

植物防疫基礎講座：

新病害究明の手順とキーテクニック・小道具類

農業生物資源研究所 ジーンバンク 佐 藤 豊 三

はじめに

近年、様々な有用植物が多様な栽培法により経済生産に組み込まれることに伴い、新たな病害の発生が増加している（「おわりに」参照）。それらの病害が新規導入作物の主要な生産阻害要因となることも多く、適切かつ迅速に防除するためには、いち早く病原を明らかにし既知病害との異同を確かめることが欠かせない。対象病害が未報告であれば少なくとも国内初発生病害であり、学会発表や論文投稿により公表する必要がある。植物病原の7～8割は菌類が占めており（日本植物病理学会，2000；2007），実際に一昨年茨城県農業総合センター園芸研究所が依頼を受けた病害診断の内、半数以上は菌類が病原と診断されている（富田恭範氏，私信）。菌類病は病原が多様多様なうえ、発病部位や病徴も多岐にわたっており、環境条件により発生様態も変わるため診断には熟練を要するが、生産現場では人手不足なども相まって若い担当者への診断技術・新病害究明法の継承が途切れがちとなっている。そこで本稿では、2000年4月開催の「第1回植物病原菌類談話会」で紹介した、新病害究明の手順と主要な技法および小道具類について筆者の経験を基に解説し、現場で未知の菌類病と格闘しておられる方々の一助としたい。

I 現地調査

生産現場から持ち込まれた罹病植物体や発病苗などの病徴および標徴（罹病植物体上に形成された病原体）を観察しただけで、病原がわかり病名が診断できることもあるが、時間が許す限り現地に赴き、発生の経緯と被害程度を把握し原病徴を記録するとともに、発生初期・中期・末期の各被害サンプルを採集する。サンプルは外部に診断を依頼することも想定し、多めに採取する。このとき必ず20～40倍のハンドルーペ（図-1）とデジタルカメラをもっていく。ルーペで病患部を観察し、標徴の確認された部分を採集する。カメラは必ずしも一眼レフの高級機である必要はなく、現地調査では接写機能付

きの小型・軽量機種が重宝である。病徴以外にも発病品種のラベルや発生環境など、メモ代わりに何でも撮っておく。採集したサンプルをすぐに実験室に持ち帰る場合は、大きめのポリエチレン袋に入れ密閉せずに運べばよいが、送付する場合は紙袋や紙封筒に入れ、さらに通気性の良い穴あき段ボール箱などに入れて冷蔵宅配便を利用する。

II 実験室での被害サンプルの調査、標本作成

1 罹病植物の接写

実験室に持ち帰った罹病植物を、三脚や接写台を用いて撮影する。このとき、被写体を載せた無反射ガラスの下に青色ペーパーホルダーを2枚重ね、市販のライトボックス上に置き点灯して撮影すると無影撮影ができる（図-2）。

2 病患部の解剖・切片作成、顕微鏡観察

実体顕微鏡の下で病患部をよく観察し、必要に応じて

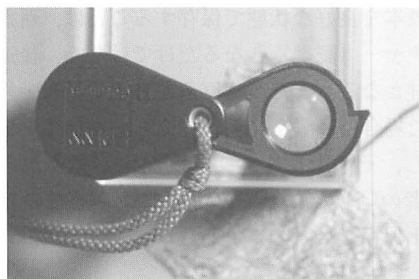


図-1 40倍ハンドルーペ



図-2 接写セット

Procedures, Key-Techniques and Tools for Researches on New Plant Diseases Caused by Fungi. By Toyozo SATO

(キーワード：新病害，菌類病，実験法，診断，同定)

メスや針で解剖しながら標徴の有無を調べる。標徴が見つからない場合、病患部の薄切片を光学顕微鏡で観察し、組織内または表皮上に菌糸や胞子などが確認されたらIV章(2)に示す組織分離を行う。

標徴がある場合は、それがわずかに露出する程度にろ紙を被せて押さえ、実体顕微鏡下で厚みを調節しながら片刃剃刀を用いて薄切する。十分に薄くかつ菌体を含む切片のみをプレパラートにし、光学顕微鏡により観察する。胞子とその形成器官などを観察・記録し、各器官のサイズを測定する。顕微鏡にカメラが装備されていれば、典型的な形態を撮影する。

