

トウモロコシ種子からの *Diplodia maydis* (BERKLEY) SACCARDO の検出について

荳 喜吉・永井三恵子・佐々木 一
中村 整・竹知 孝典*・蕨 松男**
横浜植物防疫所東京支所

Detection of *Diplodia maydis* (BERKLEY) SACCARDO from Imported Corn Seed. Kiyoshi DAI, Mieko NAGAI, Hajime SASAKI, Hitoshi NAKAMURA, Kousuke TAKECHI and Matsuo WARABI (Tokyo Branch, Yokohama Plant Protection Station) *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 23: 1-6 (1987)

Abstract: *Diplodia maydis* (BERKLEY) SACCARDO was detected from several lot of corn seed imported from the United States. The fungus is not known in Japan and marked as one of the quarantine significance. By the normal blotter method, the fungus produced rough, black cirrhous on the affected seed after incubation for 15 days or more at 27°C. When the outer layer of the affected seed was removed after incubation for 5 days, the cirrhous, consisted of mature, septate conidia, were produced on the affected seed by another incubation for 2 to 5 days. Therefore, it was considered that removal of the outer layer of the infected seed halfway through the incubation was effective for the rapid detection of the fungus from corn seed at the import quarantine inspection.

はじめに

東京港には、毎年、1~2千トンのトウモロコシ種子がアメリカ合衆国から輸入されている。これらは、港での一次検査と植物防疫所大井種苗検査場での二次検査(精密検査)を経て、大部分のものについては、病害虫の寄生のないことが確認され、合格となっている。しかし、1983年2月から輸入された荷口の一部に、二次検査でトウモロコシ種子の基部に暗褐色で不鮮明な斑点~条斑を有する種子が認められるようになり、この種子の変色、異常が *Diplodia maydis* (BERKLEY) SACCARDO によるものであることが判明した。本菌は我が国に未発生で、アメリカをはじめとするトウモロコシ生産国に広く分布している (NEEGAARD, 1977; SUTTON, 1964; SUTTON, 1966)。植物防疫所では、植物防疫官の検査手引きである「植物検疫重要病害虫解説」に当菌の概要を掲載し、その侵入について特に警戒している病原菌のひとつである。

本報告は、当該変色種子からの病原菌の分離・同定および、その検定法について検討した結果を取りまとめたものである。

試験を行うに当り、有益な御助言、御指導を賜った当所調査研究部病菌課川合昭技官に厚くお礼申し上げます。

* 現在、横浜植物防疫所札幌支所留萌出張所

** 現在、横浜植物防疫所東京支所大井出張所

材料および方法

1. 供試種子および菌の分離法

アメリカ合衆国産トウモロコシ種子(品種: G-4589) 15 RL 835, 41 RL 835および52 RL 835の3ロットから、1ロット当たり500グラムのサンプルを取り出し、水道水で種子表面に粉衣されている薬剤を良く洗い流した後、種子の穂軸付着部周辺(種子の基部)に周縁の不明瞭な褐~黒褐色の病斑が散在する種子(変色種子)を選び、供試した。

変色種子からの菌の検出はブロッター法 (NEERGAARD: 1977) により行った。すなわち、9cmペトリ皿にろ紙2枚を敷いて乾熱滅菌したものに、殺菌水4mlを注入し、ろ紙上に変色種子を置床し、27°Cのインキュベーターに置いた。培養15日目に、種子の表皮下に形成された柄子殻から噴出した胞子角の一部を取り、硫酸ストレプトマイシンを100mg/l加えたジャガイモ煎汁寒天培地(P S A)の平面培地上に移植し、27°Cで2日間培養した。伸長した菌糸の先端を採り、P S A斜面培地上に移植し、これを分離菌として各種の試験に供試した。

2. 病原性の検定

トウモロコシ苗から切り取った葉身に分離菌を接種し、分離菌株の病原性について調査した。約10cmに切った葉身を70%アルコールで軽く表面殺菌し、その

切口を柄胞子の懸濁液に10分間浸した。これを15cmペトリ皿に入れ、室内にて病徴の出現を観察した。

3. 菌の形態観察

分離菌株をP S Aで培養し、培地上に形成された柄子殻、柄胞子等の形態を生物顕微鏡を用いて観察した。また、トウモロコシの葉身に形成された柄子殻を、凍結ミクロトームを用いて切片標本を作製し、柄子殻の断面を観察した。

