

ウリ科野菜果実汚斑細菌病 防除マニュアル (種子生産・検査用)



平成21年12月
独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構
野菜茶業研究所



はじめに

果実汚斑細菌病は、ウリ科作物に発生する細菌病で、果実、葉、茎などに病斑を形成します。病原細菌・*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (以下、Aac) は、主に種子伝染します。海外では、1989～1995 年にかけてアメリカのスイカ栽培地で大発生し、大きな被害を出しました。そのため、日本に侵入した場合、甚大な被害が発生することが予想されることからスイカ果実汚斑細菌病菌、スイカ、トウガン、メロンの種子は植物防疫法施行規則によって「輸出国で栽培地検査を要する植物及び検疫有害動植物」に指定して、国内への侵入を厳しく警戒していました。しかし、日本では 1998 年に東北地方のスイカ産地で初めて発病が確認されてから 1999、2001、2004、2005 年にはスイカで、2005 年にはタイ国からの輸入種子が汚染していたことからメロンで発生が確認されています。

本病は主に種子伝染し、多くの場合、Aac に汚染した種子が原因で発生していると考えられます。上述した日本でのゲリラ的な発生事例もその全てが病原菌に汚染した種子が原因であると考えられます。そのため、本病の予防・防除において Aac の汚染がない健全種子を供給することが最も重要であると考えられ、早急な技術開発が求められます。

野菜茶業研究所では農林水産省 横浜植物防疫所、日本種苗協会、本病の発生道県、種苗管理センターのご協力を得てウリ科野菜果実汚斑細菌病に関する研究戦略構築会議を開催し、関係者間の情報交換と研究推進方向について検討、本病の発生予防と防除に必要な研究、技術開発を整理しました。これらを踏まえて平成 18 年度から 3 年間、農林水産省の競争的資金「先端技術を活用した農林水産研究高度化事業」を活用し、「ウリ科野菜果実汚斑細菌病の日本への侵入・定着防止技術の開発」との課題でプロジェクト研究を実施しました。このプロジェクト研究で得られた知見と成果のうち、病原細菌を持たない健全種子生産、種子検査に関する内容をまとめ、本マニュアルを作成しました。本病の発生生態、青果生産などの一般栽培での防除技術については別途、「ウリ科野菜果実汚斑細菌病防除マニュアル -一般栽培用」にまとめましたので本マニュアルと合わせてご活用頂ければ幸甚に存じます。

本マニュアルでは、第 1 段階として病原菌の汚染のない健全種子を生産するための栽培方法について、第 2 段階として採種、集荷された種子の消毒法について、第 3 段階として最終的に市場に健全種子を供給するための検査法及び種子からの Aac 検出法について解説します。これら、3 つの段階の全てが実行されることにより、はじめて Aac の汚染のない健全種子が供給されるものと思います。このマニュアルは、一つの案であり、利用される方はそれぞれの種苗会社、検査・指導機関などの事情を勘案して、適宜、改変されることを望みます。

最後になりましたが本研究課題の実施にあたり外部有識者として御助言、御指導頂いた元農業環境技術研究所長 浅賀宏一博士、ご協力頂いた日本種苗協会と加盟種苗会社、行政機関、研究機関の皆様には厚く御礼申し上げます。

平成 21 年 12 月

(プロジェクト研究総括者)

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

野菜茶業研究所 野菜 IPM 研究チーム

上席研究員 白川隆

I. 汚染種子形成機構と汚染種子での病原菌存在位置

種子伝染性病害において病原体の種子への汚染機構と種子での存在位置に関する情報は、後述の 項、 項で解説する種子消毒法と病原体の検出を目的とする種子検査法で用いる技術の選択にそれぞれ影響してくる。また、種子への汚染機構に関する情報は、採種栽培における防除手段の選択に有用である。本病に関してこれらの情報の蓄積は十分とは言えないが 2009 年現在の情報を以下にまとめた。

1. 汚染種子の形成機構

本病において汚染種子がどのような機構によって形成されるのかについて、スイカでは花器感染(花柱からの感染)による Aac の種子汚染の可能性が報告されている(Walcott ら、2003 ; Lessl ら、2007)。つまり、ミツバチなどの訪花昆虫が Aac を媒介し(Fessehaie ら、2005)、これが花柱を通じて子房に到達して果肉と種子の汚染をもたらすと考えられている。花器感染による種子の Aac 汚染は、本プロジェクト研究の中でスイカにおいて再確認すると共にメロンでも確認した。一方、今回の研究では茎への接種によって Aac が導管などの維管束を通じて果実に至り、汚染種子を形成する可能性を示した。これらの感染経路では、種皮表面に Aac が付着するだけでなく、種子内部に Aac が侵入する可能性が高いと考えられる。

果皮に Aac が存在した場合、採種時に種皮表面に Aac が付着する。採種時に果汁中での発酵過程を加える場合、果汁中で Aac が増殖して種子を汚染することが考えられる。ウリ科野菜の場合、種皮表面にゲル状の物質が付着してなかなか除去することができないが、採種時に極微量な Aac が種皮表面に付着しても乾燥過程でこのゲル状物質の中で Aac が一定の密度までに増殖する可能性が考えられる。

2. 汚染種子上での Aac の生存期間

Aac に汚染したスイカ種子を 4、10、15、20、30 で保存した場合、26 ヶ月以上の期間 Aac が種子上で生存して発芽後に発病することが報告されている(白川ら、2003)。2006 年からの保存実験では、メロン、トウガン、カボチャ、ユウガオ、キュウリの種子上でも 4 で保存した場合に 2 年間以上生存し、その種子上での Aac 菌数に大きな変化がないことを認めている。アメリカではメロン種子上で 40 年以上生残することが発表されている(Shepherd ら、2009)。以上のことから、保存条件の影響も受けることも考えられるが通常の種子を保存する環境ではウリ科野菜種子上で Aac が長期間生残するといえる。

3. 種子における Aac の存在位置

スイカ種子では、次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いた消毒試験や機械的に分離した種子器官からの Aac の分離・検出実験から胚などの種皮内器官にも存在することが報告されている(Rane ら、1992 ; Dutta ら、2008)。本プロジェクト研究では、メロンの自然汚染種子において種皮 - 胚間の柔組織に Aac が存在することを組織観察により認めている。以上のことから、切片の顕微鏡観察によるより詳細な究明が必要であるが、汚染種子において Aac が種皮内の胚などの組織に存在する可能性が高いと考えられる。

4. 種子における Aac の存在位置から想定できる必要な対策

上述した汚染種子が形成される際の Aac の汚染ルートと種子における存在位置は、本病の防除を目的とした種子消毒法と種子からの Aac 検出を目的とする種子検査法で用いる技術の選択に影響してくる。上述したようにこれらに関する知見の蓄積は現段階では十分とは言えないが、現段階では種子内部に Aac が存在するものとして対応するのが妥当と考えられる。表 1 に種子への汚染ルートと予想される Aac の存在位置、必要な対策についてまとめた。

表 1 汚染種子形成機構と想定される対応策

汚染ルート	予想される存在位置	必要な種子消毒	種子検査での種子洗浄法の可否
果皮 (発病、果肉到達)	種皮表面、種子内部	化学的処理、 物理的処理	不十分
果皮(無発病)	種皮表面	化学的処理	適用可能
維管束(茎内移動)	種皮表面、 種子内部、胚	化学的処理 + 物理的処理	不十分
花器感染	種皮表面、 種子内部、胚	化学的処理 + 物理的処理	不十分

