# LAMP法を用いた種子からのスイカ果実汚斑細菌病菌(Acidovorax avenae subsp. citrulli)の検出


| | |
|---|---|
| 誌名 | 日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan |
| ISSN | 00319473 |
| 著者名 | 大矢,仁志<br>中川,寛章<br>齊藤,範彦 |
| 発行元 | 日本植物病理學會 |
| 巻/号 | 74巻4号 |
| 掲載ページ | p. 304-310 |
| 発行年月 | 2008年11月 |



農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

日植病報 74：304–310（2008）
Jpn. J. Phytopathol. 74: 304–310 (2008)

# LAMP 法を用いた種子からのスイカ果実汚斑細菌病菌（*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*）の検出

大矢　仁志[1]*・中川　寛章[1]・齊藤　範彦[1]・上松　　寛[1]・小原　達二[1]

**ABSTRACT**

OYA, H.[1]*, NAKAGAWA, H.[1], SAITO, N.[1], UEMATSU, H.[1] and OHARA, T.[1] (2008): Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* from seed using LAMP method. Jpn. J. Phytopathol. 74: 304–310.

Because detection methods for the causal agent of bacterial fruit blotch, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Schaad, Sowell, Goth, Colwell, Webb, Willems, Goor, Thielemans, Gills, Kersters & DeLey), from seeds are time-consuming we evaluated a new assay using membrane filtration and loop-mediated isothermal amplification (LAMP). A LAMP primer set was designed for specific amplification of the *hrpG-hrpX* gene spacer region in *A. avenae* subsp. *citrulli*. The detection sensitivity of *A. avenae* subsp. *citrulli* of this procedure was approximately $10^3$ cfu in 100 ml of water used to wash 1000 artificially infested seeds of either watermelon, wax gourd or melon. The complete assay took approximately 2 h. When naturally infected seeds were tested, *A. avenae* subsp. *citrulli* was detected from melon and watermelon seeds. This method is valuable for the rapid and precise detection assay of *A. avenae* subsp. *citrulli* on seeds.

(Received July 6, 2007; Accepted January 22, 2008)

**Key words:** *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, bacterial fruit blotch, detection, membrane filtration, LAMP

## 緒　言

スイカ果実汚斑細菌病は，1989 ～ 1995 年にアメリカ合衆国でスイカ（*Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsum. et Nakai）に甚大な被害をもたらした（Latin and Hopkins, 1995）．我が国では，1998 年に山形県ではじめてスイカに発生が確認されて以降（菊池ら，1999; 白川ら，2000b），メロン（*Cucumis melo* L.），トウガン（*Benincasa hispida* Cogn.）において散発的に発生が確認されたが（堀田ら，2006; 富田ら，2006; 小木曽ら，2005），その都度発生源となった種子の特定と防除に努め，その後の発生は認められていない．本病の病原である *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*（Schaad, Sowell, Goth, Colwell, Webb, Willems, Goor, Thielemans, Gillis, Kersters & DeLey）（以下，Aac）のスイカでの発生生態はほぼ解明されており，汚染種子の播種による苗床での発病後，苗床内で感染が拡大し，感染苗となる．それら感染苗を圃場へ作付け後，高温・多雨の気象条件に遭遇すると本圃で発病がまん延することが報告されている（Latin and Hopkins, 1995）．本病の第一次伝染源は種子であることから，最も効果的な防除方法は汚染種子を使用しないことであり，本細菌の種子からの的確な検出技術の開発が必要とされている．これまで，種子から本細菌を直接検出できる方法は報告されておらず，Grow out test（Kucharek *et al.*, 1993），Growing-on test（水野ら，1999），選択培地法（白川ら，2000a），ELISA 法（松浦ら，1999），PCR 法（Minsavage *et al.*, 1995; Schaad *et al.*, 1999; Walcott *et al.*, 2002）のように種子の Aac を増殖後，検出する方法が開発されている．しかし，これらの方法は，いずれも検出までに必要とする時間，施設および労力，検出精度など植物検疫の場に導入するためには改善すべき点があると考えられる．近年，迅速かつ高精度な DNA 増幅手法として，Loop-mediated Isothermal Amplification（LAMP）法が開発され（Notomi *et al.*, 2000），植物病原体の検出方法としても利用されている（Fukuta *et al.*, 2003; Nie, 2005; Okuda, *et al.*, 2005）．そこで，本研究では LAMP 法を用いて，種子から本細菌を直接検出できる方法を開発した．

