

キクに感染する5種ウイルス・ウイロイドの遺伝子診断法

農業・園芸総合研究所

1 取り上げた理由

トマト黄化えそウイルス(TSWV)、キクBウイルス(CVB)、トマトアスパーミィウイルス(TAV)等によるウイルス病、キククロロティックモットルウイロイド(CChMVd)によるキク退緑斑紋病及びキクわい化ウイロイド(CSVd)によるキクわい化病は、キクの生育不良や切り花品質の低下を招く。キクは栄養繁殖性作物であることから、これら病害の対策として無病苗の利用が有効であり、無病苗を確保するためには、正確で感度の高い病害診断技術が必要である。従来の遺伝子診断法では、対象となる病害を1種類ずつ検定していたため、コストが高かったが、上記5種のウイルス・ウイロイドを単一の反応系で検定できる遺伝子診断技術を開発したので、参考資料とする。

2 参考資料

- 1) TSWV, CVB, TAV, CChMV及びCSVdの感染の有無を検定できる。
- 2) 検体は葉を用い、診断作業は遺伝子抽出、遺伝子増幅(RT-PCR)、検出(アガロース電気泳動とゲル染色)から成る(図1)。
- 3) RT-PCRの反応液における各プライマー(表1)の終濃度は、TSWV, TAV及びCSVdは各 $0.2\mu\text{M}$ 、CVBは $0.15\mu\text{M}$ 、CChMVdは $0.4\mu\text{M}$ とする。

3 利活用の留意点

- 1) 複数のウイルス・ウイロイドが混合感染している場合には、すべてを検出できない場合がある(図2)。
- 2) 所要時間は合計約6時間であり、即日で判定が可能である。
- 3) 本技術に必須の機器は、サーマルサイクラー(遺伝子増幅装置、約70万円)、アガロースゲル電気泳動装置(約4万円)、小型微量遠心機(約3万円)、紫外線照射装置(約13万円)であり、これらの機器はDNA品種識別を含めた多くの遺伝子診断技術に活用できる。
- 4) 1反応当たりの消耗品経費は約1000円である。
- 5) 遺伝子抽出、遺伝子増幅にはキアゲン社の研究用キットを使用している。
- 6) キクに感染するウイルスとして、上記のほかにキュウリモザイクウイルス(CMV)及びキク茎えそウイルス(CSNV)が知られており、CMVは市販のイムノクロマトキットで簡易に診断が可能である。なお、CSNVは、県内では未発生である。

(問い合わせ先：農業・園芸総合研究所バイオテクノロジー開発部 電話022-383-8131)

4 背景となった主要な試験研究

1) 研究課題名及び研究期間

遺伝子解析による品種識別と病害診断技術の開発 3) ウイルス病等診断技術の開発
 (4) キクわい化病 平成17~20年度

2) 参考データ

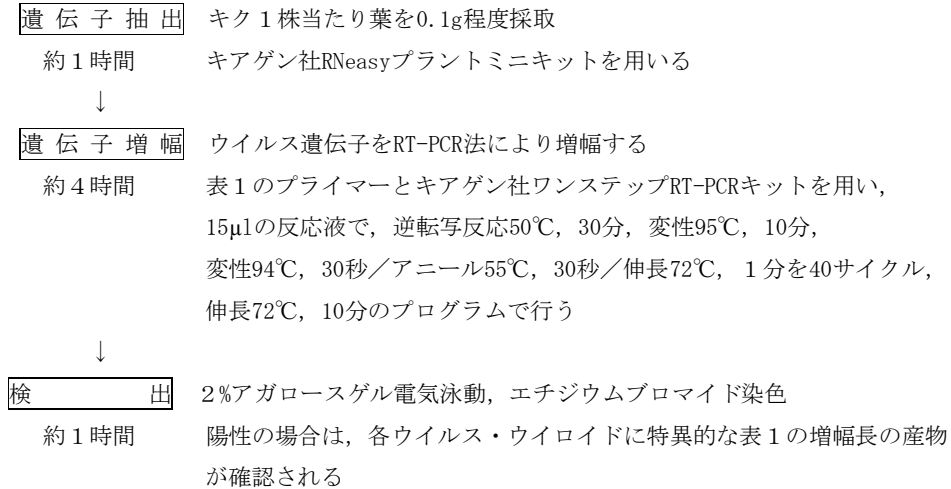


図 1 検定作業の流れ

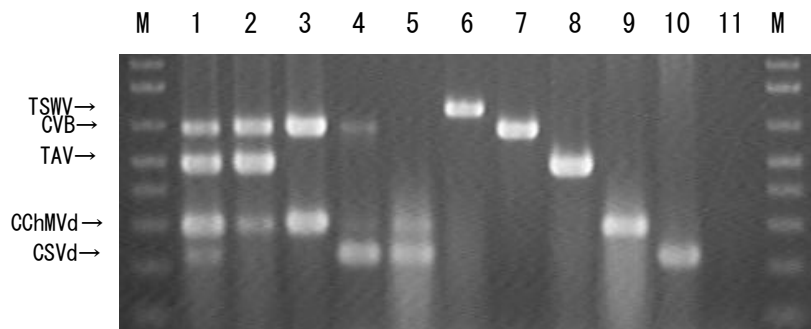


図 2 キクにおける 5 種ウイルス・ウイロイドの検定例

M : マーカー, 1 : 5 種人為混合, 2~10 : 生育不良株, 11 : 健全株

表 1 5 種ウイルス・ウイロイドを検出するプライマーの配列と増幅長

対象	5' プライマー	3' プライマー	増幅長
TSWV	ACCCTAAGAAACGACGACTGCG	TCTTACCTGATCTTCATTCATT	720bp
CVB	TCCAGCCTCCACCTAATATGCGAG	GTTGTGAATAGCCGGTCCTTGCT	629bp
TAV	CGTGGTCGTCGTAATAATAACAA	AGCACCGACATTAGACATGTC	483bp
CChMVd	GCTCTCTCCACAGCCTCA	GGTCCTCTGGAGTGGACTAAGAC	289bp
CSVd	GAGGAAGTCCGACGAGATC	AGCCCGGTGCTAAAGAAG	216bp

* CVBのプライマー配列は山本ら(2001)による

その他のプライマー配列はMuPlex(Rachlinら, 2005)を利用して設計

3) 発表論文等

北日本病害虫研究会報第60号(予定)

