

# 多量の疫病菌遊走子のうを得るための紙蓋平面培養法\*

宮田 善雄・桂 琦一・室川 嗣夫

YOSHIO MIYATA, KIICHI KATSURA and TSUGUO MUROKAWA:

Paper lid method for cultubation of numerous  
zoosporangia in *Phytophthora capsici*

要旨: *Phytophthora capsici* Leon. の遊走子のうを多量に形成させるための培養法を開拓した。培地としてはキュウリ、ダイコン、タマネギ、ナス、ニンジン、および、キャベツの食用部分のジュースのうちで、キュウリが最もすぐれていた。このジュースは果実をミキサーで粉碎後4枚のガーゼで濾過した程度がよく、混在する組織断片や細胞顆粒の中に旺盛な遊走子型発芽能力をもった遊走子のうの形成に有効な物質が含まれている。このジュースは原液のままより、むしろ、2倍程度に希釈したほうが遊走子のうの形成には適している。この培地に菌体を植込み、28°Cで2週間、前培養したのち、形成された菌そうを取出して、滅菌した脱イオン水でよく洗い、表を上にして、湿った濾紙を敷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て、28°C 蛍光灯照明付定温器内に並べておくと、24—28時間の後培養で、菌そうの上面に多量の遊走子のうが形成されるので、これをかき取って供試することになる。

## I. 緒 言

*Phytophthora* 属菌はそのほとんどが農作物に対する重要な病原菌であって、その生活環中、遊走子のうから泳ぎ出した遊走子が、急激な伝染蔓延に主体的役割を演じていることが多い。*P. capsici* もその一つであって、寄主となるキュウリやナスの果実に本菌を接種すると、数日にして、その表面に多量の遊走子のうの形成がみられ、それを水にけんたくすると1時間以内に多数の遊走子が泳ぎ出し活発に遊泳するのがみられる。筆者らの本菌遊走子の遊泳行動と寄主体侵入から感染に至る一連の研究<sup>2)</sup>は最初はそのようにして得た遊走子を用いていたが、任意に純粋かつ多量の遊走子を得る必要を痛感し、種々の検討を加えて、障子紙を張った木枠のふたを用いる遊走子のう多量形成培養法を開拓した。その概要はさきに報告<sup>1)</sup>したが、ここではその後得られた幾つかの知見を加味して、本法の一応のまとめとしたい。

## II. 方 法

供試菌は本研究室保存の *Phytophthora capsici* No. 65 であり、接種源としては、あらかじめ、28°Cで4日間ジャガイモ煎汁培地上で培養しておいた菌そ

うから、同心円状に口径5mmのステンレスパイプで切抜いた菌そう円板を1フラスコにつき1個宛加えるようにした。

植物ジュース培地の作成の際は、いずれも、植物体をそのままミキサーにかけ、ガーゼ4枚で濾過し、その濾液に等量の脱イオン水を加えて希釈し、その30mlずつを100mlまたは200mlの三角フラスコにとり、121°C、15分間のオートクレーブ滅菌処理を行なった。V-8ジュースの場合は、遠沈上清液(3500rpm、15分間)100mlに、同量の3% CaCO<sub>3</sub> 遠沈上清液を加え、さらに脱イオン水にて全量を1ℓになるように希釈したものを用いた。

その他の培養法や菌体生育量および形成遊走子のう数の測定方法はほとんど前報<sup>1)</sup>と同様であり省略する。

## III. 結 果

### 1) 各種蔬菜ジュース培地の比較

供試蔬菜ジュースとして、寄主であるキュウリ、ナスのほか、非寄主のダイコン、タマネギ、ニンジン、キャベツを選び、前報の好適培地としたV-8ジュースと比較した。結果は第1表の通りである。菌体乾重当りの遊走子のう形成数で比較すると、キュウリが最

\*京都府立大学農学部植物病理学研究室(業績88号)

Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto, Japan  
(Contribution No. 88)

昭和45年7月31日受理

第1表 各種蔬菜ジュース培地における  
遊走子のう形成

ジュース 培地	pH	遊走子のう 形成数(A)	乾燥菌体 重(B)	A/B
キュウリ	5.9	$5955 \times 10^5$	85mg	70.1
ダイコン	5.8	3353	186	18.0
V-8ジュース	4.4	1380	30	46.0
タマネギ	5.8	1680	171	9.3
ナス	5.3	810	102	7.9
ニンジン	6.5	300	320	0.9
キャベツ	6.2	158	235	0.7

