



あたらしい 農業技術

No. 570

遺伝子診断法を用いたイチゴ健全
苗生産のための病害検査プログラ
ム

平成 24 年度

要 旨

1 技術、情報の内容及び特徴

- (1) イチゴでの重要病害である炭疽病、萎黄病、疫病の検定に遺伝子診断を用いることで、潜在感染株を判別することができます。
- (2) イチゴ炭疽病検定では従来のエタノール浸漬法では検定に2週間以上を要しましたが、PCR検定ではサンプリングから3日で検定することができます。また病原性のない炭疽病菌の感染した苗も従来法では排除、処分していましたが、本法では病原性のある炭疽病菌の感染した苗のみを確認して除去することができます。
- (3) イチゴ萎黄病検定では従来は菌分離後、接種試験をする必要があり、30日以上必要でしたが、PCR検定では炭疽病同様にサンプリングから3日で検定することができます。
- (4) イチゴ疫病検定では、原因菌である2種の疫病菌を同時に根、土壌から検出することができます。

2 技術、情報の適用効果

- (1) 対象3病害について潜在感染株を早期に発見、除去できることで、本圃での発生を減らすことが期待できます。

3 適用範囲

県内イチゴ生産地での育苗ほ場

4 普及上の留意点

- (1) 検定にあたってはサーマルサイクラー、遠心機等の装置が必要です。
- (2) エタノール浸漬法より費用が掛かりますが、複数検体をまとめて検査することで費用軽減が図れます。
- (3) 詳細な検査方法については病害検査用プライマー（疫病を除く）が論文未発表のため、「イチゴ炭疽病・萎黄病・疫病感染苗検査マニュアル(2012)」を参照してください。

目次

はじめに	1
1 イチゴ立枯性病害について	1
(1) イチゴ炭疽病	1
(2) イチゴ萎黄病	1
(3) イチゴ疫病	2
2 イチゴ炭疽病の検定	2
3 イチゴ萎黄病の検定	4
4 イチゴ疫病の検定	5
5 イチゴ苗生産への導入	6
おわりに	6
引用文献	7

はじめに

近年、イチゴ生産現場では炭疽病、萎黄病及び疫病等の、難防除病害の被害が拡大し、イチゴ生産において経済的に大きな打撃を与えています。これらの病害の感染苗は、一定期間は病徴が現れず、感染していても外観で健全苗との区別が困難なため、苗生産現場や圃場に持ち込まれ、病害感染の連鎖・拡大を引き起こします。そのため、苗の流通・増殖の各段階で、苗の病害感染の有無を検査・診断し、病害感染苗の流通・増殖や圃場への植え付けを未然に防ぐシステムが求められています。

このため新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業、課題名「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（H21-23）」により、千葉県農林総合研究センター、岐阜大学、北海道、栃木県、静岡県、奈良県、佐賀県の農業試験研究機関及び株式会社ミヨシとプロジェクトチームを組み、遺伝子増幅法によるイチゴ病害の迅速診断技術の開発に取り組み、PCR法を用いた炭疽病・萎黄病・疫病の診断技術を開発しましたので紹介します。

1 イチゴ立枯性病害について

(1) イチゴ炭疽病

静岡県内のイチゴ生産において最も重要な病害が炭疽病です。*Colletotrichum gloeosporioides*(完全世代 *Glomerella cingulata*)、*C. acutatum* の2種があり、特に前者の *C. gloeosporioides* が問題です。本菌が感染すると葉に黒色斑点を形成したり、地際の茎の部分より感染することで萎凋、枯死させます。特に感染していても発病せずに、定植後などに急に萎凋、枯死してくる潜在感染株が大きな問題となっています。また薬剤による防除も予防剤中心で、発病した場合は周辺株を含めて除去する必要があります。

