

トマト黄化病の簡易検定法の開発

鈴木良地¹⁾・田中はるか²⁾・恒川健太¹⁾・内田祐太¹⁾・坂 紀邦³⁾

摘要：トマト黄化病は、生理障害であるマグネシウム欠乏症と症状が極めて類似しており、診断が困難な病害の一つである。筆者らは、reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) 法を用いて、本病害の病原ウイルスでRNAウイルスのトマト退緑ウイルス *Tomato chlorosis virus* (ToCV) を従来のPCR法より簡易に検定する方法を開発した。ToCVのheat shock protein 70 gene (*hSP70*) から設計した特異的なプライマーセットを用いて65°CのRT-LAMP反応を行い、約13分以内に罹病葉の全RNAからToCVを検出できた。また、罹病葉の粗汁液からでもToCVを検出することができた。

キーワード：トマト、トマト黄化病、ToCV、RT-LAMP、検出

Development of a Simple Detection Method for Tomato Chlorosis Disease

SUZUKI Ryoji, TANAKA Haruka, TSUNEKAWA Kenta, UCHIDA Yuta,
and SAKA Norikuni

Abstract : Tomato chlorosis disease is one of the most devastating tomato diseases, whose symptoms are very similar to those of a magnesium deficiency disorder and whose pathogenesis is difficult to assess. We developed a method to diagnose Tomato chlorosis virus (ToCV), the pathogenic virus of this disease, using the reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) method, which is simpler than the conventional polymerase chain reaction (PCR) method. A specific set of primers designed from the heat shock protein 70 (*hSP70*) gene of the ToCV was used to perform an RT-LAMP reaction at 65°C. Consequently, the ToCV hSP70 transcript was detected in the total RNA of the diseased leaves within approximately 13 min. Furthermore, the ToCV was detected in the crude sap solution of the diseased leaves.

Key Words : Tomato chlorosis disease, ToCV, RT-LAMP, Detection

¹⁾環境基盤研究部 ²⁾ 環境基盤研究部 (現尾張農林水産事務所) ³⁾環境基盤研究部 (退職)

緒言

トマト黄化病は、トマト退緑ウイルス *Tomato chlorosis virus* (ToCV) およびトマトインフェクシヤスクロロシスウイルス *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) を病原とするトマトの重要病害の一つである。これらのウイルスは、世界的に警戒すべきエマージングウイルスの一つとされている¹⁾。我が国ではTICVによる被害は稀であるが、ToCVは2008年に栃木県で初めて発生が確認されて以降、全国各地で被害が拡大している^{2,3)}。

ToCVは *Crinivirus* 属の一本鎖(+)RNAウイルスであり、同属にはTICVの他にキュウリやメロンに退緑黄化病を引き起こすウリ類退緑黄化ウイルス *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV) やビートシュードイエロースウイルス *Beet pseudoyellows virus* (BPYV) などがある。これら *Crinivirus* 属の特徴としては、コナジラミ類媒介性であるとともに、植物体内では篩部に局在し、体内ウイルス濃度が極めて低いことが挙げられる⁴⁾。

トマト黄化病が発症したトマトは、葉脈に沿った部分を残して葉全体が黄化し、えそ斑点症状を呈す⁵⁾。果実には直接的な影響はないが、生育抑制により収量が大きく減少する¹⁾。一方でこれらの症状は、生理障害の一つであるマグネシウム欠乏症と極めて類似しており、外観だけでウイルス病なのか生理障害なのかを見分けることは困難である⁶⁾。

そこで、本研究ではウイルスの一般的な遺伝診断法であるRT-PCR法よりも簡易なreverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) 法を用いて、ToCVを検出する技術を開発した。さらに、本法で用いる検定用試料の調製方法として、簡易なTris法⁷⁾が適用できることを明らかにした。

