

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6122437号
(P6122437)

(45) 発行日 平成29年4月26日(2017.4.26)

(24) 登録日 平成29年4月7日(2017.4.7)

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

請求項の数 35 (全 31 頁)

(21) 出願番号	特願2014-537021 (P2014-537021)	(73) 特許権者	510318435
(86) (22) 出願日	平成24年9月28日 (2012.9.28)		グラスランツ テクノロジー リミテッド
(65) 公表番号	特表2014-531911 (P2014-531911A)		ニュージーランド国, パーマストーン ノー
(43) 公表日	平成26年12月4日 (2014.12.4)		ス 4 4 7 4, テネント ドライブ
(86) 国際出願番号	PCT/NZ2012/000173	(74) 代理人	100079108
(87) 国際公開番号	W02013/077747		弁理士 稲葉 良幸
(87) 国際公開日	平成25年5月30日 (2013.5.30)	(74) 代理人	100109346
審査請求日	平成27年8月7日 (2015.8.7)		弁理士 大貫 敏史
(31) 優先権主張番号	61/548, 438	(74) 代理人	100117189
(32) 優先日	平成23年10月18日 (2011.10.18)		弁理士 江口 昭彦
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100134120
前置審査			弁理士 内藤 和彦
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 生存可能な内生菌検出

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

植物中の生存可能な真菌類の内生菌の存在を検出する方法であって、前記方法は、前記植物由来の幼葉またはその抽出物中で真菌類の内生菌の存在を検出するステップを含んでなり、前記幼葉または抽出物中の前記真菌類の内生菌の存在の検出が、前記植物中の生存可能な真菌類の内生菌の存在を示し、前記内生菌が、特定の内生菌種または株の存在を同定する方法によって検出され、前記真菌類の内生菌のリボソーム反復領域の遺伝子間領域 (I G S) の種特異的または株特異的部分とハイブリダイズする少なくとも 1 つのプライマーが、前記内生菌の保存を検出する P C R ベースの方法で使用される、方法。

【請求項 2】

前記幼葉が、前記植物種子の発芽後に、前記植物から生じる最初の 5 葉の内の 1 枚である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記幼葉が、前記植物種子の発芽後に、前記植物から生じる第 1 葉である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記幼葉が、前記植物種子の発芽後 4 週間以内に生じる、植物苗由来の葉である、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記幼葉が、前記植物種子の発芽後 1 4 日未満に生じる、植物苗由来のものである、請

10

20

求項 1～4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記幼葉が、前記葉を子葉鞘から分離するのに十分に成長した苗由来のものである、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記方法で使用する前に、前記幼葉を切除して、それを前記植物のその他の組織または器官から実質的に分離する、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記方法で使用する前に、前記幼葉を切除して、それを前記植物の子葉鞘から、ならびにその他の組織または器官から、実質的に分離する、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 9】

前記方法で使用する前に、前記幼葉を切除して、それを前記植物の子葉鞘およびあらゆる付着種子から、ならびにその他の組織または器官から、実質的に分離する、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記 PCR ベースの方法が、定量的 PCR またはリアルタイム PCR である、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記 PCR ベースの方法が、高分解能融解 (HRM) リアルタイム PCR である、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 12】

PCR が、前記内生菌中の核酸とハイブリダイズするプライマーを使用して実施される、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記検出が、前記特定の内生菌種または株に対して特異的である、請求項 1～12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記 PCR ベースの方法で使用される 1 つまたは複数のプライマーが、前記検出される株に対して特異的であり、増幅産物の存在または不在が、前記内生菌の存在または不在を示す、請求項 1～13 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 15】

前記検出が、前記検出される種または株に対して特異的であり、特性が、前記増幅産物のサイズによって定まる、請求項 10～12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記検出が、前記検出される種または株に対して特異的であり、特異性が、前記増幅産物生成の動態によって定まる、請求項 10～12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記特異性が、前記増幅産物の融解プロファイルによって定まる、請求項 16 に記載の方法。

40

【請求項 18】

異なる内生菌種または株中において、前記プライマーがハイブリダイズする配列の違いの結果として、異なる融解プロファイルが異なる種および株中で生じる、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記植物を前記方法で使用する前に、前記幼葉中の菌糸生体量を最大化する条件下で、前記植物の種子を発芽させる、請求項 1～18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記植物を前記方法で使用する前に、最初の出葉の中の前記種子中の菌糸生体量を最大化する条件下で、前記種子を発芽させる、請求項 1～18 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 2 1】

前記種子を 1 8 ～ 2 6 ℃ の温度範囲で発芽させる、請求項 1 9 または 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記種子を約 2 2 ℃ で発芽させる、請求項 1 9 または 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記種子を 1 6 / 8 時間の明 / 暗周期で発芽させる、請求項 1 9 または 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 4】

種子を 1 2 / 1 2 時間の明 / 暗周期で発芽させる、請求項 1 9 または 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記内生菌の存在が、前記幼葉の抽出物中で検出される、請求項 1 ～ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記方法が、前記幼葉から抽出物を調製するステップを含む、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記方法が、前記幼葉を切除するステップを含む、請求項 1 ～ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記幼葉を切除するステップと、抽出物を作成するステップとを含む、請求項 1 ～ 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記方法が、前記種子を発芽させるステップと、前記幼葉を切除するステップとを含む、請求項 1 ～ 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記方法が、前記種子を発芽させるステップと、前記幼葉を切除するステップと、抽出物を作成するステップとを含む、請求項 1 ～ 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 1】

種子バッチをスクリーニングして、前記バッチ中にどの内生菌種、株(strain)、または株(strains)が存在するかを評価するために使用される、請求項 1 ～ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2】

より大きなバッチから小さな種子サンプルを取り、前記小さなサンプルからの前記種子の発芽後に、幼葉に前記方法を実施する、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記小さなサンプル中の特定種または株の生存可能な内生菌を含有する種子の割合または百分率を測定するための請求項 3 1 に記載の方法の使用であって、前記大きなバッチ中の生存可能な内生菌を含有する種子の割合または百分率を推定するための使用。

【請求項 3 4】

請求項 3 1 または 3 2 に記載の方法の使用であって、前記大きなバッチ中の生存可能な汚染内生菌を含有する種子の割合または百分率を推定するための使用。

【請求項 3 5】

少なくとも 1 つのステップが自動化されている、請求項 1 ～ 3 2 のいずれか一項に記載の方法、あるいは請求項 3 3 または 3 4 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

技術分野

10

20

30

40

50

本発明は、牧畜農業の分野にある。本発明は、草本植物中の生存可能な内生菌を検出する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

背景技術

真菌類の内生菌は、いくつかの温帯気候草種に感染する。内生菌はアルカロイド類を産生し得て、アルカロイド類は、植物であってそれらがその中で天然に産生される植物に、ある程度の害虫防除と、場合によっては病害防除をもたらすと考えられている (Rowan and Latch, 1994)。さらに少なくともいくつかの内生菌の存在は、牧草地における選択された牧草の競合的持続性に不可欠なこともある (Fletcher and Easton, 2000)。

10

【0003】

しかし牧畜農業生産で使用される改良牧草栽培品種の、優勢な天然内生菌による感染の多くはまた、このような牧草を食む動物に重大な障害も引き起こす。このような障害の例としては、オニウシノケグサ中毒症 (Stuedemann and Hoveland, 1988) およびライグラススタグガー (Fletcher et al., 1999) が挙げられる。これらの病状は、一連の植物成長条件下で生成するアルカロイドに対する、動物の複雑な中毒反応の結果である。このような動物中毒症のために、牧畜農業システムに重大な経済的損失が生じ得る。

【0004】

牧草系統は、望ましいアルカロイドのみを産生する、選択された有益内生菌によって人工的に感染させ得る。内生菌の純粋培養物を使用して牧草の苗を感染させ、最初は無菌条件下で栽培し、次にそれを望ましい性質について選択し、商業用途のために増殖させ得る。

20

【0005】

この技術の3つの顕著な例である、ENDOSAFE (商標) 内生菌を用いたGREENSTONE (商標) 四倍体交配種ライグラス (ニュージーランド国特許第233083号) ; A R 1 内生菌を用いた様々な多年生および交配種ライグラス (Fletcher and Easton, 2000) ; およびMaxQ (登録商標) 内生菌を用いたオニウシノケグサ栽培品種 (米国特許第6, 111, 170号) が、AgResearch LtdのGrasslands事業部によって開発されている。

【0006】

商業生産のために有益内生菌株を用いて種子を調製する場合、種子バッチが、別の混入した潜在的に有害な内生菌株を含有する可能性がある。したがってこのような種子バッチおよび／または親材料の内生菌内容 (有益および／または非有益) を検査するのに利用できる手段を有することが、重要である。これに加えて、もしあれば存在する内生菌が生存可能であり、植物と共に成長して、安定した共生を形成できるかどうかを知ることが重要である。

30

【0007】

内生菌の存在について、植物組織および種子を検査する、様々な方法が開発されている。

【0008】

アニリンブルーなどの化合物による組織学的染色を用いた顕微鏡検査などのいくつかの方法は、内生菌の存在を検出するだけであり、内生菌種または株を容易に同定せず、確実に同定しない。これに加えて、顕微鏡検査を使用する現行のアプローチは、生存可能な内生菌と生存不能な内生菌とを区別しない。

40

【0009】

モノクローナル抗体キットを使用して、どのアルカロイドが生成されているのかを判定することで、存在する内生菌のタイプを肉眼レベルで示し得る。しかしこのようなキットは、実際の菌種または株を判定できない。

【0010】

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を使用して、存在する内生菌株と関連付けし得る、内生菌によって産生された毒性アルカロイドを定量化し得る。しかしこの場合もや

50

はり、この方法は、生存可能な内生菌と生存不能な内生菌とを区別しない。

【0011】

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）などの核酸法が、草の種子および植物組織中の特定菌株の存在を検出するのに使用されているが、現行のアプローチは感度を欠いており、内生菌の存在について検査し得る前に、植物を適切な成長段階に栽培するまで、かなり長時間を要する。さらに現行の方法は、生存不能な内生菌と生存可能な内生菌とを区別しない。

【0012】

イソ酵素を使用して内生菌をプロファイルし得るが、この場合も、この方法は、生存可能な内生菌と生存不能な内生菌とを区別しない。

【0013】

生存可能な内生菌の存在を検出する現行の業界標準法は、生存度を確認するために、生きた内生菌が宿主植物組織の外まで成長して、純培養培地上に到達することを要する。次に酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）（Enzyme Linked Immunosorbant Assay）が典型的に使用されて、アルカロイドプロファイルに基づいて汚染百分率が測定され、ウエスタンブロット（タンパク質免疫ブロット）解析技術を使用して、内生菌の存在または不在が判定される。この方法は、大きな労働力を要し、時間もかかる。さらにこのような血清学的方法は、類似したアルカロイドプロファイルを生じる内生菌株を区別できないことが多い。

