

土壌伝染性ウイルスによるソラマメえそ条斑症の簡易遺伝子診断法

農業・園芸総合研究所

1 取り上げた理由

近年、宮城県内各地で発生が確認されたソラマメえそ条斑症は、これまで世界中で報告のない新規ウイルスによる新病害である（普及に移す技術第81号普及情報）。ソラマメに発生するほとんどのウイルス病がアブラムシ伝搬性であるのに対し、本病は土壌伝染することが特徴であるため、防除対策は全く異なる。本病の診断は、5月中下旬に茎葉に現れる特徴的なえそ条斑により比較的容易であるが、4月～5月上旬は特徴的な症状を示さず、他のウイルス病や傷害と判別が難しい。そこで、現場で検定できる簡易な遺伝子診断法を開発したので、参考資料とする。

2 参考資料

- 1) 検定作業の手順は、実験室内で行う反応液の調整、ほ場で行う試料採取、遺伝子増幅、検出から成る（図1）。10検体程度の場合、反応液の調整から検出までの所要時間は1時間程度である。
- 2) 検出容器となるマイクロチューブは、検体数に陽性と陰性の対照を加えた数を用意し、調整した反応液を分注する。遺伝子増幅反応の保温器具として、約70℃の湯を満たした口の広い魔法瓶を用意する。
- 3) 現地では、まず魔法瓶の湯温が約65℃になるように調整する。葉を突いたつまようじの先端に付着した汁液を試料とし、1検体ごとに1本のマイクロチューブを用いる。本ウイルス感染個体の場合は、葉の汁液から反応液中に溶出したウイルス遺伝子が増幅され、反応前には薄赤色であった反応液が蛍光緑黄色に変色することにより、肉眼で判別ができる。

3 利活用の留意点

- 1) 本法は、等温遺伝子増幅反応であるLAMP（Loop-Mediated Isothermal Amplification）法を用いることにより、高価な精密機器を一切用いることなく診断が可能である。本技術に必須の機器は、マイクロピペット、マイクロチューブ、魔法瓶、小型簡易遠心器、温度計である。
- 2) 陽性対照となる本ウイルス感染葉は農園研が供給する。表1のプライマーは専門業者に合成を依頼して購入できる。
- 3) 試薬は、栄研化学㈱より販売されている。Loopamp RNA増幅試薬キット（96テスト分）60,000円（税別）、Loopamp 蛍光・目視検出試薬（96テスト分）7,800円（税別）で、購入後は冷凍庫で保存する。
- 4) 反応液は、検定実施当日に調整し、氷上保存する。なお、前日調整したものでも、使用可能である。
- 5) LAMP法は極めて感度が高い遺伝子検出法である。コンタミネーションを避けるため、検体の汁液が手や器具に付着しないように注意し、反応後のマイクロチューブの蓋は開けずに処分する。
- 6) ソラマメえそ条斑症の病原ウイルスは、ポモウイルス属に分類される新規の植物ウイルスである。実験で感染が確認された作物はソラマメとエンドウだけである。本病は、おそらく土壌生息菌の媒介による土壌伝染で、連作により被害が拡大すると予想される。このため、本ウイルスの発生が確認されたほ場では、ソラマメの作付けを避ける。

（問い合わせ先：農業・園芸総合研究所 バイオテクノロジー開発部 電話022-383-8131）

4 背景となった主要な試験研究

1) 研究課題名及び研究期間

遺伝子解析による品種識別と病害診断技術の開発 平成16～20年度

3) ウイルス病等診断技術の開発

2) 参考データ



実験室内	反応液の調整	<ul style="list-style-type: none"> 氷上に置いた1.5ml容マイクロチューブ中で、Loopamp RNA増幅試薬キットの試薬，蛍光目視検出試薬と表1のプライマー5種を所定濃度で混合し，10μl（使用説明書の半量）ずつ0.5ml容マイクロチューブに分注する。 約70$^{\circ}$Cの湯を満たした魔法瓶を用意する。大きめで，保温性の高いものを用いる。 	 <p>魔法瓶とチューブラック</p>
	↓		
ほ場	試料採取	<ul style="list-style-type: none"> 魔法瓶内の湯温を約65$^{\circ}$Cに調整する。 検定する葉をペーパータオル等で裏側から支え，病斑周辺をつまようじで4～5回刺す。直ちにつまようじの先端を反応液に1秒間浸漬し，マイクロチューブの蓋をして魔法瓶に入れて保温する。マイクロチューブが横転しないように，発泡スチロール等の薄い板でチューブラックを作ると良い。 	 <p>つまようじで試料採取</p>
	遺伝子増幅	<ul style="list-style-type: none"> 保温時間は<u>正確に35分間</u>とする。 	
	検出	<ul style="list-style-type: none"> 魔法瓶からマイクロチューブを取り出し，反応液の色を確認する。 陽性：蛍光緑黄色 陰性：薄赤色（反応前と変化なし） 	

図1 検定作業の手順

表1 ソラマメえそ条斑症病原ウイルスを検出するプライマーの配列

プライマー名	配列(5'→3')
BB1-F3	tcaggaaggaaactgca
BB1-B3	atacccgtaaagcatgt
BB1-FIP	ccatcacaataactacctcctcatcatttgtttgaatctgatgtcca
BB1-BIP	tctgtagtggttctctgatgtatggtagaattgcctggaag
BB1-LB	cggggacatacagtcataca

3) 発表論文等

普及に移す技術第81号(2006)普及情報

日本植物病理学会報(2006)72:54 (講演要旨)