



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                  |   |
|------------------|---|
| Title            | 電子顕微鏡によるマメ類ウイルスの検出 : glow discharge 効果 leaf-dip serology                          |
| Author(s)        | 中曽根, 恒一; NAKASONE, Koichi; 仙北, 俊弘 他   |
| Citation         | 北海道大学農学部邦文紀要, 11(2), 149-160  |
| Issue Date       | 1978-09-29  |
| Doc URL          | <a href="https://hdl.handle.net/2115/11912">https://hdl.handle.net/2115/11912</a> |
| Type             | departmental bulletin paper   |
| File Information | 11(2)_p149-160.pdf  |



# 電子顕微鏡によるマメ類ウイルスの検出

— glow discharge 効果と leaf-dip serology\* —

中曾根恒一・仙北俊弘

小島 誠・四方英四郎

(北海道大学農学部植物学教室)

(昭和52年12月13日受理)

## Detection of Legume Viruses by Electron Microscopy

: Glow discharge effect and leaf-dip serology

Koichi NAKASONE, Toshihiro SENBOKU, Makoto KOJIMA  
and Eishiro SHIKATA

(Department of Botany, Faculty of Agriculture,  
Hokkaido University)

### 緒 言

dip 法 (BRANDES, 1957)<sup>2)</sup> による植物ウイルスの検出は、接種試験や血清学的試験に比べて、その簡易な点から広く用いられている。しかしマメ類を侵すウイルスのように potyvirus 群に属するウイルスが多く含まれていると、形態的に類似しているため同定が困難である。

leaf-dip serology (BALL and BRAKKE, 1968)<sup>1)</sup> は dip 法と抗原抗体反応を組み合わせたもので、ウイルスの検出と同時にその同定が可能で、potyvirus 群のウイルスによる混合感染も容易にそれぞれのウイルスを判別できる。四方ら (1974)<sup>3)</sup> は同法を用いて各種ウイルスの反応を観察しており、その有効性を報告している。

dip 法あるいは leaf-dip serology によりウイルスの検出を行なうに際し、試料が支持膜上に均一に広がらないと、検出精度も悪く、抗原抗体反応も識別し難い。とくにカーボン補強膜は疎水性が強いため試料分散に難点があった。これまで膜面親水性化の方法として血清アルブミンや界面活性剤 (土居ら, 1969)<sup>3)</sup> が利用されてきたが、最近深井ら (1972)<sup>4)</sup> は、glow discharge 法によってカーボン蒸着膜を容易に親水性化し、試料の分散をよくすることができることを報告している。

本報告は、dip 法あるいは leaf-dip serology による

ウイルス検出における glow discharge 処理膜の有効性について述べ、北海道のインゲンについて電子顕微鏡 (電頭) と接種試験によるウイルス検出をあわせて行ない、比較検討した結果をまとめたものである。

### 実験材料および方法

試料支持膜はカーボン補強フオルムパール膜に 30 秒間 glow discharge 処理したものを用いた。glow discharge 装置はガラスデンシケーターを利用した自作のものを用いた。用いた電頭は JEM 5 Y (80 kV) である。

**dip および leaf-dip serology 試料作製法** dip 試料は 2% 燐タングステン酸 (PTA) pH 7.0 によるネガティブ染色を行なった。leaf-dip serology 試料は支持膜に、0.001 M 酢酸アンモニウムで 1,000 倍に希釈した抗血清をのせ、それに病葉を dip し、40°C 恒温器内で 30 分間静置後 PTA でネガティブ染色した。

**glow discharge 効果試験** あらかじめ 30 秒間 glow discharge 処理した支持膜と無処理支持膜を用い、dip 法により試料を作製し電顕観察した。供試ウイルスはインゲン黄斑モザイクウイルス CS 系統 (BYMV-CS 久米ら, 1970)<sup>6)</sup> およびジャガイモ Y ウイルス (PVY) で、それぞれのウイルスに感染したソラマメ (早生, *Vicia faba* L.) および *Nicotiana sylvestris* SPEG. & COMES

\* 本研究の一部は昭和 51 年度豆類基金協会の研究費による。

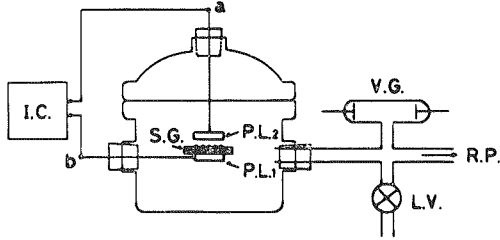
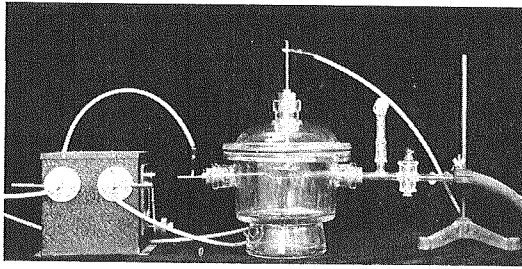


Fig. 1. The glow discharge apparatus.

