

2. 馬鈴しょ

5. コロラドハムシ (*Leptinotarsa decemlineata*)

ア 調査

【調査対象植物】

馬鈴しょ

【調査時期】

調査時期は地上部の生育期間中に、年1回以上実施する。

【調査方法及び調査内容】

- 1) 調査は、馬鈴しょの生産ほ場を対象に、各都道府県内で偏りが生じないように調査地点を設定する。
- 2) 成虫・幼虫ともに比較的大型、かつ植物体地上部を外部から加害するため、葉を中心に目視調査を実施する。また、葉の間などに隠れている場合でも振動を与えると植物体から落下するため、すくい網法（スウィーピング）や、ほ場の状況により叩き網法（ビーティング）による調査も有効である。
- 3) 設定した調査地点（ほ場）において、地上部（葉など）に食害が目立つ株があればそれらを主とし、食害等が無ければ無作為に10株を調査対象とする。
- 4) 疑わしい虫体が発見された場合は、成虫の外部形態の特徴により同定する。

【調査に当たっての留意事項】

- 1) 本種の成虫と幼虫は、外部から葉の辺縁部を摂食し、最終的にはすべての葉を食い尽くすこともある。被害株が若ければすぐに葉がなくなることがある（例外的に土壌表面に露出した塊茎を食害することもある）。また、特徴的な黒色で粘着性のある排せつ物を茎や葉上に残す。
- 2) 一方、我が国既存の馬鈴しょの害虫として、ニジュウヤホシテントウ、オオニジュウヤホシテントウ、ルイヨウマダラテントウ等、*Epilachna* 属、*Henosepilachna* 属テントウムシがあるが、これらの種の幼虫は葉の片側から葉脈を残して表皮を削り取るように食害するため、本種とは葉の食痕によって区別することができる。また、ナスノミハムシ *Psylliodes angusticollis* の成虫は黒色で小型（2mm程度）、葉に1～2mmの円形の食痕を残すことから容易に区別できる。

イ 同定診断手法

採取した疑義虫は実体顕微鏡を用いて、成虫の外部形態の特徴により同定を行う。

成虫：体長 8.5～11.5mm。体は半球形で、橙黄色だが部分的に黒～暗色。前胸に黒紋を有する。上翅は 5 対の黒色縦帯を有し、第 3 縦帯と第 4 縦帯間は黒みを帯びず明色。



図1 コロラドハムシの成虫（左：背面；中央：側面；右上：頭部，正面；右下：上翅，後正面）
©中原直子/Naoko Nakahara

幼虫：老熟幼虫の体長は約 15mm。体は背方に強く突出し、腹部は大きい。頭部両側の触角の後方に 3 対の単眼を有する。3 対の脚を有し、各脚は 3 節で爪をそなえる。腹部は 9 節。成長に伴って体色が変化し、初齢幼虫は鮮紅色で頭部と脚は光沢のある黒色だが、齢を重ねるごとに黄色味を増し、終齢幼虫は淡橙黄色。頭部と脚、前胸後部は黒色から暗褐色。中胸と後胸は背面に 2 つ、側面両側に 1 つずつ暗色紋を有する。腹部第 1～7 節の側面にはそれぞれ 2 つの顕著な暗色紋があり、上の紋は気門を囲む。腹部第 8・9 節の背面も暗色。

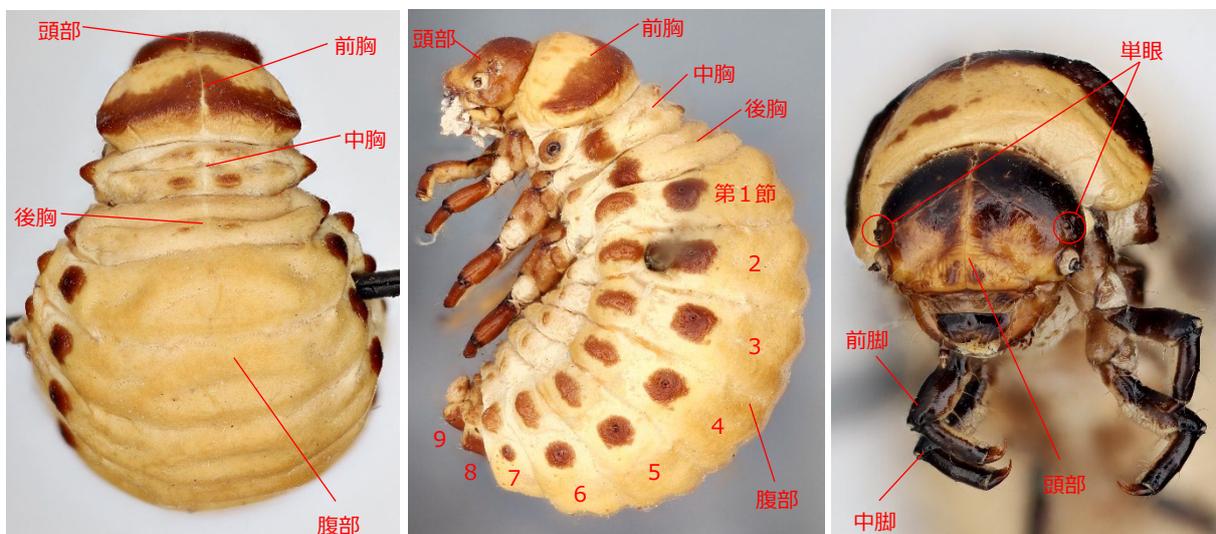


図2 コロラドハムシの幼虫標本（左：背面；中央：側面；右：頭部・胸部）

Photo credits: Alexander Konstantinov, Systematic Entomology Lab, USDA

卵：黄色または橙黄色の細長い楕円形で、長さ1 mm 強。馬鈴しょの葉下面に数十個の卵塊を形成する。卵塊中の卵は不規則な列状を呈し、各卵の一端が葉面に接着され、その長軸は葉面に対してほぼ垂直。



図3 コロラドハムシの卵塊

Whitney Cranshaw, Colorado State University, Bugwood.org (CC BY 3.0 US)

ウ 試料採取及び送付時の注意事項

- 1) 識別に適している成虫態を主として採取することとするが、同時に幼虫態等が見られた場合はそれらも併せて採取する。また、多数発見できた場合は可能であれば同一個体群から複数個体を採取する。
- 2) 採取に当たっては、採取データ等を記載した密閉容器（サンプル管等）を用い、採取後に散逸しないような方法をとる。可能であれば現地で殺虫処理（酢酸エチル殺虫管、70%エタノール液浸等）ができるとうい。
- 3) 採取した試料は、しっかり乾燥させた状態（成虫のみ：常温）またはガラス製のスクリー管瓶を用いた70%エタノール液浸状態（成虫、幼虫及び卵塊：冷蔵）で保管し、試料の確認に必要な事項（採取月日、採取場所等）を記載した試料採取票（別記様式）と合わせて保管する。
- 4) 試料を送付する際は、乾燥状態のものは虫体が破損しないようキムワイプ等で保護し、冷蔵で送付する。また、エタノール液浸状態のものは容器の破損や液漏れの無いような措置を講じた上で梱包し送付する。

エ 虫体写真等



図4 コロラドハムシ成虫

Scott Bauer, U.S. Department of Agriculture; this work has been released into the public domain by its author (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Colorado_potato_beetle_insect.jpg).



図5 コロラドハムシの成虫

図コード番号 5178045-SMPT : David Cappaert, Bugwood.org (CC BY-NC 3.0 US)



図6 コロラドハムシの幼虫

AnRo0002 (2014) This file is made available under the Creative Commons CC0 1.0 Universal Public Domain Dedication. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:20140802Leptinotarsa_dececlineata3.jpg



図7 コロラドハムシの幼虫

図コード番号 5381089-LGPT : David Cappaert, Bugwood.org (CC BY-NC 3.0 US)



図8 コロラドハムシの蛹

図コード番号 (1243047-LGPT) : Whitney Cranshaw, Colorado State University, Bugwood.org (CC BY 3.0 US)



図9 コロラドハムシに食害された馬鈴しよ

図コード番号 1148010-LGPT : USDA APHIS PPQ - Oxford, North Carolina , USDA APHIS PPQ, Bugwood.org (CC BY 3.0 US)

オ 対象病害虫解説

学名：*Leptinotarsa decemlineata* (Say)

英名：Colorado potato beetle

分布：中華人民共和国、イラク、イラン、トルコ、アゼルバイジャン、アルメニア、イタリア、ウクライナ、ウズベキスタン、英国（グレート・ブリテン及び北アイルランドに限る。）、エストニア、オーストリア、オランダ、カザフスタン、北マケドニア共和国、ギリシャ、キルギス、クロアチア、コソボ、ジョージア、スイス、スペイン、スロバキア、スロベニア、セルビア、タジキスタン、チェコ、デンマーク、ドイツ、ハンガリー、フランス、ブルガリア、ベラルーシ、ベルギー、ボスニア・ヘルツェゴビナ、ポーランド、ポルトガル、モルドバ、モンテネグロ、リトアニア、ルクセンブルク、ルーマニア、ロシア、アメリカ合衆国、カナダ、メキシコ

寄主植物：なす科植物、あざみ属植物及びもうずいか属植物の生茎葉

※なす科植物には馬鈴しょ、トマト、なす等のなす属植物、とうがらし属、たばこ属、ほおずき類、ちょうせんあさがおなど多くの種が含まれる。(CABI, 2021; UF/IFAS, 2021; 農林水産省, 1982)

生態：年間の発生回数は気温に左右され、年1～4回の発生である。成虫が土中（通常、深さ約25～40cm）で越冬する。越冬成虫は春から初夏にかけて、数週間にわたって土中から出現し、寄主植物を発見するために歩行または飛翔により分散する。成虫は通常、越冬前に交尾するが、越冬後、春に土中から出現した成虫も繰り返し交尾する。卵は10～30個から成る卵塊として寄主植物の葉裏に産卵される。雌成虫は通常、数週間にわたって産卵し、1頭の雌成虫の産卵数は2,000個以上に達することもある。卵期間は4～9日間、幼虫期間（1～4令）は14～21日間、蛹期間は5～10日間である。(CABI, 2021; 農林水産省, 1982)

分散：本種の原因は、アメリカ合衆国の西部地方で、元来は野生のナス属植物を寄主としていたが、1850年代に西部の開拓地域へ導入された馬鈴しょへ寄主の転換が起り、猛烈ないきおいで馬鈴しょの栽培地帯へまん延していった。このような急速な分布の拡大は昆虫自身の移動力にもよるが、交通機関の発達に伴う人為的な分散によるところも大きく、1874年には大西洋岸にまで達した。この間の拡大の速度は年間約130kmであった（農林水産省, 1982）。また、新疆ウイグル自治区における標識再捕獲実験においては、16日間で最大115km移動した個体が確認されており、風の状態（強さ、向

き) と本種の分散との相関関係が示唆されている (Liu et al., 2012)。

防除 : 国外における過去の事例から、以下の方法が実行可能と思われる (Liu et al., 2012; Barčić et al., 2006; Gränsbo, 1980; Bejer・Esbjerg, 1980)。

- ・ 耕種的防除 : 発生源を中心に発生範囲内で目視およびすくい網法 (スウィーピング) や叩き網法 (ビーティング) によって発育段階を問わず可能な限り多くの個体を捕獲し、殺処分する。発生が確認された馬鈴しょのほ場では植物体を除去し、同時に寄主植物 (他の寄主となり得る作物、野生寄主) の除去をできる限り行う。この際、残さを適切に処分 (焼却または密封したうえで埋没) すること。
- ・ 薬剤散布 : 発生が確認された馬鈴しょほ場では、状況に応じて土中の新成虫や蛹の駆除を目的として粒剤を土壌混和し、さらに新成虫の脱出を阻むためポリフィルムシートなどの被覆資材で表面を覆う。同時に、周辺の馬鈴しょほ場での薬剤散布、野生寄主植物やその除去跡への除草剤散布、寄主となり得る他の作物の栽培圃場での薬剤散布もできる限り行う。

<参考文献>

- Barčić, J. I., R. Bažok, S. Bezjak, T. G. Čuljak & J. Barčić, 2006. Combinations of several insecticides used for integrated control of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*, Say., Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Pest Science*, 79: 223-232.
- Bartlett, P. W., 1980. Interception and eradication of Colorado beetle in England and Wales, 1958 - 1977. *EPP0 Bulletin*. 10 (4): 481-489.
- Bejer, B. & P. Esbjerg, 1980. Survey of insect pests in Denmark 171978 and 1979. *Entomologiske Meddelelser*, 47 (3): 110-114. (In Danish.)
- CABI (2022) *Leptinotarsa decemlineata* (Colorado potato beetle) (Invasive Species Compendium, CABI) <https://www.cabi.org/isc/datasheet/30380>
- Gränsbo, G., 1980. Control measures towards Colorado beetle eradication in Sweden. *EPP0 Bulletin*. 10 (4): 499-505.
- Jacques, R. L. Jr., 1988. *The Potato Beetles*. CRC Press, Boca Raton. 144 pp.
- Liu, N., Y.-C. Li & R.-Z. Zhang, 2012. Invasion of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, in China: dispersal, occurrence, and economic impact. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 143

(3): 207-217.

UF/IFAS (University of FLORIDA) (2021) Featured Creatures: Colorado
Potato Beetle - *Leptinotarsa decemlineata* (Say)

https://entnemdept.ufl.edu/creatures/veg/leaf/potato_beetles.htm

農林水産省 (1982) 主な未侵入病害虫の解説. 植物防疫病害虫情報, (8): 6-7.

8. ネコブセンチュウ類

①コロンビアネコブセンチュウ (*Meloidogyne chitwoodi*)

②*Meloidogyne enterolobii*

〔※ ネコブセンチュウ類は調査方法が似ているため、ここではコロンビアネコブセンチュウと*Meloidogyne enterolobii*をまとめて記述する。〕

ア 調査

【調査対象植物】

- ①馬鈴しょ、トマト
- ②トマト

【調査時期】

調査は、対象植物の生育期間中に年1回以上実施する。

【調査方法及び調査内容】

- 1) 調査は、上記の調査対象植物の中から選定した上で、調査地点を設定する。なお、調査地点は各都道府県内で偏りが生じないように留意する。
- 2) 設定した調査地点当たり10株の十分生育した植物体を対象に、生育不良等の異常株がないか目視で調査する。
- 3) 異常株があった場合は、異常を示す株の抜き取り又は周囲を掘り返すことにより、根系への根こぶの有無を確認し、根系にこぶが形成され、他の病害や生理障害の関与がないか目視で確認する。なお、基本的に植物の生育期間中に異常株の抜き取り等を行うこととするが、生育期間中の抜き取り等が難しい場合には、栽培終了直後の抜き取りでも確認可能である。寄生が疑わしい場合は、症状を示している部位や株全体、周囲の様子等をデジタルカメラ等で撮影した上で、試料を採取する。
- 4) また、馬鈴しょ塊茎を用いた調査を行う場合は、調査対象の地域やほ場から収穫し貯蔵中の塊茎について、ほ場当たり10株分程度を確認し、病徴写真を参考にして、寄生による症状の有無を確認する。寄生が疑わしい症状があった場合は、デジタルカメラ等で撮影した上で、塊茎の皮をむいて線虫を採取する。

【調査に当たっての留意事項】

- 1) 発見のポイント

地下部の特徴的な病徴である根こぶの観察からネコブセンチュウの寄生を確認する。特に在来のネコブセンチュウ種が寄生しにくい馬鈴しょで被害症状が発生した場合は本種の寄生を疑う。

ア) 馬鈴しょ：塊茎表面に小さな吹き出物のような多数の隆起を引き起す。

寄生が多いと地上部に生育不良が出る。

- イ) トマト : 寄生が著しい場合、地上部に生育不良、萎ちょう、葉の黄化が見られる。

イ 同定診断手法

採取または送付された試料について、以下の手順で検定を実施する。なお、寄主植物での症状及び線虫の形態的特徴はネコブセンチュウ種間で類似するため、簡易同定法として遺伝子診断（PCR検定）を行う。

また、雌成虫の会陰門や第2期幼虫の形態によっても同定が可能であるが同定には熟練を要するため、線虫の専門知識を有する者に同定を依頼する。

1) 線虫の分離

調査によって得られた線虫寄生根の根こぶ部分をメス等を用いて解剖して雌成虫を取り出すか、根に付着した卵のうを25℃程度の水中に保存してふ化させて第2期幼虫を得る。馬鈴しょ塊茎では、線虫が小さな吹き出物のような多数の隆起を引き起こすので、当該部分をメス等で解剖して雌成虫を取り出す。根等が利用できない場合は、土壌からベルマン法で第2期幼虫を分離する。

<参考情報>

ネコブセンチュウの解剖方法

- ① 肉眼又は実態顕微鏡を用いて、根こぶ（ゴール）のある根や塊茎のこぶの部分を解剖ばさみやメスで切り取り水を入れたシャーレやシラキース時計皿等に移す。
- ② 雌成虫は根こぶの組織内部に埋まった状態に入っている。メスとピンセットを用いて根こぶの入った組織を少しずつ切開して、1mm弱（0.43～0.74mm）の乳白色で洋ナシ形をした雌成虫を摘出する。

2) 遺伝子診断

調査によって得られた線虫からDNAを抽出しPCR等の遺伝子調査によって種を判別する。尚、同定診断については専門家あるいは最寄りの植物防疫所に相談すること

ウ 試料採取及び送付時の注意事項

- 1) 採取した試料は、試料の確認に必要な事項（採取月日、採取場所、写真等）を記録した試料採取票（別記様式）を添付した上で、ビニール袋に入れ、輸送するまでクーラーボックス等（10℃）もしくは冷暗条件で保管する。
- 2) 試料の採取部位、病徴及び採取票に記録した内容等は、別途、調査野帳等に記録する。
- 3) 採取した試料は、散逸しないように厳重に梱包し、保冷剤を入れて低温に保った保冷箱等に収容して冷温のまま速やかに送付する。

エ 病徴写真等

1) 寄主植物における病徴

ア) コロンビアネコブセンチュウ

a) トマト



図1. 根上の卵のう (スケールは最小メモリが 0.5mm)
(防疫指針委託事業成果)



図2. 根上の根こぶ
(防疫指針委託事業成果)



図3. 根上の卵のう (ブリリアントブルーで染色)
(防疫指針委託事業成果)

b) 馬鈴しょ



図4. 塊茎での症状 (右: 健全サンプル)
(NPP0 of the Netherlands、EPP0 より)



Meloidogyne chitwoodi (MELGCH) - <https://gd.eppo.int>

図5. 塊茎の表皮下の寄生痕
(NPP0 of the Netherlands、EPP0 より)

イ) *Meloidogyne enterolobii*

a) トマト



図6



図7

*Meloidogyne enterolobii*による根こぶ（こぶが大きく発達する）
(龍谷大学岩堀英晶教授提供)