## 実験材料および方法

**供試菌株および供試種子**　LAMP プライマー設計のため

[1] 農林水産省横浜植物防疫所（〒 231-0801 神奈川県横浜市中区新山下 1-16-10）　Yokohama Plant Protection Station, 1-16-10, Shinyamashita, Naka-ku, Yokohama, Kanagawa 231-0801, Japan
* Corresponding author (E-mail: ooyah@pps.go.jp)

の塩基配列比較やLAMPプライマーの特異性を調査するために第1表の菌株を供試した．培養にはYNA培地（酵母エキス5 g，肉エキス3 g，ペプトン10 g，塩化ナトリウム5 g，寒天18 g，蒸留水1 l，pH 7.0）を用いた．種子からの検出における検出限界の調査には，健全種子としてスイカ種子（国内産，品種名：不明），トウガン種子（台湾産，品種名：青

第1表　供試菌株

| 菌種 | 菌株番号[a)] | 由来 | 分離地 |
|---|---|---|---|
| *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* | ATCC 29625[T], YPPS 64, YPPS 65, YPPS 66, YPPS 67, ICMP 6521, ICMP 7715, ICMP 7716 | スイカ | アメリカ合衆国 |
| | ICMP 8663 | スイカ | 不明 |
| | ICMP 7713, ICMP 7714 | メロン | アメリカ合衆国 |
| | YPPS 319 | スイカ | 日本（山形） |
| | YPPS 616 | メロン | 日本（北海道） |
| | YPPS 633, YPPS 635 | トウガン | 日本（長野） |
| | ICMP 13134, ICMP 13135, ICMP 13136, ICMP13137, ICMP 13138 | スイカ | オーストラリア |
| | ICMP 13201, ICMP 12190 | メロン | ブラジル |
| | ICMP 13309, ICMP 12196, ICMP 12198 | スイカ | ブラジル |
| *A. avenae* subsp. *avenae* | MAFF 301141 | シコクビエ | 日本 |
| | MAFF 301502, MAFF 301505, MAFF 301510, MAFF 106618, NARCB 200361, YPPS 342, YPPS 424, YPPS 467, YPPS 468, YPPS 469, NARCB 200361 | イネ | 日本 |
| | MAFF 311167 | テオシント | 日本 |
| | MAFF 311311 | サトウキビ | 日本 |
| | MAFF 301024, AZ8079, AZ8817, AZ92212 | トウモロコシ | 日本 |
| *A. avenae* subsp. *cattleyae* | MAFF 301576, MAFF 311279 | コチョウラン | 日本 |
| *A. konjaci* | MAFF 301465, MAFF 301468 | コンニャク | 日本 |
| *Burkholderia andropogonis* | MAFF 302546 | シュッコンカスミソウ | 日本 |
| *B. cepacia* | AZ8595 | イネ苗床土壌 | 日本 |
| | NARCB 200352 | コナギ | 日本 |
| *B. gladioli* | MAFF 106620 | 田面水 | 日本 |
| | MAFF 106625 | 水田土壌 | 日本 |
| | MAFF 106628, NARCB 200369 | イネ | 日本 |
| | MAFF 301064 | フリージア | 日本 |
| | MAFF 302385 | グラジオラス | 日本 |
| | MAFF 302408 | アズキ | 日本 |
| | MAFF 302418 | リョクトウ | 日本 |
| | MAFF 302424 | シンビジュウム | 日本 |
| *B. glumae* | MAFF 301723[T], MAFF 106619, MAFF 301682 | イネ | 日本 |
| | MAFF 106623 | コナギ | 日本 |
| | MAFF 302417 | リョクトウ | 日本 |
| *B. plantarii* | NARCB 200371 | 田面水 | 日本 |
| *B. vietnamiensis* | JCM 10562 | イネ根圏土壌 | ベトナム |
| *Ralstonia solanacearum* | NARCB 200341 | トマト | 日本 |
| | AZ8960 | スターチス | 日本 |
| *R. pickettii* | JCM 5969[T] | 不明 | 不明 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | AZ8913 | ムギ根圏土壌 | 日本 |
| *P. cichorii* | MAFF 301757 | レタス | 日本 |
| *P. chlororaphis* | MAFF 302536 | フクジュソウ | 日本 |
| *P. syringae* | YPPS 54 | レモン | アメリカ合衆国 |
| | YPPS 309 | ナシ | 日本 |
| *P. syringae* pv. *phaseolicola* | MAFF 301616, MAFF 301617 | インゲンマメ | 日本 |
| *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* | MAFF 301082 | イネ | 日本 |
| *X. oryzae* pv. *oryzicola* | NCPPB 1585 | イネ | マレーシア |
| *Erwinia herbicola* | AZ8053 | 不明 | 日本 |

