

# チューリップから分離されたlily symptomless virus(LSV)の 純化と診断

誌名	新潟県園芸試験場研究報告 = Bulletin of the Niigata Horticultural Experiment Station
ISSN	03888444
著者	宮川, 正通 横山, 泰裕 藤巻, 伸一
巻/号	16号
掲載ページ	p. 28-39
発行年月	1997年11月

# チューリップから分離された lily symptomless virus (LSV) の純化と診断

宮川正通・横山泰裕\*・藤巻伸一・小泉薫・榎並晃\*\*・中野太佳司\*\*\*

Purification and Detection of Lily Symptomless Virus (LSV)  
isolated from Tulip

Masamichi MIYAGAWA・Yasuhiro YOKOYAMA\*・Shinichi FUJIMAKI・  
Kaoru KOIZUMI・Akira ENAMI\*\* and Takashi NAKANO\*\*\*

## S u m a r y

Lily symptomless virus (LSV) was isolated from tulip *Tulipa gesneriana* (cv. Rose Copland and cv. Preludium). Diseased cv. Rose Copland showed dark, narrow streak and cv. Preludium showed white, narrow streak on the petals of flower. The virus was purified from infected tulip cv. Preludium by precipitation with polyethylene glycol and differential centrifugation in sucrose cushion, followed by sucrose density gradient and CsCl equilibrium density gradient centrifugations. The purified preparation contained filamentous particles 640-650 nm in length and 12 nm in width, and showed a typical UV spectrum of nucleoprotein with max. and min. absorption at 260 nm and 245 nm, respectively. The  $A_{260}/A_{280}$  ratio was 1.35. The antisera prepared from the purified virus had a titer of 1:1,024 as determined by ring interface precipitine test. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (Ind-ELISA) was used for detecting LSV from lilies and tulips. The antisera reacted best with LSV in tulips and lilies. The  $\gamma$ -globulin and the enzyme-cojugated  $\gamma$ -globulin were used at  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  and 1:2,000 dilution, respectively.

Key words: lily symptomless virus, tulip, purification, ELISA.

## 緒 言

一般栽培のユリがしばしば lily symptomless virus (LSV)<sup>1)</sup> の感染を受けていることはよく知られている<sup>2)</sup>。従来、わが国ではユリにおける LSV 感染の有無については、CMV の接種によりえそ条斑が形成されることを利用して推定してきたが、かならずしも確実な検定方法とはいえなかった。一方、オランダでは比較的早くから血清学的手法を用いた検出法が取り入れられ<sup>3, 10, 20)</sup>、ユリ球根の品質向上に役立てられている<sup>10)</sup>。最近になってわが国でも LSV の純化がなされ、血清学的手法

---

\* 新潟県高冷地農業技術センター  
\*\* 新潟県新潟農業改良普及センター  
\*\*\* 新潟県経営普及課

の一つである ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)<sup>9)</sup>により、LSVの検出が試みられるようになってきたが(11 \$ 15)、実際の場面で十分活用されているとはいえない。我々が昭和60年度から新潟県におけるユリおよびチューリップのウイルス病発生調査を実施した際、当場のチューリップ圃場から得たウイルス感染株のなかに、花卉に暗赤色の細かい線状斑を形成するチューリップ株(品種 Rose Copland)を見いだした。そこで、このチューリップの磨砕汁液を接種原として、チューリップおよびユリを含む十数種の植物に汁液接種を行ない、感染の有無と病徴について調査した。この際の汁液接種の結果および感染植物の電子顕微鏡観察<sup>10)</sup>、LSV感染のチューリップについての報告<sup>4,3,9)</sup>、Dr. Asjesの当场訪問の際の観察所見等の結果から、この花卉に暗赤色の細かい線状斑を形成するチューリップ株をLSV感染株と同定し、その内容の一部を先に報告した<sup>10)</sup>。その後、これと類似の病徴を示すチューリップ株がいくつかの品種で確認された。そこで、先に同定したチューリップのLSV感染株を材料として、LSVの純化、抗血清の作成およびELISAによるLSVの検出等について実験を行ない、若干の知見を得たのでその概要を報告する。本研究の実施にあたり、研究遂行上いろいろとご教示いただいた新潟大学教授小島誠博士ならびに Dr.C.J.Asjes (Flower Bulb Research Institute, Lisse, Holland)、本稿の校閲を賜った元果樹試験場長山口昭博士ならびに東京大学教授難波成任博士に厚くお礼申し上げます。

