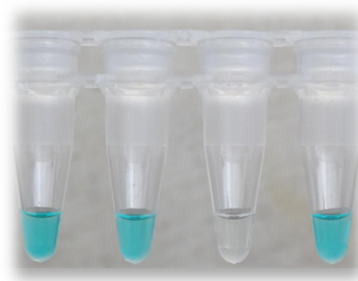
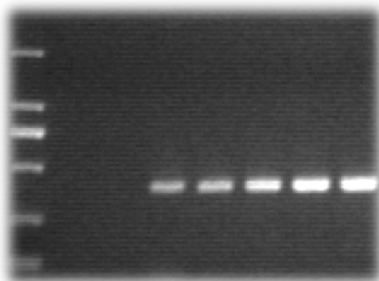


# オオバのシソサビダニおよびシソモザイクウイルス

## 検出マニュアル

### 第3版



農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業

「シソサビダニが引き起こすオオバのモザイク病およびさび症の防除体系確立」

(課題番号 27001C)

平成 27～29 年度 成果集

**A manual for detection of perilla rust mite (*Shevtchenkella* sp.) and  
Perilla mosaic virus**

**Third Edition**

National Agriculture and Food Research Organization (NARO)  
June 2020

表紙写真の解説

上段左：シソモザイクウイルスに感染しモザイク病を発症したオオバ。

上段右：シソモザイクウイルスの媒介虫シソサビダニの成虫。

下段左：RT-PCR 法によるシソモザイクウイルスの検出イメージ。

下段右：LAMP 法によるシソサビダニの検出イメージ。

## はじめに

オオバ（青しそ）のモザイク病は、葉の形や色を台無しにしてしまいます。

オオバの主要な産地である、愛知県、茨城県、大分県および高知県で発生が確認され、特に愛知県と高知県では広く発生が認められます。シソモザイク病の発生は約 30 年前から知られていましたが、長らくその原因が不明であり、防除が困難でした。近年、シソモザイク病はシソモザイクウイルス（*Perilla mosaic virus*, PerMV\*）を病原とするウイルス病であること、そのウイルスを媒介する生物がシソサビダニ（学名 *Shevtchenkella* sp.）であることが明らかになりました。

しかし、シソサビダニとシソモザイクウイルスは新たに判明した病虫害であるため、それらの生態や効果的な防除方法は依然不明でした。そこで平成 27 年から農林水産省の競争的研究資金である農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業を活用し、農研機構（中央農業研究センター・九州沖縄農業研究センター）、高知県農業技術センター、愛知県農業総合試験場、大分県農林水産研究指導センター、高知県中央東農業振興センター、法政大学の共同のもと、プロジェクト「シソサビダニが引き起こすオオバのモザイク病およびさび症の防除体系確立」において、研究開発に取り組みました。その主な内容は、各県における被害および発生実態の調査、シソサビダニおよびシソモザイクウイルスの生態解明と診断技術の開発、シソサビダニに対する農薬登録の促進と利用技術、物理的あるいは生物的現象を利用した個別防除技術の開発、そしてそれらの技術を体系化した総合防除体系の開発です。

ここで開発された総合防除体系を解説するマニュアルは、「オオバのシソサビダニおよびシソモザイク病防除マニュアル（全国共通版）」として公開しています。

一方この検出マニュアルでは、本プロジェクトで開発した、シソサビダニとシソモザイクウイルスを PCR 法または LAMP 法によって検出する手法について解説しています。利用場面に応じて、検出手法にいくつかのオプションを用意し、検出感度を優先したい、あるいは簡便さを優先したい場合の手法を記載しました。

さらに、フシダニ類、エマラウイルス全般の検出手法も開発しました。詳しくは巻末の問い合わせ先までお問い合わせください。

これらのマニュアルが、オオバの安定生産に少しでもお役に立てれば幸いです。

平成 30 年 4 月

研究総括者

農研機構中央農業研究センター

久保田 健嗣

\*シソモザイクウイルスおよび *Perilla mosaic virus* の略称として、本マニュアルの第 2 版までは PMoV を用いてきましたが、学術論文での表記に合わせ、今後は PerMV を用います。

## 目次

目次	3
I-1. シソサビダニの検出 : PCR 法編	4
1. 虫体の回収とサンプルの調製	4
2. DNA 抽出	5
3. PCR 反応	5
4. アガロースゲル電気泳動による判定	6
5. 応用: サビダニ類の PCR 検出	7
I-2. シソサビダニの検出 : LAMP 法編	9
1. 虫体の回収とサンプルの調製	10
2. LAMP 法の準備	12
3. LAMP 反応	14
4. LAMP 法の注意点など	15
II-1. シソモザイクウイルス (PerMV) の検出 : RT-PCR 法編	16
1. サンプルの調製	17
2. RT-PCR 反応	24
3. アガロースゲル電気泳動による判定	26
4. RT-PCR 法の注意点など	27
II-2. シソモザイクウイルス (PerMV) の検出 : RT-LAMP 法編	28
1. サンプルの調製	28
2. RT-LAMP 法の準備	29
3. RT-LAMP 反応	30
4. RT-LAMP 法の注意点など	31
III. 参考となる情報源	32
IV. 担当者・免責事項・お問い合わせ先	34

※オオバ (青しそ) のモザイク病、シソサビダニとシソモザイクウイルスの概要については、「オオバのシソサビダニおよびシソモザイク病防除マニュアル (全国共通版)」をご覧ください。

## I-1. シソサビダニの検出 : PCR 法編

シソサビダニは体長 0.2mm 程度と小さく、その同定は困難であるため、遺伝子診断法による特異的検出が有効です。ここでは、シソ葉上からシソサビダニの有無を PCR 法で検出する遺伝子診断手法を解説します。

また、サビダニ類は微小で植物体上で常発していない場合も多いことから、多くの作物における発生実態は不明です。そこで、上記と同様に PCR によって、各種の作物からのサビダニ類を検出する遺伝子診断技術も紹介します。

### 全体の流れ



### 1. 虫体の回収とサンプルの調製

シソサビダニの虫体のサンプリングは、実体顕微鏡下で豚のまつ毛や虫ピン等を用いて、1.5 ml チューブ（DNA 抽出用の ATL バッファーをあらかじめ入れておく）に直接回収するか、以下のエタノール回収法により行います。

#### [エタノール回収法]

- ① ダニ付着葉（5 mm 角）と 70%エタノール（1.0 ml）を 1.5 ml チューブに入れる。
- ② 1.5 ml チューブの蓋を閉め、30 秒間ボルテクスする。
- ③ 1.5 ml チューブ内の葉を除去する。
- ④ 10,000 rpm で 1 分間遠心する。
- ⑤ 沈殿物に触れないように上清を取り除く。
- ⑥ 上清を取り除き、5-10 分程度風乾する。

## 2. DNA 抽出

DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)にて、説明書に従いDNAを抽出してください。

## 3. PCR 反応

下記のPCR法ではTaKaRa Ex Taq（タカラバイオ）を使用していますが、他のメーカーの酵素を使用することも可能です。その場合、各メーカーの取扱い説明書を参照してください。

### ◆ プライマー

下表I-1-1のプライマーを準備してください。

表 I-1-1. シソサビダニ特異的プライマーの配列

	プライマー名	配列 (5'→3')
Forward Primer	SisoITS-F2	GACTCTTTGAATAAGCAGTCCA
Reverse Primer	SisoITS-R1	TCGGCCTTACTGCGACTAG

### ◆ 反応組成

酵素の取扱説明書の通り、反応試薬を混ぜてください。

※ 下表I-1-2はTaKaRa Ex Taqを用いた場合の1サンプルあたりの反応組成の例。

表 I-1-2. PCR の反応組成

DNA 溶液	1.0 μl
滅菌精製水	17.75 μl
10 x Ex Taq Buffer	2.5 μl
dNTP mixtue (2.5 mM each)	2.5 μl
Forward Primer (20 μM)	0.5 μl
Reverse Primer (20 μM)	0.5 μl
TaKaRa Ex Taq (5 U/μl)	0.25 μl
Total	25.0 μl

