

特集：ウリ科野菜果実汚斑細菌病

ウリ科野菜における果実汚斑細菌病の防除を目的とした種子検査法

種苗管理センター 佐 藤 仁 敏

はじめに

果実汚斑細菌病は *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (以下 Aac) を病原細菌とする重要なウリ科野菜の病害であり、主に種子で伝染することが知られている。本病の発生を防止するためには本病原細菌に汚染していない健全な種子の供給・使用が最も効果的と考えられ、汚染種子の混入を高感度・高精度に検出する種子検査法の確立が重要である。ウリ科野菜の種子を生産・販売する種苗会社からも種子検査法の確立と検査体制の構築が強く求められている。過去の発生事例では、汚染種子が 10,000 粒に 1 粒混入した場合でも重大な問題に発展したことがあり、しかも、その汚染種子上に極微量の病原細菌が存在した場合でも大発生につながる危険性が指摘されている。このため、本病原細菌を対象にした種子検査法には高い検出感度・精度が要求される。また、接木作業やその後の苗の養生環境による Aac 伝搬性や発病のポテンシャル、本病に対する国際的な検査状況から見ると、検査に必要な種子数はロット当たり少なくとも 10,000 ~ 30,000 粒が求められている。種苗会社によっては 50,000 粒の検査を希望する場合もあることから、多数の種子を同時に処理できる能力も要求されている。

本稿では、Aac の検出に用いられている手法とこれまでに報告されている種子検査法について紹介する。

I 検出技術

これまで、植物体または種子から Aac を検出する方法が開発されており、各技術の特徴を表-1 に示した。実際に用いる場合には、各手法が有する特徴を考慮して利用場面に合った方法を選択することになる。

1 選択培地による検出

AacSM 培地 (白川ら, 2000) は Aac の判別や分離用として大変優れた選択培地である。試料の塗布後、36 ~ 40℃ の高温下で 3 ~ 4 日間培養すると、中央部が青

色~緑色、周縁部分が白色のやや小さな Aac のコロニーが出現する。種子を緩衝液中で振とうして作製した種子洗浄液や新鮮な病斑からの分離には、AacSM 培地の組成から 2 種の抗生物質、ノボピオシンとフェネチシリンを除いた培地 (以下、不完全 AacSM 培地) を用いるとコロニーが大きくなり、識別しやすくなる。

2 血清学的手法

抗血清を利用した手法で、検出感度がやや劣るものの非常に簡便で迅速な方法が多い。これまで本病原細菌に対して ELISA キット (Neogen 社, Agdia 社, Loewe 社), イムノアフィニティ診断キット (AgriCheck : Hydros 社), イムノストリップキット (Agdia 社) が販売されている。日本でも日本植物防疫協会から本菌の検出と診断を目的とした ELISA キットが市販されている。この中で、イムノストリップキットは開始からわずか 5 分間程度で結果を得られる迅速な方法であり、本病の病斑や類似症状を示す葉の検定法として海外の採種現場や種苗会社で用いられている。また、抗体感作ラテックス粒子を用いたラテックス凝集反応法 (小宮ら, 2003) は、培地上に出現する Aac のコロニー判別に大変有効な手法である。

3 PCR 法

本法は特異性・検出感度が非常に高い遺伝子診断法の一つである。検出感度や特異性の鍵を握る Aac 検出用プライマーについて報告は多いが、その中でも SEQID4 および SEQID5 (SHAARD et al., 1999; アメリカ特許を有する) や BX-L1 および BX-S-R2 (BAHAR et al., 2008) が優れている。また、国内で分離した Aac 菌株に設計した検出用プライマーが報告されている (鈴木ら, 2008)。

