

## マレーシア産セイヨウカボチャ種子の輸入植物検査において 我が国への侵入を阻止した *Acidovorax citrulli*

青木 有紗・村瀬 良太・田中 さおり<sup>1)</sup>・岩本 健<sup>1)</sup>・松浦 貴之<sup>1)</sup>・福ヶ迫 晃

横浜植物防疫所

*Acidovorax citrulli* Intercepted During Japanese Import Plant Inspections of *Cucurbita maxima* Seeds from Malaysia. Arisa Aoki, Ryota Murase, Saori Tanaka<sup>1)</sup>, Takeshi Iwamoto<sup>1)</sup>, Takayuki Matsuura<sup>1)</sup> and Akira Fukugasako (Yokohama Plant Protection Station, 1-16-10, Shin-Yamashita, Naka-ku, Yokohama, 231-0801 Japan. <sup>1)</sup>Research Division, Yokohama Plant Protection Station.) *Res. Bull. Pl. Prot. Japan.* 62 : 11-15 (2026)

**Abstract:** In 2024, *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch, was detected in *Cucurbita maxima* (squash) seeds originating from Malaysia during Japanese plant import inspections. The bacterial strains were isolated from seeds using the grow-out method. The bacteriological characteristics of the isolates were consistent with those of *A. citrulli*, and phylogenetic analysis based on the sequence of the *pilT* gene showed that the strains clustered with known *A. citrulli* strains. Furthermore, pathogenicity tests confirmed that the isolates caused disease symptoms in cucurbit plants, and the inoculated strains were successfully re-isolated. These results identified the isolates as *A. citrulli*. Although previous publications and other sources have suggested that this pathogen may occur in Malaysia, no detailed reports based on actual isolation have been documented. This case strongly suggests the presence of *A. citrulli* in Malaysia.

**Key Words:** *Acidovorax citrulli*, *Cucurbita maxima*, bacterial fruit blotch, Malaysia

### 緒 言

2024年3月、成田国際空港に輸入されたマレーシア産セイヨウカボチャ (*Cucurbita maxima*) 種子の輸入検査で、LAMP法 (大矢ら, 2008) 及び Sweat-bag Seedling 法 (特許第 4633645号) (佐藤, 2010; 農研機構, 2009) に基づき実施した生菌確認検定により *Acidovorax citrulli* の陽性反応が確認された。

スイカ果実汚斑細菌病菌 *A. citrulli* は、ウリ科野菜に感染する植物病原性細菌として知られ、世界各地に広がっており、ウリ科作物、特にスイカ (*Citrullus lanatus*) やメロン (*Cucumis melo*) の生産者にとって深刻な脅威となっている (Burdman and Walcott, 2012)。日本では 1998 年に初めての発生が確認され (白川ら, 2000)、その後も散発的に発生が確認されている (小木曾ら, 2005; 富田ら, 2006; 堀田ら, 2006) が、適宜適切な防除がなされ、いずれも現在は終息している。*A. citrulli* は種子伝染する (Rane and Latin, 1992; Hopkins and Thompson, 2002) ことから、我が国への侵入を警戒し、植物防疫法施行規則 (農林省, 1950)

別表 2 の 2 に規定されている。本施行規則に基づき対象国に対しては、栽培用に供する生植物 (果実を除き、種子を含む。) について、栽培地における検査や輸出前の遺伝子診断法検査により *A. citrulli* に感染していない旨の確認を要求している。2024 年時点において、マレーシアはこの対象国に規定されていなかったが、侵入を警戒すべき国として輸入種苗検査要綱 (農林水産省, 1978) に基づく遺伝子診断法検査を行っていた。

*A. citrulli* はマレーシアにて発生しているが詳細は不明 (EPPO, 2009) とされており、これまでのところ同国における詳細な分離報告はない。そこで今回、マレーシア産セイヨウカボチャ種子から検出された細菌の分離並びに病原性の確認、細菌学的性状及び分子生物学的解析を行い、分離株が *A. citrulli* であることを確認したので、その詳細について報告する。

