

ほ場で栽培中のユリの LSV, TBV-L および CMV の ELISA 法と DIBA 法による検出

新美芳二・権平 正・轡田圭孝・辻 ひろ

新潟大学農学部 950-2181 新潟市五十嵐 2-8050

Detection by ELISA and DIBA Tests of Lily Symptomless Virus (LSV), Tulip Breaking Virus-Lily (TBV-L) and Cucumber Mosaic Virus (CMV) in *Lilium* spp. Grown in the Field

Yoshiji Niimi, Tadashi Gondaira, Yoshitaka Kutsuwada and Hiro Tsuji

Faculty of Agriculture, Niigata University, Niigata 950-2181

Summary

1. The viruses, LSV, TBV-L, and CMV were made in the scale-segments of *Lilium* X 'Enchantment' by both a dot immunobinding assay (DIBA) and indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The sensitivity of DIBA to detect viruses is about 10 to 100 times lower than that of ELISA, but it is an easy, reliable method to detect these viruses in routine surveys.

2. Absorbance values of LSV in leaves which were collected from the lower, middle, and upper parts of stem, perianths, and bracts were determined at 405 nm by ELISA. The most reliable value was obtained from the basal parts of leaves, located on the upper part of the stem. Based on this result, the absorbance of leaves collected at various times during the growth period was determined. The LSV level in the leaves increased gradually toward anthesis. Whereas the leaves excised from the upper part of the stem had a higher concentration of LSV than had those of the lower part in *L. X 'Enchantment'* and *L. X 'Star Gazer'*, the reverse trend was found in *L. formosanum*.

3. Individual plants (550) of 18 *Lilium* spp. growing in the field were examined for three viruses by DIBA. Leaves of test plants were collected from the upper part of stems at anthesis and their basal parts were analyzed for three viruses. One or more viruses were detected in 73% of the 550 plants investigated. The frequency of LSV, TBV-L, and CMV occurring alone in the population was 52, 2, and 1%, respectively; the remaining 18% was infected with two or three viruses. More than 80% of the plants in 10 *Lilium* spp. were infected with one or more viruses.

4. *Lilium* spp. infected with LSV were nearly symptomless. Plants of *L. rubellum* with the leaves which develop green stripe mosaic were infected with LSV and TBV-L. Stem elongation of plants of 'Casablanca', 'Hinomoto', 'Enchantment', and 'Star Gazer' multiple-infected with LSV and TBV-L or CMV was retarded compared with stem elongation of the same cultivars infected with LSV alone.

Key Words: DIBA, ELISA, *Lilium* spp., three viruses.

緒 言

ウイルスの感染は植物の生長の低下、ネクロシスの発生、生育中の水分不足の一因となり、球根植物では球根の生産量の減少や切り花品質の低下をもたらす (Bos, 1995). このウイルスの植物への感染やその被害を最小限に防止するには、まず病原ウイルスの同定が必要であり、外部病徴による診断、電子顕微鏡によるウイルスの観察、生物検定法や血清反応によるウイルス診断および同定法が開発・利用されてきた (井上, 1992). しかしながら外部病徴だけでは病原ウイルスの同定は困難であり、電子顕微鏡による方法は大型設備と高度な技術を必要とし、生

物検定法は判定に数週間を要する (井上, 1992). これらの方法は大量に商業的に栽培されている植物を対象としたウイルス診断法としてはほとんど利用されてこなかった. 一方、酵素結合抗体法 (ELISA) が植物ウイルスの診断に応用できることが Voller ら (1976) によって示されて以来、この方法は多くの植物のウイルス検出に利用されてきた (久原, 1980). ユリでは、Allen ら (1980) がユリのウイルスの検出を ELISA 法と電子顕微鏡とで行い、ELISA 法がウイルスの検出にきわめて有効であること、また、Beijerbergen・Van der Hulst (1980) は ELISA 法により一度に大量のユリ球根のウイルス検出が短時間でできることを報告している. 一方、日比 (1984) は酵素結合抗体の反応をニトロセルロース膜上で行う Dot immunobinding assay (DIBA) 法でタバコモザイクウイルスの検出を試み、ELISA 法と比較して一層簡便なウイルス検出

1997年8月22日 受付. 1998年2月9日 受理.

本報告の一部は園芸学会平成3年度秋季大会 (北海道大学) で発表し、文部省科学研究費 (06660030) で行われた.

