

## Pepino mosaic virus 検出法の検出能に関する比較調査

村瀬 良太・今村 友哉<sup>1)</sup>・仁藤 史乃<sup>2)</sup>・柳澤 広宣・福ヶ迫 晃

横浜植物防疫所

Comparative Investigation of Detection Ability Among Methods for Pepino mosaic virus. Ryota Murase, Yuya Imamura<sup>1)</sup>, Fumino Nito<sup>2)</sup>, Hironobu Yanagisawa and Akira Fukugasako ( Yokohama Plant Protection Station, 1-16-10, Shin-Yamashita, Naka-ku, Yokohama, 231-0801 Japan. <sup>1)</sup>Institute for Plant Protection, NARO <sup>2)</sup>Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Food Safety and Consumer Affairs Bureau, Plant Protection Division ) *Res. Bull. Pl. Prot. Japan.* 62 : 29-34 (2026)

**Abstract:** Pepino mosaic virus (PepMV; *Potexvirus pepini*) causes severe damage to tomato production and is one of the most important plant pathogens in plant quarantine. Currently, five main strains (LP, EU, CH2, US1, and PES) are known, showing high genetic diversity. In plant quarantine inspections, it is crucial to employ a detection method that can detect all strains with high accuracy. In this study, we compared the detection performance for each strain, the frequency of non-specific reactions, and the detection sensitivity among seven previously reported methods. As a result, the methods of Ling *et al.* (2008), EPPO (2013), and ISF (2023a) accurately detected all five strains and showed an extremely low frequency of non-specific reactions. These three methods specifically detected PepMV in a bulk sample of 400 tomato seeds, which contained a single contaminated seed. The ISF (2023a) method detected as few as  $5.7 \times 10^4$  copies in 400 tomato seeds, whereas the detection limit of both the Ling *et al.* (2008) and EPPO (2013) methods was  $5.7 \times 10^6$  copies. We conclude that all three methods are effective, with the ISF (2023a) method being the most reliable for PepMV detection in quarantine inspection.

**Key Words:** pepino mosaic virus, sensitivity, specificity, detection performance

### 緒 言

Pepino mosaic virus (PepMV, binomial name: *Potexvirus pepini*) は、1974年にペルーでペピーノ (*Solanum muricatum*) から初めて発見されたウイルスであり (Jones *et al.*, 1980)、現在では、欧州や南北アメリカを中心に30か国以上で発生が確認されているが、日本国内では確認されていない (CABI, 2021)。主にナス科植物を宿主とすることが知られており (EPPO, 2021)、重要作物の1つであるトマト (*Solanum lycopersicum*) に対して葉のモザイク・奇形や果実の着色不良等の症状を引き起こし、経済的被害をもたらすことから、植物検疫上重要な病原体に位置づけられている (EPPO, 2021; Spence *et al.*, 2006)。

PepMVの感染植物及び種子は主な侵入経路となり得るため、植物防疫法施行規則別表2の2において規定された国又は地域から該当する栽植用植物及び種子を輸入する際は、適切な方法による検査が必要となる他、欧州や豪州等も輸出国に対して輸

出前の検査を要求している。さらには、国内への侵入を特に警戒する必要があるウイルスとして侵入警戒有害植物に指定され、侵入調査事業の対象となっている。

植物検疫においては、高精度に検出し、かつ陽性・陰性の判定を明確に行うことのできる検査法を採用することが重要である。これまでに、RT-PCR (Hasiów *et al.*, 2008; Ling *et al.*, 2008)、リアルタイム RT-PCR (EPPO, 2013; ISF, 2023a) 等の様々な検出技術を用いた PepMV の検出法が報告されている。一方で、PepMV は分子生物学的な性質に基づいて5系統 (LP, EU, CH2, US1 及び PES) に分類され、各系統間における全ゲノム配列ベースの相同性は78～95%であり、遺伝的な多様性が大きいことが確認されている (Hanssen and Thomma, 2010; Moreno-Perez *et al.*, 2014)。このため、これら検出法が PepMV の全系統を検出可能か、及び植物検疫の検査対象となり得る植物において適切な検出結果を得られるか判断するための知見は限られている。

<sup>1)</sup> 農研機構植物防疫研究部門

<sup>2)</sup> 農林水産省消費・安全局植物防疫課

本調査では、既報の複数の検出法を用い、検出感度及び非特異的反応の有無に主眼を置き、PepMVの全系統に対する検出可否、並びに非特異的反応の発生頻度を調査した。さらに、実際の検査を想定した検出試験により、PepMVの検査法としての有効性を評価し、最適な検出法の選抜を試みた。

