

# イムノカプチャー逆転写遺伝子増幅法 (IC-RT-PCR) による カンキツからのリンゴステムグルーピングウイルスの検出

下村克己<sup>1)</sup>・草野成夫  
(果樹苗木分場)

カンキツのリンゴステムグルーピングウイルス (ASGV) 検定において、酵素結合抗体法 (ELISA) で判定が困難な試料の再検定に、イムノカプチャー逆転写遺伝子増幅法 (IC-RT-PCR) の適用を検討した。IC-RT-PCR は、ELISA よりも高感度の検出が可能であり、新規に作製したプライマー CTLV-CP2 (+) を用いるとさらに 100 倍以上検出感度が向上した。IC-RT-PCR は、RT-PCR と比較して、核酸の抽出操作が不要であること、ELISA に供試した磨砕汁液の利用が可能であることから、ELISA 再検定が簡易かつ迅速に実施可能であると考えられた。また、IC-RT-PCR は、ELISA で判定が困難な発芽 3 カ月後の新芽をはじめ、旧葉、樹皮からも ASGV の検出が可能であったことから、ELISA 検定に適さない時期の試料も IC-RT-PCR によって検定できることが示唆された。

以上のことから、カンキツからの ASGV の検定においては、ELISA と IC-RT-PCR を組み合わせて実施することで、迅速かつ高精度な検定が可能であると考えられた。

[キーワード：カンキツ、リンゴステムグルーピングウイルス、ELISA、IC-RT-PCR]

Detection of Apple Stem Grooving Capillovirus by Immunocapture Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction in Citrus. SHIMOMURA Katsumi and Nario KUSANO (Fukuoka Agric. Res. Cent., Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 21 : 87-91 (2001)

Apple stem grooving virus (ASGV), known to be a pathogen of the bud-union creases in citrus trees grafted on trifoliolate orange rootstock, can be detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) easily and immediately if there is a sufficient number of virus particles in the plant or sample. Unfortunately, ASGV is often not detectable by ELISA because low numbers of particles are present. We designed new forward primers on the basis of the nucleotide sequences of coat protein regions of several strains of ASGV and examined whether immunocapture reverse transcription polymerase chain reaction (IC-RT-PCR) was useful or not for the diagnosis of ASGV against samples that couldn't be judged by ELISA. We were able to detect ASGV using either RT-PCR or IC-RT-PCR. The detection ability of RT-PCR was 100 times higher when we used the new forward primer [CTLV-CP2 (+): 5'-AGGCAGAACTCTTTGAACGA-3']. ASGV was detected by IC-RT-PCR using the new primer in the saps from new leaf and bark, two-year-old leaf and bark at three months after sprouting, but it was not detected by ELISA. IC-RT-PCR using CTLV-CP2 (+) was very useful and efficient for rechecking for ASGV. This method could detect ASGV immediately because it could be performed without the extraction of RNAs from samples.

[Key words: citrus, apple stem grooving virus, ELISA, IC-RT-PCR]

## 緒 言

カンキツタターリーフウイルス (Citrus tatter leaf virus: CTLV) は、カラタチ (*Poncirus trifoliata* Raf.) を台木に用いたカンキツに接ぎ木部異常を引き起こす病原として知られている<sup>1a)</sup>。本ウイルスは、ゲノム構造の解析から、最近リンゴステムグルーピングウイルス (Apple stem grooving virus: ASGV) と同種のウイルスであることが明らかにされ、ウイルス名が ASGV と統一された<sup>1b)</sup>。カラタチを台木に利用したカンキツが本ウイルスに罹病すると、台木と穂木の接ぎ木融合部に離層と呼ばれる境界を生じ、樹勢や収量が低下し、激しい場合は枯死するなど、カンキツ栽培上重要な病害である。特に我が国のカンキツは、そのほとんどがカラタチを台木に利用した栽培が行われているため、本病の防除並びに感染防止対策は重要な課題である。本県では、そ

