

## 糸状菌の簡易単孢子分離法の改良

黄 思良\*・甲元啓介\*

平成3年5月31日受付

### A Simple Method for Isolating Single Fungal Spores

Si-Liang HUANG\* and Keisuke KOHMOTO\*

An improved method for single fungal spore isolation using a glass capillary was devised. Spore suspension was adjusted to a concentration (number of spores/ml) corresponding to the density that was theoretically calculated to contain only a single spore in a disgorged volume of the suspension from a glass capillary. The spore suspension was blotted on the sites of gellan gum or agar plates which were previously specified, and incubated to germinate vigorously for an appropriate period. The resulting germings were examined for their singularity under a microscope. Monosporic colonies could be isolated easily and efficiently, without the aid of a micromanipulator; the isolation rates were about 50% for *Cephalosporium* and 36% for *Alternaria*.

#### 結 言

植物糸状菌病の研究において、純粋な病原菌株の単離や孢子の交配型分析などを実施する上で、単孢子分離法は基本的な手段となっている。その方法は機械的マニピュレーション法と希釈平板法に大別できる<sup>1~3)</sup>。前者の共通点として、未発芽孢子そのものが直接的な分離対象となっている。したがって、その単孢子分離の操作上の難易度や確実性は対象菌種の孢子の大きさによって左右されやすい。一般的に孢子が小さいほど単孢子分離の効率と確実性は低下する。小形の糸状菌孢子の場合は、高価なマイクロマニピュレーターを使用する場合を除けば、常法による単孢子分離は事実上不可能に近い。一方、希

釈平板法<sup>3)</sup>は孢子の大きさと無関係に操作できる単孢子分離法であるが、顕微鏡による単孢子性の厳密な確認が欠けている。

著者らは従来の希釈平板法による単孢子分離プロトコール<sup>3)</sup>に改良を試み、単孢子由来のコロニーであることを保証するとともに孢子長が数 $\mu$ m以下の微小な孢子の分離効率を高める方法を確立した。以下、この改良単孢子分離方法を報告する。

#### 実験材料及び方法

使用した主な材料及び器具は以下の通りである。

(1) 供試菌：研究室保存の *Alternaria alternata* と *Cephalosporium acremonium* をそれぞれ大形及び小形孢子

\* 鳥取大学農学部農林総合科学科生物資源科学講座

\* Department of Bio-Resources Science, Faculty of Agriculture, Tottori University

生産菌として用いた。前者及び後者の胞子の大きさはそれぞれ18.8~74.3×12.5~28.1 $\mu$ mと2.8~8.4×1.0~2.4 $\mu$ mである。

(2) 貧栄養培地：1.5% gellan gum (1.5g gellan gum+0.1g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O+100ml 蒸留水) または2.0% agar (2.0g agar+100ml 蒸留水)

(3) ガラス毛细管：口径0.52mm, 管壁の厚さ0.15mm, 培地表面に1回接触するごとの平均吐出液量が約1×10<sup>-4</sup>mlの細いガラス管(但し, 裁断面の平滑な毛细管)

(4) 模型紙：白紙の上に先ず直径9cmの大円を書き, その中に更に直径7mmの小円を77個10列に分けて書いた。小円同士の間隔は1mmとした。最外層の小円と大円周との最小間隔は3mmとした。

分離操作は下記の通りに行なった。

(1) 貧栄養培地をペトリ皿(直径90mm)に流し込み, 固化させた(培地平板の厚さ：1.5~2.0mm)。

(2) 模型紙の上にペトリ皿を置き, 紙面の円に重なるように調整した。模型紙に書いてある小円の位置に従って, 滅菌コルクボーラー(内径7mm)で1枚のペトリ皿の培地平板を77個の単胞子分離用ディスク(以下, ディスクと略称する)に切断した。

