

特集：ピシウム病害

# ピシウム菌の分離のコツ

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 **東 條 元 昭**

## はじめに

本特集「総論：ピシウム菌の病原菌としての特徴」で述べたように、ピシウム菌は多様な系統群を含んでおり、また、種によっても培養性質が異なる。しかし、一部の海水生息種を除き、多くの病原種はほぼ同じ手順で分離することができる。ここでは、病害診断を目的とした病原種の分離の考え方と実際の手順を紹介する。

## I 分離の考え方

病害診断のためにピシウム菌の分離・培養操作を行う際のポイントは、①目的の菌種が生きている環境にできるだけ近い環境で操作することと、②新鮮な罹病試料を使うことの2点である。例えば病害発生圃場が近くであれば、圃場に素寒天培地などを持ち込んで、その場でピンセットで罹病部上の菌そうをできるだけ少量の罹病植物片とともに摘み取り、培地に置いてから現場の地温に近い温度で培養する。この場合、試料の水洗などは行わない。このようにすると圃場を移動中も培養期間となり、多くの場合、置床の翌日には目的の種の菌糸が培地上に伸長してくる。また、分離された菌を培養・保存する場合には、圃場現場で使っている灌がい水や雨水を培地や遊走子形成液に使う。

他の土壤病菌に比べてピシウム菌で特に注意しなければならないことは、病害の進展と衰退が一般に速い周期（数日程度）で起こることである。罹病試料を3日以上放置すると、実際に病害に関与している菌種が分離されずに、二次的に感染した他種のピシウム菌やフザリウム菌が現れることが多い。

ピシウム菌で素早い分離操作が必要なのは、この菌が代表的な糖分解菌であることと関係している。糖分解菌とは、土壤中での植物体分解過程における微生物遷移で最も早い段階で発生する糸状菌群を指す（GARRETT, 1970）。これらの菌は新鮮な植物体上で糖類をいち早く利用して一時的に増えた後に、セルロースやリグニンを分解する菌に取って代わられる。ピシウム菌は、セルロ

ース分解菌などが優占するようになっても、卵胞子などの耐久体として植物の壊死部に残存するが、セルロース分解菌やバクテリアに邪魔されるために、分離しにくくなる。また、糖分解菌は一次的糖分解菌と二次的糖分解菌に分けられ（GARRETT, 1970）、*P. ultimum* や *P. myriotylum* 等の多くの病原性ピシウム菌は前者に、*P. oligandrum* や *P. spinosum* 等の非病原性あるいは弱～程度の病原性をもつピシウム菌は後者に属する。古くなった病徴部位から *P. oligandrum* がよく分離されるのはこのためである。一次的糖分解菌の中でも *P. myriotylum* は卵胞子の発芽力が弱く他の種との競合に弱いため（SAMEJIMA and ICHITANI, 1988）、より新鮮な状態での分離が必要になる。これに対し、*P. ultimum* や *P. aphanidermatum* は卵胞子の発芽力が強く、他のピシウム菌種との競合性も高いため、ある程度古くなったり乾燥したりした試料からも分離されることが多い。

## II 分離の手順

まず、分離しようとする罹病部の表皮組織をピンセットなどで切りとって、ピシウム菌と思われる菌による感染があるかどうかを確かめる。新鮮な罹病部には、細胞壁を貫通する菌糸や、遊走子のうや造卵器の形成が見られることが多い。これらが確認された組織からは、ほぼ間違いなく病原菌が分離される。顕微鏡写真を撮っておけば、コッホの第1原則を満たす証拠になる。

罹病部からの分離は以下の手順で行う。感染初期の罹病組織3mm角ほどを切り取り、水道水中で水洗後、70%エタノールに約30秒間または2%次亜塩素酸ナトリウムに約2分間浸漬した後に滅菌水ですすぎ、ろ紙で水分を除いて素寒天培地などに置床する。罹病組織が新鮮な場合、例えば組織上に綿状の菌糸が肉眼で見えるときなどは、水洗だけで充分である（圃場現場で発病直後の試料を培地に置く場合には水洗も必要ない）。ただし、試料表面の水分は良く取り除く（乾燥させない）。また、培地の表面に凝結水の膜があると、細菌が罹病試料の周囲で増殖して分離率が下がるので注意する。細菌の汚染が激しい場合には、水洗後に100～1,000ppmのストレプトマイシン硫酸塩水溶液に10分間浸漬する。培地は素寒天培地が一般的に用いられるが、菌糸伸長の遅い菌

How to Isolate Plant Pathogenic *Pythium* spp. from Plants, Soil and Water? By Motoaki Tojo

(キーワード：ピシウム, 分離, 土壤, 水)

種では選択培地(東條,2008)を用いると分離率が上がる。

土壌や水中のピシウム菌は捕捉法で分離するのが一般的である。捕捉材料としては、キュウリなどの種子が用いられることが多い(WATANABE, 1981)。ピーマン果実の切片(UZUHASHI et al., 2008)やベントグラスの葉(WATANABE et al., 2008)等もピシウム菌の分離に効果的である。変わり種では、金魚の浮き餌で *P. aphanidermatum* が分離されたこともある(東條, 未発表)。*P. aphanidermatum* や *P. ultimum* のような菌糸伸長の速い菌種は、捕捉材料を埋没して数時間で着生するが、通常は1~2日程度埋没する。埋没後に回収した捕捉材料からの菌の分離は、罹病部からと同様の方法で行う。

