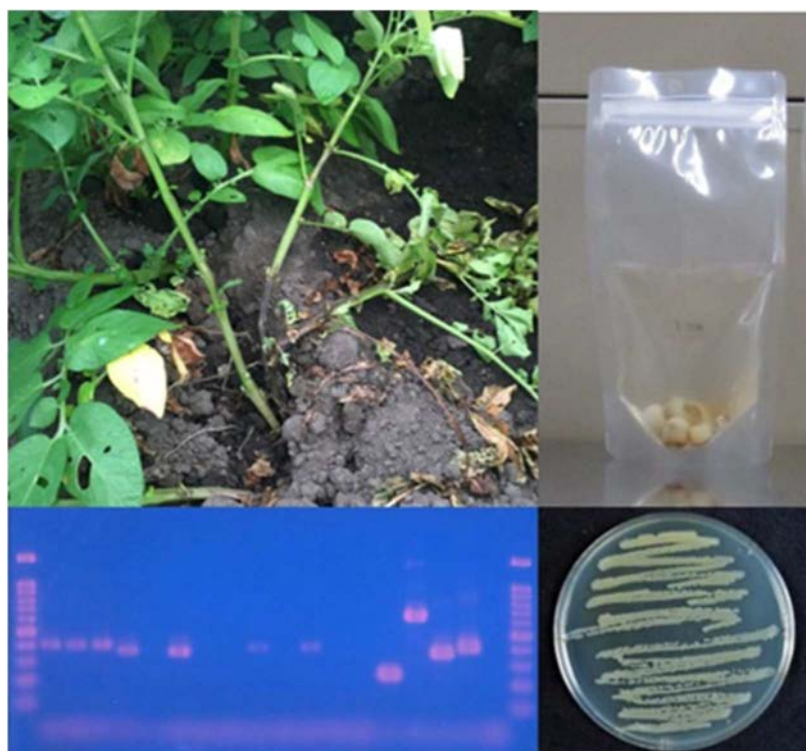


ジャガイモ黒あし病診断法 標準作業手順書

HP 公開版



目次

はじめに	1
免責事項	2
I. 日本における種ばれいしょ生産とジャガイモ黒あし病	3
1. ジャガイモ黒あし病について	3
2. 日本における種ばれいしょ生産と黒あし病検定	4
(1) 日本における種ばれいしょ生産体系	4
(2) 種ばれいしょ生産における黒あし病検定と高感度検出法の必要性	4
(3) 黒あし病発病株（疑似症状を含む）が発見された場合の対処	7
II. ジャガイモ黒あし病診断法の具体的作業手順	8
1. 種ばれいしょ生産工程とジャガイモ黒あし病検定	8
2. ほ場で見出された異常株の診断	8
(1) 異常株の症状	9
1) ジャガイモ黒あし病の萌芽期の症状	9
2) 生育初期～開花期ごろの症状	9
(2) 菌の分離	9
1) 磨碎液の調製	9
2) 寒天平板培地を用いた画線培養	11
3) コロニーの選抜	11
4) 分離した黒あし病菌菌株の保存	14
(3) DNA の調製	15
1) 熱抽出法	15
2) シリカメンブレン法（市販 DNA 抽出キット使用）	15
(4) PCR による黒あし病菌の検出	16

1) 黒あし病菌 4 菌種に対する PCR による検出の方針	16
2) プライマー	17
3) マスターミックス	17
4) PCR 条件	20
5) PCR 産物の電気泳動	21
3. 塊茎(種ばれいしょ)からの黒あし病菌の検出	23
(1) 塊茎の前処理	23
(2) 塊茎組織の採取	23
(3) 表面殺菌	24
(4) 塊茎片の破碎	25
(5) 増菌培養	25
(6) 培養液のサンプリング	26
(7) DNA 抽出・PCR	26
4. 環境試料からの黒あし病菌の検出	28
(1) 無病徴植物の茎葉部試料からの検出	28
(2) 根部試料からの検出	29
(3) 土壌試料からの検出	29
(4) 水試料からの検出	32
Ⅲ. ジャガイモ黒あし病診断法を利用した診断事例	34
1. 北海道後志地方で発生した <i>Dickeya chrysanthemi</i> によるジャガイモ黒あし病の診断事例 ..		34
(1) 発生状況	34
(2) 診断方法	34
(3) 診断結果	35
2. 北海道石狩地方で発生した <i>Dickeya dianthicola</i> によるジャガイモ黒あし病の診断事例 ...		36
(1) 発生状況	36
(2) 診断方法	36

(3) 診断結果	37
IV. 本技術の概要と従来技術に対する優位性	38
1. ジャガイモ黒あし病菌の高感度検出法の概要と黒あし病検定法（従来法）との比較	38
2. 従来法に対する高感度検出法の優位性	38
(1) 検出感度面の優位性	38
(2) 試薬コスト面の優位性	39
(3) 作業時間面の優位性	39
V. 想定される普及対象	42
VI. 用語解説	43
参考資料	45
担当窓口、連絡先	45

はじめに

ばれいしょは茎の一部である塊茎（子いも）を次作の種（種ばれいしょ）として利用する栄養繁殖性の作物であるため、ばれいしょの安定生産には健全な種ばれいしょの供給が不可欠です。そのため、種ばれいしょは、厳格な病害虫管理の下で、農研機構種苗管理センター、採種組合や採種農家のほ場で段階的に増殖することによって生産されています。しかし、2014（平成 26）年に、種ばれいしょ生産の最上流に位置する種苗管理センターの原原種ほ場において、種ばれいしょ伝搬性の細菌病害であるジャガイモ黒あし病（以下黒あし病）が発生し、一作品種の原原種の出荷停止措置が執られる事態となりました。これを受けて、平成 27 年度農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業「健全種ばれいしょ生産のためのジャガイモ黒あし病の発生要因の解明と高度診断法の開発（27005C）」（2015～2017 [平成 27～29] 年度）が実施され、同事業の中で、増菌培養^{〔→用語解説〕}と PCR 法^{〔→用語解説〕}を組み合わせた、塊茎、発病茎や土壌からの黒あし病菌の高感度検出法が開発されました。その後、同検出法の適用範囲を、雑草等の植物試料やほ場の滞水等の水試料に拡大するとともに、各工程における実施手順の修正等を行い、同検出法のブラッシュアップを図り、従来法に比べて検出感度で 1 オーダーの低下、試料コストで 64%の低減、作業時間で 45%の短縮を実現しました（IV章参照）。本書はそれらを取りまとめたジャガイモ黒あし病診断に関する手順書であり、種苗管理センター、採種団体、公設試験場等による塊茎の保菌検定のほか、黒あし病発病株の診断、黒あし病の発生生態解明等に貢献することを通して、ばれいしょの安定生産を担保するための健全な種ばれいしょの安定供給に資することを目的としています。

■ 免責事項

- ・農研機構は、利用者が本手順書に記載された技術を利用したことによる結果（誤診など）、あるいは技術を利用できないことによる結果について、一切責任を負いません。
- ・本手順書に記載の図表は全て農研機構が著作権を保有しているか、著作権が放棄されたものです。

I. 日本における種ばれいしょ生産とジャガイモ黒あし病

1. ジャガイモ黒あし病について

ジャガイモ黒あし病（以下黒あし病と略）は、種ばれいしょ伝搬性の細菌病で、植付後、まず種ばれいしょが腐敗し、種全体が腐敗すると不萌芽となります。発病した萌芽茎では、生育遅延や萎凋症状が認められ、茎基部から黒変腐敗し（黒あし症状、図 I - 1）、その後下葉から退緑、黄化、萎凋して倒伏します。子塊茎ではストロン基部から褐変、腐敗します。日本においては、1950 年代から北海道で発生が知られていましたが、近年、種ばれいしょほ場で発生がたびたび確認され、生産現場で問題となっています。

現在、日本国内において、黒あし病の病原菌は、従来から知られていたペクトバクテリウム・アトロセプチクム (*Pectobacterium atrosepticum*; 以下 Pa と略)、ペクトバクテリウム・ワサビアエ (*P. wasabiae*; 同 Pw) およびディケヤ・ディアンシコラ (*Dickeya dianthicola*; 同 Ddi) に、近年発生が国内で初めて報告されたペクトバクテリウム・カトボールム・ブラジリエンセ (*P. carotovorum* subsp. *brasiliense*; 同 Pcb) ならびにディケヤ・クリサンセミ (*D. chrysanthemi*; 同 Dch) を加えた 5 菌種が知られています (表 I - 1)。このうち、国内で 2000 年以降に発生した黒あし病菌は Pw、Pcb 及び Ddi であり、Dch は初発生報告の 1 件のみ、Pa は報告されていません。一方、欧米諸国においては、病原性が強い国内未発生菌種ディケヤ・ソラニー (*Dickeya solani*) による黒あし病が広がりつつあり、日本国内への侵入が警戒されています。



図 I - 1 ジャガイモ黒あし病

表 I -1 国内で報告されているジャガイモ黒あし病菌の菌種と特徴

菌種名	略称	特徴・発生頻度
ベクトバクテリウム・アトロセプチウム <i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Pa	2000年以降発生事例なし
ベクトバクテリウム・ワサビアエ <i>Pectobacterium wasabiae</i>	Pw	近年の主要菌種 内部保菌するが、保菌塊茎植付けによる発病はDdiより少ない
ベクトバクテリウム・カロトボールム・ブラジリエンセ <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliense</i>	Pcb	近年の主要菌種 内部保菌するが、保菌塊茎植付けによる発病はDdiより少ない
ディケヤ・ディアンシコラ <i>Dickeya dianthicola</i>	Ddi	近年も発生しているが頻度は低い 内部保菌し、保菌塊茎植付けによる発病が多い
ディケヤ・クリサンセミ <i>Dickeya chrysanthemi</i>	Dch	北海道で2017年に発生、黒あし病菌として世界初報告 国内の発生事例は1例のみ

2. 日本における種ばれいしょ生産と黒あし病検定

(1) 日本における種ばれいしょ生産体系

種ばれいしょは、植物防疫法にもとづく厳格な病害虫管理の下で、農研機構種苗管理センターから供給される種ばれいしょ（原原種）を、採種組合や採種農家の原種ほ場、採種ほ場で段階的に増殖することによって生産されています（図 I -2）。この中の各生産段階で、生産物（原原種、原種などの種ばれいしょ）や生産ほ場における異常株に対して黒あし病の検定が実施されています（図 I -2 中の赤囲み矢印）。

