

## RT-PCR法によるトマト感染葉からのタバコモザイクウイルスと トマトモザイクウイルスの同時検出の試み

渡辺 貴弘・加藤 久晴\*・福田 明美\*\*・古河 衛・佐野 義孝\*\*\*

Takahiro WATANABE, Hisaharu KATO, Akemi FUKUDA, Mamoru FURUKAWA and Yoshitaka SANO:

Simultaneous assay for detection of *Tobacco mosaic virus* and *Tomato mosaic virus* from their infected  
tomato leaves by multiplex RT-PCR

トマト葉に感染したタバコモザイクウイルス (*Tobacco mosaic virus*, TMV) とトマトモザイクウイルス (*Tomato mosaic virus*, ToMV) を同時に検出するためのRT-PCRを試みた。各ウイルスに特異的なプライマーを混合して用いたRT-PCRによってTMVあるいはToMV単独感染葉から、想定される長さ (709bp, 578bp) のDNA断片がそれぞれ増幅された。また、TMVとToMV混合感染葉、TMVとToMVのRNA混合標品からも両方のDNA断片が増幅された。一方、ToMV-L<sub>II</sub>A単独感染葉およびTMVとL<sub>II</sub>A混合感染葉からは、ToMVプライマーによるL<sub>II</sub>Aの増幅は見られなかった。L<sub>II</sub>Aを特異的に検出するプライマーを使用した場合、ToMV感染葉からは検出されなかったが、L<sub>II</sub>A感染葉からは想定されるサイズのDNA断片が増幅された。

Key words: トマト, マルチプレックスRT-PCR, *Tobacco mosaic virus*, *Tomato mosaic virus*, multiplex RT-PCR

### 緒 言

2005年の福井県におけるトマトの作付面積は94haであり、園芸品目として主要な位置を占める。本県特産の中玉トマトの品種「越のルビー」は消費者の需要が高く、高品質性が求められている。一方で、ウイルスを中心とした病害による品質低下が生じている。トマトにモザイク症状を発生させるウイルスは、タバコモザイクウイルス (*Tobacco mosaic virus*, TMV), トマトモザイクウイルス (*Tomato mosaic virus*, ToMV), キュウリモザイクウイルス, ジャガイモXウイルス, ジャガイモYウイルス, トマトアスパーミイウイルス<sup>1)</sup>があるが、本県では主にTMV, ToMVが発生している<sup>1)</sup>。

ウイルス病に対する有効な薬剤がないため、一度発病すると直接、減収や品質低下につながる。そのため、早期に感染の有無を判定し、感染植物を除去することで被害の拡大を防ぐ必要がある。

そこで、RT-PCRによる遺伝子診断法を用いて、TMVとToMVを検出する診断技術を検討した。その際、検出

コストと労力を考慮し、同時に両ウイルスが検出可能なマルチプレックスRT-PCR法を採用した。

また、「越のルビー」はToMVの弱毒ウイルスであるToMV-L<sub>II</sub>A (L<sub>II</sub>A) を接種した後、生産者に供給しているため、L<sub>II</sub>Aと強毒ToMVを区別して検出する必要がある。そこで、ToMVの強毒株と弱毒株の識別法についても検討した。

### 材料および方法

#### 1. 供試ウイルスおよび植物

本試験では、当試験場内で-80℃で保存していたTMV-OM (農業生物資源研究所大橋祐子博士より分譲), ToMV-T (MAFF104034), L<sub>II</sub>A (日華化学より分譲) を供試した。これらをカーボランダム法でトマト (品種: 大型福寿) に接種し、TMVの単独感染, ToMVの単独感染, TMVとToMVの混合感染, L<sub>II</sub>Aの単独感染, TMVとL<sub>II</sub>Aの混合感染した合計5種類のウイルス感染トマトを得た。

また、当試験場のトマト栽培圃場から採取したウイル

福井県農業試験場 Fukui Agricultural Experiment Station, 52-21 Henguri, Ryo-machi, Fukui, Fukui 918-8215

