

4. キウイフルーツかいよう病菌 Psa3 系統の検出方法 (迅速・多量検定法)

本法は、現地で確認された新葉の病斑（4 から 6 月頃）を対象として、県の研究機関や防除指導機関等におけるかいよう病菌（Psa）の迅速・多量診断に適した方法である。なお、精密な診断を目的とした場合には、葉から全 DNA 抽出することが望ましい。

反復は供試した病斑が、Psa 以外の原因による可能性があるため複数の採取断片（2014 年の実施例では 1 試料当たり 4 から 8 断片使用した。必要に応じ供試断片を追加して診断を行うことが望ましい）を用いる。

- 1 先端径が約 5mm になるよう切断したピペットチップを用いて（試料採取に針タイプのペーパーパンチャーを使用することも可能）、診断に供する新葉の病斑部分を打ち抜き断片を採取する。ピペットチップの継続使用は行わない。
- 2 採取した断片を 30 μ l の滅菌水を添加した 200 μ l の PCR チューブに入れ、滅菌水に浸漬する。
- 3 断片が入った PCR チューブを軽くボルテックス（10 から 20 秒程度）する。抽出液が着色するほど激しくボルテックスすると植物由来の PCR 阻害物質が多量し DNA 断片の増幅が困難となる場合がある。
- 4 PCR 阻害物質の PCR への影響を低下させるため、滅菌水で抽出液を 10 から 100 倍に希釈する。
- 5 4 で希釈した抽出液についてサーマルサイクラーを使用して 95℃で 10 分間処理、急冷する。
- 6 5 の抽出液および表のプライマー等を用いて、PCR で共通プライマーによる Psa 診断および Psa3 系統の特定を行う。PCR はマルチプレックス法での実施（「PsaF1・PsaR2」および「P0(hopA)-F1・P3(hopA)-R2」の組み合わせ）も可能ではあるが、供試試料によっては電気泳動時に明瞭なバンドが得られない場合もある。
- 7 アガーローズ電気泳動を行い判定する。
- 8 4 の希釈液を普通寒天培地(NA 平板) 等に画線して培養する。
- 9 8 を 3 日間程度培養した後 Psa 様コロニーの有無を確認するとともに、コロニーダイレクト PCR により Psa であるか確認する。新鮮な新葉試料であれば Psa のコロニーが優先的に分離される。なお、⑧および⑨の行程は、あくまで再確認のため行うものであり、判定までに数日を要するため必要に応じ行うものとする。

表 4 Psa 系統特異的および共通検出用プライマーの塩基配列

Psa 系統等	プライマー名	プライマー配列 (5'→3')	サイズ (bp)	参考
共通	PsaF1	TTTTGCTTTGCACACCCGATTTT	280	Rees-George <i>et al.</i> (2010)
	PsaR2	CACGCACCCTTCAATCAGGATG		
Psa3	P0(hopA)-F1	GCAGAGGCGATGCAAAACCCG	186	Psa3系統を幅広く検出できるプライマー 清水ら(2015)
	P3(hopA)-R2	ACGCGACAACCTACCTTGAAAAACG		
Psa3	China・F	GGAGTTCCAGCAACTGACG	609	Psa3系統の中国、NZタイプを検出できるプライマー Balestra <i>et al.</i> (2013)
	China・R	CGCTCAAGATCCTTTTCCAT		
Psa3	Europe・F	TGGTGATCGTCTGGATGTGT	733	Psa3系統のヨーロッパタイプを検出できるプライマー Balestra <i>et al.</i> (2013)
	Europe・R	ATTATGCTCCTGGCTCATGG		

〈反応液組成〉		〈反応条件〉	
AmpliTaq Gold® 360 Master Mix	6.0 μ l	95°C	10分
プライマー混合液※	1.0 μ l		
滅菌水	3.8 μ l	95°C	30秒
全DNA液	1.2 μ l	60°C	30秒
計	12.0 μ l	72°C	45秒
※各供試プライマーとも最終濃度が0.3 μ M にとなるように添加		72°C	7分

35
サイクル

図 9 PCR の条件 (参考例)

