

PCRを用いたイチゴ苗の炭疽病検査技術の効率化

中田菜々子・鈴木 健・深見正信

キーワード：イチゴ, 炭疽病, PCR, 検査

I 結 言

イチゴ炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Saccardo はイチゴの葉やランナーに病斑を示すほか、クラウンに侵入すると株の萎凋・枯死を引き起こす(石川, 2005)。本病は、罹病株の残さ上に形成された子のう殻や潜在感染した親株が一次伝染源となり、感染した株上に形成された分生子がかん水や降雨により水滴とともに広がり伝染する(石川, 2005; 稲田, 2012)。病原菌の発育適温は 25~30℃であるため(岡山・辻本, 1994)、夏期の育苗期間中に感染拡大して苗の不足を招く。潜在感染した苗を定植すると本圃で収穫前に枯死するなど経済的損失が大きく、我が国のイチゴ栽培において重要な病害である。*C. gloeosporioides* には、イチゴに強い病原性を持つ強毒系統とほとんど病徴を示さない弱毒系統が存在することが報告されており、これらの菌株は形態的には区別できない(植松ら, 2002)。そこで、著者らは *C. gloeosporioides* の強毒系統と弱毒系統の間で DNA 塩基配列の異なる部位を特定し、遺伝子増幅法(以下 PCR と記す)による両系統の判別技術を開発した(鈴木ら, 2008)。さらに、著者らは開発した判別技術を用いてイチゴ苗の一部を採取し PCR による検査を行うことにより、炭疽病に感染した苗を発病前に排除する方法を開発した(平成 21~23 年度新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業「イチゴ健全種苗生産のための病害検査プログラムの構築」成果集「イチゴ炭疽病・萎黄病・疫病感染苗検査マニュアル」(以下、マニュアルと記す)(千葉県, 2012)。本法におけるイチゴ炭疽病の検査は、イチゴの葉柄基部を液体培地で培養し、その培養液から DNA を抽出し、イチゴ炭疽病菌に特異的なプライマーを用いた PCR に供し、菌の有無を判定するものである。この方法は、イチゴ炭疽病の診断方法として普及しているエタノール浸漬簡易診断法(Ishikawa, 2003)に比べて短期間でほぼ強毒系統のみを検出できる点で優れている。

しかしながら、生産現場での本格的な普及・活用を図るためには以下の課題を解決する必要がある。DNA 抽出の現行

法である PrepMan1/2 法は、DNA 抽出法としては比較的簡便な方法であるが、現地サンプルの診断でしばしば見られる褐変した試料からの検出法としては適さず、本マニュアルではこのような試料からの抽出法として MagEx 法を用いることとしている(マニュアル P.7)。しかし、MagEx 法は PrepMan1/2 法と比較して試薬代が高価なことが課題であった。また、現在のマニュアルでは、PCR 反応液は用時調製することとしているが、反応液の調製には習熟を要し、不慣れた実験者が行う場合、時間がかかること、不適切な操作によってコンタミネーション等が起き、検査結果に影響する危険性があることも課題である。さらに、農業事務所等には前培養のための振とう機や DNA 抽出以降の操作に必要な機器等が無いため、現在のマニュアルに従い検査を実施するには、農林総合研究センター(以下農林総研と記す)等専用機材のある実験施設に前培養のためと DNA 抽出以降の操作のために 2 回も足を運ぶ必要があり、この手間も普及を阻む大きな課題である。

そこで、本研究では MagEx 法の試薬量を削減することで DNA 抽出にかかる費用の削減をはかった。また、さらに低コストで多検体同時処理が可能な抽出法としてガラス繊維ろ紙挿入チップを用いた DNA 抽出法(Fukami *et al.*, 2008)の適用を試みた。PCR 反応液調製時の労力及びコンタミネーション等の問題については、事前に PCR 反応液を調製し保存しておくことで操作上の問題を回避でき、PCR 作業の省力化にもつながると考えられたため、調製後一定期間凍結保存した PCR 反応液を用いた場合にも調製直後の反応液と同様にイチゴ炭疽病菌を検出できるかを検討した。さらに、前培養を農業事務所等でも行えるように静置培養の適用を検討した。検査対象のイチゴ苗集団の炭疽病感染率が極めて低いことが想定される場合に、10 株分を一括して検査することで労力やコストを大幅に低減できる方法として 10 株バルク検査(マニュアル p.8)が適用できるが、この方法についても、前培養を静置培養とした場合の実用性を検討した。

