

5.0 μm のメンブレンフィルターをピンセットで取り外し、廃棄する。新たにポアサイズ 0.45 μm のメンブレンフィルターに付け替える。

(6) セットしたろ過装置上部に (4) で採取したろ液に入れ、アスピレーターで吸引ろ過する。この工程によってメンブレンフィルター上に細菌が捕捉される。

(7) (6) の細菌を捕捉したメンブレンフィルターを、滅菌水 1 ml を入れた 50 ml チューブに移す。ろ過時の上面が 50 ml チューブの内側を向くように入れる。

(8) 50 ml チューブをボルテックスミキサーで約 1 分間攪拌し、メンブレンフィルター上の細菌を滅菌水中に懸濁する (写真 3)。

(9) 懸濁液を 1.5 ml チューブに移し、遠心分離 (9,000 $\times g$ 、5 分間、室温) を行う。

(10) 遠心分離後、上清を約 100 μl 残して除去する。このとき、チューブ底面付近の沈殿物を吸わないように注意する。

(11) ボルテックスミキサーで沈殿物を懸濁し、25 μl を新しいチューブに移し、95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分間熱処理した後、氷中で急冷し、PCR の鋳型とする。残りの懸濁液は冷凍保管する。

(12) PCR は「3 花粉懸濁液からの PCR」で行う。

表 1 のプライマーセットを使用する。

まず、Psa 系統全てを検出するプライマーセット (PsaF1 / PsaR2) を用いて PCR を行い、反応が陰性であった場合は、当該花粉はキウイフルーツかいよう病に感染していないものと判断する。なお、花粉懸濁液からの PCR においては、プライマーセット (PSA F / PSA R) の使用は、感度が低いため推奨しない。

同じ鋳型で、Psa3 を検出するプライマーセット (hopH1-F / hopH1-R 及び hopZ5-F2 / hopZ5-R2) を用いて PCR を実施し、Psa3 系統であるかを確認する。

全ての PCR が陽性の場合は、必要に応じて「4 生菌分離」へ進む。

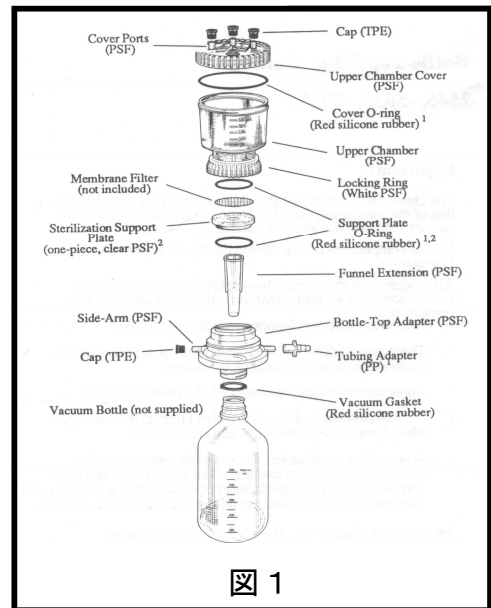


図 1



写真 3

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。花粉懸濁液からのPCRには不向き
共通	PsaF1 PsaR2	TTTTGCTTTGCACACCGATTTT CAGGCACCGTTCAATCAGGATG	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。花粉懸濁液からのPCRにて推奨
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
Psa3	hopZ5-F2 hopZ5-R2	CAGGAATTCATGACTTCTCA TAGTCTCGAAGATTCATGG	630	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)

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 (hopZ5-F2 / hopZ5-R2)

3 花粉懸濁液からの PCR

(1) PCR 反応液の組成は、以下のとおり。最終反応液量は 25 μ l とする。

1 $\times$ Ampdirect® Plus (島津製作所)、0.2 μ M each primer、
0.5U Taq DNA polymerase (Takara EX Taq Hot start Version)、
鋳型 2 μ l

