

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。

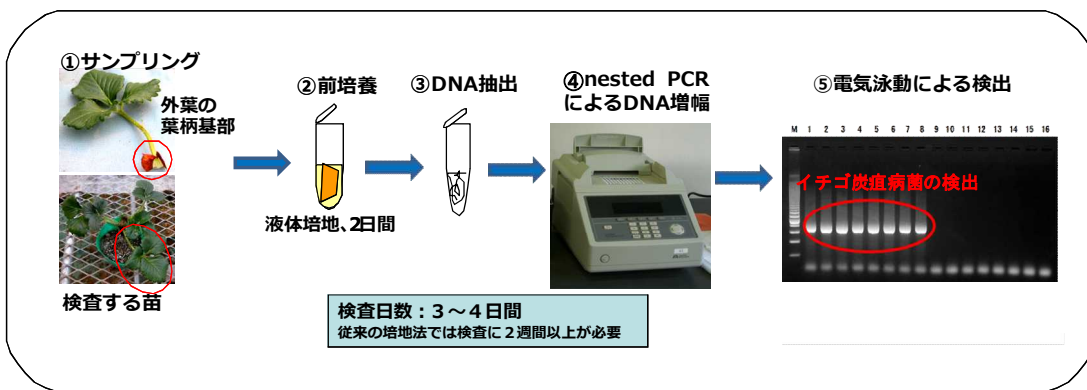
表 1-1 PCR 法による検定に要するコスト

	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）。

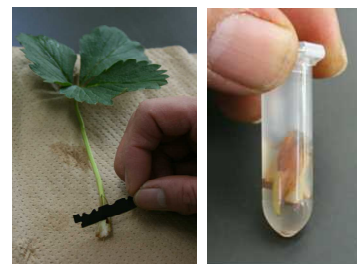


写真1-8 写真1-9

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。

① 1st 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
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

② 2nd 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
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、エキソヌクレアーゼ活性のない 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。

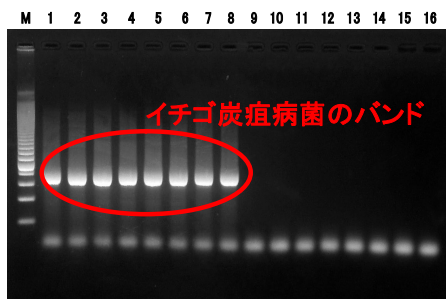


写真1-17 イチゴ炭疽病菌の電気泳動図

*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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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げ、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げ、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 $^{\circ}$ 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



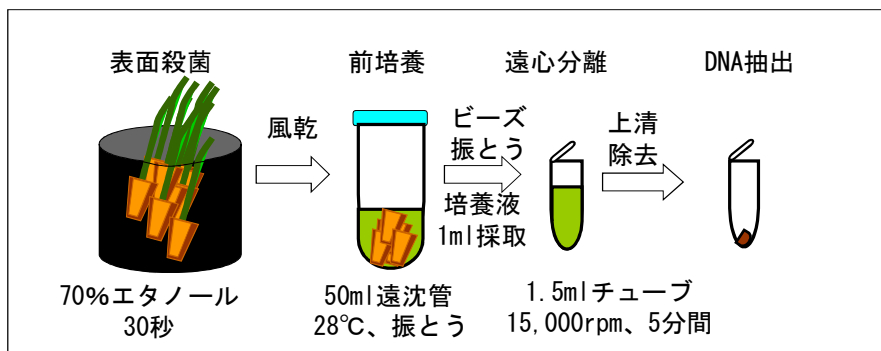
写真1-19

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。

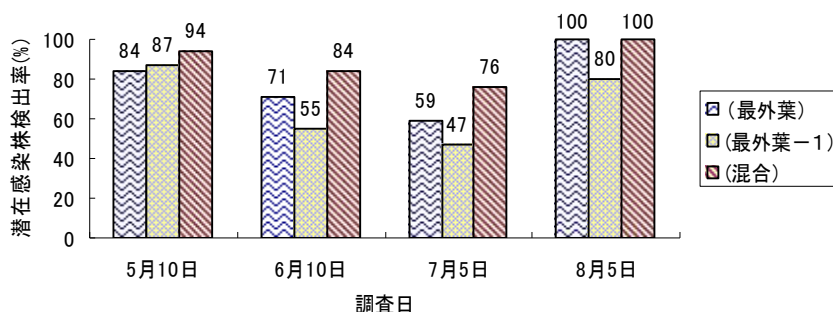


図1-1 採取部位の違いが炭疽病潜在感染株の検出に与える影響

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。

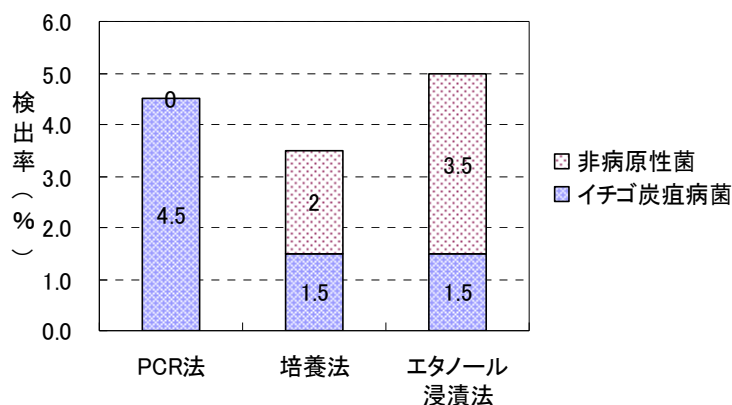


図1-2 奈良県内の苗圃場におけるイチゴ苗の炭疽病潜在感染株検定結果

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)