

フィールド&ラボ～知って得する豆知識②～

現場に即応～病原菌採取のコツと裏技

名城大学 農学部 植物病理学研究室

荒川 征夫 (あらかわ まさお)

はじめに

病害による被害を最小限に抑えるため、より迅速で的確な原因特定と対処法決定が現場で求められる。消費者需要、気候条件、集約技術の発達など様々な要素が変動・多様化する中、これら栽培環境の変遷に呼応適応するかのように新病害の発生が、地域のみならず世界規模で相次いでいる。個人や法人単位で管理する生産現場で、これまでに見聞のない病害に直面した際、どのような手順で対処を決めているだろうか。植物病原菌を含む各種微生物を取り扱うための滅菌装置、クリーンベンチや培養器などが手元にないことが理由で、診断や病原体の同定が遅れてしまう例はないだろうか。公設の試験場や大学等の研究機関で、病害診断や病原菌同定の技術を演習・実用する際は、発病した植物試料の採取と運搬保管、病原体の分離培養や遺伝子検出に必要な設備機器や試薬類および文献資料等は完備され、理想的な条件と手順で(教科書通りに)とり行われる。一方このような機関に所属する立場であっても、普段の理想的な道具類を自由に使用できない環境で、現場に即応したかたちで診断や病原体の分離が必要となる場面は意外と多い。

筆者は近年、国内外で長距離移動しながら研究対象の病原菌を採取する機会が多く、滞在先のホテル室内や寝台列車内にて一度に最大100菌株程度の病原菌を純粋分離することがある。移動で航空機を使う場合や海外で調査する場合、安全規定や動物・植物検疫的な理由から、微生物の分離や培養に必要な多くの携行品に強い制限を受けることになる。このような状況で、慣れない土

地で試料採取地の情報を入手し、設備機器や試薬類が整わない環境で効率的な病原菌分離を行い、的確な病害診断を行うためのコツをいくつか工夫してきたので紹介したい。ただし本稿の趣旨は決して、先達により確立・蓄積されてきた手技手法の理論体系に対し、無駄の指摘や手抜き横着を推奨する内容でないことをご理解いただきたい。設備や試薬類が完全には整わない環境であっても、最低限の原理・理論を充たせば、病害診断や病原菌分離は工夫次第で可能になる場合があることを実例とともに紹介したい。

I 海外での病原菌採取の実例

筆者はイネで発生する紋枯病をおもな対象とし、アジアを中心に広く世界中に分布するこの病原菌の収集に取り組んでいる。遺伝子マーカーを用い分離菌のDNA型を判定し、国や地域間で集団遺伝学的に比較することで、病原菌の起源・伝来・分散様式等について解析を進めている (ARAKAWA and INAGAKI, 2014; 牧田ら, 2014)。国内で既に報告のある病害のみでなく、近隣諸国の栽培環境、病害発生状況や薬剤耐性化要因の分布 (荒川, 2013 a) を把握することは、将来起こりうる病害発生事情の変化に対する備えになると考えられる。

イネを宿主とする病原菌を海外で採取する場合、分離源となる稲わらを国内へ持ち込むことは、動物検疫の管轄を含め輸入禁止品に該当するため、基本的に許可されない。したがって植物病原体を取り扱う研究機関が、海外で採取したイネの病原菌を国内へ持ち帰るためには、純粋培養を現地滞在中に完了する必要がある。実際の分離作業では、本来オートクレーブによる滅菌水の代用として、現地にてシリンジ加圧式のろ過滅菌フィルターで調製した水または湯沸しポットで得た湯を冷まして用いている。分離源の表面殺菌用に、次亜塩素酸ナトリウム水溶液を必要最低限量調整し携行することも多いが、コンタクトレンズ洗浄保存液やうがい薬で代用すること

もある。分離用培地の軽量化を図るため、ストレプトマイシン含有水寒天培地を短冊状に加工し微量遠心チューブに入れ込むか、径 35 mm の小型プラスチックシャーレに事前調製する。培地での菌糸生育を確認したうえで、分離源の稲わら片を含む不要部分を除去することで、輸入許可を得るようにしている。ただし本法は、水

寒天培地での菌糸生育が他と比べ圧倒的に速い菌種のみ利用可能な方法といえよう。お気づきの通り、この一連の手順はクリーンベンチを使わないこと以外は、専門書に記載の手順（荒川, 2013 b）と大きく変わらない。単に道具や試薬類を小型化しただけのことなので「現場に即応」と表現するにはまだ不十分であろう。



図-1 各種土壌病害が発生した植物試料からの簡易的分離培養法の手順

A: 白絹病罹病ピーマン地際部に形成された菌糸束と未成熟菌核, B: 紋枯病罹病イネの葉鞘に形成された病斑と菌核, C: コンタクトレンズ保存用ケースを利用した分離源(発病ピーマンの根組織片)の洗浄と表面殺菌, D: チャック式ポリ袋内へ挿入した分離源(発病イネの葉鞘組織片), 分離源組織からポリ袋内面へ伸長したピーマン白絹病菌(E)およびイネ紋枯病菌(F)の菌糸. スケールバーはいずれも 1 mm を示す.

