

愛媛県内で発生するソラマメウイルス病のマルチプレックス RT-PCR による検出

1. 目的

愛媛県内で栽培されているソラマメには、インゲンマメ黄斑モザイクウイルス (BYMV)、ソラマメウルトウイルス (BBWV)、クローバー葉脈黄化ウイルス (ClYVV)、ソラマメえそモザイクウイルス (BBNV) などのウイルスが発生する。ウイルスの防除には迅速な診断が不可欠でありこれらウイルスの検出には RT-PCR 等の遺伝子診断法が利用されている。しかし、検出するウイルス種が多いと作業工程が煩雑になり器材の数も増える。そこで、核酸精製を行わず粗抽出液を使用し簡易化を図るとともに、これら 4 種の病原ウイルスを同時に行うマルチプレックス RT-PCR 法を検討する。

2. 試験方法

1) 核酸粗抽出方法

サンプリング葉を直径 8mm (1.5ml マイクロチューブ蓋利用) にパンチングし 0.5ml の 0.05M Tris-HCl (pH7.0) バッファーでホモジナイズした後に 20 倍希釈した 2 μ l とした。

2) RT-PCR 法の実施

(1) 検定ウイルス種と使用プライマー

笹谷ら (1991) の報告により対象ウイルス種を選定した。

- ①インゲンマメ黄斑モザイクウイルス (BYMV) : Uga (2005) の使用プライマー
- ②ソラマメウルトウイルス (BBWV) : Panno et al. (2014) の使用プライマー
- ③クローバー葉脈黄化ウイルス (ClYVV) : Nakazono-Nagaoka et al. (2009) の使用プライマー
- ④ソラマメえそモザイクウイルス (BBNV) : 愛媛大学分子生物資源学研究室の指導を受け、プライマーを新規に作成した。フォワードプライマーは F1 (GGCTGTGTTGTGGAAAAAT)、リバープライマーは R12 (TCATCTCCACCGAAATCAT) を供試した。

(2) 診断方法

①テンプレートの調整と供試量

サンプリング葉を直径 8mm (1.5ml マイクロチューブ蓋利用) にパンチングし 0.5ml の 0.05M Tris-HCl (pH7.0) バッファーでホモジナイズした後に 20 倍希釈した 2 μ l とした。

②RT-PCR と電気泳動

PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver. 2 (タカラバイオ製) を用いた。各プライマー量は 20 μ M を 0.2 μ l とし、RT-PCR は 20 μ l スケールで行った。

RT-PCR 反応条件は、50°C・30 分、94°C・2 分の後、94°C・0.5 分、55°C・0.5 分、72°C・1 分を 35 サイクル繰り返し、最終伸長を 72°C・5 分とした。

ゲルレッド含有 1.5% アガロースゲルの電気泳動により DNA 増幅産物を分画した後、紫外線照射下で目的バンドの有無からウイルス感染を判定した。

3) 各ウイルスの単独感染株 (ポジティブコントロール)

農研機構 (元四国農業試験場) の笹谷孝英氏より BYMV 株 (愛媛県産)、BBWV 株、C1YVW 株を、埼玉県農林総合研究センター宇賀博之氏により BYMV 単独感染株 (埼玉県産)、BBNV 単独感染株を分譲していただいた。

3. 結果の概要

- 1) 粗抽出-マルチプレックス RT-PCR の検出は BBNV 株、BBWV 株、C1YVW 株、BYMV 株 (埼玉県産) の目的バンドを明瞭に確認でき、非特異反応も殆どなかった (図 1-1、図 1-2、図 1-3、図 1-4)。
- 2) しかし、BYMV 株 (愛媛県産) の目的バンドは不明瞭であった (図 1-5)。愛媛県産の BYMV 株は埼玉県産の BYMV 株とは別系統の BYMV と考えられ、マルチプレックス RT-PCR を行うには愛媛県産 BYMV 系統用のプライマー作成する必要があると思われる。

4. 主要成果の具体的数字

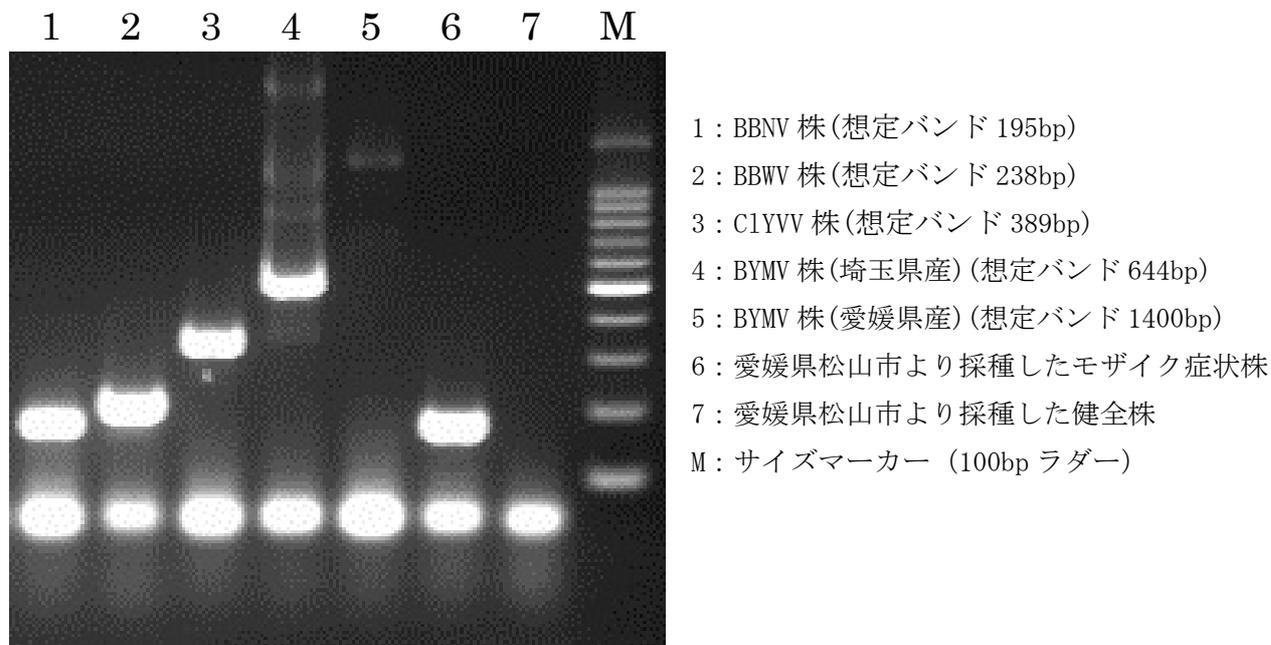


図1 粗抽出-マルチプレックス RT-PCR による検出