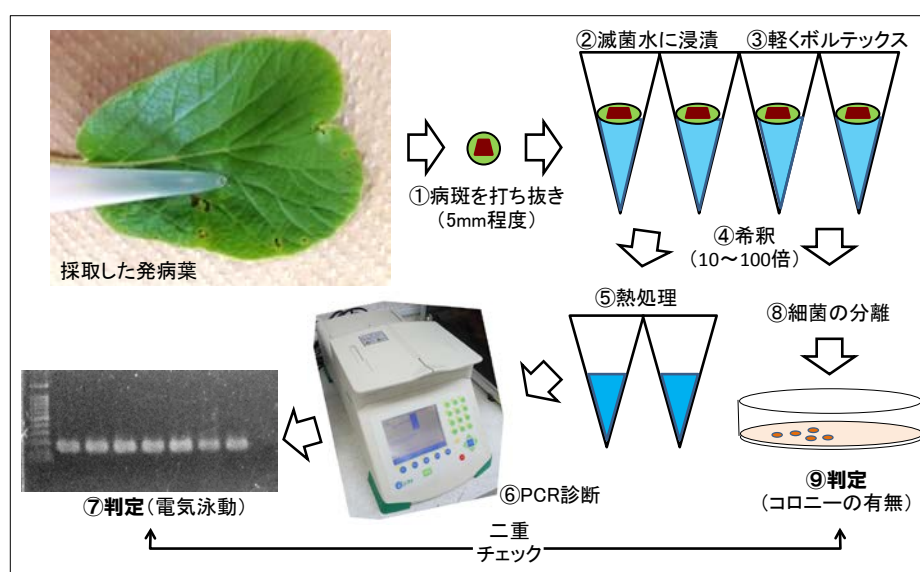


図 10 PCR によるかいよう病の迅速・多量診断のフローチャート

5. かいよう病のまん延防止のための啓発資料

未発病地域における予防的対策を主体とした暫定的なまん延防止技術等に関するパンフレットおよびリーフレットを次のとおり作成したので、指導等の参考にされたい。

- パンフレット

- キウイフルーツかいよう病緊急対策……………啓発資料 1

- リーフレット

- 果樹園管理ガイド……………啓発資料 2

- 病徴ガイド……………啓発資料 3

キウイフルーツ

かいよう病緊急対策

全国の産地で強病原性のかいよう病が発生しています。被害が大きく、広がる速度が速く、防除が難しい病気です。

新梢の枯死



枝枯れ

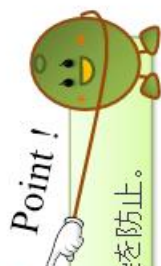


葉の斑点



疑わしい症状を見つけたら、連絡を！

発病前からの予防が重要



園地の衛生管理

器具や人への病原菌の付着による伝染を防止。



- ◆園地に入りの際は、手と足を落とした靴底を消毒。
- ◆ハサミやのこぎりは園地ごとに用意し、樹ごとに消毒。
- ◆園地外に出るときには、体や収穫かごなどに付いた植物残渣を除去。
- ◆発生園で作業したときは、そのままの服装で他の園には行かない。
- ◆園地に看板を設置し、関係者以外の立ち入りを禁止。

・手は70%エタノールで消毒。手袋を使用している場合は、園地ごとに交換。
・靴底や管理器具は200ppm(有効成分5%で250倍)以上の次亜塩素酸ナトリウムあるいは70%エタノールで消毒。

症状等が無い清浄な苗木・穂木・花粉等の使用
購入先や購入日、量を必ず記帳。

薬剤防除（予防）
低温を好む病原菌のため、秋～春の防除が重要。*

* 詳しくは最寄の指導機関(普及指導センター・JA等)にお尋ねください。

発病等に関する問い合わせは最寄の指導機関に



かいよう病とは？

- ◆ かいよう病は、樹が枯れることもある非常に被害が大きな病気です。
- ◆ 従来から発生していましたが、近年、海外から侵入してきたと思われる新系統が発生しています。
- ◆ この病気は、人畜等への影響はありません。（果実を食べても問題ありません）

大切なほ場を守るために

早期発見が重要

- ◆ 春（発芽期～開花後、最も発病が激しい）
枝幹からの樹液の流出・葉の斑点・新梢や枝の枯死等
- ◆ 夏 新梢や枝の枯死
- ◆ 秋 葉の斑点・枝の枯死
- ◆ 冬 枝幹からの樹液の流出



下のような写真のような症状を見つけたら、最寄の関係機関に連絡してください。

キウイフルーツかいよう病の発生生態と病徴



キウイフルーツかいよう病緊急対策 果樹園管理ガイド 地域の発病を防ぐためには皆様の協力が必要です。未発生園でも予防的に行ってください。  平成26年度農食事業(キウイフルーツかいよう病)研究プロジェクトチーム編	 かいよう病発生園では、看板を設置し、関係者以外の立ち入りを禁止する。
 園地に出入の際には、手を消毒液(70%エタノール)で消毒する。	 果樹園から出る前に、体に付いた植物残さや泥を落とす。
 園地に出入りの際には靴底を、消毒液(200ppm以上(5%で250倍)の次亜塩素酸ナトリウム等)で消毒する。	 発生園で作業した場合、そのままの服装で他の園には行かない。(発生園での作業は最後に)
 ハサミやノコギリ等の管理器具は、園地ごとに専用のもを用意し、樹ごとに消毒液で消毒する。	 収穫かごに植物残さを持ち込まない。使用後は清潔に保つ。