<sup>1)</sup>横浜植物防疫所調査研究部

## 材料及び方法

### 1. 供試材料

細菌の分離には、輸入検査において *A. citrulli* を対象とした LAMP 法及び Sweat-bag Seedling 法により陽性となったマレーシア産セイヨウカボチャ種子（品種名不明）と同一ロットの種子を供試した。また、陽性対照には北海道で分離された *A. citrulli* 菌株 YPPS616（大矢ら, 2008）の懸濁液を用いた。

### 2. 分離

分離は Grow-out 法により次のように行った。上記のマレーシア産陽性種子 100 粒を、滅菌した市販の土壌を充填した 350mm×500mm のプラスチックトレイに播種し、湿度を保つため透明プラスチックカバーをかけて明期 12 時間 30℃、暗期 12 時間 25℃ に設定した人工気象器内で 7～14 日間栽培した。発芽苗の病徴部を滅菌したカミソリで約 5mm 四方に切り取り、70% エタノールと 1% (w/v) 次亜塩素酸ナトリウム溶液で数秒間表面殺菌した後、滅菌水で洗浄した。その後、病徴部を 1.5ml チューブに入れた 0.1ml 滅菌水中で磨砕し、その磨砕液の原液、 $10^2$  倍及び  $10^4$  倍希釈液を不完全 AacSM 培地（白川ら, 2003; Kubota *et al.*, 2011）に白金耳で画線又はコンラージ棒で塗抹し、27℃、暗所に設定した培養器内で培養した。培養 3～4 日後に形成した単コロニーを釣菌し、単コロニー分離を繰り返し、2 菌株（A237、A239）を得た。

### 3. 病原性の確認

上記 1. で得られた分離株（A237、A239）について、YPA 培地（酵母エキス 5g、ペプトン 10 g、蒸留水 1000 ml、リン酸水素二ナトリウム・十二水和物 4g、リン酸二水素カリウム 0.5g、寒天 15g）にて 27℃ で 2～3 日間培養し、その後滅菌水に約  $10^8$  cfu/ml 濃度となるよう懸濁した。本葉 2～4 枚展葉期のセイヨウカボチャ（品種：えびす）、メロン（品種：アンデス）及びスイカ（品種：赤肉大玉西瓜 C-A）の葉に、東ねた滅菌済み 5 号昆虫針を用いて懸濁液を接種した。接种植物をビニール袋で包み、滅菌水を内部に散布して湿潤状態にし、明期 12 時間で 30℃、暗期 12 時間で 27℃ に設定した人工気象器内で 7～14 日間栽培した。陽性対照として *A. citrulli* 株 YPPS616 を、陰性対照として滅菌水を用いて同様に接種及び栽培を行った。

### 4. 細菌学的性状

上記 1. で得られた分離株（A237、A239）について、細菌検査キット API20NE（ピオメリュー・ジャパン株式会社、東京）を用いて細菌学的性状の調査を行った。調査はキット製造元の指示に従って行い、培養後の API20NE プロフィールインデックスを 96-API のデータベースで検索した（西山, 1997; 農研機構, 2016）。

