

幼苗検定の思い出

おお はた かん いち
大 畑 貫 一

幼苗検定法は植物病理学における最も基盤的な研究技法の一つで、品種の病害抵抗性検定、病原菌レースの類別、殺菌剤の開発など様々な場面で活用されている。ここでは品種の病害抵抗性検定と殺菌剤の防除効果検定についての、筆者のささやかな経験を紹介したい。

I ごま葉枯病の畑苗代検定と褐条病

話は1950(昭和25)年にさかのぼる。東海近畿地方では戦中・戦後の肥料不足から秋落ち水田が多く、ごま葉枯病が広く発生していた。

病害研究室では、品種のごま葉枯病抵抗性を検定するため畑苗代試験を始めた。ごま葉枯病は、畑苗代では自然発病しないので病原菌を接種する必要がある。畑苗代を温床のように木枠で囲み、苗が3~4葉期に達した時点で、ごま葉枯病菌を噴霧接種し、油紙を張った障子で覆い、その上にむしろを被せて保湿につとめた。

筆者は後藤和夫室長(故人)のもとでこの課題を担当したが、前年就職したばかりの新米で、ごま葉枯病の発生が少なく試験は失敗に終わった。孢子濃度と接種時の保湿が十分ではなかったようである。

ところが、葉鞘地際部から暗褐色の条斑が葉身へ伸び、草丈が低くなる病気が目立った。顕微鏡で調べたところ病組織から細菌が噴出するのがみられた。細菌を分離し、病原性、形態・培養・生理的性質を調べ、新病害であることが確認され、褐条病と命名した。

当時は話題にもならなかった病気で、今日のように箱育苗の難防除病害になろうとは思わなかった。失敗した畑苗代検定ではあったが、これが、その後の白葉枯病、もみ枯細菌病など細菌病との付き合いのきっかけとなった。

II キャベツ黒腐病菌の爪切り接種

黒腐病はアブラナ科野菜に広く発生する難防除病害である。1979(昭和54)年の筑波移転後の初仕事として、土屋行夫さん(故人)、畔上耕児さんと本病に対するキャベツ品種の抵抗性検定法の開発に取り組んだ。一般に細菌病に対する品種抵抗性の検定では噴霧接種、注射接

種、刺針接種、剪葉接種などが行われているが、本病の場合これらの方法では、病斑拡大の個体間差が大きく検定には適さなかった。そこで考えたのが爪切り接種である。

キャベツは径12cmの素焼鉢で育苗し、播種後約2か月(本葉10~15葉期)の苗を用いた。 $10^6 \sim 10^7$ 個/ml濃度の病原細菌懸濁液に浸した爪切りでキャベツ幼苗の完全展開最上葉とその下位葉の先端を葉縁に沿って切る。接種2週間後に病斑の大きさを測定する。病斑はV字型に拡大するので一応三角形と見なして病斑面積を求め、抵抗性を評価する。この方法は、付ける傷の長さが一定のため、病斑拡大の個体間の振れが小さく、操作が簡単なのが特長である。

この研究は担当者の人事移動で中止したが、苗のもっと若い時期に、“爪切り”の代わりに“毛抜き”を用いて接種すれば、より早期に検定できるのではないかと考えたりしている。

この研究の実施に当たっては、東京都農業試験場の飯嶋勉さんから有益な助言をいただいた。

III 薬剤の評価を混乱させた混合発生

1966(昭和41)年9月四国農業試験場に着任したときは、穂枯れ防除薬剤の委託試験の真っ最中で、連日のように研究室総動員で琴平町とその奥の現地圃場に出勤していた。薬剤の種類と濃度を組み合わせると、処理数は20を超えるほどもあった。毎年4~5か所の試験圃場を農家から借りるが、穂枯れは毎年発生するとは限らず、1~2か所は発病がなくて棒に振ることもあった。

2年ばかりやっているうちに、試験圃場あるいは年によって同一薬剤の効果が振れることに気付いた。多くの圃場を借り、大勢の労力をつぎ込んでいるのに信頼できるデータが得られないのにいらだちを感じた。原因を調べるため、罹病穂を採取して病原菌の分離を行った。その結果、ごま葉枯病菌といもち病菌が混合発生している圃場が意外に多いことがわかった。また、同一穂の穂首からはいもち病菌、枝梗や初からはごま葉枯病菌が分離されるケースもかなりあった。これでは安定したデータが得られないのは当然である。そこで幼苗検定法によって、穂枯れの主要原因であるごま葉枯病に対する薬剤

