

<<短 報>>

埼玉県におけるイチゴ炭疽病、萎黄病の潜在感染株検出方法の検討

小山浩由*

Detection method of symptomless Strawberry plants infected with Anthracnose and Fusarium wilt in Saitama prefecture.

Hiroyoshi KOYAMA

埼玉県のイチゴ生産は産出額 31 億円、全国第 13 位の品目（農林水産省, 2021）であり、都市近郊の立地を生かした観光摘み取り園や直売向けの栽培が盛んである。こうした背景から本県では観光直売向けにも対応可能な新品種として「埼園い 1 号（愛称：かおりん）」と「埼園い 3 号（愛称：あまりん）」（尾田ら, 2018）を育成した。埼玉県種苗センターは本県農業の振興に資することを目的として、これらのイチゴ品種を含めた健全で優良な種苗の生産を行っている。種苗センターでは 2020 年にイチゴ苗 61,152 株を供給しており、2017 年以降その数は増加傾向にある（公益社団法人埼玉県農林公社, 2021）。種苗センターにおけるイチゴ苗の生産では、ウイルスや炭疽病菌、萎黄病菌の検査を行っている。これらのうち炭疽病菌と萎黄病菌については、光学顕微鏡を用いた目視による検査を行っていたが、検出までに時間がかかることや各病原菌の特徴の判別に経験を要することが問題となっていた。

現在、植物病原菌の検出方法としては短時間で精度の高い PCR 法が広く活用されており、イチゴにおける研究知見（千葉県農林総合研究センター, 2012）も報告されている。そこで本研究では当該知見を活用して、埼玉県内の炭疽病、萎黄病を対象とした検出技術について検討した。

材料および方法

1 病原菌培養菌株からの検出

(1) 供試菌株

農研機構遺伝資源研究センター農業生物資源ジーンバンク（以下、ジーンバンク）より分譲された菌株として、イチゴ炭疽病菌（*Colletotrichum fioriniae* MAFF306282, *C. aenigma* MAFF305913, *C. siamense* MAFF239775, *C. fructicola* MAFF744017, MAFF306787）および、イチゴ萎黄病菌（*Fusarium oxysporum* f.sp. *fragariae* MAFF305557, MAFF727510）を用いた。また、埼玉県内菌株として、埼玉県内イチゴ生産圃場の発病株より分離したイチゴ炭疽病菌（*Colletotrichum* spp.）およびイチゴ萎黄病菌（*F. oxysporum* f. sp. *fragariae*）を用いた。また、炭疽病、萎黄病菌以外に県内イチゴ圃場より分離した各種菌株を用いた。県内菌株については、ITS 領域の塩基配列を 3500 Genetic Analyzer（Thermo Fisher Scientific）により解析・取得し、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の塩基配列相同性検索（blastn）により同定した。

(2) PCR 法による県内産菌株の検出

PDA 平板培地上で 28℃, 7~10 日間培養した各菌株の菌糸を滅菌した柄付き針で掻き取り、PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent（Thermo Fisher Scientific）を用いて DNA を抽出し、2 倍に希釈したものを PCR に用いた。イチゴ炭疽病菌検出プライマーセットとして Cg-m_2F（CCGTTTCGATTGATGTAAATTCGGGC; Gan *et al.*, 2017）と Cg-m_2R（GGCCAGACCAAACCTCGGCTGCAG; Gan *et al.*, 2017）および T1（AA-

* 遺伝子情報活用担当

CATGCGTGAGATTGTAAGT; O'Donnell and Cigelnik, 1997) と ColTub01_R (GAAGGTCAG-yAyTCGTCAATA;新規設計) を, イチゴ萎黄病菌検出プライマーとして FofraF (CAGACTGGGG-TGCTTAAAGTT; Suga *et al.*, 2013) と FofraR (AACCGCTAGGGTCGTAACAAA; Suga *et al.*, 2013) を用いた. PCR は Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Fisher Scientific) を用い, DNA 溶液 2.0 μ l, Nuclease Free Water 0.8 μ l, 2 μ M フォワードプライマー-1.0 μ l, 2 μ M リバープライマー-1.0 μ l, 2X Phire Plant PCR Buffer 5.0 μ l, Phire Hot Start II DNA Polymerase 0.2 μ l の計 10 μ l の組成で実施した. 各プライマーセットの PCR 条件は表 1 に示した. PCR 産物は 2%アガロースゲルで電気泳動し, Atlas ClearSight DNA Stain (BioAtlas) を用いて検出した.

