

素寒天培地を用いた *Fusarium graminearum* による オオムギ赤かび病汚染粒の検定

桐野菜美子・井上 幸次・那須 英夫

Detection of the Grains Infested with Barly Scab Caused by *Fusarium graminearum*
Using Water Agar Medium

Namiko Kirino, Koji Inoue and Hideo Nasu

緒 言

ムギ類赤かび病は主にムギ類の穂に主に発生し、減収と品質の低下を引き起こすため、多発すると著しい被害となる。また、本病の病原菌は人畜に有害なデオキシニバレノール (DON) やニバレノール (NIV) 等のマイコトキシンを産生することから、2002年に農産物検査規格規定の改正で、ムギ類赤かび病汚染粒の混入上限が0.0% (10,000粒中に4粒まで) と定められた。そのため、生産現場では被害粒を簡易に識別する技術の早急な開発が必要となった。しかし、ムギ類では品種によってアントシアニンが着生し、粒が赤く見えるものがあり、これらと赤かび病汚染粒を肉眼で識別するのは難しい。肉眼によらない判定法として外側 (1994) の *Fusarium graminearum* の選択培地 (FG 培地) や温室状態で静置した後、顕微鏡観察により大型分生子の形成を確認するといった手法があるが、生産現場での検定には不向きである。一方、これまで赤かび病汚染粒を素寒天培地に置床すると、菌の伸長により培地を赤変させることが経験的に知られており (図1)、培地色により赤かび病汚染粒の簡易検定ができると考えられた。

そこで、上記の素寒天培地を赤変させる赤かび病菌を同定し、本法の有効性を検討したので報告する。なお本試験の実施に当たり、菌株の分譲並びに貴重なご助言をいただいた東京家政大学 一戸正勝教授に厚く御礼申し上げます。



図1 *Fusarium graminearum* に感染したオオムギ汚染粒による培地の赤変 (25℃, 4日間静置後の素寒天培地)

材料及び方法

素寒天培地を用いた簡易検定法と菌の分離

2003年6月に、岡山県農業総合センター農業試験場内圃場、岡山県内の現地圃場 (岡山市藤田、灘崎町、瀬戸内市、赤磐市、倉敷市、総社市) から立毛中のオオムギ穂から採取した粒のうち、表面が赤色の粒及び岡山県内のライスセンター (藤田、備南、長船、邑久、熊山、清音、興除) において、収穫物検査時に選別された赤色のオオムギ粒をそれぞれ10~20粒供試した。供試ムギ粒は70%エタノールで30秒間表面殺菌して滅菌水で洗浄した後、シャーレ (直径9cm) 内の2%素寒天培地に5粒ずつ置床した。25℃、自然光下で4日間静置した後、培地

色の赤変の有無を肉眼観察した。そして、赤変した部位から伸長した菌糸を光学顕微鏡下で単菌糸分離し、同定に供試した。

分離菌の同定

分離した21菌株をPSA培地(ジャガイモ200g, スクロース20g, 寒天20g, 蒸留水1,000ml), FG培地(K₂HPO₄ 1g, KCl 500mg, MgSO₄·7H₂O 500mg, Fe-EDTA 10mg, D (+) キシロース 20g, L-グルタミン酸ナトリウム 2g, オックスゴール 500mg, Na₂B₄O₇·10H₂O 1g, クロラムフェニコール 250mg, 硫酸ストレプトマイシン 300mg, 寒天 15g, 蒸留水 1,000ml) 及びSNA培地(グルコース 0.2g, スクロース 0.2g, KH₂PO₄ 1g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, KCl 0.5g, 寒天 20g, 蒸留水 1,000ml) 上での25℃, 人工光で24時間照射条件下で培養(PSA培地では4日間, FG培地では10日間, SNA培地では14日間培養)後の菌叢の形状, 分生子柄, 分生子などの菌の形態を観察した。