希釈平板法による定量的なピシウム菌の分離では以下のように操作している。使用の1~3日前に選択培地(東條, 2008)を調整する。古くなった培地でも分離できるが選択性は下がる。また、培地に含まれる寒天濃度を3.8%程度の硬めにしておくと、土壌塗布する際に培地に傷がでにくく、ピシウム菌の透明なコロニーを識別しやすい。土壌を希釈するための溶液には、0.35%の寒天水溶液を使う。液状になるまで振り混ぜた寒天液に、被検土壌50gを湿重で20%(w/v)になるように加える。土壌中のピシウム菌感染源をできるだけ分散させるために、家庭用ジューサーミキサーで土壌を攪拌する。この懸濁液を寒天液で希釈し、1シャーレ当たりのコロニー出現数が5個前後になるようにする。例えば、予想される菌密度が土壌1g当たり500cfuの場合には1%(土壌重/寒天液量)の希釈となる。土壌希釈液を

シャーレ当たり1mlずつ滴下し、ガラス棒で培地面に均一に塗布する。通常、シャーレ間でコロニーの出現数がばらつくので、一つの希釈液で10~20枚のシャーレを使う。25℃で培養すると、22~24時間後に直径5~10mmのコロニーが出現してくる。土粒を洗い流して風乾し、コロニーの計数と分離を行う。土壌希釈液の洗い流しを、弱い水流で洗い流しに行くと、コロニーの起源になっている器官(卵胞子や遊走子のう等)が培地表面に残る。これを顕微鏡で観察すると、土壌中での生育生存形態を推定することもできる。これらの作業で分離されたピシウム菌株の純粋培養と保存の方法については、拙著(東條, 2004)を参照していただきたい。

## おわりに

病原性ピシウム菌の分離では、できるだけ新鮮な罹病植物を供試し、作業を手早く進めることがコツになる。また、ピシウム菌の発生生態は多様なので、目的の菌種の特性を考慮し、発生環境(特に温度)に近い条件で分離作業を行うと分離しやすくなる。

## 引用文献

- 1) GARRETT, S. D. (1970): Pathogenic root-infecting fungi, Cambridge Univ. Press, London, 294 pp.
- 2) SAMEJIMA, N. and T. ICHITANI (1988): Ann. Phytopath. Soc. Jpn. 54: 15 ~ 19.
- 3) 東條元昭 (2004): 植物防疫 58: 120 ~ 126.
- 4) ——— (2008): 同上 62: 161 ~ 163.
- 5) UZUHASHI, S. et al. (2008): Mycoscience 49: 276 ~ 279.
- 6) WATANABE, H. et al. (2008): J. Gen. Plant Pathol. 74: 417 ~ 424.
- 7) WATANABE, T. (1981): Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 47: 449 ~ 456.

## (新しく登録された農薬36ページからの続き)

ベンスルフロンメチル: 0.75%, ベンゾビシクロン: 2.0%,  
ベントキサゾン: 3.6%

**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  
●クミルロン・ベンスルフロンメチル・ベントキサゾン粒剤  
※新剤型

22857: 石原ドウジガード1キログラム剤51(石原産業)10/12/22

22858: 科研ドウジガード1キログラム剤51(科研製薬)10/12/22

22859: ドウジガード1キログラム剤51(丸紅)10/12/22

クミルロン: 12.0%, ベンスルフロンメチル: 0.51%, ベントキサゾン: 3.9%

**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(九州), ミズガヤツリ, ウリカワ, ヒルムシロ(関東・東山・東海, 近畿・中国・四国), セリ

●クミルロン・ベンスルフロンメチル・ベントキサゾン粒剤  
※新剤型

22860: 石原ドウジガード1キログラム剤75(石原産業)10/12/22

22861: 科研ドウジガード1キログラム剤75(科研製薬)10/12/22

22862: ドウジガード1キログラム剤75(丸紅)10/12/22

クミルロン: 12.0%, ベンスルフロンメチル: 0.75%, ベン

トキサゾン: 3.9%

**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

●カフェンストロール・ダイムロン・ベンスルフロンメチル・ベントキサゾン水和剤 ※新混合剤

22863: イネパーティーLフロアブル(科研製薬)10/12/22

カフェンストロール: 3.9%, ダイムロン: 27.8%, ベンスルフロンメチル: 0.94%, ベントキサゾン: 4.6%

**移植水稻**: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ミズガヤツリ, 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(関東・東山・東海)

●ベントキサゾン水和剤 ※新規参入

22865: ベアスフロアブル(宇都宮化成)10/12/22

ベントキサゾン: 2.9%

**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

●ベントキサゾン粒剤 ※新規参入

22866: ベアス1キログラム剤(宇都宮化成)10/12/22

ベントキサゾン: 1.5%

**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