法であることを報告した。

日本で栽培されるユリから検出・同定されているウイルスは7種類(大木, 1992)あり, 本報告では抗血清を手できた LSV (ユリ潜在ウイルス), CMV (キュウリモザイクウイルス) および TBV-L (チューリップブレインキングウイルス-ユリ系) を用いて, (1) DIBA 法と ELISA 法とのウイルス検出感度の違い, (2) 各器官および生育時期別のウイルス濃度の変化, (3) 新潟県下で栽培されている主要なユリの種および品種における LSV, CMV および TBV-L の発生率, および (4) 感染したウイルスの種類と外部病徴との関連についての結果を述べる。

材料および方法

実験 1. ELISA 法と DIBA 法による LSV, TBV-L および CMV の検出

本実験では間接 ELISA 法(以降, ELISA 法とよぶ)と DIBA 法で3種類のウイルスの検出を行った。TBV-L はその外被タンパク質のアミノ酸配列が TBV と 64% の相同性しかもたないウイルスで, 従来報告されている TBV とは異なるウイルス(新潟県園芸試験場, 1988; Ohira ら, 1994; 宮川, 1997)である。これら LSV, TBV-L および CMV の検出に必要な一次抗体液(抗血清)は新潟県園芸試験場(現在, 新潟県農業総合研究所園芸研究センター)から譲り受けた。

ほ場で栽培中のユリからりん片, 葉, 花被または苞葉を採集して水道水で洗ったあと, 約 1g に調製した試料を乳鉢内で約 10 ml の緩衝液とともに磨碎して粗汁液をつくり, 5°C, 3,000 rpm で 10 分間の遠心分離を行い, その上清を検定試料液とした。

1) ELISA 法では, 大木(1989)の方法に準じて試薬類を調製した。PBS は NaCl 8.0 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g, KH_2PO_4 0.2 g, KCl 0.2 g, NaN_3 0.2 g を 900 ml の蒸留水に溶解し, HCl で pH 7.4 に調整したのち蒸留水を加え 1 liter とした溶液; PBST は 1 liter の PBS 溶液に Tween 20 を 0.5 ml 添加した溶液; PBST・BSA は 1 liter の PBST に 1g 牛血清アルブミン(BSA) (v/w) を添加した溶液; 一次抗体液は, LSV, TBV-L, CMV の精製免疫グロブリン(IgG) (新潟県園芸試験場で作製したもの) を PBST で 200 倍に希釈した溶液; 二次抗体液はアルカリホスファターゼ標識抗ウサギ IgG—ヤギ IgG (Cappel Products) を PBST で 2,000 倍に希釈し, その希釈溶液に BSA を 0.1% (v/w) 濃度で添加した溶液; 基質緩衝液 (pH 9.8) は約 800 ml の蒸留水にジエタノールアミン [$\text{HN}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$] を 97 ml と NaN_3 0.2 g を溶かし, 1N HCl で pH 9.8 に調整して, 1 liter とした溶液; 基質発色液は使用直前に, 100 ml の基質緩衝液に 1g ニトロフェニルリン酸 2 ナトリウム ($\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Sigma) を添加した溶液; 停止液は 3 M NaOH。

マイクロプレート (Coring 社) の各ウェルに検定試料液

を 200 μl ずつ分注し, 試料を各ウェルの内壁にコーティングするため, 37°C で 2~3 時間静置した。ブランクは緩衝液のみとした。コーティング処理のあと各ウェルを PBST で 4 回洗浄し, 一次抗体液(抗血清)を 200 μl ずつ分注した。これを 37°C で 2~3 時間反応させたのち, 各ウェルを PBST で 4 回洗浄し, 二次抗体液を分注して 37°C で 3 時間静置した。各ウェルを PBST で 4 回洗浄後, 基質発色液を加えて反応させ, 3 M NaOH で反応を停止した。そして各ウェルの 405nm の吸光度値をマイクロプレート分光光度計(コロナ社, MTP12)で測定し, 実生葉(対照区)の吸光度値の 2 倍以上の場合をウイルス感染株とした。1 検体 2 ウェルを使用した。

2) DIBA 法では, 日比(1984)の方法に準じて試薬類を調製した。TBS は 800 ml の蒸留水にトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン [$(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$] 2.4 g と塩化ナトリウム (NaCl) 29.2 g を混合して溶解し, 1 N HCl で pH 7.5 に調製したあと, 蒸留水で 1 liter にした溶液; TBST は 1 liter の TBS 溶液に Tween20 を 0.5 ml 添加した溶液; TBSTPB は 500 ml の TBST 溶液にポリビニルピロリドン 10 g と仔牛血清アルブミン 1 g を添加した溶液; ブロック液は 500 ml の TBST 溶液にポリビニルピロリドン 10 g と仔牛血清アルブミン 10g を添加した溶液; 一次抗体液は LSV, TBV-L, CMV の精製免疫グロブリン(IgG) (新潟県園芸試験場で作製したもの) を TBSTPB 溶液で 1,000 倍に希釈した溶液; 二次抗体液はアルカリホスファターゼ標識抗ウサギ IgG—ヤギ IgG (Cappel Products) を TBSTPB 溶液で 2,000 倍に希釈した溶液; 基質緩衝液は約 800 ml の蒸留水にトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン [$(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$] 24.22 g を溶かし, 1 N HCl で pH 8.2 に調製したあと, 蒸留水で 1 liter にした溶液; 基質発色液は基質緩衝液にファーストレッド (Sigma 社) 6 mg \cdot ml⁻¹ で溶解した A 液と基質緩衝液に Naphtol AS-MX phosphate (Sigma 社) を 1 mg \cdot ml⁻¹ の濃度で溶解した B 液を使用直前に等量混合した溶液; 反応停止液は 800 ml の蒸留水にトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン [$(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$] 1.2 g と Na_2EDTA 1.9 g を混合して溶解し, 1 N HCl で pH 7.5 に調製したあと, 蒸留水で 1 liter にした溶液。