## 材料及び方法

### 1. 供試ウイルス及び供試植物

PepMVのLP、EU、CH2、US1系統各1株を農林水産大臣の許可（農林水産省指令21横植第260号及び22横植第937号）を得て輸入した（Table 1）。各系統に感染したトマト葉を0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）で磨砕し、その粗汁液をステンレス製カミソリ（フェザー安全剃刀、大阪、日本）に塗布し2～3葉期のトマト苗の茎に切付接種した。接種植物は、自然光下の室温25～30℃に維持した温室内で管理し、接種約1か月後にAgriStrip（Bioreba, Reinach, Switzerland）を用い感染を確認した。

PepMVの汚染種子は、接種後約3か月経過した感染トマト苗に着果した果実から採取し、種子表面を滅菌水で洗浄した後、室温で風乾した。その後試験に使用するまで、4℃に設定した冷蔵庫内で保管した。

一方、PepMVのPES系統は、入手できなかったことから、Yanagisawa and Matsushita（2022）の手法に従って、PES系統の既知配列（Accession No. HG313806）を基に人工合成したRNAを供することとした。

**Table 1.** Details of PepMV isolates used in this study.

Strain name <sup>a</sup>	Isolate name <sup>b</sup>	Accession Number <sup>c</sup>
LP	DSMZ PV-0554	ON398497.1
EU	DSMZ PV-0973	OQ993363.1
CH2	DSMZ PV-0975	OR233204.1
US1	DSMZ PV-0716	OR233202.1

a; Strain name reported by Hanssen and Thomma, 2010 and Moreno-Perez *et al.*, 2014

b; The number that is registered from DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH)

c; The number that is provided from GenBank/EMBL/DBJ

### 2. 試料磨砕・核酸抽出

種子及び葉の磨砕には、シェイクマスター（バイオメディカルサイエンス、東京、日本）を使用した。種子からの核酸抽出は、カリウムSDS法（Dellaporta *et al.*, 1983）を一部改変した柳澤ら（2012）の方法により実施した。葉からの核酸抽出は、葉1枚あたり1か所をコルクボーラー（直径4mm）で切り抜き、シェイクマスターを用いて磨砕した後、磨砕緩衝液（0.1 M Tris-HCl pH 8.0、0.5 M NaCl、1% 2-mercaptoethanol、0.05 M EDTA pH 8.0）を葉の切り抜き試料0.1gあたり1mL添加した。以降の工程は、種子からの核酸抽出と同様の手順で行った。

### 3. 針刺法による鋳型調製

葉からの簡易的な鋳型調製法として、柳澤ら（2012）の針刺法を実施した。5号昆虫針で葉1枚の主脈を4～5回刺し、その針を0.1M Tris-HCl（pH8.0）200μLに浸漬・懸濁した。複数

葉ある場合は、同じ針を用いて上記の操作を行い、全ての葉を針刺した懸濁液を鋳型とした。

### 4. 比較対象とする検出法の選定

日本や世界各国において、PepMVの検査に利用された実績があると判断した既報の検出法7法を調査対象とした（Table 2）。

### 5. RT-PCRの反応条件

コンベンショナル RT-PCRは、OneStep RT-PCR Kit（QIAGEN, Hilden, Germany）を用いた。リアルタイム RT-PCRのTaqMan法は、TaqMan RNA-to-Ct 1-Step Kit（Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA）、SYBR Green法は、Power SYBR Green RNA-to-Ct 1-Step Kit（Thermo Fisher Scientific）を使用した。反応液の調製は、それぞれの付属マニュアルに従った。また、コンベンショナル RT-PCRには、ProFlex PCRシステム（Thermo Fisher Scientific）を用い、反応条件は、50℃ 30分、95℃ 15分の後、PCRサイクルは、各文献の条件に従って設定し40サイクルとした。リアルタイム RT-PCRには、QuantStudio5（Thermo Fisher Scientific）を用い、反応条件は、各キットの付属マニュアルに従って設定し、PCRサイクルは40サイクルとした。

### 6. PepMVコピー数の推定

検出感度試験に供するサンプル及び汚染種子に付着するウイルス量をコピー数ベースで推定するため、絶対定量に使用する標準RNAコントロールを作製した。まず、Yanagisawa and Matsushita（2022）の手法に従い、既知のPepMV配列（Accession No. DQ000985）を基に転写RNAを作製した。当転写RNAを滅菌蒸留水で10倍ずつ段階希釈して $10^1 \sim 10^6$ の希釈系列を作製し、標準RNAコントロールとした。各希釈溶液をHasiów *et al.*（2008）のリアルタイム RT-PCRに供し、コピー数とCt値の相関関係を示す検量線を作成した。次に、LP、EU、CH2、US1各系統に感染したトマト葉からの抽出核酸について、当該検量線を基に、PepMVのコピー数をそれぞれ推定した。