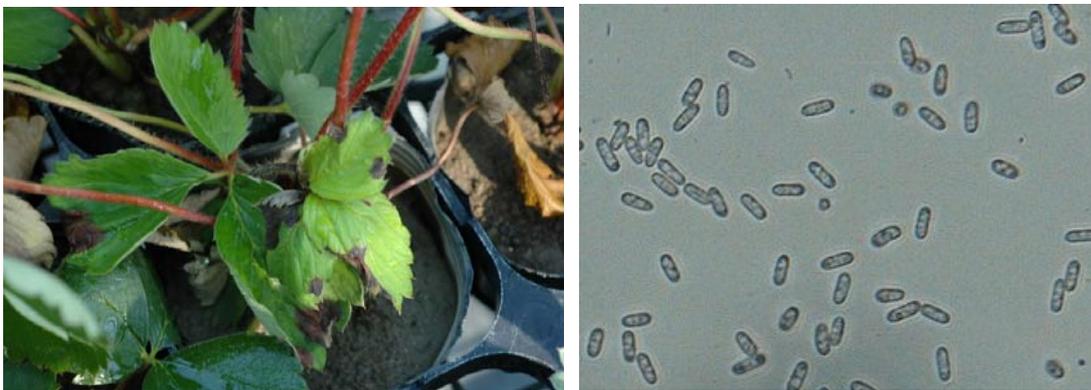


図1 イチゴ炭疽病の病徴（左）と *C. gloeosporioides* の分生子（右）

(2) イチゴ萎黄病

静岡県内では以前は重要な病害でしたが、県内栽培品種であった「章姫」が萎黄病に強かったことから、近年は発生が少なく推移していました。しかし全国的には重要な病害となっています。病原菌は *Fusarium oxysporum f. sp. fragariae* で、本菌が感染すると導管が褐変し、新葉が船形に変形し、最終的には枯死してしまいます。

防除は本圃では発生後の防除は罹病株の除去のみで、作終了後に土壌消毒を実施する必要があります。



図2 イチゴ萎黄病の病徴

(3) イチゴ疫病

静岡県内では萎黄病同様に「章姫」が疫病に強かったことから、近年は発生がほとんど確認されていませんが、品種によっては疫病に弱く、全国的にやはり重要な病害です。病原菌は *Phytophthora nicotianae*、*P. cactorum* 及び *Phytophthora sp.* で主に *P. nicotianae*、*P. cactorum* が原因となります。本菌が感染すると根が褐変すると共に、導管が褐変し、最終的には枯死に至ります。炭疽病と症状が良く似ているため、病徴からは区別ができずに混同している場合も多いです。



図3 イチゴ疫病の根の病徴（左）と導管部の褐変（右）

2 イチゴ炭疽病の検定

炭疽病の1次伝染源は潜在感染株であり、早期の防除にはこれの除去が重要です。これまで Ishikawa(2003)によるエタノール浸漬法による炭疽病潜在感染株の検査が行われています。その中で発病がほとんど認められない圃場からも高い頻度で *C. gloeosporioides* と思われる菌が分離されましたが、この菌株は病原性を示さない事例が多くありました。この菌株の形態を比較してみると、分生子の形状や培地上での菌叢の色・形態に明確な違いは見い出せていません。イチゴにはこのような非病原性菌も潜在感染しており、従来の検査ではこれも処分対象となっていました。

本研究の中では従来法に比べ潜在感染苗を迅速かつ高感度に検出でき(図4)、感染している菌の病原性の有無も判別可能な遺伝子診断(PCR)法によるイチゴ炭疽病の迅速検出技術を開発しました。PCRによる検査の手順は図5のとおりです。

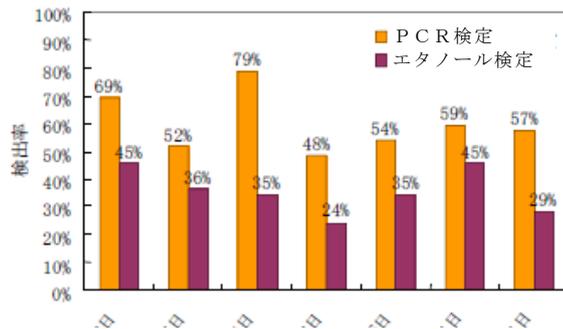


図4 C. gloeosporioides 潜在モデル株検定結果 (千葉県農総試 2009年)