鉛筆で 10 × 10 mm の区画を記したニトロセルロースシート (Bio-Rad 社) を TBS 液に約 15 分間浸漬したあと風乾し, このニトロセルロースシート上に毛細管ガラスを用いて検定試料液を約 1 μl ずつ 2 スポットした。そして日比(1984)および Hibi・Saito(1985)の方法に準拠してウイルスを検出した。発色の強さは肉眼で観察し, その強度に応じて ++ (強い発色), + (弱い発色), ± (対照区と比較して, 発色の有無の判定が困難), — (対照区と同様に無色) の 4 段階に区分し, + と ++ までをウイルス感染個体と判定した。対照区には実生葉を使用した。

3) 上述の DIBA 法と ELISA 法を用いて, 以下の実験を

行った。

DIBA法によるウイルスの検出感度をELISA法と比較するため、'エンチャントメント'のりん片を使い、DIBA法による発色強度とELISA法による吸光度値の測定(3反復)によりLSV, TBV-LおよびCMVの濃度を調べた。

各器官および葉の着生位置とウイルス濃度との関係を明らかにするため、ELISA法で器官別のウイルス濃度を比較した。7月上旬に、開花約1週間前の'スターゲザー'と開花約1カ月前のカノコユリ'内田'の各々3株から、花被、苞葉および茎の上部、中部、下部に着生する葉(茎の先端部から2, 3枚目までの葉を上部着生葉、茎の基部から上位方向に2, 3枚目までの葉を下部着生葉、これらの中間付近に着生する葉を中部着生葉とよぶ)

を使い、LSVの吸光度値(3反復)の測定により濃度を調べた。

ユリの生育時期別のウイルス濃度の変化を調べるため、'エンチャントメント'は5月24日、'スターゲザー'は6月2日およびタカサゴユリは7月2日からそれぞれの開花期まで、およそ1~2週間ごとに各ユリ3株の上部および下部着生葉を5枚ずつ採取し、LSVの吸光度値の測定を行った。

実験 2. DIBA法による栽培中のユリのLSV, TBV-LおよびCMVの検出

栽培中のユリのウイルス感染の状況を調査するため、数カ所の栽培農家および新潟大学の実験ほ場から18種類のユリを供試し、それらの上部着生葉の基部切片を検査試

Table 1. Comparison of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and a dot immunobinding assay (DIBA) for the detection of lily symptomless virus (LSV), tulip breaking virus-lily (TBV-L) and cucumber mosaic virus (CMV) in the extracts² of infected bulb scale segments in *L. X 'Enchantment'*.

Dilution of extract ^y	LSV		TBV-L		CMV	
	ELISA ^w	DIBA ^v	ELISA	DIBA	ELISA	DIBA
× 10 ⁰	1.84 ± 0.02	++	1.82 ± 0.01	++	1.86 ± 0.01	++
× 10 ¹	1.81 ± 0.03	++	1.81 ± 0	++	1.85 ± 0	++
× 10 ²	1.80 ± 0	+	1.82 ± 0.02	++	1.80 ± 0	+
× 10 ³	1.28 ± 0.01	±	1.81 ± 0	+	1.40 ± 0.01	±
× 10 ⁴	0.50 ± 0	-	1.77 ± 0.01	±	0.82 ± 0.03	-
× 10 ⁵	0.19 ± 0.01	-	0.95 ± 0.01	-	0.50 ± 0.04	-
control ^x	0.15 ± 0	-	0.05 ± 0.02	-	0.21 ± 0	-

² Extracts were prepared by homogenizing bulb scales with PBST (phosphate buffer solution containing Tween 20) in ELISA and with TBST (tris buffer solution plus Tween 20) in DIBA analyses.

^y Dilution was made with each of buffer solution.

^x Leaf extract of seedlings of *Lilium* sp.

^w Absorbance values at 405 nm.

^v Purple spot reactions by DIBA were made as follows: ++, a strong purple spot; +, a weak purple spot; ±, a very faint purple spot; -, no color reaction.

Table 2. ELISA absorbance values of LSV at 405 nm in different portions of each organ in *L. X 'Star Gazer'* and *L. speciosum* 'Uchida'.

Organ ^z	Portion ^y	ELISA absorbance value	
		<i>L. X 'Star Gazer'</i>	<i>L. speciosum</i>
Perianth	Basal	0.15 ± 0.04 ^x	0.11 ± 0.04
Bract	Basal	1.20 ± 0.20	0.63 ± 0.08
Leaves			
Upper	Basal	1.20 ± 0.12	0.71 ± 0.09
	Terminal	0.78 ± 0.16	0.45 ± 0.09
Middle	Basal	0.93 ± 0.15	0.44 ± 0.03
	Terminal	0.57 ± 0.20	0.20 ± 0.08
Lower	Basal	0.35 ± 0.14	0.22 ± 0.06
Control		0.07 ± 0.01	0.04 ± 0.01

^z Leaves were gathered from the upper, middle and lower parts of plants early in July.

