

免疫電顕法によるインゲン種子からの インゲンモザイクウイルスの検出*

萩田 孝志** 玉田 哲男**

免疫電顕法は、汁液接種法に比べ、100～1,000倍まで低濃度のウイルスが検出でき、定量も可能であった。インゲン種子からのウイルス検出率は、種子伝染率に近い値を示した。保毒種子ではウイルス濃度は異なるが、全て胚中にウイルスが検出された。子葉にウイルスが検出された種子は全て発病したので、胚中のウイルスが種子伝染による発病を生じることが示された。保毒種子の場合、子葉および胚中のウイルス濃度は、未熟種子よりは完熟種子が高く、種皮中のウイルス濃度は未熟種子より低かった。未熟種子の種皮中から高率に検出されたウイルスは、種子の完熟の過程で減少したが、胚に存在するウイルスは種子の成熟、乾燥による影響を受けなかった。健全種子に保毒種子を混ぜ、ウイルスの検出を行った結果、0.1% (重量比) の保毒種子が混在した場合全て検出できた。従って、免疫電顕法は病徴判定に比べると、短時間で、より少ない労力で、保毒種子の検出を可能にした。

緒 言

種子伝染性ウイルスの保毒種子の検定は、従来は播種後の病徴観察による判定や、種子の搾汁液を検定植物へ汁液接種する方法などで行われていたが、判定までかなりの日数や労力を要するなどの問題があり、簡便な方法が強く望まれていたところである。近年、抗血清をウイルスの検出に応用した免疫電顕法や Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) が開発され、インゲンモザイクウイルス¹⁵⁾を始め、Prune dwarf virus⁴⁾、タバコリングスポットウイルス^{11, 17)}、ダイズモザイクウイルス^{2, 3)}、エンドウ種子伝染性モザイクウイルス¹¹⁾、オオムギ斑葉モザイクウイルス³⁾、レタスモザイクウイルス^{3, 15)}など、多くの種子伝染性ウイルスにおける種子中のウイルス検出に利用されている。

インゲンモザイクウイルスは、種子伝染することを Reddick and Stewart²¹⁾ が最初に報告して以来今日まで、種子伝染に関する多くの研究がなされているが、種子中のウイルスについての報告は少なく、発育中の種子からウイルスを検出した Ekpo and Saettler⁹⁾、種子中のウイルスを電顕観察した Hoch and Provvidenti¹²⁾、ELISAにより種子内各部位からウイルスを検出した Jafarpour et al¹⁵⁾ などの報告があるのみである。

筆者らは、免疫電顕法によりインゲンの種子内各部位からウイルスの検出を行い、保毒種子の簡易検定の可能性について検討したので、その結果を報告する。

材料および方法

1. 供試ウイルス

インゲン「改良早生大福」の初生葉に、カーボランダム法によりウイルスを汁液接種した。接種約25～50日後の罹病インゲン上葉に生体重の10倍量の0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.0)を加え、乳鉢で摩砕し、ガーゼで搾汁し、3,000rpm, 10分間遠心分離し、その上清を供試した。

1984年6月4日受理

* 本報の一部は1981年度日本植物病理学会北海道部会で発表した。

** 北海道立中央農業試験場, 069-13 夕張郡長沼町

2. 供試種子

インゲン2品種を供試した。「改良早生大福」は、昭和54年、中央農試は場において生育初期に発病した株から完熟後採種した保毒種子である。その種子伝染率は17.6% (131株中23株発病)であった。「大正金時」は、昭和56年1~5月に中央農試温室内で健全種子を播き、初生葉期にウイルスを汁液接種し、発病した株から完熟後採種した。その種子伝染率は19.5% (190株中37株発病)であった。

3. ウイルスの純化と抗血清作成

ウイルスの純化は Moghal and Francki²⁰⁾ に準じて行った。すなわち、インゲン罹病葉を生体重の2倍量の0.5M ホウ酸緩衝液 (pH 8.0, 2-メルカプトエタノールを0.5%添加) で摩砕し、ガーゼで搾汁した。クロロホルムと四塩化炭素の等量混合液を搾汁液の1/2容量加え、3分間攪拌した後、5,000rpm, で15分間遠心分離し清澄化した。上清にポリエチレングリコール (No 6,000) と塩化ナトリウムをそれぞれ終末濃度が4%, 1.75%になるよう添加した後、4℃の冷室で1時間攪拌、1時間静置した。8,000rpm, で15分間遠心分離した後、沈渣に0.05M ホウ酸緩衝液 (pH 7.8 Triton X-100を5%添加) を摩砕に使用した緩衝液の容量の1/2加え懸濁した後、10,000rpm, 10分間遠心分離し、その後分画遠心分離を2度繰り返した。高速遠心分離は Beckman L3-50型超遠心分離機を用い、42.1型ロータで40,000rpm, 90分間行った。その後ウイルス試料を罹病葉重の1/50容量の0.01M ホウ酸緩衝液 (pH 8.1) で懸濁し、10~40%の蔗糖密度勾配に載せ、SW 27型ロータで23,000rpm, 3時間遠心分離した。遠心分離後、ISCO 密度勾配分析装置 (UA 4型) を用いてウイルスを分画した。日立ダブルビーム分光光度計 (200-10型) で純化ウイルスの紫外吸収スペクトルを測定した結果、波長260nmに最大値、240nmに最小値を示す核蛋白特有の吸収曲線を示し、260nm/280nmは1.40であった。その結果から罹病葉100gから約1mgのウイルスが得られた。

