ウリ科作物に発生する 3 種ポティウイルスのマルチプレックス RT-PCR による 同時検出

下元 祥史^{1*}・竹内 繁治¹

ABSTRACT

SHIMOMOTO, Y.^{1*} and TAKEUCHI, S.¹ (2006). Simultaneous detection of three *Potyvirus* species from Cucurbitaceae crops by multiplex RT-PCR. Jpn. J. Phytopathol. 72: 146–149.

A multiplex RT-PCR procedure was developed for the simultaneous detection of *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) and *Papaya ringspot virus* (PRSV) from Cucurbitaceae crops. Using oligo dT primer, cDNA was synthesized from virus RNA and amplified with a mixture of three primer sets specific to WMV, ZYMV and PRSV. Three potyviruses were accurately detected from cucumber plants singly, doubly or triply infected with these viruses as well as mixtures of virus RNA. With this method, three potyviruses could be detected from various kinds of naturally infected Cucurbitaceae crops more accurately than with indirect ELISA and more easily than with uniplex RT-PCR.

(Received January 12, 2006; Accepted March 2, 2006)

Key words: *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Papaya ringspot virus* (PRSV), Multiplex RT-PCR

ポティウイルス属に属するカボチャモザイクウイルス (*Watermelon mosaic virus*, WMV), ブッキーニ黄斑モザイクウイルス (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV), パパイア輪点ウイルス (*Papaya ringspot virus*, PRSV) はキュウリ, メロン, カボチャ等のウリ科作物に感染し, 収量の低下や果実の奇形, 果肉の劣化などを招くほか, 接木キュウリでは萎凋症の原因となるなど, 甚大な被害を及ぼしている (Anderson, 1954; 小室, 1956; 長井ほか, 1974; Lisa *et al.*, 1981; 大津ほか, 1985; 佐古ほか, 1985; 相原ほか, 1995; 森山ほか, 1995; 岩崎ほか, 1996; 土井ほか, 2001).

ウイルスによる病害の圃場診断には, 短時間で結果を得ることができる間接 ELISA (Suzuki *et al.*, 1990) が実用的であるが, WMV, ZYMV および PRSV は血清学的に近縁であるため, 抗血清とウイルスのヘテロな組み合わせでも陽性に反応することがあり, 正確な診断が困難な場合があった. 近年, RT-PCR が利用されるようになり (Langeveld *et al.*, 1991), 特異性が高くかつ高感度なウイルス検出が可能となった. しかし, 通常の RT-PCR では多検体について複数のウイルスを同時に検出するには多大な労力が必要であった. この点を改善するため, マルチプレックス RT-PCR (Bariana *et al.*, 1994) が考案され, 様々なウイルスの

検出に利用されている (Nie and Singh, 2000; Bertolini *et al.*, 2001; Kuroda *et al.*, 2002; Meunier *et al.*, 2003). そこでマルチプレックス RT-PCR をウリ科作物に発生する WMV, ZYMV および PRSV の 3 種ポティウイルスの検出に適用し, 検出系を確立したので報告する.

DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録されている WMV5 分離株 (accession nos. AB001994, AY464948, AY995215, D00535, L22907), ZYMV5 分離株 (accession nos. AB063251, AJ420012, AJ459956, AY074809, M35095) および PRSV5 分離株 (accession nos. AY010722, AY027810, D50591, S89893, U14744) の外被タンパク質遺伝子領域の塩基配列データから, それぞれの種内で保存性の高い領域を検索し, WMV, ZYMV および PRSV に特異的でかつ増幅サイズが異なるように 3 対のプライマーセット (MW-F と MW-R, MZ-F と MZ-R および MP-F と MP-R) を設計した (Table 1).