II. 採種栽培法

「ウリ科野菜果実汚斑細菌病防除マニュアル(一般栽培用)」で解説しているように、本病は多湿・多雨条件で発生が多くなると共に、比較的高温条件を好む。また、主に種子によって伝染し、育苗時に頭上灌水や接ぎ木作業によって広範囲に第二次伝染すると共に、ミツバチなどの訪花昆虫によっても伝染することが報告されている。

採種栽培では以上のような本病の病徴、発生生態などの特徴を良く理解し、一般栽培用の防除マニュアルに示した青果生産用栽培での防除よりも厳密な予防・防除措置を取ることが重要である。また、採種栽培における技術指導者、管理者は本病について精通していることが求められる。一方、本プロジェクト研究で実施したタイ国での 5 回の現地栽培試験では、発病履歴のある圃場で保菌検定により Aac を持たないことを証明した種子を使用して適切な管理、防除を行った場合に本病の発生を認めず、採種した種子からも Aac を検出しなかった。このことから、Aac を保菌しない原種種子を用いて適切に管理すれば、採種栽培において Aac 保菌種子を生産するリスクを低減できるものと考えられる。

以下に、本プロジェクトで得られた知見等をもとに Aac 汚染種子の生産することを回避するための採種栽培について解説する。

1. 使用種子の選択

原種、原原種は採種栽培期間中に植物病害の専門とする担当者が常時発病を確認可能な隔離された圃場で採種する。これらの採種栽培・採種では以下に説明する方法よりもさらに厳密な管理を必要とする。採種した原種、原原種は、必ず「 . 種子消毒法」、「 . 種子検査

法」にしたがって種子検査によって病原菌を持たないことを確認した後に採種栽培に使用する。

2. 採種圃場の選択と準備

(1) 圃場の選択

- ・ 可能な限り採種国として日本を含めた未発生国を選択する。
- ・ 発生国で採種を行う場合は、可能な限り本病の発生がない地方・地域を選択する。採種圃場および近隣圃場に発生履歴がない圃場を選択する。
- ・ 本病の発生履歴のある圃場では採種しない。
- ・ Aac はエアロゾルなどによって空気伝染することも考えられるので周囲に青果栽培を含むウリ科野菜の栽培がない圃場を選択する。
- ・ 通風と排水の良い圃場を選択する。排水が悪い圃場を使用する場合は、暗渠、明渠を設置するなど、十分な排水対策を行う。
- ・ 本病は、多雨条件で発生が多くなるので、多雨地帯で採種する場合は施設栽培が望ましく、熱帯地域では乾期に採種栽培を行う。

(2) 圃場の準備

- ・ 未熟残渣からの感染を防ぐため、土壌消毒を実施する。
- ・ Aac の圃場周辺部からの侵入を防ぐために圃場およびその周辺のウリ科植物を中心とした雑草を除去する。
- ・ 畝立てを行い、排水を良くする。
- ・ マルチ被覆を基本とし、植物体と土壌との接触を極力避ける。
- ・ 適正な施肥に心がける。特に窒素過多にならないように注意する。
- ・ 育苗箱、育苗トレイ、支柱等の農業資材は、使用前に農業資材用消毒剤を用いて消毒する。

3. 育苗時の管理

- ・ 育苗には消毒済みの培土を使用する。
- ・ 「ウリ科野菜果実汚斑細菌病防除マニュアル(一般栽培用)」にしたがって育苗時の予防・防除を行う。
- ・ 種子ロット毎に区分して、播種・育苗管理を行う。大きなロットの場合、小規模な単位に分けて管理する。
- ・ 施設内育苗とし、施設内湿度が高くなるように適正な灌水量、換気などに努める。
- ・ 灌水は日中に行い、多湿状態が長時間持続しないようにする。可能ならば、頭上灌水を避け、底面灌水とする。

4. 採種圃場での管理と防除

- ・ 定植は通常栽培よりも株間、畝間を広くとり、隣接株と葉の接触を避け、風通しを良くする。
- ・ 施設栽培等で本病が発生しにくい立ち作りが可能な場合は、立ち作りとする。

- ・ 交配後、必要な節数が確保できたら早めに摘心し、側枝を残す場合は過繁茂に注意する。管理作業による第二次伝染を防止するため、整枝、摘果などの管理作業は必ず晴天時に行い、使用するハサミや手指を消毒しながら行う。
- ・ 圃場への入退場の際には、靴、手、管理機材の消毒を行うなど、圃場衛生に注意する。
- ・ 部外者、家畜、野生動物などが圃場内に侵入しないよう、圃場周囲に柵を設置するなどの対策をとる。
- ・ 本病に登録がある防除薬剤を定期的に散布する。特に第二次伝染と感染の危険性が高い交配開始前、交配終了後、降雨後にはカスガマイシン・銅水和剤を散布する。
- ・ 本病以外の病害、害虫の防除を徹底する。

5. 採種と採種後の調整方法

- ・ 本病が発生した圃場からは採種しない。
- ・ 本病及び他の病害の病徴がある果実からは採種しない。
- ・ 収穫後、果実表面を洗浄・消毒し、清浄にする。
- ・ 果実収穫後に追熟を行う場合は腐敗に注意を払い、腐敗果実が発生した場合は速やかに廃棄する。
- ・ 果肉が腐敗している果実とその種子は廃棄する。
- ・ 果実から採取した種子は、水道水などの消毒された水を用いて十分に水洗する。種子を河川水で洗うことを避ける。
- ・ 水洗後の種子は、国内では 項で解説する食酢-銅水和剤混液への浸漬処理で、海外では現地で実施可能な浸漬処理で種子消毒する。
- ・ 浸漬処理後の種子の乾燥は迅速に行う。
- ・ 異なる圃場の種子は混合せず、種子検査が終了するまでは別ロットとして扱う。

6. 発病観察

- ・ 採種栽培における病害担当者は、研修、講習会などにより本病について精通し、本病の簡易診断法について習熟していることが求められる。
- ・ 採種栽培における病害担当者は、採種栽培者に対して本病の特徴、防除法等の情報を提供し、予防・防除対策の実施と定期的な発病観察を要請する。また、発病観察の結果と栽培の記録を指導する。
- ・ 原種、原原種種子の採種を目的とした栽培では、毎週1回は発病調査を行う。
- ・ 市販用種子の採種を目的とした栽培では、交配前後、採種用果実の収穫前は病害担当者が発病の有無を調査する。接ぎ木した場合には、少なくとも接ぎ木前、接ぎ木後の養生期間が終了した時にも発病調査を行う。
- ・ 発病調査の結果をその都度記録する。

7. 発病時の対応

- ・ 本病と疑われる症状が発生した場合、 項および「ウリ科野菜果実汚斑細菌病防除マニュアル(一般栽培用)」で示したイムノストリップ法、ELISA 法等の血清学的手法、PCR 法、

選択培地分離などによって簡易診断する。

- ・ 育苗時に本病の発生を確認した場合、同一施設内および同一種子ロットの苗は潜伏感染している可能性が高いので全量を廃棄する。
- ・ 本病が発病した圃場からは採種しない。

8. 海外で採種する場合の対応

- ・ 現地法人、委託業者、採種栽培農家に本病の特徴、防除法等の情報を提供し、予防・防除対策の実施と定期的な発病観察を要請する。また、発病観察結果と栽培の記録を指導し、栽培終了時には記録の写しの提供を求める。
- ・ 病害担当者は、定植時、交配時、採種時に採種地において発病調査を行うことが望ましい。
- ・ 本病の防除として、採種国で使用可能な防除薬剤のうち、本病に対して効果が高い薬剤を選択して予防的な防除から散布する。
- ・ 採種した種子について、採種国で実施可能で本病に対して効果が高い薬剤を用いた浸漬処理による種子消毒を実施する。
- ・ 輸入する前に種子検査を実施する。
- ・ 栽培履歴等の来歴の詳細が不明な種子は輸入しない。

