

事業名：平成28年度輸出種苗病害検査手法実用化促進

委託事業報告書

農研機構 種苗管理センター、中央農業研究センター、野菜花き研究部門

事業内容
次のⅠからⅣに掲げる種子伝染性病害に係る検査手法を実用化し、その手法をマニュアル化すること。 Ⅰ. メロンのスカッシュモザイクウイルス病 (<i>Squash mosaic virus</i>: 以下「SqMV」という。) 検査手法の実用化 1) 種子磨砕 ELISA 法によるメロン種子の SqMV 検査手法を実用化すること。 2) 以下の項目を含む「メロン種子のスカッシュモザイクウイルス病検査手法マニュアル」を作成すること。 ・ 検査試料供試数量 ・ 検査方法の詳細 (検査工程、処理方法、必要な資材名、温度設定、必要日数、診断方法等) ・ 病害鑑定方法の詳細 (観察方法、診断方法、試験方法等) Ⅱ. レタスのレタスモザイクウイルス病 (<i>Lettuce mosaic virus</i>: 以下「LMV」という。) 検査手法の実用化 1) 種子磨砕 ELISA 法によるレタス種子の LMV 検査手法を実用化すること。 2) 以下の項目を含む「レタス種子のレタスモザイクウイルス検査手法マニュアル」を作成すること。 ・ 検査試料供試数量 ・ 検査方法の詳細 (検査工程、処理方法、必要な資材名、温度設定、必要日数、診断方法等) ・ 病害鑑定方法の詳細 (観察方法、診断方法、試験方法等) Ⅲ. ダイコンの黒腐病 (<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>) 検査法の実用化 1) 選択培地法によるダイコン種子の黒腐病検査手法を実用化すること。 2) 以下の項目を含む「ダイコン種子のダイコン黒腐病検査手法マニュアル」を作成すること。 ・ 検査試料供試数量 ・ 検査方法の詳細 (検査工程、処理方法、必要な資材名、温度設定、必要日数、診断方法等) ・ 病害鑑定方法の詳細 (観察方法、診断方法、試験方法等)

IV. キャベツの黒斑病 (*Alternaria brassicae*) 検査手法の実用化

- 1) 凍結プロッター法によるキャベツ種子の黒斑病検査手法を実用化すること。
- 2) 以下の項目を含む「キャベツ種子のキャベツ黒斑病検査手法マニュアル」を作成すること。
 - ・ 検査試料供試数量
 - ・ 検査方法の詳細（検査工程、処理方法、必要な資材名、温度設定、必要日数、診断方法等）
 - ・ 病害鑑定方法の詳細（観察方法、診断方法、試験方法等）

I メロンのスカッシュモザイクウイルス病（以下「SqMV」という。）検査手法の実用化

1. 種子摩砕 ELISA 法によるメロン種子からの SqMV 検出

【目的】

種子摩砕 ELISA 法によるメロン種子からの SqMV 検出手法の最適化を図る。

【調査方法】

1) 供試したメロン種子

汚染種子：H27 年度の本事業により種苗管理センターが作出した SqMV 罹病種子（汚染種子率 68.1%、品種：アンデス）を用いた。

健全種子：種苗管理センターで管理する健全メロン種子（品種不詳）を用いた。

2) 種子摩砕試料の調製

①条件検討のための小容量試料の調製

汚染種子 1 粒と健全種子 9 粒を混合した試料を複数ロット準備し、種子の総重量を測定する。各ロット毎に破碎装置（マルチビーズショッカー、安井器械社製）で摩砕し、種子総重量の 10 倍量の抽出緩衝液を加えて攪拌、低速遠心し 5 分間以上静置する。上清を後述する ELISA に供試し、SqMV の陽性が明瞭に確認されたロットを混和、均一化して汚染種子試料の原液とした（汚染種子率 1/10 に相当）。健全種子のみのロットを上と同様に摩砕抽出して得られる健全試料原液を用いて、汚染種子試料原液を希釈することで、汚染種子率が 1/50、1/100、1/200、1/300 に相当する試料を調製し、条件検討に供試した。

②サブサンプルサイズ（100 粒）試料の調製

International Rules for Seed Testing 2016 7-026（以下 ISTA マニュアル）に記載されている最大サブサンプルサイズ 100 粒単位の検査を想定した試験を実施した。

汚染種子 1 粒と健全種子 99 粒を混合した試料を複数ロット準備し総重量を測定する。各ロット毎にマルチビーズショッカーで摩砕し、種子磨砕物から 0.5g を採取し 5ml の抽出緩衝液を加える（ISTA マニュアル記載の手法）、あるいは、摩砕に用いたチューブに種子総重量の 10 倍量の抽出緩衝液を加えて攪拌し、低速遠心後の上清を ELISA に供試した。

③陽性対照試料

SqMV の ELISA による検出の陽性対照には、種苗管理センターから提供された SqMV 感染メロン葉を乳鉢で摩砕し、抽出緩衝液を加えて 50 倍希釈（ml/g）になるように調製した SqMV 感染粗汁液を用いた。

3) ELISA 法

広く市販されている 3 種の抗体（検出キット）及び 2 種の ELISA 検出用マイクロプレートについて（表 1、2）、検出感度及び非特異反応の有無等の性能比較を行い、より確度の高い検査結果が得られる組合せを検討した。ELISA 法については、ISTA マニュアルに記載されているプロトコルに準じて行ない、1 ウエルあたりの容量、一次抗体（コーティング液）および酵素標識抗体（コンジュゲート液）の希釈倍率については用いる抗体・キット等のプロトコルに従った。検出結果については、目視およびマイクロプレートリーダー（BIO-RAD 社 model-680）による吸光度測定により評価した。

表 1. 供試した ELISA 用抗体・キット

製造元（品番）	抗体・キット名
Agdia Inc. (SRA 26400/0500)	Regent Set for Squash mosaic virus
日本植物防疫協会	スカッシュモザイク検定試薬（DAS-ELISA 用セット）
BIOREBA AG (1609215, 160925)	coating IgG (160915)、conjugate (160925)

表 2. 供試したマイクロプレート

製造元（品番）	商品名
NUNC (439454)	NN イムノプレート検定付 マキシマ (60) / Nunc-Immuno™ Plate I
住友ベークライト (MS-8896F)	ELISA 用プレート H（検定書付）

【結果】

・抗体（検出キット）の比較

供試した 3 種抗体・キットの中で、Agdia 社製のものが最も感度が高く、サブサンプルサイズを 300 粒に想定した濃度（汚染率 1/300）に調製した種子磨砕試料からも、基質添加後 2 時間以内に、安定して健全試料（ブランク補正無し）の 2.5 倍以上の吸光度が得られ、概ね目視による判別も可能であった。一方、日本植物防疫協会及び BIOREBA 社の抗体・キットでは汚染率 1/10 を想定した濃度では陽性判別が可能であったが、1/50 以下の汚染率の試料では陽性判別が困難であった。また、いずれの抗体・キットを用いた場合でも非特異反応は見られなかった（表 3）。

表 3. 抗体・検査キットの比較

		1/10	1/50	1/100	1/200	1/300	陽性対照	健全対照	ブランク
Agdia	test1*1	1.35	0.72	0.46	0.26	0.20	1.95	0.06	0.06
	test2*2	2.06	0.97	0.68	0.42	0.29	2.31	0.06	0.06
日植防	test1	0.22	0.13	0.12	0.12	0.12	0.37	0.11	0.11
	test2	0.20	0.08	0.08	0.07	0.07	0.57	0.07	0.06
BIOREBA	test1	0.27	0.15	0.13	0.12	0.12	0.45	0.12	0.11
	test2	0.27	0.09	0.08	0.07	0.07	0.94	0.06	0.06

基質添加2時間後の吸光度（2ウエルの平均値）

*1 マイクロプレートは住友ベークライト社製、1 ウエルあたりの容量はAgdiaが100 μ l、他は200 μ l

*2 マイクロプレートはNUNC社製、1 ウエルあたりの容量はAgdiaに合わせ全て100 μ lとした。

・マイクロプレートの比較

試料、抗体・キット等を同一の条件にして比較したところ、NUNC 社製の高結合能タイプ（最大 650ng/cm $\div$ 618ng/ウエル）を使用した際の吸光度は、住友ベークライト社製の H タイプ（400ng/ウエル）を使用した際の吸光度より 10～30%程度高く、特に汚染率が低い試料で差が大きい傾向が見られた。また、両者のマイクロプレートのいずれにも非特異反応は認められず、Agdia 社製の抗体・キットを用いた SqMV の ELISA 検出には特段の支障がないことが確認された。

表 4. マイクロプレートの比較

		1/10	1/50	1/100	1/200	1/300	健全対照	ブランク
test1	NUNC	2.10	1.12	0.71	0.45	0.32	0.06	0.05
	住友	1.76	0.95	0.60	0.35	0.25	0.05	0.05
	比率*1	120%	118%	119%	128%	129%	102%	—
test2	NUNC	2.06	0.97	0.68	0.42	0.29	0.07	0.06
	住友	1.80	0.87	0.56	0.31	0.21	0.05	0.06
	比率	115%	112%	121%	132%	137%	126%	—

基質添加2時間後の吸光度（2ウエルの平均値）

*1 NUNC社製プレート使用時の吸光度／住友ベークライト社製プレート使用時の吸光度

・サブサンプルサイズ（100 粒）磨砕試料から ELISA 検出

検定用試料（汚染種子 1 粒と健全種子 99 粒を混和）及び健全試料（健全種子 100 粒）から磨砕試料を調製した。容量 50ml の破砕チューブにメロン種子 100 粒（約 3g）とメタルコーンを入れ、マルチビーズショッカーによる磨砕（2,000rpm、15 秒×2cycle）を 4 回繰り返すことで、均一化したペースト状の磨砕試料が得られた。4 回以上繰り返した場合磨砕試料が強く押し固められるなどして、その後の試料採取や抽出工程に難があった。

磨砕試料から 0.5g を採取し 5ml の抽出緩衝液を加えて十分に攪拌し、低速遠心（1,000rpm、1 分）後、5 分間静置した上清を ELISA 検定用試料とした。なお、磨砕試料の均一性を確認するために、同じ磨砕試料から 0.5g を 4 点採取し、各 1 ウエルずつに ELISA に供試した。その結果、同一試料から採取した 4 点の試料間には吸光度にバラツキは少なく、マルチビーズショッカーによってほぼ均一に磨砕されていることが確認された。

表5 サブサンプルサイズ（100粒）磨砕試料のELISA結果（1）

試料A ^{*1}	試料B ^{*1}	試料C ^{*1}	健全対照 ^{*1}	試料A（分注） ^{*2}
0.200±0.02	0.565±0.03	0.053±0.00	0.052±0.00	0.224±0.01

基質添加2時間後の吸光度の平均値（各 4 ウエル）及び標準偏差

* 1 試料から0.5g試料×4ロット採取し、各 1 ウエルずつ供試

* 2 試料Aの一つのロットを 4 ウエルに分注

ISTA マニュアルでは磨砕試料から 0.5g 採取し 5ml の抽出緩衝液を加えて試料調製するとされているが、手順の簡略化と磨砕試料の不均一等のリスク回避の観点から、マルチビーズショッカーによる磨砕後、磨砕に用いたチューブに種子全重量の 10 倍容の抽出緩衝液を加えて試料調製し ELISA に供試した。その結果、0.5g 試料の採取工程を省略しても、ELISA による SqMV 検出には問題ないと考えられた。また、調製した試料を -20℃で保存した場合、吸光度は若干低下する傾向が見られた（表 6）。

サブサンプルサイズ磨砕試料の SqMV 検出結果は、汚染種子の汚染率と比較して妥当なものと考えられたが、種子の汚染程度にはかなりばらつきが見られるため、汚染程度が低い場合を考慮すると、判定のための吸光度測定は ISTA マニュアル通り、2 時間後が望ましいと考えられた（表 5、6）。

表6 サブサンプルサイズ（100粒）磨砕試料のELISA結果（2）

試料	A	B	C	D	E	F	G	H	陽性対照	陰性対照
test1 1時間後	0.20	0.79	0.71	0.26	0.10	0.16	0.21	0.07	1.48	0.05
*1 2時間後	0.35	1.48	1.36	0.47	0.16	0.27	0.36	0.09	2.64	0.06
test2 1時間後	0.15	0.75	0.68	0.20	0.10	0.12	0.17	0.06	1.33	0.05
*2 2時間後	0.25	1.35	1.21	0.34	0.14	0.20	0.29	0.07	2.34	0.05

