ダイコン幼苗の子葉および本葉を用いた べと病菌の室内増殖法

大口 富三*・吉田 克志*・Mohd. Yunus ISMAIL*・浅田 泰次**

Tomizo OHGUCHI*, Katsuyuki YOSHIDA*, Mohd. Yunus ISMAIL* and Yasuji ASADA**:

A Laboratory Method for Propagation of Downy Mildew Fungus (*Peronospora parasitica*) Using the Cotyledon or True Leaf of Japanese Radish Seedlings

Abstract

A method for propagation of Japanese radish-downy mildew fungus (*Peronospora parasitica* Pers. : Fr.) was developed using the seedlings of Japanese radish (*Raphanus sativus* Linn. var. *hortensis*). Since the cotyledon and the true leaf of the seedling are resistant to the fungus, they were subjected to hot water (50 C) treatment or the root was cut off to weaken resistance. Each of the cotyledons of cv. Awa-ichigo, Sarakamuri and Daimaru-shogoin, which had been grown for 7 to 11 days in the field and treated with hot water were put in a test tube (2.8×19 cm) containing 15 ml of distilled water after wrapping root with cotton. The upper surfaces of these cotyledons were inoculated by dropping a conidial suspension of the fungus. The percentage of the conidiophore formation on the cotyledons grown for one week at 20 C, 1,000 lux after inoculation was highest on the 11-day-old cotyledon, treated with hot water for 60 sec, of cv. Daimaru-shogoin. On the true leaf of 3-week-old seedlings, the percentage was highest on cv. Sarakamuri treated with hot water for 30 sec. Since the cotyledons of cv. Shirokubi-miyashige, Heian-tokinashi and Daimaru-shogoin, which had been grown for 4 to 6 days in a growth chamber (25 C, 5,000 lux), were very susceptible to hot water treatment, their roots were cut off instead. Cut surfaces of hypocotyls were wrapped with cotton wetted with sterilized distilled water or a modified Knop solution in order to keep the cotyledons from withering. The lower surfaces of cotyledons were inoculated with the suspension of conidium. The percentage of the conidiophore formation was highest on the 6-day-old cotyledon of cv. Shirokubi-miyashige. In the case of cv. Daimaru-shogoin, the 4-day-old cotyledon was best suited. A dark treatment (18 hr) of the infected cotyledon on the 6th day after inoculation stimulated conidiophore formation following synchronized formation of the conidia. Also, many conidiophores were formed on the infected cotyledon when moved into an incubator (20 C) after being stored in a refrigerator (5 C) for two weeks from the 3rd day after inoculation.

(Received December 12, 1988)

Key words: *Peronospora parasitica*, Japanese radish, propagation method.

緒 言

ダイコンべと病菌は人工培地上で培養できない。筆者ら²⁾は種々の培地を用いて本菌の培養を試み、クノッブ培地を基本とした人工培地上で本菌がある程度生

育することを認めたが、まだ継代培養を続けるところまでには至っていない。本菌の栄養生理学的特性には不明の点が多く残されており、人工培養法の確立のためにはさらに詳細な研究を必要とする。このためには本菌をなんらかの方法で室内で増殖させ随時実験に供

* 愛媛大学農学部 College of Agriculture, Ehime University, Matsuyama 790, Japan

** 愛媛大学 Ehime University, Matsuyama 790, Japan

することができれば好都合である。中村⁶⁾と浅田¹⁾らはダイコン根切片に本菌を接種して、これに形成される分生子を利用した。この方法は大変有用であるが、分生子柄形成が数日間にわたって起こり分生子の発育齢が不ぞろいとなる難点も認められる。またときに接種源に少量の腐生菌が混入して、ダイコン根切片上で旺盛に生育繁殖する危険性も潜んでいる。中村⁷⁾はダイコンカルス上での本菌の培養を試み、酵母菌等の雑菌による汚染を減少させることができた。しかし、カルス作製に多大の労力と時間を必要とし、さらに形成される分生子の量は必ずしも十分ではなかった。