III. 種子消毒法

項で述べたように本病は主に種子伝染するが、その種子における Aac の存在位置について自然汚染種子を用いた解析から種子内部に存在する可能性が示されている。そのため、本病の防除を目的とした種子消毒では種子内部に Aac が存在することを想定することが必要と考えられる。また、一般的に単一の作用機構による消毒法のみで処理する場合と比較して作用機構の異なる複数の消毒法を用いる場合のほうが消毒効果が飛躍的に高いことが予想される。そのため、種子消毒にあたっては複数の消毒法の組合せ処理を基本とする。

1. 化学的処理 --- 薬剤液への浸漬処理

薬剤液への浸漬処理についてこれまで過酢酸処理(Hopkins ら、2003)、食酢-銅水和剤処理等(原ら、2006)が報告されている。しかし、現在、日本においてウリ科野菜種子の種子消毒剤としては銅水和剤(食酢-銅水和剤)のみが登録されており、その他の薬剤は使用できない。そのため、ここでは食酢-銅水和剤混液への浸漬処理について解説する。

(1) 必要な消耗品

- ・ 野菜類種子消毒用ドイツボルドーA

注意：一般的な「ドイツボルドーA」も市販されているが、これは種子消毒用としては農薬登録されていないので、使用すれば適用外使用となり農薬取締法違反となる。種子消毒には必ず「野菜類種子消毒用ドイツボルドーA」を使用する。

- ・ 食酢（酸度 5 程度の製品）

(2) 手順

食酢を酢酸濃度が約 0.01M となるように希釈する。

の食酢希釈液を用いて野菜類種子消毒用ドイツボルドーAの500～1000倍の希釈液を作製する。

種子を の液に入れ、時々攪拌しながら30分間浸漬する。乾燥した種子を処理する場合、種子についた気泡がなくなるように注意する。

種子を取り出し、水洗しないでそのまま、乾燥する。

(3) 注意 --- 農薬の適正使用について

農薬登録されていない薬剤、使用濃度、使用方法により日本国内で種子消毒を行うことはできない。現在、本病の防除を目的とした種子消毒剤としては「銅水和剤（農薬の名称：野菜類種子消毒用ドイツボルドーA、使用時期：播種前、希釈倍数：500～1000倍、使用方法：30分間種子浸漬）」のみである。採種栽培に使用する原種、原原種種子についても同様であり、本剤以外の薬剤使用による種子消毒は農薬取締法違反となるので注意されたい。

2. 物理的処理 --- 乾熱処理

物理的処理として温湯浸漬処理と乾熱処理が一般的である。ウリ科野菜種子については緑斑モザイクウイルスの防除を目的として乾熱処理が一般的に行われている。そこで、ここでは乾熱処理について説明する。

(1) 乾熱装置について

乾熱処理に用いる装置には様々なタイプがあり、それぞれのタイプで温度分布や指定した温度に到達するまでに必要とする時間が異なる。理想的には装置内の温度分布が均一であると共に、処理時に種子袋内あるいは種子棚内の温度が設定温度にスムーズに到達することが望ましい。

(2) 乾熱温度について

本プロジェクト研究では、Aac細菌懸濁液の果実内接種によりメロン、キュウリ、日本カボチャ、西洋カボチャ、ユウガオ、トウガンのAac汚染種子を作製し、乾熱処理による消毒効果と乾熱処理が発芽に及ぼす影響を調査した。その結果を図1に示す。これによると処理後に発病を認めず、発芽が無処理区と有意差がない処理温度と処理時間は、メロンでは、95℃ 1～2日間、90℃ 1～3日間、85℃ 3～7日間および80℃ 7日間、キュウリでは、95℃ 1日間、90℃ 3～5日間、85℃ 3～5日間および80℃ 7日間、日本カボチャ(小粒)では、95℃ 1日間、85℃ 3～5日間、トウガンでは85℃ 7日間であった。このいずれの条件も80℃以上での乾熱処理が必要であり、緑斑モザイク病防除を目的とした75℃で3日間の乾熱処理条件と比較すると厳しい条件となっている。

種子が大きい西洋カボチャ(大粒種子)、ユウガオでは乾熱処理に適する温度と処理日数の組合せは認められなかった。

(3) 乾熱処理の手順

乾熱処理による発芽率と発芽勢の低下、奇形等の発芽障害の発生は、種子の含水量と関係あることが示されており、スイカ種子の場合、含水率が2%以下で発芽障害の発生が

少なくなる。そのため、乾熱処理にあたっては、予備乾燥が必須となる。

乾燥種子を乾熱装置に入れ、含水量 5%未満を目安として 40 程度で十分に予備乾燥する。

予備乾燥終了後、乾熱温度に温度を上げ、必要日数処理する。

作物	処理温度 ()	処理日数						
		1	2	3	4	5	7	
メロン	100	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
	95	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
	90	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
	85	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
	80	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
	75	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
キュウリ	100	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
	95	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
	90	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
	85	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
	80	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
	75	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
ユウガオ	100	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
	95	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
	90	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
	80	黄	黄	黄	黄	黄	黄	

作物	処理温度 ()	処理日数						
		1	2	3	4	5	7	
日本カボチャ	100	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
	95	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
	90	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
	85	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
	80	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
	75	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
西洋カボチャ	100	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
	95	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
	90	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
	85	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
	80	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
トウガン	100	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
	95	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
	90	黄	黄	黄	黄	黄	黄	
	80	黄	黄	黄	黄	黄	黄	

図 1 各作物種子の乾熱処理による Aac 消毒効果と正常発芽条件

: 完全に消毒、発芽障害あり、
 : 消毒不完全、発芽障害あり、
 : 完全に消毒、発芽障害なし(実用条件)
 : 消毒不完全、発芽障害なし

(4) 乾熱処理における注意点

- ・ 使用する乾熱装置の温度分布、処理中の種子温度の分布などを予め測定して把握しておく。
- ・ 使用する乾熱装置により、温度分布、設定温度に到達するまでの時間等が異なるので事前に試験的な処理によって、処理による発芽不良などの障害発生を確認する。
- ・ 品種により耐熱性が異なる可能性があるため、事前に少量の種子を用いた予備的試験により、処理による障害発生の有無を確認する。

3. 化学的処理と物理的処理の組合せ処理

上述したように、作用機構の異なる複数の消毒法を組み合わせることでより効果的に種子を消毒することが可能であると考えられる。ここでは、上述した化学的処理としての酢酸銅水和剤処理と乾熱処理の組合せ処理による種子消毒法について説明する(図 2)。この組合せ処理では、化学的処理によって種子表面に存在する多くの Aac を殺菌し、その後の物理的処理(加熱処理)によって化学的処理で生残した Aac と種皮内の Aac を消毒することが可能であると考えられる。

この組合せ処理により、トウガンでは銅水和剤 500 倍希釈液 + 0.01M 酢酸液への 60 分の浸漬処理の後、70 あるいは 75 で 4 日間の乾熱処理で発病がなく、かつ発芽率に与える影響も認められなかった。メロンでは 70 での試験例はないが、浸漬処理後、75 で 4 日間の乾熱処理で実用的な種子消毒が可能となった。酢酸-銅水和剤処理において 30 分処理と 60 分処理とは、防除効果に有意な差が認められないことから、浸漬処理時間を 30 分としても同様な防除効果が得られるものと考えられる。

