

べと病菌の長期冷凍保存法

埼玉県園芸試験場鶴ヶ島洪積畑支場 しま 嶋 ぎき 崎 ゆたか 豊

べと病菌は純寄生菌であるため、合成培地上での人工培養はできない。このため幼苗上での継代培養等（片岡, 1976；大口, 1989）により菌株の増殖、保存がなされている。近年、ブロッコリーやハウレンソウのべと病菌にもレース分化が明らかとなり（佐藤・福本, 1993 a；嶋崎, 1988），べと病菌の変異の生じない安定した長期保存はその重要性を増してきた。

多くの糸状菌の保存には真空乾燥法（凍結乾燥法等）や液体窒素法が有効であるが、べと病菌の保存には真空乾燥法が困難なため、現在のところ凍結保存法によってのみ長期保存が可能である。凍結保存の報告の多くは液体窒素法によるもので、一部に冷凍保存法が行われるようになった（表-1）。ここでは電機冷凍庫を利用した-20～-80℃によるべと病菌の冷凍保存法を主体に述べる。

I -20℃による冷凍保存法

分生孢子を密生した病斑ごと保存する方法で、明智（1983）はキュウリ及びブドウべと病菌を対象に凍害防御剤なしにそのまま冷凍して7か月近く保存させた。近年筆者らがハウレンソウべと病菌を対象にして、粉末状の凍害防御剤に病斑ごと埋設したところ、-20℃で1年以上保存できた。この手法は保存のための操作が簡便でありまた特別な装置もいらぬため、育種や栽培現場でのレース保存等に好適と考えられる。その概要を列記すると以下のとおり。

1 保存菌の準備

分生孢子を密生した病斑を1cm四方（保存容器内におさまる適当な大きさ）に切りそろえる。ハウレンソウべと病菌の分生孢子は短期間に死滅しやすいため分生孢子は病斑形成初期の新鮮なものが望ましいが、分生孢子的密度が疎であると、保存に用いる粉末状の凍害防御剤に固着して離脱しやすいため、病斑上から回収できる分生孢子的絶対量が不足しやすい。このため、病斑上の古い孢子を洗い流して新たに孢子を形成しなおしたもの〔キュウリべと病菌に関する稲葉の報告（1975）参照〕より、古い孢子も混在する密生した病斑の方が本保存法には適する。このような病斑上の分生孢子を使用すると、孢子全体の平均発芽率は低くなるが、健全孢子的絶対量の確保は容易となる。自然発病株上の孢子を保存する場合

表-1 べと病菌の保存データ（浜屋, 1987より抜すい、一部追加）

菌名	保存法	保存期間	文献番号
<i>Bremia lactucae</i>	液体窒素	3年	3
<i>Peronospora parasitica</i>	凍結-80℃	1年	11
<i>P. spinaciae</i>	凍結-20℃	15月	13
<i>P. tabacina</i>	低温5℃	131日	5
	液体窒素	2年1月	2
<i>Plasmopara viticola</i>	凍結-20℃	200日	1
<i>P. viticola</i>	液体窒素	9年	3
<i>P. viticola</i>	液体窒素	1年	14
<i>Pseudoperonospora cubensis</i>	凍結-20℃	200日	1
<i>P. cubensis</i>	凍結-70℃	127日	15
<i>P. cubensis</i>	液体窒素	1年	3
<i>Pseudoperonospora humuli</i>	液体窒素	1年	14

合は、晴天日の夕方に孢子形成の多い初期病斑を葉柄ごと切りとり、古い孢子を洗い流さずそのまま12～15℃の暗黒多湿条件下で12～17時間保って新たな孢子形成を促せた後に、新鮮な孢子が多い部分を主体に切り取って保存する。この際、急激な湿度低減による孢子的飛散（未発表）を避けるため、取り扱いを丁寧かつ迅速に行う。

