

スギ赤枯病菌分生胞子の人工形成に関する研究*

陳 野 好 之⁽¹⁾

Yoshiyuki ZINNO : Studies on Artificial Sporulation of *Cercospora*
sequoiae ELLIS et EVERHART, the Needle Blight Fungus
 of *Cryptomeria japonica*

要 旨 : スギ赤枯病の伝播と感染に重要な役割を持つ病原菌 *Cercospora sequoiae* 分生胞子の人工培地上における多量形成法の開発研究について述べた。スギ赤枯病菌は他の *Cercospora* 属菌と同様に、人工培地上で分生胞子を形成しない性質を有する。このために、実験に多くの分生胞子を必要とする病理学的諸研究や室内での防除薬剤検定などの重要研究が実施できずに残されていた。本報では従来試みられなかった本菌分生胞子の新しい人工多量形成法を開発して、この課題を解決した。すなわち、寒天培地上に生育させた本菌の菌糸（小型菌そう）を特定の液体培地に移植、25°C、15~20日間振とう培養する。これによって培地内に球形、黒色、堅い小型の菌糸塊（菌核様体）が形成される。これらの菌核様体を培地より取り出して温室に収め、25°C、光条件（自然光下または処理前半に人工光照射、処理後半暗黒下）を加味して約5日間保持することによって、菌核様体表面に多量の分生胞子を密生させることに成功した。この分生胞子形成法によると、宿主や分離源の違いとは無関係に、新しい分離菌株のすべてに胞子形成が認められた。分生胞子が形成された菌核様体を殺菌水に入れ、約5°C、約20時間保存した後に軽く振れば分生胞子浮遊液が得られる。これらの分生胞子はスギ実生苗やさしき苗に対してかなり激しい病原性を示した。また、本法に若干の改良を加えることにより、他の数種 *Cercospora* 属菌の分生胞子形成を可能にした。

目 次

I 緒 言	2
II スギ赤枯病の研究史	3
III 人工培地上におけるスギ赤枯病菌分生胞子の形成	4
1. <i>Cercospora</i> 属菌の人工培地上における分生胞子形成に関する既往の研究	5
2. 振とう培養によって形成されるスギ赤枯病菌の菌核様体からの分生胞子形成法 （振とう培養による分生胞子形成法）	7
1) 菌核様体の測定と分生胞子計数	7
2) 菌核様体の発達と胞子形成におよぼす接種源の影響	8
3) 振とう培養によるスギ赤枯病菌の菌核様体の産生条件	10
4) グロスカビネット内におけるスギ赤枯病菌の菌核様体からの分生胞子形成条件	26
5) スギ赤枯病菌の菌核様体内の含有糖類が分生胞子形成におよぼす影響	35
6) スギ赤枯病菌の菌核様体構成菌糸の形態	39
7) スギ赤枯病菌の培養菌糸の分生胞子形成	42
8) 振とう培養法によって形成されたスギ赤枯病菌分生胞子の病原性	47
IV 数種 <i>Cercospora</i> 属菌に対する振とう培養による分生胞子形成法の適用実験	55
V 総合考察とまとめ	63
引 用 文 献	65
図 版 説 明	71
Summary	74
Plate	1~8 

1978年7月19日受理

保 護—17 For. Prot.—17

(1) 保 護 部

* この報告は「スギ赤枯病菌分生胞子の形成ならびに分散に関する研究—とくに人工培地上における分生胞子の多量形成法の開発について—」という題名で、京都大学へ提出した学位請求論文の一部である。

I 緒 言

スギ苗木の赤枯病は、その被害の激しさ、まん延の速さから、わが国林業苗畑における最も重要な病害として古くから知られている。

本病に侵されたスギ苗木は、初め地際部に近い針葉が急速に褐変枯死し、しだいに上部にまん延して、激しいものでは多数の苗木が完全に枯死して惨状を呈する。また、罹病苗木の緑色主軸に形成された壊死斑（胴枯型病斑）は造林後に溝腐病に移行する。したがって、スギ赤枯病は単に苗畑における疾病にとどまらず、造林地にまで影響を及ぼすこととなる。

わが国におけるスギ苗木の養成は北海道を除く全国各地の苗畑で行われ、林業統計要覧（林野庁、1973）によると、昭和46年度の山行苗生産本数は約4億3,000万本に達し、苗木総生産本数の約35%を占める。このことは、スギがヒノキ、マツ類の主要樹種をしのいで、わが国における最も重要な樹種であることを示している。

スギ赤枯病に対する本格的な研究が開始されたのは第二次世界大戦以後のことで、これまでに病原菌の所属、生活史、病原性および培養菌糸の生理的性質などが究明され⁴²⁾⁴⁵⁾、これらの研究と併行して圃場における広範な薬剤防除試験が実施された結果^{95)~98)}、本病の防除法がほぼ確立されて今日に至っている。

スギ赤枯病によるスギ苗木の被害は、第二次世界大戦以後の防除法の進歩によって、かなり減少したが、最近10か年の被害報告¹⁴⁹⁾によると、年間約1,900万本にも達し、本病が現在でもなお、わが国林業苗畑における病虫害被害の王座を占めている。したがって、本病に対する十分な防除を行わないでスギ苗木を養成することは不可能であるといつてよい。

筆者は長年にわたって本病の防除試験に従事するとともに^{60)95)~98)145)146)}、本病の伝播と感染に重要な役割を持つスギ苗木における病原菌の分生胞子の形成と分散に関与する外的条件の解明を目的として、本病の激発苗畑における分生胞子採取試験と室内における風洞を用いた風、水滴などと分生胞子分散との関連性も追及してきた¹³⁹⁾。

スギ赤枯病菌 *Cercospora sequoiae* Ellis et Everhart は他の *Cercospora* 属菌と同様に人工培地上における分生胞子形成がきわめて困難な種類に属する。このことは、スギ赤枯病の研究推進上大きな障害となってきた。たとえば、本病原菌の病理学的諸実験、室内における防除薬剤スクリーニングテストおよび本病に対するスギ在来品種、クローンの耐病性に関する研究などは実験に多数の分生胞子を必要とし、未解決の重要課題として残されている。このような障害を打開する目的で、さきに、川崎らは人工培地の組成と培養方法に検討を加え、寒天培地上における分生胞子形成に成功した^{56)~59)}。しかし、この処法では常時、多量の分生胞子を供給することは困難であった。

筆者は、これとは別に、振とう培養によって本菌菌糸に対する薬剤効力試験を実施中¹⁴⁵⁾、培地内に球状の菌糸塊が形成される点に着目し、培地や培養条件を探索して、これらの菌糸塊を球形、黒色で堅い、いわゆる菌核様体 (sclerotium-like body) に発達させた後、光条件を加味した温室処理によって、多量の分生胞子を形成させる新しい方法を開発した。このような方法によって *Cercospora* 属菌の分生胞子形成に成功したとの報告はまったく見あたらない。

本報では、これらの実験的研究について詳述するが、その概要はすでに数回にわたって報告してきた^{141)~144)147)}。

この研究を行うにあたり、前林業試験場保護部長 伊藤一雄博士に終始懇篤なご指導と激励をいただき、京都大学農学部教授山本昌木博士、同大学教授堤 利夫博士、同大学教授滝本 敦博士および同大学教授上山昭則博士には本稿のご校閲、数々のご教示をいただき、筆者の研究半ばにして他界された故千葉

修博士（当時、林業試験場樹病科長）には実験の過程で有益なご助言をいただいた。また、林業試験場樹病科長青島清雄博士をはじめ樹病研究室長小林享夫博士および同研究室の方々より多くのご助言をたまり、同造林部種子研究室長浅川澄彦博士、東京大学農学部森林植物学教室鈴木和夫博士（現林業試験場九州支場）、おなじく伊藤進一郎氏、高知大学農学部伴 正敏氏（現大塚製菓株式会社）の諸氏には実験遂行上貴重なご助言をいただいた。農林省林業試験場東北、関西、四国および九州の各支場ならびに多くの県立林業試験場の樹病担当者にはスギ赤枯病標本の採取と送付の労を煩わした。林木と緑化樹木以外の *Cercospora* 属菌は北海道農業試験場てん菜部栽培第二研究室長杉本利哉博士、同草地開発第二部牧草第三研究室長荒木隆男博士、果樹試験場興津支場病害研究室長山田峻一博士、野菜試験場病害第一研究室長岸 国平博士（現農林水産技術会議事務局研究総務官）および茶業試験場病害研究室福田徳次博士らから分譲いただいた。なお、本報の原図は林業試験場保護部林 弘子主任研究官の労を煩わした。これらの諸氏に対して心から深謝の意を表する。

II スギ赤枯病の研究史

スギ赤枯病は明治末期から大正初期に全国各地にまん延し、被害は激甚をきわめ、スギ実生苗の養成が危機にひんしたといわれる³⁵⁾³⁶⁾。

川村^{53)~55)}は当時、茨城、山梨両県下でスギ枯死苗を調査し、これを赤枯病と命名した。同氏は病原菌として *Hormiscium* sp., *Pestalotia shiraiana* (*Pestalozzia shiraiana*) および *Phyllosticta cryptomeriae* の3種を報告したが、その後笠井⁴⁸⁾は *Phoma* sp. と *Pestalotia* sp. (*Pestalozzia* sp.) を、北島⁶³⁾⁶⁴⁾は *Phyllosticta cryptomeriae* と *Cercospora cryptomeriae* を病原菌として公表した。しかし、卜蔵⁹⁾は *Pestalotia shiraiana* (*Pestalozzia shiraiana*) を、原²⁵⁾は *Macrophoma sugi* を病原菌とした。

第二次世界大戦後、伊藤ら⁴²⁾は全国各地で採取した多数の罹病苗から20余種の菌類を同定し、病原性を追及して *Cercospora cryptomeriae* をスギ赤枯病病原菌として確定し、比較的検出頻度の高い *Phoma cryptomeriae* や *Pestalotia shiraiana* を含む他の菌類の病原性はきわめて微弱であることを明らかにした。その後同氏ら⁴¹⁾⁴³⁾はギガントセコイア (*Sequoiadendron giganteum*) を侵害して激的な葉枯性病害を起こす病原菌が *C. cryptomeriae* と同一菌であるところから、北米でギガントセコイア上に記載された *C. sequoiae* ELLIS et EVERHART 菌とスギ上の *C. cryptomeriae* の形態、病原性などの比較を行い、両者が同一菌であることを明らかにした。そして、スギ赤枯病菌の学名を *Cercospora sequoiae* ELLIS et EVERHART に改め、*C. cryptomeriae* SHIRAI をその異名とした。

病原菌の生理生態については、スギ葉上における越冬、分生胞子形成時期、離脱分散とこれに関与する諸条件、形態的变化、発芽条件などと菌糸の発育と栄養生理が公表された^{87)45)118)119)125)~129)139)}。

本病原菌は人工培地上での分生胞子形成が困難である。川崎ら^{56)~59)}は1965年以来、本菌の胞子形成培地を探索し、トウモロコシ、V₈ ジュースなどを主成分とした寒天培地上で、また、清原・徳重⁶⁸⁾も老熟菌糸に切断、乾燥、吸湿などの刺激を与えて胞子形成を試みて成功した。しかし、これらの処法では常時多量の分生胞子を形成させることは不可能であった。筆者は本菌菌糸の振とう培養によって形成される菌

糸塊が孢子形成能を有することを発見し¹⁴¹⁾、培養法その他の条件に検討を加えて独得の分生孢子多量形成法を考案して、この課題を解決した。

スギ赤枯病菌はスギのほか ギガントセコイアを侵すが、最近、ラクウショウ (*Taxodium distichum*) に対しても、かなり激しい病原性を有することが明らかにされた¹⁴⁰⁾。本菌のスギに対する病原性はきわめて強く、スギ実生苗に本菌の培養菌糸を接種した場合、3～4 週間の潜伏期を経て発病し、幼苗は枯死する。しかし、スギの樹齢が高まるにしたがって発病しにくくなるといわれる⁴²⁾。また、さしき苗は実生苗よりも本病に強い傾向を示し、スギ在来品種、クローン間にも感受性に差のあることが示唆され⁸⁴⁾⁴⁴⁾⁶⁷⁾¹³²⁾¹³³⁾、一方では実生苗に対する抵抗性検定も試みられてきた¹⁵⁾。しかし、これらの報告は、苗畑での観察、自然感染による圃場実験にとどまり、室内における厳密な実験はまったく行われていない。この原因は本病原菌分生孢子が常時、多量に得られず、分生孢子を用いた人工接種ができなかった点にある。

スギの栄養と本病の被害に関しては、圃場試験で窒素肥料の加用が被害を促進し、りん酸とかり肥料が被害を軽減するとの報告⁸¹⁾¹⁰⁹⁾と、これに対する否定的な結果⁹⁵⁾があったが、近年、砂耕苗に本病原菌糸を接種して、窒素とりん酸欠乏で発病が激しく、かり欠乏や窒素過用の影響は比較的少ないとの結果が公表された⁴⁴⁾。

昭和初期に、北島⁶⁵⁾⁶⁶⁾によって発見命名された溝腐病はスギ造林木の樹幹面に縦の溝が形成される病害で、その原因は不明であった。患部の横断面は不規則なおうとつを生じ、材部は変色、腐朽して中心部には枯死枝が残る。伊藤⁹³⁾⁴⁴⁾は本病の被害調査、病原菌の分離検出とその接種実験によって、本病は苗木時代に赤枯病菌に侵されてできた緑色主軸上の壊死斑(胴枯型病斑)が原因であることを究明した。その後、筆者ら¹⁴⁸⁾は赤枯病の罹病苗が造林地に持ち込まれた場合、これらに形成された分生孢子が感染源となって、いわゆる本病の林内感染が起こり、新たな溝腐患部が形成される事実を明らかにした。

本病の防除に関しては、明治末期から第二次世界大戦までは、育苗的な防除処理と薬剤防除試験が行われ、有効薬剤としてボルドー液が取り入れられていた¹⁸⁾²²⁾³¹⁾⁵⁴⁾⁶³⁾。しかし、当時の防除研究は病原菌が不明のために、不備な点が多かった。第二次世界大戦以後、野原と筆者は病原菌に関する研究結果⁴²⁾⁴⁵⁾に基づき、圃場を使った防除試験を行い、ボルドー液の有効性、本剤の散布濃度と時期および回数、防除機具などに検討を加えて本病の防除法をほぼ確立した^{92)～98)}。

近年、苗畑労働力不足を補う薬剤散布法の改善が求められ、筆者と川崎らはボルドー合剤に代わる省力有効薬剤の探索に努め、有機硫黄系の 2, 3 の殺菌剤の有効性を明らかにし、これにポリビニール系の固着剤を加用して散布回数の節減を計った⁶⁰⁾¹⁴⁵⁾¹⁴⁶⁾。これらの防除試験は本病汚染苗畑で自然感染によって行われてきたもので、莫大な労力とおのおの 2～3 年の繰り返し実験を必要とした。今後は本菌の分生孢子形成法が開発されたことにより、室内またはガラス室内スクリーニングテストが可能となり、苗畑での薬剤防除試験も能率的に行われることとなろう。

III 人工培地上におけるスギ赤枯病菌分生孢子的形成

スギ赤枯病菌の分生孢子形成研究に着手したのは 1965 年にさかのぼる。当初は川崎らと共同で、培地組成と菌そうの継続移植法⁴⁰⁾の応用によって、特定の寒天培地上で分生孢子形成に成功した^{56)～59)}。しかし、この処法では分生孢子形成が特定の菌株に限定され、形成量も不安定で、しかも、菌そう上に形成された分生孢子を菌糸の混在しない状態で取り出すことが困難で、必要なときに常に多量の孢子を供給する

ことができなかった。一方、筆者はスギ赤枯病菌の菌糸に対する抗生物質剤の効力を振とう培養によって検討中¹⁴⁵⁾、培地内に黒色で小型、やや堅いマリモ状の菌糸塊が形成される事実を知った。さらに、伊藤ら⁴⁵⁾はスギ赤枯病菌の菌糸をスギ苗木に人工接種して、針葉上に噴霧された微小な菌糸塊上に分生胞子形成を認めている。振とう培地内に形成された菌糸塊はスギ針葉上のものに似た形状を示していたので、1968年以降、振とう培養条件に検討を加えて、これらの菌糸塊を黒色で堅い光沢を有する球状の菌糸塊、つまり、菌核様体に発達させることができた。さらに、これらの菌核様体に光条件などを加味した湿室処理を行って、その全面におびたく多量の分生胞子を形成させる独自の方法を開発した。このような処理による *Cercospora* 属菌の分生胞子形成法は筆者の知るかぎり内外の文献に見あたらない。

