

## オオムギ黄萎ウイルスの純化および血清学的診断

宇杉 富雄・中野 正明・新海 昭<sup>1)</sup>

(九州農業試験場)

### Purification and serological diagnosis of barley yellow dwarf virus.

Tomio USUGI, Masaaki NAKANO and Akira SHINKAI (Kyushu National Agricultural Experiment Station, Chikugo, Fukuoka 833)

#### Abstract

Barley yellow dwarf virus (BYDV), occurring in Kyushu, was purified and the antiserum against BYDV was prepared. The antiserum reacted with BYDV up to a dilution of 1/160 in precipitin ring interface test. Using this antiserum, the serological diagnosis of BYDV by ELISA was developed. BYDV in the leaf extract of infected barley plants could be detected up to a dilution of 1/640 by ELISA. Concentration of BYDV in barley plants showing yellow symptoms was higher in the upper to middle leaves than in the lower leaves. BYDV was frequently detected in barley and wheat plants showing yellow symptoms in the fields of Kyushu National Agricultural Experiment Station.

前報<sup>5)</sup>において九州農試圃場、諫早市および八女市の農家圃場の黄化症状のムギ類から barley yellow dwarf virus (オオムギ黄萎ウイルス<sup>2)</sup>=BYDV) およびコムギ 黄葉ウイルス (WYLV) が分離されることを報告した。これらのウイルスの検定を病徵と電顕観察により行っているが、迅速且つ正確に検定することは困難であり、簡易検定法の確立が必要となった。

そこで筆者らは BYDV の抗血清を作製し、酵素結合抗体法 (ELISA) による血清学的診断法を確立した。ここにその結果を報告する。

#### 材料および方法

供試 BYDV は黄化症状を呈したコムギ株より分離したものであり<sup>5)</sup>、ムギクビレアブランシによりオオムギ (西海皮 1 号) に継代接種したものである。ウイルスの増殖はすべてオオムギ (西海皮 1 号) を用い、網室内で行った。 $\gamma$ -ゲロブリン、アルカリリフォスマターゼ結合抗体 (conjugate) の作製およびELISA の実施方法は、すべて Clark and Adams (1977)<sup>1)</sup> に従った。

#### 試験結果

##### 1. BYDV の純化および抗血清の作製

Matsubara らの純化法<sup>3)</sup>に従い、本ウイルスの純化を試みたところ、ほとんどウイルスが得られなかった。そこで、各種の検討を行い、第 1 図に示した純化法を確立した。Matsubara らの純化法と異なるところは、クエン酸緩衝液を使用したことおよび四塩化炭素、エチルエーテルによる処理を行ったことである。しょ糖密度勾配遠心後、本ウイルスは単一のピークとして認められた (第 2 図)。冬期に採取した純化材料からは、その他の時期に採取したものより多くのウイルス量を得ることができた。得られた純化標品を 2% PTA で染色し電顕観察したところ直徑 28-30nm の球状粒子が多く認められたが、中には若干崩壊した粒子も観察された (第 3 図)。

純化ウイルス標品をアジュバント法により家兔に 5 回注射し、抗血清を作製した。得られた抗血清はリングテストで本ウイルスと 160 倍希釈まで反応したが、健全植物成分とは反応しなかった。