### 5. 分子系統解析

上記 1. で得られた分離株（A237、A239）について、16S rRNA 及び *pilT* 遺伝子の一部領域を PCR 法にて増幅し、塩基

配列をダイレクトシーケンスで決定した。PCR の鋳型は、分離株を YPA 培地上で培養し、得られた単コロニーを針刺しして滅菌水に懸濁した後熱処理したものをを用いた。酵素には TaKaRa Ex Taq HS（タカラバイオ株式会社、滋賀）を用いた。プライマー及び反応条件については、16S rRNA 遺伝子は 16SF3/16SR3（澤田ら, 2011）プライマーセットを用い、初期変性 94℃ 1 分の後、熱変性 94℃ 30 秒、アニーリング 54℃ 30 秒、伸長 72℃ 2 分を 1 サイクルとして計 40 サイクル行い、最終伸長を 72℃ 10 分で行った。*pilT* 遺伝子は *pilT-F/pilT-R*（Feng *et al.*, 2009）プライマーセットを用い、アニーリング 60℃ 30 秒、伸長 72℃ 1 分とした他は 16S rRNA 遺伝子と同じ反応条件で増幅させた。PCR 産物は精製後、BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社、東京）を用いてシーケンシング PCR を行った。シーケンシング PCR では上記 PCR と同じプライマーセットに加えて、16S rRNA 遺伝子においては 16SF4/SR2（澤田ら, 2011）プライマーセットも用いた。反応条件は初期変性 96℃ 1 分の後、熱変性 96℃ 10 秒、アニーリング 50℃ 5 秒、伸長 60℃ 4 分を 1 サイクルとして計 25 サイクル行った後、SeqStudio™ ジェネティックアナライザ（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）で各塩基配列を決定した。部分配列の相同性は、NCBI データベースの BLAST 検索にて確認した。系統解析は、分離株の各部分配列並びに NCBI 及び NARO GenBank のデータベースから得られた *Acidovorax* 種の配列を使用して、MEGA11（Tamura *et al.*, 2021）を用いた最尤法によって行った。

## 結果及び考察

### 1. 分離

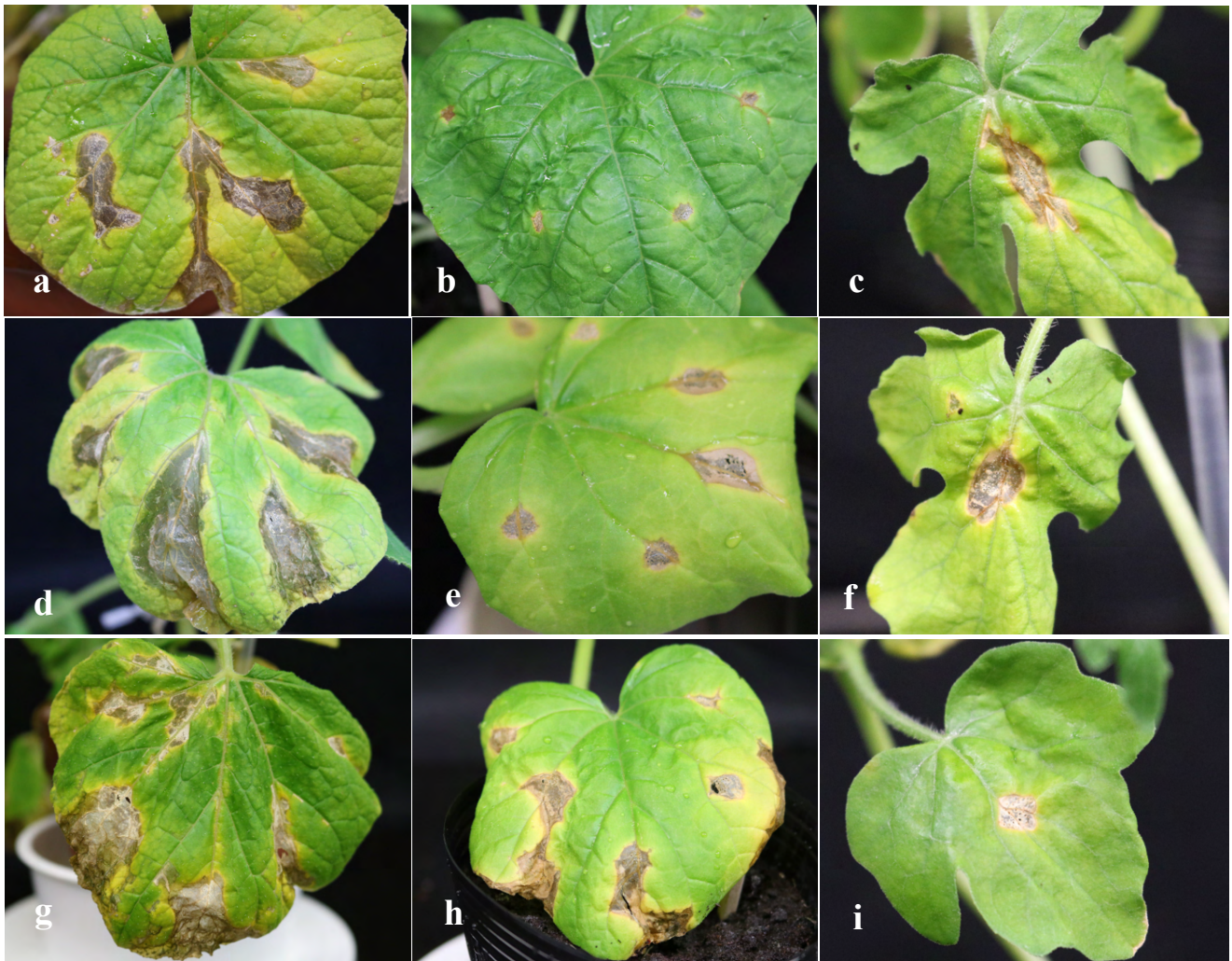
播種 7 日目頃から水浸状病斑等の症状を示す苗が見られた（Fig. 1A, B）。症状部を採取し、磨砕液を不完全 AacSM 培地上に塗抹して培養したところ、*A. citrulli* の特徴である 1mm 程度の円形、淡色の周辺部を持つ緑色から青色のコロニーが形成された。単一コロニーを釣菌して分離した結果、2 菌株（A237、A239）が得られた。



