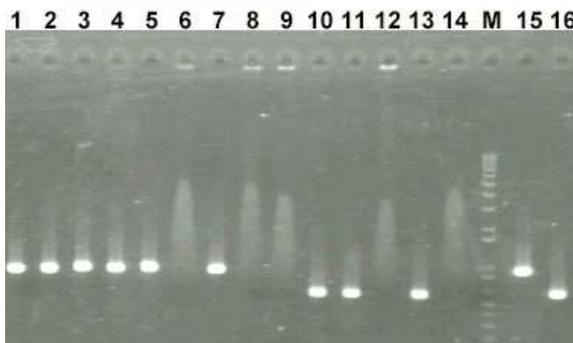


ダイコン種子の黒斑細菌病菌検査 標準作業手順書

- HP 公開版 -



目次

はじめに	1
免責事項	2
I. 背景と課題	3
1. アブラナ科黒斑細菌病とは	3
2. これまでの背景と問題点	5
II. 技術の導入先	7
1. 想定される技術の利用者	7
2. 利用の留意点	7
III. 技術の概要と特徴	9
種子検査のフローチャート	10
IV. 種子検査の準備	11
1. 満たすべき要件	11
(1) サンプルサイズ		
(2) 生菌の分離		
(3) 検査精度		
2. 使用する機材等の準備	13
(1) 準備する器具・機器等		
(2) 試薬類		
(3) 参照菌株		
(4) 接種用植物		
3. 試薬の調製	16
(1) 種子浸漬用液		
(2) 抗菌物質		

(3) その他の試薬		
4. 培地の作製	17
(1) キングの B 培地 (KB 培地)		
(2) SPamt 培地		
(3) SPbc 培地		
(4) KBC 培地		
(5) KBTA 培地		
V. 種子検査方法	22
1. サブサンプルの作製	22
2. 種子浸漬液の作製	22
3. 種子浸漬液の希釈	23
4. 選択培地への塗布	23
5. 参照菌株の培養	23
6. 擬陽性集落の選抜	24
7. 分離菌株の判定	26
8. 病原性の確認	27
VI. 分離菌株判定のための PCR 法	29
1. PCR の試薬と設定条件	29
(1) 使用するプライマー		
(2) 反応溶液の組成		
(3) 反応条件		
(4) 電気泳動による確認		
参考資料	31
担当窓口、連絡先	33

はじめに

アブラナ科の黒斑細菌病は、キャベツ、ハクサイ、ブロッコリー、カリフラワー、カブ、ダイコン等の主要なアブラナ科野菜に発生し、その被害は、アブラナ科野菜の生産の上で世界的に大きな問題となっています。黒斑細菌病は、海外では植物病原細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (以下 Psm) によって引き起こされる (英名) Bacterial leaf spot と、同じく植物病原細菌である *P. cannabina* pv. *alisalensis* (以下 Pca) によって引き起こされる (英名) Bacterial leaf blight に分けられていますが、かつて両者は同一種と見なされていたことから、わが国ではどちらの病原細菌による病害も「黒斑細菌病」として扱われています。実際には、この2種類の病原細菌では、感染植物の病徴、重症度及びアブラナ科以外に犯すことができる植物の種類が異なるため、防除の対策も異なります。このため、両者を識別することは病害の発生・拡大を防ぐ上で重要です。また、いずれの病原細菌も種子伝染により被害が拡大することから、健全な種子の生産・流通が重要事項であり、種子の検査においても、いずれの菌に汚染されているのかまで明らかにすることが、被害防止のための最重要対策となります。農研機構種苗管理センターは種苗法に基づき種苗業者に対して表示検査や集取した種子の品質検査を実施しており、国際種子検査協会 (International Seed Testing Association ISTA) の承認検査所として種子の品質証明書の発行を行っていますが、国内業者からは特にダイコン種子の黒斑細菌病菌に対する検査要望が多く寄せられています。しかし、黒斑細菌病の病原である Psm と Pca のいずれに対しても検査方法が無く、ISTA や国際健全種子推進機構 (International Seed Health Initiative ISHI) においても国際標準法が確立されていないことから、種苗の貿易に関して検査を行う機関や、種苗業界から本病の病原細菌検査法の確立が強く要望されてきました。

種子病害検査の国際標準法においては、生きた病原体の有無を確認する手法が基

本となっています。この理由は、第一に健全種苗を流通させるためであり、また、病原体生菌を含む種子ロットを廃棄することなく、農薬等による処理を施すことで流通させられるようにするためでもあります。植物細菌病害の検査においても、生きた細菌を分離・同定し、病原性を確認するまでのセットが基本となっていますが、近年は、迅速・簡便でしかも正確な検査を行うため、遺伝子情報に基づく方法の開発、導入が主流になりつつあります。また、細菌の種子検査の国際標準法では、基本的に1ロットあたり30,000粒の種子をいくつかのサブサンプルに分けて検査する事が求められています。

このような状況を踏まえ、本手順書では、基本的な植物病原菌の取扱いについて既に経験を有していて、種子の生産における品質管理や、輸出入にかかる植物検疫を含めた種子の流通過程での検査を行う方々に向けて、細菌検査の国際標準法に準じたサンプルサイズに対応し、基本である選択培地による生菌の分離と接種による病原性の確認と新たに開発した遺伝子情報を用いた簡便な病原細菌識別技術とを組み合わせた黒斑細菌病菌の検査手順を示します。

■ 免責事項

- 農研機構は、利用者が本手順書に記載された技術を利用したこと、あるいは技術を利用できないことによる結果について、一切責任を負いません。
- 本手順書に記載のプライマー及び遺伝子増幅方法は参考資料3の論文の内容を一部改変し、引用したものです。また、本プライマーは特開 2021-122216「アブラナ科黒斑細菌病菌判定用プライマーセット、及びこのプライマーセットを用いたアブラナ科黒斑細菌病の検査方法」として特許出願されています。

I. 背景と課題

1. アブラナ科黒斑細菌病とは

アブラナ科の黒斑細菌病は、キャベツ、ハクサイ、ブロッコリー、カリフラワー、カブ、ダイコン等の主要なアブラナ科野菜に発生し、その被害は、アブラナ科野菜の生産の上で世界的に大きな問題となっています。アブラナ科黒斑細菌病には、英語名で bacterial leaf spot と bacterial leaf blight の 2 種類の病害が存在し（図 I -1）、bacterial leaf spot の病原細菌は *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*（以下 Psm）、bacterial leaf blight の病原細菌は *P. cannabina* pv. *alisalensis*（以下 Pca）に分けられていますが、かつて両病原細菌は同一種とされ、病名も分けられていませんでした。このため、わが国ではどちらの病害も「黒斑細菌病」として扱われています。



(A) Bacterial leaf spot



(B) Bacterial leaf blight

図 I - 1 黒斑細菌病のキャベツ葉での病斑

Bacterial leaf spot と Bacterial leaf blight は病斑が類似しており区別が付きにくいいため、同じ病原細菌によって発生するものと考えられていた。

Bacterial leaf spot の最初の報告は 1911 年とその歴史は古く、1930 年代を中心に世界的に発生が報告されました。病原細菌（Psm）は気孔や傷から侵入し、葉に水浸状斑を伴う小型の壊死病斑を作り、これが融合して葉枯れ症状を引き起こします。

Psm は分離される宿主と細菌学的な性状の違いから 3 つの系統に類別され、トマトやキュウリに感染することが知られています。

Bacterial leaf blight は 2002 年に Bacterial leaf spot から分けられて新たな病害として報告され、それ以降、世界中でキャベツ、ダイコン、ハクサイ、ルッコラ等で報告されています。また、過去に Psm として分離された菌株の一部も Pca に再分類されており、農研機構農業生物資源ジーンバンクに収蔵されている菌株も再分類されています。Pca は、Psm と同様に、気孔や傷から侵入し、葉に水浸状斑を伴う壊死斑を作成しますが、それは大型で、数センチメートルに及ぶ大きな融合病斑を引き起こし、深刻な葉枯れを引き起こす傾向があります。Pca も細菌学的な性状、宿主への病原性の違い、遺伝的な形質から 2 つの系統に分類されています。また、Pca はエンバクに自然感染することも報告されており、アブラナ科作物とエンバクの輪作において問題となっています。

