

# ピシウム菌による病害

大阪府立大学大学院農学生命科学研究科 東 條 もと 昭

## はじめに

ピシウム菌は世界中に分布する卵菌類であり、作物の苗立枯れや根腐れの病原として知られる。一般に多犯性で生育が速く、湿潤で植栽密度が高い環境を好む。近年の海外からの植物導入の増加や、栽培方式の集約化・多様化は、本菌の発生を拡大させていると考えられ、実際、ピシウム菌による新たな病害が毎年報告されている。また、本菌による苗立枯れは病徴が明瞭で、短時間で観察することができ試験も容易なため、生物防除剤などのスクリーニングでの利用も数多くみられるようになった。そのため、本菌の同定や接種実験の方法についての関心が高まっている。

ピシウム菌の同定では、Van der PAATS-NITERINK (1981) が引用されることが多い。彼女のモノグラフには87種のピシウム菌が記載されており、それぞれの種の記載は、形態的特徴、菌糸生育の温度反応および病原性から構成されている。同定は、被検菌についてこれらの特性を調査し、記載内容と比較することによって進められる。有性器官を形成しない種や新種の記載では、これに加えて遺伝子解析の結果が示されることが多い。ここでは、図-1に示す手順を一つの例として、ピシウム菌の分離・同定操作を紹介したい。なお、本菌の特性や実験法についてはこれまでに総説がまとめられており(一谷, 1992, 1995; MARTIN, 1992; 渡邊, 1998)、ここでは、これらに詳述されている内容については、最小限の記述に止めた。

## I 発生環境、病徴観察、罹病部の顕微鏡観察

一般にピシウム菌による病害は、植栽密度が高く湿潤な状態が持続する環境で発生が多い。多くの作物は種子の発芽期から幼苗期にかけて本菌に対する感受性が高い。我が国では、ウリ科、アカザ科、ナス科の作物で、*Pythium aphanidermatum*, *P. ultimum*, *P. myriotylum*, *P. spinosum* などによる苗立枯れ病や、伸長期の根腐れ

病がよく知られている。一方、アブラナ科やキク科の作物ではウリ科などに比べて、苗立枯れ症状や伸長期の根腐れ症状の発生が軽微だが、地際部の茎葉に腐敗症状が起こりやすい(TANINA et al., 2004)。イネ科では、我が国では *P. graminicola* が病原になることが多く、発芽期から幼苗期にかけて出芽不良や出芽後の枯死を起こす。最近では、*P. helicoides* による病害がバラなどで広がりをみせている(KAGEYAMA et al., 2002)。

ピシウム菌による病害では罹病部に遊走子のうや蔵卵器の形成がみられることが多く、その形態から菌種を推定できる場合がある。まず、細菌や他の糸状菌の二次感染が進んでいない緑色・水浸状の罹病部をピンセットで摘み取って検鏡する。腐敗が進むと特徴的な形態を見付けにくくなる。ラクトフェノールコットンブルー液(コットンブルー 0.05 ~ 0.1 g, フェノール 20 g, グリセリン 40 g, 50%乳酸 20 ml, 蒸留水 20 ml)を混合溶解する。褐色ビンに入れて保存する)で染色すると、植物体中の遊走子のうや菌糸を観察しやすい(口絵-3)。発病初期の罹病部では、細胞壁を貫通する菌糸や(図-2)、有性器官(図-3)が皮層の細胞に沿って形成されている様子を観察することができる。発病初期の罹病部で見られる *P. aphanidermatum*, *P. ultimum* および *P. graminicola* の器官の形態をそれぞれ口絵-1 ~ 3に示す。*P. aphanidermatum* では、罹病部の細胞内に直径 20 ~ 25  $\mu\text{m}$  の平滑な表面の蔵卵器、1 ~ 2  $\mu\text{m}$  の厚さの透明な壁をもつ非充満性の卵胞子、膨潤した不定形の遊走子のうおよび幅広の蔵精器の形成がみられる(口絵-1)。*P. aphanidermatum* では、有性器官と遊走子のうが同時に観察されることが多い。一方、*P. ultimum* では、発病初期には直径 20 ~ 25  $\mu\text{m}$  の球状の hyphal swellings が形成され(口絵-2)、有性器官は少し遅れて形成されるか、その後も形成されないことがある。*P. graminicola* によるイネやペントグラスの病害では、地際部分の葉や根の細胞内に膨潤した不定形の遊走子のうが形成され(口絵-3)、有性器官の形成はみられないことが多い。罹病部の腐敗が進むと、遊走子のうや蔵精器が見付けにくくなる。最近、携帯用顕微鏡の性能が向上し、ピシウム菌の蔵卵器などを野外で観察しやすくなった。

