

ブドウに感染する 4 種ウイルスを適切に検出するための試料採取の 時期及び部位並びに核酸抽出法の調査

高橋 智之¹⁾・前川 晃演

神戸植物防疫所業務部

Appropriate Sampling Seasons, Locations and Nucleic Acid Extraction Methods for the Effective Detection of Four Grapevine Viruses Tomoyuki Takahashi¹⁾ and Akinobu Maekawa Kobe Plant Protection Station, 703 Befu, Ikawadani-cho, Nishi-ku, Kobe 651-2115 Japan ¹⁾Kansai Airport Sub-station, Kobe Plant Protection Station

Abstract: Suitable sampling points of grapevines and the best season for detection of the four subject viruses (GPGV, GVD, GAMaV and GRBV), which have recently become important factors for the post-entry quarantine of grapevines in Japan, were investigated. Leaf samples were collected from the upper, middle and lower parts of virus-infected grapevines grown in a greenhouse from May to October. Samples from branches were collected from February to April. The concentrations of viruses were determined by relative quantification using real-time RT-PCR. GPGV, GVD and GAMaV had the highest viral values in dormant branches, but the values lowered depending on the season and site. Suitable vine petiole positions and the best season for detection were for all petiole positions in May for GPGV, middle and lower petioles in October for GVD, lower petioles in August for GAMaV, and lower petioles from May to August for GRBV. Furthermore, appropriate total nucleic acid (TNA) extraction methods from grapevines were compared between the CTAB and the PVP-potassium SDS methods. TNA extracted by the CTAB method contained fewer reaction inhibitors, suggesting that this method is the most suitable. Utilization of these results is expected to further improvement for the accuracy and efficiency of grapevine virus testing.

Key Words: viral concentration, grapevine, virus, nucleic acid extraction, post-entry quarantine

緒 言

ブドウは栽培されている作物の中でも多様なウイルスに感染することが知られており（Xiao *et al.*, 2018）、海外から輸入されるブドウ苗木を介して本邦未発生ウイルス等の国内への侵入が危惧されている。中でも grapevine Pinot gris virus (GPGV) は発育阻害を、grapevine virus D (GVD) は幹にしわや溝を引き起こすルゴースウッド症状を、grapevine asteroid mosaic-associated virus (GAMaV) は葉にフレック症状を、grapevine red blotch virus (GRBV) は葉に赤斑を引き起こし、ブドウの収量や品質に影響を及ぼすと考えられており（Martelli, 2014, Osman *et al.*, 2008, Yepes *et al.*, 2018）、検疫上重要なウイルスである。

我が国では、海外から輸入されるブドウなどの果樹類に対して隔離栽培検査を実施し、農業生産に影響を及ぼす可能性のある病原体の侵入を水際で防いでいる。果樹類の隔離栽培検

査は、栽培期間を通じてガラス温室内で実施されるため、春期及び秋期の室温は屋外より比較的高温に、夏期は空調管理下で栽培されることから外気と比較して低い温度となり、年間を通じて室温の変化は屋外より小さくなる。また、栽培スペースが限られることから、苗木は通常一本立てで管理され、屋外での栽培条件とは異なった環境で栽培されている。さらに、検査に使用されるため、葉の枚数は経時的に減少する。GPGV、GVD、GAMaV、GRBV は、比較的近年遺伝子診断による検出方法により報告されたウイルスであり（Abou-Ghanem *et al.*, 1997, Giampetruzzi *et al.*, 2012, Krenz *et al.*, 2012, Sabanadzovic *et al.*, 2000）、隔離栽培条件下でのウイルスの濃度変化や植物体内でのウイルスの分布については知見がない。そこで本調査では、検査精度のさらなる向上を目的として、上記 4 種ウイルスの隔離栽培条件下における季節及び部位別のウイルス濃度の変化を、リアルタイム RT-PCR（以下、「RT-qPCR」という。）ま

¹⁾ 神戸植物防疫所関西空港支所

たはリアルタイム PCR（以下、「qPCR」という。）の相対定量により測定することで、適切なサンプリング時期や部位を明らかにした。

さらに、植物にはポリフェノールや多糖類などの成分が多く含まれており、これらの残存により逆転写や PCR 反応が阻害されることが報告されている（Demeke and Adams, 1992）。偽陰性を防ぐためには、植物種やその部位に応じて適切な核酸抽出法を選定することが重要である。そこで本調査では、ブドウの葉柄及び休眠枝からの核酸抽出における PVP- カリウム SDS 法及び CTAB 法の比較を行うことで、ブドウの隔離栽培検査における適切な核酸抽出法についても検討した。

