

フィールド&ラボ～知って得する豆知識①～

病害診断と菌分離—顕微鏡活用の極意—

石川県農林総合研究センター

森川 千春(もりかわ ちはる)

はじめに

地方の試験研究機関には、現場からの病害診断依頼が頻繁に入ってくる。年間約200件、勤務日で割り返せば、ほぼ毎日1件の診断を行う頻度であるが、調査・研究など正規の業務外であり、いつ何件の依頼が入ってくるかも想定できない。なによりも、依頼者への便宜のために、迅速な診断が望まれ、できればサンプルが持ち込まれたその場で、対処法まで伝えたい。とりあえず顕微鏡を覗く。糸状菌病害であれば、大部分が顕微鏡観察だけで診断が可能であり、茎葉部の斑点性病害であればその確率はさらに高まる(森川, 2008)。病斑上に形成されていた分生子と、病斑の性状が一致すれば、既知の病害の現場対応としては十分であろう。

新病害究明の手順は既報(佐藤, 2008)に譲るとして、本稿では、既知の病害の迅速な診断に主眼を置き、顕微鏡による病害診断を軸に、検鏡結果を効率的な菌の分離に結びつけるためのコツや裏技を紹介する。本稿は「第15回植物病原菌類談話会」で話題提供した「研究室での菌分離や観察でのコツや裏技」の内容を元に再構成したものである。

I ティーチングヘッドの効用

顕微鏡にオプションで装着する2～5人が同時に観察できる装置である。視野内に矢印を表示することもできる(図-1, 2)。サンプルが持ち込まれば、ただちに顕微鏡観察にうつり、依頼者にも一緒に顕微鏡を覗いてもらいながら、発生状況の聞き取りなどを行う。依頼者が普及指導員である場合、診断過程を共有することができ、診断手法の指導を効率的に行える。新任の普及指導員である場合は、光軸やコンデンサーなど顕微鏡の調整法の指導も同時に行う。微妙な画像の変化をリアルタイムで共有しながらの解説ができる。農家である場合は、被害組織内に充満する菌糸や、病斑部に形成された夥し

い胞子を見せることにより、さらには葉表より葉裏に胞子形成が多いことを見せて、防除や圃場衛生への意識を高めることができる。病害か虫害かさえ不明な場合は、それぞれの専門家の協議を検鏡しながら行うことができる。実際、近年の石川県における顕微鏡による診断実績では、その原因のほぼ50%が糸状菌、15%が細菌であるが、肉眼的には病害に見えるダニ(特にネダニやサビ



図-1 ティーチングヘッドによる演示。右手はステージを、左手は矢印を操作している

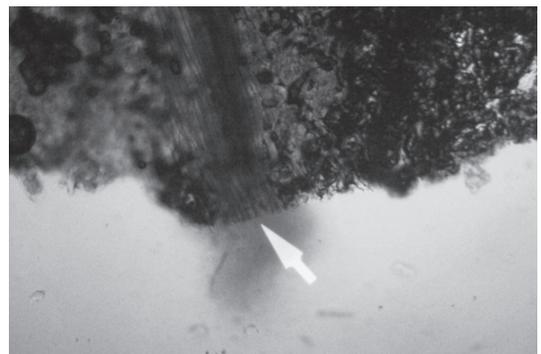


図-2 ハボタン黒腐病の検鏡。黒変した葉脈からの菌泥流出を光学矢印で示している

ダニ) やセンチュウ等微小な害虫による被害も10%前後を占めており、残り25%は生理障害や葉害等非病害虫被害である。病理担当者だけでは解決できない場合がある。小学生のサマースクールや中学生の職場体験でミクロの世界を学ばせるときの威力は絶大である。近年、機器の発達により、デジタルカメラの画像をモニター画面に表示するものや、タブレット端末をモニターにできる機種も出てきているが、像の鮮明さ、美しさはレンズを直接覗くことには及ばない。次章にも述べるコンデンサー絞りの調整による焦点深度の微妙な変化は、モニター画面ではわかりにくい。次世代の専門家の育成も重要な課題である。顕微鏡は一人黙々と見るものではない。コミュニケーション・ツールとして活用したい。

II コンデンサー絞りの効用

顕微鏡観察で最も重要な操作と考えるのは「コンデンサー絞り」の調整である。光軸をしっかりと合わせ、目的に応じてコンデンサー絞りを調整することにより、染色液を用いなくとも、鮮明な画像を得ることができる。調整手順の詳細は既報(森川, 2009)に平易に記したのでぜひご参照いただきたいが、要するに背景を映しこんだり、ぼやかしたりするカメラの絞りと同じことであり、コンデンサー絞りを開くと焦点深度が浅くなり、絞り込むと焦点深度が深くなる。焦点深度を調整することによって、見えなかったものを浮かび上げさせ、見えなくてもよいものを消すのである。