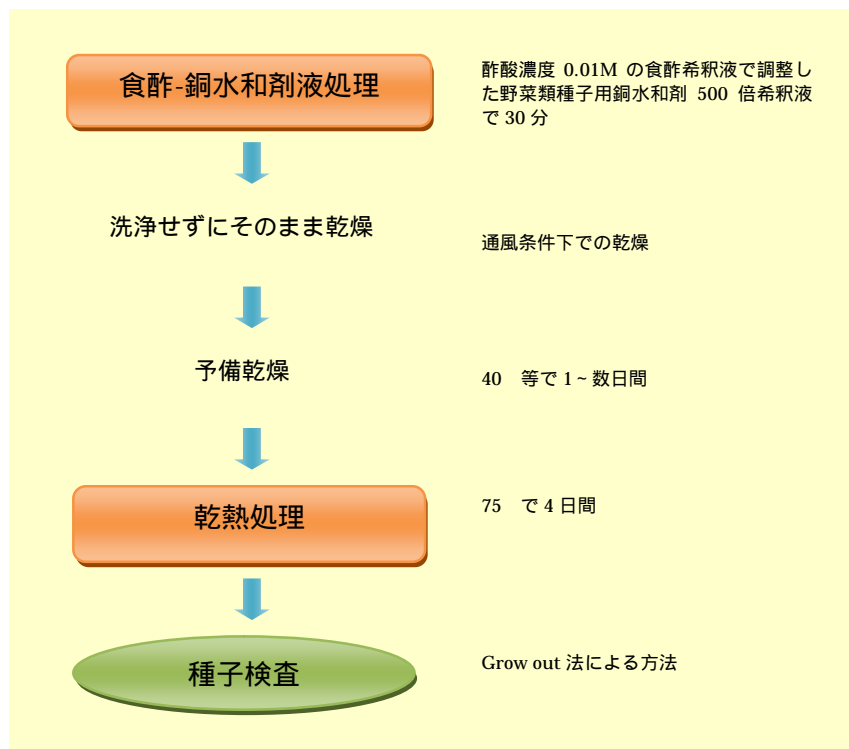


図 2 食酢-銅水和剤と乾熱処理の組合せ処理による種子消毒法

4. その他の種子消毒法

(1) 間欠温湯処理法

通常、本病の防除を目的とした温湯処理は防除効果が低くかつ発芽障害が出やすいことが報告されている。これを克服するために本プロジェクト研究の中で開発された技術で、短時間の温湯処理と冷水での冷却処理を交互に行う。稲籾用温湯処理機を用いることでリットル単位の処理も可能となる。実験的にはそれぞれ 10 分間の温湯処理後に 15 で 10 分間の冷水処理の組合せを 4 回反復する処理においてスイカでは 52 、トウガンでは 55 、カボチャでは 50 でそれぞれ高い種子消毒効果を認めている。

また、この温湯処理時に温湯として食酢-銅水和剤液、アスコルビン酸液、過酢酸液を用いるとより高い種子消毒効果を認めているが、これらの薬剤液を用いた種子処理は、農薬登録がないので実施することはできない。

(2) 過酢酸処理 (日本では適用不可)

Hopkins ら(2003)は、スイカ種子の消毒法として 30 分間の 1,600 $\mu\text{g/ml}$ の過酢酸液に高い種子消毒効果を報告している。本法は、現在、タイ国等の主要なウリ科野菜種子生産地で使用されている。原ら (2006) は、本法がスイカ以外のメロン、カボチャ、ユウガオ、トウガンでも高い種子消毒効果を認めている。しかし、過酢酸は日本では農薬として登録されていないので国内で使用することはできない。

5. 作物別の種子消毒とその考え方 (表 2)

本プロジェクト研究の結果、ウリ科野菜のうちスイカ、メロン、キュウリ等の比較的小型な種子は発芽障害を発生させることなく高い種子消毒効果を得ることができる。一方、カボ

表 2 作物別の種子消毒法と対応方針

作物	市販種子用処理	原種・ 原原種用種子	処理の方針
小型種子 スイカ メロン キュウリ トウガン 日本カボチャ 等	銅水和剤・ 酢酸混液処理 + 乾熱処理 (75℃、4日間)	銅水和剤・ 酢酸混液処理 + 乾熱処理 (75℃、4日間)	原種等用種子の消毒 健全な市販用種子の生産 消毒でさらにクリーンに
大型種子 西洋カボチャ ユウガオ 等	適用できない ^{a)}	より強い消毒法 (間欠温湯処理等)	原種・原原種用種子 を消毒 健全な市販用種子の生産

a) 処理による障害（発芽障害など）が発生しない方法では完全に消毒できない。効果は低いですが予防的に処理することは推奨される。

チャ、ユウガオなどの比較的大型な種子は、化学的処理、乾熱処理による物理的処理とともに発芽障害が発生させずに高い防除効果を得ることが困難であることが明らかになった。

以上のことから小型種子では、市販用種子に食酢-銅水和剤混液への浸漬処理と 75℃ で 4 日間の乾熱処理の組合せ処理が適用できる。

一方、大型種子では、現段階では市販用種子への実用的な種子消毒法がない。そのため、原種、原原種用種子の消毒に主体を置き、処理により多少の発芽障害の発生があったとしても食酢-銅水和剤混液の浸漬処理の後により強い乾熱処理、あるいは間欠温湯処理等の加熱処理により消毒を行う。なお、加熱処理における処理温度と処理時間は図 1 を参考として実施者で少量の種子で試験的に実施し、大きな障害が発生しない設定とする。

IV. 種子検査法

本病の病原菌である Aac は発芽苗の表面で条件が整えば爆発的に増殖するため、用いる種子が極わずかに汚染されていても大きな被害を及ぼす危険性がある。わが国のスイカやキュウリのほとんどが接ぎ木栽培されており、汚染した手や器具をとおして汚染株から健全株へと容易に、しかも広範囲に Aac の二次伝染を引き起こす可能性がある。項の説明のように、汚染種子での Aac 存在部位は種皮上はもちろん種子内部に存在する可能性が示唆されている。以上のことから本病の発生予防を目的とした高感度な種子からの Aac 検出法（以下、種子検査法）には、種子内部に存在する Aac が検出可能なことと高い検出感度が求められる。

本プロジェクト研究で開発した高感度な検査法、Sweat-bag Seedling 法は 種子上の Aac の増幅あるいは濃縮する過程、Aac の検出あるいは分離する過程の 2 つの段階から構成される。この 2 過程の技術の組合せにより、その種子検査法の性質、性能が定まる。例えば、方法としては多少の検査期間を必要としてもより確実に検出できる方法と検出感度は劣るが短時間に結果が得られる方法に分けることができる。

ここでは、Sweat-bag Seedling 法を用いた種子検査法(佐藤ら、2003);鈴木ら、2008)について詳述するとともに、現在までに利用あるいは報告されている方法の概要を紹介する。

1. Sweat-bag Seedling 法を用いた検出法

本法は、ウリ科植物の植物体上で Aac が選択的に増殖することを利用した高感度な検出法である。また、種子を発芽させる工程をとることから、種子内部に存在する Aac も検出することが可能となる。この検査法では、種子を発芽させて Aac を増殖させる「増幅過程」と植物体の摩砕液から PCR 法、選択培地法で Aac を検出する「検出過程」の 2 段階からなる(図 3)。