2) 線虫

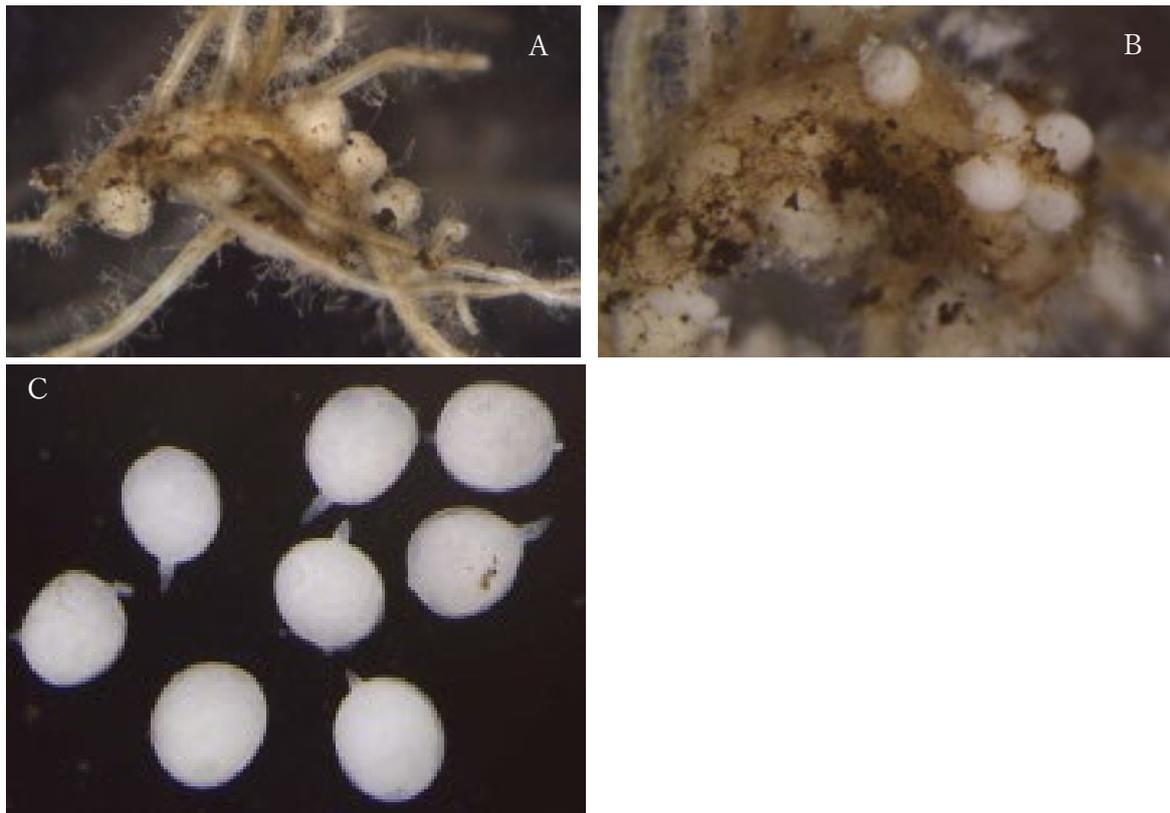


図8. コロンビアネコブセンチュウ (植物防疫所原図)

A: コブのできた被害根 (コブの上に卵のうが見られる)、B: 雌成虫 (卵のうを除去したところ)、
C: 根から摘出した雌成虫



図9. *M. enterolobii* の第2期幼虫
(龍谷大学岩堀英晶教授提供)

オ 対象害虫の解説

①コロンビアネコブセンチュウ

学名：*Meloidogyne chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo & Finley, 1980

英名、和名等：Columbia root-knot nematode

分布：トルコ、オランダ、スウェーデン、ドイツ、フランス、ベルギー、ポルトガル、南アフリカ共和国、アメリカ合衆国、アルゼンチン、メキシコ

寄主植物：テンサイ、ドイツアヤメ、エンバク、オオムギ、コムギ、トウモロコシイロハモミジ、コブカエデ、ヨーロッパカエデ、ヨーロッパシラカンバ、キクゴボウ、キミキフガ・ラケモサ、ケマンソウ、ハナケマンソウ、ロニケラ・クシロステウム、ニンジン、エリカ・キネレア、トマト、バレイショ、ポテンティラ・フルティコサ、アルファルファ、インゲンマメ、エンドウなど

形態：雄成虫と第2期幼虫は糸状、雌成虫は特徴的な洋なし型をしており、真珠光沢のある白色を示す。雌は体長430～740 μm、体幅344～518 μmである。第2期幼虫は、体長336～417 μm、体幅12.5～15.5 μm、尾は短く39～47 μmで、先端部分は透明な円筒状である。雄は体長887～1268 μm、体幅は22～37 μmで両端は次第に細くなっている。尾は短く4.7～9.0 μmで先端は丸くなっている。体環は明瞭である。卵は、長さ79～92 μm、幅40～46 μmである。

生態：雄成虫と第2期幼虫は運動性があるが、雌成虫は寄主植物の根に定着して寄生する。適切な環境下であれば、1世代は約3～4週間であり、年間3～5世代の発生であると考えられている。*Meloidogyne*属の幼虫は寄主植物なしでも1年以上生き続けることができる。本種は卵または幼虫で越冬し、氷点下でも生き残ることができる。本種はふ化及び根へ入り込むには最低4℃の温度が必要で、発育のためには最低6℃が必要である。

(Inserra et al., 1985 ; Charchar and Santo, 2001)

分散：

1) 自然分散 (CABI, 2019)

土壌伝搬する。本種の移動分散能力は非常に限定されている。第2期幼虫及び雄成虫は移動能力を有するがその距離は数十cmほどである。灌漑水により線虫が移動する。

2) 人為分散 (CABI, 2019)

本種が新しい地域へ侵入するための主な方法は、被害を受けた植物又は汚染された培養資材の移動によるものであり、本種が寄生した球根や

地下茎又は生産物により運ばれる。更に、非寄主植物の苗類や農機具等に当該線虫の汚染土壌が付着して移動することによっても、本種は分散する。

防除：クロロピクリン、DD 剤、ダゾメット粒剤、イミシアホス剤などの土壌くん蒸剤などによる防除及び非宿主作物の3年以上の栽培等、他のネコブセンチュウ種に準じた防除を行う。また、発生ほ場からの土壌の持ち出しを防ぐため、使用農機は移動前に当該ほ場で付着土壌を確実に落とす、作業者はオーバーシューズを着用するなどの措置を講じる。線虫汚染の可能性のあるほ場資材、植物残渣などは焼却処分する。

② *Meloidogyne enterolobii*

学名：*Meloidogyne enterolobii* Yang & Eisenback, 1983

英名、和名等：Pacara earpod tree root-knot nematode, Guava root-knot nematode

分布：インド、スリランカ、タイ、中華人民共和国（香港を除く。）、台湾、ベトナム、スイス、ポルトガル、コートジボワール、セネガル、ブルキナファソ、マラウイ、南アフリカ共和国、ケニア、ナイジェリア、ニジェール、アメリカ合衆国（ハワイ諸島を含まない。）、グアテマラ、コスタリカ、ブラジル、ベネズエラ、メキシコ、キューバ、トリニダード・トバゴ、プエルトリコ、マルティニーク

寄主植物：アラビアコーヒー、クチナシ、スイカ、キュウリ、ペポカボチャ、アセロラ、ナツメ、パラミツ、ショウガ、ニンジン、キャッサバ、トウガラシ、トマト、タバコ、ナス、サツマイモ、バンジロウ、ダイズなど

形態：第2期幼虫は細長く、環状で両方の先端はさらに細くなっている。体長は250～700 μm 、体幅は12～18 μm 、尾の長さは15～100 μm で、尾端透明部長が5～30 μm である。雌は洋梨型の球状、真珠のような白色を示す。体長は400～1,300 μm で、体幅300～700 μm である。雄は細長く、体長700～2,000 μm 、体幅25～45 μm である。

生態：雌成虫は400～600 個の卵を産む。なお、本種の単為生殖に関する情報はないが、他の *Meloidogyne* 属はほぼ単為生殖である。

1世代の期間は好適環境下で4～5週間。幼虫は成虫になるまで、3回脱皮を繰り返す(EPP0, 2014a)。20°Cの環境の場合、1世代6週間となる(Karssen & Moens, 2006)。

分散：

1) 自然分散

土壌伝搬する。土壌中における線虫自身の移動は数十cm 程度に限られる (EPP0, 2014a) が、年間で数m との報告もある。(EPP0, 2011)

2) 人為分散 (EPP0, 2014a)

主要な分散方法は、汚染された園芸資材や土、寄主となる根付き植物や、車両、機械、植物に付着した土壌、灌水である。

防除：寄主でない植物の栽培又は休耕を実施することが、密度の低減に最も効果的である。一般的に侵入したネコブセンチュウの根絶は困難である。

<参考文献>

EPP0 文書、<https://gd.eppo.int/taxon/MELGCH/documents>、PM9/017(1)

Meloidogyne chitwoodi and *Meloidogyne fallax*

EPP0 文書、<https://gd.eppo.int/taxon/MELGCH/documents>、Data sheet on *Meloidogyne chitwoodi*

EPP0 文書、<https://gd.eppo.int/taxon/MELGCH/documents>、PM3/069(2)

Meloidogyne chitwoodi and *M. fallax*: sampling potato tubers for detection

EPP0 文書、<https://gd.eppo.int/taxon/MELGCH/documents>、PM7/041(3)

Meloidogyne chitwoodi and *M. fallax*

日本植物防疫協会ウェブサイト JPP-NET、<http://web1.jppn.ne.jp/member/EPP0> (2014) *Meloidogyne enterolobii*. EPP0 Bulletin, 44 (2), 159-163.

Cetintas, R, Kaur R, Brito JA, Mendes ML, Nyczepir AP and Dickson DW (2007) Pathogenicity and reproductive potential of *Meloidogyne mayaguensis* and *M. floridensis* compared with three common *Meloidogyne* spp. *Nematropica*, 37, 21-31.

EPP0 (2018) Pest Risk Analysis report for *Meloidogyne enterolobii* (10-16246rev). <https://pra.eppo.int/pra/b3f5ee8e-0551-4c8f-84fc-2fb729bb3dd8> ※出版年は左記ページの記載に従ったが、内容は2019年に一部改訂されている。

Kiewnick S, Frey JE and Braun-Kiewnick, A (2015) Development and validation of LNA-based quantitative real-time PCR assays for detection and identification of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* in complex DNA backgrounds. *Phytopathology*, 105, 1245-1249.

Braun-Kiewnick A, Viaene N, Folcher L, Ollivier F, Anthoine G, Niere B, Sapp M, van de Vossenberg B, Toktay H and Kiewnick S (2016)

- Assessment of a new qPCR tool for the detection and identification of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* by an international test performance study. *European Journal of Plant Pathology*, 144, 97-108.
- EPP0 (2013) PM 9/17(1) *Meloidogyne chitwoodi* and *Meloidogyne fallax*. *EPP0 Bulletin*, 43(3), 527-533.
- Quesada-Ocampo (2018) Sweetpotato Root Knot Nematode, Vegetable Pathology Factsheets. <https://content.ces.ncsu.edu/sweetpotato-root-knot-nematode>.
- EPP0 (2018) Pest Risk Analysis record for *Meloidogyne enterolobii*. <https://pra.eppo.int/pra/b3f5ee8e-0551-4c8f-84fc-2fb729bb3dd8>
- Gamon A and Lenne N (2012) *Meloidogyne chitwoodi* and *Meloidogyne fallax* in France: initial management experiences. *EPP0 Bulletin*, 42, 122-126.
- DeBrida AL, Castro BMC2, Zanuncio JC, Serrao JE and Wilcken SRS (2018) Oat, wheat and sorghum cultivars for the management of *Meloidogyne enterolobii*. *Nematology*, 20, 169-173.
- Guimaraes LMP, Moura RM de and Pedrosa EMR (2003) *Meloidogyne mayaguensis* parasitism on different plant species. *Nematologia Brasileira*, 27, 139-145.
- Hajihassani A, Rutter WB, Schwarz T, Woldemeskel M, Emran Ali ME and Hamidi N (2020) Characterization of resistance to major tropical root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in *Solanum sisymbriifolium*. *Phytopathology* 110, 666-673.
- Rodriguez MG, Sanchez L & Rowe J (2003) Host status of agriculturally important plant families to the root-knot nematode *Meloidogyne mayaguensis* in Cuba. *Nematropica*, 33, 125-130.
- Tiango M, de Siqueira K, Castagnone-Sereno P, Mulet K, Queiroz P, dos Santos M, Teixeira C, Almeida M, Silva J and Carneiro R (2010) Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* and development of a SCAR marker for this guava-damaging species. *Plant Pathology* 59, 1054-1061
- Orui Y (1998) Identification of Japanese species of the genus *Meloidogyne* (Nematoda: Meloidogynenidae) by PCR-RFLP analysis. *Applied Entomology and Zoology* 33, 43-51.
- 水久保隆之・二井一禎 (編) (2014) 線虫学実験. 京都大学学術出版会、京都、 324 pp.
- Hu MX, Zhuo K and Liao JL (2011) Multiplex PCR for the simultaneous

- identification and detection of *Meloidogyne incognita*, *M. enterolobii*, and *M. javanica* using DNA extracted directly from individual galls. *Phytopathology* 101, 1270-1277.
- EPP0 (2016) PM 7/103 (2) *Meloidogyne enterolobii*. EPP0 Bulletin, 46, 190-201.
- Plant Pests and Diseases Programs / Golden Nematode.
<https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/planthealth/plant-pest-and-disease-programs/pests-and-diseases/golden-nematode/nematodes>
- Plant Pests and Diseases Programs / Pale cyst Nematode.
<https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/planthealth/plant-pest-and-disease-programs/pests-and-diseases/nematode/pcn>
- EPP0 (2018) PM 9/26 (1) National regulatory control system for *Globodera pallida* and *Globodera rostochiensis*. EPP0 Bulletin 48 (3), 516-532.
- 農林水産省 (2020) *Meloidogyne chitwoodi* (コロンビアネコブセンチュウ) に関する病害虫リスクアナリシス報告書
- 農林水産省 (2020) *Meloidogyne enterolobii*に関する病害虫リスクアナリシス報告書
- EPP0 (2011) *Meloidogyne enterolobii*. Bulletin OEPP/EPP0 Bulletin, 41, 329-339
- CABI (2019) *Meloidogyne chitwoodi*. In: Crop Protection Compendium. CAB International, Wallingford, UK. (Online) available from <<https://www.cabi.org/cpc/datasheet/33235>> (Last modified: 2019-11-22)

9. シストセンチュウ類

- ①ジャガイモシストセンチュウ : *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Behrens
- ②ジャガイモシロシストセンチュウ : *Globodera pallida* (Stone) Behrens
- ③テンサイシストセンチュウ : *Heterodera schachtii* Schmidt

※ シストセンチュウは植物の根に寄生するセンチュウで、雌成虫が自らの体内に産卵し、乾燥等過酷な環境でも生き残ることができるシストを形成することが特徴である。シストは非常に小さく（図1）、色も砂粒と変わらないため、土壤中にあると見つけにくい。宿主植物の根から分泌される物質に反応してシスト内の卵がふ化し、幼虫がシストから出て、根に寄生する（図2）。シストセンチュウは調査方法が同じなので、ここではジャガイモシストセンチュウ（以下「Gr」という。）、ジャガイモシロシストセンチュウ（以下「Gp」という。）、テンサイシストセンチュウ（以下「Hs」という。）をまとめて記述する。

ア 調査

【調査対象植物】

- 1) Gr及びGp : 馬鈴しょ
- 2) Hs : キャベツ、テンサイ、ハクサイ又はホウレンソウ

【調査時期】

- 1) Gr及びGp : 植付け後2か月以降の生育期間中に年1～2回（1回の場合は植付け後3か月以降）。
- 2) Hs : 播種又は定植後1か月以降の生育期間中（夏～秋）に年1回実施。

※なお、調査時期があまりに遅くなると全ての雌成虫がシストになってしまい、株を抜き取ってもシストと土壤の区別がつかなくなるおそれがある。



図1 Grの大きさ（植物防疫所原図。以下、特記が無い場合は植物防疫所原図。）
シストは非常に小さいので、注意すること

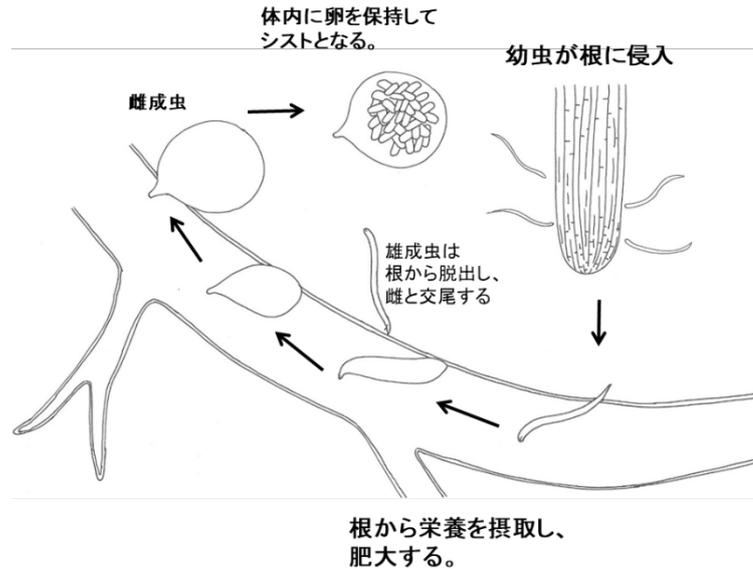


図2 シストセンチュウ Heteroderidae科 (*Globodera*属、*Heterodera*属など) の生活環

【調査方法及び調査内容】

- 1) 調査は、上記の調査対象植物の中から選定した上で、調査地点を設定する。なお、調査地点は各都道府県内で偏りが生じないように留意する。
- 2) ほ場内全体を見まわし、地上部の萎凋、下葉を中心とした黄化、枯死などの異常の有無を観察する(図27、28、31)。この場合、遠くから俯瞰的に観察し、近づいて異常の有無を確認する必要はない。
 なお、シストセンチュウの場合、ほ場内の被害株の分布がパッチ状になることが多い(図27)。ただし、シストセンチュウは侵入から作物に被害が出るまでに5年以上かかり、発見までに長期間を要することから、その間にはほ場全体に被害株の分布が広がってしまっている場合もある。
- 3) 異常株があった場合は、可能であれば地下部(根、塊茎等)ごと植物体を抜き取り、地下部に0.5ミリ程度の白色～黄色(図29、32、33、34、37。一般的にGrの雌成虫は黄色、HsやGpは白色を呈す。)の雌成虫や褐色のシスト(図35)が付着していないかを目視で調査する(以下「植物検診」という。)。植物検診が難しい場合には、参考1に記載の土壌検診を実施する。
- 4) 寄生が疑わしい場合は、寄生の様子等をデジタルカメラ等で撮影した上で、細い根ごと採取し、管ビン等に封入し、持ち帰る。

【調査に当たっての留意事項】

- 1) 生育不良は、ウイルスや根こぶ病その他病菌、肥料不足、排水不良による可能性もあるので、植物検診又は土壌検診を実施し、シストセンチュウによるものかどうか確認すること。地上部の被害だけでは判別できない。

- 2) 植物検診を実施する場合、株をシャベルやくわ等で掘り上げるが、掘り上げる際に乱暴に扱うとシストが脱落・散乱してしまうので慎重に行う（図3）。掘り上げた株を土壌ごと静かに地面に置き、まずは根回りの土壌にシストが無いか確認し、その後、根の土壌を静かに除きながら、根にシストセンチュウが寄生していないかを調査する。



図3 シャベルで土壌ごと静かに掘り上げる。

- 3) 根に寄生している状態（生きた状態）の雌成虫は、表面に艶があるので、他の類似物質と見分けがつくが、ネダニ類はシストと同じような艶があるので、注意が必要（図12、13）。また、Hsの雌成虫は土壌をまとっている場合があり、見分けが難しいときもある。疑義があれば持ち帰り、実体顕微鏡下で観察する。なお、HsやGpは白い（図33、38）が、Grは黄色（図34）になる時期がある。また、雌成虫が成熟してシストになると茶褐色になり、土壌と区別が付きにくくなる点に注意する。

根に発生する病害虫では、シストセンチュウの他に根こぶ病やネコブセンチュウ類がある。キャベツの根こぶ病（原因菌：*Plasmodiophora brassicae*（原生生物の仲間））の場合、主根や支根が肥大し根こぶ（数cm程度）を形成するが、シストセンチュウ類はこぶは形成しない。ネコブセンチュウ類（*Meloidogyne* spp.）の場合は根の一部が1～数mm程度盛り上がる小さなこぶを形成し、センチュウは其中で成長する。シストセンチュウの場合はこぶは形成せず、根に直接ごく小さな（0.5mm程度）の雌成虫あるいはシストが付着しているので、区別は極めて容易である。

