

牧草類さび病菌の重複寄生菌 *Sphaerellopsis filum* (Biv.-Bern.) Sutton の柄胞子形成に及ぼす培地、光質の影響

宮川 久義・井上 興 (山口県農業試験場)

Effects of medium and light on conidia formation of *Sphaerellopsis filum* (Biv.-Bern.) Sutton, a hyperparasite of rust fungi. Hisayoshi MIYAGAWA and Takashi INOUE (Yamaguchi Agricultural Experiment Station, Yamaguchi 753-02)

Key words: *Sphaerellopsis filum*, hyperparasite, medium, light, conidia formation

植物のさび病菌には各種糸状菌が寄生することが知られており、その中で最も普遍的に認められるのは *Sphaerellopsis filum* (Biv.-Bern.) Sutton である^{1,4,7,10}。本菌寄生によりさび病の発病抑制が期待できるため、杉山・松本⁹は1975年以降、イタリアンライグラス冠さび病の生物防除への利用を目的に、本菌の研究を行い、本菌の寄生範囲、イタリアンライグラス上での寄生消長等を明らかにしたが、本菌柄胞子散布による生物防除試験を行うためには本菌柄胞子の大量培養法の確立が必要であった。そこで著者らは、各種培地を用いた培養試験や接種試験を行ない、本菌の培養適温、寄生性等について検討し、その一部は既に報告した^{5,6}。本報では菌株と培地、光の波長が本菌柄胞子形成に及ぼす影響等について調査した結果を報告する。

材料および方法

1. 供試した *Sphaerellopsis filum* 菌株

1991~1995年に山口県内各地の農耕地、非農耕地約20か所において、イネ科牧草類に発生している各種さび菌の夏胞子堆をルーペで観察し、*S. filum* の柄子殻の有無を調査した。柄子殻が認められた場合、罹病葉を保水濾紙上で湿らせ、殻口から溢出した胞子角を実体顕微鏡下で滅菌縫い針の先で釣菌し、約100ppm ストレプトマイシン添加 PDA 培地上に移植して分離した。試験には第1表に示した4菌株を用いた。1991年に採取した3菌株は分離後オートミール斜面培地で10℃で長期保存したものを供試した。

2. 培地

培地の種類と柄胞子形成の関係を調べる試験では、オートミール寒天培地、V-8 ジュース寒天培地、野菜ジュース寒天培地、食塩無添加野菜ジュース寒天培地、トマトジュース寒天培地及びニンジンジュース寒天培地

第1表 供試した *Sphaerellopsis filum*

菌株名	採集地	さび病菌の寄主	採集年
YA91-1	防府市牟礼	カモジグサ	1991
YA91-2	大津郡油谷町	フェストロリューム	1991
YA91-3	山口市大内御堀	イタリアンライグラス	1991
YA95	山口市大内御堀	カモジグサ	1995

を用いた。オートミール寒天培地はオートミール(クエーカー社製)50gの煎汁液1,000mlに蔗糖20g、寒天15gを加え高圧滅菌したものである。V-8 ジュース寒天培地などの各種ジュース寒天培地は蒸留水800mlに対しジュース(V-8はサントリー社製そのほかはいずれもカゴメ社製)200ml、CaCO₃3g、寒天15gを加え同様に高圧滅菌したものである。

培地の pH と柄胞子形成の関係を調べるための試験では、野菜ジュース寒天培地を用い CaCO₃ によって pH の調整を行った。この場合培地の pH を直接測定できないので、寒天を加えない同一組成の液体培地を作製し、その pH と同一であると見なした。

培地中に含まれる食塩の量と柄胞子形成の関係を調べるための試験では、食塩無添加野菜ジュース寒天培地を用い、食塩濃度を0、0.1、0.5、1および2%の5段階とし、pH調整は行わなかった。