a) ATCC: American Type Culture Collection, USA, YPPS: Yokohama Plant Protection Station, ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants, JCM: Japan Collection of Microorganisms, MAFF: National Institute of Agrobiological Sciences Genebank, NARCB: National Agricultural Research Center, NCPPB: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, AZ: gifts from Dr. Azegami

ん坊）およびマクワウリ（*Cucumis melo* L. var. *makuwa* Makino）種子（タイ産，品種名：金太郎）を供試した．自然汚染種子としては，輸入時のELISA検査等でAacの汚染が確認されたスイカ種子（中国産1試料，タイ産4試料）あるいは国内での発生時にGrowing-on test等でAacの汚染が確認されたメロン種子（タイ産1試料）を供試した．

***hrpG*および*hrpX*遺伝子間スペーサー領域のシーケンシング**　LAMPプライマーの設計に関しては，Aacの病原関連遺伝子*hrpG*および*hrpX*遺伝子間のスペーサー領域（DDBJ/EMBL/GenBank Database Accession number. AY898625）を選択した．この領域におけるAacに特異的な配列を探索するために，Aac 7菌株，*A. avenae* subsp. *avenae* 13菌株，*A. avenae* subsp. *cattleyae* 2菌株の当該配列部分を増幅するPCRプライマーを設計した（第2表）．PCR反応液及び反応条件は第2表に示した．得られたPCR産物はBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）およびシーケンサー（Applied Biosystems 3130 ジェネティックアナライザ）を使用し，サンガー（ジデオキシ）法（Sanger *et al.*, 1977）により塩基配列を解読し，比較した．

**LAMPプライマー設計**　プライマーはウェブ上のLAMP法プライマー設計支援ソフトウェア（富士通 Primer Explore V3, URL: https://primerexplorer.jp/lamp3.0.0/index.html）により設計した．LAMP反応液は，12.5 µlの2×反応混合液（栄研化学），1 µlの*Bst* DNA Polymerase（栄研化学），1 µlの各プライマー（FIPプライマー40 pmol, BIPプライマー40 pmol, F3プライマー5 pmol, B3プライマー5 pmol）（第2表），2.5 µlの滅菌水からなり，鋳型DNAを5 µl添加した．反応チューブはLAMP専用のチューブ（Loopamp反応チューブ，栄研化学）を使用した．陰性対照区として，鋳型の代わりに滅菌水を用いた．この反応液をリアルタイム濁度測定装置（LA-200, Teramecs）にセットし，65°Cで3時間保持した．さらに増幅時間を短縮させる効果のあるループプライマーをLAMPプライマーと同様に設計した（第2表）．

**LAMPプライマーによる供試細菌の反応**　ループプライマーを加えたプライマーセットの特異性を第1表に示す細菌で調査した．LAMP反応は前述のものにLoopプライマー30 pmolを加えて行った．LAMP反応の鋳型は供試菌株の懸濁液（約$1 \times 10^8$ cfu/ml）を95°C，10分間加熱し，その5 µlを用いた．陰性対照区には滅菌水を用いた．反応はリアルタイム濁度測定装置で行い，試験は2反復実施した．

**LAMP法とPCR法の検出限界比較**　約$1 \times 10^8$ cfu/mlに調製したAac（ATCC 29625$^T$）懸濁液を段階希釈し$1 \times 10^1$～$1 \times 10^8$ cfu/mlの菌液を作製した．この菌液を95°C，10分間加熱したものを鋳型に用いて，LAMP法とPCR法でAacの検出限界を比較した．LAMP法は上述の方法により反応時間を1時間で行った．PCR法は，プライマーにSEQID4（5'-TCGTCATTACTGAATTTCAACA-3'）およびSEQID5（5'-CC-TCCACCAACCAATACGCT-3'）（Schaad *et al.*, 1999）を用い，95°C：30秒（初回のみ5分），53°C：30秒，72°C：30秒（最終回のみ5分）の反応を35サイクル行った．PCR産物は2%アガロースゲルで泳動し約246 bpのバンドの有無を確認した．各試験は段階希釈した菌液の検出を2点並行で行い，2反復した．

