

キャベツ黒すす病の検査法

キャベツ黒すす病

病原菌：*Alternaria brassicicola* (Schwein.) Wiltshire

ア．検査試料：400 粒

イ．前 処 理：なし

ウ．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。

エ．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℃で暗黒条件、又は 12 時間周期の暗黒・照明下（BLB ライト）条件下に 6 日間置く。

オ．鑑 定：各種子を倍率 30～80 倍で観察し，分生子を探す。分生子は長く連鎖し、ブークは短く球状を呈する。横隔壁部でのくびれが大きく、団子型に見える。分生子は種子の表面から出現し、種子全面を覆い、濃褐色となる。菌糸はみられない。

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 brassicicola* (Schwein.) Wiltshire

対象作物 : キャベツ

病 名 : 黒すす病

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 … 径 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) … $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 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 … $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$
- 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°C , 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 $\times$ 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 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 暗黒条件で 24 時間培養する。
4. ペトリ皿を冷凍庫に移し, $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 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, $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 6 日間培養する。
培養条件は, 24 時間暗黒、又は 12 時間照明と 12 時間暗黒のどちらを用いてもよい。照明を用いる際は, BLB ライトをペトリ皿の上方約 25cm に設置する (図 2)。
6. 鑑定
培養開始 6 日後, 倍率約 30 倍の実体顕微鏡下で種子から出現する連鎖する分生子を探

し、約 80 倍までの倍率で分生子の特徴を調べる。長く連鎖する分生子は通常種子の表面から出現し、種子全面を覆い、濃褐色状にみえる（図 3）。菌糸はみられない。分生子は、18 ～ 130 μm 、幅 8 ～ 20 μm 、1 ～ 11 の横隔壁（多くは 6 以下）を持ち、縦隔壁は少ない。横隔壁部でのくびれが大きく、団子型に見える（図 4）。ブークは短く、幅が 6 ～ 8 μm で球状にみえる。

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

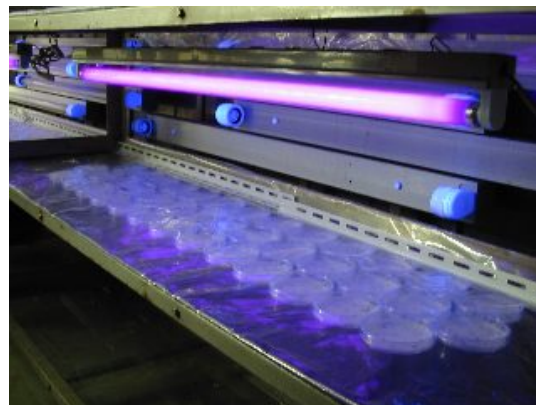


図 2. 凍結処理後、BLB ライト照明下で培養する場合

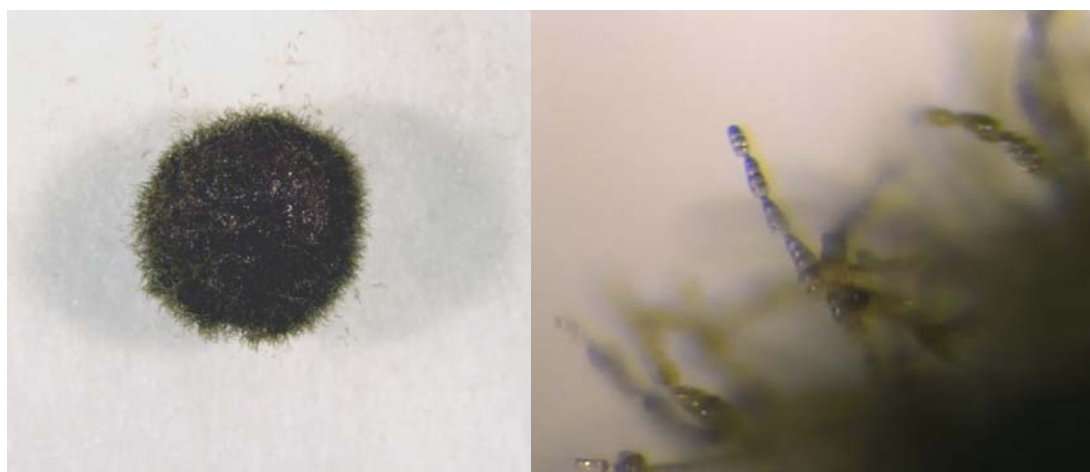


図 3. 種子上に観察される黒すす病菌 (*A. brassicicola*) の分生子
左：種子上の分生子，右：連鎖する分生子（実体顕微鏡）



図 4 黒すす病菌の分生子