

スギ赤枯病菌 *Cercospora sequoiae* ELLIS et EVERHART の人工

培地上における分生孢子形成に関する研究 (I)

分生孢子的形成に及ぼす培地組成および培養条件

川崎 俊郎⁽¹⁾・西村 鳩子⁽²⁾・陳 野好之⁽³⁾

Toshio KAWASAKI, Hatoko NISHIMURA and Yoshiyuki ZINNO: Conidial Production on Artificial Media by *Cercospora sequoiae* ELLIS et EVERHART
(I) Effect of composition of media and environmental conditions upon sporulation

要 旨: スギ赤枯病の病原菌である *Cercospora sequoiae* ELLIS et EVERHART は人工培地上で分生孢子を形成することが困難であるとされていた。人工接種を行なうためには多量の分生孢子を常時人工培地上に作らせることが必要である。筆者らはいかなる培養条件が本菌の分生孢子形成に必要であるかを知るため実験を行なった。結果を要約すると、(1)赤枯病の菌株には人工培地上で分生孢子を形成しやすいものとそうでないものがあり、今回の実験に使用した菌株のうち C C-42 が特にこの点すぐれている。(2)分生孢子を形成させるための培地組成は、スギ生葉せん汁 (100 g/l) に $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.5 g/l) および V₈ ジュース (20 cc/l) を添加し、pH 5.4 に補正、寒天 2% を加えて作った SMV 培地が最も良好な成績を示した。(3)植付け法としては、ジャガイモ—ぶどう糖寒天培地上に維持培養されているものの菌叢を三角刃で細断し、これに少量の殺菌水を入れ菌糸浮遊液を作り、SMV 培地上に移して余分の水を除く。これを陽光恒温器を使用し $25 \pm 1^\circ C$ で培養することによって多量の分生孢子を形成させることができた。(4)人工培地上に形成される分生孢子的の着生状態は寄主上に形成される場合とやや異なり、顕著な子座および分生子梗は一般に認められない。(5)人工培地 (SMV 培地) 上に形成された分生孢子をスギ苗に人工接種してその病原性を確認した。

緒

言

スギ赤枯病の病原菌 *Cercospora sequoiae* ELLIS et EVERHART* は、他の *Cercospora* 属の菌と同様、野外においては適温、適湿の条件のもとに、春先から晩秋までの間、常時寄主の病患部に無数の分生孢子を形成する。この分生孢子的の飛散によって本病は伝ばされ、スギ苗木で多大の被害を与えている。人工培地上にこの菌の分生孢子を形成させることについては、伊藤ら⁹⁾が温室処理の方法で、分離培養後約 8 か月を経過した古い培養に観察したとの記述があるのみである。

それで、農業でイネのいもち病に対する耐病性品種の育成および防除薬剤の開発に、人工培地上に形成された病原菌 *Piricularia oryzae* CAVARA の分生孢子を用いて接種試験により能率的に研究がすすめられているのに対し、林業においては、スギ赤枯病について同じ目的の研究を行なうのに、試験区の周辺に罹病苗木を植栽し、自然感染による年 1 回の試験を実施しているのが現状である。

野外におけるこの方法は圃場防除試験には必要であるが、薬剤の第一次スクリーニングの方法としては試験地の適、不適、あるいはその年の天候、気象の変化に左右され、常に満足な結果が得られるものとは限ら

* *Cercospora cryptomeria* SHIRAI は *Cercospora sequoiae* ELLIS et EVERHART の異名であることが 1967 年、伊藤ら¹⁰⁾により発表されたので、本報告には 1967 年以前の実験結果も含まれているが、すべて学名を *Cercospora sequoiae* ELLIS et EVERHART とした。

1970 年 6 月 18 日受理

(1) (2) 保護部 (3) 四国支場

ないので、きわめて非能率的である。

そこで筆者らは、スギ赤枯病に対する耐病性品種の選抜、持続性のある防除薬剤の第一次スクリーニングなどを行なうに際し、野外試験に移す前に行なわれる数多くの室内試験において用いうる本病病原菌の分生胞子を人工培地上に形成させる研究を行なった。その結果、この菌の分生胞子を常時形成させる培地組成ならびに培養条件を見いだしたので、その大要を報告する。

本研究を終始ご指導下さった保護部長伊藤一雄博士、樹病科長千葉 修博士、防疫薬剤研究室長慶野金市技官、実験遂行上技術的な面でご助言を賜った樹病研究室の皆様へ謝意を表する。

実験方法および供試菌株

培養実験に使用する菌株は、あらかじめジャガイモ—ぶどう糖寒天培地上で $25^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ の恒温器に約2週間培養したものをを用いた。植えつけの際はこの菌叢を三角刃で細断し、少量の殺菌水を入れ菌糸浮遊液を作り、これを試験培地上に流し余分の水分を除いた。

