

## カラマツ先枯病菌の培地上における胞子形成

伊藤 一雄<sup>(1)</sup>・林 弘子<sup>(2)</sup>Kazuo Itô and Hiroko Hayashi: Sporulation of *Guignardia laricina*  
(SAWADA) YAMAMOTO et K. Ito on artificial culture media

要 旨: 本菌の培地上における胞子(柄胞子)形成の良否は菌株によっていちじるしい相違があり, 供試 42 菌株中胞子形成が認められるものはわずかに 15 菌株にすぎず, これらの中にも形成程度に大きな差があり, また胞子形成の適温にも菌株によって高低が認められる。したがって, 多量の胞子を得るためには使用菌株の選択がまず第一に重要なことである。

用いる培地としては原・伊藤培地で所期の目的が達せられて, 1 試験管斜面培地当たり  $10^4 \sim 10^6$  の胞子を得られ, この培地にカラマツ枝葉熱湯抽出物や V<sub>8</sub> ジュースを添加しても胞子形成量は増加することなく, むしろ菌糸の生育が盛んになることと対照的に胞子形成は不良になる。そして, 培地上に形成された胞子を接種源として培地に移植し, それぞれの菌株の適温 ( $15^\circ \sim 20^\circ \text{C}$  あるいは  $20^\circ \sim 25^\circ \text{C}$ ) で 2 週間培養することによって常に多量の胞子を形成させることができる。

本菌の場合, 変温処理あるいは光線の有無は胞子形成に影響を及ぼすことはないようであるが, ただ接種源菌叢を 2~3 週間低温 ( $0^\circ \text{C}$ ) 処理することは, その後の胞子形成を促進する場合があるらしい。

接種源として胞子を用いれば常に多量の胞子が形成されるが, 胞子形成が普通見られないジャガイモ寒天培地に長期間培養した老成菌叢を接種源とした場合には通常胞子形成は認められない。このような, いったん胞子形成能力を失った菌糸から, ふたたびおう盛な胞子形成をもたらすには特殊な培養法を必要とする。すなわち, 菌糸を原・伊藤培地に移植,  $25^\circ \text{C}$  で数週間培養して生じた菌叢の気中菌糸を除き, 下方の固い菌叢をひっかいてその一部を培地に移植, これを数回くり返す。やがて菌叢に柄子殻状菌糸塊が生じたら, これを細かく粉状にして新たな培地の全面に塗りつけるように移植することを数回くり返し, 菌叢にかなりの量の柄子殻・胞子が形成されたら, 胞子浮游液を作り, これを用いて次の移植を行ない,  $15^\circ \text{C}$  で 2 週間培養し, 基面に形成された胞子によってこれを数回くりかえす, 継続移植培養法によってふたたびおう盛な胞子形成能力を回復させることができる。

## 緒 言

カラマツ先枯病菌 *Guignardia laricina* (SAWADA) YAMAMOTO et K. ITO (Syn. *Physalospora laricina* SAWADA) は寄主上に子囊殻世代のほか柄子殻世代 *Macrophoma* を有すものである (魚住 1961<sup>8)</sup>, 伊藤 1963<sup>9)</sup>)。本病は子囊胞子および柄胞子によって伝播するものであるから, 人工接種試験および防除薬剤のスクリーニング・テストなどには胞子によるのが最も自然であることはいうまでもない。しかし, 本菌は一般に人工培地上における胞子形成がきわめて不良な菌類に属し, 魚住 (1961)<sup>8)</sup> は齊藤氏しょう油寒天およびジャガイモ寒天上で約 60 日後に子囊胞子を, また横田 (1962)<sup>9)</sup> も同じ培地上で 1~2 の菌株に限って柄胞子の形成を報じているが, いずれもごく少量にすぎなかったようである。

本病に関する諸種の実験を能率的に遂行するには, 欲する時に, 欲する量の胞子を得られることが望ましく, この目的のために胞子(柄胞子)を多量に形成する人工培地の組成が検討され, ごく限られた菌株

1970年10月20日受理

(1) (2) 林業試験場保護部

Table 1. 供試菌株記録一覧表  
Data of stock cultures of *Guignardia laricina* used in the study

| 菌株番号<br>Stock No. | 寄主<br>Host            | 採集地<br>Locality | 分離源<br>Source of isolation | 分離年月日<br>Date of isolation | 備考<br>Remark   |
|-------------------|-----------------------|-----------------|----------------------------|----------------------------|----------------|
| GM-5              | ニホンカラマツ<br>(造林木)      | 宮城県玉造郡鳴子町       | 子嚢胞子                       | VII-29 '58                 |                |
| " - 6             | " ( " )               | 北海道函館営林署管内      | "                          | V-6 '59                    |                |
| " - 7             | " (防風林)               | 秋田市外豊島          | "                          | V-6 '59                    |                |
| " - 8             | " (3年生)               | 青森県野辺地町         | "                          | V-24 '61                   |                |
| " - 9             | " (4年生)               | "               | "                          | VII-1 '61                  | 東北支場分離         |
| " -10             | " (8年生)               | 岩手県二戸郡小繋        | 柄胞子                        | VII-26 '61                 | "              |
| " -11             | オウシュウカラマツ<br>(2年生)    | 盛岡市下厨川          | "                          | IX-1 '61                   | "              |
| " -12             | ニホンカラマツ<br>(造林木)      | 北海道白老営林署管内      | 子嚢胞子                       | XII-15 '59                 | =KPS43-21 (横田) |
| " -13             | " ( " )               | 北海道倶知安林務署管内     | "                          | III-7 '60                  | =SPS-5 ( " )   |
| " -14             | チウセンカラマツ<br>( " )     | "               | "                          | VII-13 '60                 | =Lks-2 ( " )   |
| " -15             | グイマツ ( " )            | "               | "                          | VII-13 '60                 | =LGs-4 ( " )   |
| " -16             | オウシュウカラマツ<br>(5年生)    | 北海道美唄市光珠内       | 柄胞子                        | IX-27 '60                  | =Lds-8 ( " )   |
| " -18             | グイマツ (2年生)            | 北海道天塩営林署管内      | "                          | IX-26 '60                  | =TMS-4 ( " )   |
| " -19             | ニホンカラマツ<br>(造林木)      | 北海道様似60林班       | 病組織                        | III-22 '61                 | =Sa-6C ( " )   |
| " -20             | " ( " )               | 宮城県玉造郡鳴子町       | 柄胞子                        | VII-8 '58                  |                |
| " -21             | " ( " )               | 北海道函館営林署管内      | "                          | V-6 '59                    |                |
| " -22             | " ( " )               | " 苫小牧営林署管内      | —                          | XI-9 '61                   | IM-1 (横田)      |
| " -23             | "                     | "               | 柄胞子                        | X-30 '61                   | 北海道支場分離        |
| " -24             | "                     | "               | 子嚢胞子                       | "                          | "              |
| " -25             | "                     | "               | —                          | "                          | "              |
| " -26             | "                     | 福島県田村郡常葉町国有林    | 柄胞子                        | X-4 '63                    |                |
| " -27             | "                     | " 信夫郡吾妻村高津森山    | 子嚢胞子                       | X-28 '63                   |                |
| " -28             | " (4年生)               | 北海道白老営林署虎杖浜     | 病組織                        | XII-2 '59                  | =K31-02 (横田)   |
| " -29             | " (7年生)               | 岩手県岩手郡岩手町県行造林地  | 柄胞子                        | VIII-5 '65                 | 東北支場 No. GI-20 |
| " -31             | オウシュウカラマツ<br>(8年生)    | 盛岡市下厨川東北支場第二苗畑  | "                          | VIII-18 '65                | " -22          |
| " -32             | ニホンカラマツ<br>(15年生)     | 岩手県二戸郡松尾村竜ヶ森    | "                          | "                          | " -23          |
| " -33             | オウシュウカラマツ<br>(7年生)    | 盛岡市下厨川東北支場      | 柄胞子                        | VIII-18 '65                | " -25          |
| " -34             | ニホンカラマツ<br>(4年生)      | 岩手県二戸郡安代町安比     | "                          | VIII-28 '65                | " -26          |
| " -35             | アメリカカラマツ<br>(7年生)     | 盛岡市下厨川東北支場      | "                          | VIII-18 '65                | " -72          |
| " -36             | グイマツ×ニホンカラマツ<br>(3年生) | "               | "                          | "                          | " -29          |
| " -37             | ニホンカラマツ<br>(2年生)      | 福島県石城郡三和村三阪     | 子嚢胞子                       | X-7 '65                    |                |
| " -38             | "                     | 福島県相馬郡浪江町       | "                          | "                          |                |

| 菌株番号<br>Stock<br>No. | 寄 主<br>Host       | 採 集 地<br>Locality   | 分 離 源<br>Source of<br>isolation | 分離年月日<br>Date of<br>isolation | 備 考<br>Remark  |
|----------------------|-------------------|---------------------|---------------------------------|-------------------------------|----------------|
| " -39                | ニホンカラマツ<br>(12年生) | 福島県猪苗代町長坂           | 子嚢胞子                            | X-7 '65                       |                |
| " -40                | " (昭.35年<br>植 栽)  | 北海道室蘭営林署 386 林<br>班 | "                               | IX-16 '65                     | 北海道支場 No. NG-1 |
| " -41                | " (昭.35年<br>春 植)  | "                   | "                               | "                             | " -4           |
| " -42                | "                 | 福島県郡山市湖南町           | "                               | III-12 '66                    |                |
| " -43                | " (2 年生)          | 北海道岩内郡岩内営林署<br>発足苗畑 | "                               | X-15 '66                      |                |
| " -44                | " (5 年生)          | 新潟県岩船郡朝日村布部         | 柄 胞 子                           | IX-24 '66                     |                |
| " -45                | " (9 年生)          | 栃木県那須郡那須町大島<br>国有林  | 子嚢胞子                            | VII-23 '69                    |                |
| " -46                | " ( " )           | "                   | "                               | "                             |                |
| " -47                | "                 | 福島県福島市大笹生組板<br>山    | 病 組 織                           | VIII-1 '69                    |                |
| " -48                | オウシュウカラマツ         | 長野県小諸市出水林木育<br>種場   | 子嚢胞子                            | VIII-18 '69                   |                |

