

リアルタイム PCR による サツマイモ基腐病菌の 検出・同定技術 標準作業手順書

HP 公開版



目次

はじめに	1
免責事項	2
I. サツマイモ基腐病	3
1. サツマイモ基腐病について	3
2. 背景、およびこれまでの診断技術と問題点	6
3. サツマイモ基腐病に類似した病害	7
II. リアルタイム PCR による検出作業の工程	9
1. 器具・機械および消耗品類の準備	9
2. 圃場サンプルの前処理	10
3. DNA の抽出	11
4. リアルタイム PCR の実行	13
5. リアルタイム PCR の検出特異性と検出限界	16
III. リアルタイム PCR による検出の優位性	18
1. LAMP 法	18
2. コンベンショナル PCR	19
3. 検出法の費用や性能の比較	21
用語解説	23
参考資料	26
担当窓口、連絡先	26

はじめに

サツマイモ基腐病（以下、基腐病と称します）は、サツマイモ（植物名 サツマイモ、作物名 かんしょ、以下では両方ともサツマイモと称します）が感染すると地際から発症して枯死するほか、塊根の腐敗を引き起こすため、産地に深刻な被害をもたらします。基腐病の発生地域は、感染した種苗や罹病残渣の移動により広がると考えられています。基腐病の対策では、健全なサツマイモ苗や種イモを使用し、基腐病を圃場に「持ち込まない」。万が一に基腐病が発生した場合は、感染株をすみやかに抜き取り、病原菌を圃場で「増やさない」。そして、罹病した植物残渣を圃場に「残さない」ことが重要です。そこで農研機構では、基腐病の既発生地域の被害を抑えるとともに発生地域の拡大を阻止することを目指して、本病の早期診断を可能とする、病原菌の新たな検出・同定技術を開発しました。

基腐病の被害を最小限に抑えるためには、種苗段階での感染株の除去、圃場での発生初期の被害株の発見と除去が重要です。本標準作業手順書（SOP）で紹介するリアルタイム PCR 法は、PCR による増幅をリアルタイムで測定・解析する方法であり、微生物の検出や生物種の判定等に用いられています。このリアルタイム PCR を基腐病の初発生を確認する場面だけでなく、サツマイモ種苗や生産物の品質管理などの場面で利用することで、本病の対策強化への更なる貢献が期待されます。本 SOP は、国・県の公設試験場や、民間の検査会社等、基腐病の診断を必要とする方、その業務に携わる組織の職員が読むことを想定し、作成しています。また、生物素材を用いた遺伝子診断手法であるため、分子生物学の知識や技術に加え、植物病原菌の取扱いに関する基本的な知識と操作法を習得している方が利用することを想定して作成しています。

本 SOP が、サツマイモ基腐病の被害に悩む産地はもとより、発生を警戒する地域で本病における遺伝子検査の手引きとして活用され、被害の抑制に役立つことで、サツマイモの生産振興の一助となれば幸いです。

免責事項

- 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構（以下、農研機構と称します）は、利用者が本 SOP に記載された技術を利用したこと、あるいは技術を利用できないことによる結果について、一切責任を負いません。
- 本 SOP に掲載したサツマイモ基腐病菌の検出・同定技術などの情報は特に記載がない限り 2022 年 3 月末時点のものです。
- 本 SOP は農研機構において実際に行った検出・同定の作業内容に基づいて記載されています。供試サンプルの違いや、使用する PCR 機種や試薬などの条件より結果が変動することにご留意ください。本 SOP に記載の技術の利用により、このとおりの結果が得られることを保証するものではありません。
- 本 SOP に記載されている図表および写真の一部は、イノベーション創出強化研究推進事業 01020C コンソーシアムが取りまとめた「サツマイモ基腐病の発生生態と防除対策マニュアル」より抜粋・加筆修正されたものです。農食事業 01020C コンソーシアムの参画機関は、農研機構、鹿児島県農業開発総合センター、鹿児島県経済農業協同組合連合会、宮崎県総合農業試験場、および沖縄県農業研究センターです。
- 本 SOP に記載の画像や図表はすべて農研機構が著作権を有しているか、転載許可を得ているものです。
- 本手順書に記載のプライマーは、「サツマイモ基腐病菌を検出するための核酸、プライマーセット、キットおよび方法（特許第 7349149 号）」として農研機構が特許登録しています。当該発明の実施を希望するときは、農研機構のホームページ（<https://prd.form.naro.go.jp/form/pub/naro01/patent>）からお問い合わせください。

I. サツマイモ基腐病

1. サツマイモ基腐病について

サツマイモ基腐病（以下、基腐病と称します）は、サツマイモ基腐病菌（*Diaporthe destruens*）という植物病原糸状菌によって引き起こされます。宿主植物であるサツマイモ（植物名 サツマイモ、作物名 かんしょ、以下では両方ともサツマイモと称します）が本病原菌に感染すると、圃場（苗床および本圃）で発病します。基腐病菌の圃場への主な侵入経路は、感染した種イモや苗の植え付けです。圃場では植えつけた苗の萎れや黄化・赤化症状などの生育不良が認められ、さらに地際部位に暗褐色もしくは黒色の病変が生じている場合は、基腐病の可能性が非常に高くなります（図 I - 1）。感染した塊根では、栽培中に加え貯蔵中にも腐敗症状が発生します（図 I - 2）。地際部の茎葉に生じる病変部には基腐病菌の柄子殻もしくは分生子殻と呼ばれる小さな黒粒が多数形成され、そこから雨水などの影響により内包されている大量の胞子が漏出し、水や土壌の跳ね上がりとともに周囲のサツマイモ株に感染が拡大します。サツマイモの茎葉が繁茂する生育旺盛期には、地際部の異常に気付くにくいこと、密かに感染が拡大し、収穫期に急激な病勢の進展による茎葉の生育の衰えが観察されて初めて深刻な被害が露見することが多いです。収穫後に、基腐病に感染したサツマイモ（罹病植物残渣）が圃場に残存すると、次作に土壌伝染する一次伝染源となります。連作により土壌中の基腐病菌密度が高くなった圃場では感染する危険性が大きくなります。



