

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 ^{ひら}平 ^{やま}山 ^{よし}喜 ^{ひこ}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壌病害である。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土壌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)

別の担当者が行っている。病害検定はあくまでも確認するものであり、このような人の出入りの制限とともに、培養土の蒸気消毒の実施や空中採苗方式による苗増殖等の栽培管理や防除対策にも力を入れている。

II 生産苗の診断依頼への対応

普及指導員や農協の営農指導員からは、生産者が管理しているイチゴ苗の診断依頼がある。経験豊富な普及指導員からの依頼は、萎黄病とも生理障害とも判断がつかないものが多く、現在ではPCR診断が欠かせないものとなっている。持ち込まれた苗は症状の程度によって、検定部位やDNA抽出法を使い分けて診断している。具体的な症状ごとの対応を以下に記す。

一つ目は著しく葉が奇形になっている苗である。このような場合には、導管が褐変していることが多く、前述の原原親苗の検定と同じように、クラウンから選択培地を用いた培養法で菌を分離し、その後コロニーからDNAを抽出し、PCRを行う。この方法は、どちらかというとう萎黄病菌であることを確かめるために実施している場合が多い。

次に、葉は奇形しているが、その症状が軽く、生理障害と見分けがつかないような苗である。このような苗は導管褐変が見られないことが多く、クラウンからの分離が難しいため、ポット苗の根と培養土の混合試料を採取し（口絵③）、DNA抽出を行っている。採取した試料10 mlを50 ml遠沈管に入れ、寒天を除いたFo-G2液体培地を2 ml添加し、25℃で4日間静置培養する（口絵④）。培養には時間がかかるが、試料の破碎作業を省略し、しかも検出感度を高めることができる利点がある。このとき検出限界は菌密度 10^2 個/gレベルであり、無培養に比べて約10倍の検出感度になる（平山ら、2010）。培養後、滅菌蒸留水で懸濁し、その懸濁液の沈殿物からDNAを抽出する。DNA抽出には植物体からの本菌の検出結果が良好であったMagExtractor-plant genome kit（東洋紡）を使用している。イチゴ育苗でよく使用されているピートモス、パーミキュライト、パーライトの混合培養土では、本DNA抽出キットでの検出が可能である。しかし、灰色低地土や真砂土等では検出が不安定になることを確認しており、このような土壌を混合した培養土からの検出には、塩化ベンジル法（KAGEYAMA et al., 2003）によりDNAを抽出し、その後の精製用にMagExtractor-plant genome kitを用いている。この診断法では、試料に根の一部と培養土だけを用いるため苗の傷みが少なく、陰性の場合には検定苗をその後も利用できる利点がある。

実際には、コロニーと培養土からDNAを抽出し、検定を実施する場合があるが、1週間程度で生産者に診断結果を返すことが可能となり、迅速で無駄のない防除対策へとつながっている。また、様々な症状の苗を診断し、その結果との照合を繰り返していくうちに、萎黄病とその他の原因によるものを見分ける目も養われてくる。

III 圃場診断

圃場診断は、まだ実施事例が少ない。主に厳密な管理が必要な親苗増殖圃場や、毎年本病の発生が多く対策に苦慮している圃場等に限られている。

土壌伝染性の萎黄病は、汚染土壌や被害残さが伝染源になる。近年、イチゴの育苗方式は、臭化メチル代替技術として広まった隔離育苗が主流となっている。しかし、萎黄病の発生は期待するほど減少していないのが現状である。多発圃場では、発病を繰り返す事例が多いことから、育苗施設内に残された汚染残さや通路等の土壌が汚染源として考えられた。

ここでは、親苗生産圃場の育苗ハウス内の土壌から本菌を検出し、その汚染状況を調査した事例を紹介する。土壌診断はベンチアップした隔離育苗を実施しているハウスで行い、ハウスの出入り口や通路から土壌を採取した。それぞれの採取土壌10 mlを50 ml遠沈管に入れ、Fo-G2液体培地を2 ml添加し、4日間培養した。その後、培養した土壌を滅菌蒸留水で懸濁し、その懸濁液からDNAを抽出した。DNA抽出は土壌からも安定して検出が可能な塩化ベンジル法で行い、その後、MagExtractor-plant genome kitを用いて抽出液を精製した。20検体