（参考1）土壌検診

シストセンチュウの検出方法として、ほ場の土壌を採取し、篩を用いてシストを分離する土壌検診という方法がある。

- ① ほ場を8×8（又は16×16）歩（=5～10m）の間隔で縦横に線を引き（グリッドを設定）、その交点の土壌10g（スプーンで軽く掘って地表から5～10cmの深さの土壌）を採取する（図4）。なお、圃場に2歩×2歩入った地点から土壌採取を開始する。ほ場全体としては、5,000㎡あたり、200点程度（最大400点程度）採取することになる（採取量はほ場当たり1～3kg）。また、土壌採取地点をW字型とした簡便な方法（図5）も8×8歩法と同様の結果が得られている（開始地点は上記と同様、2歩×2歩入った地点から。）。なお、5点法（ほ場の四隅及び中央部で土壌採取する方法）は、ほ場を面で検査できないので、推奨しない。

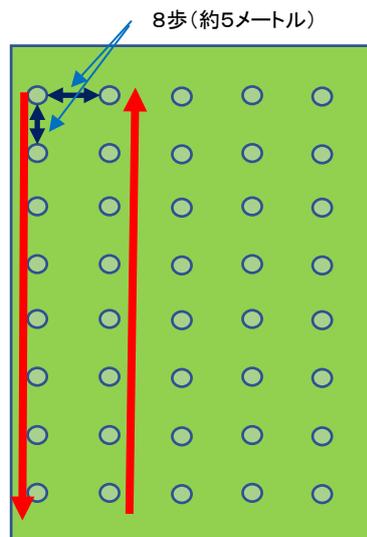


図4 8×8歩法

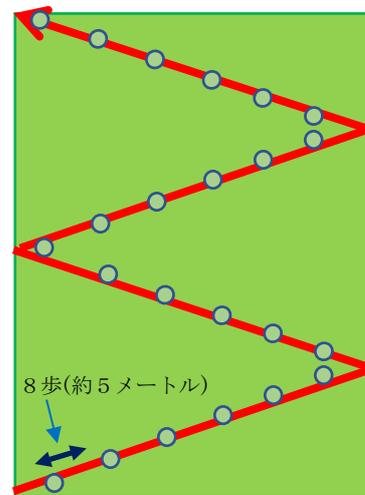


図5 W字法

- ② 採取した土壌は二重にした厚さ0.03mm以上のポリ袋に入れてよく混和し、持ち帰る。長期保存する場合は冷暗条件に置いておく。
- ③ 新聞紙を敷いたバットに土壌をなるべく平らに広げて、さらさらになるまで十分乾燥させる（土塊の中に湿り気があるとシストが十分乾燥せず、検出できない可能性があるため、大きな塊は砕いておく。）
- ④ 十分乾燥した土壌から200gをとり、大型ビーカーに水とともに入れ、よくかき混ぜる。なお、土塊中にシストが含まれていることがあるため、スプーンなどを使って小さな土塊まで残さず完全に潰す。
- ⑤ 20～30秒程度静置すると、砂礫等重いものは沈み、乾燥したシストは夾雑物とともに浮上する。
- ⑥ 浮上したシスト及び夾雑物を、16メッシュを上、60メッシュを下に重ねた篩に流し込む。シャワーの水流を使い、シストが含まれている可能性のある夾雑物を下の篩に落とし、大きな夾雑物を濾す（これら手順は、生きたシスト又は第2期幼虫が水道に流れ外部に分散しないよう鍋等の容器の中で行い、容器内に流れ出た水は作業後煮沸する。）。

⑦ 下の篩に集められたシストが含まれている可能性のある夾雑物を小さなビーカーや計数皿（ろ紙を用いてろ過してもよい。）に移し、実体顕微鏡で観察し、シストの有無を調べる。

※シストを分離する専用機材としてフェンウィック装置があるが、⑥で記載したような生きたシスト、第2期幼虫の分散防止の対策が出来た状況下での使用に限られる。

※土壌検診は、ある程度の発生密度でないと（シスト数が10,000m²当たり100万個が検出限界）、検出することが難しいとされている。植物検診についても同様に検出限界がある。

（参考2）カップ検診

Gr及びGpの検診方法として、小さな馬鈴しょ塊茎（小イモ）を土壌と一緒に透明なプラスチックカップ等に入れ、カップ内で発根させ、その根に寄生したシストセンチュウを検出するカップ検診法（奈良部他(2007)）という方法がある（図6、7）。この方法は、シストセンチュウを検出するために2～3か月かかること、小イモを準備する必要があるという問題点がある反面、だれでも簡便に実施でき（北海道では農協のほか、農家自身が実施している地域もある。）、カップ側面及び底面から肉眼でシストセンチュウを確認することができること、生きたシストセンチュウを検出できること等の利点がある。

- ① ほ場から上述（参考1）の①と同様に土壌を採取する。
- ② 100ml（又は250ml）の透明のプラスチックカップ、15g（250mlカップの場合は25g）程度の芽出しした小イモ（Gr及びGp感受性品種）を用意する。
- ③ 計量スプーン等を使って50ml（250mlカップの場合は125ml）の土壌をカップに詰める。芽を下にして小イモを土壌に埋め（小イモの上部が土壌から出ても構わない。）、蓋をする。1ほ場ごとに5カップ（5反復）検診する。



図6、7 小イモをセットしたカップ

- ④ 計量スプーンは土壌を採取したほ場が変わるごとに交換（又はアルコールで洗浄）する。
- ⑤ 小イモを設置したカップは、室温（18℃が最適だが、平均14～22℃であれば可）で、暗所で保管する。根がカップの裏面及び側面に回るようになるため、保管中は光を当てないことが重要であり、暗所での保管が必要。カップを段ボール箱に入れておけば、会議室等でも保管が可能。
- ⑥ 数日から2週間ごとに土の湿り状況を観察し、水分が不足しないよう、2～3mlほど給水する。蓋に給水用の穴を開けておけば、給水のたびに蓋を開ける面倒が省ける。
- ⑦ 早ければ5週目ごろから、白い雌成虫がカップの底面や側面の根に寄生していることが確認できる（図8）。特にGrの場合、雌成虫が黄色くなってくるので、見つけやすい。一方、Gpの場合は12週目でシストが検出される場合もあるので、3か月間、検診を続ける。
- ⑧ 検診に用いた土壌、器具等は、検診終了後、120℃で20分以上オートクレーブ（土壌以外は70℃で1時間以上の乾熱処理も可）で処理後、廃棄する。なお、シストの殻は分解しないので、絶対に土壌をほ場に戻さないこと。



図8 カップ側面でみられるGp雌成虫。（矢印がGpの雌成虫）

<参考文献>

奈良部他（2007）プラスチックカップを用いたジャガイモシストセンチュウの簡易検出・密度推定法。北海道農業研究成果情報（オンライン），入手先〈<https://www.naro.affrc.go.jp/org/harc/seika/h19/304.html>〉，（参照_2022-8-24）。

イ 同定診断手法

採取または送付された試料について、以下の手順で同定を実施する。

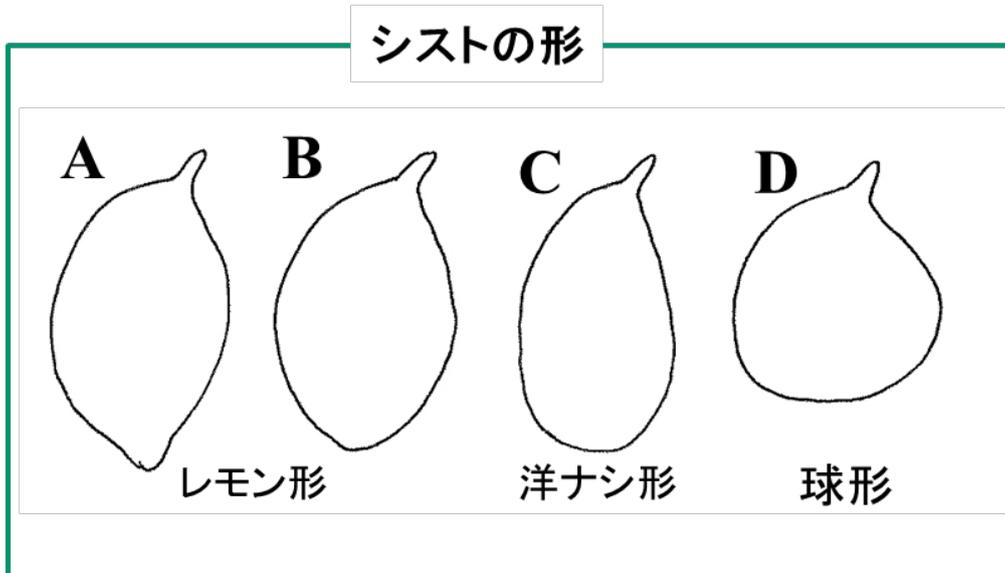
シストの形状はGr・Gpが球形、Hsはレモン型である（図9、10、11）。なお、Gr及びGpはシストの色のみで両種の区別はできない。



図9 Gr、Gp



図10 Hs



シストの形状 A: *Heterodera*属 B: *Cactodera*属
C: *Punctodera*属と*Dolichodera*属 D: *Globodera*属

図11 シストの形状。

シストセンチウは属によってシストの形が異なる。

1) 顕微鏡観察

Gr、Gp、Hsともに同属の種は日本に分布しているが、調査対象植物に寄生する近似種は知られていないため、馬鈴しょに寄生していればGr又はGp、キャベツ、テンサイ、ハクサイ、ホウレンソウに寄生していればHsの可能性が極めて高い。

採集した疑義虫については、実体顕微鏡下で頸部や体表の様子を確認し、シ

ストセンチュウかどうか確認する。シストセンチュウであった場合は、形態（陰門、陰門錘などの形状）の観察又は2)の遺伝子診断を実施する。

シストに似たネダニが観察されることがあるが、ネダニの場合は脚があるので区別は容易（図 12、13）。また、昆虫等の卵であれば頸部や陰門錘は無い。

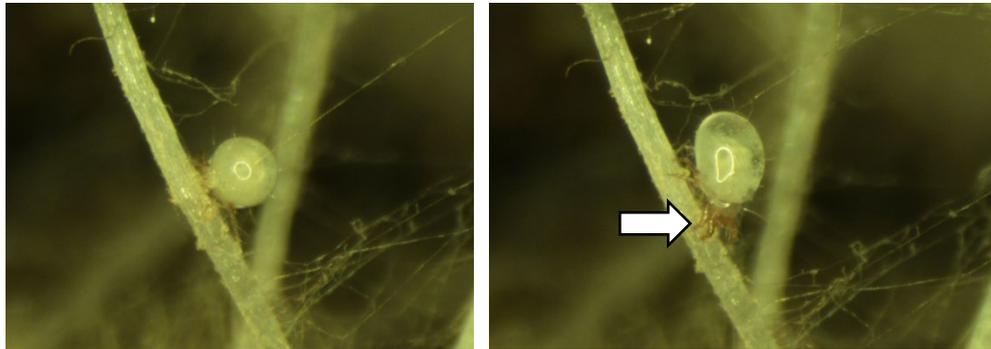


図 12、13 馬鈴しょの根に寄生するネダニの一種。

左の状態ではシストセンチュウと間違いやすいが、角度を変えて観察すると、右のように脚（矢印）が見え、ダニだと判る。

雌成虫が死んで体表が固く茶褐色になると、シストと呼ばれるようになる。

しかし、土壌中にはシストイドというシストに類似している物質（図 14）があり、土壌検診においてシストイドが検出されることがよくある。シストイドの多くは菌根の類と考えられている。シストイドは、表面の様子がシストと異なるほか、シストの頸部に当たる部分が非常に長い場合がある。表面の様子、陰門の有無を写真と比べながらよく観察する。陰門や肛門を傷つけないように注意しながらシストを割ると、シストであれば中から卵や第2期幼虫が出現することが多い（ただし、空シストの場合もある。）が、シストイドは殻が固い場合が多く、割っても卵や幼虫は出てこない。

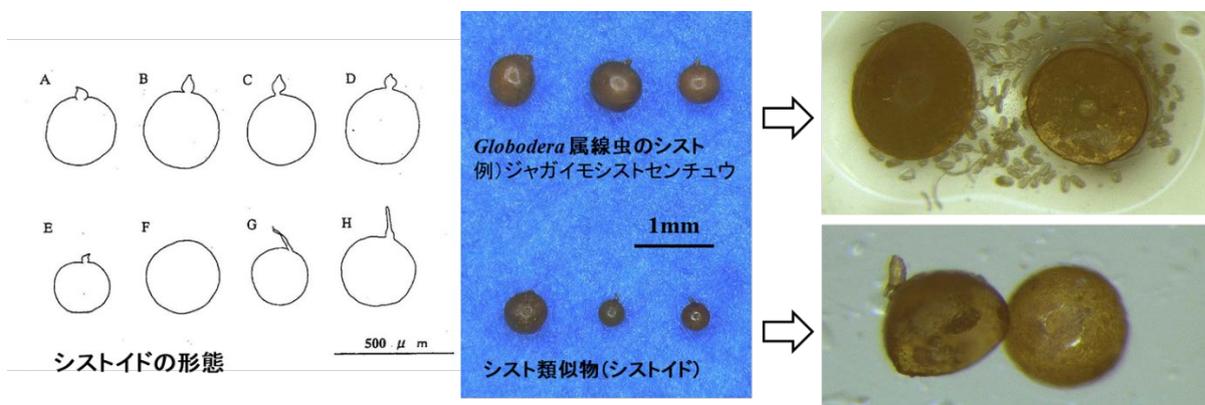


図 14 *Globodera* 属線虫のシストとシスト類似物（シストイド）との見分け方

Hs はシストに陰門錘があるので陰門の位置が比較的わかりやすいが(図 17)、Gr 及び Gp はシストが球形のため、陰門の位置が分かりにくい場合がある。

シストの形態による同定は熟練を要するため、線虫について専門知識を有する者に同定を依頼する。同定を依頼する際には、試料採取票(別記様式)を試料に添付する。

なお、参考までにシストでの同定方法を記載する。

Gr 及び Gp の場合、陰門及び肛門周辺の形態で種を区別するので、シストの陰門付近(図 15)を実体顕微鏡下で切り取り、プレパラートにして、生物顕微鏡(高倍率)で観察する。会陰部には陰門盤とその内側に陰門窓がある。また、陰門から数十 μm 離れたところに肛門がある(図 16)。陰門窓の直径(a)と陰門窓の端から肛門までの距離(b)の割合($b \div a$: グラネック値という。)が Gr は 3.0 ~ 4.5、Gp は 1.2 ~ 3.5(通常 3 以下)である。なお、*Globodera* 属は種によりシストの陰門盤と肛門の間のクチクラの隆起の数や長さが異なる他、第 2 期幼虫の形態も異なる。いずれも個体差(変異)があるので、多くの個体を観察する必要がある。

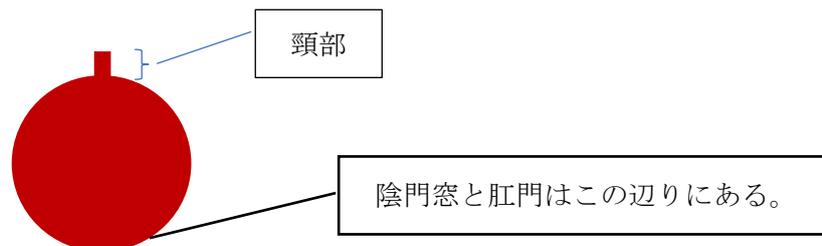


図 15 Gr や Gp のシストの模式図

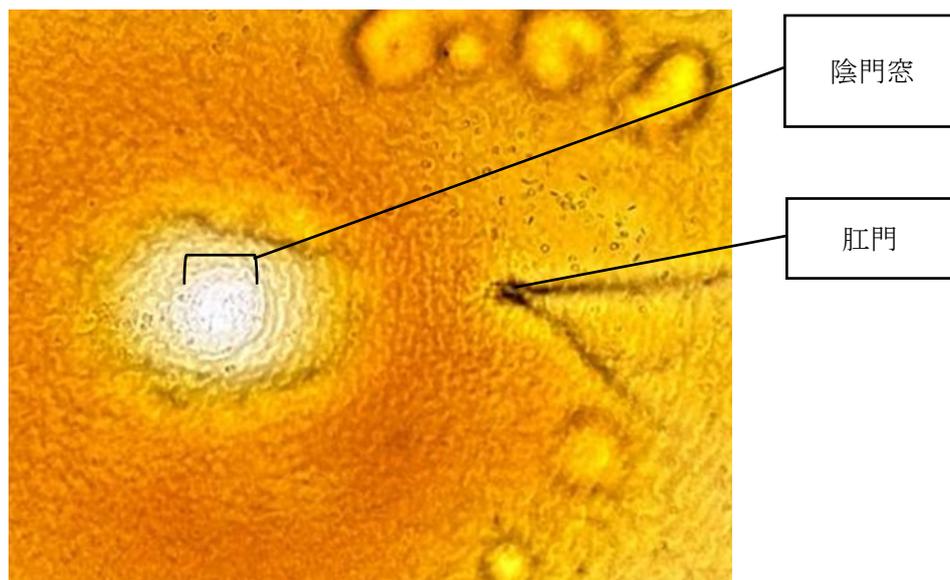


図 16 *Globodera* 属シストセンチウの陰門窓と肛門

Hs の場合、陰門錐の内部構造で他種と区別することができる。実体顕微鏡下で陰門錐 (図 17) を切り出し、プレパラートにし (陰門錐は高さがあるので、スライドガラスとカバーガラスの間にカバーガラスの小片を挟み、陰門錐がつぶれないよう工夫する。)、生物顕微鏡 (高倍率) で観察する。陰門錐内部に明瞭な下橋 (図 18) があり (下橋長は $80\sim 120\mu\text{m}$)、下橋の両端は分岐し、下橋の周囲に奥歯型の珠胞という突起 (図 19、20) が複数個並んでいる。なお、*Heterodera* 属は種により、下橋が発達しないもの、下橋の両端が分岐しないもの、珠胞が長楕円形のもの、密に並んでいるもの、珠胞が無いものなどがある (図 21、22)。また、珠胞の形態は個体差 (変異) があるので、多くの個体を観察する必要がある。