Seedling leaves of *Lilium* sp. were used in the control

^y Basal and terminal portions of each leaf were dissected and tested.

^x ± indicates standard errors of the mean.

料として、上述した DIBA 法でウイルスの検出を行った。また、鉢で栽培中のユリを使ってウイルスの種類とユリの外部病徴との関係を調査した。

結 果

実験 1. ELISA 法と DIBA 法によるウイルスの検出

1. DIBA 法のウイルス検出感度

ELISA 法では、PBST で希釈した検定試料の吸光度値

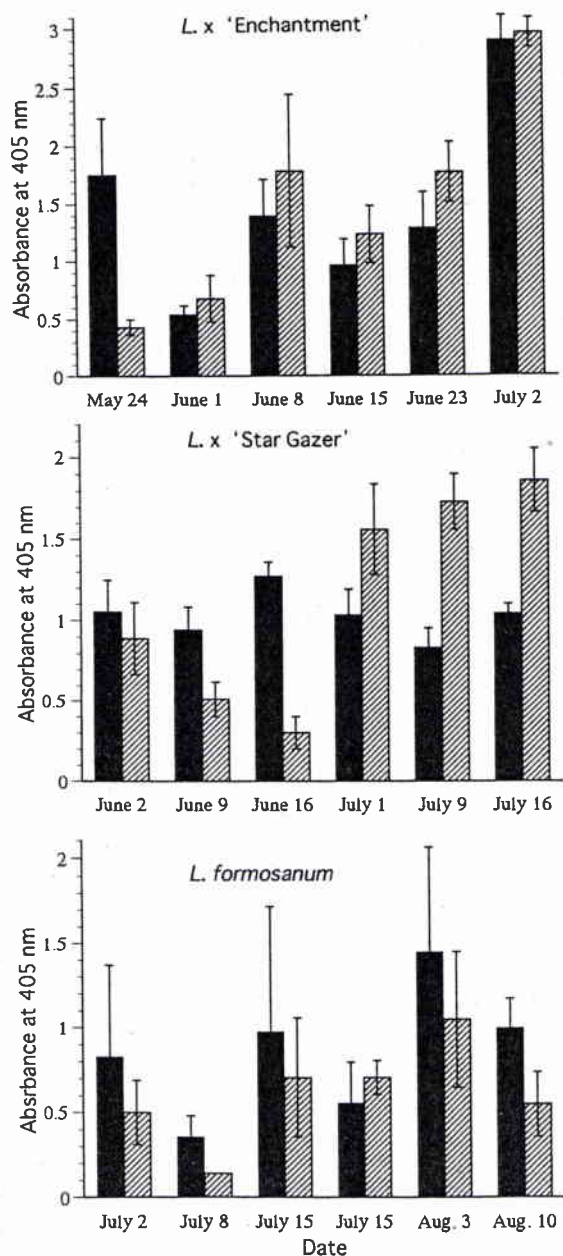


Fig. 1. Absorbance values in leaves of *L. X 'Enchantment'*, *L. X 'Star Gazer'* and *L. formosanum*. Five leaves were gathered from the lower (■) and upper (□) parts of three individual plants of each *Lilium* spp. at the indicated date and tested in duplicate. Vertical bars indicate standard errors of the mean. Absorbance value at 405 nm of healthy seedling leaves was from 0.05 to 0.15.

が対照区 (実生) と比較して 2 倍以上の差があったのは、TBV-L および CMV では 10^5 倍まで、LSV では 10^4 倍まで希釈した場合であった。一方、DIBA 法では、LSV と CMV は 10^2 倍、TBV-L は 10^3 の希釈検定試料でウイルスの検出は可能であり、それ以上に希釈したサンプルでは検出は困難となった (第 1 表)。

2. ELISA 法による各器官からのウイルス検出

'スターゲザー' と '内田' の各器官の吸光度値から両品種は LSV に感染していることが明らかとなり、吸光度値は苞葉と上部着生葉で高く、また上部と中部着生では葉の先端部より基部の切片で高いことがわかった (第 2 表)。

3. 生育時期別のウイルス濃度

上述の結果を基に、'エンチャントメント'、'スターゲザー' およびタカサゴユリの開花約 1 ヶ月前から開花までの LSV の濃度を、上部着生葉と下部着生葉の基部を使い調べたところ、各ユリの LSV 濃度は開花期に近づくにつれ高くなった。そして 'エンチャントメント' と 'スターゲザー' では、生育初期では上部着生葉より下部着生葉の吸光度値が高く、開花期に近づくとともに上部着生葉で下部着生葉より高くなった。一方、タカサゴユリではほとんどの調査時期で下部着生葉の吸光度が上部着生葉の値より高かった (第 1 図)。