基質添加 1 及び2時間後の吸光度（2ウエルの平均値）、陰性対照の2.5倍以上を陽性と判断

* 1 試料調製後、速やかにELISAを行なった。陰性対照はブランク

* 2 試料調製後、冷凍保存した試料を4日後に融解しELISAに供試した。陰性対照は健全種子試料

Ⅱ．レタスのレタスモザイクウイルス病（以下 LMV という。）検査

手法の実用化

1． ELISA 法による LMV の検出

【目的】

ISF ルールのプロトコルに基づき、レタス種子からの直接検出の場合には 500 粒を、また発芽培養処理後の検出では 100 粒を 1 つのサブサンプルとして扱っている。LMV を確実に検出できるか、抗血清の選抜・検査集団の大きさについて検討した。

【調査方法】

1－1）：LMV 検出に用いる抗血清、並びに ELISA プレーートの選抜

① 以下の 4 種の抗血清の検出感度を比較した。

1: LOEWE、2: Agdia、3: DMSZ、4: Bioreba

比較には LMV 感染レタス葉 0.5g に 5ml の摩砕バッファーを添加し、本液を原液とし 10 倍ずつ段階希釈し $10^0 \sim 10^{-4}$ の 5 段階の希釈系列を作製し、検出感度を比較した。またレタス種子をサンプルとした場合の非特異的反応の有無を確認するため、同時に健全レタス種子の摩砕液を供試した。なお、本試験ではマイクロプレートはスミトモベークライトを使用した。

② の試験でもっとも高感度であった抗血清を用い、スミトモベークライト及び Nunc Maxisorp の 2 種で比較した。

1－2）：レタス種子からの検出

① 供試 LMV 感染種子

LMV 感染種子率約 0.1% のレタス種子を用いた。なお、以降の試験は本汚染種子を用いた。

② 試料の調製

・種子からの直接検出

LMV 感染種子は、感染率が 0.1% と極めて低率であることから、感染種子の特定がほぼ不可能であった。そのため、感染種子を含むレタス種子を 100 粒、300 粒、500 粒、700 粒、1,000 粒をそれぞれカウントし、本試験では 5 反復行い検出率を比較した。

・発芽培養処理した種子からの検出

上記の種子からの直接検出の場合と同様に、感染種子を含むレタス種子を 100 粒、300 粒、500 粒それぞれカウントし、本試験では 5 反復行い検出率を比較した。

③ ELISA 法

ELISA 用の試料調製は ISF のプロトコルに従って行った。上記②の種子からの直

接検出の場合には摩砕バッファー5mlを加え、マルチビーズショッカーを用い 2,000 rpm で 60 秒間摩砕し、その後 3,000×g で 3 分間遠心分離し、その上澄み液をマイクロプレートに分注後、4℃で一晩静置した。一方、発芽培養処理した種子からの検出では、100 粒では 1ml の摩砕バッファーを、300 粒及び 500 粒の場合では、上清を得ることが困難であるため 5ml の摩砕バッファーを加え乳鉢で摩砕し上澄み液をマイクロプレートに分注後、4℃で一晩静置した。ELISA は 1－1) によって選抜した LOEWE の抗血清並びにマイクロプレートは Nunc Maxisorp を用い、添付された手順書に従って行った。基質添加 2 時間後の吸光値 (A415nm) を測定した。

【結果】

ISF プロトコルにおける判定方法は、健全区の吸光値が健全区の 2 倍以上を陽性と判定した。4 種の抗血清間の検出感度を比較した結果、LOEWE の抗血清が最も高く、次に Agdia、Bioreba、DMSZ の順で検出感度が低下した (表 1)。また、マイクロプレートの比較では、検出感度は同等であったが、Nunc Maxisorp がスミトモベークライトよりも約 20%程度吸光値が高く、健全区及びブランクにおける吸光値は低く維持された (表 2)。

表 1. 4 種の LMV 検出用抗血清の検出感度比較結果

抗体販売メーカー	希釈系列					健全レタス種子	BLANK
	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴		
LOEWE	1.711/1.678	1.257/1.184	0.779/0.790	0.294/0.267	0.205/0.247	0.187/0.158	0.134/0.129
AGDIA	0.202/0.201	0.164/0.122	0.093/0.063	0.060/0.063	0.052/0.065	0.049/0.051	0.044/0.043
DMSZ	0.144/0.144	0.116/0.120	0.094/0.093	0.087/0.087	0.085/0.090	0.103/0.101	0.088/0.088
BIOREBA	0.911/0.973	0.356/0.363	0.151/0.147	0.105/0.107	0.103/0.124	0.101/0.097	0.092/0.096

表 2. 2 種の ELISA プレート間の検出感度比較結果

ELISAプレート	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	健全レタス種子	BLANK
スミトモベークライト	1.713/1.709	1.021/1.029	0.695/0.694	0.183/0.193	0.127/0.123	0.106/0.104	0.094/0.094
Nunc Maxisorp	2.018/2.018	1.236/1.274	0.845/0.839	0.204/0.215	0.127/0.131	0.101/0.101	0.095/0.095

2. 種子からの LMV の直接検出

ISF プロトコルでは、種子 500 粒をサブサンプルとしており、この種子数の他に 100 粒、300 粒、700 粒、1000 粒のサブサンプルを準備して 5 反復実施し、検出率を比較した。その結果、ISF プロトコルに記載される陽性基準を健全区の吸光値の 2 倍とした場合には、反復区によって吸光値に差はあるが全ての試験区で陽性と判断できた (表 3)。なお、種子摩砕時の種子の摩砕程度は、500 粒まではほぼ種子の形状が確認

されない程度まで摩砕ができていたが、700 粒以上では磨砕できないまま残る種子が目立ち、種子の磨砕は 500 粒以下で有効と考えられた（図 1）。

表 3. 種子からの直接検出による LMV 検出結果

サブサンプルサイズ (粒)	1	2	3	4	5	LMV感染葉	健全種子	BLANK
100	0.225/0.230	0.221/0.237	0.410/0.405	0.270/0.270	0.212/0.220	2.441/2.392	0.101/0.103	0.103/0.076
300	0.408/0.449	0.256/0.283	0.575/0.549	0.250/0.225	0.266/0.247			
500	0.327/0.339	0.340/0.347	0.399/0.415	0.507/0.501	0.331/0.347			
700	0.394/0.382	0.402/0.396	0.366/0.376	0.375/0.383	0.347/0.369			
1000	0.366/0.366	0.329/0.334	0.381/0.376	0.571/0.577	0.347/0.369			

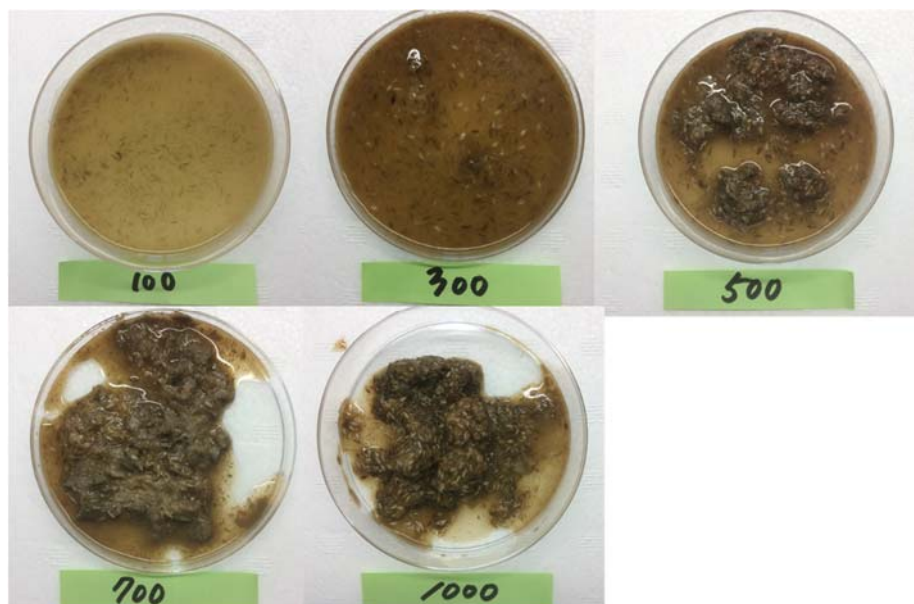


図 1. 各サブサンプルサイズの摩砕処理後の磨砕程度

3. 発芽培養処理した種子からの LMV 検出

ISF プロトコルでは、種子 100 粒をサブサンプルとなっており、この種子数の他に 300 粒、500 粒のサブサンプルを準備して 5 反復実施し、検出率を比較した。その結果、健全区の吸光値の 2 倍の吸光値を陽性とした場合、100 粒区では 5 反復中 4 反復で検出され 300 粒区では、5 反復中 2 反復、500 粒区では、5 反復中 2 反復で検出された。

表 4. 発芽培養処理した種子からの LMV 検出結果

サブサンプルサイズ (粒)	1	2	3	4	5	LMV感染葉	健全種子	BLANK
100	0.552/0.542	0.109/0.112	0.585/0.630	0.425/0.672	0.362/0.402	1.169/1.219	0.106/0.105	0.118/0.125
300	0.125/0.123	0.123/0.135	0.252/0.256	0.132/0.123	0.460/0.452	1.325/1.053	0.106/0.107	0.106/0.106
500	0.413/0.390	0.179/0.173	0.134/0.150	0.147/0.140	0.165/0.153			

【考察】

以上の結果から、検定に使用する抗血清は LOEWE 社製のものが最も検出感度が高く、当抗血清を採用することが有効と考えられた。また、マイクロプレートは、Nunc Maxisorp が住友ベークライトに比べ吸光値が 20%程度高くなり、健全区でも吸光値の上昇がみられなかったことが Nunc Maxisorp を採用し、LOEWE 社製の抗血清を用いることが最適と判断した。

レタス種子からの直接検出では、種子摩砕後の摩砕液をそのままマイクロプレートに添加した場合、プレート表面に種子組織が付着し非特異的反応が生じたため、摩砕後遠心分離工程を加えることにより、種子組織の混入の無い上清液を得ることができ非特異的反応を抑制することができた。それゆえ、摩砕処理後には、遠心分離工程を加えることにした。

レタス種子からの直接検出の場合には、ISF プロトコルに記載されるサブサンプルサイズ 500 粒を含めた 100～1000 粒のサブサンプルサイズを試し、いずれの試験区においても陽性と判断できる吸光値となったが、サブサンプルサイズが 300 粒以下の場合には種子の破砕効率は高く、検出を安定させられると考えられた。しかしながら、各試験共に吸光値の上昇は陽性と判断できる下限に近く、種子からの直接検出では擬陽性との区別が困難なケースが生じることが懸念される結果であった。

一方、発芽培養処理後の種子からの検出では ISF プロトコルに記載されるサブサンプルサイズ 100 粒の場合に最も検出率が高く、サブサンプルサイズを拡大させると検出率が低下した。また、発芽培養処理した場合には吸光値は、種子からの直接検出の場合に比べて高く、明瞭に陽性/陰性を判断することができた。

以上から、レタス種子からの LMV 検出には、サブサンプルサイズを 100 粒とし発芽培養処理後の種子から検出した場合がもっとも LMV 検定に最適と考えられる。

Ⅲ. ダイコンの黒腐病 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)

検査手法の実用化

1. 種子洗浄液量の検討

【目的】

ISTA ルールではアブラナ属野菜の黒腐病（病原：*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xcc*）の検査の際、種子 1,000 粒に 10 ml の割合で種子洗浄液を用いる。しかし、ダイコン種子はアブラナ属野菜種子と比べ大きく、吸水量も多いため、同じ割合では十分に種子が洗浄されない。そこで、ダイコン種子に適当な種子洗浄液量を検討する。

【調査方法】

1) 種子の分類

ダイコン種子は品種による大きさのばらつきが大きい。市販のダイコン 50 品種について、種子の 100 粒重を測ったところ、最小が 0.77 g、最大が 2.58 g、平均が 1.43 g であった。そこで、100 粒重が 1 g 未満のものを小粒、1 g 以上 2 g 未満のものを中粒、2g 以上のものを大粒と分類した（図 1）。