\*福井県立大学 Fukui Prefectural University, 4-1-1 Matsuoka Kenzoyozima, Eihei-ji, Fukui 910-1195

\*\*現在 福井農林総合事務所 Fukui Agriculture and Forestry General Office, 3-16-10 Matsumoto, Fukui, Fukui 910-113

\*\*\*新潟大学農学部 Faculty of Agriculture, Niigata University, 2-8050 Ikarashi, Niigata, Niigata 950-2181

ス病様の症状を呈した計3株のトマト(以下, No.1, No.2, No.3)も供試した。

## 2. プライマー設計

プライマーの設計は, DDBJのデータベースに登録されているTMV-Fujian (AF395127), TMV-Rakkyo (D63809), TMV-L (X02144), ToMV-Chinese (AJ132845), ToMV-K1 (AJ243571), ToMV-Camellia (AJ417701), ToMV-K2 (Z92909)の全塩基配列からClustal Xを使用してアライメントし, TMVおよびToMVそれぞれで特異性が高く, L<sub>11</sub>AとToMVの塩基配列が異なる領域を検索した。その結果, TMVについては, TMV-FujianゲノムRNAにおける5547番目および6217番目の塩基が3'末端になるように上流および下流プライマーを設計した。ToMVもしくはL<sub>11</sub>Aを検出するプライマーについては, L<sub>11</sub>AとToMVで塩基が異なるTMV-LゲノムRNAにおける5277, 5816番目が3'末端になるように上流および下流プライマーを設計し, 同時に3'末端から3番目の塩基がミスマッチになるようにした(第1表)。

## 3. RT-PCR法

本葉2葉期に汁液接種後, 新しく展開したモザイク症状を呈するトマト葉0.1gからRNeasy Plant Mini Kit(キアゲン社)で全RNAを抽出した。RT-PCRにはSuperScrip™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase(インビトロジェン社)を用いた。

上述のように汁液接種により感染させたトマト葉から抽出したRNAのRT-PCR反応では, TMV検出用プライマー(TMV-F, TMV-R)とToMV検出用プライマー(ToMV-F, ToMV-R)を混合した。また, L<sub>11</sub>Aを検出するために, TMV検出用プライマーとL<sub>11</sub>A検出用プライマー(L<sub>11</sub>A-F, L<sub>11</sub>A-R)を混合したRT-PCRも行った。

第1表 TMVおよびToMVを検出するためのプライマー配列

名前	プライマー配列
TMV-F	5'-AGTTTCGATCTCGAACCGGA-3'
TMV-R	5'-GTGATTACGGACACAATCCG-3'
ToMV-F	5'-AGTTTAAAGTGGTCCCAGAT-3'
ToMV-R	5'-AGTAGTCTTGCTTGCCGT-3'
L <sub>11</sub> A-F	5'-AGTTTAAAGTGGTCCCAGAC-3'
L <sub>11</sub> A-R	5'-AGTAGTCTTGCTTGCCGC-3'

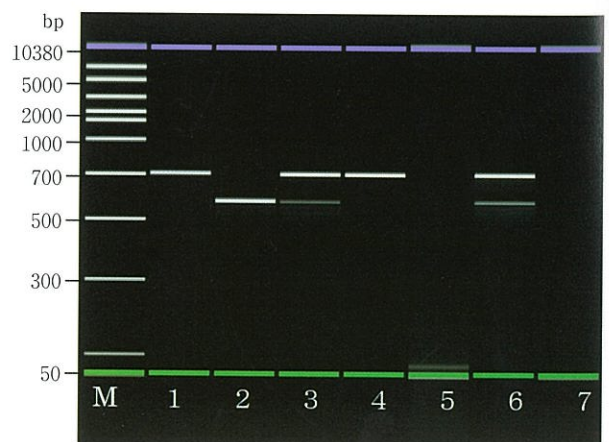
当試験場内のトマト栽培圃場から採取した罹病葉から抽出したRNAの場合は, TMV検出用プライマーのみ, ToMV検出用プライマーのみ, TMV検出用プライマーとToMV検出用プライマーの混合の3通りについてRT-PCRを行った。