2 イチゴ感染苗からの検出

(1)供試菌株

炭疽病菌は前述の 5 菌株中の 3 菌株 (*C. fioriniae* MAFF306282, *C. aenigma* MAFF305913, *C. siamense* MAFF239775), 萎黄病菌は 2 菌株中の 1 菌株 (*F. oxysporum* f.sp. *fragariae* MAFF305557) を用い, 次に示す感染苗の作成に供試した.

(2)病原菌感染苗の作製

径 9cm の黒色ポリポットに育苗したイチゴ苗(品種「とちおとめ」)を供試した.

炭疽病菌は PDA 平板培地上で 28 $^{\circ}$ C, 1 週間前培養後, 伸長した菌糸を新たな PDA 平板培地上で 28 $^{\circ}$ C, 3 週間本培養して分生子を形成させた. 平板培地上に滅菌蒸留水を注ぎ, コンラージ棒で擦って得られた液を滅菌ガーゼでろ過し, 孢子懸濁液を作成した. 滅菌蒸留水で濃度を 1.0 $\times 10^5$ 個/ml に調整した孢子懸濁液をハンドスプレーで地上部全体が濡れる程度に噴霧接種し, 黒色ポリエチレン袋で包み一晩静置した. 萎黄病菌は PD 液体培地で 28 $^{\circ}$ C, 100rpm, 1 週間往復振盪培養して小分生子様菌体を形成させた. 培養液を滅菌ガーゼでろ過し, 菌体懸濁液を作成した. 滅菌蒸留水で濃度を 1.0 $\times 10^5$ 個/ml に調整した菌体懸濁液を 1 ポット当たり 8.3ml 灌注することにより接種を行った. 病原菌接種後のイチゴ苗はガラス温室内にて 3 週間, 底面給水により管理した. 感染苗の作製は 2020 年 1 月 7 日~28 日と 8 月 4 日~25 日の 2

回実施し, 後述の病原菌検出に供試した.

(3)核酸の抽出および PCR 法による検出

病原菌接種株から最外葉葉柄基部および根を採取し, PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent を用いて葉柄基部の一部および根から DNA を抽出した. 残りの葉柄基部は 2ml チューブ中の PD 液体培地 (100mg/L クロラムフェニコール含有) に浸漬し, 28 $^{\circ}$ C, 3 日間培養し増菌処理を行った. その後, 「イチゴ炭疽病・萎黄病・疫病感染苗検査マニュアル」(千葉県農林総合研究センター, 2012) を参考に DNA を抽出した. 培養液中に滅菌ガラスビーズを添加し, ボルテックスミキサーで攪拌した菌懸濁液から PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent を用いて DNA を抽出した.

抽出した DNA を 100 倍に希釈したものを鋳型とし, T1 と ColTub01_R を用いて炭疽病菌を, FofraF と FofraR を用いて萎黄病菌の検出を行った. なお, 炭疽病菌の検出では 1 度 PCR した産物を 20 倍に希釈し, その希釈液を鋳型に再度同条件で PCR を実施した. PCR 産物は 2%アガロースゲルで電気泳動し, Atlas ClearSight DNA Stain を用いて検出した.

(4)エタノール噴霧法による検出

病原接種株から外葉を採取し, エタノール噴霧法(寺本・森, 2017)により病原菌を検出した. エタノール噴霧処理後, 葉に形成された分生子塊や菌糸を掻き取り, 光学顕微鏡を用いた形態観察により簡易的に同定した.