I.C. : Induction Coil  
 L.V. : Leak Valve  
 P.L. : Plate  
 R.P. : Rotary Pump  
 S.G. : Grids on Slide Glass  
 V.G. : Vacuum Gauge

の上葉をウイルス源とした。電顕は直接倍率 10,000 倍で観察し、写真撮影視野内 (フィルムに写る範囲) のウイルス数を数えた。なお各ウイルスにつき 5 枚の支持膜を用意し、1 枚ごとに任意の 5 つの目 (opening) を選ぶ各目の中の任意の 5 視野を観察視野とした。

**leaf-dip serology における抗血清の保存限度と希釈限度** この実験には、抗血清は抗 BYMV-CS 血清 (力価 1/1024 重層法による) を供試した。保存限度試験には 0.001 M 酢酸アンモニウムおよび 0.0015 M 塩化ナトリウムで 1,000 倍に希釈した抗血清を、5°C と -25°C で保存したものを用いた。また 5°C と -25°C に保存し反応直前に希釈した抗血清を対照とした。希釈限度試験は 0.001 M 酢酸アンモニウムによる 1,000 倍希釈抗血清を対照として、2,000, 3,000, 4,000 倍抗血清を用いた。BYMV-CS に感染したソラマメ葉をウイルス源として leaf-dip serology を行ない電顕観察した。

**一般圃場のインゲンからのウイルス検出** 北海道各地よりウイルスに感染していると思われるインゲン (*Phaseolus vulgaris* L.) 49 株を採集し実験に供した。dip 法および leaf-dip serology (抗 BYMV-CS 血清を使用) による検出を行ない、接種試験結果と比較した。接種は、凍結病葉を 0.1 M 磷酸緩衝液 pH 7.0 を加えて磨

碎し、常法に従いカーボランダムを用いて検定植物 (インゲン (銀手亡), ソラマメ (早生)) に汁液接種を行なった。

## 実験結果

### 1. dip 法における glow discharge 効果

Table 1, 2 に示すように、無処理膜では処理膜に比べウイルスの観察されなかった視野が多く、観察されたウイルス粒子の絶対数も少なかった。また無処理膜ではウイルスと染色液の支持膜上における分散も劣っており、支持膜上に染色液が均一に拡がらず、凝集するため支持膜の破損も起きやすかった。これに対して glow discharge 処理を行なった支持膜では、観察した視野の中にウイルス粒子の見つからなかった視野は殆んど無く、1 視野中のウイルス数も多いことから、本法によってウイルスの検出精度が高まったといえる。

### 2. leaf-dip serology における抗血清の保存限度

Table 3 に示すように 5°C および -25°C で保存した抗血清は、6 ヶ月後も対照と同様に顕著な反応が観察された。希釈溶媒として酢酸アンモニウムあるいは塩化ナトリウムいずれを用いた場合でも、反応の判定に顕著な差は認められなかった。

### 3. leaf-dip serology における抗血清の希釈限度

Table 4 に示すように反応は抗血清の 2,000 倍希釈までは顕著に認められたが、3,000 倍希釈では反応が確認できないことが多かった。

### 4. 電顕および接種試験によるインゲンからのウイルス検出

供試インゲン 49 株の内 17 株から dip 法により potyvirus 群ウイルスと思われる長さ約 750 nm の糸状ウイルスが検出された (Table 5)。さらに、この 17 株中 9 株から leaf-dip serology により BYMV が検出された (Table 5)。接種試験ではインゲンに葉脈緑帯を示しソラマメに感染しないウイルス (11 株) とインゲンおよびソラマメにモザイクやえそ症状を示すウイルス (10 株) が分離されたが、これらのウイルスはそれぞれインゲンモザイクウイルス (BCMV), BYMV とと思われる (村山ら, 1975<sup>7)</sup>)。また供試株の内 4 株がインゲンあるいはソラマメに病徴を示したが、本試験では同定されるに至らなかった。

電顕による検出結果を接種試験の結果と比較すると、1) dip 法でウイルスが検出された 17 株の内、接種試験では全ての株からウイルスが検出された (Table 6)。また、2) dip 法でウイルスが検出されなかった残り 32 株中 8 株から接種試験によりウイルスが検出された。leaf-

