

植物防疫基礎講座

# 菌糸切断・BL-B 蛍光灯照射による病原菌の胞子形成法

三菱化学横浜総合研究所 農化研究所 <sup>おお</sup>大 <sup>はた</sup>畑 <sup>かん</sup>貫 <sup>いち</sup>一

## はじめに

胞子形成法は植物病理学の基礎ならびに応用研究における最も基礎的な技法である。筆者はさきに菌糸切断・BL-B 蛍光灯照射によるイネいもち病菌の胞子形成について報告(大畑, 1999)したが, 本法が他のいくつかの病原菌についても適用可能なことが明らかになったので, その概要を報告する。

## I 菌糸切断・BL-B 蛍光灯照射法の基本と実施上の要点

本法の基本は, ショ糖加用ジャガイモ煎汁(PS)で振とう培養した菌糸を培地とともにブレンダーで処理して調製した菌糸懸濁液をショ糖無加用ジャガイモ煎汁寒天(PA), ショ糖加用ジャガイモ煎汁寒天(PSA), V8ジュース寒天(V8A), Elliott 処方V8ジュース寒天(EV8A)等の平板培地(プラスチックシャーレ)に病原菌を移植し, BL-B 蛍光灯(NationalFL 15 BL-B)を間断照射(明:暗, 12:12時間)しながら培養するものである。

試験法の詳細については, 前報(大畑, 1999)に記述した。また, 個々の病原菌における好適な培地, 培養期間, 温度等の実験条件を表-1に示した。表中に示した培地, 培養期間等の諸条件は, 筆者が実施した範囲から示したものであるが, 培養期間, 温度等にはかなり許容範囲がある。また, 各病原菌の好適培地は常に前記4培地を同時に供試して比較したわけではないので, 供試しなかった培地に優れたものがある可能性もある。本法の要点と実施上の留意点は次のようである。

### 1 前培養(振とう培養)培地と培養期間

培地はPSが多くの病原菌の培養に適している。培養期間は菌糸が坂口フラスコの培養液の1/3~1/2程度に生育したところが多い。菌の種類, 温度によって生育に遅速があるので, 菌糸の生育状況を見ながら決める。生育した菌糸の量が多くなりすぎるとフラスコから

ブレンダーカップに無菌的に移すのが困難になるとともに, ブレンダーの回転によって液が溢れ出ることがある。

### 2 菌糸切断程度(ブレンダーの回転数と処理時間)

ブレンダーによる菌糸の切断程度は正確には判断しにくい, ブレンダーカップからシャーレに流し込んだ場合, 長さ1mm内外の菌糸の懸濁液が平板培地にスムーズに広がる程度が目安となる。多くの病原菌では8,000rpmで40~60秒でよいが, 病原菌によっては切断しにくいものがあり, また菌糸が多いと切断されにくいので, 処理時間を延ばす。菌糸が多すぎるときには, 一部をとって処理してもよい。ブレンダーを高速で長時間かけると, 菌糸への障害が強すぎて胞子形成能が低下する(大畑, 1999参照)。ブレンダーカップはスクリューと一緒にアルミ箔はくに包んでオートクレーブ殺菌し, 完全に冷えてから使用する。なお, 1本の坂口フラスコから調製した菌糸懸濁液は, 10~20個のシャーレに流し込むことができる。菌糸懸濁液は平板上に薄く全面に広がる程度とし, 流し込みすぎた場合にはシャーレを傾けて捨てる。

### 3 後培養の培地・期間(BL-B 蛍光灯照射期間)・温度

表-1の中で胞子形成量が安定的に多かった培地にアンダーラインを付けたが, 多くの病原菌では他の培地でもかなりよく形成された。全体的に見ればEV8Aが広範囲の病原菌に適しているようであった。しかし, *Cercospora oryzae*, *Paracercospora egenula*ではPSAが, *Pseudocercospora herpotrichoides*ではPAが明らかに優れていた。

多くの病原菌では後培養(BL-B 蛍光灯照射)期間は5~7日で, BL-B 蛍光灯の連続照射よりも明:暗(12:12時間)の間断照射でより多くの胞子が形成された。しかし, *Cladosporium cucumerinum*, *Fulvia fulva*は暗黒下でもよく胞子を形成し, *P. herpotrichoides*は連続照射でよく胞子を形成した。本法の適用に当たっては, あらかじめ培養期間, BL-B 照射条件を検討しておくことが望まれる。BL-B 蛍光灯の代わりに使用した一般室内用蛍光灯でもよく形成された病原菌もあったので, 他の蛍光灯で代用できる可能性がある。

Method for the Production of Conidia of Some Pathogenic Fungi by Black-Light Blue Fluorescent Lamp Irradiation to the Cut Hyphae. By Kan-ichi OHATA

(キーワード: 胞子形成, 菌糸切断, BL-B 蛍光灯)

