

直接蛍光診断法（DFD法）によるブドウ葉巻病診断 の実用化に関する調査

渡辺 義明・山下 博・伊川 幸秀・木村 伸司

神戸植物防疫所

後藤 正明・木村 茂・高橋 勤

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 for Grapevine Leafroll. Yoshiaki WATANABE, Hiroshi YAMASHITA and Yukihide IKAWA (Kobe Plant Protection Station), Masaaki GOTO, Shigeru KIMURA, Tsutomu TAKAHASHI, Takeshi NISHIO, Noriaki NAGAO (Yokohama Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 22 : 79-82 (1987).

はじめに

直接蛍光診断法（Direct Fluorescence Detection Method, DFD法）は、難波ら（1981）によって開発、命名された方法で、永年作物である果樹や栄養繁殖を行うジャガイモなどのウイルスのうち、ブドウ葉巻ウイルス（grapevine leafroll virus, GLRV）、モモ黄葉ウイルス（peach yellow leaf virus, PYLV）、ジャガイモ葉巻ウイルス（potato leafroll virus, PLRV）など節部局在性ウイルスによる病害や、キリてんぐ巢病、クリ萎黄病などマイコプラズマ様微生物による病害など10数種の病害の診断に利用できることが報告されている。

本法は植物の維管束を含む組織（葉脈、葉柄、枝など）の横断切片をカミソリなどで作製し、落射型蛍光顕微鏡で直接検鏡して、ウイルス等に感染し壊死過程にある細胞群の発する蛍光を検出し診断する方法であり（難波ら，1981），簡便でかつ迅速な方法であるため，隔離検疫や国内母樹検疫における果樹ウイルスの検査に最適の方法と考えられた。

そこで，世界的にもその被害が大きく，植物検疫上重要と思われる節部局在性ウイルスのGLRVを対象にして，本法が植物検疫の検査場面で実用的な診断法として使用できるかどうかの検討を行った。

なお，本報告を行うにあたり，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，GLRV保毒穂木および健全苗木の分譲を賜った山梨県果樹試験場寺井康夫，西島隆の両氏ならびにウイルス

フリー穂木の分譲を賜った農林水産省果樹試験場土屋七郎室長に心よりお礼申し上げる。

材料および方法

供試したブドウはすべて1～4年生の苗木で，GLRV保毒穂木は接木検定でウイルスの保毒を確認したもので，または，それより採穂して増殖した挿木苗である。また，健全苗木は実生苗（1～2年生）およびウイルスフリーとして輸入され接木検定でGLRVを保毒していないことが確認された穂木を増殖した挿木苗である。GLRV保毒ならびに健全苗木の大部分は露地栽培したが，一部は網室内でポット栽培した。供試したブドウの品種は第1表のとおりである。

DFD法による診断は難波ら（1981）の方法によった。調査は横浜植物防疫所大和圃場（神奈川県大和市），調査研究部（横浜市）および神戸植物防疫所伊川谷圃場（神戸市）で，昭和58年～59年に実施し，調査時期は7月（第Ⅰ回），9～10月（第Ⅱ回），11～1月（第Ⅲ回）とした。第Ⅰ回と第Ⅱ回の調査では地際から3番目前後の葉の中肋を，また第Ⅲ回の調査では当年に伸長した休眠枝を試料とし，それらの連続5切片を検鏡した。

検鏡の結果，5切片すべてに蛍光が認められたものを++，3～4切片に認められたものを+，1～2切片に認められたものを±，全く蛍光の認められなかったものを-として判定した。このうち，++～+を陽

第1表 供試ブドウ品種

GLRV保毒	オリンピア, カベルネ・ソービニヨン, キャンベル・アーリー, 巨峰, 甲州, 高尾高砂, ネオ・マスカット, ピオーネ, ピッツエロ・ネロ, ピッツェロ・ピアンコ, ピノー・ノアール,
健全	イブリード・フラン (実生), カベルネ・ソービニヨン (実生, VF*), カベルネ・フラン (VF) セント・ジョージ (VF), トムソン・シードレス (VF), ピノー・ノアール (VF) マスカット・オブ・アレキサンドリア (実生), ミッション (VF), Bacco 22A(実生), 1202(実生) EH202, LN33 (VF)