### 7. 調査対象検出法の検出感度比較

6. でPepMVのコピー数を推定した抽出核酸を用いて、調査対象検出法の検出感度をコピー数ベースで比較した。まず、PepMVのコピー数を推定した抽出核酸を健全トマト種子から抽出した核酸（50ng/μL）により段階希釈し、 $10^0 \sim 10^5$ の希釈系列を作製した。PES系統については、調査対象検出法により増幅領域が異なるため、検出法ごとに各検出法の増幅領域を含む転写RNAを作製した。この転写RNAを同様の手順により段階希釈して、 $10^0 \sim 10^5$ の希釈系列を作製した。次に、各希釈液を鋳型として調査対象の各検出法により2反復検出した。

### 8. 健全植物における非特異的反応の有無

PepMVの宿主植物として報告がある6種14品種の健全種子及び4種4品種の健全葉（Table 4）を対象に非特異的反応の発生頻度を調査した。そのために、各健全植物試料から抽出した核酸を鋳型として、調査対象検出法によりそれぞれ12反復で検出した。

**Table 2.** Detection methods examined in this study.

No.	Type of Assay	Primer/probe name	Sequence(5'-3')	Position*	Reference
1	RT-qPCR	KL05-48 forward 1	ACTCCTAGAGCTGACCTCAC	5127-5233 (TGBp2)	EPPO (2013)
		KL05-49 forward 2	ACTCCTAGAGCTGATCTTAC		
		KL05-51 reverse 1	TCTCCAGCAACAGGTTGGTA		
		KL05-52 reverse 2	TCACCTGCAACTGGTTGATA		
2	RT-qPCR	KL05-50 probe	FAM-TGTCAGCTTGCATTACTTCCAAAA-BHQ	5127-5233 (TGBp2)	ISF (2023a)
		KL05_48	ACTCCTAGAGCTGACCTCAC		
		KL05_49	ACTCCTAGAGCTGATCTTAC		
		KL05_51	TCTCCAGCAACAGGTTGGTA		
		KL05_52	TCACCTGCAACTGGTTGATA		
3	RT-qPCR	NAKT05_50	FAM-TGTCAGCTTGCATTACTTC-BHQ	5709-5897 (CP)	Hasiów <i>et al.</i> (2008)
		F5	GACTTCTCAAATCCTAATACAGC		
4	RT-PCR	R5R	CACATCAGCATAAGCACGAGC	5709-5897 (CP)	Hasiów <i>et al.</i> (2008)
		F5	GACTTCTCAAATCCTAATACAGC		
5	RT-PCR	R5R	CACATCAGCATAAGCACGAGC	5709-5897 (CP)	Modification of Hasiów <i>et al.</i> (2008)
		F5-mod	GACTTCTCAAATCCTAAYACAGC		
6	RT-qPCR	R5R-mod	CACATCAGCATAAGCACGHGC	193-278 (RdRp)	ISF (2023a)
		Bejop133	ATCAATTGTCCTTATGCGCT		
		Bejop134	ATCAATTGTCCTTACGCGCT		
		Bejop135	ATCAATTGTCCTTATGCGCT		
		Bejop136	ATCAACTGTCCTTATGCGCT		
		Bejop139	GTTTGAATTGCATGAGGGTT		
		Bejop140	TTGGATTGCATGGGGRTT		
		Bejop137	FAM-ACACCCTTGAGAATCTGGTGTCCACAAT-BHQ		
7	RT-PCR	Bejop138	FAM-ACACCCTTGAGAATTTAGGTGTCCACAAT-BHQ	5376-5577 (TGBp2&3)	Ling <i>et al.</i> (2008)
		KL05-13	GTCCTCACCAATAAATTTAG		
		KL05-14	AGGAAAACCTTAACCCGTTT		

TGBp : Triple Gene Block protein, CP : Coat protein, RdRp : RNA-dependent RNA polymerase

\* Each position number is referred to bases in accession No. AJ606361.

