

(別紙様式)

令和4年度豆類調査研究助成事業成果概要

1 調査研究課題名

LAMP 法改良によるアズキ土壌病原微生物の同時検出法開発

2 調査研究組織名・研究者名

北海道大学大学院農学研究院・近藤則夫

3 調査研究の目的

北海道の小豆栽培における生産阻害要因として、アズキ落葉病、萎凋病および茎疫病は特に重要である。これら難防除病害に対し、これまで数種の複合病害抵抗性品種が育成されているが、さらなる有用品種育成のため、各病原体の迅速かつ簡易な検出法であるLAMP法の開発は品種育成に寄与することが期待される（令和2年度豆類調査研究助成事業）。すなわち、上記三病害いずれにおいても抵抗性品種の本格的な栽培後に新たなレースの顕在化が認められており、比較的少数の抵抗性母本から育成された小豆品種が普及している現状において、抵抗性品種を侵すレースの分布拡大に対応するため、小豆植物体および土壌中のそれぞれの病原体密度を迅速に把握する必要がある。本研究は、それぞれの病原微生物の検出・同定法として利用範囲が広いLAMP法を改良して、これら三種の病原微生物の迅速簡易な同時検出法の確立を行い、北海道産小豆の安定供給及び健全種子の確保等に資することを目的とする。

4 調査研究の方法

(1) 標的DNA領域の探索およびプライマーの設計

アズキ落葉病菌、茎疫病菌および萎凋病菌に対して、それぞれ、Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP)、Ras-related Proteinの*Ipt1*および*Fusarium oxysporum*が持つ病原性遺伝子である*SLX14*をコードする遺伝子領域の配列情報から、設計支援ソフトPrimerExplorer V5により6つの部分領域を選んで組み合わせた特異的なプライマーを設計する。最適反応温度を決定し、これらプライマーを用いた鎖置換による増幅反応を進行させた後、蛍光測定 (Genelyzer FIII、キャノンメディカルシステムズ株式会社) により増幅の有無を確認する。

(2) 遺伝子増幅の効率化

全病原菌の各プライマーセットに付加するループプライマー (LP) を設計し、反応速度を上げることで効率的なDNA増幅を可能にする。

(3) マルチプレックスLAMP法の開発

それぞれのプライマーおよびLPの最適濃度を決定し、各病原菌の会合解離曲線のピークが識別可能になるように最適化を図る。また、それぞれの病原微生物汚染土壌および罹病植物体からDNAを抽出し、標的DNA領域の検出が可能かを検討するとともに、段階的にサンプルDNA濃度を設定して検出感度を明らかにする。

5 調査研究の結果及び考察

1) 結果

(1) 病原微生物3種のプライマーおよびLpの設計

TCTPを標的としたプライマーセットCga10およびCga_LP2 (表1)により、アズキ落葉病菌60菌株に特異性を示し検出限界は10pgだったが、菌株によってはLPを加えることで反応時間が若干遅れる場合もあった。分化型が異なるダイズ落葉病菌 (15菌株供試) でもDNAが増幅するため両者の判別は困難ではあるものの、落葉病菌以外の糸状菌12菌株ではDNAの増幅は見られず、高い特異性を示した。

*lpt*領域を標的としたプライマーセットPva_primer_set_5およびPva_LP5 (表1)により、アズキ茎疫病菌 (8菌株供試) のDNA増幅が確認され、検出限界は10pgだった。ただし、茎疫病菌以外の55種61菌株の卵菌類各種においては、*Phytophthora cajani* および*P. melonis*を検出し、さらに、DNAが50ngの高濃度の場合のみ*P. cacambivola*と*P. sojiae*の一部菌株を検出した。

SIX14を標的とするプライマーセットFoaSIX14およびSIX14-2_LP5 (表1)により、アズキ萎凋病菌病原性菌株は1菌株を除いた24菌株を検出し、アズキ圃場から採取された非病原性菌株は検出されなかった。DNAの検出限界は50ngであった。また、その他の分化型の菌株において、*Fusarium lycopersici*、*F. phaseoli*、*F. nivaeum*菌株の一部が検出されたが、それ以外の分化型67菌株は検出されなかった。

