

ELISA 法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) による Grapevine fanleaf virus の検出*

西尾 健・小林 敏郎・加藤 幹雄
横浜植物防疫所

The detection of grapevine fanleaf virus by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Takeshi NISHIO, Toshiro KOBAYASHI and Mikio KATO (Yokohama Plant Protection Station) Res. Bull. Pl. Prot. Japan 17: 43-50 (1981)

Abstract: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect grapevine fanleaf virus (GFV) in extracts from grapevine and *Chenopodium quinoa* tissues.

A antiserum previously made (Kobayashi et al, 1980) to purified GFV-yellow mosaic str. (supplied by Dr. W.B. Hewitt, University of California, Davis, U.S.A.), with a titer of 1/80 against purified GFV using this study, was used.

The methods reported by Clark and Adams (1977) were followed in our ELISA tests. The optimal concentrations for coating and for enzyme conjugated γ -globulin were 5 μ g/ml and 1:100 to 1:200 dilution, respectively. PBS-T (Phosphate buffered saline plus 0.05% Tween 20) was useful extraction buffer for *C. quinoa*, but not for grapevine tissues because of giving nonspecific reactions. These plant-induced effects were reduced by using Flegg and Clark's extraction buffer (PBS-T plus 2% PVP, 0.2% Alubumin and 0.2% DIECA).

GFV was detected in $10^2 \sim 10^3$ times dilute sap with extraction buffer to both diseased *C. quinoa* and grapevine tissues.

Seven infected vines, and 2 virus-free vines as a control, were tested seasonally in 1979-1980. Newly sprout shoots collected in early spring (March) gave markedly higher ELISA values, while immature leaves collected in early summer (July) did a lower values. It was difficult to detect from matured leaves collected in October. In summer, when it was impossible to take immature leaves, white root tip tissues gave relatively higher ELISA values.

A comparison of data showed that ELISA was more sensitive to detect GFV in grapevine tissues than *C. quinoa* assay.

ま え が き

植物ウイルスの分野では、今までに抗血清を用いた各種の診断法が利用されているが、酵素を結合した抗体を利用する Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA 法) は、当初人間や動物の病気の診断に開発利用されていた (石川ら, 1978)。最近になって VOLLER ら (1976) は、ポリスチレン製のマイクロプレートを用いるダブルサンドイッチ法による ELISA 法によって植物ウイルスを検出できることを報告した。その後 Clark らは、若干の改良を加え、きわめて低濃度の果樹類のウイルスを迅速に、かつ多数の試料を同時に検査できることを報告した (CLARK et al, 1976 a, b, CLARK and ADAMS,

1977)。

今までに 10 数種類以上の植物ウイルスが ELISA 法によって検出できることが報告され (久原, 1980), 我国でも果樹ウイルスではカンキツの温州萎縮ウイルスとカンキツモザイクウイルスの検出について報告があるが (宇杉・斎藤, 1980, 久原, 1980), これらウイルスの多くは, Apple chlorotic leaf spot virus (FLEGG and CLARK, 1979) や Citrus tristeza virus (BAR-JOSEPH et al, 1979) に代表されるような, 宿主体内でのウイルス濃度がきわめて低く, また生物検定では長期の検定期間を必要としたり, 検定植物の環境のコントロールに厳密さを必要とするなど, 診断の困難なウイルスが多い。

外国から輸入される植物の隔離検疫ではかなり多量の果樹類を対象として, そのウイルスの検査を実施する必要がある, この ELISA 法は有効な方法であると考えられたので, 近年輸入量の多いブドウの重要ウイルスであ

* 本報告の概要は 1980 年度 日本植物病理学会大会において発表した。

る Grapevine fanleaf virus (GFV) を用いて ELISA 法による検出試験を実施したのでここに報告する。

本報告を行うにあたり、Dr. A. C. GOHEEN (University of California, Davis, U.S.A) より導入されたウイルスフリーブドウ穂木を分譲下さった果樹試験場土屋七郎博士、および試験を通じ有益な御助言をいただいた当所松濤美文博士に心より御礼申しあげる。

