

寒天葉片法を用いた病原菌の同定

はじめに

植物検疫の現場では発見された病原菌を短期間に同定することが要求されるが、常法のPDA培地による培養では孢子が形成されないなどその後の作業が進まないことがある。このような場合、寒天葉片法（岸、1995；Furukawa and Kishi, 2002）による培養は、培地の準備が簡単で、孢子形成が早く、培養中開放的な状態で試料採取しても雑菌の繁殖がほとんどないため、大変有用な培養方法である。

これまでに本法を適用した主な事例は下表のとおりであり、その概要を紹介したい。

方法

本法の詳細は参考文献を参照されたいが、

これまでの経験から次の手順で行っている。

- ① 高圧滅菌した2%素寒天培地を直径6cmのポリスチレン製シャーレに流し込み平板を作製しておく。
- ② 木の葉をシャーレに入るように切り、それを20～40秒間煮沸した後、上記素寒天平板の上に押し付け培地を作製する。
- ③ PDA培地を用いて純粋分離した菌株から菌糸片をとり、培地の葉片上に植え、12時間ブラックライト、25℃の恒温器で培養する。

径の小さいシャーレを用いているが、これは培養時のスペースが少なく、顕微鏡下での試料採取作業も容易である。

葉片の種類は、サクラ、イチョウ、ケヤキ、クチナシ、トウネズミモチなどを基本としているが、その他のものも適宜利用している。

これまでの事例で *Lasiodiplodia theobromae* が最も多くの種類に分生子殻を形成した（33種類中29種で形成）のに対し、フェイジョア由来の *Pyrenochaeta* 属菌ではササの葉にのみ分生子殻を形成した。種類により孢子形成に遅速があるため多種の植物を同時に用いる方が好ましく、同じ植物でも孢子形成に多少個体差が見

られる場合もあり、複数の葉片に接種した方がよいと思われる。なお、真冬の屋外の葉は分生子等の形成が劣るため、この時期は室内の鉢植え樹木やバラなどの切り花の葉も利用している。

葉の煮沸は、2リットルのステンレス製ピーカーに1.5リットル程度の水を入れ、実験

室のガスコンロで行っているが、手早く操作すれば特に無菌的な環境を設ける必要はない。煮沸時間について *L. theobromae* で調査したところ1分以内なら大差なく、特に厳密に行う必要はないと考えられた。通常、2～3枚の葉片を同時に処理している。

光の条件として、12時間ブラックライト照射を念のため行っている。*L. theobromae* の分生

寒天葉片法で孢子形成を観察した事例

供 試 菌	分 離 源
<i>Alternaria</i> sp.	カーネーション苗
<i>Ascochyta</i> sp.	ホウレンソウ種子
<i>Diaporthe citri</i> (分生子世代 <i>Phomopsis citri</i>)	カンキツ果実
<i>Diplodia maydis</i> (= <i>Stenocarpella maydis</i>)	トウモロコシ種子
<i>Didymella bryoniae</i> (分生子世代 <i>Phoma cucurbitacearum</i>)	カボチャ果実
<i>Glomerella lagenarium</i> (分生子世代 <i>Colletotrichum orbiculare</i>)	カボチャ果実
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	カンキツ果実
<i>Nectria haematococca</i> (分生子世代 <i>Fusarium solani</i>)	ファレノブシス苗
<i>Phoma wasabiae</i>	ワサビ根茎
<i>Phyllosticta</i> sp.	バンタ苗
<i>Pyrenochaeta</i> sp.	フェイジョア切り枝

子殻をPDA培地上に形成させるには十分な光照射が必要であるが、寒天葉片法では恒温器のガラス窓から入る室内照明でも効果があった。

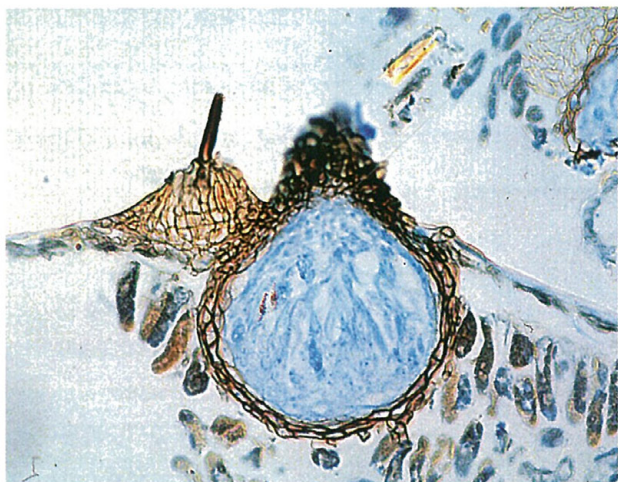
事例

貯蔵中のカンキツ果実に類似した軸腐れ症状を示す *L. theobromae* 及び *Diaporthe citri* について、多数の菌株を分離培養したところPDA培地上で分生子殻を形成しないものがあった。しかし、本法ではこのような菌株でも、分生子殻及び分生子が形成された。

ウリ類のつる枯病菌 *Didymella bryoniae* は孢子形成のため1/4濃度PDA培地が推奨されているが、輸入カボチャ果実から分離した菌株では分生子殻しか形成されなかった。一方、本法では分生子殻の他に偽子のう殻も容易に形成した。

カーネーション苗から分離した *Alternaria* sp. の事例では、PDA培地上で分生子を形成せず、また、カーネーション植物体に接種しても株全体が枯死するまで胞子を見ることができなかった。このため接種試験の再分離において本法を用いた。

輸入カボチャ果実から分離した *Glomerella lagenarium* に、カボチャ果実やPDA培地等で子のう殻しか形成しない菌株が見られたが、試みに本法で培養したところ、クチナシ及びカンキツの葉片で分生子層を観察することができた。



クチナシ葉上の *Glomerella lagenarium* の分生子層(左)及び子のう殻(右)断面

PDA培地で形成される分生子殻の多くは一カ所に多数のものが集中し、また周囲を菌糸が厚くとりまくため、分生子殻を個々に取り出して観察することは困難である。また、

寄主植物に生じるものに比べサイズが大きく、殻壁も異常に厚くなる場合があった。一方、本法により葉片上に形成される分生子殻は通常単独で形成されるため顕微鏡試料作製に適しており、形成器官の形態も寄主植物上のものに類似していた。

糸状菌の分離にあたり、目的とする菌があまり優勢でないため細菌が付随する場合でも、本法で分生子殻等を形成させ、それから再度分離すると容易に純粋分離することができる。



サクラ葉上の *Diplodia maydis* の分生子殻

おわりに

植物検疫で検出された孢子形成が難しい糸状菌の同定のため、種々の培地を準備することは煩雑であり、新たに組成の異なる培地を検討することはさらに困難である。一方、寒天葉片法の培地は手軽に作製でき、葉の種類で培地組成に変化を設けることもできる。また、葉片上に生じる分生子殻等は寄主植物上のものと類似しており、同定のための観察に適している。これらのことから、本法は効果的な培養方法であると言える。

本法考案者である岸國平氏には本稿の作成において有益な助言をいただいた。記して感謝申し上げます。

(参考文献)

岸 國平 (1995): 寒天葉片法による柄子殻、柄胞子の大量形成について。

植物防疫 49: 129 ~ 130.

Furukawa, T. and K. Kishi (2002): Production of Perithecia of Various Ascomycotina on Water Agar Medium Emended with Leaf Pieces. J. Phytopathology 150: 625 ~ 628.