材料及び方法

1. 供試株及び試料採取方法

農林水産大臣の許可（農林水産省指令 2 神植第 964 号）を得て導入した 4 種ウイルス（GPGV、GVD、GAMaV 及び GRBV）を供試材料とした。GRBV は ssDNA ウイルス、その他ウイルスは ssRNA ウイルスである。これらウイルス株は感染ブドウ穂木形態としてカリフォルニア大学デービス校より分譲された。穂木の一部を採取し、既報の RT-PCR 法（Abou-Ghanem *et al.*, 1997, Al Rwahnih *et al.*, 2013, Morelli *et al.*, 2014, Xiao and Meng 2016）を用いてウイルス感染を確認し（データ非表示）、同 RT-PCR 法でウイルスが感染していないことを確認した健全ブドウ苗に穂木を接ぎ木した。なお、GRBV 感染穂木は接ぎ木では活着しなかったため、穂木を挿し木により栽培した。

2. ウイルスの相対定量

2-1. 植物管理及び試料採取

GPGV、GVD、GAMaV 及び GRBV を相対定量の対象ウイルスとした。ウイルス感染ブドウ苗各 3 株を、隔離検査と同等の条件となるようガラス温室内で栽培し、6～9 月の期間中は空調設備下で管理した。ガラス温室内の温度データを Fig. 1 に示した。

2022 年 3 月に 2～3 芽を残して休眠枝を切り戻し、切除した休眠枝の切断面付近から試料を採取した。なお、GRBV は挿し木で栽培したため、前年の生育が悪く、当年枝が非常に細かったことから、休眠枝の試料採取は行わなかった。萌芽後はブドウの隔離栽培検査と同様の方法で 1 芽のみを残して芽かきを行い、一本立てとして管理した。同年 5 月に主幹の展開葉の 15 葉目から上部を切り戻し、以後側枝を適宜剪定した。主幹の展開葉を基部から 1 葉と数え、1～4 葉を下位葉、6～9 葉を中位葉、11～14 葉を上位葉と定め、5 月、8 月、10 月にそれぞれの位置から 1 葉ずつ採取し（Fig. 2）、葉柄を試料とした。

落葉後の翌年 2 月、休眠枝を切断し、葉柄の上・中・下位葉に相当する部位からそれぞれ節間及び節部をそれぞれ採取した。残った休眠枝は冷蔵で 6 週間保存後、室温でさらに 4 週間静置した後（同年 4 月）、同様に上・中・下位部から節間及び節部を採取した。

採取した試料は 50mg を 2.0ml 容マイクロチューブに 0.6mm

ステンレスビーズ 2 個とともに入れ、核酸抽出まで -80℃ で保管した。

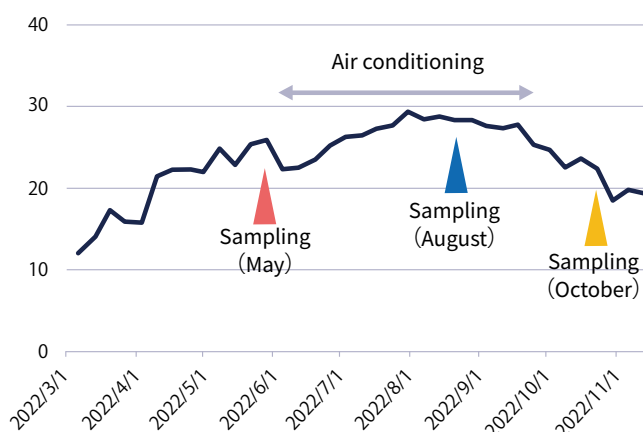


Fig.1 Room temperatures in the greenhouse recorded weekly.

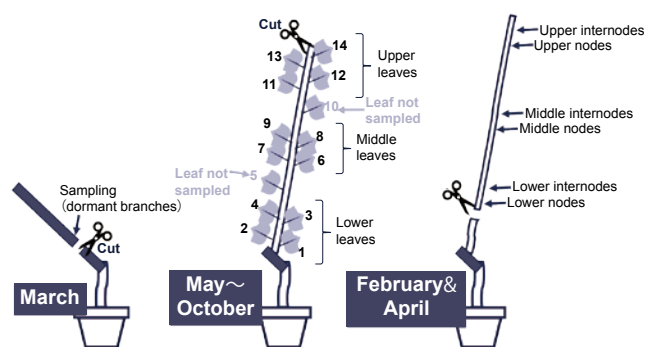


Fig.2 Cultivation and sampling methods.