III章で述べるように、検出された菌と被害植物の組み合わせから初発生病害と予想された場合は、さらに詳細な調査を続けるためにIV章(1)の直接分離を行う。

3 乾燥標本作成・保存

典型的な病徴・標徴を示す葉・茎・枝・根等は、丁寧に広げて古新聞紙に挟み荷重を掛け、紙を毎日交換し乾燥さく葉標本にする。果実などさく葉標本になりにくいものは、標徴形成部を薄くそいで、平らに広げ茎葉と同様に乾かす。十分乾いた標本は、採集データをメモした均一サイズの中性紙製標本ポケットに収め(佐藤ら, 1983)、これを複数まとめて市販の透明ラミネートフィルム袋(商品名:飛竜)に入れ、防虫剤とともにバキュームシラー(サランラップ販売(株):SQ-202)で密封する(図-3)。

乾燥標本を良好な状態で保存することは、新病害公表のバウチャー(証拠)となるだけでなく、後進指導の良い教材となる。また、病原菌が日本新産属・種や新種であった場合は、論文発表に先立ち必ず標本を公的機関に寄託し、その所在を論文に明記する必要がある。なお、筆者の経験では、この方法により通常の実験室で20年以上保存した標本でも作製当時の状態を保っている。

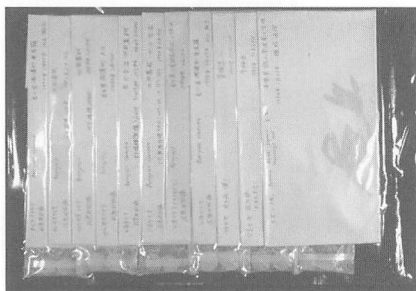


図-3 標本保存バック

III 病徴と病原菌の属による診断と初発生病害

記録した病徴・標徴を岸(1998)などの記述と比較し、既知の病害か否か判別し診断する。また、検出した菌の形態を小林ら(1992)などの図説と比較することにより属を同定し、診断結果の正否を判断する。日本植物病名目録(2000)および同日録追録(2007, 日本植物病理学会ホームページ参照)に同定した菌と宿主植物の組み合わせが掲載されていないければ、初発生病害の可能性が高いので以下の調査を進める。

IV 病原菌の分離

以下の操作のうち、分離平板の作製以外はクリーンベンチ内で行う必要はなく、閉め切った部屋の70%エタノールでぬぐった実験台上で行えばまず雑菌は混入しない。

(1) 直接分離

実体顕微鏡下で罹病植物体上に胞子塊や胞子角などが観察される場合は、それらを直接単胞子分離に用いる。胞子形成が見られない場合は、吸水ろ紙を敷いたシャーレに罹病部を入れ、近紫外線照射下または窓際で室温に1~数日間保ち、子実体や胞子の形成を促す(図-4)。罹病植物体が大きければ、濡れティッシュとともにポリエチレン袋に入れて密封する。

胞子が形成されたら、実体顕微鏡下で以下の単胞子分離を行う。PDAなどの寒天培地をシャーレに流して固化させる。金属製柄付き針の基端を火炎滅菌して滅菌水中で十分に冷やし、基端に付着した水滴をシャーレのふたの内側数箇所に移す。胞子が親水性(wet spore)で粘塊や胞子角である場合は、その針ですくい取り上記の水滴中に移す。胞子が疎水性(dry spore)で飛散しやすい場合は、寒天平板の隅から切り取った微小な寒天片を針の先端に付け、これに胞子を付着させ同じくシャーレのふたの水滴に寒天片ごと移す。次に水滴中の胞子を

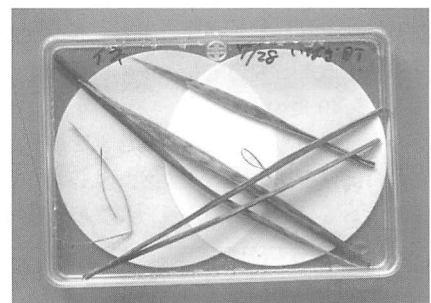


図-4 保湿中の罹病植物

同じ柄付き針の基端でかくはんし、孢子懸濁液の付いた基端で他の水滴を飛び石状に連続して触れることにより、孢子密度の異なる懸濁液を得る。肉眼で濁りが確認できない程度の孢子懸濁液に触れた柄の基端を、寒天平板上に垂直に立てて縦横に画線する(図-5)。この平板を室温に半日~数日間保った後、実体顕微鏡下で発芽した単独の孢子と発芽管を周囲の寒天ごとにかき取り、新しい培地に移す。雑菌混入などによるロスを見込んで、通常1分離平板につき5菌株以上分離する。