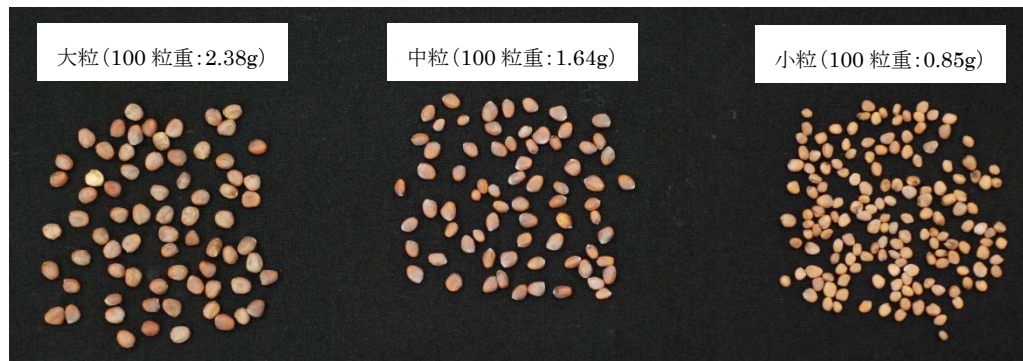


図 1 ダイコン種子の大きさ

2) 種子洗浄液量違いによる *Xcc* 検出数の差

種子洗浄液量の違いにより *Xcc* の検出数に変化があるか検証した。ポリ袋にダイコン種子 100 粒と、洗浄液（0.85%滅菌生理食塩水+0.02%Tween20）を 1.3 ml、1.8 ml 及び 2.8 ml 加えた区を設けた。各区に約 6×10^4 CFU (Colony Forming Unit) /ml に調整した *Xcc* 懸濁液を 0.2 ml 加え 125 r.p.m.、室温で振とうした。2.5 時間後、洗浄液の 10 倍希釈液を FS 培地及び mCS20ABN 培地に 100 μ l 塗布し、30℃で 3 日間培養した後、培地上に出現した *Xcc* のコロニーをカウントした。大粒、中粒及び小粒で同様の実験を行った。

3) 適当な種子洗浄液量の検討

大粒及び中粒については、100 ml 容フラスコに種子 1,000 粒を入れ、洗浄液を種子 1g 当たり 1.75 ml、2 ml、2.25 ml、2.5 ml 加えた区を設けた。小粒種子については、同様に 2 ml、2.25 ml、2.5 ml、2.75 ml の洗浄液を加えた区を設けた。これらを 125rpm、室温で振とうした。2.5 時間後、洗浄液の残量とフラスコ内の種子の動きを観察し、適当な種子洗浄液量を検証した。

【結果】

1) 種子洗浄液量の違いによる *Xcc* 検出数の差

結果を表 1 に示す。いずれの場合も、液量が少ないほど *Xcc* の検出が多かった。

2) 適当な種子洗浄液量の検討

種子 1 g 当たり、大粒では 2 ml 以上、中粒では 2.25 ml 以上、小粒では 2.5ml 以上の洗浄液を加えた区で、振とう後でも種子全体が液中で動き、洗浄が十分であると思われた。前述のように、液量が少ない方が検出される *Xcc* が多いことから、洗浄液量は種子 1 g 当たり、大粒は 2 ml、中粒で 2.25 ml、小粒で 2.5 ml が適当であると思われる。

表1 種子洗浄液量の違いによる*Xcc*の検出数

	洗浄液 (ml) + <i>Xcc</i> 懸濁液 (ml)					
	1.3+0.2		1.8+0.2		2.8+0.2	
	FS	m CS20ABN	FS	m CS21ABN	FS	m CS22ABN
大粒	148.0	122.5	126.5	107.5	82.5	76.5
中粒	115.5	96.0	96.0	75.0	57.5	55.0
小粒	149.5	130.0	110.5	91.0	88.5	57.0

数値は2反復の平均

2. 種子洗浄法によるサンプルからの *Xcc* の検出

【目的】 上述 1. により定めた種子洗浄液量で、汚染種子からの *Xcc* の検出が可能であるか検証する。

【調査方法】

1) 人工汚染種子の作出

約 10^7 CFU/ml に調整した *Xcc* (MAFF302027) 懸濁液に、ダイコン種子を 45 分間浸漬した後、風乾して作出した。この人工汚染種子の保菌数は約 10~1,000 CFU/粒、平均は約 180 CFU/粒であった。保菌数は、300 μ l の洗浄液に 1 粒の人工汚染種子を入れ、ボルテックスミキサーでしっかりと混和した後、FS 培地に希釈平板培養することで算出した。

2) 種子洗浄法によるサンプルからの *Xcc* の検出

大、中、小粒のダイコン種子各 1,000 粒に人工汚染種子を 1 粒ずつ混入させた。

これらを各々100 ml 容フラスコに入れ、125 r.p.m.、室温で2.5時間振とうした。洗浄液量は上述のとおりとした。振とう後、洗浄液100 µlをFS及びmCS20ABN培地各3枚に塗布し、30℃で培養した。3日後、培地を観察し、*Xcc*が検出されるかを確認した。大、中、小粒それぞれ8反復行った。

【結果】

結果を表2に示す。1サンプル(1,000粒)の汚染度は計算上、平均0.18 CFU/粒と推測され、これは現在実施しているアブラナ属野菜の黒腐病検査の検出限界である0.15 CFU/粒と同等であった。本実験から、この程度の汚染度では、大、中、小粒とも、FS及びmCS20ABN培地の2種類を使用し、少なくとも各2枚ずつ塗布すれば、どちらかの培地ではば*Xcc*を検出できると思われた。大粒と中粒で2枚ずつの塗布では検出できない可能性がある区が1つつあったが、これは、本実験で使用した人工汚染種子の保菌数に幅があったため、検出限界以下の保菌数であったことが原因だと推測された。

表2 *Xcc*が検出された培地の枚数

培地名		反復							
		①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
大粒	FS	1 /3	1 /3	3 /3	1 /3	2 /3	1 /3	3 /3	3 /3
	mCS20ABN	2 /3	1 /3	3 /3	3 /3	2 /3	2 /3	3 /3	3 /3
中粒	FS	3 /3	3 /3	1 /3	3 /3	3 /3	2 /3	3 /3	3 /3
	mCS20ABN	3 /3	3 /3	0 /3	3 /3	3 /3	2 /3	2 /3	3 /3
小粒	FS	3 /3	3 /3	0 /3	3 /3	3 /3	3 /3	3 /3	3 /3
	mCS20ABN	3 /3	2 /3	2 /3	3 /3	3 /3	3 /3	3 /3	3 /3

3. 接種用植物の検討

【目的】

病原性試験に適した接種用植物を検討する。

【調査方法】

接種原としてMAFF302027及びMAFF106771(いずれもダイコン分離菌株)を供試した。常法[International Seed Testing Association (2017) International Rules for Seed Testing, Edition2017, Annexe to Chapter 7: Seed Health Testing Methods, 7-019a 参照]に従って供試菌株をダイコン4品種(味づくり、冬だより、春甘及び夏みどり)及びキャベツ1品種(来陽)の幼苗に2株ずつ接種し、2週間後に発病度を評価した。発病度は0~4の指数により算出した。

【結果】

結果を表3に示す。いずれの供試菌株も、キャベツ(来陽)において最も高い発病度を示した。また、ダイコンよりもキャベツの幼苗上の方が、*Xcc*による典型的な

病徴である葉脈の黒変、壞疽がはっきりと観察された（図 2、図 3）。これらのことから、病原性試験にはキャベツ（来陽）が適すると思われた。

表 3 Xcc各菌株に対する接種植物の発病度

作物名	供試品種	各菌株に対する発病度 ^{a)}		平均発病度
		M AFF302027	M AFF106771	
ダイコン	味づくり	50.0	62.5	56.3
	冬だより	62.5	50.0	56.3
	春甘	75.0	75.0	75.0
	夏みどり	75.0	75.0	75.0
キャベツ	来陽	100.0	100.0	100.0

$$a) \text{発病度} = \frac{\sum (\text{各病度} \times \text{株数})}{\text{供試株数} \times 4} \times 100$$



図 2 接種後 2 週間のキャベツ (来陽) の病徴 (接種菌株:MAFF302027)



図 3 接種後 2 週間のダイコン (春甘) の病徴 (接種菌株:MAFF302027)

IV. キャベツの黒斑病 (*Alternaria brassicae*) 検査手法の実用化

1. キャベツの黒斑病 (*Alternaria brassicae*) の人工汚染種子の作出

【目的】

キャベツ種子に黒斑病菌を接種して人工汚染種子を作出し、検査手法及び病害鑑定方法の検討に用いる。

【調査方法】

1) 供試品種：大御所、冬将軍

2) 供試菌株：*Alternaria brassicae* (MAFF2407910)

3) 供試菌株の培養

供試菌株を V8 寒天培地 (8% V8 ジュース、0.9g/L CaCO₃、1.8% 寒天) 20℃、BLB ライト 12 時間照明/12 時間暗黒で 3 週間培養し、分生子形成を確認した。

4) 供試品種への接種

V8 寒天培地で培養した供試菌株の菌叢より菌体を白金時でかき取り、滅菌蒸留水に懸濁してガーゼでろ過した後、分生子数を 1.0×10^4 個/ml に調整した。調整した液に 0.02% Tween 20 を添加し、各供試種子を加えて 15 分間、室温で振とうした。各供試種子は、前処理として 1% 次亜塩素酸ナトリウムで表面殺菌した区と無殺菌の区を設けた。振とう後、クリーンベンチ内で風を送りながら乾燥させた。

【結果】

作出した人工汚染種子は、2. 凍結ブロッター法の条件の検討において汚染種子数を確認した。

2. 凍結ブロッター法の条件の検討

【目的】

通常ブロッター法を用いると、種皮及び発芽苗上に形成される分生子を実体顕微鏡で垂直的に観察しなければならず、判定に多大の労力を要する。そこで、ISTA ルールで用いられている凍結ブロッター法を本病害に適用するため、凍結処理後から判定までの培養日数について検討を行った。

【調査方法】

3) 供試種子：1 で作出した人工汚染種子 (大御所 (表面殺菌区)、大御所 (無殺菌区)、冬将軍 (表面殺菌区)、冬将軍 (無殺菌区))

4) 供試粒数：400 粒 (直径 9cm のシャーレに 25 粒置床、16 反復)

5) 置床資材：滅菌蒸留水で湿らせた 3 枚のろ紙をシャーレに設置

6) 凍結までの培養条件：20℃、暗黒、24 時間 (平成 26 年度輸出種苗病害検査手法

実用化促進委託事業「キャベツの黒すす病検査手法の実用化」の調査結果より、凍結前の培養日数を 24 時間とした。）

7) 凍結処理：-20℃、24 時間

8) 凍結処理後の培養条件：20℃、BLB ライト 12 時間照明／12 時間暗黒

9) 凍結処理後の培養日数：5、6、7 及び 8 日間

【結果】

黒斑病菌確認種子を判定した結果、各供試種子共に、凍結後の培養日数が 7 及び 8 日間で同一の汚染種子数を示した（表 1）。ただし、7 日間では透明な分生子や分生子形成途中で分生子数が少ない種子も確認されたため、確実な判定を行うには、成熟した色素を有する分生子がほぼ全て観察される 8 日間の培養が良いと思われた（図 1）。

黒斑病菌は種子上及び種子を置いたろ紙近傍に分生子を形成したのみで、隣の種子への広がり確認されなかった。このことから、直径 9cm のシャーレに 25 粒の種子を置床する方法で検査できるものと思われた。

また、各無殺菌区において、種子表面に雑菌が繁殖する中でも黒斑病菌の分生子は他の *Alternaria* 属菌等と比べて大柄なため、判定は可能であった（図 2）。

