

硬化病菌のディープフリーザーによる保存

誌名	蠶絲研究
ISSN	00364495
著者	河上, 清
巻/号	76号
掲載ページ	p. 58-62
発行年月	1970年7月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



蚕糸研究 第76号 正誤表

頁	行	誤	正
12	第4表注下段	---を保存しない	---を保存しない
49	第6表右端3段目	100	100
"	下から8行目	第13表	第13表
59	下から10行目	KOGLER	KÖGLER
60	アス表	表題中 entomogenous* 表中 Per Cent of mortalities	*トル Per Cent of mortalities*
64	上から8行目	S85	S85
"	、 15、	(黄きょう病菌	(黄きょう病菌
75	本文上から6行目	クロルピリン	クロルピクリン
97	下から5行目	(たてたて0.69,	(779のたてたて0.69,

硬化病菌のディープフリーザーによる保存

河 上 清

硬化病菌を用いての調査研究において必要な基本的操作の一つに、菌種または菌株の性状を長期にわたって変化させることなく保持させる菌株保存の問題がある。一般に、糸状菌は継代培養法によって、半年～1年ごとに斜面培地に植え替えて保存するが、多数の菌株の場合は労力がかかると同時に、原株の性状が変化する場合がある¹⁾。それをさけるために、通常、5℃での保存法、凍結乾燥による保存法、soil culture 法、流動パラフィン重層法など各種の方法が用いられているが^{1,3,7)}、著者は、その一つであるディープフリーザー法を用い、数種の昆虫糸状菌の保存を試みたところ、好結果がえられた。本法は簡便であり容易に利用できると思われるのでその結果について報告する。

なお、本文に入るに先立ち、ご校閲をいただいた病理部長糸井節美博士に深謝する。

材料および方法

供試菌は、硬化病研究室保存の白きょう病菌 (*Beauveria bassiana* (BALSAMO) VUILLEMIN), 黄きょう病菌 (*Isaria farinosa* FRIES), 緑きょう病菌 (*Spicaria prasina* (MAUBLANG) SAWADA), 黒きょう病菌 (*Metarrhizium anisopliae* (METCHNIKOFF) SOROKIN), および麴かび病菌2種 (*Aspergillus oryzae* (AHLBURG) COHN と *Aspergillus flavus* LINK) の合計6菌種である。これらを蚕蛹煎汁加糖(2%)寒天培地で、20日間(25℃)綿栓試験管斜面培養した後、そのまま、ディープフリーザー(-18℃～-20℃)内に移し保存した(1965年8月11日)。そして、1年、2年および4年後(1969年8月11日)に上記各菌種をとり出した。なお、ディープフリーザーから出庫する時は、いずれの場合も、通常の冷蔵庫(6℃)に1日置いた後に室温(約30℃)に出した。そして、これらの分生孢子を新しい寒天培地および液体培地に接種して、生育の有無によりそれらの生存力を検定した。

さらに、4年間保存した菌株については、一度新しい培地で培養(25℃ 20日)し、新しく形成された分生孢子を用いて、3齢蚕児への接種試験を行ない、その病死率により、保存前にあらかじめ検定しておいた各菌種の病原力との比較を行なった。

結果と論議

ディープフリーザー内に1年、2年および4年間保存した6菌種の分生胞子の生存力検定結果が第1表である。すなわち、各菌種とも検定培地によく生育し、ディープフリーザー

第1表 硬化病菌のディープフリーザー保存による生存

Table 1 Viability of cultures stored on agar slants at -18°C

Fungi	Viability of cultures in each storage period		
	1 year	2 years	4 years
<i>Beauveria bassiana</i>	+	+	+
<i>Isaria farinosa</i>	+	+	+
<i>Spicaria prasina</i>	+	+	+
<i>Metarrhizium anisopliae</i>	+	+	+
<i>Aspergillus oryzae</i>	+	+	+
<i>Aspergillus flavus</i>	+	+	+

+ : Showing the culture was viable.

ーによる4年間の凍結保存に十分耐えられることを示した。また、生育菌叢の外観、分生胞子形成度にも変化は認められなかった。

つぎに、ディープフリーザー保存前と4年間保存後における各菌種の病原力の比較検定結果を第2表に示した。

白きょう病菌、黄きょう病菌、緑きょう病菌および黒きょう病菌の4菌種は、常法により、1:1菌液を3齢起蚕に塗布接種し、その病死率を調査したが、4年間保存した菌株は、いずれも原株と同じく100%の病死率を示し、病原力の変化は認められなかった。また簡筒接種法により病死率を調査した麴かび病菌の2菌種についても、保存前後における病原力の差異は認められなかった。すなわち、ディープフリーザー内に4年間保存した6菌種の蚕児に対する病原力は、保存前(原株)と同様であった。

