

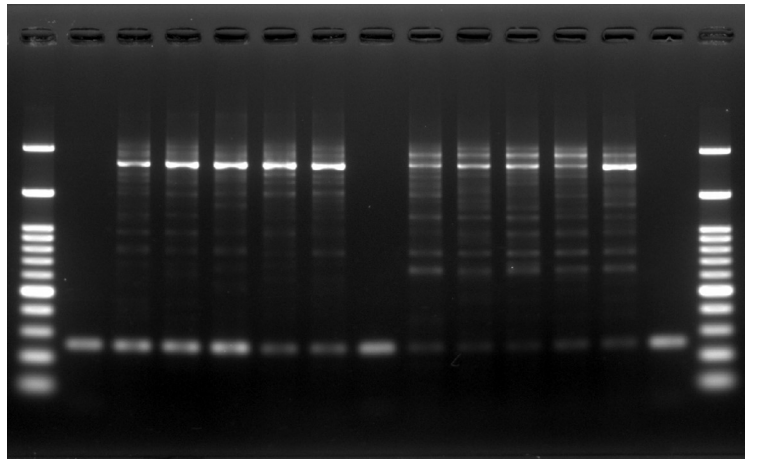
生研支援センター 戦略的スマート農業技術等の開発・改良（JPJ011397）

「輸出拡大のための新技術開発」

かんしょ輸出産地を支えるサツマイモ基腐病総合的防除体系の開発

かんしょ生産工程におけるサツマイモ 基腐病発病リスク低減技術集

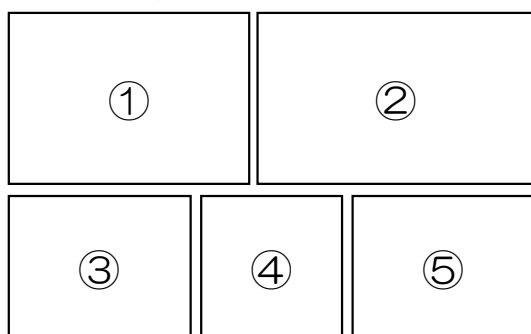
「次作におけるサツマイモ基腐病防除 対策の意思決定支援技術」マニュアル



2025年3月

かんしょ基腐病コンソーシアム

表紙写真の説明



- ① 基腐病の発生程度の違いを示したヒートマップ
- ② PCRにより増幅した基腐病菌のDNAを電気泳動で検出した事例
- ③ 枕畝により排水不良となり雨水が滞留した圃場の様子
- ④ 幼苗を用いた生物検定のために調製したサツマイモの一節苗
- ⑤ 一節苗を土壌に移植した生物検定の様子

目 次

1. はじめに	・・・ 1
2. 発病ポテンシャル診断とは	・・・ 4
3. 発病ポテンシャル診断を行う際の留意事項	・・・ 6
4. 基腐病発病ポテンシャル診断の手順	・・・ 8
5. 土壌試料の採取	・・・ 9
6. 基腐病発病ポテンシャル診断の診断項目	・・・ 10
診断項目1 前作発病度	・・・ 12
診断項目2 圃場の排水性	・・・ 13
診断項目3 土壌の汚染度	・・・ 14
診断項目4 土壌中の残渣量	・・・ 15
7. 発病ポテンシャルレベルの決定	・・・ 16
8. 発病ポテンシャルレベルに応じた対策	・・・ 17
9. 付録	・・・ 18
土壌の汚染度評価法の具体的方法	
(1) 土壌からのDNA抽出	・・・ 19
(2) コンベンショナルPCR法	・・・ 21
(3) リアルタイムPCR法	・・・ 23
(4) 一節苗生物検定法	・・・ 25
(5) ベイトトラップ法	・・・ 31
(6) 各汚染度評価法の比較	・・・ 34
残渣量測定 of 具体的方法	・・・ 35
参考資料	・・・ 37
免責事項・お問い合わせ先	・・・ 38

サツマイモ基腐病は、2018年に国内で初めて報告されて以降、2024年12月時点で36都道府県で発生が確認されています。特に、南九州（鹿児島県、宮崎県）・沖縄の産地では、本病の発生による収量の減少が深刻な問題となっています。

本病は、主に病原菌（*Diaporthe destruens*）に感染した苗によって本圃に持ち込まれ、その後感染株の病変部で形成される胞子が、降雨に伴う停滞水や跳ね上がりなどにより周辺株に拡がり、本圃で発生がまん延するとともに、汚染が広範囲に拡大します。また、収穫後に本圃に残された感染株の残渣組織（罹病残渣）では、病原菌が越冬して次作の伝染源となります。以上のようにして汚染された本圃では、健全な苗を定植しても発病してしまいます（図1）。このため、一度発生が確認された本圃でかんしょを栽培をする場合には、作付け前に防除対策の方針を決めておくことが必要となります。

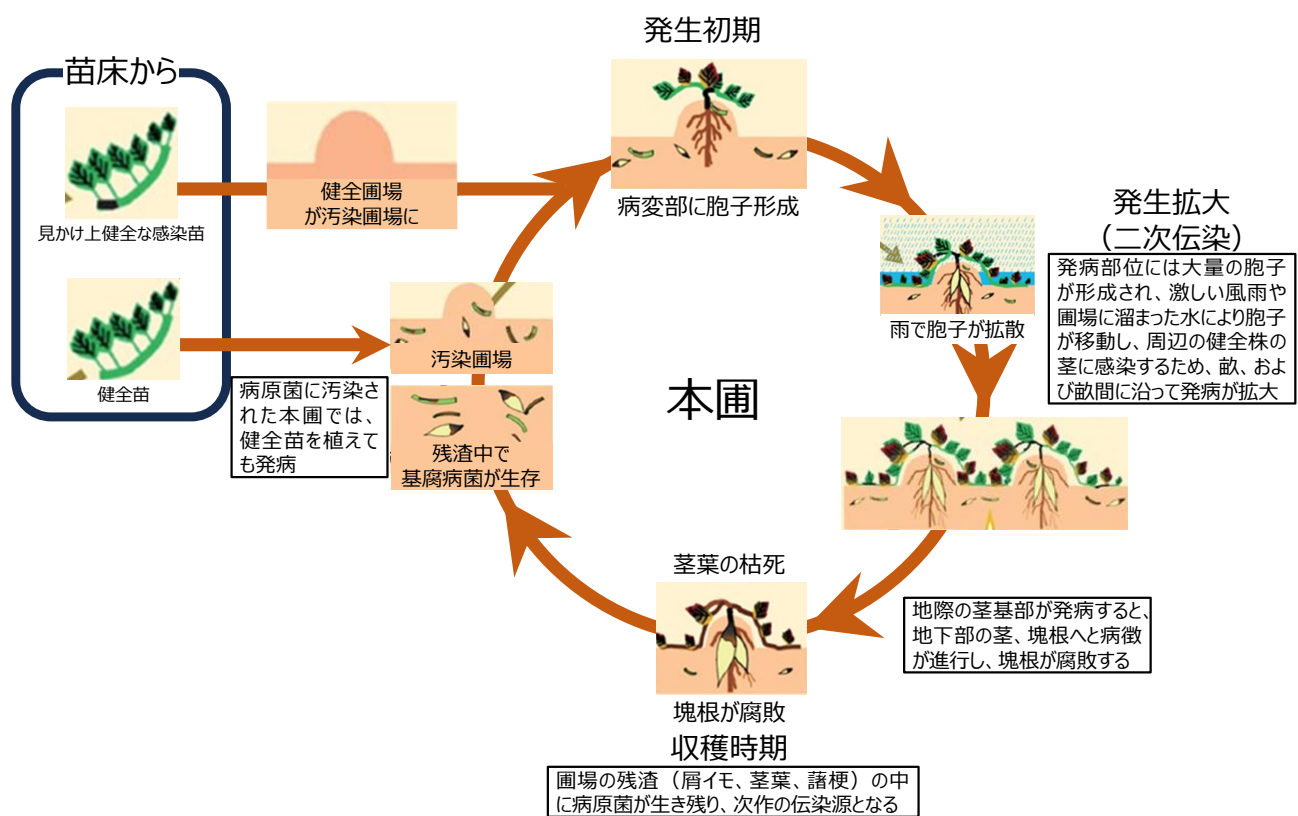


図1 本圃におけるサツマイモ基腐病の伝染環
 （「サツマイモ基腐病の発生生態と防除対策（令和4年度版）」より改変）

本圃での基腐病の防除対策を効率的に講じるためには、対象となる本圃の「基腐病発生のしやすさ」（＝発病ポテンシャル）の程度を、作付け前に診断・評価しておくことが有効です。生物系特定産業技術研究支援センターのイノベーション創出強化研究事業（JPJ007097）（令和1～3年度）および戦略的スマート農業技術等の開発・改良（JPJ011397）（令和4～6年度）（＝戦略的スマ農）において作成した「サツマイモ基腐病の発生生態と防除対策（令和4年度版）」（イノベマニュアル：参考資料1）では、前作の本圃での基腐病の発生状況（収穫時の腐敗イモの割合）に応じた防除対策が示されており、基腐病の発生が甚大であった本圃では非宿主作物の栽培（転作）や休耕を2年以上行うことが推奨されています。しかし、転作や休耕を行った翌年は前作がかんしょではないため、前作の基腐病発生状況に基づいた防除対策の必要性の判断や、効果的な防除手段の選択ができません。また、基腐病の発生には、病害の主因である基腐病菌による土壌の汚染程度だけでなく、本圃の水はけ（排水性）などが関連しているため（イノベマニュアル：参考資料1、P61～66を参照）、これらについて把握することも必要となります。