植物体からの RNA 抽出は TRIzol REAGENT (インビトロジェン) を用いて行い, RT-PCR は TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 と TaKaRa PCR Thermal Cycler MP を用いて行った. 逆転写反応は最終濃度が MgCl₂ 5 mM, RNase inhibitor 5 U, AMV Reverse Transcriptase XL 1.25 U, Oligo dT-Adaptor Primer 0.125 μM, dNTP Mixture 各 1

¹ 高知県農業技術センター (〒783-0023 高知県南国市廿枝1100) Kochi Agricultural Research Center, Nankoku, Kochi 783-0023, Japan
* Corresponding author (E-mail: Yoshifumi_shimomoto@ken2.pref.kochi.jp)

Table 1. Primer sets used for multiplex amplification of WMV, ZYMV and PRSV

Primer sequence	Target virus	Expected size
MW-F 5'-CCGCAAACTCACAACTGG-3'	WMV	612 bp
MW-R 5'-CCTGCTGTTAATTCCC GCG-3'		
MZ-F 5'-TCTCATCAGCAATTCGCCTC-3'	ZYMV	393 bp
MZ-R 5'-AGAAACATTGCTAAGGGCTG-3'		
MP-F 5'-AAAAGTGGTATGAGGGAGTG-3'	PRSV	205 bp
MP-R 5'-CGATGTATGCTTCTGCCG-3'		

mM, 1×RT buffer となるように調製した反応液 4.5 µl に 鋳型 RNA 0.5 µl を加え, 30°C10分, 50°C30分, 95°C 2分, 5°C 5分処理とした. PCR は最終濃度が 1×PCR buffer および TaKaRa Ex Taq HS 0.25 U となるように調製した反応液に, ユニプレックス PCR の場合には 1 対のプライマーセットを, マルチプレックス PCR の場合には 3 対のプライマーセットすべてを, 各プライマーの最終濃度が 0.2 µM となるように加えて総量 8 µl とした. この PCR 反応液と逆転写反応終了後の反応液 2 µl を混合し, 94°C 2分の後, 94°C30秒, 58°C30秒, 72°C40秒を30サイクル繰り返し, 最後に 72°C 5分の反応を行った. PCR 産物 5 µl を 1.5% アガロースゲルで電気泳動後, エチジウムブロマイド染色によって増幅された DNA を検出した.

高知県内のメロンより単離した WMV-WH, ZYMV-ZN および農林水産省四国農業試験場 (現近畿中国四国農業研究センター) から分譲された PRSV-Ch5 (岩崎ほか, 1996) の単独感染キュウリ葉から全 RNA を抽出後, ユニプレックス RT-PCR を行って各プライマーの特異性を調べたところ, 目的のウイルス RNA を鋳型に用いた場合のみ DNA の増幅を示す単一のバンドが認められ, 非特異反応は認められなかった (Fig. 1). 続いて各 RNA 抽出液を単独あるいは 2, 3 種組み合わせて等量混合し, これを鋳型にマル

Fig. 1 Detection of three *Potyvirus* species in total RNAs purified from cucumber plants infected with WMV (lanes 1~3), ZYMV (lanes 4~6), PRSV (lanes 7~9) and virus-free cucumber plant (lanes 10~12) by uniplex RT-PCR. Primer sets, MW-F and MW-R for WMV (lanes 1, 4, 7, 10); MZ-F and MZ-R for ZYMV (lanes 2, 5, 8, 11); MP-F and MP-R for PRSV (lanes 3, 6, 9, 12). Lane M, 100-bp DNA ladder.

チプレックス RT-PCR を実施したところ, いずれのサンプルからも期待される増幅サイズと数のバンドが確認された (データ省略).

次にキュウリ (*Cucumis sativus*, 品種: シャープ 1) に WMV-WH, ZYMV-ZN および PRSV-Ch5 を単独または重複接種し, マルチプレックス RT-PCR によって感染葉からウイルスを検出した. 各ウイルスとも感染キュウリ葉粗汁液を接種源とし, 子葉展開期のキュウリの子葉にカーボランダム法で汁液接種したが, WMV との重複接種の場合は, 他のウイルスの干渉作用による増殖抑制を避けるため, あらかじめ WMV-WH を子葉 1 枚に接種し, その 1 週間後に ZYMV-ZN, PRSV-Ch5 をもう一方の子葉に接種した. ZYMV-ZN と PRSV-Ch5 の接種10日後にモザイク症状を呈する葉から全 RNA を抽出後, 前述の方法でマルチプレックス RT-PCR を行ったところ, すべての組み合わせで接種に用いたウイルスを正確に検出できた (Fig. 2).