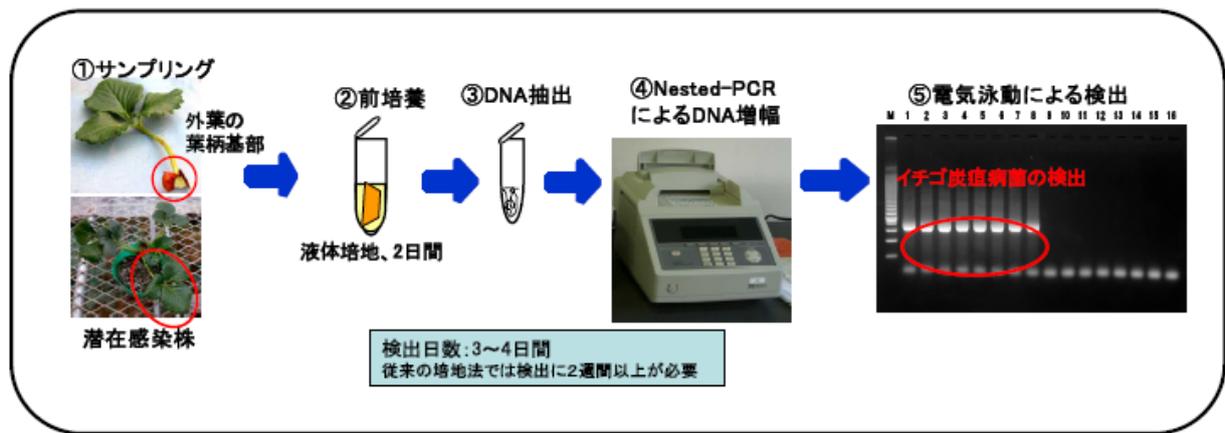


図5 PCR法によるイチゴ炭疽病潜在感染株検査法

本手法の特徴としてエタノール浸漬法では検定に2週間以上を要しましたが、PCR検定ではサンプリングから3日で検定することができます(表1)。

ただ検査コストは従来より高く、1検体当たり178円となってしまいます。しかし、10検体を同時に実施するバルク法により1検体18円までコストを下げることができます(表2)。

平成23年度は原々種、原種ほ、経済連親株圃場、現地苗生産圃場を対象にPCR法による炭疽病検定を実施し、検出株率は0%でしたが、平成22年度発生圃場で継続調査により検出株除去を行った圃場でも、本年度は発病が確認されず本法の有効性が確認されました(表3)。

表1 エタノール浸漬法及びPCR検定に要する時間

エタノール浸漬法		PCR検定	
工程	所要時間(h)	工程	所要時間(h)
前処理	1.5	培養前処理	1.5
培養	336.0	培養	48.0
		DNA抽出	12.0
	1.0	PCR前処理	1.0
	7.0	PCR	7.0
判定	1.0	電気泳動・判定	1.0
計	337.5		70.5

※100検体あたりに換算

表2 PCR検定に要するコスト

試薬	単価	1 サンプル当たり り使用量	1 サンプル当たり りのコスト
DNA 抽出試薬 (PrepMan Ultra Reagent)	15,000 円	1/200 本	75 円
Taq ポリメラーゼ	70,000 円	1/1000 本	70 円
サンプルチューブ	8 円	3 本	24 円
ピペットチップ	3 円	3 本	9 円
合計			178 円

表3 平成 23 年静岡県内育苗圃場でのイチゴ炭疽病潜在感染 PCR 法による診断結果

調査場所	検定株数	陽性判定 株数	陽性株率 (%)	現地圃場での発病 の有無
原々種圃 (所内)	100	0	0	
原種圃 (森町)	85	0	0	—
経済連育苗圃 (森町)	200	0	0	—
掛川市	280	0	0	—
藤枝市	600	0	0	—

3 イチゴ萎黄病の検定

イチゴ萎黄病菌の検出には、フザリウム選択培地による培養法が一般に行われてきました。しかし、この方法はイチゴに病原性を示さない、イチゴ萎黄病菌以外のフザリウム属菌も検出されるため、培養法の後にイチゴの苗に菌を接種して病原性を確認を行う生物検定を実施する必要があり、判定に1か月以上を要していました。そのため、潜在感染した親苗がほ場へ持ち込まれて被害が拡大する事例が多くみられました。

そこで、迅速なイチゴ苗の保菌検定を実現するため、イチゴ萎黄病菌検出用プライマーを用いた PCR 検出技術を開発しました。

萎黄病の検出では図6のようにランナーを用いて、検定作業は炭疽病検査と同様に実施します。まだ安定的に検出ができていませんが先の炭疽病との同時検出も可能です。

また萎黄病は土壌伝染性であるため土壌の検査も重要になりますが、土壌からの DNA 抽出を実施することでこれも可能です。

平成 23 年度に本手法を用いて萎黄病の調査を実施したところ、西部、中遠で本菌が検出されました(表4)。近年、診断依頼も増えており、今後の病害の拡大に注意が必要です。

