

Serologically Specific Electron Microscopy による Citrus Tristeza Virus の検出

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	石井,卓男 宇杉,富雄
発行元	日本植物病理學會
巻/号	48巻2号
巻号補足	
掲載ページ	p. 231-233
発行年月	1982年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



Serologically Specific Electron Microscopy による Citrus Tristeza Virus の検出

石井卓男*・宇杉富雄**

Takuo ISHII* and Tomio USUGI**: Detection of Citrus Tristeza
Virus by Serologically Specific Electron Microscopy

Abstract

Serologically specific electron microscopy (SSEM) proved to be useful for a diagnostic technique of citrus tristeza virus (CTV) and for a quantitative assay of CTV in crude tissue extract. The amount of CTV was much more in the young shoots than in other parts and differed with host species. There were no significant differences in number of CTV particles detected in the same host among three CTV strains.

Key Words: citrus tristeza virus, serology, diagnosis, electron microscopy.

citrus tristeza virus (CTV) の検定は、従来メキシカンライム等の木本検定植物を用いて行われてきたが、この方法では結果が得られるまでに長期間を要することや、温室等の施設が必要なことなどの不便な点が多い。最近、迅速かつ高精度な CTV の検定法として、蛍光抗体法¹⁾、ELISA²⁾、gel-diffusion 法^{3,4)}の抗原抗体反応を利用した方法が報告されている。一方、電子顕微鏡を用いた dip 法は CTV 粒子数が少ないため検出困難で実用化に至っていない。筆者らは、抗原抗体反応と電顕を併用した serologically specific electron microscopy (SSEM)⁵⁾による CTV の検出を検討した。その結果、この方法で多数の CTV 粒子を検出することが可能であり、CTV の検出法として実用できると考えたのでここに報告する。

本実験に用いた抗 CTV 血清は土崎氏（植物ウイルス研究所）より分譲されたものであり、ハッサク萎縮病の病原ウイルスである CTV を抗原として作成され

た。SSEM の手順は Fig. 1 に示したとおり Derrick and Bransky の方法を一部変えたものである⁵⁾、電顕観察に当たっては各試料につき 5 視野ずつ倍率 4,000 倍で撮影し、その 5 枚の電顕フィルム 9×7.5cm 中に認められた粒子数の平均値で CTV 検出粒子数を表わした。

試料磨砕液の希釈倍数と CTV 検出粒子数の関係は希釈倍数 50 倍から 400 倍までの間を調べたが、ほぼ比例関係が認められた (Fig. 2)。希釈倍数 50 倍では夾雑物が多くなり、粒子の計数が困難であった。このため実際に検定する場合には 100 倍希釈が適当と思われた。抗血清の希釈倍数と検出粒子数との関係を調べたところ、抗血清希釈倍数 200 倍から 3,200 倍の間では検出粒子数に大差は認められなかった。高濃度の抗血清を使用した場合には、抗血清自体による膜の汚れが多くなった。従って使用する抗血清はウイルス粒子の検出が可能で抗血清による膜の汚れの少ない 1,000 倍

* 愛媛県立果樹試験場 Ehime Prefecture Fruit Tree Experiment Station, Matsuyama, Ehime 791-01, Japan

** 農林水産省植物ウイルス研究所 Institute for Plant Virus Research, Tsukuba Science City, Yatabe, Ibaraki 305, Japan

1) Tsuchizaki, T., Sasaki, A. and Saito, Y. (1978). *Phytopathology* 68: 139-142. 2) Bar-Joseph, M., Garnsey, S. M., Gonsalves, D., Moscovitz, M., Purcifull, D. E. and Loebenstein, G. (1978). *Ibid.* 69: 190-194. 3) Gonsalves, D., Purcifull, D. E. and Garnsey, S. M. (1978). *Ibid.* 68: 553-559. 4) Garnsey, S. M., Gonsalves, D. and Purcifull, D. E. (1979). *Ibid.* 69: 88-95. 5) Derrick, K. S. and Bransky, R. H. (1976). *Ibid.* 66: 815-820.

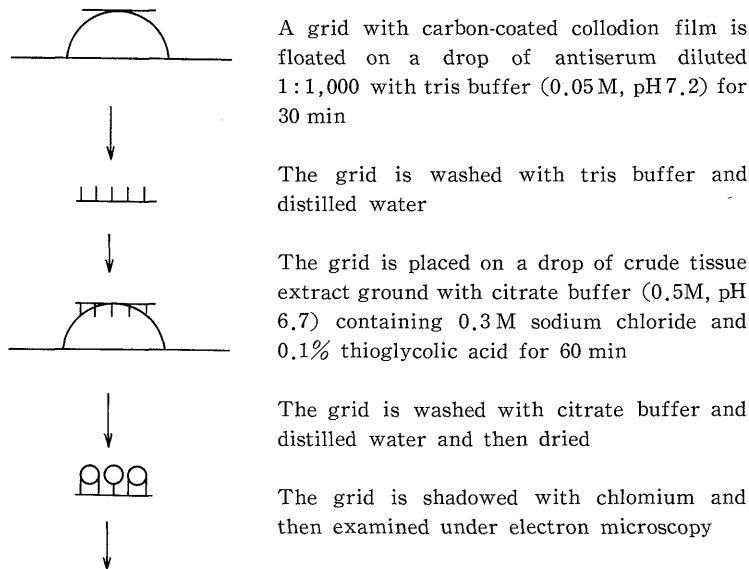


Fig. 1. Procedure of serologically specific electron microscopy.