**Table 1.** Effect of glow discharge-treated films on detection of BYMV

| Treated films     |                                       |    |    |    |    | Non-treated films |                   |                                       |   |   |   |   |         |
|-------------------|---------------------------------------|----|----|----|----|-------------------|-------------------|---------------------------------------|---|---|---|---|---------|
| Openings of grids | Number of particles in each exposure* |    |    |    |    | average           | Openings of grids | Number of particles in each exposure* |   |   |   |   | average |
| a                 | 4                                     | 9  | 5  | 8  | 3  | 5.8               | a                 | 1                                     | 0 | 1 | 0 | 0 | 0.4     |
| b                 | 4                                     | 4  | 5  | 8  | 6  | 5.4               | b                 | 2                                     | 2 | 0 | 0 | 0 | 0.8     |
| c                 | 4                                     | 6  | 4  | 11 | 8  | 6.6               | c                 | 0                                     | 0 | 0 | 0 | 0 | 0       |
| d                 | 6                                     | 9  | 8  | 7  | 13 | 8.6               | d                 | 1                                     | 2 | 0 | 1 | 0 | 0.8     |
| e                 | 7                                     | 3  | 4  | 4  | 2  | 4.0               | e                 | 3                                     | 1 | 1 | 6 | 6 | 3.4     |
| average           |                                       |    |    |    |    | 6.1               | average           |                                       |   |   |   |   | 1.1     |
| a                 | 3                                     | 8  | 7  | 5  | 10 | 6.6               | a                 | 2                                     | 0 | 0 | 0 | 1 | 0.6     |
| b                 | 4                                     | 2  | 5  | 2  | 6  | 3.8               | b                 | 0                                     | 0 | 0 | 0 | 0 | 0       |
| c                 | 4                                     | 8  | 6  | 5  | 0  | 4.6               | c                 | 3                                     | 2 | 0 | 3 | 5 | 2.6     |
| d                 | 4                                     | 3  | 7  | 6  | 5  | 5.0               | d                 | 1                                     | 1 | 0 | 1 | 0 | 0.6     |
| e                 | 5                                     | 7  | 3  | 6  | 5  | 5.2               | e                 | 3                                     | 0 | 0 | 1 | 1 | 1.0     |
| average           |                                       |    |    |    |    | 5.0               | average           |                                       |   |   |   |   | 1.0     |
| a                 | 16                                    | 11 | 17 | 10 | 13 | 13.4              | a                 | 2                                     | 0 | 2 | 0 | 0 | 0.8     |
| b                 | 8                                     | 9  | 7  | 8  | 8  | 8.0               | b                 | 1                                     | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.2     |
| c                 | 7                                     | 14 | 6  | 8  | 10 | 9.0               | c                 | 2                                     | 0 | 1 | 0 | 0 | 0.6     |
| d                 | 6                                     | 11 | 12 | 11 | 13 | 10.6              | d                 | 3                                     | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.6     |
| e                 | 10                                    | 7  | 7  | 15 | 14 | 10.6              | e                 | 2                                     | 1 | 0 | 2 | 1 | 1.2     |
| average           |                                       |    |    |    |    | 10.3              | average           |                                       |   |   |   |   | 0.7     |
| a                 | 5                                     | 7  | 1  | 0  | 3  | 3.2               | a                 | 11                                    | 9 | 0 | 0 | 0 | 4.0     |
| b                 | 3                                     | 9  | 5  | 2  | 2  | 4.2               | b                 | 1                                     | 2 | 0 | 1 | 0 | 0.8     |
| c                 | 2                                     | 0  | 4  | 0  | 3  | 1.8               | c                 | 0                                     | 0 | 0 | 0 | 0 | 0       |
| d                 | 6                                     | 3  | 7  | 6  | 5  | 4.2               | d                 | 1                                     | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.2     |
| e                 | 0                                     | 2  | 4  | 6  | 6  | 3.6               | e                 | 3                                     | 0 | 3 | 1 | 0 | 1.4     |
| average           |                                       |    |    |    |    | 3.4               | average           |                                       |   |   |   |   | 1.3     |
| a                 | 13                                    | 6  | 4  | 7  | 4  | 6.8               | a                 | 4                                     | 0 | 2 | 2 | 0 | 1.6     |
| b                 | 9                                     | 8  | 5  | 10 | 2  | 6.8               | b                 | 0                                     | 0 | 0 | 0 | 0 | 0       |
| c                 | 4                                     | 8  | 13 | 11 | 6  | 8.4               | c                 | 0                                     | 0 | 0 | 0 | 0 | 0       |
| d                 | 6                                     | 4  | 6  | 4  | 3  | 4.6               | d                 | 6                                     | 6 | 0 | 1 | 0 | 2.6     |
| e                 | 8                                     | 2  | 11 | 3  | 8  | 6.4               | e                 | 2                                     | 1 | 0 | 0 | 1 | 0.8     |
| average           |                                       |    |    |    |    | 6.6               | average           |                                       |   |   |   |   | 1.0     |

\* about 50×70 mm<sup>2</sup>, at ×10,000

Table 2. Effect of glow discharge-treated films on detection of PVY

| Treated films     |                                       |   |    |   |    |         | Non-treated films |                                       |   |   |   |   |   |         |
|-------------------|---------------------------------------|---|----|---|----|---------|-------------------|---------------------------------------|---|---|---|---|---|---------|
| Openings of grids | Number of particles in each exposure* |   |    |   |    |         | Openings of grids | Number of particles in each exposure* |   |   |   |   |   |         |
|                   |                                       |   |    |   |    | average |                   |                                       |   |   |   |   |   | average |
| a                 | 8                                     | 6 | 5  | 4 | 6  | 5.8     | a                 | 1                                     | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0.4     |
| b                 | 6                                     | 7 | 3  | 9 | 3  | 5.6     | b                 | 0                                     | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.2     |
| c                 | 7                                     | 3 | 3  | 9 | 1  | 4.6     | c                 | 1                                     | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 1.2     |
| d                 | 6                                     | 5 | 14 | 6 | 10 | 8.2     | d                 | 0                                     | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0       |
| e                 | 8                                     | 4 | 5  | 0 | 7  | 4.8     | e                 | 1                                     | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 1.0     |
| average           |                                       |   |    |   |    | 5.8     | average           |                                       |   |   |   |   |   | 0.6     |
| a                 | 2                                     | 5 | 3  | 4 | 2  | 3.2     | a                 | 2                                     | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.4     |
| b                 | 2                                     | 1 | 2  | 1 | 2  | 1.6     | b                 | 0                                     | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0       |
| c                 | 2                                     | 1 | 3  | 0 | 1  | 1.4     | c                 | 5                                     | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1.8     |
| d                 | 3                                     | 1 | 4  | 2 | 1  | 2.2     | d                 | 2                                     | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0.6     |
| e                 | 1                                     | 1 | 1  | 2 | 3  | 1.6     | e                 | 5                                     | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2.0     |
| average           |                                       |   |    |   |    | 2.0     | average           |                                       |   |   |   |   |   | 1.0     |
| a                 | 2                                     | 1 | 3  | 2 | 0  | 1.6     | a                 | 1                                     | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.2     |
| b                 | 2                                     | 0 | 4  | 0 | 1  | 1.4     | b                 | 0                                     | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0.4     |
| c                 | 2                                     | 3 | 0  | 5 | 0  | 2.0     | c                 | 0                                     | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0       |
| d                 | 1                                     | 3 | 5  | 2 | 1  | 2.0     | d                 | 0                                     | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0       |
| e                 | 1                                     | 0 | 3  | 0 | 1  | 1.6     | e                 | 0                                     | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.0     |
| average           |                                       |   |    |   |    | 1.7     | average           |                                       |   |   |   |   |   | 0.3     |
| a                 | 1                                     | 1 | 1  | 0 | 4  | 1.4     | a                 | 7                                     | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1.8     |
| b                 | 3                                     | 5 | 0  | 1 | 3  | 2.4     | b                 | 2                                     | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1.0     |
| c                 | 1                                     | 2 | 1  | 3 | 0  | 1.4     | c                 | 0                                     | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0.6     |
| d                 | 4                                     | 2 | 1  | 6 | 2  | 3.0     | d                 | 0                                     | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.2     |
| e                 | 5                                     | 3 | 1  | 1 | 0  | 2.0     | e                 | 0                                     | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0       |
| average           |                                       |   |    |   |    | 2.0     | average           |                                       |   |   |   |   |   | 0.7     |
| a                 | 3                                     | 2 | 7  | 4 | 2  | 3.6     | a                 | 0                                     | 2 | 4 | 2 | 0 | 0 | 1.6     |
| b                 | 1                                     | 3 | 4  | 4 | 1  | 2.6     | d                 | 0                                     | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.2     |
| c                 | 2                                     | 1 | 3  | 5 | 2  | 2.6     | c                 | 5                                     | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2.2     |
| d                 | 5                                     | 1 | 1  | 0 | 9  | 3.2     | d                 | 0                                     | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0.2     |
| e                 | 3                                     | 2 | 2  | 0 | 2  | 1.8     | e                 | 1                                     | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.2     |
| average           |                                       |   |    |   |    | 2.8     | average           |                                       |   |   |   |   |   | 0.9     |