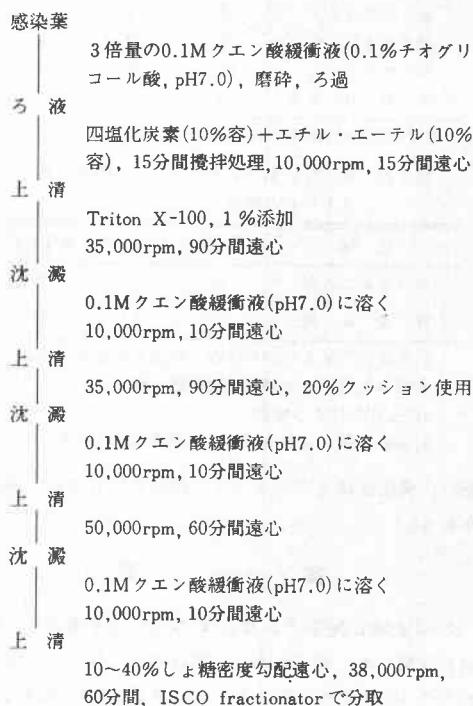
##### 2. ELISA による BYDV の検出

オオムギ感染葉の 0.02M リン酸緩衝生理食塩水 (0.05

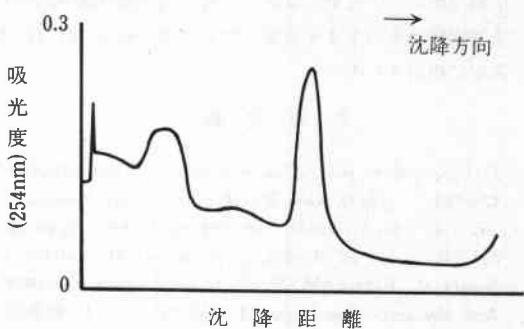
1) 現在 日本植物防疫協会

% Tween 20を含む、PBS-T)による20倍粗汁液を用いてELISAを行い、作製したγ-グロブリンおよびconjugateの最適濃度を調べた。その結果、γ-グロブリンおよびconjugateの濃度をそれぞれ1,600倍及び3,200倍にした場合においても十分に強い発色が認められた。一方、健全植物汁液ではほとんど発色が認められなかった。従って以下の試験はこの条件で行った。

オオムギ感染葉粗汁液をPBS-Tで段階希釈し、本



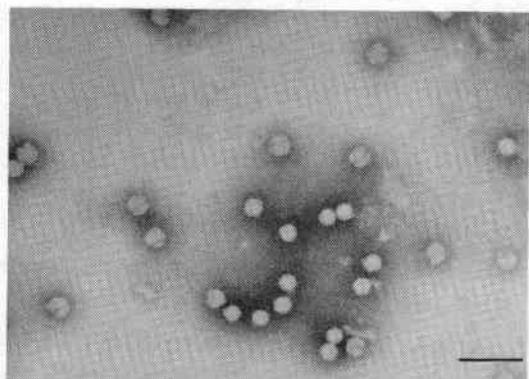
第1図 オオムギ黄萎ウイルス(BYDV)の純化法



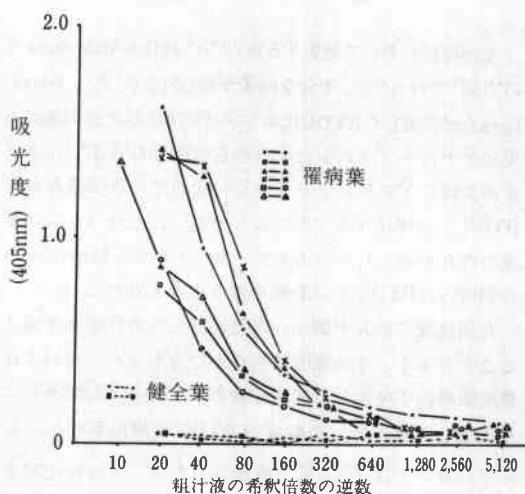
第2図 部分純化標品のしょ糖密度勾配遠心図  
(38,000rpm, 60分間遠心) 感染葉150g  
より純化

ウイルスの粗汁液における検出限界濃度を求めたところ、本ウイルスはおよそ640倍まで検出されることが明らかになった(第4図)。

接種後5ヶ月を経たオオムギから全葉を採取し、各葉位におけるウイルス濃度を調べた。その結果、止葉～上位葉は無症状であったが、高い発色値が得られた。中位葉は葉先が黄化していたが、上位葉と同程度あるいはやや弱い発色が認められた。下位葉は黄白色化、あるいは葉先が枯死しており発色は極めて弱かった(第1表)。



第3図 純化BYDVの電顕像  
2%PTA(pH7.0)で染色  
スケールは100nmを示す



第4図 BYDV感染葉粗汁液の希釈度と発色程度  
オオムギ(西海皮1号), 1,600倍のγ-  
グロブリン, 3,200倍のconjugate使用

第1表 BYDV 感染オオムギ(西海皮1号)の各葉位におけるウイルス濃度

試料番号	葉位	症状	吸光度 (405nm)
1	止葉	無症状	1.45
	止葉より1葉目	無症状	1.35
	2	無症状	1.17
	3	葉先わずかに黄化	1.29
	4	葉先わずかに黄化	1.20
	5	葉先黄化	0.55
	6	全葉黄化	0.46
2	止葉	無症状	1.37
	止葉より1葉目	無症状	1.88
	2	無症状	1.85
	3	無症状	1.25
	4	葉先わずかに黄化	1.01
	5	葉先黄化	0.73
	6	全葉黄化	0.34
	7	全葉黄白色化	0.17