キウイフルーツかいよう病緊急対策

病徴ガイド

このような病徴を見つけたら、関係機関に連絡を。



ガクの褐変



ハローを伴った斑点と葉裏の樹液流出痕(Hort16A)



新梢枯れと樹液の流出(Hort16A)



ハローが無い斑点(ヘイワード)



枝枯れ(レインボーレット)



従来のかいよう病菌による、ハローが大きな斑点(ヘイワード)



白色の樹液の流出と暗赤色の痕

6. 参考文献

- Balestra, G.M., Mazzaglia, A., Quattrucci, A., Renzi, M., and Rossetti, A. (2009). Current status of bacterial canker spread on kiwifruit in Italy. *Aust. Plant Dis. Notes* 4:34–36.
- Chapman, J.R., Taylor, R.K., Weir, B.S., Romberg, M.K., Vanneste, J.L., Luck, J., and Alexander, B.J.R. (2012). Phylogenetic relationships among global populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Phytopathology* 102:1034-1044.
- Everett, K.R., Taylor, R.K., Romberg, M.K., Rees-George, J., Fullerton, R.A., Vanneste, J.L. and Manning, M.A. (2011) First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing kiwifruit bacterial canker in New Zealand. *Aust. Plant Dis. Notes* 6, 67-71.
- Kiwifruit Vine Health(2014) Kiwifruit Vine Health Psa Statistics Report 12 December 2014. <http://www.kvh.org.nz/statistics> (参照 2014 年 12 月 27 日).
- McCann H.C., Rikkerink E.H.A., Bertels F., Fiers M., Lu A., *et al.* (2013) Genomic Analysis of the Kiwifruit Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Provides Insight into the Origins of an Emergent Plant Disease. *PLoS Pathog* 9: e1003503.
- 三好孝典・清水伸一・澤田宏之 (2012) ファゼオロトキシシン産生能を失ったキウイフルーツかいよう病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)の愛媛県における出現と分布. *日植病報* 78:92-103.
- 三好孝典・清水伸一・篠崎 毅・澤田宏之 (2014) キウイフルーツかいよう病菌に対する‘ヘイワード’および‘Hort16A’の感受性比較. 平成 26 年度日本植物病理学会大会講演要旨集 p162.
- Sawada, H., Suzuki, F., Matsuda, I. and Saitou, N. (1999). Phylogenetic analysis of *Pseudomonas syringae* pathovars suggests the horizontal gene transfer of *argK* and the evolutionary stability of *hrp* gene cluster. *J. Mol. Evol.* 49: 627-644.
- 澤田宏之・三好孝典・井手洋一 (2014a) *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* の新規 MLSA グループ (Psa5 系統) によって *Actinidia chinensis* に発生したかいよう病. *日植病報* 80:171-184.
- 澤田宏之・三好孝典・清水伸一・中畝良二・藤川貴史 (2014b) キウイフルーツかいよう病菌の多様性. *植物防疫* 68:660-667.
- Scortichini, M., Marcelletti, S., Ferrante, P., Petriccione, M., and Firrao, G. (2012) *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: A re-emerging, multi-faceted, pandemic pathogen. *Mol. Plant Pathol.* 13: 631-640.
- 芹澤拙夫・市川 健 (1993a) キウイフルーツかいよう病の発生生態 2. 新梢における主要感染時期と発病環境 *日植病報* 59:460-468.
- 芹澤拙夫・市川 健 (1993b) キウイフルーツかいよう病の発生生態 4. 新梢における発病適温. *日植病報* 59:494-701.
- 篠崎 毅・清水伸一 (2014) 愛媛県におけるキウイフルーツかいよう病発生の現状と今後の課題. *植物防疫* 68:255-258.
- Tamura, K., Imamura, M., Yoneyama, K., Kohno, Y., Takikawa, Y., Yamaguchi, I. and Takahashi, H. (2002). Role of phaseolotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in the formation of halo lesions of kiwifruit canker disease. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 60: 207-214.
- 牛山欣司(1993) キウイフルーツかいよう病の生態と防除に関する研究. *神奈川園試研報* 43 : 1～76.