培養期間中の分生胞子形成の有無を調べるには、生育した菌叢のうち数か所を三角刃で少量取り、顕微鏡下100倍および400倍で観察し、生育している菌糸の状態および分生胞子形成の有無を調べた。本実験ではその数の測定は行なわず、分生胞子数の多少により次のように記載することとした。すなわち、分生胞子を全く形成しないもの(—)、わずかに分生胞子を形成したもの(+), ある程度数多くの分生胞子を形成したもの(++)、(+++)よりもさらに多量の分生胞子を形成したもの(++++)の4段階に区分した。

培地組成は(++++)になるように培地上に生育した菌叢の状態(空中菌糸、栄養菌糸、分生子梗など)をよく観察し、分生胞子形成のために必要な分生子梗の形成量が多くなるように培地組成成分を取捨選択しながら培地を改変して実験をすすめた。なお培地の調製、殺菌などはすべて常法にしたがい、培養温度は $25^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ とし、pHの調整は NaOH で行なった。

供試菌株は 当場樹病科樹病研究室保存の43菌株のうち、採集地のちがひ、分離年度の新旧を考慮し、Table 1に示す5菌株を用いた。培養実験は同一条件で少なくとも2回以上繰返しを行なった。

Table 1. 供 試 菌 株
Data of isolates of the fungus used

菌株番号 Stock No.	採 集 地 Locality	寄 主 Host	分離年月日 Date of isolation
CC—1	東京都目黒区下目黒, 林業試験場構内 Meguro, Tokyo.	4年生苗 4-year-old seedling	Aug. 11 '49
CC—7	山形県最上郡真室川町釜淵, 林業試験場山形分場苗畑 Kamabuchi, Yamagata.	2年生苗 2-year-old seedling	Oct. 25 '50
CC—16	広島県三次宮林署苗畑 Miyoshi, Hiroshima.	2年生苗 2-year-old seedling	Oct. 12 '51
CC—37	東京都八王子市長房町, 林業試験場浅川実験林苗畑 Hachiôji, Tokyo.	2年生苗 2-year-old seedling	Nov. 15 '61
CC—42	岩手県盛岡市下厨川, 林業試験場東北支場苗畑 Morioka, Iwate.	3年生苗 3-year-old seedling	Oct. 17 '63

実 験

1. 天然物せん汁を用いて作成した培地上における分生孢子形成*

Cercospora 属菌の分生孢子形成を目的とした培養試験に関する高井²⁸⁾の総説の中で、比較的一般に用いられている天然物として風乾トウモロコシ、生ニンジンを取り上げ、対照培地として通常使用されるジャガイモ—ぶどう糖寒天培地を用いた。

実験—1

本実験に使用した材料は、新鮮なニンジンおよび風乾トウモロコシ（ともに品種、産地などは不明）である。炭素源としてはグルコース、窒素源としては粉末酵母エキス（大五栄養化学K.K.製）を用いた。培地組成および培養結果は、Table 2～3に示すとおりである。

Table 3から明らかなように、供試菌株のうちCC—42が若干ではあるが分生孢子を形成し、またK—

Table 2. 培 地 組 成
The composition of media for sporulation of the fungus

培 地 Media	組 成 (g/l) Materials	寒 天 Agar	pH
K—1	生ニンジン150gせん汁 fresh carrot decoction: 150g	2%	5.2
K—2	K—1+グルコース10g K—1, glucose: 10g	"	"
K—3	K—1+粉末酵母エキス1.5g K—1, dried extract yeast: 1.5g	"	"
K—4	K—1+グルコース10g+粉末酵母エキス1.5g K—1, glucose: 10g, dried extract yeast: 1.5g	"	"
C—1	風乾トウモロコシ50gせん汁 corn decoction: 50g	"	"
C—2	C—1+グルコース10g C—1, glucose: 10g	"	"
C—3	C—1+粉末酵母エキス1.5g C—1, dried extract yeast: 1.5g	"	"
C—4	C—1+グルコース10g+粉末酵母エキス1.5g C—1, glucose: 10g, dried extract yeast: 1.5g	"	"
PDA	バレイショ200gせん汁+グルコース20g potato decoction: 200g, glucose: 20g	"	"

注) pHは補正しない。 Acidity of media was not adjusted.

Table 3. 各種培地上における分生孢子形成の状態 (培養15日後)
Sporulation of the fungus on various media (15 days after)

菌 株 Stock No.	培 地 Media	K—1	K—2	K—3	K—4	C—1	C—2	C—3	C—4	PDA
CC—1		—	—	—	—	—	—	—	—	—
CC—7		—	—	—	—	—	—	—	—	—
CC—16		—	—	—	—	—	—	—	—	—
CC—37		—	—	—	—	—	—	—	—	—
CC—42		—	—	+	—	—	—	—	+	—

* 結果の概要は日林誌 47: 448～451 (1965)¹¹⁾に報告した。

Table 4. 培地組成および分生胞子の形成 (培養15日後)
Effect of the composition of media on sporulation of the fungus (15 days after)

培 地 Media	組 成 (g/l) Materials	寒 天 Agar	分生胞子の形成 Sporulation of the fungus
C-5-1	風乾トウモロコシ75gせん汁+グルコース10g+粉末酵母エキス1.5g corn decoction: 75 g, glucose: 10 g, dried extract yeast: 1.5 g	2%	+
C-5-2	C-5-1+MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g	"	++
C-5-3	C-5-1+KH ₂ PO ₄ 0.5 g	"	+
C-5-4	C-5-1+MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g + KH ₂ PO ₄ 0.5 g	"	+

注) pHは6.0に補正。 Acidity of media was adjusted to pH 6.0.