図 I - 1 基腐病の発生によるサツマイモ被害の様子

A : 感染初期の様子、巻葉や株の萎縮が認められます。B : 圃場における葉の異変の様子（黄色枠内）、葉が赤変・黄変し生育不良が認められます。C : 地ぎわ部の黒褐変の様子（黄色矢印）、D : 圃場から掘り上げた罹病塊根の様子、種イモは腐敗しており、苗の基部は黒褐変（黄色矢印）が認められます。参考資料 1 より転載。

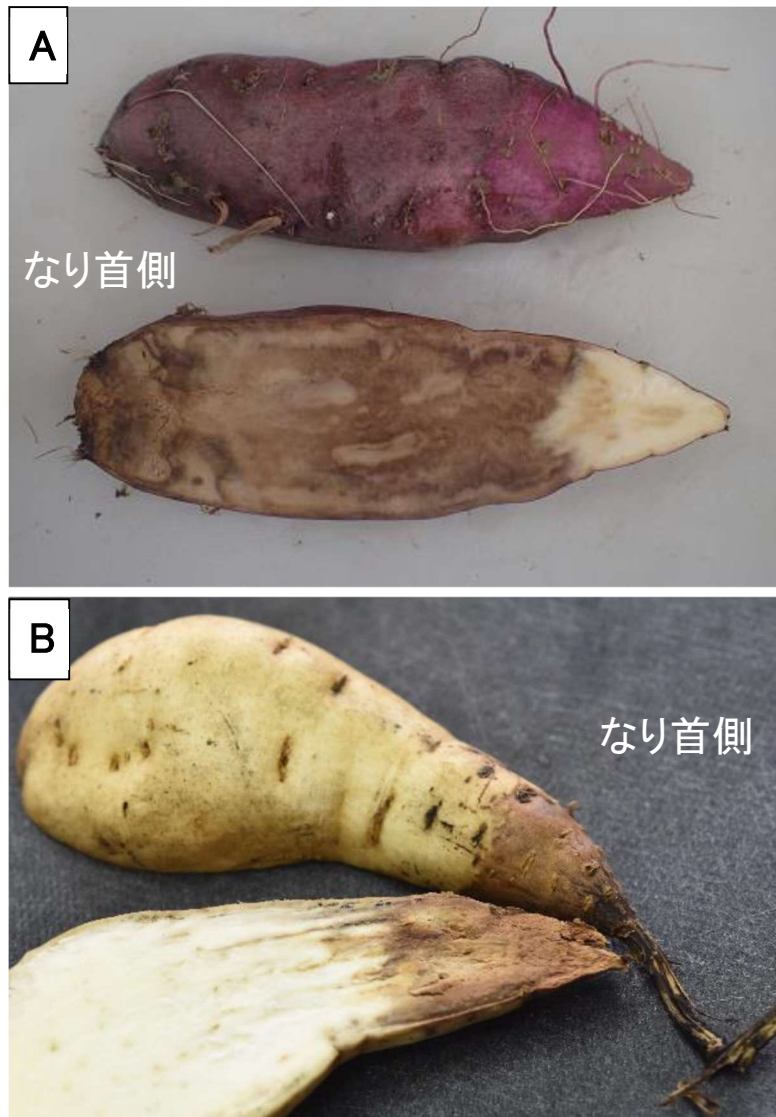


図 I - 2 基腐病により生じた塊根腐敗の様子

A : 「高系 14 号」の塊根おける腐敗症状。

B : 「コガネセンガン」における腐敗症状、参考資料 1 より転載。

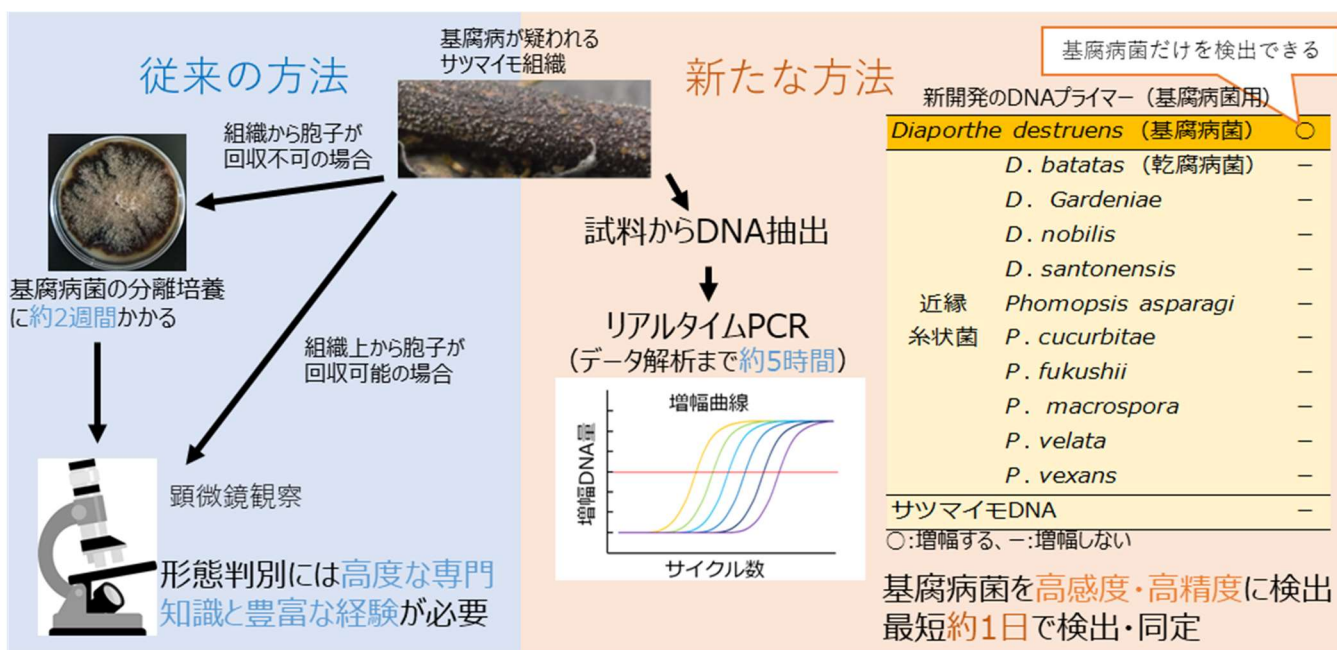
2. 背景、およびこれまでの診断技術と問題点

サツマイモ基腐病は、サツマイモが感染すると地際から発症して枯死するほか、塊根の腐敗を引き起こすことにより、産地に深刻な被害をもたらします。感染した種苗や罹病残渣の移動により発生域が広がると考えられています。我が国では、2018年に九州沖縄地方で初めて発生が確認され、現在は34都道府県において発生が確認されています（2024年2月末時点）。

一方、以前より我が国では基腐病菌と近縁の糸状菌である *Diaporthe batatas* によるサツマイモ乾腐病（以下、乾腐病と称します）が全国的に分布しています。乾腐病は、茎葉の地上部や、主に貯蔵中の塊根に腐敗症状が発生します。基腐病は、感染した塊根を苗床に伏せ込むと、萌芽苗に乾腐病と類似した「腐敗」が認められる場合があります。汚染種苗の生産・流通による基腐病の全国的な蔓延が懸念されていることから、基腐病を乾腐病を含む他の土壌病害と区別し早期診断を可能とする新たな検出・同定技術の開発が求められました。

既存の診断技術である「培養技術を用いた病原菌の形態観察」は、病原菌を特定するために2週間程度の期間を要します。また、「基腐病菌を検出可能なコンベンショナル PCR 法」（用語解説参照 p.23）は、海外での先行研究により報告されていますが、基腐病菌と乾腐病菌を判別することができません。LAMP 法（用語解説参照 p.24）による診断キットも販売されていますが、基腐病菌の検出ではコンベンショナル PCR に比べ検出感度がやや低くなります。そこで、新たにリアルタイム PCR（用語解説参照 p.24）を用いた基腐病菌と乾腐病菌を識別できる検出・同定技術を開発しました（図 I-3）。両種をそれぞれ特異的に検出できる PCR プライマー（用語解説参照 p.23）を用いたリアルタイム PCR を行うことで、最短約1日で基腐病菌と乾腐病菌それぞれを高精度に検出・同定することができます。本技術を活用することにより、発生を早期に把握して適切な防除対策を講ずることができ、発生域拡大

