

各種園芸作物の病原菌の収集と それらの孢子形成能を維持した簡易保存法の検討

古川 聡子

首都大学東京 大学院理工学研究科 生命科学専攻

[〒192-0397 八王子市南大沢 1-1]

Collection of fungi pathogenic to horticultural crops and examination of
their simple preservation method to hold sporulation ability

Toshiko FURUKAWA

Department of Biological Sciences,
Graduate School of Natural Sciences, Tokyo Metropolitan University

1. 目的

これまで様々な種類の植物において膨大な数の菌類病が発見・報告されてきた。しかし、それらの中には生きた病原が保存されておらず、微生物遺伝資源として活用できないばかりか、当該病害の存在を追認できないものがある。そこで、本探索では、おもに野菜・花き類を対象として、農業生物資源ジーンバンクには病原が保存されていない既知の菌類病様の症状を呈するサンプルを採集し、分離菌の病原性の確認を行った上で同ジーンバンクに保存するとともに、ユーザーの手元でも容易に実施可能な簡便な保存方法を開発することを目的とした。

2. 探索概要および簡易保存法の検討

1) 探索概要

2008年5月からほぼ9か月にわたり、病害が発生していると推測される時期に近隣の緑地、畑地、植物園、公共の庭園などを探索した。また、主に貯蔵病害、花卉病害の収集を目的として青果店、園芸店なども調査した。調査地は過去の経験をもとに候補を絞るとともに、新たな緑地、植物園なども調査地として加えた(表1)。具体的には、都立水元公園、都立神代植物園、堀切菖蒲園、小石川植物園、武蔵野種苗園などにおいても調査、探索を行った。なお、病原菌の分離・同定にあたっては、採集した多数の葉や実の病斑部(図1)より落下法などによる単孢子分離、またはそれが困難な場合は組織分離を行った。その後、ジャガイモ煎汁寒天培地(PDA)、オートミール寒天培地(OA)、寒天-葉片法などで菌を培養し、孢子などの形態(図1)より同定を行った。

2) 孢子形成能を維持した簡易保存法の検討

筆者らが開発し、大がかりな設備等を必要とせず、簡便な寒天一葉片法 (Furukawa & Kishi, 2002) に関し、「長期保存」という観点から検討を行った。具体的には、利便性、保存性、および保存後の孢子形成能や病原性などのいわば菌株の安定性について検討した。病害試料を採集して菌株を確立した後の保存年数が重要であるため、今回新しく分離した菌株を用い、生存率、孢子形成能、病原性などを詳細に検討するため、供試葉の種類、保存法（乾燥状態か湿潤状態か、温度条件等）が異なった実験区を設けた。

寒天一葉片法により形成された孢子を、以下のように湿潤または乾燥条件下で室温保存もしくは冷蔵するとともに、凍結乾燥あるいは凍結保存も試みた。供試葉の種類は予備試験において孢子形成能が高かったもの（表2）を用いた。これらの葉を30秒～1分間煮沸した後、素寒天上に置き、菌株を接種した後は約25℃、BLB連続照射下で培養し、2週間後、または孢子が形成された段階でそのまま密封、もしくは葉のみ取り出して乾燥させ、室温または4℃で保存した。また、10%スキムミルクに孢子を懸濁して凍結乾燥保存を行った。さらに、10%グリセロールに孢子を懸濁してマイクロチューブに入れ、-80℃で凍結保存した。対照としたスラント保存では、PDAとOAを用いて培養した菌株を室温で保存し、2か月毎に継代培養を繰り返した。実験に用いた菌株のうち、MAFF 241689, MAFF 241690, MAFF 241691, MAFF 241694, MAFF 241699, MAFF 241702, MAFF 241703, MAFF 241704は、いずれも実験開始時点では孢子を形成した。保存に関する実験は3年程度継続して行い、長期保存に適した条件を評価する予定である。

表 1. 主な探索場所

| 探索場所* | 探索時期 |
|----------------------|--------------------------|
| <畑地など> | |
| 群馬県前橋市 | 2008年5月, 6月, 7月, 2009年1月 |
| 群馬県渋川市 | 2008年10月 |
| 茨城県牛久市 | 2008年10月 |
| 茨城県土浦市 | 2008年5月 |
| 埼玉県朝霞市 | 2008年7月 |
| 東京都北区 | 2008年6月, 7月, 9月 |
| 東京都文京区 | 2008年6月 |
| 東京都港区 | 2008年5月, 2009年2月, 3月 |
| 東京都府中市 | 2008年5月 |
| 東京都国立市 | 2008年5月～2009年2月 |
| 東京都八王子市 | 2008年5月～2009年2月 |
| 神奈川県川崎市 | 2008年5月, 6月, 7月, 9月, 11月 |
| 宮崎県宮崎市 | 2008年7月 |
| <植物園など> | |
| 都立水元公園 | 2008年6月, 9月 |
| 都立神代植物園 | 2008年5月 |
| 堀切菖蒲園 | 2008年6月, 9月 |
| 小石川植物園 | 2008年6月 |
| 武蔵野種苗園 | 2008年7月 |