3培地とC-4培地が分生胞子形成の可能性のあることを示した。そして、K-3培地とC-4培地の分生胞子形成程度を比較すると、C-4培地の方がやや多い傾向が見られた。ジャガイモ—ぶどう糖寒天培地上では菌糸の生育は非常に良好であるが、分生胞子の形成はまったく見られなかった。

実験—2

実験—1で風乾トウモロコシ煎汁にグルコースおよび粉末酵母エキスを加えたC-4培地上で若干ではあるが分生胞子を形成したので、さらに分生胞子形成に必要と考えられている無機成分のうち、MgSO₄·7H₂OとKH₂PO₄を風乾トウモロコシの量をやや増加した培地に加えて培養実験を行なった。培地組成および培養結果はTable 4に示すとおりである。

Table 4でわかるように、風乾トウモロコシの量をC-4培地より50%増加しても分生胞子形成量には大きな影響を及ぼさないようである。なお、無機成分としてはMgSO₄·7H₂Oを少量添加したものが比較的良好の結果を示した。

実験—3

BERGER & HANSON¹⁾ はクロ—パー、アルファルファの斑点病をひき起こす *Cercospora zebrina* PASSERINI の生育および分生胞子形成に関する研究で、人工培地上に分生胞子を形成させるため、各種組成の培地を用いて培養試験を行ない、V₈ジュース (Cocktail vegetable, Campbell Soup Company 製品) を使用し好結果を得たと報告している。筆者らもこの事例にならい、彼らが用いた組成の培地で実験を行なった結果をTable 5に示す。

Table 5から明らかなように、培養20日目ころからわずかではあるが、分生胞子の形成が見られ、V₈ジュース培地もこの菌の分生胞子形成を促進することが明らかとなった。なお、この培地では菌糸の生育がきわめて旺盛であることが認められた。

Cercospora 属菌はその種のちがいに、分生胞子形成のための培養条件はちがうので、BERGER & HANSON の行なった組成培地がこの菌の分生胞子形成に適していないのは当然かもしれない。そこで、基

Table 5. V₈ジュース培地による培養
Sporulation of the fungus on V₈ juice-agar medium (pH 7.25)

培 地 Medium	培 養 日 数 Period lapsed (day)	5	10	15	20	30
V ₈ ジュース200cc/l + CaCO ₃ 3g/l V ₈ juice: 200cc, CaCO ₃ 3g per l		—	—	—	+	+

Table 6. 培 地 組 成
The composition of media for sporulation of the fungus

培 地 Media	組 成 (g/l) Materials	寒 天 Agar
C-4-M	風乾トウモロコシ50g せん汁+グルコース10g + 粉末酵母エキス1.5g + MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5g corn decoction: 50g, glucose: 10g, dried extract yeast: 1.5g, MgSO ₄ ·7H ₂ O: 0.5g	2%
C-4-M-V ₁	C-4-M + V ₈ ジュース200cc C-4-M, V ₈ juice: 200cc	"
C-4-M-V ₂	C-4-M-V ₁ × $\frac{1}{2}$	"
C-4-M-V ₃	C-4-M-V ₁ × $\frac{1}{5}$	"
C-4-M-V ₄	C-4-M-V ₁ × $\frac{1}{10}$	"

注) $\times \frac{1}{2}$, $\times \frac{1}{5}$, $\times \frac{1}{10}$ は希釈度を示す。
 $\times \frac{1}{2}$, $\times \frac{1}{5}$, $\times \frac{1}{10}$ show the dilute degree.

pHは 6.4に補正。
Acidity of media was adjusted to pH 6.4.

本培地に V₈ジュースを添加する考え方
で実験をすめた。今まで行なった培養
試験結果から培地上に生育する菌叢の発
育状態と分生胞子形成との関係を考える
と、ある程度分生胞子を形成する培地
でも、菌の生育に適量の糖を含有するた
めか、菌糸の生育はきわめて良好なので
あるが、分生子梗の形成はわずかなよう
である。LEONIAN¹⁷⁾ が指摘しているよ

Table 7. C-4-M-V培地上における分生胞子形
成の状態
Sporulation of the fungus on C-4-M-V media

培 地 Media	培養日数 Period lapsed(day)	5	10	15	20
C-4-M		—	—	+	+
C-4-M-V ₁		—	+	+	+
C-4-M-V ₂		—	+	+	+
C-4-M-V ₃		—	+	++	++
C-4-M-V ₄		+	+	++	++

