

LAMP 法によるアズキ落葉病菌検出に関する研究

生物資源科学専攻 作物生産生物学講座 植物病理学 三隅智央

1. 緒言

アズキ落葉病は, *Cadophora gregata* f. sp. *adzukicola* によって引き起こされる土壌伝染性病害である。本菌の選択分離培地は開発・利用されているが, 非常に緩慢な菌糸伸長のために同定まで数週間を要することに加え, コンタミネーションによる誤同定のリスクを抱えている。本研究では, LAMP 法によるアズキ落葉病菌の簡便かつ迅速な同定法の開発を試みた。さらに, 現場での使用を想定した簡便なサンプル処理による検出法を検討し, 植物や土壌由来の化合物による LAMP 反応阻害について調べた。

2. 方法

リボソーム DNA の IGS 領域と小サブユニット (SSU) 領域に着目し, プライマー設計支援ソフトウェア PrimerExplorerV5 を用いてプライマー設計を行った。プライマーの特異性は, アズキ落葉病菌株 98 菌株, ダイズ落葉病菌 19 菌株, その他土壌中に生息する代表的糸状菌あるいは卵菌 17 菌株の DNA を供試して調べた。現場への応用を見据え, サンプルを乳鉢で磨砕し, 磨砕液の希釈液を直接反応液に添加する方法 (磨砕液法) と, 罹病組織の汁液が付着した金属針を反応液に浸漬する方法 (針刺し法) (福田至朗ら 2005) による, 罹病アズキや菌混和土壌からの, LAMP 法によるアズキ落葉病菌検出法を検討した。

3. 結果と考察

IGS 領域では適切なプライマーを設計できなかった。一方, SSU 領域で設計したプライマーにより, 供試した全アズキ落葉病菌株の DNA が増幅された。本プライマーでは他菌種の DNA は増幅されなかったが, ダイズ落葉病菌の DNA は増幅された。しかし, ダイズ落葉病菌は宿主が異なるため, 現場での診断には影響はないと考えられた。

磨砕液法により, 罹病アズキや菌混和土壌からアズキ落葉病菌が検出された。このことから, DNA 抽出試薬による処理を行わずにサンプルを供試できるという, LAMP 法の頑健性や簡便性, 高い検出感度が確認された。罹病アズキについては, 針刺し法によるアズキ落葉病菌検出も可能であったが, 偽陰性となる事例も生じた。

検出試験の結果から, 反応液に添加するサンプルに含まれる植物や土壌の抽出物の濃度が高くなることで, 反応が阻害されていることが明らかとなった。反応阻害物質の候補となる化合物を反応液に添加したところ, 一定濃度以上のリグニンとフミン酸が, LAMP の反応や蛍光を阻害することが判明した。

4. まとめ

リボソーム DNA の SSU 領域で設計したプライマーは, 供試したアズキ落葉病菌全ての DNA を増幅した。本試験の結果から, 分化型の異なる菌株を判別するためには, プライマー内により多くの変異箇所を含む必要があることが示唆された。今後の試験では, 反応阻害物質の特定や阻害効果の解明を進め, 反応阻害を避けつつも, 偽陰性を減らすことができる検出法の検討を行う必要がある。