

Leaf-dip serologyとmulti-dish tray法によるジャガイモウイルスの診断

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	李, 淳炯 仙北, 俊弘 小島, 誠 四方, 英四郎
発行元	日本植物病理學會
巻/号	45巻2号
巻号補足	
掲載ページ	p. 255-257
発行年月	1979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



Leaf-dip serology と multi-dish tray 法による

ジャガイモウイルスの診断

李 淳炯*・仙北俊弘**・小島 誠***・四方英四郎**

Soon Hyung LEE*, Toshihiro SENBOKU**, Makoto KOJIMA*** and Eishiro SHIKATA:**
Diagnosis of Potato Viruses — Leaf-dip Serology and Multi-dish Tray Test —

血清反応はその特異性の高さと簡便さから多くのウイルス病の診断に広く応用されている。そのようなことを背景に血清反応における手技も年々改良が加えられ、また新しい方法も開発されている。最近、筆者らは、従来の dip 法に血清反応を折り込んだ leaf-dip serology^{1,2,3)} と組織培養用の tray を用いた micro-precipitin test の改良法 multi-dish tray 法⁴⁾ を開発し、その有用性を報告した。本報告ではこれら血清学的手技の応用例として、北海道のジャガイモウイルスの診断を試みた結果について述べる。昭和50年、北海道各地からウイルス病と思われるジャガイモ46株を採集し、ジャガイモXウイルス (PVX)、ジャガイモSウイルス (PVS) を対象として、上記方法と電顕による粒子観察、指標植物への接種などを組合わせて診断を行なった。供試した抗血清の力価は、2倍希釈粗汁液を抗原に用いた時、multi-dish tray 法で抗 PVX 血清が 1:1024 で、抗 PVS 血清は 1:4096 であった⁵⁾。Leaf-dip serology には、両血清とも酢酸アンモニウム (0.001M, pH7.0) で1,000倍希釈したものを使用した。また、PVX 検定のためのスライド反応には8倍希釈の抗 PVX 血清を用い、PVS 検定のための multi-dish tray 法には2~128倍希釈抗 PVS 血清をそれぞれ使用した。また、接種試験では PVX に対してセンニチコウ (*Gomphrena globosa*)、PVS には *Chenopodium quinoa* をそれぞれ指標植物として用いた。

Dip 法

採集した46株のジャガイモの複葉の一部を生葉のままペトリ皿に保ち、dip 法の試料とした。Glow discharge を施したカーボン補強ホルムバル支持膜上に2%PTAを1滴とり、その中に試料を dip し、電顕観察を行なった。46試料中から紐状ないし桿状ウイルスが単独ないし混合して観察された (表1)。

Leaf-dip serology

上記 dip 法同様、生葉を用い、支持膜上の希釈抗血清中に試料を dip し、37°C、15分間反応させ、乾燥後2%PTAで染色し、電顕観察に供した。その結果、前述の dip 法ではウイルス粒子が検出されなかった2試料を加えた42試料からウイルスが検出された。そのうち20株が PVX 単独感染、9株が PVS 単独感染、13株が両ウイルスの重複感染であることが明らかとなった (表1)。図1に dip 法による PVX 粒子、図2に leaf-dip serology による抗 PVX 血清と PVX 粒子の反応、また図3に dip 法による PVS 粒子、図4に leaf-dip serology による抗 PVS 血清と PVS 粒子の反応を示した。図に示すごとく両ウイルスの反応は容易に識別できた。44株から任意抽出した22株につき、抗 PVX 血清を用い、常法に従いスライドテストを行なってみたが、No. 49の1例を除き leaf-dip serology の結果とよく一致した。

Multi-dish tray 法

上記スライドテストに供した株に No.60を加えた23株につき、抗 PVS 血清を用いた muti-dish tray 法を併行した。抗原として、凍結葉を10倍量の生理的食塩

* 韓国農業技術研究所 Department Plant Pathology, Institute of Agricultural Sciences, Suwon, Korea.

** 北海道大学農学部 Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan.

*** 新潟大学農学部 Faculty of Agriculture, Niigata university, Niigata 950, Japan.

1) Ball, E. M. and Brakke, M. K. (1968). Virology 36 : 152-155. 2) 四方英四郎・上田一郎・小島 誠 (1974). 日植病報 40 : 118. 3) 四方英四郎・小島 誠 (1978). 日植病報 44 : 28-34.

4) 四方英四郎・李 淳炯・小島 誠・仙北俊弘 (1976). 日植病報 42 : 386. 5) 李 淳炯・仙北俊弘・小島 誠・四方英四郎 (1976). 日植病報 42:92.