4 LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法

本法も遺伝子診断法の一つであり、Aac に対して設計した 4 種のプライマーと特殊な DNA 合成酵素 (鎖置換型 DNA 構成酵素) を用い、一定温度で保温することによって DNA を増幅する。PCR のように高価な機器を必要とせず、DNA 増幅産物の有無は目視による濁り具合で判別するか、濁度測定装置を用いてリアルタイムに測定できる。LAMP 法の詳細については、榮研(株)のホ

Seed Health Testing Methods for Bacterial Fruit Blotch in Cucurbits Seeds. By Masatoshi SATO

(キーワード: ウリ科野菜種子, 果実汚斑細菌病, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, 種子伝染性病害, 種子検査)

表-1 これまでに開発されたウリ科野菜果実汚斑細菌病菌 (Aac) 検出技術とその特徴

種別	方法	特異性	検出限界 (cfu/ml)	必要時間	初期投資	コスト	実施場所
培地法							
	選択培地 (AacSM)	○	2	3日間	△	△	実験室
血清学的手法							
	ELISA	○	10 ⁵	3～8時間	○	△	実験室
	イムノストリップ	○	10 ⁵	5分間	◎	△	圃場・実験室
	ラテックス凝集	△	10 ⁷	5分間	◎	◎	圃場・実験室
分子生物学的手法							
	PCR	◎	10 ³	4時間<	△	△	実験室
	LAMP	◎	10 ³	1～2時間	◎	△	実験室

△：やや劣る, ○：優れる, ◎：非常に優れる.

(白川, 私信)

ームページ (<http://loopamp.eiken.co.jp/lamp/index.html>) を参照されたい。

II 種子検査法

1 Greenhouse grow-out assay

本法は、検査用の種子をガラス室や温室等に播種し、発病好適環境下（高温、高湿度）で育てた幼苗に現れる病徴で判定する検査法であり、実際の種子汚染率を得ることができる。発病株は引き続き行われる PCR 法や生菌の分離により最終的な判断が下される。本法は、現行の検査法の中では信頼性が高いと評価されており、STARAPO（アメリカの種子検査会社）の検査法に採用されている。しかし、結果を得るまでに長期間（少なくとも約3週間）を要すること、広いスペースをもつ施設や播種準備に多大な労力を要すること、好適な発病環境を長期間保つ必要があること等、実施上の制約が多い。また、この検査では無病徴の感染個体や不発芽の汚染種子は検査漏れになるため、精度の低下が懸念される。

2 Sweatbox assay

前述の温室で行う Grow-out assay を透明なプラスチック製容器内で行ったものが、本法である。培養土を入れた 30 × 40 × 30 cm（横×縦×高さ）の容器に約 800 粒の種子を播種し、12 時間照明、28℃で 2～3 週間培養する。湿度 100%の容器内では高密度の幼苗が互いに接触して生育することから、病苗から健全苗への感染が容易に広がって病徴を示す株が増加し、病株の判別がしやすくなる（KOENRAADT et al., 2005）。本法は Naktuinbow（オランダの検査会社）で実際の検査に採用されている。実際の検査では、検査に要する時間や不発芽種子の検査漏れのほかに、腐生菌による幼苗の腐敗

や Aac 以外の菌による類似病徴が発生するため、判定に苦慮する場合があるという。

3 IMS-PCR

Immunomagnetic separation-PCR (IMS-PCR) 法は、抗体を感作した微小の磁気ビーズ (magnetic beads) で Aac を捕捉し、PCR 法で検出する検査法である (WALCOTT and GRIFITHS, 2000; WALCOTT et al., 2006)。抗体を利用することで Aac を特異的に捕捉できるとともに、PCR による「偽陰性」の原因となる種子や植物に含まれる PCR 反応阻害物質を取り除くことができる。まず、減圧下で作製した種子洗浄液に抗体感作磁気ビーズを添加してゆっくり攪拌した後、チューブの外側に磁石を当てて磁気ビーズを集める。数回洗浄した磁気ビーズを少量の滅菌水に懸濁し、煮沸した液を PCR 法で検出する。BAHAR et al. (2008) は、本法とリアルタイム PCR 法 (定量 PCR) を用いて汚染率 0.02% のスイカ種子 5,000 粒から Aac を検出したと報告している。

