

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5522820号
(P5522820)

(45) 発行日 平成26年6月18日(2014.6.18)

(24) 登録日 平成26年4月18日(2014.4.18)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 5 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2008-214831 (P2008-214831)	(73) 特許権者	304020292
(22) 出願日	平成20年8月25日(2008.8.25)		国立大学法人徳島大学
(65) 公開番号	特開2010-46038 (P2010-46038A)		徳島県徳島市新蔵町2丁目24番地
(43) 公開日	平成22年3月4日(2010.3.4)	(73) 特許権者	592197108
審査請求日	平成23年8月19日(2011.8.19)		徳島県
			徳島県徳島市万代町1丁目1番地
		(74) 代理人	100088904
			弁理士 庄司 隆
		(74) 代理人	100124453
			弁理士 資延 由利子
		(74) 代理人	100135208
			弁理士 大杉 卓也
		(74) 代理人	100152319
			弁理士 曾我 亜紀

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イチゴ重要病害の病原菌検出方法および検出用プライマー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

イチゴ組織または土壌を試料とし、試料中に混入可能性のある遺伝子を分析することによるイチゴの重要病害の検出方法であって、以下の工程を含むことを特徴とする検出方法：

1) イチゴの重要病害に関連する少なくとも5種以上の病原菌の遺伝子配列を各々特異的に増幅しうる、以下のA)~E)の組み合わせからなるプライマーペアを含む、イチゴの重要病害の検出用キットを用いて遺伝子増幅処理を行う工程：

A) 配列番号1に記載のオリゴヌクレオチド(GTAGGGTCTCCGCGACCCT)と、配列番号3に記載のオリゴヌクレオチド(TTCCTACCTGATCCGAGGTCA)の組み合わせ；

B) 配列番号4に記載のオリゴヌクレオチド(GCCGCCCCACCACGGGA)と、配列番号5に記載のオリゴヌクレオチド(AAGGGCCACGTGTGCCGTG)の組み合わせ；

C) 配列番号2に記載のオリゴヌクレオチド(CCTAAACTCTGTTTCTATATGTAAC)もしくは配列番号10に記載のオリゴヌクレオチド(ctatatgtaacttctgagtaaaacc)と、配列番号3に記載のオリゴヌクレオチド(TTCCTACCTGATCCGAGGTCA)の組み合わせ；

D) 配列番号8に記載のオリゴヌクレオチド(CAATAGTTGGGGTCTTATTTGGC)と、配列番号9に記載のオリゴヌクレオチド(ATGCATACCGAAGTACACATTAAG)の組み合わせ；

E) 配列番号6に記載のオリゴヌクレオチド(CTTCGGCCTGAGCTAGTAGCTTT)と、配列番号7に記載のオリゴヌクレオチド(ATGCATACCGAAGTACACACACAT)の組み合わせ；

2) 上記遺伝子増幅処理工程により得られた増幅産物の分子量を測定する工程；

3) 測定した分子量から、増幅産物に関連する病原菌を同定する工程。

10

20

【請求項 2】

前記イチゴの重要病害が、炭疽病、疫病および/または萎黄病である請求項 1 に記載の検出方法。

【請求項 3】

前記イチゴの重要病害に関連する病原菌が、糸状菌から選択される少なくとも 5 種以上である、請求項 1 または 2 に記載の検出方法。

【請求項 4】

前記糸状菌が、グロメレラ(Glomerella)属、コレトリカム(Colletotrichum)属、フィトフィトラ(Phytophthora)属、フザリウム(Fusarium)属のいずれかに属する請求項 3 に記載の検出方法。

【請求項 5】

プライマー機能を有する少なくとも 2 種のオリゴヌクレオチドを 1 対とした、以下の A) ~ E) の組み合わせからなるプライマーペアを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 に記載の検出方法に使用する、イチゴ重要病害の検出用キット：

A) 配列番号 1 に記載のオリゴヌクレオチド (GTAGGGTCTCCGCGACCCT) と、配列番号 3 に記載のオリゴヌクレオチド (TTCCTACCTGATCCGAGGTCA) の、2 種のオリゴヌクレオチドの組み合わせ；

B) 配列番号 4 に記載のオリゴヌクレオチド (GCCGGCCCCACCACGGGGA) と、配列番号 5 に記載のオリゴヌクレオチド (AAGGGCCCCACGTGTGCCGTG) の、2 種のオリゴヌクレオチドの組み合わせ；

C) 配列番号 2 に記載のオリゴヌクレオチド (CCTAAACTCTGTTTCTATATGTAAC) もしくは配列番号 10 に記載のオリゴヌクレオチド (ctatatgtaacttctgagtaaaacc) と、配列番号 3 に記載のオリゴヌクレオチド (TTCCTACCTGATCCGAGGTCA) の、2 種のオリゴヌクレオチドの組み合わせ；

D) 配列番号 8 に記載のオリゴヌクレオチド (CAATAGTTGGGGTCTTATTTGGC) と、配列番号 9 に記載のオリゴヌクレオチド (ATGCATACCGAAGTACACATTAAG) の、2 種のオリゴヌクレオチドの組み合わせ；

E) 配列番号 6 に記載のオリゴヌクレオチド (CTTCGGCCTGAGCTAGTAGCTTT) と、配列番号 7 に記載のオリゴヌクレオチド (ATGCATACCGAAGTACACACAT) の、2 種のオリゴヌクレオチドの組み合わせ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、イチゴ重要病害に係る病原菌の早期診断のために各病原菌を検出するための各病原菌特異的 DNA 配列を増幅しうる DNA 増幅プライマーに関し、より詳しくは各種病原菌特異的 DNA 配列を増幅する工程を含むイチゴ重要病害に係る病原菌の検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

イチゴの重要病害である炭疽病、疫病、萎黄病はいずれも糸状菌の感染により引き起こされ、初期症状が似ている。各重要病害に起因する病原菌を早期に同定し、適切な対策をとることが被害の拡大を防ぐことにつながる。しかしながら、従来は、病原菌を分離・培養して形態を比較することで、菌の同定が行われ、時間と熟練と菌の形態に関する深い知識が必要であった。

【0003】

近年では、種特異的な DNA 情報に基づいた手法による病原菌等の同定が実施可能である。種特異的な DNA 情報に基づいた遺伝子反応を用いた検査法は、1) 操作が簡便であり、高度に専門的な知識を要しない、2) きわめて微量の DNA を対象とした検査ができ、培養法等と比較して病原菌をより高感度に検出できる、3) 検査に要する時間が短い、などの利点があり、病原菌を同定する方法として幾つか報告されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 4 】

例えば非特許文献 1 には、イチゴ、キク病原菌の核 rDNA - ITS 領域のシーケンスと属特異的プライマーの設計について開示されており、非特許文献 2 には徳島県で最近話題になっているイチゴ炭疽病、キュウリ褐斑病における薬剤耐性菌の出現状況に関し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) の手法を用いてチトクローム b 遺伝子変異の有無により検定を行ったことが開示されている。また、特許文献 1 には、真菌の病原体であるコレトトリカム・アクタツム、アルテナリア属、及びクラドスポリウム・カルポフィラムの検出のための PCR 分析方法について開示がある。

