
【タイトル】 LAMP 法を利用したイネもみ枯細菌病の簡易診断

【要約】 LAMP 法を利用した簡易診断キットの蛍光反応の有無によって、もみ枯細菌病を目視判定で診断できる。

【キーワード】 イネ、もみ枯細菌病、LAMP 法、簡易診断キット

【担当部署】 農林水産総合技術センター・農業研究所・病理昆虫課

【連絡先】 電話 076-429-5249

【背景・ねらい】

これまで、LAMP 法によるイネもみ枯細菌病の迅速診断技術を開発し(2021 年度 主要成果)、生産現場からの持ち込みに対して診断を行ってきた。一方、一般栽培の育苗時や種子生産における育苗から栽培期間中では、本病を早期に発見し、速やかな対策が不可欠であることから、よりフィールドに近い現場環境で実施できる簡便な手法が求められている。

そこで、LAMP プライマーを利用した簡易診断キットを開発し、苗の安定生産及び健全種子生産に寄与する。

【成果の内容・特徴】

- 1 簡易診断キットによって、もみ枯細菌病にり病した苗及び籾から特別な装置を用いることなく、66℃、60 分間反応を行うことで、緑色の蛍光目視判定ができる (図 1)。
- 2 本キットの検出限界は 4×10^2 cfu/mL 程度であり、検出機器を用いた LAMP 反応と同程度に高感度である (表 1)。
- 3 り病苗はアルカリ試薬で調製することにより、煩雑な DNA 抽出工程を経ることなく容易に DNA サンプルを得ることができ (図 1)、発病の程度を問わず 1 本から診断が可能となる (図 2、3)。
- 4 1 穂分に相当する籾からの診断を想定し、籾 70 粒中に 1 粒のもみ枯細菌病り病籾を混ぜて作成したサンプルからでも陽性判定が可能である (表 2、図 1、4)。

【成果の活用面・留意点】

- 1 定性的な判定であることから保菌リスクの評価には不向きであるが、り病苗及び籾がもみ枯細菌病に起因するかどうかの判定に適している。
- 2 り病苗及び籾からのサンプル調製は、図 1 【DNA サンプルの調製】の方法が簡便であるが、フィンガーマッシャー、減圧処理、超音波洗浄機による分離、液体培地による増菌処理などでも可能である (データ略)。
- 3 診断の際は簡易診断キットに加えて、マイクロピペット (1,000 μ L 及び 20 μ L 用) 及びチップ、PCR チューブ用冷却ラック、攪拌装置、卓上遠心機、恒温器などが必要となる。
- 4 簡易診断キット (48 検体分/1 キット) は (株) ニッポンジーンマテリアルから販売予定となっている。なお DNA 抽出に用いるアルカリ試薬は含まれていない。

[具体的データ]

1 【DNAサンプルの調製】
 り病苗: 1.5mLチューブに苗基部10mm切片と1mLのアルカリ試薬を混和し、3～15分後にミキサーでよく攪拌する。
 り病粒: 25mLチューブに1穂分の粒と3.5倍重量のアルカリ試薬を混和し、3～15分後にミキサーでよく攪拌する。



※アルカリ試薬: 20mMKOH, 1L及びホ³エチレングリコール50gの溶解液

3 DNA抽出サンプル5 μ Lと付属のミネラルオイル20 μ Lを添加した後、キャップを閉じて、転倒混和し、卓上遠心機でスピンドアウンする。



2 【診断キットの調製】
 乾燥試薬の入ったチューブを冷却用ラックに立てて、付属の溶解液20 μ Lを添加し、2分間静置する。



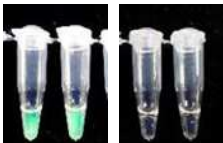
4 66℃を一定に保てる恒温器などに60分間保温した後、目視判定

自然光下



陽性（蛍光黄緑）
陰性（薄赤色）

UVランプ照射下



※より鮮明な発色になる

図1 簡易診断キットによる診断方法

表1 段階希釈した菌液からの検出

反応条件	66℃、60分							
No.	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
懸濁液の濃度 ^a	4×10^7	4×10^6	4×10^5	4×10^4	4×10^3	4×10^2	4×10^1	NC
Genie II ^b	14:45	16:45	18:45	20:45	26:00	24:45	—	—
簡易診断キット	+	+	+	+	+	+	—	—

a: 4×10^8 cfu/mLに調製したもみ枯細菌病菌を段階的に10倍希釈した懸濁液

b: LAMP反応の蛍光検出機器（表中の数値は検出時間）

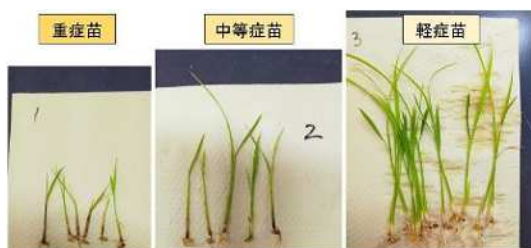


図2 症状別に分類した発病苗

注) り病苗1本を図1の方法で3分間静置後、1分間攪拌した溶液をDNA抽出サンプル(原液)とした。

表2 所定の割合でり病粒を混入して作製したサンプル粒

No.	①	②	③	④	⑤	⑥
健全粒数	69	68	67	66	63	56
り病粒数	1	2	3	4	7	14
り病粒率(%)	1.4	2.9	4.3	5.7	10	20

注1) 25mLチューブに表2で作製したサンプル粒①～⑥及び6mLのアルカリ試薬を入れ3分間静置後、1分間攪拌した溶液をDNA抽出サンプルとした。

注2) り病粒は外観で発病が認められる自然感染粒を使用

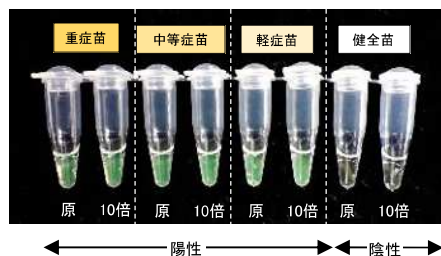


図3 簡易診断キットによるり病苗からの検出

注1) 反応試薬には原液(原)及びその10倍液(10倍)を5 μ Lずつ添加した。

注2) 陽性反応は蛍光黄緑に発色

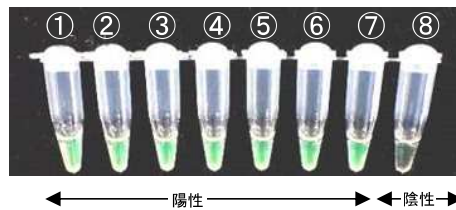


図4 簡易診断キットによるサンプル粒からの検出

注1) 図中の⑦は陽性コントロール、⑧は陰性コントロール

注2) 陽性反応は蛍光黄緑に発色

[その他]

研究課題名: もみ枯細菌病フリーな種子生産技術の開発

予算区分: 県単(革新技術開発普及費)、国補(病害虫年次変動解析試験)

研究期間: 革新; 2024年度(2024～2026年度)、国補; 2024年

研究担当者: 三室元気、山本知里 発表論文等: なし