

ニホンナシ黒星病菌分生子懸濁液の効率的濃縮法

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者	梅本, 清作 村田, 明夫 長井, 雄治
巻/号	55巻3号
掲載ページ	p. 309-314
発行年月	1989年7月

ニホンナシ黒星病菌分生子懸濁液の効率的濃縮法

梅本 清作*・村田 明夫*・長井 雄治*

Seisaku UMEMOTO, Akio MURATA and Yuji NAGAI: Effective Concentration
Method of Conidial Suspension of Japanese Pear
Scab Fungus (*Venturia nashicola*)

Abstract

It is difficult to obtain concentrated conidial suspension of Japanese pear scab fungus, even after centrifugation, because of the conidial nature of the fungus which strongly tend to float in water. Several experiments were conducted to improve the method for preparing concentrated conidial suspension. When 10 ml of conidial suspension was added with small amount of diluted agar solution such as 0.5 ml of 0.1% solution, and then centrifuged for more than five minutes at $650\times g$, conidia were efficiently trapped in a portion of agar solution at the bottom of a tube. In this case, the efficiency of concentration of a conidial suspension was 41.0-fold compared with 50-fold of the theoretical value. And, in case of addition of 1 ml of 0.1% agar solution, it was 22.1-fold compared with 25-fold of the theoretical value. A concentration of conidia in rain water flowed down along twigs of Japanese pear tree is usually very low. Therefore, it is almost impossible to count the number of conidia in rain water directly under an optical microscope, however, the above mentioned concentration method made it possible. Diluted agar solution such as 0.1% is reserved in a refrigerator without antisepsis during six months free from degeneration and contamination of microorganisms. The method was named "agar solution concentration method", abbreviated to ASC method.

(Received December 26, 1988)

Key words: Japanese pear, *Venturia nashicola*, effective concentration, agar solution.

緒 言

ナシ黒星病菌 (*Venturia nashicola*) は雨媒伝染性の病原菌である。その生態学的研究の一つとして、伝染源から分散する胞子の状況や病気の広がる過程などを究明するために、胞子数の動向を調べることは有効な方法である。しかし、伝染源近辺で採取した雨水でもその中に含まれる胞子数は意外と少なく、その数を調査するには通常濃縮処理を必要とする。従来、黒星病菌分生子の懸濁液を濃縮する場合、他の病原菌の胞子懸濁液を濃縮する場合と同様¹⁾、単に遠心処理を行い、濃縮処理を行っていた^{2,4)}。しかし、黒星病菌の分生子は水に浮遊する性質が強いので、分生子懸濁液を単に遠心処理するだけでは効率よく濃縮できないことが

明らかとなった⁵⁾。

本論文は、分生子懸濁液中に薄い寒天液を少量添加した後遠心処理を行うことにより効率よく濃縮できることが明らかとなったので⁵⁾、その結果を取りまとめたものである。

なお、本論文を草するに当たり農林水産省果樹試験場保護部長田中寛康博士にはご校閲をいただき、千葉県農業試験場室長藤家 梓博士には取りまとめに当たり貴重な助言をいただいた。ここに記して深謝の意を表する。

実験材料および方法

供試菌 無防除に近い状態で管理し、本病が多発している品種長十郎の葉病斑上の分生子を脱イオン水に

* 千葉県農業試験場
280-02, Japan

Chiba Prefectural Agricultural Experiment Station, Daizenno-cho 808, Chiba

懸濁して用いた。

寒天液濃度 脱イオン水に粉末寒天(和光純薬製)を水の重量に対して0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5%になるように加え, 約80°Cの湯煎中で十分に溶解させた。その後各寒天液を二つに分け, 約20°Cの室内と約5°Cの冷蔵庫内に保ち, 寒天液の凝固の有無を調べた。

分生子懸濁液の濃縮 前述の方法で作成した0.05, 0.1, 0.2%の各寒天液を用いた。規定容量10mlの遠沈管に分生子懸濁液を10ml入れ, 寒天液が0.05%の場合は1.0ml, 0.1%の場合は0.5または1.0ml, 0.2%の場合には0.25mlをそこへ添加した。650×gで5分間以上遠心処理を行った後, 寒天液を残して上清の部分を捨てた。

