

試験研究成果普及情報

部門	病害虫	対象	普及
課題名：PCRを用いた効率的なイチゴ苗の炭疽病検査技術			
〔要約〕新しいイチゴ炭疽病検査技術は主な検査費用を従来法の1サンプル当たり191円から約3～8割削減できる。また静置培養による前培養及び10株をまとめて検査する方法等により労力を削減できる。検査によって育苗圃場の感染親株を4月中旬までに除去することで2次感染を抑えられる。			
フリーワード イチゴ、イチゴ炭疽病、潜在感染苗、診断、PCR			
実施機関名	主 査	農林総合研究センター 生物工学研究室	
	協力機関	担い手支援課、印旛農業事務所	
実施期間	2013年度～2015年度		

〔目的及び背景〕

県内のイチゴ栽培では、依然としてイチゴ炭疽病の発生による生産性の低下が問題となっており、対策が求められている。農林総研では、農水省の競争的資金等を活用して、イチゴ苗を遺伝子増幅法により診断し、イチゴ炭疽病等に感染した苗を発病前に排除する技術（イチゴ健全種苗生産のための病害検査プログラム）を、全国に先駆けて開発した。平成23年度より普及指導員に対する技術移転を始めるなど、生産現場での普及・活用が期待されるが、本格的な普及・活用には至っていない。そこで、本プログラムの炭疽病検査にかかる手間及びコストの低減化や検査導入の効果に関する実証を行い、生産現場での普及を見据えたより実用的な検査技術を確立する。

〔成果内容〕

- 1 図1に開発した検査法のフロー図を示した。DNA抽出をPrepMan1/2法からMagEx1/4法に、またPCR反応条件をGoTaq Green Master Mix 20 μ L系からEmeraldAmp MAX PCR Master Mix 10 μ L系に変更することで、現行と同等以上の検出率を保ちながら主な検査費用を約3割削減できる（表1、表2）。
- 2 調製後-30℃で8週間保存したPCR反応試薬でも、調製直後の試薬と同様に病原菌を検出できる（表3）。あらかじめ調製・分注済みの試薬を用いることにより、必要時に容易に検出操作が行えるので、労力と時間を低減できる。
- 3 単株検査では、改変Mathur液体培地を用いて48時間から120時間の静置培養を行うことで現行の振とう培養と同程度の検出率を得られる（表4）。したがって、振とう機なしで前培養を実施できる。
- 4 10株の検体から一括して検出を行うバルク検査では、改変Mathur液体培地を用いて72時間から120時間の静置培養を行うことで現行の単株検査と同程度の検出率を得られる。（表5）。これにより、生産者あたり数百～1,000株と想定される親株検査

が可能であり、主な検査費用も約8割削減できる（図1）。

- 5 検査によって確認された育苗圃場の感染親株を4月中旬までに除去することで2次感染を抑えられる（表6）。
- 6 感染株の検出率は、2月はやや低下するので、親株検査は1月までに行う事が望ましい（表7）。
- 7 現地生産圃場2か所において病害検査プログラム導入の効果実証を行った（表8）。親株検査の結果炭疽病菌が検出された株を除去して育苗を行ったところ、親株の一部を検査したA本圃では検査導入区で発病がわずかに認められたが実質的な被害がなかった。親株の全株を検査したB本圃では、検査導入区で発病が認められず、非検査区では発病が認められた。検査の際の抽出率をできるだけ高くすることにより本圃での発病を防ぐことができる。

[留意事項]

