

# マルチプレックス RT-PCR によるキクからのトマト黄化えそウイルス (TSWV) およびキクわい化ウイルス (CSVd) の同時検出

松浦 昌平

キーワード: 同時検出, キク, キクわい化ウイルス, マルチプレックス RT-PCR, トマト黄化えそウイルス

トマト黄化えそウイルス (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) は *Bunyaviridae* 科 *Tospovirus* 属のタイプ種で多くの野菜, 花き類に被害をおよぼす重要ウイルスである。本ウイルスは少なくとも7種のアザミウマ類で媒介され (Whitfield *et al.*, 2005), ミカンキイロアザミウマ (*Frankliniella occidentalis*) の伝搬効率が最も高い (Wijkamp *et al.*, 1995)。キク (*Dendranthema × grandiflorum*) では葉や茎にえそ, 退緑などの症状を呈し (Matteoni and Allen, 1989), 著しい品質低下をもたらす。1998年以降, 広島県のキク産地では, 島しょ部で恒常的に, 山間部で散発的に被害が発生している (Matsuura *et al.*, 2002)。

キクわい化ウイルス (*Chrysanthemum stunt viroid*, CSVd) は *Pospiviroidae* 科 *Pospiviroid* 属の356ヌクレオチドからなる高次の二次構造を有する環状1本鎖RNAで, 摘蕾, 切花作業に伴い接触, 刃物伝染する。キクでは1/2程度のわい化, 花の小形化, 退緑などがみられ (Flores *et al.*, 2005), 広島県では山間部のキク産地で被害が発生している (データ省略)。これらのウイルス, ウィロイドはいずれもキクの重要病害であり, 栄養繁殖を介して親株から挿し穂へと伝染する。従って, 被害を軽減するためには, 正確な診断に基づいた感染親株の除去, 更新が不可欠である。

これまで, TSWV の診断には ELISA や RT-PCR が, 一方, CSVd の診断にはポリアクリルアミドゲル電気泳動, ハイブリダイゼーションそして RT-PCR などが行われているが, これらの病原体を同時に検出する技術は報告されていない。マルチプレックス RT-PCR は1つの PCR 反応で複数のプライマーを使用し, 2種類以上の標的遺伝子を同時に検出する技術で, 近年, 農業分野においても利用され始めている (Uga and Tsuda, 2005; 下元・竹内, 2006)。

本研究では, 健全なキク親株を確保するための簡易かつ高精度なウイルス, ウィロイド診断技術を開発することを目的に, マルチプレックス RT-PCR によるキクからの TSWV と CSVd の同時検出技術を検討した。

## 材料および方法

TSWV のプライマーは S RNA の N タンパク質遺伝子の塩基配列 (DDBJ/EMBL/GenBank アクセション番号 D13926) に基づいて324bp の DNA 断片を増幅するように設計した。一方, CSVd のプライマーは既報 (アクセション番号 V01107) の塩基配列に基づいて, 末端保存領域を含む243bp の DNA 断片を増幅するように設計した (Table 1)。いずれも, 既報のウイルス, ウィロイド株の塩基配列と照合し, 3' 末端側に変異を含まないようにした。

供試株には, 広島県内のキク農家圃場で TSWV (江田島市) と CSVd (庄原市) に自然条件下でそれぞれ単独感染し, 黄化えそおよびわい化の病徴を呈したキク '神馬' および '町娘' を使用した。供試株の TSWV 感染は N タンパク質のモノクローナル抗体 (Tsuda *et al.*, 1994) による DAS-ELISA で, CSVd 感染は楠ら (1993) および Hooftman ら (1996) の設計したプライマーを用いた RT-PCR で確認した。ツーステップ・マルチプレックス RT-PCR は以下の方法で行った。各発病葉30mg から SV Total RNA Isolation System (Promega) を用いて, プロトコールに従って全 RNA を抽出した。単独および混合の RNA 液5 $\mu$ l を鋳型として, Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) およびランダムヘキサマー (5 $\mu$ g/ml) を用いて, プロトコールに従って cDNA を合成した。cDNA 液の2 $\mu$ l を鋳型とし, Takara *Ex Taq* (Takara) により PCR を行った。PCR 反応は全量を50 $\mu$ l で行い, 各プライマーの最終濃度は0.2 $\mu$ M とし, 94 $^{\circ}$ C, 3分の

Table 1 Primers used in multiplex RT-PCR for detectiong TSWV and CSVd in chrysanthemums