の抑制につながるほか、種苗の生産・流通現場での利用が期待されます。また、リアルタイムPCRの特徴として、Ct値（用語解説参照 p.24）から標的DNAを定量することが可能であり、融解曲線解析（用語解説参照 p.24）によって増幅の確かさを判別できることから、発病レベルに達していない菌の感染を検出することで、今後の発病予測を可能にする技術の開発につながる等、既発生地域の産地を回復するための新たな防除技術開発のスピードアップ



も期待されます。

図 I -3 顕微鏡観察およびリアルタイム PCR による診断技術の概要

3. サツマイモ基腐病に類似した病害

サツマイモ病害のうち、基腐病に類似した症状を引き起こす病害があり、基腐病診断の際に誤る可能性があります。主な類似病害として挙げられるのは、上記の乾腐病のほかに、サツマイモつる割病とサツマイモ茎根腐細菌病です。詳細については、サツマイモ基腐病の発生生態と防除対策マニュアルをご参照ください（参考資料 1）。

サツマイモつる割病は、*Fusarium* 属の糸状菌（主に *F. oxysporum* f.sp. *batatas*）に感染することで引き起こされます。本病原菌に感染したサツマイモは、茎の褐変や、葉の黄化症状が発生し、特に茎が縦に裂けて繊維が目立つ病徴が発生します。塊根は、内部の導管部が褐変し、なり首側が裂けて繊維状になりますが、基腐病のような水浸状の腐敗症状は認められません。サツマイモ茎根腐細菌病は、*Dickeya* 属細菌により引き起こされる細菌病害です。感染した植物は、葉の黄化や茎の黒褐変が生じます。黒褐変した茎部は腐敗が伴い、次第に病斑は茎の上部へ進展し、最終的には枯死に至ります。類似病害のうち、基腐病と乾腐病の目視での判別は、前述の通り特に難しいとされています。そのため、リアルタイムPCRによる検出・同定が重要となります。

Ⅱ. リアルタイム PCR による検出作業の工程

基腐病菌の検出では、①検体となる茎や塊根を前処理し、②検体から DNA を抽出、③この DNA に対して基腐病菌に特異的なプライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、遺伝子の増幅によって基腐病菌の存在を確認します。本章では、基腐病菌の検出作業について、1. 器具・機械および消耗品類の準備、2. 圃場サンプルの前処理、3. DNA の抽出、および 4. リアルタイム PCR の実行について、順を追って説明します。

