

宮城県で発生したオオムギ縞萎縮ウイルスの塩基配列の解析及びRT-LAMP法による検出

瀬尾直美・長田 茂*・千葉直樹・笹原剛志**・板橋 建・中村茂雄***

(宮城県農業・園芸総合研究所・*元 宮城県農業・園芸総合研究所・**宮城県農林水産部農産園芸環境課・***宮城県産業技術総合センター)

Analysis of the Sequence of *Barley yellow mosaic virus* Occurred in Miyagi Prefecture and Detection by RT-LAMP Method

Naomi SEO, Shigeru OSADA*, Naoki CHIBA, Takeshi SASAHARA**, Takeru ITABASHI and Shigeo NAKAMURA***

(Miyagi Prefectural Institute of Agriculture and Horticulture・**Agricultural Products and Horticulture

Environment Division, Miyagi Prefectural Government・***Industrial Technology Institute,

Miyagi Prefectural Government)

1 はじめに

宮城県におけるオオムギの作付面積は1,280ha(2007年)で、全国第5位となっている。オオムギ縞萎縮病は土壌伝染性のウイルス病害で、宮城県では1979年頃から六条大麦に被害が認められている³⁾。近年、転作等によるオオムギの作付面積の増加や集落営農によるブロックローテーションに伴い、オオムギ縞萎縮病の発生が拡大する懸念がある。従来、オオムギ縞萎縮ウイルス(BaYMV)の診断は、ELISA法やRT-PCR法により実施されてきたが、これらの手法は高価な実験設備を必要とするほか、検定に数時間以上を要する。そこで、簡易に短時間で診断が可能なRT-LAMP法によるBaYMVの検出技術の開発を行った。

2 試験方法

(1) BaYMVの部分塩基配列の解析

宮城県K地区ほ場で2007年に採集し、-20℃で凍結保存したBaYMV感染オオムギ葉(品種「シュンライ」、以下、K2007感染葉とする)を用い、RNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)によりRNAを抽出した。抽出したRNAを鋳型として、BaYMV CP1及びCP4²⁾をプライマーとし、One Step RT-PCR Kit(QIAGEN)により765bpの遺伝子断片を増幅後、ダイレクトに塩基配列を決定した。

(2) RT-LAMPプライマーの設計

決定した塩基配列及びDNAデータバンク(EMBL/GenBank/DDBJ)に登録・公開されている塩基配列(Accession No. D01091、AB214502、AB214503、AB214504、AB214505)を基に、LAMP法プライマー設計支援ソフトウェアPrimer Explorer Ver.4(栄研化学株式会社・(C)Fujitsu limited)を利用して、BaYMV各系統を共通して検出できるプライマーの設計を行った。

(3) RT-LAMP法による検出

K2007感染葉及びK地区ほ場で2009年に採集した「シュンライ」の生葉のほか、K地区ほ場で2008年に採集した汚染土壌、宮城県I地区ほ場で1991年に採集した汚染土壌及び健全土壌を入れた各プランターに「白麦6号」、「はがねむぎ」及び「ミサトゴールデン」を2008年11月5日に播種し、育成した生葉を供試した。

RNA抽出は、RNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)及びSDT法⁴⁾を改変した以下の方法で行った。

オオムギの葉0.1gをTBST緩衝液300μlで磨砕した粗汁液100μlをマイクロチューブに入れ、氷上で10分間静置し、TBST緩衝液で2回洗浄後、滅菌水30μlでチューブ壁面に吸着したRNAを溶出させた液に、RNase-OUT(Invitrogen)0.5μlを加えた。

RT-LAMP反応は、Loopamp RNA増幅試薬キット及びLoopamp 蛍光・目視試薬(栄研化学株式会社)を用い、10μlの反応液を63℃で1時間保温後に、目視で蛍光の有無を判定した。

3 試験結果及び考察

(1) BaYMVの部分塩基配列の解析

決定した塩基配列660bpを図1に示した。この配列と既報のBaYMV CP遺伝子の部分配列との相同性は、98.8~99.2%であった。

(2) プライマーの設計

設計したプライマー配列を表1に示した。決定した塩基配列上のプライマー相当部分を図1に下線で示した(F3及びB3は太線、FIPは実線、BIPは波線)。

(3) RT-LAMP法による検出

各汚染土壌で育成した品種のうち「白麦6号」が最も明確な病徴を示したことから、各土壌で育成した「白麦6号」の生葉からKitで抽出したRNAを試料としてRT-PCR法でBaYMVの検出を行い、各汚染土壌で育成した株ではBaYMVが検出され、健全土壌で育成した株では検出されないことを確認した(データ省略)。

次に、K2007感染葉及び各土壌で育成した「白

麦6号」からKitで抽出したRNAを試料とし、設計したプライマーを含む反応液でRT-LAMP法による検出を行ったところ、感染個体では蛍光反応が確認された(データ省略)。したがって、設計したプライマーを用いたRT-LAMP反応により、BaYMVの検出が可能と考えられた。