◆ 反応条件

表 I-1-3 の通り、サーマルサイクラーで PCR 反応を行ってください。

表 I-1-3. PCR の反応条件

96°C	5 min	
96°C	40 sec	} ×35
55°C	40 sec	
72°C	1 min	
72°C	7 min	
4°C	∞	

#### 4. アガロースゲル電気泳動による判定

PCR 反応の後、2%アガロースゲルにより電気泳動を行って結果をみます。シソサビダニが存在すれば、約 400 bp のところにバンドが検出されます (図 I-1-1)。

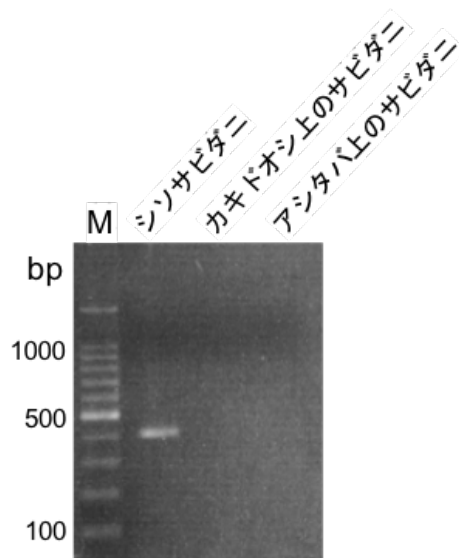


図 I-1-1. シソサビダニ特異的検出プライマーを用いた PCR の結果。M は 100 bp ラダーマーカー。



## 5. 応用：サビダニ類の PCR 検出

サビダニ類にはシソサビダニ以外にも、ミカンサビダニやトマトサビダニなど、農業上問題となるサビダニ種が数多く知られています。サビダニ類は肉眼では見えないほど小さいため、存在を確認することが困難です。ここでは、遺伝子増幅を用いたサビダニ類の検出法を解説します。

### 5-1. 虫体の回収とサンプルの調製

シソサビダニの項で記載した方法と同様です。

### 5-2. DNA 抽出

シソサビダニの項で記載した方法と同様です。

### 5-3. PCR

#### ◆ プライマー

下表 I-1-4 のプライマーを準備してください。

表 I-1-4. サビダニ類検出プライマーの配列

	プライマー名	配列 (5'→3')
Forward Primer	Eri18S-F1	GATTTGGGATTGGGGWTTGC
Reverse Primer	Eri5.8S-R1	GTGATCCACCGTTAATTGTGA

#### ◆ 反応組成および反応条件

シソサビダニの項で記載した方法と同様です。

### 5-4. 電気泳動による判定

PCR 反応の後、2%アガロースゲルにより電気泳動を行って結果をみます。サビダニ類が存在すれば、約 500～1,000 bp のところにバンドが検出されます (図 I-1-2)。必要に応じて、この増幅 DNA をもとにダイレクトシーケンスを行い、得られた配列を BLAST 検索にかけて既知のサビダニ類との異同について考察します。

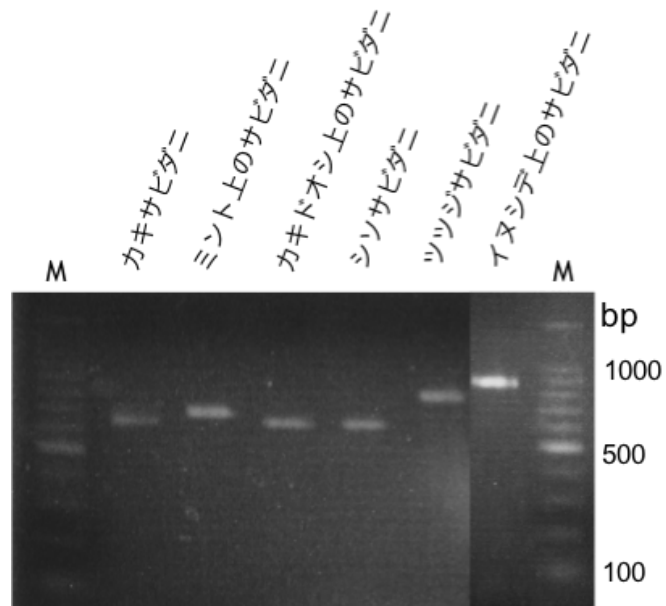


図 I-1-2. サビダニ類検出プライマーを用いた PCR の結果。

M は 100 bp ラダーマーカー。

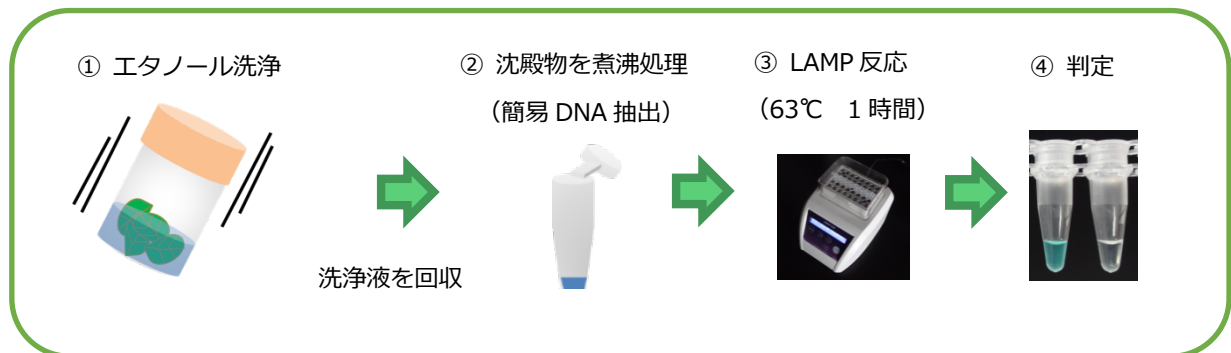
## I-2. シソサビダニの検出 : LAMP 法編

LAMP 法 (Loop-mediated Isothermal Amplification の略称) は、Notomi ら (2000) によって報告された DNA 増幅法です。4 種類のプライマーを使い、短時間・一定温度で多量の DNA を増幅できることが特徴です。さらに 2 種類のプライマーを追加することで DNA の増幅反応を早めることができ、また逆転写酵素を加えることで RNA ウイルスにも対応可能です。反応液の濁度で DNA の増幅の有無を確認できるため、電気泳動が不要で、さらに LAMP 法で使用する *Bst* DNA polymerase などの酵素は、DNA 増幅反応の阻害物質による影響を受けにくいいため、必ずしも DNA または RNA の精製を必要としません。このため感染植物体の汁液などを使った簡易な遺伝子診断に活用できます。

シソサビダニは非常に微小であり、肉眼はもちろん顕微鏡での観察も困難な場合が多いため、PCR 法や LAMP 法による遺伝子診断手法が有効です。ここでは、粗精製のサンプルからでも DNA 増幅反応が可能な LAMP 法の長所を活用して、複数枚の葉の洗浄液からシソサビダニを検出する方法を紹介します。また、シソサビダニは風に乗って拡散しており、そうした「空中のシソサビダニ」を湿式トラップにより捕獲し、LAMP 法で検出する方法も紹介します。