Isolation, Identification and Pathogenicity Determination of *Pythium* spp. By Motoaki Tojo

(キーワード: ピシウム属菌, 診断, 分離, 同定, 病原性試験)

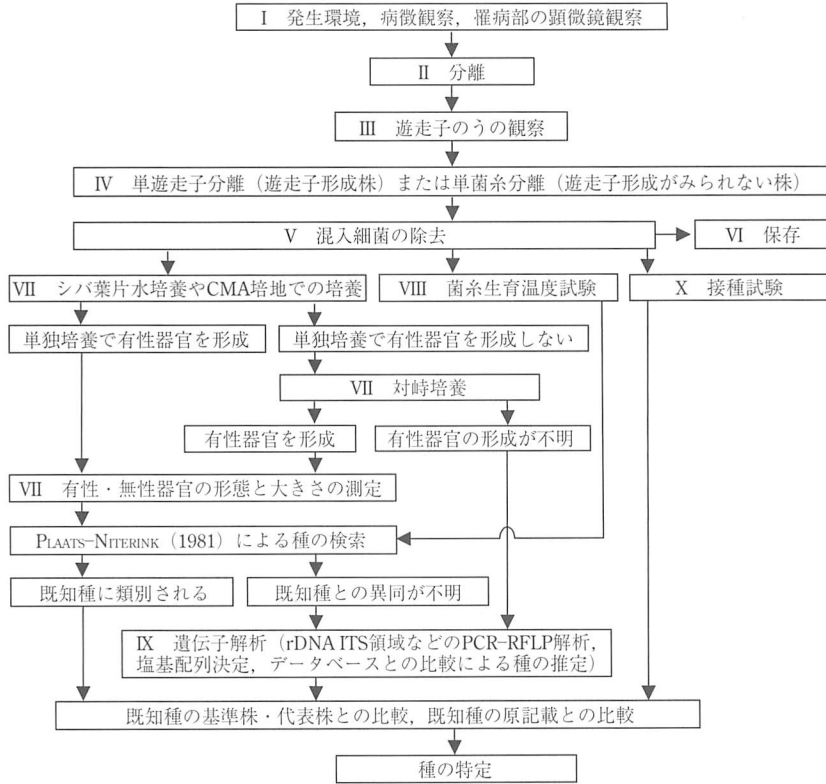


図-1 ピシウム菌の分離・同定手順の1例（ローマ数字は本文中の番号）

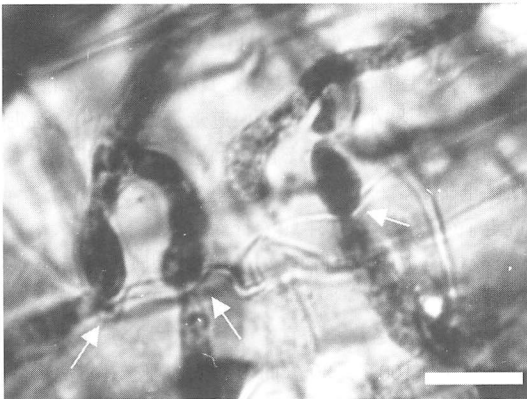


図-2 ホウレンソウの根の細胞内に侵入した *Pythium spinosum* の菌糸。貫入部分に菌糸のくびれ（矢印）がみられる。スケールは 10  $\mu$ m

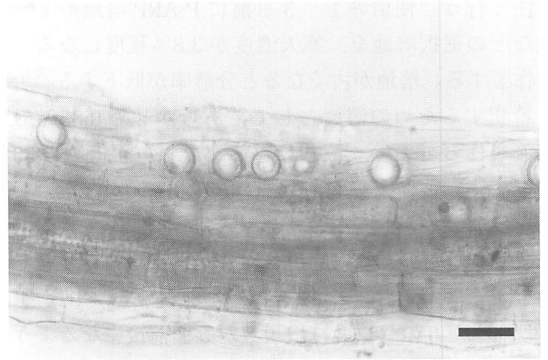


図-3 ビートの根の表層の細胞に沿って形成された *Pythium aphanidermatum* の卵胞子。スケールは 40  $\mu$ m

## II 分 離

罹病部からの分離は以下のような一般的な方法で行われる。感染初期の罹病部を切り取り、水道水中で水洗後、70%エタノールに約30秒間または2%次亜塩素酸ナトリウムに約2分間浸漬した後に滅菌水ですすぎ、ろ紙で

水分を除いて素寒天培地などに置床する。培地表面に凝結水の膜があると、細菌が罹病試料の周囲で増殖して分離率が下がる。細菌の汚染が激しい場合には、水洗後に100~1,000 ppmのストレプトマイシン硫酸塩水溶液に10分間浸漬する。培地は素寒天培地が一般的に用いられるが、菌糸伸長の遅い菌種ではP<sub>5</sub>ARP培地（JEFFERS

