

令和2年度豆類調査研究助成事業成果概要

1 調査研究課題名

アズキ落葉病、萎凋病および茎疫病を引き起こす病原微生物の LAMP 法による特異的かつ迅速な検出

2 調査研究組織名・研究者名

北海道大学 北方生物圏フィールド科学センター・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、複合病害抵抗性品種が広く普及している。しかし、上記三病害に対する抵抗性品種の本格的な栽培後に、新たなレースが出現した事例が見られたことから、このような抵抗性品種を侵すレースの分布拡大あるいは新規レースの出現が将来的に懸念される。これに対処するためには、栽培圃場における継続的なレースのモニタリングならびに抵抗性育種過程における迅速な発病判定のための迅速かつ簡便な遺伝子診断法が必要とされる。

本研究は、それぞれの病原微生物の土壌および植物体からの迅速、簡便かつ精確な検出を可能にする特異性に優れた遺伝子増幅法である LAMP 法を確立することで、北海道産アズキ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

遺伝子データベースさらに各種文献により、アズキ落葉病菌、茎疫病菌および萎凋病菌の特異的 DNA 領域の塩基配列を探索し比較検討した。

2) LAMP 法のプライマー設計

1) において候補とした標的 DNA 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、発色法あるいは蛍光測定 (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。さらに、各種糸状菌あるいは卵菌類を供試して、それぞれの病原微生物特異性を検証する。

3) LAMP 法による検出

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) 標的 DNA 領域の探索

アズキ落葉病菌 (*Cadophora gregata* f. sp. *adzukicola*) では、リボソームDNAの小サブユニット領域を標的として選択した。

アズキ茎疫病菌 (*Phytophthora vignae* f. sp. *adzukicola*) では、広く *Phytophthora* 属菌種のLAMPプライマーの設計に用いられているRas-related Protein遺伝子領域の *Ypt1* が適当であると判断した。

アズキ萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *adzukicola*) では、一般に植物病原性 *Fusarium oxysporum* の病原性に関わる木部内分泌タンパク質コード遺伝子 (*SIX*) に着目し、*SIX14* ホモログの塩基配列解析により、この領域の特異性が高いことを見出した。

(2) LAMP法のプライマー設計

リボソームDNA小サブユニット領域を標的としたプライマーセットCgaSSU(表1)により、アズキ落葉病菌60菌株のDNA増幅が確認された。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なもの、落葉病菌以外の糸状菌菌種12菌株ではDNAの増幅は見られず、高い特異性を示した。

Ypt1 領域を標的としたプライマーセットPvaYPT(表1)により、アズキ茎疫病菌(9菌株供試)のDNA増幅が確認された。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* を除いてDNA増幅は見られなかった。また、分化型が異なるササゲ茎疫病菌の *Ypt1* 領域が一致していることから、両分化型の判別はできないと判断される。

SIX14 を標的とするプライマーセットFoaSIX14(表1)により、アズキ萎凋病菌26菌株中25菌株においてDNA増幅が確認された。なお、*Fusarium oxysporum* 複合種の71菌株中4菌株でDNA増幅が確認され、このうち2菌株はトマト萎凋病菌であった。

表1 アズキの土壌伝染性病原微生物特異的LAMPプライマーセット

セット	プライマー	塩基配列 (5' → 3')
CgaSSU (落葉病菌)	FIP	TOGATCGTGTTCGCCAGAGCGAGCGGACTGTAATAACGC
	BIP	TCACCTACTACCTACCCCGAAGCTGCGGATCGTCCATTG
	F3	ACCATGCATCCCCTGAGG
	B3	TGCGCTGTAGGGTCTCC
PvaYPT (茎疫病菌)	FIP	TTCTGGGAGAGCAACGGGAGCAATGGCCAAGGTTTCCT
	BIP	AATTCGCACGATCGAGCTGGACGAATGTACCGGGATGAAC
	F3	GTCGAGCGGACGTTTTCC
	B3	CCCAACTGCGCTAAGTCG
FoaSIX14 (萎凋病菌)	FIP	TGCTTCTGATCAAAGCGGCCATAITTTGTCGCCTTGGCGTATG
	BIP	AATGCGCTTCTCGTTGTTCGAGAGGCCGACACTATAGAGGA
	F3	TGCCGTCATGCATGACATG
	B3	GGAAACGAGCTTCTGGTAGG