## 材料と方法

### 供試ウイルス

新潟県園芸試験場の圃場で採取した LSV感染チューリップ株(品種: Rose Copland)を接種原として、常法によりカーボランダムを用いて、チューリップの品種 Rose Copland および品種 Preludium に萌芽期と二葉展開期の計2回、汁液接種を行い、開花期に花卉および葉の病徴を再度確認した。開花後10日目にLSV感染株は採取して、-80Cに凍結したものを供試ウイルスとして以後の実験に用いた。

### チューリップおよびユリにおける病徴

チューリップにおけるLSV感染に伴う病徴を明らかにするため、品種 Preludium, Rose Copland, Rose Beauty, Rosa Vanlima, Aristcrat, Inglescombe Pink, Malta, West Point および Golden Harvest に、萌芽期に LSV 感染葉の磨砕汁液を2回接種した。また、ユリでは実生のシンテッポウユリに三葉期と20日後の2回接種した。これらの接種株は開花期に花卉の病徴とELISAによるLSV感染の有無を調査し、さらに、チューリップのTBV<sup>10)</sup>接種区も同時に設けて、両ウイルス感染に伴う病徴を比較した。

### 接種試験

LSVの寄主範囲を知るために、汁液接種により以下の8科16種の植物における感染性を調べた。すなわち、ツルナ科: ツルナ(*Tetragonia expansa*)、ヒユ科: センニチコウ(*Gomophrena globosa*)、アカザ科: フダンソウ(*Beta vulgaris*)、アカザ(*Chenopodium amaranticolor*)、シロザ(*C. quinoa*)、ホウレンソウ(*Spinacia oleracea*)、ウリ科: キュウリ(*Cucumis sativus*)、メロン(*C. melo* var *reticulatus*)、キク科: キンセンカ(*Calendula officinalis*)、マメ科: ハブソウ(*Cassia occidentalis*)、インゲン(*Phaseolus vulgaris*)、ササゲ(*Vigna sinensis*)、ナス科: ヨウシュチョウセンアサガオ(*Datura stramonium*)、タバコ(*Nicotiana tabacum*、品種 Bright Yellow, White Burley)、*N. benthamiana*、*N. glauca*、ユリ科: スカシユリ(*Lx elegans* Thunb、品種 紅姿)、シンテッ

ポウユリ(*Lilium longiflorum*), チューリップ(*Tulipa gesneriana*, 品種 Preldium, Rose Copland) に汁液接種して、接種植物における感染の有無を、ELISAおよび電子顕微鏡観察により調べた。なお、接種にはスカシユリ(品種 紅姿)のLSV感染株の磨碎汁液を用いた。

#### アブラムシ伝播試験

アブラムシによるLSV伝播試験には、モモアカアブラムシ(*Myzus persicae*)およびワタアブラムシ(*Aphis gossypii*)を用いた。*M. persicae*および*A. gossypii*は60分間絶食させた後、30分間LSV感染のスカシユリ(品種 紅姿)の葉上で獲得吸汁させた。その後、ただちに実生の *L. longiflorum*) および一葉展開時のチューリップ(品種 Preldium)にそれぞれ10頭づつ移して接種吸汁させ、1時間後にマラソン乳剤を散布して殺虫した。伝播試験に用いたユリおよびチューリップは、その後温室内で栽培した。接種30日後に、ELISAおよび電子顕微鏡観察によりLSV感染の有無を調査した。

#### LSVの純化

ウイルスの純化材料には開花後10日経過した品種Pre-ludium の LSV感染株を-40℃に凍結貯蔵したものを用いた。

#### FROZEN INFECTED LEAVES

Homogenize with 1/2(W/V)0.5M borate buffer,pH8.2,containing 1% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>.  
Filtrate through three layers of gauze  
Add 1% Triton X-100, and stir for 60 min  
Centrifuge at 5,000 rpm for 10 min

#### SUPERNATANT

Add chloroform(1/6 vol.supernatant),and stir for 15 min  
Centrifuge at 9,000 rpm for 10 min

