

RT-LAMP法を用いた*Potato spindle tuber viroid*検出法の改良

柳澤広宣・堤 直也・石井一考・志岐悠介・栗原金光

横浜植物防疫所

Modification on Detection Method of *Potato spindle tuber viroid* Using RT-LAMP. Hironobu Yanagisawa, Naoya Tsutsumi, Kazutaka Ishii, Yusuke Shiki, and Kinko Kurihara (Yokohama Plant Protection Station, 5-57 Kitnakadori Naka-ku, Yokohama 231-0003, Japan; yanagisawah@pps.maff.go.jp). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan.* **48**: 7-12 (2012).

Abstract: *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) is one of the most important plant pathogens. A detection method for detecting PSTVd in potato and tomato leaves and seeds using a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) method has recently been reported as an effective tool (Tsutsumi *et al.*, 2010). The RT-LAMP and sample preparation method were modified to produce a simple and rapid PSTVd inspection method in plant quarantine. As a result, with a sample preparation method using insect pins, successful detection was made in each of three test blocks: 800 tomato seedlings including one PSTVd infected tomato seedling; 100 dahlia seedlings including one infected dahlia seedling; and 50 potato tubers including one infected potato tuber. In addition, the modified RT-LAMP and sample preparation method was able to consistently detect PSTVd compared with the conventional method in a simulation test using 400 tomato seeds including one PSTVd infected seed.

Key words: RT-LAMP, *potato spindle tuber viroid*, detection method, potato, dahlia

緒 言

Potato spindle tuber viroid (PSTVd) は、バレイショやトマト等の重要な作物に甚大な病害を引き起こすことが知られており (Stevenson *et al.*, 2001; Elliott *et al.*, 2001)、植物検疫において重要な病原体とされている。また、PSTVdの伝搬経路として機械的伝播のほか、トマト及びバレイショ種子において高率に種子伝染することが知られている (Diener *et al.*, 1979; Loebenstein *et al.*, 2001; Hadidi *et al.*, 2003)。

PSTVdの発生は、アメリカ合衆国 (Diener and Raymer, 1971)、インド (Owens *et al.*, 1992)、中国 (He *et al.*, 1987)、ニュージーランド (Elliott *et al.*, 2001)、ヨーロッパ州の多くの国々 (Luigi *et al.*, 2011; Verhoeven *et al.*, 2007, 2009) 等において発生報告があり、このため、日本ではPSTVdの侵入を警戒していたが、2008年福島県の施設栽培トマト苗において、初めてPSTVdの発生が確認された。この発生は、2009年7月に根絶されたが (農林水産省, 2009)、侵入経路に関する調査を行った結果、海外から輸入されたトマト種子である可能性が高いと考えられた。さらに、2010年山梨県においてダリア (*Dahlia* sp.) 苗からPSTVdが検出された (農林水産省, 2010; Tsushima *et al.*, 2011)。そのため、現在PSTVdの根絶に向け調査が進められている。一方、海外から輸入されるバレイショ塊茎については、植物防疫所の隔離検疫によりPSTVdの感染の有無について検査が行われている。また、2011年9月

7日よりPSTVdの発生国から寄主植物 (アボカド、シマホオズキ、ダリア等) を輸入する場合には、輸出国における遺伝子学的検定が必要となり、2012年3月7日からはトマト及びバレイショの種子及び生植物であって栽培の用に供し得るものは、輸出国における栽培地検査及び遺伝子学的検定が必要となった。

これまでPSTVdの検査にはRT-PCR法が用いられているが、結果判定までに長時間 (2日間) を要するため、検定時間の短縮が求められている。

Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) は、植物体からウイルス又はウイロイドを高感度かつ迅速に検出する方法として有効であることが報告されている (福田ら, 2005a, 2005b)。Tsutsumiら (2010) は、PSTVd 特異的LAMPプライマーを開発し、トマト及びバレイショの葉や茎、並びにトマト及びバレイショ種子からPSTVdを検出するプロトコルを作成した。本試験では、Tsutsumiら (2010) の報告をもとに、当該プライマーのPSTVd特異性の検証を行い、多検体のトマト及びダリア苗、バレイショ塊茎、トマト種子からのPSTVdをRT-LAMP法を用いて高精度かつ迅速に検出するための試料調整法の検討を行った。