2-2. 核酸抽出

高橋ら（2022）の CTAB 法を、クロロホルム処理を 3 回に改変して全核酸（TNA）を抽出し、滅菌蒸留水 50μl で溶解した。NanoDrop ONE（Thermo Fisher Scientific Inc.）により吸光度を測定し、核酸濃度を求めた。予備試験により、（RT-）qPCR 阻害が起こらないことを確認した濃度である 2ng/μl まで TNA を滅菌蒸留水で希釈し、定量試験に使用した。

2-3. 定量用プライマーの設計

GPGV、GVD 及び GAMaV の定量用プライマーを設計するのに適した Polypeptide、Coat protein 領域の部分塩基配列をダイレクトシークエンスにより決定し、GenBank 上の塩基配列情報をもとに、GPGV については Primer Express Software（Thermo Fisher Scientific Inc.）を、GAMaV 及び GVD についてはアメリカ国立生物工学情報センター（NCBI）の Primer-BLAST（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome）を用いてプライマーを設計した（Table 1）。GRBV については既報のプライマー（Setiono *et al.*, 2018）を選定した。なお、GVD はそのゲノムの性状上、ゲノム RNA だけでなくサブゲノム RNA を含む定量結果となる。

RNA 用の内在性コントロールとして、ブドウの様々な組織で発現量が安定している、グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒ

Table 1. Primers used for real-time (RT-) PCR in this study.

Target	Primer name	Sequence of primers (5'-3')	Gene	Eff (%) ^a	R ²	References
GPGV	GPGV4F23	CCTTCTTCTACAGGACCCCAACA	Polyprotein	96.0	0.993	This study
	GPGV89R23	CCTCTGTGATGGCGCATATATTC	Polyprotein			This study
GVD	GVD182F	GCAGGCATGCGAACCATT	CP ^b	98.0	0.999	This study
	GVD247R	AGCCCCATCTCAGCCATCTT	CP			This study
GAMaV	GAMaVPro75F	ACTCGGTACCAGGGTGAATTG	Polyprotein	99.8	0.985	This study
	GAMaVPro75R	GAAGAAGGGTGTCCGGGTTC	Polyprotein			This study
GRBV	GRBV3v	ACATCTCTGGGYTTTGTGATATT	C1 & C3	95.8	0.999	Setiono <i>et al.</i> , 2018
	GRBV4v	CTACACGCCTTGCTCATCTT	C1 & C3			Setiono <i>et al.</i> , 2018
Plant DNA	NADP+7i	GGTGTGGTGTCTCCATAGTT	NADP+ ^c	90.0	0.992	Setiono <i>et al.</i> , 2018
	NADP+8i	CCTAGTTGCCTTGAGGTCTTT	NADP+			Setiono <i>et al.</i> , 2018
Plant mRNA	GAPDH84F	TGAAGGACTGGAGAGGTGGA	GAPDH ^d	102.0	0.994	This study
	GAPDH84R	ACACTTGGCCAACAGC/CTTG ^e	GAPDH			This study

a. PCR efficiency

b. coat protein

c. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

d. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

e. “/” indicates the position of the exon junction.

ドロゲナーゼ (GAPDH) をコードする遺伝子をサンプル間の補正に用いた (Reid *et al.*, 2006)。リバープライマーが当該遺伝子のエキソジャンクションを挟むよう、Primer-BLASTを用いて本遺伝子のメッセンジャー RNA (mRNA) に特異的なプライマーの設計を行った。逆転写酵素の添加の有無により、mRNA のみを特異的に増幅することを確認した。DNA 用の植物内在性コントロールには既報のプライマー (Setiono *et al.*, 2018) を選定した。

各プライマーセットの検量線を作成し、PCR 効率及び決定係数 (R²) を求めた。検量線は、各ウイルス感染株の葉柄の TNA を 2 倍に段階希釈し、1 反応あたりの鋳型核酸量が 2² ~ 2³ ng となる 6 点で作成した。PCR 効率及び R² は StepOne Software (Thermo Fisher Scientific Inc.) により算出した。

2-4. (RT-) qPCR

RNA ウイルスである GPGV、GVD 及び GAMaV の定量には Power SYBRTM Green RNA-to-CT 1-Step Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) を、DNA ウイルスである GRBV の定量には Power SYBRTM Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いた。キット付属のマニュアルに従って反応液を調整し、プライマーセットの終濃度は、GRBV3v/4v 及び NADP+7i/8i は 0.2 μM とし、他は 0.15 μM とした。1 反応あたり 10 μl の反応系とし、TNA は 1 反応あたり 2 μl 加えた。StepOne-Plus realtimePCR System (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて RT-qPCR 及び qPCR を行った。温度条件は、RNA ウイルスについてはキット付属のマニュアルに、DNA ウイルスについては Setiono *et al.*, (2018) に従った。解離曲線解析により非特異的な核酸増幅の有無を確認した。レプリケート数は 2 とし、Ct 値に 0.5 以上の差が認められた場合には再試験を行った (Nolan *et al.*, 2006、北條, 2008)。

定量は相対定量法の一つである ΔΔCt 法 (比較 Ct 法) を用いた (Livak and Schmittgen, 2001)。最初に、各供試サンプルについて、(RT-) qPCR で得られた各ウイルスプライマーによる Ct 値及び内部標準プライマーによる Ct 値の差 (ΔCt) をそれぞれの供試サンプルごとに計算し、各ウイルスで最大の ΔCt (内