導管からの細菌の流出は、絞り込んだほうが見やすく(図-2)、葉の病斑上の分生子は絞りを開くと見やすくなる(口絵③)。プレパラート内で分散した胞子を探すには絞り込んだほうがよい(口絵① a, b)。実際の診断過程においては、コンデンサー絞りを開いて、切片上の分生子や切片組織内の菌糸や卵胞子等を観察し、絞り込んで切片周囲に分散・流出した胞子や細菌を確認する、ということを繰り返している。ステージの上下動だけでなく、コンデンサー絞りの開閉動作も頻繁に行っている。

III セロハンテープを利用した簡易なプレパラート観察法

セロハンテープを用い、病斑上の菌を移し採ることににより、簡易に観察できるばかりでなく、分生子柄と分生子、分生子の連鎖等の観察も可能である。新素材のいわゆる透明粘着テープは水やマウント液で白濁するので、旧来のセロハン製がよい。

セロハンテープを病斑部分に軽く押し当て、病斑上の分生子を移し採る。サンプルが新鮮な場合、宿主組織が

丈夫な場合は、強く押し当ててもよいが、軟弱な組織や、乾燥した枯死葉では、宿主組織ごと貼り付いてくるので力加減が必要である。分生子形成が旺盛な場合も、強く当てると付着量が多すぎて、かえって観察しづらい。むしろ分生子形成のまばらな初期病斑の観察に適している。切片にしてしまうと見逃しやすい少数の分生子を捉えることが可能である。

分生子の付着した粘着面をスライドガラスに軽くおさえて貼りつける。貼り付けた後に、水などのマウント液を横から入れて観察する。貼り付け後に水を入れるのがコツである。分生子柄と分生子、分生子の連鎖等壊さずに観察することができる。

ただし、後から水を入れた場合、気泡が多く残ったり、水が入りすぎてプレパラートとしての厚みができてしまう場合があり、撮影に適さない状態になることが多い。筆者の場合、サンプルが豊富にあつて(失敗してもよい!), 画像撮影をしたいときには、ごく少量の水(長さ15mmのセロハンテープで3~4 μ l程度)を滴下した後に、セロハンテープを中央から周囲に向かってなぞるように貼り付けることがある。この方法は、分生子形

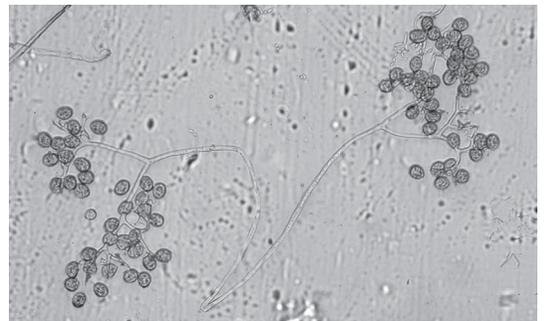


図-3 コンデンサー絞りを絞った撮影。焦点深度が深く、セロハンテープの傷や粘着剤の筋が写り込んでいる

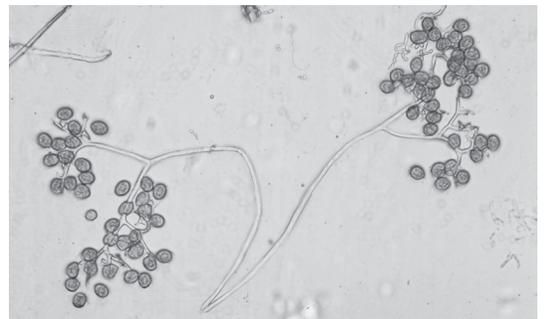


図-4 コンデンサー絞りを開いた撮影。セロハンテープの傷や筋はほぼ消えている

成のまばらな初期病斑にセロハンテープを強く押し当てたときに、特に有効である。このようにして撮影したダイズべと病の画像を示す。

撮影にあたっては先述した「コンデンサー絞り」の調整を最大限に活用したい。絞りを開き気味にして焦点深度を浅くすると、セロハンテープの傷や粘着剤の筋をほぼ消すことができる(図-3, 4, 口絵②)。焦点深度が浅くなっているため、プレパラートとしての厚みがあると、菌の全体像が捉えられなくなってしまうのである。

