四国植防，第29号： 59 ～ 63 （1994）
Proc. Assoc. Pl. Protec. Shikoku. №29：59 ～ 63（1994）

熱湯処理葉を用いた *Pyricularia zingiberi* Nishikado の分生子多量形成法

古 谷 眞 二
（高知県農業技術センター）

A Cultural Method for the Mass Sporulation of *Pyricularia zingiberi* Nishikado

By Shinji Kotani (Kochi Agricultural Research Center, 1100 Hataeda, Nankoku, Kochi, 783, Japan)

は じ め に

作物の病害を研究する上で，病原菌の分生子を容易に多量得ることができれば，極めて好都合である．これまで，イネいもち病菌においては種々の分生子多量形成法（古田ら；1967，見里ら；1957，大森ら；1966，大森ら；1970，関口ら；1966，鈴木；1966，吉村ら；1960）が考察された．それらの中で，オートミール寒天培地を用いて光を照射する古田・関口氏法（古田ら；1967，関口ら；1966）が最も広く利用され（山口；1980），この方法では培養開始12日前後に 10^5 個／cm²水準の分生子が得られる．

筆者は，ショウガやミョウガのいもち病菌 *Pyricularia zingiberi* Nishikado に対してジャガイモ・ニンジン寒天培地での培養あるいは古田・関口氏法により分生子を形成させていたが，いずれの方法によっても必要量を得るには必ずしも容易でなかった．一方，自然界においては，夏期から秋期の曇雨天時にいもち病に罹病したミョウガ茎葉で多量の分生子が認められた（Kotaniら，1992）．そこで，分生子の形成に植物体を利用することを考え，種々の予備試験を行った．その結果，熱湯処理したミョウガ葉やショウガ葉を菌そうに重ねると，菌そう培養開始から8日前後で 10^8 個／cm²水準の多量の分生子を得られることが明らかになり，既にこの方法で得た分生子を2，3の実験に供試した．今回は，本法の細かい点について検討を加え，*P. zingiberi* の分生子多量形成法をまとめたので報告する．

本研究を行うに当たり，有益な助言と菌株の分譲を頂いた農林水産省農業研究センター水田病害研究室林　長生主任研究官に対して，深謝の意を表する．

材料および方法

1. 供試菌

菌株間の分生子形成量の比較には，ショウガ根茎の黒あざ症（Kotaniら，1992）から単胞子分離したいもち病菌5菌株並びにミョウガ葉の病斑から単胞子分離したいもち病菌4菌株を用いた．その他の実験にはショウガ根茎の黒あざ症から単胞子分離した菌株ＰＺＧ34－4を用いた．

2. 分生子形成手順

ショウガ葉あるいはミョウガ葉を用いた試験では次のように分生子を形成させた．ストレプトマイシン硫酸塩を100μg／ml添加したジャガイモ煎汁寒天（mＰＳＡ）培地約10mlをペトリ皿に分注後，供試菌を移植して28℃で前培養した．前培養後5日後，ミョウガあるいはショウガの葉片（半径1cm）を菌そうの上に重ね，28℃で後培養した．用いた葉片は，あらかじめ熱湯（約98℃）に10秒間浸漬処理し，5,000μg／ml次亜塩素酸ナトリウム水溶液で30分間表面消毒後，滅菌水で3回水洗して滅菌濾紙で水分を除いたものである．ただし，熱湯処理時間に関する試験では3～18秒間の範囲で熱湯処理時間を違えた．後培養2日後，水道水と絵筆により葉片表面をブラッシングし，分生子

や菌糸片を洗い流した．ブラッシング後，滅菌濾紙で葉片表面の水分を十分除いた．この葉片を別のペトリ皿内のストレプトマイシン硫酸塩 50 μg／ml添加素寒天（mＷＡ）培地の平板に移し，28℃の暗黒条件下で24時間培養して分生子を形成させた．なお，各区には葉片３～４枚を供試した．

一方，オートミール寒天培地を用いた試験では，古田・関口氏法に準じて，次のように分生子を形成させた．オートミールとショ糖の量を減じたオートミール寒天培地（オートミール30ｇ，ショ糖５ｇ，寒天16ｇ，蒸留水 1,000 ml）40mlを分注したペトリ皿に菌そう小片を移植し，28℃で培養した．培養10日後に絵筆と滅菌水でブラッシングを行い，穴をあけたポリ塩化ビニリデンフィルムで覆い，ＢＬＢ蛍光灯（東芝，20W）で照射しながら28℃で培養した．照射２日後，分生子形成量を調査した．

