

スイカ果実汚斑細菌病の診断

スイカ果実汚斑細菌病は、*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Schaad et al.1979)Willems et al. 1993により引き起こされる。本病は本誌57号 (1999年3月)で紹介したように平成10年5月に我が国で初めて山形県で発生が確認された。本病はスイカ育苗段階から果実の収穫期まで発病が見られるが、本病の的確な診断を行うため病原細菌の検出法と分離菌の同定法について紹介したい。

なお、本病原細菌の細菌学的性質は本誌48号(1995年12月)を、本病の病徴と生活環については本誌57号 (1999年3月)を参照願いたい。

検出法：

本病原細菌は種子伝染することが知られているが、汚染種子からのスイカ果実汚斑細菌病菌の検出法と同定法を図1に示したのでそれに従って説明する。

1 growing-on test

60×40cm程度の播種箱に滅菌土壌を入れ、100～200粒のスイカ種子を播種し、25～30℃で発芽させる。子葉が展開したら、図2のような子葉上の水浸を伴う壊死斑の有無を調査する。

2 顕微鏡観察

壊死斑を伴う子葉を採取する。病斑部をカミソリで切断し切片を作成し、100～400倍率の顕微鏡下で細菌泥の漏出を観察する。図3のように細菌泥の漏出が観察されたならば、細菌の分離を行う。なお、スイカの子葉は、展開時に種皮で傷が付き、類似した症状が生ずる場合があるので病斑の顕微鏡観察を行うことが望ましい。

3 細菌の分離

病斑部を滅菌水中で2、3回洗浄する。少量の滅菌水とともによく磨砕し、磨砕液を1白金耳とり、YNA(肉エキス3g、酵母エキス5g、ペプトン10g、NaCl 1.5g、寒天20g、蒸留水1リットル、pH 7.0-7.4)平板あるいはYPA (YNAから肉エキス 3gを除いたもの)平板に画線する。30～36℃で培養し、2日ないし3日目に生じる直径1mm程度の白色、スムーズ型の集落の有無を観察

する(図4)。なお、本菌の分離の成功のコツは、子葉に病斑が生じた段階で試料を採取し、新鮮なうちに分離することである。病徴が進んで茎部まで病徴が進展し、萎れた試料や採取後、長時間経ち萎れた試料からの分離は困難である。

同定法：

4 蛍光色素の産生

上記3の集落を白金線の先端に付着させ、キングB斜面培地に白金線の先端で線を引くように細菌を塗る。2日ないし3日間培養し蛍光色素の産生を観察し、本細菌は蛍光色素産生しないものを以下の調査に用いる。

5 オキシダーゼ活性

オキシダーゼ活性の調査方法は、1%テトラメチルパラフェニレンジアミン2塩酸塩を滴下して湿らせたろ紙に、細菌をプラチナ製の白金耳でかき取って線状に塗布する。10秒後に菌泥が濃紫色になったものを陽性とする。

6 グラム反応

オキシダーゼ活性が陽性の菌株はグラム反応を調査する。菌泥の1～2白金耳と3%KOH水溶液の1滴とをスライドガラス上でよく混和する。混和液が粘ちょうになり白金耳を持ち上げると長く糸を引くようになったものをグラム陰性と判定する。

7 血清反応

グラム反応が陰性であった場合、スライド凝集法で血清反応を調査する。菌泥を滅菌水に懸濁し、 1×10^8 cfu/ml以上の濃度の細菌懸濁液を作成する。この懸濁液と適宜希釈した抗血清の同量(30～50μl)をスライドガラス上で緩やかに混和し、凝集が見られたものを陽性と判定する。

8 接種試験／簡易同定96-API

接種試験はキングB培地からYNAあるいはYPA斜面培地に移植し、1～2日培養した菌株を用いる。 1×10^8 cfu/ml以上の分離菌の懸濁液を接種源として有傷接種を行う。発病時の病徴が再現されたものを陽性と判定する。

簡易同定96-APIは、API20NEという細菌の性状

を簡易に調査できる市販のキットを利用して分離細菌の性状を調査し、そのデータと一致もしくは類似する既存の細菌をパソコンのデータベースから検索するものである。方法については西山幸司(1996)「パソコンを用いた植物病原細菌同定システム『簡易同定96』の使い方」農環研資料19などの報告を参照されたい。

なお、ここに紹介した方法に関する詳細が必要な場合は、横浜植物防疫所調査研究部まで問い合わせていただきたい。

なお、ここに紹介した方法に関する詳細が必要な場合は、横浜植物防疫所調査研究部まで問い合わせていただきたい。

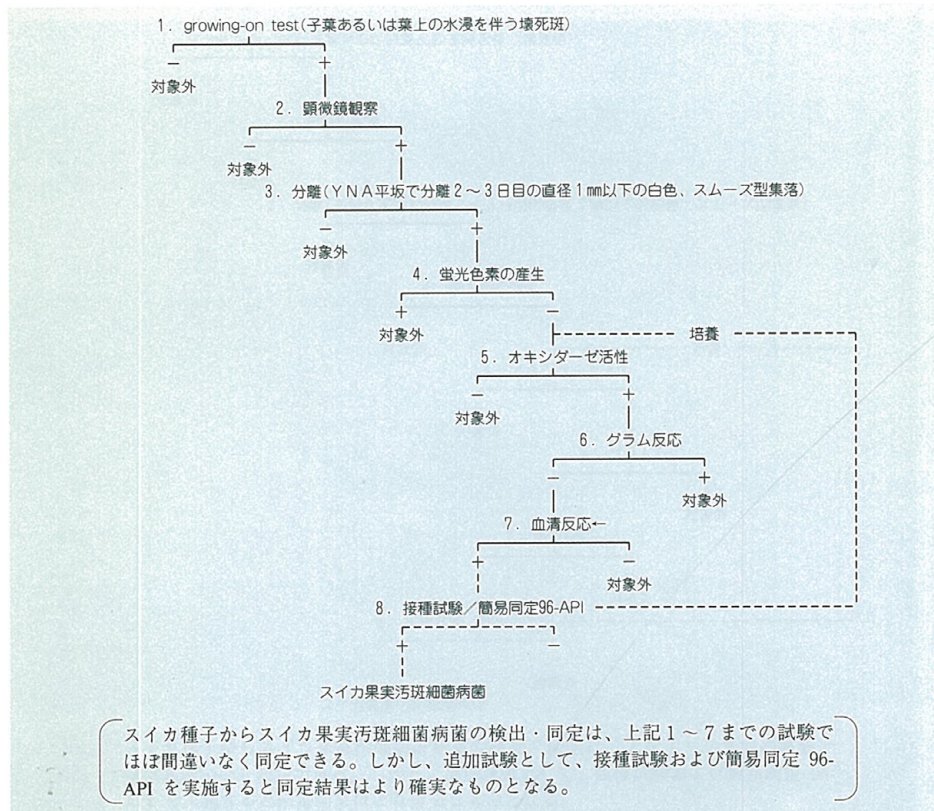


図1 スィカ果実汚斑細菌病菌の検定法



図2 スィカ子葉部に見られる暗緑色の壊死斑



図3 発病組織から漏出する細菌泥



図4 寒天培地(YNA)上のコロニー (小型のコロニーが本病原細菌)