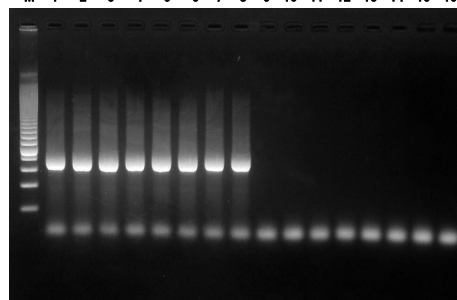


「平成 23 年度 成果普及技術資料」

イチゴ炭疽病・萎黄病・疫病 感染苗検査マニュアル



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



病原性菌株

非病原性菌株

農林水産省新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業（課題番号 21023）
「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」研究プロジェクトチーム

千葉県農林総合研究センター

はじめに

イチゴは、栽培面積 6,150ha、年間販売金額 1,700 億円と、我が国の農業生産において極めて収益性の高い重要な品目である。しかし、近年、生産現場では、難防除病害による被害が拡大している。特に、炭疽病、萎黄病及び疫病はイチゴの株を枯死させる病害であり、イチゴ生産において経済的に大きな打撃を与えている。これらの病害の感染苗は、一定期間は病徴が現れず、感染していても外観で健全苗との区別が困難なため、苗生産現場や圃場に持ち込まれ、病害発生の連鎖・拡大を引き起こす。そのため、苗の流通・増殖の各段階で、病害の感染の有無を検査・診断し、感染苗の流通・増殖や圃場への植え付けを未然に防ぐシステムが求められている。

そこで、千葉県農林総合研究センター、岐阜大学、北海道、栃木県、静岡県、奈良県、佐賀県の農業試験研究機関及び株式会社ミヨシでプロジェクトチームを組み、イチゴ病害感染苗の迅速診断技術を確立するため、PCR 法を用いた炭疽病・萎黄病・疫病感染苗の診断技術を開発した。このプロジェクトは、平成 21 年度農林水産省新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業に採択され、課題名「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」として、平成 21 年度から 3 年間の計画で研究を実施した。この研究は、第 1 に炭疽病・萎黄病・疫病的診断技術の開発、第 2 に開発した診断技術について生産現場での信頼性評価・運用評価、第 3 に病害検査による病害抑制効果の評価、第 4 に開発した診断技術の普及・定着を目標に、生産現場と結びついたイチゴ苗の病害検査システムの完成を目指すものである。

本マニュアルは、当該プロジェクトにより開発された炭疽病・萎黄病・疫病的診断技術を集約し、全国のイチゴ生産現場において活用するための技術指導書として作成した。本マニュアルが、イチゴ生産における病害防除の一助となることを望む。

平成 24 年 3 月

農林水産省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」

中核機関：千葉県農林総合研究センター

センター長 小山 豊

目 次

1. イチゴ炭疽病感染苗検査マニュアル	1
(1) イチゴ炭疽病について	1
(2) イチゴ炭疽病感染苗の遺伝子検査方法	2
1) 全体の流れ	2
2) サンプルング方法	2
3) 前培養方法	3
4) DNA 抽出方法 (PrepMan GM 1/2 法)	4
5) PCR の方法	5
6) オプション1 : 夾雑物が多いサンプルからの DNA 抽出方法 (MgEx 法)	7
7) オプション2 : 大量試料一括処理方法 (バルク法)	8
8) 実証試験結果	9
2. イチゴ萎黄病感染苗検査マニュアル	11
(1) イチゴ萎黄病について	11
(2) イチゴ萎黄病感染苗の遺伝子検査方法	12
1) 全体の流れ	12
2) サンプルング方法・前培養方法 (植物体)	12
3) 植物体からの DNA 抽出方法	13
4) サンプルング方法・前培養方法 (土壌)	13
5) 土壌からの DNA 抽出方法	13
6) PCR の方法	15
7) 実証試験結果	16
3. イチゴ疫病感染苗検査マニュアル	18
(1) イチゴ疫病について	18
(2) イチゴ疫病感染苗の遺伝子検査方法	18
1) 全体の流れ	18
2) サンプルング方法	19
3) DNA 抽出方法	19
4) PCR の方法	21
5) 実証試験結果	22
4. トラブルシューティング	25
5. 参考文献	26

1. イチゴ炭疽病感染苗検査マニュアル

(1) イチゴ炭疽病について

Colletotrichum gloeosporioides による炭疽病は、熱帯から温帯地域において穀類、野菜、花、果樹などに広く被害を引き起こしている重要病害である。イチゴ炭疽病は本菌によるイチゴの最重要病害の1つで、被害は茎葉だけでなく株全体が発病して萎凋枯死に至る（写真1-1、1-2）。本病による年間の推定被害面積は890ha、被害金額は35億円と見積もられており、農林水産省植物防疫課が2007年に実施したイチゴ炭疽病の発生状況調査によると、イチゴ炭疽病の被害は全国的にも増加傾向にあり、炭疽病防除対策への関心が高まっている。



写真1-1 炭疽病により枯死したイチゴ



写真1-2 炭疽病によるクラウンの褐変

本病の主要な第一次伝染源はイチゴ苗の潜在感染株であり（岡山，1994）、効果的な防除を行うには潜在感染株の早期除去が必要である。生産現場ではIshikawa（2003）が開発したエタノール浸漬法による炭疽病潜在感染株の検査が行われているが、発病がほとんど認められない圃場からも高い頻度で*C.gloeosporioides* と思われる菌が分離されたケースがあった（海老原ら，2006）。実際に無発病圃場から分離した菌と発病圃場から分離した菌をイチゴに接種したところ、無発病圃場の菌は、ほとんどが病原性がないかもしくは弱い菌であった（写真1-3）。このことから、イチゴには病原性を示さない菌も潜在感染していると考えられた（海老原ら，2002）。これらの菌株の形態を比較してみると、分生子の形状やPDA培地上での菌叢の色・形態に明確な違いは見いだせなかった。



強病原性菌接種苗



非病原性菌接種苗

写真1-3 イチゴから分離した *C.gloeosporioides* の病原性の違い

そこで、本プロジェクトでは、PCR法によるイチゴ炭疽病の迅速検出技術を開発した。エタノール浸漬法などの従来の炭疽病潜在感染株検査では2週間以上の検査期間が必要であるが、本法ではサンプリングから3～4日で結果が得られる。また、従来法に比べ潜在感染株を高感度に検出できる。さらに、従来法では難しかった、イチゴに感染している菌の病原性の有無を判別することが可能である。一方、検査にかかる費用は従来法に比べ高額で、1検体あたり178円、10検体をひとまとめにしたバルク検定（後述）を行うと1検体あたり18円程度の検査コストとなる（表1-1）。次項以下では、具体的な手法について解説する。

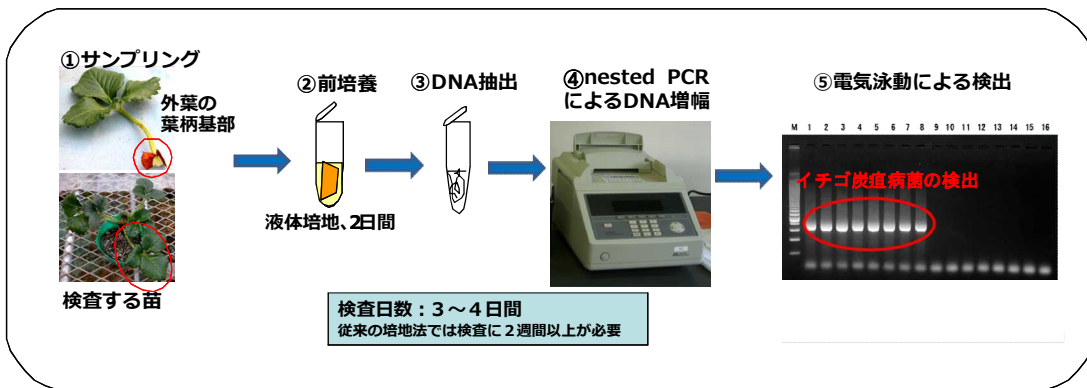
表 1 - 1 PCR 法による検定に要するコスト

	単価 (円)	1 サンプルあ たり使用量	1 サンプルあたり のコスト (円)
抽出試薬 PrepMan Ultra Reagent®	15,000	1/200	75
Taq DNA ポリメラーゼ	70,000	1/1000	70
サンプルチューブ	8	3本	24
ピペットチップ	3	3本	9
合計			178

(データ提供：千葉県農林総合研究センター)

(2) イチゴ炭疽病感染苗の遺伝子検査方法

1) 全体の流れ



PCR 法によるイチゴ炭疽病感染苗検査方法のフローチャート

PCR 法によるイチゴ炭疽病感染苗検定は①供試イチゴ苗からのサンプリング、②液体培地を用いた前培養、③DNA 抽出、④炭疽病菌特異的プライマーを用いた nested PCR、⑤アガロースゲル電気泳動による判定、によって行う (平山ら, 2008)。前培養期間を含め、サンプリングから結果判定までには、おおむね 3～4 日を要する。なお、本法はイチゴのクラウン部及び葉柄基部に炭疽病菌が侵入した潜在感染株の検出を想定した方法であり、分生子飛散による二次感染株では検出率が低下する可能性がある。

2) サンプリング方法

炭疽病菌は、イチゴのクラウン及び葉柄基部に侵入し、越冬していると考えられる。これが、翌年に潜在感染株となる。したがって、炭疽病感染苗検定には、古い葉の葉柄基部を用いる。

- ①調査するイチゴ苗の中で最も古い葉 (最外葉) と 2 番目に古い葉を供試する (写真 1 - 4)。(葉を 2 枚採取するのが難しい場合は、最外葉を用いる)



