

戦略的プロジェクト研究推進事業

「農林水産分野における気候変動対応のための研究開発」

令和元年度 最終年度報告書

中課題番号	15650846
中課題名	有害動植物の検出・同定技術の研究開発

研究実施期間	平成27年度～令和元年度（5年間）
代表機関	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 中央農業研究センター
研究開発責任者	大藤 泰雄
研究開発責任者 連絡先	TEL : 029-838-8916
	FAX : 029-838-8916
	E-mail : october@affrc.go.jp
共同研究機関	国立大学法人 岐阜大学流域圏科学研究センター
	公立学校法人 秋田県立大学生物資源学部
	学校法人 龍谷大学農学部
普及・実用化 支援組織	

<別紙様式3>最終年度報告書

I-1. 年次計画

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	27	28	29	30	31	機関	研究室
1. 遺伝子情報に基づく国内未発生トスポウウイルス類の網羅的簡易同定・検出技術とそのためのデータベースの開発	検出同定技術の開発					農研機構・中央農研	リスク解析グループ
2. 遺伝子情報に基づく国内未発生アザミウマ種及び系統の検出・同定技術とそのためのデータベースの開発	検出同定技術の開発						
3. 遺伝子情報に基づくカンキツグリーンング病病原細菌個体群及び近縁Liberibacter属細菌の検出・同定技術とそのためのデータベースの開発	検出同定技術の開発					農研機構・果樹茶研究部門	カンキツ病害虫ユニット
(1) 検出・同定・識別技術およびデータベースの開発	検出同定技術の開発						
(2) 種苗検査技術の開発	種子検定技術の開発					農研機構・種苗管理センター	病害検査課
						農研機構・果樹茶研究部門	病害ユニット
4. 遺伝子情報に基づくポスピウイロイド属の検出・同定手法の改良及びそのためのデータベースの開発						農研機構・野菜花き研究部門	生産管理ユニット
(1) 主要な花き類を加害するウイロイド類	検出同定技術の改良						

<p>(2) 主要野菜類を加害するウイルス類</p>	<p>← 検出同定技術の改良 →</p> <p>ダリア検定技術の改良</p>	<p>農研機構・中央農研</p>	<p>リスク解析グループ</p>
<p>(3) ダリア等を加害するウイルス類</p>	<p>← 検出同定技術の開発 →</p>	<p>秋田県立大学・生物資源科学部</p>	<p>生物生産科学科</p>
<p>5. 遺伝子情報に基づく国内未発生 <i>Phytophthora</i> 属病原糸状菌の検出・同定技術及びそのためのデータベースの開発</p>	<p>← 検出同定技術の開発 →</p>	<p>岐阜大学・流域圏科学研究センター</p>	<p>菌類生態学研究室</p>
<p>6. 遺伝子情報に基づく国内未発生有害線虫類の検出・同定技術とそのためのデータベースの開発</p>	<p>← 検出同定技術の開発 →</p>	<p>龍谷大学農学部</p>	<p>資源生物科学科</p>
<p>7. 遺伝子情報に基づく植物検疫のためのサツマイモの害虫ゾウムシ類個体群の検出・同定技術とそのためのデータベースの開発</p>	<p>← 検出同定技術の開発 →</p>	<p>農研機構・中央農業研究センター 農研機構・九州・沖縄農業研究センター 農研機構・農環変研究センター</p>	<p>生物的防除グループ 熱帯性病害虫管理グループ 昆虫評価分類ユニット</p>
<p>8. 重要有害動植物簡易同定のためのDNAバーコーディング等遺伝子情報に基づく検索システムの構築</p>	<p>← 統合データベースの開発 →</p>	<p>農研機構・農環変研究センター</p>	<p>昆虫評価分類ユニット</p>

I-2. 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者
	機関	研究室	
研究開発責任者	農研機構・中央農研	病害研究領域長	◎ 大藤泰雄
1. 遺伝子情報に基づく国内未発生トスポウウイルス類の網羅的簡易同定・検出技術とそのためのデータベースの開発	農研機構・中央農研	リスク解析グループ	○ 奥田 充 田中 穰 (2019. 4～)
2. 遺伝子情報に基づく国内未発生アザミウマ種及び系統の検出・同定技術とそのためのデータベースの開発	農研機構・果樹茶研究部門	虫害ユニット	○ 土田 聡 前任者 三代浩二 (～2016. 3) 後任者 上地奈美 (2016. 4～)
3. 遺伝子情報に基づくカンキツグリーンング病原細菌個体群及び近縁Liberibacter属細菌の検出・同定技術とそのためのデータベースの開発	農研機構・果樹茶研究部門	カンキツ病害虫ユニット	○ 富村健太
(1) 検出・同定・識別技術およびデータベースの開発	農研機構・果樹茶研究部門	カンキツ病害虫ユニット	△ 富村健太
		病害ユニット	藤川貴史
(2) 種苗検査技術の開発	農研機構・種苗セ	病害検査課	△ 佐藤仁敏  前任者星野はるな (～2016. 9) 前任者小野塚信哉 (2016. 10～ 2018. 3) 後任者大崎康平 (2018. 4～)
	農研機構・果樹茶研究部門	病害ユニット	藤川貴史

4. 遺伝子情報に基づくポスピウイルス属の検出・同定手法の改良及びそのためのデータベースの開発 (1) 主要な花き類を加害するウイルス類  (2) 主要野菜類を加害するウイルス類  (3) ダリア等を加害するウイルス類	農研機構・野菜花き研究部門	生産管理ユニット	○松下陽介
	農研機構・野菜花き研究部門	生産管理ユニット	△松下陽介
	農研機構・中央農研	リスク解析グループ	△柳澤広宣
	秋田県立大学	生物生産科学科	△藤 晋一 対馬大希 (2017.4～)
5. 遺伝子情報に基づく国内未発生 <i>Phytophthora</i> 属病原糸状菌の検出・同定技術及びそのためのデータベースの開発	岐阜大学	菌類生態学研究室	○景山幸二 日恵野綾香 (2017.4～)
6. 遺伝子情報に基づく国内未発生有害線虫類の検出・同定技術とそのためのデータベースの開発	龍谷大学	資源生物科学科	○岩堀英晶
7. 遺伝子情報に基づく植物検疫のためのサツマイモの害虫ゾウムシ類個体群の検出・同定技術とそのためのデータベースの開発	農研機構・九州沖縄農研	熱帯性病害虫研究グループ	○吉武 啓
	農研機構・中央農研	生物的防除グループ	有本 誠 (2017.4～)
8. 重要有害動植物簡易同定のためのDNAバーコーディング等遺伝子情報に基づく検索システムの構築	農研機構・農環変研究センター	昆虫評価分類ユニット	○中谷至伸  吉松慎一
	農研機構・農業情報研究センター	農業 AI 推進室	山中武彦

(注1) 研究開発責任者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

中課題番号	15650846	中課題 研究期間	平成27～令和元年度
大課題名	農林水産分野における気候変動対応のための研究開発		
中課題名	有害動植物の検出・同定技術の開発		
代表機関・研究開発責任者名	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 中央農業研究センター 大藤 泰雄		

### I-3. 研究目的

IPCC（気候変動に関する政府間パネル）第5次評価報告書（平成26年11月公表）においては、気候システムの温暖化は疑う余地はないとされており、地球温暖化は、我が国の農林水産物の生産にも重大な影響を及ぼす事が懸念されており、温暖化の影響や豪雨等の極端現象の増加に関する最新の科学的知見をベースとした政府全体の適応計画の検討が進められており、中長期的な視点を取り入れた適応策の策定が必要である。

そこで、本研究では、地球温暖化等により海外からの有害動植物侵入リスクが増加することを踏まえ、侵入が危惧される有害動植物種を特定し、その迅速な診断を可能とする検出・同定技術の開発を行うことを目的とする。

このため、本研究では、

1. 遺伝子情報に基づく国内未発生トスポウイルス類の網羅的簡易同定・検出技術とそのためのデータベースの開発
2. 遺伝子情報に基づく国内未発生アザミウマ種及び系統の検出・同定技術とそのためのデータベースの開発
3. 遺伝子情報に基づくカンキツグリーンング病病原細菌個体群及び近縁 *Liberibacter* 属細菌の検出・同定技術とそのためのデータベースの開発
4. 遺伝子情報に基づくポスピウイロイド属の検出・同定手法の改良及びそのためのデータベースの開発
5. 遺伝子情報に基づく国内未発生 *Phytophthora* 属病原糸状菌の検出・同定技術及びそのためのデータベースの開発
6. 遺伝子情報に基づく国内未発生有害線虫類の検出・同定技術とそのためのデータベースの開発
7. 遺伝子情報に基づく植物検疫のためのサツマイモの害虫ゾウムシ類個体群の検出・同定技術とそのためのデータベースの開発
8. 重要有害動植物簡易同定のためのDNAバーコーディング等遺伝子情報に基づく検索システムの構築

を実施する。

これらの成果により、現在植物防疫法施行規則別表1-2に記された栽培地検査を要する重要病害虫種を中心とする20種以上の有害動植物について、植物検疫において遺伝子情報に基づき24時間以内に検出・同定できるシステムの開発を目標とする。

その結果、従来迅速な検出・同定が困難であった病変部位や昆虫の卵・幼虫、もしくは死

骸の一部からであっても迅速な同定が可能な検査技術が確立されることにより、より効果的な防疫体制の確立につながり、国内の食料安定供給と国際的な重要植物病害虫の清浄国の地位の維持や輸出時の検査の効率化等の実現を通じて、我が国の農産物・食品輸出拡大にも貢献することが期待される。

## I-4. 研究方法

### (1) 遺伝子情報に基づく有害動植物の検出・同定技術の開発

我が国未発生(国内検疫対象を含む)の有害動植物について、形態等での識別が困難で侵入リスクが高い病害虫、特に、植物防疫法施行規則別表1-2に記された栽培地検査を要する重要病害虫種を中心として、発生国情報や標本、公開遺伝子情報を収集・分析し、優先して検出・同定技術開発対象とする種群を設定した。主要な有害動植物の類型として、ウイロイド、ウイルス、細菌、糸状菌、線虫・昆虫が含まれるように課題を設定した。対象とした種群について、検出・同定技術に利用可能な遺伝子情報を特定し、標本や付帯する生物学的情報と紐付けして、データベース化した。さらにこれら遺伝子情報に基づき、資料入手からおおむね24時間以内に検出・同定結果が得られるよう、PCR法・PCR-RFLP法・定量PCR法・定温核酸増幅法等を用いた簡易同定技術を開発した。

### (2) 重要有害動植物簡易同定のための情報統合データベースの開発

植物で異常が発見されたときに、上記(1)の研究で得られたデータを参照して、利用可能な検出・同定技術を検索、利用し、同定結果を確認するための、統合情報データベースを農研機構データベースに構築した。

## I-5. 研究結果

### (1) 遺伝子情報に基づく有害動植物の検出・同定技術の開発

国内未発生(国内検疫対象を含む)の有害動植物について、トスポウイルス17種、ポスピウイロイド6種、カンキツグリーンニング病やCarrot yellowsを含むLiberibacter属細菌5種、Phytophthora属糸状菌4種、線虫12種、アザミウマ類26種、甲虫2種合計72種について、国内既発生の近縁種52種との識別も可能な形で、簡易検出・同定技術を開発した。さらに、国内検疫対象となっているカンキツグリーンニング病菌アジア型とサツマイモの害虫ゾウムシ類2種については、国内での発見時における入り込みの経路推定のために、国内の個体群と海外の個体群を識別する遺伝子マーカーを開発した。さらに、サツマイモのアリモドキゾウムシでは、国内の南西諸島における遺伝子型の分布状況の詳細を初めて明らかにし、未発生地域での発見時の起源推定に貢献している。これらの種群についての遺伝子情報とその提供元となる標本情報、文献情報、画像、宿主・寄主植物等の情報を整理し、データベース化した。

### (2) 重要有害動植物簡易同定のための情報統合データベースの開発

病原体、宿主・寄主植物、標本情報、文献情報などの各種情報間の相互リンクを付けて、いずれかの情報から、他の情報を検索可能な形でデータベースを構築した。上記(1)で得られた、検出・同定技術と関連情報をこのデータベースに格納した。なお、実装先となる植物防疫所の特定されたユーザーを識別してアクセスを可能とするシステムでの運用としており、一般ユーザーは利用できない。

