

シンビジウムにおけるウイルス感染と簡便な無菌培養によるウイルス除去の試み

梁川 正・吉田由美・山本絵美・佐藤昌美

〒612-8522京都市伏見区深草藤森町1番地 京都教育大学

Viruses Detection and Elimination of Cymbidium Mosaic Virus (CyMV) in *Cymbidium* PLBs and Shoots Obtained from Simple Sterile Cultures by Direct Application of Chlorine Disinfectants

Tadashi Yanagawa, Yumi Yoshida, Emi Yamamoto and Masami Sato

Kyoto University of Education, Fukakusa-Fujinomori-cho, Fushimi-ku, Kyoto 612-8522, Japan

The possibility of virus elimination by simple shoot tip cultures and simple in vitro cultures using direct application of chlorine disinfectants was investigated using *Cymbidium* plants infected with CyMV in greenhouse culture and PLBs derived from the shoot tip cultures. The frequency of CyMV elimination tended to increase with increasing simple sterile subcultures of the PLBs on media supplemented with ribavirin. These results suggest that the simple sterile culture methods developed in this study can also be utilized as a simple method for virus elimination in vitro

筆者らは塩素殺菌剤を培地に直接加用することにより培地滅菌ができることならびにランの種子やラン幼植物体を植えつけ直後に培養容器内に殺菌剤を噴霧することにより、非無菌のオープン条件下でも無菌操作が可能な簡便な無菌培養法を明らかにし (Yanagawa ら、1995)、この方法をランのクローン増殖に利用できることを示した (梁川ら、2006)。

本研究では、この簡便な無菌培養の方法がランのウイルス除去のために利用可能かどうかについて追求した。本学の環境教育実践センターの温室で栽培されているシンビジウムについて、ウイルス感染の状況を調査するとともに、塩素殺菌剤を用いた簡便な無菌培養を行って、シンビジウムの PLB や無菌培養株におけるウイルス感染の様相と抗ウイルス剤であるリバビリンを培地に添加することによるウイルス除去の可能性について検討した。

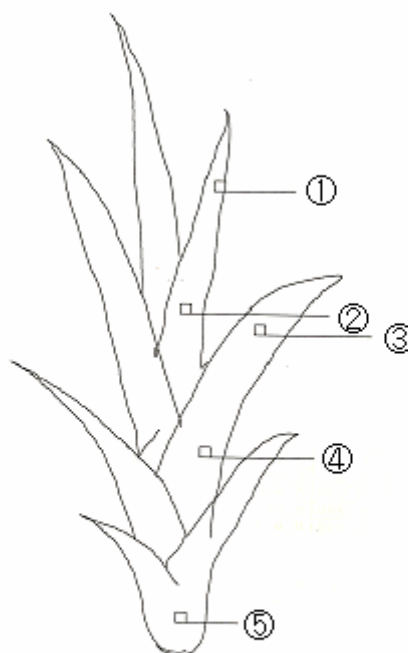
材料及び方法

(1)ラン株におけるウイルス分布

シンビジウム栽培品種ピコレディについて、シンビジウムモザイクウイルス (CyMV)、キュウリモザイクウイルス (CMV)、オドントグロッサムリングスポットウイルス (ORSV) 感染の有無を dot immunobinding assay (DIBA 法) によって検定した。CyMV 感染が認められた温室栽培のシンビジウム株のうち3株について、外側から2枚目、3枚目の葉上部、葉基部、茎基部部分 (第1図) からそれぞれ5 mm角の試料切片を採取し、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA 法) により各部位における CyMV の定量を行った。

(2)大きさの異なる茎頂切片の簡便な無菌培養

シンビジウムモザイクウイルスに感染しているシンビジウム株の新茎を採取し、基部から約 10cm で切断して粗調整し、水洗した後、消毒用エタノールに 10 秒間、10 % 次亜塩素酸カルシウム水溶液に 20 分間浸漬処理を行った。殺菌した新茎を滅菌水で洗い、茎頂部の葉原基を、メスで外側から順次除いて、茎頂部を露出させていった。その際に、茎頂部に、葉原基をそれぞれ2枚、3枚、4枚つけた茎頂切片を作成し、培地に1切片ずつ植えつけた。茎頂切片の大きさは、それぞれ 0.4 mm、1.2 mm、3.3 mm 程度であ



