

リターンゲル電気泳動による果樹ウィロイドの検出

浅井 昌記・小原 達二・高橋 勤

齊藤 鈴夫・田中 健

横浜植物防疫所

Detection of viroids in fruit trees by Return Gel Electrophoresis. Masaki ASAI, Tatsuji OHARA, Tsutomu TAKAHASHI, Suzuo SAITO and Ken TANAKA (Yokohama Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* **34**: 99-102 (1998).

Abstract: "Return"-gel electrophoresis technique is a rapid and relatively simple method for detection of viroids. Phenol extraction method and the method of DELLAPORTA *et al.* (1983) were used for nucleic acid extraction of apple scar skin viroid (ASSVd) from apple leaf tissues. ASSVd could be detected by "Return"-gel electrophoresis. The extracted sample by DELLAPORTA's method showed more clear band in the gel than the sample by phenol extraction method. By using DELLAPORTA's extraction method and return-gel electrophoresis, hop stunt viroid from plum barks and citrus exocortis viroid from citrus leaves also could be detected. It is found that this technique is applicable for detection of viroids to the inspection of mother stocks of fruit nurseries, apple, Japanese plum and citrus trees.

Key words: viroid, return gel electrophoresis, inspection of mother stocks of fruit nurseries

はじめに

現在、果樹母樹検疫で対象となっているウィロイドは citrus exocortis viroid のみである。しかし、近年、リンゴ、ナシ、核果類、カンキツ類等から多くのウィロイド病が報告され(町田, 小金沢(1989), 家城(1995), 伊藤(1995), 畑谷(1997)), その被害も無視できないものとなっている。このため、これらのウィロイド病を果樹母樹検疫の検査対象とする必要があると考えられ、また、それらの検定方法についても検討する必要がある。

ウィロイドは、外皮タンパク質を持たない環状 1 本鎖 RNA である。このため、ウィロイドの検定には外皮タンパク質の抗原性を利用した血清学的診断を用いることができず、生物検定、核酸の電気泳動、遺伝子診断法等が用いられている。これらの検定法の中で、リターンゲル電気泳動法("Return"-gel electrophoresis, SCHUMACHER ら(1986))は短時間に、比較的容易にウィロイドを検出することが可能である。このため、果樹母樹検疫におけるウィロイドの実用的な検定方法としてのリターンゲル電気泳動法の導入について検討を行った。

なお、本試験を行うにあたり、apple scar skin viroid の分譲及び有益な御助言を賜った果樹試験場リンゴ支場の吉田幸二、伊藤伝両博士に厚く御礼申し上げる。

1. 供試材料

apple scar skin viroid (ASSVd), citrus exocortis viroid (CEVd), hop stunt viroid (HSVd), ニホンナシくぼみ果症(ニホンナシ奇形果病)の罹病植物から核酸抽出を行い、電気泳動の試料とした(第 1 表)。

2. 核酸抽出及び電気泳動

ASSVd 罹病樹の生葉 1.0 g を用い、小金沢(1985)の方法及び DELLAPORTA ら(1983)の変法(以下 SDS 法)(第 1 図)により核酸抽出を行い、どちらの方法がリターンゲル電気泳動法に適しているかを比較した。リターンゲル電気泳動は、6% ポリアクリルアミドゲルを用い、1 回目(往路の泳動)は室温でウィロイド核酸が未変性の条件下において、試料に混合したキシレンシアノールがゲルの下端に達するまで泳動し、2 回目(リターン泳動)は 65°C インキュベーター内の変性条件下で電極を 1 回目とは逆にして、キシレンシアノールが上端に達するまで泳動した。泳動後はゲルを

銀染色 (SCHUMACHER ら (1986)) し、ウィロイド由来のバンドの観察を行った。

3. 試料の採取部位及び保存状態

第1表に示したウィロイド罹病樹から葉及び樹皮を採取し、それらを3等分し、うち2つは -80°C 冷凍及びシリカゲルに埋没して、 4°C 冷蔵でそれぞれ10日間保存した。残る1つは直ちに抽出試料として使用した。

これらの試料を用い、採取部位及び保存状態が電気

泳動に及ぼす影響を検討した。核酸抽出には1試料あたり0.3 g を供試した。

結果及び考察

ASSVd 罹病生葉を用いた試験では、小金沢の方法及びSDS法とも健全植物にはみられないウィロイド特有のバンドが観察されたが、SDS法によって抽出した試料を用いた方がバンドはより明瞭であった(第2

