

植物防疫基礎講座：土壤病害の見分け方(7)

疫病菌の簡易な分離・培養・形態形成法

千葉県農業総合研究センター暖地園芸研究所 うえ まつ せい じ 植 松 清 次

はじめに

Phytophthora 属は一般に「疫病菌」と呼ばれ、現在約 60 種で構成される農林業上重要な病原菌類である。本属による病害は数多く知られ、多犯性菌とされている *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 300 種近くの植物で 50 種（そのうち、合法名は約半数程度）以上の *Phytophthora* 属菌による病害が発生している（以後、疫病菌による病害を疫病と呼称する）。

我が国では疫病菌に関するモノグラフや総説があるものの（桂, 1976；鈴井, 1995；渡邊, 1998），疫病菌を分離・培養・同定・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、斜面培地で菌株を保存すると半年ぐらいで死滅してしまう場合があること、筆者のもとへ送付された菌株の中にも *Pythium* 属菌や *Mortierella* 属菌と思われるものがしばしば含まれていることなどがあり、現場の研究者にとっては分かりにくく、扱いにくい病原菌であるとして敬遠されているように思う。

そこで、本稿では、鈴井（1995）および渡邊（1998）の方法に基づいて、筆者らが用いている疫病菌の分離・培養法、簡易形態形成法や保存法について解説する。

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遊走子のうは腎臓から卵形で、体側に 2 本の鞭毛 two flagella をもつ。④細胞壁はセルロースとグルカンからなる。⑤造卵器（藏卵器）oogonium, 造精器（藏精器）antheridium を有し、造卵器は卵胞子 oospore を 1 個内包する。⑥厚壁（厚膜）胞子 chlamydospore や

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)

菌糸の膨潤（膨らみ）hyphal swellingなど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上で必須条件である（表-1）。

2 種の同定と形態による分類群

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), ②造精器の付き方 (側着性 paragynous, 底着性 amphigynous), ③有性器官の形成方法 (性的同質接合性 (雌雄同株性) homothallic, 性的異質接合性 (雌雄異株性) heterothallic) を基準にして、形態を異にする種群を 6 群に分けた。現在でもこの分類体系が採用されているが実際には中間的なものや基準に合わないものが多く、判断に困る場合が多い。

形態による種の同定は、ERWIN and RIBEIRO (1996) を参考にして行うのが最もよい（最近になり数種の新種が報告されている）。古い原著論文を必要とするときは WATERHOUSE (1970) が便利である。

なお、最近では疫病菌に関する分子系統学的研究も盛んに行われており、rDNA の ITS 領域などのシークエンスデータも公開されているので、本属菌の同定を行う

表-1 疫病菌の観察項目

菌 そ う	PDA, CMA, V 8 A 他での培養形状
菌 糸	幅, 結節, 膨潤, 位置, 連鎖性 厚壁胞子様の器官の形
遊走子のう	形, 位置, 乳頭突起の有無と形 発芽, 脱落性 caducity
調 遊走子のう柄	分岐の仕方 sporangiophore branching, extrernal or internal proliferation 脱落後の長さと幅
査 厚壁胞子	形成の有無, 形, 大きさ, 形成位置
項 遊走子, 被のう胞子	大きさ（種の同定には使用しない）
目 造卵器	形, 位置, 大きさ, 色, 表面構造, 突起の有無
造 精 器	形, 数, 位置, 大きさ, 形, 隔壁有無
受精様式	性的同質接合性, 性的異質接合性, 底着性, 側着性
卵 胞 子	形成の有無, 形, 大きさ, 充満性, 壁の厚さ, 油胞の数と大きさ
生育温度	生育温度域, 最適, 最高限界温度

上で強力な参考データとなる。

II 形態観察

1 分離・培養

原則として素寒天培地 (WA) を使用して分離培養を行う。腐敗が進んでいる場合などは適宜 MASAGO ら (1977) のBNPRA 培地, T SAO ら (1977) の選択培地を用いる。

(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。

(2) 病理標本の洗浄：新鮮な罹病部分の切片（長さ 0.5~1 cm）を 100 ml のビーカーに入れる。ビ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。アルコールや次亜塩素酸ナトリウムによる表面殺菌は普通行っていない。

(3) 置床：洗浄後，WA 培地上に置床する。分離が難しいようであれば，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，明所で培養すると，遊走子のうを WA 培地上に形成する場合が多い。

