

トウモロコシごま葉枯病菌Bipolaris maydis Shoem.の分生孢子の形態および病原力に及ぼす光の影響

誌名	草地試験場研究報告 : s ō chi shikenj ō kenky ū h ō koku = Bulletin of the National Grassland Research Institute
ISSN	03850196
著者名	月星,隆雄 佐藤,徹
発行元	農林省草地試験場
巻/号	33号
巻号補足	
掲載ページ	p. 50-56
発行年月	1986年2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



トウモロコシごま葉枯病菌 *Bipolaris maydis* Shoem. の 分生孢子の形態および病原性に及ぼす光の影響

月星隆雄・佐藤 徹¹

環境部 病理研究室

¹ 現 北海道農業試験場 企画連絡室

(昭和60年7月22日受理)

要 約

月星隆雄・佐藤 徹 (1985): トウモロコシごま葉枯病菌 *Bipolaris maydis* Shoem. の分生孢子の形態および病原性に及ぼす光の影響. 草地試研報 33: 50-56.

トウモロコシごま葉枯病菌 *Bipolaris maydis* Shoem. は分生孢子の形成に通常光を必要としないが、光照射を行うことにより分生孢子は大型化し、病原性も増大した。すなわちブラックライトの間欠照明下で形成された分生孢子は暗黒下に比べて長径が約25%増加し、トウモロコシ葉上で大型の病斑を形成した。組織観察の結果、これは分生孢子が高頻度で両極発芽し、葉組織への侵入も早まったためと考えられる。しかし、発芽率および付着器形成率は分生孢子の大きさの影響を受けなかったため、病斑形成効率には光照射の影響は認められなかった。

この光形態形成の誘起には光強度よりむしろ照射時間が関係し、照射時間が長くなるにつれて分生孢子の長径は増加し、20時間の照射でほぼ最大に達した。またブラックライトを近紫外光と青色光に分けたところ、近紫外光のみが有効であった。このことから、この光形態形成に近紫外光・青色光反応系が関与している可能性が示唆された。

緒 言

光は菌類の生育に大きな影響を及ぼし、その生育過程の様々な局面を制御している。特に分生孢子の形成に及ぼす影響は顕著であり、Leach^{8,9)}は *Alternaria dauci*, *Helminthosporium oryzae*, *Stemphylium botryosum* など多数の不完全菌類の分生孢子の形成には、光の間欠照射が不可欠であると報告している。さらに光は分生孢子柄の屈性¹⁾、培養基上での色素形成¹³⁾、および有性器官の形成²⁾ などにも重要な役割を果していると考えられている。

Bipolaris maydis (Nishikado) Shoemaker (有性世代 *Cochliobolus heterostrophus* Drechsler) はトウモロコシごま葉枯病を引き起こす糸状菌であり、本邦では西南暖地を中心に本病の発生が認められ、その被害は甚大である。したがって、トウモロコシの育苗面においても本病に対する抵抗性品種の育成が極めて重視されている。また、寄生性も分化しており、T型雄性不稔細胞質をもつトウモロコシに特異的に激しい病徴を示すTレースと、そのような宿主特異的な病原性をもたないOレースが知られている⁷⁾。

本菌は通常暗黒下においても分生孢子を形成し、その

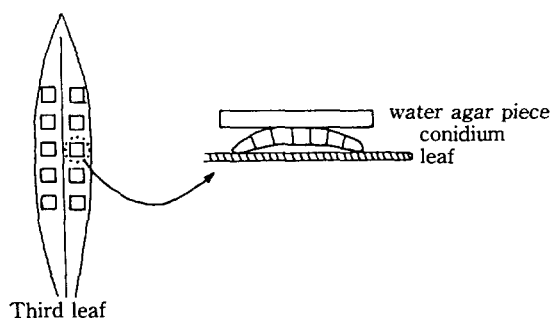
ために特に光を必要としないことが知られている。一方、著者らは本菌の培養過程において、暗黒下では分生孢子を形成しない菌株があること、また、このような菌株に光を間欠照射すると分生孢子を形成するようになることを観察した。さらに、培養時の光の照射条件の差異が分生孢子の形態や病原性にも影響を及ぼすことが観察された。そこで、*Bipolaris maydis* Shoem. の分生孢子の形態および病原性に及ぼす光の影響について、実験的に検討を行ったので報告する。