Primer <sup>a</sup>	Sequence	Length (mer)	T <sub>m</sub> (°C)	Nucleotide position	Expected size (Base pairs)
TSWV324F	5'-GCTTCCTTGGTGTCTACTT-3'	20	54	2247 to 2266 (v) <sup>b</sup>	324
TSWV324R	5'-AACTTCAGACAGGATTGGAG-3'	20	54	2551 to 2570 (vc)	
CSVd243F	5'-GTTAGCCCTTGAACCTTAG-3'	20	56	326 to 345 (v)	243
CSVd243R	5'-CCAGGAGAGGAAGGAACTA-3'	20	56	193 to 212 (vc)	

a) TSWV324F and R primers are designed from viral S RNA sequences.

b) v indicates virus (or viroid) sense. vc indicates virus (or viroid) complementary sense.

変性後、94℃、30秒、54℃、30秒、72℃、1分を30サイクル、最後に72℃で10分伸長反応させた。PCR産物はアガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色した。

TSWV および CSVd にそれぞれ単独感染し発病したキク '神馬' と '町娘' から前述の方法で全 RNA を抽出し、健全葉から抽出した全 RNA で10倍段階希釈した。各希釈液を異なる割合で混合した RNA 液を鋳型にし、同様の方法でツーステップ・マルチプレックス RT-PCR を行った。

TSWV と CSVd 重複感染キクからの簡易抽出とワンステップ・マルチプレックス RT-PCR による両ウイルス、ウイロイドの同時検出を試みた。すなわち、CSVd に感染したキク '町娘' の発根苗に TSWV を汁液接種した。TSWV によるキクえそ病の病徴を呈した '町娘' の発病葉25mg を2500 μ l (100倍量) の TE 緩衝液 (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA) で十分に磨碎し、5000rpm、5分遠心した後、その上清を同じ緩衝液で10倍段階希釈した。各希釈液は65℃、5分熱処理し、このうち1 μ l を用いて、One-Step RNA PCR Kit (AMV) (Takara) によりプロトコールに従って、ワンステップ・マルチプレックス RT-PCR を行った。プライマーは最終濃度0.4 μ M で使用し、PCR の反応条件は前述と同様とした。

## 結果および考察

TSWV および CSVd にそれぞれ単独感染したキクからの抽出 RNA の単独、混合を鋳型としたツーステップ・マルチプレックス RT-PCR では、ともに予想される分子量の DNA 断片が認められ、健全キクからは認められなかった (Fig. 1)。CSVd 感染葉からは予想された DNA 断片以外に600bp 付近に明瞭な DNA 断片が検出されたが、目的の DNA 断片と分子量が大きく異なるため、判定の障害にはならなかった。増幅 DNA 断片をゲルから切り出し、精製後、BigDye Terminator v3.1

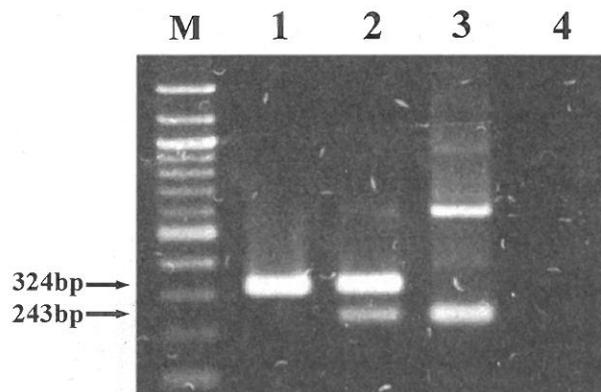


Fig.1. Two-step multiplex RT-PCR amplification products using one single or a mixture of two species of total RNAs extracted from chrysanthemum leaves infected with TSWV and CSVd. RT was performed using random hexamer primers.

Lanes : M, 100-bp ladder marker ; 1, TSWV ; 2, TSWV and CSVd ; 3, CSVd ; 4, Healthy chrysanthemum plant.

Cycle Sequencing Kit により塩基配列を決定したところ、324bp 増幅断片は TSWV の N タンパク質遺伝子と 98.5%、243bp 増幅断片は CSVd と 97.0% の高い相同性が認められ、目的の遺伝子が増幅されたことが確認された。TSWV324F と TSWV324R をプライマーとした RT-PCR では、広島県内の他の地域で採集したキクえそ病発病キク '精興の秋'、'秋晴れ'、'精の曲' および '金峯' から目的の増幅 DNA 断片が得られ、TSWV に近縁のインパチエンス・ネクロティック・スポット・ウイルス (*Impatiens necrotic spot virus*, INSV) cin9902 株 (谷名ら, 2001) に感染した *Nicotiana benthamiana* からは増幅 DNA 断片は得られなかった (データ省略)。また、CSVd243F と CSVd243R をプライマーとした RT-PCR では、広島県内の他の地域で採集したキクわい化病発病キク '舟宿' から目的の増幅 DNA が得られた