日本では、Psm や Pca によって発生するダイコンの黒芯症が問題となっています（図 I -2）。この病徴は外見から発症を見つけることが難しいため、生産者やその団体は本病の発生を警戒しています。また、どちらの菌も種子伝染することが知られており、これが大きな感染源の一つと考えられています。



図 I -2 ダイコンに発生した黒芯症

ダイコンの芯の部分が黒変するため、外観からは病徴が判別できない。写真は Psm によって生じたものであるが、Pca でも同様な病徴を示す。

2. これまでの背景と問題点

わが国の野菜類の種子の輸出量は 85 億 5 千万円（2019 年、農林水産物輸出入概況より）であり、世界でも上位の輸出国となっています。近年、種子の輸出に際して輸出相手国から種子伝染性病害に対する無病証明書が求められる場面が増えています。

世界的に重要な種子伝染性病害に対する種子の検査は、国際種子検査協会（ISTA）* が策定した国際標準法等を基に行われていますが、アブラナ科黒斑細菌病菌に対してはまだ検査手法が確立しておらず、このため種苗業界からは本病原細菌に対する種子検査法の確立が強く要望されています。特に国内では、ダイコン種子に対する検査要望が当機構種苗管理センターに多く寄せられています。また、黒斑細菌病を引き起こす 2 種類の病原細菌では、感染植物の病徴、重症度及びアブラナ科以外に犯すことができる植物の種類が異なります。特に宿主範囲の違いは周辺環境や作物への影響が異なるため、両者を識別することは病害の発生・拡大を防ぐ上で重要な課題となっています。

種子病害検査の国際標準法においては、生きた病原体の有無を確認する手法が基本となっています。この理由は、第一に健全種苗を流通させるためであり、また、病原体生菌を含む種子ロットを廃棄することなく、農薬等による処理を施すことで流通させられるようにするためでもあります。植物細菌病害の検査においても、生きた細菌を分離・同定し、病原性を確認するまでのセットが基本となっています。

細菌の種子検査の国際標準法では、基本的に 1 ロットあたり 30,000 粒という、糸状菌やウイルスの検査に比べて数倍から 10 倍の種子をいくつかのサブサンプルに分けて検査する事が求められています。これまでは黒斑細菌病菌では選択性の高い培地がないことに加えて、両種を識別できる方法がありませんでした。このような状況を踏まえ、細菌検査の国際標準法に準じたサンプルサイズに対応し、基本である選択培地による生菌の分離と

接種による病原性の確認、並びに遺伝子情報を用いた簡便な病原細菌識別技術とを組み合わせた黒斑細菌病菌の検査手順の開発を行いました。

* 国際種子検査協会（International Seed Testing Association, ISTA）は、種子検査に係る国際標準法を開発及び公開することを目的として、1924年に設立された非営利団体です。現在、世界80か国以上、200以上の検査機関からなり、種子のサンプリング及び検査に関する国際的に合意されたルールの作成、検査機関の認証、研究の促進、国際種子検査証明書と技能評価試験の提供、ならびに種子科学と技術に関する知見の普及を行っています。

II. 技術の導入先

1. 想定される技術の利用者

本手順書は種子の輸出入や国内での流通に際し種子の検査業務を行う農研機構種苗管理センターや民間の種子検査機関、種子の健全性を担保する必要がある種苗の生産及び販売を行う機関が利用者として想定されます。合わせて、輸出入種子の健全性確保のための検疫を行う植物防疫所や、病害の発生時における発生源や病原細菌の特定にあたる都道府県等の公的機関が利用されることを想定して作成しています。

2. 利用の留意点

本手順書の技術は、基本的な植物病原菌の取扱いに関する知識と経験を有していて、微生物を扱う実験設備が整った機関において利用が可能です。

本手順書の技術は、種子検査機関が、ダイコン種子の健全性を評価する手法として利用できます。なお、種子検査証書への対応につきましては、本方法を ISTA が規定する国際標準法や植物防疫所における輸出入検疫の検査法に採用されるように整備を進める予定です。

種苗の生産及び販売を行う機関において、ダイコン種子の生産における品質管理や、流通過程での検査にも利用可能です。

黒斑細菌病が発生した際に、発生源として種子が疑われる場合の検査や、輸入種子の健全性確認にもご利用いただけます。



図Ⅱ-1 本手順書の手法の想定される利用場面

本手順書の手法は、ダイコン種子の生産時の検査、種子を流通させる際の検査証明の作成、輸出入種子の健全性を担保するための検疫や、病害が発生した際の感染経路推定のための調査などで活用できる。

