



図 26 褐色斑点症状(葉裏)※1
(イタリア、平成 26 年 10 月下旬)

(注意) イタリアでは、ほ場調査においてPsa1及びPsa3系統を区別していない。図22～26に示した病徴は、Psaによる症状の可能性のあるものとして説明を受けたものである。



図 27 褐色斑点症状
Hort16A(佐賀県、平成 26 年 7 月下旬)



図 28 褐色斑点症状
Hort16A(佐賀県、平成 26 年 7 月下旬)



図 29 褐色斑点症状(Psa1)※2
Hort16A(愛媛県、平成 26 年 11 月上旬)

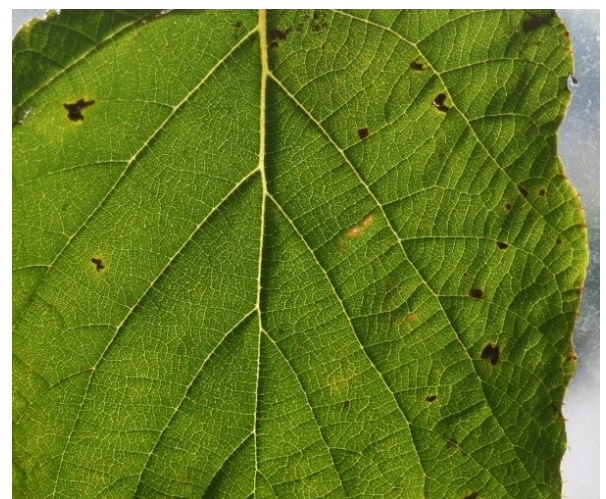


図 30 褐色斑点症状(Psa1)※2
ヘイワード(愛媛県、平成 26 年 11 月上旬)



図 31 炭疽病による褐色斑点症状
ヘイワード(福岡県、平成 26 年 8 月)



図 32 炭疽病による褐色斑点症状※2
ヘイワード(平成 26 年 10 月)



図 33 炭疽病あるいは角斑病による褐色斑点症状
ヘイワード(福岡県、平成 26 年 8 月)



図 34 水分ストレスによる症状※2
(イタリア、平成 26 年 10 月下旬)



図 35 老化による褐色斑点症状※1
(イタリア、平成 26 年 10 月下旬)

(2) 枝幹部の症状

① 枝の枯れ込み

枝が黒く変色して枯れ込む症状が観察される(図36～40)。ただし、枝折れにより枯れる場合もあるため、枝の基部等を観察して、枝折れの有無を調べることも必要である。



図 36 新梢の枯れ込み※1



図 37 枝の枯れ込み※3

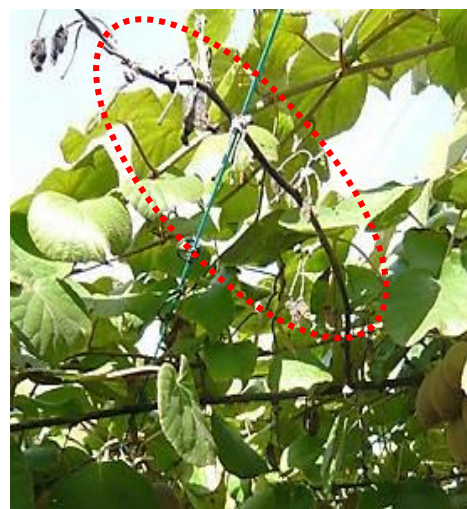


図 38 枝の枯れ込み※2



図 39 枝の枯れ込み※2



図 40 新梢の枯れ込み※4

②樹液の漏出

ア 10～12月頃は、前年の冬季から春季にかけて樹液の漏出があった場合、漏出痕が残っていることがあるので、注意深く確認する(図41～43)。

イ 12月以降の冬季では、罹病樹の枝、主幹、収穫後の果柄先端等から病原細菌を含む白色や暗赤色の樹液が漏出することがあるため、樹液漏出の有無を注意して観察する(図47～54、参考:図45、46:夏に見られる症状)。

