農業試験場 Tohoku National Agricultural Experiment Station, Arai, Fukushima 960-21

mosaic virus (CMV) 血清 (当場内のキュウリから分離した CMV をタバコで増殖し, 純化して作製) を用いた。各抗血清は純化に用いた宿主の健全葉アセトンパウダー<sup>2)</sup> で吸収した後, 硫酸塩析と DEAE-Cellulose カラムクロマトグラフィーにより  $\gamma$ -グロブリン (IgG) を精製した。

#### ELISA 法

ELISA 法は, 第 1 図に示した二重抗体法 (DAS-ELISA 法)<sup>3)</sup> と簡易法 (S-ELISA 法)<sup>11)</sup> によって行った。検出試料は最上位葉, 根および収穫した球根を用いた。また, 同一試料を 5% (W/V) 活性炭素を含む 0.05M リン酸緩衝液 pH7.1 中で磨砕し, *C. quinoa* にカーボランダム法によって汁液接種して, 局部病斑形成の有無を観察し, DAS-ELISA 法の結果と比較した。なお, ELISA 法では健全株の吸光度 (405nm) に比べ,

3~4 倍の値のものを疑陽性, さらにそれ以上のものを陽性と判定した。

#### TBIA 法

TBIA 法は, 第 2 図に示した方法 (Lin ら<sup>9)</sup> の方法を一部改変) によって行った。なお, ニトロセルロース膜へのプロットングは, 開花期の花茎もしくは貯蔵中の球根の切断面をニトロセルロース膜に押し付けることによって行った。

## 結 果

### 1. ELISA 法による診断

一般に広く用いられている PBST (0.02M リン酸緩衝液 pH7.4, 0.15M NaCl, 0.05% Tween-20) を用いた一連の操作では, 検出が困難であった。しかし, 磨砕用緩衝液やコンジュゲート溶液にポリビニルピロリドン

#### I. DAS-ELISA 法の手順

- I-1. マイクロプレートに 1  $\mu$ g/ml の IgG を含む 0.05M 炭酸緩衝液 pH9.6 を 1 well あたり 200  $\mu$ l 分注, 37°C, 3 時間静置
- I-2. PBST (0.02M リン酸緩衝液 pH7.4, 0.15M NaCl, 0.05% Tween-20) で 3 回洗浄
- I-3. 植物組織を 5 倍量の磨砕用緩衝液 (2% ポリビニルピロリドン: PVP, 2-メルカプトエタノール, 0.5% 牛血清アルブミン: BSA, 5% 活性炭素を含む, 0.05M 炭酸緩衝液 pH9.6 もしくは 0.05M Tris-HCl pH8.0) で磨砕し, 遠心分離 (10,000rpm 10min) 後の上清を 1 well あたり, 200  $\mu$ l 分注し, 37°C で 3~4 時間もしくは 4°C で一晩静置
- I-4. PBST で 3 回洗浄
- I-5. 2% PVP, 0.2% BSA を含む PBT (0.02M リン酸緩衝液 pH7.4, 0.05% Tween-20) で 500 倍に希釈したコンジュゲート溶液を 1 well あたり 200  $\mu$ l 分注後, 37°C で 2~4 時間もしくは 4°C で一晩静置
- I-6. PBST で 5 回洗浄
- I-7. 基質溶液 (10% ジエタノールアミン, pH9.8 に *p*-ニトロフェニルリン酸を 1 mg/ml の濃度で溶解) を分注し, 室温で 30~60 分間静置
- I-8. オートリーダーで吸光度 (405nm) を測定

#### II. S-ELISA 法の手順

- II-1. I-1, 2 と同じ
- II-2. I-3 と同様で遠心分離して得られた上清を, 1 well あたり 150  $\mu$ l 分注し, 次いで PBT で 125 倍に希釈したコンジュゲート溶液を 50  $\mu$ l 加えて混合, 37°C で 3~4 時間もしくは 4°C で一晩静置
- II-3. 以下 I-6 以降と同じ

