

植物に病気を引き起こすウイルスの正体を探る

生物資源科学部 生物生産科学科
2年 伊藤 愛
指導教員 生物資源学部 生物生産科学科
助教 今 辰哉
教授 藤 晋一

【目的】

身近な場所で栽培または販売されている植物の中から、ウイルス感染が疑われる植物を採取または購入し、病気の診断を行う。診断結果からウイルス種を特定し、ウイルスの感染経路を突き詰めて、蔓延防止策を考察する。

【試験方法】

1) ウイルス感染株の維持

収集したスイカズラを維持するために挿し木をした。主枝から伸びている側枝を切り、硬い部位だけが残るように更に切って植えた。挿し木した 4 本中 2 本はウイルス症状がなく健全と思われた。もう 2 本はウイルス病特有の葉脈黄化症状を引き起こしていた。

2) DNA抽出

挿し木した苗の健全な葉、ウイルス症状を示した葉それぞれ約 100 mg 収集した。それら植物からDNeasy Plant Mini Kitを用いてDNAを抽出した。サンプルをTissueRuptor、TissueLyser II、motar、pestlrを用いて破碎した。そこに バッファー AR1 400 μ l、RNase A 4 μ l を加えた。10分間65°Cでインキュベートした。バッファー P3 130 μ l を加え、氷上で5分間冷やした。溶解液を遠心分離し、チューブにはめているカルムに移し、遠心分離した。チューブの底に溜まった溶液を新しいチューブに移し、1.5 volumes of Buffer AW1 を加えた。その混ぜた溶液から650 μ l 採取し、チューブにはめているカルムに移した。遠心分離し、チューブの底に溜まった溶液は捨てた。カルムを新しいチューブに移し、バッファー AW2 500 μ l 加え、遠心分離し、チューブに残った溶液を捨てた。バッファー AW2 500 μ l を再び加え、遠心分離した。そのカルムを新しいチューブに移し、バッファー AE 100 μ l で溶解し、5分間室温で放置し、遠心分離した。この操作をもう一度行った。

3) ウイルス遺伝子の増幅

健全または感染した植物から抽出したDNAを 0.5 μ l 加えた。95°C で3分間DNAを変性した。5 μ l のreaction buffer と 0.2 μ l のenzyme mixを加え、30°Cで18時間反応させた。10分間65°Cで酵素を失活させた。11/1はチューブにH₂O 10 μ l、2×PCR buffer for KOD 25 μ l、2 mM dNTP 10 μ l を移した。10 μ M プライマーセット①(UPV1、UPC2) 1.5 μ lまたは10 μ M プライマーセット②(1470v、PAR1c496)を加えた。1.5 μ l、KOD 1 μ l、健全または感染した植物のDNA 1 μ lも加えた。プライマーセット①を加えていた溶液のPCRは以下のようにした。

プライマーセット①

94 °C 2 min(1サイクル) 98 °C 10 sec, 60 °C 30 sec, 68 °C 1.5 min (30サイクル)

プライマーセット②

94 °C 2 min(1サイクル) 98 °C 10 sec, 55 °C 30 sec, 68 °C 50 sec(30サイクル)

3) ウイルス遺伝子の確認

PCR産物はアガロース電気泳動を行い、ウイルス感染の有無を確認した。

4) ウイルス遺伝子の解析

増幅が確認できた遺伝子の塩基配列を解析した。PCR産物 3.0 μ l、PCRに使用した10 μ M primer 0.5 μ l、H₂O 2.5 μ lをチューブに入れ、バイオテクノロジーセンターに解析を委託した。得られた配列をBLAST解析し、感染ウイルスの同定を行った。

【結果】

1) ウイルス遺伝子の検出

PCRを行った結果、いずれのプライマーセットでもウイルス症状を示した植物についてはウイルス遺伝子が増幅された(図)

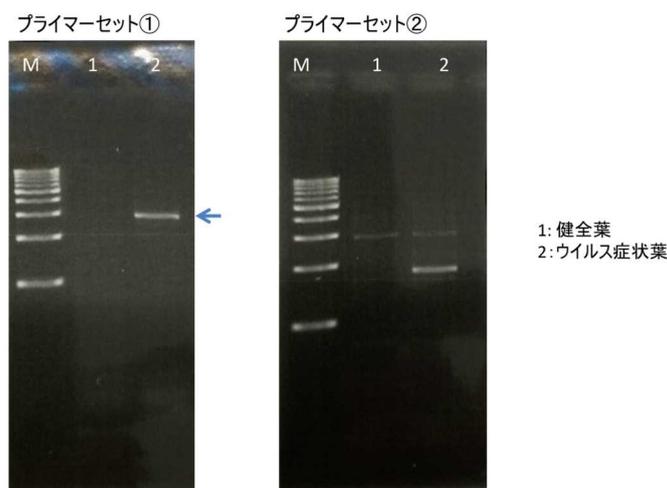


図 PCRにより増幅された遺伝子の電気泳動像

2) 感染ウイルスの同定

PCR産物の塩基配列を決定した結果、スイカズラ葉脈黄化ウイルス(honeysuckle yellow vein virus)に感染していることが明らかとなった。

【まとめ】

スイカズラに感染するウイルスは、スイカズラ葉脈黄化ウイルス(Honeysuckle yellow vein virus)、スイカズラ葉脈黄化モザイクウイルス(Honeysuckle yellow vein mosaic virus)、スイカズラ葉脈黄化鹿児島ウイルス(Honeysuckle yellow vein kagoshima virus)、タバコ巻葉日本ウイルス(Tobacco leaf curl Japan virus)、キュウリモザイクウイルス(Cucumber mosaic virus)である。スイカズラ葉脈黄化ウイルス(Honeysuckle yellow vein virus)、スイカズラ葉脈黄化モザイクウイルス(Honeysuckle yellow vein mosaic virus)、スイカズラ葉脈黄化鹿児島ウイルス(Honeysuckle yellow vein kagoshima virus)の3種類のウイルスは一部の塩基配列以外は、性状がかなり似ている。これらのウイルス粒子は師部細胞の核内に広がっていたり、集まってかたまりになっていたりする。単一環状ssDNAゲノムで外被タンパク質を保持する。スイカズラ科、ナス科植物に感染する。スイカズラでは葉脈黄化、トマトでは巻葉、黄色、縮葉、タバコでは巻葉といった症状が発生する。液汁接種は不可能で、タバココナジラミによって永続伝搬する。

【引用・参考文献】

「植物ウイルス大事典」 日比忠明, 大木理監修 2015. 11