本文では振とう培養によるスギ赤枯病菌の新しい分生胞子形成法（以下、振とう培養による分生胞子形成法）を中心として述べるが、この方法がスギ赤枯病菌の多くの培養菌株に適用できるかどうか、また、形成された分生胞子の形状、発芽能およびスギ苗木に対する病原性についても述べる。

1. *Cercospora* 属菌の人工培地上における分生胞子形成に関する既往の研究

Cercospora 属菌の人工培地上における分生胞子形成に関する研究は、かなり古くから内外多数の研究者によって行われてきた。これらの報告にみられる胞子形成に関与する要因は、きわめて複雑であるが、大別して生物学的要因、化学（栄養）的要因および物理的要因の3つに区分することができる。以下、これらの要因について現在までの研究経過の概要を述べる。

まず、生物学的要因に支配されると述べた報告としては *Cercospora musae* の胞子形成は環境条件に左右されず、遺伝的に胞子形成能を持つ菌糸と持たない菌糸が存在することを見だし、胞子形成能を有する菌糸の選抜を試みた報告¹¹⁾、*C. kikuchii* については胞子形成能を持った菌株を選抜した報告⁴⁶⁾がある。また数種の本属菌では接種源として用いた菌糸が胞子形成能を示すのは分離培養の初期で、培養の経過にしたがって、しだいに形成能の低下または消失を招くといわれ^{2)45)88)~91)}、この解決策として胞子形成のおう盛な菌糸を一定期間ごとに継続移植する方法がとられてきた³⁹⁾⁵⁷⁾⁹⁰⁾¹¹⁴⁾。しかし、このような現象とは逆に、古い培養菌株だけに胞子形成が認められるとの異論もある²⁸⁾⁶⁸⁾。このほかに、培地に菌糸片を懸濁させたり、菌糸浮遊液を塗布したり、酵母抽出液のような他の生物学的要因の添加が有効だとの報告もみられる¹²⁰⁾。

化学的要因に胞子形成因子を求めた報告としては、まず、培地組成の検討がある。この場合、*Cercospora* 属菌に共通した胞子形成培地は見あたらないが、ブドウ糖加用ジャガイモ煎汁寒天培地とニンジンとその葉の煎汁寒天培地が多くの *Cercospora* 属菌と *Cercosporella* 属菌に使われている¹²⁰⁾。また、それぞれの *Cercospora* 属菌の感受性植物の茎、葉あるいは根などの煎汁や抽出液を主体とした培地²⁾⁴⁰⁾⁸⁷⁾⁸⁹⁾⁹⁰⁾¹¹³⁾¹³¹⁾¹³⁵⁾や感受性植物以外の植物茎葉および種子の煎汁と抽出液添加培地⁵⁾⁵⁶⁾⁶²⁾⁸⁸⁾¹⁰⁸⁾¹¹⁷⁾、さらに、最近ではV₈ジュース添加培地⁶⁾⁵⁸⁾¹⁰⁸⁾¹¹⁴⁾などで成功した例がある。なお、植物体の茎葉をそのまま培地とした報告¹⁶⁾⁸⁰⁾⁸⁸⁾は植物体の組成を変質させない特殊な利用法として興味深いが、おなじ目的から培地の殺菌方法を常圧蒸気殺菌⁶¹⁾や propylene oxide による殺菌¹³⁸⁾を取り入れた報告も注目される。半合成と合成培地については、炭素源と窒素源（無機窒素と遊離アミノ酸類）の種類と添加量および混合割合が *Cercospora* 属菌の菌糸の生育と胞子形成に及ぼす影響が追及された⁷⁾⁸⁾¹⁰⁾⁴⁰⁾⁶²⁾⁷⁷⁾¹¹²⁾¹¹³⁾¹¹⁹⁾¹³⁰⁾。しかし、これらの報告で見るかぎり、*Cercospora* 属菌の種類によってそれぞれ異なった対応が示され、一定の傾向が認められない。培地に含まれる微量要素のうち、ビタミン類の影響については、*C. musae* がサイアミンを必須栄

養源とし⁸¹⁾、スギ赤枯病菌はこれを必須とはしないが、生育促進に役だつといわれる。しかし、胞子形成に影響を及ぼすかどうかは明らかでない¹¹⁸⁾。

以上述べた胞子形成培地の多くは固体培地を用いたもので、液体培地が固体培地に勝るとの報告は見られない。とくに、液体振とう培養によって *Cercospora* 属菌の分生胞子形成を試みた報告はまったくない。

つぎに、物理的要因としては、まず、培養温度の影響がある。胞子形成の適温範囲は菌糸のそれよりも狭く、適温範囲は *Cercospora* 属菌の種類によっても異なり^{13) 58) 84)}、なかには、それほど厳密な規制を必要としないもの^{68) 111)}と変温が有効なものもある¹¹⁴⁾。

関係湿度については、スギ赤枯病菌の古い菌そうを湿室に移して胞子形成を試みた報告⁴⁶⁾や、関係湿度100%で胞子形成を認めた報告⁶⁾は、胞子形成時に十分な湿度を必要とする例であるが、乾湿の交替とやや乾燥気味が有効な場合もある⁶⁸⁾。

近年、ある種の菌類では光が胞子形成にとって重要な因子として注目されてきた^{49) 99)}。不完全菌類の叢生菌目 (Moniliales) に属する植物病原菌としては、イネいもち病菌 *Pyricularia oryzae*¹⁰³⁾、トマト黒斑病菌 *Alternaria tomato*¹⁾、タバコ赤星病菌 *Alternaria longipes*¹⁹⁾、*Alternaria solani*^{17) 110)}、ナシ黒斑病菌 *Alternaria kikuchiana*¹⁰²⁾、オオムギ斑葉病菌 *Pyrenophora graminea* (*Helminthosporium graminum*)²⁹⁾、イネごま葉枯病菌 *Cochliobolus miyabeanus* (*Helminthosporium oryzae*)²⁶⁾ および *Fusarium* spp.¹⁰¹⁾ などの分生胞子形成が光によって促進されるといわれる。*Cercospora* 属菌では *Cercospora* spp.⁶²⁾、クローバー斑点病菌 *C. zebrina*⁶⁾、サトウダイコン褐斑病菌 *C. beticola*^{12) 13)}、タバコ白星病菌 *C. nicotianae*¹¹¹⁾、マツ葉枯病菌 *C. pini-densiflorae*¹¹⁴⁾ およびスギ赤枯病菌^{59) 141)}があげられる。これらの菌類の光に対する反応はさまざまで、光の連続照射、明暗の交替および日長時間などの影響を受けるが、とくに、有効波長域の存在が注目される。たとえば、350 nm 付近の波長を有効とするものにサトウダイコン褐斑病菌¹⁴⁾、ナシ黒斑病菌¹⁰²⁾およびイネいもち病菌¹⁰³⁾が、400~450 nm 付近ではナシ黒星病菌 *Venturia nashicola*¹²¹⁾が、360~480 nm ではタバコ赤星病菌¹⁹⁾が知られている。

その他の物理的要因としては、オゾン¹⁰⁶⁾、菌糸の機械的損傷が有効となった例がある⁶⁸⁾。

高井¹²⁰⁾は菌類の胞子形成を菌体内部の条件、すなわち、細胞間の影響や反応によって起こされる場合と、物理化学的な外部からの刺激、すなわち、外的条件によって起こされる場合とに分けている。このうち、内的条件による場合はほとんど普遍的な様式で働くのに対して、外的条件の場合には量質ともに一定せず、菌の種類によってはなほだしく普遍性に欠ける。したがって、ある種の菌に有効な条件が他の種類には不適となる場合が多い。上述した胞子形成要因のうち、外的条件に関する実験のほとんどが普遍性を持たない。一方、このような胞子形成要因は、それ単独では決定的要因とはなりえないようで、いくつかの因子の総合、組み合わせによってもたらされるのが普通で、菌類の胞子形成要因はきわめて複雑多岐にわたるといえる。

本項で述べた *Cercospora* 属菌の人工培地における分生胞子形成に関する従来の研究も、胞子形成数が不十分かつ不規則であることが多く、必要なときに多量の分生胞子が常時えられる方法は開発されていないのが現状で、このことは、スギ赤枯病菌においても決して例外ではない。

2. 振とう培養によって形成されるスギ赤枯病菌の菌核様体からの分生胞子形成法 （振とう培養による分生胞子形成法）

振とう培養による分生胞子形成法は大別して次に示す3段階の操作を必要とする。すなわち、

- (1) 接種源の前培養
- (2) 振とう培養による菌核様体の産生
- (3) 菌核様体からの分生胞子形成

以下、これらの実験結果を順次述べるが、あわせて、スギ赤枯病菌の培養菌株の形成能の比較と形成された分生胞子の発芽能、病原性についての実験結果も述べる。

1) 菌核様体の測定と分生胞子計数法

本項の実験材料と方法は、それぞれの項目で触れることとし、ここでは各項目に共通した菌核様体の測定、分生胞子形成程度および分生胞子計数法を述べる。

a. 菌核様体の大きさの測定

振とう培養が終了した培地を円形平底のガラス皿（直径 16 cm、高さ 4 cm）に流し込み、培地内の菌核様体を殺菌ピンセットで取り出し、殺菌水の入ったシャーレに移して洗浄する。あらかじめシャーレの底に敷いた方眼紙の目盛りから菌核様体の長径と短径を読みとり、その平均値を菌核様体の大きさ（直径）とした。

b. 分生胞子形成程度

大きさを測定した菌核様体はろ紙上で乾かし、平面寒天（3%）の入ったシャーレ内に入れて 25°C、関係湿度約 30%、室内に設置したコイトロン（KB-10）で 5 日間保持した後、実体顕微鏡（×40～80）下で菌核様体表面を観察した。これによって、体表面の菌糸と分生子梗、分生胞子形成状態が容易に判別できた。これらの結果をつぎに示す基準にあてはめ、次式によって分生胞子形成程度（指数： D ）を求めた。

- 分生胞子をまったく形成しない……………指数 0
 分生子梗わずかに散生して分生胞子を形成するが、大部分は気中菌糸に覆われる……………指数 1
 分生子梗疎生して分生胞子を形成、局所的に菌糸生育する……………指数 2
 分生子梗密生しておびただしい分生胞子を形成する……………指数 3

$$D = \frac{1n_1 + 2n_2 + 3n_3}{N}$$

N : 供試菌核様体の合計数

n_{1-3} : 各指数に該当する菌核様体数

1～3 : 指数

c. 分生胞子計数法

コイトロン（KB-10）内で湿室処理した菌核様体を 1 ml の殺菌蒸留水が入った小型ガラス管ビン（8 cm×1.5 cm）に入れ、軽く振り、栓をして約 5°C 下で約 20 時間保持すると多くの分生胞子が発芽することなく分生子梗から脱落する。所定時間後に管ビンを取り出し、静かに振って、すべての分生胞子を分生子梗から脱落させ、菌核様体を除いて胞子浮遊液とした。分生胞子の濃度測定は THOMA の血球計⁸⁾によった。すなわち、顕微鏡下で血球計の 400 分割（0.1 mm³）中の胞子数を数え、1 ml 当たりの胞子数、つまり菌核様体 1 個当たりの総胞子数を算定した。胞子形成数は、菌核様体がほぼ球形で、分生胞子

がその表面に均一に形成される場合が多いので、菌核様体の直径から求めた表面積 1 cm^2 当たりの形成数で比較した。各実験とも菌核様体 10~20 個について、5 回ずつ分生孢子数を数えた。

2) 菌核様体の発達と孢子形成に及ぼす接種源の影響

分生孢子形成能を有する菌核様体産生に適した接種源を見いだす目的で、スギ赤枯病菌の分生孢子と菌糸を接種源として 2, 3 の実験を行った。

a. 接種源の種類

スギ赤枯病菌の培養菌株は林業試験場樹病研究室の保存菌株のうち、筆者ら⁵⁷⁾¹⁴¹⁾がさきに孢子形成実験に用いた CC-42 菌株 (Table 25) を使った。供試分生孢子は振とう培養による分生孢子形成法によって得たものを、上述の孢子計数法に基づき $4\sim6\times 10^5/\text{ml}$ 濃度の浮遊液を作成し、これを殺菌ピペットで 0.5 ml, 1 ml ずつ 500 ml 振とうフラスコ (培地量 100 ml) に移植培養した。供試菌糸の調製はつぎの 2 方法を用いた。a) 約 1 か月間培養した PDA 試験管斜面培地上の菌そうに殺菌水 10 ml を加え、白金線で菌そう表面を軽くこすって、菌糸浮遊液を作製し、振とうフラスコに 1 ml, 2 ml ずつ移植した。b) シャーレ上の PDA 平面培地に上記 a) の菌糸浮遊液を流し込み、 25°C 、約 15 日間培養し、新生する小型菌そうのうち、直径約 2~3 mm の菌そうを寒天培地とともに切り取って、1 フラスコ当たり 10 個, 20 個ずつ移植培養した (Plate 1, A)。

実験結果： 25°C 、17 日間振とう培養で得られた菌核様体の大きさと分生孢子形成程度をみると (Fig. 1), 小型菌そう 10 個移植区では菌核様体の発達が著しく、球形、黒色で直径 5 mm 強に達した。これに対し、菌糸と孢子浮遊液ではいずれも小型であった。孢子形成程度は小型菌そう 10 個移植区ですぐれ、

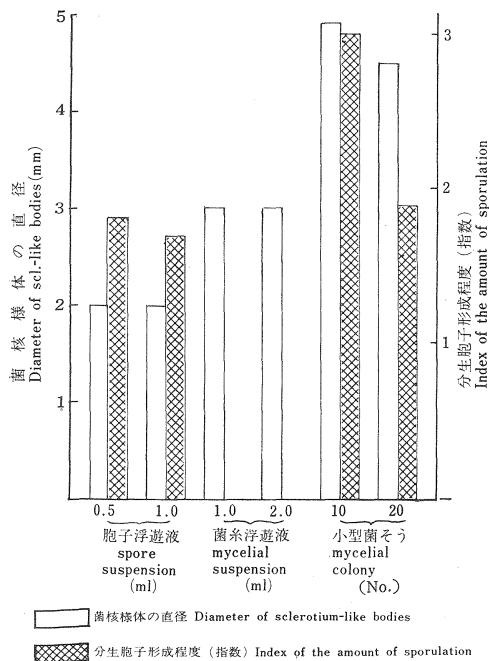


Fig. 1 スギ赤枯病菌の分生孢子形成に対する接種源の影響
Effect of inocula on sporulation of *Cercospora sequoiae*.

小型菌そう 20 個区と孢子浮遊液区では産生された菌核様体の一部に白色綿状の菌糸が生育し、孢子形成程度は低く、菌糸浮遊液区では孢子がまったく形成されなかった。肉眼観察によると、小型菌そう区では移植された菌そうがすべて菌糸塊に発達し、培養終了時にはほぼ球形で表面が黒色、平滑、光沢があって堅い菌糸塊、つまり、菌核様体 (子座様体) (sclerotium-like body, stroma-like body) に達した。これに対し、孢子と菌糸浮遊液区では、産生された菌糸塊の多くは不整形で軟らかく、発達不良、産生数も不規則で 1 フラスコ当たり平均 3 個程度にとどまった。

b. 接種源の大きさと接種量

実験 a で小型菌そうを接種源とした場合に、菌核様体の発達と孢子形成がすぐれたので、これらの菌そうの大きさと移植数を検討した。

スギ赤枯病菌の菌糸濃度を変えた浮遊液を作り、シャーレに流し込んで培養した。これによって新生菌そうの発達に差を生じ、直径 2 mm 程

度から 10 mm 程度の菌そうが得られたので、これを接種源として使用した。接種源の大きさの実験では、直径 2 mm と 5 mm 区では 1 フラスコ当たり 10 個、10 mm 区では 5 個移植し、移植数の実験では直径 2 mm 程度のものを 5, 10, 20, 30, 40 および 50 個移植した。この他の方法は実験 a に準じた。

実験結果：接種源の大きさの結果（Fig. 2）によると、小型菌そうの 2 mm と 5 mm 区では直径 5～6 mm 程度の球形の菌核様体に発達したが、10 mm 区ではさらに大型に発達し、角ばった皮革状または棒状を呈して一方に巻き込むものもあって不整形になった。しかし、表面の色調、堅さなどは小型菌そう区と変わらなかった。胞子形成程度は小型菌そう区ですぐれた。大型菌そう区でも、一部に分生子梗の発達に若干のむらを生じ、気中菌糸が局所的に生育した個体もあったが、全体的にはかなりおう盛な胞子形成が認められた（Plate 1, D, E）。つぎに小型菌そう移植数の結果（Fig. 3）のうち、菌核様体形成では 5 個と 10 個区で直径 5 mm 以上に発達して差が認められなかった。20 から 50 個までは移植数を増すにしがって菌糸塊の発達が劣り、小型化した。分生胞子形成程度は 5～10 個区ですぐれ、30 個以上では急激に衰えた。40 個以上移植区では形成された菌糸塊が不整形で球形とならず、分生子梗の発育も疎で、一部には菌糸、分生子梗ともにほとんど発育しない菌糸塊が混在した。

c. 接種源の培養期間

スギ赤枯病菌の菌糸浮遊液を PDA 培地上に流し込み、25°C、10 日間培養で明瞭な小型菌そうが形成されたので、10 日間培養を起点とし、15 日、20 日および 30 日間培養後の菌そうを接種源とした。この他の実験方法は a に準じた。

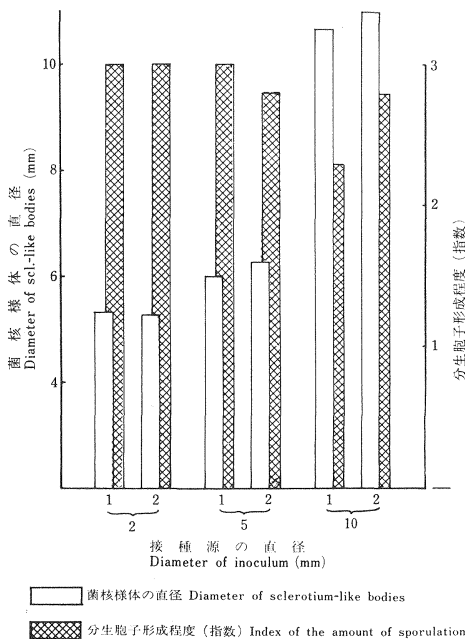


Fig. 2 接種源の大きさがスギ赤枯病菌の分生胞子形成におよぼす影響
Relation between size of mycelial colony inoculated and sporulation of *Cercospora sequoiae*.