材料及び方法

1 検定試料

愛知県内で、トマト黄化病と思われるトマト10株の病徴葉を採取し、検定に用いた(表1)。これらはいずれも下位葉から中位葉にかけて葉の黄化およびえそ斑点症状が確認された。このうち、No. 5からNo. 10の6株の病徴葉を図1に示した。また、健全トマト2株から葉を採取し、健全葉試料とした(表1)。各葉からそれぞれ2検体ずつ、TRIzol試薬(サーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社、東京)を用いてメーカー推奨のプロトコルに従って全RNAを抽出し、鋳型RNAとした。

2 RT-LAMPプライマーの設計および反応特性

GenBankに登録のあるToCV配列のうち、heat shock protein 70 gene (*hSP70*) の配列情報(Accession No. MF278017、LC342730、KY679890、HQ879846)を基に、

PrimerExplorer ver. 5 (<http://primerexplorer.jp>)を用いて、ToCVを検出するためのRT-LAMPプライマーを設計した(表2、図2)。プライマーは、同じ *Crinivirus* 属でトマトの病原ウイルスであるTICVの塩基配列と明確に異なる領域で設計した(図2)。

RT-LAMP反応液は、20 mM Tris-HCl (pH 8.8)、10 mM KCl、10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1% Tween 20、0.8 M betaine(富士フィルム和光純薬株式会社、大阪)、10 mM MgSO_4 、1.4 mM dNTPs、0.2 μM F3およびB3プライマー、1.6 μM FIPおよびBIPプライマー、0.8 μM FloopおよびBloopプライマー、8 units Bst DNA polymerase(株式会社ニッポンジーン、東京)、逆転写酵素の1 unit AMV reverse transcriptase(プロメガ株式会社、東京)を混合し、1 μL の鋳型RNAを加えて総量20 μL とした。RT-LAMP反応はリアルタイム濁度計LA200(テラメックス株式会社、京都)を用い、濁度が0.1に達する時間(濁度閾値到達時間)を計測した。最適な反応温度を明らかにするために、既報のRT-PCR法⁸⁾でToCVに感染していることを確認済みのNo. 3の全RNAを鋳型として、60°C、63°C、65°C、68°Cの4温度域でRT-LAMP反応を60分間行った。また、No. 3の全RNAを滅菌水で10倍ずつ段階希釈し、うち1 μL を用いてRT-LAMP反応を行い、同じ段階希釈液を用いて実施したRT-PCR法⁸⁾と検出感度を比較した。

3 ToCVに対する特異性

ToCVプライマーセットを用いて、ToCV以外のトマトの病原ウイルスに対する反応を調査した。供試したウイルスは、ToCV(No. 3)の他に、トマト黄化えそウイルス *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV)、キク茎えそウイルス *Chrysanthemum stem necrosis orthotospovirus* (CSNV)、キュウリモザイクウイルス *Cucumber mosaic virus* (CMV)、トマト黄化葉巻ウイルス *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV)、トマトモザイクウイルス *Tomato mosaic virus* (ToMV)を用いた。また、ToCVと同じ *Crinivirus* 属のCCYVも供試した。CMVおよびCCYVはキュウリの罹病葉から、TSWV、CSNVおよびToMVはトマトの罹病葉から、TRIzol試薬で全RNAを抽出した。TYLCVはDNeasy Plant Mini Kit(株式会社キアゲン、東京)でトマトの罹病葉から全DNAを抽出した。これらのウイルスは供試するまで-80°Cで保存し、ToCVプライマーセットにより65°Cの反応温度でRT-LAMP反応を行った。

4 簡易な鋳型調製法としてのTris法の適用

罹病葉の核酸を抽出することなく、簡易かつ迅速に鋳型を調製する方法として、本研究ではTris法の適用を試みた。罹病葉を摩砕し、0.1M Tris-HCl (pH 8.0)で重量比500倍に希釈して粗汁液試料を調製し、うち1 μL をRT-LAMP反応に供試した。

本研究では、No. 3を除く表1の検定試料について、Tris法で粗汁液を調製して65°CでToCVプライマーセットによるRT-LAMP反応を行い、Tris法の有効性を評価した。

