

# PCRによるイチゴ萎黄病菌検出技術の 生産現場での活用

奈良県農業研究開発センター <sup>ひら</sup>平 <sup>やま</sup>山 <sup>よし</sup>喜 <sup>ひこ</sup>彦

## はじめに

イチゴ萎黄病は、*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* によって引き起こされる土壤病害である。現在栽培されているイチゴ主要品種の多くが本病に対して罹病性であり、全国的に発生が多くなっている。本病の典型的な症状は、新葉の小葉3枚のうち1枚または2枚が黄化して小さくなり奇形葉となる（口絵①a）。病徴が進行すると苗全体が著しくわい化し、枯死に至る。また、発病苗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（口絵①b）。しかし、葉の奇形や黄化は、養分欠乏や過剰、薬害等の生理障害でも発生し、クラウンの褐変は炭疽病や疫病等の病害でも見られる。そのため、生産現場からの診断依頼に対して判断に迷うことが多い。また、*Fusarium oxysporum*（以下、Fo）には、作物によって病原性が異なる分化型や、非病原性菌が多く存在しており、これらの菌と萎黄病菌は形態が同じで識別することができない。そのため、本病を特定するには分離菌をイチゴに接種し、病原性を確認する必要がある。非常に多くの手間と日数がかかる作業となる。このような中、萎黄病菌と他のFoを識別できるプライマーによるPCR検出技術が開発された（SUGA et al., 2013）。迅速な対応が迫られる生産現場において、本技術は非常に有効な診断法となっている。奈良県では、①原原種苗の保菌検定、②普及指導員からの苗診断依頼、さらに、③土壤消毒の要否を判定するための圃場診断等に本検出技術を活用しているので、それら事例を紹介する。

なお、本病害の検出技術についてはイチゴ萎黄病感染苗の検査マニュアルとして成果普及技術集にまとめられている（千葉県農林総合研究センター，2012）。技術的な詳細についてはそちらを参照されたい。

## I 原原種苗の保菌検定

奈良県では県育成品種を中心にイチゴ親苗供給体制が整備されている。まず1年目に奈良県農業研究開発セン

ター大和野菜研究センターにおいて原原親苗育成し、2年目に奈良県農協が管理するイチゴ優良親苗増殖圃場において原親苗を育成する。さらに3年目に各地域の親苗増殖圃場において親苗を増殖し、約3万本の親苗を生産者へ供給している。親苗の供給体制が整備された当初は、原原親苗を対象にFo選択培地を用いた培養法による萎黄病検定が実施されてきた（口絵②）。検定部位であるイチゴクラウンの表皮をカッターで削ぎ取り、70%エタノールと5%次亜塩素酸ナトリウムで表面殺菌後、Fo選択培地であるFo-G2培地（西村，2008）で培養する。コロニーが出現した場合には陽性とみなし、陽性となった苗と親苗が同じ苗はすべて廃棄してきた。しかし、この方法では非病原性フザリウム菌が検出された場合にも陽性と判定され、多くの苗が廃棄される。このような無駄を省くために、2012年から選択培地で検出後に、出現したコロニーからDNAを抽出し、萎黄病菌検出用プライマーによるPCRを実施している。DNA抽出にはPrepMan Ultra Reagent（Life Technologies）を使用しているが、コロニーからの抽出のため他の簡易な方法でも可能である。

Fo選択培地で試料を培養すると、高濃度の次亜塩素酸ナトリウムでの表面殺菌にもかかわらず、毎年多くの非病原性フザリウム菌が検出される。2013～15年の検定では、平均19.5%の試料において非病原性フザリウム菌が検出されており（表-1）、PCR検定導入前にはこれらの試料苗が廃棄されていたことになる。

検定時には試料採取時の圃場への病原菌の持ち込みにも気をつけている。具体的には、試料採取は日々栽培管理を行っている担当者が行い、その後の培養やPCRは

表-1 原原種苗の萎黄病検定におけるフザリウム菌の検出

年度	検定数	フザリウム菌の 検出数 (分離率(%))	萎黄病菌検出数 (分離率(%))
2013	66	19 (28.9)	0 (0)
2014	65	3 (4.6)	0 (0)
2015	56	14 (25.0)	0 (0)
平均	58.7	12.0 (19.5)	0 (0)

分離率は検定数に対する割合。

Utilization of PCR Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*

Causing Strawberry Wilt. By Yoshihiko HIRAYAMA

(キーワード：イチゴ萎黄病, PCR, 検出)