



[1] ISPM 27:2006 の草稿付属書 - **Potato spindle tuber viroid** (ジャガイモやせいもウイロイド) (2006-022)

[2] 草稿履歴

[3]

本文書の日付	2013年3月20日
文書の種類	ISPM 27:2006 の新たな付属書の草稿 (規制有害動植物の診断プロトコル)
本文書の現在の段階	各国協議 (MC) のため、SC の e-decision により承認
出典	作業プログラムのトピック：ウィルス及びファイトプラズマ、CPM-2 (2007) 元のテーマ：ジャガイモやせいもウイロイド (2006-022)
主な段階	2006年5月、SC で作業プログラムにトピックを追加 2007年3月、CPM-2 で、作業プログラムにトピックを追加 (2006-002) 2012年11月、TPDP 草稿プロトコルを変更 2013年3月、各国協議 (MC) のために SC で e-decision により承認 (2013年5月10日 eSC) 2013年7月 各国協議 (MC)
専門分野の先導者歴	2008年4月 SC Gerard CLOVER (NZ) 2010年11月 SC Delano JAMES (CA)
技術レベルでの会議	本プロトコルの第1草稿は、以下の者により作成された (主執筆者及び編集チーム) <ul style="list-style-type: none"> Colin JEFFRIES (Science and Advice for Scottish Agriculture, Edinburgh, UK); Jorge ABAD (USDA-APHIS, Plant Germplasm Quarantine Program, Beltsville, USA); Nuria DURAN-VILA (Conselleria de Agricultura de la Generalitat Valenciana, IVIA, Moncada, Spain); Ana ETCHERVERS (Dirección General de Servicios Agrícolas, Min. de Ganadería Agricultura y Pesca, Montevideo, Uruguay); Brendan RODONI (Dept of Primary Industries, Victoria, Australia); Johanna ROENHORST (National Reference Centre, National Plant Protection Organization, Wageningen, the Netherlands); Huimin XU (Canadian Food Inspection Agency, Charlottetown, Canada). <p>さらに、JThJ JThJ VERHOEVEN (National Reference Centre, National Plant Protection Organization, The Netherlands) が本プロトコルの開発に大きく関わってくれた。</p> <p>草稿全体又は一部について、以下の者が意見を述べてくれた；</p> <ul style="list-style-type: none"> SL NIELSEN (Denmark); L. SEIGNER, S. WINTER, M. WASSENEGGER (Germany); H. KOENRAADT (The Netherlands); A. FOX, T. JAMES, W. MONGER, V. MULHOLLAND (UK). <p>さらに、草稿は専門家による見直しが行われ、以下の国際的専門家が意見を提出した；</p> <ul style="list-style-type: none"> Neil BOONHAM (The Food and Environment Research Agency, York, UK); Gerard CLOVER (Plant Health and Environment laboratory, Min. of

	<p>Agriculture and Forestry, Auckland, New Zealand);</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ricardo FLORES (UPV-CSIS, Universidad Politecnica, Valencia, Spain); • Ahmed HADIDI (USDA, ARA, Beltsville, USA); • Rick MUMFORD (The Food and Environment Research Agency, York, UK); • Teruo SANO (Plant Pathology laboratory, Hirosaki University, Japan); • Mathuresh SINGH (Agricultural Certification Services Inc., New Brunswick, Canada); • Rudra SINGH (Potato Research Centre, AAFC, Fredericton, Canada).
<p>診断プロトコルの開発中の主な議論点 (必要に応じ、開発中に更新)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 1.病害虫情報の文字数並びに序論及び参照の長さの削減 • 遺伝子検査は、特異性検査よりも優先して含まれるべきか • 生物学的検定、R-PAGE 及び dig プローブは含まれるべきであるか (特に生物学的検定、R-PAGE) • プライマーセット及び反応条件を公開している抽出セットを更に多く加えるべきか • 検定確認データ (更に詳しく説明すれば、その欠如) • 含めるべきコントロールは何か • RT-PCR 方法による結果の判断 • 近いうちに公開されるジェネリックリアルタイム検出方法のためにセクションを用意すべきか
<p>注釈</p>	<p>- 2013-05-07 編集</p>

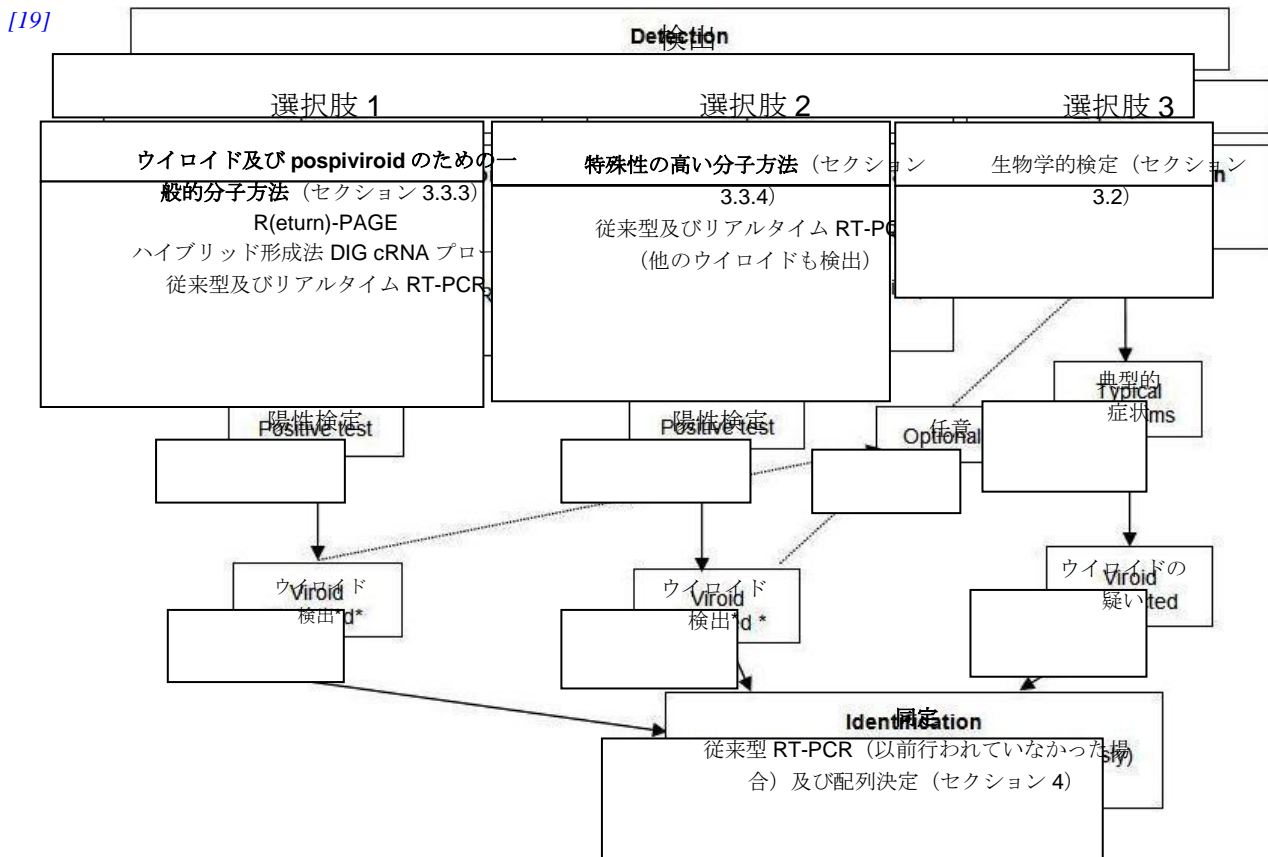
[4] 1. 有害動植物情報

- [5] ウイロイドは外殻を持たない。小さく (239 - 401 ヌクレオチド)、閉鎖鎖 RNA 分子と共有結合しており、感染宿主の中で自動複製を行うことができる (Hammond & Owens, 2006)。ジャガイモやせいもウイロイド (PSTVd ; *Pospiviroid* 属) は、一般的には長さ 359 ヌクレオチドだが、341-364 ヌクレオチドの長さのものも報告されている (Jeffries 1998、; Shamloul *et al.*, 1997; Wassenegger *et al.*, 1994)。症状が軽い株及び重症となる株の解説にあたっては、例えば *Solanum lycopersicum* (tomato) cv Rutgers といった感染度の高いトマト栽培植物で発生する症状を基準としてきた (Fernow, 1967)。
- [6] PSTVd の自然の宿主範囲は比較的狭い。主な宿主は *Solanum tuberosum* (ジャガイモ) 並びにほふく茎・塊茎を形成する *Solanum* spp. 及び *S. Lycopersicum* である。PSTVd は、*Capsicum annuum* (トウガラシ)、*Persea americana* 及び *S. Muricatum* でも発見されている。最近、PSTVd は、主にナス科の栄養繁殖をする観賞用植物種、つまり *Brugmansia* spp.、*Cestrum* spp.、*Datura* sp.、*Lycianthes rantonetti*、*Petunia* spp.、*Physalis peruviana*、*Solanum* spp. 及び *Streptosolen jamesonii* で検出されている。しかし、キク科の *Dahlia x hybrida* でも検出されている (自然宿主の詳細について知りたければ <http://www.eppo.int/DATABASES/databases.htm> でヨーロッパ地中海地域植物防疫機関 (EPPO)、植物検疫データ回復システム (PQR) で利用可能であるデータベースをダウンロード)。PSTVd の実験宿主範囲は広い。主にナス科の種類の植物への感染が見られ、また少なくともその他の 9 つの科に属するいくつかの種への感染も見られる。多くの宿主は病状を発生させることはなく、又は症状が発生することは全くない (Singh, 1973; Singh *et al.*, 2003)。
- [7] *S. tuberosum* に感染する PSTVd は、アフリカ (ナイジェリア)、アジア (アフガニスタン、中国、インド) で発見されている他に、東ヨーロッパ、北アメリカ (EPPO/CABI, 1997)、中央アメリカ (Badilla *et al.*, 1999)、中東 (Hadidi *et al.*, 2003)、及びアルゼンチン (Bartolini & Salazar, 2003) の一部で発見されている。しかしな