(2) PCR 反応条件は、以下のとおり。

反応条件 (PsaF1/PsaR2, hopH1-F/hopH1-R)			反応条件 (hopZ5-F2/hopZ5-R2)		
95°C	5分	40サイクル	95°C	5分	40サイクル
95°C	30秒		95°C	30秒	
64°C	30秒		60°C	30秒	
72°C	60秒		72°C	60秒	
72°C	5分	Hold	72°C	5分	Hold
4°C	Hold		4°C	Hold	

(3) 2%アガロースで電気泳動を行い、判定する。陽性対照と同じ位置に明瞭なバンドが認めた場合は、陽性とする。全ての Psa 系統を検出するプライマーセットでは 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 605 bp (hopH1-F / hopH1-R) 又は 630 bp (hopZ5-F2 / hopZ5-R2) のサイズの DNA 断片が増幅される。

4 生菌分離

(1) 事前に以下のものを用意する。

- KBC 平板培地 (19 枚) ○ NA 平板培地
- 滅菌水 (30 ml、50 ml 三角フラスコで作製) ○ 2.0 ml チューブ
- 滅菌爪楊枝 ○ コンラージュ棒

(2) 花粉を 2.0 ml チューブに 5 ～ 10 mg 量り取り、1 ml の生理食塩水を加え、振とう機で 150 rpm で 60 分間振とうする。

(3) (2) の花粉懸濁液 (懸濁原液) 100 μ l を滅菌水 900 μ l に加えて希釈する。しっかりと混和させる。

(4) 懸濁原液及び希釈液 100 μ l を KBC 平板培地に塗布する (各 9 又は 10 枚)。27 $^{\circ}$ C の定温器で 4 日間培養を行う。

(5) 培養 2 日までに出現したコロニーは、目的外の細菌であることから以後の試験の対象から除外する。

(6) 培養 3 日目以降に出現する 0.5 mm 以下のコロニーで、培養 4 日目以降に、

- ① やや青白色で半透明がかっている
- ② 不規則形～円形
- ③ 周縁が全縁～波状
- ④ わずかに粘性で湿光を帯び、直径が 1 mm 程度

になったコロニーを、以下の方法で、滅菌爪楊枝を用いて釣菌を行う。

(7) (6) で出現したコロニーに裏側からマジックで印を付け、番号を振る (写真 4)。キウイフルーツかいよう病菌と思われるコロニーにはすべて印を付ける。

(8) NA 平板培地の裏面にマジックで格子を書き、(7) と同じ番号を振る (1 マスに 1 コロニーの釣菌を行う)。(写真 6 参照)

(9) (7) で番号を振ったコロニーに滅菌爪楊枝 (チップでも可) で軽く触れ、NA 平板培地の同じ番号の 1 マス内に軽く突く (写真 5)。

(10) 27 $^{\circ}$ C で 2 日間培養する (写真 6)。黄色のコロニーは除外し、白色のコロニーを全て選抜する。



写真 4



写真 5

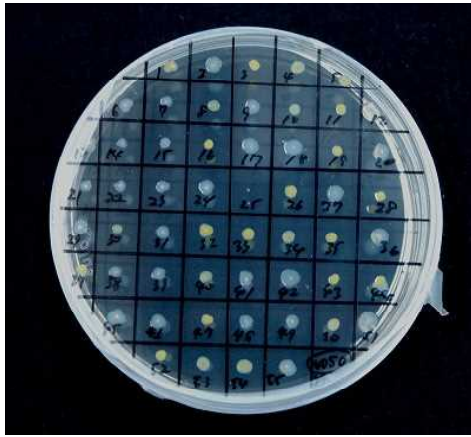


写真 6

(11) PCR

ア 選抜したコロニーは、滅菌爪楊枝で軽く突き、事前に作製した PCR 反応液に懸濁する。

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 $\times$ PCR buffer、0.2 mM each dNTP、0.2 μ M each primer、0.5 U Taq DNA polymerase (TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version)、(参考情報の (12) または (13) を実施した場合は鋳型 2 μ l)