第1表 供試植物

種 類	品 種	病 害 名	病原ウィロイド
リンゴ	ゴールデンデリシャス	リンゴさび果病	ASSVd
ナシ	二十世紀	ニホンナシ奇形果病	ASSVd
スモモ	太 陽	スモモ斑入果病	HSVd-plum
カンキツ	エトログシトロン (Arizona 861-S1)	カンキツエクソコーティス	CEVd

小金沢の方法

4.0 ml 抽出 buffer*・4.0 ml 水飽和フェノール
4.0 ml クロロフォルムを加え、磨砕
↓
2,000 g 10 分間遠心分離
↓
水層をとり 1/4 容の 10 M LiCl を加え水中
1 時間放置
↓
20,000 g 10 分間遠心分離
↓
上清に 1/10 容の 20 mM EDTA, 1/2 容の冷エタノールを
加え -20°C で 1 時間放置
↓
10,000 g 10 分間遠心分離
↓
沈殿を 1 ml の 0.1 M 酢酸ナトリウム溶液に懸濁
↓
2 倍容の冷エタノールを加え -20°C で 1 晩放置
↓
10,000 g 10 分間遠心分離
↓
沈殿に 1 ml の冷エタノールを加え沈殿を洗浄する。
↓
10,000 g 10 分間遠心分離
↓
沈殿を真空下乾燥させ 200 μl の loading buffer*** 中に溶
解し泳動用試料とする。

Dellaporta らの方法

6.0 ml 抽出 buffer**・0.2 g ポリビニルピロリドンを加え、
磨砕
↓
 65°C で 10 分静置
↓
2.0 ml の 5 M 酢酸カリウムを加え、攪拌
↓
10,000 g 10 分間遠心分離
↓
上清に 1/2 容のイソプロパノールを加え攪拌
水中に 30 分静置
↓
10,000 g 10 分間遠心分離
↓
上清を捨て沈殿物を真空下乾燥させる
↓
200 μl の loading buffer*** 中に溶解し泳動用試料とす
る。

*抽出 buffer

0.1 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 0.5% SDS
0.25% DIECA, 0.5% 2-メルカプトエタノール (pH 8.5)

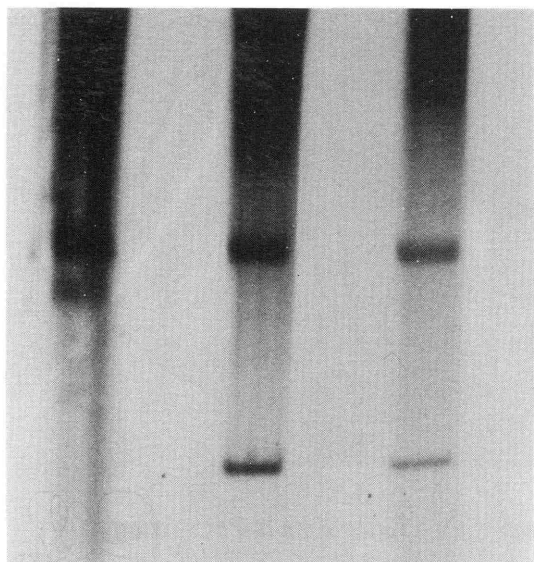
**抽出 buffer

0.1 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 50 mM EDTA
1.25% SDS, 1% 2-メルカプトエタノール (pH 8.0)

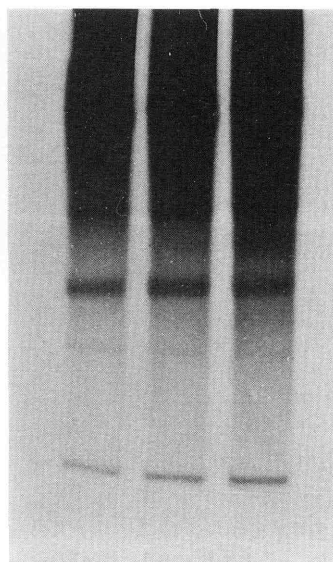
***Loading buffer

40% ショ糖, 0.025% プロモフェノールブルー
0.025% キシレンシアノール

第1図 小金沢 (1983) 及び Dellaporta ら (1983) の核酸抽出法



第2図 ASSVd 罹病葉 1.0 g を使用した抽出法の比較
 1 健全コントロール
 2 Dellaporta らの抽出法で抽出したもの
 3 小金沢の抽出法で抽出したもの
 矢印 ウイロイドバンド



第3図 ASSVd 罹病樹皮 0.1 g の各保存状態における Dellaporta らの抽出による検出比較
 1 生葉
 2 -80°C 冷凍保存
 3 シリカゲル埋没 4°C 冷蔵保存
 矢印 ウイロイドバンド