3. 培養方法および柄胞子形成量の測定

オートミール寒天培地で培養して得られた *S. filum* の柄子殻から溢出した柄胞子の塊を白金耳で各培地表面に移植し、乾燥防止のためシャーレの側面をパラフィルムで封じて25℃で培養した。なおシャーレ上蓋内側の結露を防止するため、インキュベーターの扉を開放し、光照射に用いる蛍光灯および実験室内のエアコンにより温度調節した。培養20日後、菌叢直径を測定するとともに形

第2表 培地と種類と柄孢子形成量

培地名	YA91-1	YA91-2	YA91-3	YA95
[光照射]				
オートミール	17.7 ^{a)}	48.1	109.8	39.5
ニンジンジュース	48.7	55.6	54.0	24.7
V-8 ジュース	2.1 ^{b)}	105.2	37.3	12.1 ^{c)}
野菜ジュース	1.1 ^{d)}	131.1	43.1	1.2 ^{e)}
食塩無添加野菜ジュース	0 ^{e)}	71.2	58.2	0 ^{e)}
トマトジュース	0 ^{e)}	104.9	60.0	0 ^{e)}
[暗黒]				
オートミール	1.2	7.1	2.1	6.2
ニンジンジュース	0	21.0	5.0	30.2
V-8 ジュース	0 ^{e)}	65.5	11.9	0 ^{e)}
野菜ジュース	0	91.3	32.2	0 ^{e)}
食塩無添加野菜ジュース	0	78.2	1.5	2.4 ^{e)}
トマトジュース	0 ^{e)}	99.7	13.8	0 ^{e)}

a) 柄孢子数 (×10⁶個) b) 菌叢直径が5mm以下

成された柄孢子数を調査した。柄孢子数はホルマリン・酢酸固定液 (組成: 酢酸: ホルマリン: 水=5:10:85) を用いて固定した菌叢表面をガラス棒で擦って孢子角等を掻き落とし、更に超音波照射によって柄孢子を懸濁させ、トーマ血球計算盤により計数した。原則として1区4~5シャーレ供試した。

4. 光条件

光の波長に関する試験ではプラスチックシャーレ (アドバンテック東洋社製; 約300nm以下の波長の光を透過させない) を市販のカラーセロファン、紫外線カットビニール (商品名キリナイン、以後UVAと略。約390nm以下の波長の光を透過させない) で包み、光源として分光分布が紫外部まで自然日光に近似している

第3表 UVA を用いない場合の光質と柄孢子形成量の関係

処理区分	オートミール培地		野菜ジュース培地	
	柄孢子数 (×10 ⁶ 個)	菌叢直径 (mm)	柄孢子数 (×10 ⁶ 個)	菌叢直径 (mm)
[暗黒]	5.7	40.8	102.9	30.9
[光照射]				
透明セロファン	103.8	42.2	164.4	30.5
青セロファン	83.7	36.0	174.8	31.8
赤セロファン	42.3	48.9	98.4	33.3
黄セロファン	63.2	35.0	171.8	31.0
緑セロファン	50.2	34.3	214.8	31.8
紫セロファン	75.3	34.9	169.4	32.1

菌株: YA91-2

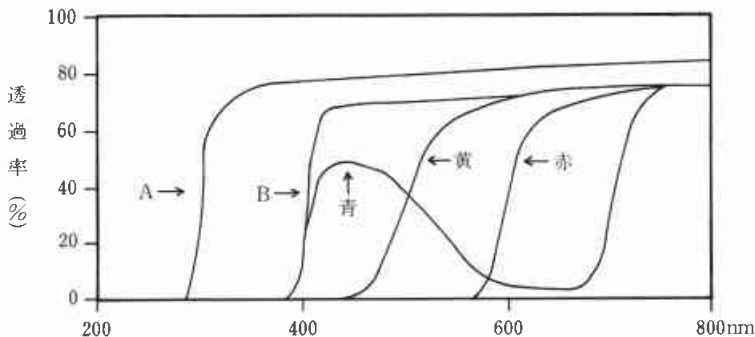
D₆₅ 蛍光ランプ (東芝ライテック社製, 20W) を約30cmの距離から照射した。その他の試験では昼光色蛍光灯を約30cmの距離から照射した。光の透過度は、UVA、各カラーセロファン、プラスチックシャーレの薄片を各々重ね、分光光度計 (日立 U2000) を用いて 200~800nm の範囲を測定した。