純化ウイルスを家兎に筋肉注射4回、静脈注射1回それぞれ一週間間隔で行い免疫した。筋肉注射はウイルス液1mlに等量の Freund's incomplete

adjuvantを加え乳化させた後、家兎の両腿に半量ずつ注射した。最終注射10日後に部分採血し、力価を調べた後全採血した。その結果リングテストで力価512倍の抗血清を得た。

4. 免疫電顕法、ダイレクトネガティブ染色法および接種検定によるウイルスの検出

免疫電顕法は、Milne and Luisoni¹⁹⁾ のトラップデコレーション法に準じた。すなわち、直径約10cmのガラスシャーレ上にパラフィルムを張り、0.1Mリン酸緩衝液で3,000倍に希釈したウイルス抗血清をガラスキャピラリーで1滴載せた。カーボン蒸着補強したホルムバル支持膜を張った150メッシュのグリッドを膜面が抗血清に接するように載せた後、ろ紙で湿した直径約16cmのガラスシャーレ内で5分間保持した。グリッドを取り出し0.1Mリン酸緩衝液約5mlを滴下し洗滌した後、ろ紙で水分を取り除いた。ウイルス試料をパラフィルム上に1滴載せ、抗血清処理したグリッドを膜面が試料に接するように載せた後、ガラスシャーレに入れて4℃の冷室で24時間反応させた。グリッドを0.1Mリン酸緩衝液で洗滌した後、再度0.1Mリン酸緩衝液で1,000倍に希釈した抗血清を15分間反応させた。グリッドを0.1Mリン酸緩衝液、次いで同量の蒸留水で洗滌した後、ろ紙で水分を取り除き風乾した。試料を2%リントングステン酸 (pH 7.0) で染色した後、電子顕微鏡観察に供した。日立HS-7D型電子顕微鏡 (50kV) を使用し、直接倍率15,000倍で観察した。ウイルス粒子数はグリッド1目の粒子数を数え、任意に3ヶ所選定しその平均値を用いた。

ダイレクトネガティブ染色法は、カーボン蒸着補強したホルムバル支持膜を張った150メッシュのグリッドの膜面にウイルス試料を載せ、約5mlの蒸留水でグリッドを洗滌後、試料を2%リントングステン酸 (pH 7.0) で染色し、上記の方法で電顕観察した。

接種検定は、温室で育苗した初生葉期のインゲン「大手亡」へカーボランダム法で汁液接種し、接種約3週間後に病徴による判定を行った。

5. 種子および種子内各部位からのウイルスの検出

完熟種子を殺菌水中で16時間浸漬吸水させた

後、吸水重の10倍量の0.1M リン酸緩衝液を加えて乳鉢中で摩砕した。摩砕液を3,000rpm, で10分間遠心分離した後その上清を供試した。未熟種子からのウイルス検出は、種子生体重の10倍量の0.1M リン酸緩衝液を加え乳鉢中で摩砕した後、摩砕液を3,000rpm, 10分間遠心分離し、その上清を供試した。種子内各部位からのウイルス検出は、殺菌水中で16時間浸漬吸水させた完熟種子から種皮を分離し、残りの部分を片刃安全カミソリで背線に沿って両断し子葉と胚を分離した。各部位を殺菌水約5mlで洗滌し、ろ紙で水分を取り除いた後、それぞれ吸水重の10倍量の0.1M リン酸緩衝液を加えて乳鉢中で摩砕した。摩砕液を3,000rpm, で10分間遠心分離し、その上清を供試した。

結 果

1. 免疫電顕法, ダイレクトネガティブ染色法および接種検定によるウイルスの検出

0.1M リン酸緩衝液でインゲン罹病葉生体重の 10^{-1} ~ 10^{-8} 倍までの10倍希釈系列を作り、各希釈液の半量をカーボランダム法により初生葉期のインゲン「大手亡」6株へ汁液接種し、残りの半量を免疫電顕法およびダイレクトネガティブ染色法によりウイルス粒子数を測定した。免疫電顕法