### 全体の流れ

#### 葉上のシソサビダニ



#### 空中のシソサビダニ

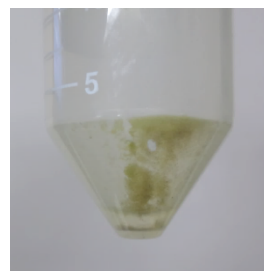


## 1. 虫体の回収とサンプルの調製

### 1-1. 葉上のシソサビダニの場合

地際付近の葉は土や砂が付着していることが多く、正常な LAMP 反応が阻害される可能性が高いため、シソサビダニの検定は最上位展開葉を用います。

- ① ふた付きの容器（容積 100～200 ml）に、シソの最上位展開葉の全葉を、10 枚から 20 枚採取する。
- ② 50%エタノールを容器の 1/4 から 1/3 量程度投入する。
- ③ ふたを閉めて激しく 30 秒間振とうし、シソ葉を洗浄する。
- ④ 50 ml ファルコンチューブ等にエタノール洗浄液を移し、3,000 rpm で 10 分間遠心分離する。
- ⑤ 上清を捨て、残った沈殿物を 5 分間から 10 分間程度風乾する。



- ⑥ 100 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.0)を 100  $\mu$ l～200  $\mu$ l 加えて懸濁し、新しい 1.5 ml マイクロチューブに全量を移す。
- ⑦ 100℃で 10 分間煮沸処理する。



- ⑧ しばらく冷やした後、5  $\mu$ l を LAMP 反応に用いる。このとき、試料液の汚れがひどい場合は、3,000 rpm で 1 分間遠心分離して、上清の 5  $\mu$ l を LAMP 反応に用いる。

## 1-2. 空中のシソサビダニの場合

微小昆虫の捕獲に利用される湿式トラップ（水盤トラップともいう）のトラップ液からシソサビダニを検出する方法です。トラップは地上高 50 cm に設置し、トラップ液として防腐効果のあるグリセリンを少量入れます。トラップは1週間程度で回収しますが、シソサビダニ以外の微小昆虫や砂、ほこり、花粉等でトラップ液がかなり汚れますので、遠心分離法ではうまくシソサビダニを回収できない場合があります。そこで脱脂綿フィルターでトラップ液をろ過洗浄し、フィルターからシソサビダニの DNA を抽出します。

- ① 湿式トラップのトラップ液からゴミをできるだけ取り除く。



自作の湿式トラップ（容器の大きさ、形状は問いません）

- ② 1 ml のピペット用チップに脱脂綿を充填（右写真）し、漏斗の先端に取り付ける。



- ③ 水道水とともにトラップ液を漏斗に流し込み、ろ過する。
- ④ 脱脂綿を 1.5 ml のマイクロチューブに回収し、以下の試薬を 1 ml 加える。

• 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)	900 $\mu$ l
• 10% Triton X-100	45 $\mu$ l
• 10% Tween 20	45 $\mu$ l
• Proteinase K (10 mg/ml)	10 $\mu$ l

⑤ 55℃で60分間保温後、100℃で10分間煮沸処理する。

⑥ しばらく冷やした後、5 µl を LAMP 反応に用いる。

## 2. LAMP 法の準備

LAMP 法は栄研化学株式会社の特許技術です。従って、本マニュアルでは、同社の Loopamp®DNA 増幅試薬キットを使用する手順を紹介します。

- ・同キットは E Genome Order (<http://genome.e-mp.jp>) で入手できます。
- ・同キットは冷凍 (-20℃) で保存してください。



Loopamp®DNA 増幅試薬キット LMP204 (48 テスト分 ¥30,000 :税別 2020 年 4 月現在)

- ◆ 2×反応液、酵素液
  - ・上記増幅試薬キットに含まれているものを使用してください。
- ◆ プライマー混合液
  - ・100 µM に調製した各プライマーを、表 I-2-1 のように混合して、プライマー混合液を作製してください。
  - ・プライマー混合液は冷凍で保存してください。

表 I-2-1. シソサビダニ検出用 LAMP プライマーの塩基配列と混合量

プライマー名	配列 (5' → 3')	
F3	GAACCGTTTATCCCCCTC	2.5 μL
B3	GGCTAGAACAGGAAGAGAG	2.5 μL
FIP	ACCCCCCAAGATGAAGAGAA-TCTAGAATTTCTTTCCATTCTGAC	20 μL
BIP	ACTACTGTCCTAGTTATGCGGT-TCACAACCATAGACCAAACA	20 μL
FLoop	AGATAGCCATATCTACAG	10 μL
BLoop	AGGGCTTGATCATAGGTCGAA	10 μL
滅菌水		135 μL
<b>計</b>		<b>200 μL</b>
(50 サンプル分)		

◆ マラカイトグリーン溶液 (以下、MG 溶液)

- ・マラカイトグリーンしゅう酸塩 (C<sub>52</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>) 2 mg を滅菌水 1 ml に溶解し、0.2%溶液を作製してください。
- ・MG 溶液は LAMP 反応後の陽性陰性の判定をし易くするために添加するものであり (Nzeli et al., *Acta tropica*, 132:1-6, 2014; Lucci et al., *Parasites*, 11:1-9, 2016)、省略も可能です。また、マラカイトグリーンしゅう酸塩は劇物に指定されているため、取り扱いに注意してください。

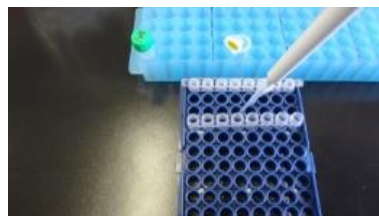
◆ LAMP 反応液

- ・DNA 増幅試薬キットの仕様書に従い、以下のように混合してください。
- ・MG 溶液を省略する場合は、代わりに滅菌水を加えてください。
- ・LAMP 反応液は使用直前に調製してください。

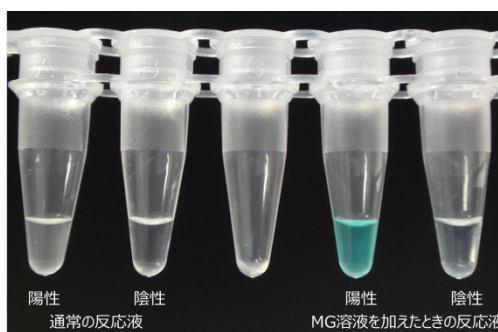
・ 2×反応液 (キット付属)	12.5 μl
・ 酵素液 (キット付属)	1.0 μl
・ プライマー混合液	4.0 μl
・ MG 溶液	1.0 μl (終濃度 0.008%)
・ 滅菌水 (キット付属)	1.5 μl
計	20.0 μl (1 サンプル分)

### 3. LAMP 反応

1. 恒温器を 63℃に設定する \*1)。
2. 「LAMP 法の準備」の項で調製した LAMP 反応液を 8 連 PCR チューブに 1 サンプルにつき 20 μl ずつ分注する。



3. サンプル液を 5 μl 加える \*2)。
4. 恒温器にチューブをセットし、1 時間保温する \*3)。
5. 1 時間後にチューブを取り出し、反応液の色を観察する。MG 溶液を添加した場合、DNA 増幅があれば反応液の色は空色である。DNA 増幅がなければ無色である \*4) \*5)。



- \*1) 恒温器がなければ、魔法瓶等の保温容器でも代用可能です。その場合はあらかじめ 70℃くらいのお湯を張って、保温容器を暖めておいてください。
- \*2) このとき、あらかじめ陽性コントロールと陰性コントロール（水）を別に用意してください。
- \*3) 恒温器の代わりに魔法瓶を使用する場合は、約 65℃の湯にチューブを浮かべて約 1 時間保温します。シソサビダニ DNA の最適反応温度は 63℃ですが、60℃から 65℃であれば十分に反応します。
- \*4) コンタミネーションの原因となるため、このとき絶対にチューブのふたを開けてはいけません。
- \*5) 反応液に MG 溶液を加えない場合は、反応液が白濁しているかどうかで陽性が陰性を判定してください。