材料及び方法

1. PSTVd感染トマト及びバレイショの作出

農林水産大臣の許可を得て導入したカナダ産PSTVd 強毒系 (PSTVd-S) 及び弱毒系 (PSTVd-M) 並びに福島

県でトマト苗から検出されたPSTVd (PSTVd-F) を用いた。これらのPSTVd 3株がそれぞれ感染したトマト葉を0.1Mリン酸緩衝 pH 7.0 で磨砕し、粗汁液をトマト (品種: Rutgers) の子葉に接種した。同様に、バレイショでは、PSTVd-S 及びPSTVd-Mの2株を健全バレイショ (品種: 男爵、キタアカリ、トヨシロ、ワセシロ) の幼葉に接種した。接種植物は、25 ~ 30°Cに調整した温室内で管理した。

接種植物のPSTVd感染確認は以下のとおり行った。接種植物の上位葉0.1gから、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて核酸抽出を行った。RT-PCRは、One-Step RT-PCR Kit (QIAGEN) を用い、PSTVd検出用プライマーにはP3, P4プライマーセット (Behjatnia *et al.*, 1996) を使用した。RT-PCR反応液の組成は、キット付属のマニュアルに従って調整した。サーマルサイクラーは、GeneAmp® PCRsystem 9700 (Applied Biosystems) を用い、RT-PCR (50°C 30分, 95°C 10分後, 94°C 30秒, 62°C 30秒, 72°C 1分を35サイクル) を実施した。得られた増幅産物は、3%アガロースゲルを用い0.1M TAE緩衝液で電気泳動を行い、約360bpの増幅断片の有無を確認した。

2. PSTVd検出用RT-LAMPプライマーの特異性

PSTVdを含む *Pospiviroid* 属に分類される近縁の種を供試し、Tsutsumiら (2010) のPSTVd検出用RT-LAMPプライマーの特異性を確認した。試験には、PSTVd 4株 (PSTVd-M, -S, -F及び山梨県産ダリア苗より検出されたPSTVd (PSTVd-D))、広島県のトマト苗より検出された *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd)、国内産カンキツ苗より検出された *Citrus excortis viroid* (CEVd)、農林水産大臣の許可を得てオランダより導入した *Tomato apical stunt viroid* (TASVd) 及び *Columnea latent viroid* (CIVd) を供試した (第1表)。LAMP反応の温度は、60°C及び65°Cの2つの温度区を設定した。

3. LAMP増幅産物の確認

LAMP反応に伴う濁度の増加が特異的反応であるか非特異反応によるものかを識別する方法として、LAMP産物を制限酵素処理し、想定されるサイズの断片に収束するか確認することが有効とされている (Notomi *et al.*, 2000)。本試験では、NEBcutter (BioLabs) を用いて選抜した制限酵素4種 (*AluI* (タカラバイオ), *BamHI* (タカラバイオ), *MspI* (タカラバイオ) 及び *Hpy188III* (BioLabs)) を使用した。各制限酵素の反応条件は、付属のマニュアルに従い実施した。

4. 多検体のトマト苗からのPSTVd検出

トマト苗では、以下の2種の方法を比較した。

[磨砕法]

コルクボーラー (内径4mm) を用い各トマト葉から1個のディスクを切り抜き、0.1M Tris-HCl pH 8.0 を添加

し、マルチビーズショッカー (安井器械) を用い2,000rpmで1分間磨砕した。その後、磨砕液の上清1mlを20,000×gで5分間遠心した後、上清4µlをRT-LAMP反応の鑄型として用いた (福田ら, 2005b)。

試験区は、PSTVd感染トマト葉のみの区、トマト葉200、500及び800枚に1枚のPSTVd感染トマト葉を混入した区の4試験区とし、LAMP反応の温度は65°Cで行った。

[針刺法]

これまでに植物体より爪楊枝又は注射針を用い刺し、直接反応液に浸漬することでLAMP法又はRT-PCR法により、ウイルス及びウイロイドの検出する方法が報告されている (福田ら, 2005a, 2005b; 竹内ら, 2006; 細川ら, 2005)。これらの方法を参考にし、昆虫針 (5号, 以下同じ) を用いて試験を行った。

