

カンキツ苗のウイルスフリー（無毒化）試験（２）ウイルス検定

谷村音樹

（農学部附属農場）

目 的

昨年の技官研修でウイルスフリー苗の作出方法について発表をしたが、実際にウイルスフリー化に成功したかどうかについては不明のままであった。そこで今回は、昨年度フリー化処理を行った苗に対し、Citrus tristeza virus (CTV) を対象とした RT-PCR (Reverse Transcript- Polymerase Chain Reaction; 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応) 検定と、Citrus tatter leaf virus (CTLV) を対象とした ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay; 酵素結合抗体法) を行うことにより、フリー化の成否を判定したので発表する。

材料と方法

供試植物

ボンカン (F2432) の母樹 (図 1) 6 本と F2432 より作出したウイルスフリー苗をカラタチ台に接木した樹 (図 2) を 10 本、合計 16 本を供試した。日本国内のカンキツはほぼ全て CTV に感染しているとされる。一方の CTLV は必ずしも検出されるとは限らないが、ここで用いた母樹が CTLV の発生地より移植されたことから、検定対象とした。

RT- PCR を使用しての CTV 検定

CTV は篩部に局在するので、磨砕しにくい髓組織を除き、葉の中肋や葉腋の皮層組織を剥ぎとって集めることにより、総量 0.2 g の試料を採取した。採取した試料を乳鉢に入れ、液体窒素を加えて凍結しつつ磨砕して粉状にした。粉状試料をエッペンドルフチューブに集め、これに、TNE 緩衝液 (pH8.0, 0.1M Tris- HCl, 2.8M NaCl, 0.05M EDTA) 0.6 ml, フェノール・クロロフォルム (1 : 1) 混液 0.6ml を加えて、ボルテックスミキサーで激しく攪拌。次に遠心分離 (15000rpm, 5 分) し、上清 350 μ l を採取。採取液に 3 倍量の 99.5% エタノールを加え軽く攪拌 (6 回上下反転) し、-85 $^{\circ}$ C に 20 分静置した後、遠心分離 (10 分) した。上清を除き、沈殿物に STE 緩衝液 (pH7.2, 0.05M Tris- HCl, 0.1M NaCl, 0.001M EDTA) 130 μ l, エタノール 70 μ l および CF11 セルロース 10mg を混ぜて遠心分離 (2 分) した。上清を捨て、沈殿物を 35% エタノールを含む STE 緩衝液 0.4ml に懸濁し、遠心分離 (2 分)。上清を捨て、沈殿物を STE 緩衝液 0.4ml に懸濁し、遠心分離 (1 分)。上清を 350 μ l 回収し、これにエタノールを 3 倍容加え、攪拌 (6 回上下反転) し、-85 $^{\circ}$ C に 20 分静置した後、遠心分離 (10 分) した。上清を捨て、減圧乾燥 (3 ~ 5 分) し、沈殿物を滅菌蒸留水 20 μ l に再懸濁したものを抽出 RNA とした。

RT- PCR Beeds 1 個がセットされている 0.5ml PCR チューブ (Ready- To- GoTM RT- PCM Beeds, Amersham Pharmacia Biotech Inc) に、DEPC 処理水 (核酸分解酵素 RNase を失活させた市販の純水) を 45 μ l, CN150 および CN151 のプライマー液 (20pM/ μ l) を各 1 μ l, そして抽出 RNA を 3 μ l 混合し、42 $^{\circ}$ C のヒートブロックに 30 分間静置することによって cDNA を作成した。CN150 および CN151 はフロリダ大学で考案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。次に、サーマルサイクラーで、95 $^{\circ}$ C (5 分) 続いて 195 $^{\circ}$ C (1 分), 55 $^{\circ}$ C (1 分), 72 $^{\circ}$ C (1 分) } \times 40 サイクルの温度条件で PCR した。PCR 産物は、1% アガロースで電気泳動後、エチジウムプロマイド溶液 (EtBr 10mg/ml) に浸漬 (15 分) し、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。