孢子数の調査 遠心処理後遠沈管の底部に残った寒天液をよくかくはんし, その一部を血球計算盤にとり, 光学顕微鏡下で1サンプル当り5回以上反復して調べた。なお, 孢子数が少ない場合は, 血球計算盤のスリット部とその周囲の平行線部分も加え, スリット部の体積に対して3.47または3.86倍の部分調査対象とした。この場合, 調査した孢子数を3.47または3.86で除した数を実孢子数とした。寒天液を添加しない従来の方法で調査する場合は, 遠心直後に遠沈管の底部, 上部から各0.2mlの懸濁液を採取し, 寒天液を加えた場合と同様に調査を行った。

寒天液の腐敗防止 寒天液は冷蔵庫中(約5°C)に保存したが, 寒天液の腐敗防止のために1l当りp-ヒドロキシン安息香酸2gとソルビン酸1gを添加溶解する場合もあった。

分生子の親水化 分生子が水に均一に分散するように, 界面活性作用のある市販の展着剤(商品名アイヤー)を5,000または10,000倍となるように分生子懸濁液に添加し, よくかくはんした。なお展着剤はあらかじめ50倍に希釈しておいたものを用いた。また, 展着剤を添加した場合は, 実孢子数を求めるために次式で補正した: 調査孢子数×(100+孢子懸濁液100ml当り添加展着剤液量)/100。

孢子の発芽試験 ペトリ皿に流し込んだ素寒天培地上またはスライドガラス上に孢子懸濁液を滴下し, 素寒天培地の場合はただちに上ぶたをし, スライドガラスの場合はペトリ皿の底に水道水で湿らせた紙を敷き, その上にスライドガラスを置き, ふたをした。それらを15°C暗黒下の培養器中に48時間保った後, 発芽の有無と発芽管長を測定した。なお, 発芽とは孢子の短径の半分以上発芽管が伸長していることとし

た³⁾。

ナシ枝を流下する雨水中の分生子数 本濃縮法の実用性を検討するために, 1983年と1984年の秋季にナシの枝を流下する雨水中の分生子数を調べた。枝の途中にアルミホイルを巻き付け, そこで雨水の流下を止め, その水が内径5mmのビニール性のパイプの口に集まるようにこのアルミホイルの端をロート状に曲げた。パイプの他の一端はポリエチレン製の容量3lの容器の中に雨水が溜るようにした。容器の口はパイプ以外から水等が入らないようにするために, アルミホイルで覆っておいた。雨水は午前9時に採取し, 雨水の量を測り, そこへあらかじめ50倍に希釈しておいた展着剤のアイヤーを5,000倍となるように添加した。以後の処理は前述の方法で行い, 孢子数の調査を行った。

実験結果

寒天濃度と凝固 寒天濃度が0.05%と0.1%では20°Cはもとより5°Cでも凝固することはなかったが, 0.2%では5°Cで凝固し, 0.3%以上では20°Cでも凝固した。寒天液を長期間保存するためには低温下におくことが好ましい。そのためには, 5°Cでも凝固しないこと, そして, さらに濃縮効率を高めるためには懸濁液に添加する量は少ないことが必要であるので, 5°Cで凝固しない0.1%寒天液が本実験の目的に最適であることが明らかとなった(Table 1)。

遠心時間と残留寒天量 0.1%寒天液を添加して行った実験では, 1分間遠心処理後に上清を捨てたところ, 遠沈管の底部には寒天液がほとんど残らなかったが, 5分間以上遠心処理を行うと底部に残る寒天量は処理時間とは関係なく一定であった。その結果, 5~60分遠心の範囲ではほぼ同数の孢子数を測定できた

Table 1. Relation between concentration and coagulation of agar solution in a refrigerator and in room condition

Concentration (%)	Coagulation	
	Refrigerator (about 5°C)	Room (about 20°C)
0.05	— a)	—
0.1	—	—
0.2	+	—
0.3	+	+
0.4	+	+
0.5	+	+

a) +: coagulated, —: not coagulated.

