

RT-PCRを用いたサツマイモからのサツマイモ斑紋モザイクウイルスの検出

大貫正俊・酒井淳一・森 昌樹・宇杉富雄¹⁾・津田新哉²⁾・花田 薫

(九州農業試験場¹⁾ 国際農林水産業研究センター沖縄支所²⁾ 茨城県農業総合センター生物工学研究所)

Masatoshi ONUKI, Jun-ichi SAKAI, Masaki MORI, Tomio USUGI, Shinya TSUDA and Kaoru HANADA :

Detection of Sweet Potato Feathery Mottle Virus from

Infected Sweet Potato Plants by RT-PCR

サツマイモ帯状粗皮病は、サツマイモ斑紋モザイクウイルス強毒系統 (SPFMV-S) に起因するが、この強毒系統を含めSPFMVのサツマイモ植物体中での分布や濃度が不均一であることはすでにいくつかの報告があり^{1), 2)}、筆者らの実験でも同様な結果が得られている³⁾。そこで、SPFMVの検出精度を高めるためにウイルスの高感度検出法の一つであるRT-PCRの利用について検討を行った。RT-PCRによるサツマイモ感染葉からのSPFMVの検出はこれまで成功していなかったが⁴⁾、筆者らはサツマイモ感染葉からもRT-PCRによりウイルス検出が容易にできることを確認したのでその概略を報告する。

1. 材料及び方法

SPFMVの感染試料としてSPFMV普通系統 (O)、強毒系統 (S) を接木接種したサツマイモ (高系14号) の葉を供試した。また、O、S及びSPFMV静岡分離株 (Si)、徳島系統 (T)、F系統 (F) に単独感染させたアサガオ葉を用いた。SPFMV各系統・分離株のウイルスRNA調製法を第1図に示した。

RT-PCR用のプライマーとして、O、S両系統の外被タンパク質をコードする領域の塩基配列を基にして、20塩基からなる2種類のオリゴヌクレオチドを作製した。これらのプライマーを用いることにより、約540bpのDNA断片の増幅が予想された。RT-PCRはRNA PCRキット (R012, 宝酒造) を用い、試薬の濃度等は添付のプロトコールに従った。温度サイクルはウイルスRNAのcDNAへの逆転写に42℃、15分間、次いで99℃、5分間処理した。cDNA増幅はDNA変性に95℃、40秒間、プライマーの会合に53℃、1分30秒間、DNA鎖の伸長に72℃、2分間処理し、これを40サイクル行った。

2. 結果及び考察

RT-PCRの結果、アサガオ感染葉からはO、S、Siに由来する約540bpの明瞭なDNA断片が検出された。F感染葉では不明瞭な断片が認められ、T感染葉では増幅断片は観察されなかった。Tの塩基配列の一部は酒井ら⁵⁾ によって明らかにされており、その配列と本試験で用いたプライマーの配列を比べると5'上流側プライマーの20塩基のうち3塩基が異なっていた。この違いのためにT特異的なDNA断片が検出されなかったものと推定された。また、Fについては不明瞭なDNA断片が認められたのみでウイルス特異的なものであるかどうかは再度検討する必要がある。

サツマイモ感染葉からの抽出試料をRT-PCRに供試したところ、O及びSに由来する約540bpの明瞭なDNA断片が得られ (第2図)、サツマイモからのSPFMVの検出が容易であることが確認された。

- 1) 感染葉 (0.2g) を0.6mlのTNE緩衝液^{a)} で磨砕する。フェノールクロロホルム (1:1) を0.6ml加えてよく混合する。
- ↓
- 2) 15,000rpm、5分間遠心し、水層をエタノール沈殿する。沈殿をSTE^{b)} 130μlに再懸濁し、100%エタノールを70μl加える。あらかじめ35STE^{c)} で湿らせておいたCF11セルロース (10mg) と混合し、Voltext 1分間。
- ↓
- 3) 15,000rpm、2分間遠心し、沈殿を35STEに再懸濁し15,000rpm、2分間遠心する。沈殿をSTE 0.4mlに再懸濁し、15,000rpm、1分間遠心後、上清を採りエタノール沈殿する。
- ↓
- 4) 沈殿を減圧乾燥し、滅菌蒸留水20μlに再懸濁し、このうち2μlをRT-PCRに供試。

第1図 SPFMVに感染したサツマイモ及びアサガオ葉からのウイルスRNAの調製法

- 注) a) TNE緩衝液: 20mM Tris-HCl (pH 8.5), 0.1 M NaCl, 1mM EDTA
 b) STE緩衝液: 50mM Tris-HCl (pH 7.0), 0.1 M NaCl, 1mM EDTA
 c) 35STE緩衝液: 35%エタノールを含むSTE

M 1 2 3



第2図 RT-PCRによるSPFMV感染サツマイモ葉からの普通 (O) 及び強毒系統 (S) の検出

- 注) M: 分子量マーカー、2/Hind III
 1: O感染葉からの増幅DNA断片
 2: S感染葉からの増幅DNA断片
 3: 健全サツマイモ葉

引用文献

- 1) Esbenschade, P. R. and Moyer, J. W. : *Plant Disease* **66**, 911-913, 1982.
- 2) Green, S. K., Kuo, Y. J. and Lee, D. R. : *Tropical Pest Management* **34**, 298-302, 1988.
- 3) 大貫正俊・酒井淳一・山川 理・長田龍太郎・宇杉富雄・花田 薫: 日植病報 **60**, 398, 1994.
- 4) 西口正通・森 昌樹・鈴木文彦・長田龍太郎・森下敏和・酒井淳一・花田 薫・宇杉富雄: 日植病報 **59**, 328, 1993.
- 5) 酒井淳一・大貫正俊・森 昌樹・宇杉富雄・花田 薫: 日植病報 **60**, 1994. (印刷中)