II 研究機器類の利用が限られた環境での病原菌採取

1 日用品のみを利用した簡易的分離培養

植物病害の診断に関する知識と技術を持ちながら、研究用機器や試薬類の利用に制限があり、迅速・的確な対策提示が遅れている現場があるならば、筆者は少しでも改善の助けになりたい。試みに国内の日用品量販店で入手可能な物品のみを用い、いくつかの植物病原菌について、試料採取から初期培養までを試みた(図-1)。例示はいずれも土壌生息性の糸状菌による病害である。ピーマン白絹病(図-1A)およびイネ紋枯病(図-1B)を試料に、それぞれ病徴を含む根と葉鞘部を分離源として採取し、紙封筒に入れ持ち帰った。なお、分離作業の開始目処がつかない状態で、分離源をビニール袋内などの高湿状態に放置するのは絶対に避けなければならない。蒸れた環境では多くの場合、数日のうちに雑菌の温床とな

り、発病の主因である病原菌が全く分離されない結果となる。病原菌の分離培養を効率よく行うために、雑菌の繁殖をいかに防ぐかが重要な鍵となる。罹病組織から分離源を切り出す際は、植物組織の健全部と病斑部の境界を含むように心掛ける。病斑周縁部に存在する菌糸は、栄養生長がまだ活発であることが多く、雑菌との競合に比較的強いためである。表面に付着する泥や砂等を洗い落とすため、水道水を満たしたコンタクトレンズ保存ケースの片方の穴に分離源を入れ、蓋をして激しく攪拌した(図-1C)。レンズ保存ケースの反対側の穴にコンタクト洗浄保存液(有効成分として多くは塩酸ポリヘキサニド約1 ppm含有)を満し、水洗後の分離源を入れ、激しく攪拌の後2~5分間静置し表面殺菌した。なお国内大手の100円ショップでは、エタノールや次亜塩素酸ナトリウム水溶液等を成分とする各種消毒液を、小容器で取り揃えている。これらは薬局で入手できるうがい薬とともに、分離源の表面殺菌として十分利用可能であっ

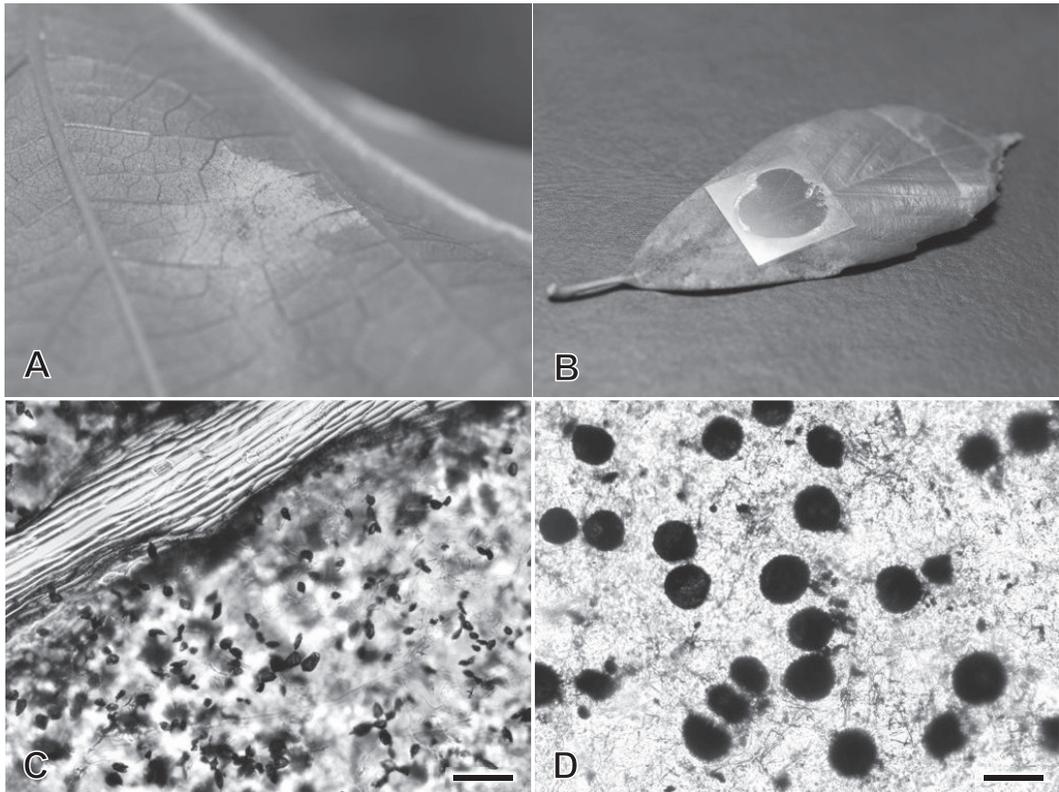


図-2 瞬間接着剤による菌体構造の包埋レプリカ採取および採取試料の光学顕微鏡観察像

A: ブドウ葉の背軸面に形成されたべと病の初期病斑, B: アラカシの葉面に形成されたうどんこ病菌叢上に滴下した瞬間接着剤をカバーガラスで押し広げた様相, C: 接着剤で硬化包埋され多数の黒点状に観察されるべと病菌の分生孢子(画像上辺から左辺に存在する束状の細胞構造は葉脈のレプリカ像), D: アラカシ葉面から採取したうどんこ病菌子のう球。スケールバーはいずれも100 μ mを示す。