表1 アズキの土壌伝染性病原微生物特異的 LAMP 法プライマーセット

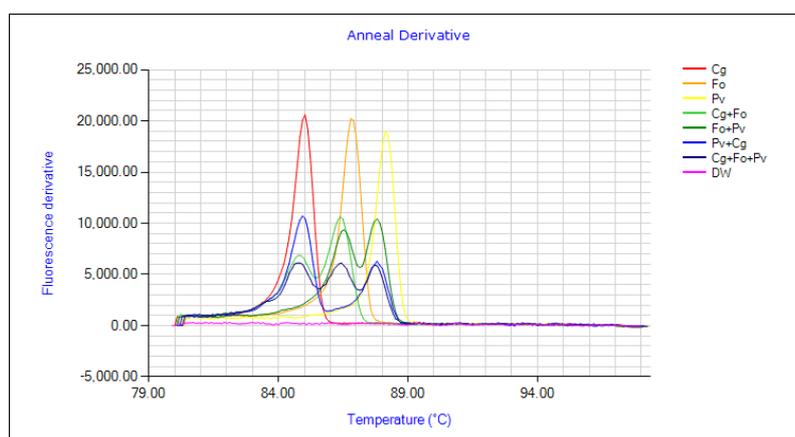
セット	プライマー	塩基配列 (5' → 3')
Cga10 (落葉病菌)	FIP	CCAGATGCAAAGCCTAAATCCCCTTGGTGTCACTCCTTTCGICA
	BIP	TGTGCTCCCTTGAGCAAAGTAGAGTGGGTCTGATATCGAAGGATCG
	F3	TCGTTCTCATGAACTACCGC
	B3	ATGAACGGCAGGATGGTACT
Cga10_LP2	LF	ATCTCAACCAAACCGTGTCCAG
	LB	TGCATATAGCGTGCATCTCTCCTC
Pva primer set5 (茎疫病菌)	FIP	TTCTGGGCAGAGCAACGGGCAGAATGGCCAAGGTTTCCT
	BIP	AATTCGCACGATCGAGCTGGACGAATGTACCGGGGATGAAC
	F3	GTCGAGCGGACGTTTTCC
	B3	CCACAACGCGCTAAGTCG
PVA_LP5	LF	CACAATAATGTCAGCAACTGGA
	LB	CGGCAAGACCATCAAGCTCCAG
SIX14-2_1 (萎凋病菌)	FIP	TGCTTCTGATCAAAGCGCCATATTTGTGCGCTTGGCGTATG
	BIP	AATGCGCTTCTCGTTGTGCGAGGCCGACACTATAGAGGA
	F3	TGCCGTCATGCATGACATG
	B3	GGAAACGAGCTTCTGGTAGG
SIX14-2_LP5	LF	CATGAATACAATAACAGGCGATCAGCT
	LB	GGCATCAAGATTCATGTCTCTCGTAT

(4) マルチプレックスLAMP法の開発

表2のプライマー組成としたLP最適化試験の結果、すべてのサンプルにおいて10分程度で検出できる最適組成を決定した。会合曲線解析の結果(図1)から、単独DNAサンプルでは、アズキ落葉病菌、萎凋病菌および茎疫病菌それぞれで84.9°C, 86.8°C, 88.2°C付近に特異的ピークが確認され、検出が可能であった。また、複数菌種のDNAが含まれるサンプルでは、サンプルに含まれるすべてのDNAがそれぞれの独自のピーク温度で検出された。また、3菌種が含まれたサンプルでは、ピークの大きさが等しくなっていた。本法においては、サンプルに含まれる菌のDNAが2種類である場合、DNAに濃度差があっても会合曲線解析のピークによる同時検出が可能だった。これまで、3菌種の検出のために1菌種あたり1時間の検出時間をかけ、3度の試験が必要であったが、本法の開発により試験時間30分ですべての菌を検出することが可能になった。これにより、検出の迅速化及び効率化が達成された。

表2 マルチプレックスLAMP法における反応組成 (Genelyzer FIII)

Isothermal Master Mix	15.0 μ L
FIP (100 μ M)	0.2 μ L each
BIP (100 μ M)	0.2 μ L each
F3 (100 μ M)	0.05 μ L each
B3 (100 μ M)	0.05 μ L each
LF (100 μ M)	CgLP : 0.025 μ L, FoLP : 0.1 μ L, PvLP : 0.025 μ L
LB (100 μ M)	CgLP : 0.025 μ L, FoLP : 0.1 μ L, PvLP : 0.025 μ L
滅菌超純水	3.2 μ L
	20.0 μ L (サンプルを加えた全量/1 チューブ)



2) 考察

本事業において設計した3組のプライマーセットにより、アズキ落葉病、茎疫病および萎凋病を引き起こす病原微生物のマルチプレックスLAMP法による検出が可能となった。なお、植物体からは改変アルカリ摩砕液法を用いることで罹病植物体からの検出を確認でき、土壌からは改変CTAB-Bead-beating法を用いて抽出することで土壌からの検出を確認できた。マルチプレックスLAMP法は上記病害の診断のさらなる効率化に有用であるものと考えられる。