著者らはこれらに代わる簡便な本菌の室内増殖法を確立するために、ダイコンの子葉および幼苗の本葉を用いる方法を検討したのでその結果について報告する。

材料および方法

供試植物 ダイコン (*Raphanus sativus* Linn. var. *hortensis*) の栽培品種、阿波1号、皿冠、大丸聖護院、平安時無を圃場でポット (直径 10 cm, ビニル製) 栽培し、播種 7~11 日後の子葉および同 3 週間後の幼苗の本葉を供試した。使用の際には根を傷つけないように水中で根部の土を洗い落とし、さらによく水洗した後、後述の熱処理を行った。子葉を使う場合は、植物の根部に脱脂綿を巻き、15 ml の蒸留水を注入した大型試験管 (2.8×19 cm) に入れた。本葉を供試する場合は、本葉 1 枚を残して子葉と未展開葉をカミソリで切断し、幼植物をバーミキュライトを入れた腰高ベトリ皿 (直径 9 cm, 高さ 6 cm) に 3 個ずつ入れた。これらはともにその後、20 C, 1,000 ルックス下で栽培した。

一方、人工気象器 (Nippon Medical & Chemical Instrument Co. Ltd., LH200-RD, 25 C, 5,000 ルックスで 12 時間照明) でポット栽培 (直径 10 cm, ビニル製, バーミキュライト, ハイポネックス 1,000 倍液使用) したダイコン品種、白首宮重、平安時無、大丸聖護院の播種 4~6 日後の幼苗も使用した。これらは根部をカミソリで切断除去し、水洗後、80% エチルアルコールで 5 秒間、ついで次亜塩素酸ソーダ (有効塩素濃度 1.0%) で 2 分間表面消毒した。よく水洗した後、子葉に胚軸を 1 cm 残して、切断部に脱脂綿を巻きつけて、脱脂綿には修正クノッブ液 [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 2 g, MgSO_4 ; 0.25 g, KNO_3 ; 0.25 g, KH_2PO_4 ; 0.25 g, NH_4NO_3 ; 0.02 g/l の蒸留水] または滅菌蒸留水を浸み込ませた。これらを、湿ったろ紙 3 枚を敷いたベトリ皿湿室 (9 cm) に子葉の裏面が上になるように入れ

た。ろ紙にも修正クノッブ液または滅菌蒸留水を浸み込ませた。

熱処理法 圃場で栽培した植物の使用に当たって、抵抗性を弱めるため熱処理を行う場合は、子葉および本葉をそれぞれ 50 C の温湯に一定時間浸漬した後、ただちに室温の滅菌水で冷却した。

供試菌 既報²⁾により、ダイコンベと病菌 (*Pero-
nospora parasitica* Pers.: Fr., 1988 年 1 月 29 日に、愛媛大学農学部圃場のダイコン品種、白首宮重葉上に形成された急性病斑から分離された) の分生子懸濁液を作製して接種源に用いた。

接種法および調査法 試験管中の子葉の場合は、その裏側表面に分生子懸濁液をループ状白金耳で接種した。接種後 20 C, 1,000 ルックス下で一定期間培養して分生子柄形成を調べた。また、人工気象器で栽培して根部及び胚軸を切断した子葉の場合は、子葉裏側表面に白金耳で接種し、恒温室 (20 C, 1,000 ルックス) で 1 週間培養した。調査はそれぞれの実験区ごとに 20 個体 (子葉数として 40 枚) を任意に選び、主として肉眼観察で行い、ときに 25 倍のルーペを使用した。黄化の程度は正常な緑色を 1、最も黄化したものを 7 として、その間を 6 段階に分けてそれぞれの子葉の葉色を数字で表し、20 個体の数の平均値で表した。

実験結果

圃場でポット栽培した阿波1号、皿冠、大丸聖護院の子葉に本菌分生子を点滴接種したところ、いずれの場合も接種部位に小黑点が多数形成されたが、分生子柄は形成されなかった。一方、50 C の熱処理を施した後接種すると分生子柄 (および分生子) の形成されることがわかったので最適処理条件を調べた。なお上記 3 品種の子葉を 80% エタノール、ついで 1,000 倍昇汞水で表面消毒した後、50 C, 20 秒間熱処理を行った場合は、子葉が著しい損傷を受け、これらに分生子を接種しても分生子柄を形成するものが少なかった。その後、その後は表面消毒を行わず直接熱処理を行うことにした。3 品種の子葉は播種 7 日後に十分に展開し、その後 5 日間は子葉を使用することができた。播種 13 日後の子葉は、接種後分生子形成が起こる前に黄化した。大丸聖護院の子葉は最も大きく肉厚で、取り扱いが容易で熱処理にも適していた。3 品種上での分生子柄形成率は大丸聖護院で最も良かったが、熱処理の強さによる変動が著しかった (Fig. 1)。次に大丸聖護院の子葉の発育齢と熱処理の強さとの関係を調べた (Fig. 2)。播種 7 日後のものでは熱処理時間が

Fig. 1. Effect of cultivar and heat-treatment on the percentage of conidiophore formation (7-day-old cotyledon). Blank and longitudinally striped bars were treated for 80 and 100 sec at 50 C, respectively.