## I-6. 今後の課題

開発期間中にも、テンサイシストセンチュウの国内発見などの事例もあり、新たな病害虫の侵入リスクに備えるためにも、侵入警戒調査や国内発見時に生産現場で使えるさらに簡易な同定技術の開発も必要である。また、ブドウのピアス病、トマトのToBRFV等の新たに世界的な脅威となっている病害虫に対する迅速・簡易な検出同定技術や、情報データベースの充実をはかってゆく必要がある。本課題では、寄生植物を除くほぼ全ての植物病害虫のカテゴリーに対



応した統合情報データベースを構築し、それぞれの病害虫のカテゴリーを代表する国内未発生の有害動植物の遺伝子情報に基づく迅速な検出・同定技術と、関連情報データベースを開発したが、引き続き、上記のような新たな脅威に対して、データベースの更新と新たな種に対応した迅速な検出同定技術の実装をはかるためにも、専門家による継続した取組が必要と考える。

中課題番号	15650846	中課題 研究期間	平成27～令和元年度
小課題番号	1	小課題 研究期間	平成27～令和元年度
中課題名	有害動植物の検出・同定技術の開発		
小課題名	遺伝子情報に基づく国内未発生トスポウウイルス類の網羅的簡易同定・検出技術とそのためのデータベースの開発		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者名	農研機構 中央農業総合研究センター・奥田充、田中穰（令和元年）		

## II. 小課題ごとの研究目的等

### 1) 研究目的

トスポウウイルスは、様々な作物に感染することやアザミウマにより永続的に媒介されることなどから発生域の拡大が危惧されており、国内既発生近縁種との異同識別ができる汎用性のある新たな検出・同定技術の開発が必要である。そこで、トスポウウイルスの遺伝子情報に基づき迅速に検出可能かつ国内既発生種・系統と識別が可能な検出法を開発する。また、海外の遺伝子情報データベースを参照して国内未発生種について海外の発生情報からの同定を迅速に行う事を可能にする技術の開発を目指す。

### 2) 研究方法

(1) 文献情報、塩基配列データベース等から、我が国で既発生のトスポウウイルス及び国内未発生のトスポウウイルスについて、名称、初発年、発生国および被害作物の疫学的情報ならびに媒介アザミウマ種および遺伝子情報等の生物学的情報を収集・整理した。

(2) 複数ウイルス種の遺伝子領域を増幅できるプライマー（ユニバーサルプライマー）を用いたトスポウウイルスの検出に関する文献を調査した。これらプライマーが実際に利用可能であることを我が国で発生しているトスポウウイルスについて検証した。また、我が国で未発生のトスポウウイルス21種のうち、L RNA分節の塩基配列が明らかになっている17種について標的部位を含む領域の人工合成RNAを作成し、ユニバーサルプライマーを用いたRT-PCRにより検出できるかどうか検証した。

(3) ユニバーサルプライマーを用いたリアルタイムPCRを行い、増幅DNAを高分解能融解曲線（HRM）解析によりトスポウウイルス種の識別を試みた。また、増幅産物のDNAをピオチン化し、マイクロプレートハイブリダイゼーションによる識別を行った。

(4) 文献情報、塩基配列データベース等から収集・整理した国内既発生及び未発生のトスポウウイルスについて、種の情報、発生国、宿主、媒介アザミウマ種についてリレーショナルデータベースに登録する。

### 3) 研究結果

(1) 文献情報、塩基配列データベース等の調査から、The International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)の分類基準に基づき、これまでに独立した種として種名が提案されているトスポウウイルスは29種あり、このうち8種が国内既発生であることが明らかとなった（表1）。トスポウウイルスを媒介するアザミウマは全てアザミウマ科に属しており、

このうちCeratothripoides属1種、Dictyothrips 属1種、Frankliniella属8種、Scirtothrips 属2種及び、Thrips属4種がトスポウウイルスを媒介する主として報告されている。ただし、8種のトスポウウイルスについては、現時点で媒介するアザミウマが特定されていない。

(2) 我が国で発生しているトスポウウイルス8種について、既報のユニバーサルプライマー（表2）により検出できるかどうかを確認した結果、gL2740とgL3920cならびにt2740とt3920cおよびgM410とgM870cは、我が国で発生しているトスポウウイルス8種を検出できることが明らかとなった。さらに、t2740とt3920cを現在報告されている全てのトスポウウイルスの標的領域の塩基配列に適合するように改変し、t2740#1とt3920c#1を作成した（図1）。

(3) ユニバーサルプライマーt2740#1とt3920c#1を用いたリアルタイムPCRを行なったところ、国内既発生8種トスポウウイルスのRNAおよび国内未発生トスポウウイルス19種の人工合成RNAからDNAの増幅が確認できた。その後、HRM解析を行なったが、得られた融解曲線から種を識別することは困難であった。このため、増幅DNAをビオチン化し、マイクロプレートハイブリダイゼーションによる判別を試みた。その結果、同種の増幅DNAの組み合わせの場合のみ高い反応を示し、24時間以内に特異的識別が可能であることが示された。また、増幅DNAをビオチン化する代わりに、ビオチン化プライマーを用いてリアルタイムRT-PCRを行うことでさらに検出に要する時間を短縮することができた。

(4) 国内未発生のトスポウウイルス発生国に関する情報178件、媒介アザミウマ種に関する情報（86件）を収集・整理し、データベースとして登録作業を行なった。

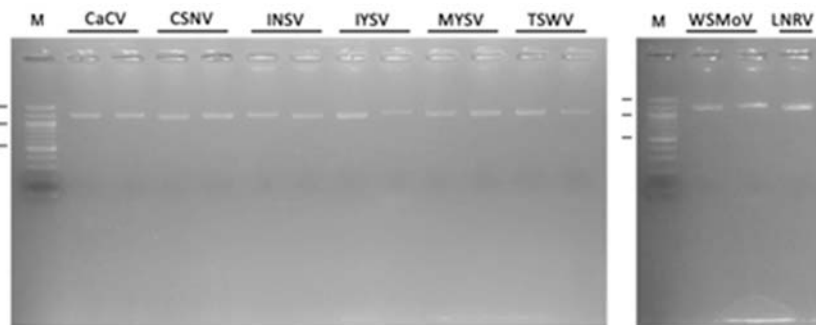


図1. ユニバーサルプライマーt2740#1とt3920c#1による国内発生トスポウウイルス種の検出

表1 トスポウウイルスの発生状況

略称 <sup>1)</sup>	初発国	初発	分布 <sup>2)</sup>	媒介種 <sup>3),4)</sup>
ANSV	コロンビア	2008	コロンビア	(Fo)
BeNMV	ブラジル	2006	ブラジル	未同定
CaCV	オーストラリア	1999	日本, インド, タイ, オーストラリア, 台湾	Cc, (Tp)
CCSV	台湾	2001	台湾	Tp
CSNV	ブラジル	1994	日本, イラン, ブラジル, ベルギー*, イタリア, オランダ*, スロベニア*, イギリス*	Fo, Fs
<u>GBNV</u>	インド	1949	イラン, インド, インドネシア, ネパール, ベトナム, タイ, バングラデシュ	Fs, Tp
GCFSV	台湾	1992	台湾	Sd
<u>GRSV</u>	南アフリカ	不詳	南アフリカ共和国, アメリカ合衆国, アルゼンチン, ブラジル, フィンランド	Fg, Fo, Fs
<u>GYSV</u>	インド	1979	インド, 中国	Sd
HCRV	中国	2007	中国	未同定
<u>INSV</u>	アメリカ	1980代後半	日本, 中国, イラン, イスラエル*, ウガンダ, カナダ, アメリカ合衆国, メキシコ, コスタリカ, チリ, 欧州(オーストリア, ベルギー, ボスニア・ヘルツェゴビナ, ブルガリア, チェコ, フィンランド, フランス, ドイツ, ハンガリー, イタリア, オランダ, ポーランド, ポルトガル, スロベニア, スペイン, イギリス), ニュージーランド	Ff, Fi, Fo
<u>IYSV</u>	オランダ	1992	日本, インド, インドネシア, イラン, イスラエル, パキスタン, スリランカ, タジキスタン, エジプト, ケニア, モーリシャス, 南アフリカ共和国, ウガンダ, ジンバブエ, アメリカ合衆国, カナダ, グアテマラ, チリ, ペルー, ウルグアイ, ブラジル, 欧州(オーストリア, ボスニア・ヘルツェゴビナ, フランス, ドイツ, ギリシャ, イタリア, オランダ, セルビア*, スロベニア, スペイン, イギリス), オーストラリア, ニュージーランド	Tt
LNRV	日本	2007	日本	未同定
MeSMV	メキシコ	2007	メキシコ	未同定
MVBaV	中国	2010	中国	未同定
MYSV	日本	1992	日本, 中国, 台湾, タイ, エクアドル	Tp
PCSV	台湾	2009	台湾	未同定
PNSV	ペルー	2010	ペルー	未同定
<u>PolRSV</u>	イタリア	2005	イタリア	Db
SVNV	アメリカ	2008	アメリカ合衆国	Sv

<u>TCSV</u>	ブラジル	不詳	アメリカ合衆国, アルゼンチン, ブラジル, ドミニカ共和国, プ エルトリコ	Fi, Fo, Fs
TNRV	タイ	2008	タイ	Cc, Tp
TNSV	中国	2009	中国	未同定
<u>TSWV</u>	オーストラリ ア	1915	アジア(アフガニスタン, 日本, 中国, インド, インドネシア, イ ラン, イスラエル, ヨルダン, 韓国, レバノン, マレーシア, ネパ ール, オマーン, パキスタン, サウジアラビア, スリランカ, シリ ア, 台湾, タイ), アフリカ(アルジェリア, ブルキナファソ, コン ゴ, コートジボワール, エジプト, ケニア, リビア, マダガスカル, モーリシャス, ニジェール, ナイジェリア, セネガル, 南アフ リカ共和国, スーダン, タンザニア, チュニジア, ウガンダ, ジン バブエ), カナダ, アメリカ合衆国, メキシコ, コスタリカ, 南米 (アルゼンチン, ポリビア, ブラジル, チリ, コロンビア, ドミニ カ共和国, エクアドル, ガイアナ, ハイチ, ジャマイカ, パラグア イ, プエルトリコ, スリナム, ウルグアイ, ベネズエラ), 欧州(ア ルバニア, アルメニア, オーストリア, アゼルバイジャン, ベル ギー, ボスニア・ヘルツェゴビナ, ブルガリア, クロアチア, キプ ロス, チェコ, デンマーク*, エストニア*, フィンランド, フラン ス, ジョージア, ドイツ, ギリシャ, ハンガリー, アイルランド, イタリア, ラトビア*, リトアニア, マルタ, モルドバ, モンテネ グロ, オランダ, ノルウェー*, ポーランド*, ポルトガル, ルーマ ニア, ロシア, セルビア, スロベニア, スペイン, スウェーデン, スイス, トルコ, ウクライナ, イギリス), オーストラリア, クッ ク諸島, ニューゼaland, パプアニューギニア	Fb, Fc, Ff, Fg, Fi, Fs, Fo, Ts, Tt
TYRV	イラン	2002	イラン, ケニア	Fo, Tt
TZSV	中国	2005	中国	Fo
<u>WBNV</u>	インド	1991	インド	Tf <sup>5)</sup>
<u>WSMoV</u>	タイ	1988	日本, 中国, インド, タイ, 台湾	Tp
<u>ZLCV</u>	ブラジル	不詳	ブラジル	Fz

1) ウイルス名称は本文を参照のこと。ICTVの認定種を下線で示した。

2) 発生国の一部は, EPP0 Global Databaseを参照した。アスタリスクのついた国は根絶された, または現在は発生が認められない国を示す。

3) Cc, *Ceratothripoides claratrix*; Db, *Dictyothrips betae*; Fb, *Frankliniella bispinosa*; Fc, センダングサアザミウマ (*F. cephalica*) ; Ff, ウスグロアザミウマ (*F. fusca*); Fg, *F. gemina*; Fi, ヒラズハナアザミウマ (*F. intonsa*); Fo, ミカンキイロアザミウマ (*F. occidentalis*); Fs, *F. schultzei*; Fz, *F. zucchini*; Sd, チャノキイロアザミウマ (*Scirtothrips dorsalis*); Sv, *Sericothrips variabilis*; Tf, キイロハナアザミウマ (*Thrips flavus*); Tp, ミナミキイロアザミウマ (*T. palmi*); Ts, ダイズウスイロアザミウマ (*T. setosus*); Tt, ネギアザミウマ (*T. tabaci*)。和名が無い種は国内未発生。