(4) 分離作業：置床数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ナイフなどを用いて実態顕微鏡下で単菌糸を寒天ごと切り取ることにより分離する。病原菌の簡易同定ではこれを菌株として使用する。遊走子のうを罹病部に形成する種の場合は，遊走子のうを WA 培地上に塗抹し，発芽後，同様に分離する。

実際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多数寄生していることが多いので，疫病菌が WA 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，分離できないことが多い（図-1）。また，同一圃場で発生した疫病でも複数の種がしばしば分離されることがあるので，WA 培地上に多数の切片を置床し，多数の菌株を分離してみるとよい。

根や地際部の罹病部からはしばしば *Pythium* 属菌などが分離される。例外もあるが，普通に分離される *Pythium* 属菌は，生育適温下では 1~4 日で 9 cm ペトリ皿中の WA 培地上を菌糸が覆い尽くすが，疫病菌では通常 5 日以上を要する。WA 培地上での菌糸の伸び方も違うので，少し慣れてくれば区別は容易である。

(5) 分離菌株の培養：V 8 ジュース寒天培地 (V 8 A) 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などでグループ分けして保存する。V 8 A の作り方は，まず V 8 ジュース 100~200 ml に， CaCO_3 2~3 g を入れ，軽く攪拌後，3,000~6,000 rpm で数分間必ず遠沈し，上澄み液を



図-1 罹病したラベンダー 3 株から WA 培地上で分離される疫病菌の分離率。一般に罹病組織からの疫病菌の分離率は比較的小ないが、疫病菌がいずれの罹病株からも分離される

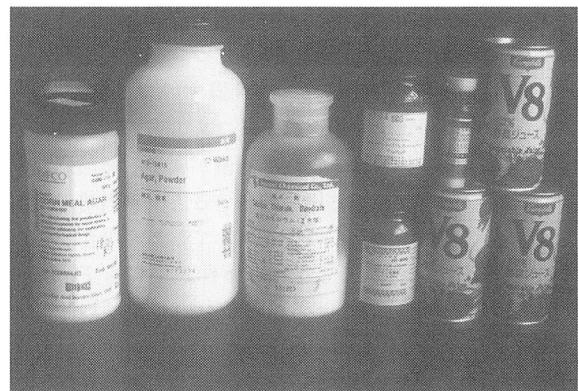


図-2 疫病菌の形態形成に用いる培地と試薬。左から CMA, 寒天, 塩化カルシウム, β -シットステロール, チアミン塩酸塩, DL-トリプトファン, V 8 ジュース

「水道水」で薄めて 1/1 にする（遠沈しないで培地を作ると，顕微鏡で観察しにくい）。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-2）。V 8 ジュースの入手が困難な場合は，代用品としてカゴメやデルモンテ社製などの野菜ジュースを用いる。

2 菌株保存

保存培地はトウモロコシ煎汁寒天培地 (CMA), PDA, リマ豆煎汁寒天培地 (LBA), 改変 WSH 培地などを用いる。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ぐらいで死滅することが多い。菌株が死なないうちに，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°C の部屋で保存する (WATANABE, 2002)。*P. syringae* など低温を好む疫病菌

は25°C以上の温度下に放置すると簡単に死滅するので注意を要する。

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ら(1977)のBNPRA培地上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見えるように、オートミールやV8ジュースなどの濁ったプロスは用いない。CMプロスは「ニワトリの餌」で作成する(小鳥屋では1kg程度に小分けして販売されている)。これを1年に1回分注する。筆者はこの方法で10年以上培養を続けている。

3 菌そう、菌糸幅、厚壁胞子および菌糸の膨潤の観察

PDAとV8Aで15°C、20°Cおよび25°C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(図-3)。

菌糸幅はPDAやV8A上で培養した主軸菌糸の太さを測定する。厚壁胞子を培地上で形成する種としない種が存在する(図-4)。培地上で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°C下に置いて観察を行う(図-5)。また、菌糸の膨潤も、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、厚膜胞子の場合と同様に、最適発育温度の±10°Cの3段階の温度下に置いてみる。

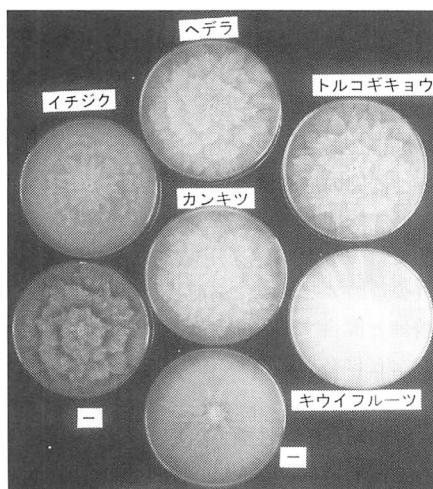


図-3 分離源が異なる *Phytophthora citrophthora* 菌株の PDA 培地上での菌そうの差

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として、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、形成用の基質としてアルファルファの茎、グリーンピースなどがある。ここでは、筆者らが用いている、麻の種子と雨水による方法を紹介する。