第1図 試料切片の採取部位

った。

培地には、Murashige & Skoog 培地(1962)に生長調節物質である - ナフタレン酢酸(NAA) 1 mg/l と、kinetin 0.1 mg/l を加え、次亜塩素酸ナトリウム(NaClO)無加用及び0.005%(有効塩素濃度)を加用した2種類の区を作成し、pH 5.8 に調整した後に、20 g/lのショ糖、8 g/lの寒天を加えた固体培地を使用した。

培養容器として、直径 18 mm×高さ 140 mm の硬質試験管を用いた。各試験管に上記の培地を 10 ml ずつ分注し、アルミホイルで密閉した後、次亜塩素酸ナトリウム無加用培地については、オートクレーブによる滅菌処理を行い、次亜塩素酸ナトリウム加用培地については、オートクレーブ滅菌処理を行わなかった。この2種類の培地への切片の置床については、クリーンベンチ内で行う他、実験室の非無菌のオープン下でも行った。オープン条件下での置床直後には、0.05%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液(有効塩素濃度)を噴霧した。培養条件は、温度 25±1、湿度 50~60%、照明 3,000 lux、16 時間日長とした。

(3)PLB の増殖に及ぼすリバビリンの影響

(2)の実験で得られた PLB を増殖させるために、PLB をシュートの出かけているものと、そうでないものに分け、2 等分にしたものとそのままのものを、100 ml エルレンマイヤーフラスコの液体培地に植えつけ振とう培養した。培地には、Kano(1965)のハイボネックス 3 g/lの培地に、NAA 1 mg/lを加え、pH 5.8に調整した後に、20 g/lのショ糖を加えた液体培地を用いた。

また、上記の液体培養より得られた PLB のうち、3 mm 以上の大きいものは、2分割し、シュートの出かけているものはその部分を切り取り、18×140 mm の試験管に分注した固体培地へ植えつけて培養した。培地には、Murashige & Skoog 培地(1962)に NAA 1 mg/l、kinetin 0.1 mg/lを加え、pH 5.8 に調整した後に、20g/lのショ糖、8 g/lの寒天を加えた固体培地を用いた。

次に、これらの培養により得られた PLB を2分割し、シュートの出かけているものはその部分を切り取り試験管の固体培地へ1つずつ植えた。培地には、Murashige & Skoog 培地(1962)に NAA 1 mg/l、kinetin 0.1 mg/l を加え、抗ウイルス剤であるリバビリンを 0 mg/l、25 mg/l、50 mg/l を添加したものを作成し、さらに各々について、次亜塩素酸ナトリウム水溶液(NaClO)無加用および0.005%(有効塩素濃度)を加用したものを作成し、pH 5.8 に調整した後に、20 g/lのショ糖、8 g/lの寒天を加え、上記の試験管に分注

した固体培地に植えた。

次亜塩素酸ナトリウム無加用培地については、オートクレーブによる滅菌処理を行い、次亜塩素酸ナトリウム加用培地については、高圧蒸気滅菌処理を行わなかった。この2種類の培地への切片の置床については、クリーンベンチ内で行うほか、実験室の非無菌のオープン下でも行った。オープン条件下での置床直後には、0.005%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液を噴霧した。培養条件は、上述の実験と同様とした。

(4)茎頂培養及び継代培養により得られた PLB 及びシュートのウイルス感染の様相

培養して得られた PLB やシュートについて、実験(1)と同様に、CyMV 感染の有無を dot immunobinding assay (DIBA 法)によって検定した。

結果及び考察

(1) ラン株におけるウイルス分布

DIBA 法によるウイルス検定の結果、シンビジウムでは71%の株が CyMV に感染していた。CMV の感染は認められなかったが、ORSV には調査したすべての株が感染していた(第1表)。

第1表 ウイルスの発生状況

ウイルスの種類	調査数	検出数			
		-	+1	+2	+3
シンビジウムモザイクウイルス (CyMV)	14	4	6	4	0
キュウリモザイクウイルス (CMV)	14	14	0	0	0
オントグロッサムリングスポットウイルス(ORSV)	5	0	5	0	0

- ; 反応なし, +1; 周囲が赤く反応, +2; 全体が赤く反応, +3; 反応が強い

CyMV の濃度を測定するために処理した試料について、415 nmでそれぞれの吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて測定した結果、シンビジウムでは、採取した各部位による CyMV の濃度に大きな違いは見出せなかった(第2表)。本実験の結果

第2表 各部位におけるCyMVの分布状況

採取部位*	株		
	1	2	3
	0.065	0.066	0.141
	0.06	0.061	0.033
	0.061	0.064	0.035
	0.062	0.071	0.039
	0.059	0.066	0.042