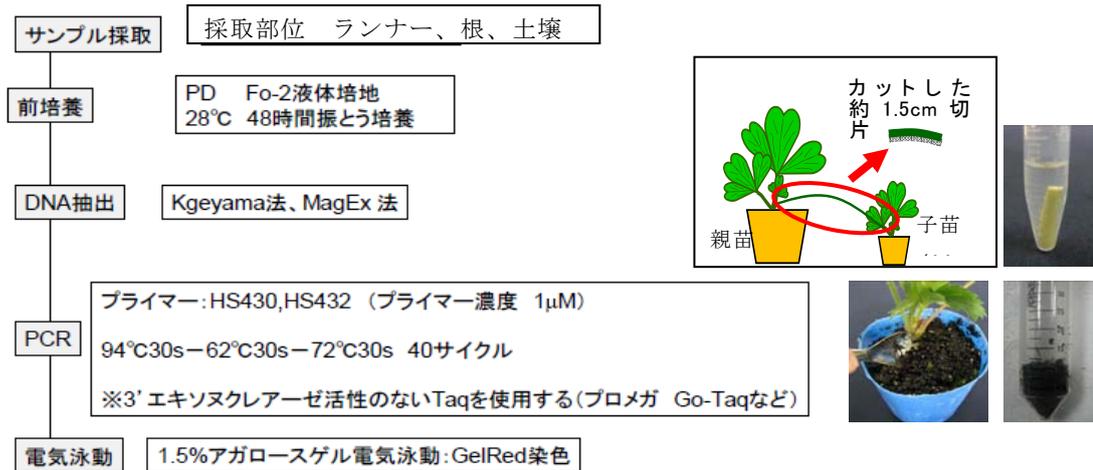


図6 PCR法によるイチゴ萎黄病潜在感染株検査法

表4 静岡県内の目視による萎黄病疑い株から分離した菌株のイチゴ萎黄病検定結果

圃場	採取場所	供試菌株数	PCR陽性菌株数	植物体からの検出	採取株の病徴進展	接種による病原性
A	袋井市	4	2		+	+
B	掛川市	3	1		+	+
C	掛川市	3	1		+	+
D	湖西市	4	2		+	+
E	掛川市	0	0	-	-	
F	掛川市	6	4	+	+	+

4 イチゴ疫病 (*Phytophthora nicotianae*, *Phytophthora cactorum*) の検定

静岡県内では現在のところほとんど問題となっていませんが、イチゴ疫病についても本研究で開発したDNA抽出法を用いることで、イチゴの根及び土壌から *P. nicotianae*、*P. cactorum* 両菌について同時に検出が可能です (図7)。

平成22年に県内20か所の土壌を採取し、菌の検出を実施したところ、疫病菌の検出はありませんでした。ただし、近年発生がみられるピシウム根腐病 (*Pythium helicoides*) も併せて検定したところ1圃場で検出されました (表5)。



図7 PCR法によるイチゴ疫病潜在感染株検査法

表5 イチゴ疫病及びピシウム根腐病の県内各地栽培土壌からの検出（2010年8月採取）

サンプルNo	場所	疫病		ピシウム 根腐病	圃場	栽培形態	土壌の性質	
		<i>P.nicotianae</i>	<i>P.cactrum</i>				土壌群	土性
SZ-1	藤枝市	—	—	—	イチゴ連作	高設ベッド		市販培土
SZ-2	島田市	—	—	—	イチゴ連作	高設ベッド		市販培土
SZ-3	掛川市	—	—	—	イチゴ親株床	高設ベッド		ロックウール細粒綿
SZ-4	掛川市	—	—	—	イチゴ育苗ポット	高設ベッド		市販育苗培土
SZ-5	掛川市	—	—	—	イチゴ連作	土耕	砂丘未熟土	壤質砂土
SZ-6	掛川市	—	—	—	イチゴ連作	土耕	砂丘未熟土	壤質砂土
SZ-7	掛川市	—	—	—	イチゴ連作	土耕	砂丘未熟土	壤質砂土
SZ-8	御前崎市	—	—	—	イチゴ連作	土耕	中粗粒グライ土	壤質砂土
SZ-9	磐田市	—	—	—	イチゴ連作	土耕	褐色低地土	埴土
SZ-10	三島市	—	—	—	イチゴ連作	土耕	褐色低地土	埴土
SZ-11	伊豆の国市	—	—	—	イチゴ連作	土耕	黒泥土	埴壤土
SZ-12	田方郡函南町	—	—	—	イチゴ連作	土耕	多湿黒ボク土	埴壤土
SZ-13	伊豆の国市	—	—	—	イチゴ連作	土耕	黒泥土	埴壤土
SZ-14	田方郡函南町	—	—	+	イチゴ連作	土耕	多湿黒ボク土	埴壤土
SZ-15	静岡市	—	—	—	イチゴ育苗ほ	土耕	褐色低地土	壤質砂土
SZ-16	静岡市	—	—	—	イチゴ育苗ほ	プランター		市販育苗培土
SZ-17	静岡市	—	—	—	イチゴ連作	石垣	褐色低地土	壤質砂土
SZ-18	静岡市	—	—	—	イチゴ連作	土耕	褐色低地土	壤質砂土
SZ-19	静岡市	—	—	—	イチゴ育苗ほ	土耕	褐色低地土	壤質砂土
SZ-20	静岡市	—	—	—	イチゴ親株床	プランター		市販育苗培土