3. 分生子数の測定

葉片を用いた試験では次のように分生子数を調査した．分生子を形成したペトリ皿内の葉片を試験管に移し，ツイーン80を0.02％となるように添加した蒸留水を葉片当たり 1.2 ml加え，ミキサー（大洋物産，ＴＢ－１）で60秒，超音波洗浄器（ヤマト科学Ｋ．Ｋ．，8200Ｊ４）で10分間処理して分生子を懸濁させた．この分生子懸濁液をThomaの血球計算板に滴下し，その 400 分割中の分生子数を顕微鏡で数え，葉片１cm²当たりの分生子数を算出した．

一方，オートミール寒天培地を用いた試験ではツイーン80を0.02％となるように添加した蒸留水をペトリ皿当たり２ml注入し，絵筆で分生子を懸濁させた．この懸濁液中の分生子を前記と同様にThoma血球計算板で調査した．

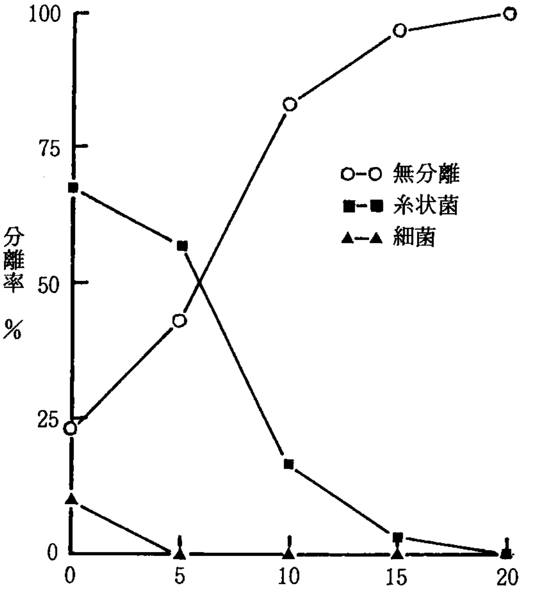
4. 分生子の発芽

１／２濃度のジャガイモ煎汁液体培地で 5.1×10^8 個／mlに調整した分生子懸濁液をホールスライドガラスに滴下し，湿室にしたペトリ皿に入れた．これを28℃の恒温器に入れ，１時間毎に４時間後まで分生子の発芽の有無を調査した．なお，発芽管の長さがその幅以上伸長した場合を発芽とみなした．

結　　果

1. 供試葉の表面消毒法

材料とする葉片からの雑菌の混入を防ぐため，葉片の表面消毒法を検討した．予備試験の結果から，消毒には５mg／mlの有効塩素を含む次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いた．この溶液にミョウガ葉片を所定の時間浸漬した後，滅菌水で３回洗浄し，細断（約２mm×２mm）した．この小片30個をジャガイモ煎汁寒天培地に置床し，28℃で４日間培養した後，糸状菌および細菌の発育の有無をみた．その結果，５mg／mlの有効塩素を含む次亜塩素酸ナトリウム水溶液で20分間浸漬処理することにより，葉片から糸状菌および細菌が検出されなくなった（第１図）．



第１図　次亜塩素酸ナトリウム液（有効塩素濃度５mg／ml）へのミョウガ葉の浸漬時間と表面消毒効果

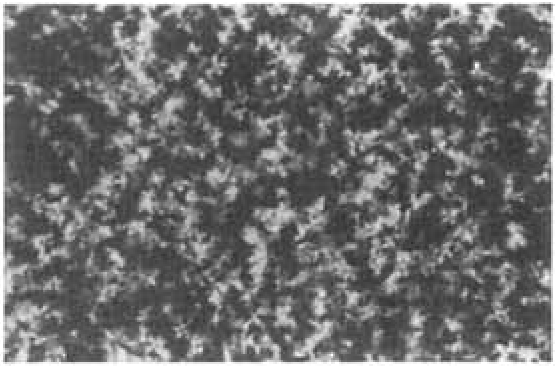
2. 葉片の熱湯処理時間

葉片の熱湯処理時間を明らかにするため，ミョウガ葉片を３～18時間熱湯（約98℃）に浸漬して，直ちに水道水で冷却した．これらの葉片を表面消毒後，前述の方法で分生子を形成させた．その結果，熱湯処理時間が３～18秒間の範囲ではその形

成量に差がなく（第1表），葉片全面に分生子柄を密生し，多量の分生子を形成した（第2図）．なお，熱湯処理をしない場合には葉片の周縁のみに分生子形成がみられ，形成された分生子数は少なかった．