結 果

1. 変色種子の特徴

菌が分離された種子には、その基部に周縁部の不明瞭な褐～黒褐色の病斑が散在するのが認められた。特に、ひどいものでは、基部全体が黒褐色を呈していた。病斑の形は斑点状のものや鋸錘形のものなど不整であった。病斑部は陥没せず、また、柄子殻などの標徴は認められなかった (Fig. 1)。基部全体が黒褐色を呈する種子の種皮を剥ぐと、胚乳部が黒変していた。

2. 分離菌の病原性

変色種子をブロッター法により培養すると、高頻度に柄子殻の形成が認められた。

前記3ロットの変色種子から分離した菌株の中から、1ロット当たり1菌株、計3菌株を用いて病原性の有無を調査した。

P S A斜面培地上に形成された柄子殻から柄胞子を採取して、各分離菌株の胞子懸濁液を作製し、トウモロコシ葉身の切口を同液に浸して接種した。接種後、24時間で切口周辺が水浸状暗緑色に変化した。その後、褐～暗褐色となり、その外縁部に黄色の暈が形成された。この病徴は葉脈に沿って急速に拡大した。5日後になると、褐変部の中央の広い部分が灰褐色に枯れ、その中に黒色で小さな粒状の柄子殻が多数形成された。柄子殻は葉身の表より裏面に多く形成された。この頃になると、柄胞子懸濁液に浸した切口から離れた葉身部にも、周縁の不明瞭な鋸錘形で褐色の小さな病斑が現われた (Fig. 5)。

葉身に形成された柄子殻には、接種源として用いた柄胞子と同型の柄胞子が形成されていた。

3. 分離菌の同定

分離菌は、P S A培地上では幾分灰褐色を帯びた白色で、同心円状の菌叢を形成し、気中菌糸の生育は旺

盛で、生育は早かった。また、P S A培地中に容易に柄子殻を形成した。

柄子殻は、直径120～288 μm (平均216 μm) で球型、黒褐～黒色を呈し、植物組織内に埋没して形成された (Fig. 2)。頂部には乳頭状の孔口があり、成熟すると内部から柄胞子が角状に噴出した。柄胞子は淡褐色、中央に1つの隔膜を有する長円形で、多くのものはまっすぐであるが、わずかに湾曲したものもあった。未熟のものは無色単胞、長円形であった。成熟した柄胞子の大きさは4.8～6×16.8～27.6 μm (平均4.85×21.95 μm) であった (Fig. 3)。なお、柄胞子は移植を繰り返すと、奇形化する傾向が認められた。

これらの特徴は、*Diplodia maydis* についての記載 (SHEAR and STEVENS, 1935; SUTTON, 1964; SUTTON and WATERSTON, 1966; SHURTLEFF, 1980; SUTTON, 1980) とよく一致し、分離菌を *Diplodia maydis* (BERK.) Sacc. と同定した。

4. *Diplodia maydis* の検出法の検討

1) 培養温度

D. maydis を検出するための最適温度を調べた。

P S A平面培地の中央に柄子殻1個を置床し、15, 20, 27, 30°Cの各温度で培養し、菌叢の拡大、柄子殻の形成について調査した。

各温度での菌叢の拡大は30, 27, 20, 15°Cの順で早く9cmペトリ皿全面に広がるのに要する期間は30°C; 3日, 27°C; 4日, 20°C; 6日, 15°C; 11日であった。柄子殻の形成は、菌叢がペトリ皿全面に広がった後に始まり、30, 27°Cでは5日目から、20°Cでは7日目から認められたが、15°Cでは14日目になっても柄子殻は形成されなかった。培地上に形成された柄子殻の分布状態は、30, 27°Cでは全面均一に分布していたが、20°Cでは中央部に濃く分布していた。

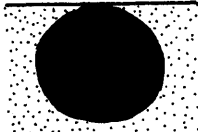
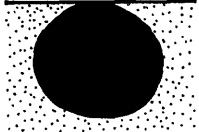
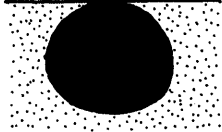
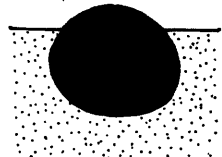
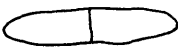
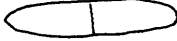
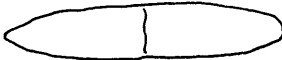
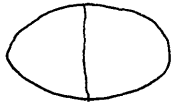
以上のように、15, 20°Cでは *D. maydis* の生育が遅く27°Cと30°Cでは、菌の生育に大きな差が認められなかった。このため、ブロッター法の培養温度は27°Cが最適と判断した。

2) 変色種子の培養方法 (柄胞子の早期検出法)