Fig. 1. Squash seedlings 7–14 days after sowing in the grow-out assay (A, B).

### 2. 病原性の確認

陰性対照区では症状は現れなかった一方で、分離株を接種した全てのウリ科植物で陽性対照区と同様に黄色いハローを伴う



**Fig. 2.** Inoculated symptoms on Squash cv. Ebisu (a, d, g), Melon cv. Andes (b, e, h), and Watermelon cv. Akanikuodamasuika C-A (c, f, i) leaves 7 days after wound inoculation with isolates A237 and A239 (a–f) and the positive control (g–i).

褐色斑を示した (Fig. 2)。また、病斑から再分離された細菌については LAMP 法により *A. citrulli* が検出された。

### 3. 細菌学的性状

API20NE 試験の結果は 2 つの分離株間で一致した。分離株は、オキシダーゼ活性及び硝酸塩還元は陽性で、インドール産生、発酵性、アルギニンジヒドロラーゼ活性、ウレアーゼ活性、エスクリン加水分解、ゼラチン加水分解及び  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は陰性であった。炭水化物の同化試験は L-アラビノース、グルコン酸カリウム、アジピン酸及び dl-リンゴ酸は陽性で、ブドウ糖、D-マンノース、D-マンニトール、N-アセチル-D-グルコサミン、マルトース、n-カプリン酸、クエン酸ナトリウム及び酢酸フェニルについては陰性であった。これらより分離株のプロフィールインデックスは 1001464 となり、*A. citrulli* に該当した。

### 4. 分子系統解析

得られた各塩基配列は、2 つの分離株間で 100% 一致した (16S rRNA: 1432bp, *pilT*: 421bp)。16S rRNA 領域の系統解析では、

*A. avenae*、*A. oryzae*、*A. cattleyae* 及び *A. citrulli* を区別できなかった (データ未掲載)。*pilT* 領域の系統解析では、分離株は *A. citrulli* と同一クレードに所属し (97% のブートストラップ値)、近縁種とは明確に区別された (Fig. 3)。