4) 文献では媒介の可能性が示唆されているが, 実験により確認されていない種はカッコ内に示した。

5) ミナミキイロアザミウマの誤同定の可能性が指摘されている (本文参照)。

表2. トスポウウイルスの検出に用いたプライマー

プライマー		ターゲット領域	増幅サイズ	報告された 検出種数	リファレンス
上流側	下流側				
gM410	gM870c	NSm (M RNA)	約700bp	12	Chen et al. (2012)
gL2740	gL3920c	RdRp (L RNA)	約1200bp	12	Chen et al. (2012)
t2740	t3920c	RdRp (L RNA)	約1200bp	5	Chao et al. (2010)
gL3637	gL4435c	RdRp (L RNA)	約890bp	10	Chu et al. (2001)

#### 4) 成果活用における留意点

#### 5) 今後の課題

検出対象としたトスポウウイルス29種のうち、8種のトスポウウイルスについては、媒介するアザミウマが特定されていないため、万一、侵入した場合に速やかな対処が困難になる可能性がある。情報収集を引き続き行う必要がある。

#### <引用文献>

- (1) 奥田充「我が国で発生しているトスポウウイルスについて」日本植物病理学会報(2016) 82: 169-184.
- (2) 奥田充「トスポウウイルスの検出に有効なユニバーサルプライマー」関東東山関東病害虫研究会報(2017) 64: 68-72

中課題番号	15650846	中課題 研究期間	平成27～令和元年度
小課題番号	2	小課題 研究期間	平成27～令和元年度
中課題名	有害動植物の検出・同定技術の開発		
小課題名	遺伝子情報に基づく国内未発生アザミウマ種及び系統の検出・同定技術の開発とのためのデータベース開発		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者 名	農研機構果樹茶業研究部門・生産・流通研究領域 虫害ユニット 土`田聡・上地奈美		

## II. 小課題ごとの研究目的等

### 1) 研究目的

近年の世界的な農産物輸出入量の飛躍的な増大により、農業害虫の世界的な分布拡大が重大な問題となっている。とりわけアザミウマ類は植物検疫で最も多く検出される害虫分類群の一つであり、侵入リスクの極めて高い害虫種といえる。特に幼虫等の未成熟ステージでは形態による同定が極めて困難、あるいは不可能である。そこで、ウイルス媒介能力の高い国内未発生のアザミウマ種および未発生系統の、特に幼虫など未成熟ステージにおける簡易識別を可能にする技術を開発し、早期発見と迅速な検疫措置の遂行を可能にする。

### 2) 研究方法

植物輸入検疫で検出されるアザミウマ種サンプルの提供を植物防疫所に依頼し、国内で採取できるアザミウマ種と合わせ、可能な限り多くの種・系統を入手する。得られたアザミウマ種は形態写真を記録するとともに、ミトコンドリアCOI遺伝子の塩基配列情報を解析する。塩基配列情報をもとに、種判別のための種特異的プライマーを設計する。得られた塩基配列情報、写真、文献情報等を統合してデータベースを作成する。DNAの抽出法、PCR条件等を検討し、アザミウマ類の種判別のための手順書を作成する。

### 3) 研究結果

- (1) 横浜、神戸および名古屋植物防疫所管内の4空港支所より、輸入検疫発見で発見されたアザミウマサンプル合計75種1028個体の提供を受けた。また、国内では53種256個体のアザミウマを採集、入手した。
- (2) DNA抽出法を検討し、後に形態を観察するための非破壊DNA抽出法、短時間での診断を可能とするための簡易DNA抽出法をそれぞれ確立した。
- (3) 得られたアザミウマ種から非破壊でDNAを抽出し、103種256系統のミトコンドリアCOI塩基配列情報を明らかにした。うち82種184系統については、COI遺伝子の全長塩基配列を明らかにしている。また、93種について、実体顕微鏡による形態写真データを蓄積した。
- (4) ミトコンドリアCOI遺伝子DNAバーコード領域を増幅するための既報プライマーを改変し、アザミウマ類全般の増幅を可能とするユニバーサルプライマーを設計した。
- (5) 得られたミトコンドリアCOI塩基配列をもとに、67種アザミウマの種特異的プライマ

ーを設計した（表1）。得られたプライマーは、同属の近縁種、および寄主植物が共通するアザミウマ種のDNAを増幅しないことを確認し、特異性を実証した。また、統一したPCR条件を確立し、同一回のPCRにより複数種アザミウマを同時判別することを可能にした。

表1 種特異的プライマーを設計したアザミウマ種

国内未分布種 (12属26種)	<i>Apterothrips apteris</i> , <i>Craspedothrips minor</i> , <i>Dichromothrips corbetti</i> , <i>Eparsothrips varicornis</i> , <i>Frankliniella gossypiana</i> , <i>F. panamensis</i> , <i>F. schultzei</i> (体色型識別可), <i>F. williamsi</i> , <i>Glaucothrips glaucus</i> , <i>Haplothrips</i> <i>froggatti</i> , <i>H. robustus</i> , <i>H. varius</i> , <i>Limothrips cerealium</i> , <i>Megalurothrips</i> <i>sjostedti</i> , <i>Scirtothrips aurantii</i> , <i>S. citri</i> , <i>Synaptothrips gezinae</i> , <i>Thrips</i> <i>angusticeps</i> , <i>T. atactus</i> , <i>T. australis</i> , <i>T. fuscipennis</i> , <i>T. imaginis</i> , <i>T. madronii</i> , <i>T. major</i> , <i>T. obscuratus</i> , <i>T. parvispinus</i> , <u><i>Frankliniella bispinosa</i></u> , <u><i>Dictyothrips betae</i></u>
国内分布種 (20属41種)	<i>Aeolothrips fasciatus</i> , <i>Anaphothrips obscurus</i> , <i>A. sudanensis</i> , <i>Arorathrips</i> <i>mexicanus</i> , <i>Chirothrips maincatus</i> , <i>Echinothrips americanus</i> , <i>Frankliniella</i> <i>cephalica</i> , <i>F. fusca</i> , <i>F. intonsa</i> , <i>F. occidentalis</i> , <i>F. tenuicornis</i> , <i>Franklinothrips</i> <i>vespiformis</i> , <i>Gynaikothrips ficorum</i> , <i>Haplothrips aculeatus</i> , <i>H. chinensis</i> , <i>H. ganglbaueri</i> , <i>H. gowdeyi</i> , <i>H. leucanthemi</i> , <i>H. nigricornis</i> , <i>Heliothrips</i> <i>haemorrhoidalis</i> , <i>Hercinothrips femoralis</i> , <i>Megalurothrips distalis</i> , <i>M. usiatus</i> , <i>Microcephalothrips abdominalis</i> , <i>Mycterothrips glycines</i> , <i>Scirtothrips dorsalis</i> , <i>Scolothrips takahashii</i> , <i>Selenothrips rubrocinctus</i> , <i>Taeniothrips eucharii</i> , <i>T. inconsequens</i> , <i>Tenothrips frici</i> , <i>Thrips alliorum</i> , <i>T. coloratus</i> , <i>T. flavus</i> , <i>T. hawaiiensis</i> , <i>T. nigropilosus</i> , <i>T. palmi</i> , <i>T. pini</i> , <i>T. setosus</i> , <i>T. simplex</i> , <i>T. tabaci</i>

下線： トスポウウイルス媒介未入手種(DB登録配列をもとに設計、ネガティブ反応のみ検証)

- (6) 複数種サンプルから同時抽出したDNAに対し、各々の種特異的プライマーでPCRすることにより、混合サンプルから複数種DNAを検出できることを明らかにし、同一植物体上に混在する複数種アザミウマの種構成を効率的に解明できることを確認した。
- (7) トスポウウイルス媒介種を中心とするアザミウマ種について、遺伝子解析関連、薬剤抵抗性関係の文献を中心に413件の文献情報をリスト化した。93種アザミウマ標本の実体顕微鏡写真、解析した103種256系統のCOI塩基配列情報、67種アザミウマの種特異的PCRプライマー配列情報とともにデータベース構築に供した。
- (8) DNAバーコーディングおよびPCRベースの診断法の2通りの手法を用いたアザミウマ類の種同定について、フローチャートで工程を示すとともに(図1)、DNA抽出法、PCR条件等をまとめた手順書を作成した。



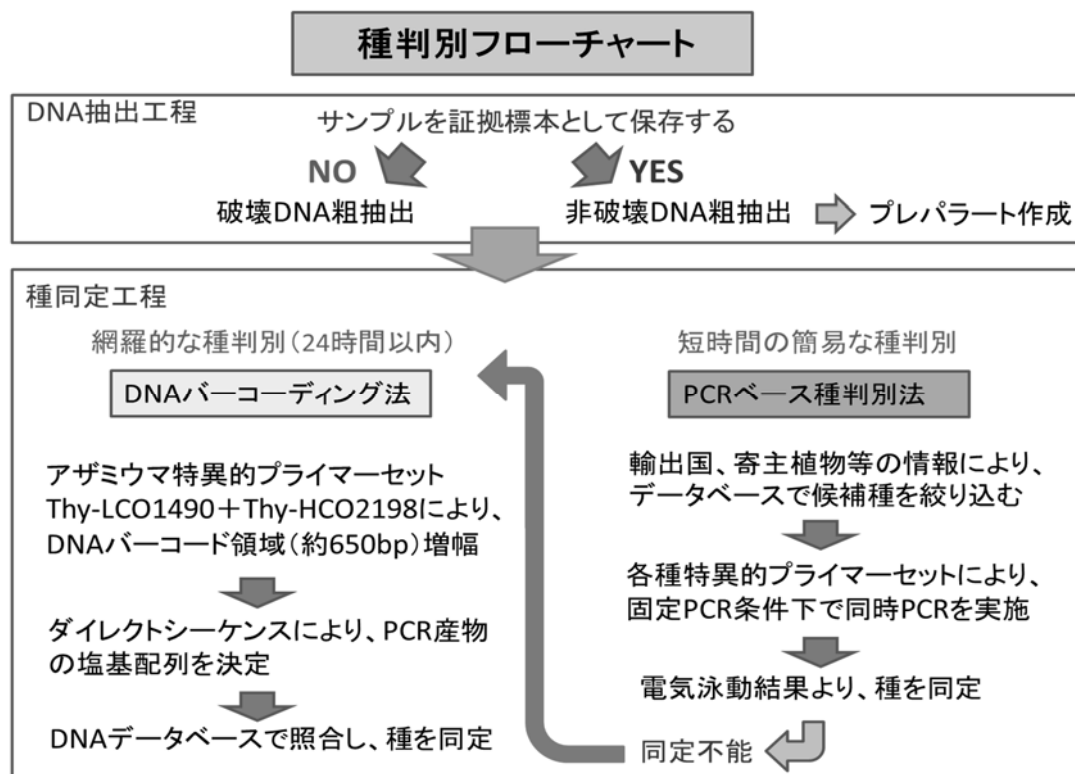


図1 DNAバーコーディング法およびPCRベース手法によるアザミウマ種判別フローチャート

#### 4) 成果活用における留意点

簡易種判別法は、開発した主要種アザミウマの特異的プライマーを用いることにより、植物輸入検疫における、発見回数ベース（1997年～2017年）で約99%のサンプルをカバーできるが、67種以外の発見回数の少ないアザミウマ種の診断には対応できない。DNAバーコーディング法による網羅的種判別においては、DNAデータベース（BOLD SYSTEM）既登録の384種（2019年12月19日現在）について分子同定可能であるが、未登録の希少種は種レベルでの同定はできない。分子同定不能種については、DNA非破壊抽出した標本を形態により同定する必要がある。

#### 5) 今後の課題

より正確な種判別を可能とするために、アザミウマ類COI塩基配列情報をさらに集積し、適宜データベースを更新していく必要がある。

<引用文献>なし

中課題番号	15650846	中課題 研究期間	平成27～令和元年度
小課題番号	3 - 1	小課題 研究期間	平成27～令和元年度
中課題名	有害動植物の検出・同定技術の開発		
小課題名	3. 遺伝子情報に基づくカンキツグリーンング病原細菌 個体群及び近縁Liberibacter属細菌の検出・同定技術とそ のためのデータベースの開発		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者名	国立研究開発法人 農研機構 果樹茶業研究部門 カンキツ研究領域 富村 健太 国立研究開発法人 農研機構 果樹茶業研究部門 生産・流通研究領域 藤川 貴史		

