

RT-PCR 法を用いたトマト及びジャガイモ種子からの *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) の検出

星野智士・奥田智勇・井坂正大・堤 直也・宮井尚彦・
池城隆明*・齊藤範彦・小原達二**・高橋 勤***

横浜植物防疫所・*那覇植物防疫事務所・**横浜植物防疫所調査研究部・***横浜植物防疫所東京支所

Detection of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) in Tomato and Potato Seeds. Satoshi HOSHINO, Tomoo OKUTA, Masahiro ISAKA, Naoya TUTUMI, Naohiko MIYAI, Takaaki IKESHIRO*, Norihiko SAITO, Tatuji OHARA** and Tsutomu TAKAHASHI*** (Yokohama Plant Protection Station, 5-57, Kitanakadori Nakaku, Yokohama 231-0003, Japan, *Naha Plant Protection Station, **Research Division, Yokohama Plant Protection Station and ***Tokyo Sub-station, Yokohama Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 42: 75-79 (2006).

Abstract: *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) is one of the most important diseases of potato and tomato, and it does not occur in Japan. It is known that PSTVd is transmitted not only through tubers, in seeds and by direct contact but also through true seeds. Since no detection method for PSTVd from tomato and potato seeds has been reported, we have studied a PSTVd detection method from seeds. Whole nucleic acid extracted from PSTVd infected potato leaves was used for inoculation to tomato plant at the seedling stage. Seeds were collected from fully matured fruits from the inoculated tomato plants, and they were checked for PSTVd infection by RT-PCR. Infected tomato seeds were used to evaluate the PSTVd detection method on both tomato and potato seeds. Mixtures of healthy and infected seeds in various ratios were ground, and whole nucleic acid was extracted from the homogenized seeds, according to the modified SDS-potassium acetate method. The extracts were examined by RT-PCR for PSTVd infection. The results suggest, that PSTVd can be detected by RT-PCR from a mixture of a single infected seed and 2000 healthy seeds of tomato and potato, respectively.

Key words: PSTVd, RT-PCR, detection, tomato seed, potato seed

はじめに

Potato spindle tuber viroid (PSTVd) は、我が国未発生種の *Pospiaviroid* 属のウィロイドで、海外ではジャガイモやトマトに重大な被害をもたらしていることが報告されている。また、本ウィロイドは感染力が非常に強く、接触伝染 (DIENER *et al.*, 1979)、ジャガイモ葉巻ウイルスを介した虫媒伝染 (QUERCI *et al.*, 1997) のほか、ジャガイモやトマトで種子伝染することが知られている (LOEBENSTEIN *et al.*, 2001; HADIDI *et al.*, 2003)。2000 年に、ニュージーランドにおいてトマトに PSTVd の発生が確認されたが、その原因は汚染された輸入トマト種子であった可能性が高いとの報告がある (ELLIOT *et al.*, 2001)。

現在、我が国の植物検疫では、輸入ジャガイモ塊茎の隔離栽培検査における PSTVd の検査方法として、栽培中の茎葉や塊茎を試料とした生物検定法や RT-PCR 法が用いられている。しかし、種子については、有効な検査方法が確立されていない。

そのため、トマト及びジャガイモ種子からの PSTVd の検出法について検討を行った。

材 料

1. PSTVd 保毒種子の作製および感染確認

保毒種子の作製には、農林水産大臣の特別許可（44 横植第 1974 号）を得て横浜植物防疫所大和圃場で保管・管理しているカナダ産 PSTVd の弱毒系株を使用した。

本葉 4 枚が展葉したトマト苗（品種：ラトガス及び瑞栄）にカーボランダムをふりかけ、ラテックス製の手袋をはめた手で PSTVd 罹病ジャガイモ葉から抽出した全核酸を直接塗布接種した。接種後のトマト苗は温室内（25℃）で栽培し、PSTVd 感染を確認した株から採種を行った。接種植物の PSTVd 感染の確認は、接種 1 ヶ月後に葉の退緑症状が確認された株から採取した新葉を試し、RT-PCR 法により行った。

RT-PCR 法では隔離栽培検査で RT-PCR 検定に用いているカリウム-SDS 法 (DELLAPORTA *et al.*, 1983; 浅井ら, 1998) により接種トマト苗から抽出した核酸を試料とした。プライマーに PPSTV-1P(5'-CGC GCC CGC AGG ACC AC-3') 及び PPSTV-1M(5'-TGT CGG CCG CTG GGC ACT-3') (NAKAHARA *et al.*, 1998) を、逆転写酵素に M-MLV H+ (和光純薬) を、DNA ポリ