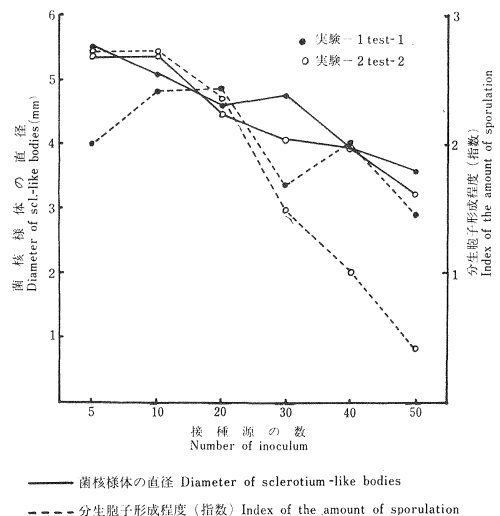


Fig. 3 接種源の移植数がスギ赤枯病菌の菌核様体の発達と分生胞子形成に及ぼす影響

Effect of numbers of mycelial colonies inoculated on growth of sclerotium-like bodies and sporulation of *Cercospora sequoiae*.

Table 1. 接種源の培養期間とスギ赤枯病菌の分生孢子形成との関係
 Relation between incubation period of inoculum and
 sporulation of *Cercospora sequoiae*

培養期間 Incubation period (day)	菌核様体の直径 Diam. of scl.-like bodies (mm)	孢子形成程度 (指数) Index of the amount of sporulation	孢子形成数 Number of conidia produced ($\times 10^4/\text{cm}^2$)	
			範囲 Range	(平均) (Average)
10	5.4	2.6	10.6~27.9	(16.3)
15	5.3	2.5	5.8~21.1	(14.5)
20	5.5	1.9	3.5~16.8	(9.7)
30	5.2	1.6	3.5~11.6	(6.8)

結果は Table 1 に示すように、この程度の培養期間のちがいで菌核様体の発達には影響を及ぼさなかった。しかし、孢子形成では10~15日間培養の新鮮な菌そうですぐれ、それ以上の培養ではしだいに低下する傾向が認められた。

d. 考察

人工培地上での孢子形成の接種源としては菌糸よりも孢子の方が有利だとの説⁸⁹⁾¹²⁰⁾がある。しかし、この場合には孢子または菌糸を固体培地上に移植培養して直接孢子を形成させる方法がとられてきた。振とう培養による孢子形成法は、振とう培養によって、まず菌糸塊を形成させ、さらに、これを孢子形成能を有する菌核様体にまで発達させることが必要条件となる。この点、スギ赤枯病菌の分生孢子または菌糸細片を接種源とした場合には、菌糸塊の形成が不規則で、数も少なく、十分に成熟しなかったため好適な接種源とはならなかった。これに対し、菌糸細片の浮遊液をシャーレ内のPDA平面培地に流し込み、25°C、10~15日培養後に新生する小型菌そうを培地の一部とともに切り取って接種源とした場合には、振とう培養によって、これらの菌そうが中心となった菌糸塊が形成され、培養の継続でさらに成熟発達して菌核様体となって、おびただしく多数の分生孢子が形成されるところから接種源として最適であると考えられる。なお、これらの小型菌そうの移植数は培地1l当たり10~20個がよい。また、培養10~15日程度の新鮮な菌そうが好適で、長期間の培養菌そうは孢子形成の低下を招き好ましくない。

3) 振とう培養によるスギ赤枯病菌の菌核様体の産生条件

小型菌そうを接種源として振とう培養を行う場合、培地内に孢子形成能を有する均質な菌核様体を常に形成させることが必要である。本項では、この目的を達成するための諸条件、とくに、培地の組成と培養条件について検討した。

a. 培地の検索

a) 各種培地の比較試験

多くの *Cercospora* 属菌分生孢子の形成に有効な培地として知られる¹²⁰⁾ ジャガイモ煎汁培地、ニンジン煎汁培地、ワクスマン氏培地、ホプキン氏培地、リチャード氏培地およびツアベック氏培地、スギ赤枯病菌の分生孢子形成に伊藤ら⁴⁵⁾ が用いた斎藤氏しょうゆ培地、川崎ら⁵⁷⁾ が採用した S-M-V、C-4-M-V の両培地、イネいもち病菌の孢子形成培地として知られる見里氏培地⁸⁶⁾ および栄研化学株式会社（東京）製ジャガイモ煎汁液の乾燥粉末を主体とした培地（以下、栄研ジャガイモ煎汁培地*）を用いた。

* 栄研化学株式会社製ジャガイモ煎汁粉末 4 g, ブドウ糖 15 g (pH 5.2)

培養は往復式振とう培養機 (振とう回数約 100 回/分) を用い、500 ml 振とうフラスコに培地 100 ml を入れ、高圧殺菌釜で 120°C、20 分間殺菌後、CC-42 菌株 (Table 25) の小型菌そうを 1 フラスコ当たり 10 個移植した。培養は 25~27°C、15 日間とした。

実験結果：2 回実験の平均値 (Fig. 4) によると、各培地ともに菌糸塊を形成したが、その形態には明らかな差が認められた。まず、菌糸塊の大きさをみると、栄研ジャガイモ煎汁、C-4-M-V、S-M-V、ジャガイモ煎汁 および ワクスマン氏の各培地では直径約 4~5 mm とやや大型に発達した。これに対して、他の培地では発育が劣り、ニンジン煎汁と合成培地では 3 mm 以下であった。つぎに、肉眼観察で菌核様体表面の形状を調べると、栄研ジャガイモ煎汁培地のは球形、黒色、平滑で光沢を有し、きわめて堅かった (Plate 1, C)。C-4-M-V とニンジン煎汁のものも栄研ジャガイモ煎汁に近い形状を示したが、斎藤氏しょうゆ、見里氏、S-M-V およびジャガイモ煎汁培地では球形、濃緑色~灰褐色でやや軟らかであった。ワクスマン氏および合成培地 3 種では角ばって不整形、黒色で部分的に濃緑色を呈し、しわ状、光沢を有し堅かった。

各培地に形成された菌核様体の孢子形成程度は、栄研ジャガイモ煎汁培地と合成培地のものがとくにすぐれていた。すなわち、菌核様体は新鮮な緑~濃緑色で、分生子梗は密生、多数の分生孢子に覆われていた (Plate 2)。ワクスマン氏、C-4-M-V、ニンジン煎汁およびジャガイモ煎汁培地がこれに次ぎ、その他の培地では菌核様体の表面が白色綿状の菌糸に覆われて孢子形成がまったく認められなかった。

これらの結果から、孢子が形成される菌核様体はおおむね球形、表面黒色、平滑で光沢を有し、きわめて堅いものにはほぼ限定され、供試培地 11 種の中では、栄研ジャガイモ煎汁培地が菌核様体の発達と孢子形成でとくにすぐれた培地であることが認められた。

b) 栄研ジャガイモ煎汁培地の組成の検討

実験 a) の結果、最適培地に認められた栄研ジャガイモ煎汁培地は、栄研化学株式会社製のジャガイモ煎汁の乾燥粉末とブドウ糖を組成とする。そこで、両者の最適組み合わせを見いだす目的でつぎの実験を行った。

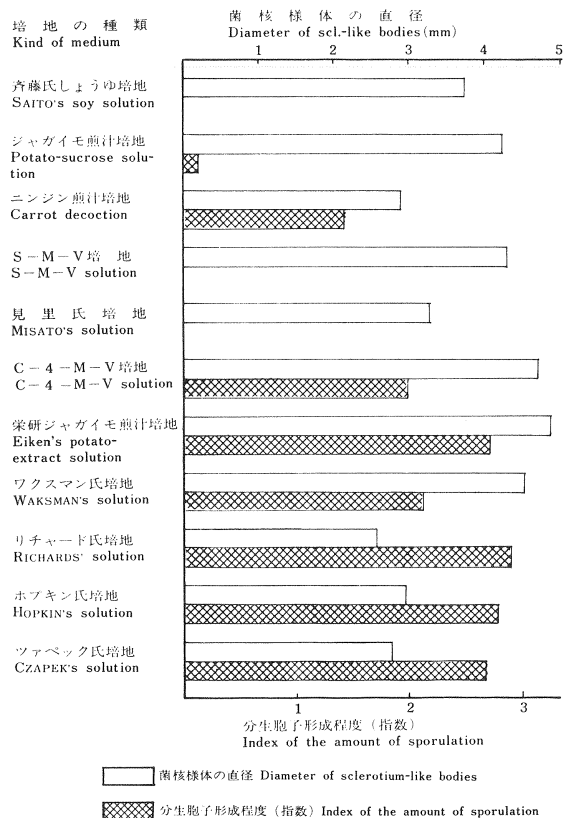


Fig. 4 培地の種類とスギ赤枯病菌の分生孢子形成との関係
Relation between kinds of medium and sporulation of *Cercospora sequoiae*.

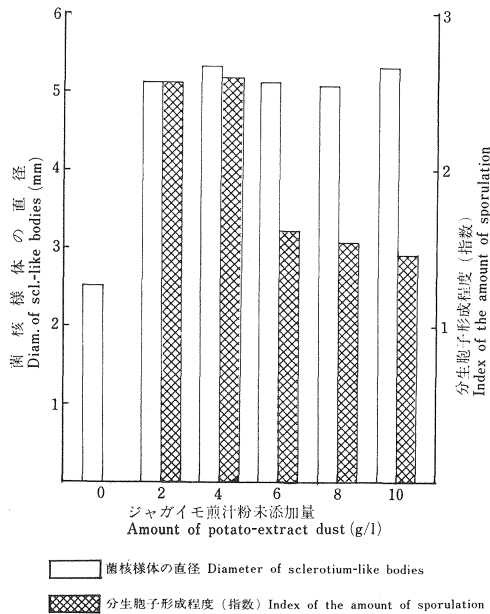


Fig. 5 スギ赤枯病菌の分生胞子形成におよぼす栄研ジャガイモ煎汁粉末添加量の影響

Effect of concentrations of Eiken's potato-extract dust on sporulation of *Cercospora sequoiae*.

実験 1 ジャガイモ煎汁粉末の添加量

培地 1 l 当たりブドウ糖を 10 g とし、ジャガイモ煎汁粉末を 0 g, 2 g, 4 g, 6 g, 8 g および 10 g 添加した培地で菌核様体の発達と胞子形成程度を調べた。この結果は Fig. 5 に示すようで、菌核様体の大きさには無添加区を除いたすべての区で差が認められなかった。一方、胞子形成程度は 2～4 g 添加区で下がったが、6 g 以上の添加区では低下した。なお、無添加区ではまったく形成されなかった。

実験 2 ブドウ糖の添加量

ジャガイモ煎汁粉末を適量の 4 g とし、ブドウ糖を 1～30 g 加えた。この結果 (Fig. 6) は、3～30 g までの広い範囲で菌核様体の発達と胞子形成がすぐれ、差が認められなかった。1～2 g 区では胞子形成が低下し、無添加区ではまったく形成されなかった。

実験 3 ジャガイモ煎汁粉末とブドウ糖の最適混合比

実験 1, 2 の結果から、両者の最適混合割合を求めるために、Table 2, 3 に示すような組み合わせによって菌核様体の発達と胞子形成程度を調べた。この結果は Table 2, 3 に示したとおりであるが、菌核様

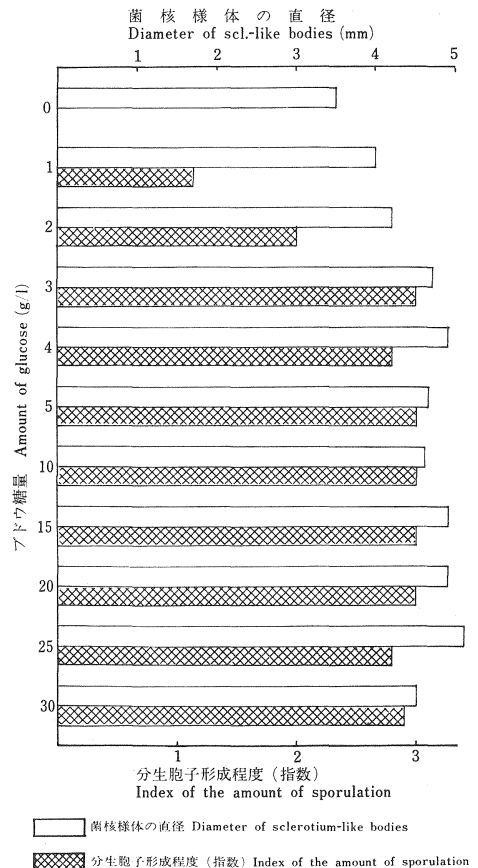


Fig. 6 スギ赤枯病菌の分生胞子形成におよぼすブドウ糖濃度の影響

Effect of concentrations of glucose on sporulation of *Cercospora sequoiae*.

Table 2. ブドウ糖とジャガイモ煎汁粉末の添加量がスギ赤枯病菌の菌核様体の発達におよぼす影響

Effect of the glucose-potato extract dust ratio in the medium on growth of sclerotium-like bodies of *Cercospora sequoiae*

ブドウ糖濃度 Glucose concentration (g)	ジャガイモ煎汁粉末濃度 Potato extract dust concentration (g)					
	0	2	4	6	8	10
0	—	3.8	3.6	4.3	4.7	5.0
5	2.6*	4.5	4.6	5.1	5.1	4.9
10	2.5	5.1	5.3	5.1	5.1	5.3
15	2.6	3.9	5.0	5.4	5.0	5.4
20	2.8	3.9	4.9	5.0	5.1	5.4

* 菌核様体の直径 Diameter of scl-like bodies (mm).

Table 3. ブドウ糖とジャガイモ煎汁粉末の添加量がスギ赤枯病菌の孢子形成におよぼす影響

Effect of the glucose-potato extract dust ratio in the medium on sporulation of *Cercospora sequoiae*

ブドウ糖濃度 Glucose concentration (g)	ジャガイモ煎汁粉末濃度 Potato extract dust concentration (g)					
	0	2	4	6	8	10
0	—	0.9*	0	0.7	2.3	2.0
5	0	2.6	3.0	2.8	2.3	2.4
10	0	2.8	3.0	2.8	1.7	1.3
15	0	2.9	3.0	2.6	2.8	2.0
20	0	2.9	3.0	2.5	1.5	1.5

* 孢子形成程度（指数） Index of the amount of sporulation.

