

特集：疫病

疫病菌類の同定のための 簡易な分離・培養・形態形成法－その2－

千葉県農林総合研究センター 暖地園芸研究所 ^{うえ}植 ^{まつ}松 ^{せい}清 ^し次

はじめに

Phytophthora 属菌による病害は一般に「疫病」と呼ばれ、農林業上重要な病原菌類である。なかでも多犯性菌として知られている *Phytophthora cinnamomi* だけでも900種以上の寄主植物が報告されている (ERWIN and RIBEIRO, 1996)。我が国では約300種以上の植物で50種以上の「疫病」が発生している (以後、疫病菌による病害を疫病と呼称する)。

Phytophthora DATABASE によると、*Phytophthora* 属菌は2013年8月末現在116種が報告されている。ERWIN and RIBEIRO (1996) は64種をリストアップし、更に近年、分子生物学的手法による研究が行われて (COOKE et al., 2000; BLAIR et al., 2008) 遺伝子情報が蓄積されており、これに基づいて50種以上の新種の報告が行われた。

我が国では疫病菌に関するモノグラフや総説があるが (桂, 1971; 鈴井, 1995; 渡邊, 1998), 疫病菌を分離、培養、同定、分類、簡易保存するための方法について詳述したものは少ない。また、疫病菌が属する卵菌類の分類では糸状菌とは異なる用語が多いことや菌株も糸状菌と同様に扱うと死滅しやすい。さらに、筆者のもとへ送付された菌株の中にも *Pythium* 属菌や接合菌類と思われるものがしばしば含まれていることから、現場の研究者にとってはわかりにくく、扱いにくい病原菌であるように思われる。

そこで、筆者は本誌に「疫病菌の簡易な分離・培養・形態形成法」(植松, 2003) をすでに寄稿した。本稿ではその後の知見を加えて再度解説する。

I 形態による疫病菌の分類体系

1 疫病菌であること

①無隔壁菌糸 coenocytic (nonseptate) mycelium である。②遊走子 zoospore は遊走子のう (胞子のう) sporangium 内で分化し、遊走子のう先端から泳ぎ出す。③

Isolation, Culture and Physiology of Production of Some Morphological Characteristics for Identification of *Phytophthora* Species. By Seiji UEMATSU

(キーワード：疫病, *Phytophthora*, 分離, 培養, 同定)

遊走子のうは腎臓形～卵形で、体側に2本の鞭毛 two flagella を持つ。④細胞壁はセルロースとグルカンからなる。⑤造卵器 oogonium, 造精子 antheridium を有し、造卵器は卵胞子 oospore を1個内包する。⑥厚壁胞子 chlamydospore や菌糸の膨潤 (膨らみ) hyphal swelling 等を形成するものもある。特に、①と②の項の観察は疫病菌による病害の判定を行ううえで必須条件である (表-1)。

2 形態と分子生物学的手法による同定

(1) 形態

種の同定は、原則として原著論文の記載とその後追加された形態の特徴を扱った論文を参考にするが、種ごとに形態、生態、病害事例等が記述されている ERWIN and RIBEIRO (1996) のモノグラフを参考にして行うのがよい。古い原著論文を参考にしたい場合は WATERHOUSE (1970) が便利である。

WATERHOUSE (1963) は疫病菌を①遊走子のうの乳頭突起の有無 (markedly papillate, semipapillate, nonpapillate)

表-1 疫病菌の観察項目

器官	観察項目
菌そう	PDA, CMA, V8A における生育, 菌そうの形状
菌糸	幅, 結節, 膨潤の形状, 連鎖性, 集塊の有無
遊走子のう	形, 位置, 乳頭突起の有無と形, 間接発芽, 直接発芽, 脱落性
遊走子のう柄	分岐の仕方, 脱落後の柄の長さ
厚壁胞子	形成の有無, 形, 大きさ, 形成位置
遊走子, 被のう胞子	大きさ (種の同定には使用しない)
造卵器	形, 位置, 大きさ, 色, 表面構造, 突起の有無
造精子	形, 数, 位置, 大きさ, 形, 隔壁の有無, 間生, 底着, 側着
受精様式	同株性, 異株性
卵胞子	形成の有無, 形, 大きさ, 充満性, 壁の厚さ, 油ほうの数, 大きさ, 油胞
生育温度	生育温度域, 最適, 最高限界温度

late), ②造精器の付き方 (側着性 *paragynous*, 底着性 *amphigynous*, 直下性 *hypogynous*), ③有性器官の形成方法 (同株性 (性的同質接合性) *homothallic*, 異株性 (性的異質接合性, *heterothallic*)) を基準にして, 形態を異にする種群を 6 群に分けた (表-2)。現在でも形態を記述するうえではこれらの項目は必須条件であるが, この 6 群のいずれに属する菌であるか議論することは少なくなっている。

(2) 分子生物学的同定による分類

近年, rDNA ITS 領域や cytochrome c oxidase subunit (COXI, COXII) 等のシーケンスデータにより解析が行われ, 情報が蓄積されている。同定を行ううえで疫病菌のシーケンスデータから相同性検索を行うことにより絞り込みを行い, 形態的特徴を確認するほうが簡便法として近道である。COOKE et al. (2000) および BLAIR et al. (2008) は rDNA の ITS 領域の分子系統学的解析により *Phytophthora* 属を 10 クレードに分けた (表-2)。最近, 新種の記載にあたってはこの方式で記述することが一般的になっている。COOKE et al. (2000) のクレードによる分類体系の分類群は WATERHOUSE (1963) の体系の分類群とは一致していない。分類学的手法による詳細は本誌掲載の景山 (2013) に譲る。