## 9. 汚染種子 1 粒あたりの PepMV コピー数の推定

バルクサンプルにおける検出限界の試験に供する疑似汚染試料を作製するため、汚染トマト種子 1 粒が保有する PepMV コピー数を推定した。1. で得られた LP 系統の汚染トマト種子 1 粒を核酸抽出し、得られた核酸溶液中の PepMV コピー数を 6. の検量線により定量した。これを汚染種子 10 粒に対して実施した。

## 10. バルクサンプルからの PepMV 検出

実際の検査において確実に PepMV を検出できるか検証するため、バルクサンプルからの検出試験を行った。まず、種子については、健全トマト種子 399 粒に LP 系統汚染トマト種子 1 粒を混入した合計 400 粒のバルク種子サンプルから核酸を抽出した。次に、葉については、健全トマト葉 399 枚に LP 系統感染トマト葉 1 枚を混入した合計 400 枚のバルク葉サンプルから核酸を抽出した。これに加えて、LP 系統感染トマト葉 1 枚のみのサンプル、健全トマト葉 9 枚、99 枚、199 枚にそれぞれ LP 系統感染トマト葉 1 枚を混入した合計 10 枚、100 枚、200 枚のバルク葉サンプルから針刺法により鋳型を調製した。これらを鋳型として、7 及び 8 の試験結果から有効と判断された検出法を用いて検出を行った。

## 11. バルク種子サンプルにおける検出限界

実際の検査を模した 400 粒のバルク種子サンプルにおける検出限界を調査した。健全トマト種子 400 粒の種子磨砕液に PepMV コピー数既知の抽出核酸を添加し、疑似汚染試料とした。抽出核酸の添加量は、9. で推定した LP 系統の汚染トマト種子 1

粒が保有する PepMV コピー数の最低値を基準に、汚染種子 1 粒、1/5 粒、1/50 粒、1/500 粒、1/5,000 粒相当量とした。疑似汚染試料から核酸を抽出し、7 及び 8 の試験結果から有効と判断された検出法を用いて検出を行った。

## 結 果

### 1. PepMV コピー数の推定

作製した標準 RNA コントロールの希釈系列を用い、リアルタイム RT-PCR により得られた Ct 値に基づき検量線を作成した。検量線の決定係数 ( $R^2$ ) は 0.997、増幅効率率は 83.2% (傾き: -3.802)、y 切片は 43.673 であり、北條 (2008) により示された絶対定量を行う際の検量線の基準を満たし、定量に適することが確認された。

本検量線により PepMV の各系統に感染したトマト葉から得られた抽出核酸に含まれる PepMV のコピー数を絶対定量した結果、LP 系統:  $2.96 \times 10^7$  コピー/μL、EU 系統:  $6.75 \times 10^8$  コピー/μL、CH2 系統:  $1.23 \times 10^9$  コピー/μL、US1 系統:  $5.71 \times 10^5$  コピー/μL であった。

### 2. 調査対象検出法の PepMV 各系統に対する検出可否及び検出感度

Table 2 に示した 7 種の検出法のうち、検出法 No.3 は PES 系統を検出できなかった (Table 3)。また、検出法 No.4 は PES 系統に対する検出限界が  $10^5$  コピー/反応と、他の 4 系統に比べ検出感度が著しく低かった。これは、検出法 No.3 及び 4 のプライ

