

参考資料 16

分類名〔病害虫〕

Micro tissue direct 法を用いたキク矮化ウイルス（CSVd）の迅速同定

宮城県農業・園芸総合研究所

1 取り上げた理由

キク矮化ウイルス（CSVd）は、キクに深刻な生長阻害・矮化をもたらす病原体である。CSVdの感染は、親株からの持ち越しやハサミ等による傷害接触を通して群落に伝染すると考えられている。そのため、CSVdの蔓延を防ぐには、感染した個体の早期発見・除去が重要である。これまで、CSVdの同定は、RT-PCR法により行ってきたが感染個体の早期同定にあたり、ステンレス製針を用いたMicro tissue direct法（Hosokawa et al., 2006）が迅速かつ有効であったため参考資料とする。

2 参考資料

- 1) Micro tissue direct法の解析手順は、①葉1枚当たりステンレス製針で中肋を含む5か所程度刺す、②汁液が付着した針を反応液に浸漬、③反応液をリアルタイムPCR装置にて解析を行い、CSVdの感染有無の判定を行う3つのステップである（図1）。
- 2) 解析にかかる時間はサンプル数により増減するが、約1時間半である（図1）。
- 3) 矮化症状等の発病が認められたキクについて本法でCSVdの同定が可能である（図2）。

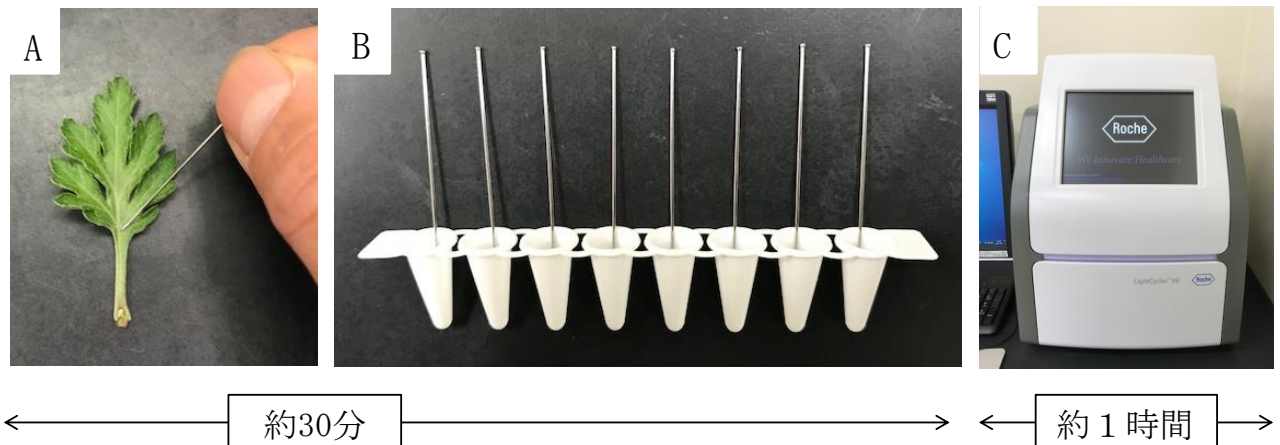


図1 Micro tissue direct法の解析手順と所要時間

A: ステンレス製針にてサンプル葉1枚当たり中肋を含む5か所程度刺す、B: 汁液がついた針を反応液に浸漬、C: 専用の機器にてqRT-PCR解析を行い、CSVdの感染有無を判定する。

3 利活用の留意点

- 1) 従来のRT-PCR法の場合は、RNA抽出と電気泳動の手順（従来のキット（RNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN））を用いた場合は1検体当たり定価820円（税別）の費用およびRNA抽出は約2時間、電気泳動による確認は約1時間を要する）を省略できるため、コストと時間を大幅に短縮することが可能である。
- 2) CSVdの感染は同一個体においても部位により濃度差があることが考えられるため、解析に用いる葉は1個体あたり上位葉から下位葉まで異なる部位で3枚程度サンプリングすることが望ましい。
- 3) 本解析では、ステンレス製針は有頭志賀昆虫針3号を、リアルタイムPCR解析はLight Cycler 96（Roche）を用いた。

4) 本技術は植物組織を破壊せず解析が可能であることから、本技術で陰性となった場合は同一のサンプルを用いてRNA抽出を行う従来法での解析が可能である。

(問い合わせ先：宮城県農業・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

国産花きの国際競争力強化のための技術開発 (実需ニーズの高い新系統及び低コスト栽培技術の開発) (平成 27 年度～)

2) 参考データ

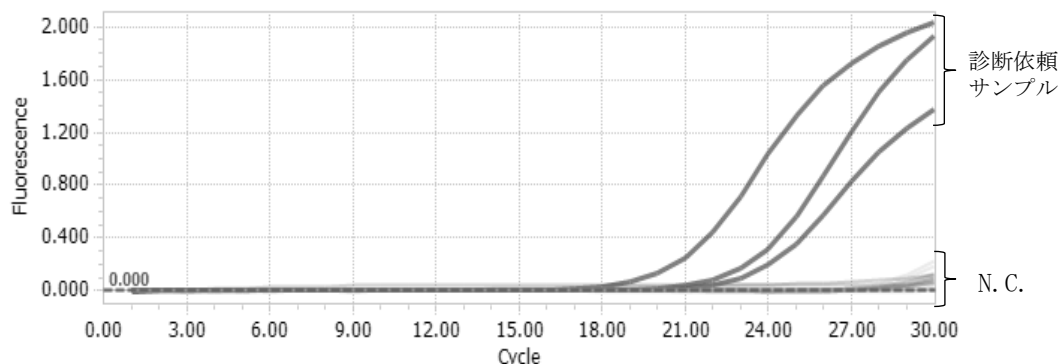


図2 Micro tissue direct法による診断依頼サンプルの検出結果

検出の際に調整した反応液は、One Step TB Green PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (TaKaRa) を用いてプライマーはYanagisawa et al. (2017) によって報告のあるCS-F1×CS-R1のプライマーセット200nMとした。反応条件は、42°C30分、95°C10秒、(95°C15秒、60°C35秒)×35回とし、反応後融解度解析を行った。診断依頼サンプルは2016年度から2017年度に行った結果を示す。N.C. : Negative Control (滅菌水)

3) 発表論文等

a 関連する普及に移す技術

- a) 「キクに感染する5種ウイルス・ウイルスの遺伝子診断法」 (第84号参考資料)
- b) 「キクのウイルス・ウイルス検出状況(2007～2011年)」 (第87号参考資料)
- c) 「キクに感染するウイルスの残存性」 (第88号参考資料)
- d) 「リアルタイムPCR法を用いたアブラナ科野菜根こぶ病菌の簡便・高感度検出」 (第90号参考資料)
- e) 「リアルタイムPCR法を活用したイチゴ炭疽病菌潜在感染株の迅速検出」 (第91号参考資料)

b その他

なし

4) 共同研究機関

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜花き研究部門、奈良県農業研究開発センター、群馬県農業技術センター