

二本鎖RNAの検出によるウイルス病の 診断に関する調査

山下 均・堀越 浩二・島田 英明・松本 工
神戸植物防疫所業務部国際第二課

Analysis of Double-Stranded RNA for Plant Virus Diagnosis. Hitoshi YAMASHITA, Kozi HOLIKOSHI, Hideaki SHIMADA and Takumi MATUMOTO (Kobe Plant Protection Station).
Res. Bull. PL. Prot. Japan 32:111-114 (1996)

Abstract : Detection of double-stranded RNA(dsRNA) was evaluated for virus disease diagnosis in plant quarantine. Double-stranded RNAs of cucumber mosaic virus(CMV) and potato virus X(PVX) were detected distinctly and easily from infected plants. And dsRNA were also detected from *Chenopodium quinoa* plants individually infected with CMV, tobacco rattle virus, tobacco ringspot virus, arabis mosaic virus, grapevine fanleaf virus, carnation mottle virus and citrus tatter leaf virus. These dsRNAs showed characteristic patterns for each virus and were suggested to be viral RNAs. Based on these results, the detection of dsRNAs seems to be appropriate for first screening of virus infections such as CMV and PVX in plant quarantine.

Key words : double-stranded RNA, electrophoresis, plant quarantine.

はじめに

二本鎖 RNA(dsRNA)は RNA ウイルスが宿主細胞内で増殖する際に生産され、普通健全植物に存在しないことからこの dsRNA を検出することでウイルス病の診断に利用できることが知られている (VALVERDE,1990)。

この診断法は、ウイルスの感染の有無ばかりでなく、異なるウイルスの判別、混合感染株の検出、同一ウイルスの系統判別なども可能である (WANG ら,1988)。また、隔離検疫では、輸入植物に未知のウイルスが感染している可能性も少なくないため、植物から dsRNA を検出することでウイルス罹病の有無を診断する方法として適していると考えられる。一方、potyvirus のように dsRNA の収量が極端に低く、本法による検出が困難なウイルスもあることが知られている (VALVERDE,1990)。そこで、dsRNA によるウイルス検出法が隔離検疫において実用的な診断法かどうか検討するため、ウイルス感染組織から dsRNA の抽出を行いウイルスの有無及びその電気泳動パターンによるウイルスの判別が可能かどうか調査した。

なお、本報告を取りまとめるにあたり、有益な御助言を賜った大阪府立大学植物病学講座大木理博士に厚くお礼申し上げる。

材料及び方法

1. 供試材料

cucumber mosaic virus (CMV), potato virus X(PVX), potato leafroll virus(PLRV), grapevine fanleaf virus (GFV), grapevine leafroll virus (PLRV)の感染植物から dsRNA 抽出を行った。供試植物は Table 1 及び Table 2 のとおりである。次に、隔離検査において常用としている検定植物の *Chenopodium quinoa* に 8 種類のウイルス (CMV, GFV, tobacco rattle virus (TRV), tobacco ringspot virus (TRSV), arabis mosaic virus (ArMV), carnation mottle virus (CaMoV), citrus tatter leaf virus (CTLV), apple stem grooving virus (ASGV)) を汁液接種により感染させ、それらから dsRNA を抽出し、これによりウイルスの判別ができるか調査した。さらに TRV と CMV を混合感染させた *C. quinoa* 葉からも抽出を行った。

2. 二本鎖 RNA の抽出と電気泳動

凍結させた植物葉 4 ~ 5g を大木 (1992) の方法に従い抽出し、6% のポリアクリルアミドゲルを用い 22.5mA で 2.5 ~ 3.5 時間電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色後バンドの観察を行った。また、GLRV の場合は、葉、樹皮及び葉柄 7g を大木 (1992)

Table 1. The Number of dsRNA bands associated with viruses extracted from infected plants