### 第 1 図 ELISA 法の手順

1. ニトロセルロース膜に, 花茎断面もしくは球根断面を押しつけ, 乾燥
2. ブロッキング液 (3% スキムミルクを含む, TBS [0.05M Tris-HCl pH8.0, 0.15M NaCl]) に 1 時間浸漬, 時々振盪
3. TBST (TBS+0.05% Tween-20) で 1 回洗浄, 5 分間振盪
4. TBSB (TBS+0.2% BSA) で希釈した抗血清 (5,000~10,000 倍) もしくは IgG (2,000~8,000 倍) に 1~2 時間浸漬
5. TBST で 3 回洗浄, 各 5 分間振盪
6. TBS で希釈したアルカリ性フォスファターゼ標識-抗ウサギ IgG: ヒツジ IgG (7,500 倍) に 1 時間浸漬
7. TBST で 3 回洗浄, 各 5 分間振盪
8. AP9.5 (0.1M Tris-HCl pH9.5, 0.1M NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) で 1 回洗浄, 5 分間振盪
9. 基質溶液 (NBT: BCIP) に浸漬し, 発色
10. 脱イオン水で洗浄
11. 5% Triton X-100 に浸漬して植物由来色素脱色
12. 脱イオン水で洗浄し, 乾燥後保存

第 2 図 TBIA 法の手順 (以上の操作は室温で行う, 緩衝液を長期保存する場合は 0.2% アジ化ナトリウムを添加)

(PVP) および牛血清アルブミン (BSA) を添加することによって非特異反応が抑えられ、さらに、同緩衝液に活性炭素や2-メルカプトエタノールを添加することにより検出感度が向上した (第1表)。また、緩衝液の種類はPBSTよりTris-HClや炭酸緩衝液が検出感度が高かった (第2表)。

### 1) 葉からの検出

DAS-ELISA法による葉からの検出では、微斑モザイク症状葉はすべて陽性であったのに対し、健全葉や他のウイルス感染葉は陰性であった。なお、無病徴葉では一部の株で陽性反応が認められた (第3表)。

### 2) 球根からの検出

DAS-ELISA法およびS-ELISA法による球根からの検出を試みたところ、健全球根や条斑症状感染球根に比べ、本症状株の試料の検出値は明らかに高く、S-ELISA法の検出値とDAS-ELISA法の検出値との間には正の相関が認められた (第3図)。また、球根各部位からDAS-ELISA法による検出を試みたところ、その検出値には、部位ごとに大きな差が認められた。なお、

主球では特にどの部位が高いといった一定の傾向は認められなかったが、子球ではsproutを含めた球根上部が根盤部を含めた球根下部に比べて検出値が高い場合が多かった (第4図)。さらに、*C. quinoa*を用いた生物検定との検出感度を比較した結果、生物検定では‘パレード’が20球中4球で陽性、‘紫水晶’が20球中6球で陽性であったのに対し、DAS-ELISAでは‘パレード’が20球中すべてが陽性、‘紫水晶’が20球中18球で陽性、残りの2球が疑陽性であった。以上のことから、生物検定に比べて、DAS-ELISA法は検出感度が高いことが示された。

### 3) 根からの検出

病土に植え付けた株の根からのDAS-ELISA法による検出を試みたところ、微斑モザイク症状株からは9株中8株が陽性と判定された。また、無病徴株からも51株中6株が陽性と判定された。生物検定では9株中4株が陽性反応で、DAS-ELISA法に比べて検出率は低かった。また、生物検定では供試した試料の多くからTNVが検出された (第4表)。

第1表 DAS-ELISA法における磨砕用緩衝液の組成と検出精度 (その1)

磨砕用緩衝液組成	$A_{405} (D/H^{1/2})$			
	$2 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}/250^{\text{b)}$	$2 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}/500$	$1 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}/250$	$1 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}/500$
PBST	1.0	1.9	2.0	2.1
PBST+PVP	1.9	1.9	2.0	5.5
PBST+PVP+Cha	8.4	9.8	13.3	12.1
PBST+PVP+BSA	1.3	1.9	2.0	2.6
PBST+PVP+2ME	1.5	2.6	2.6	8.3
PBST+PVP+EDTA	1.8	1.7	2.6	3.4

注 a) 病葉の  $A_{405}$  値 / 健全葉の  $A_{405}$  値

b) 吸着 IgG 濃度 - コンジュゲート希釈倍率, コンジュゲートは PBST (0.02M リン酸緩衝液 pH7.4, 0.15M NaCl, 0.05% Tween-20) で希釈した

c) PVP: 2% ポリビニルピロリドン, Cha: 5% 活性炭素, BSA: 0.5% 牛血清アルブミン, 2ME: 0.1% 2-メルカプトエタノール, EDTA: 5mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム

第2表 DAS-ELISA法における磨砕用緩衝液の組成と検出精度 (その2)

磨砕用緩衝液組成	$A_{405} (D/H^{1/2})$		
	$1/5^{\text{b)}$	$1/50$	$1/500$
PBT+PVP+Cha+2ME+BSA <sup>c)</sup>	22.6	15.6	5.8
PBST+PVP+Cha+2ME+BSA	26.5	22.5	6.9
CB+PVP+Cha+2ME+BSA	35.9	43.1	20.1
CBS+PVP+Cha+2ME+BSA	15.7	32.9	17.1
Tris-HCl+PVP+Cha+2ME+BSA	23.5	37.5	21.5

注 a) 病葉の  $A_{405}$  値 / 健全葉の  $A_{405}$  値, コンジュゲートは 2% PVP, 0.2% BSA を含む PBT<sup>c)</sup> で希釈した

b) 磨砕液の希釈倍率

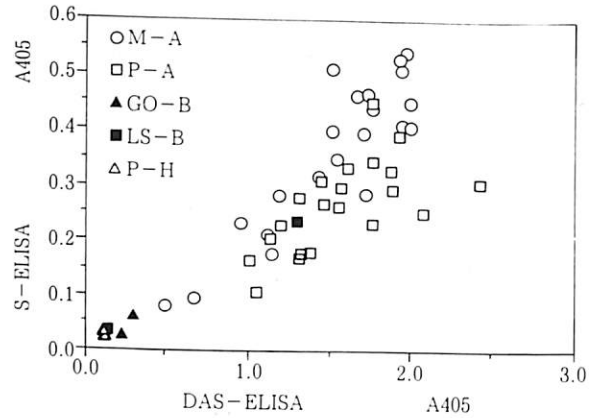
c) PBT: 0.02M リン酸緩衝液 pH7.4+0.05% Tween-20, PBST: PBT+0.15M NaCl, CB: 0.05M 炭酸緩衝液 pH9.6, CBS: CB+0.15M NaCl, Tris-HCl: 0.05M Tris-HCl pH8.0, その他は表1の脚注c)を参照

第3表 DAS-ELISAによる葉からの検出<sup>a)</sup>

品 種	症 状 <sup>b)</sup>	陽性株数 / 供試株数
メリーウィドー	A	4 / 4
	SL	2 / 10
	H	0 / 10
オレンジフェボリット	A	4 / 4
	SL	0 / 3
紫水晶	A	8 / 8
	SL	1 / 11
	H	0 / 3
パレード	H	0 / 3
アレグレット	B	0 / 6
ゴールデンオックスフォード	B	0 / 1
ハルクロ	TBV	0 / 2
ユリ (品種: 内田かのこ)	LSV	0 / 1
ツルナ	TNV (Pare-P)	0 / 1
	TNV (Koreto-1)	0 / 1