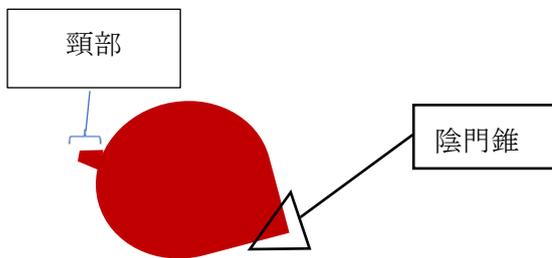


図 17 Hs のシストの模式図

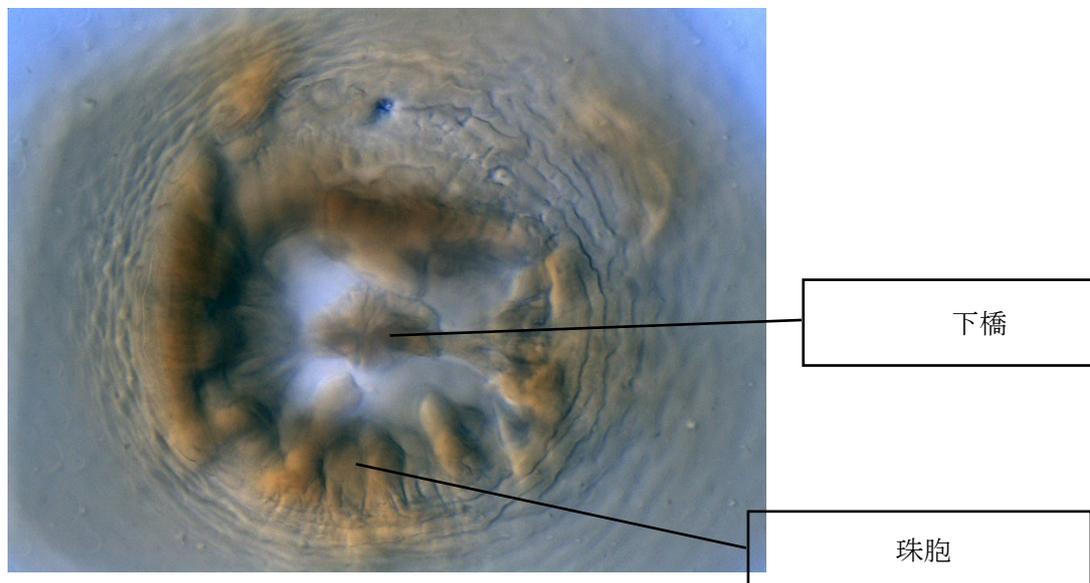


図 18 Hs 陰門錐内部の構造

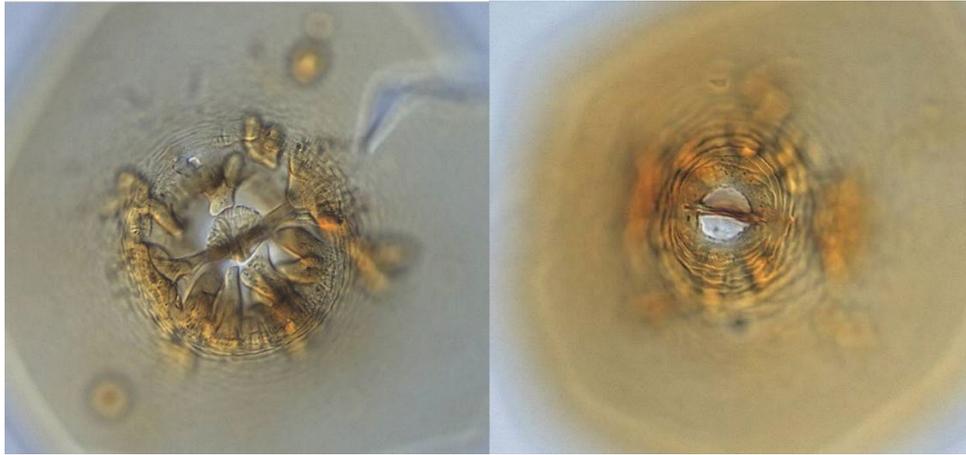


図 19 (左) Hs 陰門錐の頂点よりも下（陰門錐の中）にピンを合わせた図。
奥歯型の珠胞が並ぶ点の特徴。

図 20 (右) Hs 陰門錐の頂点にピンを合わせた図。

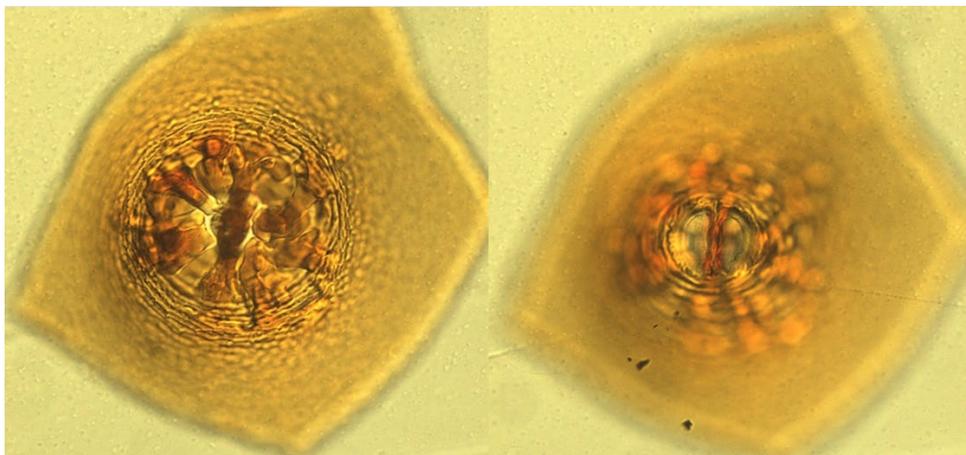


図 21 (左) ダイズシストセンチュウ (*Heterodera glycines*) の陰門錐。

陰門錐の頂点よりも下（陰門錐の中）にピンを合わせた図。

Hs とは異なり、細長い珠胞が陰門錐内部に多数存在することが特徴。

図 22 (右) 陰門錐の頂点にピンを合わせた図。

*本種は国内に分布し、ダイズ、インゲン、アズキなどマメ科植物等を寄主とする。

2) 遺伝子診断

生きた状態の雌成虫（又はシスト内に卵や第2期幼虫）が見つかった場合、PCRにより同定することが可能である。

ア) Gr 及び Gp

遺伝子診断法については、農業・食品産業技術総合研究機構から「ジャガイモシストセンチュウ類2種の同時判別技術標準作業手順書」や「LAMP法によるジャガイモシストセンチュウ類2種の識別技術」が公開されているので、詳細については当該手順書等を参照する。

「ジャガイモシストセンチュウ類 2 種の同時判別技術標準作業手順書」

https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/files/SOP21-012K20220301.pdf

「LAMP 法によるジャガイモシストセンチュウ類 2 種の識別技術」

https://www.naro.go.jp/project/results/4th_laboratory/harc/2020/harc20_s16.html

イ) Hs

本種は、今のところ種特異的プライマーによる同定法が確立していないため、PCR-RFLP による識別法 (Amiri et al. (2002)、Subbotin et al. (2010)) を紹介する。本法の場合、雌成虫 (又はシスト) 1 個体ずつ実施する必要がある。

○DNA 抽出

ここでは DNA 抽出キットを用いた核酸抽出法 (Tanaka et al. (2012) を一部改変) を例に挙げる。

- a) スライドガラス上に滅菌蒸留水を $2 \mu\text{l}$ 載せ、実体顕微鏡下で、蒸留水に雌成虫 1 個体 (幼虫や卵でも可) を入れる。その後、蒸留水が蒸発して虫体のみとなったら、ピンセットを用いて、約 1mm 角の滅菌ろ紙片で虫体を押しつぶす。
- b) 0.2ml または 0.5ml チューブに $10 \mu\text{l}$ の DNA 抽出バッファー (キットに添付されている Enzyme solution: Lysis solution: TE (pH8.0) を 5:4:100 の割合で混合したもの) を入れ、その中へ①のろ紙片を入れる
- c) サーマルサイクラー等で熱処理 (60°C、20 分) を行う。
- d) 滅菌水 90 μl を加えて混合し、使用時まで -20°C で保存する。

○PCR 1

・プライマー (Joyce et al. (1994))

TW81 (5' -GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3')

AB28 (5' -ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3')

・反応条件 (Amiri et al. (2002) を改変)

94°C · 2 分 → [94°C · 30 秒 → 55°C · 1 分 → 72°C · 30 秒] × 35 → 4°C

・電気泳動

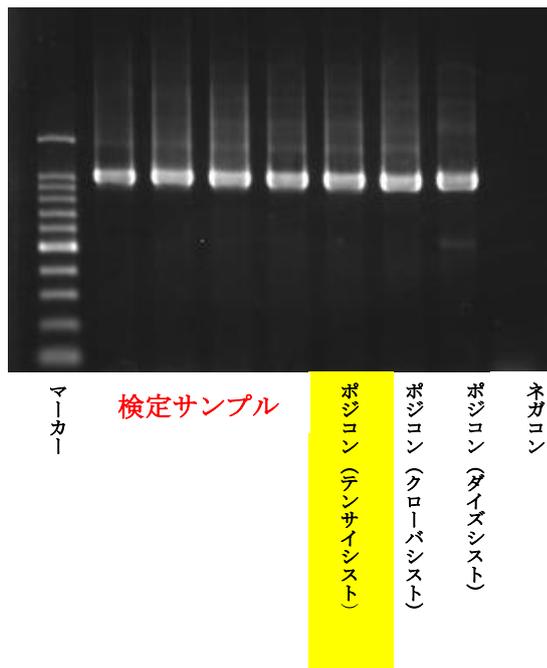


図 23 泳動パターン

○制限酵素処理

得られた PCR 産物を制限酵素 (*Mva I* (*BciT130 I*) 及び *ScrF I*) で反応 (37°C 4 時間) させ、再度電気泳動する (制限酵素が失活しないよう、反応液の調整は氷上で行う。)

- ・電気泳動：泳動パターン、制限酵素断片長を比較し、同定する。

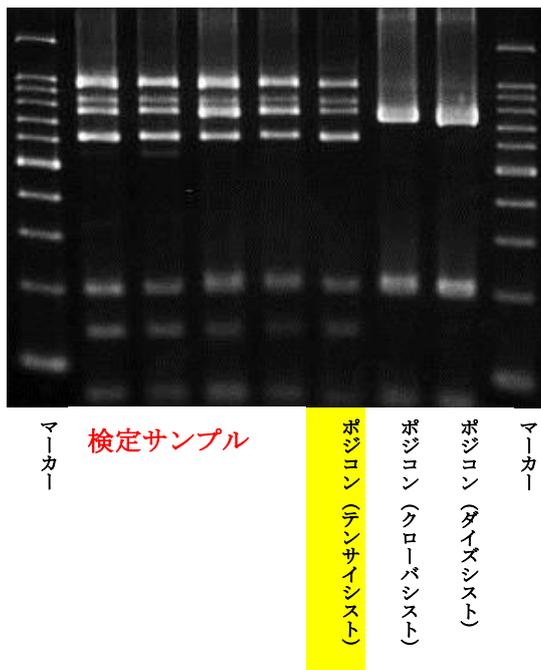


図 24 *Mva I* (*BciT130 I*) 処理の泳動パターン

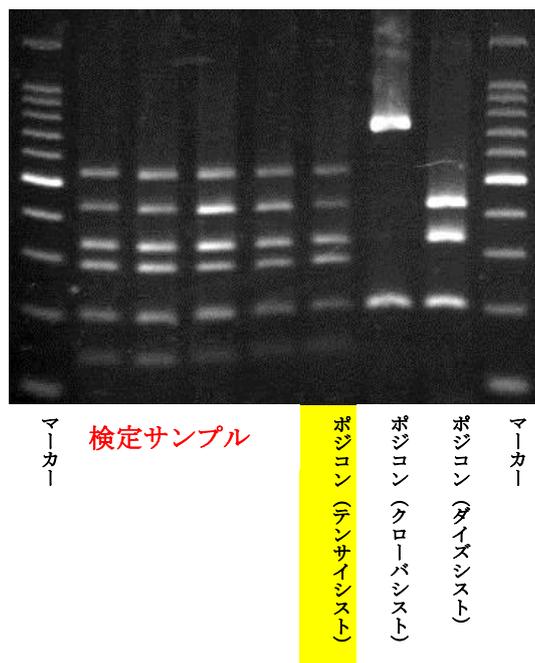


図 25 *ScrFI* 処理の泳動パターン

表 3 *Heterodera* 属シストセンチウの PCR-RFLP による制限酵素断片長*

	PCR産物 サイズ	<i>MvaI</i> (BicT130I)	<i>ScrFI</i>
テンサイシスト	1020	950, 810, 760, 620, 190, 140, 70	530, 430, 330, 290, 200, 140, 70
クローバシスト	1030	760, 200, 70	760, 200, 70
ダイズシスト	1030	760, 200, 70	430, 330, 200, 70

* 断片長のデータは Subbotin *et al.* (2010) および Amiri *et al.* (2002) からの引用。
 数値は一桁目を四捨五入し、一部は泳動パターンの原図から読み取った。
 バンドによっては薄くて確認しづらい時もあるので注意すること。

<参考文献>

Subbotin, S. A. *et al.* (2010) Systematics of Cystnematodes (Nematoda: Heteroderinae), Nematology monographs and perspectives volume 8B.

Amiri, S. *et al.* (2002) European Journal of Plant Pathology 108:497-506.

○PCR 2 (PCR 1 を改良)

- ・プライマー (Joyce et al. (1994) を改変)
 TW81m (5' -CGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGA-3')
 AB28 (5' -ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3')
- ・反応条件 (Amiri et al. (2002) を改変)
 94°C・2分 → [94°C・30秒 → 64°C・30秒 → 72°C・1分] × 35 72°C・5分
- ・電気泳動 (PCR 1 に同じ)

○制限酵素処理

得られた PCR 産物を制限酵素 (FastDigest *Alu I* (37°C、16 時間) および *Hinf I* で反応 (37°C、15 分~30 分) させ、再度電気泳動する (図 26)。制限酵素が失活しないよう、反応液の調整は氷上で行う。

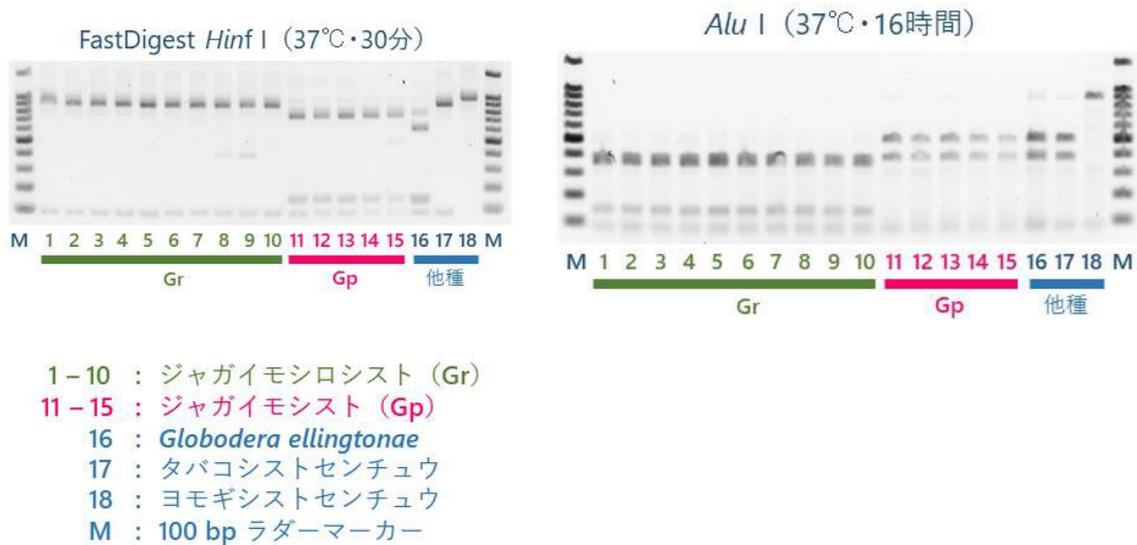


図 26 FastDigest *Alu I* (37°C、16 時間) および *Hinf I* で処理後の電気泳動パターン (防疫指針委託事業成果)

ウ 試料採取及び送付時の注意事項

生きたシストを送付する場合は、散逸しないよう、管ビン等に入れ、さらにポリ袋に入れるなど、厳重に封入する。遺伝子検査の場合は、アルコール液浸状態でも問題無く、かつ、シストが死滅しているため、理想的である（宅配便等で液浸標本を送付する場合は輸送業者に確認すること。）。土壌中のシストを送付する場合は、二重にした厚手のビニール袋に封入し丈夫な段ボール箱に入れるなどして、送付途中で散逸しないよう厳重に梱包する。

エ 被害写真等



図27 Gpの被害状況。ほ場内ではパッチ状（黒枠内）に被害株がある。



図28 Gpによる被害株。落花期には下葉が枯れ上がる。



図29 馬鈴しょの根に寄生しているGpの雌成虫及びシスト。

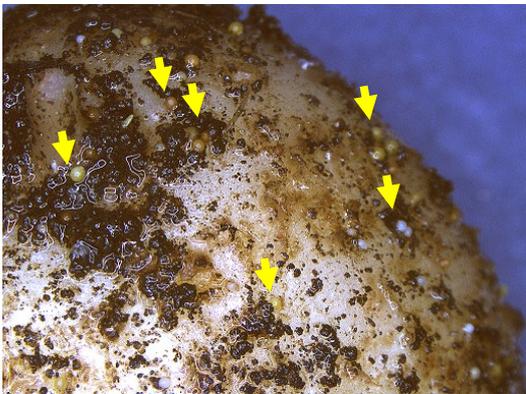


図30 馬鈴しょの塊茎に寄生しているシストセンチュウの雌成虫（矢印）。

発生密度が高いと馬鈴しょの塊茎にも寄生することがある。なお、矢印以外にも多数寄生しているのが見える。



図31 Hsの被害状況（左：健全、右：被害株）（長野県野菜花き試験場提供）

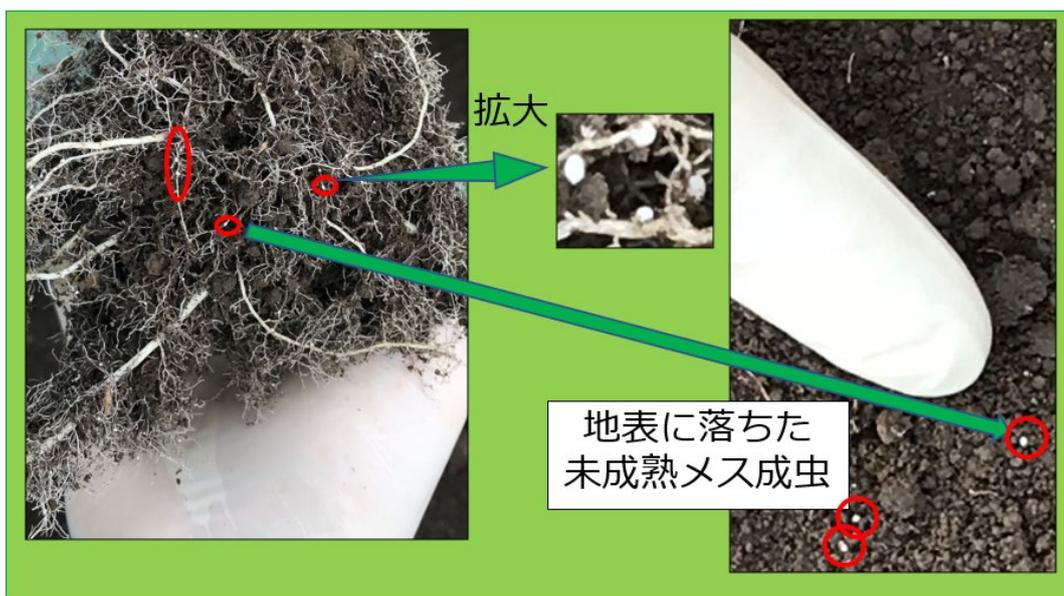


図32 キャベツの根に付着しているHsの雌成虫。(防疫指針委託事業成果)



図33 試験容器内でのハクサイ根へのHsの寄生状況。(防疫指針委託事業成果)

オ 対象病害の解説

1) ジャガイモシストセンチュウ

学名：*Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Behrens, 1975

英名：yellow potato cyst nematode、golden nematode

分布

アジア：インド、インドネシア、スリランカ、パキスタン、フィリピン、イスラエル、イラン、トルコ、レバノン

欧州：アイスランド、アイルランド、アゼルバイジャン、アルメニア、イタリア、ウクライナ、ウズベキスタン、英国、エストニア、オーストリア、オランダ、カザフスタン、キプロス、ギリシャ、キルギス、クロアチア、ジョージア、スイス、スウェーデン、スペイン、スロバキア、スロベニア、タジキスタン、チェコ、デンマーク、ドイツ、ロシア等