\* about 50×70 mm<sup>2</sup>, at 10,000

**Table 3.** Effect of storage of the 1,000-fold diluted BYMV-antiserum used in leaf-dip serology

| Temperature<br>Diluted in<br>Months | 5°C              |               | -25°C            |               |
|-------------------------------------|------------------|---------------|------------------|---------------|
|                                     | Ammonium acetate | NaCl solution | Ammonium acetate | NaCl solution |
| 3                                   | +                | +             | +                | +             |
| 6                                   | +                | +             | +                | +             |

\* positive reaction.

**Table 4.** Dilution end-point of the BYMV-antiserum used in leaf-dip serology

| Dilution (×) | 1,000 | 2,000 | 3,000 | 4,000 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|
| Reaction     | +     | +     | ±     | -     |

**Table 5.** Results of virus detection from French bean plants infected in the fields of Hokkaido

| No. | Cultivars              | Localities | Symptom | EM detection      |                                   | Sap inoculation        |                       | Identification |
|-----|------------------------|------------|---------|-------------------|-----------------------------------|------------------------|-----------------------|----------------|
|     |                        |            |         | dip <sup>a)</sup> | dip-serology (BYMV) <sup>b)</sup> | Symptom on French bean | Symptom on Broad bean |                |
| 1   | Ōfuku                  | Abuta      | M       | +                 | -                                 | BCM                    | -                     | BCMV           |
| 2   | Toramame (Chūiku T 11) | Abuta      | M       | +                 | -                                 | BCM                    | -                     | BCMV           |
| 3   | Toramame (Chūiku T 11) | Abuta      | M       | +                 | -                                 | BCM                    | -                     | BCMV           |
| 4   | Shirohana-mame         | Abuta      | M       | -                 | -                                 | BCM                    | -                     | BCMV           |
| 5   | Toramame (Chūiku T 11) | Abuta      | M       | +                 | -                                 | BCM                    | -                     | BCMV           |
| 6   | Toramame (Chūiku T 11) | Abuta      | M       | +                 | -                                 | BCM                    | -                     | BCMV           |
| 7   | Ōshirohana             | Abuta      | M       | -                 | -                                 | BCM                    | -                     | BCMV           |
| 8   | Ōshirohana             | Abuta      | M       | -                 | -                                 | -                      | -                     |                |
| 9   | Wasetoramame           | Tōya       | M       | -                 | -                                 | -                      | -                     |                |
| 10  | Wasetoramame           | Tōya       | M       | -                 | -                                 | -                      | -                     |                |
| 11  | Wasetoramame           | Tōya       | M       | -                 | -                                 | -                      | -                     |                |
| 12  | Toramame               | Tōya       | M       | +                 | +                                 | BYM, N                 | N                     | BYMV           |
| 13  | Toramame               | Tōya       | M       | -                 | -                                 | -                      | -                     |                |
| 14  | Ōfuku                  | Tōya       | M       | -                 | -                                 | -                      | -                     |                |
| 15  | Shirohana-mame         | Naganuma   | Mo      | -                 | -                                 | -                      | -                     |                |
| 16  | Akahana-mame           | Naganuma   | Mo      | -                 | -                                 | -                      | -                     |                |
| 17  | Ōfuku                  | Naganuma   | VN, M   | +                 | +                                 | SN                     | N                     | BYMV           |
| 18  | Taishōkintoki          | Takikawa   | D, M    | +                 | +                                 | M                      | N                     | BYMV           |
| 19  | Taishōkintoki          | Takikawa   | D, M    | +                 | +                                 | M                      | N                     | BYMV           |
| 20  | Taishōkintoki          | Takikawa   | BYM     | +                 | +                                 | BYM                    | M, N                  | BYMV           |

