

作物名	ソラマメ	県名	愛媛県	所属	愛媛県病害虫防除所
調査・研究課題名			担当者	毛利幸喜、青野光男、奈尾雅浩	
愛媛県内で発生するソラマメウイルス病の RT-PCR による診断					

1. 目的

愛媛県内で栽培されているソラマメにおいてモザイク症状や萎縮等のウイルス症状を発症する病原ウイルスを、遺伝子診断法である RT-PCR 法を適用して明らかにする。

2. 調査（試験）方法

1) 供試葉と症状整理

県内圃場で発症していたウイルス様症状を症状別に整理し生長点近くの上位葉を採集した（計 11 サンプル）。

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 (GGCTGTGTTGTGGGAAAAAT)、リバープライマーは R11、R12 (TCATCTCCACCGGAAATCAT)、R13 の 3 種を供試した。

(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 20~200 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。RT-PCR は 20 μ l スケールで行った。

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

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、エチジウムブロマ이드によりゲル染色し、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. 結果の概要

- 1) BBNV 検出プライマーは、F1、R12 の組み合わせが、目的バンド (195bp) を明瞭に確認でき、非特異反応も殆どなく、最適であった (図 1)。

- 2) 供試 11 サンプル中 9 サンプルに BYMV が感染し、4 サンプルには BBNV が感染し、3 サンプルは BYMV と BBNV の重複感染であった (表 1)。
- 3) CIYVV、BBWV は未検出であった。
- 4) 症状と検出ウイルス種に明確な関連性は認められなかった (表 1)。

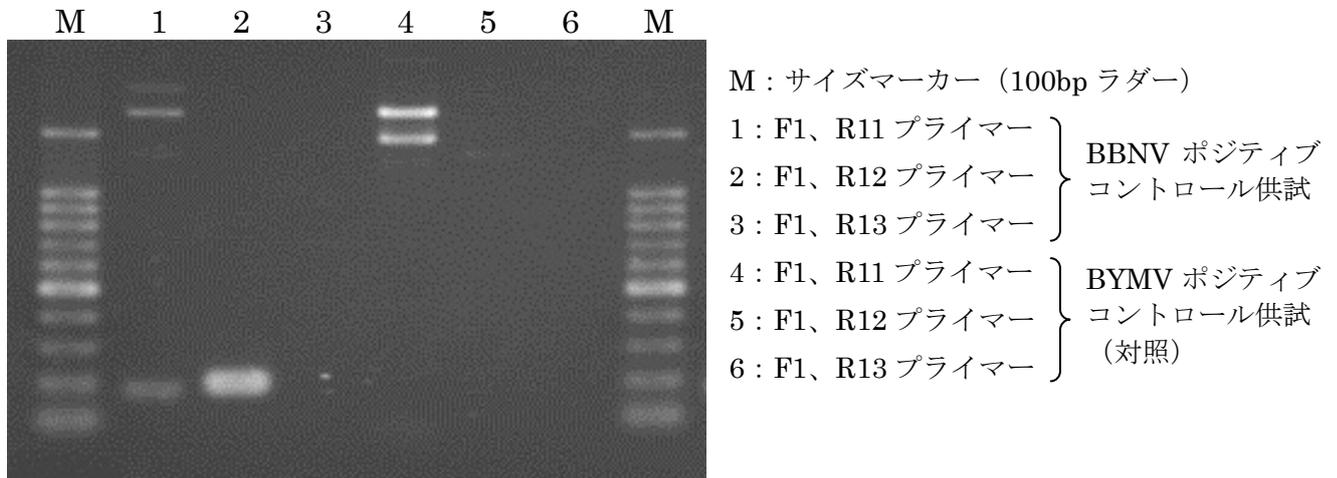


図 1 各プライマーによる BBNV、BYMV 感染葉における RT-PCR 反応後の電気泳動像
 増幅サイズは、F1、R11 : 179bp、F1、R12 : 195bp、F1、R13 : 247bp。

表 1 ソラマメのウイルス症状の違いと RT-PCR による検出ウイルス種

採集場所	葉のモザイク		葉の萎縮		壊疽		株の萎縮	検出ウイルス種
	鮮明なモザイク	不鮮明モザイク	葉がねじれ、上方に巻く	葉が変形して小型化	葉に壊疽斑点	茎に壊疽条斑		
難波(旧北条)①		○	○		○			BYMV、BBNV
難波(旧北条)②	○		○		○			BYMV、BBNV
難波(旧北条)③		○	○		○	○		BYMV
安城寺	○						○	BBNV
岡田		○	○					BYMV
三谷	○		○	○	○		○	BYMV
大間		○	○				○	
小坂①	○		○					BYMV
小坂②	○		○					BYMV
天山		○					○	BYMV、BBNV
味生	○				○			BYMV

サンプルは松山市、伊予郡松前町で採集。検定対象ウイルス種は BYMV、BBNV、BBWV、CIYVV の 4 種。