

RT-PCRを用いたサツマイモ斑紋モザイクウイルスの検出方法

鈴木 健

キーワード：サツマイモ、ウイルス検定、RT-PCR、SPFMV

I 緒 言

千葉県のサツマイモは、作付面積6020haで全国3位、粗生産額233億円で全国1位の位置にあり、本県の畑作農業を支える基幹作物となっている。特に、1989年度以降原種農場を中心にウイルスフリー苗の配布が開始され、県内サツマイモの収量、品質が著しく向上した。現在では、約15万鉢のウイルスフリー苗が栽培農家に配布されている。

ウイルスフリー苗は、ウイルスフリー化していない苗に比べ生育が旺盛で増収が期待できる、塊根色が鮮やかになり品質が向上する等の利点が多い。しかし、ウイルスが再感染するとその能力が徐々に低下することが報告されている(大越ら,1991)。このことから、ウイルスフリー苗生産に当たってはウイルス検定作業が不可欠となっている。

サツマイモに感染するウイルスは、サツマイモ斑紋モザイクウイルス(以下SPFMVと略す。)、サツマイモ縮葉モザイクウイルス、サツマイモ葉巻ウイルス、サツマイモ潜在ウイルス等6~7種が知られている(土崎ほか,1993)。特に、SPFMVはサツマイモウイルスフリー苗塊根の品質に与える影響が大きく(加勇田・坂本,1987)、効率的なウイルス検定法が求められている。

SPFMVはアブラムシによって媒介されるポティウイルスグループに属するひも状ウイルスで、塊根に帯状粗皮症状を引き起こすSPFMV強毒系統(SPFMV-S)のほか数種の系統が報告されている(宇杉ら,1990;宇杉・真岡,1993)。

現在、ウイルスフリー苗生産に伴うウイルス検定では、指標植物を用いた生物検定法が採用されている。しかしながら、この方法では①検定結果が判明するまでにある程度の期間が必要となる、②検定品目や指標植物の種類によっては熟練した技術が必要となる、③長期間多数の植物を維持する必要から、人的コスト等が大きい、④時期によりウイルス病徴が消失してしまうため検定が難し

い場合がある等の問題がある。また、ウイルス検出法として一般的に用いられているenzyme-linked immunosorbent assay(以下ELISA法と略す)は短時間で検出が可能であるが、サツマイモ葉との非特異的反応がみられ、判定が不明確になる場合がある。

一方、近年多方面で利用され始めている遺伝子増幅法(RT-PCR法)を応用したRNAウイルスの検出が図られており、SPFMVの検出についてもいくつかの報告がなされている(NISHIGUCHI et al,1995;大貫ら,1995)。このRT-PCR法はごく短期間で結果の判定が可能で、簡便かつ非常に高感度な方法であると期待されている。

著者は、RT-PCR法を用いたSPFMV検出技術の実用性を検討し、本県におけるサツマイモウイルスフリー苗に対するSPFMV検定法を確立したので報告する。

本研究を遂行するに当たり、独立行政法人九州沖縄農業研究センター病害遺伝子制御研究室長花田薫博士には、SPFMVプライマー及びSPFMV抗体を分譲していただくとともに始終適切なお指導をいただいた。また、千葉県工業試験場生物工学課長田中正男氏、千葉県農業総合研究センター遺伝子工学研究室深見正信氏にはSPFMV塩基配列の解読をしていただいた。ここに記して深く感謝の意を表する。

II 材料および方法

試験1.RNA抽出方法

効率の良いRNAの抽出方法を選択するため、CF-11セルローズパウダー+フェノール+クロロホルム抽出法(以下CF-11法と略す)(大貫ら1995)とグアニジンチオイソシアネート+フェノール+クロロホルム抽出法(CHOMCZYNSKI and SACCHI,1987)を一部改変した方法(以下AGPC法と略す)を比較した。

