

植物防疫基礎講座：

罹病植物標本の作製・維持管理・利活用方法

筑波大学大学院生命環境科学研究科 ^{やま}山 ^{おか}岡 ^{ゆう}裕 ^{いち}一

はじめに

罹病植物標本は、その病気に典型的な病徴や標徴を保存することができるだけでなく、そのうえに形成された病原菌の胞子や胞子を形成する構造物をそのまま保存することができる。これらの構造は、病原菌の同定や分類のために重要なカギとなる。特に、培養ができない、あるいは培養困難なさび病菌やうどんこ病菌のような絶対寄生菌の分類・同定のためには、極めて重要な試料となる。また、黒穂病菌や分生子果不完全菌類(Coelomycetes)のように、培養は容易にできるものの、人工培地上ではその菌の分類・同定に必要な胞子や胞子形成のための構造を形成しない、あるいは重要な形質を失ってしまう菌にとっても、罹病植物の標本は極めて重要な試料である。これらの罹病植物標本は、植物標本というよりはむしろ植物寄生菌標本として取り扱うべきである。植物寄生菌を新種記載する際には、基準標本(タイプ標本)を選定しなければならないが、そのためにも乾燥標本が利用される。また近年では、乾燥標本から病原菌の核酸を抽出することができ、植物病原菌の同定や分類に利用されている。そのため、乾燥標本の価値が見直されてきた。

ここでは、罹病植物標本(植物寄生菌の標本)の作成方法、維持管理方法、利活用方法について、さび病菌に感染した植物を例として紹介する。さび病菌は、担子菌類サビキン目に属する植物寄生菌で、世界で7,000種以上存在すると言われている(KIRK et al., 2008)。栽培植物、森林樹木をはじめ、シダ植物以上の様々な植物に寄生する。一部の種で培養に成功しているものの、ほとんどの種は培養できない絶対寄生菌であるため、前述のとおり、罹病植物の乾燥標本作成は、分類・同定のためには必須の作業である。

I 標本の作製方法

1 試料の採集

さび病菌に感染した植物では、葉や茎に胞子堆を伴う

病斑が形成されたり、幹や枝にこぶやてんぐ巣が形成される。これらの罹病部を採集する際には、以下の点に注意する必要がある。①可能な限り新鮮な、菌寄生菌などにダメージを受けていない胞子堆を含めること。この段階で既にダメージを受けた胞子堆ばかりの試料だと、せっかく標本にしても、形態観察、核酸抽出に適した標本とならない可能性が高い。②2種類以上の胞子堆が形成されていないか確認しながら採集すること。1種のさび病菌がその生活環で、形態的、機能的に異なる最大で5または6種類の胞子世代(精子、さび胞子、夏胞子、冬胞子、担子胞子、両性胞子)を有するという性質がある。可能な限り新鮮な胞子堆を採集したほうがよいと書くと、緑色の葉に形成されたさび胞子堆や夏胞子堆に目が行くが、枯れかけた葉や古くなった病斑内に冬胞子堆が形成されていることもある。このような部分にも注目しながら採集するべきである。アナモルフとテレオモルフの両方を形成する可能性のある、他の病原菌の場合も同様である。③罹病部分の試料を多めに採集すること。自分が一度プレパラートを作り形態観察したり、DNA抽出に利用できればよいのではない。標本は後世まで保存し、必要に応じて繰り返し利用するものである。そのことも考え十分な量を採集する必要がある。④罹病部分のみでなく、植物の同定に必要なその他の部分(花など)も採集すること。宿主植物の正確な同定は、そのさび病菌の宿主範囲について正確な情報を提供するとともに、さび病菌の同定のためにも大変助けとなる。そのため、採集の際には、栽培植物など宿主植物の名前が確実な場合を除き、後で植物の正確な同定ができるようにその植物体をできるだけ大きく採集する必要がある。もし花があればその部分には菌が感染していなくても採集しておくほうがよい。また、罹病部が著しく奇形を起こしている場合も、必要に応じて健全部分を採集しておく。