*ウイルスフリーとして輸入されたもの

性とし、総調査個体に占める陽性個体の割合を陽性率とした。

毒苗木では陽性率が16.4~36.2% (平均28.9%, 180/623; 同上) であった。

結果および考察

1. GLRV 保毒苗木および健全苗木の比較調査

昭和58~59年に横浜, 神戸両所で GLRV 保毒苗木のべ623本と健全苗木のべ618本の計1,241本について DFD 法による検診を行い、時期別、年次別に総合した結果を第2表に示した。なお、昭和58年に供試した個体は翌年にも供試した。

その結果、健全苗木では昭和58年の第I回調査を除きいずれの調査でも陽性率は10%以下 (平均7.8%, 48/618; 陽性個体数/総調査個体数) で、GLRV 保

2. 同一苗木の継続調査

上述の保毒、健全苗木の調査時に、時期によって判定が++, +から-になったり、またその逆の場合もあり判定結果の変動が大きい様に思われたことから、同一の個体についての継続調査を行った。

健全苗木10本 (カベルネ・ソービニヨン実生) と GLRV 保毒苗木15本 (ネオ・マスカット: 7本, ピオーネ: 8本) を用いて、昭和58年~59年の2年間に同一個体を継続調査した結果を第3表に示した。

健全苗木の陽性率はいずれの時期でも0~20%であるが、一方 GLRV 保毒苗木では0~87%となった。

第2表 GLRV 保毒苗木および健全苗木の比較調査

年次	区分	調査 時期	調査 本数	検定結果				陽性率 (%)
				++	+	±	-	
昭和 58年	GLRV 保毒苗木	I*	61	1 (本)	9	13	38	16.4
		II*	125	9	26	29	61	28.0
		III**	87	3	24	20	40	31.0
	健全 苗木	I	52	0	14	7	31	26.9
		II	82	0	2	6	74	2.4
		III	53	0	2	9	42	3.8
昭和 59年	GLRV 保毒苗木	I	130	10	31	29	60	31.5
		II	130	11	36	43	40	36.2
		III	90	8	12	13	57	22.2
	健全 苗木	I	186	0	8	25	153	4.3
		II	185	3	13	53	116	8.6
		III	60	2	4	10	44	10.0

調査時期は I: 7月, II: 9~10月, III: 11~1月で、試料は * : 下位葉の中肋, ** : 休眠枝を用いた。

第3表 健全苗木およびGLRV保毒苗木の同一苗木の継続調査

検定時期 個体番号	58年				59年						
	7月*	9月*	10月*	11月**	12月**	7月*	10月*	12月**	11月**	12月**	
健全苗木	CS-1	-	-	-	-	+	-	±	-	-	±
	2	-	-	-	-	±	-	+	+	±	±
	3	-	-	-	-	±	-	±	-	-	+
	4	-	-	-	-	±	-	-	+	+	+
	5	-	-	-	±	+	-	±	-	-	±
	6	-	-	-	-	-	-	±	-	±	-
	7	-	-	-	-	-	±	+	-	±	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	9	-	-	-	-	-	±	±	-	±	±
	10	-	-	-	-	±	-	±	-	±	±
陽性率 (%)		0	0	0	0	20	0	20	20	20	
GLRV保毒苗木	NM-1	+	-	-	-	±	-	±	-	+	+
	2	+	-	-	-	±	-	±	±	±	++
	3	+	-	±	-	±	-	+	-	++	±
	4	-	-	±	-	±	+	+	+	+	++
	5	±	-	-	-	++	-	+	±	±	+
	7	+	±	+	-	-	-	+	-	+	+
	8	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
	P-1	-	±	+	±	±	±	+	±	+	+
	2	-	++	++	-	±	++	++	+	±	+
	3	-	-	±	-	+	+	+	±	±	+
	4	±	-	-	-	-	±	+	+	+	±
	5	±	-	-	-	+	+	+	+	+	++
	6	+	-	±	-	±	-	±	+	±	++
7	±	-	-	±	+	+	+	-	+	++	
8	±	-	±	-	±	-	+	-	+	++	
陽性率 (%)		33	7	27	0	27	27	80	33	60	87

