

LAMP法によるブルーベリーに感染する3種のウイルス (*Blueberry red ringspot virus*, *Blueberry scorch virus*及び*Blueberry shock virus*)の検出法の開発

神谷昌希¹⁾、柳澤広宣、齊藤範彦

横浜植物防疫所業務部

Development of Detection Methods of Three Viruses (*Blueberry red ringspot virus*, *Blueberry scorch virus* and *Blueberry shock virus*) that Infect in Blueberry by Loop-mediated Isothermal Amplification Method. Masaki Kamiya¹⁾, Hironobu Yanagisawa and Norihiko Saito (Yokohama Plant Protection Station 1-7, Nagamine, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-0052 Japan. yokohama_seibutsu@pps.maff.go.jp¹⁾ Haneda Sub-station, Yokohama Plant Protection Station) *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* **50** : 47-52

Abstract : *Blueberry red ringspot virus*(BRRV), *Blueberry scorch virus*(BIScV) and *Blueberry shock virus*(BIShV) cause serious diseases in blueberry plants. In order to specifically and rapidly detect these viruses, we have developed a detection method using the Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) method. Each LAMP primers set was designed based on the sequences of BRRV, BIScV and BIShV respectively. These three viruses could be detected with the designed primer sets from nucleic acid extraction of each virus infected blueberry plants. Nonspecific reactions were not confirmed in virus free blueberry plants, viruses in same genus (except BRRV) and other virus species. Moreover, each target virus could be detected by the LAMP method with a simple sample preparation method that consisted of sticking each virus infected plant with an insect pin.

Key Words : LAMP, *Blueberry red ringspot virus*, *Blueberry scorch virus*, *Blueberry shock virus*

緒 言

Blueberry red ringspot virus(BRRV)、*Blueberry scorch virus*(BIScV)及び*Blueberry shock virus*(BIShV)はブルーベリー (*Vaccinium* spp.)に重要な病害を引き起こす植物ウイルスであり(Martin *et al.*, 2012)、BIScV及びBIShVは日本での発生は確認されていない。

BRRVは*Soymovirus*属に分類される球状のDNAウイルスで、接ぎ木によって伝搬されるが、媒介虫による伝搬の報告はない(Martin *et al.*, 2012)。本ウイルスは1950年にアメリカ合衆国で確認され(Hutchinson *et al.*, 1954)、ポーランド(Paduch-Cichal *et al.*, 2011)や韓国(Cho *et al.*, 2012)等で発生報告があり、日本でも最近、一部地域で発生が確認されている(Isogai *et al.*, 2009)。本ウイルスはブルーベリーの葉、茎及び果実に赤い輪紋症状等の病徴を引き起こすことが知られており(Ramsdell *et al.*, 1987; Caruso and Ramsdell 1995)、また、果実生産量が25%減少したという報告(Caruso and Ramsdell 1995)もあることから、まん延した場合、果実生産に多大な影響を与える可能性が考えられる。

BIScVは*Carlavirus*属に分類されるひも状のRNAウイル

スで、アブラムシ及び接ぎ木で伝搬される(Bristow *et al.*, 2000)。アメリカ合衆国やカナダ、イタリア等で発生報告がある(EPP0 2009; Moretti *et al.*, 2011)。本ウイルスはブルーベリーの花と葉に激しい枯れ込み症状等を引き起こすことが知られており(Bristow *et al.*, 1987; Martin *et al.*, 1988)、品種によっては果実の収量を著しく減少させ、株全体が枯死することもある(Caruso and Ramsdell 1995)。また、BIScVによって引き起こされる病徴はBIShVや糸状菌等による病害、生理障害等の症状に類似し、病原を適切に診断するためには精密検査が必要とされる(Caruso and Ramsdell 1995)。

