

市販DNA抽出キット利用によるトマト黄化葉巻病遺伝子診断の簡便化						
[要約]市販キットを利用することにより、 <u>トマト黄化葉巻病に感染した葉から Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) のゲノムDNAを簡便に抽出でき、</u> トマト葉の各部位を用いて、本ウイルスのPCRによる <u>遺伝子診断</u> ができる。						
総合農林試験場・環境部・病害虫科	専門	作物病害	対象	果菜類	分類	指導
資料名：平成13年度普通作・野菜等病害虫試験成績書						

[背景・ねらい]

トマト黄化葉巻病は、Tomato yellow leaf curl virus(TYLCV)を病原とするウイルス病で、1996年に本県ならびに愛知県、静岡県で発生が確認された新しい病害である。本県では、現在4市9町で本病の発生が認められ、1999年には新たにトルコギキョウにも発生するなど問題が拡大している。本ウイルスはシルバーリーフコナジラミによって媒介され、感染したトマトは新葉が黄化、萎縮して生長が止まり、着果不良になるため、長期間栽培を行う促成栽培で大きな被害を与えている。また、本病は一旦発生すると媒介虫によって急速に蔓延するため、病株の早期発見による抜き取りが肝要であるが、症状がホウ素欠乏症などの生理障害と酷似しており、的確で迅速な診断が必要である。しかし、現在本病の検定はPCRによる遺伝子診断のみであり、これまでの方法では核酸(DNA)抽出のために数種の試薬調製や遠心分離など煩雑な作業が多くて、この抽出作業だけでも1時間以上を要する(図1)。そこで、病害虫防除所等の現場機関における診断を簡便化するため、最近市販されたDNA抽出キットを用いてTYLCVの検出を試みる。

[成果の内容・特徴]

1. 市販キットのAmpliCARD™ Sampling Kit(CHEMICON社)によって、トマト黄化葉巻病に感染した葉から、試薬調製や遠心分離操作を行うことなく、約30分間で簡便にTYLCVのゲノムDNAの抽出ができる(図2)。
2. 抽出される全DNAをPCRにかけることにより、TYLCVの特異的なDNA断片(2.4kb)が得られる(図3)。
3. 以上、本市販キットを利用することにより、トマト黄化葉巻病に感染した葉からTYLCVのゲノムDNAを簡便に抽出でき、本ウイルスのPCRによる遺伝子診断ができる。また、トマト葉の各部位からも本ウイルスの検出は可能である(図2、3)。

[成果の活用面・留意点]

1. 診断には、黄化葉巻症状を呈する新鮮な生葉を用いる。
2. 本キットを利用したDNA抽出コストは、1検体あたり70~100円である。

[具体的データ]

感染葉

- 0.1 g の感染葉を0.35mlの2%CTABを入れた乳鉢で磨碎する。
- 1.5mlチューブに移し、8M LiClを0.35mlを加え、やさしく攪拌する。
- 65℃、5分インキュベート（時々攪拌する）する。
- 0.35mlのクロホルム/イソミルアルコールを加え、やさしく攪拌する。
- 12,000rpmで3分間遠心する。
- 上澄みを新しい1.5mlチューブに移す。
- ～ を繰り返す。
- 等倍のイソプロパノール加えて、やさしく攪拌する。
- 8000rpmで10分間遠心分離する。
- 70%冷エタノールを1ml加え、すぐに捨てる。
- 1mlの冷エタノールを1ml加え、すぐに捨てる。
- 10分風乾する。
- 50 μ l TEbuffer（10 μ g/mlのRNaseA入り）55℃ で溶解する。

ゲノムDNA → PCRへ

図1 従来のDNA抽出作業の手順（参考）



図2 市販キット利用によるTYLCV感染トマト葉からのDNA抽出手順
1~5: 検定トマト葉 N: 健全トマト葉, P: 感染トマト葉

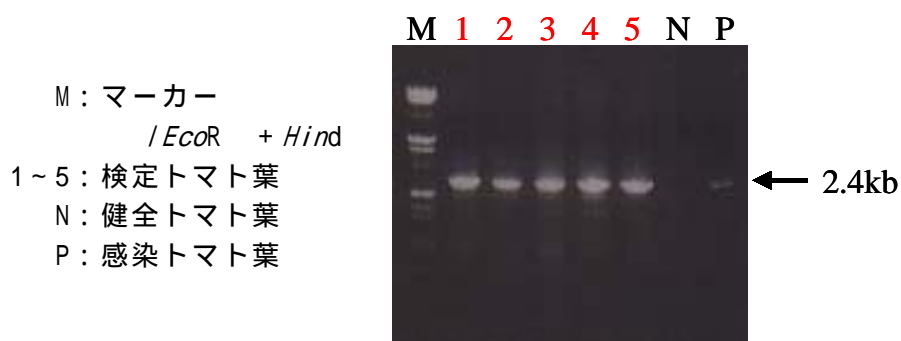


図3 抽出DNAからPCRによって得られたTYLCVの特異的DNA断片

[その他]

研究課題名: トマト黄化葉巻病の防除技術確立

予算区分: 国庫 (地域新技術)

研究期間: 平成13年度 (平成13~15年)

研究担当者: 内川敬介

既発表論文等: 九州病害虫研究会報、第48巻(2002)、講演要旨