ペトリ皿各3枚, 3回反覆平均値。

も多量に形成され, 次いで, V-8 ジュース, ダイコン, タマネギ, ナスの順であり, ニンジン, キャベツが最も劣る。ナスは本菌の寄主であるが意外に形成が少なく, 非寄主であるダイコンが比較的多量の形成をみたのはおもしろい。また, 遊走子のう形成の旺盛であるキュウリや V-8 ジュースでは菌体生育量が少なく, 逆に遊走子のう形成の悪いニンジンやキャベツでは菌体の生育がすこぶる旺盛であった。

## 2) キュウリジュース培地の稀釈と遊走子のう形成

キュウリジュースが遊走子のう形成にすぐれていることがわかったが, 次に培地を有効に用いるために, 数段階に稀釈して, 遊走子のう形成量を比べてみた。結果は第2表に示す通り, 意外にも, キュウリジュ

第2表 キュウリジュース培地の  
稀釈と遊走子のう形成

培地の稀釈	遊走子のう 形成数(A)	乾燥菌 体重(B)	A/B
原液	$3923 \times 10^5$	314mg	12.8
1/2	13073	118	110.3
1/4	5633	52	108.8
1/8	1215	23	52.8
1/16	698	15	45.8
1/32	232	7	34.5

ペトリ皿各3枚, 3回反覆平均値。

スをそのまま培地とした場合よりも, 2倍あるいは4倍に稀釈した方が, はるかに遊走子のう形成が旺盛となることがわかった。原液のままではなぜ遊走子のう形成がよくないのかはわからないが, 菌体生育量は2倍稀釈液の場合よりはるかに多く, 1)の結果と同様に, 菌体生育量と遊走子のうの形成とは概して逆の関係にあるように思える。

## 3) キュウリ果実の部位と遊走子のう形成

キュウリ果実の果皮と果肉のいずれの部分に遊走子のう形成に有効な物質が含まれているかを知る目的で, 果実を果皮と果肉の部分に分け, それぞれのジュ

第3表 キュウリ果実の部位と遊走子のう形成

キュウリ果実 の部位	遊走子のう 形成数(A)	乾燥菌 体重(B)	A/B
果実全体	$3165 \times 10^5$	70mg	45.4
果皮のみ	1755	55	31.7
果肉のみ	3060	99	31.1

ペトリ皿各3枚, 3回反覆平均値。

ースを培地として遊走子のう形成程度を調べた(第3表)。その結果, 乾燥重量当たりの遊走子のう形成数では, 果皮と果肉の間に差異は認められなかったが, 遊走子のうの形成量では果肉の方がかなり良好で, 果皮は菌体生育量も果肉より劣っていた。

## 4) 煎汁と搾汁(ジュース)との比較

グルコース添加ジャガイモ煎汁培地(PDA)を代表として, 植物体から作られる天然培地の多くは煎汁液を用いている。一方, 本法で用いたキュウリジュース培地は搾汁である。そこで, キュウリの煎汁と搾汁との培地としての比較を試みた(第4表)。菌体生育

第4表 キュウリ煎汁と搾汁の比較

	遊走子のう 形成数(A)	乾燥菌 体重(B)	A/B
キュウリ煎汁	$1025 \times 10^5$	107mg	9.6
キュウリ搾汁	13650	94	149.0

ペトリ皿各3枚, 3回反覆平均値。

量は両者ともほとんど同じであったが, 遊走子のう形成量は煎汁の場合はすこぶる悪く, 搾汁の約15分の1ほどであった。

## 5) オートクレーブによる滅菌処理回数と遊走子のう形成

培地の滅菌方法は121°C, 15分間のオートクレーブ処理を標準としているが, この処理が培地成分に変化を与え, 菌体の生育や遊走子のう形成に影響を及ぼすことは十分に考えられる。そこで, オートクレーブの処理回数と, 遊走子のう形成との関係を調べてみた。その結果は第5表に示すようであって, 処理回数の増加につれて, 形成された遊走子の総数は漸次減少するが, それよりも菌体生育量の減少が著しく, かえ

第5表 オートクレーブ滅菌処理回数  
と遊走子のう形成

オートクレー ブ回数	遊走子のう 形成数(A)	乾燥菌 体重(B)	A/B
1	$7635 \times 10^5$	73mg	105.8
2	6750	58	117.0
3	5213	21	252.8

