

植物ウイルス及び線虫検査キットの研究開発

谷田 昌穂 [株式会社ラボ／R&D シニアアドバイザー]

杉山 俊平 [株式会社ラボ／研究員]

鈴木 佳奈 [株式会社ラボ／研究員]

志村 華子 [北海道大学農学研究院／助教]

植原 健人 [独立行政法人農研機構北海道農業研究センター／主任研究員]

朝倉 浩三 [清里町農業協同組合農部農畜産課／農畜産課課長]

野 成晴 [清里町農業協同組合農部農畜産課／主査]

背景・目的

作物のウイルス病や病害線虫は減収や品質低下をもたらし、北海道の主要作物で問題になっている。また、植物ウイルスは同一個体に複数のウイルスが重複感染することが多い。作物に一旦ウイルスや線虫が感染してしまうと、それら病原体に有効かつ安全な農薬は無いことから、汚染個体を早期発見して除去するのが最も有効な対策である。本課題では、線虫または複数のウイルスを同時に正確・簡便・迅速・安価に検出できるマクロアレイを利用したキットの開発を目標とした。

内容・方法

1) マクロアレイによるウイルス検出の簡便化とコスト低減

これまでに開発したウイルス検出技法は、植物組織からのRNA抽出からマクロアレイによる検出までに2.5日を要した。そこで、RT-PCRを利用した新しい標識プローブの調製方法を検討することにより、操作の簡便化とコストの低減を図る。

2) 植物ウイルス検出キットの開発(ジャガイモ・ナガイモ・ユリ・ニンニク)

ジャガイモ、ナガイモ、ユリ、ニンニクの各作物について国内で問題となっているウイルスを特異的に検出するためのウイルスcDNAを設計合成し、実用的なマクロアレイを開発する。

3) 線虫検出キットの開発

道内で問題となっている、キタネグサレセンチュウ、キタネコブセンチュウについて遺伝子解析を行いマクロアレイ等を用いて各線虫を特異的に検出する方法の開発を行う。

4) 生産現場における実証試験

開発した病原体検出法を用いて、清里町の一般圃場から採集したナガイモについてウイルス診断を行い、実際の使用現場に適した方法の改良を行う。

結果・成果

1) マクロアレイによるウイルス検出の簡便化とコスト低減

これまでに開発したウイルス検出技法は、植物組織からのRNA抽出からマクロアレイによる検出までに2.5日を要した。そこで、RT-PCRを利用した新しい標識プローブの調製方法を検討した。One Step PCRにより2時間程度で標識プローブ調製ができ、そのままハイブリに持ち込むことも可能となった。また、ハイブリダイゼーション後の洗浄、検出時間の短縮検討を行い、洗浄・検出までの時間を今までより1.5時間短縮できる手順を確立した。これらの改良により、検出時間は、1.5日、コストは約5,000円から1,500～2,000円まで抑えることができた。

2) 植物ウイルス検出キットの開発(ジャガイモ・ナガイモ・ユリ・ニンニク)

ナガイモ・ユリにおいてウイルスを特異的に検出するためのウイルスcDNAを設計合成し各作物ごとにマクロアレイを作製した。マイクロチューブハイブリダイゼーション法(MTH法)を用いて、One Step PCRにより標識プローブ調製を行い、ウイルス検出ができることが確認した。また、現場での利便性向上のために、核酸抽出、標識プローブ調製、ハイブリダイゼーションに用いる各試薬やマクロアレイを一式にしたキット化製品を開発した。

ニンニクについては、RT-PCR法およびTissue print法で、鱗片・葉鞘・根の部位によらずリークイエローストライプウイルス(LYSV)、タマネギ萎縮ウイルス(OYDV)、アレキシウイルスの3種類のウイルスを検出することを可能にした。各種産地のニンニクの解析から、北海道産のニンニクからはLYSVが多く検出され、OYDVとの混合感染で病徵が激しくなることが判明した。

3) 線虫検出キットの開発

ニンニクに害を与えるイモグサレセンチュウの遺伝子をプラスミドに組み込み精製を行い、シーケンス解析後、遺伝子情報を解析した。

4) 生産現場における実証試験

開発した検出法を用いることによって、一般圃場から採集した外見上判定が困難なナガイモの葉について、サンプリングの翌日午前中には判定結果を農家に知らせることが可能になった。また、葉の他に、不定芽、ムカゴからでもウイルス検出できることを明らかにした。さらに、エライザ法との結果の比較から、本法の感度がより優れていることが示された。