うに培地の含有する糖濃度が菌の生育に要する適量より低いと菌の生育は非常に悪いのであるが、分生胞子
形成には適していることも考えられるので、今までの培養実験の結果、比較的良い培地と考えられるC-4
培地を基本培地とし、これに V₈ジュース および MgSO₄·7H₂O を添加するとともに、この原液を 1/2,
1/5, 1/10に希釈した培地を作り、糖含量の逓減が分生胞子形成におよぼす影響を調べる実験を行なった。
培地組成および培養結果は Table 6~7 に示すとおりである。

Table 7 でわかるように、C-4-M-V₃, C-4-M-V₄培地は、C-4-M-V₁, C-4-M-V₂培地に比較すると明らかに分生胞子形成量が多く見られた (Plate 1, A)。一般的に見て、V₈ジュース
添加の分生胞子形成に及ぼす影響も現われているように思われる。菌の生育状態は分生胞子形成の状態とは
まったく逆で、糖濃度の高いもので菌糸の生育がよく、C-4-M-V₄のように原培地を 1/10に希釈した
ものでは菌叢の生育はきわめて不良であった。

2. 分生胞子の形成と光との関係*

CALPOUZOS & STALLKNECHT^{22, 23, 24)} はサトウダイコン および ホウレンソウの斑点病、褐斑病をひき起こ

* 結果の一部は77回日林大会講 (1966)¹²⁾および78回日林大会講 (1967)¹³⁾に報告した。

す *Cercospora beticola* SACCARDO の人工培地上における分生胞子形成には、太陽光線が影響するところ大であると報告している。筆者らも *Cercospora sequoiae* の培養時における陽光の分生胞子形成におよぼす影響を知るために、次の実験を行なった。この実験では今までの実験結果から良好なものと考えられる C—4—M—V₄ 培地を用いた。

実験—1 明暗の差による分生胞子形成量の比較

実験方法

(1) 接種用分生胞子浮遊液の作成

分生胞子の継続移植により C—4—M—V₄ 培地に培養保存されている C—42 菌株を新しい C—4—M—V₄ 培地に移植し、 $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ に調整した採光恒温器で14日間培養した後、試験管に殺菌蒸留水約5ccを入れ、軽く5～6回振り、分生胞子浮遊液を作る。この分生胞子浮遊液を正確に0.05ccとり、100倍の顕微鏡下でその全数を測定する。この操作は同一材料について3回繰返し行ない、その平均値をとり0.05cc中に含まれている分生胞子の総数とした。かくして分生胞子数のわかっている分生胞子浮遊液を殺菌蒸留水で希釈し、1ccあたり150～200個の胞子数となるように調整した。

(2) 培養法

(1)のようにして作られた分生胞子浮遊液をよく振り、その0.15cc (分生胞子数、25～30個含有) を C—4—M—V₄ 培地の寒天斜面上に、上部から全面に広がるように無菌箱の中で静かに流し込む。流し終わったら液が流動しないようにいねいに取り扱い、比較的明るい部屋の窓ぎわに設置された陽光恒温器 (コイト

トロン, K B—II) 中に寒天斜面が水平になるように静置した。陽光恒温器は $24^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ に調整した。

培養期間中陽光の分生胞子形成に及ぼす影響を知るため、全培養試験管を明暗2つのグループに分け、暗グループは黒紙をもって完全におおい、まったく光を遮断し、明グループはそのままとした。測定時における培養試験管の数は各グループとも3本を1区とした。この場合、各試験管に接種した分生胞子数は必ずしも一定しないので、培養3～4日後、試験管寒天斜面上に生育した菌叢数を数え、測定時に使用する試験管3本の菌叢数の合計がほぼ同数となるように各グループとも、それぞれ5つの区に区分した。

(3) 形成された分生胞子数の測定法

分生胞子数は培養7、14、21、28、35日後の5回測定した。分生胞子数の測定法は、試験管内に少量の水を加え、菌叢の表面を三角刃で軽くかき、激しく振とうする程度では、

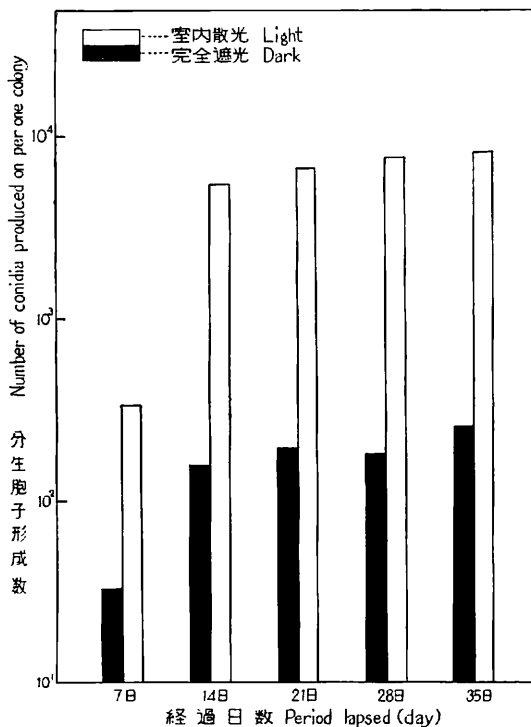


Fig. 1 菌叢1個あたりの形成分生胞子数
Number of conidia of the fungus produced on per one colony.

