

平成28年3月10日

事業名：平成27年度輸出種苗病害検査手法実用化委託事業

事業報告書

独立行政法人種苗管理センター

事業内容
次のⅠ及びⅡに掲げる種子伝染性病害に係る検査手法又は罹病種子製作手法を実用化し、その手法をマニュアル化すること。 Ⅰ. メロンのスイカ緑斑モザイクウイルス (<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i> : 以下「CGMMV」という。) の種子検査手法の実用化 1) ELISA 法によるメロン種子の CGMMV 検査手法を実用化すること。 2) 以下の項目を含む「メロンのスイカ緑斑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) Ⅱ. メロンのスカッシュモザイクウイルス (<i>Squash mosaic virus</i> : 以下「SqMV」という。) 罹病種子製作手法の実用化 1) メロンの SqMV の病害検査手法開発に必要な罹病種子製作手法を開発すること。 2) 病害検査手法開発に供するメロンの SqMV 罹病種子を 100 粒以上製作すること。 3) 以下の項目を含む「メロンのスカッシュモザイクウイルス病罹病種子製作マニュアル」を作成すること。 ・ 製作方法の詳細 (製作工程、処理方法、必要な資材名、温度設定、必要日数等) ・ 罹病種子であることの鑑定方法の詳細 (観察方法、診断方法、試験方法等)

I. メロンの CGMMV 種子検査手法の実用化

1. 種子粉砕物からの ELISA 法による CGMMV の検出

【目的】

ISTA ルールでは 100 粒を 1 つの集団として扱っている。ウイルスが確実に検出できる検査集団の大きさについて検討した。

【調査方法】

1) 供試 CGMMV 感染種子

H26 年度に本委託事業で作出した CGMMV 感染種子率 55.9%のメロン種子を用いた。なお、以降の試験は本汚染種子を用いた（品種：FR アムス）。

2) 感染種子の特定

CGMMV 感染種子から 1 粒ずつ取り出し、ミルで粉砕後、その半量を後述する ELISA 法で CGMMV の検出を行い、ウイルスの感染を特定した。残りの粉砕物はそれぞれ 4℃で保存した。

3) 試料の調製

ミルで粉砕した健全メロンの種子粉砕物と上記 2) で特定したウイルス感染種子粉砕物を用いた。重量換算で健全種子 100 粒中に汚染種子が 1 粒（×100 区）、200 粒に 1 粒（×200 区）、400 粒に 1 粒（×400 区）混入する試料をそれぞれ調製した。なお、感染種子試料は、保存した種子粉砕物をいくつか合せて混和したものを一つの試料とし、本試験では 3 反復行った。

4) ELISA 法

ELISA 用の試料調製は ISTA ルールに従って行った。上記 3) で作製した各試料に 10 倍容の PBS-Tween を加え、15 秒攪拌後 5 分間静置し、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。ELISA は（社）日本植物防疫協会から購入した ELISA キットを用い、添付された手順書に従って行った。基質を加えた後、60 分後の吸光値（A415nm）を測定した。

【結果】

吸光値を測定した結果、汚染種子が×100 区及び×200 区まで 0.1 以上の吸光値を示した（図 1）。ISTA ルールにおける判定方法は、健全区の 2.5 倍以上の吸光値を示したものを陽性と判定するとしているが、本試験での健全区の吸光値が 0.0 付近と非常に低かったことから、目視で確認可能であること及び経験値から 0.1 以上を陽性と判定した。この結果、ELISA 法での検出は、感染種子が 200 粒中に 1 粒の混入まで検出できることが明らかとなった。