**Table 3.** Detection sensitivity of seven methods across all PepMV strains.

Number of detection method in Table 2	Strain of PepMV	Copy number of template <sup>a</sup>						Negative control <sup>b</sup>
		5.9×10 <sup>5</sup> copies	5.9×10 <sup>4</sup> copies	5.9×10 <sup>3</sup> copies	5.9×10 <sup>2</sup> copies	5.9×10 <sup>1</sup> copies	5.9×10 <sup>0</sup> copies	
No.1	LP	20.6 <sup>c</sup> / 20.5	24.1 / 24.1	27.3 / 27.1	30.7 / 29.9	- <sup>d</sup> / -	- / -	- / -
No.2		20.5 / 20.4	24.0 / 23.9	27.4 / 27.1	30.9 / 30.6	34.2 / 34.1	- / -	- / -
No.3		24.2 / 24.2	26.3 / 26.5	29.9 / 29.9	32.9 / 34.2	- / -	- / -	- / -
No.4		+ <sup>e</sup> / +	+ / +	+ / +	+ / +	- / -	- / -	- / -
No.5		24.5 / 24.5	27.0 / 27.0	29.3 / 29.7	30.1 / -	- / -	- / -	- / -
No.6		25.3 / 25.4	28.9 / 28.8	32.3 / 31.6	35.3 / 34.9	- / -	- / -	- / -
No.7		+ / +	+ / +	+ / +	+ / -	- / -	- / -	- / -
		1.4×10 <sup>5</sup> copies	1.4×10 <sup>4</sup> copies	1.4×10 <sup>3</sup> copies	1.4×10 <sup>2</sup> copies	1.4×10 <sup>1</sup> copies	1.4×10 <sup>0</sup> copies	Negative control
No.1	EU	22.8 / 22.9	26.0 / 26.6	30.0 / 29.3	- / -	- / -	- / -	- / -
No.2		23.7 / 23.7	27.2 / 26.8	30.2 / 30.0	33.6 / 33.0	- / -	- / -	- / -
No.3		24.9 / 25.3	28.8 / 28.4	31.4 / 32.4	34.4 / 34.5	- / -	- / -	- / -
No.4		+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	- / -	- / -	- / -
No.5		24.7 / 24.7	27.5 / 27.4	30.4 / 30.9	30.5 / 31.1	- / -	- / -	- / -
No.6		26.8 / 26.8	30.8 / 30.3	33.8 / 33.3	36.6 / -	- / -	- / -	- / -
No.7		+ / +	+ / +	+ / +	- / -	- / -	- / -	- / -
		2.5×10 <sup>5</sup> copies	2.5×10 <sup>4</sup> copies	2.5×10 <sup>3</sup> copies	2.5×10 <sup>2</sup> copies	2.5×10 <sup>1</sup> copies	2.5×10 <sup>0</sup> copies	Negative control
No.1	CH2	22.8 / 22.9	26.0 / 26.0	29.5 / 29.1	- / -	- / -	- / -	- / -
No.2		23.2 / 23.7	26.7 / 27.1	30.6 / 30.4	33.5 / 34.1	37.7 / 36.6	- / -	- / -
No.3		24.5 / 24.2	27.8 / 27.6	32.4 / 30.9	34.4 / 34.4	35.0 / -	- / -	- / -
No.4		+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	- / -	- / -	- / -
No.5		24.1 / 23.8	26.7 / 26.6	28.5 / 29.2	30.9 / -	- / -	- / -	- / -
No.6		27.6 / 27.1	30.3 / 30.7	33.4 / 33.6	37.5 / 37.6	37.5 / -	- / -	- / -
No.7		+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	- / -	- / -	- / -
		1.1×10 <sup>5</sup> copies	1.1×10 <sup>4</sup> copies	1.1×10 <sup>3</sup> copies	1.1×10 <sup>2</sup> copies	1.1×10 <sup>1</sup> copies	1.1×10 <sup>0</sup> copies	Negative control
No.1	US1	19.4 / 19.3	22.7 / 22.6	26.0 / 26.2	28.8 / 28.8	- / -	- / -	- / -
No.2		20.3 / 19.8	23.4 / 23.4	27.1 / 26.8	30.7 / 30.3	33.5 / 34.5	35.9 / -	- / -
No.3		26.7 / 26.3	29.2 / 29.0	33.4 / 32.1	34.8 / 37.3	- / -	- / -	- / -
No.4		+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	- / -	- / -	- / -
No.5		25.5 / 25.3	27.0 / 27.1	29.6 / 29.9	29.8 / -	- / -	- / -	- / -
No.6		21.1 / 21.0	24.8 / 24.5	28.1 / 28.1	31.1 / 31.3	34.8 / 35.2	38.5 / 39.1	- / -
No.7		+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	- / -	- / -	- / -
		2.7×10 <sup>5</sup> copies	2.7×10 <sup>4</sup> copies	2.7×10 <sup>3</sup> copies	2.7×10 <sup>2</sup> copies	2.7×10 <sup>1</sup> copies	2.7×10 <sup>0</sup> copies	Negative control
No.1	PES <sup>f</sup>	22.6 / 22.7	25.7 / 25.8	28.7 / 28.7	32.0 / 33.6	- / -	- / -	- / -
No.2		23.1 / 23.2	26.8 / 26.7	30.5 / 30.1	33.5 / 33.1	36.2 / -	- / -	- / -
No.3		- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
No.4		+ / +	+ / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
No.5		27.9 / 27.9	29.5 / 28.4	31.2 / 28.9	- / -	- / -	- / -	- / -
No.6		1.9×10 <sup>5</sup> copies	1.9×10 <sup>4</sup> copies	1.9×10 <sup>3</sup> copies	1.9×10 <sup>2</sup> copies	1.9×10 <sup>1</sup> copies	1.9×10 <sup>0</sup> copies	Negative control
No.6		28.2 / 27.9	31.4 / 31.4	34.6 / 35.3	37.1 / -	- / 39.9	- / -	- / -
		5.1×10 <sup>5</sup> copies	5.1×10 <sup>4</sup> copies	5.1×10 <sup>3</sup> copies	5.1×10 <sup>2</sup> copies	5.1×10 <sup>1</sup> copies	5.1×10 <sup>0</sup> copies	Negative control
No.7	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	- / -	- / -	- / -	

Nucleic acids as template were extracted from each dilution, and then RT-PCR or RT-qPCR was carried out for each template with duplicate.

a; Estimated copy number of PepMV added as template

b; Healthy tomato seeds

c; Ct values obtained by RT-qPCR

d; No detected

e; Detected by RT-PCR

f; Template of PES strain was used artificial transcribed RNA based on an isolate of PepMV PES strain (Accession No. HG313806). Therefore, different RNA dilution sets were used respectively, because amplified sites of each detection method were different on PepMV genome.