【0014】

したがって目下利用できる方法の多くは、時間がかかり、費用もかかる。方法のいくつかは感度もまた欠いており、および／または種子から結果までの迅速な所要時間で複数サンプルをスクリーニングするのに適さない。さらに考察されるように、このような方法の多くは、生存可能な内生菌と生存不能な内生菌の存在を区別できない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

先行技術に付随する困難さの1つまたは複数を克服する、植物中の生存可能な内生菌の存在を検出する方法を提供すること、および／または少なくとも有用な選択肢を公共に提供することが、本発明の目的である。

【課題を解決するための手段】

【0016】

発明の概要

出願人らは、植物中で生存可能な内生菌の存在を検出する迅速な方法を発明した。本発明の方法を使用して、発芽植物の第1葉中の内生菌の存在を検出することにより、生存不能な内生菌を含有する植物とは対照的に、生存可能な内生菌を含有する植物を迅速に同定することが可能である。方法は、生存可能な有益内生菌と、あらゆる生存可能な汚染内生菌の双方の初期同定を可能にする。

【0017】

本発明の方法は、種子バッチサンプルからの発芽苗などの植物組織を（手動または自動工程のいずれかで）検査して、特定の生存可能な有益内生菌および／または生存可能な非有益内生菌の菌種と菌株の存在を判定するのに適している。したがって本方法を品質管理で使用して、商業生産用種子バッチ中の生存可能な有益内生菌または生存可能な汚染内生菌の百分率を測定し得る。

【0018】

生存可能な内生菌検出方法

本発明の第1の態様では、植物中の生存可能な内生菌の存在を検出するための方法が提供され、方法は、植物からの幼葉およびその抽出物中で、内生菌の存在を検出するステップを含み、幼葉または抽出物中における内生菌の存在の検出は、植物中の生存可能な内生菌の存在を示す。

【0019】

幼葉を葉数によって定義する？

一実施形態では、幼葉は、植物種子の発芽後に、植物から生じる最初の5葉の内の1枚である。好ましくは、幼葉は、植物種子の発芽後に植物から生じる最初の4葉、より好ましくは最初の3葉、より好ましくは最初の2葉の内の1枚である。

【0020】

好ましい実施形態では、幼葉は、植物種子の発芽後に植物から生じる第1葉である。

【0021】

より成熟した植物組織とは対照的に、好ましくは第1葉である初期葉を使用して、種子発芽から生存可能な内生菌検出までの時間を顕著に短縮することが可能である。したがって本発明の方法は迅速であり、それは牧畜／種子産業にとって重要な利点である。

10

【0022】

幼葉を苗年齢によって定義する？

一実施形態では、幼葉は、植物種子の発芽後、4週間以内、より好ましくは3週間以内、より好ましくは2週間以内に生じる、植物苗からの葉である。

【0023】

一実施形態では、幼葉は、植物種子の発芽後、14日未満、好ましくは13日未満、好ましくは12日未満、好ましくは11日未満に生じる、植物苗からのものである。

【0024】

好ましい実施形態では、幼葉は、植物種子の発芽の約10日後に生じる植物苗からのものである。より好ましくは、幼葉は、植物種子の発芽の10日後に生じる植物苗からのものである。

20

【0025】

好ましくは、より成熟した植物組織とは対照的に、発芽の約10日後に生じる植物苗からの幼葉を使用することで、種子発芽から生存可能な内生菌検出までの時間を短縮することが可能である。したがって本発明の方法は迅速であり、それは牧畜／種子産業にとって重要な利点である。

【0026】

幼葉を成長によって定義する

好ましくは、幼葉は、葉を子葉鞘から分離するのに十分に成長した苗からのものである。

30

【0027】

幼葉を切除する

一実施形態では、方法で使用する前に、幼葉を切除して、それを他の植物組織または器官から実質的に分離する。

【0028】

さらなる実施形態では、方法で使用する前に、幼葉を切除して、それを子葉鞘から、ならびに他の植物組織または器官から実質的に分離する。

【0029】

さらなる実施形態では、方法で使用する前に、幼葉を切除して、それを子葉鞘およびあらゆる付着種子から、ならびに他の植物組織または器官から、実質的に分離する。

40

【0030】

生存可能

「生存可能」という用語は、本明細書の用法では、成長できることを意味する。好ましくは「生存可能」な内生菌は、植物内で増殖して安定した共生を形成できる。

【0031】

生存可能な内生菌の存在を検出する？

出願人らは、（生存不能な内生菌でなく）生存可能な内生菌のみが、発芽苗の幼葉（特に最初の出葉）中で成長し得ることを発見し、本発明の方法を使用して、生存可能な内生菌を含有する植物と生存可能な内生菌を含有しない植物が、幼葉段階で区別できることを示した。したがって出願人の発明は、生存可能な内生菌の存在を検出することに関する。

50

本発明の方法は、真菌生体量が、典型的に非常に低い場合、幼葉中の生存可能な内生菌を検出して同定するのに十分な感度がある。

【0032】

本方法の一実施形態では、光学顕微鏡検査、染色および光学顕微鏡検査、電子顕微鏡検査、抗体ベースの方法、モノクローナル抗体ベースの方法、酵素結合免疫測定法（ELISA）、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、核磁気共鳴（NMR）、近赤外線分光法、イソ酵素ベースの方法、核酸ベースの方法、核酸プローブベースの方法、核酸プライマーベースの方法、PCRベースの方法のアプローチのいずれか1つによって、幼葉中で内生菌が検出される。

【0033】

好ましくは内生菌は、特定の内生菌種または株の存在を同定する方法によって検出される。

【0034】

特定種または株の内生菌の存在を検出する好ましい方法としては、抗体ベースの方法、モノクローナル抗体ベースの方法、酵素結合免疫測定法（ELISA）、核酸ベースの方法、核酸プローブベースの方法、核酸プライマーベースの方法、およびPCRベースの方法が挙げられる。

【0035】

好ましい実施形態では、内生菌は核酸ベースの方法によって検出される。

【0036】

好ましい実施形態では、内生菌はPCRベースの方法によって検出される。一実施形態では、PCRベースの方法は、定量PCRである。好ましい実施形態では、PCRベースの方法は、リアルタイムPCRである。

【0037】

より好ましい実施形態では、PCRベースの方法は、高分解能融解（HRM）リアルタイムPCRである。

【0038】

本方法で使用されるPCRプライマー

一実施形態ではPCRは、内生菌中の核酸とハイブリダイズするプライマーを使用して実施される。

【0039】

好ましい実施形態では、プライマーは、内生菌中の多コピー遺伝子とハイブリダイズする。

【0040】

より好ましい実施形態では、プライマーは、内生菌のリボソーム反復領域の遺伝子間領域（IGS）とハイブリダイズする。

【0041】

検出の特異性

好ましい実施形態では、検出は、特定の内生菌種または株に対して特異的である。

【0042】

一実施形態では、PCRベースの方法で使用されるプライマーは、検出される株に対して特異的である。この実施形態では、増幅産物の存在または不在が、内生菌の存在または不在を示す。

【0043】

代案としては、特異性は、増幅産物の性質によって定まってもよい。一実施形態では、特異性は、増幅産物のサイズによって定まる。この実施形態では、増幅のために同一プライマーを使用して、異なる内生菌種または株から、異なるサイズの産物が生じてよい。

【0044】

代案としては特異性は、増幅産物生成の動態によって定まってもよい。一実施形態では、特異性は、融解プロファイルによって定まる。この実施形態では、増幅からの同一プラ

10

20

30

40

50

イマーを使用して、異なる内生菌種または株から、異なる融解プロファイルが生じてもよい。

【0045】

異なる融解プロファイルは、異なる内生菌種または株中で、配列であって詮索する人（prier）がそれにハイブリダイズする配列に見られる、単一ヌクレオチド多形性（SNP）、挿入、欠失などの違いの結果として生じてもよい。

【0046】

種子の発芽

本発明の基本的方法で使用する前に、植物種子を発芽させる。

【0047】

好ましくは、幼葉中の菌糸生体量を最大化する条件下で、種子を発芽させる。

【0048】

好ましくは、最初の出葉中の菌糸生体量を最大化する条件下で、種子を発芽させる。

【0049】

一実施形態では、18～26℃の温度範囲で種子を発芽させる。好ましくは、19～25℃、より好ましくは20～24℃、より好ましくは21～23℃の温度範囲で種子を発芽させる。最も好ましくは、約22℃で種子を発芽させる。

【0050】

一実施形態では、16／8時間の明／暗周期で種子を発芽させる。好ましくは、14／10時間の明／暗周期で種子を発芽させる。より好ましくは、約12／12時間の明／暗周期で種子を発芽させる。最も好ましくは、12／12時間の明／暗周期で種子を発芽させる。

【0051】

幼葉から抽出物を調製する

内生菌の存在は、幼葉からの抽出物中で検出されてもよい。

【0052】

植物の幼葉から抽出物を調製するステップを含む発明の方法

本発明の一実施形態では、本方法は、幼葉から抽出物を調製するステップを含む。

【0053】

したがって一実施形態では、本発明は、

a) 幼葉を提供するステップと、
b) 幼葉から抽出物を調製するステップと、
c) 抽出物中の内生菌の存在を検出するステップと
を含んでなる植物中の生存可能な内生菌の存在を検出する方法であって、抽出物中の生菌の存在の検出は、植物中の生存可能な内生菌の存在を示す方法を提供する。

【0054】

内生菌を検出する前に、幼葉を植物から切除するステップを含む本発明の方法

本発明の一実施形態では、方法は、幼葉を切除するステップを含む。

【0055】

したがって一実施形態では、本発明は、

a) 植物を提供するステップと、
b) 幼葉を切除するステップと、
c) 幼葉中の内生菌の存在を検出するステップと
を含んでなる草本植物中の生存可能な内生菌の存在を検出する方法であって、幼葉または抽出物中の内生菌の存在の検出は、植物中の生存可能な内生菌の存在を示す方法を提供する。

