

***Pestalotia* 菌による *Aphelenchoides* sp. の培養温度**

小口健夫

Effect of temperature for propagation of *Aphelenchoides* sp.

on *Pestalotia shiraiana*.

by Takeo OGUCHI

は し が き

線虫の生態学的、生理学的な研究または殺線虫剤の効力検定の材料として豊富な個体群を随時に供給するために、線虫を人工的に培養するところみがおこなわれてきた。

すなわち **BERLINER & BUSCH(1960)** 線虫研究指針は、土壌のかわりに寒天培養基をもちい、それに寄主植物を無菌的にそだてて線虫を接種する方法で *Heterodera Schachtii* の培養をおこない、また **BYARS (1914)** は **Preffer** の培養基をもちいて、トマトなどをそだてこれで *Meloidogyne* sp. の培養をおこなった。その後おおくの研究者によりこの方法が応用されて線虫の生活史や生態的な研究に役立ってきた。

しかし、この寄主植物の幼苗や組織をもちいて線虫を培養する方法は寄主植物をそだてにくいこと、寄主植物が大きいと困難になる不便がある。微生物を利用して線虫を培養する方法では、*Aphelenchoides*, *Aphelenchus*, *Ditylencus*, *Dorylaimus* 属などの線虫が培養に成功している。とくに植物寄生性線虫のなかでも比較的腐食性な *Aphelenchoides* 属の線虫では、おおくの報告がなされている。

CHRISTIE & ARNDT (1936) は、corn meal に培養した *Neurospora sitophila* 菌上で *Aphelenchoides parietinus* と *Aphelenchus avenae* が培養できることをあきらかにした。また、**CHRISTIE & CROSSMAN(1936)** は *Alternaria citri* 菌をもちいて *Aphelenchoides fragariae* を培養し、**TODD & ATKINS(1952)** は *Helminthosporium* 菌あるいは *Fusarium* 菌を利用して *Aphelenchoides oryzae* (?) を培養した。このほかに弥富・西沢、**TODD & ATKINS**、古山(1960 線虫研究指針)はともに *Alternaria* 菌をもちいて *Aphelenchoides besseyi* を培養している。このように *Aphelenchoides* 属の線虫は菌による培養が比較的可能である。

著者は *Nitsckia tuberculifera* 菌によるスギのこぶ病を研究中、*Pestalotia shiraiana* 菌におかされたこぶの表組織内に *Aphelenchoides* sp. がいることを顕微鏡下で発見した。このためこの *Aphelenchoides* sp. が *Pestalotia* 菌で培養しうるかどうか、またその培養適温をしるための実験をおこなった。

この実験をすすめるにあたり種々御指導をいただいた農林省林業試験場真宮靖治技官、材料の採取に御努力下された松前林務署江口完造林課長ならびに課員の方々に厚く謝意を表する。

材 料 と 方 法

実験にもちいた *Aphelenchoides* sp. と *Pestalotia shiraiana* はともに松前林務署管内松前町字上川にある

大正 15 年植栽スギ造林地の枝にできたこぶから分離した。

ペトリ皿にやく 10ml の馬鈴薯寒天培地をそそぎ、平面培養基とし、分離した *Pestalotia* 菌を接種し、25 で培養した。10 日後菌糸はペトリ皿をおおったので、この菌糸上に殺菌蒸留水の少量を滴状にそそぎ、この殺菌蒸留水に無殺菌のまま *Aphelenchoides sp.* の雌 10 頭を hand-picked 法で接種した。この線虫を接種したペトリ皿をそれぞれ 5°, 15°, 25°, 35° の温度に保ち、接種 10 日、20 日、30 日、40 日、50 日後に、各培養温度ごとにペトリ皿 3 枚を 1 組として、培地とともに Baermann 法で分離をおこなった。なお分離時間はやく 24 時間とした。

各培養温度での接種 10 日後の頭数と 35° 培養の 20 日、40 日、50 日後の頭数は syracuse の時計皿で計数し、そのたの処理では、線虫をふくむ分離液を 500ml に稀釈し、1 ml の線虫計数板をもちいて各ペトリ皿につき 6 回計数をおこない平均した。

実験結果および考察

各培養温度における *Pestalotia* 菌上での *Aphelenchoides sp.* の頭数を Table 1 に またこの平均頭数を Fig. 1 にしめした。

Table 1 . The effect of temperature for propagation of *Aphelenchoides sp.* on *Pestalotia shiraiana* .
Pestalotia 菌による *Aphelenchoides sp.* の培養温度