(1) 供試材料

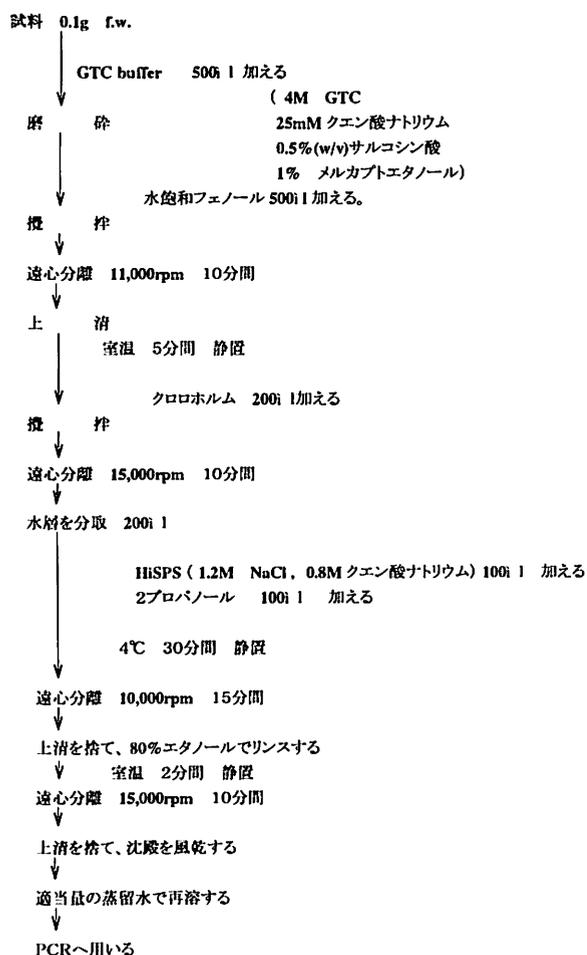
1996年10月に県内の栽培圃場より採集しSPFMVの感染を確認した“ベニアズマ”の塊根を15cm径のポリポットに植え付け、温室内で気温20~33℃の環境下で栽培、維持したものを試験に用いた。また、同じ株に野生アサ

ガオの一種である *Ipomea setosa* を接木接種しウイルス病徴の確認できた葉を試験に用いた。

(2) 抽出方法

CF-11法は、展開葉0.1g (f.w.) にTNEバッファー600 μ lを加え氷上で磨砕後フェノール、クロロホルム抽出を行い、CF-11 セルロースパウダーに吸着させ精製した。

AGPC法は、展開葉0.1g (f.w.) に4M グアニジンチオイソシアネートを主成分としたGTCバッファー500 μ lを加え氷上で磨砕後フェノール、クロロホルム抽出を行い、2-プロパノール沈殿を行い精製した (第1図)。



第1図 AGPC法を用いたRNA抽出方法

(3) RANテンプレートの希釈設定

サツマイモ葉及び *I. setosa* 葉0.1gを試験に用い、CF-11法及びAGPC法で抽出精製して50 μ lの超純水で再溶したものを原液テンプレート (以下 $\times 1$ と略す) とし、この $\times 1$ の10倍希釈液 (以下 $\times 10$ と略す)、100倍希釈液 (以下 $\times 100$ と略す)、1000倍希釈液 (以下 $\times 1000$ と略す)、10000倍希釈液 (以下 $\times 10000$ と略す) をRANテンプレートとしてRT-PCRを行った。

(4) RT-PCRの設定

RT-PCRに用いるSPFMVのプライマーは独立行政法人九州沖縄農業研究センター病害遺伝子制御研究室で

デザインされたVCプライマーセットを用いた (第1表)。RT-PCRに用いた酵素はTAKARA One-stepRT-PCR kitを使用した。酵素濃度等の反応条件は本kitのマニュアルに従った。RT-PCRの処理条件は大貫ら (1995) の方法に従い、逆転写反応は42 $^{\circ}$ Cで20分間、その後95 $^{\circ}$ C5分間とし、PCRは94 $^{\circ}$ C2分間前処理の後、熱変性94 $^{\circ}$ C1分間、アニーリング55 $^{\circ}$ C1分30秒間、伸長反応72 $^{\circ}$ C2分間の処理を1サイクルとし、30サイクル行った。反応処理はApplied Biosystems社製PJ-480サーマルサイクラーを使用した。

第1表 SPFMV検出プライマーの配列

Mtv5'	5'-AACACACTTATggTTgT-3'
Mtv3'	5'-CgCgCAAgACTCATATCA-3'
VC5'	5'-CACTTCAGTgACgTTgCTgA-3'
VC3'	5'-ggCTCgATCAGgAACCAAAA-3'
VCCIC2-5'	5'-TggATCAGggAAATCAACTg-3'
VCCIC2-3'	5'-gAATgCAGCCTCTgTTgCg-3'
VCNAA2-5	5'-CgCAACAgAggCTgCATTC-3'
VCNAA2-5	5'-ACAACCATAAgTgTgTTg-3'