ウ PCR 反応条件

PCR 反応条件は、以下のとおり

反応条件 (PSA F/PSA R, hopZ5-F2/hopZ5-R2)			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 605 bp (hopH1-F / hopH1-R) 又は 630 bp (hopZ5-F2 / hopZ5-R2) のサイズの DNA 断片が増幅される。

[効率的に検定するために次の方法も実施可能]

(12) 対象コロニーが多数の場合、1 試料に複数コロニーをまとめる方法 (バルク法) が可能。500 μ l の滅菌水に複数のコロニーを 1 コロニーずつ軽く突いて懸濁する方法で 20 コロニー分を PCR の鋳型 1 試料とする。なお、陽性となった場

合は、改めて1コロニー分ずつPCRを実施する。

- (13) 対象コロニーがさらに多数の場合、分離培地上の対象コロニーを移植する(8)のNA平板培地を2組作成し、そのうち1組の培地表面に1 mlの滅菌水を加え、全てのコロニーを懸濁しながらかきとり、PCRの鋳型とする方法が可能。なお、陽性となった場合は、改めて1コロニー分ずつPCRを実施する。

<参考>

1. KBC 平板

Mohan, SK and Schaad, NW, 1987. *Phytopathology* 77: 1390-1395.

(http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1987Articles/Phyto77n10_1390.PDF)

2. NA 平板培地

Nutrient broth (Difco) 8g, 寒天 18g、蒸留水 1000 ml、pH6.8 ~ 7.2、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。

3. 生理食塩水 (0.85 % NaCl)

400 ml の蒸留水に 4.25g を溶かし、500 ml にメスアップし、オートクレーブ (121 °C 15 分)

4. 滅菌爪楊枝

100 ml ビーカーに入れアルミホイルでふたをして 121 °C 15 分高圧滅菌後、乾燥機で乾燥 (ない場合は 10 µl 用の滅菌済チップ等で代用可能)

5. リューザブルボトルトップフィルター

Nalgene DS0320-2545 (容量 250 ml、適合口径 45 mm)

<http://www.thermosci.jp/lab-products/plasticware/product.php?id=207>

6. ガラス繊維フィルター

ADVANTEC GA-100 (47 mm 径)

7. メンブレンフィルター

Merck Millipore SMWP04700 (ポアサイズ 5.0 µm、47 径)

Merck Millipore HAWP04700 (ポアサイズ 0.45 µm、47 径)

キウイフルーツかいよう病に対する農薬施用

1 収穫後から発芽前まで（11 月中旬頃～2 月頃）

（1）防除の観点

冬季には落葉痕や、剪定時の切り口を介して感染リスクが高まるため、銅剤では剪定前後の散布により、その他の剤では剪定後の散布により主枝や枝幹部への感染の防止を図る。抗生物質の樹幹注入により菌密度の上昇を抑制する。

（2）使用できる薬剤

- ① 銅水和剤 コサイド 3000
2000 倍散布（収穫後～果実肥大期）
本剤の使用回数「ー」
- ② 銅水和剤 IC ボルドー 66D
25 ～ 50 倍散布（収穫後～発芽前）
本剤の使用回数「ー」
- ③ 銅・ストレプトマイシン水和剤（銅ストマイ水和剤）
600 ～ 800 倍散布（休眠期～蕾出現前）
本剤の使用回数「4 回以内」
- ④ カスガマイシン・銅水和剤（カスミンボルドー等）
500 倍散布（休眠期）
本剤の使用回数「4 回以内」
- ⑤ ストレプトマイシン水和剤（アグレプト水和剤等）
1000 倍散布（収穫 90 日前まで）
本剤の使用回数「4 回以内」
- ⑥ ストレプトマイシン液剤（アグレプト液剤）
1000 倍樹幹注入（収穫後～落葉前まで）
本剤の使用回数「1 回」
- ⑦ カスガマイシン液剤（カスミン液剤）
400 倍散布（収穫 90 日前まで）、200 倍樹幹注入（収穫後～落葉前まで）
本剤の使用回数「4 回以内（樹幹注入は 1 回）」
- ⑧ オキシテトラサイクリン・ストレプトマイシン水和剤（アグリマイシンー 100）
1000 倍散布（落花期まで）
本剤の使用回数「3 回以内」

