

第3節 糸状菌を培養する

菌類は微生物の主要な一群であり、いわゆるカビ、酵母、キノコなどを含む。菌類は真核生物であり、その細胞は一般的にキチンやグルカンからなる細胞壁で覆われている、また、従属栄養生物であり、単純な栄養物を、細胞壁を通して吸収する、あるいは分子量の大きな有機物に対しては酵素類を細胞外に分泌・作用させ、それらを分解した上で吸収することなどが特徴として挙げられる。酵母のように単細胞体が二分分裂あるいは出芽することによって生育するものもあるが、多くの菌類は細胞が糸状に連なった菌糸と呼ばれる構造を形成する。このような、菌糸を形成する菌類を特に糸状菌と呼ぶ。菌糸は普通、先端部で成長し、盛んに分岐し、また、しばしば菌糸同士が融合する。菌糸の集合体は菌糸体と呼ばれ、菌糸体の一塊を菌叢と呼ぶ。多くの菌類は、有性的・無性的に孢子と呼ばれる繁殖体を形成する。菌類の多くは、分解者として生物遺体を分解利用し、腐生的に生活している。しかし、活着している生物、特に植物に寄生して寄主生物に害を及ぼすものも少なくない。これらは、農業生産に重大な被害をもたらし、時には大飢饉の原因となる。1840年代アイルランドでおこったジャガイモ疫病菌による飢饉では百万人以上が餓死、百七十万人が移住を余儀なくされた。また、1943年にインドでおこった大ベンガル飢饉では豪雨とそれに続くイネごま葉枯病菌の流行のため、推定二百万人が餓死したといわれている。一方、ペニシリンをはじめとする菌類由来の生理活性物質や有用機能は産業・農業で活用され、人間社会の発展に大きな貢献をしてきた。このように、菌類は資源生物生産管理上、あるいはそれ自身が資源生物として非常に重要である。本節では、菌類の取り扱いの基礎技術を、植物病原糸状菌の分離・培養・接種実験を通して習得する。

3.1 植物病原糸状菌の分離

【目的】

目に見えない菌類を取り扱うためには、まず目的とする菌類を分離し、培養する必要がある。微生物はあらゆるところに分布しているので、多種多様な微生物の中から目的とする菌類を純粋に分離培養するためには、その対象菌の特性を理解して、他の微生物の混入を避けるようにしなければならない。従って、菌類の分離培養ひとつを取り上げても、対象とする菌類の種類によってその方法は異なっており、多くのノウハウが必要とされる。罹病組織から病原菌の分離培養するにあたっては夾雑微生物をいかに排除するかが重要である。ここでは、罹病組織を培地上で培養し、その中から病原体を見つけだす方法と植物罹病組織上に形成された孢子などの病原体の一部（標徴）を顕微鏡下で直接分離する方法を実習する。

【材料・機器】 ジャガイモ、グルコース、寒天末、メスシリンダー（1000ml）、三角フラスコ（300ml用）、ほうろうびーカー（2000ml）、ガーゼ、アルミ箔、滅菌シャーレ、白金線（ステンレス製無頭虫ピンを白金耳ホルダーに取り付けたもの）、恒温培養器、オートクレーブ、クリーンベンチ、ウリ類炭そ病菌 (*Colletotrichum lagenarium*) 罹病葉、トウモロコシごま葉枯病菌 (*Cochliobolus heterostrophus*) 罹病葉、ガラスシャーレ、ろ紙、滅菌済みはさみ、ガスバーナー、70%エタノール、1%アンチホルミン、滅菌水。

【方法】

分離に先立って、平板培地を作製する。菌類の培養に用いられる培地には多くの処方があり、それぞれに特徴があるので、目的に応じて使い分ける必要がある。本実験では植物病原糸状菌の培養において一般的によく用いられているジャガイモブドウ糖寒天（PDA）培地を作製する。

（1）PDA 平板培地の作成

皮をむいたジャガイモ 200g を蒸留水 1L で 20 分間煮沸、ガーゼで濾して得られた浸出液に、ブドウ糖 20g を加え、蒸留水を用いて 1L に調整しジャガイモブドウ糖液体培地（PDB）を作製する。300ml

三角フラスコに200mlずつ分注し、3gの寒天を加え、アルミ箔でふたをした後、オートクレーブ滅菌する（3章2節を参照）。滅菌終了後、培地の温度が約55℃に低下したら、クリーンベンチにおいて滅菌シャーレに寒天培地を流し込む。このときシャーレの側壁上部に培地が付着しないように注意する。シャーレを静かに揺すって、培地が全面にゆき渡るようにする。培地が完全に固化するまで放置する。

