

PCR法によるイチゴ炭疽病潜在感染株の迅速高感度診断技術

イチゴ炭疽病潜在感染株を検出する診断法として、外葉の葉柄基部組織を2日間培養後PCR法により検出する方法は、従来の簡易診断法と比較して、診断期間が14日から3日に、検出割合が2倍以上になり、迅速かつ高感度な診断が可能である。

熊本県農業研究センター農産園芸研究所バイオ育種研究室 (担当者: 野田孝博)

研究のねらい

イチゴの重要病害である萎凋性炭疽病は、感染していても苗の状態では病徴が現れず、定植後に発症し枯死することもあり安定生産において大きな問題となっている。また、現在イチゴの原苗供給施設で実施している簡易診断法では、診断に2週間を要し感度も十分でない。

そこで健苗生産のため、原苗株での保菌の有無を迅速かつ高感度に診断する遺伝子診断法を開発する。

研究の成果

1. PCR法による炭疽病菌の検出は使用するプライマーペアにより、萎凋性炭疽病菌 (*Glomerella cingulata*) と葉枯れ炭疽病菌 (*Colletotrichum acutatum*) とを共通のバンドで、あるいは異なったバンドパターンで検出が可能である (図1)。
2. 外葉の葉柄基部組織をサンプルとして2日間の前培養とPCR法を組み合わせた方法では、従来の簡易診断法と比較して潜在感染株を高確率かつ短時間で診断することが可能である (表1、表2)。

普及上の留意点

1. PCR法における診断の際には、両炭疽病菌を区別する必要があるかないかによって、使用するプライマーが異なるため、使用の際は個別に情報を提供する。
2. 表2ではPCR法の診断コストが約700円であるが、そのうちの500円がDNA抽出キット代である。他の抽出法を検討することでコストをより低く抑えられる。
3. 必要な機器・試薬等は表2の注に記載。

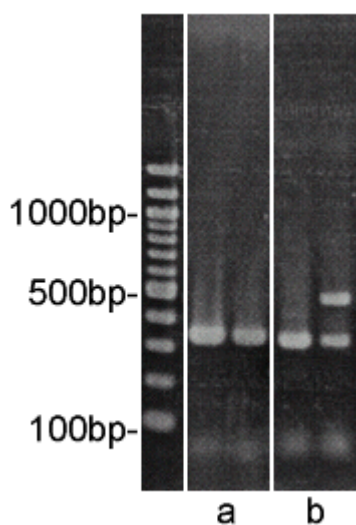


図 1 PCR 法におけるイチゴ炭疽病の検出

- a, 2 種類の炭疽病菌 (レーン左, *Glomerella cingulata*; レーン右 *Colletotrichum acutatum*) を共通のバンドで検出するプライマーを使用
 b, 2 種類の炭疽病菌を異なったバンドで検出するプライマーを使用

表 1 PCR 法と従来診断法の検出割合^a

PCR 法 ^b			簡易診断法 ^c
前培養 (-)		前培養 ^d (+)	葉 ^e
葉 ^e	葉柄基部 ^f	葉柄基部 ^d	
8.0%	37.3%	84.0%	36.0%

^a サンプルはいずれかの診断法で陽性と判断された 75 株, ^b 2 種類の炭疽病菌を共通のバンドで検出するプライマーを使用, ^c 診断株の外葉 1 枚をサンプルとし表面殺菌後ビニール密閉し 30°C で 2 週間後に鮭肉色の胞子の形成にて診断, ^d 診断株の外葉 1 枚の葉柄基部をサンプルとし PS 液体培地 (コロムフェコール 10 μg/ml 添加) にて 48 時間培養後 DNA を抽出, ^e 外葉をサンプルとし表面殺菌後 DNA を抽出, ^f 診断株の外葉 1 枚の葉柄基部をサンプルと表面殺菌後 DNA を抽出.

表 2 PCR 法と従来診断法の比較 (1 サンプル当たり)

項目	PCR 法 ^a	簡易診断法 ^b
期間	3 日	14 日
コスト	約 700 円 ^c	10 円 ^d 以下

^a サーマルサイ클ラー, 電気泳動装置, ゲル撮影装置, オートクレーブ滅菌装置, 簡易クリーンベンチ, ピペット等の備品を要する. ^b インキュベーターを要する. ^c DNA 抽出キット (キアゲン), プライマー, TaqDNA ポリメラーゼ, アガロース等の消耗品. ^d エタノール, ビニール袋等の消耗品.