(2) 種ばれいしょ生産における黒あし病検定と高感度検出法の必要性

これまで黒あし病の検定には、種ばれいしょ伝搬性細菌病の病原菌（輪腐病菌、青枯病菌、黒あし病菌）の検出技術として開発された増菌 PCR 法^{〔→用語解説〕}（堀田ら 2008）をベースとした方法（黒あし病検定法、以下従来法；図 I -3）が用いられてきました。しかし、従来法には以下の改良点が残されていました。

- ① 黒あし病菌に選択性がないキング B (KB) 培地を増菌培養に用いている
- ② 嫌気条件の作出に流動パラフィンの重層を要する

③ 黒あし病菌 3 菌種 (Pa、Pw、*Dickeya* 属菌) の検出を 3 種類のシンプレックス PCR ^{〔→用語解説〕} により個別に実施する必要がある

④ 黒あし病菌の新菌種 Pcb に対応していない

これら加えて、近年種ばれいしょ以外の感染源由来の発病が疑われる事例も見出されていることから、雑草などばれいしょ以外の植物種、ほ場の土壌や水など幅広いサンプルを対象に加えた、高感度検出法を再構築する必要が生じました。そこで、従来法の増菌培養条件や PCR 条件に改良を加え、ジャガイモ黒あし病菌高感度検出法を開発しました (図 I -3)。本手法を適用することで、種ばれいしょの黒あし病診断の高精度化が図られるばかりでなく、ほ場環境中からの感染源の特定など、黒あし病の発生生態解明への貢献が期待でき、ひいてはばれいしょの安定生産を担保するための健全な種ばれいしょの安定供給に資することを目的としています。

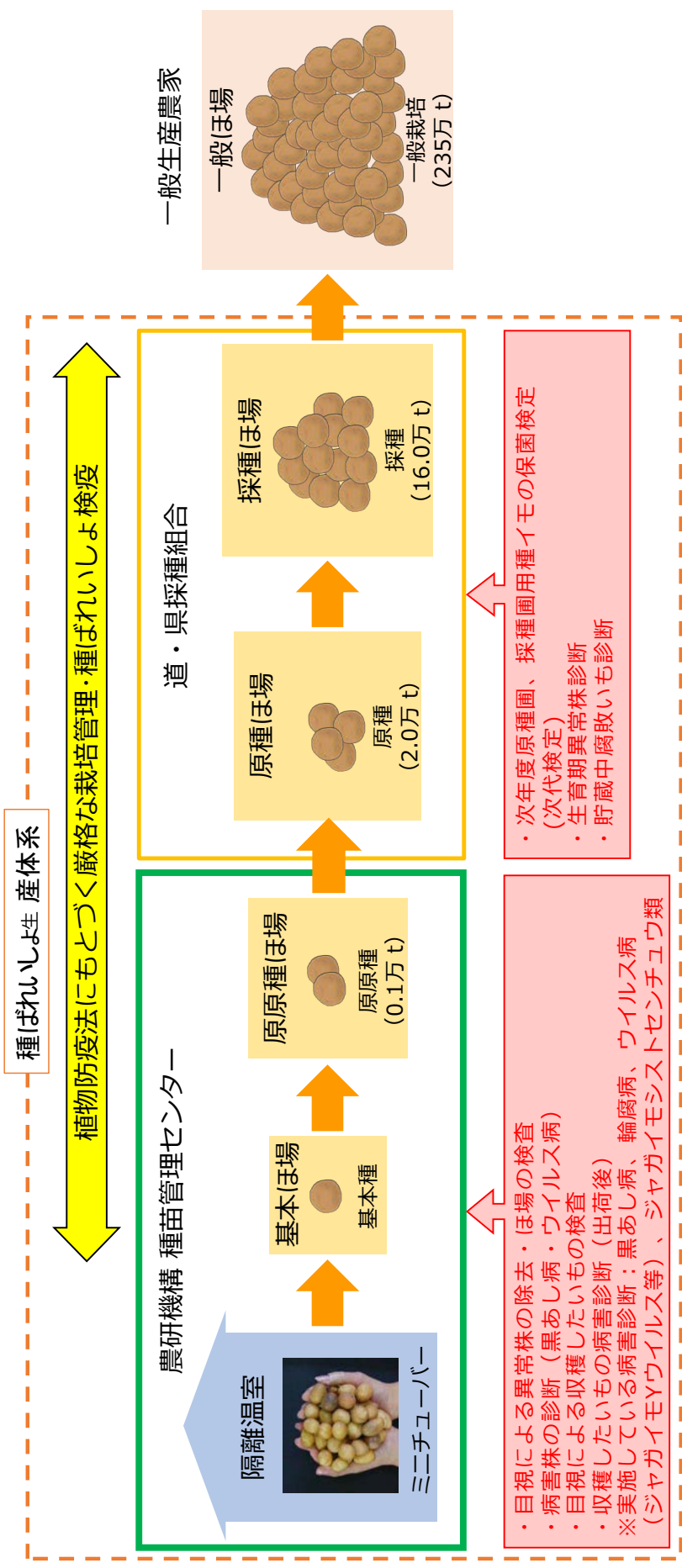


図 I -2 日本における種ばれいしよ生産体系と黒あし病検定

種苗管理センターでは隔離温室で栽培したミニチューパーを基本ほ場で栽培し、得られた基本種をさらに原原種ほ場で栽培して原原種を収穫し、採種組合に出荷しています。ほ場での栽培時に、目視による異常株の抜き取りを徹底して行い、それらの異常の原因を診断します。黒あし病以外にも、ウイルス病や輪腐病の検定も行なっています。

原原種は採種組合によりさらに増殖され、その過程においても収穫された原種、採種の種ばれいしよの保菌検定を行なって、検査に合格した種ばれいしよが一般農家の栽培に利用されます。

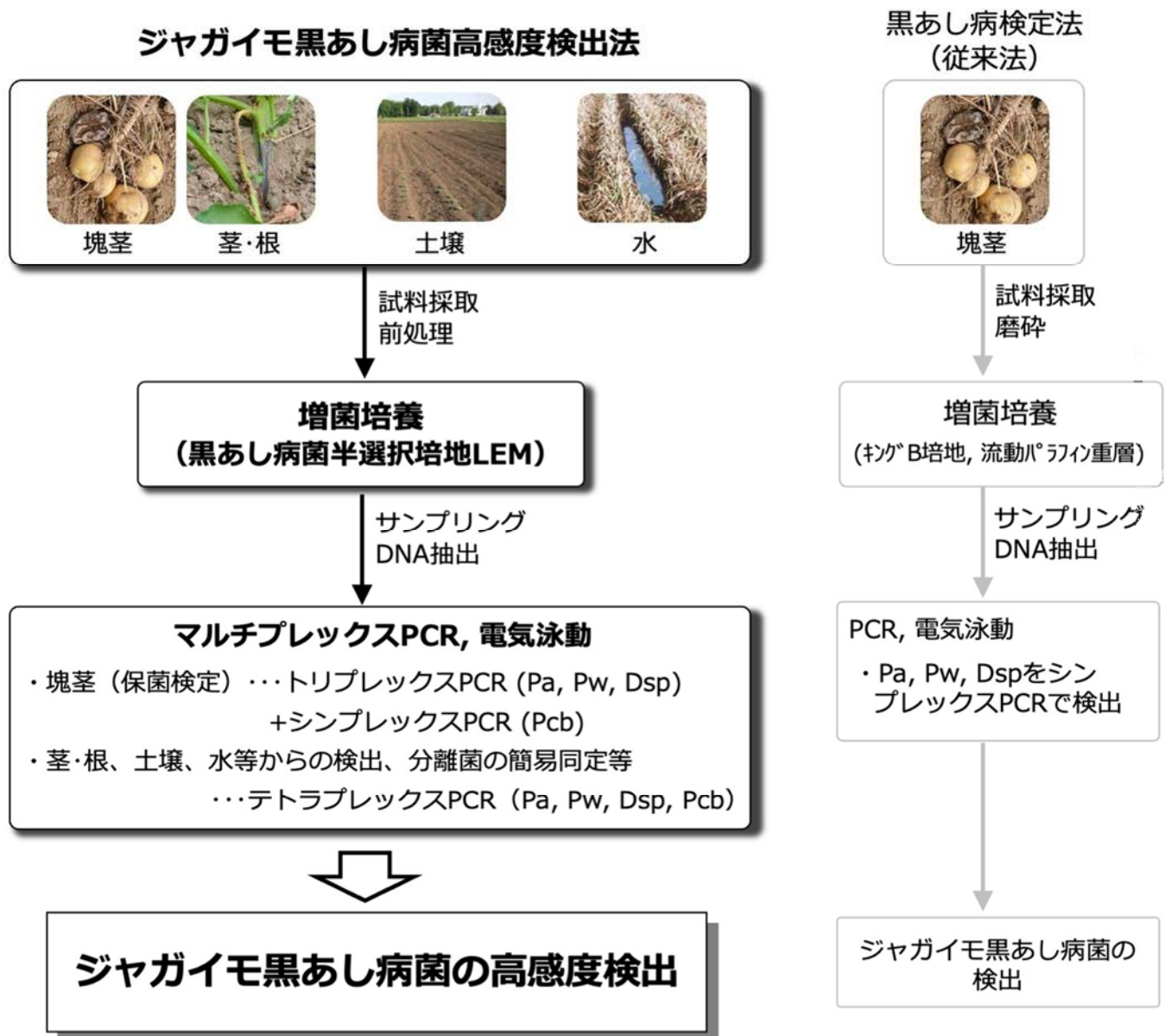


図 I -3 ジャガイモ黒あし病高感度検出法と黒あし病検定法 (従来法)

Pa: *Pectobacterium atrosepticum*, Pw: *P. wasabiae*, Pcb: *P. carotovorum* subsp. *brasiliense*, Dsp: *Dickeya* 属菌