体が直径 5 mm 以上のものはジャガイモ煎汁粉末 2 g とブドウ糖 10 g を組み合わせた場合から、これらを 10 g と 20 g 組み合わせた場合まで広範囲の培地で認められた。一方、孢子形成程度で指数 2.8 以上を示したものは、ジャガイモ煎汁粉末 2 g とブドウ糖 10 g の組み合わせから、おなじく 6 g と 10 g までと比較的狭い範囲に限られ、さらに指数 3 のものはジャガイモ煎汁粉末 4 g とブドウ糖 5~20 g の場合に限定された。以上の結果から、孢子形成程度で最もすぐれたジャガイモ煎汁 4 g と、この添加区で菌核様体の発達顕著なブドウ糖 10 g の混合をもって、この培地の最適組成とした。

c) Difco ジャガイモ煎汁培地の検討

栄研ジャガイモ煎汁の乾燥粉末は、現在市販されていないため、同社に特注するか、同社製ポテトデキストロース寒天培地「栄研」をろ過し、寒天を除いて使用しなければならないので不便である。そこで、これに代わるものとして Difco ジャガイモ煎汁粉末 (Difco Laboratories U. S. A.) を用いて実験を行った。

Table 4. Difco ジャガイモ煎汁粉末の濃度とスギ赤枯病菌
の分生孢子形成との関係Relation between amount of the dehydrated potato extract (Difco
Laboratories, U. S. A.) and sporulation of *Cercospora sequoiae*

濃 度 Amount (g/l)	菌核様体の直径 Diam. of sclerotium- like bodies (mm)	孢子形成程度(指数) Index of the amount of sporulation	孢 子 形 成 数 No. of conidia produced ($\times 10^4/\text{cm}^2$)
0	2.9	0	0
1	4.0	0 0.8	0~6.3 (3.7) 0~4.7 (1.9)
2	4.5	0.3 2.6	4.0~21.1 (12.2) 3.5~15.2 (8.7)
3	5.1	1.7 2.7	9.6~41.4 (23.8) 7.4~15.4 (11.6)
4	5.5	2.5 2.6	10.6~49.0 (30.7) 6.2~14.2 (10.0)
5	5.5	2.6 2.5	18.7~56.7 (38.6) 8.0~17.1 (12.4)
6	5.6	2.6 2.5	27.6~53.1 (38.1) 8.1~20.3 (14.0)

培地 1 l あたりブドウ糖 10 g を加えた。

Glucose was added at the rate of 10 g per liter of medium.

実験はブドウ糖 10 g に対し Difco ジャガイモ煎汁 0~6 g 添加した。この結果は Table 4 に示す。Difco ジャガイモ煎汁粉末 4~6 g とブドウ糖 10 g の組成で菌核様体は十分に発達した。しかし、孢子形成では体表面の一部に気中菌糸が生育し、栄研ジャガイモ煎汁粉末よりいくらか劣る傾向を示した (Plate 3, C~E)。

d) ジャガイモ煎汁培地の検討

ジャガイモから直接作製したジャガイモ煎汁培地は *Cercospora* 属菌の孢子形成培地として古くから使われてきた^{8) 27) 105)}。しかし、振とう培養の場合には、実験 a) で示したように、形成された菌核様体は球状に発達するが軟らかで、孢子形成程度は栄研ジャガイモ煎汁培地より劣った。一方、筆者が行った振とう培養法の予備実験¹⁴¹⁾では孢子形成がすぐれていた。このように、ジャガイモ煎汁培地は安定しない結果となる傾向がある。この原因として、供試ジャガイモの品質の不均一、煎汁調製操作のわずかな違いによる濃度の影響、煎汁に含まれる澱粉粒などの固形物の多少があるように考えられた。そこで、これらの諸点を考慮したジャガイモ煎汁を調製して再実験を試みた。

ジャガイモは新鮮なものを選び、蒸留水 1 l に対して 200 g を細かく切って投入し、約 30 分間煮沸後 2 枚のガーゼでろ過して作成した。また、この煎汁を再び約 10 分間煮沸し、冷却後ろ過 (東洋ろ紙 No. 1) して固型物を除いた。炭素源としてブドウ糖 10 g を加えた。

実験結果は Table 5 で示すように、菌核様体の発達はろ過液の標準区と 1/2 区でやや大型になったが、全体として十分に発達して差が認められなかった。孢子形成程度は煎汁そのままよりもろ過液ですぐれ、とくに、ろ過液の 1/2~1/5 濃度ですぐれた。これらの結果は栄研ジャガイモ煎汁培地よりは劣るが、ジャガイモより直接煎汁を作成して振とう培養する場合には、ジャガイモ 200 g/l、30 分間煮沸の 1/2 濃度

Table 5. ジャガイモ煎汁がスギ赤枯病菌の分生胞子形成におよぼす影響
Relation amount of potato decoction and sporulation
of *Cercospora sequoiae*

ジャガイモ 煎汁濃度 Amount of decoction	実験番号 Exp. number	菌核様体の直径 Diameter of scl.-like bodies (mm)	胞子形成程度 (指数) Index of the amount of sporulation	胞子形成数 No. of conidia produced ($\times 10^4/\text{cm}^2$)	
				範 囲 Range	(平 均) (Ave.)
標準濃度液 Standard	1	5.2	1.4	7.9~10.8	(9.4)
	2		1.0	2.2~14.1	(8.3)
$\times 1/2$	2	5.2	1.0	8.8~27.8	(13.7)
	1	5.5	0.9	1.9~6.7	(4.3)
標準濃度液* Standard	2		1.0	5.3~20.0	(12.6)
	1	5.7	2.2	4.5~24.0	(12.0)
$\times 1/2^*$	2		2.6	24.5~47.9	(42.5)
	1	5.4	0.9	1.4~16.3	(7.5)
$\times 1/5^*$	2		2.6	31.1~68.8	(51.2)
	2	4.8	1.4	1.4~8.3	(4.8)
	2				

標準濃度液：蒸留水 1 l あたりジャガイモ 200 g。

培地 1 l あたりブドウ糖 10 g を加えた。

Standard : Potato 200 g per liter of distilled water.

Glucose was added at the rate of 10 g per liter of medium.

* ジャガイモ煎汁液をろ紙でろ過した (東洋ろ紙 No. 1)。

Filtrated through a filter paper (Toyo filter paper No. 1).

Table 6. スギ針葉煎汁がスギ赤枯病菌の分生胞子形成におよぼす影響
Effect of *Cryptomeria* needle decoction on sporulation
of *Cercospora sequoiae*

スギ針葉煎汁 Needle decoction	栄研ジャガイモ煎汁粉末 Eiken's potato extract dust (g)	ブドウ糖 Glucose (g)	培地の pH 値 pH of medium		菌核様体の直径 Diam. of scl.-like bodies (mm)	胞子形成程度 (指数) Index of the amount of sporulation	胞子形成数 No. of conidia produced ($\times 10^4/\text{cm}^2$)
			培養前 At beginning	培養後 At last			
標準* Standard	4	10	4.7	6.8	5.5	3.0	7.1~39.4 (24.8)
	0	10	4.9	5.0	4.5	0	
	4	0	4.7	7.9	4.8	0	
	0	0	5.0	7.9	4.2	0	
半量 Standard $\times 1/2$	4	10	4.7	5.4	5.8	3.0	7.8~16.2 (11.1)
	0	10	5.0	5.0	4.1	0	
	4	0	4.7	8.0	5.6	0	
	0	0	5.1	6.7	3.6	0	

* 標準：蒸留水 1 l あたりスギ針葉 50 g の煎汁。

Standard : Needles of *Cryptomeria* 50 g per liter of distilled water.

の煎汁を再煮沸，冷却後にろ過して使用することが望ましい。

e) スギ針葉煎汁添加の影響

スギ赤枯病菌の宿主であるスギ針葉の煎汁添加が菌核様体の発達と孢子形成を増進させるかどうかを検討した。

煎汁は2年生苗木の緑色主軸の一部を含めた針葉 50 g を蒸留水 1 l に入れ，約 30 分間煮沸，ろ過して作った。基礎培地には栄研ジャガイモ煎汁培地を用いた。

実験結果 (Table 6) は，スギ針葉煎汁に栄研ジャガイモ粉末とブドウ糖を添加した区では菌核様体の発達が良く，孢子形成も顕著であった。これに対し，栄研ジャガイモ煎汁粉末とブドウ糖のいずれか一方をスギ針葉煎汁に置き換えた場合，または，スギ針葉煎汁単独区では菌核様体の発達はやや劣り，孢子形成はまったく認められなかった。結局，スギ針葉煎汁の添加は孢子形成に対して有効とは考えられない。

b. 培養温度と期間

振とう培養によって培地内に形成される菌核様体の発育と孢子形成に及ぼす培養期間と温度の影響を調べた。

a) 培養期間

培地は栄研ジャガイモ煎汁培地を用い，小型菌そうを1フラスコ当たり10個ずつ接種し，25℃で培養した。培養期間は実験1では28日間とし，この間3～4日ごとに所定数のフラスコを取り出し，形成された菌核様体の大きさと孢子形成程度を調べた。実験2では40日間培養，5日ごとに調べた。

これらの結果は Fig. 7 で示すように，接種された小型菌そうは培養5～7日ころから直径3～4 mm，球形で膨軟な菌糸塊に発達する。しかし，孢子形成はまったく認められない。培養10日ころには菌糸塊の大きさは約5 mm，球形，濃緑～黒色となるが，表面はおうとつがあって軟らかい (Plate 1, B)。孢子形成はいくらか認められたが，多くは白色綿状の菌糸に覆われて形成されなかった (Plate 1, F)。培

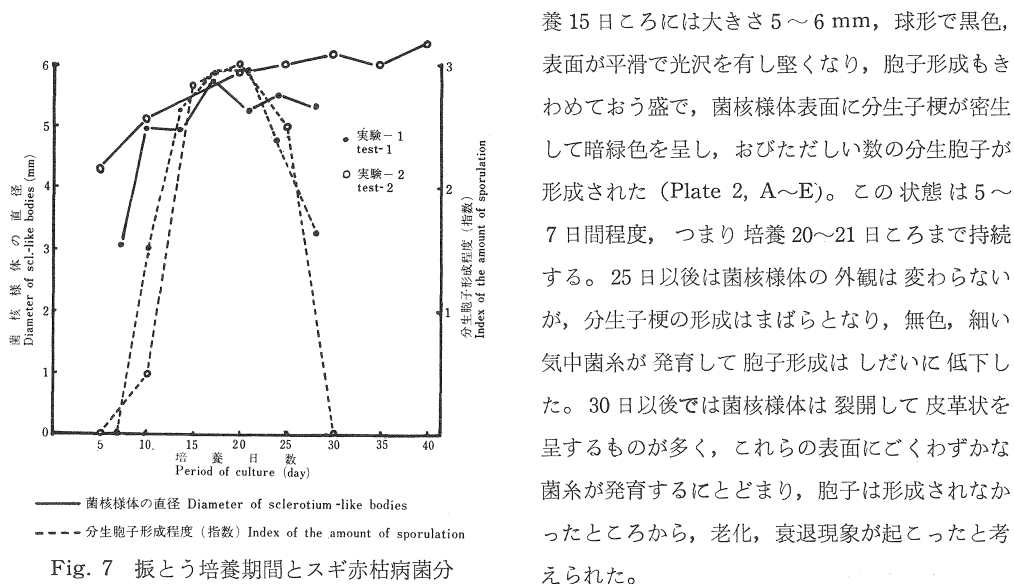


Fig. 7 振とう培養期間とスギ赤枯病菌分生孢子形成との関係

Relation between duration of culture and sporulation of *Cercospora sequoiae*.

養15日ころには大きさ5～6 mm，球形で黒色，表面が平滑で光沢を有し堅くなり，孢子形成もきわめておう盛で，菌核様体表面に分生子梗が密生して暗緑色を呈し，おびただしい数の分生孢子が形成された (Plate 2, A～E)。この状態は5～7日間程度，つまり培養20～21日ころまで持続する。25日以後は菌核様体の外観は変わらないが，分生子梗の形成はまばらとなり，無色，細かい菌糸が発育して孢子形成はしだいに低下した。30日以後では菌核様体は裂開して皮革状を呈するものが多く，これらの表面にごくわずかな菌糸が発育するととどまり，孢子は形成されなかったところから，老化，衰退現象が起こったと考えられた。

b) 培養温度

冷凍恒温槽付振とう培養機を用い。培養温度を

Table 7. スギ赤枯病菌の菌核様体の発達と分生胞子形成におよぼす培養温度の影響

Effect of temperatures on growth of sclerotium-like bodies and sporulation of *Cercospora sequoiae*

温 度 Temperature (°C)	培 養 日 数 Period shaked (day)	菌核様体の直径 Diam. of scl.-like bodies (mm)	胞子形成程度 (指 数) Index of the amount of sporulation	胞 子 形 成 数 Number of conidia produced ($\times 10^4/\text{cm}^2$)	
				範 囲 Range	(平 均) (Ave.)
15	10	3.3	0	0	
	15	3.8	0	0	
	20	3.9	1.5	3.5~25.4	(11.4)
	25	4.1	2.3	12.7~33.3	(23.6)
20	10	4.4	0	0	
	15	4.9	2.8	21.1~63.9	(41.1)
	20	5.5	2.1	5.6~43.8	(17.2)
	25	5.5	1.8	0~28.9	(9.4)
	30	5.9	0	0	
25	10	4.6	1.2	0.6~16.6	(7.4)
	15	5.2	3.0	22.7~39.2	(30.2)
	20	5.7	3.0	13.5~40.5	(29.2)
	25	5.9	2.8	5.6~13.2	(7.9)
	30	5.9	0.7	0.9~1.9	(1.3)
30	10	4.1	0.5	0~6.1	(3.4)
	15	4.4	2.5	5.7~24.6	(16.2)
	20	4.8	2.2	8.6~33.3	(18.0)
	25	5.2	1.6	5.8~26.3	(14.1)
	30	5.4	1.4	0~3.8	(1.4)

15°C, 20°C, 25°C および 30°C に規制して 10~30 日間培養した。

実験結果は Table 7 のように、菌核様体は 25°C と 20°C で大型に発達し、30°C がこれに次ぎ、15°C では小型であった。胞子形成程度と形成数も 25°C ですぐれ、15°C, 20°C, 30°C ではいくらか劣った。なお、培養適期は温度によって異なるようで、とくに、15°C 培養では 25°C の適期 15~20 日間よりも 5~10 日程度遅れることがわかった。

c. 培地の炭素源と窒素源

栄研ジャガイモ煎汁培地の主成分である ジャガイモ煎汁乾燥粉末と ブドウ糖のいずれか一方を欠いても、その混合割合を変えても、菌核様体の発達が減退し、胞子形成の低下または消滅を招く。そこで、これらの成分中、炭素源と窒素源の影響を確かめる目的で、ジャガイモ煎汁粉末を各種の窒素源に、ブドウ糖を各種の炭素源に置き換えた。培地中の糖の利用経過も検討した。

a) 各種炭素源の影響

実験に用いた炭素源はつぎの 11 種で、添加量はブドウ糖 10 g/l 中の炭素量と等量にした³⁾。栄研ジャガイモ煎汁粉末は 4 g/l とした。

単 糖 類 : ブドウ糖, 果糖, ガラクトース, アラビノース, キシロース

二 糖 類 : 麦芽糖, 乳糖, しょ糖

多 糖 類 : でんぶん

高級アルコール : グリセリン, マニトール

接種は小型菌そうを 1 フラスコ当たり 10 個とし, 25°C, 15 日間培養した。

実験結果 (Table 8) : 菌核様体の大きさはキシロースの場合 直径 6.6 mm, アラビノースの場合 4.8 mm であった。これらを除いた他の炭素源では直径 5 mm 台でほとんど差が認められない。菌核様体の形状はキシロースの場合にやや軟らかく, 淡色となったが, これ以外の炭素源では球形, 黒色で平滑, 光沢を有し, かなり堅くなった。胞子形成はキシロースとアラビノースを除いた単糖類の場合に菌核様体のほぼ全面に認められ, 指数 2.7~3.0 を示した。二糖類と多糖類では一部に菌糸が生育して胞子形成がいくらか低下した。高級アルコール類では気中菌糸がやや多く, 指数 2.5~2.7 となった。胞子形成数はキシロースの平均形成数 7.2×10^4 個を除いて, いずれも $\times 10^5$ 個に達した。とくに, ブドウ糖, 果糖およびガラクトースとしょ糖で著しかった。

Table 8. スギ赤枯病菌の分生胞子形成に対する炭素源の影響
Effect of sources of carbon on sporulation of *Cercospora sequoiae*