についてではあるが、まずまず満足すべき結果が得られた (原・伊藤 1963<sup>1)</sup>)。

この培地は原・伊藤培地 (以下 HIA) とよばれ、次の組成を有する。

|                                             |        |
|---------------------------------------------|--------|
| 粉末酵母エキス (大五栄養化学 K K).....                   | 3 g    |
| 可溶性デンプン .....                               | 10 g   |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O ..... | 0.25 g |
| 寒 天 (日本海藻工業 K K).....                       | 15 g   |
| 蒸 留 水 .....                                 | 1 l    |

pH 7.0 に補正

ところがその後、特定の菌株を HIA に移植した場合、いつでも同一程度に胞子が形成されるとは限らず、時によりまた人によりその形成量にはなほだしい差が生じ、極端な場合には胞子形成がほとんど全く見られないことすらあるといわれた。それで、改めて本菌の培地上における胞子形成条件についてくわしく検討を加え、常に所期の好結果が得られる培養方法を明らかにし、また胞子の形成が全く見られなくなった古い培養菌系から、限られた菌株ながら多量の胞子が得られ、さらにかつては培地に胞子を形成しないとされた菌株のいくつかについても、多量の胞子を形成させることが可能になったので、ここにその実験の概要を報告する。

本研究を行なうにあたり、本菌の貴重な培養菌株を提供された北海道支場樹病研究室長横田俊一博士および東北支場樹病研究室長佐藤邦彦博士ならびに同研究室員各位に謝意を表す。

#### 本研究に用いた培養菌株

供試菌株の記録は Table 1 にしめすとおりである。

なお、原・伊藤 (1963)<sup>1)</sup> は GM-5~GM-19 の 15 菌株を供試し、これらのうち GM-8 および GM-11 の 2 菌株に胞子形成を認め、GM-8 が GM-11 よりも胞子形成能力がすぐれているとして、GM-8 について定量的実験を行なっている。

胞子形成に及ぼすカラマツ枝葉抽出液の影響

HIA にカラマツ枝葉抽出液を添加することが胞子形成を良好にするかどうかを知るために次の実験を行った。

Table 2. カラマツ枝葉抽出液加用培地の組成  
Compositions of HARA-Ito's agar containing various amounts of larch-shoot decoction

| 成分<br>Element                         | 培地<br>Agar medium | 0    | I    | II   | III  |
|---------------------------------------|-------------------|------|------|------|------|
| 粉末酵母エキス                               |                   | 3 g  | 3 g  | 3 g  | 3 g  |
| 可溶性デンプン                               |                   | 10   | 10   | 10   | 10   |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O |                   | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| 寒天                                    |                   | 15   | 20   | 20   | 20   |
| 蒸留水                                   |                   | 1000 | 900  | 700  | 500  |
| カラマツ枝葉抽出液                             |                   | 0    | 100  | 300  | 500  |

pH.....7.0

Table 3. 胞子形成に及ぼすカラマツ枝葉抽出液の影響—1  
Effect of larch-shoot decoction on sporulation of the fungus—1

| 菌株<br>Stock No. | 培地<br>Medium | 菌叢<br>Macroscopic appearance of colony | 柄子殻形成<br>Degree of pycnidium production |
|-----------------|--------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|
| GM-8            | 0            | 全面に発育，気中菌糸白色で少ない                       | 卅                                       |
|                 | I            | 0よりも発育良好                               | 卅                                       |
|                 | II           | 発育はさらに良好で，気中菌糸が多量                      | +                                       |
|                 | III          | 〃                                      | +                                       |
| GM-11           | 0            | 菌叢灰色，直径25~35mm，気中菌糸は短い                 | 卅                                       |
|                 | I            | 〃 気中菌糸はやや長い                            | ++                                      |
|                 | II           | 〃                                      | +                                       |
|                 | III          | 〃 気中菌糸はさらに長い                           | +                                       |

Table 4. 胞子形成に及ぼすカラマツ枝葉抽出液の影響—2  
Effect of larch-shoot decoction on sporulation of the fungus—2

| 菌株<br>Stock No. | 温度<br>Temperature (°C) | 培地<br>Medium | 柄子殻形成<br>Degree of pycnidium production |
|-----------------|------------------------|--------------|-----------------------------------------|
| GM-8            | 27                     | 0            | 卅                                       |
|                 |                        | I            | 卅                                       |
|                 |                        | II           | 卅                                       |
|                 |                        | III          | 卅                                       |
|                 | 20                     | 0            | 卅                                       |
|                 |                        | I            | ++                                      |
|                 |                        | II           | +                                       |
|                 |                        | III          | +                                       |

供試菌株 GM-8, GM-11

実験方法 針葉がついたままのカラマツ小枝 100 g を細かくきざみ、これを熱湯 1 l 中に投げ、その後は冷却するにまかせて 24 時間放置して抽出液 (pH 4.4) を得た。この抽出液を Table 2 にしめすとおり HIA に添加し、試験管斜面培地とする。

各菌株の HIA 上菌叢の小片を各斜面培地に移植し、2 週間、27°C あるいは 20°C にそれぞれ保つ。

実験結果 2 回の実験結果は Table 3~4 にしめすとおり、添加抽出液量が多くなれば菌糸の発育が良好になる反面、孢子形成は不良になる傾向が見られ、カラマツ枝葉抽出物を添加することによって孢子形成が促進される現象は認められなかった。

### V<sub>8</sub> 培地上における孢子形成

諸種の菌類の孢子形成培地として 賞用されている V<sub>8</sub> ジュース (Cocktail vegetable juice, Campbell Soup, Co.) が、本菌の場合にも好結果をもたらすかどうかを知るために次の実験を行なった。

供試菌株 GM-11, GM-8

培地の組成

|                                      |       |
|--------------------------------------|-------|
| トウモロコシ煎汁*                            | 1 l   |
| V <sub>8</sub> ジュース                  | 20 cc |
| MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O | 0.5 g |
| 寒 天                                  | 20 g  |

pH 5.6~6.0

実験方法 使用試験管の太さをそろえ、培地を 10 cc ずつ分注し、殺菌後一定の高さの枕木に並べて傾斜をそろえ、培地斜面の表面積を等しくした。

Table 5. V<sub>8</sub> 培地における孢子形成—1 (菌株 GM-11)  
Sporulation of the fungus on V<sub>8</sub>-juice agar—1 (Stock No. GM-11)

| 培 地<br>Medium        | 孢 子 形 成 数<br>Number of spores produced × 10 <sup>4</sup> | 平 均<br>Averaged       |
|----------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------|
| V <sub>8</sub> ・agar | 96, 66, 112, 54, 68, 75, 77, 32, 83, 77                  | 74 × 10 <sup>4</sup>  |
| HIA                  | 133, 251, 145, 166, 153, 131, 132, 132, 93, 125          | 146 × 10 <sup>4</sup> |

HIA...HARA-Ito's agar

Table 6. V<sub>8</sub> 培地における孢子形成—2 (菌株 GM-8)  
Sporulation of the fungus on V<sub>8</sub>-juice agar—2 (Stock No. GM-8)

| 培 地<br>Medium        | 孢 子 形 成 数<br>Number of spores produced × 10 <sup>4</sup> | 平 均<br>Averaged      |
|----------------------|----------------------------------------------------------|----------------------|
| V <sub>8</sub> ・agar | .                                                        | +                    |
| HIA                  | 83, 43, 45, 72, 42, 67, 71, 82, 64, 83                   | 65 × 10 <sup>4</sup> |
| PDA                  | .                                                        | —                    |

PDA...Potato dextrose agar

\* トウモロコシ 50 g を蒸留水 1 l に投じて煮沸、その煎汁を供試

形成胞子数の算定には斜面培地に殺菌水 1 cc を注ぎ、白金耳で菌叢の表面を軽くこすり、殺菌水に胞子を浮遊させ、よく振ってから小型試験管に移し、Thoma 血球計算器に滴下、400 区画の胞子数を算え  $\times 10^4$  すると 1 cc 中の胞子数となる。斜面培養 10 本の平均値をもって形成胞子数とした。なお、以下の実験においても形成胞子数の算定はこの方法による。

本実験には V<sub>8</sub> 培地と比較するために HIA およびジャガイモ寒天培地（以下 PDA）を用い、あらかじめ HIA に形成された胞子の浮遊液を同一量白金耳で培地面に接種、25°C、2 週間後に形成胞子数の算定を行なった。

**実験結果** 2 回の実験結果は Table 5~6 のとおりで、本菌の場合 V<sub>8</sub> ジュースが胞子形成を良好にする現象は認められず、これに対して HIA 上では多量の胞子が形成され、また PDA では全く形成されなかった。

### 胞子形成に及ぼす温度の影響

#### 1. 定 温

供試菌株 GM-8, GM-11, GM-25, GM-28

**実験方法** HIA に形成された菌糸と胞子を新たな HIA 斜面培地に移植し、15°C、20°C、25°C、27°C および 30°C のそれぞれに保ち、2 週間後に形成胞子数を算定した。

**実験結果** この実験結果をかかげれば Table 7 のとおりで、GM-8 では 25°C~27°C で、これに対して GM-11 では 15°C~20°C で胞子形成が良好な傾向が認められ、また GM-25 および GM-28 では 15°C と 25°C で差がなかった。すなわち、菌株が異なれば胞子形成適温にちがいのことが知られ、GM-11 は比較的低温において胞子の形成がすぐれていた。

