

## リアルタイムPCR法を活用したイチゴ炭疽病菌潜在感染株の迅速検出法

宮城県農業・園芸総合研究所

### 1 取り上げた理由

イチゴ炭疽病の感染源の多くはイチゴ苗の潜在感染株であり、防除のためには潜在感染株の早期除去が重要である。これまでに、エタノール浸漬法（SDEI）や PCR 法によりイチゴ炭疽病菌の感染株の検出が行われてきたが、リアルタイム PCR 解析により従来法と比較して迅速かつ高感度に潜在感染株の検出ができたので、参考資料とする。

### 2 参考資料

- 1) 本法は、イチゴ炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* (完全世代:*Glomerella cingulata*) を表 1 に記したプライマーを用いることで、特異的に検出することが可能である。
- 2) 葉柄基部から抽出した DNA を基にリアルタイム PCR 解析を行い、得られた Ct 値（PCR 増幅産物がある一定量に達した時のサイクル数）から図 2 に示した検量線を用いて、炭疽病菌感染の有無を判定することが可能である（図 1, 図 2, 表 2, 表 3）。
- 3) 本法における菌体 DNA の検出限界は 50fg であり、PCR 法による検出限界は 1pg であったことから PCR 法と比較して約 20 倍高く検出が可能である（図 2 A, 表 3）。また、本法は、検査に用いる植物体 0.1g 当たり炭疽病菌分生子濃度  $2 \times 10^2$  個まで検出が可能である（図 2 B, 表 3）。
- 4) SDEI 法は所要時間約 2 週間、鈴木ら（2012）「イチゴ炭疽病・萎黄病・疫病感染苗検査マニュアル」によって報告のある手法は 3～4 日で結果が得られるのに対し、本法は同等の検出感度でゲノム DNA の抽出から解析まで最短 1 日での検査が可能である（表 3）。

表 1 本手法に用いたプライマー配列

プライマー名	配列 5' -3'
MG_Cg1o_pF	CAGGGTCTCCGCGACCCTAC
MG_Cg1o_pR	ACTTATCGCATTTTCGCTGCG

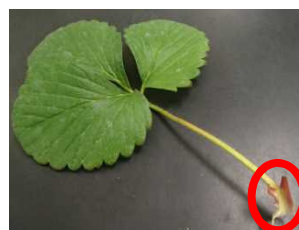


図 1 サンプルング部位  
検出の際に用いる葉柄基部

### 3 利活用の留意点

- 1) 本法は、クラウン部及び葉柄基部に感染した潜在感染株の検出方法であり、分生子飛散等による感染株での検出では検出率が低下する可能性がある。
- 2) 炭疽病菌潜在感染株は、クラウン及び葉柄基部から感染し植物体内に感染していると考えられるため、検定には葉柄基部を用いる。採取した葉を水洗いし、泥や汚れを取り除き、70%エタノールで約 30 秒表面殺菌した後、滅菌水で洗浄し、風乾した葉から葉柄基部を約 0.1g サンプルングする。
- 3) リアルタイム PCR 解析を行うため、カラムを利用した DNA 抽出を推奨する。その他 DNA 抽出キットや CTAB 法を用いる場合や褐変症状の多いサンプルから抽出を行う際は、必要に応じて精製キット等を用い、ゲノム DNA の精製を行う。

4) SDEI 法, 本法ともに病原性・非病原性菌株を検出する可能性があり, それらの識別には, 鈴木ら (2012) による感染苗の検査法が有効である。

5) 検査にかかる費用は, SDEI と比較して高額で, 1 検体当たりの消耗品は DNA 抽出の際に DNeasy Plant Mini Kit (TaKaRa) を使用した場合, 約 540 円 (単価 27000 円/50 検体), PrepMan Ultra Regent (Life Technologies) を利用した場合, サンプル精製キットを合わせて約 238 円 (DNA 抽出キット: 単価 15000 円/200 検体, サンプル精製キット (Fast Gene DNA extraction kit を用いた場合): 単価 12000 円/100 検体, 他, チップ, 酵素代等) 程度の検査コストとなる。

(問い合わせ先: 宮城県農業・園芸総合研究所 バイオテクノロジー開発部 電話 022-383-8131)

#### 4 背景となった主要な試験研究

##### 1) 研究課題名及び研究期間

病害虫の定量的遺伝子診断技術の開発と防除への応用 (平成 25~26 年度)

遺伝子診断を活用した土壌病害対策支援技術の開発 (平成 27~27 年度)