結 果

1. 培地の種類の柄孢子形成量

第2表に培地の種類が柄孢子形成に及ぼす影響について示した。菌株によって柄孢子形成量および菌叢生育に差が認められた。YA91-2 菌, YA91-3 菌は各培地とも明条件では柄孢子形成が良好であった。

一方、暗条件下では YA91-2 菌はオートミール寒天培地で不良であったが、その他の培地では柄孢子形成が良好であった。YA91-3 菌は野菜ジュース寒天培地でやや形成が良好であったが、他の培地では不良であった。YA95 菌, YA91-1 菌は明条件ではニンジンジュース寒



第1図 UVA, セロファン, シャーレを組み合わせた場合の光の透過率
 A: 透明セロファン+シャーレ, B: UVA+透明セロファン+シャーレ
 赤: UVA+赤セロファン+シャーレ, 青: UVA+青セロファン+シャーレ
 黄: UVA+黄セロファン+シャーレ

第4表 UVA を用いた場合の光質と柄胞子形成量の関係

処理区分	オートミール培地						野菜ジュース培地	
	YA91-1		YA91-2		YA95		YA91-2	
	柄胞子数 ($\times 10^6$ 個)	菌叢直径 (mm)	柄胞子数 ($\times 10^6$ 個)	菌叢直径 (mm)	柄胞子数 ($\times 10^6$ 個)	菌叢直径 (mm)	柄胞子数 ($\times 10^6$ 個)	菌叢直径 (mm)
[暗黒]	±	18.3	10.9	36.5	1.6	19.8	162.1	31.1
[光照射]								
UVA 無								
透明セロファン	18.9	9.5	57.8	30.6	22.1	9.8	190.2	23.9
UVA 有								
透明セロファン	0	15.5	0	34.4	0	14.3	4.5	30.4
青セロファン	0	15.0	0	33.0	0	12.5	2.2	31.4
赤セロファン	0	16.0	0	33.4	0	10.8	19.9	30.1
黄セロファン	0	15.5	0	33.2	0	17.5	1.8	32.3

YA91-2 菌のみ3反復の平均値, ±は形成量がごく微量

第5表 野菜ジュース培地の pH と柄胞子形成量

pH	光照射		暗黒	
	柄胞子数 ($\times 10^6$ 個)	菌叢直径 (mm)	柄胞子数 ($\times 10^6$ 個)	菌叢直径 (mm)
試験 I				
4.3	45.0	10.7	197.7	28.7
7.1	198.5	25.2	165.0	31.2
試験 II				
4.2	39.3	9.8	168.3	30.0 ^{a)}
6.5	156.0	23.3	143.6	32.0
7.0	168.2	25.9	134.0	36.5
7.08	154.7	27.4	123.3	35.0
7.12	147.9	26.1	130.8	35.5
7.2	139.2	26.8	157.1	35.5

a) 表の下段の暗黒区のみ供試シャーレ数1枚
菌株: YA91-2

天培地, オートミール寒天培地で柄胞子形成が良好であった。

一方, 暗条件ではニンジンジュース寒天培地で YA95 菌の柄胞子形成が良好だった他は不良であった。両菌は上記2種の培地以外では明・暗とも菌叢直径が5mm以下の場合が多く, この場合菌叢は明条件下では黒褐色~茶褐色の塊状, 暗条件では菌叢色は白色で柄胞子をほとんど形成しなかった。

以上のように4菌株ともオートミール寒天培地, ニンジンジュース寒天培地では明条件で柄胞子形成が良好であった。なお, YA91-2 菌の様に V-8, 野菜ジュース等の培地で形成が良好な場合もあった。