（3）留意点

- ・抗生物質を樹幹注入に使用する場合、樹体内へ十分浸透させるために、収穫後早い時点で施用することが望ましい。

2 病原菌が増殖しやすい発芽期から開花期まで（3月頃～5月頃）

（1）防除の観点

春先までは銅剤を主体として感染を徹底予防する。4月以降に葉や新梢、花蕾で症状が見られる場合は、抗生物質等の散布による防除及び感染拡大の防止を図る。

（2）使用できる薬剤

- ① 銅水和剤（コサイド 3000）
2000 倍散布（収穫後～果実肥大期）
本剤の使用回数「ー」
- ② カスガマイシン・銅水和剤（カスミンボルドー等）
1000 倍散布（発芽後叢生期（新梢長約 10cm）まで）
本剤の使用回数「4 回以内」
- ③ 銅・ストレプトマイシン水和剤（銅ストマイ水和剤）
600 ～ 800 倍散布（休眠期～蕾出現前）
本剤の使用回数「4 回以内」
- ④ ストレプトマイシン水和剤（アグレプト水和剤等）
1000 倍散布（収穫 90 日前まで）
本剤の使用回数「4 回以内」
- ⑤ カスガマイシン液剤（カスミン液剤）
400 倍散布（収穫 90 日前まで）
本剤の使用回数「4 回以内」
- ⑥ オキシテトラサイクリン・ストレプトマイシン水和剤（アグリマイシンー 100）
1000 倍散布（落花期まで）
本剤の使用回数「3 回以内」

（3）留意点

発芽期以降の銅水和剤散布については、薬害軽減のために炭酸カルシウム水和剤を 200 倍となるよう混用すること。

3 雨が多く気温が低い時の開花期後から果実肥大期（5月下旬～9月末頃）

（1）防除の観点

樹体内での菌密度が低下する時期である。まん延リスクも低くなるが、気象条件によっては追加的に抗生物質や銅剤を散布してまん延を防止する。

（2）使用できる薬剤

- ① ストレプトマイシン水和剤（アグレプト水和剤等）
1000 倍散布（収穫 90 日前まで）
本剤の使用回数「4 回以内」
- ② カスガマイシン液剤（カスミン液剤）
400 倍散布（収穫 90 日前まで）

本剤の使用回数「4回以内」

- ③ 銅水和剤 コサイド 3000
2000 倍散布（収穫後～果実肥大期）
本剤の使用回数「－」

（3）留意点

抗生物質の使用時期は収穫 90 日前までである。

4 剪定整枝時及び発病枝切除後

（1）防除の観点

発病枝切除による切り口等からの病原菌の漏出や飛散を防止するとともに、剪定整枝時の切り口及び傷口からの病原菌の感染を防止する。

（2）使用できる薬剤

トップジンMペースト（チオファネートメチル剤）
原液塗布
本剤の使用回数「3回以内」

※農薬の登録内容は、平成30年1月11日時点のもの

※有効成分ごとの総使用回数は、銅「－（制限なし）」、カスガマイシン「4回以内（樹幹注入は1回以内）」、ストレプトマイシン「4回以内（樹幹注入は1回以内）」、オキシテトラサイクリン「3回以内」であるので、1作期で各総使用回数以内での施用となるよう、注意すること。