II 形 態 観 察

1 分離・培養

筆者は素寒天培地 (WA) を使用して分離培養を行っている。腐敗が進んでいる場合などは適宜 MASAGO et al. (1977) の BNPR-HMI 培地, TSAO and GUY (1977) の PVPH 選択培地等を用いるが, 通常の場合は必要としない。

(1) 病理標本の観察

最初, 病理標本を顕微鏡で観察して, 組織中を迷走する無隔壁菌糸を観察する。植物体組織により, 観察しにくい場合が多いので, 丹念に観察する必要がある。

(2) 病理標本の洗浄

アルコールや次亜塩素酸ナトリウムによる表面殺菌は通常行わない。新鮮な罹病部分の切片 (長さ 0.5 ~ 1 cm) を 100 ml のピーカーに入れる。ピーカーの口をガーゼで覆い, 水道の蛇口の下に置き, 流水で 15 分ほど洗い流す。

(3) 置床

洗浄後, 滅菌ろ紙上に置き, 切片の表面の水分を取る。ただし, 切片が乾くまで水分を取り去る必要はない。切片は表面が湿潤でない WA 培地上に置床する。培地上に水分が多いと, 切片周辺に細菌が繁殖してしまい, 分離

が難しくなる。病原菌の生育温度や他の汚染糸状菌の生育など未知の部分もあるので, 分離に際し 2 ~ 3 段階の異なった温度で培養を行ってみるのもよい。また, 明るいところで培養すると, 遊走子のうを WA 培地上に形成する場合が多いので, 疫病菌であることが判定しやすい。

遊走子のうを罹病部上に形成する種の場合は, 遊走子のうを WA 培地上に塗抹する。例えば, スイカやカボチャの疫病菌 *P. capsici* は遊走子のうが脱落しやすいので, 果実表面に白く密生した病変部をスパチュラなどで軽くなでて遊走子のうを拭い取とることができる。ナシ, ビワ, イチジク, カンキツに発生した *P. cactorum* や *P. palmivora* による疫病の場合も同様な方法で分離可能である。

(4) 分離作業

罹病部切変を置床した 2 ~ 4 日後に, 寒天上に伸び出した無隔壁菌糸を外科用の使い捨てメスなどを用いて実体顕微鏡下で単菌糸を寒天ごと切り取るにより分離する。病原菌の簡易同定ではこれを菌株として使用する。

実際に分離を行ってみると, 地際部や根には疫病菌以外の糸状菌が培地上に多数伸び出して来ることが多い。疫病菌が培地上に伸び出しているにもかかわらず, 他の菌の生育が早い場合は, 分離率が低くなる。また, 同一圃場で発生した疫病でも複数の種が分離される事例もあるので, 1 圃場あたり 10 罹病植物またはそれ以上, 1 植物個体あたり 5 ~ 10 切片を培地上に置床し, 分離してみるとよい。

(5) 分離菌株の培養

分離した菌株は, V8 ジュース寒天培地 (V8A) とジャガイモ煎汁ブドウ糖寒天培地 (PDA) 上に移して培養し, 菌そう発育の模様や生育程度, 培地上での有性器官や遊走子のうの形成の有無等でグループに分けて保存する。特に PDA 培地を用いると菌そうでの区別が付きやすい。また, V8A 培地を用いた観察は, 国際的スタンダードになっている。V8A 培地の作り方は, まず V8 ジュース 100 ~ 200 ml に, CaCO₃ を 2 ~ 3 g 入れ, 軽く攪拌後, 3,000 ~ 6,000 rpm で数分間必ず遠沈し, 上澄み液を水 (水道水または蒸留水) で薄めて 1 l にする。これに寒天を 20 g 入れ高压滅菌後, ペトリ皿に 10 ml ずつ分注する (図-1)。V8 ジュースの代用品として他社の野菜ジュースを用いてもよい。

注意点として, V8A 培地を遠沈せずに培地を作成した場合, 顕微鏡観察ににくいので, 遠沈作業は必須である。また, V8 ジュースには塩分の多少により異なる商品があるが, いずれを使用してもよい。