| No. | Cultivars              | Localities   | Symptom | EM detection      |                                   | Sap inoculation        |                       | Identification |
|-----|------------------------|--------------|---------|-------------------|-----------------------------------|------------------------|-----------------------|----------------|
|     |                        |              |         | dip <sup>a)</sup> | dip-serology (BYMV) <sup>b)</sup> | Symptom on French bean | Symptom on Broad bean |                |
| 21  | Fukushiro              | Takikawa     | BYM     | +                 | +                                 | BYM                    | N                     | BYMV           |
| 22  | Ōfuku                  | Aino-nai     | SN      | +                 | +                                 | BYM, SN                | N                     | BYMV           |
| 23  | Shirohana-mame         | Oketo        | M       | -                 | -                                 | -                      | -                     |                |
| 24  | Shirohana-mame         | Oketo        | Mo      | -                 | -                                 | -                      | -                     |                |
| 25  | <i>Shirohana-mame</i>  | <i>Oketo</i> | M       | -                 | -                                 | -                      | -                     |                |
| 26  | Shirohana-mame         | Oketo        | VN, Y   | -                 | -                                 | -                      | -                     |                |
| 27  | Toramame (Chūiku T 25) | Kunneppu     | M       | -                 | -                                 | -                      | -                     |                |
| 28  | Toramame (Chūiku T 25) | Kunneppu     | Mal, YS | -                 | -                                 | -                      | -                     |                |
| 29  | Toramame (Chūiku T 25) | Kunneppu     | SN      | -                 | -                                 | -                      | -                     |                |
| 30  | Toramame (Chūiku T 25) | Kunneppu     | M, YS   | -                 | -                                 | BCM                    | -                     | BCM            |
| 31  | Tenashiōtebō           | Koshimizu    | SN      | -                 | -                                 | -                      | -                     |                |
| 32  | Ōfuku                  | Memambetsu   | SN      | -                 | -                                 | BYM, SN                | N                     | BYMV           |
| 33  | Ōfuku                  | Memambetsu   | BCM     | +                 | -                                 | BCM                    | -                     | BCM            |
| 34  | Ōfuku                  | Memambetsu   | BCM     | +                 | -                                 | BCM                    | -                     | BCM            |
| 35  | Ōfuku                  | Memambetsu   | BYM     | -                 | -                                 | BYM, VN                | -                     |                |
| 36  | Ōfuku                  | Memambetsu   | VC      | -                 | -                                 | BYM                    | -                     |                |
| 37  | Waseōfuku              | Memambetsu   | SN      | -                 | -                                 | -                      | -                     |                |
| 38  | Waseōfuku              | Memambetsu   | BCM     | +                 | -                                 | BCM                    | -                     | BCM            |
| 39  | Waseōfuku              | Memambetsu   | BYM     | +                 | +                                 | M, Mal                 | -                     |                |
| 40  | Toramame               | Memambetsu   | YS      | -                 | -                                 | -                      | -                     |                |
| 41  | Taishōkintoki          | Memambetsu   | Y       | -                 | -                                 | -                      | -                     |                |
| 42  | Puebla 152             | Memuro       | SN      | +                 | +                                 | BYM, SN                | N                     | BYMV           |
| 43  | Fukuryūchūnaga         | Memuro       | YS      | -                 | -                                 | -                      | -                     |                |
| 44  | Fukuryūchūnaga         | Memuro       | YS      | -                 | -                                 | M                      | N                     | BYMV           |
| 45  | Fukuryūchūnaga         | Memuro       | YS      | -                 | -                                 | -                      | M                     |                |
| 46  | Himetebō               | Ashoro       | SN      | -                 | -                                 | -                      | -                     |                |
| 47  | Himetebō               | Ashoro       | SN      | -                 | -                                 | -                      | -                     |                |
| 48  | Himetebō               | Ashoro       | SN      | -                 | -                                 | -                      | -                     |                |
| 49  | Tenashitebō            | Honbetsu     | SN      | -                 | -                                 | -                      | -                     |                |

a) Detection of potyviruses by dip method

b) Detection of BYMV by leaf-dip serology

Abbreviation:

BCM: BCMV-type mosaic, BYM: BYMV-type mosaic, D: Dwarf, M: Mosaic, Mal: Malformation, Mo: Mottling, N: Necrosis, SN: Stem necrosis, VB: Vein banding, VC: Vein clearing, YS: Yellow spot

**Table 6.** Results of detection of potyviruses from French bean plants by dip method

| Total number of plants  |                   | 49 |    |
|---|-------------------|----|----|
| Number of plants that potyviruses were detected by dip method |                   | +  | -  |
|   |                   | 17 | 32 |
| Mechanical inoculation  | BCMV              | 8  | 3  |
|   | BYMV              | 8  | 2  |
|   | Uncertain viruses | 1  | 3  |
|   | Healthy           | 0  | 24 |

**Table 7.** Results of detection of BYMV from French bean plants by leaf-dip serology

| Number of plants that potyviruses were detected by dip method |                   | 17 |   |
|---|-------------------|----|---|
| Number of plants that BYMV was detected by leaf-dip serology  |                   | +  | - |
|   |                   | 9  | 8 |
| Mechanical inoculation  | BCMV              | 0  | 8 |
|   | BYMV              | 8  | 0 |
|   | Uncertain viruses | 1  | 0 |
|   | Healthy           | 0  | 0 |

dip serology により BYMV が検出された 9 株の内 8 株が、接種試験で BYMV と同定された (Table 7)。逆に leaf-dip serology で BYMV と判定されなかった 8 株の内、接種試験で BYMV と同定された株はなく、全て BCMV と同定された (Table 7)。

## 考 察

### 1. glow discharge 効果

dip 法によりウイルスを検出する場合、ウイルスが支持膜上により多く、かつ均一に分散することが、検出の速さ・確実さに重要な意味をもつ。それには染色液の膜面への展着性を高めることが必要である。しかしカーボン補強膜は疎水性のため膜上での分散が均一にならない。土居ら (1969)<sup>3)</sup> は PTA にドライウエルを添加することにより展着性を高める方法を報告している。しかし界面活性剤はきわめて低濃度で、場合によってはウイルス粒子を破壊する恐れがないとはいえない。またドライウエル添加で検出ウイルス数が無添加よりも減少したと