(5) 電気泳動によるPCR産物の検出

PCR産物の分子量を推定するため、アガロースゲル電気泳動を行った。電気泳動装置はCOSMOBIO社製Mupid-2を使用した。泳動バッファーはTAEバッファーを用い、1%アガロースゲルを使用した。DNAの染色は500ng/mlのエチジウムブロマイド溶液を用い、260nm紫外線光下で観察した。

試験2.千葉県内に発生するSPFMVの検出用プライマーの選定

千葉県内に発生しているSPFMVには遺伝子レベルでは数種の系統があるものと推定された。そこで、県内に発生しているSPFMVのいずれの系統も検出可能なプライマーを選抜するために試験を行った。

(1) 供試材料

県内各地の栽培圃場より採取した“ベニアズマ”5株 (A株、B株、C株、D株、E株) 及び農林水産省九州農業試験場 (現独立行政法人九州沖縄農業研究センター) で分離したSPFMV強毒系統 (SPFMV-S) を供試した。供試株に感染しているSPFMVのコート蛋白コード領域の一部をクローニングしDNAシーケンサーを用いて塩基配列を解読しウイルスの系統を調査した。ウイルス遺伝子のクローニングおよびDNAシーケンサーによる塩基配列の解読は千葉県工業試験場生物学課に依頼した。

(2) 試料の調製

感染株の展開葉0.05gから試験1のAGPC法に従ってRNAを抽出し、500 μ lの超純水で再溶してRT-PCRを行っ

た。

(3) プライマーの設計

試験に用いたプライマーは独立行政法人九州沖縄農業研究センター病害遺伝子制御研究室でデザインされたVCHCA, VCHCC, VCCIA, Mtv, VCの6組（大貫ら, 1995; 花田ら, 1997; SAKAI et al, 1997）とSPFMV-Sの塩基配列を基に独自にデザインしたVCCIC2, VCNAA2の2組のプライマーセットである。

(4) RT-PCRの設定

RT-PCRの処理条件はプライマーセット以外は試験1と同様の条件で行った。ただし、PCRのアニーリング温度はプライマーごとに予備試験を行い、最も良好に反応する温度を53~56℃の範囲で設定した。

(5) PCR産物の検出

試験1と同様にアガロースゲル電気泳動によって行った。

試験3. RT-PCR法による各被検体採取部位からのSPFMVの検出

最も高感度にSPFMVを検出できる被検体の採取部位を選択するため、同一のウイルス感染株の葉、なり首、根部等からサンプルを採取し、RT-PCR法によってウイルスを検出した。

(1) 供試材料

試験1の“ベニアズマ”供試株と同一の株を同様に栽培、維持し、蔓全長120cm前後、展葉枚数24枚前後に生育したものを試験に用いた。

(2) 被検体の採取部位

葉は最も古い展開葉を第1葉とし第2葉から1枚おきに最終展開葉までを0.02g (f.w.)づつ採取した。また、塊根から伸長した細根、塊根表皮、塊根なり首、蔓基部（第4葉着生部位）、蔓先端部（最終展開葉着生部位）を同様に採取した。

(3) 試料の調製

採取した試料0.02g (f.w.)を試験1のAGPC法に従ってRNAを抽出し、500 μlの超純水で再溶してRT-PCRを行った。

(4) RT-PCRの設定

SPFMV検出用プライマーは独立行政法人九州沖縄農業研究センター病害遺伝子制御研究室でデザインされたMtvプライマーセットを用いた。RT-PCRの処理条件は試験2と同様に逆転写反応は42℃で20分間、その後95℃5分間とし、PCRは94℃2分間前処理の後、熱変性94℃1分間、アニーリング55℃1分30秒間、伸長反応72℃2分間の処理を1サイクルとし、30サイクル行った。

(5) PCR産物の検出

試験1と同様にアガロースゲル電気泳動によって行った。

(6) 電子顕微鏡による観察

RT-PCRに供試した試料と同一のものを2%PTA溶液を用いてダイレクトネガティブ染色法で染色した。これを日立製作所製透過型電子顕微鏡TEM H-7100を使用して観察し、ウイルス粒子の有無を確認した。