（2）組織培養による分離法

罹病組織の病斑部と中毒部（病斑部と健全部の境界）を含む部分を乾熱滅菌したはさみを用いて、3から5mm幅の帯状に切り取る。組織片を70%エタノールに20秒、続いて1%アンチホルミンに10分程度浸し、表面殺菌する。滅菌水をいれた滅菌シャーレを3枚用意し、表面殺菌した組織片を順次移して洗浄後、PDA平板培地上に置き、恒温培養器（20～25℃）で培養する。菌叢の形成が認められたら、先端部分を白金鉤で切り取り新しいPDA培地に移植し、培養する。伸長した菌叢をかき取り、生物顕微鏡を用いて分生孢子を確認する。

（3）標徴からの分離法

ガラス製ペトリ皿に濾紙を敷き、乾熱滅菌した後、濾紙が充分湿る程度の滅菌水を注入する。罹病組織片を、この中に置き、2日から7日程度、恒温培養器で培養する。実体顕微鏡下で罹病組織片をよく観察し、病斑あるいは中毒部に認められる病原体の標徴（分生孢子）の存在を確認する。白金線の針の部分で火炎滅菌後、PDA平板培地に突き刺し、冷却する。次に、この白金線を持ちいて、分生子を顕微鏡下で釣り上げ、PDA平板培地に移す。伸長した菌叢をかき取り、生物顕微鏡を用いて分生孢子を確認する。

【結果の整理と考察について】

罹病組織分離法と標徴分離法で得られた菌の種類、数を比較せよ。

3.2 植物病原糸状菌の培養

【目的】 糸状菌などの微生物研究においては、その対象となる微生物を純粋培養することは、研究を進める上で基本的かつ必須の技術である。この技術を正確に習得できていなければ、雑菌の混入などに悩まされ実験に支障をきたしてしまう。一般に菌の分離、純粋培養には、平板培地が用いられる。しかし、シャーレの平板培地上で純粋培養に成功した菌株も、そのままではやがて雑菌の混入を受ける。そのため、長期間にわたって純粋状態を保持したいときは、綿栓もしくはシリコンゴム栓をした試験管中の斜面培地に無菌的に移し換えておく。ここでは、例として2種の植物病原糸状菌ウリ類炭そ病菌とトウモロコシごま葉枯病菌を用いて無菌操作ならびに培養を行う。

【材料・機器】 ウリ類炭そ病菌の野生株およびアルビノ変異株、トウモロコシごま葉枯病菌の野生株およびアルビノ変異株、PDB培地、寒天、三角フラスコ（1000ml）、白金鉤（500Wニクロム線をL字に曲げ、先端を研磨したものを白金耳ホルダーに取り付ける）、恒温培養器、オートクレーブ、クリーンベンチ

【方法】

まず、PDA培地を用いて斜面培地の作製を行う。

（1）PDA斜面培地の作製

PDB培地を調製する。PDB培地を三角フラスコに移し、寒天（1.5g/100ml）を加え、沸騰水中で湯せんする。培地をガラス棒などでかき混ぜながら、寒天が十分に溶解されていることを確認する。あらかじめ、準備しておいた試験管に、溶けたPDA培地を10mlずつ分注する。10mlが試験管中でどのくらいの深さに前もって調べておき、それを元におよその量で分注してもかまわない。分注後、綿栓もしくはシリコン栓を装着してオートクレーブにより滅菌する。オートクレーブから取り出した培地を、角材などにもたせかけて斜めに傾けた状態で放冷する。

(2) 糸状菌の移植

平板培地において純粋培養した菌を新しい培地に植え継ぐなどの操作には、白金鉤を用いる。クリーンベンチ内に、培養した菌株と新しい培地を用意する。右手の親指・人差し指・中指を使って、ちょうど鉛筆を持つ要領で白金鉤の柄部をもち、ニクロム線の部分をガスバーナーの炎によって赤熱する。また、柄の金属部を炎の中に3～4回往復させて火炎滅菌する、ニクロム線を平板培地に密着させ、ニクロム線を冷やす。左手の親指・人差し指・中指を使って、シャーレのふたを少し開き、冷えた白金鉤の先で少量の菌体を切り取り、新しい培地に移植する。白金鉤の出し入れの際は、シャーレや他の器物の火炎滅菌していない部分などに接触させないように注意する。もし、接触した場合は、白金鉤の火炎滅菌からやり直す。白金鉤の先端を火炎滅菌したうえで、机の上に置く。移植済みシャーレには、菌株名、日付などを油性マジックで書き付けておく。菌を移植したプレートは恒温培養器で一定期間の静地培養を行う。