炭 素 源 Source of carbon	添 加 量 Amount (g/l)	実験番号 Exp. No.	菌核様体の直径 Diam. of scl.-like bodies (mm)	胞子形成程度 (指数) Index of the amount of sporulation	胞 子 形 成 数 No. of conidia produced ($\times 10^4/\text{cm}^2$)	
					範 囲 Range	(平 均) (Ave.)
ブ ド ウ 糖 Glucose	10.0	1 2	5.6	3.0 3.0	— 61.9~77.9	(68.9)
果 糖 Fructose	10.0	1 2	5.5	3.0 2.9	— 58.9~77.9	(67.1)
ガラクトース Galactose	10.0	1 2	5.3	2.7 3.0	— 52.6~83.2	(70.9)
し ょ 糖 Sucrose	9.5	1 2	5.7	3.0 2.9	— 46.0~89.4	(68.1)
麦 芽 糖 Maltose	9.5	1 2	5.3	3.0 3.0	— 37.9~61.1	(48.3)
乳 糖 Lactose	9.5	1 2	5.0	2.9 2.6	— 11.6~21.1	(18.2)
で ん ぶ ん Starch	5.0	1 2	5.5	2.8 2.8	— 25.3~64.2	(34.8)
マニトール Mannitol	10.0	1 2	5.3	2.5 2.6	— 49.5~60.0	(57.8)
グリセリン Glycerine	10.2	1 2	5.3	2.7 2.6	— 29.9~50.6	(36.4)
アラビノース Arabinose	10.0	2	4.8	2.6	28.4~52.6	(40.4)
キシロース Xylose	10.0	2	6.6	0.5	4.1~13.0	(7.2)

各培地は栄研ジャガイモ煎汁乾燥粉末 4 g/l を加えた。

Eiken's potato extract dust was added 4 g per liter to each medium.

b) 培地中の糖の消費経過

培地は栄研ジャガイモ煎汁培地を用い、炭素源はブドウ糖 10 g/l を加えた。接種源は大きさの均一な小型菌そうを 1 フラスコ 当たり 10 個ずつ移植した。実験は 3 回行い、実験 1 では 28 日間培養し、週に 2 回ずつ所定数のフラスコを取り出して分析し、実験 2 では 25 日、実験 3 では 35 日間培養し、5 日ごとに取り出した。分析試料は培地をろ過して菌糸を除き、ろ液 50 ml を中性酢酸鉛と飽和碳酸ソーダで除蛋白し、蒸留水で 1 l に薄めた。糖の定量はソモギらのマイクロ法⁸⁵⁾によった。

各培養期間ともフラスコ 3 本について 3 回ずつ定量し、その平均値を培地内の糖の残存量とした。Fig. 8 の消費量は当初のブドウ糖投与量 10 g から分析値を差し引いて示した。

実験結果は Fig. 8 のように、培地に加えられた糖は培養期間 10 日で投与量の約 30%、おなじく 20 日で 50~70%、30 日で 80% 以上が消費された。つぎに、培養時期別の消費量は、培養開始から 15 日間が活発で、とくに、10~15 日付近でおう盛であった。その後 15~20 日でやや緩慢になるが、20 日以後に再び上昇傾向が認められた。20 日以後の消費は菌核様体と、この時期にフラスコ頸部に生育してくる菌糸によるものが加わったと推定される (Plate 2, C)。

c) 各種窒素源の影響

実験 1 無機窒素源の影響

供試塩類は、硝酸塩として KNO_3 、 NaNO_3 、アンモニウム塩類として $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ を、両者を含むものとして NH_4NO_3 を用い、亜硝酸化合物として KNO_2 を用いた。基礎培地としては実験 a-a) で比較的菌核様体の発達がすぐれたホプキン氏培地を用い、窒素源を上記の塩類に置き換えた。窒素源の添加量は培地 1 l 当たり KNO_3 2 g とし、他の塩類は KNO_3 2 g/l 相当の N を含むようにした⁸⁾。小型菌そうを各フラスコ当たり 10 個ずつ移植し、25°C、15 日間培養した。

実験結果は Table 9 のとおりである。培地の pH の変化は、 NO_3^- -塩では培養開始時の 4.1 が終了時には中性または弱アルカリ側に傾き、 NH_4^+ -塩では培養開始時よりもさらに酸性側に傾いた。比較の栄研ジャガイモ煎汁培地ではおおよそ 5 から 6 へと中性側に变化した。菌核様体の発達は平均 2.7~3.6 mm で栄研ジャガイモ煎汁よりも小型で、発達が劣った。無機窒素源のうちでは NH_4^+ -塩が NO_3^- -塩にまさり、 NO_2^- -塩ではほとんど生育しなかった。胞子形成程度では NH_4^+ -塩が指数 2.6~2.7 で栄研ジャガイモ煎汁培地の 2.9 に近づいた。菌糸塊の発達が劣った NO_3^- -塩では胞子形成指数 0.9~1.4 とごくわずかで、 NO_2^- -塩では胞子形成がまったく認められず、胞子形成に阻害的に働いたとみられる。

実験 2 アミノ酸類による影響

供試アミノ酸類は酒井¹⁰⁷⁾ がペーパークロマトグラフィー一次上昇法によって、ジャガイモ煎汁に含ま

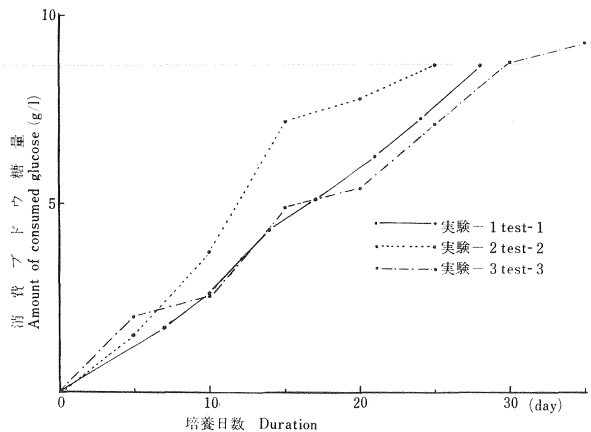
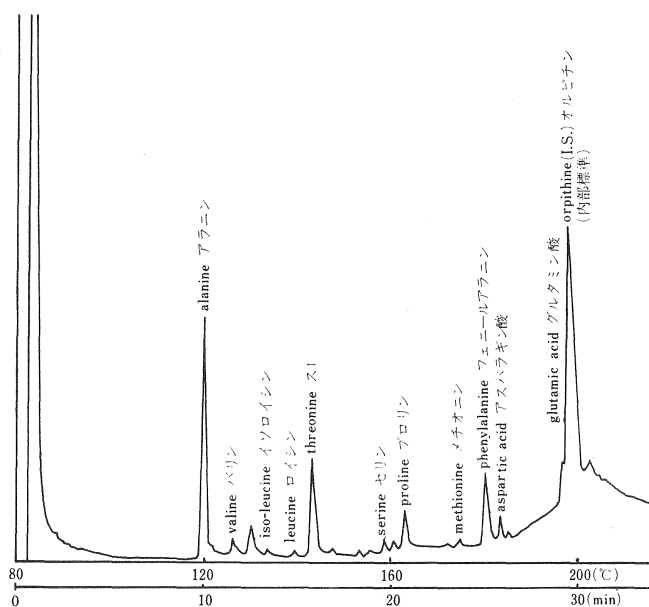


Fig. 8 スギ赤枯病菌の生育によって消費された培地中のブドウ糖量

Amount of glucose in culture medium consumed by *Cercospora segoioae*.

Table 9. スギ赤枯病菌の分生孢子形成に対する窒素源の影響
Effect of sources of nitrogen on sporulation of *Cercospora sequoiae*

窒 素 源 Nitrogen source	実験番号 Exp. No.	培 地 の pH 価 pH of medium		菌核様体の直径 Diameter of scl.-like bodies (mm)	孢子形成程度(指数) Index of the amount of sporulation	
		培養開始時 At beginning	培養終了時 At last		(平均) (Ave.)	(平均) (Ave.)
KNO ₃	1	4.1	7.2	3.3	0.3	(0.9)
	2	4.1	6.8	2.6	1.5	
NaNO ₃	1	4.1	7.1	2.7	1.1	(1.4)
	2	4.1	6.8	2.7	1.7	
NH ₄ NO ₃	1	4.1	2.9	3.9	1.0	(1.4)
	2	4.1	3.2	3.1	1.7	
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	4.3	2.6	3.8	3.0	(2.7)
	2	4.1	3.3	2.7	2.3	
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1	6.6	5.4	4.2	3.0	(2.6)
	2	7.0	6.0	2.9	2.1	
KNO ₂	1	5.9	6.5	2.6	0	(2.9)
栄研ジャガイモ煎汁培地	1	5.4	6.4	4.9	3.0	
Eiken's potato extract	2	5.0	5.7	5.1	2.7	



カラム：内径 3 mm, 長さ 1.5 m,
ガラスカラム, EGA 0.5% on
Chromosorb W (80~100 mesh,
acid washed), カラム温度 80~
210°C, 4°C/min, キャリアガス
N₂, 50 ml/min.

Column: 150×0.3 cm i. d. glass.
0.5% EGA on 80~100 mesh,
acid washed Chromosorb W,
with an initial temperature of
80°C under the program of
temperature increase of 4°C
per minute. Carrier gas flow,
50 ml N₂/minute.

Fig. 9 栄研ジャガイモ煎汁粉末に含まれる遊離アミノ酸のガスクロマトグラム

Gas chromatogram of N-TFA amino acid
n-butyl esters prepared from Eiken's
potato-extract dust.

れると報告したつぎの遊離アミノ酸類, すなわち, アスパラギン, アスパラギン酸, グルタミン, グルタミン酸およびバリンの5種類を選び, つぎに栄研ジャガイモ乾燥粉末に含まれる遊離アミノ酸類をガスクロマトグラフィーによって検出した。検出方法は, 栄研ジャガイモ煎汁乾燥粉末 4g (風乾) を 100 ml の蒸留水に溶解して分析試料とし, これから 10 ml を取って 1% ピクリン酸で除蛋白した。ガスクロマトグラフは島津製作所製 GC-4 BPTF を用い, 遊離アミノ酸類の検出は C_{EHFFE} らの TFA 法¹⁵⁰⁾によった。Fig. 9 から比較的顕著なピークを示したものにはアラニン, スレオニン, フェニールアラニンおよびグルタミン酸があり, 小さいピークとしては, バリン, イソロイシン, ロイシン, セリン, メチオニン, アスパラギン酸およびプロリンがあった。以上2つの結果から, ジャガイモ煎汁に含まれる12種類の遊離

Table 10. スギ赤枯病菌の分生胞子形成に対する各種アミノ酸の影響
Effect of different amino acids as a sole nitrogen source
on sporulation of *Cercospora sequoiae*

アミノ酸の種類 Kind of amino acid	添加量 Amount (g/l)	実験 番号 Exp. No.	培地の pH 値 pH of medium	菌核様の 直径 Diam. of scl.-like bodies (mm)	胞子形成程度 (指数) Index of the amount of sporulation	胞子形成数 No. of conidia produced ($\times 10^4/\text{cm}^2$)	
						範囲 Range	(平均) (Ave.)
L-アスパラギン L-asparagin	1.308	1 2	4.9	3.2	3.0 2.7	13.2~26.3 18.4~39.5	(19.3) (26.7)
L-アスパラギン酸 L-aspartic acid	2.634	1 2	3.0	3.1	3.0 2.7	21.1~31.6 9.1~30.3	(25.4) (17.4)
L-グルタミン L-glutamine	1.446	1 2	5.2	3.3	3.0 2.9	13.2~26.3 21.1~36.8	(17.8) (28.3)
L-グルタミン酸 L-glutamic acid	2.912	1 2	3.0	3.1	2.5 2.8	5.3~15.8 7.1~20.4	(10.5) (13.4)
DL-バリン DL-valine	2.318	1 2	5.1	3.0	2.0 2.2	5.3~21.1 7.1~25.0	(11.8) (17.4)
L-アラニン L-alanine	1.764	1 2	5.2	3.1	2.8 1.5	15.2~36.4 8.2~20.8	(21.7) (12.0)
L-フェニールアラニン L-phenyl alanine	3.268	1 2	5.3	3.2	2.8 2.9	10.5~23.7 21.1~36.8	(16.7) (27.0)
DL-スレオニン DL-threonine	2.358	1 2	5.2	3.3	0 2.5	0.7~2.3 8.7~37.5	(1.8) (21.0)
L-ロイシン L-leucine	2.596	1 2	5.2	3.4	1.0 0.2	4.5~11.4 1.8~4.6	(7.6) (3.9)
L-イソロイシン L-isoleucine	2.596	1 2	5.2	3.2	2.7 2.7	9.1~18.2 13.2~34.2	(14.8) (23.0)
L-プロリン L-proline	2.278	1 2	5.3	3.3	2.3 2.0	6.8~11.4 3.0~14.2	(9.1) (6.7)
L-セリン L-serine	2.088	1 2	5.3	3.4	2.5 2.6	15.9~20.5 26.3~42.1	(18.2) (36.6)
栄研ジャガイモ煎汁 Potato extract (Eiken)	4.0	1 2	— 5.0	5.7 5.6	3.0 2.9	30.5~42.1 30.5~55.8	(36.1) (38.2)

基礎培地は HOPKIN 氏培地, 各アミノ酸は KNO_3 2.0 g/l と同量を加えた。

HOPKIN's solution without nitrogen source was used as the basal medium and various amino acid were supplied at the rate of KNO_3 2.0 g per liter of medium.

アミノ酸類を供試した。基礎培地は無機窒素の場合と同じくホプキン氏培地とし、 KNO_3 を各アミノ酸類に置き換え、添加量を KNO_3 2g/l の N 量と同量とした。培養は 25°C 、15 日間とした。

実験結果 (Table 10) は各アミノ酸とも菌核様体の大きさが 3 mm 台で、栄研ジャガイモ煎汁培地の 5.6~5.7 mm よりも劣った。菌核様体は球形とならず、不整形、角ばってやや軟らかであったが、すべて胞子を形成し、とくに、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミンおよび L-フェニールアラニンでは栄研ジャガイモ煎汁培地の胞子形成指数 2.9~3.0 にほぼ匹敵し、形成数も平均 $17\sim 28 \times 10^4$ 個に達した。ついで菌核様体表面に気中菌糸を観察したが、胞子形成数の多いものに、L-グルタミン酸、L-イソロイシン、L-セリン、L-アラニンおよび DL-バリンなどがあつた。これらに比べて、L-ロイシン、DL-スレオニンおよび L-プロリンでは菌核様体の大部分が白色菌糸に覆われて、胞子形成数は $2\sim 10 \times 10^4$ 個に減少した。なお、培地の pH 値は L-アスパラギン酸と L-グルタミン酸でほぼ 3 を示したほかは 5~5.5 で、後述するように、菌核様体の発達と胞子形成に適した値であつた。

d. 培地の水素イオン濃度

栄研ジャガイモ煎汁培地の pH 値を 0.1% HCl と NaOH を用いて 3~9 に補正した。NaOH によるアルカリ側への補正は加圧殺菌 (120°C) でほぼ中性に戻つたので³²⁾、殺菌後に別に殺菌した NaOH 0.1% 液で再補正してから小型菌そうを移植した。培養は 25°C 、15 日間とした。

実験結果は Table 11 で示すように、培養終了時の pH 値が pH 3, 6 および 7 区では、開始時に比べてそれほど変わらなかった。しかし、pH 4 と 5 の両区では pH 値 1 程度中性に、pH 8 と 9 の両区でも中性に近づいた。菌核様体の発育は酸性側ですぐれ、pH 値 3 と 4 の両区では直径 5.8~6 以上となつた。酸性側の菌核様体の形状はおおむね黒色、球形で表面平滑、堅くなつたが、pH 3 区の一部に不整形で裂

Table 11. スギ赤枯病菌の分生胞子形成に対する培地の水素イオン濃度の影響
Effect of H-ion concentrations on sporulation of *Cercospora sequoiae*

実験番号 Exp. No.	培地の pH 値 pH of medium		菌核様体の直径 Diameter of scl.-like bodies (mm)	胞子形成程度 (指数) Index of the amount of sporulation	胞子形成数 No. of conidia produced ($\times 10^4/\text{cm}^2$)	
	培養開始時 At beginning	終了時 At last			範囲 Range	(平均) (Ave.)
1	3.1	3.5	6.0	3.0	69.0~108.3	(86.0)
2	3.0	3.0		1.5	0.8~18.2	(7.5)
1	4.1	5.0	5.8	2.9	45.1~90.4	(61.9)
2	4.0	4.4		2.6	8.0~22.0	(12.5)
1	5.1	6.3	5.5	3.0	30.1~126.0	(84.3)
2	5.0	5.9		2.9	16.4~41.1	(28.2)
1	6.1	6.2	5.0	2.6	8.9~36.7	(18.4)
2	6.0	6.3		2.7	15.0~26.9	(20.6)
1	7.0	6.8	4.8	1.0	0~15.8	(7.4)
2	7.0	6.7		1.3	3.2~10.1	(6.3)
1	8.1	7.2	4.7	1.0	1.3~15.2	(6.8)
2	8.0	7.0		1.1	0.7~8.0	(4.4)
1	9.1	7.4	3.8	1.0	1.3~6.3	(3.2)
2	9.0	7.0		1.0	1.0~6.0	(3.5)