アフリカ：アルジェリア、エジプト、カナリア諸島、ケニア、南アフリカ共和国

北米：アメリカ合衆国、カナダ

中南米：アルゼンチン、エルサルバドル、グアテマラ、コスタリカ、チリ、ニカラグア、パナマ、ベネズエラ、ベリーズ、ペルー、ボリビア、ホンジュラス、メキシコ

大洋州：オーストラリア、ニュージーランド
宿主植物：アカザ属、ナス科（馬鈴しょ、トマト、ナスなど）

寄主植物：あかざ属及びナス科（馬鈴しょ、トマト、ナスなど）

形態：大きさ

シスト：体形はほぼ球形。茶褐色～褐色（図35、36）。シストの体長（頸部を除く。）は 0.45 ± 0.05 mm、体幅は 0.38 ± 0.06 mmである。陰門窓の直径は 19.0 ± 2.0 μ m、肛門から陰門窓までの長さ 66.5 ± 10.3 μ m、グラネック値 3.6 ± 0.8 。

雌成虫：体形は初めは紡錘形で、シストになる直前になると球形となり、体長・体幅ともシストとほぼ同じになる（図34）。

雄成虫：体形は糸状。体長 $890-1,270$ μ m、排泄口の体幅 28 ± 1.7 μ m、口針長 26 ± 1.0 μ m、尾長 5.4 ± 1.0 μ m、交接刺長 35 ± 3.0 μ m。

第2期幼虫：体形は糸状。体長は 468 ± 100 μ mである。排泄口体幅は 18 ± 0.6 μ m、口針長は 22 ± 0.7 μ m。尾長は 44 ± 12 μ m、尾端透明部長は 26.5 ± 2 μ mである。

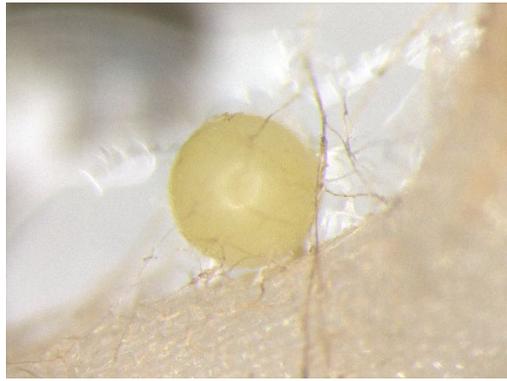


図34 馬鈴しょの根に寄生しているGrの雌成虫



図35 馬鈴しょの根に付着しているGrのシスト



図36 Grのシスト

生態：

a) 繁殖様式

本種は雌雄が存在し有性生殖する。雌成虫は、200～500個程度の卵を産卵する。

b) 年間世代数

馬鈴しょでは、通常1作の間に1世代が経過するとされる。また、日本国内の研究では、恒温条件下で、土壌温度16℃で49～51日、22℃で37～39日で1世代を完了するとの報告がある。

c) シストの生存期間

*Globodera*属線虫のシスト内卵内幼虫は、硬化したシストと卵殻に包まれて、寄主植物がない場合などでは休眠状態となり、土壌中で15年以上生存が可能である。寄主植物の根から分泌されるふ化促進物質の刺激などにより、休眠が打破され、第2期幼虫がふ化する。シスト内卵内幼虫の年間平均減少率は、Grでは30%、Gpでは20%と見積もられている。

分散：

a) 自然分散

土壌中における線虫自身の移動は、第2期幼虫で最大でも1 m程度である。また、汚染土壌では、表面が乾燥していると風により土壌とともに飛ばされたり、雨水・洪水によってシストが流されたりしてシストが移動分散する。汚染土壌が家畜類や野生の鳥獣類の足に付着して移動する場合もある。

b) 人為分散

線虫に寄生された馬鈴しょ塊茎、寄主植物地下部（苗等を含む。）、汚染土壌、汚染土壌が附着した植物・農業機械（トラクター等）・農機具・収穫用コンテナ・人の靴・車両（タイヤや跳ねた泥など）等の移動により、移動分散する。なお、本線虫は、ペルーから日本に輸入されたグアノ肥料内にシストが混入していたことで、日本国内に伝搬したとの報告がある。

防除：D-D剤、メチルイソチアネート等のくん蒸剤やオキシムカルバメート等の非くん蒸剤による化学的防除のほか、輪作や抵抗性品種、対抗植物を利用した耕種的防除、湛水や蒸気処理等の物理的防除が知られている。最近では、人工合成したふ化促進物質による防除の実証試験が行われている。

<参考文献>

令和元年度 国際基準を踏まえた防疫指針策定のための調査委託事業

事業報告書（令和2年3月13日）国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業研究センター

Globodera rostochiensis（ジャガイモシストセンチュウ）に関する病害虫リスクアナリシス報告書（令和3年2月3日版）農林水産省横浜植物防疫所

2) ジャガイモシロシストセンチュウ

学名：*Globodera pallida* Stone, 1973

英名：white potato cyst nematode、pale potato cyst nematode、pale cyst nematode

分布：

アジア：インド、パキスタン

中東：トルコ

欧州：アイスランド、アイルランド、アゼルバイジャン、アルメニア、イタリア、ウクライナ、ウズベキスタン、英国、エストニア、オーストリア、オランダ、カザフスタン、キプロス、ギリシャ、キルギス、ジョージア、スイス、スウェーデン、スペイン、ロシア等

アフリカ：アルジェリア、カナリア諸島、ケニア、モロッコ

北米：米国、カナダ

中南米：エクアドル、コスタリカ、コロンビア、チリ、パナマ、フオーランド諸島、ベネズエラ、ペルー、ボリビア

大洋州：ニュージーランド

(国内では現在、北海道の一部地域で発生が確認されており、当該地域において植物防疫法に基づく緊急防除を実施中。)

寄主植物：なす科 (馬鈴しょ、トマト、ナスなど)

形態：

シスト：体形はほぼ球形。茶褐色～褐色 (図39)。シストの体長 (頸部を除く。) は 0.579 ± 0.07 mm、体幅は 0.534 ± 0.066 mmである。陰門窓の直径は $24.5 \pm 5.0 \mu\text{m}$ 、肛門から陰門窓までの長さ $49.9 \pm 13.4 \mu\text{m}$ 、グラネック値 2.1 ± 0.9 。

雌成虫：体形は初め紡錘形 (図37) で、シストになる直前になると球形となり、体長・体幅ともシストとほぼ同じになる (図38)。

雄成虫：体形は糸状。体長 $1,198 \pm 104 \mu\text{m}$ 、排泄口の体幅 $28.4 \pm 1.3 \mu\text{m}$ 、口針長 $27.5 \pm 1.0 \mu\text{m}$ 、尾長 $5.2 \pm 1.4 \mu\text{m}$ 、交接刺長 $36.3 \pm 4.1 \mu\text{m}$ 。

第2期幼虫：体形は糸状。体長は $486 \pm 23 \mu\text{m}$ である。排泄口体幅は $19.3 \pm 0.6 \mu\text{m}$ 、口針長は $23.8 \pm 1.0 \mu\text{m}$ 。尾長は $51.1 \pm 2.8 \mu\text{m}$ 、尾端透明部長は $26.6 \pm 4.1 \mu\text{m}$ である。

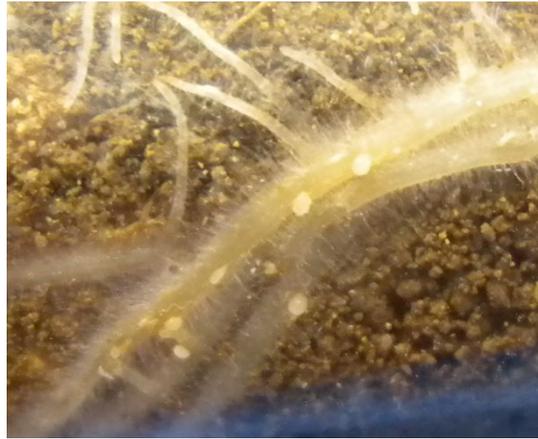


図37 馬鈴しよの根に寄生しているGpの雌成虫

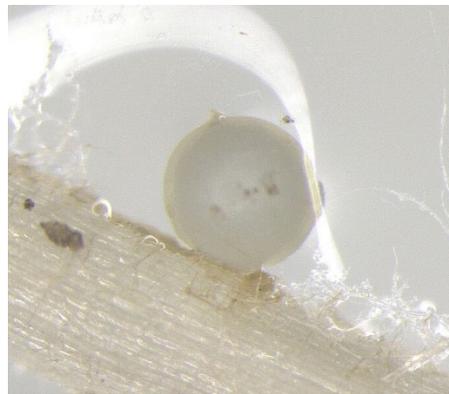


図38 馬鈴しよの根に寄生しているGpの雌成虫

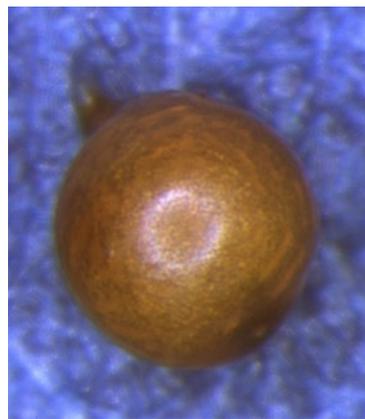


図39 Gpのシスト

生態：

a) 繁殖様式

本種は雌雄が存在し有性生殖する。雌成虫は、200～500個程度の卵を産卵する。

b) 年間世代数

馬鈴しょでは、通常1作の間に1世代が経過するとされる。

c) シストの生存期間

*Globodera*属線虫のシスト内卵内幼虫は、硬化したシストと卵殻に包まれて、寄主植物がない場合などでは休眠状態となり、土壤中で15年以上の生存が可能である。寄主植物の根から分泌されるふ化促進物質の刺激などにより、休眠が打破され、第2期幼虫がふ化する。シスト内卵内幼虫の年間平均減少率は、Grでは30%、Gpでは20%と見積もられている。

分散：

a) 自然分散

土壤中における線虫自身の移動は、第2期幼虫で最大でも1 m程度である。また、汚染土壤では、表面が乾燥していると風により土壤とともに飛ばされたり、雨水・洪水によってシストが流されたりしてシストが移動分散する。汚染土壤が家畜類や野生の鳥獣類の足に付着して移動する場合もある。

b) 人為分散

線虫に寄生された馬鈴しょ塊茎、寄主植物地下部（苗等を含む。）、汚染土壤、汚染土壤が附着した植物・農業機械（トラクター等）・農機具・収穫用コンテナ・人の靴・車両（タイヤや跳ねた泥など）等の移動により、移動分散する。

防除：D-D剤等のくん蒸剤やオキサミル等の非くん蒸剤による化学的防除のほか、輪作や抵抗性品種、対抗植物を利用した耕種的防除、湛水や蒸気処理等の物理的防除が知られている。最近では、人工合成したふ化促進物質による防除の実証試験が行われている。

<参考文献>

令和元年度 国際基準を踏まえた防疫指針策定のための調査委託事業事業報告書（令和2年3月13日）国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業研究センター

Globodera pallida（ジャガイモシロシストセンチュウ）に関する病害虫リスクアナリシス報告書（令和3年12月22日版）農林水産省横浜植物防疫所

3) テンサイシストセンチュウ

学名：*Heterodera schachtii* Schmidt, 1871

英名：beet cyst nematode

分布：

アジア：大韓民国、パキスタン 中東：イスラエル、イラク、イラン、シリア、トルコ、ヨルダン

欧州：アイルランド、アゼルバイジャン、アルバニア、アルメニア、イタリア、ウクライナ、ウズベキスタン、英国、エストニア、オーストリア、オランダ、カザフスタン、ギリシャ、キルギス、クロアチア、コソボ、ジョージア、スイス、スウェーデン、スペイン、スロバキア、スロベニア、セルビア、タジキスタン、チェコ、デンマーク、ドイツ、トルクメニスタン、ハンガリー、フィンランド、フランス、ブルガリア、ベラルーシ、ベルギー、ポーランド、ロシア等

アフリカ：エジプト、カーボヴェルデ、カナリア諸島、ガンビア、セネガル、南アフリカ共和国、モロッコ、リビア

北米：アメリカ合衆国、カナダ 中南米：チリ、ペルー、メキシコ

大洋州：オーストラリア、ニュージーランド、ハワイ諸島

(国内では現在、長野県の一部地域で発生が確認されており、当該地域において植物防疫法に基づく緊急防除を実施中。)

寄主植物：フダンソウ属、ハウレンソウ、アブラナ属、シヨクヨウダイオウ、トマト

形態：

シスト：外形はレモン形。茶褐色～褐色。その形態には変異があり（図41）、シストの体長（頸部を除く。）は0.5～0.9mm、体幅は0.3～0.6mmである。シスト表面には網目状の構造がある。通常、シスト内には卵及び第2期幼虫が存在する（図40）。

雌成虫：体長・体幅ともシストとほぼ同じ。レモン形。成熟雌成虫の体色は白色である。

雄成虫：体形は糸状。体長1,119-1,438 μm 、体幅28-42 μm 、口針長29 μm 、交接刺長34-38 μm 。

第2期幼虫：体形は糸状。体長は450(435-492) μm である。最大体幅は約21-22 μm 、口針長25(24.4-25.7) μm 。尾は円錐状で、尾長は47(38-60) μm 、尾端透明部長は26(20-30) μm である。

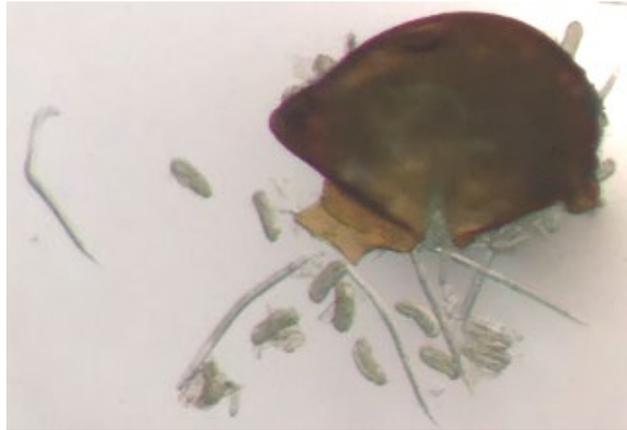


図40 Hsのシストから出てきた卵及び第2期幼虫（防疫指針委託事業成果）



図41 Hsのシスト及び雌成虫（防疫指針委託事業成果）

生態：

a) 繁殖様式

本種は雌雄が存在し有性生殖を行うと考えられるが、詳細は不明。雌成虫は、体外にゼラチン状物質を排出し、その中に1～200個程度の卵を産卵する。その後、雌成虫はシストを形成し、シストは数個～600個程度の卵を内包する。米国で行われた調査では本種500頭のシスト内に平均286個の卵が含まれていたことが報告されている。

b) 年間世代数

米国カリフォルニアでは、テンサイ1作期間に3～5世代経過する。また、ドイツ北部の気象条件では、年間3世代としている。本種の発育適温は18～28℃で、最適温度は25℃とされている。なお、本種は好適条件下では、約30日間で生活史を完了する。

c) シストの生存期間

本種は土壤中にシストの状態でも6年以上の生存が可能とされている。ほ場調査では、テンサイを栽培してから12年後の土壤にも低い個体数ながら本種が生存していたとする報告がある。なお、休耕区又は非寄主植物のほ場では、気候や天敵により変動するものの、本種の頭数が年間40～60%減少するとの報告もある。

分散：

a) 自然分散

土壌中における線虫自身の移動距離は、一般に1年間あるいは一生のうちに数～数十cmと考えられており、本種の第2期幼虫も同程度と考えられる。また、シストセンチュウは、孵化した第2期幼虫が根に侵入後、根に定着し移動しないが、雌成虫が死亡後にシストとなると、風によって飛ばされたり、雨水、洪水によって流されたりして移動分散する。汚染土壌が家畜類や野生の鳥獣類の足に付着して移動する場合もある。

b) 人為分散

寄主植物地下部、本種に汚染された土壌（汚染土壌）、汚染土壌が附着した植物・農業機械（トラクター等）・農機具・収穫用コンテナ・人の靴・車両（タイヤや跳ねた泥など）等の移動により、移動分散する。インドでは、輸入検疫で、寄主植物の種子と種子の間（すき間）にシストが夾雑物と一緒に混入しているのが発見されている。日本においても、輸入検疫で、ハウレンソウ種子からシストの発見事例がある。

防除：メチルイソチオシアネート・D-D油剤、D-D剤、クロルピクリンくん蒸剤等のくん蒸剤やイミシアホス粒剤、ホスチアゼート粒剤等の非くん蒸剤による化学的防除のほか、輪作や抵抗性品種、対抗植物を利用した耕種的防除、太陽熱消毒等の物理的防除が知られている。

<参考文献>

令和元年度 国際基準を踏まえた防疫指針策定のための調査委託事業事業報告書（令和2年3月13日）国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業研究センター

Heterodera schachtii（テンサイシストセンチュウ）に関する病害虫リスクアナリシス報告書（平成31年3月25日版）農林水産省横浜植物防疫所

10. ジャガイモがんしゅ病菌 : *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Percival

ア 調査

【調査対象植物】

馬鈴しょ

【調査時期】

調査は、生産ほ場又は収穫物の貯蔵施設において収穫期から貯蔵中に年1回実施する。

【調査方法及び調査内容】

- 1) 調査地点は各都道府県内で偏りが生じないことを留意し、設定する。
- 2) 本病害は地際部以外の地上部（茎の基部や露出した塊茎など）に症状が出にくいことが特徴であるが、生産ほ場において地際部に特徴的なこぶのある株が見つかった場合、本病を疑い、地中の茎基部、塊茎（芽付近）やほふく枝（ストロン）先端などを確認する。調査は、ほ場あたり10株程度とする。

貯蔵施設において調査を実施する場合には、10株分程度の塊茎を対象に病徴写真を参考にして、本病に似た症状がないか目視で確認する（廃棄も置き場等を確認場所の一部に加えることも可。）。

- 3) 感染が疑わしい場合は、発症部位や発症部位を含む塊茎や株全体、周囲の様子等をデジタルカメラ等で撮影した上で、試料を採取し以下の形態学的診断又は遺伝子診断を実施する。

【調査に当たっての留意事項】

1) 発見のポイント（病徴）

ア) 主として塊茎（芽が起点）、ほふく枝（先端）、地際部（地上や地中の茎基部）に病徴（こぶ）が形成される。

イ) こぶの形状は様々だが、主に球状～不規則（カリフラワー状など）、大きさは豆粒大～こぶし大程度。地上部に形成されたこぶは初期、緑色～褐色だが、やがて成熟すると黒色に変化する。地下部に形成されたこぶは白色～茶色で、腐敗すると黒色になる。

ウ) 若い発達中の塊茎に感染すると、こぶはスポンジ状となりほとんど認識できない状態に変化する。成熟した塊茎に感染すると特徴的ないぼ状、カリフラワー様の突起が発達する。同様ないぼ状こぶは、ほふく枝上にも生じる。

エ) 根への感染は知られていない。

- 2) 本病は地上部に症状が出ないことが多い病害である。侵入調査の調査時

期ではないものの、通常の栽培環境下で平時よりも異常に生育が衰え、地際や地下部等にこぶを認めた場合には、本菌の感染を疑い、ア【調査方法及び調査内容】3)の対応を行う。

イ 同定診断手法

採取又は送付された試料について、以下の手順でいずれかの診断を実施して本病菌を同定する。

1) 形態学的診断（病徴観察及び顕鏡観察）

類似症状と識別するため、まず実体顕微鏡でがんしゅ病の特徴を有するこぶを観察する。また、こぶから切片を作成し、生物顕微鏡で本病菌の休眠孢子等を確認する。また、馬鈴しょのこぶから出る *Synchytrium* 属菌遊走子を確認することにより、*S. endobioticum* の診断及びその生存の確認を行うことができる。

