

双子葉植物に発生する3種ジェミニウイルスのPCRによる検出

大貫正俊・酒井淳一・花田 薫 (九州農業試験場)

Masatoshi ONUKI, Junichi SAKAI and Kaoru HANADA :
Detection of Three Dicot-infecting Geminiviruses by PCR

ジェミニウイルスは環状1本鎖DNAをゲノムとして有する双球状ウイルスで、熱帯・亜熱帯では、とくに重要なウイルスである。これまでのところ、我が国に発生するジェミニウイルスとして、単子葉植物のオギに発生するオギ条斑ウイルス、双子葉植物に発生するアプシロンモザイクウイルス (AbMV)、タバコ巻葉ウイルス (TLCV) およびサツマイモ巻葉ウイルス (SPLCV) が記録されている。ジェミニウイルスの検出に関しては、PCRの利用が高感度で有用であるとする報告がいくつかなされている。そこで、我が国の双子葉植物に発生する3種ジェミニウイルスのPCRによる検出を試み、良好な結果を得たのでその概要を報告する。なお、農業研究センター病害虫防除部の本田要八郎博士にはジェミニウイルスである bean golden mosaic virus (BGMV) および mungbean yellow mosaic virus (MYMV) の感染葉の核酸抽出液を分譲していただいた。ここに記して謝意を表する。

1. 材料および方法

病徴観察あるいは電顕観察の結果、ジェミニウイルス様粒子の感染が示唆されたアプシロンおよびヒヨドリバナから全核酸を抽出した。また、タバココナジラミにより罹病サツマイモから SPLCV を伝搬させたアサガオからも全核酸を抽出した。3種植物の健全葉についても同様に核酸抽出を行い、PCRに供試した。PCR用のプライマーは、BGMVのゲノムAおよびB成分に由来する5組³⁾と African cassava mosaic virus (ACMV) のゲノムA成分のうち、C1と呼ばれるオープンリーディングフレーム内の配列に由来する1組¹⁾の合計6組を用いた (第1図A, B)。PCRの温度条件はDNA変性に94℃, 50秒, アニールに45℃, 1分, DNA鎖の伸長に72℃, 3分間処理し、これを40サイクル実施した。なお、比較のために、BGMVおよびMYMV感染葉からの抽出核酸も同様にPCRに供試した。PCR産物は1%

アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウムで染色後、紫外光下で観察した。

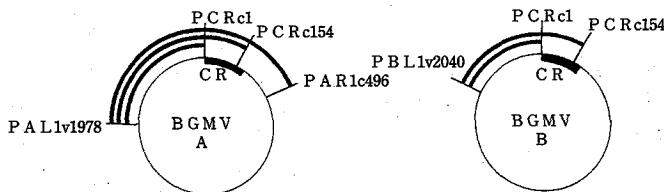
2. 結果および考察

BGMVのゲノム塩基配列に由来する5組のプライマーおよびACMV由来の1組のプライマーを用い、それぞれのウイルス感染葉および健全葉の核酸抽出液をPCRに供試した。BGMVとAbMV感染葉の抽出核酸からは、6組すべてのプライマーにより、特異的な増幅断片が検出された。BGMVとAbMVの各増幅断片の分子量はほぼ等しく、それらの泳動パターンはよく似ていた。一方、MYMV, TLCV, SPLCV感染葉の抽出核酸からはBGMV由来の5組のプライマーでは増幅DNA断片は得られず、ACMV由来のプライマーでのみ特異的断片が増幅された。健全葉の抽出核酸からはいずれのプライマーを用いても特異的なDNA断片は検出されなかった。ACMV由来のプライマーによる増幅断片の分子量はBGMVおよびAbMVが約2.6kbp, MYMVが約2.7kbp, TLCVとSPLCVは約2.8kbpであった。

実験に供試した3種ジェミニウイルスのうち、AbMVについては全塩基配列の解析が行われ、2粒子分節ゲノムであることが明らかにされているが²⁾, TLCV, SPLCVについては単一ゲノムか2粒子分節ゲノムであるのかも分かっていない。本実験で得られたウイルスDNAのPCR増幅産物をもとに、TLCV及びSPLCVのゲノム構造に関する知見が得られるものと期待される。

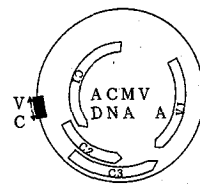
引用文献

- 1) Briddon, R. W. and Markham, P. G. : *Molecular Biotechnology* 1, 202 - 205, 1994.
- 2) Frischimuth, T., Zimmat, G. and Jeske, H. : *Virology* 178, 461 - 468, 1990.
- 3) Rojas, M. R., Gilbertson, R. L., Russell, D. R. and Maxwell, D. P. : *Plant Dis.* 77, 340 - 347, 1993.



第1図A BGMVゲノムA, B成分に由来するプライマー配列

Primer	5'	G C A T C T G C A G C C C C A C A T Y G T G T T T Y C C N G T	3'
PAL1v1978	5'	C T A G C T G C A G C A T A T T T A C R A R W A T G C C A	3'
PCRc1	5'	G G T A T A T T A T A H C G G A T G G	3'
PCRc154	5'	A A T A C T G C A G G C G T T Y C T R A C A T R G G	3'
PAR1c496	5'	C C C T C T G C A G C A R T G R T C K A T C T T C A T A C A	3'
PBL1v2040			



第1図B ACMVゲノムA成分に由来するプライマー配列

Primer	5'	K S G G G T C G A C G C T C A T C A A T G A C G T T R T A C	3'
V	5'	A A R G A A T T C A T K G G G C C C A R R R G A C T G G C	3'
C			

注) プライマーの名称は Rojasら (1993) の記述に従った。下線部は制限酵素 EcoRI, SalI 認識部位。K=G, T; R=A, G; S=C, G