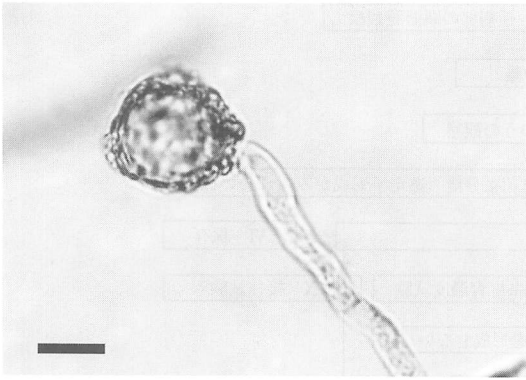


図-4 VP<sub>3</sub>培地上に現れたコロニーの起源の顕微鏡写真。形態から、このコロニーの起源は卵胞子であることがわかる。スケールは10 μm

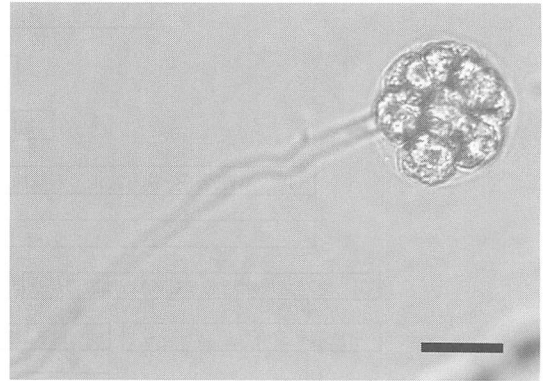


図-5 シンバ葉片水培養で形成された *Pythium aphaniidermum* の球のう。スケールは20 μm

and MARTIN, 1986) や VP<sub>3</sub> 培地 (ALI-SHITAYEH et al., 1986) などの選択培地を用いると分離率が上がる。

土壌中のピシウム菌は捕捉法で容易に分離することができる。捕捉材料としては、キュウリなどの種子が用いられることが多い (WATANABE, 1989)。*P. aphaniidermum* や *P. ultimum* のような菌糸伸長の速い菌種は、捕捉材料を埋没して数時間で着生するが、通常は1日程度埋没する。埋没後の捕捉材料からの菌の分離は、罹病部からと同様の方法で行う。

希釈平板法による定量的なピシウム菌の分離は以下の方法で行う。使用の1~3日前に P<sub>5</sub>ARP 培地や VP<sub>3</sub> 培地などの選択培地を、寒天濃度が3.8%程度になるように作製する。培地が古くなると分離率が低下する。土壌を希釈するための溶液として、あらかじめ0.35%の寒天液を作っておく。液状になるまで振り混ぜた0.35%寒天液に、被検土壌50gを湿重で20% (w/v) になるように加える。土壌中のピシウム菌感染源をできるだけ分散させるために、家庭用ジューサー等のミキサーで土壌をかくはんする。この懸濁液を寒天液で希釈し、1ペトリ皿当たりのコロニー出現数が5個前後になるようにする。例えば、予想される菌密度が土壌1g当たり500cfuの場合には1% (土壌重/寒天液量) の希釈となる。土壌希釈液をペトリ皿当たり1mlずつ滴下し、ガラス棒で培地面に均一に塗布する。通常、ペトリ皿間でコロニーの出現数がばらつくので、一つの希釈液で10~20枚のペトリ皿を使う。25℃で培養すると、22~24時間後に直径5~10mmのコロニーが出現している。土粒を洗い流して風乾し、コロニーの計数と分離を行う。土壌希釈液の洗い流しをていねいに行うと、コロニーの起源となっている器官が培地表面に残る (図-4)。これを顕微鏡で観察すると、土壌中での生育生存形態を推定す

ることができる。

### III 遊走子のうの観察

分離株を属レベルで類別すると同時に、単遊走子分離株を得るために、遊走子のうと遊走子を観察する。ピシウム菌は疫病菌やアフアノミセス菌と有性器官の形態が類似しており、分離の際、これらが同時に得られることがある。これらは遊走子の現れ方によって区別される。ピシウム菌では、遊走子のうから逸出管が伸びてその先端に球のう (図-5) が形成され、その内部に移動した原形質が、遊走子に分化する。球のうの膜が破れると、内部の遊走子が直ちに泳ぎだす。疫病菌では球のうは形成されず、遊走子のうの中で原形質が遊走子に分化する。アフアノミセス菌では、細長い遊走子のうの中に遊走子が一列に並び、放出される際には遊走子が遊走子のうの頂口に止まる。

