

## 輸入種子検査におけるカボチャ立枯病菌診断法の改良

基 喜吉・木村 茂

横浜植物防疫所調査研究部

A modified diagnostic method for *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 1 in imported squash seed testing. Kiyoshi DAI and Shigeru KIMURA (Research Division, Yokohama Plant Protection Station, 1-16-10, Shin-yamashita, Naka-ku, Yokohama 231-0801, Japan). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 40: 103-106 (2004).

**Abstract:** Seed testing for *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 1, using germinated squash seeds as an inoculating material, was proposed. Preparation of inoculating plants: First, coats of squash seeds for inoculation were removed, to prevent seeds from contamination. Then, seeds were sterilized with 1% sodium chloride for five minutes. Finally, they were grown by the blotter method for three days. Diagnostic method: When colonies of *F. solani* were confirmed on imported seeds at three days after blotter method testing, a drop of conidial suspension from a colony was placed on a peg of an inoculating plant. When foot rot and a disturbance of stem growth appeared on the stem at four to five days after inoculation, these lesions were assumed to be results of the inoculation with *F. solani* f. sp. *cucurbitae* race 1. This method could obtain the same result as the combination of seedling inoculation testing and fruit inoculation. We think it is an effective diagnostic method.

**Key words:** *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 1, squash seed, peg, inoculation test

### はじめに

カボチャ立枯病菌 *Fusarium solani* (MART.) APP. et Wr. f. sp. *cucurbitae* SNYD. et HANS. race 1 の識別は、特定重要病害虫検査要綱対象病菌であった頃から、小型分生子及びその分生子柄の形態で *Fusarium solani* と同定し、その後大型分生子の中に 5 隔膜以上のものが形成されるものを本病原菌としていた。ところが、1985 年に沖縄県（金城ら、1987）、87 年には岡山（粕山ら、1990）及び茨城県（下長根ら、1989）下でカボチャ立枯病が発生した。各地から採取したこれら病原菌を調査したところ、いずれも 4 隔膜優勢の菌株だけで 5 隔膜優勢のものはなかった。また、輸入検査の現場においては、検査されるカボチャ種子から 5 隔膜以上の大型分生子をもつ *Fusarium solani* が発見され、これらについてカボチャ苗への接種試験を実施したところ病原性を示さない事例が多く認められた。

このことから、これまでの診断法に問題があることが明らかとなった。*Fusarium solani* の分化型決定における病原性の検定は、本病原菌診断の必須条件と考えられることから現行検査法の改良を検討した。カボチャ立枯病菌の同定には、その分化型を確認する必要があり、そのためには、カボチャへの病原性を検定す

るための接種試験が重要である。そこで、ユウガオつる割れ病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* が Peg を通じ子葉内に侵入することが知られている（大畑ら、1999）ことから、発芽後間もないカボチャ種子に形成された Peg 部位への接種が有効であるか検証するため、カボチャ果実への接種及び苗を用いた土壤接種との比較検討を行った。その結果、発芽間もない種子を接種材料に用いることで、現行検査期間 8 日の間に、より正確な診断ができる方法を立案したのでここに報告する。

### 材料及び方法

#### 1. 果実への接種

供試菌株は Table 1 に示した *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* を用いた。race 1 として米国からの導入した 2 菌株、沖縄、岡山、茨城県から分離された各 4 菌株を、race 2 としては米国から導入した 1 菌株の計 15 菌株を用いた。

接種植物には、市販されているエビスカボチャの生果実を供試した。

接種方法は、PDA 斜面培地で 25°C、7 日間培養した菌叢の一部を白金耳でかき採り、果実表面への無傷接種区と果実を切断し、その断面部に菌叢をのせる有

Table 1. Results of pathogenicity tests with strains of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*.

