

ミクロ凝集反応による *Hippeastrum* Mosaic Virus の診断

末 次 哲 雄・松 濤 美 文

横浜植物防疫所国際課

はじめに

一般に、輸入隔離栽培検疫中に発見されるアマリリスのウイルス病は、Cucumber Mosaic Virus (CMV) と *Hippeastrum* Mosaic Virus (HMV) である。例えば、1964 年から 67 年まで当所大和隔離圃場でアマリリスを 3,057 株隔離検疫して、CMV を 57 株、HMV を 697 株発見している。このうち、HMV は BRANTS and VAN DEN HEUVEL (1965) がオランダで、ついでわが国では岩木 (1967) が、CMV については STOUFFER (1963), KAHN and SCOTT (1964) およびわが国では小室 (1960) がそれぞれ報告している。この両ウイルスのアマリリス上での病徴は大差なく、肉眼による区別は非常に難しいが、主として、CMV は葉脈に沿って濃淡の明瞭なモザイクを生じ、HMV は CMV にくらべやや不明瞭、不規則な型をしたモザイク病徴を生じ、時によると無病徴のものからも多数検出されることがある。したがって、検疫をより正確にするためには肉眼以外の方法によらなければならない。しかしながら一般に行なわれている検定植物を利用する診断は、多くの労力と、結果が判明するまでに長時間を要するため、輸入検疫のように短期間に多量のものを検査するには不適當である。

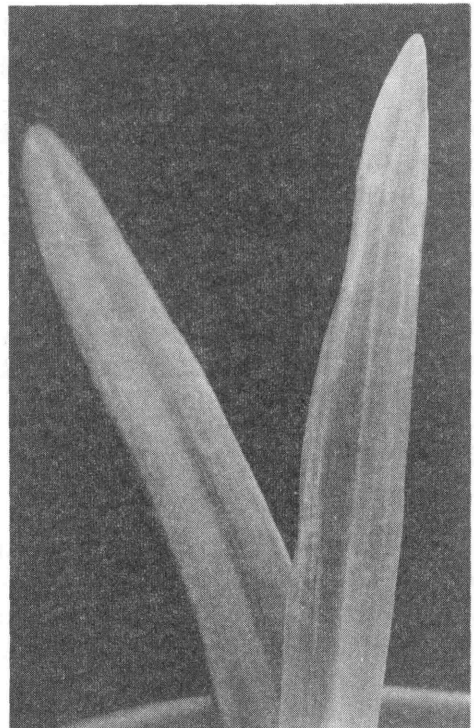
抗血清の利用については KAHN and SCOTT (1964) により CMV 抗血清と、アマリリスから分離した CMV との関係の研究がされている。筆者らは隔離検疫をより正確、かつ迅速に実施するため、アマリリスのウイルス病のうちの大部分を占めている *Hippeastrum* Mosaic Virus の抗血清をつくり、その診断能力を調査したので報告する。

本実験をおこなうにあたり、有益な御助言を頂いた植物ウイルス研究所小室雄博士に深謝の意を表する。

I. 実験材料および方法

1. 抗原および抗血清の作製

抗原の作製は HMV した感染しているアマリリス葉



第 1 図 HMV 罹病アマリリスの病徴

(第 1 図) に 1/10 量の PH 7.0, 0.01 モル磷酸緩衝液を加えて搾汁し、四塩化炭素処理をしたあと 1~2 回の分画遠心をしてウイルスを集めた。これを上記磷酸緩衝液を原汁液の 1/10~1/20 量加えて溶かし抗原とした。この抗原の 1 部をセンニチコウ (*Gomphrena globosa*) に接種し、活性のあることを確かめ、5.0ml づつ 4~7 日おきに 10 回、計 50ml を家兎の耳静脈に注射して、抗血清を得た。抗血清の力価は混合法で 16 倍であった。

2. 健全汁液による吸収

この抗血清は健全な実生苗の汁液でわずかながら陽性反応を生じたため、実生苗から育てた無病のアマリリス

汁液を抗血清の3倍量加えて36°Cで1時間と2時間健全汁液に対する抗体の吸収をおこなった。その後13,200 G 15分の遠心分離をおこない、上清を1夜凍結したのち溶解し、再度13,200 Gで15分の遠心分離して沈澱物を除去した。