実 験 方 法

供試した菌株はトウモロコシの罹病葉から単孢子分離したOレースの4菌株である。トウモロコシの罹病葉は栃木、鳥取、熊本、および宮崎の4県で採集した(表1)。これらの菌株をV-8ジュース(Campbell製)寒天培地上、25°C暗黒下で3日間前培養し、菌叢上に形成された分生孢子および分生孢子柄を滅菌水で洗い流した後、光照射処理を行った。なお、培養には光透過性の高いPyrex製ベトリ皿(外径9.6cm)を用いた。光照射処理は、BLB(Black light fluorescent bulb, FL20S・BLB, 東芝製、輻射波長域310-420nm, 20w)とDLB(Day-light fluorescent bulb, FL20S・D/NL, 東芝製、輻射

Table 1. Geographical origin and mating type of isolates of *B. maydis* race O

Isolate	Origin (Prefecture)	Mating type
BMZM 7901	Tochigi	A
8120	Miyazaki	—
8135	Tottori	a
8199	Kumamoto	a

**Fig. 1.** Inoculation method

波長域 380–750 nm, 20 w) それぞれ 3 本を用いて行い、25 cm の高さから明暗各 12 時間の周期で 2 日間照射した。温度設定は照射下 25°C, 暗黒下 20°C とした。対照として暗黒区を設け、12 時間を 25°C に、続く 12 時間を 20°C に保つ処理を 2 日間行った。これらの処理後に形成された分生胞子についてその長径を測定した。

また処理後に形成された分生胞子を用いて、ごま葉枯病に対して感受性反応を示すトウモロコシ品種パワーデント S-125 (FRB 73×Pa 91) に接種を行った。接種方法は 25–30°C の温室で約 2 週間育苗し、完全展開したパワーデント S-125 の第 3 葉に、分生胞子 1 個をのせた素寒天片を中肋を隔てて両側に 5 個ずつ計 10 個置いた (図 1)。次いで 25°C の温室に 16 時間放置した後に、素寒天片を除去し、25°C 陽光定温器 (8 時間照明, 16 時間暗黒) に移した。1 週間後に形成された病斑の数と面積を調査した。病斑面積は病斑を楕円形とみなし、病斑の長さおよび幅をそれぞれ長径および短径として算出した。

分生胞子発芽試験は素寒天上およびトウモロコシ葉上で行った。光照射処理によって得られた分生胞子を素寒天および完全展開後切離した第 3 葉 (品種 FRB 73×Pa 91) に絵筆で塗抹し、25°C 暗黒下の温室に置いた。素寒天上では 3 時間後に発芽率 (片端および両端から発芽している分生胞子の割合) を、トウモロコシ葉上では 5 時間後にラクトフェノールコットンブルー法により固定染

色し、両端発芽率 (両端から発芽している分生胞子の割合)、付着器形成率 (片端および両端に付着器を形成した分生胞子の割合)、およびトウモロコシ組織への侵入率を調査した。発芽とは分生胞子の長径以上に発芽管が伸長した場合、あるいは付着器を形成した場合とした。1 処理につき 100–150 の分生胞子について 3 反復調査を行った。