本検査法の実施に当たっては、専用機材（PCR装置等）が必要である。

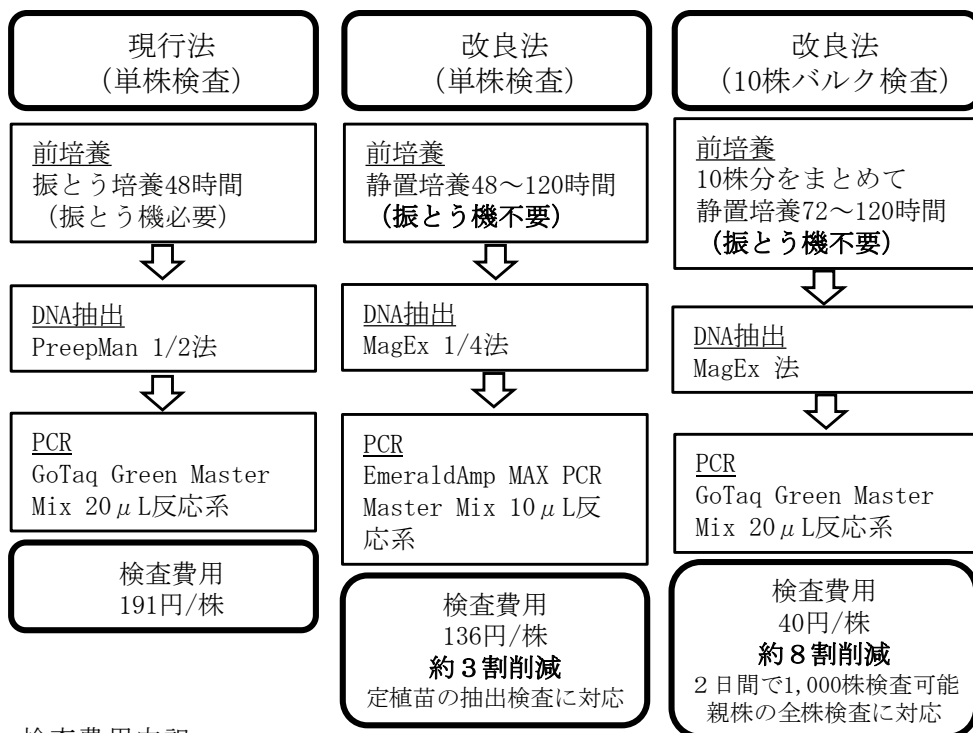
[普及対象地域]

県内全域のイチゴ生産者

[行政上の措置]

[普及状況]

[成果の概要]



検査費用内訳

	費用 (円/株)		
	現行法 (単株検査)	改良法 (単株検査)	改良法 (10株バルク検査)
DNA抽出試薬	90	70	28
PCR酵素試薬	60	17	6
サンプルチューブ ¹⁾	16	16	2
ピペットチップ ²⁾	25	33	4
合計	191	136	40

注 1) 4円/本

2) 2.5円/本

図 1 改良した病害検査のフロー図と主な検査費用の内訳

表 1 異なる抽出法による検出率、費用及び抽出時間の比較

DNA抽出法	現行法 (PrepMan1/2)	改良法 (MagEx1/4) ¹⁾
イチゴ炭疽病菌の検出率 (%) ²⁾	64.6 ± 12.6	95.0 ± 5.0
1 サンプルあたりのDNA抽出試薬費用 (円)	90	70
20サンプルあたりのDNA抽出時間 (分)	100	140

注 1) MagEx1/4: MagEx法 (イチゴ炭疽病・萎黄病・疫病感染苗検査マニュアル) の前培養液使用量を含む全ての液量を4分の1に削減し、最終的に25 μLのTEバッファーにDNAを溶出

2) 3回のPCRの平均±標準偏差

3) PCRはGoTaq Green Master Mix (Promega) 使用、反応液量20 μL

表 2 異なる PCR 試薬を用いた場合の検出率及び費用の比較

試薬名 ¹⁾	GoTaq Green Master Mix (Promega, 現行)	EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (TaKaRa)
反応液量 (μ L)	20	10
イチゴ炭疽病菌の検出率 (%) ²⁾	96.7 \pm 4.7	96.7 \pm 4.7
試薬費用 (円/反応)	60	17

注 1) PCR条件はそれぞれの試薬の添付の説明書に従い、アニーリング温度を58℃、サイクル数を40とした

2) 15株からMagEx1/4法で抽出したDNAを用いて、2回のPCRによる検出率の平均 \pm 標準偏差 (%)