メラーゼに rTaq ポリメラーゼ (タカラバイオ) を用いた。PCR 反応は、GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用い、2 温度 PCR (変性: 94°C 30 秒、アニーリング及び伸長: 68°C 2 分) を 40 サイクル行った。

感染を確認したトマト株から収穫した完熟果実から種子を採取し、蒸留水で 3 回洗浄した。その後、常温で 2 週間乾燥してデシケーター内に保管し、以下の試験に供試した。

PSTVd 保毒の確認は、およそ 1500 粒の採種種子のうち 160 粒について 1 粒ごとに乳鉢内で磨砕し、上述の RT-PCR 法により行った。

その結果、供試した 160 粒のすべてから PSTVd に特異的な増幅が得られ、当該種子は 100% PSTVd を保毒しているものと考えられた。

同様に、ジャガイモ (品種: 農林一号) の保毒種子の作製を試みたが、ジャガイモが他家受粉性であり、また PSTVd の特別許可管理条件下での罹病ジャガイモからの採種が不可能であったため、ジャガイモ種子からの検出方法の検討では、ジャガイモ保毒種子の代わりにトマト保毒種子を用いた。

2. トマト及びジャガイモの健全種子の採種

検出試験に供試するトマト健全種子 (品種: ラトガス及び瑞栄) は網室内でポット栽培した健全株から採種し、また、ジャガイモ健全種子は露地栽培した国内産ジャガイモ (品種: 農林一号) の完熟果実から採種した。

トマトは母株の開花期の新葉から、ジャガイモは完熟した果肉及び果汁からそれぞれ核酸抽出を行い RT-PCR 法により、PSTVd に感染していないことを確認した。

方 法

1. トマト種子からの PSTVd の検出

(1) トマト種子の磨砕法の検討

健全トマト種子 400 粒 (約 1.4 g) に対し PSTVd 保毒種子 1 粒相当を加えた試料を調製し、カリウム-SDS 法による核酸抽出を行う場合の磨砕方法について検討した。健全種子に加える保毒種子は、滅菌カミソリ刃を用いて 2 等分し、その片方について RT-PCR 法で PSTVd 保毒を確認した。保毒が確認された種子 1/2 片を 2 個併せ保毒種子 1 粒相当とした。

磨砕のために添加する抽出緩衝液 (0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 1% 2-メルカプトエタノール, 0.05 M EDTA, pH 8.0, 1.25% SDS, 3.3% PVP M.W. 40000) の量は最終的に 10 ml とし、磨砕には乳鉢・乳棒またはマルチビーズショッカー (MB501 YPPS, 安井器械(株)製) を使用した。マルチビーズショッカーを用いた場合、浅井らの方法では、磨砕工程での発泡が著

しく、以後の核酸抽出操作に支障を来した。このため、抽出緩衝液から発泡の原因となる成分 (SDS, PVP) を除外したものを磨砕液 (第 1 液: 0.2 M Tris-HCl, pH 8.0, 1.0 M NaCl, 2% 2-メルカプトエタノール) とし、磨砕後、それに除外した成分 (第 2 液: 0.1 M EDTA, pH 8.0, 2.5% SDS, 6.6% PVP M.W. 40000) を添加した。すなわち、マルチビーズショッカー用の 50 ml の磨砕チューブに保毒トマト種子 1 粒相当を加えた健全トマト種子 400 粒 (約 1.4 g) に第 1 液を 5 ml 加え、2000 回転で 1 分間磨砕処理した後、第 2 液を 5 ml 加え転倒混和した。

(2) 核酸抽出緩衝液量の検討

効率の良い核酸抽出に適した緩衝液量を検討するために、上記の磨砕液 10 ml に 10 ml, 30 ml, 50 ml, 70 ml, の抽出緩衝液を加えたもの (最終量: 20 ml, 40 ml, 60 ml, 80 ml) を調製し、それぞれについてカリウム-SDS 法による核酸抽出を行い、RT-PCR 法による検出を行った。

(3) RT-PCR 法による検出

上記抽出用磨砕液から 1.5 ml ずつ採取し 2.0 ml のマイクロチューブに分注し、アルミブロック内で 65°C, 10 分間加温した。次に 5 M 酢酸カリウムを 0.5 ml 加え激しく振とうし、水中で 30 分間静置した。続いて 10000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、1.5 ml のマイクロチューブに上清を 0.9 ml 採取し、0.54 ml のイソプロパノールを添加し、転倒混和後、水中に 30 分間静置した。静置後 10000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、沈澱を 70% エタノールでリンスし、減圧乾燥後、50 μ l の蒸留水に懸濁し RT-PCR 法に供した。