実験 2. 栽培中のユリのウイルス感染率と外部病徴

1. ウイルスの感染率

調査した合計 550 個体の約 73% からいづれかのウイルスが検出され、LSV、TBV-L および CMV が単独で検出された株はそれぞれ約 52、2 と 1% で、残りの 18% から複数のウイルスが検出された (第 3 表)。そしてウイルス感染率が 80% 以上のユリはアジアティック・ハイブリッドの 'エンチャントメント' や 'コネチカットキング'、オリエンタル・ハイブリッドの 'カサブランカ' や 'スターゲザー'、テッポウユリ 'ひのもと' やカノコユリ '内田' など 10 種類であった。

2. 外部病徴と検出されたウイルスとの関係

鉢植えのヒメサユリで、モザイク症状や退緑条斑の葉を生じた個体から LSV と TBV-L が検出されたが (第 2 図 A)、他のユリではこの症状と感染ウイルスの種類 (LSV と TBV-L) とは必ずしも一致しなかった。また重複感染株では茎の生長が抑制された場合が多く、'スターゲザー' で LSV と TBV-L が検出された重複感染株のうち TBV-L の発色反応の強い株では反応の弱い株と比べてその茎の生長が劣り (第 4 表)、'カサブランカ' など他のユリでも LSV と TBV-L または CMV が検出された重複感染株の茎の生長は同じ品種で LSV のみが検出された株と比べて抑制された (第 2 図 B, C, D)。

Table 3. Detection of LSV, TBV-L, and CMV by DIBA in leaves² of *Lilium* spp. and cultivars.

Species and cultivars	No. plants examined ^y	Number of plants infected with						
		LSV	TBV-L	CMV	LSV+TBV-L	LSV+CMV	TBV-L+CMV	LSV+TBV-L+CMV
<i>L.</i> × 'Enchantment'	38 (81.6)	5	4	0	22	0	0	0
<i>L.</i> × 'Connecticut King'	10 (100)	9	0	0	1	0	0	0
<i>L.</i> × 'White River'	5 (40)	1	0	1	0	0	0	0
<i>L.</i> × 'Stering Star'	5 (60)	0	0	3	0	0	0	0
<i>L.</i> × 'Sado - sukashi'	66 (50)	18	1	0	14	0	0	0
<i>L.</i> × 'Benisugata'	11 (81.8)	3	0	0	6	0	0	0
<i>L.</i> × 'Casablanca'	165 (90.3)	134	0	0	10	0	3	2
<i>L.</i> × 'Le Reve'	25 (40)	10	0	0	0	0	0	0
<i>L.</i> × 'Star Gazer'	56 (96.4)	33	0	0	20	0	1	0
<i>L.</i> × 'Rosalie'	20 (90)	18	0	0	0	0	0	0
<i>L. longiflorum</i> 'Hinomoto'	12 (100)	1	0	0	6	1	0	4
<i>L. speciosum</i> 'Uchida'	40 (82.5)	33	0	0	0	0	0	0
<i>L. henryi</i> Baker	20 (100)	20	0	0	0	0	0	0
<i>L. concolor</i>	6 (50)	0	0	0	3	0	0	0
<i>L. rubellum</i>	39 (7.7)	1	1	0	1	0	0	0
<i>L. nobilissimum</i>	12 (33.3)	1	0	0	3	0	0	0
<i>L. japonicum</i>	10 (10)	0	0	1	0	0	0	0
<i>L. auratum</i>	10 (90)	1	3	0	4	0	0	1
Total	550 (73.5)	288 (52.4)	9 (1.6)	5 (0.9)	90 (16.4)	1 (0.2)	4 (0.7)	7 (1.3)

² Leaves were collected from the upper part of plants and the base of them was used in detecting viruses.

^y Figures in parenthesis represent the percentage of individuals infected with viruses.

Table 4. Effect of multiple infection with LSV and TBV-L on the length and growth rate of stems in *L. X 'Star Gazer'* growing in the field.

Serological detection ^z		Stem length (cm) on each date ^y						
LSV	TBV-L	May 19	May 29	June 2	June 9	June 16	June 23	Jun 30
++	+	19.0 ^a (100) ^x	23.0 ^a (121)	27.3 ^a (144)	30.0 ^a (158)	33.7 ^a (177)	33.7 ^a (177)	34.3 ^a (181)
++	+	19.3 ^a (100)	23.7 ^a (123)	29.0 ^a (150)	34.3 ^a (178)	36.7 ^a (190)	37.3 ^a (193)	37.7 ^a (195)
++	±	17.7 ^a (100)	25.0 ^a (141)	32.3 ^a (182)	39.0 ^b (220)	45.7 ^b (258)	49.7 ^b (281)	50.3 ^b (284)
++	-	18.3 ^a (100)	23.7 ^a (130)	31.7 ^a (173)	40.3 ^b (220)	49.3 ^b (269)	52.0 ^b (284)	55.3 ^b (302)

^z Spot reactions by DIBA were determined by the same criteria as Table 1.

^y Mean stem length (n=5) not followed by the same letter for each date is significantly different at p=0.05 by Duncan's multiple range test.

^x Figures in parenthesis are expressed as a relative percentage to the stem length on May 19.