※植物病原細菌では、ストレプトマイシン等への抵抗性が発達する可能性があるため、同一系統の薬剤の連用は避けること。

キウイフルーツかいよう病に適用のある農薬一覧

平成30年1月11日現在

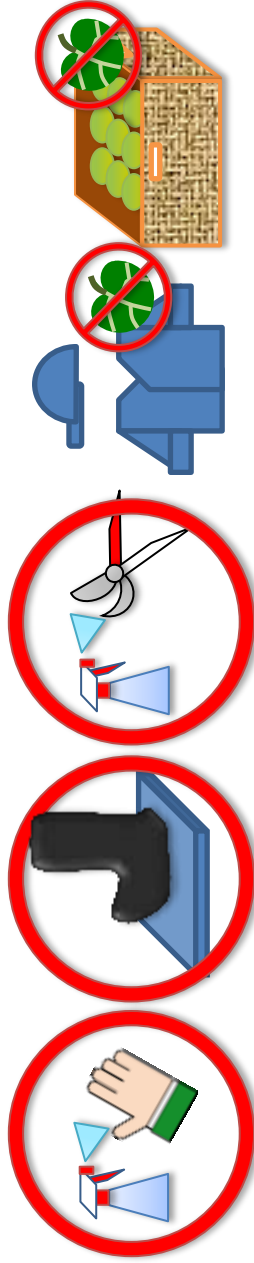
登録番号	登録種類名	商品名	希釈倍数・ 使用量	散布液量	使用方法 名称	使用時期	本剤の 使用回数	総使用回数
22533	銅水和剤	コサイド3000	2000倍	200～700 リットル/10a	散布	収穫後～果実 肥大期	－	－
22534	銅水和剤	クミアイコサイド3000	2000倍	200～700 リットル/10a	散布	収穫後～果実 肥大期	－	－
22535	銅水和剤	MICコサイド3000	2000倍	200～700 リットル/10a	散布	収穫後～果実 肥大期	－	－
22536	銅水和剤	丸和コサイド3000	2000倍	200～700 リットル/10a	散布	収穫後～果実 肥大期	－	－
22537	銅水和剤	ホクサンコサイド3000	2000倍	200～700 リットル/10a	散布	収穫後～果実 肥大期	－	－
15557	銅水和剤	クミアイコサイドボルドー	500倍		散布	収穫後～発芽 前	－	－
22572	銅水和剤	MICコサイドボルドー	500倍		散布	収穫後～発芽 前	－	－
18645	銅水和剤	ICボルドー66D	25～50倍	200～700 リットル/10a	散布	収穫後～発芽 前	－	－
3316	オキシテトラサイ クリン・ストレプト マイシン水和剤	アグリマイシンー100	1000倍	200～700 リットル/10a	散布	落花期まで	3回以内	3回以内
7290	カスガマイシン 液剤	ホクコーカスミン液剤	400倍		散布	収穫90日前ま で	4回以内	4回以内(ただ し、樹幹注入は 1回以内)
7290	カスガマイシン 液剤	ホクコーカスミン液剤	200倍		樹幹注入	収穫後～落葉 前まで	1回	4回以内(ただ し、樹幹注入は 1回以内)
5655	ストレプトマイシ ン水和剤	アグレプト水和剤	1000倍		散布	収穫90日前ま で	4回以内	4回以内(ただ し、樹幹注入は 1回以内)
13823	ストレプトマイシ ン液剤	アグレプト液剤	1000倍 (200ppm)		樹幹注入	収穫後～落葉 前まで	1回	4回以内(ただ し、樹幹注入は 1回以内)
8088	ストレプトマイシ ン水和剤	サンケイマイシン20水 和剤	1000倍		散布	収穫90日前ま で	4回以内	4回以内(ただ し、樹幹注入は 1回以内)
14625	カスガマイシン・ 銅水和剤	カスミンボルドー	1000倍	200～700 リットル/10a	散布	発芽後叢生期 (新梢長約 10cm)まで	4回以内	4回以内(ただ し、樹幹注入は 1回以内)
14625	カスガマイシン・ 銅水和剤	カスミンボルドー	500倍	200～700 リットル/10a	散布	休眠期	4回以内	4回以内(ただ し、樹幹注入は 1回以内)
15744	カスガマイシン・ 銅水和剤	カッパーシン水和剤	500倍	200～700 リットル/10a	散布	休眠期	4回以内	4回以内(ただ し、樹幹注入は 1回以内)
15744	カスガマイシン・ 銅水和剤	カッパーシン水和剤	1000倍	200～700 リットル/10a	散布	発芽後叢生期 (新梢長約 10cm)まで	4回以内	4回以内(ただ し、樹幹注入は 1回以内)
14470	銅・ストレプトマ イシン水和剤	日農銅ストマイ水和剤	600～800 倍		散布	休眠期～蕾出 現前	4回以内	－
14471	銅・ストレプトマ イシン水和剤	明治銅ストマイ水和剤	600～800 倍		散布	休眠期～蕾出 現前	4回以内	－