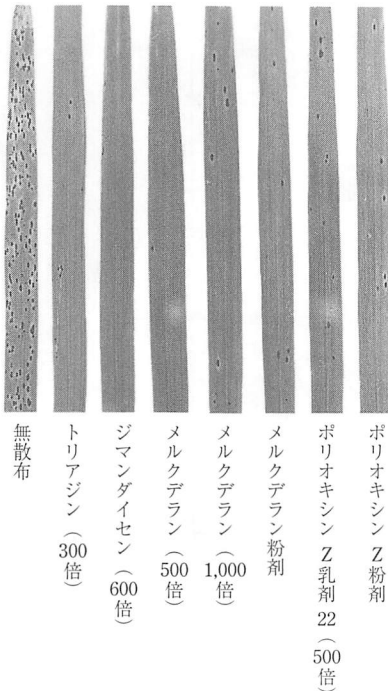


図-1 イネごま葉枯病防除剤の幼苗検定結果

の効果を検定し、圃場試験に代替できないか検討した。

種籾（‘農林8号’）を素焼鉢に播いて戸外で育苗した。4～5葉期に薬剤を散布して、1週間後にごま葉枯病菌を噴霧接種した。4～5日後に薬剤散布時の完全展開上葉（薬剤が全面にかかっている）の全病斑数を数え、防除効果を評価した（図-1）。薬剤散布後接種までの間に人工降雨処理を日を変えて2回行った。一方、ごま葉枯病による穂枯れが発生した2圃場を選定し、2年にわたって幼苗検定と同一薬剤を散布して病穂率から防除価を求め、幼苗検定の防除価との相関を検討した。その結果、両者の間には高い相関があり、ごま葉枯病に起因する穂枯れ防除薬剤の効果は、幼苗検定で実用に耐える評価ができることを確認した。

この幼苗検定のポイントは降雨処理をすることで、降雨処理をしないとどの薬剤も効果が高く出て、圃場試験の結果との相関が低かった。

委託元の企業は委託試験の結果に大きな期待をかけている。試験のデータが欠けることは開発の判断が遅れることになり、企業にとっては大きな痛手となる。気象条件などによって発病がなく、圃場試験のデータが得られない場合でも、圃場試験と相関の高い幼苗検定のデータがあれば、確度の高い判断が可能となる。

IV 幼苗検定と孢子形成

農水省退職後、1988（昭和63）年2月から三菱化学横浜総合研究所で殺菌剤開発研究に携わるようになった。主な仕事の一つは、殺菌剤の防除効果を評価する幼苗検定法の立ち上げであった。これで苦勞したのは、病原性が強く安定した菌株の確保と糸状菌では孢子の大量かつ安定的な形成法の開発だった。大勢の方々の協力を得て、これまで経験のない病害/病原菌の幼苗検定法も立ち上げることができた。ここではコムギふ枯病とイネもち病の幼苗検定法にまつわる話を紹介したい。

1 コムギふ枯病

新しい候補剤が出るとヨーロッパでの需要を予測する。ヨーロッパのコムギでは、ふ枯病はさび病、うどんこ病と並ぶ重要病害である。本病への適用の可否が需要を大きく左右することから、防除効果検定法を立ち上げるようになった。

当時（1989、平成元年）ふ枯病は学会報を探しても報告が見当たらず、国内での発生状況も分からなかった。ふと、宇都敏夫さんから鹿児島県農業改良実験所で戦後行われた本病防除試験の別刷をいただいたことを思い出した。早速、鹿児島県農業試験場の和泉勝一さんに罹病標本の送付を依頼した。そのときは発生はみられないとの返事だったが、2年後にそれらしい病気が発生しているとの連絡をいただいた。直ぐ研究所の富田啓文さんが伺って標本をいただいてきた。しばらくして大分県農業試験場の扶間渉さんからも標本が送られてきた。扶間さんは和泉さんから聞いて送って下さったのである。

標本からはそれらしい菌が高率に分離されたが、孢子を形成せず、ふ枯病菌かどうか確認できなかった。海外の文献を参考に、PSA 平板培養にBL-B 蛍光灯を条件を変えながら照射したが、一向に孢子は形成されなかった。そんなある日、陽光定温器を覗いてみると、置き忘れて乾燥しかけた培養シャーレに黒粒点がまばらに生えているのがみられた。顕微鏡で調べてみると黒粒点は分生子殻で、中から孢子が噴出しているのが確認された。形成条件を検討した結果、ポイントは培地を乾燥気味にすることと培養温度を20℃に下げることだった。これまでシャーレ当たり20 ml 流し込んでいたPSAを半減した。菌を移植して菌そう直径が2～3 cm になった時点でBL-B 蛍光灯を照射することで大量の孢子を得ることができた。