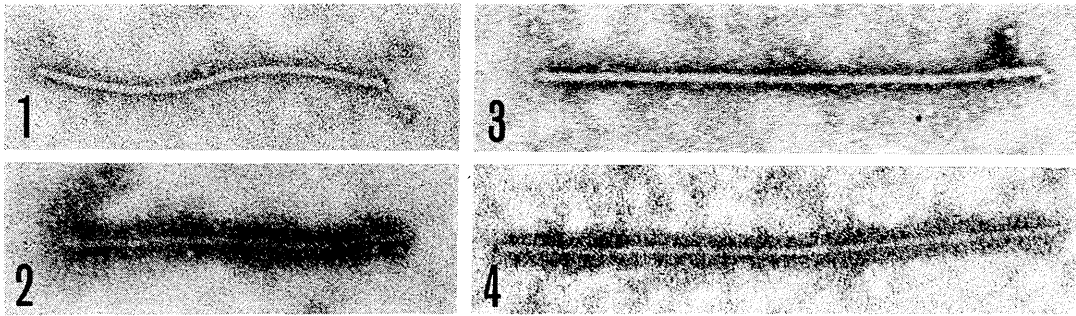


図 説 明 1 ; dip 法による PVX 粒子, ($\times 30,000$).
 2 ; leaf-dip serology による PVX 粒子, (抗 PVX 血清+PVX 粒子) ($\times 30,000$).
 3 ; dip 法による PVS 粒子, ($\times 30,000$).
 4 ; leaf-dip serology による PVS 粒子, (抗 PVS 血清+PVS 粒子) ($\times 30,000$).

水を加え磨砕し, 低速遠心した上清を用いた。抗原と抗血清を各0.025ml 宛加え, 混合した後, 流動パラフィン0.03ml を注入し, 37C, 1時間静置し, 暗視野顕微鏡で観察した。その結果, 19例は他の方法による結果と合致したが, 4例に不一致があった(表1)。

即ち, leaf-dip serology で陰性であった No. 28 が本法で陽性であり, 逆に No. 105, 114, 118の3例では leaf-dip serology が陽性であったが, 本法では陰性であった。

以上の実験から, 接種検定によらなくとも, おおよ

表1 Dip 法, dip serology ならびに multi-dish tray 法によるジャガイモウイルスの診断例

株番号 (No.)	品 種	病 徴	採集地	電 顕 ^{a)}				血清反応 ^{b)}		接種試験 ^{c)}	
				dip 法		dip serology		スライド 法	MDT法	PVX	PVS
				縦 状	桿 状	PVX	PVS				
26	紅 丸	脈 間 退 緑	北 見	+	—	+	—	+	—	•	•
28	"	"	"	+	—	+	—	+	+	•	•
40	農 林 1 号	"	"	—	+	+	+	+	+	•	•
41	紅 丸	"	中 標 津	+	—	+	—	•	•	+	—
44	"	"	"	+	—	+	—	+	—	•	•
45	"	無 病 徴	"	—	—	+	+	•	•	+	+
46	農 林 1 号	脈 間 退 緑	"	—	+	+	+	•	•	—	+
49	メークイン	"	"	+	—	+	—	•	•	—	+
50	紅 丸	モ ザ イ ク	"	+	—	+	—	+	—	•	•
54	"	脈 間 退 緑	"	+	—	+	•	•	•	+	—
59	"	"	"	+	—	+	•	+	+	•	•
60	"	"	"	+	—	+	•	•	+	•	•
96	エ ニ ワ	"	大 正	—	+	—	+	—	+	•	•
105	紅 丸	"	中 標 津	—	+	—	+	—	—	•	•
106	エ ニ ワ	無 病 徴	"	—	+	—	+	•	•	—	+
110	農 林 1 号	脈 間 退 緑	音 更	+	—	+	•	+	—	•	•
111	"	"	"	+	+	+	+	•	•	+	+
114	"	微斑モザイク	士 幌	+	+	+	+	+	—	•	•
116	"	脈 間 退 緑	"	+	+	+	+	+	+	•	•
118	"	"	"	+	+	+	+	+	—	•	•

a) dip 法+-: ウイルスの有無(++++は粒子の多少を示す), dip serology+-: 反応の有無

b) +-: 反応の有無, MDT 法: multi-dish tray 法

c) +-: 指標植物上での局部病斑の有無

d) 試験を行なわなかった区

そ dip 法だけでもウイルス 感染の 有無を知ることができたが、抗血清を用いた leaf-dip serology,あるいは multi-dish tray 法によって正確なウイルスの同定が可能となった。Leaf-dip serology は極く少量の抗血清で済むこと、通常の dip 法とはほぼ同様な手順で極めて簡便で、しかも適確にウイルスを同定できるので、PVX, PVS などの紐状ないし桿状ウイルスの診断には最も適した方法であると考ええる。また、multi-

dish tray 法は試験管内での沈降反応混合法に比べ抗原ウイルス液が極く少量でよいこと、抗血清が節約できること、また流動パラフィンで反応液を覆うため、乾燥防止ができ、一つの tray で96の 反応が見れること、暗視野顕微鏡で反応を観察するため誤読が少ないなどの利点が多く、電顕使用が不可能な場合のウイルス診断に効果的な方法と考えられる。

(1978年 8月28日受理)