- ②採取にあたっては、クラウンと葉柄の接合部分を極力丁寧に剥がす（写真1-5）。
- ③採取した葉は、泥や汚れ等を水洗し取り除く（写真1-6）。（特に葉柄基部を丁寧に扱うこと）
- ④水洗した供試葉を70%エタノールに30秒間浸漬処理する（写真1-7）。
- ⑤エタノール浸漬処理した供試葉を滅菌水中で洗い、エタノールを十分洗い流す。



写真1-5



写真1-6



写真1-7 エタノール処理

- ⑥軽く風乾し、カミソリで葉柄基部を切り離す。クラウンとの接合部から5~10mmの位置で切断する（写真1-8）。
- ⑦クラウン接合部を含む葉柄基部を前培養にかける（写真1-9）。

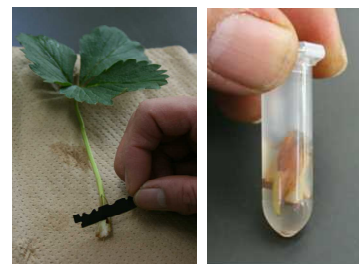


写真1-8 写真1-9

3) 前培養方法

この工程は、イチゴの葉柄基部に侵入したわずかな炭疽病菌を、培養によって増殖させるために行う。これにより、炭疽病菌は培養液及びイチゴの組織表面で増殖するので、この菌体を回収する。

- ①サンプル調製した葉柄基部を2mlチューブに入れ、液体培地1mlを加える。使用する培地は、ポテトデキストロース（PD）液体培地（100mg/l クロラムフェニコールを含む）もしくは改変 Mathur 液体培地（Freeman et al.,1997; Freeman et al.,2001）を使用する。
- ②試料及び液体培地の入ったチューブは、28℃で48時間以上振とう培養を行う（写真1-10）。（長時間培養すると、培養時にガスが発生し、チューブのフタがあいてしまう場合がある）
- ③前培養終了後にチューブを回収し、ガラスビーズ（アズワンAZ-06）を0.2g加える（写真1-11）。
- ④ボルテックスで5分間攪拌する。
- ⑤攪拌後、直ちに培養液と菌体を吸い出し新しい1.5mlサンプルチューブに移す。吸い出しには先端を切ったイエローチップを使用する。（イチゴ葉柄とガラスビーズは残す）
- ⑥DNA抽出工程に移る。

改変 Mathur 液体培地(1,000ml)	
シュクロース	10.0g
バクトペプトン	1.0g
酵母エキス	1.0g
硫酸マグネシウム (7水和物)	2.5g
リン酸-カリウム	2.7g
蒸留水	1,000ml
高圧滅菌後	
イブロジオン 50%水和剤 (ロブラール水和剤)	5mg
乳酸	1ml
アンピシリン	25mg



写真1-10



写真1-11

4) DNA 抽出方法 (PrepMan GM 1/2 法)

前培養したサンプルについて、褐変等が少ない場合は本法を適用する。サンプルの褐変等が著しい場合は、後に述べる MgEx 法を用いて DNA 抽出を行う。

使用する DNA 抽出 kit : PrepMan® Ultra Reagent (Life Technologies 商品番号 4318930)

PrepMan GM 1/2 法

- ①試料 (菌体を含む培養液 : 48 時間培養したもの*1) 200 μ l を 1.5ml サンプルチューブに移す (先切りチップ使用*2)。
- ②遠心分離 (15,000rpm、3 分間、室温) により菌体を沈殿させる。
- ③上清を捨てる。
- ④Tris-EDTA Buffer (TE) (pH8.0)*3 を 500 μ l 加える。
- ⑤十分に攪拌し (3 分間程度)、菌体を洗浄する。
- ⑥遠心分離 (15,000rpm、3 分間、室温) により菌体を沈殿させる。
- ⑦上清を捨てる。
- ⑧ガラスビーズ*4 を 0.2g、スキムミルク溶液 (0.2g/ml) を 10 μ l、PrepMan® Ultra Reagent を 100 μ l 加える。
- ⑨十分に攪拌する (3 分間以上)。
- ⑩熱処理 (100 $^{\circ}$ C、10 分間) *5。
- ⑪TE (pH8.0) を 100 μ l 加える。
- ⑫室温放置 (常温になるまで)。
- ⑬クロロホルム 200 μ l を加える*6。
- ⑭攪拌 5 分間以上。
- ⑮遠心分離 (15,000rpm、10 分間、4 $^{\circ}$ C)。
- ⑯上層の水相を 50 μ l 回収する (中間層は吸わないこと) *7。
- ⑰回収した水相をミリ Q 水で 10 倍に希釈し、PCR のテンプレートに使用する。

*1 直ちに DNA 抽出を行わない場合は 4 $^{\circ}$ C で 1 週間程度保存できる

*2 菌体液回収には先切りチップを使用する (写真 1-1 2)



写真 1-1 2

*3 Tris-EDTA buffer :
Tris(hydroxymethyl)amino-
methane 10mM
EDTA 1mM

*4 この行程でのガラスビーズは菌体破碎の補助として使用する

*5 100 $^{\circ}$ C 処理時にはチューブにロックをかける (写真 1-1 3)



写真 1-1 3

*6 クロロホルムは水との比重が異なるので上下に激しく振って攪拌する (ボルテックス不可)

*7 中間層には PCR 阻害物質が多く存在する。50 μ l の回収が難しい場合は回収可能な量で良い (写真 1-1 4)

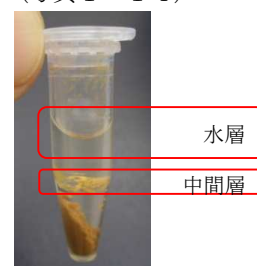


写真 1-1 4

5) PCR の方法

本法では、検出感度を上げるため nested PCR を行う。これは、一度 PCR 増幅 (1st PCR) をした後、増幅産物の内部配列に対応した別のプライマーを用いて再度 PCR (2nd PCR) を行う方法で、ごく微量の DNA からでも増幅できる。

①1st PCR

●プライマー (鈴木ら, 2008)

AP-BF : 5'- TGAATGCTGAGGCTGCGATGAG

AP-N1 : 5'- GCGGCGAGGTAACCTCTTCTC

※上記プライマーについては、論文未発表である

●PCR 溶液

2 × Go-Taq Green Master Mix® (Promega)*8	10.0 μl
AP-BF 10 μM	0.25 μl
AP-N1 10 μM	0.25 μl
ミリ Q 水	8.5 μl
DNA テンプレート	1.0 μl
<hr/>	
計	20.0 μl

●反応条件*9

94°C 2 分

↓

94°C 30 秒 → 58°C 30 秒 → 72°C 30 秒 (40 サイクル)

↓

72°C 8 分

②2nd PCR

●DNA テンプレート

反応が終了した 1st PCR 溶液をミリ Q 水で 20 倍に希釈して、2nd PCR の DNA テンプレートとして用いる。*10*11

●プライマー (鈴木ら, 2008)

AP-f3 : 5'- GAAGGGGCTTGTAGTCGAAAT

AP-r7 : 5'- GATGAGGTTGCTCTCCATAT

※上記プライマーについては、論文未発表である

●PCR 溶液

2 × Go-Taq Green Master Mix® (Promega)	10.0 μl
AP-f3 10 μM	0.25 μl
AP-r7 10 μM	0.25 μl
ミリ Q 水	8.5 μl
DNA テンプレート	1.0 μl
<hr/>	
計	20.0 μl

●反応条件

1st PCR の反応条件と同様。

*8 ここでは Go-Taq Green Master Mix® を使用しているが、他の Taq DNA ポリメラーゼでも適用可能。ただし、エキソヌクラーゼ活性のない Taq DNA ポリメラーゼを使用する

TAKARA Taq® (TAKARA)
Geen Taq® (ニッポンジーン)
など

*9 この反応条件は、ABI 9700 (ABI) (写真 1-15) を用いた場合のプログラムである。反応条件はサーマルサイクラーの機種によって調整する



写真 1-15 ABI 9700

*10 1st PCR 溶液の希釈にあたっては、DNA のコンタミに注意する

*11 2nd PCR の結果に非特異的バンドが見られる場合は、1st PCR 溶液を 50~100 倍に希釈する

③判定（電気泳動）

PCR が完了した PCR 溶液は、アガロースゲル電気泳動により、増幅産物の有無を確認する。供試材料に炭疽病菌が存在した場合、683bp の PCR 産物が増幅される。

1.5%濃度のアガロースゲルを用意する*12。



泳動バッファーは TAE を用いる*13。



サブマリン電気泳動（写真1-16）により電気泳動を行う。



トランスイルミネーターにより683bpのバンドを確認する（写真1-17）*14。

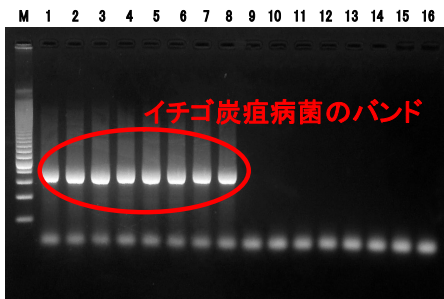


写真1-17 イチゴ炭疽病菌の電気泳動図

*12 本研究では、Agarose ME(和光)を使用している。また、染色液として GelRed® (Biotium, Inc : ニッポンジーン)をゲルに混合して使用している (GelRed®は高価だが、発ガン性がないこと、感度が高いことから使いやすい)。

