

# *Olpidium* 属菌の実験取り扱い方法

富山県農業技術センター野菜花き試験場 守川俊幸

## はじめに

*Olpidium* 属菌はツボカビ門 (Chytridiomycota) に属する菌類の一種で、植物、藻類、菌類、線虫、ワムシなどに寄生するものを含んでいる。このうち植物に寄生する *Olpidium* 属菌として、葉に寄生するソラマメ火ぶくれ病菌 *O. viciae* などのほか、根に寄生する *O. brassicae* および *O. bornovanus* が知られている。この根に寄生する 2 種の *Olpidium* 属菌が媒介する各種植物ウイルスは、作物によっては甚大な被害を及ぼす。このように本菌は農業生産上重要な研究対象ではあるが、絶対寄生菌で取り扱いが難しいため、他の菌類に比べて研究が十分に進展しているとはいえない。また、その分類も常に混乱している。例えば、以前まではメロンえそ斑点ウイルス (MNSV) の媒介菌は *O. cucurbitacearum* とされてきたが、近年では *O. bornovanus* (Syn.: *O. radicale*, *O. cucurbitacearum*) が採用される場合が多い。また、本稿で紹介するチューリップ微斑モザイクウイルス (TMMMV) やミラフィオリレタスウイルス (MLBVV), タバコネクロシスウイルス (TNV) ほかの媒介菌である *O. brassicae* に至っては、古くから植物寄生性や交配様式 (雌雄異株か同株か) が異なる複数種が混在していることが指摘されており (SAHTIYANCI, 1962), 本邦産菌株を用いた研究でもこれを支持する結果が得られている (小金澤ら, 2004)。今後も、*O. brassicae* および *O. bornovanus* の分類・命名が大きく変更される可能性があるので注意願いたい。

以上の分類上の問題点はあるものの、*Olpidium* 属菌を研究するうえでの障害は、「取り扱いが難しい」という点に帰結する。本稿では筆者らがこれまでに *O. brassicae* を用いて行ってきたウイルス媒介試験の経験から、本菌を扱ううえでの注意点を整理して紹介する。今後の *Olpidium* 属菌研究の参考になれば幸いである。

## I 植物の栽培=菌の培養条件

*O. brassicae* は絶対寄生菌であるため、宿主である植物上で増殖させる必要がある。したがって、菌を良好に発育させるには餌植物（根）の発育も十分に確保する必要がある。両者の発育に好適な条件は必ずしも一致しないことから、バランスのとれた栽培条件が実験の成否の鍵といえる。以下、注意すべき栽培 (= 培養) 条件を項目ごとに説明するが、菌を培養するというよりも飼育するという感覚で取り組むことを推奨したい。

### 1 温度

*O. bornovanus* の発育適温が 25 ~ 30℃ 付近であるのに対し、本菌 *O. brassicae* は 15 ~ 20℃ 付近が発育適温で、遊走子は 5℃ でも活発に遊泳する比較的低温性の菌である。また、本菌は繁殖器官として遊走子嚢と休眠胞子を形成するが、25℃ 以上では休眠胞子の形成比率が相対的に高まるとともに、増殖は著しく停滞する。一方、多くの植物種は 15℃ 前後で著しく生育が停滞し、根の発育も芳しくないことから餌植物と菌の発育を両立させるには 20℃ 前後で管理する必要がある。筆者らは、変温制御が可能な自然光型のグロスキャビネットで管理する場合は昼温 23℃ / 夜温 18℃ の変温条件とし、変温制御ができない陽光恒温機を使用する場合は 20℃ 一定温度下で管理している。

