

1. 圃場検診技術

1.1. 画像解析

1.2. 対象植物の観察

1.2.1. 罹病植物の病徴

バナナ萎凋病に感染した植物では、葉の黄化、時に葉の半身黄化、外葉からの萎凋、外葉から垂れ下がり枯死、偽茎の縦の裂け（つる割れのような症状）、植物体全体の枯死等の外部病徴を示す。また、偽茎を切断すると、維管束の褐変が認められる（図 1.2.1.1.）。この症状は、青枯病でも類似するが、青枯病の場合は、維管束切断面を水に浸すと間もなく菌泥の溢出が認められるが、萎凋病の場合菌泥は認められない。青枯病のケースは少ない。



図1.2.1.1. 萎凋病罹病バナナの病徴
A、葉の黄化；B、外葉の萎れと枯れ；C、偽茎の縦の裂けと植物体の枯死；D、裂けた偽茎と維管束褐変；E、維管束褐変

1.2.2. 病原菌の分離

Fusarium 選択培地 Fo-G1 (Nishimura 2007)、および、PDA などの平板に、偽茎の褐変した維管束をピンセットなどで少量採取し、置く。27°C前後で、数日でコロニーが見られるので、コロニーの端を少量採取し、新しい平板に置く。これを繰り返し、最後は短孢子分離等を行なって菌株として確立する。

1.2.3. 接種試験

分離した菌株を 300 ml 三角フラスコに入れた 100 ml の PDB 培地に植え、27°C前後で 3 日間ほど震盪 (120 spm) 培養する。Bud-cell を遠心分離で集め、滅菌水に懸濁し、およそ 10^8 cells/ml の孢子懸濁液を調製、接種源とする。サイズ約 15 cm 程度のバナナの苗のポット地際部に、接種源 2~10 ml を灌注する。この際、ペグなどで根に付傷すると発病しやすい。レース 1 と 4 の識別に際しては、品種島バナナ (レース 1 及び 4 感受性) および Cavendish (レース 1 抵抗性、レース 4 感受性) を使用することが望ましい。約 27°Cで 20~40 日後に病徴が現れるので、観察する (例、図 1.2.3.1.) と共に、病徴を評価する。通常、0 (健全) ~4 枯死のように評価し、接種区の平均値を無接種区の平均値と比較する。

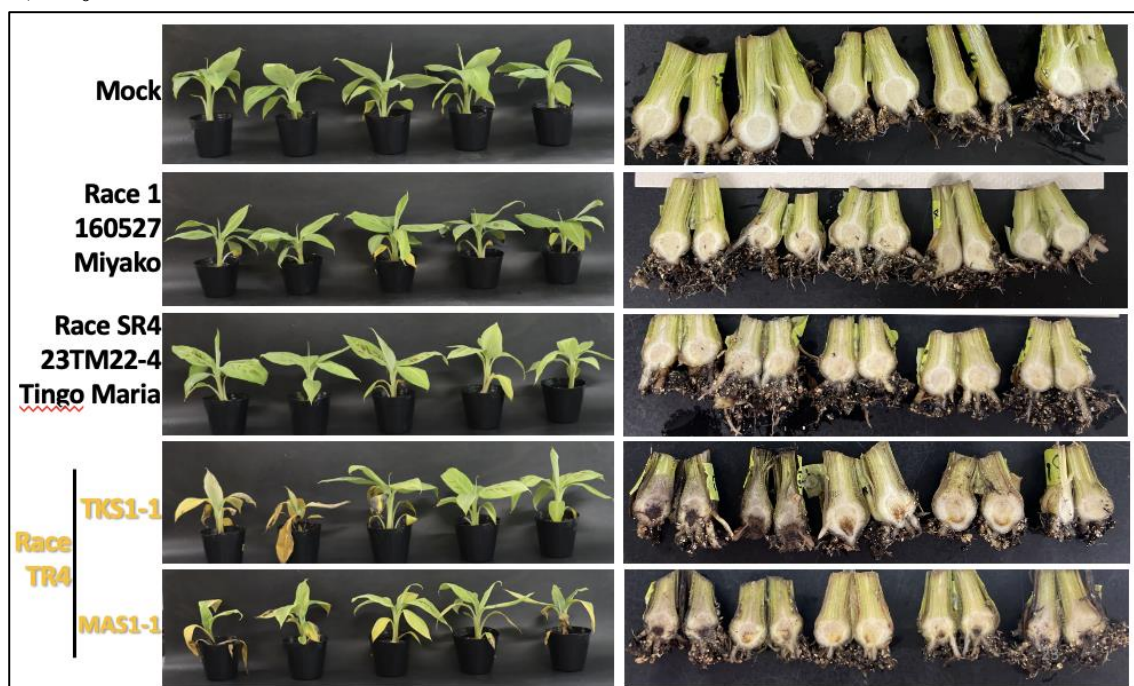


図 1.2.3.1. バナナ cv. Cavendish 苗に対する接種の結果 (接種 30 日後)

