

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法による イチジク株枯病菌の検出

福田至朗*・三宅律幸*・間下なぎさ**・山田真人*

摘要：LAMP法を用い、イチジク株枯病菌(*Ceratocystis fimbriata*)を検出する技術を開発した。株枯病菌のITS領域から設計したLAMPプライマーにより、0.1 pgの株枯病菌DNAを検出することができた。また、イチジク植物体の病変部からの簡易検出法として、爪楊枝法が利用できることを明らかにした。これらの方法を用い、愛知県内のイチジク及び汚染土壌から高精度に株枯病菌を検出できたことから、本法が実用可能であると考えられた。

キーワード：イチジク株枯病、*Ceratocystis fimbriata*、Loop-mediated isothermal amplification、LAMP

Detection of *Ceratocystis Fimbriata* from Fig Tree and Soil by the Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method

FUKUTA Shiro, MIYAKE Noriyuki, MASHITA Nagisa and YAMADA Masato

Abstract: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) to detect the causal agent of Ceratocystis canker, *Ceratocystis fimbriata* was developed. Specific primers were designed by targeting the ITS region. The detection sensitivity of LAMP was 0.1 pg of *C. fimbriata* DNA. With LAMP methods, *C. fimbriata* could be detected from fig tree and soil samples that were prepared from fig fields in Aichi prefecture.

Key Words: Ceratocystis canker, *Ceratocystis fimbriata*, Loop-mediated isothermal amplification, LAMP

緒言

イチジク株枯病は1981年に愛知県で始めて報告された病害である¹⁾。その後、全国の主要なイチジク産地に広がり、現在ではイチジク栽培で最も重要な病害となっている。株枯病は株枯病菌(*Ceratocystis fimbriata*)によって引き起こされるが、株枯病菌に感染したイチジクは、定植3~5年目頃から萎凋症状が認められ、更に進行すると下葉の黄化や枯れ込みが見られる。このような罹病株では結果枝の伸長が抑制され、収穫量は顕著に減少し、やがては枯死に至る。

株枯病の伝搬については、キクイムシ類による虫媒伝染についての報告もあるが²⁾、栽培上最も問題となるのが苗伝染と土壌伝染である。罹病苗の持込みによりイチジク栽培圃場の土壌が汚染され、その後雨水などによって圃場全体に広く蔓延していくことが知られている¹⁾。このようなことから、株枯病を防除するためには、新植するイチジク苗や定植後の生育不良株の病害診断、土壌を消毒した後の病原菌の有無の確認、が必要になる。

これまで、本病の簡易な診断法として、褐変した病変部の表皮を温室条件下で1週間培養した後、病斑部に形成された子のう殻の有無を観察する方法が用いられていた。一方、土壌については、対象土壌にイチジクの切り枝を突き刺し、約10日後に切り枝と土壌との境界付近に形成される子のう殻の有無を観察することによって行っていた³⁾。いずれの方法も簡易ではあるが、判定まで1週間以上必要とする上、検出感度がやや低いことが問題であった。そのため、清水ら⁴⁾は株枯病の高感度で正確な検出法としてPCR法を報告している。この方法は、糸状菌の分類の指標によく利用されるリボゾームDNAのITS領域(internal transcribed spacer、転写領域内部のスペーサー)からプライマーを設計し、株枯病菌を特異的に増幅するものである。PCR法は高い検出感度を持つ優れた方法であるが、サーマルサイクラーなどの機器や電気泳動を行う必要があることから、農業現場での利用は難しい。そのため、現場で利用できる簡易で正確な診断技術を開発する必要があると考えられた。

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法はNotomiら⁵⁾によって報告された新たなDNA増幅法である。LAMP法の大きな特徴として、一定温度でDNAを増幅することができる、DNAが増幅したか否かを目視で判定できる^{6,7)}、ことが挙げられる。この特徴により、LAMP法による病害診断にはサーマルサイクラーや電気泳動が要らず、簡易な設備で正確な診断を行うことができる。