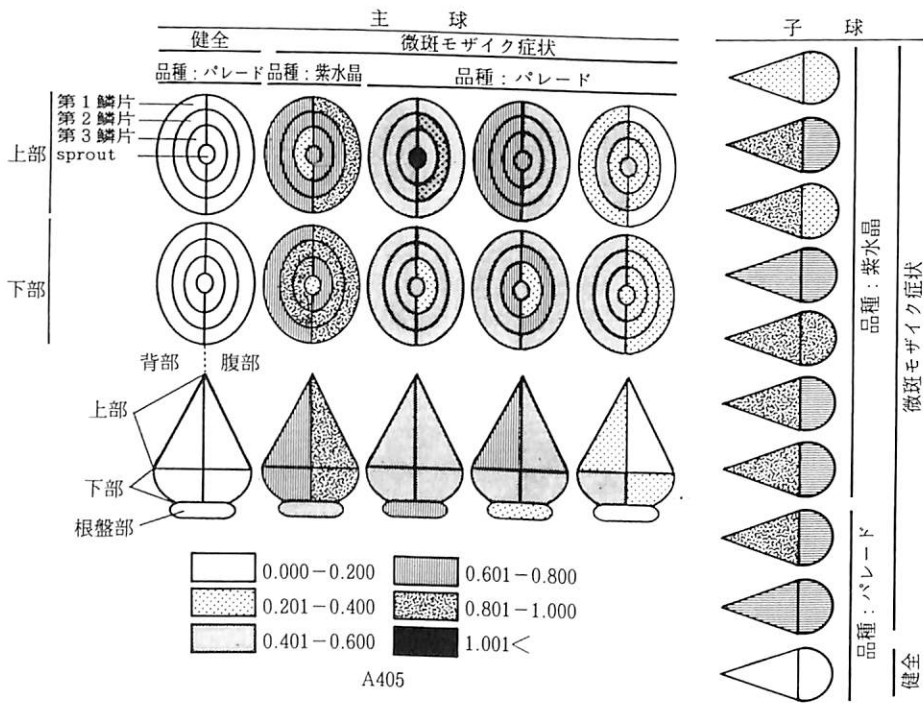
注 a) 検定は1993年5月7日に行った

b) A; 微斑モザイク症状葉, B; 条斑症状葉, SL; 無病微葉, H; 健全葉, TBV; TBV 感染葉, LSV; LSV 感染葉, TNV; TNV 感染葉



第3図 DAS-ELISA法とS-ELISA法による球根からの検出値の相関

注) 検定は1992年10月19日に行った  
 M-A; 微斑モザイク症状感染球根 (品種: 紫水晶)  
 P-A; 微斑モザイク症状感染球根 (品種: パレード)  
 GO-B; 条斑症状感染球根 (品種: ゴールデンオックスフォード)  
 LS-B; 条斑症状感染球根 (品種: ラッキーストライク)  
 P-H; 健全球根 (品種: パレード)



第4図 DAS-ELISA法による球根各部位からの検出

## 2. TBIA 法による診断

微斑モザイク症状株の花茎断面を本法により検定した結果、対照に行った TBV や LSV の検定結果に比べて、発色程度が弱かったが、健全株と識別することができた(第5図)。なお、TBV や LSV は維管束や表皮周辺が強く発色するが多いのに対し、本症状株の場合は維管束周辺のみが淡く発色した。栽培圃場で採集したウイルス病様の異常株花茎を用いて診断した結果は、TBV、LSV や CMV も含めて ELISA 法による診断結果とよ

く一致した(第5表)。次に、貯蔵中の球根の断面をブロッティングした場合、対照の TBV や LSV では断面全体が強く発色したのに対し、微斑モザイク症状では部分的に発色し(第6図)、先の ELISA 法による診断結果と同様に、感染特異的粒子の球根内での遍在性が示唆された。なお、第2図に示したように、発色停止後のニトロセルロース膜を5%程度の TritonX-100 に浸漬することにより、植物色素(緑色)が脱色され、判定が容易となった。

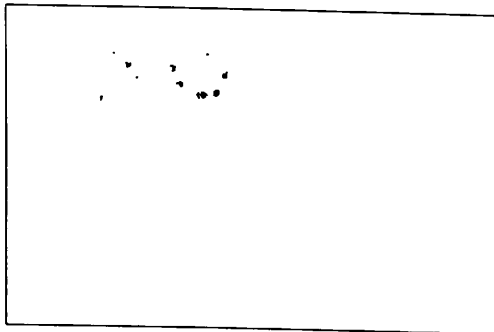
第4表 病土に植え付けたチューリップ(品種:パレード)の根からのDAS-ELISA法と生物検定による検出<sup>a)</sup>

株番号	症状 <sup>b)</sup>	ELISA法 TMMA	生物検定 <sup>c)</sup>		株番号	症状	ELISA法 TMMA	生物検定	
			TMMA	TNV				TMMA	TNV
1	SL	-	-	-	33	SL	-	-	+
2	SL	-	-	+	34	SL	-	-	+
3	SL	-	-	-	35	SL	-	-	-
4	SL	-	-	-	36	SL	+	-	+
5	SL	-	-	-	37	A	+	+	-
6	A	+	-	-	38	SL	-	-	+
7	SL	+	-	+	39	SL	-	-	-
8	SL	-	-	+	40	SL	-	-	-
9	SL	-	-	+	41	SL	-	-	-
10	SL	-	-	+	42	SL	-	-	+
11	SL	-	-	+	43	A	+	+	+
12	SL	-	-	-	44	SL	+	-	+
13	SL	-	-	-	45	SL	+	-	-
14	A	-	-	+	46	SL	-	-	-
15	SL	-	-	-	47	SL	-	-	-
16	SL	-	-	+	48	SL	-	-	+
17	SL	-	-	+	49	A	+	-	+
18	A	+	+	+	50	A	+	+	+
19	SL	-	-	+	51	SL	+	-	+
20	SL	-	-	-	52	SL	-	-	+
22	A	+	+	+	53	SL	-	-	+
23	SL	-	-	-	54	SL	-	-	+
24	B	-	-	+	55	AB	+	-	+
25	SL	-	-	-	56	SL	-	-	+
26	B	-	-	+	57	SL	-	-	+
27	SL	-	-	+	58	SL	-	-	+
28	SL	-	-	+	59	SL	+	-	+
29	SL	-	-	+	60	SL	-	-	+
30	SL	-	-	-	61	SL	-	-	-
31	SL	-	-	-	62	SL	-	-	+
32	SL	-	-	+	63	SL	-	-	-