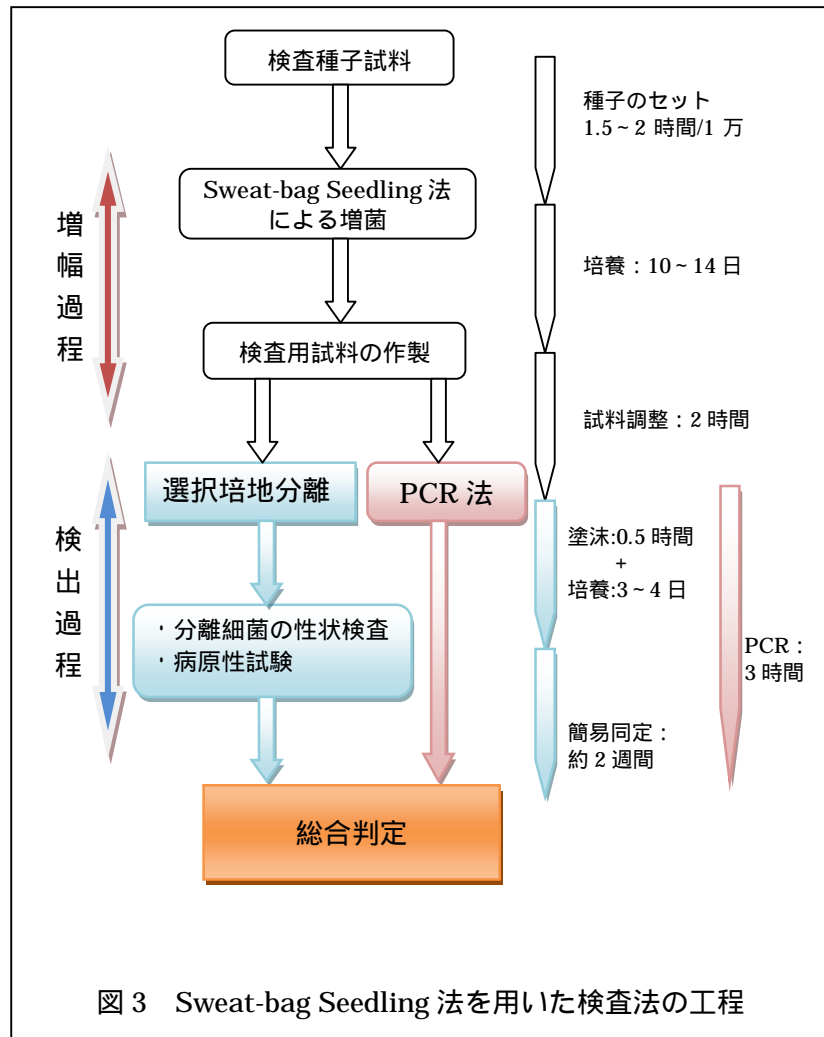


図 3 Sweat-bag Seedling 法を用いた検査法の工程

本法の検出感度は高く、実験的にはスイカ種子では 2cfu/1000 粒の検出感度を確認している。また、自然感染したスイカ及びメロンの汚染種子からも Aac を検出した。本検査法に要する資材は、特殊な資材、試薬を必要とせず、一般的な実験室に使用している物で行うことができ、検査する種子量に応じて柔軟に対応できる。

(1) 必要な機材・消耗品

以下の物品が必要である。

機械・備品類

- 恒温器 (発芽用、28~30 に保てるもの、できれば照明付き)
- エアーポンプ
- マイクロピペット(1000 μl、可変)
- マイクロピペット(200 μl、可変)
- マイクロピペット(20 μl、可変)
- 電気泳動装置
- シュレッダー
- クリーンベンチ
- 恒温器 (細菌培養用、5~50)
- 電子天秤
- ストマッカー
- 微量高速遠心機
- PCR 装置
- トランスイルミネーター
- オートクレーブ

消耗品類

- パット (アルミまたはステンレス製)
- キムタオル (4つ折りタイプ)
- プラスチック板
- ピンセット

- 使い捨て手袋(ビニールまたはゴム製等)
- メスシリンダー(200ml、滅菌)
- メスシリンダー(100、1000ml 程度のもの)
- 1000 μ l チップ (滅菌)
- 1.5ml 容マイクロチューブ
- 白金耳 (細菌移植用)
- ターンテーブル
- ユニパック(L-8、厚さ 0.08mm)
- 木槌
- 200 μ l チップ (滅菌)
- シャーレ(90mm, 滅菌)
- 洗浄瓶 (滅菌可能なもの、PP 製等)
- コーンラージ棒

試薬類

- リン酸水素二ナトリウム・12 水和物 (Na₂HPO₄·12H₂O)
- リン酸二水素カリウム (KH₂PO₄)
- 硫酸アンモニウム ((NH₄)₂SO₄)
- アジピン酸ナトリウム(和光純薬) (和光純薬)
- 硫酸マグネシウム・7 水和物 (MgSO₄·7H₂O)
- 塩化カルシウム・2 水和物 (CaCl₂·2H₂O)
- モリブデン酸ナトリウム・2 水和物 (Na₂MoO₄·2H₂O)
- プロモチモールブルー
- 酵母エキス
- ペプトン
- 精製寒天
- アンピシリン
- シクロヘキシミド
- *Ex Taq*[®] (250U) (TAKARA RR001A)
- エタノール
- アガロース
- TAE (電気泳動用緩衝液、50 倍濃縮液)
- DNA 分子量マーカー(100bp)

(2) 必要な溶液、培地類

1) 0.01M リン酸緩衝液、pH7.4 の作製法

0.01M リン酸水素二ナトリウム(Na₂HPO₄)液

1.4196g の Na₂HPO₄ を蒸留水に溶かし、1,000ml にする。

0.01M リン酸二水素ナトリウム(NaH₂PO₄)液

1.1998g の NaH₂PO₄ を蒸留水に溶かし、1,000ml にする。

pH メータを使用しながら と を混合し、pH を 7.4 に調整する。使用する前に高圧滅菌(オートクレーブ、121、15 分間)しておく。

2) YPA 培地(Yeast Peptone Agar)の作り方

酵母エキス	5g
ペプトン	10 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	4 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
寒天	15 g
蒸留水	1,000 ml (pH 7.0~7.2)

以上の処方では、pH は中性域付近となる。Na₂HPO₄·12H₂O と KH₂PO₄ を添加し

ない場合は pH 調整が必要となる。高圧滅菌(121 , 15 分間)後、約 60 位に冷めたら滅菌シャーレに 10~15ml ずつ分注する。

3) 選択培地の作製法 --- 不完全 AacSM 培地：(白川ら、2000)

[基本培地]

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.5 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0 g
アミノ酸二アミノ酸	10.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	29.0 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	67.0 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	25.0 mg
BTB	12.5 mg
酵母エキス	10.0 mg
寒天	15.0g
蒸留水	1,000 ml

濃縮液を用いた作り方

50 g	} A 液 (20 倍液, 常温保存) 溶解後, 1,000ml にメスアップ
10 g	
40 g	
200 g	} B 液 (20 倍液, 常温保存) 溶解後, 1,000ml にメスアップ
580 mg	
1,340 mg	
500 mg	} C 液 (1,000 倍液, 凍結保存) 0.1N NaOH で溶解後, 100ml にメスアップ。1ml ずつ小分けにして-20 で凍結保存
1,250 mg	
1 g	
 < 作り方 >	
A 液 50 ml	} 混合後, 1,000ml にメスアップ。 寒天 15g を加えて高圧滅菌。その後, 抗生物質を添加する。
B 液 50 ml	
C 液 1 ml	

[抗生物質]