※使用回数の「－」は「制限なし」を意味する。

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*と泥を落とした靴底**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さを除去。
- ◆ 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



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。

樹液の流出



新梢の枯死



葉の斑点

枝枯れ



疑わしい症状を見つけたら、連絡を！

参考1

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

Point!

キウイフルーツかいよう病の発生生態と病徴



④4月 褐変したガク



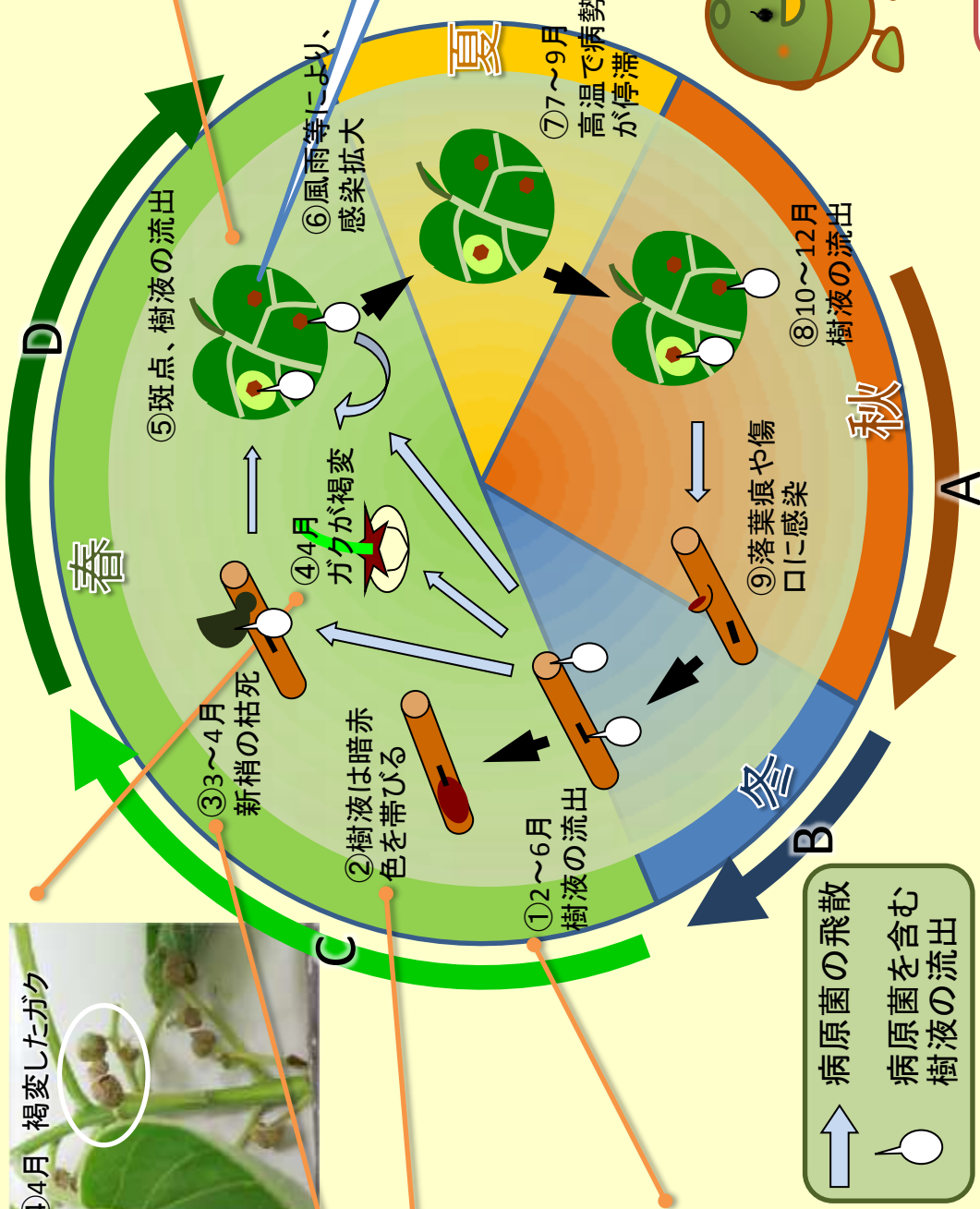
③3～4月 新梢の枯死



②暗赤色を帯びた樹液



①2～6月 樹液の流出



⑤斑点ができた葉



ハロー*が無いこともある



Point!

* 病斑の周りの黄色に変色した部分をハローと呼びます。
従来の系統は大きなハローを作りますが、近年、発生している系統は品種や時期によりハローを作らないことがあります。

- ① 樹液流動が始まる2月頃から、皮目や剪定痕などの傷から病原菌を含む樹液が流出し、気温が上がる6月ごろまで続きます。
- ② 皮層部が壊死すると樹液は暗赤色を帯びます。
- ③ 発芽間もない新梢を枯死させます。
- ④ ガクや花弁を褐変させます。

- ⑤ 4月頃から、葉に感染し、発病します。
- ⑥ 病斑から病原菌が流出し、感染が拡大します。
- ⑦ 平均気温が25℃を超える7月～9月は、病勢は停滞します。