試験4. RT-PCR法と生物検定法及びELISA法の比較

SPFMVに対するRT-PCR法を用いたウイルス検定技術の実用性を明らかにするため、RT-PCR法と慣行法である生物検定法及びELISA法を比較した。

(1) 供試材料

千葉県原種農場隔離温室（現農業総合研究センター育種研究所隔離温室）内で維持した“ベニアズマ”ウイルスフリー株から穂を採取し、隔離網室及び露地で1年間栽培した後に収穫した“ベニアズマ”の塊根20株を10.5cm径のポリポットに植え付け、気温20~33℃の温室内で3ヶ月以上栽培、維持したものを試験に用いた。これらの株の下位葉及び塊根表皮を採取し試験に用いた。

(2) 試料の調製

試験3と同様に行った。RT-PCR法による検定は低温時期である2000年3月21日と高温時期である8月2日に行った。

(3) RT-PCRの設定

試験3と同様に行った。

(4) PCR産物の検出

試験1と同様に行った。

(5) 生物検定法

生物検定法は、供試した株に子葉展開期の*I.setosa*を割り接ぎによって接木し、2週間から4週間栽培した後、*I.setosa*葉の病徴を観察し判定した。判定結果は、ウイルス病徴が確認できるものを+、全く病徴の確認できないものを-、判定不能は+-と示した。生物検定法は低温時期である2000年2月3日と高温時期である8月2日に実施した。

(6) ELISA法による検定

ELISA法は間接ELISA法（大木, 1997）により行った。試料は供試株の塊根表皮を0.1g程度採集し、炭酸バッファーを使用して常法で抽出し適宜希釈したものを用いた。SPFMV抗体は独立行政法人九州沖縄農業研究センター病害遺伝子制御研究室で作成したものを1,000倍に希釈して使用した。ELISA法による調査は、高温時期である2000年8月2日に実施した。

III 結 果

1. RNA抽出方法

第2表に、サツマイモ葉及び*I.setosa* 葉0.1gを試料に用い、CF-11法及びAGPC法で抽出したRNAテンプレートを段階希釈してRT-PCRを行った結果を示した。*I.setosa* 葉を試料とした場合は両法とも×1、×10、×100でPCR産物のバンドが認められた。しかし、CF-11法によって抽出したサツマイモ葉試料からは、希釈の程度に係わらずPCR産物のバンドは認められなかった。これに対しAGPC法では、サツマイモ葉×1ではPCR産物のバンドは確認できなかったが、10~100倍希釈した試料ではバンド

が確認できた。

2. 千葉県内に発生するSPFMVの検出用プライマーの選定

本試験に使用した供試株それぞれに感染しているSPFMVコート蛋白コード領域の一部をクローニングし、DNAシーケンサーを用いて塩基配列を解読しウイルスの系統を調査したところ、SPFMV - S系統との相同性が比較的高い系統、低い系統、その中間の系統の3グループに分類できた(第3表)。今回使用したプライマーセットでは0.7~2.3kbpのPCR産物が得られたが、供試した株によってはPCR産物の生成がみられないものがあった(第4表)。特に、供試株A株はMtvを除く6組のプライマー

第2表 CF-11法及びAGPC法による抽出RNAの希釈限界

抽出法	試料	×1	×10	×100	×1000	×10000
CF-11抽出	<i>I.setosa</i>	○ ¹⁾	○	○	×	×
CF-11抽出	サツマイモ	×	×	×	×	×
AGPC抽出	<i>I.setosa</i>	○	○	○	×	×
AGPC抽出	サツマイモ	×	○	○	×	×

1) PCR産物が増幅生成された場合を○、されない場合を×で示した。

第3表 供試株感染SPFMVの塩基配列調査結果

供試株	クローンNo. ¹⁾	SPFMV-Sとの相同性	推定されるSPFMVグループ
A株	#35	63.2%	T系統
B株	#39	63.5%	T系統
B株	#52	88.7%	O系統
C株	#53	89.0%	O系統
D株	#55	98.2%	S系統
E株	#62	89.1%	O系統
SPFMV-S	#71	-	S系統