部標準に対するウイルス濃度が最も低いサンプル) を基準とした。次に、各サンプルの ΔCt から基準 ΔCt を引くことにより得られた値 (ΔΔCt) から、ウイルス RNA または DNA の倍率差を以下の式により計算した: 2^{-ΔΔCt}。この値は、基準とするサンプルのウイルス量に対する各サンプルのウイルス量を示す。なお、ここで記すサンプルとは、植物から個別に抽出された、ウイルス核酸を含む TNA を指す。これらの解析は、StepOne Software の Study 機能により、複数のプレートのデータを集約してウイルスの相対濃度を解析した。

3. 核酸抽出法の比較

3-1. 試料採取及び核酸抽出

GPGV に感染していないブドウ 4 株を供試材料とし、葉柄及び休眠枝の節間から 1mm 程度の断片を複数切り出し、2 本の 2.0ml 容マイクロチューブに各 50mg を分注し、0.6mm ステンレスビーズ 2 個を加え、核酸抽出まで -80℃ で保管した。これらを高橋ら (2022) の CTAB 法を改変した手法 (2-2 で述べた核酸抽出法のクロロホルム処理を 2 回のみとした手法) 及び PVP-カリウム SDS 法 (勝ら (2017) の抽出バッファーの 2-mercaptoethanol を 1% に改変) を用いてそれぞれ TNA を抽出し、滅菌蒸留水 50 μl で溶解した。NanoDrop ONE により吸光度を各サンプル 3 回ずつ測定し、その平均値を求めた。

3-2. RT-PCR を用いた比較

植物の mRNA である NADH dehydrogenase subunit 5 (Nad5) をターゲットとした RT-PCR (Menzel *et al.*, 2002) を用いて、CTAB 法及び PVP-カリウム SDS 法で得られた TNA が逆転写反応をどの程度阻害するかを定性的に比較した。各手法で抽出した TNA を以下の 2 つの方法で逆転写及び PCR に供試し、各核酸抽出法を定性的に比較した。

① TNA を原液のまま逆転写後、逆転写産物を滅菌水で 5 倍希釈して PCR

② TNA を滅菌水で 5 倍希釈してから逆転写後、逆転写産物は原液のまま PCR

逆転写反応は高橋ら (2022) の方法に従って行った。PCR

反応は TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version (タカラバイオ) を用いて付属のマニュアルに従って PCR 反応液を調整し、プライマーセットの終濃度は 0.2 μ M とした。反応条件は 94℃ 2 分の後、94℃ 30 秒、60℃ 30 秒、72℃ 30 秒で 30 サイクル行い、72℃ 7 分の後、4℃ で維持した。増幅産物を 2% アガロースゲルで電気泳動し、GelRed™ (Biotium Inc.) で染色し、UV 光で視覚化した。

3-3. RT-qPCR を用いた Spike テストによる比較

CTAB 法及び PVP- カリウム SDS 法で得られた TNA が PCR 反応をどの程度阻害するかを定量的に比較した。最初に、3-1 で得られた CTAB 法及び PVP- カリウム SDS 法で抽出された GPGV 陰性サンプル 4 株の TNA を、滅菌蒸留水により段階希釈し、5⁰ ~ 5² 倍希釈系列を作成した。次に、RT-qPCR 反応液に GPGV 感染株の TNA を添加し、各 PCR チューブに分注した。各 PCR チューブに、GPGV 陰性株の TNA 段階希釈系列をそれぞれ 1 反応当たり 1 μ l ずつ添加し、GPGV 定量用 RT-qPCR に供試した。さらに対照区として、TNA の代わりに滅菌水を添加した区を設けた。各試験区で得られた Ct 値を、対照区の Ct 値で引くことにより、各 TNA が Ct 値に与える影響を調査した。レプリケート数は 2 とした。

なお、GPGV 感染株の TNA は、2-2 で得られた GPGV 感染株の 5 月の下位葉から得たものを用い、添加量は 1 反応あたり 0.5ng とすることで、本 TNA が引き起こす PCR 阻害の影響を軽減させた。

結果及び考察

1. 4 種ウイルスの相対定量

1-1. 定量用プライマーの決定

各プライマーセットは、各ウイルス株の TNA の段階希釈液で測定した検量線により評価され、PCR 効率が 90 ~ 110 %、R² が 0.98 以上であることを確認した (Table 1)。また、RNA 用の内在性コントロールである GAPDH84F/84R については、qPCR では検出されず、RT-qPCR でのみ検出されたことから、ゲノム DNA は増幅せず、mRNA のみを特異的に増幅することが確認された。

1-2. 相対定量

4 種ウイルスのブドウ樹体内における濃度変化を (RT-) qPCR で相対定量し、各ウイルスにおける適切な試料採取の時期や部位を調査した。定量は比較 Ct 法を用い、試料を採取し

