

[成果情報名] TYLCV とトマト遺伝子の同時検出によるトマト黄化葉巻病の効率的遺伝子診断法

[要約] トマト黄化葉巻病の遺伝子診断 (PCR) において、トマト遺伝子を増幅する Hsc プライマーと TYLCV 遺伝子を増幅する NTG プライマーを同時に用いることにより、トマトと TYLCV の遺伝子を同時に検出でき、操作の確実性の判断や診断の効率化ができる。

[キーワード] トマト、黄化葉巻病、TYLCV、診断、PCR

[担当] 総合農林試験場・環境部・病害虫科

[連絡先] 電話 0957-26-3330、電子メール uchikawa@pref.nagasaki.lg.jp

[区分] 野菜 (生産環境)

[分類] 普及

[背景・ねらい]

トマト黄化葉巻ウイルス (TYLCV) を病原とするトマト黄化葉巻病の被害拡大防止策の一つとして、早期診断による発病株の抜き取りが肝要である。しかし、現在行われている PCR を用いた遺伝子診断は、技術的な習熟が必要であり、新たに診断システムを立ち上げる際には、核酸抽出等、PCR の一連の作業工程において問題が生じやすく、陰陽性の判断に支障を来すこともある。また、診断を行える機関は限られており、多量のサンプルが集中して持ち込まれるなどして、操作上のミスも生じることが懸念される。現在の PCR においては、想定バンドがあることで陽性の判断はできるが、一方、バンドがない場合は陰性か DNA の抽出操作上のミスかが厳密に判断できない。

そこで、本病の PCR による遺伝子診断において、TYLCV とトマトの遺伝子を同時に検出することにより、操作の確実性を判断し、診断の効率化を図る。

[成果の内容・特徴]

1. トマト遺伝子を増幅するには、Hsc プライマーを用いる。バンドサイズは 1.0kb である (表 1)。
2. Hsc プライマーと TYLCV の遺伝子を増幅する NTG プライマー (大貫ら、2000) との組み合わせによる同時検出では、トマトおよび TYLCV 由来のそれぞれ想定される 1.0kb および 2.4kb のバンドが得られる (図)。
3. 両プライマーの組み合わせにおいては、生葉および抽出後凍結保存した陽性サンプルから想定した 2本のバンドが得られる (図)。
4. PCR 反応液組成は 2種のプライマーを等量混合して行い、反応条件は定法 (大貫ら、2000) に従う (表 2)。

[成果の活用面・留意点]

1. 本成果は県内外の病害虫防除所等、診断機関で活用できる。
2. サンプルのウイルス濃度が低い場合、Hsc プライマーの影響により、TYLCV のバンドが得られないことがある。
3. Hsc プライマーはトマトにおいて保存性の高い領域にてデザインしているが、ハウス桃太郎、ハウス桃太郎コルト、桃太郎 J、優美、麗容、レディーファーストおよび千果以外の品種における同時検出では、あらかじめ想定したバンドが得られるか否かを確認する必要がある。

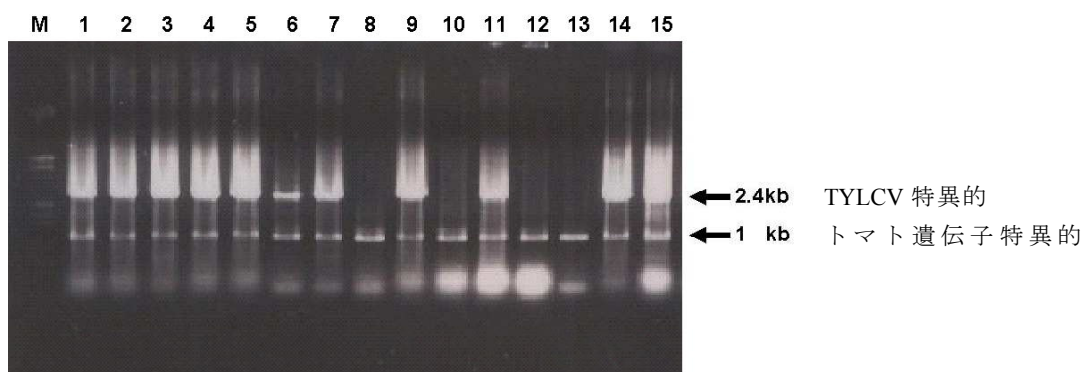
[具体的データ]

表1 トマト遺伝子および TYLCV 遺伝子増幅プライマーの塩基配列

名前	塩基配列	バンドサイズ
Hsc-s	5'-GTCAGGCTACTAAGGATGCTGGAA-3'	1.0kb
Hsc-a	5'-CGAAGCATAACAGTGATTTGGGGG-3'	...
NTG-V	5'-CTCAAAGCTCTATGGCAATC-3'	2.4kb
NTG-C	5'-GACTTCATTGATTTTGGAGT-3'	...

※ Hsc プライマー：DNA Data Bank of Japan (DDBJ)、Sun,S.W.ら (1996)の *Lycopersicon esculentum* の hsc70 gene (ヒートショックプロテイン発現遺伝子) を参考に設計。

NTG プライマー：大貫ら (2000)九州沖縄農業研究センター研究成果情報より。



+ + + + + + + - + - + - - + +

図 NTG および Hsc プライマーによる TYLCV およびトマト DNA の同時検出

M：マーカー (λ /EcoR I + Hind III)

1～12：診断依頼、13：健全トマト葉、14:発病トマト葉、15:発病トマト葉から抽出した DNA 凍結

+：TYLCV 陽性 -：TYLCV 陰性

表2 同時検出における PCR 反応液の組成と反応条件

| 反応液組成(終濃度) | | 反応条件 |
|-----------------------------------|-------------------------------|---|
| 抽出 DNA | 1.0 μ l | 95 °C - 2min
↓
95 °C - 50sec
58 °C - 1min
72 °C - 3min
↓
72 °C - 10min
} 35cycle |
| 10 × buffer (MgCl ₂ 含) | 2.0 μ l ([× 1]) | |
| 2.5 m M dNTPs | 1.6 μ l (各 200 μ M) | |
| 10 μ M Hsc-s | 1.0 μ l (0.5 μ M) | |
| 10 μ M Hsc-a | 1.0 μ l (0.5 μ M) | |
| 10 μ M NTG-V | 1.0 μ l (0.5 μ M) | |
| 10 μ M NTG-C | 1.0 μ l (0.5 μ M) | |
| DNA polymerase (ExTaq) | 0.1 μ l (0.5U/20 μ l) | |
| 滅菌蒸留水 | 11.3 μ l | |
| total | 20.0 μ l | |

[その他]

研究課題名：トマト黄化葉巻病の病原ウイルス及び媒介虫シルバーリーフコナジラミの生態解明に基づく環境保全型防除技術の確立

予算区分：国庫補助 (地域新技術)

研究期間：2001～2003年度

研究担当者：内川敬介、中村吉秀 (病害虫防除所)