表1 検定試料

| 試料 No. | 採取年月 | 採取地等 | 品種 | 種苗メーカー | 葉の症状 | RT-PCR 法 ¹⁾ | | RT-LAMP 法 ²⁾ | | | |
|--------|----------|------|----------|-----------|---------|------------------------|---|-------------------------|---------|------------------|---------|
| | | | | | | 全 RNA | | 全 RNA | | 粗汁液 | |
| | | | | | | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| 1 | 2020年3月 | 試験場内 | 麗妃 | サカタのタネ | 健全 | — | — | — | — | — | — |
| 2 | 2020年3月 | 試験場内 | アイタキ1号 | 愛知県、タキイ種苗 | 健全 | — | — | — | — | — | — |
| 3 | 2019年11月 | 豊川市 | 不明 | 不明 | 黄化、えそ斑点 | + | + | +(11.8) | +(11.7) | nt ³⁾ | nt |
| 4 | 2019年12月 | 豊川市 | TY千果 | タキイ種苗 | 黄化、えそ斑点 | + | + | +(11.1) | +(12.5) | +(15.7) | +(15.2) |
| 5 | 2020年1月 | 弥富市 | 桃太郎ピース | タキイ種苗 | 黄化、えそ斑点 | — | — | — | — | — | — |
| 6 | 2020年2月 | 東郷町 | TYファースト | 愛知県、愛三種苗 | 黄化、えそ斑点 | — | — | — | — | — | — |
| 7 | 2020年2月 | 豊橋市 | SC160 | サカタのタネ | 黄化、えそ斑点 | + | + | +(12.3) | +(11.7) | +(20.5) | +(18.9) |
| 8 | 2020年3月 | 弥富市 | 桃太郎ピース | タキイ種苗 | 黄化、えそ斑点 | — | — | — | — | — | — |
| 9 | 2020年3月 | 豊橋市 | 麗旬 | サカタのタネ | 黄化、えそ斑点 | + | + | +(12.0) | +(11.7) | +(13.9) | +(18.7) |
| 10 | 2020年3月 | 豊川市 | りんか409 | サカタのタネ | 黄化、えそ斑点 | + | + | +(12.1) | +(11.9) | +(14.6) | +(15.4) |
| 11 | 2020年4月 | 豊川市 | 小鈴SP | みかど協和 | 黄化、えそ斑点 | — | — | — | — | — | — |
| 12 | 2020年4月 | 豊川市 | MKS-T820 | みかど協和 | 黄化、えそ斑点 | + | + | +(11.3) | +(11.4) | +(18.8) | +(18.1) |

1) RT-PCRは全RNAを用いてHirota et al (2010)のプライマーで実施し、360 bpの増幅産物が確認された場合を陽性として「+」、確認されなかった場合を陰性として「-」で示した。

2) RT-LAMPは、60分間の反応時間内に濁度0.1以上が検出された場合を陽性として「+」、検出されなかった場合を陰性として「-」で示した。また、陽性の場合には括弧内にLAMP反応時間(分)を記した。