がら、観賞用植物及び他の宿主については、幅広い地理的分布が観察されている。

- [8] ジャガイモの場合、PSTVdがまん延する主な理由は栄養繁殖によるものである。接触によってもまん延し、主に圃場で使用する機械類又は種イモの塊茎の切断により引き起こされる (Hammond & Owens, 2006)。PSTVdがジャガイモの真正種子に感染すると、その種イモの最大100%は、感染する可能性がある (Fernow *et al.*, 1970; Singh, 1970) – また花粉にも感染することがある (Grasmick & Slack, 1985; Singh *et al.*, 1992)。De Bokx及びPirone (1981)の発表によると、アブラムシ *Macrosiphum euphorbiae* によるPSTVd感染率は低いが、*Myzus persicae* 又は *Aulacorthum solani* では感染しない。しかしながら、実験的にPSTVdを入手し、*Potato leafroll virus* (PLRV)にも感染した植物から *Myzus persicae* によりPSTVdに感染させた例が報告されている (Salazar *et al.*, 1995; 1996; Singh & Kurz, 1997)。PSTVdは最終的に、PLRVの小片中で異種キャプシド化する (Querci *et al.*, 1997)。これは疫学的に重要な説明となるかもしれない現象であり、圃場でのPSTVdまん延についても重要な含みを持つ。トマトの場合、PSTVdは接触することで容易に広まり、花粉及び種子により伝染することが証明されている (Kryczynski *et al.*, 1988; Singh, 1970;)。もし感受性のある他の植物を触る前に、感染した観賞用種を取扱った場合は、当該観賞用種が接種源として働く可能性もあり得る (Verhoeven *et al.*, 2010)。 *Apis mellifera*、 *Bombus terrestris*、 *Frankliniella occidentalis* 又は *Thrips tabaci* によるPSTVd媒介は示されていない (Nielsen *et al.*, 2012)。
- [9] PSTVdは、自然状態で *S. tuberosum* 栽培種に感染する唯一のウイロイドとして知られている。しかしながら、*Mexican papita viroid* は *Solanum cardiophyllum* の野生種に感染する (Martinez-Soriano *et al.*, 1996)。実験によると、*Pospiviroid* 属の他のウイロイド種は、*S. tuberosum* に感染する (Verhoeven *et al.*, 2004)。PSTVdに加え、自然状態での *S. Lycopersicum* に感染するウイロイドには以下を含む: *Citrus exocortis viroid* (CEVd; Mishra *et al.*, 1991)、 *Columnnea latent viroid* (CLVd; Verhoeven *et al.*, 2004)、 *Mexican papita viroid* (MPVd; Ling & Bledsoe, 2009)、 *Tomato apical stunt viroid* (TASVd; Walter, 1987)、 *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd; Singh *et al.*, 1999) 及び *Tomato planta macho viroid* (TPMVd; Galindo *et al.*, 1982)。
- [10] 2.分類学上の情報
- [11] 名前: *Potato spindle tuber viroid* (頭字語 PSTVd)
- [12] シノニム: potato spindle tuber virus、 potato gothic virus
- [13] 分類学上の位置: *Pospiviroidae*, *Pospiviroid*
- [14] 一般名: potato spindle tuber
- [15] 3.検出
- [16] 症状の現れ方と重症度はPSTVdの株、品種及び環境により異なる。*S. tuberosum* の場合、寄生は無病徴であるか、又は軽いものから重度のもの(植物のサイズが縮小し、上部から植物を見た場合葉が直立状態で右回りの葉序となる;濃緑でしわの多い葉)まで多様な病徴が現れるかもしれない。塊茎の大きさは縮小し、形が損なわれ、紡錘又はダンベル状の形となり、芽が等しい長さで顕著に伸びることが観察される (EPPO, 2004)。*S. lycopersicum* では、症状には発育阻害、上偏生長、多皺、新葉の横へのねじれ、葉の萎黄病、赤み、粉碎、壊死、果実の大きさの縮小が見られ、果実が完熟することはない。(Hailstones *et al.*, 2003; Lebas *et al.*, 2005; Mackie *et al.*, 2002)。*C. Anuum* の場合、症状は軽く、植物の上近くの葉の端は、波のように縮まっている (Lebas *et al.*, 2005)。観賞用植物種では、症状は見られない (Verhoeven 2010)。
- [17] PSTVdは無症状である場合もあることから、検定にはPSTVdの検出及び同定が必要となる。PSTVdの検出は、図1で選択肢として説明されている生物学検定及び分子検定により行われる。しかし、これらの検定はPSTVdに特化したものではなく他のウイロイドも検出するであろうことから、同定にはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)産物/アンプリコンの配列決定が行われなければならない。配列決定は、偽陽性の報告を防ぐことにも役立つだろう。病原性が重要だと考えられるならば、生物学的指標が行われ得る。ある国で初めてPSTVd同定が行われる場合、その国の研究所は、他の研究所にその診断を確認するよう要望してもよい。

[18] 全ての検定において、偽陽性又は偽陰性結果のリスクを最小限にするため、適切なコントロールを含むべきである。



*特定の状況下、例えば PSTVd 異常発生を扱う場合などは、全てのウィロイド検出が同定が必要となるわけではない。

注釈：サンプル内にウィロイドの疑い（つまり典型的症状がある）があるが検定の結果陰性となるならば、結果の確認のために別の検定方法が実施されるべきである。

図 1. *Potato spindle tuber viroid* の検出及び同定のための最低要件

[20] 検出及び同定方法を選択する時には他のウィロイドの存在を考慮すべきである。本プロトコルは、ポスピウイロイド及び PSTVd（加えて非常に近い関係の他のウィロイド）等の既知のウィロイド全てを検出する非特異的方法を解説している。PCR 産物の配列を決定することにより同定が行われる。

[21] 本診断プロトコルでは、検定方法（銘柄名の参照を含める）は発表された通りに記載している。これは、これらの方法が実現した感度、特異性又は再現性のオリジナルのレベルを規定しているためである。本基準で解説されているプロトコルは、研究所が採用する他のプロトコルが適切に有効性を確認されているならば、それらの他のプロトコルが不適切であることを意味するものではない。推奨される植物診断の妥当性確認方法は、EPPO（2010）により発表されている。

[22] 3.1 サンプリング

[23] サンプリング方法の全般的ガイダンスは、ISPM 31:2008、積荷サンプリングのための方法で規定されている。

- [24] ***S. tuberosum* のマイクロプランツ及び温室で栽培された *S. tuberosum* 植物** マイクロプランツの場合、その植物全体をサンプルとして使用すべきである。又は上部 2/3 を、無菌状態でサンプルとすべきである。これにより、その他の部分は続けて生長することができる。マイクロプランツは 4-6 週間のもので、茎の長さは約 5 cm、葉の形が非常に良いものを選ぶべきである。温室栽培植物の場合、各植物から取られた完全に広がった小葉が使用されるべきである。ウイロイドの密度は温度及び光の程度により影響されるので、出来るならば、温度 18°C 以上、光周期 14 時間以上という環境で栽培すべきである。マイクロプランツ又は葉をひとまとめにする（バルキング）こともできる。バルキング率は、検定方法により異なる。バルキング率は有効なものでなければならない。
- [25] **圃場で生長した *S. tuberosum* 植物** 各植物の頂部から取られた、末端にある老化していない小葉が使用されるべきである。検定のために葉をひとまとめにする（バルキング）こともできる。ひとまとめにする際の割合は検定方法により異なる。バルキング率は、有効なものでなければならない。
- [26] ***S. tuberosum* の塊茎** PSTVd は感染した *S. tuberosum* の塊茎に全体的に広がる。つまり“芽”、皮層部分、皮層柔組織を含んだ皮質部分、外部師部組織、リング状木部、内部師部と師部柔組織ストランド組織を含めた髓辺縁部、髓辺縁部のデンプン貯蔵柔組織及び髓に広がる。（Shamloul *et al.*, 1997）。一次感染した塊茎及び二次感染した塊茎両方の異なる部分にも、ほぼ同じ程度発生する（Roehorst *et al.*, 2006）、つまり、頂部及び他部分の芽、基部底、皮片及び塊茎全体の実の芯部分に発生する。収穫直後に最も密度が高くなり、4°C で最大 3 ヶ月保存しても密度はほとんど低下しない。収穫後 4°C で 6 ヶ月保存すると、密度は 10^4 倍以上低下することがある。塊茎のあらゆる部分から芯を取り出してサンプルとして使用することができる（塊茎のどの部分でもよい）。リアルタイム逆転写（RT-）PCR 法を行う場合は、抽出のために、それぞれ 50 mg の小さな芯を最大 100 までまとめることができる。他の方法のためのバルキングも有効とするべきである。
- [27] **他の作物及び観賞用植物種の葉** 完全に広がった若い葉由来のサンプルを使用する。*Brugmansia* spp. の場合、葉液が検定植物の接種に適切ではないので、代わりに根を使用するべきである。
- [28] **種子** ウイロイド密度は種ごとに大きく異なり、感染程度は 100% から 5% 未満までの差を持つ場合がある。このため、推奨される最大バルキング率の決定は難しいものとなっている。*S. lycopersicum* の場合、検体サンプルとなる 1000-3000 の種子につき、100-1000 のバルキング率が使用されている（EUPHRESCO, 2010）。国によっては、検体サンプルの 20000 種子について 400 種子というバルキング率が使用されている（H Koenraadt, Naktuinbouw, The Netherlands, personal communication, 2012）。
- [29] 種子はトレーのコンポストに蒔かれたものでもよく、苗は破壊検査又は非破壊検査いずれでも構わない。
- [30] **3.2 生物学的検出**
- [31] *S. lycopersicum* 植物の接種（cvs Rutgers、Moneymaker 又は Sheyenne）を行うと多くのウイロイドが検出されるが、ポスピウイロイド *Iresine viroid 1*（IrVd-1）等特定のウイロイドは検出できない。この方法は感度が高く、結果は反復及び再現が可能なものであり、視覚的な病原性の証拠が観察され得る。しかしながら、症状がないために分離物からは検出不可能な場合があり、症状が見られる場合であっても、PSTVd と診断されることはないかもしれない。さらに、生物学的指標作成には相当な広さの温室を必要とすることがある。労働集約的な作業であり、検定完了までに、数週間又はそれ以上を必要とすることがある。この方法の感度と本プロトコルで定める他の方法の感度とを比較する研究が行われたことはない。
- [32] 約 200-500 mg の葉又は塊茎組織を、カーボランダム（400 mesh）を含むリン酸塩接種緩衝液（希釈率 1:1 が適切）わずか 0.1M の中で粉碎する。リン酸塩緩衝液の作成は、80.2 ml の 1M K_2HPO_4 を 19.8 ml の 1M KH_2PO_4 に加え、量が 1 リットルになるように、蒸留水で調節する。
- [33] 1 又は 2 枚の完全に開いた葉を持つ若いトマトに接種する。接種材料に浸した手袋をはめた指又は綿棒を使用して葉の表面を接種材料でやさしく拭い、その後直ちにカーボランダムが除去されるまで、葉を水ですすぐ。