ELISA による CTLV 検定

まず、ELISA 用ポリスチレン・タイタープレート (96wells) の各 well に、炭酸緩衝液 (pH9.6, 1.59 g Na₂CO₃, 2.93 g NaHCO₃, 0.2 g NaN₃/1000ml 滅菌蒸留水) で 5 μ g/ml に希釈した CTLV 抗体液 (日本植物防疫協会より購入) を 200 μ l ずつ分注した。37 $^{\circ}$ C に 4 時間静置後、未吸着抗体液を除去し、PBS- Tween (pH7.4, 8.0 g NaCl, 0.2 g KH₂PO₄, 2.9 g NaHPO₄ · 12H₂O, 0.2 g KCl, 0.5 μ l Tween20, 0.2 g NaN₃/1000ml 滅菌蒸留水) で 3 回洗浄の後、抗原液として、試料液 0.3 g に PBS- Tween を 6 ml を加えて磨砕して得た上清を 200 μ l ずつ分注した。4 $^{\circ}$ C に一晩静置した後、未吸着抗体液を除去し、PBS- Tween で 4 回洗浄の後、PBS- Tween で 5 μ g/ml に希釈したコンジュゲート液 (アルカリフォスファターゼ結合抗体液, 日本植物防疫協会より購入) を 200 μ l ずつ分注した。37 $^{\circ}$ C に 3 時間静置後、PBS- Tween で 3 回洗浄し、基質液 (p-ニトロフェニルリン酸 2 ナトリウムを pH9.8, 10% ジエタノールアミン溶液に 1 mg/ml 濃度で溶解したもの) を 200 μ l ずつ分注した。室温に 1 時間半静置後、3 N 水酸化ナトリウムを 50 μ l ずつ添加して反応を停止させ、発色 (陽性反応) の有無を判定した。

結果と考察

RT-PCR を使用しての CTV 感染の有無を調べた結果、母樹 6 個体は全て CTV に感染していたが、フリー化処理を行った苗 10 個体は全て、CTV を保毒していなかったことが判明した (図 3)。一方、ELISA を用いて CTLV 感染の有無を調べた結果、母樹ならびにフリー化苗の全てが CTLV を保毒していなかったことが判明した (図 4)。

今回供試した母樹は、たまたま CTLV に感染していなかったと考えられるが、少なくとも CTV に関する限り、今回のフリー化処理は成功していたと考えられる。また、供試植物の項で述べたように、日本国内で栽培されているカンキツは、ほとんどのものが CTV を保毒しているという事実を考え合わせると、今後は RT-PCR によって CTV の存在をモニターリングすることによって、フリー化処理の成否を評価することが出来るのではないだろうか？本技術は、実用化・業務課 (ルーチンワーク化) の価値があると考えられる。

現在、ウイルスフリー苗は小型の人工気象器で維持しているが、昨年の発表時に 30 鉢あったものが、今回の CTV 検定時には 10 鉢、CTLV 検定時には 8 鉢に減り、人工気象器での幼苗維持の難しさを痛感した。CTV は、カンキツ園内でごく普通に見られるミカンクロアブラムシによって再感染するので、ウイルスフリー苗を維持するには、人工気象器での隔離栽培を、続行せざるをえない。

