

ニガウリにおける *Acidovorax citrulli* の種子伝染の初報告

井上 豊・野村 彼方*

神戸植物防疫所

First Confirmed Report of Seed Transmission by *Acidovorax citrulli* in Bitter Gourd. Yutaka Inoue and Kanata Nomura* (Kobe Plant Protection Station 1-1 Hatoba-cho, Chuo-ku, Kobe, 650-0042, Japan. *Present address: Kinki Regional Agricultural Administration Office Chojiburo-cho, Kamigyo-ku, Kyoto, 602-8054, Japan.) *Res. Bull. Pl. Prot. Japan.* 62 : 35-38 (2026)

Abstract: In February 2022, a bacterial disease was observed on bitter gourd (*Momordica charantia* var. *pavel*) seedlings at a commercial nursery in Ehime Prefecture, Japan. The causal agent was identified as *Acidovorax citrulli*. To confirm that bitter gourd seeds were the primary source of infection, we examined the same seed lot used for seedling production using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay (Oya et al., 2008) and a grow-out test. The isolated bacteria were identified as *A. citrulli* based on bacteriological characteristics, pathogenicity tests on watermelon and bitter gourd, and phylogenetic analysis of the *gltA* and *pilT* gene sequences. This study represents the first report of seed transmission of *A. citrulli* in bitter gourd.

Key Words: *Acidovorax citrulli*, Bitter gourd, *Momordica charantia*, Seed transmission

緒 言

スイカ果実汚斑細菌病菌 (*Acidovorax citrulli*) は、ウリ科作物に深刻な被害を及ぼす植物病原細菌で、日本では1998年にスイカ（菊池ら, 1999; 白川ら, 2000）での発生が確認されて以降散発的に発生しているが、その都度適切な防除により根絶されている（農林水産省, 2023）。本病原細菌は主に種子伝染し（Rane, K. K. and Latin, R. X., 1992）、日本に侵入した場合、スイカ、メロン等の産地で甚大な被害を及ぼすことから、日本は本病発生国からの宿主植物種子の輸入に際しては、輸出国における栽培地検査又は遺伝子診断法による検査を行い、本細菌に感染していないことを確認し、その旨を検査証明書に追記することを求めている（農林省, 1950; 農林水産省, 1998）。2022年、愛媛県の民間育苗施設において、ニガウリ苗の1品種（非公表）の約8割で腐敗症状が確認されたことから、神戸植物防疫所に同定診断依頼があり、当該症状から *A. citrulli* が分離、同定され、本菌の感染が原因であることが判明した。一次感染源としてニガウリ種子が疑われたが、ニガウリにおける *A. citrulli* の種子伝染の報告はない。一方で、ニガウリで *A. citrulli* の感染報告（Cheng and Huang, 1998）が確認されていることから、ニガウリにおける種子伝染について、発病が確認された種子と同

一ロットの種子を用いて調査を行った。

材料及び方法

供試種子

A. citrulli による発病が確認されたニガウリ苗作製に用いた同一ロット種子を供試した。

試験方法

1. LAMP法による *A. citrulli* の検出

種子1,000粒を試料とし、輸入検疫で用いられるろ過濃縮による種子洗浄液からのLAMP法による検出（大矢ら, 2008）により *A. citrulli* の検出を試みた。結果は、リアルタイム濁度測定装置 LoopampEXIA（栄研化学株式会社, 東京）及び増幅産物の電気泳動パターンをポジティブコントロールのものと比較することで確認した。ポジティブコントロール及びネガティブコントロールは、YPPS319株の細菌懸濁液（大矢ら, 2008）及び滅菌蒸留水を用いた。

* 現在、近畿農政局

2. Grow-out test による種子の発病調査と発病苗からの *A. citrulli* の分離

滅菌土壌を詰めたセルトレイ (47cm×32cm×6.5cm) 3 枚に種子 1,000 粒をおおよそ 3 等分に播種し、フラワーキャップを被せ、高湿度 (湿度 80%) 下の人工気象機内 (明期 14 時間 30℃、暗期 10 時間 25℃) で約 3 週間栽培し、病徴発現の有無を調査した。発病が認められた幼苗は、Aac イムノストリップ (Agdia 社, Elkhart, IN, USA) を用いて陽性となった発病葉から普通寒天培地 (NA 培地) を用いて常法により分離を行った。

