

植物防疫基礎講座：

植物病原菌類の分離・培養テクニック

—特に単孢子分離を中心に—

三重大学大学院 ^{なか}中 ^{しま}島 ^ち千 ^{はる}晴

はじめに

Ⅲ 簡易同定と単孢子分離

植物病害の多くを占める植物寄生菌の診断・研究において、純粋な単孢子分離株を確立することが重要であるのは言うまでもない。本稿では、植物寄生性糸状菌の単孢子分離法について、筆者の用いている方法を紹介する。これらの方法は圃場や持込サンプルの観察から既に処理が始まり、その時点で属レベルでの診断も終了できる。なお、本稿の図版は「第7回植物病原菌類談話会」にて用いたものである。

Ⅰ ルーペや実態顕微鏡下での観察

まずは病斑上の菌体の有無を確認し、菌の大まかなグループ分けを行う。分生子柄と分生子からなる菌叢が観察されれば糸状不完全菌、殻が観察されれば分生子果不完全菌、もしくは子のう菌などと判断できる。これらの見え方については成書（岸・我孫子, 2003）が優れた例示をしている。この際に菌体が観察されなければ、ビニール袋に軽く湿らせた脱脂綿とともに罹病植物を密閉し、湿室にて菌体の形成を待つ。しかしながら、この方法で形成された胞子は、変異が大きいため種の同定に用いるべきではない。特徴的な菌体が形成されない場合には流水洗浄法などの組織分離を試みることになるが、本稿では取り上げない。

Ⅱ 器具の作成と用いる器材

単孢子分離に用いる器具2種類の作成方法を図-1に示す。針は5 cm 程度の木綿針、ニクロム線は1,000 W 程度（径1 mm）のものがホームセンターなどで手に入る。長さや角度は好みであるが、出来上がりで5 cm 程が使いやすいようである。準備するものは以下の通り：顕微鏡（実習用がよい）、2%素寒天平板培地、滅菌水、メス、スライドガラス、有柄針、カミソリ、両面テープ、マーカーペン（2色）。

Techniques for Establishment of Monoconidial Isolates of Plant Pathogenic Fungi. By Chiharu NAKASHIMA

（キーワード：カイト法、子のう菌、植物寄生菌、担子菌、不完全糸状菌）

1 簡易同定

この後の単孢子分離に備え、簡易な同定を行う必要がある。まず病斑部より徒手切片を作成する。この徒手切片を光学顕微鏡下で観察し、属レベルまでの同定を行ってしまう。属が不明であっても、胞子の形状、着色の有無、隔壁数、大まかなサイズはスケッチなどで把握する。

2 単孢子分離1：胞子が採生しているもの。胞子懸濁液の塗布による分離法；図-2

(1) 胞子懸濁液の調整

1) 病斑上に形成されている胞子の場合：前章で作成したマイクロスパチュラを滅菌水で湿らせ、ごく軽く病斑をなぞるようにして胞子を回収し、アルコール滅菌したスライドガラス上に数滴滴下した滅菌水中へ懸濁する（図-3）。

2) 葉組織内に形成されている胞子の場合：観察用の徒手切片より若干厚めのものを切り出し、アルコール滅菌したスライドガラス上へ1滴滴下した滅菌水上に浮かべる。これをスライドガラスをかけずに100倍の光学顕微鏡下で、殻が視野の中心になるよう移動する。この殻を有柄針もしくは0番の虫ピンで破壊、中の胞子を押し出し、胞子懸濁液とする（図-4、5）。

