

LAMP 法によるオオムギ斑葉病検定技術

1. 成果の要約

オオムギ斑葉病菌検出 LAMP 法用プライマーを設計した。本プライマーを使用した LAMP 反応では、オオムギ斑葉病菌にのみ特異的な蛍光反応を示し（陽性）、他の主要なオオムギ種子伝染性病原菌への反応は陰性であった。また、検出感度は既知の PCR 法と比較して 10 倍劣ったが、多検体検出が可能であった。大麦種子をバルク化し DNA 抽出することで、保菌種子率 2% まで安定した検出を行うことができた。さらに 100 粒バルク（保菌種子率 1%）に対し、5ml の殺菌蒸留水（最終濃度 1.6×10^{-3} 粒/ μ l）、0.25g のポリクラール VT を添加して DNA 抽出を行うことで、保菌種子率 1% まで検出を向上させることができた。

2. キーワード

LAMP 法用プライマー、オオムギ斑葉病保菌種子、多検体検出

3. 試験のねらい

オオムギ斑葉病は種子伝染性病害であり、ほ場での発病が見られなくとも、大麦種子が本病原菌を保菌している場合がある。オオムギ斑葉病の既知の検定方法では、サーマルサイクラー等の専用装置が必要であり、生産現場で直に検定を行うことが困難である。LAMP（loop-mediated isothermal amplification）法は温度を一定に保つことができれば専用の装置が不要となる利点がある。そこで、種子生産現場での保菌種子の確認手法として、LAMP 法によるオオムギ斑葉病保菌種子検定技術の確立をめざして試験を行う。

4. 試験方法

(1) 大麦の主要な種子伝染性病害に対する LAMP 反応の確認

オオムギ斑葉病菌のみを特異的に反応するプライマーを設計した（表-1）。オオムギ斑葉病菌に加え、オオムギ斑葉病菌と同じ大麦の種子伝染性病害であるオオムギ網斑病菌、オオムギ黒節病菌、オオムギ赤かび病菌について LAMP 反応を確認した。

(2) 検出精度の検討

オオムギ斑葉病保菌種子から抽出した DNA を 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 倍に段階希釈し、LAMP 法による検出を行った。比較として本病菌の特異的プライマー PG2-F/PG2-R（Taylor et al., 2001）を用いて PCR 法による検出を行った。

(3) 多検体検出法の検討

本病保菌種子を用いて多検体検出法による抽出方法を検討した。保菌種子率 100、50、10、5、2、1、0.1、0% になるように保菌種子と健全種子を混ぜ、LAMP 法による検出を行った。さらに、多検体検出における検出精度の向上を検討するため、保菌種子率 1% における DNA 抽出時の buffer 量および抽出による夾雑物（多糖類）を吸着するポリクラール VT 添加を検討した。

5. 試験結果および考察

(1) 本プライマーを使用した LAMP 反応では、オオムギ斑葉病菌にのみ特異的な蛍光反応を示し（陽性）、他の主要なオオムギ種子伝染性病原菌への反応は陰性であった（表-2）。

(2) LAMP 法では 10 倍希釈まで、PCR 法では 10^2 倍希釈まで安定して斑葉病が検出された（表-3）。

(3) 多検体検出では、保菌種子率 2% まで本法による安定した検出が可能であった（表-4）。また、100 粒バルクに対し殺菌蒸留水 5ml、ポリクラール VT を 0.25g 添加することにより保菌種子率 1% まで検出精度を向上させることが出来た。このときの最終濃度は保菌種子に対し 1.6×10^{-5} 粒/ μ l であった（表-5）。

（担当者 駒場麻有佳、山城都*、高橋怜子**）

*現河内農業振興事務所、**現経営技術課

表-1 LAMP 法用プライマーの配列

プライマー名	塩基配列(5'→3')
Pg_F3	GGACGATGTTCCGGACACTG
Pg_B3	GACAAGGGCACACGCTAG
Pg_LB	GGTCCCAGTCCATCGCCTC
Pg_LF	TCAAGTGCTACAACCTGCGGC
Pg_FIP	CCAGACAGAGCAAGCAGGAGAATCTTGCTATGTGGCCTGACT
Pg_BIP	CGAGCTTGACCCACCTTCGTACAGTCTACTCCGAAGACCA

表-2 オオムギの主要な種子伝染病
に対する LAMP 反応結果

病名	菌株名	LAMP ¹⁾
オオムギ斑葉病 <i>Pyrenophora graminea</i>	葉-1	+
オオムギ網斑病 <i>Pyrenophora teres</i>	CTF1204	-
	CTF1205	-
	CTF1207	-
オオムギ黒節病 <i>Pseudomonas syringae</i>	17-1	-
オオムギ赤かび病 <i>Fusarium graminearum</i>	AS-1	-

1) +: 陽性, -: 陰性

表-3 検出精度の検討

希釈倍率	PCR ¹⁾			LAMP ¹⁾		
	反復			反復		
	I	II	III	I	II	III
1	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10 ²	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10 ³	++	++	++	++	++	++
10 ⁴	-	-	-	-	-	-

1) +: 陽性, -: 陰性

表-4 多検体検出法における保菌種子検出感度の検討

保菌種子率 (%)	保菌種子数 (粒)	健全種子数 (粒)	合計種子数 (粒)	添加抽出液量 ¹⁾ (ml)	LAMP ²⁾		
					反復		
					I	II	III
100	1	0	1	0.1	+++	+++	+++
50	1	1	2	0.2	+++	+++	+++
10	1	9	10	1	+++	+++	+++
5	1	19	20	2	+++	+++	+++
2	1	49	50	5	+++	+++	+++
1	1	99	100	10	++	++	++
0.1	1	999	1000	100	-	-	-
0	0	1	1	0.1	-	-	-

1) 菌蒸留水の添加量は種子1粒に対し0.1mlになるよう統一した

2) +: 陽性, -: 陰性

表-5 多検体検出における DNA 抽出条件の検討

保菌種子率 (%)	保菌種子数 (粒)	健全種子数 (粒)	合計種子数 (粒)	抽出液量 (ml)	LAMP反応時の 最終濃度(粒/μl)	ポリクラーラルVT ¹⁾	LAMP ²⁾		
							I	II	III
1	1	99	100	20	4 × 10 ⁻⁶	-	++	+	-
1	1	99	100	20	4 × 10 ⁻⁶	1g	-	-	-
1	1	99	100	10	8 × 10 ⁻⁶	-	-	+	+
1	1	99	100	10	8 × 10 ⁻⁶	0.5g	+	-	-
1	1	99	100	5	1.6 × 10 ⁻⁵	-	-	+	-
1	1	99	100	5	1.6 × 10 ⁻⁵	0.25g	+	+	+

1) ポリクラーラルVTは抽出液量に対し5%になるよう加えた

2) +: 陽性, -: 陰性