

RT-PCR 法によるグラジオラスからの タバコ茎えそウイルスの検出

山路 禎之・堀越 浩二・山下 均・松本 工

神戸植物防疫所業務部種苗担当

Detection of tobacco rattle virus on gladiolus by RT-PCR. Yoshiyuki YAMAJI, Koji HORIKOSHI, Hitoshi YAMASHITA, Takumi MATSUMOTO (Kobe Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 34: 107-111 (1998)

Abstract: Tobacco rattle virus (TRV) was detected from TRV-infected gladiolus (*Gladiolus* spp.) leaf, flower, corm and scale of corm by modified Robinson (1992)'s reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) methods. RT-PCR is able to detect serological strains of TRV which ELISA can not.

Key words: tobacco rattle virus, RT-PCR, gladiolus, detection

はじめに

タバコ茎えそウイルス (tobacco rattle virus: TRV) は、線虫によって媒介される土壌伝染性ウイルスで、検疫上重要なウイルスである。

最近、隔離検査においてグラジオラスから TRV を検出する事例が相次いでいる。TRV 感染グラジオラスの病徴は葉の V 字型の切れ込みなどとされているが、罹病株が必ずしもすべてこのような症状を現すわけではない (STEIN 1995)。また、電子顕微鏡観察で粒子確認が困難な場合があること、TRV には数種の血清学的系統が存在するため血清学的方法では検出できない場合があることなどの困難もあり、現在複数の検出手法を組み合わせ、結果を総合的に検討している。

近年、TRV の数系統で RNA の塩基配列が明らかにされ (ANGENENT *et al.* 1989, HAMILTON *et al.* 1987)、RT-PCR 法を用いた高感度な遺伝子診断法が可能となり、*Nicotiana clelandii* 及びスイセン (ROBINSON 1992)、ジャガイモ塊茎 (CROSSLIN *et al.* 1995, WEIDEMANN *et al.* 1995) 及び媒介線虫 (VAN DER WILK *et al.* 1994) からの検出などが報告されている。

そこで、RT-PCR 法によるグラジオラスからの TRV 検出について検討を行うとともに、従来の検定手法との比較を行った。

材料及び方法

1. 供試材料

隔離検査中に電子顕微鏡観察等で TRV 罹病と診断したオランダ王国産グラジオラス 3 品種 (品種 Mascagni, Manhattan 及び Cimarosa) を供試した。試料は生育中の葉及び花並びに休眠中の球茎及びその外皮を用いた。

品種 Mascagni については、発芽後約 2 週目 (生育初期)、2 ヶ月目 (開花前) 及び 5 ヶ月目 (生育終期) の葉を採取し、試料の採取時期の検討を行った。

TRV 罹病グラジオラスの葉又は球茎の組織 0.05 g を用い核酸抽出及び RT-PCR を行った。またこれらの試料と TRV 無病植物体を重量比で、1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1,000 に混合して試料とし、TRV が検出できるか調査した。

なお、試料は核酸抽出までの間保存する場合はすべて -80°C の冷凍庫で保存した。

2. 核酸抽出及び RT-PCR

核酸抽出は、ROBINSON (1992) の方法を Fig. 1 のとおり改変し、行った。RT-PCR は同じく ROBINSON (1992) の方法をもとに CROSSLIN ら (1995) 及び中山 (1996) を参考にして若干の簡便化を図り、遺伝子増幅装置 (PERKIN ELMER 社 GeneAmp PCR System 2400) を用いて Fig. 2 の手順で実施した。RT-PCR に

[Nucleic acid extraction]

Sample (0.05 g)

Grind in 250 μ l of extraction buffer (50 mM Tris-HCl PH 7.0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA)
Add 250 μ l of extraction buffer (containing 1% SDS)

Sap

Transfer the sap into 1.5 ml micro centrifuge tube
Incubate at 65°C for 10 min.
12,000 rpm for 10 min.

Supernatant

Adjust to 500 μ l with extraction buffer
Add 250 μ l of water saturated phenol
Add 250 μ l of chloroform
Shake for 1 min.
12,000 rpm for 10 min.

Aqueous phase

Add 500 μ l of chloroform
Shake for 1 min.
12,000 rpm for 10 min.

Aqueous phase

Add 2 volumes of ethanol
Add 1/10 volume of 3 M sodium acetate (pH 6.5)
Incubate at 4°C for 30 min.
12,500 rpm for 5 min.

Precipitate

Add 1 ml of 70% ethanol
Mix by shaking upside down
12,500 rpm for 5 min.