【 0 0 0 5 】

しかしながら、複数の菌の由来する各種のイチゴの重要病害に関し、一度の検査で容易かつ正確に菌を検出し、同定しうる検出方法はなかった。なお、各重要病害に対し、とりうる対策が異なるので、その対策を誤ると被害の拡大を招くことになる (図 1 参照)。したがって、早期に病原菌を検出し、同定する方法が望まれている。

【非特許文献 1】奈良県農業技術センター研究報告 第 32 号、9-18 頁 (2001 年)

【非特許文献 2】四国植物防疫研究 第 41 巻、49-50 頁 (2006 年)

【特許文献 1】特表 2 0 0 4 - 5 2 0 8 4 3 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 6 】

本発明は、イチゴの重要病害で初期症状が似ている病原菌を早期に検出し、同定しうる検査方法を提供することを課題とする。より詳しくは、炭疽病、疫病および萎黄病等の病原菌の検出方法を提供することを課題とし、具体的には、検査に使用しうるオリゴヌクレオチド (プライマー) を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 7 】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、各病原菌の遺伝子特異的に増幅し、増幅産物の分子量が異なるように設計された各プライマーを混合したプライマーミックスを用いて遺伝子増幅操作を行い、増幅産物の分子量を測定することにより、容易に病原菌を検出し、同定できることを見出し、本発明を完成した。

【 0 0 0 8 】

すなわち、本発明は以下よりなる。

1. イチゴ組織または土壌を試料とし、試料中に混入可能性のある遺伝子を分析することによるイチゴの重要病害の検出方法であって、以下の工程を含むことを特徴とする検出方法：

- 1) イチゴの重要病害に関連する少なくとも 2 種以上の病原菌の遺伝子配列を各々特異的に増幅しうる複数のプライマーを用いて遺伝子増幅処理を行う工程；
- 2) 上記遺伝子増幅処理工程により得られた増幅産物の分子量を測定する工程；
- 3) 測定した分子量から、増幅産物に関連する病原菌を同定する工程。

2. 前記イチゴの重要病害が、炭疽病、疫病および / または萎黄病である前項 1 に記載の検出方法。

3. 前記イチゴの重要病害に関連する病原菌が、糸状菌から選択される少なくとも 2 種以上である、前項 1 または 2 に記載の検出方法。

4. 前記糸状菌が、グロメレラ (*Glomerella*) 属、コレトトリカム (*Colletotrichum*) 属、フィトフィトラ (*Phytophthora*) 属、フザリウム (*Fusarium*) 属のいずれかに属する前項 3 に記載の検出方法。

5. 複数のプライマーが、各病原菌のリボソーム RNA 遺伝子の ITS (internal transcribed spacer) 領域の部分を含む塩基配列を検出しうるプライマーである、前項 1 ~ 4 のいずれか 1 に記載の検出方法。

6. 前項 1 ~ 5 のいずれか 1 に記載の検出方法に使用する遺伝子増幅用プライマー。

7. 前項 6 に記載のプライマーであり、以下の 1) ~ 10) のいずれかに示す塩基配列、

10

20

30

40

50

並びに各塩基配列のうち、1～3個のヌクレオチドが置換、欠失、付加若しくは導入された塩基配列からなり、病原菌の遺伝子配列を特異的に増幅しうるプライマー機能を有するオリゴヌクレオチドから選択されるいずれかのオリゴヌクレオチドを含む、イチゴの重要病害検出用の遺伝子増幅用プライマー：

- 1) GTAGGTCTCCGCGACCCT (配列番号 1) ；
- 2) CCTAAACTCTGTTTCTATATGTAAC (配列番号 2) ；
- 3) TTCCTACCTGATCCGAGGTCA (配列番号 3) ；
- 4) GCCGGCCCCACCACGGGGA (配列番号 4) ；
- 5) AAGGGCCACGTGTGCCGTG (配列番号 5) ；
- 6) CTTCGGCCTGAGCTAGTAGCTTT (配列番号 6) ；
- 7) ATGCATACCGAAGTACACACACAT (配列番号 7) ；
- 8) CAATAGTTGGGGTCTTATTTGGC (配列番号 8) ；
- 9) ATGCATACCGAAGTACACATTAAG (配列番号 9) ；
- 10) ctatatgtaacttctgagtaaaacc (配列番号 10) 。

8 . プライマー機能を有する少なくとも2種のオリゴヌクレオチドを1対とし、以下のA)～E)のいずれかの組み合わせからなるオリゴヌクレオチドのセットであって、前項1～5のいずれか1に記載の検出方法に使用するイチゴの重要病害検出用の遺伝子増幅用プライマーセット：

A) 配列番号1に記載のオリゴヌクレオチド、または前記オリゴヌクレオチドのうち、1～3個のヌクレオチドが置換、欠失、付加若しくは導入された塩基配列からなるオリゴヌクレオチドのいずれかと、配列番号3に記載のオリゴヌクレオチド、または前記オリゴヌクレオチドのうち、1～3個のヌクレオチドが置換、欠失、付加若しくは導入された塩基配列からなるオリゴヌクレオチドのいずれかから選択される、2種のオリゴヌクレオチドの組み合わせ；

B) 配列番号4に記載のオリゴヌクレオチド、または前記オリゴヌクレオチドのうち、1～3個のヌクレオチドが置換、欠失、付加若しくは導入された塩基配列からなるオリゴヌクレオチドのいずれかと、配列番号5に記載のオリゴヌクレオチド、または前記オリゴヌクレオチドのうち、1～3個のヌクレオチドが置換、欠失、付加若しくは導入された塩基配列からなるオリゴヌクレオチドのいずれかから選択される、2種のオリゴヌクレオチドの組み合わせ；

C) 配列番号2に記載のオリゴヌクレオチド、または前記オリゴヌクレオチドのうち、1～3個のヌクレオチドが置換、欠失、付加若しくは導入された塩基配列からなるオリゴヌクレオチドのいずれかと、配列番号3に記載のオリゴヌクレオチド、または前記オリゴヌクレオチドのうち、1～3個のヌクレオチドが置換、欠失、付加若しくは導入された塩基配列からなるオリゴヌクレオチドのいずれかから選択される、2種のオリゴヌクレオチドの組み合わせ；

D) 配列番号8に記載のオリゴヌクレオチド、または前記オリゴヌクレオチドのうち、1～3個のヌクレオチドが置換、欠失、付加若しくは導入された塩基配列からなるオリゴヌクレオチドのいずれかと、配列番号9に記載のオリゴヌクレオチド、または前記オリゴヌクレオチドのうち、1～3個のヌクレオチドが置換、欠失、付加若しくは導入された塩基配列からなるオリゴヌクレオチドのいずれかから選択される、2種のオリゴヌクレオチドの組み合わせ；

E) 配列番号6に記載のオリゴヌクレオチド、または前記オリゴヌクレオチドのうち、1～3個のヌクレオチドが置換、欠失、付加若しくは導入された塩基配列からなるオリゴヌクレオチドのいずれかと、配列番号7に記載のオリゴヌクレオチド、または前記オリゴヌクレオチドのうち、1～3個のヌクレオチドが置換、欠失、付加若しくは導入された塩基配列からなるオリゴヌクレオチドのいずれかから選択される、2種のオリゴヌクレオチドの組み合わせ。