1.3. 分子生物学的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的手法によって、バナナ萎凋病菌あるいはそのレースを特異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やその保持パターン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>SIX</i> ₁	<i>SIX</i> ₂	<i>SIX</i> ₃	<i>SIX</i> ₄	<i>SIX</i> ₅	<i>SIX</i> ₆	<i>SIX</i> ₇	<i>SIX</i> ₈	<i>SIX</i> ₉	<i>SIX</i> ₁₀	<i>SIX</i> ₁₁	<i>SIX</i> ₁₂	<i>SIX</i> ₁₃	<i>SIX</i> ₁₄
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 2 (contig 2) がアクセサリー染色体であり、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 2 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を喪失し、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。

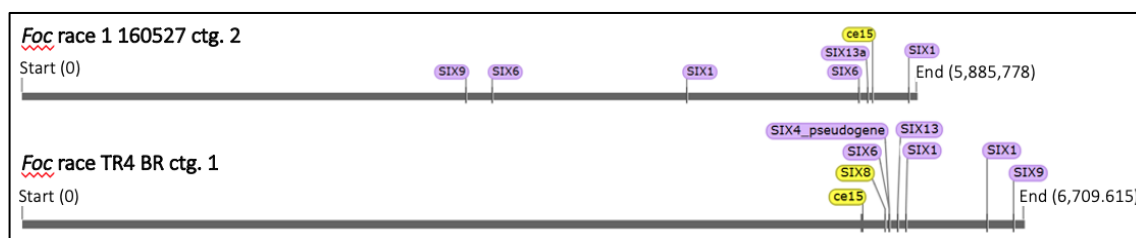


図 1.3.1.1. アクセサリー染色体上の想定病原性関連遺伝子

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>SIX6</i>	<i>SIX7</i>	<i>SIX8</i>
レース 1	+	b	—	—
レース SR4	+	—	a	a,b
レース TR4	+	a	—	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. 植物組織のサンプリング

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 mm³ 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. 分離した菌体からの DNA の抽出

分離した菌がバナナ萎凋病菌であ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。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。

菌体を、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。

1.3.1.4. 土壌からの DNA の抽出 (未完成)

1.3.1.4.1. 土壌のサンプリング

土壌のサンプリング方法を書く

1.3.1.4.2. 土壌からの DNA の抽出

ニッポンジーンなどの土壌抽出キットを用いる

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

1.3.2.1. 反応液の調製

1.3.2.1.1. キット・器具など

Ex-Taq polymerase、タカラバイオ

10×Ex Taq Buffer、タカラバイオ

プライマーセット

鋳型 DNA

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

サーマルサイクラー

0.5 × TAE バッファー

アガロースゲル

エチジウムブロマイド溶液

電気泳動装置

UV 照射機

1.3.2.1.2. 反応液の調製

表 1.3.2.1 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 1.3.2.1. PCR 反応液

試薬名	量 (μl)
10×Ex Taq Buffer	1.0
dNTPs Mixture	0.8
F primer	0.2
R primer	0.2
Ex-Taq polymerase	0.05
MilliQ	6.75
合計	9.0

1.3.2.2. 反応

1.3.2.1.2. で混合した反応液を各チューブに 9 μl ずつ分注する。サンプル、ポジティブコントロールまたはネガティブコントロール（滅菌 RO 水）を各チュ

ープに 1 µl 加え、スピンドウンする。

使用するプライマーに合わせて加熱を行う。

1.3.2.2.1. バナナ萎凋病菌の検出

rDNA 間の非転写領域 intergenic spacers (IGS) を標的とした、2つのプライマー、FIGS11 (5'-GTAAGCCGTCCTTCGCCTCG-3') と FIGS12 (5'-GCAAATTCAATAGTATGGC-3') (Kawabe et al., 2005) を 1.3.2.1. でプライマーとして使用する。1.3.2.2 において次の反応条件で加熱する。98 °C、10 秒間 ; [98 °C、10 秒間 ; 60 °C、30 秒間 ; 72 °C、30 秒間] × 30 サイクル ; 72 °C、5 分間