材料および方法

1. ウイルスおよび検定用試料

供試したウイルスは、1977年にフランス産ブドウ品種 Cabernet Sauvignon より分譲された GEV (小林ら, 1980: 農林水産省指令 54 横植 1443 号) である。GFV 検出試験に用いたブドウは第1表のとおりで、上述の原株と、その株の穂木を接木接種した後、数回の *Chenopodium quinoa* への汁液接種で感染していることが確認された4個体と、1978年に新たに GFV を検出したイタリア産1個体の計6個の罹病個体と、汁液接種では GFV の検出されなかった1個体およびカルフォルニア大学の GOHEEN 博士よりのウイルスフリーブドウ2個体(2品種)である。また GFV 罹病 *C. quinoa* と、これより小林らの方法 (1980) で純化したウイルスも供試した。

2. ELISA 法使用器具、試薬類および手順

ELISA 法に使用した器具、試薬類およびその手順は、すべて CLARK and ADAMS (1977) の方法に準じた。操作手順は第1図のとおりで、光路長 10mm のセルで測定した 405nm の吸光度を ELISA 価とした。

通常の GFV 検出試験では、コーティング γ -グロブ

第1図 ELISA 手順

1. プレートの1穴当たり 200 μ l のコーティング γ -グロブリン液を分注し、37°C で4時間静置。

↓ 洗滌*

2. 200 μ l の試料磨砕液を分注し、6°C で1晩静置。

↓ 洗滌

3. 200 μ l の酵素結合 γ -グロブリンを分注し、37°C で3時間静置。

↓ 洗滌

4. 300 μ l の基質溶液 (0.6~1.0mg/ml.) を分注し、室温で約1時間静置。

↓

5. 50 μ l の 3.0MNaOH 液を分注。

↓

6. 分光光度計にて測定 (405 nm にて)。1試料当たり、2穴を用い測定時に1本の小試験管にまとめた上に 2.5 ml の水を加え希釈した後測定し、この値を ELISA 価とした。

* PBS-T を、プレートの穴に満たし、3~5分放置しよく振って水を切る、この操作を3回くりかえす。

リン液は 5 μ g/ml 液、また酵素結合 γ -グロブリン液は調整原液の 1/100~1/200 倍希釈液を使用した。試料は乳鉢内で十分磨砕し、磨砕液は遠心せずそのまま 10^4 g 中に分注した。分光光度計による測定では、健全植物汁液を試料とした対照区で通常 ELISA 価は 0.05 前後で、この値を基準とし、この値の2倍すなわち 0.1 以上の ELISA 価を示すものについてウイルスを検出できた (陽性反応) と考えた。この 0.1 では、肉眼で黄色の発色を確認できた。

使用器具および試薬

使用したマイクロタイタープレートは、Cook 社製の

第1表 供試ブドウ

個体 No.	産 地	品 種 名	汁液接種による GFV の検出**
1	フランス	Cabernet Sauvignon	+
2	—*	St. George	+
3	イタリア	Pizzutello Nero	+
4	—*	不 明	+
5	—*	St. George	+
6	—*	不 明	+
7	フランス	Cabernet Sauvignon	—***
8	U. S. A	Pinot Noir (Virus Free)	—
9	U. S. A	LN33 (Virus Free)	—

* No. 1 の原株穂木を接木接種したもの。

** 時期を変え数回 *Chenopodium quinoa* に接種し一度でも GFV を検出できたものを+とした。1978 年に実施。

*** この No. 7 は、後に GFV を検出できた (本文参照)。

Dynatech microelisa プレートで、使用酵素はアルカリ性リン酸分解酵素 (Alkaline phosphatase, Type VII, Sigma 社製)、その基質は p-ニトロフェニルフォスフェイト (p-nitrophenylphosphate, Sigma 社製) である。プレートへの溶液の分注には 1 滴 50 μ l のパーマネントドロップパー (Cook 社製) および 200 μ l 目盛付マイクロピペット (Drummond 社製) を用いた。使用した緩衝液は次のとおりである。

γ -グロブリンのコーティング用：0.05M 炭酸緩衝液 (pH 9.6)、洗浄用および酵素結合 γ -グロブリンの希釈用：リン酸緩衝生理食塩水 (PBS=0.02M Na-K リン酸緩衝液, 0.15M 塩化ナトリウム, pH 9.4) に 0.05% の Tween-20 を加えた溶液 (PBS-T)