た。またピンセットがないことを想定し、竹串2本を箸のように用い、切り出した分離源の摘出と移動を行った(図-1 C, D)。余剰な殺菌成分や界面活性剤を除去するため、分離源を水道水で洗浄し、チャック式の小型ポリ袋内へ入れ密閉し、室温で2～3日間静置した(図-1 D)。ルーペを用いポリ袋越しに分離源組織を観察し、特に切断面からポリ袋内面へはい出すように伸長する菌糸の形態の特徴を注視した(図-1 E, F)。なおポリ袋などの疎水の膜面に形成される病原菌の菌体構造は、親水性の強い寒天培地で形成される構造と比べ、宿主表皮面での構造類似性がより高いように思われる。ハイドロフォビン(hydrophobin)と呼ばれる菌体由来のタンパク質群が疎水性面の認識に関与し、感染構造の発達分化に影響を及ぼすことを示す研究例もある(TUCKER and TALBOT, 2001; WÖSTEN, 2001)。

さらに詳細な診断は、専門の研究機器類が未整備の環境では困難であるが、この培養を継続することで、病原菌の種同定の根拠となる耐久構造の形成が生じることもある。また本法で生育した菌糸は、顕微鏡観察、単菌糸分離による純粋培養やDNA塩基配列解析のための遺伝子増幅反応にも供試可能である。

2 瞬間接着剤による菌体構造の包埋レプリカ採取法

植物の表皮面に形成された菌叢、分生孢子あるいは子実体構造を物理的に破損しないよう試料運搬することが困難な場合、顕微鏡観察用の前処理を現場で行うことが可能である。また対象となる病原菌が絶対寄生菌の場合、培養菌株を得ることは期待できないため、宿主植物体で形成した菌体構造を長期間維持できる試料採取が望ましい。以下に瞬間接着剤を利用した植物表皮面の包埋レプリカ採取法(図-2)を紹介する。本法により、病原菌のはふく菌糸、分生孢子や孢子柄さらには植物表皮面に存在する気孔や葉脈等の細胞構造の配置を光学顕微鏡で観察することが可能となる。

植物表皮面の菌叢形成部位に滴下した瞬間接着剤をカバーガラス面で押し広げ、接着剤が硬化するまでそのま

ま2～3分間保持する。破損ししやすいカバーガラスの代用として、食料品店で販売されているお惣菜弁当の透明蓋やペットボトルから切り取った平面片を使うことも可能である。接着剤の硬化後、カバーガラスをていねいに剥離することで、包埋された菌体構造とともに宿主表皮のクチクラ・ワックス面や気孔配置構造のレプリカが得られる。剥離面を光学顕微鏡の対物レンズ側に向けて検鏡し、焦点面を上下に動かしながら観察することで、宿主表皮細胞に対する病原菌構造の立体的な配置を確認することが可能となる。検鏡時の屈折率改善のため、10%グリセロール液滴で剥離面を満たし、スライドガラスと密着させることで、より高解像な観察も可能となる。またこの包埋試料は、長期間の試料保管が可能で、例示の図-2 CおよびDはそれぞれ約4か月および8か月間保存後の観察像である。

おわりに

本稿では、筆者がおもに対象とする限られた種類の土壌生息性病原菌を中心に、試料採取時のコツと裏技的技法を紹介した。植物の栽培環境では多種多様な病害が発生しており、それぞれを適切に診断するためにはケースバイケースの変法があり、通り一遍な技法では太刀打ちできない件は多いはずである。次々に発生する各種病害に対し、もし設備や予算面の制限が理由で、診断や病原菌の同定ひいては病理的措置対策が遅れ、安定的生産の妨げとなっている現場があるならば、少しでも役にたきたい。そのための情報交換のきっかけとなれば幸いである。

引用文献

- 1) 荒川征夫(2013 a):第23回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集:2～9.
- 2) ———(2013 b):土壤微生物実験法 第3版,日本土壤微生物学会編,養賢堂,東京,p.172.
- 3) ARAKAWA, M. and K. INAGAKI (2014): J. Gen. Plant Pathol. 80 : 401～407.
- 4) 牧田結衣ら(2014):日植病報 80 : 264～265 (講要).
- 5) TUCKER, S.L. and N. TALBOT (2001): Annu. Rev. Phytopathol. 39 : 385～417.
- 6) WÖSTEN, H.A.B. (2001): Annu. Rev. Microbiol. 55 : 625～646.