の報告もある (後藤, 1976)<sup>5)</sup>。本実験の結果では、glow discharge 法により処理した膜面は、親水性に変わり、染色液が膜面全体に均一に広がった。また Table 1, 2 のようにウイルス粒子の分散および検出率についても、処理膜が未処理膜にまさっていた。このように glow discharge 処理膜は、dip 法によるウイルス検出上きわめて有効であると思われる。

### 2. leaf-dip serology の反応条件

BALL and BRAKKE (1968)<sup>1)</sup> は 10 倍希釈した抗血清を凍結保存し、使用時に 1,000 倍に希釈して用いた。しかし、1,000 倍希釈抗血清は少なくとも 6 ヶ月の保存が可能であった。また凍結保存した希釈抗血清と冷室に保存した希釈抗血清の間に差はみられなかった。したがって、試料作製時間を短縮し、検出能率を高めるためには、あらかじめ 1,000 倍希釈抗血清を準備し保存するのがよいように思われる。

酢酸アンモニウムで希釈した抗血清は、塩化ナトリウムによるものよりも力価が低下すると言われるが、現在のところ、乾燥後電顕観察に支障をきたす塩が残らないという点でこれにまさるものがない。0.001 M 酢酸アンモニウムを用いた時の反応は、抗血清の希釈倍数 3,000 倍まではほぼ認められた。しかし、膜面上の植物成分の沈着のため、2,000 倍希釈抗血清でも判定が困難な場合もあった。また、1,000 倍以下の希釈抗血清では視野が暗くなり観察し難いこともあって、leaf-dip serology には 1,000 倍希釈抗血清が適当であると思われる。しかし抗血清の適当な希釈倍数は抗血清の力価にも関係するので、leaf-dip serology には 1,000 倍以上の希釈に耐える高力価の抗血清が必要である。

### 3. 電顕によるウイルス検出

植物ウイルスの検出を行なう場合、電顕による検出はその簡易なこと、判定が迅速であることで他の方法をしのぐものである。しかし最も重要なことはその検出の精度であり、電顕による検出の精度が血清学的試験や接種試験に劣るか否かが問題である。

北海道のインゲンのウイルスの内 potyvirus 群に属する BCMV, BYMV を対象として、dip 法および leaf-dip serology 法によるウイルス検出結果を接種試験による検出結果と比較したが、実験結果に示すように、dip 法および leaf-dip serology による検出結果は接種試験の結果とほとんど一致した。特に leaf-dip serology は dip 法でウイルス粒子検出が容易なウイルスについては、有効かつ簡易なウイルス同定法であると思われる。しかし利用できる種々のウイルスの抗血清を作製

し、その反応を観察しておくことが必要である。

### 摘 要

1. dip法における支持膜の glow discharge 効果を調べた。その結果、glow discharge 処理によりウイルス粒子の分散が良好となり検出率が高まった。

2. leaf-dip serology において、1,000倍希釈抗BYMV-CS血清(力価1/1024)の保存限度は6ヶ月以上、希釈限度は2,000~3,000倍であった。実際には0.001M酢酸アンモニウムにより1,000倍に希釈した抗血清を用い、30分間静置(40°C)後、電顕観察するのがよいように思われた。

3. 北海道各地からウイルス感染と思われるインゲン(49株)を採集し、dip法およびleaf-dip serology、接種試験によりウイルス検出を行ない、比較検討した。

4. dip法では49株中17株からpotyvirus群と思われる糸状ウイルスが検出された。その内9株からleaf-dip serologyによりBYMVが検出された。接種試験ではBCMVが11株、BYMVが10株それぞれ検出された。以上の結果を比較すると、dip法によりウイルスが検出された17株は全て接種試験でも検出され、またdip法で検出されなかった32株の内、接種試験でウイルスが検出されたのは9株であった。leaf-dip serologyによるBYMV検出結果は全て接種試験と一致した。

### 引用文献

1. BALL, E. M. and BRAKKE, M. K.: Leaf-dip serology for electron microscopic identification of plant viruses, *Virology*, **36**: 152-155. 1968
2. BRANDES, J.: Eine elektronenmikroskopische Schnellmethode zum Nachweis faden- und stäbchenförmiger Viren, insbesondere in Kartoffeldunkelkeimen, *Nachrbl. deut. Pflanzenschutzdienst (Braunschweig)*, **9**: 151-152. 1957
3. 土居養二・鳥山重光・与良 清・明日山秀文: ダイレクト・ネガティブ染色による感染植物組織からのウイルス粒子の検出, 日植病報, **35**: 180-187. 1969
4. 深井孝之助・津坂康弘・西村昭子: Glow dischargeによる支持膜の親水性化, —Boy de la Jour 法の紹介—, *J. Elect. Micros.*, **21**: 331-332. 1972
5. 後藤正昭: 電子顕微鏡によるジャガイモウイルス

検定法, 婦恋馬鈴薯原種農場調査研究報告第11号, 1-17. 1976

6. 久米宏毅・田中貞之・村山大記: アカクローバーから分離したインゲン黄斑モザイクウイルス (Bean yellow mosaic virus) の一系統について, 北大農邦文紀, **7**: 435-449. 1970
7. 村山大記・四方英四郎・小島 誠・仙北俊弘・梶原一義・上田一郎: 北海道におけるマメ類ウイルス病に関する研究 第1報 インゲンより分離されたウイルスについて, 北大農邦文紀, **9**: 155-159. 1975
8. 四方英四郎・上田一郎・小島 誠: 植物ウイルスの電子顕微鏡による同定 leaf dip serology, 日植病報, **40**: 118. 1974

