

# 植物検疫における寒天葉片法の活用

神戸植物防疫所関西空港支所

まつもと  
松本

たくみ  
工

## はじめに

糸状菌の孢子形成法として寒天葉片法(岸, 1995; FURUKAWA and KISHI, 2002)があり, 輸入植物の検疫において4年前から本法を用いているが, 多くの事例で良好な結果が得られている。輸入カンキツ果実の貯蔵病害の同定で初めて用い, 種々の条件で本法による培養を多数実施したところ, 培地の準備が簡単で培養中たびたび開放的な条件で試料採取しても雑菌の侵入がなく, 孢子形成が早く大変有効な培養方法であった。その後, 検出した糸状菌に孢子形成が見られない場合や, 植物体上で分生子殻や子のう殻が観察された事例で本法を用い同定診断に役立てている。

以下, カンキツおよびカボチャ果実の病害で本法を用いたときの状況について述べ, 次にその他の事例の概要を掲げ, 今後本法を利用する方々の参考としたい。

## I カンキツ果実の貯蔵病害

輸入カンキツ果実の貯蔵病害で, いわゆる軸腐れ症状(BROWN and ECKERT, 2000)を生じる病原菌として, へた腐病菌 *Lasiodiplodia theobromae* および軸腐病菌 *Diaporthe citri* (分生子世代 *Phomopsis citri*) があり, これらの病徴は類似し同じ環境条件で発生しやすく混在することもある。また, 果実上で分生子を形成しないため正確な識別には菌の分離培養が必要となっている。しかし, PDA 培地で培養した場合に分生子が確認できない事例があり, 寒天葉片法による培養を検討した。まず検出事例の多いへた腐病菌で培養条件を調査した後, 同じ条件下で軸腐病菌が分生子を形成するかを調べた。

### 1 へた腐病菌 *L. theobromae*

#### (1) PDA 培地での培養条件

矢口ら(1992)の調査方法を参考に, PDA 培地における分生子殻および分生子の形成に好適な培養条件を輸入カンキツ果実から分離した菌で調べた。その結果, 培養温度は 25°C, 光照射は BLB ランプ連続照明が適し, ポ

リスチレンシャーレを用いたもので最も数多くの分生子殻が形成された。

#### (2) 寒天葉片法の諸条件

身近で入手できる 33 種類の植物を供試したところ, 29 種で分生子殻および分生子が形成された。このうちイチョウ, クチナシ, ケヤキ, サクラ, トウネズミモチで早く, また多くの分生子殻が形成された。

次にその他の条件を調べたところ, 葉の煮沸時間は 20~40 秒が良好で, 素寒天培地の濃度は 1, 1.5 および 2%のいずれでも分生子殻は形成されるが, 培養中検鏡試料の採取に便利な 2%が適当と考えられた。光の照射は PDA 培地の場合に比べはるかに少ない条件下で分生子殻の形成が見られた。

#### (3) PDA 培地と寒天葉片法の比較

軸腐れ症状を示す輸入カンキツ果実から罹病組織を PDA 培地に移し, 翌日に生じた菌糸を PDA 培地および寒天葉片法(クチナシ葉)で培養した。培養は PDA 培地で分生子殻が最も形成されやすいと考えられる条件とし, 培養後 5 日目から 2 または 3 日ごとに観察した。この結果 16 事例で *L. theobromae* が検出され, 培養後日数と分生子を確認できた事例の累計は図-1 のとおりとなった。

未成熟胞子は無色単胞で分生子形成の初期に見られ, 成熟胞子はその後に生じる褐色 2 胞子のものである。未成熟胞子は他に類似するものがないため, この胞子の確認で本菌と判断でき, 寒天葉片法では 5 日目にすべての事例で確認できた。一方, PDA 培地では分生子殻形成が遅く分生子が全く見られない事例もあり, 寒天葉片法は本菌の検出に適していた。