*店などは除く

表 2. 用いた葉の種類

| |
|--------|
| クヌギ |
| シャリンバイ |
| クワ |
| マテバシイ |
| アオキ |
| ビワ |
| ナンテン |
| アジサイ |
| イチョウ |
| ツバキ |
| サザンカ |
| ツツジ |
| キンモクセイ |
| カシ |
| サクラ |
| クチナン |
| ケヤキ |
| モクレン |

3. 結果

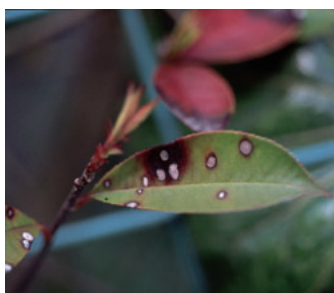
1) 探索収集

表 4 に示した 8 菌株（アセビ由来の *Colletotrichum* sp., クチナシ由来の *Phomopsis* sp., ジャガイモ由来の *Fusarium* sp., ナス由来の *Sclerotinia sclerotiorum* および *Botrytis cinerea*, ナンテン由来の *Glomerella cingulata*, ネギ由来の *Alternaria porri*, マンリョウ由来の *Colletotrichum* sp.）をジーンバンクに登録することができた。

今までの知見をもとに、病害頻発場所を中心に調査・採集を何度も繰り返したが、目的とする病害が発生していないことが多く、目標とする収集菌株数には達しなかった。また、病徴より既知の病害であると予測して採集したが、複数の菌が分離され、新病害の可能性が示唆されるものが少なからず認められた(表 3)。現在、それらの分離菌を対象として、病原性をはじめとする各種性状の確認試験を実施中であり、新病害として記載するための準備を進めている。

表 3. 病原菌特定中の病害が認められたサンプル

| 植物名 | 採集場所 | 採集時期 |
|--------|---------|----------|
| カナメモチ | 東京都北区 | 2008年9月 |
| キンモクセイ | 東京都北区 | 2008年9月 |
| サカキ | 東京都文京区 | 2008年6月 |
| シャガ | 東京都府中市 | 2008年5月 |
| シャリンバイ | 東京都府中市 | 2008年5月 |
| ショウブ | 市場で購入 | 2008年5月 |
| ツツジ | 神奈川県川崎市 | 2008年5月 |
| ツワブキ | 東京都国立市 | 2008年10月 |
| ネギ | 埼玉県朝霞市 | 2008年7月 |
| バラ | 群馬県前橋市 | 2008年7月 |
| パンジー | 神奈川県川崎市 | 2008年5月 |
| フェイジョア | 市場で購入 | 2008年8月 |
| ホトトギス | 東京都北区 | 2008年7月 |
| ミヤコワスレ | 神奈川県川崎市 | 2008年7月 |
| ユリ | 東京都八王子市 | 2008年8月 |



カナメモチ (東京都北区)



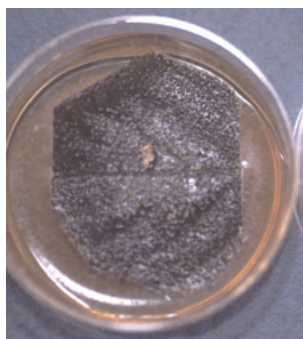
シャガ (東京都府中市)



ツワブキ黒斑病 (東京都八王子市)



シャガ分離菌の培養
(寒天-葉片法)



キンモクセイ分離菌の培養
(寒天-葉片法)



ツツジ分離菌の子のう殻
(寒天-葉片法により形成)