*13 TAE(Tris-Acetate-EDTA) :
 トリス塩基 40mM
 酢酸 20mM
 EDTA 1mM

*14 PCR 産物の濃度が極端に濃い場合、泳動距離が短くなることがある。このため、683bp と異なる位置にバンドが出現する可能性がある。



写真1-16 サブマリンゲル電気泳動装置

※我が国の主要イチゴ産地で調査を行ったところ、本検出法はイチゴに病原性を持つ菌のほとんどを検出できた。しかし、病原性を持つが検出できない菌（擬陰性菌株）が、ごく一部存在していることを確認している（表1-2）。

表1-2 分離地別炭疽病菌の病原性調査結果

分離地	生物検定		AP-f3,r7プライマー		擬陰性菌株 ^{注1)}	擬陽性菌株 ^{注2)}
	病原性菌	非病原性菌	陽性株数	陰性株数		
千葉県	87	89	88	88	1	2
三重県	28	26	30	24	0	2
栃木県	16	1	14	3	2	0
神奈川県	12	2	12	2	0	0
北海道	8	24	9	23	0	1
奈良県	6	5	7	4	0	1
佐賀県	4	2	4	2	1	1
福岡県	4	1	5	0	0	1
その他	14	9	13	7	0	2
合計	179	159	182	153	4	10

注1)生物検定陽性かつAP-f3,r7プライマーPCR陰性の菌株

注2)生物検定陰性かつAP-f3,r7プライマーPCR陽性の菌株

(データ提供：千葉県農林総合研究センター)

6) オプション1：夾雑物が多いサンプルからの DNA 抽出方法 (MgEx 法)

本マニュアルで用いた DNA 抽出法である PrepManGM1/2 法は、簡便・安価な方法だが、供試材料の褐変等が著しい場合は、うまく DNA が抽出されない場合がある (写真1-18)。このようなケースでは、MgEx 法を用いて DNA の抽出操作を行う。

使用する DNA 抽出 kit : MagExtractor®-plant genome kit
(東洋紡 商品コード NPK-501) (以下 MgEx kit と略す)



写真1-18 褐変した試料

MgEx 法

- ①試料 (菌体を含む培養液) 200 μ l を 1.5ml サンプルチューブに移す (先切りチップ使用)。
- ②遠心分離 (15,000rpm、3 分間、室温)。
- ③上清を捨てる。
- ④TE (pH8.0) を 500 μ l 加える。
- ⑤十分に攪拌し (3 分間程度)、菌体を洗浄する。
- ⑥遠心分離 (15,000rpm、3 分間、室温)。
- ⑦上清を除去し、MgEx kit の溶解液を 300 μ l 加え、ボルテックスで 1 分間激しく攪拌する。
- ⑧65°C で 10 分間インキュベートする*15。
- ⑨クロロホルム 300 μ l を加え、1 分間激しく攪拌する*16。
- ⑩遠心分離 (15,000rpm、5 分間、4°C)。
- ⑪上層の水相部分を 250 μ l 回収し、新しい 1.5ml サンプルチューブに移す
- ⑫MgEx kit の吸着液を 600 μ l、磁気ビーズを 40 μ l 加える*17。
- ⑬ボルテックスで 1 分間激しく攪拌する。
- ⑭チューブを磁気スタンドにセットして 30 秒間放置する (写真1-19) *18。
- ⑮チューブのふたをあけ、ラックごと逆さにして上清を除く。
- ⑯MgEx kit の洗浄液を 900 μ l 加え、1 分間激しく攪拌する。
- ⑰チューブを磁気スタンドにセットして 30 秒間放置する。
- ⑱チューブのふたをあけ、ラックごと逆さにして上清を除く。
- ⑲70%エタノールを 900 μ l 加え、1 分間激しく攪拌する。
- ⑳⑰～⑲の工程を繰り返す。
- ㉑ラックにチューブをセットしたまま、70%エタノールを極力取り除く*19。
- ㉒TE バッファーを 100 μ l 加え、1 分間激しく攪拌する。
- ㉓チューブを磁気スタンドにセットして 30 秒間放置する。
- ㉔DNA が含まれる上清を新しい 1.5ml サンプルチューブに回収する。

*15 65°C 加温中は、3~4 分おきにボルテックスで 5 秒間激しく攪拌する

*16 クロロホルムは水との比重が異なるので、上下に激しく振って攪拌する (ボルテックス不可)

*17 磁気ビーズは使用直前によく攪拌して使用する

*18 磁気スタンドがない場合は、遠心分離 30 秒で代用可能



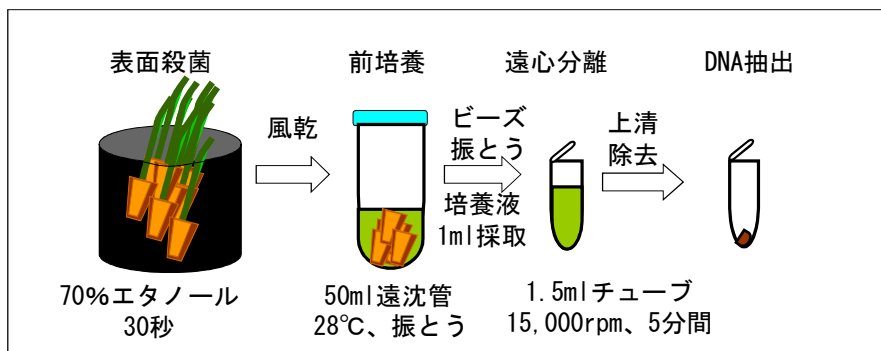
写真1-19

磁気スタンド(Magical Trapper®)

*19 エタノールが残っていると回収率が悪く、PCR に悪影響を与えるので、ピペットなどで極力吸い出し、室温で 30 分程度風乾させる

7) オプション2：大量試料一括処理方法（バルク法）

炭疽病の感染率が極めて低いことが想定されるケース（原原種生産苗など）では、複数試料を一括で検定するバルク検定法が適用できる（表1-3）*9。これにより大量試料の一括検定が可能となり、検査労力及び検査コストを大幅に低減できる。



バルク法によるイチゴ炭疽病感染苗検査方法のフローチャート

表1-3 潜在感染モデルを用いたバルク検出法の比較

供試株	単株検定結果	10株バルク検定結果		
		MgEx	PrepMan ×1	PrepMan ×1/2
No.1	+	+	+	+
No.2	-	-	-	-
No.3	+	+	+	+
No.4	+	+	+	-
No.5	+	+	+	+
健全	-	-	-	-

注1) MgExは、MgEx法によりDNAを抽出した

PrepMan ×1はPrepMan (GM)法により、PrepMan ×1/2、PrepMan ×1/4 はPrepMan (GM)法の PrepMan ® Ultra Reagent をそれぞれ規定量の 1/2、1/4 で使用した

注2) 検定結果の+は陽性判定、-は陰性判定の結果を示す

注3) 10株バルクは、感染株試料1サンプルと健全株試料9サンプルを混合し、1バルク検体とした

(データ提供：千葉県農林総合研究センター)

*9 PrepManGM1/2 法と組み合わせたバルク検定では、10株中1株が感染株であっても検出できる。



写真1-20

バルク法での培養の様子

- ①検査対象株10株（葉柄基部20枚）を1バルクとし、サンプリングを行う。サンプリング及び表面殺菌処理は、前記の2)と同様に行う。
- ②調製した葉柄基部をひとまとめにして、50ml サンプルチューブに入れる（写真1-20）。
- ③液体培地10mlを加える。培地は、PD液体培地（100mg/l クロラムフェニコールを含む）もしくは Mathur 液体培地を使用する。
- ④試料及び液体培地の入ったチューブは、28°Cで48時間以上振とう培養を行う。
- ⑤前培養終了後にチューブを回収し、ガラスビーズ（アズワン AZ-06）を2g加える。
- ⑥ボルテックスで5分間攪拌する。
- ⑦攪拌後、直ちに菌体を含む培養液から1mlを吸い出し、新しい1.5ml マイクロチューブに移す。吸い出しには先を切ったブルーチップを使用する。
- ⑧DNA抽出工程に移る。

※1. バルク検定の結果が陽性だった場合は、バルクを構成する検査対象株 10 株はすべて排除する。

※2. バルク検定法では、ある程度感染が予想されるケースでは、陽性判定となる比率が高くなるため、適用できない。(例えば 100 株の苗を検査するケースで、苗の実際の病害感染株率が 10%である場合、苗 10 株を 1 バルクとして 10 検体を検査すると、バルク検定では 10 検体すべて=100 株すべてが陽性判定となる可能性がある。) バルク検定の実施にあたっては、事前に検査対象の一部を個別に検定し、検査対象の病害感染株率を調査する必要がある。

8) 実証試験結果

①本法による炭疽病潜在感染株検出率は検定期間により変動する(図1-1)。4~5月が比較的検出率が高い。栽培状況を勘案し、最適な検定期間を検討する必要がある。また、最外葉 2 枚を供試することで検出率は向上し、おおむね全期間を通じ 75%以上の検出率を示した。

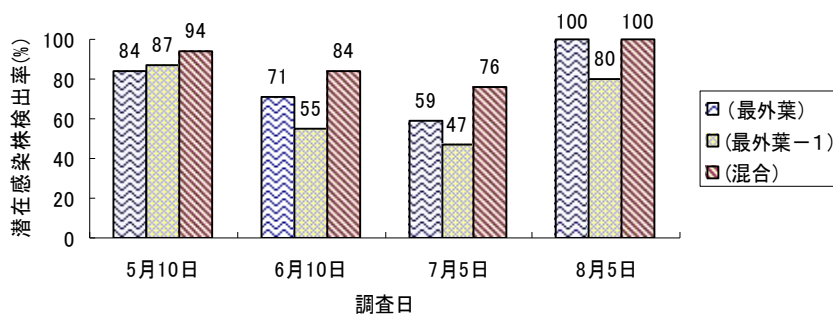


図1-1 採取部位の違いが炭疽病潜在感染株の検出に与える影響

注) (最外葉-1) は最外葉の1枚内側の葉を採取した。

(混合) は最外葉と最外葉の1枚内側の葉を採取し、2枚をあわせて1サンプルとした。

(データ提供: 千葉県農林総合研究センター)