第1表　ミョウガ葉片の熱湯処理時間と分生子形成量

熱湯処理時間（秒）	分生子数（10^{8} 個／㎠）
0	1.0
3	7.5
6	6.7
9	6.3
12	5.0
15	6.3
18	5.5



第2図　ショウガ葉片上での分生子の形成状況

3.　葉片の培地上への置床法

ミョウガ葉片を用いて，mPSAで発育させた菌そうに葉表あるいは葉裏を接触させて重ねた場合における分生子形成量について検討した．その結果，いずれの場合においてもほぼ同程度の分生子を形成した（第2表）．

4.　ミョウガ葉，ショウガ葉と分生子形成

ミョウガおよびショウガの葉片を用いて，分生子形成量を比較した．その結果，両者の形成量に大きな差はなかったが，ミョウガ葉片で分生子形成量がやや多い傾向がみられた（第3表）．

5.　供試葉の葉位と分生子形成

ガラス室で生育させた展開葉数10〜15枚のショウガ茎を供試し，その株元から2〜4枚目の下位葉，6〜9枚目の中位葉および最上位展開葉を採集し，葉位と分生子形成量を比較した．その結果，中位葉および最上位展開葉では同程度の分生子を形成したが，下位葉での分生子形成量はやや少ない傾向がみられた（第4表）．

第2表　ミョウガ葉片の菌そう接触面と分生子形成量

葉片の菌そう接触面	分生子数（10^{8} 個／㎠）	
	実験1	実験2
葉　裏	6.5	6.3
葉　表	6.4	4.7

第3表　ミョウガ，ショウガの葉片上における分生子形成量

熱湯処理時間（秒）	分生子数（10^{8} 個／㎠）	
	ショウガ葉	ミョウガ葉
6	4.0	6.7
9	5.5	6.3

第4表　ショウガ葉の葉位と分生子形成量

葉　位	分生子数（10^{8} 個／㎠）
最上位展開葉	6.6
中　位　葉	5.6
下　位　葉	2.8

6.　菌株と分生子形成

菌株間で本法による分生子形成量に差があるか否かをショウガ葉片を用いて検討した．その結果，ショウガからの分離菌株PZG 34－1を除いて，いずれの菌株も10^{8} 個／㎠水準の分生子を形成し，供試した菌株間では大きな差が認められなかった（第5表）．菌株PZG 34－1では葉片組織への菌糸の侵入が全く認められなかった．

7.　従来の方法との分生子形成量の比較および分生子の発芽勢

オートミールおよびショ糖の量を減じたオート

ミール寒天培地を用い，古田・関口氏法に準じて分生子を形成させ，ショウガ葉を用いた本法と分生子形成量について比較した．その結果，本法では 10^8 個／㎠水準，古田・関口氏法では 10^6 個／㎠水準の分生子が形成され，前者が後者よりもかなり多くの分生子を形成した（第6表）．また，本法で形成させた分生子は，ジャガイモ煎汁液体培地中で28℃ 2時間後に約64%，4時間後には約93%発芽した（第7表）．

第5表　数種菌株の分生子形成量

分離植物	菌株No.	分生子数（ 10^8 個／㎠）
ショウガ	PZG 34−4	6.7
〃	PZG 34−1	5.0
〃	PZG 40−1	8.7
〃	PZG 60−1	0.0
〃	PZG 71−1	8.2
ショウガ	PZM306−1	5.0
〃	PZM405−1	6.0
〃	YNZiM1−1−2 1)	6.3
〃	NNZiM1−1−1 1)	6.9

1）農林水産省農業研究センターからの分譲菌株

第6表　古田・関口氏法との分生子形成量の比較

方　法	分生子数（ 10^6 個／㎠）
古田・関口氏法 1)	1.7
本　　法 2)	542.6

1）オートミールとショ糖の量をそれぞれ，30，5 g／ℓに減じた培地を供試し，ペトリ皿3枚に培養．
2）3枚のショウガ葉片を供試．

第7表　熱湯処理葉片で形成させた分生子の発芽の推移

培養時間（hr.）	発芽率（%）
0	0.0
1	0.0
2	63.8
3	82.8
4	93.4

考　　察

熱湯処理をしなかった葉片では，葉片作成時の切断部と次亜塩素酸ナトリウムの影響で傷んだ周縁組織に分生子を少数生じた．しかし，その他の部分では分生子形成がほとんどみられなかった．一方，熱湯処理葉片ではmPSA培地の菌そうに重ねた2日後には多量の分生子を生じ，ブラッシング後mWA培地に移して24時間を経過すると，さらに多くの分生子を一斉に生じ，その数は古田・関口氏法（古田ら；1967）よりも多かった．また，得られた分生子の発芽も揃っていた．これらのことから，熱湯処理した葉片を用いる本法は，同調した多量の分生子を得る有効な手段と思われる．