3. 分離菌の病原性確認

前項で分離した菌を NA 培地で 3 日間培養 (27℃) 後、滅菌蒸留水で約 10⁸cfu/ml に懸濁し、ニガウリ苗 (品種: 分離源と同一品種) 及びスイカ苗 (品種: ピロマスタ 2) に有傷接種した。また、滅菌蒸留水のみを有傷接種した比較対象区を設けた。接種苗は、人工気象機内 (明期 14 時間 25℃、暗期 10 時間 22℃) で管理し、病徴の発現を確認し、接種菌の再分離を実施した。

4. 分離菌の同定

1) 細菌学的性状試験

前項同様に 2. で分離した菌を NA 培地で 3 日間培養 (27℃) した後、API20NE (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) を利用して細菌学的性質を調査した。得られたデータを基に The Bacterial Diversity Database (<https://bacdiv.dsmz.de/dashboard>) を利用し、API20NE 情報が登録される細菌群と比較した。

2) 分子系統解析

2. の分離菌の *glcA* (Type II Citrate synthase) 遺伝子及び *pilT* (Twitching motility protein) 遺伝子領域について分子系統解析を行った。分離菌の対象領域はコロニー PCR で増幅させた。コ

ロニー PCR には、Feng *et al.* (2009) の対象領域用プライマーセット及び TaKaRa Ex Taq[®] Hot Start Version (タカラバイオ株式会社、滋賀) を使用し、PCR 反応は GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) を用いた。PCR 産物は、Exosap-IT express PCR Product Cleanup Reagent (Applied Biosystems) で精製し、BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) によるサイクルシーケンス反応を行った後、BigDye[®] X Terminator[™] Purification Kit (Applied Biosystems) で精製し、SeqStudio Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いたダイレクトシーケンスにより部分塩基配列を確定した。その後、MEGA11 を用いて、最尤法 (Maximum likelihood 法) により *Acidovorax* 属細菌群と分子系統樹を作製した。

結果及び考察

1. LAMP 法による *A. citrulli* の検出

LAMP 法を試みたところ、ポジティブコントロールと同様に種子から *A. citrulli* 由来と思われる増幅反応が認められた (Fig. 1)。

2. 感染種子の発病確認と *A. citrulli* の分離

スイカ果実汚斑細菌病疑似症状が確認された幼苗を Aac イムノストリップで確認したところ、7 株で陽性反応が確認され、病原分離を行ったところ、乳白色、中高、円形 (1-2mm) の *A. citrulli* の形態的特徴と類似する細菌が分離された。

3. 分離菌の病原性確認

苗への接種後 5 日目には、ニガウリ苗及びスイカ苗ともに接種部位に褐色不整形の壊死斑が確認され、その後拡大した。ニガウリではスイカに比べより激しい病徴が確認された (Fig. 2)。

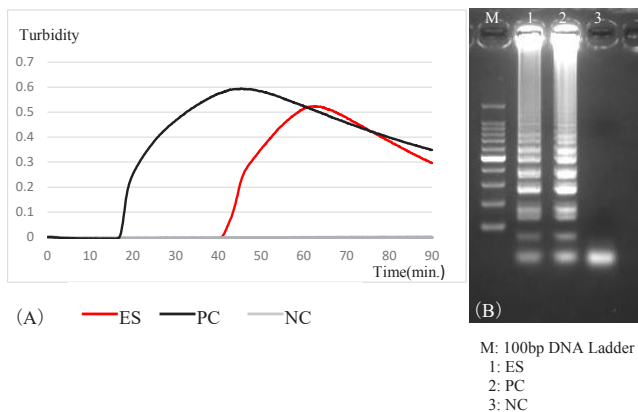


Fig. 1. LAMP assay results. (A) Real-time turbidimeter observations. (B) Agarose gel electrophoresis of LAMP products.