本研究では、愛知県のイチジク産地で大きな問題となっている株枯病を引き起こす*C. fimbriata*を高精度に検出できるLAMP法による簡易な診断技術について検討した。

材料及び方法

1 イチジク株枯病菌

イチジク株枯病菌(*C. fimbriata*)は県内のイチジク圃場の罹病イチジクから分離し、PDA培地により25℃で培養した。

株枯病菌のDNAは、PDA培地上の菌系をかきとり、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出した。抽出したDNAを10 ng/μLに調整し、これを10倍ずつ希釈してPCR法及びLAMP法の検出に用いた。

2 塩基配列の決定

*C. fimbriata*は地域や宿主によって塩基配列に差があることが報告されており⁸⁻¹⁰⁾、県内のイチジク圃場から分離した株枯病菌についてITS領域の塩基配列を調べる必要がある。そのため、抽出したDNAを鋳型として清水ら⁴⁾の報告したプライマーCFF3及びCFR3(表1)を用いてITS領域を増幅し、得られたPCR産物をpGEM-Easy TA clonig kit (Promega) を用いてクローニングした後、遺伝子解析システムCeq8000 (BECKMAN COULTER) を用いてシークエンスした。

3 LAMPプライマーの設計

LAMPプライマーはITS領域の塩基配列を用い、Web上のLAMP法プライマー設計支援ソフトウェア(富士通 PrimerExplorer V3, URL: <https://primerexplorer.jp/lamp3.0.0/index.html>)を用いて設計した。設計

表1 本研究で用いたプライマーとその配列

プライマー名	塩基配列	文献番号
CFF3	5' -GATAAGAGATATGCTGCTTTGG -3'	3
CFR3	5' -GTTTCCAACAGAAGTTGAATACAG-3'	3
CerF-F3	5' -GATCTCTTGGCTCTAGCAT-3'	*
CerF-B3	5' -CAAGTAGAACGCCGATGCA-3'	*
CerF-FIP	5' -GCGCAATGTGCGTTCAAAGATT -GATGAAGAAGCGAGCGAA-3'	*
CerF-BIP	5' -TGTCCGAGCGTCATTTACACC -GGAGAACAGGACCTCCAA-3'	*
CerF-FLoop	5' -GCAATTCACATTACTTATCGC-3'	*
CerF-BLoop	5' -CAAGAACTGTTTCTTTCTTGGTG-3'	*

*、本研究で開発したLAMPプライマー

したLAMPプライマーの配列 (CerF-F3、CerF-B3、CerF-FIP、CerF-BIP、CerF-FLoop、CerF-BLoop) を表1に示した。

4 LAMP反応

LAMP反応は、20 mM Tris-HCl pH 8.8、10 mM KCl、8 mM MgSO₄、10 mM (NH₄)₂SO₄、0.1% Tween20、0.8 M betaine、1.4 mM dNTPs、0.2 μM CerF-F3及びCerF-B3プライマー、1.6 μM CerF-FIP及びCerF-BIPプライマー、0.8 μM CerF-FLoop及びCerF-BLoopプライマー、8 unitsの*Bst* DNA polymerase (NEB)、1 μlのDNA抽出液を含む 25 μlの反応液を用いた。反応液をリアルタイム濁度測定装置LA200 (Teramecs) にセットし、濁度を測定しながら63 °Cで60分間の反応を行った。

5 PCR反応

PCRは清水ら⁴⁾の方法に若干の変更を加えて行った。Ex-*Taq*添付の1×緩衝液に0.2 mM dNTPs、0.2 μM CFF3とCFR3プライマー (表1)、1 unitのEx-*Taq*、1 μLの鋳型DNAを含む20 μLの反応液を用い、94 °Cで2分の変性後、94 °Cで1分・55 °Cで1分・72 °Cで1分を35回繰り返す。最後に72 °Cで10分の温度条件でDNAを増幅した。PCR増幅産物は1%アガロースで電気泳動し、株枯病菌由来の519bpのバンドを確認した。