表 1. 凍結ブロッター法の培養日数と黒斑病菌検出種子数

人工汚染種子 品種	反復	黒斑病菌確認種子数 (%)			
		5 日目	6 日目	7 日目	8 日目
大御所 表面殺菌区 ^{a)}	実験 1	35 (8.8%) ^{c)}	86 (21.5%)	140 (35.0%)	140 (35.0%)
	実験 2	48 (12.0%)	72 (18.0%)	101 (25.3%)	101 (25.3%)
	実験 3	34 (8.5%)	77 (19.3%)	117 (29.3%)	117 (29.3%)
	平均	39 (9.8%)	78.3 (19.6%)	119.3 (29.8%)	119.3 (29.8%)
大御所 無殺菌区 ^{b)}	実験 1	40 (10.0%)	52 (13.0%)	54 (13.5%)	54 (13.5%)
	実験 2	43 (10.8%)	56 (14.0%)	63 (15.8%)	63 (15.8%)
	実験 3	39 (9.8%)	48 (12.0%)	53 (13.3%)	53 (13.3%)
	平均	40.7 (10.2%)	52.0 (13.0%)	56.7 (14.2%)	56.7 (14.2%)
冬将軍 表面殺菌区	実験 1	11 (2.8%)	28 (7.0%)	34 (8.5%)	34 (8.5%)
	実験 2	9 (2.3%)	16 (4.0%)	28 (7.0%)	28 (7.0%)
	実験 3	5 (1.3%)	10 (2.5%)	24 (6.0%)	24 (6.0%)
	平均	8.3 (2.1%)	18.0 (4.5%)	28.7 (7.2%)	28.7 (7.2%)
冬将軍 無殺菌区	実験 1	79 (19.8%)	99 (24.8%)	104 (26.0%)	104 (26.0%)
	実験 2	45 (11.3%)	79 (19.8%)	86 (21.5%)	86 (21.5%)
	実験 3	45 (11.3%)	56 (14.0%)	64 (16.0%)	64 (16.0%)
	平均	56.3 (14.1%)	78.0 (19.5%)	84.7 (21.2%)	84.7 (21.2%)

a) 1.0% 次亜塩素酸ナトリウムで種子表面を殺菌後、黒斑病菌を接種した。

b) 種子表面の殺菌を行わず、黒斑病菌を接種した。

c) 供試種子数：400 粒

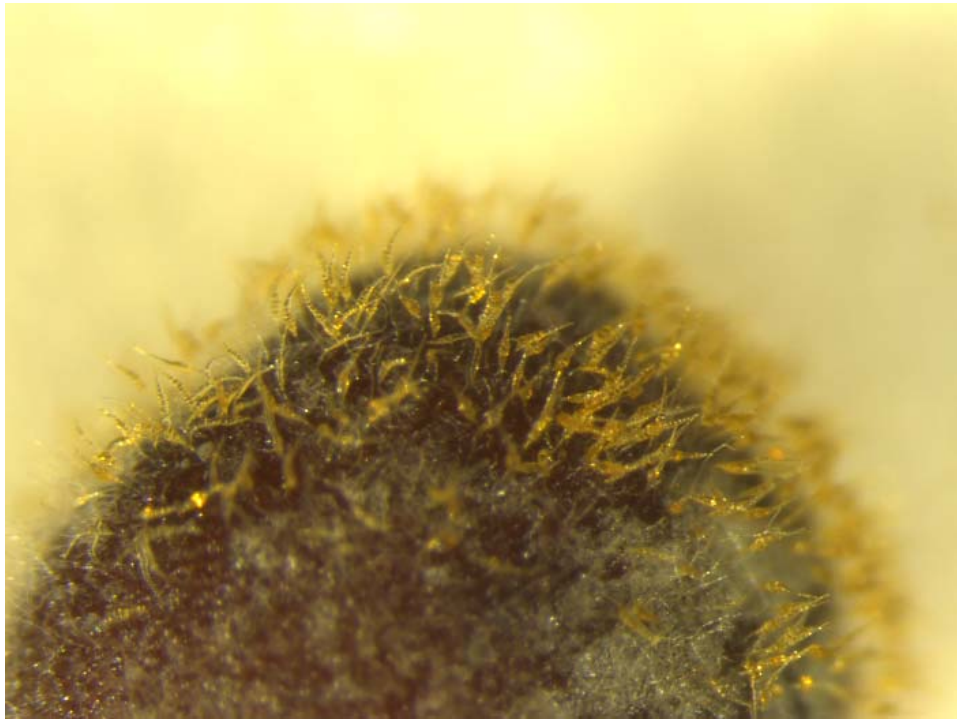


図 1．培養 8 日目の黒斑病菌確認種子

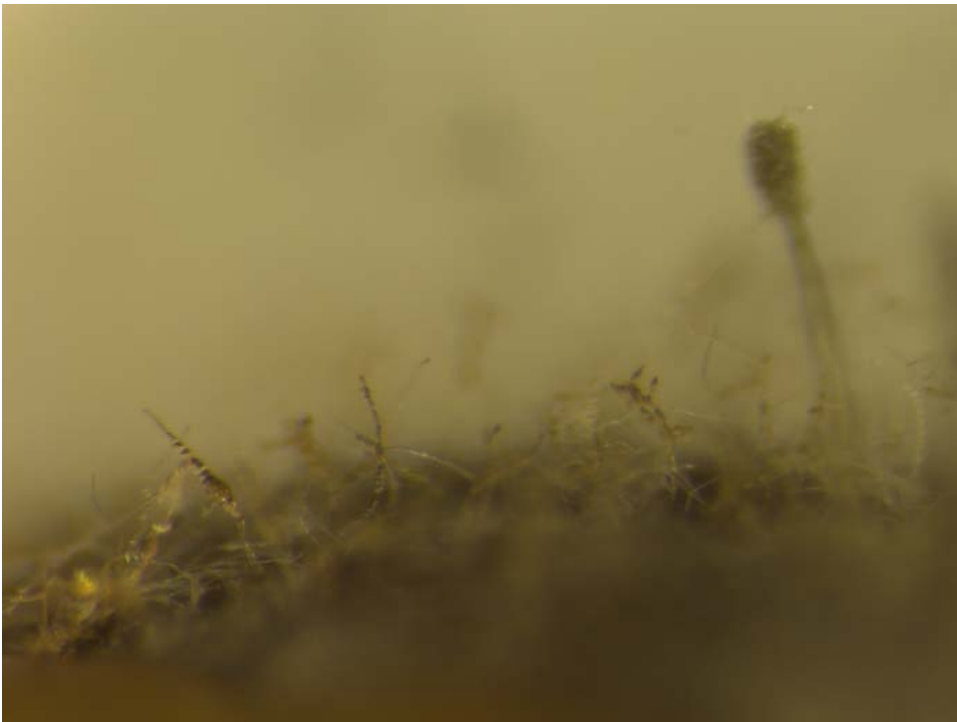


図 2．黒斑病菌の分生子と雑菌の大きさ比較

3. 凍結ブロッター法、2,4-D ブロッター法及びマルト培地法による比較

【目的】

ISTA ルールに記載されている糸状菌の種子検査には、凍結ブロッター法の他に、2,4-D ブロッター法及びマルト培地法が利用されている。凍結ブロッター法とこれらの方法について比較した。

【調査方法】

- 1) 供試種子：1 で作出した人工汚染種子（大御所（表面殺菌区）、大御所（無殺菌区）、冬将軍（表面殺菌区）、冬将軍（無殺菌区））
- 2) 供試粒数：400 粒（直径 9cm のシャーレに 25 粒置床、16 反復）
- 3) 各方法：以下の通り
 - ・凍結ブロッター法
上記 2 の結果を用いた。
 - ・2,4-D ブロッター法
0.2%の 2,4-D 溶液で湿らせた 3 枚のろ紙をシャーレに設置し、種子を置床後、20℃、BLB ライト 12 時間照明／12 時間暗黒で培養し、5、6、7 及び 8 日後に判定した。
 - ・マルト培地法
マルト培地に種子を置床し、20℃、BLB ライト 12 時間照明／12 時間暗黒で培養し、5、6、7 及び 8 日後に判定した。

【結果】

3 種の検出法を比較した結果、凍結ブロッター法と 2,4-D ブロッター法では黒斑病菌を検出した種子数はほぼ同じであり、同等の能力を有することが判明した（表 2）。一方、マルト培地法では培地上に雑菌が蔓延し、黒斑病菌の判定は困難であった（表 3、図 3）。以上の結果を表 4 にまとめた。

2,4-D ブロッター法は、ISTA ルールでキャベツの根朽病菌（*Phoma lingam*）の検査法として記載されているが、現在、薬剤を使用しない凍結ブロッター法への改定するため、認証試験が予定されている。このことを考慮し、黒斑病の検査は凍結ブロッター法を適用するのがよいものと思われた。

表 2. 2,4-D ブロッター法の培養日数と黒斑病菌検出種子数

人工汚染種子 品種	反復	黒斑病菌確認種子数 (%)			
		5 日目	6 日目	7 日目	8 日目
大御所 表面殺菌区 ^{a)}	実験 1	47 (11.8%) ^{c)}	103 (25.8%)	122 (30.5%)	122 (30.5%)
	実験 2	47 (11.8%)	97 (24.3%)	118 (29.5%)	118 (29.5%)
	実験 3	35 (8.8%)	73 (18.3%)	100 (25.0%)	100 (25.0%)
	平均	43.0 (10.8%)	91.0 (22.8%)	113.3 (28.3%)	113.3 (28.3%)
大御所 無殺菌区 ^{b)}	実験 1	35 (8.8%)	71 (17.8%)	82 (20.5%)	82 (20.5%)
	実験 2	36 (9.0%)	65 (16.3%)	78 (19.5%)	78 (19.5%)
	実験 3	31 (7.8%)	45 (11.3%)	66 (16.5%)	66 (16.5%)
	平均	34.0 (8.5%)	60.3 (15.1%)	75.3 (18.8%)	75.3 (18.8%)
冬将軍 表面殺菌区	実験 1	2 (0.5%)	6 (1.5%)	27 (6.8%)	27 (6.8%)
	実験 2	2 (0.5%)	6 (1.5%)	26 (6.5%)	26 (6.5%)
	実験 3	3 (0.8%)	8 (2.0%)	23 (5.8%)	23 (5.8%)
	平均	2.3 (0.6%)	6.7 (1.7%)	25.3 (6.3%)	25.3 (6.3%)
冬将軍 無殺菌区	実験 1	53 (13.3%)	63 (15.8%)	71 (17.8%)	71 (17.8%)
	実験 2	33 (8.3%)	49 (12.3%)	68 (17.0%)	68 (17.0%)
	実験 3	45 (11.3%)	61 (15.3%)	75 (18.8%)	75 (18.8%)
	平均	43.7 (10.9%)	57.7 (14.4%)	71.3 (17.8%)	71.3 (17.8%)

a) 1.0% 次亜塩素酸ナトリウムで種子表面を殺菌後、黒斑病菌を接種した。

b) 種子表面の殺菌を行わず、黒斑病菌を接種した。

c) 供試種子数：400 粒

表 3. マルト培地法の培養日数と黒斑病菌検出種子数

人工汚染種子 品種	反復	黒斑病菌確認種子数 (%)			
		5 日目	6 日目	7 日目	8 日目
大御所 表面殺菌区 ^{a)}	実験 1	判定不可 ^{c)}	判定不可	判定不可	判定不可
	実験 2	判定不可	判定不可	判定不可	判定不可
	平均	—	—	—	—
大御所 無殺菌区 ^{b)}	実験 1	判定不可	判定不可	判定不可	判定不可
	実験 2	判定不可	判定不可	判定不可	判定不可
	平均	—	—	—	—
冬将軍 表面殺菌区	実験 1	判定不可	判定不可	判定不可	判定不可
	実験 2	判定不可	判定不可	判定不可	判定不可
	平均	—	—	—	—
冬将軍 無殺菌区	実験 1	判定不可	判定不可	判定不可	判定不可
	実験 2	判定不可	判定不可	判定不可	判定不可
	平均	—	—	—	—

a) 1.0% 次亜塩素酸ナトリウムで種子表面を殺菌後、黒斑病菌を接種した。

b) 種子表面の殺菌を行わず、黒斑病菌を接種した。

c) 雑菌が培地上に増殖し、判定が困難であった。



図3 マルト培地法の培養5日目
左：大御所（表面殺菌区）、右：冬将軍（無殺菌区）

表4. 3種の方法による黒斑病菌検出種子数の比較

人工汚染種子 品種	培養8日目の黒斑病菌確認種子数（％）		
	凍結プロッター法	2,4-D プロッター法	マルト培地法
大御所 表面殺菌区 ^{a)}	119.3 (29.8%) ^{c)}	113.3 (28.3%)	判定不可 ^{d)}
大御所 無殺菌区 ^{b)}	56.7 (14.2%)	75.3 (18.8%)	判定不可
冬将軍 表面殺菌区	28.7 (7.2%)	25.3 (6.3%)	判定不可
冬将軍 無殺菌区	84.7 (21.2%)	71.3 (17.8%)	判定不可

a) 1.0% 次亜塩素酸ナトリウムで種子表面を殺菌後、黒斑病菌を接種した。

b) 種子表面の殺菌を行わず、黒斑病菌を接種した。

c) 供試種子数 400 粒で行った試験の 3 反復の平均種子数（％）。

d) 雑菌が培地上に増殖し、判定が困難であった。

マニュアル（案）

- 1 メロン種子のスカッシュモザイクウイルス病検査手法マニュアル（案）
- 2 レタス種子からのレタスモザイクウイルス病検査手法マニュアル（案）
- 3 ダイコン種子のダイコン黒腐病検査手法マニュアル（案）
- 4 キャベツ種子のキャベツ黒斑病検査手法マニュアル（案）

