

ピーマンに感染するトマト環紋ウイルスの遺伝子診断法			
[要約] ピーマンに感染するトマト環紋ウイルス (TZSV) は、植物内在性遺伝子 <i>nad5</i> を内部標準とする二重 RT-PCR 法により、RNA 抽出や PCR 反応の失敗による偽陰性を防ぎ、高い特異性で迅速・確実に診断できる。			
茨城県農業総合センター園芸研究所	令和7年度	成果区分	技術情報

1. 背景・ねらい

茨城県は全国有数のピーマン産地であるが、近年、アザミウマ類が媒介するオルソトスウイルス属ウイルスによる被害が深刻化しており、新たに同属のトマト環紋ウイルス (TZSV) の発生も確認された。しかし、TZSV による病徴は他のオルソトスウイルス属ウイルスと類似しており、目視での識別は困難である。適切な防除対策のためにはウイルス種の特定が不可欠であることから、TZSV を迅速かつ確実に検出できる遺伝子診断法を確立する。

2. 成果の内容・特徴

- 1) TZSV に感染したピーマンは、葉に同心円状の輪紋やえそ、茎のえそ等の症状を示す (図 1)。罹病株では葉が著しく脆弱化し、軽く触れただけで容易に落葉する。
- 2) 本遺伝子診断法には、二重 RT-PCR (1 反応で 2 種類の遺伝子を同時に増幅する手法) を用いる。
- 3) 二重 RT-PCR で用いるプライマーは表 1 のとおりで、各プライマーを 2 μ M になるよう混合した 10 \times プライマーカクテルを調製して使用する。TZSV 特異的プライマーの標的は *N* 遺伝子領域で、内部標準プライマーの標的は植物内在性遺伝子 *nad5* 領域である。
- 4) 本診断法により、TZSV 感染葉の RNA からは 443 bp の TZSV 特異的増幅産物が検出されるが、健全株からは検出されない。また、206 bp の内部標準増幅産物により、RNA 抽出及び RT-PCR 反応の成否を確認できる (図 2)。
- 5) 他のオルソトスウイルス属ウイルス (TSWV、INSV、CSNV、CaCV、WSMoV) 及びピーマンの既存検定対象ウイルス (CMV、TRV、PVY、PMMoV) との交差反応は認められない (図 2)。

3. 成果の活用面・留意点

- 1) 遺伝子増幅装置 (サーマルサイクラー) を有する機関で診断することができる。
- 2) RT-PCR には、植物から抽出・精製した RNA を鋳型として用いる。
- 3) 反応緩衝液及び逆転写酵素・DNA ポリメラーゼには PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver. 2 を使用することが推奨される。
- 4) 異なる試薬・酵素類を使用する場合、反応条件等を個別に検討する必要がある。
- 5) 本診断法は他のウイルスとの重複感染を同時に診断できないため、既存の 8 種ウイルス同時検定法 (平成 25 年度主要成果) と併用することが望ましい。
- 6) 検定試料は、輪紋やえそ等の病徴が明瞭に見られる葉を用いる。同じ葉内でもウイルスの蓄積量には局在性があるため、無病徴の部位では検出できない場合がある。

4. 具体的データ

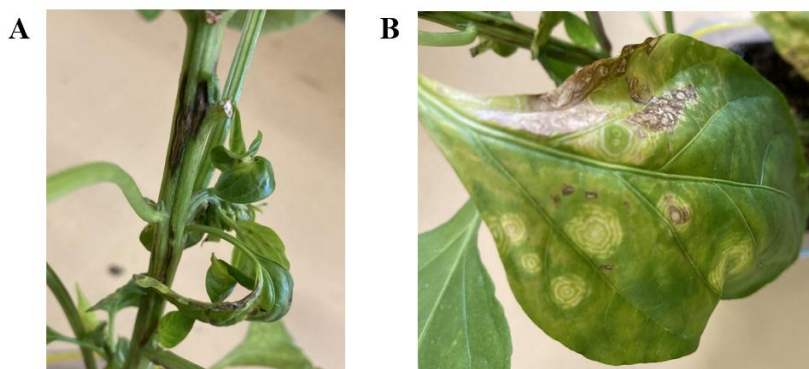


図1 TZSVに感染したピーマンの病徴
(A: 茎及び葉のえそ症状、B: 葉の同心円状輪紋)
※罹病株では葉が著しく脆弱化し、容易に落葉する。

表1 本遺伝子診断法に用いるプライマー

対象	5' プライマー	3' プライマー	増幅長
TZSV	TGAATGCAGTCTCCATCTGC	ACTTATCAGCATGGCCGAAC	443 bp
nad5 ¹⁾	AGATCCTTCCTGCGTTTCG	TCCCACATACGAGAAAAGGTC	206 bp

※反応条件: 50℃ 30分、95℃ 3分、(95℃ 30秒-58℃ 30秒-72℃ 30秒) × 35サイクル

1) 岡田ら (2016)

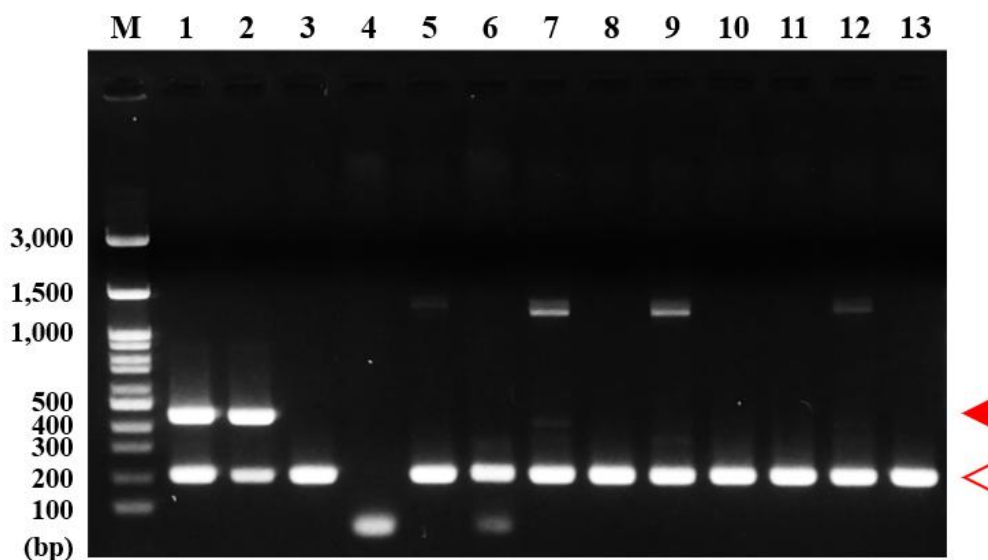


図2 本遺伝子診断法による特異性検証

※M: 100 bp ラダーマーカー、レーン1: TZSV 茨城株、2: TZSV 神奈川株、3: 健全ピーマン、4: 蒸留水、5: INSV、6: CMV、7: TRV、8: PVY、9: TSWV、10: PMMoV、11: CSNV、12: CaCV、13: WSMoV。▲はTZSV特異的増幅産物(443 bp)、△は内部標準nad5増幅産物(206 bp)を示す。

5. 試験課題名・試験期間・担当研究室

ピーマンに感染するオルソトスポウイルス種の早期診断技術および媒介昆虫アザミウマ類の防除対策技術の開発・令和7年度～令和10年度・病虫研究室