(1) 形成溶液

地表面では土壤の跳ね上がりがあるので必ず「屋上」で雨水をカナダライ等の容器に受けて採取する。キムワイプかティッシュでろ過し、高圧滅菌しないで冷蔵庫で保存する。

(2) 基質

小鳥屋で販売している小袋詰め「麻の実(種子)」を用いる。麻種子の利用法としては、①20分ぐらい煮沸して種皮が割れたら、種皮を取り除いて使用する。②種皮ごと半分に切り、オートクレーブをかけて滅菌して使用する。③後の観察がしづらいが、そのまま高圧滅菌したものを使用する方法などがあるが、必要に応じて使い分ける。

(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、培地上でそのまま計測する。また、培地上で遊走子のうを形成しにくい菌株では、培養菌そう上に麻種子を置き、1~4日

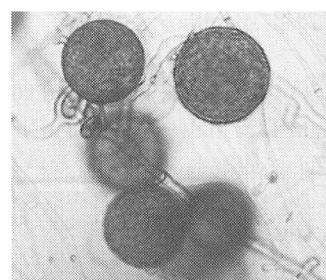


図-4 厚壁胞子

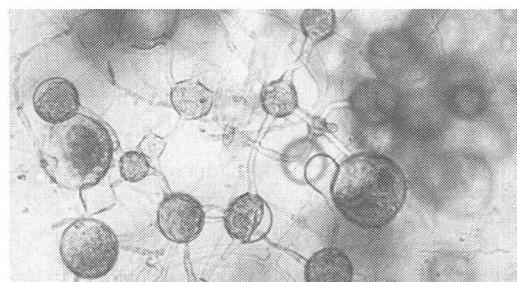


図-5 菌糸の膨潤

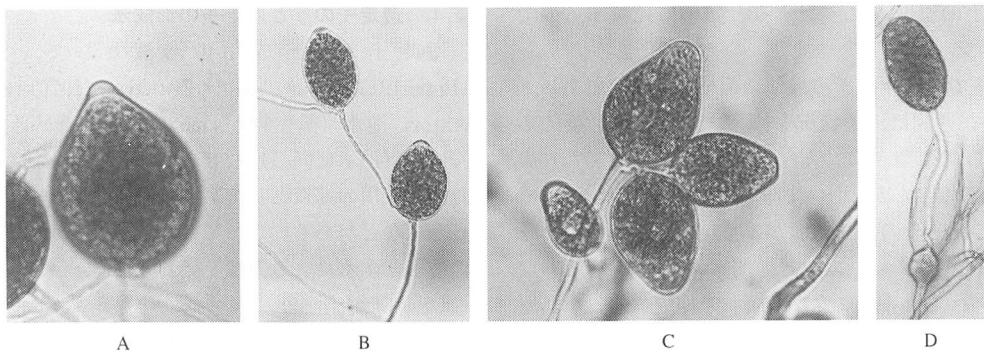


図-6 遊走子のうの形態。A:乳頭突起が顕著 (papillate), B:遊走子のう柄が仮軸状に外部増殖性分岐し、遊走子の乳頭突起が若干認められる (semipapillate), C:同様に分岐し、遊走子は乳頭突起が認められない (nonpapillate), D:遊走子のう柄が内部増殖性分岐している

間培養後、9 cm ペトリ皿に1~3個の培養麻種子を移して、雨水を種子が水没する程度にまで入れる。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。遊走子のうが形成されたらその長さと幅を測定する。遊走子のうが形成されない場合、毎日水の取り替えを行なうか、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0.22~0.45 μm のフィルターでろ過する。こうした方法で遊走子のうを形成させると、比較的揃ったものが観察できる。菌そうをほぐして用いる小菌糸塊による遊走子のう形成法では(鈴井, 1995), 時間が経つにつれ、しだいに小さくなってくるので、初めに形成された遊走子のうを観察する。