#### SUPERNATANT

Add 4% PEG, and stir for 60 min  
Centrifuge at 9,000 rpm for 10 min

#### PELLET

Resuspend in 0.05M borate buffer,pH8.2,containing 0.1% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>  
and 0.1% Triton X-100  
Centrifuge at 10,000 rpm for 10 min

#### SUPERNATANT

Layer on 20% sucrose cushion containing 0.1% Triton X-100  
Centrifuge at 24,000 rpm for 120 min

#### PELLET

Resuspend in 0.05M borate buffer,pH8.2,containing 0.1% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>  
Centrifuge at 8,000 rpm for 10 min

#### SUPERNATANT

Layer on sucrose density gradient column  
Centrifuge at 24,000 rpm for 150 min

#### VIRAL ZONE

Centrifuge at 35,000 rpm for 120 min

#### PELLET

Resuspend in 0.02M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
Layer on CsCl density-gradient column  
Centrifuge at 35000 rpm for 20 hr

#### VIRAL ZONE

#### PURIFIED VIRUS

Fig.1. Procedure of the purification for lily symptomless virus

ウイルスの純化は Shepard<sup>10)</sup>の方法に準じ、Fig.1に示す手順で行なった。すなわち、感染葉の磨砕、クロロホルム処理、PEGによるウイルスの濃縮、ショ糖密度勾配遠心、次いで、塩化セシウム平衡密度勾配遠心により純化ウイルスを得た。また、得られた純化ウイルス試料を0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)で希釈して、分光光度(UV-240、島津)を用いて紫外部吸収曲線を求めた。さらに、吸光度を測定し、他の Carlavirus の例<sup>10)</sup>にならい、 $E_{260} = 3.0$ によりウイルス量を算出した。ウイルス粒子は2%リタングステン酸(PH7.0)あるいは4%酢酸ウラニル液でネガティブ染色後、電子顕微鏡(HA-300日立)による観察を行なった。ウイルス粒子の大きさは、純化試料中に加えたタバコモザイクウイルスと比較して計測した。

#### 抗血清の作製および血清試験

抗血清は純化ウイルス試料(0.5mg/ml)と Freund's in-complete adjuvant を当量混和して乳化させた後、家兎の後肢に一週間おきに3回の筋肉注射を行なった後、4回目にウイルス試料1mlを耳静脈に注射し、その10日後に全採血して常法により作製した。出来た抗血清を用いて免疫電顕法、および寒天ゲル内二重拡散法を行なった。免疫電顕法は Ball and Brakke<sup>9)</sup>にならい leaf dip serology (LDS) 法を行なった。即ち、TBV と LSV を混合しグリットにのせて抗血清を処理した後、蒸留水で数回洗浄し2%PTA液(PH7.0)で染色して電子顕微鏡観察に供した。寒天ゲル内二重拡散法は Purcifull and Batchelor<sup>16)</sup>にならい、ウイルス粒子変性剤としてドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を用い、プラスチックシャーレ内で反応させた。寒天は0.7%の割合で0.5% SDSを加用した0.05Mトリス緩衝液(PH 7.0)に加えて加熱溶解した後、シャーレに入れ固化させた。シャーレ内の寒天には、中心部と中心部の穴から5mmはなれた周囲に、直径4mmの穴をあけ、中心部の槽には LSV 抗血清、周囲の槽には SDSを0.5%の割合で加用した純化 LSV液(OD<sub>260</sub>=1.50)、純化 TBV液およびユリおよびチューリップの LSV感染葉とTBV感染葉の磨砕汁液、未感染葉の磨砕汁液を注入した。抗血清および試料を注入したシャーレは、25℃の温度下に静置して、24および48時間後に白色沈降帯出現の有無を観察した。

