

リンドウで発生するソラメウイルス2, クローバ葉脈黄化ウイルス, キュウリモザイクウイルス及びリンドウモザイクウイルスを検出するマルチプレックスRT-PCR

誌名	北日本病害虫研究会報
ISSN	0368623X
著者名	山本,英樹
発行元	北日本病害虫研究会
巻/号	63号
巻号補足	
掲載ページ	p. 107-109
発行年月	2012年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



リンドウで発生するソラマメウルトウイルス 2, クローバ葉脈黄化ウイルス, キュウリモザイクウイルス及び リンドウモザイクウイルスを検出するマルチプレックス RT-PCR

山本英樹*

Detection of *Broad bean wilt virus 2*, *Clover yellow vein virus*, *Cucumber mosaic virus*
and *Gentian mosaic virus* in *Gentian* by Multiplex RT-PCR

Hideki YAMAMOTO*

A method of multiplex RT-PCR analysis for detecting *Broad bean wilt virus 2*, *Clover yellow vein virus* and *Cucumber mosaic virus*, which was reported by Kuroda *et al.* (2002), was modified to simultaneously detect *Gentian mosaic virus* with the three viruses. Total RNAs were extracted from gentian plants singly infected with each of the four viruses; double, triple and quadruple mixtures were also prepared. After cDNA was synthesized from each sample using four antisense primers (BBR, CIYR, CMR and GeMV-2437), multiplex PCR with four primer sets (BBF/BBR, CIYF/CIYR, CMF/CMR and GeMV2222-/GeMV-2437) was carried out. The appropriate fragment corresponding to each virus species was amplified. When this method was applied to various kinds of naturally infected gentian plants, the four viruses were properly detected.

Key words: *Broad bean wilt virus 2*, *Clover yellow vein virus*, *Cucumber mosaic virus*, gentian, *Gentian mosaic virus*, multiplex RT-PCR

近年、秋田県ではリンドウの生産が飛躍的に拡大しており、本県の花き生産の第3位となっている(3)。本県のリンドウで発生しているウイルスについて調査したところ、ソラマメウルトウイルス 2 (BBWV-2) が最も多く、次いで近年新たに発見されたリンドウモザイクウイルス (GeMV) (1)、キュウリモザイクウイルス (CMV) であることが明らかとなった(3)。クローバ葉脈黄化ウイルス (CIYVV) の発生は少ないものの症状が激しいため、今後注意が必要である。一方、国内のリンドウで発生が報告されているインパチエンスネクロティックスポットウイルス、インゲンマメ黄斑モザイクウイルス及びタバコ茎えそウイルスは確認されなかった。

本調査では、Kuroda *et al.* (2) のマルチプレックス RT-PCR 法により BBWV-2, CIYVV 及び CMV を同時検定したが、一度に3種のウイルスが検定できることから、省力的で経費も削減できるため大変実用的、有効な方法であった。しかし、本法が開発された当時はまだ GeMV が発見されていなかったため、GeMV には対応していなか

った。そこで、Kuroda *et al.* (2) の方法を基に GeMV も同時検出できるように改変を行ったので報告する。

本試験を行なうに当たって、農業試験場鈴木奈緒氏には補助して頂いた。お礼申し上げる。

材料および方法

1. 供試材料

2009～2011 年に本県のリンドウから採取した葉から RNeasy Plant RNA Kit (キアゲン) を用いて抽出した全 RNA (前報(3)において RT-PCR 法によるウイルス検定済み) を用いた。

2. プライマー及び RT-PCR

BBWV-2, CIYVV 及び CMV を検出するプライマーはそれぞれ Kuroda *et al.* (2) のマルチプレックス RT-PCR の BBF/BBR (相同プライマー/相補プライマー、以下同じ)、CIYF/CIYR 及び CMF/CMR を用いた (Table 1)。それぞれ 453bp, 739bp, 607bp のバンドが得られるため、GeMV 特異的プライマーは増幅産物が約 200～350bp に

*秋田県農業試験場 Akita Agricultural Experiment Station, Yuwa-aikawa, Akita 010-1231, Japan
現在: 秋田県北秋田市旭町 Asahicho, Kitaakita, Akita 018-3313, Japan