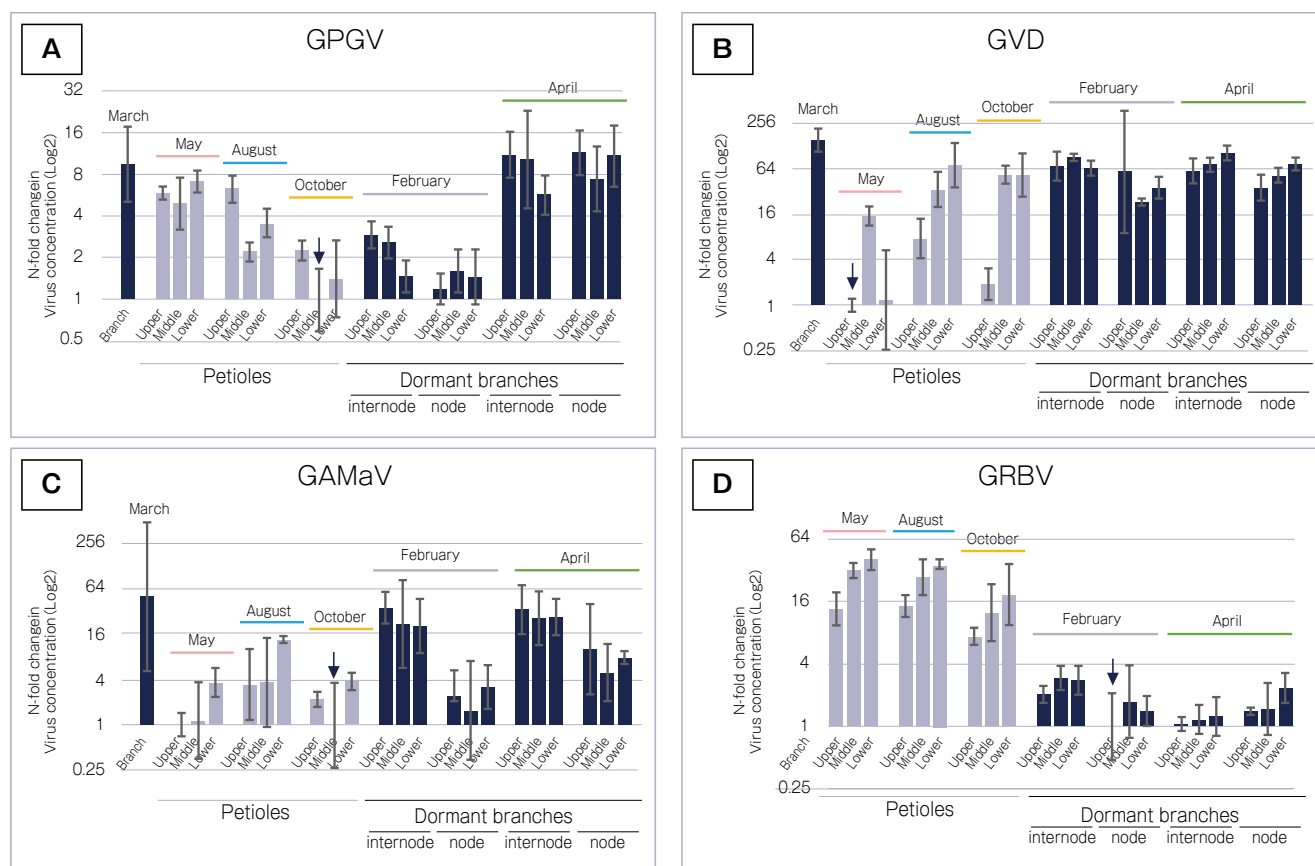


Fig.3 Relative distribution of four viruses in greenhouse-grown grapevines (A:GPGV, B: GVD, C: GAMaV, D: GRBV). The histogram shows the changes of virus concentrations in dormant branches and petioles between March 2022 and April 2023 except for the dormant branches with GBRV in March 2022. Vertical axes are set on logarithmic scales. The relative virus concentrations are calculated based on the site with the lowest virus concentrations of each virus, as indicated by arrows. Error bars indicate standard errors.

た全ての時期及び部位中で最もウイルス濃度が低かった部位を 1 とした場合の、休眠枝及び各葉柄での相対量を Fig. 3 に示した。エラーバーは標準誤差を示す。

GPGV は 3 月及び 4 月の休眠枝において最もウイルス濃度が高かった (Fig. 3-A)。2 月の休眠枝においては秋期の葉柄程度まで低かったが、4 月の休眠枝では大幅に増加した。葉柄においては 5 月に濃度が高く、8 月～10 月にかけて減少した。葉の位置による差は中位葉でやや減少傾向が見られ、上位葉においては 8 月でもウイルス濃度は 5 月と同程度であった。このことから、休眠枝の場合は 3 月から 4 月の発芽が近づいた時期、葉柄の場合は 5 月が最も採取時期として適していることが示唆された。