植物は 25-39°C、光周期 14 時間下で栽培される。必要であれば、照明を補う（約 650 uE/m²/s；Grassmick & Slack, 1985）。症状を見つけるため、接種後、最長 6 週間、毎週植物を検査する。PSTVd の症状には発育障害、上偏生長、多皺並びに新葉の横へのねじれ、葉の白化、赤化、脆弱化及び壊死がある。

- [34] トマトの生物学的検定は、多くのポスピウイロイドを検出することができるため、RT-PCR は、症状を示す植物から抽出した核酸を使用して行われるべきである。PCR 産物は、同定のために配列決定されるべきである。
- [35] **3.3 分子検出**
- [36] **3.3.1 組織の浸軟**
- [37] **マイクロプランツ、葉素材及び根** すり鉢及びすりこぎ又は抽出バッグ付きのホモジナイザー（例、Homex 6、Bioreba）¹ を使用して、物体をきれいに粉砕する。少量の水、溶解抽出緩衝液又はサンプルを凍結したもの（例、液体窒素内で）を加えると、均等化をうまく行える。
- [38] ***S. tuberosum* 塊茎** 塊茎の芯を、水又は溶解緩衝液の中で完全に均等化する（塊茎芯 1 g 当たり 1 ml）。抽出バッグ付きの Homex 6 といった粉砕機を使用すると、うまく均等化できる。水又は溶解緩衝液を加える前に芯を凍結させる（例、-20°C）と、均等化をうまく行える。
- [39] **種子** 少量の種子 (<100) の場合、組織溶解液（例、Retsch TissueLyser, Qiagen²）を使用できる。すり鉢とすりこぎを使用してもよいが、通常の使用には現実的ではなく、二次汚染を制御することが難しくなるであろう。多量の種子の場合、最初の均等化には、抽出緩衝液を最低量にして、パドルブレンダー（例、MiniMix[®], Interscience）³ 又はホモジナイザー（例、Homex 6）が使用され得る。他に、サンプル凍結のために液体窒素を使用し、細胞粉砕機で粉砕する方法がある（この方法は、他の種類の組織にも使用できる）。
- [40] **3.3.2 核酸抽出**
- [41] 市販キットを使用する方法から科学誌に掲載されている方法まで、核酸抽出には様々な方法がある。以下の核酸抽出方法は、それぞれの方法について解説される通りに行われ、PSTVd 検出に成功してきた。
- [42] **市販キット RNeasy[®] (Qiagen)⁴ 及び MasterPure[™] (Epicentre Biotechnologies)⁵** 等の市販の抽出キットを使用する際は、製造会社の説明に従う。RNeasy[®] は、EUPHRESKO DEP プロジェクトの一部として、*S. lycopersicum* の種からの PSTVd RNA 抽出に関して評価されている（EUPHRESKO, 2010）。
- [43] **溶解緩衝液** Mackenzie *et al.* (1997) が説明する方法で調整された抽出溶解緩衝液が使用可能。様々な種の植物から、質のよい RNA を抽出する。
- [44] **EDTA 緩衝液** 簡単な抽出緩衝液（50 mM NaOH、2.5mM エチレンジアミン四酢酸（EDTA））で植物組織を均等化することも可能である。その後、培養（約 25°C で 15 分）又は遠心分離（12000g で 4°C で 15 分間）が行われる。その後、必要な感度のレベルにより、浮遊物は RT-PCR のために直接使用される（感度が低い場合）。又は、ニトロセルロース膜に点在させ、滅菌蒸留水を使用して溶出される（感度が高い場合）（Singh *et al.*, 2006）。規定される他の抽出方法と比較すると、EDTA 法によるウイロイド密度は低いが、この方法が RT-PCR 又はジゴキシゲニン(DIG)プローブとともに使用される場合は、限定因子となるべきではない。この方法は *S. lycopersicum* 及び *S. tuberosum* 並びに様々な観賞用植物種で使用される。
- [45] **ツーステップ PEG 抽出法** ポリエチレングリコール（PEG）を用いるこの抽出法（EPPO, 2004）では、様々な種類の植物（例えば葉、ジャガイモ塊茎等）の種類の組織用に、本プロトコルで規定されるリターン（R-）ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）、DIG ジゴキシゲニン-RNA プローブ及び従来型 RT-PCR と共に

組み合わせて利用されてきた。

- [46] **CTAB** セチルトリメチルアンモニウム臭化物 (CTAB) を使用するこの抽出法 (EPPO, 2004) は、多様な種類の植物の葉及びトマトの種子を使用して、リアルタイム RT-PCR で利用されてきた。
- [47] **KingFisher (ThermoScientific⁶)** 以下に示す自動方法は、KingFisher mL Magnetic Particle Processor の使用を前提としている。量を適切に加減すれば、他の KingFisher モデルも使用できる。この抽出方法は、様々な種類の植物の葉、*S. tuberosum* の塊茎及び *S. lycopersicum* の種子に使用されてきた。この方法は本基準に規定される RT-PCR 法で使用されてきた。KingFisher モデルを使用すると、本プロトコルに規定されている他の抽出方法よりもサイクル閾値 (Ct) は、高いものとなるかもしれない。しかし、サンプル量の増加により、有益な抽出方法とされている。抽出緩衝液 (EB) の製法は、200 µl の 8.39% w/v-テトラリン酸ソーダ (TNaPP) 溶液 (pH 10.0-10.9) 及び 100 µl の Antifoam B Emulsion (AB) (Sigma)⁷ を、9.8 ml のグアニジン溶液緩衝液 (GLB) に加える。GLB は、以下のものから成り立つ：水、750 ml；純粋エタノール、250 ml；グアニジン-HCl、764.2 g；脱水ジナトリウム EDTA、7.4 g；ポリビニルピロリドン (PVP)、30.0 g；クエン酸一水和物、5.25 g；クエン酸三ナトリウム、0.3 g；TritonTM-X-100、5 ml。GLB は保存可能 (無期限)。EB を 4°C で保存し、使用されていないものは、その日の終わりに処分する。
- [48] 各サンプルにつき、200 mg 以上の葉若しくは塊茎組織又は 100 以下の種子を浸軟し、その後 EB を植物組織 1g につき緩衝液 10 ml、又は種 1 g につき緩衝液 20 ml の割合で直後に加えられる。浸軟は、最小の完全な組織片を持つきれいな細胞溶解物を得るまで続けられる。
- [49] 約 2 ml の溶解物を新鮮なマイクロ遠心分離チューブに移す。チューブを約 5000 g で、1 分間遠心分離する。1 ml の上澄みを取り除き、KingFisher MI ラックの第 1 チューブ (A) に加える。50 µl の渦状 Map 溶剤 A 磁性粒子 (Invitek/Thistle Scientific)⁸ が加えられる。1ml の GLB はチューブ B に、1 ml の 70% エタノールはチューブ C 及び D に加えられる。200 µl の水又は 1 x Tris-EDTA (TE) 緩衝液をチューブ E に加える。
- [50] チューブを繋げて KingFisher mL の中に入れる。プログラム (表 1 参照) を実行させる。20 分後、機械を停止させ加熱段階に入る。チューブストリップを 65-70°C のオープンに 5 分間入れ、その後 KingFisher mL に戻し、プログラムを再開させる。他のモデルの中には、加熱又は蒸発継続段階が含まれているものがある。
- [51] 完了したら溶出した核酸を新しい微量遠心機チューブに移し、-20°C から -80°C の間で保存する。

[52] 表 1. Kingfisher 磁性粒子プロセッサー用のプログラム

[53]

Plate layout Default: Plate type = KingFisher tubestrip 1000 µl; Plate change message = Change Default

A: volume = 1000, name = Cell lysate or tissue homogenate; volume = 50, name = Magnetic particles;

B: volume = 1000, name = Washing buffer 1 (Various) ; C: volume = 1000, name = Washing buffer 2 (Various) ;

D: volume = 1000, name = Washing buffer 3 (Various) ; E: volume = 200, name = Elution buffer (Various)

STEPS COLLECT BEADS Step parameters: Name = Collect Beads; Well = A, Default; Beginning of step: Premix = No; Collect parameters: Collect count = 1. BIND Step parameters: Name = Lysing, Well = A, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 1min 0s, speed = Fast dual mix; Bind parameters: Bind time = 4min 0s, speed = Slow; End of step: Collect beads = No. BIND Step parameters: Name = Lysing, Well = A, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 1min 0s, speed = Fast dual mix Bind; Bind parameters: Bind time = 4min 0s, speed = Slow; End of step: Collect beads = No. BIND Step parameters: Name = Lysing, Well = A, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 1min 0s, speed = Fast dual mix; Bind parameters: Bind time = 4min 0s, speed = Slow; End of step: Collect beads = Yes, count = 4. WASH Step parameters: Name = Washing, Well = B, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 0s, speed = Fast; Wash parameters: Wash time = 3min 0s, speed = Fast dual mix; End of step: Collect beads = Yes, count = 3. WASH Step parameters: Name = Washing, Well = C, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 0s, speed = Fast; Wash parameters: Wash time = 3min 0s, speed = Fast dual mix; End of step: Collect beads = Yes, count = 3. WASH Step parameters; Name = Washing, Well = D, Default; Beginning of step: Release =