Table 7. 胞子形成に及ぼす温度の影響—1 (定温)  
Effect of temperatures on sporulation of the fungus—1 (Constant temperature)

| 実験番号<br>Experiment<br>No. | 菌株<br>Stock No. | 胞子形成数 (試験管培養 1 本当たり)<br>Number of spores produced per 1 test tube |                   |                  |                  |                   |
|---------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|
|                           |                 | 温 度 Temperature (°C)                                              |                   |                  |                  |                   |
|                           |                 | 15                                                                | 20                | 25               | 27               | 30                |
| I                         | GM- 8           | +                                                                 | $7 \times 10^4$   | $60 \times 10^4$ | $31 \times 10^4$ | $0.2 \times 10^4$ |
|                           | " -11           | $109 \times 10^4$                                                 | $106 \times 10^4$ | $63 \times 10^4$ | $57 \times 10^4$ | $3 \times 10^4$   |
| II                        | GM- 8           | $0.7 \times 10^4$                                                 | $2 \times 10^4$   | $49 \times 10^4$ | $75 \times 10^4$ | —*                |
|                           | " -11           | $156 \times 10^4$                                                 | $80 \times 10^4$  | $65 \times 10^4$ | $88 \times 10^4$ | —*                |
| III                       | GM- 8           | $0.9 \times 10^4$                                                 | $9 \times 10^4$   | $54 \times 10^4$ | $71 \times 10^4$ | $4 \times 10^4$   |
|                           | " -11           | $216 \times 10^4$                                                 | $69 \times 10^4$  | $97 \times 10^4$ | $65 \times 10^4$ | $45 \times 10^4$  |
| IV                        | GM-25           | $78 \times 10^4$                                                  | —**               | $66 \times 10^4$ | —**              | —**               |
|                           | " -28           | $15 \times 10^4$                                                  | —**               | $30 \times 10^4$ | —**              | —**               |
| V                         | GM-25           | $14 \times 10^4$                                                  | —**               | $30 \times 10^4$ | —**              | —**               |
|                           | " -28           | $48 \times 10^4$                                                  | —**               | $19 \times 10^4$ | —**              | —**               |

\*...定温器故障

\*\*...実験欠

## 2. 変 温

供試菌株 GM-8, GM-11

実験方法 HIA に形成された菌糸と孢子を HIA 斜面培地に移植したのち、次のように区分して培養した。

- 25°C 定温で 1 週間培養後、黑色カーボン紙でおおって、さらに 1 週間室温に保つ。
- 27°C 定温で 1 週間培養後、黑色カーボン紙でおおって、さらに 1 週間室温に保つ。
- 25°C 定温で 2 週間培養する。
- 27°C 定温で 2 週間培養する。

形成孢子の算定は前実験と同一方法によった。

実験結果 4 回の実験結果を摘記すれば Table 8 のとおりで、変温処理することによって孢子形成が促進される現象は認められなかった。

## 3. 低温処理

供試菌株 GM-11

Table 8. 孢子形成に及ぼす温度の影響—2 (変温)  
Effect of temperatures on sporulation of the fungus—2 (Variable temperature)

| 実験番号<br>Experiment No. | 菌株<br>Stock No. | 胞子形成数(試験管1本当たり)<br>Number of spores produced per 1 test tube |                     |                    |                     | 備考<br>Remark       |
|------------------------|-----------------|--------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
|                        |                 | 温度処理 Temperature treatment                                   |                     |                    |                     |                    |
|                        |                 | 25°C                                                         | 25°C→R.T.           | 27°C               | 27°C→R.T.           |                    |
| I                      | GM- 8           | 38×10 <sup>4</sup>                                           | 12×10 <sup>4</sup>  | 87×10 <sup>4</sup> | 58×10 <sup>4</sup>  | R.T.=18<br>~22.5°C |
|                        | 〃 -11           | 28×10 <sup>4</sup>                                           | 16×10 <sup>4</sup>  | 48×10 <sup>4</sup> | 30×10 <sup>4</sup>  |                    |
| II                     | GM- 8           | 57×10 <sup>4</sup>                                           | 58×10 <sup>4</sup>  | 13×10 <sup>4</sup> | 33×10 <sup>4</sup>  | R.T.=18<br>~23.5°C |
|                        | 〃 -11           | 24×10 <sup>4</sup>                                           | 47×10 <sup>4</sup>  | 47×10 <sup>4</sup> | 38×10 <sup>4</sup>  |                    |
| III                    | GM- 8           | 90×10 <sup>4</sup>                                           | 25×10 <sup>4</sup>  | 73×10 <sup>4</sup> | 35×10 <sup>4</sup>  | R.T.=16<br>~23.5°C |
|                        | 〃 -11           | 32×10 <sup>4</sup>                                           | 85×10 <sup>4</sup>  | 22×10 <sup>4</sup> | 107×10 <sup>4</sup> |                    |
| IV                     | GM- 8           | 42×10 <sup>4</sup>                                           | 25×10 <sup>4</sup>  | 56×10 <sup>4</sup> | 27×10 <sup>4</sup>  | R.T.=16<br>~23.5°C |
|                        | 〃 -11           | 61×10 <sup>4</sup>                                           | 114×10 <sup>4</sup> | 78×10 <sup>4</sup> | 157×10 <sup>4</sup> |                    |

R.T.…室温

Table 9. 低温処理が孢子形成に及ぼす影響 (菌株 GM-11)  
Effect of temperatures on sporulation of the fungus—3  
(Low-temperature treatment)

| 実験番号<br>Experiment No. | 孢 子 形 成 数 (試験管 1 本当たり)<br>Number of spores produced per 1 test tube |                                                                  |                     |                    |                     |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
|                        | 15°C 定温                                                             | 低 温 (0°C) 処 理 期 間<br>Duration of low-temperature treatment (0°C) |                     |                    |                     |
|                        |                                                                     | 1 week                                                           | 2 weeks             | 3 weeks            | 4 weeks             |
| I                      | 6×10 <sup>4</sup>                                                   | 40×10 <sup>4</sup>                                               | 31×10 <sup>4</sup>  | 22×10 <sup>4</sup> | 142×10 <sup>4</sup> |
| II                     | 13×10 <sup>4</sup>                                                  | 18×10 <sup>4</sup>                                               | 204×10 <sup>4</sup> | 47×10 <sup>4</sup> | 23×10 <sup>4</sup>  |
| III                    | 49×10 <sup>4</sup>                                                  | 38×10 <sup>4</sup>                                               | 9×10 <sup>4</sup>   | 45×10 <sup>4</sup> | 34×10 <sup>4</sup>  |

**実験方法** HIA 上に 15°C, 2週間培養後, 0°C 定温室に搬入して 0, 1, 2, 3, 4 の各週間低温にさらした菌叢(胞子を含む)をおのおの接種源として新たな HIA に移植し, 15°C, 2週間後, 各処理別ごとに形成胞子を算定した。

**実験結果** 3回の実験結果は Table 9 にしめすとおりで, 実験 1~2 では低温処理によって胞子形成が促進されたやに見えたが, 実験 3 ではそのような現象は認められず, 接種源を低温処理することが, その後の胞子形成を常に良好にするとは必ずしもいえないようである。

### 胞子形成に及ぼす光線の影響

**供試菌株** GM-8, GM-11

**実験方法** HIA に移植後, 無光線区(暗区)は試験管を黒色カーボン紙でおおい, また有光線区(明区)はそのまま室内におき, 1, 2, 4 週間後にそれぞれ形成胞子数を算定した。

**実験結果** 2回の実験結果をしめせば Table 10 のとおりで, 本菌の場合光線(散光)の有無は胞子形成に影響することは無い。

### 培養期間と胞子形成

培地上で胞子形成の最大量をしめすのは培養開始後何日ごろであろうか。これを知るために本実験を行った。

**供試菌株** GM-8, GM-11

**実験方法** HIA に形成された胞子の浮游液を新たな HIA 斜面培地に移植し, 25°C および 27°C のそれぞれに保ち, 1, 2, 3, 4, 5 各週後にそれぞれの形成胞子数算定を行なった。なお, GM-11 については別に 15°C における 1~4 週後の胞子形成数も調べた。

**実験結果** 5回にわたる実験結果を摘記すれば Table 11 のとおりである。すなわち, 培養期間は2~3週間で形成胞子数は最大をしめし, それ以後は漸減の傾向にあるが, しかし, その差は顕著ではなく, 2~4 週間以内ならば大体胞子形成は良好といってよさそうである。なお, 比較的低温において胞子形成がよい菌株 GM-11 では, 15°C において 2~6 週間, ほぼ等しい胞子形成量をしめしている。

### 接種源の密度と胞子形成

培地上の胞子形成は接種源とした胞子密度(胞子数)の大小に左右されるかどうかを知るために本実験を行なった。

**供試菌株** GM-11

**実験方法** 胞子が形成された HIA 斜面培養に殺菌蒸留水を注入し, 白金線で菌叢表面を軽くこすって胞子の濃厚浮游液をつくり, ついでこの原液を殺菌蒸留水で次の5段階に希釈する。

- (1) 標準(濃厚胞子浮游液  $130 \times 10^4/cc$ )
- (2) 標準  $\times 1/2$
- (3) 標準  $\times 1/4$
- (4) 標準  $\times 1/10$



Table 10. 孢子形成に及ぼす光線の影響  
Effect of light on sporulation of the fungus

| 実験番号<br>Experiment No. | 菌株<br>Stock No. | 明暗処理<br>Light or dark | 孢子形成数 (試験管1本当たり)<br>Number of spores produced per 1 test tube |                     |                    | 備考<br>Remark |
|------------------------|-----------------|-----------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------|--------------|
|                        |                 |                       | 経過日数<br>Period lapsed                                         |                     |                    |              |
|                        |                 |                       | 1 week                                                        | 2 weeks             | 3 weeks            |              |
| I                      | GM- 8           | Light                 | 55×10 <sup>4</sup>                                            | 133×10 <sup>4</sup> | 24×10 <sup>4</sup> | 22~32°C      |
|                        |                 | Dark                  | 27×10 <sup>4</sup>                                            | 57×10 <sup>4</sup>  | 50×10 <sup>4</sup> |              |
|                        | GM-11           | Light                 | 59×10 <sup>4</sup>                                            | 19×10 <sup>4</sup>  | 35×10 <sup>4</sup> |              |
|                        |                 | Dark                  | 58×10 <sup>4</sup>                                            | 66×10 <sup>4</sup>  | 87×10 <sup>4</sup> |              |
| II                     | GM- 8           | Light                 | 86×10 <sup>4</sup>                                            | 74×10 <sup>4</sup>  | 70×10 <sup>4</sup> | 25~30°C      |
|                        |                 | Dark                  | 41×10 <sup>4</sup>                                            | 142×10 <sup>4</sup> | 69×10 <sup>4</sup> |              |
|                        | GM-11           | Light                 | 53×10 <sup>4</sup>                                            | 36×10 <sup>4</sup>  | 68×10 <sup>4</sup> |              |
|                        |                 | Dark                  | 64×10 <sup>4</sup>                                            | 113×10 <sup>4</sup> | 70×10 <sup>4</sup> |              |

