



Title	ジャガイモ健全種苗育成に向けたウイルス除去技術の省力化・効率化に関する研究
Author(s)	鈴木, 智
Description	この博士論文の全文は利用可能日以降に公開されます。利用可能日以前の閲覧方法は https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/ をご参照ください。
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第16685号
Issue Date	2025-12-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16685
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/98659
Type	doctoral thesis
File Information	SUZUKI_Tomo_summary.pdf, 全文の要約



博士論文の要約

博士の専攻分野の名称： 博士（農学）

氏名 鈴木 智

学位論文題名

ジャガイモ健全種苗育成に向けたウイルス除去技術の省力化・効率化に関する研究

ジャガイモは栄養繁殖性作物であり、栽培期間中にウイルスに感染すると、種イモを介して次世代へ感染が伝播する。また、増殖率は約 10 倍と穀類に比べて著しく低いため、国内では、市場に流通するまでに、種イモを年ごとに段階的に増殖する体系が採用されている。この増殖体系に新品種を導入する場合、農研機構種苗管理センターにおいて、ウイルス非感染（ウイルスフリー）が確認された培養苗から増殖が開始される。ウイルスフリー培養苗の作出には、ウイルス感染塊茎のスクリーニング検査、茎頂培養によるウイルスフリー化処理、再生培養苗のウイルスフリー確認検査といった工程を経る必要がある（図 1）。しかし、これらの工程で用いられる RT-PCR によるウイルス検定は、RNA 抽出操作にかかる作業負担が大きいことに加え、国内で発生が報告されている全 12 種のウイルスに対応可能なプライマーセットが未整備という課題がある。また、ジャガイモの茎頂培養技術は、0.2～1.0 mm の茎頂組織を無菌培養で再生させ、ウイルスを除去する方法である。切除サイズが小さいほどウイルス除去率は高まるが、作業負担が大きくなることに加え、再生率が低下し再生期間も長期化する。よって、ウイルス除去効率の向上や植物体の再生期間の短縮など、作業の簡便化・効率化に繋がる技術的な改良が求められている。本研究では、これら課題の解決とジャガイモのウイルス除去技術の基盤強化を目的として、省力的なウイルス検定法の開発および RNA サイレンシング機能の活性化に着目した茎頂培養技術の改良に取り組んだ。

1. 熱処理鋳型調製法を用いた RT-PCR による省力的なウイルス検定法の開発

茎頂培養に使用する塊茎のスクリーニング検査は、従来、Trizol 法で精製した RNA を用いた RT-PCR により行われており、多検体の検査には大きな作業負担が伴っていた。そこで、これに代わる簡易手法として、RNA 抽出操作を省略した RT-PCR により、ジャガイモ葉の粗汁液から国内主要 4 種ウイルス（ジャガイモ葉巻ウイルス（PLRV）、ジャガイモ S ウイルス（PVS）、ジャガイモ X ウイルス（PVX）、ジャガイモ Y ウイルス（PVY））を迅速に検出する新規検定法を開発した。本法の開発に際して、既報の主要 4 種ウイルスおよびジャガイモ遺伝子 *E1α* を同時検出するプライマーセット（Onozuka et al., 2020）に含まれる PVS・PVX・*E1α* の検出プライマーを再設計し、これをプライマーミックス A とした（図 2）。本法は、ジャガイモ葉の希釈粗汁液とプライマーミックス A を PCR チューブ内で混合し、70℃で 5 分の熱処理操作を施す「熱処理鋳型調製法」により RT-PCR 鋳型を調製する。そして、所定の RT-PCR キット試薬を添加することで、one-step multiplex RT-PCR によりウイルスを同時検出することが可能である。本検定法の特徴は粗汁液とプライマーを混ぜて熱処理する点にあり、粗汁液単独で熱処理するよりもウイルスを

高感度に検出できる（図3）。検出感度は、ウイルス検定で広く使用される ELISA や、以前に開発した RNA 簡易抽出法（ろ紙法）を用いた RT-PCR と同等以上であり、鋳型調製に要する時間も大幅に短縮した（データ省略）。さらに、熱処理鋳型調製法は塊茎組織からの直接検出やリアルタイム RT-PCR にも適用できることを確認した。本法は、鋳型調製に劇物試薬を使用しないことから安全性にも優れており、スクリーニング検査の省力化および迅速化に資する新たな技術として有望である。