3) ntは「未実施」を示す。

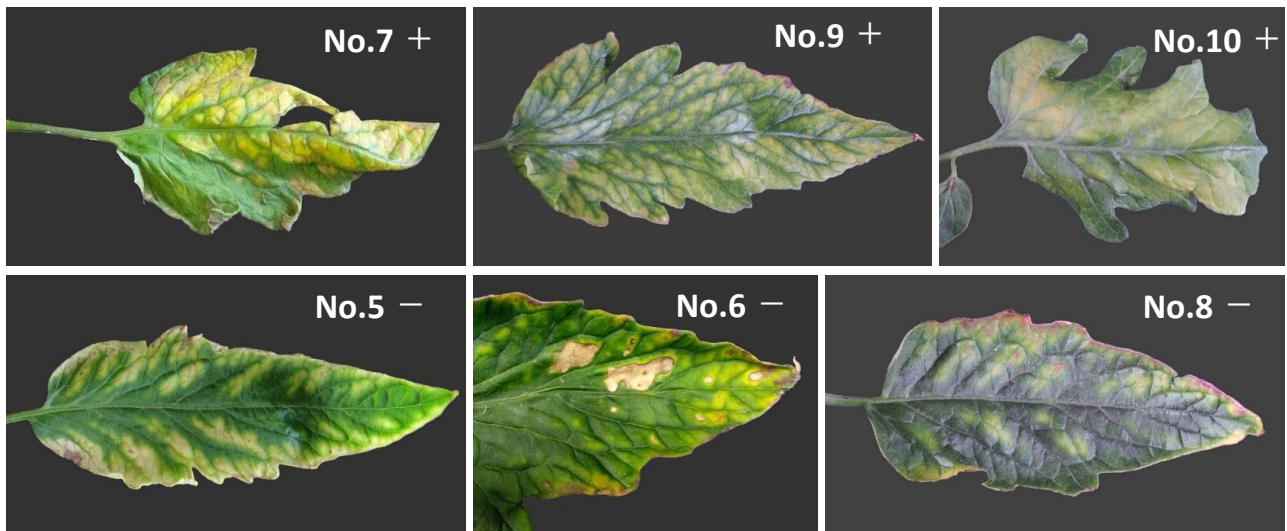


図1 供試株の病徴葉

ToCV 陽性:上段 (No. 7、9、10)、ToCV 陰性:下段 (No. 5、6、8)

結果及び考察

1 ToCV検出用RT-LAMPプライマーの反応特性

トマト黄化病罹病葉の全RNAを鋳型として、60℃、63℃、65℃、68℃の4温度域でRT-LAMP反応を60分間実施した結果、いずれも20分以内に濁度が0.1以上に上昇したが、その中でも63℃および65℃が最も早かった(図

3)。このことから、本研究のToCVプライマーセットは63℃～65℃で反応させると良いことが明らかとなった。なお、65℃で反応させたときのRT-LAMP法の検出感度を調査した結果、 10^4 希釈まで検出できた(図4)。また、既報のRT-PCR法⁸⁾では360 bpの増幅産物の有無で判定を行い、同様に 10^4 希釈まで検出できた(図5)。一般的にLAMP法はPCR法と比べて検出感度が同等またはそれ以上とされているが⁹⁾、本研究でも同様だった。

表2 ToCV検出用RT-LAMPプライマー

| primer | sequence (5' to 3') |
|--------|---|
| F3 | CGATCTCAATGTGTCTGTTC |
| B3 | GTGACAAACTTACCATATCGC |
| FIP | GACGTAAATTGAAACCCAAAGAGGA-CGGCTGATTACAAGTCTGG |
| BIP | GCCGCTATTTACTGCGTTTCTAAA-AGAAGTGTCGAAAAGTACCG |
| Floop | GCCTGCATGAAAAGTCTC |
| Bloop | ATCCGCAGTATGCTTATTC |