表-2 *Phytophthora* DATABASE 上に掲載されている種の形質と形態的分類群および分子系統学的 clade

種	菌糸の 膨潤 ^{a)}	厚壁 胞子 形成 ^{a)}	遊走子のうの形質			有性器官の形質		菌糸生育 上限温度 (℃)	形態 的分 類群 ^{c)}	分子系 統学的 clade ^{d)}
			乳頭 突起 ^{b)}	脱落性	柄長 (μm)	同株性/ 異株性	造精器の 付き方			
<i>Phytophthora cactorum</i>		+ / -	顕著	脱落性	短柄	同株性	側着	< 35	I	1a
<i>Phytophthora idaei</i>	-	+ / -	顕著	非脱落性		同株性	大部分 側着	27	I	1a
<i>Phytophthora hedraiaandra</i>	-	-	顕著	脱落性	短柄	同株性	大部分 側着	30	I	1a
<i>Phytophthora pseudotsugae</i>	+ / -	-	顕著	非脱落性		同株性	主に側着	30	I	1a
<i>Phytophthora clandestina</i>	+	-	顕著	脱落性	短柄	同株性	底着/ 側着	31	I	1b
<i>Phytophthora iranica</i>	-	+ / -	顕著	非脱落性		同株性	大部分 側着	35	I	1b
<i>Phytophthora tentaculata</i>	+	+	顕著	脱落性・ 非脱落性	短柄	同株性	主に側着	32	I	1b
<i>Phytophthora andia</i>	-	-	有	脱落性	短柄	異株性	底着	30	IV	1c
<i>Phytophthora ipomoeae</i>	+ / -	-	有	脱落性	短柄	同株性	底着	25	IV	1c
<i>Phytophthora mirabilis</i>			有	脱落性	短柄	異株性	底着	-	IV	1c
<i>Phytophthora phaseoli</i>	-	-	有	脱落性	5 ~ 20	同株性	底着	25 ~ 30	IV	1c
<i>Phytophthora infestans</i>	-	-	有	脱落性	< 3	異株性	底着	26	IV	1c
<i>Phytophthora nicotianae</i>	+	+	顕著	非脱落性		異株性	底着	37	II	1
<i>Phytophthora botryosa</i>		+ / -	顕著	脱落性	5 ~ 20	異株性	底着	32	II	2a
<i>Phytophthora citrophthora</i>	-	+ / -	顕著	非脱落性		無/一部 異株性	底着	32 ~ 33	II	2a
<i>Phytophthora colocasiae</i>	-	+	有	脱落性	3.5 ~ 10	異株性	底着	> 35	IV	2a
<i>Phytophthora inflata</i>	+	-	有	非脱落性		同株性	側着	30 ~ 35	III	2a
<i>Phytophthora meadii</i>	-	+ / -	顕著	脱落性	10 ~ 20	大部分 同株性	底着	> 33	II	2a
<i>Phytophthora capsici</i>	+	+ / -	顕著	脱落性	10 ~ 200	異株性	底着	> 35	II	2b
<i>Phytophthora glovera</i>	-	-	有	非脱落性		同株性	側着・ 底着	30	III	2b
<i>Phytophthora menzei</i>	-	-	有	非脱落性		同株性	側着	33 ~ 35	III	2b
<i>Phytophthora mexicana</i>	+ / -	+ / -	顕著	非脱落性		異株性	底着	< 35	II	2b
<i>Phytophthora siskiyouensis</i>	-	-	有	脱落性	0 ~ 133	同株性	主に側着	30	III	2b
<i>Phytophthora tropicalis</i>		+	顕著	脱落性	> 50	異株性	底着	35	II	2b
<i>Phytophthora bisheria</i>	-	-	有	非脱落性		同株性	側着	32	III	2
<i>Phytophthora capensis</i>	-	-	有	非脱落性		同株性	側着	27.5	III	2
<i>Phytophthora citricola</i>	-	-	有	非脱落性		同株性	側着	31	III	2
<i>Phytophthora elongata</i>		-	有	非脱落性		同株性	側着	< 32.5	III	2
<i>Phytophthora frigida</i>	+	+	顕著	脱落性	短柄	異株性	大部分 底着	35	II	2

表-2 つづき

種	菌糸の 膨潤 ^{a)}	厚壁 胞子 形成 ^{a)}	遊走子のうの形質			有性器官の形質		菌糸生育 上限温度 (℃)	形態 的分 類群 ^{c)}	分子系 統学的 clade ^{d)}
			乳頭 突起 ^{b)}	脱落性	柄長 (μm)	同株性/ 異株性	造精器の 付き方			
<i>Phytophthora multivesiculata</i>	+	—	無・有	非脱落性		同株性	底着	35	IV	2
<i>Phytophthora multivora</i>	—	—	有	非脱落性		同株性	側着	32.5	III	2
<i>Phytophthora pini</i>	+ / —	—	有	非脱落性		同株性	側着	30	III	2
<i>Phytophthora plurivora</i>	+	—	有	非脱落性		同株性	側着	32.5	III	2
<i>Phytophthora ilicis</i>	—	—	有	脱落性	5 ~ 15	同株性	底着	25	IV	3
<i>Phytophthora nemorosa</i>	+	+	有	脱落性	5 ~ 20	同株性	底着	20	IV	3
<i>Phytophthora pseudosyringae</i>	+	—	有	非脱落性		同株性	主に側着	25	IV	3
<i>Phytophthora psychrophila</i>	—	+	有	脱落性	短柄	同株性	底着	25	IV	3
<i>Phytophthora alticola</i>		+ / —	顕著	脱落性	短柄	同株性	主に底着	—	II	4
<i>Phytophthora arenaria</i>	+	—	顕著	非脱落性		同株性	側着	32.5	I	4
<i>Phytophthora megakarya</i>	—	+	顕著	脱落性	10 ~ 30	異株性	底着	29 ~ 30	II	4
<i>Phytophthora palmivora</i>	—	+	顕著	脱落性	短柄	異株性	底着	35	II	4
<i>Phytophthora quercetorum</i>	+	+ / —	顕著	非脱落性		同株性	側着	32.5	I	4
<i>Phytophthora heveae</i>	—	—	顕著	脱落性	< 10	同株性	底着	31 ~ 32.5	II	5
<i>Phytophthora katsurae</i>	—	+	顕著	非脱落性		同株性	底着	32	II	5
<i>Phytophthora fluvialis</i>	+	—	無	非脱落性		異株性	底着	38	V/VI	6a
<i>Phytophthora gemini</i>	+ / —	+	無	非脱落性		異株性	底着	33	V/VI	6a
<i>Phytophthora humicola</i>	+	—	無	非脱落性		同株性	大部分 側着	32	V	6a
<i>Phytophthora inundata</i>	—	—	無	非脱落性		異株性	底着	35 ~ 37	VI	6a
<i>Phytophthora rosacearum</i>		—	無	非脱落性		同株性	主に側着	36	V	6a
<i>Phytophthora bilorbang</i>	+	—	無	非脱落性		同株性	側着	32.5	V/VI	6b
<i>Phytophthora borealis</i>		—	有	非脱落性		異株性	底着	30	V/VI	6b
<i>Phytophthora gibbosa</i>	+	—	無/有	非脱落性		同株性	大部分 底着	< 35	VI	6b
<i>Phytophthora gonapodyides</i>	—	—	無	非脱落性		異株性	底着	30 ~ 35	VI	6b
<i>Phytophthora gregata</i>	+	—	無	非脱落性		同株性	大部分 側着	30 ~ 35	V/VI	6b
<i>Phytophthora lacustris</i>	+ / —	—	無	非脱落性		異株性	底着	37	V/VI	6b
<i>Phytophthora litoralis</i>	+	+	無	非脱落性		異株性	底着	32.5 ~ 35	V/VI	6b
<i>Phytophthora megasperma</i>	+	—	無	非脱落性		同株性	主に側着	> 33	V	6b
<i>Phytophthora pinifolia</i>	+	—	無	脱落性	14 ~ 32	—	—	30		6b
<i>Phytophthora riparia</i>		—	無	非脱落性		—	—	35		6b
<i>Phytophthora thermophila</i>	+	+	無	非脱落性		同株性	底着	37	V/VI	6b
<i>Phytophthora asparagi</i>		—	無	非脱落性		同株性	底着	30	VI	6c
<i>Phytophthora amnicola</i>		—	無	非脱落性		—	—	37.5	?	6