RT-PCRの反応条件は, 逆転写が60℃で15分, 94℃で2分, PCRが94℃で15秒, 56℃で30秒, 68℃で45秒の30サイクルとした。PCR終了後は, チップ式電気泳動装置(Agilent Technologies社, アジレント2100バイオアナライザ)で電気泳動を行い, 増幅産物の有無を確認した。

## 結果および考察

TMV検出用プライマーとToMV検出用プライマーを混合してRT-PCRを行った場合, TMVあるいはToMV単独感染葉の抽出RNAからは想定される長さ(709bp, 578bp)のDNA断片がそれぞれ増幅された。また, TMVとToMV混合感染葉の抽出RNA, TMVとToMVのRNA混合試料からも両方のバンドが同時に認められたが, ToMVのDNA断片は少し薄くなる傾向が確認された。一方, L<sub>11</sub>A単独感染葉およびTMVとL<sub>11</sub>A混合感染葉からは, L<sub>11</sub>A由来と考えられるDNA断片の増幅が認められなかった(第1図)。

次に, TMV検出用プライマーとL<sub>11</sub>A検出用プライマーを混合してRT-PCRを行った場合, TMVおよびL<sub>11</sub>A



第1図 TMV, ToMV検出用プライマーによるRT-PCR反応結果

M: DNA マーカー レーン1: TMV単独感染, レーン2: ToMV単独感染, レーン3: TMV, ToMV混合感染, レーン4: TMV, L<sub>11</sub>A混合感染, レーン5: L<sub>11</sub>A単独感染, レーン6: TMV, ToMVのRNA混合, レーン7: 健全葉



単独感染葉からは想定される長さのDNA断片がそれぞれ認められた。また、TMVとL<sub>11</sub>A混合感染葉、TMVとL<sub>11</sub>AのRNA混合試料からも両方のDNA断片が同時に認められたが、L<sub>11</sub>AのDNA断片は少し薄くなる傾向が確認された。一方、ToMV単独感染葉およびTMVとToMV混合感染葉から、ToMV由来のDNA断片は増幅されず、L<sub>11</sub>Aプライマーの特異性が確認された(第2図)。なお、ToMVおよびL<sub>11</sub>A検出用プライマーの配列については、当初、山本ら<sup>6)</sup>が報告した3'末端の1塩基のみが置換した手法を用いたが、しばしばToMVとL<sub>11</sub>A両方のDNA断片が増幅して結果が不安定であった。そこで、林ら<sup>2)</sup>の報告を参考に3'末端から3番目の塩基にミスマッチを導入したプライマーを設計し、RT-PCRに供試したところ、ToMVおよびL<sub>11</sub>A由来のDNA断片がそれぞれ特異的に増幅され、両者の識別が可能であった。

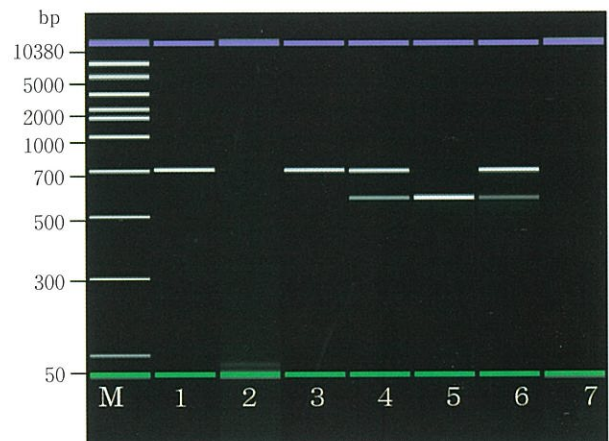
今回設計したプライマーが、栽培圃場から採集したトマト罹病株でも増幅可能かどうかを検討するために行ったRT-PCRでは3株ともDNA断片が増幅された。つまり、No.1からは、TMVが、No.2およびNo.3からは、ToMVが、各々検出された(第3図)。また、竹内ら<sup>5)</sup>が考案したプライマーを用いての検出も行ったが、我々のRT-PCRの結果と同じであった。