**ろ過濃縮による種子洗浄水からの検出**　500 mlガラスビンに1試験区あたり1000粒のスイカ，トウガンまたはマクワウリの種子と滅菌水100 mlを加え，さらに約$1 \times 10^2$ cfu/ml，$1 \times 10^3$ cfu/ml，$1 \times 10^4$ cfu/mlに調整したATCC 29625$^T$懸濁液1 mlをそれぞれ加えた．陰性対照区には滅菌水100 ml

第2表　シーケンスおよびLAMPに使用したプライマー

| 名前 | 配列 | 設計位置[a)] |
|---|---|---|
| PCR，シーケンスプライマー[b)] | | |
| SQ1FW | 5'-CCTCCCCGATTCAACAAA-3' | 33256-33273 |
| SQ1RV | 5'-TCCTGTCCTATCAGCAGCA-3' | 34025-34007 |
| LAMPプライマー | | |
| F3 | 5'-TTGATTCACCGCCGAACG-3' | 33285-33302 |
| B3 | 5'-TTACAGACGATAAATGACCCGG-3' | 33477-33498 |
| FIP | 5'-TACGGCTGTCACAGTCGTAGCT-GACTCGCATGATTTCCCCA-3' | 33381-33360, 33318-33336 |
| BIP | 5'-TTGCACCTCATTGCAAATGCC-CCGTCTGGAATGAACTAAGCT-3' | 33409-33429, 33474-33454 |
| Loop B | 5'-TGAGTGGCGACAGACGCA-3' | 33436-33453 |

a）設計位置はGenBankデータベースAY898625の塩基番号を示した．

b）PCR反応液及び反応条件　1×反応緩衝液（Applied Biosystems GeneAmp 10 × PCR buffer II），200 µMのdNTP mixture（Applied Biosystems），150 µMの$MgCl_2$（Applied Biosystems），0.5 µMのフォワードおよびリバースプライマー，0.5 UのTaq DNAポリメラーゼ（Applied Biosystems AmpliTaq Gold DNA polymerase）の混合液を20 µl調製し，鋳型DNAとしてcetyltrimethylammonium bromide（CTAB）法（Murray and Thompson, 1980）により抽出した各細菌のDNA溶液5 µl（10 ng/µl）を添加した．

のみを種子に加えた．5分間の振とうで種子を洗浄し，その洗浄水を種子ごと，まず47 mm径ガラス繊維フィルター（ADVANTEC GA-100）とポアサイズ5.0 μmの47 mm径メンブレンフィルター（MILLIPORE SMWP04700）を重ねてセットしたリユーザブルボトルトップフィルターシステム（Nalge Nunc International, 500 ml）に入れ吸引ろ過し，次にそのろ液をポアサイズ0.45 μmの47 mm径メンブレンフィルター（MILLIPORE HAWP04700）をセットした同フィルターシステムを用いて再度吸引し，フィルター上に集菌した．集菌後のフィルターをあらかじめ滅菌水1 mlを入れた50 ml容コニカルチューブに移し，ボルテックスミキサーで約1分間振とうすることによりフィルター表面を洗浄した．この洗浄水を1.5 mlチューブに移し，9000 × *g*，5分間遠心し，上清を約50 μl残して除去した．ボルテックスミキサーで再懸濁後95°C，5分間処理し，その5 μlを用いてLAMP法によるAacの検出を試みた．試験は2反復行い，LAMP法は上述の方法により行った．

**自然汚染種子からの検出**　ELISA法またはGrowing-on testでAacの自然汚染が確認されたスイカおよびメロン種子から，前述の手法により本細菌の検出を試みた．いずれの種子も1000粒を1試験区とし，2反復行った．陽性対照区として本細菌のDNA抽出液（10 ng/μl）5 μl，陰性対照区として滅菌水5 μlをLAMP法の鋳型に用いた．自然汚染種子の試験区でリアルタイム濁度測定装置により0.1以上の濁度が確認された場合，増幅産物を2%アガロースゲルで泳動し，陽性対照区と同様のバンドパターンであることを確認した．さらに，種子の洗浄方法を検討した．入手できた自然汚染種子数に限りがあったため，本試験では1試験区あたり300粒のスイカまたはメロンの自然汚染種子に滅菌水を50 ml加え，振とう機（Bio-Shaker BR-43FL, TAITEC）による振とう（170 rpm/分），超音波洗浄機（US CLEANER, AS ONE）による処理，浸漬のみをそれぞれ5分間行ったものを用いて，リアルタイム濁度測定装置によりLAMP反応開始から増幅が開始されるまでの時間を比較した．各試験は2反復行った．