考 察

DIBA法とELISA法によるタバコモザイクウイルス(TMV)の感染の有無をその発色度に基づき肉眼で判定した場合は両者間での結果にほとんど違いはないが、判定をDIBA法では肉眼で、ELISA法では分光光度計の測定値により行くと、前者の検出感度は後者の約1/5~1/10である(Hibi・Saito, 1985). 本実験で3種類のユリウイルス(LSV, TBV-LおよびCMV)の検出感度についてDIBA法とELISA法を比較した結果、前者は後者に比べ約1/10~1/100程度で、鋭敏さにやや欠けた。しかしDIBA法に用いる検定試料の希釈倍率を検討すればELISA法と

ほぼ等しい結果が得られることが明かとなり、特別な機器を必要としない簡易ウイルス検出法としてすぐれていることが明かとなった。一方、植物がウイルスフリーか否かの判定、ウイルスの濃度が低いことが予想されるなどの場合には、検出感度の高いELISA法や電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察などの方法を使う必要がある。

ユリに感染したウイルスの検出のための好適な器官を検討するため、地上部の各器官のウイルス濃度を比較した結果、茎の上部着生葉の基部切片がウイルスの検出に適していることが明かとなった(第1図, 第2表)。LSVの検出については、Derks・Vink-van den Abeele (1980)は茎の先端から1/4付近までに着生する葉で最も信頼でき

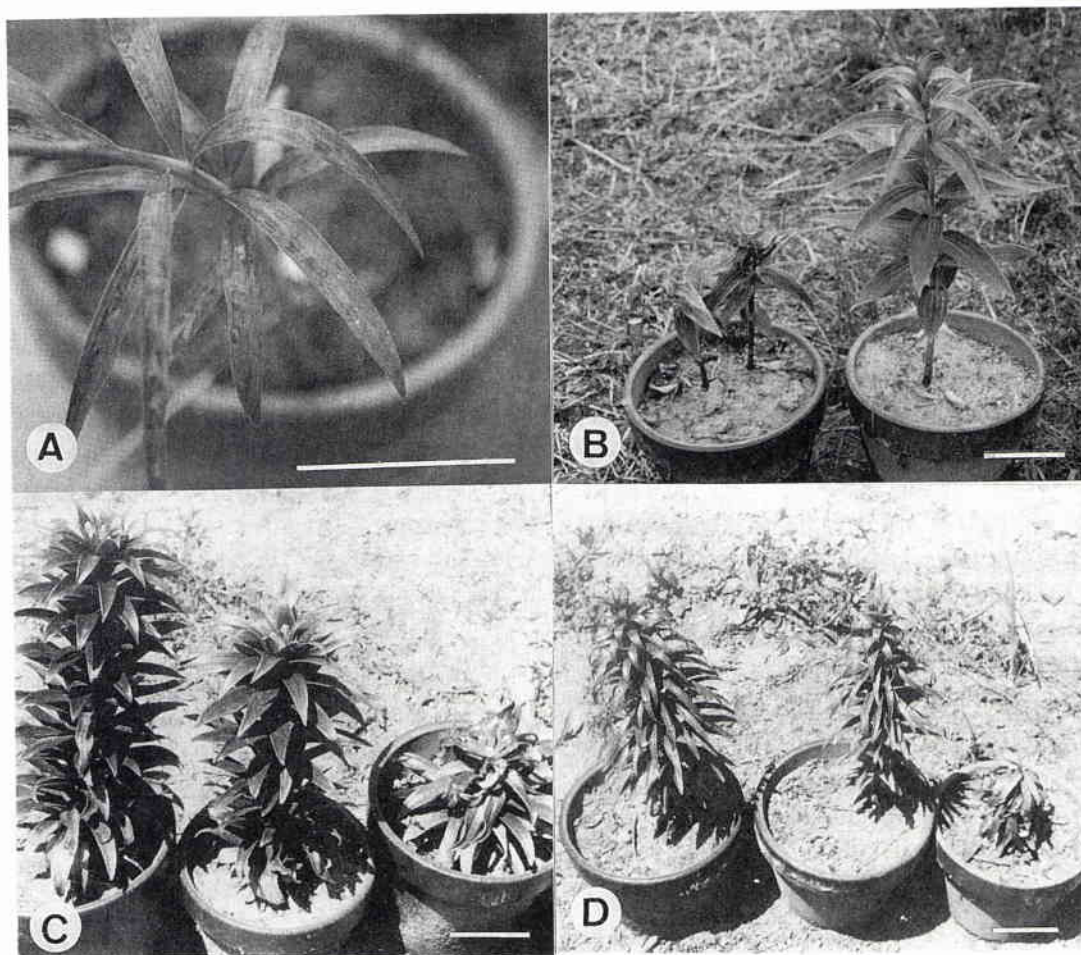


Fig. 2. Virus-like symptoms in *Lilium* spp. (A), light green-stripe mosaic on the leaves of *L. rubellum* infected with LSV and TBV-L. (B), stunted stems of *L. X 'Casablanca'* with LSV and CMV (left) compared with the plant infected with LSV (right). (C), *L. longiflorum 'Hinomoto'* infected with LSV, LSV + TBV-L, and LSV + CMV, respectively, (left to right). (D), growth retardation of *L. X 'Enchantment'*; the two plants on the right infected with LSV + TBV-L compared with the plant infected with LSV alone (left). Bars represent 10 cm