Table 11. 培養期間と孢子形成  
Relation between duration of culture and sporulation of the fungus on HARA-Ito's agar

| 実験番号<br>Experiment No. | 菌株<br>Stock No. | 温度<br>Temp. (°C) | 孢子形成数 (試験管1本当たり)<br>Number of spores produced per 1 test tube |                   |                   |                   |                   |
|------------------------|-----------------|------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                        |                 |                  | 培養日数<br>Incubation period (week)                              |                   |                   |                   |                   |
|                        |                 |                  | 1                                                             | 2                 | 3                 | 4                 | 5                 |
| I                      | GM- 8           | 25               | $26 \times 10^4$                                              | $53 \times 10^4$  | $33 \times 10^4$  | $3 \times 10^4$   | —*                |
|                        |                 | 27               | $34 \times 10^4$                                              | $48 \times 10^4$  | $5 \times 10^4$   | $0.1 \times 10^4$ | —*                |
|                        | GM-11           | 25               | $49 \times 10^4$                                              | $27 \times 10^4$  | $29 \times 10^4$  | $30 \times 10^4$  | —*                |
|                        |                 | 27               | $18 \times 10^4$                                              | $25 \times 10^4$  | $17 \times 10^4$  | $8 \times 10^4$   | —*                |
| II                     | GM- 8           | 25               | $37 \times 10^4$                                              | $105 \times 10^4$ | $27 \times 10^4$  | $14 \times 10^4$  | $3 \times 10^4$   |
|                        |                 | 27               | $7 \times 10^4$                                               | $50 \times 10^4$  | $15 \times 10^4$  | $2 \times 10^4$   | $1 \times 10^4$   |
|                        | GM-11           | 25               | $36 \times 10^4$                                              | $50 \times 10^4$  | $50 \times 10^4$  | $25 \times 10^4$  | $25 \times 10^4$  |
|                        |                 | 27               | $39 \times 10^4$                                              | $65 \times 10^4$  | $57 \times 10^4$  | $40 \times 10^4$  | $23 \times 10^4$  |
| III                    | GM- 8           | 25               | $1 \times 10^4$                                               | $71 \times 10^4$  | $37 \times 10^4$  | $27 \times 10^4$  | $12 \times 10^4$  |
|                        |                 | 27               | 0                                                             | $14 \times 10^4$  | $8 \times 10^4$   | $2 \times 10^4$   | $0.6 \times 10^4$ |
|                        | GM-11           | 25               | $9 \times 10^4$                                               | $35 \times 10^4$  | $45 \times 10^4$  | $18 \times 10^4$  | $15 \times 10^4$  |
|                        |                 | 27               | $9 \times 10^4$                                               | $77 \times 10^4$  | $114 \times 10^4$ | $106 \times 10^4$ | $40 \times 10^4$  |
| IV                     | GM-11           | 15               | $6 \times 10^4$                                               | $23 \times 10^4$  | $36 \times 10^4$  | $27 \times 10^4$  | $18 \times 10^4$  |
| V                      | 〃               | 〃                | $2 \times 10^4$                                               | $49 \times 10^4$  | $49 \times 10^4$  | $31 \times 10^4$  | $26 \times 10^4$  |

\*…実験欠

Table 12. 接種源密度と孢子形成  
Relation between number of spores inoculated and sporulation  
of the fungus on HARA-Ito's agar

| 実験番号<br>Experiment<br>No. | 形成孢子数 (試験管1本当たり)<br>Number of spores produced per 1 test tube |                       |                       |                       |                       |                       |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                           | 接種源孢子密度<br>Number of spores inoculated                        |                       |                       |                       |                       |                       |
|                           | Standard                                                      | Standard<br>× 1/2     | Standard<br>× 1/4     | Standard<br>× 1/10    | Standard<br>× 1/100   | Standard<br>× 1/1000  |
| I                         | 303 × 10 <sup>4</sup>                                         | 337 × 10 <sup>4</sup> | 364 × 10 <sup>4</sup> | —**                   | —**                   | —**                   |
| II*                       | 169 × 10 <sup>4</sup>                                         | 164 × 10 <sup>4</sup> | 154 × 10 <sup>4</sup> | —**                   | —**                   | —**                   |
| III                       | 206 × 10 <sup>4</sup>                                         | —**                   | —**                   | 227 × 10 <sup>4</sup> | 195 × 10 <sup>4</sup> | 201 × 10 <sup>4</sup> |
| IV                        | 237 × 10 <sup>4</sup>                                         | 304 × 10 <sup>4</sup> | 325 × 10 <sup>4</sup> | 257 × 10 <sup>4</sup> | 181 × 10 <sup>4</sup> | 140 × 10 <sup>4</sup> |

\*...接種源として柄子殻を使用

\*\*...実験欠

(5) 標準 × 1/100

(6) 標準 × 1/1000

各希釈液をよく攪拌しながら、2白金耳ずつ HIA 斜面の全面に塗布して 15°C で2週間培養後、形成孢子数の算定を行なった。

なお、実験—IIは接種源として HIA に形成された柄子殻を用い、希釈は次の3段階とし、形成孢子数の算定上と同一方法によった。

(1) 標準 柄子殻数 15~20個/1培地

(2) 標準 × 1/2 // 8~10個/1培地

(3) 標準 × 1/4 // 3~4個/1培地

実験結果 Table 12 にかかざるとおりの結果が得られた。すなわち、接種源の密度が標準の 1/100 あるいは 1/1000 というような極端な場合には形成孢子数はやや少なくなるが、接種密度が高ければ高いほど多量の孢子が形成されるというものではない (Plate 1, A)。

#### 原・伊藤培地上の移植回数が孢子形成に及ぼす影響

HIA 上における移植度数の多少が孢子形成に影響を及ぼすかどうかを知るためにこの実験を行なった。

供試菌株 GM-11

実験方法 PDA 上の菌叢小片を HIA に移植、15°C で2週間培養して得られた孢子を接種源とし、これを殺菌水に投じて孢子浮游液をつくり、常に同一濃度のものを新たな HIA に接種した。接種された HIA は次の2処理区に分け、15° および 25°C 定温に保った。

a 区 10 日間隔に形成された孢子によって移植を継続する。

b 区 10 日培養後 0°C に保存、a 区で3回移植する間に1回の割合で移植を継続する。

a、b 両区とも前実験と同一方法によって形成孢子数を算定した。

実験結果 3回にわたる実験結果は Table 13~15 に示すとおりで、片や4回移植する間に一方は12回移植を継続しても、形成孢子数にはさしたる差異は認められない。

Table 13. HIA 上の移植回数と胞子形成—1  
Relation between number of transplantings of inocula and  
sporulation of the fungus on HARA-Ito's agar—1

| 15°C                                 |                                       |                                      |                                       | 25°C                                 |                                       |                                      |                                       |
|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| a                                    |                                       | b                                    |                                       | a                                    |                                       | b                                    |                                       |
| 移植回数<br>Number of trans-<br>planting | 形成胞子数<br>Number of spores<br>produced | 移植回数<br>Number of trans-<br>planting | 形成胞子数<br>Number of spores<br>produced | 移植回数<br>Number of trans-<br>planting | 形成胞子数<br>Number of spores<br>produced | 移植回数<br>Number of trans-<br>planting | 形成胞子数<br>Number of spores<br>produced |
| 1                                    | $118 \times 10^4$                     | 1                                    | $201 \times 10^4$                     | 1                                    | $80 \times 10^4$                      | 1                                    | $50 \times 10^4$                      |
| 2                                    | $193 \times 10^4$                     |                                      |                                       | 2                                    | $112 \times 10^4$                     |                                      |                                       |
| 3                                    | $137 \times 10^4$                     |                                      |                                       | 3                                    | $71 \times 10^4$                      |                                      |                                       |
| 4                                    | $210 \times 10^4$                     | 2                                    | $214 \times 10^4$                     | 4                                    | $70 \times 10^4$                      | 2                                    | $91 \times 10^4$                      |
| 5                                    | $263 \times 10^4$                     |                                      |                                       | 5                                    | $45 \times 10^4$                      |                                      |                                       |
| 6                                    | $449 \times 10^4$                     |                                      |                                       | 6                                    | $82 \times 10^4$                      |                                      |                                       |
| 7                                    | $178 \times 10^4$                     | 3                                    | $246 \times 10^4$                     | 7                                    | $92 \times 10^4$                      | 3                                    | $67 \times 10^4$                      |
| 8                                    | $237 \times 10^4$                     |                                      |                                       | 8                                    | $89 \times 10^4$                      |                                      |                                       |
| 9                                    | $191 \times 10^4$                     |                                      |                                       | 9                                    | $161 \times 10^4$                     |                                      |                                       |
| 10                                   | $153 \times 10^4$                     | 4                                    | $184 \times 10^4$                     | 10                                   | $189 \times 10^4$                     | 4                                    | $58 \times 10^4$                      |
| 11                                   | $217 \times 10^4$                     |                                      |                                       | 11                                   | $170 \times 10^4$                     |                                      |                                       |
| 12                                   | $270 \times 10^4$                     |                                      |                                       | 12                                   | $212 \times 10^4$                     |                                      |                                       |