1) クローンNo.はPCR産物を組み込んだ大腸菌コロニーの番号を示した。

第4表 プライマーの違いによるPCR産物の増幅

供試株	プライマーセット						VC
	VCHCA	VCHCC	VCCIA	VCCIC2	VCNAA2	Mtv	
A株	×	×	×	×	×	○	×
B株	×	×	○	○	○	○	○
C株	×	×	○	○	○	○	○
D株	○	○	○	○	○	○	○
E株	○	○	○	○	○	○	○
SPFMV-S	○	○	○	○	○	○	○

注1) 供試ウイルス感染株にはそれぞれ異なる系統のウイルス、もしくは複数の系統のウイルスが感染している。

2) PCR産物が増幅生成された場合を○、されない場合を×で示した。

セットでPCR産物の生成がみられなかった。Mtvプライマーはすべての株から約1.3kbpのPCR産物が得られた。

3. RT-PCR法による各被検体採取部位からのSPFMVの検出

RT-PCR法及び電子顕微鏡観察による各被検体採取部位からのSPFMVの検出結果を第5表に示した。RT-PCR法による検出では、細根、塊根表皮、塊根なり首、蔓基部及び下位葉（第2葉）からは検出が可能であったが、

蔓先端部及び最終展開葉からは検出できなかった。

同一の試料を電子顕微鏡観察したところ、RT-PCRで検出できなかった部位にはウイルス粒子は認められなかった。また、塊根なり首は他の部位に比べウイルス粒子が特に多く観察された。

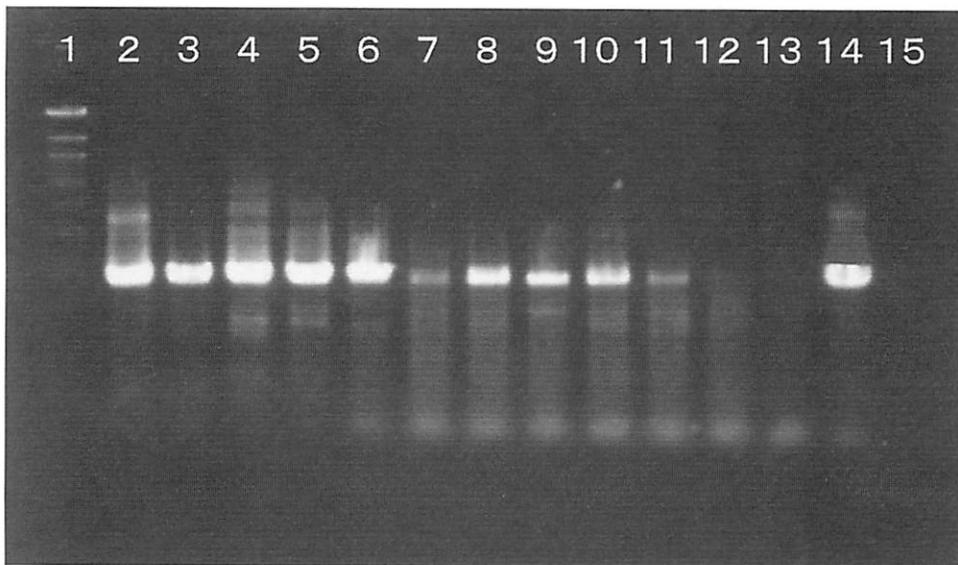
さらに、第2葉から1枚おきに最終展開葉（第24葉）までRT-PCRを行ったところ、第20葉までは検出可能であったが、第22葉及び第24葉からは検出できなかった（第2図）。

第5表 RT-PCR法による各被検体採取部位からのSPFMVの検出

採取部位	RT-PCRによる検出 ¹⁾	電子顕微鏡観察による検出 ²⁾
上位葉（第24葉）	—	—
上位葉（第2葉）	+	+
蔓先端部	—	—
蔓基部	+	—
塊根なり首	+	+++
塊根表皮	+	+
細根	+	—

1) RT-PCRによる検出は、特異的バンドが認められた場合+、認められない場合—で標記した。

2) 電子顕微鏡観察による検出は、ウイルス粒子が確認されなかった場合—、粒子が確認された場合は粒子の個数に対して少～多を+～+++の計4段階で標記した。



第2図 サツマイモ葉採取位置の違いによるSPFMVの検出の有無

レーン1：λ/Hind III DANマーカー レーン2：第2葉 レーン3：第4葉 レーン5：第6葉 レーン6：第8葉 レーン7：第10葉 レーン8：第14葉
レーン9：第16葉 レーン10：第18葉 レーン11：第20葉 レーン12：第22葉 レーン13：第24葉 レーン14：ポジティブコントロール レーン15：ネガティブコントロール