4 メンブレンフィルター免疫染色法

本法はイネ籾伝染性病原細菌の定量検出法（小原ら, 2003）をもとに松浦ら（2008）が果実汚斑細菌病菌用に改変したものであり、メンブレンフィルター (MF) と選択培地を用いて Aac を定量的に検出する方法である。手順は、超音波洗浄処理により作製した種子の浸漬液をガラス繊維フィルターに通して夾雑物を取り除き、そのろ過液を 0.45 μm の MF で再び吸引ろ過して MF 上に集菌する。この MF を選択培地 (AacSM 培地) 上で 3 日間培養する。コロニーが出現した MF の表面を新しい選択培地にスタンプし、その培地を 37℃で培養すると同時にスタンプ後の MF を免疫染色し、Aac のコロニーを識別する。Aac が確認された場合、選択培地上の対

応するコロニーを分離するとともにコロニー PCR により再同定を行う。本法では、スイカ種子 1,000 粒を用いた浸漬液 100 ml 中に Aac が数 cfu 以上存在する場合、確実に検出することが可能であった。

5 LAMP 法を用いた方法

本法 (大矢ら, 2008) は検査の迅速性が要求される植物検疫への活用を想定して開発された検査法であり, 約 2 時間で結果が得られる。まず, 種子を超音波洗浄機で処理し, その洗浄液をガラス繊維フィルターと 5.0 μm の MF で夾雑物を取り除いた後, さらに 0.45 μm の MF で吸引ろ過して集菌する。この MF を滅菌水で攪拌・洗浄して菌液を作製し, さらに遠心分離により調製した菌濃縮液を LAMP 法で検出する。LAMP 法には病原関連遺伝子の *hrpG* および *hrpX* 遺伝子間のスペーサー領域に対して設計した 6 種の LAMP プライマーを用いている。スイカ, トウガン, マクワウリの種子それぞれ 1,000 粒の洗浄液に Aac を混入させて検出を行った結果, 検出限界は約 10^3 cfu/ml であった。また, スイカおよびメロンの自然汚染種子から Aac を検出したと報告している。

6 Sweat-bag seedling 法による増菌検出法

本法は, 最初に種子に存在する Aac を増菌した後, PCR 法および選択培地によって検出する方法で, 精密な種子検査を目的に開発された (佐藤ら, 2006)。増菌法は発芽した苗を Aac の半選択的増殖用の基質として利用するというユニークな方法であり, 種子に存在する極微量の Aac が指数的に増加する。しかも, 特別な機材を必要とせず, 実験室に常備されている一般的な消耗品で検査可能である。まず, 湿らせたペーパータオルに種子を高密度で散りばめ, これを透明なポリ袋に入れて空気を注入した後, 密封する。これを 28 ~ 30°C で約 2 週間静置培養すると, 湿度 100% に保たれたポリ袋の中では“もやし”状に伸びた幼苗が触れ合うように生育する。このポリ袋に 0.01M リン酸緩衝液を添加後, ポ

リ袋ごとストマッカーで混和した液を作製し, 不完全 AacSM 培地と PCR 法で Aac を検出する。250 粒のスイカ種子に Aac を混入させて Aac の検出を行った結果, 本法の検出限界は 0.2 cfu/ml であった。薬剤処理を行った種子の適用について調べたところ, 海外で本病原菌の種子消毒剤として使用されている過酢酸 (商品名: Tsunami100) 処理種子は処理後約 2 か月を経過すれば検査に供することができるが, 食酢と塩基性銅水和剤 (商品名: ドイツボルドー) の混合液で処理した種子は適用できないことが判明した。また, 防かび剤として選定したイプロジオン水和剤について検討した結果, 検査用種子に粉衣することによりポリ袋内の実生苗に発生するかびを防止できるだけでなく, Aac の増殖助長効果が顕著に認められた (佐藤ら, 2008)。本検査法は, スイカのほかにメロンおよびカボチャの種子にも適用でき, これまで, 自然感染したスイカおよびメロン種子から Aac を検出・分離できた。現在, 本法の検査精度について種苗会社が参加した実証試験を実施しているところである。なお, 前述のように, 本病害に対して登録のある「食酢と塩基銅水和剤」で処理した種子は, 本検査法には適用できていない。今後, この課題を解決する必要があると考えている。