GVD は休眠枝において最も安定してウイルス濃度が高く、休眠枝の部位及び時期による差は小さかった (Fig. 3-B)。葉柄においては 5 月に濃度が低く、8 月～10 月にかけて上昇したが、上位葉においては 5 月～10 月にかけて一貫して低かった。このことから、休眠枝は 2 月から 4 月の期間を問わず、葉柄の場合は 10 月の中・下位葉が採取部位・時期として適していることが示唆された。

GAMaV の休眠枝におけるウイルス濃度は、節部では低かったが、節間では安定して高かった (Fig. 3-C)。葉柄では 8 月にウイルス濃度が高い傾向が見られたが、供試株や採取した葉柄の位置によってばらつきが見られた。このことから、休眠枝の節間が最も採取部位として適していると考えられた。また、葉柄を用いて検定する必要がある場合は、8 月の下位葉が採取部位として適していると考えられたが、サンプリングする葉柄の位置によってはウイルス濃度が低い可能性も考えられることから、春期と夏期に上、中、下位の葉柄を採取するなど、複数の時期に複数の部位から採取することで、検査精度を担保する必要があると考えられた。

GRBV は葉柄と比べて休眠枝でのウイルス濃度は非常に低い結果となった (Fig. 3-D)。なお、採取できなかった 3 月の休眠枝については調査対象から除外した。葉柄の部位においては、下位葉で最も高く、位置が上がるにつれてウイルス濃度は低下した。季節では、5 月～8 月にかけては横ばいであったが、10 月に若干低下した。このことから、5 月～8 月の葉柄が最も採取部位として適していることが示唆された。

2. 核酸抽出法の比較

ブドウの葉柄及び休眠枝における CTAB 法及び PVP-カリウム SDS 法の比較を行った。

2-1. 吸光度の比較

純度の高い TNA においては、260nm/280nm の吸光度比は 1.8～2.0、260nm/230nm は 1.8～2.2 になるとされる (Desjardins and Conklin, 2010)。CTAB 法においては、葉柄、休眠枝ともに各値の平均が 1.8 以上であった。一方 PVP-カリウム SDS 法は、葉柄、休眠枝ともに 260nm/280nm の平均値は約 1.7 であったものの、260nm/230nm の平均値は葉柄で約 0.9、休眠枝で約 1.0 と低い値を示した (Table 2)。

Table 2. Absorbance ratio of nucleic acids extracted from plant materials.

Site	Nucleic acid extraction method	TNA (ng/μl) ^a	A260/A280	A260/A230
Petioles	CTAB	141.1 ± 1.9 ^b	1.87 ± 0.01	1.70 ± 0.05
	PVP- Potassium SDS	114.4 ± 9.0	1.68 ± 0.06	0.88 ± 0.10
Branches	CTAB	260.6 ± 18.8	1.99 ± 0.01	2.11 ± 0.03
	PVP- Potassium SDS	212.4 ± 12.3	1.79 ± 0.02	0.99 ± 0.02

a. Total nucleic acid concentration

b. average ± standard error

2-2. RT-PCR による比較

① TNA を原液で逆転写に供試後、5 倍希釈してから PCR に供試、② TNA を 5 倍希釈してから逆転写に供試後、逆転写産物を原液のまま PCR に供試、の 2 試験区で調査を行った。反応阻害物質が残存していなければ、①と②の PCR の鋳型量は同程度となり、結果は一致するが、逆転写阻害物質が多く残存している場合、検出率は①のほうが下がると推測される。

CTAB 法においては、葉柄、休眠枝ともに①及び②のすべてのサンプルで Nad5 が検出された (Fig. 4)。一方、PVP-カリウム SDS 法の葉柄においては、①での検出率は 1/4 に留まり、②ではすべてのサンプルで Nad5 が検出されたものの、2 サンプルは増幅が弱かった。また、休眠枝においては①、②ともにすべてのサンプルで Nad5 が検出されたものの、CTAB 法と比較して①における増幅は弱かった。このことから、PVP-カリウム SDS 法によりブドウから抽出された TNA 中には、特に葉柄

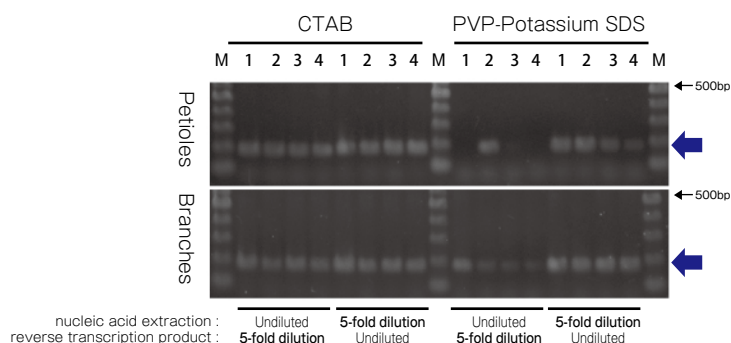


Fig.4 Comparison of nucleic acid extraction methods using the RT-PCR assay for plant mRNA detection. All bands were detected from TNA extracted by the CTAB method. In contrast, no bands were detected in 3 out of 5 samples of TNA extracted by the PVP-potassium SDS method if the extract was not diluted. Lane 1-4: healthy grapevine's TNA, M: 100bp ladder marker