BIShVは*Ilarvirus*属に分類される球状のRNAウイルスで、花粉(ミツバチによる媒介)及び接ぎ木により伝搬される(Bristow *et al.*, 1999)。アメリカ合衆国及びカナダの一部地域で発生が報告されている(Schilder 2009)。本ウイルスはBIScVと同様にブルーベリーの花や葉に壊死などの病徴を引き起こすことが知られている(Caruso and Ramsdell 1995; MacDonald *et al.*, 1991)。BIScVの感染によって枯れた花はそのまま樹に残るが、本ウイルスにより枯れた花及び葉はすべて落葉する。その後、再び徐々に芽が伸び始め、正常な樹とほとんど見分けがつかなくなる。感染樹における病徴は1～

¹⁾横浜植物防疫所羽田空港支所

数年でほとんど現れなくなるが、ウイルスは保毒しているため、感染源となる(Bristow *et al.*, 1999; Bristow *et al.*, 2002)。

現在、本ウイルスの遺伝子診断法による検出方法の報告はない。

これまで植物防疫所が実施する隔離検疫において、これらのウイルス検定はEnzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)法またはPolymerase Chain Reaction(PCR)法により行っていたが、これらの方法は鋳型の抽出等の手順が煩雑であり、結果判定まで長時間(数時間~2日間)を必要とすること、時期によって検出困難な場合や、抗血清の供給が安定していないなどの問題が存在している。

Loop-mediated Isothermal Amplification(LAMP)法(以下、RT-LAMP法も含む)は高感度かつ特異性の高い遺伝子診断法であり(Notomi *et al.*, 2000)、作業工程が少なく、逆転写反応及びDNAの増幅が短時間(60分以内)で完了し、反応液の濁度を測定することで標的とする遺伝子の検出がリアルタイムで確認できるため(Fukuta *et al.*, 2003)、検疫精度の向上及び検定時間の短縮が図れる。そこで、本試験では各ウイルスを特異的に検出するLAMPプライマーセットを設計し、ブルーベリーからのLAMP法による各ウイルスの検出方法の開発を行った。また、鋳型の簡易な調製方法についても検討を行った。

材料及び方法

1. 各ウイルス感染株の導入及び感染確認

BRRVについては、岩手大学農学部磯貝准教授から分譲された本ウイルスに感染した国内産ブルーベリー苗木を用いた。

BlScV及びBlShVについては、各ウイルスに感染したブルーベリー苗木を農林水産大臣の許可によりアメリカ合衆国から導入した(農林水産省指令17横植第114号)。8月に各ブルーベリー苗木から成葉を100mg採取し、ELISAキット(Agdia社)を用いて、付属のマニュアルに従い、対象とするウイルスの感染を確認した。

2. LAMPプライマーの設計

BlShV特異的プライマーは、NCBI GenBankに登録されているBlShVのRNA依存RNAポリメラーゼ遺伝子の塩基配列(Accession No. GQ865670.1)からLAMPプライマー設計ソフト「Primer Explorer version 4」(栄研化学、富士通)により設計した。BRRV及びBlScV特異的プライマーは、NCBI GenBankに登録されているそれぞれのウイルスの外殻タンパク質遺伝子の塩基配列情報を多重整列プログラムであるClustalW(DDBJ)を用いて整列し、種間変異の少ない領域を選択して、BlShVと同様に設計した。各ウイルス検出用のプライマーセットは、第1表に記載した。