表 3 調製後冷凍保存した PCR 反応液を用いた検出結果

PCR反応液 保存期間 ⁴⁾	現行条件 ¹⁾				低コスト条件 ²⁾			
	DNA濃度 ³⁾ (pg/ μ L)				DNA濃度 (pg/ μ L)			
	10	1	0.1	0.01	10	1	0.1	0.01
8週間	+ ⁵⁾	+	\pm	-	+	+	\pm	-
0日	+	+	\pm	-	+	+	\pm	-

注 1) GoTaq Green Master Mix (Promega) 使用、反応液量20 μ L

2) EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (TaKaRa) 使用、反応液量10 μ L

3) イチゴ炭疽病菌培養菌体から抽出したDNAを段階希釈して用いた

4) DNA以外の試薬を混合後、-30℃で保存した期間、0日は保存せずにPCRを行った

5) + : 2反復中2回とも増幅有り、 \pm : 2反復中1回のみ増幅有り

- : 2反復中2回とも増幅無し

表 4 単株静置培養における培養時間別検出率

液体培地	10サンプルあたりの検出率 (%) ¹⁾				
	振とう 48h ²⁾	静置			
		48h	72h	96h	120h
PD+Cm ³⁾	100.0 \pm 0.0	83.3 \pm 5.8	43.3 \pm 5.8	56.7 \pm 15.3	46.7 \pm 15.3
改変Mathur ⁴⁾	83.3 \pm 5.8	100 \pm 0.0	86.7 \pm 5.8	83.3 \pm 20.8	96.7 \pm 5.8

注 1) イチゴ炭疽病菌を接種した葉柄基部切片を使用した、検出率は3回のPCRの平均 \pm 標準偏差

2) 培養時間

3) 100 mg/L クロラムフェニコール添加ポテト・デキストロース液体培地

4) Freeman and Katan, 1997, Phytopathology 87: 516-521

5) 現行の培養はPD+Cm液体培地による48時間の振とう培養

表 5 10株バルク静置培養における培養時間別検出率

検出率 (%)	現行培養区 (単株)	10株バルク静置培養区			
		48h ¹⁾	72h	96h	120h
	100	70	100	100	100

注 1) 培養時間

2) イチゴ炭疽病菌を接種した葉柄基部切片を供試した、現行培養区はPD+Cm液体培地による48時間の振とう培養、10株バルク静置培養区は改変Mathur液体培地を使用、10株バルク静置培養区の72時間及び96時間培養区は6サンプル、その他は10サンプルあたりの検出率

表6 4月中旬に炭疽病菌接種親株を除去した圃場での検出株数及び発病株数

試験区	検出株数/検査対象株数		発病株数/子苗数
	7月22日	8月18日	9月30日
接種親株除去区	0/10	0/20	0/82
非除去区	0/10	1/20	5/69

注) 場内のモデル圃場での試験、平成26年実施、接種親株除去区では4月14日に接種親株を除去した

表7 秋季に接種した株からの時期別病原菌検出率

検出月	12	1	2
検出率 (%)	70.7	76.7	55.3

注) 平成27年12月～平成28年2月実施、接種時期は平成27年11月、各月の調査苗数は50株とした

表8 現地生産圃場での病害検査プログラム導入の効果実証

圃場	試験区	育苗方法	潜在感染親株数/調査親株数 ²⁾ (抽出率) ³⁾	本圃での発病株数/調査株数 ⁴⁾
A	検査 ¹⁾ 導入区	もみ殻 無仮植	2/62 (28%)	2/11600
	非検査区	雨よけ地床	-	0/11600
B	検査導入区	もみ殻 無仮植	1/62 (100%)	0/3600
	非検査区	もみ殻 無仮植	-	8/3600

注1) 現行法による検査

2) 検査日：平成26年5月12日 (A)、26日 (B)

3) 検査導入区全体の株数に対する検査株数の割合

4) 定植から調査日までの発病株数、調査日：平成26年10月16日 (A)、11月11日 (B)

5) 過去の炭疽病発生状況は、圃場Aが3、4年前に多発しその後小発生、圃場Bは8年前に多発しその後小発生

[発表及び関連文献]

イチゴ炭疽病・萎黄病・疫病感染苗検査マニュアル、千葉県、2012年

(<http://www.pref.chiba.lg.jp/lab-nourin/nourin/koukaishiryou/manual.html>)

[その他]