1. 器具・機械および消耗品類の準備

オートクレーブ、冷凍庫 (-20 °C)、冷蔵庫 (4 °C)、遠心分離機、乳鉢・乳棒、マイクロピペット等、一般の実験施設に通常備えられている器具・機械に加え、

- ・ ビーズ式サンプル破碎装置
- ・ DNA 濃度測定用吸光度計
- ・ リアルタイム PCR 装置

が必要となります。また、消耗品としては 1.5 mL マイクロチューブ、各種マイクロピペット用チップ、径 9 cm の滅菌済みプラスチック製ペトリ皿等に加え、

- ・ 先端口径が広い 1 mL チップ (ラージボアチップ (ワトソン)、Large Orifice Tip (フナコシ) など)
- ・ ビーズ式サンプル破碎機用チューブ
- ・ 直径 2 mm のジルコニアビーズ

- ・ DNA 抽出試薬
- ・ リアルタイム PCR 用チューブ
- ・ リアルタイム PCR 用試薬
- ・ 基腐病菌検出用プライマー（10 μM に調整）

Dd ITS-F : GTT TTT ATA GTG TAT CTC TGA GC

Dd ITS-R : GGC CTG CCC CCT TAA AAA

が必要となります。

本 SOP ではビーズ式サンプル破碎装置としてマルチビーズショッカー（安井器械）を、DNA 抽出試薬として DNeasy Plant mini kit（キアゲン）を用いた方法を記載しています。また、リアルタイム PCR 装置は QuantStudio リアルタイム PCR システム（サーモフィッシャーサイエントフィック）を、リアルタイム PCR 試薬は TB Green Premix Ex Taq II（タカラバイオ）を用いた方法を記載しています。

2. 圃場サンプルの前処理

圃場で発病が認められるサツマイモ茎や土壌中の塊根、または貯蔵中に発病した塊根の表面に付着している汚れや土壌等をキムワイプ等で拭き取って除去します。汚れが激しい場合は、蒸留水で採取物を洗浄します。ただし、採取物上に柄子殻が形成されている場合（図Ⅱ-1）は、胞子を漏出させる要因となるおそれがあるため、水に浸すことは避けましょう。



**図Ⅱ-1 基腐病菌の柄子殻が形成されている
薩摩芋茎**

黒色の粒状のものが柄子殻

サツマイモの罹病組織について、茎は病斑部を含むように長さ 5~10 mmの輪切りに切り出し、塊根は、他の罹病組織と比べて高密度に基腐病菌が存在しているなり首側の罹病部位を表皮が含まれるように 7 mm角程度に細断し、それぞれ 1~数個の切断片を診断用の試料とします（図 II -2）。すぐに DNA を抽出しない場合には、試料を 2 ml マイクロチューブに入れ、-20 °Cのフリーザーで凍結保存します。



図 II -2 罹病サツマイモのサンプリング部位（左：茎、右：塊根）

採取部位（例）：赤粋、サツマイモ基腐病の発生生態と防除対策(令和 3 年度版)より転載

3. DNA の抽出

試料からの DNA 抽出方法を、順を追って説明します。

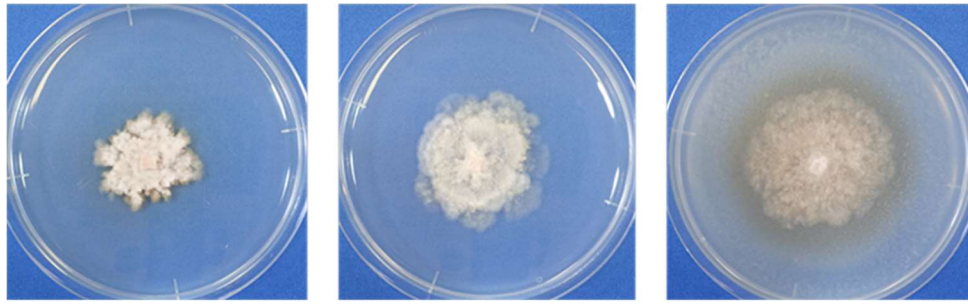
前処理で切り出した試料を乳鉢に入れ、DNeasy Plant mini kit に付属の AP1 バッファ-を 500 μ L 加えてから、形がなくなるまで磨碎します。さらに AP1 バッファ-を 400 μ L 加えて乳鉢内ですりつぶすように攪拌します。

次に、すりつぶした試料の 400～500 μL を、先端口径の広い 1 mL のチップを使ってジルコニアビーズを 3 個入れた 2 ml のビーズショッカー用のチューブに入れ、マルチビーズショッカーで 2,500 rpm 30 秒間の処理を 3 回行い、試料を完全に破碎します。

チューブを 500 rpm で 5 秒間遠心機にかけて蓋側に付いた磨砕物を落とし、内容物が 400 μL 以上あることを確認します。足りない場合はバッファーを加えます。確認できたら DNeasy Plant mini kit に付属の RNase A を 4 μL 加え軽く攪拌してから 65 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間加温します。

以降は DNeasy Plant mini kit のプロトコルに従い、DNA を抽出します。なお、別の DNA 抽出試薬を用いてもかまいませんが、その場合は磨砕に用いるバッファー等の検討が必要です。抽出した DNA の溶液は PCR に用いるまで冷蔵、または長期間使用しない場合は冷凍で保存します。