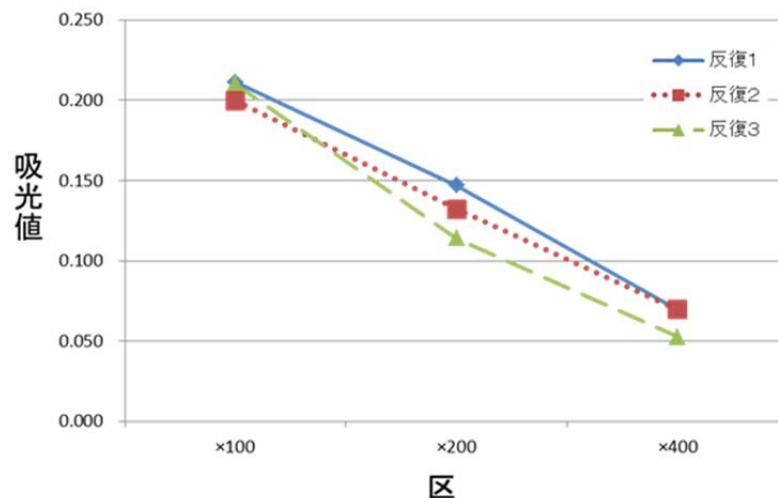


図1. メロン種子集団の大きさと ELISA 法による SqMV の検出

2. 種子粉砕物の均一性について

【目的】

ISTA ルールでは、種子 100 粒の粉砕物から 0.5g を代表として取り出して検査の試料としている。試料の均一性について検証を行った。

【調査方法】

1) 試料の調製

メロン種子（品種：FR アムス）100 粒の重量は 3g であった。健全種子及び感染種子の各粉砕物を用い、それぞれの割合が 99 : 1、全体の重量が 3g になるように調製した。調製した試料から無作為に 0.5g ずつ 6 つ採取した。

2) ELISA 法

ELISA 用試料の調製及び ELISA は前述と同様に行った。判定は、基質添加 60 分後の吸光値（A415nm）が 0.1 以上の反応を示すものを陽性とした。

【結果】

吸光値を測定した結果、多少のばらつきはあったものの、試験した 3 反復のすべての試料で陽性を示した（図2）。このことから、種子粉砕物は均一性が保たれており、採取する 0.5g を検査用試料として問題がないと思われた。

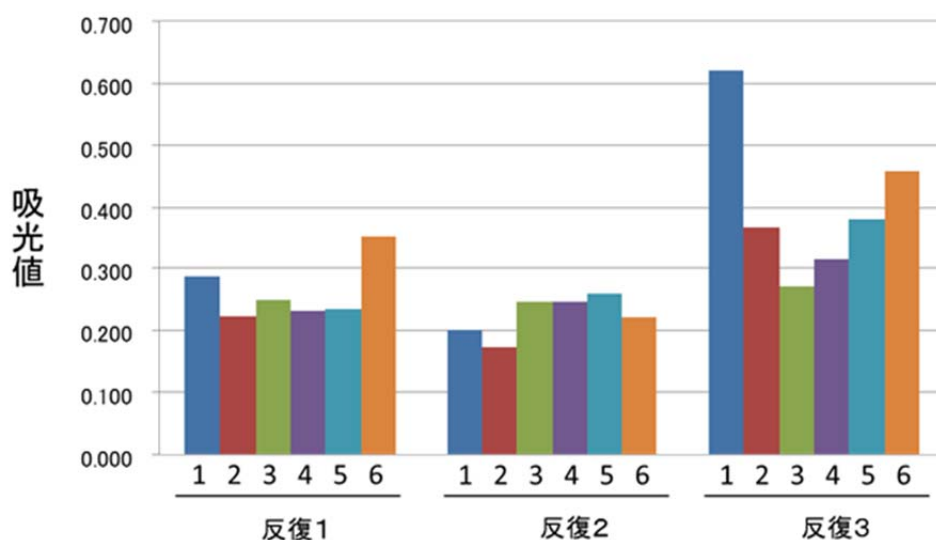


図2. メロン種子粉砕物の均一性について

3. 大型種子での CGMMV の検出と種子粉砕物の均一性について

【目的】

検査対象がカボチャ等の大型種子となった場合、メロン種子と同様に 0.5g を検査試料としても、確実に検査が行えるか検証を行った。

【調査方法】

1) 試料の調製

カボチャ種子 100 粒の重量は約 16g であった。カボチャの感染種子がないため、メロン種子で代用した。メロン健全種子及びメロン感染種子が 99: 1、全体の重量が 16g になるように調製し、その中から 0.5g の区を 8 つ作った。ここで、16g 中の 0.5g は全体の 3.1% に過ぎず、検査量が少なすぎると思われた。そのため、確実に検査が行えるものと考えた全粉砕物の 25% の区を設定し、比較対象とした。