結果

1 病原菌培養菌株からの検出

炭疽病菌検出プライマーの Cg-m_2F と Cg-m_2R を用いた PCR の結果, ジーンバンク分譲菌株の *C. aenigma* と *C. siamense*, 県内産の *Colletotrichum* sp.6 菌株中の 2 菌株で目的増幅産物長のバンドが確認されたが, それ以外の菌株ではバンドが確認されなかった(図 1a). 県内産炭疽病菌の検出を目的に新規に設計したプライマー ColTub01_R と T1 (O'Donnell & Cigelnik, 1997) を用いた PCR の結果, ジーンバンク分譲および県内分離の *Colletotrichum* 属菌株で目的増幅産物長のバンドが確認された(図 1b-1). ま

た，県内イチゴ圃場より分離された *Colletotrichum* 属以外の菌株でバンドは確認されなかった (図 1b-2). よって，以降の炭疽病菌の検出は本プライマーセットを用いて実施した.

萎黄病菌検出プライマーの FofraF と FofraR を用いた PCR の結果，ジーンバンク分譲菌株および県内分離菌株で目的増幅産物長のバンドが確認された (図 1c).

表 1 各プライマーセットにおける PCR 温度条件

Fofra F / R		Cg-m-2 F / R		T1 / ColTub01-R	
94°C	2 min	94°C	5 min	94°C	3 min
94°C	30 sec	94°C	30 sec	94°C	30 sec
55°C	30 sec	72°C	1 min	62°C	30 sec
72°C	30 sec	72°C	2 min	72°C	30 sec
72°C	8 min			72°C	5 min