### 2 灌水

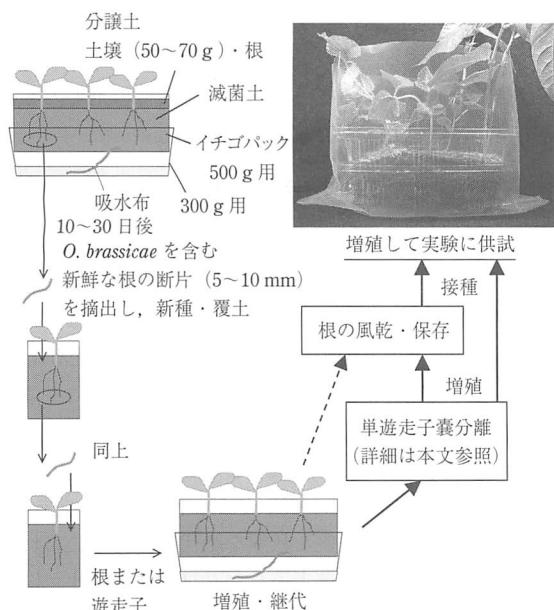
筆者らは、脱イオン水または水道水 (砺波市上水道) を用いて灌水している。灌水量は、餌植物のボリュームや栽培環境によって大きく異なるものの、植物の栽培に適した常識的な量を適時灌水すればよいと判断している。本菌を扱いはじめた当初は、本菌の伝染に適した多湿条件での管理を心がけたが、根の発育が著しく停滞して、本菌の増殖に失敗することが多かった。現在、図-1 に示したような排水と保水が同時に保てる栽培容器を使用し、2 日に 1 回程度の灌水で管理している。なお、図-1 中の写真のように厚手のポリ袋に入れておくと (上部は開放), 灌水時に他の容器へ水が飛び跳ねるのを防ぐことができる。

### 3 培土

粒状の加工床土 (クレハ園芸培土) を 95℃ 2 時間蒸

Handling Techniques in Preparation of *Olpidium* Culture. By  
Toshiyuki MORIKAWA

(キーワード: *Olpidium brassicae*, 分離・保存, ウイルス媒介試験)

図-1 *O. brassicae* の分離・増殖のフロー

写真：厚手のポリ袋（上部開放）に入れた栽培容器。

気消毒したものを用いているが、砂（海砂・ケイ砂）やバーミキュライトを高圧滅菌して使用している研究者も多い。餌植物が良好に生育すれば、床土の種類は特に問わないと考えられるが、pHが5以下の酸性領域では本菌の発育が抑制されることから、pHが6~7程度の床土を用いるのが望ましい。なお、床土のpHが低い場合、少量の炭酸カルシウム懸濁液を灌注することでpHを中性域に保つことができる。

#### 4 飼植物

一般に本菌の寄主範囲は広く、様々な植物の根に寄生するが、植物寄生性が異なる系統（種）が存在することから (SAHTIYANCI, 1962; TEMMINK et al., 1970; 守川・多賀, 2004; 小金澤ら, 2004), 実験の目的によっては植物種の選定が以降の実験の成否を左右する。特に、キャベツやレタスへの寄生性は系統（種）によって明瞭に異なるので注意が必要である。レタスピックベイン病にかかるウイルス媒介菌の生態研究ではレタスを用いる必要があろうし、研究の目的に応じて植物種を選定する必要がある。筆者らはマクワウリ（自家採種、「銀泉」）やササゲ（‘黒種三尺’）を用いている。その理由は、両植物に捕捉・分離される *O. brassicae* のほとんどが、筆者らの研究対象であるチューリップ微斑モザイクウイルスを媒介すること、多くの系統が共通して両植物に寄生し、何よりもその増殖も良好なこと、さらに植物体の生育が他

の植物に比べて緩慢で実験スペースを確保しやすいことなどが上げられる。また、両植物を捕捉植物として用いることにより、国内各地の耕地土壤から高頻度に本菌を検出・分離することに成功しており (守川・多賀, 2004), 両植物は本菌を捕捉検出し、増殖するのに汎用性の高い宿主であると考えている。