形成されたすべてのものを完全に水中に脱落させることができないので、本実験では次の方法によった。すなわち、試験管内寒天斜面上に生育している菌叢をすべて三角刀を用いてはがし取り、ホモジナイザー（1分間、16,500回転）のガラスチューブに入れ、これに10ccの蒸留水を加え、5分間処理し、分生孢子と菌糸細片の混在する浮遊液を作る。この液を適当に希釈し、その0.05ccを取り、100倍の顕微鏡下で3回繰り返し全孢子数を測定し、その平均値を求め、希釈倍率を乗じて原液中に含まれている分生孢子数の総数を算出した。なおこの実験は4回繰り返し実施し、その結果は Fig. 1 に示すとおりである。

Fig. 1 から知られるように、分生孢子が形成されはじめるのは培養開始後7日目ごろからで、14日目ごろにはその数は急激に増加し、28日目ごろにピークに達するものようである。

明、暗処理による差はきわめて顕著で、7日目では明グループは暗グループの約10倍、14日目以降は約35～40倍に達している。

実験—2 陽光下における各種培地上の分生孢子の形成

実験—1により培養条件の一つとして、培養時における明、暗の差が分生孢子形成量に大きな影響を与えていることが明らかとなったので、1の項で行なった培養実験の培地を再検討するとともに、2、3の培地について、陽光恒温器（コイトロン、KB—II）による培養実験を行なった。

a) ジャガイモ—ぶどう糖培地

1の項で行なった実験結果では、植物病原菌の培養に広く用いられるジャガイモ—ぶどう糖寒天培地上ではまったくこの菌は分生孢子の形成が見られなかったのである。しかし培養条件を変え、陽光恒温器を用いて培養するといかなる結果を示すかを知るため、培地希釈による糖濃度通減の手法を取り入れてふたび実験を行なった。培地組成および培養結果は Table 8 に示すとおりである。

Table 8 に示されるように、陽光恒温器で培養すると、ジャガイモ—ぶどう糖寒天培地上でもわずかなはあるが、分生孢子を形成し、培地の含有する糖濃度が低くなると分生孢子形成量は多くなる。ジャガイモ—ぶどう糖寒天培地を1/10に希釈し、この培地1 l に対しV₈ジュース、20ccの割合で添加したものはさらによい結果を示し、分生孢子形成の状態が比較的長く持続されているようである。

b) スギ生葉せん汁培地

人工培地上に植物病原菌を培養して分生孢子を形成させるため、しばしば寄主植物の茎、葉せん汁を使用することはよく知られている。筆者らもこれにならってスギ生葉せん汁を主体とした培地を作り、この菌の培養実験を行なった。培地組成および培養結果は Table 9 に示すとおりである。

Table 8. 各種濃度のジャガイモ—ぶどう糖寒天培地上における分生孢子の形成
Sporulation of the fungus on various concentrations of potato-dextrose agar media

培 地 Media	培 養 日 数 Period lapsed (day)	6	11	14	20	28	35
P—1*		—	—	—	+	+	+
P—2*		—	+	+	+	+	+
P—5*		+	+	+	+	+	+
P—10*		+	+	+	+	+	+
P—20*		+	++	++	++	+	+
P—10*—V ₈ 20cc/l		+	++	++	++	++	++
C—4—M—V ₈		++	++	++	++	++	++

* は希釈倍率を示す。 Show the dilute degree.

Table 9. スギ生葉せん汁培地における分生胞子形成
Sporulation of the fungus on *Cryptomeria*-needles decoction agar

培地 Media	組 成 (g/l) Materials	培 養 日 数 Period lapsed (day)					
		5	7	10	13	16	30
S-1	スギ生葉100gせん汁 <i>Cryptomeria</i> -needle decoction: 100g agar: 2%	+	+	+	+	+	+
S-2	S-1+ グルコース10g + 粉末酵母エキス1.5g + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g S-1, glucose: 10g, dried extract yeast: 1.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.5g agar: 2%	-	+	+	+	+	+
S-3	S-2+ V_8 ジュース20cc S-2, V_8 juice: 20cc, agar: 2%	+	+	+	+	++	++
S-4	S-1+ V_8 ジュース20cc S-1, V_8 juice: 20cc, agar: 2%	-	+	+	+	+	++
S-5	S-1+ V_8 ジュース200cc S-1, V_8 juice: 200cc, agar: 2%	-	+	+	+	+	+
S-6 (SMV)	S-1+ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g + V_8 ジュース20cc S-1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.5g, V_8 juice: 20cc, agar: 2%	+	+	++	++	+++	+++

注) pHは5.4に補正。 Acidity of media was adjusted to pH 5.4.

