

#### 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。