Fig. 2. Effect of heat shock-time on conidiophore formation (cv. Daimaru-shogoin). Blank, longitudinally striped and dotted bars show 7-, 9- and 11-day-old cotyledones, respectively.

100 秒間で最も良かったが、11 日後のものでは 100 秒間では強すぎ、60 秒間が最適となった。同様に阿波 1 号の播種 7, 9, 11 日後のものでは、それぞれ 100, 80, 60 秒間が最適で、皿冠でも播種 7 日後のもので 120 秒間、9 日後と 11 日後のものではともに 80 秒間が最適であった。このように一般に子葉の発育齢が進むと熱に対する感受性が増した。以上の結果より子葉の試験では、大丸聖護院の播種 11 日後の子葉に対する 60 秒間の熱処理で分生子柄形成率が最も高いことがわかった。一方、圃場でポット栽培した幼苗本葉での場合は、皿冠の 30 秒間熱処理で最も高い分生子柄形成率

Fig. 3. Effect of cultivar and heat-treatment on conidiophore formation (true leaf of a 3-week-old seedling). Blank, longitudinally striped and dotted bars were treated for 20, 30 and 40 sec at 50 C, respectively.

Fig. 4. Effect of aging and incubation-method on the etiolation of the cotyledon. Blank, longitudinally striped, dotted and transversely striped bars: 4-, 5-, 6- and 28-day-old cotyledons of Shirokubimiyashige, respectively. A, B and C show a modified Knop solution (Knop)/Knop, sterilized distilled water (D.W.)/D.W. and Knop in a cotton ball/D.W. in filter papers, respectively.

がみられた (Fig. 3)。

松山市近郊の圃場では 9 月から 11 月上旬までがダイコン種子の播種適期である。それ以後の播種では気温低下に伴い生育不良となる。そこで実験に供試する子葉を周年得る目的で、人工気象器を用いてダイコンを栽培した。人工気象器で栽培したダイコン子葉を用

いた結果は短時間の熱処理でも損傷が大きく、それらの多くが腐敗した。したがって熱処理に代えて幼植物の根部を切断したところ、本菌に対する抵抗性が低下し、接種子葉上に分生子柄形成が容易になった。しかし、切断により子葉の黄化が早まるので、これを抑制するため切断部に滅菌水あるいは修正クノップ液を浸み込ませて、影響を調べた (Fig. 4)。それによると、発育齢が大きいほど黄化しやすいが、播種 28 日後の子葉を用いたとき、修正クノップ液を添加した区で黄化時期が遅れた。ペトリ皿中のろ紙に修正クノップ液添加した区は、滅菌水添加区よりも黄化が遅れる傾向が認められた。次に 3 品種、白首宮重、平安時無、大丸聖護院の発育齢の異なる子葉上での分生子柄形成率は白首宮重で最も高くまた齢が進むほど高かった (Fig. 5)。大丸聖護院では播種 4 日後のもので形成率が高かった。分生子柄数は平安時無の播種 5 日後と 6 日後のもので著しく多かったが、これは調査した 20 個体中に異常に多量の分生子柄を形成した子葉が 1 個体ずつ含まれていたことによるものである (Fig. 6)。播種 4 日後および 6 日後の白首宮重では分生子柄形成率が高いにもかかわらず、形成数が比較的少なかったが、播種 5 日後の子葉では分生子柄数も多く増殖用に最も適していた。分生子柄形成の最も高かった白首宮重を用いて、子葉の発育齢と添加液の種類が分生子柄形成に及ぼす影響を調べた (Fig. 7)。その結果、修正クノップ

Fig. 5. Effect of cultivar and aging of the cotyledon on conidiophore formation. Blank, longitudinally striped and dotted bars show 4-, 5- and 6-day-old cotyledons, respectively.

