

苗木病害の遺伝子診断

マニュアル ver.0.5

(国研)森林研究・整備機構 森林総合研究所
きのこ・森林微生物研究領域 苗木病害研究会編

目次

- ①はじめに
 - 本マニュアルについて
- ②遺伝子診断の目的と意義
 - メリットとデメリット
- ③遺伝子診断に必要なツール
 - 実際に使用する器具、装置等
- ④遺伝子診断方法各論
 - 1 スギ赤枯病
 - 2 樹木疫病
- ⑤検出結果の判定について
 - 判定における注意点
- ⑥トラブルシューティング
 - よくある問題と対処法
- ⑦診断における注意点
 - 実験と結果の取り扱いについて
- ⑧最後に
 - メッセージ

①はじめに

本マニュアルは日本における主要造林樹種で問題になりつつある苗木病害について、遺伝子による診断方法の手順をまとめたものです。苗木病害の原因菌は多様であり、原因菌ごとに検出方法は異なります。原因菌の種類に応じて方法を使い分ける必要がありますが、本マニュアルでは特に重要な病原菌を対象に、遺伝子診断の手法をまとめました。遺伝子診断の技術は年々更新されていますので、本マニュアルも継続的に更新していく予定です。

対象者：研究者、大学院生、樹木医など、苗木病害の遺伝子診断に関わる全ての方

②遺伝子診断の目的と意義

苗木病害の原因菌を特定する目的は病害防除のためです。病原菌の特定は、発生している病害について適切な防除方法を選択する手がかりとなります。例えば、農薬の使用に際し、登録農薬を使う際には、病気あるいは病原菌に対応した農薬でなければ法律上使用できません。また、病気に対応した農薬でなければ効果がないこともあります。正確な原因菌の特定により、病気に有効な農薬を選択し、使用することができます。また、病原菌を特定することで、病気が今後どのような広がりを見せる可能性があるのかを予想し、予防的な処理を考える手がかりにもなります。さらには、病気にかかった苗木の移動を制限するかどうかの判断もできます。一方で、病気になっている苗木について、原因菌の特定が難しいこともあります。原因菌の特定を可能にするような形態的特徴が見えない場合や、症状からは区別が難しい病害の存在もあります。こうした場合に遺伝子診断は重要な選択肢になります。

遺伝子診断のメリットとしては、通常分離培養による原因菌の検出にかかる時間に比べて、早期に診断結果が得られる点があります。通常は分離と培養で1週間以上、そこから形態観察やDNA解析による原因菌の特定まで加えるとさらに時間がかかります。また、専門家でもなくても遺伝子診断技術があれば原因菌の特定が可能な点もメリットといえます。一方、遺伝子診断のデメリットは、技術習得とコスト面にありますが、近年ではより簡便で低コストになりつつあります。

③遺伝子診断に必要なツール

特定の商品を推奨することはしませんが、使用する器具は研究室によって様々なものがあります。遺伝子実験を行ったことがある研究室であれば最低限保有していると考えられるものを使用します。PCR増幅に使用するDNAポリメラーゼは各研究室で通常使用しているもの、国内外でよく使われているものであれば問題はないと思います。

ピペット類:

マイクロチューブ:

高速遠心分離機:

卓上遠心機

サーマルサイクラー:

電気泳動装置:

アガロース:

DNAポリメラーゼ:

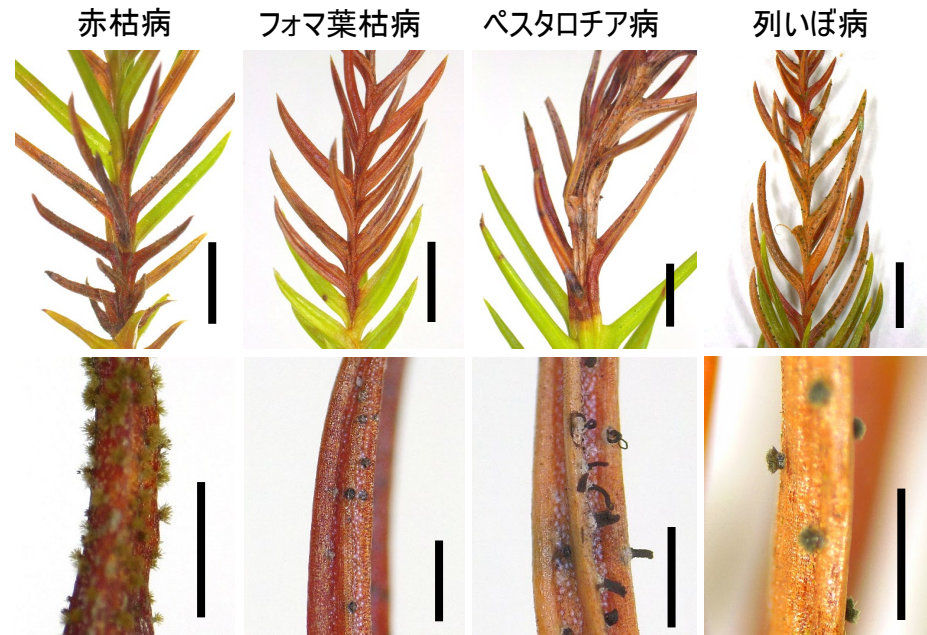
プライマー:

