

1. 圃場健診技術

1.1. 画像解析

1.2. 対象植物の観察

1.3. 分子生物学的方法による病原菌レース等の精密識別

バナナ萎凋病菌あるいはそのレースのみがもつ病原性関連遺伝子、宿主特異性決定遺伝子、レース決定遺伝子などを見出すことができれば、当該遺伝子の保持を分子生物学的手法によって、バナナ萎凋病菌あるいはそのレースを得意的に識別することが可能になる。

近年、植物病原菌のゲノム解析が可能になり、ゲノム比較によって、バナナ萎凋病菌あるいはそのレースのみがもつ遺伝子などが明らかになってきた（Asai 2019）。

表 1.3.1.1. バナナ萎凋病菌各レースのトマト萎凋病菌エフェクター *SIX* 遺伝子群相同遺伝子の保持状況

レース	<i>SIX</i> genes													
	<i>SIX1</i>	<i>SIX2</i>	<i>SIX3</i>	<i>SIX4</i>	<i>SIX5</i>	<i>SIX6</i>	<i>SIX7</i>	<i>SIX8</i>	<i>SIX9</i>	<i>SIX10</i>	<i>SIX11</i>	<i>SIX12</i>	<i>SIX13</i>	<i>SIX14</i>
Race 1	d,f	-	-	b	-	b	-	-	a	-	-	-	a	-
Race SR4	g	d	-	a	-	-	a	a,b	a	-	-	-	-	-
Race TR4	a,h,i	c	-	a	-	a	-	a	a	-	-	-	a,e	-

表中の異なるアルファベットは、各相同遺伝子の塩基配列が異なることを示す。

例えば、レース 1 160527 株のゲノム解析の結果、染色体 12 (contig 12) がアクセサリ染色体であり、この染色体に病原性や宿主特異性に関する遺伝子が乗っていることが推察されている (図 1.3.1.1.)。また、染色体 12 の一部を欠損すると、菌の生育には影響がないものの病原性が低下 (喪失?) し、この領域に病原性決定因子が乗ることが示唆されている。

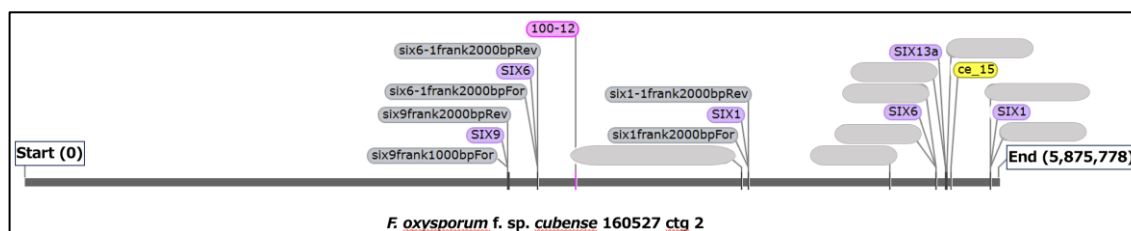


図 1.3.1.1. アクセサリ染色体上の想定病原性関連遺伝子

表 1.3.1.2 分子生物学的方法による病原菌レース等の精密識別に使用する遺伝子の例と各レースの保持パターン

バナナ萎凋病菌 (f. sp. <i>cubense</i>)	<i>Ce 15</i>	<i>SIX7</i>	<i>SIX8</i>
レース 1	+	—	—
レース SR4	+	a	a,b
レース TR4	+	—	a
その他の分化型菌	—	±	±

1.3.1. 鋳型 DNA 溶液の調製

1.3.1.1. ポジティブコントロール

標的遺伝子等を人工的に合成した DNA 溶液をポジティブコントロールとして用いる。濃度は 5×10^7 copies/ml で、2 ml/反応液を加える。

乾燥 DNA の場合、「陽性コントロール」チューブに「陽性コントロール溶解液」10 μ l を加え、スピンドウン、室温で 5 分間静置、タッピングした後、スピンドウンし、2 ml/反応液を加える

1.3.1.2. 植物組織からの DNA の抽出

1.3.1.2.1. キット・器具など

Template Prepper Kit、ニッポンジーン（室温）

マイクロピペット（200 μ l）

フィルター付き滅菌マイクロチップ（200 μ l）

滅菌マイクロチューブ

1.3.1.2.2. サンプルリング

圃場でバナナの茎を地上約 50 cm で切断、切断面からピンセットを用いて、1 mm 各程度の組織片をとる。圃場から研究室に持ち帰る場合は、バナナ茎を 15 cm 程度の円筒に切断、可能であれば冷蔵して持ち帰る。切断面は、褐色に酸化するので、研究室で新たな切断面を作る。組織片を取る際に、切断面の褐変の有無などを観察して記録する（1.2.）。

1.3.1.2.3. DNA 抽出

植物が萎凋病菌に感染しているかどうかを知るだけの目的の場合、DNA は以下

のプロトコールに従って抽出するのみで良い。濃度などを測定する必要はない。

Extraction solution (ES) 100 μ l を PCR チューブにとる。

サンプル植物組織片約 1 mm^3 を、PCR チューブ中の ES に浸す。

95°C で 10 分間、加熱する。

氷上で 2 分間、冷却する。

DNA 溶液として用いる。

1.3.1.3. 菌体からの DNA の抽出

未記入

1.3.2. PCR (polymerase chain reaction) 法によるバナナ萎凋病菌やそのレースの特異識別

未記入

1.3.3. LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法によるバナナ萎凋病菌やそのレースの特異識別

LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法は高野ら (2014) が開発した遺伝子増幅技術である。標的の遺伝子等に対応したプライマーを使用することで目的の DNA 断片を増幅し、病原菌に特徴的な遺伝子を標的とすることで病原菌をそうでないものと区別して特異的に診断することができる。長期間が必要な接種試験 (X.X.X.) を行わなくとも、病原やレースの特異識別が可能となるため、迅速な対応が可能となる。