## 実験結果

***hrpG*および*hrpX*遺伝子間スペーサー領域の塩基配列**　Aac, *A. avenae* subsp. *avenae*, *A. avenae* subsp. *cattleyae*の*hrpG*および*hrpX*遺伝子間スペーサー領域をPCRにより増幅した結果，約750 bpの増幅産物が得られた．これらの塩基配列をAac 7菌株で比較すると塩基の置換や欠損の位置により3つのタイプの塩基配列に分かれた．ATCC 29625$^T$に対して，YPPS 64およびYPPS 616は99.87%，YPPS 65, YPPS 66, YPPS 67およびYPPS 319は98.92%の相同性であった．さらに*A. avenae* subsp. *avenae* 13菌株および*A. avenae* subsp. *cattleyae* 2菌株との相同性はそれぞれ81.95 ～ 84.11%，85.6%であった．これらの得られた塩基配列を比較し，Aacに特異的に反応するLAMPプライマーの設計を行った．

**LAMP法によるAacの検出**　LAMPプライマーセットは，*hrpG*遺伝子のコード領域42 bpを含む*hrpG*および*hrpX*遺伝子間スペーサー領域の上流部に設計した．このプライマーセットにループプライマー（第2表）を設計することで，増幅開始時間を約10分間短縮できた．プライマーの特異性調査の結果，Aac25菌株のDNAはすべて増幅がみられたが，Aac以外の供試43菌株のDNA断片は増幅しなかった（第3表）．

**LAMP法およびPCR法の検出限界**　PCR法は約1 × $10^4$ cfu/mlまでAacを検出したが，LAMP法では，約1 × $10^3$ cfu/mlまで検出した（第1図）．また，ろ過濃縮を用いて種子洗浄水からLAMP法でAacを検出する試験では，スイカ，トウガンおよびマクワウリ種子の各1000粒の洗浄水にAacが約1 × $10^3$ cfu含まれている場合まで検出できた．一方，健全種子を供試した場合は，非特異的な反応は認められなかった．

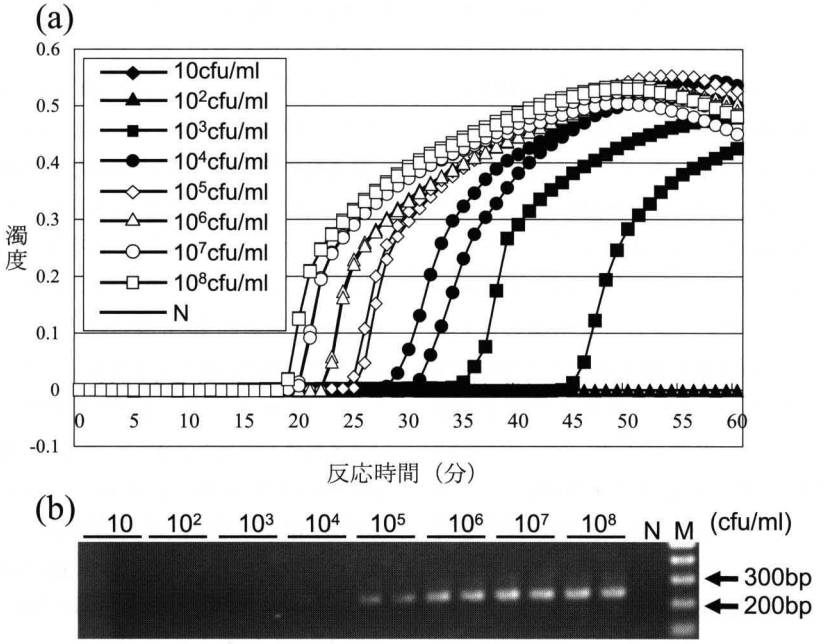
**種子からの検出**　スイカおよびメロンのAac自然汚染種子6試料についてろ過濃縮により検出を試みた結果，2反復とも全ての種子洗浄水濃縮液でLAMP増幅がリアルタイム