これら胞子懸濁液の濃度は100倍で一視野当たり5～

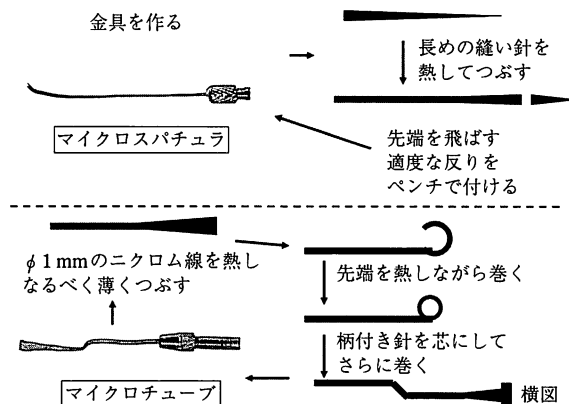


図-1 単孢子分離に用いる金具の作成方法

10 個あれば十分である。この濃度になるよう、滅菌水を用いて調整する。

(2) 孢子懸濁液の塗布

赤や青などのマーカーペンで、底に点線にて三角形を

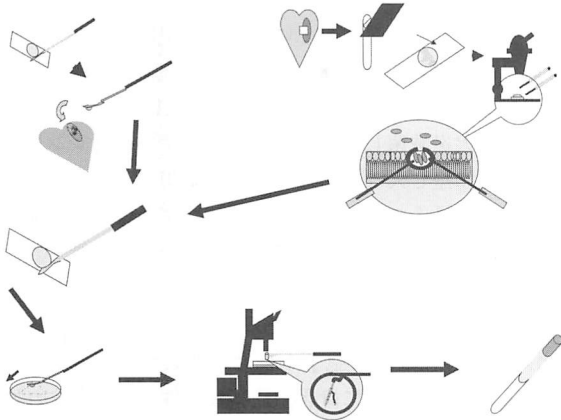


図-2 孢子懸濁液を用いた単孢子分離法の流れ

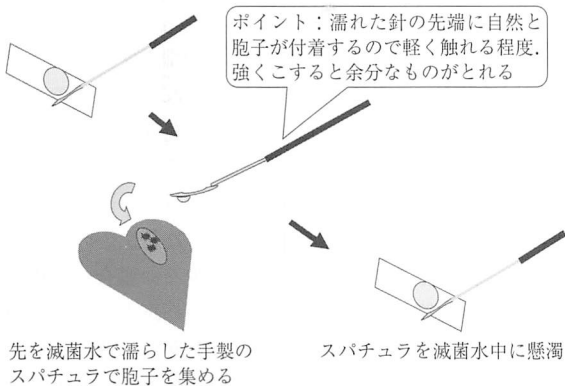


図-3 病斑上に孢子を生ずる菌類の孢子懸濁液調整方法

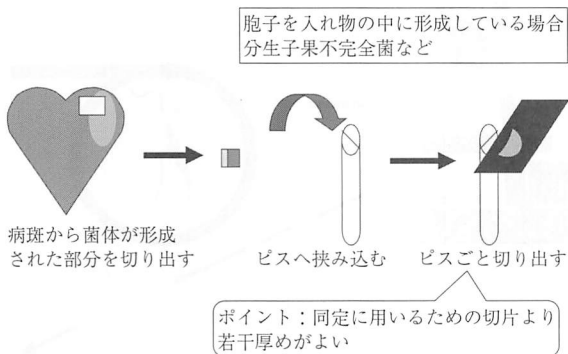


図-4 孢子を殻内に生じる菌類の孢子懸濁液調整方法 1

書き込んでおいた径 9 cm シャーレの平板培地 (2% 素寒天培地 15 ml 程度) に、マイクロスポチュラを用いてすくい上げた孢子懸濁液を塗布、20 ~ 25℃ の培養器にて 24 時間倒置培養し、孢子の発芽を待つ (図-6)。

3 単孢子分離 2：担子菌、子のう菌の射出または落下孢子を拾うもの

(1) 菌体の切り出し 1 (樹皮や枝の場合)

病斑部に形成された殻を罹病組織ごと 5 mm 程度に切り出し、滅菌水中に 3 ~ 5 分間浸潤する。処理した試料は余分な水分をろ紙などで取り除き、これを、素寒天培地を流し込んだ 9 cm シャーレのふたの内側に、孔口が手前を向くように、かつ、端から 2 cm 程のところ、6 時と 12 時の位置に両面テープで固定する。したがってシャーレ 1 枚当たり二つの試料となる (図-7, 8)。

(2) 菌体の切り出し 2 (草本の場合)