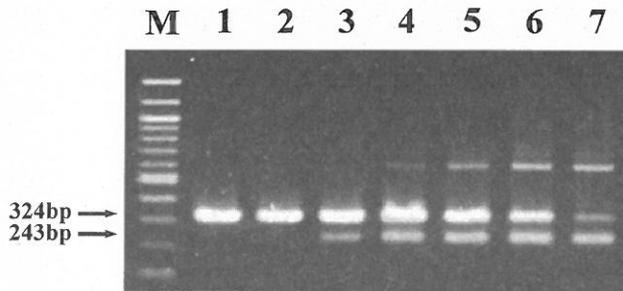


Fig.2. Two-step multiplex RT-PCR amplification products using a mixture of two species of total RNAs extracted from chrysanthemum leaves infected with TSWV and CSVd. Total RNAs were separately diluted with RNAs from healthy leaves and mixed to create  $10^0$  to  $10^{-3}$  dilutions of TSWV and CSVd. RT was performed using random hexamer primers.

Lanes : M, 100-bp ladder marker; 1-3,  $10^{-3}$  to  $10^{-1}$ -fold dilutions of CSVd with  $10^0$ -fold dilution of TSWV ; 4,  $10^0$ -fold dilution of TSWV and CSVd ; 5-7,  $10^{-1}$  to  $10^{-3}$ -fold dilutions of TSWV with  $10^0$ -fold dilution of CSVd.

(データ省略)。このように、本プライマーはそれぞれの病原体に高い特異性を有しており、かつ、異なる時期と場所で採取されたキクの TSWV と CSVd 株を検出できるものと推察された。異なる割合で混合した抽出 RNA 液を鋳型にしたツーステップ・マルチプレックス RT-PCR では、CSVd は  $10^{-2}$  希釈まで、TSWV は  $10^{-3}$  希釈でも検出できた (Fig.2)。このように、鋳型 RNA 量の比率を変えても、ツーステップ・マルチプレックス RT-PCR によって TSWV と CSVd の同時検出が可能であった。ランダムヘキサマーを用いたツーステップ・マルチプレックス RT-PCR では、合成した cDNA 液を用いて、他の病原体も検出できる可能性があり今後の検討を要する。

TSWV と CSVd の重複感染キクからの粗汁液を用いたワンステップ・マルチプレックス RT-PCR では、TSWV は  $10^{-8}$  希釈まで、CSVd は  $10^{-5}$  希釈まで検出できた (Fig.3)。また、 $-35^{\circ}\text{C}$  で 1 週間凍結した罹病サンプルを使用しても同じ結果が得られた (データ省略)。感染葉からは、450bp と 900bp 付近に増幅 DNA 断片が検出されたが、目的の分子量と異なるため、判定の障害にはならなかった。本法による TSWV の検出感度は、同じサンプルを用いたモノクローナル抗体による DAS-ELISA の検出限界が  $10^{-5}$  であったのに対して、約 1000 倍の十分な高さを示した (データ省略)。Uga ら (2005)

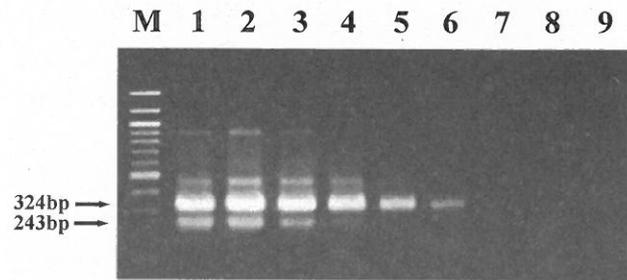


Fig.3. Detection sensitivity by one-step multiplex RT-PCR using crude sap from TSWV and CSVd co-infected chrysanthemum leaves. A leaf sample (25 mg) was ground with 2500  $\mu\text{l}$  of extraction buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) and the resultant crude sap was serially diluted up to  $10^{-9}$ -fold with the same buffer. Approximately, 1  $\mu\text{l}$  of crude sap, centrifuged and heated at  $65^{\circ}\text{C}$  for 5 min, was used as the template for one-step multiplex RT-PCR.

Lanes : M, 100-bp ladder marker ; 1-8,  $10^{-2}$  to  $10^{-9}$ -fold dilutions ; 9, healthy chrysanthemum plant.