以上の調査により、PCR によるイチゴ炭疽病検査に係わる工程の簡略化及び費用の削減方法が明らかとなったので報告する。

受理日 2017 年 8 月 8 日

II 材料及び方法

1. DNA抽出にかかる費用削減の検討

(1) 供試菌株

1994年に館山市のイチゴから分離された *C. fruticola* S-1株を用いた。なお、近年 *C. gloeosporioides* は複数の遺伝子の塩基配列を用いた系統解析に基づいて *C. fruticola* を含む22種及び1亜種に分割することが提案されており (Weir *et al.*, 2012), 千葉県では本種が優占している (Pamela *et al.*, 2017)。

(2) イチゴ炭疽病潜在感染苗 (モデル感染苗) の作製

ブドウ糖・ジャガイモ煎汁培地 (PD液体培地) 50mLを300mL三角フラスコに入れ、S-1株を培養したブドウ糖・ジャガイモ煎汁寒天培地 (PDA) 片を加えて28°C条件下で7日間振とう培養 (100 rpm) し、bud cellを回収した。これを用いて濃度 10^5 個/mLに調整したbud cell懸濁液を作製し、接種源とした。この接種源を、「とちおとめ」9号ポット苗20株に噴霧接種 (5mL/株) し、ポリエチレン袋に密封して28°Cで48時間多湿状態を維持した。その後苗を袋から取り出し、15°Cの恒温室内で管理した。

(3) モデル感染苗からの異なる抽出法によるDNA抽出及びPCRによる検出

S-1株の接種から20日目に、モデル感染苗の外葉を1株当たり2枚採取し、マニュアルP.3に記載の前培養を行った。すなわち、採取した葉を水洗後、70%エタノールに30秒間浸漬し、その後滅菌水で洗浄した。カミソリでクラウンとの接合部から5~10mmの位置で切断し、この切片を100mg/Lクロラムフェニコールを含むPD液体培地を1mL入れた2mLチューブに添加した。このチューブを28°Cで48時間振とう (100rpm) した。前培養後、チューブにガラスビーズ (アズワンAZ-06) を0.2g加え、ボルテックスで5分間攪拌した。その後、直ちに前培養液と菌体を吸い出し、新しい1.5mLチューブに移した。この前培養液から以下i, ii, iiiまたはivの方法によりDNAを抽出した。

i PrepMan1/2法 : 現行法 (マニュアルP.4)

前培養液200 μ Lを1.5mLサンプルチューブに移し、遠心分離 (15,000rpm, 3分, 25°C) 後、上清を捨てた。Tris-EDTA Buffer (TE) (pH8.0) を500 μ L加えてボルテックスで攪拌 (3分) した後、再度遠心分離 (15,000rpm, 3分, 25°C) し、上清を捨てた。ガラスビーズを0.2g、スキムミルク水溶液 (0.2g/mL) を10 μ L、PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Thermo Fisher Scientific K.K.) を100 μ L加え、ボルテックスで攪拌 (3分) した後、100°Cで10分間加熱した。その後、TE (pH8.0) を100 μ L加え、室温で1分間放置し、クロロホルム200 μ Lを加えた。縦方向に1分間激しく振とうした後、遠心分離 (15,000rpm, 10分, 4°C)

して上層の水相を50 μ L回収し、新しい1.5mLサンプルチューブに移した。この水相を滅菌蒸留水で10倍に希釈し、PCRの鋳型として使用した。

ii MagExtractor法 : MagEx法 (マニュアルP.7)

前培養液200 μ Lを1.5mLサンプルチューブに移し、遠心分離 (15,000 rpm, 3分, 25°C) 後、上清を捨てた。TE (pH8.0) を1mL加えてボルテックスで攪拌 (3分) した後、再度遠心分離 (15,000rpm, 3分, 25°C) し、上清を捨てた。Mag Extractor –Plant Genome– (TOYOBO) (以下、MagExとする) の溶解液300 μ Lを加え、ボルテックスで1分間攪拌した。65°Cで10分間加熱した後、クロロホルム300 μ Lを加え、縦方向に1分間激しく振とうした。遠心分離 (15,000rpm, 10分, 4°C) を行った後、上層の水相部分を約250 μ L回収し、新しい1.5mLサンプルチューブに移した。MagExの吸着液を600 μ L、磁気ビーズを40 μ L加えた後、ボルテックスで1分間攪拌した。チューブを磁気スタンドにセットして30秒間放置した後、チューブの蓋を開け、ラックごと逆さにして上清を除いた。次に、MagExの洗浄液を900 μ L加え、ボルテックスで1分間攪拌した。チューブを磁気スタンドにセットして30秒間放置した後、チューブの蓋を開け、ラックごと逆さにして上清を除いた。その後、70%エタノールを900 μ L加え、洗浄液と同様に攪拌して上清を除く作業を2回繰り返した後、遠心エバポレーターで10分間遠心して磁気ビーズを乾燥させた。TE (pH8.0) を100 μ L加えてボルテックスで1分間攪拌した後、チューブを磁気スタンドにセットして30秒間放置し、DNAが含まれる上清を新しい1.5mLサンプルチューブに回収した。