【0056】

内生菌を検出する前に、植物から幼葉を切除して、幼葉から抽出物を作成するステップを含む本発明の方法

本発明の一実施形態では、方法は、幼葉を切除するステップと、抽出物を作成するステ

10

20

30

40

50

ップとを含む。

【0057】

したがって一実施形態では、本発明は、

a) 植物を提供するステップと、

b) 幼葉を切除するステップと、

c) 幼葉から抽出物を作成するステップと、

c) 抽出物中の内生菌の存在を検出するステップと

を含んでなる植物中の生存可能な内生菌の存在を検出する方法であって、抽出物中の内生菌の存在の検出は、植物中の生存可能な内生菌の存在を示す方法を提供する。

【0058】

内生菌検出前に種子を発芽させて、幼葉を切除するステップを含む本発明の方法

本発明の一実施形態では、方法は、種子を発芽させるステップと、幼葉を切除するステップとを含む。

【0059】

したがって一実施形態では、本発明は、

a) 種子を発芽させて、少なくとも1枚の幼葉が生じるまで植物を栽培するステップと、

b) 幼葉を植物から切除するステップと、

c) 幼葉中の内生菌の存在を検出するステップと

を含んでなる植物中の生存可能な内生菌の存在を検出する方法であって、幼葉中の内生菌の存在の検出は、植物中の生存可能な内生菌の存在を示す方法を提供する。

【0060】

内生菌を検出する前に、種子を発芽させるステップと、幼葉を切除するステップと、抽出物を作成するステップとを含む本発明の方法

本発明の一態様では、方法は、種子を発芽させるステップと、幼葉を切除するステップと、抽出物を作成するステップとを含む。

【0061】

したがって一態様では、本発明は、

a) 種子を発芽させて、少なくとも1枚の幼葉が生じるまで植物を栽培するステップと、

b) 幼葉を植物から切除するステップと、

c) 幼葉から抽出物を作成するステップと、

d) 幼葉中の内生菌の存在を検出するステップと

を含んでなる草本植物中の生存可能な内生菌の存在を検出する方法であって、抽出物中の内生菌の存在の検出は、草本植物中の生存可能な内生菌の存在を示す方法を提供する。

【0062】

種子バッチをスクリーニングする方法の使用

本発明の方法を使用して、種子バッチをスクリーニングして、どの内生菌種、株、または株群が存在するかを評価してもよい。

【0063】

このアプローチでは、典型的に、より大きなバッチから小さな種子サンプル（例えば50～100個の種子）を取る。次に本明細書に記載されるように、小さなサンプルからの種子の発芽後に、方法を幼葉に実施する。

【0064】

したがって大きなバッチ中の生存可能な内生菌を含有する種子の割合または百分率を推定するために、本発明の方法を使用して、小さなサンプル中の特定種または株の生存可能な内生菌を含有する種子の割合または百分率を測定する。

【0065】

また大きなバッチ中の生存可能な汚染内生菌を含有する種子の割合または百分率を推定するために、本発明の方法を使用して、小さなサンプル中の生存可能な汚染内生菌を含有する種子の割合または百分率を測定してもよい。

【0066】

10

20

30

40

50

自動化された実施形態

本発明の方法は、自動工程に適している。ステップのいずれか1つが、自動化されてもよい。自動工程に特に適しているステップとしては、抽出物を調製する工程、および検出段階、特にPCRベースの段階が挙げられる。

【0067】

一実施形態では、これらの段階の少なくとも1つが、自動化されている。さらなる実施形態では、これらの段階の双方が、自動化されている。

【0068】

植物

「植物」という用語は、種子および苗、ならびにより成熟した植物を含む。したがって本方法で使用するために提供される「植物」は、苗であってもよい。

10

【0069】

さらに、植物中の生存可能な内生菌の存在を検出する本発明の方法はまた、それから植物が生じる種子中で、生存可能な内生菌の存在を検出するための方法とも見なし得る。本明細書で考察されるように、このような種子の発芽後に、このような種子サンプルの方法を実施することで、方法を種子バッチに適用して、このような種子バッチ中の生存可能な内生菌の割合または百分率を評価し得る。

【0070】

植物源

植物は、内生菌と安定した共生を形成できる、いずれの種からのものであってもよい。

20

【0071】

一実施形態では、植物は双子葉種からのものである。

【0072】

好ましい実施形態では、植物は単子葉植物種からのものである。

【0073】

好ましい単子葉植物属としては、以下が挙げられる。カモジグサ属 (Agropyron)、ネギ属 (Allium)、スズメノテッポウ属 (Alopecurus)、ウシクサ属 (Andropogon)、アルテナラム属 (Arrhenatherum)、アスパラガス属 (Asparagus)、カラスムギ属 (Avena)、ホウライチク属 (Bambusa)、ベレバリア属 (Bellavalia)、ブリメウラ属 (Brimeura)、ブロディアエア属 (Brodiaea)、ブルボコディウム属 (Bulbocodium)、モンツキガヤ属 (Bothrichloa)、ボウテロウア属 (Bouteloua)、スズメノチャヒキ属 (Bromus)、カラモビルファ属 (Calamovilfa)、カマッシア属 (Camassia)、クリノイガ属 (Cenchrus)、チオノドクサ属 (Chionodoxa)、クロリス属 (Chloris)、イヌサフラン属 (Colchicum)、クロッカス属 (Crocus)、オガルカヤ属 (Cymbopogon)、シノドン属 (Cynodon)、アツモリソウ属 (Cypripedium)、カモガヤ属 (Dactylis)、オニササガヤ属 (Dichanthium)、メヒシバ属 (Digitaria)、アブラヤシ属 (Elaeis)、オヒシバ属 (Eleusine)、スズメガヤ属 (Eragrostis)、エレムルス属 (Eremurus)、カタクリ属 (Erythronium)、ソバ属 (Fagopyrum)、フェスツカ属 (Festuca)、バイモ属 (Fritillaria)、スノードロップ属 (Galanthus)、ヒマワリ属 (Helianthus)、オオムギ属 (Hordeum)、ヒヤシンス属 (Hyacinthus)、ヒアキントイデス属 (Hyacinthoides)、ハナニラ属 (Ipheion)、アヤメ属 (Iris)、スノーフレーク属 (Leucojum)、リアトリス属 (Liatris)、ドクムギ属 (Lolium)、ヒガンバナ属 (Lycoris)、ススキ属 (Miscanthus)、ジャイアントミスカンサス (Miscanthus x giganteus)、ムスカリ属 (Muscari)、ギカイソウ属 (Ornithogalum)、イネ属 (Oryza)、キビ属 (Panicum)、パスプルム属 (Paspulum)、ペンニセツム属 (Pennisetum)、クサヨシ属 (Phalaris)、フレウム属 (Phleum)、ポア属 (Poa)、プスキニア属 (Puschkinia)、サトウキビ属 (Saccharum)、ライムギ属 (Secale)、セタリア属 (Setaria)、ソルガストラム属 (Sorghastrum)、モロコシ属 (Sorghum)、シノピルム属 (Thinopyrum)、コムギ属 (Triticum)、バニラ属 (Vanilla)、ライコムギ (X Triticosecale Triticale)、およびトウモロコシ属 (Zea)。

30

40

【0074】

50

好ましい単子葉植物種としては、以下が挙げられる。フェアウェイホイトグラス (*Agropyron cristatum*)、クレストッドホイトグラス (*Agropyron desertorum*)、トールホイトグラス (*Agropyron elongatum*)、アグロピロン・インターメディウム (*Agropyron intermedium*)、ウエスタンホイトグラス (*Agropyron smithii*)、ブルーバンチホイトグラス (*Agropyron spicatum*)、スレンダーホイトグラス (*Agropyron trachycaulum*)、プベセントホイトグラス (*Agropyron trichophorum*)、エシャロット (*Allium ascalonicum*)、タマネギ (*Allium cepa*)、ラッキョウ (*Allium chinense*)、ポロネギ (*Allium porrum*)、チャイブ (*Allium schoenoprasum*)、ネギ (*Allium fistulosum*)、ニンニク (*Allium sativum*)、オオスズメノテッポウ (*Alopecurus pratensis*)、ビッグブルーステム (*Andropogon gerardi*)、ビッグブルーステム (*Andropogon gerardii*)、ビッグブルーステム (*Andropogon scoparius*)、オオカニツリ (*Arrhenatherum elatius*)、アスパラガス (*Asparagus officinalis*)、ハダカエンバク (*Avena nuda*)、エンバク (*Avena sativa*)、ダイサンチク (*Bambusa vulgaris*)、ターキッシュベレバリア (*Bellvalia trifoliata*)、ブリメウラ・アメシスティナ (*Brimeura amethystina*)、カリフォルニアヒアシンス (*Brodiaea californica*)、ムラサキハナニラ (*Brodiaea coronaria*)、ブロディアアエ・エレガンス (*Brodiaea elegans*)、ブルボコディウム・ベルシコロル (*Bulbocodium versicolor*)、ボトリオクロア・バルビノディス (*Bothrichloa barbinodis*)、カモノハシガヤ (*Bothrichloa ischaemum*)、ボトリオクロア・サッカロイデス (*Bothrichloa saccharoides*)、ボウテロウア・クリペンデュラ (*Bouteloua curipendula*)、ボウテロウア・エリオポダ (*Bouteloua eriopoda*)、メダカソウ (*Bouteloua gracilis*)、ブロムス・エレクツス (*Bromus erectus*)、ブロムス・イネルミス (*Bromus inermis*)、ブロムス・リパリウス (*Bromus riparius*)、カラモビルファ・ロンギフォリア (*Calamovilfa longifolia*)、ワイルドヒヤシンス (*Camassia scilloides*)、ヒゲクリノイガ (*Cenchrus ciliaris*)、チオノドクサ・フォーベシー (*Chionodoxa forbesii*)、アフリカヒゲシバ (*Chloris gayana*)、イヌサフラン (*Colchicum autumnale*)、サフラン (*Crocus sativus*)、コウスイガヤ (*Cymbopogon nardus*)、ギョウギシバ (*Cynodon dactylon*)、キプリペディウム・アカウレ (*Cypripedium acaule*)、カモガヤ (*Dactylis glomerata*)、ヒメオニササガヤ (*Dichanthium annulatum*)、オニササガヤ (*Dichanthium aristatum*)、シラゲオニササガヤ (*Dichanthium sericeum*)、ジギタリア・デクンベンス (*Digitaria decumbens*)、トキワメヒシバ (*Digitaria smutsii*)、ギニアアブラヤシ (*Elaeis guineensis*)、アメリカアブラヤシ (*Elaeis oleifera*)、シコクビエ (*Eleusine coracana*)、エリムス・アングスツス (*Elymus angustus*)、エリムス・ジュンセウス (*Elymus junceus*)、シナダレスズメガヤ (*Eragrostis curvula*)、テフ (*Eragrostis tef*)、オオキツネオラン (*Eremurus robustus*)、エリトロニウム・エレガンス (*Erythronium elegans*)、エリトロニウム・ヘレナ (*Erythronium helenae*)、ソバ (*Fagopyrum esculentum*)、ダッタンソバ (*Fagopyrum tataricum*)、オニウシノケグサ (*Festuca arundinacea*)、ウシノケグサ (*Festuca ovina*)、ヒロハノウシノケグサ (*Festuca pratensis*)、オオウシノケグサ (*Festuca rubra*)、センバイモ (*Fritillaria cirrhosa*)、マツユキソウ (*Galanthus nivalis*)、ヒマワリ (*Helianthus annuus*)、二条オオムギ (*Hordeum distichum*)、オオムギ (*Hordeum vulgare*)、ヒヤシンス (*Hyacinthus orientalis*)、スパニッシュ・ブルーベル (*Hyacinthoides hispanica*)、イングリッシュ・ブルーベル (*Hyacinthoides non-scripta*)、イフェイオン・セッシレ (*Ipheion sessile*)、アイリス・コレッティ (*Iris collettii*)、アイリス・ダンフォルディアエ (*Iris danfordiae*)、ミニアイリス (*Iris reticulata*)、スノーフレーク (*Leucojum aestivum*)、リアトリス・シリンドラセア (*Liatris cylindracea*)、リアトリス・エレガンス (*Liatris elegans*)、オニウシノケグサ (*Lolium arundinaceum*)、ロリウム・ロンギフロルム (*Lolium longiflorum*)、ネズミムギ (*Lolium multiflorum*)、ホソムギ (*Lolium perenne*)、ロリウム・ウェスターウォルディウム (*Lolium westerwoldicum*)、ネズミホソムギ (*Lolium hybridum*)、ヒガンバナ (*Lycoris radiata*)、ススキ (*Miscanthus sinensis*)、ジャイアントミスカンサス (*Miscanthus x giganteus*)、ムスカリ・アルメ

