

資 料

ポンカン品種 'F2432' のウイルスフリー化

谷村音樹¹・野村哲也²・福留弘康²・川口昭二¹・増野陽公^{3, *}

岩井 久³・山本雅史^{1, 4}

(¹附属農場唐湊果樹園, ²附属農場指宿植物試験場, ³植物病理学研究室, ⁴果樹園芸学研究室)

2003年9月19日 受理

Production of Virus Free Plant of Ponkan (*C. reticulata* Blanco) cv. F.2432

Otoki TANIMURA¹, Tetsuya NOMURA², Hiroyasu FUKUDOME², Shouji KAWAGUCHI¹,

Youkou MASHINO³, Hisashi IWAI³ and Masashi YAMAMOTO^{1, 4}

(¹Toso Orchard, ²Ibusuki Experimental Botanical Garden, ³Laboratory of Plant Pathology,

⁴Laboratory of Fruit Science)

緒 言

カンキツには様々なウイルスが感染し、わが国だけでなく世界各地で大きな被害が生じてきた。附属農場唐湊果樹園では、現在のところウイルス病による被害は発生していないが、教育研究用として各地から品種を導入しているため、ウイルス罹病樹による被害発生の可能性が常に存在している。そのため、唐湊果樹園においてカンキツのウイルスフリー化技術を早急に確立する必要がある。既に何種類ものウイルスフリー化技術が開発されてきたが、高原ら⁸⁾の簡易茎頂接ぎ木法は、必要とする設備も簡単で良く、比較的短時間でウイルスフリー植物が得られる優れた方法である。本試験ではその方法によってポンカンのウイルスフリー化を試みた。

材料および方法

唐湊果樹園のガラス温室で保存している鉢植えのカラタチ台 'F2432' ポンカンを材料とした。ウイルスフリー化は高原ら⁸⁾の簡易茎頂接ぎ木法に従った。植物材料はウイルスの不活化のため、熱処理 (34°C, 16時間日長) を行った。また、特に熱処理を行わず、ガラス室

* 現在 九州大学大学院
連絡責任者：山本雅史，附属農場唐湊果樹園

内に保存している植物も7月～9月の高温期の供試材料とした。いずれも繰り返し剪定を行わない、新梢の発芽を促し、約3～5cm伸長したものをウイルスフリー化に用いた。

ウイルスフリー化の方法としては新梢の先端部約台木0.5mmを実体顕微鏡下で切り取り穂木とし、暗黒下、25℃で約2週間育成したカラタチ実生の切断面と穂木の切断面を密着させ、パラフィルムで覆った。接ぎ木した植物は室温、散乱光下で維持した。その後、活着した個体は25℃、16時間日長で生育させた。

ウイルスの検定には、ウイルスフリー化を図った植物（フリー化植物）10個体と、ウイルスフリー化していない植物（母樹）6個体を供試した。検定したウイルスはカンキツトリステザウイルス（CTV）とカンキツタツタリーフウイルス（CTLV）である。CTV検定にはRT-PCR法を用いた。CTVは篩部に局在する¹⁾ので、葉の中肋や葉腋の皮層組織を材料とした。これからのRNAの抽出はDellaporta et al.³⁾の方法に準じた。すなわちRT-PCR BeedsがセットされているPCRチューブ（Ready-To-Go™ RT-PCM Beeds, Amersham Pharmacia Biotech Inc）にDPEC処理水、プライマーとしてCN150とCN151、抽出RNAを混合し、42℃、30分処理でcDNAを作成した。CN150およびCN151はフロリダ大学で開発されたプライマーで、CTVの大半の系統・株のコートタンパク質（CP）コード領域を増幅できる⁷⁾。次にサーマルサイクラーで、95℃（5分）、続いて95℃（1分）、55℃（1分）、72℃（1分）の40サイクルのPCRを行った。PCR産物は1%アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド溶液で染色して、紫外線照射下でCTV-CPに相当するバンドの有無を確認、写真撮影により記録した。

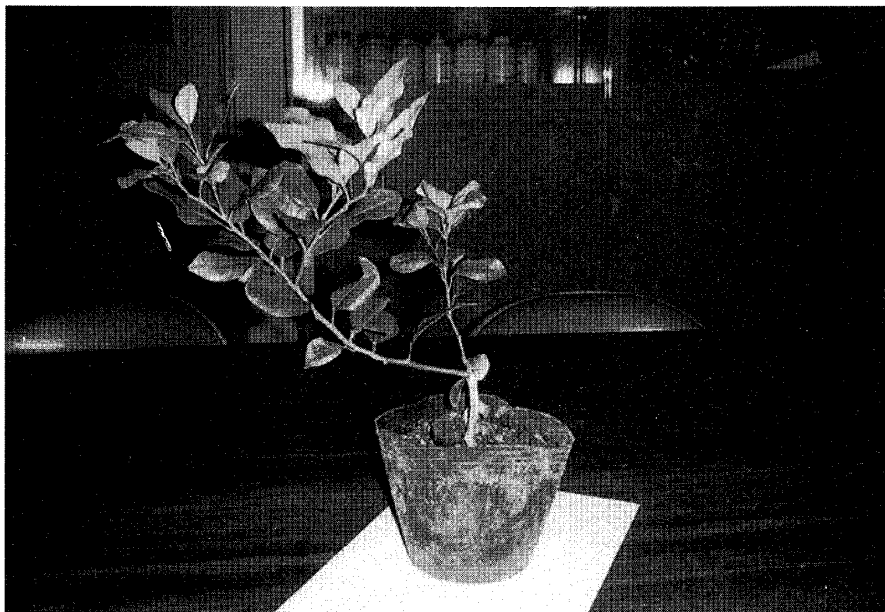
CTLV検定はELISA法で行った。CTLV抗体液およびコンジュゲート液（アルカリフォスファターゼ結合抗体液）は、日本植物防疫協会から購入した。ELISA法は定法に従い²⁾、発色（陽性反応）の有無で、ウイルス保毒状況を調査した。