トマト葉を1本の昆虫針で数回刺し、0.6ml容マイクロチューブに分注した0.1M Tris-HCl pH 8.0 200µlに浸漬した後、この溶液をよく攪拌し、4µlをRT-LAMP反応の鑄型として用いた。

試験区は、PSTVd感染トマト葉のみの区、トマト葉100、400、800枚に1枚のPSTVd感染トマト葉を混入した区の4試験区を設定した。また、LAMP反応の温度は、65°Cで行った。

5. 多検体のダリア苗からのPSTVd検出

トマトの場合と同様に、0.6ml容マイクロチューブに入れた0.1M Tris-HCl pH 8.0 200µlにPSTVd感染ダリア葉 (品種: 古都) を刺した昆虫針を浸漬し、その溶液を良く攪拌した後、4µlをRT-LAMPの鑄型として用いた。また、PSTVd感染ダリア苗の葉並びに茎を数回刺した昆虫針をRT-LAMP反応液に直接浸漬しLAMP反応を実施した。さらに、多検体のダリア苗からのPSTVdの検出方法として、トマト苗に用いた針刺法について試験を行った。試験区は、PSTVd感染ダリア葉のみ区、ダリア葉50、100、300枚に1枚のPSTVd感染ダリア葉を混入した区の4試験区を設定し、LAMP反応温度は65°Cで行った。

6. 多検体のバレイショ塊茎からのPSTVd検出

Tsutsumiら (2010) は、バレイショの葉及び茎からRT-LAMP法によりPSTVdを検出できることを報告したが、バレイショ塊茎からの検出について行われていないため本試験で検討を行った。はじめに、バレイショ塊茎を昆虫針で刺しLAMP反応液に浸漬し、PSTVdを検出できるか試験を行ったところ、非特異的濁度の上昇が生じ、PSTVdを検出できなかった。この原因として、バレイショ塊茎に含まれる多量のデンプンであることが考えられた。そのため、デンプンを分解または除去するため、以下の2法について試験を行った。

(1) 各バレイショ塊茎について1本の昆虫針を用いて

第1表 PSTVd検出用LAMPプライマーセットの特異性試験に用いた供試ウイルス及びRT-LAMP反応温度別の検出結果

供試ウイルス	DDBJ ¹⁾ accession No.	各ウイルス株の由来	RT-LAMP反応温度	
			65°C	60°C
PSTVd-M	-	1969年、カナダ (Singh氏) より分譲、44横植第1974号 ²⁾	+	+
PSTVd-S	-	1969年、カナダ (Singh氏) より分譲、44横植第767号 ²⁾	+	+
PSTVd-F	EU862231	2008年、福島県	+	+
PSTVd-D	-	2010年、山梨県	+	+
TCDVd	AB329668	2007年、広島県	-	+
CEVd	-	日本国内	-	-
CIVd	AY372392	2010年、オランダ (Verhoeven氏) より分譲、22横植第306号 ²⁾	-	-
TASVd	AM777161	2009年、オランダ (Verhoeven氏) より分譲、20横植第896号 ²⁾	-	-

¹⁾: DNA データバンク (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)、+: 検出、-: 非検出 ²⁾: 農林水産省輸入許可指令番号

いくつかの芽を数回刺した後、0.6ml容マイクロチューブ内の0.1M Tris-HCl pH 8.0 200 μ lに浸漬した。デンプンを分解するため、さらに1 μ lの α -アミラーゼ (4~10Units/ μ l) (ニッポンジーン) 及び5 μ lのプロテアーゼ K (20mg/ml) (ニッポンジーン) を添加し、60°Cで30分間加温した。その後、20,000 $\times g$ で4°C 3分間遠心し、上清4 μ lをRT-LAMP反応の鋳型として用いた。