(4) 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ので、注意を要する(図-6)。

(5) 遊走子のう柄の観察

遊走子のう柄の分岐 sporangiophore branching の仕方が、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外部増殖性 external proliferation か遊走子のうから遊走子のうが泳ぎだした後に遊走子のう内側基部から遊走子のう柄が伸張する内部増殖性 internal proliferation 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。脱落する場合には遊走子のうに付いている柄 pedicel の長さを測定する。例えば、脱落性の特徴を有する *P. cactorum*

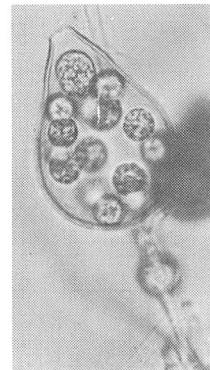


図-7 遊走子は遊走子のう内で分化し、先端から放出される

や *P. palmivora* の柄は5 μm 以下と短く、*P. capsici* では10~200 μm の長さがある。

(7) 遊走子の形成、放出

顯微鏡下で成熟した遊走子のうから遊走子が放出されるのがしばしば観察される(図-7)。観察されない場合、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場合がある。

4 有性器官の形成法と測定

(1) 形成培地

基本的にはV8A培地を用いる。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後、分注前に培地と混合する), チアミン塩酸塩, DL-トリプトファンなどは必要に応じて添加する(図-2, PALMELA and WEBSTER, 1988)。

(2) 性的同質接合性種 (培地上で有性器官を形成する種) における観察

培地上で有性器官を形成するもの (homothallic) の観察は培地上に形成された有性器官の造卵器の直径、造

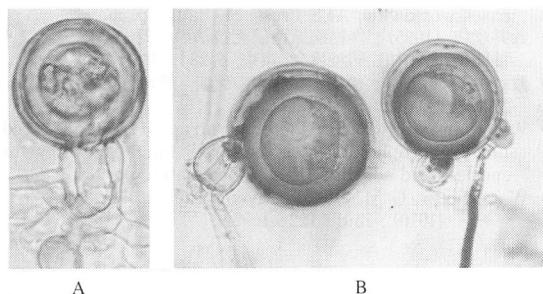


図-8 有性器官。A：造精器が造卵器に底着する（底着性）。卵胞子は、壁が厚く、造卵器に充満して形成されている。B：造精器の底着性（左側）と側着性（左側）が認められる種もある

精器の縦横、卵胞子の直径、卵胞子の壁の厚さなどを測定する（図-8）。観察にはラクトフェノール・コットンブルーで染色すると、卵胞子の壁が特に明瞭になる。

（3）性的異質接合性種（培地上で有性器官を形成しない種）における観察

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。V8 A 培地上で交配型 A1 または A2 の菌株と分離した菌株を 3~5 cm 離して対峙させ、最適温度よりやや低温（2.5~10°Cほど）、暗黒下で 1~3 週間培養する。ただし、異種間の交配型でも卵胞子を形成することがあるので、注意を要する。数種の疫病菌の交配型 A1 および A2 の菌株がジーンバンクに保存されているので、これらを利用する。

III 疫病菌についての主な参考文献

- 1) ERWIN, D. C. and O. K. RIBEIRO (1996). (引用文献参照。疫病菌の同定を行う場合、参考書として最もよい)
- 2) RIBEIRO, O. K. (1978) : A source book of the genus *Phytophthora*, J. Cramer, Hirschberg, pp. 417. (手法が多数記述されている)
- 3) STAMPS, D. J. et al. (1990) : Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. Mycological Papers **162**: 1~28. (一覧表になっているが、分かりにくい)
- 4) WATERHOUSE, G. M. (1963) : Key to the species of *Phytophthora* De Bary. (引用文献参照。基本となる検索表であるが、理解しにくい)
- 5) ——— (1970) : The genus *Phytophthora* De Bary. Diagnoses (or descriptions) and figures from the original papers 2nd ed. (引用文献参照。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)

- 6) 渡邊恒雄 (1998). (引用文献参照。土壤病原菌の分類・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)
- 7) 鈴井孝仁 (1995). (引用文献参照。分類上の基礎的な手技が解説されている)
- 8) 桂 埼一 (1976). 植物の疫病、誠文堂新光社, pp. 128. (日本産疫病菌のモノグラフ。同定には不適)

