

ファイトプラズマの同定診断プロトコル
2004-018: Draft Annex to ISPM 27:2006 – Phytoplasmas

Para. no.	Comment type	Comment	Explanation
G	Substantive	Insert flow chart for detection of phytoplasma. ファイトプラズマの検出のためのフローチャートを加えること。	This will be useful for understanding the procedure for detecting phytoplasma. ファイトプラズマの検出の手順を理解するのに有用であるため。
G	Technical	The detection and diagnosis method using the DAPI stain method can be added as the first-step screening method after the symptom observation. DAPI 染色を用いる検出及び診断の方法が病徴観察の後の第 1 段階のスクリーニング法として追加することが出来る。	<p>Phytoplasma infections are characterized by an associated accumulation of DNA within the phloem, so infections can be demonstrated by treatment of plant tissues with the DNA-binding fluorochrome DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindole, 2HCl) on examination under UV light by fluorescence microscopy.</p> <p>ファイトプラズマの感染は、師部内のDNAの蓄積により特徴付けられる。そのため、感染は、蛍光顕微鏡を用い、UV照明の下で DNA結合性蛍光色素の DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole, 2HCl) で植物組織を処理することで明確に示される。</p> <p>Also, it is known that the DAPI stain method can be used for the large-scale diagnosis.</p> <p>また、DAPI染色法は、大規模スケールでの診断で利用できることが知られている。</p> <p>In addition, this method does not need special expensive facilities and reagents, such as a PCR thermal cycler, DNA polymerase or related clean molecular test rooms It is suitable for the screening of suspected samples where it is not generally assumed that phytoplasma titre is extremely low (i.e., strongly suspected samples which show clear phytoplasma symptoms) or where there is a need to know quickly whether or not phytoplasma is present.</p> <p>さらに、本法は、PCRサーマルサイクラーやDNA合成酵素、又は(精密検定室のような)クリーンルームといった、特別で高価な設備や試薬は不要である。また、一般的には、ファイトプラズマ濃度が極めて低いことは想定されないような事例の試料(すなわちファイトプラズマの症状が明瞭に示されている強く感染が疑われる試料の場合)や、迅速にファイトプラズマが存在するかどうかを知る必要がある場合の、スクリーニングに適している。</p> <p>根拠論文 Seemüller E, 1976. Demonstration of mycoplasma-like organisms in the phloem of trees with pear decline or proliferation symptoms by fluorescence microscopy. <i>Phytopathologische Zeitschrift</i>, 85:368-372. Sinclair WA, Griffiths HM, Davis RE, Lee IM, 1992. Detection of ash yellows mycoplasma-like</p>

			organisms in different tree organs and in chemically preserved specimens by a DNA probe vs. DAPI. <i>Plant Disease</i> , 76(2):154-158 Andrade N. M. & N. L. Arismendi, 2013, DAPI Staining and Fluorescence Microscopy Techniques for Phytoplasmas, <i>Phytoplasma Methods in Molecular Biology</i> , 938, pp.115-121.
14	Substantive	http://www.costphytoplasma.eu/index.htm	The page cannot be found. 該当ページなし。
21	Editorial	<p>The International Research Programme on Comparative Mycoplasmaology (IRPCM) Phytoplasma/Spiroplasma Working Team-Phytoplasma Taxonomy Group (2004) has published guidelines for the description of a “<i>Candidatus (Ca.) Phytoplasma</i>” genus. Delineation of “<i>Ca. Phytoplasma</i>” species is based on 16S rRNA gene sequences as well as on biological characteristics. In general, phytoplasmas within a species share a minimum of 97.5% similarity (>97.5% similarity) in their 16S rRNA gene sequences. Descriptions of “<i>Ca. Phytoplasma</i>” species are published in the <i>International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology</i> and as of October 2013, 32 “<i>Ca. Phytoplasma</i>” species have been described.</p> <p>マイコプラズマの比較に関する国際研究プログラム (IRPCM) ファイトプラズマ/スピロプラズマ作業チーム-ファイトプラズマ分類チーム (2004 年) は、「<i>Candidatus (Ca.) Phytoplasma</i>」属の説明に関するガイドラインを発行した。「<i>Ca. Phytoplasma</i>」種に関する概要説明は、16S リボソーム (r) RNA 遺伝子配列および生物学的特性に基づいている。一般的には、一つの種に含まれるファイトプラズマは、その 16S リボソーム (r) RNA 遺伝子配列において最低でも 97.5% の相同性を共有している。「<i>Ca. Phytoplasma</i>」種に関する説明は、<i>International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology</i> 誌の 2013 年 10 月 (第 32 号) で説明されている。</p>	Editorial correction 修辞上の修正。