樹液の漏出あるいは漏出痕を見逃さず、必要に応じて表皮を剥いで確認する(図44、枝の樹皮下の赤色化はPsaの典型的な病徴)。

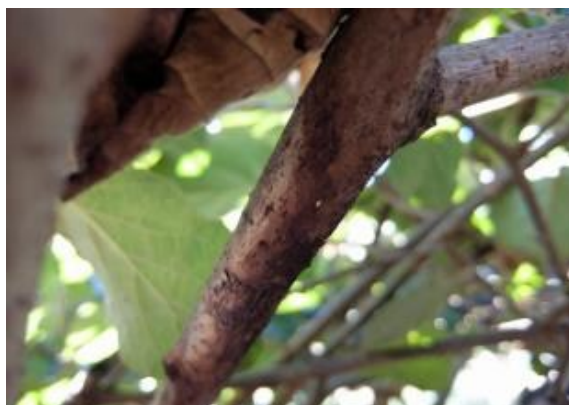


図 41 暗赤色の樹液の漏出痕※1
(イタリア、平成 26 年 10 月下旬)



図 42 暗赤色の樹液の漏出痕※1
(イタリア、平成 26 年 10 月下旬)



図 43 暗赤色の樹液の漏出痕※4
(イタリア、秋季)



図 44 樹皮下の赤色化※4
(イタリア、秋季)



図 45 暗赤色の樹液の漏出
Hort16A(佐賀県、平成 26 年7月下旬)



図 46 暗赤色の樹液の漏出
Hort16A(佐賀県、平成 26 年7月下旬)



図 47 収穫後の果柄先端からの樹液漏出※6



図 48 白色の樹液の漏出※5



図 49 剪定切り口からの樹液の漏出※5



図 50 落葉痕からの樹液漏出※4

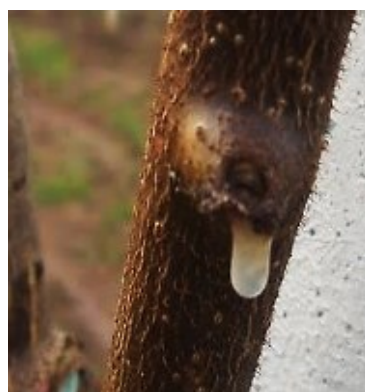


図 51 樹液漏出※4



図 52 樹液漏出※4



図 53 剪定痕からの樹液漏出
(表面が乾いて膜状となっているが、
内部には粘性のある液が含まれる)
(平成 27 年2月)



図 54 落葉痕からの樹液漏出※1
(品種・紅妃)
(平成 27 年3月)

(3) その他

葉や枝にPsaによる病徴が現れていない場合でも、果実がしぼむ(しなびる)ことがあるため、収穫前から注意して観察する(図55、56)。



図 55 果実のしぼみ※6



図 56 果実のしぼみ※3

※1 中畝 良二氏 原図

※2 篠崎 毅氏 原図

※3 KVVH; Kiwifruit Vine Health(ニュージーランド)より許可を得て転載

<http://www.kvh.org.nz/>

※4 Marco Scortichini氏 原図

※5 芹澤 拙夫氏 原図

※6 Giorgio.M.Balestra氏 原図

キウイフルーツかいよう病菌 Psa3 系統の検出方法 (1)

(葉及び枝からの生菌分離を行う検定法)

本法は、現地で確認された病徴のある葉及び枝を対象として、確実にキウイフルーツかいよう病菌 (Psa) を分離し、ほ場に Psa が存在することを証明する必要がある場合や分離株を得る必要がある場合に適した方法である。

1 診断

- (1) 園地で別紙 2 及び 3 の病徴写真のような症状があるか否かを確認。
- (2) 症状を確認した場合、「2 擬似症状の採取法」で試料を採取し、以下の方法で細菌泥の漏出を確認する。
 - ア 症状のある葉及び枝から、症状部と健全部の境界部分を中心に 3 ~ 4 mm 四方の小片を切り取る。
 - イ スライドガラス上に切り取った試料を置き、パスツールピペットで 1 滴の水 (50 μ l ~ 100 μ l 程度) を垂らし、カバーグラスを乗せる。なお、カバーグラスは軽く乗せ、試料を潰してはならない。
- (3) 生物顕微鏡下 (100 ~ 400 倍) で観察し、カミソリによる切断部分から細菌泥の漏出を確認する (写真 1)。細菌泥の漏出が観察された場合には、キウイフルーツかいよう病を想定し、次のステップに進む。