表-2 つづき

種	菌糸の 膨潤 ^{a)}	厚壁 胞子 形成 ^{a)}	遊走子のうの形質			有性器官の形質		菌糸生育 上限温度 (℃)	形態 的分 類群 ^{c)}	分子系 統学的 clade ^{d)}
			乳頭 突起 ^{b)}	脱落性	柄長 (μm)	同株性/ 異株性	造精器の 付き方			
<i>Phytophthora alni</i> subsp. <i>alni</i>		－	無	非脱落性		同株性	底着	29	VI	7a
<i>Phytophthora alni</i> subsp. <i>uniformis</i>		－	無	非脱落性		同株性	底着	27 ～ 32	VI	7a
<i>Phytophthora alni</i> subsp. <i>multiformis</i>		－	無	非脱落性		同株性	底着	30	VI	7a
<i>Phytophthora cambivora</i>	+	+	無	非脱落性		異株性	底着	32	VI	7a
<i>Phytophthora europaea</i>	+	－	無	非脱落性		同株性	側着	30	V	7a
<i>Phytophthora fragariae</i>		－	無	非脱落性		同株性	側着	25 ～ 28	V	7a
<i>Phytophthora rubi</i>			無	非脱落性		同株性	主に側着	28	V	7a
<i>Phytophthora uliginosa</i>	+	－	無	非脱落性		同株性	側着	30	V	7a
<i>Phytophthora cajani</i>	－	－	無・有	非脱落性		同株性	底着	30	VI	7b
<i>Phytophthora cinnamomi</i> var. <i>parvispora</i>	+	+	無	非脱落性		異株性	底着	36 ～ 37	VI	7b
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	+	+	無	非脱落性		異株性	底着	36 ～ 37	VI	7b
<i>Phytophthora melonis</i>	+	+	無	非脱落性		同株性・ 異株性	底着	37	VI	7b
<i>Phytophthora pistaciae</i>	+	－	無	非脱落性		同株性	側着・ 希に底着	35	V	7b
<i>Phytophthora sinensis</i>	+	－	無	非脱落性		同株性	底着	36.5	VI	7b
<i>Phytophthora sojae</i>	+	+/－	無	非脱落性		同株性	大部分 側着	35	V	7b
<i>Phytophthora vignae</i>	+	+	無	非脱落性		同株性	底着	32	VI	7b
<i>Phytophthora crypogea</i>	+	－	無	非脱落性		異株性	底着	31 ～ 33	VI	8a
<i>Phytophthora drechsleri</i>	+	－	無	非脱落性		異株性	底着	37	VI	8a
<i>Phytophthora erythroseptica</i>	+	－	無	非脱落性		同株性	底着	34	VI	8a
<i>Phytophthora medicaginis</i>	+	+	無	非脱落性		同株性	底着/ 側着	> 33	V	8a
<i>Phytophthora sansomeana</i>		－	無	非脱落性		同株性	主に側着	35	V	8a
<i>Phytophthora trifolii</i>	－	－	無	非脱落性		同株性	大部分 側着	30 ～ 35	V	8a
<i>Phytophthora richardiae</i>	+	－	無	非脱落性		同株性	大部分 底着	30 ～ 32	VI	8a
<i>Phytophthora brassicae</i>	+	－	有	脱落性	短柄	同株性	大部分 底着	27	IV	8b
<i>Phytophthora porri</i>	+	+	有	非脱落性		同株性	底着・ 側着	27	III	8b
<i>Phytophthora primulae</i>	－	－	有	非脱落性		同株性	大部分 側着	< 27	III	8b
<i>Phytophthora syringae</i>	+	－	有	非脱落性		同株性	主に側着	23 ～ 25	III	8b