ア) こぶ切片の観察

バケツ等を下に配置して、流水でこぶ表面の土壌を洗浄する（洗浄水は滅菌する。）。洗浄したこぶ（病徴部）をメス又はカミソリで極力薄く（長さ3mm、厚さ1mm未満）切り出し、切片をスライドガラス上に置き、乳酸又はラクトフェノールに封入して顕微鏡（400倍程度）で観察する（スライド内に気泡が含まれる場合は、ライター等で軽くあぶって気泡を除く。）。エ) 病徴写真の形態的特徴等を参考に、病徴や確認された休眠孢子のう等の形態を比較し本病菌を形態的に診断する。

イ) 生きた *Synchytrium* 属菌遊走子が馬鈴しょのこぶから出ることによる

S. endobioticum の診断

バケツ等を下に配置して、流水（15℃程度）でこぶ表面の土壌等を軽く洗浄する（洗浄水は滅菌する。）。

白色から緑色、褐色を呈した若いこぶ（黒変したこぶは使用に不向き）を切り出し、約15℃にした Dill and Fuller の DS/4 溶液（DS 溶液すなわち KH_2PO_4 ; $5 \times 10^{-4}\text{M}$ 、 K_2HPO_4 ; $5 \times 10^{-4}\text{M}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$; $5 \times 10^{-4}\text{M}$ 、 CaCl_2 ; $5 \times 10^{-4}\text{M}$ 、 MgCl_2 ; $5 \times 10^{-4}\text{M}$ を脱イオン水で3倍に希釈した溶液）にこぶの切り口が水面に触れないように設置する（切り口からの浸みだし液が水中に混ざることにより、遊走子の放出に影響を与えないため。）。

設置して約60～90分後までに、検鏡により当該溶液中に次の特徴を有する小型の遊走子を確認されれば本菌とする。遊走子は、孢子のうから出たばかりは球形、泳ぎだすと洋ナシ形で、直径1.5-2.2 μm 、後部に17 μm までの長さの尾形鞭毛1本を持つ。水封入での観察では明色の脂質（油点）を有する。

<参考文献>

L. Lange and L.W. Olson(2011):The zoospore of *Synchytrium endobioticum*,

2) 遺伝子診断

本病菌の遺伝子診断法による検定は、以下の手順で実施する。

ア) 核酸の抽出

・試料準備

採取した疑似症状植物から、病斑部（最大 100mg）をカミソリ等で切り出し、試料とする。

・核酸抽出

市販の核酸抽出キットを用いる。

・サンプルの保管

抽出した核酸及び試料は検定終了まで -20°C で保管する。

イ) コンベンショナル PCR 法 (EPP0. (2017) PM 7/28 (2))

以下のプライマーを使用して PCR を行い、1.5%アガロースゲルを使用した電気泳動法等により、増幅予定長の産物が確認された場合、陽性とする。

表・プライマー

プライマー名	塩基配列 (5' -3')	増幅 サイズ	アニーリング 温度	参考文献
F49	CAACACCATGTGAACTG	472	57°C	EPP0. (2017) PM 7/28 (2)
R502	ACATACACAATTCGAGTTT			

・コントロールの準備

・陰性分離コントロール(NIC)：健全なジャガイモから抽出した DNA 溶液。

(核酸抽出の際のコンタミネーションをモニターするためのもの)

・陽性分離コントロール(PIC) (ある場合)：罹病ジャガイモから抽出した DNA 溶液。

(十分な量と質の核酸が抽出されていることを確認するためのもの)

・陰性増幅コントロール(NAC)：反応調整に用いた水。(PCR 反応溶液の調整中のコンタミネーションによる擬陽性を排除するためのもの)

・判定 (EPP0. (2017) PM 7/28 (2) の場合)

アガロースゲル電気泳動により、増幅産物のサイズ (472bp) を確認する。

陽性コントロールと同サイズ (472bp) の増幅産物が得られた場合、当該サンプルを陽性と判定する。増幅産物が得られなかった場合、又は陽性コントロールと異な

るサイズの増幅産物が得られた場合は、陰性と判定する。ただし、矛盾点や不明瞭な点がある場合は、再試験を行う。

ウ 試料採取及び送付時の注意事項

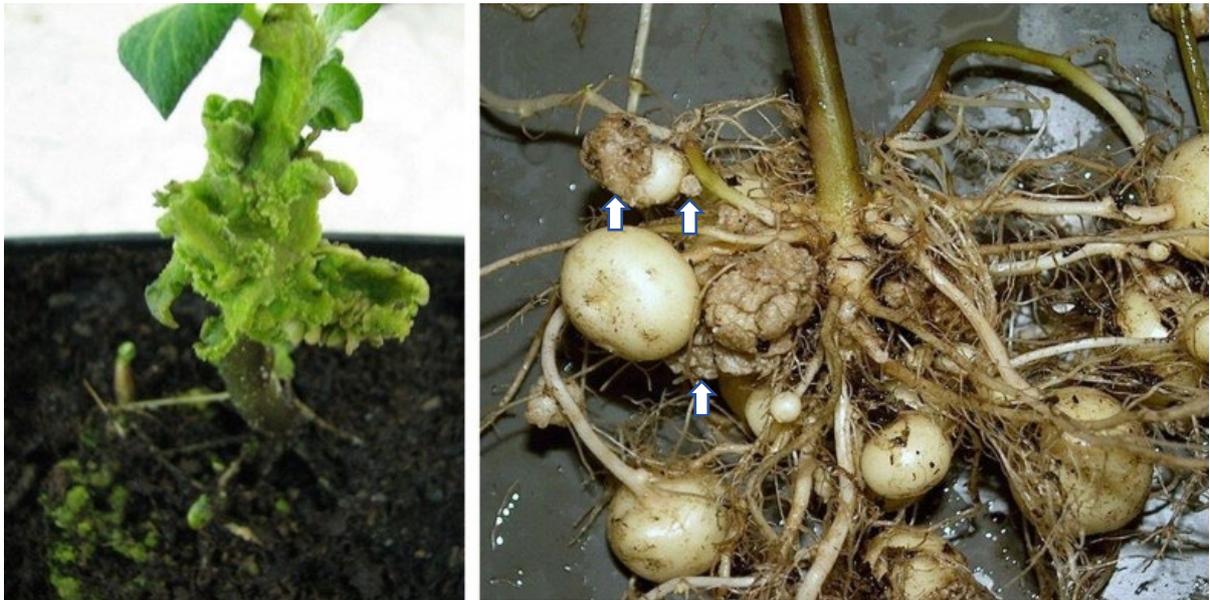
- 1) 試料を採取する場合は、本菌が検出された場合を想定し、試料採取前に目印を付ける。
- 2) 疑似症状を呈した馬鈴しょの茎や塊茎を採取する。異常のない地上部（茎葉、花、果実）は、適宜取り除く。
- 3) 調査を実施した園地内に病徴を示す株が複数ある場合は、ほ場ごとに手袋を交換し、採取に使用した器具類は試料ごとに70%エタノール又は有効塩素濃度1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液等により消毒する。
- 4) 採取した試料は、試料の確認に必要な事項（採取月日、採取場所、写真等）を記録した試料採取票（別記様式）を添付した上で、ビニール袋に入れ、輸送するまでクーラーボックス等（4℃）に保管する。なお、長期間保存する場合は、雑菌の繁殖や腐敗を防ぐため、過湿とならないように十分表面を乾燥させる。
- 5) 試料の採取部位、病徴及び採取票に記録した内容等は、調査野帳に記録する。
- 6) 採取した試料は、散逸しないように厳重に梱包し、保冷剤を入れて低温に保った保冷箱等に収容し、冷温のまま送付する。
- 7) 疑似症状を認めたほ場において、以降の調査を行うがある場合は、オーバーシューズ等の着用、取り換え等分散防止に十分留意する。
- 8) 試料を採取する際、ほ場から本病菌を持ち出さないように、本病菌の胞子が付着した可能性のある器具機材、長靴等は次により消毒を行うこと。
 - ア) 消毒作業にあたり、飛沫による汚染や消毒作業の人体の影響を考慮し、適宜、カップ、作業ゴーグル、マスク、手袋、オーバーシューズ等の保護具を着用すること。
 - イ) 消毒液として、0.15%第4級塩化アンモニウム化合物溶液（塩化ベンザルコニウム等）もしくは0.5%次亜塩素酸塩溶液を使用する。なお、取扱いの際は各薬剤の使用上の注意事項を確認すること。
 - ウ) 消毒液はスプレー散布もしくは直接浸漬し、対象に消毒液を十分浸潤させること。なお、土壌が付着している場合は、付着した状態で土壌に消毒液を十分浸潤させたのち除去する。大型の農機等は、土壌の付着しやすい底面やタイヤの周りを念入りに確認し消毒すること。
 - エ) 消毒後は、すすぎをせずにそのまま風乾させる。すすぎが必要な場合は、消毒後1時間以上経過した後にすすぎを行う。
 - オ) 作業に使用した保護具等は、使用后汚染の可能性を考慮して、同様に消毒をするか、適切に廃棄する。

<参考文献>

Quintero, T. and Rodriguez, J. (2020) New Pest Response Guidelines
Synchytrium endobioticum (Schilb.) Percival Potato Wart Disease.
USDA. (online) Available from
<https://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/potato/downloads/pvy/nprg-synchytrium-endobioticum.pdf>(Last accessed_19 Aug.
2022)

エ 病徴写真等

1) 病徴



(Adolf B. et al. (2020)から引用)

Creative Commons Attribution 4.0 International License
クリエイティブコモンズ 表示 4.0 国際 (CC BY 4.0)

図1 (左) 地上部の症状、こぶは緑色になる。(Pathotype 2(Ch1)、品種 : Cykada)

図2 (右) 地下部の症状。塊茎やほふく枝 (ストロン) にこぶ (矢印) が生じているのが見える。(Pathotype 18(T1)、品種 : Deodara)



Central Science Laboratory, Harpenden, British Crown, Bugwood.org

Creative Commons Attribution-Noncommercial 3.0 License.

クリエイティブコモンズ 表示 - 非営利 3.0 アメリカ合衆国 (CC BY-NC 3.0 US)

図3 塊茎に発達した症状。いくつかのこぶ症状は、既に腐敗し始めている。

2) 本菌の形態的特徴

ア) 休眠孢子のうち

無隔壁、金茶色、三層の壁を有し、最外層はうね状隆起、顕著な隆起があり、厚みは不規則である。直径は 25~75 μm (平均 50 μm)、球形~卵形。

わが国の馬鈴しょほ場に存在するか不明であるが、類似の *Synchytrium* 属菌の情報をエ) に下述した。

生死判定については、孢子内に灰色味のある粒状物が含まれている場合を生存、一方、原形質分離を起こし、細胞内容物が明瞭でない場合を死滅と判断する。ただし、生死判定は技術的に困難であるため、明瞭に判別可能な場合にのみ行われ、少しでも判断に迷うような場合は、生存しているものとして扱われるべきであるとされている。

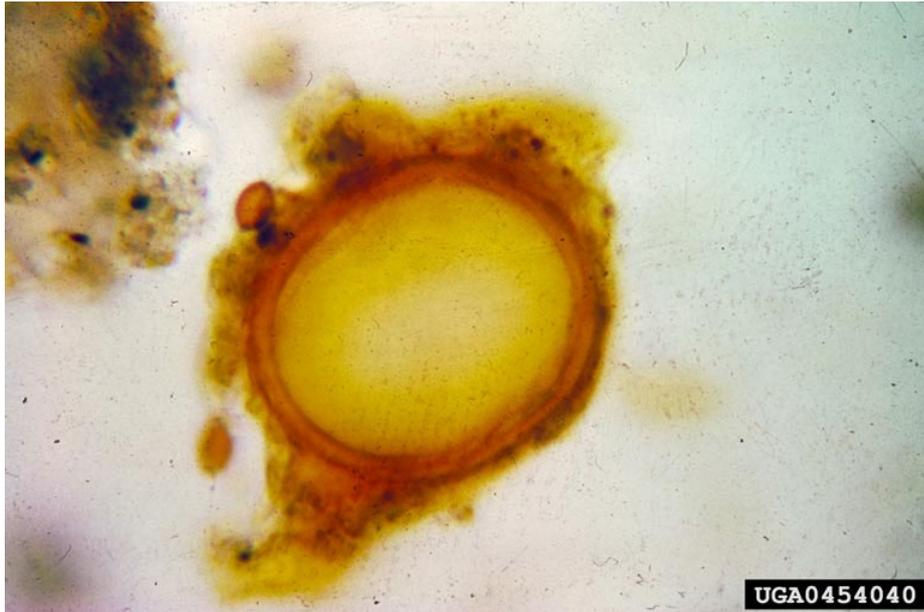


Central Science Laboratory, Harpenden , British Crown, Bugwood.org

Creative Commons Attribution-Noncommercial 3.0 License.

クリエイティブコモンズ 表示 - 非営利 3.0 アメリカ合衆国 (CC BY-NC 3.0 US)

図4 休眠孢子のうち (生存) の顕鏡写真



Central Science Laboratory, Harpenden , British Crown, Bugwood.org

Creative Commons Attribution-Noncommercial 3.0 License.

クリエイティブコモンズ 表示 - 非営利 3.0 アメリカ合衆国 (CC BY-NC 3.0 US)

図5 休眠孢子のう（死滅）の顕鏡写真

イ) 孢子のう

本菌は、1～9個の孢子のうの塊（孢子のう群）を形成する。大きさは25-38 μm ×62-87 μm で多面体、卵形～ほぼ丸型、透明で、無隔壁、滑らかな膜をもつ。休眠孢子のうが発芽して孢子のう群に孢子のうを形成する場合もある。各孢子のうの大きさは、41-64 μm ×47-75 μm 。

ウ) 遊走子

洋ナシ型、直径1.5-2.2 μm 、後部に17 μm までの長さの尾形鞭毛をもつ。水封入での観察では明色の脂質（油点）を有し、1本の尾形鞭毛のため水平に遊泳しているものを観察すると、動きが速いが、油点が比較的長時間見ることができる。（疫病菌等の2本鞭毛の遊走子のような複雑な動きをしない。）

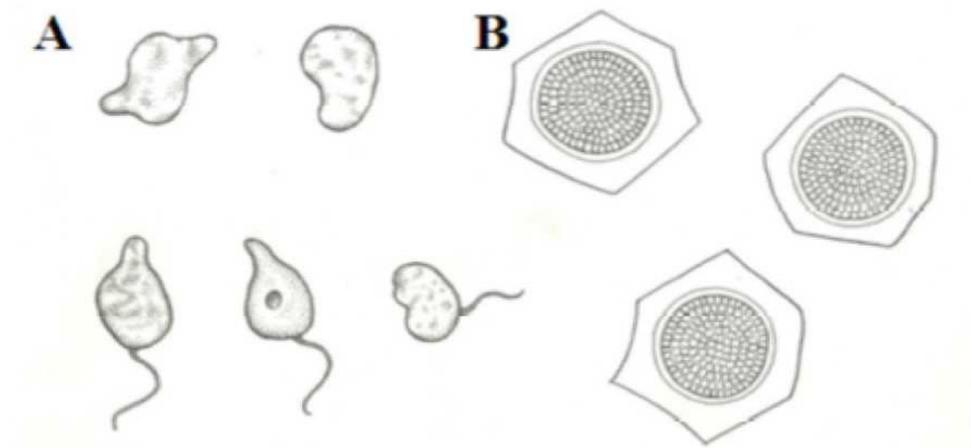


図6 A: 遊走子 B: 休眠孢子のお (植物防疫所原図)

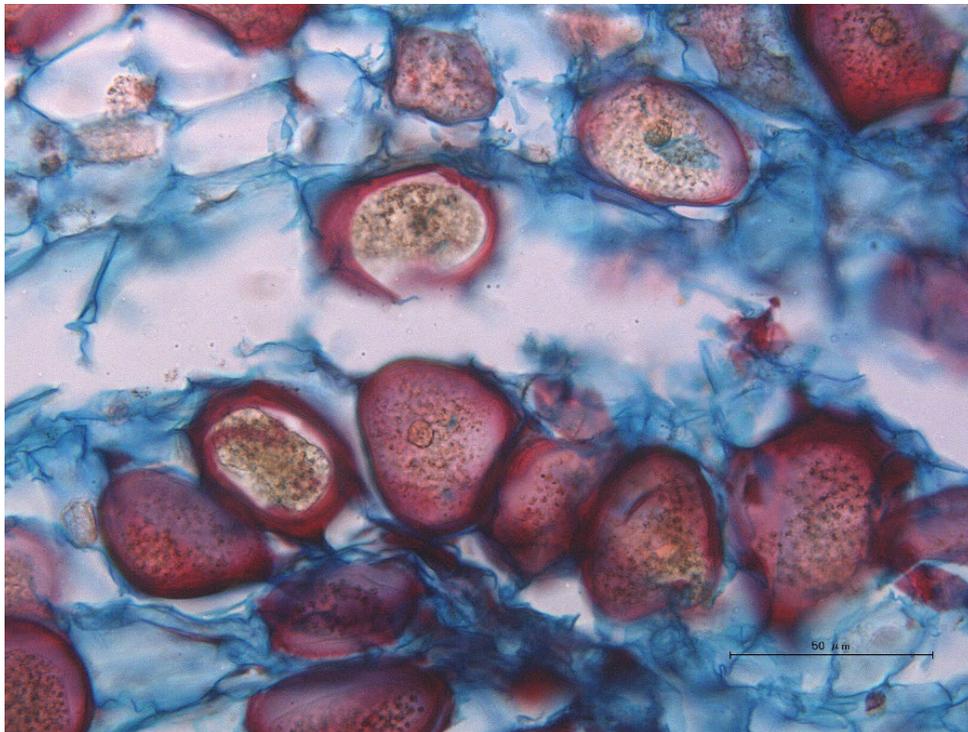


図7 こぶの組織内の休眠孢子のお (染色したもの) (植物防疫所原図)

エ) 我が国発生の類似菌

- *Synchytrium fulgens*(コマツヨイグサ葉脹れ症状)

休眠孢子のお壁に肥厚はあるが顕著な隆起はない。マツヨイグサ類の茎葉に脹れ症状を起こし、ほかに黄色の孢子のお群を形成する点も異なる。



図8 (左) *Synchytrium fulgens*(コマツヨイグサ葉脹れ症状から) 休眠孢子のうち
 図9 (右) *Synchytrium fulgens*の孢子のうち群及び孢子のうち (植物防疫所原図)

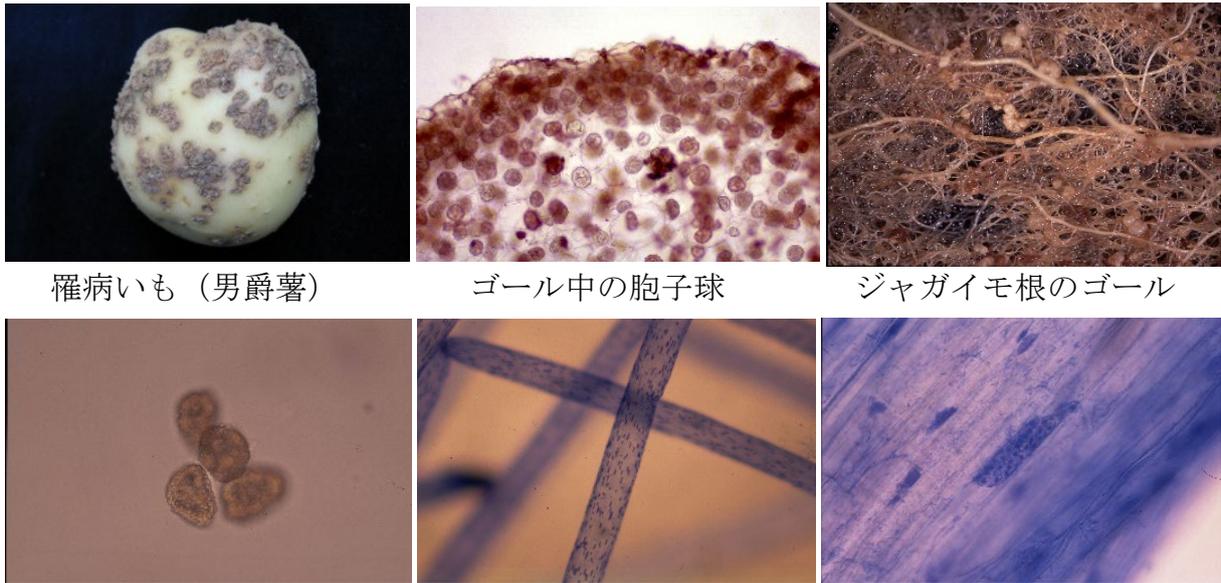
オ) 馬鈴しょに発生する類似症状

・ Proliferation of eyes (pseudo-wart)