採集した植物は紙袋やポリ袋に入れるかまたは新聞紙などに包み、野外から持ち帰る。異なるサンプルは必ず別の袋また包みに入れ、2種類以上のサンプルを混ぜてはならない。一緒の袋に複数のサンプルを入れると、胞子が混ざり、後で標本を使用する際にトラブルの原因になる。

枝や幹に形成されたこぶやてんぐ巣は、1年を通じて

Methods for Preparation, Preservation and Usage of Dry Specimens of Diseased Plants. By Yuichi YAMAOKA

(キーワード：植物寄生菌、乾燥標本、DNA抽出、さび病菌)

いつでも樹木上に見つけることができる。しかし、その上で胞子が形成されている期間は短く、採集はその胞子形成時期に合わせて行うことが望ましい。

2 試料の乾燥

持ち帰った植物は、1 サンプルごとに新聞紙に挟み、サンプルの入っていない新聞紙（吸湿紙として使用）と交互に重ねひとまとめにする（図-1 a～e）。温風乾燥機（40～50℃）が使用できる場合は、利用すると効率よく乾燥することができる。使用できない場合は、野冊あるいはそれに代わる通気性のよい板（例えば、焼き網、ハンガーネット、穴を開けたベニヤ板等）に挟んで保存すると効率よく乾燥することができる。それがない場合には新聞紙の上から重しをし、風通しのよいとこ

ろに置く。

乾燥を開始してから数日は、毎日吸湿紙の新聞紙を交換する必要がある。葉や茎がボキッと折れるくらいに乾燥すれば完成である。乾燥に時間がかかったり、生乾きの状態で密閉容器に移し保存するとかびが生えてしまい、せっかくの標本が台なしになってしまう。雨の日に採集した試料、多肉質の植物など水気の多い試料が含まれている場合には特に注意が必要である。

木質の枝や幹に形成されたこぶ、てんぐ巣、タケ類の桿に形成された胞子堆などの試料を乾燥させるには、温風乾燥機を使用するほうがよい。また、ウラジロモミのてんぐ巣病のように、胞子堆がてんぐ巣症状を示す枝についた針葉上に形成される場合、乾燥するとその罹病針