なお, 分生子殻観察のためカンキツの枝の小片に接種したが, 分生子殻形成まで長時間を要し雑菌が繁殖するなどの問題があった。

### 2 軸腐病菌 *D. citri* (分生子世代 *P. citri*)

本菌では分生子世代を観察することになるが, PDA 培地と寒天葉片法の比較をへた腐病菌の場合に準じて行った。その結果図-2 のとおりとなり, 本菌でも寒天葉片法が分生子殻および分生子の形成に適していた。

Application of Agar-Leaf Piece Medium to Identification of Fungi Detected in Plant Quarantine. By Takumi MATSUMOTO

(キーワード: 寒天葉片法, 同定, 植物検疫)

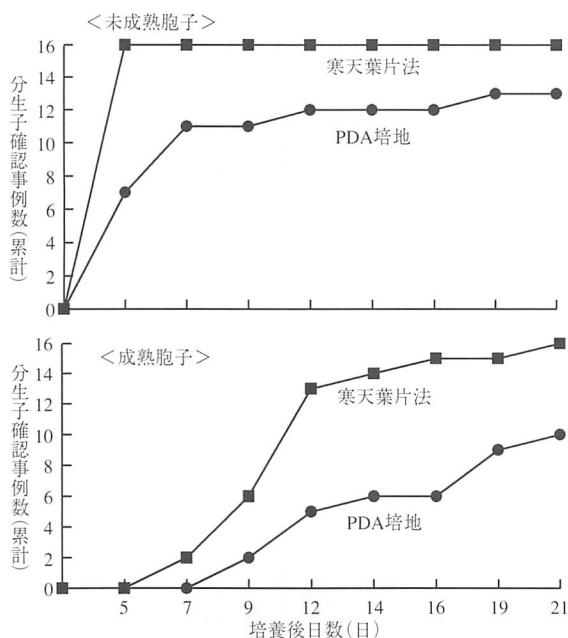


図-1 *L. theobromae* の培養日数と分生子形成状況 (輸入カンキツ果実 16 事例について)

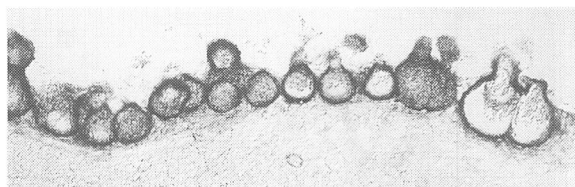


図-3 *D. bryoniae* のカボチャ果皮に生じた偽子のう殻

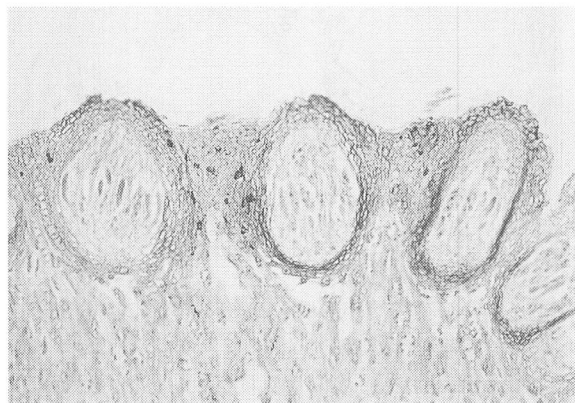


図-4 *G. lagenarium* のカボチャ果皮に生じた子のう殻

生子殻および偽子のう殻の形成を観察するとともに、10 种植物の葉を用い寒天葉片法を試みた。

この結果、1/4 濃度 PDA 培地およびカボチャ苗では分生子殻のみが形成され、カボチャ果実片や寒天葉片法では分生子殻および偽子のう殻の両者が認められた。寒天葉片法で用いる植物としてはイチヨウおよびクチナシが良好であった。

本菌は分生子殻が先に形成されたが、カボチャ果実片で培養すると分生子殻から多量の分生子が放出され、その後生じる偽子のう殻を確認しにくく、また、分生子殻および偽子のう殻 (図-3) が密接に形成されるため検鏡試料の採取も困難であった。一方、寒天葉片法ではこのようなことはなく観察材料として適していた。