分子生物学的方法として PCR 法 (1.3.2.) が一般的であるが、LAMP 法はその増幅機構が PCR 法とは異なる。PCR 法では 2 つのプライマーを用いるが、LAMP 法では 6 つの特定の塩基配列をターゲットとしたプライマーセットを用いる。このプライマーセットは生成物の両端が自己アニールするように設計されており、生成物が鋳型とプライマーの両方の機能を果たす。二本鎖を引き剥がしながら新たな鎖を合成することができる DNA 合成酵素を使用することで、爆発的な反応を可能にする。

LAMP の手法の優れている点は大きく 3 つ挙げられる。まず、専用機器が不要である。60°C 付近で働く鎖置換型 DNA 増幅酵素と自己の配列を標識とするようデザインしたプライマーを用いることで、簡便かつ迅速な標的配列の増幅が可能となり、サーマルサイクラーのような器具を必要としない。2 つ目の利点は操作の簡略化が可能であることだ。蛍光インターカレーターや蛍光プローブなどと組み合わせることで、発色や濁度によって増幅を確認することができ、電気

泳動や染色といった操作を省略できる。また、増幅反応が強いため、阻害剤の影響を受けにくく、精製されていないゲノム DNA を鋳型に利用した場合でも増幅が可能である。最後に、特異性が高いことが挙げられる。6 箇所の領域を標的とするプライマーセットを使用するため特異性が高く、特異検出に適している。

※LAMP 法では、DNA 断片が爆発的に増幅するため、一度コンタミを起こすと解決できない状況に陥る場合がある。そのため、フィルター入りチップ等を使用の上、細心の注意を払って実験操作を行う必要がある。

1.3.3.1. LAMP 用プライマーセット

特異識別に使用するプライマーセットは、例えば、表 1.3.1.2 のように、識別したいレース等が特異的に保持するゲノム領域などをターゲットにして設計する。通常、1 つの対象ゲノム領域に対して 3 セットほどを仮に作成、交差性が少なく、反応速度や感度が高いものを選抜して使用する。ニッポンジーン HP 参照。

1.3.3.2. 反応液の調製

1.3.3.2.1. 液体試薬を使用する場合

未記入

1.3.3.2.2. 乾燥試薬を使用する場合

1.3.3.2.2.1. キット・器具など

DryADD LAMP Master Mix (Turbidity/Visible Dye)、ニッポンジーン (室温)
LAMP 用プライマーセット (例: Foc、SIX7、SIX8)、ニッポンジーン (室温)
鋳型 DNA (1.3.1.2. で抽出したもの)

マイクロピペット (200 μ l、20 μ l、2 μ l)

フィルター付き滅菌マイクロチップ (200 μ l、20 μ l、2 μ l)

滅菌マイクロチューブ

ヒートブロック (mini8Thermal Cycler、miniPCR) か、サーマルサイクラー

1.3.3.2.2.2. 反応液の調製

表 1.3.3.2. に従って、必要な各試薬 (DNA サンプルを除く) を、マイクロピペットを用い、滅菌マイクロチューブ内に入れ、転倒混和する。混合後、スピンドウンし、氷上に置く。

表 1.3.3.2. 1 反応チューブあたりの反応液の組成

試薬名	量 (μ l)
-----	---------------

ddWater	15.5
LTV Dissolve Solution	2.5
10×LAMP Primer Mix	5.0
合計	23

1.3.3.3. 反応

乾燥試薬の場合、以下のように反応させる。

1.3.3.2.2.2. で混合した反応液を、LAMP Mater Mix の各チューブに 23 μ l ずつ分注し、溶解、スピンドウンする。

1.3.1.2.3. で調製したサンプル、ポジティブコントロール (1.3.1.1.) またはネガティブコントロール (滅菌 RO 水) を各チューブに 2 μ l 加え、スピンドウンする。

ミネラルオイルを 20 μ l 加える。サーマルサイクラーを用いる場合は不要。

64.5 $^{\circ}$ C で約 30 分間 (~1 時間) 加熱する。

氷上で冷却する。

結果を観察する。

1.3.3.4. 結果の観察

観察方法は 2 通りあり、目視による観察と UV 照射による観察とがある。

目視による観察の場合、陰性であれば反応液の色は変化せず黄色いままであり、陽性であれば淡い緑色に変化する (図 1.3.3.2)。

UV (395 nm、vs-f101jp、Vansky) を照射すると陽性の場合蛍光が観察されるため、目視の場合よりも違いが分かりやすい (図 1.3.3.3)。

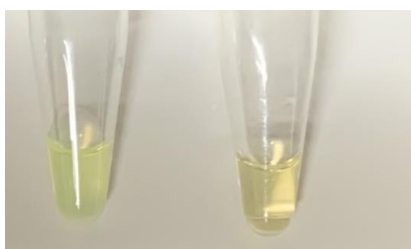


図 1.3.3.2. 目視による観察 (左：陽性 右：陰性)

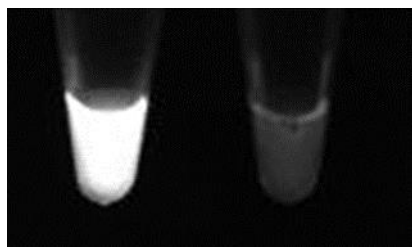


図 1.3.3.3. UV 照射による観察 (左：陽性 右：陰性)

引用文献

高野ら (2014) タイトル、書誌情報など、