

LAMP 法によるイチゴ炭疽病の迅速診断

1. 成果の要約

イチゴ炭疽病に特異的な LAMP 用プライマーを用いることにより本病の迅速診断が可能である。また、バルク法による多検体検出が可能であり本検出法の有効性が明らかとなった。

2. キーワード

潜在感染株、多検体検出、LAMP 用プライマー

3. 試験のねらい

イチゴ炭疽病は育苗期の潜在感染株を早期除去することが課題となっている。そこで、イチゴ炭疽病の迅速診断技術確立のため宇都宮大学で設計した LAMP (Loop-mediated amplification) 用プライマーを用い、LAMP 法による診断手法の有効性の検討および実用的な検定方法を明らかにする。

4. 試験方法

イチゴ炭疽病検出 LAMP 用プライマー (宇都宮大学作成 表-1) について、県内で発生したイチゴ炭疽病菌 (*Glomerella cingulate* および *Colletotrichum acutatum*) の LAMP 法による検出を検討した (表-1)。また、LAMP 法に供試するためのいちご株からの DNA 抽出方法について、いちご葉柄基部から DNeasy Plant Mini Kit、カネカ簡易 DNA 抽出キット、PrepMan Ultra、TE(pH8.0)、殺菌蒸留水を用いそれぞれで抽出した DNA をテンプレートとして LAMP 法による検出の有効性を検討した。

苗生産現場での使用を想定し、いちご最外葉の葉柄基部 10 個および 20 個をひとまとめにし、それぞれにイチゴ炭疽病感染株の葉柄基部 1 個を入れバルク法による検出を検討した。

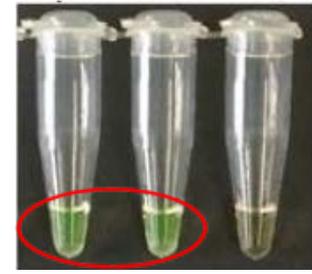
5. 試験結果および考察

- (1) 県内で発生したイチゴ炭疽病菌 (*Glomerella cingulate* (34 地点、71 菌株)、*Colletotrichum acutatum* (4 地点、7 菌株)) について LAMP 法による検出を検討した結果、供試した全ての菌株で特異的な LAMP 反応が確認され、本プライマーの有効性が確認された (表-2、図-1)。
- (2) 各抽出キット等で抽出した DNA をテンプレートとして LAMP 法による検出を検討した結果、検出可能であったのは DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 社)、polyclal VT を添加した TE(pH8.0) および殺菌蒸留水であった (データ省略)。
なお、LAMP 法における蛍光反応は、反応液中に金属キレート化合物等 (EDTA 等) が含まれていると鋳型の増幅に関係なく蛍光を発することがあることから TE buffer は用いないほうが良いと考えられた。
- (3) バルク法による検出を検討した結果、葉柄基部 10、20 個のひとまとめにした LAMP 反応による検出が可能であった。なお、ひとまとめとして処理する検体数が増加した場合、多糖類の吸着を目的として添加する polyclal VT 量が少ないと多糖類の影響等により LAMP 反応が阻害されることが考えられるため注意が必要である (表-3)。
- (4) 従来の検定手法に比べ LAMP 法は、迅速診断が可能である (表-4)。

(担当者 研究開発部 病理昆虫研究室 福田 充)

表-1 供試したプライマー配列

プライマー名	配列
CgF3	ATGCCTGTTCGAGCGTC
CgFIP	GCCACTACCTTTGAGGGCCTACTTTCAACCCTCAAGCTCTGC
CgB3	TCCGAGGTCAACCTTTGGAA
CgBIP	CGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAGGGTTTTACGGCAAGAGTCC
CgLF	GTAGGGCCCCAACACCA
CgLB	CTTTACGTCTCGACTGGGA