火傷病の同定診断プロトコル

2004-009: Draft Annex to ISPM 27:2006 – *Erwinia amylovora* (Burrill)

Para. no.	Comment type	Comment	Explanation
G	Substantive		Insert some pictures of disease symptoms on typical host plants. These pictures would be useful to identify <i>Erwinia amylovora</i> . 火傷病の同定に役立つよう、典型的な宿主植物の病徴写真を追加すること。
5	Editorial	1. Pest Information	Editorial correction
6	Substantive	<p>～略～</p> <p>The disease begins in spring with the production of the primary inoculum from bacteria overwintering in cankers (Thomson, 2000) causing blossom infection, continuing into summer with shoot and fruit infection, and ending in winter with the development of cankers throughout the dormant period of the host (Thomson, 2000; van der Zwet and Beer, 1995). <u>In this infection cycle, the disease is easily dispersed by birds, insects, rain or wind in this (Thomson, 2000).</u></p> <p>この病気は、春に潰瘍の中で越冬した細菌の一次感染から始まり、花に感染し、続いて夏に芽や果実に感染し、冬になって宿主の休眠中に潰瘍を発達させて終わる(Thomson, 2000)。本病気は感染サイクルにおいて、鳥、昆虫、風雨により容易に分散する。(Thomson 2000)</p>	<p>According to the data sheet on <i>E. amylovora</i> in the Crop Protection Compendium, <i>E. amylovora</i> is easily dispersed by several agents (e.g., rain, wind, insects, birds, etc.) and widely imparts serious damage to nursery fields.</p> <p>CPC のデータによれば、火傷病は雨、風、昆虫、鳥等により、容易に分散し、苗圃に深刻な被害を与える。</p>
7	Editorial	2. Taxonomic Information	Editorial correction
9	Editorial	3. Detection	Editorial correction
68	Editorial	4. Identification	Editorial correction
69	Substantive	<p>～略～</p> <p>Differentiation of <i>E. amylovora</i> from these closely related <i>Erwinia</i> species (that can be found in similarly symptomatic tissues in some hosts) can be achieved with a combination of three techniques based on different biological principles:</p> <p><u>(1) Nutritional and enzymic identification (section 4.1) (42) PCR based on chromosomal DNA (sections 3.1.5.2 and 4.3.1); (23) DASi-ELISA using specific monoclonal antibodies as described for detection (see section 3.1.4.1, excluding the enrichment step); and (3) inoculation into fire blight hosts to fulfil the requirements of Koch's postulates, including re-isolation of the inoculated pathogen (section 4.4).</u></p> <p>極めて類似する <i>Erwinia</i> 種(いくつかの宿主の中の同じような症候性の組織に発見される)を区別するには、次の異なる生物学的原理に基づいた 3 種類の検査法の組み合わせを行うことが必要である(1) 栄養酵素学的同定(セクション 4.1)(42)染色体の DNA に基づく PCR(セクション 3.1.5.2 及び 4.3.1); (23) 特定の単クローン抗体を用いた DASi-ELISA(セクション 3.1.4.1 参照。但し増菌手順は除く)、そして (3) 接種された病原体の再分離を含むコッホの前提条件の要求を満たす火傷病宿主への接種(セクション 4.4)である。</p>	<p>Three techniques indicate nutritional and enzymic identification, molecular identification and serological identification. The pathogenicity test in section 4.4 is an independent phase in the Fig.1 so it is not included among the three techniques.</p> <p>三つの手法は栄養・酵素学的同定、分子生物学的同定、血清学的同定を示す。セクション 4.4 の病原性試験は図 1 において、独立したフェーズであるので、三つの手法には含まれない。</p>