6 イチジク苗への株枯病菌の接種

15 cm径のポットで育成したイチジク苗の株元の土壌に、PDA培地で培養した株枯病菌を混ぜ込み、温室で1ヶ月栽培し、株元に株枯病を発病させた。株元に褐変症状が現れたイチジク株を診断に用いた。

7 植物体からの鋳型調整

イチジク病変部からのDNA抽出には、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)を用いた。100 mgのイチジク樹皮を用い、添付のプロトコールに従ってDNAを抽出し鋳型として用いた。

簡易な鋳型調整法として、福田ら¹¹⁾の報告した爪楊枝法を用いた。すなわち、株枯病に罹病したイチジクの病変部に爪楊枝を突き刺し、そのまま、LAMP反応液に数秒浸した後、63 °Cで1時間のLAMP反応を行った。

8 土壌からの鋳型調整

ポット試験及びイチジク現地圃場の土壌からのDNAの抽出には、PowerSoil DNA Isolation Kit (Mo Bio Lab.)、及び簡易な方法として報告されたKageyamaら¹²⁾のDNA抽出法を用いた。

9 野外サンプルからのイチジク株枯病菌の検出

2006年から2007年に愛知県内のイチジク圃場からイチジクの株元の表皮及び表層10~15 cmの土壌を採取した。植物体からは爪楊枝法を用いてLAMP法及びDNeasy Plant Mini Kitを用いてDNAを抽出しPCR法で検定した。土壌についてはPowerSoil DNA Isolation Kitを用いてDNAを抽出し、LAMP法及びPCR法で検定を行った。

試験結果

1 LAMPの検出感度

株枯病菌から抽出したDNAを10 ng/μLに調整し、更に、10倍ずつ0.01 pg/μLまで計7段階まで調整した。それぞれの希釈DNA液1 μLを用いて、PCR法及びLAMP法による株枯病菌の検出を行った。その結果を図1に示

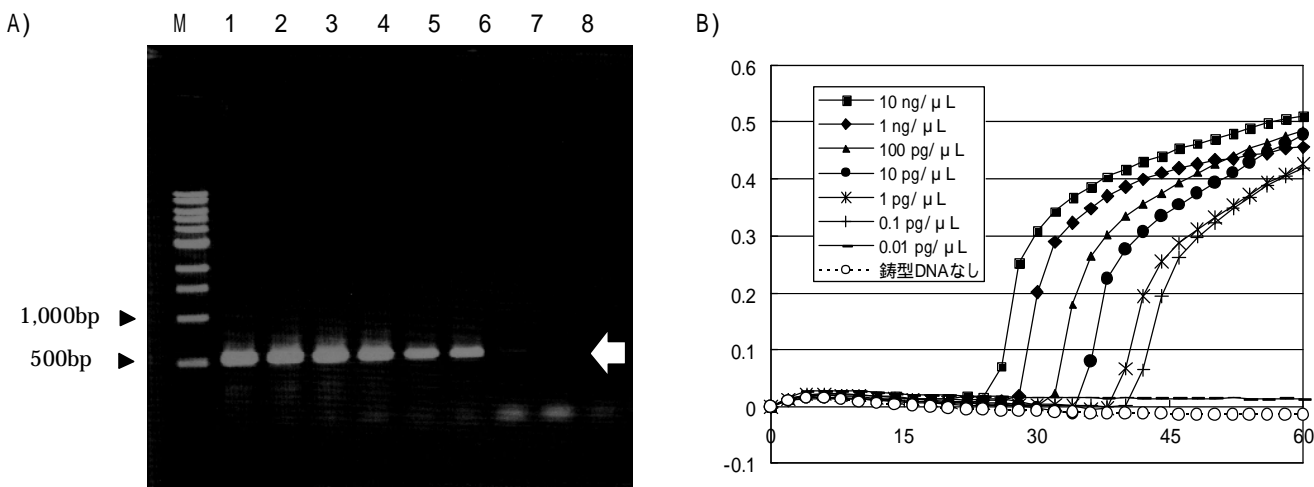


図1 PCR法及びLAMP法によるイチジク株枯病菌DNAの検出感度の比較

A: PCR法による株枯病菌の検出。1:10 ng/μL、2:1 ng/μL、3:100 pg/μL、4:10 pg/μL、5:1 pg/μL、6:0.1 pg/μL、7:0.01 pg/μL、8:0 pg/μLの株枯病菌のDNAを鋳型に用いた。519bp (右矢印) にバンドが検出される。M、ラダーマーカー。