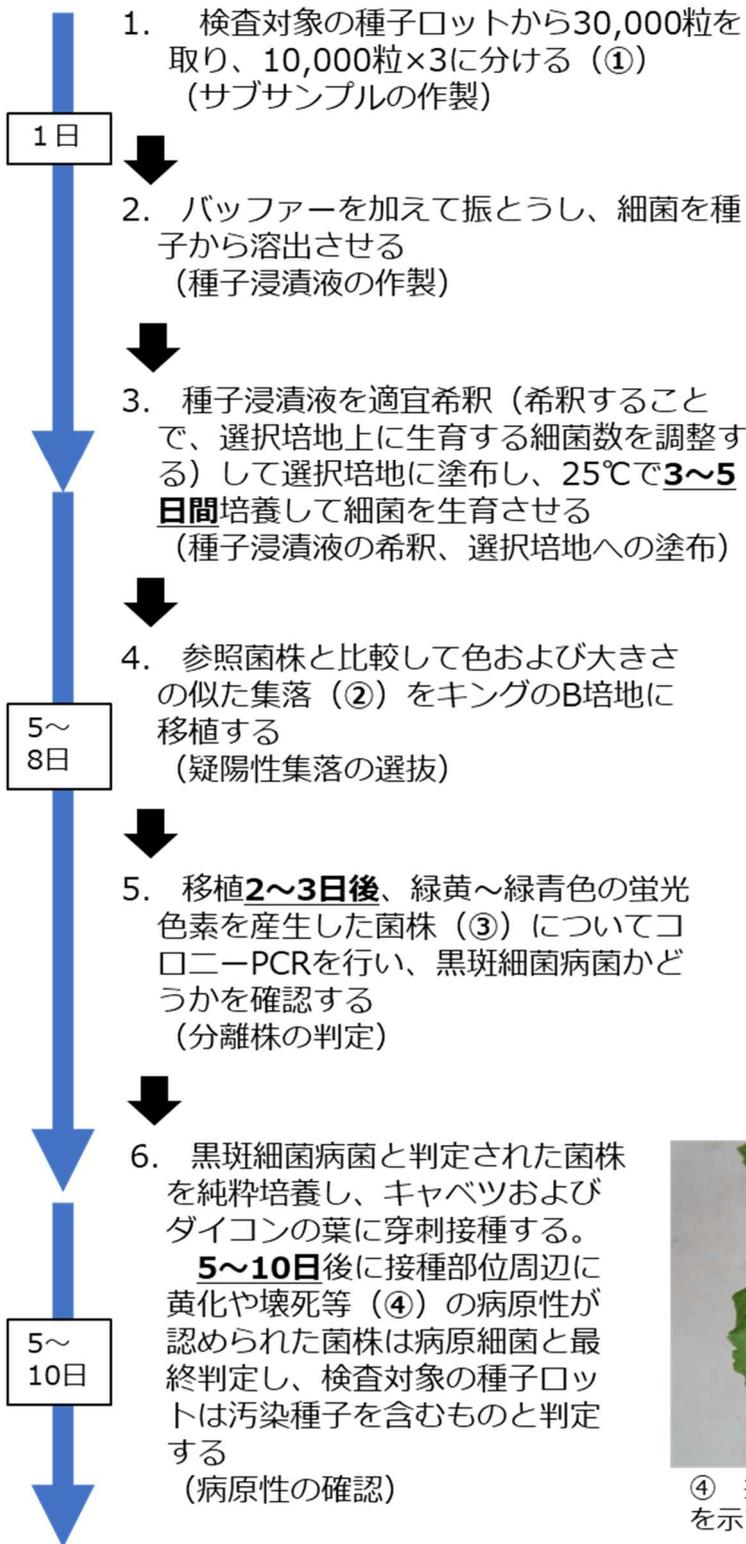
Ⅲ. 技術の概要と特徴

本手順書に示す検査方法（下に示すフローチャート）は、種子消毒やコーティング処理等を行っていない、30,000 粒のダイコン種子を試験対象としています。はじめに、サブサンプル（10,000 粒）毎に種子浸漬液を作製し、これを選択培地に塗布、培地上に生じた細菌の集落を PCR（Polymerase Chain Reaction）法によってアブラナ科黒斑細菌病菌が識別し、黒斑細菌病菌と同定されたものを純粋培養後にキャベツあるいはダイコンに接種して病原性を確認し、最終的に元の試料に汚染種子が含まれていたか否かを判定します。

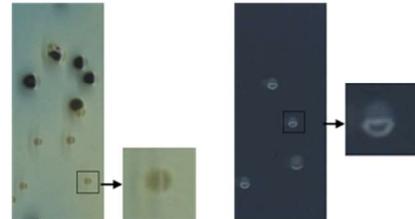
本検査方法では、選択培地として SPamt 培地、SPbc 培地、または KBC 培地と KBTA 培地（各培地の組成は次章の 4.培地の作製で示します）を用い、培地上の細菌集落の形状により最初のスクリーニングを行います。通常、アブラナ科植物の種子表面や内部には、標的とする細菌以外の細菌も多種棲息しており、その種類や菌量はサンプル毎に異なります。いずれの培地もそれらの標的外細菌の生育を完全に抑えることはできませんが、抗菌物質の構成の違いにより生育できる細菌が異なります。2 種類の培地を使用し、雑菌の生育が少なく識別しやすい培地をサンプル毎に選択し、標的とする細菌を分離することで、最初のスクリーニングを効率的に行えるようになっています。選択培地から分離した細菌株は専用のプライマーを用いた PCR によって、黒斑細菌病菌かどうかを識別します。

本検査方法では、種子浸漬液の作製方法を、アブラナ科野菜で黒斑細菌病同様に種子伝染し問題となるアブラナ科黒腐病菌の検査と共通としています。このため、同じ浸漬液を用いて黒斑細菌病菌と黒腐病菌の検出作業を同時に行うことで、検査に使用する種子量を抑え、検査の準備の手間を省くことを可能としています。さらに、本検査方法は黒腐病菌の検査と同様に、ダイコン以外のアブラナ科野菜種子にも応用可能です。

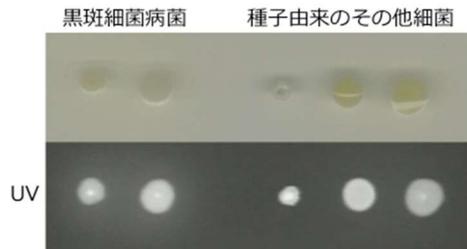
種子検査のフローチャート (詳細はV. 種子検査方法を参照)



①ダイコン種子30,000粒 (10,000粒×3)



② SPamt培地上に生じた集落(左)とSPbc培地上に生じた集落(右)の例。矢印は黒斑細菌病菌の集落を拡大したもの



③ 黒斑細菌病菌の蛍光色素産生。集落周辺の培地が広く緑黄~緑青色に着色し、UV照射で蛍光を発する (本図は蛍光を見やすくするため20℃で4日間培養した)



④ 接種5日目のダイコン葉。矢印が接種した部分を示す

IV. 種子検査の準備

1. 満たすべき要件

(1) サンプルサイズ

現在、細菌が病原となる病害の場合、1ロットあたり30,000粒の種子から存在の有無を確認することが検査の主流となっています。例えばISTAの発行するアブラナ属黒腐病の標準検査手順書においても1ロットあたり最低でも30,000粒の種子から病原細菌を検出することとされています。一般的に、10,000粒ずつの3つのサンプルに分け、検出を行います。

(2) 生菌の分離

アブラナ科黒腐病菌のような培養可能な細菌性病原を対象とする場合、生きた細菌を分離し、その病原性を調査することが求められています（培養ができない細菌については遺伝子診断等の技術開発が行われています）。このため、検査対象となる細菌を特異的に増殖させる選択培地（検査対象以外の細菌の生育を極力抑制し、対象となる細菌が識別可能な半選択培地を含めます）を用いた検査が必須となります。

(3) 検査精度

黒腐病菌の検査手法や本手順書で示す方法では、種子浸漬液を塗布した選択培地上に1個の標的細菌の集落が形成されるのが検出の限界値となります。検査では一種類の選択培地に対して、種子浸漬液の原液、10倍希釈液、100倍希釈液をそれぞれ100μLずつ2枚に塗布するため、222μL相当の種子浸漬液を使用します。したがって、培養・分離するためには222μLの種子浸漬液中に少なくとも1個の標的細菌

菌が存在しなければなりません。後述（19 ページ）のように、例えば種子 10,000 粒の重量が 200 g の種子を用いた場合は種子浸漬用液を 400 mL 用いるため、計算上は $400\text{mL}/222\ \mu\text{L}\times 1\ \text{個}\approx 1800$ 個程度の標的細菌が検出の限界値、10,000 粒の重量が 90 g の種子を用いた場合は種子浸漬用液を 225 mL 用いるため、計算上は $225\text{mL}/222\ \mu\text{L}\times 1\ \text{個}\approx 1,000$ 個程度が検出の限界値となり、種子の重量によって検出の限界値が変わります。また、標的細菌の 1 粒種子上の存在量はまちまちであり、汚染種子の混入割合と播種後の病害の発生割合も調査されたデータが無いため、汚染種子の混入率の許容範囲は正確に計算できません。こうした理由から、汚染種子混入率による判定はせず、検査を行って 1 個でも標的細菌の集落が形成されれば、その検査対象となったロットは病原細菌に汚染された種子を含むと判断します。これは既存の黒腐病菌の検査手法でも同様です。

本作業手順書を作成するにあたって、サブサンプルの 10,000 粒中に 50 粒の人工汚染種子を含むものを調整し、それから標的細菌を検出する試験を行いました。これは、種子浸漬液を選択培地に塗布した際に計算上は 10 個程度の標的細菌集落が形成されることを意図した試験ですが、実際には、Psm 汚染種子を用いた 7 回の試験では 6 個から 254 個、Pca 汚染種子を用いた 6 回の試験では 5 個から 141 個の標的細菌集落が得られ、結果には振れが生じました。この試験からも、汚染種子の混入の程度と発病の関係を正確に把握することは難しいことがわかります。検査を行って 1 菌株でも病原性のある細菌が分離されれば、その検査対象となったロットは病原細菌に汚染された種子を含むものと判断することが妥当と考えられます。

2. 使用する機材等の準備

(1) 準備する器具・機器等

この検査では、クリーンベンチ、オートクレーブ、冷凍庫（-20℃）、冷蔵庫（4℃）、25℃の恒温器、pH メーター、振とう器、吸光度計、PCR 用のサーマルサイクラー、電気泳動装置及びゲル撮影装置、マイクロピペット、メジウム瓶、植物を 25℃で管理する植物インキュベーターまたは温室が必要となります。

消耗品として、径 9 cm の滅菌済みプラスチック製ペトリ皿、1.5 mL マイクロチューブ、15 mL コニカルチューブ、マイクロピペット用チップ、コンラージ棒、孔径 0.45 μm 以下の滅菌済みシリンジフィルター（水溶液とアルコール溶液のろ過ができるもの）、シリンジ、爪楊枝等の実験用資材が必要となります。