その他グローブ、キムワイプ等消耗品

④遺伝子診断各論

スギ赤枯病

スギ赤枯病は*Passalora sequoiae*により引き起こされるスギ苗木の最重要病害です。1900年代初頭に発生し急速に全国に被害が拡大しました。侵入病害としても知られており、その被害は拡大造林期にピークに達し、その後収束したかのように見えたが、近年の苗木増産の機運が高まる中、再び被害が顕在化しつつあります。被害苗の症状がフオマ葉枯病やペスタロチア病(右図:スケールは約5mm)に似ていることから、孢子形成前では診断が難しい病害です。ここでは安藤、升屋(2018)の解説に基づき手法をまとめました。

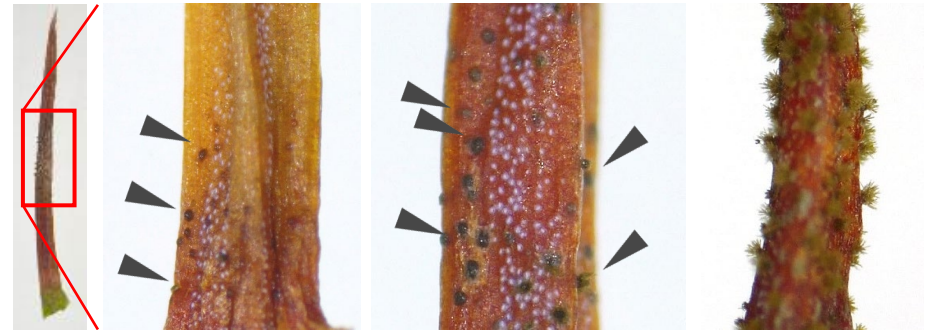


・試料採取

スギ赤枯病は地際付近で感染・発病が生じやすく、次第に上部に被害が進展していきます。そのため、苗木の下部に注目しながら発病の疑いのある試料を採取します。野外で採取した罹病苗は実験室に持ち帰り、実体顕微鏡で観察しながら遺伝子診断に用いる試料を探します。

遺伝子診断には、罹病針葉1本を供試します。

発病初期や冬期は、罹病針葉上でも分生子(矢印)がみられない場合があるため、注意が必要です。慣れないうちは疑わしい試料は遺伝子診断を試してみましょう。



分生子は
未形成
(子座のみ)

子座上に
分生子を
僅かに形成

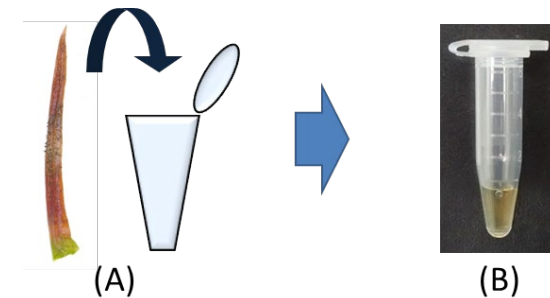
分生子を
多量に形成

・DNA抽出(スギ赤枯病)

ここでは比較的簡便な2つの方法を紹介いたします。

PrepMan™ Ultra sample preparation reagent
(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

1. 罹病組織を採取
2. PrepMan試薬80 μ Lに入れる
3. 滅菌したペッスルで破碎
4. 98°Cで10分維持
5. 遠心分離機(15,000 \times g)で3分
6. 上澄みをDNA抽出物として使用