(3) 黒あし病発病株 (疑似症状を含む) が発見された場合の対処

種ばれいしよ生産ほ場において、黒あし病と疑われる株を見つけた場合、農協担当者を通して各普及センターに連絡をするとともに、発病株を速やかに抜き取り、周辺への被害の拡大や病原菌の拡散を防ぎます。普及センターは農業試験場等へ診断を依頼し、診断結果に応じて速やかに適切な対応をとります。

II. ジャガイモ黒あし病診断法の具体的作業手順

本章では、ジャガイモ黒あし病診断法に関して、まず種ばれいしょ生産工程とその中で実施されるジャガイモ黒あし病診断について、次いで、生育ステージごとにはほ場で見出された異常株の診断、その後、収穫物である種ばれいしょからの黒あし病菌の検出、最後に、環境試料からの黒あし病菌の検出、について説明します。

なお、PCR 等に用いる試薬、器具、機器類等は複数市販されていますが、本 SOP では、農研機構で実施した診断法の開発、検証において有用性を確認したものを記載しています。

1. 種ばれいしょ生産工程とジャガイモ黒あし病検定

種ばれいしょ生産工程においては、植付前の時期、生育期間中、ならびに収穫後の収穫物を対象に、黒あし病検定が実施されています（図 II -1）。



図 II -1 種ばれいしょ生産の作業時期と黒あし病検定（北海道の場合）

2. ほ場で見出された異常株の診断

生育期間中にはほ場で見出された異常株の診断は、異常株の症状の観察、菌の分離（塊茎腐敗能の検定）、分離菌株の保存、DNA 調製、PCR による検出、の順に実施します。

(1) 異常株の症状

1) ジャガイモ黒あし病の萌芽期の症状

黒あし病の初期の症状は萌芽後 1～2 週間経過したころから現れ、萌芽茎の生育不良、萎凋、黒変腐敗を観察することができます。これらの症状を呈している生育不良株を掘り上げ、種塊茎の腐敗の有無を観察することにより、本症状が黒あし病に起因するものであるかを推定することができます (図 II -2)。



図 II -2 ジャガイモ黒あし病の萌芽期における症状(品種「トヨシロ」)

左：生育不良株（左）と正常株、中央：萎凋症状、右：種塊茎の腐敗と萌芽茎基部の黒変

2) 生育初期～開花期ごろの症状

日中に下位～上位葉の萎れが生じ、茎基部の黒変腐敗（黒あし症状）を発症します。同一の種いもより伸張した複数の茎すべてに発症することはまれで、多くの場合、一部の茎にのみ発症します。発症茎は病徴が進むと下葉から退緑、黄化、萎凋して倒伏します (図 II -3)。

(2) 菌の分離

菌の分離は清浄な実験室内で、無菌操作が可能なクリーンベンチを利用して行います。

1) 磨砕液の調製

発病茎から分離する場合、地際部から 5 cm 程度を採取し、以下の条件で表面殺菌します。



図 II -3 ジャガイモ黒あし病の生育初期～開花期における症状

左・中：下位～上位葉の萎凋症状（矢印）、右：黒あし症状（矢印）と茎葉の倒伏

- ① 70%エタノール 瞬間浸漬
- ② 1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液（アンチホルミン）3 分間浸漬
- ③ 滅菌水 浸漬（2 回）

クリーンベンチ中で、殺菌した試料を縦断し（図 II -4）、維管束褐変部、または健全組織と腐敗部位の境界部組織を 5 mm 角程度の大きさに切り出し、厚手のポリ袋または滅菌した乳鉢中で、少量（0.5 ml 程度）の滅菌水を添加して磨砕し、懸濁液（磨砕液）とします。

腐敗した種塊茎からの菌を分離する場合、腐敗した組織をスパチュラや白金耳で少量掻き取り、少量の滅菌水に懸濁して、懸濁液とします。



図 II -4 ジャガイモ黒あし病の発病茎地際部の断面

2) 寒天平板培地を用いた画線培養 [→用語解説]

1)で調製した摩砕液あるいは懸濁液を KB 寒天平板培地に画線し、25 °Cで 2 日間培養します (図 II -5)。普通寒天培地等の一般細菌用培地でも実施可能ですが、次項で述べるように、KB 培地を用いることにより、黒あし病菌のコロニーを識別することができます。基準菌株として既同定の菌株を同様に画線しておくこと、コロニー判別時の参考になります。黒あし病菌各菌種の基準菌株としては、以下の菌株が推奨されます (いずれも農研機構遺伝資源センター [<https://www.gene.affrc.go.jp/distribution.php>] から入手可能)。

- ・Pw MAFF301620、MAFF140142
- ・Pa MAFF301614、MAFF212554
- ・Pcb MAFF140116、MAFF140161
- ・Ddi MAFF140122、MAFF311041
- ・Dch MAFF212555



図 II -5 画線培養方法

(左の模式図は農研機構遺伝資源センターHPより引用)

3) コロニーの選抜

画線培養した培地上に現れたコロニーの中から、コロニーの性状が黒あし病菌と思われ

るもののうち（KB 寒天平板培地上において、乳白色で円形、全縁のコロニーを形成し、蛍光色素は産生しません。図 II -6） 、他のコロニーから明確に分離して、単独で存在しているものを選び、白金線あるいは乾熱滅菌した爪楊枝の先で突いて釣り上げ（釣菌） 、新しい培地に移植します（単コロニー分離） 。なお、KB 培地を使用することにより、黄色や赤色などに着色したコロニーや、蛍光色素産生性のコロニーは、黒あし病菌ではないと容易に識別できます。

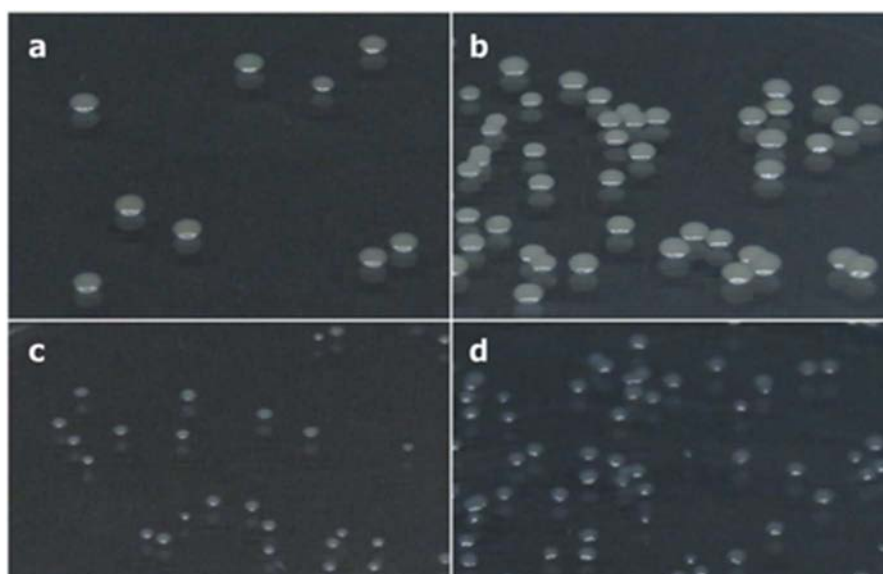


図 II -6 KB 寒天培地上での黒あし病菌のコロニー（25℃、48 時間培養後）

a: Pw; b: Pcb; c: Pa; d: Ddi

釣菌と同時に、第 4 項で述べる PCR 法による菌種同定を行う場合は、培地に移植後、そのまま楊枝先端をあらかじめ準備した PCR 反応液中で軽く濯ぎ、PCR 反応を行います。純粋な菌株とするためには、得られた単コロニー菌株を再度画線分離に供し、均一なコロニーが出現していることを確認した上で、再度分離状態の良い単一のコロニーを釣菌します。

新鮮な試料から病徴境界部等の適切な部位を採取して作成した磨砕液を画線培養した場合、外観がほぼ均一なコロニーが得られます。外観が異なるコロニーが現れた場合

には、主要なもの、または基準菌株と類似するものを複数選びます。Ddi は菌株によってもコロニーの外観が異なる場合があることに注意が必要です（図Ⅱ-7）。



図Ⅱ-7 KB 寒天培地上での *Dickeya dianthicola* 2 菌株のコロニー（25 °C、48 時間培養後）

コロニー外観での選抜が困難な場合には、黒あし病菌が塊茎腐敗能を有することを利用して、釣菌した菌株について、以下の塊茎腐敗能検定法により、塊茎腐敗能の有無で予備選抜した後、Ⅱ-2-(4)で後述する PCR 法による菌種同定に供試します。

【塊茎腐敗能検定法】

外観健全な塊茎を流水洗浄し、皮を剥いた後、厚さ 5 mm 程度のスライスを作成します。スライス表面に少量の菌体を塗布または菌懸濁液を滴下し、湿室中、25 °Cで一晩培養します。スライス上の接種部位の軟化腐敗状況を観察し、腐敗能の有無を判定します（図Ⅱ-8）。



図Ⅱ-8 塊茎スライスを用いた塊茎腐敗能検定（25 °C、24 時間培養後）

左：腐敗能あり、右：腐敗能なし

4) 分離した黒あし病菌菌株の保存

Ⅱ-2-(2)で単コロニー分離した菌株は、画線培養を複数回行って、性状の均一な菌株とした後、以降の各種性状解析や病原性検定等に供試することができるように保存を行います。

①通常保存（継代保存）

分離した黒あし病菌菌株の接種試験などを目的とした通常保存は、普通寒天培地や LB 寒天培地の斜面に増殖させた菌体を 4～15 °C 程度の比較的低温条件で保存し、使用時にそこから適当な培地に移植、増殖して使用します。*Pectobacterium* 属菌（Pa、Pcb、Pw）は斜面培地で数ヶ月程度は維持できますが、*Dickeya* 属菌は比較的短期間（1ヶ月程度）で再増殖が困難になる場合があるため、継代培養の間隔に注意が必要です。また、長期間継代培養を繰り返した場合、病原性など性状の変異を生じることがあるので、それらが疑われる場合は次項で述べる凍結保存菌体（フリーズストック）から再増殖を行います。

