

植物防疫基礎講座：

うどんこ病菌の室内継代培養

東京都農林総合研究センター ^{はし}星 ^{ひで}秀 ^お男

はじめに

うどんこ病菌は絶対寄生菌であり、生きた植物上でしか生育・増殖ができない。そのため、菌株の培養や維持は無病で育成した植物（原宿主）上で行わなければならない。寒天培地で培養が可能な多くの病原菌類とは、継代培養の方法が根本的に異なる。

近年、東京都内では *Oidium* 属 *Reticuloidium* 亜属菌によるキュウリや花き類のうどんこ病が多発している。このため、東京都農林総合研究センターでは、本亜属菌の生態解明、防除対策確立のために、常時、数十菌株のうどんこ病菌を継代培養しながら、各種の試験研究を実施している。うどんこ病菌の接種試験や薬剤耐性検定など各種実験のための菌株確保や菌株保存の方法は研究者によって様々な方法が考案されており、近年でも、浅利ら（1994）、中澤・大塚（1994）、小板橋（2002）、UCHIDA et al.（2009）等が報告しているが、室内継代培養についての詳細な解説は見当たらない。佐藤ら（2007）は、乾燥凍結によるうどんこ病菌の長期保存法を開発したが、特殊な機器類を必要とし、本方法で保存が可能なうどんこ病菌は一部の種に限られることから、一般的とは言えない。そこで、本稿では筆者が日常行っているうどんこ病菌の菌株の確保および継代培養方法を紹介したい。なお、うどんこ病菌の分類体系は分子系統解析結果をもとに、従来の形態分類が大幅に改訂され、世界的に定着しつつある。*Oidium* 属 *Reticuloidium* 亜属菌を含む最新の分類体系や観察・同定の手法などは、高松（2002）および佐藤（1999；2002）を参考にされたい。

I 菌株の採取

うどんこ病菌を長期間維持、継代するためには、第一に、採取する菌（サンプル）の状態が成否を決めると言っても過言ではない。特に、単独のコロニーが発生している発病初期の新鮮なサンプルを採取することが大切である。発病後期のサンプルには、寄生菌が混入していることが多く、このような状態の菌で継代培養を始めても、短期間でうどんこ病菌が死滅してしまうばかりか、

実験系に雑菌を持ち込むことになる。また、アザミウマ類、ハダニ類等の微小害虫の寄生がないものを選ぶことも必要である。これらの害虫を一度実験室に持ち込んでしまうと、完全に駆除するのに大変労力を要する。

1株の植物上あるいは1枚の病葉上には、肉眼的には標徴として判別しがたいが、2種類以上のうどんこ病菌が同時に寄生している場合が多々ある。そこで、単一のコロニーごとに生物（正立）顕微鏡で観察し、菌の形態から目的とする菌種を特定した後、そのコロニー上の分生子を室内で育成した健全な原宿主植物に接種する。接種方法は、罹病植物上の単一のコロニーから画筆を使って分生子をかき取り、健全植物へなすりつけるか（中澤・大塚，1994）、もしくは払い落とす。

II 菌株の保存

採取したうどんこ病菌を、室内で原宿主植物に接種して継代培養を開始するには、菌を接種した植物を隔離し、コンタミを防ぐための容器が必要になる。筆者は、①透明な塩化ビニル（以下「塩ビ」）製の管、②食器の水切りかごや漬け物用容器、③昆虫飼育箱の三つを使用している（口絵①）。それらの詳細は以下である。①は、厚さ1mmの透明な塩ビ板を、熱水に浸して柔らかくし、直径約10cm×長さ30cmの水道管（塩ビ製）に巻きつけて、円筒状に形成し、冷やした後、端を接着する。その内部には7.5cmポリポット植えの植物がちょうど1鉢入る。上部はラップで覆い、その開け具合で内部の湿度を調整する。②はフタが透明であればどんなものでもよい。ホームセンターなどには様々な大きさや形状の容器が販売されているので、使用する植物や置き場所、試験規模にあわせて選択するとよい。筆者は主に新輝合成（株）製の水切りかご（規格No.2とNo.3）を使用している。③は三紳（株）製ツマグロコバイ類大量飼育箱を使用している。通常前面となるフタを上面にし、側面の網は上からラップで覆う。②、③はフタの開け具合で湿度調節が簡単にでき、植継ぎに新しい植物を追加する場合も作業が容易である。

①～③のいずれを使う場合でも、下部に深さ1cm程度の水を張り（①、③は鉢下にトレイを置く）、植物には底面から給水させると同時に、容器内の湿度を維持す

る。遠藤(1989)は、湿度80%以上の条件では分生子の飛散がほとんど認められないことを報告しており、高湿度条件は実験室内での分生子飛散によるコンタミ防止に有効と考えられる。実際に筆者の試験範囲ではコンタミは完全に防いでいる。湿度条件は容器内壁の一部がわずかに曇る程度がよい。容器や葉に水滴がつくようでは湿度が高すぎ、植物の生育に悪影響を及ぼす。