プライマー、逆転写酵素及び DNA ポリメラーゼは前述したものを用いた。逆転写反応は、42°C で 15 分間、PCR 反応は、3 温度 PCR (変性 94°C 30 秒、アニーリング 57°C 1 分、伸長 72°C 2 分) または前述の 2 温度 PCR を 40 サイクル行った。

(4) 検出限界調査

健全トマト種子 400 粒に PSTVd 保毒トマト種子 4 粒相当 (保毒確認済み種子の 1/2 片を 8 個、健全種子 100 粒中保毒種子 1 粒相当) を加え、磨砕後、抽出緩衝液で最終 60 ml に調製して、核酸抽出用磨砕液とした。

これを、健全トマト磨砕液 (健全トマト種子 400 粒を同様に磨砕し抽出緩衝液で最終 60 ml に調製) で段階希釈することにより健全種子に対する保毒種子の割合が 1/100~1/2000 となるよう設定し (Table 2 の A)、RT-PCR 法による検出限界を調査した。核酸抽出法及び RT-PCR 法は前述と同様の方法で行ったが、DNA ポリメラーゼには rTaq ポリメラーゼ及び AmpliTaqTM Gold (Applied Biosystems) を用い、ポリメラーゼの違いによる検出限界の差についても併せて検討した。

2. ジャガイモ種子からの PSTVd の検出

(1) 抽出緩衝液量の検討

健全ジャガイモ種子 400 粒 (約 0.3 g) に PSTVd 保毒トマト種子 1/4 粒 (重量でジャガイモ種子 1 粒相当) を加え、2 ml, 4 ml, 8 ml 及び 16 ml の抽出緩衝液 (0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 1% 2-メルカプトエタノール, 0.05 M EDTA, pH 8.0, 1.25% SDS, 3.3% PVP M.W. 40000) を用い乳鉢内で磨砕後、核酸抽出及び RT-PCR を実施した。PCR 反応は、上述の 3 温度 PCR 及び 2 温度 PCR を 40 サイクル行った。

(2) 検出限界調査

健全ジャガイモ種子 400 粒に PSTVd 保毒トマト種子 1 粒相当を加え (健全種子 100 粒中に保毒ジャガイモ種子として 1 粒相当)、磨砕後、抽出緩衝液で最終 8 ml に調製した。

これを、健全ジャガイモ磨砕液 (健全ジャガイモ種子 400 粒を同様に磨砕し抽出緩衝液で最終 8 ml に調製) で段階希釈することにより健全種子に対する保毒種子の割合が 1/100~1/2000 となるよう設定し (Table 2 の B)、RT-PCR 法による検出限界を調査した。核酸抽出法及び RT-PCR 法はトマト種子における検出限界調査と同様とした。

結果及び考察

1. トマト種子からの PSTVd の検出

(1) トマト種子の磨砕方法の検討

トマト種子は硬く扁平であるため、乳鉢内で短時間に多量のものを磨砕することは困難であった。一方、マルチビーズショッカーを用いた場合、磨砕は極めて容易であるが磨砕行程での発泡が著しく、以後の核酸抽出操作に支障を来した。そのため、抽出緩衝液から発泡の原因となる成分 (SDS, PVP) を除外したものを磨砕液 (第 1 液) とし、磨砕後、それに除外した成分 (第 2 液) を添加することにより発泡が効果的に抑制できた。

(2) 抽出緩衝液量の検討

種子粒数 400 粒に対して、抽出緩衝液最終量が 60~80 ml の条件で核酸抽出を実施した場合、2 温度及び 3 温度 PCR の両条件とも安定した検出が可能であった。しかし 20 ml の条件では、抽出核酸に白濁した沈殿が見られ、RT-PCR による検出結果は安定しなかった (Table 1)。

(3) 検出限界調査

rTaq を使用した場合、3 温度 PCR では 1/2000 区でも検出されたが、2 温度 PCR では 1/400 区までしか検出できなかった。

Table 1. Effect of the amount of extraction buffer for RT-PCR.