このため、かんしょの連作だけでなく、転作や休耕を含めた本圃に対応して、かんしょ作付け前に防除対策の要否を判断したり、効果的な防除対策を選択するためには、本圃における前作の基腐病発生状況だけでなく、本圃の発生に関連する他の要因も加味した基腐病の発病ポテンシャル診断・評価法が必要です。

このような背景から、戦略的スマ農では、さまざまな栽培条件の本圃で活用できる総合的な基腐病発病ポテンシャル診断・評価法を開発し、その内容を解説するためのマニュアルとして本書を作成しました。

本マニュアルは、南九州地域の生産現場において、公設の普及指導機関や民間の指導的立場の方が圃場の発病ポテンシャル診断を行う際に参照するためのものです。診断結果は、次作の基腐病防除対策の要否や手段を決定する際の判断材料の一つとなりますので、生産者への営農指導の際にご活用ください。発病ポテンシャル診断にもとづく基腐病の効率的な防除を通じて、かんしょの持続的生産に役立てていただければ幸いです。

戦略的スマート農業技術等の開発・改良（JPJ011397） 中課題2「対策技術の要否および効果判定のための基腐病発生リスク評価法の開発」リーダー

農研機構植物防疫研究部門 関口 博之

本マニュアルで紹介するサツマイモ基腐病の発病ポテンシャル診断は、「健康診断の発想に基づく土壌病害管理法（HeSoDiM：ヘソディム）」（参考資料2）の考え方（図2）に基づくもので、作付け前に本圃での基腐病の発生のしやすさの程度を大まかに3段階レベル（レベル1：低いレベル ～ レベル3：高いレベル）で評価することを表します。診断結果に応じた防除対策を講じることで、効率的で無駄のない防除対策を行うことが期待できます。

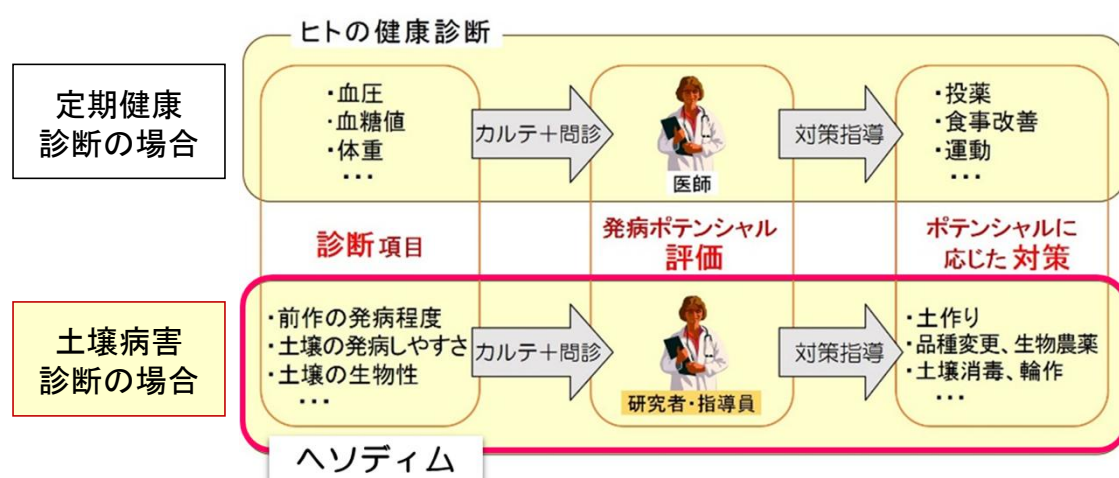


図2 ヘソディムの概念図

基腐病に対しては、これまでに前作の本圃での基腐病の発生状況（収穫時の腐敗イモの割合が、ない・1割未満・1割以上、の3段階レベル）に応じた対策技術が整理されています（イノベマニュアル：参考資料1、P26を参照）（図3）。したがって、この3段階のレベルを発病ポテンシャルのレベルとして設定し、作付け前の本圃がどのレベルにあるのかを診断・評価できれば、その本圃の状態に合わせた効率的な防除対策の選択や実践が可能となり、具体的には、

- ・基腐病対策として輪作や休閑していた本圃でのかんしょ作付けの可否の判断
- ・本圃での防除対策の要否や手段の選択
- ・作付け品種の選定

などに役立てることが出来ます。

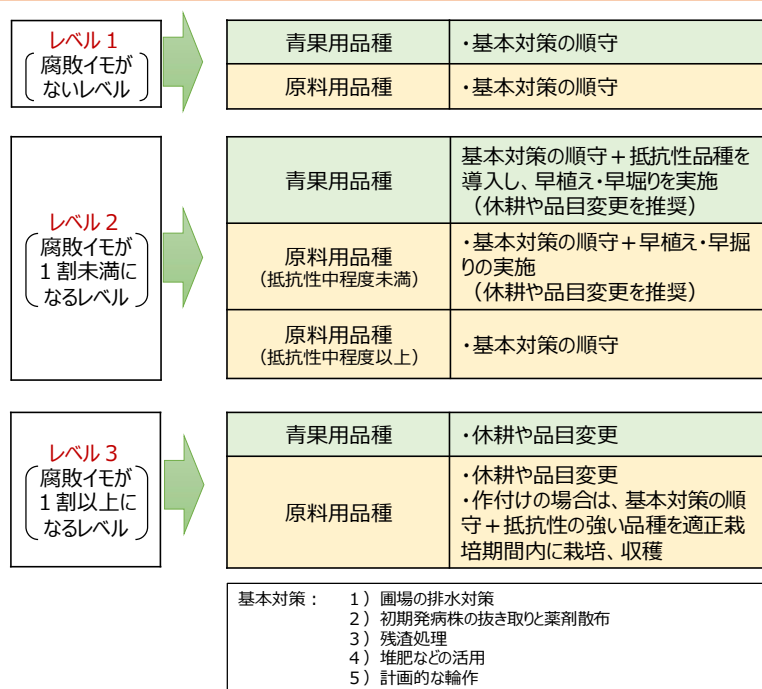


図3 これまでに開発された収穫時の腐敗イモの発生程度に応じた次作の防除対策（イノベマニュアル：参考資料1、P68の記載を改変）

戦略的スマ農では、基腐病に対する本圃での発病ポテンシャル診断法の開発に取り組む、その結果、4つの診断項目毎に作付け前の本圃の状態（危険度）を点数化し、その合計点で発病ポテンシャルのレベルを3段階に評価する方法を開発しました（図4）。この診断法は、2021～2024年に鹿児島・宮崎県内の現地の本圃で行われた調査および実証に基づき開発されたものです。

診断項目1

前作発病程度	危険度1	危険度2	危険度3
発病株率	コガネセンガン・高系14号：3%未満 (2年以上の連続の休作・輪作圃場を含む)	コガネセンガン：3%～40%未満 高系14号：3%～25%未満 (過去に発生履歴があり、1年間の休耕または輪作等で作付けせず)	コガネセンガン：40%以上 高系14号：25%以上
発病ポテンシャル得点	0点	3点	6点

診断項目2

圃場の排水性	危険度1	危険度2	危険度3
50 mm程度の降雨後の停滞水の消失期間	3hr以内	1日未満	1日以上
発病ポテンシャル得点	0点	1点	2点

診断項目3

土壌の汚染度	危険度1	危険度2	危険度3
コンベンショナルPCR法	非検出	検出	
リアルタイムPCR法	非検出	検出	
発病ポテンシャル得点	0点	2点	
一節苗生物検定法	発病無し	発病株あり	
発病ポテンシャル得点	0点	2点	
バイトトラップ法（5片の葉を使用）	非検出	1片で検出	2片以上で検出
発病ポテンシャル得点	0点	1点	2点