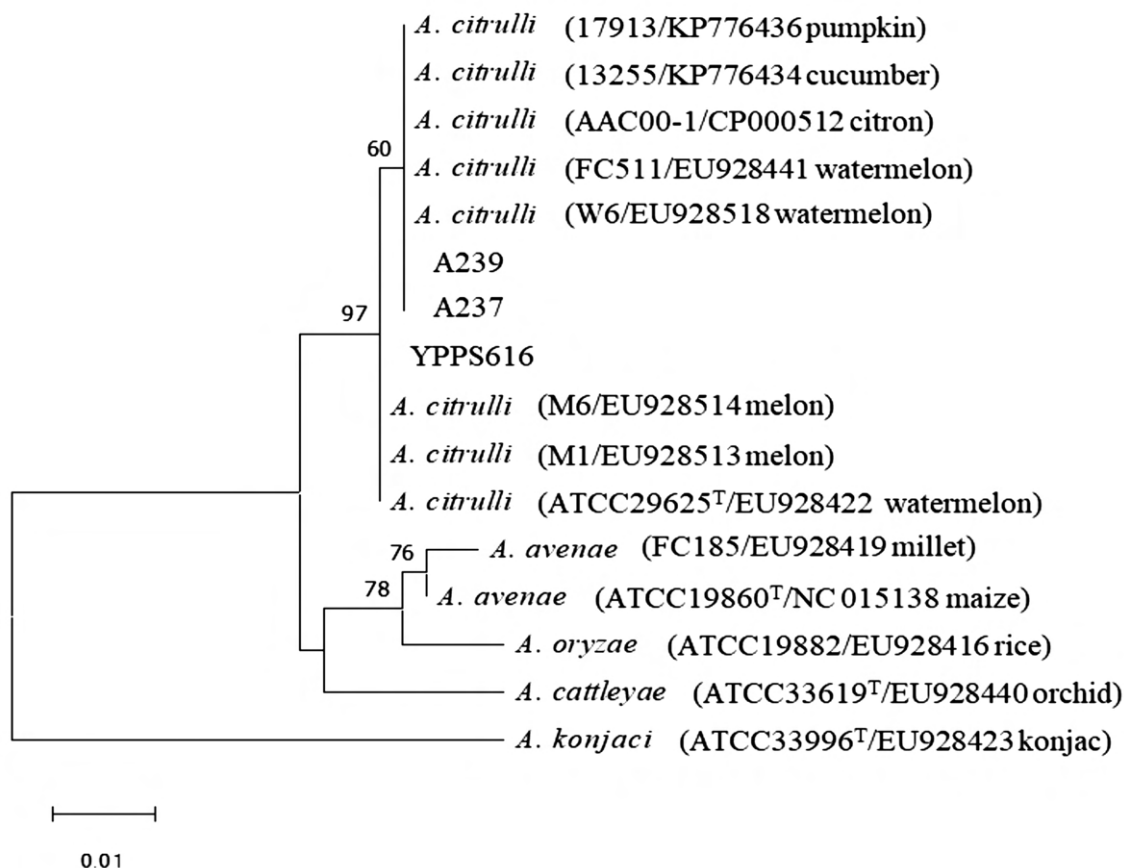
以上、病原性の確認、細菌学的性状及び分子系統解析の結果から、マレーシア産セイヨウカボチャ種子から分離した菌株を *A. citrulli* と同定した。

*A. citrulli* は、マレーシアで発生しているが詳細は不明 (EPPO, 2009) とされており、その根拠である Feng *et al.* (2009) の試験においては詳細が不明なマレーシア産とされる菌株が使用されている。また、Zhao and Walcott (2018) においても発生しているとされているものの詳しい情報はなく、これまで同国において、分離に基づいた詳細な発生報告はなかった。本事例により、*A. citrulli* がマレーシアで発生していることが改めて強く示唆された。一方で本事例は輸入検疫における発見であるため、より確実な情報とするために、今後は同国内における発生状況の調査が望まれる。なお、我が国では 2025 年 (令和 7 年) 6 月 23 日 農林水産省令第 30 号 [第 276 次改正] により、植物防疫法施行規則 (農林省, 1950) 別表 2 の 2 に定める *A. citrulli*

に係る地域にマレーシアが追加（2025年12月23日施行）された。

我が国が輸入する栽培用の *A. citrulli* 宿主植物は、ほとんど

が種子の状態で購入されるが、その外見から感染の有無の見分けは出来ない。そのため、*A. citrulli* の侵入を防ぐには栽培地検査や遺伝子診断法検査による感染の確認が重要となる。そのた



**Fig. 3.** Phylogenetic trees of isolates A237 and A239, *A. konjaci*, *A. avenae*, *A. oryzae*, *A. cattleyae*, and *A. citrulli* constructed using the maximum-likelihood method based on 421 bp *pilT* sequences. Numbers at nodes indicate bootstrap values (>50%) from 1,000 replicates, and scale bars represent 0.01 substitutions per site. Strain number, accession number, and sequence source are shown in parentheses.