培地の中央部に 5 mm 大のサンプルを、殻の孔口が手

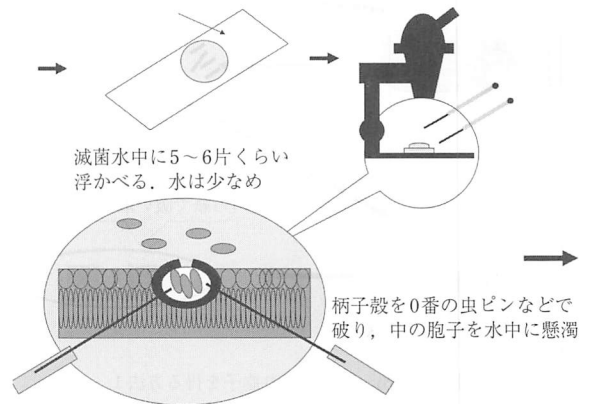


図-5 孢子を殻内に生じる菌類の孢子懸濁液調整方法 2

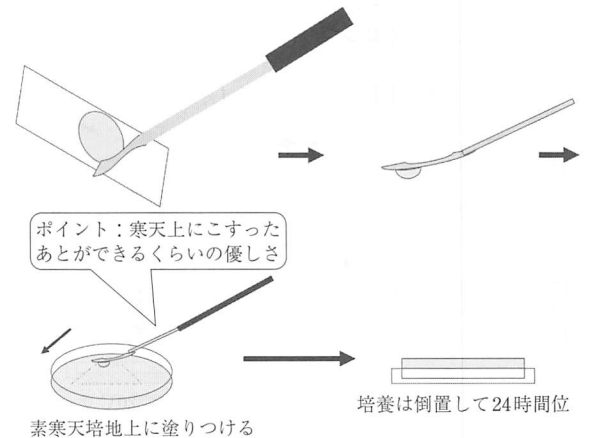


図-6 孢子懸濁液の平板培地への塗布

前を向くように二つ貼り付け、これを滅菌メスなどで寒天ごと切り出し、シャーレのふたに貼り付けてもよい。この場合、事前に試料へ滅菌水を浸潤させる必要はない。

上記のような処理をしたシャーレのふたを、素寒天平板培地の上に被せ、底からマジックで試料の位置に試料を取り囲むように丸印をしておく。これを20～25℃の培養器にて24時間ほど静置（注：倒置ではない）すると、孢子が培地上に落下しているのが観察される。さらに24時間ほど培養し、孢子の発芽を待つ。

4 分生子の拾い上げ

発芽の確認はシャーレを裏返し、光学顕微鏡下で、三角形に沿って検鏡すると観察することができる。ただし、菌の種類によっては発芽までに数か月を要する場合があるので、発芽まで根気よく待つことも必要である。