第3表　LAMPプライマーによる供試菌株の反応[a)]

| 菌種 | 菌株数 | LAMP増幅[b)] |
|---|---|---|
| *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* | 25 | + |
| *A. avenae* subsp. *avenae* | 8 | − |
| *A. avenae* subsp. *cattleyae* | 1 | − |
| *A. konjaci* | 2 | − |
| *Burkholderia andropogonis* | 1 | − |
| *B. cepaciat* | 2 | − |
| *B. gladioli* | 9 | − |
| *B. glumae* | 5 | − |
| *B. plantarii* | 1 | − |
| *B. vietnamiensis* | 1 | − |
| *Ralstonia solanacearum* | 2 | − |
| *R. pickettii* | 1 | − |
| *Pseudomonas aeruginosa* | 1 | − |
| *P. cichorii* | 1 | − |
| *P. chlororaphis* | 1 | − |
| *P. syringae* | 2 | − |
| *P. syringae* pv. *phaseolicola* | 2 | − |
| *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* | 1 | − |
| *X. oryzae* pv. *oryzicola* | 1 | − |
| *Erwinia herbicola* | 1 | − |

a) 約$10^8$ cfu/mlに濃度を調製した菌液をLAMP反応の鋳型とした．

b) リアルタイム濁度測定装置による結果．＋：濁度0.1以上，−：濁度0.1未満



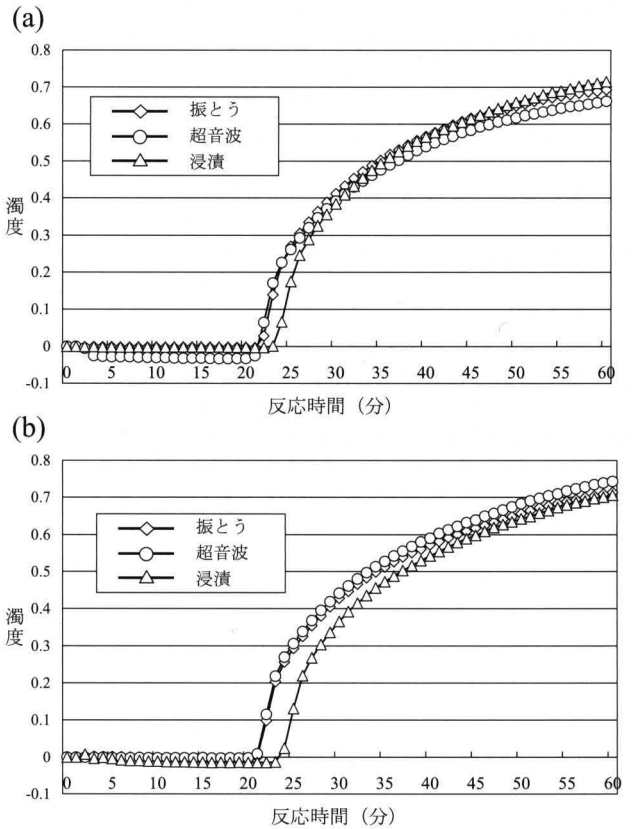

第1図　LAMP と PCR の検出限界比較
鋳型は約 1 × $10^8$ cfu/ml の細菌懸濁液を段階希釈した．(a) LAMP．リアルタイム濁度測定装置により 1 反復あたり 2 点並行で測定した試験例．N：陰性対照区．(b) PCR．SEQID4, SEQID5 のプライマーで PCR を 1 反復あたり 2 点並行で行い，246 bp の増幅 DNA 断片を検出した試験例．M：100 bp ladder marker，N：陰性対照区

濁度測定装置でみられ，増幅産物の電気泳動パターンは陽性対照区と同じバンドパターンを示した．自然汚染種子を用いて種子の洗浄方法を検討した結果，振とうと超音波処理には LAMP 反応開始から増幅が開始されるまでの時間に差はなく，浸漬ではこの時間が 2 ～ 3 分間遅かった（第 2 図）．