iii MagExtractor1/4法

iiのMagEx法について、前培養液使用量を含むほぼ全ての液量を約4分の1に削減し、DNAを抽出した。但し、以下の点は液量が4分の1でないか、手順を追加した。(i) 全培養液を遠心後、上清を捨てた後に加えるTE (pH8.0) は500 μ Lとした。(ii) クロロホルム添加後に水相を回収する際、液層の境界を見やすくするために、溶解液を加えるのと同時にスキムミルク水溶液を30 μ L加えた。(iii) クロロホルム添加後に回収する水相は60 μ Lとした。(iv) 洗浄液及び70%エタノールは全て200 μ Lとした。

iv ガラス繊維ろ紙挿入チップを用いた抽出法 (ろ紙法)

Fukami *et al.* (2008) に準じて以下の様に行った。すなわち、iと同様に前培養液200 μ Lを遠心し沈殿をTE (pH8.0) で洗浄後、0.2gのガラスビーズ、200 μ Lの抽出バッファー (200mM Tris-HCl (pH 7.5), 250mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% SDS), 0.5% 2-メルカプトエタノール, 25 μ g/ml プロテアーゼ K 及び5% ポリビニルピロリドン) を加え、シェイクマスター (バイオメディカルサイエンス) で1分間振とうした。その後、65°Cで10分間保温し、遠心

(12,000rpm, 30 秒) 後の上清 7 μ L をガラス繊維ろ紙 (亜硫酸ナトリウム液に数秒間浸漬後乾燥させたもの) (以下ろ紙と記す) に浸透させた。このろ紙を入れたピペットチップで固定液を吸引及び排出することを 3 回繰り返し、固定液を変えて同様に 4 回行い、室温で 1 分間放置して DNA をろ紙に固定した。その後、洗浄液を吸引及び排出することを 3 回繰り返し、洗浄液を変えて同様に 4 回行い、さらに 70% エタノールを吸引及び排出することを 5 回繰り返し不純物を洗浄した。このろ紙が入ったピペットチップを勢いよく振ってエタノールを除去し、50 μ L の TE (pH8.0) を吸引及び排出することで DNA を溶出した。

PCR 反応液の組成は、DNA 溶液 1 μ L, 2 \times Go-Taq Green Master Mix (Promega) 10 μ L, 10 μ M プライマー AP-BF (5'-TGAATGCTGAGGCTGCGATGAG-3') 及び AP-N1 (5'-GCGGCGAGGTAAGTCTTCTC-3') (鈴木ら, 2008) を各 0.25 μ L, 滅菌蒸留水 8.5 μ L として、反応条件は 94 $^{\circ}$ C 2 分の後 94 $^{\circ}$ C 30 秒, 58 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 30 秒を 1 セットとして 40 サイクル繰り返し、最後に 72 $^{\circ}$ C 8 分の処理を行った。この PCR 反応液を滅菌蒸留水で 20 倍に希釈し、2 回目の PCR を行った。反応液の組成及び反応条件は 1 回目と同様だが、プライマーのみ AP-f3 (5'-GAAGGGGCTTGAGTCCGAAAT-3') 及び AP-r7 (5'-GATGAGGTTGCTCTCCATAT-3') (鈴木ら, 2008) に変更した。その後、PCR 反応液 5 μ L をアガロースゲル電気泳動にかけてイチゴ炭疽病菌に特異的な 683bp の増幅断片を確認した (マニュアル P.5-6)。各抽出液について PCR を 3 回行った。

2. 試薬混合後の冷凍保存期間の長さ及び凍結融解回数が PCR に与える影響

1.5mL チューブ 5 本に各 20 サンプル分の PCR 反応液 (2 \times Go-Taq Green Master Mix (Promega) 200 μ L, 10 μ M プライマー溶液各 5 μ L, 滅菌蒸留水 170 μ L を混合する) (マニュアル P.5) を作製し、-30 $^{\circ}$ C で 8 週間保存した。5 本のうち 4 本は凍結融解の処理区として保存期間中に室温で融解し再度 -30 $^{\circ}$ C で凍結する処理を 2 回 (反応液作成日から 21, 36 日目), 4 回 (同 14, 28, 36, 37 日目), 7 回 (同 14, 21, 28, 35, 36, 37, 39 日目), 9 回 (同 7, 14, 21, 28, 35, 36, 37, 39, 41 日目) 行った。当日作製した反応液及び冷凍保存した反応液をそれぞれ 19 μ L ずつ分注し、下記の鋳型 DNA 溶液を 1 μ L 加えて PCR を実施し、反応液の保存期間及び凍結融解回数とイチゴ炭疽病菌の検出率の関係を調査した。なお、本試験に用いた 2 \times Go-Taq Green Master Mix は、購入後に 1 度融解して 1.5mL チューブに 1mL ずつ分注し、再度 -30 $^{\circ}$ C で凍結保存していたため、当日作製した反応液においては 2 回の融解を経ており、8 週間保存した反応液においては凍結融解処理以外に 3 回の融解を経ている。鋳型 DNA 溶液の調製は次のとおり行った。S-1