2. 柄胞子形成に及ぼす光質の影響

UVA とカラーセロファンを用いてシャーレを覆うことにより, 赤, 黄および青の単色光による照射が可能であった(第1図)。なお UVA を用いずシャーレをカ

ラーセロファンのみで覆った場合には, カラーセロファンの種類に関係なく 300~390nm の光が少量透過した。

UVA で覆わない場合には, 第3表に示すようにセロファンの色にかかわらず柄胞子が形成された。両培地の結果を比較すると, 赤色でやや少ない他は培地間で一定の蛍光は認められなかった。菌叢生育には特に一定の傾向は見られなかった。なお暗黒下では野菜ジュース寒天培地でオートミール寒天培地より多量の柄胞子が形成された。

次に UVA で覆った場合には各菌株ともカラーセロファンの色にかかわらず, UVA で覆わない場合に比べて柄胞子形成量は激減した(第4表)。オートミール寒天培地では, 白色菌叢のみで柄胞子がほとんど形成されず, 顕微鏡観察でも柄胞子は認められなかった。野菜ジュース寒天培地では YA91-1, YA95 菌はほとんど柄胞子を形成しなかったため, YA91-2 菌の結果を示した。この場合は UVA で覆った場合, 柄胞子形成が激減したものの柄胞子形成は認められた。色別では赤セロファンで他の色よりやや多い傾向であった。各培地上での菌叢生育は各菌とも UVA 無区で直径がやや小さい傾向であった。

なお暗黒下では, オートミール寒天培地では各菌株とも柄胞子形成はわずかであったが, 野菜ジュース寒天培地では YA91-2 菌は第2, 3表と同じく柄胞子を多量に形成した。

5. 野菜ジュース寒天培地の pH と柄胞子形成

まず予備試験として NaOH および HCl で pH を調整したところ, 高压滅菌後に特にアルカリ側で pH が大きく変化したため, 以後 CaCO_3 で調整した。

培地の pH を CaCO_3 で調整した場合には, 暗黒下培養では菌叢生育・柄胞子形成とも pH の如何にかかわらず良好であった。しかし光照射下では, pH4.2 で菌叢

第6表 野菜ジュース培地の食塩含量と柄胞子形成量

食塩濃度 (%)	YA91-2		YA95	
	柄胞子数 ($\times 10^6$ 個)	菌叢直径 (mm)	柄胞子数 ($\times 10^6$ 個)	菌叢直径 (mm)
0	161.3	28.6	55.4	23.9
0.1	165.2	29.0	47.6	23.1
0.5	116.7	26.1	±	16.8
1.0	±	27.3	±	11.4
2.0	0	18.8	0	10.6

生育が pH6.5~7.2 での半分以下に抑制され、柄胞子形成量も約4分の1に減少した(第5表)。

食塩無添加野菜ジュース寒天培地に食塩を添加した試験では、2菌株とも食塩含量が0.5%で菌叢生育・柄胞子形成とも減少し、1%以上ではほとんど柄胞子を形成しなかった(第6表)。

考 察

先に筆者らは^{5,6)} *S. filum* の柄胞子形成にはオートミール寒天培地および V-8 ジュース寒天培地を用い光照射下での培養が適していると報告した。しかし本報で示したように、野菜ジュース寒天培地、V-8 ジュース寒天培地では柄胞子形成が良好な場合(YA91-2, YA91-3)と全く不良の場合(YA91-1, YA95)が認められたが、オートミール寒天培地、ニンジンジュース寒天培地では供試菌株全てで柄胞子形成が良好であった。したがって *S. filum* の柄胞子形成には蛍光灯の光照射下、オートミール寒天培地、ニンジンジュース寒天培地で培養することが適していると考えられるが、YA91-2 菌の野菜ジュース寒天培地、V-8 ジュース寒天培地での結果のように後者の培地が柄胞子の大量培養に適している場合もあると考えられる。