## II 分離法と継代・保存

### 1 分離法

先にも述べたとおり、本菌には植物寄生性が異なる系統が存在することから、捕捉・分離に用いる植物種の選定には注意が必要である。以下、筆者らが実施している菌の検出・分離法を紹介する。まず、滅菌土で育成した捕捉植物の苗（ササゲは第1葉、マクワウリは子葉が展葉後）の地際部に、分離源の土壤（50~70 g生土）を散布し、20°C前後の温度条件下で栽培する。圃場から採取した植物根から分離する場合は、土壤を接種する代わりに分離源の根を捕捉植物の地際部に接種し、滅菌土で覆土すればよい。土壤を接種後の約1週間は、土壤表面から少量の灌水をこまめに施す。菌密度の高い土壤では10日前で根に本菌の寄生を確認できる。菌密度の低い土壤では継続して栽培し、その後1か月程度経時的に根の一部を回収して寄生の有無を観察する。寄生が認められた段階で、根を水道水の流水中で洗浄後、顕微鏡下で寄生部位を確認して約5~10 mmの断片を切り出し、これを新しい苗の地際部に置床し、滅菌土を覆土して栽培する。最後に再度、寄生根の断片を同様に回収して接種し、分離菌とする。以上の分離菌は複数の遊走子囊に由来することから、実験の目的によっては単遊走子囊を分離するのが望ましい。すなわち、分離菌をマクワウリの苗に接種し、接種5~6日後（遊走子が分化する前）に根をカミソリにて細断、適量の滅菌水に懸濁して素寒天に少量滴下し、単独の遊走子囊（正確には、この段階で遊走子囊と休眠胞子のどちらに分化するかを見分けられない）を寒天ごと切り出してマクワウリ苗の根に触れるように接種する。その後マクワウリ上で増殖させたものを単遊走子囊分離株として用いている。なお、遊走子囊の摘出にマイクロマニュピレーターを用いてもかまわない。

以上の分離作業を行ううえでの留意点は、以下のとおりである。捕捉植物の種子は分離源の土壤に直接播種してもかまわないが、苗立枯病、タネバエ等が発生して分離に失敗する場合がある。よって、一定量の生育を確保した植物苗に分離源土壤を接種する方が失敗は少ない。

また、捕捉植物から最初に摘出する根の断片は極力新鮮なものを選ぶとともに、*Pythium* 菌など雑菌混入防止に細心の注意を払う必要がある。注意深く顕微鏡下で本菌のみが感染した新鮮な根を厳選すれば、*Pythium* 菌が混入することはほとんどないが、もしも混入した場合には再度根を厳選して異種の植物に接種するとともに、接種後の早い段階（7日程度）で継代を繰り返すか、あるいは単遊走子囊分離を行うことにより取り除くことができる。なお、分離源の土壤を接種する段階で、メタラキル粒剤を約 50 mg/イチゴパック施用することにより、*Pythium* 菌の混入を減じることができる。次に、単遊走子囊の分離は、他の遊走子囊から放出された遊走子の混入を防ぐため、遊走子囊内部に遊走子が分化する前に実施する必要がある。筆者らは接種 5～6 日後に作業を行っているが、栽培条件や菌の系統によっては接種 4～5 日後に遊走子の分化が認められる場合があり、作業を開始するタイミングを逃さぬよう注意する必要がある。また、接種源に寄生根を用いた場合、接種源から遊走子が放出されている可能性が高いことから、接種源を取り除いた後に根を十分に洗浄し、分離作業を開始する。なお、根を乳鉢で磨細すると菌体も粉々になってしまふことから、カミソリでチョッピングして細断されることをお勧めする。この際、あまり細かく裁断すると夾杂物（根の組織片）も増加して以降の単離作業に支障をきたすことから、適度な細かさとなるよう工夫されたい。また、拾い上げる遊走子囊は大きめのものを選ぶと、分離の成功率が高いようである。

## 2 繼代と保存法

継代のための接種源は、寄生根、その磨碎液、遊走子懸濁液のいずれでもかまわない。当方では 0.1 g 程度の新鮮な寄生根を新しい苗に接種して覆土する方法か、灌水後に栽培容器の下段：貯水容器（図-1）に流れ出す遊走子を新しい苗に灌注接種する方法を探ることが多い。遊走子は、2 日ほど灌水を控えて乾き気味に管理した後、水を与えると大量に放出される。継代の間隔は、菌の増殖の程度にもよるが 2 週間程度で実施するのが好ましい。古い根での増殖が良くないせいもあるが、あまり継代の間隔を空けると、休眠胞子の形成頻度が高まつて増殖の勢いが低下することが多い。

長期間保存する場合、接種 3～4 週間後に根を回収し、耐久器官である休眠胞子が多数形成されていることを確認した後、風乾して紙袋に入れ、4°C または -80°C で保存する。この方法で最低でも 2 年は生存を確保できる。なお、4°C 保存では 3～4 年で死滅する分離株があるこ