III 継代培養を行う場所

継代培養を行う場所について、菌株数がさほど多くなければ、通常の実験室内で問題はない。塩ビ管数個程度なら窓際に置くことで採光は十分であり、自然光が取り込めない場合には、植物育成灯を設置する。多くの菌株を扱う場合は、うどんこ病菌継代培養専用の部屋を設けたほうがスペース的にも作業的にも都合がよいが、空調は不可欠で、室温を23℃前後に保てることが理想である(口絵②)。なお、継代場所付近に生物顕微鏡(正立)を1台設置しておくことと菌の状態を随時確認でき、非常に便利である。

IV コンタミの防止対策

通常の実験室でうどんこ病菌を継代培養する場合、外部からの持ち込みや培養中の菌株同士でのコンタミには細心の注意を払う必要がある。培養環境を完全な無菌状態にすることはほぼ不可能であるが、以下の点に留意することにより、コンタミのリスクを限りなく低くすることができる。

(1) うどんこ病菌を培養している実験室へはむやみに入らない。また、実験に携わっていない人の入室は厳禁とする。コンタミは、ほとんどの場合、人の衣服などに付着して外部から持ち込まれることにより発生する。入室制限は、菌のコンタミ防止だけでなく、微小害虫の侵入防止にも極めて有効である。

(2) うどんこ病菌を扱う実験は、野外や圃場に出る前に行う。圃場などから戻った後にうどんこ病菌の実験を行う場合は必ず衣服を着替える。

(3) 部屋は常に清潔に保ち、実験前と実験後は必ず机などを70%エタノールで拭く。また、実験室に不要な土砂や植物などを持ち込んだり、放置しない。

(4) うどんこ病菌を培養中の植物は、分生子の飛散などを防ぐため、必要なとき以外は動かさない。

その他、実験や観察を行う際には、容器のフタの開閉は極力静かに行うこと、実験中は空調を一時停止し、室内の空気の流れを止めることなど、細心の注意を払うことが重要である。

V 継代培養用植物の育成

うどんこ病菌の試験を開始する前に、あらかじめ培養用の宿主植物を育成しておく必要がある。培養用植物の育成は、うどんこ病菌を採取、または接種する時期を考慮して、計画に栽培する必要がある。

培養用の植物を苗や穂で購入すると、必ずと言ってよいほど各種の菌類や微小害虫が付着してくる。やむを得ない場合以外は、実験室内で種子から育成する。品種によってうどんこ病菌に対する感受性の差異、室内の光条件でも徒長しにくい、過湿条件に強いなど、実験室での扱いやすさに差異があるので、初めは1種類の植物で数品種用意し、実験環境に最も合う品種を選定する。筆者の場合、例えばキュウリでは‘南極2号’、ヒマワリでは‘ビッグスマイル’という品種を予備実験から選定し、使用している。

培養用植物の栽培はポットで行う(7.5 cmのポリポットがスペースも取らず、管理しやすい)。用土は赤玉土を単独で使用し、植物の生育状況を見ながら液肥を施用する。市販の園芸培土は植物の種類によって生育に差が出やすく、何種類もの植物を同時に扱う場合にはやや使いにくいように感じる。また、園芸培土には有機物が豊富なものも多く、これらをエサとする微小害虫が発生しやすい欠点もあり、室内でのうどんこ病菌の継代培養には適さない。

VI 応急的な菌株の維持

新宿主の発見などで、手元に培養用の健全植物がない場合は、罹病植物を根付きで採取し、鉢植えにして維持する。それができない場合には、サンプルをそのまま挿し穂にし、水切りかごなどで保持する。このような場合も考慮して、サンプルはなるべく罹病初期で新鮮なものを多めに採取する。栽培中のキュウリなど葉しか採取できない植物では、葉柄をカミソリで切り直して新鮮な切り口をつくり、その切り口に湿った脱脂綿を巻き、容器に静置して適度な湿度に管理すると、植物の種類によっては2週間以上維持できる(口絵③)。

おわりに

筆者が行っているうどんこ病菌の継代培養法では、特別な機器や専用の道具はほとんど使用しない。身の回りにあるものをうまく利用する工夫と、実験環境を清潔に保つという植物病理学実験の基本を忠実に守ることで、絶対寄生性という特徴をもつうどんこ病菌でも室内で長期間継代培養することが可能である。とはいえ、いまだ