(2) 各バレイショ塊茎について、1本の昆虫針でいくつかの芽を数回刺した後、0.6ml容マイクロチューブに分注したRLT緩衝液 (RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) 付属) 200 μ lに浸漬した。その後、よく攪拌し56°Cで2分間静置した。次に、すべての緩衝液をQIAshredder (キット付属) に移し、20,000 $\times g$ で2分間遠心した。1.5ml容マイクロチューブに上清を移し、上清の半量の100%エタノールを添加した。全溶液をRNeasy spin カラム (キット付属) に移し、20,000 $\times g$ で15秒間遠心した後、RW1緩衝液 (キット付属) 350 μ lをRNeasy spin カラムに添加し、20,000 $\times g$ で15秒間遠心した。RPE緩衝液 (キット付属) 350 μ lをRNeasy spin カラムに添加し20,000 $\times g$ で2分間遠心した。1.5ml容マイクロチューブにRNeasy spin カラムを移し、RNase-free Water (キット付属) 30 μ lを添加し、20,000 $\times g$ で2分間遠心した。溶出したろ液4 μ lをRT-LAMP反応の鋳型として用いた。

上記の2法を、PSTVd感染バレイショ塊茎のみの区、塊茎50個に1個のPSTVd感染塊茎を混入した区の2試験区について実施した。またLAMP反応温度は、65°Cに設定して実施した。

7. トマト種子からのPSTVd検出

同時に多数のサンプルを処理できる核酸抽出法について検討した。トマト種子 (品種: Rutgers及び桃太郎) 400粒に1粒のPSTVd感染トマト種子を混入し、マルチビーズショッカー (安井器械) を用い、2,500rpmで1分間摩砕した。次に、摩砕緩衝液 (0.1M Tris-HCl pH 8.0、0.5M NaCl、1% 2-mercaptoethanol、0.05M EDTA pH 8.0、3.3% PVP M.W. 4000) 35ml及び1.75mlの25% SDSを添加し、よく攪拌し、2ml容マイクロチューブに摩砕液1.9mlを移

し、2,300 $\times g$ で4°C、2分間遠心した。次に2ml容マイクロチューブに上清1.5mlを移し、65°Cで10分間加温した。5M酢酸カリウム溶液0.5mlを加え激しく振とうし、水中で20分間静置し、その後13,000 $\times g$ で4°C、10分間遠心した。その後、1.5ml用マイクロチューブに上清0.9mlを移し、イソプロパノール0.54mlを添加し良く混合し、水中で10分間静置した。その後、20,000 $\times g$ で4°C、5分間遠心した。次に上清を取り除き、70%エタノール1.0mlを添加し、20,000 $\times g$ で4°C、5分間遠心し、上清を取り除き乾燥させた後、RNaseフリー水50 μ lを加え、この溶液4 μ lをRT-LAMP反応の鋳型として用いた。

また、Tsutsumiら (2010) の方法に従い、トマト種子400粒からPSTVdを検出できるか再現試験を行ったところ検出率が安定しないことが確認された。そのため、反応温度を65°C、63°C、60°Cに設定し、検出率に差が生じるか確認した。また、LAMP反応の温度が60°Cの場合、PSTVdとともにTCDVdが検出されるため、PSTVdであることを確認するため、制限酵素Hpy188III (BioLabs) を用いLAMP産物を処理し、PSTVd特異的バンドパターンに収束するか試験を行った。

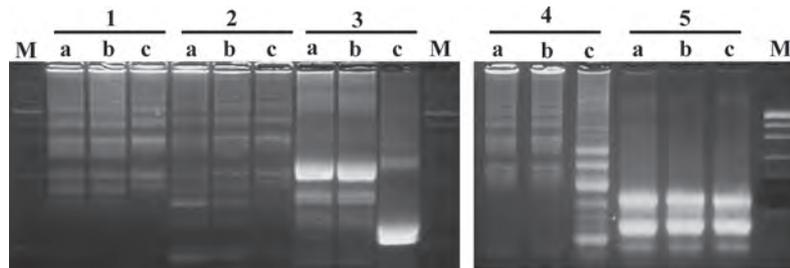
結 果

1. PSTVd感染トマト及びバレイショの作出

PSTVdを接種して約1ヵ月後のトマト及びバレイショ苗について、RT-PCRによりPSTVdに感染していることを確認した。トマト苗では葉脈間に凹凸を生じ株全体が萎縮した。また、PSTVd-M及びPSTVd-Fを接種したトマト苗では種子を採取することができたが、PSTVd-Sを接種したトマト苗では、萎縮が顕著に生じたため果実が形成されず、種子を採取することができなかった。バレイショでは葉には明瞭な症状は見られなかったが、次世代塊茎の小型化が認められた。