②長期保存（凍結保存）

分離した黒あし病菌菌株の病原性等の性状や遺伝的な変異を避け、増殖能力を維持した状態での長期保存を目的に、ディープフリーザー（-80 °C）を用いた凍結保存を行います。

寒天培地（斜面、平板）や液体培地で培養後、無菌的に集菌した菌体を、①滅菌 10% (v/v) グリセロール、または②10% (w/w) スキムミルク・1.5% (w/w) グルタミン酸ナトリウム水溶液に懸濁し、凍結保存チューブに 1 ml 程度ずつ分注し、-80 °C で凍結保存します。便法として、液体培養液に 1/4 容の滅菌 50% (v/v) グリセロールを添加、混合し（グリセロールの最終濃度 10% (v/v)）、-80 °C で凍結保存することもできます（グリセロールストック）。いずれの方法においても、頻回の凍結溶解を避けるた

め、ストックは複数本調製しておき、予め使用回数の上限（10 回など）を決めて使用します。

分離した黒あし病菌菌株は、他の研究者が研究材料として利用できるように、また分離者の手元の菌株ストックが何らかの原因で失われた場合の再入手先を確保するため、公的な遺伝資源保存機関（例えば農研機構遺伝資源センター <https://www.gene.affrc.go.jp/deposit.php> や製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター <https://www.nite.go.jp/nbrc/cultures/index.html>）に寄託しておくことが推奨されます。

(3) DNA の調製

1) 熱抽出法

黒あし病菌培養液から、PCR による検出や簡易同定に供試する鋳型 DNA を簡易に調製するためには、Hélias et al. (1998) の方法に準じた熱抽出法を用います。

培養液から遠心分離により集菌した菌体や、寒天培地から掻き取って集めた菌体を、セーフロックチューブ（エッペンドルフ 0030 120.086、QSP L-510-GRD-Q など）に入れた 100 μ l 程度の超純水や TE 緩衝液に懸濁します。チューブを 100 $^{\circ}$ C に予熱したヒートブロックに挿入して、10 分間加熱後、氷浴上で急冷します。加熱処理した懸濁液を遠心分離（9,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 分間）し、上清を鋳型 DNA 溶液として用います。ヒートブロックがない場合は、沸騰水にチューブを浮かべて 10 分間加熱後、同様に処理します。

2) シリカメンブレン法（市販 DNA 抽出キット使用）

黒あし病菌のシーケンス解析^{〔→用語解説〕}や、個体識別のための rep-PCR フィンガーブ

リンティング^{〔→用語解説〕}に供試する高純度の DNA を得るには、寒天培地や液体培地で培養した新鮮な菌体から、市販の DNA 抽出キット（NuculeoSpin Tissue、Machrei-Nagel 社など）を利用したシリカメンブレン法^{〔→用語解説〕}で調製します。調製はキットに付属のプロトコルに従ってください。

調製した DNA 溶液は吸光光度計（NanoDrop、サーモフィッシャーサイエンティフィックなど）を利用して DNA 濃度を測定し、5 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 8.5）や超純水を用いて DNA 濃度を調整後（20 ng/μl など）、以降の試験に供します。

(4) PCR による黒あし病菌の検出

1) 黒あし病菌 4 菌種に対する PCR による検出の方針

前項で示した方法で抽出した鋳型 DNA 溶液を PCR に供試して、黒あし病菌 4 菌種（*Pectobacterium wasabiae* [Pw]、*P. atrosepticum* [Pa]、*Dickeya* sp.、*P. carotovorum* subsp. *brasiliense* [Pcb]）を検出します。検出に用いる PCR としては、【1】 Pw、Pa、*Dickeya* sp.に対する 3 種のプライマーペア（DHT1/DHT2 [堀田ら 2008]、ECA1f/ECA2r [De Boer and Ward 1995]、ADE1/ADE2 [Nassar et al. 1996]）を用いたトリプレックス PCR と、Pcb に対する BR1f/L1r (Duarte et al. 2004) を用いたシンプレックス PCR の 2 種の PCR の組み合わせで検出を行う方法、【2】 4 菌種を 1 回の PCR で検出するテトラプレックス PCR (Pw 検出用プライマーには Contig 1F/Contig 1R [de Haan et al. 2008] を用い、他の 3 菌種については【1】と同じ)、の 2 手法を検出場面に応じて使い分けます。

【2】のテトラプレックス PCR は、①Pw の検出に用いる Contig 1F/Contig 1R の検出感度が DHT1/DHT2 に劣ることに起因して、トリプレックス法と比較して Pw の検出感度が劣る、②日本産 Pcb と *Dickeya* sp.の増幅産物のサイズ差が小さいため（Pcb

374 bp、*Dickeya* sp. 407 bp) 、アガロースゲル電気泳動におけるバンドの検出位置が近接している、などの短所があります (図 II -10 のレーン 6 および 7) 。そのため、テトラプレックス PCR の使用場面は、コロニー-PCR や、後述の増菌培養液由来のテンプレート等、十分に黒あし病菌由来の DNA 濃度が高いと想定される黒あし病菌の検出や菌種の簡易同定場面限定し、塊茎の保菌検定など高い検出感度を要する場合には、より検出感度が高い【1】の方法により黒あし病菌 4 菌種を検出します。

上記の手法において、*Dickeya* sp.の検出は、同属細菌に対する汎用プライマーである ADE1/ADE2 を用いているため、*Dickeya* sp.が検出された場合、別途 Ddi 特異的プライマー (Fujimoto et al. 2018) を用いた PCR を実施し、検出菌種が Ddi かそれ以外か識別を行う必要があります (図 II -11) 。日本国内においては Ddi のほかに *D. chrysanthemi* (Dch) による黒あし病が報告されていることに加え (Fujimoto et al. 2018)、欧州では *D. solani*による黒あし病の発生が拡大しており (van der Wolf et al. 2014)、我が国においても同菌種の侵入が警戒されていることから、本法により *Dickeya* sp.が検出された場合、Ddi であるかどうか、菌種の識別は慎重に行う必要があります。

2) プライマー

各 PCR 法に使用するプライマーを表 II -1 に示します。

3) マスターミックス

PCR酵素としては、AmpliTaq Gold 360 Master Mix (サーモフィッシャーサイエントフィック) を用います。上記以外のPCR酵素を使用する場合は、反応液組成や検出感度等を改めて検討する必要があります。

表Ⅱ-1 黒あし病菌 4 菌種の PCR 検出に用いるプライマー

対象菌種 ¹⁾	プライマー名	シーケンス (5' to 3')	増幅産物 サイズ (bp)	ターゲット領域	文献
Pw	Forward	TGTAGACTCATGCTGACGCCGA	270	16S-23SリボソームDNA ITS領域	堀田ら (2008)
	Reverse	GGTCATCGTGTTTTGTCAGCC			
	Forward	CCTGCTGGCGTGGGGTATCG	258	ジャガイモに萎凋症状を起こすPccサブグループに特異的なDNA断片	de Haan et al. (2008)
	Reverse	TTGCGGAAAGATGTCGTGAGTGCG			
Pa	Forward	CGGCATCATAAAAACACG	665 ²⁾	pectate lyase遺伝子	De Boer and Ward (1995)
	Reverse	GCACACTTCATCCAGCGA			
Dickeya sp.	Forward	GATCAGAAAAGCCCGCAGCCAGAT	407 ³⁾	pel ADE遺伝子クラスターのORF領域	Nassar et al. (1996)
	Reverse	CTGTGGCCGATCAGGATGGTTTTGTCGTGC			
Ddi	Forward	TTGCTGTGTTCCAGCCGGACACT	216	recA 遺伝子	Fujimoto et al. (2018)
	Reverse	GGATTGAAAACAGGTTACCAGCCAA			
Pcb	Forward	GCGTGCCGGGTTTTATGACCT	374 ⁴⁾	16S-23SリボソームDNA ITS領域	Duarte et al. (2004)
	Reverse	CA(A/G)GGCATCCACCGT			

1) Pw: *Pectobacterium wasabiae*, Pa: *P. atrocepticum*, Pcb: *P. carotovorum* subsp. *brasiliense*, Ddi: *Dickeya dianthicola*, 2) 国内産Paの増幅産物サイズ,文献値は690 bp, 3) 同Ddiの増幅産物サイズ,文献値は420 bp, 4) 同Pcbの増幅産物サイズ,文献値は322 bp

Pw、Paならびに*Dickeya* sp.検出のためのトリプレックスPCRのマスターミックス組成を表Ⅱ-2に、Pcb検出のためのシンプレックスPCRのマスターミックス組成を表Ⅱ-3に、Pw、Pa、*Dickeya* sp.ならびにPcb検出のためのテトラプレックスPCRのマスターミックス組成を表Ⅱ-4に、Ddi検出のためのシンプレックスPCRのマスターミックス組成を表Ⅱ-5に示します。なお、トリプレックスPCRならびにテトラプレックスPCRのマスターミックス組成からプライマーセットを減らし、超純水で総量を調整することにより、2菌種を対象としたデュプレックスPCRまたは1菌種を対象としたシンプレックスPCRも可能です。

表Ⅱ-2 Pw、Pa ならびに *Dickeya* sp.検出のためのトリプレックス PCR のマスターミックス組成

	プライマー濃度 (μM)	最終濃度 (μM)	所要量 (μl) /チューブ
AmpliTaq Gold 360 Master Mix			5.00
DHT1	20	0.5	0.25
DHT2	20	0.5	0.25
ECA1f	20	0.75	0.38
ECA2r	20	0.75	0.38
ADE1	20	0.2	0.10
ADE2	20	0.2	0.10
超純水			2.55
鋳型DNA溶液			1.00
合計 (μl)			10

表Ⅱ-3 Pcb 検出のためのシンプレックス PCR のマスターミックス組成

	プライマー濃度 (μM)	最終濃度 (μM)	所要量 (μl) /チューブ
AmpliTaq Gold 360 Master Mix			5.00
BR1f	20	0.5	0.25
L1r	20	0.5	0.25
超純水			3.50
鋳型DNA溶液			1.00
合計 (μl)			10