DON 産生能の検定

前項で供試した21菌株及び対照としてムギ類赤かび病菌(*F. graminearum*, 一戸正勝教授より分譲)を, ムギ培地(ハダカムギ30gに水5mlを加用後高圧滅菌)を用いて, 25℃の人工光で24時間照射条件下で14日間培養した。増殖した菌糸を含むムギ培地からそれぞれ5gを採取して蒸留水25mlを加えて3分間振とう後, ろ紙(ADVANTEC No.2)でろ過し, 市販のDON検定キット(NEOGEN社製, ベラトクス ポミトキシシ 5/5)を用いてろ液中のDON産生の有無を調査した。

Fusarium 属菌の素寒天培地における菌叢

Fusarium 属菌のうち, *F. graminearum*, 赤かび病原菌種に随伴するかび毒産生菌種である *F. semitectum*, *F. sporotrichioides*, *F. equiseti*, ムギ類への潜在的感染菌種である *F. proliferatum* (いずれも一戸正勝教授から分譲) 及び *F. oxysporum* (岡山農試保存菌株, イチゴ萎黄病菌) の各1菌株を素寒天培地上で25℃, 人工光で24時間照射条件下で4日間培養し, 培地の色を比較した。

結果及び考察

分離21菌株は, いずれもFG培地上では鮮紅色の菌叢を呈した。また, PSA培地で初め白色, やがて黄色を呈する綿毛状の気中菌糸を伴った深紅色の菌叢を呈し, 40mm以上の菌糸生育を認めた。

SNA培地上では, いずれの分離菌株も小型分生子を形成せず, 緩やかに湾曲した鎌形の大型分生子(図2-

A, B) を徳利形フィアライドからモノフィアライドで産生した(図2-D)。大型分生子の隔壁数は3~7で主に5, 大きさは約50×5μmであった。まれに菌糸又は大型分生子に厚膜胞子を形成した(図2-C)。

DON産生能はいずれの分離菌株も有していた。

小泉(1993)らによると, 西日本におけるムギ類赤かび病菌の分布は *F. graminearum* が優占種であり, *F. culmorum* の分布は国内では北海道及び東北地方に限られると報告している。分離菌のFG培地上での菌叢は, 外側(1994)の記述する *F. graminearum* の記載と一致しており, PSA培地上での菌叢の形態, さらに分生子の形態および特徴はNelson *et al.* (1983)による *F. graminearum* の記載と一致した。また, 分離した21菌株はすべて *F. graminearum* や *F. culmorum* により産生されるDONを産生した。これらのことから, 分離菌はすべて *F. graminearum* であると考えられる。

素寒天培地上で, 25℃の人工光照射下で4日間培養した培地の色は, *F. graminearum* だけが赤色となり, *F. semitectum*, *F. sporotrichioides*, *F. proliferatum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum* は着色しなかった(表1)。

以上の結果から, 素寒天培地を用いた本検定法は西南暖地における主要な赤かび病菌である *F. graminearum* によるオオムギの汚染粒の検定に有効であることが明らかとなった。本法は *F. graminearum* によるコムギの汚染粒の検定にも有効であると考えられる。

摘 要

F. graminearum によるオオムギ赤かび病汚染粒の簡易検定法として, 素寒天培地の赤変による判定法の有効性を検討した。

1. オオムギ粒から分離し素寒天培地の色を赤変させた21菌株は形態及びDON産生能からいずれも *F. graminearum* と同定した。
2. *Fusarium* 属菌6種を素寒天培地で培養すると, *F. graminearum* だけの培地が赤変した。