高圧滅菌(121 , 15 分間)後、約 60 に冷めてから添加する。1N の NaOH で pH 7.0 ~ 7.2 に調整する。

アンピシリン 20 mg (20 mg/ml in 0.1N NaOH を 1ml 添加)

シクロヘキシミド 25 mg (25 mg/ml in 0.1N NaOH を 1ml 添加)

[平板培地の作り方]

溶解した寒天培地を滅菌シャーレ(径 9 cm)に 15~20ml ずつ無菌的に注ぎ、そのまま凝固させる。培地が固まったら、蓋を半開きにして培地表面を乾燥させる(季節とクリーンベンチ内の位置にもよるが 10 ~ 20 分程度)。以上の操作の全ては、クリーンベンチ内で行う。

4) PCR プライマー

Aac 用の PCR プライマーとして多くのプライマーが報告されており(Bahar ら、2008 ; Beck ら、2003 ; Cucuzza ら、2008 ; Schaad ら、1999 ; Song ら、2002 ; Walcott ら、2006)、特許がかけられているプライマーについては European Patent Office の esp@cenet 等で参照することができる。当然ながら特許がかけられているプライマーの商業的な利用には許諾が必要である。ここでは、これまで良く使用されてきたプライマーについて説明する。なお、本プロジェクト研究で開発したプライマーの情報は、

論文が出た時点で速やかに公開する予定である。また、その他のプライマー情報はお問い合わせ下さい。

Aac に対する特異性が高いが、US 特許品(Song et al., 2002)

SEQID No 5: 5' - CCTCCACCAACCAATACGCT - 3'

SEQID No 4: 5' - TCGTCATTACTGAATTTCAACA - 3'

Aac の他に他種菌(*Acidovorax avenae* subsp. *avenae* 等)にも反応する。
非特許品(Walcott et al., 2000)。

WFB 1: 5' - GACCAGCCACACTGGGAC - 3'

WFB 2: 5' - CTGCCGTACTCCAGCGAT - 3'

上記いずれのプライマーを用いた場合、下記の温度条件で PCR を行う。

	変性	アニリング	ポリメラーゼ反応
1 サイクル	: 94 , 5 分	56 , 30 秒	72 , 1 分
2 ~ 30 サイクル	: 94 , 30 秒	56 , 30 秒	72 , 1 分
ラストサイクル	: 72 , 8 分	4 ,	

5) PCR 用 premix 液の作り方

試薬	1 試料分	備考
10x <i>Ex Taq</i> Buffer *	2 μ l	TAKARA <i>Ex taq</i> の添付品
MgCl ₂ (25 mM) *	1.2 μ l	TAKARA <i>Ex taq</i> の添付品
dNTPs (各 2.5mM) *	1.6 μ l	TAKARA <i>Ex taq</i> の添付品
Forward プライマー (10 pmol/ μ l)	1 μ l	
Reverse プライマー (10 pmol/ μ l)	1 μ l	
<i>Ex Taq</i> (5U/ μ l) *	0.2 μ l	TAKARA <i>Ex taq</i> の添付品
滅菌蒸留水	12 μ l	






これに試料液 1 μ l を加えて、1 チューブ当たり合計 20 μ l となる。

試料は必ず一番最後に加える。それまでは試料液を扱ってはならない。

実際には、(試料分 +) \times 各試薬の必要量 で premix 液を調製し、チューブ当たり 19 μ l ずつ分注する。

(3) 手順

1) Sweat-bag seedling 法による増菌

1.1.	アルミ製のバット(約 40cm×30cm)にプラスチック板を置き,その上にキムタオルを1枚敷く。シュレッダーで裁断した 35g の細断片を均一に敷き,その上から 0.01M リン酸緩衝液, pH7.4 (PB) 300ml を散水し,均等に湿らせる。	
1.2.	<p>予めイプロジオン水和剤をまぶした供試種子をできるだけ均一に播く。スイカ種子は,表面に発芽抑制物質が存在するので,種子が重ならないように均一に播くことを心がける。この上をキムタオル(1枚)で覆う。</p> <p>このサイズのペーパータオルの場合,検査可能なスイカ及びメロン種子数はおおよそ 1,000 粒とする。カボチャ等の大型の種子は,400~500 粒が適当である。</p>	 
1.3.	プラスチック板を上手に使いながらジッパー付きのポリ袋(ユニパック L-8, 0.08mm 厚)に入れる。エアポンプで空気を注入してポリ袋を膨らませた後,素早くジッパーを閉じる。	
1.4.	ポリ袋を 28~30℃, 12 時間照明下で 10~14 日間静置する。照明は必ずしも必要としない。この間,2~3 日おきにポリ袋内の空気を交換する。交換は,まずポリ袋内の空気を追い出し,3 と同じ手順でポリ袋を膨らませる。	
1.5.	10~14 日間静置後,検査用試料液の作製を行う。ポリ袋内のキムタオルをストマッカーにセットできる大きさに折り畳み,200ml の PB を加える。ポリ袋の上から木槌などでたたいて「実生苗+キムタオル」を薄くする。これを,ストマッカーにセットし,1 分間処理する。	
1.6.	ポリ袋内の液を手で絞り出すようにして集め,マイクロピペットで 1 ml の混和液を 2 本のマイクロチューブ(1.5ml)にそれぞれ取る。これが検出用の試料原液となる。	


2) 選択培地による Aac の分離・検出

2.1.	<p>選択培地(不完全 AacSM 培地)を作製する。</p> <p>[資料 2]に従って作製した選択培地を滅菌シャーレ(径 9 cm)に 15~20ml ずつ無菌的に注ぎ,凝固させる。操作は,クリーンベンチ内で行う。</p>	
------	---	--

2.2.	<p>試料原液を PB で希釈し , 下図に従って $10^3 \sim 10^5$ の希釈液を作製する。</p> <p style="text-align: center;">0.1 ml 0.1 ml 0.1 ml 0.1 ml 0.1 ml</p> <p style="text-align: center;">↪ ↪ ↪ ↪ ↪</p>  <p style="text-align: center;">試料原液 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} ← 0.9 ml PB</p>	クリーンベンチ内での作業
2.3.	<p>試料原液は , 先端がループ状をした白金耳 (または同等品) を使って不完全 AacSM 培地に塗抹する (画線培養)。</p>	<p>クリーンベンチ内での作業</p> 
2.4.	<p>マイクロピペットで $10^3 \sim 10^5$ の希釈液からそれぞれ 0.1 ml ずつ取り , ターンテーブル上の培地中央に滴下する。ターンテーブルを回しながら , L 字型ガラス棒 (コーンラージ棒) で平板上の試料液を均一に拡散塗抹する。</p>	<p>クリーンベンチ内での作業</p> 
2.5.	<p>シャーレを上下逆さまにしてポリ袋に入れ , 口を閉じた後 , $36 \sim 40^\circ\text{C}$ で培養する。 3 ~ 4 日後 , 培地表面に生育する細菌コロニーを観察する。不完全 AacSM 培地で生育する Aac のコロニーは , 円形で丘上 , 平滑で湿光を帯び , 中心が黄緑 ~ 青色で周辺部が淡色を呈する特徴をもつ。</p>	<p>恒温器</p> 
2.6.	<p>Aac と疑わしい細菌が観察された場合 , 白金耳でコロニーを掻き取り , YPA 培地に画線培養する。出現した単コロニーを新しい培地に移して培養し , その後の病原性試験 , 性状試験に用いる。</p>	