マーの3'末端配列とPES系統の遺伝子配列の間にミスマッチが存在することが原因と推定された。他の5種の検出法は、全ての系統を検出したが、その中でもNo.2の検出法は、LP、CH2、US1系統に対し10<sup>1</sup>コピー/反応まで、EU、PES系統は10<sup>2</sup>コピー/反応までを検出したことから、高い検出感度が認められた。

### 3. 健全植物における非特異的反応の有無

検出法No.1及び7は、全ての試験区において非特異的反応が確認されなかった (Table 4)。検出法No.2は、供した植物のうちトマト苗のみにおいて、12反復中1反復で非特異的反応が認められ、非特異的反応の発生頻度は0.46%であった。一

方で、検出法3、5及び6は複数の試験区において非特異的反応が生じ、各検出法の非特異的反応の発生頻度は、No.3:2.8%、No.5:5.1%、No.6:14.8%であった。

EPP0 (2022) に掲載される Tomato brown rugose fruit virus の検出法は、偽陽性率が2~14%であったと報告されている (Luigi *et al.*, 2022)。本調査においては、より厳しい条件を設定し、非特異的反応の発生頻度が1%未満を絞り込みの基準とした。

結果2.及び3.より、PepMV全系統を安定的に検出でき、非特異的反応の発生頻度が1%未満であった検出法No.1、2及び7が検出法として高い検出能が認められたことから、これら3法に絞り込み、以降の試験を実施した。

**Table 4.** Results of non-specific reaction tests for seven detection methods using healthy seed and seedling samples.

Species of plant	Cultivar	Sample type	Number of detection method in Table 2						
			No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7
Tomato	Large type	Seed	0/12 <sup>a</sup>	0/12	0/12	0/12	0/12	3/12	0/12
	Medium type		0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	5/12	0/12
	Small type		0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	3/12	0/12
Pepper	Chili pepper	Seed	0/12	0/12	0/12	nt <sup>b</sup>	3/12	0/12	0/12
	Green bell pepper		0/12	0/12	0/12	nt	0/12	0/12	0/12
	Red bell pepper		0/12	0/12	0/12	nt	1/12	0/12	0/12
	Shishito		0/12	0/12	0/12	nt	0/12	0/12	0/12
Eggplant	Long type	Seed	0/12	0/12	1/12	nt	2/12	0/12	0/12
	White type		0/12	0/12	4/12	nt	0/12	0/12	0/12
	Round type		0/12	0/12	1/12	nt	2/12	0/12	0/12
	Mizunasu		0/12	0/12	0/12	nt	1/12	3/12	0/12
Basil	-	Seed	0/12	0/12	0/12	nt	0/12	1/12	0/12
Amaranthus	-		0/12	0/12	0/12	nt	0/12	2/12	0/12
Kochia	-		0/12	0/12	0/12	nt	0/12	1/12	0/12
Tomato	-		0/12	1/12	0/12	0/12	0/12	5/12	0/12
Chili pepper	-	Seedling	0/12	0/12	0/12	nt	1/12	3/12	0/12
Eggplant	-		0/12	0/12	0/12	nt	1/12	0/12	0/12
Potato	-		0/12	0/12	0/12	nt	0/12	6/12	0/12

RT-PCR or RT-qPCR was performed in 12 times for each template.  
a; Number of non-specific reactions / number of total tested samples  
b; Not tested