Virus Name	Plant	Number of dsRNA bands associated with virus
cucumber mosaic virus	Lily asiatic hybrid (Maremma)	4
〃	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. White Burley	5
〃	<i>Physalis floridana</i>	5
potato virus X	<i>Solanum tuberosum</i> (Dansyaku)	1
〃	<i>Datura stramonium</i>	1
〃	<i>Physalis floridana</i>	1
potato leafroll virus	<i>Solanum tuberosum</i> (Andesuaka)	0
〃	<i>Physalis floridana</i>	0
grapevine fanleaf virus	<i>Vitis vinifera</i> (Rkatsiteri rozovyj)	0
grapevine leafroll virus	<i>Vitis vinifera</i> (Koshu)	0

Table 2. Healthy control plants for dsRNA analysis

Lily asiatic hybrid (Chianti), Lily asiatic hybrid (Kreta)
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. White Burley, <i>Physalis floridana</i>
<i>Datura stramonium</i> , <i>Solanum tuberosum</i> (Andesuaka)
<i>Vitis vinifera</i> (Rkatsiteri rozovyj)
<i>Vitis vinifera</i> (Cabernet franc), <i>Chenopodium quinoa</i>

及び Hu ら (1990) の方法に従い行った。

なお、イネ萎縮病罹病のイネ葉から同様な方法で抽出した dsRNA を分子量マーカーとして用いた。

結果及び考察

感染植物から健全植物には見られないウイルスに特異的な dsRNA が検出されたものは Table 1 のとおり CMV 及び PVX で、検出されなかったものは PLRV、GFV 及び GLRV であった。CMV では、Dodds ら (1984)、VALVERDE (1990) らと同じ泳動パターンを示し、ユリからは RNA1,2,3,4 に相当する 4 本、*Nicotiana tabacum* cv. White Barley 及び *Physalis floridana* からは上記の 4 本の他にサテライト RNA を含む 5 本のバンドが検出された (Fig.1)。また、ユリから抽出した試料は汚れが目立ったがセルロースカラムによる精製を 2 回繰り返すことで除去された。PVX では、VALVERDE (1985) によると濃い 1 本のバンドの他に 1 本のバンドが検出されているが、本調査では、ジャガイモ及び *D. stramonium*, *P. floridana* からほぼ同じ位置に明瞭なバンドが一本検出された。なお、GLRV では Hu ら (1990) によりブドウ樹の篩部組織から検出されているが、本調査で検出されなかったのは試料中のウイルス濃度が低かったことが考えられる。

以上、CMV 及び PVX では dsRNA を検出することができ、これによりウイルス感染の有無の判定が可能と思われる。

ウイルス感染 *C. quinoa* からの抽出・泳動結果は Table 3 のとおりで、ASGV を除きそれぞれのウイルスに特異的と思われる明瞭なバンドと不明瞭なバンドが検出された (Fig.3)。また、健全 *C. quinoa* からも薄くて細いバンドが 3~5 本検出された。明瞭なバンドは安定して検出されたが、不明瞭なものは検出数に変動があり、健全 *C. quinoa* のバンドと判別し難いものもあった。各ウイルスのバンドパターンを観察したところ、CMV ではサテライト RNA を含む 5 本が検出され、TRV との混合感染試料からも CMV 由来のバンドを判別することができた。ArMV、GFV 及び TRSV は、ゲノム RNA の成分数が 2 で、分子量もそれぞれ同じであり (MURANT, 1981)、検出された dsRNA は、いずれもほぼ同じ位置に 2 本のバンドが見られた (Fig.4)。分子量においても小さい方のバンドが 2.8×10^6 で RNA 2 の二倍量であったことから、dsRNA は、ゲノム RNA に対応して検出されたと考えられた。TRV では明瞭なバンド 4 本、不明瞭なバンド 2~5 本、CaMoV では明瞭なバンド 3 本、不明瞭なバンド 5~6 本、CTLV では明瞭なバンド 1 本、不