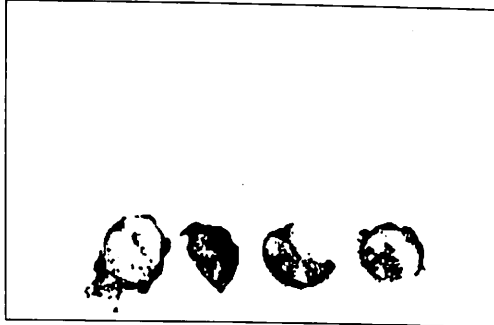
注 a) 検定は1992年5月2日に行った

b) A: 微斑モザイク症状, B: 条斑症状, AB: 両症状, SL: 無病徴

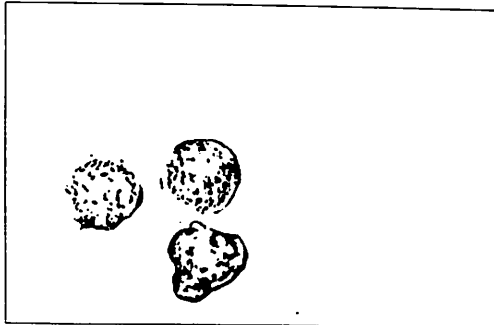
c) *Chenopodium quinoa* 上の局部病斑の形状から判定



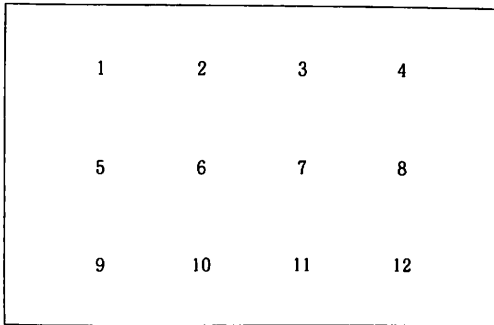
TMMA



TBV



LSV

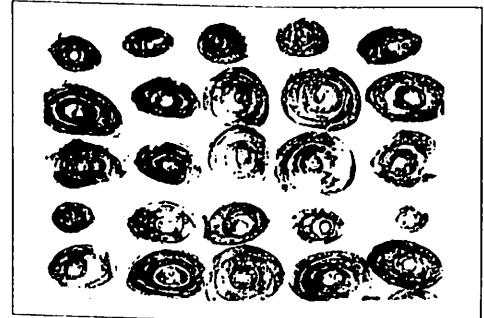


第5図 TBIA法によるチューリップ花茎からの微斑モザイク症状 (TMMA), TBV及びLSVの検出

- 注) 1, 2: 微斑モザイク症状感染株 (品種: メリーウィドー)  
 3, 4: 健全株 (品種: メリーウィドー)  
 5, 6: LSV 感染株 (品種: ドリームランド)  
 7, 8: 健全株 (品種: ドリームランド)  
 9: TBV 感染株 (品種: ドリームランド)  
 10: TBV, LSV 感染株 (品種: ドリームランド)  
 11, 12: TBV 感染株 (品種: ハルクロ)