### Summary

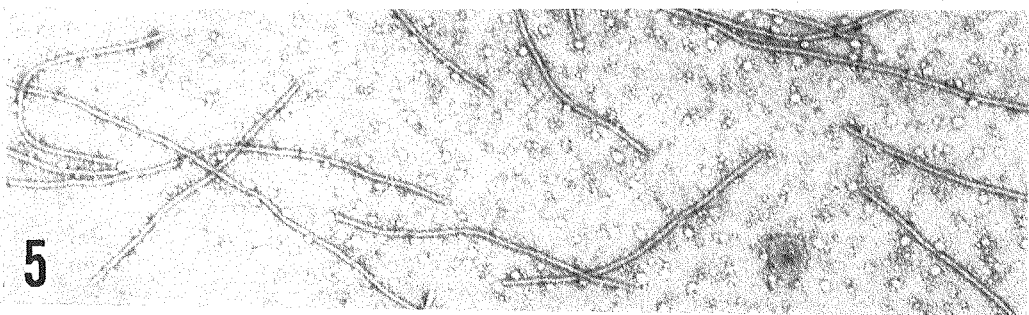
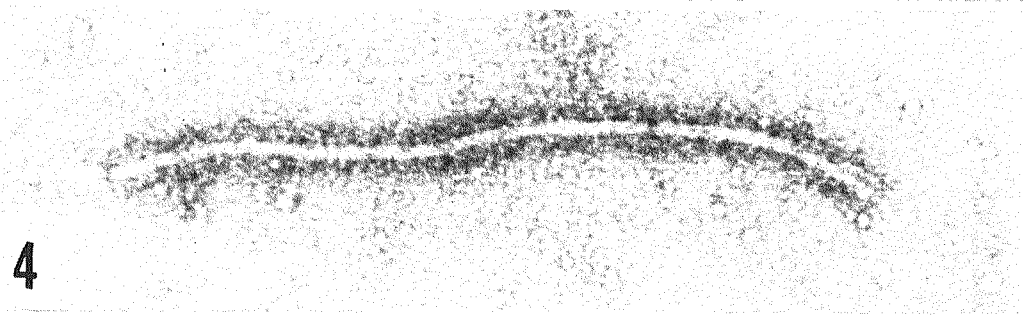
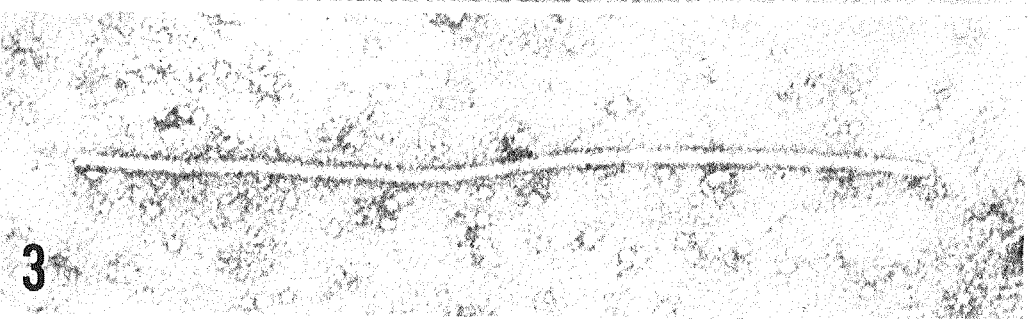
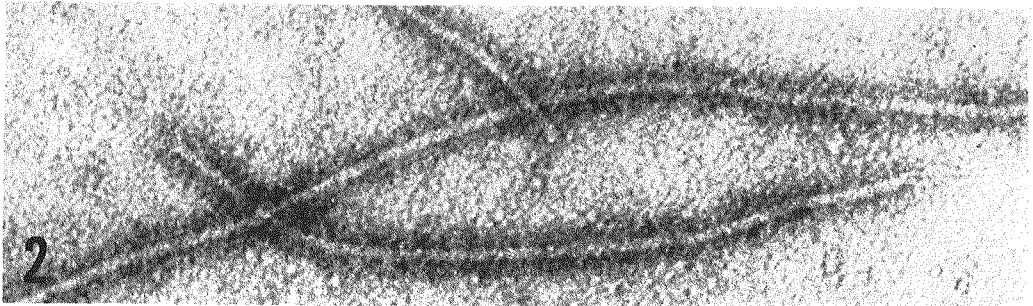
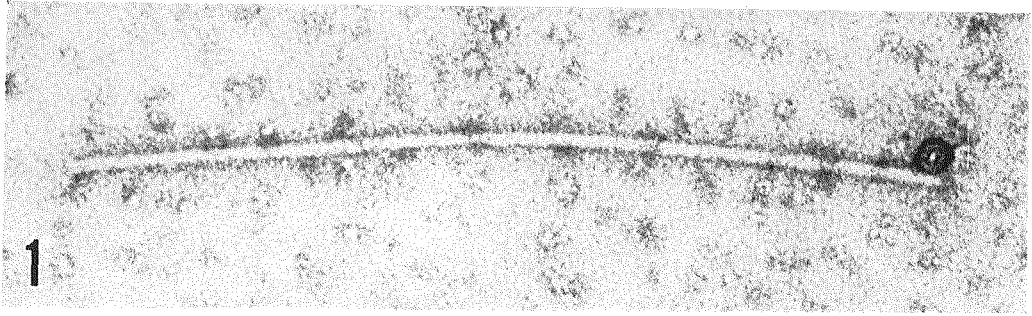
Effect of glow discharge treatment in advance to dip preparation was remarkable. The carbon coated formvar films hydrophilized by glow discharge just before use, dispersed the virus particles more evenly in dip preparations of bean yellow mosaic virus (BYMV) and potato virus Y. In addition, average numbers of those particles detected on any openings of each grid examined increased.