さらに光照射時間、光質、および光強度が分生胞子の形態および孢子形成数に及ぼす影響について、菌株 BMZM 8135 を用いて検討した。光照射時間の影響を調べるためには BLB 3 本を用い、照射時間は 0 から 36 時間までの 11 段階とし、照射後暗黒下で 24 時間培養し、分生胞子の長径の測定を行った。同時に菌叢の中心から 1 cm 離れた部位を直径 1 cm のコルクボーラーで打ち抜き、これに展着剤 Tween 20 を添加した水 100 ml を加えて十分に振とうした後、50 μ l 中の分生胞子数を数えた。また光質についての処理は、色ガラスフィルター UV-D 33 S (透過波長域 310–390 nm, 東芝硝子製) および V-44 (透過波長域 390–420 nm, 同社製) により BLB 照射光を近紫外光と青色光に分けて行った。また、光強度は照射に用いる BLB の本数を変えて調節した。光質および光強度の処理にあたっては、光照射を 12 時間行い、その後 24 時間暗黒下で培養した後、分生胞子の形態を観察した。

結 果

1) 分生胞子の形態に及ぼす光照射の影響

供試したいずれの菌株でも、光照射を行った場合、暗黒下に比べて分生胞子が大型化し、長径および短径のいずれも増加した (写真)。特に BLB 照射の効果は顕著で、分生胞子の長径は暗黒下では平均 74.4 μ m であったのに比べ、BLB 照射を行った場合は 95.1 μ m となり、約 25% 増加した (表 2)。DLB 照射を行った場合、分生胞子の長径は平均 80.4 μ m となり、BLB 照射区と暗黒区の間値を示した。

2) 分生胞子の病原性に及ぼす光照射の影響

菌株 BMZM 7901, 8120, および 8135 では、病斑形成効率 (10 個の分生胞子から形成された病斑の数) には光照射の影響は認められなかった (表 3)。しかし BMZM 8199 だけは、光照射を行って形成された分生胞子による病斑形成効率が暗黒下に比べて高い値を示した。一方、病斑面積に及ぼす光照射の影響は明瞭であり、いずれの菌株においても光照射を行って形成された分生胞子は暗黒下に比べて大型の病斑を形成した。特に BLB 照射を行って形成された大型の分生胞子は常に大型の病斑を形

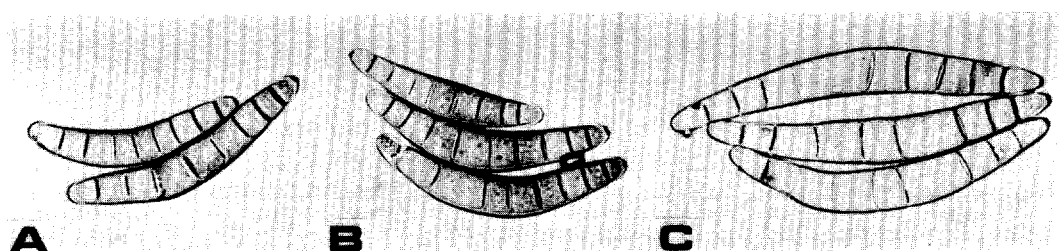


Fig. 1. Conidia of the isolate BMZM 8135 formed in the dark (A), under alternate irradiation with daylight fluorescent bulbs (B), and black light fluorescent bulbs (C)

Table 2. Effect of fluorescent light irradiation on the conidial length of *B. maydis*

Light treatment ^x	Conidial length (μm) ^w					
	Isolate number	7901	8120	8135	8199	av.
BLB ^y		75.8	101.6	107.7	95.3	95.1
DLB ^z		62.3	86.0	90.6	82.8	80.4
Check (dark)		58.9	81.3	84.0	73.3	74.4

w: Values in each column are significantly different ($P=0.05$) as determined by paired t-tests.

x: Alternate irradiation under 12hr light (25°C) and 12hr dark (20°C) regime for two days

y: Irradiation with black light fluorescent bulb (BLB, Toshiba FL20S•BLB, emission range 310-420nm)

z: Irradiation with daylight fluorescent bulb (DLB, Toshiba FL20S•D/NL, emission range 380-750nm)

Table 3. Enhancement of virulence of the conidia of *B. maydis* after light treatments