Table 14. HIA 上の移植回数と胞子形成—2  
Relation between number of transplantings of inocula and  
sporulation of the fungus on HARA-Ito's agar—2

| 15°C                                 |                                       |                                      |                                       | 25°C                                 |                                       |                                      |                                       |
|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| a                                    |                                       | b                                    |                                       | a                                    |                                       | b                                    |                                       |
| 移植回数<br>Number of trans-<br>planting | 形成胞子数<br>Number of spores<br>produced | 移植回数<br>Number of trans-<br>planting | 形成胞子数<br>Number of spores<br>produced | 移植回数<br>Number of trans-<br>planting | 形成胞子数<br>Number of spores<br>produced | 移植回数<br>Number of trans-<br>planting | 形成胞子数<br>Number of spores<br>produced |
| 1                                    | $64 \times 10^4$                      | 1                                    | $90 \times 10^4$                      | 1                                    | $92 \times 10^4$                      | 1                                    | $99 \times 10^4$                      |
| 2                                    | $87 \times 10^4$                      |                                      |                                       | 2                                    | $51 \times 10^4$                      |                                      |                                       |
| 3                                    | $180 \times 10^4$                     |                                      |                                       | 3                                    | $94 \times 10^4$                      |                                      |                                       |
| 4                                    | $82 \times 10^4$                      | 2                                    | $84 \times 10^4$                      | 4                                    | $107 \times 10^4$                     | 2                                    | $84 \times 10^4$                      |
| 5                                    | $157 \times 10^4$                     |                                      |                                       | 5                                    | $143 \times 10^4$                     |                                      |                                       |
| 6                                    | $362 \times 10^4$                     |                                      |                                       | 6                                    | $123 \times 10^4$                     |                                      |                                       |
| 7                                    | $75 \times 10^4$                      | 3                                    | $54 \times 10^4$                      | 7                                    | $76 \times 10^4$                      | 3                                    | $60 \times 10^4$                      |
| 8                                    | $97 \times 10^4$                      |                                      |                                       | 8                                    | $76 \times 10^4$                      |                                      |                                       |
| 9                                    | $344 \times 10^4$                     |                                      |                                       | 9                                    | $120 \times 10^4$                     |                                      |                                       |
| 10                                   | $215 \times 10^4$                     | 4                                    | $178 \times 10^4$                     | 10                                   | $61 \times 10^4$                      | 4                                    | $66 \times 10^4$                      |
| 11                                   | $366 \times 10^4$                     |                                      |                                       | 11                                   | $72 \times 10^4$                      |                                      |                                       |
| 12                                   | $251 \times 10^4$                     |                                      |                                       | 12                                   | —                                     |                                      |                                       |

Table 15. HIA 上の移植回数と胞子形成—3  
Relation between number of transplantings of inocula and  
sporulation of the fungus on HARA-Ito's agar—3

| 15°C                                 |                                       |                                      |                                       | 20°C                                 |                                       |                                      |                                       |
|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| a                                    |                                       | b                                    |                                       | a                                    |                                       | b                                    |                                       |
| 移植回数<br>Number of trans-<br>planting | 形成胞子数<br>Number of spores<br>produced | 移植回数<br>Number of trans-<br>planting | 形成胞子数<br>Number of spores<br>produced | 移植回数<br>Number of trans-<br>planting | 形成胞子数<br>Number of spores<br>produced | 移植回数<br>Number of trans-<br>planting | 形成胞子数<br>Number of spores<br>produced |
| 1                                    | 34 × 10 <sup>4</sup>                  | 1                                    | 61 × 10 <sup>4</sup>                  | 1                                    | 68 × 10 <sup>4</sup>                  | 1                                    | 30 × 10 <sup>4</sup>                  |
| 2                                    | 65 × 10 <sup>4</sup>                  |                                      |                                       | 2                                    | 82 × 10 <sup>4</sup>                  |                                      |                                       |
| 3                                    | 25 × 10 <sup>4</sup>                  |                                      |                                       | 3                                    | 60 × 10 <sup>4</sup>                  |                                      |                                       |
| 4                                    | 36 × 10 <sup>4</sup>                  | 2                                    | 22 × 10 <sup>4</sup>                  | 4                                    | 59 × 10 <sup>4</sup>                  | 2                                    | 52 × 10 <sup>4</sup>                  |
| 5                                    | 90 × 10 <sup>4</sup>                  |                                      |                                       | 5                                    | 74 × 10 <sup>4</sup>                  |                                      |                                       |
| 6                                    | 53 × 10 <sup>4</sup>                  |                                      |                                       | 6                                    | 40 × 10 <sup>4</sup>                  |                                      |                                       |
| 7                                    | 81 × 10 <sup>4</sup>                  | 3                                    | 64 × 10 <sup>4</sup>                  | 7                                    | 53 × 10 <sup>4</sup>                  | 3                                    | 36 × 10 <sup>4</sup>                  |
| 8                                    | 62 × 10 <sup>4</sup>                  |                                      |                                       | 8                                    | 50 × 10 <sup>4</sup>                  |                                      |                                       |
| 9                                    | 84 × 10 <sup>4</sup>                  |                                      |                                       | 9                                    | 52 × 10 <sup>4</sup>                  |                                      |                                       |
| 10                                   | 38 × 10 <sup>4</sup>                  | 4                                    | 37 × 10 <sup>4</sup>                  | 10                                   | 30 × 10 <sup>4</sup>                  | 4                                    | 32 × 10 <sup>4</sup>                  |
| 11                                   | 84 × 10 <sup>4</sup>                  |                                      |                                       | 11                                   | 34 × 10 <sup>4</sup>                  |                                      |                                       |
| 12                                   | 29 × 10 <sup>4</sup>                  |                                      |                                       | 12                                   | 34 × 10 <sup>4</sup>                  |                                      |                                       |

ジャガイモ寒天培地上の菌糸移植回数が胞子形成に及ぼす影響

PDA (本菌の胞子形成は通常認められない) 上でいくたびか移植をくり返した菌叢から胞子形成を試みなければならないことがしばしばある。それで、PDA 上での移植度数の多少が、その後の HIA 上における胞子形成に影響するかどうかを知る目的でこの実験を行なった。

供試菌株 GM-11

Table 16. PDA 上における菌糸の移植回数と胞子形成  
Effect of number of transplantings with mycelium on potato dextrose  
agar on sporulation of the fungus on HARA-Ito's agar

| Experiment 1                                                                |                    |                      | 移植回数<br>Number<br>of trans-<br>planting | Experiment 2         |                                                                             |                    |
|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------|----------------------|-----------------------------------------|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| 形 成 胞 子 数<br>(試験管 1 本当たり)<br>Number of spores pro-<br>duced per 1 test tube |                    | 移植間隔<br><br>Interval |                                         | 移植間隔<br><br>Interval | 形 成 胞 子 数<br>(試験管 1 本当たり)<br>Number of spores pro-<br>duced per 1 test tube |                    |
| 15°C                                                                        | 25°C               |                      |                                         |                      | 15°C                                                                        | 25°C               |
| +                                                                           | 0                  |                      |                                         |                      | day                                                                         | day                |
| 33×10 <sup>4</sup>                                                          | 3×10 <sup>4</sup>  | 25                   | 1                                       | 30                   | 33×10 <sup>4</sup>                                                          | 3×10 <sup>4</sup>  |
| 27×10 <sup>4</sup>                                                          | 2×10 <sup>4</sup>  | 30                   | 2                                       | 30                   | 27×10 <sup>4</sup>                                                          | 2×10 <sup>4</sup>  |
| 11×10 <sup>4</sup>                                                          | 22×10 <sup>4</sup> | 35                   | 3                                       | 30                   | 11×10 <sup>4</sup>                                                          | 22×10 <sup>4</sup> |
| 35×10 <sup>4</sup>                                                          | 21×10 <sup>4</sup> | 30                   | 4                                       | 30                   | 35×10 <sup>4</sup>                                                          | 21×10 <sup>4</sup> |
| 63×10 <sup>4</sup>                                                          | 31×10 <sup>4</sup> | 30                   | 5                                       | 30                   | 63×10 <sup>4</sup>                                                          | 31×10 <sup>4</sup> |
| 16×10 <sup>4</sup>                                                          | 37×10 <sup>4</sup> | 45                   | 6                                       | 45                   | 16×10 <sup>4</sup>                                                          | 37×10 <sup>4</sup> |
| 64×10 <sup>4</sup>                                                          | 7×10 <sup>4</sup>  | 30                   | 7                                       | 30                   | 64×10 <sup>4</sup>                                                          | 7×10 <sup>4</sup>  |
|                                                                             |                    |                      | 8                                       |                      |                                                                             |                    |

**実験方法** HIA 上に形成された胞子を PDA に移植，25℃ で培養して得られた菌叢を第 1 回目とし，25～45 日間隔で菌叢の薄片を用いて移植回数を重ねてゆく。PDA に移植すると同時に HIA にも同様の移植を行ない，それぞれ 2 週間後に形成胞子数の算定を行なった。培養温度は 15℃ および 25℃ の 2 区とした。

**実験結果** 2 回の実験結果を摘記すれば Table 16 にしめすとおりで，第 1 回目を除き，第 2 回以降は 25～45 日間隔で PDA で 8 回の移植を重ねても，胞子形成が格別に不良になることはない。また第 1～3 回の移植で処理温度 25℃ の場合には同 15℃ の場合よりも胞子形成が不良なのは，供試菌株 GM-11 が比較的低温において胞子形成が促進される性質があることによるものであろう。

### ジャガイモ寒天培地上菌糸の老若と胞子形成

長期間経過して堅く乾いた PDA 保存培養菌叢を HIA に移植する場合，通常胞子形成は認められない。それで PDA での培養期間の長短，すなわち菌叢の老若がその後の HIA 上における胞子形成にどのように影響するかを知るために本実験を行なった。

供試菌株 GM-11

**実験方法** PDA 保存培養の菌叢を新たな PDA に移植，25℃ で 2 週間培養してから 15℃ に保存する。その後ある日数経過ごとに，同一試験管培養菌叢の薄片を HIA に移植し，15℃ および 25℃ にそれぞれ保ち，2 週間後に形成胞子数の算定を行なった（Experiment—1）。

上と比較のため，培地に形成された胞子を PDA に単個培養し，25℃ で 2 週間経過後，新たな PDA に菌糸を移植，その後は上記実験と同様の取り扱いをした（Experiment—2, Experiment—3）。