## II. 小課題ごとの研究目的等

### 1) 研究目的

カンキツグリーンング病原細菌に関しては現在日本国内における発生域が限定されているものの、新規発生地もしくは根絶した地域への再侵入のリスクがある。本病原細菌が再侵入するリスクに備え、侵入経路を推定する技術の構築が必要である。また、国内未発生である近縁Liberibacter属細菌種についても侵入リスクが高まっている。そこで本研究では、カンキツグリーンング病原細菌個体群を識別できる技術開発を行うとともに、近縁Liberibacter属細菌種を迅速に同定・識別できる技術開発を目指す。

### 2) 研究方法

(1) InDelマーカーおよびSNPマーカーにより得られたLas集団に関する遺伝子情報をデータベースに登録する。

(2) 現時点で知られているカンキツグリーンング病原細菌の全ゲノム情報をもとに挿入・欠失配列を検索する。さらに、検索した挿入・欠失配列を識別するInDelマーカーを作成する。

(3) 塩基配列データベース情報を基に塩基多型が見られる遺伝子領域を特定しSNPマーカーを作成する。

(4) 作成したSNPマーカーおよびInDelマーカーのうち、どの遺伝子マーカーを用いればLasの国内集団と海外集団を識別できるか検討する。さらに、ステークホルダーである植物防疫所等で利用可能な技術として提供するために、デモンストレーションを行うとともに、改善点等を反映させた手順書（マニュアル）を作成する。

(5) 近縁Liberibacter属細菌5種(Las, Laf, Lam, LsoおよびLcr)を同時に検出できる遺伝子領域を選抜する。さらに、ステークホルダーである植物防疫所等で利用可能な技術として提供するために、デモンストレーションを行うとともに、改善点等を反映させた手順書（マニュアル）を作成する。

### 3) 研究結果

(1) Lasに関する遺伝子情報 (SNPおよびInDelマーカーを用いたジェノタイピングデータ) について、データベースに登録した。

(2) カンキツグリーンング病原細菌の全ゲノム情報が明らかになっている日本株、アメリカ株および中国株の3株についてゲノムワイドに比較を行った。その結果、プロフェージ遺伝子領域以外にも、少なくとも4遺伝子座において挿入・欠失配列の有無が確認されたことから、これら遺伝子座について5種類のInDelマーカーを作成した。

(3) 塩基多型が観察されたomp遺伝子領域の2カ所およびcluster遺伝子領域の4カ所計6カ所のSNPについてマーカーを作成した。

(4) 作成した5種類のInDelマーカーのうち、Domain I-aもしくはDomain IIマーカーを用いることで両集団を識別することが可能と思われた。また6種類のSNPマーカーのうち、SNP-omp2415もしくはSNP-rpl8061マーカーを用いることでも両集団を識別することが可能と思われた。Lasに関する海外集団と国内集団の識別法のマニュアル化に向け、門司植物防疫所でデモンストレーションを行い、改善点の洗い出しを実施した。デモンストレーションでの改善点を踏まえ手順書 (マニュアル) を作成した。

(5) 近縁Liberibacter属細菌5種を同時に検出できる遺伝子領域としてnuoNおよびdnaA遺伝子座を選抜するとともに、いずれの遺伝子座についても安定して増幅することを確認した。次に、PCR-RFLP法を用いることにより近縁Liberibacter属細菌5種を種ごとに識別できることが明らかとなった。近縁Liberibacter属細菌種の識別法のマニュアル化に向け、横浜植物防疫所でデモンストレーションを行い、改善点の洗い出しを実施した。デモンストレーションでの改善点を踏まえ手順書 (マニュアル) を作成した。

### 4) 成果活用における留意点

Lasに関する海外集団と国内集団の識別法については、今回開発した3遺伝子マーカーのいずれかを用いることで識別可能であるが、手順書に記載したが1遺伝子のみの結果をもってLasの集団の由来を誤推定する危険性を完全に否定できないので、複数の遺伝子マーカーを用いて推定することが望ましい。

### 5) 今後の課題

これまでに得られた成果の論文化を行うとともに、本課題で開発した技術についてはステークホルダーに対してフォローアップを行う予定である。

### <引用文献>

富村健太、カンキツグリーンング病対策の現状と今後の展望、植物防疫 72(11), 2-6 (2018)

中課題番号	15650846	中課題 研究期間	平成27～令和元年度
小課題番号	(3-2)	小課題 研究期間	平成27～令和元年度
中課題名	有害動植物の検出・同定技術の開発		
小課題名	遺伝子情報に基づくカンキツグリーンニング病病原細菌個体群及び近縁Liberibacter属細菌の検出・同定技術とそのため のデータベースの開発 (2) 種苗検査技術の開発		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者名	国立研究開発法人・農研機構・種苗管理センター・大崎康平/佐藤仁敏、果樹茶業研究部門・藤川貴史		

## II. 小課題ごとの研究目的等

### 1) 研究目的

Liberibacter属細菌の検出・同定技術とそのためデータベースの開発を目的とする。特に、海外から種子検査が求められているCandidatus Liberibacter solanacearum (Lso) については、伝搬経路とみなされるニンジン種子における検査技術を開発する。

### 2) 研究方法

フランス産Lso汚染ニンジン種子3ロットを用いて、①本病原体の種子伝染の可能性を明らかにし、また②ニンジン種子のLso検査法を確立した。

(1) H29およびH30年度に、汚染種子3ロット、それぞれ約240株を播種、栽培し、栽培期間中にLsoの病徴発現を観察した。また、病徴の有無にかかわらず、全ての育苗株から採葉し、遺伝子解析によってLso検出を試みた。この結果から、「相対的な寄生圧」を算出し、Lsoの種子伝染の可能性について明らかにした。

(2) ニンジン種子のLso検査法について、国内外の検査機関等で用いられている検査マニュアルを入手した。それぞれの検査手順について、その妥当性評価試験を実施し、最適な検査手順を選択した。また、文献やデータベースからLso特異プライマーを入手または開発し、その特異性および検出感度について評価した。

この選択した検査手順および特異プライマーについて、ニンジン種子からのLso検出試験を実施し、検査マニュアル(案)を確立した。このマニュアル(案)について、植物防疫所協力のもと実施した妥当性評価試験の結果をもとに、ニンジン種子の検査マニュアル(初版)を完成させた。

### 3) 研究結果

(1) H29およびH30年度の栽培試験において、Lso汚染種子由来の全ての実生苗に、Lsoと疑われる病徴は観察されなかった。またそれぞれの苗から採取した葉の遺伝子解析結果につい

でも、全てLso陰性であった。それぞれの汚染種子ロットの汚染率を考慮し、「相対的な寄生圧」を計算した結果、Lso汚染種子由来の実生苗の汚染圧比は約0.0028であった。これはFisher流95%信頼度で、Lso汚染している種子に対してLso汚染種子由来のニンジン実生苗がLsoに汚染されている可能性が0.0028以下であることを示しており（1:0.0028）、数理的には、Lsoは汚染種子から苗に伝染する可能性が著しく低いことを示す（参考として、「事実上サクラはPPVに感染しない（汚染圧比0.87%）」場合と比べてもLso実生苗の汚染圧比は低い。）この値は、輸入検疫における不良植物の限界寄生率と比較しても十分に低い値であることから、種子伝染は起こらないと考えられた。本試験結果を論文として取りまとめた（JGPPに投稿・受理済）。

（2）Lso検査マニュアルについて、オーストラリア検疫、横浜植物防疫所およびISHI-Vegの検査法を評価し、最適な検査方法を確立した。その結果、無処理種子5000粒中の汚染種子1粒を検出できる方法が確立された。本法の妥当性について、横浜植物防疫所輸出検疫担当および精密検定担当の協力のもと、確認試験を実施した結果、全ての供試試料について正しい結果が得られ、その妥当性が確認された。以上の結果を基に、ニンジン種子のLso検査マニュアル（初版）を完成させた。

なお、確立した検査法（開発法）は、検疫等で用いられている従来法と比較して、1検体あたりの検査作業を約4時間短縮し、試薬消耗品コストをおよそ¥28,000削減させることができた（下表を参照）。

表 1. 開発法と従来法とのコスト比較。

20,000 粒/サンプル、開発法は 5,000 粒/サブサンプル、従来法は 400 粒/サブサンプル、市販キットによる DNA 抽出、リアルタイム PCR 解析の条件で比較

項目	従来法	開発法	差額
消耗品	¥9,515	¥940	¥8,575
サブサンプリング	*1	*1	
種子粉砕	*1	*1	
DNA 抽出	¥13,558	¥1,085	¥12,473
リアルタイム PCR 解析	¥8,349	¥1,237	¥7,112

\*1 消耗品費に含まれる。

表 2. 開発法と従来法との作業時間比較。

表 1 と同じ検査条件で比較（単位：時間）

項目	従来法	開発法	短縮時間
サブサンプリング	1.5	0.8	0.7
種子粉砕	1.5	0.5	1.0
DNA 抽出	4.0	1.5	2.5
リアルタイム PCR 解析	0.5	0.5	0.0

#### 4) 成果活用における留意点

(1) ニンジンのLsoが種子伝染する可能性が極めて低く見積もられることについて、論文

等による公表の他、検疫機関および種苗関連業者に情報共有し、検疫・品質管理検査や種子処理などの必要性に関する検討材料とさせる。

(2) まず、植物防疫所に実装してもらうために、本マニュアルを論文等により公表する。また、民間（特に検査会社）へ実装させる際には、成果利用の許諾を得させる必要がある。

#### 5) 今後の課題

- ・ニンジンLsoの種子伝染の可能性および検査マニュアル（検出技術）について、国内外の検査機関・種苗関連業者への情報提供を継続する。
- ・本検査マニュアルを論文等により公表する。
- ・検査機関および種苗業者の品質管理部門などへ本技術を移転する。

#### <引用文献>

- ・ Fujikawa et al. (2020) Seed transmission of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ is unlikely in carrot
  - ・ Fujiwara and Fujikawa (2016) Primers for both conventional and real-time PCR in diagnosis of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’
- ・ Australian Government, Department of Agriculture (2017), Diagnostic protocol for the identification and detection of *Candidatus Liberibacter solanacearum*, the causal agent of zebra chip of potatoes.
- ・ International seed federation (2016), Detection of *Candidatus Liberibacter solanacearum* on carrot seeds
- ・ 大石ら (2017)、リアルタイムPCR法を用いたニンジン種子からの *Candidatus Liberibacter solanacearum* 検出プロトコルの検証、横植調研報 第53号
- ・ 山村 (2011)、農学と統計学、計量生物学Vol. 32

中課題番号	15650846	中課題 研究期間	平成27～令和元年度
小課題番号	4	小課題 研究期間	平成27～令和元年度
中課題名	有害動植物の検出・同定技術の開発		
小課題名	遺伝子情報に基づくジャガイモやせいもウイルス属の検出・同定手法の改良及びそのためのデータベースの開発		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者名	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 野菜花き研究部門・松下陽介 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 中央農業研究センター・柳澤 広宣 公立大学法人 秋田県立大学 生物資源科学部 生物生産科学科植物保護学研究室 藤 晋一・対馬大希		

## II. 小課題ごとの研究目的等

実行課題名：主要な花き類を加害するウイルス類

### 1) 研究目的

ジャガイモやせいもウイルス (PSTVd) 等ポスピウイルスは宿主への感染や種子伝染等を通じて新しい変異体が発生するリスクが非常に高く、特に無病徴感染した花き類を通じた侵入リスクが高い。ここでは輸入検疫上重要となる花き類に感染するPSTVdの病徴や宿主範囲、種子伝染等を含めた生物的性質と遺伝子塩基配列の変異体の情報をデータベース化する。また、変異が起こりにくい部位を特定し、普遍的な検出技術と的確な変異体識別技術の開発を目指す。

### 2) 研究方法

国内外の花き類で発生したPSTVdの発生・宿主・塩基配列・病徴等の情報の収集分析を行い、侵入リスクに基づき、迅速な検出・同定技術開発の優先度が高い技術開発対象のPSTVd変異体を数種選抜する。それらを接種源として侵入リスクの高い花き類に接種して発病リスクと変異体発生リスクを調査する。変異体がポスピウイルス検出系において検出可能であることを示す。また、各変異体の病徴および種子伝染リスクについても検証し、それらの情報をデータベースに掲載する。開発したポスピウイルス検出系

(Pospi6-F/RのSYBR Greenの検出系：引用文献1) の導入とスムーズな運用をはかるために、ウイルス検出への影響・健全植物における非特異的反応の事例データを収集する。検疫上検査対象となる植物種を対象とする。