基質用：10% ジエタノールアミン溶液 (塩酸で pH 9.8 に調整)

以上の緩衝液には、すべて 0.02% の窒化ナトリウムを加えて用いた。

使用抗血清と γ -グロブリンの純化

使用した GFV 抗血清は、Dr. W.B. HEWITT より分譲を受けた GFV (yellow mosaic strain) を使用し作製したもので (小林ら, 1980)、純化した供試ウイルスと重層法で 80 倍希釈まで反応した。

γ -グロブリンの純化は、水で 10 倍希釈した抗血清に等量の飽和硫酸溶液を加えて塩析後、1/2 濃度の PBS に溶解し、透析し脱塩後 DEAE-セルロースカラムクロマトグラフを実施し、非吸着分画を採り、これを純化 γ -グロブリンとし用いた。純化 γ -グロブリンは 1mg/ml 溶液 ($OD_{278}=1.4$) とし、1~2ml ずつ小試験管に分注し -20°C で凍結保存した。

γ -グロブリンと酵素の結合

酵素の硫酸懸濁液を遠心し、沈澱に純化 γ -グロブリン溶液を加えて溶解した。酵素と γ -グロブリンの混合比は 1:1 または 2.5:1 (w/w) とした。この混合液を PBS に対して透析後、グルタルアルデヒドを最終濃度 0.05~0.2% とし、 22°C で 4~2 時間静置した後再び PBS に対し十分に透析した溶液を酵素結合 γ -グロブリン溶液とし、1% 小牛血清アルブミンを加え、 4°C で保存した。

3. 汁液接種検定

ELISA 法による GFV の検出試験とともに、比較として *C. quinoa* を用いて汁液接種検定も実施した。ブドウ組織は 2.5% のニコチン溶液を用いて磨砕し、カーボランダムを用いる常法により汁液接種し、接種後は直ちに水洗した。通常 1 試料に対して 2 本の *C. quinoa* を使用した。

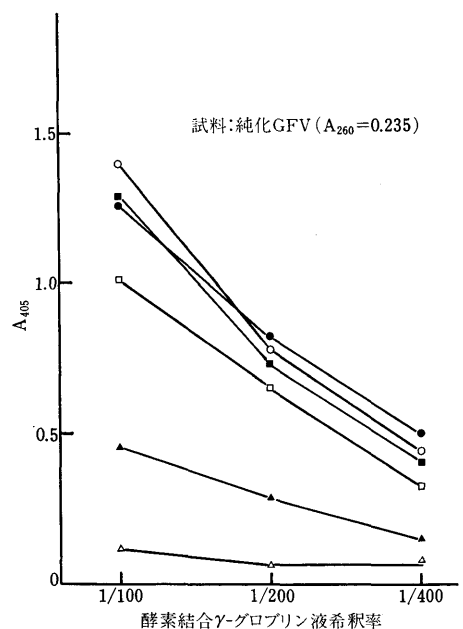
実験結果

1. コーティング γ -グロブリンおよび酵素結合 γ -グロブリン濃度の検討

純化ウイルス原液 ($A_{260}=2.35$) の 10^{-1} ~ 10^{-6} 希釈液を用いて、最適のコーティング γ -グロブリンおよび酵素結合 γ -グロブリン濃度を検討した。

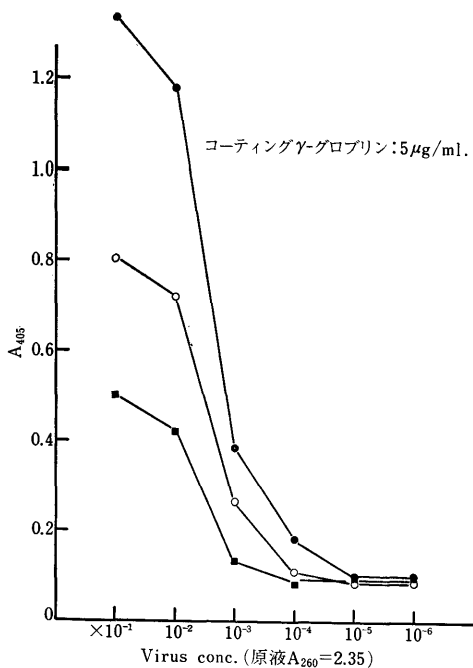
コーティング γ -グロブリンは、純化した γ -グロブリン液 (1mg/ml 溶液) を原液とし、コーティング用緩衝液を用い 2 倍希釈し、1/50~1/1600 希釈液 (20~0.62 μ g/ml 液) について検討した。