Table 2. Number of conidia in agar solution after different times of centrifugation ^{a)}

Time (min)	Number of conidia ^{b)} $\bar{x} \pm S.D.$
1	— ^{c)}
5	81.3 ± 26.2
10	87.0 ± 42.1
20	83.0 ± 29.4
60	80.7 ± 21.0

a) 1 ml of 0.1% agar solution was added to 10 ml of the original suspension having 4.0 conidia per 10^{-3} ml, and 3.6 of S.D.

b) Number of conidia per 10^{-3} ml (average of 30 trials).

c) Not coagulated.

(Table 2)。このことから、遠心処理は5分間以上行う必要のあることが明らかとなった。

寒天液の濃度、添加量と残留寒天量 0.05, 0.1, 0.2% 寒天液をそれぞれ 1.0, 0.5, 0.25 ml 添加し、添加総寒天量を同一にして遠心処理を行い、遠沈管の底部に残留する寒天量を調べた。その結果、残留寒天量はいずれの場合でもほぼ同じで、添加した総寒天量に比例することが明らかとなった。そして、残留寒天中の分生子濃度もほぼ同じであった (Table 3)。

発芽率および発芽管の伸長に対する防腐剤および展着剤添加の影響 寒天液の腐敗防止のために、昆虫飼育用の餌の腐敗防止に一般に使用されている *p*-ヒドロキシ安息香酸とソルビン酸を保存用の寒天液に添加した。そして、これらを使用した場合の分生子の発芽率および発芽管長に対する影響の有無を素寒天培地およびスライドグラス上で調べた。その結果、素寒天培地上では悪影響は認められず、スライドグラス上では胞子の発芽率にはわずかに影響が認められる場合があったが発芽管の伸長には影響はまったく認められず、展着剤を添加した場合も防腐剤を添加した場合とほぼ同様な結果であった (Table 4)。

また、残留寒天量にも違いが認められなかった。

遠心処理法と分生子の存在部位 分生子懸濁液に 0.1% 寒天液を 0.5 ml 添加した後遠心処理を行い、まず遠沈管の底部に残留した寒天中における分生子数を調べた。次いで遠心処理後の上清だけを再度同様に濃縮処理を行い、上清中に含まれていた分生子数も調べて、両者を比較した。その結果、原液を遠心処理した寒天中には多数の分生子が認められたが、上清だけを再度遠心処理を行った寒天中には分生子はわずかしこ認められなかった (Table 5)。一方、懸濁液をそのまま遠心処理する従来の方法では遠心直後においても遠沈管の底部に存在する胞子数は少なく、上部にも原液の胞子数よりは少ないが、かなりの数の分生子が存在していた (Table 5)。以上の結果から、黒星病菌分生子の懸濁液を濃縮する場合、懸濁液をそのまま遠心処理すると濃縮効率は非常に低いが、寒天液を少量添加してから遠心処理を行うと効率的に濃縮できることが明らかとなった。

濃縮効率 分生子濃度が異なる懸濁液を作製し、各懸濁液に前述の寒天液を少量添加して行う濃縮法に従って濃縮した。ただし、使用寒天液濃度は 0.1%、添加量は 0.5 または 1.0 ml とした。1 懸濁液当りの胞子数調査回数は 10 から 50 回であった。原液の平均胞子数と濃縮後の平均胞子数との比を濃縮効率として求めた。その結果、0.1% 寒天液を 0.5 ml 添加した場合の濃縮効率は 33.3 から 49.2 で平均 41.0、1.0 ml 添加した場合は 12.0 から 24.9 で平均 22.1 であった (Table 6)。また、濃縮効率の理論値は、遠沈管中の懸濁液量/残留寒天量であるので、実験値との差が濃縮時における損失となる。0.5 ml 添加した場合の理論値は 50 であるので、損失は $(1 - 41/50) \times 100 = 18\%$ 、同様に 1.0 ml 添加した場合には $(1 - 22.1/25) \times 100 = 11.6\%$ であった。