ここで用いる針は、日新 EM 製直径 0.2 mm または 0.3 mm タングステン線を可変抵抗器(小・中学校理科実験用、交流 10 V)に繋ぎ、通電しながら電解液(NaOH: 50 g, NaNO₂: 150 g, 蒸留水: 900 ml)に数分間漬けて電解研磨したもの(椿ら, 1998)で、基端が丸く滑らかな金属製の柄にしっかり挟む(図-6)。また、栄研器材製滅菌 MM シャーレ(直径 5 cm)とそれが7枚入る滅菌 300 ml 検査用コップは、分離などに好適である。

(2) 組織分離

30%乳酸を直径 9 cm シャーレに3滴加えて、PDAなどの富栄養培地または素寒天などの貧栄養培地を流し込み、静かにゆすってから固化させる。病患部と健全部の境界組織を数~5 mm 四方の小片に切り出し、70%エタノールに約 10 秒間、次いで 1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に 30 秒~1 分間浸漬した後、水洗せずに上記の両酸性培地に2~4片置く。この分離平板を近紫外線照射下または窓際で室温に数~7日間保ち、分離源から菌糸が伸びてきたら、実体顕微鏡下でタングステン針を用い先端部の単菌糸を周囲の寒天ごと切り取り、新しい培地

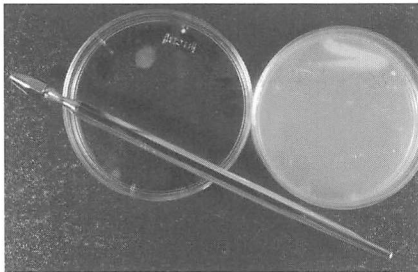


図-5 単孢子分離平板

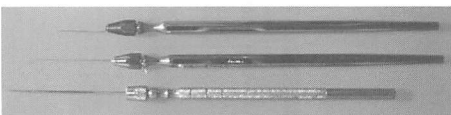


図-6 菌株分離用柄付き針(中・上:電解研磨タングステン針)

に移す。

細菌を含む雑菌が病原菌とともに生育することも多く、また、特に卵菌類は切り出した菌糸が短いと死滅しやすいので、異なる菌叢から5菌株以上を分離する。なお、培地上の分離片近辺で孢子などが形成されたときは、プレパラートを作成して観察するとともにIV章(1)の直接分離を行う。

V 病原菌の種同定

少なくとも属まで、できれば種まで接種試験以前に同定し、初発生病害であるか確認することが望ましい。

(1) 培地上の形態形成、形態・生育の調査

II章2節の罹病植物上の病原菌の形態観察・測定データに加えて、培地上の病原菌の形態形成や形態・生育を調べることにより、種同定の決め手を得る。分生子殻や分生子層等の器を形成しない不完全糸状菌類は、スライドカルチャー(竹内, 1986)により分生子形成様式(分生子形成細胞と分生子の発達過程)を観察する。培地上で子のう殻などの有性器官や分生子殻などの無性器官を形成させるために、貧栄養培地に滅菌した麦わらやアジサイ葉などの植物基質あるいはろ紙片を加え、近紫外線照射下または窓際で培養する(岸, 1995; FURUKAWA and KISHI, 2002; 図-7)。

分離菌株の低温・高温での生育や適温での生育速度は、同定の参考になるほか接種試験の温度設定に利用できる。PDAなどの平板培地に対象菌株を移植し、暗黒・室温下で培養して菌叢が平板全面をほぼ覆ったら、プロピレンオキサライドで滅菌した直径約 6 mm のプラスチックストロー(図-8)により菌叢を寒天ごと打ち抜く。得られた菌叢ディスクを新たな平板培地の中央に移し、5~40℃の範囲で5℃おきに温度設定した恒温器に入れる。各温度区3枚以上の平板培地で培養する。平板が多い場合はチャック付きポリ袋ユニ



図-7 SNA +ろ紙培地上で形成された子のう殻

パック H4 にまとめて入れるとよい。生育適温で菌叢が直径約 8 cm に達したら、全温度区の菌叢直径を電子ノギスで測定し (図-9)、生育温度範囲と適温を調べ適温での生育速度を算出する。