結果は第 2 図のとおりで、20, 10, 5 μ g/ml の 3 区では同じ値となるが、20 および 10 μ g/ml 区では試料にウイルスを含まない PBS-T を用いた対照試験でわずかながら非特異発色が認められることおよび γ -グロブリンの節約という観点より 5 μ g/ml が最適と思われた。



第2図 コーティング γ -グロブリン濃度の決定
●—● 20 μ g/ml, ○—○ 10 μ g/ml, ■—■ 5 μ g/ml, □—□ 2.5 μ g/ml, ▲—▲ 1.25 μ g/ml, △—△ 0.62 μ g/ml

一方、酵素結合 γ -グロブリンは、調整原液を PBS-T で 1/100, 1/200, 1/400 に希釈したものについて検討した。結果は第 3 図のとおりで、いずれも非特異発色は認められなかったが、1/400 希釈液では若干発色が弱く、1/100~1/200 希釈液を用いるのが適当と思われた。双方



第3図 酵素結合γ-グロブリン液希釈率の決定

●—● 1/100 倍液, ○—○ 1/200 倍液,
■—■ 1/400 倍液

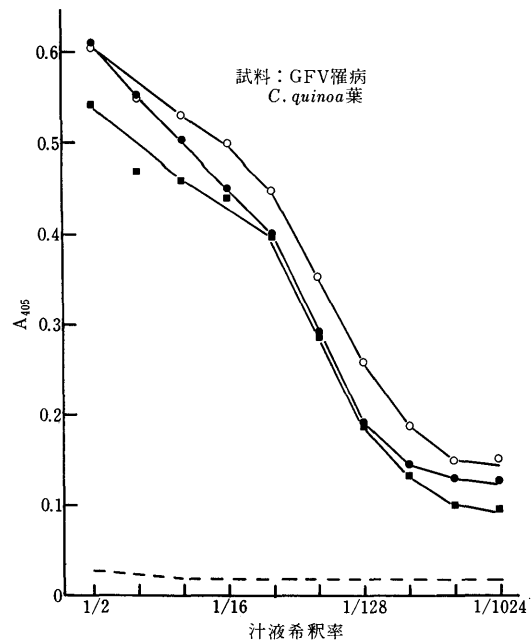
のγ-グロブリン液とも高濃度のものほど ELISA 価は大きくなるが、同時に非特異発色も大きくなる傾向が認められた。

2. 罹病葉からのウイルス抽出用磨砕液の検討

GFV 罹病および健全 *C. quinoa*, 罹病ブドウ (個体 No. 1) およびウイルスフリーブドウ (個体 No. 8) を用いた。今までに報告のある数種磨砕液 (VOLLER et al, 1976, CLARK et al, 1976 a, b, ADAMS, 1978, FLEGG and CLARK, 1979) について検討した。

C. quinoa 葉を 2g 取り ① PBS-T, ② PBS-T + 2% PVP (Polyvinyl pyrrolidone, M. W. 40,000), ③ PBS-T + 2% PVP + 0.2% アルブミン (小牛血清) の 3 種溶液を各々 2ml ずつ加えて乳鉢内でよく磨砕し、それぞれを各磨砕液で 2 倍希釈したものを試料とした。その結果は第4図のとおりで、1/2~1/1024 希釈の間で、健全 *C. quinoa* 汁液の ELISA 価はいずれの磨砕液でも 0.04~0.06 であったが、罹病 *C. quinoa* では、最高 0.6 (1/2 希釈)~最低 0.1 ぐらい (1/1024 希釈) で、この値はいずれの磨砕液でも大差は認められず、*C. quinoa* ではどの磨砕液でも容易に GFV を検出できた。