②従来の検定方法である選択培地検定法やエタノール浸漬法では、病原性菌と非病原性菌を区別できないが、本法ではイチゴに病原性を示す菌のみを検出できた(図1-2)。また、従来法に比べ高い検出率を示した。

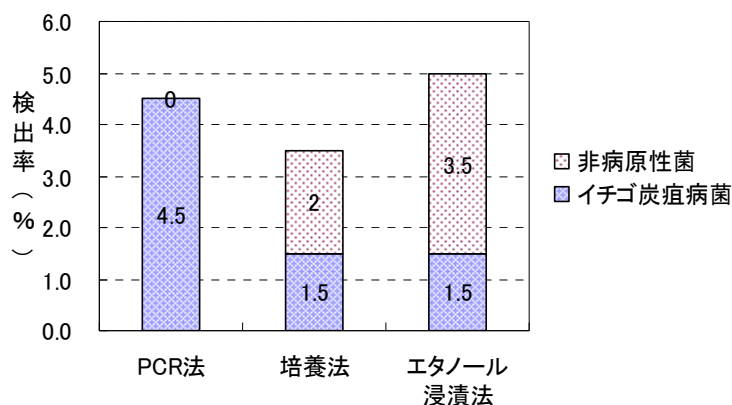


図1-2 奈良県内の苗圃場におけるイチゴ苗の炭疽病潜在感染株検定結果

注) 2009年9月調査

(データ提供: 奈良県農業総合センター)

③表1-4は、現地圃場における、PCR法検定結果とその圃場における発病率を調査した結果である。PCR法検定で陽性株率が高い圃場では、炭疽病の発病率が高かった。モデル試験の結果から、潜在感染株が必ずしも100%発病するとは限らないことがわかっており、本試験の結果とあわせると、PCR法検定による陽性株率は、圃場における発病危険度を反映していると考えられた。

表1-4 栃木県の育苗期におけるイチゴ炭疽病のPCR法検定結果及び発病状況^{注1)}

	PCR法による陽性株率 (%) (陽性株数)	発病率(%) (発病株数)
栃木県内A圃場	12 (12/100) ^{注2)}	1.0 (3/300) ^{注3)}
栃木県内B圃場	2 (2/100)	0.0 (0/300)
栃木県内C圃場	28 (28/100)	15.3 (46/300)

注1) 調査は2009年8月26日に実施

注2) (陽性株数)は陽性判定株数/調査株数

注3) (発病株数)は発病株数/調査株数

(データ提供：栃木県農業試験場)

(イチゴ炭疽病感染苗検査マニュアル執筆担当者：千葉県農林総合研究センター 鈴木 健)

2. イチゴ萎黄病感染苗検査マニュアル

(1) イチゴ萎黄病について

イチゴ萎黄病は、*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* によって引き起こされる土壌病害である。現在栽培されているイチゴ品種の多くは、本病に対して感受性のものが多く、全国的に発生が多くなっている。高温性病害である本病はイチゴ栽培の育苗期に発生が多く、その伝染方法は土壌伝染とともに育苗時にはランナーで伝染する。

典型的な症状は、新葉の小葉3枚のうち1枚または2枚が黄化して極端に小さくなり奇形葉となる（写真2-1）。このとき、発病株は健全株に比べて著しく矮化し、葉色が濃くなることが多い（写真2-2）。また、発病株のクラウンを輪切りにすると、導管の黒変あるいは褐変が見られる（写真2-3）。

栄養繁殖性のイチゴは、潜在感染した親苗が翌年の伝染源になるため、その対策には親苗の潜在感染株検定を行い、汚染苗を圃場へ持ち込まないことが最も大切である。近年、民間業者による親苗の販売や各都道府県や産地間での苗のリレー生産が増加し、イチゴ苗の移動による広域的な汚染リスクが増大していることから、潜在感染株検定の重要性がますます高まっている。

これまでイチゴ萎黄病菌の検出には、*Fusarium oxysporum* 選択培地による培養法が一般に用いられてきた。しかし、この方法では異なる分化型を含めたイチゴ萎黄病菌以外の *Fusarium* 属菌も検出されるため、培養法による菌分離の後に生物検定を行う必要があり、判定に1ヶ月以上を要する。そのため、潜在感染した親苗が圃場へ持ち込まれて被害が拡大することが多い。

そこで、迅速に診断できるイチゴ苗の潜在感染株検定を実現するため、イチゴ萎黄病菌検出用プライマーを用いたPCR法による検出技術を開発した。



写真2-1 イチゴ萎黄病の奇形葉症状



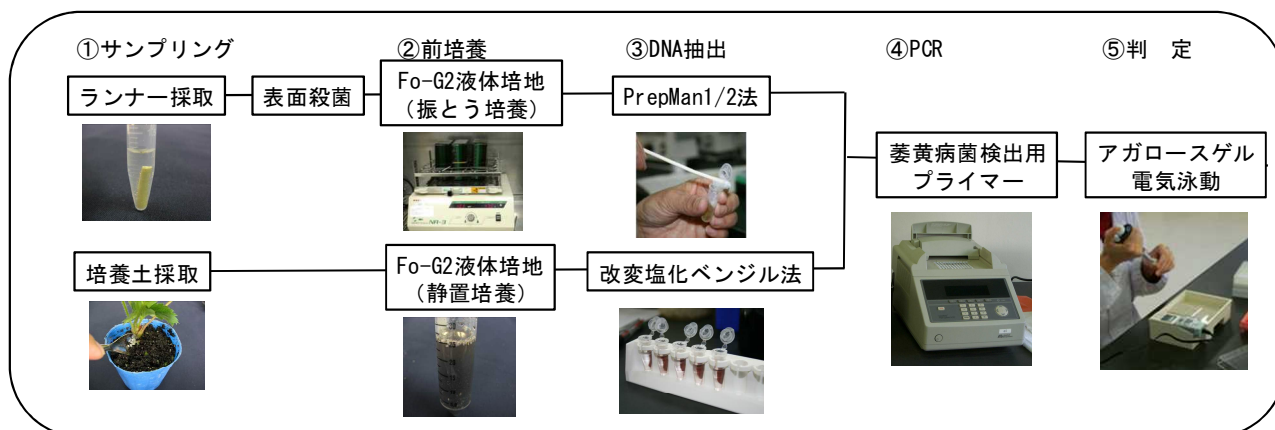
写真2-2 イチゴ萎黄病の矮化症状



写真2-3 イチゴ萎黄病による導管褐変

(2) イチゴ萎黄病感染苗の遺伝子検査方法

1) 全体の流れ



PCR 法によるイチゴ萎黄病感染苗検査方法のフローチャート

検定試料にはポット苗の培養土やランナーを用いる。汚染源がある程度特定できる状況で、土壤伝染が疑われる場合には培養土を、親苗からのランナー伝染が疑われる場合にはランナーを用いる。しかし、実際には汚染源を絞りきれないことも多いため、本研究では可能な限り培養土とランナーの両方を用いて検出精度を高めるようにしている。

検出感度を高めるため、DNA を抽出する前にあらかじめ試料を培養（前培養）する。これは、イチゴ導管内に感染している萎黄病菌を培養液中で増殖させることで、煩雑な破碎作業を省く目的もある。DNA 抽出は、イチゴ組織からの検出には PrepManGM1/2 法を、培養土からの検出には、土壤からの検出用に開発された塩化ベンジル法（Kageyama et al.,2003）を、さらに簡便化した改変塩化ベンジル法（景山法）を用いる。PCR には、萎黄病菌とそれ以外の *Fusarium oxysporum* を識別できる萎黄病菌検出用プライマー（Forward primer : HS430、Reverse primer : HS 432）（須賀ら，2011）を用いる。

2) サンプルング方法・前培養方法（植物体）

植物体からの検出部位にはランナーを用いる。ランナーが採取できるのは育苗時に限定されるが、ランナー伝染した子苗を高頻度で検出することができる。ランナーは検定苗の親株側のものを採取し、長さ 1.5cm 程度の切片を用いる（図 2-1）。試料は 70%エタノールで 30 秒間の表面殺菌を行い、風乾する。その後、培養液 1ml を入れた 1.5ml マイクロチューブで 25℃、4 日間の振とう培養を行う（写真 2-4）。培養には萎黄病菌を効率的に増殖する *Fusarium oxysporum* 選択培地である Fo-G2（Nishimura, 2007）*1 の液体培地を用いる。

*1 Fo-G2 液体培地(1,000ml)

リン酸一カリウム	1.0g
塩化カリウム	1.0g
硫酸マグネシウム・7水和物	0.5g
クエン酸水素二アンモニウム	2.0g
ホウ酸	0.5g
硝酸エコナゾール	10mg
クロラムフェニコール（高圧滅菌後）	0.25g
L-ソルボース	20g
イミダジン酢酸塩 25%液（ペフラン液剤 25）	0.4ml
トリクロステル 50%水和剤（リゾレックス水和剤）	3mg
10%リン酸で pH3.7~3.9 に調整	