寒天葉片法で得られた子実体を検鏡したところ、CHIU and WALKER (1949) が記載した子のう胞子様の細胞を含む子実体や偽子のう殻内の偽側糸の有無 (CHIU and WALKER, 1949; CORLETT, 1981) が容易に観察でき、これら形態はカボチャ果実片を用いても同じ結果であった。

## 2 カボチャ炭疽病菌 *Glomerella lagenarium* (分生子世代 *Colletotrichum orbiculare*)

輸入カボチャ果実の果皮に *Glomerella* 属の子のう殻 (図-4) を形成している黒色の病斑があった。菌の分離培養を行い PDA 培地およびカボチャ果実片に接種したが、分離源のカボチャ果実と同様に子のう殻が形成された。試みに寒天葉片法を行ったところ、クチナシなどで

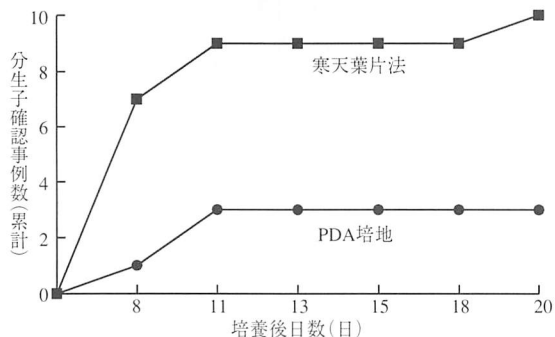


図-2 *P. citri* の培養日数と分生子形成状況 (輸入カンキツ果実 10 事例について)

## II カボチャ果実の病害

輸入カボチャ果実に見られたつる枯病 (ZITTER, 1996) および炭疽病 (SITTERLY and KEINATH, 1996) の同定で寒天葉片法を用いた。

### 1 カボチャつる枯病菌 *Didymella bryoniae* (分生子世代 *Phoma cucurbitacearum* syn. *Ascochyta cucumis*)

輸入カボチャ果実で本菌が検出され、PDA 培地上では分生子殻および偽子のう殻の形成が困難なため培養方法を検討した。1/4 濃度 PDA 培地 (KEINATH et al., 1995), カボチャ苗およびカボチャ果実片に接種して分

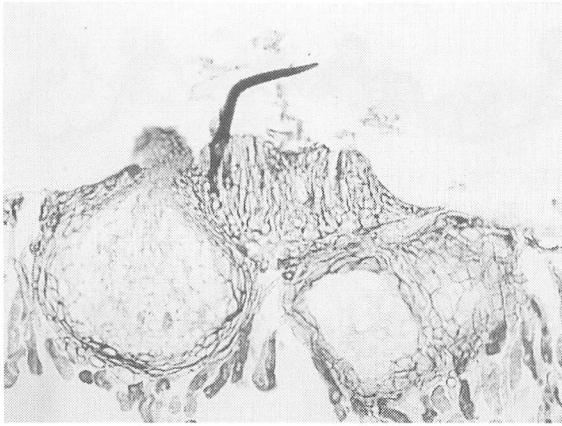


図-5 *G. lagenarium* の寒天葉片法(クチナシ葉)で形成された分生子層(中央)および子う殻(左右)

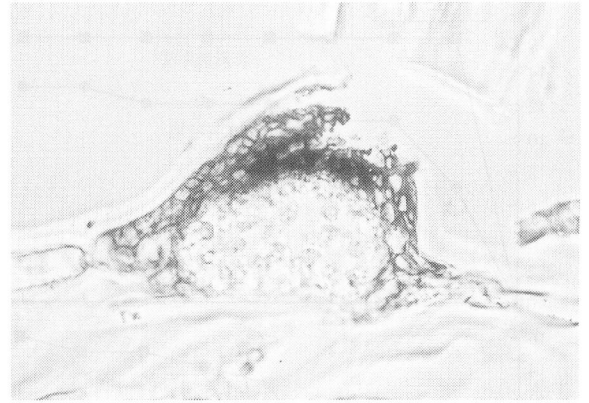


図-6 バンダの葉に見られた *Phyllosticta* sp. の分生子層

剛毛をもつ分生子層が形成され(図-5), この分生子を採取し附着器を含め調査した結果, 小林ら(1998)が検出した *C. orbiculare* と類似しており, 輸入カボチャに見られたものはこれの完全世代と考えられた。なお, 寒天葉片法で生じた分生子層はその近くに子う殻が生じ, 2~3日で外観上識別できなくなった。