希釈がよいと思われた。

ハッサク萎縮系統 (HD) の CTV を保毒するユズを用い、部位別に CTV 粒子の検出を行った。その結果、新梢 (新葉を除く) で最も多く検出され、他の部位では極めて少なかった (Table 1)。この結果は gel-diffusion 法³⁾ や ELISA²⁾ による検定結果とよく一致している。

HD, 弱毒系統 (M), 萎黄系統 (SY) の CTV 3 系統を保毒する数種類のカンキツの新梢を用いウイルスの系統間、カンキツの種類別および SSEM と dip 法間の CTV 検出粒子数の比較検討を行った (Table 2)。SSEM では同一種のカンキツにおいては CTV の検出粒子数には系統間に大きな差は認められなかった。しかし、カンキツの種類が異なる場合には検出粒子数に差が認められ、ユズにおいて最も多く、次にユーレカレモンであり、ワシントンネーブルやウンシュウミカンでは少なかった。これは同一系統の CTV でもカンキツの種類によってウイルス増殖量に差があることを示している。dip 法の場合には検出される粒子数は極めて少なく SSEM による場合のほぼ 1/10 程度であった。dip 法においては SSEM によって認められるような CTV の系統およびカンキツの種類と検出粒子数との関係は認められなかった。

SSEM と dip 法によって検出された CTV 粒子の長さを測定したところ、dip 法と比較して SSEM の

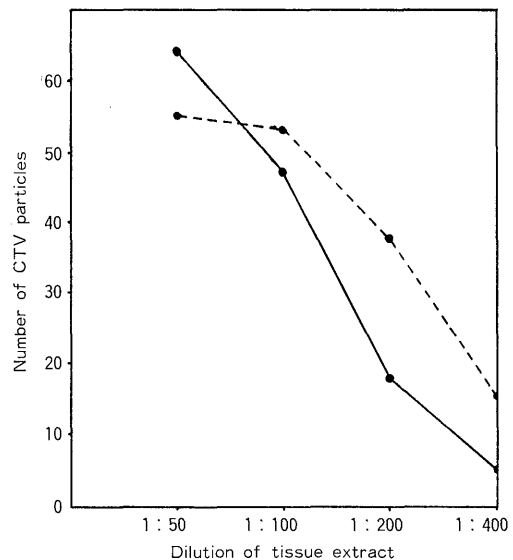


Fig. 2. Relationship between number of CTV particles detected and dilutions of crude tissue extract.

- : Young shoots of yuzu infected with seedling-yellows strain of CTV
- - -●: Young shoots of yuzu infected with hassaku dwarf strain of CTV

場合には 500nm 前後の短い粒子の割合が高かった。これは実験操作中に CTV 粒子が切断され短くなったものと考えられる。

抗 citrus tatter leaf virus (CTLV) 血清を用いて同様の方法で SSEM を行った。CTLV に感染した

Chenopodium quinoa および *Chenopodium amaranticolor*, CTLV および CTV に重複感染したウンシュウミカンから多数の CTLV が検出されたが、ウンシュウミカンに感染した CTV は抗 CTLV 血清とは反応せず検出できなかった。この結果は SSEM が使用する抗血清に対して特異的であり、ウイルスの同定にも使用できることを示している。

以上の結果から、検出粒子数の多い新梢を用いることにより、CTV の SSEM による検定が可能となった。SSEM は反応の特異性が高く消費する抗血清が極めて少量ですむという利点がある。電顕観察に Cr-shadowing の試料を用いるとウイルス粒子が明確に確認され、粒子の計数が容易となり、定量的な実験も可能となった。

なお、本研究を行うに当たり抗 CTV 血清を分譲いただいた植物ウイルス研究所土崎常男博士ならびに各系統の CTV を提供いただいた広島県果樹試験場佐々木篤博士に深謝の意を表する。

(1981年9月14日受理)

Table 1. Number of CTV particles detected in crude tissue extracts from various parts of yuzu (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka)

Parts ^{a)}	No. of CTV particles ^{b)}
Young shoots	162.8
Bark of spring shoots	9.2
Bark of biennial twigs	11.4
Young leaves	20.8
Mature spring leaves	11.8

a) Crude tissue extracts were diluted 1:100.

b) Particle counts shown represent the average of the total number of virus particles on five sheets of 9×7.5cm negatives taken at ×4,000.

Table 2. Number of CTV particles detected in young shoots of different host species by SSEM and dip method

Strain of CTV	Yuzu		Eureka lemon		Washington navel		Unshiu
	SSEM ^{a)}	dip	SSEM	dip	SSEM	dip	SSEM
Hassaku-dwarf	287 ^{b)}	30.2	131.3	6.2	—	—	—
Mild	238.8	16.4	127	—	—	—	—
Seedling-yellows	246.8	—	—	—	55	23.2	—
unknown	—	—	—	—	—	—	46

a) Crude tissue extracts were diluted 1:100.

b) Particle counts shown represent the average of the total number of virus particles on five sheets of 9×7.5 cm negatives taken at ×4,000.