は各希釈汁液にインゲン健全葉汁液を1%加えた場合と加えなかった場合の両者について調べた。接種検定による病徴判定は、ウイルス接種21日後に行った。その結果をTable 1に示した。

ダイレクトネガティブ染色法では、 10^{-4} 倍希釈までウイルスが検出できたのに対して、免疫電顕法は 10^{-5} 倍希釈まで、さらに試料にインゲン健全葉汁液を加えた場合 10^{-7} 倍希釈まで検出できた。これに対して、接種検定では 10^{-5} 倍希釈までであった。

2. 種子および種子内各部位からのウイルス検出

インゲン2品種の種子からウイルス検出を行った結果をTable 2に示した。試験は各品種2回ずつ行い合計すると、「改良早生大福」は供試78種子中18種子(ウイルス検出率23.1%)から、「大正金時」は供試110種子中26種子(ウイルス検出率23.6%)からウイルスが検出された。グリッド1目のウイルス粒子数を1~100(低濃度), 101~1,000(中濃度), 1,001以上(高濃度)に類別し保毒種子のウイルス濃度を調べた結果, 「改良早生大福」の場合, 保毒種子18粒中高濃度の種子15粒, 中濃度の種子1粒, 低濃度の種子2粒, 「大正金時」の場合, 保毒種子26粒中高濃度の種子22粒, 中濃度の種子2粒, 低濃度の種子2粒であっ

Table 1. Sensitivity of immune electron microscopy (IEM), direct negative staining (DN), and inoculation test for detecting bean common mosaic virus (BCMV) in leaf extracts

Dilutions of leaf extracts (reciprocals)	Average number of virus particles detected ^{a)}			Percent of BCMV-infected ^{c)} (%)
	IEM ^{b)}	IEM	DN	
10^1	158,004	104,597	1,201	100
10^2	20,420	16,447	647	100
10^3	2,864	2,662	49	100
10^4	233	2	4	83
10^5	52	1	0	50
10^6	11	0	0	0
10^7	2	0	0	0
10^8	0	0	0	0

a) Average number of BCMV particles in three grid squares at 15,000 X.

b) Add 1% (V/V) leaf extract of healthy French bean plants to a final volume of each dilution.

c) Six healthy French bean plants "Ôtebo" were inoculated with each dilution at the expanded primary leaf stage.

た。

次に種子内各部位のウイルス濃度を調べるため、「大正金時」を用いて子葉、胚、種皮それぞれの部位からウイルスの検出を行った結果をTable 3に示した。保毒種子の場合、10試料中子葉10試料、胚7試料にウイルスが検出されたが、種皮からは

全く検出されなかった。健全種子の場合はいずれの部位からもウイルスが検出されなかった。ウイルスの検出された子葉および胚についてその濃度を調べた結果、両者とも個体間に濃度差が認められたが、平均すると胚のウイルス濃度の方が子葉のそれよりも高かった。

Table 2. Detection of BCMV in French bean seeds

Cultivars	Exp. no.	Number of seeds tested	Number of infected seeds	Percent of infected seeds (average)	Number of seeds classified according to average number of virus particles			
					0	1-100	101-1,000	1,000<
Taisho- ^{a)}	Exp. 1	70	12	17.1	58	2	1	9
kintoki	Exp. 2	40	14	35.0	26	0	1	13
Kairyo- ^{b)}	Exp. 1	48	9	18.8	39	1	1	7
Waseōfuku	Exp. 2	30	9	30.0	21	1	0	8

a) Infection rate by BCMV is 19.5%.

b) Infection rate by BCMV is 17.6%.

Table 3. Detection of BCMV particles in various parts of French bean seeds by IEM

Seeds ^{a)}	Number of BCMV-infected parts in seeds			Average number of virus particles observed (range)		
	Cotyledon	Embryo	Seed coat	Cotyledon	Embryo	Seed coat
Infected	10/10	7/10	0/10	10,774 (369-21,991)	19,939 (601-61,450)	0
Healthy	0/10	0/10	0/10	0	0	0

a) Seeds were collected from the infected plants inoculated with BCMV at primary leaf stage.

