

[平成18年度普及に移した技術]

[普及に移す技術名] キクわい化ウイルスの簡易検定法

[要約] キクわい化ウイルスは、有害な薬品を使用しない熱処理法により2時間30分でウイルス RNA を簡易に抽出し、抽出 RNA をドットプロットハイブリダイゼーション後、NBT/BCIP の発色反応により検出できる。

[キーワード] キクわい化ウイルス、熱処理法、検定

[担当] 福井園試・花き研究グループ

[連絡先] 電話 0770-32-0009

電子メール enshi@ain.pref.fukui.jp

[分類] 参考

[背景・ねらい]

キクわい化ウイルスによる切り花品質の低下を防ぐためには、親株のウイルス検定が必要である。しかし、従来の検定方法では、ウイルス RNA の抽出の際に有害な薬品を用いる上、所要時間も多くなる。そこで、ウイルス RNA を安全で簡易に抽出し、検定する方法を検討する。

[技術の内容・特徴]

1. キクのウイルス検定はウイルス RNA を熱処理法により抽出し、ドットプロットハイブリダイゼーションにより検出する。この一連の作業は一日半でできる(図1)。
2. ウイルス RNA の熱処理法による抽出は、抽出溶液で磨砕した生葉を遠心し、その液層を100、3分間処理することに特徴があり、有害な薬品を使用しない。また、抽出操作は全て室温でできる(図2)。
3. 検出はドットプロットハイブリダイゼーション後、NBT/BCIP による発色反応により行い、発色の有無により判定する(図3、4)。

[技術の活用面・留意点]

1. 検定サンプルは、老化していない中位葉を用いる。
2. 検定サンプルはビニール袋に入れて冷蔵保存し、早めに検定する。
3. この方法でウイルスが検出されなかった株を次回作の親株として用いる。
4. 発病には品種間差がみられるため、肥培管理につとめる。
5. ウイルスが検出された親株は早急に焼却処分する。

[具体的データ]

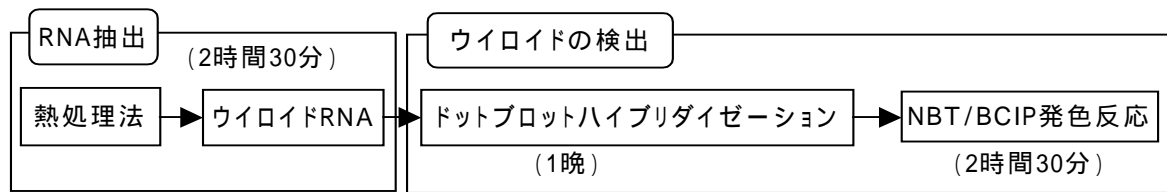
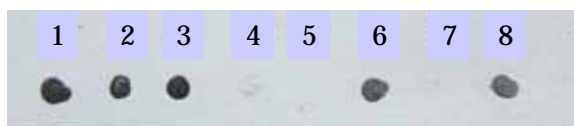


図1 ウィロイド検定の流れと所要時間

- キク生葉(1g)
- 磨碎 + 1mL抽出溶液(1%CTAB, 50mMTris-HCl, 10mMEDTA, 0.7MNaCl)
 - 遠心 15,000rpm, 5分
- 液層
- 熱処理 100℃, 3分
 - 急冷却 0℃, 5分
 - 遠心 15,000rpm, 5分
- 液層(300 μL)
- 攪拌 + 30 μL3M酢酸ナトリウム
 - + 300 μL2-プロパノール
 - 重層 + 400 μL2M塩化リチウム
 - 静置 室温, 10分
 - 遠心 15,000rpm, 30分
- 沈殿
- 洗浄 + 400 μL70%エタノール
 - 乾燥
 - 溶解 + 40 μLH₂O
- ウイルスRNA

図2 熱処理法によるウイルスRNAの抽出方法



発色あり：ウイルス感染株 1,2,3,6,8
 発色なし：健全株 4,5,7

図4 発色の有無によるウイルスRNAの検出状況

- ドットプロットハイブリダイゼーション
- ウィロイドRNA
 - プロット メンブレンにRNA溶液1 μL滴下
 - 固定 120℃, 30分
- ハイブリダイゼーション
- 前処理 Hyb.Buf. 50℃, 30分
 - ハイブリ + プローブ2 μL/1mL
 - 50℃, 1晩反応
 - 1次洗浄 2×SSC, 0.1%SDS
 - 室温5分×2
 - 2次洗浄 0.1×SSC, 0.1%SDS
 - 68℃ 15分×2
- 検出
- 洗浄 Washing Buf. 室温2分
 - 固定 Blocking Buf. 室温30分
 - 吸着 + DIG抗体 室温30分
 - 洗浄 Washing Buf. 室温15分×2
 - 発色 Detection Buf. + NBT/BCIP溶液
- NBT/BCIP発色反応
- 判定

図3 ウィロイド検出方法

[その他]

研究課題名：キクウィロイドフリー苗の生産技術確立

研究期間：2001～2005年度

研究担当者：岩本祐佳、滝修三、数馬俊晴