3) PCR 法による Aac の検出

3.1.	試料原液 1ml をテストチューブ(1.5ml 容, オートクレーブ滅菌済)にとる。微量高速遠心機にチューブをセットし, 10,000×g, 10 分間遠心する。	
3.2.	チューブの液(上清)をマイクロピペットで完全に吸い取り, 捨てた後, PB を 1ml 加えて沈殿物を溶解する。 使用するマイクロピペットのチップ, PB は, あらかじめオートクレーブで滅菌しておく。	
3.3.	再び, 10,000×g, 10 分間遠心する。マイクロピペットでチューブ内の上清を完全に捨て去った後, 滅菌蒸留水を 100μl 加え, チューブミキサーまたはボルテックスで完全に溶解する。	
3.4.	チューブをチューブラックにセットする。ガスコンロに水を張った鍋を置き, 沸騰させる。この沸騰したお湯にチューブラックを入れ, 15 分間処理する(細菌内部からの DNA の遊離)。	
3.5.	煮沸処理している間, 新しいチューブにポリビニルポリピロリドン(PVPP)を 8~12mg 入れておく。	
3.6.	煮沸処理したチューブを微量高速遠心機にセットし, 10,000×g, 10 分間遠心する。マイクロピペットでチューブ内の上清(DNA が含まれている)を 80 μl とり, PVPP が入ったチューブに移す。チューブ内の液と PVPP をよく混ぜる。 直ちに PCR を行わない場合は, -20 以下で凍結保管する。	
3.7.	1-(2)-4)に従って, PCR 用 premix 液を作製し, これに 3.6. の試料を 1 μl 加えて混和する。軽く遠心した後, サーマルサイクラーにチューブをセットし, PCR を行う。	

3.8.	<p>PCR 後の試料を電気泳動する。泳動後のゲルをエチジウムブロマイドで染色した後、UV を当てて増幅産物の有無を確認する。</p> <p>エチジウムブロマイドは発ガン性物質なので、取り扱いには十分注意すること。</p>	
------	---	---

(4) 本法における注意点

- ・ 本法を適用する場合、種子の処理歴に注意する。過酢酸処理した種子での検出はできるが、銅水和剤で処理した種子からは検出できない。
- ・ Sweat-bag Seedling 法では、1バックあたりに播種する種子量は作物種、種子の大きさによって調整する。

2. その他の方法 1—発芽実生苗の発病を利用した方法

以下の方法は、種子を播いて発病に好適な比較的高温で多湿な条件に保って発病を促し、発病した実生苗を肉眼観察、PCR 法あるいは選択培地法などの方法による診断で判定する方法である。詳細については引用文献を参照して下さい。

(1) Greenhouse grow-out 法

本法は、ガラス室や温室などの施設内の発病好適環境下（高温多湿）で育苗して発病を促し、発現する病徴を指標として判定する検査法である。発病個体は肉眼で診断するほか、Aac の分離、PCR 法等により簡易診断する。現行の検査法の中では信頼性の高いと評価される本法は、海外の主要な種子検査会社で採用されている。しかし、結果を得るまでに長期間を要すること（少なくとも約 3 週間）、広い播種スペースと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、多くの実施上の制約が存在する。また、無発病の感染個体や発芽しない汚染種子が検査漏れになるなど、検査精度が低下する危険性も考えられる。一方、感染しても病徴が軽いウリ科作物が存在するので、作物によっては精度の低下が懸念される。本法の詳細は、アメリカ USDA The National Seed Health System (NSHS)のホームページ上で公開されているので参照されたい。

(2) Sweatbox grow-out 法(Koenraad et al. , 2005)

本法は、透明なプラスチック製の容器に高密度で播種し、高温多湿条件で発芽と発病を促す方法である。Greenhouse grow-out 法と同様に発病を指標として判定する方法だが、発芽した高密度の実生苗が容器内で接触することで発病苗から健全苗への Aac の感染が容易に広がり、発病の有無と判別を容易に行うことができる。発病個体は肉眼で診断するほか、Aac の分離、PCR 法等により簡易診断する。本法は海外の一部の検査会社で採用されている。本法では、検査に必要とする期間や不発芽種子の検査漏れなどの問題の他に、腐生菌

による幼苗の腐敗や Aac 以外の細菌による類似病徴が発生するために判定に苦慮する場合がある。

3. その他の方法 2---種子洗浄法による方法

以下の方法は、種子を滅菌した蒸留水あるいは緩衝液に種子を浸して振盪あるいは超音波処理によって細菌を浮遊させた種子洗浄液から Aac を PCR 法、LAMP 法、DIBA 法によって検出する方法である。検査に必要とする時間は短く、大きな施設等を必要としないのが特徴である。これらの方法では主に種子表面に付着している Aac が検出できるが、種子内部の Aac を検出することは困難だと考えられる。

(1) Immunomagnetic separation-PCR (IMS-PCR) (Walcott et al., 2000, 2006)

種子を PBS 緩衝液中で振盪して得た種子洗浄液を検出試料液とする。抗-Aac 抗体を感作した磁気ビーズで試料液中の Aac 菌体を捕捉し、さらに PCR 法で Aac を検出する検査法である。抗-Aac 抗体を利用することで Aac を特異的に捕捉して濃縮すると共に、試料液に含まれる PCR 反応阻害物質を除去することができる。最初に、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、強力な磁石を用いて磁気ビーズだけを集める。その後、数回洗浄した磁気ビーズを煮沸し、その液を PCR 法に供試する。本法では、1 日で結果を得ることができる。Bahar ら(2008)は本法とリアルタイム PCR 法を用いて汚染率 0.02%のスイカ汚染種子 5,000 粒から Aac を検出したと報告している。

(2) メンブランフィルター免疫染色法(松浦ら、2008)

本法はイネの重要な種子伝染性病害であるもみ枯細菌病菌(*Burkholderia glumae*)のイネ種子からの検出法(小原ら、2003)を Aac 用に改変した方法で、メンブランフィルターと選択培地を用いて Aac を定量的に検出することが可能である。最初に、超音波洗浄機処理によって作製した種子洗浄液をガラス繊維フィルターを通して夾雑物を除去し、その濾過液を 0.45 μm のメンブランフィルターで吸引濾過してフィルター上に細菌を捕捉する。このメンブランフィルターを選択培地(AacSM)の表面にのせて 37 $^{\circ}\text{C}$ で 3 日間培養する。フィルター上に現れた細菌集落を新しい選択培地にスタンプしてその培地を培養すると同時に、スタンプ後のフィルターを DIBA 法にしたがって免疫染色して Aac 集落を識別する。

この方法では、Aac の検出と定量が同時にできると共に、Aac を検出した場合、証拠となる Aac 菌株を分離することが可能で、その後の PCR 法、病原性試験などの簡易同定によって検出結果を確実なものにすることができる。本法では、スイカ種子 1,000 粒を用いた種子洗浄液 100ml 中に Aac が数 cfu 以上存在する場合に、検出することが可能である。

(3) LAMP 法を用いた検出法(大矢ら、2008)

本法は、迅速な検査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。上述のメンブランフィルター免疫染色法と同様にして種子洗浄液を作製、種子洗浄液中の細菌をメンブランフィルターに捕捉します。メンブランフィルター上の細菌を滅菌水に懸濁して、遠心分離により洗浄して最後に細菌濃縮液を調整する。この細菌濃縮液を試料液として LAMP 法により Aac を検出する。LAMP 法は、単一温度で特異的 DNA 断片を増幅する方法であり、複雑な温度管理を必要とせず、反応時間も 1 時間程度と短い点が長所である。本法の検出限界は、スイカ、トウガン、マクワウリの種

