

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。

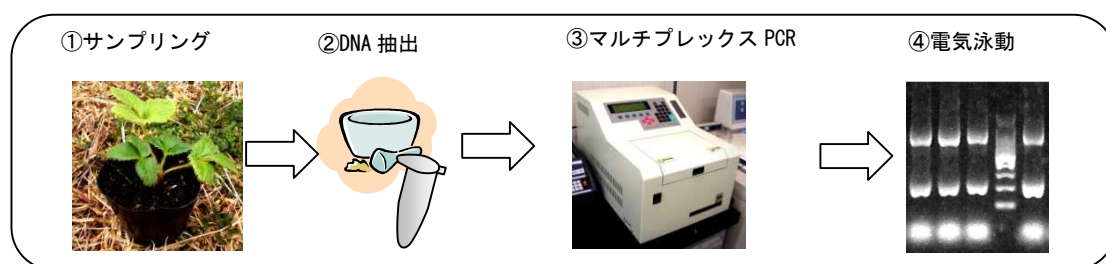


写真3-1 疫病的病徴（左：株の萎れ 右：クラウンの褐変）

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。

- ⑭室温で 30 分間静置して乾燥させる (写真 3-4)。*9
- ⑮50 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。
- ⑯マイクロチューブを Magical Trapper® にセットして、30 秒間待つ*10。
- ⑰DNA 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' GGTGGTGCCCTCCGTCAA 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

↓

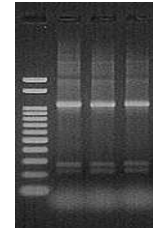
95℃ 30秒→66℃ 30秒→72℃ 60秒 (35サイクル)

↓

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



← 18Sプライマー
増幅産物
← *P. nicotianae*
P. cactorum

写真3-6

●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

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。

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。

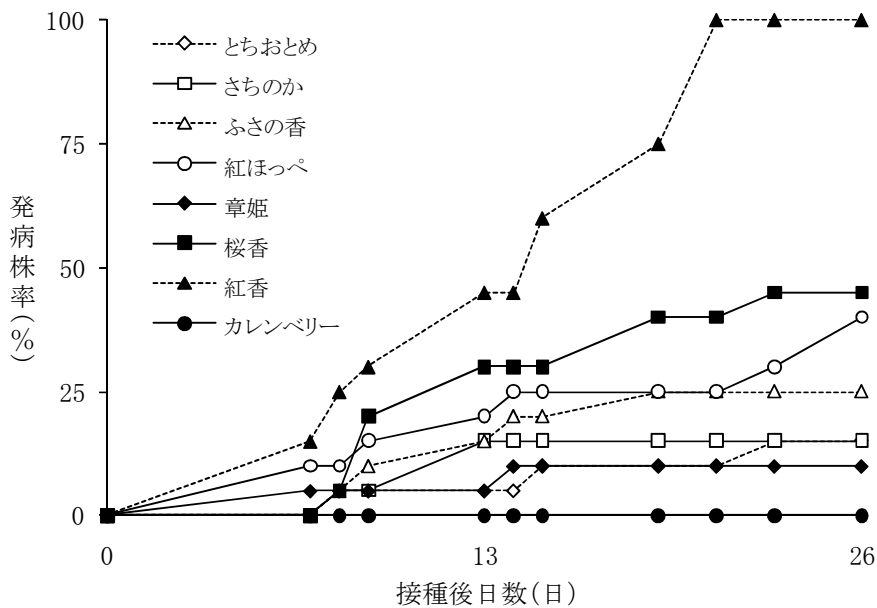


図3-1 *P. nicotianae* 人為接種モデルにおけるイチゴ8品種の発病株率の推移
注) 2010年9月29日接種

(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)