**実験結果** 得られた結果の概要を示せば Table 17 のとおりである。すなわち，保存培養菌糸から出発した場合には，PDA 上で約 120 日経過すると，HIA に移植しても胞子形成はきわめて不良になり，240

Table 17. PDA 上培養菌糸の老若と胞子形成  
Relation between age of inocula cultured on potato dextrose agar  
and sporulation of the fungus on HARA-Ito's agar

| 接種源菌糸<br>の培養日数<br>Age of<br>inoculum | 老成菌糸からスタートした場合<br>Inoculum started from<br>old mycelium |                    | 培地上の胞子からスタートした場合<br>Inoculum started from spores on medium |                    |                    |                    |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------|------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                                      | 形 成<br>Number of spores produced per 1 test tube        |                    | 胞 子 数 (試験管 1 本当たり)                                         |                    |                    |                    |
|                                      | Experiment 1                                            |                    | Experiment 2                                               |                    | Experiment 3       |                    |
|                                      | 15℃                                                     | 25℃                | 15℃                                                        | 25℃                | 15℃                | 15℃                |
| 7 day                                | 28×10 <sup>4</sup>                                      | 4×10 <sup>4</sup>  | 25×10 <sup>4</sup>                                         | —*                 | 11×10 <sup>4</sup> | 7×10 <sup>4</sup>  |
| 14                                   | 18×10 <sup>4</sup>                                      | 4×10 <sup>4</sup>  | 140×10 <sup>4</sup>                                        | 8×10 <sup>4</sup>  | 41×10 <sup>4</sup> | 7×10 <sup>4</sup>  |
| 28                                   | 74×10 <sup>4</sup>                                      | 5×10 <sup>4</sup>  | 48×10 <sup>4</sup>                                         | 7×10 <sup>4</sup>  | 22×10 <sup>4</sup> | 2×10 <sup>4</sup>  |
| 60                                   | 24×10 <sup>4</sup>                                      | 22×10 <sup>4</sup> | 16×10 <sup>4</sup>                                         | 2×10 <sup>4</sup>  | 89×10 <sup>4</sup> | 3×10 <sup>4</sup>  |
| 90                                   | 31×10 <sup>4</sup>                                      | 11×10 <sup>4</sup> | 44×10 <sup>4</sup>                                         | 1×10 <sup>4</sup>  | 22×10 <sup>4</sup> | 2×10 <sup>4</sup>  |
| 120                                  | 5×10 <sup>4</sup>                                       | 1×10 <sup>4</sup>  | 32×10 <sup>4</sup>                                         | 15×10 <sup>4</sup> | 96×10 <sup>4</sup> | 8×10 <sup>4</sup>  |
| 180                                  | 2×10 <sup>4</sup>                                       | 1×10 <sup>4</sup>  | 43×10 <sup>4</sup>                                         | 25×10 <sup>4</sup> | 34×10 <sup>4</sup> | 40×10 <sup>4</sup> |
| 240                                  | 0                                                       | +                  | 52×10 <sup>4</sup>                                         | 4×10 <sup>4</sup>  | 11×10 <sup>4</sup> | 12×10 <sup>4</sup> |

\*...実験欠

日間 PDA で培養した菌糸からでは胞子の形成はほとんど認められない。これに対して、等しく PDA 上における培養菌糸でも、胞子から出発した場合には 240 日経過しても、なおおう盛な胞子形成を見る (Plate 1, B)。

### 継続移植培養法による老成菌糸からの胞子形成

PDA に培養して長期間放置した菌叢の小片を HIA に移植した場合、たとえそれが胞子形成を行なう菌株であっても、胞子が容易に形成されないことにしばしば遭遇する。それで、このように胞子が形成されなくなった菌糸からふたたび胞子を形成させるにはどのようにしたらよいかについて種々検討した結果、次の方法によれば胞子形成を可能にすることが判明したので、その要点を述べる。

供試菌株 GM-11

実験方法・結果 PDA 保存培養の菌叢小片を HIA に移植して、25°C および 15°C のそれぞれに保つ。約 4 週間経過すると菌叢上に少数の柄子殻状菌糸塊が形成された。ただし、これは 25°C においてのみ認められ、15°C では白色の気中菌糸が盛んに伸長して、柄子殻状菌糸塊は全く形成されなかった。

Table 18. 継続移植法による老成菌糸からの胞子形成  
Sporulation from mycelium of old culture by the consecutive transfer method on HARA-Ito's agar

| 移植番号<br>Transplantation No.   | 移植間隔<br>Interval of transplanting | 接種源<br>Inoculum                      | 菌叢<br>Macroscopic appearance of colony                          |                   |               |
|-------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------|---------------|
| 1                             | 4 week                            | 保存菌株の老成菌糸                            | ① 菌叢上に柄子殻状菌糸塊を少数形成                                              |                   |               |
| 2                             | 3                                 | ①の柄子殻状菌糸塊                            | ② 柄子殻・胞子が少量形成                                                   |                   |               |
| 3                             | 3                                 | ②の柄子殻・胞子                             | ③ 同上                                                            |                   |               |
| 4                             | 4                                 | ③の柄子殻・胞子                             | ④ 柄子殻および多量の胞子形成                                                 |                   |               |
| 処理—a<br>前代の培地に形成された柄子殻・胞子を移植  |                                   |                                      | 形成胞子数 (試験管 1 本当たり)<br>Number of spores produced per 1 test tube |                   | 備考<br>Remark  |
|                               |                                   |                                      | 15°C                                                            | 25°C              |               |
| 5                             | 2                                 | ④の柄子殻・胞子<br>前代の柄子殻・胞子<br>"<br>"<br>" | $11 \times 10^4$                                                | $5 \times 10^4$   | 0°C で<br>1 週間 |
| 6                             | 3                                 |                                      | $143 \times 10^4$                                               | $4 \times 10^4$   |               |
| 7                             | 2                                 |                                      | $9 \times 10^4$                                                 | $2 \times 10^4$   |               |
| 8                             | 2                                 |                                      | $7 \times 10^4$                                                 | $0.4 \times 10^4$ |               |
| 9                             | 2                                 |                                      | $11 \times 10^4$                                                | $1 \times 10^4$   |               |
| 処 理—b<br>前代の培地に形成された胞子の浮游液を移植 |                                   |                                      | 形成胞子数 (試験管 1 本当たり)<br>Number of spores produced per 1 test tube |                   | 備考<br>Remark  |
|                               |                                   |                                      | 15°C                                                            | 25°C              |               |
| 4                             | 2                                 | ③の胞子<br>前代の胞子<br>"<br>"<br>"<br>"    | $5 \times 10^4$                                                 | $4 \times 10^4$   |               |
| 5                             | 2                                 |                                      | $89 \times 10^4$                                                | $16 \times 10^4$  |               |
| 6                             | 2                                 |                                      | $100 \times 10^4$                                               | $19 \times 10^4$  |               |
| 7                             | 2                                 |                                      | $112 \times 10^4$                                               | $13 \times 10^4$  |               |
| 8                             | 2                                 |                                      | $203 \times 10^4$                                               | $11 \times 10^4$  |               |
| 9                             | 2                                 |                                      | $143 \times 10^4$                                               | $4 \times 10^4$   |               |

柄子殻状菌糸塊を新たな HIA に移植, 25°C で約 4 週間経過すると, 柄子殻および孢子が少量ながら形成されたので, これらをさらに HIA に移植し, 約 3 週間 25°C に保つ。このようにして HIA 上に生じた柄子殻・孢子をいま 1 回 HIA に移植して, 25°C に約 4 週間保つと, 培地上にかなり多量の柄子殻・孢子の形成が見られた。次に孢子浮游液をつくり, 孢子を接種源として HIA の表面に接種, 15°C あるいは 25°C に保ち, その後 2 週間ごとに孢子による移植を数回くり返すことによって, 多量の孢子を形成させることができた。

上の実験の経過および結果を摘記すれば Table 18 にしめすとおりである。

その後, 多くの実験を試み, すでに孢子形成が全く見られなくなった培養菌糸から, 次の方法によって孢子を形成させることが可能になり, またそれまで孢子形成が認められなかった菌株のいくつかにも孢子を形成させることができた。

(1) HIA に移植して生じた菌叢の表面の気中菌糸を除去し, その下に現われる固いかさぶた状の菌叢, とくに培地斜面の下部から白金線でひっかくようにして菌糸の小塊をとり出し, これを新たな HIA に移植する。その後 3~4 週間間隔で同様の移植を 3~4 回継続する。

(2) HIA 上菌叢の表面に黒色の小菌塊 (柄子殻状菌糸塊) ができたら, これを白金線でとり出し, 殺菌試験管の内壁ですりつぶすようにして, ごく細かい粉状にし, HIA の全面に塗りつけるように移植する。

(3) (2)によってついには培地上に多量の柄子殻および孢子が形成されるから, これらを少量の殺菌水に投じて孢子の濃厚浮游液をつくり, 白金耳で新たな HIA に移植, その後約 2 週間おきにこれを 1~2 回くり返すことによって, 多量の孢子形成が認められるようになる。

Table 19. 農林省林業試験場保存菌株のうち HIA 培地に孢子形成するもの  
Sporulating strains among 42 stock cultures stored in  
the Government Forest Experiment Station, Japan

| 菌株番号<br>Stock No. | HIA 培地における孢子形成程度<br>Spore production on HIA | 備考<br>Remark |
|-------------------|---------------------------------------------|--------------|
| GM- 7             | +                                           |              |
| " - 8             | +++                                         | 孢子形成適温 25°C  |
| " -11             | +++                                         | " 15~20°C    |
| " -16             | +                                           |              |
| " -18             | +++                                         | " 18~20°C    |
| " -19             | +++                                         | " 18~20°C    |
| " -22             | ++                                          | " 18~20°C    |
| " -25             | +++                                         | " 15~20°C    |
| " -27             | +++                                         | " 18~20°C    |
| " -28             | +++                                         | " 20~25°C    |
| " -31             | +++                                         | " 15~20°C    |
| " -39             | ++                                          | " 15~20°C    |
| " -43             | +++                                         | " 15~20°C    |
| " -45             | ++                                          | " 15~20°C    |
| " -47             | +                                           |              |

+...ごく少量形成    ++...多量に形成    +++...きわめて多量に形成

(4) (1)の処理は 25°C が、また(2)~(3)はやや低温の 15°C~20°C がよい結果をおさめるようである。  
胞子形成の可能な菌株は(2)の処理で少量ながら胞子をつくるのが普通である。