## 考　察

Aac を種子から直接検出できる方法はこれまで報告されていない．これまでに報告された種子からの検出方法は，種子にわずかな Aac が存在している場合を想定してそれぞれの方法で検出可能な濃度にまで増殖させるため，培地等での培養や種子の発芽により増菌を行っている（Kucharek *et al.*, 1993; Minsavage *et al.*, 1995; 松浦ら，1999; 水野ら，1999; Schaad *et al.*, 1999; 白川，2002; Walcott *et al.*, 2002）．これらの方法は手法が煩雑となり，時間もかかる．とくに培地等での培養による増菌は，種子に付随する他の微生物も増殖させる結果となり，むしろ Aac の増殖を抑制し，検出できなくなる恐れもある．このため，本研究では増菌を行わずとも Aac を高精度に検出できる方法を検討した．1 試験区あたり供試する種子数は，これまで報告された DNA 増幅手法による検出では 1000 ～ 5000 粒であったため，本法においては 1000 粒で試験を行った．その結果，今回，設計したプライマーを用いた LAMP 法により，スイカ，トウガン，メロン及びマクワウリ種子の洗浄水から Aac を直接検出することが可能であった．これは LAMP 法が ELISA や PCR 法よりも検出感度が高く，PCR 法よりも植物由来の反応阻害物質の影響を受けにくいためと考えられる（Kaneko *et al.*, 2006）．さらに LAMP 法では反応は一定温度で進み，増幅の確認には DNA 増幅反応の副産物であ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たピロリン酸マグネシウムの白濁により視覚的に容易に判定することもできる．また，種子から LAMP 法の鋳型を調製して検出するまでの時間は約 2 時間であり，これまでの検出法に比べ大幅な検出時間の短縮が可能となった．種子の洗浄方法としては，振とうによる洗浄では種子の夾雑物が洗浄水に漏出し，フィルターの目詰まりを引き起こすことから，超音波洗浄が実用的であった．以上のことから，本法は種子から Aac を短時間，高精度に検出する手法として適用可能であると考えられた．

しかし，LAMP 法は DNA 増幅手法であるために増殖活性のない菌をも検出するため，本法で陽性となった種子が発病の危険性のある種子かどうかは即断できない問題が残る．このため，確実に Aac の生菌の確認が必要な場合は，本法で種子の検定を行い，陽性となった試料について，メンブレンフィルター免疫染色法（松浦ら，2006）や実生苗からの増菌検出法（佐藤ら，2006）などの Aac 分離菌株を得ることができる方法を併用するなど，他法と組み合わせて利用すること




第2図　洗浄方法による増幅開始時間の比較
洗浄方法による増幅開始時間の違いをリアルタイム濁度測定装置により測定した試験例. 滅菌水 50 ml に 1 試験区あたり 300 粒の自然汚染種子を加え，振とう，超音波，浸漬をそれぞれ 5 分間行った．(a) 中国産スイカ，(b) タイ産メロン

がより有効であると考えられる.

また，本報の LAMP プライマーは *hrpG* および *hrpX* 遺伝子間のスペーサー領域を利用し設計した. これは既報の PCR プライマー（Shaad *et al.*, 1999; Walcott *et al.*, 2002）が対象としている 16S rDNA および 23S rDNA のスペーサー領域は種内の保存性が高く，プライマーの設計に 6 カ所のアニーリング領域を必要とする LAMP プライマーには適していなかったことによる. この領域は本報の LAMP プライマーが本試験において Aac に対する亜種特異性を示したことから，遺伝子診断を目的とした各種方法のプライマー設計領域としても適していると考えられる.

## 摘　要

種子からスイカ果実汚斑細菌病菌 Aac を直接検出する方法を開発した. 方法は種子の洗浄水をメンブレンフィルターでろ過濃縮した後，LAMP 法で検出するものである. 病原関連遺伝子である *hrpG* および *hrpX* 遺伝子間スペーサー領域から設計した LAMP プライマーは Aac の DNA 断片を特異的に増幅した. 本法により，スイカ，トウガン，マクワウリ種子それぞれ 1000 粒の洗浄水に Aac を約 $1 \times 10^3$ cfu 添加した場合まで検出可能であり，その検出時間は約 2 時間であった. さらにスイカおよびメロンの自然汚染種子 6 試料の洗浄水のすべてから本細菌に特異的な LAMP 増幅がみられた. このことから，本法は Aac 汚染種子から Aac を直接検出する手法として実用可能であると考えられた.