4. RT-PCR法と生物検定法及びELISA法の比較

RT-PCR法、生物検定法及びELISA法によるウイルス検出結果を第6表に示した。生物検定法による検出では、気温の低い2月3日には20株中4株からSPFMVが検出された。これに対し、RT-PCR法では低温期の3月21日調査で20株中11株からSPFMVが検出された。RT-PCR法に

よる調査では、生物検定法では陰性もしくは判定不能であった株からもウイルスが検出された。

生物検定法は、高温期である8月3日の調査ではすべての株で病徴が確認されなかった。これに対し、RT-PCR法では7株からELISA法では3株からSPFMVが検出された。

第6表 RT-PCR法とELISA法及び生物検定法との比較

供試株番号	RT-PCR法		生物検定法		ELISA法
	(3/21) ¹⁾	(8/2)	(2/3)	(8/2)	(8/2)
1	- ²⁾	-	-	NT ³⁾	-
2	-	-	-	NT	-
3	+	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-
6	-	-	-	NT	-
7	-	-	-	NT	-
8	-	-	-	NT	-
9	-	-	-	NT	-
10	+	+	+	-	-
11	+	+	+-	-	-
12	+	+	+-	-	-
13	-	-	-	-	-
14	+	+	-	-	+
15	+	+	+	-	-
16	-	-	-	NT	-
17	+	-	-	-	-
18	+	+	+	-	+
19	+	+	+	-	+
20	-	-	-	NT	-

1) () 内は調査実施日

2) +は陽性の結果、-は陰性の結果、+-は判定不能を示した。

3) NTは調査実施せず。

IV 考 察

RT-PCR法を用いたSPFMV検出技術を確立するため、試料の抽出方法、検出用プライマーの選定、試料採取位置について試験した。

RNA抽出方法を比較したところ、CF-11法で抽出した *I.setosa* 葉からはPCR産物の増幅が認められたが、サツマイモ葉からは認められなかった。西口ら (1995) は、サツマイモ葉中のポリフェノールや多糖類はPCR反応を阻害し、これらが十分除去できない場合はPCR産物が増幅されなくなることを報告している。CF-11法で抽出したサツマイモ葉試料からPCR産物が増幅されなかったのはこの理由によるものと考えられた。これに対しAGPC法では、試料の濃度が濃い場合はPCR産物が増幅されなかったが、希釈倍率を上げていくとSPFMV由来のPCR産物が増幅された。このことは、AGPC法で抽出した試料がCF-11法で抽出した試料に比べPCR反応阻害物質の含有が少ないためと推察された。そのため、試料を希釈することによってPCR反応阻害物質の影響が減少し、サツマイモ葉抽出試料からの遺伝子増幅ができたものと考えられた。この様に、AGPC法によりRNAを抽出することでRT-PCR法によるサツマイモ葉からのSPFMV検出が可能と判断された。

千葉県内に発生しているSPFMVには遺伝子レベルでは数種の系統があるものと推定された。また、同一地域、圃場においても複数のSPFMV系統が存在する場合があることが報告されており (酒井ら,2001)、異なる系統のウイルスを同時に検出可能なプライマーを選択することは重要であると考えられた。

今回試験したプライマーセットの中には、一部の供試株でPCR産物の生成がみられないものがあった。特に、供試株A株はMtv以外のプライマーではPCR産物の生成がみられなかった。本試験に使用した供試株それぞれに感染しているSPFMVの塩基配列を調査したところ、その相同性の程度から3グループに分類できた。これらのグループは、それぞれ既に報告されている (酒井ら,1995; SAKAI et al,1997) SPFMV-S系統、O系統、T系統とよく似かよった塩基配列で、A株はSPFMV-T系統、B株はSPFMV-TとSPFMV-O系統の重複感染、C株はSPFMV-O系統、D株はSPFMV-S系統、E株はSPFMV-O系統のグループのウイルスに感染しているものと考えられた。このうちA株が感染していたSPFMVはSPFMV-Sの塩基配列に対して63%程度の比較的低い相同性であった。今回試験したプライマーはいずれもSPFMV-Sの塩基配列を元に設計されたものであった。このためSPFMV-Sの塩基配列と異なる部分が多いA株のSPFMVは、Mtv以外の

