

疫病菌遊走子のうの多量形成培養法*

桂 琦一・宮田 善雄・三谷 隆彦

KIUCHI KATSURA, YOSHIO MIYATA and TAKAHIKO MITANI;
A new method for the numerous formation of
zoosporangia in *Phytophthora* spp.

要旨: 無菌的かつ簡単に多量の遊走子のうを形成させるための新しい方法を試案した。

供試菌は *Phytophthora capsici* No. 65 である。培地としては、菌糸の生育良好で、良質の遊走子のうを形成するものとして V 8 ジュースを選出した。100ml のフラスコに入れた 30ml の液体培地中で、28°C、3 週間、前培養した菌そうを、ブフナー漏斗を用いて、殺菌水にてよく洗浄し、あらかじめ、湿った濾紙 2 枚を敷いておいたペトリ皿に移し、障子紙を張った木枠のふたをかぶせ、蛍光灯照明付 28°C 定温器中に並べておくと、36~48 時間後、表面に多量の遊走子のうの形式がみられた。この遊走子のうは気中性で、小型の葉さじで容易にかき取ることができる。本法は *P. palmivola* および *P. melonis* にも適用して多量の遊走子のうを得たが、*P. parasitica*, *P. citrophthora* および *P. heveae* では満足すべき結果が得られなかった。

I. 緒 言

Phytophthora capsici は、ナス科およびウリ科植物の疫病を起因する重要病原菌のひとつであるが、筆者らは、本病の伝染蔓延に最も重要な役割を演ずる遊走子の運動、とくに、走性に関する研究を進めてきた。それら一連の研究を通じて、供試した遊走子は、市販のキュウリまたはナス果実上に接種により形成させた遊走子のうから得ていたが、この方法では、市場に入荷するキュウリあるいはナス果実の時期的変遷が遊走子のうの形成に質的量的変動を生来し、また操作上、バクテリアや雑菌類の混入を防ぐことが困難であって、

研究が進むにつれ、それらのことが次第に支障となってきた。そこで、新しいペトリ皿培養方法の開発を試み、従来方法において、経験的に遊走子のう形成に好適な条件を与える、乾そう状態に置くことと、蛍光灯照明を行なうことの 2 点を取り入れて、一応、満足すべき結果を得たのでここに報告することにした。なお、これはすでに 1968 年 2 月の関西病虫害研究会において講演発表を行なったものである。

II. 材料並びに方法

供試菌は主として本研究室保存の *Phytophthora capsici* No. 65 を用い、最後に、本法の応用範囲を広げ

第 1 表 供試培地とその組成

培 地	培地組成 (1000ml 当り)
アスパラギン・グルコース培地	KH ₂ PO ₄ 3g, CaCl ₂ 3.4g, FeSO ₄ ·7H ₂ O 1mg, ZnSO ₄ ·5H ₂ O 1.8mg, (NH ₄) ₂ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O 0.3mg, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5mg, MnSO ₄ ·H ₂ O 0.3mg, CuSO ₄ ·5H ₂ O 0.4mg
トウモロコシ煎汁培地	トウモロコシ 50g
オートミール培地	オートミール (えん麦) 50g (糖化処理 60°C, 1 時間)
ジャガイモ煎汁培地	ジャガイモ 200g
V-8 ジュース培地	10% (CaCO ₃ にて中和)
酵母デンプン培地	可溶性デンプン 15g, K ₂ HPO ₄ 1g MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5g

* 京都府立大学農学部植物病理学研究室 (業績 第 77 号)

Laboratory of Phytopathology, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto, Japan,
昭和 43 年 7 月 31 日受理