株を 28 $^{\circ}$ C 条件下の PDA で 7 日間培養し、この菌叢から Mag Extractor-Plant Genome (TOYOBO) により DNA を抽出した。Quant-iT PicoGreen dsDNA Reagent (Invitrogen) により抽出液の DNA 濃度を測定し、滅菌蒸留水で 10pg, 1pg, 100fg, 10fg/ μ L となるように調整した。各濃度の DNA 溶液 1 μ L を鋳型として、上記の反応液を用いて 1. と同様に PCR を行った。なお、各濃度の DNA 溶液について PCR を 2 回行った。

3. 前培養方法の違いが検査結果に与える影響

(1) 接種切片の作製

「とちおとめ」9 号ポット苗から採取した葉から葉柄基部 (約 5mm 幅) を切り取り、70% エタノールで表面殺菌した。これを 1. と同じ方法で作製した S-1 株の bud cell 懸濁液 (10⁴ 個/mL) に 3 分間浸漬し、キムタオル上で軽く水気を切った。その後滅菌水で湿らせたろ紙を敷いたシャーレに重ならないように並べ、多湿条件下で 28 $^{\circ}$ C 48 時間静置したものを接種切片とした。

(2) 前培養の培地及び培養方法

(1) と同様に採取した葉から切り取った葉柄基部を無接種切片として、この無接種切片及び接種切片を水洗いし、70% エタノールに 30 秒間浸漬処理後、滅菌水で洗浄した。2mL チューブに液体培地 1mL を加え、無接種区には洗浄した無接種切片を各チューブに 2 個ずつ入れた。接種区には洗浄した接種切片及び無接種切片を各チューブに 1 個ずつ入れた。培地は現行の 100mg/L クロラムフェニコールを含む PD 液体培地 (以下 PD+Cm と記す) 及び *Colletotrichum acutatum* の分離に使われる改変 Mathur 液体培地 (1L あたり ショ糖 10g, バクトペプトン 1g, 酵母エキス 1g, 硫酸マグネシウム 7 水和物 2.5g, リン酸一カリウム 2.7g, イプロジオン 50% 水和剤 5mg, 乳酸 1mL, アンピシリン 25mg) (Freeman and Katan, 1997 ; Freeman *et al.*, 2001) を使用した。無接種区及び接種区の現行培養区は試料及び液体培地の入ったチューブを 28 $^{\circ}$ C で 48 時間振とう (チューブの上下方向に 100rpm) した。静置培養区はチューブを静置した状態で 48, 72, 96, 120 時間培養した。無接種区は 5 サンプル、接種区は 10 サンプルを反復として設けた。

(3) DNA 抽出方法及び PCR 条件

培養後、各培養液から上述の MagEx 法により DNA を抽出した。PCR は 1. と同様に行った。

4. 10 株バルク検査における静置培養の実用性の検討

(1) 前培養

3. と同じ方法で作製した接種及び無接種切片を水洗いし、70% エタノールに 30 秒間浸漬処理後、滅菌水で洗浄した。これらの切片を用いて、各区以下の条件で前培養を行った。

- i 現行培養区：2mL チューブに PD+Cm を 1mL 入れ、

第1表 各DNA抽出法にかかる費用及び所要時間

DNA抽出法	DNA抽出 試薬費用 (円/1サンプル)	DNA抽出時間 (分/20サンプル)
PrepMan1/2法	90	100
MagEx法	280	140
MagEx1/4法	70	140
ろ紙法	20	75

第2表 モデル感染苗20株から異なる抽出法により得られたDNA溶液におけるイチゴ炭疽病菌の検出率

DNA抽出法	イチゴ炭疽病菌の 検出率 (%) ^{注)}	PCR3回とも陽性 反応が得られた DNA抽出液の割合 (%)
PrepMan1/2法	64.6 ± 12.6	50
MagEx法	71.7 ± 16.1	60
MagEx1/4法	95.0 ± 5.0	90
ろ紙法	18.3 ± 2.9	5