スギ赤枯病の罹病針葉からのDNA抽出
罹病針葉1本を供試し(A)、試料からDNAを抽出する(B)。

カネカ簡易DNA抽出キット
version2 (Kaneka, Tokyo, Japan)

1. 罹病組織を採取
 2. SolutionA試薬100 μ Lに入れる
 3. 滅菌したペッスルで破碎
 4. 98°Cで8分維持
 5. 室温で2分維持後、solution Bを14 μ L入れて混和
 6. 遠心分離機(15,000 \times g)で3分
 7. 上澄みをDNA抽出物として使用
- *長期保存にはTEバッファーを使用

・PCRによる検出

スギ赤枯病菌 (*Passalora sequoiae*) 特異的PCRプライマー

Pas_seq-4F: 5' -GCCCCCGGAGGGAATCAA-3'

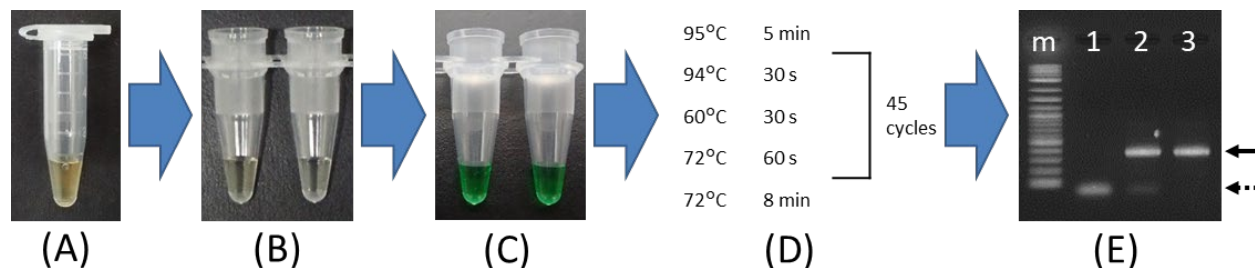
Pas_seq-R6: 5' -CTTGGGTAAAGATTTAACGGCCGTC-3'

使用するPCR酵素: GoTaq® Green Master Mix (Promega, Tokyo, Japan)

手順

1. DNA抽出物(下図A)を500倍および1,000倍希釈(下図B)
2. 希釈液(下図B)それぞれ1 μ Lを鋳型DNAとして使用してPCR反応液を調整(下図C)
3. PCR反応を上記の設定(下図D)で実行
4. アガロースゲルを用いた電気泳動で増幅の有無を確認(下図E)

下図(E)スギ赤枯病菌のDNAが増幅された場合は、サイズマーカー(m)の400 bp付近にバンドがみられる(実線矢印部)。ネガティブコントロール(1)では、しばしば100 bp付近に非特異的な増幅産物のバンドが現れることがある(点線矢印部)。スギ赤枯病罹病サンプル(2, 3)では明瞭なバンドが確認される。



・RPAによる検出

スギ赤枯病菌 (*Passalora sequoiae*) 特異的RPAプライマー

TAMP_Psq-F: 5' -GGTCAGTTAACCGACATGCTGCGAAGCTTGCGAC-3'

TAMP_Psq-R: 5' -GATGGCCTTCTCTCTCTCCTGTTCACTTATATC-3'

使用するRPAキット: TwistAmp Basic kit (TwistDX)

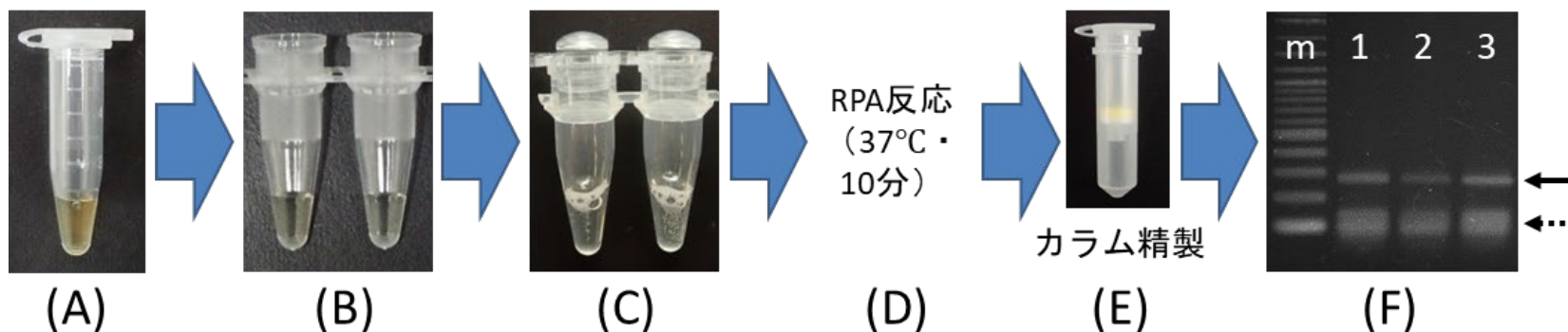
精製キット: NucleoSpin® gel and PCR clean-up kit (Macherey-Nagel GmbH & Co., Düren, Germany)