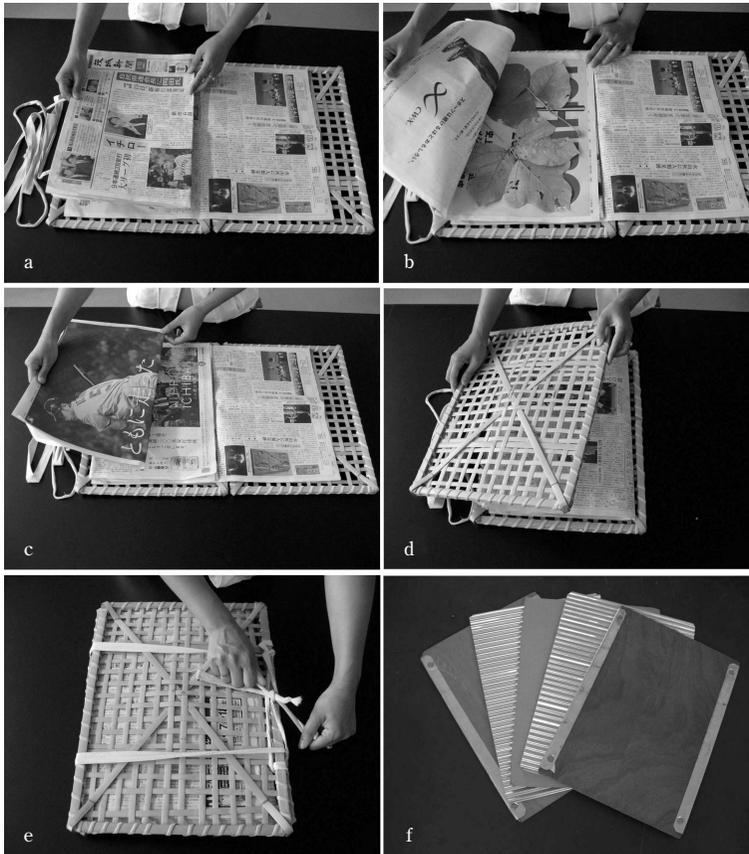


図-1 乾燥標本の作成法

(a)野冊の大きさに合わせ新聞紙を四つ折りにし、吸い取り紙にする。(b)その上に半分に切った新聞紙を置き、試料をひろげ新聞紙を二つに折り挟み込む。(c)その上に吸い取り紙を置く。(d)試料を挟んだ新聞紙と吸い取り紙を交互に重ねていく。(e)竹製の野冊で挟み、ひもで縛る。(f)温風乾燥機を使用する場合には吸い取り紙用の新聞紙の代わりに段ボール板とトタン波板を交互に使用すると試料を挟んだ新聞紙の間にも温風が流れ早く乾燥させることができる。

葉がすべて枝から脱落する。このような場合には、罹病針葉部分のみを別個に乾燥標本とする必要がある。

3 必要データの記録

乾燥が完了した試料は、宿主植物が確実に同定できて

いれば、標本として必要な部分を適切な大きさに切断あるいは折りたたみ標本ポケットに収納する(図-2)。宿主植物の同定は、小さく切断された植物体では困難な場合があるため、同定が完了するまでは切断しないようにしている。

標本ポケットに、標本として必要な以下の項目を記録する。一般的には必要事項を記入したラベルを貼ることが多い(図-3)。

必要記入事項：標本番号、菌の種名、(菌の孢子世代)、宿主の種名、(宿主和名)、採集地、採集日、採集者、同定者、同定日。採集地点をより厳密に記述するため、採集地の標高、標準地域メッシュの第3次メッシュコードやGPS (Global Positioning System) 情報を記録する場合もある。

II 標本維持管理方法

標本は、機密性の高い金属などの収納箱かまたはロッカーに、ナフタリンなどの防虫剤を入れて保存する(図-4)。長期に保存する場合には、それらの収納箱を標本保存専用の部屋(標本庫)で保存することが望ましい。標本は低温で大きな温度変化がなく、乾燥した条件で保存することが望ましい。少なくとも、高温多湿にならないよう注意する必要がある。標本を食べる害虫やかびが発生しないように、温度、湿度の制御、防虫剤の補給等、きちんとした管理をし、標本を保存しなければならない。

標本庫での標本配列方法には、大きく分けて2種類の方法がある。一つは標本番号順に配列する方法、もう一つは分類群ごとに配列する方法である。標本番号順に配

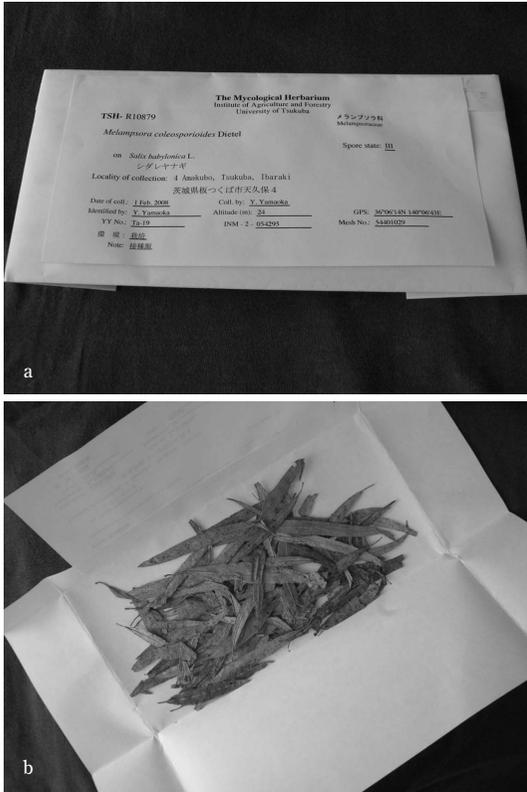


図-2 紙製の標本ポケット

The Mycological Herbarium Institute of Agriculture and Forestry University of Tsukuba			フラグミジウム科 Phragmidiaceae
TSH- R10907			Spore state: <u>II,III</u>
<i>Phragmidium montivagum</i> Arthur			
on <i>Rosa rugosa</i> Thunb. ハマナス			
Locality of collection: Botanical Garden, University of Tsukuba 1 Tennoudai, Tsukuba, Ibaraki 茨城県つくば市天王台1 筑波大学 植物見本園			
Date of coll.: <u>4 Nov. 2007</u>	Coll. by: <u>Y. Yamaoka</u>	GPS: <u>36°06'55N 140°06'04E</u>	
Identified by: <u>Y. Yamaoka</u>	Altitude (m): <u>29</u>	Mesh No.: <u>54401038</u>	
Note:			