開するものが認められた。一方、アルカリ側では菌核様体の発達が極端に低下し、直径3～4 mm程度、不整形、表面粗で、石灰様物質の散在が認められた（Plate 3, F～I）。

分生胞子形成も酸性側でまざり、pH 値4～6では指数2.6～3で、大きな違いを示さなかったが、これらの中で2回の実験をとおして、pH 値5区が胞子形成数 $28\sim84\times10^4$ 個に達し、菌核様体表面に菌糸もほとんど生育せず、これが最適 pH 値とみられた。中性とアルカリ側では胞子形成が著しく低下し、指数1程度、胞子形成数 $3\sim7\times10^4$ 個にとどまった。pH 8と9の両区の菌核様体を実体顕微鏡下でみると、表面に白色、細い菌糸がまばらに生育し、分生子梗の形成も局所的で数も少なかった。

e. サイアミンとビオチン添加

培地に対するサイアミンの添加はスギ赤枯病菌菌糸の生育を増進させる¹¹⁸⁾が、ここでは、サイアミンとビオチン添加が菌核様体の発達と胞子形成に及ぼす影響を検討した。

培地は榮研ジャガイモ煎汁培地を用いたが、培地中に含まれるビタミン類、その他の不純物を除くために、あらかじめ培地1 lに対して化学用活性炭粉末5 gを加えて約30分間煮沸後ろ過してからサイアミンとビオチンを加えた。サイアミンは高井¹¹⁸⁾に準じ、培地1 lあたり0.1 mg, 1 mg, 10 mg, 100 mg および1,000 mg 添加し、ビオチンでは1,000 mgを除いてサイアミンにしたがった。培地のpH 値は5～5.7で胞子形成に適していたので補正しなかった。殺菌は間けつ殺菌法⁷⁸⁾により、培養期間は実験1で25°C, 17日、実験2ではおなじく15日とした。

Table 12. スギ赤枯病菌の菌核様体の発達と分生胞子形成におよぼす
サイアミンの影響

Effect of thiamine on sporulation and growth of sclerotium-like
bodies of *Cercospora sequoiae*

番 号 No.	サイアミン添加量 Amount of thiamine (mg/l)	培 地 の pH 値 pH of medium	実験番号 Exp. No.	菌核様体 の直径 Diam. of scl.-like bodies (mm)	胞子形成程度 (指 数) Index of the amount of sporulation	胞 子 形 成 数 No. of conidia produced ($\times 10^4/\text{cm}^2$)	
						範 囲 Range	(平 均) (Ave.)
1*	0	5.6	1 2	4.5	2.9 3.0	14.9～31.6 18.4～53.7	(21.5) (33.7)
2	0.1	5.7	1 2	6.2	1.2 0	1.5～29.0 0	(8.6)
3	1.0	5.6	1 2	6.5	2.4 0	1.2～12.8 0	(8.0)
4	10.0	5.6	1 2	7.0	2.2 0	2.2～51.0 0	(31.3)
5	100.0	5.7	1 2	6.7	8.8 0	10.0～19.8 0	(14.9)
6	1,000.0	4.7	1 2	7.1	3.0 1.2	25.0～29.6 5.2～16.2	(26.5) (10.4)
7	榮研ジャガイモ 煎汁培地 Eiken's potato extract	5.1	1 2	5.7	3.0 2.4	23.0～43.2 21.3～33.8	(29.4) (26.9)

* 1～6 はあらかじめ化学用活性炭5 g/lを培地に加え煮沸ろ過した。

Number 1 to 6 were treated beforehand with 5 g of active carbon per liter of the basal medium (potato extract 4 g, glucose 10 g and distilled water 1 liter), respectively.

実験結果 (Table 12) : 菌核様体の大きさは、活性炭処理・サイアミン無添加区で直径平均 4.5 mm となり、無処理区とサイアミン添加区よりも小型であったところから、サイアミン添加が菌核様体の発達を増進させたとみられる。すなわち、サイアミン 0.1~1 mg/l 区では直径 6.2~6.5 mm, 10~1,000 mg/l では約 7 mm またはそれ以上となった。菌核様体の形状は 0.1~100 mg/l 区では球形、黒色、堅く、表面にいくらかのおうとつが認められた。1,000 mg/l 区ではしわ状で裂開するものもあったが、堅く、光沢を有した (Plate 3, A, B)。サイアミン添加による孢子形成増加は認められず、むしろ、ジャガイモ煎汁培地区や活性炭処理・サイアミン無添加区よりも劣った。すなわち、活性炭処理・サイアミン無添加区の平均孢子形成数が $22\sim34\times10^4$ 個を示したのに対し、サイアミン 1,000 mg/l 区では $10\sim27\times10^4$ 個、サイアミン 0.1~100 mg/l 区では実験 1 では $8\sim31\times10^4$ 個、実験 2 ではまったく形成されなかった。

ビオチン添加の結果 (Table 13) は、ジャガイモ煎汁培地区の菌核様体が直径 5.7 mm、ビオチン 0.1~100 mg 区では 4.8~5.3 mm で、ビオチン添加による菌核様体の発育効果はなかったとみられる。孢子形成はビオチン 0.1 mg 区では菌核様体表面に多数の菌糸が発育して孢子形成数がやや減少した。しかし、全体として、栄研ジャガイモ煎汁培地と活性炭処理・ビオチン無添加区に比べて差が認められず、ビオチン添加の影響は現われなかった。

f. 考 察

本項では振とう培養によるスギ赤枯病菌の分生孢子形成法の第二の操作、つまり、振とう培養によって孢子形成能を持つ菌核様体を常に産生させることを目的として実験を行った。この実験によって、培地内には形状の異なる 様々な 菌糸塊が形成されたが、孢子形成能を持つ菌糸塊 (菌核様体) はほぼ球形で黒

Table 13. スギ赤枯病菌の菌核様体の発達と分生孢子形成におよぼす
ビオチンの影響

Effect of biotin on sporulation and growth of sclerotium-like
bodies of *Cercospora segoioiae*

番 号 No.	ビオチン添加量 Amount of biotin (mg/l)	培 地 の pH 値 pH of medium	実験番号 Exp. No.	菌核様体の 直径 Diam. of scl.-like bodies (mm)	孢子形成程度 (指 数) Index of the amount of sporulation	孢 子 形 成 数 No. of conidia produced ($\times 10^4/\text{cm}^2$)	
						範 囲 Range	(平 均) (Ave.)
1*	0	5.4	1	4.8	3.0	13.7~78.9	(42.0)
			2		3.0	33.3~62.1	(45.8)
2	0.1	5.0	1	5.3	1.5	3.5~73.5	(22.7)
			2		2.0	1.4~51.9	(24.3)
3	1.0	5.1	1	5.0	3.0	26.3~62.5	(45.8)
			2		2.0	19.2~63.2	(33.5)
4	10.0	5.0	1	4.9	2.9	13.8~55.2	(37.5)
			2		2.0	10.1~41.4	(25.1)
5	100.0	5.0	1	5.1	2.8	18.3~47.4	(34.2)
			2		2.9	17.9~21.1	(19.2)
6	栄研ジャガイモ 煎汁培地 (Eiken)	4.9	1	5.7	2.8	17.3~60.9	(45.1)
			2		3.0	37.5~59.6	(48.8)

* 1~5 はあらかじめ化学用活性炭 5 g/l を培地に加え煮沸ろ過した。

Number 1 to 5 were treated beforehand with 5 g active carbon per liter of the basal medium (potato extract 4 g, glucose 10 g and distilled water 1 liter), respectively.

色、表面平滑で光沢を持ち、堅いものに限られることが明らかにされた。したがって、振とう培養操作では、このような形状の菌核様体の産生が必要条件となる。

この条件の一つに培地がある。実験ではいくつかの天然と合成培地を使用したところ、栄研ジャガイモ煎汁培地が他の培地に比べて、とくにすぐれ、常に安定した結果が得られた。この培地は栄研化学株式会社製のジャガイモ煎汁の乾燥粉末にブドウ糖を加えたもので、その混合比はジャガイモ煎汁粉末 4 g、ブドウ糖 10 g が最適である。ジャガイモ煎汁粉末の増量は孢子形成を低下させるが、ブドウ糖はかなり増量してもそれほど影響がない。また、いくら効果の低下はあるが市販の Difco 製ジャガイモ煎汁粉末 4~6 g/l を栄研ジャガイモ煎汁粉末の代用とすることもできる。なお、新鮮なジャガイモから直接煎汁を作製した培地は上記の培地よりも劣り、結果が不安定であった。しかし、常法（ジャガイモ 200 g/l）の煎汁の約 1/2 希薄液を再煮沸、ろ過（東洋ろ紙 No. 1）して使用すれば孢子数はかなり増加するところから、煎汁の濃度や澱粉粒などの固形物が菌核様体の形成発達に微妙な影響を与えたものと考えられる。

Cercospora 属菌の分生孢子形成培地の探索は古くから行われてきたが、このうち、最も広く用いられて効果が認められたものはジャガイモ煎汁培地である。しかし、多くの研究は寒天培地上に移植された菌そうから直接孢子の形成を試みたもので、筆者の方法とは大きな違いがあるし、ジャガイモ煎汁の他に植物煎汁や抽出液の添加、継続移植法や特殊な物理的刺激などを併用したもので、ジャガイモ煎汁の有効性に対する解析は行われていない⁵⁾⁶⁸⁾⁸⁷⁾¹⁰⁵⁾。また、感受性植物や他の植物の葉、茎および種子などの煎汁、抽出液を主体とした培地が多くの研究者によって使われてきたが²⁾⁵⁾⁶⁾⁴⁰⁾⁶¹⁾⁸⁴⁾⁸⁷⁾⁸⁸⁾¹¹³⁾¹¹⁴⁾¹¹⁷⁾¹³¹⁾¹³⁵⁾、振とう培養による孢子形成法は宿主植物であるスギ針葉の煎汁は孢子形成に有効ではなかったし、他の植物、たとえば、トウモロコシ、ニンジン、の煎汁、V₈ ジュースなども、それほど有効とは考えられなかった。

合成培地では菌核様体の発達が不十分で、いずれもジャガイモ煎汁培地には及ばなかった。従来の報告でも、酒石酸アンモニウムと DL-ロイシンを窒素源として好結果を得た例⁷⁾¹¹²⁾ がみられるに過ぎず、合成培地は *Cercospora* 属菌の孢子形成培地としてはほとんど使われていない。

一般に天然培地はその組成成分が複雑多岐にわたり、孢子形成因子の解析には不適當であるが、ここでは、振とう培養による菌核様体の形成に重要な因子と考えられる培地中の炭素源と窒素源および pH 値について検討した。炭素源は孢子形成能を有する菌核様体形成にとって必須栄養源である。それは、ブドウ糖無添加培地では菌核様体の発育がきわめて悪く、孢子形成がまったく認められなかったことで明らかである。スギ赤枯病菌は供試 11 種類の炭素源をすべて利用したが、キシロースでは菌核様体がやや膨軟で成熟せず、孢子形成も劣ったところから、スギ赤枯病菌の菌糸の発育¹¹⁹⁾と同様に、本菌はキシロースを十分利用し得ないと推定される。孢子形成はブドウ糖、果糖およびガラクトースなどの単糖類ですぐれ、二糖類のしょ糖がこれに次ぎ、多糖類、高級アルコール類でやや劣った。糖類が菌に利用される場合、構造的により簡単な単糖類が利用されやすいといわれ¹¹⁹⁾、本結果はこのような傾向が端的に現われたものと考えられる。

従来の知見によると、タバコ白星病菌¹¹²⁾ではしょ糖が最適で、*Cercospora herpotrichoides* ではでんぷんと麦芽糖で孢子形成が著しく、ブドウ糖で減退し⁷⁾、ワタ葉焼病 *Cercospora gossypina* ではブドウ糖無添加で好結果を得たようで⁸⁴⁾、筆者の結果とは一致しない。

窒素源も菌核様体の発達にとって必須栄養源である。無機塩類では NH₄-塩が NO₃-塩よりもよく利用され、NO₂-塩では発育阻害があったとみられる。このような結果は *Cercospora herpotrichoides*⁷⁾ が

酒石酸アンモニウムをよく利用し、タバコ白星病菌¹¹²⁾では NH_4 -塩が NO_3 -塩にまさるとの報告と一致する。ところで、無機窒素源を培地に加えた場合、培地の pH 値が変化する¹¹⁹⁾¹²²⁾。この実験では、 NH_4 -塩培地では当初の pH 値 (約 4) が酸性側に変わり、 NO_3 -塩では逆にアルカリ性側に移行した。このような両培地の pH 値の違いが菌核様体の発達と胞子形成に強い影響を与えたと考えられる。

培地の pH 値は菌核様体の発達と胞子形成にとって重要な因子である。すなわち、菌核様体は酸性側の培地でよく発達して顕著な胞子形成が認められ、pH 5 付近を最適とする。中性からアルカリ側では菌核様体の発達が明らかに低下し、胞子形成も減退する。これは、スギ赤枯病菌の菌糸の発育が pH 4~8 の間でそれほどの影響を受けないとの報告⁴⁵⁾やサトウダイコン褐斑病菌が pH 5.3~10 の範囲で胞子形成に大差がないとの知見⁸⁸⁾とは異なり、振とう培養による胞子形成法の大きな特徴として注目してよい。

ジャガイモ煎汁に含まれる多種類の遊離アミノ酸の影響を調べたところ、各アミノ酸区とも菌核様体はやや小型であったが、胞子形成数では栄研ジャガイモ煎汁に匹敵した。とくに、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミンおよび L-フェニルアラニンなどの炭素源としても菌体合成ないし呼吸基質に利用され、良好な栄養源と考えられている種類のアミノ酸類¹¹⁹⁾の利用度が高かったといえる。L-ロイシン添加は菌核様体の発育、胞子形成ともに劣り、スギ赤枯病菌の菌糸生育の結果¹¹⁹⁾に一致するが、タバコ白星病菌が DL-ロイシンとイソロイシン添加ですぐれた胞子形成を認めたとの報告¹¹²⁾とはまったく異なる。

スギ赤枯病菌の菌糸はサイアミンを必須とはしないが、100 ppm 以上の添加が菌糸の発育促進に役立つといわれる¹¹⁸⁾ので、菌核様体の大形化を期待してサイアミンを添加してみたところ、100 ppm 以上添加で菌核様体はかなり大型に発育した。しかし、胞子形成は刺激されず、ワタ葉焼病菌⁸⁴⁾、*Cercospora herpotrichoides*⁷⁾、タバコ白星病菌¹¹³⁾およびトウモロコシ茎葉枯病菌 (*Helminthosporium maydis*)²⁰⁾で認められたと同様に、サイアミンは胞子形成を抑制したとみてよいであろう。また、*Alternaria burnsii* ではビオチン添加が胞子形成を促進し²¹⁾、*Cercospora herpotrichoides* ではビオチン 50~1,000 mg/l 添加がサイアミンよりも有効な例⁷⁾もみられるが、振とう培養による胞子形成法ではビオチン添加の影響がほとんど認められなかった。

4) グロスキャビネット内におけるスギ赤枯病菌の菌核様体からの分生胞子形成条件

振とう培養の終了した菌核様体はグロスキャビネット (コイトロン KB-10 型) 内の湿室に移されて胞子形成操作を行う。本項ではこの操作段階で胞子形成に必要な各種条件を探究した。

供試菌核様体は栄研ジャガイモ煎汁培地で 25°C、15~17 日間振とう培養後の、十分に成熟して胞子形成能を持つとみられる個体を厳選した。実験用グロスキャビネットは実験室窓ぎわに静置し、箱内温度は特別の実験を除いて 25°C に規制したが、関係湿度は 20~30% で、かなり乾燥状態下におかれた。

a. 湿室保持日数と分生胞子形成数との関係

2.5~3% 寒天を固めて平面としたシャーレを湿室とし、この寒天上に菌核様体 5~10 個を置き、グロスキャビネット内に保持し、7 日間にわたって毎日菌核様体を取り出して、形成された分生胞子数とその大きさを測定した。

実験結果 (Table 14) : 湿室 1 日間保持では分生胞子がまったく形成されず、2 日後にはじめて認められた。しかし、形成数は少なく、小型であった。3 日以後 5 日までは胞子数が漸増し、大きさには差が認められない。7 日後では胞子数、大きさともに 5 日後と変わらないところから、おおよそ 5 日間の湿室保

Table 14. グロスキャビネット*内保持日数によるスギ赤枯病菌分生胞子の大きさと形成数
Size and number of conidia produced on sclerotium-like bodies of *Cercospora sequoiae* in each period under the condition of growth cabinet*

保持 日数 Period lapsed (day)	実験 番号 Exp. No.	分生胞子の大きさ Size of conidia (μm)				隔膜数 No. of septum		分生胞子形成数 Number of conidia produced ($\times 10^4/\text{cm}^2$)					
		長さ Length		幅 Width		範囲 (平均) Range (Ave.)		1** 2 3 4 5 (平均) (Ave.)					
		範囲 Range	(平均) (Ave.)	範囲 Range	(平均) (Ave.)								
1	1 2	—	—	—	—	—	—	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	(0) (0)
2	1 2	12.5~42.5	(27.1)	3.8~6.3	(5.0)	0~4	(2)	7.9 4.3	12.9 2.9	12.1 4.4	12.6 1.6	23.4 —	(13.8) (3.3)
3	1 2	12.5~50.0	(33.5)	3.8~6.3	(5.1)	1~6	(3)	33.4 11.1	37.6 12.0	46.3 7.0	21.3 3.7	42.4 —	(36.2) (8.4)
4	1 2	16.5~52.7	(33.3)	3.8~6.3	(5.2)	1~5	(3)	55.2 45.1	92.5 22.7	73.9 29.8	69.2 17.5	39.5 —	(66.1) (28.8)
5	1 2	20.0~50.0	(34.9)	4.5~6.3	(5.2)	2~7	(5)	44.2 31.4	72.1 22.8	90.2 30.9	87.3 46.2	111.3 —	(81.0) (32.9)
6	1 2	20.0~50.0	(35.3)	4.5~6.3	(5.3)	2~7	(4)	69.0 41.6	74.6 44.5	108.6 39.7	84.2 23.4	56.3 —	(78.5) (37.3)

* コイトロン KB-10 型 Koitotron KB-10.