2. RT-LAMPプライマーのPSTVdへの特異性

PSTVd検出用RT-LAMPプライマーは、反応温度が65°Cの場合、PSTVdのみ濁度の上昇が確認されたが (第1表)、TCDVd、TASVd、CEVd及びCIVdは反応しな

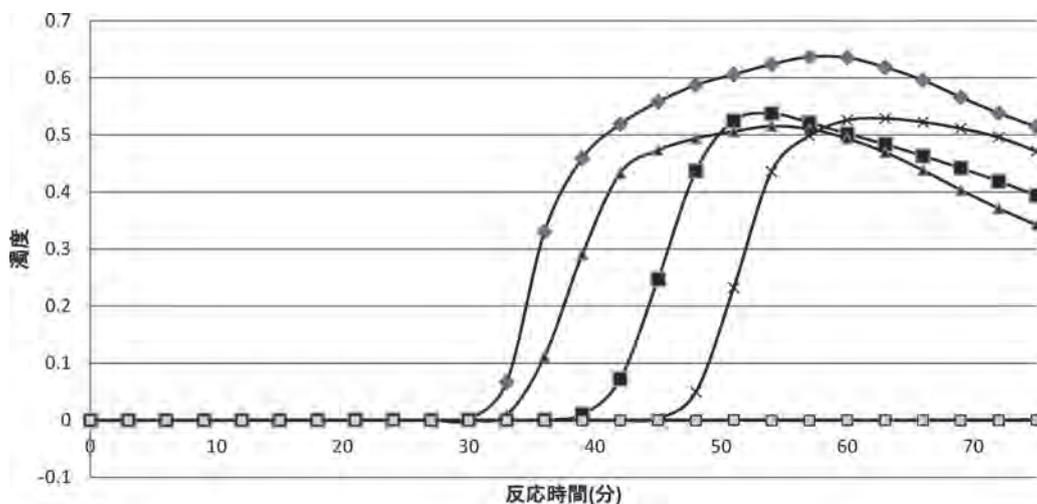


第1図 PSTVd及びTCDVdのLAMP産物の制限酵素処理試験

LAMP産物を4種の制限酵素を用いて処理を行い、想定されるサイズの断片に収束し、2種の制限酵素 (*Hpy188III*及び*AluI*)では、PSTVdとTCDVdにおいて異なるバンドパターンを示した。

1: 制限酵素未処理, 2: *Bam*HI, 3: *Hpy188III*, 4: *AluI*, 5: *MspI*

a: PSTVd-F, b: PSTVd-M, c: TCDVd, M: 100bp ladder marker



第2図 バレイシヨ塊茎50個中に1個のPSTVd感染塊茎が含まれた際のPSTVd検出結果LAMP反応の温度は、65°Cで実施した。(バレイシヨ塊茎50個中に1個のPSTVd感染塊茎を含む区 ◆:ダンジャク, ■:ワセシロ, ▲:キタアカリ, ×:トヨシロ) (健全のみ区 △:ダンジャク, ○:ワセシロ, |:キタアカリ, □:トヨシロ)

かった。しかし、反応温度が60°Cの場合、PSTVd及びTCDVdにおいて濁度が上昇した。

3. PSTVd検出用RT-LAMPプライマーの特異性

PSTVd及びTCDVdのLAMP産物を *MspI*により処理した場合、同じバンドパターンに収束することが確認されたが(第1図)、*AluI*及び*Hpy188III*により処理した場合には、異なるバンドパターンに収束した。また、*Bam*HIによる処理では、PSTVd及びTCDVd共に収束しなかった。

4. 多検体のトマト苗からのPSTVd検出

[摩砕法]では、PSTVd感染トマト葉のみの試験区ではPSTVdを検出することができたが、健全葉に感染葉を加えたすべての試験区ではPSTVdを検出することはできなかった(第2表)。
[針刺法]では、すべての試験区においてPSTVdを検出することができた。

5. 多検体のダリア苗からのPSTVd検出

LAMP反応液にPSTVd感染葉を刺した昆虫針を直接浸

漬した場合、PSTVd感染ダリア苗では濁度の上昇が確認されたが、健全ダリア苗では濁度の上昇は見られなかった。また0.1M Tris-HCl緩衝液にPSTVd感染ダリア葉を刺した昆虫針のみを浸漬した場合でも、PSTVdを高率に検出することができた。

