

新技術 解説

イチゴの RNA 簡易抽出法および遺伝子診断法

—誘導抵抗性を利用したイチゴの病害防除技術の開発に向けて—

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所 なるさか 鳴坂 よしひろ 義弘・なるさか 鳴坂 まり 真理

はじめに

国民の食の安全、安心および環境保全への意識の向上から、減農薬や無農薬栽培へのニーズは高まっている。また、病害虫の薬剤耐性の発達が深刻化しており、従来の殺菌・殺虫性の農薬に依らない防除法の開発が求められている。

植物は生物学的ストレス（病原菌感染、虫害等）、環境ストレス（乾燥、塩、温度等）を受けると防御反応を発動する。特に、病害抵抗反応を誘導する物質はエリシターと呼ばれ、病原菌の細胞壁成分、銅などの重金属、紫外線（賀来・渋谷，2001）などがあり、病害防除への利用が試みられている。また、植物自身が備えている病害防御機能の活性化による病害防除剤としてプラントアクチベーターが開発されている（鳴坂ら，2010）。プラントアクチベーター（プラントディフェンスアクチベーター、抵抗性誘導剤）として、これまでにオリゼメート（プロベナゾール，PBZ：明治製菓）、バイオン（アシベンゾラル-S-メチル，ASM，BTH：シンジェンタジャパン，現在は農薬登録抹消）、ブイゲット（チアジニル，TDL：日本農薬）、ルーチン（イソチアニル：バイエルクロップサイエンス）が商品化された。殺菌性の農薬は病原菌に直接的に作用し、殺菌，病原菌の生育阻害等により病害を防除する。一方，プラントアクチベーターは植物が持つ内在性の防御システムを活性化して病害を防除する化合物であり，①複数の病原菌に対して予防的な効果がある（作用スペクトルが広い），②病原菌には直接作用せず，耐性菌の出現率が極めて低い，③防除効果が長期間持続する，④生態系への直接の影響は少なく環境に対する負荷が低い，という特徴を有している。主にイネの病害を対象としたプラントアクチベーターにはこれまで，国内外を通して薬剤耐性菌の発生の報告はなく，耐性菌発生のリスクは極めて低いと考えられる。このよう

な特徴はイチゴの重要病害であるイチゴ炭疽病（*Colletotrichum gloeosporioides* 種複合体），イチゴうどんこ病（*Sphaerotheca aphanis* (Wollroth) Braun var. *aphanis*）等の防除にとっても非常に有用である。これまでに，プラントアクチベーターがイチゴ炭疽病の防除に効果があると報告されているが（樋口，2011），農薬登録されているプラントアクチベーターはない。その原因としては，農薬登録に関する経済的な理由のほかに，イチゴの誘導抵抗性に関する研究・試験が十分でなく，知見および技術が乏しいことも一つの要因と考えられる。本稿では，イチゴの誘導抵抗性の評価に有用な高品質の RNA の簡易抽出法，誘導抵抗性のマーカー遺伝子，イチゴのマイクロアレイ解析について紹介したい。

I イチゴ葉から的高純度 RNA の抽出

イチゴの誘導抵抗性の解析のためには，高品質の RNA を抽出する必要がある。イチゴの組織は RNA 抽出を阻害し，その後の実験操作でも阻害の原因となる様々な成分を含んでいる。特に，ポリフェノール類，タンニン，多糖類を多く含むことから，一般的な抽出方法や市販の抽出キットでは，PCR，リアルタイム PCR およびマイクロアレイ等の実験に使用できる高品質の RNA の抽出は困難である。私たちは，特別な技術や準備を必要とせず，専門知識を有していない実験補助員などでも簡単に短時間で高品質な RNA を抽出することが可能な方法を検討した。その結果，total RNA を自動で精製できる promega 株式会社の Maxwell®RSC simplyRNA Kits と Maxwell®RSC Instrument の組合せ，またマニュアル精製する場合は，ReliaPrep™ RNA Miniprep Systems (promega(株)) が有効であったので紹介する。

自動化キットを用いた方法を図-1 および 2 にまとめた。本法では，最大 16 サンプルを 1 時間程度で精製できる。Maxwell®RSC Instrument は，promega(株)から貸し出しも行っているので利用しやすい。また，イチゴ以外の植物および動物の細胞・組織からの抽出も可能である。私たちは，シロイヌナズナ，ベンサムアーナタバコ，イネ，ハクサイ，コマツナ，チンゲンサイ，トマト，

A Rapid Protocol for Extraction of High Quality RNA from Strawberry Plant Tissues. By Yoshihiro NARUSAKA and Mari NARUSAKA (キーワード：RNA, 遺伝子診断, イチゴ, プラントアクチベーター, 誘導抵抗性評価)