### 3) 研究結果

約160のPSTVdの変異体から、由来が明確で塩基配列の情報として信頼できる変異体を抽出し、系統樹を作成した結果、PSTVdの変異体は宿主毎にクラスターが構成された。作成した系統樹上において宿主・塩基配列上異なるPSTVd株約10株を選抜した。この10変異体をトマトに接種して接種1か月時点での病徴を確認したところ、一部の花き由来の

PSTVdでは生理障害と区別困難な症状を示した。上記のPSTVd等を侵入リスクの高い花き類に汁液接種を実施して感染を確認した結果新規の変異体を得られた。これら新規変異体は開発したリアルタイムPCR法（引用文献1）においても検出可能であった。これらの既報のウイロイドおよび変異体を検出できることが示されたことから、本検出系は普遍的な検出技術であることが示された。次に、ポスピウイロイド検出系のマニュアルを作成するために陽性と非特異反応（偽陽性）の判定を可能とする参考事例としての非特異反応データの収集は予定どおり検定対象となる花き類での非特異データは得られた。これらの非特異データは検査マニュアルの参考データに反映した。

植物防疫上有益となる情報として新たにPSTVdの近縁種であるPCFVd (Tomato *planta macho viroid*) およびTPMVd (Pepper chat fruit viroid) についての宿主・病徴・種子伝染（ペチュニアにおいて、TPMVdは、17.5–96.4%、PCFVdは、0–91.9%で種子伝染）等データが得られた（引用文献2・3）。

#### 4) 成果活用における留意点

ポスピウイロイド検出系の使用については、今後も増加すると予想される変異体や対象植物種の増加に伴い、改良を継続する必要がある。

#### 5) 今後の課題

ウイロイドは変異発生の頻度が非常に高いことから、海外で発生したウイロイド変異体について継続して調査を行う必要がある。特に周辺国におけるポスピウイロイドの発生情報等には留意する必要がある。

#### <引用文献>

- 1) Yanagisawa H., Shiki Y., Matsushita Y., et al. (2017) Development of a comprehensive detection and identification system for eight Pospiviroids. *Eur. J Plant Pathol.* 149(1),11-23.
- 2) Yanagisawa H., Matsushita Y. (2017) Host ranges and seed transmission of Tomato *planta macho viroid* and Pepper chat fruit viroid. *Eur. J Plant Pathol.* 149(1),211-217.
- 3) Vertical and horizontal transmission of pospiviroids. Yosuke Matsushita, Hironobu Yanagisawa, Teruo Sano. (2018) *Viruses.* 10(12), 22-31.

実施課題名：主要な野菜類を加害するウイロイド類

#### 1) 研究目的

ジャガイモやせいもウイロイド (PSTVd) 等ポスピウイロイドは宿主への感染や種子伝染等を通じて新しい変異体が発生するリスクが非常に高く、特に無病徴感染した野菜類を通じた侵入リスクが高い。ここでは輸入検疫上重要となる野菜類に感染するPSTVdの病徴や宿主範囲、種子伝染等を含めた生物的性質と遺伝子塩基配列の変異体の情報をデータベース化する。また、変異が起こりにくい部位を特定し、普遍的な検出技術と的確な変異体識別技術の開発を目指す。

#### 2) 研究方法

国内外で発生したPSTVdおよびその近縁種の発生・宿主・塩基配列・病徴等の情報の収集分析を行い、情報から得られたPSTVd等の変異体を数種特定し、それらを接種源として侵入リスクの高い野菜類に接種して発病リスクと変異体発生リスクを調査する。得られ



た接種源と感染植物体を元にして各接种植物における新規発生の変異体を解析し、得られた配列を集積する。侵入リスクが高い野菜類のPSTVdについて、宿主範囲等を含む生物学的性質と塩基配列の変異体の情報を集積・データベース化し、保存性の高い遺伝子の塩基配列部位を特定し、普遍的な検出技術と的確な変異体識別技術を開発する。また、各変異体の種子伝染リスクについても検証し、それらの情報をデータベースに付加する。また、植物防疫所への開発中のリアルタイムPCRによる検定法の導入をはかるための準備を行い、実際の検定法導入のための必要な問題点を抽出する。

### 3) 研究結果

160のPSTVdの変異体から、野菜類に感染するPSTVdを抽出し、系統樹を作成した結果、PSTVdの変異体は宿主毎にクラスターが構成された。作成した系統樹上において宿主・塩基配列上異なる野菜類に感染するPSTVd株約10株を選抜し、発病リスクの高い植物であるトマトへ接種したところ、変異体により病原性に大きな差があり、トマト以外の野菜類（ピーマン、パプリカ、ナス）では病徴を示す植物は確認されなかったことから、病原性の低いPSTVdや無病徴感染する可能性の高い植物により侵入する可能性が考えられた。これら変異体情報や病徴等の情報をデータベースに記載した。

国内外の野菜類で発生したPSTVd変異体を野菜類へ接種したところ、シュンギクやナスにおいて新規変異体が発生した。また、ピーマンにおいては強い矮化症状と葉脈壞疽が確認された。これらの変異体は全て開発したリアルタイムPCR（引用文献1）において検出可能であった。これら既報のウイロイドおよび変異体を検出できることが示されたことから、本検出系（引用文献1）は普遍的な検出技術であることが示された。次に、本検出系を植物防疫所に導入するため、これまでの検査データの蓄積によって得られたトラブルシューティング等（偽陽性判別方法など含む）を記載したマニュアル作成を作成した。

植物防疫上有益となる情報として新たにPSTVdの近縁種であるPCFVdおよびTPMVdについての宿主・病徴・種子伝染のデータを得た。PCFVdおよびTPMVdはナス科のピーマン、トウガラシ、パプリカ、ナス、ジャガイモ、ペピーノ等に感染し、感染ピーマンでは果実の奇形が生じ、ペピーノでは植物体の矮化が確認され、これらウイロイドの感染リスクが明らかとなった（引用文献2）。

### 4) 成果活用における留意点

本法では、トマト種子を例として400粒に1粒の汚染種子が混入したバルクサンプルからでも検出可能であることを確認している。しかし、植物や品種が異なる場合には破碎効率や夾雑物の含有量が異なることから、検査実施前に有効な検査数量の設定が必要である。同時に、植物種毎に最適な核酸抽出法が異なるため、検査対象となる植物に合った核酸抽出法を選定することで偽陰性のリスクを軽減できる。

### 5) 今後の課題

検査の有効性を確保するため、検査に用いる陽性コントロールRNAの使用は必須である。そのため、本事業で開発した陽性コントロールRNAを安定的に供給できる体制作りが今後必要となってくると考えられる。

### <引用文献>

(1) Yanagisawa H., Shiki Y., Matsushita Y., et al. (2017) Development of a comprehensive detection and identification system for eight Pospiviroids. *Eur. J Plant Pathol.* 149(1),11-23.

(2) Yanagisawa H., Matsushita Y. (2017) Host ranges and seed transmission of Tomato planta macho viroid and Pepper chat fruit viroid. Eur. J Plant Pathol. 149(1),211-217.

実施課題名：ダリア等を加害するウイロイド類

### 1) 研究目的

ダリアから検出されるPSTVdダリア株の塩基配列情報およびトマト等重要作物に感染した場合の病原性、また、PSTVdダリア株から他品目への感染リスクについての評価を行い、それらをデータベースに反映させる。また、今後感染ダリアを介した新たなPSTVd株の侵入リスクを想定して、病原性の異なるPSTVd株がダリアに感染した場合のダリアにおける症状の有無を明らかにする。加えて、PSTVd株の侵入を水際で防ぐための確かな検査部位を決定するため、ダリアにおける局在性の有無と全身移行速度を明らかにすることにより、ダリアにおける早期・高感度検出技術の開発をめざす。

### 2) 研究方法

国内のダリアに発生したPSTVdダリア株に特徴的な塩基配列を明らかにする。また、ダリアにダリア株および高病原性株感染した場合の症状、挙動ならびに感染後の遺伝的変異の有無、ダリア株についてはトマトでの病原性を明らかにし、塩基配列情報、病原性、種子伝染リスクについて記載したデータベースを構築する。リアルタイムPCRを用いたPSTVdの検出法について、感染ダリアにおける検出部位等の違いが検出精度に影響を及ぼすか調査する。ダリア株と高病原性株混合感染した場合を想定し、ダリア体内におけるPSTVdの挙動を調査するとともに、いずれの株が優位となるかと両株間での組換えが生じるかどうかを明らかにする。加えて、ダリア株と高病原性株を識別できる方法を開発し、検出限界と検出精度を明らかにする。得られた結果に基づいて、網羅的なPSTVd等の検出・識別技術としてマニュアルを作成する。

### 3) 研究結果

データベースに登録されている354種のPSTVd分離株と、国内ダリアから検出された9種のダリア分離株から系統樹を作成した結果、ダリア分離株は同じクラスターに分類された。ダリア株と高病原性株3種は、ダリア「アジタート」に無病徴感染し、他品種ダリアである「ポートライトペアビューティー」と「ポンポンショコラ」でも全ての分離株が感染したが、高病原性株が感染したポートライトペアビューティーは、明らかな矮化症状を示し、重症の感染株は開花前に枯死した。この結果から、ダリアは品種とPSTVd分離株の違いによって病原性に大きな差があることが示された。一方で、ダリア株をトマト「ルトガス」に接種したところ、全ての分離株が感染し、一部感染株で軽度な矮化症状が確認されたが、ダリア株は、トマトへ無病徴感染すると考えられた（引用文献1）。ダリアへのPSTVd接種試験で得られた感染株を用い、種子伝染率について調査を行っているが、今のところ、垂直伝染および水平伝染いずれも確認されていない。

横浜植物防疫所で実施しているリアルタイムPCRによる検出系について（引用文献2）、検出部位等の違いによる検出精度の違いの有無を調査した。組織部位ごとの調査では、塊茎を含むいずれの部位においても検出が可能であることが明らかになった。本課題で開発した検出系について（引用文献3）、栽培ダリアでも適用可能か調査した結果、問題なく

検出できることが明らかになった。以上のことから、本課題で開発した検出系により、ダリアから迅速かつ的確にPSTVdを検出できることが示された。

PSTVdダリア株と高病原性株がダリアに混合感染した場合、ダリア体内では、ダリア株が優位に複製し、低確率ながら重複感染することが明らかになった。また、重複感染株によって、キメラ変異体等は出現せず、各々が単独で感染していた。

リアルタイムPCRのHRM解析を活用して、増幅される遺伝子領域のMelting Curveでのパターンの違いによりダリア株と高病原性株ならびに重複感染株を識別できる方法を開発した。HRM解析によるPSTVd分離株の識別技術については、検査マニュアルの参考データとして記載した。

上記研究成果に基づいて、1. 「PSTVd感染ダリアの症状とその特徴」 2. 「ダリアからの塊茎を含む検出方法と検出に関する留意点」について記載した、国内検疫で活用できる検査マニュアルを作成した。

表. 本課題で用いた検出系（検査法）の作業時間および試薬消耗品費の試算

項目	Boonham (2004)	Yanagisawa (2017)	HRM 解析による識別法
	1 サンプルあたり *1	1 サンプルあたり	1 サンプルあたり
作業時間 *2	30 分～1 時間	30 分～1 時間	30 分～1 時間
リアルタイム PCR 反応時間	1 時間 30 分	2 時間 40 分	2 時間 40 分
試薬消耗品費	¥250 *3	¥280	¥350

\*1: 作業内容は、RNA検定用試料の準備、反応液調整、リアルタイムPCR開始までを含む。サンプリング時間は、検査現場によって状況が異なるため考慮していない。

\*2: 作業時間は概算であり、検査現場によっては数値が前後する。また、一度に解析できるサンプル数は、検査現場で用いるリアルタイムPCR装置により異なる。

\*3: 試薬消耗品費は、時価の変動等により数値が前後する。

※Boonham (2004)の方法は安価で所要時間は短いが全ての変異体に対応していないので、検出漏れの可能性がある一方で、本事業で用いた方法は全ての既報の変異体に対応している。

#### 4) 成果活用における留意点

マニュアルは国内検疫に利活用できるものであるが、国内での発生に迅速に対応するため都道府県への配布も計画している。マニュアルに基づいて都道府県で陽性反応が確認された場合、直ちに農林水産省の関係機関に連絡し、検査結果の妥当性について検証することが重要である。

#### 5) 今後の課題

ダリアは営利栽培のほか趣味栽培が広く行われている花きであることから、本研究成果を種苗会社、農家、愛好家等が一堂に会する「日本ダリア会」等で積極的に情報発信し、

PSTVdについて広く知ってもらい、PSTVdの侵入・拡大が再び起こらないようにすることが重要である。

<引用文献>

(1) Tsushima D., Nishimura, M., Toda T., Furuya H., Fuji S. (2019) Molecular characterization of Potato spindle tuber viroid cloned from Dahlia plants in Japan. *Eur. J Plant Pathol.* 154(4), 1091–1102

(2) Boonham N., González Pérez L., Mendez M. S., Lilia Peralta E., Blockley A., Walsh K., Barker I., Mumford R.A. (2004) Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of Potato spindle tuber viroid. *J.Virol. Methods* 116(2), 139-146.