また、多検体のダリア苗を対象とした[針刺法]では、ダリア苗1~100株ではPSTVdを検出することができたが、300株ではPSTVdを検出することができなかった(第2表)。

6. 多検体のバレイシヨ塊茎からのPSTVd検出

α -アミラーゼを用いた方法により試験を行った結果、非特異的濁度の上昇は生じなかったが、PSTVdを検出できない場合があった。一方、RNeasy Plant Mini Kitを用いた方法では、非特異的濁度の上昇は確認されず、供試した全てのバレイシヨの品種において安定してPSTVdが検出された(第2図)。

第2表 [摩砕法] 及び [針刺法] による多検体のトマト苗からのPSTVd検出結果

検体の種類	検出法	試験区	1/1 ¹⁾	1/200	1/500	1/800
トマト	[摩砕法]	試験区	1/1 ¹⁾	1/200	1/500	1/800
		検出結果	+(3/3) ²⁾	-(0/3)	-(0/3)	-(0/3)
	[針刺法]	試験区	1/1	1/100	1/400	1/800
		検出結果	+(3/3)	+(3/3)	+(3/3)	+(3/3)
ダリア	[針刺法]	試験区	1/1	1/50	1/100	1/300
		検出結果	+(3/3)	+(3/3)	+(3/3)	-(1/1)

¹⁾: PSTVd感染トマト苗数/総トマト苗数, ²⁾: 検出数/試験数, +: すべて検出, -: 検出不能

第3表 RT-LAMPの反応温度別のトマト種子400粒からのPSTVd検出結果

	反応温度 (°C)		
	60	63	65
PSTVd-M	4/4 ¹⁾	nt ²⁾	1/4
PSTVd-F	8/8	6/8	5/8

¹⁾: 検出サンプル数/試験サンプル数, ²⁾: 未試験

7. トマト種子からのPSTVdの検出

トマト種子の摩砕行程にマルチビーショッカーを用いたことにより、短時間で処理ができ、トマト種子の摩砕程度も各サンプルにおいて、均一に摩砕されていた。また、摩砕用チューブのフタの開閉時におけるサンプルの飛散もなかった。

LAMP反応の温度が65°Cの場合は、12サンプルのうち6サンプルで、63°Cでは8サンプルのうち6サンプルでPSTVdが検出された(第3表)。また反応温度が60°Cの場合では、12サンプルすべてでPSTVdを検出された。LAMP反応の温度が60°Cにおいて濁度の上昇が確認されたサンプルについて制限酵素 (*Hpy188III*) を処理した結果、PSTVdと同じバンドパターンが確認された。

考 察

Tsutsumiら(2010)により報告されたPSTVd検出のためのLAMPプライマーは、反応温度が65°Cの場合、供試したウイロイドのうち、PSTVdのみを特異的に検出し、TCDVd、TASVd、CEVd及びCIVdを検出しなかったが、反応温度を60°Cとした場合では、TCDVdもPSTVdと同様に検出した。これは、当該プライマーセットのうち、4プライマーがPSTVdとTCDVdの共通領域に設計されていることから、反応温度を低く設定したことによりTCDVdも増幅したものと考えられる。反応温度については、65°Cに設定した場合、PSTVdの検出率は50% (6/12)、63°Cでは75% (6/8)であったが、60°Cに設定した場合は、100% (12/12)となった。当該プライマーを用いてPSTVdのみを検出する場合には、反応温度を65°Cに設定する必要があるが検出率の低下が認められた。これに対し、反応温度を60°Cに設定した場合はPSTVdとTCDVdを検出するものの、検出率は高く維持することができた。検出率の向上は、反応温度を下げたことにより、LAMP

反応の増幅効率が向上したことにより検出率が向上したと推察される。また、LAMP産物を制限酵素処理することにより、PSTVdとTCDVdを明瞭に区別することが可能であることが確認された。このため、実際の検定においては、反応温度を60°Cに設定し、陽性反応が現れた場合は、制限酵素処理によりPSTVdとTCDVdを区別する必要がある。