注) 各DNA溶液について3回実施したPCRの平均±標準偏差

第3表 調製後凍結保存したPCR反応液によるイチゴ炭疽病菌検出PCRの結果

PCR反応液 保存期間 (-30℃)	凍結融解 処理回数 ¹⁾	鋳型DNA濃度 ²⁾ (pg/μL)			
		10	1	0.1	0.01
0日	0	+ ³⁾	+	±	-
	0	+	+	-	-
	2	+	+	±	-
8週間	4	+	+	-	-
	7	+	+	±	-
	9	+	+	-	-

注1) -30℃で保存中に室温で融解した回数。なお、本試験に用いた2×Go-Taq Green Master Mixは、試験前に1度融解し再度-30℃で保存していたため、当日作製した反応液においては2回の融解を経ており、8週間保存した反応液においては凍結融解処理以外に3回の融解を経ている。

2) イチゴ炭疽病菌培養菌体から抽出したDNA

3) +: 2反復中2回とも増幅有り, ±: 2反復中1回のみ増幅有り, -: 2反復中2回とも増幅無し

4) PCR後の反応液20μLのうち5μLを電気泳動に用いた。

接種切片1個と無接種切片1個を入れた。28℃で48時間振とう培養を行った。10サンプルを反復として設けた。

ii 10株バルク静置培養区: 3.の結果からPD+Cm液体培地よりもMathur液体培地の方が静置培養に適していると考えられたため、Mathur液体培地を用いた。50mLチューブにMathur液体培地を10mL入れ、接種切片1個と無接種切片19個を入れた。静置条件で48, 72, 96, 120時間培養を行った。48時間及び120時間培養区は10サンプル, 72時間及び96時間培養区は6サンプルを反復として設けた。

(2) DNA抽出方法及びPCR条件

各区以下の条件でDNA抽出を行った。PCR及び電気泳動は1.と同様に行った。

i 現行培養区: 培養液200μLを遠心し、沈殿をTE(pH8.0)500μLで洗浄した。この沈殿から上述のMagEx法によりDNAを抽出した。なお、最終溶出液量は100μLとした。

ii 10株バルク静置培養区: 静置培養を行った50mLチューブから培養液2mLを2mLチューブに移し、遠心分離後、沈殿をTE(pH8.0)2mLで洗浄した。この沈殿から上述のMagEx法によりDNAを抽出した。なお、最終溶出液量は100μLとした。

(3) 検出感度の評価

無接種切片を10株バルク静置の72, 96, 120時間培養区と同じ条件で培養した。この培養液のDNA抽出液でそれぞれ10株バルク静置の72, 96, 120時間培養区のDNA抽出液を希釈(5倍, 10倍, 100倍)して1.と同様にPCRを行った。各希釈液について3回のPCRを行い、各試験区間の検出率を比較した。

III 結果及び考察

1. DNA抽出にかかる費用削減の検討

各抽出法にかかる費用及び所要時間を第1表に示す。1サンプルあたりの試薬費用が最も安価かつ抽出に要する時間が短いのはろ紙法である。MagEx1/4法は、PrepMan1/2法に比べ抽出時間は長いですが、試薬費用は安価である。モデル感染苗20株の前培養液から異なる抽出法により得られたDNA溶液をイチゴ炭疽病菌検出PCRに供試した結果、現行法のPrepMan1/2法での検出率は64.6±12.6%であり、MagEx法は71.7±16.1%、MagEx1/4法は95.0±5.0%、ろ紙法は18.3±2.9%であった(第2表)。また、各DNA溶液につき3回実施したPCRの全てでイチゴ炭疽病菌に特異的な増幅断片が得られたDNA抽出液の割合は、PrepMan1/2法で50%、MagEx法で60%、MagEx1/4法で90%、ろ紙法で5%であった(第2表)。MagEx法よりもMagEx1/4法の検出率が高く安定していた理由としては、MagEx1/4法で操作性を良くするために添加したスキムミルクの作用が考えられる。すなわち、スキムミルクによって液相の境目が見やすくなり、境目付近の夾雑物を含むことなく正確に上清だけを分取できる作用や、スキムミルクに含まれるタンパク質がチューブの壁面に吸着されることでDNAの吸着が抑えられる作用である。

現行のPrepMan1/2法は、褐変した試料からの検出が難しく(マニュアルP.7)、このようなサンプルではMagEx法を使用することが推奨されているが、試薬代が高価なこ