**Table 5.** Results of detection tests using three selected methods for bulk samples of tomato seeds and seedlings.

Sample type	Seed	Seed	Seedling	Seedling	Seedling	Seedling	Seedling	Seedling	Seedling
Contamination rate	1 / 400 <sup>a</sup>	Negative control	1 / 400	Negative control	1 / 1	1 / 10	1 / 100	1 / 200	Negative control
Preparation method of template	K-SDS <sup>b</sup>	K-SDS	K-SDS	K-SDS	insect pin <sup>c</sup>	insect pin	insect pin	insect pin	insect pin
No.1 <sup>d</sup>	26.5 <sup>e</sup> / 26.4 27.4 / 27.5	- / -	18.3 / 18.3 17.3 / 17.4	- / -	27.1 / 27.2 29.3 / 29.4	26.8 / 26.8 28.9 / 28.8	26.3 / 26.3 25.7 / 25.7	24.4 / 24.5 22.6 / 22.8	- / - - / -
No.2	26.5 / 26.4 28.2 / 28.1	- / -	20.1 / 20.2 19.0 / 19.0	- / -	28.6 / 28.7 31.3 / 31.1	28.3 / 28.3 30.7 / 30.7	27.7 / 27.9 27.0 / 27.5	25.9 / 25.7 24.1 / 24.3	- / - - / -
No.7	+ <sup>g</sup> / + + / +	- / - - / -	+ / + + / +	- / - - / -	+ / + + / +	+ / + + / +	+ / + + / +	+ / + + / +	- / - - / -

Nucleic acids as template were extracted from each dilution with duplicate, and then RT-PCR or RT-qPCR was carried out for each template with duplicate.

a; Number of contaminated seeds or seedlings / number of total seeds or seedlings

b; Nucleic acids as template were extracted according to Yanagisawa *et al.*, 2012

c; Templates were prepared according to Yanagisawa *et al.*, 2012

d; Number of detection method that is shown in Table 2

e; Ct values obtained by RT-qPCR

f; No detected

g; Detected by RT-PCR

#### 4. 汚染種子 1 粒あたりの PepMV コピー数の推定

供試した 10 粒の汚染トマト種子全てから PepMV が検出され、汚染種子 1 粒が保有する PepMV コピー数は、最高値  $1.25 \times 10^9$  コピー / 粒、最低値  $2.83 \times 10^7$  コピー / 粒、平均値  $3.59 \times 10^8$  コピー / 粒と推定された。

#### 5. バルクサンプルからの PepMV 検出

1 粒の LP 系統汚染トマト種子を含む 400 粒のバルクトマト種子サンプルから、No.1、2、7 の各検出法により PepMV の検出を実施した結果、3 法ともに検出された (Table 5)。

また、1 枚の LP 系統汚染トマト葉を含む 400 枚のバルクトマト葉サンプルについても、同様に 3 法とも検出が認められた。さらに、針刺法を用いた場合においても、全ての試験区において PepMV を検出した。

#### 6. バルク種子サンプルにおける検出限界

検出法 No.1 及び 7 のバルク種子サンプルにおける検出限界は、 $5.65 \times 10^6$  コピー / サンプル (汚染種子 1/5 粒相当)、検出法 No.2 の検出限界は、 $5.65 \times 10^4$  コピー / サンプル (汚染種

子 1/500 粒相当) であった (Table 6)。検出法 No.2 は、検出法 No.1 及び 7 より 100 倍検出感度に優れていた。

#### 考 察

本調査結果より、検出法 No.1、2 及び 7 は、PepMV 全系統を検出でき、非特異的反応の発生頻度は極めて低く、トマトの種子及び葉のバルクサンプルからも PepMV を確実に検出できることが明らかとなった。一方で、検出法 No.6 は、既に検出能に係るバリデーションが実施され、非特異的反応は確認されなかったと報告されているが (ISF, 2023b)、本調査では非特異的反応が複数確認された。本調査における非特異的反応が認められた要因は、レポーター蛍光のバックグラウンドが高いことが関係していると考えられ、蛍光シグナルのわずかな変化が影響したためでないかと推察された。また、ISF (2023a) は、本調査とは異なるリアルタイム RT-PCR 用試薬を使用していることから、ISF (2023a) に従って検出を実施すれば、非特異的反応は発生しないと考えられた。以上のことから、本調査の方法では、検出法 No.1、2 及び 7 が PepMV の検査法として高い検

**Table 6.** Detection limits of three selected methods for bulk samples consisting of 400 tomato seeds.

Number of detection method in Table 2	Copy number spiked sample <sup>a</sup>					Negative control <sup>b</sup>
	2.8×10 <sup>7</sup> copies	5.7×10 <sup>6</sup> copies	5.7×10 <sup>5</sup> copies	5.7×10 <sup>4</sup> copies	5.7×10 <sup>3</sup> copies	
No.1	26.4 <sup>c</sup> / 26.4	28.7 / 28.3	- <sup>d</sup> / -	- / -	- / -	- / -
	26.4 / 26.4	28.6 / 28.6	- / -	- / -	- / -	- / -
No.2	28.3 / 27.9	30.3 / 30.3	34.0 / 33.6	38.3 / 36.1	- / 37.5	- / -
	27.6 / 27.6	29.9 / 30.0	33.5 / 33.5	37.5 / 38.0	- / -	- / -
No.7	+ <sup>e</sup> / +	+ / +	- / -	- / -	- / -	- / -
	+ / +	+ / +	- / -	- / -	- / -	- / -