(2) 試薬類

以下に必要な試薬類を一覧で示します。

- ・ バクト ペプトン (Gibco, 211677)
- ・ バクト プロテオースペプトン No. 3 (Gibco, 211693)
- ・ スクロース
- ・ 寒天
- ・ 硫酸マグネシウム七水和物
- ・ リン酸水素 2 カリウム
- ・ グリセリン
- ・ ブロムチモールブルー (BTB)
- ・ 1 M HEPES(4-Hydroxyethylpiperazineethanesulfonic acid)バッファー (pH 7.0)
- ・ L-アスコルビン酸
- ・ 塩化ナトリウム
- ・ Tween 20

- セファレキシム
- ホウ酸
- 亜テルル(IV)酸カリウム
- アンピシリンナトリウム
- メチルバイオレット
- ナイスタチン
- BIOTAQ DNA ポリメラーゼ
(キットに反応バッファー、d NTP、50 mM MgCl₂ を含む)
- アガロース (電気泳動用)
- 電気泳動用バッファー*
- DNA 染色試薬*
- 1 Kb ラダーマーカー

* 本手順書内では電気泳動に TAE (Tris-acetate-EDTA) バッファーを用いましたが、TBE (Tris-borate-EDTA) バッファーでも問題ありません。DNA 染色試薬も、本手順書内ではサイバーグリーン系の電気泳動後に染色する試薬を用いましたが、エチジウムブロマイドを用いても問題ありません。ただし、サイバーグリーン系の電気泳動前に染色するタイプの試薬を用いた場合、バンドが上方 (分子量が大きい側) にシフトすることがあるため注意が必要です。これはサイバーグリーン系の蛍光物質のサイズが大きいため、これが DNA に過剰に結合するとゲルの穴を通りにくくなるためです。

(3) 参照菌株

種子浸漬液を塗布した選択培地上に目的の細菌が生育しているか確認するのに、同定済みの Psm と Pca を選択培地上に生育させて比較する必要があります。Psm は 3 系統、Pca は 2 系統に分けられ、それぞれ選択培地上での生育の速さが異なるため、理想的には比較対象として 5 系統すべて培養することが望ましいです。

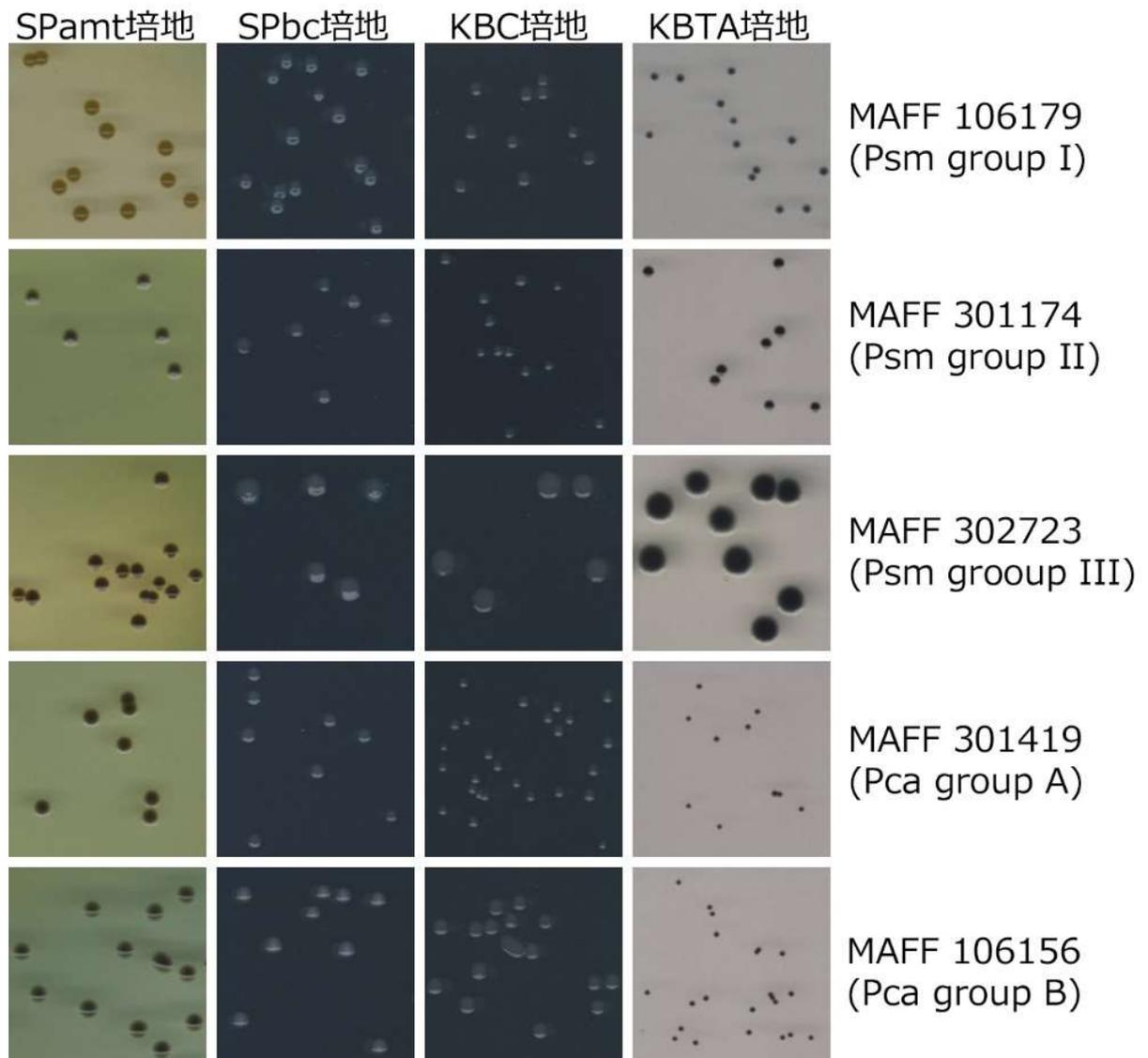
標準の参照菌株としては、農業生物資源ジーンバンクから購入可能な以下の菌株を推奨します。菌株の購入方法につきましては遺伝資源配布申し込みのページ (<https://www.gene.affrc.go.jp/distribution-micro.php>) をご参照ください。

- ・ MAFF 106179 (Psm group I)
- ・ MAFF 301174 (Psm group II)
- ・ MAFF 302723 (Psm group III)
- ・ MAFF 301419 (Pca group A) ※病原のグループ名は参考資料
- ・ MAFF 106156 (Pca group B) 6に従い記載

これら菌株の4種類の培地上での集落の写真を図IV-1に示します。菌は使用1～3日前にKB培地に植菌して培養しておき、使用前に滅菌蒸留水に懸濁します。

(4) 接種用植物

病原性を確認するための接種試験には、播種3週間～1か月程度（本葉2～3枚）のキャベツ及び/またはダイコンの苗を使用します。品種の指定はありませんが、上記の参照菌株を用いて黒斑細菌病に感染することを事前に確認した上で使用してください。



図IV-1 SPamt 培地, SPbc 培地, KBC 培地、KBTA 培地で形成される標的細菌の集落

SPamt, SPbc, KBC は培養 3 日目、KBTA は培養 5 日目

3. 試薬の調製

(1) 種子浸漬用液*

蒸留水 1 L に塩化ナトリウム 8.5 g と Tween 20 200 μL を加えて溶解させ、121℃・20 分間処理またはフィルターろ過して滅菌します。

* 黒腐病菌検出で使用する種子浸漬用液と同等であり、その作製方法に準拠していれば問題ありません。黒腐病菌検出手法は参考資料「ダイコン種子のダイコン黒腐病検査手法マニュアル」をご覧ください。