Yes, time = 0s, speed = Fast; Wash parameters: Wash time = 3min 0s, speed = Fast dual mix; End of step: Collect beads = Yes, count = 3. ELUTION Step parameters: Name = Elution, Well = E, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 10s, speed = Fast; Elution parameters: Elution time = 20s, speed = Bottom very fast; Pause parameters: Pause for manual handling = Yes, message = Heating, Post mix time = 30s, speed = Bottom very fast; Remove beads: Remove beads = Yes, collect count = 4, disposal well = D

[54] **3.3.3 ポスピウイロイド検出用の一般的分子法**

[55] **3.3.3.1 R-PAGE (EPPO, 2004)**

[56] R-PAGE は、PSTVd に感染した *S. tuberosum* の葉の検出方法として推奨されてきた (EPPO, 2004)。しかし、他の分子方法よりも感度は低いと評価されている。研究所によっては、他の方法では、少なくとも感染した葉の組織のうち、15.5 µg を検出する (検定された最低重量) のに対し、R-PAGE では PSTVd に感染した葉の組織のうち 5-20 mg に等しい量を検出 (基準量の健康な葉の組織と混合した場合) する。PSTVd を検出した研究所の 75 パーセントでは、結果は反復可能であり、多くは再現可能である (Jeffries & James, 2005)。

[57] この方法は、例えば *C. annuum*、*S. tuberosum* (塊茎)、*S. lycopersicum* 等他の宿主植物について用いられ、成功してきた。感度が低いため、サンプルバルクを確認する必要がある。

[58] R-PAGE は知られている全てのポスピウイロイドを検出する。このため、PSTVd の同定のため、核酸に RT-PCR を行い、その後 PCR 産物の配列決定が行われなければならない。

[59] **3.3.3.2 DIG で標識した cRNA プローブ混成**

[60] この方法は *S. tuberosum* の葉に感染させた PSTVd 検出に推奨されてきた (EPPO, 2004)。*S. tuberosum* の PSTVd 検出の感度は、PSTVd に感染した葉の組織のうち 15.5 µg 以上 (最低重量検定) であり、これは PSTVd の 17 pg と等しい (Jeffries & James, 2005)。結果は反復可能でありほぼ再現可能であるが、この方法を評価した 9 つの研究機関は全て PSTVd を検出したが感度のレベルは異なっていた。ほとんどの研究機関は 0.25-0.5 mg の感染した葉の組織を検出した。他の宿主についての検定結果は、*Petunia spp.*、*Solanum jasminoides*、*S. lycopersicum* 及び *S. tuberosum* (塊茎) を含めてうまく行うことができた。

[61] この標識 cRNA プローブ法は、以下のウイロイドを検出する：*Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd)、CEVd、CLVd、IrVd-1、MPVd、PSTVd、TASVd、TCDVd 及び TPMVd (T James, Science and Advice for Scottish Agriculture (SASA), UK, personal communication, 2010)。Pepper chat fruit viroid (PCFVd) は、ポスピウイロイド種に新しく加えることが提案されている。(Verhoeven *et al.*, 2009)、この方法によっても検出されている (T James, SASA, UK, personal communication, 2010)。

[62] 使用するプローブは、Agdia Inc.⁹ 製作の PSTVd のフルレンジスモノマーを基にしている (Cat. No. DLP 08000/0001)。プローブは製造会社の説明に従って使用すべきであり、又はこの方法の詳細は EPPO (2004) を参照すべきである。Ames 緩衝液 (EPPO 2004) に加え、PEG 及びその他の抽出緩衝液も核酸抽出のために使用できる。

[63] PSTVd 同定には、従来型 RT-PCR を行い、その後 PCR 産物の配列を決定すべきである。

[64] **3.3.3.3 Verhoeven *et al.* (2004) のプライマーを使用する従来型 RT-PCR**

[65] この検定では Verhoeven *et al.* (2004) による Pospi 1 及び Vid プライマーを使用する。Pospi 1 プライマーは CEVd、CSVd、IrVd-1、MPVd、PCFVd、PSTVd、TASVd、TCDVd 及び TPMVd を検出する。Vid プライマー

は PSTVd、TCDVd、さらに CLVd を検出する。2つの異なる反応で Pospi プライマー及び Vid プライマーを使用することで、全てのポスピウイロイドを検出する。プライマー標的部位の重要な位置で不適当な配列があると、分離検出を妨げることがあるかもしれない(例、これらのプライマーを使用すると、CLVd 分離を検出できない; Steyer *et al.*, 2010)。コンピュータによる研究では、重要な位置でのプライマー/配列が不適切であるため、以下の PSTVd 分離は検出されないかもしれないと証明された: *Pospi 1* プライマー: EU879925、EU273604、EF459697、AJ007489、AY372398、AY372394、FM998551、DQ308555、E00278。Vid プライマー: EU273604¹⁰。PSTVd 検出に関しては、*Pospi 1* プライマーの方が Vid プライマーよりも感度がよい。

[66] プライマー

[67] *Pospi1*-forward (F): 5'-GGG ATC CCC GGG GAA AC-3' (nucleotide (nt) 86-102)

[68] *Pospi1*-reverse (R): 5'-AGC TTC AGT TGT (T/A)TC CAC CGG GT-3' (nt 283-261)

[69] Vid-F: 5'-TTC CTC GGA ACT AAA CTC GTG-3' (nt 355-16)

[70] Vid-R: 5'-CCA ACT GCG GTT CCA AGG G-3' (nt 354-336)

[71] 様々な RT-PCR キットや反応条件が利用されるであろうが、それらは、関連するポスピウイロイド全てを検出することができ、意図する目的に合うことをチェックし、妥当性を確認するべきである。

[72] 反応条件

[73] The Qiagen¹¹ OneStep RT-PCR キットは、PSTVd、CEVd、CLVd、CSVd、TASVd 及び TCDVd の検出 (EUPHRESCO, 2010) 並びに本セクションの始めに挙げられている他のポスピウイロイドの検出 (T James, (SASA), UK, personal communication, 2010) に信頼性があると証明されている。EUPHRESCO (2010) に規定されている Q-solution を使用する必要はない。

[74] 2 マイクロリッターの鋳型を 23 µl のマスターミックスに加える。マスターミックスの内容は、順方向及び逆方向御それぞれに 1.0 µl のプライマー (10 µM)、5 µl の 5 × Qiagen OneStep RT-PCR 緩衝液、1.0 µl の Qiagen OneStep RT-PCR 酵素ミックス、1.0 µl dNTPs (各 dNTP 10 mM)、14 µl の水。サーモサイクリングプログラムは以下のとおり: 50°C で 30 分; 95°C で 15 分; 94°C で 30 秒、62°C で 60 秒、72°C で 60 秒を 35 サイクル。最後の延長段階では 72°C で 7 分。

[75] ゲル電気泳動

[76] RT-PCR の後で、PCR 産物 (*Pospi* と Vid それぞれについて約 197 bp と 359 bp) を、ゲル電気泳動 (アガロースゲル 2%) で解析すべきであり、ウイロイド種の同定のために、正しいサイズの PCR アンプリコンの配列を決定されるべきである。実際には、197 bp の産物を配置決定すると、完全なウイロイドゲノムの配列決定のように、識別結果は常に同じである。

[77] 3.3.3.4 GenPospi 検定(Botermans *et al.* (2013))を使用するリアルタイム RT-PCR 反応

[78] GenPospi 検定は、ポスピウイロイド属の知られている全ての種を検出するために TaqMan®リアルタイム RT-PCR 法を利用する。2つの反応が同時進行する; 1つ (反応ミックス 1) は CLVd 以外のポスピウイロイド全てを目的とする (Botermans *et al.*, 2013); もう 1つ (反応ミックス 2) は、特に CLVd を目的とする (Monger *et al.*, 2010)。RNA 抽出を観察するために、植物ミトコンドリアの mRNA (ミトコンドリア NADH デヒドロゲナーゼ遺伝子) を増幅するための Menzel *et al.* (2002) が開発したプライマーを基にした *nad5* 内部コントロールが含まれている。GenPospi 検定は最大で 0.13% の相対感染率 (希釈率 770 倍と等しい) で全ての Pospiviroid を検出することが、トマトの葉について行われた反応方法の有効性確認で証明された。植物宿主から採取した

他のウイロイド、ウイルス又は核酸についての二次反応は観察されなかったことから、この検定は特異性のあるものであった。反復性及び再現性は 100%であり、この分析は研究機関間で比較しても説得力あるものようである。GenPospi 分析は、知られている全てのポスピウイロイドに対する大規模なスクリーニングを行うにあたって、ふさわしい方法であることが証明されている。トマトの葉に対しての有効性は知られているが、あらゆる穀物にも使用できる可能性がある。

[79] プライマー

[80] TCR-F 1-1: 5'-TTC CTG TGG TTC ACA CCT GAC C-3' (Botermans *et al.*, 2013)

[81] TCR-F 1-3: 5'-CCT GTG GTG CTC ACC TGA CC-3' (Botermans *et al.*, 2013)

[82] TCR-F 1-4: 5'-CCT GTG GTG CAC TCC TGA CC-3' (Botermans *et al.*, 2013)

[83] TCR-F PCFVd: 5'-TGG TGC CTC CCC CGA A-3' (Botermans *et al.*, 2013)

[84] TCR-F IrVd: 5'-AAT GGT TGC ACC CCT GAC C-3' (Botermans *et al.*, 2013)

[85] TR-R1: 5'-GGA AGG GTG AAA ACC CTG TTT-3' (Botermans *et al.*, 2013)

[86] TR-R CEVd: 5'-AGG AAG GAG ACG AGC TCC TGT T-3' (Botermans *et al.*, 2013)

[87] TR-R6: 5'-GAA AGG AAG GAT GAA AAT CCT GTT TC-3' (Botermans *et al.*, 2013)

[88] CLVd-F: 5'-GGT TCA CAC CTG ACC CTG CAG-3' (Monger *et al.*, 2010)

[89] CLVd-F2: 5'-AAA CTC GTG GTT CCT GTG GTT-3' (Monger *et al.*, 2010)

