

ミニ特集：ムギ類の種子生産における黒節病管理技術

## ムギ種子の簡便な黒節病菌保菌粒率調査法

三重県農業研究所 <sup>はしづめ</sup>橋爪 <sup>ふじお</sup>不二夫・<sup>ふじた</sup>藤田 <sup>あやか</sup>絢香

## はじめに

ムギ類の黒節病は病原細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *japonica* (synonym pv. *syringae*) によって引き起こされる。本病害は種子が第一次伝染源とされているため、採種圃における発生が栽培圃場における発生の拡大、さらには収穫物の品質低下、減収を招くおそれがある。そのため、採種圃段階で汚染度の低い種子を生産することが重要となるが、汚染度を定量的に評価するための指標の一つとなるのが種子の保菌粒率である。効果的な種子消毒法や耕種の防除手法を開発するためにも簡便かつ客観的な保菌粒率の調査法が必要となってくる。

これまでに筆者らが黒節病菌の保菌粒率調査法を考案する過程で、黒節病菌は種子の胚に高濃度で存在しており、吸水で漏出させることで検出が容易になることがわかってきた。そこで、黒節病菌選択培地(森ら, 1999) (以下、選択培地) に種子の胚側を差し込み、黒節病菌のコロニーの発生割合をカウントする方法 (以下、選択培地差込法) (橋爪ら, 2009) を開発した。しかし、この選択培地差込法は1粒ずつ多数の種子を差し込むために多大な労力と時間がかかること、糸状菌の繁殖によって黒節病菌の判定がしにくくなること、多量の実験培地の作成が必要なためコストがかかること等の問題があり、簡便な方法とは言えなかった。

そこで、96穴プレートに入れた種子の浸水液を選択培地に少量スポットすることで、簡便にムギ種子の黒節病菌保菌粒率を調査する方法 (以下、96穴プレート法) を開発したので紹介する。

## I 96穴プレート法の特徴

本法は、選択培地差込法を用いる場合と比較して以下のような特徴がある。長所としては、①選択培地の量を約7分の1に低減できる、②差込法とは異なり、種子表

面に付着した雑菌を高濃度で持ち込まないため雑菌の発生が少なく、黒節病菌のコロニーが判定しやすい、③作業の手間、時間を低減できる。一方、短所としては、移植する器具の使用経験がない場合、操作に慣れる必要がある。

## II 96穴プレート法の基本操作

## 1 選択培地の作成

黒節病菌の選択培地(森ら, 1999)を用いる。具体的には蒸留水1l当たり  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  1.3 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25 g, L-セリン 5 g,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  24 mg (100倍濃縮液を10 ml添加), カビサイジン 100 mg 力価 (乳鉢で粉碎後99.5%エタノール10 mlに懸濁), 寒天 15 g を入れてオートクレーブ滅菌 (120°C, 20分間) し、60°C程度まで冷却後に、最終濃度でメチルバイオレット 1 ppm, アンピシリンナトリウム 10 ppm, シクロヘキシミド 25 ppm, 亜テルル酸 (IV) カリウム 25 mg となるよう調整した100倍濃縮混合液を10 ml加える。作成した選択培地はマイクロプレート型シャーレ (アズワン 1-9668-02 など) に20 ml ずつ分注する。9 cm シャーレ (90 mm × 15 mm) を用いる場合は、10 ml とする。培地は厚さが一定で表面が水平に固まるように注意する。

## 2 ムギ種子の水浸漬

1検体当たり用いる種子数は種子の汚染度によって異なり、想定される保菌粒率が低いほど多くの種子を検定する必要がある。ここでは保菌粒率が1%未満であっても検出できるように、2枚の96穴プレート (ピーエム機器 BM6001 など) に、ピンセットで192粒の種子を入れることを基本とした。大麦の種子の場合、胚 (尖っていない側) が着実に浸水されるよう下向きに入れる。リザーバー (ピーエム機器 BM-0852-5 など) に滅菌水を入れ、200  $\mu\text{l}$  8連ピペットで、200  $\mu\text{l}$  ずつウェルに注ぐ。または、分注器を使って、1ウェルずつ200  $\mu\text{l}$  の滅菌水を注ぐ。ふたをして、2プレートごとにラップで包んで密閉する。これらの浸水した種子を4~10°Cで3日間浸漬する。ただし、雑菌が発生せず、発芽が操作の妨げにならない種子、汚染度の低い種子を用いる場合、25°C, 2日間処理でも構わない。種子浸水の温度を

A Simple Method to Survey a Ratio of Wheat and Barley Seeds Infested by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. By Fujio HASHIZUME and Ayaka FUJITA

(キーワード: ムギ類黒節病菌, 種子保菌粒率, 96穴プレート, 選択培地)