

# LAMP 法によるイチゴ萎黄病の迅速診断技術

## 1. 成果の要約

葉柄サンプルから *Fusarium* 属菌を検出できるプライマーを用いてサンプルのスクリーニングを行い、さらに、陽性を示したサンプルを分離培養し、得られた菌体を病原性判別用のプライマーを用いることで LAMP 法によりイチゴ萎黄病の感染を診断できる。

## 2. キーワード

いちご、イチゴ萎黄病、迅速診断、LAMP 法

## 3. 試験のねらい

イチゴ萎黄病は土壌および苗によって伝染するいちごの重要病害である。これまで感染株を診断するための技術として、エタノール簡易診断や PCR 法による遺伝子診断技術の開発が行われてきたが、より迅速な LAMP 法を用いた診断技術を開発する。

## 4. 試験方法

### (1) DNA 抽出方法の検討

菌体サンプルからの DNA 抽出法として、アルカリ熱抽出法（高橋ら 2009 を改変）、界面活性剤熱抽出法（関川ら 2008 を改変）、従来法（福田 2016）を比較した（表-1）。LAMP 反応は、栄研化学 DNA 増幅試薬キット（2×Reaction Mix 12.5 ul、Bst DNA Polymerase 1.0 ul、Distilled Water 3.5ul）、発色試薬 1.0 ul（栄研 fluorescent detection reagent）、プライマー（FIP・BIP 各 40pmol、F3・B3 各 5pmol、LF20pmol）各 1.0ul、template DNA 2.0 ul を加え 25 ul とし、63℃で 60 分間、95℃で 2 分間処理した。なお、プライマーは V2-2 を用いた。

### (2) プライマーの検討

宇都宮大学で作成された候補プライマー V0 プライマー（特許 6381771）および V2 プライマー（加藤 2019）のほか、本病菌の病原性に関連する領域の塩基配列（Suga *et.al* 2013）を参照（V2-2 プライマー）、あるいは既報の本病菌塩基配列（IGS : KX451277、EF1  $\alpha$  : KX456039、ITS・18S : MAFF712071）を参照して Primer Explorer V.5（富士通）により作出した 18 候補について、63℃で各 templateDNA と LAMP 反応を行った。なお、templateDNA は、病原性の有無が明らかな当場保存菌株 9 菌株の菌体サンプルを供試し、PDA 平板培地で培養した菌叢表面を爪楊枝で少量掻き取り、10% tween20 を含む TE を加え、電子レンジ 700W で 70 秒加熱後に 15,000rpm で 2 分間遠心分離後、上清を templateDNA とした。

陽性反応が認められたプライマーは、葉柄サンプルから *Fusarium* 属菌の検出について検討した。葉柄サンプルは、イチゴ萎黄病菌株（FoF288）をマングビーン液体培地で 15 日間培養し常法により調製・かん注接種した感染株および健全株から採取した最外葉葉柄基部をカミソリで切出した。これを、10% polyclalVT を添加した 10% tween20 を含む TE に入れて電子レンジ 700W で 70 秒加熱後に 15,000rpm で 2 分間遠心分離した上清を templateDNA とし、63℃または 65℃で LAMP 反応を行った。

## 5. 試験結果および考察

(1) 菌体サンプルから templateDNA を抽出する際には、アルカリ熱抽出法あるいは界面活性剤熱抽出法（TE を使用）を用いた場合、従来法に比べて LAMP 反応が安定していた。なお、界面活性剤熱処理法（TE を使用）は、アルカリ熱抽出法に比べて操作工程が少なく LAMP 反応の安定性はほぼ同等であった（表-2）。

(2) 候補プライマーのうち、V0 プライマー（HPLC 精製）は、感染葉柄サンプルから *Fusarium* 属菌の検出が可能であったが、健全サンプル 6 検体のうち 1 検体で陽性となる等、非特異的反応が一部に認められたことからバルク抽出は不適当と考えられた（表-3、表-4）。また、PDA 培地で 2~3 日間培養した菌体サンプルにおいて、V0 プライマーでは病原性菌株と非病原性菌株の識別ができな一方、V2-2 プライマー（通常精製）は病原性菌株の識別が可能であった（表-5）。