TMMA



TBV



LSV

第6図 TBIA法によるチューリップ球根からの微斑モザイク症状 (TMMA), TBV及びLSVの検出

### 考 察

これまで微斑モザイク症状の診断には、チューリップでの病徴診断と *C. quinoa* による生物検定が用いられているが、これらの方法では以下のような問題があった。すなわち、病徴によって診断する場合には、葉での病徴が不鮮明であるため蕾の退色斑を指標としているが、この病徴は開花とともに不明瞭となることから、診断できる期間が短く、診断するには熟練を要した。さらに、白・黄色の品種では蕾に病徴が生じないなどの問題点があった。また、生物検定では結果がでるまでに1週間程度の期間を要し、生じる局部病斑が特異的因子によるものかは断定しがたいこと、かつ、多数の試料を同時に診

断するのが労力的に困難なことに加え、夏期の高温時には局部病斑が形成されないなどの問題点があった。本試験の結果、ELISA法は生物検定に比べて検出感度が高いことが明らかとなった。また、TBIA法もELISA法と同等の精度と考えられる(第5表)ことから、両手法は、上記問題点を解決する極めて有効な診断方法と考えられる。

ELISA法による診断の結果、健全植物やチューリップの他のウイルス病感染植物に比べて、本症状感染チューリップは例外無く有意に検出値が高かった。このことにより、特異的粒子が本症状の発現に密接に関与している<sup>9)</sup>ことが改めて明らかとなった。なお、葉からの検出では無病徴株の3株、球根からの検出では条斑症状を示した株の1株が、また根からの検出では無病徴株の6株が陽性反応を示した(第2-4表, 3図)。これらの試料は何れも本症状に潜在感染していたものと考えられた。この様な潜在感染株の存在は球根伝染試験の結果からも明らかとなっており<sup>10)</sup>、圃場での病徴を指標とした抜き取りだけでは本病防除は不十分であると考えられた。

本症状は土壌伝染することから、根から感染することが想像される。ところが、本試験では同一株で根と地上部からの検出を同時に行っていないことから、これを証明するに至らなかった。今後、根と地上部からの同時検出を行って、この点について明らかにする必要がある。また、*Olpidium*菌によって媒介されるTNVを生物検定で検出したところ、本症状株から9株中7株(78%)、無病徴株からは51株中29株(57%)が検出され、本症状株の方がTNVの検出率が高かった(第5表)。山本ら<sup>12)</sup>も微斑モザイク症状や条斑症状からTNVを分離しており、*Olpidium*菌あるいはTNVと両症状の発生およびその分布との関係を今後調査する必要があると考えられた。

ELISA法では磨砕用緩衝液に活性炭素を添加することにより、検出感度が高くなった。活性炭素は特異的粒子を純化する過程でも、磨砕液に添加する必要があり、さらに、磨砕液中の特異的因子の安定性(感染性)を高めることも知られている<sup>9)</sup>。このことから、活性炭素は磨砕液中の特異的粒子および特異的因子に対する不活化因子もしくは分解因子を吸着する働きを持つものと考えられる。このことが、ELISA法による診断にも有効に働いているものと考えられた。なお、本報告では示していないが、特異的粒子の部分純化試料では、活性炭素の添加が無くとも有意な検出が可能なることから、粗汁液中にのみ上述因子が有意に存在するものと推察された。

チューリップ球根の部位別のELISA法による検出値には、大きな差が認められ、かつ、球根断面のTBIA法による検出結果でも部分的に強く発色することから、球

第5表 チューリップウイルス病様異常株のTBIA法とDAS-ELISA法による診断結果の比較<sup>a)</sup>

ウイルス	陽性株数/検定株数(陽性率) <sup>b)</sup>	
	TBIA法	DAS-ELISA法
TMMA	4/137(3%)	4/137(3%)
TBV	87/137(64%)	89/137(65%)
LSV	10/137(7%)	10/137(7%)
CMV	1/137(1%)	1/137(1%)

注a) 検定は1994年5月4日に行った

b) 当場栽培圃場から採集したチューリップ花茎(29品種)を検定試料とした

根での特異的粒子は部分的に濃度が高いものと考えられた。この様なウイルスの遍在性はTobacco rattle virusにおいても知られており、球根を試料とした検出診断には注意が必要であると報告されている<sup>11)</sup>。同様に、本症状の場合も組織片を採取する部位によっては陽性であるべき球根が陰性と診断される可能性があることから、球根で感染の有無を診断する場合はこのことに十分に留意する必要があると考えられた。また、この遍在性が本症状の球根伝染率が品種や年度で大きく異なる<sup>10)</sup>原因の一つとなっている可能性があることから、今後、品種や球根の貯蔵条件によって遍在性がどの様に異なるかを経時的に調査する必要があると考えられた。