遊走子の形成は次の手順で行う。ベントグラスやコウライシバなどのイネ科植物の若い葉の断片 (5mm前後に切ったもの) が使いやすい。若くて薄い葉の方が、葉の周囲や中に形成された器官を観察しやすい) を水に浸して間欠滅菌 (100℃, 30分間の蒸気処理を3日間繰り返す滅菌法) あるいは高圧滅菌しておく。ピンセットで一つかみの葉片を無菌的にペトリ皿の中央に置き、滅菌水1滴を滴下して湿り気をもたせる。含菌寒天片を葉片上に置いて、葉片を乾燥させないように気をつけながら18~25℃で1~2日間培養すると、葉片の表面や周囲に菌そうが発達してくるのが肉眼で見える。この葉片に、間欠滅菌あるいは高圧滅菌した池水などのろ過水を約10ml加え、水中に葉片を分散させて15~25℃ (雪腐病菌などの低温性のピシウム菌では1~10℃) の室内に静置する。窓辺などの自然光が入る場所に置くと遊走

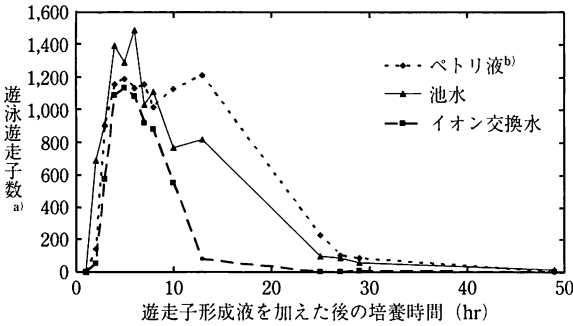


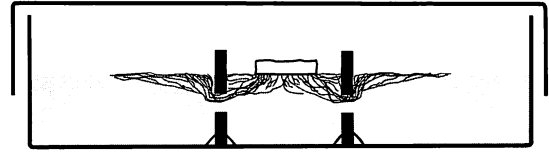
図-6 遊走子形成液の違いが *Pythium aphanidermatum* の遊泳遊走子数に及ぼす影響

V8 ジュース寒天平板培地に *P. aphanidermatum* OPU428 株を接種して 34℃ で 3 日間培養後、各遊走子形成溶液 10 ml を加えた。25℃ の暗黒下に静置し、遊泳中の遊走子数を計数した。a) 25℃ 下で 6 分間の観察中に顕微鏡の 1 視野 (200 倍) 内を泳いで通過した遊走子の数。b) 遊走子形成液の種類。池水は大阪府立大学構内の調整池の水を高圧滅菌して使用した。

子が形成されやすいことがあるが、その際は、直射日光を避け、温度の上がり過ぎに注意する。1~7 日後まで毎日検鏡し、遊走子の形成の有無を調べる。*P. aphanidermatum* のように注水後数時間で遊走子が形成される種もあるが、形成までに 1 週間以上を要するものもある。また、水の交換や温度変化は、遊走子の形成を促すことがある。観察のタイミングが遅れて、遊泳している遊走子がほとんどみられなくなったときは、中空の遊走子のうを探す。逸出管の存在を確認して、遊走子のうの形態を推定する。遊走子形成に用いる水としては、イオン交換水や蒸留水よりも、池水やベトリ液 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 150 mg, MgSO<sub>4</sub> 150 mg, KCl 60 mg, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 400 mg, 水 1,000 ml) の方がよいようである。*P. aphanidermatum* を使った予備的な実験では、イオン交換水、池水、ベトリ液の順に、遊泳遊走子を長く観察することができた (図-6, 未発表)。

#### IV 単遊走子分離または単菌糸分離

同定では、単遊走子・菌糸から培養した株を用いることが前提となるが、煩雑で省略されがちである。ピシウム菌では一つの罹病組織から複数の種が分離されるのが普通であり、菌そう先端部の培養では、複数種が混在することがよくある。また、長く継代されている培養株でも複数種が混在していることがある。かつてピシウム菌の代表的な病原種として知られていた *P. debaryanum* が、原記載に用いた培養株が純粋培養でなかったと考えられるために、現在では種名としてほとんど使われてい



リング (コニカルチューブの輪切り) の底部をシリコンボンドで固定

図-7 van Tieghem cell 改変法

ないことはよく知られている。同定の前に、単遊走子分離か単菌糸分離を行って純粋培養株を得る。遊走子の形成がみられる株では単遊走子分離を行う。シバ葉片水培養で遊走子の形成がみられたら、シバ葉を少量取って、葉の周りに着いた水滴を素寒天培地などに塗り広げ、18~25℃ で 12~24 時間培養する。寒天培地表面を低倍率で検鏡し、発芽している遊走子を探し、ベトリ皿の裏からしるしをつける。クリーンベンチ内で拡大鏡や実体顕微鏡で観察し、周囲に他の遊走子や繁殖体がないのを確認したうえで、発芽遊走子を周囲の寒天片とともに切り出す。遊走子を形成しない菌株では、hyphal swellings や卵胞子から同様の方法で培養するか、素寒天培地で低密度の菌そうを伸長させて単菌糸分離を行う。