以上から、①葉柄サンプルから DNA を抽出し、V0 プライマーを用いた LAMP 反応（65℃）

によってスクリーニングが可能であること、②葉柄サンプルを分離培養して得られた菌体から界面活性剤熱抽出法で DNA を抽出し、V2-2 プライマーを用いた LAMP 反応 (63°C) によって病原性が判別できることが明らかになった。このことから、葉柄基部をサンプリングし、V0 プライマーを用いてスクリーニングする第一段階と、陽性を示したサンプルのみ分離培養し、V2-2 プライマーを用いて病原性を判別する第二段階によって、イチゴ萎黄病感染株を LAMP 法で診断することができると考えられた。

(担当者 研究開発部 病理昆虫研究室 山崎周一郎)

表-1 菌体サンプルからの DNA 抽出法の比較

	アルカリ熱抽出法	界面活性剤熱抽出法①	界面活性剤熱抽出法②	従来法
抽出 buffer	25mMNaOH (50 $\mu$ l)	DW <sup>2)</sup> + 10%Tween20 (100 $\mu$ l)	TE <sup>2)</sup> + 10%Tween20 (100 $\mu$ l)	DW <sup>2)</sup> + 10%polyclalVT (100 $\mu$ l)
加熱時間 電子レンジ (700w)	70秒	70秒	70秒	60秒
加熱後添加	1MTris-HCl(pH7.5) (4 $\mu$ l)	-	-	-

1) 各抽出法とも、上記の工程後に15,000rpm 2分間遠心分離した上清をtemplateDNAとし、LAMP反応に供した。  
2) DW:滅菌蒸留水、TE:Tris-EDTA Buffer (pH 8.0)

表-2 菌体サンプルからの DNA 抽出法の比較結果

	アルカリ 熱抽出法	界面活性剤 熱抽出法①	界面活性剤 熱抽出法②	従来法
LAMP反応の有無 <sup>1)</sup>	+++	+-	+++	++±

1) 「+」は陽性反応、「-」は陰性反応、「±」は判然としないの意。  
2) templateDNAは培養菌体(UKA-1)から抽出。栄研化学DNA増幅キットとプライマーの組合せで63°CでLAMP反応を行った。プライマーは、V2-2プライマー(ループプライマーあり・通常精製)を用いた。3反復で実施した。

表-3 イチゴ葉柄サンプルと  
各プライマーの LAMP 反応

プライマー	反応温度	生葉柄	
		罹病	健全
V0 プライマー	63°C	+++	---
V2-2プライマー		+-	---
V0 プライマー	65°C	+++	---
V2-2プライマー		---	---

1) templateDNAは罹病株または健全株の1葉柄から界面活性剤熱抽出法(TE使用)で抽出し、栄研化学DNA増幅キットと各プライマーを用い63°Cまたは65°CでLAMP反応を行った。プライマーはHPLC精製を用いた。3反復で実施した。

表-4 V0 プライマーを用いた LAMP 反応  
による健全及び感染葉柄サンプルからの検出

	イチゴ株番号	LAMP反応
		V0プライマー・65°C
健全イチゴ株 葉柄	健全①	-
	健全②	-
	健全③	-
	健全④	-
	健全⑤	+
	健全⑥	-
感染イチゴ株 葉柄	罹病①	+
	罹病②	+
	罹病③	+
	罹病④	+
	罹病⑤	+
	罹病⑥	+

1) templateDNAは罹病株葉柄から抽出。栄研化学DNA増幅キットとプライマーの組合せで65°CでLAMP反応を行った。なおプライマーはHPLC精製。  
2) templateDNA抽出法は、界面活性剤熱抽出法(TE使用)を採用した。

表-5 V0 及び V2-2 プライマーを用いた LAMP 反応による菌体サンプルからの検出

プライマー <sup>2)</sup>	供試菌株 <sup>1)</sup>								
	FOF6 (病)	FOF18 (非)	FOF50 (病)	FOF55 (非)	FOF13 (非)	FOF113 (非)	FOF121 (非)	FOF288 (病)	UKA-1 (病)
V0プライマー <sup>3)</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V2-2プライマー	+	-	+	-	-	-	-	+	+

1) templateDNAは培養菌体(乾燥)から界面活性剤熱抽出法(TE使用)で抽出し、栄研化学DNA増幅キットと各プライマーの組合せで63°CでLAMP反応を行った。  
2) すべてのプライマーは通常精製。  
3) V0プライマーの結果は2017年度データ、V2-2プライマーは2018年度データ。  
4) 「病」は病原性菌株、「非」は非病原性菌株の意。