今後の課題として、ウイルスフリー苗のより簡便で効果的な保存方法を考えていきたい。

謝辞；RT-PCR および ELISA の技術指導をして頂いた植物病理学研究室の岩井久助教授に感謝いたします。

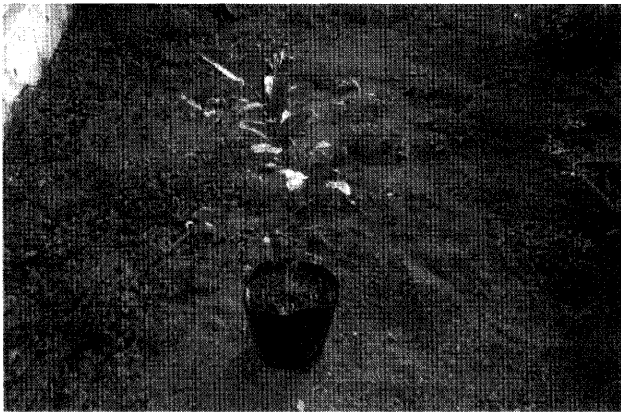


図 1 F2432 (ポンカン) 母樹

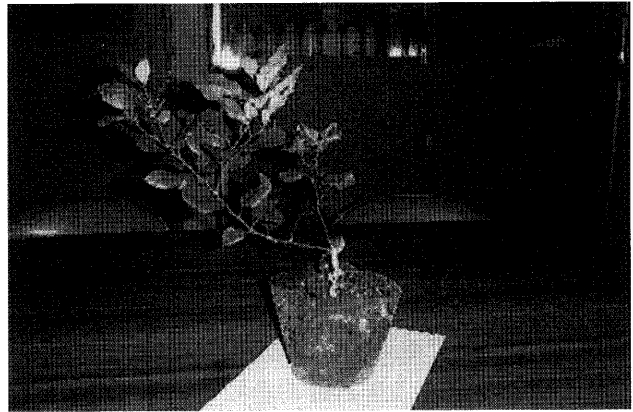


図 2 ウイルスフリー苗

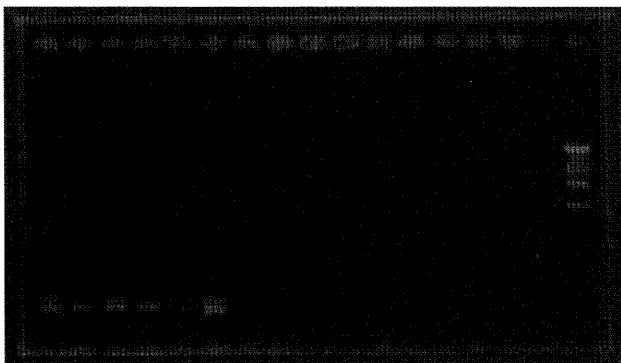


図 3 RT-PCR による CTV 検定結果

左から 6 番目までのレーンは母樹。7～16 番目のレーンはウイルスフリー化を行った苗。右端のレーンは分子量マーカーとして用いた λ DNA/HindIII。母樹には 672 塩基対の CTV-CP 遺伝子が認められるがフリー化苗からは検出されていない。

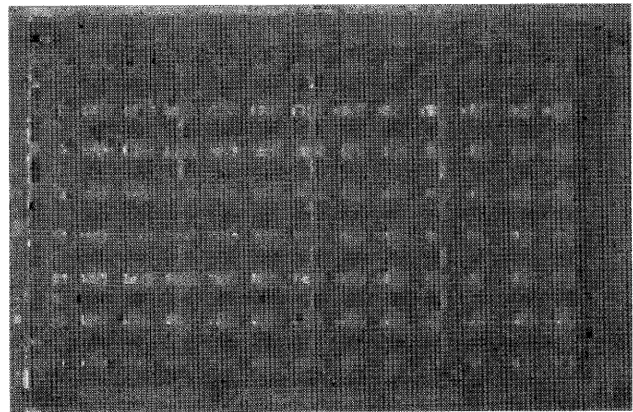


図 4 ELISA による CTLV 検定結果。

抗原としては、B～D 列を 3 反復として、左より 2～7 番目のウェルに母樹の葉粗汁液を、E～G 列を 3 反復として、左より 2～9 番目のウェルにフリー化苗の葉粗汁液を入れた。残りのウェルには、対照区として PBS-Tween を入れた。どの試料も CTLV 陰性の結果を示している。