Table 10. 合成培地上における分生胞子形成の状態
Sporulation of the fungus on synthetic media

培地 Media	培養日数 Period lapsed (day)	5	7	10	14	21	28	35
CD-1*		-	-	-	+	+	+	+
CD-5*		-	-	+	+	+	+	+
CD-10*		-	+	+	+	+	+	+
CD-20*		-	+	+	+	+	+	+
CD-30*		-	+	+	+	+	+	+
Ri-1*		-	-	-	-	+	+	+
Ri-10*		-	-	+	+	+	+	+
Ri-20*		-	-	-	-	+	+	+
Ri-50*		-	+	+	+	+	+	+
C-4-M-V ₄		+	+	++	++	++	++	++

注) CD.....Czapek 寒天培地 Czapek agar medium. pHは補正しない。

Ri.....Richards 寒天培地 Richards agar medium. Acidity of media was not adjusted.

*は希釈倍率を示す。 Show the dilute degree. 寒天 2% Agar 2%

Table 9からわかることは、スギ生葉せん汁のみで作った培地でも、この菌はわずかに生育し、若干ではあるが分生胞子を形成する。これにグルコース、粉末酵母エキス、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を添加したS-2培地はC-4-M-V₄培地にはおよばないが、スギ生葉煎汁のみで作ったS-1培地よりかなり多くの分生胞子を形成する。S-2培地に V_8 ジュースを1/1に対して20ccの割合で添加したS-3培地は、C-4-M-V₄培地には及ばないが相当量の分生胞子を形成する。また、スギ生葉煎汁にグルコース、粉末酵母エキスを添加することを止め、菌の生育に不適当な栄養状態とし、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ と V_8 ジュースのみを添加したS-6 (SMV) 培地では、菌の生育は悪いが多量の分生胞子を比較的長期にわたって形成した。

(Plate 1-B)

c) 合成培地

Cercospora 属菌は一般に合成培地上でも生育するが、分生胞子の形成は困難なものとなっている。そし

て、本菌の合成培地上での生育については、いまだ十分に検討されていない。それで、筆者らは従来糸状菌の培地として使用されている Czapek 培地および Richards 培地を用い、これまでの実験結果から明らかにされた培地含有の糖濃度軽減の方法、および陽光恒温器による培養法を併用して実験を行なった結果を Table 10 に示す。

Table 10 から知られたことは、陽光恒温器内で培養すると、本菌は培地の糖濃度のいかにかわらず合成培地上でも若干ではあるが分生孢子を形成する。この場合も今までの他の培地による培養実験と同様、培地の糖濃度が低くなるにしたがって菌の生育は悪くなるが、分生孢子的形成量は増加する傾向が見られる。天然物せん汁を用いて作った培地とちがうことは、分生孢子が形成しはじめてから短期間のうちにその形成を止め、培養日数の経過にともない必ずしも分生孢子数は増加しないことである。

3. 培地上に形成された分生孢子的の病原性

人工培地上に形成された本菌の分生孢子がどの程度の病原性を持っているかを知るため、スギ実生2年生鉢植え苗を用いて接種試験を行なった。

試 験 法

(1) 接種用分生孢子浮遊液の作成

SMV 培地、4 代目、10～12 日培養の菌を 5℃～10℃ の冷暗所に 2 日間放置し、のち培養試験管 1 本に約 5 cc の殺菌蒸留水を入れ軽く 5～6 回振り、そのまま約 15 時間 10℃～15℃ の室内に静置する。次に菌叢の菌糸が脱落しないように軽く 5～6 回振とうする。このようにすると、比較的多くの分生孢子は水中に脱落し、1 cc あたり 16,000～20,000 個の分生孢子を含む液を作ることができる。

(2) 接種法および接種後の苗木の管理

供試スギ2年生実生苗木は、あらかじめ径 11 cm の素焼鉢に 4～5 本植えとする。接種の際、供試苗木は殺菌蒸留水を用いてよく洗い、次に分生孢子浮遊液を苗木が完全にぬれるよう噴霧接種する。接種の終わった苗木は、温度 $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、関係湿度 80% 以上に保たれている恒温陽光恒温器 (コイトロン、3 S—135 A) に入れる。この際、供試苗木鉢は水を十分入れた大型シャーレに入れ、はじめの 2 日間は黒色に塗った大型ガラスポットで完全におおい、関係湿度 100% に近い状態の中に置き、次の 5 日間はおおったガラスポットをわずかに引き上げ、その下部がシャーレの水面よりもやや上になるようにし、カバー内の空気の流通を良くする。7 日後はガラスポットのカバーを取り去り、そのまま恒温陽光恒温器中に放置した。その結果、接種後 17 日目ごろから供試苗木の茎葉上に病斑が現われ始め、病斑部には明らかに本病原菌の子座を認めることができた。以上の実験結果から人工培地 (SMV 培地) 上に形成された C C—42 菌株の分生孢子的は病原性を保有していることが確認された。

考 察

一般に糸状菌の人工培地上における分生孢子形成のための条件は大別して、(1) 培養温度、(2) 関係湿度、(3) 通気、(4) 培養基の組成および水素イオン濃度、(5) 光、(6) 環境条件の相互作用¹⁹⁾ の 6 つをあげることができる。Cercospora 属に限らず、植物病原菌のなかには人工培地上でよく生育はするが、孢子は形成されないか、あるいは形成されにくい菌は数多く知られている。そして、これらの菌について人工培地上に孢子を形成させようと試みた研究もまた多数報告されている。しかし、菌の属あるいは種のちがいに、その条件が違っており、すべてのものに共通する普遍的なものはない。

