

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

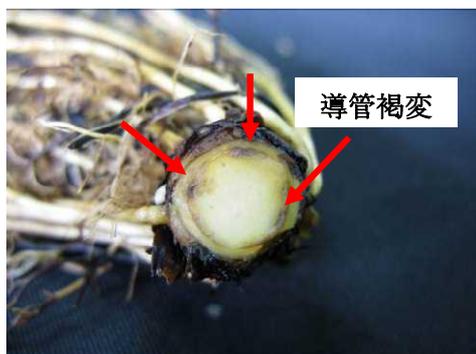
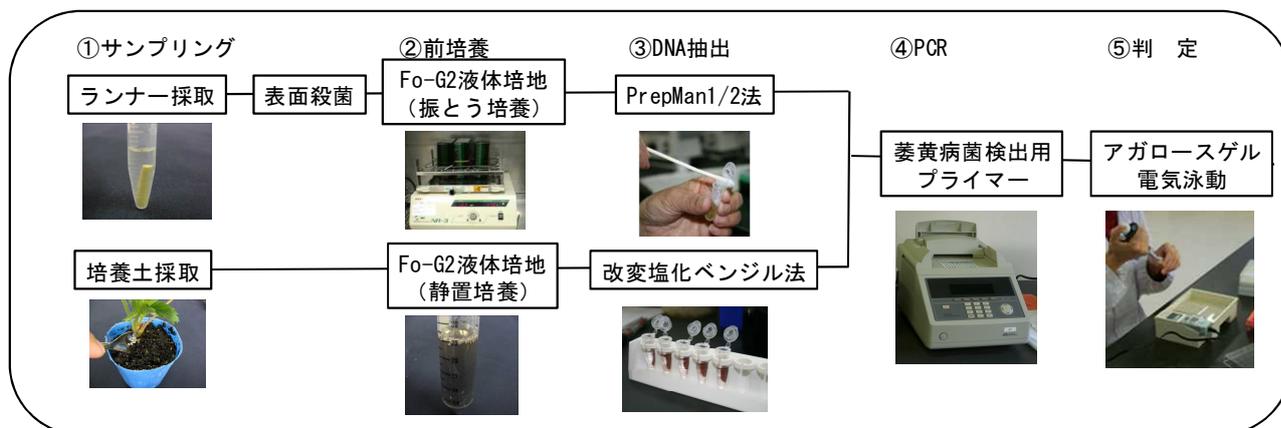


写真2-3 イチゴ萎黄病による導管褐変

(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	

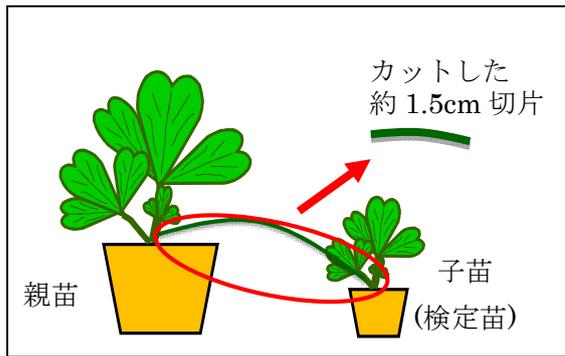


図 2-1 ランナーの採取

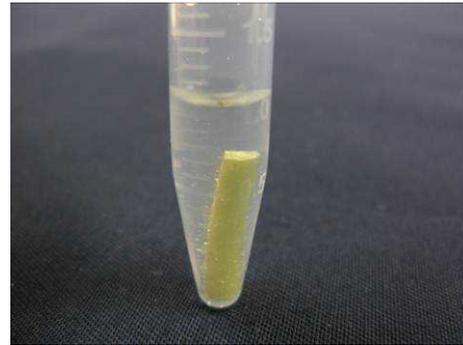


写真 2-4 ランナー切片の前培養

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

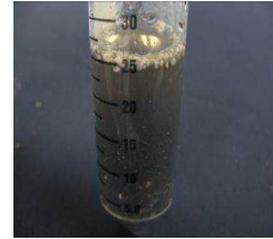


写真 2-7

*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)。

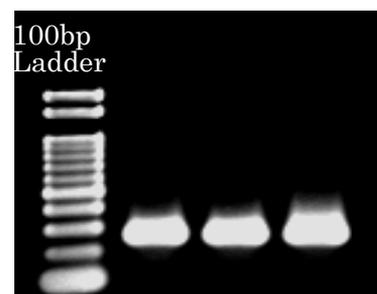


写真 2-8 萎黄病菌の電気泳動図

●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)
奇形葉 ⁴⁾	3/12	(6/12)

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)