佐藤⁸⁾はタイ国で収集した *S. filum* は、PDA (ジャガイモ煎汁ブドウ糖)、PCA (ジャガイモ・ニンジン)、V-8 ジュース寒天培地で柄胞子形成が良好であったと報告している。培養条件が異なるので一概に比較できないが佐藤の報告⁸⁾でもジャガイモ・ニンジンの寒天培地で柄胞子形成が良好であったことから、ニンジンの成分が本菌に適している可能性が考えられる。

植物病原糸状菌では光の胞子形成に及ぼす影響については本田²⁾が詳細な研究を行っている。しかし、本菌については今までのところ光の柄胞子形成に及ぼす影響についての報告が見あたらない。そこで筆者らは特定の波長域の光に対する反応を調査することとした。井上⁹⁾の著書に基づき筆者らはカラーセロファンを用いた簡易な

実験系によって、第1図に示すように分光光度計による透過率調査で赤、青、黄色が分離できることを確認した。

本試験で明らかなように、*S. filum* の柄胞子は暗黒下でも形成されるが、300~390nmの紫外線を含む光で促進される。一方、390nm以下の紫外線を除去すると柄胞子はほとんど形成されない。この阻害効果は390nm以上の波長域全体に認められることから、*S. filum* の柄胞子形成は可視光によって阻害され、本田²⁾の分類の「光阻害型」と考えられる。

今回の試験で、YA91-2 菌と野菜ジュース寒天培地の組み合わせで最も多量の柄胞子を形成したため、この組み合わせで培地の pH と柄胞子形成の関係を検討した結果、暗黒条件下では pH 如何に関わらず菌叢生育および柄胞子形成が良好で、pH は特に影響しないことが明らかになった。しかし、光照射下では pH4.2~4.3 では菌叢生育、柄胞子形成とも pH6.5~7.2 より大幅に抑制され、NaOH を用い pH 調整を行った予備試験の結果と考えあわせると、pH の影響は光照射下で発現されるものと考えられた。

以上のように前報^{5,6)}および本報を通じて *S. filum* の種々の培養的性質が明らかになり、本菌柄胞子の大量培養が可能となった。本菌の生物防除への利用に当たっては、実際の草地において培養した柄胞子散布試験を行いその防除効果や効果の持続性について調査する必要があるが、その前に本菌の寄生消長調査、寄主範囲⁹⁾等を考慮して、例えばイタリアンライグラスの様な越冬が困難でかつ1回の収穫で栽培を終えるような植物と越冬性の牧草類や放牧地の様な永年草地のどちらが本菌利用に適しているかといった、防除対象さび病寄生草種の検討を行う必要がある。

引 用 文 献

- 1) CAMPBELL, R. (1989) Biological control of microbial plant pathogen. Cambridge Univ. Press, U. K. pp. 218.
- 2) 本田雄一 (1969) 東北大農研報 21: 63-132.
- 3) 井上康則 (1983) 実験生物学講座 16 (勝見充行・増田芳雄編) 丸善: 139-165.
- 4) LITTLEFIELD, L. J. (1981) Biology of the Plant Rusts. Iowa State Univ. Press, U. S. A. pp. 103.
- 5) 宮川久義・井上興・村本和之 (1993) 日植病報 59: 75 (講要).
- 6) 宮川久義・井上興・村本和之 (1994) 草地飼料作研究成果最新情報 9: 57-58.
- 7) 西原夏樹 (1962) 千葉農試資料 2: 1-195.
- 8) 佐藤豊三 (1991) 平成元年度微生物遺伝資源探索収集調査報告書 農業生物資源研究所: 15-35.
- 9) 杉山正樹・松本邦彦 (1980) 日植病報 46: 83 (講要).
- 10) SUTTON, B. C. (1980) The Coelomycetes. Commonwealth Mycological Institute U. K. pp. 696.

(1996年4月30日 受領)