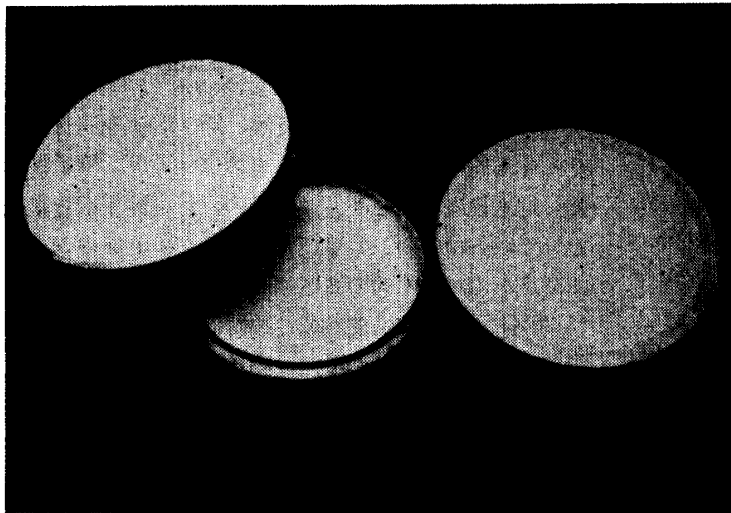
るために *P. parasitica*, *P. heveae*, *P. melonis*, *P. citrophthora*, および *P. palmivola* を用いて検討した。

供試培地は通常疫病菌培養に用いられるトウモロコシ煎汁培地, オートミル培地, ジャガイモ煎汁培地のほか菌糸の生育および孢子形成に好適とされるアスパラギン・グルコース培地¹⁾, V-8 ジュース培地²⁾, および酵母デンプン培地³⁾ の6種で, その組成は第1表に挙げた。

前培養における菌糸の培養には, 培養液 30ml を入れた 100ml フラスコを用い, 接種源は常に直径 5mm の菌そう円板を1個宛とし, 最初の菌量を一定にするようにした。培養後の菌体は, 東洋沱紙 No.2 を敷い



第1図 培養菌体の洗浄



第2図 乾式平面培養のペトリ皿

たブフナー吸引沱斗に移し, 殺菌水を流下して洗浄した(第1図)。

後培養における乾式平面培養では, ペトリ皿のふたを取り除き, 2枚の湿った沱紙を敷き, その上に洗浄した菌体を沱紙のまま載せ, 特製した障子紙を張った木枠のふた(第2図)をかぶせ, 蛍光灯(20W, 5本)照明付定温器に納めて, 遊走子のう形成を促した。培養温度はすべて 28°C とした。

遊走子のう形成数の測定は, 1枚のペトリ皿当たり 10 ml の水を加え, 毛筆でかきまぜ, その一定量を検鏡測定し換算して全形成遊走子のう数を求めた。

また, 菌体乾重の測定法は, あらかじめ乾重を測定しておいた直径 70 mm の沱紙円板に培養菌体を移し, 水分を吸い取り, 数時間風乾後, ペトリ皿に入れて, 85~90°C の定温器に 12時間保った後すばやく計量した。計量前後の重量変化は平均 3.6mg であり菌体重に比し無視してもよいと思われる。

III. 結 果

(1) 培地の種類と菌体生育量

供試培地は第1表に示した6種を用いた。28°C 定温器にて菌体を培養し, 1, 2および3週間後にそれぞれフラスコ3個宛取出し, 前述の方法で菌体乾重を測定した。

結果は第2表のようになり, V-8ジュース培地が菌体の生育に最もよく, 次いで, 酵母デンプン培地, アスパラギングルコース培地, トウモロコシ煎汁培地がほぼ同じぐらいであり, オートミル培地, ジャガイモ煎汁培地がやや劣っていた。