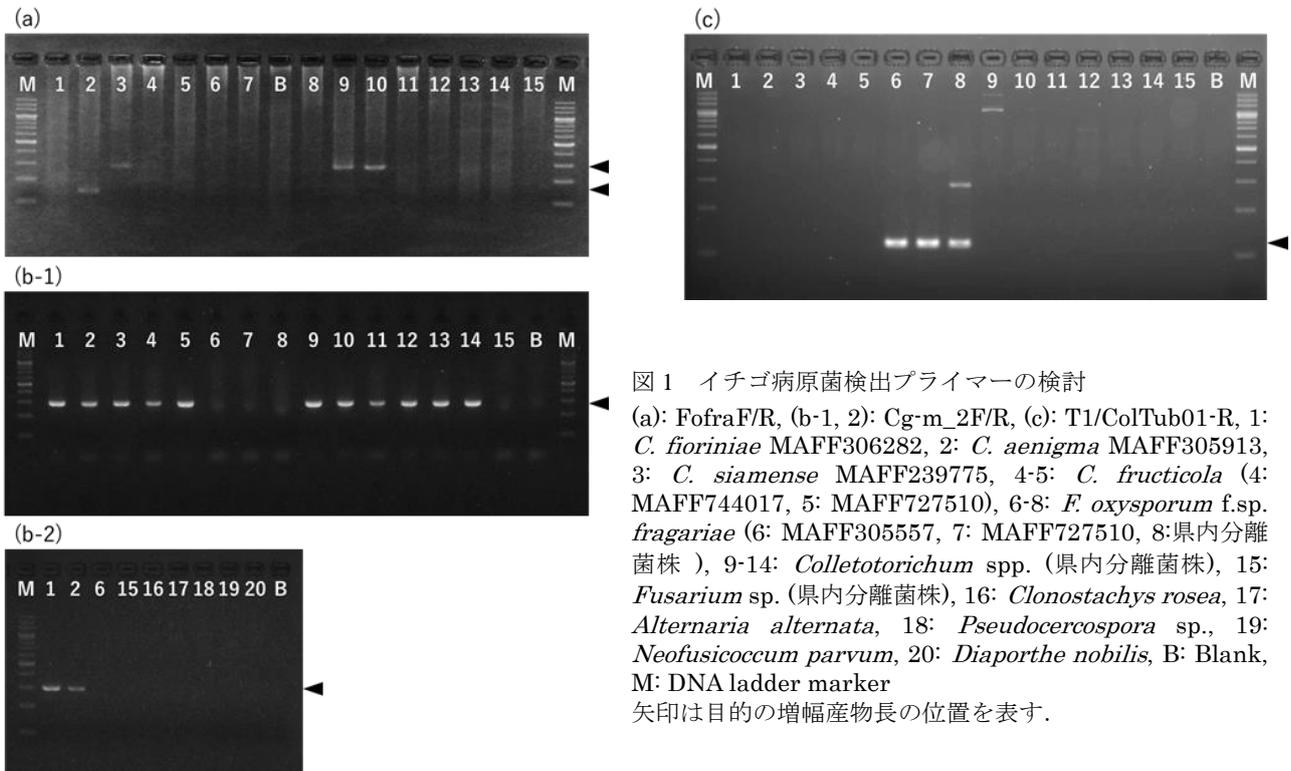


図 1 イチゴ病原菌検出プライマーの検討

(a): FofraF/R, (b-1, 2): Cg-m_2F/R, (c): T1/ColTub01-R, 1: *C. fioriniae* MAFF306282, 2: *C. aenigma* MAFF305913, 3: *C. siamense* MAFF239775, 4-5: *C. fruticola* (4: MAFF744017, 5: MAFF727510), 6-8: *F. oxysporum* f.sp. *fragariae* (6: MAFF305557, 7: MAFF727510, 8: 県内分離菌株), 9-14: *Colletotrichum* spp. (県内分離菌株), 15: *Fusarium* sp. (県内分離菌株), 16: *Clonostachys rosea*, 17: *Alternaria alternata*, 18: *Pseudocercospora* sp., 19: *Neofusicoccum parvum*, 20: *Diaporthe nobilis*, B: Blank, M: DNA ladder marker
矢印は目的の増幅産物長の位置を表す.

2 イチゴ感染苗からの検出

1 月に接種したイチゴ苗を供試した結果，葉柄基部および根から直接抽出した DNA 試料ではバンドが確認されず，葉柄基部を浸漬した培養液から抽出した DNA 試料ではバンドが確認された (図 2). 8 月に接種したイチゴ苗を供試した結果も同様で，培養液から抽出した DNA 試料のみでバンドが検出された (図 3).

葉柄基部を浸漬した培養液から抽出した 6 株の苗サンプルからバンドが確認された数は，1 月の

C. fioriniae 接種区で 2 株，*C. aenigma* 接種区で 5 株，*C. siamense* 接種区で 1 株，*F. oxysporum* f.sp. *fragariae* 接種区で 5 株，8 月の *C. fioriniae* 接種区で 1 株，*C. aenigma* 接種区で 5 株，*C. siamense* 接種区で 1 株，*F. oxysporum* f.sp. *fragariae* 接種区で 3 株であった (表 2).

エタノール噴霧法により病原菌を検出した結果，6 株の苗サンプルから分生子や分生孢子が確認された数は，1 月の *C. fioriniae* 接種区で 2 株，*C. aenigma* 接種区で 2 株，*C. siamense* 接種区で 0 株，