とから、2 年を目途に再度植物に接種して増殖しなおすことをお勧めする。また、乾湿の変動が菌の生存率を低下させる可能性があることから、紙袋は除湿剤とともに密閉容器に梱包して保存するのが望ましい。

## III 遊走子の調製

実験の内容によっては、大量の遊走子を準備する必要がある。一方、根に遊走子囊が大量に形成されていても、必ずしもこれらが同調的に遊走子を放出するとは限らないため、一定量の遊走子を得るのに苦労することがしばしばある。研究者によれば、根を緩衝液などに浸漬して遊走子の放出を促しているが、これらを用いても劇的に放出量が向上されるとは限らない。過去の研究例を参考に筆者らが実施している方法は以下のとおりである。まず、本菌の増殖が旺盛な状態を継代・維持し、これを接種源に寄生根または遊走子をマクワウリやササゲに接種する。接種 12～18 日後に 2 日間ほど灌水を控えて乾燥気味に管理した後（もしくは回収した根を一晩軽く風乾）、流水中で根を手早く水洗して培土を取り除き、水道水または蒸留水（水温は 15～20°C）に浸漬して静置する。こうすると、数分後には大量の遊走子が放出され始め、20～30 分ほどで十分な量の遊走子が確保できる（これ以上長時間置いても収量は上がらない）。最後に、根を取り除いて遊走子懸濁液とするが、使用するまでに時間がいる場合は冷蔵庫に入れて保管する。

## IV 植物寄生性調査

各種植物への寄生性を調査するための接種法は、滅菌土で育成した各種植物の苗に遊走子懸濁液を灌注する方法を探るのが一般的である。一方、寄生性の評価は接種した植物の根における遊走子囊や休眠胞子の形成程度で評価する方法（LANGE and INSUNZA, 1977；守川ら, 2004）と、根を水に浸漬して放出される遊走子の数で評価する方法（CAMPBELL and SIM, 1994；小金澤ら, 2003）に分けられる。接種した植物から遊走子が放出されて初めて世代を全うしたと考えれば、遊走子数で寄生程度を評価するのが望ましいが、遊走子の放出量は接種後の栽培条件や植物の生育ステージに左右されることが多く、さらに土壤に残存して伝染源になるであろう休眠胞子からの遊走子の放出量は評価できない。よって、実験の目的にもよるが、厳密にはその両項目を経時的に調査するとともに、各植物の根量とその表面積で補正しながら、菌の増殖量で評価すべきだろう。

表-1 レタスピッグベイン病株から分離される MLBVV・LBVaV の *O. brassicae* を用いた媒介試験（夏秋ら, 2002 の結果を簡略化）

伝染源	接種菌	検定株（レタス）の反応	
		発病・ウイルスの感染 <sup>a)</sup>	<i>O. brassicae</i> の寄生
発病	レタス寄生性 <i>O. brassicae</i>	+	+
レタス	レタス非寄生性 <i>O. brassicae</i>	-	-
	なし	-	-
健全	レタス寄生性 <i>O. brassicae</i>	-	+
レタス	レタス非寄生性 <i>O. brassicae</i>	-	-
	なし	-	-

a) ウエスタンプロット法により MLBVV と LBVaV の感染の有無を調査。

## V ウィルス媒介試験

*O. brassicae* が媒介するウィルスとして、TNV, TMMMV, MLBVV, レタスピッグベインウィルス (LBVaV), タバコわい化ウィルス (TStV), その他が知られている (CAMPBELL, 1996; 守川ら, 1997; Lot et al., 2002; 夏秋ら, 2002)。本菌のウィルス媒介形式はこれらウィルスの種類によって異なり, TNV のように遊走子の表面に付着して伝搬する場合と, その他のウィルスのように菌に内胞されて伝搬する場合に分けられる (CAMPBELL, 1996)。以下, 具体的な媒介試験の手順を簡単に紹介する。