(2) 抗菌物質

- ・ セファレキシン：100 mg を 10 mL の蒸留水で溶解し、孔径 0.45 μm の滅菌済みシリンジフィルターでろ過滅菌します。試薬は -20°C に保管します。
- ・ 亜テルル(IV)酸カリウム：2.5 g を 10 mL の蒸留水で溶解し、孔径 0.45 μm の滅菌済みシリンジフィルターでろ過滅菌します。試薬は 1 mL ずつ小分けにし、 -20°C に保管します。冷凍したものを解凍すると沈殿ができることがありますが、よく混ぜて使用すれば問題ありません。
- ・ アンピシリンナトリウム：1 g を 10 mL の蒸留水で溶解し、孔径 0.45 μm の滅菌済みシリンジフィルターでろ過滅菌します。試薬は 1 mL ずつ小分けにし、 -20°C に保管します。
- ・ メチルバイオレット:100 mg を 10 mL の 70%エタノールで溶解し、孔径 0.45 μm の滅菌済みシリンジフィルターでろ過滅菌します。試薬は 4°C に保管します。
- ・ ナイスタチン：100 mg を 10 mL の 70%エタノールで溶解します。試薬は 4°C に保管します。

(3) その他の試薬

種子浸漬液の希釈等に使用する 1 mM HEPES バッファー (pH 7.0) は、1 M 溶液を希釈し、オートクレーブを用いた 121°C での加圧滅菌や滅菌済みシリンジフィルターを用いたろ過滅菌などの一般的な手法を用いて滅菌します。BTB 溶液は 50mg の BPB を 1 mL のエタノールに溶解します。

4. 培地の作製

(1) キングの B 培地 (KB 培地)

以下の成分を蒸留水 900 mL 程度に溶解し、pH メーターを用いて 1 規定の塩酸または 1 規定の水酸化ナトリウム液を加えて pH を 7.2 に合わせてから 1 L に調整し、寒天を 15 g 加えて 121℃・20 分間滅菌を行います。

・ リン酸水素 2 カリウム	1.5 g
・ 硫酸マグネシウム七水和物	1.5 g
・ バクト プロテオースペプトン No. 3	20 g
・ グリセリン	10 mL

滅菌処理後、50℃程度まで温度が下がったら、径 9 cm の滅菌済みプラスチック製ペトリ皿に 18 mL 程度ずつ分注して平板培地を作製します。クリーンベンチ内で培地表面を 30 分程度乾かしてから密閉して 4-10℃で保存します。

(2) SPamt 培地

以下の成分を蒸留水 900 mL 程度に溶解し、pH を 6.8 に合わせてから 1 L に調整し、寒天を 15 g 加えて 121℃・20 分間滅菌を行います。

・ リン酸水素二カリウム	0.5 g*
・ リン酸二水素ナトリウム・二水和物	0.5 g*
・ 硫酸マグネシウム・七水和物	0.2 g
・ バクト ペプトン	5.0 g
・ スクロース	20 g
・ BTB 溶液 (50mg/mL)	1 mL

* 原著論文の組成から、pH を合わせやすいように改変が行われています。

滅菌処理後、50℃程度まで温度が下がったら、以下の抗菌物質を加えてよく混ぜ、径 9 cm の滅菌済みプラスチック製ペトリ皿に 18 mL 程度ずつ分注して平板培地を作製します。クリーンベンチ内で培地表面を 30 分程度乾かしてから密閉して 4-10℃で保存します。

- ・ 亜テルル(IV)酸カリウム (250 mg/mL) 0.1 mL
- ・ アンピシリンナトリウム (100 mg/mL) 0.1 mL
- ・ メチルバイオレット (10 mg/mL) 0.1 mL
- ・ ナイスタチン (10 mg/mL) 3.5 mL

(3) SPbc 培地

以下の成分を蒸留水 800 mL 程度に溶解し、KB 培地と同様に pH を 7.0 に合わせてから 900 mL に調整し、寒天を 15 g 加えて 121℃・20 分間滅菌を行います。同時にホウ酸 1.5 g を 100 mL の蒸留水に溶解したのも滅菌します。

- ・ リン酸水素二カリウム 0.6 g*
- ・ リン酸二水素ナトリウム・二水和物 0.4 g*
- ・ 硫酸マグネシウム七水和物 0.2 g
- ・ バクト ペプトン 2.0 g
- ・ スクロース 20 g

* 原著論文の組成から、pH を合わせやすいように改変が行われています。

滅菌処理後、50℃程度まで温度が下がったら、滅菌したホウ酸溶液 100 mL と以下の抗菌物質を加えてよく混ぜ、径 9 cm の滅菌済みプラスチック製ペトリ皿に 18 mL 程度ずつ分注して平板培地を作製します。クリーンベンチ内で培地表面を 30 分

程度乾かしてから密閉して 4-10℃で保存します。

- ・ セファレキシシ (10 mg/mL) 8 mL
- ・ ナイスタチン (10 mg/mL) 3.5 mL

(4) KBC 培地

以下の成分を蒸留水 800 mL 程度に溶解し、KB 培地と同様に pH を 7.2 に合わせてから 900 mL に調整し、寒天を 15 g 加えて 121℃・20 分間滅菌を行います。同時にホウ酸 1.5 g を 100 mL の蒸留水に溶解したのも滅菌します。

- ・ リン酸水素 2 カリウム 1.5 g
- ・ 硫酸マグネシウム七水和物 1.5 g
- ・ バクト プロテオースペプトン No. 3 20 g
- ・ グリセリン 10 mL

滅菌処理後、50℃程度まで温度が下がったら、滅菌したホウ酸溶液 100 mL と以下の抗菌物質を加えてよく混ぜ、径 9 cm の滅菌済みプラスチック製ペトリ皿に 18 mL 程度ずつ分注して平板培地を作製します。クリーンベンチ内で培地表面を 30 分程度乾かしてから密閉して 4-10℃で保存します。

- ・ セファレキシシ (10 mg/mL) 8 mL
- ・ ナイスタチン (10 mg/mL) 3.5 mL

(5) KBTA 培地

以下の成分を蒸留水 900 mL 程度に溶解し、KB 培地と同様に pH を 7.0 に合わせてから 1 L に調整し、寒天を 15 g 加えて 121℃・20 分間滅菌を行います。

- ・ リン酸水素 2 カリウム 1.5 g
- ・ 硫酸マグネシウム七水和物 1.5 g
- ・ バクト プロテオースペプトン No. 3 20 g
- ・ グリセリン 10 mL

滅菌処理後、50℃程度まで温度が下がったら、以下の抗菌物質を加えてよく混ぜ、径 9 cm の滅菌済みプラスチック製ペトリ皿に 18 mL 程度ずつ分注して平板培地を作製します。クリーンベンチ内で培地表面を 30 分程度乾かしてから密閉して 4-10℃で保存します。

- ・ 亜テルル(IV)酸カリウム (250 mg/mL) 0.1 mL
- ・ アンピシリンナトリウム (100 mg/mL) 0.1 mL
- ・ メチルバイオレット (10 mg/mL) 0.1 mL
- ・ ナイスタチン (10 mg/mL) 3.5 mL

V. 種子検査方法

1. サブサンプルの作製

検査対象の種子ロットから無作為に約 30,000 粒を取り、約 10,000 粒×3 に分けます。具体的な手順としては 30,000 粒を直接数えるのではなく、まず 100 粒重を量り、10,000 粒であればその 100 倍の重量を 1 サブサンプルとし、3 つのサブサンプルを作製します。これをシードバックや 1 L の三角フラスコ等、この後に種子浸漬用液を入れても十分余裕のある容器に入れます。

2. 種子浸漬液の作製

ダイコンの種子は品種だけでなく産地や採集年度によって大きさがまちまちであるため、種子の重量によって加える種子浸漬用液（0.02% Tween20 を含む生理食塩水）の量を調整し、種子が種子浸漬用液に完全に浸るようにします。サブサンプルの重量に対して加える種子浸漬用液の量は以下の通りです。

