

試験研究成果普及情報

部門	病害虫	対象	普及
課題名：エタノール浸漬法と PCR を併用したイチゴ炭疽病菌の検出			
[要約] イチゴ葉を用いたエタノール浸漬法においてイチゴ炭疽病菌は 2 週間目までに分生子塊を形成する。まれに非病原菌の分生子塊も出現するので、病原性判別が必要な場合は A17 プライマーセットによる PCR で判別できる。			
キーワード イチゴ、エタノール浸漬法、炭疽病菌、PCR、病原性判別			
実施機関名	主 査	農業総合研究センター	生物工学部 微生物工学研究室
	協力機関	農業総合研究センター	暖地園芸研究所 環境研究室
		農業総合研究センター	育種研究所 野菜花き育種研究室
実施期間	2003 年度～2005 年度		

[目的及び背景]

イチゴ炭疽病菌の簡易検出法としてエタノール浸漬法が利用されている。この方法で炭疽病菌の潜在感染率を調査すると、3～5 週間後に急激に出現率が高まる。また、出現した分生子塊にはイチゴに病原性を示さない菌も混在することが明らかになった。イチゴの最重要病原菌である炭疽病菌について病原性を判別する方法を開発する。

[成果内容]

- 生産農家のイチゴ葉についてエタノール浸漬法における分生子塊出現時期と病原性との関係を調査すると、病原性の分生子塊出現は 2 週間以内である。一方、非病原性分生子塊の出現時期は遅れ、3 週目以降に出現する分生子塊は全て非病原性である（表 1）。
- イチゴ炭疽病の発生回避策として実施するエタノール浸漬法では、病原性の判別は以下のとおりとする。
 - エタノール浸漬法では、基本事項を着実に実施し、処理後の検査葉の保存は 28℃ を維持し、1 週間目と 2 週間目の 2 回の観察を行う。
 - 1 週間目までに出現する分生子塊は全て病原菌と判断する。
 - 2 週間目に出現する分生子塊には、病原性の有る菌と無い菌が混在している可能性がある。この場合、A17 プライマーセットによる PCR を行うことによって病原性を判別できる。
- A17 プライマーセットを用いた PCR は TaKaRa 社製の *TaKaRa EX Taq* を使用し、変性を 94℃ で 1 分間、アニーリングを 55℃ で 1 分間及び伸長を 72℃ で 1 分間を 1 サイクルとし、30 サイクル行う。
- PCR の結果は、約 950bp に PCR 産物を生じた菌株は全て病原菌と判断する。非病原菌では、約 1,050bp に PCR 産物を生じる場合と全く PCR 産物を生じない場合がある。（図 1・表 2）。

[留意事項]

A17 プライマーセットによる PCR では 3 週目以降に出現する非病原菌を病原菌と誤判定する場合は 2 割程度ある(表 2)。この誤判定を回避するためにエタノール浸漬法を確実に実施し、2 週間目前後に出現する分生子塊の検定に PCR を行うと効果的である。

[普及対象地域]

県内全域、イチゴ担当普及指導者

[行政上の措置]

[普及状況]

なし。

[成果の概要]

表 1 エタノール浸漬法における
分生子塊出現日数と病原性との関係

出現日	(株)	
	病原性 有	無
7日	4	0
14日	1	1
21日	0	4
28日	0	8

表 2 炭疽病菌の病原性と PCR 産物のサイズ

病原性	(株)			
	950bp	1,050bp	PCR産物無	合計
有	23	0	0	23
無	9	15	27	51

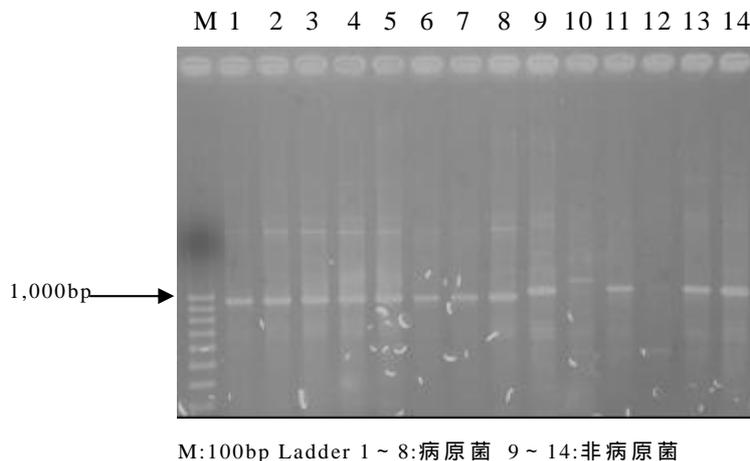


図 1 A17 プライマーセットを用いた PCR の結果

[発表及び関連文献]

生物学試験成績書(平成 15、16 年度)

[その他]

平成 13 年度試験研究要望課題(提起機関:安房農林振興センター)