(3) 胞子が懸濁液中に均質に分散することを前提条件として, 毛细管法による吐出1回当たりの分離胞子数は下記の関係式で示される。

$$S \times L = N$$

但し, S=胞子最適濃度(個/ml), L=毛细管の吐出液量(ml), N=期待される分離胞子数(個)で, 単胞子分離の場合にはNは1である。したがって, トーマ氏血球計で胞子の濃度を計測し, 毛细管の吐出液量(本実験では1×10<sup>-4</sup>ml)から算出した胞子最適濃度(1×10<sup>4</sup>個/ml)に胞子懸濁液を滅菌水で希釈した。比較のため, この最適濃度を中心に8つの異なった胞子濃度区を設けた。

(4) 滅菌毛细管を希釈した胞子懸濁液に挿入して, 胞子懸濁液を毛细管内に吸入させた。毛细管内の胞子懸濁液の上昇が停止したのち, 毛细管を取出し, 毛细管口をディスクの中央に軽く接触させることによって, 微量の胞子懸濁液を毛细管内からディスク表面に吐出・移転させた。ディスク上の胞子懸濁液の水が完全に蒸散した後, ペトリ皿の蓋をした。

(5) 低倍率接物レンズ(×4または×10)装着の光学顕微鏡でペトリ皿の裏面からディスク表面に付いている胞子を順次検鏡した。胞子が1個だけ存在するディスクを見出したら直ちにマーカー・ペンでマークを付けておき, 単胞子搭載ディスク(以下, 単胞子ディスクと略称

する)の予選とした。なお, 胞子が小さすぎてディスク表面に付着している微小な不純物と区別しにくい場合には, この手順を省略した。

(6) 予選済みのペトリ皿を25~28°Cで胞子がおおよそ最高発芽率に達するまで培養した。発芽管を十分に伸長させ, かつ胞子の原形が未だ消失しないうちに(5)で予選した単胞子ディスクだけを再び検鏡した。なお, (5)を省いた場合には, 全てのディスクを検鏡した。発芽管の有無, 及び発芽管が単胞子に由来したものと否かによって単胞子ディスクを確認・選抜した。

(7) 移植刀で単胞子ディスクを富栄養培地(PDA)に移植した。その際, 胞子発芽管の付着面を下にして植菌した。

## 結果と考察

小形及び大形胞子生産菌に対する単胞子分離の実験結果を第1表と第2表に示す。胞子濃度1×10<sup>4</sup>個/ml区における前者と後者の単胞子ディスク率はそれぞれ50.6と36.1%であって, 各胞子濃度区に比べて最も高かった。次に, 単胞子ディスク率の高いのは両者とも5×10<sup>3</sup>個/mlの胞子濃度区であった。1×10<sup>4</sup>個/ml以上あるいは5×10<sup>3</sup>個/ml以下の胞子濃度区では, その単胞子ディスク率は0~7.8%と著しく低かった。これらの結果は毛细管の吐出液量(1×10<sup>-4</sup>ml)から算出された胞子最適濃度の理論値(1×10<sup>4</sup>個/ml)とよく符号している。理論的な計算によると, 毛细管の吐出液量に対応した胞子最適濃度な

第1表 小形胞子生産菌*C. acremonium*に対する単胞子分離効果\*

胞子濃度 (個/ml)	分離効果		
	単胞子 ディスク率(%)	無胞子 ディスク率(%)	複数胞子 ディスク率(%)
1×10 <sup>6</sup>	0.0	0.0	100.0
5×10 <sup>5</sup>	0.0	0.0	100.0
1×10 <sup>5</sup>	0.0	0.0	100.0
5×10 <sup>4</sup>	7.8	0.0	92.2
1×10 <sup>4</sup>	50.6	19.5	29.9
5×10 <sup>3</sup>	35.1	53.2	11.7
1×10 <sup>3</sup>	6.6	93.4	0.0
5×10 <sup>2</sup>	5.2	94.8	0.0
1×10 <sup>2</sup>	1.3	98.7	0.0