変色種子をブロッター法により27°Cで培養した場合、培養2～3日目に、変色種子表面に淡灰白色の菌糸が伸長した。培養5～6日目には、種子全面が淡灰白色の菌叢に被われた。さらに、培養を続けると、15～16日目に淡灰白色の菌叢表面に柄胞子の、胞子角を噴出するのが認められた。

ブロッター法による培養中に、種子の表皮を剥皮し

Table 1. Comparison between the isolates and 3 species of seed-transmissible *Diplodia* on corn seed

	Isolates	<i>D. maydis</i> ¹⁾	<i>D. macrospora</i> ²⁾	<i>D. frumenti</i> ³⁾
	immersed in host tissue	immersed in host tissue	immersed in host tissue	emerge through longitudinal cracks in the epidermis
	globose	spherical to subglobose	spherical to subglobose	subglobose to globose black
	dark-brown to black	dark-brown to black	dark-brown to black	
Pycnidia	120-288 μ m	150-300 μ m	200-300 μ m	170-470 μ m
				
	straight, curved or irregular	straight, curved or irregular	straight or curved, rarely irregular	oval
	1 (0-2) septate	1 (0-2) septate	1 (0-3) septate	1 (0-1) septate
	pale brown	pale brown	pale brown	brown
Conidia	16.8-27.6 \times 4.8-6 μ m	15-34 \times 5-8 μ m	44-82 \times 7.5-11.5 μ m	24-28 \times 13-14 μ m
				

1) SUTTON, B.C. and Waterston J.M. (1966) 2

3) EDDINS, A.H.(1930)

2) SUTTON B.C. and Waterston J.M. (1966) 1

て種子内部での柄子殻の形成状況を経時的に調べると、培養5~6日目から柄子殻が認められた。この時期の柄子殻内の柄胞子は、まだ、十分に成熟していなかったが、剥皮後2~4日目には成熟した柄胞子が確認された。以上から、ブロッター法による培養途中(5~6日目)に種子を剥皮し、さらに培養すれば、培養7~10日目には成熟柄胞子を確認できることが判った。

考 察

アメリカ合衆国産トウモロコシ種子に混入していた変色種子から、トウモロコシの葉身に病原性を有する *Diplodia* 属菌が分離された。トウモロコシの穂軸や種子に病気を起こす *Diplodia* 属菌は *D. frumenti* ELL. & EV., *D. macrospora* EARL. と *D. maydis* (BERK.) SACC. の3種が知られている (EDDINS, 1930; SHURTLEFF, 1980;

SUTTON, 1964)。これらの *Diplodia* 属菌の特徴と分離菌とを比較したものを Table 1 に示した。柄子殻は *D. frumenti* が宿主組織内に半埋没して形成されるのに対し、他の3者は宿主組織内に埋没して形成される。色、大きさについては4者間に大きな差異はない。柄胞子の大きさは長径で *D. macrospora* が44~82 μ m と他の3者に比べ大きく、短径では *D. frumenti* が13~14 μ m と最も大きく次いで、*D. macrospora* の7.5~11.5 μ m, *D. maydis* が5~8 μ m で分離菌はこれに近く、4.8~6 μ m であった。以上のことから、分離菌はその形態および病原性から *Diplodia maydis* (BERK.) SACC. と同定した。

D. maydis は、トウモロコシに stalk rot, ear rot, seedling blight 等の病害を起こし (SUTTON and WATSON, 1969), 種子伝染性である (RICHARDSON, 1979) ことが知られている。EPP0 (European and Mediter-