手順

1. DNA抽出物(下図A)を5倍および10倍希釈(下図B)
2. それぞれ1 μ Lを鋳型DNAとして使用して、上記特異的プライマーを含むRPA反応液を調整(下図C)
3. RPA反応を37°Cで10分(D)
4. カラム精製キットでRPA産物の精製(E)

5. アガロースゲルを用いた電気泳動で増幅の有無を確認(F)

スギ赤枯病菌のDNAが増幅された場合は、サイズマーカー(m)の300 bp付近にバンドがみられる(実線矢印部)。本手法ではしばしば100 bp付近に非特異的な増幅産物のバンドが現れることがある(点線矢印部)(E)。1-3は全てスギ赤枯病罹病サンプル。



④遺伝子診断各論 樹木疫病

樹木疫病は*Phytophthora*属菌により引き起こされる病害で、苗木病害ではあまりなじみがないように見えます。しかし、世界的には最も重要な森林病害の一つであり、欧米では苗木による移動も問題になっています。日本国内ではこれまで被害は認識されていませんでしたが、実際には主要造林樹種の苗木での感染が確認されており、今後被害の顕在化が危惧されます。作物病害として非常に有名なグループであるため、すでに数多くの診断技術が確立されています。また、市販のキットでも検出が可能になっています。ここでは苗木に感染している疫病の検出手法として比較的導入しやすい手法を紹介します。



*Phytophthora cinnamomi*の卵胞子

・分離に使用する培地

通常培地

・ニンジンエキス寒天培地 (CA)

ニンジンエキス*	100 mL
寒天	15 g
蒸留水	1 L

*ニンジンエキスはニンジンをジューサーで破碎しガーゼなどで濾したものの

・V8ジュース寒天培地 (V8A)