\*調査ディスク数は胞子濃度1×10<sup>3</sup>個/ml区(76個)以外は各濃度区とも77個である。

第2表 大形胞子生産菌 *A. alternata* に対する単胞子分離効果\*

胞子濃度 (個/ml)	分離効果		
	単胞子 ディスク率(%)	無胞子 ディスク率(%)	複数胞子 ディスク率(%)
$1 \times 10^6$	0.0	0.0	100.0
$5 \times 10^5$	0.0	0.0	100.0
$1 \times 10^5$	3.9	0.0	96.1
$5 \times 10^4$	6.5	3.9	89.6
$1 \times 10^4$	36.1	34.7	29.2
$5 \times 10^3$	23.4	68.8	7.8
$1 \times 10^3$	6.5	93.5	0.0
$5 \times 10^2$	3.9	96.1	0.0
$1 \times 10^2$	1.3	98.7	0.0

\* 調査ディスク数は胞子濃度  $1 \times 10^4$  個/ml区 (72個) 以外は各濃度区とも77個である。

らば、単胞子の分離率は100%になることが期待される。しかし、胞子濃度の計測、胞子懸濁液の希釈・吐出などの一連の操作中での誤差や、さらに重要なことは胞子の均質分散性が損なわれやすいことなどから、実際の操作では、100%の単胞子分離率を得ることは困難なものと考えられる。また、同じ胞子最適濃度でも、大形胞子生産菌 *Alternaria alternata* の単胞子ディスク率が小形胞子生産菌 *Cephalosporium acremonium* のそれより低かったのは、胞子が大きいほど胞子の懸垂性が低下し、均質性が損なわれやすいためと考えられる。

改良した本単胞子分離法は、従来の単胞子分離方法<sup>1-3)</sup>に比較して、次の特徴を持っている。

- (1) 単胞子性の判別を胞子発芽後にすることによって、単胞子分離菌株であることが確実に保証される。
- (2) 培地の表面に存在している微小な不純物による誤認や発芽力を喪失した胞子を除去することができる。
- (3) 胞子の発芽に伴う菌糸体長の増大のため、当然のことながら、検鏡作業は容易となる。*Cephalosporium*

*acremonium* の胞子のように無色透明で小形胞子の場合、胞子発芽前では×10接物レンズによる単胞子ディスクの検鏡・確認は大変困難であったが、胞子発芽管が伸長した後は、×4接物レンズによる検鏡でも単胞子ディスクの確認は容易にできる。したがって、糸状菌胞子の大きさによる単胞子分離の制限はほとんど解消される。

(4) 検鏡作業を無菌室以外の場所で行なっても雑菌汚染の心配は全くない。

(5) 短時間内に大量の単胞子を分離することが可能であり、作業能率が高い。

本改良単胞子分離法をより効果的に利用するために、次の事項を注意するとよい。①毛細管の吐出液量と胞子濃度は単胞子分離の効率に直接影響する要因であるので、使用する毛細管の吐出液量を必ず正確に測定し、それと対応する胞子最適濃度を計算して胞子懸濁液の希釈を行なうこと、その際、誤差の影響を考慮して、胞子最適濃度の前後の濃度区を設定しておくとう便利である。②予め胞子発芽率の時間経過を調査しておき、ほぼ最高発芽率に達するまで発芽管を十分に伸長させ、しかも胞子の原形の消失前に単胞子性の調査検鏡をするのが最も効果的である。③毛細管で胞子懸濁液を分散滴下する時に、ディスク表面が壊れるほど深い傷がつかないように丁寧に操作すること。胞子の存在をより迅速に検出するための検索標識として毛細管口の印痕がディスク表面に軽く付く程度は適当である。④貧栄養培地上で発芽できない栄養要求性胞子の単離に際しては、培地内に胞子発芽に必要な栄養物を添加するか、あるいは貧栄養培地の代わりに富栄養培地を用いる。

#### 引用文献

- 1) 赤井重恭・桂 琦一 編：植物病理学実験ノート、養賢堂、東京 (1974) pp.196
- 2) 明日山秀文・向 秀夫・鈴木直治 編：植物病理実驗法、日本植物防疫協会、東京 (1962) pp.190-194
- 3) 青島清雄・椿 啓介・三浦一郎 編：菌類研究法、共立出版、東京 (1983) pp.34