さらに、各オオムギ生葉から改変したSDT法でRNAを抽出した試料を用い、同様にRT-LAMP反応を行ったところ、K地区で採集した「シュンライ」、各汚染土壌で育成した「白麦6号」、「はがねむぎ」で蛍光反応が確認された(表2)。「ミサトゴールドデン」は、今回使用した汚染土壌ではBaYMVの病徴が認められず(データ省略)、RT-LAMP法による検出においても蛍光反応が認められなかった(表2)。1991年に宮城県のBaYMV単独汚染ほ場において、BaYMV感染に対するオオムギの品種間差異を病徴診断及びELISA法で検討した結果では、「はがねむぎ」等、抵抗性遺伝子の $ym3$ を有する品種が高率に罹病しており³⁾、今回の結果と一致した。「ミサトゴールドデン」は $ym5$ 遺伝子を有しており¹⁾、今回使用した汚染土壌に存在するBaYMV系統に対して、抵抗性であることが示唆された。

4 ま と め

以上の結果から、BaYMV感染オオムギ葉から簡易

に抽出したRNAを試料とし、宮城県で発生したBaYMV遺伝子を解析して設計したプライマーを用いたRT-LAMP法により、1時間の反応後にチューブを目視するだけでBaYMVの検出が可能であることが示された。

引 用 文 献

- 1) 小川 奎, 渡辺 健, 飯田 幸彦, 千葉 恒夫, 山崎 郁子, 柏崎 哲, 土崎 常男. 1995. 茨城県におけるムギ類の土壌伝染性ウイルス病の発生生態と防除に関する研究 第1報 病原ウイルスの系統と発生生態. 茨城農総セ農研研報 2: 1-52.
- 2) Okada, Y., Kato, T., Yoshida, M. and Saito, A. 2008. Identification of Japanese strains of *Barley yellow mosaic virus* by RT-PCR/RFLP analysis of the coat protein-coding region. J. Gen. Plant Pathol. 74: 258-263.
- 3) 長田 茂, 高橋 智恵子, 柏崎 哲, 日比野 啓行. 1992. 宮城県におけるオオムギ萎縮病の発生状況とBaYMVの系統. 日植病報 58: 614-615. (講要)
- 4) Suehiro, N., Matsuda, K., Okuda, S., and Natsuaki, T. 2005. A simplified method for obtaining plant viral RNA for RT-PCR. J. Virol. Methods 125: 67-73.

```

1:CCAGTTAACCTCACAGCAACACGCATGCCCCACAGAAGATGATGGTAACTCAAAACACCA 60
61:TCTGGCGCTAGAATACCATCATCAGCTGCAGATGGTACCTGGAGCGTGCCAGCAACGAAG 120
121:CAAGTTAACGCTGGTTTGACACTTAAATTCCTTAAATAAGCTCAAAAGTGACCTAAG 180
181:TCTGTTATGGAGCATAACAACCTCAGTCGCACTCGAATCTGAGCTAAAAGCCTGGACTGAT 240
241:GCTGTGCGCACAAAGTTTAGGTATCACAACTGATGAGGCATGGATCGATGCCCTCATTCCC 300
301:TTCATCGGATGGTGTCTGCAACAATGGCACCTCAGACAAGCATGCTGAGAATCAAGTAATG 360
361:CAAATTGACAGCGGAAAGGGAGCTGTACAGAGATGAGTCTGTCCCATTTATTGTTTCAT 420
421:GCTCGAATGAATGGTGGACTCCGAAGGATCATGCGCAACTACAGTGATGAAACCGTCTTA 480
481:CTCATCACAACAACAACACTAGTTGCGCATTGGTCAATGAAGCATGGCGCTTCTGCAAAC 540
541:GCAAAATACGCTTTTCGATTTCTTCGTCCACGATCATGGATGAACCCACAGGATATCGAA 600
601:GTGTCAAAGCAAGCGCGCTTAGCAGCACTTGGAACTGGAACGTATAACACCATGTAACT 660

```

図1 BaYMV CP遺伝子の部分塩基配列

下線は設計したRT-LAMPプライマー配列相当部分(太線:F3及びB3, 実線:FIP, 波線:BIP)

表1 BaYMV検出用RT-LAMPプライマーの塩基配列

プライマー	塩基配列(5' - 3')
BaYMV-F3	CAGTCGCACTCGAATCTGAG
BaYMV-B3	TGGGACAGACTCATCTCTG
BaYMV-FIP	AGGGAATGAGGGCATCGATCCATGATGCTGTGCGCACAAAG
BaYMV-BIP	GGATGGTGTGCAACAATGGCGACAGCTCCCTTTCCGCT

表2 SDT法でRNAを抽出した試料のRT-LAMP法によるBaYMV検出結果

由来	品 種	陽性数/検定数
K地区ほ場(2009)	シュンライ	2/2
	白麦6号	2/2
	はがねむぎ	2/2
	ミサトゴールドデン	0/2
I地区汚染土壌	白麦6号	2/2
	はがねむぎ	2/2
	ミサトゴールドデン	0/2
	健全土壌	0/1
健全土壌	白麦6号	0/1
	はがねむぎ	0/1
	ミサトゴールドデン	0/1