

## LAMP法を利用したトマト黄化葉巻病の診断



トマト黄化葉巻病の症状と  
タバココナジラミ

トマト黄化葉巻病診断キットを使った診断

愛知県農業総合試験場では、トマト栽培で大きな問題となっているトマト黄化葉巻病について、Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を利用した診断法を開発しました。

LAMP法は、国内で開発された新しい遺伝子増幅技術です。農作物に病気を引き起こすウイルスや細菌、糸状菌はそれぞれ固有の遺伝子 (DNAかRNA) を持っているため、このLAMP法を使うことによって、簡単に病気の診断をすることができます。

### LAMP法の特徴

- ・ 反応液を 60～65℃ に 1 時間おくだけ
- ・ 病気に感染しているか否かを見た目 (反応液の白濁や蛍光) で判定可能

## 診断に必要なもの

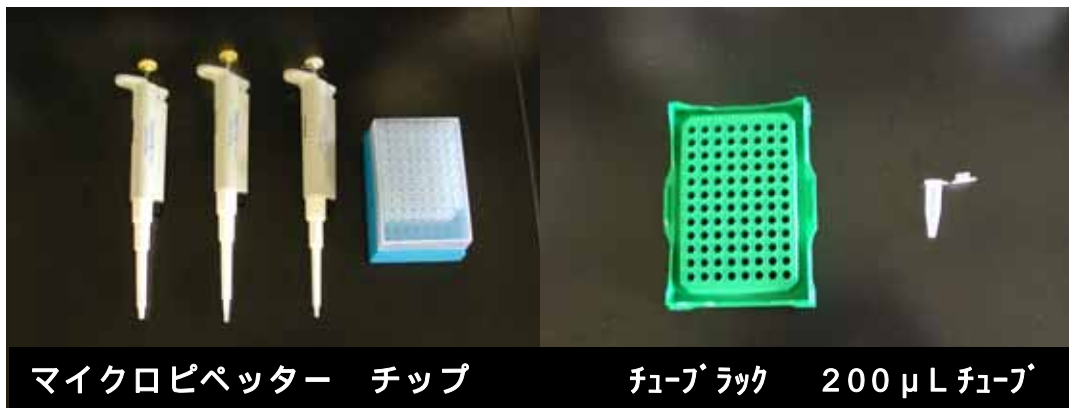
### 診断を行う場所

LAMP法は、これまでの遺伝子診断法に比べ、クリーンルーム、クリーンベンチなどの施設は不要ですが、反応液の調整にはなるべく清潔な部屋を用意する、反応後のDNAの混入を避けるため、反応を行うための部屋を別にするなどの注意が必要です。

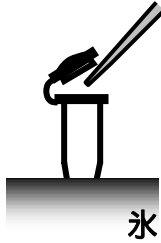
### 用意する器具

LAMP法を用いてトマト黄化葉巻病の診断を行う器具としては、以下のものがが必要です。

- ・ トマト黄化葉巻病診断キット（株ニッポンジーン）  
ウイルス検査薬、酵素液、蛍光発色液、ミネラルオイル、陽性コントロール  
200  $\mu$ Lチューブ、説明書
- ・ マイクロピペッター（200  $\mu$ L、20  $\mu$ L、10  $\mu$ L用）
- ・ チップ
- ・ チューブラック（200  $\mu$ Lチューブ用）
- ・ 検査液作製のマイクロチューブ（0.5mlまたは1.5ml）
- ・ 爪楊枝
- ・ 氷（クラッシュアイス）
- ・ 冷凍冷蔵庫（診断キットを保存）
- ・ 恒温器または恒温水槽（60 ~ 65 を一定時間保持できる機器）
- ・ 紫外線ランプ