V8ジュース*	100 mL
素寒天	15 g
蒸留水	1 L

*V8ジュースは100 mLに1 gの炭酸カルシウムを加え十分攪拌した後、7,000 rpmで 10分遠心した上澄みを用います

・ポテトデキストロース寒天培地 (PDA)、コーンミール寒天培地 (CMA) などもよく使用されます。

選択培地

V8ジュース寒天培地	1L
Hymexazol	50mg
アンピシリン酸ナトリウム	250mg
リファンピシン	10mg
ナスタチン	10mg

*抗生物質はあらかじめ10mlの滅菌水で混合し、シャーレに分注する前に混合します。他にも様々な選択培地が開発されています。

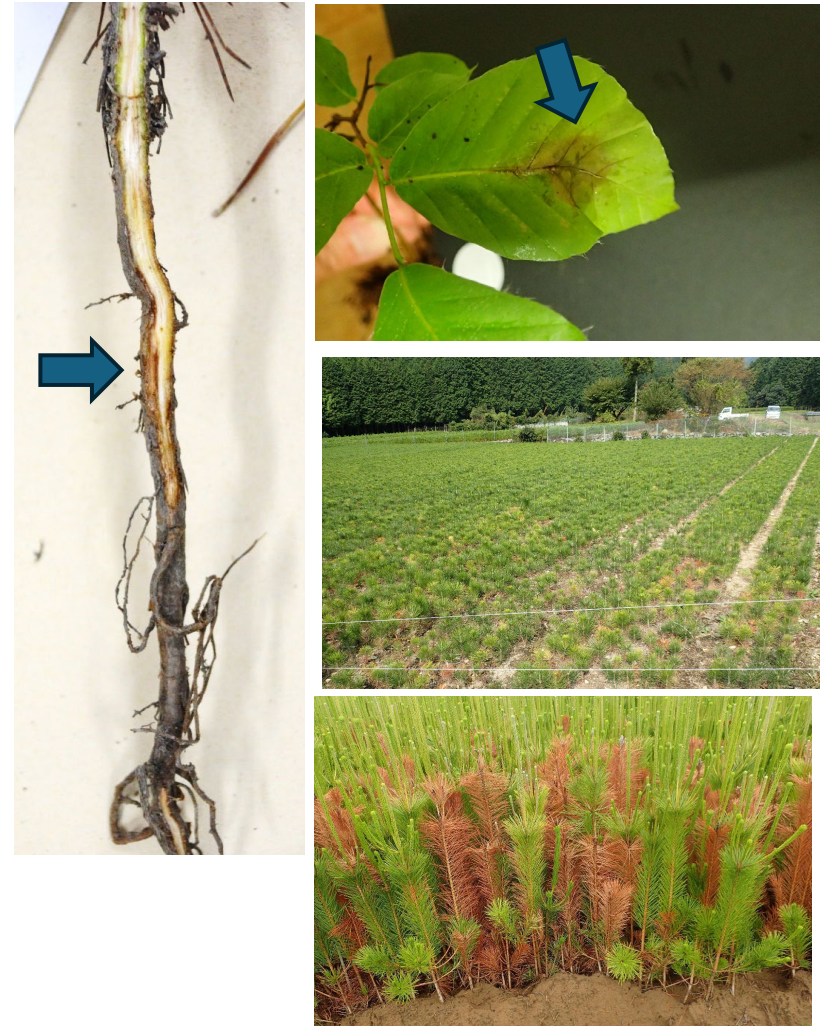
・試料採取

樹木疫病菌の検出には通常、植物組織片からの分離と根圏土壌からの分離が用いられます。選択培地を用いる方法が一般的ですが、様々な選択培地が提案されています。

まず壊死斑(矢印)からの分離法について記します。

- ・壊死斑のある部位を探索します。
- ・壊死部を切り出し、選択培地に静置します。
- ・疫病菌は菌糸に特徴があるので、そうした菌糸をニンジンエキス寒天培地、V8ジュース寒天培地などに移植し、純粋培養菌株を確立します。

注) 壊死斑から必ずしも分離されるわけではありません。特に古い病斑からは *Fusarium* 属菌など他の菌が分離されることがよくあります。



・試料採取

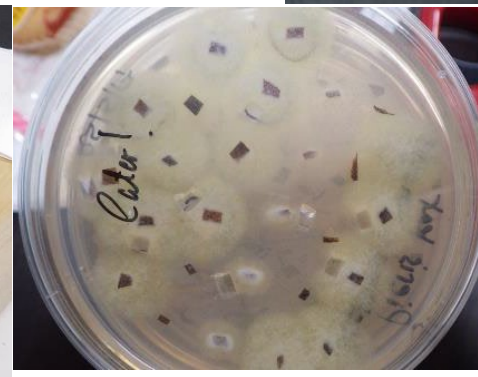
土壌からの検出にはベイト法が用いられます。

・3 Lサイズの容器に土壌を1 L入れてから、蒸留水を2 L入れます。

・水面に新鮮な葉を浮かべ、3日間維持します。

・壊死斑が生じたら、そこから組織片を切り出し、選択培地で分離培養します。

水面に浮かべる葉は、ナラ類、ツツジ類がよく用いられます。
バラ科の葉はあまり使いません。



・DNA抽出

PrepMan™ Ultra sample preparation reagent
(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

1. 罹病部位1か所、サイズ約2mm³採取
2. PrepMan試薬80μlに入れる
3. 滅菌したペッスルで破碎
4. 98°Cで10分維持
5. 遠心分離機(15,000 g)で3分
6. 上澄みをDNA抽出物として使用

カネカ簡易DNA抽出キット
version2 (Kaneka, Tokyo, Japan)

1. 罹病部位1か所、サイズ約2mm³採取
 2. SolutionA試薬100 μLに入れる
 3. 滅菌したペッスルで破碎
 4. 98°Cで8分維持
 5. 室温で10分維持後、solution Bを14 μL入れて混和
 6. 卓上遠心機で3分遠心後、上澄みを再度遠心
 7. 上澄みを滅菌水*で20倍希釈してDNA抽出物として使用
- *長期保存にはTEバッファーを使用