(ES: Bitter gourd seed extract solution; PC: bacterial suspension of *Acidovorax citrulli* (YPPS 319); NC: distilled water.)



Fig. 2. Symptoms observed on bitter gourd (left) and watermelon (right) leaves 10 days after inoculation.

4. 分離菌の同定

1) 細菌学的性状試験

2. の分離菌の細菌学的性状を API20NE により調査したところ、硝酸還元、オキシダーゼ活性、L-アラビノース、グルコン酸カリウム、アジピン酸、リンゴ酸の同化が陽性であり、インドール産生、グルコース発酵、アルギニン脱水素酵素、ウレアーゼ活性及びその他の炭素源、窒素源の同化は陰性であった。その結果、プロファイルインデックスは 1001464 となり、The

Bacterial Diversity Database の登録細菌株群と比較したところ、*A. citrulli* 基準株 (DSM 17060) と一致した。

2) 分子系統解析

2. の分離菌の *gltA* 及び *pilT* 遺伝子領域の部分塩基配列のそれぞれ 483 bp 及び 399 bp を確定し、両塩基配列を結合し最尤法による分子系統樹を作製した。その結果、分離菌は *A. citrulli* 細菌株群のメロン分離株と同じクレードに含まれた (Fig. 3)。

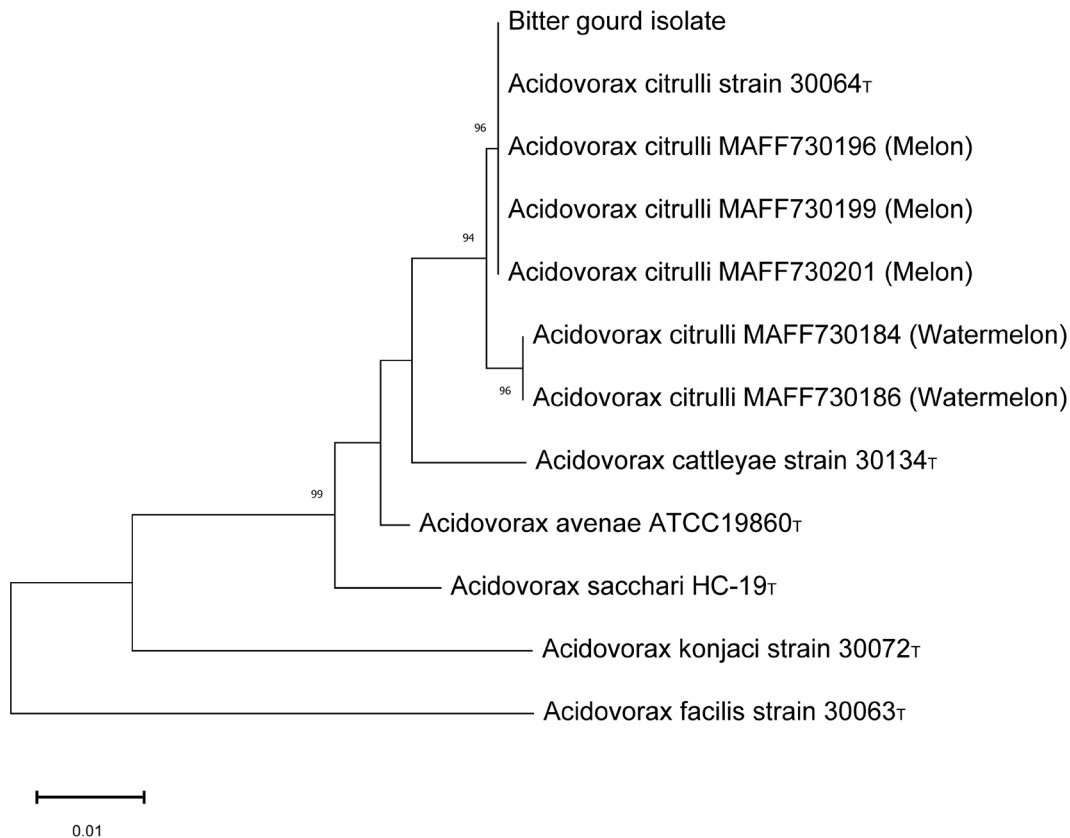


Fig. 3. Maximum-likelihood phylogenetic tree of the bitter melon isolate, six strains of *Acidovorax citrulli*, and five *Acidovorax* spp. The tree was constructed using a concatenated 882 bp sequence from two genes: *pilT* (399 bp) and *gltA* (483 bp). Bootstrap values $\geq 70\%$ from 1,000 replicates are shown at the nodes.