### 1 外付型伝搬ウィルスの媒介試験

TNV (現在, TNV-A と TNV-D に分けられている) の媒介試験は比較的容易である。まず, 媒介試験に供試するウィルスの部分純化液または感染葉粗汁液の遠心上清を遊走子懸濁液に加え, 10 分間ほど静置した後, ウィルスと菌の増殖が良好な植物苗を育成したポットに灌注接種する。このようにウィルスと遊走子を混合して接種するという簡単な操作で, ウィルスを植物の根に感染させることができる。ウィルス感染の有無は血清学的手法や汁液接種法が用いられる。対照にはウイルスおよび菌をそれぞれ単独で接種した区と無接種区を設ける。このような手法で, ウィルス系統(種)と菌株系統の親和性が評価されている (TEMMINK et al., 1970)。

### 2 内胞型伝搬ウィルスの媒介試験

内胞型で伝搬されるウィルスでは, ウィルス感染植物に菌を寄生させ, 植物体で菌にウィルスを獲得させる

必要がある。ここではレタスピッグベイン病に関与しているとされる MLBVV と LBVaV の媒介試験法について紹介する (夏秋ら, 2002)。まず, 発生圃場から採集した土壌あるいは罹病株の根を混和した滅菌土にレタスを播種する。条件が良ければ 2~3 週間でビッグベイン病の病徴が発現する。次に, 発病株を地際部の少し上の部分で切断し, この地上部を水に挿して再度発根させた後, 滅菌土に鉢上げして *O. brassicae* を接種する。接種 20 日後に根の一部を採集し, 健全なレタス苗 (検定株) を育成した別のポットに接種し, 定期的に発病の有無を調査するとともに血清学的手法で両ウィルスの感染の有無を調査する。もちろん, 対照には健全なレタスを伝染源とした区, 菌を接種しない区を設ける。そうすると, ウィルスに感染したレタスを伝染源にし, *O. brassicae* を接種した区でのみ, 検定株で発病, ウィルス感染が確認される (表-1)。

## おわりに

以上, *Olpidium* 属菌のうち筆者らが研究対象としている *O. brassicae* を中心にその扱い方について紹介したが, 筆者らの手法が最良の方法であるとは考えていない。各実験室が有する施設・機材の構成によって柔軟に改良していただきたい。*O. brassicae* は *O. bornovanus* に比べて実験室環境での増殖が容易だとされており, 良好的な条件で培養・継代が維持されれば爆発的な勢いで増殖する。一方, 原因は不明だがいったん増殖が停滞するとなかなか回復しないことが多い (往々にして, 管理に手を抜いたときに生じる)。本菌の取り扱いのポイントは, “菌の生理・生態を理解しながら, こまめな管理を心がける”という地道な作業の積み重ねだと考える。

## 引用文献

- 1) CAMPBELL, R. N. (1996) : Ann. Rev. Phytopathol. 34: 87 ~ 108.
- 2) \_\_\_\_\_ and S. T. SIM (1994) : Can. J. Bot. 72: 1136 ~ 1143.
- 3) \_\_\_\_\_ et al. (1995) : Eur. J. Pl. Pathol. 101: 273 ~ 282.
- 4) 小金澤頼城ら (2003) : 四国植防 38: 23 ~ 28.
- 5) \_\_\_\_\_ (2004) : 日植病報 70: 307 ~ 313.
- 6) LANGE, L. and V. INSUNZA (1977) : Trans. Br. Mycol. Soc. 69: 377 ~ 384.
- 7) Lot, H. et al. (2002) : Phytopathology 92: 288 ~ 293.
- 8) 守川俊幸ら (1997) : 日植病報 63: 504.
- 9) \_\_\_\_\_ (2004) : 富山農技セ研報 21: 1 ~ 141.
- 10) \_\_\_\_\_, 多賀由美子 (2004) : 土と微生物 58: 43 ~ 52.
- 11) 夏秋啓子ら (2002) : 日植病報 68: 309 ~ 312.
- 12) SAHITYANCI, S. (1962) : Arch. Mikrobiol. 41: 197 ~ 228.
- 13) TEAKLE, D. S. and B. J. THOMAS (1985) : Ann. Appl. Biol. 107: 11 ~ 15.
- 14) TEMMINK, H. M. et al. (1970) : J. Gen. Virol. 9: 201 ~ 213.