

絶対寄生菌の純粋培養・最近の研究動向*

三重大学生物資源学部植物病理学研究室 久 能 ひとし 均

はじめに

病原菌の行動と生理的性質を把握することは、植物の病害対策を講ずる上できわめて重要である。純粋培養が可能な菌類の場合には、その栄養要求性や生長にかかわる環境要因などが詳しく解析され、防除対策の確立に一役買っているが、純粋培養できない絶対寄生菌の特性は、宿主上の行動から生理的性質が類推されているにすぎず、不明な点が多い。植物病原菌の仲間では、さび病菌、べと病菌、うどんこ病菌が絶対寄生菌の代表格で、1940年代から多くの研究者がこれらの菌の純粋培養を試みてきた。筆者の知る限りでは、ブドウ茎カルスでブドウべと病菌を純粋培養した MOREL (1944) の論文が、絶対寄生性の植物病原菌類を人工的に培養した最初の報告と思われる。彼の報告以来、いくつかの絶対寄生菌がカルス上で純粋培養されているが、これらの報告については、浅田 (1974) の総説に詳しいので参照されたい。無菌組織やカルスを利用した培養も純粋培養に違いはないが、菌の生長が植物組織そのものに依存していることに変わりはなく、病原菌の生理の解析には必ずしも適さない場合もある。ただし、自然状態や温室環境下で一年を通じて研究材料が得られない菌の場合には、たとえカルス上でであってもその純粋培養は貴重である。絶対寄生菌に関心をもつ研究者は、多かれ少なかれなんらかの方法で純粋培養を試みていると思われるが、実際に論文として現れる成果はごく一部である。ここでは、浅田 (1974) の総説以降に発表された業績を中心として、最近の研究状況を概説することとする。

I 植物体内における絶対寄生菌の特性

殺生菌は植物の細胞壁、細胞膜を貫通してその細胞質に達するか、または細胞間隙を伸長するかのいずれかの方法で養分吸収を行う。これに対して絶対寄生菌は、植物細胞壁を貫通するが細胞膜を突き破らず、細胞壁と細胞膜の間に吸器を形成して養分を吸収する (図-1)。絶対寄生菌の侵入菌糸先端は、植物細胞壁を通過すると膨潤して吸器原基となる。このときに侵入部位の植物細胞膜

が吸器原基を取り巻くように伸びる。吸器原基が大きくなり成熟するにつれて、植物細胞膜は変性しながらますます伸長し、成熟吸器を細胞質から隔離した状態にとどめてしまう。したがって、絶対寄生菌は植物細胞質に到達せずに細胞膜をとおして養分吸収することになる。絶対寄生菌が宿主植物の細胞膜を破ると報告されているのは、ダイコンべと病菌の例だけである (白石ら, 1973)。

植物組織中における殺生菌と絶対寄生菌の生活様式の違いから (図-1)、後者の生長継続には宿主細胞が生きていることが必須であり、宿主細胞が生合成している特異的な成分を常に吸収する必要があると考えられていた。この考え方は宿主組織と菌との関係からみると間違いではないが、さび病菌の純粋培養が可能になってみると必要十分条件でなかったことは明白である。

II さび病菌の純粋培養

培養された植物組織などを用いずに、純粋の人工培地上で *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* の菌糸が伸長することを WILLIAMS et al. (1966) が報告し、一躍世界の注目を集めた。翌年、彼らは人工培地上で同菌が夏胞子と冬胞子とを形成すること、培地上で形成された夏胞子がコムギに病原性を示すことを報告した。これらの報告がさび病菌の純粋培養の幕開けとなり、以後多数のさび病菌が純粋培養されるようになった。