** 材料番号 Materials number.

持て胞子形成はピークに達するものと思われる。5日後の分生胞子の形状は Fig. 10 に示す。すなわち、幼若なものは長楕円形、単胞または2胞であるが、成熟するにつれて倒棍棒状または円筒形となつてまっすぐか、わずかに湾曲し、淡黄褐色、両端淡色、隔膜部でわずかにくびれる (Plate 7, C)。なお、一部には胞子基部が異常にふくらんで、変形したものも認められた。

分生胞子の大きさは、長さ 20~50 μm (平均 35 μm)、幅 4.5~6.3 μm (平均 5.2 μm)、隔膜数 2~7 (最多 4~5) で、伊藤ら⁴²⁾の記載に比べていくらか小型であった。

b. 分生胞子形成に及ぼす温度と関係湿度

温度はグロスキャビネット内の温度を 15°C, 20°C, 25°C, 30°C および 35°C に規制し、関係湿度はデシケータ底部に過飽和塩類を入れ、Table 16 で示すように、関係湿度を 31%, 51%, 71% および 93% に調節し、100% 区は蒸留水を入れ、グロスキャビネット内に収めた。菌核様体は上ふたを取った 3% 寒天平面シャーレの

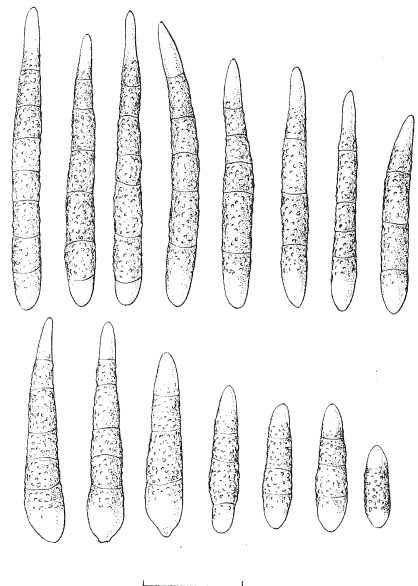


Fig. 10 振とう培養法によって形成されたスギ赤枯病菌の分生胞子
Conidia of *Cercospora sequoiae* produced by the shaking method ($\longleftrightarrow$: 20 μm).

Table 15. グロスキャビネット*内の温度
とスギ赤枯病菌の分生胞子形成
との関係Relation between temperature in
the growth cabinet* and sporula-
tion of *Cercospora sequoiae*

温 度 Temperature (°C)	胞 子 形 成 数 No. of conidia produced ($\times 10^4/\text{cm}^2$)	
	範 囲 Range	(平均) (Ave.)
15	0 0	(0) (0)
20	0~ 1.1 0~ 1.5	(0.5) (0.8)
25	17.7~70.2 25.0~41.1	(35.3) (28.8)
30	3.7~14.2 5.5~25.0	(10.6) (9.8)
35	1.0~ 7.0 2.1~ 5.0	(4.0) (3.5)

* コイトロン KB-10 型 Koitotron KB-10.

重要性が指摘された。ここでは、上記の報告で実証されなかった諸点について実験をすすめ、光と胞子形成との関係をよりくわしく究明することとした。

a) 明暗と分生胞子形成との関係

グロスキャビネットは室内窓ぎわで散光線の入る場所に置いた。実験は湿室に保持された菌核様体が自然光を満度に受ける明区と、シャーレを黒色紙で包んだ暗黒区および自然光の受光日数に制限を加えた区を設けた。

実験結果 (Fig. 11) : 暗黒区では胞子がほとんど形成されなかった。これに対し、保持期間中のすべて、あるいは4日間自然光を受けた区では胞子形成数がきわめて多く、平均 $52\sim 75 \times 10^4$ 個にも達した。

Table 16. スギ赤枯病菌の分生胞子形成におよぼす関係湿度の影響
Effect of relative humidities on sporulation of *Cercospora sequoiae*

過 飽 和 塩 類 Salt in oversaturated solution	関係湿度 Relative humidity (%)	胞 子 形 成 数 Number of conidia produced ($\times 10^4/\text{cm}^2$)			
		実 験 1	Exp. 1	実 験 2	Exp. 2
		範 囲 Range	(平 均) (Ave.)	範 囲 Range	(平 均) (Ave.)
H ₂ O	100	8.6~15.3	(11.3)	3.1~38.6	(18.9)
NH ₄ H ₂ PO ₄	93	2.3~ 4.6	(3.7)	0.5~ 1.3	(0.9)
KNO ₃	71	0~ 1.1	(0.6)	2.6~10.1	(6.1)
Ca(NO ₃) ₂ ·4 H ₂ O	51	0~ 1.1	(0.6)	0.9~ 1.2	(0.5)
CaCl ₂ ·6 H ₂ O	31	0		0~ 1.8	(1.0)

25°C, 5日間保持した。 After 5 days, at 25°C.

寒天上に置き、デシケーター内に保持した。なお、31%と51%区では保持期間中(5日間)に寒天が乾燥したため、一度新しいシャーレと取り替えた。

実験結果 (Table 15, 16) : 胞子形成は20~35°Cで認められた。しかし、適温は25°C付近のごく狭い範囲に限定され、30°Cでは形成数がかなり減少し、20°Cでは菌核様体表面が灰褐色の菌糸に覆われて、胞子数は極端に減少した。関係湿度は100%区で胞子形成が最もすぐれ、93%区ではかなり減少し、51%以下ではほとんど形成されなかった。

c. 分生胞子形成に及ぼす光の影響

スギ赤枯病菌の分生胞子形成と光との関係については、さきに、固体培地上で胞子形成を試みた川崎ら⁵⁸⁾と清原・徳重⁶⁸⁾および筆者¹⁴¹⁾が行った振とう培養による胞子形成法の予備実験で、その

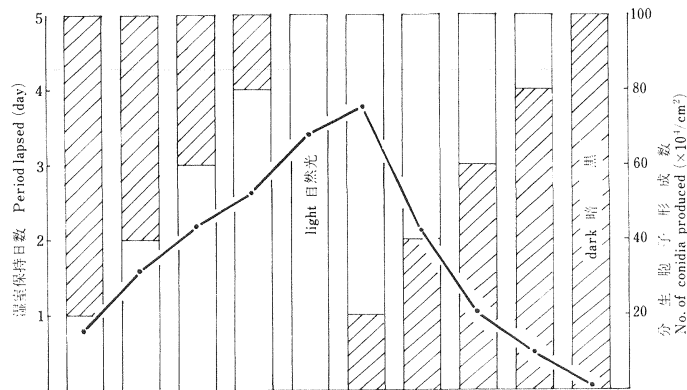


Fig. 11 スギ赤枯病菌の分生胞子形成におよぼす自然光の影響
Effect of sunlight on sporulation of *Cercospora sequoiae* in the growth cabinet.

Table 17. スギ赤枯病菌の菌核様体上における分生子梗の發育におよぼす光の影響

Effect of sunlight on development of conidiophores produced on sclerotium-like bodies of *Cercospora sequoiae*

処 理 Treatment	保持日数 Period lapsed (day)	分 生 子 梗 の 大 き さ Size of conidiophore (μm)				隔 膜 数 Number of septum	
		長 さ Length	(平 均) (Ave.)	幅 Width	(平 均) (Ave.)	範 囲 Range	(平 均) (Ave.)
自 然 光 Light	1	29~93	(67)	3.8~5.0	(4.5)	0~5	(2.5)
	2	50~170	(129)	3.8~5.0	(4.7)	3~10	(2.5)
	3	80~205	(155)	3.8~5.0	(4.3)	3~12	(6.9)
	4	80~230	(167)	3.8~5.0	(4.5)	4~13	(7.3)
	5	100~290	(178)	3.8~5.0	(4.5)	4~13	(8.9)
暗 黒 Dark	1	23~100	(49)	3.8~5.0	(4.6)	0~4	(1.9)
	2	60~200	(127)	3.8~5.0	(4.8)	3~10	(6.0)
	3	110~250	(192)	3.8~5.0	(4.4)	5~12	(8.0)
	4	120~240	(177)	3.8~5.0	(4.7)	6~12	(8.0)
	5	130~295	(186)	3.8~5.0	(4.6)	5~13	(8.0)

コイトロン (KB-10), 25°C. At 25°C, in Coitotron (KB-10).

自然光の受光日数に制限を加えた場合、その日数の減少に比例して形成数が低下した。なお、処理期間中の前半と後半受光の間には著しい差を認めないが、どちらかといえば前半受光区でまざった。

b) 明暗処理が分生子梗の形成伸長に及ぼす影響

湿室に保った5日間、自然光を十分に受けた菌核様体と終始暗黒下に置かれたものを比較した。菌核様体は毎日取り出してカーボワックスで固定包埋¹¹⁶⁾した後、スライディングミクロトームで切片を作成し、顕微鏡下で観察した。

実験結果：分生子梗の生育測定値を Table 17 に、形態的特徴を Plate 5, C, D に示す。分生子梗は、明区の場合、湿室処理2日間は1日当たり60~70 μm 伸長し、その後は伸長がやや鈍ったが、暗区では、

Table 18. スギ赤枯病菌の分生孢子形成におよぼす日長時間の影響
Effect of exposure time to sunlight on sporulation of *Cercospora sequoiae*

陽 光 時 間 Length exposed (hr./day)	孢 子 形 成 数 Number of conidia produced ($\times 10^4/\text{cm}^2$)			
	実 験 1 Exp. 1		実 験 2 Exp. 2	
	範 囲 Range	(平均) (Ave.)	範 囲 Range	(平均) (Ave.)
14	40.0 ~ 70.5	(54.7)	67.4 ~ 101.0	(83.7)
8	31.6 ~ 54.4	(39.3)	36.8 ~ 72.3	(53.9)
4	17.7 ~ 40.0	(30.7)	34.7 ~ 37.6	(30.7)
1	19.0 ~ 46.3	(29.9)	31.6 ~ 35.7	(34.1)
0	4.2 ~ 11.6	(8.5)	0 ~ 1.6	(0.6)

はじめの2日間は明区と同様に伸長し、その後も鈍化することなく伸長を続け、約200 μm に達した。分生子梗基部の太さや隔膜数には差が認められなかった。

つぎに、分生子梗の形態をみると、1日と2日間処理ではまっすぐに伸びて両者間に違いは認められないが、3日後の明区では分生孢子が形成された傷跡 (scar)¹³⁶⁾を1~3か所ほど残して、ジグザグ状に伸びるのに対して、暗区では傷跡がまったく認められず、分生子梗はまっすぐに伸び、隔膜部がくびれて軟弱であった。暗区に分生子梗はさらに伸長して気中菌糸に移行するものと推定される。

c) 日長時間と分生孢子形成との関係

1日当たりの自然光の受光時間を0 (暗黒)、1時間、4時間、8時間および約14時間 (終日受光)として5日間保持した。1~8時間受光区は午前9時から所定時間自然光を受光させ、それ以外は黒色紙で包んで暗黒とした。

実験結果 (Table 18) : 最多孢子形成数を示したのは約14時間区で、8時間区がこれに次ぎ、4時間区、1時間区ではかなり減少し、暗黒区で激減した。

d) 光の波長域と分生孢子形成との関係

ある範囲の波長域の光を透過するアクリルフィルムを使用した。これは Fig. 12 のスペクトラム分布

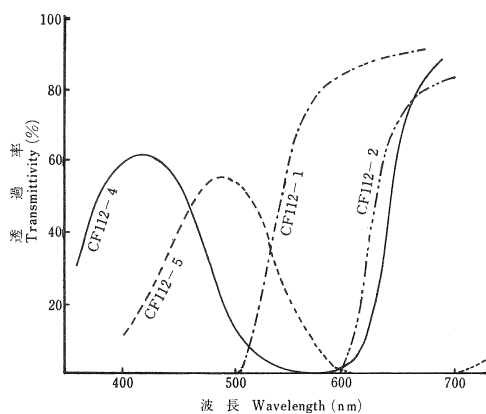


Fig. 12 アクリルフィルムのスペクトラル分布

Spectral distribution of acryl film.

図が示すように、波長域400 nm付近を透過率のピークとし、これ以下と500~600 nmを遮断するCF-112-4フィルム、500 nm付近の波長を透過率のピークとし、400 nm以下と600~700 nmを遮断するCF-112-5フィルム、500 nm以下を遮断するCF-112-1フィルム、600 nm以下を遮断するCF-112-2フィルムの4種に分かれる。各フィルムは紙箱 (30 $\times$ 20 $\times$ 6 cm)の上ぶた全面に張りつけ、紙箱底部には小穴を多数あけて空気の流通をはかり、箱内に菌核様体の入った湿室 (3%寒天平面シャーレ)を収めた。なお、CF-112-4フィルムを使用する際はシャーレの上ぶたを透明ビニールと交換した。グロスキャビネット

Table 19. 光の波長がスギ赤枯病菌の分生胞子形成におよぼす影響
Effect of wavelength of light on sporulation of *Cercospora sequoiae*

処 理 Treatment	胞 子 形 成 数 Number of conidia produced ($\times 10^4/\text{cm}^2$)					
	実 験 1	Exp. 1	実 験 2	Exp. 2	実 験 3	Exp. 3
	範 囲 Range	(平 均) (Ave.)	範 囲 Range	(平 均) (Ave.)	範 囲 Range	(平 均) (Ave.)
自 然 光 Light	4.9~10.8	(8.1)	4.6~12.3	(9.3)	8.4~12.6	(11.3)
暗 黒 Dark	0~ 0.2	(0.1)	0~ 1.5	(0.4)	0~ 1.2	(0.3)
CF-112-4 フィルム	4.7~ 6.5	(5.4)	1.3~10.5	(5.2)	3.8~12.7	(7.6)
CF-112-5 フィルム	10.0~20.9	(14.4)	2.8~11.3	(5.8)	5.8~11.5	(8.1)
CF-112-1 フィルム	0~ 0.2	(0.1)	0.9~ 1.8	(1.2)	0~ 1.2	(0.6)
CF-112-2 フィルム	0~ 0.2	(0.1)	0~ 0.8	(0.5)	0~ 1.3	(1.0)

は屋外の 25°C, コイトロン 3S 型を使用した。

実験結果 (Table 19) : 5 日間後の胞子形成数は自然光下で平均 $8.1 \sim 11.3 \times 10^4$ 個, CF-112-5 区では $5.8 \sim 14.4 \times 10^4$ 個で, ほとんど差がない。CF-112-4 区は $5.2 \sim 7.6 \times 10^4$ 個と前 2 者にやや劣ったが, 大きな差ではなかった。しかし, CF-112-1 と CF-112-2 区では形成数のごくわずかで, 暗区の $0.1 \sim 0.4 \times 10^4$ 個とあまり変わらない。これらの結果から, スギ赤枯病菌の分生胞子形成に対する有効波長域は 400~500 nm の範囲にあることが明らかにされた。ただし本実験の胞子形成数はコイトロン KB-10 型の実験値より低かったが, その原因は確かめられていない。

e) 人工光源による分生胞子形成

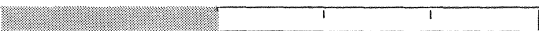
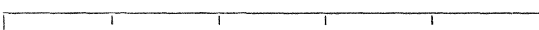
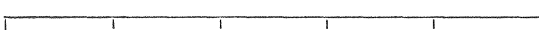
連続的な光照射と明暗処理の交替とスギ赤枯病菌分生胞子の形成との関係, ならびに, 実験 d) のアクリルフィルムは 700 nm 以上の光域が遮断されていないので, この光域を持たない蛍光灯照射で, その影響も検討した。

