

## 直接蛍光診断法(DFD法)によるジャガイモ葉巻 病診断の実用化に関する調査

山口 周治・石本 征夫・藤井 伸泰・久米 勝美・今泉 照男\*

名古屋植物防疫所

渡辺 義明・今村 毅・西俣 攻・中原 松美\*\*

神戸植物防疫所

大門 輝男\*\*\*・阿久根光明

門司植物防疫所

永井 康夫\*\*\*\*・斎藤 範彦・及川 巖・木村 伸司\*

西尾 健・長尾 記明

横浜植物防疫所

Studies on the Application of the Direct Fluorescence Detection (DFD) Method for Routine Diagnosis of Potato Leafroll. Shuji YAMAGUCHI, Yukio ISHIMOTO, Nobuhiro FUJII, Katsumi KUME and Teruo IMAIZUMI (Nagoya Plant Protection Station), Yoshiaki WATANABE, Takeshi IMAMURA, Mamoru NISHIMATA and Matsumi NAKAHARA (Kobe Plant Protection Station), Teruo DAIMON, and Mitsuaki AKUNE (Moji Plant Protection Station), Yasuo NAGAI, Norihiko SAITO, Iwao OIKAWA, Shinji KIMURA, Takeshi NISHIO and Noriaki NAGAO (Yokohama Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 23: 7-11 (1987).

**Abstract:** The correlation between symptom expressions of potato leafroll and results of diagnosis by DFD method (NAMBA et al, 1981) was very high at mid to late growing season. Furthermore, internal symptoms could be detected by DFD method before leafroll symptoms were expressed. In comparison with the results of DFD diagnosis, ELISA tests and observation of the symptoms through the growing season, it was considered that the DFD method was reliable for routine diagnosis of potato leafroll.

### ま え が き

篩部局在性ウイルスならびに各種マイコプラズマによる病害の診断法として、難波ら(1981)によって開発された直接蛍光診断法(DFD法)は、診断手技が簡便で迅速なことから、多数の検体を取扱う場面の多い植物検疫でのウイルス病等の検査に有効な診断法であると期待された。そこで、種馬鈴しょ検疫や隔離検疫で検出される例の多い、ジャガイモ葉巻病について検討したところ、本法が実用的な診断法であることが判明したので、ここに報告する。

試験は昭和57~59年の3ヶ年間にわたり、横浜、名古屋、神戸および門司植物防疫所の共同で実施した。

報告にあたり、試験を通じて有益な御助言を賜った東京大学農学部難波成任先生、貴重なジャガイモ葉

巻ウイルス抗血清を分譲下さった新潟大学農学部小島誠先生、ならびにウイルスフリーのジャガイモ塊茎を分譲下さった孺恋馬鈴しょ原々種農場の担当官、ジャガイモ葉巻病罹病塊茎を分譲下さった横浜植物防疫所札幌支所の担当官に心からお礼申し上げる。

### 材料および方法

神奈川、愛知、兵庫および福岡県下の圃場(植物防疫所の圃場を含む)で栽培中のジャガイモ、および網室または温室内で栽培されたジャガイモ葉巻ウイルス(potato leafroll virus; PLRV)罹病ジャガイモ(前年に典型的な葉巻病徴を示した株から採取した塊茎を植付けたもの)およびウイルスフリージャガイモの計595株を供試した。

DFD法は、生育初期(草丈10cmの頃)、中期(着蕾の頃)および後期(下葉の黄化直前の頃)に供試株

\* 現在、神戸植物防疫所

\*\* 現在、農林水産省経済局国際協力課

\*\*\* 現在、横浜植物防疫所

\*\*\*\* 現在、那覇植物防疫事務所

の中～下位葉を採取し、凍結させないで冷蔵保存し、採取日またはその翌日に難波らの方法(1981)によって、小葉の中央脈から連続した5切片を作製して、落射蛍光顕微鏡(ニコンXF-EF, B励起)で観察した。観察の結果、5切片のうち3切片以上で篩部組織に、篩部え死に伴う特異蛍光細胞群(難波ら, 1981)の認められたものを陽性(DFD(+)), それ以外のものを陰性(DFD(-))と判定した。

