

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 ²⁾ 罹病葉 (市宝株) | 判定 | 野生種 健全葉 |
| 10 | 0.839 ¹⁾ | + | 0.033 | 2.211 | + | 0.027 |
| 10 ² | 0.177 | + | 0.005 | 0.829 | + | 0.006 |
| 10 ³ | 0.022 | - | 0.002 | 0.078 | + | -0.002 |
| 10 ⁴ | -0.003 | - | 0.004 | 0.005 | - | -0.005 |
| 10 ⁵ | -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 ² 倍 ¹⁾ | 0.243 ²⁾ | + |
| 10 ³ 倍 | 0.239 | + |
| 10 ⁴ 倍 | 0.167 | + |
| 10 ⁵ 倍 | 0.002 | - |
| 10 ⁶ 倍 | -0.003 | - |
| 10 ⁷ 倍 | -0.002 | - |
| 陽性 cont ³⁾ | 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 ¹⁾ | LAMP法 ²⁾ | 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 ³⁾ | 20点 | 10点 | 32点 | 200点 |
| コスト ⁴⁾ | - | 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 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 | ウイルスフリー苗 | (随時) | ELISA法 | SMYEV | 抽出検査 | |
| 現 地 | 養成畑 (リレー苗) | いちご生産団体 | - | ELISA法 | SMYEV | 抽出検査 |
| | 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