Isolate	Origin	Methods of inoculation				
		Fruit		Seeding (Inoculation to soil)	Stem of germinated seed	
		Non-wounded	Wounded		Rot	Disturbed to grow
race 1						
ATCC18278	USA	—	+	+	+	+
ATCC18280	USA	—	+	+	+	+
R-1	Okinawa	—	+	+	+	+
64-1	Okinawa	—	+	+	+	+
51-2	Okinawa	—	+	+	+	+
57-2	Okinawa	—	+	+	+	+
岡山	Okayama	—	+	+	+	+
西脇元 6.33-1	Okayama	—	+	+	+	+
宝伝元 6.3-1	Okayama	—	+	+	+	+
プリンスメロン	Okayama	—	+	+	+	+
カ A2	Ibaraki	—	+	+	+	+
E13	Ibaraki	—	+	+	+	+
F22	Ibaraki	—	+	+	+	+
キ A-1	Ibaraki	—	+	+	+	+
race 2						
S-203	USA	—	+	—	±	—

傷接種区を設け、これらについて 25℃、保湿、暗黒下で 5 日間保管培養し、病徴形成の有無を調査した。

## 2. 苗を用いた土壌接種

供試菌株は果実への接種と同様の 15 菌株を用いた。

接種植物として、播種 12 日目のカボチャ苗（品種：黒ダネ）を 1 区当たり 2 本を供試した。

接種方法は、各菌株を PDA 斜面培地上で 25℃、7 日間培養し、これに 10 ml の殺菌水を分注、白金耳にて菌叢表面を軽くこすり分生子懸濁液を作り接種源とした。これをカボチャ苗の地際部に注いだ後、25℃に設定した陽光インキュベーター内で 14 日観察し、苗地際部に形成される病徴の有無を調査した。

## 3. 発芽間もない種子への接種

供試菌株は、Table 1 に示した *F. solani* f. sp. *cucurbitae* 15 菌株及び *F. solani* f. sp. *cucurbitae* 以外の供試菌株として Table 2 に示した 15 菌株の計 30 菌株とした。

接種植物には、カボチャ（品種：黒ダネ）の種子からピンセット等を用い子葉部を傷つけないように種皮を剥ぎ、これを 1% アンチフォルミンにて 5 分間浸漬後、そのままプロッター法にて 25℃で 3 日間培養し、雑菌の汚染がないことを確認した後、供試した。1 区に対し 5 粒を供試した。

接種方法は、苗を用いた土壌接種と同様に調整した。この懸濁液 1 白金耳分をとり、供試種子の発芽基部にある Peg 部に置床し、プロッター法を用い、25℃にて 5 日間保管培養し、病徴の有無を調査した。

## 結果及び考察

病徴形成の結果については Table 1 及び Table 2 に示したとおりである。

### 1. 果実への接種

有傷接種における race 1 の 14 菌株及び race 2 の 1 菌株は、いずれも接種後 5 日目に果実断面上に径 20 mm ほどの腐敗症状を形成させた。無傷接種では 15 菌株すべてが果皮表面に薄い菌叢を発達させたが、腐敗等の病徴の形成には至らなかった。

### 2. 苗を用いた土壌接種

race 1 の 14 菌株はすべて、接種 5 日目に苗の地際部に水浸状、淡褐色の変色域を形成した。また、病徴表面に白色の菌体を伸長させているものも認められた。race 2 の 1 菌株には病徴の形成もなく健全であった。

### 3. 発芽間もない種子への接種

race 1 の 14 菌株は接種 4 日目になると、すべての供試植物に対し、茎の伸長を著しく阻害し、Peg 及び

**Table 2.** Results of pathogenicity tests with fungi excepted *F. solani* f. sp. *cucurbitae*.

Strain	Stem of germinated seed	
	Rot	Disturbed to grow
<i>Alternaria brassicola</i>	—	—
<i>Botrytis cinerea</i>	—	—
<i>Colletotrichum dematium</i>	—	—
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	—	—
<i>Fusarium lateritium</i>	—	—
<i>F. solani</i> f. sp. <i>pisi</i>	—	—
<i>F. solani</i> f. sp. <i>robiniae</i>	—	—
<i>F. solani</i> f. sp. <i>xanthoxyli</i>	—	—
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>narcisi</i>	—	—
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i>	—	—
<i>Mucor</i> sp.	—	—
<i>Phytophthora capsici</i>	+	+
<i>Rhizoctonia solani</i>	—	—
<i>Rhizopus</i> sp.	—	—
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	—	—

**Fig. 1** Results of inoculation test with *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 1 and race 2 on squash seedlings. Note that カA2 (a strain of race 1) disturbs to grow stem and causes foot rot, S-203 (a strain of race 2) causes brown rot only on roots 5 days after inoculation.