また、DFD法に供試した試料中のPLRV存在の有無を確認するため、一部の試料については同一葉の別の小葉を-80℃で凍結保存した後、PLRV抗血清(新潟大小島教授より分譲)を用いてELISA(CLARK and ADAMS, 1977)を実施した。ELISAでは、健全試料の2倍以上のELISA値を示したものを陽性、それ以外のものを陰性と判定した。

## 結果および考察

### 1. 葉巻病徴を呈する個体と無病徴個体とのDFD法による診断結果の比較

外部病徴(葉巻症状)の有無とDFD法による診断結果を比較するため、生育中期に圃場で典型的な葉巻病徴を呈する株計159株(品種内訳、男爵薯:50, メークイン:50, 農林1号:43, デジマ:16株), および無病徴株計138株(品種内訳、男爵薯:50, メークイン:49, 農林1号:20, デジマ:19株)を採取し、DFD法で診断した結果はTable 1のとおりである。

すなわち、DFD(+)と判定されたものは、葉巻病徴株では159株中146株(91.8%), 無病徴株では、138株中13株(9.4%)であった。一方、DFD(-)と判定されたものは、葉巻病徴株のうち13株(8.2%), 無病徴株では125株(90.6%)であった。

以上の様に、生育中期の外部病徴の肉眼観察の結果と、DFD法による診断の結果は、9割以上の高率でよく一致することが明らかとなった。

**Table 1.** Comparison between the results of DFD diagnosis of potato plants showing leafroll and no symptom.

| Symptom  | No. of plants |         |
|----------|---------------|---------|
|          | DFD (+)       | DFD (-) |
| No       | 13            | 125     |
| Leafroll | 146           | 13      |

### 2. 葉巻病罹病個体およびウイルスフリー個体の各生育段階におけるDFD法による診断結果

本法による診断の信頼度をさらに確認するとともに本法による診断をおこなう際の試料の適切な採取時期を明らかにする目的で、葉巻病罹病塊茎41個(品種内訳、農林1号:20, デジマ:18, 男爵薯, メークイン, トヨシロ各1個), および対照としてウイルスフリー塊茎76個(品種内訳、男爵薯:54, 農林1号:22個)を5～8号鉢に植え付け、生育の各段階(初, 中, 後期)において、肉眼による病徴観察とともにDFD法による診断を実施した。

その結果はTable 2のとおりで、ウイルスフリー株(76株)は生育の全期間を通じて、全株ともに病徴は現われず、また全てDFD(-)と診断された。

一方、葉巻病罹病株(41株)は、生育初期には39株がまだ葉巻病による外部病徴が認められなかったが、この時期でも26株(63.4%)がDFD(+)と判定された。生育中期には14株が病徴を発現しなかったが、39株(95.1%)がDFD(+)となった。生育後期には全株(41株)がDFD(+)となったが、症状を発現しなかった株が依然として6株認められた。なお、個体別に見ると、初期にDFD(+)と判定されたものが、中期以降にDFD(-)となった事例はなかった。

以上から、DFD法は生育中、後期に実施すればほぼ確実に葉巻病を診断できるものと思われた。また、病徴の発現する前にDFD法による診断が可能となることも明らかとなった。

### 3. 圃場内で無作為抽出した個体のDFD法による診断

DFD法の実用性を調べる目的で一般の栽培圃場あるいは防疫所の圃場内で栽培中のジャガイモのうちから、萌芽時に無作為に抽出した計181株について生育の各段階(初, 中, 後期)において、肉眼による病徴観察およびDFD法による診断を実施した。

その結果はTable 3のとおりである。DFD(+)と判定された株は生育初期に28株、中期に32株、後期には34株となった。この内、葉巻病の病徴が認められなかったものは、初期に26株(92.9%; DFD(+))の株数に対する比率であったが、中期に9株(28.1%), 後期には3株(8.8%)と減少し、生育初期には多くが無病徴であったが、後期には大部分が葉巻病徴を発現した。