Isolate number and light treatment	Virulence ^x	
	DE ^y	LA (mm^2) ^z
7901 BLB	7.6 a	7 a
DLB	7.3 a	5 b
Dark	7.2 a	4 c
8120 BLB	8.6 a	10 a
DLB	8.1 a	9 b
Dark	8.3 a	8 b
8135 BLB	9.5 a	9 a
DLB	9.3 a	7 b
Dark	9.0 a	7 b
8199 BLB	7.6 a	9 a
DLB	7.3 a	8 b
Dark	5.8 b	8 b

Inoculation: Ten agar pieces with a single conidium were placed each on the third leaf of a corn seedling

x: Values of virulence for each isolate followed by the same letter are not significantly different ($p=0.05$), as determined by paired t-tests.

y: Disease efficiency (DE) = mean number of lesions induced by ten conidia

z: Lesion area (LA) = mean of all lesion measurements

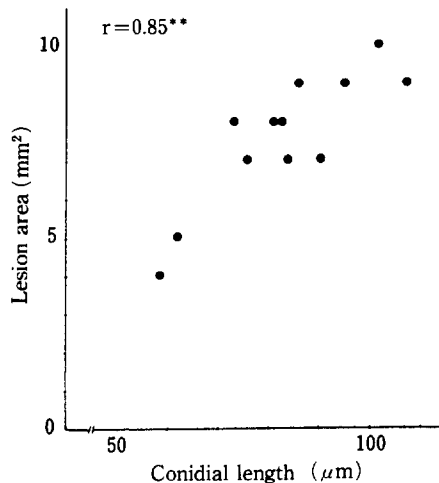


Fig. 2. Relation between conidial length and area of lesion caused by a single conidium of *B. maydis*.

Data for conidial length and lesion area are presented in Tables 2 and 3, respectively.

Table 4. Germination, appressorium formation of the conidia of *B. maydis* and invasion of corn tissues after light treatment

Isolate number and light treatment	Germinated conidia (%)	Conidia with two germ tubes (%)	Conidia that produced appressoria (%)	Conidia that invaded corn tissues (%)
7901 BLB	86.1*	95.2 ^y	89.0	47.7
DLB	85.7	80.8	82.4	33.4
Dark	91.1	77.2	78.2	33.0
8120 BLB	97.9	96.5	97.0	87.3
DLB	99.0	96.4	96.3	84.1
Dark	98.6	87.9	92.0	65.2
8135 BLB	98.7	97.6	93.2	61.3
DLB	97.1	96.4	94.3	63.6
Dark	98.9	92.6	91.7	47.0
8199 BLB	95.5	96.2	96.2	80.2
DLB	97.1	95.9	77.6	46.1
Dark	98.5	95.7	88.6	54.2
F-ratio (treatments) ^z	2.07	7.20**	2.56	5.15*

x: Data were collected three hours after inoculation on water agar.

y: Data were collected five hours after inoculation on corn leaves.

z: Asterisks indicate statistical significance. (*: $P=0.05$, **: $P=0.01$)

Percentage figures were analyzed after an arcsine transformation; however, nontransformed means are shown in the table.

成し、DLB 照射を行って形成された分生胞子は BLB 照射区と暗黒区の間の大さの病斑を形成した。分生胞子の長径と病斑面積との間には有意な相関関係が認められ ($r=0.85$, $P=0.01$)、分生胞子が光照射処理により大型化するにつれ、大型の病斑を形成した (図 2)。

3) 分生胞子の発芽に及ぼす光照射の影響

素寒天上での発芽率には処理間の差はなく、光照射に

よる分生胞子の大型化の影響は認められなかった (表 4)。トウモロコシ葉上での付着器形成率にも同様に処理間の差は認められなかった。しかし、両極発芽率は暗黒区で平均 88.4% であったのに対し、BLB 照射区では 96.4% となり、処理間に有意差が認められた (分散比 7.20, $P=0.01$)。さらに、トウモロコシ組織への侵入率にも処理間の差があり (分散比 5.15, $P=0.05$)、暗黒区