Cercospora 属菌を人工培地上に培養して分生胞子を形成させるためには、培地組成の差によってその形成の有無は大きく左右されることはもちろんであるが、培養時の温度、湿度、光などの物理的条件もまた重要な要因になっていることは既往の研究^{5) ~ 9) 14) ~ 16) 18) 20) ~ 27) 29)} から明らかである。

筆者らは伊藤ら⁹⁾の培養実験結果から得られた好適培地 pH、培養温度を足がかりとして行なった一連の実験によって相当量の分生胞子を常時短期間のうちに形成する培地組成および培養条件を明らかにすることができた。その形成量の多少を別にすれば、ジャガイモ—ぶどう糖寒天、トウモロコシ煎汁寒天、スギ生葉せん汁寒天、Czapek 寒天、Richards 寒天のいずれの場合でも、その含糖濃度を低くし、陽光をあて、25°Cで培養することによって胞子形成が認められ、それらのうち最も重要な要因として培養時の太陽光線の影響があげられる。

菌の生育を栄養面から考えた場合、本菌はスギ茎葉に寄生することからみても、その生育にはそれほど高濃度の炭素源、窒素源を必要とするとは考えられず、人工培地の含有する糖濃度が極端に低い方が菌の栄養成長を短期間に終了させ、分生胞子形成という生殖生理へ移行するといえよう。

植物病原菌が寄主に多量の胞子を形成するのは、野外における昼夜間の温度較差、空気中の関係湿度の変化や、菌の生育にとってはむしろ阻害的に働く紫外線を含む太陽光線の照射など複雑な環境条件によるものと考えられる。そこで、実験室内で本菌の分生胞子を形成させる培養法については、野外の環境条件をできるだけ再現することが必要であろう。

文 献

- 1) BERGER, R. D. and E. W. HANSON : Relation of environment factors to growth and sporulation of *Cercospora zebrina*. *Phytopath.*, 53, p. 286, (1963)
- 2) CALPOUZOS, L. and G. F. STALLKNECHT : Sporulation of *Cercospora beticola* affected by an interaction between light and temperature. *Phytopath.*, 55, 1370~1371, (1965)
- 3) ——— and ——— : Phototropism by Conidiophores of *Cercospora beticola*. *Phytopath.*, 56, 702~704, (1966)
- 4) ——— and ——— : Effect of light on sporulation of *Cercospora beticola*. *Phytopath.*, 57, 679~681, (1967)
- 5) LEACH Charles M. : Ultraviolet-absorbing substances associated with light induced sporulation in fungi. *Can. J. Botany*, 43, 185~200, (1965)
- 6) DIACHUN, S. and W. D. VALLEAU : Conidial production in culture by *Cercospora nicotiana*. *Phytopath.*, 31, 97~98, (1941)
- 7) ITÔ, K. and Y. HOSAKA : Notes on some leaf-spot of plane trees. *Bull. Gov. For. Exp. Sta.*, 46, 17~32, (1950)
- 8) 伊藤一雄・波川浩三・小林孝夫 : スギ赤枯病に関する病原学的並に病理学的研究(I), 林試研報, 52, 79~152, (1952)
- 9) 伊藤一雄・波川浩三・寺下隆喜代 : スギ赤枯病に関する病原学的並に病理学的研究(II), 林試研報, 76, 27~60, (1954)
- 10) ITÔ, K., T. KOBAYASHI and K. SHIBUKAWA : A comparison between *Cercospora cryptomeriae* SHIRAI and *Cercospora sequoiae* ELLIS et EVERHART. *Bull. Gov. For. Exp. Sta.*, 204, 73~90, (1967)
- 11) 川崎俊郎・西村鳩子・陳野好之 : スギ赤枯病菌 *Cercospora cryptomeriae* SHIRAI の胞子形成培地について (予報), 日林誌, 47, 448~451, (1965)

