

試験研究成果普及情報

部門	バイテク	対象	普及
課題名:RT-PCR法を用いたサツマイモ斑紋モザイクウイルス検定法			
[要約]RT-PCR法を応用したサツマイモ斑紋モザイクウイルスの検出は、Mtvプライマーを用い、比較的ウイルス濃度の高い塊根なり首部分または展開下位葉を試料とすることで可能である。RT-PCR法は生物検定法やELISA法に比べて高い検出感度が得られる。			
キーワード(専門区分)バイテク(研究対象)野菜類-トマト (フリーキーワード)カンショ、RT-PCR、SPFMV、RNA抽出			
実施機関名(主査)原種農場ウイルスフリー育苗成室 (協力機関)工業試験場生物学課 農林水産省九州農業試験場病害遺伝子制御研究室 (実施期間)1998年度～2000年度			

[目的及び背景]

現在サツマイモウイルスフリー苗生産に伴うウイルス検定は、指標植物を用いた生物検定法が用いられているが、手法が煩雑で、問題点が多い。高感度で短時間に検出可能な遺伝子増幅法(RT-PCR法)を応用したサツマイモ斑紋モザイクウイルス(SPFMV)の検出法を開発する。

[成果内容]

- 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。SPFMVのいずれの系統も検出可能なプライマーは九州農業試験場病害遺伝子制御研究室でデザインされたMtvプライマーであり(表1)、供試したすべてのウイルス系統から約1.3kbpのcDNAを増幅できる。
- RT-PCRによる検出は高感度であるが、検定に当たって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(表2)。
- RT-PCR法と生物検定法及びELISA法を比較すると、生物検定法は高温期ではほとんど病徴が確認できず検定は不可能であるが、RT-PCR法とELISA法は高温期でも検定が可能である(表3)。また、RT-PCR法は生物検定やELISA法に比べ高い検出感度が得られる。
- RT-PCRを用いたSPFMV検定は以下の方法で行う。
(1)新鮮または冷凍保存した試料0.02～0.1gをAGPC法により抽出精製し、500 μ lの純水で再溶する。
(2)SPFMV検出用プライマーはMtvプライマーを使用する。
(3)RT-PCRの反応温度設定は、逆転写反応は、42度で20分間、その後95度5分間とする。PCRは、94度2分間前処理の後、94度1分間、55度1分30秒間、72度2分間の処理を1サイクルとし、30サイクル行う。
(4)RT-PCR反応終了後PCR産物の分子量を推定するため、1%アガーローズゲル電気泳動を行う。DNAの染色はエチジウムブロマイドを用い、260nm紫外線光下で約1.3kbpのPCR産物の有無を観察する。

[留意事項]

- 核酸を数十万倍に増幅させる技術なので、試料のコンタミネーションには極力注意を払う必要がある。
- RT-PCR検定を実施する場合、感染の確認されたポジティブコントロールと感染していないネガティブコントロールを組み込むことが望ましい。

[普及対象地域]

サツマイモ種苗増殖施設を持ち配布を行っている組織。

[行政上の措置]

サツマイモ種苗増殖施設を持ち配布を行っている組織。

[成果の概要]

RT-PCRを用いたウイルス検定業務に対応した体制の整備。

[普及状況]

[成果の概要]

表1 プライマーの種類とPCR産物の増幅結果

供試ウイルス 感染株	プライマーセット						
	VCHCA	VCHCC	VCCIA	VCCIC2	VCNAA2	Mt v	VC
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た。

注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。

表2 試料採取部位とRT-PCR及び電子顕微鏡観察によるSPFMV検出結果

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

注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。

注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。

表3 RT-PCR法とELISA及び生物検定との比較

供試株番号	RT-PCR法		生物検定		ELISA
	(3/21)	(8/3)	(2/3)	(8/3)	(8/3)
1	-	-	-	-	-
2	+	+	+	-	-
3	+	+	+/-	-	-
4	+	+	-	-	+
5	+	+	+	-	-
6	+	+	+	-	+
7	+	+	+	-	+
8	-	-	-	-	-

注1) +は陽性の結果、-は陰性の結果、+/-は判定不能を示した。

注2) ()内は調査実施日

[発表及び関連文献]

平成11年度日本植物病理学会大会 口頭発表
 平成10年度～平成12年度 原種農場試験成績書
 千葉県農業総合研究センター研究報告第1号(投稿中)