基腐病菌の検出では、正常に PCR 反応が行われたことを確認するために、健全なサツマイモから検体試料と同様の方法で抽出した DNA（陰性対照）、および基腐病菌の菌体から抽出した DNA（陽性対照）も準備します。一般的に糸状菌の DNA 抽出ではポテトデキストロース寒天培地（PDA 培地；ジャガイモ 200 g 分の煮汁 1 L、グルコース 20 g、寒天 15 g）で生育させた菌から抽出を行いますが、基腐病菌では PDA 培地での生育が遅いことから、寒天以外の成分を半分にした PDA 培地（1/2PDA）や、PDA 培地のジャガイモの代わりにサツマイモの煮汁を用いた培地（SPDA）で 25 $^{\circ}\text{C}$ 、1～2 週間培養（図 II -3）し、菌糸を含む寒天片を切り出して抽出を行います。寒天片からの DNA 抽出もサツマイモからの抽出と同様に DNeasy Plant mini kit を用いて行います。



培地 PDA 1/2PDA SPDA

図Ⅱ-3 各種培地上の基腐病菌の生育

基腐病菌 MAFF246953 (25 °C、暗所で1週間培養)

4. リアルタイム PCR の実行

抽出した DNA 溶液の濃度を測定し、5 ng/μL 程度に調整します。これを鋳型として、リアルタイム PCR を行います。PCR 反応液は、

- | | |
|-----------------------------|--------|
| ・ TB Green Premix Ex Taq II | 10 μL |
| ・ プライマー Dd ITS-F (10 μM) | 0.8 μL |
| ・ プライマー Dd ITS-R (10 μM) | 0.8 μL |
| ・ ROX リファレンス Dye (50×) | 0.4 μL |
| ・ DNA 溶液 (5 ng/μL 程度) | 2.0 μL |
| ・ 滅菌蒸留水 | 6.0 μL |

とし、合計 20 μL にします。抽出した DNA 溶液が 5 ng/μL 程度に満たない場合は、加える DNA 量が 10 ng となるように DNA 溶液を増やし、その分滅菌蒸留水の量を減らします。ただし、抽出した DNA 溶液には PCR を阻害する物質が含まれているため、加える DNA 溶液の量が多いと PCR が阻害され、検出が上手くいかない場合があるので注意が必要です。

正常に PCR 反応が行われたことを確認するために、健全なサツマイモから抽出した DNA (陰性対照)、および基腐病菌の菌体から抽出した DNA (陽性対照) も同様に鋳型として使用します。基腐病菌の DNA は、DNA 量が 1 μ g から 0.1 ng まで 10 倍段階で希釈したものを用意し、それぞれの DNA 量を縦軸、増幅が確認できた Ct 値を横軸にして検量線を作成します。この検量線に当てはめることで、Ct 値から供試サンプルに含まれる基腐病菌の DNA 量を定量することができます。DNA 量と菌の存在量は比例するので、DNA 量が多ければ菌の存在量も多いと言えます。

QuantStudio リアルタイム PCR システムを用いたリアルタイム PCR の反応条件は、94 $^{\circ}$ C で 1 分間の初期変性を行った後、94 $^{\circ}$ C で 30 秒間の変性、55 $^{\circ}$ C で 30 秒間のアニーリング、および 72 $^{\circ}$ C で 30 秒間の伸長のサイクルを 40 回行います。この間の蛍光強度の上昇を観察することで DNA の増幅の有無を確認することができます。続けて融解曲線分析を行うために、94 $^{\circ}$ C で 15 秒間加熱してから 55 $^{\circ}$ C に冷却して 1 分間保持し、その後 94 $^{\circ}$ C まで 1 $^{\circ}$ C ずつ温度を上昇させ、蛍光強度を測定することで DNA の融解温度 (T_m 値) を調べます。標的としている基腐病菌 DNA の T_m 値はおよそ 86 $^{\circ}$ C であり、これと異なる T_m 値を示した場合は標的ではない DNA の増幅 (非特異的な増幅) が起こったことを示します。リアルタイム PCR では Ct 値によって基腐病菌の DNA の存在量を、 T_m 値によって基腐病菌が検出できているかを知ることができます。以上の基腐病菌検出の作業手順を図 II -4 に示します。一方で、PCR 反応ではサイクル数が増すと非特異的な増幅が起こりやすくなります。基腐病菌のリアルタイム PCR でも、35 サイクルを超えると陰性対照においても非特異的な増幅が起こる場合があることから、35 サイクル以下で増幅が認められたものを基腐病菌陽性としています。