Precipitate

Dry in vacuo for 5 min.
Resuspend 25 μ l of sterilized water

Fig. 1. Protocol for TRV extraction by modified ROBINSON's extraction method

供する抽出核酸は原液又は希釈液 (1/10) とした。用いるプライマーを決定するため、予備調査において、VAN DER WILK ら (1994) 及び WEIDEMANN H.L. (1995) が設計したプライマーを用いグラジオラスからの TRV の検出を試みたが、明瞭な増幅は認められなかった。一方、ROBINSON (1992) のプライマーを用いた場合は、より明瞭な増幅が認められた。さらに、その報告では、多くの系統の TRV を検出していることから、本調査ではこれを採用した。プライマーの配列は、相同プライマーが 5'-GACGTGTGTACTCAAG-GGTT-3'、相補プライマーが 5'-CAGTCTATACAC-AGAAACAGA-3' で (ROBINSON 1992)、これは、TRV の SYM 系統の 16 K タンパク質領域の 463 bp を増幅するものである (HAMILTON *et al.* 1987)。PCR 産物

10 μ l を 1% アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイド溶液で染色し、463 bp の TRV 特異的増幅断片の有無を観察した (Fig. 3)。

3. ELISA 法

Clark ら (1977) の方法に準じた。抗血清 IgG は TRV ホウレンソウ分離株から作製されたものを用いた。結果がマイナスのものは再度試験し、陽性反応が見られないことを確かめた。

4. 汁液接種法

指標植物として *Chenopodium quinoa* を用い、常法により行った。

[RT Reaction]

— Extracted sample	1 μ l
— 25 μ M Complementary primer	2.5 μ l
— Sterilized water	6.5 μ l

Incubate 65°C for 5 min., 4°C for 1 min.

— 5×First strand buffer	4 μ l
— 5 mM dNTPs	4 μ l
— 0.1 M DTT	1 μ l
— M-MLV reverse transcriptase (200 U/ μ l, GIBCO BRL)	1 μ l

Incubate 37°C for 60 min.

[PCR]

10×reaction buffer (TOYOBO Co.)	5 μ l
5 mM dNTPs	2 μ l
25 μ M Complementary primer	1.25 μ l
25 μ M Homologous primer	1.25 μ l
Sterilized water	38.25 μ l
Tth DNA polymerase (1 U/ μ l, TOYOBO Co.)	1.25 μ l
RT reaction product	1 μ l

First cycle : 94°C/5.5 min, 58°C/1 min., 72°C/1 min.

2-24 cycle : 94°C/30 sec., 58°C/1 min., 72°C/1 min.

25 cycle : 94°C/30 sec., 58°C/1 min., 72°C/8 min.

Fig. 2. Protocol of RT-PCR by modified ROBINSON's method

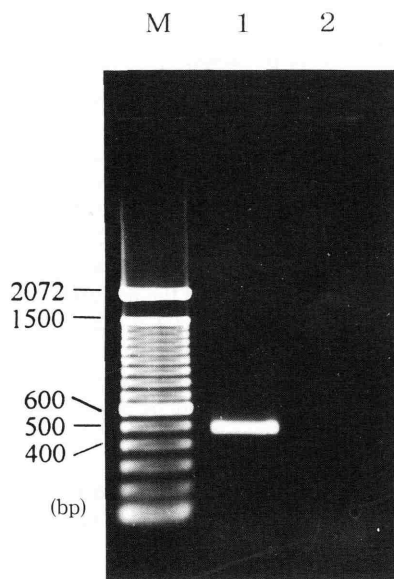


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis (1%) of RT-PCR products. Lane 1: TRV-infected gladiolus corm, Lane 2: TRV-free corm, M: 100 bp DNA ladder (Gibco BRL).

5. 電子顕微鏡観察

グラジオラスの葉の2ヵ所以上から試料を採取し、ダイレクトネガティブ染色法(大木 1997)で観察した。

結果及び考察

各生育段階の葉(品種 Mascagni)を試料とした RT-PCR の結果, すべての試料から TRV が検出され, 葉の生育段階に関わらず本法は有効であった。

グラジオラス 3 品種を用い, TRV の検出を種々の方法で行ったところ, Table 1 のとおりとなった。葉を試料とした ELISA 法で 19 株中 3 株が検出できなかったが, これらはすべて品種 Mascagni で, 用いた抗血清と血清学的系統が異なる TRV と判断された。ROBINSON (1992) は RT-PCR 法により, 供試した血清学的に異なる 8 系統すべてで検出できることを報告しているが, 今回の結果も同様な結果となった。

また, 球茎についても RT-PCR 法ではすべての試料から検出でき, ELISA 法や汁液接種法に比べ優れていた。

球茎外皮は, RT-PCR 法でも十分な結果が得られ

Table 1. Detection of TRV from various part of infected gladiolus

Part of plant	RT-PCR	ELISA	Inoculation ¹⁾	EM ²⁾
Leaf	19/19 ³⁾	16/19	19/19	18/19
Flower	5/5	NT ⁴⁾	NT	NT
Corm	11/11	5/11	0/11	NT
Scale of corm	3/5	3/5	0/5	NT