Table 4. Relation between detection of BCMV in cotyledons and seed transmission

Number of seeds tested	Number of seeds	Average number of particles observed in cotyledons	(range)	Mosaic symptoms
53	13	1,952	(24-13,121)	+
	40	0		-

Table 5. Detection of BCMV in mature and immature French bean seeds and the number of particles observed

seeds	Number of seeds tested	Number of infected seeds	Number of seeds classified according to average number of particles observed			
			0	1-100	101-1,000	1,000<
Immature	20	20	0	5	13	2
Mature	20	13	7	9	0	4

3. 子葉からのウイルス検出と発病

温室においてインゲン「大正金時」を駄温鉢（径12cm、深さ10cm）に1粒ずつ播種し、発芽後直ちに子葉の1片を切離しウイルスの検出を行い、一方残りの株の病徴観察を播種約40日後に行った。その結果をTable 4に示した。供試53種子中子葉からウイルスが検出されたのは13種子で、それらは全てモザイク病徴を現わした。これに対し、子葉からウイルスが検出されなかった株で発病したものは全く認められなかった。子葉から検出されたウイルス粒子数は保毒種子個体間で差が認められ、平均すると1,952であった。

4. 未熟および完熟種子からのウイルス検出

温室内の有底コンクリート枠土壌中にインゲン「改良早生大福」を播種し、初生葉（播種後15日経過）にウイルスを接種し発病した株より未熟種子（播種後88日経過）、完熟種子（播種後111日経過）を任意に採種し、種子および種子内各部位からウイルスの検出を行った。その結果をTable 5に示した。各供試種子20粒中未熟種子20粒、完

熟種子13粒からウイルスが検出された。グリッド1目の粒子数を1～100（低濃度）、101～1,000（中濃度）、1,001以上（高濃度）に類別し、ウイルスの検出された保毒種子について、その濃度を調べた結果、未熟種子の場合保毒種子20粒中高濃度の種子2粒、中濃度の種子13粒、低濃度の種子5粒、完熟種子の場合保毒種子13粒中高濃度の種子4粒、中濃度の種子0粒、低濃度の種子9粒であった。

次に未熟および完熟の保毒種子をそれぞれ子葉、胚、種皮に分け、ウイルスの検出を行った結果をTable 6に示した。未熟種子の場合、供試した2試料中全ての部位からウイルスが検出された。ウイルス粒子数は個体間の差が認められ、平均すると子葉20,425、胚910、種皮1,744であった。これに対し、完熟種子の場合、供試した4試料中全ての部位からウイルスが検出され、平均粒子数は子葉33,393、胚22,950、種皮30であった。

Table 6. Comparison of BCMV particles detected in various parts of mature and immature French bean seeds

Seeds	Number of BCMV-infected parts in seeds			Average number of virus particles observed (range)		
	Cotyledon	Embryo	Seed coat	Cotyledon	Embryo	Seed coat
Immature	2 / 2	2 / 2	2 / 2	20,425(2,600–38,250)	910(220–1,600)	1,744(1,744)
Mature	4 / 4	4 / 4	4 / 4	33,393(20,350–48,500)	22,950(16,830–29,070)	30(2–80)

Table 7. Comparison of BCMV particles detected in seed coats of mature and immature French bean seeds

Cultivars	Seeds	Number of BCMV-infected seed coats to total seed coats tested	Average number of virus particles observed (range)
Kairyo-wase-ofuku	Immature	15 / 15	55 (4–257)
	Mature ^{a)}	13 / 15	2 (1–3)
	Mature ^{b)}	5 / 5	2 (1–5)
Taisho-kintoki	Mature ^{c)}	0 / 21	0

a) Stored for 4 months at 15°C after harvest.

b) Stored for 28 months at 15°C after harvest.

c) Stored for 9 months at 15°C after harvest.

5. 種皮からのウイルス検出

種子の成熟、乾燥、保存の過程における種皮中のウイルス濃度の変動を調べるため、インゲン2品種を供試し種皮からウイルス検出を行った。試験に使用した種子は「改良早生大福」が昭和56年9月採種の未熟種子、同10月採種の完熟種子、昭和54年採種の完熟種子、「大正金時」が昭和56年5月採種の完熟種子で、いずれも温室にて発病株から採種した。その結果を Table 7 に示した。昭和56年産「改良早生大福」未熟種子は供試15種皮中全てからウイルスが検出され、平均粒子数は55であった。同完熟種子は供試15種皮中13種皮からウイルスが検出され、平均粒子数は2であった。昭和54年産「改良早生大福」は供試5種皮全てからウイルスが検出され、平均粒子数は2であった。これに対し、「大正金時」は21種皮供試したが、ウイルスは全く検出されなかった。

