

福岡県農業総合試験場特別報告

第 2 5 号

カンキツ、スモモにおけるウイルスおよび ウイロイドの診断技術の開発ならびに 樹体への影響に関する研究

平成 1 9 年 9 月

福岡県農業総合試験場

(筑紫野市大字吉木)

**SPECIAL BULLETIN
OF
THE FUKUOKA AGRICULTURAL RESEARCH CENTER
NO.25**

**Studies on the diagnosis of viruses and viroids of citrus and plum ,
and their influence on the trees**

by

Nario Kusano

THE FUKUOKA AGRICULTURAL RESEARCH CENTER

Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan

September 2007

要 約

果樹のウイルス・ウイロイドの診断技術については、これまで抗原抗体反応を利用した ELISA やイムノクロマト法、さらには分子生物学的な高感度検出法として遺伝子診断法が開発されている。本研究では、抗原抗体反応を利用したカンキツウイルス検出のための ELISA の改良、半永久的に安定して抗体を産生できるモノクローナル抗体の作製と実用化、さらに、この抗体を利用したイムノクロマト・キットの作製とその評価、さらには圃場レベルで診断可能とするための簡易磨砕容器の開発を行った。さらに、遺伝子診断技術を応用したリンゴシステムグループウイルス (ASGV) の高感度検出法を開発した。

また、カンキツおよびスモモにおけるウイロイド感染の樹体への影響についての解析を行った。

1 抗原抗体反応を利用したカンキツウイルスの検出

温州萎縮ウイルス (SDV)、カンキツモザイクウイルス (CiMV) およびカンキツトリステザウイルス (CTV) を対象とした ELISA の簡易化法について検討した結果、抗体を固相化したプレートを予め超低温冷凍庫に保存しておくこと、試料液と酵素標識抗体を同時分注することで、全行程所要時間が従来法の所要時間の 31 時間から 11 時間に短縮され、操作の簡易化と併せて総合的な検定方法の簡易化が達成された。また、ASGV は同時分注後の静置温度を 37 とした場合にはほとんど検出できないこと、抗体をビオチンで標識することによって従来法に比べて高感度な検出が可能になることを明らかにした。

モノクローナル抗体 (MAb) の作出とその利用について検討し、CTV では 2 種類の、SDV では 3 種類の抗原決定基 (エピトープ) をそれぞれ認識する MAb を産生するハイブリドーマ (抗体種: IgG) を得た。また、得られた MAb を用いた ELISA およびイムノクロマト法では、異なるパラトープグループに属する MAb を固相化抗体と酵素標識抗体、金コロイド標識抗体として組み合わせて用いることで、変異株を含めた広範囲のウイルス系統を高感度で検出可能であることが明らかとなった。さらに、考案したイムノクロマト・キット (ICA キット) と簡易磨砕容器を用いることで、ICA キットを用いた圃場における果樹ウイルスの診断が可能となった。

2 遺伝子診断による ASGV の高感度検出

多数の異なる ASGV 分離株の検出に有効なプライマーセットの設計や高感度で周年検定可能なシステム構築に関する検討を行い、外被タンパク質 (CP) 領域を含む塩基配列の 6049 か

ら 9496 を RT-PCR で増幅することで ASGV を安定的に検出することができた。また，反応チューブに抗体を固相化して磨砕液中のウイルスを捕捉し，そのチューブ内で逆転写反応および PCR を連続して行うことで（ワンチューブ・ワンステップ IC-RT-PCR），検出感度が飛躍的に高くなり，磨砕液の 100 万倍希釈まで反応陽性を示すバンドを確認することができた。これは，本法を用いることによって従来の RT-PCR と比較して約 500 倍以上検出感度が向上することを示している。カンキツの ASGV 検定においては，まず 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 で再検定することで，さらに信頼性の高いウイルス検定を行うことが可能であると考えられる。

3 スモモ斑入果病の診断法と新たな変異株の検出

RT-PCR を用いた年間を通しての検定試料として樹皮が適していること，ウイロイドの抽出方法として CTAB 法に CF-11 を用いた精製操作を併用することで植物由来の RT-PCR 阻害物質を除去できること，非フェノール性試薬の市販の抽出キットであるセパジーン RV-R が利用可能であることを明らかにした。また，従来，佐野ら（1986）が報告したホップ矮化ウイロイド plum 系（HpSVd-plu）分離株に加えて 3 種類の変異株を発見し，それらの塩基配列を FP1，FP2，FP3 として DDBJ に登録した。

4 各種ウイロイドがカンキツに与える影響解明

調査した圃場の温州ミカン樹は，無病徴樹も含めてすべて 1 ～ 4 種類のカンキツウイロイド（CVd）を保有していることが明らかとなった。カラタチ台の病徴が激しいほど，また，保毒ウイロイド数が多いほど樹容積が小さくなる傾向にあり，被害の大きい台木の病徴はカンキツエクソコーティスウイロイド（CEVd）の病徴と区別が出来ないことが明らかとなった。

5 ホップ矮化ウイロイドがスモモに与える影響解明

西南暖地において，露地の‘大石早生李’では，罹病樹の果実で糖度，酸度がともに高く，無加温ハウスの‘ソルダム’では，露地と比較して罹病樹の果実の糖度低下が認められたが，糖組成については明確な差は認められなかった。これらの調査結果から，スモモ果実の糖度や酸度に対する HpSVd-plu の影響は品種や気温条件で異なると考えられた。新たに発見した HpSVd-plu の 3 変異株も，‘ソルダム’の果実品質に影響を与え，果実糖度の低下が認められた。