89	Editorial	A suspension of approximately 10 ⁶ cells/ml is prepared in PBS from levan-positive, non-fluorescent colonies and the IF procedure described in section 3.1.4.3 is applied. The specificity of the antibodies must be established in advance.	Editorial correction 修辭上の修正
102	Substantive	Suspected <i>E. amylovora</i> colonies should be inoculated back into host plants to fulfil Koch's postulates and verify their pathogenicity. For plant inoculation, susceptible cultivars of pear, apple, loquat, <i>Crataegus</i> , <i>Cotoneaster</i> or <i>Pyracantha</i> spp. are used. Koch の前提条件を満たす宿主植物の中に疑いのある <i>E. amylovora</i> コロニーを接種し、その病原性を検証する。植物の接種については、ナシ、リンゴ、ビワ、サンザシ、コトネアスター、あるいはピラカンタ種の感受性の品質を使用する。	Add the example of susceptible cultivars of each plant. This information is useful for countries without <i>Erwinia amylovora</i> 火傷病未発生国にとっては有用な情報であるので、植物毎に感受性品種を例示すること。
166	Substantive	Figure 2. Flow chart for the identification of <i>Erwinia amylovora</i> in asymptomatic samples.	Insert "Other tests that may be recommended to be performed" following "IDENTIFICATION TESTS (section 4) is Negative" . In the case of a false negative, another test might be necessary for identification. ”同定検査(セクション 4)がネガティブ”の後に”その他の検査を行うことが推奨される”を挿入すること。偽陰性の場合、同定のための、別の試験が必要となり得る。
169	Substantive	Footnote 2: The use of products of the brand bioMérieux in this diagnostic protocol implies no approval of them to the exclusion of others that may also be suitable. This information is given for the convenience of users of this protocol and does not constitute an endorsement by the CPM of the chemical, reagent and/or equipment named. Equivalent products may be used if they can be shown to lead to the same results. <u>Add the following explanation in the paragraph[170].</u> Footnote3: <u>When using LAMP on a regular basis in an area which has a patent system such as Japan (Patent Nos. 3,313,358, 3,974,441 and 4,139,424), the United States of America(US6,410,278, US6,974,670 and US7,494,790), the European Union (Nos. 1,020,534, 1,873,260, 2,045,337 and 2,287,338), China (ZL008818262), the Republic of Korea (Patent No. 10-0612551), Australia (No. 779160), and the Russian Federation (No. 2,252,964), it is necessary for users to receive a license from Eiken Chemical Co., Ltd. before use.</u> 次の説明を新パラグラフ[170]に加えること。 脚注3: 特許権が存在する国(日本: 特許第 3,313,358 号、特許 3,974,441 号及び特許 4,139,424、米国: US6,410,278 号、US6,974,670 号、及び US7,494,790、EU: 第 1,020,534 号、第 1,873,260 号、第 2,045,337 号及び第 2,287,338 号、中国: ZL008818262.0 号、韓国: 特許第 10-0612551 号、オーストラリア: No.779160 号、ロシア: No.2,252,964)で LAMP 法を業務として使用する場合、使用前に使用者は英研化学(株)よりライセンスを受ける必要がある。	To protect the intellectual property right. 知的財産権を保護するため。

Anastrepha 属の同定診断プロトコル
2004-015: Draft annex to ISPM 27:2006 - Genus Anastrepha

Para. no.	Comment type	Comment	Explanation
G	Substantive		<p>1) Suggest using "<i>A. fraterculus</i> species complex" instead of a number of different names as used in this protocol such as "<i>A. fraterculus sensu lato</i>" in paragraph [79], or "<i>A. fraterculus</i> (species complex)" in paragraph [132], or "<i>A. fraterculus</i>" in paragraph [134] and [136], and adding a description of the features of each known local population to appropriately reflect the recent progress in taxonomic research on <i>A. fraterculus</i>. <i>A. fraterculus</i> の種名については、複数の名称が使われているので <i>A. fraterculus</i> species complex に合わせる。また、地域個体群の特徴について記載すること。</p> <p>2) Add clear pictures or figures of the habitus (thorax in dorsal aspect, abdominal tergites and wings) of every species, as such pictures or figures are useful for identification. 全ての種について、胸部背面、腹部背板及び翅の明瞭な写真、図を加えること。</p> <p>3) Point out the names of parts using arrows in the pictures or figures. 写真や図に部位の名称を矢印を使って示すこと。</p>
6	Editorial	<p>～略～ At least six<u>seven</u> species of <i>Anastrepha</i> are considered major economic pests because of the great importance of the cultivated fruits they attack (e.g. mango and citrus) and their wide host range; for example, the Mexican fruit fly, <i>A. ludens</i> (Loew); ～略～ <i>Anastrepha</i> のうちの少なくとも 67 種が、これらが加害する栽培果実 (例: マンゴー及びかんきつ類) の高い重要性、及び、広い寄主範囲を鑑みて、主要経済有害動植物と考えられる。</p>	<p>This protocol explains 7 species. 本プロトコルでは 7 種説明している。</p>
9	Editorial	<p>～略～ In this regard, the species <i>A. suspensa</i>, <i>A. fraterculus</i> and <i>A. riatastriata</i> breed mainly in hosts belonging to the family Myrtaceae, <i>A. ludens</i> in the Rutaceae, <i>A. obliqua</i> in the Anacardiaceae, <i>A. serpentina</i> in the Sapotaceae, and <i>A. grandis</i> in the Cucurbitaceae (Norrbon, 2004b). この点に関して、<i>A. suspensa</i>, <i>A. fraterculus</i> 及び <i>A. riatastriata</i> は、主にフトモモ科に属する寄主に卵を産み、<i>A. ludens</i> はミカン科、<i>A. obliqua</i> はウルシ科、<i>A. serpentina</i> はアカテツ科、そして、<i>A. grandis</i> はウリ科、に卵を産む (Norrbon, 2004b)。</p>	<p>Editorial correction 修辭上の修正。</p>