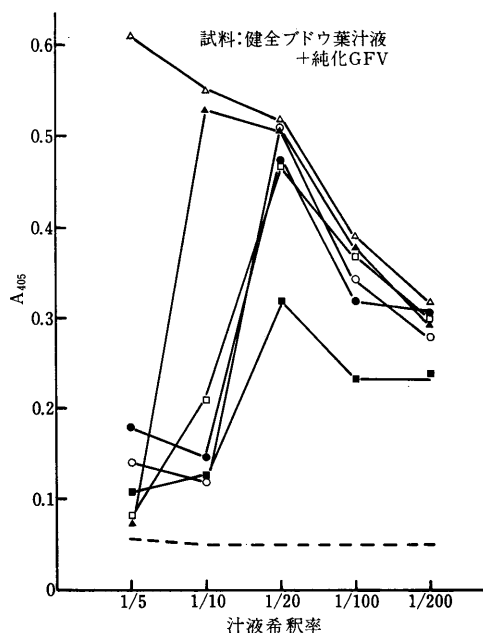
ブドウ葉の磨砕液としては、前述の ①②③ 液と ④ PBS-T+1% PEG (Polyethyleneglycol, M. W. 6,000) お



第4図 *C. quinoa* 葉磨砕液の検討

●—● ①PBS-T, ■—■ ②PBS-T+2% PVP
○—○ ③PBS-T+2% PVP+0.2% アルブミン
---- 対照区, 健全 *C. quinoa* 葉

よび ⑤ PBS-T+2% PVP+0.2% アルブミン + 0.2% Sodium diethyldithiocarbamate (DIECA) について検討した。試料ブドウ葉は、非特異発色が大きいと思われる夏の硬化葉を用いた。ブドウ葉 1~2g に、その 4 倍重量の各磨砕液を加え磨砕しこれを 1/5 希釈液とし、さらに磨砕液と同じ溶液で 1/10~1/200 希釈液を作りこれを試料とした。ウイルスフリーブドウを用いた場合、いずれの磨砕液でも 1/5 希釈液ではわずかの非特異発色が認められ、また ①, ④ 液は他に比べ非特異発色が大きく磨砕液として不適当と思われた。一方、GFV 罹病ブドウを用いた場合、いずれの磨砕液を用いてもウイルスフリーブドウに比べ高い ELISA 価が得られたが、その値が低い場合結果の解析が困難であった。このため、ウイルスフリーブドウの 1/5 希釈液 1ml 当り 50μl の純化ウイルス液 ($A_{260}=2.35$) を加え、これを同様に希釈したものを試料とした。対照区には、純化ウイルスをブドウ汁液を含まない PBS-T で希釈したものを用いた。その結果は第5図のとおりで、1/5 希釈液では対照区に比べすべての区で発色が著しく抑制された。一方、1/10 希釈液では①②③④液では発色の抑制が認められるが、⑤液ではほぼ対照区に近い値が得られた。1/20 希釈以上では④液を除き、大きな発色抑制は認められなかった。



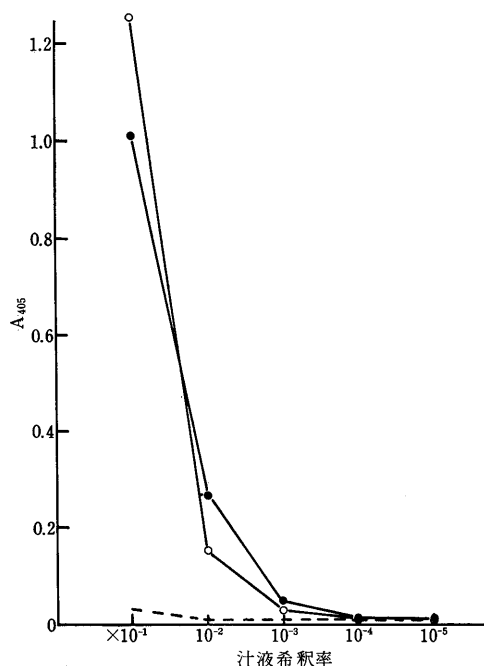
第5図 ブドウ葉磨砕液の検出

●—● ①PBS-T, ○—○ ②PBS-T+2% PVP
□—□ ③PBS-T+2%PVP+0.2% アルブミン
■—■ ④PBS-T+1%PEG, ▲—▲ ⑤PBS-T
+2% PVP+0.2% アルブミン+0.2%DIECA
△—△ 対照区, 純化ウイルスをブドウ汁液を
含まない PBS-T で希釈した。
----- 健全ブドウ葉を⑤液で磨砕したもの。