陽性 陰性

*陽性の場合には、緑色に
蛍光発色

図-1 LAMP 反応

表-2 供試したイチゴ炭疽病菌

Glomerella cingulata

地点数	菌株数	菌株名	採取日	宿主	地点数	菌株数	菌株名	採取日	宿主
1	1	鹿沼 ①	--	とちおとめ	20	38	真岡 M ①	140620	とちおとめ
1	2	鹿沼 ②	--	とちおとめ	39	39	真岡 M ②	140620	とちおとめ
2	3	小山 ①	--	スカイベリー	40	40	宇都宮 K ①	140624	スカイベリー
2	4	小山 ②	--	スカイベリー	41	41	宇都宮 K ②	140624	スカイベリー
3	5	鹿沼 O ①	2013	とちおとめ	42	42	栃木 ①	140701	とちおとめ
3	6	鹿沼 O ②	2013	とちおとめ	43	43	栃木 ②	140701	とちおとめ
4	7	真岡 A ①	2013	とちおとめ	22	44	栃木 ③	140701	とちおとめ
4	8	真岡 A ②	2013	とちおとめ	45	45	栃木 ④	140701	とちおとめ
5	9	雀宮 S ①	2013	とちおとめ	46	46	栃木 ⑤	140701	とちおとめ
5	10	雀宮 S ②	2013	とちおとめ	23	47	栃木 W	140724	とちおとめ
6	11	河内 A ①	2013	とちおとめ	48	48	下野 S ①	140724	スカイベリー
6	12	河内 A ②	2013	とちおとめ	24	49	下野 S ②	140724	スカイベリー
7	13	鹿沼 K	131113	--	50	50	下野 S ③	140724	スカイベリー
8	14	佐野 W ①	130919	とちおとめ	51	51	宇都宮 S ①	140724	スカイベリー
8	15	佐野 W ②	130919	とちおとめ	25	52	宇都宮 S ②	140724	スカイベリー
9	16	佐野 N ①	130919	とちおとめ	53	53	宇都宮 S ③	140724	スカイベリー
9	17	佐野 N ②	130919	とちおとめ	54	54	真岡 I ①	140724	とちおとめ
10	18	馬頭 F ①	130919	とちおとめ	26	55	真岡 I ②	140724	とちおとめ
10	19	馬頭 F ②	130919	とちおとめ	56	56	真岡 I ③	140724	とちおとめ
11	20	芳賀 斑点型 ①	130919	とちおとめ	57	57	佐野 S ①	140729	スカイベリー
11	21	芳賀 斑点型 ②	130919	とちおとめ	27	58	佐野 S ②	140729	スカイベリー
12	22	上三川 I ①	140127	--	59	59	佐野 S ③	140729	スカイベリー
12	23	上三川 I ②	140127	--	60	60	下野 I ①	140802	スカイベリー
13	24	栃木 K ①	140422	--	28	61	下野 I ②	140802	スカイベリー
13	25	栃木 K ②	140422	--	62	62	下野 I ③	140802	スカイベリー
14	26	宇都宮 S ①	140422	とちおとめ	29	63	宇都宮 S ③	140809	とちおとめ
14	27	宇都宮 S ②	140422	とちおとめ	30	64	栃木 都賀 ①	140809	とちおとめ
15	28	壬生 ①	140422	とちおとめ	31	65	足利 K ②	140813	とちおとめ
15	29	壬生 ②	140422	とちおとめ	32	66	宇都宮 S ①	140925	スカイベリー
16	30	足利 M ①	140422	とちおとめ	67	67	宇都宮 S ②	140925	スカイベリー
16	31	足利 M ②	140422	とちおとめ	33	68	鹿沼 ①	140925	--
17	32	鹿沼 N ①	140606	--	69	69	鹿沼 ②	140925	--
17	33	鹿沼 N ②	140606	--	70	70	小山 T ①	140925	とちおとめ
18	34	H ①	140606	--	34	71	小山 T ②	140925	とちおとめ
18	35	H ②	140606	--					
19	36	鹿沼 O ①	140620	とちおとめ					
19	37	鹿沼 O ②	140620	とちおとめ					

Colletotrichum acutatum

地点数	菌株数	菌株名	採取日	宿主
1	1	芳賀 葉枯れ ①	130919	とちおとめ
1	2	芳賀 葉枯れ ②	130919	とちおとめ
2	3	Y ①	130930	スカイベリー
2	4	Y ②	130930	スカイベリー
3	5	U ①	130930	スカイベリー
3	6	U ②	130930	スカイベリー
4	7	U ①	140701	とちおとめ

表-3 バルク法によるイチゴ炭疽病菌の検出

葉柄数	殺菌蒸留水	polyclal V T	LAMP 反応
10 個	500 μ l	0.7g (スパチュラで5杯)	○
10 個	500 μ l	0.7g (")	○
20 個	500 μ l	0.7g (")	×
20 個	1 ml	1.5g (スパチュラで10杯)	○

表-4 従来の検定手法との比較

	エタノール診断法	PCR法	LAMP法
診断時間	15日	8日	90分
診断費用	20円/検体	370円/検体	250円/検体