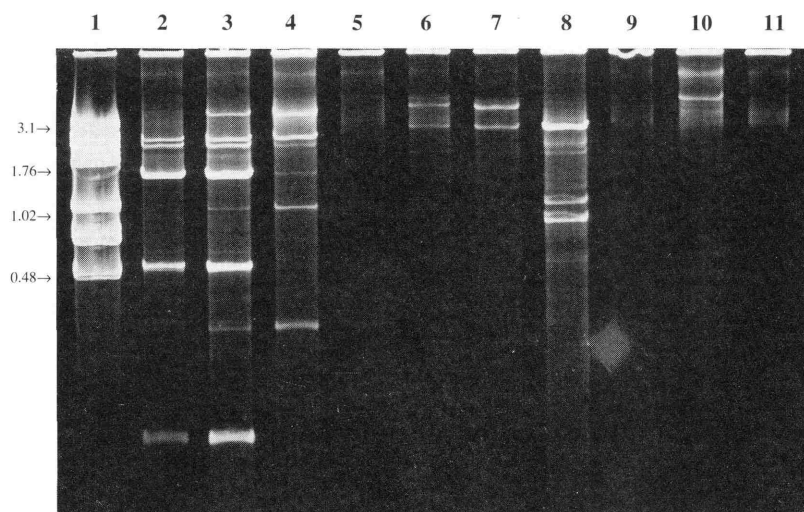


Fig.3 Electrophoretic analysis of dsRNA extracted from *C. quinoa* infected with different viruses and healthy *C. quinoa*. Lane 1: rice dwarf virus (as a molecular weight marker), Lane 2: CMV, Lane 3: CMV and TRV, Lane 4: TRV, Lane 5: GFV, Lane 6: TRSV, Lane 7: ArMV, Lane 8: CaMoV, Lane 9: ASGV, Lane 10: CTLV, Lane 11: healthy.

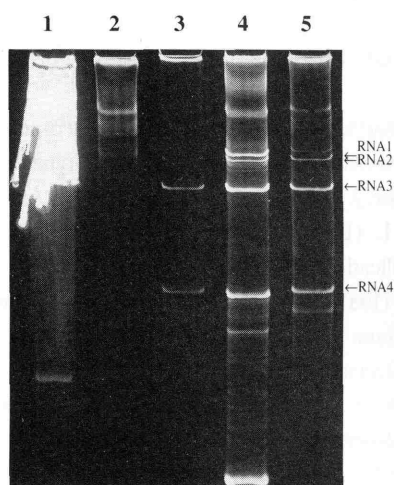


Fig.1 Electrophoretic analysis of dsRNA extracted from CMV infected plants and healthy lily. Lane 1: healthy lily (chianti), Lane 2: healthy lily (Kreta), Lane 3: infected lily (Maremma) without symptom, Lane 4: infected *N. tabacum* cv. White Burley, Lane 5: infected lily (Maremma) with symptom, Lane 1 and 4: one cycle of chromatography, Lane 2, 3, 5: two cycle of chromatography.

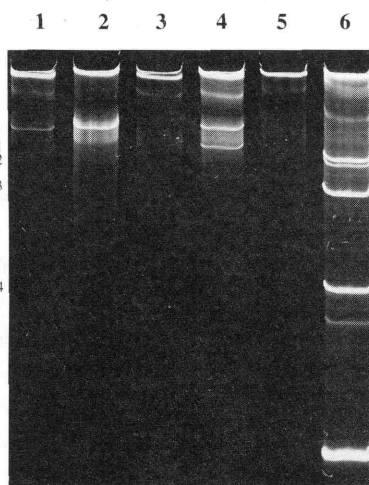


Fig.2 Electrophoretic analysis of dsRNA extracted from plants infected with three viruses. Lane 1: *P. floridana* infected with PVX, Lane 2: *D. stramonium* infected with PVX, Lane 3: *P. floridana* infected with PLRV, Lane 4: *C. quinoa* infected with GFV, Lane 5: healthy *C. quinoa*, Lane 6: *C. quinoa* infected with CMV (as a molecular weight marker).

