

課題分類：

研究課題：いちごのウイルスフリー苗生産のためのウイルス検査法  
(いちごのウイルスフリー苗生産のためのウイルス検査法の開発)

担当部署 中央農試 基盤研究部 遺伝子工学科  
北海三共株式会社

協力分担：なし

予算区分：道費(重点領域)

研究期間：2005～2007年度(平成17～19年)

---

## 1. 目的

栄養繁殖性であるいちごは、ウイルスに感染すると、生産性と品質が著しく低下するためウイルスフリー苗による栽培が不可欠であるが、その検査は経費、作業時間、検査者の技術といった多くの問題を抱えている。本試験では、現地で多く発生しているイチゴマイルドイエローエッジウイルス(SMYEV)のELISA法(酵素結合抗体法)と母株のウイルス高感度検査法として主要なウイルスであるSMYEV、イチゴモットルウイルス(SMoV)、イチゴベインバンディングウイルス(SVBV)のRT-LAMP法(遺伝子診断法)を確立し、いちごのウイルスフリー苗の安定生産に寄与する。

## 2. 方法

### 1) ELISA法による検出

(1) SMYEVの遺伝子配列情報から外被タンパク質(CP)領域をPCR法により増幅し大腸菌発現ベクターに導入し大腸菌内で大量発現させ、マルトース結合タンパク質に融合したSMYEV-CP抗原を作成した。

(2) 抗原をウサギに免疫し、得られた抗血清からELISA法による検出を試みた。

### 2) LAMP法による検出

(1) SMYEV、SMoV、SVBVについてウイルス遺伝子のcDNAから遺伝子配列を解析した。

(2) (1)の結果を基にプライマーを設計し、cDNAの検出を行ってプライマーを選抜した。選抜したプライマーを用いて、罹病葉からの検出を試みた。

## 3. 成果の概要

1) いちごの現地サンプルから高い頻度で検出されているSMYEVについて大腸菌発現系でSMYEV-CPを発現させることができた。

2) SMYEV-CPを免疫して、特異的なSMYEV抗体を作製した。DAS-ELISA法により検出したところ、SMYEV罹病葉の生体重の $10^2 \sim 10^3$ 倍希釈まで検出が可能であった(表1)。

3) 病害虫診断試験で持ち込まれたサンプルについてELISA法により検出したところ、76サンプル中29点からSMYEVが検出された(表2)。

4) いちごの主要なウイルスであるSMoV、SMYEV、SVBVの北海道分離株について遺伝子配列を明らかにし、プライマーを設計して特異性の高いプライマーを選抜したところいちご罹病葉の粗抽出液からLAMP法によりSMYEVは罹病葉の生体重の $10^4$ 倍希釈、SMoVは $10^3$ 倍希釈、SVBVは $10^6$ 倍希釈まで高感度に検出することが可能であった。(表3)。

5) 以上の結果、SMYEVのELISA法は多検体検定が可能で高価な機器を必要としないため、苗の検査や病害虫診断、生産現場での検査に利用が可能である。またSMYEV、SMoV、SVBVのLAMP法はPCR法に代わりウイルスフリー苗の母株のウイルスフリー検査に利用が可能である。LAMP法およびELISA法と既存の検査法との比較と利用場面を表4と5に示した。

希釈倍率	吸光値 (ABS)					
	HS138 罹病葉 (大滝株)	判定	HS138 健全葉	野生種 <sup>2)</sup> 罹病葉 (市宝株)	判定	野生種 健全葉
10	0.839 <sup>1)</sup>	+	0.033	2.211	+	0.027
10 <sup>2</sup>	0.177	+	0.005	0.829	+	0.006
10 <sup>3</sup>	0.022	-	0.002	0.078	+	-0.002
10 <sup>4</sup>	-0.003	-	0.004	0.005	-	-0.005
10 <sup>5</sup>	-0.004	-	-0.004	0.006	-	0.001

1) 実測値 - bufferの吸光値(0.171) 2) *Fragaria vesca* UC-1

年度	市町村名	陽性/検定
19	A町	1/1
	B町	0/1
	C町	0/1
20	B町	28/73

表3 LAMP法によるSMYEVの希釈による検出限界

サンプル	濁度	判定
10 <sup>2</sup> 倍 <sup>1)</sup>	0.243 <sup>2)</sup>	+
10 <sup>3</sup> 倍	0.239	+
10 <sup>4</sup> 倍	0.167	+
10 <sup>5</sup> 倍	0.002	-
10 <sup>6</sup> 倍	-0.003	-
10 <sup>7</sup> 倍	-0.002	-
陽性 cont <sup>3)</sup>	0.242	+
緩衝液	-0.001	-

1) 表1 野生種と同じ罹病葉を半分ずつ使用

2) リアルタイム濁度計で80分後の測定値

3) SMYEVcDNAプラスミド

表4 いちごのウイルス検査法の比較

	標準法	現行法	新検査法	
	小葉接ぎ法	PCR法 <sup>1)</sup>	LAMP法 <sup>2)</sup>	ELISA法
検出精度	普通	非常に高い	非常に高い	高い
経験・設備	特に必要	必要	必要	不要
作業性	-	難	簡易	簡易
検査期間	1ヶ月以上	3日間	2時間~	2日間
検体数 <sup>3)</sup>	20点	10点	32点	200点
コスト <sup>4)</sup>	-	1300円	900円	50円

1) 前処理・RT反応を含む 2) RT反応を含む

3) 1サイクルの同時処理検体数 4) 1点当たり

表5 検査法の利用場面

対象世代	使用者	現行法	新検査法	ウイルス	検査対象	
親苗	親株 種苗生産団体	PCR法	LAMP法	SMYEV	ウイルスフリー	
		小葉接ぎ法		SMoV	全株検査	
生産フリー苗		(随時)	ELISA法	SMYEV	抽出検査	
現地	養成畑	いちご生産団体	-	ELISA法	SMYEV	抽出検査
	(リレー苗)		リレー苗生産団体			
	実取畑	農試・普及センター	-	ELISA法	SMYEV	病害虫診断

#### 4. 成果の活用面と留意点

1) ELISA法およびLAMP法はウイルスフリー苗生産において、ウイルス検査法として利用する。

2) 本試験で作成したSMYEVのELISA抗体は道立中央農業試験場における抗体提供規定に基づき、配布可能である。

#### 5. 残された問題とその対応