

造林樹木苗の安定生産に向けた 苗木病害の迅速な診断手法の開発

SATテクノロジー・ショーケース2022

■ はじめに

日本の陸地面積の約7割を占める森林のうち、約4割は人工林で構成されています。現在、戦後の拡大造林期に植栽された造林木の半数以上が利用期を迎えており、主伐後の再造林施策に向けて造林樹木苗の需要が高まっています。一方で、苗木の安定生産を阻害する要因として、病害による苗木の枯損被害の発生・拡大が懸念されています。特に、主要な造林樹種であるスギ (*Cryptomeria japonica*) においては、最重要病害として知られる赤枯病 (病原菌: *Passalora sequoiae*) の発生が危惧されています。被害の拡大を抑制するためには、迅速な診断を行うことが重要になります。しかし、従来の外観的症状による診断では、専門的な知識がなければ症状が類似する他の病害と誤診してしまうリスクが潜在しています。

そこで森林総合研究所では、迅速かつ正確に診断を行うために、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅 (RPA: Recombinase Polymerase Amplification) 法という核酸増幅技術を活用したスギ赤枯病菌の検出方法の開発を行いました。RPA法は、一定の温度に維持することで核酸を増幅する等温核酸増幅法の1つで、反応温度が比較的低く (37~42℃)、反応時間が短い (10~20分) ことが特徴として挙げられます。

■ 活動内容

1. スギ赤枯病菌特異的プライマーの設計

スギ赤枯病菌を特異的に検出するために、*rpb2* (RNA polymerase II subunit) 遺伝子の部分塩基配列情報を解読し、DNAデータベースに登録されている近縁種の塩基配列情報と比較してスギ赤枯病菌に特異的に結合するプライマーを設計しました。

2. 罹病苗木からのスギ赤枯病菌の検出

TwistAmp® Basic kit (TwistDx Ltd., Cambridge, UK) と設計した特異的プライマーを用いて、罹病苗木からの検出方法の検討を行いました。

スギ赤枯病に罹病した苗木から罹病針葉、無病徴針葉および症状が類似する他の病害に罹病した針葉を採取し (図1)、DNAを抽出しました。滅菌水で5~10倍に希釈したDNA抽出液と特異的プライマー、およびTwistAmp® Basic kitを製品プロトコルに従って混合して反応液を調整し、37℃で10分間の増幅反応を行いました。増幅産物をカラム精製キットで精製した後、アガロースゲルを用いた

電気泳動によって増幅の有無を確認した結果、スギ赤枯病に罹病した針葉由来のDNA抽出液でのみ増幅が確認されました (図2)。

本手法を用いることで、DNA抽出から検出結果の確認まで約1時間で完了する迅速な診断が可能になります。

■ 今後の課題

RPA法は、これまで医療分野で主に応用されてきた技術ですが、樹木病原菌の検出にも有効であることが確認できました。今後は、電気泳動を行わずに増幅産物を確認できる技術を適応させることで、より簡易で迅速かつ現場での診断に適した手法に発展させていくことを計画しています。

■ 関連情報等 (特許関係、施設)

論文 Ando Y., Masuya H. (2021) Rapid detection of *Passalora seuoiae* causing needle blight on Japanese cedar. *Journal of Forest Research*, 26:136-142.

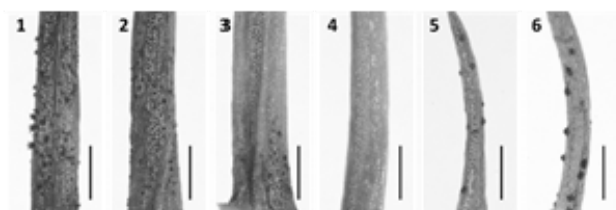


図1 DNA抽出に用いた針葉。1~3: 赤枯病罹病針葉。4: 健全な針葉。5~6: 症状が類似する他の病害 (5: フオマ葉枯病、6: ペスタロチア病) の針葉。

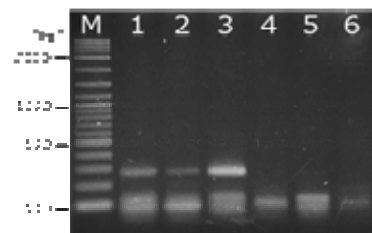


図2 RPA増幅産物の電気泳動の結果。1~6: 図1の番号と対応。M: 100 bp ラダーマーカー。

代表発表者 安藤 裕萌 (あんどう ゆうほ)
所 属 (国研) 森林研究・整備機構 森林総合研究所
きのこ・森林微生物研究領域
問合せ先 〒305-8687 つくば市松の里1
TEL: 029-829-8246 FAX: 029-873-1543
yuhando@ffpri.affrc.go.jp

■ キーワード: (1) 造林樹木苗
(2) 樹木病害
(3) 迅速診断

■ 共同研究者: 升屋 勇人 (森林総合研究所)