以上のことから以後の GFV 検出試験でのブドウ葉の磨砕時には、葉重量の 10 倍量の⑤液を用いた。

3. ブドウ葉および *C. quinoa* 葉からの GFV 検出限度

罹病ブドウ (個体 No.6) の春芽と罹病 *C. quinoa* 頂葉を用い、 10^{-1} 希釈液から 10 倍希釈を進め 10^{-5} 希釈液まで調査した。対照として、ウイルスフリーブドウ (個体 No. 8) の春芽と健全キノア頂葉を用いた。その結果は第6図のとおりで、双方とも 10^{-2} 希釈液では確実に GFV を検出できた。また 10^{-3} 希釈液でも、対照区に比べ約 2 倍程度の ELISA 価が得られ、条件が良ければこの付近まで検出は可能と思われる。同じ試料を *C. quinoa* を用いた汁液接種法と比較試験すると、*C. quinoa* では 10^{-4} まで、ブドウでは 10^{-2} まで検出が可能であり、*C. quinoa* からの GFV の検出感度は ELISA 法が劣るが、ブドウでの検出感度は同等あるいは、ELISA 法が若干上回ると思われた。



第6図 GFV 検出感度

●—● 罹病 *C. quinoa* 葉, ○—○ 罹病ブドウ葉, --- 対照区, 健全葉汁液, *C. quinoa* およびブドウではほぼ同じ値であった。

4. 各季節に採取したブドウ葉からの GFV の検出

春の新芽 (1980. 3. 20 網室), 夏のつるの先端付近の未硬化葉 (1979. 7. 5 網室), 秋の硬化葉 (1979. 10. 4 網室) を採取し、検定を実施するまで -20°C で保存した。結果は第2表のとおりで、春の新芽では明りょうな発色が認められ、容易に GFV を検出できた。夏の未硬化葉では発色は弱い、No. 5 を除きほぼ GFV を検出できた。秋の硬化葉では No. 6 でかろうじて検出できたが、他のものでは検出できなかった。夏、秋に採取した葉については ELISA 法による検出試験と並行し、*C. quinoa* による汁液接種試験を実施したが、No. 6 の夏の未硬化葉を除き GFV を検出できなかった。また、No. 7 の夏の未硬化葉はウイルスフリーの2個体に比べ高い値を示し、再検討の必要を感じ、1980 年春～夏にかけて検定植物数を多くして *C. quinoa* による汁液接種検定を実施したところ GFV を検出できた。

5. ブドウの各部からの GFV の検出

初夏 (1980. 6. 4 網室) に採取した未硬化葉および白色の根について検討した。その他、1979 年にも夏 (7 月) ～冬 (12 月) にかけて採取した根、幼果、休眠芽について調査した。

第2表 ブドウ葉からの GFV の検出

個体 No.	試料の採取時期		
	春 (3月20日)	夏 (7月5日)	秋 (10月4日)
1	.555*	.163(-)**	.070(-)
2	.555	.287(-)	.063(-)
3	.519	.160(-)	.075(-)
4	.498	.270(-)	.068(-)
5	.428	.080(-)	.060(-)
6	.542	.125(+)	.108(-)
7	.049	.130(-)	.053(-)
8	.050	.045(-)	.063(-)
9	.053	.050(-)	.073(-)

* ELISA 価

** () 内は、同時に実施した汁液接種試験結果

+: GFV を検出できた。-: できなかった。

第3表 ブドウの各部からの GFV の検出*

個体 No.	試料の採取部位		
	未硬化葉	硬化葉	根 (白色)
1	.472	.052	.318
2	—**	.088	—
3	—	.054	.152
4	—	.048	.354
5	.128	.050	.221
6	—	.063	.402
7	—	.047	.120
8	—	.047	—
9	—	.065	.057

* 1980. 6. 4 採取試料。

** -: 試料を採取できなかった。

1980.6.4 採取分については、第3表のとおりである。この時期には未硬化葉のとれないものが多く、採取できた No.1 および No.5 では GFV を検出できたが、他のものは硬化葉しかとれず、この硬化葉からはいずれも GFV を検出できなかった。一方、白色の根では高い ELISA 価を示すものが多く、根を採取できなかった No.2 を除きすべて GFV を検出できた。又、No.7 はこの試験でも根から GFV を検出でき、GFV に感染していることが確認された。