RT-PCRでのTMVとToMVの検出例としては、上記の竹内ら<sup>5)</sup>によって報告されているピーマン、シシトウガラシにおけるイムノキャプチャーRT-PCR、V. Jacobiら<sup>3)</sup>によって報告されているマツにおけるイムノキャプチャーRT-PCRがあるが、ウイルスに対する抗体を用い

た免疫沈降反応を必要とするため手順が煩雑であると同時に検出に時間を要する。そこで、本試験ではTMVとToMVの同時検出の時間、労力の軽減をトマトで実践するためにone stepのRT-PCR法を試みた。

その結果、今回、設計したプライマーでの実験条件では、各ウイルスに単独感染したトマトから標的としたDNA断片が増幅され、TMV、ToMVおよびToMV-L<sub>11</sub>Aの識別が可能であった。

一方、TMVとToMVあるいは、TMVとL<sub>11</sub>Aが混合感染したトマトでは各ウイルス由来のDNA断片が増幅されたが、ToMVあるいはL<sub>11</sub>AのDNA断片が少し薄くなる



第2図 TMV, L<sub>11</sub>A検出用プライマーによるRT-PCR反応結果

M: DNA マーカー レーン1: TMV単独感染, レーン2: ToMV単独感染, レーン3: TMV, ToMV混合感染, レーン4: TMV, L<sub>11</sub>A混合感染, レーン5: L<sub>11</sub>A単独感染, レーン6: TMV, L<sub>11</sub>AのRNA混合, レーン7: 健全葉



第3図 栽培圃場で採取したトマト葉からのウイルス検出

M: DNA マーカー レーン1, 4, 7: No. 1株, レーン2, 5, 8: No. 2株, レーン3, 6, 9: No. 3株, レーン1~3: TMV検出用プライマー, レーン4~6: ToMV検出用プライマー, レーン7~9: TMV, ToMV検出用プライマー

傾向が確認された。これは、プライマーの同士の競合などの影響が考えられた。したがって、今後は、上記のように混合感染した場合でも各ウイルス由来のDNA断片がはっきりと増幅されるように反応条件等を検討する必要がある。

なお、本試験は特別電源所在県地域科学技術振興事業「主要園芸作物に感染するウイルス群の遺伝子診断技術の確立」の一環として行った。

#### 引用文献

- 1) 福田明美・駒野雅保・本多範行 (2001) ミディトマトに発生した *Tobacco Mosaic Virus* の諸性質. 福井農試研報 38: 47~57.
- 2) Hayashi, K., Hashimoto, N., Daigen, M., Ashikawa, I. (2004) Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz* locus. *Theor. Appl. Genet.* 108: 1212~1220.
- 3) Jacobi, V., Bachand, G. D., Hamelin, R. C. and Castello, J. D. (1998) Development of a multiplex immunocapture RT-PCR assay for detection and differentiation of tomato and tobacco mosaic tobamoviruses. *J. Virol. Meth.* 74: 167~178.
- 4) 日本植物病理学会 (2000) トマト 日本植物病名目録 (初版), 250~254, 日本植物防疫協会, 東京.
- 5) 竹内繁治・浜田博幸・川田洋一・曳地康史 (2002) RT-PCRを利用したトバモウイルスの病原型の識別とピーマンにおける分布調査. *日植病報* 68: 100.
- 6) 山本英樹・木口忠彦・松本 勤 (2000) RT-PCR法によるトマトモザイクウイルス (ToMV) 強毒株と弱毒株L<sub>11</sub>AおよびL<sub>11</sub>A由来弱毒変異株の識別の試み. *日植病報* 66: 144.

(2008年1月30日受理)