図-3 標本ラベルの見本



図-4 標本ポケットを収納したロッカー（国立科学博物館の例）

列する方法では、後から種名の変更があっても標本を移動させる必要がなく、またスペースを有効に使うことができるなどの利点があるが、検索能力の優れたデータベースの併用が必須である。例えば、「A」という種の標本を取り出すためには、データベースで検索し、一つ一つ該当する番号の標本を取り出さなければならない。またもし、データベースに情報を入力する際にミスがあると、二度とその標本を拾い出すことができなくなるおそれがある。一方、分類群ごとに配列する方法では、「A」という種の標本は既にまとめて保存されているため、そのすべての標本を簡単に取り出すことができる。しかし、種名が変更されたときには、配列位置を変える必要があり、また、あらかじめ各菌群用にスペースを確保しなければならないため、より広いスペースが必要となる。取り扱う標本の量、分類群の範囲にあわせて方法を選ぶべきである。

標本庫から標本を効率よく取り出すためには、いずれにしても検索能力に優れたデータベースの構築が必要である。前章に述べた各標本に記入した基本情報を確実に入力しておく必要がある。また、入力するデータ項目はできるだけ分けたほうがよいと考えられている。例えば、菌の種名に関しても一つの項目としてすべてを入力するのではなく、属名、種小名、著者名、種内分類ランク、種内分類群名、種内分類著者名等に分けて入力するほうがよい。2001年に地球規模生物多様性情報機構（Global Biodiversity Information Facility (GBIF)）が設立され、加盟国が所有する自然史標本データを全世界的横断検索により利用することを目的とした国際科学プロジェクトが進められている。情報検索システムの構築に当たり、GBIFが推奨するデータ項目のセットがある

(http://gbif.ddbj.nig.ac.jp/gbif_search/darwincore.html)。個人的に標本管理を行う場合には、必ずしもこの方法に従う必要はないが、将来重要な標本（タイプ標本など）を博物館などの公共の標本保存施設に寄託する可能性を考えると、推奨されている方法を採用するほうが望ましい。

標本の中でも、特に種を記載するときの基準とした標本はタイプ標本と呼ばれ、分類学的に特に重要である。タイプ標本を研究者が個人的に保存管理することは、紛失や破損のおそれがあり大変危険である。そのような事態にならないよう博物館などの公共の標本保存施設に寄託し、確実に保管管理するとともに、その標本を必要に応じて他の研究者も利用できるような体制をとることが重要である。

III 標本利活用法

罹病植物標本の最大の利用価値は、罹病植物上に形成された胞子や胞子形成構造を長期間保存することができる点である。菌類の同定、分類のためには、これらの構造の形態観察は欠かすことができない。乾燥標本にしておく、多くの場合、生材料で観察できる構造と同様の形態をいつでも観察することができる。適切な方法で作成され、保存されてきた標本であれば、100年以上経過した標本でも全く問題なく利用することができる。タイプ標本を残しておくことも、ここに大きな意味がある。

研究で使用した試料を証拠標本として保存しておくことも重要である。異なる研究者が同じ生物種を使って研究をしているつもりでも、実は異なるという場合もある。研究成果に何らかの矛盾が生じたときに、研究に使用した試料が実は別種であったのではないかという疑いが出てきたときなど、乾燥標本として保存されていた証拠標本を確認することができれば、問題を解決することができる場合もある。乾燥標本が長期間にわたり利用価値の高いものであることを再認識したい。