## 4. LAMP 法の注意点など

- ・ LAMP 反応は非常に増幅効率が高いため、特に以下の点に注意してください。
  - ① サンプルの採取は、手袋を着用したり、よく手を洗ってから行ってください。また、つまようじや注射針はサンプルごとに取り替えてください。特につまようじを用いた検定では順番を間違ふことが多いので、細心の注意を払ってください。
  - ② LAMP 反応において最も問題となるのが増幅産物のコンタミネーションです。増幅産物が反応試薬に少しでも混入すると、陰性コントロールも含めて全ての反応液で DNA 増幅反応がおきてしまいます。コンタミネーションを防ぐためには、作業ごとに器具と場所を分け、チューブのふたはしっかりと閉めて、反応後も絶対に開けないでください。
  - ③ 病害発生 の 現 地 で 検 定 作 業 を 行 う 場 合 は、 あ ら か じ め 必 要 本 数 分 の 試 薬 を 分 注 し て お く、 作 業 は 落 ち 着 い て 可 行 する 管 理 舎 等 で 行 う、 一 連 の 作 業 は 一 人 で 行 う、 事 等 で 初 歩 的 な 作 業 ミ ス を 大 幅 に 減 ら す こ と が 可 行 可 能 だ と 考 え ら れ ます。

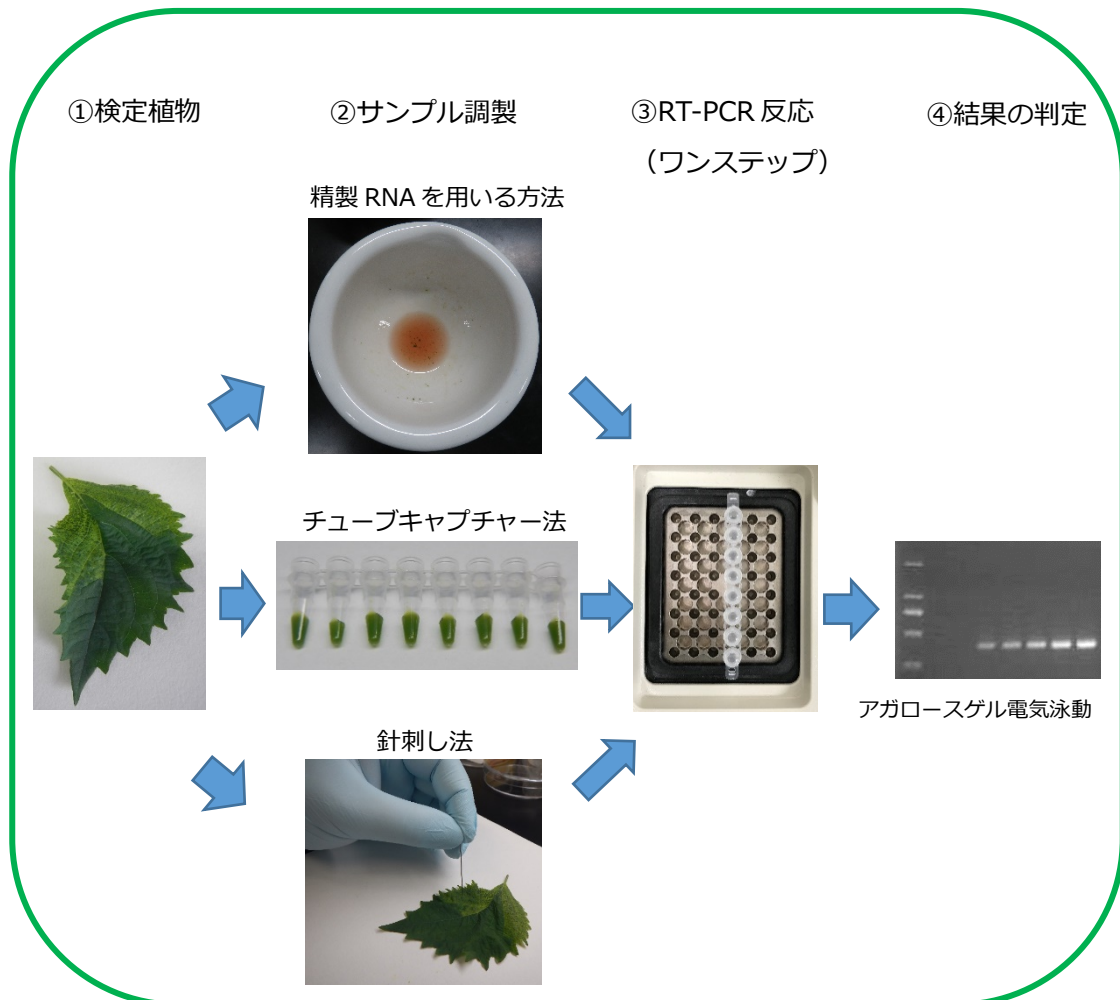
## Ⅱ-1. シソモザイクウイルス (PerMV) の検出 : RT-PCR 法編

シソモザイクウイルス (Perilla mosaic virus, PerMV) は、環状の糸のような粒子構造をとります。分類学上、フィモウイルス科エマラウイルス属に属すると考えられます。エマラウイルス属には、イチジクモンサビダニに媒介されるイチジクモザイクウイルスなど、世界でおよそ 15 種が報告されています。

PerMV に感染したシソは、葉脈に疎って退色しモザイク様の病徴を呈しますが、アブラムシによる吸汁や生理障害と思われる症状とも類似しているため、外観だけで PerMV 感染を特定することは困難です。

従って、確実にシソモザイク病を診断するためには PerMV を遺伝子レベルで検出する必要があります。この項では RT-PCR 法による検出法を紹介します。

### 全体の流れ

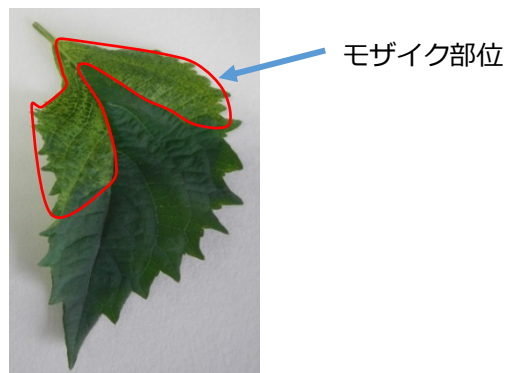


## 1. サンプルの調製

RNA 抽出時の注意点として、PerMV は葉の中での局在性が高く、モザイクを呈している部位に高濃度で存在していると考えられています。そのため、RNA 抽出の際には、モザイクを呈している部分（下図の赤線で囲われた部分）を用いることが重要です。

RT-PCR により、PerMV を検出するためには、何らかの方法で植物から RNA を抽出する必要があります。本マニュアルではまず、TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて植物から全 RNA を抽出し、ワンステップ RT-PCR で PerMV を検出する方法を紹介します（1-1, 18 ページ）。

また、本法で RNA 抽出を行うのは、大量のサンプルを診断するには多くの手間と時間（所要時間約 1.5~2 時間）を要します。また、カラムを使う市販の RNA 抽出キットはより簡便ですが、1 サンプルあたり約 700 円と高価なため、大量のサンプルを診断するには多くの費用がかかります。そこで、本マニュアルでは、さらに、大量検定、簡易検定を行う際の方法として、これらの RNA 抽出法に比べより簡便かつ低コストで RT-PCR のテンプレートを得る方法を 2 つ紹介します（チューブキャプチャー法; 21 ページ、針刺し法 ; 23 ページ）。



モザイクが葉の一部にのみ現れている罹病葉

## 1-1. 精製 RNA を用いる方法

本マニュアルでは、サンプル調製の基本的な方法として、まず、TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.) を使用した RNA 抽出法を紹介します。

### 1-1-1. 必要な試薬および器材

乳鉢・乳棒

微量冷却高速遠心機

液体窒素

TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.)