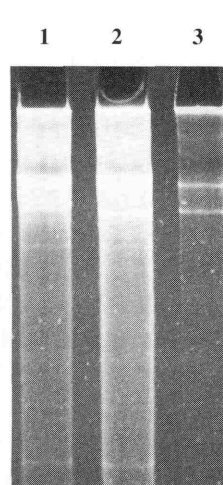


Fig.4 Electrophoretic analysis of dsRNA extracted from *C. quinoa* infected with GFV, TRSV or ArMV. Lane 1: GFV, Lane 2: TRSV, Lane 3: ArMV.

Table 3 The properties of dsRNA extracted from infected *C. quinoa*.

Virus name	Number of dsRNA		Molecular weight of dsRNA				
	Major	Minor	Major	band (× 10 ⁶ daltons)			
cucumber mosaic virus	5	0	2.4	2.2	1.6	0.5	< 0.1
tobacco rattle virus	4	2 ~ 5	3.6	2.5	0.9	< 0.1	
grapevine fanleaf virus	2	0	3.6	2.8			
tobacco ringspot virus	2	0	3.6	2.8			
arabis mosaic virus	2	0	3.6	2.8			
carnation mottle virus	3	5 ~ 6	2.8	1.0	0.8		
citrus tatter leaf virus	1	1 ~ 3	4.1				
apple stem grooving virus	0	0	—				

明瞭なバンド 1 ~ 3 本がそれぞれ検出された。これらの本数はゲノム RNA の成分数より多かった。

CTLV は、加納ら(1986)により、2 または 4 本のバンドが検出されている。また、TRV 及び CaMoV はサブゲノムの存在が知られており (CARRINGTON et al., 1986, MANDAHAR, 1989), 検出された dsRNA の本数が多いのはこれらが関与しているかもしれない。

以上の結果から、dsRNA は、ウイルス及びその寄主植物の種類により検出されないものもあったため、本方法だけですべてのウイルスについて感染の有無の判定は困難であるが、電気泳動のバンドパターンはそれぞれのウイルスについて特徴があり、ウイルスの判別に利用できると思われる。また、隔離検査において、多くの試料を扱うことには不向きであるが、CMV 及び PVX では本法により比較的容易に検出することができるので、一次スクリーニングのウイルス検出法として有用と考えられた。

引用文献

- 大木 理 (1992) 日本に発生する植物ウイルス一覧. 日本植物防疫協会 pp86-88.
 CARRINGTON, J. C. and T. J. MORRIS (1986) High Resolution Mapping of Carnation Mottle Virus-Associated RNAs. *Virology*, 150, 196-206.

加納 健, 小泉銘冊 (1986) 二本鎖 RNA の検出によるカンキツウイルス病の診断 果樹試験場興津支場試験研究年報 No.13, 116-117.

DODDS, J. A., T. J. MORRIS, R. L. JORDAN (1984) Plant Viral Double-Stranded RNA. *Ann. Rev. Phytopathol.* 22, 151-168.

HU J. S., D. GONSALVES and D. TELIZA (1990) Characterization of Closterovirus-like Particles Associated with Grapevine Leafroll Disease. *J. Phytopathology* 128, 1-14.

MANDAHAR, C. L. (1989) Plant Viruses. Volume 1 Structure and Replication. pp76-82.

MURANT, A. F. (1981) Nepovirus. In *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis* (E. KURSTAK, ed), Elsevier, Amsterdam. pp197-238.

VARVERDE R. A., J. ALLAN DODDS and JAMES A. HEICK (1985) Double-stranded Ribonucleic Acid from Plants Infected with Viruses Having Elongated Particles and Undivided Genomes. *Phytopathology* 76, 459-465.

VARVERDE R. A. (1990) Analysis of Double-Stranded RNA for Plant Virus Diagnosis. *Plant Disease*/March: 255-258.

WANG W. Q., T. NATUAKI, S. OKUDA and M. TERANAKA (1988) Comparison of Cucumber Mosaic Virus Isolates by Double-Stranded RNA Analysis. *日植病報* 54: 536-539.