の防除対策の一環として、酵素結合抗体法 (Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)<sup>4,6)</sup> による検定を年間 3,500 試料について実施している。本法は、大量の検定を行う際には、簡易かつ効率的であるが、検出感度や精度の限界から、判定が困難な擬陽性の試料が存在すること、また試料の採取時期が限定されるなどの問題点がある。特に、擬陽性の試料について正確な再検定を実施するには、樹体内のウイルス濃度が高まる翌年の春期の新芽を供試するか、あるいは生物検定を行う必要があり、いずれも長期間を要することから高精度な検定法の確立が望まれている。本論文では、ELISA 検定において判定が困難な試料に対し、同一の調整試料を用いて、より高感度、高精度の判定が可能と推測されるイムノカプチャー逆転写遺伝子増幅法 (Immunocapture reverse transcription polymerase chain reaction: IC-RT-PCR)<sup>5,7,11)</sup> の適用を検討し、良好な結果が得られたので報告する。

1) 現企画経営部

## 材料および方法

### 供試ウイルス

1981年に徳島県果樹試験場より分譲され、ウイルスフリーのウンシュウミカン‘興津早生’(*Citrus unshiu* Marc.)に接ぎ木接種後、当分場で保存しているASGV (BD-44株およびTO-1株)を供試した。また、岩手大学農学部吉川信幸博士より分譲されたリング分離株(P-209)およびユリ分離株(Li-23)にそれぞれ感染した*Chenopodium quinoa*葉を供試した。

### PCR用プライマー

カンキツに接ぎ木部異常を引き起こすASGVには、ササゲやカラタチ台カンキツでの反応に違いが認められる様々な系統が報告されている<sup>2,3,9,12,13,16</sup>。また、リング、ナシなどでは、同一樹内に複数の塩基配列変異株が存在していることが明らかにされている<sup>15,17</sup>。したがって、RT-PCRによるASGVの検出においては、できるだけ多数の分離株のゲノムを増幅できるプライマーを設計することが、特に重要である。

そこで、本研究では、Yoshikawaら<sup>17</sup>の報告したプライマー [CTLV-ON (+), ASGV-ON2 (+) および ASCT-3' (-)] に加えて、ASGVの各分離株の塩基配列<sup>10,17</sup>を基にして、各分離株間で相同性の高い外被タンパク質 (CP) 領域の4種の+鎖プライマー [CTLV-CP1 (+), CTLV-CP2 (+), CTLV-CP3 (+) および CTLV-CP4 (+)] (Table 1.) を新たに作製して供試した。-鎖プライマー [ASCT-3' (-)] とこれら4種のプライマーで増幅されるDNAのサイズは、それぞれ0.85キロボ塩基対 (kbp), 0.44kbp, 0.33kbp および 0.21kbp である。

Table 1. Primers used for RT-PCR to detect ASGV.

Primers <sup>a)</sup>	Sequences (5'-3') <sup>b)</sup>
forward	
CTLV-ON(+)	5 <sup>3</sup> 4 <sup>7</sup> ATT CAG CTC GTT TCT TGG AG <sup>5</sup> 3 <sup>6</sup> 6
ASGV-ON2(+)	5 <sup>9</sup> 2 <sup>3</sup> GAA GGG GAG ACT GAC GAA GG <sup>5</sup> 9 <sup>4</sup> 8
CTLV-CP1(+)	5 <sup>8</sup> 4 <sup>4</sup> AGT TTG GAA GAC GTG CTT CG <sup>5</sup> 6 <sup>3</sup> 3
CTLV-CP2(+)	6 <sup>0</sup> 4 <sup>9</sup> AGG CAG AAC TCT TTG AAC GA <sup>5</sup> 0 <sup>6</sup> 8
CTLV-CP3(+)	6 <sup>1</sup> 5 <sup>3</sup> AAG AAA TGG CCC AAA GCT TT <sup>6</sup> 1 <sup>8</sup> 2
CTLV-CP4(+)	6 <sup>2</sup> 8 <sup>2</sup> GCT TTT TCG TAC TGA AGG AC <sup>6</sup> 3 <sup>0</sup> 1
reverse	
ASCT-3' (-)	6 <sup>4</sup> 9 <sup>6</sup> AGA GTG GAC AAA CTC TAG AC <sup>6</sup> 4 <sup>7</sup> 7