る結果が得られると報告し、一方、りん片ではりん茎内の着生位置に関わらずその基部切片が適している(新美ら, 1991)。また検体の採集時期によりウイルス濃度に変化し、カノコユリの LSV 濃度は開花前よりも開花後の葉で高くなり(Derks・Vink-van den Abeele, 1980)、本実験では‘エンチャントメント’と‘スターゲザー’では萌芽から開花期に近づくにつれ上部着生葉で高くなった。一方、タカサゴユリではほとんどの調査時期で下部着生葉の吸光度が上部着生葉の値より高かった(第1図)。植物に感染したウイルスは細胞間を移行して師管へ侵入したあと光合成産物とともに移動して植物全体に次第に広がるといわれ(Hammond, 1995)、これが植物の種類、生育時期や器官の種類とその部位によってウイルス濃度が異なる一因かもしれない。従って、ELISA法やDIBA法でユリのウイルスの検出を行う場合の検体は、生長が活発でかつ維管束の密度の高い部分、すなわちりん茎の内

側や中央部付近に着生するりん片の基部あるいは茎の上部に着生する葉の基部のいずれかを用いれば、比較的信頼できる結果が得られる可能性が高いことが本実験の結果(第1図, 第2表)および他の報告(Derks・Vink-van den Abeele, 1980; 荻田, 1989; 新美ら, 1991; Hammond, 1995)の結果から判断される。

上述の結果を基に各種のユリ、合計550個体の開花期頃の上部着生葉の基部切片を使ってユリのウイルス(LSV, CMVおよびTBV-L)の検出をDIBA法で行った結果、ウイルス感染株は全調査個体の72%で、10種類のユリでは調査個体のうち80%以上からウイルスが検出された(第3表)。露地栽培されている食用ユリ(荻田, 1989)や韓国で栽培されているユリ(Kimら, 1996)でウイルス感染状況が調査され、その罹病率は栽培品種や栽培地域により異なるが、LSV, CMVやTBV(チューリップブレーキングウイルス)が検出され、LSVはこれら

ずれの報告でもかなり高率で検出されている。以上のことから、現在栽培されているユリのほとんどがウイルス、特に LSV に感染している可能性がきわめて高いといえる。このような状況下で日本でのユリの球根生産が行われているのは、(1)栽培中にウイルス症状を示した株除去の実施、(2)今日まで栽培されてきている主要なユリ品種は LSV に対する感受性が低いこと、(3)感染ウイルスの種類がおもに LSV であること、などが考えられる。Asjes ら (1973) は 'エンチャントメント' や '内田' は LSV に対して感受性の低い品種であり、LSV と TBV が重複感染しないと病徴は軽微かほとんど現れないと報告している。ヒメサユリでは LSV が単独で検出された株は無症状であるが、モザイク症状を呈した葉 (第 2 図 A) からは LSV と TBV-L が検出され、また、'スターゲザー' (第 4 表) や 'カサブランカ' など (第 2 図 B) の重複感染株の茎の生長は LSV 単独感染株と比べ劣った。このように、ユリでは一般的に LSV に対して感受性の低い品種が多く、Asjes (1990) がすでに指摘しているように、LSV と他のウイルスとの重複感染により正常な生育に支障が生じると思われる。一方、日本で栽培される各種の無病徴のほとんどのユリ株から LSV、TBV あるいは CMV が検出され (荻田, 1989)、また、わが国では本研究で調査したウイルスのほか CTLV (井上ら, 1979) など数種類のウイルスが同定されている (大木, 1992)。これらの事実から、これまで日本のユリ球根生産現場で行われてきた外部病徴に基づく株抜き取り法のみでは良質なユリ球根の生産を維持・発展させるのはかなり困難と思われる。従って、ELISA 法や DIBA 法を利用したウイルス検査体制下での組織的なユリ球根生産体制を確立し、同時に本研究で調査した以外の病原ウイルスのユリの生育に及ぼす影響を調査する必要がある。

摘 要

1. DIBA 法のウイルス検出感度を調べるため、DIBA 法と ELISA 法でユリ 'エンチャントメント' のりん片を試料として、ウイルス (LSV, TBV-L, CMV) の検出を行った。DIBA 法の検出感度は ELISA 法の約 1/10~1/100 であったが、ウイルスの検出は可能であることがわかった。

2. ユリのウイルスの検出に好適な試料を決めるため、花被、苞葉と茎の下部、中部および上部に着生した葉について ELISA の吸光度値 (405 nm) を比較した結果、上部着生葉で最も高い値が得られた。そして 2 品種および 1 種を試料として、上部および下部着生葉を開花約 1 カ月前から開花まで採集して ELISA 検定を行った結果、葉の ELISA の吸光度値はいずれのユリでも開花期頃に最高となり、2 品種では上部着生葉、1 種では下部着生葉でそれぞれ高かった。