第4表 単株振とう培養及び単株静置培養における培養時間別検出率

試験区	培養方法	培養時間 (時間)	検出率(%) ¹⁾	
			PD+Cm	改変Mathur
無接種区	振とう	48	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	振とう	48	100.0 ± 0.0 ²⁾	83.3 ± 5.8
接種区	静置	48	83.3 ± 5.8	100 ± 0.0
		72	43.3 ± 5.8	86.7 ± 5.8
		96	56.7 ± 15.3	83.3 ± 20.8
		120	46.7 ± 15.3	96.7 ± 5.8

注 1)無接種区は5サンプルあたりの検出率で2回実施したPCRの平均±標準偏差, 接種区は10サンプルあたりの検出率で3回実施したPCRの平均±標準偏差

2)現行培養区(100 mg/L クロラムフェニコールを含むブドウ糖・ジャガイモ煎汁培地による48時間の振とう培養)

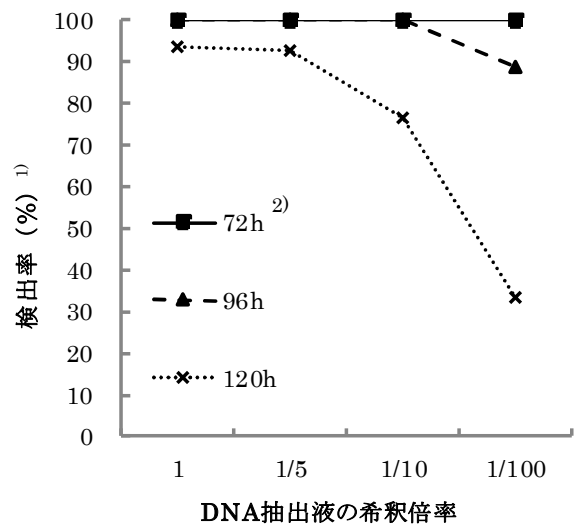
第5表 10株バルク静置培養における培養時間別検出率

試験区	培養時間 (時間)	検出率 (%) ³⁾
現行培養区 (単株) ¹⁾	48	100
	48	70
10株バルク 静置培養区 ²⁾	72	100
	96	100
	120	100

注 1) 100 mg/L クロラムフェニコールを含むブドウ糖・ジャガイモ煎汁培地による48時間の振とう培養

2) 改変 Mathur 液体培地を使用

3) 10株バルク静置培養区の72時間及び96時間培養区は6サンプル, その他は10サンプルあたりの検出率. PCRは1回/サンプル.



第1図 改変 Mathur 液体培地による10株バルク静置培養区における検出感度

注 1)3回のPCRの平均値. 120時間区(120h)は10サンプル, その他は6サンプル中の検出率.

2) h: 培養時間

3)100倍希釈区における異なる文字の試験区間は5%水準で有意差あり(逆正弦変換後 Tukey-Kramer法). その他の希釈倍率における試験区間の検出率は5%水準で有意差無し(逆正弦変換後 Tukey-Kramer法).

とが課題であった. 本試験の結果から, MagEx 法のコスト削減のために検討した MagEx1/4 法は, MagEx 法と同等以上にイチゴ炭疽病菌を検出できることがわかった. さらに, MagEx1/4 法は, 現行の PrepMan1/2 法に比べても試薬代が安価で, 安定して本菌を検出することができた. しかし, さらなる低コスト化のためにこれ以上試薬の使用量を減らすことは, クロロホルム添加後の水相回収時の操作上難しいと考えられる. 一方, 最も安価で所要時間が短いろ紙法は, 今回検討した方法では検出率が低いため利用は難しいと考えられた. ろ紙法の検出率が低い理由として, 200µL の前培養液の沈殿物から DNA 抽出に用いる量が200分の7と少量であることが一因として考えられる. ろ紙法は植物の葉などから DNA を抽出するために考案された多検体処理法であり, 本検査のようにごく微量の病原菌の DNA を回収するためにはより詳細な条件検討が必要と考えられる.

2. 試薬混合後の冷凍保存期間の長さがPCRに与える影響

調製当日及び-30°Cで8週間保存したPCR反応液の検出率を調査した結果, 検出限界は調製当日の場合も8週間保存中に9回凍結融解処理を行った場合も同じく1pgで

あった(第3表). このことから, 反応液は調製後8週間程度保存でき, 保存期間中に9回までは凍結融解を行えることが判明した. 従って, 作業者は保存してある反応液を使用できるため, 反応液の調製が不要となり, PCR作業の省力化がはかられる. 2回のPCRを行う上では, 20検体あたり30分程度の作業時間を削減することができる. また, 反応液調製時の不適切な操作によるコンタミネーションが生じる可能性も低減できると考えられた. さらに, 8週間以内であれば残った反応液を再度凍結保存し利用することも可能である.