表-1 菌糸切断・BL-B 蛍光灯照射による孢子形成法適用病原菌

病原菌	孢子形成	後培養培地	前培養期間 (日)	後培養期間 (日)	後培養温度 (°C)
<i>Alternaria brassicicola</i> (D)	◎	PA, V8A, EV8A	5~7	7	25
<i>A. dauci</i> (D)	◎	PA, EV8A	5~7	7	25
<i>A. kikuchiana</i> (D)	◎	EV8A, PA	5~7	7	25
<i>A. mali</i> (D)	○	V8A, PA	5~7	7	25
<i>A. porri</i> (D)	◎	EV8A	5~7	7	25
<i>A. radicina</i> (D)	○	EV8A, PA	5~7	7	25
<i>A. solani</i> (D)	○	EV8A, V8A	5~7	7	25
<i>Botrytis cinerea</i> (M)	○	PA, V8A	7	5	20~22
<i>Cercospora beticola</i> (D)	○	EV8A, PSA, V8A	5~7	7	25
<i>C. kikuchii</i> (D)	○	EV8A, PA	5~7	7	25
<i>C. oryzae</i> (D)	○	PSA, V8A, EV8A	5~7	7	25
<i>Cladosporium cucumerinum</i> (D)	○	PSA, EV8A	7	7	22~24
<i>Bipolaris leersiae</i> (D)	○	PA, V8A	5~7	5~7	25
<i>Elsinoë fawcettii</i>	◎	PA, V8A	7	5~7	25
<i>Fulvia fulva</i> (D)	○	PA, PSA, EV8A	10~15	7	23~24
<i>Helminthosporium sigmoideum</i> var. <i>irregulare</i> (D)	○	V8A, PA	7	7~9	25
<i>Paracercospora egenula</i> (D)	◎	PSA, PA, EV8A	5~9	5~7	25
<i>Pestalotiopsis menezesiana</i> (M)	○	PA	7	5~7	25
<i>Pseudocercospora herpotrichoides</i> (D)	◎	PA, PSA	10~15	5~15	8~15
<i>Pyricularia oryzae</i> (M)	○	EV8A, PA, V8A	5~7	7	25

注) 前培養: ショ糖加用ジャガイモ煎汁による振とう培養, 後培養: プラスチックシャーレの平板培地に BL-B 蛍光灯を間断照射しながら培養, PA: ショ糖無加用ジャガイモ煎汁寒天, PSA: ショ糖加用ジャガイモ煎汁寒天, V8A: V8 ジュース寒天 (処方は大畑, 1999 参照), EV8A: Elliott 処方 V8 ジュース寒天 (処方は大畑, 1999 参照), アンダーライン: 供試培地のうちで孢子形成の多かった培地, ○: よく形成, ◎: 非常によく形成, (D): Dematiaceae (暗色分生子柄科), (M): Moniliaceae (無色分生子柄科).

一般には孢子の形成適温は生育適温よりやや低いところにあるが, 本法では多くの病原菌が 25°C でよく孢子を形成した。*Botrytis cinerea*, *C. cucumerinum*, *F. fulva* では孢子形成適温は 25°C よりやや低いところにあった。*P. herpotrichoides* は 8~15°C でよく孢子を形成し, 25°C では全く孢子を形成せず, 温度 (低温) 依存性が極めて強いようであった。

## II 菌糸切断・BL-B 蛍光灯照射法の適用病原菌

本法により孢子形成が見られた病原菌と実験条件を表-1 に示した。本試験では *Elsinoë fawcettii* を除いて, 供試病原菌は Dematiaceae (暗色分生子柄科) と Moniliaceae (無色分生子柄科) であり, いずれもよく孢子を形成した。

表-1 には本法の適用できる病原菌のみを挙げたが, 同時に供試した *Pyrenophora teres* は全く孢子を形成し

なかった。供試 *P. teres* は分離後保存期間が長かったために孢子形成能を失ったのではないと思われる。*Alternaria alternata* でも分離後 20 年以上経過した菌株では本法で孢子形成が見られなかったが, 新しい菌株では本法で孢子がよく形成されることを, 別の試験で経験している。供試病原菌のなかでは, *Cercospora* 属菌は保存期間が長くなると孢子形成能が急速に低下する傾向が強かった。

以上から本法は Dematiaceae および Moniliaceae に属する他の病原菌にも適用できるのではないかと推察される。本報では *E. fawcettii* を除いて他科の病原菌については検討していないので, 本法が適用できるか否か不明である。

## おわりに

本報では, 後培養 (BL-B 蛍光灯照射) はクリーンベンチ内で実施した。そのため供試菌株数, 反復, BL-B

蛍光灯照射の均一性などに制約があり、各病原菌の最適培地、最適温度、最適培養期間等を完全には絞り切れなかった。しかし、表-1に示した実験条件は絶対的なものではなく、かなり許容範囲があり実用上はそれほど問題にならないと思われる。

前報で示したように、イネいもち病菌では菌株により孢子形成の劣るものがあった。また、本試験では供試した菌株数が限られており、本法の利用に当たっては、あらかじめ菌株による形成能を検討しておくことが望まれる。