B: LAMP法による株枯病菌の検出。10 ng/μLから0.1 pg/μLまで1時間以内に反応液の濁度上昇が認められた。

した。

PCR法では、0.1 pg/μLの濃度まで519bpに株枯病由来の増幅産物が認められた(図1A)。一方、LAMP法についても、0.1 pg/μLの濃度まで1時間以内に反応液の白濁が確認された(図1B)。

以上の結果から、本研究で開発したLAMP法は清水ら⁴⁾の報告したPCR法とはほぼ同等の検出感度を有するものと考えられた。

2 株枯病菌接種イチジク及び土壌からの株枯病菌の検出

株枯病菌を接種したイチジクを用い、病変部及び土壌からの株枯病菌の検出を行った。植物体からの銹型

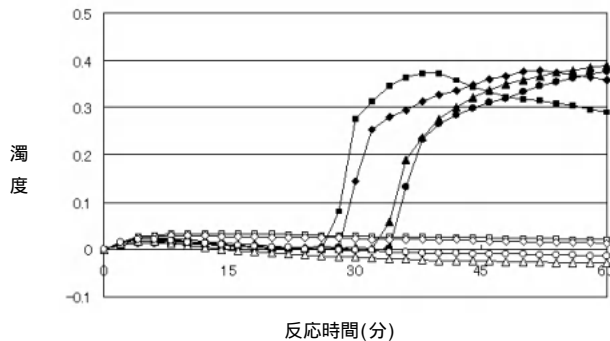


図2 LAMP法によるイチジク樹皮からの株枯病菌の検出

、 、 、 はDNeasy Plant Mini Kitで抽出したDNAを銹型に、 、 、 、 は爪楊枝法で調整したDNAを銹型に用いた。また、 、 、 、 はイチジク株枯病を接種した植物から、 、 、 、 は健全イチジクから銹型を調整した。

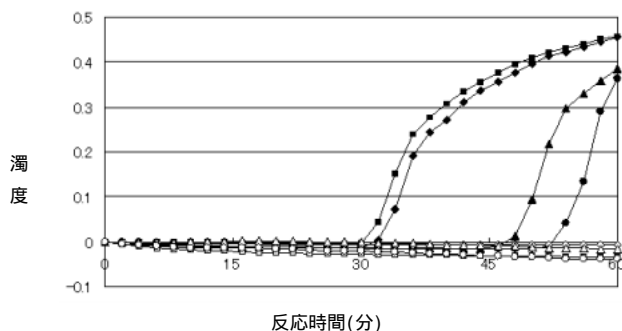


図3 LAMP法による土壌からの株枯病菌の検出

、 、 、 はPowerSoil DNA Isolation Kitで抽出したDNAを銹型に、 、 、 、 はKageyamaらの方法¹²⁾で調整したDNAを銹型に用いた。また、 、 、 、 はイチジク株枯病を接種した土壌から、 、 、 、 は接種していない土壌から抽出した。

DNAの調整には、DNeasy Plant Mini Kit及び簡易な爪楊枝法を用いた。

その結果、病変部から抽出したDNAについては反応開始から30分以内に、爪楊枝法を用いた場合についても、30~35分後に濁度の上昇が認められ、株枯病を検出することができた。一方、健全植物からはどちらの調整法でも濁度の上昇は認められなかった(図2)。

土壌からの検出については、PowerSoil DNA Isolation Kitで抽出したDNAでは反応開始から約30分後に、Kageyamaら¹²⁾の方法で抽出したDNAではやや遅れ、約45分後に濁度の上昇が認められた(図3)。ともに、1時間以内のLAMP反応で株枯病の検出が可能であったが、サンプル間の差が少ないことや検出までの時間がより短いことから、PowerSoil DNA Isolation Kitを用いるのが好ましいと考えられた。