6. 保毒種子の集団検定

殺菌水中で浸漬吸水させたインゲン「大正金時」を半切し、その一方についてウイルス保毒の有無を調べた。ウイルスの検出された保毒種子の残りの半分を安全カミソリで細かく切り刻み、別に準備した殺菌水で浸漬吸水させたインゲン健全種子に、重量比で0.1%, 0.05%となるようそれぞれ加えた後、吸水種子重の10倍量の0.1Mリン酸緩衝液を加えてミキサーで摩砕した。摩砕液を3,000 rpm, 10分間遠心分離し、その上清を供試した。試料にはインゲン健全汁液を終末濃度1%になるよう加えた。その結果を Table 8 に示した。保毒種子を0.1%の割合で健全種子に混ぜた場合、供試した9試料全てからウイルスが検出され、ウイルス粒子数は3~30の範囲であった。また、0.05%の割合で混ぜた場合、9試料中8試料からウイ

ルスが検出され、ウイルス粒子数は1~7の範囲であった。

考 察

抗血清処理した支持膜を使用して、ウイルス罹病葉汁液との反応時間を変えた場合、検出される粒子数は時間が長くなるにともない増加し、ジャガイモ葉巻病ウイルス²²⁾の場合によく一致した結果が得られた。ジャガイモYウイルスやタバコモザイクウイルス⁸⁾で報告されている様に、免疫電顕法によって多数のBCMV粒子を検出できたが、特にインゲン健全葉汁液を試料の終末濃度に1%の割合で添加した場合、ダイレクトネガティブ染色法に比べ1,000倍、インゲンへの接種検定に比べ100倍の希釈倍数まで検出できた。また、汁液の段階希釈倍数にほぼ比例した粒子数が検出されたことによりタバコモザイクウイルス⁸⁾と同様に、ウイルスの定量にも適用できると思われた。

発病株から採種したインゲン2品種を用い、種子伝染率と免疫電顕法によるウイルス検出率が符合するかどうかを調べた結果、既報のダイズモザイクウイルス^{3, 13)}、ダイズ萎縮ウイルス¹³⁾、タバコリングスポットウイルス³⁾、アズキモザイクウイルス・ササゲモザイクウイルス²⁴⁾、レタスモザイクウイルス・オオムギ斑葉モザイクウイルス³⁾と同じく種子伝染率に近い値を示した。

保毒種子のウイルス濃度は、両品種ともグリッド1目の粒子数が1,001以上の高濃度の種子がほとんどであったが、粒子数100以下の低濃度の種子も認められた。このことは成熟胚間の濃度差は小さいと報告したダイズモザイクウイルス・ダイズ萎縮ウイルス¹³⁾およびタバコリングスポットウイルス・オオムギ斑葉モザイクウイルス・ダイズ

Table 8. Detection of BCMV by IEM in seed homogenates

Sample	Ratio of infected to total tested samples	Average number of virus particles observed (range)
Infected seeds (0.1%) ^{a)}	9 / 9	10 (3-30)
Infected seeds (0.05%) ^{a)}	8 / 9	3 (1-7)
Healthy seeds	0 / 6	0

a) Healthy seeds were mixed with 0.1 and 0.05 % (W/W) diseased seed tissues.

モザイクウイルス・レタスモザイクウイルス³⁾の場合と異なった。一方飯塚¹³⁾および土崎ら²⁴⁾は、保毒した未熟胚には高濃度のウイルスを含むものと低濃度のウイルスを含むものがあり、後者の場合はウイルスが受精後親植物から直接侵入したもので種子伝染には関係しないと報告している。しかし、本試験の低濃度の種子が種子伝染に関係ないかどうかについては明らかでない。

保毒種子の胚(子葉を除く)、子葉、種皮各部位中のウイルスについては、子葉から全てウイルスが検出されたのに対し種皮からは全く検出されなかった。そこで、子葉中のウイルスの存否と発病との関係を調べたところ両者がよく一致した。既報のダイズモザイクウイルス¹⁶⁾、オオムギ斑葉モザイクウイルス¹⁴⁾、アズキモザイクウイルス・ササゲモザイクウイルス²⁴⁾と同様インゲンモザイクウイルスの場合についても、胚中に存在するウイルスが種子伝染に関係することが分った。

種子の成熟、乾燥がウイルスに与える影響については、未熟胚のウイルス検出率が種子伝染率よりも高く、ダイズモザイクウイルス¹³⁾、アズキモザイクウイルスやササゲモザイクウイルス²⁴⁾の場合とよく一致した。また、各々の種子について部位別にウイルス濃度を調べたところ、胚中の濃度は未熟種子に比べ完熟種子の方が高く、種皮では未熟種子が高かった。従って種子の成熟過程でウイルスが不活化し減少するとされている南部インゲンモザイクウイルス^{5, 7, 18, 25)}、Pea streak virus¹⁰⁾、Broad bean stain virus^{6, 26)}、Echtes Ackerbohnen mosaic virus^{6, 26)}、ピーナツモットルウイルス¹⁾と異なりインゲンモザイクウイルスの場合、胚中のウイルスは種子の成熟、乾燥による影響を全く受けず、Ekpo and Saettler⁹⁾、Jafarpourら¹⁵⁾と同様の結果を得た。一方種皮中のウイルスが減少した原因は、Jafarpourら¹⁵⁾の指摘するようにウイルスの不活化か、ウイルス抽出の際の損失によるためと思われる。上述の結果から、未熟種子から高率に検出されたウイルスの多くは種皮中に存在し、受精以降に親植物から侵入したものと推定された。長期間保存後の種皮中のウイルスの変動については、「改良早生大福」の場合、完熟後28ヶ月保存した種皮から少量のウ