その周辺を褐色腐敗させた。5日目には白色の菌叢を発達させるものが多くあった。race 2はPeg周辺を僅かに褐変させたが、腐敗には至らず、茎の伸長を阻害させることもなかった (Fig. 1)。そして、*F. solani* f. sp. *cucurbitae* 以外の菌株においては、カボチャ疫病原菌である *Phytophthora capsici* だけが、race 1と同様に茎の伸長阻害を生じさせ、さらに根の褐変腐敗、

子葉へと病斑を拡大させた。他の菌株は、分化型の異なる *F. solani* の3菌株も含め病斑を形成させなかった。

これらの結果から「発芽間もない種子への接種」は、果実への接種と苗を用いた土壌接種との組合せによる本病の判定と同等の結果が得られた。

一般に、検定精度の面で優れるとされる土壌接種を

行うためには、病原菌の増殖や苗の育成等多くの労力と時間及び機器・施設を必要とする。本法はこれを大幅に軽減できるものである。また、検査作業という点から見ても、①現行のプロッター法を基本とすることから新たな資材の導入を必要としないこと。②接種用種子の準備にかかる3日間が *F. solani* の確認ができる生育期間と一致しており、接種後の病斑形成に要する4~5日を含めても現行の検査期間(8日間)に収まること。さらに、③検査の阻害要因である *Rhizopus* 属菌をはじめとする雑菌が繁殖する前に、*F. solani* の菌叢を採り、表面殺菌された接種植物に移す作業を行うことによりこの問題を除去できるなど利点がある。

これらのことから、現行の大型分生子の形態から *F. solani* f. sp. *cucurbitae* race 1 を診断する手法を改め、発芽間もない種子を接種植物として用いる簡易接種を採り入れた本菌の検査法を次のように提案したい。

簡易接種を用いたカボチャ立枯病菌の輸入種子検査法

- 1) サンプリングした種子を無作為に300粒採り、プロッター法にて25°Cで培養する。
- 2) 3日間培養した後、種子上に白色の菌糸が発達していた場合、この一部を、スライドガラス上の水滴に乗せ、カバーガラスで被わず100倍で観察する。
- 3) *Fusarium solani* の分生子を確認した場合、これを分生子懸濁液とし、ここから1白金耳採り、用意しておいた発芽間もない種子の Peg 形

成部に接種する。これを *Fusarium* 汚染種子1粒につき発芽間もない種子2粒行う。

- 4) 接種した種子は25°Cにて4~5日間培養する。
- 5) 培養終了後、茎の伸長阻害を伴う褐色病斑を形成し、その上に *F. solani* 菌体を認めた場合は本菌とする。

## 引用文献

- 粕山新二・井上孝次・岡本康博(1990)岡山県で発生したカボチャ立枯病について. 日本植物病理学会報 56: 384
- 金城衣恵・渡嘉敷唯助・松尾卓見(1987)沖縄で発見されたニガウリのカボチャ台木を侵す *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 1. 日本植物病理学会報 53: 86
- 大畑貫一・国安克人・高橋康治・栃原比呂志・長尾記明(1999)種子伝染病の生態と防除—健全種子生産をめざして—日本植物防疫協会: 250-253
- 大戸謙二・基 喜吉・下長根鴻(1989)カボチャ立枯病の発生と防除. 植物防疫 43: 625-628
- 下長根鴻・河又 仁・照沼貞夫(1989)茨城県で発生を認めたカボチャ立枯病について. 日本植物病理学会報 55: 120-121
- 特定重要病害虫検疫要綱 53 農蚕第 8308 号 *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* SNYDER & HANSEN, 昭和 53 年 12 月 4 日.
- TOUSSON, T. A. and W. C. SNYDER (1961) The pathogenicity, distribution, and control of two race of *Fusarium (Hypomyces) solani* f. *cucurbitae*. Phytopathology 51: 17-22