3. ほ場に生育中の 18 種類のユリの 550 個体の上部着生葉の基部切片を試料として、DIBA 法で 3 種類のウイルス

の検出を行った。調査個体の約 73% からいづれかのウイルスが検出され、LSV、TBV-L および CMV が単独で検出された株はそれぞれ約 52、2 と 1% で、残りの 18% からは複数のウイルスが検出された。調査した 18 種類のうち 10 種類のユリでは、80% 以上の個体からウイルスが検出された。

4. LSV のみが検出されたユリではウイルスによる外部病徴はほとんど現れなかった。しかし、モザイク症状を呈した 1 種の葉からは LSV と TBV-L が検出され、LSV と TBV-L あるいは CMV に重複感染した 3 品種の株は、茎の伸長が LSV のみ検出された株と比べ抑制された。

謝 辞 本研究を行うに際して、新潟県園芸試験場 (現在、新潟県農業総合研究所園芸研究センター) からウイルスの抗血清を分譲していただいた。ここに記して感謝の意を表す。

引用文献

- Allen, T. C., W. C. Anderson, O. Ballantyne, W. Lin and J. Goodell. 1980. Recent advances in research on lily symptomless virus. *Acta Hort.* 109: 179-485.
- Asjes, C. J., N. P. de Vos and D. H. M. van Slogteren. 1973. Brown ring formation and streak mottle, two distinct syndromes in lilies associated with complex infections of lily symptomless virus and tulip breaking virus. *Neth. J. Pl. Path.* 79: 23-35.
- Asjes, C. J. 1990. Production for virus freedom of some principal bulbous crops in The Netherlands. *Acta Hort.* 266: 517-529.
- Beijersbergen, J. C. M. and C. Th. C. van der Hulst. 1980. Detection of lily symptomless virus (LSV) in bulb tissue of lily by means of ELISA. *Acta Hort.* 109: 487-491.
- Bos, L. 1995. Symptoms of virus and virus-like diseases. P.85-98. In: G. Loebenstein, R. H. Lawson and A. A. Brunt (eds). *Virus and virus-like diseases of bulb and flower crops*. John Wiley & Sons, Chester.
- Derks, A. F. L. M. and J. L. Vink-Van den Abeele. 1980. Purification of lily symptomless virus. Use and value of antisera against intact and pyrrolidine-degraded virus for testing lilies and tulips. *Neth. J. Plant Path.* 86: 239-250.
- Hammond, J. 1995. Replication of viruses and movement in the plant. P.145-154. In: G. Loebenstein, R. H. Lawson and A. A. Brunt (eds). *Virus and virus-like diseases of bulb and flower crops*. John Wiley & Sons, Chester.
- 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.
- Hibi, H. and Y. Saito. 1985. A dot immunobinding assay for the detection of tobacco mosaic virus in infected tissues. *J. gen. Virol.* 66: 1191-1194.
- 井上成信・前田 憲・光畑興二. ユリから分離された Citrus

- tatter leaf virus. 1979. 日植病報. 45:712-720.
- 井上成信. 1992. 花き植物に発生するウイルス病の診断. 166-171. 新美芳二編著 図解花のバイオ技術. 誠文堂新光社. 東京.
- 久原重松. 1980. 酵素結合抗体法 (ELISA) による植物ウイルス病の診断. 植物防疫 34: 129-135.
- Kim, J. Y., S. Y. Lee, H. R. Kim, S. T. Choi and M. S. Rho. 1996. Survey on virus diseases of *Lilium* spp. and their indexing by tissue and dot immunobinding assays. Acta Hort. 414. 189-194.
- 宮川正道. 1997. スカシユリから分離された tulip breaking virus -lily (TBV-li, 仮称) について. 新潟県園芸試験場研究報告 15: 52-64.
- 新潟県園芸試験場. 1988. 昭和 62 年度試験成績書 (病害虫・土壤肥料). 16-18.
- 新美芳二・権平 正・轡田圭孝・辻 ひろ. 1991. ユリのウイルスフリー球根生産に関する研究. 第 1 報 DIBA 法によるユリウイルス (LSV, LBV, CMV) の検出. 園学雑. 60 (別 2): 556-557.
- Ohira, K., S. Namba, M. Miyagawa, T. Kusumi and T. Tsuchizaki. 1994. Nucleotide sequence of the coat coding region of tulip breaking virus. Virus Genes 8: 165-167.
- 荻田孝志. 1989. 食用ユリりん茎のキュウリモザイクウイルスならびにユリ潜在ウイルスの ELISA 法による保毒検定. 日植病報 55: 344-348.
- 大木 理. 1989. 酵素結合抗体法によるウイルスの検定-間接 ELISA 法と DIBA 法-. p. 44-49. 獅山慈孝監修 植物病理学実験マニュアル. 養賢堂. 東京.
- 大木 理. 1992. 日本に発生する植物ウイルス一覽. 1-93. 植物防疫特別増刊号. 日本植物防疫協会.
- Voller, A., A. Bartlett, D. E. Bidwell, M. F. Clark and A. N. Adams. 1976. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). J. gen. Virol. 33: 165-167.