表-2 つづき

種	菌糸の 膨潤 ^{a)}	厚壁 胞子 形成 ^{a)}	遊走子のうの形質			有性器官の形質		菌糸生育 上限温度 (℃)	形態 的分 類群 ^{c)}	分子系 統学的 clade ^{d)}
			乳頭 突起 ^{b)}	脱落性	柄長 (μm)	同株性/ 異株性	造精器の 付き方			
<i>Phytophthora foliorum</i>		—	有	脱落性	5 ~ 20	同株性	大部分 側着	28	III	8c
<i>Phytophthora hibernalis</i>	—	—	有	脱落性	23 ~ 73	同株性	大部分 底着	25	IV	8c
<i>Phytophthora himalsilva</i>	—	—	顕著	脱落性	平均 15.1	同株性	側着/ 底着	30 ~ 31	I/II	8c
<i>Phytophthora lateralis</i>	—	+	無・有	非脱落性		同株性	側着	< 26	V	8c
<i>Phytophthora ramorum</i>	—	+	有	脱落性	短柄	異株性	底着	< 26	IV	8c
<i>Phytophthora austrocedri</i>	+	—	有	非脱落性		同株性	底着	< 25	IV	8d
<i>Phytophthora obscura</i>		—	有	非脱落性		同株性	側着	25	III	8d
<i>Phytophthora aquimorbida</i>			無	非脱落性		同株性	造精器 なし	40		9
<i>Phytophthora captiosa</i>	—	—	無	非脱落性		同株性	底着	30	VI	9
<i>Phytophthora chrysanthemi</i>	+	+	無	非脱落性		同株性	主に側着	35	V	9
<i>Phytophthora constricta</i>		—	有	非脱落性		同株性	側着	32.5	V	9
<i>Phytophthora fallax</i>	—	+	無	非脱落性		同株性	側着・ 底着	27	V	9
<i>Phytophthora hydropathica</i>	+	+	無	非脱落性		異株性	底着	40	VI	9
<i>Phytophthora insolita</i>	+	+	無	非脱落性		同株性	—	38	V/VI	9
<i>Phytophthora irrigata</i>	—	—	無	非脱落性		異株性	底着	40	VI	9
<i>Phytophthora macrochlamydospora</i>	+	+	有	非脱落性		—	—	34	III/IV	9
<i>Phytophthora parsiana</i>	—	+	無・有	非脱落性		異株性	底着	37	VI	9
<i>Phytophthora polonica</i>	+	+	無	非脱落性		同株性	多くは 側着	38	V	9
<i>Phytophthora quininea</i>	+	+	無	非脱落性		同株性	側着	30	V	9
<i>Phytophthora boehmeriae</i>		+ / —	顕著	脱落性	短柄	同株性	底着	32.5	II	10
<i>Phytophthora gallica</i>	+	+	無	非脱落性		—	—	30	V/VI	10
<i>Phytophthora kernoviae</i>	—	—	顕著	脱落性	5 ~ 19	同株性	底着	26	II	10
<i>Phytophthora morindae</i>	—	—	顕著	脱落性	8 ~ 66	異株性	底着	27	II	10
<i>Phytophthora quercina</i>	—	+ / —	顕著	非脱落性		同株性	側着	27.5	I	1 と 5 の近傍

^{a)} + : 膨潤有り, + / — : まれに観察されるまたは菌株により観察される, — : 観察されない, 空欄 : 記載なし.

^{b)} 顕著 : papillate, 有 : semipapillate, 無 : nonpapillate.

^{c)} WATERHOUSE et al. (1990) および ERWIN and RIBEIRO (1996) から引用.

^{d)} COOKE et al. (2000) および BLAIR et al. (2008) による分子系統学的 clade.



図-1 疫病菌の形態形成に用いる培地と試薬

右から CMA, 炭酸カルシウム, V8 ジュース, チアミン塩酸塩, DL-トリプトファン, β -シトステロール。

2 菌株保存の簡易法

(1) 斜面培地

保存培地はトウモロコシ煎汁寒天培地 (CMA), PDA 培地, ライマメ煎汁寒天培地 (LBA), 改変 WSH 培地等を用いる。CMA や PDA 培地で試験管の斜面培地で培養後放置すると、多くの疫病菌は半年～1年で死滅することが多い。したがって、斜面培地で保存する場合は半年から1年で移植を繰り返す必要がある。

(2) ミネラルオイル封入法

V8A 培地などの斜面培地全体を疫病菌が生育したところに、ライトミネラルオイルを斜面が埋没するまで入れて、約 15℃ 下で保存する方法である (ERWIN and RIBEIRO 1996)。ミネラルオイルは 121℃ で高圧滅菌後、150℃ で乾熱処理して水分を取り除く。2年またはそれ以上の保存が可能であるという。15℃ 以下での保存は不適とされている。本法は、ミネラルオイルを使用するため、移植や器具の洗浄等の作業に煩雑さがある。

(3) 蒸留水法

V8A 培地などの寒天培地で培養し、寒天培地の小片を滅菌蒸留水中に投入して保存する方法である。Ko (2003) は、V8A 培地で前培養した 10 × 4 × 3 mm の 4 小片を滅菌水の入ったスクリュウキャップ付き試験管 (長さ 125 mm, 直径 15 mm) の中に入れて保存した。24～25℃ の室温下で *Phytophthora cinnamomi*, *P. parasitica* および *P. palmivora* は 6～23 年生存したという。

(4) 貧栄養液体培地

菌株が死なないうちに、CMA や PDA 培地で用いる通常濃度の CM プロスまたは PD プロスを 20～100 倍程度に希釈した希釈液を、斜面培地が 1/2～2/3 程度まで隠れるくらいに分注して、1週間程度生育させた後、

10～20℃ の部屋で保存する (WATANABE 2002)。分注作業で注意すべき点は他の菌による汚染である。分注後 1～2 週間は汚染状況を観察することが必要である。汚染してしまった場合は、MASAGO et al. (1977) の BNPR 培地などを用いて早めに分離を行うとよい。

