

21. 牧草・芝草のアクレモニウム・エンドファイトの ELISA法による検出			分 類	研 究
草地試験場 育種部 育種化学研究室、環境部 作物病害研究室			連 絡 先	育種化学研
適用地域	特に制限なし			0287-36-0111
[要約] <u>アクレモニウム・エンドファイト</u> はイネ科牧草や芝草に感染し、家畜に対する有害物質を産生したり植物に病虫害抵抗性を付与することから最近注目を集めている。このエンドファイトの感染の有無を抗エンドファイト抗血清を作成することにより <u>ELISA法</u> で感度よく迅速に判定することができた。				

背景・ねらい

アクレモニウム・エンドファイト（以下エンドファイトと略する）はイネ科牧草や芝草に感染して、家畜に対する有害物質を産生したり、植物に病虫害抵抗性を付与することから最近注目を集めている。このエンドファイトに感染した植物は通常病徴を呈することがないため、その感染の有無の判定には光学顕微鏡による観察が主に行われている。しかし、この方法は多数の試料の検定には適さないため、本研究ではエンドファイトに対する抗血清を作成し、マイクロプレートを用いたELISA法によるエンドファイトの検出を行う。

成果の内容・特徴

エンドファイトに対する抗血清を作成し、それを利用したELISA法によるエンドファイトの検出システムを確立した。これにより微量および多数の植物試料のエンドファイト感染の有無を効率よく判定できるようになった。

- (1) 50 μ lの植物抽出液で感染の有無が判定できるため、生重で0.2gの試料があれば分析できる（表1）。
- (2) マイクロプレートを使用するため多数の検体の判定を迅速に行うことができる。
- (3) 数十ナノグラム（10⁻⁸g）のエンドファイト蛋白質の検出が可能である（図1）。
- (4) 405nmの吸光度（A₄₀₅）= 0.3を基準として植物体のエンドファイト感染の有無が判定できる（表2）。
- (5) 多数の個体をまとめて一つの抽出液とすることができるため、圃場のエンドファイト感染の有無は、顕微鏡法より少ない検体数で判定できる（表3）。

成果の活用面・留意点

- (1) 多数の試料の中からエンドファイトを検出するための1次スクリーニングの方法として非常に有用なものとなる。
- (2) 植物抽出液中にも本システムに反応する物質が一部存在するので弱い発色しか示さない試料の判定には注意を要する。また今回使用した抗血清はアクレモニウム・エンドファイト以外の若干のカビにも反応するので、光学顕微鏡観察等を併用することが望ましい。

研究課題名： エンドファイト寄生植物の特性解明

－ELISAによるエンドファイト検出法の開発－

研究期間： 平成3年

予算区分： 重点基礎

研究担当者： 秋山典昭・古賀博則・月星隆雄・斎藤祐二・植松 勉

発表論文等： 秋山典昭・古賀博則・月星隆雄・植松 勉（1992）牧草エンドファイト（*Acremonium* spp.）に対するELISA法の開発とその適用，日植病報 58(1) 157.

[具体的データ]

表1 ELISA法の操作

操作*	所要時間(分)	備考
試料 ¹⁾ の吸着	30	50 μ l / 穴
└ 洗浄		TBS (50mM Tris, 500mM NaCl, pH7.5)
ブロッキング	30	3%脱脂粉乳/TBS
└ 洗浄		T-TBS (0.05% Tween-20 / TBS)
1次抗体反応	60	ウサギ免疫血清(自家調製)
└ 洗浄		T-TBS
2次抗体反応	60	ヤギ抗ウサギIgG抗体 - 7A3リファクター ²⁾ (Bio-Rad社より購入)
└ 洗浄		T-TBS
7A3リファクター ²⁾ の 発色反応	60	7A3リファクター ²⁾ 基質の分解 → 発色(405nm)
└ 反応の停止		0.5N NaOH

吸光度の測定(405nm ; A ₄₀₅)		マイクロプレートリーダー(タイテック社)
└ 判定		

* ; 反応は30' Cで行った
 ** ; 凍結試料(g) : 緩衝液(ml) = 1 : 10 で抽出したものを分析

表2 植物体中のエンドファイトの検出

品名	感染 ¹⁾ の有無	A ₄₀₅
トールフェスク		0 0.5 1.0
タイタン	+	***** (0.81)
ケンタッキー31	-	***** (0.18)
ベレニアルライグラス		
SR4100	+	***** (0.68)
ジャイアント	-	***** (0.24)
チモシー		
(品名不明)	+	***** (0.73)
(品名不明)	-	***** (0.14)

* ; 顕微鏡観察により感染の有無を確認した試料を分析

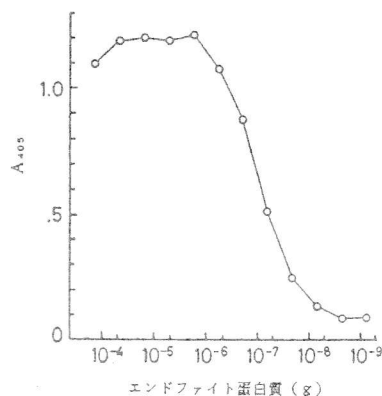


図1 エンドファイト抽出液を試料とした時のELISA法の感度

表3 圃場中のエンドファイトの検出

品種 (ベレニアルライグラス)	顕微鏡 ¹⁾ 感染率 (%)	ELISA ²⁾ A ₄₀₅
Cowboy	95	++
Palmer	0	-
Prelude	0	-
Repel	80	+
All Star	90	+
Pennant	75	+
Derby	0	-
SR4000	90	+
Manhattan II	0	-
Jazz	70	++
Pennfine	0	-
Omega II	90	+
SR4100	80	++
Competitor	70	+

* ; 観察した20個体の試料の内、菌糸が確認された個体の百分率
 ** ; 5個体をまとめて調製した1つの抽出液を分析
 - ; A₄₀₅ < 0.3, + ; 0.3 ≤ A₄₀₅ < 0.4, ++ ; 0.4 ≤ A₄₀₅