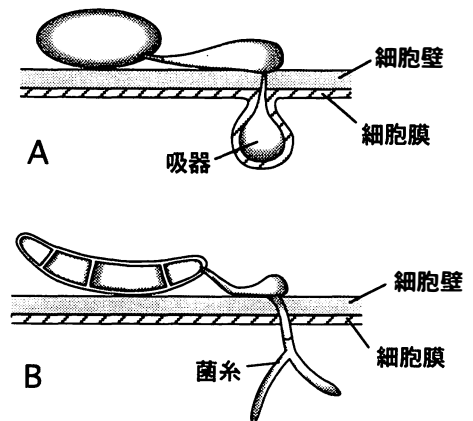


図-1 植物細胞内における絶対寄生菌 (A) と殺生菌 (B) の生活様式の違い。絶対寄生菌は宿主細胞の細胞膜を破らないが、多くの殺生菌は細胞膜を破る。

*: 三重大学植物病理学研究室業績 No. 127

Recent Advances of Axenic Culture of Obligate Parasitic Fungi. By Hitoshi KUNOH

WILLIAMS et al. の培地は Czapek 培地を基本とし、これに酵母エキスとペプトンを加えた寒天培地であり、既知培地を多少改変しただけであったので、多くの研究者は意外に平凡な培地でさび病菌が増殖することに驚いた。そののち、表-1 に示すような多数のさび病菌が純粋培養されるようになった。表-1 から明らかなように、基本としている培地は Czapek または Murashig-Skoog 培地である。これまでの文献を調べると、さび病菌の培養では寒天培地に孢子を直接播く場合と、表面殺菌した感染植物組織片あるいはカルスを寒天培地に埋め込む場合とがある。葉片やカルスを用いる場合には、組織培養によく使われる Murashige-Skoog 培地を基本としていることが多い。この場合でも植物組織やカルス上で生長した菌糸が寒天培地上に伸長し、そこで孢子を形成するので、Murashige-Skoog 培地もさび病菌そのものの生長に差し支えないと考えられる。この培地は Czapek 培地組成のすべての元素を含んでいるので、菌の生長に不足はないのであろう。植物組織を埋め込む場合には、2,4-D, NAA, IAA, サイトカイニンなどの植物ホルモンを加える例もあるが、これは菌生長のためというよりむしろ植物組織の生長維持のためと考えられる。さび病

菌の栄養生長や孢子形成には、酵母エキスやペプトンあるいはカゼインやソイトンの加水分解物が必要である(表-1)。酵母エキスやペプトンは多種類のタンパク、糖、ミネラルなどを含んでおり、菌類や細菌の培養に一般に使われる。カゼインは微量の糖を含む燐タンパクで牛乳成分であり、すべてのアミノ酸が含まれている。また、ソイトンはダイズタンパクで、カゼインと同様ほとんどすべてのアミノ酸を含んでいる。これらの加水分解物は、恐らく菌に対するアミノ酸供給源として重要なのであろう。*Cronartium ribicola* (HARVEY and GRASHAM, 1974), *Melampsora lini* (BOSE and SHAW, 1974) の培養には牛血清アルブミンを添加する例もみられる。後者の場合には、Czapek 培地に Ni, Co, Be など多種類の微量元素を加え、さらに血清アルブミンを加えているので、恐らくこれもアミノ酸源として働いているのであろう。表-1 で用いられている Czapek 培地は原法を改変して用いられる場合が多い。成分は同じでも菌種によって添加量が異なっている。同じ属の菌であっても種によって微妙に成分要求量は異なるようである。例えば、*Melampsora betulinum* はグルコースとペプトンを多く加えた培地上でコロニーを発達させるが、*M. coleospori-*

表-1 さび病菌の人工培養に用いられる主な培地

属・種	培地 ^{a)}	接種源	培地上の菌体	文献番号
<i>Puccinia graminis</i>	C, Pep, Soy	感染葉片	夏, 冬孢子	3
”	C, Pep, YE	夏孢子	夏, 冬孢子	26
”	C, Pep, CH	夏孢子	菌糸	8
<i>P. coronata</i>	C, Pep, YE	感染葉片	夏, 冬孢子	2
<i>P. horiana</i>	MS	冬孢子	冬孢子	1
<i>Pucciniastrum agrimoniae</i>	MS, Soy, Pep, 2,4-D	感染葉片	夏孢子	30
<i>Phragmodium tuberculatum</i>	C, Pep, YE, CH	夏孢子	夏・冬孢子 様構造	21
<i>Cronartium ribicola</i>	C, Pep, YE, BSA	感染カルス	単核孢子	12
”	”	小生子	菌糸	9
<i>C. fusiforme</i>	MS, Pep, YE, ST, OA, FA, など	小生子 さび・夏孢子	菌糸	11
<i>Melampsora lini</i>	C, BSA, Ni, Co, Be など	夏孢子	夏孢子	7
<i>M. capraearum</i>	MS, Pep	感染葉片	夏・冬孢子	29
<i>M. chelidonii-pierotii</i>	MS, Soy, Pep	感染葉片	夏孢子	28
<i>Uromyces dianthi</i>	C, Pep, YE,	菌叢	菌糸	16
<i>Gymnosporangium asiaticum</i>	C, Pep, YE, 2,4-D など	感染カルス	さび柄子殻	23