溶液中で菌そうの発育状態がよくみえるように、オートミールや V8 ジュース等の濁ったり着色するプロスは用いない。CM プロスはニワトリの飼料から作成する (ペットショップでは 1 kg 程度で販売されている)。多くの抗生物質が添加されていると思われるが、今までの実験では菌の生育に影響はなかった。これを 1～2 年に 1 回分注する。CM プロス 1 L に対しポリペプトンを耳かき 2～3 杯添加することもある。筆者はこの方法で 20 年以上培養を続けている。

保存温度は 15℃ 前後が適当と思われる。*P. syringae* や *P. porii* など低温性の疫病菌は 25℃ で放置すると簡単に死滅するので、できる限り 20℃ 以下の冷暗所に置く。

3 菌そう、菌糸幅、厚壁孢子および菌糸の膨潤の観察

PDA と V8A 培地で 15℃, 20℃ および 25℃ などで培養する。菌そうの模様は特定の種には特長のある模様を形成する場合があるが、菌そうから種類の判別を行うことはできない。

菌糸幅は PDA や V8A 培地上で培養した主軸菌糸の太さを測定する。厚壁孢子を培地上で形成する種としない種が認められる。培地上で厚壁孢子をなかなか形成しない場合は、PD プロスなどで培養した菌そうのマットをピンセットなどでほぐし、少量を滅菌水へ入れて 5～15℃ 下に置いて観察を行う。また、菌糸の膨潤 (swelling) も、V8A 上や遊走子のう形成実験中に形成されることが多い。形成されない場合は、厚壁孢子の場合と同様に、最適発育温度の $\pm 10^\circ\text{C}$ の 3 段階の温度下に置いてみるとよい (図-2)。

4 遊走子のうと遊走子の形成法

遊走子のう形成用の溶液は、ペトリ液 (PETRI, 1917), CHEN and ZENTMYER (1970) の mineral water, 池水 (微生物がいるので、ろ過が必要), 土壤浸出液 (池水に同じ) などのいろいろな方法がある。また、形成用基質にはアルファルファの茎、グリーンピース等がある。ここでは筆者らが用いている、アサ種子 (麻の実) と雨水による方法を紹介する。

(1) 形成溶液

雨水をタライに受けて採取し、キムワイプかティッシュでろ過し、高圧滅菌せずに容器に入れて冷蔵庫で保存する。

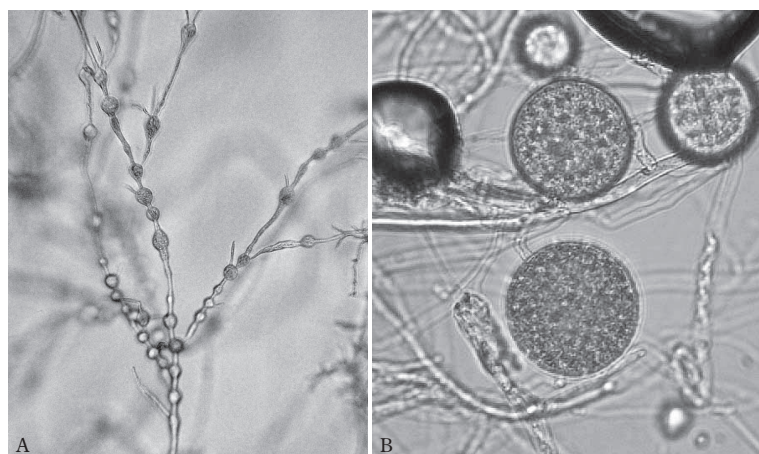


図-2 菌糸の膨潤 (A) と厚壁胞子 (B)

(2) 基質

アサ種子 (ペットショップで購入) を高圧滅菌して用いる。

(3) 遊走子のうの観察

培地上に遊走子のうを形成する菌株では、そのまま計測する。培地上で形成しにくい菌株では、培養菌そう上にアサ種子を置き、分離菌株の生育適温付近で1~4日間培養後、9 cm ペトリ皿に1~2個の培養種子を移して、水没する程度にまで雨水を入れる (種子が多いと形成が悪くなる)。蛍光灯スタンド (15 W) 下に15~30 cm 離して置き、全明条件とする。遊走子のうは1日程度で形成されるので、その長さとお幅を測定する。形成が悪い場合、毎日水の取替えを行うか、温度を変えて培養する。細菌の繁殖が気になるようであれば、雨水を0.22 μm のフィルターでろ過して用いる。分離菌株の生育適温付近で形成が悪い場合は、生育適温の5℃程度の低温または高温で培養する。

培養菌そうをほぐして作成した小さい菌糸塊による遊走子のうの形成法 (鈴井, 1995) では、時間が経つにつれ、形成される遊走子のうが次第に小さくなってくるので、形成初めの遊走子のうを観察する。

(4) 遊走子のうの乳頭突起 (papilla) の観察

ラクトフェノール・コットンブルー液 (フェノール 20 g, グリセリン 40 g, 50% lactic acid 20 ml (または 75% lactic acid 13.3 ml), 蒸留水 30 ml, cotton blue 0.5 g) で染色して観察する。染色しないと、乳頭突起を有しないものでも存在するように観察されることがある (図-3)。

(5) 遊走子のう柄の観察

遊走子のうは遊走子のう柄上に形成される (菌糸上に形成されるのではない)。遊走子のう柄の分岐 sporangio-

phore branching の仕方が、外部増殖性 external proliferation (遊走子のうの基部付近から外側に遊走子のう柄が伸張する) か内部増殖性 internal proliferation (遊走子のうから遊走子のうが泳ぎだした後の遊走子のう内側の基部から遊走子のう柄が伸張する) であるかを観察する。