サンプリング & 前処理工程

30分

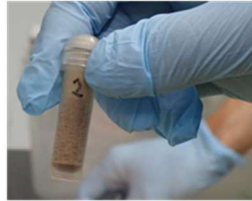


- ・ 表面洗浄
- ・ サンプリング

- ・ 反応後のデータ解析

DNA抽出工程

120分



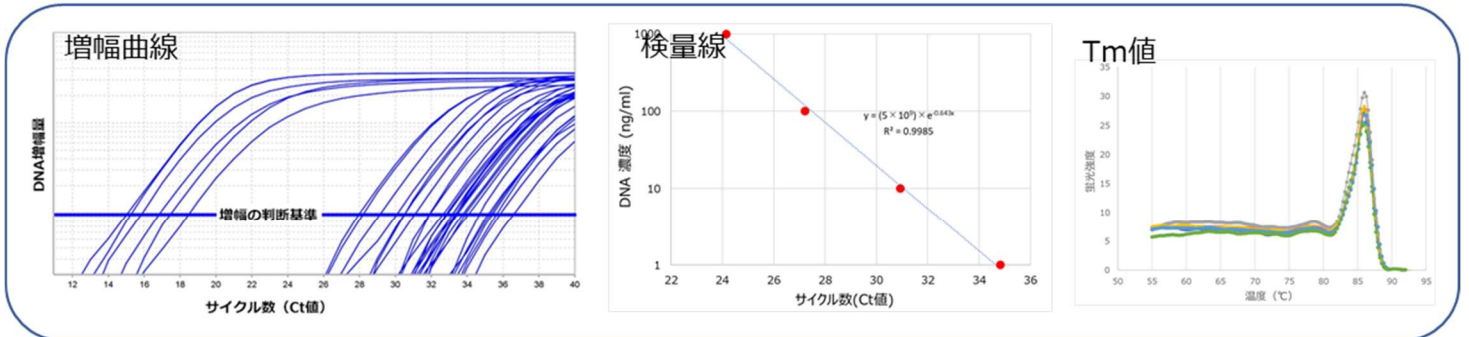
- ・ 磨砕
- ・ 細胞の溶解
- ・ DNA精製・溶出

リアルタイムPCR

120分



- ・ PCR反応液の調整
- ・ PCRサイクルの実行



基腐病菌の有無を判定

図 II-4 基腐病菌検出の作業手順

5. リアルタイム PCR の検出特異性および検出限界

リアルタイム PCR による基腐病菌検出の特異性の調査では、これまでにサツマイモが感染する基腐病菌以外の病原糸状菌や、基腐病菌に近縁種の糸状菌に対する誤検出は認められていません。特に、これまで難しかった基腐病菌と近縁のサツマイモ乾腐病菌との識別が可能となりました（表 II -1）。同時に、乾腐病菌を検出するためのリアルタイム PCR 法も確立されており、これらを用いることで基腐病菌と乾腐病菌の識別が可能です^{*1}。また、希釈した基腐病菌の DNA を鋳型に用いた実験結果から、本技術では、基腐病菌の DNA が 0.0005 ng/ μ L 濃度以上で検出が可能であることが確認されています。

表 II -1 リアルタイム PCR による Dd ITS プライマーを用いた基腐病菌と Db ITS プライマーを用いた乾腐病菌の特異的検出

	プライマー	
	Dd ITS	Db ITS
基腐病菌	17	0
乾腐病菌	0	11

基腐病菌 17 株と乾腐病菌 11 株を用いてそれぞれのプライマーによる増幅を検証した

^{*1} 乾腐病菌用のプライマーセット（Db ITS-F : GTTTCTATAGTGAATCTCTGAGT、Db ITS-R : TCCAGAGCGAGATGTA ACTA）を用いることで、基腐病菌と同じ PCR の条件で検出が可能です。

リアルタイム PCR では、利用する機器と試薬との組み合わせにより、病原体の検出限界が変化することが知られています。本標準作業手順書に示す技術を開発するにあたり、2022年1月時点で市販されているリアルタイム PCR 機器3種類とリアルタイム PCR 試薬5種類の組み合わせによる基腐病菌の検出感度の違いを比較しました。表Ⅱ-2は、各社のプロトコルに従って最適化した条件で基腐病菌のDNA (5 ng/μL から 0.00005 ng/μL、10倍段階希釈)を鋳型として用いた試験結果を示しています。本 SOP はその有用性を検証し論文として公表している QuantStudio5 と TB Green Premix Ex Taq II の組み合わせで作成していますが、ここで試した中では、KOD SYBR qPCR Mix と各種リアルタイム PCR 機器との組み合わせで高い検出限界が得られました。

表Ⅱ-2 リアルタイム PCR の機器と試薬による基腐病原体の検出限界

リアルタイム PCR 試薬	リアルタイム PCR 機器		
	QuantStudio5 (サーモフィッシャー サイエンティフィック)	LightCycler 480 (ロシュ)	CFX384 Touch (バイオラッド)
基腐病菌 DNA の検出限界濃度 (ng/μL)			
TB Green Premix ExTaq II (タカラバイオ)	0.0005*	0.005	0.5
SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (バイオラッド)	0.0005	0.0005	0.0005
PowerUp SYBR Green Master Mix (サーモフィッシャーサイエンティフィック)	5	未調査	未調査
Go Taq qPCR Maste Mix (プロメガ)	5	0.0005	0.5
KOD SYBR qPCR Mix (東洋紡)	0.00005	0.00005	0.00005

*本作業手順書で用いた組み合わせ

※リアルタイム PCR 試薬を変更すると Tm 値も変わるため、陽性対照を用いて Tm 値を求める必要があります。

※農研機構内実験施設で行った結果であり、処理条件を変更することで結果が変わることがあります。

Ⅲ. リアルタイム PCR による検出の優位性

本 SOP ではリアルタイム PCR を用いたサツマイモ基腐病菌の検出技術を紹介していますが、本菌の検出では、LAMP(Loop-Mediated Isothermal Amplification)法による検出キット（ニッポンジーンマテリアル）が市販されており、また、コンベンショナル PCR による診断技術も海外で報告されています。それぞれの方法には利点と欠点があり、一概にどの方法が優れているとは言いにくく、使用する場面に合わせた使い分けが重要です。

そこで、サツマイモ基腐病菌の検出場面での LAMP 法およびコンベンショナル PCR による診断技術を紹介すると共に、新技術の利点や技術の応用について紹介します。

1. LAMP 法

LAMP 法は、高度な温度制御を行う機器は必要なく、また増幅された DNA 産物は目視で確認できる利点があります。また前述の通り、検出キットも販売されていることから他の方法と比べ簡便に検出が行えます。

基腐病菌の DNA と健全サツマイモの DNA を混合した試料を用いてリアルタイム PCR と LAMP 法による検出感度の比較を行いました。リアルタイム PCR と LAMP 法の検出限界を比較すると、リアルタイム PCR では LAMP 法よりも 100 倍もの高い検出能が得られています（表Ⅲ-1）。このため、感染はしているがまだ病徴が出ていない、潜在感染などの病原菌密度の低いサンプルでは LAMP 法で検出できずに取りこぼしていた場合もありましたが、リアルタイム PCR を利用することで基腐病菌の検出が可能となることが確認されています。