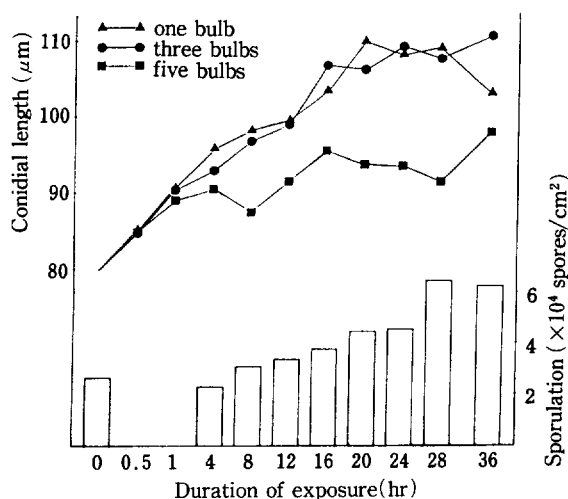


Fig. 3. Effect of duration of exposure to and intensity of black light on conidial length and sporulation of the isolate BMZM 8135

Table 5. Effect of light quality on the conidial length of the isolate BMZM8135

	NUV *	B †	Check (Dark)
Conidial length (μm)	99.8	84.8	84.0

x: Near ultraviolet light (NUV) was obtained through a colored glass filter (Toshiba UV-D33S) from black light.
 y: Blue light (B) was obtained through a colored glass filter (Toshiba V-44) from black light.

では平均49.9%, BLB 照射区では69.1%であった。また、大型の分生胞子ほど大型の付着器を形成する傾向も認められた。

4) 分生胞子の形態および胞子形成に及ぼす光照射時間, 光強度, および光質の影響

光照射時間の影響をみると, 照射30分以上で効果が現われ, 照射時間にほぼ比例して分生胞子は大型化し, 照射24時間で109.0 μm に達した(図3)。光強度を変えてもこの反応は変わらず, BLB 1本の弱光下でも照射20時間で109.7 μm に達した。しかし, BLB 5本で8時間以上照射した場合, 分生胞子は暗黒下に比べて大型ではあるが, 他の照射区に比べると小型であった。

胞子形成数は暗黒下では菌叢1 cm^2 あたり 2.7×10^4 個であったが, 照射時間が長くなるにつれて増加し, 28時間照射を行った場合, 6.5×10^4 個と最大に達した。

BLB 照射光を近紫外光と青色光に分けて照射すると, 暗黒下での分生胞子の長径は84.0 μm であるのに比べ, 近紫外光を照射した場合は99.8 μm , 青色光では84.8 μm であった(表5)。このように近紫外光のみに効果が認められた。

考 察

菌類の形態に対する光の影響について, Hendrix⁴⁾は *Phytophthora palmivora* および *P. capsici* で, 白色光を照射すると暗黒下に比べ大型の遊走子のうが形成され, その大きさは菌の形態の原記載に一致するとしている。さらに Harter³⁾によれば, *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* の大分生胞子は光の間欠照射により大型化し, 隔膜数も増加するといわれる。また Honda⁶⁾は *Exserohilum prolatum* の分生胞子が光照射と適当な温度条件下での培養により大型化して, 自然状態に近い形態になるとし, いずれも菌の分類同定に光照射は不可欠であるとしている。本実験で用いた *B. maydis* でも光照射は分生胞子の形態に影響を及ぼし, 暗黒下では小型の分生胞子を形成したのに対し, 光照射特に BLB 照射によって大型で *B. maydis* の形態の原記載によく一致