- 12) 川崎俊郎・西村鳩子・陳野好之：スギ赤枯病菌の人工培地上における分生孢子形成に関する研究(第2報), 日林講, 77, 293~295, (1966)
- 13) 川崎俊郎・西村鳩子：*Cercospora cryptomeriae* SHIRAI の Sporulation media に関する研究(Ⅲ), 日林講, 78, 208~209, (1967)
- 14) KILPATRICK, R. A. and H. W. JOHNSON : Sporulation of *Cercospora* species on carrot leaf decoction agar. *Phytopath.*, 46, 180~181, (1956)
- 15) 清原友也・徳重陽山：マツ葉枯病菌 *Cercospora pini-densiflorae* HORI et NAMBU とスギ赤枯病菌 *Cercospora sequoiae* ELLIS et EVERHART の培地上孢子形成(Ⅰ), 日林誌, 51, 98~101, (1969)
- 16) LANDERS, K. E. : Growth of *Cercospora arachidicola* in glucose-phosphate-asparagine thiamine agar medium. *Phytopath.*, 54, p. 1236, (1964)
- 17) LEONIAN, L. H. : A study of factors promoting pycnidium-formation in some *Sphaeropsidales*. *Am. Jour. Bot.*, 9, 19~50, (1924)
- 18) LEWIS, R. W. : A method of inducing spore production by *Cercospora apii* FRIES in pure culture. *Phytopath.*, 30, p. 623, (1940)
- 19) HAWKER Lilian E. : The physiology of reproduction in fungi. Cambridge University press, 128 pp., (1957)
- 20) MILLER, J. W. : Cultural conditions affecting sporulation of *Cercospora gossypina*. *Phytopath.*, 59, p. 511, (1969)
- 21) 内藤中人・高原 弘：*Cercospora beticola* の培地上における孢子形成並びに孢子形態に及ぼす2, 3の要因について, 香川大学術報告, 6, 283~288, (1955)
- 22) NAGEL, C. M. : Conidial production in species of *Cercospora* in pure culture. *Phytopath.*, 24, pp. 1101~1110, (1934)
- 23) NAGEL, C. M. and S. M. DIETZ : Sporulation of five species of *Cercospora* in pure culture (Abst.). *Phytopath.*, 27, p. 22, (1937)
- 24) 酒井隆太郎：馬鈴薯疫病菌の培養に関する栄養生理学的研究, 北海道農試報, 57, (昭・36)
- 25) 桜井 寿：テンサイ褐斑病菌の孢子形成について, 日本植物病理学会秋季関東部会, (昭・39, 1964)
- 26) STAVELY, J. R. and NIMMO Jocye A. : Relation of pH and nutrition to growth and sporulation of *Cercospora nicotianae*. *Phytopath.*, 58, 1372~1376, (1968)
- 27) ——— and ——— : Effect of temperature upon growth and sporulation of *Cercospora nicotianae*. *Phytopath.*, 59, 496~498, (1969)
- 28) 高井省三：*Cercospora* 属菌の分生孢子形成に関与する諸因子, 日林誌, 42, 29~35, (1960)
- 29) 柄内吉彦・竹内昭士郎：甜菜褐斑病の孢子形成促進物質について, 日植病報, 17, p. 186, (1953)

図 版 説 明
(Explanation of plates)

Plate 1

人工培地上に形成された *Cercospora sequoiae* ELLIS et EVERHART の分生孢子
Conidia of *Cercospora sequoiae* ELLIS et EVERHART produced on artificial media.

- A. C-4-M-V₄培地上に形成された正常型分生孢子
Normal type conidia produced on C-4-M-V₄ medium. ×400
- B. SMV培地上に形成された正常型, 耐久型分生孢子
Normal and abnormal (Dauerform) type conidia produced on SMV medium. ×600
- C. D. 菌濃上に形成されている分生子梗および分生孢子
Conidiophores and conidia produced on the surface of colonies cultured on SMV me-

dium. $\times 100$

E. F. 菌叢上に形成された分生胞子の着生状態

Conidial formation at the apical parts of hyphae (conidiophores) on C-4-M-V,
medium. $\times 100$

Plate 2

培地に形成された分生胞子による人工接種試験

Results of artificial inoculation with conidia produced on the medium to 2-year-old
Cryptomeria seedlings.

A. 接種後20日 20 days after inoculation.

B. 接種後40日 40 days after inoculation.

Conidial Production on Artificial Media by *Cercospora sequoiae*

ELLIS et EVERHART

I. Effect of composition of media and environmental conditions upon sporulation

Toshio KAWASAKI,⁽¹⁾ Hatoko NISHIMURA⁽²⁾ and Yoshiyuki ZINNO⁽³⁾

Summary

It is well known that many species of *Cercospora* scarcely produce conidia in culturing on artificial media. This is true of *Cercospora sequoiae* ELLIS et EVERHART, the causal fungus of the blight and canker of *Cryptomeria japonica* D. DON. There are no reports concerning the reproduction of this fungus on artificial media, though an abundant supply of conidia is desired for many kinds of inoculation experiments. Studies were undertaken to ascertain what cultural conditions affect the sporulation of the fungus on artificial media.

Among many kinds of artificial media tested, the most favorable one for conidial production was SMV-agar medium; decoction of young leaves of host plant "Sugi" (100g/l), V₈-juice (20g/l), and MgSO₄·7H₂O (0.5g/l) (Table 9).

The influence of daylight for conidial production was tested by using a growth cabinet (Koitozon KB-II), and it was confirmed that daylight was an important factor for sporulation of the fungus (Fig. 1).

The conidia produced on artificial media was similar in shape and size to those on lesions under natural conditions, although there were variances in the ability of conidial production among many isolates of the fungus (Table 3).

Pathogenicity of the conidia obtained was tested by spraying of spore suspension on 2-year-old seedlings of "Sugi", *Cryptomeria japonica* D. DON. As shown in Plate 2, the lesions were produced on the needles after about 17 days.

Received June 18, 1970

(1) (2) Forest Protection Division (3) Shikoku Branch Station