熱湯の処理時間に関しては，3～18秒間の処理では分生子形成量にはほとんど差がなく，この時間の範囲内であれば，とくに時間を限定する必要がないように思われた．また，葉片を菌そうに重ねる場合，葉裏あるいは葉表のいずれを菌そうに接触させてもよいと考えられた．

一方，葉片に用いる植物の種類は，ショウガおよびミョウガのいずれでも問題はなかったが，材料の準備を考えると，ショウガが適当と思われた．ミョウガでは，種茎の入手がやや困難で，その植付け時期によっては休眠打破の必要があり，鉢植えも難しい．しかし，ショウガでは根茎の入手が容易で，いつでも鉢植えが可能である上，うまく管理すると4，5カ月間は使用することができる．なお，保存したショウガあるいはミョウガの押し葉を用いてもほぼ同程度の分生子が得られた．

本法において，直径9㎝のペトリ皿内の平板培地の5，6か所に菌そう小片を移植し，菌そう発育後，ペトリ皿全面に葉片を敷き詰める方法をとると，菌そう培養開始8日後にペトリ皿当たり 10^{10}～ 10^{11} 個の分生子を得ることも可能である．また，分生子を形成させた葉片の表面にカバーガラスなどを置き，それに付着させて分生子を採集すると．菌糸片や培地成分などが混じらない純粋な分生子を多量得ることができる．さらに，ブラッシングの際に滅菌水と滅菌絵筆を使用すると，無菌的に分生子を得ることも可能である．

なお，葉片の表面消毒に加え，培地への抗生物質の添加が必要か否かなど，本法をより簡便にす

るための検討が今後必要である．また，本法をイネいもち病菌とイネ葉の組み合わせで試験したところ，10^7個／cm²水準の分生子を得ることができたことから，イネいもち病菌への応用も今後の検討課題である．

摘　　要

ショウガあるいはミョウガの葉片を用いた*Pyricularia zingiberi* Nishikadoの分生子多量形成法を検討した．その手順と特徴は次の通りである．

1. ストレプトマイシン硫酸塩を100 μg／ml添加したジャガイモ煎汁寒天培地約10 mlをペトリ皿に分注し，供試菌を移植して28℃で前培養する．一方，ショウガあるいはミョウガの葉片を熱湯（約98℃）に3～18秒間浸漬後，5 mg／mlの有効塩素を含む次亜塩素酸ナトリウム水溶液に20分間浸漬消毒して3回水洗後，滅菌濾紙で表面の水分を取除く．この葉片を前培養で発育させた菌そうに重ね，28℃で後培養する．後培養2日後，水道水と絵筆でブラッシングして分生子や菌糸片を洗い流す．ブラッシング後，滅菌濾紙で葉片表面の水分を十分に除き，ストレプトマイシン硫酸塩を50 μg／ml添加した素寒天培地を分注した別のペトリ皿に移し，28℃で24時間培養して分生子を形成させる．
2. 本法により，約8日間で同調した分生子を10^8個／cm²形成させることができた．
3. 本法により形成された分生子をカバーガラスに付着させて採集すると，ほとんど夾雑物の混じらない分生子を得ることができた．また，滅菌水と滅菌絵筆によるブラッシングにより，分生子が無菌的に多量得られた．

引　用　文　献

古田　力・関口義兼（1967）：いもち病菌の胞子形成法．植物防疫，21：160～162．

KOTANI, S. and KURATA, M. (1992) : Black blotch of ginger rhizome by *Pyricularia zigiberi* Nishikado. Ann. Phytopath. Soc. Japan, 58 : 469～472.

見里朝正・原　薫（1957）：稲熱病菌胞子形成培地について．農業及園芸，32：797～798．

大森　薫・武籐哲二（1966）：イネいもち病菌分生胞子形成培地．関東病虫研報，13：21．

大森　薫・中島三夫（1970）：多量のイネいもち病菌胞子を得る培地ならびに培養法．関東病虫研報，17：12．

関口義兼・古田　力（1966）：いもち病菌分生胞子の同時多量形成法．日植病報，32：67（講要）．

鈴木幸雄（1966）：いもち菌胞子の実用的な大量培養形成法．北陸病虫研報，14：30～31．

山口富夫（1980）：イネいもち病と抵抗性育種（山崎義人・高坂淖爾編）．博友社，東京，pp. 145～150．

吉村彰治・鈴木幸雄（1960）：培地におけるイモチ菌胞子の大量形成法．北陸病虫研報，8：65～68．