[90] CLVd-R: 5'-CGC TCG GTC TGA GTT GCC-3' (Monger *et al.*, 2010)

[91] nad5-F: 5'-GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3' (Menzel *et al.*, 2002)

[92] nad5-R: 5'-CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3' (Menzel *et al.*, 2002)

[93] プローブ

[94] pUCCR: 6FAM-5'-CCG GGG AAA CCT GGA-3'-MGB (Botermans *et al.*, 2013)

[95] CLVd-P: 6FAM-AGC GGT CTC AGG AGC CCC GG-3'-BHQ1 (Monger *et al.*, 2010)

[96] nad5-P: VICr-AGG ATC CGC ATA GCC CTC GAT TTA TGT G-3'-BHQ1 (Botermans *et al.*, 2013)

[97] 2つの反応混合物は、TaqMan® RNA-to-CT™ 1-ステップキット (Applied Biosystems) ¹²を基にしている。

[98] 反応混合物 1 (CLVd + nad5 を除く全ての Pospiviroid)

[99] 反応混合物は、12.5 µl の 2× TaqMan® RT-PCR 混合物、0.6 µl の 1× TaqMan® RT 混合酵素、0.75 µl (10 µM) 順方向プライマー(TCR-F 1-1、TCR-F 1-3、TCR-F 1-4、TCR-F IrVd、TCR-F PCFVd 及び nad5-F)並びに逆方向プライマー(TR-R1、TR-R CEVd、TR-R6 及び nad5-R) (最終濃度はそれぞれ 0.3 µM)、0.25 µl (10 µM) TaqMan®プローブ pUCCR (最終濃度 0.1 µM) 及び 0.5 µl (10 µM) TaqMan®プローブ nad5-P (最終濃度 0.2 µM)。分子生物学用水及び 2 µl の RNA 鋳型を最終量 25 µl に加える。

[100] 反応混合物 2 (CLVd + nad5)

- [101] 反応混合物の内容は 12.5 µl の 2× TaqMan® RT-PCR ミックス、0.6 µl の 1× TaqMan® RT 酵素ミックス、0.75 µl (10 µM) の順方向プライマー (CLVd-F、CLVd-F2 及び nad5-F) 並びに逆方向プライマー (CLVd-R 及び nad5-R) (最終濃度はそれぞれ 0.3 µM)、0.25 µl (10 µM) の TaqMan® プローブ CLVd-P (最終濃度 0.1 µM)、0.5 µl (10 µM) の TaqMan® プローブ nad5-P (最終濃度 0.2 µM)。分子生物学用水及び 2 µl の RNA 鋳型を最終量 25 µl に加える。
- [102] それぞれの反応混合物に対するサーモサイクリング条件は：48°C で 15 分、95°C で 10 分。その後 (95°C で 15 秒及び 60°C で 1 分) のサイクルを 40 サイクル繰り返す。
- [103] この方法では、Botermans *et al.* (2013) は、cycle threshold (Ct) の数値が 32 以下であれば陽性、32 から 37 未満であれば疑わしく、確認を必要とし、値が 37 以上であれば陰性であると判断した。しかしながら、これらの数値は各研究機関で決定する必要がある。
- [104] **3.3.4 特異性の高い分子方法による PSTVd 検出**
- [105] **3.3.4.1 Shamloul *et al.* (1997) のプライマーを使用する従来型 RT-PCR**
- [106] この分析で使用される RT-PCR プライマーは、Shamloul *et al.* (1997) によるものであり、これはまた Weidemann 及び Buchta (1998) によっても説明されている。このプライマーは MPVd、PSTVd、TCDVd 及び TPMVd を検出する。コンピュータによる研究では、重要な位置でのプライマー / 配列不適合のため、以下の PSTVd 分離物は検出されない可能性があることが証明された：AY372394、DQ308555、逆方向プライマーにおける EF459698²。
- [107] **プライマー**
- [108] 3H1-F : 5'-ATC CCC GGG GAA ACC TGG AGC GAA C -3' (nt 89-113)
- [109] 2H1-R : 5'-CCC TGA AGC GCT CCT CCG AG -3' (nt 88-69)
- [110] **方法1 (Platinum Taq を使用する Invitrogen¹³ SuperScript® I ステップ RT-PCR)**
- [111] それぞれの反応用に、1 µl の鋳型 RNA を 24 µl のマスターミックスに加える。マスターミックスの内容は：順方向逆方向各プライマー 7 µl (15 µM)、12.5 µl の 2 x 反応緩衝液、0.5 µl の RT/Platinum® Taq、及び 7.6 µl の水。サーモサイクリングプログラムは以下の通り：43°C で 30 分、94°C で 2 分、10 x (94°C で 30 秒、68°C で 90 秒、72°C で 45 秒)、20 x (94°C で 30 秒、64°C で 90 秒、72°C で 45 秒)、72°C で 10 分、20°C で 1 分。
- [112] **方法2 (2 ステップ RT-PCR)**
- [113] 2 ステップ RT-PCR を利用すると、*S. tuberosum* 中の PSTVd 検出感度は、感染した葉の組織に存在する PSTVd の少なくとも 15.5 µg である。しかし、達成される感度は研究機関により異なり、多くの研究期間は感染した葉の組織で少なくとも 62 µg の PSTVd を検出している (Jeffries & James, 2005)。方法 2 の解説は、EPPO (2004) を参照。
- [114] RT-PCR 実施後、PCR 産物 (約 360 bp) は解説通りにゲル電気泳動により分析される。正しいサイズの PCR アンプリコンは、ウイルス種同定のために配列される。
- [115] *nad5* を使用する内部標準分析 (Menzel *et al.*, 2002) は、単一 (個別の) 反応についての分析に使用されてきた (Seigner *et al.*, 2008)。プライマーは最終濃度 0.2 µM で使用される。アンプリコンの長さは 181 bp である。
- [116] *nad5* sense: 5'-GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT -3' (nt 968-987 and 1836-1838)
- [117] *nad5* antisense: 5'-CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA-3' (nt 1973-1995)

[118] 3.3.4.2 リアルタイム RT-PCR

[119] この分析で使用されるプライマーとプローブは、Boonham その他 (2004) により解説されている。しかしながら、この分析も、公開されているリアルタイム分析も、特に PSTVd を同定するものではない。リアルタイム PCR により陽性の結果となった場合、ウイロイドの同定は、従来型 RT-PCR 及び配列により決定される。

[120] この方法で PSTVd、MPVd、TCDVd 及び TPMVd を検出する。CTAB 抽出法では、*S. tuberosum* に存在する PSTVd 検出感度は、PSTVd 感染葉組織 15.5 µg 以上となる (検定での、最も低い重量)。これは、17 pg の PSTVd と等しい (Jeffries & James, 2005)。変種 PSTVd と合成オリゴヌクレオチドの分析により、この方法は、知られている全ての配列の種類を検出することが証明されている。これらはコンピュータ解析により、検出失敗の可能性のあるプライマー/配列不適合であるとされた。(Boonham *et al.*, 2005)。しかしながら、Owens *et al.* (2009) により最近解説された IR-06/7L 及び VIR-06/10L という異なる分離物については、プローブ固定位置へ塩基を追加挿入するため、検出されない可能性がある (W Monger, SASA, UK, personal communication, 2011)。

[121] プライマー

[122] PSTV-231-F: 5'-GCC CCC TTT GCGCTG T-3' (nt 232-247)

[123]

[124] PSTV-251T: FAM-5'-CAG TTG TTT CCA CCG GGT AGTAGC CGA-3' TAMRA (nt 278-252)

[125] 内部コントロール COX プライマーは、植物ミトコンドリアで発見される *cytochrome oxidase 1* 遺伝子を増幅する (Weller *et al.*, 2000)。

[126] COX-F: 5'-CGT GCG ATT CCA GAT TAT CCA-3'

[127] COX-R: 5'-CAA CTA CGG ATA TAT AAG RRC CRR ACC TG-3'

[128] COXsol-1511T: VIC-5'-AGG GCA TTC CAT CCA GCG TAA GCA -3' TAMRA

[129] 反応混合物は 96 ウェルプレート用であり、EPPO 法を改良したものである (EPPO, 2004)。これは、ウイロイド及び COX 検出のための二重反応並びにウイロイド検出のための単一反応を組み入れるためである (Roehorst *et al.* 2005)。

[130] 反応混合物の内容: 13.75 µl の水、25 µl の 2x マスターミックス (Applied Biosystems)¹⁴、1.25 µl の 40x MultiScribe™ (Applied Biosystems)、PSTV231F プライマーと PSTV296R プライマー (10 µM) それぞれを 1.5 µl、1.0 µl の PSTV251T プローブ (5 µM)。この反応混合物は 22 µl ずつ等しく二等分され、パート A 及びパート B となる。2 マイクロリッターの水を A に加える。各 COX プライマー (10 µM) を 0.75 µl、プローブ COXsol1511T (5 µM) を 0.5 µl を B に加える。1 マイクロリッターの RNA 対象物を A と B それぞれに加え、反応プレートの各ウェル用に、25 µl の最終反応混合物を作る。反応混合物 A を使用すると PSTVd が検出され、反応混合物 B を使用すると二重反応により、PSTVd 及び COX が検出される。

[131] サーマサイクリング条件は 48°C で 30 分、95°C で 2 分、(95°C で 15 秒、60°C で 1 分) を 40 サイクル。

[132] 3.4 分子検査のためのコントロール

[133] 信頼性のある検査結果を得るために、適切なコントロール—これは使用される検定の種類と要求される確実性のレベルによって変わる—が重要である。核酸分離及び対象有害動植物又は対象核酸の増幅の各回において、以下のコントロールを考慮すべきである。RT-PCR については、陽性核酸コントロール、内部コントロール及び陰性増幅コントロール (鋳型コントロールではない) を最低限使用するべきである。

[134] **陽性核酸コントロール** 調合前 (保存してあるもの) のウイロイド核酸、DNA を増幅したゲノム全体又は検出に使用されたものと同じ対プライマーを使用して形成された合成コントロール (例、クローン PCR 産物)