Kind of seeds	Tomato				Potato			
Amount of extraction buffer (ml)	20	40	60	80	2	4	8	16
3-Temperature PCR**	3/4*	3/4	4/4	4/4	0/3	3/3	3/3	2/3
2-Temperature PCR***	1/4	4/4	4/4	4/4	5/12	8/12	12/12	10/12

*No. of samples detected/No. of samples tested

**Denaturation at 94°C, annealing at 57°C, and primer extension at 72°C

***Denaturation at 94°C, annealing and primer extension at 68°C

Table 2. PSTVd detection limit by RT-PCR.

A. Detection from tomato seeds

PCR method	Polymerase	Ratio of PSTVd infected seed to healthy tomato seeds										
		1/100*	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1000	1/1200	1/1400	1/1600	1/1800	1/2000
3-Temperature PCR	rTaq	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Taq Gold	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-Temperature PCR	rTaq	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
	Taq Gold	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

B. Detection from potato seeds

PCR method	Polymerase	Ratio of PSTVd infected seed to healthy potato seeds										
		1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1000	1/1200	1/1400	1/1600	1/1800	1/2000
3-Temperature PCR	rTaq	+	+	+	—	+	—	+	+	—	+	+
	Taq Gold	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-Temperature PCR	rTaq	+	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—
	Taq Gold	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*Infected seed/healthy seeds, **+: detected; —: not detected

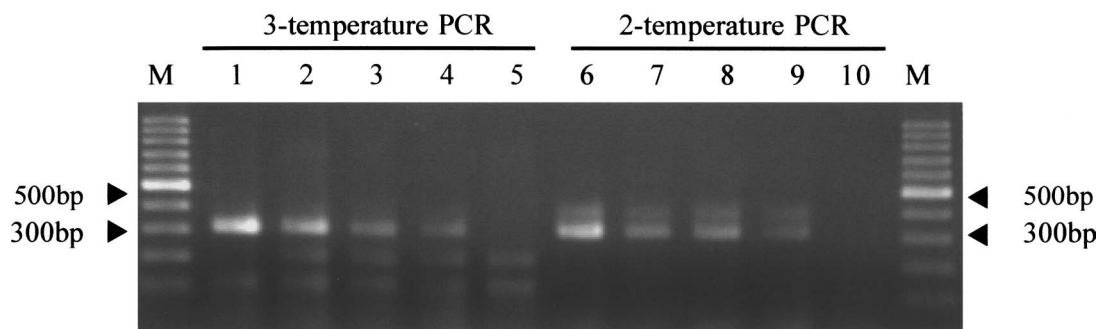


Fig. 1. Detection of PSTVd in tomato seeds by RT-PCR. lanes 1-5: 3-temperature PCR. lanes 6-10: 2-temperature. Ratio of PSTVd infected seed to healthy tomato seeds is, lanes 1, 6: 1/100. lanes 2, 7: 1/400. lanes 3, 8: 1/1000. lanes 4, 9: 1/2000. lanes 5, 10: 400 healthy tomato seeds. M: 100 bp DNA ladder marker.

しかし、AmpliTaq™ Gold を使用した場合、3 温度 PCR 及び 2 温度 PCR の両条件とも 1/2000 区まで検出が可能であった (Table 2, Fig. 1)。

2. ジャガイモ種子からの PSTVd の検出

(1) 抽出緩衝液量の検討

ジャガイモ種子 400 粒に対して 8 ml の抽出緩衝液を加えて磨砕しカリウム-SDS 法による核酸抽出を行うことにより、含まれる保毒種子が 1 粒相当 (本試験ではトマト種子を供試) であっても安定して PSTVd が検出された。しかし抽出緩衝液 2 ml の条件では、抽出核酸に粘性の高い白濁した沈殿が見られ、2 温度 PCR 及び 3 温度 PCR とともに検出率は低く検出結果は安定しなかった (Table 1)。

(2) 検出限界調査

rTaq を使用した場合、3 温度 PCR では 1/2000 区でも検出されたが、2 温度 PCR では 1/800 区までしか検出できなかった。

しかし、AmpliTaq™ Gold を使用した場合、3 温度 PCR 及び 2 温度 PCR の両条件とも 1/2000 区まで検出が可能であった (Table 2)。

3. まとめ

トマト種子の場合、種子が硬く扁平であるため 400 粒もの種子を乳鉢・乳棒で磨砕することは非常に困難であったが、マルチビーズショッカーを使用し、抽出緩衝液を 2 種 (第 1 液及び第 2 液) に分けて、第 1 液で磨砕後、発泡の原因となる PVP 及び SDS を含む第 2 液を別に加えることにより、容易に磨砕試料を得ることが可能となった。