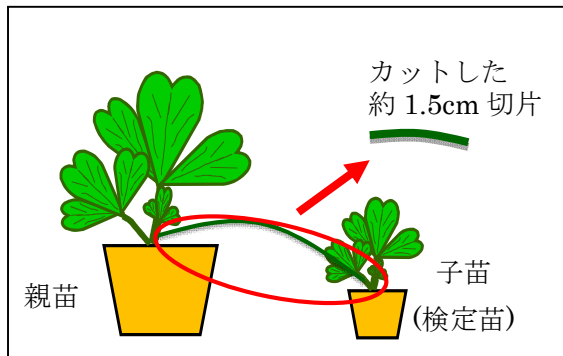


図 2-1 ランナーの採取



写真 2-4 ランナー切片の前培養

3) 植物体からの DNA 抽出方法

植物体からの検出には、炭疽病菌の DNA 抽出法に準じて行う。すなわち、PrepManGM1/2 法を基本とし、試料が腐敗している場合には MgEx kit を用いて DNA 抽出を行う。

4) サンプリング方法・前培養方法（土壌）

イチゴ苗へのダメージを極力少なくするため、スパチュラーを用いてポット表面の培養土を 10ml 程度採取し、50ml 遠沈管に入れる（写真 2-5、2-6）。このとき根が混入しても検出感度に影響することはない。試料に Fo-G2 培地を 2ml 添加し、25°C、4 日間静置培養する。



写真 2-5 培養土の採取
※表面の培養土を採取



写真 2-6 遠沈管に入れた培養土
※培養土は軽く押さえながら入れる

5) 土壌からの DNA 抽出方法

前培養した試料に滅菌蒸留水を 20ml 加えて、1 分間振とうする。その懸濁液 0.5ml を新しいマイクロチューブに移して 15,000rpm で 1 分間の遠心分離を行い、上澄みを除去し、残った沈殿物を DNA 抽出に用いる。これまでにピートモス、バーミキュライト、パーライトを混合した培養土では、DNA 抽出を Mg Ex kit で行っても検出結果は良好であったが、まさ土や畑土壌などでは不安定であることを確認している。そのため、培養土からの検出には、土壌からの DNA 抽出に有効な改変塩化ベンジル法が適している。本法は、溶解液に塩化ベンジル、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) などを用い、スキムミルクを添加するのが特徴である。また、精製の操作を簡便化するため、Mg Ex kit を使用する。土壌からの DNA 抽出法である塩化ベンジル法をより簡便化した方法である。

改変塩化ベンジル法

DNA 抽出

- ①前培養した試料に滅菌蒸留水 20ml を加えて、1 分間攪拌する (写真 2-7)。
- ②懸濁液*2500 μ l を新しいチューブに移す。
- ③遠心分離 (15,000rpm、1 分間) し、上清を除去する。
- ④ガラスビーズ*3 とスキムミルク (0.2g/ml) 10 μ l*4、抽出バッファー*5 250 μ l、10%SDS50 μ l、塩化ベンジル 150 μ l を加え、激しく攪拌*6 する。
- ⑤60°C で 15 分間処理する。
- ⑥3M 酢酸ナトリウム 150 μ l を加えて、攪拌する。
- ⑦氷上で 15 分間静置する。
- ⑧遠心分離 (15,000rpm、10 分間) し、上清約 300 μ l を新しいチューブに入れる。これを MgEx kit による精製作業に用いる。

精 製 (MgEx kit)

- ①上清液に吸着液 600 μ l と磁気ビーズ 40 μ l を加えて、チューブミキサーで 1 分間攪拌する。
- ②磁気スタンド (商品名: Magical Trapper[®] (TOYOBO)) にセットし、30 秒間静置し、その後上清を除去する。
- ③洗浄液 900 μ l を加えて、チューブミキサーで 10 秒間攪拌する。
- ④磁気スタンドにセットして 30 秒間静置し、その後上清を除去する。
- ⑤70%エタノール 900 μ l を加えて、チューブミキサーで 10 秒間攪拌する。
- ⑥④の操作を行う*7。
- ⑦TE 100 μ l を加えて、チューブミキサーで 1 分間攪拌する。
- ⑧磁気スタンドにセットして 30 秒間静置し、上清を新しいチューブに回収する。これを PCR の鋳型に用いる。

*2 培養土の懸濁液



写真 2-7

*3 ガラスビーズ
径 0.6mm、約 0.2g
(アズワン AZ-06 など)

*4 スキムミルクの添加量 10 μ l を標準量とするが、DNA が抽出できない試料では 80 μ l に増量することで抽出できる場合がある。スキムミルクは -20°C で保存する。

*5 抽出バッファーの組成
100mM Tris-HCl pH9.0
40mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)
作成方法
1M Tris-HCl pH9.0 10ml
0.5M EDTA 8ml
D.W. 82ml
高圧滅菌後、室温で保存

*6 攪拌機の例
Vortex Genie 2[®] (1.5ml
アタッチメント着用) (エム
エス機器(株))

*7 エタノールが残っている場合には、チップで除去する。

6) PCR の方法

●イチゴ萎黄病菌検出用プライマー (須賀ら, 2011)

Forward primer : HS430 (CAGACTGGGGTGCTTAAAGTT)

Reverse primer : HS432 (AACCGCTAGGGTCGTAACAAA)

※上記プライマーについては、論文未発表である。

●PCR 溶液

2 × GoTaq Green Master Mix®	10.0 μl
プライマー (HS430)	10 μM 0.5 μl
プライマー (HS432)	10 μM 0.5 μl
滅菌蒸留水	8.0 μl
サンプル DNA	1.0 μl
計	20.0 μl

●反応条件

反応条件はサーマルサイクラーの機種によって調整する。

94°C 2分

↓

94°C 30秒→55°C 30秒→72°C 30秒 (40 サイクル)

↓

72°C 8分

(上記は ABI9700 を使用した場合の反応条件)

●判 定

1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動を行う。

約 240bp のバンドが現れたら、陽性と判定する(写真 2-8)。

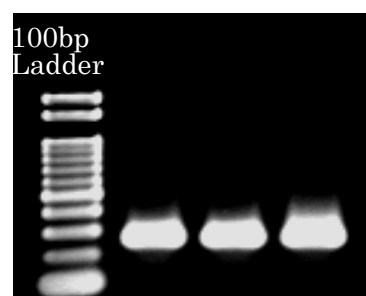


写真 2-8 萎黄病菌の電気泳動図

●ユニバーサルプライマーによる PCR

DNA 抽出が確実にできたかを確認するため、萎黄病菌検出用プライマーとは別にユニバーサルプライマーによる PCR を行う。確認の PCR であるのでユニバーサルプライマーの種類は特に問わないが、下記の真菌のリボゾーム RNA 遺伝子の増幅用プライマー ITS5、ITS4 (White et al.,1990) が利用できる。反応条件は萎黄病菌検出用プライマーと同じ条件で確認できる。

ITS5 (5' - GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG - 3')

ITS4 (5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3')

7) 実証試験結果

①従来の萎黄病菌検出法との比較

今回紹介した PCR 法と *Fusarium oxysporum* 選択培地やエタノール浸漬法 (SDEI) について、検出感度を比較した結果を紹介する。

●選択培地との比較

萎黄病菌自然感染株を用いて、PCR 法及び *Fusarium oxysporum* 選択培地を用いた検査法の検出感度を比較検討したところ、根または葉柄基部を用いる PCR 法は、葉柄基部を用いる選択培地検査法に比べ高い検出率を示した (表 2-1)。

表 2-1 イチゴ萎黄病菌感染親株から採苗した苗での PCR 法による検出状況

検査法	検査試料 ¹⁾ (部位)	供試株数	萎黄病菌検出株率 (%)
PCR ²⁾	葉柄基部	75	34.7
	根	75	46.7
選択培地 ³⁾ (慣行)	葉柄基部	75	10.7

1) 2010年5月10日にイチゴ萎黄病菌分生子懸濁液を親株 (品種: さがほのか) にかん注接種。伸長したランナー先端苗を随時採苗し7月12日にランナーを切り離した75株を供試。検定試料は7月30日にそれぞれ採取。

2) DNA抽出は試料を Fo-G2 (*Fusarium* 属菌選択培地) 液体培地で48時間振とう培養後 MgEx kit により実施し、イチゴ萎黄病菌検出用プライマーを用いた PCR を実施。

3) Fo-G2 培地を用いた培養法により検出。

(データ提供: 佐賀県農業研究センター)

●SDEI との比較

エタノール浸漬法 (SDEI、従来法) と PCR 法による萎黄病菌の検出率を比較した。従来法では検出が認められなかった株においても、PCR 法では検出された。一方、萎黄病菌接種株においては、SDEI が 25% に対して PCR 法では 91.7% と非常に高い検出率であった。PCR 法が従来法より高い検出率であり、有効性が認められた (表 2-2)。

表 2-2 イチゴ萎黄病菌の SDEI 及び PCR 法による検出状況¹⁾

検定部位	検定方法	
	SDEI ²⁾	PCR ³⁾
無病徴葉	0/12 (1/12)	3/12
奇形葉 ⁴⁾	3/12 (6/12)	11/12

数値: 検出数/検定数

1) サンプルの採集及び検定は 2010 年 10 月 22 日に実施。

2) エタノール浸漬法。() 内は病原性菌以外も含む検出数。

3) DNA 抽出は試料を Fo-G2 (*Fusarium* 属菌選択培地) 液体培地で 48 時間振とう培養後 MgEx kit により実施し、イチゴ萎黄病菌検出用プライマーを用いた PCR を実施。