Table 1. The list of LAMP primers sets for detection of blueberry viruses

Virus	Primer Name	Sequence (5'-3')
BRRV	BRRV F3	CCAATTATAATCAAGGACGGTT
	BRRV B3	TGATCTCTGCTTCGAGTTC
	BRRV FIP	AGGGTGTCCAGGGCCATAATTTTCTAGCACAAATTC AATTATCGAACT
	BRRV BIP	CCAGGGAATGGAAGGAGCTATACTTCTGCTTCTTTGCTTGG
	BRRV LF	AAAATATATTTTCCTAGT
	BRRV LB	ACATTGGAGAATCAAATCAGCACC
BlScV	BlScV F3	TGTGCTAGTGTGAGCAGTTC
	BlScV B3	CGGCGGTTGATTTTTGACT
	BlScV FIP	GAATCGACTGACACTGCTCCCCTGTCTATCTGGATCCCGA
	BlScV BIP	GAAGCTAGTCTTCGCAAAGTGTGCATGAAATTCACACGAC
	BlScV LF	CTCAAACCTCAATGCTTCC
	BlScV LB	GCAGGTTGTACGCGCC
BlShV	BlShV F3	ATTTTCACCGCTTTGGGT
	BlShV B3	AGGTAACATTAGGATCCAACAA
	BlShV FIP	TACCACAAGGTCCGTCACCTAATGAGTTTTTGCAAATGTGGTTTTG
	BlShV BIP	TGTGAACTATCAACGACGTACCGCGCTTAAAGTAATGATAGTGTTC
	BlShV LF	CAAGAGTGCTTAACAGTGTA
	BlShV LB	GAGATGCTTGTACTTATTTGG

3. ウイルス感染ブルーベリー苗木からの核酸抽出及び簡易鋳型調製法

設計したLAMPプライマーセットによる標的ウイルス検出の可否及び特異性の調査には、各供試植物の成葉100mgから、カリウムSDS法(Dellaporta *et al.*, 1983)で抽出した核酸を用いた。また、植物の部位別検出の適否及び簡易な鋳型調製方法の検討を行うため、各ウイルス感染株の葉、茎(樹皮)または根を昆虫針(5号)で4回刺し、直接LAMP反応液に浸漬し鋳型とした(以下、針刺し法とする)。また、陰性対照区として健全なブルーベリー苗木の葉からカリウムSDS法により抽出した核酸を鋳型として使用した。上記の試験において、BRRVについては感染株に病徴(赤色輪点)が現れている8月及び翌年の病徴がまだ現れていない5月に試料を採取した。BiScV及びBiShVについては8月に採取した試料を使用した。

4. LAMP反応

設計した各ウイルス検出用プライマーセットを用いて標的ウイルスが検出可能か、また、最適温度条件を調査するため、反応温度を60℃、61℃、62℃、63℃とし、濁度上昇開始時間が早く、非特異的増幅が生じない温度を確認した。測定時間は60分までとした。

Loopamp DNA(又はRNA)増幅キット(栄研化学)の付属マニュアルに従い反応液を調製し、各反応液に鋳型1 μ lを添加して、リアルタイム濁度測定装置(LA-200・テラメックス株式会社)で遺伝子増幅反応の副産物であるピロリン酸マグネシウムの生成による反応液の濁度を測定した。

5. 各プライマーセットの特異性調査

設計した各プライマーセットの特異性を調査するために、ブルーベリーに感染することが知られている標的ウイルス以外のウイルス及び標的ウイルスと同属のウイルスの検出可否を調査した。

ブルーベリーに感染する標的ウイルス以外のウイルスとして、*Blueberry shoestring virus*(BSSV：農林水産省指令22横植第307号)を使用した。標的ウイルスと同属のウイルスとして、BiScVについては*Potato virus S*(PVS)及び*Lily symptomless virus*(LSV)を、BiShVについては*Apple mosaic virus*(ApMV)、*Prunus necrotic ringspot virus*(PNRSV)及び*Prune dwarf virus*(PDV)を用いた。これらのウイルスはいずれも国内由来であり、また、ブルーベリーに感染する報告はない。なお、BRRVと同属のウイルスは入手できなかった。

結 果

1. LAMP法による標的ウイルスの検出及び設定温度

各プライマーセットを用いてLAMP法を実施したところ、それぞれ標的ウイルス感染株から抽出した鋳型において、濁度の上昇が確認された。試験は5反復行い、濁度が安定して増幅し始めた時間を開始時間とした。BRRV及びBiScVは60℃、BiShVは61℃が最も濁度上昇の平均開始時間が早く、陰性対