10

20

30

40

50

ニアカム (*Muscari armeniacum*)、ムスカリ・マクロカルプム (*Muscari macrocarpum*)、ラッパスイセン (*Narcissus pseudonarcissus*)、オルニトガルム・モンタヌム (*Ornithogalum montanum*)、イネ (*Oryza sativa*)、パニクム・イタリシウム (*Panicum italicum*)、ギネアキビ (*Panicum maxymum*)、イヌキビ (*Panicum miliaceum*)、パラグラス (*Panicum purpurascens*)、スイッチグラス (*Panicum virgatum*)、シマスズメノヒ (*Paspalum dilatatum*)、アメリカスズメノヒエ (*Paspalum notatum*)、キクユグラス (*Pennisetum clandestinum*)、パールミレット (*Pennisetum glaucum*)、ネピアグラス (*Pennisetum purpureum*)、パールミレット (*Pennisetum spicatum*)、クサヨシ (*Phalaris arundinacea*)、フレウム・ベルトリニイ (*Phleum bertolinii*)、オオアワガエリ (*Phleum pratense*)、ポア・フェンドレリアナ (*Poa fendleriana*)、ナガハグサ (*Poa pratensis*)、タチイチゴツナギ (*Poa nemoralis*)、プスキニア (*Puschkinia scilloides*)、サトウキビ (*Saccharum officinarum*)、ロバスタム種サトウキビ (*Saccharum robustum*)、カラサトウキビ (*Saccharum sinense*)、ワセオバナ (*Saccharum spontaneum*)、オートムスキル (*Scilla autumnalis*)、オオツルボ (*Scilla peruviana*)、ライムギ (*Secale cereale*)、アワ (*Setaria italica*)、アフリカキンエノコロ (*Setaria sphacelata*)、インディアングラス (*Sorghastrum nutans*)、モロコシ (*Sorghum bicolor*) ; カザリモロコシ (*Sorghum dochna*)、セイバンモロコシ (*Sorghum halepense*)、スーダングラス (*Sorghum sudanense*)、シノピルム・ポンティクム (*Thinopyrum ponticum*)、タイリンエンレイソウ (*Trillium grandiflorum*)、コムギ (*Triticum aestivum*)、エンマーコムギ (*Triticum dicoccum*)、デュラムコムギ (*Triticum durum*)、ヒトツブコムギ (*Triticum monococcum*)、ツリパ・バタリニー (*Tulipa batalinii*)、ツリパ・クルシアナ (*Tulipa clusiana*)、ツリパ・ダシステモン (*Tulipa dasystemon*)、ツリパ・ゲスネリア (*Tulipa gesneriana*)、ツリパ・グレイギー (*Tulipa greigii*)、ツリパ・カウフマニアナ (*Tulipa kaufmanniana*)、ツリパ・シルベストリス (*Tulipa sylvestris*)、ツリパ・トルケスタニカ (*Tulipa turkestanica*)、バニラ (*Vanilla fragrans*)、ライコムギ (*X Triticosecale*)、およびトウモロコシ (*Zea mays*)。

【0075】

特定の好ましい単子葉植物としては、ライコムギ、オオムギ、コムギ、ソルガム、およびトウモロコシを含むが、これに限定されるものではない、単子葉植物茎葉飼料種からのものが挙げられる。

【0076】

特に好ましい単子葉植物としては、草本が挙げられる。好ましい草本としては、イネ科 (*Poaceae*) からのものが挙げられる。好ましいイネ科 (*Poaceae*) 草本としては、多年生ライグラス (ホソムギ (*Lolium perenne*))、イタリアンライグラス (ネズミムギ (*Lolium multiflorum*))、カモガヤ (カモガヤ (*Dactylis glomerata*))、およびオニウシノケグサ (オニウシノケグサ (*Festuca arundinacea*))、オニウシノケグサ (*Lolium arundinaceum*) のシノニム) が挙げられる。

【0077】

別の好ましいイネ科草本としては、イチゴツナギ亜科 (*pooideae*) が挙げられる。好ましいイチゴツナギ亜科 (*pooideae*) 植物としては、コムギ、オオムギ、オートムギ、スズメノチャヒキ、およびアシが挙げられる

【0078】

別の好ましいイネ科草本としては、キビ亜科 (*panicoideae*) が挙げられる。好ましいキビ亜科 (*panicoideae*) 植物としては、パニックグラス、トウモロコシ、ソルガム、サトウキビ、キビ、フォニオ、およびブルーステムグラスが挙げられる。

【0079】

特に好ましい草種としては、ロリウム・ロンギフロルム (*Lolium longiflorum*)、ネズミムギ (*Lolium multiflorum*)、ホソムギ (*Lolium perenne*)、ロリウム・ウェスターウォルディクム (*Lolium westerwoldicum*)、ネズミホソムギ (*Lolium hybridum*)、オニウシノケグサ (*Festuca arundinacea*) (オニウシノケグサ (*Lolium arundinaceum*) のシノ

10

20

30

40

50

ニム)、ウシノケグサ (*Festuca ovina*)、ヒロハノウシノケグサ (*Festuca pratensis*)、オオウシノケグサ (*Festuca rubra*)、およびトウモロコシ (*Zea mays*) 挙げられる。

【0080】

一実施形態では、草はドクムギ属 (*Lolium*) からのものである。好ましいドクムギ属 (*Lolium*) 種としては、オニウシノケグサ (*Lolium arundinaceum*)、ロリウム・ロンギフロルム (*Lolium longiflorum*)、ネズミムギ (*Lolium multiflorum*)、ホソムギ (*Lolium perenne*)、ロリウム・ウェスターウォルディウム (*Lolium westerwoldicum*)、ネズミホソムギ (*Lolium hybridum*) が挙げられる。特に好ましいドクムギ属 (*Lolium*) 種は、ホソムギ (*Lolium perenne*) である。

【0081】

10

さらなる実施形態では、草は、フェスツカ属 (*Festuca*) からのものである。好ましいフェスツカ属 (*Festuca*) 種としては、以下が挙げられる。オニウシノケグサ (*Festuca arundinacea*)、ウシノケグサ (*Festuca ovina*)、ヒロハノウシノケグサ (*Festuca pratensis*)、オオウシノケグサ (*Festuca rubra*)。特に好ましいフェスツカ属 (*Festuca*) 種は、オニウシノケグサ (*Festuca arundinacea*) (オニウシノケグサ (*Lolium arundinaceum*) のシノニム) である。

【0082】

オニウシノケグサ (*Lolium arundinaceum*) は、オニウシノケグサ (*Festuca arundinacea*) のシノニムである。2つの名称は、区別なく使用され得る。

【0083】

20

内生菌

内生菌は、植物と安定した共生を形成できる、あらゆる種からのものであってもよい。

【0084】

好ましくは、内生菌は、子囊菌門 (*Ascomycota*) からの真菌類の内生菌である。好ましくは、内生菌は、バツカクキン科 (*Clavicipitaceae*) からの真菌類の内生菌である。

【0085】

好ましくは内生菌は、ネオティホディウム属 (*Neotyphodium*) またはエピクロエ属 (*Epichloe*) から選択される。

【0086】

一実施形態では、内生菌はネオティホディウム属 (*Neotyphodium*) からのものである。

30

【0087】

好ましいネオティホディウム属 (*Neotyphodium*) 種としては、以下が挙げられる。ネオティホディウム・アオテアロアエ (*Neotyphodium aotearoae*)、ネオティホディウム・アウストラリエンス (*Neotyphodium australiense*)、ネオティホディウム・チレンス (*Neotyphodium chilense*)、ネオティホディウム・チソスム (*Neotyphodium chisosum*)、ネオティホディウム・コエノフィアルム (*Neotyphodium coenophialum*)、ネオティホディウム・ガンスエンス (*Neotyphodium gansuense*)、ネオティホディウム・フエルファヌム (*Neotyphodium huerfanum*)、ネオティホディウム・ロリイ (*Neotyphodium lolii*)、ネオティホディウム・メリシコラ (*Neotyphodium melicicola*)、ネオティホディウム・オクルタンス (*Neotyphodium occultans*)、ネオティホディウム・シエゲリイ (*Neotyphodium siegelii*)、ネオティホディウム・スタリイ (*Neotyphodium starrii*)、ネオティホディウム・テンブラデラエ (*Neotyphodium tembladerae*)、ネオティホディウム・チフィヌム (*Neotyphodium typhinum*)、ネオティホディウム・ウンシナツム (*Neotyphodium uncinatum*)、ネオティホディウム・シニクム (*Neotyphodium sinicum*)、およびネオティホディウム・シノフェスツカエ (*Neotyphodium sinofestuae*)。

40

【0088】

特に好ましいネオティホディウム属 (*Neotyphodium*) 種は、ネオティホディウム・ロリイ (*Neotyphodium lolii*) である。

【0089】

特に好ましいネオティホディウム・ロリイ (*Neotyphodium lolii*) 株としては、AR 1

50

、AR 5、AR 6、およびAR 37が挙げられる。

【0090】

特に好ましいネオティホディウム・ロリイ (*Neotyphodium lolii*) は、AR 1である。

【0091】

別の特に好ましいネオティホディウム・ロリイ (*Neotyphodium lolii*) は、AR 37である。

【0092】

別の特に好ましいネオティホディウム属 (*Neotyphodium*) 種は、ネオティホディウム・コエノフィアルム (*Neotyphodium coenophialum*) である。

【0093】

特に好ましいネオティホディウム・コエノフィアルム (*Neotyphodium coenophialum*) 株としては、AR 542、AR 584、およびAR 601が挙げられる。