ナシ枝から採取した雨水中の分生子数 採水を開始

Table 3. Number of conidia in agar solution having different combinations of concentration and volume after centrifugation ^{a)}

Concentration of agar solution	Volume added	Volume of agar solution ^{b)}	Number of conidia ^{c)} $\bar{x} \pm S.D.$
0 %	0 ml	0 ml	4.3 ± 3.2
0.05	1.0	0.2	120.2 ± 22.8
0.1	0.5	0.2	124.5 ± 29.4
0.2	0.25	0.2	134.3 ± 42.4

a) Volume of the original conidial suspension: 10 ml.

b) At a bottom of tube after centrifugation.

c) Number of conidia per 10^{-3} ml (average of 12 trials).

Table 4. Effects of antiseptic and spreader on germination of conidia and elongation of germ tube on glass slide

Addition of antiseptic	Concentration of spreader added	Germination		Germ tube	
		Number of conidia counted	Rate	Number of conidia measured	Length (μm) $\bar{x} \pm \text{S.D.}$
+ a)	0.02%	336	67.6% c b)	25	63.8 \pm 25.5
-	0.02	365	53.7 d	25	55.5 \pm 23.8
+	0.01	344	72.7 bc	25	68.8 \pm 28.3
-	0.01	390	76.2 ab	25	65.5 \pm 28.0
+	0	359	83.8 a	25	67.0 \pm 30.5
-	0	319	76.5 ab	25	85.0 \pm 23.3

a) +: added, -: not added.

b) Figures in each column followed by the same letters are not significantly different $P \leq 0.05$ (Duncan's multiple range test).

Table 5. Number of conidia in different portion of suspension in tube after centrifugation

Treatment of conidial suspension			Portions of sample in tube ^{c)}	Number of conidia ^{d)} $\bar{x} \pm \text{S.D.}$
Centrifugation ^{a)}	Addition of agar solution ^{b)}	Re-centrifugation of supernatant ^{a)}		
-	-	-	Whole	2.94 \pm 1.47
+	-	-	Upper	0.72 \pm 0.81
+	-	-	Bottom	3.75 \pm 2.97
+	+	-	Upper	0.09 \pm 0.17
+	+	-	Bottom	112.10 \pm 47.87
+	+	+	Bottom	1.93 \pm 0.95

a) 25 min at $650 \times g$ (+), not centrifuged (-).

b) 0.5 ml of 0.1% agar solution was added (+), not added (-).

c) Bottom: portion of agar solution.

d) Number of conidia per 10^{-3} ml (average of 20 trials).

Table 6. Effect of volume of agar solution added to the original suspension on its concentration efficacy after centrifugation

Agar solution added ^{a)}	Number of conidial suspensions	Concentration efficiency ^{b)} $\bar{x} \pm \text{S.D.}$
0.5 ml	5	41.0 ^{c)} \pm 6.16
1.0	9	22.1 \pm 5.10

a) Agar concentration is 0.1%.

b) Ratio of number of conidia per ml of agar solution after centrifugation to that of the original suspension. 10 to 50 trials were conducted for each conidial suspension.

c) Average of 5 or 9 suspensions.

した1984年9月上旬から落葉期の11月中旬まで雨水中に分生子はつねに認められた。雨水1ml中の胞子数は7~160個、1本の枝から1回に採取した雨水中の総分生子数は422~53,214個であった(Fig. 1)。そして、この値は1983年の実験ですでに得られている結果とはほぼ同様であった⁶⁾。採取した雨水を光学顕微鏡で直接観察した場合には、ごく一部の例外を除いて