照区(NC)ではどの設定温度でも濁度の上昇は確認されなかった(結果省略)。

2. LAMPプライマーの特異性

(1)BRRV検出用プライマーセット

BRRVのみ反応開始から約20分後に濁度の上昇が確認されたが、BiScV、BiShV、BSSV及び陰性対照区(NC)については濁度の上昇は確認されなかった(第1図)。

(2)BiScV検出用プライマーセット

BiScVのみ反応開始から約15分後に濁度の上昇が確認され

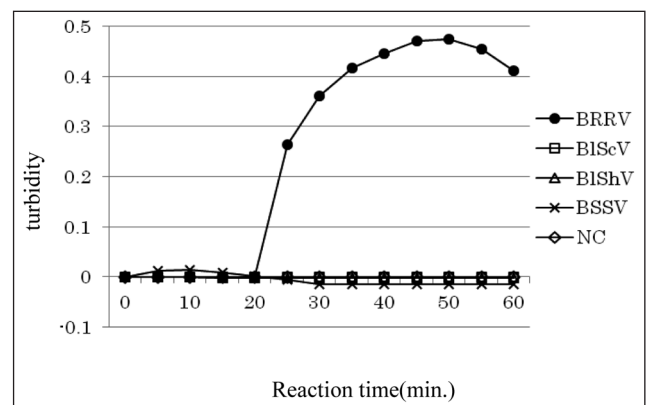


Fig. 1. Specific detection of BRRV with the designed LAMP primers set

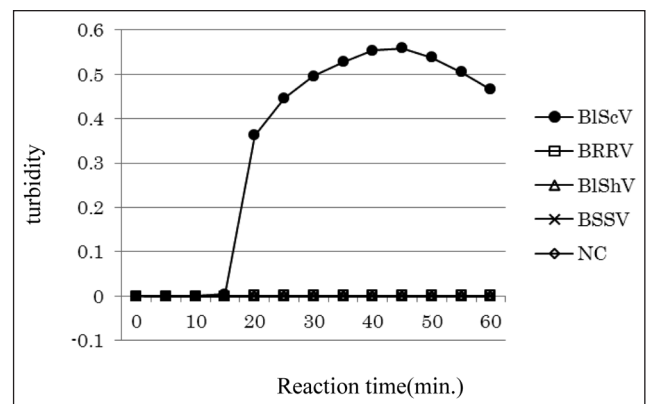


Fig. 2. Specific detection of BiScV with the designed LAMP primers set

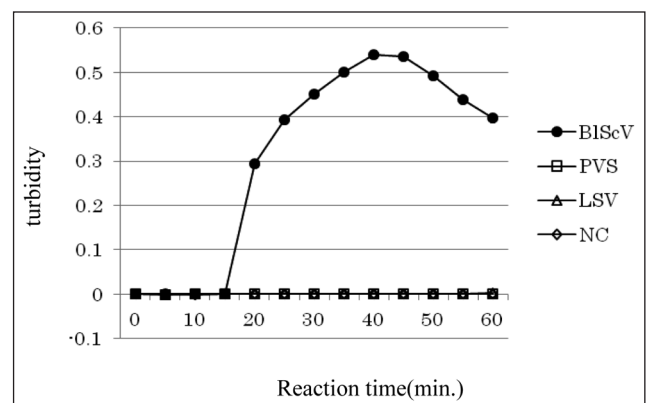


Fig. 3. Specific detection of BiScV with the designed LAMP primers set