近年、分子生物学的手法を用いた菌類の系統解析やその解析結果を利用した分類システムの再構築が盛んに行われている。核酸の抽出には通常培養菌株や、宿主植物上で形成された生きた胞子が使われる。しかし、適切な方法で作成され、保存されてきた乾燥標本からも核酸を抽出することが可能である。本研究グループでは、SUYAMA et al. (1996) がモミ属植物の花化石からのDNA抽出に使用した方法を一部修正して (VIRTUZZO et al., 2001) 使用している。抽出結果の一例を表-1に示した。作成して数年以内の標本からは問題なくDNAを抽出できたが、10年以上経過した標本、20年以上経過し

表-1 *Pucciniastrum* 属菌乾燥標本からの DNA 抽出結果の例

採集年	DNA 抽出に 使用した 標本数	DNA 抽出に 成功した 標本数 (%)	DNA 抽出に成功した標本数の内訳		
			ITS1-5.8S- ITS2 region	D1/D2 region	ITS region と D1/D2 region
1900 以前	1	0	0	0	0
1901 ~ 10	3	0	0	0	0
1911 ~ 20	0	0	0	0	0
1921 ~ 30	10	0	0	0	0
1931 ~ 40	10	0	0	0	0
1941 ~ 50	14	0	0	0	0
1951 ~ 60	58	1 (1.7)	0	1	0
1961 ~ 70	63	1 (1.6)	0	1	0
1971 ~ 80	31	2 (6.5)	2	2	2
1981 ~ 90	25	10 (40.0)	4	7	2
1991 ~ 2000	54	32 (59.3)	25	28	21
2001 以降	50	50 (100)	50	50	50
合 計	319	96 (30.1)	81	89	75

DNA 抽出は 2003 ~ 05 年に行った (梁, 未発表データ)。

た標本と保存年数が経つにつれ成功率が下がっていく傾向があった。しかしこの方法を用いて、80 年以上前あるいは 100 年以上前に採集された *Puccinia* 属菌夏胞子の標本から DNA を抽出し、rDNA の ITS 領域、5.8S rDNA や LSU rDNA の D1/D2 領域の解析を行うことができた例もある (VIRTUDAZO et al., 2001; POT, 未発表データ)。

おわりに

今回はさび病罹病植物を例として解説したが、その他の様々な病原菌による罹病植物の乾燥標本作成にも、この方法は利用できる。罹病植物標本の作成法について解説した本として、平塚 (1959)、佐藤ら (1983) がある。現在は入手困難であるが、機会があればごらんいただきたい。また、多汁質の試料を乾燥させる方法については、キノコ標本の作製法 (吹春ら, 2006) が大変参考になる。

適切な方法で作成され、ていねいに保存されてきた標本であれば、形態観察はもちろん、DNA 抽出にも利用できる。しかし、作成方法や保存方法が適切でなかった標本からは、正確な形態情報を得ることができず、ま

た、新しい標本であっても核酸の抽出は困難なようである。今後、標本の利用価値をますます高めていくためにも、適切な方法で標本を作製し、保存していくことが重要と考える。植物を含め様々な自然史標本の重要性、保存管理方法について、国立科学博物館編 (2003) の中で詳細に解説されている。参考にしていただきたい。

謝辞 (独)国立科学博物館植物研究部、細矢 剛氏には、菌類標本の管理、データベースの構築、運営に関して、貴重な情報提供をいただいた。また、筑波大学大学院生命環境科学研究科、梁 英梅博士、Ms. Siriporn POT には、乾燥標本からの核酸抽出に関して有益な情報提供をいただいた。心からお礼申し上げる。

引用文献

- 吹春俊光ら (2006): *Bio Industry* 23(12): 13 ~ 24.
- 平塚直秀 (1959): やさしい植物採集と標本, 地球出版社, 東京, 89 pp.
- KIRK, P. M. et al. (2008): *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*, CAB International, Oxfordshire, p. 577 ~ 580.
- 国立科学博物館編 (2003): 標本学 自然史標本の収集と管理, 東海大学出版会, 秦野市, 250 pp.
- 佐藤昭二ら (1983): 植物病理学実験法, 講談社サイエンティフィック, 東京, p. 2 ~ 10.
- SUYAMA, Y. et al. (1996): *Genes Genet. Syst.* 71: 145 ~ 149.
- VIRTUDAZO, E. V. et al. (2001): *J. Gen. Plant Pathol.* 67: 28 ~ 36.