1 メロン種子のスカッシュモザイクウイルス病検査手法マニュアル（案）

メロン種子のスカッシュモザイクウイルス病検査

ア. 対象作物：メロン

イ. 病原体：*Squash mosaic virus*（SqMV）

ウ. 検査試料：9,400 粒又は 2,000 粒（依頼者の要望に応じて）

エ. 前 処 理：なし

オ. 方 法：種子 ELISA 法

検査種子を 100 粒のサブサンプルに分け、それぞれ破砕装置（マルチビーズショッカー等）で粉砕する。種子粉砕物 0.5g に対して抽出緩衝液を 5ml 加えてよく混和し、低速遠心後、5 分以上静置する。得られた上清液を ELISA 法で調べる。

カ. 判 定：ELISA 法で陽性反応が認められたものを陽性と判定する。

検査の手順

病原ウイルス：*Squash mosaic virus* (SqMV)

対象作物：メロン

病名：スカッシュモザイク病

方法：ELISA 法

検査種子数：9,400 粒又は 2,000 粒（依頼者の要望に応じて）

I. 検査の概略

1. ELISA 用試料の調製

種子を粉砕して抽出緩衝液を加え、よく混和してから、低速遠心や静置により清澄化し、その上清液を検査用試料とする。

2. ウイルス検定

上清液を ELISA 法で検査する。

【準備する器具等】

- 種子粉砕装置（マルチビーズショッカー等）
- マイクロプレートリーダー
- マイクロピペット
- マイクロピペット用チップ
- 抗血清及びコンジュゲイト
- 遠心機
- 冷凍庫
- 冷蔵庫（4℃）
- 恒温器（37℃）
- イオン交換蒸留装置
- pHメーター
- 電子天秤

II. 検査方法

1. 種子上の標徴

- 1.1. 汚染種子の標徴はない。

2. ELISA

2.1. ELISA 実施に当たって

ELISA 法は 100 μ l /well 系の DAS-ELISA 法で実施する。ただし、キット化された製品を使用する場合は、その製品のプロトコルに従って実施する。

2.2. マイクロプレートのコーティング

- 2.3.1 抗SqMV-IgGをコーティング用緩衝液で適正な濃度に希釈し、各wellに100 μ l ずつ分注する。
- 2.3.2 マイクロプレートを37℃で4時間、または4℃で一晩インキュベートする。
- 2.3.3 well内の液物を捨て、PBS-Tweenでマイクロプレートを3回以上洗浄する。
- 2.3.4 コーティング処理したマイクロプレートは直ちに使用するか、またはwell内を空にした後に-20℃で保存する。

2.3. 検査試料の作製

- 2.3.1 抽出緩衝液を準備する。
- 2.3.2 検査種子を100粒のサブサンプルに分ける。
- 2.3.3 サブサンプルごとにマルチビーズショッカーで粉碎し、種子粉碎物の0.5gをチューブに取り、5mlの抽出緩衝液を加えてよく混和する。1,000 rpm, 1分程度の低速遠心により夾雑物を沈殿させた後、さらに5分間以上静置し、その上清液を試料とする。上清液は混和した後4時間以内に使う。
- 2.3.4 コントロールとして用いる健全及び汚染種子も、同様にして粉碎物の上清液を作製する。

2.4. 磨砕汁液のインキュベーション

- 2.4.1 コーティング処理を行ったマイクロプレートに検査試料、陽性及び健全コントロールを100 μ l/well分注する。
- 2.4.2 マイクロプレートを4℃で一晩インキュベートする。

2.5. コンジュゲイトのインキュベーション

- 2.5.1 インキュベート後、PBS-Tweenでマイクロプレートを最低3回以上洗浄する。
- 2.5.2 適正濃度のコンジュゲイト液を作製し、100 μ l/well分注する。
- 2.5.3 マイクロプレートを湿室状態に保ち、37℃で3時間、または4℃で一晩インキュベートする。

2.6. 基質の投入

- 2.6.1 マイクロプレートのwell内の液を捨て、PBS-Tweenでマイクロプレートを3回以上洗浄する。
- 2.6.2 基質緩衝液を用いて基質溶液を作る。

2.6.3 洗浄後、直ちに基質溶液を 100μl/well に分注し、室温で静置する。

2.6.4 基質液投入後、1 時間及び 2 時間後（及び適する時間）にマイクロプレートリーダー（A405nm）で吸光値を測定する。この際、陽性試料及び健全試料が正常に反応しているかどうか、確認する。もし、いずれかのコントロール試料、もしくは両コントロール試料が正常な反応を示さない場合、検査をやり直す。

2.7. 判定

得られた吸光値を次式によって判定する。健全試料の平均値 $\overline{X}$ を 2.5 倍する。この計算値より高い吸光値を示す試料を陽性と判定する。

$$2.5 \times \overline{X}$$

注）使用する IgG によっては、健全の吸光値がブランク値とほぼ同じ値を示すことがある。この場合は、経験をもとにした適切な判定基準を設ける。

3. 操作上の注意点

- 各緩衝液は 4℃で保存する。
- 各ステップの間や洗浄後のマイクロプレートは、乾燥させないようにすること。
- 洗浄：洗浄操作は、非特異反応やバックグラウンドを低減させるための重要なポイントであり、しっかり行うこと。
- インキュベーションする時は、well 内液の蒸発を最小限に抑えるため、マイクロプレートは蓋をし、湿室条件を保つこと。
- ELISA では抗血清の品質が最も重要であるため、信頼性の高い抗血清を使用すること。

Ⅲ. 評価

検出法及び検出された病原の学名、検査したサブサンプル数に対する陽性サブサンプル数について報告する。

IV. 緩衝液

コーティング用緩衝液

1.59 g Na_2CO_3 , 2.93 g NaHCO_3 を 1,000ml の蒸留水に溶解後, pH 9.6 に調整する。

PBS-Tween緩衝液 (PBS-Tween)

まず、0.1M PBSを作り、5倍希釈して0.02M PBS-Tweenを調製する。

[0.1M PBS]

NaCl	40.0 g
KH_2PO_4	1.0 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	14.5 g
KCl	1.0 g
NaN_3	1.0 g

溶解後, 1,000mlにメスアップする。

[0.02M PBS-Tween, pH7.4 : PBS-Tween]

0.1M PBを蒸留水で5倍に希釈。

Tween 20を 0.5ml/1,000ml加える。

抽出緩衝液

NaCl	8.0 g
KH_2PO_4	1.0 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	14.5 g

を約850mlの蒸留水に溶解し、さらに

Oxalbumine (Grade II)	2.0 g
Tween 20	10.0 ml
PVP (mol wt. 10000)	20.0g

を加えて溶解した後、蒸留水で全量を 1,000ml にする。

基質用緩衝液

850 ml の蒸留水に 97 ml のジエタノールアミンを加え, HCl (f.e. 36.8%) で pH 9.8 に調整する。蒸留水で全量を 1,000ml にする。

2 レタス種子のレタスモザイクウイルス病検査手法マニュアル（案）

検査の工程

ウ. 対象作物：レタス

エ. 病原体：*Lettuce mosaic virus* (LMV)

ウ. 検査試料：(依頼者の要望に応じて)

種子からの直接検出の場合：10,000 粒

発芽培養処理した種子の場合：2,000 粒

エ. 前 処 理：

種子からの直接検出の場合：無し

発芽培養処理した種子の場合：発芽用育苗箱にろ紙をセットし、折り目に 100 粒ずつ置床し、ろ紙に十分な水分を浸透させる。その後、2 日間、暗黒 15℃で静置する。2 日後、10ml の水を追加した後、4 日間、照明（900lux, 8 時間：明条件）下に移す。これらの発芽処理後に種子を摩砕する。

オ. 方 法：ELISA 法

種子からの直接検出の場合：

検査種子を 300 粒のサブサンプルに分け、摩砕バッファー（PBS・Tween）を 5ml 加えて、乳鉢で磨砕又は摩砕機（例：安井器械、マルチビーズショッカー）で 2,000 rpm で 1 分間摩砕し、その後 3,000×g 以上、3 分間室温で遠心分離し、上清液を ELISA 検定に用いる。

発芽培養処理した種子の場合：

100 粒のサブサンプルに摩砕バッファー（PBS・Tween）を 1 ml 加えて、乳鉢で磨砕又は摩砕機（例：安井器械、マルチビーズショッカー）で 2,000 rpm で 1 分間摩砕し、その後 3,000×g 以上、3 分間室温で遠心分離し、上清液を ELISA 検定に用いる。

カ. 判 定：ELISA 法で陽性反応が認められたものを陽性と判定する。

検査の手順

病原ウイルス：*Lettuce mosaic virus* (LMV)

対象作物：レタス

病名：レタスモザイク病

方法：ELISA 法

検査種子数：(依頼者の要望に応じて)

種子からの直接検出の場合：10,000 粒

発芽培養処理した種子の場合：2,000 粒

I. 検査の概略

1. ELISA 用試料の調製

種子からの直接検出の場合：

検査種子を 300 粒のサブサンプルに分け、摩砕バッファを 5ml 加えて、乳鉢で磨砕又は摩砕機（例：安井器械、マルチビーズショッカー）で 2,000 rpm で 1 分間摩砕し、その後 3,000×g、3 分間室温で遠心分離し、上清液を ELISA 検定に用いる。

発芽培養処理した種子の場合：

発芽培養処理した種子の場合：発芽用育苗箱にろ紙をセットし、折り目に 100 粒ずつ置床し、ろ紙に十分な水分を浸透させる。その後、2 日間、暗黒 15℃で静置する。2 日後、10ml の水を追加した後、4 日間、照明（900lux, 8 時間：明条件）下に移す。これらの発芽処理後に幼苗および根を摩砕する。各サブサンプルに摩砕バッファを 1 ml 加えて、乳鉢で磨砕又は摩砕機（例：安井器械、マルチビーズショッカー）で 2,000 rpm で 1 分間摩砕し、その後 3,000×g 以上、3 分間室温で、遠心分離し上清液を ELISA 検定に用いる。

2. ウイルス検定

上清液を ELISA 法で検査する。

【準備する器具等】

- 種子粉碎装置（例えばミル等）
- マイクロプレートリーダー
- マイクロピペット
- マイクロピペット用チップ
- 抗血清及びコンジュゲイト
- 冷凍庫

- 冷蔵庫 (4℃)
- 恒温器 (15℃) ※発芽培養用
- 恒温器 (37℃)
- イオン交換蒸留装置
- pHメーター
- 電子天秤

II. 検査方法

1. 種子上の標徴

- 1.1. 汚染種子の標徴はない。

2. ELISA

2.1. ELISA 実施に当たって

ELISA 法は 180 μ l/well 系の DAS-ELISA 法で実施する。ただし、キット化された製品を使用する場合は、その製品のプロトコルに従って実施する。

2.2. マイクロプレートのコーティング

- 2.2.1 抗LMV-IgGをコーティング用緩衝液で適正な濃度に希釈し、各wellに180 μ lずつ分注する。
- 2.2.2 マイクロプレートを37℃で4時間、または4℃で一晩インキュベートする。
- 2.2.3 well内の液物を捨て、PBS-Tweenでマイクロプレートを3回以上洗浄する。
- 2.2.4 コーティング処理したマイクロプレートは直ちに使用するか、またはwell内を空にした後に-20℃で保存する。

2.3. 検査試料の作製

- 2.3.1 PBS-Tween を準備する。
- 2.3.2 検査種子を直接検出の場合 300 粒のサブサンプルに分ける。
- 2.3.3 種子からの直接検出の場合：

検査種子を 500 粒のサブサンプルに分け、摩砕バッファーを 5ml 加えて、乳鉢で磨砕又は摩砕機（例：安井器械、マルチビーズショッカー）で 2,000 rpm で 1 分間磨砕し、その後 3,000 $\times g$ 以上、3 分間室温で、遠心分離し上清液を ELISA 検定に用いる上清液は混和した後 4 時間以内に使う。

発芽培養処理した種子の場合：

発芽培養処理した種子の場合：発芽用育苗箱にろ紙をセットし、折り目に 100 粒ずつ置床、ろ紙に十分な水分を浸透させる。その後、2 日間、暗黒 15℃で静置する。2 日後、10ml の水を追加した後、4 日間、照明（900lux, 8 時間：明条件）下に移す。これらの発芽処理後に種子を摩砕する。検査種子を 100 粒のサブサンプルに分け、摩砕バッファーを 1 ml 加え