2. 国内既報告ウイルス8種を対象としたプライマーセットの整備と育種圃場周辺におけるウイルス発生調査

国内で発生が報告されている 12 種ウイルスのうち、主要 4 種以外の 8 種ウイルスから、それぞれ 4 種ずつ検出するプライマーミックス B およびプライマーミックス C を設計した。これらに熱処理鋳型調製法を用いた RT-PCR を適用したところ、ミックス B では 80℃、ミックス C では 98℃で 5 分の熱処理を施すことによって、ろ紙法の RNA 溶液を用いた RT-PCR と同等以上の検出感度が得られた（図4、図5）。これにより、国内報告のある 12 種のジャガイモウイルスを 3 通りの RT-PCR で効率的に検出することが可能となった。

プライマーミックス A、B、C を用いて、北海道芽室町のジャガイモ遺伝資源保存圃でウイルスの発生調査を実施したところ、PVS が最も多く検出され、次いで PVX および PVY が検出された（表 1）。また、一部の品種では PLRV やジャガイモ M ウイルスも検出された。これらの結果から、本プライマーミックスの実用性が示されるとともに、新品種導入の際に 12 種ウイルスを検定することの重要性が確認された。

3. ジャガイモの茎頂培養によるウイルスフリー化技術の改良

ニンニクの茎頂培養において、アスコルビン酸誘導体、ジャスモン酸系誘導剤、および PVS 特異的な低分子干渉 RNA（siRNA）を茎頂組織に処理することで、薬害の発生を抑えつつウイルスフリー化効率が向上することが報告されている。そこで、0.2 mm～0.3 mm（葉原基 1～2 枚程度）の茎頂でないと除去が困難とされ、ウイルス発生調査で最も多く検出された PVS を対象に、これらの試薬のジャガイモ茎頂培養への適用を検討した（図6）。

茎頂培養試験を実施するにあたり、ジャガイモ培養苗の節分割培養に用いる MS 培地における sucrose 濃度および光条件を検討し、茎頂材料の効率的な作出法を確立した。この作出法により調製した、PVS に感染したジャガイモ品種‘男爵薯’の培養苗の茎頂組織を採取し、各処理が茎頂培養のウイルスフリー化や生育へ与える影響を検討した。

アスコルビン酸誘導体を添加した MS 培地での茎頂培養では、0.2 mm～0.3 mm および 0.3 mm～0.5 mm（葉原基 2～3 枚程度）の茎頂組織を切り出して茎頂培養試験を実施した。その結果、PVS 除去効果は限定的であったが、いずれの茎頂サイズにおいても再生期間の短縮が認められた。複数の品種の培養苗由来または塊茎由来の茎頂組織を用いて再生期間を比較した結果、再生期間の有意な短縮と再生率の向上が確認された。このことから、アスコルビン酸誘導体添加培地は、培養苗の効率的な生産に有用であると考えられた。

ジャスモン酸系誘導剤を添加した MS 培地での茎頂培養では、茎頂組織における PVS 陽性率が有意に低下した。一方、著しい生育異常や再生期間の長期化が認められた。アスコルビン酸誘導

体の同時添加により再生期間の短縮が確認され、さらに通常培地への植え継ぎにより生育異常の回復も観察された。今後、より生育への影響が少ない処理方法の検討が必要である。

siRNAを使用した茎頂培養の試験では、初めにPVSを標的とするsiRNAを設計した。PVSに感染したジャガイモ葉から全RNAを抽出し、small RNAシーケンスを実施した。得られたsmall RNAデータセットをPVSゲノム配列にマッピングし、カバレッジ領域を解析することで、PVSを標的とするsiRNAを推定し、22塩基長のsiRNAを4種類設計した。次に、PVSの感染により局部病斑を形成するアカザおよびセンニチコウの葉に設計した4種類のsiRNAの混合液を塗布し、その後PVSを接種したところ、局部病斑の形成が抑制された。設計したsiRNAの抗PVS効果が確認されたことから、今後ジャガイモ茎頂組織への効率的なsiRNAの導入法の検討が必要である。