Temperature 温 度	Replicate plate no. くり返し番号	Days after in oculation 接 種 後 日 数				
		10	20	30	40	50
5	6*	250±100	600±400	3,600±510	21,500±2,000	
	4*	600±400	250±250	3,000±600	21,000±1,950	
	8*	400±500	350±150	750±150	2,750±300	
15	32*	13,500±1,850	219,500±7,600	111,500±13,950	165,000±13,050	
	80*	6,500±750	421,500±23,650	353,000±24,200	81,000±3,400	
	70*	24,500±2,850	280,500±31,000	487,000±58,100	304,500±28,350	
25	34*	162,000±11,700	790,500±65,200	36,500±4,850	49,500±7,550	
	570*	206,000±16,200	422,000±33,100	435,000±29,450	366,500±13,150	
	751*	202,000±14,350	366,000±25,500	71,000±4,900	133,500±7,300	
35	5*	0*	0	148*	5*	
	2*	0*	200±250	3*	4*	
	0*	0*	100±200	74*	0*	

The average and standard deviation of number of *Aphelenchoides sp.* on *P. shiraiana* .

Pestalotia 菌上における *Aphelenchoides sp.* の平均数と標準偏差

* Counted by the syracuse watch glass .

syracuse の時計皿による計数

5° 培養では接種後 50 日間に徐々にではあるが、頭数はふえる傾向にあつて、最大頭数は接種 50 日後でやく 21,500 頭となった。15° に保ったものでは接種 40 日後に平均頭数でやく 430,000 頭となるが、くりかえしにおける頭数の変動が大きいので、接種 30 日後から 40 日後が増殖の最大になる期間とおもわれる。培養温度 25° では接種 30 日後でやく 520,000 頭となり、接種 40 日後には急速に減少している。35° 培養では増殖はおこなわれず培

養温度としては不適當とおもわれる。

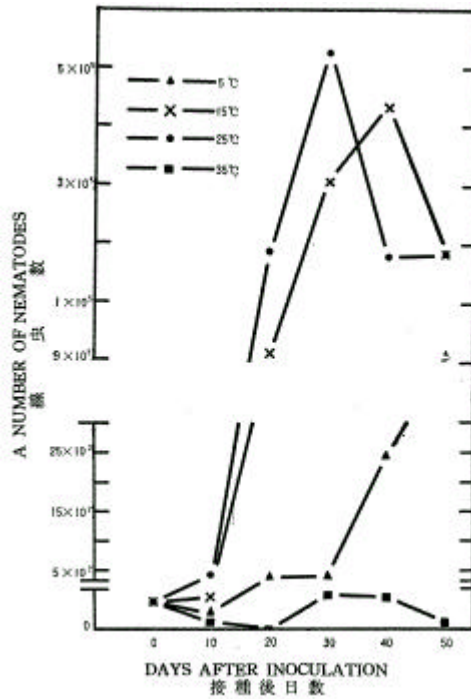
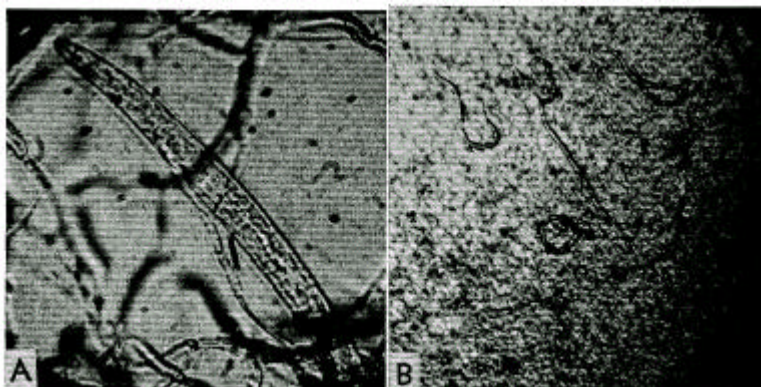


Fig . 1 . Average number of *Aphelenchoides* sp . at 5 ° , 15 ° , 25 ° and 35 ° and 10 , 20 , 30 , 40 , and 50 days after inoculation .

温度 5 ° , 15 ° , 25 ° , 35 ° における接種 10 , 20 , 30 , 40 , 50 日後の *Aphelenchoides* sp . の平均数



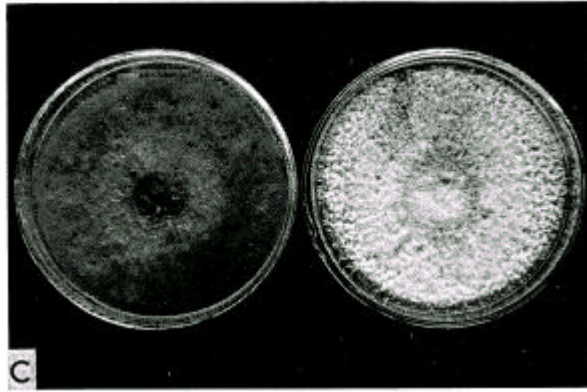


Fig .2

A) *Aphelenchoides* sp . in the tissue of gall .