(2) 培地の種類と遊走子のう形成

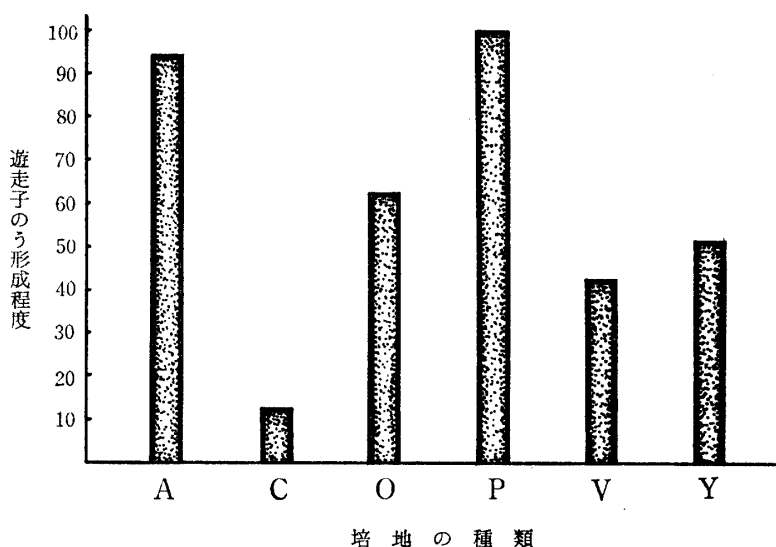
先の実験と同じ6種の培地を用い, 28°C, 2週間培養後, 前述の乾式平面培養法により遊走子のうを形成させて比較した。

その結果は, ジャガイモ煎汁培地の場合を 100 として各培地の遊走子のう形成程度を表わすと第3図のようになり, ジャガイモ煎汁培地, アスパラギングルコース培地が良好で, オートミル培地, 酵母デンプン培地, V-8ジュース培地の順に劣り, トウモロコシ培地が最も遊走子のうの形成が悪かった。しかしながら, V-8ジュース培地上で形成された遊走子のうは他と比較して遊走子発芽状態が良好で, 遊出した遊走子の活力も強いようであり, 遊走子のう形成好適培地としては V-8 ジュースを用いるのがよいと思われる。

第2表 培地の種類と菌体生育量

供 試 培 地	菌 体 生 育 量*		
	培養期間(週間)		
	1	2	3
アスパラギン・グルコース培地	82.8	124.4	201.9
トウモロコシ煎汁培地	27.7	101.9	209.7
オートミール培地	37.3	33.5	190.2
ジャガイモ煎汁培地	24.9	54.1	178.5
V-8ジュース培地	41.7	116.2	267.0
酵母デンプン培地	78.6	124.4	217.4

* 数値は菌体乾重



A: アスパラギングルコース培地, C: トウモロコシ煎汁培地, O: オートミール培地, P: ジャガイモ煎汁培地, V: V-8ジュース培地, Y: 酵母デンプン培地

第3図 培地の種類と遊走子のう形成

第3表 前培養期間と遊走子のう形成数

培 地	遊走子のう形成数* ($\times 10^9$ 個)	
	前培養期間(週間)	
	2	3
オートミール培地	16.2	125.2
ジャガイモ煎汁培地	35.2	120.0
V-8ジュース培地	23.1	38.0
酵母デンプン培地	31.0	61.0

* 1ペトリ皿当りの遊走子のう形成数

第4表 後培養の時間と遊走子のう形成

培 地	遊走子のう形成数* ($\times 10^9$ 個)		
	後培養時間		
	24	36	48
ジャガイモ煎汁培地	17.5	34.9	40.5
オートミール培地	17.5	22.3	29.6

* ペトリ皿1枚当りの遊走子のう形成数

(3) 前培養の期間と遊走子のう形成
前培養の期間と遊走子のう形成量の関係を調べた。

オートミール培地, ジャガイモ煎汁培地, V-8ジュース培地, 酵母デンプン培地の4種を用い, 前培養を行なってから2週間および3週間目にそれぞれ乾式平面培養法による後培養に移し, 24時間後形成された遊走子のう数を測定した。

その結果(第3表), いずれも3週間前培養のものが2週間培養より遊走子のうの形成量が多く, とくにオートミール培地およびジャガイモ煎汁培地で著しい。V-8ジュース培地では3週間培養しても2週間のものに比べて形成量がそれほど増大しないようであるから, 早く遊走子のうを得たい場合は2週間の前培養でもよいようである。