プライマーでは十分なアニーリングができなかったためPCR産物の増幅が得られなかったものと考えられた。このことから、RT-PCR法によるSPFMVの検出にはMtvプライマーを使用することが適当と判断した。

サツマイモ植物体中のウイルス濃度や分布が不均一であることが知られており、これがRT-PCR法による検出の結果に影響することが指摘されている（大貫・花田, 1996）。そこで、適切な被検体採取部位を検討するためウイルス感染株の葉、なり首、根部等からサンプルを採取し試験した。供試した部位の大部分からSPFMVが検出可能であったが、蔓先端部及び最終展開葉からは検出できなかった。同一の試料を電子顕微鏡観察したところ、RT-PCR法で検出できなかった部位にはウイルス粒子は認められなかった。しかし、蔓先端部2節を挿し木して生育させたところ、5株中5株からウイルスの感染が認められた。したがって、蔓先端部や新葉などの組織が若い部位ではウイルスの増殖が十分ではなく、ウイルス濃度が極めて低いため検出できなかったと推察された。これに対し、塊根なり首部分は電子顕微鏡観察の結果から比較的ウイルス濃度の高い部分と考えられた。

これらのことから、RT-PCR法によるSPFMVの検出には比較的ウイルス濃度の高い塊根なり首部分もしくは展開下位葉を用いることが適当であると考えられた。

以上のことから、RT-PCR法によるサツマイモからのSPFMV検出には、①試料からのRNA抽出にはAGPC法を用いる、②SPFMVの検出にはMtvプライマーを使用する、③試料は塊根なり首部分もしくは展開下位葉を採取して用いる、以上の方法を採用することで可能と判断された。

このRT-PCR法を用いたSPFMV検出技術の実用性を検討するため、RT-PCR法と慣行法である生物検定法及びELISA法を比較した。

生物検定法は、気温の低い時期では20株中4株からSPFMVが検出された。これに対し、RT-PCR法は20株中11株が陽性と判定され、生物検定法では陰性もしくは判定不能であった株からもウイルスが検出された。このことから、RT-PCR法は生物検定法以上の検出感度があるものと考えられた。

高温期の調査では、生物検定法ではすべての株で病徴が確認されなかった。一部のウイルスは、気温の変化によって病徴がマスクされることが知られている。これは温度環境が変化することで、宿主のウイルス感受性が変化する、ウイルスの増殖速度が低下する等が原因と推定されている（平井ら, 1978）。このため、高温期には検定植物の病徴がマスクされ、生物検定法が適用不能となるものと考えられた。

このように生物検定法は高温期のウイルス検出が困難であったが、RT-PCR法及びELISA法は高温期でも検出が可能であった。しかし、RT-PCR法でも高温期は検出感度がやや低下するため、検定は低温期に行うことが望ましい。また、RT-PCR法ではウイルスが検出できたが、ELISA法では検出できなかった供試株があった。このことから、RT-PCR法はELISA法に比べ高い検出感度を持つものと考えられた。

以上のように、RT-PCR法を用いたサツマイモ生体からのSPFMV検出方法の条件を明らかにできた。また、RT-PCR法は比較的簡便で高感度なウイルス検定方法として十分に実用的であると考えられた。ウイルスフリー苗の生産におけるウイルス検定業務の効率化を図るため、本手法の導入を期待する。

V 摘 要

サツマイモウイルスフリー苗生産におけるウイルス検定業務の効率化を図るため、高感度で短時間に検出可能なRT-PCR法を応用した SPFMVの検出方法を確立した。

1. グアニジンチオイソシアネート+フェノール+クロロホルム抽出法は、CF-11セルロースパウダー+フェノール+クロロホルム抽出法に比べ抽出試料中に混入するPCR反応阻害物質が少なく、サツマイモ葉から効率よくSPFMVのRNAを抽出することができた。

2. 千葉県内に発生しているSPFMVには遺伝子レベルで数種の系統があることが確認された。Mtvプライマーはすべての株から約1.3kbpのPCR産物が得られた。このことから、RT-PCR法によるSPFMVの検出にはMtvプライマーを使用することが適当であることが明らかとなった。

3. RT-PCR法による検出では、比較的ウイルス濃度の濃い塊根なり首部分もしくは下位葉を用いることが適当であった。

1. RT-PCR法はELISA法及び生物検定法に比べSPFMVの検出感度が高かった。

VI 引用文献

CHOMCZYNSKI P. and N.SACCHI (1987). Singlestep method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate phenol-chloroform extraction. *Ann. Biochem.* 162:156-159.