#### ELISA 法による LSVの検出

ELISA に先立ち、Clark and Adams<sup>9)</sup>に従いγ-グロブリンの精製を行なった。また、純化LSV(100ng/ml)を抗原として、一次抗体液(γ-グロブリン)および二次抗体液(Alkalinephosphatase conjugate, 以下 conjugateと略記 TAGO Inc.)のELISAに使用する場合の最適濃度を求めた。一次抗体液は1/2M PBS(PH7.4)でγ-グロブリンを0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、5.0 μg/mlの6段階に、二次抗体液は1,000、1,500、2,000、2,500、3,000倍に希釈したものをを用い、各々を組合せたものについて吸光度を求めて最適濃度を決定した。最適濃度を決定後、一般栽培圃場におけるユリの LSV 感染状況を調べた。検定試料としてはユリの品種 Enchantment, Connecticut King, 紅の舞, テッポウユリ, 黄すかしの5品種を各10株づつを用いた。また、対照には、茎頂培養由来の紅姿、実生のシンテッポウユリ、チューリップ(品種 Preludium)の LSV 感染株を用いた。検定部位としてはユリ株の止め葉から5-6葉下の葉2枚を用いた。各検定試料は10倍量の0.05M炭酸緩衝液(PH 9.6)を加えて磨砕後、その上清をELISAの抗原として使用した。結果の判定はマイクロプレートリーダー(MTP-12,日立)を使い、波長405 nmの吸光度を測定して対照区と比較して決定した。

## 結 果

### 病徴

LSV を汁液接種したチューリップでは、開花期に至っても葉にはほとんど病徴は認められず、草丈も健全株と差はなかった。しかし、開花期には品種 Preludium ではピンク色の花卉の一部が白く線状に褪色し(Plate I-1a)、品種 Rose Copland では淡い赤紫色の花卉に暗赤色の細かい線が多数認められた(Plate I-1b)。また、他のチューリップ品種では、Rosa Van lima, Aristocrat, Inglescombe Pink が Rose Copland と同様の病徴を示し、Rose Beauty では Preludium と同様の白く線状に褪色した病徴を示した。また、赤色の品種 Malta や黄色の品種 West Point および Golden Harvest の感染株では、花卉の花色にほとんど変化なく、肉眼的な観察では、感染の有無は判定できなかった。一方、実生のシンテッポウユリへの接種では、生育初期は健全株と比較しても顕著な差はなかったが、開花期になると健全株に比べてやや草丈が低いものが多くなり、上位葉が軽くねじれた株も30%程度みられた。LSV感染株の花の大きさは、健全株の花よりもやや小さかったが、極端な差はなく、花卉割れや斑入りなどの異常花や、葉のモザイクおよび葉の黄化なども認められなかった。なお、チューリップのLSV感染株と比較のため栽培した tulip breaking virus (TBV) 接種のチューリップ株では、開花すると品種 Rose Copland では adding type の、品種 Preludium では removing type の breaking 症状が花卉に認められ、花卉に線状斑形成の LSV感染株との病徴の違いは明確であった。

### 接種試験および伝播試験

8科16種の植物への汁液接種の結果、LSVの感染が認められたのはスカシユリ(品種:紅姿)およびチューリップ(品種:Rose copland, Preludium)のみであった。これらのユリ科植物以外での感染は認められなかった。感染がみられたスカシユリでは、外観状は未感染株とほとんど差異はなかったが、チューリップでは花卉に前述の特異な線状斑が認められたが、葉には病徴は認められなかった。伝播試験では用いたモモアカアブラムシおよびワタアブラムシのいずれでも伝播が確認された。

### ウイルスの純化

ウイルスの純化は Fig.1 に従い実施した。その結果、ショ糖密度勾配遠心により得られた部分純化ウイルスを0.02M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  で希釈後、所定量の塩化セシウムを加え、塩化セシウム平衡密度勾配遠心を行なったところ、液面から4.3cmの部位に巾が約2mmの一本の乳白色のバンドが形成された(Plate I-2)。バンドの部分を取り出し、35000rpm、90分間の超遠心分離により塩化セシウム除去し、得られた pellet に0.02M リン酸緩衝液(PH7.0)を少量加えて溶解した液を純化ウイルス液とした。この液を少量メッシュにとり、2%リタングステン酸(PH7.0)および4%酢酸ウラニルでネガティブ染色して、電子顕微鏡観察を行なったところ、多数の均一なひも状ウイルス粒子が観察された(Plate I-3)。純化ウイルス試料の紫外外部吸収曲線は核蛋白特有の曲線を示して、260nmに極大、245nmに極小を示し、 $A_{\text{max/min}}=1.17$ 、 $A_{260/240}=1.35$ であった(Fig.2)。

この紫外外部吸収曲線には290nm付近に小さなショルダーが認められた。ウイルス液に加えたTMV粒子を基準に200個のLSV粒子の大きさを測定したところ、長さ640-660nm前後の大きさの粒子がもっとも多く認められた。本方法によるLSV粒子の収量は、チューリップのLSV感染葉100g当り平均1.8mg(3回の平均)であった。