3. 前培養方法の違いが検査結果に与える影響

単株検査における前培養の条件を検討した結果, 無接種

第6表 普及指導員等がイチゴ炭疽病検査を行うことを想定した作業工程表

作業工程	作業内容	作業場所	作業時間 (20 サンプルあたり)	農林総研による 事前の準備
試料採取	検査対象株の最外葉2枚を採取	圃場	約30分	特になし
試料調製	試料を水洗し、70%エタノールで表面殺菌後、葉柄基部を切断して2 mLチューブに入れる	農業事務所等	約40分	改変Mathur液体培地を2 mLチューブに分注して農業事務所等に送付
前培養	改変Mathur液体培地を用い、28℃で72~120時間静置培養	農業事務所等	特になし	特になし
DNA抽出	前培養した試料について、MagEx1/4法によりDNA抽出	農林総研実験室	約2時間20分	試薬類やチューブ等の準備
PCR	冷凍保存してあるPCR反応液を用いてPCRを行う	農林総研実験室	約4時間	PCR反応液を作製し冷凍保存
電気泳動・判定	PCR終了後反応液を電気泳動し、紫外線ランプ上で写真撮影	農林総研実験室	約40分	アガロースゲル及び泳動バッファーを作製し保存

区ではイチゴ炭疽病菌は検出されなかった。接種区のPD+Cm液体培地では48時間の静置培養でも80%以上の検出率が得られた一方、72時間以上静置した場合の検出率は60%以下と低かった(第4表)。これに対し、接種区の改変Mathur液体培地では48時間から120時間の間で80%以上の高い検出率が得られた。

改変Mathur液体培地は抗生物質アンピシリンと酸性条件によって細菌の増殖を抑えるとともに糸状菌の増殖を抑える作用のあるイプロジオンが含まれるのに対し、PD+Cm液体培地には抗生物質のクロラムフェニコールが含まれるのみである。このためPD+Cm液体培地では長時間の培養により真菌等の雑菌が増えて検出率が低下した可能性がある。

これらの結果から、単株検査において改変Mathur液体培地を用いることで静置培養でも現行法と同等の検出率が得られることがわかり、振とう機がない農業事務所等でも前培養を行うことが可能となった。また、適当な培養時間が48時間から120時間と幅があることは、休日を含んで培養できるなど実用上のメリットと考えられる。

4. 10株バルク検査における静置培養の実用性の検討

静置培養区では、培養時間が48時間の場合、検出率が70%と低かった。これは、イチゴ炭疽病菌が好気性菌であるため、酸素の供給量が少ない静置培養では増殖に時間がかかるためと考えられる。一方、72時間、96時間、120時間では現行培養区と同様100%の検出率が得られた(第5表)。そこで、72時間、96時間、120時間静置培養したDNA抽出液について、無接種の切片をそれぞれ同じ条件で培養した培養液のDNA抽出液で希釈し、検出感を調査した結果、100倍希釈液では、120時間区に比べて、72時間区及び96時間区の検出率が有意に高かった(Tukey-Kramer法, $p < 0.05$) (第1図)。120時間区の検出感度が下がった原因として以下のことが考えられ

る。単株検査では培養液200 μ LからDNAを抽出し最終的に100 μ LのTE(pH8.0)に溶出するのに対し、10株バルク検査では培養液2mLから同じく100 μ LのTE(pH8.0)に溶出する。このため、単株検査に比べて10株バルク検査ではDNA抽出液中にPCR阻害物質が濃縮されやすいと考えられる。また、培養時間が長くなるほど葉柄基部の褐変が進むことから、120時間区ではポリフェノール等のPCR阻害物質が最も蓄積されたと考えらる。以上から、120時間区では、希釈によって炭疽病菌の濃度が低くなるほど、他の試験区よりも多く蓄積されたPCR阻害物質の影響を受け、検出率が低下したと考えられた。これらの結果から、10株バルク検査においても改変Mathur液体培地を用いることで静置培養が可能であり、培養時間は72時間から96時間が適当であることが明らかになった。

本研究の結果から、著者らは普及指導員等がイチゴ炭疽病検査を行う体系について、第6表に示す手順を新たに提案したい。この体系では、前培養の工程を農業事務所で行うため、農林総研等の専用機材を備える実験室での作業を1日程度にできる。また、あらかじめ農林総研で作成し保存していたPCR反応液を用いることによりPCRの工程が省力化でき、コンタミネーションの危険も回避できる。さらに、褐変の有無にかかわらず同じDNA抽出法が適用でき、試薬費用も削減できる。