表Ⅲ-1 リアルタイム PCR と LAMP 法との基腐病菌の検出感度比較

DNA 混合比	基腐病菌:健全サツマイモ					
	1:1	1:10	1:100	1:1000	1: 10000	1: 100000
リアルタイム PCR 法	+	+	+	+	+	-
LAMP 法	+	+	+	-	-	-

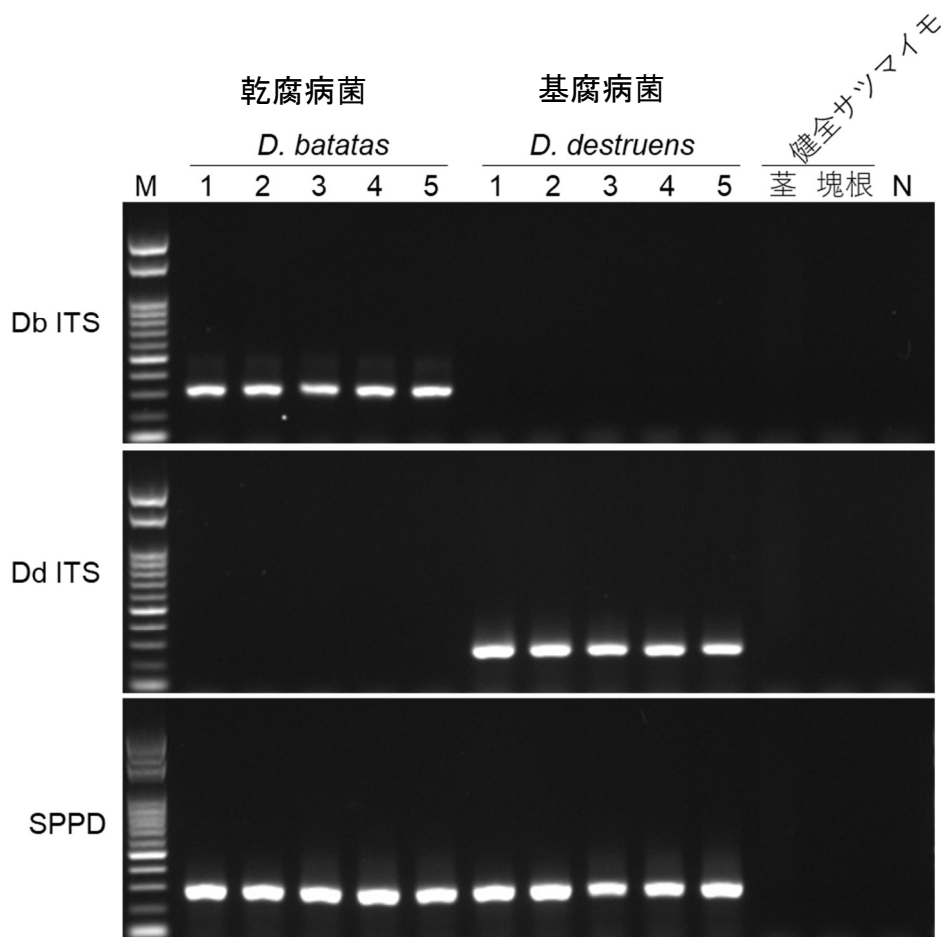
+陽性、-陰性

2. コンベンショナル PCR

これまでに海外の研究グループより、コンベンショナル PCR による基腐病菌の遺伝子検査法が報告されています (Lin ら 2017)。コンベンショナル PCR ではリアルタイム PCR で必須な蛍光の常時観測が必要でないため、比較的安価なサーマルサイクラーや蛍光色素を含まない試薬で検出が可能です。また、プライマーや温度サイクルの条件によってリアルタイム PCR と同等な検出感度を得ることも可能ですが、標的遺伝子の増幅を電気泳動と染色により確認する必要があることや、定量性が無いことが欠点となります。

ところで、これまでに海外で報告がある PCR プライマー (SPPD) を用いたコンベンショナル PCR では基腐病菌と乾腐病菌を識別できません (図Ⅲ-1)。このことは、日本国内を含む両病害が発生する地域で診断に用いる上で大きな問題となります。一方、本 SOP で使用するリアルタイム PCR による基腐病菌検出用に設計したプライマーセット (Dd ITS) および乾腐病菌検出用に設計したプライマーセット (Db ITS) を用いて、基腐病菌と乾腐病菌の培養菌体から抽出した DNA を鋳型にコンベンショナル PCR を行い、特異性を調べた結果では、

Dd ITSと Db ITS は、基腐病菌および乾腐病菌に対して、リアルタイム PCR での結果と同じく、それぞれ特異的な増幅産物が得られています。従って、本 SOP で紹介している PCR プライマーを用いたコンベンショナル PCR による遺伝子検査でも基腐病菌と乾腐病菌を特異的に検出できます。



図Ⅲ-1 設計したプライマーセットを用いたコンベンショナル PCR における基腐病菌および乾腐病菌に対する特異性評価

Db ITS プライマー：乾腐病菌(*D. batatas*)の検出プライマー、Dd ITS プライマー：基腐病菌(*D. destruens*)の検出プライマー、SPPD プライマー：既報 (Lin ら 2017) の基腐病菌検査用 PCR プライマー、M：サイズマーカー、N：陰性対照 (鋳型 DNA なし)、1-5：サンプルの反復

