

令和 7 年 3 月 1 4 日

## 事業実施報告書

1. 事業名 : 令和 6 年度植物品種等海外流出防止総合対策・推進委託事業
2. 課題名 : 種子伝染性病害の検査手法の開発等の取組
3. 課題目標 : 開発に要する汚染種子の作出及び文献等から収集した検出法の有効性検証試験の実施
4. 実施期間 : 令和 6 年度
5. 担当機関 : 農研機構 種苗管理センター 試験・検査部 種苗検査課

### 6. 検査法開発に係る試験方法

日本国内の種苗業界において、輸出の障壁となっている種子伝染性病害のうち特に重要な病害について、まず、検査法の確立に必要な汚染種子の作出を試みた。また、文献や公開情報等から当該病害の検出法に関する知見を収集し、作出できた汚染種子もしくは入手できた参照病原体等を用いてその有効性を検証する試験を実施した。対象とした病害は以下のとおり。

#### ① カボチャのつる枯病

本病原菌は、分生子殻及び偽子嚢殻を作る菌である。人工汚染種子の作出のため、接種源となる胞子を産生する分生子殻を効率よく形成するための条件を検討し、その上で汚染種子の作出を行った。この人工汚染種子を供試し、種子からの本病原菌の検出のためのブロッター法の精度検証、及び海外種子検査機関により公表されている リアルタイム PCR (qPCR) 法について、市販キットによる核酸抽出法の条件やプライマーの特異性等について検証した。このほか、両手法について頑健性や併行精度等についても検証した。

#### ② キュウリのアラビスモザイク病

本ウイルス (ArMV) が感染するキュウリ種子の作出を試み、市販キットによる種子から本ウイルスの検出を検証した。

### ③ トマトの斑点細菌病

昨年度の同事業において作出した汚染種子を用いた検出法の妥当性確認試験として、サブサンプルサイズや種子磨砕方法、半選択培地の性能評価、併行精度確認試験等の検証を実施した。

## 7. 試験結果

### ① カボチャのつる枯病

#### 1) 分生子殻形成条件の検証

分生子殻の形成について、アジサイ葉を用いた葉片寒天法、1/4 濃度 PDA 培地及び湿室条件下でのカボチャ種子への接種を比較した結果、種皮を取り除いたカボチャ種子に当該菌を接種する方法は最も効率的に分生子殻を形成した。いずれの方法とも 20℃、暗黒・近紫外線照射 12 時間周期下で培養した。また、各法の概要は次のとおり。

- ・ 葉片寒天法：形成されるほとんどは偽子囊殻であり、分生子殻は極少数であった。
- ・ 1/4 濃度 PDA 培地：分生子殻を形成するが、その大部分は培地内に作られており、胞子の回収は困難であった。
- ・ カボチャ種子：PDA 培地で培養した菌叢片（含菌寒天片）を切り取り、種子に接種して培養したところ、種皮には偽子囊殻、発芽根には分生子が形成された。
- ・ 種皮を取り除いたカボチャ種子：カボチャ種子と同様に含菌寒天を接種して培養したところ、発芽した根及び子葉に多数の分生子殻が形成され、多くの胞子を回収できた。

#### 2) 人工汚染種子の作出

1) の種皮を取り除いたカボチャ種子から胞子を回収し、 $0.5 \times 10^6$  個/mL 及び  $1.0 \times 10^6$  個/mL に調整した胞子懸濁液を作製した。新しいカボチャ種子をこの懸濁液に減圧下で 30 分間浸漬し、人工汚染種子を作出した。

#### 3) ブロッター法の精度検証

作出した人工汚染種子を供試し、National Seed Health System (NSHS) に基づいた方法と国際標準法によるブロッター法を比較した。その結果、両方法は、供試したいずれの人工汚染種子ともに同等の検出度合いを示した。

なお、両法の異なる点は培養条件にあり、その条件は次のとおり。

- ・ NSHS 法：5℃、暗所で 10 日間培養後に更に 20℃、近紫外線 12 時間照射で約 3 日間培養

- ・ 通常法：20℃、近紫外線 12 時間照射下で 10 日間培養

#### 4) PCR 法の精度検証

試料として本病原菌の菌糸、分生子殻、孢子、並びに雑菌について、それぞれの懸濁液を用意した。各懸濁液から核酸を抽出し、NSHS が公表している qPCR 法について検証した。その結果、用意した試料のうち、本病原菌由来の試料からは検出でき、雑菌と識別できた。また、少なくとも  $1.0 \times 10^5$  個/mL の孢子懸濁液から検出できることも確認できた。さらに、雑菌に対して qPCR が非特異反応を起こさないことも確認できた。