V 摘要

PCRによるイチゴ苗の炭疽病検査技術の普及をはかるために、検査に係わる工程の簡略化及び費用の削減方法を検討した結果、以下の点が明らかとなった。

1. DNA抽出をPrepMan1/2法からMagEx1/4法に変更することで1検体当たりのDNA抽出費用を削減でき、現

行と同等以上の検出率を得られる。

2. 調製後-30℃で8週間保存したPCR反応試薬は、耐熱性ポリメラーゼの凍結融解の回数が12回の場合において、同じく凍結融解の回数が2回の調製直後の試薬と同様に炭疽病菌を検出することができる。
3. 単株検査では、改変 Mathur 液体培地を用いて48時間から120時間の静置培養を行うことで現行の振とう培養と同程度の検出率を得られる。
4. 10株の検体から一括して検出を行うバルク検査では、改変 Mathur 液体培地を用いて72時間から96時間の静置培養を行うことで現行の単株検査と同程度の検出率を得られる。
5. 以上の結果から、普及指導員等がイチゴ炭疽病検査を行う体系を提案する。

VI 引用文献

- 千葉県 (2012) イチゴ炭疽病・萎黄病・疫病感染苗検査マニュアル. 千葉県農林総合研究センター平成23年度成果普及技術資料. <<http://stg2.chp.pbl.pref.chiba.lg.jp/lab-nourin/nourin/koukaishiryoku/manual.html>>. 最終アクセス平成29年12月14日.
- Fukami, M., Y. Muramoto and K. Ohkoshi (2008) Rapid and simple DNA extraction method from rice using a glass-fiber filter inserted pipette tip. *Plant Biotech.* 25:493-496.
- Freeman, S., S. Horowitz, and A. Sharon (2001) Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. *Phytopathology* 91:986-992.
- Freeman, S. and T. Katan (1997) Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. *Phytopathology* 87:516-521.
- Gan, P., N. Nakata, T. Suzuki and K. Shirasu (2017) Markers to differentiate species of anthracnose fungi identify *Colletotrichum fructicola* as the predominant virulent species in strawberry plants in Chiba Prefecture of Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* 83:14-22.
- 稲田稔 (2012) 潜在感染株からの降雨および灌水によるイチゴ炭疽病菌 (*Glomerella cingulata*) の飛散. 植物防疫. 66:388-392.
- Ishikawa, S. (2003) Method to diagnose latent infection by *Glomerella cingulata* in strawberry plants using ethanol. *J. Gen. Plant Pathol.* 69:372-377.
- 石川成寿 (2005) イチゴ炭疽病の病原菌, 生態ならびに環境に配慮した防除技術開発. 栃木農試研報 54
- 岡山健夫・辻本明 (1994) *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding et Schrenk によるイチゴ炭そ病の発生とその病原性. 日植病報 60:617-623.
- 鈴木健・田中千華・伊東靖之・植松清次・平山喜彦・岡山健夫 (2008) イチゴ炭疽病菌に対する特異的プライマーの作成. 日植病報 74:198 (講要).
- 植松清次・海老原克介・鈴木健・宮原秀一・小林敏満・野宮左近・川村栄一・河名利幸 (2002) 北海道の田畑輪換圃場を利用したイチゴリレー苗生産における *Colletotrichum gloeosporioides* の潜在感染とその病原性. 日植病報 68:201-202 (講要).
- Weir, B.S., P. R. Johnston, and U. Damm (2012) The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycol.* 73:115-180.

Improved Efficiency of Anthracnose Detection Method Using PCR in Strawberry Nursery Plants

Nanako NAKATA, Takeshi SUZUKI and Masanobu FUKAMI

Key words: strawberry, anthracnose, PCR, detection

Summary

The following points were revealed as a result of reducing the labor and cost of a technique for detecting strawberry anthracnose using an enhanced PCR process on strawberry nursery plants to promote the dissemination of the technique.

1. The DNA extraction cost per sample can be reduced by changing the DNA extraction process from the PrepMan 1/2 method to the MagEx 1/4 method. The detection rate of the new method was equal to or higher than that of the current method.
2. We were able to detect the pathogen at the same sensitivity as when using the PCR reaction reagent immediately after preparation (two freeze-thaw cycles of the polymerase) as when using reagent stored after preparation at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 8 weeks (12 freeze-thaw cycles).
3. In each sample inspection, stationary culture was carried out for 48, 72, 96 or 120 hours using a modified Mathur liquid medium. In all cases, the detection rate was the same as the method using the current shake culture.
4. In the test that collectively detects from 10 samples, the detection sensitivity with stationary culturing for 72 or 96 hours using modified Mathur liquid medium was the same as with the current detection for each sample.
5. Based on the above results, we propose an improved strawberry anthracnose disease detection system for use by agricultural extension workers and other parties.