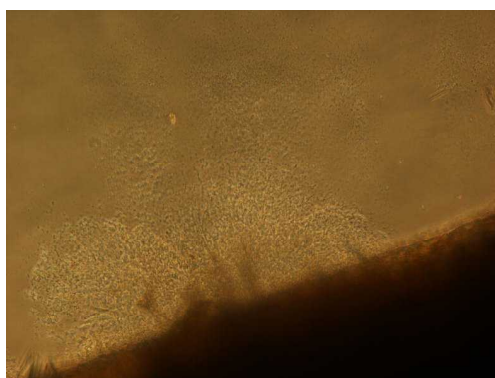


写真 1

2 擬似症状の採取法

- (1) 試料採取に当たっては、症状部を中心に健全部分を含めて広い範囲で採取する。試料採取に使用した剪定鋏等の器具類は、その都度、200ppm 以上の濃度の次亜塩素酸ナトリウム水溶液又は 70 % エタノールを用いて消毒する。
- (2) 試料を採取した植物にその旨を標示する。標示は脱落したり、不鮮明になら

ないように十分に配慮する。

- (3) 試料を採取した植物の位置が分かる見取り図を作成する。
- (4) 採取した試料は、ビニール袋に入れ、散逸しないよう厳重に梱包し、輸送するまでクーラーボックス等によりできる限り低温（0～10℃とする。ただし、かいよう病菌の死滅を避けるため、凍結させてはならない。）で保管する。
- (5) 採取した試料に、個別に試料番号を付し、試料の確認に必要な事項（採取月日、採取場所、採取者名及び試料の詳細）を記録した試料採取票を添付する。
- (6) 採取した試料の送付には、冷蔵指定（4℃）の郵便又は宅配便を利用する。
分離した菌株を送付するときは、斜面培地（普通寒天培地（NA））に移植・培養し、冷蔵指定（4℃）で送付する。

3 分離

- (1) 細菌泥の漏出が観察された症状部を5 mm 四方程度の小片として切り取り、滅菌水で2回程度洗浄する。
- (2) 洗浄した試料は滅菌スライドガラス上に置き、滅菌水(100 µl 程度)を滴下し、滅菌したカミソリで細かく切り刻む。
- (3) ガラス製ホモジナイザーを用いる場合は、試料を滅菌水 200 µl とともに磨碎する。
- (4) 上記で調製した懸濁液を普通寒天培地(NA 平板)に白金耳を用いて画線分離する。
- (5) シャーレを裏返し、27℃の定温器で3日間培養する。
- (6) 培養2日目以降に出現する0.5 mm 以下の均一な集落で、培養3日目以降に白色、円形、中高で周縁が全縁～波状、わずかに粘性で湿光を帯びた1 mm 程度の集落になったものについて、4 (2) のコロニー PCR による同定を実施する。

4 同定

使用するプライマーセットについては「表1 プライマーセット」から、以下の目的に合わせて選択する。

- ・ かいよう病菌であるかどうかの検定が必要な場合は、日本で発生が確認されている全系統を検出するプライマーセット（PSA F / PSA R 又は PsaF1 / PsaR2）を用いる。
- ・ かいよう病菌と同定された場合には、日本で発生が確認されている系統の Psa3 を検出するプライマーセット（China-F / China-R 又は hopH1-F / hopH1-R）を用いる。

表 1 プライマーセット

Psa系統等	プライマー名	プライマー配列	サイズ	参考情報
共通	PSA F PSA R	CAGAGGCGCTAACGAGGAAA CGAGCATACATCAACAGGTCA	311	Psa共通プライマーセット：日本で発生が確認されているPsa全系統を検出
共通	PsaF1 PsaR2	TTTTGCTTTGCACACCCGATTTT CACGCACCGTTCAATCAGGATG	280	Psa共通プライマーセット：日本で発生が確認されているPsa全系統を検出
Psa3	China-F China-R	GGAGTTCAGCAACTGACG CGCTCAAGATCCTTTTCCAT	609	Psa3（China群）用プライマーセット：Psa3系統のうち、NZ、中国及び日本で発生が確認されている分離株を検出
Psa3	hopH1-F hopH1-R	CGTCTCGATATCCAGGCATC TTCAGCTCGGATGGAGTTCT	605	Psa3用プライマーセット：日本で発生が確認されているPsa3系統の全分離株を検出