液を添加した、播種 6 日後の子葉区で分生子柄形成率が高かった。さらに、接種 6 日後に暗処理を行った結果、暗処理により分生子柄数が急増した (Table 1)。つぎに培養温度と分生子柄及び菌糸塊形成との関係を調べた (Fig. 8)。白首宮重上の菌糸塊形成数は、15 C

Fig. 6. Effect of cultivar and aging of the cotyledon on the number of conidiophores. Blank, longitudinally striped and dotted bars show 4-, 5- and 6-day-old cotyledons, respectively.

Fig. 7. Effect of incubation method on conidiophore formation (cotyledon of cv. Shirokubi-miyashige). A, B and C show a modified Knop solution (Knop)/Knop, sterilized distilled water (D.W.)/D.W. and Knop in a cotton ball/D.W. in filter papers, respectively. Blank, longitudinally striped, dotted and transversely striped bars show 4-, 5-, 6- and 28-day-old cotyledons.

Table 1. Effect of dark-treatment on conidiophore formation (cotyledon of cv. Shirokubi-miyashige)

Incubation method	Dark-treatment	Percent of conidiophore formation	No. of conidiophore
A ^{a)}	+ ^{b)}	100	78
	—	66	9
B	+	77	46
	—	68	18

a) A and B show a modified Knop solution/ a modified Knop solution and sterilized distilled water in a cotton ball/ sterilized distilled water in filter papers, respectively.

b) The dark-treatment (18 hr) started 6 days after inoculation.

Fig. 8. Effect of incubation temperature on conidiophore- and massive hypha-formations. Blank and longitudinally striped bars show organ formation of the fungus cultured at 15°C and 20°C. Inoculated plants were cultured under continuous illumination for 6 days and then in the dark for 18 hr. A: Shirokubi-miyashige, B: Daimaru-shogoin.

と 20°C ではほぼ同数であったが、後者で菌糸塊がより大形となった。また、気孔部および菌糸塊上に形成される分生子柄数は 15°C で著しく多かった。大丸聖護院の菌糸塊形成数と気孔からの分生子柄形成数は 15°C で多かったが、菌糸塊からの分生子柄形成では両温度区間で有意な差を認めなかった。品種間では、15°C で大丸聖護院に比べ、白首宮重において分生子柄形成数が著しく多かった。

以上のようにダイコン子葉を用いて本菌を継続して増殖させることができる。しかし、この方法では 1 週間ごとに移植を行わなければならない。そこで移植間

隔を延長する方法を検討した。前述のように人工気象器で栽培し、根部を除去した幼苗の子葉に本菌分生子を接種し、20°C 連続照明下に 3 日間保った後、湿室ペトリ皿をアルミはくで包み 5°C の冷蔵庫に入れて 2 週間保った。その後 20°C (暗黒下) に移して 1 日間培養すると、分生子柄が多数形成された。この低温下での保存法を併用することにより、移植間隔を大幅に広げることが可能になった。

考 察

ダイコン子葉にべと病菌分生子を接種しても、通常は壊死病斑を形成するのみで分生子柄を形成しない。大内ら⁹⁾と谷ら^{10,11)}はそれぞれうどんこ病と冠さび病に抵抗性のオオムギとエンバク品種を 50°C 前後の温度で熱処理すると、抵抗性が低下すること、また松本ら⁵⁾は、ダイコン根柔組織で木化誘導因子処理による木化誘導が熱処理により抑制されることを報告した。筆者らはダイコン子葉または本葉のべと病菌に対する抵抗性を低下させるために、温湯浸漬による熱処理または根の切断除去を行った。50°C の熱処理により、子葉と本葉は本菌に感染し分生子柄が多数形成された。その形成量は供試ダイコン品種や発育齢、熱処理の強さなどの組み合わせによって著しく異なった。人工気象器で栽培した幼苗の子葉は圃場で栽培したものに比べて小さく、葉肉も薄く熱に弱かったため、これらの子葉には熱処理に代えて根部を切断除去して本菌分生子を接種した。片岡ら^{3,4)}はキュウリ葉の葉柄切断部にクノッ液を浸み込ませた脱脂綿をつけてペトリ皿湿室中に入れ、これにキュウリべと病菌を接種して遊走子のうを形成させる方法でキュウリべと病菌を継代増殖できることを報告した。筆者らはキュウリ葉を用いて追試したところ、葉の葉柄切断部に根が生じ、葉は長期間緑色を保ち続けた。しかし、ダイコン子葉では根の形成が悪く、根の形成されない子葉では黄化が比較的早かった。キュウリ葉の場合、下位葉で緑色