36	Technical	<p>~略~ This can be accomplished by placing it in a 10% sodium hydroxide (NaOH) or a 10% potassium hydroxide (KOH) solution and heating it in a boiling water bath for 10–15 min, washing the structure with distilled water, and then removing internal contents under a stereomicroscope with the help of dissection forceps. ~略~ これは、10%水酸化ナトリウム (NaOH) 又は 10%に水酸化カリウム溶液に入れ、それを沸騰水の入った容器で 10–15 分間温め、組織を蒸留水で洗い、その後、実体顕微鏡下で解剖用ピンセットを使い、中身を取り除くことで達成される。</p>	<p>Potassium hydroxide is also used to remove the internal contents. 内容物を取り除くのに水酸化カリウムも使用される。</p>
45	Technical	<p>~略~ The incised larva then needs to be immersed in a test tube containing 10% NaOH or KOH solution and heated in a boiling water bath for 10–15 min. ~略~ その後、切開された幼虫を、10%NaOH 又は KOH 溶液を入れた試験管に浸し、沸騰水をいれた容器の中で、10-15 分間温める必要がある。</p>	<p>Same as paragraph [36]. パラ 36 と同様。</p>
51	Substantive	<p>Wings (Figure 4): Subcostal break present; crossvein R-M placed distal to mid-length of discal cell (<i>dm</i>); basal cubital cell (<i>bcu</i>) with a well-developed posteroapical extension; vein <i>M</i> usually conspicuously curved forwards apically (strongly so in all pest species) and not meeting costa at a 90° angle. Wing pattern with orange to brown coloured bands forming a typical pattern as follows: costal (C)-band on basal costal margin including all of vein <i>R</i>₁, subcostal cell and the pterostigma; S-band extending from apex of cell <i>bcu</i> across cell <i>dm</i> and crossvein R-M, reaching costal margin, and continuing to apex of wing; and V-band forming an inverted V shape, comprising the proximal arm (subapical band) along vein dm-cuDM-CU and the distal arm (posterior apical band) arising from cell <i>m</i>, both are convergent in cell R₄₊₅; distal arm frequently incomplete or absent. The typical wing pattern is modified in some economically important species (see key to species).</p>	<p>Capital letters are used for both longitudinal and cross veins in Fig. 4. Lowercase letters are used for cells of wings in Fig. 4. 図 4 で縦、横脈は大文字、翅室は小文字で記載されている。</p>
105	Substantive	<p>2- Prominent chitinized preoral teeth (=stomal guards) adjacent to oral opening, or dental sclerite conspicuous (Figures 45, 47); and/or caudal tubercles strongly developed; or larva taken from papaya with caudal tuberclesridges lacking and caudal sensilla strongly reduced. 2- 突き出たキチン化した口前歯 (preoral teeth=吻合部ガード (stomal guards)) が開口部に隣接する、又は歯の硬皮がはっきりと見える (図 45、47); 及び/又は、尾部の結節 (tuberclesridges) が非常に発達している; 或いは、幼虫が、パパイヤから採取され、尾部の結節がなく、尾部感覚子 (caudal sensilla) が非常に少ない。</p>	<p>The term "caudal ridges" is used in Figs. 59 and 60. Change "caudal tubercles" to "caudal ridges" based on White et al. (2000) Glossary. pp. 881-924. M. Aluja & A.L. Norrbom (ed.), Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior. Fig59 及び 60 では "caudal ridges" という用語が使われている。文献に基づき、"caudal tubercles" を "caudal ridges" に変更すること。</p>
111	Editorial	<p>Dorsal spinules absent on all abdominal segments, or if present, only in segment A1 (Abdominal segment) (some specimens of <i>A. ludens</i>)</p>	<p>For more clarity.</p>
125	Substantive	<p>7- Posterior spiracular processes SP-I and SP-IV with 5 to 11 short trunks (average, 8) (Figure 36); oral ridges usually in 12 to 14 rows; anterior spiracle with 13 to 19 tubules in a single row (Figure 35); anal lobes usually bilobed (as in Figure 57). Cephalopharyngeal skeleton as in Figure 30. (Main hosts: larvae breed in fruits of Sapotaceae; distribution: tropical Americas.) 7-後気門突起 (posterior spiracular processes) SP-I と SP-IV に、5 本から 11 本 (平均 8 本) の短い幹 (trunks) がある (図 36); oral ridges は通常、12 から 14 列である; 前気門 (anterior spiracle) には、1 列に並んだ 13 から 19 の気門瘤がある (図 35); 肛門瘤 (anal lobes) は通常、二裂である (図 57 の通り)。頭咽頭骨格 (cephalopharyngeal skeleton) は、図 30 の通りである。(主な寄主: 幼虫は、アカテツ科の果実で育つ; 分布: 南北アメリカ大陸熱帯地域)</p>	<p>Indicate the position of trunks in any of Figs. 46, 49 or 50 because the number of trunks differs between basal and apical branched parts. 基部と先端部の枝分かれ部では trunks の数が異なるので、図中に trunks の位置を示すこと。</p>