一方、DFD(-)と判定された株は生育初期に153

**Table 2.** Diagnosis of leafroll diseased and virus free potato plants by DFD method at different growing seasons.

| Leafroll infestation    | Time of test           | No. of plants |        |          |        |
|-------------------------|------------------------|---------------|--------|----------|--------|
|                         |                        | No symptom    |        | Leafroll |        |
|                         |                        | DFD(+)        | DFD(-) | DFD(+)   | DFD(-) |
| free<br>(76 plants)     | early growing season*  | 0             | 76     | 0        | 0      |
|                         | mid growing season**   | 0             | 76     | 0        | 0      |
|                         | late growing season*** | 0             | 76     | 0        | 0      |
| diseased<br>(41 plants) | early growing season*  | 24            | 15     | 2        | 0      |
|                         | mid growing season**   | 12            | 2      | 27       | 0      |
|                         | late growing season*** | 6             | 0      | 35       | 0      |

\* plants were about 10 cm high. \*\* flower buds were emerging.

\*\*\* just before yellowing of leaves started.

**Table 3.** DFD diagnosis of potato plants sampled at random from commercial fields

| Time of test           | No. of plants |         |          |         |
|------------------------|---------------|---------|----------|---------|
|                        | No symptom    |         | Leafroll |         |
|                        | DFD (+)       | DFD (-) | DFD (+)  | DFD (-) |
| early growing season * | 26            | 153     | 2        | 0       |
| mid growing season *   | 9             | 148     | 23       | 1       |
| late growing season *  | 3             | 145     | 31       | 2       |

181 potato plants were tested.

\*same as Table 2.

株、中期に149株、後期には147株で、このうち葉巻病徴の認められたものは中期に1株、後期に2株のみであった。

以上から、DFD法では、外部病徴の発現しない生育の初期でも、かなりの確率で診断が可能であると思われた。また、この試験でも生育中期以降、肉眼による病徴観察の結果とDFD法による診断結果は9割以上の確率で一致することが確認された。

#### 4. ELISA による PLRV 感染の確認

分譲を受けた PLRV 抗血清から、 $\gamma$ -グロブリンを純化した後、アルカリ性リン酸分解酵素を標識した酵素抗体（コンジュゲート）を作製し、CLARK and ADAMS (1977) の方法によって、ELISA による PLRV

の検出を行った。コーティング  $\gamma$ -グロブリンは2.5  $\mu$ g/ml、コンジュゲートは1/200希釈液を用いた。試料に、10倍量の PBS-Tween（リン酸緩衝生理食塩水に Tween 20 を0.05% となる様に加えた磨砕液）を加えてよく磨砕し、氷中で静置した後その上清液を ELISA に供した。上述の試験に用いた、ウイルスフリー株（76株）、葉巻病罹病株（41株）および圃場内で無作為抽出した株（181株）の計298株から、生育中期に採取した葉を ELISA 用の試料とした。

その結果は Table 4 に示した。ウイルスフリー株では全て陰性であった。また、葉巻病罹病株では41株中39株が陽性であったが、2株は陰性であった。

圃場内で無作為に抽出した株では、181株中17株が陽性と判定され、この内16株は DFD(+) と判定され

**Table 4.** Detection of potato leafroll virus(PLRV) by ELISA from potato plants sampled at mid growing season for DFD diagnosis.

| DFD<br>diagnosis | Detection<br>of PLRV<br>by ELISA | No. of plants        |         |                    |    |                                            |     |
|------------------|----------------------------------|----------------------|---------|--------------------|----|--------------------------------------------|-----|
|                  |                                  | Virus free potatoes* |         | Diseased potatoes* |    | Potatoes growing in**<br>commercial fields |     |
|                  |                                  | LR***                | NO **** | LR                 | NO | LR                                         | NO  |
| +                | +                                | 0                    | 0       | 25                 | 12 | 11                                         | 5   |
|                  | -                                | 0                    | 0       | 2                  | 0  | 12                                         | 4   |
| -                | +                                | 0                    | 0       | 0                  | 2  | 0                                          | 1   |
|                  | -                                | 0                    | 76      | 0                  | 0  | 1                                          | 147 |

\*same samples as Table 2.