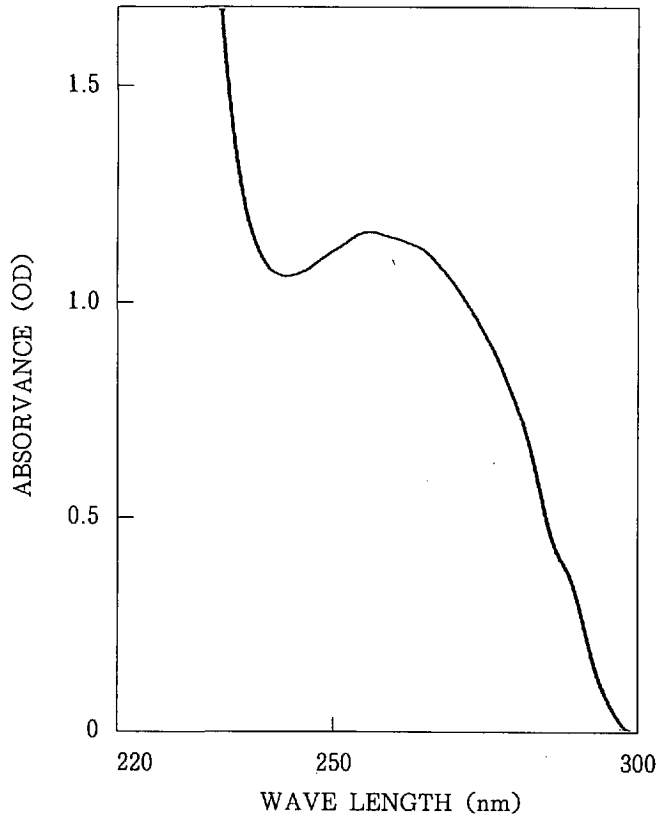


Fig.2. Absorption spectrum of a purified preparation of lily symptomless virus isolated from lily.

#### 血清試験

LSV を抗原として、家兎に免疫し、重層法で1024倍の力価を示す抗血清を得た。本抗血清に対する反応を免疫電顕法により調査したところ、本抗血清と反応した LSV粒子の周囲には抗体分子が付着し、少し太目に濃く染色されたが、対照ウイルスとしたTBV粒子では、抗体分子の付着は認められなかった(Plate I-5)。また、寒天ゲル内二重拡散法を行なったところ、LSV 抗体と純化 LSV液および LSV感染葉磨碎汁液を入れた槽の間にのみ白色の沈降帯が形成され、二本の沈降帯は先端が融合してスパーは認められなかった(Plate I-4)。

#### ELISA によるLSVの検出

純化ウイルス液(100ng/ml)を抗原として、一次抗体液(γ-グロブリン)および二次抗体液(conjugate)の最適濃度を検討した。その結果をTable.1 に示した。Table.1からも明らかなように、最も吸光度が高かったのはγ-グロブリン濃度 1.5 μg/ml、conjugateが 2000倍希釈のものであったが、γ-グロブリン濃度 1.0-2.5 μg/ml、conjugateの濃度1500-2500倍の範囲では吸光度に極端な差は認められず、以後の実験は全てγ-グロブリン濃度1.0 μg/ml、conjugateの希釈倍数を2000倍として使用した。また、対照として用いた実生のシンテッポウユリ、茎頂培養の紅姿および黄透

の吸光度はそれぞれ 0.02, 0.01, 0.01と極めて低く、非特異発色は認められなかった。

Table.1. Effect of different coccentration of  $\gamma$ -globulin and conjugate on the detection of purified LSV

Coccentration of conjugate	Coccentration of $\gamma$ -globulin ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )			
	0.5	1.0	2.0	5.0
1,500	1.55	1.73	2 <	2 <
2,000	1.32	1.68	1.91	2 <
2,500	0.92	1.21	1.60	1.71
3,000	0.58	0.77	1.03	1.14