IV 顕微鏡観察による分離法を選択

見えないものは採れないし、見えているものは必ず採れる(コンタミもする)。

やみくもに組織分離を行ったり、温室での孢子形成にうつるよりも、被害組織を検鏡することにより、適切な分離法を選択したい。

1 細菌の存在を確認する

目的の病害が細菌性のものであれば、病斑の各部位を検鏡し、細菌細胞が最も多く見られる部位を分離に供することは言うまでもないが、糸状菌病害による被害組織で、菌糸や孢子とともに細菌が見られれば、必ずコンタミする。あらかじめ培地に抗生物質や乳酸を添加するとよい。

2 孢子形成なく組織内菌糸だけであれば表面殺菌して組織分離を行う

孢子形成を狙い安易に温室に入れると、細菌の二次増殖を招きやすい(診断を急ぐための温室であればこの限りではない:分離と診断は分けて考える)。サンプルが新鮮なうちに分離作業に移るに越したことはない。

3 複数種の糸状菌の増殖があれば、一度宿主に戻す
二種以上の糸状菌の増殖が観察された場合、組織分離での純化が困難なことがある。罹病組織片を健全宿主組織に再接種することにより、コンタミや二次的な増殖であれば、病原菌が宿主組織へ侵入していき、混発であっても侵入速度が異なることがある。一例を示せば、アスパラガス茎枯病とアスパラガス株腐病の混発株からそれぞれを分離するときに、被害組織をグリーンアスパラガスに挿入接種して良好な結果を得たことがある。

4 孢子形成が旺盛であれば、孢子画線や希釈平板で単孢子分離する

孢子形成の確認には前述のセロハンテープを活用した簡易プレパラートが便利である。あらかじめ孢子形成の旺盛な部位を確認して分離にあたる。単孢子分離には、エルジロイ線やタングステン線を電気分解して、先端を細くしたものをを用いるとよい。エルジロイ線は火炎滅菌

できないので、火炎滅菌のできるタングステン線が実用上、使いやすい(佐藤, 2008)。

単孢子分離には様々な方法があるが(中島, 2008)、タングステン線を作成するには電気分解を行う可変抵抗器が必要であり、実態顕微鏡下での作業に不慣れな場合もあるであろう。ここでは最も簡易に行う方法を示してみたい(既知病害の薬剤感受性検定など、多くの菌株を得る必要がある場合、分離作業のストレスは極力小さいほうがよい!)。寒天平板上に、孢子画線や希釈平板法で広げた孢子を、シャーレ裏面からマーキングし、マーキングに沿って肉眼的に寒天片ごと切り出す方法である。用いる有柄針も昆虫針0号程度で十分である。

孢子懸濁液の調整にはプラスチックシャーレを用いている(図-5)。シャーレ周辺に滅菌水を滴下し希釈段階を作成する。筆者の場合、孢子濃度は懸濁液を100倍で観察して、画線(1 μ l ディスポループを使用)するときには視野内に7~8個、希釈平板(9cm シャーレに50~100 μ l 滴下)の場合は視野内に2~3個程度に調整している。視野の広さは顕微鏡の性能やレンズの規格によって異なるので、お使いの顕微鏡で適正な濃度をはじき出していきたい。孢子濃度の計測にあたっては、コンデンサー絞りを絞り込むとよい。液中に分散した孢子を逃さず捉えることができる(森川, 2009)。

孢子懸濁液を白金耳またはディスポ・ループなどを用いて素寒天平板上に画線、あるいは寒天平板上に滴下塗布する。1~2日培養後、シャーレ裏側から検鏡し、孢子が単独になって発芽しているものにシャーレ裏面にマーキングして、PDAなど栄養培地に移植すると、容易に分離できる。マーキングの際、発芽した菌糸が周囲の孢子由来の菌糸と交わっていないことを顕微鏡下で慎重