結果および考察

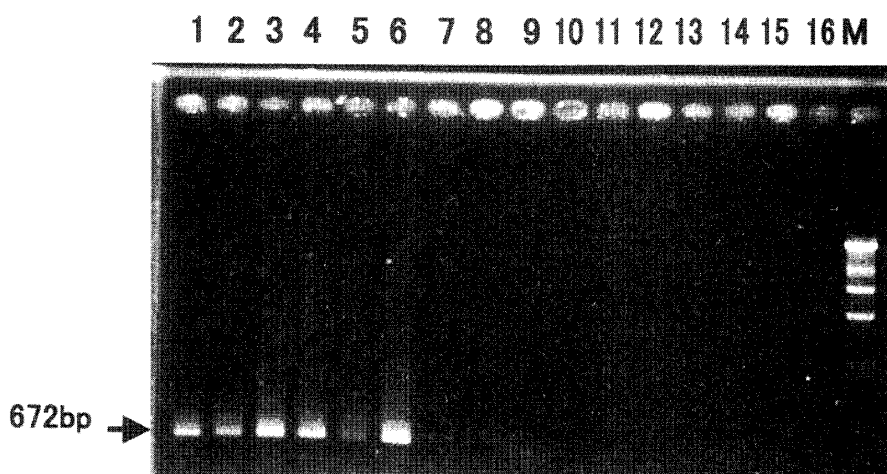
熱処理した材料の接ぎ木は86本実施した。そのうち25本（29.1%）が活着した。無処理区は20本接ぎ木したうち、5本（25.0%）が活着した。

これらのうち、熱処理した穂木を接ぎ木した植物体を約1年生育させ（第1図）、ウイルス検定を行った。RT-PCR法によるCTV検定の結果、母樹6個体は全てCTV感染が認められたが、フリー化植物10個体にはCTVの存在が認められなかった（第2図）。一方、CTLV検定では母樹およびフリー化植物のいずれにおいてもウイルスが認められず、もともと母樹がCTLVに感染していなかったことが判明した。

以上の結果、筆者らが行ったカンキツのウイルスフリー化においては、簡易茎頂接ぎ木の活着率は高くは無かったが、その後生育した植物においては、CTVに関する限り検定した全個体のウイルスフリー化に成功した。ポンカンでは主として台湾から導入された古い品種



第1図. 1年間生育させたウイルスフリー化した個体。
(ウイルスフリー植物)



第2図. RT-PCRによるCTV検査結果。
1～6：母樹，7～16：ウイルスフリー化個体，
M：マーカーDNA (λ DNA/HindIII)。
母樹には672塩基対のCTV-CP遺伝子が認められるが，
ウイルスフリー化個体からは検出されない。

系統において、CTLVに感染していることがあるため^{4, 5)}、本研究においてもウイルス検定を行ったが、母樹がこのウイルスに感染しておらず、CTLVのフリー化の成否については判断できなかった。しかし、熱処理と簡易茎頂接ぎ木法を組み合わせることにより、カンキツの主要ウイルスであるCTV、CTLV、温州萎縮病ウイルス(SDV)およびカンキツモザイクウイルス(CiMV)並びにエクソコーティスウイロイド(CEV)のウイルスフリー化が可能であることが示されており⁸⁾、本研究でCTVのウイルスフリー化に成功したことは、他の

ウイルスのフリー化についても成功する技術があることを示唆するものとする。

引用文献

- 1) Bar-Joseph, M. and Lee, R.F. Citrus tristeza virus. Description of plant viruses No. 353 (No. 33 revised). Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol. Kew, Surrey, England (1989)
- 2) Clark, M.F. and Adams, A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbant assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34 : 475-483 (1977)
- 3) Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J. B. A plant DNA miniprep: version II. Plant Mol. Biol. Rep. 4 : 19-21 (1983)
- 4) 岩堀修一・桑波畑竜沢・大畑徳輔：鹿児島県主産地におけるポンカンの導入経路調査と優良系統の探索について。鹿大農学術報告, 35, 1-7 (1985)
- 5) 宮川経邦：カンキツにおける接木部異常症の病原ウイルスとその分布状況。植物防疫, 31, 395-398 (1977)
- 6) 宮川経邦：カンキツ総論。岩堀修一・門屋一臣編。P.618-638養賢堂, 東京(1999)
- 7) Rubio, L., Ayllon, M.A., Guerri, J., Pappu, H., Niblett, C. and Moreno, P. Differentiation of citrus tristeza closterovirus (CTV) isolates by single-strand conformation polymorphism analysis of the coat protein gene. Ann. Appl. Boil. 129: 479-489 (1996)
- 8) 高原利雄・奥代直巳・久原重松：簡易茎頂接ぎ木法によるカンキツウイルスの無毒化。果樹試報, D 8, 13-24 (1986)