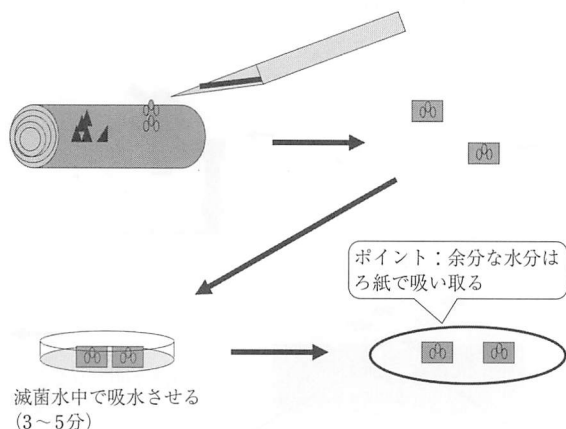


図-7 射出・落下により孢子を得る方法1

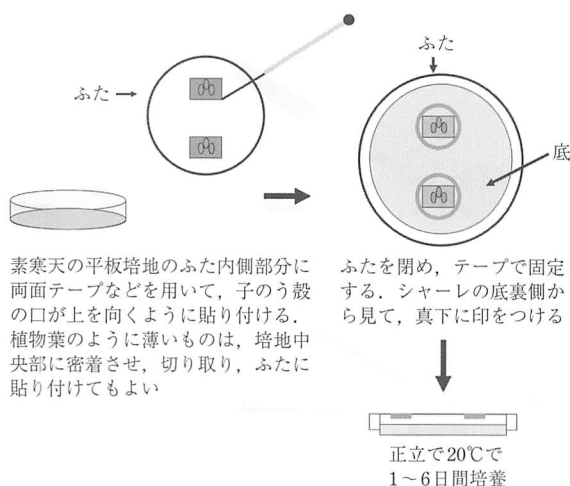


図-8 射出・落下により孢子を得る方法2

この際には、簡易同定によって把握した孢子の形状を基に目的とする孢子を探し、懸濁液を塗布したときにできた擦過痕をガイドにする。落下させた孢子の場合にはふたを回転させ、丸印の近辺で発芽している孢子を探す。発芽の程度は20～30μmの長さで発芽したものがよく、それ以下だと拾い上げる際に流失する可能性がある。発芽した孢子を拾い上げるには、準備したマイクロチューブを用いる。シャーレのふたをとり、100倍程度の光学顕微鏡下に置き、発芽した孢子に焦点を合わせる。次に火炎滅菌したマイクロチューブを対物レンズと孢子の間に差し入れる。このとき顕微鏡の視野にはチューブの影が見えているはずで、チューブの輪の中に発芽した1個の孢子が入るようにする。その状態を維持したままですぐ寒天ごと打ち抜き、やや斜めに引き上げ、適当な培地上で、寒天を再び打ち抜くようにすると、「ところ天」のように孢子を乗せた寒天がせり上がってくる。これを培地上に置き、適当な条件下で培養すればよい（図-9, 10）。孢子を落下させた場合、ふたを少しずつずらしていけば、さらに孢子を得ることが可能で、時間ごとの落下数を知ることができる。

チューブが思うように扱えない場合、裏側から発芽を点検した際に、点線の色とは異なる微細なマーカーパーンをレンズとシャーレの底の間に差し入れ、顕微鏡の視野に現れるマーカ先端の影を頼りに、発芽した孢子の位置に印をつける。その印のある部分を表より肉眼で見ながらマイクロスパチュラで寒天ごと切り出す。しかしながら、汚染と拾い損ねる可能性が高くなる。

また、試料上の孢子の数が非常に少ない場合、汚染により目的外の孢子が多い場合、一つの病斑から複数の種類の孢子を拾い上げたい場合には、発芽前に直接拾い上げる方法もある。なんらかの方法で、培地上に孢子を撒き、直ちに100倍の光学顕微鏡下で観察、針を用いて拾

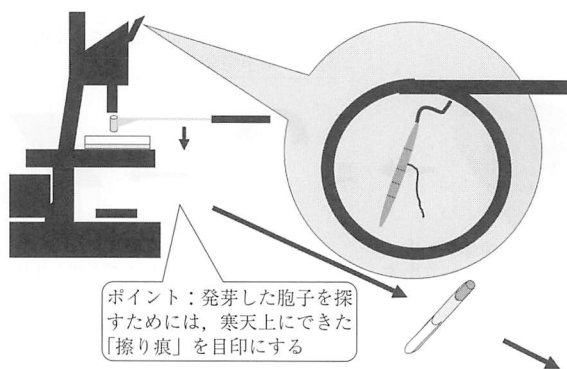
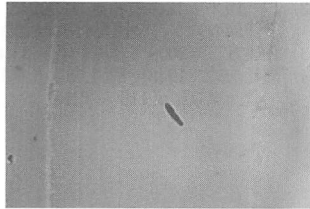
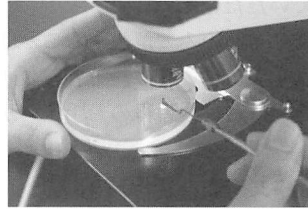


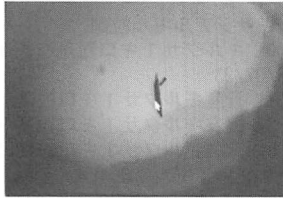
図-9 発芽した単孢子を拾い上げる1



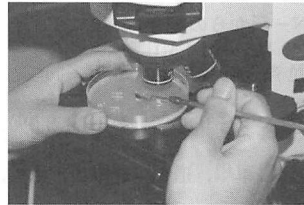
擦過痕を目印に分生子を探す



レンズと培地の間にマイクロチューブを差し入れる



発芽した分生子とマイクロチューブの陰



そのまま真っ直ぐ下におろして打ち抜く。さらに清浄な場所で数回押し出す

図-10 発芽した単胞子を拾い上げる 2

い上げるものである。この際に用いる針は本シリーズ（植物防疫基礎講座）にて佐藤豊三氏が紹介しているタングステン線や歯科用エルジロイ線の電解針を用いてもよい（佐藤，2008）が、筆者は使い捨ての針灸針を用いている。火炎滅菌はできないが、医療用のため滅菌済みで、アルコール滅菌で再利用でき、持ち手が簡易加工されていること、安価である点で優れている。この方法を用いる際には、胞子を培地上で多少転がしてやると、細菌による汚染をある程度除去することができ、また、容易に拾い上げることもできる。