ELISA法とTBIA法を比較した場合、TBIA法は発色が弱く、検出精度の面ではELISA法が優れているものと考えられたが、TBIA法はELISA法と異なり、試料を磨砕する手間が省ける長所があり、かつ、生産者からプロットングしたニトロセルロース膜を郵送してもらって検定することも可能と考えられる。今後は、両手法を用いてTBV, LSVおよびCMVも含めた広範囲な調査を行いたい。また、微斑モザイク症状については、病原の同定や発生生態の解明にも活用されることが期待される。

## 摘 要

ELISA法とTBIA法によるチューリップ微斑モザイク症状の診断を試みた結果、両手法で検出診断が可能であった。症状株は特異的に陽性反応を示すことから、症状株から検出される特異的粒子は、本症状の発現に密接に関与しているものと考えられた。球根では、部分的に検出値が高く、特異的粒子の遍在性が示唆された。

## 引用文献

- 1) Asjes, C.J., van Schadewijk, A.R. and Segers, L. CH. (1992) Detection of tobacco rattle virus by ELISA and test plants in main sprouts

- of tulip bulbs during storage at different temperatures. *Neth. J. Pl. Path.* 98 : 213~219.
- 2) Ball, E. M., Hampton, R. O., de Boer, S. H. and Schaad, N.W. (1990) *In Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens : polyclonal antibodies* (Hampton, R. *et al.* eds). APS Press, Minesota. pp. 33~54.
  - 3) Clark, M.F. and Adams, A.N. (1977) Characteristics of the microplate methods of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34 : 475~483.
  - 4) Lin, N. S., Hsu, Y. H. and Hsu, H. T. (1990) Immunological detection of plant virus and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathology* 80 : 824~828.
  - 5) 宮川正通・中臣康範 (1986) lily symptomless virus の精製と ELISA の作成. *日植病報* 52 : 97 (講要).
  - 6) 守川俊幸・野村良邦 (1993) チューリップモザイクウイルスの純化と抗血清の作製. *北陸病虫研報* 41 : 53~55.
  - 7) 守川俊幸・野村良邦 (1993) ELISA 法によるチューリップ微斑モザイク症状の診断. *日植病報* 59 : 325 (講要).
  - 8) 守川俊幸・野村良邦・築尾嘉章・山本孝彜 (1994) チューリップから分離されたユリ潜在ウイルス (LSV) と Direct tissue blot immunoassay によるチューリップモザイクウイルス (TBV), キュウリモザイクウイルス (CMV), チューリップ微斑モザイク症状 (TMM-A) および LSV の検出. *日植病報* 60 : 783 (講要).
  - 9) 守川俊幸・野村良邦・大浦佳世子・山本孝彜 (1993) チューリップ微斑モザイク症状の感染特異的粒子の検出. *日植病報* 59 : 65 (講要).
  - 10) 守川俊幸・大浦佳世子・山本孝彜・野村良邦・松本美枝子・名畑清信 (1995) 富山県で発生認められたチューリップウイルス様症状について. *富山農技セ研報* 16 : 55~66.
  - 11) Takahashi, Y., Omura, T., Hayashi, T., Shohara, K. and Tsuchizaki, T. (1988) Detection of rice transitory yellowing virus (RTYV) in infected rice plants and insect vectors by simplified ELISA. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 54 : 217~219.
  - 12) 山本孝彜・守川俊幸・名畑清信・稲垣佳世子 (1990) チューリップから分離されたタバコネクロシウイルス (tobacco necrosis virus) の血清学的性質. *北陸病虫研報* 38 : 54~59.
  - 13) 山本孝彜・守川俊幸・稲垣佳世子・松本美枝子・名畑清信 (1989) チューリップに発生したウイルス様症状 (1)病徴および伝染経路. *日植病報* 55 : 101 (講要).
  - 14) 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 (1990) 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. *北陸病虫研報* 38 : 45~50.
  - 15) Van der Vlugt, C. I. M., Linthorst, H. J. M., Asjes, C. J., Van Schadewijk, A. R. and Bol, J.F. (1988) Detection of tobacco rattle virus in different parts of tulip by ELISA and cDNA hybridisation assays. *Neth. J. Pl. Path.* 94 : 149~160.

(1995年5月8日受領)