#### V 混入細菌の除去

ピシウム菌では菌糸に沿って細菌が随伴することが多い。素寒天培地などで菌そうの先端の植え継ぎを数回繰り返せば除去することができるが、多数の菌株を扱うときは煩わしい。選択培地を用いれば細菌を除去することができるが、抗生物質による選択圧は避けたい。細菌を除去するための簡便な方法に van Tieghem cell 法がある。この方法は、糸状菌は寒天培地をくぐり抜けるが細菌は通過するのが困難なことを利用したものである。一度の植え継ぎで細菌を除去できるが、リング状のセルが固定されていないためにセルと寒天のすき間に凝結水が入りやすく、水膜に沿って細菌が拡散してしまうことがある。そこで、側面に穴を開けたセルを底面に固定したベトリ皿を作製して用いたところ (図-7)、容易に細菌を除去できるようになった。使用済みのコニカルチューブ (ポリプロピレン製、50 ml 容) をノコギリで輪切りにして、ハンダゴテなどで側面に直径 2~3 mm の穴を開け、市販のシリコンボンドでガラス製のベトリ皿の底面に固定することによって、簡単に安く作製できる。培地 (素寒天培地や 4 分の 1 濃度の CMA 培地) を側面の穴が完全に浸るまで分注する。細菌に汚染された培養株をセルの内側に接種して培養し、セルの穴を通して伸長

してきた菌そうを採取する。コニカルチューブやシリコンボンドは高圧滅菌が可能である。寒天を分注・固化した後で、通常の培地と同じように冷蔵庫で保存できるため、作り置きもできる。

## VI 保 存

ピシウム菌の保存は CMA 斜面培地で行われることが多い。当研究室では、手製の CMA 培地（市販の 5% 魚粉添加養鶏用飼料 20 g を蒸留水で 1 時間煮沸後、木綿布でろ過し、蒸留水を加えて 1,000 ml とする。棒寒天 20 g を加えて加熱・溶解後、pH6～7 に修正してオートクレーブ）を用いている。年に 1 回以上継代し、夏期間は空調設備のある室内で、それ以外の季節は空調のない室内（5～25℃）で保存する。低温性の菌種は、10℃前後の低温で保存している。長期の保存法としては、アサの種子（小鳥の餌として市販されている麻実）を用いた水保存法、CMA 培地などに鉱油を重層する方法、凍結保存法などがある。水保存法が、扱いやすく特別な設備も要しないので、最も広く行われているようである。

## VII 形態観察（有性・無性器官の形態と大きさの測定）

供試菌の純粋株を、上述（III）のシバ葉片や CMA 培地で培養し、光学顕微鏡で観察する。微分干渉顕微鏡を用いると観察しやすい。Van der PAATS-NITERINK（1981）の検索表に従って種の検索を進めるために、次の項目について調べて記録する。①主軸菌糸の幅、②遊走子のうまたは hyphal swellings〔遊走子形成が確認されると遊走子のう（sporangium）と呼ばれ、未確認の場合には hyphal swellings と呼ばれる〕の形、大きさ、形成位置が間生（intercalary）か頂生（terminal）か、proliferation（遊走子放出後に、新たな遊走子のうを貫性する現象）がみられるか、乳突起の有無、単生か集合生か、離脱性があるか、③球のうの内部に形成される遊走子のおおよその数、④逸出管の長さと言口部の幅、⑤シスト化後の遊走子の直径、⑥附着器様構造（appressorium）の有無、形、大きさ、⑦蔵卵器の形、大きさ、形成位置が間生か頂生か、突起の有無と形、色、内包する卵胞子の数、⑧蔵精器の形、大きさ、形成位置が間生か頂生か、蔵卵器 1 個当たりの数、蔵精器柄の分枝の有無、⑨有性生殖様式が雌雄同株性（homothallic）、雌雄異株性（heterothallic）、直下性（hypogynous）、雌雄同菌糸性（monoclinous）、雌雄異菌糸性（diclinous）のいずれか、⑩卵胞子の形、大きさ、色、卵胞子壁の厚さ、表面構造

（平滑か網状か）、充満性（plerotic）か非充満性（aplerotic）か。

これらの観察項目について、それぞれ少なくとも 50 個の記録を取る。データはエクセルなどの表計算ソフトで集計し、最大値、最小値、平均値を求める。主要な形態のスケッチや写真撮影を行う。観察時の培養条件（培地や遊走子形成液の種類、培養の温度と期間など）を記録しておく。