ペトリ皿各3枚, 3回反覆平均値。

って、菌体重当たりの遊走子のう形成数に増加を示す結果となった。このことから、オートクレーブ処理は菌体の生育に必要な物質の活性を低下させるが、遊走子のう形成に有効な物質は熱に対してかなり安定な性質を有することを推察させる。このことから遊走子のうを多量に得るためには、オートクレーブ処理は出来るだけ少なくすることが好ましいことになる。

#### 6) 培養した菌そうの表裏と遊走子のう形成

本法において、前培養として液体培地中にて 28°C、2 週間の静置培養を行なうと、菌糸は培地表面にマット状に広がり、後培養に移すためにピンセットでつまみ出したものは、フェルトの円板のような菌そうである。この菌そうの表裏の区別はさほど困難でなく、後培養では、一応、表を上にして置くようにしているが、その表と裏で遊走子のうの形成量に差異があるものかどうかを調べてみた。その結果は第 6 表に示すよ

第 6 表 菌そうの表裏における遊走子のう形成の比較

菌そうの表裏	遊走子のう形成数(A)	乾体重量(B)	A/B
表	7410×10 <sup>5</sup>	96mg	75.1
裏	3874	98	39.5

ベトリ皿各 3 枚、3 回反覆平均値。

うに、裏では表の半分ほどの形成量になることがわかった。したがって、後培養の際、菌そうは表を上にして置くように留意せねばならない。

#### IV. 考察ならびにまとめ

前回には、一般に菌類の培養によく用いられる培地（ジャガイモ、トウモロコシ煎汁培地、オートミル培地、V-8 ジュース培地、酵母デンプン培地など）について検討し、遊走子のうの形成が良好で、かつ、遊走子型発芽の旺盛に起こる培地として V-8 ジュース培地を選出したが、まだ十分に満足できるほどの培地ではなかったので、この V-8 ジュースが 8 種の蔬菜の混合ジュースであることから考えて、市販の種々の蔬菜からジュースをつくり、その効果を検討したところ、前述のように、キュウリ果実のジュースが、活発な遊走子型発芽能力を有する遊走子のうを多量に得るためのさらにすぐれた培地であることを知った。キュウリは本菌の寄主植物であるが、同じ寄主であるナスでは遊走子のう形成量はあまりよくなく、逆に、非寄主であるダイコンがすぐれた培地となったことと考え合わせて、遊走子のう形成に好適な培地となる植物は、寄主であることとは関係なく、遊走子のう形成に有効な

物質を多く含んでいるかどうかということに依っているであろう。キュウリジュースは 4 枚のガーゼで濾過した程度であるから、組織断片や細胞顆粒を多量に含んでおり、それらの中に遊走子のう形成に有効な物質や遊走子型発芽を行なうのに必須の物質が存在している。このことはキュウリ煎汁培地の場合、遊走子のう形成がすこぶる悪く、しかも、この遊走子のうは遊走子型発芽を示さないことから知られるが、キュウリジュースを 10000rpm、15 分間の遠沈をかけ、その上清液を培地として用いた場合、形成された遊走子のう数は、遠沈処理をしない場合とほぼ同じ程度であったにもかかわらず、遊走子型発芽は全く認められなかったことから明らかに、その後の研究から、その遠沈残渣中に含まれるステリンが、遊走子型発芽能力をもった遊走子のうの形成に必須の物質があることも明らかにし得た<sup>1)</sup>が、その詳細はあらためて報告したい。遊走子のう形成のメカニズムについては現在ほとんどなにもわかっていないと云ってもよからう。本研究中に得られた幾つかの知見も単に現象をとらえたにすぎないが、目的はとにかく多量の遊走子のうおよび遊走子を得るための方法の開拓にあったから、前回にひきつづき、前述のような幾つかの知見をさらに加えて、一応の満足できる方法を確立することができたと思う。最後にそれらをまとめてみよう。

#### 遊走子のう多量形成のための紙蓋平面培養法

本法は菌体を生育させるための前培養と遊走子のう形成を起こさせるための後培養に分かれる。

##### A. 前 培 養

キュウリ果実を適当に切り、ミキサーで充分粉碎しガーゼ 4 枚に包んでしぼる。濾液に同量の脱イオン水を加え、200ml の三角フラスコに 30ml ずつ分注する。綿栓あるいはアルミホイルのふた<sup>1)</sup>などをほどこして、オートクレーブ (121°C、15 分間) による滅菌処理を行なう。あらかじめベトリ皿に平面培養しておいた *P. capsici* の菌そうから同心円状に金属パイプ (直径 5mm) でくりぬいた菌そう片を各培地に植込み、28°C 定温器に入れて、2 週間培養する。