は各種植物の粗汁液を用いたワンステップ RT-PCR で種々の植物ウイルスが高感度に検出できたと報告し、その理由として、希釈によるタンパク質、多糖類などの PCR 阻害物質の低濃度化、検定キット自体の阻害物質を受けにくい特性等を推察している。本実験でも、容積比 100 倍以上の TE 緩衝液で磨砕した粗汁液を用い、ワンステップ・マルチプレックス RT-PCR を行うことで、キクの阻害物質の影響を受けずに、TSWV と CSVd を高感度に同時検出することが可能であった。

TSWV はキク組織内で局在することが報告されている (Allen *et al.*, 1990; Van de Wetering *et al.*, 1999; Matsuura *et al.*, 2004)。粗汁液を用いた本法では、無病徴の感染キク '神馬' から TSWV を検出することが可能であったが、感染株でも検出できない部位もみられた (データ省略)。したがって、親株を検定する場合は、複数葉を採取し混合して検定するなど、ウイルスの局在性を均質化することが必要と考えられる。一方、CSVd は RT-PCR で検出可能な高濃度感染と Nested RT-PCR でないと検出できない低濃度感染があることが知られており (細川ら, 2003)、多くの品種が低濃度感染している可能性も示唆されている。本法により、無病徴の感染キク 'レサイバー・サーモン' から CSVd を検出することができたが (データ省略)、低濃度感染株からの検出は行っていない。しかし、低濃度感染の場合、

発病まで長期間を必要とするため、挿し穂を用いる切り花栽培における被害回避という視点に立てば、高濃度感染のみを標的にして問題はないと考えられ、その選別は本法で可能と考えられる。

以上のように、煩雑な核酸の精製を行わず、感染葉の粗汁液を用いたワンステップ・マルチプレックス RT-PCR によってキクの TSWV と CSVd を同時に高感度検出することが可能であり、本法は切り花生産あるいは親株維持用の挿し穂を採穂するための母株のより簡便な診断手法として、公的な指導機関や種苗会社等において利用できるものと考えられる。

近年、キクでは *Tospovirus* 属の *Chrysanthemum stem necrosis virus*, CSNV (Duarte *et al.*, 1995) や *Pelamoviroid* 属の *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*, CChMVd (Yamamoto *et al.*, 2005) の被害も問題となっている。今後はこれらの病原体をも含めた同時検出技術を確立する必要がある。

## 謝 辞

本研究の実施にあたり、岡山県農業総合センター谷名光治氏よりインパチエンス・ネクロティック・スポット・ウイルス分離株を、中央農業研究センターの津田新哉博士より TSWV モノクローナル抗体を分譲していただいた。ここに記して深く謝意を表する。

## 摘 要

TSWV の S RNA の N 遺伝子から 324bp を、CSVd の 243bp を増幅するプライマーを設計した。TSWV および CSVd それぞれのキク発病葉から全 RNA を抽出し、ランダムプライマーを用いてツーステップ・マルチプレックス RT-PCR を行ったところ、RNA の単独、混合ともに予想される分子量の増幅 DNA が認められ、健全葉からは認められなかった。また、鋳型 RNA 量の比率が異なっても両病原体の同時検出が可能であった。さらに、INSV 発病 *Nicotiana benthamiana* から増幅 DNA は検出されなかった。TSWV と CSVd に重複感染したキクの TE 粗汁液を鋳型にワンステップ・マルチプレックス RT-PCR を行ったところ、TSWV は  $10^{-8}$  希釈まで、CSVd は  $10^{-5}$  希釈まで検出できた。以上から、煩雑な核酸精製を行わず、感染葉の粗汁液を用いたワンステップ・マルチプレックス RT-PCR によってキクの TSWV と CSVd を同時に高感度検出することが可能で、切り花生産あるいは親株維持用の挿し穂を採穂するための母