1 個の萌芽点 (bud) から、全ての芽が一斉に発芽し、こぶ症状様の形態となる。しかし、尖った芽が集合してできた形状をしており、成熟しても腐敗しない。また、孢子のうち及び休眠孢子のうは存在しないという点が、本菌による症状と異なる。本症状の原因は不明であるが、生理的又は品種上の性質及び様々な化学物質による刺激が原因であると考えられている。

・ 粉状そうか病 (Powdery scab)

粉状そうか病菌 *Spongospora subterranea* f. sp. *sunterrane* (国内既発生) による病害。まず、根に白色ないし灰白色の若干膨大した部分が生じ、しだいに黄褐色に変じ、粉状物を生ずる。塊茎では、初めわずかに褐色の隆起部を生じ、しだいに大きくなるとともに病斑部はゼリー状となり、のちに表皮は裂け、病巢中に形成された粉状の孢子 (休眠孢子) が出てくる。病斑の大きさは径 1 ~ 7 mm だが融合して大きな病斑になることがある。新鮮な病斑中には、卵形、不整形又は細長い、18~100 μ m の孢子球が観察される。個々の孢子 (休眠孢子=cyst) は黄色から褐色、多角形で 3.5~4.5 μ m。症状が深刻な場合は、こぶ状の突起の形成が誘導され、かさぶた状組織を完全に覆うまでになることがある。この状態がジャガイモがんしゅ病菌による病徴に多少類似しているが、がんしゅ菌はジャガイモ根に寄生しないこと、大きなこぶを作ること、孢子球を形成しないこと、休眠孢子のうの大きさや形成場所等で識別できる。



罹病いも（男爵薯）

ゴール中の孢子球

ジャガイモ根のゴール

孢子球

馬鈴しょ根表皮の遊走子のう

変形体

図 10 粉状そうか病菌（防疫指針委託事業成果）

・ *Thecaphora smut* (Potato smut)

Thecaphora solani（国内未発生）による病害。症状は、地下部の塊茎及び地下茎、ほふく枝にこぶまたはふくれを生じ、地上部及び根には生じない。塊茎に生じたこぶは、直径 1 mm 以下のものから 4 cm 以上のものまで様々な大きさであり、感染した塊茎は奇形化・硬化する。こぶの内部には卵形～不整形で小腔室のある、様々な大きさの孢子堆が存在する。孢子堆には赤褐色、粒状～粉状の黒穂孢子球が含まれる。各黒穂孢子は黒穂孢子球内で圧着されており、ある程度力をかけないとバラバラにならない。球状～やや多角形で、大きさは $7.5-20 \times 8-18 \mu\text{m}$ 。いものこぶの内部に黒穂孢子（やその黒穂孢子球）を形成する菌は本菌のみである。



William M. Brown Jr., Bugwood.org Creative Commons Attribution 3.0 License.

クリエイティブコモンズ 表示 - 非営利 3.0 アメリカ合衆国 (CC BY 3.0 US)

図 11 馬鈴しょ塊茎に生じた *Thecaphora solani* による病徴

(参考)

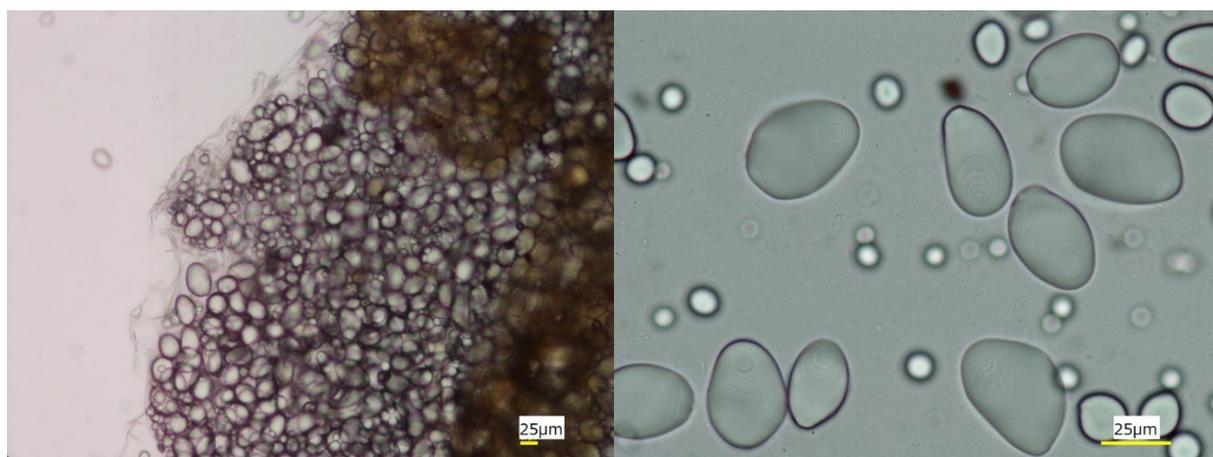


図 12 馬鈴しょのデンプン粒 (防疫指針委託事業成果)

オ 対象病害の解説

学名：*Synchytrium endobioticum*(Schilb.) Percival

英名：Potato wart

和名：ジャガイモがんしゅ病菌

分布：

アジア：インド、ネパール、ブータン

中東：トルコ

欧州：すべての国（アルバニア、キプロス、ギリシャ及びラトビアを除く。）

アフリカ：アルジェリア、チュニジア、南アフリカ共和国

北米：カナダ

中南米：ウルグアイ、エクアドル、フォークランド諸島、ペルー、ボリビア

大洋州：ニュージーランド

宿主植物：馬鈴しょ等のナス科植物

主要な宿主植物は馬鈴しょとされるが、メキシコでは野生種のナス属でも感染が確認されている。トマト、トウガラシ、チョウセンアサガオ属の一種等は実験的に感染することが確認されている。

生態：

本菌は絶対寄生菌である。春先に土壤温度や水などの感染条件が整うと休眠孢子のう（Winter sporangia=prosorusとして機能）が孢子のう群（内部に孢子のう内包）を外部に形成する様式で発芽し、その孢子のうから1本の

尾形鞭毛をもつ遊走子を放出し当年の伝染環を開始する。

遊走子は短命で形成後1～2時間以内に感受性の宿主組織に感染する必要がある。

遊走子が宿主表面（生長点）に到着すると感染細胞やその周辺細胞は拡大、分裂を繰り返し、初期より感染組織がはるかに増生したこぶ（wart）を生じ、こぶの表面付近に胞子のう（Summer sporangia）を形成する。この胞子のうからの1nの遊走子が感染を繰り返す。

土壌中の水分不足などのストレス条件下におかれると、胞子のうから生じた+、ないし-の1nの遊走子の一部は接合し、1核で2nの接合子（尾形鞭毛は2本）となり、この感染により、こぶの内部に休眠胞子のうを生じる。休眠胞子のうは土壌で40～50年生き続けると言われており一般的な土壌薬剤に対して極めて高い耐性を持つ。

分散：

1) 自然分散

短距離分散では、遊走子の自立的な運動により最長でおよそ5cmの移動のほか、ミミズによりおよそ10～25cmの範囲内の分散の可能性も挙げられている。

長距離分散では、感染した馬鈴しょを摂食した家畜のフン、家畜の蹄に付着した汚染土壌、汚染されたかんがい水の流出、汚染土壌からの土埃の飛散が挙げられる。

2) 人為分散

塊茎（種いも）等罹病植物体による分散、汚染土壌の付着した馬鈴しょの商業輸送、農業機械、農具、靴に付着した汚染土壌が原因となる。

被害：

本菌に感染した馬鈴しょは、市場価値が無くなる。さらに、栽培ほ場にも本菌が残るため、他の作物を作ることができなくなる。また、本菌の影響により、馬鈴しょの産出量が50～100%減少することがある。

防除：

本菌は、いったん侵入すると防除や根絶が非常に困難である。休眠胞子は土壌で40～50年生き続けると言われており一般的な土壌薬剤に対して極めて高い耐性をもつ。

発生国では耕種的防除法として、免疫性または抵抗性遺伝子を組み入れた品種の導入などが行われている。

欧州のEPP0加盟国においては、発生ほ場での馬鈴しょ等の栽培制限、発生地域からの宿主植物の移動の禁止の措置や当該地域で生産された馬鈴しょの廃棄等の措置が実施されている。

<参考文献>

- 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業研究センター
(2022) 令和3年度 国際基準を踏まえた防疫指針策定のための調査委託事業報告書 (令和4年3月16日)
- EPP0 (2017) Standard PM 7/28(2) *Synchytrium endobioticum* OEPP/EPP0
Bull. (2017)47(3):420-440 (online), available from <
<https://gd.eppo.int/download/standard/152/pm7-028-2-en.pdf>> (Last
accessed_19 Aug. 2022)
- 農林水産省横浜植物防疫所(2011) ポジティブリスト対象病害虫の解説 (ジャガイモがんしゅ病), 植物防疫所病害虫情報: 94, 5
- 農林水産省横浜植物防疫所(2019) *Synchytrium endobioticum* (ジャガイモがんしゅ病菌) に関する病害虫リスクアナリシス報告書

11. *Thecaphora solani* (以下「Ts」という。)

ア 調査

【調査対象植物】

馬鈴しょ

【調査時期】

調査は、生産ほ場又は収穫物の貯蔵施設において収穫期から貯蔵中に年1回以上実施する。

【調査方法及び調査内容】

- 1) 調査地点は各都道府県内で偏りが生じないように留意し、設定する。
- 2) 収穫期に生産ほ場において調査を実施する場合には設定した調査地点当たり10株程度、貯蔵施設において調査を実施する場合には10株分程度の塊茎を対象に、病徴写真を参考にして本病に似た症状がないか目視で確認する。
- 3) 感染が疑わしい場合は、発症部位や発症部位を含む塊茎や株全体、周囲の様子等をデジタルカメラ等で撮影した上で、試料を採取し遺伝子診断等を実施する。

【調査に当たっての留意事項】

1) 発見のポイント (病徴・標徴)

塊茎、地下茎及びほふく枝にこぶを生じ、地上部及び根には生じない。塊茎に生じたこぶは、直径1mm以下のものから4cm以上のものまで様々な大きさであり、感染した塊茎は奇形化・硬化する。こぶの内部には卵形～不整形で小腔室のある様々な大きさの孢子堆が存在する。

- 2) 病徴写真と比較して症状が似ている場合であっても、発生の状況が平時と同じであれば、積極的に試料を採取し、検定する必要はない。一方、通常の栽培環境下で平時と比べて症状の出方が異常である場合には、本病の感染を疑い、試料を採取し、検定を実施する。

イ 同定診断手法

採取または送付された試料について、以下の手順で診断を実施する。

・ 形態学的診断 (病徴観察及び検鏡観察)

疑似症状植物のこぶの内部には卵形から不整形で小腔室がある様々な大きさの孢子堆が存在する。この特徴のため、観察サンプルは表面土壌を分散防止に留意して洗浄、除去したTsの特徴を呈するこぶの内部組織から切り出して切片とする(こぶ崩壊時にも同様とする)。(洗浄水等は殺菌する。) 孢子堆は直径約1mmで、さび茶色の孢子球で満たされている。成熟した孢子球は、固く密着した2～8個(またはそれ以上)の黒穂孢子を含み、シナモン色～さ

び茶色、直径 15-50×12-40 μm。なお、不稔細胞は見られない。黒穂胞子は、力を加えなければ分離されないほど密着しているが、個別の黒穂胞子では半球状～半楕円形、やや多角形で淡黄色～淡さび褐色いくつかの平坦な面の1面を計測すると大きさは9-15 × 12-20(23) μm。黒穂胞子の壁厚は、平滑面で0.5-0.8 μm、外側の丸まった面では2-4 μm、約2.5 μmまでのいぼ状突起を密生する。(Vanky, K 2012)

このため、上記【調査に当たっての留意事項】1)の病徴(馬鈴しょ上にTsの特徴的なこぶ又は脹れ)並びにイ 1)の形態的特徴が観察サンプルに認められた場合、Tsと診断できる。

胞子等の写真は以下のHPアドレス参照

<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompndium.53508>

ウ 試料採取及び送付時の注意事項

- 1) 試料を採取する場合は、Tsが検出された場合を想定し、試料採取前に目印を付ける。
- 2) 疑似症状を呈した馬鈴しょの茎や塊茎を採取する。異常のない地上部(茎葉、花、果実)は、適宜取り除く。
- 3) 採取した試料は、試料の確認に必要な事項(採取月日、採取場所、写真等)を記録した試料採取票(別記様式)を添付した上で、ビニール袋に入れ、輸送するまでクーラーボックス等(4℃)に保管する。
- 4) 試料の採取部位、病徴及び採取票に記録した内容等は、調査野帳に記録する。
- 5) 採取した試料は、散逸しないように厳重に梱包し、保冷剤を入れて低温に保った保冷箱等に収容して冷温のまま送付する。
- 6) 採取した試料を長期保管する場合は、冷凍保管(-80℃)する。
- 7) 疑似症状を認めた圃場において、以降の調査を行うがある場合は、オーバーシューズ等の着用、取り換え等分散防止に十分留意する。

エ 病徴写真等



図1 馬鈴しょ塊茎における病徴

(左図) URL : <https://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5356848#collapseseven>

情報源 : William M. Brown Jr., Bugwood.org,

(右図) URL : <https://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5356849#collapseseven>

情報源 : William M. Brown Jr., Bugwood.org,

利用条件 : クリエイティブコモンズ 表示 3.0 アメリカ合衆国 (CC BY 3.0 US)

元の作成者と情報源についての適切なクレジットを表示し、ライセンスへのリンクを提供し、変更があったらその旨を示す。

オ 対象病害の解説

学名 : *Thecaphora solani* (Thirum & M. J. O'Brien)

英名、和名等 : smut of potato, thecaphora smut

分布 : エクアドル、コロンビア、チリ、パナマ、ベネズエラ、ペルー、ボリビア、メキシコ

宿主植物 :

ナス科 : シロバナヨウシュチョウセンアサガオ、トマト、馬鈴しょ等

生態 : Tsによる病徴は、馬鈴しょでは塊茎、地下部の茎、ほふく枝に黒色のこぶを生じ、地上部や根には生じない。こぶの中には冬孢子（黒穂孢子）を形成する。感染塊茎は奇形になり、さらに症状が進むと褐色の粉状孢子塊を生じ、塊茎を切断すると確認できる。トマトの生植物では、こぶが特に根と茎の結合部にできる。Tsに汚染された土壤に植え付けるとこぶは一般的に植え付け後45~60日後に観察される (CABI, 2015; Mordue, 1988; Torres, 2001)。

分散 :

1) 自然分散

自然分散の可能性はとても低いとされる (CABI, 2015)。

2) 人為分散

Tsの最も一般的な伝搬手段は、感染苗、種イモの移動であるが、感染イモの破片等が土壤に混入している場合、これら感染土壤により分散する可能性がある。同様に、灌漑用水や放牧された家畜、農業機械も感染拡大の要因となりうる (CABI, 2015; Torres, 2001)。

防除 : 抵抗性品種の使用が最も効果的である。このほか、無病種イモの使用、収穫後の罹病残渣の除去、宿主雑草の除去、感染地での放牧の回避、感染源の蓄積を防ぐための長期間輪作の利用、Tsの侵入を防ぐための厳格な検疫の適用、発生を抑制するための土壤くん蒸等が挙げられる (Torres, 2001)。

<参考文献>

令和4年度国際基準を踏まえた防疫指針策定のための調査委託事業 調査計画
農林水産省横浜植物防疫所 (2019) *Thecaphora solani*に関する病害虫リスクア
ナリシス報告書

EFSA PLH Panel (2018) Scientific Opinion on the Pest categorisation of
Thecaphora solani. EFSA Journal 16 (10) : 5445

23. ポスピウイロイド

- ①ジャガイモやせいもウイロイド : *Potato spindle tuber viroid*
- ②トマト退緑萎縮ウイロイド : *Tomato chlorotic dwarf viroid*
- ③ *Columnea latent viroid*
- ④ *Pepper chat fruit viroid*
- ⑤ *Tomato apical stunt viroid*

※ ポスピウイロイドは、ジャガイモやせいもウイロイド (*Potato spindle tuberviroid*。以下、「PSTVd」という。)を含むポスピウイロイド科ポスピウイロイド属に属するウイロイドで、これまでに10種類が報告されており、ほとんどがナス科植物に感染し、世界的に大きな被害をもたらしている。ここでは、侵入調査の対象となっている *Columnea latent viroid* (以下、「CLVd」という。)、 *Pepper chat fruit viroid* (以下、「PCFVd」という。)、 トマト退緑萎縮ウイロイド (*Tomato chlorotic dwarf viroid*。以下、「TCDVd」という。)、 *Tomato apical stunt viroid* (以下、「TASVd」という。) 及びPSTVdについて記述する。

ア 調査

【調査対象植物】

- 1) 全種：トマト
- 2) PSTV d：馬鈴しょ

【調査時期】

- 1) トマトでは、定植後1か月以降の栽培期間中に年1回以上調査を実施する。なお、気温25℃以上の条件で明確な病徴（葉の黄化・えそ、葉のねじれ、植物全体の矮化、果実の小型化など）が現れやすいため、できるだけ高温時が望ましい。
- 2) 馬鈴しょでは、萌芽後から収穫時の地上部を対象に栽培期間中に年1回以上調査を実施する。または収穫後の塊茎を対象に1回調査を実施する。なお、地上部を対象とした調査の場合、気温25℃以上の条件で明確な病徴（葉の黄化、小型化、葉の主脈や茎のえそ、植物全体の矮化など）が現れやすいため、できるだけ高温時が望ましい。

【調査方法及び調査内容】

- 1) 調査は、上記の調査対象植物の中から選定した上で、調査地点を設定する。なお、調査地点は各都道府県内で偏りが生じないように留意する。
- 2) 設定した調査地点当たり10株を対象に、エの病徴写真を参考にしつつ、ポスピウイロイドの感染植物に生じる葉の症状（黄化・奇形など）、葉の主脈や茎のえそ症状、植物全体の矮化等がないか、塊茎の調査の場合は奇形、

亀裂等がないかを目視で調査する。

- 3) 感染が疑わしい場合は、発症部位や株全体又は塊茎、周囲の様子等をデジタルカメラ等で撮影した上で、試料を採取し遺伝子診断等を実施する。

【調査に当たっての留意事項】

- 1) ポスピウイロイドによる症状は、生理障害等と見分けることが難しい。このため、通常の栽培環境下で平時と異なる発病状況であった場合に、ポスピウイロイドの感染を疑い、試料を採取し遺伝子診断等を実施する。すなわち、病徴写真と比較して、症状が似ている場合であっても、発生の状況が平時と同じ場合は積極的に試料を採取し遺伝子診断等を実施する必要はない。
- 2) 発見のポイント（病徴・標徴）
 - ア) トマト：葉の黄化、ねじれ、小型化、葉の主脈や茎のえそ、植物全体の矮化、果実の小型化（小さいまま成熟すること。）、奇形果等。
 - イ) 馬鈴しょ：葉の黄化、小型化、葉の主脈や茎のえそ、植物全体の矮化等。塊茎の奇形、二次肥大によるこぶ症、亀裂等。