【0094】

別の特に好ましいネオティホディウム・コエノフィアルム (*Neotyphodium coenophialum*) 株は、AR 542である。

【0095】

別の実施形態では、内生菌は、ピクロエ属 (*Epichloe*) からのものである。

【0096】

好ましいピクロエ属 (*Epichloe*) 種としては、以下が挙げられる。エピクロエ・ブロミコラ (*Epichloe bromicola*)、エピクロエ・フェスツカエ (*Epichloe festucae*)、およびエピクロエ・シルバチカ (*Epichloe sylvatica*)。

【0097】

特に好ましいピクロエ属 (*Epichloe*) 種は、エピクロエ・フェスツカエ (*Epichloe festucae*) である。

【0098】

好ましいエピクロエ・フェスツカエ (*Epichloe festucae*) 株は、AR 1501である。

【0099】

別の好ましい内生菌としては、P-内生菌が挙げられる。好ましいP-内生菌としては、グリオクラジウム属 (*Gliocladium*) 様およびフィアロフォラ (*Phialophora*) 様内生菌が挙げられる。

【0100】

内生菌寄託

AR 1、AR 5、AR 6、AR 37、AR 42、AR 542、AR 584、AR 601、およびAR 1501という用語は、例えばマイクロサテライトパターンなどのそれらの遺伝子型によって他の内生菌と区別され得る、内生菌株を指す。これらの以下の内生菌株は、特許手続きの目的で、ブダペスト条約に準じて、National Measurement Institute (NMI), Suakin Street, Pymble, New South Wales, Australiaに寄託された。

【0101】

10

20

30

【表 1】

菌株	菌種	寄託	寄託日	寄託番号
AR1	N. ロリイ (N. lolii)	NMI	1998 年 5 月 12 日	NM98/04669
AR5	N. ロリイ (N. lolii)	NMI	2007 年 7 月 23 日	VO7/029055
AR6	ネオティホディウム属 (Neotyphodium)種(LpTG-2)	NMI	2008 年 10 月 14 日	VO8/0211261
AR37	N. ロリイ (N. lolii)	NMI	2003 年 5 月 23 日	NM03/35819
AR542	N. コエノフィアルム (N. coenophialum)	NMI	1998 年 5 月 12 日	NM02/04675
AR584	N. コエノフィアルム (N. coenophialum)	NMI	1998 年 5 月 12 日	NM02/04676
AR601	N. コエノフィアルム (N. coenophialum)	NMI	2007 年 7 月 23 日	VO7/029058

10

【0102】

PCRプライマー

本発明のさらなる態様では、内生菌のリボソーム反復領域の遺伝子間領域（IGS）とハイブリダイズするプライマーが提供される。

20

【0103】

一実施形態ではプライマーは、内生菌のリボソーム反復領域の遺伝子間領域（IGS）の菌種特異的または菌株特異的（specificic）領域とハイブリダイズする。

【0104】

好ましくは、内生菌は、本明細書に記載されるような内生菌である。

【0105】

一実施形態では、プライマーは、配列番号1～配列番号8の配列のいずれか1つと、少なくとも70%の同一性を有する。

【0106】

さらなる実施形態では、プライマーは、配列番号1～配列番号8のいずれか1つの配列を有する。

30

【0107】

本発明の方法の一実施形態では、内生菌は、本発明の少なくとも1つのプライマーを使用して、PCRベースの方法によって検出される。好ましくは、本発明の少なくとも2つのプライマーが、方法で使用される。

【発明を実施するための形態】

【0108】

詳細な説明

出願人らは、内生菌が、植物中で、節間伸展によって増殖することに気付いた。出願人らは、発芽苗または植物の幼葉（特に最初の出葉）中に、（生存不能な内生菌でなく）生存可能な内生菌のみが見られることを発見した。出願人の発明は、生存可能な内生菌の存在を検出することに関する。本発明の方法を使用して、出願人らは、以前の方法と比べて迅速に、生存可能な内生菌を含有する植物と、生存可能な内生菌を含有しないまたは生存不能な内生菌のみを含有する植物とを区別できることを示した。本発明の方法は、真菌生体量が典型的に非常に低いとき、幼葉中の内生菌を検出して同定するのに十分な感度がある。

40

【0109】

種子は、生存可能な内生菌および生存不能な内生菌の双方を含有することが多いが、生存可能な内生菌を含有する種子と、内生菌を含有しないまたは生存不能な内生菌のみを含

50

有する種子とを識別する現行のアプローチは、面倒であり時間がかかる。本発明以前は、生存可能な内生菌を検出する標準アプローチでは、生存度を確認するために、生きた内生菌が宿主組織塊の外まで成長して、純培養培地内に到達することが必要であった。このような成長検査では、成長段階に先立って、内生菌の顕微鏡的検出が必要なこともある。

【0110】

したがって本発明は、自動化にも適している、迅速で都合良く費用効率が高い代案を提供する。

【0111】

生存可能な内生菌の存在を検出する？

抗体ベースの方法

10

本発明の方法では、抗体を使用して、幼葉中の内生菌の存在を検出してもよい。診断ツールとして抗体を使用する一般方法は、当該技術分野で公知である（Immunoassays: A Practical Approach, Gosling J.P. (Ed) Oxford University Press。酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）モノクローナル抗体、および免疫ブロットアプローチを本発明の方法に応用してもよい。

【0112】

内生菌の診断的検出のために、抗体は、真菌菌糸体のホールセル抽出物に対して特異的であってもよい。利用できるその他の抗体は、ペラミン、パキシリン、およびロリンなどの内生菌アルカロイドを検出するものである。

【0113】

20

核酸ベースの方法

診断核酸ベースの方法は、当業者に良く知られている。有用な方法としては、プローブハイブリダイゼーション方法、およびPCRベースの方法が挙げられる。

【0114】

プローブベースの方法

本発明の方法において、プローブベースの方法を応用して、生存可能な内生菌を検出してもよい。プローブを標的核酸配列にハイブリダイズする方法は、当業者に良く知られている（Sambrook et al., Eds, 1987, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Press）。

【0115】

30

「プローブ」という用語は、ハイブリダイゼーションベースのアッセイにおいて、プローブと少なくとも部分的に相補的であるポリヌクレオチド配列を検出するのに使用される、短いポリヌクレオチドを指す。プローブは、本明細書で定義されるポリヌクレオチドの「断片」からなってもよい。好ましくはこのようなプローブは、少なくとも5、より好ましくは少なくとも10、より好ましくは少なくとも20、より好ましくは少なくとも30、より好ましくは少なくとも40、より好ましくは少なくとも50、より好ましくは少なくとも100、より好ましくは少なくとも200、より好ましくは少なくとも300、より好ましくは少なくとも400、および最も好ましくは少なくとも500ヌクレオチド長である。

【0116】

40

プローブは、標的DNA配列と完全に相補的でなくてもよい。同一プローブを使用した際の異なる菌種または株中の標的配列の違いを利用して、菌種または株を区別してもよい。

【0117】

PCRベースの方法

本発明の方法で内生菌を検出するためには、PCRベースの方法が特に好ましい。

【0118】

一般的PCRアプローチは、当業者に良く知られている（Mullis et al., 1994）。基本的なPCRアプローチの種々のその他の展開もまた、本発明の方法に有利適用してもよい。実施例は、簡潔に考察される。

50

【0119】

対立遺伝子特異的PCR

対立遺伝子特異的PCRは、単一ヌクレオチド多形性（SNP）（DNA中の単一塩基の違い）に基づく、診断またはクローニング技術である。これには、対立遺伝子の違いを含む、DNA配列に関する事前の知識が必要であり、その3'末端がSNPを包含するプライマーを使用する。ストリンジェントな条件下のPCR増幅は、テンプレートとプライマー間のミスマッチの存在下では、はるかに効率が劣るため、SNP特異的プライマーを用いた増幅の成功は、配列中の特定SNPの存在を示唆する（Newton et al., 1989）。

【0120】

配列間特異的PCR

配列間特異的PCR（ISSR）は、単純な配列反復間の領域を増幅させて、増幅断片長に固有のフィンガープリントを生成する、DNAフィンガープリント法のためのPCR法である（Zietkiewicz et al., 1994）。

【0121】

マルチプレックスPCR

マルチプレックスPCRは、単一PCR反応内の複数のプライマーセットを利用して、異なる標的DNA配列に対して特異的な様々なサイズの増幅産物（アンプリコン）を生成する。同時に複数配列を標的にすることで、さもないければ実施に数倍の試薬とより長時間を要する診断情報が、単一反応から得られてもよい。

【0122】

アニーリング温度およびプライマーセットは、単一反応中で機能して、異なるアンプリコンサイズを生じるように、一般に最適化される。すなわちアンプリコンは、ゲル電気泳動によって視覚化した際に、特徴的なバンドを形成すべきである。本発明の方法でマルチプレックスPCRを使用して、単一サンプルまたは反応中の2つ以上の内生菌の存在を検出し得る。

【0123】

定量PCR

定量PCR（Q-PCR）を使用して、（通常リアルタイムで）PCR産物の量が測定される。Q-PCRは、DNA、cDNA、またはRNAの開始量を定量的に測定する。Q-PCRを一般に使用して、DNA配列がサンプル中に存在するかどうか、そしてサンプル中のそのコピー数を判定する。定量的リアルタイムPCRは、非常に高い精度を有する。Q-PCR法は、Sybr Green、EvaGreenなどの蛍光染料、またはTaqManなどのフルオロフォア含有DNAプローブを使用して、増幅産物の量をリアルタイムで測定する。Q-PCRは、時にRT-PCR（リアルタイムPCR）またはRQ-PCRと略される。QRTP-PCRまたはRTQ-PCR。

【0124】

高分解能融解（HRM）リアルタイムPCR

高分解能融解（HRM）分析は、二本鎖DNAサンプル中の変異、多形性、およびエピジェネティックな違いを検出するための強力な技術である。

【0125】

HRM分析は、二本鎖DNAサンプル上で実施される。典型的に、使用者は、HRM分析に先だって、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用して、その中に対象変異が存在するDNA領域を増幅する。増幅されるこの領域は、アンプリコンとして知られている。PCR処理後に、HRM分析が開始される。処理は、約50℃から最高約95℃まで、単にアンプリコンDNAを正確に加温するだけである。この処理中のある時点で、アンプリコンが融解温度に達し、DNA二本鎖が分離または「融解」分離する。本発明の方法では、融解プロファイルの違いを使用して、存在する内生菌株を区別し得る。

【0126】

遺伝子型同定

挿入または欠失（内生菌株に依存する）を同定することが可能であり、それを使用して

10

20

30

40

50

異なる内生菌株を区別し得る。(単数または複数の)挿入または欠失の側面に位置して、異なるサイズの特定アンプリコンを生じるように、PCRプライマーをデザインでき、特定アンプリコンは、従来のゲル電気泳動によって分離され、または異なるサイズのピークを同定して生菌株中の遺伝子型を提供するGenotyper (Life Technologies/Applied Biosystems) を使用して分離され得る。