ここで紹介した種子検査法の特徴を表-2 に示した。この特徴をもとに使用場面を想定すると, 検出までに要する期間が短い IMS-PCR や LAMP 法の手法は植物検疫の現場に適していると考えられる。一方, 検査には長期間を要するが検出精度の高い Grow-out assay や Sweat-bag seedling 法等の手法は本格的な種子検査機関で行う検査に適していると考えられる。

おわりに

果実汚斑細菌病に対する種子検査法の開発や確立は遅れているのが現状である。今後, 高感度・高特異性を有する PCR 法や LAMP 法を利用した精度の高い本病の種

表-2 これまでに開発されたウリ科野菜果実汚斑細菌病 (Aac) 種子検査法とその特徴

検査法	種子処理	判定法	菌分離	検査期間	検出可能 Aac 存在部位*
Greenhouse grow-out assay	播種・育苗	病徴	可	2 ~ 3 週間	種子内・種皮
Sweatbox assay	播種・育苗	病徴	可	2 ~ 3 週間	種子内・種皮
IMS-PCR	洗浄液	PCR	不可	2 日間	種皮
MF 免疫染色法	洗浄液	選択培地, 血清, PCR	可	約 7 日間	種皮
LAMP 法	洗浄液	LAMP	不可	2 時間	種皮
Sweat-bag seedling 法	播種・増菌	選択培地, PCR	可	2 ~ 3 週間	種子内・種皮

*検査法から推定される検出可能な Aac 存在部位。

子検査手法を確立するためには、次の点を抑える必要があると思われる。第一のポイントは、陽性を示す種子ロットから生菌を分離することである。PCR法やLAMP法はDNAを増幅する手法であるため、DNAが保存されている死菌も検出される。このため、PCR法などで陽性を示す種子ロットが発病の危険性があるかどうかの証拠として生菌を分離する必要があるものと思われる。第二のポイントは汚染種子からAacを遊離させる手法を組み合わせることである。種子に存在するAacについての報告は少ないが、RANE and LATIN (1992)は種子の内部にもAacが存在すると報告している。種子洗浄液は簡便で比較的短時間で作製できるが種子内部まで十分に洗浄できず、種子内部に存在するAacを洗い出すことはできないものと推測される。一方、種子の発芽を組み合わせた検査法は、種子内部に存在するAacを容

易に種子外に露出させることができる手法であると考えられる。今後、これらの要件を満たす検査法の構築に向け、さらに検討を進めたい。

参考文献

- 1) BAHAR, O. et al. (2008): Plant Pathology 57: 754 ~ 763.
- 2) KOENRAADT, H. et al. (2005): Phytopathology 95: 962.
- 3) 小宮友紀子ら (2003): 日植病報 69: 15 ~ 18.
- 4) 松浦貴之ら (2008): 同上 74: 153 ~ 156.
- 5) 小原達二ら (2003): 同上 69: 309 ~ 310.
- 6) 大矢仁志ら (2008): 同上 74: 304 ~ 310.
- 7) RANE, K. K. and R. X. LATIN (1992): Plant Disease 76: 509 ~ 512.
- 8) 佐藤仁敏ら (2006): 日植病報 72: 311 ~ 312.
- 9) ————ら (2008): 同上 74: 257.
- 10) SCHAAD, N. W. et al. (1999): US Patent 39387.
- 11) 白川 隆ら (2000): 日植病報 66: 132.
- 12) 鈴木輝子ら (2008): 同上 74: 42.
- 13) WALCOTT, R. R. and R. D. GITAITIS (2000): Plant Disease 84: 470 ~ 474.
- 14) ———— et al. (2006): Seed Science and Technology 34: 101 ~ 116.

