

## RT-PCRを用いたサツマイモ斑紋モザイクウイルスの系統特異的検出

長田龍太郎・森 昌樹<sup>1)</sup>・宇杉富雄<sup>2)</sup>・酒井淳一<sup>1)</sup>・花田 薫<sup>1)</sup>・西口正通<sup>3)</sup>(宮崎県総合農業試験場・<sup>1)</sup>九州農業試験場・<sup>2)</sup>国際農林水産業研究センター沖縄支所・<sup>3)</sup>農業生物資源研究所)

Ryutaro NAGATA, Masaki MORI, Tomio USUGI, Junichi SAKAI, Kaoru HANADA and

Masamichi NISHIGUCHI : Strain Specific Detection of Two Strains of

Sweet Potato Feathery Mottle Virus by RT-PCR

宮崎県においては青果用サツマイモの生産にウイルスフリー苗が用いられているが、そのウイルス検定は電子顕微鏡観察により行っており、技術と経験が必要で、簡便ではない。最近、RT-PCRを用いたウイルス検定技術が報告されている。西口ら(1993)はサツマイモ斑紋モザイクウイルス強毒系(SPFMV-S)及び普通系(SPFMV-O)の塩基配列に基づいて、強毒系特異的プライマー(Sプライマー)を合成し、RT-PCRによるアサガオからのSPFMV-Sの検定を報告している。

今回、上記Sプライマーの他、普通系特異的プライマー(Oプライマー 上流プライマー:GAAAGTTCTACGCATGGGTC, 下流プライマー:GCTVGTATCAGCCCATATG)を合成し、アサガオ及びサツマイモ葉からウイルス系統特異的検出方法の検討を行った結果、各々の植物体からウイルス各系統由来と思われるバンドを検出できたので報告する。

## 1. 材料及び方法

供試材料として、SPFMV-S及び-Oにそれぞれ単独で感染したアサガオ葉並びにSPFMV-S単独感染及び両系統の重複感染サツマイモ葉を用いた。対照としてウイルスフリーアサガオ葉及びサツマイモ葉を用いた。

試料の調製:①ほう酸緩衝液-フェノール法:感染葉を10倍量のほう酸緩衝液(pH8.0)で磨碎し、遠心分離した。上清に等量のTE飽和フェノールを加え、混和し、さらに遠心分離で水層部を得た後、クロロホルムを等量加え、混和した。遠心分離によって得られた水層部を供試した。②SDS-フェノール法:感染葉を10倍量の抽出用混合液(0.1M NaCl, 10mM EDTA及び1%SDSを含む0.1Mトリス緩衝液(pH9.0), TE飽和フェノール, 1/24量のイソamilアルコールを含むクロロホルム, メルカプトエタノールをそれぞれ2:1:1:0.2の割合で混合)で磨碎し、混和後遠心分離した。さらに上清に1/20容量の5M NaClを加えた後、エタノール沈殿を行った。10mM EDTA及び0.1% SDSを含む10mMトリス緩衝液に懸濁し、5M LiClを添加した後、4℃に一晚放置し遠心分離した。さらに常法によりエタノール沈殿を一回行い、滅菌蒸留水20 $\mu$ lに懸濁し、供試した。

RT-PCRは、Gene Amp PCR System 9600(パーキン・エルマー)の装置及びRT-PCRキット(宝酒造)を用いた。逆転写反応は42℃(15分), PCRは95℃(2分)後、DNA解離に95℃(1分), アニーリング及び伸張に60℃(1分)のサイクルを40回繰り返した。PCR産物は1%アガロース電気泳動により検定した。

## 2. 結果及び考察

アサガオ感染葉では、①の試料の10<sup>5</sup>倍希釈まで検出可能であった。特異的プライマーを用い、アサガオ感染葉についてRT-PCRを行った結果、いずれの系統も各々特異的プライマーでのみ検出可能であった(写真1)。SPFMV-S感染サツマイモ葉について①の手法で調製した試料をRT-PCRに供試したが、検出できなかった。②の手法あるいはその簡便法で調製したRNAについてRT-PCRを行った結果、②の方法で調製した試料で明瞭なDNAバンドが検出できた(写真2:レーン7参照)。両系統に重複感染したサツマイモ葉を同様の手法で調製し、RT-PCRを行ったところ、いずれの系統特異的プライマーを用いてもDNAバンドが検出できた。またOプライマーでは、O系統由来のDNAバンドの他に、低分子側にDNAバンドが観察された。本DNAバンドは対照区のウイルスフリーサツマイモにおいても認められ、宿主由来と考えられた。

今後、サツマイモ培養幼植物体の葉について検定手法を確立する予定である。

1 2 3 4 5 6 7

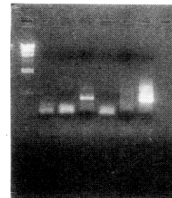


写真1 SPFMV-S及び-O特異的プライマーを用いたウイルス感染アサガオ葉からのRT-PCRによるウイルス由来DNAの検出

注) 1:  $\lambda$ /HindIII 2: H<sub>2</sub>O/プライマー-S  
3: H<sub>2</sub>O/プライマー-O  
4: S感染アサガオ/プライマー-S 5: S感染アサガオ/プライマー-O  
6: O感染アサガオ/プライマー-S 7: O感染アサガオ/プライマー-O

1 2 3 4 5 6 7

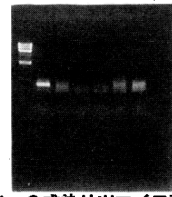


写真2 SPFMV-S感染サツマイモ葉からのSDS-フェノール抽出物のRT-PCRによるウイルス由来DNAの検出

注) 1:  $\lambda$ /HindIII 2: 純化SPFMV-S RNA  
3: SDS-フェノール/LiCl/エタノール沈殿  
4: SDS-フェノール/エタノール沈殿(澱除去)/LiCl  
5: SDS-フェノール/エタノール沈殿  
6: SDS-フェノール/エタノール沈殿/LiCl  
7: SDS-フェノール/エタノール沈殿/LiCl/エタノール沈殿