IV 培 養

発芽した胞子を移植する培地は、使い慣れた培地、すなわち、培養後、純粋であることを自ら確認できるものでよい。ただし、同定を依頼する場合には、依頼先の指定した培地を分離時より使用すべきである。筆者は短期間の保存には径 5 cm のプラシャーレを用い、シールせずに、ポリプロピレン製のふた付きカップへ積み重ねて収納し、密閉して培養している。長期保存に当たっては、やはり専門家に依頼すべきであろう。依頼先としては（独）農業生物資源研究所微生物ジーンバンク（MAFF）や（独）製品評価技術基盤機構（NBRC）などの微生物保存機関を活用している。

一方、特定の系統を維持しなければならない場合には、やはり佐藤豊三氏（佐藤，2008）が紹介している方法（シリコンゴム製ダブルキャップや、凍結保存）を用

いている。シリコンゴム製ダブルキャップで *Cercospora* 属とその関連属菌を保存した場合、室温で 10 年以上放置しても生存していることを確認している。かつてよく用いられた流動パラフィン重層法よりも簡便で、取り扱いも容易である。

お わ り に

瀧元（1942）は「微生物学及植物病理学実験法 第 4 版」の中で、様々な単胞子分離法を紹介しており、これまで紹介した方法はカイト法（KEITT, 1915）として紹介されている。また、我が国における創薬源微生物の探索現場や、糸状菌の生態研究の現場では、スカーマン・マイクロマニピレーターが多様な菌類を一つの試料から得るために用いられている。このように、単胞子分離株を得る方法には様々なものがあり、一長一短もある。おそらく、研究室ごとに異なった技法が伝承されているものと思うが、自身が最も得意で純粋に分離できる方法を確立すればよい。

本稿は、前述のように「第 7 回植物病原菌類談話会」で講演した内容の一部である。談話会は日本植物病理学会大会に合わせて開催されており、2009 年には第 10 回を迎える。その趣意は病原菌の同定、病害診断現場に立つ者同士が互いの最新情報や、困ったことを共有しようというものである。毎回 100 名を超える参加者があり、通常は菌群ごとに基礎的な技法から最新の分類・同定に関する情報交換を行っている。ぜひ談話会へ参加頂

き、情報の共有に加わっていただきたい。

本稿のように、手技を文章と図のみで解説することは非常に難しい。取り上げた手法については、筆者らの研究室に一度足を運んでいただければ、習得のお手伝いができるかと思う。

引 用 文 献

1) KERR, G. W. (1915): Phytopathol. 5: 226.

- 2) 岸 国平・我孫子和雄 (2003): 野菜病害の見分け方一診断と防除のコツ, 全国農村教育協会, 東京, 364 pp.
 3) 佐藤豊三 (2008): 植物防疫 62: 49 ~ 53.
 4) 瀧元清透 (1942): 微生物学及植物病理学実験法 第 4 版, 養賢堂, 東京, p. 116 ~ 121.

(新しく登録された農薬 24 ページからの続き)

●シアナジン・テブチウロン・DBN・DCMU 粒剤

22184: ワイドウェイ Z 粒剤 (グリーン & ガーデン) 08/07/09

シアナジン: 2.0%, テブチウロン: 0.80%, DBN: 2.0%, DCMU: 4.0%

樹木等 (公園, 庭園, 堤とう, 駐車場, 道路, 運動場, 宅地, 墓地, 鉄道等): 一年生雑草, 多年生広葉雑草, スギナ

22185: ネコソギエース Z 粒剤 (レインボー薬品) 08/07/09
 シアナジン: 2.0%, テブチウロン: 0.80%, DBN: 2.0%, DCMU: 4.0%