本法の実用性を検証するため, 高知県内の現地圃場でモザイク症状を呈したキュウリ, メロン (*Cucumis melo*), カボチャ (*Cucurbita* spp.) およびユウガオ (*Lagenaria siceraria* var. *hispida*) を採集し, マルチプレックス RT-PCR とユニプレックス RT-PCR を実施するとともに, WMV 抗血清 (青森県グリーンバイオセンター作製), ZYMV 抗血清 (日本植物防疫協会作製) および PRSV-W 抗血清 (四国農業試験場作製) を用いた間接 ELISA (Suzuki *et al.*, 1990) を行い, 結果を比較した. その結果, マルチプレックス RT-PCR とユニプレックス RT-PCR の結果は完全に一致し, 供試した 4 種 8 株の植物のうち 5 株で WMV の単独感染, 1 株ずつで ZYMV または PRSV の単独感染, 他の 1 株で WMV と ZYMV の重複感染を示すバンドが認められた (Fig. 3). 一方, 間接 ELISA においては, マルチプレックス RT-PCR とユニプレックス RT-PCR で WMV あるいは PRSV の単独感染が示された試料 (Fig. 3, No. 1, 2, 3, 5, 7) が, それぞれの抗血清だけでなく

Fig. 2 Detection of three *Potyvirus* species in total RNAs purified from cucumber plants inoculated with WMV, ZYMV and PRSV by multiplex RT-PCR. Lane 1, WMV; lane 2, ZYMV; lane 3, PRSV; lane 4, WMV+ZYMV; lane 5, ZYMV+PRSV; lane 6, PRSV+WMV; lane 7, WMV+ZYMV+PRSV; lane 8, virus-free cucumber plant; lane M, 100-bp DNA ladder.

Fig. 3. Detection of three *Potyvirus* species in Cucurbitaceae crops collected from fields in Kochi Prefecture by multiplex RT-PCR (A), uniplex RT-PCR (B, WMV; C, ZYMV; D, PRSV) or non-precoated indirect ELISA (E). Lanes 1~4, cucumbers plants; lanes 5~6, melon plants; lane 7, squash plant; lane 8, moonflower plant; lane 9, virus-free cucumber plant; lane M, 100-bp DNA ladder.

ZYMV 抗血清とも反応した。そこで、用いた ZYMV 抗血清と 3 種ポティウイルスとの反応を WMV-WH, ZYMV-ZN および PRSV-Ch5 単独感染キュウリ葉を材料として間接 ELISA で調べたところ、405 nm における吸光度は ZYMV の場合が 1.625 であったのに対して、WMV と PRSV の場合はそれぞれ 0.470 と 0.162 であり、本抗血清が WMV や PRSV と反応して、ある程度の発色が認められることが確認された。このことから、上記の試料で認められたマルチプレックス RT-PCR と間接 ELISA との結果の違いは、間接 ELISA における抗血清の非特異反応に起因することが強く示唆され、マルチプレックス RT-PCR によって、間接 ELISA では明確に区別できない単独感染と重複感染の違いを正確に識別できることが確認された。また、間接 ELISA では発色が弱いために陽性と陰性の判別が難しい試料についても、マルチプレックス RT-PCR では明確に検

出できた (Fig. 3, No. 8)。

以上の結果から、本法はウリ科作物に発生するポティウイルスの検出手段として間接 ELISA より特異性が高く、感染ウイルスを正確に識別できることがわかった。また、ユニプレックス RT-PCR と比較して少量の試薬類やチューブで 3 種類のウイルスを同時に検出することが可能で、操作時間も短縮できることから、ウリ科作物からの WMV, ZYMV および PRSV の 3 種ポティウイルスの迅速かつ正確な検出に非常に有効であると考えられた。