* 試料切片の採取部位は第1図に示す

第3表 大ききの異なる茎頂切片のPLB及びシュート形成に及ぼす培地及び植えつけ操作場所の影響

培地滅菌法と植えつけ操作場所	茎頂切片における葉原基数	供試切片数	生存切片数	汚染切片数	変色切片数	新たなPLB形成切片数	1切片当たりPLB数	シュート形成切片数	1切片当たりシュート数	切片の大きさ
オートクレーブとクリーンベンチ	2	10	8	2	6	0	-	1	6	4.8
	3	10	10	3	5	1	2	0	-	4.1
	4	10	8	2	4	1	3	0	-	6.6
オートクレーブとオープン条件	2	10	10	0	10	0	-	0	-	3.2
	3	10	10	0	10	0	-	0	-	3.6
	4	10	10	0	10	0	-	0	-	4.2
NaClO加用とクリーンベンチ	2	10	8	3	3	4	7.3	2	2	13
	3	10	10	3	1	3	5.3	1	3	11.1
	4	10	10	2	3	3	2	0	-	5.5
NaClO加用とオープン条件	2	9	9	0	10	0	-	0	-	2.6
	3	10	10	0	10	0	-	0	-	2.9
	4	9	9	0	10	0	-	0	-	4.5

置床後66日目の結果

では、茎頂以外のウイルス濃度の低い部位を見出せなかった。

(2) 大ききの異なる茎頂切片の簡便な無菌培養

それぞれの茎頂切片は置床して培養後、15日目頃には、肥大し、茶色に変色し、40日目頃には、PLB及び根の形成がみられ、54日目頃には、PLB及びシュートの形成が認められた。

葉原基数2枚、3枚、4枚の茎頂切片を次亜塩素酸ナトリウム入り培地にクリーンベンチ下で植えつけた区と、葉原基数3枚、4枚の茎頂切片をオートクレーブ滅菌培地にクリーンベンチ下で置床した区でのみ、PLB形成がみられ、非無菌条件下で植えつけて次亜塩素酸ナトリウム水溶液を噴霧した区では切片が変色してPLBの形成は認められなかった(第3表)。

(3) PLBの増殖に及ぼすリバビリンの影響

液体培地へ植えつけた結果、PLBの形成については、上部を切り取ったPLBと上部を切り取り2分割にしたPLBに新たなPLB形成がみられた。1切片当たりのPLB数の平均をみると、上部を切り取り2分割にしたPLBに多くの形成が認められた。シュート形成が最も多くみられたのは、PLB形成と同様上部を切り取り、2分割にしたPLBであった。

固体培地へ植えつけした場合、約半数の切片が肥大し、2割強の切片に新たなPLBが認められた。

リバビリン添加培地で培養した結果、リバビリン0 mg/l区、50 mg/l添加区においては、オートクレーブ滅菌培地にクリーンベンチ下で植えつけた区、次亜塩素酸ナトリウム加用培地にクリーンベンチ下置床区でPLB形成がみられ、リバビリン25 mg/l添

加した次亜塩素酸ナトリウム加用培地にオープン下で植えつけた区以外の区においてPLB形成がみられた。1切片当たりのPLB数についてみると、どの濃度のリバビリン添加区についても、オートクレーブ滅菌培地にクリーンベンチ置床区において最も多くの形成が認められた。

リバビリン50 mg/l添加の次亜塩素酸ナトリウム加用培地にクリーンベンチ下で植えつけた区、リバビリン0 mg/l区、25 mg/l添加区、50 mg/l添加区の次亜塩素酸ナトリウム加用培地にオープン下で置床する以外の区においてシュート形成がみられた。1切片当たりのシュート数は、リバビリン25 mg/l添加区のオートクレーブ培地にクリーンベンチ下で置床した区が最も多かった。

(4) 茎頂培養及び継代培養により得られたPLB及びシュートのウイルス感染の様相

茎頂培養及び継代培養により得られたPLB及びシュートにおけるシンビジウムモザイクウイルス感染の様相を(1)の実験と同様にDIBA法により検定した結果、茎頂培養より得られたPLB及びシュートにおけるほぼ全体が、シンビジウムモザイクウイルスに感染していた。その程度は、葉原基数の多い茎頂切片ほど感染程度の大きいものが多かった(第4表)。