株の簡易な診断手法として利用できるものと考えられる。

## 引用文献

- Allen, W. R., Matteoni A. J. and Broadbent A. B. 1990. Susceptibility of cultivars of florist's chrysanthemum to tomato spotted wilt virus. *Can. J. Plant Pathol.* 12 : 417-423.
- Duarte, L. M. L., Rivas, E. B., Alexandre, M. A. V., de Avila, A. C., Nagata, T. and Chagas, C. M. 1995. Chrysanthemum stem necrosis caused by a possible novel tospovirus. *J. Phytopathol.* 143 : 569-571.
- Flores, R., Hernandez, C., Martinez de Alba, E., Daros, J. and Di Serio, F. 2005. Viroids and viroid-host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43 : 117-139.
- Hoofman, R., Arts, M. J., Shamloul, A. M., Van Zaayen, A. and Hadidi, A. 1996. Detection of chrysanthemum stunt viroid by reverse transcription-polymerase chain reaction and by tissue blot hybridization. *Acta Hort.* 432 : 120-128.
- 細川宗孝・植田恵美・大石一史・矢澤 進. 2003. キクスタントウイロイドの感染によるキクの開花に対する日長反応性の攪乱. *園学雑* 72別2 : 447.
- 楠 幹生・寺見文宏・寺内英貴・十河和博. 1993. 逆転写-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) によるキク矮化ウイロイドの検出. *関西病虫研報* 35 : 7-12.
- Matsuura, S., Hoshino, S., Hayashi, H., Kohguchi, T., Hagiwara, K. and Omura, T. 2002. Effects of latent infection of stock plants and abundance of thrips on the occurrence of Tomato spotted wilt virus in chrysanthemum fields. *J. Gen. Plant Pathol.* 68 : 99-102.
- Matsuura, S., Ishikura, S., Shigemoto, N., Kajihara, S. and Hagiwara K. 2004. Localization of *Tomato spotted wilt virus* in chrysanthemum stock plants and efficiency of viral transmission from infected stock plants to cuttings. *J. Phytopathol.* 152 : 219-223.
- Matteoni, J. A. and Allen W. R. 1989. Symptomatology of tomato spotted wilt virus infection in florist's chrysanthemum. *Can. J. Plant Pathol.* 11 : 373-380.
- 下元祥史・竹内繁治. 2006. ウリ科作物に発生する 3 種

- ポテウイルスのマルチプレックス RT-PCR による同時検出. 日植病報 72 : 146-149.
- 谷名光治・井上幸次・伊達寛敬・奥田 充・花田 薫・那須英夫・粕山新二. 2001. インパチエンスネクロティックスポットウイルスによるシネラリアえそ斑紋病. 日植病報 67 : 42-45.
- Tsuda, S., Hanada, K., Fujisawa, I., Kameya-Iwaki, M. and Tomaru, K. 1994. The demonstration of strain-specific antigenic determinants on nucleocapsid of Tomato spotted wilt virus by monoclonal antibodies. Ann. Phytopath. Soc. Japan 60 : 216-220.
- Uga, H. and Tsuda, S. 2005. A one-step reverse transcription-polymerase chain reaction system for the simultaneous detection and identification of multiple tospovirus infections. Phytopathology 95 : 166-171.
- Uga, H. 2005. Use of crude sap for one-step RT-PCR-based assays of *Bean yellow mosaic virus* and the utility of this protocol for various plant-virus combinations. J. Gen. Plant Pathol. 71 : 86-89.
- Van de Wetering, F., Posthuma, K., Goldbach, R. and Peters, D. 1999. Assessing the susceptibility of chrysanthemum cultivars to tomato spotted wilt virus. Plant Pathol. 48 : 693-699.
- Whitfield, A. E., Ullman D. E. and German T. L. 2005. Tospovirus-thrips interactions. Annu. Rev. Phytopathol. 43 : 459-489.
- Wijkamp, I., Almarza, N., Goldbach, R. and Peters, D. 1995. Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. Phytopathology 85 : 1069-1074.
- Yamamoto, H. and Sano, T. 2005. Occurrence of *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* in Japan. J. Gen. Plant. Pathol. 71 : 156-157.

## Simultaneous Detection of *Tomato spotted wilt virus* and *Chrysanthemum stunt viroid* by Multiplex RT-PCR from Chrysanthemum

Shohei MATSUURA

### Summary

A multiplex RT-PCR method was developed for detecting *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) and *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) simultaneously from chrysanthemum. Two-step multiplex RT-PCR using random hexamer primers and specific primer sets detected the RNAs of the virus and viroid separately and simultaneously in extracts of TSWV and CSVd-infected chrysanthemum leaves. One-step multiplex RT-PCR, using crude sap of chrysanthemum leaves co-infected with TSWV and CSVd, was also sufficiently sensitive to detect TSWV at dilutions of up to  $10^{-8}$ -fold and CSVd up to  $10^{-5}$ -fold. The results suggest this method to be able to detect these pathogens in chrysanthemum stock plants; if adopted, it could markedly reduce the dispersal of these diseases via cuttings.

Key words : *chrysanthemum*, *Chrysanthemu stunt viroid*, multiplex RT-PCR, simultaneous detection, *Tomato spotted wilt virus*