などが、検定方法の有効性及び RT-PCR を伴う増幅を監視するためのモニターとして使用できる。

- [135] **内部コントロール** 従来型及びリアルタイム RT-PCR の場合、抽出失敗、核酸変質又は PCR 阻害物質の存在による偽陰性の可能性を排除するために、COX 又は NAD 等の植物ハウスキーパー遺伝子 (HKG) を RT-PCR プロトコルに組み入れるべきである。内部コントロールプライマーは、ポスピウイロイド/PSTVd プライマーとの二重反応でなるべく使用するべきである。しかしながら、ウイロイドについては、検定の感度が低下することなく完了させることが困難な可能性がある。このことから、実現可能であるならば、ポスピウイロイド/PSTVd プライマーと HKG の二重反応及びポスピウイロイド/PSTVd の単一反応を実施することが推奨される。
- [136] **nad5** ミトコンドリア *NADH* 脱水素酵素 5 遺伝子の断片は、従来型 RT-PCR に関する抽出段階及び RT ステップが行われたことを示すものであり、信頼性がある (Menzel *et al.*, 2002)。 *S. tuberosum* 及び *Solanum* 属の他の種 (*S. bonariensis*, *S. dulcamara*, *S. jasminoides*, *S. nigrum*, *S. pseudocapsicum*, *S. rantonnetii*, *S. sisymbriifolium*)、*Acnistus arborescens*, *Atropa belladonna*, *Brugmansia* spp., *Capsicum* spp., *Cestrum* spp., *Lochroma cyanea*, *Nicotiana* spp., *Physalis* spp. 等多くの植物種について分析が行われてきた (Seigner *et al.*, 2008)。 *nad5* プライマーはイントロンをスパンニングするため、DNA からは増幅されない。RNA はイントロンが除かれた後で増幅される。
- [137] COX は本プロトコルでは内部コントロールとして使用されてきたが、COX プライマーは、RNA 及び DNA を増幅する。そのため、RNA だけでなく、むしろ増幅可能な DNA の質のみを示し、RT ステップを制御しない。
- [138] PCR 方法の解説において、内部コントロール COX 又は *nad5* について説明されていない場合、研究機関は内部コントロールを選択し、その有効性を確認すべきである。
- [139] **陰性増幅コントロール (鋳型コントロールではない)**。従来型及びリアルタイム RT-PCR には、反応混合物調剤中の汚染を原因とする偽陽性を除外するために、反応混合物を調合するために使用された PCR 用水が増幅段階で加えられる。
- [140] **陽性抽出コントロール** このコントロールは、対象ウイロイド拡散が RT-PCR に十分な量と質であることを確保するために、及びウイロイドの検出を確実にするために使用される。ウイロイド核酸は、感染した宿主組織又はウイロイドが接種された健康な植物組織から抽出される。
- [141] 陽性コントロールは、RNA 抽出のために使用される各植物の葉組織量の約 1/10 とすべきである。サンプルのバルキングが行われたならば、その後、陽性コントロールの量は、内容に応じて調節されるべきである (例、RNA 抽出用に 20 mg のサンプルを 10 ロットまとめ、2 mg の感染した葉に 198 mg の健康なじゃがいもの組織を加える)。検出できない場合には、その検定を繰り返す、又は信頼性のある検出ができるまで、バルキング率を下げるべきである)。
- [142] RT-PCR を行う場合、注意して陽性コントロールまたは陽性サンプルからのエアロゾルによる二次汚染を避けるべきである。研究機関で使用された陽性コントロールは、配列決定をし、この配列が、正しいサイズの PCR アンプリコンから得られた配列と容易に比較できるようにすべきである。その他、やはり正しいサイズの PCR アンプリコンと比較可能な既知の配列を使用して、合成陽性コントロールを形成することも可能である。
- [143] **陰性抽出コントロール** このコントロールは、核酸抽出時の汚染及び宿主との交差反応を観察するために使用される。また、核酸抽出及びその後の非感染宿主組織の増幅が必要条件となる。多数の陽性サンプルが予測される場合は、複数のコントロールを含めることが推奨される。
- [144] **3.5 従来型及びリアルタイム RT-PCR 結果の判断**

[145] 従来型 RT-PCR

[146] 病原体特異的な PCR が有効となるのは、以下の場合のみである：

[147] ・陽性コントロールがウイロイドに対する正しいサイズの産物を形成する；及び

[148] ・陰性抽出コントロール及び陰性増幅コントロールではウイロイドに対する正しいサイズのバンドが形成されない。

[149] *nad5* 内部コントロールプライマーが使用されるならば、その後（健康な植物組織）陰性コントロール（使用された場合）、陽性コントロール及び検査サンプルそれぞれは、181 bp のバンドを形成するはずである（*nad5*）。サンプルが内部コントロールプライマーを増幅しないならば、それは、例えば、RNA 抽出の失敗、核酸が反応混合剤に含まれていなかった、RT ステップの失敗、PCR で禁止されている物質が RNA 抽出物に存在していた、又は RNA/DNA の変質等を意味する。

[150] サンプルが正しいサイズのアンプリコンを形成すれば、サンプルは陽性と考えられる。ウイロイド種同定のために、PCR 産物の配列決定を行わなければならない。

[151] リアルタイム PCR

[152] リアルタイム RT-PCR が有効となるのは、以下の場合のみである：

[153] ・陽性コントロールが病原体特異的なプライマーと増幅曲線を形成する；及び

[154] ・陰性抽出コントロールで増幅曲線が観察されない（つまり、サイクル閾値(Ct)の値が 40）であり、有効性承認の後で、陰性増幅コントロール又は他の Ct 値が研究機関により決定される。

[155] COX 内部コントロールプライマーも使用される場合、陰性コントロール（使用された場合）、陽性コントロール及び各検査サンプルは、増幅曲線を形成するはずである。内部コントロールプライマーを使用したか、サンプルによる増幅曲線が形成されないならば、それは、例えば核酸抽出の失敗、核酸が反応混合物に含まれていなかった、PCR で禁止されている物質が RNA 抽出物に存在していた、又は核酸の変質等を意味する。

[156] サンプルが典型的なアンプリコン曲線を形成すれば、サンプルは陽性と考えられる。ある方法のために、Ct カットオフ値の特異性情報が提供されている（セクション 3.3.3.4）。

[157] 4. 同定

[158] セクション 3（3.3.3.3 及び 3.3.4.1）に記載されている従来型 RT-PCR 法のいずれかから得られた産物の配列を決定することで、同定を行うべきである。PCR 産物が弱いものであれば、分かった配列を認めることで、PCR 産物クローニングを有効とすることが可能である。

[159] リアルタイム PCR で検出された陽性サンプルの同定には、従来型 RT-PCR でその産物の配列決定を行うことができるように、サンプルの再検査を行うべきである。しかしながら、リアルタイム解析の感度は高くなっているため、従来型 RT-PCR では、産物を入手できない可能性がある。リアルタイムアンプリコンを直接配列決定することは、信頼できる同定とはならない配列情報を与えることになる。ウイロイドとして同定されるアンプリコンを認めはするが、種の同定又は使用された陽性コントロールとの区別を認めることはない。

[160] 4.1. 配列決定及び配列解析

[161] 研究機関又は研究機関と取引のある企業が、配列を決定することができない場合、ウェブサイトでそのサービスを提供する企業を探すことができる。企業は、PCR 産物の配列決定に必要な条件を詳細に規定する。配列決定を行うため、精製した産物（求められるならば、順方向及び逆方向プライマーも）を企業に送る。

- [162] 機関内で配列決定が行われるならば、その方法を確定し、従うべきである。PCR プライマーを配列決定用プライマーとして各鎖に使用し、PCR 産物の配列を決定する。
- [163] 間違いを検出するため、2本鎖の配列データ結果のファイルをエクスポートし、配列決定ソフトウェアにより作成された基部細胞 (A、C、G 及び T) を観察する。PCR プライマーの部位に延長する塩基配列が存在すると、プライマー配列と結合部位との違いに気付かないことがある。この塩基配列は、ウイロイドゲノムの結合部位ではなく、プライマー配列の増幅のために見られるものであるため、プライマー配列を切断し、除去すべきである。プライマー部位を含めると、結果比較が誤ったものになる可能性がある。配列決定された2つの異なる DNA 鎖 (順方向及び逆方向プライマー) は、1つのものに組み合わせられ、各ヌクレオチド部位の塩基記号 (アイデンティティ) を確認すべきである。2本の鎖のミスマッチは、修正配列中の、あいまいな塩基 (N) として分類されるべきである。編集された一致する配列 (2本の鎖を比べて決定される) は、その後ポスピウイロイド配列のデータベースと比較できる。
- [164] ヌクレオチド配列の一致は、最も似ている配列を同定するため、ヌクレオチドデータベースで検索すべきである (例、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) によって GenBank を検索)。BLAST では、中断することなくゲノム全体の配列を知ることができない場合があることから、アライメントプログラム (例、Clustal 又は MEGA) を使用して配列全体の情報を得る必要があるかもしれない。
- [165] 多少の塩基対の差によって、ウイロイドが規制有害動植物又は非規制有害動植物として分類されることとなる場合には、ポスピウイロイドに対して慎重なアライメントが必要となる。
- [166] ウイロイドの種の同定には、国際ウイルス分類委員会による分類基準に従うべきである (Flores *et al.*, 1998, 2005; Owens *et al.*, 2011)。多くの場合、任意レベルで 90% の塩基配列同定が可能であれば、種と異なる種とを分ける、明確な線引きとなる。その結果 (1) 類似性が 90% を超過し (2) データベースの他の種とサンプルの類似性が 90% 未満であれば、サンプルはその種と最大の類似性を持つ種であると同定される。しかしながら Flores *et al.* (1998, 2005) は種の特徴付けにおいて生物学的特性の評価についても触れている。
- [167] **5. 記録**
- [168] 記録及び証拠は ISPM 27:2006 のセクション 2.5 で説明されている通りに保存されるべきである。
- [169] 他の加盟国が診断の結果により影響を受ける可能性がある、特にノンコンプライアンスとなる場合、及び PSTVd がある国または新しい地域で初めて発見された場合には、以下のものを完全にトレーサビリティが可能となる方法で保存すべきである：
- [170] -元のサンプル (その時点でも入手可能である場合) は、-80°C で保存又はフリーズドライ状態にして、室温で保存すべきである。
- [171] -関連性があれば、RNA 抽出物を -80°C で保存すべきである。
- [172] -関連性があれば、RT-PCR 増幅物産を -20°C から -80°C で保存すべきである
- [173] -サンプルの同定のために一致した配列を作るために使用された DNA 配列のトレースファイル。
- [174] 以前記録された分離物と、分離物の分子又は生物学的特徴が異なると証明された場合、国立の植物病害虫標本庫 (例、Q-bank, DSMZ) に提供されるべきである。
- [175] あらゆる検定において PSTVd 分離物の検出が行われなかったことを示す証拠があるならば、分離物の詳細 (GenBank アクセションナンバーが好ましい) を、IPPC 事務局に送るべきである。
- [176] **6. 詳しい情報の入手先**