表-2 親苗生産圃場からのイチゴ萎黄病菌の検出

調査圃場	採取場所			発病の有無
	入口	通路1	通路2	
A	+	-	-	無
B	-	-	-	無
C	+	-	+	無
D	-	+	+	無
E	-	-	+	有
F	+	+	+	無
G	-	+	+	無
H	+	-	+	無
I	-	-	-	無

+：萎黄病菌が検出，-：萎黄病菌が非検出。
有：発病を確認，無：発病なし。

表-3 各用途別のイチゴ萎黄病菌の検出法

活用場面	採取部位	前培養	DNA抽出	備考
原原親苗の検定	クラウン	Fo-G2 培地	PrepMan Ultra Reagent	コロニー PCR
診断依頼への対応	クラウン	Fo-G2 培地	PrepMan Ultra Reagent	導管褐変がある場合、コロニー PCR
	培養土と根	Fo-G2 液体培地の添加	MgEx	導管褐変がない場合
土壌診断	土壌	Fo-G2 液体培地の添加	塩化ベンジル法 + MgEx	

MgEx: MgExtractor-plant genome kit-

処理するのに DNA 抽出から精製まで 2 時間程度の時間が必要である。

検定の結果、9 圃場中 7 圃場の通路と入り口付近のいずれかの土壌から本菌が検出され、高頻度で汚染されていることが明らかになった(表-2)。また、調査した圃場のうち、発病が確認されたのは 1 圃場のみであった。このことから、ハウス内の通路が汚染されていても必ずしも発病するものではないが、管理作業や土壌が風で舞うことによって、間接的に本菌がイチゴに感染し、発病する可能性があると考えられた。このような結果を踏まえて、特に親苗増殖圃場では、クレゾールによる長靴の消毒、育苗施設の太陽熱消毒を実施することを徹底するように指導している。

おわりに

今回紹介した萎黄病菌検出技術は、当初イチゴ親苗の保菌検定を目的に開発された。近年、各県で育成されたブランド品種が他県でも栽培されるようになり、親苗や生産苗の移動が頻繁になっている。このことから広域的な病害発生リスクが高まっていると言える。このような背景から、苗の病害検定を実施し、無病苗を販売あるいは譲渡することが重要であり、今回紹介した原原親苗の PCR 検定は基本となるものと考えられる。さらに、土壌から安定して検出できる DNA 抽出法が確立され、萎黄病菌検出用プライマーが現地圃場の土壌から検出した場合にも特異性を持つことが明らかにされた。これにより、生産者圃場の育苗苗の診断や土壌汚染状況調査も可能となった。現在では、それぞれの目的に応じて、最適

な採取部位や DNA 抽出法等が明らかとなっている(表-3)。

近年、各都道府県の病害虫防除所や研究機関ではサーマルサイクラー等の必要機器が整備され、PCR は植物病害の診断に欠かせない技術となっている。また一昔前に比べれば、PCR に必要な試薬類などの消耗品が格段に安価になり、数多くの検体にも対応できるようになった。今後は、病害診断だけでなく、これまで未解決であった感染源の特定や発生生態の解明のために PCR をどのように応用していくかが重要になると考える。

最後に、本成果は農林水産省の新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業「イチゴ健全種苗生産のための病害検査プログラムの構築(課題番号 21023)」の中で、千葉県農林総合研究センター鈴木 健氏、岐阜大学生命科学総合研究支援センター須賀晴久博士、岐阜大学流域圏科学研究センター景山幸二博士等多くの方々との共同研究によって得られた成果である。なお、本事業ではイチゴ萎黄病菌のほか、炭疽病と疫病の検出技術も開発し、前述の成果普及技術資料にまとめている。興味のある方は是非活用していただきたい。

引用文献

- 1) 千葉県農林総合研究センター (2012): 平成 23 年度成果普及技術資料「イチゴ炭疽病・萎黄病・疫病感染苗検査マニュアル」: 26 pp.
(<https://www.pref.chiba.lg.jp/lab-nourin/nourin/koukaishiryu/manual.html>)
- 2) 平山喜彦ら (2010): 日植病報 76: 160 (講要).
- 3) KAGEYAMA, K. et al. (2003): J. Gen. Plant Pathol. 69: 153 ~ 160.
- 4) 西村範夫 (2008): 植物防疫 62: 162 ~ 167.
- 5) SUGA, H. et al. (2013): Plant Dis. 97: 619 ~ 625.