結論

本研究では、熱処理鋳型調製法およびジャガイモの国内発生ウイルス12種に対応可能なプライマーセットを開発することで、ウイルスフリー化事業におけるウイルス検定作業の省力化と検査体制の強化を可能にした。特に、熱処理鋳型調製法は他作物や他ウイルス種への応用展開が期待できる汎用性の高い技術であり、種イモ生産にとどまらず、さまざまな作物に対する検定体制の強化にも貢献できる。また、茎頂培養技術の改良については、アスコルビン酸誘導体の生育促進効果、ジャスモン酸系誘導剤によるPVS除去効果、抗PVS効果を示すsiRNAの設計など、有用な知見が得られた。これらの成果は、ウイルスフリー苗の迅速な供給体制の構築に寄与し、ジャガイモ健全種苗生産の効率化と安定化に資する技術基盤の強化に大きく貢献する。

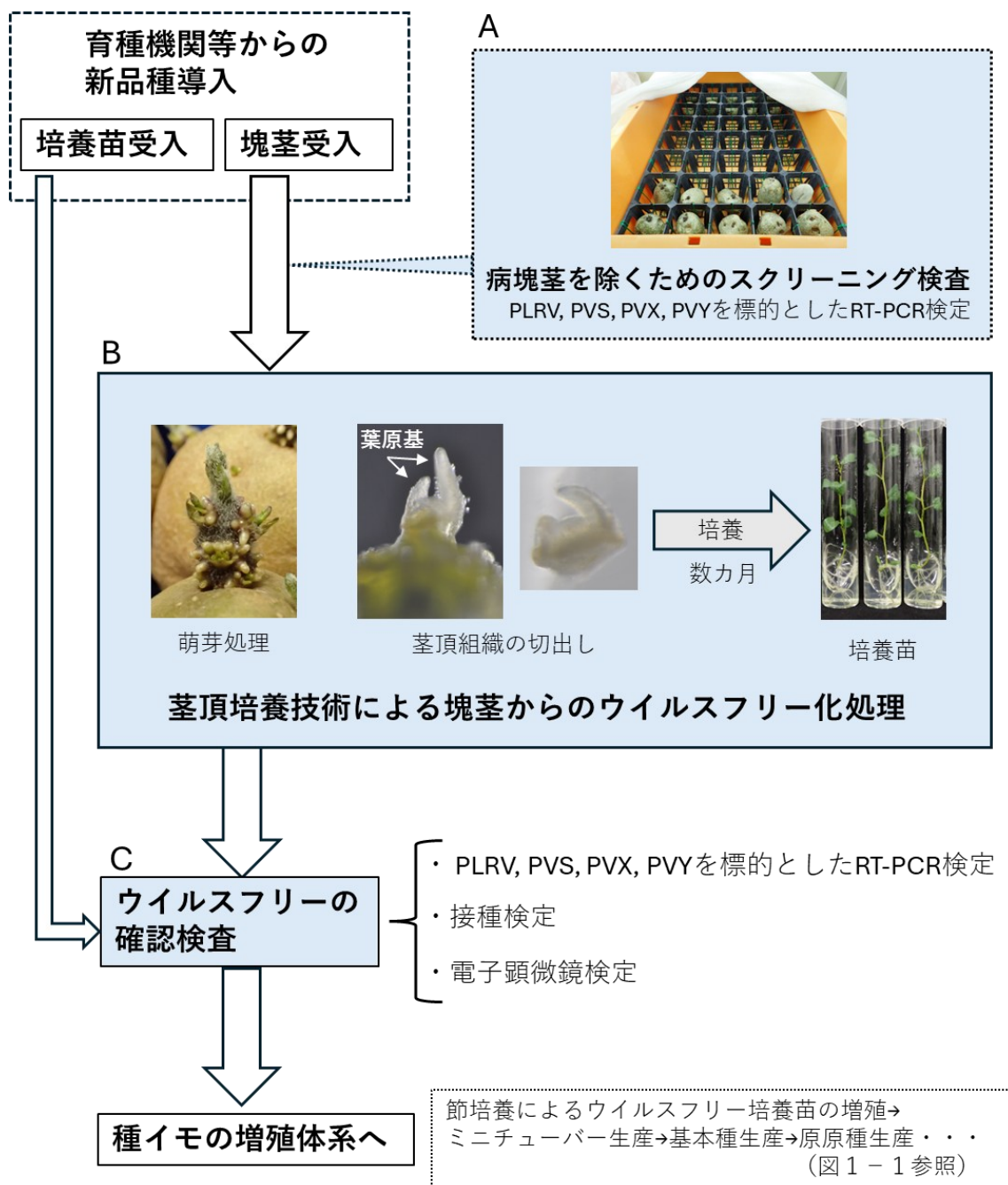
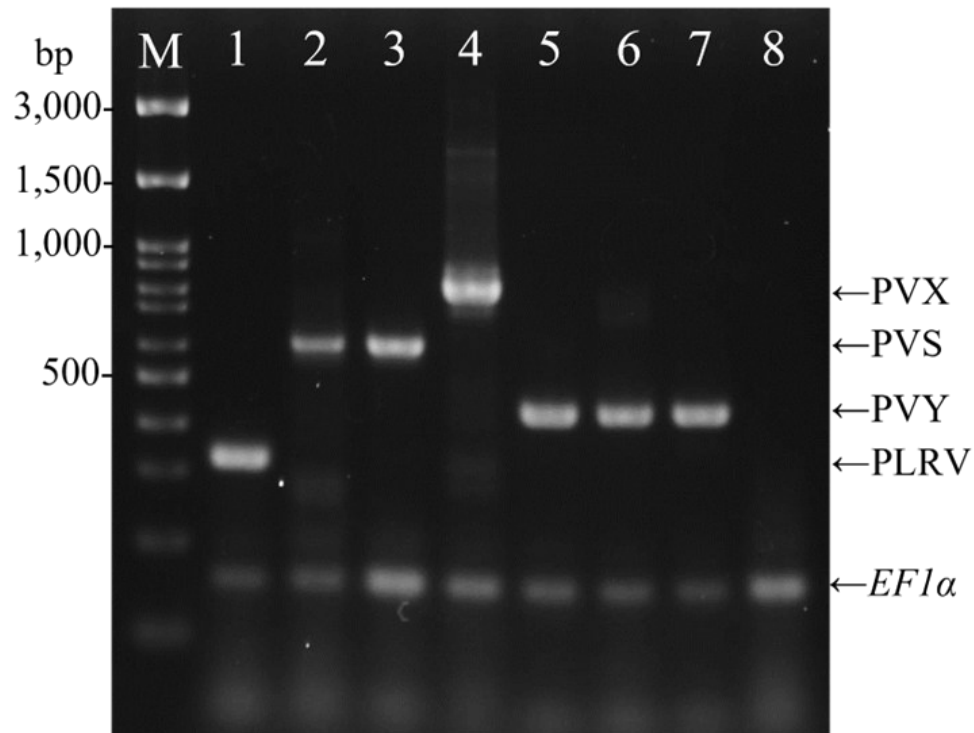


