

検疫中のジャガイモからの Potato spindle tuber viroid 検出法の検討*

西尾 健・加藤 幹雄・小林 敏郎
釘持 秀禧・及川 巖・松濤 美文
横浜植物防疫所

Comparative Studies of the Methods for Detection of Potato Spindle Tuber Viroid in Imported Potatoes During Plant Quarantine. Takeshi NISHIO, Mikio KATHO, Toshiro KOBAYASHI, Hideki KENMOTSU, Iwao OIKAWA, Mifumi MATSUNAMI (Yokohama Plant Protection Station)

Abstract: Comparative studies of tomato cross-protection test (Fernow 1967, Singh 1970) and electrophoretic method using polyacrylamide gel (Morris and Smith 1977) were done.

Severe strain (PSTV-S) and mild strain (PSTV-M) of PSTV, and Sheyenne tomato seed were kindly supplied by Dr. R.P. Singh, Canada, because PSTV is not existent in Japan.

PSTV-S was easily detected for production of characteristic symptoms on Sheyenne tomato plants. While PSTV-M symptomlessly infected to Sheyenne tomato. PSTV-M was well able to detect by tomato-cross protection test during June to September in Japanese climate at Yamato city, Kanagawa Prefecture, in glass greenhouse without supplemental light and heating facilities.

The both strains of PSTV were reliably detected by the electrophoretic method in 1-2 g of young terminal tissues of infected Sheyenne and Kurihara tomato, young terminal tissues and tubers of infected potato var. Danshaku (=Irish Cobbler). The both strains of PSTV were detected in doubly infected Sheyenne tomatoes with Potato Virus X,Y,M and Cucumber Mosaic Virus. The presence of the other virus did not interfere with the electrophoretic test for PSTV in Sheyenne tomato.

According to comparison with tomato cross-protection test, electrophoretic method is extremely rapid to get the results. Furthermore, this method is not necessary the labor and space to grow tomato, and the foreign PSTV as a control. The Japanese tomato var. Kurihara also showed the characteristic symptom like Sheyenne tomato's, so this plant can possibly be used as indicator for PSTV.

PSTV was not detected by both methods in imported 20 potatoes including 4 varieties from U.S.A., 30 potatoes including 3 varieties from Canada respectively, and 80 potatoes including 4 varieties from several seed potato production area of northern Japan.

ま え が き

Potato spindle tuber disease は、ジャガイモの塊茎が細長くなる病気として 1920 年代のはじめごろから知られていたが、その病原体は一応ウイルスであろうと考えられていたものの、長らく不明のままであった。1967 年に至って DIENER and RAYMER は、この病原体は通常の植物ウイルスの様な外皮タンパクをもたず、低分子の核酸 (RNA) のみから成るものであることを証明した。又、この種の病原体を Viroid (ウイロイド) と呼ぶこと

が提案された (DIENER 1971)。

Potato spindle tuber viroid (PSTV) は、北アメリカ大陸、ソ連、南アフリカに分布する (DIENER and RAYMER 1971)。特に、アメリカ合衆国とカナダには広く分布し、この地域のジャガイモ栽培に大きな被害をおよぼしている。この PSTV は 1978 年 12 月特定重要病害虫の 1 つに指定され、分布地域から輸入されたジャガイモは特定重要病害虫検疫要綱に基づく検査を植物防疫所において実施する事となった。

PSTV の診断は、生育中のジャガイモ地上部の病徴が軽微で、適当な検定植物もないため経験によるところが大きく困難なものであった。しかし、Rutgers トマトや

* 本報告の概要は、昭和 53 年度日本植物病理学会秋季関東部会 (1978) において発表した。

Sheyenne トマトが汁液接種により PSTV に感染し、明りょうな病徴を出し、検定植物として利用できることが報告されて (RAYMER and O'BRIEN 1962, RAYMER *et al* 1964, SINGH *et al* 1964), 以後比較的楽に行なえる様になった。ところが、その後トマトに明瞭な症状を出さない系統の存在することが報告され、これを Mild strain (PSTV-M), 従来知られていたトマトに症状を出すものを Severe strain (PSTV-S) と分類された (FERNOW 1967)。一般の圃場に発生するものの大部分は PSTV-M であるという (FERNOW 1967, SINGH *et al* 1970, 1971)。

FERNOW (1967) は、塊茎や葉の汁液をトマトに接種し、PSTV-S との交叉免疫を利用して、PSTV-M を検出する方法を報告した。又、SINGH ら (1970) は、検出精度を上げるために、罹病組織からフェノール抽出した核酸溶液をトマトに接種する改良法を報告した。先に述べた要綱に示めされた検査法は、この SINGH らの方法である。又、近年、ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動を利用した PSTV の検出法が報告された (MORRIS and SMITH 1977)。