3. 検出法の費用や性能の比較

リアルタイム PCR、コンベンショナル PCR、LAMP 法による各診断方法について、時間、費用、設備費、感度および定量性を表Ⅲ-2 に示しました。

リアルタイム PCR は感度が高く、定量的な検出が可能な一方で、使用する機器が高額です。

コンベンショナル PCR はリアルタイム PCR の機器より安価なサーマルサイクラーを用いるため、設備費が安価で済みます。欠点として定量性に欠けることおよび判定に電気泳動が必要になることが挙げられます。

LAMP 法は反応時間が 40 分と短く、試薬の調整を入れても 1 時間程度で結果が得られます。また、65 °C に保つ恒温槽があれば良いため、高価な機器も必要ではありません（ただし、定量的な検出を行う場合は専用の機器が必要となりますが、それも他の手法で用いる器機よりは安価です）。このため、3 つの方法の中では設備費という点では最も安価に行うことができます。その半面、前述の通り基腐病菌の検出では感度がやや劣ること、試薬が高額であることが欠点です。

基腐病についての確定的な診断については、本 SOP で取り上げているリアルタイム PCR、コンベンショナル PCR に加えて、LAMP 法の 3 方法、それぞれ一長一短があります。各場面で適した方法を採用して下さい。なお、今回お示した各技術の詳細につきましては参考資料 2、3、4 をご参照ください。

表Ⅲ-2 検出方法の費用や性能の比較

	リアルタイム PCR	コンベンショナル PCR	LAMP
作業時間 (分) *1	120	140	60
試薬費 (円) *2 (1 サンプル当たり)	225	179	2556
設備費 (万円)	300~1000	50~100	5~65
感度	◎	○~◎	○
定量性	◎	×	×~○*3

*1 DNA 抽出までの時間や費用は含まない

*2 2021 年度の購入価格より試算

*3 専用の機器を用いることで定量的な検出も可能

用語解説

DNA

デオキシリボ核酸（deoxyribonucleic acid、DNA）は、遺伝子情報を保持している物質です。DNAは4種類のヌクレオチドと呼ばれる基質が鎖状につながったものが2本結合した構造をしており、このヌクレオチドの並び順によって遺伝情報が記憶されています。

PCR 法

PCR（Polymerase Chain Reaction）法は、PCRプライマー（次項）と耐熱性DNAポリメラーゼ（DNAを合成するための酵素）を用いて、標的とする遺伝子領域を増幅させる手法です。検体を90℃以上の高温にすることでDNAの2本の鎖を解離させてから急冷し、PCRプライマーを解離させたDNAに結合させ、耐熱性DNAポリメラーゼで標的とする遺伝子領域を合成することを繰り返すことで、標的とする遺伝子領域のみが増幅されます。

PCR プライマー

PCRで増幅したいDNAの塩基配列に相補的な塩基配列を持つ一本鎖の合成DNAです。目的のDNAに結合することでDNAポリメラーゼによるDNA合成の開始点となります。

コンベンショナル PCR

リアルタイムPCRが開発される前から行われていた、PCR法によって増幅した標的遺伝子のDNAを電気泳動によって目視で確認する方法です。

リアルタイム PCR

PCR 産物の濃度変化を反応の工程を通して経時的に測定し、その増幅率に基づいて標的とする鋳型遺伝子を定量的に検出する技術です。検出の有無に加えて、元の試料に含まれる標的遺伝子の濃度についても定量的な情報が得られ、コンベンショナル PCR で用いる電気泳動による増幅産物の検出は不要です。

Ct 値

リアルタイム PCR において、標的遺伝子の増幅が最初に確認できた時のサイクル数を指します。Ct 値は、サンプルに含まれる標的遺伝子の量が多いほど小さく、少ないほど大きくなります。

融解曲線解析


融解曲線（解離曲線）は、リアルタイム PCR の反応において、PCR 反応温度の上昇に伴い結合した二本鎖 DNA が一本鎖 DNA へ解離する際に観察される蛍光の変化をグラフ化したものです。PCR 産物は、その塩基配列の違いによって、融解温度が異なるため、この融解曲線の解析により標的遺伝子に特異的な融解温度を調べることで標的遺伝子領域の増幅産物が得られたかどうかを確認できます。

LAMP法

LAMP(Loop-Mediated Isothermal Amplification)法は、PCR法とは異なる方法で標的とする遺伝子領域を増幅する手法です。PCR法と異なり、60 °C程度の一定温度で反応が進むため、一定の周期で正確に試料温度を変化させる高度な温度制御が必須の機器は

必要ありません。また、増幅されたDNA産物は反応液の濁りの程度により目視で確認できる利点があります。

参考資料

1. サツマイモ基腐病の発生生態と防除対策(令和4年度版) (農研機構、2023年5月)
https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/158250.html 
2. Fujiwara et al. (2021) Real-time PCR assay for the diagnosis and quantification of co-infections by *Diaporthe batatas* and *Diaporthe destruens* in sweet potato. *Front. Plant Sci.* 12:694053
3. Lin et al. (2017) A method for the specific detection of *Phomopsis destruens* in sweet potato by PCR. *J. Taiwan Agric. Res.* 66:276-285
4. 前島健作ら (2022) LAMP 法によるサツマイモ基腐病の迅速遺伝子診断技術とその活用. *植物防疫* 76 : 414-420
5. 藤原和樹ら 特許第 7349149 号 「サツマイモ基腐病菌を検出するための核酸、プライマーセット、キットおよび方法」

担当窓口、連絡先

外部からの受付窓口：

農研機構 植物防疫研究部門 研究推進部 研究推進室

IPP-Koho@naro.affrc.go.jp



「農研機構」は、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構のコミュニケーションネーム（通称）です。