図1 新品種の種イモ増殖体系への導入フロー

A～Cは農研機構種苗管理センターで実施される。



PLRV: 336 bp, PVS: 609 bp, PVX: 894 bp, PVY: 438 bp

図2 新規設計プライマーによる主要4種ウイルスの検出

M : FastGene 100 bp DNA ladder RTU (日本ジェネティクス (株))、1 : PLRV (ChLR_2 株)、2 : PVS^O (M 株)、3 : PVS^A (ChS_3 株)、4 : PVX (O-IC249 株)、5 : PVY^O (Y28 株)、6 : PVY^{NA-N} (PVY-NTND6 株)、7 : PVY^{NTN} (Eu-12jp 株)、8 : 健全‘男爵薯’。

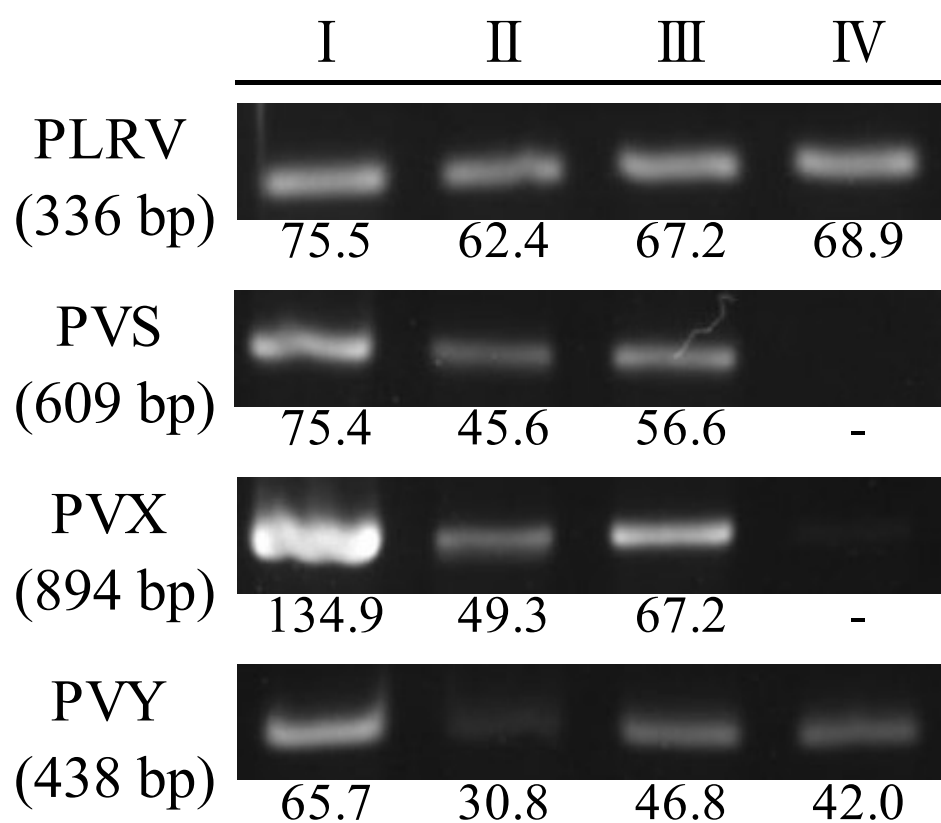


図3 粗汁液の各熱処理条件における主要4種ウイルスの検出

I：希釈粗汁液とプライマーミックス A の混合液を 70℃で 5 分間熱処理、II：希釈粗汁液とプライマーミックス A を別々に 70℃で 5 分間熱処理、III：希釈粗汁液のみを 70℃で 5 分間熱処理、IV：熱処理処理なし。各バンドの下部に示された数値は、ImageJ ソフトウェアを用いて測定した増幅産物領域の平均グレースケール値を示す。(－) は増幅産物が検出されなかったことを示す。