イ 同定診断手法

ウイロイドは RNA のみで構成される病原体であるため、RT-PCR 等の遺伝子診断法のみが有効であり、ELISA 等抗原抗体反応による検出手法は利用できない。

採取又は送付された試料について、以下の手順 1) 又は 2) どちらかの検出法を用い検定を実施する。なお、初発の際は RT-PCR 検定後に塩基配列を確認する。

なお、試料として馬鈴しょの塊茎を用いる場合は、できる限り芽を含む表皮を採取する。

1) 遺伝子診断（コンベンショナル RT-PCR 法）

ア) 採取したサンプルから RNA を抽出する。RNA 抽出は市販のキット等を用い、キット付属のプロトコルに従い実施する。

イ) 抽出した RNA を鋳型にして RT-PCR を表 1 のプライマーセットを用いて行う。RT-PCR は市販のキット等を用いて行う。

なお、反応液の組成及び反応条件はキット付属のプロトコルを参照する。

ウ) 電気泳動によって増幅産物のサイズが各ウイロイドの予定長の増幅サイズであるか確認する。

表1 ウイロイド検出用プライマー

ウイロイド 名前	塩基配列 (5' -3')	増幅 サイズ※	アニーリング 温度	参考文献
PSTVd, P3	CCGGATCCCTGAAGCGCTCCTCCGAGC	360	60°C	Behjatnia et al. (1996)
TCDVd, P4	TCGGATCCCCGGGAAACCTGGAGCG			
TASVd, TAV-R13	AAGGAAACCCGAAGAAAGGA	282	60°C	Matsushita et al. (2015)
TAV-F13	CCTCACGCGCTTTTCTCTA			
CLVd, CLV-R6	CTCTCCGCCAATCTTTTT	239	60°C	Matsushita et al. (2015)
CLV-F6	GGTCGGAGGATCTTCTGGAG			
PCFVd, PCFV-FW	CGGCCGGGAGTGAAGCTAC	330	60°C	Yanagisawa & Matsushita (2017)
PCFV-RE	TGGAAGAAAAAGCACCTCTG			

※増幅サイズは、分離株により数塩基の差が生じる。

2) 遺伝子診断 (リアルタイム RT-PCR)

ア) 1) のア) と同様に核酸抽出を行う。

イ) SYBR Green法

表2に示すユニバーサルプライマー、PCFVd及びCLVd用プライマーを使用し、市販のキットを用いて検出する。SYBR Green法は、本調査対象のウイロイド5種を網羅的に検出するための検定法である。なお、標的となるウイロイドの種が判明している場合にはイ) SYBR Green法及びウ) TaqMan法のうち、個別のウイロイド特異的プライマー・プローブを用いたリアルタイムRT-PCRのみを行っても問題ない。

表2 SYBR Green法に用いるウイロイド検出用プライマー

ウイロイド	名前	塩基配列 (5' -3')	参考文献
一次検定用ユニバーサル プライマー*	6pospi-F	TCCTGTGGTTCACACCTGACC	Yanagisawa et al. (2017)
	6pospi-R	TTCAGTTGTTCCACCGGGTA	
CLVd	CLV-F 1	AAGAGCAAGAGCGGTCTCAG	Yanagisawa et al. (2017)
	CLV-R 3	AGGAAAGGAAACCCGAAGAA	
PCFVd	PCFV-F 8	CCCGAAGCCCGCTTAGG	Yanagisawa et al. (2017)
	6pospi-R	TTCAGTTGTTCCACCGGGTA	

*ユニバーサルプライマーはCLVd及びPCFVd以外のPSTVd、TCDVd、TASVdを含む6種のウイロイドを検出可能

・判定

Yanagisawa et al. (2017)による SYBR Green法においては、PCR反応後に得られるAmplification Plot及びMelting Curveの2つの結果から、陽性・陰性の判定を行う。なお、文献に記載のメーカー以外の反応試薬を使

用した場合、下記の判定法に変更を要する場合がある。

- ユニバーサルプライマー（6Pospi-F/R）の場合

Amplification Plotにおいて、Ct値が38以内であり、かつ、Melting Curveのピーク値が82℃から87℃以内である場合には、陽性と判断し、2つの条件のいずれかのみが該当する場合には陰性と判断する。またこの時、Melting Curveの各ウイロイドのピーク値は以下の値に近似するが、同種のウイロイドであっても多くの変異体が存在するため、Melting Curveのピーク値には一定の幅が生じる。これは、CLVd及びPCFVdの場合も同様である。

(各ウイロイドのMelting Curveのピーク値の例)

PSTVd : 約86.5℃付近、TASVd : 約83.5℃付近、TCDVd : 約85℃付近

- CLVd特異的プライマー（CLVd-F1/R3）の場合

Amplification Plotにおいて、Ct値が38以内であり、かつMelting Curveのピーク値が約84.8℃付近である場合には、陽性と判断し、2つの条件のいずれかのみが該当する場合には、陰性と判断する。

- PCFVd特異的プライマー（PCFVd-8/6Pospi-R）の場合

Amplification Plotにおいて、Ct値が38以内であり、かつMelting Curveのピーク値が約84℃付近である場合には、陽性と判断し、2つの条件のいずれかのみが該当する場合には、陰性と判断する。

ウ) TaqMan法

SYBR Green法によるユニバーサルプライマーで陽性のサンプルは、以下の表3に示すPSTVd、TCDVd、TASVdの各特異的プライマー・プローブを使用し、ウイロイドの種を特定する。

表3 TaqMan法に用いるウイロイド種識別用プライマー・プローブ

ウイロイド	名前	塩基配列 (5'-3')	参考文献
PSTVd	PS-F1	GTGCCAGCGGYCGAC	Yanagisawa et al. (2017)
	SM-R1	TAGCCGAAGCGACAGCGC	
	P3R	[FAM]CCTGCGGGCGCGAGGAAGGA[TAMRA]	
TCDVd	TC-F3	CGGCAGGGAGCTTGTGGAA	Yanagisawa et al. (2017)
	TC-R2	GCCGAAGCGACAGCGCAAG	
	TC-P2	[FAM]CTTCCTTTGCGGCCACTCGAC[TAMRA]	

TASVd	TA-F3	GAGCTTCTCTCTGGAGACT	Yanagisawa et al. (2017)
	TA-R3	TCGCCCGGAGAGCAAC	
	329Pospi- -P2	[FAM] ACCCGGTGGAWACA[MGB]	

・判定

Yanagisawa et al. (2017)に記載の試薬を用いた場合、Threshold lineをオートからマニュアルに変更し、Threshold lineの値をいずれのウイロイドの場合にも0.128に設定した際、Ct値が38以下の検体を陽性とし、それ以外の場合は全て陰性とする。

なお、他メーカーの反応試薬を使用した場合、判定法に変更を要する場合がある。

ウ 試料採取及び送付時の注意事項

- 1) 試料を採取する宿主植物には、ポスピウイロイドが検出された場合を想定し、試料採取前に目印を付ける。
- 2) トマトについては葉を、馬鈴しょについては葉又は塊茎を採取する。
 - ア) 葉については症状を示す株1株あたり5枚の葉を採取する。ウイロイドは全身感染するため、上位葉であれば発病の有無にかかわらずどの部位でも問題ない。ただし、枯れたような葉は避ける。
 - イ) 馬鈴しょの塊茎については、外観の症状（奇形、二次肥大によるこぶ症、亀裂）があれば、複数個を採取する。なお、収穫直後の塊茎はウイロイド濃度が維持されているため、そのまま検定に使用できる。一方で冷蔵保存中又は保存後の塊茎においては、ウイロイドの濃度低下により偽陰性になるリスクがあるため、萌芽させることが望ましい。
- 3) 本ウイロイドは容易に接触伝搬するため、調査を実施した園地内に病徴を示す株が複数ある場合は、株ごとに手袋を交換し、せん定ばさみ等の器具類は、株ごとに有効塩素濃度1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液等に60秒以上浸漬することにより消毒して使用する。なお、酸性薬品や消毒用アルコールは、当該ウイロイドに対してほとんど効果がないため、使用しない。
- 4) 採取した試料は、試料の確認に必要な事項（採取月日、採取場所、写真等）を記録した試料採取票（別記様式）を添付した上で、ビニール袋に入れ、輸送するまでクーラーボックス等（4℃）に保管する。
- 5) 試料の採取部位、病徴及び採取票に記録した内容等は、調査野帳に記録する。
- 6) 採取した試料は、散逸しないように厳重に梱包し、保冷剤を入れて低温に保った保冷箱等に収容して冷温のまま送付する。

エ 病徴写真等

1) 宿主植物における病徴

ア) トマト



図1、2、3 CLVdに感染したトマト（防疫指針委託事業成果）
上位葉の小型化、黄化、退緑



図4 CLVdに感染したトマト（植物防疫所原図）
上位葉の小型化



図5、6、7、8 PCFVdに感染したトマト（防疫指針委託事業成果）
上位葉の小型化、黄化



図9、10 PCFVdに感染したトマト（植物防疫所原図）
上位葉の小型化、巻葉、退緑



図 11、12 PCFVd に感染したトマト（植物防疫所原図）
退緑、えそを伴う葉巻症状



図 13 左：PCFVd に感染したトマト 右：健全なトマト（植物防疫所原図）
上位葉の小型化、植物全体の萎縮



図 14、15 TCDVd に感染したトマト（防疫指針委託事業成果）
 上位葉の退緑、黄化、えそを伴う葉巻症状、植物全体の萎縮症状



図 16 左、中： TCDVd に感染したトマト 右：健全なトマト（植物防疫所原図）
 株の萎縮、葉の黄化、奇形



図 17、18、19 TASVd に感染したトマト（防疫指針委託事業成果）
葉の奇形、黄化、えそ



図20 TASVdに感染したトマト（植物防疫所原図）
葉の奇形、退緑



図 21、22 PSTVd に感染したトマト（防疫指針委託事業成果）
巻葉、葉の黄化、縮葉（葉がちぢれること）



図 23 PSTVd に感染したトマト（植物防疫所原図）
巻葉、葉の黄化、縮葉（葉がちぢれること）



図 24、25 PSTVd に感染したトマト（植物防疫所原図）
 上位葉の縮葉（葉がちぢれること）



図 26 PSTVd に感染したトマト（植物防疫所原図）
 卷葉、縮葉（葉がちぢれること）、えそ、退緑



図 27 PSTVd に感染したトマト (植物防疫所原図)
縮葉 (葉がちぢれること) 及び葉の主脈のえそ



図 28 左 : PSTVd に感染したトマト 右 : 健全なトマト (植物防疫所原図)
株の萎縮、巻葉、縮葉 (葉がちぢれること)、えそ、退緑



図 29 PSTVd に感染したトマト（植物防疫所原図）
 巻葉、縮葉（葉がちぢれること）、えそ、退緑

イ) 馬鈴しょ



図 30、31 PSTVd に感染した馬鈴しょ（植物防疫所原図）
 上位葉の小型化、巻葉、退緑、縮葉



図 32 PSTVd に感染した馬鈴しょ (植物防疫所原図)
巻葉、退緑、えそ



図 33 PSTVd に感染した馬鈴しょ (植物防疫所原図)
塊茎の小型化、奇形



図 34 左：健全な馬鈴しょ 右： PSTVd に感染した馬鈴しょ（植物防疫所原図）
塊茎の奇形、こぶ症、亀裂

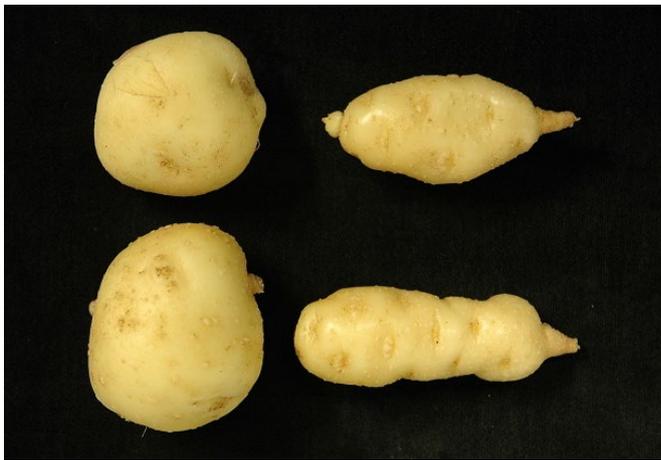


図 35 左：健全な馬鈴しょ 右： PSTVd に感染した馬鈴しょ（植物防疫所原図）
塊茎の細長化



図 36 左：健全な馬鈴しょ 右： PSTVd に感染した馬鈴しょ（植物防疫所原図）
塊茎の細長化

オ 対象病害の解説

学名：ポスピウイルス (*pospiviroid*) 属

Columnea latent viroid (CLVd), *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd),
Tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd), *Tomato apical stunt viroid*
(TASVd), *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd)

英名、和名等：TCDVd (トマト退緑萎縮ウイルス)

PSTVd (ジャガイモやせいもウイルス)

その他については和名なし

分布及び宿主植物：

(植物防疫法施行規則別表2-2 (一部改正 [令和四年三月農林水産省令・一八号] 版) から抜粋)

	発生国	宿主植物 * (種子伝染が知られているもの)
PSTVd	インド、中華人民共和国、パキスタン、バングラデシュ、アフガニスタン、イスラエル、イラン、トルコ、イタリア、ウクライナ、英国、オーストリア、オランダ、カザフスタン、ギリシャ、クロアチア、スペイン、スロベニア、チェコ、ドイツ、フランス、ベラルーシ、ベルギー、ポーランド、マルタ、モンテネグロ、ロシア、ウガンダ、エジプト、ガーナ、ケニア、ナイジェリア、アメリカ合衆国、コスタリカ、ミニカ共和国、ベネズエラ、ペルー、メキシコ、オーストラリア、ニュージーランド	アボカド、いぬほおずき、おおせんなり、しまほおずき、せんなりほおずき、たまさんご、つるはななす、とうがらし、トマト、はりなすび、ばれいしよ、ペピーノ、カリブラコア属、ケストルム属、ダリア属、ブルグマンシア属及びペチュニア属等 * (とうがらし、トマト、はりなすび、ばれいしよ及びペチュニア属)
CLVd	イタリア、英国、デンマーク、ドイツ、フランス、マリ、アメリカ合衆国、カナダ、コスタリカ	グロキシニア(シーマニア)・ギムノストマ、グロキシニア(シーマニア)・ネマタントデス、グロキシニア(シーマニア)・ブルプラスケンス、コルムネア・エリトロファエア、ソラム・ストラモニーフォルム、とうがらし、トマト、ネマタンツス・ウエッツテイニ、ブルンフェルシア・ウンドウラタ * (とうがらし及びトマト)
TASVd	インドネシア、イスラエル、イタリア、オーストリア、オランダ、クロアチア、スロベニア、ドイツ、フィンランド、フランス、ベルギー、ポーランド、ガーナ、チュニジア、セネガル、コートジボワール	たまさんご、つるはななす、トマト、ケストルム属及びブルグマンシア属 * (トマト)
TCDVd	インド、英国、スロベニア、チェコ、フィンランド、フランス、アメリカ合衆国、メキシコ、ハワイ諸島	とべら、トマト、なす、ひめつるにちにちそう、カリブラコア属、パーベナ属及びペチュニア属 * (トマト、なす及びペチュニア属)
PCFVd	タイ、オランダ、カナダ	とうがらし及びトマト * (とうがらし、トマト)

一部改正[令和四年三月農林水産省令・一八号]版

分散：

1) 自然分散

接触 (機械的) 伝搬、種子伝搬、栄養繁殖体による伝搬、花粉伝搬及びベクターによる伝搬が知られている。アブラムシ類 (ジャガイモヒゲナガアブラムシ (*Macrosiphum euphorbiae*)、モモアカアブラムシ (*Myzus persicae*)) による虫媒伝搬はジャガイモ葉巻ウイルス (*Potato leafroll virus*) や *Velvet tobacco mottle virus* と混合感染した場合に生じる。また、トマトの授粉に利用されるクロマルハナバチにより伝搬する。

2) 人為分散

接触（機械的）伝搬、接木伝搬、種子伝搬、栄養繁殖体による伝搬及び花粉伝搬が知られている。ハサミ、ナイフ等の器具、人の手などを介して栽培作業により感染拡大する。

3) 種子伝染

CLVd：トマト、とうがらしで種子伝染が確認されている。

PCFVd：トマト、とうがらしで種子伝染が確認されている。

PSTVd：トマト、とうがらし、ペチュニア等で種子伝染が確認されている。

TCDVd：ペチュニアで種子伝染が確認されている。トマトでの種子伝染は議論が分かれている。

TASVd：トマトで種子伝染が確認されている。

防除：本ウイロイドの防除には感染していない植物の作出及び増殖、ほ場の衛生管理が有効である。感染が確認された植物は、早期に根こそぎ抜き取り、栽培中の他の植物と接触しないようビニール袋等に入れてほ場外に持ち出し、地中深く埋没又は焼却する。薬剤による有効な防除方法は報告されていない。道具類の消毒には、有効塩素濃度 0.5%以上の次亜塩素酸ナトリウムに15秒以上浸漬することが有効である。

<参考文献>

Behjatnia et al. (1996) New Potato Spindle Tuber Viroid and Tomato Leaf Curl Geminivirus Strains from a Wild *Solanum* sp. *Molecular Plant Pathology* 86(8):880-886.

花田薫 (2021) 世界最小の植物病原であるウイロイドの特性と保存法. 微生物遺伝資源利用マニュアル (44) 農業・食品産業技術総合研究機構遺伝資源研究センター

広島県立総合技術研究所農業技術センター (2010) トマト退緑萎縮病 (TCDVd) 総合対策マニュアル

蚊爪竜一・大石盛伝・本蔵洋一 (2018) .ペチュニア種子からの Tomato chlorotic dwarf viroid 検出に関する検討. 植物防疫所調査研究報告 (植防研報) 54: 89-93.

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業研究センター (2021)

令和2年度 国際基準を踏まえた防疫指針策定のための調査委託事業報告書 (令和3年2月8日)

Matsushita et al. (2015). Host ranges of Potato spindle tuber viroid, Tomato chlorotic dwarf viroid, Tomato apical stunt viroid, and Columnea latent viroid in horticultural plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 141(1) 193 - 197.

- Matsushita・Tsuda (2016). Seed transmission of potato spindle tuber viroid, tomato chlorotic dwarf viroid, tomato apical stunt viroid, and Columnea latent viroid in horticultural plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 145(4):1007-1011.
- 農林水産省(2013)Columnea latent viroid (CLVd) に関する病害虫リスクアナリシス報告書 (2021改訂)
- 農林水産省(2013)Pepper chat fruit viroid に関する病害虫リスクアナリシス報告書(2015改訂)
- 農林水産省(2013)Potato spindle tuber viroid (ジャガイモやせいもウイロイド) に関する病害虫リスクアナリシス報告書 (2021改訂)
- 農林水産省(2013)Tomato apical stunt viroid (TASVd) に関する病害虫リスクアナリシス報告書(2015改訂)
- 農林水産省(2013)Tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd) (トマト退緑萎縮ウイロイド) に関する病害虫リスクアナリシス報告書(2015改訂)
- Yanagisawa et al. (2017). Development of a comprehensive detection and identification molecular based system for eight pospiviroids. *Eur. J. Plant Pathol.* 149(1):11-23.
- Yanagisawa・Matsushita (2017). Host ranges and seed transmission of Tomato planta macho viroid and Pepper chat fruit viroid. *Eur. J. Plant Pathol.* 149(1):211-217.