(2) 属の確認と種の絞り込み

III 章で線画の多い文献 (小林ら, 1992; BARNET and HUNTER, 1998) との形態比較により目星をつけた属の正否を, V 章(1)で得られた形態的特徴などを基に判断する。宿主植物と病原菌の組み合わせから既知の病害と判明した場合は, 岸 (1998) などに掲載された該当病害の病原菌の記載と比較して種を特定する。一方, III 章で述べたように初発病害と推定した場合は, 当該属の主な種が網羅された文献 (モノグラフ) を ROSSMAN et al. (1987) で調べ, コピーを取り寄せて検索表などにより該当種を絞り込む。候補種の記載と III 章・V 章(1)の観察結果を比較し, 特徴や大きさなどに差がなければ同種と判断する。一致する種が見当たらない場合は, 属名をキーワードにして CAB や BIOSIS などの文献データベースを検索し, 調べたモノグラフの出版後に新たな種が公表されていればコピーを取り寄せて比較検討する。対象種がそれらと一致しない場合やモノグラフ以降に新たな種が公表されていなければ, 新種と判断する。な

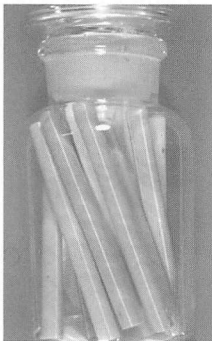


図-8 菌叢打ち抜き用ストロー



図-9 電子ノギス

お, 目星を付けた種の文献が入手できない場合や近縁属・種を含めた分子系統解析などにより新種の確証を得るときには, 農業生物資源研究所ジーンバンク (<http://www.gene.affrc.go.jp/micro/about.html>) などの菌株保存機関が配布する関連菌株, あるいは微生物インベントリーセンター (<http://cse.niaes.affrc.go.jp/seya/index.html>) などから借用できる同定済み標本との比較を推奨する。

VI 病原菌分離株の長期保存

分離菌株の病原性や形態形成能を保持するために, 以下の方法で長期保存を行う。

(1) スラントの低温保存

改変 WSH 培地 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O : 1g$, $KH_2PO_4 : 1g$, $NaNO_3 : 1g$, クエーカーオートミール : 10g (コーヒーミルで粉碎し, 28 メッシュふるいを通したもの), 水道水 : 1l, 寒天 : 20g) でスラントを作製し, 菌株を移植・培養した後ダブルゴム栓で密封し 5℃ 冷蔵庫で保存する (図-10)。

(2) 菌体凍結保存

平板培地上に生育した菌叢を滅菌ストローで打ち抜き, 10%グリセリンとともに凍結チューブに入れ, 5℃で2日間予冷後, -40 ~ -80℃で凍結保存する。(1)のスラント培養に10%スキムミルク+1.5%グルタミン酸 Na を加えて, 同様に凍結することもできる。復活培養は 40 ~ 50℃温湯中にチューブを約1分間漬けて, 急速解凍し移植する。

VII 原病徴の再現

各病原菌に適した接種法の詳細は, 大畑ら (1995) を参照されたい。なお, 必ず対照無接種区を設けるとともに, 接種菌の再分離を行い接種植物の病変が接種菌によるものであることを裏付ける。

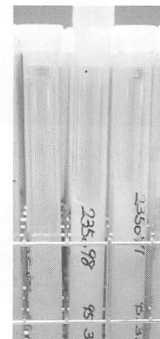


図-10 ダブルゴム栓

VIII 新病名の提案

日本植物病名目録(2000)とその追録(2007)に対象植物が未掲載の場合、あるいは掲載されているが病原菌が日本新産属・種であるとき、およびその植物と病原菌の組み合わせが未掲載であれば、少なくとも初発生病害となる。また、病原菌と植物との組み合わせが国内外ともに未報告の場合、さらに病原菌が新種であれば新病害と判断される。これらいずれの場合も同一植物(群)で類似病害がほかに知られていなければ、学会発表や論文により新たな病名(新称)を提案することができる。このとき供試した菌株・標本は、誰でも利用できるような原則として公的菌株・標本保存機関に寄託する。新病名、病原追加、病原学名変更など提案の指針や病名委員会への申請手続きは、上記学会ホームページに掲載されている。