表Ⅱ-4 黒あし病菌 4 菌種 Pw、Pa、Dickeya sp.ならびに Pcb 同時検出のためのテトラプレックス PCR のマスターミックス組成

	プライマー濃度 (μM)	最終濃度 (μM)	所要量 (μl) /チューブ
AmpliTaq Gold 360 Master Mix			5.00
Contig 1F	20	0.5	0.25
Contig 1R	20	0.5	0.25
ECA1f	20	0.75	0.38
ECA2r	20	0.75	0.38
ADE1	20	0.2	0.10
ADE2	20	0.2	0.10
BR1f	20	0.5	0.25
L1r	20	0.5	0.25
超純水			2.05
鋳型DNA溶液			1.00
合計 (μl)			10

表Ⅱ-5 Ddi 簡易識別のための PCR のマスターミックス組成

	プライマー濃度 (μM)	最終濃度 (μM)	所要量 (μl) /チューブ
AmpliTaq Gold 360 Master Mix			5.00
dianthicola_recA_F1	20	0.5	0.25
dianthicola_recA_R1	20	0.5	0.25
超純水			1.50
鋳型DNA溶液			3.00
合計 (μl)			10

4) PCR 条件

各 PCR 法のための統一 PCR 条件を表Ⅱ-6 に、Ddi 識別のための PCR 条件を表Ⅱ-7 に示します。

表 II-6 黒あし病菌 4 菌種 Pw、Pa、*Dickeya* sp.ならびに Pcb 検出のためのシンプレックス PCR、トリプレックス PCR、テトラプレックス PCR のための統一 PCR 反応条件

熱変性	95 °C x 10 分	
	↓	
熱変性	94 °C x 30 秒	} 35 サイクル
アニーリング	62 °C x 45 秒	
伸長反応	72 °C x 1 分	
	↓	
伸長反応	72 °C x 7 分	
	↓	
保存	4 °C x ∞	

表 II-7 Ddi 識別のための PCR 反応条件

熱変性	94 °C x 5 分	
	↓	
熱変性	94 °C x 30 秒	} 35 サイクル
アニーリング	55 °C x 30 秒	
伸長反応	72 °C x 1 分	
	↓	
伸長反応	72 °C x 7 分	
	↓	
保存	4 °C x ∞	

5) PCR 産物の電気泳動

黒あし病菌 4 菌種を対象に、各 PCR 法を用いて得られた PCR 反応生成物の電気泳動結果を図 II-9～II-11 に示します。

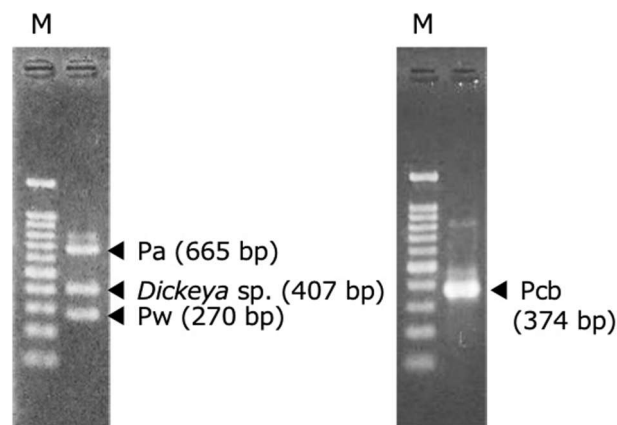


図 II-9 トリプレックス PCR による Pw、Pa および *Dickeya* sp. (左) とシンプレックス PCR による Pcb の検出(右)

2%アガロースゲル、0.5×TBE、左レーン (M) はサイズマーカー (100 bp DNA Ladder RTU、GeneDirex)

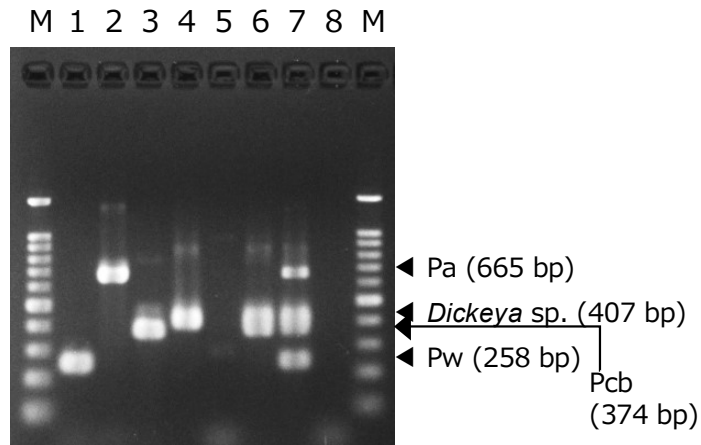


図 II-10 テトラプレックス PCR によるジャガイモ黒あし病菌 4 菌種 (Pw, Pa, Pcb, *Dickeya* sp.) の同時検出

2%アガロースゲル、0.5×TBE、M: DNA サイズマーカー(100 bp DNA Ladder RTU, GeneDirex); 1: Pw (EccNR-2); 2: Pa (Eca2); 3: Pcb (kbs-1); 4: *Dickeya* sp. (Ddi, MAFF311041); 5: SRP (軟腐病菌); 6: Dsp+Pcb; 7: Pw+Pa+Pcb+Dsp+SRP; 8: 蒸留水



図 II-11 Ddi 特異的プライマーを用いた Ddi の検出 *Dickeya* 属菌汎用プライマー (a) ならびに Ddi 特異的プライマー (b) を用いた PCR による各種 *Pectobacterium* 属菌および *Dickeya* 属菌の検出

1: Ddi、2: *Dickeya zeaе*、3: *D. dadantii*、4: *D. dieffecbaciae*、5: *D. chrysanthemi*、6: *D. solani*、7: Pa、8: Pw、9: Pcb、10: *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*、11: 蒸留水、供試菌株: 国内で分離・同定された Ddi (24 菌株)

3. 塊茎（種ばれいしょ）からの黒あし病菌の検出

種ばれいしょの検定において、黒あし病菌の塊茎の内部保菌の有無を明らかにするためには、黒あし病菌が存在する可能性の高いストロン基部組織を黒あし病菌の半選択培地である LEM 培地 (Hélias et al. 2012, 表 II -8) 中で前培養し (増菌培養)、培養液から抽出した鋳型 DNA を II-2-(4) で述べた PCR 法に供試することにより、黒あし病菌を高感度に検出することができます。

本項の方法による黒あし病菌の検出限界は、模擬条件下 (健全塊茎片を菌密度既知の黒あし病菌菌液とともに LEM 培地中で培養) においては、塊茎片 10 個単位の系 (10 塊茎片に対し培地 100 ml) ならびに同 60 個単位の系 (60 塊茎片に対し培地 500 ml) で、10 cfu/100 ml です。

表 II -8 LEM 培地の組成 (Hélias et al. 2012)

5 N NaOH	20 µl
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.0375 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1 g
K ₂ HPO ₄	0.1 g
DIPECTA, AG366 pectin (Agdia)	0.17 g
蒸留水	up to 100 ml

一定量の蒸留水に上から順に試薬を溶解する。蒸留水で定容後、オートクレーブ滅菌 (121 °C、15 分間) する。

(1) 塊茎の前処理

供試する塊茎のストロン基部周辺を中心に、予め水道水で洗浄し、ペーパータオル等で表面の水分を除きます。

(2) 塊茎組織の採取

直径 9 mm のイモクリ (抉芽刀、遠藤商事等) でストロン基部を採取します (図 II

-12)。イモクリは複数用意し、塊茎単位または集団ごとに 1%次亜塩素酸ナトリウム液等に浸漬消毒することで試料間の相互汚染を防止します。採取した塊茎片は、検定試

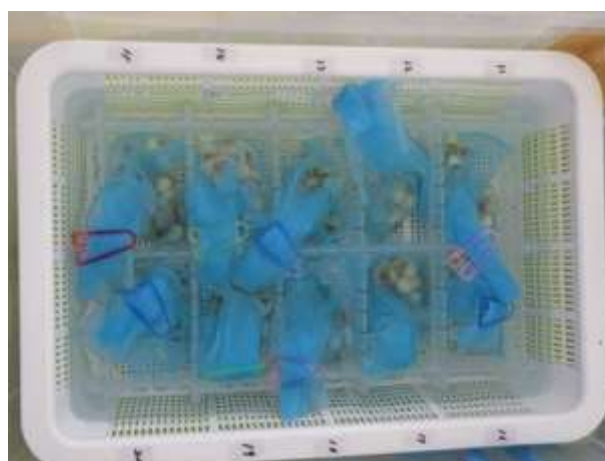


図Ⅱ-12 イモクリを用いたストロン基部から塊茎片採取（左）と採取した塊茎片(右)

料ごとにラベル付けしたネット等に入れます。

(3) 表面殺菌

ネットに入れた塊茎片を、70%エタノールに瞬間浸漬、次いで 1%次亜塩素酸ナトリウム液（有効塩素濃度 1%）に 5 分間浸漬後、流水で 5 分間洗浄します（図Ⅱ-13）。



図Ⅱ-13 塊茎片の表面殺菌

(4) 塊茎片の破碎

滅菌したピンセットなどを用いて、表面殺菌済みの塊茎片をチャック付きラミネート袋（商品名 ラミジップ、生産日本社、以下ラミジップ）へ移します。使用するラミジップの規格は、1 サンプルあたり塊茎片 10 個単位の検定の場合は LZ-10、同 60 個単位の場合は LZ-16 を使用します。塊茎片が入った袋の上から、袋が破損しないよう注意しながら、ゴムハンマー等で叩き、塊茎片を荒く破碎します（図Ⅱ-14）。



図Ⅱ-14 塊茎片の破碎

(5) 増菌培養

破碎した塊茎片が入ったラミジップに、LEM 培地を塊茎量の 10 倍量 (V/W) (10 個単位の場合 100 ml、60 個単位の場合 500 ml) 注加し、内部の空気を抜きなが



