

試験研究成果普及情報

部門	病害虫	対象	研究
課題名：サトイモ疫病菌の簡易検出技術			
〔要約〕サトイモ葉を用いたベイトから培地を介してサトイモ疫病菌を検出する PCR 法及び LAMP 法を確立した。発病圃場由来の種芋から定植時まで疫病菌が検出されたことから、種芋は次作の伝染源となり得る。			
キーワード [※] サトイモ、疫病、PCR、LAMP、伝染源			
実施機関名	主 査	農林総合研究センター 生物工学研究室	
	協力機関	農林総合研究センター 病理昆虫研究室、担い手支援課専門普及指導室、千葉農業事務所、印旛農業事務所、香取農業事務所、山武農業事務所、君津農業事務所、病害虫防除課	
実施期間	2019年度～2021年度		

〔目的及び背景〕

サトイモ疫病は短期間で圃場全体に蔓延し、地上部の腐敗、枯死による大幅な減収を招くサトイモの重要病害である。平成 29 年度に、千葉県内のサトイモ産地で急激に拡大し問題になっていることから、千葉県におけるサトイモ疫病の発生生態の解明と有効な防除技術の確立が求められている。発生生態の解明では多くの検体を調査するため、疫病菌を簡易に検出する技術が必要となる。そこで、圃場内外における伝染源の調査等に使用するサトイモ疫病菌の簡易検出技術を開発する。

〔成果内容〕

- 1 岐阜大学が開発したサトイモ疫病菌の PCR 法及び LAMP 法の検出感度を比較すると PCR 法が LAMP 法より 100 倍高い（表 1）。LAMP 法は、簡便かつ迅速に検出が可能であることから初発をいち早く把握する必要のある診断等の場で活用できる。PCR 法は高感度で検出が可能であることから発生生態の解明等で活用できる。
- 2 感染可能な生きた遊走子を誘引し検出するために用いるベイトとして、サトイモ葉を用いると検出率は高い。さらに、ベイトから直接検出するよりも、選択培地を介して検出する方が検出率は高くなる。したがって、サトイモ疫病菌の検出は、サトイモ葉を用いたベイトから培地を介して検出する方法が適している（表 2）。
- 3 開発した簡易検出法（図 1）を用いて発病圃場から得た種芋の保菌状況を調べたところ、貯蔵前で約 3～4 割、貯蔵後で約 1 割の種芋からサトイモ疫病菌が検出された（表 3）。このことから、発病圃場から得た種芋が伝染源になることが考えられる。また、貯蔵前の種芋の植物体から疫病菌は検出されなくとも、付着土壌から検出される例があった（表 4）。このことから、少なくとも種芋に付着する土壌が伝染源になり得ることが考えられる。

4 栽培期間中及び収穫 20 日前に検出された土壌中に存在するサトイモ疫病菌は、サトイモ収穫後 11 日後には土壌からは検出されない（表 5）。一方、サトイモ疫病菌で人工的に汚染した土壌から、24 週間後でも検出されることから、発病圃場において疫病菌は長期間生存し、伝染源となる可能性がある（表 6）。

[留意事項]

サトイモ疫病菌の土壌中における生存期間は室内試験による結果のため、発病圃場において確認、検討が必要である。

[普及対象地域]

県内サトイモ生産者及び指導機関

[行政上の措置]

[普及状況]

[成果の概要]

表 1 LAMP 法及び PCR 法の検出感度の比較

DNA量 ¹⁾	LAMP法 ²⁾	PCR法 ³⁾
100 pg	○ ⁴⁾	○
10 pg	×	○
1 pg	×	○
100 fg	×	×
10 fg	×	×
1 fg	×	×

注 1) 反応液中に含まれるサトイモ疫病菌の DNA 量

2) Feng *et al.* (2019)

3) 景山幸二ら (2019)

サトイモ疫病対策マニュアル (2020 年版) (技術員向けマニュアル) (サトイモ産地を救う研究開発コンソーシアム)

4) ○は検出を、×は非検出を示す

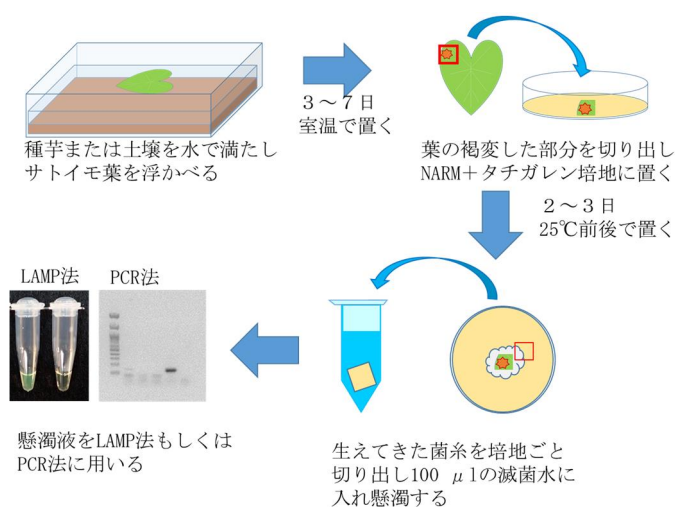


図 1 バイト-LAMP 法とバイト-PCR 法の流れ

表 2 貯蔵後の種芋を供試したベイト-LAMP法におけるベイト植物種及びベイト植物からの検出方法の違いによる検出率の比較

試験No. (反復)	品種	種芋の ¹⁾ 個数	ベイトから直接LAMP法 ²⁾			NARM+タチガレン培地を介したLAMP法 ³⁾		
			サトイモ(葉)	エゴマ	アサ	サトイモ(葉)	エゴマ	アサ
1	石川早生	100	○	×	×	1/1	0/15	0/15
2	石川早生	100	×	×	×	1/1	0/15	0/15
3	石川早生	100	○	×	×	1/1	0/15	0/15
4	石川早生	100	○	×	×	1/1	0/15	1/15
5	石川早生	100	×	×	×	1/1	0/15	0/15
6	石川早生	100	○	×	×	1/1	0/15	0/15
7	石川早生	100	×	×	×	1/1	1/15	0/15
8	石川早生	100	○	×	×	1/1	1/15	0/15
9	土垂	100	×	×	×	1/1	0/15	0/15
10	土垂	20	○	×	×	1/1	2/15	1/15

注 1) 発病圃場から得た種芋 100 個 (一部 20 個) を入れたタライに井水を約 15 L 加えベイト植物種を浮かべた

2) ベイト植物を水に懸濁し熱処理 (98℃ 8 分) した上澄みを LAMP 法に供試し、サトイモ疫病菌が検出された場合を○、非検出を×とした

3) ベイト植物それぞれを培地に置床後、図 1 と同様に検出を行い、検出されたサンプル数を示した。それぞれの母数は置床した葉片及び種子数とした

表 3 貯蔵前後の種芋からのベイト-PCR法によるサトイモ疫病菌の検出

処理区	品種	サトイモ疫病菌が検出された種芋の個数	
		貯蔵前 (収穫直後)	貯蔵後 (定植時)
子芋	石川早生	36/100	5/100
孫芋	石川早生	32/100	10/100

注) 図 1 の方法で発病圃場から得た種芋 1 個ずつを水に浸漬し、検出を行った。供試した葉片 2 枚のうち、1 枚でも陽性であれば検出と判定した

表 4 LAMP 法及び PCR 法による貯蔵前の種芋における部位別の検出

供試資料	検出結果	
	LAMP法	PCR法
種芋表面に付着した土壌	0/18	1/18
根	0/18	0/18
皮 (茸毛含む)	0/10	0/10
可食部	0/18	0/18

注) 発病圃場から得た種芋を用いた。検出結果は、LAMP 法及び PCR 法により陽性と判定された数/調査した種芋の個数とした。根、皮は表面殺菌後、可食部は滅菌したナイフで内部を切り出した後、DNA 抽出を行った

表5 サトイモ栽培期間中と収穫前後の圃場土壌からのベイト-LAMP法及びベイト-PCR法によるサトイモ疫病菌の検出

処理区	品種	栽培期間中		収穫20日前	収穫11日後
		令和2年9月2日		令和2年10月27日	令和2年11月27日
		LAMP法	PCR法	PCR法	PCR法
地点1	石川早生	1/3	3/3	0/3	0/3
地点2	石川早生	1/3	3/3	2/3	0/3
地点3	石川早生	1/3	3/3	0/3	0/3
対照区	—	0/3	0/3	0/3	0/3

注) 発病圃場内の離れた3地点の表面から地下5cmの土壌を試験に用いた。収穫は11月16日に行った。検出は、図1と同様に行った。検出には3枚の葉片を供試し、それぞれの母数を置床した葉片とし、子数を検出された葉片数とした。対照区は、井水のみを入れた容器にサトイモ葉を浮かべた

表6 サトイモ疫病菌混合土壌からのベイト-PCR法によるサトイモ疫病菌の検出

供試菌株	4週目	8週目	12週目	16週目	20週目	24週目
CBYaS2-1	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
EPC2017Ko1sh	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3

注) 各菌株と土壌を混合したものを50mlチューブに入れ、保存期間毎に3本ずつ取り出し、試験に供試した。図1と同様に検出を行い、供試した葉片3枚のうち、1枚でも陽性であれば検出と判定した

[発表及び関連文献]

- 1 令和4年度試験研究成果発表会(野菜Ⅳ)
- 2 サトイモ疫病対策マニュアル(2020年版)(技術員向けマニュアル)(サトイモ産地を救う研究開発コンソーシアム、令和2年度)
- 3 Feng et al. A simple loop-mediated isothermal amplification assay to detect *Phytophthora colocasiae* in infected taro plants, *Journal of General Plant Pathology* 85, 2019
- 4 景山幸二ら、サトイモ疫病菌 *Phytophthora colocasiae* のPCRおよびリアルタイムPCRによる土壌からの検出、*日本植物病理学会報*、第85巻第3号、2019年

[その他]

- 1 平成30年度試験研究要望課題(提起機関:印旛農業事務所)
- 2 緊急技術開発促進事業「サトイモ疫病の防除対策の確立」(令和元~3年度)