(4) 後培養時間と遊走子のう形成

遊走子のう形成の良好なジャガイモ煎汁培地とオートミール培地を用い, 後培養時間と遊走子のう形成量との関係を調べた。

その結果(第4表), 遊走子のうの形成は後培養の時間と共に増大し, 48時間後にほぼ最大に達した。従って後培養時間は48時間とするのが好ましいようであるが, 菌そうの乾そう状態がかなり激しく, これは遊走子発芽に影響するので, 実用的には36時間とする方がよいようである。

(5) 後培養における明暗, 乾湿処理と遊走子のう形成

前述したように天然キュウリ果実上に遊走子のうを形成させた場合, 経験的に蛍光灯による照明と適当な乾そう条件が好ましいことを知ったが, それを明確にするために次の実験を行なった。

V-8ジュース培地による培養, 28°C, 3週間目の菌そうを前述の方法によりペトリ皿にひろげ, 障子紙を張った木枠のふたをかぶせたもの, その障子紙を墨汁で黒くぬったもの, および, 普通のペトリ皿のガラスぶたをかぶせたものの3区に分け, それぞれ蛍光照明付 28°C 定温器内に並べて, 36時間後, 遊走子のう形成数を測定した。その結果, 障子紙のふたをかぶせたものは 199.4×10^9 個の遊走子のうを形成したのに対し, 黒ぬりのものでは 92.2×10^9 個, ペトリ皿のふたの場合は 72.5×10^9 個と最も形成遊走子のう数が少なかった。この際, 照度はそれぞれ490, 26 および 1250ルクスで, このことより, 遊走子のう形成に光は有効

であるが、それ以上に、適度な乾そう状態が大きな要因であることを示す。また V-8 ジュース寒天培地上に菌そうを伸ばし、菌そうがペトリ皿の平面を完全に覆った頃、ふたを取除いて、前記の障子紙ふたをかぶせ、蛍光照明付定温器に保ったところ、障子紙ふたの場合、かなりの遊走子のう形成を認めたがそのままペトリ皿のふたで覆っていたものでは全く形成をみなかった。このことも、遊走子のう形成には、表面の乾そう状態が重要であることを示唆しているようである。

(6) 他の *Phytophthora* 属菌に対する本法の適用

本研究室において保存する *Phytophthora* 属菌のうち、代表的な菌株 *P. parasitica*, *P. heveae*, *P. melonis* (No. 14 および No. 16), *P. palmivola* および *P. citrophthora* を用い、本法の適用範囲を調べてみた。

その結果、*P. palmivola* では、ほぼ *P. capsici* に匹敵する遊走子のう形成がみられ、十分に実用の可能性がある。*P. melonis* では No. 14 はかなり多数の形成をみたが、No. 16 はごくわずかで、遊走子のう形成は分離系統間でも異なるようである。*P. citrophthora* も遊走子のうの形成を認めたが、実用性は少なく、また、*P. heveae* は大部分が卵胞子で、普通のペトリ皿培養の場合とほとんど同じであった。

IV. 考 察

遊走子をも含めて、胞子を用いた研究においては、培養により多数の胞子を得ることが必須条件となってくる場合が多い。そのためには普通、胞子形成の良好な菌株を選出し、胞子形成に好適な培地成分の検討がなされるが、さらに、胞子形成に効果のある種々の物理的、生理的条件を組み合わせ、創意と工夫に富んだ様々の胞子形成培養法が生み出されてきた。例えば、2種の異なる培地を用いた前後2段培養法⁸⁾、あるいはその変型である養分の稀釈または除去による飢餓培養法⁹⁾、温度変換と飢餓培養を組み合わせた培養方法^{4,10)}などがあり、またスポンジ小片を用いた Matsuura⁶⁾の方法も、飢餓効果と適度の温度効果を組み合わせた新しい胞子形成培養法と云えよう。一方、著者らの乾そう平面培養法においては、光の照射と乾そう処理の胞子形成促進効果を利用したのであるが、これらはずで、いもち病菌の胞子形成においても、井上ら⁸⁾が培養菌糸をピーカーに移して日射下に放置した方法、あるいは、吉村ら¹¹⁾の布ぎれ転換法において効果を認めたと同様である。しかし、この胞子形成における光の効果