図Ⅱ-15 チャック付きラミネート袋（ラミジップ[®]）を利用した塊茎片の増菌培養

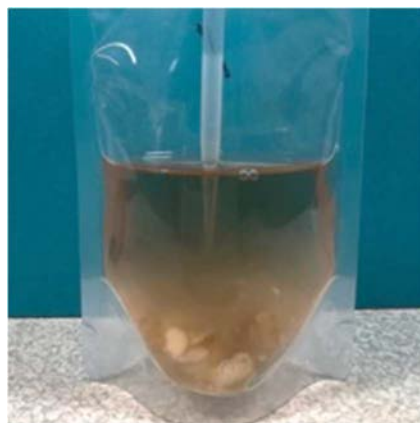
左：塊茎片 10 個単位の検定（使用する袋の規格：LZ-10）、右：同 60 個単位の検定（同：LZ-16）

らチャックを閉じます。ラミジップを軽く揉んで塊茎片と培地をよく混和した後、自立させた状態で、25 °Cで3日間静置培養します（図Ⅱ-15）。

（6）培養液のサンプリング

培地中で増殖した黒あし病菌は、塊茎片とともに沈殿している可能性があるため、チップ先端を培地の中層まで入れ、沈殿が舞い上がるように5回程度ピペティングをしてから、増菌液1 mlを1.5 mlマイクロチューブ（セーフロックタイプ）にサンプリングします（図Ⅱ-16）。ラミジップからのサンプリングの際は、試料間の相互汚染を避けるため、ロングチップ（サーモサイエンティフィック、3791-HR等）の使用を推奨します。

サンプリング後、直ちにDNA抽出に進むことができない場合は、チューブを4 °Cで保存します（4 °Cで10日間保存後の培養液からPCRで黒あし病菌を検出可能であることを確認済み）。



図Ⅱ-16 チャック付きラミネート袋（ラミジップ）から塊茎片の増菌培養液のサンプリング

（7）DNA抽出・PCR

サンプリングした増菌培養液を遠心分離（9,000 ×g、4 °C、5 分間）に供して、上清を除きます。その際、上清の除去程度が最終的な黒あし病菌の検出成否に大きく影

響するため、図 II -17 を参考に適切な除去を行います。

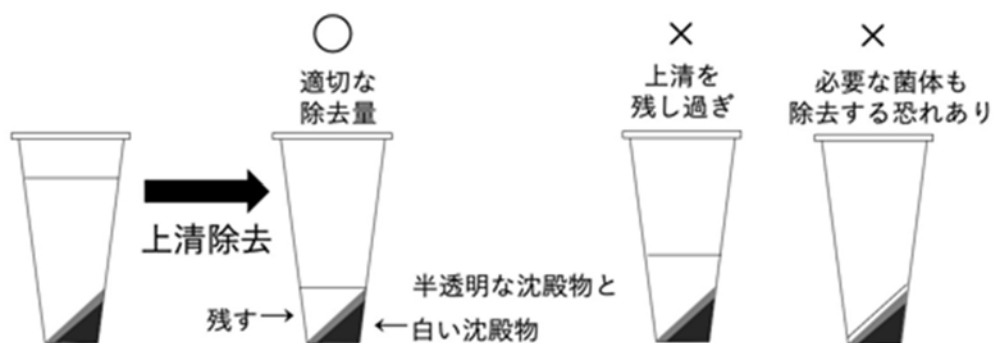


図 II -17 DNA 抽出工程における遠心分離後の上清除去の目安

得られた沈殿は滅菌超純水 1 ml に懸濁し、再度同条件で遠心分離します。上清を除去後、沈殿を TE 緩衝液 100 μ l に懸濁後、II -2-(3)に述べた方法に従って DNA を熱抽出します。抽出した鋳型 DNA 溶液は PCR 法に供試するまで -20 $^{\circ}$ C 以下で保存し、融解後に転倒混和して、遠心分離 (9,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 min) 後の上清を PCR に供試します。鋳型 DNA 溶液は、II -2-(4)に準じて PCR に供試し、黒あし病菌を検出します。

4. 環境試料からの黒あし病菌の検出

(1) 無病徴植物の茎葉部試料からの検出

無病徴の茎葉部試料からの黒あし病菌の検出は以下の手順に沿って実施します。

1) 磨砕液の調製

Ⅱ-2-(2)項と同様にして、地際部の茎などを 5 cm 程度切り取り、水洗後、表面殺菌します。クリーンベンチ中で維管束部組織を切り出し、少量 (0.5 ml 程度) の滅菌水中で摩砕します。摩砕は乳鉢と乳棒を用いるか、サンプル数が多数の場合は細胞破碎機 (マルチビーズショッカー、安井器械など) を用いて行います。

2) 増菌培養

マイクロチューブに 1 ml ずつ分注した LEM 培地に、1) で調製した茎摩砕液を 10 μ l 加え、転倒混和した後、25 $^{\circ}$ C で 3 日間静置培養します。

3) サンプルング

増菌培養液をボルテックスにより混和後、100 μ l を 1.5 ml マイクロチューブ (セーフロックタイプ) にサンプルングします。遠心分離 (9,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 分間) により上清を除去した後、TE 緩衝液 80 μ l に再懸濁します。残余の培養液は、黒あし病菌の分離に備え、グリセロールストックとして凍結保存します (Ⅱ-2-(2)-4) 参照)。

4) DNA 抽出・PCR

3) で調製した懸濁液からの DNA 抽出ならびに PCR は、それぞれⅡ-2-(3)ならびⅡ-2-(4)項に既述した方法に従って実施し、黒あし病菌を検出します。DNA 溶液を凍結保存した場合、PCR 供試前に再懸濁し、遠心分離 (9,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 分間) した上

清を鋳型 DNA 溶液として用います。

(2) 根部試料からの検出

植物の根部試料からの黒あし病菌の検出は以下の手順に沿って実施します。

1) 根部試料の採取と破碎

根部を水洗し、付着した土壌や植物残渣などを除きます。根内部に存在する黒あし病菌を検出する場合は、3-(3)に準じた方法で表面殺菌を行います。ペーパータオル等で水分を除いた後、根部全体の数カ所から 10 g 程度を採取し、チャック付ラミネート袋（ラミジップ LZ-10）に入れ、図 II -14 と同様にして、袋の破損に注意しながら、袋の上からゴムハンマー等で叩き、根片を荒く破碎します。

2) 増菌培養

破碎した根片が入ったラミジップに LEM 培地 100 ml を注加し、内部の空気を抜きながらチャックを閉じます。袋を軽く揉んで根片と培地をよく混和した後、25 °C で 3 日間静置培養します。

3) サンプルング・DNA 抽出・PCR

II -3-(6)および(7)項（塊茎からの検出）と同様にして、培養液のサンプルング、DNA 抽出を行い、II -2-(4)項に従って PCR を実施します。

(3) 土壌試料からの検出

土壌試料からの黒あし病菌の検出は以下の通り行います。

1) 増菌培養

土壌試料 10 g を直接チャック付ラミネート袋（ラミジップ LZ-10）に量り取り、LEM 培地 100 ml を注加します。内部の空気を抜きながらチャックを閉じ、袋を軽く揉んで土壌を培地中に懸濁した後、25 °C で 5 日間静置培養します。

2) サンプルング

培地中で増殖した黒あし病菌は、土壌とともに沈殿している可能性があるため、チップ先端（ロングチップの使用を推奨）を培地の中層まで入れ、沈殿が舞い上がるように 5 回程度ピペティングをしてから、増菌液 1 ml を 1.5 ml マイクロチューブにサンプルングします（図 II -18）。その際、多量の土壌混入は PCR を阻害する恐れがあるため、ピペティングして数秒待ってから増菌液をサンプルングし、細かい土壌粒子ができるだけ含まれないようにします。サンプルングした培養液を遠心分離（90 ×g、4 °C、5 分間）し、上清 800 μl を新しい 1.5 ml マイクロチューブ（セーフロックタイプ）に移します。



図 II -18 チャック付きラミネート袋（ラミジップ）から土壌の増菌培養液のサンプルング

3) DNA 抽出・PCR

2) でサンプリングした培養上清を遠心分離 (9,000 ×g、4 °C、5 分間) に供し、得られた沈殿を滅菌超純水 1 ml に懸濁します。再度同条件で遠心分離し、上清を除去後、沈殿を TE 緩衝液 100 µl に懸濁します。以後、II-2-(3)に述べた方法に従って DNA を熱抽出して鋳型 DNA 溶液を調製し、II-2-(4)に準じて PCR に供試します。

調製した DNA 溶液が暗褐色に着色している場合は、土壌由来の腐植酸等の PCR 阻害物質の混入が考えられ、これらによる PCR 反応への悪影響が懸念されます。この場合、セファデックス G-75 (メルク) -ポリビニルポリピロリドン (PVPP) スピнкаラムを用いたクリーンアップ (Cullen and Hirsch 1998) を行うことにより、PCR 結果の改善が認められる場合があります。スピнкаラムの調製ならびにクリーンアップは以下の手順で行います。

【セファデックス G-75-PVPP スピнкаラムによる DNA 溶液のクリーンアップ】

- ① マイクロバイオスピノマトグラフィー用カラム (以下スピнкаラム、日本バイオラッド、品番 7326204) を 1.5 ml マイクロチューブにセット
- ② スピнкаラムに TE 緩衝液懸濁セファデックス G-75 (セファデックス G-75 を TE 緩衝液で膨潤後、オートクレーブしたもの) 0.8 ml を注加
- ③ 遠心分離 (350 ×g、4 °C、2 分間) し、流出液を廃棄
- ④ TE 緩衝液懸濁 PVPP (PVPP と等量の TE 緩衝液を混合し、オートクレーブしたもの) 0.8 ml を重層
- ⑤ 遠心分離 (350 ×g、4 °C、2 分間) し、流出液を廃棄
- ⑥ 滅菌超純水 100 µl を注加
- ⑦ 遠心分離 (350 ×g、4 °C、2 分間) し、流出液を廃棄
- ⑧ 滅菌超純水 100 µl を注加

- ⑨ 遠心分離（350 ×g、4 °C、2 分間）し、流出液を廃棄
- ⑩ 調製したセファデックス G-75/PVPP カラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブにセット
- ⑪ 土壌増菌液から抽出した DNA 溶液（80 μl）をカラムに注加
- ⑫ 遠心分離（350 ×g、4 °C、1 分間）
- ⑬ 静置（2 分間）
- ⑭ 遠心分離（350 ×g、4 °C、5 分間）
- ⑮ 流出液を精製 DNA 溶液として供試