- ・ 種子の 100 粒重が 1 g 未満の場合 : サブサンプル重の 2.5 倍量
- ・ 種子 100 粒重が 1 g 以上 2 g 未満の場合 : サブサンプル重の 2.25 倍量
- ・ 種子 100 粒重が 2 g 以上の場合 : サブサンプル重の 2 倍量

例 1) 100 粒重 0.8 g の場合 : サブサンプル重 80g、種子浸漬用液 200mL

例 2) 100 粒重 1.2 g の場合 : サブサンプル重 120g、種子浸漬用液 270mL

浸漬用液を加えたら、室温（25℃程度）でおおよそ 100-125 rpm の回転数で振とうし、2 時間半後に 5 mL の上清を滅菌済みのコニカルチューブに回収します。回収した上清を種子浸漬液として検査に使用します。

3. 種子浸漬液の希釈

2本の1.5 mL チューブに1 mM HEPES バッファー (pH 7.0) を900 μ L ずつ入れます。回収した種子浸漬液の100 μ L を HEPES バッファー (pH 7.0) の入ったチューブに入れ、10 倍希釈液を作製します。さらにこの10 倍希釈液の100 μ L を HEPES バッファー (pH 7.0) の入ったチューブに入れ、100 倍希釈液を作製します。

4. 選択培地への塗布*

種子浸漬液原液を SPamt 培地、SPbc 培地それぞれ2枚に100 μ L ずつ、滅菌されたコンラージ棒を用いて塗布します。10 倍希釈液、100 倍希釈液も同様に SPamt 培地、SPbc 培地に塗布します。培地は蓋を下側にして（ひっくり返して）25°Cの恒温器に入れて培養します。培地は毎日観察し、集落の形成を確認します。

* SPamt 培地、SPbc 培地はアブラナ科黒斑細菌病菌に対する完全な選択性を有していないため、種子に生存するその他の細菌の一部も生育しますが、抗菌物質の構成の違いにより生育できる菌が異なることから、サンプル毎に雑菌の生育の少ない、識別しやすい方の培地から黒斑細菌病菌を分離すればよいようになっています。KBC 培地は SPbc 培地と同様の細菌に対する選択性を示しますが、形成する集落の色や形が異なります。KBTA 培地は主にダイコンに病気を引き起こす Psm group III の生育が良く識別しやすい特徴を持っています。SPamt 培地と SPbc 培地での分離を推奨しますが、状況に応じて KBC 培地と KBTA 培地の利用も可能です。

5. 参照菌株の培養*

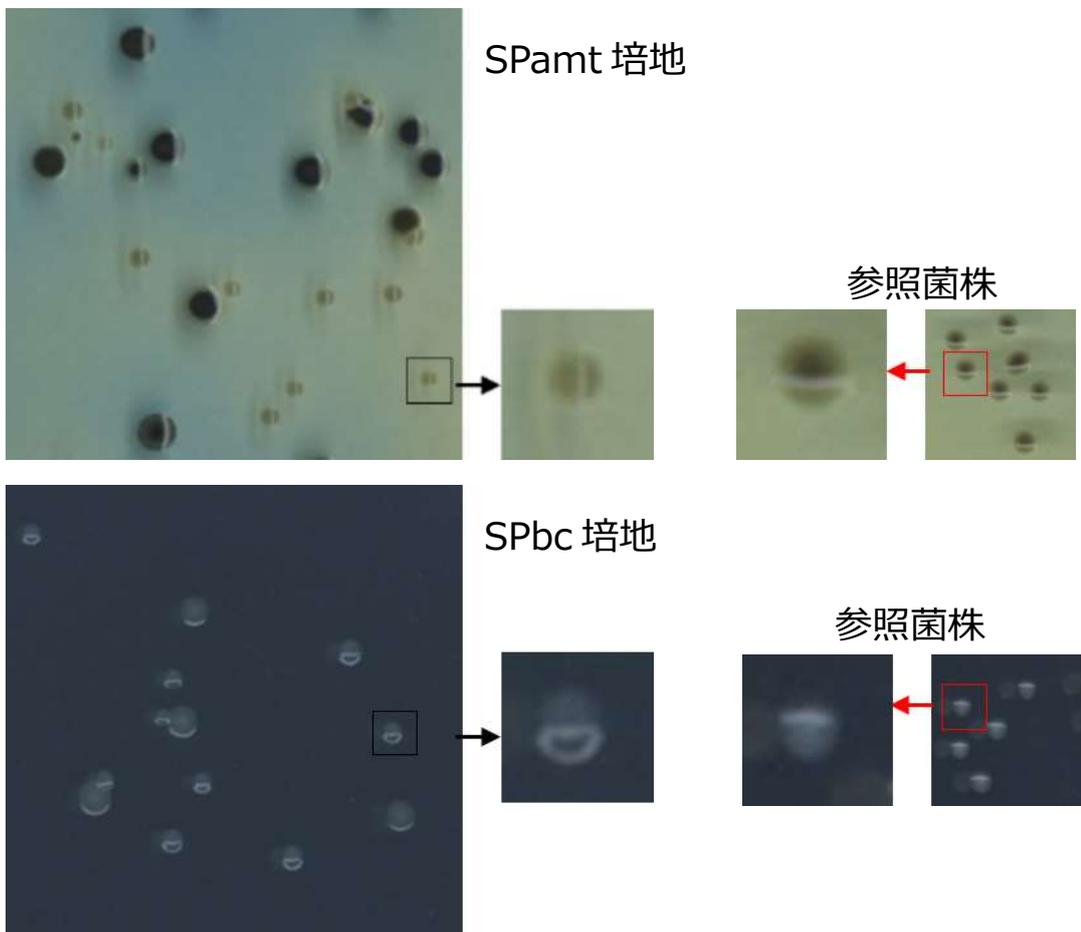
KB 培地で培養した参照菌株を、600nm の波長の吸光度が0.25-0.3 になるように滅菌蒸留水に懸濁します。この細菌懸濁液を1 mM HEPES バッファー (pH 7.0) を用いて100,000 倍に希釈します。この希釈した細菌懸濁液の100 μ L を SPamt 培

地、SPbc 培地それぞれに、滅菌されたコンラージ棒を用いて塗布します。培地は蓋を下側にして 25℃の恒温器に入れて培養します。

* 4.で KBC 培地、KBTA 培地を利用する場合は、参照菌株も KBC 培地、KBTA 培地で培養します。

6. 擬陽性集落の選抜

培養 3～5 日後に、種子浸漬液及びその希釈液を塗布した培地上に生じた集落について、参照菌株の集落と比較して色及び大きさの似たものを擬陽性集落とします（図 V-1）。見分けが容易なものでは 2～4 集落程度、見分けの難しいものでは 6～10 集落を目途に、オートクレーブ滅菌した爪楊枝で集落を刺した後、新しい KB 培地に刺すことで集落を移植します。参照菌株も 1 集落、同様の方法で同じ培地に移植します。