\*\*same samples as Table 3.

\*\*\*leafroll symptom.

\*\*\*\*no symptom.

た株であったが、1株はDFD(-)と判定された株であった。生育中期に実施したDFD法による診断では、32株がDFD(+)と判定されたが (Table 3)、このうち16株がELISAでは陰性と判定されたことになる。この16株のうち、12株には葉巻病徴が認められることから、これらはPLRVに感染している可能性がある。一方、DFD(-)と判定された149株のうち148株はELISAで陰性と判定された。

以上の様に、網室または温室内で栽培したウィルスフリー株、葉巻病罹病株では病徴の発現、DFD法による診断の結果およびELISAによるPLRVの検出結果は互いによく一致した。

圃場から無作為に抽出したジャガイモを供試した場合、DFD(+)と判定された株では、ELISAによる診断の結果や、肉眼観察の結果が互いに一致しない例も多かった。しかし、DFD(-)と判定された株では、ELISAでPLRVの検出されたものや、病徴を発現したものは極めて少数であった。

## 5. 総合考察

以上の結果を総合すると次のことが明らかとなった。まず、生育中期以降には外部病徴の肉眼観察の結果と、DFD法による診断の結果はよく一致することが明らかとなった (Table 1, 2, 3)。

また、外部病徴の発現する前にも、DFD法によれば診断が可能となることも明らかとなった (Table 2, 3)。このことは、PLRV感染植物の電顕観察で、外部

病徴の発現に先立って篩部え死が観察された事実 (田中・塩田, 1973) とよく符合する。従来報告のある篩部え死を染色し光学顕微鏡で観察する診断法では、診断時期が生育の相当後期 (開花後) に行う必要があり、初期にはえ死を検出できなかったと述べられているが (平井ら, 1953)、DFD法では生育初期から相当高率に篩部え死を検出でき、より高精度の診断法であると思われた。

圃場で生育中のジャガイモを無作為に抽出して行った試験で、DFD(+)と判定されたものでは、その半数 (16/32株) が、ELISAでPLRVを検出できず、また外部病徴の観察結果とも一致しないものが多く認められた (Table 3, 4)。これについては KOJIMA et al (1982) のELISAによるジャガイモ葉巻病診断に関する報告でも同様の事例が疑似症状株等で少例ながら認められている。この原因は明らかではないが、組織中のPLRV濃度がELISAの検出限界以下であった、PLRV以外のウィルス等が関与している等が考えられる。一方、DFD(-)と判定されたものから、ELISAでウィルスが検出されたものは極めて希 (1/149株) であり (Table 4)、肉眼症状の認められたものも、中期 (1/149株)、後期 (2/147株) とともに極めて希であった (Table 3)。このことから、DFD(-)と判定されたものの大部分は健全であると思われた。

以上から、DFD法は、診断手技が簡便で迅速なことから相まって、実用性の高い診断法であると結論された。

圃場での種馬鈴しょ検疫では、ジャガイモ葉巻病の防除に肉眼検査による罹病株の抜き取りが有効なことは、長年の実績から明らかであり、今後ともジャガイモ葉巻病検査の主体は肉眼検査であることには疑問の余地はない。しかし、肉眼判定が難しい場合や、早期診断が必要な場合、あるいは外国からの導入品種の隔離検疫に、本法は特に有用であると思われる。

## 引用文献

- 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.
- 平井篤造・工藤和一・小岩龍衛 (1953) 馬鈴薯葉巻病の検定並びに診断法. *植物防疫* **7** : 113-115.
- KOJIMA, M., T. TAKIZAWA, I. UYEDA, and E. SHIKATA (1982) Application of enzyme-linked immunosorbent assay to diagnosis of potato leafroll disease. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **48** : 458-465.
- 難波成任・山下修一・土居養二・與良 清 (1981) 萎黄型ウイルス病およびマイコプラズマ病感染植物の直接蛍光診断法 (DFD法). *日植病報* **47** : 258-263.
- 田中 智・塩田弘行 (1973) ジャガイモ葉巻病ウイルス感染植物体内の篩部壊死について. *日植病報* **39** : 61-66.