2 凍害防御剤

病斑をそのままポリエチレン袋等に収めて凍結しても、2～3か月であれば保存孢子里に病原性が認められる。しかし、1年以上の保存が必要な場合は、凍害防御剤である寒天末またはスキムミルクを粉末の状態で使用する。スキムミルクは市販の食用のものも利用できるが、保存する病斑部の水分等により寒天末に比べて固まりやすい。このような固化部に孢子が多く付着するため、病斑部から離脱する孢子的量が多く回収量が減少する。このため、保存する孢子的量が少ない場合は寒天末を利用するとよい。

3 凍害防御剤内部への孢子形成病斑の埋設

これらの凍害防御剤を入れた保存容器の内部に、病斑切片を重ねらぬように埋設するが、凍害防御剤と病斑切片を交互に容器内に入れるとよい（図-1参照）。保存容器はネジ口瓶等の蓋付きのものが望ましいが、パラフィルム等で密封してもよい。なお、凍害防御剤・保存容器とも滅菌処理は不要である。

4 冷凍温度

孢子形成病斑を保存容器に収め密閉した後、-20℃の冷凍庫に保存する。-80℃による保存とほぼ同等の保存

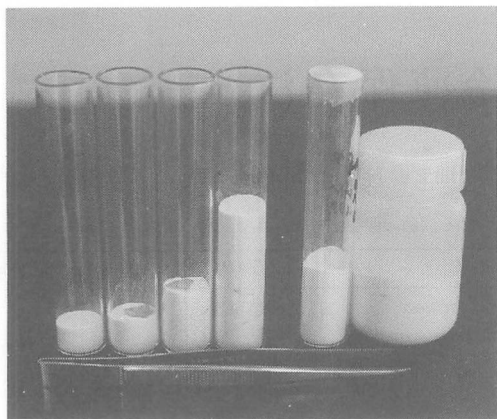


図-11 粉末状の凍害防御剤への埋設（左の試験管 4 本は左→右の順に病斑切片を埋設している状況）

効果が認められる（表-2）。予冷処理などは不要である。

5 復元と接種源の調整

保存容器内で凍害防御剤とともに保存した病斑切片を取り出して凍害防御剤を軽くたたきおとした後、1cm 四方の病斑切片 1 枚当たり 1ml の純水をペトリ皿などに注いで病斑切片をその純水に浸し、30 分前後放置する。凍結融解の際、温浴の必要はなく、室温（15～30℃）でよい。病斑切片は水の表面に浮いてしまうため、あらかじめ孢子形成が多い面を下側にするか、途中で裏返すと満遍なく吸水される。その後、湿った病斑部から絵筆等で分生孢子を水中へ洗い落とす。この際、落としきれなかった凍害防御剤も孢子懸濁液の中に混入するが、そのまま接種源に用いて支障ない。

6 保存期間

15 か月までは十分な病原力を保持している（表-2）。保存 7 か月後における孢子発芽率は、保存直前の 50～80% であり、これらの孢子懸濁液をハウレンソウ幼苗に塗布接種したところ、病株率は 65～80% であった（表-2、表-3）。孢子発芽率は保存前のものを含めて全般に低かったが、これは密生した孢子の中に死滅した孢子が多数混入していた結果と考えられる。しかし、全孢子数が多かったため、発芽した孢子数は 1ml 当たり約 10^4 個混在していた。

また、ハウレンソウベと病菌レース 4 について、保存後のレース検定を行ったところ、保存前と同一のレースであることが確認され、寄生性分化にも変異が認められなかった（表-4）。

7 接種前後の留意事項

接種に供するハウレンソウは、ベと病抵抗性が認められない“豊葉”等の品種を使用する。また本葉出現初期に接種すると感受性が高く、接種した病原菌の懸濁液が

表-2 ベと病菌分生孢子の低温保存方法と保存後の病原性

孢子形成した 病葉の埋設材料	ハウレンソウの発病株率 (%)				
	レース 3 菌		レース 4 菌		
	85 日後	464 日後	209 日後		
	-20℃	-20℃	-80℃	-20℃	5℃
寒天末	90	70	70	65	0
スキムミルク	80	50	70	75	0
ポリビニルアルコール	40	10	75	50	0
無処理	20	0	50	5	0