- ⑧ 10月頃から、菌の増殖が活発化し、菌の流出は落葉期まで続きます。
- ⑨ 流出した菌は落葉痕や傷口から樹体内に感染します。

防除時期 (A～D)

病原菌は、春(C～D)に活発に活動し、夏は一旦停滞しますが、**秋(A)～冬(B)**に再び活動します。このため、**秋～春**にかけて(A～D)が薬剤防除の時期になります。

A 落葉期 B 剪定後 C 発芽期～出蕾前 D 出蕾後

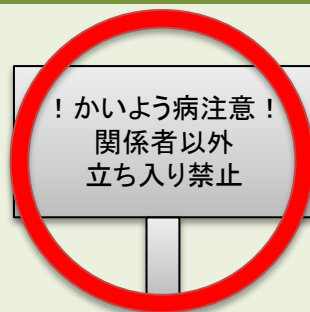
果樹園管理ガイド

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

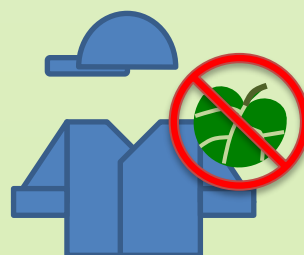
参考2



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。



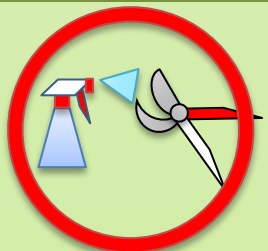
果樹園から出る前に、体に付いた植物残さや泥を落とす。



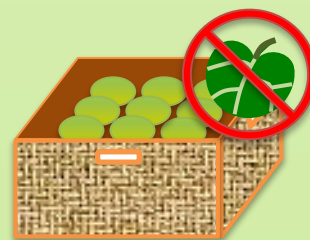
園地に出入りの際には靴底を、消毒液(200ppm以上(5%で250倍)の次亜塩素酸ナトリウム等)で消毒する。



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のを用意し、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。

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



新梢枯れと樹液の流出
(Hort16A)



枝枯れ(レインボーレッド)



白色の樹液の流出と暗赤色の痕