1979 年の結果も、夏の根についてはほぼ同様に GFV を検出できたが、夏の効果あるいは冬の根、休眠芽などでは試料の保存状態が悪かったこともあり、ウイルスフリーブドウに非特異発色の認められたものもあって明らかに GFV を検出することができなかった。

6. その他

作製した酵素結合 γ -グロブリンは 4°C で保存すれば、1 年経過後も大幅な力価の低下は認められなかったが、多少非特異発色の増加が認められること、および肉眼的に沈殿が認められたが、遠心し沈殿を除去すれば十分に使用できた。 γ -グロブリンをコーティングしたプレートは洗滌乾燥後 -20°C で保存し約 8 ヶ月経過したものについて試験したが、良好な発色が得られ保存状態がよければ相当長期間の保存が可能であると思われた。

考 察

罹病ブドウの ELISA 法による GFV の検定では、春の新芽を用いれば容易に GFV を検出できることがわかった (第2表)。また夏場 (6~7 月) になって、若い未硬化葉が採れなくなった時期でも根の先端付近の白い組織を用いれば検出は可能であった (第3表)。このことは、根の先端部付近の組織は夏場でもウイルス濃度が高いためと思われ、UYEMOTO ら (1976) の *C. quinoa* を用いた汁液接種検定の結果ともよく符合する。

今のところ、ブドウのウイルス病の ELISA 法による診断に関しては、RAMSDELL ら (1979) の Peach rosette mosaic virus (PRMV) と GONSALVES (1979) の Tomato ringspot virus (TomRSV) についての報告があり、*C. quinoa* を用いた検定法との比較で、PRMV では *C. quinoa* による検定がより鋭敏であり、TomRSV ではほぼ同等の精度であったと報告された。本試験でも、罹病ブドウからの検出感度を *C. quinoa* を用いた汁液接種検定法と比較したが、罹病ブドウを希釈した試験では、ELISA 法と汁液接種検定はほぼ同等ないしは若干

ELISA法がよい程度の結果であったが(第6図)、夏に採取した未硬化葉試料を用いた試験では、ELISA法では罹病7個体中6個体でGFVを検出できたが、汁液接種法ではわずかに1個体から検出できただけでELISA法がより鋭敏であると思われた(第2表)。本試験に用いたGFV抗血清の力価は、重層法で80倍希釈までと低かったためさらに高力価の抗血清を使用すれば検出感度はさらに上昇するものと思われる。

No.7は当初汁液接種検定で全くGFVを検出できなかったが、ELISA法で低い値ではあるがGFVを検出でき、その後の調査でもGFVに感染していることを確認できた。このこともELISA法が*C. quinoa*を用いた汁液接種検定より感度が高いことを示していると思われる。ただこのNo.7は春の新芽のELISAでは陰性であったりで結果にばらつきがあり植物体内でのウイルスの濃度が低い状態であるのか、ウイルスの分布にばらつきがあるのかなど不明の点があり、今後の調査が必要と思われる。

以上の結果などから従来実施しているSt. Georgeを用いた接木接種法および*C. quinoa*を用いた汁液接種法とELISA法との総合的な比較を行うと、検定期間はSt. Georgeへの接木接種法では数ヶ月から約1年、*C. quinoa*を用いた汁液接種法で約2週間から1ヶ月かかるが、ELISA法では2~3日で1回の検査を完了でき、極めて迅速な検査法である。検出感度は、本試験の限りではELISA法は、*C. quinoa*を用いた汁液接種検定より鋭敏であった。UYEMOTOら(1976)は、*C. quinoa*を用いた汁液接種検定は2回実施すれば、St. Georgeを用いた接木接種検定に匹敵する感度の高い検定法であると述べていることから、このELISA法は相当に高感度の検定法であると思われる。又、ELISA法は汁液接種法や接木接種法のように検定植物を育成するスペースと労力を必要とせず、多数の試料を検査することができる。ただ、多数の試料を検査する際には、試料の磨砕に要する手間を少なくする必要がある。この点でBAR-JOSEPHら(1979)はUltra turraxを用い短時間(1試料当たり20~30秒)で磨砕できたと報告しており、今後この方法等を含め試料の磨砕法について検討する必要があると思われる。