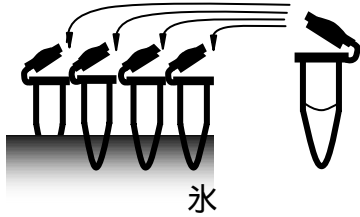


# 診断

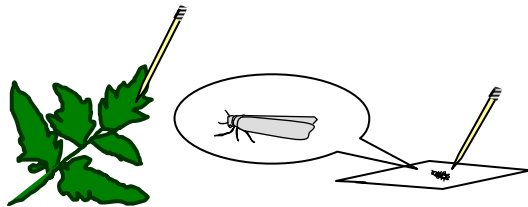


1 テスト分	
ウイルス検査液	4.6 $\mu\text{L}$
酵素液	0.2 $\mu\text{L}$
蛍光発色液	0.2 $\mu\text{L}$
合計	5.0 $\mu\text{L}$

必要テスト数の検査溶液をまとめて作製する。



検査溶液を1テスト分5  $\mu\text{L}$  ずつ分注する。



トマトの葉を爪楊枝で1~2回軽く突き刺す。  
タバココナジラミを爪楊枝で突き刺すことで、保毒の有無を調べることができます。



爪楊枝を検査溶液に浸す。  
また、対照として検査溶液に陽性コントロールを1  $\mu\text{L}$  添加する。  
陰性コントロールとしてサンプルをいれないもの(検査溶液のみ)も用意する。  
ミネラルオイルを10  $\mu\text{L}$  入れる。



63  $^{\circ}\text{C}$ 、1時間恒温器または恒温水槽で反応させる。  
続けて、80  $^{\circ}\text{C}$  で2分間反応させる。



反応チューブに紫外線を当て、判定する。  
対照の陽性反応液と同じような、鮮やかな緑色の蛍光が認められるサンプルはウイルスが感染している。  
反応後のチューブはふたを開けず、すぐ廃棄する。

## トラブルシューティング

正確な診断を行うためには、陽性コントロールと陰性コントロールを検査ごとに作製する必要があります。それぞれのサンプルの陽性・陰性の判定はコントロールとの比較で行ってください。

表      トラブルシューティング

トラブル	原因	対処法
検査溶液が緑色を呈していて判定が困難	サンプルの持込み量が過剰	LAMP反応は極めて高感度な反応です。硬い台の上に置いたサンプル葉を爪楊枝で1～2回軽く突き刺す程度で検出が可能です。過剰なサンプルの持込みは誤判定の原因となりますので、注意してください。
陽性コントロールが発色しない。	検査方法の違い	試薬の入れ忘れはありませんか。試薬の添加量をチェックして下さい。また、恒温器の設定温度を確認してください。
	試薬の失活	キットにはLAMP反応を進める酵素が含まれています。酵素を常温に長時間放置すると、反応を進める能力が失われてしまいます。試薬を使う際には必ず氷の上に置いて下さい。
陰性コントロールが発色した。	試薬または室内のコンタミネーション	試薬の汚染の可能性があります。検査器具、検査環境を清掃し、再度検査を行って下さい。

## その他の診断項目

愛知県農業総合試験場ではLAMP法を利用し、以下のような病害虫の診断技術を確立しました。今後、これらの診断技術が県内で広く利用されるよう、普及を進めていきます。

表      診断できる病害虫

病原体	種類
ウイルス	CMV、CSVd、CVB、CyMV、INSV、JYMV、KGMMV、MNSV、MYSV、RSV、SBMV、TSWV、TYLCV、WMV、ZYMV
糸状菌・細菌	イチジク株枯病菌、イチゴ炭そ病菌 カーネーション萎凋細菌病菌、トマトかいよう病菌
害虫の識別	アザミウマ類の種識別、タバココナジラミのタイプ識別

編集・発行

愛知県農業総合試験場

〒480-1193 愛知県愛知郡長久手町大字岩作字三ヶ峯1-1

TEL 0561-62-0085 内線 323 (企画普及部)

FAX 0561-63-0815

<http://www.pref.aichi.jp/nososi>