### III その他の事例

以下の輸入植物検査で検出した糸状菌についても, その同定のためまず常法どおり PDA 培地で培養を行ったが, 孢子形成が悪く同定困難な場合が多かったので寒天葉片法を適用した。用いた葉の種類はその時々に入手しやすいもの数種(イチョウ, サクラ, トウネズミモチなど)で, 2%素寒天培地, 温度 25°C, BLB ランプ 12 時間照射の条件で行った。

#### 1 バンダから検出した *Phyllosticta* sp.

タイ産バンダの苗に多数の黒褐色の小斑点があり, その内部に厚い殻壁をもつ古い分生子殻(図-6)が認められたが, これによる同定は困難であった。菌の分離培養を行ったところ, PDA 培地では分生子殻が上下左右に重なり合って形成され観察困難で, バンダ上のものと殻壁の状態が異なっていた。このため寒天葉片法で培養したところ, バンダに生じていたものに類似する分生子殻(図-7)が得られ本菌の属の同定が可能となった。

#### 2 カーネーションから検出した *Alternaria* sp.

褐色斑点を生じたトルコ産カーネーション苗から菌の分離培養を行ったが, 分離菌は PDA 培地上では孢子を形成しなかった。とりあえず病原性を見るため菌糸を接種源とし健全株の葉に有傷接種したところ, 病斑の拡大中は孢子を形成せず, 株全体が枯死した後に分生子が認

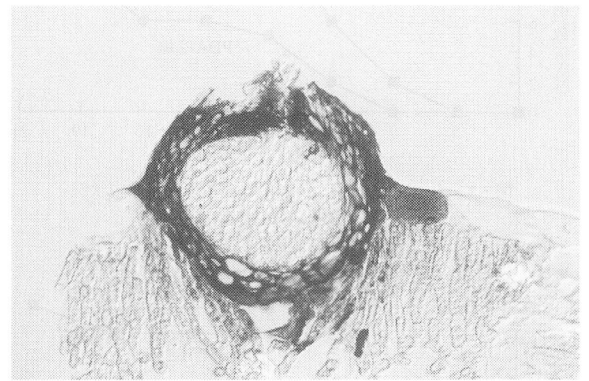


図-7 バンダより分離した *Phyllosticta* sp. の寒天葉片法(サクラ葉)で形成された分生子層

められた。一方, 本菌を寒天葉片法で培養すると, 数日で孢子が形成された。この場合 PDA 培地では分生子を確認できないため, 接種試験した材料からの再分離においても寒天葉片法を利用した。

#### 3 ファレノプシスから検出した *Nectria haematococca* (分生子世代 *Fusarium solani*)

台湾産ファレノプシス苗で, 根の一部が枯死し表面に球状赤褐色の子う殻が見られ, PDA 培地で培養したが, *F. solani* が認められ約 3 週間後に子う殻が形成された。形成される子う殻が少なかったため, 寒天葉片法を試みたところ約 1 週間で多数の子う殻が生じ, 本菌の観察に好都合であった。

なお, 本菌は我が国では株枯病として報告(森田ら, 1992)があるが, 台湾産の分離菌株の接種試験は行っていない。

#### 4 フェイジョアから検出した *Pyrenochaeta* sp.

ニュージーランド産フェイジョア切り枝の葉裏に不明瞭な黒色斑点が見られ, 斑点内に *Pyrenochaeta* 属の分生子殻が散在していた。菌の分離培養を行ったが,

PDA 培地上では分生子殻は形成されず、このため寒天葉片法を試みたところ、ササを用いた場合にのみ分生子殻が形成され、菌の分離に間違いがないことが確認できた。

イチヨウやサクラを寒天葉片法に用いた場合、多くの事例では分生子殻などの形成が良好であったが、本菌は分生子殻をまったく形成せず異例であった。

### 5 ワサビ墨入病菌 *Phoma wasabiae*

台湾および中国産ワサビ根茎で病徴を示しているものを採取し、PDA 培地で病原菌の分離を試みたが、分生子殻は形成されなかった。このため、寒天葉片法で分生子殻を観察した。