(6) 遊走子のうの脱落性 caducity の観察

遊走子のうが形成されている麻種子をスライドグラス上に滴下された水の中で軽く揺すり、検鏡する。遊走子のう柄から脱落したら遊走子のうに付いている柄 pedicel の長さを測定する。例えば、脱落性の特長を有する *P. cactorum* や *P. palmivora* の柄は5 μm 以下と短く、*P. nemorosa* では5~20 μm , *P. capsici* では31~99 μm の長さがある。

(7) 遊走子の形成、放出

(3) の顕鏡時に、成熟した遊走子のうから遊走子を放出するのがしばしば観察される (図-3)。観察されない場合、(3) の溶液中で形成させた遊走子のうを、ペトリ皿ごと冷蔵庫に1~12時間置き、室温に取り出すと遊走子が形成されることがある。

5 有性器官の形成法と測定

(1) 形成培地

V8A 培地を用いる。有性器官の形成が悪い場合には、これに β -シトステロール (少量のアセトンに、湯煎しながら溶かしたのち添加する)、チアミン塩酸塩、DL-トリプトファン等は必要に応じて添加し、高圧滅菌後に分注する (GUNNELL and WEBSTER, 1988)。ほかに、ニンジンジュース培地などがある (図-1)。

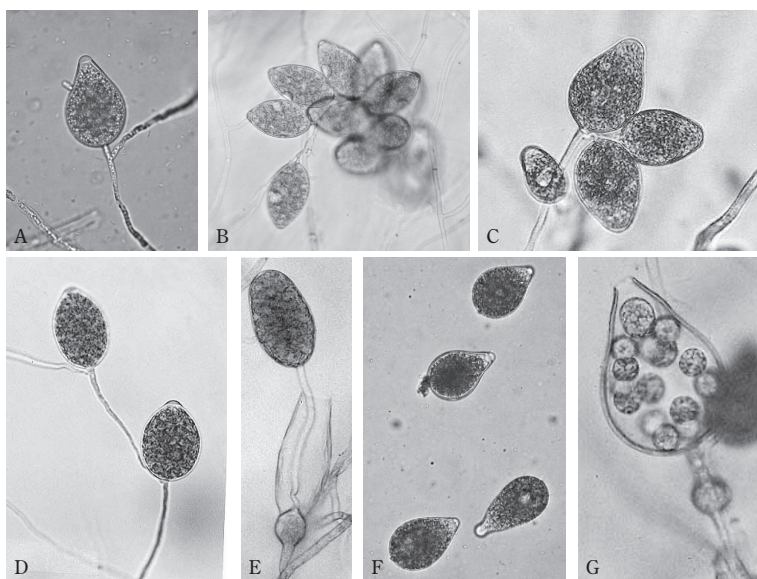


図-3 遊走子のうの形態

- A: 乳頭突起が顕著 (papillate).
 B: 遊走子のうが仮軸状に外部増殖性分岐し、乳頭突起を有する (semipapillate).
 C: 仮軸状に外部増殖性分岐し、遊走子は乳頭突起が認められない (nonpapillate).
 D: 仮軸状に外部増殖性分岐をし、遊走子の乳頭突起が若干認められる (semipapillate).
 E: 遊走子のうの柄が内部増殖性分岐し、乳頭突起が認められない (nonpapillate).
 F: 遊走子のうが脱索性を有する疫病菌 (papillate).
 G: 遊走子の分化、遊走子は遊走子のう内で分化し、先端部から放出される。

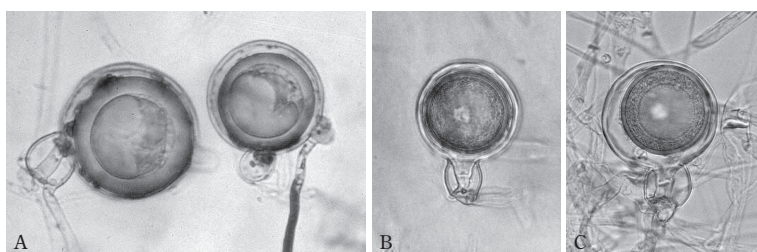


図-4 有性器官

- A: 造精器が底着 (左側)、側着 (左側) するものが認められる。卵胞子の壁が厚い。
 B: 造精器が造卵器に底着する (底着性)。卵胞子は壁がやや薄く、造卵器に充満して形成されている。
 C: 造精器は底着し、卵胞子は壁が厚く、造卵器に充満しないで (非充満) 形成されている。

(2) 同株性種 (homothallic 培地上で単独で有性器官を形成する種)

培地上に形成された造精器の縦横、造卵器の直径、卵胞子の直径、卵胞子の壁の厚さ等を測定する。また、造精器の形状や造卵器への付き方が底着性 amphigynous であるか、側着性 paragynous であるか、造卵器内の卵胞子が充満性 plerotic であるか、非充満性 applerotic であ

るかなども観察する。観察にはラクトフェノール・コトンプルー液で染色すると、卵胞子の壁が特に明瞭になる (図-4)。

(3) 異株性種 (heterothallic 培地上で単独で有性器官を形成しない種):

疫病菌には A1 および A2 と名付けられた交配型 mating type が存在し、対峙培養によって有性器官を形成さ

せる。V8A培地上で交配型A1またはA2の菌株と分離した菌株を3～5cm離して対峙させ、暗黒下で1～3週間培養する。異種間の交配でも卵胞子を形成する事例が多数ある。交配型A1およびA2の菌株はジーンバンクから入手する(図-4)。