診断項目4

かんしは残渣量	危険度1	危険度2	危険度3
生重/1 kg土壌	0.8 g 未満		0.8 g 以上
発病ポテンシャル得点	0点		2点

それぞれの診断項目のポテンシャル得点を加算し、合計得点に応じて発病ポテンシャルレベルを決定する。

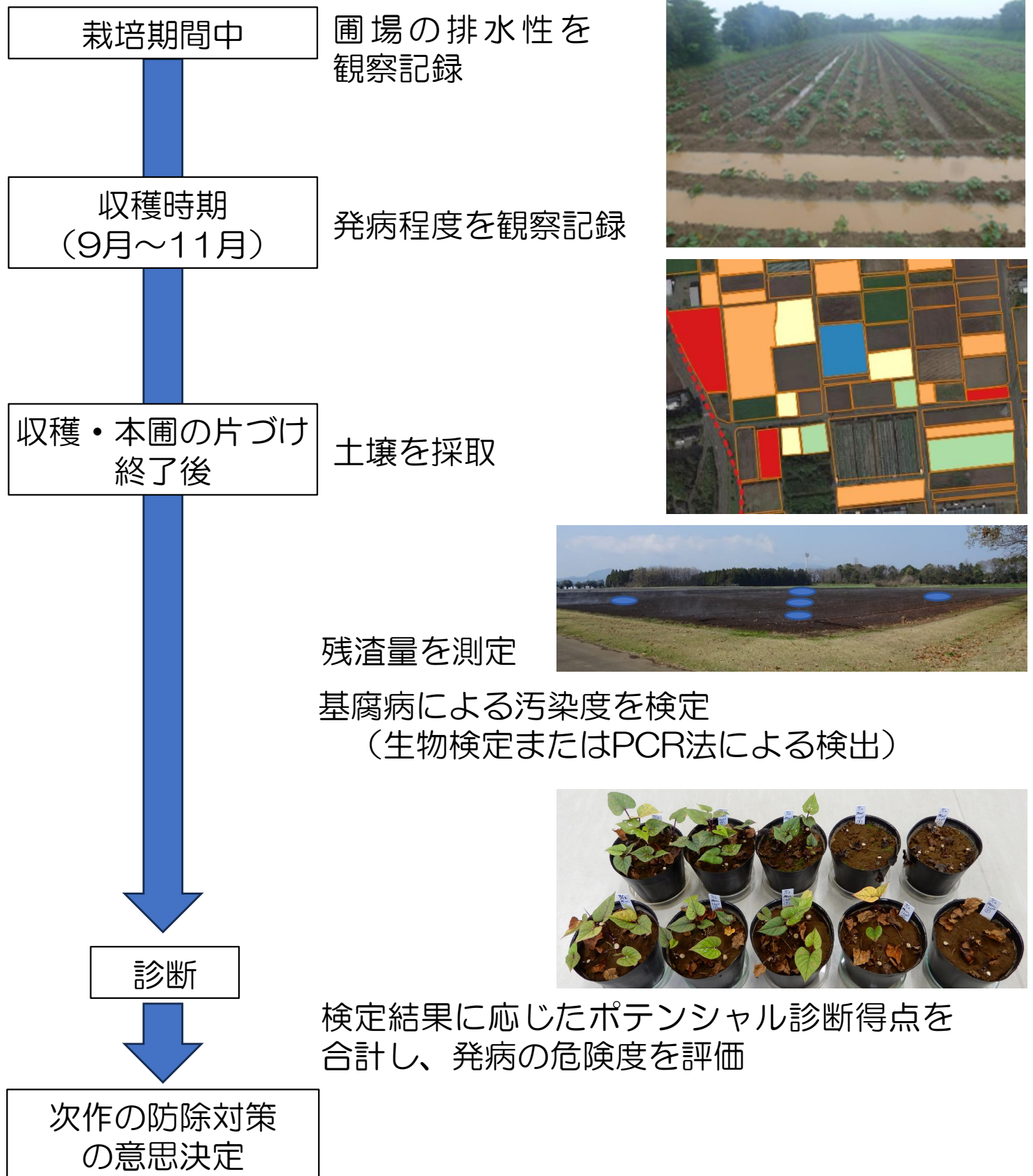
発病ポテンシャル得点の合計	発病ポテンシャルレベル
0 ～ 1	1
2 ～ 5	2
6 以上	3

図4 本圃における圃場の発病ポテンシャル診断法の概要

- 1) 基腐病は病原菌に感染した苗の定植によっても本圃で発病しますが、本診断法は、病原菌に感染していない健全な苗を定植した時の本圃での発病程度を診断するものとなっています。仮に感染苗を定植した場合には、診断された発病ポテンシャルレベルよりも病害発生程度が高くなりますのでご注意ください。
- 2) 基腐病菌は、本圃では降雨に伴う停滞水や跳ね上がりなどにより発病株から周辺株に拡がる特性があるため、本圃でのサツマイモ栽培期間中の降雨条件などによっては、診断された発病ポテンシャルレベルとは異なる発生状況となる場合があります。また、本圃への定植時期や栽培期間も発生状況と関係しており、早植え・早掘りの栽培体系では、病害発生は軽減される傾向であることが知られています（別冊「本圃におけるサツマイモ基腐病発病リスク低減技術」マニュアル3(3)参照）。
- 3) 本診断法は、2022年（令和4年）の南九州地域の気象条件（参考資料3）、定植時期が4月下旬～5月中旬（普通植え）で定植後130日程度の本圃での発生状況を診断するものとして作成しています。早植え・早掘りの栽培をすでに予定しているなど、栽培条件が上記の条件と異なることが予めわかっている場合には、その条件に応じて発病ポテンシャルレベルの設定基準を変更するなどして本診断法をご活用ください。
- 4) 本診断法は、品種「コガネセンガン」または「高系14号（宮崎紅、ベニサツマ）」を本圃で栽培した場合の発生状況を診断するものとなっています。これらの品種と異なる品種を栽培する場合には、栽培品種の抵抗性程度（イノベマニュアル：参考資料1、P27～34を参照）を加味して、発病ポテンシャルレベルの設定基準を変更するなどによって本診断法をご活用ください。

3 発病ポテンシャル診断を行う際の留意事項

5) 本圃の環境や栽培条件は各圃場で異なります。各本圃の条件に適したポテンシャル診断を行うためには、本診断法による診断結果と実際の本圃での発生状況とを照らし合わせる検証を毎回行い、必要に応じて診断法を改良していくことが重要です。将来的には、この検証の工程をPDCAサイクルで繰り返すことによって、それぞれの本圃の条件に最適な発病ポテンシャル診断法（テラーメードの診断法）を作り上げることができます。本診断法は、今後テラーメードの診断を行っていく際の基本形になるものと考えてください。



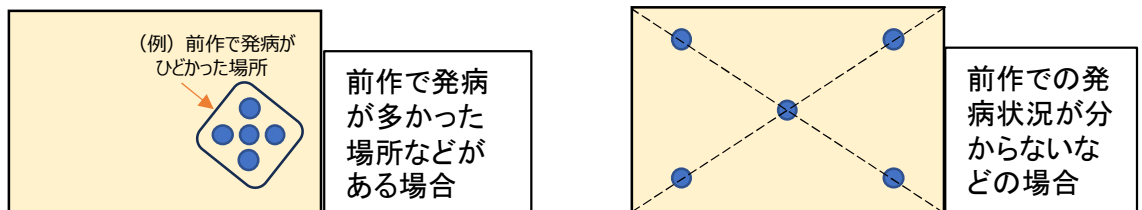
土壌採取の時期

土壌の汚染度を評価するために用いる土壌は、栽培が終了し本圃の片づけ（残渣の持ち出しなど）が終わった後に採取します。土壌は水分率が20～25%程度（握ったあとパラパラと崩れる程度）のものを採取するようにします。

土壌の採取場所、採取方法

土壌を採取する場所は、本圃の中で気になる場所（前作で発病が多かった場所、水がよく溜まりやすい場所など）がある場合は、その場所の5地点から採取し、よく混合してひとつの土壌試料とします。前作での発病状況が分からなかったり、全面的に発病が見られた本圃の場合には、原則的には圃場内の5地点（圃場中心と、角を結ぶ対角線の中央よりやや四隅側など）から偏りがないように採取します（本圃の形状が歪な場合は、採取地点に偏りが生じないようにその形状に合わせて採取地点を選定してください）。

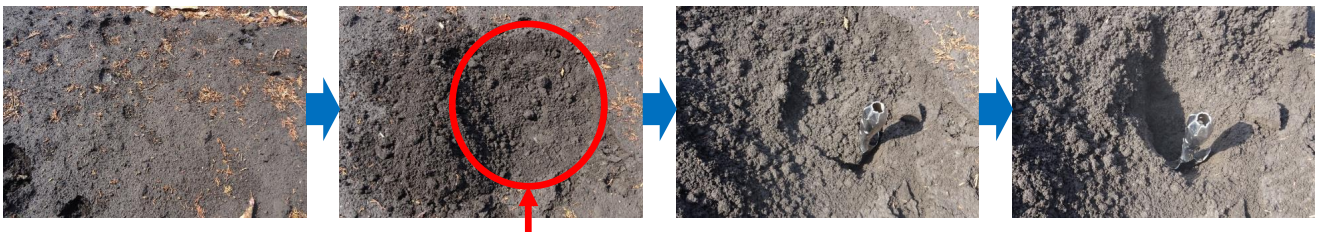
上から見た本圃のイメージ図



1 圃場につきの5点（青丸）から均等にサンプリングし、1つにまとめます。

① 最初に移植ごてで地表面の土を除きます（数cm程度）。

② 深さ20 cm程度までの土を採取します。



表面の土を除いた部分から採取を行います

③ 各地点（5点）から採取した土壌の合計が2kg程度（1点あたり400g程度：握りこぶし2個ぐらい）となるようにビニール袋に採取し 1つにまとめて圃場のサンプル土壌とします。採取の際に移植ごてで拾えない大きさの屑イモなどの残渣がある場合は取り除いてください。

発病ポテンシャル診断では、基腐病の発病に関連する以下の4つの項目について診断を行い、各項目の診断結果に対応した危険度別にポテンシャル得点を算出します。各診断項目と基腐病の発病に関しては以下の関係が示されています。