する分生胞子を形成した。したがって, 本菌の同定に際しても光照射下での培養が必要である。

培養条件と病原性について, 佐野ら¹²⁾は培養基のC/N比の低下に伴い, *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* の大分生胞子が大型化し, 病原性も増大したとしている。また Trainor ら¹⁴⁾は *B. maydis* race T の病原性が培養基によって異なり, PDA (Potato dextrose agar) に比べ GCLA (Ground corn leaf agar) 上で形成された分生胞子は大型になり, 形成する病斑も大きくなるとしている。本実験でも, *B. maydis* の分生胞子が大型化するほど形成する病斑の面積が増加した。また, トウモロコシ葉上での分生胞子の発芽試験において, 小型の分生胞子は両極発芽率がやや低く, 小型付着器を形成して侵入が遅れるのに対して, 大型の分生胞子は大多数が正常に両極発芽し, 大型の付着器を形成して侵入が早まることが観察された。このことから, 分生胞子の大型化によって宿主に対する病原性が増大したと考えられ, 両極から発芽および侵入が生じ, 侵入時期が早まった結果, 大型の病斑を形成したと考えられる。

一方, 病斑形成効率については, 処理間の差異はほとんどなかった。これは素寒天上での発芽率およびトウモロコシ葉上での付着器形成率が処理によって変動せず, 発芽および付着器形成という葉組織内への侵入に必要な過程が分生胞子の大きさの影響を受けなかったためと考えられる。

菌類の光形態形成については, 近紫外光と青色光によるマイコクローム系の存在が知られている^{5,15)}。本田⁹⁾はイネごま葉枯病菌 *Helminthosporium oryzae* (= *B. oryzae*) の分生胞子の形成において, 促進的に作用する近紫外光と阻害的な青色光との間に可逆的光反応が存在し, この反応にマイコクロームすなわち光によって変換可能な光受容体が関与していることを報告している。本実験においても, BLB 照射光は DLB 照射光に比べて, *B. maydis* の分生胞子を大型化する作用が顕著に認められた。また, BLB 照射光の波長の中でも, 近紫外波長域の光がより明瞭な作用を示し, 青色波長域の光ではほとんど効果が認められなかった。さらに本田は *H. oryzae* の分生胞子の形成を誘起する要素として, 光強度よりも照射時間が大きく影響することを指摘し, 分生胞子の形成を十分に誘起するためには12時間以上の照射が必要であることを述べている。本実験の *B. maydis* においても, 分生胞子大型化の効果は強光下ではやや弱かったものの, 光強度にはほとんど左右されず, 弱光下でも明瞭に認められた。また, 照射時間にほぼ比例して分生胞子は大型化し, 20時間の照射で効果はほぼ最大に達し

た。以上の結果から、この光形態形成にも同じマイコ ROOM 系が関与している可能性が示唆されたが、この点についてはさらに検討を要する。

B. maydis の孢子形成数は、照射時間が長くなるほど増加する傾向があった。尾田¹¹⁾は、一部の不完全菌類の分生孢子形成過程は光照射下の分生孢子柄形成と暗黒下の分生孢子形成の2段階から構成されることを述べている。一方、*B. maydis* においても、光照射下では分生孢子柄の形成は行われるものの、分生孢子はほとんど形成されないことが知られている¹⁰⁾。したがって、光照射時間を長くするとより多くの分生孢子柄が形成され、このため孢子形成数が増加すると考えられる。

菌類の形態形成には光が重要な役割を果たしているが、*B. maydis* の場合には、光照射が分生孢子を大型化すると同時に病原力を高める作用を有することが明らかになった。また、病原菌の接種試験を行う場合、接種菌の病原力は重要な問題である。したがって、本菌の培養を行う場合、光条件には十分留意することが必要と考えられる。