図 1. 供試した罹病植物と分離菌

表4. 登録菌株一覧

| MAFF番号 | 学名 | 宿主名 | 病名 | 採集場所 | 採集時期 | 備考 | 元株名 |
|--------|---------------------------------|-------|-------|---------|---------|---------------------|--------|
| 241691 | <i>Colletotrichum</i> sp. | アセビ | ND | 群馬県前橋市 | 2008年5月 | | 08GB6 |
| 241694 | <i>Phomopsis</i> sp. | クチナシ | ND | 東京都八王子市 | 2008年5月 | 病原性確認済み (学会発表予定) | 08GB7 |
| 241696 | <i>Fusarium</i> sp. | ジャガイモ | ND | 神奈川県川崎市 | 2008年5月 | 市場で購入 | 08GB14 |
| 241697 | <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> | ナス | 菌核病 | 宮崎県宮崎市 | 2008年7月 | | 08GB32 |
| 241698 | <i>Botrytis cinerea</i> | ナス | 灰色かび病 | 宮崎県宮崎市 | 2008年7月 | | 08GB33 |
| 241699 | <i>Glomerella cingulata</i> | ナンテン | ND | 群馬県前橋市 | 2008年5月 | | 08GB 5 |
| 241702 | <i>Alternaria porri</i> | ネギ | 黒斑病 | 群馬県前橋市 | 2008年5月 | | 08GB1 |
| 241705 | <i>Colletotrichum</i> sp. | マンリョウ | ND | 群馬県前橋市 | 2008年5月 | | 08GB4 |

ND: Not decided

2) 胞子形成能を維持した簡易保存法

保存法に関しては、スラント、凍結、凍結乾燥、および寒天一葉片法を用いて研究を実施している。なお、寒天一葉片法の予備試験において、アジサイとクチナシの葉片を供試した場合、多くの菌株で生育および胞子形成が良好になることが認められたので、この2種類の葉を用いて保存実験を実施することにした。

スラント保存法では、MAFF 241699において2回の継代培養後に胞子形成能が著しく低下することが認められた。また、寒天一葉片法において、MAFF 241702では胞子形成能が低下することが観察された。その他の菌株に関しては、6ヶ月後の現時点（平成21年8月）において、いずれも胞子形成能は保たれている。今後もさらに実験を継続することによって、安定した簡易保存法を確立したい。

4. 所感

東京都、群馬県、神奈川県など関東地方の畑地を中心に過去の知見から糸状菌による既知病害が多く発生すると思われる場所において調査、収集を行った結果、新病害と思われる事例が多数観察され、むしろ既知病害と確認できたものは少数であった。今後、既知病害の病原菌を収集する際には、園地の管理者などとの連絡を密にし、調査範囲を絞ってより頻繁に調査を行う方が効率的に収集できる可能性が高いと考えられた。

5. 謝辞

本探索においては、武蔵野種苗園、東京大学大学院理学系研究科附属植物園（小石川植物園）、東京都立神代植物公園、および東京都立水元公園にご協力をいただいた。ここに感謝の意を表する。

6. 参考文献

- 1) 小林享夫他 編（1992）植物病原菌類図説。 全国農村教育協会。 東京。
- 2) 岸國平 編（1998） 日本植物病害大辞典。 全国農村教育協会。 東京。
- 3) 日本植物病理学会 編（2000）日本植物病名目録。 東京。
- 4) 古川聡子・岸國平（2000）産地を異にする *Phoma* 型菌3菌株によるタチアオイ（ホリホック）の斑点性病害。 日本植物病理学会報 66 : 273.
- 5) Furukawa, T. and Kishi K. (2002) Production of perithecia of various Ascomycotina on water agar medium emended with leaf pieces. J. Phytopathology 150:625-628.
- 6) Furukawa, T. and Kishi, K. (2004) Black leaf spot and circular leaf spot of *Farfugium japonicum* (L.) Kitamura caused by *Phoma* spp. J. Gen. Plant Pathol. 70:292-294.

Summary

We explored phytopathogenic fungi, which were not registered at the NIAS Genebank, in farmer's fields, botanical gardens, green tracts, fruits and vegetable shops, flower shops and so on in Tokyo, Kanagawa, Gunma, Ibaraki, Saitama Prefectures in Kanto District and Miyazaki Prefecture in Kyushu District intermittently from May 2008 to February 2009. As a result, 8 isolates were collected and deposited to the NIAS Genebank. Some of them were the pathogens of known diseases. Others seemed to be pathogens of new diseases, though their symptoms were similar to those of known diseases. The pathogenicity of them are now under examination.

To develop a simple preservation method of fungal strains, agar slant culture methods using PDA or OA, freezing methods, freeze-dry methods and the Agar Leaf Piece Method, are now under investigation concerning their survivability and ability of sporulation.