通常はまったく胞子を確認できなかったもので、本濃縮法を使うことにより、雨水中の胞子を効率良く濃縮し、胞子数を定量化できることが明らかとなった。

考 察

ナン黒星病菌分生子懸濁液は一定時間遠心処理後上清を捨て、遠沈管の底部に残った液を調査する従来の

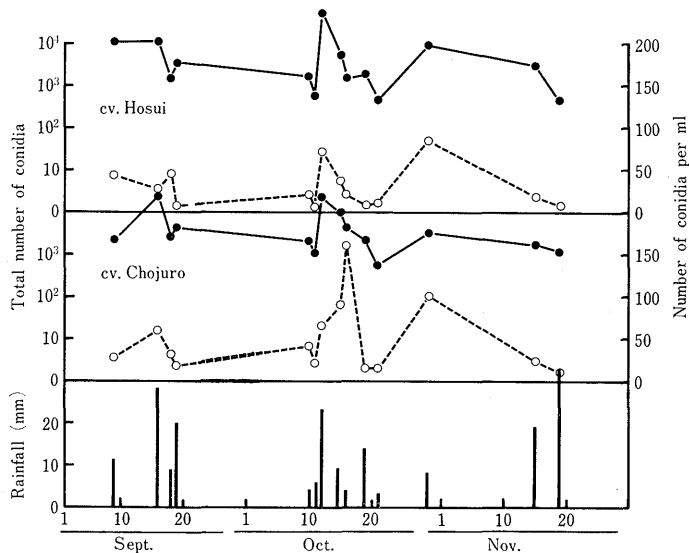


Fig. 1. Number of conidia in rain water flowed down along a twig. ●: total number of conidia
○: number of conidia per ml.

方法²⁾では効率よく濃縮できなかった。この原因は、分生子が水に浮きやすいためであろうと思われる。実際、採取したばかりの病斑上の分生子を水に懸濁しようとしても表面に浮いている胞子の割合が非常に高い。このような状態でも、遠心処理を行えば分生子は遠沈管の底部へ移行しているはずであり、移行した分生子が遠心処理終了後に浮遊しないように捕えてしまえば、効率よく濃縮できることになる。著者らは実験室で非常に容易に手に入り、透明に近く、変質しにくく、しかも効率よく分生子を捕える物質として寒天液を使うことに思い当たった。しかし、その他の材料でも寒天液と同様な働きをするものがあれば、どのようなものでも有効と思われる。

寒天液の主成分は有機物であるので、長期間放置すれば腐敗する。そこで、この実験の初期には防腐の目的で昆虫飼育用の餌の防腐のために添加されているp-ヒドロキシ安息香酸とソルビン酸を添加してみた。実験の結果、黒星病菌分生子の発芽率や発芽管の伸長に対するこれらの薬剤の悪影響は、実験誤差を考慮すると、ほとんど認められなかった。一方、冷蔵庫中で保存をすると防腐剤は添加しない条件でも6~7カ月間腐敗することがなかった。したがって、防腐剤はあえて添加する必要はないと判断された。

雨水を採取し、そのなかの黒星病菌分生子の数を調べようとする場合、そのまま光学顕微鏡による調査を行うには胞子数が一般に少なすぎるので、濃縮処理を

行う必要がある。また、採取した雨水の一部を取り濃縮しようとする場合、雨水中に分生子が均一に分散している必要がある。そこで、この目的のために界面活性剤を5,000~10,000倍となるように添加し、よくかくはんした。実験の結果、分生子の発芽率および発芽管の伸長に対する添加した展着剤の悪影響は、実験誤差を考慮すると、ほとんど認められなかった。したがって、濃縮処理を行って得た分生子を接種実験等胞子の発芽率が問題となる実験に供しても、添加した展着剤の影響はとくに考慮する必要はないと判断された。

本報告で示した方法による分生子懸濁液の濃縮効率は添加する寒天液濃度、添加量および遠沈管の容量により決定された。本実験では遠沈管は10 mlの容量のものを使用した。仮に遠沈管を100 mlの容量のものに替えれば濃縮効率は計算上10倍高まることになる。しかし、胞子懸濁液中には微細なゴミが多量に混入していることが多く、濃縮処理を行えばこれらのゴミも同時に濃縮される。濃縮後のサンプル中にゴミが多量に存在すれば、光学顕微鏡による分生子数の調査はかなり困難となる。また、雨水が100 ml以上採取されないような少雨量の場合も多い。一方、添加寒天量を少なくして濃縮効率を高めることも可能であるが、この場合は残留寒天量が少ないので調査反復数が制限される。以上のことを考慮すると、本方法では遠沈管の容量は10 ml、添加寒天液の濃度は0.1%のものを0.5 ml添加するのが良好であると判断された。