2) ELISA 法

ELISA 用試料の調製及び ELISA は前述と同様に行った。判定は、基質添加 180 分後の吸光値 (A415nm) の比較によって行った。

【結果】

結果は図 3 に示した。3 つの各反復において、0.5g 区の 8 つの試料はほぼ同等の吸光値であったことから、種子粉砕物の均一性は保たれていると思われた。さらに、25% 区と 0.5g 区の吸光値を比較するとほぼ同等であった。これらのことから、大型種子において検査量を 0.5g とすることは問題ないと思われた。

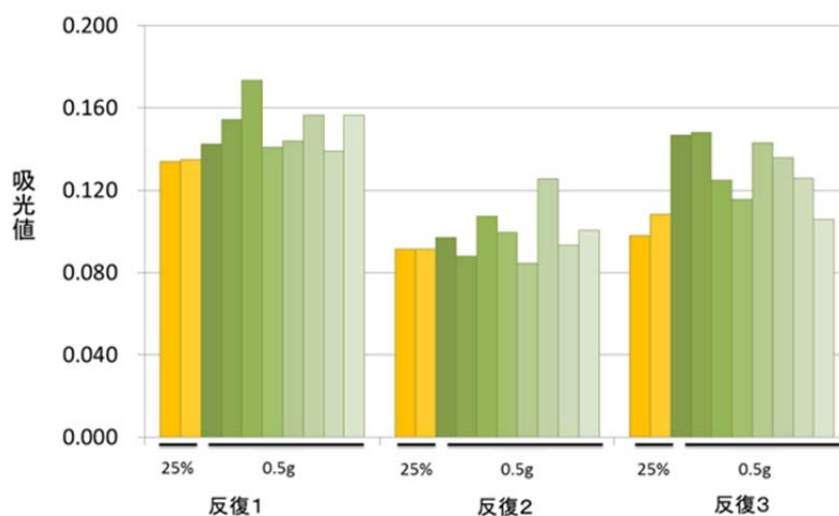


図3．大型種子を想定した場合の種子粉碎物の均一性について

Ⅱ．メロンの SqMV 罹病種子製作手法の実用化

1．汚染種子の作製手法の開発

【目的】

接種時期および品種の違いによるメロン種子の SqMV 感染率について検討する。

【調査方法】

1) 栽培管理

供試品種：FR アムス、アンデス

供試株数：1区 5～14株

供試ウイルス：SqMV MAFF260055

接種源の調製:病徴の明らかなメロン罹病葉を用い、葉重に対して5倍量の0.1M リン酸緩衝液 (pH7.2) を加えて磨砕し、接種源とした。

接種法：カーボランダム法

接種時期

- 子葉期－子葉接種区
- 第一本葉期－子葉接種区
- 第一本葉期－第一本葉接種区

栽培管理

7月1日～8日に播種し、7月27日～31日にかけて直径30cmのポットに移植した。一株一果で栽培し、10月27日～11月12日に収穫した。栽培は、種苗

管理センター病害検査棟の温室内で行った（図2）。

2) 汚染種子率の算出

収穫した種子を発芽検査用のプリーツろ紙を用いて置床し、28℃で7日間生育させた（図3）。この実生苗をビニル袋に一本ずつ入れ、磨砕して汁液を作った。この汁液をELISA用のPBS-Tweenに加えて5倍希釈液とし、ELISA法によりSqMVの検出を行った。ELISAキットは、(社)日本植物防疫協会から購入し、添付された手順書に従ってELISAを行った。

【結果】

1) 品種における病徴発現について

品種又は接種区により病徴発現（図4）に違いがあるかどうか調べた。接種後10目に調査した結果を表1に示した。FRアムスでは「子葉期－子葉接種区」及び「第一本葉期－子葉接種区」では病徴発現株数がそれぞれ3株、6株であったが、「第一本葉期－第一本葉接種区」では供試した14株中13株発病した。一方、アンデスでは、「第一本葉期－子葉接種区」及び「第一本葉期－第一本葉接種区」で全ての株が発病した。この結果から、アンデスの方がSqMVに対して病徴を発現しやすい品種であることが明らかとなった。