5 イチゴ苗生産への導入

本技術を今後の静岡県内でのイチゴ苗生産に活用していくために、まず研究所内の原原苗について平成24年度より本法を用いた検定を実施したのち、原原苗の配布を行います。

また静岡経済連原種ほ場の原苗の検定については平成24年度は技術講習を兼ねて実施し、その後の検定については検定費用や労力、実施場所等の課題について検討した後に導入を進めていきます。

この検査の導入により、イチゴ苗生産場面での最上流部より無病の苗が供給されることで末端のイチゴ生産者ほ場における苗由来の発病がなくなり、安定したイチゴ生産体制が構築されることが期待されます。

おわりに

イチゴ炭疽病をはじめ、苗伝染性の病害では健全苗の供給が重要です。苗の流通・増殖の各段階で検査が行われて、健全な苗が生産現場へ供給されるシステムの構築に、本研究で開発した遺伝子診断技術が役立つことができれば幸いです。

本成果は新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業（H21～23）「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」によるものです。詳細な検査法については事業の



図8 イチゴ健全種苗検査マニュアル

中で作成した「イチゴ炭疽病・萎黄病・疫病感染苗検査マニュアル」(図8)を参照してください。

参考文献

- 1) 海老原克介ら (2006) 育苗圃におけるイチゴ炭疽病の潜在感染率の推移と発病との関係. 日植病報 73(1), 41.
- 2) Freeman, S., Katan, T. (1997). Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. *Phytopathology* 87:516-521.
- 3) 平山喜彦ら (2008) .病原菌特異的プライマーを用いた PCR による潜在感染株からのイチゴ炭疽病菌の検出. 日植病報 74(3), 198.
- 4) Ishikawa, S. (2003). Method to diagnose latent infection by *Glomerella cingulata* in strawberry plants using ethanol. *J. Gen. Plant Pathol.* 69: 372-377.
- 5) Kageyama, K et al. (2003). Refined PCR protocol for detection of plant pathogens in soil. *J. Gen. Plant Pathol.* 69:153-160.
- 6) 鐘ヶ江良彦ら (2011) .イチゴ疫病潜在感染検定技術確立のためのイチゴ疫病菌 (*Phytophthora nicotianae*) 高頻度検出部位の解明. 関東東山病害虫研究会報 58 : 113.
- 7) Li, M. et al. (2011). A multiplex PCR for the detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. cactorum*, and a survey of their occurrence in strawberry production areas of Japan. *Plant Disease* 95:1270-1278.
- 8) Nisimura, N (2007). Selective media for *Fusarium oxysporum*. *J. Gen. Plant Pathol.* 73:342-348.
- 9) 岡山健夫 (1994) .イチゴ炭そ病の病原菌, 発生生態および発病制御に関する研究. 奈良農試研報特別報告 1-128.
- 10) 須賀晴久ら (2011) .イチゴ萎黄病菌の特異的検出が可能な PCR 用プライマー. 日植病報 77:62.
- 11) 鈴木 健ら (2008) イチゴ炭疽病菌に対する特異的プライマーの作成. 日植病報 74(3), 198.

農林技術研究所 植物保護科 上席研究員 鈴木幹彦
科長 影山智津子
研究員 土田祐太
上席研究員 伏見典晃 (現交通基盤部農地局農地利用課)

発行年月：平成25年3月
編集発行：静岡県経済産業部振興局研究調整課

〒420-8601
静岡市葵区追手町9番6号
TEL 054-221-2676

この情報は下記のホームページからご覧になれます。
<http://www.pref.shizuoka.jp/sangyou/sa-130a/>