##### B. 後 培 養

前培養した菌そうをピンセットでつまみ出し、ブフナー濾斗の濾紙 (東洋濾紙, No. 2, 直径 7cm) の上に、菌そうの表を上になるようにして広げ、滅菌脱イオン水をそそいでよく洗浄し、濾紙のままとり出して、2 枚の湿った濾紙 (東洋濾紙, No. 2, 直径 9cm) を敷いたベトリ皿 (実際はベトリ皿のふたの方をつかう) に移す。この時の濾紙および菌そうの水分量が適

度でないと十分な遊走子のう形成量は望めない。経験的には濾紙と菌そうに滅菌脱イオン水をさらに加え、ペトリ皿ごと逆さにして保水量以上の水を落し去ったぐらいが調度よい。これを障子紙を張った木枠のふた（直径 10cm）をかぶせ、28°C 蛍光灯照明付定温器内に並べ、24時間培養すると菌そう表面に多量の遊走子のうが形成されるから、小さな葉さじですくい取るか、または、水を加えて、筆でなぞってけんだく液としてとる。筆者らの用いた蛍光灯照明付定温器は、定温器の上面をガラス張りとし、その上に20Wの蛍光灯を8本並べたもので、ペトリ皿の位置における照度は約500ルクスである。なお、前・後培養を通じて雑菌の混入は出来るだけ防ぐように配慮することが好ましく、障子紙を張った木枠のふたをかぶせる理由は空中の雑菌の混入を防ぎ、かつ、光と適度な乾燥状態を与えて遊走子のうの形成を促がすことを可能にした。

本法は *P. capsici* のみならず、*P. palmivola* や *P. melonis* No. 14 にも適応できると共に、自然状態で罹病した寄主植物体上に気中型の胞子を多量に形成するような病原菌であれば応用できるのではないかと考えている。

## 引用文献

- 1) 桂 琦一・宮田善雄・三谷隆彦(1968)：京府大学報・農20：32-36.
- 2) Katsura, K., and Y. Miyata(1970)：The United States-Japan Cooperative Science Program (in press).
- 3) 宮田善雄・桂 琦一・渡辺健三(1970)：日本植物生理学会講要：27
- 4) 宮田善雄(1969)：化学と生物7：604-5.

## Summary

Paper lid method for the cultural formation of abundant zoosporangia of *Phytophthora capsici* Leon. was described on this paper.

The juice medium of cucumber was most favorable for obtaining numerous zoosporangia among that of seven vegetable plants, i.e. cucumber, radish, onion, eggplant, carrot, cabbage and V-8 juice (Campbell Soup Co.). Cucumber fruits were homogenized by an electric mixer, and filtered through four sheets of gauze. The filtrate contained fine tissue debris and cellular particles, which were indispensable as active factors for production of zoosporangia released vigorously swimming zoospores. The cucumber juice medium was produced by adding same volume of deionized water to the filtrate. Thirty ml of the medium in each of 200 ml Erlenmeyer flask was sterilized by autoclaving at 121°C for 15 min. Many times of sterilization by autoclaving were unfavorable for mycelial growth and zoosporangium formation. This medium was inoculated with a 5mm diam disk of mycelium grown on PDA plane agar in Petri dish at 28°C for 4 days. The inoculated medium was incubated at 28°C for 2

weeks. The grown mycelial mat was removed from the flask, and rinsed with sterilized deionized water through a Buchner funnel with a sheet of 70mm diam filter paper (Toyo No. 2). The clean mycelial mat put on two sheets of 90mm diam wet filter paper in Petri dish which was covered with a special paper lid, instead of ordinary glass lid of Petri dish. The paper lid was a wooden hoop with 100mm diam, 13mm wide and 3mm thick, covered with Japanese paper on upper side.

The lid keeps the surface of mycelial mat in moderately dry condition which was very effective for sporangium production by this fungus, and prevents it from being contaminated by another microorganisms. The Petri dish placed in a 28°C incubator illuminated with fluorescent lamp. The illumination was about 50 ft-c at the surface of the Petri dish. Numerous zoosporangia were formed on the surface of mycelial mat after 24 hours. They were easily collected by a small spatula, or suspended in water by stirring with a short brush.