Tsutsumiら(2010)は、トマトの葉及び茎を昆虫針で刺し、直接LAMP反応液に浸漬することでPSTVdを検出可能であると報告した。しかし、多検体のトマト苗からPSTVdを検出する場合には、昆虫針を反応液に複数回浸漬するため反応液が著しく減少し、また、反応チューブの蓋を開放した状態が長時間続いたため、コンタミネーションの発生リスクが高くなることから不相当であると考えられる。Tris-HCl緩衝液を用いた[針刺法]は核酸抽出工程が必要なく、迅速にPSTVdを検出でき、トマト苗800株に1株のPSTVd感染トマト苗を含む場合においても安定してPSTVdを検出することが可能であった。また、ダリア苗においてもTris-HCl緩衝液を用いた[針刺法]では、ダリア苗100株以下であれば1株PSTVd感染ダリア苗が混入されている場合でも、PSTVdを安定して検出することができた。このことから、多検体のトマト及びダリア苗を対象としたPSTVdの検出では、Tris-HCl緩衝液を用いた[針刺法]によりPSTVdを迅速かつ効率的に検出することができると思われる。

バレイショ塊茎については α -アミラーゼを用いた[針刺法]では、非特異的な濁度の上昇を抑えることができたが、PSTVdを安定して検出することができなかった。しかし、RNeasy Plant Mini Kitを用いた[針刺法]により、バレイショ塊茎50個に1個PSTVd感染塊茎が混入している場合においても、PSTVdを安定して検出することができた。また当手法では、非特異的な濁度の上昇は全く生じなかった。さらに核酸抽出に要する時間が非常に短時間(約30分間)であった。

Tsutsumiら(2010)はトマト種子400粒に1粒のPSTVd感染トマト種子を混入した条件からPSTVdが検出できることを報告したが、トマト種子を乳鉢で磨砕しており、同時に多数のサンプルを処理するには、乳鉢で磨砕することはたいへんな労力であり困難と考えられる。そのため、トマト種子からの検出法では、磨砕機を用いることにより労

力の大幅な軽減を図ることができた。なお、LAMP反応の温度を低く設定したことによりPSTVdのほかTCDVdを検出することが想定される。そのため、トマト種子を対象とした試験では、濁度の上昇が確認されたサンプルについて制限酵素処理試験を行い、PSTVdであることを確認する必要がある。

以上から、これらの試料調製法等は、RT-LAMP法を用いて多検体からPSTVdを検出する場合に有効な方法である考えられる。

摘 要

Potato spindle tuber viroid (PSTVd) は、ジャガイモ、トマト等の主要作物に経済的被害を与える、重要な病原の一つであるため、わが国の輸入検疫において、RT-PCR法による検査が採用されている。最近、Tsutsumiら (2010) は、ジャガイモやトマト種子からの本ウイルスの効果的な検出方法として、RT-LAMP法を報告した。しかしながら、本法によるトマト及びダリア苗、バレイショ塊茎の多検体の検査方法については確立されていないため、植物検疫への適用が困難であった。このため、迅速な多検体検査方法の確立を試みた。

昆虫針を使用した試料調製法を用いることにより、トマト苗では、800苗中PSTVd感染1苗を含んだ試料から、ダリア苗では、100苗中PSTVd感染1苗を含んだ試料から、また、ばれいしょ塊茎では、50塊茎中PSTVd感染1塊茎を含んだ試料からPSTVdを検出することができた。

さらに、改良したRT-LAMPと試料調製法により400粒中PSTVd感染1種子を含んだトマト種子から従来の方法と比較して、より安定したPSTVdの検出が可能となった。