3 野外サンプルからの検出

愛知県内のイチジク栽培を行っている12圃場で採取したイチジク樹皮及び土壌からの株枯病菌検出を行った。その結果、すべてのサンプルでLAMP法とPCR法の結果は一致した(表2)。

考 察

LAMP法は簡易・迅速・精確を特徴とするDNA増幅技術である。LAMP反応に用いる*Bst* DNA polymeraseは2本鎖DNAを引き剥がしながら伸長反応を進める鎖置換合成能を持っている。これによりLAMP反応は変性を必要とせず、60~65 の一定温度でDNAを増幅することができる⁴⁾。

また、LAMP反応では、DNA増幅の際にできるピロリン酸イオンと反応液中のマグネシウムイオンが結合し、不溶性のピロリン酸マグネシウムが生成する。そのため、LAMP反応におけるDNA増幅はピロリン酸マグネシウムによる反応液の白濁を目視で確認することにより判断することができる^{5,6)}。

表2 野外サンプルからのイチジク株枯病菌の検出

No.	材料	発病の有無	PCR法	LAMP法
1	イチジク樹皮	有	+	+
2	イチジク樹皮	有	+	+
3	イチジク樹皮	無	-	-
4	イチジク樹皮	無	-	-
5	土壌	有	+	+
6	土壌	有	+	+
7	土壌	有	+	+
8	土壌	有	+	+
9	土壌	有	+	+
10	土壌	有	+	+
11	土壌*	有	-	-
12	土壌*	有	-	-

*: 株枯病発生後に熱水土壌消毒で滅菌した土壌

更に、Kanekoら¹³⁾は、LAMP法はPCR法に比べ反応阻害物質の影響を受けにくいことを報告している。そのため、LAMP法は、従来用いられていたPCR法に比べ簡易な鑄型調整法でDNAを増幅することができるものと考えられた。

これらの特徴により、LAMP反応は農業現場において簡易で正確な病害診断を行うために適した方法であり、これまでに多くの植物病原の診断に関する報告がなされてきた¹³⁻¹⁶⁾。

本研究では、イチジクの最も重要な病害である株枯病についてイチジク及び汚染土壌からの検出技術確立した。段階希釈した株枯病菌のDNAを鑄型に用いた試験結果から、このプライマーは清水らの報告したPCR法とほぼ同等の検出感度があることが明らかとなった(図2)。本研究で用いたLAMPプライマーは、愛知県内のイチジクから分離された株枯病菌のITS配列を用いている。*C. fimbriata*は宿主や分離された地域などによって遺伝的な差異があるとの報告もあり⁹⁾、本プライマーがサツマイモなど他の植物に感染する*C. fimbriata*検出にも利用できるかについては明らかではない。

病変部からの株枯病菌の検出では、爪楊枝を使った鑄型調整によって極めて簡易に株枯病の診断を行うことができた。

土壌からの株枯病菌検出では、PowerSoil DNA Isolation Kitを用いて抽出したDNAを鑄型に用いることにより、効率的に検出できることが明らかとなった。

更に、県内のイチジク圃場から採取した土壌においても、PCR法と同等の結果を得ることができた。このような環境中のDNA - メタゲノムを鑄型に用いたLAMP反応については、Aoiら¹⁸⁾及びTaniら¹⁹⁾によって活性汚泥中のアンモニア酸化遺伝子(amoA)の定量的な検出法が報告されているが、植物病原菌については本研究が初めての報告である。今後、LAMP法を用いた環境からの病原菌検出が数多く研究されていくものと考えられる。

本研究の成果を現場で活用するためには、感染初期の無病徴株からの病原菌検出が必要になる。今後、本技術がこのような無病徴のイチジクからの株枯病菌検出に利用できるかを調べる必要がある。