F. oxysporum f.sp. *fragariae*接種区で3株, 8月の *C. fiorinia*接種区で0株, *C. aenigma*接種区で0株,

C. siamense 接種区で1株, *F. oxysporum* f.sp. *fragariae*接種区で3株であった(表2).

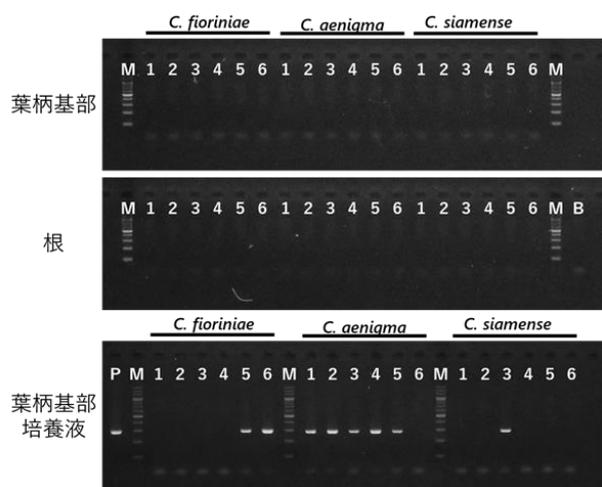


図2 イチゴ病原菌検出におけるDNA抽出の検討(1月)
1~6: 病原菌接種株抽出DNA試料, P: ポジティブコントロール, B: Blank, M: DNA ladder marker

葉柄基部, 根, 培養液はそれぞれDNA抽出に用いた試料を表す。

各菌株接種区における同一の数字は, 同一個体から採取した試料であることを表す。

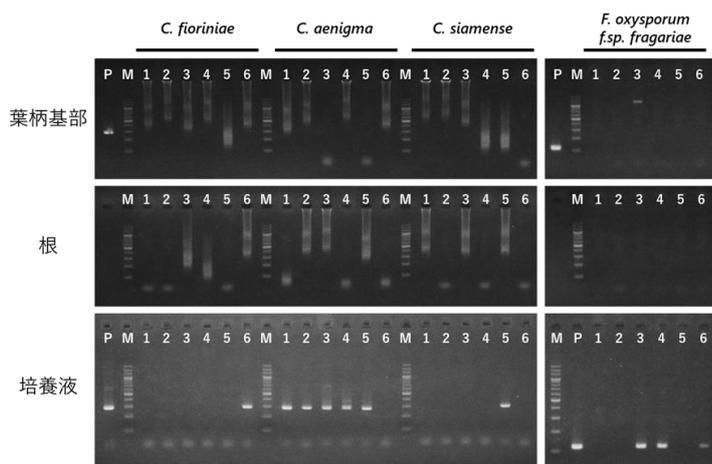


図3 イチゴ病原菌検出におけるDNA抽出の検討(8月)

1~6: 病原菌接種株抽出DNA試料, P: ポジティブコントロール, B: Blank, M: DNA ladder marker

葉柄基部, 根, 培養液はそれぞれDNA抽出に用いた試料を表す。

各菌株接種区における同一の数字は, 同一個体から採取した試料であることを表す。

表2 冬季および夏季の各手法によるイチゴ苗からの炭疽病菌・萎黄病菌の検出数(n=6)

		炭疽病菌			萎黄病菌
		<i>C. fiorinia</i>	<i>C. aenigma</i>	<i>C. siamense</i>	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>fragariae</i>
1月	PCR法	2	5	1	5
	エタノール噴霧法	2	2	0	3
8月	PCR法	1	5	1	3
	エタノール噴霧法	0	0	1	3

考察

イチゴ炭疽病菌について, Cg-m_2FとCg-m_2Rは *C. fructicola*, *C. siamense*, *C. aenigma*を検出, 区別するプライマーセットとして報告されている

(Gan *et al.*,2017). 本プライマーセットを用いたPCRにより, 埼玉県内分離菌株の一部および, ジーンバンク分譲の *C. fiorinia*でバンドが検出されなかった(図1a). Gan *et al.*(2017)では複数の遺伝子領域を用いて種同定を実施しているが, 本試験では

ITS 領域のみで属レベルまでの同定にとどまる。埼玉県内分離菌株でバンドが検出されなかった原因として、当該菌株が本プライマーセットの検出対象でない菌種であることが推察される。なお、ジーンバンク分譲の *C. fructicola* でバンドが検出されなかった明確な理由は判然とせず、炭疽病菌検出プライマーセットとして使用する際にはさらなる検討が必要である。

一方で、T1 と ColTub01_R を用いた PCR により、ジーンバンク分譲および県内分離の *Colletotrichum* 属菌株でバンドが確認され、それ以外の菌株でバンドは確認されなかった (図 1b)。このことから、本プライマーセットは埼玉県内の炭疽病菌株の検出に有用であると考えられる。