PBS-Tによる20倍希釈粗汁液を抗原として使用。

1,600倍γ-グロブリン、3,200倍conjugateを使用

また、接種後1カ月を経たオオムギを用いても同様の結果が得られた。

1987年春、九州農試圃場から黄化症状を呈するオオムギ、コムギを採取し、ELISAおよび電顕観察によるBYDVとWYLVの検定を行った。その結果、オオムギではいずれの品種においても高い検出率でBYDVが検出された(第2表)。コムギにおいてもBYDVの検出率は高かったがWYLVの検出率は低かった(第3表)。

### 考 察

九州地区において発生するBYDVの純化をMatsubaraらの方法<sup>3)</sup>で行ったが、十分な結果が得られなかった。Matsubaraらが供試したBYDVはムギクビレアプラムシの他にムギヒゲナガアブラムシによっても伝搬されるが<sup>2,4)</sup>、本ウイルスはムギクビレアプラムシによってのみ伝搬される。BYDVには媒体するアブラムシの違いによりいくつか系統の存在が知られているので、本ウイルスとMatsubaraらが用いたBYDVとは系統が違うのかも知れない。

九州地域でのムギ類は、成熟初期から黄化症状を呈することが多く、その原因は明らかでなかった。今回九州農試圃場内で発生した黄化症状のムギ類をELISAにより調査したところ、高頻度でBYDVが検出された。コムギにおいてはWYLVが検出されたが、その検出頻度は低かった。これらの結果は、BYDVが黄化症状の原因の一つであることを示している。今後、WYLVの簡易検定法を確立し、BYDVおよびWYLVの発生状況を調

第2表 黄化症状を呈する二条オオムギのELISAによるBYDV検定

品種名	試料総数	検定結果	
		陽性	陰性
ふじ二条	6	5	1
あまぎ二条	4	3	1
はるな二条	4	4	0
カワサイゴク	6	6	0
さつき二条	10	10	0
イシュクシラズ	14	12	2
カワミズキ	7	7	0
アサヒ5号	9	7	2
カワホナミ	12	10	2
ダイセンゴールド	5	5	0

試料採取は1987年4月13日

第3表 黄化症状を呈するコムギから検出されたウイルスの種類

品種	試料総数	BYDV <sup>a)</sup>	WYLV <sup>b)</sup>
シロガネコムギ	4	4	0
育成系統	17	14	4

試料は1987年2月20日採取、育成系統は全てコムギ縞萎縮病、ムギ類萎縮病に抵抗性。

a) ELISAによる検定

b) 電顕観察による検定、コムギ黄葉ウイルス

査し、黄化症状とウイルスとの関連を明らかにする必要がある。

### 摘

### 要

九州地域に発生するBYDVの純化法を確立し、抗血清を作製した。得られた抗血清は本ウイルスとリングテストで160倍まで反応した。本抗血清を用い、ELISAによる血清学的診断法を開発した。本法によりオオムギ感染葉粗汁液中のウイルスは640倍希釈まで検出された。黄化症状株のオオムギ葉におけるBYDV濃度は上～中位葉で高く、下位葉では低かった。九州農試圃場において黄化症状を示すオオムギ、コムギ株からはBYDVが高率に検出された。

### 引 用 文 献

- CLARK, M. F. and ADAMS, A. N. (1977) J. gen. Virol. **34**: 476-483.
- KOJIMA, M., MATSUBARA, A., YANASE, S. and TORIYAMA, S. (1983) Ann. Phytopath. Soc. Japan **49**: 338-346.
- MATSUBARA, A., KOJIMA, M., KAWANO, S., NARITA, M., HATTORI, M., UYEDA, I. and SHIKATA, E. (1985) Ann. phytopath. Soc. Japan **51**: 152-158.
- 新津純一・高橋亘・小島誠 (1987) 日植病報 **53**: 424.
- 宇杉富雄・中野正明・新海昭 (1987) 九病虫研会報 **33**: 21-23.

(1988年4月30日 受領)