

イチゴ無病苗供給のための遺伝子診断技術の開発

遺伝子情報活用担当 小山 浩由

1 背景・目的

- 埼玉県種苗センター（以下、種苗センター）ではイチゴ苗の生産・供給をしており、平成30年度からは本県育成品種である「かおりん（品種名：埼園い1号）」「あまりん（品種名：埼園い3号）」の生産が開始されています。

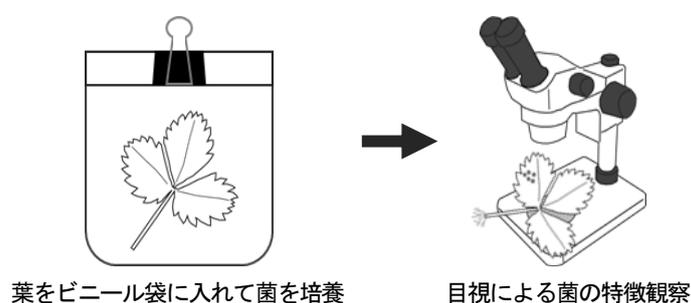


図1 目視観察の概要

- 供給する種苗は無病苗であることが重要となることから、種苗センターでは目視による観察で炭疽病菌および萎黄病菌の検査を実施していますが、時間がかかる点、各菌の特徴の判定に経験を必要とする点が課題となっていました。

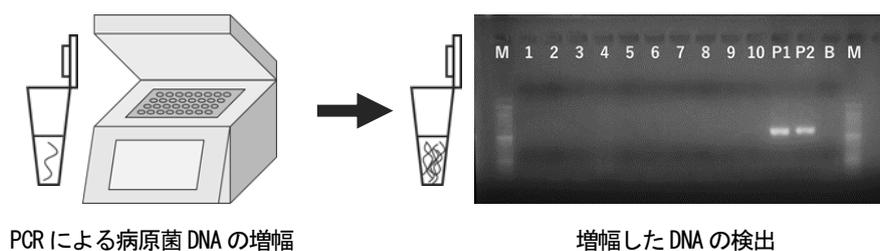


図2 PCR法の概要

- 一方、近年の病害診断技術としてPCR*法による遺伝子診断が活用されています。

*: ポリメラーゼ連鎖反応（Polymerase Chain Reaction）の略

DNAの特定領域を指数関数的に増幅させる技術でウイルスや病原菌の検出、作物の品種判別、遺伝子組換え作物の検査などに用いられる。

- 病害診断技術として活用されているPCR法による検査は、病原菌の微量なDNAを短時間で増幅し、目的の増幅産物長のバンド**の有無を判定の基準とするため、検査に時間がかからず観察経験を必要としないといったメリットがあります。

** : PCRにより得られるDNAの増幅産物をゲル電気泳動解析した際に確認される泳動像

(図2の画像「増幅したDNAの検出」のP1, P2の下に現れるような線状の像)

特定のDNA領域を増幅するように設計されているため、目的の増幅が起こった場合は推定される大きさの位置に像が確認できる。

- PCR法によるイチゴ炭疽病および萎黄病の診断技術についても、すでいくつかの報告がありますが、県内菌株への適用性が未検討であったことから、適応性の検討および新規検出条件の開発を行いました。また、種苗センターで可能なDNA抽出方法として、抽出する部位と方法について検討しました。
- 開発した技術は専門的な知識が不要で実用的な診断技術マニュアルとしてまとめ、種苗センター職員による実証を行ったので、それらの成果について説明します。

2 試験方法及び結果

(1) PCR法による県内菌株の検出

- 供試材料として、県内のイチゴ炭疽病および萎黄病発生圃場より分離した菌株（以下、県内菌株）を用いました。また、炭疽病菌や萎黄病菌の検出には既に報告のあるプライマー***を用いてPCRを実施しました。