診断項目1 前作の発病程度（発病株率）

有効な防除対策が行われていなかった鹿児島・宮崎県内の本圃における調査において、前作での発病株率と当該年作での発病株率は相関することが確認されています（図5）。

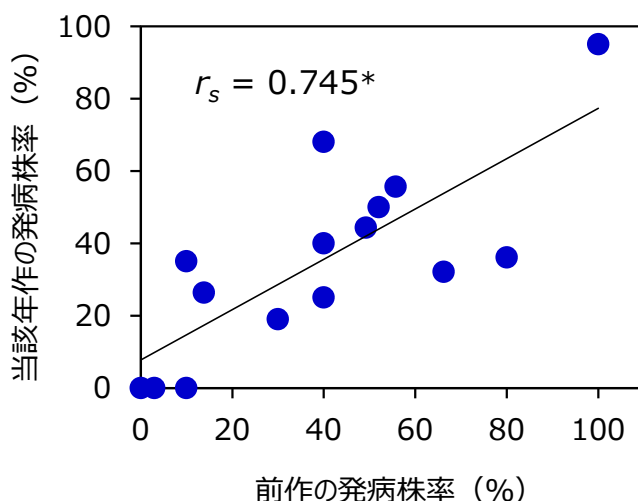


図5 鹿児島・宮崎県内の本圃（2021または2022年作）における前作の発病株率と当該年作での発病株率の関係
 r_s はスピアマンの順位相関係数
 (* = $p < 0.05$)を示す。

診断項目2 圃場の排水性

基腐病は排水不良な場所でまん延しやすいことが知られています（イノベマニュアル：参考資料1、P61～66を参照）。

診断項目3 土壌の汚染度

ポット栽培試験において、汚染程度（基腐病菌の菌密度）が高い土壌にかんしょ苗を植え付けると基腐病が発生しやすいことが確認されています（図6）。

また、栽培前の土壌から基腐病菌のDNAがPCRで検出された本圃では、検出されなかった本圃と比べて基腐病の発生程度が高いことが確認されています（図7）。



図6 基腐病菌の密度（孢子数/g生土）を変えた土壌で栽培されたかんしょ苗の基腐病の発生程度

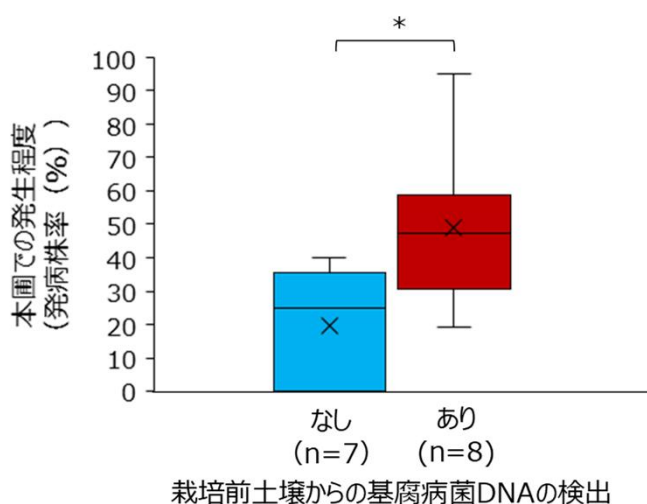


図7 PCRにより栽培前土壌から基腐病菌DNAが検出された本圃および検出されなかった本圃における基腐病の発生程度（箱ひげ図）

* Mann-Whitney U検定で有意差 ($p=0.042$) があることを示す。

診断項目4 かんしょの残渣量

栽培終了後の本圃において、かんしょの残渣量が多いと土壌の汚染度（病原菌密度）も高くなることが知られています（参考資料4）。

診断項目1 前作の発病程度（発病株率）

聞き取り調査、または現地調査により、診断する圃場（範囲）における前作の基腐病発生程度を調査します。調査にあたっては、前作で栽培していた品種の基腐病に対する抵抗性の違いを考慮し、以下の基準に従い危険度を評価します。ここでは、コガネセンガンと高系14号について示します。

危険度	品種ごとの発病株率（％）		発病ポテンシャル得点
危険度1	コガネセンガン 高系14号	3%未満 3%未満	0点
危険度2	コガネセンガン 高系14号	3%～40%未満 3%～25%未満	3点
危険度3	コガネセンガン 高系14号	40%以上 25%以上	6点

これらの品種と異なる品種を栽培する場合には、栽培品種の抵抗性程度を加味して、発病株率の基準を変更するなどしてください。かんしょ品種の基腐病に対する抵抗性程度については、イノベマニュアル：参考資料1のP27～34を参照してください。

なお、2年以上の休耕またはヒルガオ科作物以外の作付け（輪作）を行った本圃には0点、過去に基腐病の発生履歴があり、休耕またはヒルガオ科作物以外の作付け（輪作）を1年間行った本圃には3点を付与します。

診断項目1

前作発病程度	危険度1	危険度2	危険度3
発病株率	コガネセンガン・高系14号：3%未満 (2年以上の連続の休作・輪作圃場を含む)	コガネセンガン：3%～40%未満 高系14号：3%～25%未満 (過去に発生履歴があり、1年間の休耕または輪作等で作付けせず)	コガネセンガン：40%以上 高系14号：25%以上
ポテンシャル得点	0点	3点	6点

診断項目2 圃場の排水性

聞き取り調査、または現地調査により、診断する本圃（範囲）の排水性を評価します。基準としては、日降雨量50mm程度の降雨があった場合の停滞水の消失時間を評価します。

危険度	停滞水消失までに要する時間	危険度に基づく発病ポテンシャル得点
危険度 1	3時間以内に消失	0点
危険度 2	1日未満で消失	1点
危険度 3	1日以上	2点

診断項目2

圃場の排水性	危険度 1	危険度 2	危険度 3
50mm程度の降雨後の 停滞水の消失期間	3hr以内	1日未満	1日以上
ポテンシャル得点	0点	1点	2点

診断項目3 土壌の汚染度

土壌の汚染度については、以下の3つの方法で評価します。

- コンベンショナルPCR法 または リアルタイムPCR法¹⁾
- 一節苗を用いた生物検定法²⁾
- バイトトラップ法

1) 特願2024-007929

2) 特開2024-115521

確実に土壌中の基腐病菌を検出するためには、全ての方法で評価することを推奨しますが、実施する場所や設備の状況、費用や評価に要する時間などを踏まえ、実情に応じていずれかの方法を選択してください（P34の付録の比較表もご参考ください）。各評価法の具体的な手順は、P19～33の付録をご覧ください。

それぞれの分析結果に基づいて、以下の表に従い危険度を評価します。複数の方法で評価した場合は、最も高かった点数を採用します。

診断項目3

土壌の汚染度	危険度 1	危険度 2	危険度 3
コンベンショナルPCR法	非検出	検出	
リアルタイムPCR法	非検出	検出	
ポテンシャル得点	0点	2点	
一節苗生物検定法	発病無し	発病株あり	
ポテンシャル得点	0点	2点	
バイトトラップ法 (5片の茎を使用)	非検出	1片で検出	2片以上で検出
ポテンシャル得点	0点	1点	2点

診断項目4 土壌中の残渣量

栽培後に片付けが終了した本圃から採取した土壌に含まれる残渣量を測定します。土壌約1 kgを5 mmのふるいに掛け、ふるいの上部に残った残渣の重量を測定します。この際、明らかにかんしょの残渣ではないとわかる雑草等の残渣や、小石、土塊は除去してください。より詳細な具体的手順は、P35～36の付録をご覧ください。

危険度	残渣量	発病ポテンシャル得点
危険度 1	0.8 g/kg土壌 未満	0点
危険度 2	0.8 g/kg土壌 未満	0点
危険度 3	0.8 g/kg土壌 以上	2点

診断項目4

かんしょ残渣量	危険度 1	危険度 2	危険度 3
生重/1 kg土壌	0.8 g 未満		0.8 g以上
ポテンシャル得点	0点		2点

発病ポテンシャルレベルの決定

各項目の診断結果に応じた危険度1～3に対応するポテンシャル得点（下表赤字）の合計点に基づき、本圃の発病ポテンシャルレベルを決定します。

診断項目		危険度 1	危険度 2	危険度 3
1	前作発病程度	0 点	3 点	6 点
2	圃場の排水性	0 点	1 点	2 点
3	土壌の汚染度	(以下の①～④のいずれかにより診断、 可能であれば複数項目を実施)		
	① コンベンショナルPCR法	0 点	2 点	
	② リアルタイムPCR法	0 点	2 点	
	③ 一節苗生物検定法	0 点	2 点	
	④ バイトトラップ法 (5 片のつるを使用)	0 点	1 点	2 点
4	かんしよ残渣量	0 点		2 点

各診断項目の
ポテンシャル得点を合計

各診断項目の合計点	0 点～1 点	2 点～5 点	6 点以上
発病ポテンシャルレベル	レベル 1	レベル 2	レベル 3
想定される発病程度	腐敗イモが見られないレベル 発病株率で換算した場合： コガネセンガン 10%未満 高系14号 7%未満	腐敗イモ率が1割未満のレベル 発病株率で換算した場合： コガネセンガン 10～40%未満 高系14号 7～25%未満	腐敗イモ率が1割以上のレベル 発病株率で換算した場合： コガネセンガン 40%以上 高系14号 25%以上

発病ポテンシャルレベルに応じた対策を実施します
(次ページへ)

前ページで診断された発病ポテンシャルレベルに応じた対策は、イノベママニュアル：参考資料1、P68で示された対策技術（図8）に準じて実施してください。具体的な対策手段は、生産者と協議して選択・決定することが大切です。なお、別冊のマニュアル（「本圃におけるサツマイモ基腐病発病リスク低減技術」マニュアル）で紹介されている新たな薬剤を用いた防除体系については、発病ポテンシャルレベル2およびレベル3の圃場で有効な対策技術と考えることができます。