(4) 培養条件

暗黒下で行うが、最適温度～高温条件では有性器官が形成しにくい。最適温度よりやや低温(2.5～10℃)で培養を行う。筆者の変わった経験では、キンセンカから分離された低温性菌は、15～20℃下で有性器官の形成が認められなかったため、異株性とした。たまたまV8A培養中の菌株を冷蔵庫に入れて置いたところ、1か月後に卵胞子の形成が認められ、同株性と訂正したことがある。

III 疫病菌の同定に参考となる文献

- 1) ERWIN, D. C. and O. K. RIBEIRO (1996): *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS Press, St. Paul, MN. USA. p. 562.
(疫病菌の同定を行う場合、参考書として最もよい。)
- 2) GALLEGLY, M. E. and C. X. HONG (2008): *Phytophthora: Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints*. APS Press, St. Paul, MN. USA. p. 158.
- 3) KANG, S. C. et al.: *Phytophthora DATABASE*.
<http://www.phytophthoradb.org/#>
(ペンシルベニア州立大学の SEOG CHAN KANG 教授が中心となり運営されている最近の基礎研究～病害防除の話題、文献、遺伝子情報等の *Phytophthora* 属菌に関する Global *Phytophthora* Network. *Phytophthora* と *Pythium* 属に関するワークショップ Third International *Phytophthora*, *Pythium* and related genera workshop (2008) の情報も入手できる。)
- 4) 桂 琦一 (1971): 植物の疫病 理論と実際, 誠文堂新光社, 東京, p. 128.
(絶版: 日本産疫病菌のモノグラフ。現在の同定には不適。)
- 5) RIBEIRO, O. K. (1978): *A Source Book of the Genus *Phytophthora**. J. Cramer, Vaduz, Liechtenstein, p. 417.
(絶版: 手法が多数記述されている。)
- 6) STAMPS, D. J. et al. (1990): *Mycol. Papers* **162**: 1～28.
(一覧表になっているが、わかりにくい。)
- 7) 鈴井孝仁 (1995): 作物病原菌研究技法の基礎—分離・培養・接種—。大畑寛一ら 編, 日本植物防疫協会, 東京, p. 284～288.
(分類上の基礎的な手技が解説されている。)
- 8) 植松清次 (2003): 植物防疫 **57**: 431～436.
- 9) 渡邊恒雄 (1998): 植物土壌病害の事典, 朝倉書店, 東京, p. 272.
(引用文献参照。土壌病原菌の分類・生態, 特に *Phytophthora*, *Pythium* および *Aphanomyces* 属菌に関する分類の考え方や生態が詳述されている。)
- 10) WATERHOUSE, G. M. (1963): *Mycol. Papers* **122**: 1～59.
(原著論文の原記載部分が原図とともに英文で翻訳されている。)

おわりに

温暖化などの地球環境の変化や物流の大量化とグローバル化により、新たな病害虫が拡がった事例は少なくない。最近、新たに報告されている疫病菌類の中にもそのように考えざるを得ない事例もある。欧米では今世紀に入り、*Phytophthora ramorum* や *P. kernoviae* 等による sudden oak death と呼ばれるカシ・ブナ林などの大量枯死が問題となっており、我が国でも 2011 年に侵入を警戒する病原菌に指定された。この大量枯死問題から、これまであまり調査されていなかった森林への疫病菌に関心が集まり、分子生物学的手法の進歩により、多くの疫病菌が発見され、報告のラッシュとなっている。一方、我が国では、かつて本属に関する分類学的基礎研究が盛んに行われたが、最近では非常に少なくなった。欧米で分子生物学的手法を取り入れた疫病菌および関連属菌の分類学的研究が盛んに行われている現状を考えると、本邦産疫病菌の収集、保存と、分類学検討が望まれるところである。

引用文献

- 1) ERWIN, D. C. and O. K. RIBEIRO (1996): *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS Press, St. Paul, MN. pp. 562.
- 2) BLAIR, J. E. et al. (2008): *Fungal Genet. Biol.* **45**: 266～277.
- 3) CHEN, D. and G. A. ZENTMYER (1970): *Mycologia* **62**: 397～402.
- 4) COOKE, D. E. L. et al. (2000): *Fungal Genetics and Biology* **30**: 17～32.
- 5) GUNNELL, P. S. and R. K. WEBSTER (1988): *Plant Disease* **72**: 909～910.
- 6) 景山幸二 (2013): 植物防疫 **67**: 517～520.
- 7) 桂 琦一 (1971): 植物の疫病 理論と実際, 誠文堂新光社, 東京, pp. 128.
- 8) Ko, W. H. (2003): *J. Gen. Plant Pathol.* **69**: 186～188.
- 9) MASAGO H. et al. (1977): *Phytopathology* **67**: 425～428.
- 10) PETRI, L. (1917): *Atti Regia Accademia dei Lincei* **26**: 297～299.
- 11) 鈴井孝仁 (1995): 作物病原菌研究技法の基礎。—分離・培養・接種—。大畑寛一ら 編, 日本植物防疫協会, 東京, pp. 342.
- 12) TSAO, P. H. and S. O. GUY (1977): *Phytopathology* **67**: 796～801.
- 13) 植松清次 (2003): 植物防疫 **57**: 431～436.
- 14) 渡邊恒雄 (1998): 植物土壌病害の事典, 朝倉書店, 東京, pp. 272.
- 15) WATANABE, T. (2002): *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi, Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species*, 2nd EDS. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 504.
- 16) WATERHOUSE, G. M. (1970): *Mycol. Press* **92**: 1～122.