- [177] 本プロトコルについての詳しい情報は、以下に記す施設で入手可能：
- [178] Science and Advice for Scottish Agriculture(SASA), Roddinglaw Road, Edinburgh EH12 9FJ, Scotland (Dr C.J. Jeffries, colin.e-mail:jeffries@sasa.gov.uk).
- [179] National Plant Protection Organization, PO Box 9102, 6700 HC Wageningen, the Netherlands (Dr J.W. Roenhorst, e-mail: j.w.roenhorst@minlnv.nl; Dr J.Th.J. Verhoeven, e-mail: j.th.j.verhoeven@minlnv.nl).
- [180] Department of Primary Industries, Knoxfield Centre, Private Bag 15, Ferntree Gully Delivery Centre, Victoria, Australia (e-mail: Dr B. Rodoni, e-mail: brendan.rodoni@dpi.vic.gov.au).
- [181] CFIA, Charlottetown Laboratory, 93 Mt Edward Road, Charlottetown, PE, C1A 5T1, Canada (Dr H. Xu, e-mail: huimin.xu@inspection.gc.ca).
- [82] Conselleria de Agricultura de la Generalitat Valenciana, Centro de Proteccion Vegetal y Biotecnologia, IVIA, 46113 Moncada (Valencia), Spain (Dr N. Duran-Vila, e-mail: nduran@ivia.gva.es).
- [183] USDA-APHIS, Plant Germplasm Quarantine Program BARC-E, BLD 580, Powder Mill Road, Beltsville, MD 20705, USA (Dr J.A. Abad, e-mail: jorge.a.abad@aphis.usda.gov).
- [184] Laboratorios Biológicos, Dirección General de Servicios Agrícolas, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Millán 4703, Montevideo, Uruguay (Dr A. Etchevers, e-mail: anitaetchevers@hotmail.com).
- [85] **7. 謝辞**
- [186] 本プロトコルの第1草稿は以下の者により作成された：C.J. Jeffries (SASA, UK), J.W. Roenhorst, (National Plant Protection Organization, the Netherlands), B. Rodoni, (Department Primary Industries, Australia), H. Xu (CFIA, Canada), N. Duran-Vila (INIA, Spain), A. Etchevers (Laboratorios Biológicos, Uruguay) and J.A. Abad (USDA-APHIS, USA) (see section 6 for contact details). In addition, J.Th.J. Verhoeven (National Plant Protection Organization, the Netherlands)は、本プロトコルの開発に大きく貢献してくれた。
- [187] 本プロトコル開発中、役に立つ助言を与えてくれた以下の人々に感謝する。 S.L. Nielsen (Denmark), L. Seigner, S. Winter and M. Wassenegger (Germany), H. Koenraad (the Netherlands), and A. Fox, T. James, W. Monger and V. Mulholland (UK).
- [188] **8. 参照**
- [189] Badilla, R., Hammond, R. & Rivera, C. 1999. First report of Potato spindle tuber viroid in Costa Rica. *Plant Disease*, 83: 1072.
- [190] Bartolini, I. & Salazar, L.F. 2003. Viroids in South America. In A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles and J. Semancik, eds. *Viroids*, pp. 265–267. Melbourne, Australia, CSIRO Publishing. 392 pp.
- [191] Boonham, N., Fisher, T. & Mumford R.A. 2005. Investigating the specificity of real-time PCR assays using synthetic oligonucleotides. *Journal of Virological Methods*, 130: 30–35.
- [192] Boonham, N., González, L., Lilia Peralta, E., Blockley, A., Walsh, K., Barker, I. & Mumford, R.A. 2004. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of Potato spindle tuber viroid (PSTVd). *Journal of Virological Methods*, 116: 139–146.
- [193] Botermans, M., van de Vossenbergh, B.T.L.H., Verhoeven, J.Th.J., Roenhorst, J.W., Hooftman, M., Dekter, R. & Meekes, E.T.M. 2013. Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 187: 43–50.
- [194] De Bokx, J.A. & Pirone, P.G. 1981. Transmission of Potato spindle tuber viroid by aphids. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 87: 31–34.
- [195] EPPO/CABI (I.M. Smith, D.G. McNamara, P.R. Scott and M. Holderness, eds). 1997. *Quarantine pests for Europe*, second edition. Wallingford, UK, CABI.

- [196] EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2004. Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/33. Potato spindle tuber viroid. EPPO Bulletin, 34: 155–157 (doi:10.1111/j.1365-2338.2004.00727.x).
- [197] EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2010. PM7/98. Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. EPPO Bulletin, 40: 5–22.
- [198] EUPHRESKO. 2010. Detection and epidemiology of pospiviroids (DEP). EUPHRESKO Final Report. York, UK, EUPHRESKO. Available at <http://www.euphresco.org/downloadFile.cfm?id=536>. (last accessed on 15 May 2013).
- [199] Fernow, K.H. 1967. Tomato as a test plant for detecting mild strains of potato spindle tuber virus. *Phytopathology*, 57: 1347–1352.
- [200] Fernow, K.H., Peterson, L.C. & Plaisted, R.L. 1970. Spindle tuber virus in seeds and pollen of infected plants. *American Potato Journal*, 47: 75–80.
- [201] Flores, R., Randles, J.W., Bar-Joseph, M. & Diener, T.O. 1998. A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Archives of Virology*, 143: 623–629.
- [202] Flores, R., Randles, J.W., Owens, R.A., Bar-Joseph, M. & Diener, T.O. 2005. Subviral agents: Viroids. In C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L.A. Ball, eds. *Virus taxonomy*, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, pp. 1147–1161. San Diego, CA, USA, Elsevier Academic Press. 1340 pp.
- [203] Galindo, J., Smith, D.R. & Diener, T.O. 1982. Etiology of planta macho, a viroid disease of tomato. *Phytopathology*, 72: 49–54.
- [204] Grasmick, M.E. & Slack, S.A. 1985. Symptom expression enhanced and low concentrations of potato spindle tuber viroid amplified in tomato with high light intensity and temperature. *Plant Disease*, 69: 49–51.
- [205] Hadidi, A., Mazyad, H.M., Madkour, M.A., Bar-Joseph, M. 2003. Viroids in the Middle East. In A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles and J. Semancik, eds. *Viroids*, pp. 275–278. Melbourne, Australia, CSIRO Publishing. 392 pp.
- [206] Hailstones, D.L., Tesoriero, L.A., Terras, M.A. & Dephoff, C. 2003. Detection and eradication of Potato spindle tuber viroid in tomatoes in commercial production in New South Wales, Australia. *Australasian Plant Pathology*, 32: 317–318.
- [207] Hammond, R.W. & Owens, R.A. 2006. Viroids: New and continuing risks for horticultural and agricultural crops. APSnet. Available at <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Viroids.aspx> (last accessed on 20 December 2012).
- [208] Jeffries, C. 1998. Technical guidelines for the safe movement of germplasm. No.19. Potato. Rome, FAO/IPGRI. 177 pp.
- [209] Jeffries, C. & James, C. 2005. Development of an EU protocol for the detection and diagnosis of Potato spindle tuber pospiviroid. EPPO Bulletin, 35:125–132.
- [210] Kryczynski, S., Paduch-cichal, E. & Skrzeczkowski, L.J. 1988. Transmission of three viroids by seed and pollen of tomato plants. *Journal of Phytopathology*, 121: 51–57.
- [211] Lebas, B.S.M., Clover, G.R.G., Ochoa-Corona, F.M., Elliott, D.R., Tang, Z. & Alexander, B.J.R. 2005. Distribution of Potato spindle tuber viroid in New Zealand glasshouse crops of capsicum and tomato. *Australian Plant Pathology*, 34: 129–133.
- [212] Ling, K.S. & Bledsoe, M.E. 2009. First report of Mexican papita viroid infecting greenhouse tomato in Canada. *Plant Disease*, 93: 839.