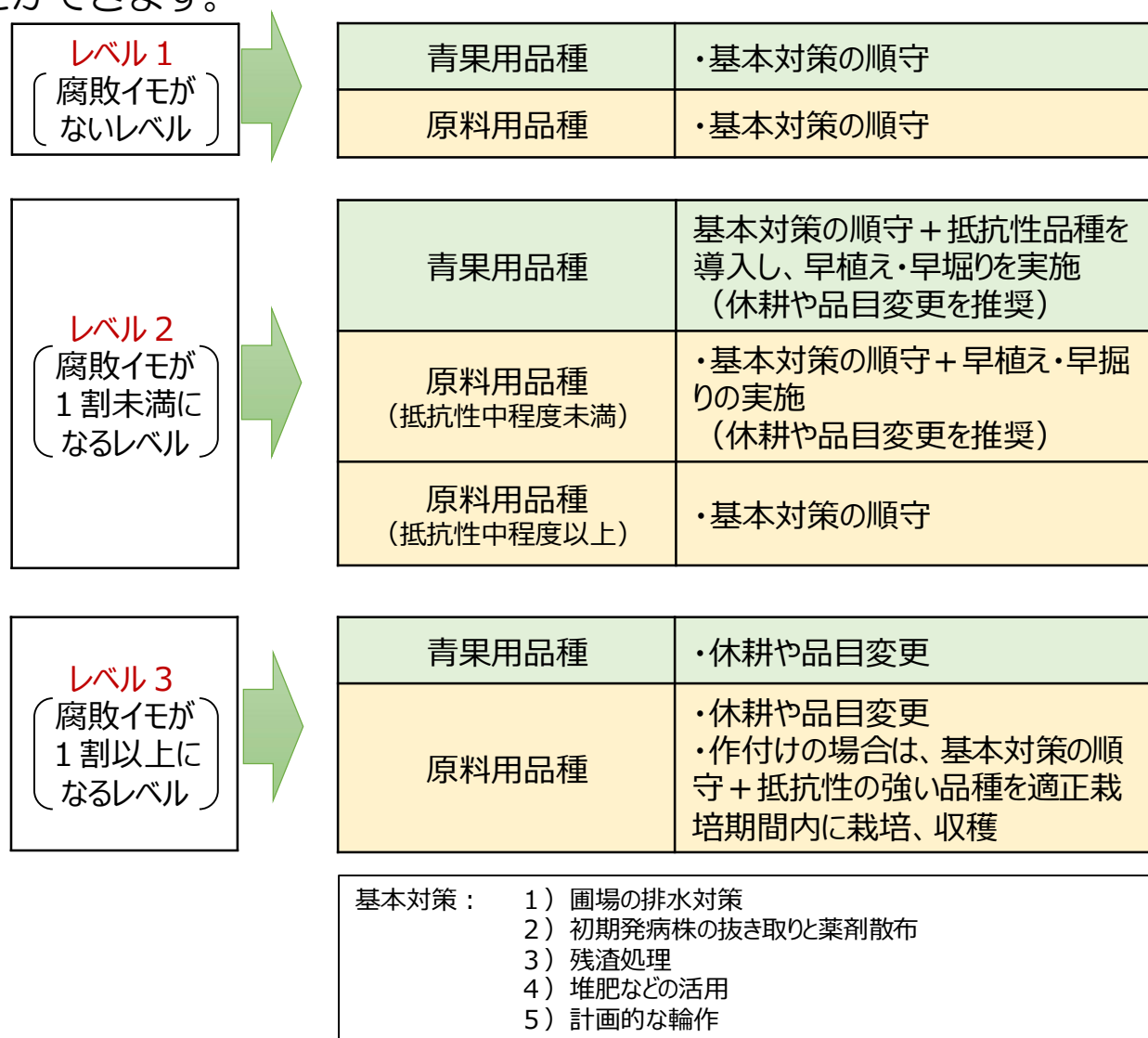


図8 発病ポテンシャルレベルに応じた防除対策
 （イノベママニュアル：参考資料1、P68の記載を改変）

「次作におけるサツマイモ基腐病防除 対策の意思決定支援技術」マニュアル

付 録

概要

土壌から市販の抽出キットを用いて全DNAを抽出する。火山灰性の土壌はDNAが吸着され抽出が困難になるため、細胞破碎装置で処理する前にスキムミルクを添加する。抽出したDNAはPCRによる基腐病菌の定量・検出用の鋳型DNAとして用いる。

装置

- 細胞破碎装置
MP Biomedicals FastPrepシリーズ
TOMY MicroSmash
- 小型微量遠心器

試薬・消耗品

- FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals)
- DNA Clean & Concentrator Kit (ZYMO RESEARCH)
- 1.5mLエッペンチューブ、チップ類
- 10mLディスポチューブ
- 20%スキムミルク溶液

スキムミルク（DIFCO）1 gを5 mLの蒸留水に懸濁し、オートクレーブで115℃5分間熱処理したものを1 mLずつ分注し、-20℃で冷凍保存。スキムミルクに微生物が混在するためオートクレーブ処理を行うが、121℃で滅菌処理すると土壌粒子へのDNA吸着を阻害する作用が失われるため、オートクレーブでの熱処理条件は固定とする。

DNA抽出方法

詳細は抽出キットのマニュアル、または、農水省委託プロジェクト「土壌微生物相の解明による土壌生物性の解析技術の開発（eDNAプロジェクト）」で公開した「土壌細菌・糸状菌相解析マニュアル」（参考資料5）を参考にされたい。以下、注意点を記載する。

- 0.4gの土壌と抽出用の溶液を入れた破碎用チューブに20%スキムミルクを100 μ L添加してから細胞破碎装置にセットし、破碎処理を行う。
- 使用する細胞破碎装置により、破碎条件が異なる。
 - 例1） FastPrepシリーズの場合 5.5m/secで 30秒
 - 例2） MicroSmash シリーズの場合 5,000rpm で 30秒
- FastDNA SPIN Kit for Soilによる抽出工程の最終操作でDNA吸着担体（BindingMatrix）からの溶出液（DES）の量は、より溶出しやすいように80～100 μ Lとする（キットのマニュアルでは50 μ L）。
- FastDNA SPIN Kit for Soilにより抽出したDNA溶液には、PCRを阻害する夾雑物が含まれる可能性があるため、DNA Clean & Concentrator Kit (Zymo Research)による再精製を行い、最終溶液を50 μ Lとする。
- 各キットにより抽出、精製操作終了後、抽出できていることを確認するため、NanoDrop等によりDNA濃度を測定する。

概要

土壌から抽出したDNAに含まれる基腐病菌のDNAをPCRにより検出する。
1 土壌あたりDNAを3本抽出し、そのうちの1本でも陽性があれば、その土壌は陽性と診断する。

装置

- PCR装置（Applied BiosystemsのPCR装置を推奨）
- 遠心器 スピンドアウン用
（8連チューブチビタン、96穴遠心機など）

試薬・消耗品（消耗品はPCR装置への適合性などに注意）

- PCR試薬（東洋紡KOD FX neo）
- PCRチューブ（96穴プレート、8連PCRチューブなど）
- PCR用キャップ（96穴プレートシールなど）

PCRプライマー配列（参考資料6）（特許第7349149号）

- Forwardプライマー（Dd ITS-F）
5'-GTTTTTATAGTGTATCTCTGAGC-3'
- Reverseプライマー（Dd ITS-R）
5'-GGCCTGCCCCCTTAAAAA-3'

PCR反応液組成

試薬等	量 (μL)
H ₂ O	2.4
2xPCR Buffer for KOD FX neo	10
2mM dNTPs	4
Forward primer (DdITS-F : 10μM)	0.6
Reverse Primer (DdITS-R : 10μM)	0.6
KOD FX neo	0.4
Template DNA	2

PCR反応温度条件

94℃	2分	} 35サイクル
98℃	10秒	
55℃	30秒	
68℃	30秒	
68℃	7分	
4℃	∞	

PCR終了後の電気泳動

PCR終了後の反応液に6×Loading Dyeを5 μ L添加し、ピペッティングにより混合した溶液5 μ Lを2.0%アガロースゲルのウェルに載せ、100Vで30分電気泳動する。電気泳動終了後、ゲルレッド入りバッファーで30分間染色し、撮影装置（BioRad Gel Doc等）で泳動画像を撮影（下図）。

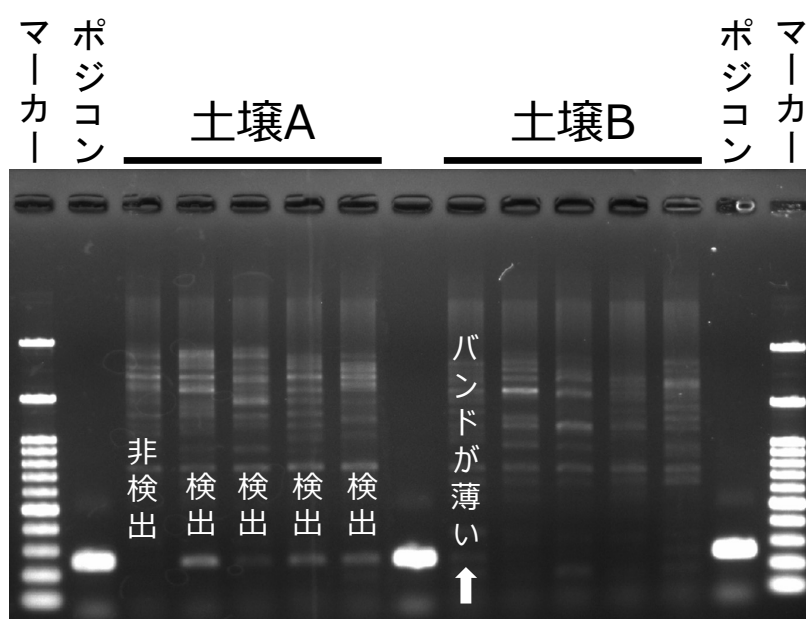


図 バンドの電気泳動例

電気泳動による基腐病菌DNAの検出判定について

土壌1試料につき5本のDNAを抽出し、それぞれを鋳型DNAとしてPCRを行った（実際の診断は3本で行う）。

基腐病菌の量が少ない土壌の場合、非特異に増幅したDNAにより検出の有無の判断がばらつきやすい。目的のサイズ（258bp）のPCR産物として10ng以上、または、ポジコンとして、1gあたり25孢子に調整した土壌のDNAより増幅したPCRバンドを同時に電気泳動し、検出の基準とする（矢印は陰性と判断した）。