これらの抗血清を用いて、健全アマリリス38株を供試して、これをミクロ凝集反応法により、室温下で1, 2, 3, 4, 6および20時間後の凝集の有無を調査した。

なお、吸収の結果を調べるため、生理食塩水で4倍に希釈した未吸収の抗血清を同様の方法で試験し結果を比較した。

その結果、未吸収の抗血清では、4時間後に50%以上のものが反応を示し、診断には不適當であることが判明した。一方、36°Cで1時間および2時間吸収した抗血清では、両者はほとんど変わらず、4時間後に38株中2株のものがわずかに反応を生じたのみであった。20時間後では、未吸収の抗血清では全供試株の38株が反応を生じたが、吸収抗血清では8株が反応を生じたのみであった。

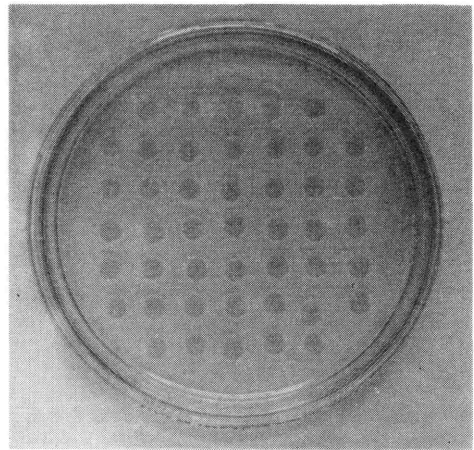
これらより吸収結果は十分であるとは言えないが、検査の実施面からはさほど支障はないと考え、本抗血清を、36°Cにて1時間、3倍量の健全汁液でもって吸収したのち、診断能力を調査した。

II. 抗血清と検定植物との診断能力の比較

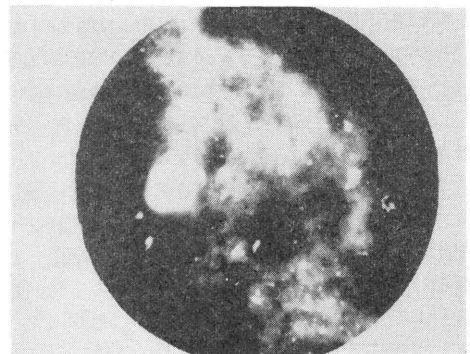
前記吸収抗血清を使用して、ミクロ凝集反応法 (Microprecipitation reaction) により、昨年、オランダから輸入されたアマリリスで、CMVに感染していない111株を供試し、診断能力を調査した。なお、この診断能力を知るために、HMVのLocal lesion hostであるセンニチコウ (*Gomphrena globosa*) の結果と比較した。

方法は、供試株の病徴を記録したのち、各株から数ヶ所の葉を切りとり、葉重の3倍量の0.05% KCN液を加え搾汁し、この搾汁液の1部をカーボラダム法でセンニチコウ20葉に接種し、発生するLocal lesionを調べた。また、残りの汁液は1,600 G, 30分の低速遠心分離をおこない、上清に同量の四塩化炭素を加え強く振とうしたのち、冷蔵庫内で30分静置し、その後再び1,600 G 30分の低速遠心分離をおこない被検汁液とした。

これらの被検汁液をVEKEN, VANDER, VAN SLOOTEREN and VAN DER WANT (1962) が記載しているMicroprecipitation法で調査した。すなわち、Polyvinyl Formal 1%のクロロホルム溶液をつくり、シャーレに少量流してしばらくするとすい膜が生じる。このPolyvinyl Formal膜を張った9cmのシャーレに、各々



第2図 ミクロ凝集反応法：一度に45株もの検定ができる



第3図 暗視野顕微鏡下でのHMVの凝集反応

マイクロピペットで1滴づつ各株の被検汁液を並べ、その上に前記の処理をした抗血清を同量落とし、乾燥を防ぐため流動パラフィンを通して上を覆い、室温下に静置し、4時間後の凝集反応を暗視野照明で検鏡した(第2図、第3図)。

また対照として、実生の健全アマリリス葉を上記被検汁液と同じ方法で供試して反応を調査した。

III. 実験結果

抗血清と検定植物の診断能力の比較調査の結果は第1表のとおりである。

供試アマリリス111株のうち検定植物のセンニチコウにより、ウイルス病として認められたものは92株であり、82.8%の高率でHMVに感染していたことになる。抗血清によりウイルス病と認められたものは全体で78株、70.2%であったが、肉眼検査によって判別できたも

第1表 センニチコウ接種とミクロ凝集反応との HMV 検出能力の比較

センニチコウ接種		陽性株		陰性株		計
抗血清反応		+	-	+	-	
検定株の病徴	モザイク	15	0	0	0	15
	病徴不明確	4	0	0	0	4
	無病徴	59	14	0	19	92
実生株		0	0	2	48	50