て、乳鉢で磨砕又は摩砕機（例：安井器械、マルチビーズショッカー）で 2,000 rpm で 1 分間摩砕し、その後 3,000×g 以上、3 分間室温で、遠心分離し上清液を ELISA 検定に用いる。

- 2.3.4 コントロールとして用いる健全及び汚染種子も、同様にして粉碎物の上清液を作製する。

2.4. 磨砕汁液のインキュベーション

- 2.4.1 コーティング処理を行ったマイクロプレートに検査試料、陽性及び健全コントロールを 180 μl/well 分注する。

- 2.4.2 マイクロプレートを 4℃で一晩インキュベートする。

2.5. コンジュゲイトのインキュベーション

- 2.5.1 インキュベート後、PBS-Tween でマイクロプレートを最低 3 回以上洗浄する。

- 2.5.2 適正濃度の LMV-コンジュゲイト液を作製し、180 μl/well 分注する。

- 2.5.3 マイクロプレートを湿室状態に保ち、37℃で 3 時間、または 4℃で一晩インキュベートする。

2.6. 基質の投入

- 2.6.1 マイクロプレートの well 内の液物を捨て、PBS-Tween でマイクロプレートを 3 回以上洗浄する。

- 2.6.2 基質緩衝液を用いて基質溶液を作る。

- 2.6.3 洗浄後、直ちに基質溶液を 180 μl/well に分注し、室温で静置する。

- 2.6.4 基質液投入後、1 時間及び 2 時間後（及び適する時間）にマイクロプレートリーダー（A415nm）で吸光値を測定する。この際、陽性試料及び健全試料が正常に反応しているかどうか、確認する。もし、いずれかのコントロール試料、もしくは両コントロール試料が正常な反応を示さない場合、検査をやり直す。

2.7. 判定

得られた吸光値を次式によって判定する。健全試料の平均値（ $\overline{X}$ ）を 2.0 倍する。この計算値より高い吸光値を示す試料を陽性と判定する。

$$2.0 \times \overline{X}$$

注）使用する IgG によっては、健全の吸光値がブランク値とほぼ同じ値を示すことがある。この場合は、経験をもとにした適切な判定基準を設ける。

3. 操作上の注意点

- 各緩衝液は4℃で保存する。
- 各ステップの間や洗浄後のマイクロプレートは、乾燥させないようにすること。
- 洗浄：洗浄操作は、非特異反応やバックグラウンドを低減させるための重要なポイントであり、しっかり行うこと。
- インキュベーションする時は、well 内液の蒸発を最小限に抑えるため、マイクロプレートは蓋をし、湿室条件を保つこと。
- ELISA では抗血清の品質が最も重要であるため、信頼性の高い抗血清を使用すること。

Ⅲ. 評価

検出法及び検出された病原の学名，検査したサブサンプル数に対する陽性サブサンプル数について報告する。

IV. 緩衝液

コーティング用緩衝液

1.59 g Na_2CO_3 , 2.93 g NaHCO_3 を 1,000ml の蒸留水に溶解後, pH 9.6 に調整する。

PBS-Tween緩衝液 (PBS-Tween)

まず、0.1M PBSを作り、5倍希釈して0.02M PBSに調製する。

[0.1M PBS]

NaCl	40.0 g
KH_2PO_4	1.0 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	14.5 g
KCl	1.0 g
NaN_3	1.0 g

溶解後, 1,000mlにメスアップする。

[0.02M PB, pH7.4 : PBS-Tween]

0.1M PBを蒸留水で5倍に希釈。

Tween 20を 0.5ml/1,000ml加える。

基質用緩衝液

850 ml の蒸留水に 97 ml のジエタノールアミンを加え, HCl (f.e. 36.8%) で pH 9.8 に調整。蒸留水で全量を 1,000ml にする。

3 ダイコン種子のダイコン黒腐病検査手法マニュアル (案)

ダイコン黒腐病

病原菌：*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

ア. 査 試 料： 30,000 粒

イ. 前 処 理： なし

ウ. 方 法： 洗浄液培養法。10,000 粒のサブサンプルに分け、各サブサンプルに Tween 20 加用滅菌生理食塩水を加えて振とう洗浄する。洗浄液の原液、10 倍希釈液及び 100 倍希釈液を黒腐病菌選択培地に塗布する。

エ. 培 養： 30℃で 3～4 日間培養する。

オ. 鑑 定： 肉眼あるいは低倍率の実体顕微鏡下でコロニーを観察する。黒腐病菌は、デンプン加水分解によるハローを伴った、黄色（培地によっては薄緑色）で光沢のある粘性コロニーを形成する。このようなコロニーが認められたら、YDC 培地上でコロニー形態を調査し、対象作物の幼苗へ接種を行う。YDC 培地で粘性があり、黄色色素を産生するもののうち宿主植物に対し病原性が認められたものを黒腐病菌とする。

病 原 体 : *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Synonym : *Bacillus campestris* Pammel

Pseudomonas campestris (Pammel) E.F.Smith

Bacterium campestris (Pammel) Chester

Phytomonas campestris (Pammel) Bergey

対象作物 : ダイコン

病 名 : 黒腐病

方 法 : 洗浄培養法 (ISTA 規定法改変 : International Rules for Seed Testing, Edition 2007. 7-019)

検査種子数 : 30,000 粒

I. 準備する器具・機器等

参照菌株	... 参照菌株または他の適当な材料
資 材	... 三角フラスコ (1,000 ml 又は 500ml)
培養土	... キセキ培養土等
コニカルチューブ	... 滅菌済み
ペトリ皿	... 径 9 cm の消毒済みプラスチック製ペトリ皿
振とう機	... 回転数 120 rpm
恒温培養器 (庫)	... 30±2℃
冷凍庫	... -20±2℃
マイクロピペット	... 1,000 µl, 200µl
その他	... ○ピンセット ○70%エタノール ●滅菌生理食塩水 ●爪楊枝 等

注) ●は滅菌済みまたはオートクレーブで滅菌 (121℃, 20 分間) したものをを用いる

II. 検査方法

1. 接種用植物の準備

1.1 培養土に播種後, 9cm のポリ鉢に 2 本移植する。本菌に対して感受性であるキャベツの品種を選んで用いる。「来陽」が接種に適する。

1.2 本葉 3 ~ 4 葉期になるまで害虫の発生に注意しながら育苗する。

2. 種子洗浄液の調製

2.1 無作為に 30,000 粒の種子を選定する。10,000 粒を一つのサブサンプルとし、検査はサブサンプルを 3 反復する。

- 2.2 1,000 ml 又は 500ml 容の滅菌済みの三角フラスコに 10,000 粒の種子を入れ、これに 0.02% Tween20 添加滅菌生理食塩水（種子洗浄液）を加える。加える種子洗浄液は下記の表を参照のこと。

表 加える種子洗浄液の量

種子 100 粒重が 1g 未満の場合	: 種子 1g 当たり 2.5ml の種子洗浄液を加える
種子 100 粒重が 1g 以上 2g 未満の場合	: 種子 1g 当たり 2.25ml の種子洗浄液を加える
種子 100 粒重が 2g 以上の場合	: 種子 1g 当たり 2ml の種子洗浄液を加える

- 2.3 振とう機（回転数およそ 125rpm）で 2.5 時間、室温で振とうする。

3. 種子洗浄液の希釈と培地への塗布

- 3.1 滅菌チップを付けたマイクロピペットを用いて種子洗浄液を 2～4 ml 採取し、滅菌済みのコニカルチューブに移す。この液を原液とする。なお、採取前にはフラスコを良く振って液を混和させておく。
- 3.2 滅菌チップを付けたマイクロピペットで種子洗浄液（原液）を 0.5ml 採取し、これを 4.5ml の滅菌生理食塩水を入れた滅菌コニカルチューブに加え、ボルテックスミキサーでよく混和する（10 倍希釈液）。次に、4.5ml の滅菌生理食塩水を入れた滅菌コニカルチューブに 10 倍希釈液を 0.5ml 加え、ボルテックスミキサーでよく混和する（100 倍希釈液）。
- 3.3 原液及び 10 倍、100 倍希釈液から滅菌マイクロピペットで 0.1ml ずつ採取し、ターンテーブル上に置いた FS 培地及び mCS20ABN 培地の中央に滴下する。ターンテーブルを回転させながらアルコール火炎滅菌したコーンラージ棒で検査液を平板上に均等に拡げる。1 種類の検査液につき各培地を 2 枚用いる。
- 3.4 陽性コントロールとして *X. campestris* pv. *campestris* 保存菌株を用い、各選択培地に塗布する。白金耳ですくい取った保存菌株を滅菌生理食塩水に溶解し、菌懸濁液を作製する（ほんのり白濁した状態が約 10^8 CFU/ml である）。この菌懸濁液を滅菌生理食塩水で希釈して 10^6 倍までの 10 倍の段階希釈系列を作製する。この中から 10^4 倍及び 10^6 倍の各希釈液 0.1ml を採取し、FS 培地及び mCS20ABN 培地に塗布する。
- 3.5 $30\pm 2^\circ\text{C}$ の恒温器で培養し、3～4 日後に鑑定する。
- 3.6 上記の操作に用いた 0.02% Tween20 添加滅菌生理食塩水（種子洗浄用）と滅菌生理食塩水（希釈液作製用）を各選択培地に塗布した後、上記と同じ恒温器で培養し、無菌であることを確認する。

4. 鑑定

- 4.1 培養開始 3～4 日後、無菌状態の検査と参照菌株の生育の確認を行う。
- 4.2 参照菌株のコロニーと比較しながら、検査液を塗布した培地に出現するコロニーを鑑定する。選択培地における典型的な *X. campestris* pv. *campestris* のコロニーは、以下のと

おりである。

[FS 培地] デンプン加水分解によるハローを周辺に伴う、小型で薄緑色を呈した光沢のある粘性コロニーを形成する。コロニーの大きさは変化に富む。

[mCS20ABN 培地] デンプン加水分解によるハローを周辺に伴う薄黄色で、光沢のある粘性コロニーを形成する。コロニーの大きさは変化に富む。培養3日後には多数のコロニーが出現して容易に鑑定できるが、観察が遅れるとハローが融合し疑わしいコロニーを判別するのが困難になる。

4.3 各培地を数日間4□に保持すると、ハローが鮮明になる。陽性と疑われるコロニー数を記録する。

5. 疑陽性コロニーの確認

5.1 疑陽性のコロニーがある場合、サブサンプル当たり少なくとも6つのコロニーをYDC培地に移植する。同時に、*X. campestris* pv. *campestris* 保存菌株も移植する。移植用のYDC培地は、フェルトペンでペトリ皿の底に線を引いて区分したものを用意し、それぞれの区画に1つのコロニーをジグザグに画線して移植する。1枚のペトリ皿には同じサブサンプル由来の菌だけを移植する。

5.2 30±2□で、24～48時間培養する。

5.3 疑わしいコロニーを参照菌株と比較しながら鑑定する。*X. campestris* pv. *campestris* はYDC培地上で、黄色で粘性のあるコロニーを形成する。YDC培地上に黄色で粘性を持つコロニーの病原性を確認する。

6. 病原性試験

6.1 本葉3～4葉が展開した対象作物の苗を用意する。

6.2 滅菌した爪楊枝でYDC培地のコロニーを取り、葉の縁付近の葉脈に菌を接種する。1つの分離菌につき、2本の苗（各苗2葉用い、1葉につき6カ所）に接種する。

6.3 同時に、*X. campestris* pv. *campestris* 基準菌株を接種する。

6.4 接種した苗を温室内に置き、10～14日後に陽性コントロールの病徴と比較しながら接種株を観察する。*X. campestris* pv. *campestris* は葉縁にV字型壊死斑や黄化またはえその典型的な病徴を示す。このような典型的な病徴を示すものを陽性株とし、その分離菌を*X. campestris* pv. *campestris* と判定する。

[参考] *X. campestris* pv. *armoraciae* に分類される菌でも、キャベツに対して接種部位にだけえそを示すものがあることが報告されている。しかし、現在のところその分類学的状態は明確にされていない。

III. 評価・報告

- 1) 検出法及び検出された病原の学名，種子当たりの病原菌数（CFU），検査したサブサンプルに対する陽性サブサンプル数について報告する。

IV. 参考文献

- 1) International Seed Testing Association (2014) International Rules for Seed Testing, Edition 2014, Annexe to Chapter 7 Seed Health Testing Methods, 7-019a: Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on *Brassica* spp.
- 2) International Seed Health Initiative–Vegetable (2002) Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on Cabbage (Brassica), Draft.