この SINGH らの交叉免疫法と、MORRIS and SMITH の電気泳動法について、わが国の気候条件下で適用できるかを確認するとともに、その検出精度、簡便さなどについて検討したのでここに報告する。

なお、交叉免疫法の検討は 1971 年 4 月から 12 月に実施し、電気泳動法の検討は 1977 年 4 月から 1978 年 11 月にかけて実施したものである。報告にあたりウイルスフリージャガイモを分譲下さった孺恋馬鈴薯原々種農場の堀尾英弘博士、PSTV 2 系統と Sheyenne トマト種子を分譲下さったカナダの Dr. R. P. SINGH に心よりお礼申し上げます。

材料および方法

1. Viroid および検定植物等

農林水産大臣の特別許可を受けカナダの Dr. R. P. SINGH より分譲された PSTV-S (農林省指令 44 植物 767 号), PSTV-M (同第 1974 号) および 1978 年に隔離検疫中のスペイン産オレンジより分離された Citrus exocortis viroid (CEV) を供試した。検定植物として供試した Sheyenne トマト種子は、Dr. R. P. SINGH より分譲を受けたものである。汁液接種時の磨砕液には、0.1~0.2 M K_2HPO_4 緩衝液 (pH 8.0) を用いた。トマトへの汁液接種は、本葉の出る前の子葉にあらかじめ 600 メッシュのカーボランダムをふりかけ実施した。植物の生育温度は 25~32°C とした。

2. 交叉免疫法

おおむね SINGH ら (1970) の方法によった。罹病 Sheyenne トマト茎葉からフェノール抽出によって核酸分画を取り接種源とした。フェノール抽出の方法は、罹病葉に同重量の 0.5 M K_2HPO_4 を加えて磨砕し、等量の水飽和フェノールを加えよく振とう後 3,500~4,000 rpm, 20 分間遠心し、その上清に罹病葉と同重量のエーテルを加えよく振とう後、遠心し下層の核酸分画を取った。

接種の方法は、第一次接種として Sheyenne トマト 10 本に PSTV-S 核酸分画を、20 本に PSTV-M 核酸分画をそれぞれ汁液接種し、20 本は無接種とした。接種 14~17 日後交叉免疫をみるため、第二次接種として、PSTV-M を接種した 10 本と無接種の 10 本にそれぞれ PSTV-S 核酸分画を接種した。この無接種株への接種はその時に使用した PSTV-S 核酸分画に感染力があったかを調べるためのものである。残った無接種株 10 本はそのまま対照とした。第一次接種に PSTV-M を接種し、第二次接種に PSTV-S を接種しても病徴を発現しないものを交叉免疫があったと考える。なお、この試験はわが国の気候条件でこの交叉免疫法がどの時期に実施できるかを調べるために、加温しないガラス室内で実施した。

3. 電気泳動試験材料

PSTV を汁液接種した後 20 日以上経過した Sheyenne トマトと栗原トマト、約 2 ヶ月経過したウイルスフリージャガイモ (男爵薯) および接種ジャガイモに形成された罹病塊茎、その塊茎を植え付けて生育した次代植物、ならびに CEV を接木接種後典型的症状であるエピナシティー症状を発現したエトログシトロン (Arizona 861) で罹病塊茎以外は生長点付近の軟らかい茎葉を採取した。

4. 電気泳動用試料調整法

MORRIS and SMITH の方法 (1977) によった。5g の生または凍結組織に、2.5 ml の抽出緩衝液 (0.2 M グリシン, 0.1 M Na_2HPO_4 , 0.6 M NaCl, 1% ラウリル硫酸ナトリウム, 5 M NaOH で pH 9.5 に調整), 5 滴のメルカプトエタノール, 10 ml の水飽和フェノール (0.1%, 8-ハイドロキシキノリンを含む) および 10 ml のクロロホルム・ペンタノール混液 (25: 1, v/v) を、氷冷したすり鉢に同時に加えよく磨砕する。磨砕液は 8,000 g で 15 分間遠心し上部の水層をとり、10 M LiCl 溶液を加え最終濃度を 2 M LiCl とする。この溶液を氷中で 2 時間静置した後、8,000 g で 15 分間遠心して上清を取り、これを水に対して一晚透析する。この透析内液をそのままかあるいは 95% 冷エタノールと数滴の 4 M

酢酸ナトリウムを加えた後 -20°C で1時間以上静置し、8,000 g で15分間遠心し核酸を沈殿させ、0.3~1.0 mlの水に溶解し濃縮したものを電気泳動用試料とした。以上の操作は特にことわらない限りは 4°C で実施した。