単独培養で有性器官を形成しない菌株は、その菌株と無性器官の形態が類似するヘテロタリック種の標準交配型と、対峙培養を行う。また、同じ場所から雌雄双方の菌株が得られることが多いので、同時に分離された菌株群の中から形態の似た菌株を選び出し対峙培養すると、有性器官を形成することがある。培地は、PCA（ニンジン 20 g とジャガイモ 20 g を細かく切り、1 l のイオン交換水か蒸留水に入れて 10 分間湯せんした後、数枚重ねたガーゼでろ過し、イオン交換水か蒸留水で 1 l に調整し、高圧滅菌する）、市販や手製（上述 VI）の CMA、V8 ジュース寒天培地（V8 ジュース 160 g に CaCO<sub>3</sub> 3 g を加えてスターラーで 10 分間かくはん後、3,000 rpm で遠心した上澄み 100 ml に、寒天 15 g、小麦胚芽油 500 mg を加えて、イオン交換水か蒸留水で 1 l に調整し、高圧滅菌する）が使われる。対峙培養で有性器官の形成がみられない場合には、後述の遺伝子解析の各手法によって種を推定する。

## VIII 菌糸生育温度試験

PCA 培地に接種して生育適温付近に静置し、菌そうの直径が 1～2 cm になるまで培養する。3℃間隔の異なる温度に設定されたインキュベータに移し、菌糸の伸長が安定した後に測定を開始する。菌糸伸長の最適・最低・最高温度、最適温度における 1 日当たりの菌糸伸長速度を求める。

## IX 種 の 検 索

形態と菌糸生育温度の観察結果に基づいて、Van der PAATS-NITERINK（1981）の検索表で種を検索する。検索表の和訳（一谷、1992）を利用することもできる。検索表を進める途中では、可能性のある選択肢をすべてチェックし、それぞれで検索を進めて、少しでも可能性のある種をリストアップする。それらの種の記載と照合しながら、消去法で種を絞り込んでいく。記載と照合では、必要に応じて、原記載や、MIDDLETON（1943）、WATERHOUSE（1967）、DICK（1990）の検索表を参考にする。最終的には、原記載との比較や、基準種または代表

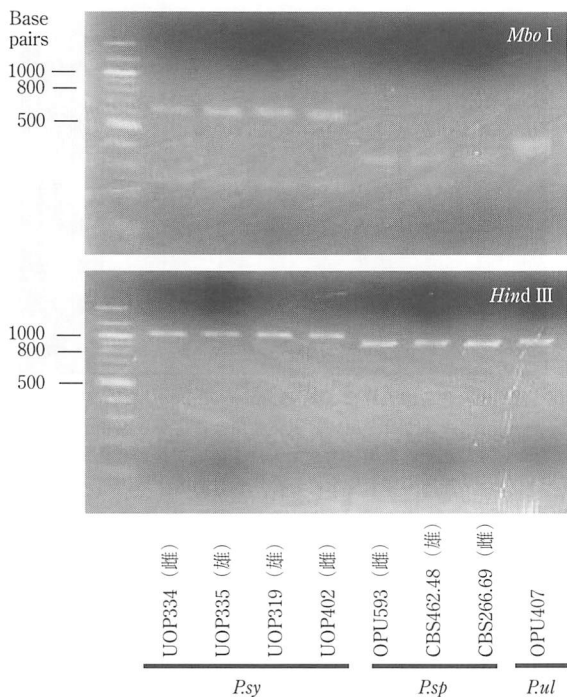


図-8 rDNA 遺伝子 ITS 領域の PCR-RFLP 法による *Pythium sylvaticum* (*P.sy*), *P. splendens* (*P.sp*) および *P. ultimum* (*P.ul*) の識別. 制限酵素 *Mbo* I と *Hind* III による消化の結果

株が入手できる場合にはそれらとの直接比較によって種を特定する。

### X 遺伝子解析

有性器官の形成が不明瞭な分離株や、既知種との異同が不明の分離株の同定では、遺伝子解析を行うことによって作業を効率的に進めることができる。PCR-RFLP 法は最も簡便な種間比較の手法である。この方法では、目的とする遺伝子を PCR で増やした後、制限酵素で切断して電気泳動を行い断片長を比較する。筆者らは、観葉植物のパキラで発生した茎腐れ症状の病原の同定を確認するためにこの手法を利用した。罹病部からパキラに病原性を有するピシウム菌様の糸状菌が分離された。分離株は、球状の hyphal swellings を多数形成したが、遊走子や有性器官の形成はみられなかった。Hyphal swellings の形態や色の特徴から、*P. splendens* と考えられたため、同種の雄性株と対峙培養させたところ、藏卵器様の器官をわずかに形成した。しかし、形成数が少なく形態も不明瞭であったので、類似の形態を有する他種を含めて、rDNA 遺伝子 ITS 領域の PCR-RFLP を調べた。材料として、被検株 (OPU593), *P. splendens* の代