Table 1 Primers used in this study

Virus	Sense primer: 5'-sequence-3'	Antisense primer: 5'-sequence-3'	Fragment size(bp)
BBWV-2	BBF ^{a)} : GTACATGCTTGGTCAAGCAC	BBR ^{a)} : AACTTCTTGTTACCACGCAC	453
CIYVV	CIYF ^{a)} : CATTCCAGACAGAGACATCAATGCAG	CIYR ^{a)} : ACGGAGAATTTAAAGACGGATAC	739
CMV	CMF ^{a)} : CGGTCTTTAGCACTTTGGTGCG	CMR ^{a)} : CATATTCCTGACTGAATCAGG	607
GeMV	GeMV2222-: CAATGATGGGAGCAACTTTT	GeMV-2437: CCACTTCCTCTGTCTTATCT	216
GeMV	GeMV2635-: GGGTACAAGCAAGGTCAAGC	GeMV-2935: CTGCCTGGGAAGTTCTTCTG	301
GeMV	GeMV2209-: CTTATGAGCAGCCCAATGAT	GeMV-2437: CCACTTCCTCTGTCTTATCT	229
GeMV	GeMV1544-: CAATACCCCTGAATGTCACT	N-1-38L ^{b)} : CACCAATCACAGCAGAGAA	316

a) Primers were designed by Kuroda *et al.* (2) to simultaneously detect BBWV-2, CIYVV and CMV.

b) The reverse primer was designed by Kobayashi *et al.* (1) to amplify part of GeMV RNA-2.

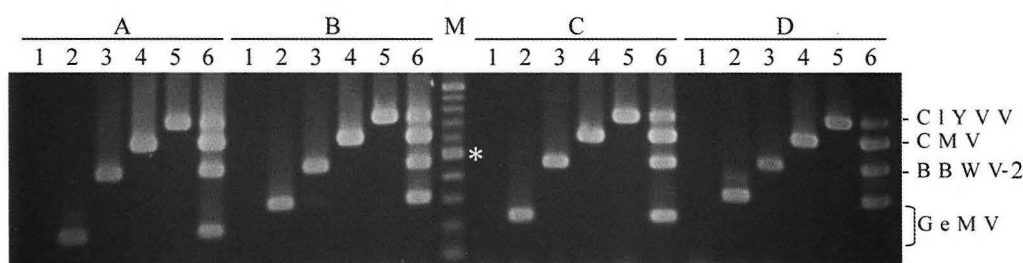


Fig. 1 Comparison of four multiplex RT-PCR methods for simultaneous detection of BBWV-2, CIYVV, CMV and GeMV in gentian. The primer sets used are BBF/BBR, CIYF/CIYR and CMF/CMR in combination with GeMV2222-/GeMV-2437 (A), GeMV2635-/GeMV-2935 (B), GeMV2209-/GeMV-2437 (C) and GeMV1544-/N-1-38L (D), respectively. Lane 1 is a total RNA from a healthy plant. Lanes 2 to 5 are those from plants infected with GeMV, BBWV-2, CMV, and CIYVV, respectively; lane 6 is an equal mixture of the four total RNAs. Lane M is a 100-bp DNA ladder (New England Biolabs); the asterisk indicates 500 bp.

なるように4組 (GeMV2222-/GeMV-2437, GeMV2635-/GeMV-2935, GeMV2209-/GeMV-2437 及び GeMV1544-/N-1-38L) 設計し, それぞれ Kuroda *et al.* (2) のプライマーセットと組み合わせた.

RT-PCRはPrimeScript RT-PCR Kit (タカラバイオ) を用いて説明書に従い行った. なお, 鋳型は全RNA 約100ngを用いた (条件設定試験での重複感染株を想定した試料は単独感染株から抽出した全RNAを各約100ngずつ混合した). 逆転写は, ランダムヘキサマーと相補プライマーを比較したところ後者での増幅が良かったことから, これを用いることにした (データ省略). すなわち, 各相補プライマー (BBR, CMR, CIYR 及び GeMV 特異的相補プライマー) が0.1 μ M となるように添加して, 50°Cで30分間反応させた. また, マルチプレックスPCR (逆転写反応液を1/10量含む) はBBF/BBR, CMF/CMR, CIYF/CIYR 及び GeMV 特異的相同プライマー/相補プライマーが各0.2 μ M となるように添加して, 熱変性を94°Cで30秒, アニーリングを54°Cで30秒, 伸長を72°Cで1分, 30サイクルとした.

結果及び考察

BBWV-2, CIYVV, CMV 及び GeMV の単独感染株から抽出した全RNA, これらを等混合した試料及び健全株の全RNAについて, Kuroda *et al.* (2) のプライマーにGeMV特異的プライマーを加えた4組のプライマーセットを用いてRT-PCRを行った (Fig. 1). 得られたバンドパターンを比較, 検討した結果, GeMV2635-/GeMV-2935を加えたプライマーセット (B) ではBBWV-2単独感染株 (lane 3) でGeMVとほぼ同じサイズのマイナーバンドが認められ, GeMV2209-/GeMV-2437 (C) と GeMV1544-/N-1-38L (D) では4ウイルス混合試料 (lane 6) でのCIYVVの増幅が単独感染株に比べ少ないようだった. 加えてGeMV1544-/N-1-38L (D) では, GeMV単独感染株 (lane 2) で400bp付近に比較的明瞭な非特異増幅が認められたので, GeMV2222-/GeMV-2437 (Fig. 1A) を選択した.