Nucleic acids as template were extracted from each dilution with duplicate, and then RT-PCR or RT-qPCR was carried out for each template with duplicate.

a; Estimated copy number of PepMV added in 35mL solutions of homogenized 400 tomato seeds

b; Healthy 400 tomato seeds

c; Ct values obtained by RT-qPCR

d; No detected

e; Detected by RT-PCR

出能を有すると判断した。

植物検疫においては、高精度に検出できることは検出法を選定する上で重要な要素である。特に、種子は製品化される加工工程において、洗浄や消毒を含む様々な処理が施されることから、種子に存在するウイルス量は大きく変動することが想定される。そのため、種子を対象とする検査においては、高感度に検出できることが特に求められるため、有効と考えられる3法の中でも最も検出感度が高かった検出法 No.2 が検出法として最適であると推察された。

#### 引用文献

- CABI (2021) Pepino mosaic virus. Crop Protection Compendium. (online), available from <<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.43661>>, (accessed\_2025-7-11).
- Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1**: 19-21.
- EPPO (2013) PM 7/113 (1) Pepino mosaic virus. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. **43**: 94-104.
- EPPO (2021) *Potexvirus pepini*. EPPO Global Database. (online), available from <<https://gd.eppo.int/taxon/PEPMV0/datasheet>>, (accessed\_2025-7-11).
- EPPO (2022) PM 7/146 (2) Tomato brown rugose fruit virus. *EPPO Bulletin*. **52**: 665-692.
- Hanssen, I.M. and B.P.H.J. Thomma (2010) Pepino mosaic virus: A successful pathogen that rapidly evolved from emerging to endemic in tomato crops. *Mol. Plant Pathol.* **11**: 179-189.
- Hasiów, B., N. Borodynko and H. Pospieszny (2008) Development of a real time RT-PCR assay for detecting genetically different pepino mosaic virus isolates. *J. Plant Prot. Res.* **48(3)**: 295-301.
- 北條浩彦 (2008) 原理からよくわかるリアルタイム PCR 実験ガイド. 羊土社 東京 日本 : 1-189.
- ISF (2023a) Detection of Pepino mosaic virus (PepMV) in tomato seed. (online), available from <<https://worldseed.org/our-work/seed-health/ishi-methods/>>, (accessed\_2025-7-14).
- ISF (2023b) Detection of Pepino mosaic virus (PepMV) in tomato seed by seed extract RT-qPCR (SE-qPCR). (online), available from <<https://worldseed.org/our-work/seed-health/ishi-method-development-and-validation/>>, (accessed\_2025-7-14).
- Jones, R.A.C., R. Koenig and D.E. Lesemann (1980) Pepino mosaic virus, a new potexvirus from pepino (*Solanum muricatum*). *Ann. Appl. Biol.* **94**: 61-68.
- Ling, K.-S., W.M. Wintermantel and M. Bledsoe (2008) Genetic composition of Pepino mosaic virus population in North American greenhouse tomatoes. *Plant Dis.* **92**: 1683-1688.
- Luigi, M., A. Manglli, A. Tiberini, S. Bertin, L. Ferretti, A. Taglienti, F. Faggioli and L. Tomassoli (2022) Inter-laboratory comparison of RT-PCR-based methods for the detection of Tomato brown rugose fruit virus on tomato. *Pathogens*. **11**: 207.
- Moreno-Perez, M.G., I. Pagan, L. Aragon-Caballero, F. Caceres, A. Fraile and F. Garcia-Arenal (2014) Ecological and genetic determinants of Pepino mosaic virus emergence. *J. Virol.* **88**: 3359-3368.
- Spence, N.J., J. Basham, R.A. Mumford, G. Hayman, R. Edmondson, and D.R. Jones (2006) Effect of Pepino mosaic virus on the yield and quality of glasshouse-grown tomatoes in the UK. *Plant Pathol.* **55**: 595-606.
- 柳澤広宣・堤直也・石井一考・志岐悠介・栗原金光 (2012) RT-LAMP 法を用いた Potato spindle tuber viroid 検出法の改良. 植防研報 **48**: 7-12.
- Yanagisawa, H. and Y. Matsushita (2022) Effect of potato spindle tuber viroid variants and infection stage on seed transmission through pollen. *Lett. Appl. Microbiol.* **75**: 836-843.