引用文献

- 相原弘和・酒井淳一・加藤公彦・花田 薫 (1995). 静岡県のメロンから分離されたパパイヤ輪点ウイルス (PRSV) — RNA の外被タンパク質遺伝子の塩基配列. 日植病報 61: 285 (講要).
- Anderson, C. W. (1954). Two watermelon mosaic virus strains from central Florida. *Phytopathology* 44: 198–202.
- Bariana, H. S., Shannon, A. L., Chu, P. W. G. and Waterhouse, P. M. (1994). Detection of five seedborne legume viruses in one sensitive multiplex polymerase chain reaction test. *Phytopathology* 84: 1201–1205.
- Bertolini, E., Olmos, A., Martinez, M. C., Gorris, M. T. and Cambra, M. (2001). Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. *J. Virol. Meth.* 96: 33–41.
- 土井 誠・萩原恭二・大村敏博・大沢高志・本田要一郎 (2001). 静岡県のメロンモザイク病株から分離されたズッキーニ黄斑モザイクウイルス (ZYMV) の同定. 関東病虫研報 48: 53–56.
- 岩崎真人・山本孝稀・稲葉忠興 (1996). ウイルスによるカボチャ台接ぎ木キュウリの萎凋症に関する研究. 四国農試報 60: 1–88.
- 小室康雄 (1956). 日本におけるカボチャ・モザイク病に関する研究 I. 病徴, 寄主範囲及び伝染方法. 日植病報 21: 162–166.
- Kuroda, T., Urushibara, S., Takeda, I., Nakatani, F. and Suzuki, K. (2002). Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction for simultaneous detection of viruses in gentian. *J. Gen. Plant Pathol.* 68: 169–172.
- Langeveld, S. A., Dore, J. M., Memelink, J., Derks, A. F. L. M., van der Vlugt, C. I. M., Asjes, C. J. and Bol, J. F. (1991). Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. *J. Gen. Virol.* 72: 1531–1541.
- Lisa, V., Boccardo, G., D'Agostino, G., Dellavalle, G. and d'Aquilio, M. (1981). Characterization of a Potyvirus that causes zucchini yellow mosaic. *Phytopathology* 71: 667–672.
- Meunier, A., ois Schmit, J. F., Stas, A., Kutluk, N. and Bragard, C. (2003). Multiplex reverse transcription-PCR for simultaneous detection of beet necrotic yellow vein virus, Beet soilborne virus, and Beet virus Q and their vector *Polymyxa betae* KESKIN on sugar beet. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2356–2360.

- 森山美穂・大貫正俊・清田洋次・花田 薫 (1995). 九州農試圃場のメロンから分離されたカボチャモザイクウイルスとキュウリモザイクウイルス. 九病虫研会報 41: 15-17.
- 長井雄治・土岐知久・深津量栄 (1974). キュウリ緑斑モザイク・ウイルス—スイカ系によるスイカのモザイク病および果肉劣変に関する研究. 千葉農試研報 15: 1-53.
- Nie, X. and Singh, R. P. (2000). Detection of multiple potato viruses using an oligo (dT) as a common cDNA primer in multiplex RT-PCR. J. Virol. Meth. 86: 179-185.
- 大津善弘・佐古宣道・Somowiyarjo, S. (1985). 宮古・八重山群島のカボチャから分離した Zucchini Yellow Mosaic Virus. 日植病報 51: 234-237.
- 佐古宣道・吉田博昭・川越 仁 (1985). 宮崎県で分離されたカボチャモザイクウイルスの 1 系統. 日植病報 51: 64 (講要).
- Suzuki, N., Shirako, Y. and Ehara, Y. (1990). A simple method of elimination of non-specific reactions in non-precoated indirect and electroblot enzyme-linked immunosorbent assay procedures used for detection of zucchini yellow mosaic virus. Ann. Phytopath. Soc. Japan 56: 337-341.