概要

土壌から抽出したDNAに含まれる基腐病菌のDNAをTaqMan®プローブを用いたリアルタイムPCRにより検出する。ポテンシャル診断では、1土壌あたりDNAを3本抽出し、そのうちの1本でも陽性があれば、その土壌は陽性と診断する。

装置

- リアルタイムPCR装置
(Applied BiosystemsのStepOneを推奨)

試薬・消耗品（消耗品はリアルタイムPCR装置への適合性に注意）

- MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL
- MicroAmp™ Optical Adhesive Film
- TaqMan® Fast Advanced Master Mix
5mL入り。500μLずつ分注して冷蔵保存
- TaqMan MGB遺伝子発現Kit
- EASY Dilution for Real Time PCR (Takara)
プライマー希釈溶液

PCRプライマー配列（コンベンショナルPCRの配列とは異なる）

（参考資料7）（特願2024-007929）

- Forwardプライマー（Dd-F）：5'-GGCCTGCCCCCTTAAAAA-3'
- Reverseプライマー（Dd-R）：5'-GCAGGCCGGCCTCTCT-3'
- Probe（Dd-P）：5'-FAM-TTTGCTCAGAGATACACTA-MGB-3'

プライマーのストック溶液（100μM）を10μMに希釈してランニング試薬とする。希釈にはEASY Dilution for Real Time PCRを用いる。

付録（土壌の汚染度評価法の具体的方法） （3）リアルタイムPCR法

9

PCR反応液組成

試薬等	量 (μL)
H ₂ O	2
TaqMan Fast Advanced Master Mix	5
10 μM Forward Primer	0.9
10 μM Reverse Primer	0.9
Probe	0.2
Template DNA	1

PCR反応温度条件

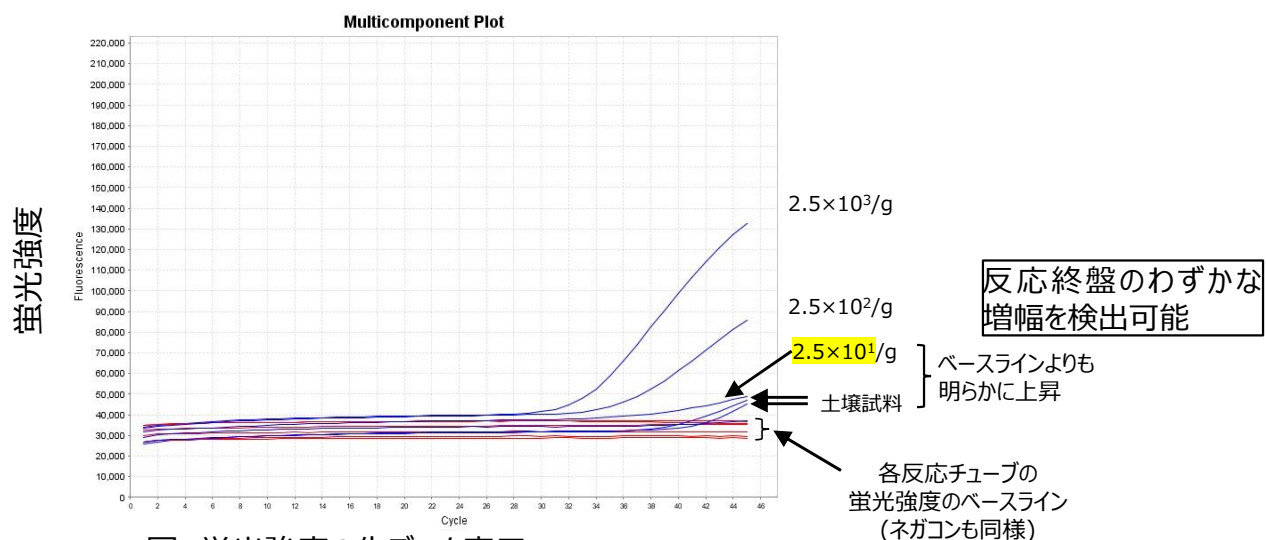
95℃ 2分
 95℃ 3秒
 60℃ 1分

45サイクル

- 試薬を混合したらPCRチューブに9 μL 、Templateを1 μL 加える。
- ポテンシャル診断では定量はしないが、ポジコンとして各濃度（2.5孢子/g土壌～2.5 $\times 10^5$ 孢子/g土壌）に調製した土壌より抽出した濃度スタンダードを含めれば、基腐病菌の定量も可能。
- ネガコン（DW）は必要。

リアルタイムPCRでの陽性判断の目安

2.5 $\times 10$ 孢子/g以下でも、蛍光強度の生データ表示において、40サイクル以降にネガコンやベースラインよりも明確に上昇していれば陽性と判断（図）。



付録（土壌の汚染度評価法の具体的方法） （４）一節苗生物検定法

一節苗生物検定法の概要

「一節苗生物検定法」は、土壌の基腐病菌汚染程度を評価するための簡便で低コスト、小規模な生物検定方法である。検定用の植物体としてかんしょ苗をそのまま用いると、大量の被検土壌、栽培用のスペースが必要となるため、植物体として一節苗（下写真）を用い、これを被検土壌に移植し1か月経過後の発病程度（地際部だけでなく、植物体全体の枯死を含む）で評価する。



一節苗



土壌に一節苗を移植



基腐病菌	DW	$1 \times 10^3/g$	$1 \times 10^4/g$	$1 \times 10^5/g$	$1 \times 10^6/g$
接種量					
(孢子懸濁液)					

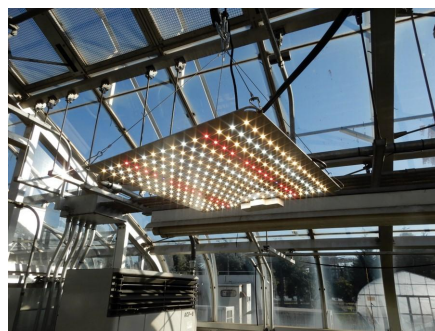
土壌に基腐病菌の胞子を接種し、一節苗を移植した結果接種濃度に応じて基腐病が発病した様子

付録（土壌の汚染度評価法の具体的方法） （４）一節苗生物検定法

9

生物検定用かんしょ苗の栽培の留意点

- 生物検定用のかんしょ苗は、健全であることが必須である。そのため、圃場の土ではなく、市販の培土（ニッピ粒状培土など）を用いて栽培する。
- ばんじゅうなどに培土を詰め、「コガネセンガン」、「ベにはるか」などの苗を検定用植物体の親苗として移植、栽培する。
- 短日条件では花芽の形成が優勢となり検定に必要な一節苗が得られなくなる。このため、検定用土壌の試料数が増えることが想定される9月後半以降にも十分な数の一節苗を確保するため、補光により必要な明期時間を確保するよう留意する。以下の写真は、植物育成用のパネル型LED照明装置（60～65W消費時にHPS/MH600W相当）をかんしょ植物体の約1 m上部に設置し、日長と合わせて明期12時間以上を確保している事例である（茨城県つくば市、12月）。



- 栽培期間中にコナジラミ、ハダニ、アザミウマ等の害虫が発生するため、適宜殺虫剤による防除を実施する。
- 親苗を定植する際、一節苗ではなく、先端から5節目程度までの苗を用いると、早く生長するため準備期間が短縮できる。また、頂芽を切らずに、莖を長く伸ばすことで、なるべく多くの一節苗を効率よく準備することができる。
- 一節苗からの発根、発芽が悪くなった場合は適宜親苗を更新する。



付録（土壌の汚染度評価法の具体的方法）

（４）一節苗生物検定法

一節苗の準備（切り出し）

ばんじゅうで栽培したかんしょの茎を採取し、葉柄基部と不定根基部を含む部位（節）がひとつ含まれるように切り出す。節の上側は5mm、下側は1.5cm～2cm程度残すようにする（短いと発芽、発根不良となりやすく、検定用の植物体としては不向きになる）。



つる苗より切り出し、ピペトリザーバーに整列



一節苗の切り出し方の違いと発芽発根に及ぼす影響

良好に発芽

発芽

短いと発芽が悪い

一節苗の準備（水耕栽培による発芽と発根）

切り出した一節苗をピペトリザーバー等を利用して立てた状態とし、苗の下端から1cm程度を蒸留水で浸す。さらに水の蒸発による乾燥から保護するため、湿らせたキムワイプで苗の下部を覆う。