^{a)} BSA: 牛血清アルブミン, C: Czapek 培地, CH: カゼイン加水分解物
FA: フェルラ酸, MS: Murashige-Skoog 培地, OA: オレイン酸,
Pep: ペプトン, Soy: ソイトン, ST: ステロイド, YE: 酵母エキス



図-2 培地上で形成された *Melampsora epitea* の夏孢子
(勝屋敬三博士のご好意による)

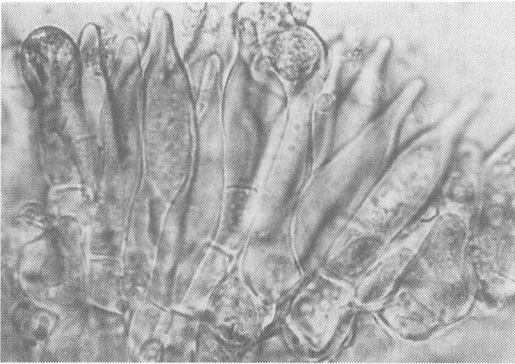


図-3 培地上で形成された *Melampsora epihylla* の冬孢子
(勝屋敬三博士のご好意による)

oides は倍量のシュークロースと 2,4-D を加えた培地で生育がよい (YAMAOKA and KATSUYA, 1984 a)。

このように現在では、培地組成を多少改変すればほとんどのさび病菌が純粋培養できる域に達していると考えてよいであろう (図-2, 3)。

III ベと病菌の純粋培養

べと病菌の純粋培養は、厳密な意味ではまだ成功していない。日本では、中村 (1959) がカブやコールラビの肥大組織からカルスを誘導し、それに *Peronospora brassicae* を接種して菌糸生育と分生孢子形成を観察している。カルス上でべと病菌を培養する試みはほかにも数例 (GRIFFIN and COLEY-SMITH, 1968; INGRAM and JOACHIM, 1971) みられるが、べと病菌が寒天培地上で生育すると報告した例は、恐らく TIWARI and ARYA (1969) の報告が最初であろう。彼らは、*Sclerospora graminicola* に感染している花器を唐人ビエのカルスに接触させて約 40 日間で菌糸がカルスから培地上に伸長することを観察して

いる。彼らが用いた培地は、White 培地に含まれる塩類のほかに、グルコース、カゼイン加水分解物、植物ホルモン、ビタミンなど多数の微量成分を加えた半合成培地である。彼らによると、培地上でも孢子嚢や蔵卵器、蔵精子は形成されるが、孢子嚢柄の分岐回数が多かったり、遊走子が孢子嚢の中で発芽してしまうなどの異常が認められ、さらに、伸長した菌糸を同じ培地で 20 日間隔で継代培養すると 3 代目から急速に菌叢発達が悪くなるなどの現象が起こる。一方、浅田・大口 (1981) はクノップ培地を基本培地として、*Peronospora brassicae* の培養を試みている。孢子懸濁液を培地上にまくと、孢子は発芽して分岐しながら菌糸状になるが、やがて菌糸の生長は停止する。しかし、ダイコンの根組織薄片に接種して同じ培地の上に置くと、菌糸は培地上に伸長し、培地の中に膨潤構造を形成する。この構造の形や大きさは吸器に似ているが、組織薄片を置床してから 2 週間たたないと形成されないで、機能的に吸器とは異なると彼らは推定している。この報告では培地の糖濃度や pH などが詳しく検討されているが、その後の研究の進展は定かではない。これらの研究はさび病菌の培養法の検討と基本的にほぼ同じ方向を目指しているが、べと病菌の純粋培養の確立にはさらにもう一工夫必要なのである。1991 年の ZAHARA and VIRANYI の培養法は、これまで述べた方法とはやや趣を異にしている。彼らは *Agrobacterium rhizogenes* を感染させたヒマワリの根を培養し、この上で *Plasmopara* を維持すると約 2 か月間遊走子嚢が生き続けると報告している。これはいわゆる菌の純粋培養とはいえないが、発根を促進する *A. rhizogenes* の性質を利用したユニークな方法である。