9 . 前項8のA)～E)のいずれかのオリゴヌクレオチドの組み合わせからなる遺伝子増幅用プライマーセットを、少なくとも2セット以上含む、イチゴの重要病害の検出用キッ

10

20

30

40

50

ト。

【発明の効果】

【0009】

本発明の検出方法によると、症状の似ているイチゴ重要病害について、簡便な操作で複数種の病原菌を同時に検査することができ、早期に検出し、同定することができる。検出に際し、従来の方法では病原菌を分離・培養することが必要であり、菌の形態を観察することを要するため、正確に判断するためには時間と熟練と菌の形態に関する深い知識が必要であったが、本発明の検出方法では、そのような経験が浅い場合でも、正確に検出し、同定することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明のイチゴの重要病害の検出方法は、イチゴ組織または土壌を試料とし、試料中に混入可能性のある遺伝子を分析することにより行われる。遺伝子の分析による検出方法は、少なくとも以下の工程を含む。

- 1) イチゴの重要病害に関連する少なくとも2種以上の病原菌の遺伝子配列を各々特異的に増幅しうる複数のプライマーを用いて遺伝子増幅処理を行う工程；
- 2) 上記遺伝子増幅処理工程により得られた増幅産物の分子量を測定する工程；
- 3) 測定した分子量から、増幅産物に関連する病原菌を同定する工程。

【0011】

上記において、本発明の検出方法は、イチゴの重要病害に起因する病原菌を同定するものであり、細菌、糸状菌、真菌やウイルスなど、遺伝子を有する病原菌に起因する重要病害に対して本発明の検出方法を適用することができる。特に、初期症状の似ているイチゴ重要病害としては、炭疽病、疫病および萎黄病が挙げられる。これらの重要病害は、いずれも糸状菌に起因するものである。糸状菌として、具体的には、グロメレラ(*Glomerella*)属、コレトリカム(*Colletotrichum*)属、フィトフィトラ(*Phytophthora*)属、フザリウム(*Fusarium*)属が挙げられ、より具体的には炭疽病菌である*Glomerella cingulata*および*Colletotrichum acutatum*、疫病菌である*Phytophthora nicotianae*および*Phytophthora cactorum*、並びに萎黄病菌である*Fusarium oxysporum*が挙げられる。

【0012】

本発明の検出方法に供する試料は、イチゴ組織または土壌から取得することができる。重要病害関連病原菌に感染可能性のあるイチゴ植物組織、またはイチゴ栽培に関連する土壌、例えばイチゴが過去、現在において栽培に供されている土壌若しくは今後供される可能性のある土壌を試料とし、これらの試料からDNAを抽出することで、本発明の検出方法に供することができる。試料からのDNAの抽出は、例えば、フェノール・クロロホルム法のような常法や、市販のDNA抽出キット(例えば、Nucleon PhytoPure™(Nucleon Bioscience社))を用いることができる。試料から抽出したDNAを検体として、本発明のプライマーを用い、遺伝子を増幅することができる。

【0013】

本発明の検出方法は、上記の病原菌の遺伝子配列を特異的に増幅しうる遺伝子増幅処理工程を含む。本発明における遺伝子増幅方法は、遺伝子を増幅可能であればよく、自体公知の増幅方法のいずれであっても良いし、今後開発される新たな増幅方法であっても良い。遺伝子増幅方法の例として、具体的にはポリメラーゼ連鎖反応法(PCR法、Science, 230:1350-1354, 1985)やLAM法(特開2001-242169号公報)等々と適用することができる。最も一般的で簡便な遺伝子増幅方法として、PCR法が挙げられる。

例えば、試料中に検出したい遺伝子の混入が極微量の場合は、微量の遺伝子であっても増幅可能な方法が好適である。PCR法の場合、例えばリアルタイムPCR法などの手法により、感度よく検出することができる。

【0014】

本発明の検出方法では、上記の病原菌のうち、2種以上の遺伝子配列を各々特異的に増幅しうる複数のプライマーを用いて、同時に遺伝子増幅処理を行うことを特徴とする。こ

10

20

30

40

50

ここで、2種以上とは、少なくとも2種であればよく、それ以上であっても良い。つまり、各遺伝子の配列を個々に増幅処理するのではなく、一度の増幅処理において少なくとも2種以上の遺伝子を増幅処理でき、得られた増幅産物から遺伝子の種類を特定できることが必要である。そのような機能を有する複数のプライマーとは、各遺伝子特異的に増幅しうる複数のプライマーで、同様の増幅条件、例えば温度条件、時間条件等を共通にして各遺伝子の増幅処理可能な複数のプライマーであることをいう。また、本発明の検査方法に使用しうるプライマーを用いることにより得られた増幅産物は、遺伝子ごとに異なる分子量のものが検出されることが必要である。具体的には、例えば Glomerella cingulata、Colletotrichum acutatum、Phytophthora nicotianae、Phytophthora cactorum、Fusarium oxysporum などから少なくとも2種、好ましくは5種の菌に各々特異的な遺伝子配列を増幅

10

【0015】

ここで、増幅される各遺伝子は、各病原菌特異的な配列を有する部分であることが必要である。特異的な配列を有する遺伝子としては、各病原菌のリボソームRNA（以下単に、「rRNA」という。）遺伝子が挙げられる。rRNAの遺伝子は、そのコピー数の多さによって、分子プローブターゲットとして使用するのに好適である。糸状菌のrRNA遺伝子は、ユニットとして組織化され、各ユニットは18S、5.8Sおよび26Sの3つの成熟したサブユニットをコードする。これらのサブユニットは、2つの内部転写スペーサーであるITS (internal transcribed spacer) 領域、すなわちITS IおよびITS IIに分離される。成熟したrRNA配列間の高い保存性にもかかわらず、非転写領域およびスペーサー領域の配列は、通常保存性が低いため、各菌種の検出のためのターゲット配列として好適である。本発明の検査方法に使用可能なプライマーは、特に各病原菌に特異的な配列を検出できればよく、具体的にはrRNA遺伝子のITS領域の部分を含む塩基配列を増幅できればよい。

20

【0016】

本発明の検出方法に使用可能な遺伝子増幅用プライマーは、具体的には以下の1)~10)のいずれかに示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドが挙げられる。さらには、各塩基配列のうち、1~3個のヌクレオチドが置換、欠失、付加若しくは導入された塩基配列からなり、病原菌の遺伝子配列を特異的に増幅しうるプライマー機能を有するオリゴヌクレオチドであってもよい。

30

- 1) GTAGGGTCTCCGCGACCCT (配列番号1)
- 2) CCTAAACTCTGTTTCTATATGTAAC (配列番号2)
- 3) TTCCTACCTGATCCGAGGTCA (配列番号3)
- 4) GCCGGCCCCACCACGGGGA (配列番号4)
- 5) AAGGGCCCACGTGTGCCGTG (配列番号5)
- 6) CTTCGGCCTGAGCTAGTAGCTTT (配列番号6)
- 7) ATGCATACCGAAGTACACACACAT (配列番号7)
- 8) CAATAGTTGGGGTCTTATTTGGC (配列番号8)
- 9) ATGCATACCGAAGTACACATTAAG (配列番号9)
- 10) ctatatgtaacttctgagtaaaacc (配列番号10)。