(3) Yanagisawa H., Shiki Y., Matsushita Y., et al. (2017) Development of a comprehensive detection and identification system for eight Pospiviroids. *Eur. J Plant Pathol.* 149(1),11-23.

中課題番号	15650846	中課題 研究期間	平成27～令和元年度
小課題番号	5	小課題 研究期間	平成27～令和元年度
中課題名	有害動植物の検出・同定技術の開発		
小課題名	遺伝子情報に基づく国内未発生 <i>Phytophthora</i> 属病原糸状菌の検出・同定技術及びそのためのデータベースの開発		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者名	岐阜大学 流域圏科学研究センター・植生管理学研究分野 景山幸二		

## II. 小課題ごとの研究目的等

### 1) 研究目的

*P. ramorum*、*P. kernoviae* 等の検出技術を現場で実施可能な技術とするとともに、開発した技術を用いた一連の検査手順についてマニュアルとして確立し、関連情報の統合データベースへのデータ登録を完了する。

### 2) 研究方法

輸入検疫における輸入禁止対象となっている*Phytophthora*属菌及びその他の国内未発生の有害*Phytophthora*属菌と疑わしい事例が検疫及び国内において発生した際のDNA情報に基づく簡易同定、及び、それら以外の同属菌の場合に国内未発生であるかどうかを迅速に判断するためのデータベースを構築する。

### 3) 研究結果

#### データベースの整備

- ・全 188 種の *Phytophthora* 属菌について、基準菌株、分離年、分離源(宿主)、分離地(国)、新種報告の文献および塩基配列情報を収集し、データベースに登録できる形で整備した。
- ・種の基準菌株あるいはそれと等価な菌株について、分譲および購入可能な全ての菌株 141 種を収集し、本属の系統解析によく利用されている rDNA-ITS、rDNA-LSU、 $\beta$ -tubulin、*tigA*、*cox1* および *cox2* について、74.5～100%の塩基配列の取得を完了した。
- ・検疫で得られた塩基配列を解析するため、信頼できる塩基配列のみ登録した Local BLAST 用のデータベースを整備した。

#### 検出技術の開発、改良および省力化

- ・植物および土壌からの最適な DNA 抽出法を選定し、手順の省力化や抽出液に含まれる増幅阻害物への対策などを行った。
- ・LAMP 法による検出技術として、*Phytophthora* 属全体の検出プライマー、重要病原菌である *P. ramorum*、*P. kernoviae*、*P. lateralis*、*P. phaseoli* および唯一検疫対象外である *P. nicotianae* の種特異的検出プライマーを設計した。蛍光検出では、属全体の検出プライマーに *P. nicotianae* の種特異的消光プローブを組み合わせた同時検出法を開発した。また、植物ユニバーサルプライマーとのマルチプレックス LAMP によって検定の成否の評価を可能にした。多様な現場に実装可能な技術とするため、リアルタイム PCR 機器、濁度測定器および目視による検出に対応させた。

・PCR 法による検出技術として、*Phytophthora* 属全体の検出プライマーを設計した。また、*P. nicotianae* の種特異的プライマーおよび植物ユニバーサルプライマーとのマルチプレックス PCR による同時検出法を確立した。

・PCR-RFLP 法による簡易種判別に最適な制限酵素を 2 種類選定した。また、宿主植物を指定してバンドサイズを入力すると、該当する *Phytophthora* 種、基準菌株名、*Ypt1* 塩基配列および泳動画像が検索できるバンドパターン検索システムを開発した。

#### 開発した検出技術の各行程にかかる時間およびコスト (図 1)

行程に必要な作業時間および対照区を除いた 1 反復分の試薬コスト (プライマーを除く、少数点以下繰り上げ) は以下の通りである。

- ・DNA 抽出法：一検体あたり植物組織 30 分 360 円、土壌 80 分 900 円
- ・マルチプレックス蛍光 LAMP による検出 (属プライマー + *P. nicotianae* 特異的消光プローブ + 植物プライマー)：一検体あたり 80 分 430 円
- ・マルチプレックス蛍光 LAMP による検出 (種特異的プライマー + 植物プライマー)：一検体あたり 70 分 253 円
- ・濁度 LAMP による検出 (SYBR<sup>®</sup> Green I で検出した場合)：一検体あたり 60 分 177 円
- ・マルチプレックス PCR による検出 (属プライマー + *P. nicotianae* 特異的プライマー + 植物プライマー)：一検体あたり 3 時間 65 円
- ・PCR-RFLP による簡易種同定 (一検体に対して *AluI* および *HhaI* で検出した場合)：一検体 (2 反応 1 セット) あたり 7 時間 291 円



図 1 検出の各行程にかかる時間およびコスト

4) 成果活用における留意点

特になし

5) 今後の課題

*Phytophthora*属菌は近年盛んに新種が報告されているため、一定期間ごとに情報の追加更新を行う必要があると考えられる。

<引用文献>

特になし

中課題番号	15650846	中課題 研究期間	平成27～令和元年度
小課題番号	6	小課題 研究期間	平成27～令和元年度
中課題名	有害動植物の検出・同定技術の開発		
小課題名	遺伝子情報に基づく国内未発生有害線虫類の検出・同定技術とそのためのデータベースの開発		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者名	龍谷大学・岩堀英晶		

## II. 小課題ごとの研究目的等

### 1) 研究目的

リスク評価に基づいて選定した国内未発生線虫類および既発生近縁種について、寄生性等の生物的情報および形態的情報並びに遺伝子情報を解明し、それら情報をデータベース化して遺伝子情報に基づく分類・同定技術を開発する事を目指す。

### 2) 研究方法

リスク評価により日本の農業上脅威となりうる要警戒検疫有害線虫を対象に、対象種および近縁種の生物的・形態的特性、ならびに分類・同定に関する遺伝子情報の収集・解析を行い、DNA バーコーディング等遺伝子情報を利用した検出・同定技術を開発し、迅速に検出・同定できるシステムを開発する。具体的には、要警戒検疫有害線虫を選定し、これらの生体またはDNAサンプルを収集する。また、これら生体（幼虫、成虫、シスト）や植物体中の対象種から効率的なDNA回収法を確立し、種同定のための全ゲノムを得る。対象種の検出・同定のため、既報の文献やWeb情報、あるいは対象種の候補DNA領域を直接シーケンスすることにより、それぞれの種に対するリアルタイムPCRにも利用可能な種特異的プライマーを選定・開発する。開発された種特異的プライマーを用いて、実際に有効かどうかを実際の生体またはDNAサンプルに対して検証する。一方で、対象種に関する情報および本研究による成果を取りまとめたデータベースを構築する。データベースは、農研機構農業環境変動研究センター担当者に取りまとめた情報を送ることにより構築され、プロジェクトメンバーおよび植物防疫官等に限定してアクセス可能とする。

### 3) 研究結果

リスク評価により日本の農業上脅威となりうる要警戒検疫有害線虫を19種選定し、12種についてこれらの生体またはDNAサンプルを収集した。また、収集の過程でオランダやフランス、スペインにおける線虫研究と線虫管理設備について知見を得ることができた。これら対象種に対して、既報の文献やWeb情報、あるいは対象種の候補DNA領域を直接シーケンスすることにより、リアルタイムPCRにも利用可能な種特異的プライマーを選定・開発した。また、線虫生体（幼虫、成虫、シスト）や植物体寄生中の対象種から、DNA抽出キットおよびビーズ破砕法を用いた効率的なDNA回収法を開発し、迅速な検出・同定法を確立した<sup>1)</sup>。対象種に関する情報および本研究による成果を取りまとめたものについては、啓蒙活



動に利用可能な解説冊子・マニュアルを作成した。利用者を限定して閲覧可能にする。

#### 4) 成果活用における留意点

本成果の活用のためには、いくつかの専門的な機器の整備が必要である。具体的には、線虫を観察できる生物顕微鏡、実体顕微鏡、PCR装置（リアルタイムPCR装置）、電気泳動装置、ゲル撮影装置、冷凍機等が必要となる。

#### 5) 今後の課題

植物防疫所や国および都道府県において病害虫検査（検出・同定）を業務としている機関へ本技術を普及すべく本技術に関する研修会を開催するなど、社会実装促進に必要な取組が必要である。

#### <引用文献>

<sup>1)</sup>岩堀英晶(2017) 根こぶ1個からの迅速・簡便なネコブセンチュウDNA抽出と種同定法. 植物防疫71(10) 669-671.

中課題番号	15650846	中課題 研究期間	平成27～令和元年度
小課題番号	7	小課題 研究期間	平成27～令和元年度
中課題名	有害動植物の検出・同定技術の開発		
小課題名	遺伝子情報に基づく植物検疫のためのサツマイモ害虫ゾウムシ類個体群の検出・同定技術とそのためのデータベースの開発		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者名	国立研究開発法人農研機構 九州沖縄農業研究センター・生産環境研究領域 熱帯性病害虫管理グループ・吉武 啓		

## II. 小課題ごとの研究目的等

### 1) 研究目的

サツマイモの重要害虫であるアリモドキゾウムシとイモゾウムシについて、国内における未発生地域への侵入や根絶確認地域への再侵入、および輸入検疫において海外からの持ち込みに対して迅速な対応をとるために、遺伝子DNA情報に基づく、国内発生地域個体群間並びに海外発生個体群と国内個体群の簡便な識別技術を開発した上で、当該昆虫群の種情報をデータベース化する。

### 2) 研究方法

対象種となる昆虫群について、簡易識別に係る技術開発の分類学的基盤を確立するとともに、各種の侵入・定着リスクの評価に係る情報収集する。また、国内での網羅的なサンプル（無水エタノール液浸標本）収集と国外の主要な発生地域でのサンプル収集を通じて各種群のDNA分析用標本コレクションを構築する。個体群識別に有用と想定される領域の塩基配列データを集積し、各個体群の遺伝的集団構造の解析を行う。同領域で識別できない個体群を識別するため、種特異的なバーコード領域を選定し、塩基配列データを蓄積する。その上で、各領域の塩基配列情報を用いた個体群識別技術のプロトコルを作成するとともに、各種群のDNAバーコードライブラリーを作成、各種の形態、生態、分布情報と分子情報、標本情報をデータベース化する

### 3) 研究結果

欧州でのタイプ標本等の参照標本調査を通じて各種の形態的特徴を把握し、簡易識別技術開発の分類学的基盤を確立するとともに、植物防疫所に保管されている検疫標本調査により台湾やフィリピン、インドシナ半島からの植物の持ち込みによるアリモドキゾウの侵入リスクは高いが同属他種の侵入リスクは低いことを明らかにした。また、国内外におけるサンプリングによって15,000点以上のDNA分析用標本を収集した。アリモドキゾウムシについて、1,936検体分の該当領域のデータを解析した結果、国内からは複数の系統と多数

の遺伝子型が検出され、海外個体群と明確に識別できた。また、同領域の遺伝子型が同じ鹿児島県本土捕獲8個体および国内24島産191個体について4つの種特異的なバーコード領域を選定し解析した結果、各領域の遺伝子型を組み合わせた場合多数の遺伝子型が認められ、複数の島において固有の遺伝子型となり、個体群識別の有用性が高まることが明らかとなった。一方、イモゾウムシでは95検体の該当領域を解析した結果、少数の遺伝子型が検出された。7島産34個体について2つの種特異的なバーコード領域を選定し解析した結果、各領域の遺伝子型を組み合わせた場合、複数の島において固有の遺伝子型となり、個体群識別の有用性が高まることが明らかとなった。これらの識別技術を解説した「アリモドキゾウムシ及びイモゾウムシの個体群識別マニュアル」を作成し、植物防疫所に技術移転を行った。また、塩基配列データを含む種情報をデータベースに登録することにより、今後の個体群識別において利用可能な参照データを構築した。

#### 4) 成果活用における留意点

植物検疫業務の実践において既存のデータセットに新規データが追加され、データベースの内容が拡充されてゆくことにより、検疫現場での本個体群識別法の有用性が向上してゆくと思われる。