以上の結果をふまえて、農家の圃場より採取したユリ 6 品種について、ELISAにより LSVの感染状況を調査し、結果をTable.2 に示した。農家の圃場で栽培されているユリの大部分から LSV が検出され、LSV が認められない株は極めて少なかった。また、調査株中には、激しくわい化した株や極端に大きさが小さく、葉にモザイク症状が認められるのに、低い吸光度しか示さない株もあった。それらの LSV 抗血清に反応しない株のなかには CMV の感染株も存在したが、LSV 抗血清を用いた免疫電顕法によると、LSV 抗体の付着が認められない potyvirus 様粒子が認められる株も多く、他ウイルスとの複合感染が考えられた。

Table.2. Detection of LSV by ELISA from leaves of naturally infected lilies

Lily cultivars	No. of lilies tested	No. of LSV infected samples	ELISA absorbance values at 405 nm of infected sample*
LSV infected lilies			
<i>L. spp.</i>			
Enchantment	20	18	1.43
Connecticut king	20	13	1.11
Beninomai	20	13	0.85
Kisukashi	20	17	1.03
<i>L. longiflorum</i>	20	19	1.15
LSV free lilies			
<i>L. sp.</i>			
Benisugata	5	0	0.01
<i>L. formolongi</i>	5	0	0.01
Control			
Purified LSV	—	—	1.87

\* Each value is the average of ELISA absorbance values measured.

## 考 察

Lily symptomless virus (LSV)<sup>9)</sup> は単独感染の場合には、ユリにはほとんど病徴が現われないこ



とからユリ潜在ウイルスともよばれ、一般栽培のユリは大部分が LSV の感染を受けているといわれている<sup>9)</sup>。しかし、LSV や TBV<sup>10)</sup> はタバコ、アカザ、シロザ、ツルナ等の検定植物には感染しないことから<sup>9)</sup>、検定植物による LSV の診断はできない。ユリにおける LSV 感染の有無については、CMV との重複感染でテッポウユリにえそ条斑を<sup>9)</sup>、TBV との重複感染で Enchantment の葉に streak mottle、球根には褐色の輪点が形成される<sup>9)</sup>等の報告があり、以前はそれらの知見を根拠に LSV や TBV の存在を推定してきた。なかでも LSV については、CMV の接種によりえそ条斑が形成されること<sup>6,7)</sup>を利用して、LSV の存在の推定が行なわれることが多かった。しかし、カノコユリでは CMV 単独感染でも葉にえそ条斑を生ずること<sup>12)</sup>、CMV 単独接種のシンテッポウユリではモザイクとえそ条斑を生ずることなどの報告<sup>13)</sup>がなされている。著者等の Enchantment における観察でも、LSV 単独感染株においてえそ条斑の形成を認め、逆に LSV と CMV の重複感染でもえそ条斑の形成が認められないこともあり、葉におけるえそ条斑の形成は LSV と CMV の重複感染株特有の現象とばかりはいえない結果が得られている。さらに、ユリの品種によりえそ発生様相にも差があることなども合わせて考えると、葉に形成されるえそ条斑の有無を LSV 存在の根拠とすることはなかなか正しくはないと考えられる。一方、LSV はユリ以外ではチューリップにのみ感染するといわれてきたが<sup>1)</sup>、わが国においてはチューリップの LSV 感染株についての報告はまだ少ない<sup>14)</sup>。一般圃場で栽培のチューリップにおいて LSV 感染株の存在を、初めて認めたのは Allen<sup>2)</sup>であるが、その後 C. J. Asjes<sup>3)</sup>により LSV 単独感染および LSV と TBV の複合感染したチューリップについての報告がなされた。さらに、Derks and Asjes<sup>9)</sup>により LSV 感染チューリップの病徴、アブラムシによる感染、チューリップからの LSV の純化等についての報告がなされ、それらのなかで、LSV に感染した品種 Preludium および Rose Copland では、花卉に特異な病徴が認められ、2 品種間の病徴には明確な差があることが報告されている。著者らも本実験において彼らと同様な観察結果を得て、先に発表した<sup>1)</sup>が、最近になって他のチューリップ品種においても LSV 感染株の存在を、いくつかの品種で認めている<sup>10)</sup>。これらの LSV 感染チューリップ株では、いづれも花卉に特異な線状斑を示すことから、チューリップの品種によっては、花卉の観察により LSV 感染の有無の判別が可能であると考えられる。一方、LSV の純化、抗血清の作成、診断などについては、これまでオランダの研究者によりいくつか報告<sup>5,10,21)</sup>がなされているが、本報告では Shepard が potato virus M<sup>10)</sup> の純化に際して行なった方法に準じて純化を行い、最終段階で塩化セシウム密度勾配遠心を実施して純化ウイルスを得た。この結果、得られた純化ウイルス液の紫外外部吸収曲線では 259nm に吸収極大、245 nm に吸収極小を示し、 $A_{\max/\min}=1.12$ 、 $A_{250/240}=1.35$ であったが、この値は従来の報告<sup>9)</sup>で認められたとほぼ同様な値であった。また、本ウイルスを家兎に免疫して得られた抗血清を用いて、ELISA による LSV の検出を行なった。LSV の血清学的検出方法としては、オランダで実施された single immunodiffusion drop test によるものが最初のものであり<sup>20)</sup>、その後 ELISA によるチューリップおよびユリのウイルス病診断が試みられるようになり<sup>5,10)</sup>、現在オランダではユリやチューリップの品質向上の面で広く役立てられているといわれている<sup>14)</sup>。ELISA には直接法と間接法があることは知られおり<sup>8)</sup>、著者らも以前に直接法による LSV の検出について報告しているが<sup>10)</sup>、本実験においては間接 ELISA により LSV の検出を試み、 $\gamma$ -グロブリンが 1~5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、conjugate が 1500~3000 倍の範囲のものであれば、実際の検出に十分用いることが可能で、非特異反応はほとんど認められないことを明らかにした。これらの結果にもとづき、一般農家の圃場に栽培されているユリを使って LSV の検出を行なったところ、従来からいわれてきたように圃場から採取した検定株のうち大部分の個体で LSV の感染が認められ、非特異発色もほとんど認められなかった。これらのことから、ELISA による LSV の検出は、その正確性、迅速性などの点からますます頻繁に利用されるものと思われる。なお、ELISA と同様な血清学的な診断法として、より簡便な dot immunobindind assay (DIBA 法) が発表され、ユリからの LSV の検出に筆者等も実