1.3.2.2.2. バナナ萎凋病菌のレースの特異識別

1.3.2.2.2.1. レース 1 の判別

SIX6b を標的とした、2つのプライマー、R1sp_SIX6b_F (5'-CTACGTCGACATCACTCCCA-3') と R1sp_SIX6b_R (5'-TCCACGAGACAAGTTGGTGA-3') を使用する。1.3.2.2 において次の反応条件で加熱する。94 °C、1 分間 ; [94 °C、30 秒間 ; 55 °C、30 秒間 ; 72 °C、20 秒間] × 30 サイクル ; 72 °C、7 分間

1.3.2.2.2. レース 4 の判別

OPA02₄₀₄ を標的とした、2 つのプライマー、Foc-1 (5'-CTACGTCGACATCACTCCCA-3') と Foc-2 (5'-TCCACGAGACAAGTTGGTGA-3') (Lin et al., 2008) を使用する。1.3.2.2 において次の反応条件で加熱する。94 °C、1 分間 ; [94 °C、1 分間 ; 60 °C、30 秒間 ; 68 °C、25 秒間] ×30 サイクル ; 68 °C、7 分間

1.3.2.2.3. レース SR 4 の判別

SIX7a を標的とした、2 つのプライマー、FocSTR4 F (5'-GCGCAAGTAGTCTTGCTTCC-3') と FocSTR4 R (5'-ATTAAGCGGTTGGCGTATTG-3') (Raman et al., 2022) を使用する。1.3.2.2 において次の反応条件で加熱する。94 °C、1 分間 ; [94 °C、30 秒間 ; 58 °C、30 秒間 ; 72 °C、20 秒間] ×30 サイクル ; 72 °C、7 分間

1.3.2.2.4. レース TR 4 の判別

SIX1a を標的とした、2 つのプライマー、FocTR4 F (5'-TGATTTGCCGTGGAATGACA-3') と FocTR4 R (5'-

TGGTCTTGACACGACCCA-3') (Raman et al., 2022)を使用する。1.3.2.2において次の反応条件で加熱する。94 °C、1 分間 ; [94 °C、30 秒間 ; 65 °C、30 秒間 ; 72 °C、20 秒間] ×30 サイクル ; 72 °C、7 分間