イルスが検出されたのに対し、「大正金時」では、9ヶ月保存した種皮から全く検出されなかった。両者の差異が何によって起るかは明らかではなく検出されたウイルスが感染力をもつか否かも明らかでない。

免疫電顕法による種子中のウイルス検出率はほぼ種子伝染率に近い値を示した。検出されたウイルス濃度は、種子間で差が認められた。しかし、高濃度の種子が受精時の配偶子に由来し、低濃度の種子がそれ以降に親植物から直接侵入したものの否かは明らかではない。未熟種子の場合、受精以降に親植物から直接侵入したと推定されるウイルスが多くの種皮中に存在するが、種子の成熟、乾燥による影響で不活化されて減少するが、数年保存後でも少量が検出される。

免疫電顕法およびELISA, を利用して保毒種子を早期かつ簡便に検出しようとする試みが、インゲンモザイクウイルス¹⁵⁾を始め、タバコリングスポットウイルス^{3, 17)}、オオムギ斑葉モザイクウイルス^{3, 17)}、ダイズモザイクウイルス^{3, 17)}、レタスモザイクウイルス^{3, 15)}、エンドウ種子伝染性モザイクウイルス¹¹⁾などで報告された。それらの結果では、重量比1~0.1%の範囲まで保毒種子が検出された場合が多い。Jafarpourら¹⁵⁾はインゲン種子から胚(子葉を除く)のみを取り出し、インゲンモザイクウイルスの検出を行った結果、重量比0.05%まで検出できたと報告している。本試験では、インゲン種子を用いてウイルス保毒種子の検出を行った結果、重量比0.1%の保毒種子を含んだ場合確実に検出できた。以上から、従来行われていた病徴観察による判定に比べ、短時間で、広い面積を必要とせず、少ない労力で保毒種子の集団検定が可能である。

謝 辞 本研究を行うにあたり、多大の便宜をいただいた元北海道立中央農業試験場病虫部長高桑亮博士、並びに本稿を作成するにあたり有益な助言をいただいた同場病理科長赤井純博士に厚く御礼申し上げる。また本稿の校閲を賜った北海道大学農学部教授四方英四郎博士に深く謝意を表す。