a) Primers were designed on the basis of the nucleotide sequences of the genomes of 5 isolates of ASGV and CTLV<sup>17</sup>.  
b) Figures indicate the nucleotide positions in the genome of ASGV (P-209)<sup>10</sup>.

### RT-PCR

BD-44株感染ウンシュウミカン‘興津早生’の発芽後30日以内の新芽(0.05g)から、核酸抽出剤ISOGEN(ニッポンジーン)を用いて全核酸を抽出後、20 $\mu$ Lの再蒸留水に懸濁した。RT-PCRは以下のように行った。

逆転写反応液 [6 $\mu$ Lの5x first strand buffer, 1.5 $\mu$ LのRNase Inhibitor (1U/ $\mu$ L, Perkin Elmer), 1.5 $\mu$ LのASCT-3' (-) (100pmol/ $\mu$ L), 12 $\mu$ LのdNTP (2.5mM, TAKARA), 3.5 $\mu$ Lの再蒸留水, 3 $\mu$ Lの0.1Mジチオスレイトールおよび

1.5 $\mu$ Lの逆転写酵素M-MLV (GibcoBRL)]を入れた200 $\mu$ Lマイクロアンプチューブ (Perkin Elmer)に、抽出した全核酸1 $\mu$ Lを鋳型として加え、サーマルサイクラー (Gene Amp System2400, Perkin Elmer)にセットし、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。得られたcDNA溶液またはその希釈液1 $\mu$ Lを、PCR反応液 [8.9 $\mu$ Lの再蒸留水, 0.05 $\mu$ LのASCT-3' (-), 0.05 $\mu$ Lの+鎖プライマー (100pmol/ $\mu$ L) および25 $\mu$ Lのpremix Taq solution (TAKARA)]を入れたチューブに加え、熱変性94 $^{\circ}$ C, 30秒; アニール55 $^{\circ}$ C, 10秒; 伸長反応72 $^{\circ}$ C, 30秒の条件で45サイクル反応させた。産物(10 $\mu$ L)は、1.5%アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色した。

### RT-PCRによって増幅されたウイルスゲノムDNA断片の塩基配列比較

カンキツから分離されたBD-44株, TO-1株, リング分離株であるP-209およびユリ分離株であるLi-23をCTLV-CP2 (+)とASCT-3' (-)のプライマー組み合わせによるRT-PCRに供試して得られたウイルスゲノムDNAの増幅産物を用い、(株)北海道ラボシステムズにシーケンスを依頼して、塩基配列を比較した。

### ELISA および IC-RT-PCR 用試料の調整

BD-44株感染ウンシュウミカン‘興津早生’の発芽後30日以内の新芽を、10倍容の0.1Mクエン酸緩衝液 (pH7.2, 0.1%チオグリコール酸含む)で磨砕後、遠心(5,000rpm, 10分間)して得られた上清を-80 $^{\circ}$ Cで1年間保存した。これを同様に調製、保存した健全カンキツ葉汁液で段階希釈し、ELISAとIC-RT-PCRに供試した。