IV うどんこ病菌の純粋培養の試み

さび病菌やべと病菌と比べると、うどんこ病菌の純粋培養は大幅な遅れをとっている。多くの研究者がさび病菌培地と同様の培地でうどんこ病菌を培養しようとしているが、成功したという報告はいまだにない。筆者の経験によると、さび病菌培地に *Erysiphe graminis* の分生孢子をまくと、発芽管が孢子長径の約 10 倍の長さには達するが、先端が渦巻状になり生長を停止する。この発芽管には隔壁は形成されるが、分岐はほとんど起こらない。

うどんこ病菌の孢子は宿主植物に付着した後であれば、たとえその植物組織を水中に沈めても吸器を形成して孢子形成に至るという報告 (YAMAOKA, 1993) もあるが、一般的にこの菌の孢子は水に接触すると発芽や付着器形成が極端に悪くなる。水寒天上のセルロース膜やプラスチック膜に *E. pisi* の分生孢子を接種すると、いずれ

の膜上でも発芽はするが、前者の膜上では発芽管が徒長し附着器をほとんど形成しない(KUNOH et al., 1992)。しかし、水透過性がない後者の膜上では、宿主上と同じように附着器を形成する。また、HEINTZ(1986)は水透過性がないメタクリレートの薄膜上で *Oidium tuckeri* の分生胞子がよく附着器を形成すると報告している。したがって、これらの菌の附着器形成には水の存在が邪魔になるようである。これに対して、*E. graminis* の分生胞子は水透過性が悪いコロジオン膜よりも透過性が高いセルロース膜上で附着器をよく形成する(KOBAYASHI et al., 1991)。このように、うどんこ病菌の場合には菌種によって水の影響の現れ方が異なる。*O. tuckeri* の附着器は侵入菌糸を生じて膜を貫通し裏側にやや伸長することが示されており、*E. graminis* の場合も侵入菌糸が膜に孔を開けることが証明されている。したがって、適切な培地の上にそれぞれの菌に適した支持膜をおけば培養ができるような気がする。うどんこ病菌は外部寄生菌であるために培養が難しいのかもしれない。もしそうならば、内部寄生や半内部寄生菌である *Leveillura* や *Phyllactinia* のほうが外部寄生菌よりも試行錯誤するには適しているのかもしれない。

おわりに

以上述べたように、さび病菌の場合には植物組織やカルスを利用しなくても、寒天培地上で菌糸を生育させ、胞子を形成させることがほぼできるようになった。しかしながら、胞子を形成させれば菌の培養に成功したと言い切れるであろうか。菌学的、植物病理学的観点からいくつかの問題が指摘されている。例えば、一つの属種でも系統によって同じ培地上で全く異なるコロニーを形成する場合が認められている(YAMAOKA and KATSUYA, 1984 b)。また、ANDO and KATSUYA (1985) が *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* を純粋培養したところ、親レースとは病原性の異なるレースが出現していたという。これは、人工培養世代を経ると生理的性質が変異する可能性があることを如実に示している。

絶対寄生菌の純粋培養は、①病原菌が宿主なしで培養され、胞子を培地上に作る、②培養された菌体が宿主に感染し、典型的な病徴を引き起こす、③同じ病原体が病徴部から再分離される、という3条件が満足されない限り、成功したといえないという厳しい意見もある(WILLIAMS et al., 1966)。栄養要求性や病原性などの生理的性質が変異しない培養法の検討も必要になってくるであろう。