1.3.2.3. 結果の観察

1.3.2.3.1. 電気泳動

電気泳動装置を使用して 0.5× TAE バッファー中で、増幅産物に合わせて、2%に調整したアガロースゲルを用いて、135 V で 25 分間の条件で行う。

1.3.2.3.2. 染色

1.3.2.3.1.の後に、ゲルをエチジウムブロマイド溶液 (5 µl/mL) に約 20 分間程度、暗黒条件下で浸漬することで染色する。

1.3.2.3.3. 結果の観察

1.3.2.3.2.の後に、ゲルを UV 照射することでバンドを可視化し、増幅の有無を確認する。

1.3.2.5.4. バナナ萎凋病菌識別例

各プライマーを用いた各サンプルの PCR による識別を行った実験例を図

1.3.2.5.に示す。

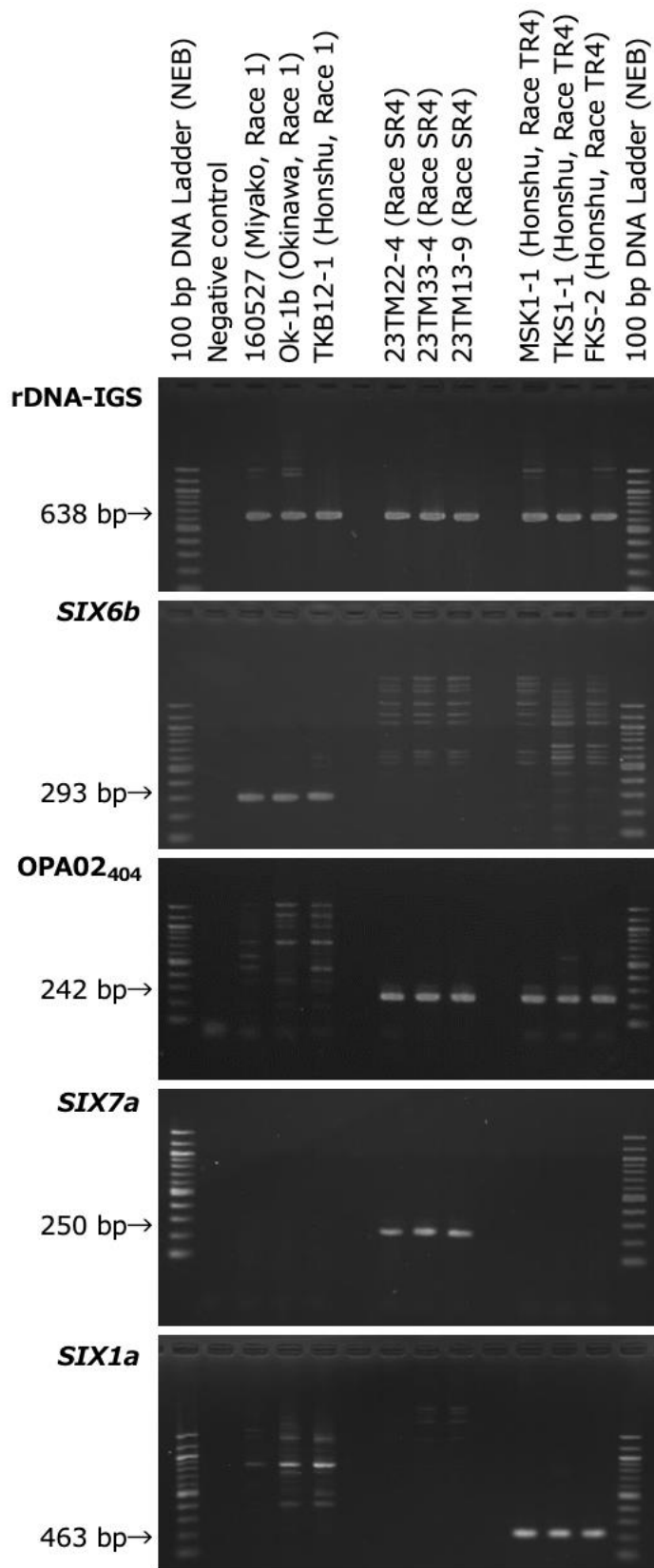


図 1.3.2.5 PCR によるレース識別結果 (例)

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 (1.2.3.) を行わなくとも、病原やレースの特異識別が可能のため、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

1.3.3.2.1.1. キット・器具など

植物病検査用 LAMP プライマーセット専用 DNA 増幅試薬、ニッポンジーン LAMP 用プライマーセット、ニッポンジーン

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

1.3.3.2.1.2. 反応液の調製

表 1.3.3.1 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 1.3.3.1 反応液の組成

試薬名	量 (μ l)
ddWater	9.6
10×LAMP バッファー	2.5
10×LAMP Primer Mix	2.5
反応添加液	5.0
dNTPs Mixture	1.4
蛍光発色液 alpha	1.0
DNA 増幅酵素	1.0
合計	23

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	5.0
10 \times LAMP Primer Mix	2.5
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）。

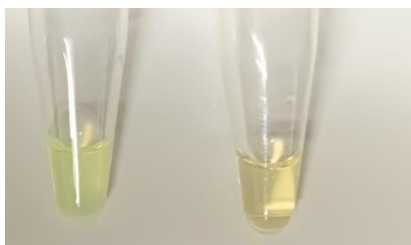


図 1.3.3.2. 目視による観察（左：陽性 右：陰性）

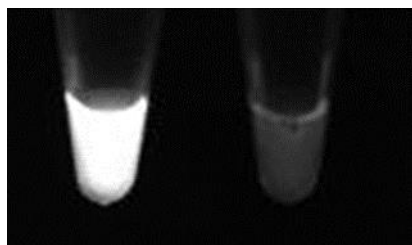


図 1.3.3.3. UV 照射による観察（左：陽性 右：陰性）

1.3.3.5. バナナ萎凋病菌の特異識別

1.3.3.2.において Foc 検出用プライマーを使用する。1.3.3.3.の反応の手順に従い操作を行う。反応後、1.3.3.4.の手順に従い結果を判別する。この時、陽性であればバナナ萎凋病菌である

1.3.3.5. バナナ萎凋病菌のレースの特異識別

1.3.3.5.1. レース 4 の判別

1.3.3.2.2.において SIX8 検出用プライマーを使用する。1.3.3.3.の反応の手順に従い操作を行う。反応後、1.3.3.4.の手順に従い結果を判別する。この時、陽性であればレース 4 である

1.3.3.5.2. レース SR4 の判別

1.3.3.5.1.でレース 4 の判定をしたサンプルに対し操作を行う。1.3.3.2.2.において SIX7 検出用プライマーを使用する。1.3.3.3.の反応の手順に従い操作を行う。反応後、1.3.3.4.の手順に従い結果を判別する。この時、陽性であればレース SR4 である。