において反応阻害物質が残存しており、逆転写反応が阻害されている可能性が示唆された。

2-3. RT-qPCR を用いた Spike テストによる比較

PCR 反応液に GPGV 陽性株の TNA を添加後、各手法で抽出した GPGV 陰性株の TNA を添加し、GPGV 定量用 RT-qPCR に供試した。各手法による TNA に RT-PCR 反応阻害物質が残存している場合、Ct 値は上昇（検出感度が低下）する。得られた Ct 値を、対照区である滅菌水添加区の Ct 値で引いた値（以下、「 Δ Ct 値」という。）が、0 に近いほど RT-PCR 阻害は低いと判断される。

CTAB 法における Δ Ct 値は、葉柄 TNA の原液区では約 1.9 であり、5 倍希釈区では約 0.6 まで低下した（Table 3）。25 倍希釈区では阻害は確認されなかった。休眠枝においては、原液区で約 2.6 とやや高かったものの、5 倍希釈区では約 1.1、25 倍希釈区では約 0.4 まで低下した。一方、PVP- カリウム SDS 法における Δ Ct 値は、葉柄の原液区では 4 サンプル中 3 サンプルで増幅は確認されなかった。5 倍希釈区ではすべてのサンプルで増幅が確認されたが、 Δ Ct 値は約 3.4 と高く、25 倍希釈区では約 1.0 だった。休眠枝の原液区では 4 サンプル中 2 サンプルで増幅は確認されなかった。5 倍希釈区では約 4.6、25 倍希釈区でも約 1.7 と高かった。このことから、PVP- カリウム SDS 法による TNA には CTAB 法による TNA よりも、阻害物質が多く残存していることが示唆され、2-2 の試験の結果を支持した。TNA の純度の比較、RT-PCR 及び RT-qPCR による比較試験の結果から、ブドウの核酸抽出においては PVP- カリウム SDS 法よりも CTAB 法が適していると考えられた。

また、PCR は指数関数的増幅が行われることから、2 つの試験区における RT-qPCR 阻害率の差は、各サンプルの Δ Ct 値の差（以下、「 $\Delta\Delta$ Ct 値」という。）で 2 を累乗した値、すなわち式 $2^{\Delta\Delta\text{Ct 値}}$ で予測計算できる。CTAB 法の無希釈区と 5 倍希釈区における RT-qPCR 阻害率の差は、葉柄で約 2.5 倍、休眠枝で約 3 倍となり、いずれも希釈倍率である 5 倍を下回った。このことから、CTAB 法で核酸を抽出する場合には、希釈せずに RT-qPCR に供試したほうが、ウイルスをより確実に検出できると考えられた。

Table 3. Increases in Ct values (GPGV) when adding healthy grapevine's TNA in each method.

Site	Nucleic acid extraction method	Δ Ct ^a (average $\pm$ standard error)		
		Undiluted	5-fold dilution	25-fold dilution
Petioles	CTAB	1.88 $\pm$ 0.18 ^b	0.55 $\pm$ 0.09	-0.03 $\pm$ 0.04
	PVP- Potassium SDS	not detected ^c	3.42 $\pm$ 0.60	0.99 $\pm$ 0.21
Branches	CTAB	2.63 $\pm$ 0.30	1.06 $\pm$ 0.10	0.41 $\pm$ 0.08
	PVP- Potassium SDS	not detected ^d	4.62 $\pm$ 0.51	1.71 $\pm$ 0.29

a. Δ Ct = "Ct value of test group with added TNA of healthy grapevine" - "Ct value of test group with added sterilized distilled water". The closer Δ Ct is to 0, the less RT-qPCR inhibition.

b. average $\pm$ standard error

c. Not detected in 3 out of 4 samples. The average Δ Ct value of a detected sample is 3.50.

d. Not detected in 2 out of 4 samples. Average Δ Ct value of 2 detected samples is 7.72.