※プライマー根拠文献：

Balestra et al. (2013) Plant Disease 97: 472-478 (PSA F / PSA R、China-F / China-R)

Ferrante and Scortichini (2011) Journal of Plant Pathology 93: 659-666
(hopH1-F / hopH1-R)

Rees-George et al (2010) Plant Pathology 59 : 453-464 (PsaF1 / PsaR2)

澤田ら（2015）日本植物病理学会報 81: 111-126

（１）釣菌

ア 3（６）の集落のうち、検定に供試するものにマジックで丸を付ける（写真２）。

イ 丸を付けた集落は、斜面培地に釣菌培養しておく。



写真 2

(2) PCR

ア (1) イにおいて釣菌した集落の残り（丸を付けた集落）は、クリーンベンチ内で、滅菌した爪楊枝を用いて軽く突き（写真3）、事前に作成したPCR反応液に懸濁する（写真4）。

イ PCR反応液の組成は、以下のとおり。反応液の量は25 μ lとする。

1 $\times$ PCRbuffer、0.2 mM each dNTP, 0.2 μ M each primer,

0.5 U Taq DNA polymerase (TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version)

ウ PCR反応条件は、以下のとおり。

反応条件 (PSA F/PSA R, China-F/ChinaR)				反応条件 (PsaF1/PsaR2, hopH1-F/hopH1-R)			
95°C	5分			95°C	5分		
95°C	30秒	30サイクル		95°C	30秒	30サイクル	
60°C	30秒			64°C	30秒		
72°C	60秒			72°C	60秒		
72°C	5分			72°C	5分		
4°C	Hold			4°C	Hold		

エ 2%アガロースゲルで電気泳動を行い判定する。陽性コントロールと同じ位置に明瞭なバンドが認められた場合は、陽性とする。全ての系統を検出するプライマーセットでは311 bp (PSA F / PSA R) 又は280 bp (PsaF1 / PsaR2) のサイズのDNA断片が増幅される。Psa3を検出するプライマーセットでは609 bp (China-F / China-R) 又は605 bp (hopH1-F / hopH1-R) のサイズのDNA断片が増幅される。

オ 陽性コントロールが必要な場合には、横浜植物防疫所調査研究部病菌担当に相談する。



写真3



写真4

5 その他参考

(1) NA 平板培地 :

Nutrient broth(Difco) 8g, 寒天 15g ~ 18g、蒸留水 1000 ml、 pH6.8 ~ 7.2
(通常はこの範囲に入る。)、121 °C 15 分高圧滅菌後、クリーンベンチ内で
シャーレに分注して固める。

(2) NA 斜面培地 :

- ・ ビーカー内で各試薬を溶かす。その際、ラップ等でふたをして、湯煎を行い、全体的に透明になるまで完全に溶かす。
- ・ 分注器で試験管に分注する（直径 18 mm の試験管 1 本につき約 8 ml）。
- ・ 分注終了後シリコ栓で栓をし、121 °C 15 分高圧滅菌し、枕木に寝かせて固める。

キウイフルーツかいよう病菌 Psa3 系統の検出方法（２）

（多量検体を迅速に診断できる検定法）

本法は、現地で確認された新葉の病斑（４～６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。

供試した病斑が Psa 以外の原因による可能性もあるため、複数の採取断片を用いて反復をとる（2014 年の実施例では、１試料当たり 4～8 断片を使用した。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。）。

- 1 先端径が約 5 mm になるよう切断したピペットチップを用いて、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（10～20 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 阻害物質が多量に抽出され、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 倍（抽出液が着色しているときは、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 $^{\circ}$ C で 10 分間処理し、急冷する（これを全 DNA 液とする。）。
- 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 診断及び 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」及び「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 アガロース電気泳動を行い、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について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及び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、必要に応じて行うものとする。

表 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℃	10分
プライマー混合液※	1.0 μ l		
滅菌水	3.8 μ l	95℃	30秒
全DNA液	1.2 μ l	60℃	30秒
計	12.0 μ l	72℃	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℃	7分

35
サイクル

図1 PCR の条件