High-Salt Solution for Precipitation (Plant) (タカラバイオ株式会社) (省略可能)

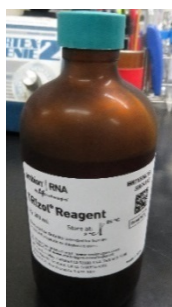
クロロホルム

2-プロパノール

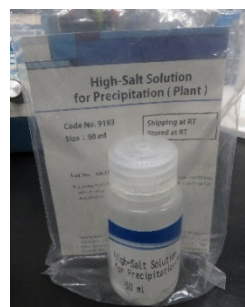
エタノール

75%エタノール

RNase-free water



TRIzol Reagent  
(100 ml, ¥29,000 : 参考価格)



High-Salt Solution for Precipitation (Plant)  
(50 ml, ¥6,500 : 令和2年4月現在)

### 1-1-2. 手順

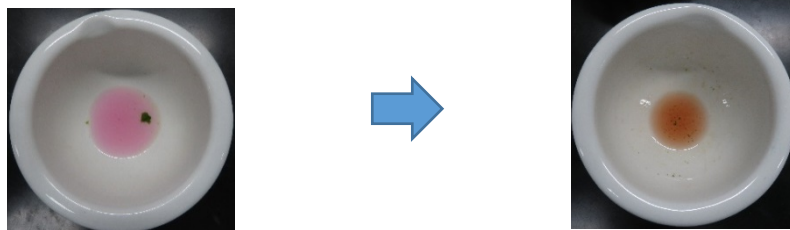
- ① 1.5 ml チューブや直径 8 mm 生検トレパン (カイインダストリーズ株式会社) を用いて、リーフディスクを 3 枚作製し、乳鉢に移す。



- ② 液体窒素で凍結させ、乳棒で磨砕し、粉末にする。



- ③ この凍結粉末を 1 ml の TRIzol Reagent を入れた別の乳鉢に移し、乳棒でさらに磨砕する。



- ④ 磨砕液を 1.5 ml チューブに移し、12,000×g、4℃、10 分の条件で遠心分離する。



- ⑤ 上清を回収し、新しい 1.5 ml チューブに移す。

- ⑥ 0.2 ml のクロロホルムを加え、混和する。その後、12,000×g、4℃、15 分の条件で遠心分離する。



- ⑦ 水層を 500  $\mu$ l 回収し、新しい 1.5 ml チューブに移す。

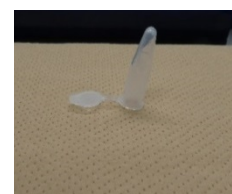


- ⑧ 250  $\mu$ l の 2-プロパノールと High-Salt Solution for Precipitation (Plant) (タカラバイオ) をそれぞれ加え、混和し、室温で 15 分静置する (High-Salt Solution を加えず、500  $\mu$ l の 2-プロパノールでも可能)。その後、12,000 $\times$ g、4  $^{\circ}$ C、15 分の条件で遠心分離する。

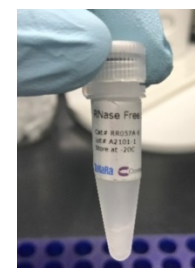


- ⑨ 上清を捨て、1 ml の 75%エタノールを加え、沈殿物を洗浄する。その後、12,000 $\times$ g、4  $^{\circ}$ C、5 分の条件で遠心分離する。

- ⑩ 上清を捨て、5 分間室温に静置し、風乾する。



- ⑪ 20  $\mu$ l の RNase-free water を加え、ピペッティングで混和する。  
この抽出液 1  $\mu$ l を RT-PCR のテンプレートとして使用する。



2. RT-PCR 反応 (24 ページ) へ進んでください。

## 1-2. チューブキャプチャー法

チューブキャプチャー法はフェノールやクロロホルムなどの危険な試薬を使わず、さらに、エタノール沈殿や遠心分離をすることなく簡易に RNA を抽出する方法です (Suehiro et al., J Virol Methods, 125:67-73, 2005; 石川 (末廣) ら, 植物防疫, 62:387-390, 2008)。所要時間は、10 サンプル行って約 30~40 分程です。

### 1-2-1. 必要な試薬および器材

PBS-T (1L の 1×PBS に 0.5ml の Tween20 を加える)

8 連ピペット (100 $\mu$ l 用)

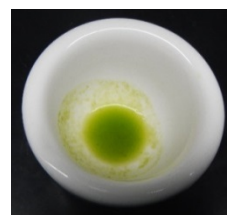
サーマルサイ클ラー

### 1-2-2. 手順

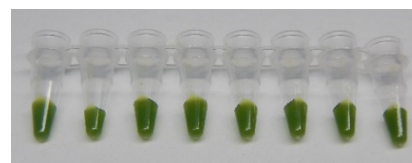
- ① 罹病葉のモザイク部位より、1.5 ml チューブや直径 8 mm 生検トレパン (カイインダストリーズ株式会社) を用いてリーフディスクを 1 枚作る。生検トレパンを使用する際は、新品または滅菌処理したものを用いる。



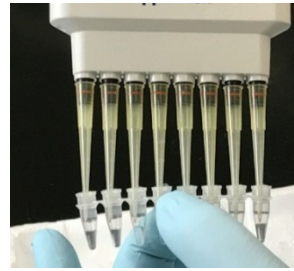
- ② 乳鉢に移し、250 $\mu$ l の PBST を加えて乳棒で磨砕する。



- ③ ②の粗汁液を 50 $\mu$ l、PCR チューブに移し、蓋をして室温で 5 分静置する。



- ④ 液を捨て、50  $\mu$ l の PBS-T をチューブに加え、4~5 回ピペティングをして洗浄する。この操作を 2 回繰り返す。



- ⑤ 30  $\mu$ l の RNase-free water をチューブに加え、95℃に 1 分間静置する。その後、氷上に移し 1~2 分静置する。この溶液を RT-PCR のテンプレートとして 1  $\mu$ l 使用する。



2. RT-PCR 反応 (24 ページ) へ進んでください。



### 1-3. 針刺し法

針刺し法は、罹病葉のモザイク部位を5回、昆虫針で刺し、PCR溶液に浸すだけの簡単な方法です。上記1-1, 1-2の方法と比べると検出感度はやや劣る傾向にありますが、多検体を省力的かつ低コストで検定するのに適しています。サンプル調製に必要なものは昆虫針（1本あたり約3.5円）です。以下に手順を示します。

#### 1-3-1. 必要な器材

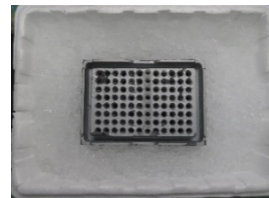
有頭シガ昆虫針 5号



有頭シガ昆虫針 5号（志賀昆虫普及社、100本 ￥350）

#### 1-3-2. 手順

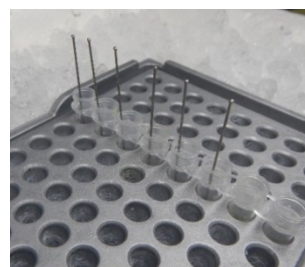
- ① RT-PCRの反応液（後述）を8連PCRチューブに分注し、氷上に準備する。



- ② 罹病葉を濾紙等の上に置き、モザイク部位を昆虫針で5回刺す。  
コンタミネーション防止のため、針はサンプルごとに交換する。濾紙はサンプルごとに交換するか、同じ場所を使わないようにする。



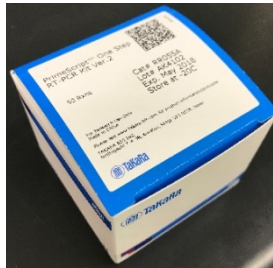
- ③ あらかじめ用意しておいた、RT-PCR反応液に10秒ほど浸す。



2. RT-PCR反応（24ページ）へ進んでください。

## 2. RT-PCR 反応

PerMV は RNA ウイルスであるため、遺伝子診断を行う際は、抽出した RNA を逆転写反応 (RT) し、cDNA を作製した後、PCR 反応を行う必要があります。それぞれの反応を別々に行うこともできますが、本マニュアルでは、PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 (タカラバイオ株式会社) を用いて、1つのチューブ内で RT と PCR 反応を連続して行う方法を紹介し、検出用のプライマーは下記の表に示したものを使用します。プライマー以外の必要な試薬はすべて、本キットに含まれています。



PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 (50 回用、¥ 45,000(税別)、令和 2 年 4 月現在)

表 II-1-1. PerMV 検出用 RT-PCR プライマー

プライマー名	配列 (5' → 3')
PerMV_RNA1-fw4	GATGCATCAAAATGGTCAGCAA
PerMV_RNA1-rv4	GCACTATCATCTGAATGCACAAGG

① 下記の通り反応液を調製する (表 II-1-2)。これ以降の操作は反応液を氷冷した状態で行う。

表 II-1-2. 反応液組成

2 x 1 step Buffer	5 $\mu$ l
Primer Pair (5 $\mu$ M each)	0.8 $\mu$ l
PrimeScript 1 step Enzyme Mix	0.4 $\mu$ l
Template RNA	1 $\mu$ l
RNase Free dH <sub>2</sub> O	2.8 $\mu$ l <sup>*1</sup>
-----	
Total	10 $\mu$ l <sup>*2, 3</sup>

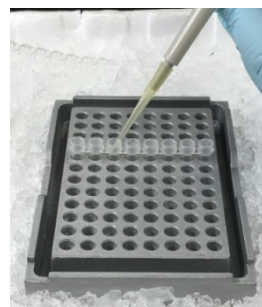
\*<sup>1</sup> 針刺し法使用時は、Template RNA の代わりに H<sub>2</sub>O を 1  $\mu$ l 多く加える。

\*<sup>2</sup> 取り扱い説明書では 50  $\mu$ l の系での反応が推奨されているが、10  $\mu$ l の系でも問題なく反応し、検出できる。

\*<sup>3</sup> サンプル毎に調製するのではなく、あらかじめマスターミックスを作り、分注する。その際、サンプル

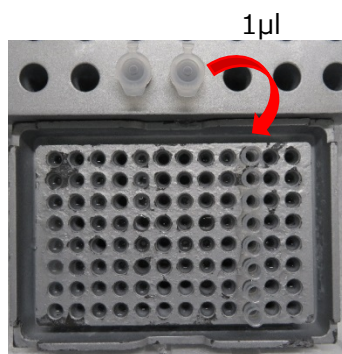
数+0.5 個分ほど多めに調製する。

- ② 精製 RNA を用いる方法およびチューブキャプチャー法を用いる場合は1サンプルあたり 9  $\mu\text{l}$ 、針刺し法の場合は 10  $\mu\text{l}$  ずつ8連 PCR チューブに分注する。

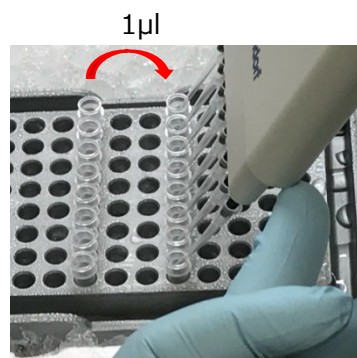


- ③-1 精製 RNA を用いる方法およびチューブキャプチャー法の場合

上記 1-1-2 (ステップ⑩) または 1-2-2 (ステップ⑤) で作製した抽出液を、1  $\mu\text{l}$  ずつ、RT-PCR 反応液に加え、蓋を閉める。



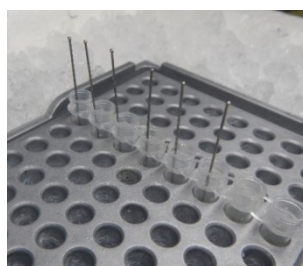
精製 RNA を用いた方法



チューブキャプチャー法

- ③-2 針刺し法の場合

昆虫針で罹病葉のモザイク部位を 5 回刺し、RT-PCR 反応液に 10 秒程浸してチューブの蓋を閉める。



### 針刺し法

- ④ 上記の PCR チューブをサーマルサイクラーにセットし、以下の反応条件で RT-PCR 反応を開始する。

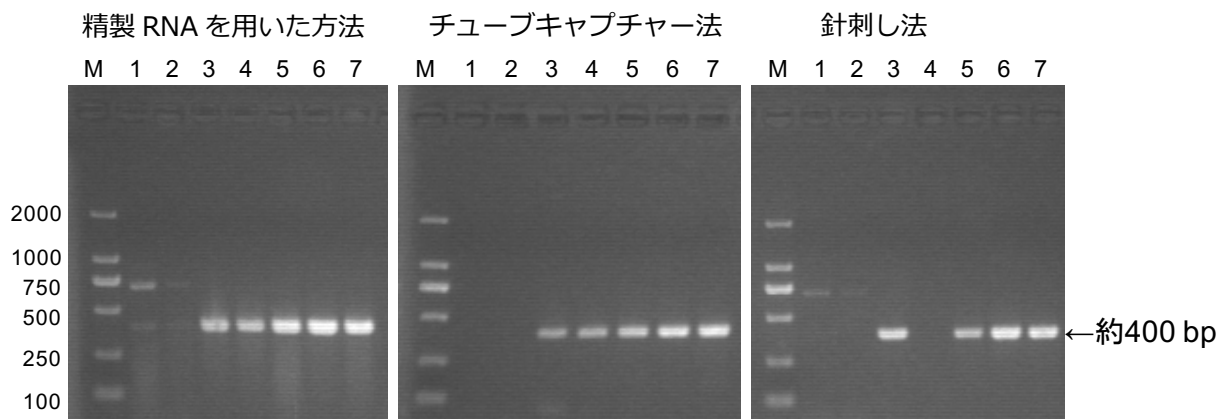


逆転写反応	{	50°C 30分	
		94°C 2分	
PCR反応	{	94°C 30秒	} × 35 サイクル
		53°C 30秒	
		72°C 40秒	
		72°C 5分	
		4°C ∞	

### 3. アガロースゲル電気泳動による判定

RT-PCR 反応の終了後、反応液 5 μl を、2%アガロースゲルで電気泳動し、エイチジウムプロマイド等で染色して、検出結果を確認する。PerMV が検出できていれば、約 400 bp のバンドが確認できる。健全および PerMV 罹病シソ葉のサンプルを用いて行った試験では、針刺し法では罹病葉 5 サンプル中 4 サンプル、チューブキャプチャー法では 5 サンプル中すべてから PerMV を検出できました。

以上 3 つの手法の検出感度とコスト、手間をふまえ、使用場面に適した方法をお使いください。



レーン番号 : 1 と 2 は 健全シソ葉, 3~7 はモザイク病罹病シソ葉。

## 4. RT-PCR 法の注意点など

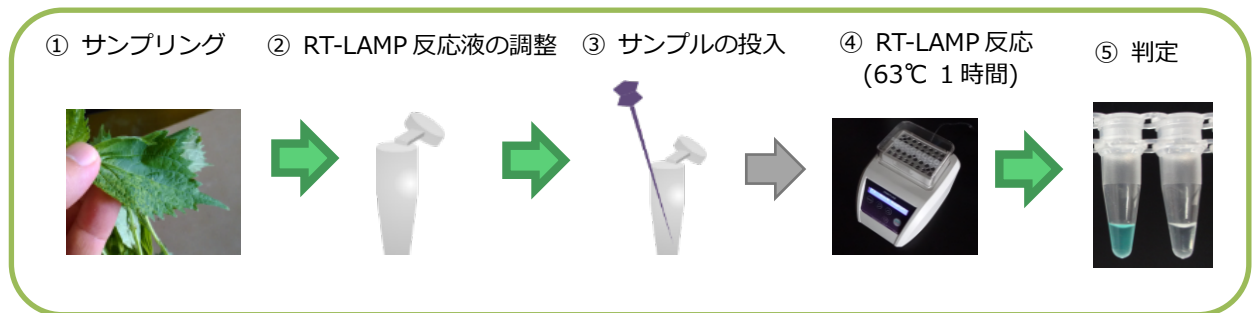
RT-PCR による検出は、非常に増幅感度が高いため、以下のことに注意しコンタミネーションが起こらないように注意する必要があります。