病徴を示す株を移植し、採種用株として栽培を行った。

2) 品種における感染種子について

各株とも良好な生育、着果を示した（図5）。

一果実当たりの平均採種量は、FRアムスが176.4粒であるのに対し、アンデスでは254.7粒と多かった（表2）。

ウイルス感染種子率を比較すると、FRアムスでは「第一本葉期－第一本葉接種区」で最も高く56.4%であり、アンデスでは「子葉期－子葉接種区」が最も高く68.1%、次いで「第一本葉期－第一本葉接種区」が53.2%であった（表3）。

以上のことから、SqMVの感染種子の作出には病徴発現がよく及び採種量の多い品種、アンデスを用い、接種時期は「子葉期－子葉接種」又は「第一本葉期－第一本葉接種」がよいものと思われた。

表1 メロン品種における SqMV の病徴発現

接 種 区		病徴発現株*	
		FR アムス	アンデス
子葉期	子葉接種区	3/14 (21.4%)	9/14 (62.3%)
第一本葉期	子葉接種区	6/14 (42.9%)	14/14 (100.0%)
第一本葉期	第一本接種区	13/14 (92.9%)	14/14 (100.0%)

* 病徴発現株数／供試株数

表2 各区のメロン種子採種量

品種名	区	収 穫 数		1果当たりの 平均種子数	品種別 平均種子数
		果実*	種子		
FR アム ス	子葉期	子葉接種区	14	2,946	210.4
	第一本葉期	子葉接種区	5	816	163.2
	第一本葉期	第一本葉接種区	11	1712	155.6
アンデス	子葉期	子葉接種区	6	1,679	279.8
	第一本葉期	子葉接種区	14	3,464	247.4
	第一本葉期	第一本葉接種区	14	3,316	236.9

* 果実数は栽培株数と同じ

表3 各区のメロン種子における SqMV 汚染種子率

接 種 区		ELISA 法による検出*	
		FR アムス	アンデス
子葉期	子葉接種区	55/188 (29.3%)	128/188 (68.1%)
第一本葉期	子葉接種区	52/188 (27.7%)	45/188 (24.0%)
第一本葉期	第一本接種区	106/188 (56.4%)	100/188 (53.2%)

* SqMV 検出種子／供試種子数



図4 SqMV 接種メロン株の病徴



図5 メロンの栽培状況

Ⅲ. 各種マニュアル（案）の作成

1. メロンのスイカ緑斑モザイクウイルス種子検査マニュアル（案）

検査の工程

ア. 対象作物：メロン

イ. 病原体：*Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV)

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：ELISA 法

検査種子を 100 粒のサブサンプルに分け、それぞれミルで粉砕する。
種子粉砕物 0.5g に対して PBS-Tween を 5ml 加えてよく混和し、10 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：*Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV)

対象作物：メロン

病名：緑斑モザイク病

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

種子を粉碎して PBS-Tween 緩衝液 (PBS-Teen) を加え、よく混和してから静置し、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（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 100µl/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CGMMV-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 PBS-Tween 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ミルで粉碎し、種子粉碎物の 0.5g をチューブに取り、5ml の PBS-Tween を加えてよく混和する。10 分以上静置し、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 100 μ l/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（ $\bar{X}$ ）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。

2. メロンの *Squash mosaic virus* (SqMV) 罹病種子製作マニュアル (案)

作製の手順

病 原 : *Squash mosaic virus* (SqMV)

対象作物 : メロン

I. 準備する器具・機器等

培養土 … 市販の培養土

ポリ鉢 … 径 9 cm、30cm

支柱、又は吊り下げ用ひも

メロン種子 … 病徴が出やすい品種

ウイルス … SqMV

カーボランダム

発芽試験用プリーツろ紙及び箱

CGMMV 用 ELISA キット… (社) 日本植物防疫協会

その他 … ○ピンセット ○マイクロピペット○0.1M リン酸緩衝液, pH7.2

II. 栽培管理

1. 種子を径 9cm のポットに播種し、第 4 本葉が展開し始めた頃に径 30cm の鉢に移植する。

その際、支柱又は吊り下げひもで弦を誘引する。

メロンの発芽適温は 25~30℃であり、温度管理に注意する。また、メロンは多湿を嫌うため、灌水は用土が乾いた時に行う。株元が湿りすぎると病気にかかりやすくなるので、灌水はポットの際に沿って行うようにする。