40

【0017】

反応系におけるプライマーの濃度は、所望のDNAが増幅しうる条件であれば良く、特に制限されないが、各プライマーは一般的には0.1~2 μ Mで使用することができ、特に約0.25~0.75 μ Mで使用することが好ましい。反応系に加えるTaqポリメラーゼは、たとえばタカラ社製 Ex taqのような、増幅効率の優れたものが望ましいが、通常のTaqポリメラーゼによっても遺伝子増幅反応のサイクルを増すことにより増幅されるDNA断片の量を増加させることができる。

【0018】

上記プライマーを用いた遺伝子増幅工程により得られた増幅産物は、上述したように病

50

原菌由来の遺伝子ごとに分子量が異なるため、遺伝子断片の分子量を測定することにより遺伝子の種類を同定することができる。増幅産物としての遺伝子断片分子量の測定方法は、特に限定されないが、例えば電気泳動法を用いるのが好適である。具体的には、アガロースゲル電気泳動法により増幅産物を分離し、エチジウムブロマイド等DNA染色試薬により染色し、検出することができる。

【0019】

試料中に所望の病原菌由来の遺伝子が存在していれば、上記のようにして増幅された遺伝子断片が検出され得る。検出限界は、用いるプライマーの種類および組み合わせ、試料中の対象遺伝子の量、増幅反応条件、検出方法などの種々の要因によって異なり得る。適切な条件を選択すれば、微量の試料においても、高感度で遺伝子の存在を検出することが

10

【0020】

本発明は、上記プライマーのほか、プライマー機能を有する少なくとも2種のオリゴヌクレオチドを1対としたプライマーセットにも及ぶ。ここでは、プライマーの組み合わせが2種のみのもをプライマーペアといい、2種以上のプライマーを含むものを包括的にプライマーセットという。

具体的には以下のA)～E)のいずれかの組み合わせからなるオリゴヌクレオチドのセットからなるイチゴの重要病害検出用の遺伝子増幅用プライマーセットが挙げられる。

【0021】

A) Glomerella cingulata特異的遺伝子検出用

20

配列番号1または前記オリゴヌクレオチドのうち、1～3個のヌクレオチドが置換、欠失、付加若しくは導入された塩基配列からなるオリゴヌクレオチドのいずれかと、配列番号3に記載のオリゴヌクレオチド、または前記オリゴヌクレオチドのうち、1～3個のヌクレオチドが置換、欠失、付加若しくは導入された塩基配列からなるオリゴヌクレオチドのいずれかから選択される、2種のオリゴヌクレオチドの組み合わせ。

【0022】

B) Colletotrichum acutatum特異的遺伝子検出用

配列番号4に記載のオリゴヌクレオチド、または前記オリゴヌクレオチドのうち、1～3個のヌクレオチドが置換、欠失、付加若しくは導入された塩基配列からなるオリゴヌクレオチドのいずれかと、配列番号5に記載のオリゴヌクレオチド、または前記オリゴヌクレオチドのうち、1～3個のヌクレオチドが置換、欠失、付加若しくは導入された塩基配列からなるオリゴヌクレオチドのいずれかから選択される、2種のオリゴヌクレオチドの組み合わせ。

30

【0023】

C) Fusarium oxysporum特異的遺伝子検出用

配列番号2に記載のオリゴヌクレオチド、または前記オリゴヌクレオチドのうち、1～3個のヌクレオチドが置換、欠失、付加若しくは導入された塩基配列からなるオリゴヌクレオチドのいずれかと、配列番号3に記載のオリゴヌクレオチド、または前記オリゴヌクレオチドのうち、1～3個のヌクレオチドが置換、欠失、付加若しくは導入された塩基配列からなるオリゴヌクレオチドのいずれかから選択される、2種のオリゴヌクレオチドの組み合わせ。

40

【0024】

D) Phytophthora nicotianae特異的遺伝子検出用

配列番号8に記載のオリゴヌクレオチド、または前記オリゴヌクレオチドのうち、1～3個のヌクレオチドが置換、欠失、付加若しくは導入された塩基配列からなるオリゴヌクレオチドのいずれかと、配列番号9に記載のオリゴヌクレオチド、または前記オリゴヌクレオチドのうち、1～3個のヌクレオチドが置換、欠失、付加若しくは導入された塩基配列からなるオリゴヌクレオチドのいずれかから選択される、2種のオリゴヌクレオチドの組み合わせ。

【0025】

50

E) *Phytophthora cactorum* 特異的遺伝子検出用

配列番号 6 に記載のオリゴヌクレオチド、または前記オリゴヌクレオチドのうち、1 ~ 3 個のヌクレオチドが置換、欠失、付加若しくは導入された塩基配列からなるオリゴヌクレオチドのいずれかと、配列番号 7 に記載のオリゴヌクレオチド、または前記オリゴヌクレオチドのうち、1 ~ 3 個のヌクレオチドが置換、欠失、付加若しくは導入された塩基配列からなるオリゴヌクレオチドのいずれかから選択される、2 種のオリゴヌクレオチドの組み合わせ。

【0026】

本発明は、イチゴの重要病害の検出用キットにも及ぶ。具体的には、上記 A) ~ E) のいずれかのオリゴヌクレオチドの組み合わせからなる遺伝子増幅用プライマーペアを、少なくとも 2 種以上含むキットが挙げられる。具体的には、上記 A) ~ E) で特定される 2 種のオリゴヌクレオチドからなるプライマーペアを 5 種含んでいてもよいし、例えば *Glomerella cingulata* および *Fusarium oxysporum* を検出するためのプライマーは、いずれも配列番号 3 に記載のオリゴヌクレオチドを用いることができるため、共用して用いることもできる。具体的には、配列番号 1 ~ 9 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーセットのキットとして用いることができる。

【実施例】

【0027】

以下、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。また、実施例においては、プライマーの塩基配列が特定されて示されているが、その塩基配列からなるオリゴヌクレオチドに 1 もしくは複数個の塩基が置換し、欠失し、挿入し、あるいは付加されたオリゴヌクレオチドであって、DNA 増幅反応に供されることによって、特定のイチゴ重要病害に係る菌の DNA を特異的に検出するプライマーもまた、本発明の範囲に含まれることはいうまでもない。

【0028】

(実施例 1) プライマーミックスの調製 1

1) 試料

試料としてイチゴに病原性を持つ培養菌株 5 種 (*Glomerella cingulata*, *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora nicotianae*, *Phytophthora cactorum*) および実験的にこれらの菌に病気に感染させたイチゴ苗を用いた。更に徳島県内のイチゴ栽培農家から病原菌に感染したと思われるイチゴ苗 28 株を入手し、実験に用いた。

【0029】

2) 試料からの DNA の抽出

DNA の抽出に、植物 DNA 抽出キット Nucleon PhytoPure™ (Nucleon Bioscience 社) を用いた。操作はマニュアルに従って次のような手順で行った。