*試料として、下位葉の中肋を用いた。**試料として、休眠枝を用いた。
なお、58年9月、10月には2回検定を実施した。

また、健全苗木では昭和58年の7月には陽性の個体は認められなかったが、その後陽性の個体が認められる様になった。個体別に見ると、GLRV保毒個体でいずれの時期にも陽性と判定されたものはなく、健全苗木でいずれの時期にも-又は±と判定されたものは3個体あった。

3. GLRV保毒苗木および健全苗木の全葉の調査

昭和59年の第I回、第II回の調査でいずれも陽性と判定されたGLRV保毒の4個体と、健全苗木(ウイルスフリー苗木)でいずれの調査でも全く特異蛍光を検出できずと判定された3個体の計7個体について、昭和59年9月に各苗木の葉すべてをDFD法により調査した。その結果を第4表に示したが、GLRV保毒苗木では、陽性と判定された葉数の総葉数に対する比率

(陽性葉率)は23-68%(平均54%, 52/96; 陽性葉数/総葉数)であり、一方、健全苗木では3-4%(平均3.8%, 3/80; 同上)と明らかな差が認められた。特に木の先端付近の葉より地際部に近い葉ほど顕著な差が認められた。なお、供試したブドウ苗木は、保毒、健全ともに調査時の外観は健全であった。

考 察

以上の調査結果から、GLRV保毒苗木は明らかに健全苗木より陽性率が高く(第2表、第3表)、また、保毒、健全苗木の全葉の調査でも明らかな差が認められ(第4表)、DFD法によりGLRV感染にともなう病変を検出できることが確認された。

第4表 GLRV保毒苗木および健全苗木の全葉の調査
(昭和59年9月実施)

検定結果*	区分 個体 番号 No.	GLRV保毒苗木				健全苗木		
		101	121	140	148	17	18	19
++	3(枚)	1	1	18	0	0	0	
+	7	7	6	9	1	1	1	
±	9	10	13	6	5	3	3	
-	7	7	10	7	24	19	23	
総調査葉数	26	25	30	40	30	23	27	
陽性葉率(%)	38	32	23	68	3	4	4	

* 試料には中肋を用いた。

しかし、保毒苗木の陽性率が平均28.9%と低率であったこと(第2表)、健全苗木でも陽性と判定されたものが平均7.8%認められたこと(第2表)、同一の苗木でも時期を異にして検定した場合、判定の一定しない例が多かったこと(第3表)から、隔離検疫および母樹検疫において、個別のブドウ苗木を1年間に2

～3回のDFD検定を実施してGLRV感染の有無を判定することは困難で、本法だけによってGLRVの診断を行うには無理があると推察された。

今のところ、ブドウ葉巻の検査は接木検定が最も確実と思われるが、この接木検定は多量に輸入されるブドウ苗木、穂木の全量に適用するには多くの困難がある。迅速で簡便なDFD法は、多量の検体の取扱いが容易であることから、輸入ブドウの隔離検疫で輸入された苗木穂木の一検査単位(荷口)が健全であるかどうかを大まかに見極める補助的な検査法として利用できるものと思われた。ただ、この際には一検体当たりの試料をできる限り多くし、また、検定期間を変え4～5回以上の検定を行いこれらの結果を総合的に判断する必要があるだろう。

引用文献

- 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