### 農林省林業試験場保存菌株の胞子形成

Table 1 にかかげた当場樹病研究室保存のカラマツ先枯病菌のすべてについて、上述の方法によって胞子形成の有無を調べた結果、総数 42 菌株のうち Table 19 に示すように 15 菌株に胞子形成が認められた。しかし、胞子形成の良否は各菌株ごとにおのずから差があり、また形成に好適な温度にも違いのあることも知られた。

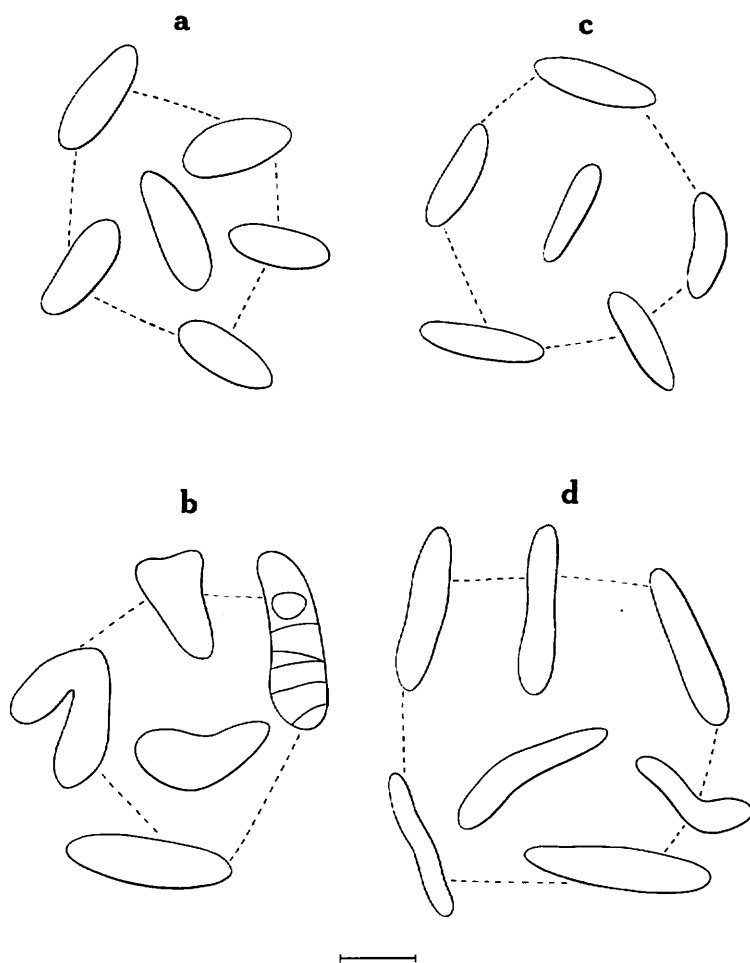


Fig. 1 培地上に形成された正常形胞子 (a, c) と変形胞子 (b, d) (—=10 μ)

a, b: 原・伊藤培地 c, d: ジャガイモ寒天培地

Normal (a, c) and abnormal (b, d) spores of *Guignardia laricina*  
produced on agar media.

a, b: on HARA-Ito's agar c, d: on potato-dextrose agar



## 培地上における変形胞子の形成

菌株 GM-11 の胞子形成諸実験を行なっている間に、培地上の胞子の中で正常形のものに比べてやや大型の胞子あるいは奇形の胞子が認められ、多い場合には全胞子数の約 10% の変形胞子が見られた。

胞子形成のおう盛な培養を PDA に移植した場合には、しばしば大型胞子が現われ、長さ  $50\mu$ 、幅  $11\mu$  に達するものがあり、正常形胞子の大きさ  $15\sim 37\times 5\sim 11\mu$  に比べて、長さがいちじるしく大きく (Fig. 1, d), また HIA では 2 胞子が癒着したようなハート型の胞子がしばしば認められ、時にこれが約 1% 出現することがあった (Fig. 1, b)。

変形胞子を単個培養し、HIA で胞子形成を試みたが、正常形胞子からの場合に比べてとくに変形胞子の出現頻度が高いということとはなかった。

また、変形胞子からの培養菌糸によってカラマツに人工接種試験を行なったのであるが、これと正常形胞子からの培養菌糸との間に病原性の差は認められず、なお人工接種によって発病した患部から再分離した結果は、変形胞子が格別多く現われるということもなかった。

## 考 察

原・伊藤 (1963)<sup>1)</sup> は本菌の胞子 (柄胞子) 形成培地の研究を行ない、窒素源、炭素源、重金属塩類、無機塩類、水素イオン濃度などについて検討を行ない、主として窒素源に粉末酵母エキスを、炭素源として可溶性デンプンを、そして無機塩類として  $MgSO_4\cdot 7H_2O$  をそれぞれ含み、pH 7 に規正した固体培地 (原・伊藤培地) を考案、ごく限られた 1~2 の菌株ながら 1 試験管斜面培地当たり、 $10^4\sim 10^6$  の形成胞子を認めた。

ところで、この原・伊藤培地により同一菌株を用いて実験してもその胞子形成量に著しい変動が起こり、時としては胞子形成を全く見ないことすらあるといわれ、ここに本菌の胞子形成に及ぼす諸因子をくわしく解明する必要にせまられた。

菌類の胞子形成は内的小および外的条件によって左右されることはよく知られているところである (高井 1960)<sup>2)</sup>。これらのうち、外的条件の影響は細胞を通じてある種の刺激として伝達されるものといわれ、これは質的にもまた量的にも一定せず、ある種の菌に好適なものが、他の種には不適なこともあって、はなはだしく普遍性を欠く。一方、内的条件は遺伝的特性を主体とし、これに細胞間の影響、成分変化、反応など、環境的あるいは外的諸因子の刺激を受けるところもあると考えられる。

一般に菌類の胞子は合成培地よりも天然物培地において良好な傾向があり、本菌もまたその例外ではない。寄主体上では容易に胞子を形成するので、これに胞子形成物質の確実な存在が予想される。それで、カラマツ枝葉熱湯抽出液を原・伊藤培地に添加してその影響を調べた結果は、抽出液添加量が多くなればなるほど、菌糸の発育は良好になる反面胞子形成は不良になり、寄主抽出物が本菌の胞子形成を促進する現象は認められなかった。これは、もしもカラマツ枝葉内に胞子形成に好適なものがあるとしても、熱にきわめて不安定な物質ゆえ、培地の高圧・熱殺菌によって破壊され、本菌の栄養成長を促す物質のみが作用したとも考えられる。また、諸種の菌類の胞子形成に良好な成果をあげている V<sub>8</sub> ジュースも、本菌の場合これが格別すぐれた結果をもたらさなかった。

外的条件としての物理的要因のうち、温度は菌類の胞子形成に影響する場合が数多く知られている。菌

糸の発育に適温があるように、胞子形成にも適温域があり、菌糸に比して胞子形成のそれは一般に狭いとされている。また、一定温に保つよりもやや高温で短時日培養し、次に比較的低温に移す、変温処理によって胞子形成に成功した例も知られている。本菌の場合胞子形成適温は菌株によって差があり、15°~20°Cの比較的低温で良好なもの(例 GM-11)、25°Cのやや高温で多量の胞子を形成するもの(例 GM-8)もあるが、概して菌糸発育の適温 25~27°C よりもやや低い。また、本菌の場合 25°C→室温(16~24°C)、27°C→室温(16~24°C)の変温処理は胞子形成の多少に影響を及ぼすことはなかった。ただ、接種源を1~4週間低温(0°C)処理した場合、これを15°C定温に保った場合に比して、その後の胞子形成が著しく促進されることが、3回の実験中2回認められたが、これらの実験結果から確言することはさし控えたい。

外的条件の一つとして光線が存在が胞子形成を促し、暗黒状態ではこれが不良な例が他の菌類では知られている。しかし、本菌の場合、光線が胞子形成を良好にする事実は認められなかった。

一般に、接種源は分離培養の初期のものに高い胞子形成能を有するが、時日の経過とともにこの能力は低下する傾向があり、とくに長年月の間に移植をくり返した古い菌叢から、胞子を形成させることはきわめて困難である。しかし、おう盛な胞子形成が認められる菌叢の菌糸あるいは胞子を、培地上に継続移植することによって、かなり長期にわたり胞子形成能を保持させることが可能なものが知られている(NAGEL 1934,<sup>5)</sup> Ito & Hosaka 1950<sup>3)</sup>)のであるが、本菌の場合も同様で、盛んに胞子形成を行なっている菌叢の、菌糸小片あるいは胞子を接種源として継続移植することにより、きわめて長期間常に良好な胞子形成能を維持することができ、この際菌糸を用いるよりは、胞子を接種源とする方がよりすぐれた結果がおさめられる。ただし、本菌では胞子形成が普通見られない培地、たとえばジャガイモ寒天培地に培養した場合、その培養期間が長くなればなるほど、これを接種源として原・伊藤培地に移植しても胞子形成は不良になる。すなわち、菌糸の状態で長期間経過することによって胞子形成能はしだいに低下し、ついには胞子の形成を全く見ないようになる。

培地上に胞子を形成する菌株であっても、長期間菌糸のみの状態におくと胞子形成は全く認められなくなり、これから胞子を再生させることは容易でない。本研究の重点目標の一つはこの問題を解決することにあった。まず老成菌糸を原・伊藤培地に移植、長期間経て菌叢上に柄子殻状菌糸塊の形成を待ち、これを新培地に移植、数回継続移植を行なって多量の柄子殻が形成されたら、その胞子の浮游液を接種源として新培地に接種し、これを数回くり返すことによって、ふたたびおう盛な胞子形成能を回復させることができた。このように、培地上に継続移植することによって胞子の形成を全く見なくなった菌糸から、柄子殻状菌糸塊、柄子殻および胞子としだいに繁殖器管の生成をみるようになり、なおいったん胞子が形成されればその浮游液を接種源として移植を行ない、これを数回継続することにより多量の胞子形成を見るのは、どのような機構によるものであろうか。これを単純に、現象面から見れば胞子形成の好適培地に継続移植することによって、漸次馴化されたのだといえなくもない。しかし、胞子を接種源とした場合には培地上に胞子を容易に形成し、一方菌糸による培養を長期間行なった菌叢からの菌糸を接種源とした場合には、これが認められないことから、そもそも胞子の原形質中に胞子を形成する内的要因が存在し、分離の初期にはなおこれが菌糸中にも残存するが、おう盛な栄養成長の開始とともにこの因子はしだいに消失の方向に進み、菌糸のみで長期間培養されることによって胞子形成物質が全く失なわれるのではないかという見解(Houston & Oswald 1946<sup>2)</sup>, 内藤・高原 1955<sup>6)</sup>, 高井 1960<sup>7)</sup>)は傾聴に値する。本菌の場合、原・伊藤培地上で移植をくり返すことによって、極度に低下した菌糸中の胞子形成要因の働きがふたたび