上記 5 種の病原菌の培養菌株を寒天プレート上に培養し、菌叢をヘラで約 25 mg 掻き取り、乳鉢中で蒸留水 1000 μL を加え、氷温で組織をすり潰した。上記キットに含まれる試薬 1 (reagent1) を 1500 μL 加え、乳鉢でさらにすり潰した後、700 μL を採取し、マイクロチューブに移した。マイクロチューブ中の細胞破碎液に、上記キットに含まれる試薬 2 (reagent2) を 200 μL 加え、上下をよく反転し混合後、アルミバス中 65

で 20 分間保温し、2 - 3 分ごとによく振って撹拌した。その後、氷中で 20 分間静置し、-20 の冷クロロホルム 500 μL と上記キットに含まれる上記キットに含まれる精製試薬 (Nucleon PhytoPure resin) を 100 μL 加え、室温で 10 分間上下を反転させながら混合した。5000 rpm で遠心し、上層 (DNA 層) を滅菌済の新しい 1.5 mL チューブに移した。冷イソプロパノールを 600 μL 加えて、撹拌して DNA を析出させた。DNA のペレットを得るため、12000 rpm で 10 分間遠心し、上清を捨てた。70% エタノールを 300 μL 加え、再び 12000 rpm で 5 分間遠心し、上清を廃棄した。沈殿物を真空ポンプで 2 分間真空状態に置き、DNA を含む沈殿物を乾燥させた。乾燥した沈殿物は 50 μL の × 0.1 TE 緩衝液を加えてピペティングにより溶解した後、-20 で保存した。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 0 】

イチゴ苗に関しては、苗の組織（葉、クラウン）0.15 g をはさみで細かく切り、上述と同様の操作を行い、DNA を抽出した。

【 0 0 3 1 】

3) プライマーの作製

上記5種の菌種の遺伝子を、一度の遺伝子増幅処理（マルチプルPCR）で検出するように、プライマーを設計した。各プライマーは、各菌種特異的な遺伝子の配列部分を増幅可能であり、かつ、得られた増幅産物の分子量が異なるように考慮して設計した（図2参照）。

【 0 0 3 2 】

プライマーの設計にあたり、NCBIのデータベースに登録されている既知の配列を参考にした。1種類の菌につき、ヌクレオチド数が一番長い配列を抜粋し、解析ソフトウェアClustalXによりアライメントし、rRNA 遺伝子のITS IおよびITS IIの2領域上に菌特異的プライマーを設計した（表1）。各菌種の遺伝子を検出するためのプライマーペアを表2に示した。このとき、フォワードプライマーとリバースプライマーとで挟まれた配列の長さが、個々に異なるよう留意した（表2、図2）。プライマーとして利用されるオリゴヌクレオチドは、日本遺伝子研究所（仙台市）に受託して合成した。

【 0 0 3 3 】

【表1】

プライマー名	配列(5'→3')	配列番号	塩基数	Tm 値(°C)
Gcin1	GTAGGGTCTCCGCGACCCCT	1	19	62.5
FoxyF6	CCTAAACTCTGTTTCTATATGTAAC	2	25	53.9
FGC-R	TTCCTACCTGATCCGAGGTCA	3	21	58.5
Cacu1-1	GCCGGCCCCACCACGGGGA	4	19	69.0
CacuR1	AAGGGCCCACGTGTGCCGTG	5	20	66.3
Pcac1	CTTCGGCCTGAGCTAGTAGCTTT	6	23	60.5
PcacR1	ATGCATACCGAAGTACACACACAT	7	24	57.1
PnicF2	CAATAGTTGGGGTCTTATTTGGC	8	24	58.8
PnicR1	ATGCATACCGAAGTACACATTAAG	9	24	55.3

【 0 0 3 4 】

【表2】

対象の糸状菌	プライマーペア		増幅産物の長さ (bp)
<i>G. cingulata</i>	Gcin1 (配列番号1)	FGC-R (配列番号3)	453
<i>C. acutatum</i>	Cacu1-1 (配列番号4)	CacuR1 (配列番号5)	304
<i>F. oxysporum</i>	FoxyF6 (配列番号2)	FGC-R (配列番号3)	382
<i>P. nicotianae</i>	PnicF2 (配列番号8)	PnicR1 (配列番号9)	761
<i>P. cactorum</i>	Pcac1 (配列番号6)	PcacR1 (配列番号7)	659

【 0 0 3 5 】

4) DNA 量の確認

上記2により抽出、精製したDNA 溶液中のDNA 収量を測定するため、既知濃度のマーカーDNA とともに電気泳動を行い、染色後のバンドの発色を比較して、DNA 濃度を計算した。DNA 溶液8 μL に染色液（0.25% Bromophenol blue (BPB)、40% スクロース、100 mM EDTA）を2 μL 加え、電気泳動を行った。マーカーDNA とし

10

20

30

40

50

て、制限酵素Hind IIIで消化した DNA (0 . 2 5 μ L / 1 0 μ L) を 1 0 μ L 添加した。電気泳動装置はMupid^(R)-2 (コスモ・バイオ、東京) を使い、 2 . 0 % のアガロースゲル、 1 \times T A E 緩衝液中を 5 0 V で 8 0 分泳動することにより、 DNA 断片を展開した。アガロースは、核酸電気泳動用アガロース (Agarose for 1Kbp fragment (ナカライテスク、京都市)) を使用した。泳動終了後、 1 0 0 m L の蒸留水に 5 m g / m L のエチジウムブロマイド (E B) を 1 2 μ L 加えた染色液にゲルを移し、 3 0 分おいて染色した。染色後、UVP Ultraviolet Transilluminator TDM-20 (UVP, Inc., Uoland, CA, USA) により紫外線を照射し、写真撮影した。

【 0 0 3 6 】

5) 遺伝子増幅 (P C R 法)

P C R 法による遺伝子増幅はPuReTaq Ready-To-Go PCR Beads in strips (Amersham BioScience, Inc, Piscataway, NJ, USA) を使用し、サーマルサイクラーは、TaKaRa PCR Thermal Cycle Dice TP600 Gradient/TP650 Standard (タカラバイオ) を用いて行った。検体の調製は以下の手順で行った。

【 0 0 3 7 】

上記 3) で作製した各プライマーについて、各々 2 . 5 p m o l / μ L (2 . 5 μ M) に希釈したプライマー溶液を作製し、反応液中で 1 / 1 0 量となるようにした。ただし、CacuR1のみ他のプライマーよりも 3 倍の濃度にして混合した。プライマー溶液に滅菌水を加え、各プライマーの最終濃度が 0 . 2 5 μ M となるようにした。ただし、プライマー-CacuR1のみ最終濃度 0 . 7 5 μ M となるようにした。

各菌に対応する 1 対のプライマーペアおよびすべてのプライマーを混合したプライマーミックス溶液を、上記濃度に従い作製した。

【 0 0 3 8 】

P C R 用マイクロチューブ (PuReTaq Ready-To-Goシリーズ、G E ヘルスケア社) に、プライマー溶液、および上記 2) で抽出した DNA を加え、さらに反応液が 2 5 μ L となるように滅菌水を加えて混合し、P C R を行った。