2. 10 節までは小弦を除去し、11 節~20 節まで小弦を延ばし、小弦の 3 節目で摘心する。
3. 12 節~15 節の間に咲いた雌花に授粉する。授粉は午前 9 時くらいまでに行い、月日を記しておく。
4. 適度に追肥、灌水を行って管理する。
5. 果柄に離層が出来た頃に果実を収穫する。
6. 播種から収穫まではおよそ 4 ヶ月かかる。

III. 採種

1. 果実を切断し、種子を含む内容物を水中で解きほぐし、種子以外の内容物及び水に浮く種子を取り除く。水に沈んだ種子を集めて自然乾燥させる。
2. 乾燥後、種子を袋に収めて種子貯蔵庫等で保管する。

IV. ウイルスの接種

1. 病徴の明瞭な SqMV に感染したメロン葉を用意し、葉重量の約 5 倍の 0.1M リン酸緩衝液、pH7.2 (0.1M PB) を加えて乳鉢で磨砕する。この磨砕液を接種源とする。
2. メロンの葉にカーボランダムをふりかけ、接種源に触れた指で子葉を優しくこすりつける。その後、直ちに水で子葉を洗い流す。接種時期は、子葉期の子葉接種、又は第一本葉期の第一本葉接種である。
3. 接種後 5～10 日目、上葉にモザイクが現れるのを確認する。

V. 汚染種子の確認

1. 発芽用のプリーツろ紙に約 40ml の蒸留水を加え、メロン種子を置床する。約 28℃、12 時間照明で 6～7 日間置く。
2. 発芽した実生苗を一本ずつビニル袋に入れ、磨砕して汁液を作製する。この汁液を ELISA 用の PBS-Tween で 5 倍の希釈汁液を作製し、ELISA 法でウイルスを検出する。
3. ELISA は (社) 日本植物防疫協会で販売する SqMV の ELISA キットを使用し、プロトコルに従って ELISA を行う。
4. 汚染種子率を算出する。

VI. 図版



図 1. SqMV によるメロンの病徴



図 2. プリーツろ紙によるメロンの実生苗

IV. 外部専門家による検証・評価

平成27年度輸出種苗病害検査手法実用化委託事業の報告について、外部の専門家を招いて下記のとおり評価会を開き、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28年2月26日（金）10:00～12:00
2. 場 所：独立行政法人種苗管理センター共用会議室1
3. 出席者：

○植物ウイルス専門家

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究センター	
病虫害研究領域	主任研究員 久保田 健嗣
同上	主任研究員 柴 卓也

○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
-----------------	-------	------

○事業委託・実施者

独立行政法人種苗管理センター業務調整部病害検査	課長 佐藤 仁敏
同上	調査員 星野はるな

4. 議 事

種苗管理センターが作成した委託事業報告書及び2種病害のマニュアル（案）について検討を行った。

1) CGMMV の検査法、及び SqMV の感染種子作製について

- ① 語句の誤り、及び語句の統一について指摘があった。
- ② ELISA 法で使用するイムノマイクロプレートにはいろいろな種類があり、その中でも高結合タイプが反応がよい。（柴）
「高結合タイプを推奨する」の内容を付加する（佐藤）
- ③ 委託事業報告書及びマニュアルの内容について、その他特段の指摘はなかったが、下記のように ELISA 法について情報提供があった。
 - ・ ELISA 法における陽性/陰性の判定基準の確からしさとして、敏感度と特異度をあらかじめ求めておくことができる。
 - ・ また、同様の判定基準には、健全対照の吸光値の標準偏差を求め、その3倍の値を基準とする場合がある。

V. マニュアルの作成

これまで検討した結果を踏まえ、「キャベツ黒すす病検査手法マニュアル」及び「メロンの CGMMV 罹病種子製作マニュアル」の各案を一部修正し、各マニュアルを作成した。

なお、CGMMV 罹病種子を100粒以上製作した。