引用文献

- 1) Adams, D.B.; Kuhn, C.W. "Seed transmission of peanut mottle virus". *Phytopathology*. **67**, 1126-1129 (1977).
- 2) Bossennec, J.M.; Maury, Y. "Use of the ELISA technique for the detection of soybean mosaic virus in soybean seeds". *Ann. de Phytopathol.* **10**, 263-268 (1978).
- 3) Brlansky, R.H.; Derrick, K.S. "Detection of seedborne plant viruses using serologically specific electron microscopy". *Phytopathology*. **69**, 96-100 (1979).
- 4) Caspar, R. "Testung von *Prunus avium*-samen aus prune dwarf virus mit dem ELISA verfahren (Assay of *Prunus avium* seed for prune dwarf virus by ELISA method)". *Phytopathol. Z.* **90**, 91-94 (1977).
- 5) Cheo, P.C. "Effect of seed maturation on inhibition of southern bean mosaic virus in bean". *Phytopathology*. **45**, 17-21 (1955).
- 6) Cockbain, A.J.; Bowen, R.; Vorra-urai, S. "Seed transmission of broad bean stain virus and Echtes Ackerbohnenmosaik-virus in field bean (*Vicia faba*)". *Ann. Appl. Biol.* **84**, 321-332 (1976).
- 7) Crowley, N.C. "Studies on the time of embryo infection by seed-transmitted viruses". *Virology*. **8**, 116-123 (1959).
- 8) Derrick, K.S. "Quantitative assay for plant viruses using serologically specific electron microscopy". *Virology*. **56**, 652-653 (1973).
- 9) Ekpo, E.J.A.; Saettler, A.W. "Distribution pattern of bean common mosaic virus in developing bean seed". *Phytopathology*. **64**, 269-270 (1974).
- 10) Ford, R.E. "Recovery of pea streak from pea seed parts and its transmission by immature seed". *Phytopathology*. **56**, 858-859 (1966).
- 11) Hamilton, R.I.; Nichols, C. "Serological methods for detection of pea seed-borne mosaic virus in leaves and seeds of *Pisum sativum*". *Phytopathology*. **68**, 539-543 (1978).
- 12) Hoch, H.C.; Provvidenti, R. "Ultrastructural localization of bean common mosaic virus in dormant and germinating seeds of *Phaseolus vulgaris*". *Phytopathology*. **68**, 327-330 (1978).
- 13) 飯塚典男. "ダイズにおけるウイルスの種子伝染". *東北農試研報*. **46**, 131-139 (1973).
- 14) 井上忠男. "麦斑葉モザイクウイルスの種子伝染機構および花粉伝染について". *農学研究*. **48**, 117-122 (1961).
- 15) Jafarpour, B.; Shepherd, R.J.; Grogan, R.G. "Serologic detection of bean common mosaic and lettuce mosaic viruses in seed". *Phytopathology*. **69**, 1125-1129 (1979).
- 16) 越水幸男, 飯塚典男. "大豆のウイルス病に関する研究". *東北農試研報*. **27**, 1-103 (1963).
- 17) Lister, R.M. "Application of enzyme-linked immunosorbent assay for detecting viruses in soybean seed and plants". *Phytopathology*. **68**, 1393-1400 (1978).
- 18) McDonald, J.G.; Hamilton, R.I. "Distribution of southern bean mosaic virus in the seed of *Phaseolus vulgaris*". *Phytopathology*. **62**, 387-389 (1972).
- 19) Milne, R.G.; Luisoni, E. "Rapid immune electron microscopy of virus preparations". *Methods in virology*. Maramorosch, K.; Koprowski, H. ed. Academic Press, New York, 1977, p. 265-281.
- 20) Moghal, S.M.; Francki, R.I.B. "Towards a system for the identification and classification of potyviruses 1. Serology and amino acid composition of six distinct viruses". *Virology*. **73**, 350-362 (1976).
- 21) Reddick, D.; Stewart, V.B. "Transmission of the virus of bean mosaic in seed and observations on thermal death point of seed and virus". *Phytopathology*. **9**, 445-450 (1919).
- 22) Roberts, I.M.; Harrison, B.D. "Detection of potato leafroll and potato mop-top viruses by immunosorbent electron microscopy". *Ann. Appl. Biol.* **93**, 289-297 (1979).
- 23) 四方英四郎, 小島誠. "植物ウイルス抗原抗体反応の電子顕微鏡観察". *日植病報*. **44**, 28-34 (1978).
- 24) 土崎常男, 興良清, 明日山秀文. "ササゲおよびアズキにおけるウイルスの種子伝染. III 胚感染と種子伝染との関係". *日植病報*. **37**, 11-16 (1971).
- 25) Uyemoto, J.K.; Grogan, R.G. "Southern

- bean mosaic virus: evidence for seed transmission in bean embryos". *Phytopathology*. **67**, 1190-1196 (1977).
- 26) Vorra-urai, S.; Cockbain, A.J. "Further studies on seed transmission of broad bean stain virus and *Echtes Ackerbornen* mosaic virus in field beans (*Vicia faba*)". *Ann. Appl. Biol.* **87**, 365-374 (1977).

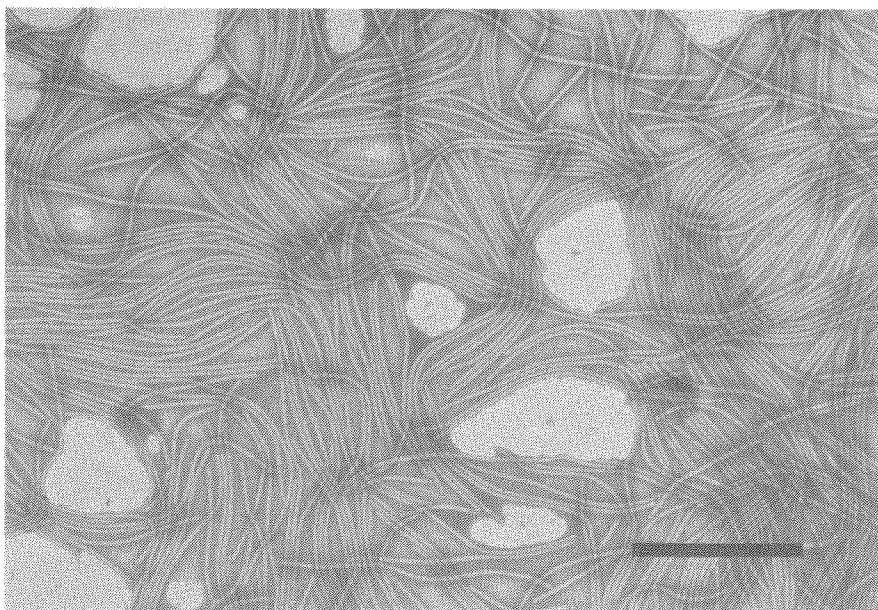


Fig 1. Purified preparation of bean common mosaic virus (BCMV) negatively stained with potassium phosphotungstae. The bar represents 500 nm.