【0127】

PCRプライマー

「プライマー」という用語は、通常は遊離3'OH基を有する短いポリヌクレオチドを指し、それはテンプレートとハイブリダイズして、テンプレートに相補的なポリヌクレオチド重合をプライミングするために使用される。このようなプライマーは、好ましくは少なくとも5、より好ましくは少なくとも6、より好ましくは少なくとも7、より好ましくは少なくとも9、より好ましくは少なくとも10、より好ましくは少なくとも11、より好ましくは少なくとも12、より好ましくは少なくとも13、より好ましくは少なくとも14、より好ましくは少なくとも15、より好ましくは少なくとも16、より好ましくは少なくとも17、より好ましくは少なくとも18、より好ましくは少なくとも19、より好ましくは少なくとも20ヌクレオチド長である。

【0128】

好ましくはPCRは、内生菌中の核酸とハイブリダイズする、プライマーを使用して実施される。

【0129】

出願人らは、内生菌中で、単一コピー遺伝子でなく、多コピー遺伝子とハイブリダイズするプライマーを使用することで、検出感度を増大できることを示した。したがって好ましい実施形態では、プライマーは、内生菌中の多コピー遺伝子とハイブリダイズする。

【0130】

このようなプライマーを用いて、出願人らは、植物の幼葉中で内生菌DNAを成功裏に増幅し、したがって生存可能な内生菌の存在を検出した。この発達段階では、内生菌生体量は典型的に低く、標準PCRまたはその他の方法によって検出するのが困難である。

【0131】

出願人らは、様々な内生菌について、リボソーム反復領域の遺伝子間領域(IGS)を同定し、これらの領域をPCRプライマー結合の標的にし得ることを示して、内生菌を検出する高感度の方法を提供した。

【0132】

リボソームリボ核酸(rRNA)は、リボソームのRNA成分である。リボソームRNAは、大型サブユニット(LSU)と小型サブユニット(SSU)の2つのサブユニット(図)を形成する。ほとんどの真核生物中の18S rRNAは、小型リボソームサブユニット内にあり、大型サブユニットは3種のrRNA(5S、5.8S、および28S rRNA)を含有する。28S、5.8S、および18S rRNAは、2つの内部転写されたスパーサー(ITS)によって隔てられる単一転写ユニットによってコードされる。各転写ユニットは、遺伝子間配列(IGS)によって隔てられる。真核生物は、一般に、タンDEM反復に組織化されたrRNA遺伝子の多数のコピーを有するので、遺伝子とIGS配列の双方の複数コピーがある。真菌においては、5S rRNAは、典型的にゲノム中の他の箇所でコードされるので、5S遺伝子によって隔てられるより小さな2つの領域ではなく、より大きな1つのIGS領域がある(図2)。

【0133】

好ましい実施形態では、プライマーは、内生菌のリボソーム反復領域の遺伝子間領域(IGS)とハイブリダイズする。

【0134】

一実施形態では、内生菌のリボソーム反復領域の遺伝子間領域(IGS)は、配列番号9~16の配列のいずれか1つの少なくとも70%から一部の配列を含んでなる。

【0135】

一実施形態では、内生菌のリボソーム反復領域の遺伝子間領域（IGS）は、配列番号 9～16 の配列のいずれか 1 つの配列を含んでなる。

【0136】

さらなる実施形態では、プライマーは、配列番号 9～16 の配列の配列のいずれか 1 つの少なくとも 70 % から一部を有する。

【0137】

本発明の一実施形態では、方法で使用されるプライマーは、配列番号 1～8 の配列のいずれか 1 つの配列と少なくとも 70 % の同一性を有する。

【0138】

さらなる実施形態では、プライマーは、配列番号 1～配列番号 8 のいずれか 1 つの配列を有する。

【0139】

% 同一性

変異ポリヌクレオチド配列は、特定のポリヌクレオチド配列に対して、好ましくは少なくとも 70 %、より好ましくは少なくとも 71 %、より好ましくは少なくとも 72 %、より好ましくは少なくとも 73 %、より好ましくは少なくとも 74 %、より好ましくは少なくとも 75 %、より好ましくは少なくとも 76 %、より好ましくは少なくとも 77 %、より好ましくは少なくとも 78 %、より好ましくは少なくとも 79 %、より好ましくは少なくとも 80 %、より好ましくは少なくとも 81 %、より好ましくは少なくとも 82 %、より好ましくは少なくとも 83 %、より好ましくは少なくとも 84 %、より好ましくは少なくとも 85 %、より好ましくは少なくとも 86 %、より好ましくは少なくとも 87 %、より好ましくは少なくとも 88 %、より好ましくは少なくとも 89 %、より好ましくは少なくとも 90 %、より好ましくは少なくとも 91 %、より好ましくは少なくとも 92 %、より好ましくは少なくとも 93 %、より好ましくは少なくとも 94 %、より好ましくは少なくとも 95 %、より好ましくは少なくとも 96 %、より好ましくは少なくとも 97 %、より好ましくは少なくとも 98 %、および最も好ましくは少なくとも 99 % の同一性を示す。同一性は、少なくとも 10 ヌクレオチド配列部位、より好ましくは少なくとも 10 ヌクレオチド配列部位、より好ましくは少なくとも 12 ヌクレオチド配列部位、より好ましくは少なくとも 13 ヌクレオチド配列部位、より好ましくは少なくとも 14 ヌクレオチド配列部位、より好ましくは少なくとも 15 ヌクレオチド配列部位、より好ましくは少なくとも 16 ヌクレオチド配列部位、より好ましくは少なくとも 17 ヌクレオチド配列部位、より好ましくは少なくとも 18 ヌクレオチド配列部位、より好ましくは少なくとも 19 ヌクレオチド配列部位、より好ましくは少なくとも 20 ヌクレオチド配列部位、より好ましくは少なくとも 21 ヌクレオチド配列部位であり、最も好ましくは特定のポリヌクレオチド配列の全長に及ぶ、比較ウィンドウにわたって見出される。

【0140】

ポリヌクレオチド配列同一性は、以下の様式で判定し得る。対象ポリヌクレオチド配列は、NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/BLAST/>) から公的に入手可能である、b12seq中のBLASTN（プログラムのBLASTスイートから、バージョン 2. 2. 5 [2002 年 11 月]）を使用して、候補ポリヌクレオチド配列と比較される（Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999), “Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences”, FEMS Microbiol Lett. 174:247-250）。低複雑度部分の選別が、オフであるべきことを除いて、b12seqのデフォルトパラメータが使用される。

【0141】

ポリヌクレオチド配列の同一性は、以下のunixコマンド系統のパラメータを使用して検査してもよい。

```
b12seq -i nucleotideseq1 -j nucleotideseq2 -F F -pblastn
```

パラメータ-FFは、低複雑度部分の選別をオフにする。パラメータ-pは、配列対の適切なアルゴリズムを選択する。b12seqプログラムは、行”同一性=”中の同一ヌクレオチドの

10

20

30

40

50

数および百分率の双方として、配列同一性を報告する。

【0142】

ポリヌクレオチド配列同一性はまた、全体的配列アラインメントプログラムを使用して、候補と対象ポリヌクレオチド配列の重なるの全長にわたって計算してもよい（例えばNeedleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453）。Needleman-Wunsch大域アラインメントアルゴリズムの完全な実装は、<http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Software/EMBOSS/>から入手し得るEMBOSSパッケージ中のneedleプログラム（Rice, P. Longden, I. and Bleasby, A. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Trends in Genetics June 2000, vol 16, No 6. pp.276-277）にある。欧州バイオインフォマティクス研究所（European Bioinformatics Institute）もまた、オンラインで2つの配列間のEMBOSS-needle大域アラインメントを実施する便宜を<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>で提供する。

10

【0143】

代案としては、末端ギャップのペナルティを科すことなく、2つの配列の最適大域アラインメントを計算するGAPプログラムを使用して、配列同一性を計算してもよい。GAPは、論文Huang, X. (1994) On Global Sequence Alignment. Computer Applications in the Biosciences 10, 227-235に記載される。

【0144】

配列同一性はまた、比較される配列をClustalWアルゴリズム（Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Research 24, 4876-4882）を使用するVector NTIバージョン9.0を使用して配列し、次に整合配列間の配列同一性の百分率をVector NTIバージョン9.0（2003年9月2日著作権1994-2003 InforMax, Invitrogenの商標）を使用して計算することで、計算してもよい。

20

【0145】

生存可能

「生存可能」という用語は、内生菌に関して本明細書の用法では、成長能力があることを意味する。好ましくは「生存可能」な内生菌は、植物内で増殖して安定した共生を形成できる。

【0146】

種子の発芽

当業者は、種子発芽のための材料と方法を十分知っている。出願人らは、種子発芽条件を最適化して、幼葉中の内生菌生体量最大化した。

30

【0147】

したがって一実施形態では、18～26℃の温度範囲で種子を発芽させる。好ましくは、19～25℃、より好ましくは20～24℃、より好ましくは21～23℃の温度範囲で種子を発芽させる。最も好ましくは、約22℃で種子を発芽させる。

【0148】

さらなる実施形態では、16/8時間の明/暗周期で種子を発芽させる。好ましくは、14/10時間の明/暗周期で種子を発芽させる。より好ましくは、約12/12時間の明/暗周期で種子を発芽させる。最も好ましくは、12/12時間の明/暗周期で種子を発芽させる。

40

【0149】

幼葉を切除する

本発明の好ましい実施形態では、内生菌検出に先だって、幼葉が苗または植物から切除される。当業の研究者らは、植物組織および器官をどのように切除するかを知っている。好ましくは、切除は無菌的に実施されて、異なる苗または植物間の混入を最小化すべきである。

【0150】

好ましくは、方法で使用する前に、幼葉を切除して、それを他の植物組織または器官から実質的に分離する。より好ましくは、方法で使用する前に、幼葉を切除して、それを子

50

葉鞘から、ならびに他の植物組織または器官から実質的に分離する。最も好ましくは、方法で使用する前に、幼葉を切除して、それを子葉鞘およびあらゆる付着種子から、ならびに他の植物組織または器官から、実質的に分離する。

【0151】

出願人らは、このような他の組織および器官（特に種皮および子葉鞘が、生存可能な内生菌検出するための本発明の方法に干渉する、生存不能な内生菌を保有し得ることを示した。したがってこのような他の組織は、好ましくは除去される。

【0152】

子葉鞘

子葉鞘は、発芽単子葉植物中で、出現する苗条を覆う、先のとがった管状保護鞘である。 10

【0153】

幼葉

本発明の大きな利点は、植物の成長初期段階において、（生存不能な内生菌とは対照的に）生存可能な内生菌の存在を検出することである。したがって本方法は、植物中の生存可能な内生菌を検出する他の既知の方法と比べてより迅速である。