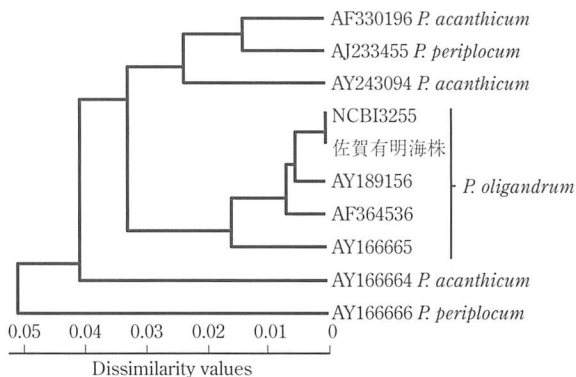


図-9 遺伝子データベースを利用したピシウム菌の同定の確認. *Pythium oligandrum* とその近縁種について、DDBJ/EMBL/GenBank に rDNA 遺伝子 ITS 領域の塩基配列の全長が登録されているものをすべて用い、UPGMA 法で系統樹を作成した。被検菌 (佐賀有明海株) が、*P. oligandrum* のクラスターに属することが確認された

表株、*P. sylvaticum* および *P. ultimum* の当研究室保存株を用いた。KAGEYAMA et al. (1998) の方法に準じて、rDNA 遺伝子 ITS 領域の PCR-RFLP 法を行ったところ、制限酵素 *Mbo* I, *Hind* III, *Hinf* I, *Pst* I および *Taq* I の断片長パターンで 3 種が識別され、被検株が *P. splendens* に類別されることが確認された (図-8, Tojo et al., 2004)。

また、遺伝子データベースを利用してピシウム菌の同定を確認したり、形態等で同定の困難な菌株の種を推定したりすることができる。図-9 に遺伝子データベースを利用した同定確認の 1 例を示す。佐賀有明海海底から分離されたピシウム菌について調べたところ、形態的な特徴や生理的性状から *P. oligandrum* と同定された (菱池ら, 2003)。しかし、特殊な環境中からの分離であったことから、同定を確認するために同種とその近縁種との rDNA 遺伝子 ITS 領域の塩基配列の比較を行った。*P. oligandrum* とその近縁種について、同領域の塩基配列の全長が DDBJ/EMBL/GenBank に登録されているものをすべて抽出し、UPGMA 法で系統樹を作成した。その結果、佐賀有明海株は *P. oligandrum* のクラスターに属することが確認された。このような手法は、同定を確認するためだけでなく、形態的な特徴や生理的性状がこれまでの記載と一致しない菌株について、種名を推定する場合にも利用できる。一方で、GenBank 等のデータベースに登録されている rDNA 遺伝子の塩基配列は、同種として登録されているものでも大きく異なることがある。形態による同定と同様に、遺伝子解析による同定

でも、原記載の基準株や、詳細な記載のある代表株との比較が重要である。なお、ピシウム菌の rDNA 遺伝子 ITS 領域の解析方法については、MATSUMOTO et al. (1999) に詳しい。

## XI 接種試験

病原性試験はピシウム菌を同定するために必須ではないが、形態の特徴と合わせて記述されることが多い。ピシウム菌では様々な接種法が知られている（一谷, 1995; MARTIN, 1992; 渡邊, 1998）。ここでは、筆者らが日常的に行っている簡便な方法を紹介する。

### 1 ベントグラス種子培地による接種

ベントグラス種子（コーティングされていないもの）1 g を 300 ml 容の三角フラスコに入れ、5 ml の水を加えてフラスコの底に一様に分散させ、高圧滅菌する。接種後、25℃で数日から2週間培養する。菌そうをフラスコから取り出して乳鉢に入れ、滅菌風乾土 50 g を加えて乳棒で菌そうを分断しながらよく混和させる。菌そうと土の混和物約 0.5 ~ 1 g を幼植物の苗の株元に置く。または、感染種子の湿重で 0.02 ~ 0.1% (w/w) になるように培土にあらかじめ混和し、供試植物を播種する。過湿状態にして発病適温付近で育成し、発病を観察する。卵胞子や球状の hyphal swellings を形成しにくい菌種や菌株では、風乾土との混和で感染力を失うため、感染種子をゲル状の素寒天に懸濁させて接種する。ピシウム菌の接種法として従来から行われている土壤フスマ培養と比べて、培養に手間がかからず、接種後に雑菌がはびこりにくい。