*** : PCRによるDNAの増幅に必要な短い一本鎖DNA

DNAの増幅反応の起点になるもので、目的とするDNA領域の両端と同じ配列に設計する。

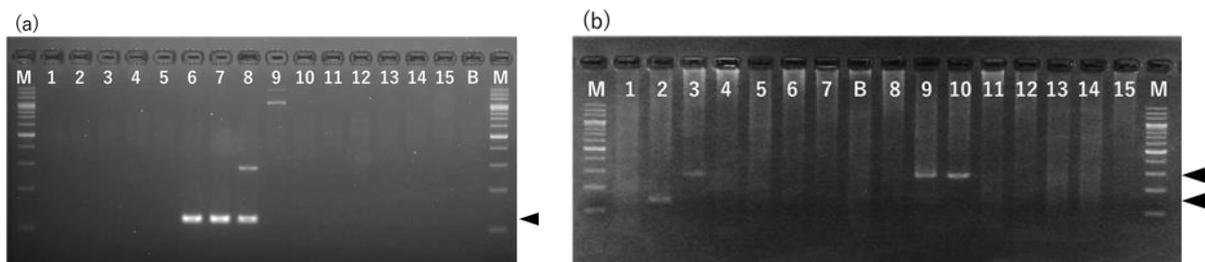


図3 イチゴ病原菌検出プライマーの検討

(a): 萎黄病菌検出プライマー, (b): 炭疽病菌検出プライマー, 1-5: ジーンバンク分譲炭疽病菌 (1: *C. fioriniae*, 2: *C. aenigma*, 3: *C. siamense*, 4-5: *C. fructicola*), 6-7: ジーンバンク分譲萎黄病菌 (6-7: *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*), 8: 県内分離萎黄病菌, 9-14: 県内分離炭疽病菌, 15: 県内分離非対象菌株, B: ブランク, M: DNAサイズマーカー
矢印は目的増幅産物長の位置を表す。

- 図3は既に報告のあるプライマーを用いてPCRを実施した結果です。

- 萎黄病菌では県内菌株で目的の増幅産物長のバンドが確認されました。これにより、報告のあるプライマーによって県内菌株の検出が可能であることがわかりました。
- 一方、炭疽病菌では県内菌株の一部で目的の増幅産物長のバンドが確認されませんでした。

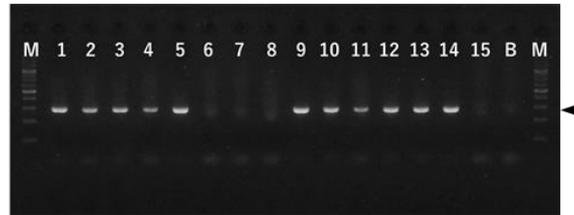


図4 新規設計炭疽病菌検出プライマーの検討

1-5: ジーンバンク分譲炭疽病菌 (1: *C. fioriniae*, 2: *C. aenigma*, 3: *C. siamense*, 4-5: *C. fructicola*) , 6-7: ジーンバンク分譲萎黄病菌 (6-7: *F. oxysporum* f.sp. *fragariae*) , 8: 県内分離萎黄病菌, 9-14: 県内分離炭疽病菌, 15: 県内分離非対象菌株 , B: ブランク, M: DNAサイズマーカー

矢印は目的増幅産物長の位置を表す.

- そこで、県内菌株も検出するため新たにプライマーを作成しました。図4は新たに作成したプライマーを用いてPCRを実施した結果です。
- 新規に作成したプライマーでは、すべての県内菌株で目的の増幅産物長のバンドが確認されました。よって、以降の炭疽病菌検出には作成したプライマーを用いて検出を行いました。

(2) DNAの抽出方法

- 供試材料として、炭疽病菌および萎黄病菌をそれぞれ接種したイチゴ苗を用いました。DNA抽出は葉柄基部や根からDNAを抽出する方法、および培地に葉柄基部を浸漬し2〜3日培養した培養液からDNAを抽出する方法を実施しました。

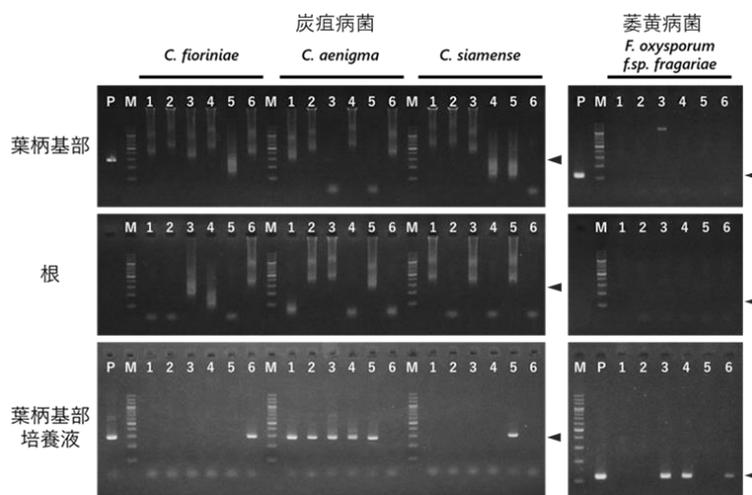


図5 イチゴ病原菌検出におけるDNA抽出の検討

1-6: 病原菌接種株DNA試料, P: ポジティブコントロール, B: ブランク, M: DNAサイズマーカー
葉柄基部, 根, 葉柄基部培養液はそれぞれDNA抽出に用いた試料を表す。
各菌株接種区における同一の数字は, 同一個体から採取した試料であることを表す。
矢印は目的増幅産物長の位置を表す。