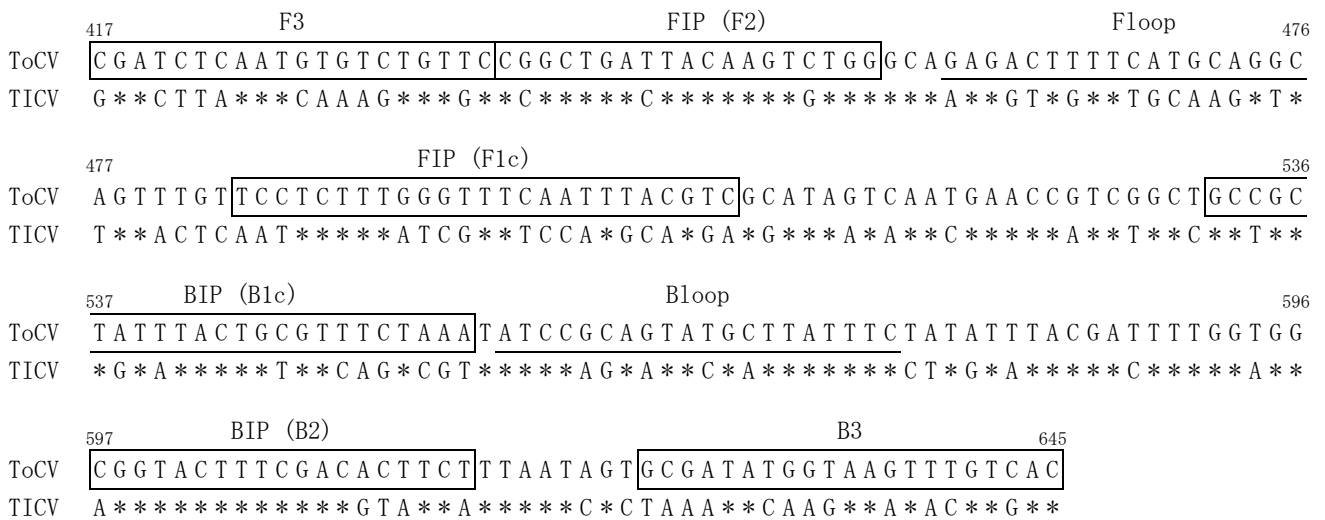


図2 RT-LAMP プライマーの設計領域

ToCV は heat shock protein 70 gene (GenBank Accession No. MF278017) を、TICV は同様に *hsp70* (No. FJ815441) の配列を記した。TICV 配列の*は対応する ToCV 配列と同一であることを示す。FIP および BIP はそれぞれ F1c + F2 および B1c + B2 から構成される。

2 ToCVに対する特異性

図6にToCV、TSWV、CSNV、CMV、TYLCV、ToMVおよびCCYVの7種のウイルスの罹病葉から抽出した全RNAまたは全DNA、および健全葉から抽出した全RNAを鋳型としたときのRT-LAMP反応結果を示した。本研究で作出したプライマーに対してはToCVだけが反応した。本研究では同じ *Crinivirus* 属でToCVと近縁のTICVは供試できなかったが、ToCV検出用プライマーはTICVと明らかに配列が異なる領域で設計されている(図2)。従って、本プライマーにTICVが反応することはないと考えられるが、今後はTICVを含めて特異性を再検証する必要がある。

3 RT-PCR法およびRT-LAMP法によるToCV検定

表1に全ての試料のRT-PCR法およびRT-LAMP法によるToCV検定結果を示した。RT-PCRは全RNAを用いて、Hirotaら⁸⁾の報告の方法によって実施した後、電気泳動を行い、アガロースゲル上で360 bpの増幅産物が確認さ

れた場合を陽性とした。RT-PCR法では、検定試料のうち、No. 3、4、7、9、10、12が陽性と判定された。このうち、試料No. 1からNo. 10までの電気泳動結果を図7に示した。一方で、RT-LAMP法では、ToCV検出用RT-LAMPプライマーを用いて65°Cで60分間のLAMP反応を行い、30分以内に濁度閾値到達が確認された場合を陽性とした。その結果、RT-LAMP法でもRT-PCR法と同様に、No. 3、4、7、9、10、12が陽性と判定された。このうち、試料No. 1からNo. 10までの全RNAを鋳型としたときのRT-LAMP反応結果を図8に示した。

また、Tris法で調製した粗汁液を鋳型としてRT-LAMP法で検定した結果、濁度閾値到達時間は約14分~21分であり、全RNAの場合で約11分~13分だったのに対して約5分遅くなったうえに、ばらつきが大きくなった(表1)。しかし、判定結果は、全RNAを鋳型としたときのRT-PCR法およびRT-LAMP法と完全に一致した。罹病葉の核酸を抽出することなく、簡易かつ迅速に試料を調製する方法としては、Tris法、つまようじ法および注射針法