おわりに

疫病菌の所属について付記すると、今までこのグループは菌類界 Fungi—真菌門 Eumycota—鞭毛菌亜門 Mastigomycotina—卵菌綱 Oomycetes—フハイカビ科 Pythiaceae に所属していた。ところが、Cavarilier-Smith (1981; 1987; 1989) は、管状マスチゴネマ mastigonemes または tripartite tubular hairs と呼ばれる小毛を鞭毛表面にもつ羽形鞭毛胞子（遊走子）zoospore with tinsel flagellum を形成する生物群（藻類、菌類、原生動物要素の生物）に対してクロミスタ界 Kingdom Chromista を創設し、この中の 1 門 (Heterokonta) に菌類要素の卵菌類 Oomycota とサカゲツボカビ類 Hyphochytridomycota およびラビランツラ類 Labryinthulamycota を移すという大きな分類学上の変更を行った。クロミスタ界の代わりにほぼ同じ概念のストラメノパイル界 Stramenopila (または Straminipila) が用いられることもある [詳しくは、原生生物図鑑 (原生生物情報サーバ) <http://protist.i.hosei.ac.jp/taxonomy/menu.html>、または、藻類画像データ (筑波大学生物学系植物系統分類研究室) http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~inouye/ino/phycological_images.html のホームページを参照のこと]。その結果、疫病菌は Chromista—Heterokonta—卵菌亜門 Oomycota—フハイカビ目 Pythiales—フハイカビ科 Pythiaceae に所属している。

温暖化などの地球環境の変化により、新たな病害が拡がるおそれもあり、疫病もその一つと考えられる。しかし、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。先進国で分子遺伝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再検討が盛んに行われている現状を考えると、本邦産疫病菌についても検討が望まれるところである。新たに疫病に取り組もうとする研究者に本稿が役立てば幸いである。

なお、本論で用いた用語は菌学用語集（日本菌学会編、1996）および応用植物病理学用語集（日本植物病理学会編、1990）を参考にしたが、卵菌類に属すミズカビ類や疫病菌、べと病菌、*Pythium* 属菌、*Albugo* 属菌などで用語の統一を図る必要がある。

引用文献

- 1) ERWIN, D. C. and O. K. RIBEIRO (1996) : *Phytophthora* dis-

- eases worldwide, APS Press, St. Paul, pp. 562.
 2) 鈴井孝仁 (1995) : 作物病原菌研究技法の基礎一分離・培養・接種一, 日本植物防疫協会, 東京, p. 284~288.
 3) 渡邊恒雄 (1998) : 植物土壤病害の辞典, 朝倉書店, 東京, pp. 272.
 4) WATANABE, T. (2002) : Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species, 2nd ed, CRC Press, Boca Raton, pp. 486.
 5) WATERHOUSE, G. M. (1963) : Mycol. Papers 92: 1~22.
 6) ———— (1970) : ibid 122: 1~59.

発行図書

作物病原菌研究技法の基礎

一分離・培養・接種一

大畠 貢一 他編 B5判 本文 342 頁
 定価 8,360 円税込み (本体 7,962 円) 送料 340 円

植物病理学の実験では病気の生態を熟知し、対象となる病気を思うように発病させることが重要です。本書は病原菌の分離・培養・保存・接種・発病調査法および薬剤の効果検定法を、第一線で活躍されている方々に執筆していただいた実験の手引書です。

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

発行図書

応用植物病理学用語集

濱屋悦次 編著 B6判 本文 506 頁
 定価 4,983 円税込み (本体 4,660 円) 送料 340 円

植物病理学研究に必要な用語について、植物病理学はもちろん、農薬、防除、生化学、分子生物学などについても取り上げ(約 6,800 語)、紛らわしい用語には簡単な説明を付けそれを英和、和英に分けてアルファベット順に掲載し、また、付録には植物のウイルス、細菌、線虫の分類表を付した用語集です。植物病理学を学ばれる方はもちろん、広く植物防疫の関係者にご活用いただきたい用語集です。

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

発行図書

日本植物病名目録(初版)

日本植物病理学会 編 B5判 本文 734 頁+索引約 124 頁
 定価 11,550 円税込み (本体 11,000 円) 送料サービス

1960 年から発行された日本有用植物病名目録：第 1 卷(食用作物・特用作物・牧草・芝草)，第 2 卷(野菜および草花)，第 3 卷(果樹)，第 4 卷(針葉樹，竹籠)，第 5 卷の広葉樹(林木・観賞樹木)までの全 5 卷に新規に「きのこ」を追加して一冊に纏めた見やすい大植物病名目録です。掲載内容は、食用作物、特用作物、牧草及び芝草、野草、野菜、きのこ、草花、果樹、針葉樹、竹籠、広葉樹、索引(宿主和名、宿主学名、病原学名、病原和名、ウイルス・ウイルロイドの種名・略号・和名・科名および属名一覧表)。

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