にしても、それが必須の要素でないことは、いもち病菌をはじめ、多くの糸状菌胞子が暗黒中においても容易に形成されるものであり、*Phytophthora capsici* できえ暗黒中で遊走子のうを形成することができる。乾そう状態もまた胞子形成の重要な要因とはならない。すなわち、*Phytophthora parasitica* およびその近縁菌は水中において遊走子のうの形成が著しく、本研究に用いた *P. capsici* もまた水中において罹病した植物根表面に多数の遊走子のうを形成することはすでに報告⁵⁾した通りである。

このように、胞子形成に関与する要因は種々雑多であり、かつ、多くの矛盾する内容を含んでいる理由は、これらの要因が、直接に胞子形成への代謝系の発動を促進する場合のみならず、なんらかの形で栄養生長のための代謝系の動きを抑制さえすれば、間接的に胞子形成を促進した結果となる場合があるからであろう。いずれにしても、胞子形成の機構の解明には今後に残された課題が実に多いようであるが、筆者らの試みはあくまで、多量の遊走子のうを無菌的かつ簡単に得る方法を開発することにあつた。ここに述べた障子紙を張った木枠のふたをかぶせる乾式平面培養法によって、供試するに十分な胞子形成を得たことはまず満足すべき結果であり、今後はこの方法によって得た遊走子のうを用い、研究を進めることができる。

引用文献

- 1) Bartnicki Garcia, S. (1966): J. Gen. Microbiol. **42**: 57-69.
- 2) Emerson, R. (1958): Mycologia **50**: 589-621.
- 3) 井上義孝・木下末雄 (1953): 日植病報. **17**: 178.
- 4) 桂 琦一・宮田善雄・橋本信彦 (1968): 関西病虫害研究会報. **11**: 投稿中.
- 5) 桂 琦一・宮田善雄・池上琢磨 (1968): 坂本教授還暦記念論文集: 317-325.
- 6) Matsuura, K. (1965): Ann. Rept. Takeda Research Lab. **24**: 266-272.
- 7) Miller, P. M. (1955): Phytopathol. **45**: 461-462.
- 8) 高橋喜夫 (1955): 農業技術. **10**: 563-565.
- 9) 田中寛康・赤井重恭 (1963): 日植病報. **28**: 64-65.
- 10) Tsao, P. H. (1967): 日植病報. **33**: 73.
- 11) 吉村彰治・鈴木幸雄 (1960): 北陸病虫害研究会報. **8**: 65-70.

Summary

A new method for obtaining abundant zoospores of *Phytophthora* spp. is described in this

paper.

The V-8 juice medium was favorable for both

mycelial growth and zoosporangium formation of *Phytophthora capsici* Leon. No.65. Thirty ml of the medium in each of 100 ml Erlenmeyer flask was sterilized by autoclaving at 121°C for 15 minutes. This medium was inoculated with a 5mm diam. disk of mycelium grown on potato dextrose agar plate at 28°C for a week. After 3 week incubation period at 28°C, mycelial mat was removed from the flask, and rinsed with sterilized deionized water through a Buchner funnel with a sheet of filter paper (Fig.1). The clean mycelial mat then put on 2 sheets of moistened filter paper in a Petri dish. The Petri dish was covered with a special paper lid (Fig.2), and placed in a 30°C incubator illuminated with fluorescent lamp. One of the important points of this method is to use the

paper lid instead of the ordinary glass lid of Petri dish. The paper lid keeps the surface of mycelial mat in moderately dry condition. The another point is to illuminate with fluorescent lamp. Both dry condition and illumination seems to be very effective for sporangium production by this fungus. Numerous zoosporangia were formed on the surface of mycelial mat after 36-48 hours. They were easily collected by a small spatula.

This method has so far been found to be applicable to *P. palmivola* and *P. melonis*, but not to *P. parasitica*, *P. citrophthora* and *P. heveae*. In general, this method seems to be practicable for the fungi which produce abundant spores on the surface of the host plant in field.