施しているが、DIBA法については次の機会に発表したい。

また、本調査を実施中に LSVが検出された株において、激しくモザイク症状がでている株があり、免疫電顕法でLSV抗体とは反応しないpotyvirus 様粒子が確認され、他のウイルスとの複合感染も考えられたが、詳細については明らかではない。

## 摘 要

新潟県のチューリップ栽培圃場で採集したチューリップの品種Rose Coplandおよび Preludium に LSV 感染株が存在するのを確認した。チューリップの LSV 感染株では花卉に、品種Rose Copland は暗赤色の線条斑を、品種 Preludium では花色が白く線状に抜けた白色の線条斑を形成した。この病徴は LSV 感染株に特異な症状であった。8科16種の植物を用いた接種試験ではユリ以外にチューリップでのみ感染が認められた。伝播試験では汁液接種以外にモモアカアブラムシとワタアブラムシにより伝播された。また、品種 Preludium の LSV 感染株を材料として、0.05M ホウ酸緩衝液 (PH8.2)を用いて、PEG によるウイルスの濃縮、分画遠心、塩化セシウム密度勾配遠心により LSV を純化した。純化ウイルス粒子は長さ640-650 nmのひも状粒子であった。純化ウイルス液の紫外部吸収曲線は 260 nm に極大を、245 nm に極小をもち、 $A_{max}/min = 1.12$ 、 $A_{260}/280 = 1.35$  で核蛋白特有の吸収スペクトルを示した。ウイルスの収量は感染葉100 g 当り1.8mgであった。作製した LSV に対する抗血清 (力価1024倍) は寒天ゲル内二重拡散法では LSV を抗原とした槽との間にもみ単一の白色沈降帯を形成した。免疫電顕法では LSV 粒子の周囲にもみ抗体分子の付着を示した。作製した抗血清と市販の conjugate を用いて間接法 ELISA により一般栽培圃場のユリから LSV の検出を行なったところ、ほとんどの検定個体から LSV が検出された。ELISA における  $\gamma$ -グロブリンおよび conjugate の最適濃度は、抗  $\gamma$ -グロブリンが  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、conjugate が 2,000 倍であった。本実験で作成された LSV 一次抗体は、非特異反応はほとんど認められず、供試した市販の二次抗体も実際の使用に際して問題はなかった。