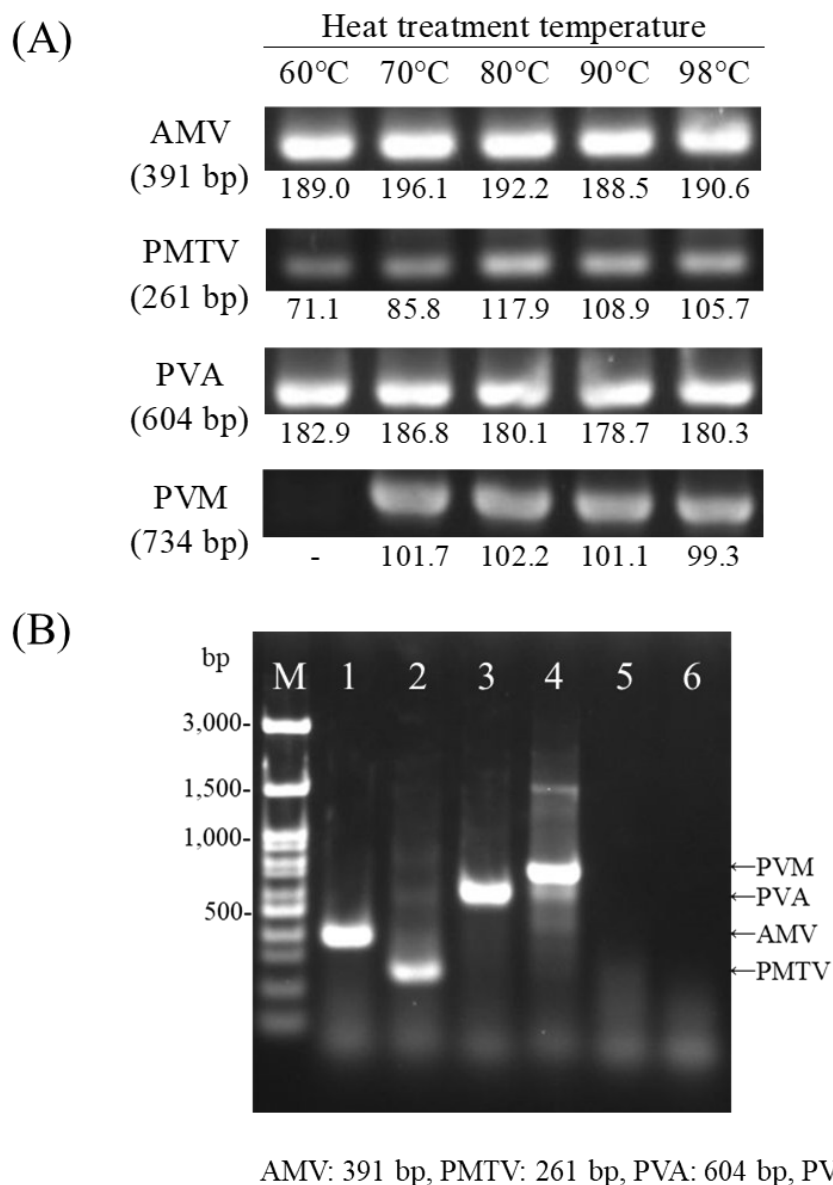


図4 熱処理鋳型調製法を用いたプライマーミックス B による AMV、PMTV、PVA、PVM の検出

(A) 熱処理温度による検出感度の比較

(B) 80°Cで熱処理した粗汁液とプライマーミックス B の混合液からのウイルスの検出

1 : AMV、2 : PMTV、3 : PVA、4 : PVM、5 : 健全葉、6 : Blank、M : 100 bp DNA ラダー。各バンドの下部に示された数値は、ImageJ ソフトウェアを用いて測定した増幅産物領域の平均グレースケール値を示す。(－) は増幅産物が検出されなかったことを示す。