新しく登録された農薬 (22.4.1 ~ 4.30)

掲載は、種類名、登録番号：商品名（製造者又は輸入者）登録年月日、有効成分：含有量、対象作物：対象病害虫：使用時期等。ただし、除草剤・植物成長調整剤については、適用作物、適用雑草等を記載。（登録番号：22650 ~ 22681）種類名に下線付きは新規成分。※は新規登録の内容。

「殺虫剤」

- **ピフェントリンくん煙剤** ※新製剤
22650：日曹テルスタージェット（日本曹達）10/04/07
- 22651：FMCテルスタージェット（エフエムシー・ケミカルズ）10/04/07
- 22652：新富士テルスタージェット（新富士化成薬）10/04/07
- ピフェントリン：5.0%
- 葉たばこ（葉たばこ倉庫）：タバコシバンムシ、チャマダラメイガ：—
- **BT水和剤**
22653：チューレックス顆粒水和剤（三井物産）10/04/07
- 22654：ジャックポット顆粒水和剤（アリスト ライフサイエンス）10/04/07
- バチルス チューリングゲンシス菌の生芽胞及び産生結晶毒素：10.0%
- 野菜類：コナガ、アオムシ：発生初期 但し、収穫前日まで
キャベツ：ヨトウムシ、ハスモンヨトウ、オオタバコガ：発生初期 但し、収穫前日まで
- 日本なし：ハマキムシ類：発生初期 但し、収穫前日まで
- **ジノテフラン・ブプロフェジン水和剤** ※新混合剤
22661：クミアイアプロードスタークルゾル（クミアイ化学工業）10/04/07
- 22662：アプロードスタークルゾル（日本農薬）10/04/07
- ジノテフラン：9.0%、ブプロフェジン：18.0%
- 稲：ウンカ類、ツマグロヨコバイ、カメムシ類、カメムシ類：収穫7日前まで（無人ヘリコプターによる散布含む）
- **MPP乳剤** ※名称変更
22665：ホクサンバイジット乳剤（北海三共）10/04/07

- MPP：50.0%
- 三共バイジット乳剤（No. 10856）から商品名のみ変更
- **CYAP乳剤** ※名称変更
22667：ホクサンサイアノックス乳剤（北海三共）10/04/07
- CYAP：50.0%
- 三共サイアノックス乳剤（No. 7678）から商品名のみ変更
- **イミダクロプリド粒剤** ※名称変更
22668：ホクサンアドマイヤー箱粒剤（北海三共）10/04/07
- イミダクロプリド：2.0%
- 三共アドマイヤー箱粒剤（No. 18217）から商品名のみ変更
- **イミダクロプリド水和剤** ※名称変更
22669：ホクサンアドマイヤー顆粒水和剤（北海三共）10/04/07
- イミダクロプリド：50.0%
- 三共アドマイヤー顆粒水和剤（No. 20746）から商品名のみ変更
- **クロチアニジン・フェンプロパトリンエアゾル** ※新混合剤
22672：ベニカケムシエアゾール（住友化学園芸）10/04/21
- クロチアニジン：0.032%、フェンプロパトリン：0.020%
- 樹木類（つつじ類、まさき、くちなし、さんごじゅを除く）：ケムシ類
- つつじ類：ケムシ類、ツツジゲンバイ
- まさき：ケムシ類、ミノウスバ
- くちなし：ケムシ類、オオスカシバ
- さんごじゅ：ケムシ類、サンゴジュハマシ

(43 ページに続く)