孢子形成法が確立され、コムギ苗への接種温度を20℃に保つことで幼苗検定が可能となった。遅きに失したが何とか面目を果たした。

2 イネいもち病

いもち病菌の孢子形成は古田・関口法で行ってきたが、培養中に雑菌が生えて孢子が採れず、新規化合物の検定ができなくなった。

窮余の一策として、振とう培養法の利用を考えた。まず、いもち病菌を蔗糖加用ジャガイモ煎汁に移植して25℃で振とう培養し、その菌そうを滅菌ブレンダーにかけて菌糸を切断して菌糸懸濁液を調製した。これをあらかじめV-8 ジュース寒天培地を流し込んで平板としたプラスチックシャーレに流し込んで全面に広げ、BL-B 蛍光灯を照射した。この方法では振とう培養中に雑菌の入る危険はなく、ブレンダー処理中に少しの雑菌が混入してもいもち病菌の量が圧倒的に多く、孢子形成に支障はなかった。これで検定を再開することができた。

雑菌混入の原因は無菌室のフィルターの故障で、修理後は再び古田・関口法に戻り、開発した方法は不要になった。ところが今回開発した方法は、孢子形成が困難で幼苗検定法の立ち上げに苦慮していた多くの病原菌にも適用できることが分かった。正に“けがの功名”である。詳細は本誌53巻2号、54巻7号を参照されたい。

V 抵抗性誘導剤の軒下検定

「生研機構」の出資により設立された「植物防御システム研究所」の委託で、開発途上にあった抵抗性誘導剤の防除効果の評価を1997(平成9)年の初め、もと生研機構の理事だった岸國平さんから依頼された。いくつか困難が想定されたが、各方面の援助を得て空家だった牛久市の自宅の軒下で実施することになった。

培地の調製は、日本植物防疫協会の牛久研究所で高橋幸吉さんのお世話になった。ウイルスは農業研究センターの本田要一郎さん、細菌は農業環境技術研究所の西山幸司さんと南九州大学の尾崎克己さん、トマト萎凋病菌は農業研究センターの萩原廣さんと中山尊登さん、日植防牛久研究所の田代定良さん、他の糸状菌は三菱化学横浜総合研究所からいただき、接種法も教わった。

供試植物の生育・発病適温と病原菌の生育適温の時期を勘案して試験を実施した。例えばコムギ赤さび病・うどんこ病の試験は4月から5月上旬、イネいもち病とごま葉枯病は6月一杯、トマト萎凋病と青枯病は7月から8月までといった具合である。

供試植物は底に穴を開けた紙コップあるいはビニールポットに播種し、市販のプランターに納め、アブラムシの飛来や鳥害を防ぐため寒冷紗あるいは防鳥ネットを張った木枠の中で育苗した(図-2)。

培養できないコムギ赤さび病・うどんこ病菌は、契約前に松戸市の自宅マンションのベランダで育てておい



図-2 抵抗性誘導剤の幼苗検定実施状況
手前は防鳥ネット、奥は寒冷紗張り。

たコムギに接種して増殖し、供試の都度牛久へ運んだ。他の病原菌は牛久の自宅で培養した。

イネいもち病菌・ごま葉枯病菌、コムギ赤さび病菌、トマト葉かび病菌、キュウリ斑点細菌病菌・炭疽病菌は風呂場で噴霧接種し、接種植物は湿室にした大型のプラスチック製の衣装箱内に1昼夜インキュベートした。トマト青枯病菌は細菌懸濁液の土壤灌注により、トマト萎凋病菌はふすま培養菌を土壌混和して接種した。ウイルスはカーボランダムを用い常法により汁液接種した。

キュウリモザイクウイルス(CMV)を除いて防除効果の評価に十分な発病がみられ、所期の目的を達成した。

自然環境下では幼苗検定可能な時期は制約されるが、植物の生育、感染・発病の適期を選べば、薬剤の評価は可能であることが確認された。

以上のように幼苗検定法は、作物の選択・育苗、病原性の安定した病原菌の確保・糸状菌では孢子の形成法、接種の時期・方法、発病程度の評価法など、植物病理学の基盤の実験技法が総合された技術体系である。そして抵抗性品種の育成、病原菌レースの類別、殺菌剤の開発など実用技術への橋渡しの役目を担っている。

筆者の狭い経験を紹介したが、実施に当たっては、多くの方々の温かいご理解と援助をいただいた。この場を借りて厚くお礼申し上げる。

(なお、お世話になった方々の役職と所属は当時である)