### ELISA

ELISAは日本植物防疫協会のELISAキットを用い、既報<sup>4,5</sup>に準じて行った。

### IC-RT-PCR

IC-RT-PCRは、以下の手順で行った。200 $\mu$ Lマイクロアンプチューブ (Perkin Elmer)に、0.02Mリン酸緩衝液 (pH7.2, 0.08% NaClを含む)で500倍希釈した抗血清 (日本植物防疫協会)を入れ、37 $^{\circ}$ C, 1時間インキュベートした後、0.05% Tween20加用0.02Mリン酸緩衝液 (以下PBS-T)で3回洗浄した。このコーティングチューブに前述のように調製した試料を加えて、4 $^{\circ}$ Cで一晩静置した。試料を除去後、PBS-Tで3回洗浄後し、反応液 [6 $\mu$ Lの5x first strand buffer, 1.5 $\mu$ LのRNase Inhibitor (1U/ $\mu$ L, Perkin Elmer), 1.5 $\mu$ LのASCT-3' (-) (100pmol/ $\mu$ L), 12 $\mu$ LのdNTP (2.5mM, TAKARA) および3.5 $\mu$ Lの再蒸留水]を加え、65 $^{\circ}$ Cで10分間加熱した。これに3 $\mu$ Lの0.1Mジチオスレイトールと1.5 $\mu$ Lの逆転写酵素M-MLV (GibcoBRL)を加え、サーマルサイクラー (Gene Amp System2400, Perkin Elmer)にセ

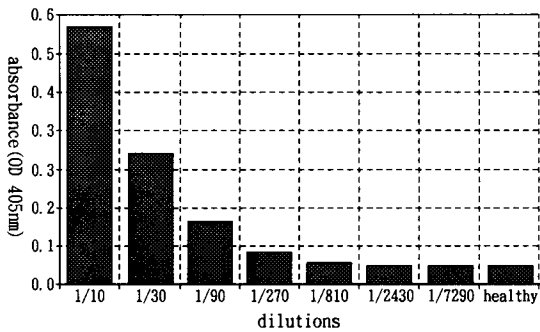


Fig. 1 ELISA of sap from ASGV (BD-44)-infected citrus tree leaves.

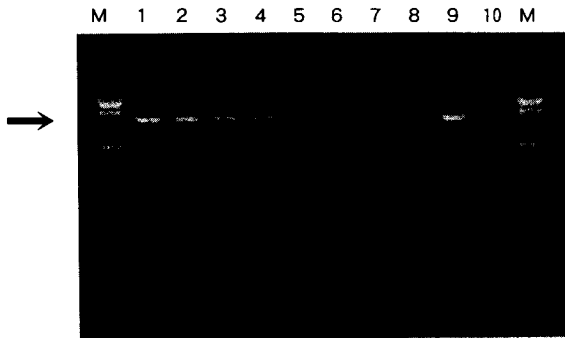


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of DNAs amplified by IC-RT-PCR from leaf samples of a citrus tree infected with ASGV (BD-44). Lane M, DNA 100 bp ladder marker, lanes 1 to 7, DNA products from threefold dilution samples from 1/10 to 1/7290, respectively, lane 8, a product from a healthy sample. Lane 9 and 10, DNA products amplified by RT-PCR from RNAs extract of infected and healthy samples. The arrow indicates the ASGV specific DNA band.

ットし、37℃で1時間反応させた。得られたcDNA溶液(1μL)は前述のRT-PCRと同じ条件でPCRを行い、産物(10μL)は、1.5%アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色した。

### 結果および考察

#### IC-RT-PCRによるカンキツからのASGVの検出

前述のようにして調製したBD-44株感染ウンシュウミカン‘興津早生’の段階希釈汁液を、ELISAとIC-RT-PCRに供試した。Fig.1.に示したように、ELISAでは、希釈倍数が90倍の試料において+ (陽性)と判定されたが、270倍の試料においては± (擬陽性)の判定であった。これに対して、CTLV-ON (+)とASCT-3' (-)のプライマー組み合わせを用いたIC-RT-PCRでは、希釈倍数が2, 430倍の試料からも予想されたサイズ(1.1kbp)のウイルスゲノムDNA断片が増幅された(Fig.2)。