(4) 水試料からの検出

ほ場の滞水や明渠排水等の水試料からの黒あし病菌の検出は以下の手順に沿って実施します。

1) 水試料の前処理

採取した水試料に混入している土壌粒子や粗大有機物（根などの植物残渣など）は、増菌培養前にろ紙などを用いて濾過を行い除去します。

2) 増菌培養

水試料 10 ml をチャック付ラミネート袋（ラムジップ LZ-10）に計り取り、LEM 培地 100 ml を注加します。内部の空気を抜きながらチャックを閉じ、袋を軽く揉んでよく混和した後、袋を立てた状態で、25 °C で 5 日間静置培養します。

3) サンプリング・DNA 抽出・PCR

培地中で増殖した黒あし病菌は、袋の底に沈殿している可能性があるため、チップ先端（ロングチップの使用を推奨）を培地の中層まで入れ、沈殿が舞い上がるように 5 回程度

ピペティングをしてから、増菌液 1 ml を 1.5 ml マイクロチューブにサンプリングします。

DNA 抽出ならびに PCR は、それぞれⅡ-2-(3)ならびⅡ-2-(4)項に既述した方法に従って実施し、黒あし病菌を検出します。DNA 溶液を凍結保存した場合、PCR 供試前に再懸濁し、遠心分離 (9,000 ×g、4 °C、5 分間) した上清を用います。

Ⅲ. ジャガイモ黒あし病診断法を利用した診断事例

1. 北海道後志地方で発生した *Dickeya chrysanthemi* によるジャガイモ黒あし病の診断事例

(1) 発生状況

2017年7月に、北海道後志地方のばれいしょほ場において、茎基部の黒変腐敗ならびに茎葉の萎凋などの症状を呈するばれいしょ株が見いだされました（図Ⅲ-1）。発症株を掘り上げたところ、種いもの腐敗が認められ、茎葉の症状と合わせて、ジャガイモ黒あし病が疑われました。



図Ⅲ-1 北海道後志地方で発生した黒あし病の類似症状（矢印）

(2) 診断方法

ほ場で採取した発病株について、茎を縦断し内部の症状を観察するとともに、維管束褐変部分（図Ⅱ-4参照）または軽度の腐敗部分を切り出しました。表面殺菌後に切片を摩砕し、磨砕液をKB寒天平板培地に画線しました。25℃で2日間培養後、蛍光物質

を産生せず、コロニー性状が黒あし病菌と類似した細菌を釣菌し、その中から塊茎腐敗能が認められたものを選び、PCR に供試しました。分離菌株は健全種いもに浸漬接種してほ場および温室で栽培し、病原性の確認を行ったほか、各種細菌学的性状解析ならびに分子系統解析を実施しました。

(3) 診断結果

発病株はすべて茎内部の腐敗ならびに維管束褐変が認められ、病徴部より塊茎腐敗能を有する細菌が分離されました。分離菌株から DNA を調製し、PCR に供試した結果、*Dickeya* 属細菌由来の増幅産物（407 bp）が検出されました。そこで同菌株の DNA をさらに Ddi 特異的プライマーを用いた PCR に供試したところ、増幅産物は得られなかったことから、分離菌株は Ddi ではないと考えられました。詳細な解析の結果、本分離菌株は、これまで黒あし病の病原として報告のない *D. chrysanthemi* (Dch) であることが判明しました。分離菌株の種いも接種試験において、黒あし病の症状が再現され、罹病部位から接種菌が再分離されました。また、分離菌株は炭水化物からの酸の生成や有機酸の利用能等の細菌学的性状が Dch とほぼ一致しました。以上の結果、北海道後志地方のばれいしよで発生したは症状は Dch によるジャガイモ黒あし病と診断され、日本におけるジャガイモ黒あし病の病原として Dch が追加されました。

本診断事例に示したように、診断の結果、*Dickeya* 属菌であるが、Ddi ではない可能性が高い場合は、さらに菌種の判定に詳細な解析を行う必要がありますので、2-(3) 黒あし病発病株（疑似症状を含む）が発見された場合の対処に従って、農業試験場等へ診断を依頼してください。

2. 北海道石狩地方で発生した *Dickeya dianthicola* によるジャガイモ黒あし病の診断事例

(1) 発生状況

2018年7月、北海道石狩地方の種ばれいしょほ場において、雨天による滞水が生じたあと、茎基部の黒変腐敗ならびに茎葉の萎凋など症状を呈し、黒あし病と推定される株が見いだされました（図Ⅲ-2）。同ほ場では、発病が一部の滞水区画に限られているなどの現象が認められ、ほ場での感染が推察されました。



図Ⅲ-2 北海道石狩地方で発生した黒あし病（矢印）

(2) 診断方法

ほ場で採取した発病株について、茎を縦断し病徴部組織を切り出し、表面殺菌後に切片を摩砕し、磨砕液を KB 寒天平板培地に画線しました。25℃で2日間培養後、蛍光物質を産生せず、コロニー性状が黒あし病菌と類似した細菌を釣菌し、その中から塊茎腐敗能が認められたものを選抜しました。熱抽出法により調製した DNA を PCR に供試して同

定を行うとともに、発病区画近傍の畦畔に自生する雑草を対象に感染源の探索を行いました。雑草根ならびに根域土壌を LEM 培地で増菌培養後、培養液から DNA を抽出し、菌種特異的 PCR 法で検出を行いました。

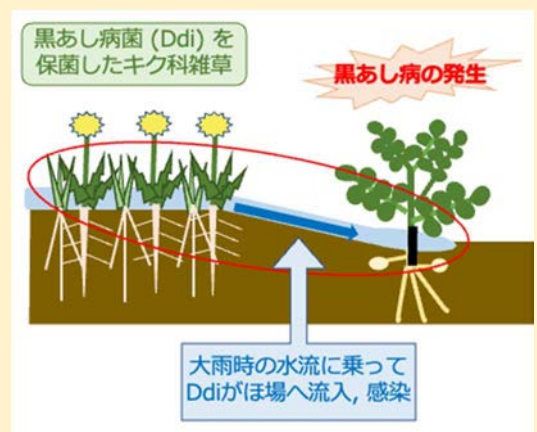
(3) 診断結果

発病株はすべて茎内部の腐敗ならびに維管束褐変が認められ、病徴部より塊茎腐敗能を有する細菌が分離されました。分離菌株から DNA を調製し、PCR に供試した結果、*Dickeya* 属細菌由来の増幅産物（407 bp）が検出されました。同菌株の DNA をさらに Ddi 特異的プライマーを用いた PCR に供試したところ、特異的断片の増幅が認められたため、分離菌株は *D. dianthicola* (Ddi) と同定されました。

本診断法を用いて、発病区画近傍の畦畔に自生する雑草を対象に、黒あし病菌の感染源の探索を行った結果、ヒメジョオンなど複数種のキク科雑草の根ならびに根域土壌から Ddi が分離、同定されました。以上から、本発病事例では、畦畔に自生するキク科雑草が Ddi の感染源となっていた可能性が示唆されました。

【コラム】 ジャガイモ黒あし病菌の新たな感染経路の解明

Ⅲ-2 の発生事例では、発病区画近傍の畦畔に自生していたヒメジョオンなど複数種のキク科雑草の根ならびに根域土壌のほかに、大雨のあと、ほ場にできた水たまりからも Ddi が分離同定されました。これらの分離菌株は、ばれいしよに黒あし病を発病させました。分離菌株についてさらに解析を進めた結果、黒あし病発病株、雑草、さらにはほ場のたまり水からの分離菌株はすべて遺伝的に同一であることが分かりました。以上のことから、これまで謎であったほ場環境中の黒あし病菌（Ddi）の感染源のひとつがキク科雑草であり、大雨時の水の流れに乗ってほ場のジャガイモにたどり着いて感染、発病させたことが明らかになり、種いも以外の黒あし病菌の感染経路として世界で初めて報告しました。



IV. 本技術の概要と従来技術に対する優位性

1. ジャガイモ黒あし病菌の高感度検出法の概要と黒あし病検定法（従来法）との比較

本手順書で記述したジャガイモ黒あし病診断法の根幹部分である、ジャガイモ黒あし病菌の高感度検出法（以下高感度検出法）は、従来用いられてきた黒あし病検定法（以下従来法）を改良し、黒あし病菌に対する特異性や検出感度を高め、かつ低コスト化ならびに省力化を実現したものです（図 I -3）。

高感度検出法では、増菌培養に用いる培養基材や PCR 反応試薬を変更し、培養条件、反応条件の最適化を図りました。その結果、検出感度の向上、増菌培養手法の簡素化や PCR 反応のマルチプレックス化に伴う省力化に加え、使用試薬の変更に伴う省コスト化を図ることができました。以下に、図 I -3 に示した高感度検出法ならびに従来法を用いて、モデル試験における検出限界の比較、ならびに塊茎試料 24 サンプルから黒あし病菌の検出の実施することを想定した場合の、主要工程で使用する試薬コストならびに作業時間の試算結果を比較しました。

2. 従来法に対する高感度検出法の優位性

(1) 検出感度面の優位性

塊茎からの黒あし病菌の検出を想定したモデル試験（両手法で用いる培地に塊茎片と菌量既知の菌液を添加して培養し、同条件で DNA 抽出、PCR を実施し、検出限界を比較）において、従来法と比較して、高感度検出法では検出限界が 1 オーダー低下し、従来法と比較し、検出感度の向上が確認されました（表IV-1）。

表IV-1 高感度検出法および従来法の黒あし病菌検出限界の比較（モデル試験）

対象菌種 ¹⁾	初期菌密度 (cfu/10 ml)	検出結果 ²⁾	
		従来法（キングB）	高感度検出法（LEM）
Pw	5×10^1	3/3	3/3
	5×10^0	1/3	3/3
Pa	8×10^1	3/3	3/3
	8×10^0	1/3	3/3
Pcb	2×10^1	3/3	3/3
	2×10^0	2/3	3/3
Ddi	7×10^1	3/3	3/3
	7×10^0	0/3	3/3
蒸留水		0/3	0/3