## 引用文献

1. Allen, T.C.Jr. (1972). Lily symptomless virus. C.M.I./A.A.B. Description of plant virus-es. No.96.
2. ————. and Lyons, A.R. (1969). Electron microscopy of lily symptomless virus and cucumber mosaic virus within fleck diseased lilies. *Phytopathology* 59:1318-1322.
3. Asjes, C.J.Vos, N.P.de and Slogteren, D.H.M.van, (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.
4. Ball, E.M. and Brakke, M.F. (1968). Leaf-dip serology for electron microscopic identification of plant viruses. *Virology* 36:152-155.
5. Beijersbergen, J.C.M. and Hulst, C.Th.C.van der, (1980). Detection of lily symptomless virus (LSV) in bulb tissue of lily by means of ELISA. *Acta.Hortic.* 109:487-493.
6. Brierley, P. and Smith, F.F. (1944). Study on virus disease: the necrotic fleck complex in *Lilium longiflorum*. *Phytopathology* 34:529-555.
7. Civerolo, E.L., Semancik, J.S. and Weathers, L.G. (1968). Partial purification of virus like

- particles associated with the necrotic fleck disease of Easter lily. *Ibid.*58:1481-1486.
8. 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.
  9. Derks, A.F.L.M. and Asjes, C.J. (1975). Lily symptomless virus in tulip. *Neth. J. Pl. Path.* 81:14-21.
  10. ———, and Vink-Van Den Abeele, J.L. (1980). Purification of lily symptomless virus. Use and value of antisera against intact and pyrrolidine-degraded virus for testing lilies and tulips. *Ibid.*86:239-250.
  11. 萩田孝・児玉不二男・赤井純. (1989). 北海道におけるユリのウイルス病. *日植病報.*55:70-77.
  12. 岩木満朗・小室康雄. (1969). 内田カノユリのえそ斑症状株から分離されるウイルスについて. *関東東山病害虫研究会年報.*第16集. 66.
  13. 前田高憲・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.
  14. 松尾英輔. (1986). オランダと日本のテッポウユリ生産. 春園堂書店, pp.27-55.
  15. 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.
  16. 西尾健・長尾記明・後藤正昭・木村茂・尾崎勝美・藤井伸泰・今井恭子 (1988). 日本産チュウリップに発生したウイルス様症状について. *植防研報.*24:63~67.
  17. Purciful, D.E. and Bachelor, D.L. (1977). Immunodiffusion drop test with sodium dodecyl-sulfate (SDS)-treated plant viruses and viral inclusions. *Flo. Agric. Exp. Stan. Tech. Bull.*788. 39p.
  18. Shepard, J., F. (1972). Gel-diffusion method for the serological detection of potato virus X, S and M. *Bull. Mont. agric. Exp. Stn.*662, 72pp.
  19. Slogteren, D.H.M. van, (1971). Tulip breaking virus. C.M.I./A.A.B. Description of plant viruses. No.71.
  20. ———, and Neeltje De Vos. (1966). breaking, its serological behavior and serological relationship to a virus isolated from lily. In *Viruses of plants. Proc. Int. Conf. Viruses, Wageningen 1965:*320-323.
  21. ———, Derks, A.F.L.M. Blom, G.J. Bunt, M.H. and Vink, J.L. (1976). A further simplified single immunodiffusion drop test for the detection of lily symptomless virus in *Lilium* species. *Acta. Hort.* 59:29-36.
  22. Verisetty, V. and Brakke, M.K. (1978). Purification of some legume carlavirus. *Phytopathology.*68:59-64.

## E x p l a n a t i o n o f p l a t e

### Plate- I

1. Symptom of flower in tulips infected with LSV. Infected cv.Rose Copland(a) showing dark, narrow streak and infected cv.Preludium(b) showing white, narrow streak.
2. A band of LSV formed CsCl after equilibrium density gradient centrifugation.
3. Electron micrograph of purified LSV particles stained with 2% uranyl acetate.  
Bar represent 300 nm.
4. Serological reaction in SDS-immunodiffusion test in agar gel. Wells contain, As: antiserum to LSV. 1: purified preparation of LSV. 2: LSV leaf extract. 3: purified preparation of TBV. 4: TBV leaf extract. 5,6: healthy leaf extract.
5. Serological specific electron microphotograph of LSV and TBV. The viruses were incubated for 20 min with antiserum to LSV, diluted 1:1000. Bar 200 nm.