1.3.3.5.3. レース TR4 の判別

1.3.3.5.1. でレース 4 の判定をしたサンプルに対し操作を行う。1.3.3.2.2. において SIX6a 検出用プライマーを使用する。1.3.3.3. の反応の手順に従い操作を行う。反応後、1.3.3.4. の手順に従い結果を判別する。この時、陽性であればレース TR4 である。

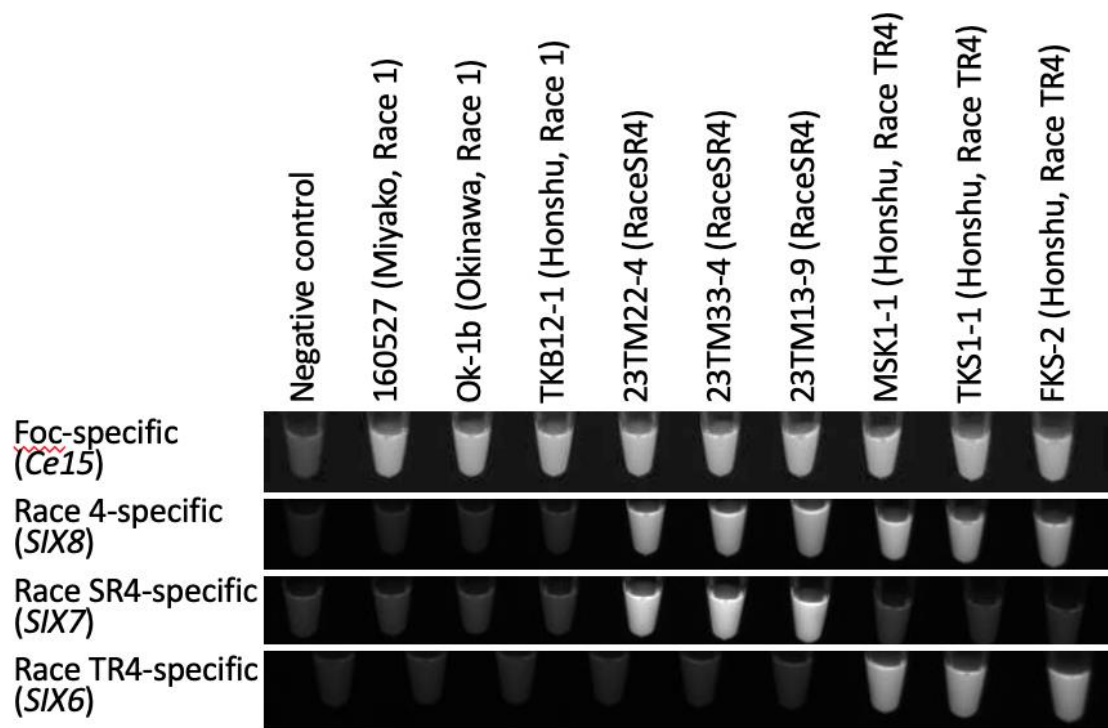


図 1.3.3.4. 各プライマーセットを用いたレースの識別

引用文献

高野弘・酒井栄一・佐々木泰治 (2014) LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法の原則と応用. モダンメディア 60:211-231

Kawabe M, Kobayashi Y, Okada G, Yamaguchi I, Teraoka T, Arie T (2005) Three evolutionary lineages of tomato wilt pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, based on sequences of IGS, MAT1, and pgl, are each composed of isolates of a single mating type and a single or closely related vegetative compatibility group. *J Gen Plant Pathol* 71:263-272

Nishimura N (2007) Selective media for *Fusarium oxysporum*. *J Gen Plant Pathol* 73:342-348 DOI:10.1007/s10327-007-0031-y

Raman Thangavelu, Esack Edwinraj, Muthukathan Gopi, Periyasamy Pushpakanth, Kotteswaran Sharmila, Manivasakan Prabakaran, Murugan Loganathan, Subbaraya Uma (2022) Development of PCR-Based Race-Specific Markers for Differentiation of Indian *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, the Causal Agent of Fusarium Wilt in Banana. *Journal of Fungi* 8(1), 53

Ying-Hong Lin, Jing-Yi Chang, En-Tzu Liu, Chih-Ping Chao, Jenn-Wen Huang & Pi-Fang Linda Chang (2008) Development of a molecular marker for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. *European Journal of Plant Pathology* 123:353-365