表-3 病葉上の分生孢子の低温保存法と保存後の発芽率

病 葉 の 埋 設 材 料	分生孢子の発芽率 (%)		
	-80℃	-20℃	5℃
寒天末	11	13	0
スキムミルク	4	8	0
ポリビニルアルコール	2	6	0
無処理	0	0	0

209 日間の保存後に調査した。保存直前の発芽率は 16%

表-4 ハウレンソウベと病レース 4 菌における
冷凍保存前後の病原性の差異

判別品種	抵抗性遺伝子	病株率 (%)	
		保存前	保存後 ^{b)}
豊 葉	無	85	80
Califlay	M1・M3	80	70
Ozarka	M1・M2	85	70
Chinook	M1・M2・M3	70	65
St. Helens	M1・M2・M3	70	75
試 交 215	(R3・R4) ^{a)}	0	0

^{a)} レース 3 と レース 4 に抵抗性。

^{b)} -20℃で 209 日間保存したもの

本葉の発生部にも多量に溜り感染頻度も増大するので、本葉出現初期の生育ステージは、塗布接種に最も適している。ハウレンソウは 3 号ポリポットに数株生育させて苗を仕立て、夕方に絵筆等を用いて孢子懸濁液を子葉の表裏にくまなく塗布接種し、鉢ごとポリ袋等で密閉して翌朝まで 15℃前後の暗黒に保って感染させる。その後は、ガラス室等で 5～20℃に管理する。十分な日光と通常の肥培管理を行うと、10 日前後で子葉に分生孢子を多数形成する。子葉が軟弱であると孢子形成量が少なく、また発病後 2～3 日のうちに枯死してしまう。子葉に形成された分生孢子を集めて懸濁液とし、プランター等で栽培したハウレンソウの本葉 1～2 葉展開苗に噴霧接種し、その後は上記と同様に管理して、本葉上に形成される病斑から多量の分生孢子を得る。このように、保存孢子をまず

子葉上に接種して新鮮な胞子を形成させて、それらをもとに本葉上で増殖すると保存菌株の増殖が確実である。

II -80℃による冷凍保存

佐藤・福本 (1993b) はブロッコリーべと病菌を対象に液体の凍害防御剤を使用した-80℃による保存法を確立し、寒天等粉末状の凍害防御剤より優れた結果を得ている。

病葉上の新鮮な分生胞子を滅菌水中に刷毛ではき落として遠沈凝集し、これを凍害防御剤中へ 10^4 個/ml 以上になるように懸濁してプラスチックのネジ口瓶に収める。凍害防御剤は10%DMSO (ジメチルスルホキシド) +10%スキムミルクまたは10%DMSO+5%スキムミルクを使用する。液状の凍害防御剤による-20℃での保存及び予備凍結を行わない直接-80℃での凍結は保存菌の死滅が早い、-20℃で24時間予備凍結した後に-80℃で冷凍すると、12か月の保存が可能である。

本法は新鮮な胞子のみを保存対象にすることが可能であり、また、同質の胞子懸濁液を多量にあるいは複数に分けて保存できるので、精度を厳しく求められる基礎試験等の接種源にも利用可能であろう。なお、本法も融解温度の影響は認められないが、40℃の温浴で融解が行われている。とけたら早めにネジ口瓶ごと流水で冷やす。