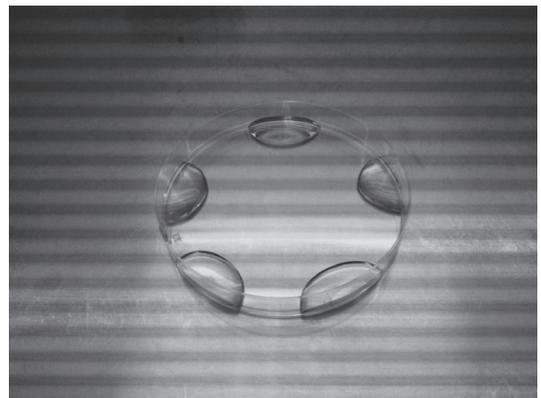


図-5 プラスチックシャーレを用いた孢子懸濁液の希釈

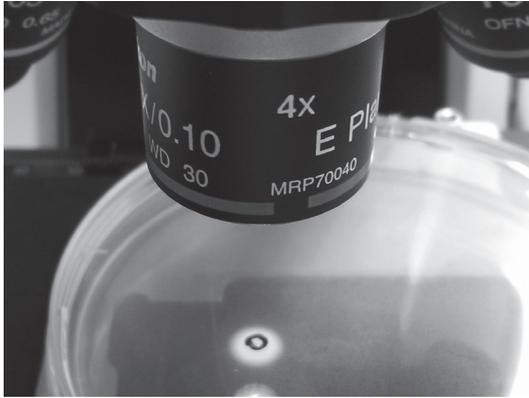


図-6 シャーレ上に投影された光の中心へのマーキング

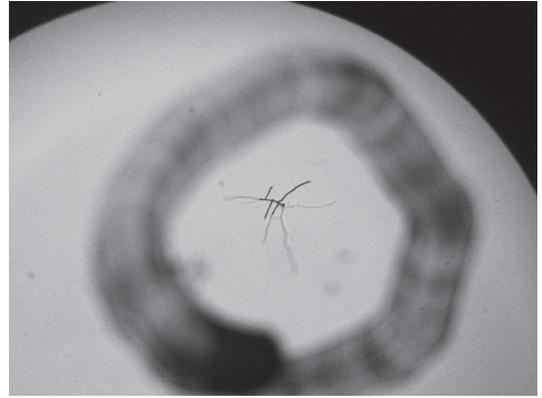


図-7 対物レンズ4倍でトマト灰色かび病菌を観察。マーキングの中心に発芽した分生子が見えている。この画像はスマートフォンで撮影した

に確認する。培地表面だけでなく培地中を伸長していることがあるので注意が必要である。

シャーレ裏面からの観察には、プラスチックのディスクポシャーレが使いやすい。軽量なためクレンメル（プレパラートを挟むもの）上に置くだけで、メカニカルステージが不自由なく使える。光源絞りとコンデンサー絞りを絞り込むと、シャーレ上の光が観察位置を正確に示している（光軸が合っていれば！）、光に従ってマーキングする。対物レンズ4倍で狙った胞子を視野中央に捉えたら、シャーレ上の光の中心に径2mmくらいの円で囲む（図-6, 7）。さらに倍率を上げてステージを上下し、円内に他の微小な胞子や菌糸断片、細菌集塊等がないことを確認してマーキング終了である。この操作は光軸がピッタリと合っていることが前提である（森川, 2009）。光軸の調整は顕微鏡の操作性も向上させる。あとは肉眼での作業で容易に寒天片ごと切り出すことができる。

筆者の経験上では、円の外周から隣接する菌糸や胞子まで1mm以上（つまり円の半径以上）の距離があれば、寒天片切り出し時に失敗することはない。ただし、寒天が厚いと、シャーレ裏面のマーキングと寒天表面上の胞子の距離が離れてしまうので、視線の方向による誤差が大きくなる。誤差を小さくするために寒天の厚さは薄めにしておく（9cmシャーレで8ml程度の分注）のがコツであり、薄い寒天片を扱いやすよう、寒天濃度は濃い

め硬め（3%程度）がよい。

おわりに

病害の診断、病原菌の分離にあたって、重要なことはまず被害組織で何が起きているかを、よく観察することである。肉眼で見えないミクロの世界でも、マクロの世界と同様に、あるいはそれ以上に複雑な、病原菌と宿主の関係だけにとどまらない生物間の相互作用が営まれている。ちょっとした工夫でそれらが鮮やかに視野の中に現れたり、また逆に、多種多様なものが混ざり合って何を見ているのかわからなくなることもある。そのような事態に陥っている顕微鏡をみると、コンデンサーの調整が正しく行われていないことが多い。本稿では、顕微鏡を用いた病害診断や菌分離の簡便法の紹介にあたり、様々な場面で必要となるコンデンサーの調整にも意識的に触れてみた（これが裏技の本体でもある！）。顕微鏡はステージの上下だけで観察するものではない。コンデンサーの調整、コンデンサー絞りの積極的な活用により、顕微鏡の世界を存分に楽しんでいただきたい。

引用文献

- 1) 森川千春 (2008): 植物防疫 62: 43 ~ 50.
- 2) ——— (2009): 同上 63: 54 ~ 56.
- 3) 中島千晴 (2008): 同上 62: 46 ~ 50.
- 4) 佐藤豊三 (2008): 同上 62: 49 ~ 53.