摘 要

日本におけるブドウの隔離栽培検査において、近年、検査上重要となっている 4 種のウイルス (GPGV、GVD、GAMaV 及び GRBV) の検出に適した季節と採取部位を調査した。5 月から 10 月にかけて温室内で栽培したウイルス感染ブドウ樹の上・中・下部から葉柄試料を採取した。また、2 月から 4 月にかけても同様に休眠枝から試料を採取した。これらのウイルス濃度をリアルタイム RT-PCR を用いた相対定量により決定した。GPGV、GVD 及び GAMaV の濃度は、休眠枝において最も高かったが、時期及び部位によっては値が低かった。葉柄の場合は、GPGV は 5 月が、GVD は 10 月の中・下位葉が、GAMaV では 8 月下位葉が、GRBV は 5 月から 8 月の下位葉が最も検出に適していた。さらに、ブドウからの適切な全核酸 (TNA) 抽出法を CTAB 法と PVP- カリウム SDS 法で比較した。CTAB 法による TNA は反応阻害物質が少なく、ブドウの核酸抽出に適していることが示唆された。これらの成果の活用により、ブドウのウイルス検査におけるさらなる精度と効率の向上が期待される。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、貴重なウイルス株を分譲いただいたカリフォルニア大学デービス校の Maher Al Rwahnih 博士に厚く感謝申し上げる。

引用文献

- Abou-Ghanem, N., P. Saldarelli, A. Minafra, N. Buzkan, M.A. Castellano, G.P. Martelli (1997) Properties of grapevine virus D, a novel putative trichovirus. *J. Plant Pathol.* **79**(1): 15-25.
- Al Rwahnih, M., A. Dave, M.M. Anderson, A. Rowhani, J.K. Uyemoto, M.R. Sudarshana, (2013) Association of a DNA virus with grapevines affected by red blotch disease in California. *Phytopathology* **103**(10): 1069-1076.
- Demeke, T., R.P. Adams (1992) The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *Biotechniques*. **12**(3): 332-334.
- Desjardins, P., D. Conklin (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J. Visualized Exp.* **45**: 2565.
- Giampetruzzi, A., V. Roumi, R. Roberto, U. Malossini, N. Yoshikawa, P. La Notte, P. Saldarelli (2012). A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus-and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris. *Virus Res.* **163**(1): 262-268.
- 北條浩彦 (2008) 原理からよくわかるリアルタイム PCR 実験ガイド. 羊土社 東京 日本: 1-189
- 勝幸司・柳澤広宣・神谷昌希・城戸剛 (2017) 小果樹類に感染するウイルスの検出に適した試料採取の時期及び部位の調査. 植防研報 **53**: 69-74.
- Krenz, B., J.R. Thompson, M. Fuchs, K.L. Perry (2012). Complete genome sequence of a new circular DNA virus from grapevine. *J.*

- Viol.* **86**: 7715.
- Livak, K. J., T.D. Schmittgen (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. **25**(4): 402-408.
- Martelli, G.P. (2014). Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *J. Plant Pathol.* **96**(1 Suppl.): 1-136.
- Menzel, W., W. Jelkmann, E. Maiss (2002) Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *J. Virol. Methods*. **99**: 81-92.
- Morelli, M., A.D.M. Catarino, L. Susca, P. Saldarelli, V. Gualandri, G.P. Martelli (2014) First report of Grapevine pinot gris virus from table grapes in southern Italy. *J. Plant Pathol.* **96**(2): 439.
- Nolan, T., R.E. Hands, S.A. Bustin (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.* **1**(3): 1559-1582.
- Osman, F., A. Rowhani (2008) Real-time RT-PCR (TaqMan®) assays for the detection of viruses associated with Rugose wood complex of grapevine. *J. Virol. Methods*. **154**(1-2): 69-75.
- Reid, K. E., N. Olsson, J. Schlosser, F. Peng, S.T. Lund (2006) An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biol.* **6**(1): 1-11.
- Sabanadzovic, S., N. Abou-Ghanem, M.A. Castellano, M. Digiaro, G.P. Martelli (2000) Grapevine fleck virus-like viruses in Vitis. *Arch. Virol.* **145**: 553-565.
- Setiono, F. J., D. Chatterjee, M. Fuchs, K.L. Perry, J.R. Thompson (2018) The distribution and detection of Grapevine red blotch virus in its host depend on time of sampling and tissue type. *Plant Dis.* **102**(11): 2187-2193.
- 高橋智之・橋本俊祐・井上豊 (2022) ブドウに感染する 3 種ウイルスを同時検出するマルチプレックス RT-PCR 法の開発と植物内在性 mRNA 塩基配列由来の人工陽性コントロール DNA の作出. 植防研報. **57**: 51-55.
- Xiao, H., M. Shabanian, C. Moore, C. Li, B. Meng (2018) Survey for major viruses in commercial Vitis vinifera wine grapes in Ontario. *Virol. j.* **15**(1): 1-11.
- Xiao, H., B. Meng (2016) First report of Grapevine asteroid mosaic-associated virus and Grapevine rupestris vein feathering virus in Grapevines in Canada. *Plant Dis.* **100**(10): 2175-2175.
- Yepes, L.M., E. Cieniewicz, B. Krenz, H. McLane, J.R. Thompson, K.L. Perry, M. Fuchs (2018) Causative role of grapevine red blotch virus in red blotch disease. *Phytopathology*. **108**(7): 902-909.