214	Substantive	<p>Figures 21–26. (21) Morphology of the cephalopharyngeal skeleton of third instar larvae. Mandible hook of third instar larvae, lateral view: (22)<i>Ceratitis capitata</i>; (23)<i>Anastrepha obliqua</i>; (24)<i>Bactroceradorsalis</i>; (25)<i>Rhagoletis tomatidis</i>; (26)<i>Toxotrypana</i> sp. <i>At</i>, apical tooth; <i>DC</i>, dorsal cornu; <i>Hb</i>, hypopharyngeal bridge; <i>HS</i>, hypopharyngeal sclerite; <i>MD</i>, mandible; <i>Mn</i>, mandibular neck; <i>PB</i>, parastomal bar; <i>Pt</i>, preapical tooth; <i>Va</i>, ventral Apodeme; <i>VC</i>, ventral cornu. Source: All figures adapted from Frías <i>et al.</i> (2006).</p>	<p>Add the dental sclerite in Fig. 21. The features of the dental sclerite are explained in paragraphs [105] and [107], but the dental sclerite is not indicated in Fig. 21. dental sclerite はパラ 105、107 で説明されているが、Fig 21 において、この部分が示されていないので、加えること。</p>
-----	-------------	---	--

ナミクキセンチュウ及びイモグサレセンチュウの同定診断プロトコル
 2004-017: Draft Annex to ISPM 27:2006 – *Ditylenchus dipsaci* and *Ditylenchus destructor*

Para. no.	Comment type	Comment					Explanation	
100	Editorial	Characters	<i>D. destructor</i>	<i>D. africanus</i>	<i>D. myceliophagus</i>	<i>D. gigas</i>	<i>D. dipsaci</i>	Editorial correction 修辭上の修正。
		Body length female (mm)	0.8–1.9	0.7–1.1	0.6–1.4	1.6–2.2	1.0–1.3	
		Number of lateral lines	6	6–15	6	4	4	
		Form of tail terminus	Rounded	Rounded	Rounded	Pointed to finely rounded	Pointed	
		c (body length/tail length) of female	9 –30	8.8–16.9	10.5–20.5 –17	15.8–27.6	14 –18	
		Posterior bulb	Short, dorsally overlapping	Short, dorsally overlapping	Short, dorsally overlapping	Slightly overlapping	Not overlapping	
		Stylet length (µm) of female	10–14	8–10	7–8	10.5–13.0	10–12	
		PUS/vulva–anus length (%)	53–90	37–85	30–69	*About 50 %	40–70	
		Spiculum length (µm)	24–27	17–21	15–20	23.5–28	23–28	
		Bursa length (as % of tail length)	50–70	48–66	20–55	72–76	40–70	
Host preference (helpful information in case of confusing morphological criteria)	Higher plants and mycelia of fungi	Groundnut and fungi	Mycelia of fungi	Higher plants	Higher plants and fungi			