表-1の供試各病原菌孢子の病原性については調べていないが、イネいもち病菌(大畑, 1999)では、本法で形成された孢子の病原力が、古田・関口法(1967)によって形成された孢子に劣る事例は見られなかった。一般に孢子形成が少ない場合には病原力も低下している傾向があるので、本法の利用に当たっては、孢子形成量をあらかじめ検討しておくことが望ましい。

本研究の実施に当たっては、元 日本植物防疫協会牛

久研究所 木曾 皓部長、元 茨城県農業総合センター園芸研究所 下長根 鴻所長、島根大学生物資源科 荒瀬 栄博士、元 島根県林業技術センター 周藤靖雄博士、秋田県立農業短期大学 古屋廣光博士、野菜・茶業試験場 我孫子和雄病害研究室長、元 北陸農業試験場 鈴木穂積博士、佐賀果樹試験場 田代暢哉 病害虫研究室長からは有益な示唆をいただき、あるいは貴重な病原菌の分譲を受けた。また、三菱化学横浜総合研究所 植田清之助、中山 清、鈴木 泰、太田博樹、渡辺久雄 歴代農化研究所長、春日井啓之、重松太郎、高橋洋治、神山洋一、富田啓文 歴代生物グループリーダーからは常日頃温かい励ましをいただいた。これらの方々には心からお礼申しあげる。

#### 引用文献

- 1) 古田 力・関口義兼 (1967): 植物防疫 21:160~162.
- 2) 大畑賢一 (1999): 同上 53(2):60~65.
- 3) 周藤靖雄 (1983): 島根県林業試験場報告 32:1~102.

#### 書評

##### 新農学シリーズ『植物保護』

一谷多喜郎・中筋 房夫 著

B5版, 164ページ, 本体3,400円,

朝倉書店

本書は、同じ著者たちによる『作物保護』(1987年発行)の事実上の改訂版であり、その後十年余りの間に得られた新しい知見が盛り込まれ、内容の充実化がはかられている。前著は、作物保護学は生物資源の開発、生産だけでなく生存環境の創造にも関わる分野であり、今後、作物・有害生物・環境のシステムの総合的アプローチが求められるであろうとの著者たちの先駆的ともいえる認識から、植物病理学、応用昆虫学、雑草学などの分野を1冊にまとめて誕生した。そして、今回の改定に際して書名が変更されたのは、「はしがき」にのべられているように、人類による環境破壊によって野生生物の減少など諸問題が地球規模で顕在化し、他方では自然の保護、復元への動きが活発化しつつある現状をみるにつけ、保護の対象は「作物」から「植物」へとより普遍化されなければならないとの思いにかられているようである。本書の構成は、前著とほぼ同じ題名の5章からなり、1章「農業、植物の被害と保護」では1980年以後の主な植物保護技術の発展と「食料・農業・農村基本法」の制定など農政の推移が加筆され、現場に疎い者にはたいへん参考になる。2章「病原体、害虫と雑草の生物学」では、多少の内容追加のほか項目の配置換え程度で前著とほぼ同じ。3章「植物の被害の種類と対策」で

は、病害の記述が整理されて読みやすくなった。また、3.5項で「鳥獣害」から「鳥類、哺乳類の被害と自然保護」へと小見出し名が変えられ、3.7項の「環境汚染」とともに内容も豊かになり、著者たちの本書にける意気込みが感じられる。これは4章「新しい植物保護技術」にもあてはまり、各種の保護技術の紹介順序が大幅に変えられ、前著において冒頭で紹介された「化学的防除」が最後尾にまわされ、「耐病虫性品種」がそれに入れ替わった。5章「病害虫と雑草のシステム管理」では、5.1項は1965年のFAOによる総合的有害生物管理(IPM)の定義の3つの概念に対応して項目が建て直されて読みやすくなった。さらに、この項のe.の小見出し「発生予察」に農家自身による「発生監視」を追加し、農家の自助努力を求めている点は注目に値する。最終項5.5「病害虫・雑草の総合的管理」はあたらしく追加された項で、カリフォルニア大学デービス校の研究者たちによるトマト、トウモロコシの4年輪作畑における有機栽培、エネルギー低投入栽培の病害虫、雑草の発生、被害、収益、防除コストに対する影響に関する研究が紹介されている。このような総合的発想のできる学徒の養成が著者たちの願いなのであろうが、本書に相応しいフィナーレとなっている。さらに、本書の末尾には主要作物の病害虫や雑草の被害とそれらに対する対策が付表としてまとめられ、また章ごとにコラム、参考文献、研究課題などが用意されるなど細やかな気配りも随所にみられる。本書は、学生のためのテキストとしてだけでなく、簡潔で軽快な文体とあいまって、最近の植物保護分野の全貌を手取り早く知りたい向きには肩の凝らない好個のテキストである。(杉本 毅)