樹木等 (公園, 庭園, 堤とう, 駐車場, 道路, 運動場, 宅地, 墓地, 鉄道等): 一年生雑草, 多年生広葉雑草, スギナ

●フェントラザミド・プロモブチド・ベンスルフロンメチル粒剤

22197: クサオウジ H ジャンボ (三共アグロ) 08/07/09

フェントラザミド: 7.5%, プロモブチド: 15.0%, ベンスルフロンメチル: 1.87%

移植水稻: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ヘラオモダカ, ミズガヤツリ (東北), ウリカワ, クログワイ (東北), オモダカ, ヒルムシロ, セリ, アオミドロ・藻類による表層はく離

22198: クサオウジ 1 キロ粒剤 75 (三共アグロ) 08/07/09

フェントラザミド: 3.0%, プロモブチド: 6.0%, ベンスルフロンメチル: 0.75%

移植水稻: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ヘラオモダカ, ミズガヤツリ (東北), ウリカワ, クログワイ (東北), オモダカ, ヒルムシロ, セリ, アオミドロ・藻類による表層はく離

●フェントラザミド・プロモブチド・ベンスルフロンメチル水和剤

22199: クサオウジ H フロアブル (三共アグロ) 08/07/09

フェントラザミド: 6.0%, プロモブチド: 18.0%, ベンスルフロンメチル: 1.4%

移植水稻: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ヘラオモダカ, ミズガヤツリ (東北), ウリカワ, ヒルムシロ, セリ, アオミドロ・藻類による表層はく離

●オキサジアルギル粒剤

22200: キルクサ 1 キロ粒剤 (バイエルクロップサイエンス) 08/07/23

22201: 日産キルクサ 1 キロ粒剤 (日産化学工業) 08/07/23

22202: 協友キルクサ 1 キロ粒剤 (協友アグリ) 08/07/23

22203: 三共キルクサ 1 キロ粒剤 (北海三共) 08/07/23

オキサジアルギル: 0.50%

移植水稻: 水田一年生雑草, マツバイ, いぐさ, 水田一年生雑草

●オキサジアルギル・プロモブチド・ベンゾフェナップ粒剤

22204: バイエル パパール 1 キロ粒剤 (バイエルクロップサイエンス) 08/07/23

22205: パパール 1 キロ粒剤 (協友アグリ) 08/07/23

22206: 三共パパール 1 キロ粒剤 (北海三共) 08/07/23

オキサジアルギル: 0.50%, プロモブチド: 6.0%, ベンゾフェナップ: 5.0%

移植水稻: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ (東北を除く), ミズガヤツリ (北海道を除く), ヘラオモダカ (北海道, 東北)

●オキサジアルギル・ピラゾレート粒剤

22207: ショキボンジャンボ (三共アグロ) 08/07/23

オキサジアルギル: 1.7%, ピラゾレート: 30.0%

移植水稻: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ

●オキサジアルギル・プロモブチド・ベンゾフェナップ水和剤

22208: パディクリンフロアブル (北海三共) 08/07/23

オキサジアルギル: 0.90%, プロモブチド: 11.0%, ベンゾフェナップ: 9.0%

移植水稻: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ヘラオモダカ, ウリカワ, ヒルムシロ, アオミドロ・藻類による表層はく離

●エトキシスルフロン水和剤

22212: 日曹グラッチェ顆粒水和剤 (日本曹達) 08/07/23

エトキシスルフロン: 60.0%

日本芝: 一年生広葉雑草, 多年生広葉雑草, ヒメクグ, ハマスケ

西洋芝 (ベントグラス), 西洋芝 (ブルーグラス): 一年生及び多年生広葉雑草, ヒメクグ, ハマスケ

登録が失効した農薬 (20.7.1 ~ 7.31)

掲載は、種類名, 登録番号: 商品名 (製造者又は輸入者) 登録失効年月日。

「殺虫剤」

●カルタップ・MIPC 粒剤

19300: パダンミブシン 1 キロ粒剤 (住友化学) 08/07/30

「殺菌剤」

●イブロジオン・TPN 水和剤

19293: ローヌ・プーランプラタンフロアブル (バイエルクロップサイエンス) 08/07/22

●イミノクタジン酢酸塩・フサライド粉剤

16847: ヤシマラブサイドベフラン粉剤 25DL (協友アグリ) 08/07/27

「除草剤」

●モリネート粒剤

12512: ヤシマオードラム粒剤 (協友アグリ) 08/07/03

●ブタミホス乳剤

19304: キングタフラー乳剤 80 (キング化学) 08/07/30