のはわずか15株、13.5%であった。

すなわち、供試111株のうちセンニチコウに Local lesion を生じた株でアマリリス上での病徴が明瞭であったもの15株、発病していると思われるが病徴と言えるかどうか不明なもの4株はいずれも抗血清で反応を示した。また、無病徴の92株のうち73株はセンニチコウに Local lesion を生じ、この73株のうち抗血清では59株が反応を示し、14株が陰性であった。同じく、無病徴92株のうち、センニチコウに Local lesion を生じなかった19株のアマリリスは抗血清でも陰性であった。

これらの結果から、抗血清による診断能力はセンニチコウより劣るが、肉眼による診断よりは著しくすぐれていると言える。

対照の実生苗50株については、いずれも病徴はなく、また、センニチコウに陰性であったが、2株のものが抗血清で陽性反応を示した。

IV. 考 察

以上の実験結果から、このミクロ凝集反応が HMV の発病株については病徴の程度にかかわらずほとんど100%の診断能力をもっているが、健全株については極くわずかであるが罹病株と誤診する可能性をもっていることを示している。しかしながら、無病徴の株については検定植物に劣るものの、肉眼では発見できない罹病株についても高い率で診断し得る能力がある。

我々の輸入隔離検疫では、多数の隔離植物を短時間に、しかも正確に診断しなければならぬ。この点から、この範囲の誤差は止むを得ないものと考えられる。したがって、この抗血清によるミクロ凝集反応法は、輸入隔離検査における第1次スクリーニング法として十分に利

用してよい方法と考える。

V. 摘 要

輸入隔離検疫において、数多くのアマリリス株のウイルス病を短期間に診断する方法を確立するために、抗血清による診断方法を試みた。

この植物のウイルス病の大部分を占めている Hippeastrum Mosaic Virus を、罹病汁液から分画遠心法で純化し、家兎に注射して抗血清を作製した。その抗血清を健全汁液で吸収し、ミクロ凝集反応法で診断能力を調査した。その結果はつぎのようである。

1. 病徴の明瞭なもの、ならびに発病していると思われるが病徴と言えるかどうか不明な株については、この方法による抗血清の診断の精度は、検定植物による診断能力と全く同じであった。

2. 保毒しているが発病していない株の診断の精度は検定植物にくらべて劣っていた。

3. 健全実生苗のうち、約4%の株の汁液とこの抗血清は凝集反応をおこした。

4. この方法による HMV の診断は検定植物よりやや劣り、かつ健全株を罹病株と誤診する可能性がわずかに存在するが、肉眼よりはるかに迅速で正確である。したがって、輸入隔離栽培時におけるウイルス検定の第1次スクリーニング法として利用価値は大きいものと思われる。

文 献

- BRANTS, D.H. and J. VAN DEN HEUVEL (1965) Investigation of Hippeastrum mosaic virus in *Hippeastrum hybridum*. Netherlands Journal of Plant Pathology, **71**: 145-151.
- KAHN, R.P. and H.A. SCOTT (1964) Serological relationship of cucumber mosaic virus and certain virus isolate that incite Amaryllis mosaic symptoms. Phytopathology, **54**: 360-362.
- 岩木満郎 (1967) わが国におけるアマリリスモザイク病の病原ウイルス。日植病報, **33**: 237-243.
- STOUFFER, R.F. (1963) A mosaic disease of hybrid Amaryllis caused by cucumber mosaic virus. Proc. Fla. St. Hort. Soc., **76**: 462-466. (R.A.M., **44**: 1108.)
- VAN DER VEKEN, J.A., D.H.M. VAN SLOGTERN and J.P.H. VAN DER WANT (1962) Immunological Methods. Modern Methods of plant Analysis, Berlin, 434-435.

Summary

Serological Detection of Hippeastrum Mosaic Virus in Hippeastrum Hybrids

By

Tetsuo SUETSUGU and Mifumi MATSUNAMI

Import Section, Yokohama Plant Protection Station

An antiserum against Hippeastrum mosaic virus (HMV) was prepared by immunizing rabbits with a partially purified virus antigen from infected Hippeastrum hybrid leaves. This antiserum was absorbed with healthy plant sap and its efficiency in detecting the virus was tested by the microprecipitation method.

This antiserum detected the virus in leaves with either distinct or obscure symptom equally as well as the sensitive herbaceous indicator, *Gomphrena globosa*, but the detection from symptomless leaves was inferior. A positive precipitation reaction was observed with 4% of the apparently HMV-free Hippeastrum seedlings. Although the serological method here described does not compare with the herbaceous indexing in the detection level and may lead to a false diagnosis in limited cases, it will provide a handy and much more reliable diagnosis than the visual inspection. This method can be favored for use in the initial screening of Hippeastrum plants in the postentry quarantine inspection.