### 2 含菌寒天片による土壤接種

HERRERO et al. (2003) の方法を紹介する。キュウリなどの供試植物の種子をポットに必要数よりも多めに播き、出芽後に大きさのそろった個体を必要な数だけ残して、他を抜き取る。1 ~ 2 日間育成した後、被検菌の含菌寒天片を植物体の地際部から数 mm 離れた土壤表面に置く。湿室内に置いて育成を継続すると、出芽後の立枯れを観察することができる（図-10）。この方法は、*P. ultimum* などの出芽後立枯れを起こす菌種でしか使えないが、多くのメリットがある。例えば、被検菌の菌そうが土壤表面を伝って植物体に到達し、発病に至る様子を肉眼で観察することができるため、雑菌の混入による立枯れと区別しやすい。また、供試植物の種子発芽率や出芽不ぞろいに影響されないため、ばらつきの少ない結果が得られる。接種前に、植物にいろいろな処理を施すことができるので、生物防除剤などの評価法としても利用しやすい。

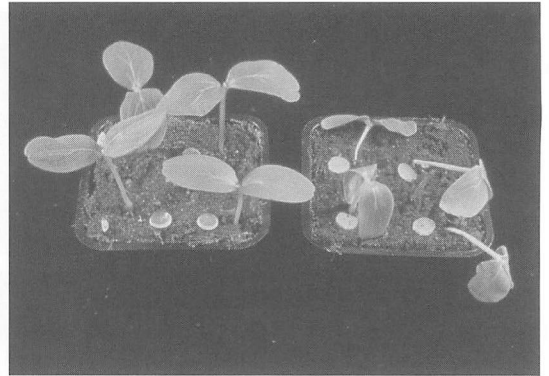


図-10 含菌寒天片による *Pythium ultimum* の土壤接種。キュウリを用い、双葉展開後に茎から数 mm 離れた土壤表面に含菌寒天片を置いて接種した。左は無菌の寒天片を置いた比較対照区

## おわりに

ピシウム菌は分離しやすいものが多く、数日の培養期間で特徴的な器官が観察されることが多い。そのために、形態観察は、費用をほとんど必要としない簡便な同定手段となっている。一方で、安価で正確な遺伝子診断技術の発達にもなって技術的な使い分けが行われており、形態的に区別しやすい種は顕微鏡観察によって同定し、それが難しいものについては遺伝子解析を同時に行うというようになりつつある。また、種によっては分離操作を経ずとも罹病部の顕微鏡観察からある程度診断が可能なものもある。個々の試験目的に応じて手法を使い分けよう。本稿が参考になれば幸いである。

## 引用文献

- 1) ALI-SHITAYEH, M. S. et al. (1986) : Trans. Br. Mycol. Soc. 86 : 39 ~ 47.
- 2) DICK, M. W. (1990) : Key to *Pythium*, Univ. Reading, 64pp.
- 3) HERRERO, M. L. et al. (2003) : J. Phytopathol. 151 : 36 ~ 41.
- 4) 菱池政志ら (2003) : 日本植物病理学会関西西部会講演要旨集.
- 5) 一谷多喜郎 (1992) : 防菌防黴 20 : 107 ~ 116.
- 6) ——— (1995) : 作物病原菌研究技法の基礎—分離・培養・接種—, 日本植物防疫協会, 東京, pp. 288 ~ 292.
- 7) JEFFERS, S. N. and S. B. MARTIN (1986) : Plant Dis. 70 : 1038 ~ 1043.
- 8) KAGEYAMA, K. et al. (1998) : Plant Dis. 82 : 218 ~ 222.
- 9) ——— et al. (2002) : Gen. Plant Pathol. 68 : 15 ~ 20.
- 10) MARTIN, F. N. (1992) Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi, APS Press, St. Paul, pp. 39 ~ 49.
- 11) MATSUMOTO, C. et al. (1999) : Mycoscience 40 : 321 ~ 331.
- 12) MIDDLETON, J. T. (1943) : Torrey Bot. Club Mem. 20 : 1 ~ 171.
- 13) TANINA, K. et al. (2004) : J. Gen. Plant Pathol. in press.
- 14) TOJO, M. et al. (2004) : Plant Dis. 88 : 84.
- 15) 東條元昭ら (1993) : 関西病虫研報 35 : 1 ~ 5.
- 16) Van Der PLATS-NITERINK, A. J. (1981) : Stud. Mycol. 21 : 1 ~ 242.
- 17) 渡邊恒雄 (1998) : 植物土壤病害の辞典, 朝倉書店, 東京, 272pp.
- 18) WATANABE, T. (1989) Ann. Phytopath. Soc. Jpn. 68 : 697 ~ 698.
- 19) WATERHOUSE, G. M. (1967) : C. M. I. Mycol. Pap. 109 : 1 ~ 15.