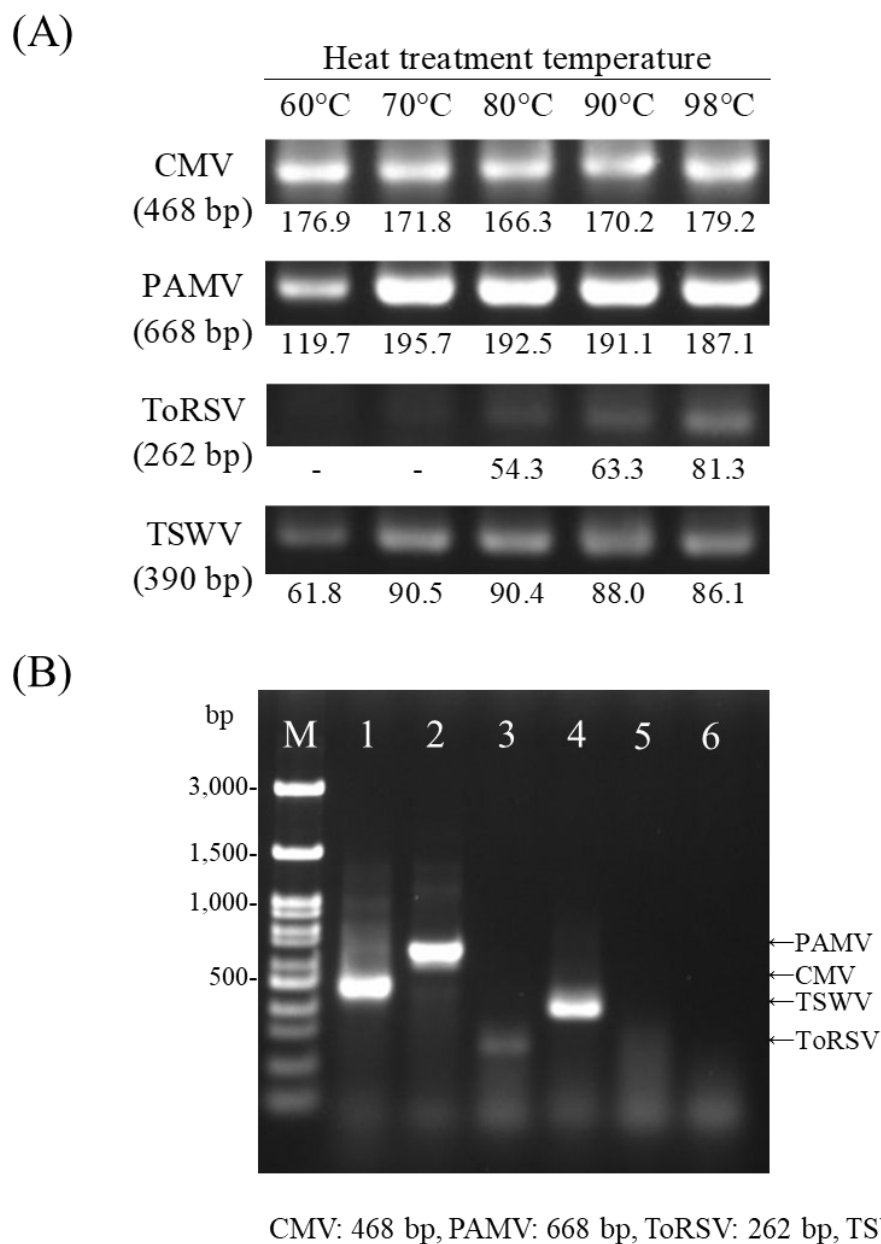


図5 熱処理鋳型調製法を用いたプライマーミックス C による CMV、PAMV、ToRSV、TSWV の検出

(A) 熱処理温度による検出感度の比較

(B) 98°Cで熱処理した粗汁液とプライマーミックス B の混合液からのウイルスの検出

1 : CMV、2 : PAMV、3 : ToRSV、4 : TSWV、5 : 健全葉、6 : Blank、M : 100 bp DNA ラダー。各バンドの下部に示された数値は、ImageJ ソフトウェアを用いて測定した増幅産物領域の平均グレースケール値を示す。(－) は増幅産物が検出されなかったことを示す。

表1 One-step multiplex RT-PCRによるバレイショ遺伝資源保存圃での各ウイルスの検出^a

検出したウイルス ^b	検出品種数
PVS	47
PVY	14
PVX	17
PVS + PVX	44
PVS + PVY	21
PLRV + PVS + PVX	1
PLRV + PVS + PVY	1
PVM + PVS + PVY	1
PVS + PVX + PVY	9
PLRV + PVM + PVS + PVX	1
不検出	27
品種数合計	183

^a : AMV、CMV、PAMV、PMTV、PVA、ToRSV、TSWVは検出されなかった。

^b : 複数のウイルス表記はウイルスの混合感染を示す。

	茎頂サイズ 葉原基数目安	フリー化 効率	再生率	再生期間
PVS PVX 除去目安となる 茎頂サイズ	0.2~0.3 mm 1~2枚	高効率	低い	長い
	0.3~0.5 mm 2~3枚			
	0.5~0.7 mm 3~4枚			
PLRV PVY	0.7~1.0 mm 4~5枚	低効率	高い	短い

図6 ジャガイモ茎頂サイズによるウイルスフリー化率・再生率・再生期間への影響

ウイルス除去の目安となる茎頂サイズは Mori (1971) の報告に基づく。図中の範囲「0.2~0.3 mm」「0.3~0.5 mm」「0.5~0.7 mm」「0.7~1.0 mm」は、それぞれ対応する切断面直径の範囲（上限未満）を示す。