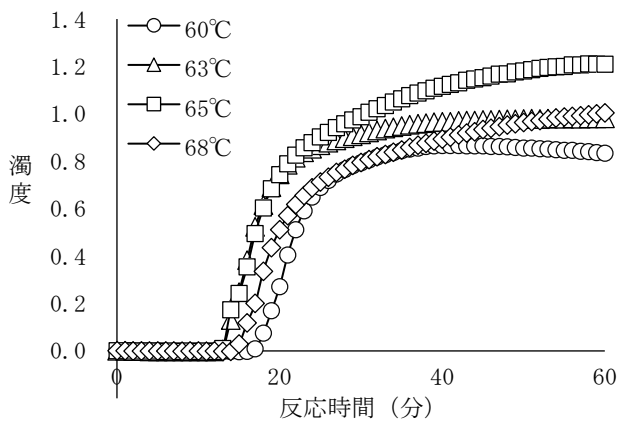


図 3 RT-LAMP プライマーの反応温度の比較

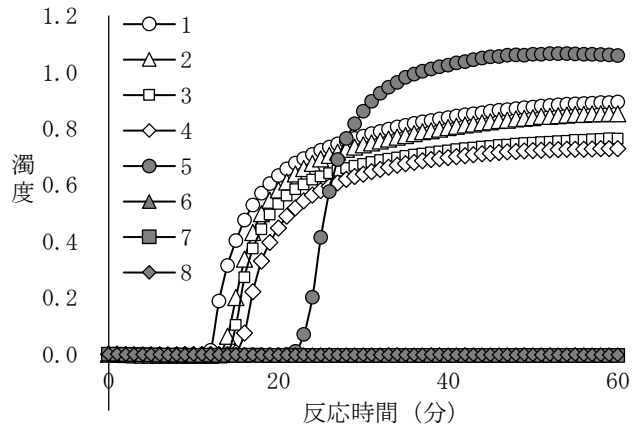


図 4 RT-LAMP 法の検出感度

1:無希釈、2:10 倍希釈、3:10² 希釈、4:10³ 希釈、5:10⁴ 希釈、6:10⁵ 希釈、7:10⁶ 希釈、8:10⁷ 希釈

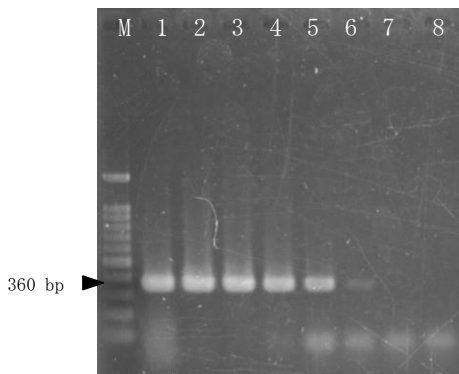


図 5 RT-PCR 法の検出感度

M:100 bp ladder、1:無希釈、2:10 倍希釈、3:10² 希釈、4:10³ 希釈、5:10⁴ 希釈、6:10⁵ 希釈、7:10⁶ 希釈、8:10⁷ 希釈