以上の結果から, 本法は主関与菌である *F. graminearum* による赤かび病汚染粒の検定に有効と考えられる。

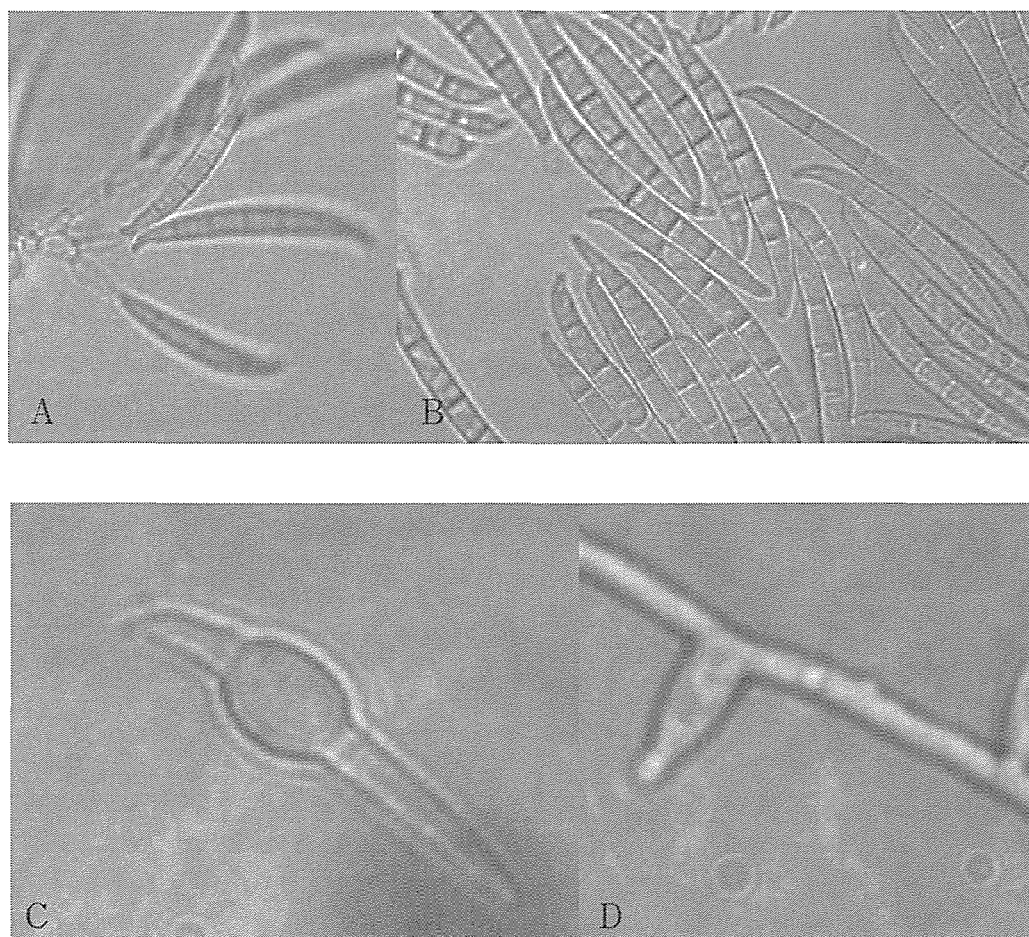


図2 SNA 培地における分離菌 (No. 5) の形態

- A : 分生子形成細胞から形成される大型分生子
 B : 大型分生子
 C : 分生子に形成された厚膜胞子
 D : 分生子形成細胞

表1 *Fusarium* 属菌を培養後の素寒天培地の色

菌種	素寒天培地の色	P S A 培地上での色 ^{a)}
<i>F. graminearum</i>	赤色	赤色
<i>F. sporotrichioides</i>	無色	赤色
<i>F. semitectum</i>	無色	黄褐色から茶色, まれに赤色
<i>F. equiseti</i>	無色	黄褐色から茶色, まれに赤色
<i>F. proliferatum</i>	無色	暗紫色
<i>F. oxysporum</i>	無色	暗青色または暗紫色

a) Nelson *et al.*(1983)

引用文献

- 小泉信三・加藤肇・吉野嶺一・駒田 旦・一戸正勝・梅原吉広・林 長生(1993) ムギ類赤かび病の病原学的・疫学的研究. 農業研究センター研究報告, 23 : 1-104.
- Nelson, P. E. and T. A. Toussoun, and W. F. O. Marasas, (1983) *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification, The Pennsylvania State University Press, United States of America, 193p.
- 外側正之(1994) *Fusarium graminearum* 分離のための選択培地. 土と微生物, 44 : 77-88.

Summary

We tested the validity of simple detection of grains infested with barley scab by incubation for four days at 25°C on water agar media. The twenty-one isolates, which changed color of the water agar medium to red, were identified as *Fusarium graminearum*, based on morphological characteristics and production of Deoxynivalenol (DON). And other six *Fusarium* species did not change the media red in color.

We conclude from the experiments that this assay is useful for detection of the grains infested with barley scab caused by *F. graminearum* as dominant pathogen in western Japan.