28℃の人工気象器内（明暗期12時間）

72時間水耕栽培



付録（土壌の汚染度評価法の具体的方法） （４）一節苗生物検定法

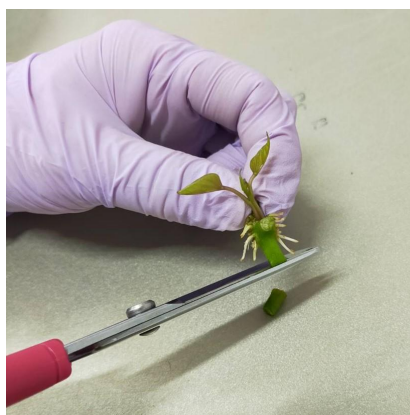
9

一節苗の移植前切断処理

28℃一定、明暗期各12時間の人工気象器内（照明は植物栽培用等が望ましい）で72時間経過後、脇芽と不定根の伸長が確認できた一節苗を検定に用いる。一節苗を供試土壌に移植する直前に、発病を促すため下端部約5mmをはさみで切断する。なお、切断する際は、茎をはさみでつぶさないように注意する。



発芽した一節苗



ハサミで切断



切断処理した一節苗

検定用土壌への移植

9cmの黒ポットに250gの供試土壌をつめ、切断処理した一節苗を7株移植し、28℃の人工気象器で栽培を行う。



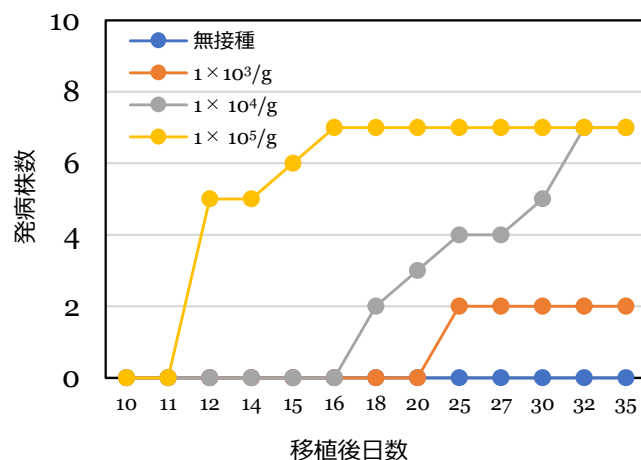
黒ポットに土を詰め、一節苗を移植する

付録（土壌の汚染度評価法の具体的方法）

（４）一節苗生物検定法

発病の経過観察

オートクレーブした土壌（＝他の微生物による競争がない状態にした土壌）に基腐病菌の胞子を $1 \times 10^3/\text{g} \sim 1 \times 10^5/\text{g}$ となるように混和し、一節苗を移植すると基腐病の発病が観察できる（下写真）。また、発病は右のグラフのような経過をたどる。基腐病菌量が最も高い $1 \times 10^5/\text{g}$ では初発病は12日目に見られ接種濃度が低くなるにつれ初発病



人工接種土壌に移植した一節苗の基腐病発病経過
発病株率は地際基部の黒変化だけでなく植物体全体の枯死を含む

が遅延し、また、30日目までで発病株の増加は概ね終了することから、生物検定においては、12日目以降30日目までの枯死株を基腐病発病株として記録する（12日目より以前に、枯死に至らず病徴が生じている場合もある）。次ページに生物検定中の発病の特徴について示したので、判定の参考にされたい。



基腐病菌量
(胞子懸濁液)

DW

$1 \times 10^3/\text{g}$

$1 \times 10^4/\text{g}$

$1 \times 10^5/\text{g}$

人工汚染土壌に移植した一節苗生物検定（21日目の様子）

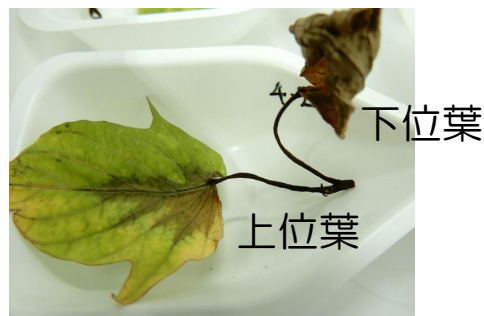
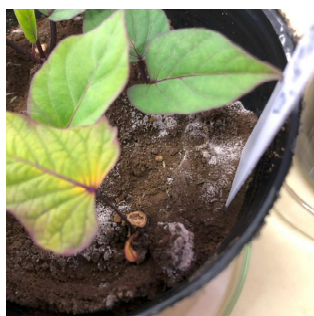
基腐病による枯死株の特徴

本圃での基腐病は、株元から茎が黒変して、黒変部には柄子殻が形成されて、次第に病変が植物体全体に広がって枯死するという特徴があるが、生物検定では、判定する30日目までに枯死した植物体でも、柄子殻の形成に至ることは少ない。

一節苗の生物検定における基腐病の病徴は、検定開始から早い段階では脇芽から伸長した第一葉が黄化（写真）、株元と葉柄は黒く変色し、葉柄は細くくびれる。黄化した葉では葉脈の基部から黒褐色の病斑が広がり、さらに病徴は、下位葉から上位葉へと伸展し、植物体全体が萎凋、枯死する。

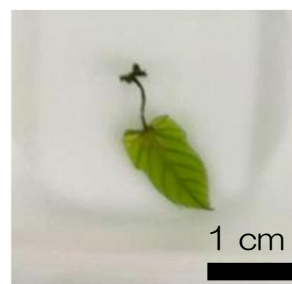


発病初期の葉の黄化



病徴の伸展

なお、一節苗をポットに移植後、数日から1週間程度で脇芽が大きく伸長することなく枯死していくケースもあるが、この場合、植物体も小さく、基腐病によらない生育不良とし、検定からは除外する。



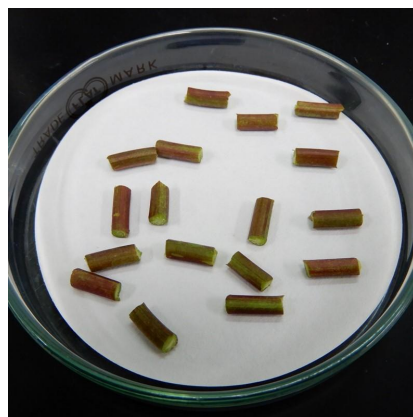
移植後1週間以内の生育不良

ベイトトラップ法の概要

ベイトトラップ法は、基腐病菌の栄養源や生息部となるかんしょの茎を検定対象土壌に埋め込み、2週から3週間経過後に回収した茎片から、集積された基腐病菌をPCRで検出する手法である。

ベイトの準備

かんしょの茎を1 cmの長さに切断（節は含まない）



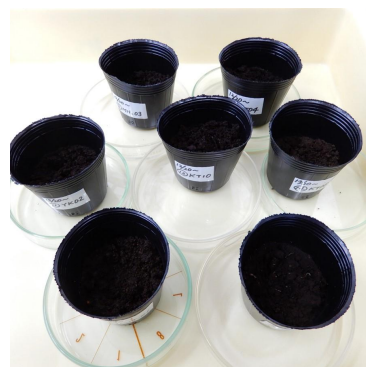
土壌へのベイトの埋め込み

6cmの黒ポットに供試土壌を50g程度詰め、上記切断した茎片を各ポットに5個ずつ置床後、1 cmほど覆土する。28℃での静置中はポットにラップをかぶせて乾燥しないようにする。

約1センチの長さに茎を切断
（節は含まない）



1ポットに5個ずつ埋設
上から覆土する



28℃で静置培養

28℃で3週間静置
（乾燥させないようにする）

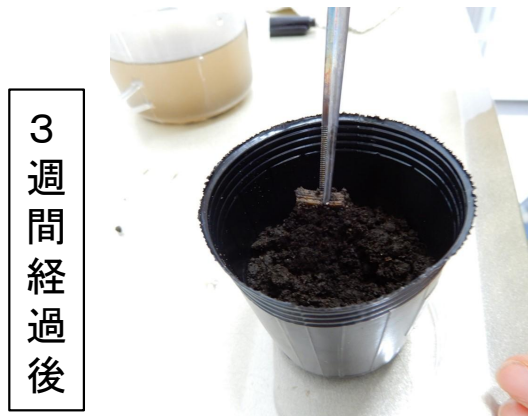


付録（土壌の汚染度評価法の具体的方法） （5）ベイトトラップ法

9

ベイトの回収

3週間経過後、ポット内に埋設した茎片を回収する。回収後、水道水で土塊などの汚れを取り除き、風乾する。分解が進んでいると見つからない場合もある。



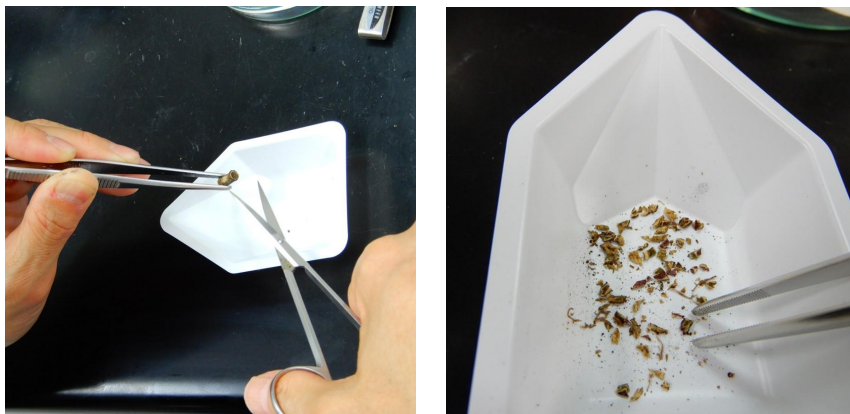
回収



水道水で洗浄後風乾

ベイトからのDNA抽出

風乾したベイトをハサミ等で細断し、DNA抽出のための粉碎用の容器に移し、容器ごと一晩以上凍結する（可能であれば -80°C 、なければ -30°C ）。試料の粉碎に際しては、マルチビーズショッカー（推奨）、乳鉢等でしっかり粉碎し、DNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN）によりDNAを抽出する。

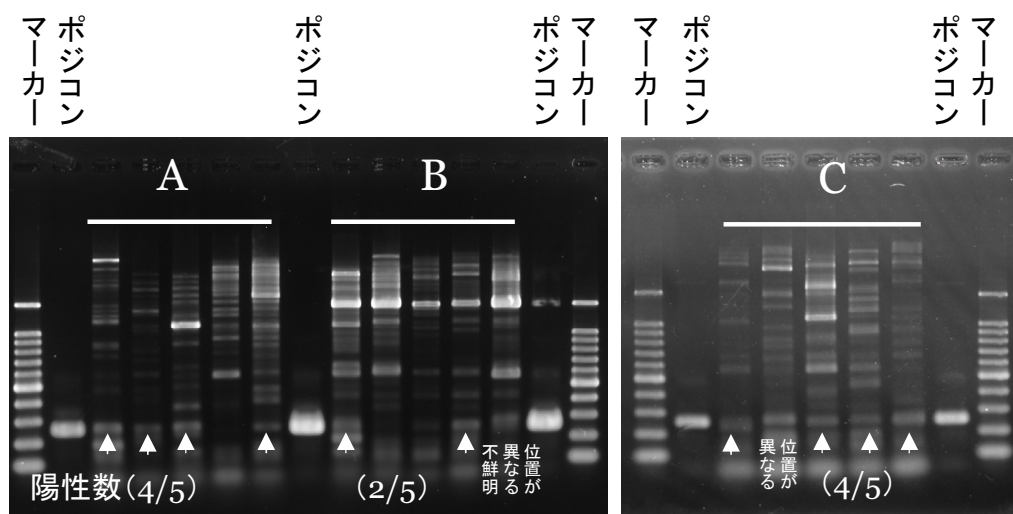


ハサミ等で細断

ベイトから抽出したDNAのPCR

基腐病菌検出用プライマー（P21記載のもの）を用いてコンベンショナルPCRを行い、アガロース電気泳動で基腐病菌のDNAの有無を確認するか、TaqManプローブを用いたリアルタイムPCRにより検出してもよい。リアルタイムPCRの場合、試薬に係る分析コストは上がるが、電気泳動の手間や時間を省ける。

電気泳動による検出の判定は、病原菌由来のPCR産物と同じ移動度のDNA（258 bp）を陽性とし、5個のベイトのうちの陽性数に応じてポテンシャル得点を付与する（1個なら1点、2個以上で2点）。基腐病菌のDNAと近い位置に非特異なPCR産物がみられることもあり、移動度が不鮮明な場合は陰性とする。また、リアルタイムPCRにより判定する場合はP24に記載した陽性判断の目安に従う。



ポジコンの位置にあるバンドを基腐病菌として検出

付録（土壌の汚染度評価法の具体的方法）

（6）各汚染度評価法の比較

9

各汚染土評価法にかかる経費、労力比較

土壌の汚染度評価法に係るコスト（経費、労力）や評価に要する期間をまとめた。評価項目それぞれに、長所、短所があるため、実施者の実情に応じて、診断項目を選択する際の参考としていただきたい。

各汚染度評価法の比較（概要と特徴）

	コンベンショナル PCR法	リアルタイム PCR法	一節苗生物検定法	バイト法
概要	被検土壌中の基腐病菌を PCR検出	被検土壌中の基腐病菌を PCR検出・定量	一節苗を被検土壌に植え、発 病検定	被検土壌に埋め込んだ茎を回 収後、基腐病菌のDNAを PCR検出
必要な設備、手法	DNA抽出、精製、PCR、 電気泳動、撮影装置	DNA抽出、精製、 リアルタイムPCR装置	栽培が可能な場所 (人工気象器内が望ましい)	DNA抽出、PCR、 電気泳動、撮影装置
費用 (1土壌あたり)	約4000円	約4500円	6円	約5000円
作業	煩雑	煩雑	簡単	煩雑
検定に要する期間	3日	3日	1か月半	2～3週間

費用は生物検定黒ポット、DNA抽出キット、DNA精製キット、PCR試薬、TaqManPCR用試薬、PCR反応に係るプラスチック消耗品の価格から試算

残渣量の測定概要

土壌中のかんしょ残渣は、基腐病菌の生息場所であり、次作の伝染源となる。採取した土壌約1kgより5mmの網上に残ったかんしょ残渣を測定する。

採取した土壌を約1kg計量



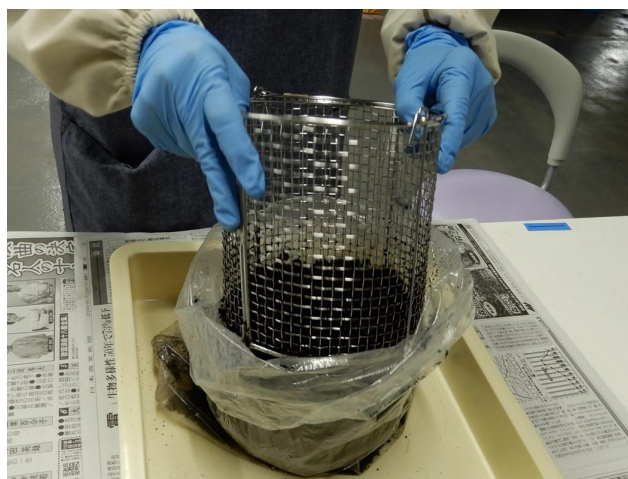
5mmの金網かご 検定土壌

〔 網目が5mmであれば、
園芸用のふるいなどでもよい 〕



新しい袋に約1kg計量

土壌のふるい掛け



元々の袋にかごと入れてふるい掛けする。

網上に残ったものから残渣を選別



網上の残渣



残渣をピンセットで計量用の容器（シャーレなど）にとりわけ

残渣の重さを計量、記録



電子天秤等で計量
（写真は0.1g以下）



比較的残渣の多い土壌
（写真は1.5g）

ポテンシャル診断の際の残渣量
0.8g未満はポテンシャル得点 0点
0.8g以上でポテンシャル得点 2点

土壌は生物検定にも用いるため、ふるい掛けした土壌および計量後の残渣は再度元の土壌に戻す。

参考資料

1. 「サツマイモ基腐病の発生生態と防除対策（令和4年度版）」（農研機構・鹿児島県農業開発総合センター・鹿児島県経済農業協同組合連合会・鹿児島県大隅地域振興局・宮崎県総合農業試験場・沖縄県農業技術センター・沖縄県農林水産部農業革新支援班・（株）サナス・三州産業（株）・三和物産（株）、2023年）

https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/files/stem_blight_and_storage_tuber_rot_of_sweetpotator04a.pdf

2. 「健康診断に基づく土壌病害管理 ヘソディム 指導者向けマニュアル」（農研機構〔農業環境技術研究所〕、2013年）
<https://www.naro.affrc.go.jp/archive/niaes/techdoc/hesodim/hesodim.pdf>

3. 「2022年の九州・山口県为天候の経過」（気象庁ホームページ）
<https://www.data.jma.go.jp/fukuoka/kaiyo/chikyu/report/pdf/tenko2022.pdf>

4. 「サツマイモ基腐病の多発圃場における休耕期間中のサツマイモ残渣および土壌中の菌量の変化」（西八束・本田傑・西岡一也、2024年、九病虫研会報、70：13-20.）

5. 「PCR-DGGE による土壌細菌・糸状菌相解析法」（農研機構〔農業環境技術研究所〕、2010年）
https://www.naro.affrc.go.jp/archive/niaes/project/edna/edna_jp/manual_bacterium.pdf

6. 「Real-time PCR assay for the diagnosis and quantification of co-infections by *Diaporthe batatas* and *Diaporthe destruens* in sweet potato」 (Fujiwara K., Kobayashi Y. O, Usui M, Nishioka K., Nakamura M, Kawano S, Okada Y, Kobayashi A, Miyasaka A, Hirayae K, Kushima Y, Nishi Y, Inoue H、2021年、Frontiers in Plant Science 12: 694053.)

7. 「Detection and quantification of *Diaporthe destruens* from soil using real-time PCR with a novel TaqMan probe」 (Sato E, Sekiguchi H, Kawabe M, Yoshida S、2025年、土と微生物（印刷中）)

免責事項

本マニュアルは、発行時点での情報に基づいて作成しております。本マニュアルを利用することにより生じたあらゆる損害等については、利用の如何にかかわらず一切責任を負いません。

本マニュアルに関するお問い合わせ先

農研機構：<https://www.naro.go.jp/inquiry/index.html>

上記サイトの「お問い合わせ」にある「技術について知りたい」から入り、「技術についてのお問い合わせ」フォームを利用して、お問い合わせください。