以上の結果から、IC-RT-PCRは、カンキツからのASGVの検出に有効であり、ELISAの再検定にも適用できる可能性が示唆された。

#### PCR用プライマーの改良と増幅されたウイルスゲノムDNA断片の塩基配列比較

本研究で新たに作成した4種の+鎖プライマー(Table 1)とASCT-3' (-)の組み合わせを用いて、BD-44株ウンシュウミカン‘興津早生’葉から抽出した全核酸からのRT-PCRを行ったところ、いずれのプラ

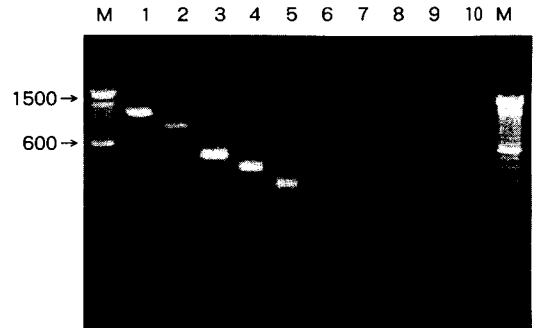


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of DNAs amplified by PCR from leaf samples of a citrus tree infected with ASGV (BD-44). Lane M, DNA 100 bp ladder marker, lanes 1 to 5, DNA products from ASGV-infected samples, lane 6 to 10, DNA products from healthy samples. Primers used were CTLV-ON (+) and ASCT-3' (-) (lanes 1 and 6), CTLV-CP1 (+) and ASCT-3' (-) (lanes 2 and 7), CTLV-CP2 (+) and ASCT-3' (-) (lanes 3 and 8), CTLV-CP3 (+) and ASCT-3' (-) (lanes 4 and 9) and CTLV-CP4 (+) and ASCT-3' (-) (lanes 5 and 10).



Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of DNAs amplified by RT-PCR from leaf samples of a citrus tree infected with ASGV (BD-44) using two different primer pairs, [CTLV-ON (+) and ASCT-3' (-)] (lanes 1 to 5) and [CTLV-CP2 (+) and ASCT-3' (-)] (lanes 6 to 10). Lane M, DNA 100 bp ladder marker, lanes 1 and 6, lanes 2 and 7, lanes 3 and 8, lanes 4 and 9 and lanes 5 and 10; cDNA diluted to 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> and 10<sup>5</sup>, respectively. Arrows indicate ASGV specific DNA bands.

イマー組み合わせでも予想されるサイズのASGVゲノムDNA断片の増幅が確認された(Fig.3)。

次に、2種類のプライマーの組み合わせ、すなわち[CTLV-ON (+), ASCT-3' (-)]と[CTLV-CP2 (+), ASCT-3' (-)]間での検出限界をBD-44株から作製した逆転写後のcDNAを用いて比較した。その結果、CTLV-ON (+)とASCT-3' (-)の組み合わせでは、10<sup>-3</sup>倍に希釈したcDNA溶液が検出限界であったのに対して、CTLV-CP2 (+)とASCT-3' (-)の組み合わせでは、10<sup>-5</sup>希釈液からも判定に十分なウイルスゲノムDNA断片の増幅が認められた(Fig.4)。

BD-44株に加え、同じくカンキツから分離されたTO-1株、リング分離株であるP-209およびユリ分離株であるLi-23を供試して、CTLV-ON (+), ASGV-ON2 (+)およびCTLV-CP2 (+)とASCT-3' (-)のプライマー組み合わせでRT-PCRを行った。その結果、プライマー組み合わせ[CTLV-ON (+), ASCT-3' (-)]では、BD-44とLi-23, [ASGV-ON2 (+), ASCT-3' (-)]では、BD-44とP-209, [CTLV-CP2 (+), ASCT-3' (-)]では、すべての分離株から予想サイズの増幅断片が得られた(データ略)。