The BYMV-antiserum (titre: 1/1024 in ring interface precipitin test) diluted 1/1,000 with 0.001 M ammonium acetate was stored for more than 6 months at 5°C and -25°C without any detectable decrease of titre. Dilution end point in leaf-dip serology detected by an electron microscope was between 1/2,000 and 1/3,000. No difference was observed in antigen-antibody reaction of leaf-dip serology when the antiserum was diluted with 0.001 M ammonium acetate or diluted with 0.0015 M NaCl solution.

Forty-nine diseased French bean collected in the fields were examined by dip and leaf-dip serology to detect BYMV and bean common mosaic virus. The results fairly correlated to the results obtained by mechanical inoculation tests. The reliability of the electron microscopic detection and identification of some of the viruses are now improved when glow discharge method and leaf-dip serology employed.

### Explanation of plates

1. An electron micrograph of PVY in dip preparation from *Nicotiana sylvestris*.  $\times 120,000$
2. An electron micrograph of PVY in leaf-dip serology with homologous antiserum.  $\times 120,000$
3. An electron micrograph of BYMV in dip preparation from Broad bean.  $\times 120,000$
4. An electron micrograph of BYMV in leaf-dip serology with homologous antiserum.  $\times 120,000$
5. An electron micrograph of dip preparation of BYMV, dispersing seperately on a glow discharge-treated carbon coated formvar film.  $\times 40,000$



76年は両地区とも標識確認後、体重を測定し、雄では睪丸下降の有無、下降時には睪丸のふくらみをも毛皮の上から測定し、74年のデータと照し合せて成熟度を見た。雌では、膣開口の有無、乳頭の発達状態、妊娠の有無(胎仔生長時)を観察して捕獲地点に放した。

## 結 果

前述の方法により74年は107頭のエゾアカネズミを採集し、76年は生振では78個体90例のデータ、小清水では203個体293例のデータを得た(Table 1)。

Table 1. Monthly change of the number of mice captured

| Location            | Sex/Month | Apr. | May | Jun. | Jul. | Aug. | Sep. | Oct. | Nov. |
|---------------------|-----------|------|-----|------|------|------|------|------|------|
| Sapporo<br>(1974)   | ♀ Adult   | 7    | 3   | 2    | 4    | 15   | 8    | 2    | 1    |
|                     | Young     | 1    | 0   | 4    | 0    | 8    | 0    | 1    | 0    |
|                     | ♂ Adult   | 4    | 6   | 1    | 3    | 11   | 5    | 2    | 2    |
|                     | Young     | 0    | 0   | 3    | 3    | 4    | 1    | 6    | 0    |
|                     | Total     | 12   | 9   | 10   | 10   | 38   | 14   | 11   | 3    |
| Sapporo<br>(1976)   | ♀ Adult   | 1    | 1   | 3    | 3    | —    | 13   | 5    | —    |
|                     | Young     | 0    | 0   | 4    | 0    | —    | 0    | 2    | —    |
|                     | ♂ Adult   | 4    | 2   | 2    | 2    | —    | 28   | 5    | —    |
|                     | Young     | 1    | 0   | 5    | 1    | —    | 4    | 4    | —    |
|                     | Total     | 6    | 3   | 14   | 6    | —    | 45   | 45   | —    |
| Koshimizu<br>(1976) | ♀ Adult   | 11   | 11  | 8    | 4    | 19   | 27   | 13   | —    |
|                     | Young     | 0    | 0   | 7    | 7    | 3    | 7    | 4    | —    |
|                     | ♂ Adult   | 9    | 7   | 7    | 9    | 23   | 44   | 19   | —    |
|                     | Young     | 1    | 0   | 12   | 7    | 14   | 10   | 10   | —    |
|                     | Total     | 21   | 18  | 34   | 27   | 59   | 88   | 46   | —    |

### 雄の性成熟と繁殖期

74年に札幌市藻岩山および石狩町生振で得た雄54頭について性成熟状況を調べた。これらの個体中、当年個体では、6~8月の期間に睪丸が10 mm以上に肥大した個体が15個体得られたが、その中で貯精嚢が10 mm以上に発達していたものはわずか3個体のみで、精巢上部尾部へ精子が出現していたものは2個体であった(Fig. 1)。エゾアカネズミにおいても精巢が肥大したところで、やや遅れて貯精嚢が発達し、次いで精巢上部尾部へ精子が出現すると言える。ネズミ類の雄では精巢上部尾部への精子の出現は、生理的に生殖可能な状態を示すものとされている<sup>6)</sup>。このことより、これらの条件を備えた個体を繁殖可能な個体と見なして、雄の繁殖期を推定した。エゾアカネズミの場合、Fig. 1より精巢長径がおよそ15 mm以上になると、精巢上部尾部へ精子の出現が見られることから、これ以上の個体を成熟個体とみなした。また睪丸の外部測定値18 mm以上が実測値15 mm以上に相当することより、76年のマーキング法では外部測定値から成熟度を推定した。

このようにして識別された性成熟個体の最低体重は

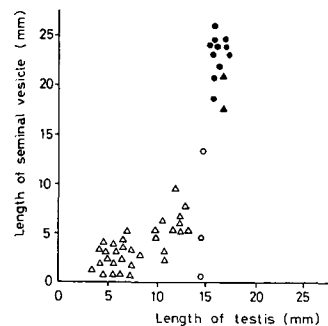


Fig. 1. Relationship between the length of testis and the length of seminal vesicle at Sapporo in 1974.

- Overwintered males with active cauda epididymis.
- Overwintered males with inactive cauda epididymis and atrophied testis.
- ▲ Current year's males with active cauda epididymis.
- △ Current year's males with inactive cauda epididymis and atrophied testis.