イチゴ萎黄病菌について、FofraF と FofraR は *F. oxysporum* f.sp. *fragaiae* を検出、区別するプライマーセットとして報告されている (Suga *et al.*, 2013)。本プライマーセットを用いた PCR により、埼玉県内で分離したイチゴ萎黄病菌株から抽出した DNA 試料において目的の増幅産物が確認された (図 1c)。このことから、本プライマーセットは埼玉県内の萎黄病菌株の検出に有用であると考えられる。

本研究において、葉柄基部および根から直接抽出した DNA 試料からバンドは検出されなかった (図 2, 3)。板宮・吉川 (2016) の報告では本試験と同じ PCR キットを用いた検討において、植物試料に含まれるタンニンが PCR を阻害する要因であると推察している。また、山田ら (1998) はカテキンとプロシアニジン B3 がイチゴ葉における主要ポリフェノールであると報告している。カテキンはタンニンの一種であり、潜在感染株の組織から直接 DNA を抽出する方法では、これらの PCR 阻害物質による影響で検出することが難しくなると考えられる。

また、接種を行った各炭疽病菌それぞれの発病程度を確認した結果、PCR 法で多く検出された *C. aenigma* の発病度は高く、他の 2 菌株の発病度は低かった (データ未記載)。このことから、培養液からの抽出 DNA でもバンドが検出されなかった菌株については、接種によっても感染に至らな

かったか、もしくは、感染後に菌株の死滅・溶菌によって DNA が変性あるいは分解してしまった可能性が考えられる。

本研究において、葉柄基部を用いた PCR 法による検出数はエタノール噴霧法による検出数と同程度かそれ以上であった (表 2)。このことから、炭疽病菌および萎黄病菌の検出において PCR 法は目視による検出法と同程度またはそれ以上の有用性を持つと考えられる。なお、本研究や実際の検査に向けて検討した内容をまとめた種苗センターでの使用を目的とするマニュアルを作成しており、種苗センターの職員およびセンターに導入されている機器による検出が可能であることも確認している。

引用文献

- 千葉県農林総合研究センター(2012): イチゴ炭疽病・萎黄病・疫病感染苗検査マニュアル. 千葉県農林水産部, 千葉.
- Gan P., Nakata N., Suzuki T., Shirasu K. (2017): Markers to differentiate species of anthracnose fungi identify *Colletotrichum fructicola* as the predominant virulent species in strawberry plants in Chiba Prefecture of Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* 83, 14-22.
- 板宮裕美・吉川ひとみ(2016): 植物の法科学的検査に適した PCR キットの比較. *分析化学*. 65, 757-763.
- 農林水産省 (2021): 令和元年生産農業所得統計. http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/nougyou_sansyutu/index.html (2022/2/1 閲覧)
- 尾田秀樹・内田裕也・小林延子 (2018): イチゴ新品種「埼園い 1 号」および「埼園い 3 号」の育成. *埼玉農技研研報*. 17, 7-13.
- O'Donnell K. and Cigelnik E. (1997): Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* 7(1), 103-116.
- 公益社団法人埼玉県農林公社 (2020): 令和 2 年度 事業報告書. p12., 埼玉
- Suga H., Hirayama H., Morishima M., Suzuki T.,

Kageyama K. and Hyakumachi M (2013):
Development of PCR primers to identify *Fusarium*
oxysporum f. sp. *fragariae*. *Plant Dis.* 97, 619-625.
寺本 健・森 三紗 (2017): 長崎県におけるエタノール噴
霧法によるイチゴ炭疽病 (*Colletotrichum*
gloeosporioides) の発生予察法. 九病虫研会報. 63,

8-13.
山田修平・元森美奈雄・中島寿亀・國武久登・森
欣也・中村典義・辻聡宏・田中政信・石丸幹二
(1998): イチゴのポリフェノール成分. 日本食
品化学学会誌. 5, 201-205.