このことは、プライマーCTLV-ON (+)および

	5971 <sup>a)</sup>		6040
P-209 <sup>b)</sup>	: tctggcgaaa aaacaaaaat ttgaggatc gatttgtcaa atgttgtcc tgaattgaaa acctttgctg		
Li-23	: tctggcgaaa aaacaaaaat ttgagaaatc gacttgtcaa atgttgtacc tgaattgaaa acctttgctg		
BD-44	:		
TO-1	:		
	6041	<i>forward primer (CTLV-CP2(+))</i>	6110
P-209	: ccacttccag gcagaactct ttgaacgaat gtacgttcag aaagctttgc gagccatttg ccgatttggc		
Li-23	: ccacttccag gcagaactct ttgaacgaat gtacgttcag aaagctttgt gagccatttg ctgatttggc		
BD-44	: ag gcagaactct ttgaacgaat gtacgttcag aaagctttgt gagccatttg ctgatttggc		
TO-1	: ag gcagaactct ttgaacgaat gtacgttcag aaagctttgt gagccatttg ctgatctagc		
	6111		6180
P-209	: tgcgagaattt ctacatgaaa ggtggtctaa gggatttggc accaatattt acaagaaatg gcccaaagct		
Li-23	: ccgttgagttt ctacatgaaa ggtggtctaaa aggatttggc actaacattt ataagaaatg gcccaaagct		
BD-44	: ccgttgagttt ctacatgaaa ggtggtctgaa aggatttggc accaacattt acaagaaatg gcccaaagct		
TO-1	: tgcgagaattt ctacatgaaa ggtggtctcaa aggttttggc actaacattt acaagaaatg gcccaaagct		
	6181		6250
P-209	: ttcgaaaaaa gtccatgggt ggcctttgat tttgccactg gtctgaaaat gaatcgtta acacctgatg		
Li-23	: ttgaaaaaa gcccttgggt ggcatttgat tttgccacog gtctaaaaat gaatcgttta acacctgatg		
BD-44	: ttgaaaaaa gcccttgggt ggcatttgat tttgccactg gtctaaaaat gaatcgttta acacctgatg		
TO-1	: ttgagaaaa gtccatgggt ggcatttgat tttgccacog gtctaaaaat gaatcgtttg acacctgatg		
	6251		6320
P-209	: agaaacaggt gattgataga atgaccaaaa gactttttcg tactgaagga caaaaagggg ttttcgaggc		
Li-23	: agaaacaggt gatogacagg atgaccaaaa gactttttcg tactgaagga caaaaagggg ttttcgaggc		
BD-44	: agaaacaggt gatogacagg atgaccaaaa gactttttcg tactgaagga caaaaagggg ttttcgaggc		
TO-1	: agaaacaggt gatogacagg atgaccaaaa gactttttcg tactgaagga caaaaagggg ttttcgaggc		
	6321		6390
P-209	: aggttcggaa agtaacctgg aactggaggg ttaggagtcg tgtgaaattc cgcaaaacttg gtcgcggtct		
Li-23	: aggttcggag agtaacctgg aactggaggg ttaggagtcg tgtgaaattc cgcaaaacttg gtcgcggtct		
BD-44	: aggttcggag agtaacctgg aactggaggg ttaggagtcg tgtgaaattc cgcaaaacttg gtcgcggtct		
TO-1	: aggttcggag agtaacctgg aactggaggg ttaggagtcg tgtgaaattc cgcaaaacttg gtcgcggtct		
	6391		6460
P-209	: tgcaggttga catgcctgcc tttatactta attaaagggt tccccgggt ttctgagcat ttccgggtta		
Li-23	: tgcaggttga catgcctgcc tttatactta attaaagggt tccccgggt ttctgagcat ttccgggtta		
BD-44	: tgcaggttga catgcctgcc tttatactta attaaagggt tccccgggt ttctgagcat ttccgggtta		
TO-1	: tgcaggttga catgcctgcc tttatactta attaaagggt tccccgggt ttctgagcat ttccgggtta		
	6461	6490	
P-209	: gtgtggtttt tctagagtct agagtttgtc cactct	<i>reverse primer (ASCT-3' (-))</i>	
Li-23	: gtgtggtttt tctagagtct agagtttgtc cactct		
BD-44	: gtgtggtttt tctagagtct agagtttgtc cactct		
TO-1	: ggtgtggtttt tctagagtct agagtttgtc cactct		