子洗浄液を用いた結果、 1×10^3 cfu/ml で PCR 法の 1×10^4 cfu/ml よりも高感度あったと報告されている。

Aac 検出法として LAMP 法は簡便かつ短時間で実施可能なことから、今後、上述した実生苗上での Aac の特異的増殖を利用した方法、実生苗の発病を利用した方法、種子洗浄法による方法で最後に Aac を検出、簡易同定する技術しての利用が期待できる。なお、LAMP 法で市販種子を品質保証を目的として検査する場合、本法の開発元である栄研化学（株）とライセンス契約を締結する必要がある。

4. 種子検査法の選択

表 3 これまでに開発された Aac 種子検査法とその特徴

検査法	種子処理	判定法	菌分離	死菌での陽性反応	検査期間	検出可能な Aac 存在部位
Greenhouse growout assay	播種・育苗	病徴、PCR	可	無	2~3 週	種子内・種皮
Sweatbox grow-out assay	播種・育苗	病徴、PCR	可	無	2~3 週	種子内・種皮
Sweat-bag seedling 法	播種・増菌	選択培地 PCR	可	無	2~3 週	種子内・種皮
IMS-PCR	洗浄液	PCR	不可	有	2 日	種皮*
MF 免疫染色法	洗浄液	選択培地, 血清, PCR	可	無	約 7 日	種皮*
LAMP 法	洗浄液	LAMP	不可	有	2 時間	種皮*

これまでに開発された種子検査法それぞれに長短所がある。その論点は、証拠としての生菌分離の可否、死菌での陽性反応の有無、種皮内 Aac 検出の可否、処理済み種子への適用の可否、必要とする検査期間、検出限界の 6 点である。検出限界を除いた各検査法の特徴を表 3 にまとめた。種子検査を必要とする機関毎に、重要とする論点は異なる。一般的に検査期間が短い検査法は、種子内部の Aac を検出できず、死菌での陽性反応となる可能性が高い。反対に検査期間が長い検査法は種子内部の Aac を検出でき、死菌で陽性反応となる可能性は低い。そのため、検査目的、検査を行う種子の状態、検査に費やせる検査期間、検査精度、検査への投資金額等を勘案して検査方法を選択されたい。

V. 参考文献

- Bahar, O., Efrat, M., Hadar, E., Dutta, B., Walcott, R.R. and Burdman, S. (2008). New subspecies-specific polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citruilli*. Plant Pathology 57:754-763.
- Beck, J., Barnett, C.J., Yarnall, M.S. and Zeitouni, L. (2003). Diagnostics for the detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citruilli*, causal agent of material fruit blotch in melons. US Patent US2003190658.
- Cucuzza, J. and Braum, C.J. (2008). Primers and primer sets for use in methods to detect the presence of *Acidovorax avenae* subsp. *citruilli*. US Patent 7319005.
- Dutta, B., Genzlinger, L.L. and Walcott, R.R. (2008). Localization of *Acidovorax avenae* subsp.

- citrulli* (Aac), the bacterial fruit blotch pathogen in naturally infested watermelon seed. *Phytopathology* 98:S49.
- Fessehaie, A., Hopkins, D., Gitaitis, R., Langston, D. and Walcott, R. (2005) Role of honey bees in watermelon seed infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Phytopathology* 95:S29.
- 原 一晃・氷上涼子・島津樹一・白川 隆(2006). ウリ科野菜の果実汚斑細菌病に対する銅水和剤と有機酸の混合処理ならびに過酢酸処理の種子消毒効果. 関西病虫研報 48: 57-60.
- Hopkins, D.L., and Thompson, C.M. (2003). Wet seed treatment with peroxyacetic acid for the control of bacterial fruit blotch and other seedborne diseases of watermelon. *Plant Dis.* 87: 1495-1499.
- Koenraadt, H, Borst, R., van Vliet, A., Hoekstra, M., van Schie and J., Buimer, M. (2005). Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* with the sweatbox method. *Phytopathology* 95:962.
- Lessl, J. T., Fessehaie, A., Walcott, R. R.(2007). Colonization of female watermelon blossoms by *Acidovorax avenae* ssp *citrulli* and the relationship between blossom inoculum dosage and seed infestation. *J. Phytopathology* 155: 114-121.
- 松浦貴之・白川 隆・佐藤仁敏・井上康宏・畔上耕児(2003) . メンブレンフィルター免疫染色法を利用したスイカ種子からのスイカ果実汚斑細菌病菌の検出と分離 . 日植病報 74:153-156 .
- 小原達二・安達直人・畔上耕児 (2003). メンブレンフィルター・免疫染色法によるイネ種子からののみ枯細菌病菌の高感度定量検出 . 日植病報 69:309-310 .
- 大矢仁志・中川寛章・齋藤範彦・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 .
- Rane, K.K. and Latin, R.X. (1992) Bacterial fruit blotch of watermelon: Association of pathogen with seed. *Plant Dis.* 76: 509-512.
- 佐藤仁敏・白川 隆・松浦貴之・田城保夫 (2003). スイカおよびメロン種子における実生苗を利用した*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*増菌検出法 . 日植病報 72:311-312 .
- Schaad, N.W. Song, W.Y. Hatziloukas, E. (1999). PCR primers for detection of plant pathogenic species and subspecies of *Acidovorax*. US Patent 6146834.
- Shepherd, L.M. and Block, C.C. (2009). Long-term survival and seed transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in melon and watermelon seed. *Phytopathology* 99: S199.
- 白川 隆・會澤雅夫・小宮友紀子・我孫子和雄(2000) . 種子 , 植物体からの *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* の分離・検出を目的とした選択培地の開発 . 日植病報 66: 132 .
- 白川 隆・小宮友紀子・我孫子和雄 (2003). 汚染種子および汚染種子由来スイカ苗における *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* の動態. 日植病報. 69: 102-106.
- Song, W., Kim, H. and Schaad N.W. (2002). PCR Primers for detection and identification of Plant pathogenic species, subspecies, and strains of *Acidovorax*. US Patent 6423499.

鈴木輝子・佐藤仁敏・山内智史・大矢仁志・松浦貴之・白川 隆(2008)新しい特異的PCRプライマーとポリビニルポリピロリドンを用いた果実汚斑細菌病菌検出法の改良．日植病報 74:42．

Walcott, R. R., Gitaitis, R. D. and Castro, A. C. (2003). Role of blossoms in watermelon seed infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Phytopathology* 93: 528-534.

Walcott, R.R. and Gitaitis, R.D. (2000). Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 84: 470-474.

Walcott, R.R., Castro, A.C., Fessehate, A. and Ling, K. (2006). Progress towards a commercial PCR-based assay for *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Seed Science and Technology* 34: 101-116.

本マニュアルは、下記のプロジェクト研究の成果を中心に作成しました。

新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業

「ウリ科野菜果実汚斑細菌病の日本への侵入・定着防止技術の開発」

研究年度：平成18～20年度

参画機関：(独)農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所

(独)種苗管理センター、

北海道立花・野菜技術センター、

茨城県農業総合センター 園芸研究所

長野県野菜花き試験場

カネコ種苗(株)

(株)サカタのタネ

タキイ種苗(株)

ナント種苗(株)

行政対応特別研究

「スイカ果実汚斑細菌病の防除技術の開発」

研究年度：平成11～13年度

実施機関：(独)農業技術研究機構 野菜茶業研究所

本誌から転載、複製する場合は、
当研究所の許可を得て下さい。

問い合わせ先

野菜茶業研究所 TEL 059-268-4626 FAX 059-268-3124