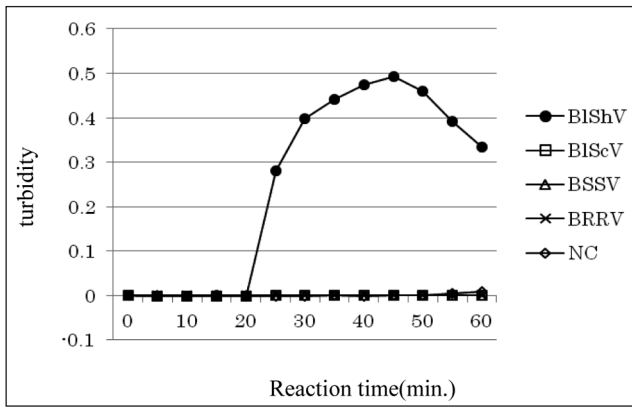


Fig. 4. Specific detection of B1ShV with the designed LAMP primers set

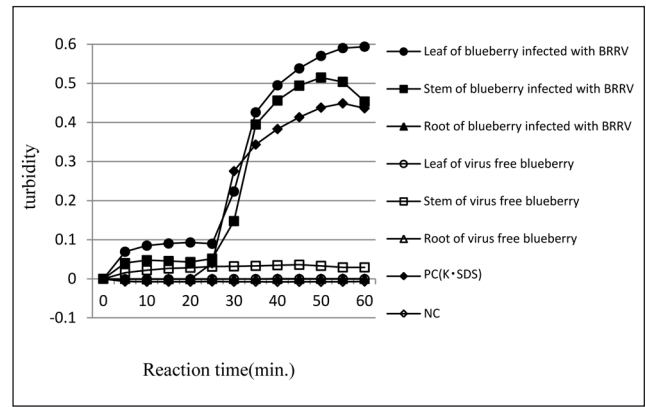


Fig. 6. Detection of BRRV by LAMP method with insect pin sticking in August

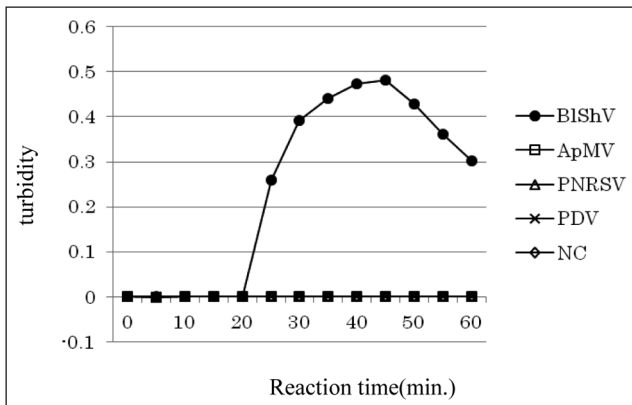


Fig. 5. Specific detection of B1ShV with the designed LAMP primers set

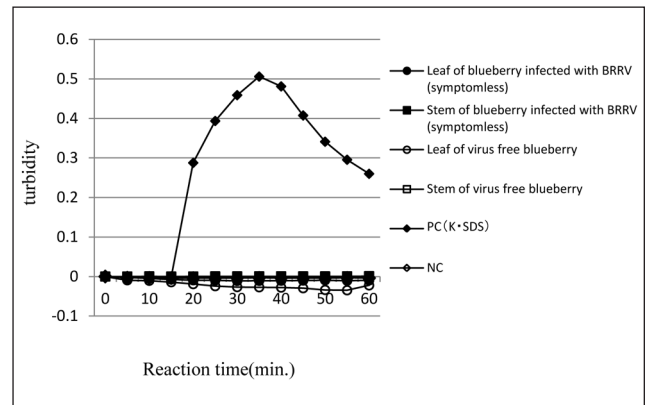


Fig. 7. Detection of BRRV by LAMP method with insect pin sticking in May

たが、BRRV、B1ShV、BSSV及び陰性対照区(NC)については濁度の上昇は確認されなかった(第2図)。また、同属ウイルスのPVS及びLSVについても濁度の上昇は確認されなかった(第3図)。