¹⁾ sap inoculation to *C. quinoa*²⁾ electron microscopy by direct negative stain method³⁾ detected/tested⁴⁾ not tested

Table 2. Detection of TRV from low concentration sample of gladiolus by RT-PCR

Part of plant	Dilution ¹⁾						
	1	1/10	1/20	1/50	1/100	1/500	1/1,000
Leaf	19/19 ²⁾	3/3	2/3	4/7	4/9	3/10	0/2
Corm	11/11	— ³⁾	—	3/4	6/7	5/10	2/9

¹⁾ TRV-infected sample 0.01 g was diluted 1/10, 1/20, 1/50, 1/100, 1/500 and 1/1,000 with 0.09 g, 0.19 g, 0.49 g, 0.99 g, 4.99 g, 9.99 g healthy one, respectively.²⁾ detected/tested³⁾ not tested

ず、検定試料としては不適当と考えられた。

大量の個体を一つの試料として取りまとめて検定する手法を検討した結果、Table 2 のとおりであった。葉及び球茎からそれぞれ 1/500 及び 1/1,000 という高希釈でも検出可能な場合もあったが、一方葉では 1/20、球茎では 1/50 においても検出できない場合があり、不安定であった。希釈と検出の関係については、個々のデータを検討した結果、用いた罹病個体の TRV 濃度の差によるものと考えられた。

ROSNER ら (1992, 1994) は、RT-PCR 法によるグラジオラス球茎及びその組織培養体からのインゲン黄斑モザイクウイルス (bean yellow mosaic virus) の検出において、T7RNA ポリメラーゼによる転写及びハイブリダイゼーション法を組み合わせることで、RT-PCR 法のみでは検出できなかった試料についても検出可能になると報告している。高希釈試料からの TRV 検出の改善策としてこの手法を今後検討したい。

以上の結果、RT-PCR 法はグラジオラスの TRV 検定において、精度が高い手法であることが確認でき、特に、球茎からの検出において優れていることが判明した。

引用文献

- 大木 理 (1997) 植物ウイルス同定のテクニックとデザイン. 社団法人植物防疫協会 pp 19-21.
- 中山広樹 (1996) バイオ実験イラストレイテッド 3 本当にふえる PCR. 秀潤社 pp 45-46.
- ANGENENT, G.C., POSTHUMUS, E., BREDERODE, F. Th. and BOL, J.C. (1989) Genome structure of tobacco rattle virus strain PLB: further evidence on the occurrence of RNA recombination among tobamoviruses. *Virology*, **171**: 271-274.
- CLARK, M.F. and ADAMS, A.N. (1977) Characteristics of microplate method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. *J. gen. Virol.*, **34**: 475-483.
- CROSSLIN, J.M. and THOMAS, P.E. (1995) Detection of tobacco rattle virus in tubers exhibiting symptoms of corky ringspot by polymerase chain reaction. *American Potato Journal*, **72**: 605-609.
- HAMILTON, W.D.O., BOCCARA, M., ROBINSON, D.J. and BAULCOMBE, D.C. (1987) The complete nucleotide sequence of tobacco rattle virus RNA-1. *J. gen. Virol.*, **68**: 2563-2575.
- ROBINSON, D.J. (1992) Detection of tobacco rattle virus by reverse transcription and polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, **40**: 57-66.
- ROSNER, A., STEIN, A. and LEVY, S. (1992)

- Transcription amplification of polymerase chain reaction products of bean yellow mosaic virus RNA extracted from gladioli corms. *Ann. appl. Biol.*, **121**: 269-276.
- ROSNER, A., STEIN, A., LEVY, S., LILIEN-KIPNIS, H. (1994) Evaluation of linked PCR-transcription amplification procedure for bean yellow mosaic virus detection in gladioli. *J. Virol. Methods*, **47**: 227-236.
- STEIN, A. (1995) Gladiolus. In: *Virus and virus-like disease of bulb and flower crops*. Loebenstein G., Lawson R.H. and Brunt A.A. (eds.) John Wiley & Sons.
- VAN DER WILK, F., KORSMAN, M. and ZOON, F. (1994) Detection of tobacco rattle virus in nematodes by reverse transcription and polymerase chain reaction. *European Journal of Plant Pathology*, **100**: 109-122.
- WEIDEMANN, H.L. (1995) Detection of tobacco rattle virus in potato tubers and roots by polymerase chain reaction (PCR). *J. Phytopath.*, **143**: 455-458.