#### 5) 妥当性試験の実施

上記のブロッタ法及び PCR 法について、併行精度等の妥当性確認試験を実施した。開発担当が用意したブラインドサンプルについて、被試験者は想定される正しい検出結果を得ることができた。この結果より検出法の妥当性を確認することができた。これを踏まえ、カボチャのつる枯れ病菌検査マニュアル（案）を作成した。

### ② キュウリのアラビスモザイク病

#### 1) 接種源の調製

ArMV 感染葉を検定植物の *Chenopodium quinoa* 及び *C. amaranticolor* に汁液接種し、モザイク及び奇形を表した上葉を接種源とした。これを常法に従って発芽後のキュウリの子葉に接種すると上葉には明瞭なモザイクを表し、植物の生育は著しく抑制された。採種することを目的にしていたことから、キュウリは着蕾始めの時期まで無接種で栽培し、着蕾始めの時期に接種を行った。

#### 2) 採種種子の感染確認

接種 127 日後、キュウリの苗ごとに果実を収穫した。葉は 2024 年 7 月から 9 月の高温及びうどんこ病の発生により枯死してしまい採取することができなかった。採取できた果実について、有効と思われる検出法として選定していた市販の ELISA キットを用いた結果、接種した 4 株のうち 1 株が陽性反応を示した。しかし、この株由来の種子 100 粒を ELISA 法で検定した結果、陽性を示すものは認められなかった。

#### 3) 接種源の作出

新たに汚染種子を作出するため、本ウイルスを *C. quinoa* 及び *C. amaranticolor* に汁液接種し、接種源を確保、保存した。また、ウイルス培養用に *P. hybrida* の育苗を開始した。

### ③ トマトの斑点細菌病

#### 1) 汚染種子の作出

トマト果実に菌体を接種したものの、妥当性試験に必要な汚染度・粒数の種子を得ることができなかったため、菌懸濁液を用いて減圧器による人工汚染を試みた。その結果、約 1,000 cfu/粒の汚染度の種子を 100 粒以上作出することができた。

#### 2) サブサンプルサイズ及び前処理の検証

サブサンプルサイズについては、検出感度及び検査効率を考慮して最大 5,000 粒とし、ホモジナイザーによる粉砕とハンマーによる粉砕の検出感度や条件、工程等を比較検証した。その結果、ホモジナイザーによる粉砕の場合も、現行のハンマーによる方法と同程度の精度や簡便性が得られることが確認できた。

#### 3) 半選択培地の性能評価

ISHI 法（引用規格③1）における mTMB 培地及び CKTM 培地の性能を評価し、当該菌のコロニーを検出できることを確認した。

#### 4) PCR 法及び病原性試験

半選択培地から得られたコロニーから DNA を抽出し、ISHI 法が提示するプライマー、プローブ、PCR 試薬を用いて、当該菌を特異的に検出できることを確認した。

また、健全トマト苗に菌体をシリンジを用いた浸透法により接種し、3～7 日程度で水浸状の病徴が生じることで、その病原性を評価できることを確認した。

#### 5) 妥当性試験の実施

上記の結果より ISHI 法によるトマトの斑点細菌病検査が当センターで実施できることが確認できたので、併行精度等の妥当性確認試験を実施した。開発担当が用意したブラインドサンプルについて、被試験者は想定される正しい検出結果を得ることができた。この結果より検出法の妥当性を確認することができた。現在、これら妥当性データを取りまとめ、検査マニュアル（案）の作成に着手しているところ。

### 8. 引用規格・参考資料

#### ① カボチャのつる枯病

- 1) D. Lee et al., 1984. Detection and Location of Seed-Borne Inoculum of *Didymella bryoniae* and its Transmission in Seedlings of Cucumber and Pumpkin. *Phytopathologische Zeitschrift.*, 109, 301-308.
- 2) Cb 2.1 PCR (Ling et al., 2010) ver. 1.0, 2012, NSHS (National Seed Health System).

3) Cb 2.2 Vegetables Blotter Assay, ver. 1.0, 2001, NSHS.

② キュウリのアラビスモザイク病

- 1) 岩木満朗・小室康雄（1974）スイセンから分離されたウイルス第 5 法 *Arabis mosaic virus* について. 日植病法 40 : 344-353.
- 2) 藤原裕治ら（1993）イギリス産オランダイチゴから分離された *arabis mosaic virus*. 植物防疫所調査研究報告 29 : 53-56.

③ トマトの斑点細菌病

- 1) Method for the Detection of *Xanthomonas* spp. in Tomato seed. Version 5, July 2017. ISF.
- 2) K. Sijam et al., 1991. An Agar Medium for the Isolation and Identification of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from Seed. The American Phytopathological Society. Vol. 81, No. 8.

9. その他

当課題は担当者である大崎、松田、佐々木、篠坂のほか、種苗検査課、病害検査担当職員である横山 舞由調査員並びに契約職員の協力のもと実施された。なお、いずれの職員も種子伝染性病害検査に関する知識・技術を十分に有している。