以上、供試6菌種については、ディープフリーザーによる凍結保存法を用いることができるが、昆虫糸状菌によるこの種の調査は少ない。MÜLLER-KOGLER (1967)によると、*Beauveria bassiana*, *B. tenella*, *Metarrhizium anisopliae*, *Paecilomyces farinosus*, *Cephalosporium* sp. は、ディープフリーザーにより1年~1年半、*Entomophthora* E 202は6年間保存することができたが、*Empusa aulicae*の培養は数カ月しか生存しなかったという、また、昆虫糸状菌ではないが、CARMICHAEL (1962)は糸状菌と酵母400株を -20°C のフリーザーに5年間保存し、95%が生存していたと報告している。さらに、*Aspergillus*のある菌株は、 -20°C に45日保存した時の分生胞子生存率が60~90%であり、また別の菌株を7~15カ月保存した時のそれは2~80%であると要約されている³⁾。

なお、本調査では、培地の種類、凍結条件、融解条件などを変えた試みは実施しなかったが、糸状菌の -20°C における生存力を考えると、凍結過程の条件、保存中の寒天の乾燥

第2表 ディープフリーザー保存菌の病原力

Table 2 Virulence for the silkworm larvae of the entomogenous* fungi stored in the deep freezer

菌種 Fungi	供試蚕数 No. of larvae tested	病原株 Per cent of Original culture	死亡率 of mortalities 4年間保存後 Stored culture (for 4 years)
<i>Beauveria bassiana</i>	30	100%	100%
<i>Isaria farinosa</i>	30	100	100
<i>Spicaria prasina</i>	30	100	100
<i>Metarrhizium anisopliae</i>	30	100	100
<i>Aspergillus oryzae</i> **	25	12	16
<i>Aspergillus flavus</i> **	25	44	36

* 支124号×日124号3齢起蚕に各菌株の分生孢子液(1:1)を塗布接種し、5齢6日まで調査した。

** 10日間培養したコロニー上に蚕児を這わせて菌接種を行なった。

* Third instar larvae of C124 X J124 strain of the silkworm were inoculated with spore suspension of each culture. Used fungi were cultured for 20 days at 25°C.

** Infection was induced in the larvae by crawling on 10 day-cultured colony of *Aspergillus*.

程度、さらに出庫時の融解過程の条件と菌種、すなわち、菌細胞の凍結融解および乾燥に対する強さの程度とによって、生存期間の長短が決まるように推察される。

終りに、昆虫糸状菌の保存の場合、病原力の保持も重要なことと考えられるが、病原力の変化の有無に関する調査は、著者のもの以外にはみられない。

摘 要

白きょう病菌、黄きょう病菌、緑きょう病菌、黒きょう病菌および麴かび病菌2種の合計6菌種は、綿栓試験管で普通に斜面培養した後、単にディープフリーザー(-18°C~-20°C)内に保存するだけで、4年後も生存し原株と同様の病原力を保持していた。

文 献

- 1) 微生物学ハンドブック 1967. 技報堂(東京) P1012-1014, 1027-1028.
- 2) CARMICHAEL, J. W. 1962. Viability of mold cultures stored at -20°C. *Mycologia* 54: 432-436.

- 3) 伝染病研究所学友会編 1958. 細菌学実習提要 丸善. p.152—157.
- 4) 河上 清 1960. 硬化病菌の継代培養による性状の変化について. 蚕試報. 16 : 83—99.
- 5) MAZUR, P. 1968. Survival of fungi after freezing and desiccation. In "The Fungi" (AINSWORTH, G. C. and A. S. SUSSMAN, ed.) Vol. III, Acad. Press, New York, P. 325—394.
- 6) MÜLLER-KÖGLER, E. 1967. On mass cultivation, determination of effectiveness, and standardization of insect pathogenic fungi. Proc. Intern. Colloq. "Insect Pathology and Microbial Control" (Wageningen 1966) (edit. : LAAN, P. A. van der). North-Holland Publ. Co., Amsterdam, P. 339—353.
- 7) 武井千代子・岡崎 浩 1966. カビの実験法. 蛋白核酸酵素 11 : 824—828.

Summary

Deep freeze storage of some entomogenous fungus cultures

By

Kiyoshi KAWAKAMI

Entomogenous fungus cultures on agar slants may be preserved for 4 years by simply placing them in a freezer at -18°C to -20°C .

The fungi stored in the deep freezer are *Beauveria bassiana* (BALSAMO) VUILLEMIN, *Isaria farinosa* FRIES, *Spicaria prasina* (MAUBLANG) SAWADA, *Metarrhizium anisopliae* (METCHNIKOFF) SOROKIN, *Aspergillus oryzae* (AHLBURG) COHN, and *Aspergillus flavus* LINK. These fungi were cultured on slants of the silkworm pupae decoction agar in usual test tubes with cotton plug for 20 days at 25°C . Sporulating cultures were placed in the freezer. Temperature in the freezer varied from -18°C to -20°C during the storage period.

Cultures to be tested for viability were removed from the freezer and allowed to stand for 1 day at 6°C (in refrigerator) before they were brought to room temperature. Spores of the cultures were placed on fresh agar slants or liquid media, incubated, and checked for growth. Table 1 shows viability of each fungus culture stored for 1, 2, and 4 years. The results were good for all used fungus cultures.

Virulence of the original cultures and the cultures stored for 4 years were examined by inoculating the fungus spores on third instar larvae of the silkworm. Four year-stored cultures have been kept the same level of the virulence for the larvae as the original cultures showed (Table 2).

(The Sericultural Experiment Station, Suginami-ku, Tokyo)