べと病菌とうどんこ病菌の純粋培養成功までにはまだまだかなり距離があるが、石井ら(1995)によるVA菌根菌の人工培養法は、これらの菌の培養にヒントを与えら

れる。植物根に共生するVA菌根菌は、これまで純粋培養に成功していなかった。彼らは、メタノールで分画抽出したパピアグラスの根の成分を培地に添加して菌糸の生育状態を観察し、25%メタノールで抽出される成分が菌糸生育を促進し、菌糸の感染性をも維持することを証明した。宿主植物の磨砕液を培地に添加したり、組織を培地に置床することによって絶対寄生菌の培養成功に至る例が数々報告されているが、植物の分画成分を検討することも一つの方向性である。絶対寄生菌の純粋培養にはまだ幾多の困難があるが、菌の生長過程を丹念に観察すれば、培養成功へのヒントが得られると思われる。

引用文献

- 1) ANDO, K. et al. (1979) : Can. J. Bot. 57: 2162~2166.
- 2) ——— and K. KATSUYA (1982 a) : Trans. mycol. Soc. Japan 23: 95~100.
- 3) ——— (1982 b) : Ibid. 23: 313~318.
- 4) ——— (1985) : Ann. Phytopath. Soc. Japan 51: 421~425.
- 5) 浅田泰次 (1974) : 植物防疫 28: 318~322.
- 6) ———・大口富三 (1981) : 日植病報 47: 71~74.
- 7) Bose, A. and M. Shaw (1974) : Can. J. Bot. 52: 1183~1195.
- 8) Bushnell, W. R. and D. M. Stewart (1971) : Phytopathology 61: 376~379.
- 9) Dinner, A. M. and R. L. Mott (1982) : Can. J. Bot. 60: 1950~1955.
- 10) Griffin, M. J. and J. R. Coley-Smith (1968) : J. gen. Microbiol. 53: 231~236.
- 11) Hare, R. C. (1978) : Can. J. Bot. 56: 2641~2647.
- 12) Harvey, A. E. and J. L. Grasham (1974) : Phytopathology 64: 1028~1035.
- 13) HEINTZ, C. (1986) : Vitis 25: 215~225.
- 14) INGRAM, D. S. and I. JOACHIM (1971) : J. gen. Microbiol. 69: 211~220.
- 15) 石井孝昭 (1995) : 日植病学会創立80周年記念大会 講要: 124~125.
- 16) JONES, D. R. (1973) : Physiol. Plant Pathol. 3: 379~386.
- 17) KOBAYASHI, I. et al. (1991) : Trans. mycol. Soc. Japan 32: 187~198.
- 18) KUNOH et al. (1992) : Ibid. 33: 87~93.
- 19) MOREL, G. (1944) : Compt. Rend. Acad. Sci. Paris 218: 50.
- 20) 中村広明 (1959) : 日植病報 25: 217 (講要).
- 21) RAHBAR-BHATTI, M. H. (1984) : Can. J. Bot. 62: 1098~1099.
- 22) 白石雅也ら (1973) : 愛媛大農紀要 18: 157~178.
- 23) TETSUKA, Y. et al. (1981) : Ann. Phytopath. Soc. 47: 680~684.
- 24) TIWARI, M. M. and H. C. ARYA (1969) : Science 163: 291~293.
- 25) WILLIAMS, P. G. et al. (1966) : Phytopathology 56: 1418~1419.
- 26) ——— (1967) : Ibid. 57: 326~327.
- 27) YAMAOKA, N. (1993) : Ann. Phytopath. Soc. Japan 59: 487~491.
- 28) YAMAOKA, Y. and K. KATSUYA (1984 a) : Trans. mycol. Soc. Japan 25: 435~444.
- 29) ——— (1984 b) : Ibid. 25: 445~453.
- 30) ——— (1987) : Ibid. 28: 155~161.
- 31) ZAHKA, G. A. and F. VIRANYI (1991) : Can. J. Bot. 69: 2709~2715.