め今後も、今回のような発生が疑われる国について、発生状況等の情報収集に努めるとともに、必要に応じて検定等を継続的に実施し、侵入リスクを抑えることが重要である。

### 引用文献

- Burdman, S. and R. Walcott (2012) *Acidovorax citrulli*: Generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry. *Mol. Plant Pathol.* **13**: 805-815.
- EPPO (2009) *Acidovorax citrulli* (PSDMAC)[Malaysia] EPPO Global Database (online), available from <<https://gd.eppo.int/taxon/PSDMAC/distribution/MY>>, (accessed 2025-09-09).
- Feng, J., E.L. Schuenzel, J. Li and N.W. Schaad (2009) Multilocus sequence typing reveals two evolutionary lineages of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Phytopathology.* **99**: 913-920.
- Hopkins, D.L. and C.M. Thompson (2002) Seed transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in cucurbits. *HortScience.* **37**: 924-926.
- 堀田治邦・塚本貴敬・上松寛・安岡眞二 (2006) 日本で発生した *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* によるメロン果実汚斑細菌病 (新称). 日植病報 **72**: 82. (講要)
- Kubota, M., N. Hagiwara and T. Shirakawa (2011) A method to evaluate percentage of cucurbit seeds infested with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, pathogen of bacterial fruit blotch. *J. Gen. Plant Pathol.* **77**: 112-115.
- 西山幸司 (1997) アピ 20NE キットおよび追加した 11 項目の細菌学的性状に基づく植物病原細菌の鑑別表の作成. 農環研報 **14**: 1-35.
- 農研機構 (2009) 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). (オンライン), 入手先<[https://www.naro.go.jp/publicity\\_report/publication/files/uri-2.pdf](https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/files/uri-2.pdf)>, (参照 2025-07-11).
- 農研機構 (2016) 簡易同定 96-API. (オンライン), 入手先<<https://www.naro.affrc.go.jp/archive/niaes/bact/BactID6/Waku96AR.html>>, (参照 2025-07-02).

- 農林省 (1950) 植物防疫法施行規則 (昭和 25 年 6 月 30 日農林省令第 73 号).
- 農林水産省 (1978) 輸入種苗検疫要綱 (昭和 53 年 9 月 30 日付け 53 農蚕第 6963 号農蚕園芸局長通達).
- 小木曾秀紀・藤永真史・松崎良一・上松寛 (2005) スイカ接木苗に発生した台木トウガン種子に起因する果実汚斑細菌病. 日植病報 **71**: 290. (講要)
- 大矢仁志・中川寛章・齊藤範彦・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 R.X. Latin (1992) Bacterial fruit blotch of watermelon: Association of the pathogen with seed. *Plant Dis.* **76**: 509-512.
- 佐藤仁敏 (2010) ウリ科野菜における果実汚斑細菌病の防除を目的とした種子検査法. 植物防疫 **64**(6): 374-377.
- 澤田宏之・功刀幸博・綿打享子・工藤晟・佐藤豊三 (2011) *Xanthomonas arboricola* によるブドウ斑点細菌病 (新称). 日植病報 **77**: 7-22.
- 白川隆・菊池繁美・加藤智弘・我孫子和雄・川合昭 (2000) 日本におけるスイカ果実汚斑細菌病の発生. 日植病報 **66**: 223-231.
- 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.
- Tamura, K., G. Stecher and S. Kumar (2021) MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* **38**: 3022-3027.
- 富田恭範・小河原孝司・白川隆・佐藤仁敏・鹿島哲朗・中西宏 (2006) 茨城県におけるスイカ果実汚斑細菌病菌によるメロン病害の発生. 日植病報 **72**: 312. (講要)
- Zhao, M. and R.R. Walcott (2018) *Acidovorax citrulli*: History, Epidemiology, and Management of Bacterial Fruit Blotch of Cucurbits. Plant Pathogenic *Acidovorax* species. APS Press, Minnesota USA: 200 pp.