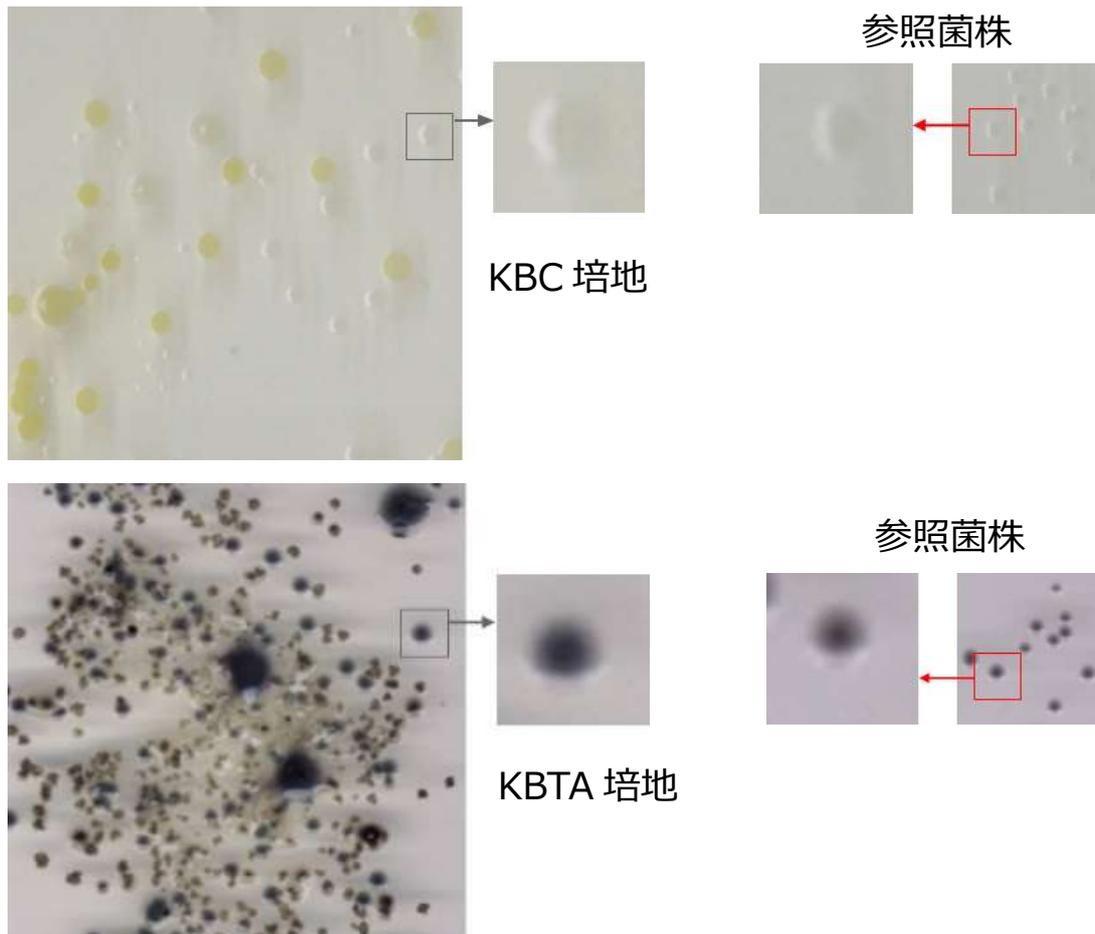


図 V-1 各選択培地で形成される種子由来細菌の集落と、標的細菌の集落

SPamt, SPbc, KBC は培養 3 日目、KBTA は培養 5 日目の写真。標的細菌の 1 個の集落の画像を右側に四角く抽出し、参照菌株の集落の画像と比較した。

7. 分離菌株の判定

移植 2～3 日後、培地上で黄色の蛍光色素を産生した擬陽性集落及び参照菌株について、滅菌した爪楊枝で集落を刺した後、25 μ L の滅菌水を入れたマイクロチューブに入れ、先端についた菌を懸濁します。菌体が多すぎたり、培地や爪楊枝の木片が混入すると PCR 反応を阻害するため、この細菌懸濁液の一部を取って 5 倍に希釈し、希釈液の 5 μ L を PCR のテンプレートとして PCR 用チューブに移します。PCR の試薬と設定条件は後記します。PCR 後に 1%アガロースゲルを用いて電気泳動し、分子量が 900 bp 程度の増幅断片が得られれば Pca、590 bp 程度の増幅断片が得られれば Psm であることが確認できます（図 V-2）。

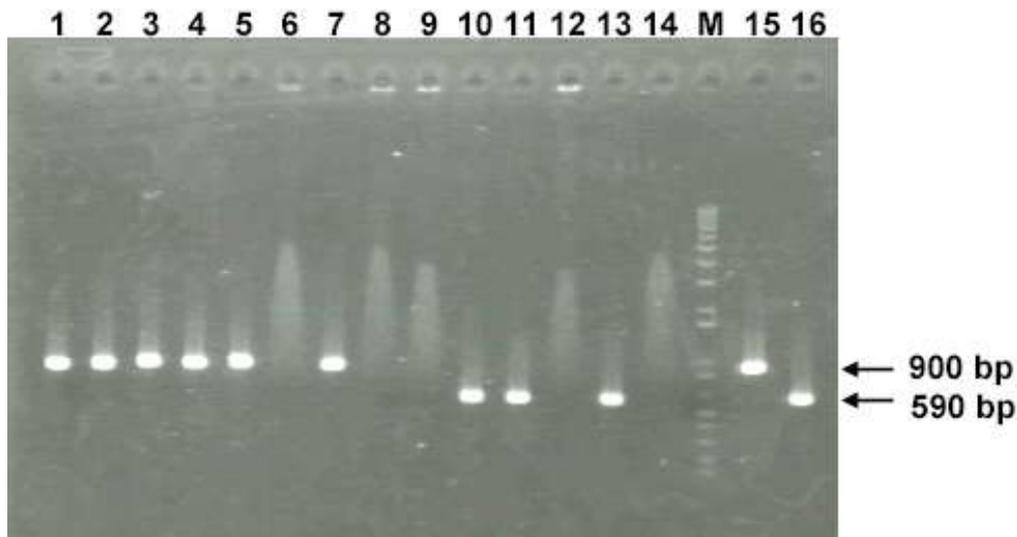


図 V-2 コロニー-PCR による黒斑細菌病菌の見分け方の例

レーン 1-7 : Pca を接種した種子サンプルから生じた集落の PCR、レーン 8-14 : Psm を接種した種子サンプルから生じた集落の PCR の結果。レーン 15 は Pca、レーン 16 は Psm のポジティブコントロール、M は 1kb ラダーマーカー。種子検査では、増幅産物が得られなかったレーン 6、8、9、12、14 の集落は除外して病原性の確認を行う。