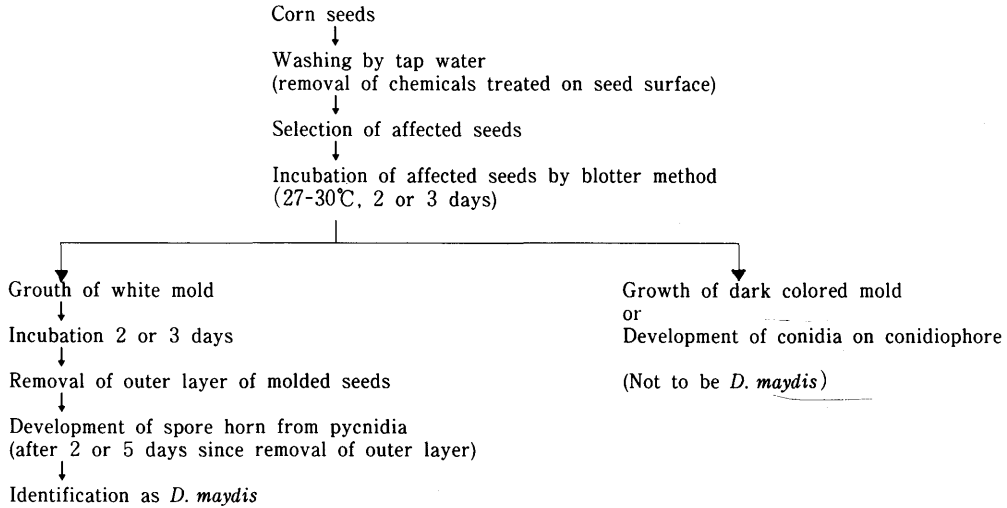


Fig. 6. Procedure for detection of *Diplodia maydis* from imported corn seeds

nian Plant Protection Organization) は、検疫対象病害虫の A 2 リスト中に格付けし (EPPO; 1975), トウモロコシ種子の検査対象病菌に指定している。特に、ハンガリー、ポーランド、ユーゴスラビアでは、本病に対する特別な検疫措置がとられている (NEERGARD, 1980)。

また、*D. maydis* によるトウモロコシの被害は、高温乾燥地帯よりも、冷涼で湿潤な気候で激しく出る (RICHARDSON, 1979) と言われており、我が国においても、その侵入には特に、警戒を要する病害のひとつと考えられる。

一般に、柄子殻を形成する病原菌の種子からの検出、同定には、同定の指標となる子実体が形成されるまでに時間がかかるため、長期間を要する。トウモロコシ種子からの *Phomopsis* 属菌の検出の場合、培養 7 日目に菌のカウントを行う通常の seed health test では検出不可能で、18日間の培養が必要であると指摘されている (NWIGWE, 1974)。筆者らの調査でも、*D. maydis* の場合、ブロッター法で培養して、種子表面に柄胞子が噴出するのに通常の方法では15日間以上を要した。

輸入種子検疫における検査期間は、輸入された荷を港に留め置いて検査を行うことから、できる限り短期間であることが望ましい (川合ら, 1985)。このため、トウモロコシ種子の *D. maydis* の検出にあたって、変色種子をブロッター法で培養する途中に、種子の表皮を剥皮する方法を取り入れることは、検査期間を短縮する上で有効な手段であると考えられる。Fig. 6 に示したものは、この方法を取り入れたトウモロコシ種子の検

査方法の一案である。

摘 要

アメリカ産トウモロコシ種子に混入していた変色種子から、*Diplodia maydis* (BERKLEY) SACCARDO が検出された。

D. maydis は、27, 30°Cにおいて、生育が良好で、P S A培地上で柄子殻を多数形成した。

変色種子をブロッター法により、27°Cで15日以上培養することにより、柄胞子を噴出したが、培養途中 (5~6日目) に種子の表皮を剥ぐことによって、培養7~10日後に成熟した柄胞子を確認できた。培養途中に種子を剥皮する方法を取り入れたトウモロコシ種子の検査方法の一案を提示した。

引用文献

- EDDINS A.H. (1930) A New *Diplodia* Ear Rot of Corn. *Phytopathology* 20: 733-742.
- E P P O (1975) E P P O Recommendations on New Quarantine Measures. E P P O Bulletin Special Issue; 30
- 川合昭・木村茂・西尾健・長尾記明 (1985) E L I S Aによるキウリ種子からのCGMMVの検出, 植防研報 21; 47-53.
- MICHAELSO, M.E. (1967) Factors affecting development of stalk rot of corn caused by *Diplodia zeas* and *Gib-*

- berella zae*. *Phytopathology* **47**; 499-503.
- NEERGAARD, P. (1977) The Macmillan Press Ltd.; pp. 241-242.
- NEERGAARD, P. (1980) A Review on Quarantine for seed. National Academy of Sciences, India Golden Jubilee Commemoration Volume.; pp. 495-530.
- NWIGWE, C. (1974) Occurrence of *Phomopsis* on Maize (*Zea mays*), *Plant Disease Report* **58**; 416-617.
- RICHARDSON, M.J. (1979) An Annotated List of Seed-Borne Diseases. Third Edition. CMI; 256 p.
- SHEAR, C.L. and N.E. STEVENS (1935) *Sphaeria zae* (*Diplodia zae*) and confused species. *Mycologia* **27**; 467-477.
- SHURTLEFF, M.C. (1980) A Compendium of Corn Diseases. The American Phytopathological Society Inc.; pp.44.
- SUTTON, B.C. (1964) *Coelomycetes* III *Mycological Papers* No. **97**; 1-42.
- SUTTON, B.C. and J.W. WATERSTON (1966) 1. *Diplodia macrospora* in CMI Description of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 83.
- SUTTON, B.C. and J.W. WATERSTON (1966) 2. *Diplodia maydis* in CMI Description of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 84.
- SUTTON, B.C. (1980) *The Coelomycetes* CMI; 696 p.