引用文献

1. 廣田耕作, 加藤喜重郎, 宮川壽之. イチジク株枯病の薬剤防除について. 愛知農総試研報. 16, 211-218 (1984)
2. 新田浩通, 森田剛成, 若崎由香, 水主川桂宮. キクイムシによるイチジク株枯病の伝搬事例. 関西病虫害研究会報. 47, 95-98 (2005)
3. 梶谷裕二. 切り枝を利用した土壌からのイチジク株枯病菌の簡易検出法. 日本植物病理学会報. 61, 229 (1995)
4. 清水伸一, 三好孝典, 兼松聡子. 磁性シリカビーズを用いたイチジク株枯病菌のPCRによる土壌からの検出. 愛媛果樹試研報. 15, 35-40 (2002)
5. Notomi, K., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28, E63 (2000)
6. Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N. and Notomi, T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 150-154 (2001)
7. Mori, Y., Kitano, M., Tomita, N. and Notomi, T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J. Biochem. Biophys. Methods* 59: 145-157 (2004)
8. Barnes, I., Gaur, A., Burgess, T., Roux, J., Wingfield, B. D. and Wingfield, M. J. Microsatellite markers reflect intra-specific relationships between isolates of the vascular wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata*. *Molecular Plant Pathology* 2, 319-325 (2001)
9. Engerbrecht, C. J. B., Harrington, T. C., Steimel, J. and Capretti, P. Genetic variation in eastern North American and putatively introduced populations of *Ceratocystis fimbriata* f. *platani*. *Molecular Ecology* 13, 2995-3005 (2004)
10. Thorpe, D. J., Harrington, T. C. and Uchida, J. Y. Pathogenicity, internal transcribed spacer-rDNA variation, and human dispersal of *Ceratocystis fimbriata* on the family Araceae. *Phytopathology* 95, 316-323 (2004)
11. 福田至朗, 穴井尚子, 加藤政司, 吉村幸江, 深谷雅博, 矢部和則, 大矢俊夫, 神戸三智雄. 簡易な鑄型調整によるloop-mediated isothermal amplification (LAMP)法を用いたトマト黄化葉巻ウイルスの検出. 関西病虫害研報. 47, 37-41 (2005)
12. Kageyama, K., Komatsu, T., Suga and H. Refined PCR protocol for detection of plant pathogens in soil. *J. Gen. Plant Pathol.* 69, 153-160 (2003)
13. Kaneko, H., Kawana, T., Fukusihima, E. and Suzutani, T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 70, 499-501 (2007)
14. Fukuta, S., Kato, S., Yoshida, K., Mizukami, Y., Ishida, A., Ueda, J. and Kanbe, M. Detection of tomato yellow leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification reaction. *J. Virol. Methods.* 112, 35-40 (2005)
15. 奥田充, 河野伸二, 村山裕子, 岩波徹. LAMP法を用いたカンキツグリーンング病原細菌検出の反応条件と非磨砕DNA抽出法の検討. 日植病報. 74, 316-320 (2008)
16. 大矢仁志, 中川寛章, 齋藤範彦, 植松寛, 小原達二. LAMP法を用いた種子からのスイカ果実汚染細菌病

- (*Acidovorax avenae* subsp. *Citrulli*)の検出. 日植病報. 74, 304-310 (2008)
17. Tomlinson, J. A., Baker, I. and Boonham, N. Faster, simpler, more-specific methods for improved molecular detection of *Phytophthora ramorum* in the field. Appl. Environ. Microbiol. 73, 4040-4047 (2007)
18. Aoi, Y., Hosogai, M. and Tsuneda, S. Real-time quantitative LAMP (loop-mediated isothermal amplification of DNA) as a simple method for monitoring ammonia-oxidizing bacteria. J. Biotechnology. 125, 484-491 (2005)
19. Tani, H., Teramura, T., Adachi, K., Tsuneda, S., Kurata, S., Nakamura, K., Kanagawa, T. and Noda, N. Technique for quantitative detection of specific DNA sequences using alternately binding quenching probe competitive assay combined with loop-mediated isothermal amplification. Analytical Chemistry. 79, 5608-5613 (2007)