(3) LAMP法による検出

プライマーセットCgaSSUによる落葉病菌DNAの検出感度は、1 pg/tubeであった(図1)。プライマーセットPvaYPTによる莖疫病菌DNAの検出感度は、10pg/tubeとなり(図2)、Ypt1領域を標的とした他の卵菌類の場合の報告と比較し、大きな値を示した。プライマーセットFoaSIX14による萎凋病菌DNAの検出感度は、5 pg/tubeであった(図3)。

植物体からの抽出方法を検討し、針刺し法およびボルテックス法と比較して、いずれの病原体においても磨砕液法の検出率が最も高かった。なお、磨砕液法においてはNaOH(0.5N)50 μ L中で植物切片を磨砕し、Tris-HCl(100mM pH8.0)195 μ L中で保存した後に測定した。

落葉病菌接種土壌を滅菌水で希釈し菌密度を10cfu/tube以上としたサンプルから落葉病菌DNAの検出は可能であったが、0.1cfu/tubeのサンプルからは検出されなかった。莖疫病菌の場合、先行研究の大澤ら(2020)により改良された改変CTAB-Bead-beating法により、蛍光測定の前に接種土壌からDNAを抽出することにより、菌密度25 cfu/tubeの卵胞子接種土壌サンプルからDNAが検出された。なお、萎凋病菌については、土壌からの検出は未検討である。

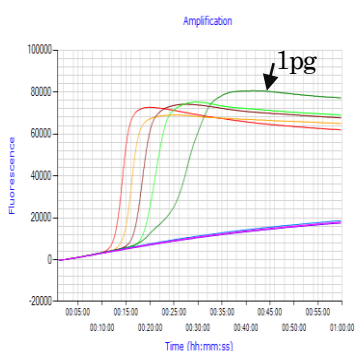


図1 アズキ落葉病菌の検出

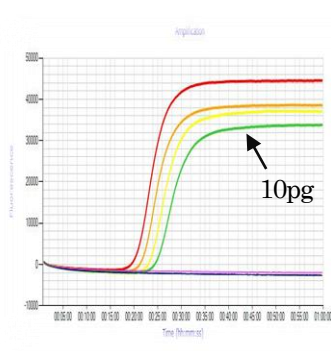


図2 アズキ莖疫病菌の検出

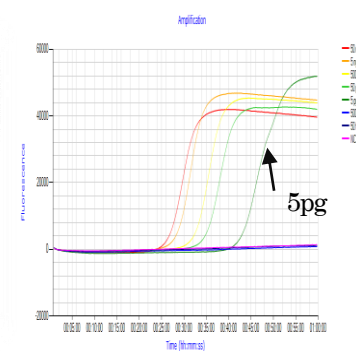


図3 アズキ萎凋病菌の検出

2) 考察

本事業において設計した三組のプライマーセットにより、アズキ落葉病、莖疫病および萎凋病を引き起こす病原微生物のLAMP法による検出が可能となった。萎凋病菌の土壌からの検出については研究継続の必要があるものの、植物体および土壌からの迅速かつ簡便な検出法がほぼ確立したものと考えられる。土壌からの検出における阻害要因として明らかになったフミン酸およびリグニン成分の除去については、今後の課題である。

また、今回示したプライマーセットの特異性について、さらに改善の必要性が認められたことから、よりの確かな標的DNA領域の探索の必要がある。将来的には、より利便性が高いと考えられる、複数種が同時に識別可能なLAMP法の開発により、アズキ病害に関わる病原体の動態が効率的に把握可能となるとともに、今後の複合病害抵抗性品種の育成においても、迅速な抵抗性判定により精度の高い罹患識別法への応用が可能と考えられる。