図)。

そこで、試料の採取部位、保存状態がリターンゲル電気泳動に与える影響について SDS 法を用い検討した。その結果、試料の採取部位は葉に比べ樹皮の方がより明瞭なバンドが観察され、寺内ら (1989) と同様の結果となった。保存状態についてはシリカゲル埋没 4°C 保存した試料がもっとも明瞭なバンドが確認され、次に無処理、 -80°C 保存試料の順となった (第3図)。

上記の結果から、シリカゲル埋没 4°C で保存した試料及び SDS 法を用い、スモモの葉・樹皮、カンキツの葉・樹皮及びナシの葉・樹皮からウィロイドが検出できるか否かについて検討した。

その結果、スモモ樹皮、カンキツ葉からそれぞれのウィロイドを検出することができた (第4図)。

しかし、スモモ葉、カンキツ樹皮及びナシ樹皮、葉から検出することはできなかった。

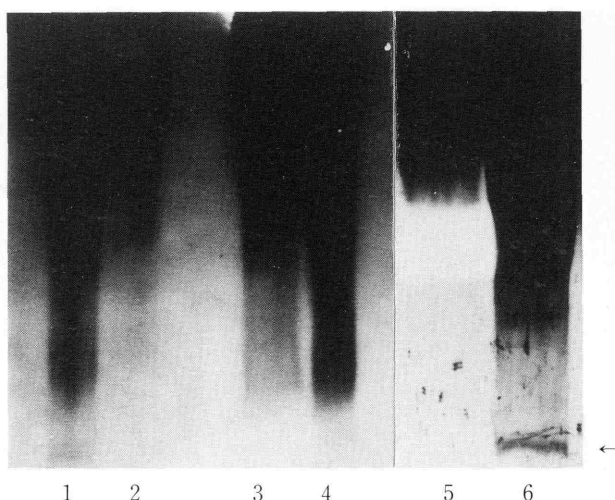
これは、宿主成分、樹体内におけるウィロイドの不

均一な分布 (寺内ら (1989)) 及び試料採取時期等の影響によるものと思われる。

以上のことから SDS 法及びリターンゲル電気泳動法を用いることにより、リンゴ樹皮から ASSVd、スモモ樹皮から HSVd、カンキツ葉から CEVd をそれぞれ検出することができることが判明した。しかし、リターンゲル電気泳動法により検出されるウィロイド由来のバンドによって、その種類を判別することは非常に困難である。このため、ウィロイドの種類を判別する必要がある場合は PCR 等の遺伝子診断法を用いる必要がある。

果樹母樹検疫において、その種類を問わずウィロイド感染の有無のみを検定する第1次スクリーニングにリターンゲル電気泳動法を用いることによりウィロイドの迅速な検定が可能になるとと思われる。

今後、本法に加え遺伝子診断法の導入について検討する必要がある。



第4図 各罹病樹からの Dellaporta らの抽出法による検出結果 (全て 0.3 g シリカゲル埋没 4°C 冷蔵保存試料)

- | | |
|---------|----------|
| 1 スモモ樹皮 | 4 ナシ葉 |
| 2 スモモ葉 | 5 カンキツ樹皮 |
| 3 ナシ樹皮 | 6 カンキツ葉 |
- 矢印 ウイロイドバンド

引用文献

- DELLAPORTA, S.L., J. WOOD, J.B. HICKS (1983) A Plant DNA Miniprep; Version II Plant Molecular Biology Reporter 1: 19-21
- KOGANEZAWA, H. (1985). Transmission to Apple Seedlings of a Low Molecular Weight RNA Extracted from Apple Scar Skin Diseased Trees. Ann. Phytopath. Soc. Japan 51: 176-182
- 畑谷達児 (1997) わが国のカンキツから検出される ウイロイドの特性と検出法. 植物防疫 51: 163-167
- 家城洋之 (1995) 柑橘類のウイルス・ウイロイド病. 果実日本 4: 22-25
- 伊藤 伝 (1995) リンゴのウイロイド病. 果実日本 4: 26-29
- 町田郁夫, 小金沢碩城 (1989) リンゴウイルス及びウイロイド病の検定方法. 植物防疫 43: 456-460.
- SCHUMACHER, J., N. MEYER, D. RIESNER and H.L. WEIDEMANN (1985) Diagnostic Procedure for Detection of Viroidosis and Viruses with Circular RNAs by "Return"-Gel Electrophoresis. J. Phytopathology. 115: 332-343
- 寺内英貴, 吉川信幸, 高橋 壮 (1989) リンゴさび果 ウイロイド (ASSVd) の樹体内分布. Ann. Phytopath. Soc. Japan 55: 90