

# PCRによる *Phytophthora nicotianae* と *Ph. cactorum* のイチゴ主要生産地および圃場内分布調査

岐阜大学流域圏科学研究センター <sup>かげやま</sup>景山 <sup>こうじ</sup>幸二・<sup>り</sup>李 <sup>みんしゅ</sup>明珠

## はじめに

イチゴ栽培では炭疽病、萎黄病、疫病が難防除病害として大きな被害をもたらしている。疫病はそれほど多くの報告はないが、主要な病害である炭疽病との病徴が類似していることから、混同され潜在的に発病していることが危惧される。この問題は防除において重要である。防除薬剤は炭疽病と疫病では全く異なり、薬剤防除での効果が低い原因が病害診断の困難さに起因している可能性が考えられるからである。また、イチゴ栽培では高設栽培など養液栽培が行われるようになってきており、水媒伝染もする疫病的被害の増大が予想される。

病害防除の確立においては、病原菌の伝染経路など生態に関する情報は重要項目の一つである。しかし、疫病菌は分離・同定が困難であり、環境サンプル中の定量はほとんど不可能である。そこで、近年多くの病原菌の検出に応用されているPCR法をイチゴ疫病菌に適用し、主要イチゴ生産地における分布および発病圃場内の菌の分布を調査した結果を紹介する。

## I 病原菌

イチゴ疫病菌は、これまで根冠部の褐変、病徴進展による地上部萎凋を引き起こす *Phytophthora nicotianae*, *Ph. cactorum* および未同定の *Phytophthora* sp., 根腐れを引き起こす *Ph. fragariae* が報告されている。最近、未同定の *Phytophthora* sp. のうち北海道で分離された菌株(白井ら, 2006)は新種であることが明らかにされ、*Ph. fragariaefolia* として登録された (RAHMAN et al., 2014)。ここでは、主要な疫病菌である *Ph. nicotianae* および *Ph. cactorum* について検出方法を開発し、分布を調査した結果を紹介する。

## II 検出法の開発

PCRによる病原菌検出法の開発では、二つの要素が

Distribution Survey of *Phytophthora nicotianae* and *Ph. cactorum* Causing Strawberry Crown Rot in Strawberry Main Production Area and Greenhouse Using PCR. By Koji KAGEYAMA and Mingzou LI

(キーワード: 疫病菌, *Phytophthora* 属菌, イチゴ, 分布, PCR 検出)

ある。一つは、土壌など環境サンプルからのDNA抽出技術である。PCRには純度の高いDNAが必要であるが、土壌などの環境サンプルにはPCRを強く抑制する物質が含まれており、一般のDNA抽出では除去することが困難である。特に、我が国で多く分布している酸性火山灰土(黒ぼく土)ではPCR抑制物質として腐植酸などが多く含まれており、抽出後これら抑制物質を抽出DNAから取り除く純化が必須である。図-1に示す方法により高収量で高純度なDNAを抽出することが可能である (Li et al., 2001)。

本抽出法の特徴は、①ガラスビーズを添加した抽出液でサンプルを強く振とうすることにより物理的にサンプルを破碎して菌が土壌団粒内や有機残渣中であってもDNAが抽出されやすくすること、②抽出液にスキムミルクを添加することでPCR阻害物質の除去を行うこと、③DNA抽出後、TOYOBO社製植物用核酸抽出キットのDNA純化ステップを用いてDNAを純化することである。さらに、PCR時には反応液に牛血清アルブミンを添加してPCR阻害効果を抑制する。本法により、疫病菌のみならず、*Pythium* 属菌、アブラナ科野菜根こぶ病菌、半身萎凋病菌なども検出可能である。

主要なイチゴ生産地における分布調査では *Ph. nicotianae* と *Ph. cactorum* を一つの反応で両種を検出し、さらにDNA抽出が有効であるかどうかを検定できるマルチプレックスPCR法を開発した (Li et al., 2011)。種特異的プライマーは、*Ph. nicotianae* については一般的に標的として使われているrDNA ITS領域、*Ph. cactorum* についてはrDNA ITS領域では特異性の高いプライマーが設計できなかったため、最近種特異的プライマーの設計で注目されているras-related protein gene *Ypt1* から設計した。また、DNA抽出の有効性を検定するためのプライマーとしてこれまでにユニバーサルプライマーとしてrDNA 18S遺伝子に設計されていたプライマーを利用した。これら3組のプライマーを一つの反応液に添加し、プライマーおよび塩化マグネシウム濃度やPCR反応温度条件などを調整した。検出限界は、*Ph. nicotianae* と *Ph. cactorum*, それぞれ100 fgと1 pgと高感度であった。両種間での感度の違いは、*Ph. nicotianae* のプライマーはゲノム当たり数十コピーあるとされるrDNA ITS領域