各菌種の DNA は、各々個別に P C R を行う他、5 種をすべて混合した DNA 溶液を作製して P C R を行った。

【 0 0 3 9 】

サーマルサイクラーで変性過程を 9 4 $^{\circ}$ C で 5 分を 1 回、次に変性過程を 9 4 $^{\circ}$ C で 3 0 秒、アニーリングを 5 5 $^{\circ}$ C または 5 3 $^{\circ}$ C で 3 0 秒、伸長反応を 7 2 $^{\circ}$ C で 3 0 秒のサイクルを 3 5 回繰り返し、その後、伸長反応を 7 2 $^{\circ}$ C で 7 分を 1 回行った後 4 $^{\circ}$ C に冷却して終了させた。

【 0 0 4 0 】

6) アガロース電気泳動

P C R 後のアガロース電気泳動は、核酸電気泳動用アガロース (Agarose for 50-800bp fragment (ナカライテスク、京都市)) を使い、 1 . 0 % の濃度で行った以外は 4) と同手法により行った。電気泳動後、同様に E B 染色し、写真撮影した。

【 0 0 4 1 】

上記電気泳動の結果を図 3 に示した。各病原菌検出用のプライマーペアを単独で用いて P C R を行ったときに検出された位置と、プライマーミックスを用いて P C R を行った場合に、各病原菌由来遺伝子の増幅部位 (バンド) は、各々同じ位置に認められた。このことから、プライマーミックスを用いた一度の増幅処理により、各病原菌の検出が可能であることが確認された。

【 0 0 4 2 】

(実施例 2) 4 種のイチゴ苗についての病原菌の検査

イチゴ栽培農家から得た重要病害の可能性のある 2 8 のイチゴの苗のうち 4 つ (苗番号 3 , 2 7 , 9 , 1 1) について、実施例 1 で作製したプライマーミックスを用いて、P C R 法により、5 種 (Glomerella cingulata , Colletotrichum acutatum , Fusarium oxysporum , Phytophthora nicotianae , Phytophthora cactorum) の病原菌の検出を行った。 D

10

20

30

40

50

NAの抽出、PCR条件および電気泳動の手法は、上記実施例1と同手法により行った。

【0043】

上記電気泳動の結果を図4に示した。苗番号3はFusarium oxysporum、株番号27はGlomerella cingulataに感染していることが確認された。苗番号9はFusarium oxysporumおよびGlomerella cingulataに感染していることが確認された。苗番号11については、Phytophthora nicotianae、Glomerella cingulataおよびColletotrichum acutatumに感染していることが確認された。

【0044】

(実施例3) 土壌中の病原菌の検査

萎黄病を発病したイチゴ苗を栽培したときの土壌について、実施例1で作製したプライマーミックスを用いて、PCR法により、5種(Glomerella cingulata, Colletotrichum acutatum, Fusarium oxysporum, Phytophthora nicotianae, Phytophthora cactorum)の病原菌の検出を行った。

【0045】

土壌試料からのDNAの抽出は、以下のとおりに行った。土を0.2g秤量し、マイクロチューブに入れた。DNA抽出キットNucleon PhytoPure™(Nucleon Bioscience社)に含まれる試薬1(reagent1)を600μL、試薬2(reagent2)を200μL加えてから超音波細胞破砕装置Bio-ruptor UCD-200™(バイオラッド社)で10分処理して細胞を破砕した。その後、アルミバス中65℃で20分間保温し、実施例1に記載と同手法によりDNAを抽出した。

【0046】

PCR条件は、サイクルを100回繰り返したほかは、実施例1と同条件で行い、その後の電気泳動の手法も、実施例1と同様に行った。

【0047】

上記電気泳動の結果、土壌試料中に、萎黄病菌Fusarium oxysporumが検出され、イチゴ苗で発病した病原菌が土壌においても確認された。その他、Colletotrichum acutatumと不明のバンドが検出された(図5)。

【0048】

(実施例4) プライマーミックスの調製2

Fusarium oxysporumの検出のためのプライマーとして、FoxyF6(配列番号2)のかわりに以下に示すプライマー(FoxyF2)を用いたほかは、実施例1に記載の方法と同手法によりPCR法により病原菌の検出を行い、電気泳動を行った。本実施例で用いた各プライマーの位置を図6に示した。Fusarium oxysporumの検出のためのプライマーとして、FoxyF2およびFGC-Rを用いた場合の増幅産物の長さは368bpである。

FoxyF2 ctatatgtaacttctgagtaaaacc (配列番号10)

【0049】

上記電気泳動の結果を図7に示した。各病原菌検出用のプライマーペアを単独で用いてPCRを行ったときに検出された位置と、プライマーミックスを用いてPCRを行った場合に、各病原菌由来遺伝子の増幅部位(バンド)は、各々同じ位置に認められた。このことから、プライマーミックスを用いた一度のPCRにより、各病原菌の検出が可能であることが確認された。

【0050】

(実施例5) 5種のイチゴ苗についての病原菌の検査

イチゴ栽培農家から得た重要病害の可能性のある28のイチゴの苗のうち5つ(苗番号22, 23, 1, 9, 6)について、実施例4で作製したプライマーミックスを用いて、5種(Glomerella cingulata, Colletotrichum acutatum, Fusarium oxysporum, Phytophthora nicotianae, Phytophthora cactorum)の病原菌の検出を行った。DNAの抽出、PCR条件および電気泳動の手法は、上記実施例1と同手法により行った。

【0051】

上記電気泳動の結果を図8に示した。苗番号22および23はFusarium oxysporum、苗

10

20

30

40

50

番号1はGlomerella cingulataに感染していることが確認された。苗番号9は、実施例2の結果と同様に、Fusarium oxysporumおよびGlomerella cingulataに感染していることが確認されたほか、上記5種で検出される以外の場所にもバンドの検出が認められた。また、苗番号6については、Glomerella cingulataに感染しているほか、同様に上記5種で検出される以外の場所にも3種類のバンドの検出が認められた。

【産業上の利用可能性】

【0052】

以上詳述したように、本発明の検出方法によると、症状の似ているイチゴ重要病害について、簡便な操作で同時に検査することができ、早期に正確に病原菌を同定することができる。また、試料中に病原菌に起因する遺伝子が微量にしか混入していない場合であっても、本発明の方法によれば感度良く検出し、同定することができる。

10

【0053】

このため、イチゴの重要病害については、熟練を要することなく一度の検査で早期に病原菌の検出が可能となり、早期に病原菌を同定することにより、早期に各重要病害に対する対策を講じることができる。早期に対策を講じることにより、イチゴ農家の被害の拡大防止を早期に図ることができる。さらには、イチゴ栽培のための土壌についても本発明の検出方法を用いて病原菌の検査を行うことで、発病前や栽培前であっても病原菌の感染のリスクを排除することができる。さらには、イチゴを栽培した後に土壌を再利用する場合にも、重要病害の病原菌について評価することができ、経済的に非常に大きな効果が期待される。

20

【0054】

また、本発明の検出方法は、培養操作を要しないため、培養のための特別の実験施設も必要としないことから、汎用が可能である。このことから、非常に経済効果が大きい。

【0055】

さらに、本発明の検出方法に使用可能なプライマーセットや検出キットを用いると、一定の基準に基づき菌の同定を行うことができ、より正確な検査が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0056】

【図1】イチゴ栽培の流れと重要病害の防除方法を示す図である。

【図2】各病原菌の遺伝子を検出するために設計したプライマーの位置を示す図である。

30

(実施例1)