- ①本マニュアルのすべての工程の作業は、実験用の手袋を着用して行ってください。また、ネガティブコントロールとして健全植物を用いる際には、罹病植物を扱う前に健全植物を扱うことで、コンタミネーションのリスクを減らすことができます。
- ②TRIzol Reagent やクロロホルムを扱う作業はクリーンベンチやドラフト内で行い、実験用手袋や、安全ゴーグルを使用することが望ましいです。また、これらの廃液は各施設の規則に従って、適切に処分してください。
- ③針刺し法を行う際、使用する昆虫針はサンプルごとに必ず交換してください。濾紙はサンプルごとに交換するか、前のサンプルと刺す場所を変えて使用してください。使用した針はまとめて保存し、滅菌処理をして、各施設の規則に従って処分してください。再利用はしないでください。
- ③チューブキャプチャー法を行う際、8 連ピペットを使用すると、コンタミネーションのリスクを減らすだけでなく、作業性も向上し、時間短縮が可能です。
- ④作業は落ち着いてできる実験室等で行うこと、一連の作業は一人で行うことなどで初歩的な作業ミスを大幅に減らすことができます。

## Ⅱ-2. シソモザイクウイルス（PerMV）の検出 : RT-LAMP 法編

シソサビダニの項でも述べましたが、LAMP 法は逆転写酵素を加えることで RNA ウイルスにも対応可能な遺伝子診断法です。この項では、発生現場において、普及指導員の方が迅速に PerMV を検出・診断できる方法として、RT-LAMP 法による検出法を紹介します。

### 全体の流れ



### 1. サンプルの調製

・ PerMV は葉組織内で偏在しており、その分布はモザイク症状と一致します。従って、PerMV の検定には、モザイク症状の部位を用品。

・ RT-LAMP 法は精製された RNA ではなくても分析が可能なため、簡易なサンプル調製が可能です。抽出 RNA 以外のサンプル調製方法としては、次の 2 法が適用できることが確認されています。

- ① 罹病葉の磨碎希釈溶液
- ② 罹病葉の汁液

①では、罹病葉のモザイク症状の部位を乳鉢またはビーズ破砕機等を用いてすり潰し、100 mM Tris-HCl バッファー(pH8.0)で 500 倍程度に希釈し、1  $\mu$ l を RT-LAMP 反応に用品。

②では、滅菌つまようじや注射針等を罹病葉のモザイク症状の部位に 10 回から 20 回程度突き刺し、先端部に付着した汁液を RT-LAMP 反応に用品。

・ 本マニュアルでは、「② 罹病葉の汁液」を用いた方法を記載しますが、抽出 RNA や罹病葉の磨碎希釈溶液を用いる場合でも、RT-LAMP 反応液に 1  $\mu$ l のサンプルを加えること以外は全て同じです。

## 2. RT-LAMP 法の準備

- ・ LAMP (RT-LAMP) 法は栄研化学株式会社の特許技術です。従って、本マニュアルでは、同社の RNA 増幅試薬キットを使用する手順を紹介します。
- ・ 同キットは E Genome Order (<http://genome.e-mp.jp>) で入手できます。
- ・ 同キットは冷凍 (-20℃) で保存してください。



Loopamp®RNA 増幅試薬キット LMP244 (48 テスト分 ¥35,000 ; 税別 2020 年 4 月現在)

### ◆ 2 × 反応液、酵素液

- ・ 上記増幅試薬キットに含まれているものを使用してください。

### ◆ プライマー混合液

- ・ 100 μM に調製した各プライマーを下表のように混合して、プライマー混合液を作製してください。
- ・ プライマー混合液は冷凍で保存してください。

表 II-2-1. PerMV 検出用 RT-LAMP プライマーの塩基配列と混合量

プライマー名	配列 (5' → 3')	
F3	TCCAGTTTGCCTTTTGTCA	2.5 μL
B3	AGAACGATTCCTGTGAC	2.5 μL
FIP-1	ACTGAAGTGATCTTCAGCTGG-ACTAAAAGCATAGTTGCCATAC	20 μL
BIP-1	AGGTTTTGAACTCCTAGATTGCTT-AAATAAGAGACTCGGTGTCA	20 μL
FIP-2	ACTGAAGTGATCTTCAGCTGG-ACTAGAAGCATGGTTGCC	20 μL
BIP-2	GAAAGTTTTTGGACTCCTAGATTAC-GAATAAAAGGCTTGGTGTCA	20 μL
FLoop	CCACTAGGAACTGGAATGGGTG	10 μL
BLoop	TTCTTCCACAAGACAGTTGCA	10 μL
滅菌水		95 μL

計 200 μL  
(50 サンプル分)



## ◆ マラカイトグリーン溶液（以下、MG 溶液）

- ・シソサビダニの検出 : LAMP 法編（13 ページ） を参照してください。

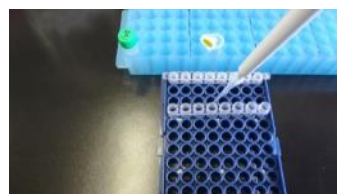
## ◆ RT-LAMP 反応液

- ・RNA 増幅試薬キットの仕様書に従い、以下のように混合してください。
- ・MG 溶液を省略する場合は、代わりに滅菌水を加えてください。
- ・RT-LAMP 反応液は直前に調製してください。

・ 2×反応液（キット付属）	12.5 $\mu$ l
・ 酵素液（キット付属）	1.0 $\mu$ l
・ プライマー混合液	4.0 $\mu$ l
・ MG 溶液	1.0 $\mu$ l（終濃度 0.008%）
・ 滅菌水（キット付属）	6.5 $\mu$ l
計	25.0 $\mu$ l（1 サンプル分）

### 3. RT-LAMP 反応

1. 恒温器を 63℃ に設定する <sup>\*1)</sup>。
2. 「RT-LAMP 法の準備」の項で調製した RT-LAMP 反応液を、8 連 PCR チューブに 1 サンプルにつき 25  $\mu$ l ずつ分注する。



3. 滅菌つまようじ、または注射針等を、罹病葉のモザイク症状の部位に 10 回～20 回突き刺す <sup>\*2) \*3)</sup>。



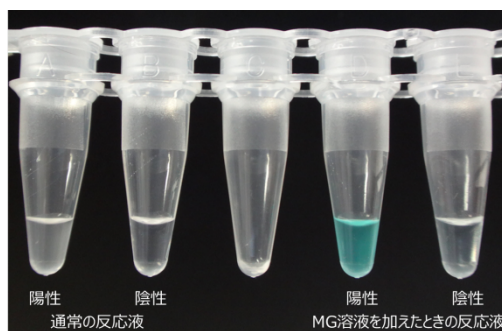


4. 汁液の付着した先端を、分注した LAMP 反応液に一瞬だけ浸け、しっかりとふたをする\*4)。



5. 恒温器にチューブをセットし、1時間保温する\*5)。

6. 1時間後にチューブを取り出し、反応液の色を観察する。MG 溶液を添加した場合、RNA 増幅があれば反応液の色は空色である。RNA 増幅がなければ無色である\*6)\*7)。



\*1) 恒温器がなければ、魔法瓶等の保温容器でも代用可能です。その場合はあらかじめ 70℃ くらいのお湯を張って、保温容器を暖めておいてください。

\*2) 注射針を用いる場合は、キャップ付きが便利です。番号を記入しておけばサンプルの入れ間違いを防げるとし、キャップをして冷蔵庫で保管し、後で LAMP 検定することもできます。