茎頂培養により得られたPLBを、さらに、液体培養して得られたPLBの上部を切り取った切片に

第4表 茎頂培養により得られたPLB及びシュートにおけるCyMVの検出

無菌培養時に用いた葉原基数	検定に用いた材料	ウイルス			ウイルス検出程度		
		検定数	未検出数	検出数	+1	+2	+3
2	PLB	5	2	3	2	1	0
2	シュート	4	2	2	2	0	0
3	PLB	3	2	1	0	1	0
3	シュート	5	2	3	0	1	2
4	PLB	4	1	3	0	0	3
4	シュート	9	3	6	2	2	2

茎頂培養で用いたPLBは、オートクレーブ培地、またはNaClO加用培地にクリーンベンチ下置床区より用いた。ウイルス検出程度 +1:小、+2:中、+3:大

第5表 液体培養によって得られたPLB及びシュートにおけるCyMVの検出

用いたPLBの状態	検定に用いた材料	ウイルス			ウイルス検出程度		
		検定数	未検出数	検出数	+1	+2	+3
無切断	PLB	1	0	1	1	0	0
たてに2分割した	PLB	1	0	1	0	1	0
上部を切り取った	PLB	2	2	0	-	-	-
2分割し上部を切り取った	シュート	2	1	1	0	1	0
	PLB	2	1	1	1	0	0
	シュート	1	0	1	1	0	0

ウイルス検出程度 +1:小、+2:中、+3:大

第6表 リバビリン添加培地によって得られたPLB及びシュートにおけるCyMVの検出

リバビリン濃度 (mg/l)	培地滅菌法と操作場所	検定に用いた材料	検定数	ウイルス検出の有無		ウイルス検出程度		
				無	有	+1	+2	+3
0	オートクレーブとクリーンベンチ	PLB	8	5	3	3	0	0
		シュート	4	4	0	-	-	-
	オートクレーブとオープン条件下	PLB	1	1	0	-	-	-
		シュート	3	2	1	1	0	0
25	オートクレーブとクリーンベンチ	PLB	3	3	0	-	-	-
		シュート	3	3	0	-	-	-
	オートクレーブとオープン条件下	PLB	2	2	0	2	0	0
		シュート	2	2	0	-	-	-
50	オートクレーブとクリーンベンチ	PLB	2	2	0	-	-	-
		シュート	1	1	0	-	-	-
	オートクレーブとオープン条件下	PLB	2	1	1	1	0	0
		PLB	1	0	1	1	0	0
	NaClO加用とクリーンベンチ	PLB	3	2	1	1	0	0

ウイルス検出程度 +1:小、+2:中、+3:大

ついては、ウイルス未検出のものがみられた(第5表)。全体に、茎頂培養より得られたPLB及びシュートをさらに培養するにつれて、ウイルス検出程度は小さくなった。

リバビリン添加培地より得られたPLB及びシュートについて、リバビリン0mg/l、25mg/l、50mg/lの全ての添加区において、ウイルスは検出され、ウイルス除去に対するリバビリンの添加効果は明確には認められなかった。次亜塩素酸ナトリウム加用培地にクリーンベンチ下で植えた区では、ほぼ全てがウイルス未検出であった。また、PLBよりもシュートの方がウイルス未検出数は少なかった(第6表)。

検定個体数が少ないので、さらに多くの検体を調べることが課題ではあるが、茎頂培養で得られたPLBを抗ウイルス剤リバビリンを添加した液体培地や固体培地で継代培養することにより、ウイルス検出程度が低くなる傾向がうかがえ、その際の培養方法に次亜塩素酸ナトリウムといった塩素殺菌剤を用いた簡便な無菌培養法を用いることは

十分に有効であることが認められた。塩素殺菌剤を用いた簡便な無菌培養法は増殖方法が簡便なだけでなく、ウイルス除去の観点からみても容易に継代培養を繰り返すことができるので、ウイルス除去個体の獲得にも有効な方法であることがわかった。

引用文献

- Yanagawa, T., M. Nagai, T. Ogino and R. Maeguchi. 1995. Application of disinfectants to orchids seeds, plantlets and media as a means to prevent in vitro contamination. *Lindleyana* 10:33-36.
- 梁川 正・船井リマ・山本絵美・西山杏奈 2006 塩素殺菌剤を用いたランの簡便な in vitro クローン増殖. 名古屋国際蘭会議記録 2006 pp.29-34.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-479.
- Kano, K. 1965. Studies on the media for orchid seed germination. *Mem. Fac. Kagawa Univ.* 20:1-68