にこれが最適という方法は見いだせておらず、富山県立大学教授佐藤幸生博士、法政大学生命科学部教授堀江博道博士をはじめ、多くの先生方のご指導を仰ぎながら、試行錯誤を繰り返している状態である。本稿での手法を試される場合には、研究者ごとに実験環境や取り扱う菌に合わせてアレンジしていただくようお願いする。

もう一つ筆者が重視している点は、実際の生産圃場における環境条件、植物の生育状況等、特にうどんこ病多発生圃場の環境を常に体感し、それを実験室の環境作りに応用することである。専門書や実験書に記述された手法をベースにすることは基本ではあるが、自然発生下に

おける様々な条件を、わずかでも継代培養の環境に組み入れるよう改善を重ねることで、より良好な結果が得られている。

引用文献

- 1) 浅利 寛ら (1994): 関東病虫研報 41: 69 ~ 75.
- 2) 遠藤忠光 (1989): 福島農試特研報 5: 21 ~ 24.
- 3) 小坂橋基夫 (2002): 植物防疫 56: 251 ~ 254.
- 4) 中澤靖彦・大塚範夫 (1994): 同上 48: 270 ~ 272.
- 5) 佐藤幸生 (1999): 同上 53: 185 ~ 194.
- 6) ——— (2002): 同上 56: 274 ~ 280.
- 7) ———ら (2007): 日植病報 73: 217 (講要).
- 8) 高松 進 (2002): 植物防疫 56: 229 ~ 237.
- 9) Uchida, K. et al. (2009): J. Gen. Plant Pathol. 75: 92 ~ 100.

登録が失効した農薬 (21.7.1 ~ 7.31)

掲載は、**種類名**、登録番号：商品名（製造者又は輸入者）登録失効年月日。

「殺虫剤」

- マラソン乳剤
2360：フマキラー印マラソン乳剤（フマキラー）09/07/19
2100：ヤシママラソン乳剤 50（協友アグリ）09/7/23
- CYAP 水和剤
11059：ヤシマサイアノックス水和剤（協友アグリ）09/07/06
- MPP 乳剤
11099：ファインケム B 乳剤（東京ファインケミカル）09/07/31
- フェンバレレート・MEP 水和剤
15460：ヤシマパーマチオン水和剤（協友アグリ）09/7/23
- エチルチオメトン・ダイアジノン粒剤
16060：ヤシマバジノン粒剤 6（協友アグリ）09/07/04
- クロルピクリン・DCIP 油剤
17053：ルーテクト油剤（エス・ディー・エス バイオテック）09/07/29
- 17054：三光ルーテクト油剤（三光化学工業）09/07/29
- DDVP くん煙剤
17891：ジェット VP（新富士化成薬）09/07/19
17892：日曹ジェット VP（日本曹達）09/07/19
- エトキサゾール・フェンプロパトリン水和剤
19963：ヤシマビルク水和剤（協友アグリ）09/7/23
- アセフェート・イソキサチオン粉粒剤
21083：カルホスエース微粒剤 F（三井化学アグロ）09/07/07

「殺虫殺菌剤」

- シフルトリン・トリアジメホン液剤
21732：ムシキン液剤 AL（レインボー薬品）09/07/19

「殺菌剤」

- イミノクタジン酢酸塩液剤
15651：ヤシマベフラン液剤 25（協友アグリ）09/7/23

- フサライド・ベンシクロン水和剤
18254：ヤシマラブサイドモンセレンフロアブル（協友アグリ）09/7/23
- フサライド水和剤
18633：ヤシマラブサイドフロアブル（協友アグリ）09/7/23
- フェノキサニルマイクロカプセル剤
21731：BASF アチーブ MC（日本農薬）09/07/19

「除草剤」

- シメトリン・モリネート粒剤
11922：ヤシママメット粒剤（協友アグリ）09/7/23
- シメトリン・モリネート・MCPB 粒剤
13314：ヤシママメット SM 粒剤（協友アグリ）09/7/23
- ピラゾスルフロンエチル・メフェナセット粒剤
17461：ヤシマアクト粒剤（協友アグリ）09/7/23
- ピラゾスルフロンエチル・モリネート粒剤
17466：ヤシマバールーフ粒剤（協友アグリ）09/7/23
- シメトリン・モリネート・MCPB 粒剤
19016：ヤシママメット SM1 キロ粒剤（協友アグリ）09/7/23
- クミルロン・ベントキサゾン剤
19855：ヤシマ草笛ジャンボ（協友アグリ）09/7/23
- インダノファン・ピラゾスルフロンエチル・プロモブチド粒剤
20720：ヤシマキリフダエースジャンボ（協友アグリ）09/7/23
- インダノファン・ピラゾスルフロンエチル・ベンゾピシクロン粒剤
21214：ヤシマボス 1 キロ粒剤（協友アグリ）09/7/23