Fig.5 Comparison of nucleotide sequences of the genomes of ASGV(isolates P-209, Li-23, BD-44, TO-1).

a) Number means nucleotide position. b) The nucleotide sequences were drawn from papers by Yoshikawa et al.<sup>10,17)</sup> for P-209 and Li-23.

ASGV-ON2(+)はASGV4分離株の遺伝的変異位置に、一方CTLV-CP2(+)は変異していない位置にアニールしていることを示唆しており、多数の分離系統の検出にはCTLV-CP2(+)が有効なことを示している。

さらに、プライマー組み合わせ [CTLV-CP2(+), ASCT-3'(-)] によるRT-PCRによって得られた各ASGV分離株由来のPCR産物の塩基配列を比較 (Fig.5) した。その結果、プライマーCTLV-CP2(+)はASGVのCP遺伝子の標的部にアニールしたことは明らかで、その位置は遺伝的変異がほとんどないことが確認された。このことから、本プライマーセットは多数の分離株の検出に有効であると考えられた。

#### IC-RT-PCRによるカンキツ各組織からのASGVの検出

ELISAによるASGVの検出には、発芽後30日以内の新芽による検定が最も信頼度が高く、それ以上生育が進んだ試料からは検出が困難である<sup>9)</sup>。そこで、発芽後3ヵ月経過したBD-44株の新葉、樹皮および前年枝の旧葉、樹皮から新芽と同様にして得た汁液をELISAとIC-RT-PCRに供試したところ、ELISAでは全く検出されなかった(データ略)が、IC-RT-PCRでは全ての試料で検出可能であった (Fig.6)。このことから、ELISA検定に適さない時期の試料もIC-RT-PCRによって検定できる可能性が示唆された。

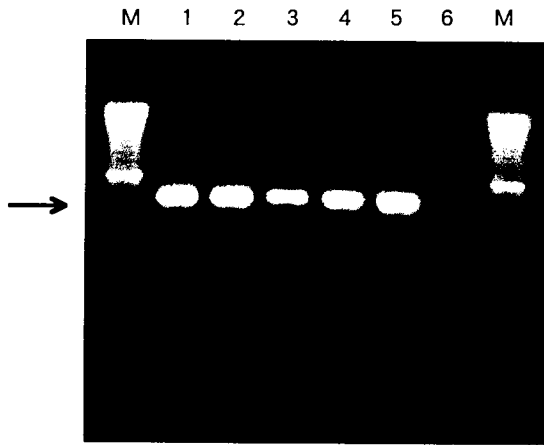


Fig. 6. Agarose gel electrophoresis of DNAs amplified by IC-RT-PCR from different parts of a citrus tree infected with ASGV (BD-44). Lane M, DNA 100 bp ladder marker, lanes 1 to 2, DNA products from ASGV-infected new leaf and bark samples, lane 3 and 4, DNA product from ASGV-infected 2-year-old leaf and bark samples, lane 5 and 6, products from ASGV-infected and healthy new shoots. The arrow indicates the ASGV specific DNA band.