【0154】

種子発芽から生存可能な内生菌検出までの時間をできるだけ短縮するために、内生菌は、好ましくは第1葉中で検出される。

【0155】

好ましくはないが、より成長した幼葉もまた本発明の方法で使用し得る。 20

【0156】

一実施形態では、幼葉は、植物種子の発芽後に、植物から生じる最初の5葉の内の1枚である。好ましくは、幼葉は、植物種子の発芽後に植物から生じる最初の4葉、より好ましくは最初の3葉、より好ましくは最初の2葉の内の1枚である。

【0157】

好ましい実施形態では、幼葉は、植物種子の発芽後に植物から生じる第1葉である。

【0158】

第1葉

単子葉植物の第1葉は、子葉、双葉、胚性葉または最初の出葉とも呼ばれ称される。これらは全て、本明細書の用法では、「第1葉」という用語に包含される。 30

【0159】

出願人は、生存可能な内生菌のみが分裂組織の外まで成長して、第1葉原基と、引き続く幼葉に入り得ることを示した。本明細書の用法では、第1葉原基もまた「第1葉」という用語に含まれる。

【0160】

幼葉から抽出物を調製する

本発明の方法は、任意選択的に、幼葉の生菌検出前に、幼葉から抽出物を生成するステップを含む。抽出手順は、もちろん抽出物中の内生菌の存在を検出するのに使用される技術に左右される。 40

【0161】

抗体ベースの方法では、タンパク質抽出手順が使用される。植物からタンパク質抽出物を調製するいくつかの方法は、当業者に知られている（参考文献）。

【0162】

核ベースの方法では、核酸抽出物手順が使用される。植物から核酸抽出物を調製するいくつかの方法は、当業者に知られている（ワールドワイドウェブwww.protocol-online.org/biology-forums/DNA.htmlで入手可能なProtocol Onlineを参照されたい）。好ましい核酸抽出方法としては、DNA抽出法が挙げられる。

【0163】

好ましいDNA抽出法としては、Post法（Post et al., 2003. Euphytica 130: 255-26 50

0)、およびHotShot法(ワールドワイドウェブwww.protocol-online.org/biology-forums/DNA.htmlで入手可能なProtocol Onlineを参照されたい)、Genaid Genomic DNA Mini Kit -Plant (Geneaid Biotech Ltd) が挙げられる。特に好ましいDNA抽出法は、HotShot法である。

【0164】

DNA抽出手順は、本発明の方法において、有利には自動化されてもよい。自動化に適しているDNA抽出手順は、当業者に良く知られている。自動化は、ロボット(例えばSlipstream Automation, Palmerston North, New Zealand)の使用を通じてよい。

【図面の簡単な説明】

【0165】

10

【図1】は、ユニークな融解プロファイルを示す、異なる内生菌株の高分解能融解(HRM)曲線を示す。AR1のHRM曲線は、点線()で示される。AR37のHRM曲線は、実線()で示される。一般的有毒野性型*N. lolii* (N. lolii)のHRM曲線は、破線()で示される。AR42のHRM曲線は、点線/破線()で示される。

【図2】小型(SSU)および大型(LSU)サブユニットリボソームRNAと、内部転写されたスペーサー(ITS)および遺伝子間領域(IGS)とを示す、真核生物からの一般的なリボソーム反復構造を示す。

【図3】プライマーRJ243F(IGSF、LR12R)およびRJ243R(IGSR、invSRIR)(配列番号17および18)を用いた、AR1、AR37、AR42、および一般的有毒野性型*N. lolii* (N. lolii)から得られるIGS配列のためのClustalWを使用したDNA多重配列アラインメントを示す。株間のヌクレオチド多形性、および挿入と欠失が示される。

20

【図4】この領域を異なる内生菌から増幅するのに使用される、遺伝子間スペーサー配列(IGS)の普遍的PCRプライマーを示す。

【実施例】

【0166】

実施例1:PCR増幅の標的として内生菌株特異的配列を同定する

材料と方法

普遍的プライマー(下述)は、Duke UniversityからのIGS配列(図参照)に基づいて合成された(ワールドワイドウェブ<http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>で入手可能)。

30

【0167】

RJ243F(IGSF、LR12R)GAACGCTCTAAGTCAGAAATCC(配列番号17)

RJ243R(IGSR、invSRIR)ACTGGCAGAAATCAACCAGGT A(配列番号18)

【0168】

以下の内生菌株から抽出されたゲノムDNAに対して、PCRを実施した。

一般的有毒野性型

40

AR1

AR42(野性型株に類似)

一般的毒性野性型*N. lolii* (N. lolii)

AR37

AR542

AR584

AR601

FL1

E. シリアリス(E. ciliarus)

【0169】

50

P C R 反応およびサイクル条件は次のとおり。

2 0 μ L 5 prime PCR Extenderキットを使用した反応混合物

2 μ L 1 0 × Tuning 緩衝液

0. 4 μ L 2 5 mM の d N T P

0. 8 μ L (各) 1 0 μ M のプライマー

0. 2 μ L 5 U / μ L の PCR Extender ポリメラーゼ

M Q 最高 2 0 μ L の総容積

4 0 n g テンプレートとしてのゲノム D N A

【 0 1 7 0 】

P C R サイクル条件

9 3 ' C 3 分間

9 3 ' C 1 5 秒間}

6 2 ' C 3 0 秒間} 1 0 ×

6 8 ' C 5 分間}

9 3 ' C 1 5 秒間}

6 2 ' C 3 0 秒間} 1 7 ×

6 8 ' C 5 分間 = 2 0 秒間 / サイクル}

A R 3 7 では、6 0 ° C および 5 8 ° C のアニーリング温度も試された。

【 0 1 7 1 】

結果

ゲルラダーに基づくおよその生成物

A R 1 約 2. 8 K b

A R 3 7 約 1. 8 K b

A R 4 2 約 1. 8 K b

A R 5 4 2 約 2. 2 K b

A R 5 8 4 約 2. 2 K b

A R 6 0 1 約 2. 8 K b

F L 1 約 2. 8 K b

E. シリアリス (E. ciliarus) 約 1. 6 K b

【 0 1 7 2 】

P C R 産物をゲル精製して配列決定し、引き続く株間アラインメントのための I G S 配列を提供した。増幅 I G S 配列の配列は、配列番号 9 ~ 1 6 に示される。

【 0 1 7 3 】

実施例 2 : 内生菌株間で区別するための P C R プライマーデザイン、および P C R の手順と条件の最適化

材料と方法

図 3 に示されるように、clustalW を使用して I G S 配列を配列比較した。

【 0 1 7 4 】

特定内生菌株に特有な領域の側面に位置するプライマーをデザインした (表 1)

結果

表 1 に列挙されるプライマー対を I G S 配列に対してデザインして、高分解能融解 (H R M) P C R によって試験し、3 つの内生菌株 (野性型、A R 1、および A R 3 7) の特徴的な高分解能融解 (H R M) プロファイルを提供するのに有用なものを選択した。

【 0 1 7 5 】

10

20

30

40

【表 2】

表1

プライマー	配列	配列番号
DH008F	gaagagttactagctgatgc	1
AR1F	gaagagttactagctgatg	2
endoph_F1	tagctgatgcgctgttggtc	3
DH004F	ctcatgtgcgggcagtgtag	4
DH004R	ctacactgcccgcacatgag	5
DH_IGS_F	cctaacctatacctgcccg	6
AR1R	cgcgggcaggtatagggt	7
DH007R	cctacatatataatagcattgc	8

10

【0 1 7 6】

予想されたアンプリコン、単一ヌクレオチド多形性（SNP）の数、および特定の株 I G S 配列内の欠失の存在もまた、示されるプライマー対について下の表 2 に列挙される。

20

【0 1 7 7】

【表 3】

表2

プライマー対	内生菌	サイズ	SNP	欠失 (BP)
DH008F/DH004R	AR1	145	5	21
	AR37	145		21
	WT	166		
DH008F/AR1R	AR1	174	5	21
	AR37	174		21
	WT	195		
AR1F/DH004R	AR1	145	5	21
	AR37	145		21
	WT	166		
AR1F/AR1R	AR1	174	5	21
	AR37	174		21
	WT	195		
endoph_F1/DH004R	AR1	135	3	21
	AR37	135		21
	WT	156		
endoph_F1/AR1R	AR1	164	3	21
	AR37	164		21
	WT	185		
DH004F/DH007R	AR1	336	10	24
	AR37	275		40,24 & 21
	WT	360		
DH_IGSF/DH007R	AR1	307	10	24
	AR37	246		40,24 & 21
	WT	331		
	AR1	461	15	21 & 24
	AR37	400		21,40,24 & 21
	WT	506		
B11F/B11R	AR1	148	N/A	N/A
	AR37	130	N/A	N/A
	ctWT	177	N/A	N/A
	AR42	181	N/A	N/A

【0178】

培養した内生菌から抽出された対照DNAを使用して、表2に列挙されるプライマー対についてHRMを実施した。

【0179】

図1で示されるように、プライマー対DH008F/DH007Rは、特徴的なHRMプロファイルを与えることが分かった。

【0180】

プライマー対DH008F/DH007のPCR条件は、次のとおりである。

94℃で4分間

94℃で30秒間、55℃で秒間、72℃で45秒間を×40

72℃で7分間
使用されたamplitaq Goldポリメラーゼ
25 ngのゲノムDNA
10×PCR緩衝液gold1. 5 μL / 5 μLの反応
50 mMのMgCl₂ 0.45 μL
25 mMのdNTP 0.12 μL
10 μMのDH008F / DH007R 0.75 μL
5 U / μLのAmpli Taq Goldを0.12 μL
MQ 9.06 μL

【0181】

内生菌は、ピークサイズベースでなく、融解プロファイルベースで区別されることに留意されたい。

【0182】

実施例3：幼葉中の最大菌糸生体量から苗発芽／成長条件を最適化する

材料と方法

内生菌AR1を感染させたライグラス栽培品種Samsonについて最適化を実施した。

【0183】

(受入番号A10735)。種子サンプルを加熱処理して、生存不能な内生菌感染種子をシミュレートした。内生菌生存度検査は、標準的な技術を使用して、ニトロセルロース膜上に押しつぶした分蘖のウエスタンブロット法によって実施した。ブロッティング検査を実施して、PCR結果との比較のために、そして加熱処理種子中の内生菌が生存不能であることを確認するために、受入中のAR1感染種子の%生存度を測定した。

【0184】

この受入中の種子は、95%生存可能な内生菌を含有し、加熱処理種子中の全ての内生菌が、生存不能であることが確認された(図5)。

【0185】

植物体中の真菌生体量に対する温度の影響を測定するために、種子を19、22、および28℃で13日間発芽させて、18S rRNA遺伝子に対してデザインされたプライマーを使用して、PCRによって内生菌感染について苗を評価した。