##### 2) 参考データ

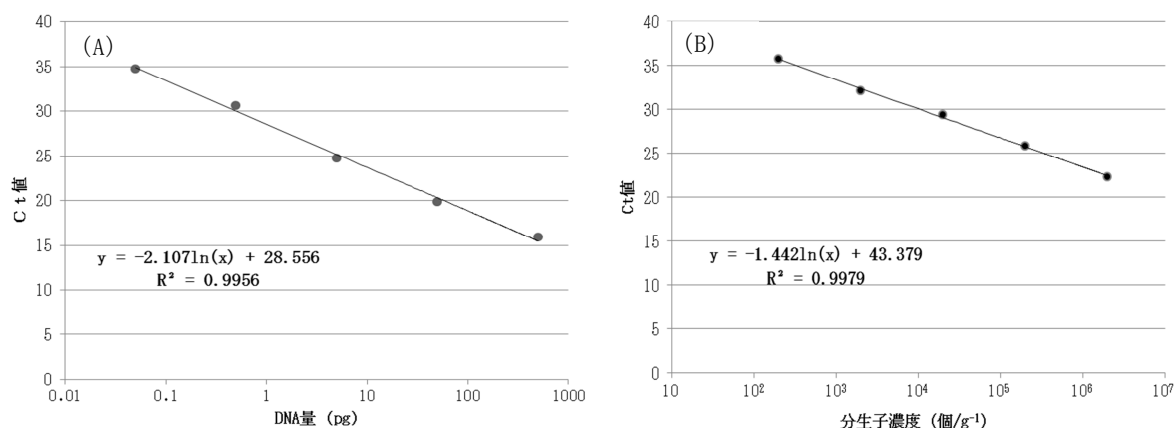


図 2 リアルタイム PCR 解析による検出結果 (Ct 値) と菌体 DNA との相関性

リアルタイム PCR によって得られた Ct 値と炭疽病菌 (A) DNA 段階希釈系列,

(B) 分生子濃度段階希釈系列における検量線

\*Ct 値: PCR 増幅産物がある一定量に達した時のサイクル数

表 2 炭疽病斑形成株におけるリアルタイムPCR解析

サンプリング 年度	品種	株番号	病徴	リアルタイムPCRによる 診断結果/Ct値*1	DNA量 (pg/g <sup>-1</sup> )*2	
平成27年	とちおとめ	1	+	+ / 14.6 ± 0.09	748.9 ± 31.3	
		もういっこ	1	+	+ / 26.9 ± 0.02	2.3 ± 0.02
		2	+	+ / 26.6 ± 0.04	2.5 ± 0.05	
	とちおとめ	3	+	+ / 26.9 ± 0.01	2.2 ± 0.01	
		1	+	+ / 26.1 ± 0.05	3.2 ± 0.08	
		1	-	- / N. D.*3	-	
		2	-	- / N. D.	-	
平成26年	とちおとめ	1	+	+ / 29.1 ± 0.03	0.8 ± 0.01	
		2	+	+ / 28.8 ± 0.04	0.9 ± 0.02	

\*1 Ct値: PCR増幅産物がある一定量に達した時のサイクル数

\*2 サンプリング葉0.1gに対する炭疽病菌DNA量

\*3 N. D. : 検出限界以下

表3 炭疽病菌人工接種株における潜在感染株の検出比較

株番号	病徴 <sup>*1</sup>	PCR <sup>*2</sup>	前培養 +nested PCR <sup>*3</sup>	SDEI	リアルタイムPCR 解析結果/Ct値 <sup>*4</sup>	DNA量 (fg/g <sup>-1</sup> ) <sup>*5</sup>
1	—	—	+	+	+ / 32.8±0.3	136.0±2.0
2	—	—	+	+	+ / 32.0±0.1	193.2±4.1
3	—	—	+	+	+ / 33.5±0.5	96.6±2.2
4	—	—	+	+	+ / 34.6±0.3	56.8±0.7
5	—	—	+	+	+ / 34.4±0.7	63.9±0.2
6	—	—	+	+	+ / 36.0±0.7	29.5±0.1
7	—	—	+	+	+ / 34.3±0.6	64.9±0.1
8	—	—	+	+	+ / 33.4±0.1	98.5±0.2
無接種	—	—	—	—	— / N. D. <sup>*6</sup>	—

\*1 サンプルング時における病徴の有無

\*2 Mills ら (1996) によるプライマーを用いた検定

\*3 鈴木ら (2012) による検定方法

\*4 Ct値：PCR増幅産物がある一定量に達した時のサイクル数

\*5 サンプルング葉0.1gに対する炭疽病菌DNA量

\*6 N. D.： 検出限界以下

### 3) 発表論文等

#### a 関連する普及に移す技術

イチゴ炭疽病の防除 (第60号参考資料)

#### b その他

大坂正明・瀬尾直美・大場淳司・辻英明 (2015), リアルタイム PCR 法を用いたイチゴ炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* の検出, 日植病報第82巻 (講要), p40-41

### 4) 共同研究機関

なし