1) Pw: *Pectobacterium wasabiae*, Pa: *P. atrocepticum*, Pcb: *P. carotovorum* subsp. *brasiliense*, Ddi: *Dickeya dianthicola* 2) キングB培地またはLEM 10 mlに健全種ばいしょ由来のくり抜き片1個と所定菌密度の菌液100 μlを加え、25℃で72時間静置培養後、培養上清からDNAを抽出し、PCRで黒あし病菌を検出した。3反復中の陽性サンプル数を示す。

(2) 試薬コスト面の優位性

高感度検出法と従来法の1サンプルあたりの試薬コストを比較した結果、増菌培地の培養基材の変更、PCR酵素の変更ならびにPCR回数の削減により、試薬コストは従来法の1サンプルあたり237.1円に対し、高感度検出法は86.3円と、約64%低減できました（表IV-2）。

(3) 作業時間面の優位性

表IV-3 脚注の前提条件にもとづいて、塊茎試料24サンプルから、高感度検出法ならびに従来法を用いて、黒あし病菌の検出の実施することを想定した場合の、想定作業時間を試算し、比較した結果、主としてマルチプレックス化によるPCR回数と、電気泳動回数の削減により、高感度検出法の作業時間は従来法の約45%短縮できることが明らかになりました（表IV-3）。

表IV-2 高感度検出法または従来法を用いて塊茎試料 24 サンプルからの黒あし病菌検出を想定した試薬コストの比較

①増菌培地 (従来法：キングB, 高感度検出法：LEM, 100 ml/サンプル)	従来法			高感度検出法						
	試薬	メーカー [†]	価格 (¥)	内容量	使用量 (g, ml) /サンプル	各試薬 単価(¥) /サンプル	使用量 (g)/ サンプル	各試薬 単価(¥) /サンプル		
1サンプルあたり単価(¥) (従来法からの低減率%)	プロテオースベプトンNo.3	BD	25,700	500 g	20	2	102.8			
	グリセロール	FW	1,730	500 ml	10	1	3.5			
	KH ₂ PO ₄	FW	1,700	500 g	1.5	0.15	0.5	0.3		
	MgSO ₄ ・7H ₂ O	FW	1,200	500 g	5	0.5	1.2	0.1		
	(NH ₄) ₂ SO ₄	FW	1,600	500 g				0.3		
	DIPECTA, AG366 pectin	AG	60,480	500 g				20.6		
							108.0	21.3		
								▲ 80.3		
②PCR (10 µl反応系)	試薬		価格	内容量	使用量 (U)/反応	PCR回数	使用量 (U)/サンプル	使用量 (µl)/サンプル		
1サンプルあたり単価(¥) (従来法からの低減率%)	TaKaRa Ex Taq	TB	30,000	250 U	0.25	4	1.0			
	AmpliTaq Gold 360 Master Mix	TF	30,200	5,000 µl				5.0		
							120.0	60.4		
								▲ 49.7		
③電気泳動 (2%, 24サンプル/25 ml/ゲル)	試薬		価格	内容量	使用量(g) /ゲル	サンプル数 /ゲル	泳動回数	使用量(g) /ゲル	サンプル数 /ゲル	泳動回数
1サンプルあたり単価(¥) (従来法からの低減率%)	Agarose S	NG	55,000	500 g	0.5	24	4	0.5	24	2
							9.2			4.6
										▲ 50.0
1サンプルあたり単価(¥) (従来法からの低減率%)							237.1			86.3
										▲ 63.6

価格は2020年12月時点 † BD：日本ベクトンディッキンソン、FW：富士フィルム和光純薬、AG：Agdia、TB：タカラバイオ、TF：サーモフィッシュヤーサイエンス、NG：ニッポンジーン

表IV-3 高感度検出法または従来法を用いて塊莖試料 24 サンプルからの黒あし病菌
検出を想定した作業時間の比較

作業工程	項目	サンプル数	従来法		高感度検出法	
			回数・種類	所要時間(分) /24サンプル	回数・種類	所要時間(分) /24サンプル
サンプリング	イモクリ,袋詰め (10塊莖/サンプル)	24	2.5	60.0		60.0
増菌培養	培地分注	24	2.5			
	流動パラフィン重層	24	0.5	12.0		
	培養液サンプリング	24	0.5	12.0		12.0
DNA抽出		24		60.0		60.0
PCR	マスターミックス調製		5.0	20.0	2	10.0
	マスターミックス分注	24	0.2	16.0	2	8.0
	サンプル分注	24	0.2	16.0	2	8.0
	反応時間		120.0	480.0	2	240.0
電気泳動	サンプル分注	24	0.2	16.0	2	8.0
	泳動時間		50.0	200.0	2	100.0
	染色・記録		60.0	240.0	2	120.0
	24サンプルあたり作業時間(分)			1,132.0		626.0
	(従来法からの低減率%)					▲ 44.7

比較のための前提条件は以下の通り

- ・塊莖片サンプリング (イモクリ)、袋詰め、培地分注、培養液サンプリングに要する時間は両手法で同一とする。
- ・培地調製、増菌培養時間、流パラ廃棄処理に要する時間は作業時間に含めない。
- ・DNA抽出工程は同一 (熱抽出法) とし、所要時間も等しい。
- ・PCRはサーマルサイクラー1台で実施 (4種のシンプレックスPCRは個々のサイクル条件で実施)
- ・電気泳動は標準的なサブマリン型泳動装置1台で実施 (最大25レーン [24サンプル+マーカー])

V. 想定される普及対象

本技術は、主に種ばれいしょ生産を担う農研機構種苗管理センター各農場、農業団体検査機関、ならびにばれいしょ病害の診断対応を担う公設農業試験研究機関、民間研究機関への普及が想定されます。

VI. 用語解説

画線培養：植物組織の磨砕液などから、細菌などを分離するための培養方法。懸濁液を塗布した白金耳で、寒天培地表面に連続してジグザグに線を引く。次いで、滅菌した白金耳を用い、1 回目のジグザグ線の末端付近を始点にして、1 回目の線と重ならないようにして、同様にジグザグ線を引きます。これをさらに 1～2 度繰り返した後、恒温器中で一晩から数日間静置培養することにより、引いたジグザグ線上のいずれかの場所に単一の細胞から増殖したと考えられる細胞塊（コロニー）が出現します（本書の図 II -5 参照）。これを滅菌した白金線や爪楊枝などで釣り上げます（単コロニー分離）。得られた単一のコロニー由来の菌株について、出現するコロニーの性状が均一になるまで単コロニー分離を複数回繰り返すことにより、得られた菌株を純粋菌株として保存、試験に供試します。

シーケンス解析：DNA を構成する 4 種類のヌクレオチド（アデニン [A]、チミン [T]、グアニン [G]、シトシン [C]）の並び方（塩基配列、シーケンス）を決定すること。未知の菌株の DNA から、PCR 法で増幅して得られた増幅断片についてシーケンス解析を行い、DNA データベース中の登録情報と比較することにより、菌種の同定や推定ができます。

シリカメンブレン法：DNA を簡便に精製する方法の一つで、高塩濃度条件下で、DNA がシリカメンブレン（膜）表面の水酸基に結合しやすくなる性質を利用します。メンブレンに吸着された DNA は、低塩濃度条件下でメンブレンから遊離して、溶出されます。スピнкаラムを利用したタイプの様々なキットが市販されています。

増菌培養：無症状の植物試料など、菌量が非常に低いため、直接菌を検出・分離するのが難しい場合に、検出や分離操作に先立って、目的とする病原菌を増やすことを目的に、検出対象の菌の増殖に適した培地中で試料を前培養すること。

増菌 PCR 法：試料を増菌培養して得られた培養液から DNA を抽出し、この DNA をテンプレートとして PCR 法を行うことにより、対象の菌を感度良く検出可能とする方法。

マルチプレックス PCR：通常 1 回の PCR 反応には 1 セットのプライマーペアが用いられるが（シンプレックス PCR）、1 回の反応で複数の対象を同時に検出することにより検出の効率化を図るために、複数セットのプライマーペアを同一の反応液中に添加して PCR 反応を行う方法 [2 セット（デュプレックス PCR；検出対象は 2 種）、3 セット（トリプレックス PCR；同 3 種）、あるいは 4 セット（テトラプレックス PCR；同 4 種）]。テトラプレックス PCR を行うことにより、黒あし病菌 4 菌種を 1 回の PCR で検出することができます。

PCR 法：ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction）の略称。増幅したい目的の遺伝子領域を挟み込むように設計された短い 2 種類のオリゴヌクレオチド（プライマー、2 種類なのでプライマー対、プライマーペアと呼ばれる）と耐熱性 DNA ポリメラーゼ（*taq* ポリメラーゼなど）を、試料から抽出した DNA（テンプレート）ならびに基質（デオキシヌクレオチド三リン酸；dNTP）と同一の緩衝液中で、熱変性（加熱による 2 本鎖 DNA の遊離；94 °C 程度）-アニーリング（プライマーとテンプレートの結合；60 °C 程度）-伸長（DNA ポリメラーゼによる目的 DNA のコピーの合成；70 °C 程度）の反応サイクルを 30-35 サイクル程度繰り返すことにより、目的の DNA を指数関数的に増幅させ、検出、分離を可能とする方法。

参考資料

1. ジャガイモ黒あし病の診断マニュアルと種ばれいしょ生産工程における保菌リスク（北海道立総合研究機構刊、平成 29 年度 普及奨励ならびに指導参考事項、2018 年 4 月）

<https://www.hro.or.jp/list/agricultural/center/kenkyuseika/ippan30.html> からダウンロード可能



2. 塊茎、茎・根、土壌、水試料に対応したジャガイモ黒あし病菌の高感度検出法（農研機構 普及成果情報 病害虫・鳥獣害 2020 年）

https://www.naro.go.jp/project/results/4th_laboratory/harc/2020/20_044.html



3. ジャガイモ黒あし病の発生を防ぐための工程管理マニュアル（農研機構刊、2022 年 3 月）

https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/laboratory/nipp/manual/152127.html からダウンロード可能



担当窓口、連絡先

外部からの受付窓口：

農研機構 北海道農業研究センター 研究推進部 事業化推進室 011-857-9212



「農研機構」は、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構のコミュニケーションネーム（通称）です。