5. 電気泳動法

ガラス管内で重合させた直径6 mm、長さ9 cmの5%ポリアクリルアミドゲル1本当たり50~500 μl の核酸試料に、0.05%ブロムフェノールブルー液1滴と飽和ショ糖溶液1~2滴を加えよく混合したものを乗せて、5~7 mA/ゲルでトレーサー色素がゲルの底部より約1 cmのところにくるまで泳動した。泳動後ゲルは0.1%トルイシンブルーO水溶液中で一晩染色した後、脱色し肉眼で泳動パターンを観察した。なお、泳動時の上下緩衝液、ゲル緩衝液はすべて同一で、0.04 M トリス、0.02 M 酢酸ナトリウム、1 mM EDTA、pH 7.2 緩衝液を用いた。

6. 混合感染試料からの検出試験

PSTV と他のジャガイモのウイルスが混合感染した Sheyenne トマトから、他のウイルスの影響なく PSTV が検出されるかどうかを調べた。Potato virus X (PVX), Potato virus Y (PVY), Potato virus M (PVM) および Cucumber mosaic virus (CMV) の4種ウイルスを用いた。PVM はジャガイモに感染したものを、他の3種ウイルスはタバコに感染したものをを用いた。PSTV 感染 Sheyenne トマト葉と他のウイルスに感染した病植物葉を一つにまとめ同時に磨碎して Sheyenne トマトに汁液接種し、この混合感染した Sheyenne トマトを電気泳動の試料とした。

実験結果

1. トマトおよびジャガイモの病徴

PSTV-S を接種した Sheyenne トマトでは、接種2週間目ごろから病徴が出はじめ、株全体のわい化、葉のちぢれ、頂葉先端部の黄化、葉脈のえそ、エピナシティー、小葉の内巻などの症状をあらわす(図1)。一方、PSTV-M はほとんど無病徴であるが、時に接種2ヶ月目ごろに頂葉の軽いちぢれ症状を出すことがあった。

我国のトマト品種の1つである栗原トマトでもほぼ同様の症状をあらわした(図2)、Sheyenne トマトとくらべると PSTV-S では病徴の発現が少しおくれるが、PSTV-M の症状は Sheyenne トマトより明瞭で、このトマトも検定植物として利用できると思われる。

ジャガイモ(男爵薯)では2系統とも接種当代の症状は認められなかったが、次代植物には2系統とも発芽のおくれや生育の不良が認められ(図3)、葉が細長くなること、茎と複葉の葉柄との角度が小さくなり株全体を

見た時に上方に向いか鋭く立ち上がった様な印象を受ける等(図4)の症状が認められた。いずれの症状も PSTV-S が PSTV-M にくらべより激しく、一見して差がわかった。塊茎の症状は生育温度が高すぎたためか塊茎がほとんど形成されず不明であった。

2. 交叉免疫法による検出

結果は表-1 のとおりである。PSTV-S を接種して発病しなかったものは4月20日に接種したもののうち6本、10月16日に接種した3本と11月16日に接種した10本すべてであった。他の時期に接種したものは、いずれも全株発病した。病徴は、7~8月の間が最も激しかった。PSTV-M を接種したものでは、70本接種したうち、わずか2本に軽い病徴を現わしただけであった。交叉免疫を調べるため、PSTV-M を一次接種し、PSTV-S を二次接種したものでは、対照区の PSTV-S が全株発病した時期(6月~9月)のもの40本のうち1本のみが発病したが、この発病は PSTV-S を接種してから3日後、PSTV-M を接種してから18日後であり、潜伏期間を考えると PSTV-S の症状とは考えにくく、PSTV-M の症状がたまたま強く出たものと考えられた。

以上から、PSTV-S は Sheyenne トマトに接種すれば、容易に検出できることがわかった。一方、PSTV-M は Sheyenne トマトにほとんど病徴をあらわさないが、PSTV-S との間に交叉免疫性をもっており、わが国の気候条件では7~8月に接種検定を実施すれば十分に検出可能であると思われる。

3. 電気泳動パターン

無接種、PSTV-S および PSTV-M 接種 Sheyenne トマト試料の泳動パターンは、図5のとおりであった。この泳動パターンは栗原トマト、男爵薯でもほぼ同じであった。PSTV 接種試料では、無接種試料には認められない PSTV バンドが、9 SRNA バンドの上部に認められた。この PSTV バンドは濃縮しない試料では、男爵薯試料で最もシャープかつ鮮明であった。又 PSTV-S と PSTV-M 接種試料に差は認められなかった。

PSTV バンドの感染性を確認するため、PSTV-S を接種した Sheyenne トマト試料を泳動し、未染色のゲルを3 mm 幅に切断し、各々に0.04 M トリス-HCl 緩衝液(pH 7.6)を加えてよく磨碎した後 Sheyenne トマトに接種した。その結果、PSTV バンドと感染性のピークが一致することが確認された(図6)。