## 謝　辞

本研究を行うにあたり，供試細菌を分譲頂いた独立行政法人農業技術研究機構中央農業総合研究センター畔上耕児博士および東北農業研究センター門田育生博士に感謝申し上げる.

## 引 用 文 献

Fukuta, S., Iida, T., Mizukami, Y., Ishida, A., Ueda, J., Kanbe, M. and Ishimoto, Y. (2003). Detection of Japanese yam mosaic virus by RT-LAMP. Arch. Virol. 148: 1713–1720.

堀田治邦・塚本貴敬・上松　寛・安岡眞二（2006）. 日本で発生した *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* によるメロン果実汚斑細菌病（新称）. 日植病報 72: 82.（講要）

Kaneko, H., Kawana, T., Fukushima, E. and Suzutani, T. (2007). Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. J. Biochem. Biophys. Methods 70: 499–501.

菊池繁美・加藤智弘・本間　隆・石山久悦・白川　隆・我孫子和雄（1999）. 我が国で発生したスイカ果実汚斑細菌病：(1) 現地の発生実態と病徴. 日植病報 65: 359.（講要）

Kucharek, T., Perez, Y. and Hodge, C. (1993). Transmission of the watermelon fruit blotch bacterium from infested seed to seedlings. Phytopathology 83: 466. (Abstr.)

Latin, R. X. and Hopkins, D. L. (1995). Bacterial fruit blotch of watermelon: The Hypothetical exam question became reality. Plant Dis. 79: 761–765.

松浦貴之・水野明文・會澤雅夫・白川　隆（1999）. スイカ果実汚斑細菌病菌の種子からの検出法の開発. 日植病報 65: 652–653.（講要）

松浦貴之・白川　隆・佐藤仁敏・井上康宏・畔上耕児（2007）. メンブレンフィルター法と選択培地を用いたスイカ種子からのスイカ果実汚斑細菌病の検出と分離. 日植病報 73: 39.（講要）

Minsavage, G. V., Hoover, R. J. and Kucharek, T. A. (1995). Detection of the watermelon fruit blotch pathogen on seeds with the polymerase chain reaction. Phytopathology 85: 1162. (Abstr.)

水野明文・君島悦夫・迫田琢也・川合　昭・白川　隆・西山幸司（1999）. 抗血清を利用したスイカ果実汚斑細菌病菌の特異的検出. 日植病報 65: 361–362.（講要）

Murray, M. G. and Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high-molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8: 4321–4326.

Nie, X. (2005). Reverse transcription loop-mediated isothermal

amplification of DNA for detection of *Potato virus Y*. Plant Dis. 89: 605–610.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 28: e63.

小木曽秀紀・藤永真史・松崎良一・上松　寛（2005）．スイカ接木苗に発生した台木トウガン種子に起因する果実汚斑細菌病．日植病報 71: 290.（講要）

Okuda, M., Matsumoto, M. and Tanaka, Y. (2005). Characterization of the *tuf*B-*sec*E-*nus*G-*rpl*KAJL-*rpo*B gene cluster of the citrus greening organism and detection by loop-mediated isothermal amplification. Plant Dis. 89: 705–711.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463–5467.

佐藤仁敏・白川　隆・松浦貴之・田城保夫（2006）．スイカおよびメロン種子における実生苗を利用した *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* の増菌検出法．日植病報 72: 311.（講要）

Schaad, N. W., Song, W. Y. and Hatziloukas, E. (1999). PCR primers for detection of plant pathogenic species and subspecies of *Acidovorax*. US Patent 6146834.

白川　隆（2002）．スイカ果実汚斑細菌病の防除技術の開発．pp. 24–34，農林水産技術会議事務局.

白川　隆・會沢雅夫・小宮友紀子・我孫子和雄（2000a）．種子，植物体からの *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* の分離・検出を目的とした選択培地の開発．日植病報 66: 132.（講要）

白川　隆・菊池繁美・加藤智弘・我孫子和雄・川合　昭（2000b）．日本におけるスイカ果実汚斑細菌病菌の発生．日植病報 66: 223–231.

富田恭範・小河原孝司・白川　隆・佐藤仁敏・鹿島哲朗・中西宏（2006）．茨城県におけるスイカ果実汚斑細菌病菌によるメロン病害の発生．日植病報 72: 312.（講要）

Walcott, R. R., Gitaitis, R. D. and Castro, A. C. (2002). Role of blossoms in watermelon seed infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Phytopathology 93: 528–534.