菌株の長期保存時などには平板培地から試験管の斜面培地への移植が必要となる。まず、試験管の口部とその周辺を炎で軽くあぶり、火炎滅菌する。白金鉤を前述のように火炎滅菌する。ニクロム線を試験管内の培地に突き刺し冷やす。平板培地から菌体を切り取り、培地斜面上に接種する。菌叢の観察に邪魔にならないところに菌株名、日付などを油性マジックで書き付けておく。

【結果の整理と考察について】

平板培地上において一定期間培養した（一週間程度）病原菌の生育度や菌叢の様子を調べる。異種の植物病原菌間において、あるいは同種の病原菌の野生株と変異株間において、どのような相違が見いだされるかについて定量的と定性的両面から調査を行う。見いだされた結果からどのようなことが考察されるだろうか？

3.3 植物病原糸状菌の接種

【目的】 一般的に植物病原糸状菌には明確な宿主範囲が存在している。つまり、ある植物種に対しては非常に激しい病原性を示す病原菌が、別の植物種に対しては全く感染できない。そのため、植物の罹病組織から分離、培養した植物病原糸状菌が、その罹病原因であるかどうかを評価するためには、その植物への再接種試験を行い同様の病斑が形成されるかを調べるのが最も有効な方法である。本実験においては植物病原糸状菌の植物体への一般的な接種法を習得する。そして2種の宿主範囲の異なる病原菌について接種実験を行うことにより、植物病原糸状菌の宿主特異性について学習する。また、両菌におけるメラニン合成が欠損したアルビノ変異株を用いることにより、メラニン合成と植物病原菌の病原性との関係を調査する。

【材料・器具】 ウリ類炭そ病菌の野生株およびアルビノ変異株、トウモロコシごま葉枯病菌の野生株およびアルビノ変異株、滅菌蒸留水、キュウリ本葉、トウモロコシ本葉、綿棒、血球計測盤、ガーゼ、遠心管、光学顕微鏡、恒温培養器、人工気象器

【方法】

植物病原糸状菌の接種法は、まず無傷接種と有傷接種とに大別される。無傷接種には、胞子を用いた接種と菌糸片を用いた接種がある。胞子を豊富に形成する植物病原菌においては、基本的に胞子接種を行う。しかし、一般的な栄養寒天培地上ではほとんど胞子形成を行わない病原菌も多数存在する。その場合、培地の組成などの培養条件に変更を加えて胞子形成を行う条件設定を行い、胞子接種を行うのが一つの解決策である。しかし、菌糸片を用いて病原性を検討することが可能な植物病原菌も存在し、このような病原菌に対して、菌糸片接種は有効な方法である。一方、有傷接種とは、検定植物に傷をつけ、そこに胞子あるいは菌糸を接種する方法であり、病原菌の植物体への侵入後の進展能力を評価する際に行われる実験である。

(1) 胞子を用いた無傷接種（ウリ類炭そ病菌）

3. 2で述べたように、ウリ類炭そ病菌の野生株およびアルビノ変異株をジャガイモ寒天平板培地に移植し、培養を行うことにより分生胞子を形成させる。滅菌蒸留水10mlを注ぎ、菌体表面を滅菌した綿棒でこすり、胞子懸濁液を調整する。菌糸片を除去するために、懸濁液をガーゼでろ過し、遠心管に移す。遠心分離を行って、分生胞子を集める。沈殿した分生胞子に少量の水を加え、分生胞子懸濁液を調整する。この分生胞子懸濁液を希釈し、血球計測盤を用いて約 10^5 分生胞子/mlの胞子懸濁液を調製する。調製した胞子懸濁液をキュウリ葉およびトウモロコシ葉に滴下する。接種葉は人工気象器など明期を設定できる培養器内において多湿条件で静地培養する。約1週間後に、病斑形成について観察を行う。

(2) 菌糸片を用いた無傷接種（トウモロコシごま葉枯病菌）

平板培地上でトウモロコシごま葉枯病菌を培養する。培養した菌体片を、検定植物葉の上に接種する。以下は(1)と同じ。

(3) 有傷接種

検定植物に針を用いて傷をつける。培養したプレートから調製した胞子または菌糸片を調製し、傷口に接種する。以下は(1)と同じ。

【結果の整理と考察について】

(1) ウリ類炭そ病菌とトウモロコシごま葉枯病菌の、宿主植物および非宿主植物に対する接種試験の結果を観察する。宿主植物、非宿主植物に対し両病原菌はどのような影響を及ぼしたであろうか

(2) ウリ類炭そ病菌、トウモロコシごま葉枯病菌のアルビノ変異株の接種結果を観察する。両種において、メラニン合成欠損アルビノ変異株で野生株と比較してその病原性に変化はあったであろうか？メラニン合成と病原性との関係について考察する (3) 有傷接種と無傷接種では結果に相違はあったであろうか？得られた結果からは何が読みとれるのだろうか？