摘 要

近年輸入量の多いブドウの重要ウイルスであるGrapevine fanleaf virus (GFV)の検出にELISA法が適用できるかどうか検討した。

使用した抗血清は、HEWITT博士より分譲を受けたGFV (yellow mosaic strain)を用いて作製したもので供

試GFVと重層法で80倍希釈まで反応した。

検査手順はCLARK and ADAMS (1977)の方法に従った。コーティングγ-グロブリン液濃度は5μg/ml、酵素結合γ-グロブリン液は調整原液の1/100~1/200希釈液が最適と思われた。

ウイルス抽出用磨砕液は、罹病*chenopodium quinoa*では0.05% Tween-20加用PBS(0.02Mリン酸緩衝液、0.15M NaCl、pH 7.4)で十分であったが、ブドウ葉では、この磨砕液で非特異反応が認められたので、今までに報告のある各種の添加剤を検討したところ、この磨砕液に2% Polyvinyl pyrrolidone、0.2% アルブミン、0.2% Sodium diethyldithiocarbamateを加えたもの(FLEGG and CLARK, 1979)が最適であると思われた。

C. quinoa、ブドウの双方とも罹病葉汁液の 10^{-2} ~ 10^{-3} 希釈液までGFVを検出できた。

罹病ブドウおよび対照としてウイルスフリーブドウ(計9個体)を用いて、GFVの検出試験を実施したところ、春に採取した新芽からは容易にGFVを検出でき、又初夏に採取したつるの先端部付近の若い葉からも検出できたが、秋に採取した成熟葉からの検出は困難であった。

夏に若い葉を採取できないものでも白色の根からGFVを検出できた。

*C. quinoa*を用いた汁液接種法との比較の結果、ELISA法がより鋭敏であると思われた。

引用文献

- ADAMS, A.N. (1978) The detection of plum pox virus in *Prunus* species by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Ann. appl. Biol.* **90**: 215-221
- BAR-JOSEPH, M., S.M. GARNSEY, D. GONSALVES, M. MOSCOVITZ, D.E. PURCIFULL, M.F. CLARK and G. LOEBENSTEIN (1979) The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology*. **69**: 190-194
- CLARK, M.F. and A.N. ADAMS (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. gen. Virol.* **34**: 475-483
- CLARK, M.F., A.N. ADAMS and D.J. BARBARA (1976a) The detection of plant viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Acta Horticulturae*. **67**: 43-49
- CLARK, M.F., A.N. ADAMS, J.M. THRESH and R. CASPER (1976b) The detection of plum pox and other viruses in woody plants by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Acta*

- Horticulturae **67**: 51-57
- FLEGG, C.L. and M.F. CLARK (1979) The detection of apple chlorotic leafspot virus by a modified procedure of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Ann. appl. Biol. **91**: 61-65
- GONSALVES, D. (1979) Detection of tomato ring-spot virus in grapevines: A comparison of *Chenopodium quinoa* and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Plant Dis. Repr. **63**: 962-965
- 石川栄治, 河合 忠, 宮川潔 編 (1978) 酵素免疫測定法, 医学書院. 東京
- 小林敏郎, 川合 昭, 西尾 健, 松濤美文 (1980) 輸入検疫中にヨーロッパ産ブドウから分離された Grapevine fanleaf virus および Arabis mosaic virus. 植防研報. **16**: 49-57
- 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
- RAMSDELL, D.C., R.W. ANDREWS, J.M. GILLET and C.E. MORRIS (1979) A comparison between enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and *Chenopodium quinoa* for detection of peach rosette mosaic virus in 'Concord' grapevines. Plant Dis. Repr. **63**: 74-78
- 宇杉富雄, 斎藤康夫 (1980) Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法による温州萎縮ウイルスの検出. 日植病報, **46**: 106. (講要)
- UYEMOTO, J.K., A.C. GOHEEN, C.F. LUHN and L.J. PETERSEN (1976) Use of *Chenopodium quinoa* in indexing for grapevine fanleaf virus. Plant Dis. Repr. **60**: 536-538
- 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