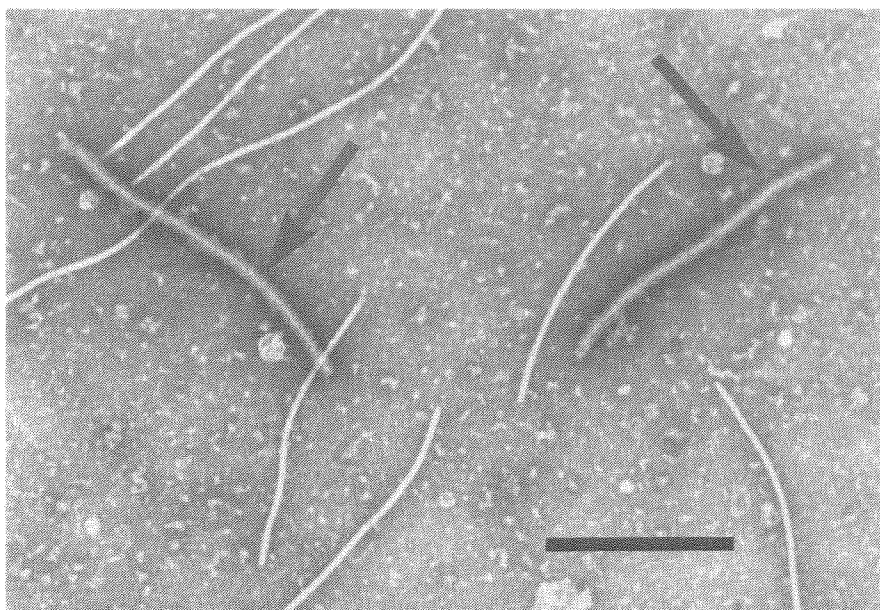


Fig 2. Purified bean common mosaic virus (BCMV) and bean yellow mosaic virus (BYMV) mixed and treated with BCMV antiserum. Only the BCMV particles (arrows) are decorated with antibody. The bar represents 500 nm.

Detection of Bean Common Mosaic Virus in French Bean Seeds by Immune Electron Microscopy

Takashi HAGITA* and Tetsuo TAMADA*

Summary

Immune electron microscopy (IEM) was applied to detect bean common mosaic virus (BCMV) using BCMV-antiserum (titer: 1/512 in ring interface precipitin test) diluted to 1/3,000 with 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0). Sensitivity of IEM for detection of the virus in leaf extracts was one thousand times higher than direct negative staining and one hundred times higher than mechanical inoculation to *Phaseolus vulgaris* "Ôtebo". It was shown that IEM could be also applied for quantitative assay.

Using two cultivars of *P. vulgaris* "Taisho-kintoki" and "Kairyo-wase-ôfuku", it was found that the rate of detection of the virus by IEM in mature seeds from the infected plants was closely coincide with that of seed transmission, but the concentration of the virus detected in the infected seeds were variable. The virus was detected in all cotyledons tested and most of embryos, but none of the virus was shown in seed coats in the mature infected seeds, whereas no virus particle was detected in various parts of the mature healthy seeds. Cotyledons were taken shortly after emergence of the infected seeds from soil, and the relationship between the virus particles detected in the cotyledons and the disease symptoms on the seedlings were examined. The result showed that all of the seedlings which the virus particles were detected in cotyledons appeared mosaic symptoms. It was evident that seed transmission was caused by the virus particles in cotyledons (embryos). The concentration of the virus particles was much higher in mature cotyledons and embryos than in immature ones, but higher in immature seed coats than in mature seed coats. Most of the viruses, which were detected in immature seed coats at significant rate, was inactivated and disappeared during seed maturation and drying. In contrast, the viruses in immature embryos were unaffected by seed maturation and drying.

In another experiment, the seeds were halves and one halves were assayed for the virus particles using IEM. The remaining seed halves were combined with healthy seed tissues to make the mixtures containing 0.1, 0.05% (W/W) diseased tissues. Using IEM, the virus particles were detected consistently in the mixture containing 0.1% diseased tissues. It was concluded that IEM was a less laborious, space- and time-consuming technique for indexing BCMV in French bean seed lots than sandbench germination test.

* Hokkaido Central Agricultural Experiment Station, Naganuma, Hokkaido, 069-13, Japan.