以上のことから、カンキツの ASGV 検定は、ELISA で大量の試料を検定した後に、擬陽性と判定された試料について IC-RT-PCR を実施することで、さらに高精度なウイルス検定を行うことができると考えられた。

## 謝 辞

今回の試験を実施するに当たり、岩手大学農学部吉川信幸博士には、貴重な材料の提供を始め、懇切な御指導、御助言を賜った。ここに記して厚く感謝の意を表する。

## 引用文献

- 1) Calavan, E. C., D. W. Christiansen, and C. N. Roistacher (1963) Symptoms associated with tatter-leaf virus infection of Troyer citrange rootstocks. *Plant Dis. Rep.* **47** : 971 - 975.
- 2) 井上成信・前田孚憲・光畑興二 (1979) ユリから分離された Citrus Tatter Leaf Virus. *日植病報* **45** : 712 - 720.
- 3) 岩波徹・加納健・小泉銘冊 (1991) カンキツタターリーフウイルスの病原性の変異について. *日植病報* **57** : 74.
- 4) 川合昭・西尾健 (1990) 酵素結合抗体法 (ELISA) によるカンキツタターリーフウイルスの検出. *日植病報* **56** : 342 - 345.
- 5) Kinard, G. R., Scott, S. W. and Barnett, O. W. (1996) Detection of apple chlorotic leaf spot virus and apple stem grooving virus by RT-PCR. *Plant Dis.* **80** : 616 - 621.
- 6) 草野成夫・下村克己 (1995) カンキツタターリーフウイルス検出のための ELISA の改良. *福岡農総試研報* **14** : 163 - 166.
- 7) Marinho, V. R. A., Kummart, J., Ruflard, G., Clinet,

- D. and Lepoivre, P. (1998) Detection of apple stem grooving virus in dormant apple trees with crude extracts as templates for one-step RT-PCR. *Plant Dis.* **82** : 785 - 790.
- 8) Miyakawa, T. (1976) A bud-union abnormality of satsuma mandarin on Poncirus trifoliata rootstock in Japan. In proc. 7th Conf. IOCV. IOCV, Riverside. : 125 - 131.
- 9) Miyakawa, T., M. Tsuji. (1986) The association of tatter leaf virus with budunion crease of trees on trifoliata orange rootstock. In proc. 10th Conf. IOCV. IOCV, Riverside. : 360 - 364.
- 10) Magome, H., Yoshikawa, N., Takahashi, T., Ito, T. and Miyakawa, T. (1997) Molecular variability of the genomes of capilloviruses from apple, Japanese pear, European pear, and citrus trees. *Phytopathology* **89** : 389 - 396.
- 11) Nemchinov, L., Hadidi, A., Foster, J. J., Candresse, T. and Verderevskaya, T. (1995) Sensitive detection of apple chlorotic leaf spot virus from infected apple or peach tissue using RT-PCR, IC-RT-PCR, or multiplex IC-RT-PCR. *Acta hort.* **386** : 51 - 62.
- 12) 西尾健・川合昭・高橋勤・難波成任・山下修一 (1989) カンキツタターリーフウイルスの純化ならびに諸性質. *日植病報* **55** : 254 - 258.
- 13) Ohira, K., Namba, S., Rozanov, M., Kusumi, T. and Tsuchizaki, T. (1995) Complete nucleotide sequence of an infectious full-length cDNA clone of citrus tatter leaf capillovirus: Comparative sequence analysis of capillovirus genomes. *J. Gen. Virol.* **76** : 2305 - 2309.
- 14) Semancik, J. S. and Wethers, L. G. (1965) Partial purification of a mechanically transmissible virus associated with tatter leaf of citrus. *Phytopathology* **55** : 1354 - 1358.
- 15) 高橋和雄 (1983) ナシ樹から見出された3種の潜在ウイルスと Apple stem grooving virus の関係. *日植病報* **49** : 432.
- 16) Yoshikawa, N., Imaizumi, M., Takahashi, T. and Inouye, N. (1993) Striking similarities between the nucleotide sequence and genome organization of citrus tatter leaf and an capilloviruses apple stem grooving capilloviruses. *J. Gen. Virol.* **74** : 2743 - 2747.
- 17) Yoshikawa, N., Sasamoto, K., Sakurada, M., Takahashi, T. and Yanase, H. (1996) Apple stem grooving and citrus tatter leaf capilloviruses obtained from a single shoot of Japanese pear (*Pyrus serotina*). *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **62** : 119 - 124.