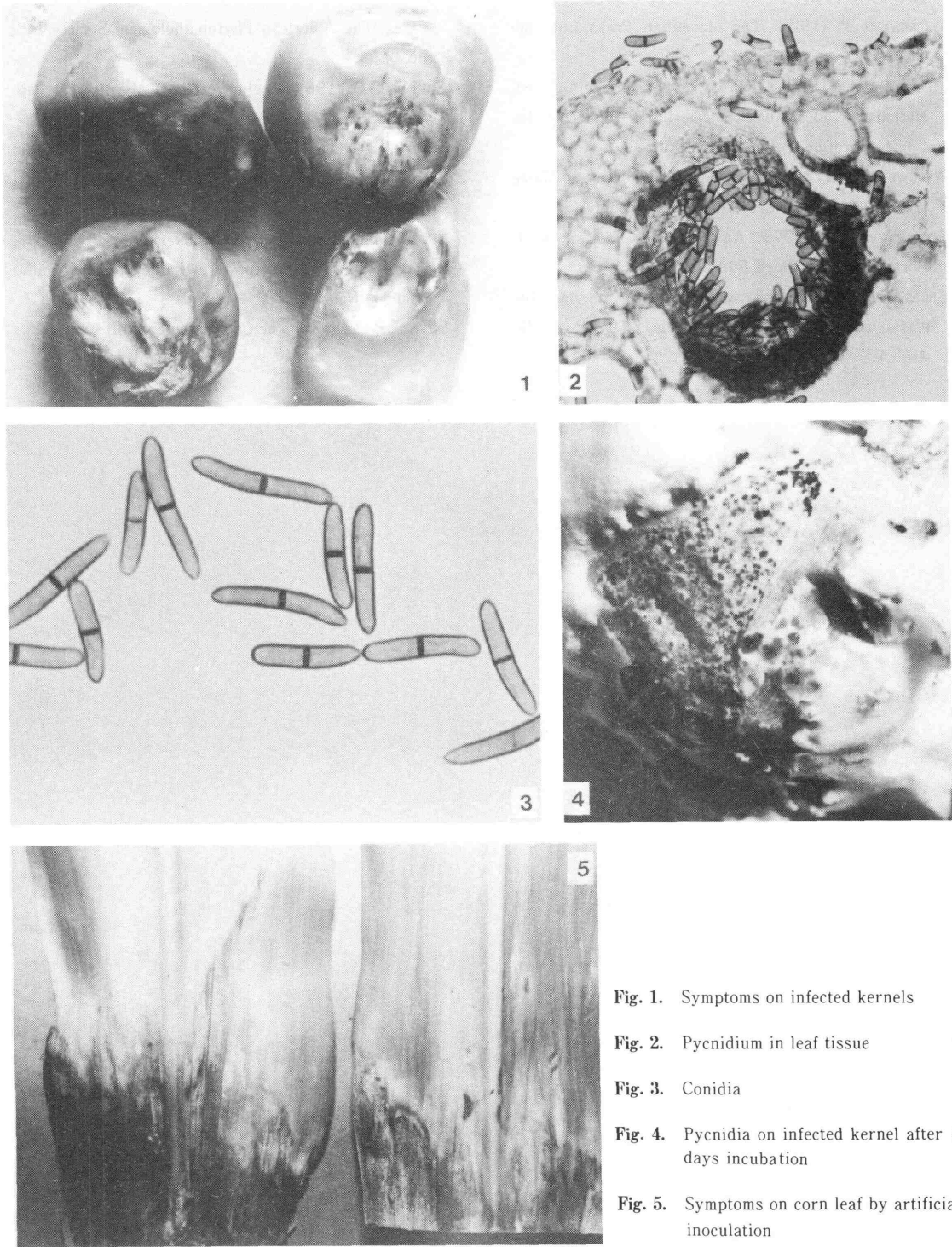


Fig. 1. Symptoms on infected kernels

Fig. 2. Pycnidium in leaf tissue

Fig. 3. Conidia

Fig. 4. Pycnidia on infected kernel after 6 days incubation

Fig. 5. Symptoms on corn leaf by artificial inoculation