このプライマーセットを用いて, 各ウイルス単独感染株から抽出した全RNAを2種類, あるいは3種類, 等混合した試料についてRT-PCRを行ったところ, 想定されるバンドパターンが得られた (Fig. 2). 以上から健全株

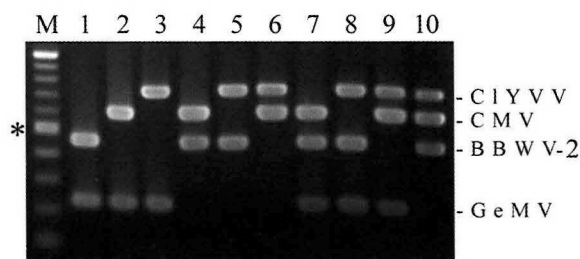


Fig. 2 Simultaneous detection of BBWV-2, CIYVV, CMV and GeMV by the multiplex RT-PCR method with the primer sets BBF/BBR, CIYF/CIYR, CMF/CMR and GeMV2222-/GeMV-2437 in gentian. Lanes 1 to 10 are virus combinations of GeMV/BBWV-2, GeMV/CMV, GeMV/CIYVV, BBWV-2/CMV, BBWV-2/CIYVV, CMV/CIYVV, GeMV/BBWV-2/CMV, GeMV/BBWV-2/CIYVV, GeMV/CMV/CIYVV and BBWV-2/CMV/CIYVV, respectively. Lane M is the 100-bp DNA ladder; the asterisk indicates 500 bp.

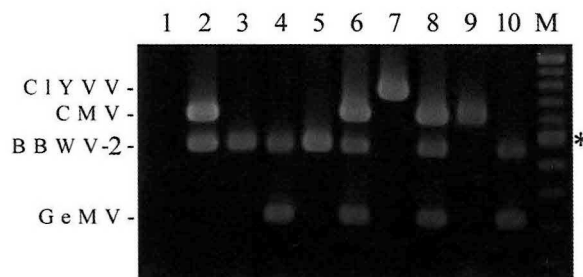


Fig. 3 Application of the multiplex RT-PCR method simultaneously detecting BBWV-2, CIYVV, CMV and GeMV to commercially grown gentian plants. Samples are plants infected with no viruses (lane 1), BBWV-2 (lanes 3 and 5), CIYVV (lane 7), CMV (lane 9), BBWV-2/CMV (lane 2), BBWV-2/GeMV (lanes 4 and 10) and BBWV-2/CMV/GeMV (lanes 6 and 8), respectively. Lane M is the 100-bp DNA ladder; the asterisk indicates 500 bp.

ではバンドが生じず、BBWV-2, CIYVV, CMV 及び GeMV の単独及びこれらのウイルスの全ての組み合わせにおいて、想定されるバンドパターンが得られることが確認された。

最後に、現地のリンドウ圃場から採集し、既報 (3) でウイルス検定済みの健全 1 株及び自然感染 9 株を用いて、本プライマーセットで検定を行ったところ、既報 (3) で得られた結果と一致した (Fig. 3)。

以上のように、Kuroda *et al.* (2) のマルチプレックス RT-PCR を改変し、秋田県のリンドウで発生する 4 ウィルス、BBWV-2, CIYVV, CMV 及び GeMV を同時に検定できるようになった。前述のようにマルチプレックス RT-PCR は省力的で経費も削減できるため、本法がリンドウのウイルス検定に役立てば幸である。

引用文献

- 1) Kobayashi, Y. O., Kobayashi, A., Hagiwara, K., Uga, H., Mikoshiba, Y., Naito, T., Honda, Y. and Omura, T. (2005) Gentian mosaic virus: A new species in the genus *Fabavirus*. *Phytopathology* 95 : 192-197.
- 2) Kuroda, T., Urushibara, S., Takeda, I., Nakatani, F. and Suzuki, K. (2002) Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction for simultaneous detection of viruses in gentian. *J. Gen. Plant Pathol.* 68 : 169-172.
- 3) 山本英樹・菊地英樹・千田峰生 (2012) 秋田県のリンドウで発生しているウイルス. 北日本病虫研報 63 : 104-106.