#### 5) 今後の課題

イモゾウムシについては、とくに多くの個体群の塩基配列データを追加する必要がある。また、個体群識別の迅速化のためシステム上での塩基配列データの相同性検索や系統樹の自動出力が望まれる。

#### <引用文献>

無し

中課題番号	15650846	中課題 研究期間	平成27～令和元年度
小課題番号	8	小課題 研究期間	平成27～令和元年度
中課題名	有害動植物の検出・同定技術の開発		
小課題名	重要病害虫簡易同定のためのDNAバーコーディング等遺伝子情報に基づく検索システムの構築		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者名	農研機構 農業環境変動研究センター・昆虫分類評価ユニット・中谷至伸		

## II. 小課題ごとの研究目的等

### 1) 研究目的

海外からの侵入や国内における分布拡大が懸念される有害動植物や病原菌等微生物の迅速な同定や侵入経路の特定にはバックグラウンドとして膨大なデータが必要となり、これらのデータの検索・閲覧が容易にできるシステムが必要となる。これらの検疫有害動植物について、分子情報および形態、生態、分布等の分類群に関する情報や標本の情報を蓄積・収納したデータベースを構築することで重要病害虫等の同定の迅速化に貢献する。

### 2) 研究方法

昆虫標本に関わる情報を蓄積・発信を目的として公開している「昆虫インベントリーシステム」をベースに、命名表記の異なるウイルス等の微生物にも対応可能なシステムを構築し、試験データを用いて格納試験を行う。特に、本研究ではDNAなどの塩基配列情報を主として扱うため、情報の閲覧・登録が簡易になるよう検索方法や登録手法について検討を行う。データベースについては、各課題担当者や検疫担当者が利用できるように運用方法を検討し、システムを構築する。

### 3) 研究結果

昆虫類を主な対象として作成されたシステムを基にデータ項目の見直しを行い、ウイルス等の微生物にも対応できるように改修した。また、各種データへのアクセスを容易にするために表示方法、データ間のリンクの見直しを行い、標本・サンプルデータのダウンロード機能を追加した。現時点でトスポウイルス、アザミウマ類、ポスピウイロイドをはじめとする病原菌や有害動植物約300種、約2200件のサンプルデータ、約500件の文献情報を格納している。情報の内容は対象の分類群によって異なるが、例えばトスポウイルスでは媒介するアザミウマ種の情報、国別の発生状況に関する文献が含まれる。データベースは農研機構サーバーで稼働し、IPアドレスによるアクセス制限を設けることで、各課題担当者、植物防疫所からのみ利用可能なシステムとして構築した。

### 4) 成果活用における留意点

本研究で構築したシステムは非公開で植物防疫行政で活用する予定。

### 5) 今後の課題

他の検疫有害動植物の検出・同定に係る技術開発と関連データの集積

Ⅲ 研究成果一覧【公表可】

課題番号 15650846

中課題名 有害動植物の検出同定技術の開発

成果等の集計数

課題番号	学術論文		学会等発表(口頭またはポスター)		出版図書	国内特許権等		国際特許権等		PCT	報道件数	普及しうる成果	発表会の主催(シンポジウム・セミナー)	アウトリーチ活動
	和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得					
15650846	5	9	45	15	1	0	0	0	0	0	0	1	1	3

(1)学術論文

区分:①原著論文、②その他論文

整理番号	区分	タイトル	著者	機関名	掲載誌	掲載論文のDOI	発行年	発行月	巻(号)	掲載ページ
1	①	Seed transmission of Potato spindle tuber viroid, Tomato chlorotic dwarf viroid, Tomato apical stunt viroid, and Columnea latent viroid in horticultural plants.	Matsushita Y and Tsuda S.	農研機構	Eur. J Plant Pathol.		2016	8	145(4)	1007-1011
2	①	我が国で発生しているトスポウイルスについて,	奥田充	農研機構	日本植物病理学会報	<a href="https://doi.org/10.3186/jjphytopath.82.169">https://doi.org/10.3186/jjphytopath.82.169</a>	2016	8	82(3)	169-184
3	①	Development of a comprehensive detection and identification system for eight Pospiviroids	Yanagisawa Hら	農研機構	Eur. J Plant Pathol.		2017	9	149(1)	11-23
4	①	Host ranges and Seed transmission of Tomato planta macho viroid and Pepper chat fruit viroid	Yanagisawa Hら	農研機構	Eur. J Plant Pathol.		2017	9	149(1)	211-217
5	②	根こぶ1個からの迅速・簡便なネコブセンチュウDNA抽出と種同定法	岩堀英晶	龍谷大学	植物防疫		2017	10	71(10)	669-671
6	①	我が国で発生する8種トスポウイルスを検出できるユニバーサルプライマー	奥田充	農研機構	関東東山病害虫研究会報	<a href="https://doi.org/10.11337/ktpps.2017.68">https://doi.org/10.11337/ktpps.2017.68</a>	2017	11	64	68-72
7	②	カンキツグリーンング病対策の現状と今後の展望	富村 健太	農研機構	植物防疫		2018	11	72(11)	2-6
8	②	日本で発生するトスポウイルスを網羅的に検出できるユニバーサルプライマー	奥田充	農研機構	植物防疫		2018	8	72(8)	34-38
9	①	Differences in dynamics of horizontal transmission of Tomato planta macho viroid and Potato spindle tuber viroid after pollination with viroid-infected pollen	Hironobu Yanagisawa, Yosuke Matsushita	農研機構	Virology	<a href="https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.01.023">https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.01.023</a>	2018	3	516	258-264

10	①	Vertical and horizontal transmission of pospiviroids	Yosuke Matsushita, Hironobu Yanagisawa, Teruo Sano	農研機構・弘前大学	Viruses	<a href="https://doi.org/10.3390/v10120706">https://doi.org/10.3390/v10120706</a>	2018	12	10(12)	706(ページ数は無く論文番号のみ)
11	①	Influence of the terminal left domain on horizontal and vertical transmissions of tomato planta macho viroid and potato spindle tuber viroid through pollen	Hironobu Yanagisawa, Teruo Sano, Shu Hase, Yosuke Matsushita	農研機構・弘前大学・山形大学	Virology	<a href="https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.09.021">10.1016/j.virol.2018.09.021</a>	2019	1	526	22-31
12	①	Rapid detection of <i>Phytophthora nicotianae</i> by simple DNA extraction and Real-time Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay	Ayaka Hieno et al.	岐阜大学	Journal of Phytopathology	<a href="https://doi.org/10.1111/jph.12785">https://doi.org/10.1111/jph.12785</a>	2019	2	167(3)	174-184
13	①	Seed transmission of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' is unlikely in carrot	Fujikawa et al.	農研機構	Journal of General Plant Pathology	<a href="https://doi.org/10.1007/s10327-020-00927-1">https://doi.org/10.1007/s10327-020-00927-1</a>	2020	5	86	266-273
14	①	Molecular characterization and eradication of new potato spindle tuber viroid isolates from dahlia plants in Japan	Daiki Tsushima et al.	秋田県立大学	Eur. J Plant Pathol.	<a href="https://doi.org/10.1007/s10658-019-01730-1">https://doi.org/10.1007/s10658-019-01730-1</a>	2019	4	154	1091-1102
15		First records of two invasive species of thrips (Insecta: Thysanoptera) from Kyoto and Wakayama Prefectures	Kenji Fujimoto, Tadaaki Tsutsumi, Satoshi Toda, Shiro Nakao	農研機構	京都府立大学学術報告		2019	12	71	1-2
16	①	Detection of the genus <i>Phytophthora</i> and the species <i>Phytophthora nicotianae</i> by LAMP with a QProbe	Ayaka Hieno et al.	岐阜大学	Plant Disease	<a href="https://doi.org/10.1094/PDIS-12-19-2523-RE">https://doi.org/10.1094/PDIS-12-19-2523-RE</a>	2020	7	online公開	未定

(2) 学会等発表(口頭またはポスター)

整理番号	タイトル	発表者名	機関名	学会等名	発行年	発行月
1	「トスポウウイルスを検出するユニバーサルプライマーの検討」	奥田 充	農研機構	関東東山病害虫研究会	2017	2
2	国内未分布アザミウマ種の分子診断法開発のための遺伝子情報収集	土田 聡、中村有希、上地奈美、三代浩二	農研機構 果樹茶業研究部門	第61回日本応用動物昆虫学会大会	2017	3
3	ダリアに感染しているジャガイモやせいもウイロイドの遺伝的多様性とその病原性・宿主適応	藤 晋一・戸田 武・古屋 廣光	秋田県立大学	平成28年度日本植物病理学会 東北部会	2016	9
4	ジャガイモやせいもウイロイド(PSTVd)の変異体に感染したトマトにおける病原性比較	松下陽介・柳澤広宣	農研機構	平成28年度園芸学会秋季大会	2016	9

5	LAMP法による <i>Phytophthora pseudolactucae</i> の簡易検出技術の開発	馮 文卓・須賀晴久・景山幸二	岐阜大学	日本植物病理学会報	2016	10
6	<i>Phytophthora</i> sp. によるデルフィニウム疫病(新称)	近藤 亨・大坪佳代子・景山幸二	岐阜大学	日本植物病理学会報	2016	10
7	<i>Phytophthora</i> sp.によるウメ枝の褐変症状について	福田明美・冬廣吉朗・渡辺貴弘・吉田貴寿・本多範行・景山幸二	岐阜大学	日本植物病理学会報	2016	10
8	日本産アスパラガス疫病菌と米国産アスパラガス疫病菌 <i>Phytophthora asparagi</i> との比較	児玉不二雄・植松清次・Mohammad Ziaur Rahman・守川俊幸・古屋廣光・園田高広・堀越紀夫・平子喜一・小木曾秀紀・鐘ヶ江良彦・景山幸二	岐阜大学	日本植物病理学会報	2016	10
9	<i>Phytophthora glovera</i> によるナス根腐疫病菌の発生と本病に対する各種薬剤の効果および台木品種の抵抗性程度の違い	楠 幹生・Yoshilia Rani・景山幸二	岐阜大学	日本植物病理学会報	2016	10
10	<i>Phytophthora</i> 属菌の簡易検出・同定技術の開発	日恵野綾香	岐阜大学	東海植物病理学会	2016	12
11	Establishment of global <i>Phytophthora</i> database for accurate diagnosis	A. Hieno, M.Li, K. Otsubo, H. Suga, K. Kageyama	岐阜大学	1st International symposium of river basin studies	2017	3
12	根こぶ1個からの迅速・簡便なネコブセンチュウDNA抽出と種同定法	岩堀英晶	龍谷大学	第61回日本応用動物昆虫学会大会	2017	3
13	鹿児島県におけるアリモドキゾウムシの近年の発生状況と遺伝的多様性	吉武啓	農研機構	平成28年度ゾウムシ研究会	2016	11
15	ポスピウイルスのウイロイド感染花粉による水平伝染の可能性	柳澤 広宣・松下 陽介	農研機構	日本植物病理学会報	2017	8
16	ダリアに感染しているジャガイモやせいもウイロイド各種クローンのトマトでの病原性とゲノム変異	藤 晋一・西村 真帆・戸田武・古屋 廣光	秋田県立大学	日本植物病理学会報	2017	8
17	ダリアに対するジャガイモやせいもウイロイドのリスク評価およびqRT-PCRでの効率的な検出	対馬大希・西村 真帆・一関優菜・戸田 武・古屋 廣光・藤 晋一	秋田県立大学	平成30年度日本植物病理学会	2018	3
18	First report of stem rot on hydrangea caused by <i>Phytophthora hedraiondra</i> in Japan	R. Yoshilia, M. Morishima, H. Suga, K. Kageyama	岐阜大学	平成29年度日本植物病理学会大会	2017	4
19	LAMP法を用いた <i>Phytophthora nicotianae</i> の特異的検出	日恵野綾香・大坪佳代子・須賀晴久・景山幸二	岐阜大学	平成29年度日本植物病理学会大会	2017	4
20	Diversity of oomycetes in southern Sumatera and Central Java islands of Indonesia	A. Afandi, Masanto, A. Wibowo, S. Subandiyah, S. Loekito, Afandi, H. Suga, K. Kageyama	岐阜大学	第2回環境微生物系学会合同大会2017	2017	8
21	レタス圃場における <i>Phytophthora</i> および <i>Pythium</i> 属菌のLAMP法による検出	馮 文卓・日恵野綾香・楠 幹生・須賀晴久・景山 幸二	岐阜大学	第2回環境微生物系学会合同大会2017	2017	8
22	輸入検疫での実用化に向けたTriplex PCR法による <i>Phytophthora</i> 属の特異的検出法の確立	日恵野綾香・大坪佳代子・須賀晴久・景山幸二	岐阜大学	第2回環境微生物系学会合同大会2017	2017	8