・PCRによる検出

疫病菌の遺伝子診断手法はLAMP、種特異的プローブによる検出、遺伝子編集技術を応用した特異的検出法と、非常に様々なものが考案されていますが、初期導入が低コストで操作性が容易な特異的プライマーによる検出を紹介します。以下に疫病菌特異的なプライマーとして以下を示します。これらは実際に使用して、増幅しやすかったものです。種名まで特定したい場合、増幅産物の塩基配列を読むことで分かる種類もあります。また、DNA抽出が成功しているかどうかの確認やPCR阻害物質の有無を確認するために植物特異的プライマーも示します。

	プライマー	配列	アニール温度・時間	引用文献
<i>Phytophthora</i> 属特異的プライマー				
Forward	Yph1F_mod2	5'-CGACCATKGGTGTGGACTTTG-3'	62°C・45秒	Bi et al. 2018
Reverse	Yph2R_mod2	5'-ACGTTCTCRCAGGCGTATCTG-3'		
Forward	FMPH-8b	5'-AAAAGAGAAGGTGTTTTTATGGA-3'	66°C・30秒	Martin et al. 2004
Reverse	FMPH-10b	5'-GCAAAAGCACTAAAAATTAATATAA-3'		
Forward	18Ph2F	5'-GGATAGACTGTTGCAATTTTCAGT-3'	58°C・60秒	Kostov et al. 2016
Reverse	28Ph2R	5'-AAGGAACTTGCCCCAAGC-3'		
植物特異的プライマー				
Forward	FMP1-2b	5'-GCGTGGACCTGGAATGACTA-3'	60°C・30秒	Martin et al. 2004
Reverse	FMP1-3 b	5'-AGGTTGTATTAAGTTTCGATCG-3'		

・PCRによる検出(各研究室や使用機材によって条件が異なることもあります)

使用するPCR酵素: GoTaq® Green Master Mix (Promega, Tokyo, Japan)

PCR反応液は, 全量25 μL [鋳型DNA: 1 μL , GoTaq® Master Mix (Promega KK, Tokyo, Japan): 12.5 μL , フォワードプライマー(10 μM): 0.5 μL , リバースプライマー(10 μM): 0.5 μL , 超純水: 10.5 μL]

PCR反応条件

初期変性: 95°C・5分

熱変性94°C・30秒

アニーリング60°C・30秒

伸長反応72°C・1分

} 45サイクル

最終伸長を72°C・8分

アガロースゲル電気泳動

・検出キットの使用

使用するキット

Agdia ImmunoStrip® for Phytophthora (Phyt)

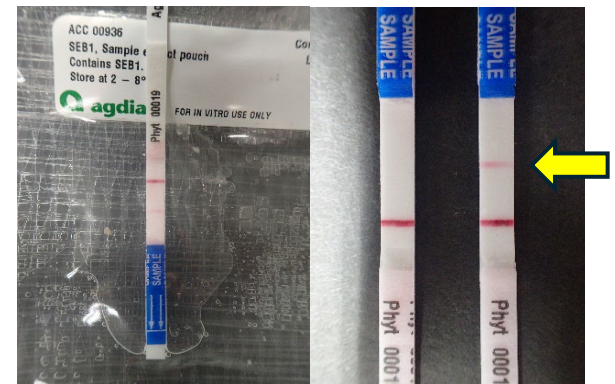
5 strips and buffer filled bags (ISK 92601/0005)

25 strips and buffer filled bags (ISK 92601/0025)

(<https://orders.agdia.com/agdia-immunostrip-for-phyt-isk-92601>)

- ・葉、茎、根における壊死部を約5 mm³サイズで採取
- ・疫病菌検出キットにある袋（抽出バッファが3 mL入っている）に入れる
- ・袋の外からペンなどで押しつぶす等サンプルを砕く
- ・試験紙を入れて5分維持
- ・陽性の場合には青いラベル寄りにバンドが出ます（黄色矢印）。1本も出ない場合は試験紙が劣化している可能性があります。

注) *Phytopythium*が反応することがあります。



⑤検出結果の判定について

検出結果の判定において、重要な点は、ポジティブコントロール(必ず陽性になるサンプル)とネガティブコントロール(必ず陰性になるサンプル)を準備することと、反復試験を行うことです。ポジティブコントロールとネガティブコントロールを調べたいサンプルと同時に解析することで、作業上のエラーの有無を検証し、結果を評価する際に、正確性を保証することができます。一方で、サンプルの量が少なかったり、遺伝子増幅を阻害する物質が混入したりすることにより、明瞭なバンドがでない場合、偽陽性、偽陰性と判断せざるを得ない場合もあります。この場合は十分量のサンプルを準備し、反復実験を行う必要があります。