また、抽出緩衝液量の検討及び検出限界調査の結果、トマト種子では 400 粒に対して抽出緩衝液量を 60 ml の割合、ジャガイモ種子では 400 粒に対して抽出緩衝液量を 8 ml の割合とし、PCR のポリメラーゼに AmpliTaq™ Gold を使用すれば、3 温度 PCR、2 温度 PCR のいずれでも健全種子 2000 粒中に保毒種子が 1 粒混入したサンプルからの検出が可能であることが示唆

Grind method for tomato seeds

1. Put 400 tomato seeds in 50 ml grinding tube.
2. Add 5ml of grinding buffer 1* and a metal cone.
3. Grind at 2000 rpm for one minute using a Multi-beads shocker, Yasui Kikai Co.
4. Add 5 ml of grinding buffer 2** and mix upside-down gently.
5. Transfer the grinding liquid to a 100 ml vessel.
6. Add 50 ml of extraction buffer*** and mix.

Grind method for potato seeds

1. Grind 400 potato seeds with a mortar and pestle.
2. Add 8 ml of extraction buffer*** and mix.

Extraction method

1. Put 1.5 ml of the grinding sample in a 2 ml tube.
2. Incubate for 10 minutes at 65°C.
3. Add 0.5 ml of 5 M potassium acetate and vortex.
4. Place in ice for 30 minutes.
5. Centrifuge for 10 minutes at 10000 rpm.
6. Transfer 0.9 ml of the supernatant to a new 1.5 ml tube.
7. Add 0.54 ml of isopropyl alcohol and mix upside-down.
8. Place the tube in ice for 30 minutes.
9. Centrifuge for 10 minutes at 10000 rpm.
10. Rinse the pellet with 70% ethanol.
11. Dry the pellet *in vacuo*.
12. Add 50 µl of distilled water and vortex.

*Grinding buffer 1: 0.2 M Tris-HCl (pH 8.0), 1.0 M NaCl, 2% 2-mercaptoethanol

**Grinding buffer 2: 0.1 M Ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt (EDTA) (pH 8.0), 2.5% sodium Laureth sulfate, 6.6% polyvinylpyrrolidone (PVP) M.W. 40000

***Extraction buffer: Mixture of equal volumes of grind buffer 1 and 2

Fig. 2. Grind and extraction method of nucleic acid of PSTVd in tomato and potato seeds.

された。

以上のことから、トマト及びジャガイモ種子からの PSTVd の検出について、Fig. 2 に示した磨砕・抽出方法で得られた核酸抽出物を供試して、AmpliTaTM Gold を用いた RT-PCR 検定を行うことが、信頼性の高い輸入種子の検査法として適当であると考ええる。

引用文献

- 浅井昌記・小原達二・高橋 勤・齊藤鈴夫・田中 健 (1998) リターンゲル電気泳動による果樹ウイロイドの検出. 植防研報 34: 99-102.
- DELLAPORTA, S. L., J. WOOD and J. B. HICKS (1983) A Plant DNA Miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21.
- DIENER, T. O. (1979) Viroids and Viroid Diseases. John Wiley & Sons, 12 pp.
- ELLIOT, D. R., B. J. R. ALEXANDER, T. E. SMALES Z. TANG, and G. R. G. CLOVER (2001) First report of potato spindle tuber viroid in tomato in New Zealand. *Plant Disease* 85: 1027.
- HADIDI, A., R. FLORES, J. W. RANGLES, and J. S. SEMANCIK, eds. (2003) Viroids, 37 pp.
- LOEBENSTEIN, G., P. H. BERGER, A. A. BRUNT, and R. H. LAWSON, eds. (2001) Virus and Virus-like Diseases of Potatoes and Production of Seed-Potatoes, 138 pp.
- NAKAHARA, K., T. HATAYA, Y. HAYASHI, T. SUGIMOTO, I. KIMURA, and E. SHIKATA (1998) A mixture of synthetic oligonucleotide probes labeled with biotin for the sensitive detection of potato spindle tuber viroid. *J. Virol. Methods* 71: 219-227.
- QUERCI, M., R. A. OWENS, I. BARTOLINI, V. LAZARTE, and L. F. SALAZAR (1997) Evidence for heterologous encapsidation of potato spindle tuber viroid in particles of potato leafroll virus. *J. gen. Virol.* 78: 1207-1211.