4) 2010 年 9 月 1 日にイチゴ萎黄病菌汚染土壌に定植した株から採集。

(データ提供: 栃木県農業試験場)

②検定結果と発病との関係

PCR 法による検定と発病の結果が一致するかどうかを検証した試験を紹介する。

接種親苗から発生した無病徴の子苗について、ランナー切片、葉柄基部及び培養土を用い、それぞれの PCR 検出結果とその後の発病との関係を調査した。その結果、ランナー切片を検定試料として用いた場合に、陽性株が最も多く、続いて葉柄基部であった。

また、検定において最も避けなければいけないのは、陰性であった株が発病するケースである。調査において、検定で陰性であった株のうち発病した株の割合は、検出率が最も高いランナーにおいて 6.3%で、葉柄基部では 10.2%であった（表 2-3）。このことから、PCR 法による検定は完璧なものではなく、いわゆる「漏れ落ち」があることがわかる。したがって、検定はリスクを下げる技術であり、防除対策もこれまでと同様に実施しなければいけないという認識が必要である。

表 2-3 接種親苗から発生した子苗¹⁾を用いた萎黄病菌の PCR 法検出結果と検査株の発病

検定部位 ²⁾	PCR 法検出結果 ³⁾	検査後の発病状況 ⁴⁾		
		発病株数	無発病株数	
ランナー	陽性株数	28	7	21
	陰性株数	51	3 (6.3%)	48
葉柄基部	陽性株数	14	4	10
	陰性株数	65	6 (10.2%)	59
培養土	陽性株数	20	1	19
	陰性株数	59	9 (18.0%)	50
計		79	10	69

1) 2011 年 5 月 23 日に萎黄病菌を接種した親苗から発生した子苗を用いた。

育苗はポット育苗、かん水は底面給水で行った。

2) 7 月 15 日に同じ子苗から親苗側のランナー切片、葉柄基部、培養土を採取し、検定に用いた。

3) 萎黄病菌検出用プライマーを用いた PCR での検定を行った。

4) 検定後、各苗を隔離して管理し、9 月 13 日に発病の有無を調査した。

() 内の数値は、検定で陰性であった株のうち発病した株の割合を示す。

(データ提供：奈良県農業総合センター)

(イチゴ萎黄病感染苗検査マニュアル執筆担当者：奈良県農業総合センター 平山喜彦)

3. イチゴ疫病感染苗検査マニュアル

(1) イチゴ疫病について

イチゴ疫病は、*Phytophthora nicotianae*、*P. cactorum* 及び *Phytophthora* sp. によって引き起こされる土壌病害である。主に産地で発生して問題となるのは *P. nicotianae* と *P. cactorum* である。疫病菌はイチゴのクラウンと根の基部から感染し、クラウンの褐変と根の腐敗を引き起こして植物体を萎凋・枯死させる（写真3-1）。これらの疫病の病徴は、イチゴの最重要病害の一つである炭疽病とよく似ているため、一見しただけでは疫病と炭疽病の区別は難しい。さらに炭疽病もクラウンの褐変を呈するため、産地ではしばしば疫病と炭疽病が混同されて処理されている。

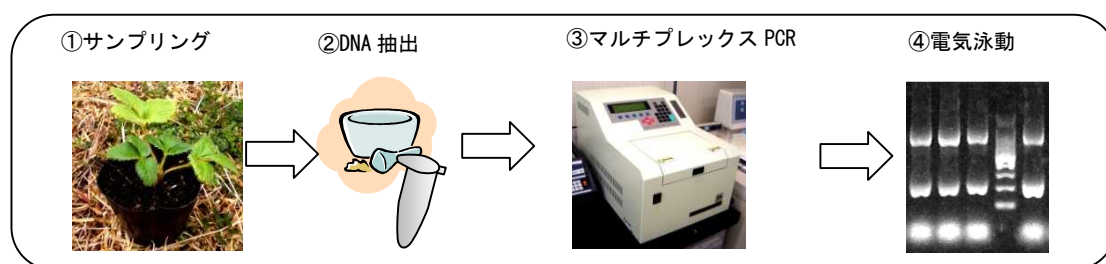


写真3-1 疫病的病徴（左：株の萎れ 右：クラウンの褐変）

イチゴ疫病は、発病圃場の罹病残さや土壌が伝染源となるほか、感染苗の持ち込みによって発生する可能性も考えられる。したがって、無病の親株を育苗に用いることが重要であり、親株の検査技術の開発が求められていた。本プロジェクト内で実施した *P. nicotianae* 感染モデルを用いた調査により、*P. nicotianae* はイチゴの根及び土壌から高率に検出されることが明らかとなった（鐘ヶ江ら，2011）。そこで、イチゴの根及び土壌を検体とし、PCR法を用いた迅速な診断技術を開発した。

(2) イチゴ疫病感染苗の遺伝子検査方法

1) 全体の流れ



PCR法によるイチゴ疫病感染苗検査方法のフローチャート

PCR法によるイチゴ疫病感染苗検定は①供試イチゴ苗からのサンプリング、②DNA抽出、③*P. nicotianae* 及び *P. cactorum* 特異的プライマーを用いたマルチプレックスPCR、④アガロースゲル電気泳動による判定、によって行う。検査する試料の数によるが、結果の判定までにはおおむね2日を要する。

2) サンプリング方法

イチゴの根と土壌を、クラウンを傷つけないようにナイフやスパチュラーなどで慎重に採取する（写真3-2）。多数の検体を同時に検査する場合は、採取器具をその都度よく洗い、異物混入（コンタミネーション）を避ける。根と土壌を選別し、根はよく水洗する。土壌は0.2g、根は0.1gを計量し、チャック付きポリ袋などの清潔なサンプルバッグに入れる。^{*1}



写真3-2 試料のサンプリング

^{*1} サンプリングが複数日にまたがる場合は、計量したサンプルを-20℃で冷凍保存し、試料が揃ってからDNAの抽出に移っても問題はない。

3) DNA 抽出方法

準備するもの

乳鉢と乳棒（オートクレーブ滅菌済みのもの）

以下の試薬

- Extraction buffer（オートクレーブ滅菌後、4℃保存）
100 mM Tris-HCl (pH9.0)
40 mM EDTA
- 塩化ベンジル
- 0.2 g/ml スキムミルク（-20℃保存）
- 10% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）^{*2}
- 3 M 酢酸ナトリウム（pH5.2、オートクレーブ滅菌後、室温保存）
- TE buffer（オートクレーブ滅菌後、室温保存）
10 mM Tris-HCl (pH7.5)
1 mM EDTA

^{*2} 粘膜刺激性があるので取扱いに注意する。また、低温時にはSDSが析出するため25℃以上で保存する。

土壌

- ①マイクロチューブに0.2gのガラスビーズ（直径1mm）を入れる。
- ②試料0.2gを加える。
- ③250μlのExtraction buffer、10μlの0.2g/ml スキムミルク、50μlの10%SDS及び150μlの塩化ベンジルを加える。
- ④ボルテックス^{*3}で5分間攪拌する。

^{*3} 攪拌機の例
Vortex Genie 2[®]（1.5mlアタッチメント着用）（エムエス機器（株））

根

- ①試料0.1gをカミソリを用いて細かく切断する^{*4}。

^{*4} 新しいパラフィルムを裁断し、その上で行う。

- ②オートクレーブした乳鉢に試料を加える。
- ③500 μ l の Extraction buffer、20 μ l の 0.2 g/ml スキムミルク及び 100 μ l の 10 %SDS を加え、乳棒でよく磨砕し、全量の磨砕液をマイクロチューブに回収する。
- ④300 μ l の塩化ベンジルを加え、1 分間激しく攪拌する。

共通

- ⑤60°Cで 15 分間インキュベートする。
- ⑥遠心分離 (15,000 rpm、1 分間、室温) し、気泡を除去する。
- ⑦150 μ l の 3M 酢酸ナトリウムを加え、マイクロチューブを手で転倒混和して穏やかに攪拌する。
- ⑧氷上で 15 分間静置する。
- ⑨遠心分離 (15,000 rpm、10 分間、4°C)。
- ⑩水層を注意深く採取し、新しいマイクロチューブに回収する (写真 3-3) *5。

*5 中間層を吸わないように。



写真 3-3

MgEx kit を用いた DNA 精製 *6

- ⑪600 μ l の吸着液を加える。
- ⑫40 μ l の磁性ビーズを加え、穏やかに攪拌する。
- ⑬マイクロチューブを Magical Trapper®にセットし 30 秒間待つ。
- ⑭水層を除去する。*7
- ⑮900 μ l の洗浄液を加え、ゆるやかに攪拌して磁性ビーズを再懸濁させる。
- ⑯マイクロチューブを Magical Trapper®にセットし 30 秒間待つ。
- ⑰水層を除去する。*7
- ⑱900 μ l の 70 %エタノールを加え、ゆるやかに攪拌して磁性ビーズを再懸濁させる。
- ⑲マイクロチューブを Magical Trapper®にセットし 30 秒間待つ。
- ⑳水層を除去する。*7
- ㉑遠心分離 (15,000 rpm、1 分間、室温)。
- ㉒マイクロチューブを Magical Trapper®にセットし 30 秒間待つ。
- ㉓水層を除去する。*7*8

*6 製品の説明書では計 4 回洗浄しているが、本マニュアルでの使用に際しては 2 回で十分である。

*7 コンタミを極力避けるためにマイクロピペットを用いる。

*8 可能な限り水層を取り除く。

- ④室温で 30 分間静置して乾燥させる（写真 3-4）。*9
 ⑤50 μ l の TE buffer を加え、ゆるやかに攪拌して磁性ビーズを再懸濁させる。
 ⑥マイクロチューブを Magical Trapper® にセットして、30 秒間待つ*10。
 ⑦DNA を含む水層を採取し、新しいマイクロチューブに回収する。