この場合の濃縮効率は平均 41 倍であった。血球計算盤を使った孢子数の調査では、スリット部の体積は 10^{-4} ml であるので濃縮効率が 41 倍の場合は $10^4/41=243.9$ となり、1 ml 当り約 244 個の孢子が存在していれば 1 回の調査で平均 1 個の孢子が確認されることが明らかとなった。さらに調査効率を高めるために、スリット部とその周辺の平行線部分も調査対象に含め、スリット部に対して 3.86 倍の部分の調査対象とすると、 $10^4/41/3.86=63.2$ となり、1 ml 中に平均 63.2 個の孢子が存在すれば 1 回の調査で 1 個の孢子を確認できることが明らかとなった⁵⁾。

秋季に黒星病菌が腋花芽鱗片に感染し、翌年の第一次伝染源となることはよく知られている^{2,4,7)}。鱗片に感染する黒星病菌は枝を流下する雨水を介して鱗片に運ばれると考えられているので、雨水を採取し、その中に含まれている分生子数を各降雨ごとに調査することは、黒星病菌の伝染環を調べる上で重要と思われる。そこで、枝を流下する雨水を採取し、本法によって濃縮し、分生子数を調べたところ、かなり多くの分生子が含まれていることが明らかとなり、さらに分生子数を定量的に把握することが可能であった⁶⁾。したがって、本法はこのような実験に効果的な方法であることが実証された。

本方法を確立するために、黒星病菌の分生子をおもに供して実験を行ってきたが、子のう孢子を供した場

合にも分生子の場合と同様に効率よく濃縮された。したがって、雨水を介して伝搬する他の病原菌の孢子を濃縮する場合でも本法は有効な方法になると思われる。また、この濃縮法を寒天液濃縮法 (ASC) と呼称することにしたい。

摘 要

ナン黒星病菌分生子懸濁液を遠心処理により効率的に濃縮する方法について検討した。懸濁液をそのまま遠沈管に取り遠心処理を行うと、分生子は浮く性質が強く、遠沈管の底部に効率よく集めることはできなかった。しかし、分生子懸濁液に薄い寒天液を少量添加した後、遠心処理を行ったところ、底部に寒天が集まり、その中に効率よく分生子が捕えられた。その効率は、10 ml の分生子懸濁液に 0.1% 寒天液を 0.5 ml 添加した場合、理論値がもとの孢子濃度の 50 倍に対して実測値は 41 倍、同様に 1 ml 添加した場合には理論値の 25 倍に対して 22.1 倍であった。秋季にナンの枝を流下する雨水を採取し、本法により濃縮し、雨水中の分生子数を光学顕微鏡で調査したところ、十分調査可能であり、分生子数を定量的に把握することが可能であった。寒天液は約 5°C の冷蔵庫中に保存すれば約 6 カ月以上腐敗しなかった。本濃縮法を寒天液濃縮法 (ASC) と呼称することにしたい。

引用文献

1. 北島 博 (1962). 植物病理実験法 (明日山秀文ほか編). 日本植物防疫協会, 東京. pp. 257-258.
2. 御園生 尹・深津量栄 (1968). 千葉農試研報 8: 42-52.
3. 水沢芳名 (1962). 植物病理実験法 (明日山秀文ほか編). 日本植物防疫協会, 東京. p. 667.
4. 高梨和雄・山本省二・北島 博 (1970). 園試報 A 9: 17-33.
5. 梅本清作・村田明夫・長井雄治 (1985). 日植病報 51: 91 (講要).
6. 梅本清作・村田明夫 (1985). 同上 51: 325 (講要).
7. 梅本清作・長井雄治 (1985). 千葉農試研報 26: 129-135.