こぶ組織内の *Aphelenchoides* sp .

B) *Aphelenchoides* sp . on *Pestalotia shiraiana* 30 days after inoculation at 25 .

温度 25 , 接種 30 日後の *Pestalotia* 菌上の *Aphelenchoides* sp .

C) Effect of *Aphelenchoides* sp . on *P. shiraiana* 30 days after inoculation at 25 .

(left : inoculation , right : uninoculation)

温度 25 での *Aphelenchoides* sp . 接種後 30 日後における *Pestalotia* 菌の菌そう。

(左 : 接種 , 右 : 無接種)

また 15 , 25 培養の場合それぞれ接種 40 日後 , 30 日後に増殖頭数は最大になり , それ以後減少にむかう。この原因は , 線虫の食物となる *Pestalotia* 菌の菌糸が食いつくされるためと考えられ , このことは , Fig . 2 . C) にみられる。各処理のくりかえしにみられる頭数の変動は , 主として接種された線虫の成熟度の差と , 食物となる *Pestalotia* 菌の培養基上での発育状態の相違によるものとおもわれる。また頭数がすくない処理で標準偏差が大きいのは , 計数にさいして稀釈をし , 計数板で計数をおこなったためである。

む す び

スギのこぶから分離した *Aphelenchoides* sp . が , おなじくこのこぶから分離された *Pestalotia* 菌で培養することが可能であること , そして培養温度を 15 あるいは 25 に保つとき , はげしく増殖することがしられた。このことはこの線虫の生態的 , 生理的あるいはそのほかの研究に大いに役立つことができるとおもわれる。

この線虫がスギのこぶ病の原因となんらかの関係があるのか , ただたんにこぶの組織表面に寄生した *Pestalotia* 菌を食って生活しているのかは確かでない。またこの線虫がどのようにして地上数mにあるスギのこぶまで移動するのかなどの興味ある問題については今後の研究にまたねばならない。

Literature Cited

- BYARS , L . P . (1914) . Preliminary notes on the cultivation of the plant parasitic nematode , *Heterodern radicola* . *Phytopath* . 4 , 323-326 .
- CHRISTIE . J . R . and L . CROSSMAN (1936) . Notes on the strawberry strains of the bud and leaf nematode , *Aphelenchoides fragariae* , I . *Proc . Helminth . Soc . Wash* . 3 , 69-72 .

- CHRISTIE, J. R. and C. H. ARNDT (1936). Feeding habits of the nematodes *Aphelenchoides parietum* and *Aphelenchus avenae*. *Phytopath.* **26**, 698-701.
- GUBS, E. F. (1961). *Monograph of Monochaetia and Pestalotia*. 349 p. Harvard University Press.
- ITÔ, K., SHIBUKAWA K. and T. KOBAYASHI (1952). Etiological and pathological studies on the needle blight of *Cryptomeria Japonica* - I. Morphology and pathogenicity of the fungi inhabiting the blighted needles. *Bull. Gov. For. Exp. Sta.* No. 52, 79-152.
- 農林省振興局研究部編 (1960). 線虫研究指針. 110 p.
- TODD, E. H. and J. G. ATKINS, JR. (1952). Laboratory culture of the rice white tip nematode and inoculation studies. *Phytopath.* **42**, 21.
- 横尾多美男 (1959). 土壤線虫 - 生態と防除 - . 541 p. : 明文堂.

S u m m a r y

During a study of the gall of *Cryptomeria japonica* D. Don caused by *Nitschkia tuberculifera* Kusano, a nematode *Aphelenchoides* sp. was observed in the surface tissue of the gall which was infested with *Pestalotia shiraiana* P. Henn.

This experiment was made to determine whether *Aphelenchoides* sp. can be propagated on *P. shiraiana*. The fungus and nematode were collected from the tissue of the gall. The potato-dextrose agar in the petri plates was inoculated with the fungus and the plates were incubated at 25°. Ten days after the incubation (the plates were covered with the mycelial mats) a drop of water was placed on the mycelial mats of each plate, and 10 nonsterilized female nematodes were transferred to this drop by the hand-picked method. Each plate was maintained at constant temperatures of 5°, 15°, 25° and 35°. Three samples from each of the treatments were isolated by Baermann funnel method and a number of nematodes were counted by 1 ml eelworm counting slide at 10 days intervals.

The results of this experiment were following.

- 1) In the incubation temperature of 15° and 25°, 40 and 30 days after inoculation, 10 nematodes were increased over 430,000 and 520,000 in average.
- 2) In the incubation temperature of 5° they were on the slow increase during 50 days and not increased at 35°.
- 3) The optimum temperatures for propagation of *Aphelenchoides* sp. on *Pestalotia shiraiana* were 15° and 25°.