### 6 トウモロコシの *Diplodia maydis* (= *Stenocarpella maydis*)

アメリカ産トウモロコシ種子から本菌を検出し、さらに調査をするため PDA 培地で培養した。しかし、分生子を確認するまで長時間を要し、また、生じた分生子殻は菌糸が密に取り囲み形態観察は困難であった。寒天葉片法で形成された分生子殻は、トウモロコシ種子上に生じた分生子殻に類似し、本菌の場合も同定のために寒天葉片法が有用であることが認められた。

### おわりに

植物検疫の現場では、発見された病原菌を短期間に同

定することが要求されるが、常法の PDA 培地による培養ではなかなかその目的が達せられないことが多い。その場合寒天葉片法の応用が極めて有効であることについて述べた。本法は輸入検疫の場合だけでなく、農業の現場に近い都道府県の試験研究機関や防除所等においても、発生した病害の確実な同定のために役立たせることができるものと思われる。ここに紹介したことをそのような面にも生かしていただければ幸いである。

本稿を草するに当たっては、小林亨夫、岸 國平、栃原比呂志の3氏のご指導をいただいた、記して感謝申し上げます。

### 参考文献

- 1) BROWN, G. E. and J. W. ECKERT (2000): Compendium of Citrus Diseases 2nd ed. APS Press, Minnesota, pp. 43~45.
- 2) CHIU, W. F., and J. C. WALKER (1949): J. Agric. Res. 78: 81~102.
- 3) CORLETT, M. (1981): Can. J. Bot. 59: 2116~2042.
- 4) FURUKAWA, T. and K. KISHI (2002): J. Phytopathology 150: 625~628.
- 5) KEINATH, A. P. et al. (1995): Phytopathology 85: 364~369.
- 6) 岸 國平 (1995): 植物防疫 49: 129~130.
- 7) 小林慶範ら (1998): 植防研報 34: 55~58.
- 8) 森田泰彰ら (1992): 日植病報 58: 452~455.
- 9) SITTERLY, W. R. and A. P. KEINATH (1996): Compendium of Cucurbit Diseases, APS Press, Minnesota, pp. 24~25.
- 10) 矢口行雄ら (1992): 東京農大農学集報 37: 106~115.
- 11) ZITTE, T. A. (1996): Compendium of Cucurbit Diseases, APS Press, Minnesota, pp. 48.

## ! 本会発行のシリーズ図書: 植物保護ライブラリー!

各冊 B6判 定価 1,326 円 (本体 1,263 円+税)

「イネいもち病を探る」-研究室から現場まで-	小野小三郎 著	送料 240 円
	口絵カラー 2 頁	本文 174 頁
「作物の病気を防ぐくすりの話」	上杉 康彦 著	
	本文 121 頁	送料 240 円
「虫たちと不思議な匂いの世界」	玉木 佳男 著	
	本文 187 頁	送料 240 円
「日本ローカル昆虫記」-虫の心・人の心-	今村 和夫 著	
	本文 220 頁	送料 310 円
「ミクロの世界に魅せられて」-植物病原細菌の虚像と実像-	後藤 正夫 著	
	本文 221 頁	送料 310 円
「茶の効用と虫の害」	刑部 勝 著	
	本文 166 頁	送料 240 円
「リンゴ害虫の今昔」-害虫防除と環境-	奥 俊夫 著	
	本文 270 頁	送料 310 円

お申し込みは直接当協会へ、前金(現金書留・郵便振替)で申し込むか、お近くの書店でお取り寄せ下さい。

社団法人 日本植物防疫協会 出版情報グループ 〒170-8484 東京都豊島区駒込1-43-11

郵便振替口座 00110-7-177867 TEL (03)3944-1561(代) FAX (03)3944-2103 メール: order@jppa.or.jp