おわりに

日本植物病名目録(2000)には、1890年代から1998年10月末までに採録された約12,500病名(付録を含む)が掲載されている。その後編纂された追録最新版(2007)では約2,300病名が公開されており、未採録の新病名を1割弱と見積ると、この10年間では年平均250もの新病名が公表されたことになる。2000年版目録と追録との比較から、最近10年間の新病名採録数が倍増していることが容易に読み取れる。追録でも菌類病の比率は依然として高く、生産現場での遭遇頻度も群を抜いている。このような背景と冒頭で述べた現場からの要

請を受けて、2005年日本植物病理学会主催の「教育プログラム」で一般会員を対象とした病害の診断・同定に関する研修・教育が実施された。また一昨年、東京大学に「植物医科学講座」が新設され、次いで昨年「植物病害診断研究会」が上記学会の公認のもとで発足した。これらの新たな取り組みを活用して、非伝染性障害と病害との判別法や、菌類病と細菌病などとの見分け方も習得し、初発生菌類病を積極的に究明し公表していただきたい。この解説と植物病原菌類談話会の活動が、少しでもお役に立てれば幸いである。

引用文献

- 1) BARNET, H. L. and B. B. HUNTER (1998): Illustrated Genera of Imperfect Fungi 4th ed., APS Press, St. Paul, 218 pp.
- 2) FURUKAWA, T. and K. KISHI (2002): J. Phytopathology 150 : 625 ~ 628.
- 3) 岸 國平 (1995): 植物防疫 49 : 129 ~ 130.
- 4) ———編 (1998): 日本植物病害大事典, 全国農村教育協会, 東京, 1,276 pp.
- 5) 小林享夫ら編 (1992): 植物病原菌類図説, 全国農村教育協会, 東京, 685 pp. (改訂版印刷中)
- 6) 日本植物病理学会 (2000): 日本植物病名目録, 日本植物防疫協会, 東京, 857 pp.
- 7) ——— (2007): 日本植物病名目録追録, <http://www.ppsj.org/mokuroku.html>, 106 pp.
- 8) 大畑貫一ら編 (1995): 作物病原菌研究技法の基礎, 日本植物防疫協会, 東京, 342 pp.
- 9) ROSSMAN, A. Y. et al. (1987): A Literature Guide for the Identification of Plant Pathogenic Fungi, APS press, St. Paul, 252 pp.
- 10) 佐藤昭二ら編 (1983): 植物病理学実験法, 講談社, 東京, p. 7 ~ 10.
- 11) 竹内昭士郎 (1986): 日植病報 52 : 854 ~ 857.
- 12) 椿 啓介ら (1998): 不完全菌類図説, アイビーシー, 東京, p. 11.

発生予察情報・特殊報 (20.2.1 ~ 2.29)

各都道府県から発表された病害虫発生予察情報のうち、特殊報のみ紹介。発生作物：発生病害虫(発表都道府県)発表月日。都道府県名の後の「初」は当該都道府県で初発生の病害虫。

※詳しくは各県病害虫防除所のホームページまたはJPP-NET (<http://www.jpnn.ne.jp/>)でご確認下さい。

- メロン, キュウリ:メロン退緑黄化病(仮称), キュウリ退緑黄化病(仮称)(熊本県) 2/4
- メロン, キュウリ:メロン退緑黄化病(仮称), キュウリ退緑黄化病(仮称)(大分県) 2/4
- キュウリ:キュウリ退緑黄化病(仮称)(佐賀県:初) 2/4
- メロン, キュウリ:メロン退緑黄化病(仮称), キュウリ退緑黄化病(仮称)(宮崎県:初) 2/4
- キュウリ:キュウリ黄化えそ病(奈良県:初) 2/4
- ニガウリ:Melon yellow spot virus (MYSV)(高知県:初) 2/8
- メロン, キュウリ:メロン退緑黄化病(仮称), キュウリ

- 退緑黄化病(仮称)(長崎県:初) 2/15
- バンジー, ピオラ:スミレ類根腐病(神奈川県:初) 2/19
- オクラ:アカホシカメムシ(鹿児島県:初) 2/15
- ピーマン:ナスコナカイガラムシ(鹿児島県:初) 2/15
- ダイズ(黒大豆):ダイズ子実汚斑病(京都府:初) 2/27
- 前作バレイシヨの土壌:ジャガイモシストセンチュウ(三重県:初) 2/28
- スイカ(トウガン台木):スイカ黒点根腐病(神奈川県:初) 2/28
- キュウリ:キュウリ退緑黄化病(仮称)(福岡県:初) 2/28