(3)B1ShV検出用プライマーセット

B1ShVのみ反応開始から約20分後に濁度の上昇が確認されたが、BRRV、B1ScV、BSSV及び陰性対照区(NC)については濁度の上昇は確認されなかった(第4図)。また、同属ウイルスのApMV、PNRSV及びPDVについても濁度の上昇は確認されなかった(第5図)。

3. 針刺し法による各ウイルスの検出及び検出可能部位

(1)BRRV検出用プライマーセット

8月の病徴が現れているBRRV感染株の葉、茎及び陽性対照区(PC：BRRV感染葉からカリウムSDS法により抽出した核酸)において、反応開始から約28分後までに濁度の上昇が確認されたが、感染株の根、健全ブルーベリー及び陰性対照区(NC)については濁度の上昇は確認されなかった(第6図)。また、翌年5月の無病徴のBRRV感染株においては、陽性対照区(PC)で反応開始から約16分後に濁度の上昇が確認されたが、本法により調製した鋳型では葉及び茎からBRRVは検出されなかった(第7図)。なお、BRRV感染株の根については、病徴の現れた前年8月の試験で本ウイルスを検出できなかった

ことから、試験を行わなかった。

(2)B1ScV検出用プライマーセット

B1ScV感染株の葉、茎、根及び陽性対照区(PC：B1ScV感染葉からカリウムSDS法により抽出した核酸)において、反応開始から約23分後までに濁度の上昇が確認されたが、健全ブルーベリー及び陰性対照区(NC)については濁度の上昇は確認されなかった(第8図)。

(3)B1ShV検出用プライマーセット

B1ShV感染株の葉、茎、根及び陽性対照区(PC：B1ShV感染葉からカリウムSDS法により抽出した核酸)において、反応開始から約28分後までに濁度の上昇が確認されたが、健全ブルーベリー及び陰性対照区(NC)については濁度の上昇は確認されなかった(第9図)。

考 察

本試験で設計したブルーベリーに感染する3種のウイルス検出用LAMPプライマーセットを用いることにより、それぞれの標的ウイルスを検出することができた。カリウムSDS法により抽出した核酸を鋳型とした場合は、3種とも反応開始から15～20分程度で濁度の上昇が確認され、標的遺伝子の増幅反応は60分以内に終了することができた。このことからLAMP法

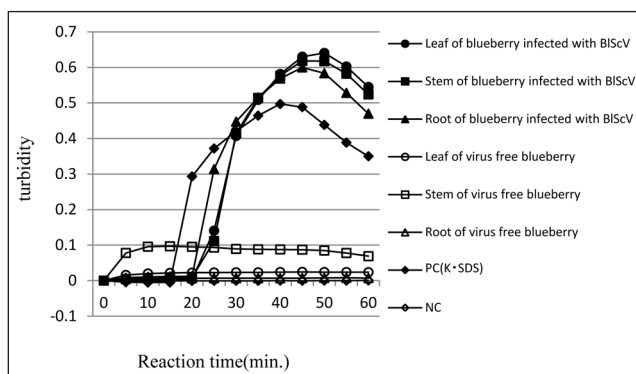


Fig. 8. Detection of BlScV by LAMP method with insect pin sticking

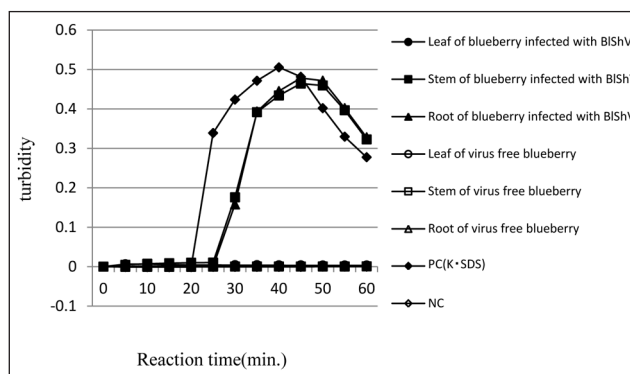


Fig. 9. Detection of BlShV by LAMP method with insect pin sticking

を用いることで、PCR法やELISA法と比較して検定時間の短縮が可能であることが示された。また、いずれのプライマーセットもブルーベリーに感染することが知られている標的ウイルス以外のウイルスを検出することはなく、BlScV及びBlShVにおいては同属のウイルスも検出されなかった。これらの結果から、各プライマーセットの特異性は非常に高いと考えられる。

Martin *et al.* (2012)は、BRRV感染株の無病徴の葉から既報のPCR法による本ウイルスの検出は信頼性が低いと報告しているが、本試験において、病徴が現れていない葉からでも、カリウムSDS法により抽出した鋳型であれば、LAMP法でBRRVを検出することが可能であった。このことから、LAMP法は既存のPCR法よりも検出感度が高いことが示唆される。

簡易な鋳型調製法である針刺し法により、BRRVは葉及び茎から、BlShVは茎及び根から、BlScVは、葉、茎及び根の全てから検出することができた。針刺し法により調製した鋳型の場合、反応開始から23～28分程度で濁度の上昇が確認された。濁度上昇開始時間はカリウムSDS法により抽出した核酸を鋳型とした場合よりも数分遅かったが、針刺し法を用いることで、鋳型の調製から標的ウイルスの検出までを非常に短時間(約90分)で実施可能であることが示された。なお、本試験で供試したBlScV感染株及びBlShV感染株については、病徴が現れなかったため、病徴を呈した試料からの検出可否は調査できなかった。

以上のことから本試験により開発したプライマーセットを用いたLAMP法によって、迅速かつ特異的に3種のウイルスを検出することが可能であることが示唆された。特に、BlShVについては、これまで遺伝子診断法の報告が無かったが、本試験により開発した検定方法により迅速な検定が可能となった。これまで、これらのウイルスの検定については輸入された植物の病徴観察、指標植物を用いた生物検定により行われており、検定結果が出るまで数ヶ月以上の長期間を要していた。また、近年はELISA法やPCR法も用いられるようになったが、試料調製や核酸抽出が煩雑であった。また、今後、研究の進展によって新たな検査対象病害が追加されれば検定時間や作業に要する手間も倍増し、合否判定までにより時間を要することとなる。しかし、今回開発した試料調製法及びLAMP法を用いることで高精度な検定が可能となると同時に、検定時間の短

縮や作業量が軽減され、業務の効率化を図ることが可能となる。なお、標的ウイルスによっては簡易鋳型調製法では植物の部位や病徴発現の有無等で検出されない場合もあることから、今後の課題として、鋳型を調製する部位や時期によるウイルス検出率の違い等の比較調査を実施し、当該調製法が実施可能な条件を検討する必要があると考える。

摘 要

ブルーベリーの重要病原ウイルスとして知られている *Blueberry red ringspot virus* (BRRV)、*Blueberry scorch virus* (BlScV) 及び *Blueberry shock virus* (BlShV) について、これらのウイルスを迅速かつ特異的に検出するため、LAMP法を用いた検出法を開発した。BRRV、BlScV及びBlShVの既報の塩基配列からそれぞれ検出用プライマーセットを設計し、各感染ブルーベリー苗木から核酸抽出した鋳型を用いてLAMP法を実施したところ、標的ウイルスのみ特異的増幅が確認された。また、簡易な鋳型調製法である針刺し法でもそれぞれ標的ウイルスが検出可能であった。このことから、本試験において開発したLAMP法を用いることで、PCRなどの従来法より迅速、簡便かつ特異的に標的ウイルスを検出できることが明らかになった。

謝 辞

BRRV感染ブルーベリーの分譲及び本試験における助言を賜りました岩手大学農学部磯貝准教授に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- Bristow, P. R., and Martin, R. R. (1987) A virus associated with a new blight disease of highbush blueberry. (Abstr.) *Phytopathology* 77:1721-1722.
- Bristow, P. R., and Martin, R. R. (1999) Transmission and the role of honeybees in field spread of blueberry

- shock ilarvirus, a pollen-borne virus of highbush blueberry. *Phytopathology* 89:124-130.
- Bristow, P.R., Martin, R.R., and Windom, G.E. (2000) Transmission, field spread, cultivar response, and impact on yield in highbush blueberry infected with blueberry scorch virus. *Phytopathology* 90:474-479.
- Bristow, P.R., Windom, G.E. and Martin, R.R. (2002) Recovery of plants infected with Blueberry shock virus (B1ShV). *Acta Hort.* 574:85-89.
- Caruso FL, Ramsdell DC (1995) Compendium of blueberry and cranberry diseases. Disease compendium series. *APS Press, St. Paul* : 51-52, 57-59 pp.
- Cho IS, Chung BN, Cho JD, Choi GS, Lim HS (2012) First report of Blueberry red ringspot virus infecting highbush blueberry in Korea. *Plant Disease*, 96(7):1074.
- Dellaporta S. L., J. Wood and J. B. Hicks (1983) A Plant DNA Minipreparation: Version . *Plant Molecular Biology Reporter* 1:19-21.
- EPPO 2009. PQR Database. Paris, France: European and Mediterranean Plant Protection Organisation. [www.eppo.org]
- Fukuta, S., Iida, T., Mizukami, Y. Ishida, A., Ueda, J., Kanbe, M. Ishimoto, Y. (2003) Detection of Japanese yam mosaic virus by RT-LAMP. *Archives of Virology* 148, 1713-1720
- Hutchinson MT, Varney EH (1954) Ringspot-A virus disease of cultivated blueberry. *Plant Dis Rep* 38:260-262
- Isogai, M., Ishii, K., Umemoto, S., Watanabe, M., Yoshikawa N. (2009) First report of blueberry red ringspot disease caused by Blueberry red ringspot virus in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* 75(2): 140-143
- MacDonald, S.G., Martin, R.R. and Bristow, P.R. (1991) Characterization of an ilarvirus associated with a necrotic shock reaction in blueberry. *Phytopathology* 81: 210-214.
- Martin, R. R., and Bristow, P. R. (1988) A carlavirus associated with blueberry scorch disease. *Phytopathology* 78:1636-1640.
- Martin, R. R., Polashock J. J., and Tzanetakis I. E. (2012) New and Emerging Viruses of Blueberry and Cranberry. *Viruses* 2012, 4, 2831-2852
- Moretti M, Ciuffo M, Gotta P, Prodorutti D, Bragagna P, Turina M (2011) Molecular characterization of two distinct strains of blueberry scorch virus (BLSeV) in northern Italy. *Archives of Virology*, 156(7):1295-1297.
- Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, and T. Hase (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28, e63 (2000).
- Paduch-Cichal E, Kalinowska E, Chodorska M, Sala-Rejczak K, Nowak B (2011) Detection and identification of viruses of highbush blueberry and cranberry using serological elisa test and PCR technique. *Acta Scientiarum Polonorum - Hortorum Cultus*, 10(4):201-215.
- Polashock JJ, Ehlenfeldt MK, Crouch JA. Molecular detection and discrimination of Blueberry red ringspot virus strains causing disease in cultivated blueberry and cranberry. *Plant Dis.* 2009;93:727-733
- Ramsdell, D. c., K. S. Kim, and J. P. Fulton. (1987) Red ringspot of blueberry, pp 121-123. In Converse, R. H., ed., Virus diseases of small fruits. *United States Department of Agriculture, Agriculture Handbook* No 631. U. S. Government Printing office, Washington, D.C., 277 pp.
- Schilder, A. (2009) Blueberry shock virus, Pest Alert Factsheet. Michigan State University Extension, East Lansing, MI, USA.