謝 辞

本稿の校閲をいただいた原楨紀環境部長、君ヶ袋尚志病理研究室長、ならびに本稿の作成に協力していただいた島貫忠幸主任研究官に深く感謝いたします。

引用文献

1. Calpouzd, L. and Stallknecht, G. F. (1966): Phototropism by conidiophores of *Cercospora beticola*. *Phytopathology* **56**: 702-704.
2. Curtis, C. R. (1964): Physiology of sexual reproduction in *Hyphomyces solani* f. *cucurbitae* II. Effects of radiant energy on sexual reproduction. *Phytopathology* **54**: 1141-1145.
3. Harter, L. L. (1939): Influence of light on the length of the conidia in certain species of *Fusarium*. *Am. J. Bot.* **26**: 234-243.
4. Hendrix, J. W. (1967): Light-cholesterol relationships in morphogenesis of *Phytophthora palmivora* and *P. capsici* sporangia. *Mycologia* **59**: 1107-1111.
5. 本田雄一(1969): *Helminthosporium oryzae* の孢子形成に及ぼす光の影響に関する研究. 東北大農研報 **21**: 63-132.
6. Honda, Yuichi (1978): Photosporogenesis in *Exserohilum rostratum*: temperature effects on sporulation and spore morphology. *Mycologia* **70**: 343-354.
7. Hooker, A. L., Smith, D. R., Lim, S. M., and Beckett, J. B. (1970): Reaction of corn seedlings with male-sterile cytoplasm to *Helminthosporium maydis*. *Plant Dis. Repr.* **54**(8): 708-712.
8. Leach, C. M. (1961): The sporulation of *Helminthosporium oryzae* as affected by exposure to near ultraviolet radiation and dark periods. *Can. J. Bot.* **39**: 705-715.
9. Leach, C. M. (1967): Interaction of near ultraviolet light and temperature on sporulation of the fungi *Alternaria*, *Helminthosporium*, and *Stemphylium*. *Can. J. Bot.* **45**: 1999-2016.
10. Nelson, R. R. and Tung, G. (1973): Influence of some climatic factors on sporulation by an isolate of race T of *Helminthosporium maydis* on a susceptible male-sterile corn hybrid. *Plant Dis. Repr.* **57**(4): 304-307.
11. 尾田義治 (1969): 菌類における光形態形成反応. 科学 **39**: 78-85.
12. 佐野慎亮・宇井格生 (1981): *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* 大型分生孢子の諸形質に及ぼす炭素源、窒素源および C/N 比の影響. 日植病報 **47**: 547-554.
13. Tinline, R. D. and Samborski D. J. (1959): *Cochliobolus sativus*. II. Photoactivated pigmentation. *Mycologia* **51**: 77-88.
14. Trainor, M. J. and Martinson, C. A. (1978): Nutrition during spore production and the inoculum potential of *Helminthosporium maydis* race T. *Phytopathology* **68**: 1049-1053.
15. Vakalounakis, D. J. (1980): Sporulation in *Alternaria cichorii* is controlled by a blue and near ultraviolet reversible photoreaction. *Can. J. Bot.* **59**: 626-628.

SUMMARY

Effects of Light on Conidial Morphology
and Virulence of *Bipolaris maydis* Shoem.Takao TSUKIBOSHI and Toru SATO¹*Environment Division, National Grassland Research Institute,
Nishinasuno, Tochigi, 329-27 Japan*¹*Hokkaido National Agricultural Experiment Station,
Toyohira-ku, Sapporo, 016-01 Japan*

Received July 22, 1985

Bipolaris maydis Shoem. generally requires no light for sporulation, but produces large and more virulent conidia in response to light. The conidia formed under alternate irradiation with black light lamps (12hr light/25°C and 12hr dark/20°C regime for two days) were 25% longer and induced large sized lesions on corn seedlings in comparison with conidia formed in continuous darkness. Based on the histological study, the apparent enhancement of conidial virulence was ascribed to the increase in the rate of germination with two germ tubes and the decreased time required for lesion initiation. The disease efficiency, however, was not affected by irradiation, since the conidial size had no effect on the rate of germination with one and two germ tubes and appressorium formation.

Induction of the photomorphogenesis was related to the duration of exposure rather than the intensity of light, and the conidial length increased with the increase of the duration of exposure by 20 hours. Black light was dissociated into blue light and near ultraviolet light through colored glass filters and only near ultraviolet light was effective. These results suggest that the blue and near ultraviolet photoreaction system was involved in the photomorphogenesis.

Bull. Natl. Grassl. Res. Inst. 33: 50-56 (1986)