*9 磁性ビーズのツヤが無くなったら乾いている。

左：濡れている、右：乾いている



写真 3-4

*10 試料によっては磁性ビーズがなかなか上がってこないものがある。その場合は軽く叩くと磁性ビーズが上がりやすくなる。

4) PCR の方法*11

●PCR 溶液（単位は μ l）*12

鋳型 DNA	2.0
Roche FastStart Taq®	0.2
4 mg / ml BSA（牛血清アルブミン）	2.5
10×PCR buffer	2.5
25 mM MgCl ₂	3.0
10 mM dNTP	0.25
40 μ M <i>P. cactorum</i> forward primer	1.25
40 μ M <i>P. cactorum</i> reverse primer	1.25
40 μ M <i>P. nicotianae</i> forward primer	0.625
40 μ M <i>P. nicotianae</i> reverse primer	0.625
10 μ M 18S forward primer	0.625
10 μ M 18S reverse primer	0.625
滅菌水	8.3

*11 ここでは、TaKaRa PCR Thermal Cycler MP® を用いた。使用するサーマルサイクラーの機種によって、PCR 条件を調整する必要がある。



写真 3-5 TaKaRa PCR Thermal Cycler MP®

*12 すべての操作は、極力氷で冷やすなどして行う。

●使用プライマー *13

P. cactorum forward primer (Pcac-Li-F)
 5' CGTGGCGTGTTCCTATTC 3'

P. cactorum reverse primer (Pcac-Li-R)
 5' TTCCGTCGGCTCTTTCAG 3'

P. nicotianae forward primer (Pnic-Li-F)
 5' CCTATCAAAAACAAGGCGAACG 3'

P. nicotianae reverse primer (Pnic Li-R)
 5' TGGCATACTCCAGGACTAACC 3'

18S forward primer (18S-69F) *14
 5' CTGCGAATGGCTCATTAATCAGT 3'

18S reverse primer (18S-1118R) *14
 5' GGTGGTGCCCTCCGTCAG 3'

*13 Li et al. (2011) より引用

*14 このプライマーは、大部分の真核生物に共通の配列をもとにしており、DNA 抽出操作に問題がなければ、病原菌の有無に関係なく 1069bp の増幅産物が得られる。本プライマーによって増幅される PCR 産物の有無をチェックすることで、操作に問題がないかを判断できる。

●反応条件

反応条件はサーマルサイクラーの機種によって調整する。

95℃ 5分熱変性

↓

95℃ 30秒→66℃ 30秒→72℃ 60秒 (35サイクル)

↓

72℃ 10分

(上記は TaKaRa PCR Thermal Cycler MP® (写真3-5) を使用した場合の反応条件)

*15 電気泳動写真

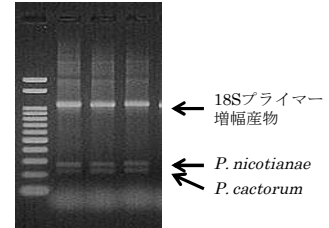


写真3-6

本研究では、分離精度を上げるために3% Ultra Low Range Agarose® (BioRad)を使用している。

●判定

2～3%アガロースゲルを用いて電気泳動を行う。

P. nicotianae に特異的な増幅産物は 267bp、*P. cactorum* に特異的な増幅産物は 223bp にバンドを呈する (写真3-6)。*15

5) 実証試験結果

P. nicotianae 接種モデル試験結果

疫病の検定に用いる部位を明らかにするため、*P. nicotianae* の汚染培土を詰めたポリポットに疫病菌に感受性が異なる8品種のイチゴ苗を植え付け、*P. nicotianae* の部位別感染状況を発病株と未発病株においてPCR法によって調査した。

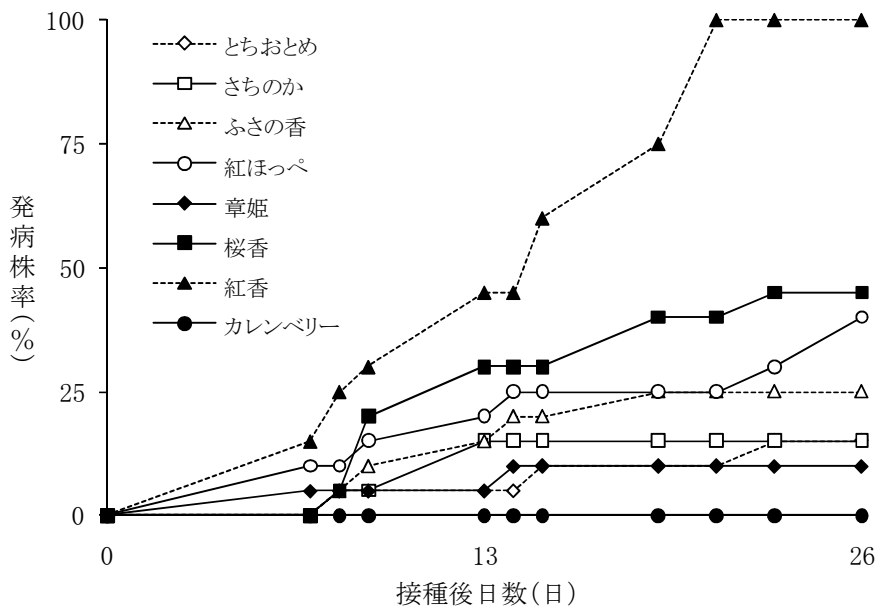


図3-1 *P. nicotianae* 人為接種モデルにおけるイチゴ8品種の発病株率の推移
注) 2010年9月29日接種

(データ提供：千葉県農林総合研究センター)

P. nicotianae に対するイチゴ各品種の発病株率は図3-1のように推移した。発病株率が最も高かったのは「紅香」で、接種21日目には発病株率100%となった。一方、「カレンベリー」は全く発病しなかった。「章姫」、「さちのか」、「とちおとめ」の発病株率は比較的lowく、「桜香」は比較的高かった。

PCR法による調査の結果、全ての品種で、発病株と未発病株のいずれにおいても、*P. nicotianae* のDNAが検出できた。また、いずれの品種でも、クラウン、根、細根での検出率が高かった(表3-1、表3-2)。発病が認められなかった「カレンベリー」においても根及び細根での検出率が高かった。炭疽病及び萎黄病の検査マニュアルでの検定部位としている葉柄基部については、検出率はおおむね高かったが、「ふさの香」、「章姫」で低く、「章姫」の未発病株では全く検出されないケースがあった。また、ポット内の土壌からは病原菌が100%検出された。

表3-1 人工接種モデルにおける発病株からの *P. nicotianae* の部位別検出率

品種	調査株数	部位別検出率(%)						
		クラウン	根	細根	葉柄基部(葉位) ^{注)}			
					1	2	3	4
とちおとめ	2	100.0	100.0	50.0	100.0	50.0	100.0	50.0
さちのか	2	100.0	100.0	100.0	50.0	50.0	50.0	0.0
章姫	2	100.0	100.0	100.0	50.0	0.0	50.0	0.0
ふさの香	5	60.0	100.0	100.0	60.0	80.0	60.0	100.0
紅ほっぺ	8	87.5	87.5	87.5	50.0	62.5	62.5	75.0
桜香	9	88.9	77.8	100.0	100.0	77.8	55.6	33.3
紅香	9	100.0	100.0	100.0	100.0	88.9	88.9	77.8

注1) 2010年9月29日接種、10月27日調査

注2) 葉位は最外葉を1とした

(データ提供：千葉県農林総合研究センター)

表3-2 人工接種モデルにおける未発病株からの *P. nicotianae* の部位別検出率

品種	調査株数	部位別検出率(%)						
		クラウン	根	細根	葉柄基部(葉位) ^{注)}			
					1	2	3	4
とちおとめ	7	57.1	100.0	100.0	71.4	71.4	71.4	71.4
さちのか	7	100.0	100.0	100.0	85.7	42.9	57.1	14.3
章姫	8	62.5	100.0	75.0	0.0	0.0	0.0	0.0
ふさの香	4	75.0	100.0	100.0	25.0	25.0	25.0	50.0
紅ほっぺ	2	100.0	50.0	100.0	100.0	50.0	50.0	50.0
桜香	1	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
カレンベリー	10	50.0	100.0	90.0	90.0	50.0	80.0	50.0

注1) 2010年9月29日接種、10月27日調査

注2) 葉位は最外葉を1とした

(データ提供：千葉県農林総合研究センター)

これらのことから、*P. nicotianae*による疫病についてのイチゴ苗検定では、イチゴ品種の疫病感受性にかかわらず、根及び根域土壌が検定箇所として適していることが示された。

P. cactorum 接種モデル試験結果

P. cactorum による疫病の検定に用いる部位を明らかにするため、*P. cactorum* の汚染培土を詰めたポリポットに「さがほのか」を植え付け感染させた接種モデル株について、*P. cactorum* の部位別感染状況を調査した。汚染土壌に植え付けた「さがほのか」は、5～6週間後に萎凋が認められた。萎凋株の根は大部分が黒変しており、一部細根の脱落も認められた。萎凋していない株についても根の黒変が認められた。

接種モデル株に対する部位別調査の結果、発病した「さがほのか」の根では *P. cactorum* が100%検出され、クラウンでは60%検出された(表3-3)。このことから、*P. cactorum* による疫病についてのイチゴ苗検定では、根が適していることが示された。