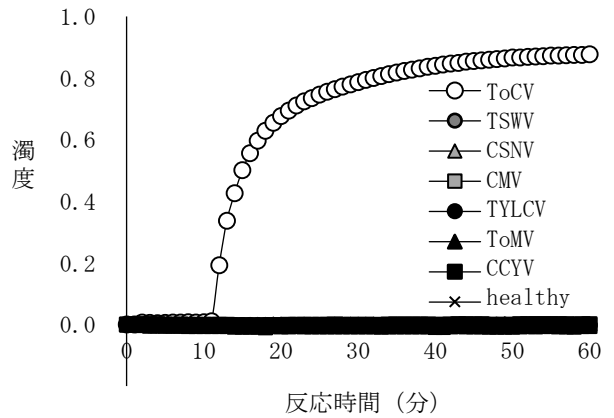


図 6 RT-LAMP プライマーの特異性

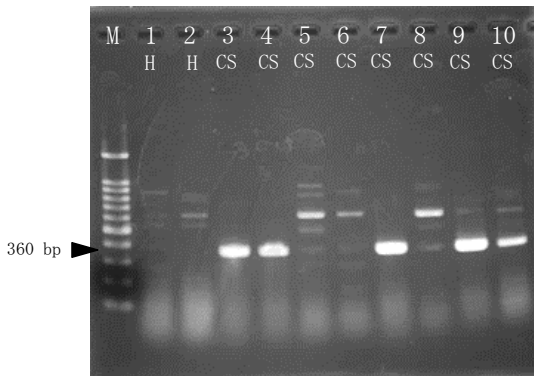


図 7 RT-PCR 反応結果

M: 100 bp ladder、1~10 までは試料 No. 1~10 を示し、H は健全葉を、CS は病徴葉を示す。

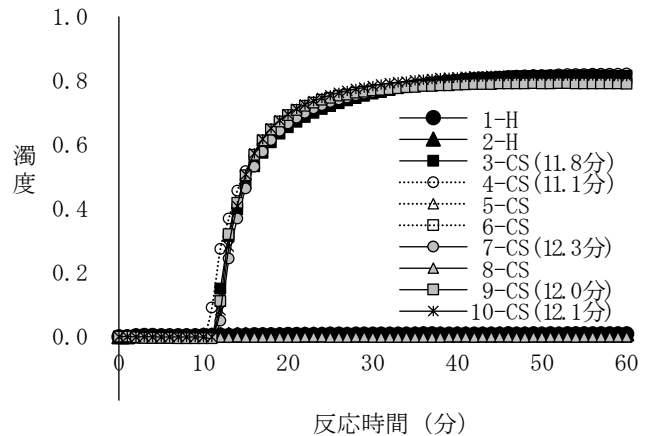


図 8 RT-LAMP 反応結果

1~10 は試料 No. 1~10 を示し、H は健全葉を、CS は病徴葉を示す。また括弧内の数値は LAMP 反応時間を示す。

などが RT-LAMP 法に適用できることが報告されている^{7,9,10}。筆者らはこのうち注射針法により罹病葉からの ToCV 検出を試みたが、検出精度が安定しなかった(データ省略)。注射針法は、罹病葉に注射針 23G(テルモ株式会社、東京)を複数回突き刺し、針の先端に付着した汁液に含まれるウイルス粒子をそのまま RT-LAMP 法により

検出する極めて簡単なウイルス採取法である。しかし、局在性であるとともにウイルス濃度が極めて低い *Crinivirus* 属の ToCV の検出には、注射針法および類似の手法のつまようじ法は不向きと考えられた。一方、Tris 法は注射針法と比べて工程がやや多くなるが、局在性のウイルスに対しては有効な簡易調製法と考えられた。検

定試料のうち、ToCVが検出された6株 (No. 3、4、7、9、10、12) は、RT-PCR法およびRT-LAMP法の遺伝子診断結果が一致しており、トマト黄化病と考えられた。一方で、トマト黄化病様の症状があり、かつToCVが検出されなかった4株 (No. 5、6、8、11) については、TICVが病原である可能性も考えられた。しかし、既報のTICV検出用PCRプライマー¹¹⁻¹³⁾を用いて検定したところ、いずれのプライマーでもTICVは検出されなかった (データ省略)。従って、詳細な土壌診断または養分吸収特性等の調査を実施していないので断定はできないが、これらはマグネシウム欠乏症の可能性が高いと考えられた。

4 ToCV陽性株と陰性株の葉の病徴比較

本研究によりToCV陽性と判定されたNo. 7、9、10およびToCV陰性と判定されたNo. 5、6、8の病徴葉を図1に示した。全ての葉で葉脈に沿った部分を残して葉全体の黄化、えそ斑点がみられ、ToCV陽性葉と陰性葉でその症状に違いはなかった。トマト黄化病はウイルスを媒介するコナジラミが多いハウスの開口部に集中しやすいことや、畝またはハウス全体に一律ではなく、散発的に発生することが多いなど、ある程度その原因を推測することは可能である。しかし病徴だけでToCVを原因とするトマト黄化病を見分けることは極めて困難であることが確認され、ウイルスの有無を検定することが同病の判定に必要であることが示された。