III 液体窒素保存法

液体窒素保存法はDAHMAN (1983) の報告や山里 (1987) のとりまとめに詳しく述べられているが、べと病菌の保存例も多いため概略を述べる。

液体窒素をいれた密閉容器により保存する方法で、保存温度は液相部で-196℃、気相部で-150℃といずれも低く、処理条件により長期の安定した保存が可能である。凍害防御剤は8.5%スキムミルク+10%グリセロールまたは15%DMSO等の液体が多く用いられ、これらに胞子を懸濁して保存する。胞子懸濁液の最終調整濃度は $10^6 \sim 10^8$ 個/ml と高めに設定する。凍害防御剤のDMSOは細胞により毒性がみられることがあるため、新たにべと病菌の保存を検討する際には留意する。手塚・勝屋 (1983) はホップべと病及びブドウべと病を対象に、凍害防御剤としてポリビニルアルコールや寒天末等の粉末を用いて、胞子を形成した病斑ごとこれらに埋設することによりこれらの病原菌の保存を可能にした。べと病菌の種類により凍害防御剤の種類や使用濃度の検討が重要と思われる。

液体窒素保存法は著しい低温で保存するため、凍害防御剤のほかにもべと病菌保存操作上留意せねばならないポイントが多いので略記する。

まず凍結速度は緩慢に行う必要がある。その手法の一例をあげれば、保存する菌体を4~7℃に30分置いて細

胞内に凍害防御剤を浸透させる。次いでプログラムフリーザーを使用して-30~-40℃まで-1℃/分の割合で温度を下げ、その後に液体窒素をいれた密閉容器に収める。

次に保存菌体またはその懸濁液を入れる保存容器は、窒素が流入しても安全なプラスチックバイアルを用いてネジ口とする。べと病菌の保存量は液体窒素をいれた密閉容器の容積を考えると、一般的には少量に限られよう。

復元時の融解温度は、べと病菌に対しての影響はないものと考えられているが40℃の温浴の事例が多い。

最後に蛇足ながら液体窒素保存法は安定した方法ではあるが、経費が高額となる事をつけ加えたい。

糸状菌の保存法は近縁の種が同一の手法で可能なことも多い反面、種が異なると保存結果の異なる事例もみられる。特に純寄生菌であるさび病菌やうどんこ病菌にはこのような例が多くみられるため、べと病菌についても各種保存法で比較検討し、対象とする種に最適な保存法を明らかにしていく必要がある。さらには、各種べと病菌に共通な保存方法の確立が望まれる。また今後の問題として、もともと生存期間の短い分生子のような無性胞子より、生存期間の長い卵胞子を対象とした保存法の検討が待たれる。そのためにも、卵胞子の形成 (稲葉 1979) 及び発芽等の条件の十分な解明が切望される。

引用文献

- 1) 明智洸一郎 (1983) : 日植病報 49 (1) : 99.
- 2) BROMFIELD, K. R. and C. G. SCHMITT (1967) : Phytopathology 57 : 1133.
- 3) DAHMAN, H. et al. (1983) : Phytopathology 73 (2) : 241~246.
- 4) 浜屋悦次 (1987) : 微生物の長期保存法, 農林水産技術会議事務局・農業環境技術研究所, 東京, pp. 117~135.
- 5) HILL, A. V. (1962) : Nature 195 : 827~828.
- 6) 稲葉忠興 (1975) : 植物防疫 29(11) : 441~446.
- 7) ——— (1979) : 植物防疫 33(10) : 447~451.
- 8) 片岡正明・清水幸夫 (1976) : 日植病報 42(1) : 109.
- 9) 大口富三ら (1989) : 日植病報 55(5) : 561~566.
- 10) 佐藤 衛・福本文良 (1993a) : 日植病報 59(3) : 296.
- 11) ———・——— (1993b) : 日植病報 59(5) : 492~499.
- 12) 嶋崎 豊 (1988) : 植物防疫 42(7) : 347~350.
- 13) ———・野口 篤 (1992) : 日植病報 58(4) : 589.
- 14) 手塚保行・勝屋敬三 (1983) : 日植病報 49(5) : 731~735.
- 15) 土屋行夫 (1985) : 凍結及び乾燥研究会会誌 31 : 53~62.
- 16) 山里一英 (1987) : 微生物の長期保存法, 農林水産技術会議事務局・農業環境技術研究所, 東京, pp. 25~28.