【図3】設計したプライマーを、1種の菌検出用にプライマーペアとしたもの、または5種の菌検出用にプライマーミックスとしたものを用いてPCRを行ったときの増幅産物の電気泳動結果を示す図である。(実施例1)

【図4】実施例1で用いたプライマーミックスを用いて、農家からの持ち込みイチゴ株について分析した結果を示す図である。(実施例2)

【図5】実施例1で用いたプライマーミックスを用いて、土壌について分析した結果を示す図である。(実施例3)

【図6】各病原菌の遺伝子を検出するために設計したプライマーの位置を示す図である。

(実施例4)

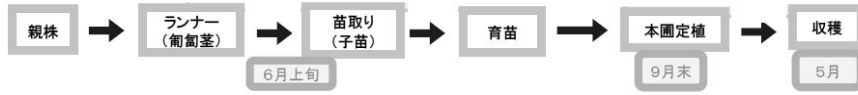
40

【図7】設計したプライマーを、1種の菌検出用にプライマーペアとしたもの、または5種の菌検出用にプライマーミックスとしたものを用いてPCRを行ったときの増幅産物の電気泳動結果を示す図である。(実施例4)

【図8】実施例4で用いたプライマーミックスを用いて、農家からの持ち込みイチゴ株について分析した結果を示す図である。(実施例5)

【 図 1 】

イチゴ栽培の流れ



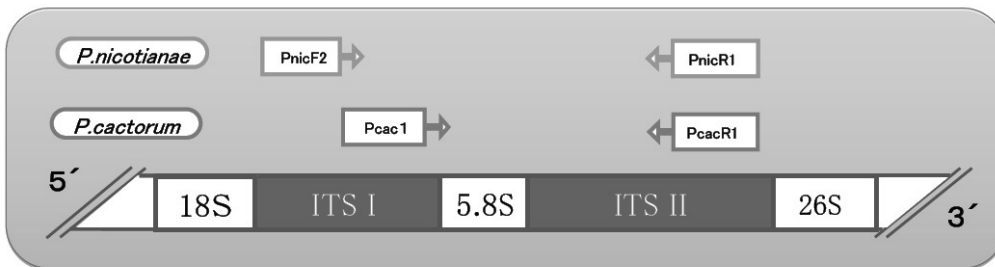
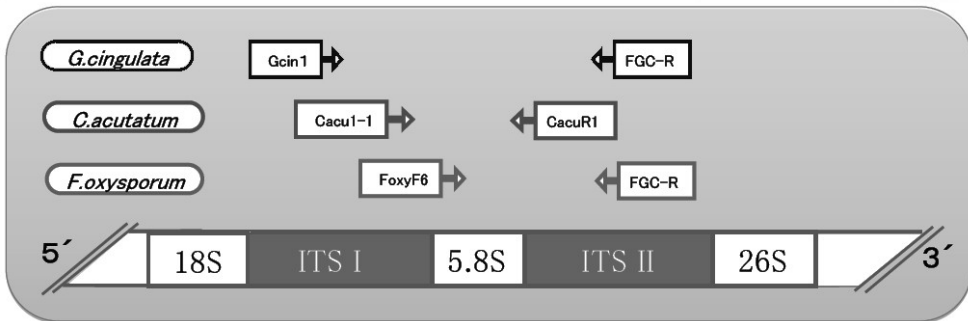
病気の防除法

炭疽病	育苗圃の土壤消毒		農薬		その他		本圃の土壤消毒		農薬		その他	
	予防として有効	・挿し芽前の苗をベンレートに浸ける ・育苗期にセイビアー、アントラコール、ゲッター、テラン等の散布	・窒素を抑える ・風通しをよくする ・水やりをソフトに	予防として有効	・定植前にベンレートに浸ける ・定植後にベンレートを灌注 ・定植後にセイビアー、ゲッターの散布	排水対策						
萎黄病	予防として有効	・挿し芽前の苗をベンレートに浸ける	・本葉2-3枚展開時に苗を切り離す	予防として有効								
疫病	予防として有効	・育苗期にランマンを灌注	・水やりをソフトに	予防として有効		排水対策						

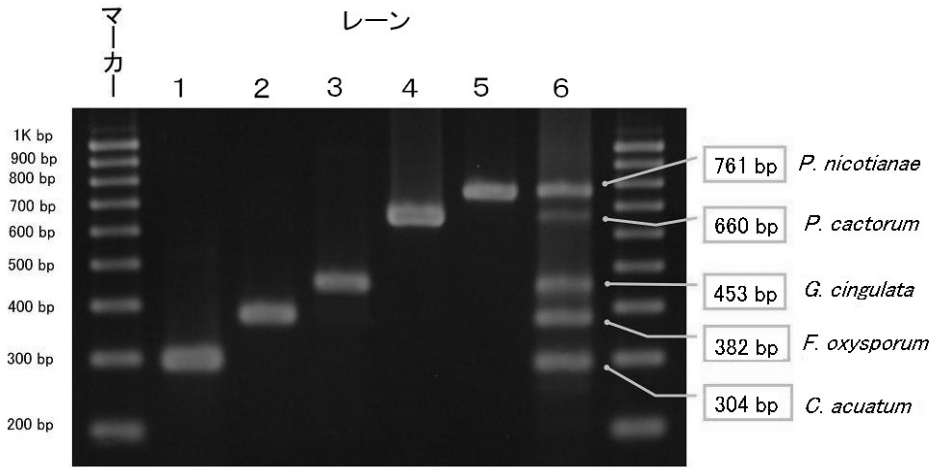
病気により対策が異なり、早期診断・早期対策が被害の拡大防止に繋がる

【 図 2 】

設計したプライマーの位置 (実施例1)



