

[平成19年度参考となる技術]

[技術名] RT-LAMP法によるトマトに感染するTMV、ToMVの検出

[要約] トマトのTMVやToMVによるウイルス病をRT-LAMP法を活用すれば、簡便かつ迅速に診断できる。

[キーワード] トマト、TMV、ToMV、RT-LAMP法

[担当] 福井農試・生産環境部・病理昆虫研究グループ

[連絡先] 電話 0776-54-5100 電子メール takahiro_watanabe@fklab.fukui.fukui.jp

[背景・ねらい]

県内のトマト栽培においては、TMVやToMVによるウイルス病が発生し、安定生産の障害となっている。これらウイルス病には有効な薬剤がないことから早期に感染の有無を診断し、罹病株を除去することにより被害の拡大を防ぐことが重要である。しかし、現在、ウイルス診断で主流となっているRT-PCR法は温度を正確に上下させる特別な機器や操作が必要であることから試験場等の限られた場所でしか診断ができない。そこで、生産現場でも対応可能な簡便で迅速なRT-LAMP法によるウイルス診断技術を確立する。

[技術の内容・特徴]

1. RT-LAMPプライマーの設計は、遺伝子配列情報(DDBJ)からTMVとToMVにほぼ共通している塩基配列部分を用いたので、TMV単独感染、ToMV単独感染、TMV・ToMV混合感染について検出できる(表1)。
2. トマト葉をつまようじで数回刺し、得られた汁液をRT-LAMP反応液に浸して反応(63℃で1時間)させる。その反応液に紫外線を照射し、蛍光発光を確認することによって、TMV・ToMV感染の有無を判定することができる(図1・2)。

[技術の活用面・留意点]

1. 本法で診断するためには、恒温器・紫外線照射ランプを必要とする。
2. コンタミが非常に問題となるので、反応後のチューブは開けずに廃棄するなど試薬や器具が汚染しないように管理をする。

[具体的データ]

表1 プライマーの塩基配列

F 3	G T A C T T C T G C G G G A G G T A
B 3	G G G C G G T T T T A T G A A C C T
F I P	G A T G T G T T T A G C A C C A A G T T T C G A - C G T G A T T C A T C A C G A T A G A G G
B I P	T T G G A G G A G T T C A G A A G A T C C C - G T C A A T T G T G T G T A A T A C G C

RT - LAMP 反応液

2 × Reaction	Mix (RM)	12.5 μ l
Primer : FIP	40 pmol	1 μ l
Primer : BIP	40 pmol	1 μ l
Primer : F3	5 pmol	1 μ l
Primer : B3	5 pmol	1 μ l
Enzyme (EM)		1 μ l
蛍光・目視検出試薬 (FD)		1 μ l
Distilled Water (DW)		6.5 μ l

フローチャート

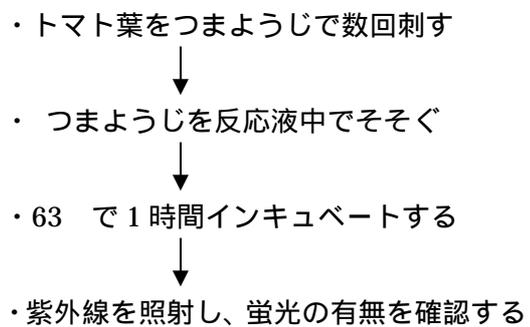


図1 RT - LAMP 反応液とフローチャート

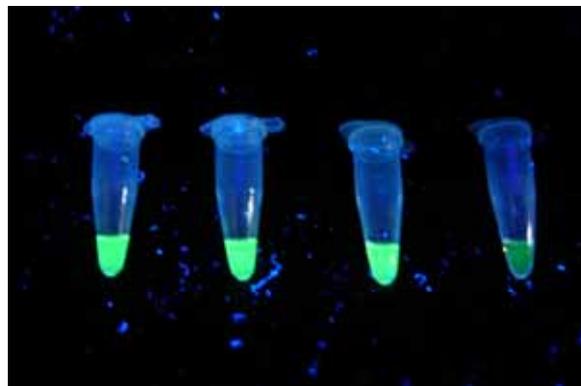


図2 TMV、ToMV の RT - LAMP 反応結果
 TMV 単独感染葉、 ToMV 単独感染葉
 TMV・ToMV 混合感染葉、 健全葉

[その他]

研究課題名：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

研究期間：2004～2006年度

研究担当者：渡辺 貴弘、古河 衛、福田 明美