

感染性クローンを利用した TYLCSV の簡易接種法マニュアル



2013 年 12 月

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

野菜茶業研究所

目 次

1. はじめに	・・・	1
2. 感染性クローンを利用した TYLCV の簡易接種法に必要な 機器、試薬および消耗品	・・・	2
3. 感染性クローンを利用した簡易接種法による TYLCV の 接種手順	・・・	3
4. 参考文献	・・・	5
5. 問い合わせ先等	・・・	5

1. はじめに

1) 背景

Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)によって引き起こされるトマト黄化葉巻病はトマトの重要病害である。抵抗性品種の育成・利用が最も効果が高い防除法であるが、TYLCVは保毒タバココナジラミの吸汁によってのみ媒介されることから、選抜のための抵抗性検定には保毒虫による接種が行われている。保毒虫による接種は虫の維持・管理や接種作業に多大な労力を要するとともに、接種圧が必ずしも一様とならないため接種漏れが生じやすい。一方、感染性クローンによる接種は、塩基配列レベルで常に同一のウイルスを接種できるという長所もあるが、現行のシリンジによる接種は労力や接種圧の点で同様の問題があった。本マニュアルでは、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所が開発した、感染性クローンを利用した信頼性の高いTYLCVの簡易接種法を解説する。

2) 本接種法の特徴と留意点

①保毒虫の維持・管理が不要

TYLCVは保毒虫の吸汁によってのみ媒介されるため、TYLCVの接種には保毒虫の維持・管理に労力を要したが、本接種法では保毒虫を用いないため、その維持・管理は不要である。

②常に同一・単一のクローンを接種することが可能

通常のTYLCVは塩基配列の異なるウイルスが混合して存在している。また、ウイルスの維持の過程で変異が蓄積していく可能性がある。本接種法では感染性クローンを使用するため、常に同一・単一のクローンを接種することが可能である。

③接種法が簡便であり大量接種が可能

虫媒接種や従来のシリンジを用いる感染性クローンの接種は、作業が複雑であるため、接種できる植物体の数に制限があったが、本接種法は極めて簡便であり、一人でも短時間のうちに大量の植物に接種が可能である。5分間の浸漬処理で、通常90～100%の植物に感染させることができる。

④減圧処理を追加することにより接種漏れなく確実な接種が可能

虫媒接種や従来のシリンジを用いる感染性クローンの接種は、しばしば接種

漏れが発生する問題があった。本接種法では浸漬処理後に 5 分間の減圧処理を追加で行うことにより接種漏れなく確実に接種することが可能である。接種漏れがなく、病徴発現やウイルス DNA 蓄積の開始時期が揃うため、品種・系統間の抵抗性程度の差異を評価することが可能である。

⑤接種作業およびその後の栽培は組換え DNA 実験に該当する。

接種後の植物は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」における遺伝子組換え生物等に該当するため、本接種法の利用にあたっては法令に定められた規制に従う必要がある。

2. 感染性クローンを利用した TYLCV の簡易接種法に必要な機器、試薬および消耗品

1) 必要な機器、試薬および消耗品

- ・真空計付き真空ポンプ
- ・アセトシリンゴン 和光純薬、328-29612
- ・Jiffy-7 ペレット Jiffy Product International BV、32170142 直径 42 mm
- ・プラントボックス 旭硝子、41-012-002
- ・セルトレー ランドマーク社、50 穴、280 mm × 540 mm

2) 培地、バッファー類

- ・LB 培地

10 mg/L Tryptone, 5 mg/L yeast extract, 10 mg/L NaCl pH 7.0

- ・Infiltration buffer

10 mM MgCl₂, 10 mM 2-morpholinoethansulfonic acid, pH 5.2, 使用直前にアセトシリンゴンを 200 μM となるように加える。

3. 感染性クローンを利用した簡易接種法による TYLCV の接種手順

1) アグロバクテリウム懸濁液の調製

①TYLCV の感染性クローン (pBSzY 等) をアグロバクテリウム (C58C1 等) に導入し、適切な抗生物質を添加した LB 寒天培地上でコロニーを形成させる。コロニーを 3mL の液体 LB 培地に接種し 25°C で静止期まで前培養する。100mL の新しい液体 LB 培地に 200 μ L の前培養液を接種し、25°C で一晩震盪培養する。

②培養液を 8,000 \times g、室温、2 分間遠心し菌体を回収する。菌体を infiltration buffer (10 mM MgCl₂, 10 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid, pH 5.2) に懸濁し、OD₆₀₀ が 1.0 となるように希釈する。接種直前にアセトシリンゴンを終濃度が 200 μ M となるように添加する。

2) 簡易接種法によるトマト切断シュートへ接種

①トマト (第 5 本葉展開後程度) のシュートを長さ 6 cm 程度になるように切り取る (図 1a)。アグロバクテリウム懸濁液 10mL を入れた 50mL のピーカーに、切断面が懸濁液中に浸かるように切断シュートを入れる (図 1b)。5 分間静置して浸漬させる。

②接種漏れなく接種するためには、さらに減圧処理を行う。5 分間の浸漬後のシュートをピーカーごと、-0.09 MPa で 5 分間減圧処理する (図 1c)。

3) 接種したシュートの挿し芽、発根後の病徴観察・ウイルス増殖評価

①接種処理した切断シュートを、Jiffy-7 等の育苗培地に挿し芽する (図 1d)。プラントボックス等の密閉器中で 2 週間培養し発根をさせる (図 1e)。1 週間後から徐々に外気に馴らし始め、2 週間後から外気中で栽培する (図 1f)。

②経時的に病徴観察 (図 1g) やリアルタイム PCR によるウイルス DNA の定量を行い、ウイルス感染に対する応答を評価する。



図1 感染性クローンを利用した TYLCV の簡易接種法の手順

(a) トマトのシュートを長さ 6 cm となるように切る。(b) 切断面がアグロバクテリウム懸濁液に浸かるように 5 分間浸漬する。(c) 接種漏れなく確実に接種する場合は、5 分間の浸漬後、さらに -0.09 MPa で 5 分間減圧処理を行う。(d) 接種後の切断シュートを Jiffy-7 等の育苗培地に挿し芽する。(e) プラントボックス等の密閉容器内で 2 週間培養し発根させる。(f) 2 週間後以降、外気で栽培する。経時的に病徴観察・ウイルス DNA 定量を行い、ウイルス感染に対する反応を評価する。(g) 黄化葉巻症状を示す罹病性品種。

4. 参考文献

Ueda S, Kimura T, Onuki M, Hanada K, Iwanami T (2004) Three distinct groups of isolates of *Tomato yellow leaf curl virus* in Japan and construction of an infectious clone. *Journal of General Plant Pathology* 70:232-238.

Yamaguchi H, Ohnishi J, Miyatake K, Nunome T, Ohyama A, Negoro S, Fukuoka H (2013) A simple, efficient agroinoculation soaking procedure for *Tomato yellow leaf curl virus*. *Journal of General Plant Pathology*, 79, 243-248.

5. 問合せ先等

ご質問等あれば下記までご連絡ください。

〒514-2392 三重県津市安濃町草生 360

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

野菜茶業研究所 野菜育種・ゲノム研究領域

主任研究員 山口博隆

E-mail: hyamagu@affrc.go.jp

TEL: 050-3533-4615(直)

FAX: 059-268-1339

本マニュアルの内容を無断で複製・転載することを禁じます。



NARO

農研機構

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構