表3-3 人工接種モデルにおける発病株からの *P. cactorum* の部位別検出率

品種	調査株数	部位別検出率(%)					
		クラウン	根	葉柄基部(葉位) ^{注)}			
				1	2	3	4
さがほのか	10	60	100	10	10	20	10

注1) 2011年2月14日接種、3月21日調査

注2) 葉位は最外葉を1とした

(データ提供：千葉県農林総合研究センター)

(イチゴ疫病感染苗検査マニュアル執筆担当者：千葉県農林総合研究センター 鐘ヶ江良彦)

4. トラブルシューティング

(1) PCR 産物の増幅が見られない。

→PCR 産物の増幅が見られないケースは、①供試イチゴが病原菌感染していないもしくは菌の密度が検出限界以下である、②DNA 抽出に失敗している、③PCR に失敗している、などの理由が考えられる。このため、検査にあたっては、常にポジティブコントロールとネガティブコントロールを用意して実施する。

(2) イチゴ苗に症状が認められるが、PCR 産物の増幅が見られない。

→(1) に示した原因で検査に失敗している可能性があるため、検査手順を再確認する。また、本法で用いる炭疽病菌検出用プライマー (AP-f3, AP-r7) 及び萎黄病菌検出用プライマー (HS430, HS432) はイチゴに病原性を持つ菌を特異的に検出するが、ごく一部の菌 (擬陰性菌株) では反応しない場合がある。

(3) エタノール浸漬法による検査に比べ陽性株率が低い。

→本法は、イチゴに病原性を持つ菌を特異的に検出するため、非病原性菌には通常反応しない。このため、エタノール浸漬法による検査に比べ見かけ上の陽性株率が低い場合がある。

→本法はイチゴのクラウン部及び葉柄基部に炭疽病菌が侵入した潜在感染株の検出を想定した方法であり、分生子飛散による二次感染株では検出率が低下する場合がある。この場合、エタノール浸漬法によって得られた分生子塊から DNA を抽出し PCR 法による検定を実施することで、菌の病原性を判別できる。

(4) 検査した試料がすべて陽性だった。

→本法は、ごく微量の病原菌 DNA を数十万倍に増幅するため、試料のコンタミネーションの影響が極めて大きい。このため、検査にあたっては、常にポジティブコントロールとネガティブコントロールを用意して実施する。

→バルク検定法では、ある程度感染が予想されるケースでは、陽性判定となる比率が高くなるため、適用できない (例えば 100 株の苗を検査するケースで、苗の実際の病害感染株率が 10%である場合、苗 10 株を 1 バルクとして 10 検体を検査すると、バルク検定では 10 検体すべて=100 株すべてが陽性判定となる可能性がある)。バルク検定の実施にあたっては、事前に検査対象の一部を個別に検定し、検査対象の病害感染株率を調査する必要がある。

(5) MgEx 法でうまく DNA が抽出できない。

→MgEx 法の最後に 70%エタノールでの洗浄工程があるが、ここでエタノール除去が不十分だと DNA の回収率が低下する。したがって、最後はピペットなどで極力エタノールを取り除き、室温で 30 分程度風乾する。なお、風乾に遠心エバポレーターなどの乾燥機を使用すると、乾燥しすぎて DNA が遊離しなくなるので使用しない。

5. 参考文献

- 海老原克介・植松清次・宮原秀一・小林敏満・染谷 肇・野宮左近・川村栄一・河名利幸・石川正美(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(2), 201-202. (講要)
- 海老原克介・染谷 肇・宮原秀一・小林敏満・星野 勲・上堀内里沙・橋本 威・鐘ヶ江良彦・金森啓介・鈴木康雄・野宮左近・山口 勇・飯島直人・鈴木 健・田中千華・植松清次 (2006) 育苗圃におけるイチゴ炭疽病の潜在感染率の推移と発病との関係. 日植病報 73(1), 41. (講要)
- Freeman, S., Katan, T. (1997). Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. *Phytopathology* 87:516-521.
- Freeman, S., Horowitz, S., Sharon, A. (2001). Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. *Phytopathology* 91:986-992.
- 平山喜彦・鈴木 健・伊東靖之・岡山健夫・西崎仁博・松谷幸子 (2008) .病原菌特異的プライマーを用いた PCR による潜在感染株からのイチゴ炭疽病菌の検出. 日植病報 74(3), 198. (講要)
- Ishikawa, S. (2003). Method to diagnose latent infection by *Glomerella cingulata* in strawberry plants using ethanol. *J. Gen. Plant Pathol.* 69: 372-377.
- Kageyama, K., Komatsu, T., Suga, H. (2003). Refined PCR protocol for detection of plant pathogens in soil. *J. Gen. Plant Pathol.* 69:153-160.
- 鐘ヶ江良彦・田中 (三輪) 千華・鈴木健・吉田菜々子 (2011) .イチゴ疫病潜在感染検定技術確立のためのイチゴ疫病菌 (*Phytophthora nicotianae*) 高頻度検出部位の解明. 関東東山病害虫研究会報 58 : 113. (講要)
- Li, M., Asano, T., Suga, H., Kageyama, K. (2011). A multiplex PCR for the detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. cactorum*, and a survey of their occurrence in strawberry production areas of Japan. *Plant Disease* 95:1270-1278.
- Nisimura, N. (2007). Selective media for *Fusarium oxysporum*. *J. Gen. Plant Pathol.* 73:342-348.
- 岡山健夫 (1994) .イチゴ炭そ病の病原菌, 発生生態および発病制御に関する研究. 奈良農試研報 特別報告 1-128.
- 須賀晴久・平山喜彦・森島正二・鈴木 健・景山幸二・百町満朗 (2011) .イチゴ萎黄病菌の特異的検出が可能な PCR 用プライマー. 日植病報 77:62. (講要)
- 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(3), 198. (講要)
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Talor, J. (1990). Amplification and direct sequence of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322: PCR protocols: A guide to methods and applications. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White, eds. Academic Press, San Diego, CA.

農林水産省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」研究担当者

千葉県農林総合研究センター	鈴木 健 (研究総括)
千葉県農林総合研究センター	伊東 靖之
千葉県農林総合研究センター	鈴木 達哉
千葉県農林総合研究センター	吉田菜々子
千葉県農林総合研究センター	大谷 徹
千葉県農林総合研究センター	鐘ヶ江良彦
千葉県農林総合研究センター	田中 千華
国立大学法人岐阜大学流域圏科学研究センター	景山 幸二
国立大学法人岐阜大学流域圏科学研究センター	李 明珠
国立大学法人岐阜大学生命科学総合研究支援センター	須賀 晴久
(地独) 北海道立総合研究機構農業研究本部花・野菜技術センター	角野 晶大
(地独) 北海道立総合研究機構農業研究本部花・野菜技術センター	西脇 由恵
北海道空知農業改良普及センター	成松 靖
北海道空知農業改良普及センター	松井 梨絵
栃木県農業試験場	森島 正二
栃木県農業試験場	福田 充
栃木県農業試験場	山城 都
栃木県農業試験場	和氣 貴光
静岡県農林技術研究所	鈴木 幹彦
静岡県農林技術研究所	影山智津子
静岡県農林技術研究所	土田 祐大
静岡県農林技術研究所	伏見 典晃
奈良県農業総合センター	平山 喜彦
奈良県農業総合センター	西崎 仁博
奈良県農業総合センター	米田 祥二
奈良県農業総合センター	神川 諭
奈良県農業総合センター	岡山 健夫
佐賀県農業試験研究センター	稲田 稔
佐賀県農業試験研究センター	古田 明子
佐賀県農業試験研究センター	陣内 宏亮
佐賀県農業試験研究センター	伊東 寛史
株式会社 ミヨシ	小野寺清子

おわりに

本マニュアルに示した PCR によるイチゴ苗病害検査方法は、従来の方法に比べ感度、精度が格段に勝る。これにより、潜在感染苗の持ち込みによる病害蔓延のリスクは大幅に低減できるものと期待される。今後、本マニュアルを活用したイチゴ種苗病害検定技術が定着することにより、生産現場においては、病害の発生が抑制され、薬剤防除の適正化により環境負荷の低減をもたらす、生産コストが低減される。このことは、農産物に対する安心安全に寄与するものと考えられる。また、イチゴ苗病害検査が定着・普及することにより農業分野における遺伝子診断による病害検査が一般化すれば、これまで現場レベルでの活用がなされなかった遺伝子診断を利用した検査方法の普及・定着が期待できる。このため、本マニュアルが広く活用されることを願う。

最後に、農林水産省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」の研究推進に参画・協力していただいたすべての皆様に心より感謝申し上げます。

平成 24 年 3 月

農林水産省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」
研究総括 鈴木 健（千葉県農林総合研究センター）

本マニュアルに関する問い合わせ先

千葉県農林総合研究センター

〒266-0006 千葉市緑区大膳野町 808

電話番号：043-291-0151(代)

ファクス番号：043-291-5319

※本誌から転載・複製を行う場合は、千葉県農林総合研究センターの許可を受けてください。

※本誌に掲載された試験研究データは論文等未発表のものが含まれますので、取り扱いには留意願います。また、本誌内容の使用に際しては、下記に連絡をお願いします。

連絡先

千葉県農林総合研究センター 生産環境部生物工学研究室

鈴木 健

〒266-0006 千葉市緑区大膳野 808

TEL 043-291-9533 (ダイヤルイン)

E-Mail: t.szk62@pref.chiba.lg.jp

「イチゴ炭疽病・萎黄病・疫病感染苗検査マニュアル」

平成 24 年 3 月 発行

発行者 〒266-0006 千葉市緑区大膳野町 808

千葉県農林総合研究センター

印刷 株式会社 ハシダテ