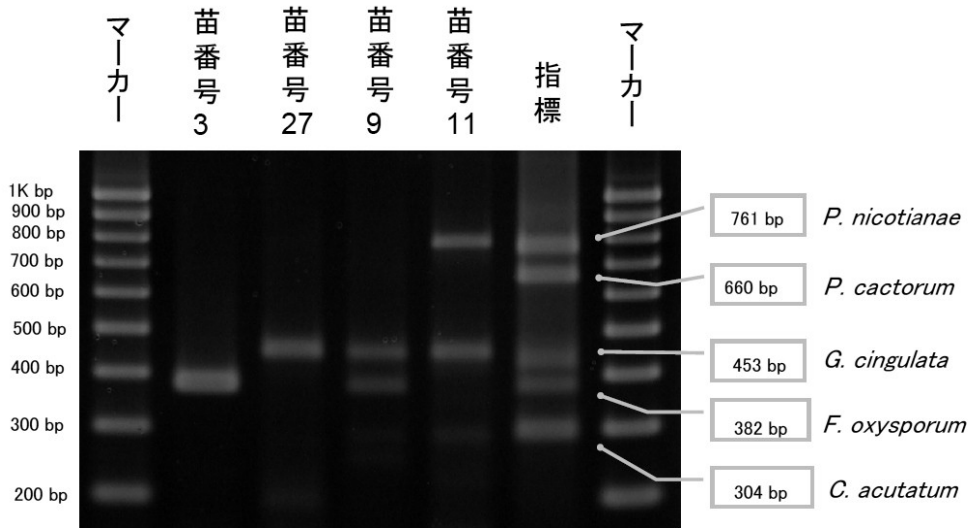
【 図 3 】



培養菌株DNAを用いたプライマーの有効性の確認

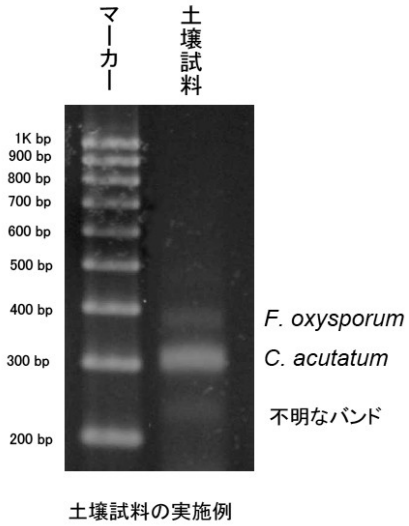
- レーン1: *C. acutatum* (Cacu1-1 & CacuR1)
- レーン2: *F. oxysporum* (FoxyF6 & FGC-R)
- レーン3: *G. cingulata* (Gcin1 & FGC-R)
- レーン4: *P. cactorum* (Pcac1 & PcacR1)
- レーン5: *P. nicotianae* (PnicF2 & PnicR1)
- レーン6: 菌5種類(プライマー9種類)

【 図 4 】



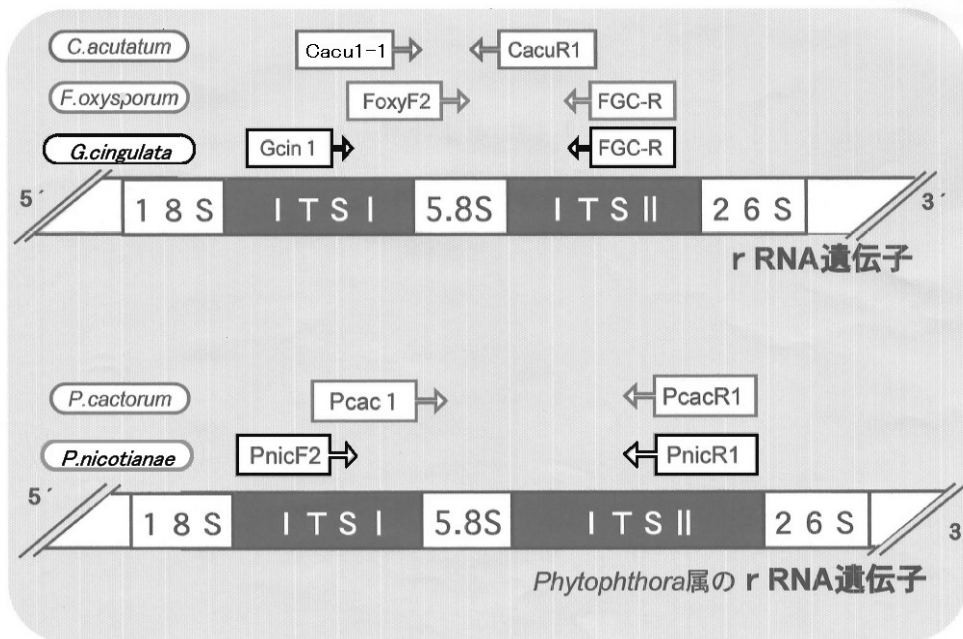
農家持ち込み苗の診断結果

【 図 5 】

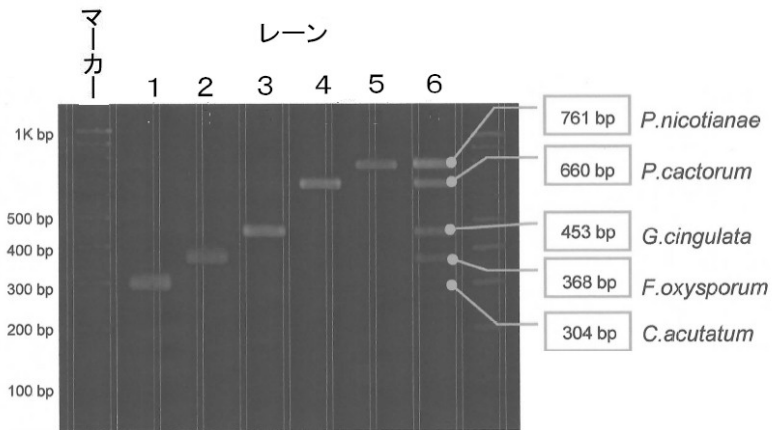


【 図 6 】

設計したプライマーの位置 (実施例4)

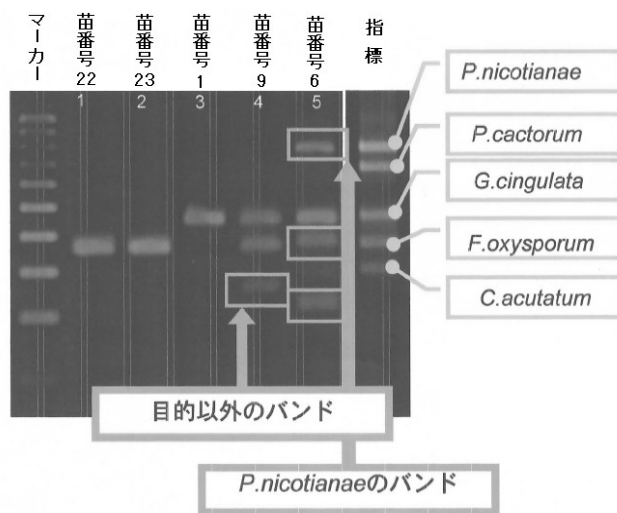


【 図 7 】



レーン1: *C. acutatum* (Cacu1-1 & CacuR1)
 レーン2: *F. oxysporum* (FoxyF2 & FGC-R)
 レーン3: *G. cingulata* (Gcin1 & FGC-R)
 レーン4: *P. cactorum* (Pcac1 & PcacR1)
 レーン5: *P. nicotianae* (PnicF2 & PnicR1)
 レーン6: 菌5種類(プライマー9種類)

【 図 8 】



【 配列表 】

[0005522820000001.app](#)

フロントページの続き

- (72)発明者 佐藤 征弥
徳島県徳島市南常三島町1-1 国立大学法人徳島大学総合科学部自然システム学科生命科学講座内
- (72)発明者 広田 恵介
徳島県吉野川市鴨島町鴨島88 徳島県立農林水産総合技術支援センター試験研究部内
- (72)発明者 向井 真紀子
徳島県徳島市南常三島町1-1 国立大学法人徳島大学総合科学部自然システム学科生命科学講座内

審査官 木原 啓一郎

- (56)参考文献 徳島生物学会会報, 2007年11月23日, Vol.60, No.2, p.9, URL, <http://web.ias.tokushima-u.ac.jp/life/TBC/2007-2.swf>
植物防疫, 2008年3月1日, Vol.62, No.3, p.26-29
九州病害虫研究会報, 2006年11月10日, Vol.52, p.11-17

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/68

C12N 15/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CPlus/REGISTRY(STN)