本研究ではトマト黄化病の診断にRT-LAMP法によるウイルス検出が有効であることを示した。従来は、ウイルスの検出のため罹病葉から複雑な工程を経てRNAを抽出し、RT-PCR法で核酸を増幅し、電気泳動法によりアガロースゲル上で増幅産物を確認する数時間の作業が必要だった。これに対して、本研究ではRT-PCR法よりも簡易な遺伝子診断法であるRT-LAMP法を用いて、全RNAだけでなく粗汁液からでも約20分でToCVを検出できた。これにより、これまでウイルス病か生理障害かを見分けることが困難であったトマト黄化病の原因を迅速かつ簡易に判定できるようになり、的確な防除対策の構築に貢献できると考えられる。

引用文献

- Hanssen, I. M., Lapidot, M. and Thomma, B. P. H. J. Emerging viral diseases of tomato crops. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 23(5), 539-548(2010)
- 栃木県農業環境指導センター. 平成21年度病害虫発生予察特殊報第1号(2009)
- 愛知県農業総合試験場環境基盤研究部病害虫防除室. 平成28年度病害虫発生予察特殊報第2号(2016)
- 久保田健嗣. ウリ類退緑黄化ウイルス抗血清の開発と診断方法. *植物防疫*. 64(12), 814-817(2010)
- 山城都, 青木久美, 伊村務. トマト退緑ウイルス (Tomato chlorosis virus) の宿主範囲. *関東東山病害虫研究会報*. 60, 35-36(2013)
- 福田充, 森島正二, 和氣貴光, 廣田知記, 夏秋知英. 栃木県での *Tomato chlorosis virus* (ToCV) の発生状況と感受性のトマト品種間差異. *関東東山病害虫研究会報*. 57, 27-29(2010)
- Fukuta, S., Tamura, M., Maejima, H., Takahashi, R., Kuwayama, S., Tsuji, T., Yoshida, T., Itoh, K., Hashizume, H., Nakajima, Y., Uehara, Y. and Sirako, Y. Differential detection of *wheat yellow mosaic virus*, *Japanese soil-borne wheat mosaic virus* and *Chinese wheat mosaic virus* by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification reaction. *J. Virol. Methods* 1089, 348-354 (2013)
- Hirota, T., Natsuaki, T., Murai, T., Nishigawa, H., Niibori, K., Goto, K., Hartono, S., Suastika, G. and Okuda, S. Yellowing disease of tomato caused by *Tomato chlorosis virus* newly recognized in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* 76, 168-171(2010)
- Suzuki, R., Fukuta, S., Matsumoto, Y., Hasegawa, T., Kojima, H., Hotta, M. and Miyake, N. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay as a simple detection method of *Chrysanthemum stem necrosis virus* in chrysanthemum and tomato. *J. Virol. Methods*. 236, 29-34(2016)
- 福田至朗, 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. 簡易な鋳型調製による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(2005)
- Li, R. H., Wisler, G. C., Liu, H.-Y. and Duffus, J. E. Comparison of diagnostic techniques for detecting *tomato infectious chlorosis virus*. *Plant Dis*. 82:84-88(1998)
- Louro, D., Acotto, G. P. and Vaira, A. M. Occurrence and diagnosis of *Tomato chlorosis virus* in Portugal. *Eur. J. Plant Pathol.* 106:589-592(2000)
- Hartono, S., Natsuaki, T., Sayama, H., Atarashi, H. and Okuda, S. Yellowing disease of tomatoes caused by *Tomato infectious chlorosis virus* newly recognized in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* 69, 61-64(2003)