23	LAMP法による輸入検疫有害菌 <i>Phytophthora ramorum</i> , <i>P. kernoviae</i> および <i>P. lateralis</i> の特異的検出	日恵野綾香・大坪佳代子・須賀晴久・景山幸二	岐阜大学	平成29年度日本植物病理学会関西西部会	2017	9
24	Identification and population genetics of <i>Phytophthora nicotianae</i> causing root rot of pineapple	A. Afandi, S. Loekito, Afandi, A. Hieno, H. Suga, K. Kageyama	岐阜大学	Asian Mycological Congress 2017	2017	10
25	Development of accurate DNA database of <i>Phytophthora</i> and genus specific PCR-based detection	A. Hieno, M. Li, K. Otsubo, H. Suga, K. Kageyama	岐阜大学	Asian Mycological Congress 2017	2017	10
26	Establishment of global <i>Phytophthora</i> database for quarantine control	A. Hieno, M. Li, K. Otsubo, H. Suga, K. Kageyama	岐阜大学	UGSAS-GU International symposium	2018	3
27	Morphological and molecular identification of causal agent of cocoa pod rot disease in Indonesia	Masanto, A. Wibowo, S. Subandiyah, M. Shimizu, H. Suga, K. Kageyama	岐阜大学	UGSAS-GU International symposium	2018	3
28	First report of stem blight of lettuce by <i>Phytophthora crassamura</i> in Japan	R. Yoshilia, M. Kusunoki, H. Suga, K. Kageyama	岐阜大学	2nd International symposium of river basin studies	2018	3
29	Specific detection of quarantine species, <i>Phytophthora ramorum</i> , <i>P. kernoviae</i> and <i>P. lateralis</i> by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay	A. Hieno, K. Otsubo, H. Suga, K. Kageyama	岐阜大学	2nd International symposium of river basin studies	2018	3
30	Distribution of mating type of <i>Phytophthora palmivora</i> isolates from Indonesia and Japan	Masanto, A. Hieno, A. Wibowo, S. Subandiyah, M. Shimizu, H. Suga, K. Kageyama	岐阜大学	2nd International symposium of river basin studies	2018	3
31	Genetic diversity of <i>Phytophthora palmivora</i> causing cocoa pod rot in Indonesia	Masanto, A. Hieno, A. Wibowo, S. Subandiyah, M. Shimizu, H. Suga, K. Kageyama	岐阜大学	平成30年度日本植物病理学会大会	2018	3
32	Quenching-loop-mediated isothermal amplification (Q-LAMP) 法による <i>Phytophthora</i> 属菌および <i>P. nicotianae</i> の同時検出	日恵野綾香・大坪佳代子・須賀晴久・景山幸二	岐阜大学	平成30年度日本植物病理学会大会	2018	3
33	鹿児島県におけるアリモドキゾウムシの近年の発生状況と遺伝的多様性(中間報告)	吉武啓・有本 誠	農研機構	平成29年度ゾウムシ研究会	2017	11
34	Occurrence of tospovirus diseases in Japan	奥田充	農研機構	Taiwan-Japan Joint Symposium on Plant Virus Diseases	2018	7
35	アザミウマ類の遺伝的多様性の解明と分子分類への活用	土`田聡	農研機構	第63回日本応用動物昆虫学会大会	2019	3
36	Haplothrips属とLiothrips属群における食性転換と系統進化	土`田聡	農研機構	第63回日本応用動物昆虫学会大会	2019	3



37	「根絶地域への再侵入と未発地域への侵入を警戒するための新しいグリーン病識別技術」	富村 健太	農研機構	平成29年度果樹茶業研究会「常緑・落葉果樹病害虫研究会」カンキツグリーン病分科会	2018	2
38	「カンキツグリーン病病原細菌をはじめとした近縁Liberibacter属細菌種の識別法とその利用」	富村 健太	農研機構	平成30年度果樹茶業研究会「常緑・落葉果樹病害虫研究会」カンキツグリーン病分科会	2019	2
39	「カンキツグリーン病病原細菌集団を識別可能なSNPおよびInDelマーカーの開発」	富村 健太	農研機構	平成31年度日本植物病理学会大会	2019	3
40	Vertical and horizontal transmission of Pospiviroids	Yosuke Matsushita, Hironobu Yanagisawa	農研機構	Viroid-2018	2018	7
41	Development of a comprehensive detection and identification molecular based system for eight Pospiviroids	Hironobu Yanagisawa, Yosuke Matsushita, Shinya Tsuda	農研機構	国際植物病理学会	2018	7
42	Molecular characterization of Potato spindle tuber viroid from Dahlia plants in Japan	Daiki Tsushima, Shin-ichi Fuji	秋田県立大学	Viroid-2018	2018	7
43	高分解能融解曲線(HRM)解析を用いたジャガイモやせいもウイロイド分離株の識別	対馬大希・戸田 武・古屋廣光・藤 晋一	秋田県立大学	平成30年度日本植物病理学会 東北部会	2018	9
44	ダリアにおけるジャガイモやせいもウイロイドの混合感染に対するリスク評価	対馬大希・一関優菜・戸田 武・古屋廣光・藤 晋一	秋田県立大学	平成31年度日本植物病理学会	2019	3
45	Specific detection of quarantine species, <i>Phytophthora ramorum</i> , <i>P. kernoviae</i> and <i>P. lateralis</i> by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay	A. Hieno, K. Otsubo, H. Suga, K. Kageyama	岐阜大学	6th Int. Oomycetes Workshop & ICPP 2018	2018	7
46	Simple identification of <i>Phytophthora</i> species by using PCR-RFLP	A. Hieno, K. Otsubo, H. Suga, K. Kageyama	岐阜大学	第3回流域圏保全研究推進セミナー	2019	3
47	PCR法による <i>Phytophthora</i> 属菌の検出における土壌DNA抽出法の比較	日恵野綾香・大坪佳代子・須賀晴久・景山幸二	岐阜大学	平成31年度日本植物病理学会大会	2019	3
48	A practical species-specific real-time PCR primer for <i>Heterodera shachtii</i>	Hideaki Iwahori and Noritaka Nakamura	龍谷大学	ヨーロッパ線虫学会2018	2018	9
49	テンサイシストセンチュウの侵入源と侵入経路の推定およびDNAによる土壌密度推定法	岩堀英晶・浅水恵理香・中村慎崇	龍谷大学	第63回日本応用動物昆虫学会大会	2019	3
50	アリモドキゾウムシの個体群レベルでの識別技術の開発に向けて	吉武 啓	九州沖縄農業研究センター	九州病害虫研究会第96回研究発表会、特別講演(於宮崎市民プラザ)	2018	11
51	鹿児島県離島におけるアリモドキゾウムシの近年の分布状況及び遺伝的多様性	吉武 啓	九州沖縄農業研究センター	門司植物防疫所植物防疫官研修、講義(於門司植物防疫所)	2018	11
52	Emergence and spread of tospovirus diseases in Japan	M. Okuda	農研機構	International Symposium on Virus Diseases of Important Crop(台中市)	2019	9

53	侵入警戒を要するポスピウイルス	松下陽介	農研機構	日本植物病理学会第54回感染生理談話会	2019	11
54	PCR-RFLP法による <i>Phytophthora</i> 属菌の簡易種同定	日恵野綾香・李明珠・大坪佳代子・須賀晴久・景山幸二	岐阜大学	日本菌学会第63回大会	2019	5
55	植物ユニバーサルプライマーを内部コントロールとして用いたMultiplex LAMPによる輸入検疫有害菌 <i>Phytophthora ramorum</i> , <i>P. kernoviae</i> および <i>P. lateralis</i> 各種の検出	日恵野綾香・大坪佳代子・須賀晴久・景山幸二	岐阜大学	令和元年度日本植物病理学会関西支部会	2019	9
56	Multiplex LAMP detection of <i>Phytophthora ramorum</i> , <i>P. kernoviae</i> and <i>P. lateralis</i> with plant universal primer set as an internal control	A. Hieno, K. Otsubo, H. Suga, K. Kageyama	岐阜大学	Asian Mycological Congress 2019	2019	10
57	Extraction and detection of woody plant DNA with universal LAMP primer	A. Hieno, K. Otsubo, H. Suga, K. Kageyama	岐阜大学	第4回流域圏保全研究推進セミナー	2020	3
58	バラ科植物に感染する <i>Phytophthora</i> 属菌のPCR-RFLPによる簡易種同定	日恵野綾香・李明珠・大坪佳代子・須賀晴久・景山幸二	岐阜大学	令和2年度日本植物病理学会大会	2020	3
59	コロンビアネコブセンチュウ、ニセコロンビアネコブセンチュウ、およびニセネコブセンチュウの種同定および定量に有効なリアルタイムPCRプライマー	吉田裕史・岩堀英晶	龍谷大学	第64回日本応用動物昆虫学会大会	2020	3

(3) 出版図書

区分: ①出版著書、②雑誌(学術論文に記載したものを除く、重複記載をしない。)、③年報、④広報誌、⑤その他

整理番号	区分	著書名(タイトル)	著者名	機関名	出版社	発行年	発行月
1	①	シリーズ21世紀の農学 大変動時代の食と農 第8章増大する作物病害虫の進行	大藤泰雄(日本農学会編 分	農研機構	養賢堂	2018	4

(4) 国内特許権等

区分: ①育成者権、②特許権、③実用新案権、④意匠権、⑤回路配置利用権

整理番号	区分	特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	機関名	出願番号	出願年月日	取得年月日
		該当なし						

(5) 国際特許権等

区分: ①育成者権、②特許権、③実用新案権、④意匠権、⑤回路配置利用権

整理番号	区分	特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	機関名	出願番号	出願年月日	取得年月日	出願国
		該当なし							

(6)報道等

区分:①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映、④その他

整理番号	区分	記事等の名称	機関名	掲載紙・放送社名等	掲載年月日	備考	
		該当なし					

(7)普及に移しうる成果

区分:①普及に移されたもの・製品化して普及できるもの、②普及のめどがたったもの、製品化して普及のめどがたったもの、③主要成果として外部評価を受けたもの(複数選択可)。

整理番号	区分	成果の名称	機関名	普及(製品化) 年月		主な利用場面	普及状況
1	②	国内未発生ポスピウイルス8種の網羅的検出・同定技術	農研機構	2019	4	植物検疫におけるトマト種子検査、国内発生事例における確定診断、根絶確認	植物防疫所(5本所及び主要空港4支所)

## (8)発表会の主催(シンポジウム・セミナー等)の状況

整理番号	発表会の名称	機関名	開催場所	年月日	参加者数	備考
1	ポスピウイルス検出講習会	農研機構	中央農研環境保全型病害虫防除技術開発共同実験棟	2018/10/31	5	種苗メーカーの品質管理部門の担当者向けに本事業で開発した技術の利用のための技術講習を施した。

## (9)アウトリーチ活動の状況

区分:①一般市民向けのシンポジウム・講演会及び公開講座・サイエンスカフェ等、②展示会及びフェアへの出展・大学及び研究所等の一般公開への参画、③その他(子供向け出前授業等)

整理番号	区分	アウトリーチ活動	機関名	開催場所	年月日	参加者数	主な参加者	備考
1	③	松下陽介 第3回種苗検査セミナー「野菜のウイルスの病徴・検査技術について」	農研機構	品川パドム	2016/11/25	53	種苗業界関係者	主催:(株)ファスマック
2	①	平成29年度日本農学会シンポジウム「大変動時代の食と農」における講演「増大する作物病害虫の新興リスクにどう立ち向かうか」	農研機構	東京大学弥生講堂	2017/10/14	180	会社員、主婦、学生、行政等	主催:日本農学会
3	①	「Taiwan-Japan Joint Symposium on Plant Virus Diseases ~ Tackling new threats on agriculture ~」における講演「Occurrence of tospovirus diseases in Japan」	農研機構	筑波産学連携支援センター	2018/7/3	41	行政、公的研究機関、大学、一般	主催:農研機構
4	①	日本ダリア会 大輪ダリア切り花出荷20周年記念大会	秋田県立大学	ホテルメトロポリタン秋田	2019/9/27	162	行政、公的研究機関、大学、種苗業界関係者、一般	主催:日本ダリア会