4. 試料組織重量および泳動用試料体積

PSTV-M 感染 Sheyenne トマトを用いて、PSTV バンドの最少検出可能組織重量はどれくらいであるかを

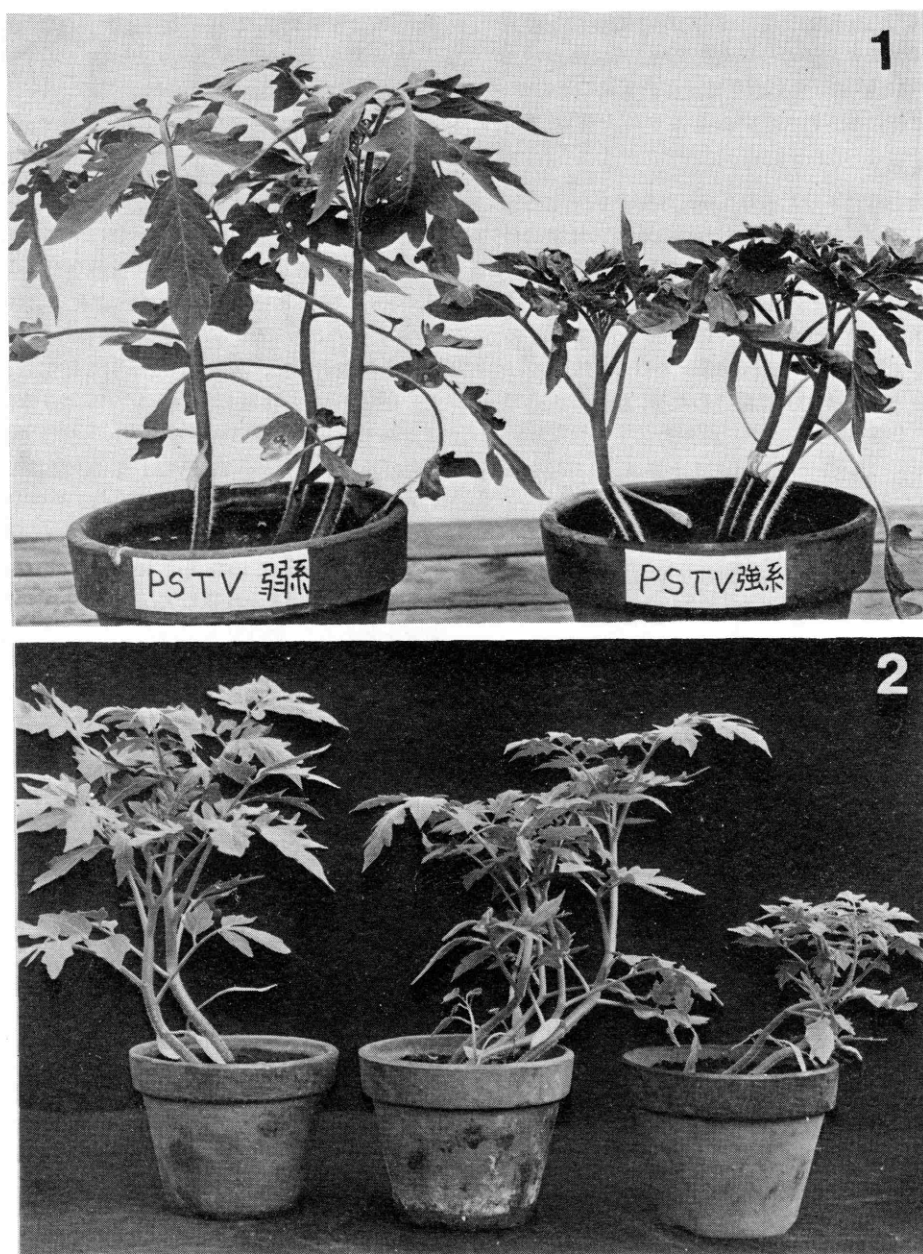


図 1 Sheyenne トマトの病徴。接種後約 2 週間目。
 左: PSTV-M 接種, 右: PSTV-S 接種
 図 2 栗原トマトの病徴。接種後約 1 ヶ月目。
 左: 無接種, 中央: PSTV-M 接種, 右: PSTV-S 接種

0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10g の試料について検討した。この際、組織重量に比例して使用試薬量を増減した。その結果、0.2g でもフェノール抽出後の水層さえ取れば、

検出は可能であったが 0.2g, 0.5g の場合にフェノール抽出後の水層が取れないこともあり、1g の試料があれば確実に検出できることがわかった。