【0186】

RJ240F / 18S rRNA (E. フェスツカエ (E. festucae)) : ATCTCTTG GTTCTGGCATCG (配列番号19)

RJ240R / 18S rRNA (E. フェスツカエ (E. festucae)) : TGGTTGCGAGGTGGTATGTT (配列番号20)

【0187】

結果

ブロッティングによって>95%生存度を有することが実証された苗に対するPCR解析は、19または28℃のいずれかで発芽させた種子では、いかなるPCR産物も得られなかったことを示した。それとは対照的に、22℃での発芽種子からの検査された全ての苗は、予想サイズのPCR産物を増幅した。結果は、植物体中の内生菌生体量が、より低い(19℃)またはより高い(28℃)温度のいずれかで成長した苗中では、不十分であることを示す。この結果に基づいて、この先の将来のDNA抽出と引き続くPCR(遺伝子型同定またはHRMのいずれか)は、22℃で成長した苗で実施された。

【0188】

実施例4：種子バッチ中の有益内生菌および非有益内生菌の百分率を評価する

材料と方法

新鮮種子を提供して、上述したような堆肥中に播種した。22℃で14日間の成長後、92本の苗の第1葉を採取して、96ウェルのロボットマイクロタイタートレーに入れた。残りの4つのウェルは対照DNAを含んでなり、内生菌型(wt、AR1、AR37)とPCR条件が評価された。

【0189】

Slipstream AutomationによってDNAをロボット制御で抽出し、96ウェルHRMプレートにロボット制御で移した。上述のプライマーDH008F/DH007Rと条件を使用して、HRM PCRを実施した。HRMソフトウェアは、各ウェルについて高分解能融解プロファイルを判定し、生存度状態（検出生成物）と内生菌型（AR1、AR37またはwt）を自動的に割り当てる。生存度百分率および百分率オフタイプ（percent of f type）は、92からの陽性の数に100を乗じた、直接計算値である。

【0190】

最初の概念実証実験は、それから第1葉を採取した元の苗を保持して、苗をさらに4週間（合計6週間）栽培し、次に免疫ブロット分析して、非依存性（非分子）法によって、それらの感染状態を判定した。ブロットニング結果は、同一苗を用いたHRMで得られた結果と比較された。

【0191】

さらにHRMによって評価するために、異なるライグラス栽培品種と異なる内生菌株を含んでなる種子系統がGTLによって提供され、これらもまた、ブロットニング結果と比較された（表2）

【0192】

結果

下の表3で示されるように、ブロットニング結果とHRM結果の間には、高い相関があった。

【0193】

【表4】

表3

系統番号	内生菌	栽培品種	苗日齢	AgResearch Extracted DNA				Slipstream Automation Extracted DNA					
				HRM結果		ブロット結果		HRM結果		ブロット結果		SSA HRM結果	
				実測	%	ブロット実測	%	実測	%	ブロット実測	%	実測	%
A16360	AR1	5773 AR1	10	87/91	96%	89/91	98%	74/90	82%	90/90	100%	88/91	97%
			12	88/90	98%	88/90	98%	87/81	96%	90/91	99%		
			14	89/92	97%	91/92	99%	86/87	99%	87/87	100%		
A15403	AR37	Samson AR37	10	83/92	90%	85/92	92%	55/89	62%	81/89	91%	77/90	86%
			12	84/91	92%	83/91	91%	74/90	82%	81/90	90%		
			14	76/89	85%	76/89	85%	80/92	87%	81/92	88%		
A15862	AR37	Commando AR37	10	69/92	75%	70/92	76%	66/91	73%	79/91	87%	68/88	77%
			12	85/92	92%	84/92	91%	72/88	82%	73/88	83%		
			14	79/91	87%	79/91	87%	72/91	79%	73/91	80%		
N1892	AR1	Marsden AR1	10	80/84	95%	82/84	98%	62/89	70%	84/89	94%	85/91	93%
			12	84/90	93%	88/90	98%	84/91	92%	89/91	98%		
			14	86/91	95%	88/91	97%	86/92	93%	89/92	97%		

【0194】

参考文献

Fletcher, L.R. 1999: "Non-toxic" endophytes in ryegrass and their effect on livestock health and production. In Ryegrass endophyte: an essential New Zealand symbiosis.

Fletcher, L.R.; Easton, H.S. 2000: Using Endophytes for Pasture Improvement in New Zealand. In Proceedings of The Grassland Conference 2000, 4th International Neotyphodium/Grass Interactions Symposium. Eds. Paul, V. H. ; Dapprich, P. D. Uni

verstat, Paderborn, pp 149-162.

Leuchtmann, A.1997: Ecological diversity in Neotyphodium-infected grasses as influenced by host and fungus characteristics. In Neotyphodium/Grass Interactions, Eds. Bacon, C.W.; Hill, N.S. Plenum Press, New York, pp 93-108.

Mullis et al., Eds. 1994 The Polymerase Chain Reaction, Birkhauser

Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, and Markham AF (1989). "Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS)". Nucleic Acids Research 17 (7): 2503-256.

Rowan, D.D.; Latch, G.C.M.1994: Utilization of endophyte-infected perennial ryegrasses for increased insect resistance. In Biotechnology of endophyte fungi in grasses. Eds. Bacon, C.W. White, J. CRC Press, pp 169-183.

Stuedemann, J.A.; Hoveland. C..1988: Fescue endophyte: History and impact on animal agriculture. Journal of Production Agriculture 1: 39-44.

Zietkiewicz E., Rafalski A., and Labuda D. (1994). "Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) -anchored polymerase chain reaction amplification". Genomics 20 (2): 176-83.

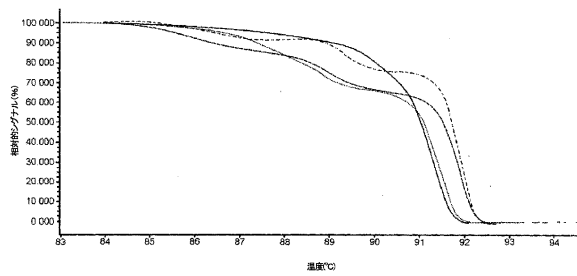
【 0 1 9 5 】

【表 5】

配列の要約

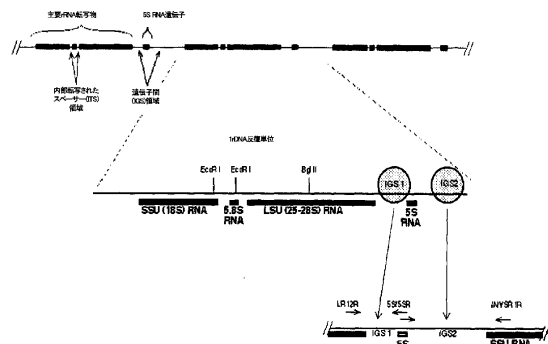
配列番号	配列	タイプ	参考
1	ポリヌクレオチド	人工, プライマー	DH008F
2	ポリヌクレオチド	人工, プライマー	AR1F
3	ポリヌクレオチド	人工, プライマー	endoph_F1
4	ポリヌクレオチド	人工, プライマー	DH004F
5	ポリヌクレオチド	人工, プライマー	DH004R
6	ポリヌクレオチド	人工, プライマー	DH_IGS_F
7	ポリヌクレオチド	人工, プライマー	AR1R
8	ポリヌクレオチド	人工, プライマー	DH007R
9	ポリヌクレオチド	内生菌 IGS 領域	ctWT
10	ポリヌクレオチド	内生菌 IGS 領域	AR42
11	ポリヌクレオチド	内生菌 IGS 領域	AR37
12	ポリヌクレオチド	内生菌 IGS 領域	AR1
13	ポリヌクレオチド	内生菌 IGS 領域	AR601
14	ポリヌクレオチド	内生菌 IGS 領域	AR584
15	ポリヌクレオチド	内生菌 IGS 領域	AR542
16	ポリヌクレオチド	内生菌 IGS 領域	AR1501 [FL1]
17	ポリヌクレオチド	人工, プライマー	RJ243F (IGSF, LR12R)
18	ポリヌクレオチド	人工, プライマー	RJ243R (IGSR, invSRIR)
19	ポリヌクレオチド	18S rRNA プライマー	RJ240F
20	ポリヌクレオチド	18S rRNA プライマー	RJ240R

【図 1】



【図 2】

リボソーム反復遺伝子



【図 4】



【図 3】

Figure 3

[illegible]

【配列表】

0006122437000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 ジョンソン, リチャード, デーヴィッド
ニュージーランド国, パーマストン ノース 4472, アールディー2, スコッツ ロード 3
76ビー

(72)発明者 ヴォワゼー, クリスティン, ロザリー
ニュージーランド国, パーマストン ノース 4410, アール プレイス 14

審査官 宮岡 真衣

- (56)参考文献 特開2003-300805 (JP, A)
国際公開第2004/106487 (WO, A1)
Belanger, F., A rapid seedling screening method for determination of fungal endophyte viability., Crop Science, 1996年, 36(2):, 460-462
WELTY REら, Detecting viable Acremonium endophytes in leaf sheaths and meristems of tall fescue and perennial ryegrass., Plant Disease, 1986年, 70:, 431-435
Higgins KLら, Culturing and direct PCR suggest prevalent host generalism among diverse fungal endophytes of tropical forest grasses., Mycologia, 103(2)(Epub 2010.10.1), 247-60
Cohen SDら, Host selectivity and genetic variation of *Discula umbrinella* isolates from two oak species: analyses of intergenic spacer region sequences of ribosomal DNA., Microb Ecol., 2006年, 52(3):, 463-9
Lacava PTら, Rapid, specific and quantitative assays for the detection of the endophytic bacterium *Methylobacterium mesophilicum* in plants., Journal of Microbiological Methods, 2006年, Volume 65, Issue 3, 535-541
Castellanos E.ら, Rapid identification and differentiation of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis types by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis of the MAP1506 locus., J Clin Microbiol., 2010年, 48(4):, 1474-7.
菅原 幸哉 他, Glassland Science, 49(5)(2003), p.536-542
GANLEY A.R.D. et al , Genetics, 150(1998), p.1625-1637
Epichloe typhina strain E8 ribosomal RNA intergenic region, partial., ddbjpln_3|AF049673, 2002年 7月 7日
Oliveira JAら, Incidence and viability of *Acremonium* endophytes in tall fescue accessions from North Spain., Genetic Resources and Crop Evolution, 1997年, 44(6):, 519-522
Holder TLら, Incidence and viability of *Acremonium* endophytes in tall fescue and meadow fescue plant introductions., Crop Science, 1994年, 34(1):, 252-254.
Dombrowski, James E.ら, A sensitive PCR-based assay to detect *Neotyphodium* fungi in seed and plant tissue of tall fescue and ryegrass species., Crop Science, 2006年, 46(3), 1064-1070

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/09
C12Q 1/68
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
PubMed
GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq