HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ジャガイモウイルスの検出技術とジャガイモYウイルスの発生実態に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	小野塚, 信哉
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第14648号
Issue Date	2021-09-24
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/83091
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	onozuka_nobuya_abstract.pdf (論文内容の要旨)

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称: 博 士(農学)　　氏名 小野塚 信哉

学 位 論 文 題 名

ジャガイモウイルスの検出技術とジャガイモ Y ウイルスの発生実態に関する研究

はじめに

ジャガイモ(*Solanum tuberosum* L.)に感染するウイルス(ジャガイモウイルス)は30種以上報告されており，そのうち potato leafroll virus(PLRV)，potato virus S(PVS)，potato virus X(PVX) potato virus Y(PVY)の 4 種は，世界中でジャガイモ生産に多くの被害を与えている．ジャガイモウイルスは，塊茎を通じて次世代へと伝搬するため，先進諸国では，植付け予定の種ばれいしょのウイルス感染率の検定(冬季検定)と栽培期間中の植物体のウイルス感染率の検定(夏季検定)によって種ばれいしょ検疫が実施されている．本研究では，冬季検定の省力化と高度化を目的として4種ウイルスの同時検出技術を開発した．また，効率的な夏季検定に資する知見を得るため，病原性の異なる多数の系統が存在している PVY について，国内のジャガイモほ場で発生している系統の構成を明らかにするとともに，系統毎の塊茎伝搬率を解析した．

第1部 ジャガイモウイルス検定法の開発

現在は Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)法がウイルスの検出に用いられているが，粗汁液の作製から検出までに多くの時間と労力を要する．そこで，ろ紙を用いた簡易的な RNA 調製法および 4 種のジャガイモウイルスを対象とする multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction(mRT-PCR)法によるウイルス検定法を開発した．簡易 RNA 調製法は，ピペット操作のみで，PCR チューブ内で葉の粗汁液をろ紙に吸着させ，2 種のアルコールで洗浄したのちに熱処理で RNA を溶出することで，RT-PCR 法の鋳型として十分な濃度の RNA 溶液を調整できた．検出法は，コンベンショナル mRT-PCR 法とリアルタイム mRT-PCR 法の 2 種類を開発した．いずれの手法も，1 本のチューブ内で逆転写反応と PCR を連続的に行うワンステップ反応系で行い，クロスコンタミネーションのリスクと人為的なミスを軽減できる．コンベンショナル mRT-PCR 法では，ウイルスの多様性を考慮し，PVS と PVY は既報の全ての系統を検出できるようにプライマーを新たに設計し，加えて内部標準として Elongation factor 1 alpha gene(*EF1α*)特異的プライマーを設計した．これらのプライマーと既報の PLRV および PVX 特異的プライマーを用い，主要な 4 種のジャガイモウイルスを同時に検出できた．簡易 RNA 調製法と組合せ時の検出感度は，ELISA 法に比べ，PLRV と PVY では 10 倍，PVX では 1,000 倍高感度，PVS は同等であり，種ばれいしょ検疫で用いるのに十分であった．

リアルタイム mRT-PCR 法は，各増幅産物を融点(Tm 値)で識別するインターカレーター法を用いて開発した．ウイルス特異的プライマーと *EF1α* 特異的プライマーは，増幅産物の Tm 値が重複しないように新たに設計した．その結果， 4 種のジャガイモウイルスを同時検出でき，各ウイルスの国内分離株は Tm 値により識別できた．国内分離株の増幅産物の Tm 値の計算値と測定値と比較したところ，強い直線的な相関(R^2 = 0.9875)があり，計算値

は十分な信頼性があった．そこで，各ウイルスの海外分離株の増幅産物の Tm 値を計算したところ，昇順に，PVY は 77.7 – 79.5，PVS は 81.0 – 82.5，PVX は 84.5 – 85.5 および PLRV は 87.0 – 87.5 となり重複していないことから，本法は海外分離株も識別できると考えられた．また，ウイルス感染葉の粗汁液の希釈系列を用いたモデル試験の結果，簡易 RNA 調製法とリアルタイム mRT-PCR による検定法は，葉 100 枚をまとめて検定するのに十分な検出感度があった．

第 2 部　ジャガイモ Y ウイルスの発生系統の解析ならびに塊茎伝搬率の解析

2016 年から 2018 年にジャガイモほ場から収集した PVY 感染葉 107 試料を解析したところ，NTN 系統が 86.0%，NA-N 系統が 7.5%，O 系統が 5.6%であった．また，国内外未報告の組換え体（JPH1806）が検出され，ゲノム解析の結果，JPH1806 は NTN 系統を主な親系統とし，NA-N 系統と O 系統の 3 系統の組換え体であることが推定された．

NTN 系統がほ場で優占している要因を解明するため，系統間の塊茎伝搬率を比較した．植付け 4 週間後に汁液接種し，感染株から収穫した塊茎を調査したところ，NTN 系統は 3 品種全てで 100%，NA-N 系統は男爵薯で 88.3%，トヨシロで 63.2%およびコナヒメで 97.9%，O 系統は男爵薯で 14.3%，トヨシロで 0%およびコナヒメで 100%の塊茎から PVY が検出された．以上より，NTN 系統の塊茎伝搬率が 3 品種全てで高かったが，NA-N 系統も比較的高い塊茎伝搬率を示した．

生育後期における塊茎伝搬率を比較するため，トヨシロを供試し，植付け 8 週後から 11 週後にかけて汁液接種した植物から収穫した塊茎を調査したところ，植付け 8 週後に NTN 系統を接種した試験区でのみ 16.7%の塊茎から PVY が検出され，それ以外の試験区の塊茎からウイルスは検出されなかった．以上より，NTN 系統は，品種に関わらず高い塊茎伝搬率を有し，かつ，生育後期の感染でも塊茎まで移行できると考えられた．

総合考察

塊茎の貯蔵期間中にウイルスの検出率が低下することから，種ばれいしょ検疫では収穫した塊茎を植付けて栽培した植物体の葉を試料としている．多数の試料を検査するため，数十枚の葉を 1 試料としてスクリーニングをし，陽性となった試料は 1 枚ずつ個別に検査してウイルス感染率を確認している．開発したコンベンショナル mRT-PCR 法とリアルタイム mRT-PCR 法は，それぞれ増副産物の断片長と融点で識別するため，両方の手法を組み合わせることで高精度にウイルスを検出できる．そのため，より多検体の検出に適したリアルタイム mRT-PCR 法でスクリーニングを行い，陽性率などの詳細な解析が必要な場合はコンベンショナル mRT-PCR 法で個別に検査することで，省力的かつ高精度にウイルスの検査ができる．

ほ場で発生する PVY 系統の解析から，国内では改めて NTN 系統が優占していることが確認された．NTN 系統が優占している要因としては，塊茎伝搬率の解析から，他の系統に比べ，ジャガイモの植物内での移行速度が早く，塊茎伝搬率が高いことが影響している可能性が示唆された．また，国内外未報告の組換え体 JPH1806 が発見されたが，NTN 系統と病原性に大きな違いは認められず，種ばれいしょ検疫においては，これまでと同様の対応で良いと考えられた．

以上，本研究で得られた技術や知見は，ジャガイモの安定生産への貢献が期待される．