- 図5は病原菌を接種したイチゴ苗から、各手法により抽出したDNAを用いてPCRを実施した結果です。
- 葉柄基部や根からDNAを抽出する方法では炭疽病菌および萎黄病菌を接種したすべての供試試料で目的の増幅産物長のバンドは確認されませんでした。
- 一方、培養液から抽出する方法では炭疽病菌および萎黄病菌を接種した両方の供試試料で目的の増幅産物長のバンドが確認されました。
- そこで、病原菌の検出は葉柄基部を浸漬し培養した培養液からDNAを抽出する方法に決定しました。

(3) PCR法と目視観察の比較

- 炭疽病菌および萎黄病菌をそれぞれ接種したイチゴ苗を用いて、冬季（1月）と夏季（8月）の2回試験を実施しました。
- PCR法は（1）で決定したプライマーと（2）で決定した方法により培養液から抽出したDNAを供試し、検出を行いました。
- 目視観察は、病原菌接種苗の葉をビニール袋に入れて2週間培養し、現れた孢子塊や菌糸の観察により実施しました。

表1 各手法によるイチゴ炭疽病・萎黄病菌の検出数の比較

		炭疽病接種区			萎黄病接種区
		<i>C. fioriniae</i>	<i>C. aenigma</i>	<i>C. siamense</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>
1月	PCR法	2	5	1	5
	目視観察	2	2	0	3
8月	PCR法	1	5	1	3
	目視観察	0	0	1	3

各接種区とも6株を供試した。

- 表1はPCR法と目視観察により病原菌を検出した結果です。
- PCR法で目的のバンドが検出された株数は、1月の*C. fioriniae*接種区で2株、*C. aenigma*接種区で5株、*C. siamense*接種区で1株、*F. oxysporum* f.sp. *fragariae*接種区で5株、8月の*C. fioriniae*接種区で1株、*C. aenigma*接種区で5株、*C. siamense*接種区で1株、*F. oxysporum* f.sp. *fragariae*接種区で3株でした。
- 目視観察で目的の菌が確認された株数は、1月の*C. fioriniae*接種区で2株、*C. aenigma*接種区で2株、*C. siamense*接種区で0株、*F. oxysporum* f.sp. *fragariae*接種区で3株、8月の*C. fioriniae*接種区で0株、*C. aenigma*で接種区0株、*C. siamense*接種区で1株、*F. oxysporum* f.sp. *fragariae*接種区で3株でした。
- このことから、PCR法は目視観察と同程度またはそれ以上の検出精度であることがわかりました。
- また、検査に必要な日数はPCR法で5日程度、目視観察で14日程度であり、PCR法は目視観察よりも迅速に検査可能でした。

(4) 種苗センターにおける実証

- 開発および検討した条件をまとめたマニュアルを作成し、種苗センターにおいて研修を実施しました。

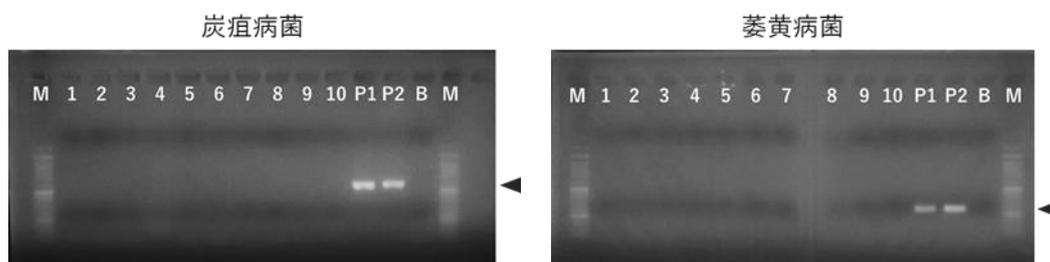


図6 種苗センター職員によるPCR法の病害診断結果

1-9: 種苗センター管理イチゴ苗供試試料, P: ポジティブコントロール, B: ブランク, M: DNAサイズマーカー

矢印は目的増幅産物長の位置を表す.

- 図6は種苗センター職員によるPCR法の病害診断を実施した結果です。
- ポジティブコントロールで目的の増幅産物長のバンドが確認されました。
- 開発した技術は、未経験の職員でも実施が可能でした。

3 今後に向けて

- 種苗センターでは2017年以降イチゴ苗の供給数が増加傾向にあり、2020年には新品種を含めて61,152株を供給しており、従来よりも迅速に未経験の職員でも可能なPCR法の検査が重要になると考えられます。
- 種苗センターにもPCR機器が導入され、種苗センターにおける遺伝子検査体制が整い始めていることから、今後とも、県育成品種をはじめとする健全な種苗の供給のため、種苗センターと連携して遺伝子診断に関する支援をしていきます。