花田 薫・酒井淳一・大貫正俊 (1997). サツマイモ斑紋モザイクウイルスの系統共通プライマーを用いた

RT-PCRによる検出.日植病報. 63 :259.

平井篤造・高橋 壮・四方英四郎・都丸敬一 (1978) .
新編 植物ウイルス学.202-212.養賢堂.東京.

加勇田誠・坂本真一 (1987) . 食用カンショ 帯状粗皮
症の発生原因と対策 第1報 帯状粗皮症状の接木伝染
と茎頂培養苗の効果.九農研. 49 :64.

NISHIGUCHI M., M.MORI, F.SUZUKI , R.NAGATA,
T.MORISITA, J.SAKAI, K.HANADA and T.USUGI,
(1995). Specific etection of a Severe Strain of
Sweet Potato Feathery Mottle Virus(SPFMV-S) by
Reverse Transcription and Polymerase Chain Reac-
tion(RT-PCR).Ann. Phytopathol. Soc.Jpn. 61 :119-
122.

大木 理 (1997) . 植物ウイルス同定のテクニックと
デザイン.55-57.日本植物防疫協会.東京.

大越一雄・猪野 誠・長谷川理成 (1991) . サツマイ
モウイルスフリー苗の利用効果 (1) 障害防止及び増収
効果. 日本作物学会紀. 60 (別号1) :276-277.

大貫正俊・酒井淳一・森 昌樹・宇杉富男・津田新哉・
花田 薫 (1995) . 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.九農研. 57 :
96.

大貫正俊・花田 薫 (1996) . RT-PCR法を利用した

サツマイモウイルス病の高感度簡易診断.植物防疫. 50 :
102-105.

酒井淳一・大貫正俊・森 昌樹・宇杉富男・花田 薫
(1995) . サツマイモ斑紋モザイクウイルス徳島系統の
ゲノムRNA3'末端領域の構造解析.九農研. 57 .98.

SAKAI,J.,M.MORI,T.MORISITA,K.HANADA,T.USUGI
and M.NISHIGUCHI (1997). Complete nucleotide
sequence and genome organization of sweet potato
feathery mottle virus (S strain)genomic RNA:
the large coding region of the P1 gene. Arch Virol.
142 :1553-1562.

酒井淳一・甲斐由美・花田薫 (2001) . 九州農試カン
ショ系統保存圃場におけるSPFMV の発生調査.九農研.
63 :78.

土崎常男・栃原比呂志・亀谷満朗・柳瀬春男 編 (19
93) . 原色作物ウイルス病事典.113-121.全国農村教育協
会.東京.

宇杉富男・中野正明・大貫正俊・林 隆治 (1990) .
サツマイモ塊根に帯状粗皮症状を引き起こすひも状ウイ
ルスについて.日植病報. 56 :423.

宇杉富男・真岡哲夫 (1993) . サツマイモ斑紋モザイ
クウイルス徳島系統 (SPFMV-T) の諸性質について.日
植病報. 59 :331.

Detection of Sweet potato feathery mottle virus (SPFMV) in Sweet Potato by Reverse scription and Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) .

Takeshi SUZUKI

Key words : Sweet potato,Virus assay,RT-PCR,SPFMV

Summary

Reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) were adopted for detecting sweet potato feathery mottle virus (SPFMV) in this study .Comparison of efficiency of RNA extraction of two methods,a CF-11 cellulose column (CF-11) and guanidine thiocyanate-phenol (AGPC), were less inhibitory substance of PCR reaction in the extracted samples than those of CF-11,were considered to be more accurrate for detecting SPFMV from sweet potato. It was confirmed that SPFMV, of which cases occurred in Chiba Prefecture, has several genetic lines. Mtv primers could obtain about 1.3 Kbp of PCR products from all lines, suggesting that Mtv primers could be used as a virus assay for the detection of SPFMV with RT-PCR.We determined that the use of the proximal end of a tuberous root or a lower leaf, which exhibited a relatively high virus concentration, is suitable for assays using this method. RT-PCR demonstrated a higher detection sensitivity than both a bioassay and ELISA.