⑥トラブルシューティング

Q. PCRの結果、バンドが出ない。

- ・DNA抽出が成功しているかどうかを糸状菌、植物用ユニバーサルプライマーで確認してみてください。
- ・DNA抽出物にPCR阻害物質が含まれる可能性がある場合はOneStep PCR Inhibitor Removal kit(ZymoResearch)などで追加精製してみてください。

Q. ネガティブコントロールでもバンドが出てしまう

- ・使用試薬、滅菌水、プライマー等にコンタミがないか確認します。

Q. ポジティブコントロールとして菌株を使用したいが、入手先を教えてください。

- ・各種菌株については農業生物資源ジーンバンクで有料にて配布しておりますので、ご利用ください。
- ・スギ赤枯病菌については森林総合研究所、疫病菌については岐阜大学においても分譲を承っております。

Q. その他困ったときは？

- ・森林総合研究所問い合わせ窓口 (qanda@ffpri.go.jp) までお問い合わせください。

⑦苗木病害の遺伝子診断における注意点

苗木病害の遺伝子診断における注意点として、以下のことがあげられます。

- ・実験室内での安全対策として、操作ミスなど実験中の事故のみならず、サンプルの取り違い、他DNAのコンタミネーションといったリスクを極力低減させるため、作業環境は適切に管理しましょう。
- ・結果の取り扱いについては、風評被害につながらないよう、サンプルの入手元と意思疎通をはかり、公表する場合には十分議論した上で行うようにしましょう。
- ・病気の診断と病原菌の同定は区別して考えることが大切です。病原菌が見つかった場合でも、それが病気の原因とは断定できないことがあります。

⑧最後に

遺伝子診断は近年、より身近になりつつある強力な病害診断ツールの一つです。初期導入コストにやや課題はありますが、比較的容易に利用できるようになってきました。特に大学や国、県の研究機関ではすぐに利用可能な技術です。本マニュアルを幅広く苗木病害の早期診断に利活用いただければ幸いです。なお、本マニュアルの内容の正確性については万全を期しておりますが、利用者が本マニュアルの情報をを用いて行う一切の行為について、何ら責任を負うものではありません。本マニュアルに起因して生じた損害につき、責任を負いかねますのでご了承ください。

本マニュアル作成に際し、各県担当者様、松本敦子様、幸丸和子様、多くの方々にご協力いただきました。ここに厚く御礼申し上げます。なお本マニュアルは森林総研交付金プロジェクト1「種子、苗木病害の診断と防除法の高度化」(202313)の一環として作成されました。本マニュアルについてのご意見、ご質問は(国研)森林研究・整備機構森林総合研究所相談窓口(qanda@ffpri.go.jp)からお問い合わせください。

引用文献

- 安藤裕萌・升屋勇人 (2022) スギ赤枯病菌の迅速な検出技術の開発とその使用方法. 森林防疫 71(2): 3–11
- Bi X, Hieno A, Otsubo K, Kageyama K, Liu G, Li M. (2019) A multiplex PCR assay for three pathogenic *Phytophthora* species related to kiwifruit diseases in China. Journal of General Plant Pathology 85(1): 12–22
- Martin FN, Tooley PW, Blomquist C (2004) Molecular detection of *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death in California, and two additional species commonly recovered from diseased plant material. Phytopathology 94: 621–631
- Kostov K, Verstappen ECP, Bergervoet JHW, de Weerd M, Schoen CD, Slavov S, Bonants PJM (2016) Multiplex detection and identification of *Phytophthora* spp. using target-specific primer extension and Luminex xTAG technology. Plant Pathology 65: 1008–1021

(国研)森林研究・整備機構 森林総合研究所 苗木病害研究会

令和5～7年度 森林総研交付金プロジェクト1「種子、苗木病害の診断と防除法の高度化」

相川拓也、安藤裕萌(九州支所)、市原 優(関西支所)、小坂肇、高橋由紀子、服部友香子、升屋勇人

©著者ら 2026. 本マニュアルはCC BY-NC ライセンス
(<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) の元で
自由にご活用いただけます。