V. 手順の中で注意すること

1. 分離株の番号

サブサンプルから分離した各分離株には，希釈に関わりなく連続した番号を割り当てて検査票に記載する。下記に記載例を示す。

例) 検査種子番号／サブサンプル番号. 分離菌番号

#123 の検査種子のサブサンプル#1 から分離した#1 の菌の場合
記載は、123/1.1 となる。

2. 10 倍の段階希釈系列の作製

希釈液は，種子洗浄液または既に調製した希釈液から 0.5ml 採取し，4.5ml の滅菌希釈用液が入ったスクリュウキャップ付きチューブに加える。洗浄液等は採取前によく混和し，希釈後はボルテックスを行い，よく混和する。各希釈段階では，新しいチップに交換する。ピペットはその精度を適適に検査し，必要に応じて補正しておく。希釈液の作製は上記と異なる量による作製も可能である。ただし，要求される精度を満たしているかどうか，あらかじめ実験室で確認しておく必要がある。

3. 希釈平板

希釈液を作製してからできるだけ素早く培地に塗布すること（30 分以内）。平板培地への塗布は高希釈液から低希釈液に向かって行い，培地名を記載し，表面が乾いた培地の真ん中に 0.1ml を滴下し，ガラスロッドで拡げる。高希釈液から低希釈液に向かって塗布する場合，同一サンプル内では一本のチップ，一本のガラスロッドを用いて行うことができる。シャーレを逆さまにして培養する前に，滴下した液を全て寒天培地に吸収させること。もし必要であれば，クリーンベンチで送風して培地を風乾させてもよい。

4. 希釈平板の記録

希釈平板の結果は全て記録シートに記録する。総菌数が 30～300 の培地から最も確からしい細菌数の概数を算出する。しかしこの操作は、疑陽性コロニーと他のコロニーの相対的な数字によってさらに進むと混乱を招くかもしれない。最小限の努力するために、最上希釈について記録を

始め、疑陽性コロニーと他の細菌のコロニーを計数する。もし、全くコロニーが見られない場合には‘st’ (sterile : 無菌) と記録する。次に、高希釈培地について行う。培地上のコロニーが 300 を遙かに越える数であることが明らかな場合、正確に計数することではなく、その場合には既にさらに希釈の高い培地でより確実な計数ができている結果を用いる。この場合、まだコロニーを識別できる培地には‘m’ (many) を、コロニーが融合した場合には‘c’ (confluent) の記載で十分である。

5. 扇形に区分された YDC 培地 (Sectored Plates)

9 cm シャーレの底をマジックペンで扇形に 6 等分する。白金耳で単コロニーを取り、一つの区にジグザクに塗抹する。この際、隣接する区との間にコンタミネーションが生じないように十分なスペースを取る。

6. 結果の報告

陽性の結果が出た場合、種子当たりの病原細菌数 (CFU) の平均、これと全ての検査数に対する陽性サブサンプル数を報告する。

□. 培地等

1) 0.02% Tween 20 加用生理食塩水

NaCl	8.5 g
Tween 20	0.2 ml
蒸留水	950 ml

容量を 1,000ml に調整した後、オートクレーブで滅菌 (121℃, 15 分間) する。

2) 生理食塩水

NaCl	8.5 g
蒸留水	950 ml

容量を 1,000ml に調整した後、オートクレーブで滅菌 (121℃, 15 分間) する。

3) FS 培地 : Fieldhouse-Sasser agar

可溶性デンプン	25.0 g (Merck 1252)
酵母エキス	0.1 g

K ₂ HPO ₄	0.8 g
KH ₂ PO ₄	0.8 g
KNO ₃	0.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g

1% メチルグリーン水溶液(水層部) 1.5 ml

Bacto Agar	15.0 g
蒸留水	1,000 ml

オートクレーブ滅菌（121℃，15 分間）後，培地を約 50℃に冷ましてから次の試薬を加え，混合する。

10mg/ml ナイスタチン溶液	3.5 ml (35 mg)
3mg/ml D-メチオニン溶液	1.0 ml (3 mg)
1mg/ml 塩酸ピリドキシン溶液	1.0 ml (1 mg)
50mg/ml セファレキシシン溶液	1.0 ml (50 mg)
10mg/ml トリメトプリム溶液	3.0 ml (30mg)

クリーンベンチ内で培地表面を乾かした後，ポリエチレン袋に入れて冷蔵庫で保管する。
2～4℃で3日間保管した本培地を使用すると，本病原菌の反応（デンプン加水分解）が明瞭になる。培地は作製後2週間以内に使用する。

4) mCS20ABN 培地 : Modified Chang-Schaad agar

Soytone (Soya peptone)	2.0 g
Tryptone	2.0 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.8g
KH ₂ PO ₄	2.8 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4 g
L-グルタミン	6.0 g
L-ヒスチジン	1.0 g
D-グルコース (Dextrose)	1.0 g
可溶性デンプン	25.0 g (Merck 1252)
Bacto Agar	18.0 g

蒸留水 1000 ml

高圧滅菌（121℃，15 分間）後，培地を約 50℃に冷ました後に下記の試薬を加える。

10mg/ml ナイスタチン溶液	3.5 ml (35 mg)
------------------	----------------

40mg/ml 硫酸ネオマイシン溶液	1.0 ml (40 mg)
100mg/ml バシトラシン溶液	1.0 ml (100 mg)

分注器で9 cm ペトリ皿につき約 20ml ずつ分注する。クリーンベンチ内で培地表面を乾かした後、ポリエチレン袋に入れて冷蔵庫で保管する。2～4℃で3日間保管した本培地を使用すると、本病原菌の反応（デンプン加水分解）が明瞭になる。培地は作製後2週間以内に使用する。

5) 10mg/ml ナイスタチン溶液

50%エタノール 20 ml にシクロヘキシミド 0.2 g を溶解する。

6) 100mg/ml バシトラシン溶 40mg/ml 硫酸ネオマイシン溶液

50%エタノール 20 ml にバシトラシン 2.0 g を溶解する

7) 40mg/ml 硫酸ネオマイシン溶液

20%エタノール 25 ml に硫酸ネオマイシン 1.0 g を溶解する。

8) 1 %メチルグリーン溶液

滅菌蒸留水 100 ml にメチルグリーン 1.0 g を溶解する。

9) 3mg/ml D-メチオニン溶液

50%エタノール 100 ml に D-メチオニン 300 mg を溶解する。

10) 1mg/ml 塩酸ピリドキシン溶液

50%エタノール 30ml に塩酸ピリドキシン 30 mg を溶解する。

11) 50mg/ml セファレキシン溶液

70%エタノール 20ml にセファレキシン 1.0 g を溶解する。

12) 10mg/ml トリムトプリム溶液

70%エタノール 10ml にトリメトプリム 0.1 g を溶解する。

13) YDC 培地 : Yeast dextrose Chalk

酵母エキス	10 g
CaCO ₃	20 g
Bacto Agar	15 g
ブドウ糖 (Dextrose)	20 g

蒸留水 1,000 ml

オートクレーブで滅菌（121℃, 15 分間）し，約 50℃に冷ました後に 9 cm ペトリ皿に分注する。クリーンベンチ内で培地表面を乾かした後，ポリエチレン袋に入れて室温で保管する。培地は作製後数ヶ月間使用できる。

VII. 図版



図 1. 三角フラスコを使用した種子洗浄液の調製

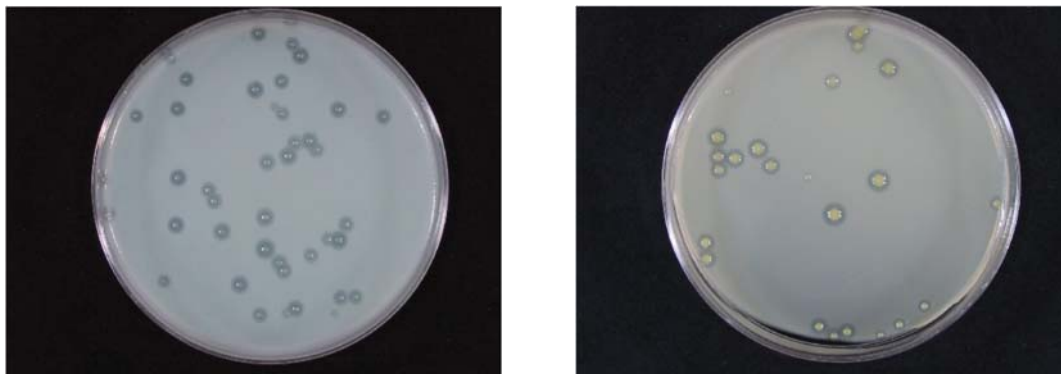


図 2. 選択培地における Xcc のコロニー
FS 培地 (左) 及び mCS20ABN 培地 (右) の *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc)
いずれの培地でも Xcc のコロニー周辺にデンプン加水分解によるハローの形成が
みられる



図 3. YDC 培地上の Xcc コロニー
黄色で粘性のあるコロニーを形成する。



図4．接種適期の植物
本葉3～4枚展葉期のキャベツ幼苗



図5．接種後14日目の陰性コントロール
(品種：来陽)



図6．陽性コントロールの病徴（品種：来陽）
接種部位周辺が退緑し、やや水浸状となる。その後葉脈に沿ってえそがあらわれる。

4 キャベツ種子のキャベツ黒斑病検査手法マニュアル (案)

キャベツの *Alternaria brassicae* の検査

ア. 対象作物：キャベツ

イ. 病 名：黒斑病

ウ. 検査試料：400 粒

エ. 前 処 理：なし

オ. 方 法：凍結ブロッター法。プラスチック製ペトリ皿にろ紙を 3 枚敷き、1 皿に 25 粒を置床する。ろ紙は滅菌蒸留水に浸し、余分な水を切る。

カ. 培 養：20℃、24 時間、暗黒下に置く。その後、-20℃で 24 時間凍結する。さらに、20℃、12 時間周期の暗黒・照明下（BLB ライト）に 8 日間置く。

キ. 鑑 定：各種子を倍率 30～80 倍で観察し、分生子を探す。分生子はほとんどが単生で、稀に 3、4 個まで鎖生する。分生子は倒棍棒状で真直または僅かに湾曲し、10 前後の横隔壁を持ち、ビークが分生子の全長の 1/3～1/2 を占める。分生子の大きさは、通常アブラナ科でみられる *Alternaria* 属菌よりも大柄な印象を受ける。分生子は種子の表面から出現し、種子全面を覆い、黄金色～褐色となる。菌糸はあまりみられないが、中には種子の表面を菌糸が覆い、分生子が形成されることもある。

ペトリ皿ごとに汚染種子数を記録する。

検査の手順

病 原 : *Alternaria brassicae* (Berkeley) Saccardo

対象作物 : キャベツ

病 名 : 黒斑病

方 法 : 凍結プロッター法

検査種子数 : 400 粒

I. 準備する器具・機器等

参照菌株	…	参照菌株または他の適当な材料
資 材	…	円形の 9 cm のろ紙 (ADVANTEC 定性 No2 など), 微生物フリーで菌の生育抑制物質が含まれていないもの (ペトリ皿 1 枚当たり 3 枚)
ペトリ皿	…	径 9 cm の消毒済みプラスチック製ペトリ皿
恒温培養器 (庫)	…	20±2℃, タイマー制御された近紫外線ライト (BLB ライト) を装備
冷凍庫	…	-20±5℃
その他	…	○ピンセット ○70%エタノール ○アルコールランプ (または同等品) ○実体顕微鏡 ○BLB ライト ●滅菌蒸留水 注) ●は滅菌済みまたはオートクレーブで滅菌 (121℃, 20 分間) したものをを用いる

II. 検査試料の準備

1. 種子試料間でクロスコンタミネーションを生じさせないようにすることが重要である。このため、70%エタノールを用い、使用する器具類や作業台、手を消毒する。
2. 検査には、国際種子検査規程 7.4.1 に従って作製した試料を用いる。
3. 検査では [25 粒/ペトリ皿×4 皿] を 1 区 (100 粒) とし、4 反復を行う。

III. 検査方法

1. ピンセットで 3 枚のろ紙を取り、滅菌蒸留水に浸す。ろ紙を蒸留水から取り出し、余分な水を除去した後、プラスチック製ペトリ皿に敷く。
2. ペトリ皿 1 枚当たり 25 粒を置床する (図 1)。種子を取り扱うピンセットは、検体を取り扱う前及び検体が変わるごとに、その先端を 70%エタノールに浸漬し、火炎滅菌を行う。
3. ペトリ皿を 20±2℃, 暗黒条件で 24 時間培養する。
4. ペトリ皿を冷凍庫に移し、-20±2℃, 24 時間保つ。
5. 冷凍処理後、ペトリ皿を培養庫内に 1 枚ずつ並べ、12 時間照明と 12 時間暗黒の連続条件で