引用文献

- Behjatnia S. A. A., I. B. Dry, L. R. Krake, B. D. Conde, M. I. Connolly, J. W. Randles and M. A. Rezaian (1996) *New Potato Spindle Tuber Viroid and Tomato Leaf Curl Geminivirus Strains from a Wild Solanum sp.* Phytopathology, Oxford, UK 86: 88 pp.
- Diener, T. O. (1979) *Viroids and Viroid Diseases*. John Wiley & Sons, Wiley-Interscience Publication, New York, 12 pp.
- Diener, T. O. and W. B. Raymer (1971) Potato spindle tuber 'virus.' CMI/AAB Description of Plant Viruses. No. 66.
- Elliott D. R., B. J. R. Alexander, T. E. Smales, Z. Tang, G. R. G. Clover (2001) First report of Potato spindle tuber viroid in tomato in New Zealand. *Plant Dis.* **85**: 1027.
- 福田至朗・新美喜久・大石一史・吉村幸江・穴井尚子・堀田真紀子・深谷雅博・加藤俊博・大矢俊夫・神戸美智雄 (2005) 2種のウイルスとキクスタントウイルスを検出する reversetranscription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) 法の開発. 関西病虫研報 **47**: 31-36.
- 福田至郎・穴井尚子・加藤政司・吉村幸江・深谷雅博・矢部和則・大矢俊夫・神戸三智雄 (2005a) 簡易な鋳型調整による loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を用いたトマト黄化葉巻ウイルスの検出. 関西病虫研報 **47**: 37-41.
- Hadidi, A., R. Flores, J. W. Randles and J. S. Semancik eds. (2003) *Viroids*, CSIRO Publishing, Australia, 37 pp.
- He, L. Y., H. L. Zhang and H. Huang (1987) Potato diseases in Asia: Resent and expected developments. *Acta Horticulturae* No. 213: 129-142.
- Hosokawa, M., Y. Matsushita, H. Uchida, and S. Yazawa (2006) Direct RT-PCR method for detecting two chrysanthemum viroids using minimal amounts of plant tissue. *J. Virol. Methods* **131**: 28-33.
- Loebenstien, G., P. H. Berger, A. A. Brunt and R. H. Lawson eds. (2001) *Virus and Virus-like Diseases of Potatoes and Protection of Seed-Potatoes*, Kluwer Academic Publishers, Boston, 138 pp.
- 農林水産省 (2009) プレイスリリース「ポテトスピンドルチューバーウイルスによるトマトの病気の調査結果と今後の対応について」〈<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/syokubo/090807.html>〉
- 農林水産省 (2010) プレイスリリース「ポテトスピンドルチューバーウイルス (PSTVd) によるダリア苗の発生と対応について」〈<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/syokubo/100205.html>〉
- Notomi, T., H. Okatama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino and T. Hasa (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **28**, e63.
- Owens, R. A., S. M. P. Khurana, D. R. Smith, M. N. Singh, I. D. Garg (1992) A new mild strain of potato spindle tuber viroid isolated from wild *Solanum* spp. in India. *Plant Disease*, **76**(5): 527-529.
- Stevenson, W. R., R. Loria, G. D. Franc and D. P. Weingartner (2001) *Compendium of Potato Diseases, 2nd edition*, St. Paul APS Press, 65-66.
- 竹内良彦・福田至郎・大矢俊夫 (2006) RT-LAMP法によるメロン黄化えそウイルス (MYSV) の検出. 愛知農総試研報 **38**: 57-63.
- Tsushima, T., S. Murakami, H. Ito, Y.-H. He, A. P. C. Raj and T. Sano (2011) Molecular characterization of Potato spindle tuber viroid in dahlia. *J. Gen. Plant Pathol.* **77**: 253-256.
- Tsutsumi, N., H. Yanagisawa, Y. Fujiwara and T. Ohara (2010) Detection of Potato Spindle Tuber Viroid by Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification. *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* **46**: 61-67.
- Luigi, M., D. Luison, L. Tomassoli, and F. Faggioli (2011) First report of *Potato spindle tuber* and *Citrus excortis viroids* in *Cestrum* spp. in Italy. *New Diseases Reports* **23**, 4.
- Verhoeven, T. Th. J., M. Botermans and J. W. Roenhorst (2009) First report of *Potato spindle tuber viroid* in Cape Gooseberry (*Physalis peruviana*) from Turkey and Germany. *Plant Disease* **93**: 316.
- Verhoeven, T. Th. J., C. C. C. Jansen and J. W. Roenhorst (2007) First report of pospiviroids infecting ornamentals in the Netherlands: *Citrus excortis viroid* in *Verbena* sp., *Potato spindle tuber viroid* in *Brugmansia suaveolens* and *Solanum jasminoides*, and *Tomato api*. *New Diseases Reports* **15**, 7.