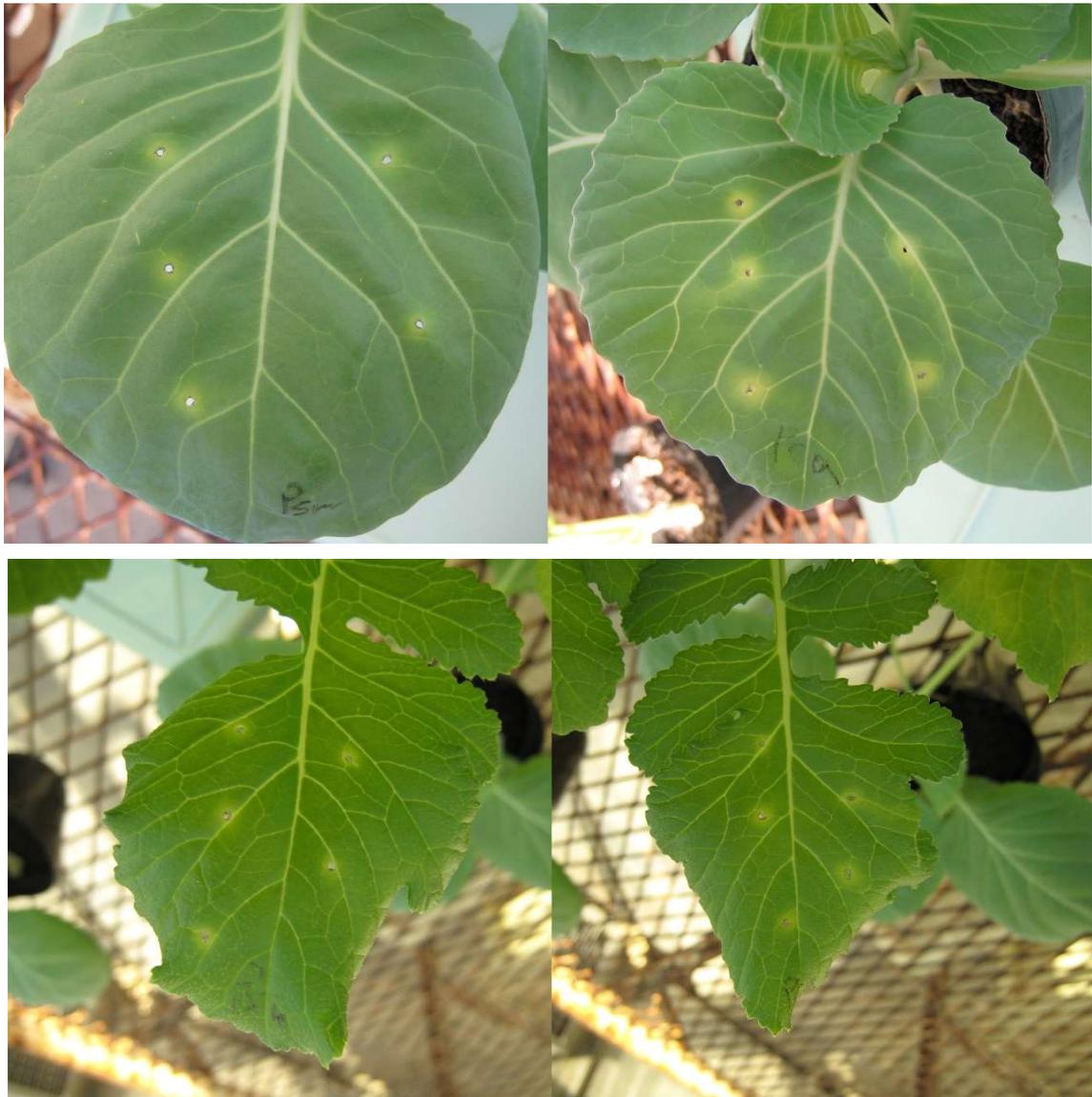
8. 病原性の確認

PCR で検査対象の細菌と合致する増幅産物が得られ、陽性となった集落を、再度 KB 培地上に画線培養し、形態や色が異なる集落が含まれていないか確認します。複数種類の集落が生育する場合は単集落分離を行います。

KB 培地上で画線培養した分離菌株を、600nm の波長の吸光度が 0.25-0.3 になるように滅菌蒸留水に懸濁します。この細菌懸濁液を爪楊枝の先端に付け、被接種植物の本葉に穿刺します（穿刺接種）。1 つの分離菌株につき、異なる 2 枚の葉に 5 か所ずつ穿刺します。穿刺接種した植物は、25℃のインキュベーターまたは温室で栽培します。5～10 日程度で発病の有無を確認します（図 V-3）。接種部位周辺に黄化や壊死等の病原性が認められた菌株は病原細菌と判定します。

分離株に 1 株でも病原性が確認されれば、サンプリングしたロットは汚染種子を含む種子ロットと判定されます。

接種植物は検査開始 3 週間程度前に播種し、本葉 3 枚以上に育苗したものを用品です。



図V-3 Psm（左）及び Pca（右）を接種し 4 日後のキャベツ（上段、品種：アーリーボール）及びダイコン（下段、品種：耐病総太り）の葉の症状

VI. 分離菌株判定のための PCR 法

1. PCR の試薬と設定条件

(1) 使用するプライマー

hrpK_fw1 (共通)	: 5'-GTCTGGGCGGACAGATGAT-3'
ALS_rv1 (Pca 用)	: 5'-CATGTTTCGCGGCAGTTACC-3'
MAC_rv1 (Psm 用)	: 5'-CGCCTTCTGGTGTGCTTTAC-3'

(2) 反応溶液の組成

プライマー (各 3.2 pmol に調製済みのもの)

hrpK_fw1、ALS_rv1、MAC_rv1	各 1.0 μ L	(各 0.16 pmol) *
10 \times 反応 buffer	2.0 μ L	(1 \times)
dNTP Mix (2.5 mM each)	1.6 μ L	(0.2 mM each)
BIOTAQ DNA Polymerase**	0.1 μ L	(0.025 U/ μ L)
MgCl ₂ (50 mM) ***	0.6 μ L	(1.5 mM)
滅菌蒸留水	7.7 μ L	
計	15.0 μ L	

* ()内はテンプレートとなる細菌懸濁液にこの反応溶液を添加した後の、PCR 反応時の濃度を示します。

** 本手順書では BIOTAQ DNA Polymerase (Bioline, London, UK)を推奨しますが、他の Taq DNA Polymerase でも増幅することを確認しています。

*** 反応バッファーに Mg が含まれる場合は MgCl₂を添加せず、滅菌蒸留水を 8.3 μ L にします。

(3) 反応条件

細菌懸濁液 5 μL に (2) の反応溶液 15 μL を加えて反応させます。温度条件は

95 $^{\circ}\text{C}$ ・3 分間➡

95 $^{\circ}\text{C}$ ・30 秒間➡58 $^{\circ}\text{C}$ ・25 秒間➡72 $^{\circ}\text{C}$ ・30 秒間の 3 過程を 30 回反復➡

72 $^{\circ}\text{C}$ ・5 分間➡

4~15 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベーション

(4) 電気泳動による確認

1%アガロースゲルを用いて電気泳動します*。マーカーとして 1 Kb ラダーマーカーを使用することを推奨します。

* 本手順書内では電気泳動に TAE バッファーを用いましたが、TBE バッファーでも問題ありません。DNA 染色試薬も、本手順書内ではサイバーグリーン系の電気泳動後に染色する試薬を用いましたが、エチジウムブロマイドを用いても問題ありません。ただし、サイバーグリーン系の電気泳動前に染色する試薬を用いた場合、バンドがゲル上方（分子量が大きい側）にシフトすることがあるため注意が必要です。これはサイバーグリーン系の蛍光物質の分子量が大きいため、これが DNA に過剰に結合するとゲルの穴を通りにくくなるためです。

参考資料

1. ダイコン種子からの黒斑細菌病菌検査法（農研機構普及成果情報、2021 年 4 月）
https://www.naro.go.jp/project/results/4th_laboratory/carc/2020/20_041.html 
 2. ダイコン種子のダイコン黒腐病検査手法マニュアル
https://www.maff.go.jp/j/kanbo/tizai/brand/b_syokubut/attach/pdf/index-43.pdf 
 3. Inoue Y., Takikawa Y. (2021) Primers for specific detection and identification of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *P. cannabina* pv. *alisalensis*. *Applied microbiology and biotechnology* 105,1575–1584
 4. Inoue Y. (2022) Three semi-selective media for *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *P. cannabina* pv. *alisalensis*. *Applied microbiology and biotechnology* 106, 5741-5755
 5. International Seed Testing Association (2023) International rules for seed testing 2023, validated seed health testing methods, 7-019a: Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* in *Brassica* spp.
https://www.seedtest.org/api/rm/4S8N9CX7KQ5X6B6/7-019a-detection-of-xanthomonas-campestris-pv-camp-5.pdf* 
- * ISTA の資料は更新頻度が高いため、上記 URL で参照できない場合は下記をご覧ください。
- International Seed Federation (2019) Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and pv. *raphani* on *Brassica* spp. seed.

https://worldseed.org/wp-content/uploads/2020/09/Brassica_spp_Xcc-Xcr_v6.2_Oct_2019.pdf



6. 瀧川雄一、高橋冬美 (2014) アブラナ科植物黒斑細菌病 歴史と現状. 日本植物病理学会報 104, 104-110

7. 井上康宏 特開 2021-122216 「アブラナ科黒斑細菌病菌判定用プライマーセット、及びこのプライマーセットを用いたアブラナ科黒斑細菌病の検査方法」 2021 年 8 月 30 日公開

<https://plidb.inpit.go.jp/pldb/html/HTML.L/2021/001/L2021001986.html>



担当窓口、連絡先

外部からの受付窓口：

農研機構 植物防疫研究部門 研究推進部 研究推進室

IPP-Koho@naro.affrc.go.jp



「農研機構」は、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構のコミュニケーションネーム（通称）です。