5. 考察

以上の結果から、*A. citrulli* がニガウリにおいて種子伝染することが明らかとなり、愛媛県で発生したニガウリ苗における *A. citrulli* の感染は、ニガウリ種子に起因する種子伝染の可能性がきわめて高いと考えられた。ニガウリにおける本菌の感染報告は、台湾での事例 (Cheng and Huang, 1998) はあるものの種子伝染については今回が初報告となる。

なお、本試験結果に基づき、愛媛県で発生が確認された *A. citrulli* の感染が疑われる種子はすべて廃棄され、同種子を使用した苗は、植物防疫所及び都道府県が協力して調査及び苗の処分を行い、スイカ果実汚斑細菌病の根絶が達成されている (愛媛県病害虫防除所, 2023)。また、併せて *A. citrulli* が発生する地域からのニガウリ種子の輸入に対しては、植物防疫法に基づく検疫措置として、輸出国における検査が義務付けられることとなり (官

報号外第 22 号, 2023)、現在日本への同病の侵入防止が図られている。

引用文献

- Cheng A.H. and T.C. Huang (2015) Bacterial fruit blotch on melon, and bitter melon caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. 農業知識庫. 研究報告 649. available from <<https://kmweb.moa.gov.tw/knowledgebase.php>> (accessed 2025-07-11)
- 愛媛県病害虫防除所 (2023) 病害虫防除技術情報 (第 10 号)
- Feng J., E.L. Schuenzel, J. Li and N.W. Schaad (2009) Multilocus sequence typing reveals two evolutionary lineages of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Phytopathology*. **99**: 913.
- Hopkins D.L. and C.M. Thompson (2002) Seed Transmission of

- Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Cucurbits. *Hortscience*. **37**: 924–926.
- 官報号外第 22 号 (2023) 植物防疫法施行規則の一部改正 . (online), available from <<https://www.kanpo.go.jp/old/20230201/20230201g00022/20230201g000220017f.html>>. (accessed 2025-10-16)
- 菊池繁美・加藤智弘・本間隆・石山久悦・白川隆・我孫子和雄 (1999) 我が国で発生したスイカ果実汚斑細菌病：(1) 現地の発生実態と病徴 . 日植病報 **65**: 359 (講要).
- Kubota, M., N. Hagiwara and T. Shirakawa (2011) A method to evaluate percentage of cucurbit seeds infested with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, pathogen of bacterial fruit blotch. *J. Gen. Plant Pathol.* **77**: 112–115.
- 農林省 (1950) 植物防疫法施行規則 (昭和 25 年農林省令第 73 号).
- 農林水産省 (1998) 輸出国における検疫措置を必要とする植物に係る輸入検疫実施要領 (平成 10 年 3 月 30 日付け 10 農産第 2122 号農産園芸局長通達).
- 農林水産省 (2023). 国内におけるスイカ果実汚斑細菌病の発生 . (online), available from <https://www.maff.go.jp/j/syouan/syokubo/keneki/k_kokunai/info_1.html>. (accessed 2025-09-01)
- 大矢仁志・中川寛章・齊藤範彦・上松寛・小原達二 (2008) LAMP 法を用いた種子からのスイカ果実汚斑細菌病菌 (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) の検出 . 日植病報 **74**: 304–310.
- 白川隆・菊池繁美・加藤智弘・我孫子和雄・川合昭 (2000) 日本におけるスイカ果実汚斑細菌病の発生 . 日植病報 **66**: 223–231.