の濃い葉が適していたが^{3,4)} ダイコン子葉の場合も子葉が肉厚で緑色の濃いものが適していた。分生子柄は通常、子葉裏側表面全体に形成されているので、子葉が大きいことが望ましい。このためには圃場で栽培した子葉が適するが栽培期間が限定される。人工気象器では随時栽培できるが、子葉が小さくなるので白首宮重や大丸聖護院のように子葉の大きい品種を用いることが大切である。

筆者ら⁵⁾ はダイコンべと病菌が菌糸塊を多量に形成することを見だし報告した。菌糸塊は分生子柄（さらには分生子）を形成するもので、暗処理により同調化が容易である。菌糸塊は白首宮重と大丸聖護院で高頻度に形成され、形成数は前者で多かった。

本報では幼苗の子葉と本葉を用いて本菌の室内増殖法を検討した。本葉は栽培に期間がかかること、葉が大きいため取り扱いが容易でなく、とくに、接種の際、大きな容器を必要とすること、また葉肉が薄いので熱処理による損傷が大きいことなどの欠点を有し、いずれの点でも子葉が優っていた。人工気象器で栽培した白首宮重の播種5日と6日後の幼苗の子葉で分生子柄形成が良かったが、6日後の子葉ではときとして黄化する個体が認められた。したがって、播種5日後の子葉を用い切断部に修正クノッ液を添加し蛍光灯連続照明（15℃または20℃）下で6日間培養した後、18時間の暗処理をすることにより多量の分生子柄を形成することができた。

摘 要

ダイコンべと病菌 (*Peronospora parasitica* Pers. : Fr.) の室内増殖、維持にダイコン (*Raphanus sativus* Linn. var. *hortensis*) 幼苗の子葉と本葉を用いる方法を検討した。子葉はべと病菌に対して抵抗性であるので、抵抗性を弱めるために温湯浸漬による熱処理または根部の切断処理を行った。圃場でポット栽培した3品種（阿波1号、皿冠、大丸聖護院）の発育齢の異なる子葉を50℃で60～120秒間熱処理後本菌を接種したところ、大丸聖護院の播種11日後の子葉の60秒間処理区で分生子柄および分生子形成率が最大値を示した。播種3週間後の幼苗本葉では、皿冠の30秒間処理で最大であった。人工気象器でポット栽培した幼苗の根部を切断して子葉に分生子を接種したところ、供試した3品種のうち白首宮重で分生子柄の形成率が最も高く、大丸聖護院、平安時無の順であった。発育齢との関係では白首宮重の場合は、播種5日後の子葉で、大丸聖護院では播種4日後の子葉でそれぞれ安定した分生子柄の形成が認められた。接種6日後の子葉を暗処理すると、分生子柄の形成促進と同調化の効果がみられた。接種3日後の子葉をペトリ皿湿室に入れ、低温（5℃）暗黒下に2週間保った後、20℃、暗黒下に戻すと分生子柄が多数形成された。この方法は本菌継代維持上、移植間隔を延長するのにきわめて有効である。

引 用 文 献

1. 浅田泰次・松本 勲 (1967). 日植病報 33 : 335 (講要).
2. Asada, Y. and Ohguchi, T. (1981). Ann. Phytopath. Soc. Japan 47 : 71-74.
3. 片岡正明・清水幸夫 (1976). 日植病報 42 : 109 (講要).
4. 片岡正明・清水幸夫・安田 康 (1976). 同上 42 : 615-617.
5. Matsumoto, I., Ohguchi, T. and Asada, Y. (1978). Ann. Phytopath. Soc. Japan 44 : 22-27.
6. 中村広明 (1958). 日植病報 23 : 20 (講要).
7. 中村広明 (1960). 同上 25 : 217 (講要).
8. Ohguchi, T., Nagao, Y., Yoshida, K. and Adasa, Y. (1990). Ann. Phytopath. Soc. Japan (投稿中).
9. Ouchi, S., Oku, H., Nakabayashi, H. and Oka, K. (1975). Ibid. 41 : 453-460.
10. Tani, T., Yamamoto, H., Onoe, T. and Naito, N. (1975). Physiol. Pl. Path. 7 : 231-242.
11. Tani, T., Ouchi, S., Onoe, T. and Naito, N. (1975). Phytopathology 65 : 1190-1193.