回復するにいたったと解すべきではあるまいか。

培地上にしばしば形成される変形胞子は、その単個培養を行なって生ずる胞子に変形のものがとくに現われやすいことはなく、大多数が正常形であること、およびその人工接種によって生ずる寄主の病斑から、再分離して得られる菌叢には正常形胞子を生ずることから、この変形は遺伝質の変化に由来するものとは考えられない。

## 文 献

- 1) 原 薫・伊藤一雄: カラマツ先枯病菌胞子形成培養基について (予報). 日林誌 45, 238~241 (1963).
- 2) HOUSTON, B.R., and J.W. OSWALD: The effect of light and temperature on conidium production by *Helminthosporium gramineum*. Phytopath., 36, 1049~1055 (1946).
- 3) Ito, K., and Y. HOSAKA: Notes on some leaf-spot diseases of broadleaved trees—I. *Cercospora* leaf-spot of plane trees. 林試研報 46, 17~32 (1950).
- 4) Ito, K.: Shoot blight of larches. A destructive disease in larch plantations of Japan. 林試研報 159, 89~104 (1963).
- 5) NAGEL, C.M.: Conidial production in species of *Cercospora* in pure culture. Phytopath., 24, 1101~1110 (1934).
- 6) 内藤中人・高原 弘: *Cercospora beticola* の培地上に於ける胞子形成並胞子の形態に及ぼす 2, 3 の要因について. 香川農大術報 6, 283~288 (1955).
- 7) 高井省三: *Cercospora* 属菌の分生胞子形成に関与する諸因子. 日林誌 42, 29~35 (1960).
- 8) 魚住 正: カラマツ先枯病について—特に病原菌の生活史— 林試研報 132, 47~54 (1961).
- 9) 横田俊一: カラマツ先枯病に関する研究 (II). 病原菌とその生活史. 林試研報 142, 173~202 (1962).

## 図 版 説 明 Explanation of plate

### A. 接種源胞子密度と胞子形成

a. 標準    b. 標準×1/10    c. 標準×1/100    d. 標準×1/1000

Relation between number of spores inoculated and sporulation of the fungus on HARA-Ito's agar.

a. Standard    b. Standard×1/10    c. Standard×1/100    d. Standard×1/1000

### B. 接種源菌糸の老若と胞子形成

a~b. ジャガイモ寒天培地に 180 日間培養後、菌糸小片を原・伊藤培地に移植した場合—胞子形成は全く認められない—

c~d. ジャガイモ寒天培地に 14 日間培養後、菌糸小片を原・伊藤培地に移植した場合—柄子殻が形成されている—

c. 菌叢表面の空中菌糸を除去して柄子殻を示す

Relation between age of inocula cultured on potato dextrose agar and sporulation of the fungus on HARA-Ito's agar.

a~b. No-sporulating colonies inoculated with mycelium of 180 days' culture on potato dextrose agar.

c~d. Pycnidial formation on colonies inoculated with mycelium of 14 days' culture on potato dextrose agar.

c. Pycnidial masses under surface aerial mycelium.

**Sporulation of *Guignardia laricina* (SAWADA) YAMAMOTO  
et K. ITO on Artificial Culture Media**

Kazuo ITO<sup>(1)</sup> and Hiroko HAYASHI<sup>(2)</sup>

Summary

The shoot blight caused by *Guignardia laricina* (SAWADA) YAMAMOTO et K. ITO is one of the most destructive diseases of larches in nurseries and plantations in the northern parts of Japan. Considerable difficulty had been encountered in obtaining spore production of the fungus in pure culture in connection with studies of artificial inoculations and screening-tests for preventive fungicides.

HARA and ITO (1963) reported preliminarily abundant pycnospore production with the fungus when they grew the fungus on an agar medium, but they succeeded in obtaining spores with only 2 out of 15 isolates. The formula of the medium used by them in the sporulation trials was as follows:

|                                                      |         |
|------------------------------------------------------|---------|
| Yeast-extract power (Digo Eiyo Kagaku Co. Ltd.)..... | 3 g.    |
| Soluble starch .....                                 | 10 g.   |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O .....          | 0.25 g. |
| Agar-agar (Nihon Kaiso Kogyo Co. Ltd.) .....         | 15 g.   |
| Distilled water .....                                | 1 l     |

pH 7.0

Since that time the medium has been generally known as HARA-ITO's agar by Japanese forest pathologists.

The effect of environmental factors relating to sporulation of the fungus and the procedure for obtaining abundant sporulation and for maintaining culture in a sporulating condition studied by the present authors are described in this paper.

Among 42 isolates of the fungus tested only 15 produced spores, and abundant sporulation took place in a few of them.

Sporulation on HARA-ITO's agar with larch-shoot decoction added as an additional source of nutrients, and V<sub>8</sub> juice agar was not better than that on HARA-ITO's agar, although the fungus made a good vegetative growth. The fungus seldom produced spores on potato-dextrose agar, and when it did, only sparingly.

Several media were employed to test their relative value for sporulation, but there was little evidence to indicate that any were superior to the standard HARA-ITO's agar.

However, as the transfer intervals were lengthened there was macroscopic evidence that more vegetative growth was taking place than in culture with shorter transfer intervals. In order to maintain the fungus in a good sporulating condition it is necessary to transfer spores rather than mycelium.

Optimal temperature for spore production of the fungus was variable in each isolate, ranging from 15~20°C to 20~25°C, and it was lower than that for mycelial growth, 25~

Received October 20, 1970.

(1) Director, Division of Forest Protection Research, Government Forest Experiment Station, Meguro, Tokyo.

(2) Forest Pathologist, Section of Forest Pathology, Division of Forest Protection Research, Government Forest Experiment Station, Meguro, Tokyo.

27°C. Enormous spore production was often observed when inocula had been kept at low temperature (0°C) for several weeks before planting.

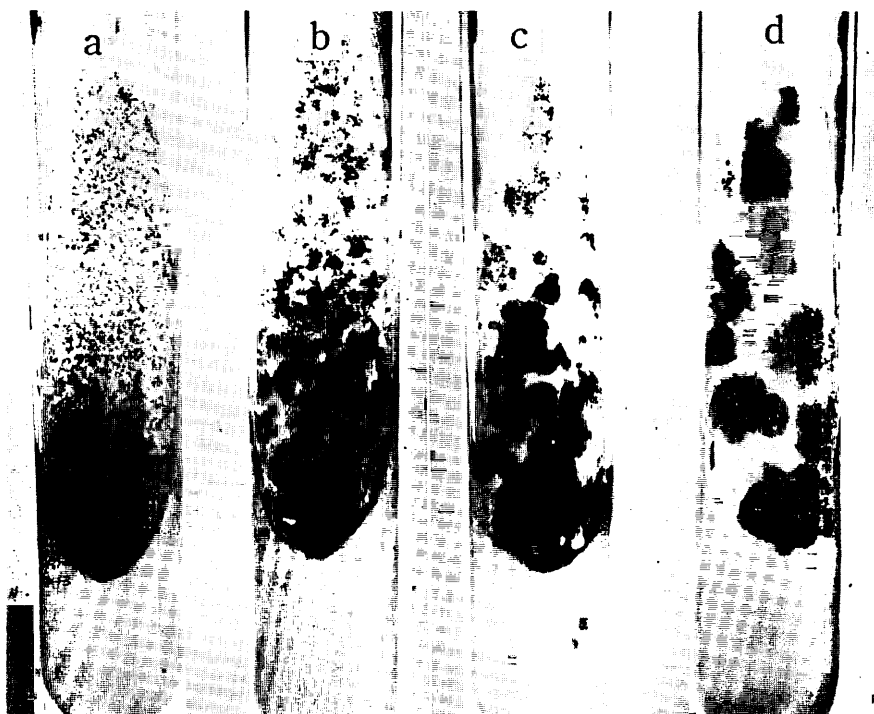
Effect of light on sporulation of the fungus was negligible, as far as this study is concerned.

There has been observed the tendency of the fungus cultures to lose their power of fruiting when grown in artificial culture for long periods of time. It is very difficult to obtain spores from old stock culture of the fungus which has been consecutively transferred on potato-dextrose agar under ordinary laboratory conditions for a long time. Using transfers with mycelium from stock culture to HARA-Ito's agar, no spore production was observed usually, although the fungus made a good vegetative growth. From such sterile hyphae of stock culture the present authors were successful in obtaining abundant spores by the following procedure:

A small piece of the mycelial colony of stock culture was planted on HARA-Ito's agar slant and kept at 25°C for several weeks. A part of the hard colony under the aerial mycelium was torn off, transplanted on fresh HARA-Ito's agar and was placed in an incubator and kept at 25°C for 3 to 4 weeks. This treatment was repeated 2 to 3 times. Then, pycnidial hyphal mass produced on the mycelial colony was picked up and crushed in sterilized small test-tube. The broken pycnidial hyphal mass was smeared on the entire surface of fresh HARA-Ito's agar slant and kept at 25°C for 2 to 3 weeks. This treatment was repeated 2 to 3 times. In the meantime, many pycnidia containing pycnospores were produced on the agar, and then suspension of spores and hyphal fragments was inoculated to fresh HARA-Ito's agar slant and incubated at 15~20°C for 2 weeks.

By the treatment mentioned above, abundant spore production took place on the agar. Afterwards, by consecutive spore transfers at intervals of about 2 weeks good sporulation was maintained over a period of 9 years.

A



B