20±2℃, 8日間培養する。照明には BLB ライトを用い, ペトリ皿の上方約 25cm に設置する (図2)。

6. 鑑定

培養開始8日後, 倍率約 30 倍の実体顕微鏡下で種子から出現する分生子を探し, 約 80 倍までの倍率で分生子の特徴を調べる。分生子は、倒棍棒状で真直または僅かに湾曲する。通常種子の表面から出現し, 種子全面を覆い, 黄金色～褐色状にみえる (図3)。ほとんどが単生であるが, 稀に 3, 4 個まで鎖生する (図4、5)。菌糸はあまりみられないが, 中には種子の表面を菌糸が覆い, 分生子が形成されることもある。分生子は, 75～350 μm, 幅 20～30 μm, 5～19 の横隔壁 (多くは 11～15) を持ち, 縦隔壁は 5 前後で, 通常アブラナ科でみられる *Alternaria* 属菌よりも大柄な印象を受ける (図6)。ビークは長く, 分生子の全長の 1/3～1/2 を占める (図7)。

ペトリ皿ごとに汚染種子数を記録する。

IV. 評価

1. 許容誤差の検定

4 反復の検査結果を国際種子検査規程 5.1 表に照らし合わせ, 検査の許容誤差を検定する。結果が適合していなければ, 再試験を行う。

2. 結果の報告

報告は, 検査法及び検出された病原菌の学名, り病種子率 (供試種子数に対するり病種子数の百分率) について報告する。

V. 参考文献

- ・ 窪田昌春 (2010) *Alternaria* 属と *Phoma* 属の野菜類病原菌、微生物遺伝資源利用マニュアル (30) (2010)



図 1．種子の置床

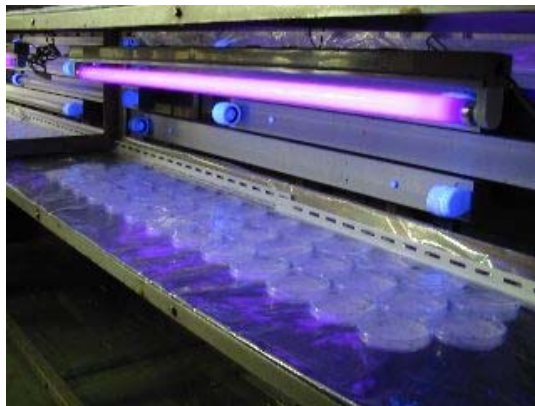


図 2．凍結処理後，BLB ライト照明下で
8 日間培養

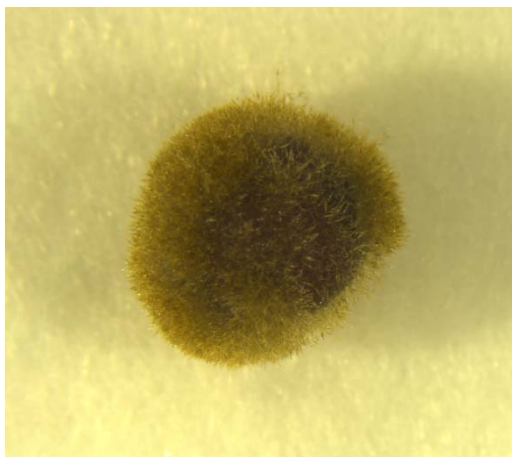


図 3．種子上に観察される黒斑病菌
(*A. brassicae*) の分生子

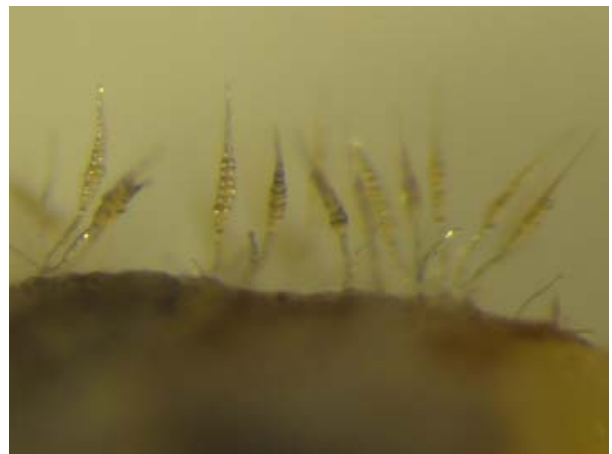


図 4．単生の分生子（実体顕微鏡）

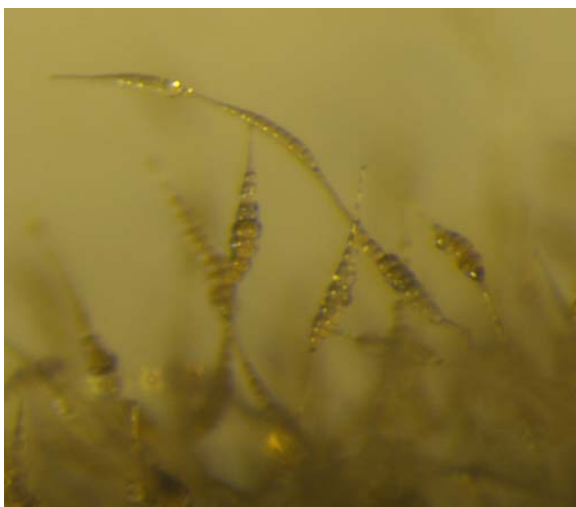


図 5．鎖生の分生子（実体顕微鏡）

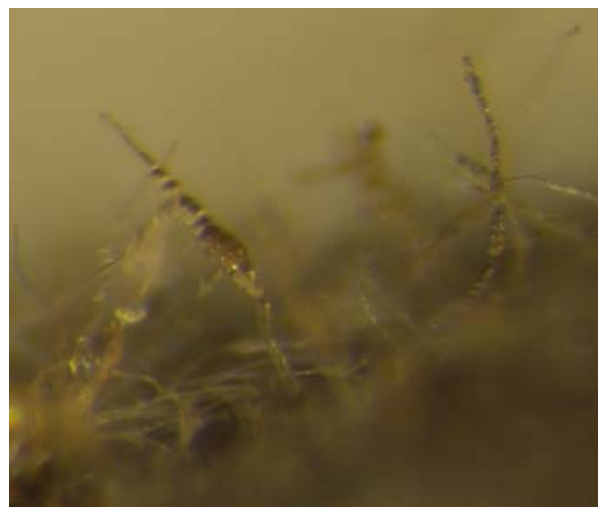


図 6．*A. brassicae* と *A. brassicicola* の分生子
の大きさ比較（実体顕微鏡）



図 7．黒斑病菌の分生子（光学顕微鏡）

外部専門家による検証・評価

平成 28 年度輸出種苗病害検査手法実用化促進委託事業の報告について、外部専門家を招いて下記のとおり検討会を開き、委託事業報告書及びマニュアル（案）について検討を行った。

1. 日 時 平成 29 年 2 月 27 日(月) 13:30～16:00

2. 場 所 農研機構種苗管理センター大会議室

3. 出席者

○糸状菌専門家

農研機構野菜花き研究部門野菜生産システム研究領域 窪田 昌春

○細菌専門家

農研機構野菜花き研究部門野菜生産システム研究領域 染谷 信孝

○ウイルス専門家

農研機構中央農業総合研究センター病害研究領域 久保田 健嗣

○ 事業委託元

農林水産省食料産業局知的財産課種苗産業班 中井 豊

○ 事業実施者

農研機構中央農業研究センター病害研究領域 田中 穰

同上 柳澤 広宣

農研機構野菜花き研究部門花き生産流通研究領域 (松下 陽介)

農研機構種苗管理センター試験・検査部長 佐藤 仁敏

同上 試験・検査部病害検査課 小曾納 雅則

同上 同上 高橋 弘喜

同上 同上 岡田 薫

4. 議事

委託事業報告書及び 4 種病害のマニュアル（案）について検討を行った。

○ 検討会における検討内容

1) SqMV、LMV 関連

- ① (問) 陽性判定の基準に関して、SqMV では健全吸光値の 2.5 倍を超えた場合を陽性としているが、LMV は 2.0 倍となっているのはどうしてか。

(久保田)

(答) ISTA マニュアルでは 2.5 倍が基準となっている。SqMV では、健全試料の吸光値上昇がほとんど上がらなく、バックグラウンド補正をするとゼロに近い値やマイナス値になる場合もあり、そのまま 2.5 倍超を基準とすることは適当でないと判断し、ブランク補正せずに健全試料あるいは陰性対照の吸光値の 2.5 倍超を陽性の基準とした。(田中)

LMV では発芽培養を用いた検出法であれば、陽性対照の 2.5 倍超を陽性としても陽性と判定できると考えるが、種子からの直接検出の場合では、2.5 倍超を陽性とした場合では、ほぼ陰性となってしまう可能性がある。LOEWE 社の抗血清では、ブランク値や陰性区における吸光値の上昇が認められなかったことから、LMV の陽性判断基準は陰性対照の吸光値の 2 倍超として、陰性/陽性の判断基準とした。また、陰性/陽性の判断する際の判断材料として、吸光値だけでなく、肉眼により実際の発色程度を確認することが重要と考える。(柳澤)

- ② (問) サブサンプルサイズの数値の確認。報告書では 300 粒となっているがマニュアルで 500 粒となっているところがあるのは？。(中井)

(答) 単純なミスであり、訂正する。(柳澤)

- ③ (問) 試料抽出するために遠心分離処理を実施しているが、遠心分離はオプションと考えても良いか。(佐藤)

(答) SqMV の場合、磨砕残渣と上清を分離する時間を短くするためのオプションと考えても良い。(田中)

LMV の場合、自然沈降による上清採取では磨砕残渣が混入し非特異反応反応が生じたため静置でなく、遠心分離の行程は必要と考える。

(柳澤)

- ④ (問) ELISA 関係でも写真があればマニュアルに付けた方が良い。(久保田)

(答) 種子の磨砕程度や発芽培養処理時の状況が分かるように写真を加える。

(柳澤)

「その他、発言内容」

(問) LOEWE 社の抗体は代理店経由で購入できるのか (佐藤)。

(答) 日本の代理店で購入できる。(柳澤)

(問) マニュアルの中にマイクロプレートに関する情報を載せることはどう (佐藤)。

(答) 参考情報として追加することで対応する (田中、柳澤)。

2) ダイコン黒腐病関連

① (問) マニュアルの中で語句を統一すべき。(染谷)

(答) 統一する。(高橋)

② (問) ISTA マニュアルを確認するとアブラナ属の黒腐病検査の判定法に関して PCR 法の記載があるが、今回のマニュアル (案) の中では記載がないのは何故か? (染谷)

(答) 最終判定は PCR ではなくキャベツ幼苗への接種による病原性で判定することにしており、PCR は適用しない。(高橋)

③ (問) マニュアルの中の説明文で意味の理解できない部分があるので修正を要する。(染谷)

(答) 修正する。(高橋)

④ (問) マニュアル (案) は、現在使用されている ISTA マニュアルと内容的に違いがあるが。(染谷)

(答) 旧バージョンを参考にしたため生じたことから、確認の上修正したい。(高橋)

専門家が確認したバージョンとマニュアル (案) の基となったバージョンの違いから生じた指摘事項が多数あることから、検討会の中では、一部の指摘にとどめ、検討会後に指摘事項を確認することにした。

3) キャベツ黒斑病関連

① 今回、検査手法を検討した *Alternaria brassicae* と *Alternaria brassicicola* が混在した場合、*Alternaria brassicicola* が先に生長するため、*Alternaria brassicae* が隠れてしまう可能性がある。畑での発病に関しても *Alternaria brassicicola* 由来の黒すす病が発病する。(窪田)

両糸状菌をセットで依頼検査を受けるという方法もあり、依頼検査の対象病害に追加する際に検討したい。(佐藤)

5. マニュアル作成

検討会の結果を踏まえ、「メロン種子のスカッシュモザイクウイルス病検査マニュアル」、「レタス種子のレタスモザイクウイルス病検査手法マニュアル」、「ダイコン種子のダイコン黒腐病検査手法マニュアル」及び「キャベツ種子のキャベツ黒斑病検査手法マニュアル」の各案について必要に応じて修正を加え、別添の各マニュアルを作成した。