- [213] Mackenzie, D.J., McLean, M.A., Mukerji, S. & Green, M. 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 81: 222–226.
- [214] Mackie, A.E., McKirdy, S.J., Rodoni, B. & Kumar, S. 2002. Potato spindle tuber viroid eradicated in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, 31: 311–312.
- [215] Martinez-Soriano, J.P., Galindo-Alonso, J., Maroon, C.J.M., Yucel, I., Smith, D.R. & Diener, T.O. 1996. Mexican papita viroid: Putative ancestor of crop viroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 9397–9401.
- [216] Menzel, W., Jelkmann, W. & Maiss, E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with co-amplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 99: 81–92.
- [217] Mishra, M.D., Hammond, R.W., Owens, R.A., Smith, D.R. & Diener, T.O. 1991. Indian bunchy top disease of tomato plants is caused by a distinct strain of citrus exocortis viroid. *Journal of General Virology*, 72: 1781–1785.
- [218] Monger, W., Tomlinson, J., Boonham, N., Virscek Marn, M., Mavric Plesko, I., Molinero-Demilly, V., Tassus, X., Meekes, E., Toonen, M. & Papayiannis, L. 2010. Development and inter-laboratory evaluation of real-time PCR assays for the detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 169: 207–210.
- [219] Nielsen, S.L., Enkegaard, A., Nicolaisen, M., Kryger, P., Marn, M.V., Pleško, I.M., Kahrer, A. & Gottsberger, R.A. 2012. No transmission of Potato spindle tuber viroid shown in experiments with thrips (*Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*), honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus terrestris*). *European Journal of Plant Pathology*, 133: 505–509.
- [220] Owens, R.A., Flores, R., Di Serio, F., Li, S-F., Pallas, V., Randles, J.W., Sano, T. & Vidalakis, G. 2011. Viroids. In A.M.Q King, M.J. Adams, E.B. Carstens and E.J. Lefkowitz, eds. *Classification and nomenclature of viruses*, IX Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, pp. 1221–1234. London, Elsevier Academic Press. 1340 pp.
- [221] Owens, R.A., Girsova, N.V., Kromina, K.A., Lee, I.M., Mozhaeva, K.A. & Kastalyeva, T.B. 2009. Russian isolates of Potato spindle tuber viroid exhibit low sequence diversity. *Plant Disease*, 93: 752–759.
- [222] Querci, M., Owens, R.A., Bartolini, I., La zarte, V. & Salazar, L.F. 1997. Evidence for heterologous encapsidation of potato spindle tuber viroid in particles of potato leafroll virus. *Journal of General Virology*, 78: 1207–1211.
- [223] Roenhorst, J.W., Jansen, C.C.C., Kox, L.F.F., De Haan, E.G. & Van den Bovenkamp, G.W. 2006. Real-time RT-PCR voor grootschalige toetsing van aardappel op het aardappelspindelknolviroïde. *Gewasbescherming*, 37: 198–203 (in Dutch).
- [224] Roenhorst, J.W., Jansen, C.C.C., Kox, L.F.F., de Haan, E.G., van den Bovenkamp, G.W., Boonham, N., Fisher, T. & Mumford, R.A. 2005. Application of real-time RT-PCR for large-scale testing of potato for Potato spindle tuber pospiviroid. *EPPO Bulletin*, 35: 133–140.
- [225] Salazar, L.F., Querci, M., Bartolini, I. & Lazarte, V. 1995. Aphid transmission of potato spindle tuber viroid assisted by potato leafroll virus. *Fitopatologia*, 30: 56–58.
- [226] Seigner, L., Kappen, M., Huber, C., Kistler, M. & Köhler, D. 2008. First trials for transmission of Potato spindle tuber viroid from ornamental Solanaceae to tomato using RT-PCR and an mRNA based internal positive control for detection. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 115: 97–101.
- [227] Shamloul, A.M., Hadidi, A., Zhu, S.F., Singh, R.P. & Sagredo, B. 1997. Sensitive detection of potato spindle tuber viroid using RT-PCR and identification of a viroid variant naturally infecting pepino plants. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 89–96.

- [228] Singh, R.P. 1970. Seed transmission of potato spindle tuber virus in tomato and potato. *American Potato Journal*, 47: 225–227.
- [229] Singh, R.P. 1973. Experimental host range of the potato spindle tuber virus. *American Potato Journal*, 50: 111–123.
- [230] Singh, R.P., Boucher, A. & Somerville, T.H. 1992. Detection of potato spindle tuber viroid in the pollen and various parts of potato plant pollinated with viroid-infected pollen. *Plant Disease*, 76: 951–953.
- [231] Singh, R.P., Dilworth, A.D., Singh, M. & Babcock, K.M. 2006. An alkaline solution simplifies nucleic acid preparation for RT-PCR and infectivity assays of viroids from crude sap and spotted membrane. *Journal of Virological Methods*, 132: 204–211.
- [232] Singh, R.P. & Kurz, J. 1997. RT-PCR analysis of PSTVd aphid transmission in association with PLRV. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 418–424.
- [233] Singh, R.P., Ready, K.F.M. & Nie, X. 2003. Viroids on solanaceous species. In A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles and J. Semancik, eds. *Viroids*, pp. 125–133. Melbourne, Australia, CSIRO Publishing. 392 pp.
- [234] Singh, R.P., Xianzhou, N. & Singh, M. 1999. Tomato chlorotic dwarf viroid: An evolutionary link in the origin of pospiviroids. *Journal of General Virology*, 80: 2823–2828.
- [235] Steyer, S., Olivier, T., Skelton, A., Nixon, T. & Hobden, E. 2010. Columnea latent viroid (CLVd): First report in tomato in France. *Plant Pathology*, 59: 794.
- [236] Verhoeven, J.Th.J. 2010. Identification and epidemiology of pospiviroids. Thesis, Wageningen University, Wageningen, Netherlands. Available at <http://edepot.wur.nl/137571> (last accessed 20 December 2012).
- [37] Verhoeven, J.Th.J., Hüner, L., Virscek Marn, M., Mavric Plesko, I. & Roenhorst, J.W. 2010. Mechanical transmission of Potato spindle tuber viroid between plants of *Brugmansia suaveolens*, *Solanum jasminoides*, potatoes and tomatoes. *European Journal of Plant Pathology*, 128: 417–421.
- [238] Verhoeven, J.Th.J., Jansen, C.C.C., Roenhorst, J.W., Flores, R. & de la Peña, M. 2009. Pepper chat fruit viroid: biological and molecular properties of a proposed new species of the genus Pospiviroid. *Virus Research* 144: 209-214.
- [39] Verhoeven, J.Th.J., Jansen, C.C.C., Willemsen, T.M., Kox, L.F.F., Owens, R.A. & Roenhorst, J.W. 2004. Natural infections of tomato by Citrus exocortis viroid, Columnea latent viroid, Potato spindle tuber viroid and Tomato chlorotic dwarf viroid. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 823–831.
- [240] Walter, B. 1987. Tomato apical stunt. In T.O. Diener, ed. *The Viroids*, pp. 321–328. New York, Plenum Press. 365 pp.
- [241] Wassenegger, M., Heimes, S. & Sängler, H.L. 1994. An infectious viroid RNA replicon evolved from an in vitro-generated non-infectious viroid deletion mutant via a complementary deletion in vivo. *EMBO Journal*, 13: 6172–6177.
- [242] Weidemann, H.L. & Buchta, U. 1998. A simple and rapid method for the detection of potato spindle tuber viroid (PSTVd) by RT-PCR. *Potato Research*, 41: 1–8.
- [243] Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N.C., Boonham, N. & Stead, D.E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2853–2858.
- [244] 脚注 1. 本診断プロトコルでは **Bioreba** という銘柄の製品を使用しているが、適していると思われる他の製品を認めないことを意図するものではない。この情報は、ユーザーが本プロトコルを使用する際の利便性のためのものであり、名を挙げた化学物質、試薬又は装置に対する CPM の保証を意味するものではない。同じ結果に至ることが証明されれば、同等の製品も使用可能である。

- [245] 脚注 2. 本診断プロトコルでは **Retsch**、**Qiagen** 及び **Interscience** という銘柄の製品を使用しているが、適していると思われる他の製品を認めないことを意図するものではない。この情報は、ユーザーが本プロトコルを使用する際の利便性のためのものであり、名を挙げた化学物質、試薬又は装置に対する **CPM** の保証を意味するものではない。同じ結果に至ることが証明されれば、同等の製品も使用可能である。
- [246] 脚注 3. 脚注 2 を参照。
- [247] 脚注 4. 脚注 2 を参照。
- [248] 脚注 5. 本診断プロトコルでは **Epicentre Biotechnologies** という銘柄の製品を使用しているが、適していると思われる他の製品を認めないことを意図するものではない。この情報は、ユーザーが本プロトコルを使用する際の利便性のためのものであり、名を挙げた化学物質、試薬又は装置に対する **CPM** の保証を意味するものではない。同じ結果に至ることが証明されれば、同等の製品も使用可能である。
- [249] 脚注 6. 本診断プロトコルでは **ThermoScientific** という銘柄の製品を使用しているが、適していると思われる他の製品を認めないことを意図するものではない。この情報は、ユーザーが本プロトコルを使用する際の利便性のためのものであり、名を挙げた化学物質、試薬又は装置に対する **CPM** の保証を意味するものではない。同じ結果に至ることが証明されれば、同等の製品も使用可能である。
- [250] 脚注 7. 本診断プロトコルでは **Sigma** という銘柄の製品を使用しているが、適していると思われる他の製品を認めないことを意図するものではない。この情報は、ユーザーが本プロトコルを使用する際の利便性のためのものであり、名を挙げた化学物質、試薬又は装置に対する **CPM** の保証を意味するものではない。同じ結果に至ることが証明されれば、同等の製品も使用可能である。
- [251] 脚注 8. 本診断プロトコルでは **Invitek** 及び **Thistle Scientific** という銘柄の製品を使用しているが、適していると思われる他の製品を認めないことを意図するものではない。この情報は、ユーザーが本プロトコルを使用する際の利便性のためのものであり、名を挙げた化学物質、試薬又は装置に対する **CPM** の保証を意味するものではない。同じ結果に至ることが証明されれば、同等の製品も使用可能である。
- [252] 脚注 9. 本診断プロトコルでは **Agdia Inc.** という銘柄の製品を使用しているが、適していると思われる他の製品を認めないことを意図するものではない。この情報は、ユーザーが本プロトコルを使用する際の利便性のためのものであり、名を挙げた化学物質、試薬又は装置に対する **CPM** の保証を意味するものではない。同じ結果に至ることが証明されれば、同等の製品も使用可能である。
- [253] 脚注 10. 2010年3月1日現在。
- [254] 脚注 11. 脚注 4 を参照。
- [255] 脚注 12. 本診断プロトコルでは **Applied Biosystems** という銘柄の製品を使用しているが、適していると思われる他の製品を認めないことを意図するものではない。この情報は、ユーザーが本プロトコルを使用する際の利便性のためのものであり、名を挙げた化学物質、試薬又は装置に対する **CPM** の保証を意味するものではない。同じ結果に至ることが証明されれば、同等の製品も使用可能である。
- [256] 脚注 13. 本診断プロトコルでは **Invitrogen** という銘柄の製品を使用しているが、適していると思われる他の製品を認めないことを意図するものではない。この情報は、ユーザーが本プロトコルを使用する際の利便性のためのものであり、名を挙げた化学物質、試薬又は装置に対する **CPM** の保証を意味するものではない。同じ結果に至ることが証明されれば、同等の製品も使用可能である。
- [257] 脚注 14. 脚注 12 参照。