\*3) 滅菌つまようじまたは注射針を用いる方法は、微量な汁液中のウイルスを検出するため、検出誤差が生じやすいです。従って、できるだけ反復を取ってください。

\*4) このとき、あらかじめ陽性コントロールと陰性コントロール（水）を別に用意してください。

\*5) 恒温器の代わりに魔法瓶を使用する場合は、約 65℃ の湯にチューブを浮かべて約 1 時間保温してください。PerMV 検出の最適反応温度は 63℃ ですが、60℃ から 65℃ であれば十分に反応します。

\*6) コンタミネーションの原因となるため、このとき絶対にチューブのふたを開けないでください。

\*7) 反応液に MG 溶液を加えない場合は、反応液が白濁しているかどうかで陽性が陰性を判定してください。

#### 4. RT-LAMP 法の注意点など

- ・シソサビダニの検出 : LAMP 法編、4. LAMP 法の注意点など (15 ページ) を参照してください。

### Ⅲ. 参考となる情報源

#### シソサビダニ・シソモザイクウイルスの生態

久保田健嗣 (2017) フシダニ類で媒介されるエマラウイルスと作物への被害. ウイルス, 67:37-48.

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsv/67/1/67\\_37/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsv/67/1/67_37/_article/-char/ja/)

久保田健嗣, 多々良明夫 (2018) 青しその生産地におけるシソモザイクウイルスと媒介虫シソサビダニの発生態. 植物ウイルス病研究会レポート, 13:39-49.

堀川英則, 伊藤涼太郎, 大橋博子, 恒川健太, 市川耕治, 三宅律幸 (2018) アオジソ (オオバ) におけるシソサビダニとシソモザイク病の発生活長. 関西病虫害研究会報, 60:23-29.

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/kapps/60/0/60\\_23/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/kapps/60/0/60_23/_article/-char/ja/)

武井円, 中平知芳, 岡田知之, 鍵和田聡, 上遠野富士夫 (2019) シソサビダニ *Shevtchenkella* sp. の生態特性. 日本ダニ学会誌, 28:1-16.

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/acari/28/1/28\\_1/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/acari/28/1/28_1/_article/-char/ja/)

Kubota K, Usugi T, Tomitaka Y, Shimomoto Y, Takeuchi S, Kadono F, Yanagisawa H, Chiaki Y, and Tsuda S (2020) *Perilla mosaic virus* is a highly divergent emaravirus transmitted by *Shevtchenkella* sp. (Acari: Eriophyidae). *Phytopathology*, doi: 10.1094/PHYTO-01-20-0013-R.

#### 検出・診断技術

鈴木良地, 堀川英則, 恒川健太, 久保田健嗣 (2019) RT-LAMP 法によるシソモザイク病の診断. 関西病虫害研究会報, 61:31-35. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/kapps/61/0/61\\_31/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/kapps/61/0/61_31/_article/-char/ja/)

鈴木俊之, 上遠野富士夫, 鍵和田聡, 多々良明夫 (2018) シソサビダニの越冬生態と生殖休眠条件. 関東東山病害虫研究会報, 65:125-129.

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/ktps/2018/65/2018\\_125/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/ktps/2018/65/2018_125/_article/-char/ja/)

久保田健嗣, 千秋祐也 (2017) ウイルス診断法. 特開 2019-13169. (RT-PCR 法を用いたエマラウイルス全般の網羅的検出法.)

鈴木良地, 田中はるか, 鍵和田聡, 堀川英則, 恒川健太 (2019) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法によるシソサビダニの発生量の推定. 日本ダニ学会誌, 28:17-27.

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/acari/28/1/28\\_17/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/acari/28/1/28_17/_article/-char/ja/)

上遠野富士夫, 多々良明夫, 鍵和田聡, 鈴木良地, 千秋祐也, 久保田健嗣 (2019) オオバのシソサビダニとモザイク病 – オオバのシソサビダニおよびモザイク病の生態および検出技術 – . 植物防疫, 73:275-280.

## 防除体系・マニュアル

農研機構（2020）オオバのシソサビダニおよびシソモザイク病 防除マニュアル（全国共通版）第3版.

[https://www.naro.affrc.go.jp/publicity\\_report/publication/pamphlet/tech-pamph/080862.html](https://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/080862.html)

愛知県農業総合試験場（2018）愛知県版シソサビダニ・シソモザイク病防除マニュアル

<http://www.pref.aichi.jp/byogaichu/2018/shiryousisomanyuaru.pdf>

大分県農林水産研究指導センター（2018）オオバに発生するシソサビダニ及びモザイク病の防除マニュアル

の作成. [https://www.pref.oita.jp/uploaded/life/282789\\_2190797\\_misc.pdf](https://www.pref.oita.jp/uploaded/life/282789_2190797_misc.pdf)

高知県農業技術センター（2019）オオバのシソサビダニおよびシソモザイク病防除マニュアル（高知県版）

<http://www.nogyo.tosa.pref.kochi.lg.jp/info/dtl.php?ID=8219>

高知県農業技術センター（2015）オオバの主要病害虫総合防除マニュアル（技術者用）暫定版

<http://www.nogyo.tosa.pref.kochi.lg.jp/download/?t=LD&id=6769&fid=39427>

恒川健太, 堀川英則, 市川耕治, 武山桂子, 大橋博子, 伊藤涼太郎, 田中はるか, 坂紀邦（2019）愛知県におけるシソモザイク病の発生実態の解明と防除体系の現地実証. 関西病虫害研究会報. 61:91-98.

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/kapps/61/0/61\\_91/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/kapps/61/0/61_91/_article/-char/ja/)

下八川裕司, 森田泰彰, 恒川健太（2019）オオバのシソサビダニとモザイク病 –総合防除体系の開発と産地への普及の取り組み–. 植物防疫, 73:281-284.

## Ⅳ. 担当者・免責事項・お問合せ先

### 担当者

#### 農研機構中央農業研究センター

久保田健嗣、宇杉富雄、千秋祐也、富高保弘、柳澤広宣、津田新哉

#### 高知県農業技術センター

広瀬拓也、森田泰彰、下元満喜、島本文子、岡田知之、下元祥史、沖友香、中平知芳、下八川裕司、清遠亜沙子

#### 愛知県農業総合試験場

市川耕治、鈴木良地、田中はるか、天野淳二、松本祐保、恒川健太、武山桂子、堀川英則、伊藤涼太郎、大橋博子

#### 大分県農林水産研究指導センター

後藤英世、若月洋、山崎修一、姫野和洋、田中啓二郎、松本翔太

#### 学校法人法政大学

上遠野富士夫、多々良明夫、鍵和田聡

#### 高知県中央東農業振興センター

久家工人、横山克郎、山本正志、谷岡賀子

### 免責事項

本マニュアルの情報の掲載には注意を払っておりますが、本マニュアルを利用することにより生じたあらゆる損害等について、理由の如何に関わらず、農研機構および上記の機関は一切責任を負いません。

本マニュアルに掲載されている情報へのご指摘、ご意見等がございましたら、下記連絡先までお知らせくださいますようお願いいたします。

### 本マニュアルに関するお問合せ先

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

中央農業研究センター

〒305-8666 茨城県つくば市観音台 2-1-18

[https://prd.form.naro.go.jp/form/pub/naro01/carc\\_press](https://prd.form.naro.go.jp/form/pub/naro01/carc_press)

電子メール：koho-carc@ml.affrc.go.jp

# オオバのシソサビダニおよびシソモザイクウイルス 検出マニュアル

## 第3版



発行日	平成30年4月1日
改訂第2版	令和元年6月1日
改訂第3版	令和2年6月1日
編集・発行	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 中央農業研究センター 〒305-8666 茨城県つくば市観音台2-1-18 電話 029-838-8481