実験は 25°C の恒温室内で行い, 蛍光灯は白色光, 20 W 2 基を使用, 湿室シャーレの約 30 cm の距離から照射した。アクリルフィルムの使用法は実験 d) に準じ 5 日間保った。光照射, アクリルフィルムと暗黒との組み合わせ方法は Table 20 に示す。

実験結果 (Table 20) : 湿室に保った期間中をとおして人工光を連続照射すると, 2 回実験の平均胞子形成数は 0.7×10^4 と 1.5×10^4 個で, 連続暗黒区の 0.2×10^4 , 0.3×10^4 個と同様に胞子形成がほとんど認められない。連続照射終了後の菌核様体表面を実体顕微鏡下で観察すると, 分生子梗は菌核様体表面に密生, 伸長し, 実験 b) の暗黒下における分生子梗の伸長状態に類似した。これに対し, 処理期間の前半 2 日間照射, 後半 3 日間暗黒区では平均胞子形成数が 24.3×10^4 , 29.1×10^4 個ときわめておう盛であった。これと逆の処理, つまり, 前半 2 日間暗黒, 後半 3 日間照射では激減して暗黒や連続照射区の水準に戻された。また, 実験 d) で有効波長域の透過フィルムと認められた CF-112-5, CF-112-4 フィルムでも, 連続照射区で形成数が少なく, 前半照射・後半暗黒区できわめておう盛となって, 蛍光灯照射と変わらなかった。CF-112-1 と CF-112-2 フィルム区では, これらの各処理とも胞子形成数が少なく, この光域の影響はないと考えられる。

以上の結果から, スギ赤枯病菌の分生胞子形成に関与する有効波長域はおおよそ 400~500 nm 付近の可視光線の短波長部, すなわち, 青色光ないしは近紫外光付近にあることが明らかとなった。また, 本項

Table 20. 各種の光条件下におけるスギ赤枯病菌の菌核様体からの分生孢子形成
 Sporulation on the sclerotium-like bodies of *Cercospora sequoiae*
 under different light conditions

保 持 日 数 Incubation period (day)					胞 子 形 成 数 No. of conidia produced ($\times 10^4/\text{cm}^2$)	
1	2	3	4	5	範 囲 Range	(平 均) (Ave.)
 蛍光灯 Light					0 ~ 2.3	(1.5)
 蛍光灯 Light					0 ~ 1.1	(0.7)
 蛍光灯 Light					17.7 ~ 40.5	(24.3)
 蛍光灯 Light					17.9 ~ 41.5	(29.1)
 蛍光灯 Light					0.5 ~ 1.1	(0.7)
 蛍光灯 Light					0 ~ 1.9	(1.0)
 蛍光灯 Light					0 ~ 1.3	(0.2)
 蛍光灯 Light					0 ~ 1.1	(0.3)
 CF-112-4 フィルム					0.6 ~ 3.4	(2.1)
 CF-112-4 フィルム					0.5 ~ 5.3	(3.1)
 CF-112-4 フィルム					9.6 ~ 29.1	(14.6)
 CF-112-4 フィルム					21.1 ~ 60.9	(37.6)
 CF-112-4 フィルム					1.6 ~ 4.8	(3.0)
 CF-112-4 フィルム					0 ~ 1.2	(0.4)
 CF-112-5 フィルム					0.5 ~ 3.2	(1.3)
 CF-112-5 フィルム					1.9 ~ 15.4	(8.8)
 CF-112-5 フィルム					15.2 ~ 26.6	(24.4)
 CF-112-5 フィルム					26.9 ~ 71.3	(48.9)
 CF-112-5 フィルム					2.1 ~ 15.5	(9.1)
 CF-112-5 フィルム					0 ~ 0.6	(0.1)
CF-112-1 フィルム					0 ~ 10.6	(3.5)
CF-112-1 フィルム					2.2 ~ 17.9	(7.1)
CF-112-1 フィルム					0 ~ 1.0	(0.4)
CF-112-1 フィルム					3.2 ~ 9.5	(5.3)
CF-112-1 フィルム					0.4 ~ 5.3	(2.4)
CF-112-1 フィルム					0 ~ 1.3	(0.3)
CF-112-2 フィルム					0 ~ 5.1	(2.2)
CF-112-2 フィルム					1.0 ~ 6.3	(2.2)
CF-112-2 フィルム					0 ~ 1.4	(0.5)
CF-112-2 フィルム					0 ~ 1.0	(0.5)
CF-112-2 フィルム					0 ~ 1.0	(0.4)
CF-112-2 フィルム					0 ~ 0.5	(0.3)

 光 照 射 Light.

 暗 黒 Darkness.

実験 a) でも述べたように、湿室処理による菌核様体上の胞子形成経過を調べてみると、湿室処理後 2 日間は分生子梗は盛んに伸長するが、胞子はほとんど形成されない。3 日後に多くの胞子が形成されはじめ、5 日後にピークに達する。したがって、胞子形成に対する光照射は分生子梗形成伸長時に有効で、分生胞子形成時にはこれを抑制または阻害する働きを持つものと考えられる。

d. 同一菌核様体の反復胞子形成能

実験 a の処法で胞子を形成させた菌核様体を殺菌水の入った管ビンに入れ、約 5°C 下に約 20 時間保持後、軽く振って分生子梗から胞子を脱落させてから菌核様体をろ紙上に移し、表面の水分を取り去って再び湿室に入れて第 2 回目の胞子形成をうながした。第 3 回以降も同様の処理を行い 5 回反復した。

実験結果 (Fig. 13) : 第 1 回目の形成数が最も多く、以下しだいに減少した。ただ、第 1 回と 2 回では著しい差がない。これは、第 1 回目で形成数が多かった個体は第 2 回目に減少したが、第 1 回目で比較的少なかった個体では第 2 回目に増加したためである。反復 3 回では形成数がかなり減少し、4～5 回反復でほとんど形成されなくなった。形成された分生胞子の大きさは Table 21 のように、1～3 回までは差がなく、4、5 回反復でいくらか大型であった。また、各反復ごとの分生胞子形成状態を実体顕微鏡で観察したところ、反復処理によって新しい

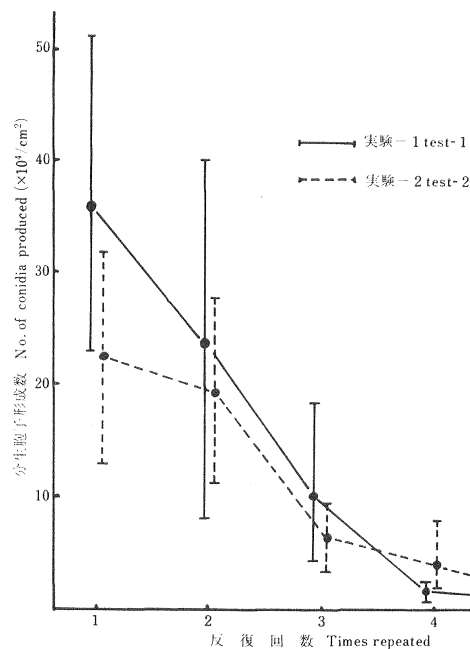


Fig. 13 スギ赤枯病菌の菌核様体の反復胞子形成数

The number of conidia of *Cercospora sequoiae* produced by repeating with the same sclerotium-like bodies.

Table 21. スギ赤枯病菌の分生胞子形成の反復回数と分生胞子の大きさとの関係
Relation between size of conidia of *Cercospora sequoiae* and repeated times of sporulation

反復回数 Times repeated	分生胞子の長さ Length (μm)		分生胞子の幅 Width (μm)		隔膜数 No. of septum	
	範囲 Range	(平均) (Ave.)	範囲 Range	(平均) (Ave.)	範囲 Range	(平均) (Ave.)
I	30 ~ 65	(36.7)	4.5 ~ 7.5	(5.2)	2 ~ 6	(4)
II	35 ~ 55	(38.0)	4.5 ~ 7.5	(5.8)	3 ~ 6	(4)
III	25 ~ 55	(37.5)	5.0 ~ 6.3	(5.5)	3 ~ 5	(4)
IV	30 ~ 63	(46.3)	5.0 ~ 6.3	(5.8)	3 ~ 8	(7)
V	30 ~ 65	(46.3)	5.0 ~ 7.5	(5.8)	3 ~ 7	(6)

分生子梗は出現せず、初回に形成された分生子梗がさらに伸長して新しい分生子胞子を順次頂生する。すなわち、反復によって、これらの分生子梗がしだいに分生子胞子形成能を失ってゆくように観察された。

e. 考 察

本項では振とう培養によって産生された菌核様体上の分生子胞子形成に関与する条件を検討した結果、温度、関係湿度および光が重要な因子であることが明らかにされた。

分生子胞子形成の適温は 25°C 付近で、30°C では胞子数が激減し、20°C では分生子梗の多くが淡褐色～灰色、綿状の気中菌糸に移行する。スギ赤枯病菌の菌糸は 6～33°C で生育し、適温も 20～25°C と幅広く⁴⁵⁾、振とう培養による菌核様体形成の適温もそれほど厳密な規制を受けない。しかし、分生子胞子形成の段階では温度に対する適応が狭いことを示している。一方、他の *Cercospora* 属菌の人工培地上における分生子胞子形成適温をみると、サトウダイコン褐斑病菌⁸⁸⁾では 25°C であるが、マツ葉枯病菌¹¹⁴⁾は昼 25°C、夜 16°C の変温を、タバコ白星病菌¹¹¹⁾、トマトすすかび病菌 *Cercospora fuligena*¹⁸⁵⁾では 18～22°C と比較的低温を適温とする。したがって、*Cercospora* 属菌の分生子胞子形成温度はその種類によって異なり、一定の傾向がないとみられる。つぎに、菌核様体を収納する湿室内の関係湿度も胞子形成にとって重要な因子である。すなわち、温度を適温の 25°C としても、関係湿度 93% 以下では湿度が低下するほど胞子形成数は減少する。これに対し、関係湿度 100% のもとではきわめておう盛な胞子形成が認められる。これは、清原・徳重⁶⁸⁾がスギ赤枯病菌とマツ葉枯病菌は 55～100% の関係湿度で胞子を形成し、どちらかといえば乾燥状態が好適であると述べた報告とは一致しない。

第 3 番目の胞子形成要因として光がある。まず、自然光下での実験結果を要約するとつぎのとおりである。胞子形成能をもつ菌核様体は胞子形成処理期間（5 日間）を自然光下に保たれた場合、最もおう盛な胞子形成を示すが、自然光の受光日数や 1 日当たりの受光時間を減らすにしたがって、胞子形成数も明らかに減少し、終始暗黒下では胞子形成の著しい低下または消失を招く。

川崎ら⁶⁸⁾はさらに、寒天培地上においてスギ赤枯病菌の分生子胞子形成を試みたが、この結果でも自然光下での培養が暗黒下よりも約 10 倍の胞子形成量に達することを確かめている。

これらの結果によって、スギ赤枯病菌の分生子胞子形成に対して光が密接な関係を持つことが明らかにされたと考える。

一般に、菌類の形態形成にあたっては、光をまったく必要としないものと必要とする種類とがあり、後者に属する種類のなかでも明暗の周期を必要とするもの、光の連続照射が有効なもの、光の質についても、ある波長が特異的に有効なもの、これを持たないものが知られている⁴⁹⁾。

本項では自然光と人工光下で、ある特定の波長域を透過のピークに持つアクリルフィルムを使って、まず、波長域を調べた結果、400 nm と 500 nm の波長を透過のピークに持つフィルムで顕著な胞子形成がみられ、500 nm 以下の波長が遮断された光域では暗黒下とほぼ同様に胞子形成は起こらなかった。このフィルムの光域はかなり広いので、さらに詳細な検討を必要とするが、可視光の青色光と近紫外光付近の光域がスギ赤枯病菌の分生子胞子形成に対して強い影響を与えるものと考えてよい。

従来の知見によって、重要な植物病原菌の胞子形成に対する有効波長域をみると、ナシ黒星病菌 *Venturia nashicola*¹²¹⁾は 400 nm、450 nm、イネいもち病菌¹⁰³⁾では 340 nm、365 nm を透過のピークにもつガラスフィルターで、タバコ赤星病菌¹⁹⁾では 360～480 nm、イネごま葉枯病菌のある系統²⁶⁾では 320～480 nm が胞子形成を刺激し、*Cercospora* 属菌ではサトウダイコン褐斑病菌が 310～355 nm を有効波長

域に持つといわれ¹²⁾, 病原菌の種類によっていくらかの差が認められる。しかし, これらの病原菌も, 多くの菌類の形態形成に関与する波長域, すなわち, 可視光の短波長部の青色光と近紫外光を有効波長域とする点においてはスギ赤枯病菌と変わらない。

つぎに, このような有効波長域を持つ光の連続照射と明暗の周期について検討した結果, つぎの諸点が明らかにされた。まず, 光の連続照射では胞子形成がほとんど認められず, 暗黒下と変わらなかったところから, 光の連続照射は胞子形成を抑制したと考えられた。これに対して, 処理期間の前半 2 日間照射し, 後半 3 日間を暗黒にすると著しい胞子形成が起こる。しかし, このような明暗周期を逆転させた前半暗黒, 後半照射では胞子形成が極端に衰える事実が明らかにされた。

ところで, 菌核様体上に分生胞子が形成される経過を観察すると, 処理開始から 2 日間は分生子梗の形成～伸長の時期にあって, 分生胞子の形成はごく少ない。3 日後から分生胞子が多数形成されて, 5 日後まで連続的に行われる。このような経過と光照射を結びつけると, 分生子梗形成～伸長時の光照射は分生胞子形成にとってきわめて有効となるが, 分生胞子形成時の光照射は分生胞子形成を抑制する。

このような分生胞子形成に対する明暗周期を必要とする菌として *Choanephora cucurbitarum*⁴⁾ が報告されている。また, 本田・坂本²⁶⁾²⁷⁾ はイネごま葉枯病菌のある特定の菌株の胞子形成過程での形態的観察と光の波長域に対する反応から, 1) 近紫外光の照射下で進行する分生子梗の形成過程, 2) 暗黒下で進行し, 青色光と BLB (Toshiba FL-20-BLB) 照射で抑制される分生子梗の成熟過程, 3) 青色光などの抑制を受けずに進行する分生胞子形成過程とに区分されると報告した。スギ赤枯病菌の分生胞子形成が同氏らの示唆した反応, すなわち分生子梗の形成, 成熟, 胞子形成の 3 段階で, それぞれ異なる光反応系が存在するかどうかについては, 今後のよりくわしい実験によって論及したい。

5) スギ赤枯病菌の菌核様体内の含有糖類が分生胞子形成におよぼす影響

本実験では振とう培養で形成される菌核様体の含有糖類の消長と, これらの糖類の分生胞子形成におよぼす影響を調べた。

培地は栄研ジャガイモ煎汁培地を用いた。糖類の分析試料は接種源, 振とう培養期間 5 日, 10 日, 15 日, 20 日および 25 日の菌糸塊と菌核様体を用いたが, 接種源は PDA 培地上の直径 3～4 mm 小型菌そう 20 個を選び, 培地内の栄養源を除くために寒天を除去した。培養 5 日以後の試料は, 5 本の振とうフラスコに形成された約 50 個の菌核様体から任意に 4～5 個を選び, 殺菌蒸留水で洗浄後ろ紙上に置いて, 水分を除き風乾とした。残りの菌核様体は湿室処理によって分生胞子形成を観察した。糖類の分析はガスクロマトグラフィーによった。まず, 上述の菌核様体に 80% エタノールを加えて乳鉢で破砕し, アルコール抽出後ろ過して菌糸片を取り除いた。ろ液はロータリーエバポレータを用いてエタノールを除去した。除蛋白は 10% 中性酢酸鉛と飽和蓆酸ソーダにより遠心分離機で行った。ガスクロマトグラフィーによる糖類の定量は鈴木・千葉¹¹⁾ に従い, ガスクロマトグラフは島津製作所の GC-4 BPTF を用いた。実験は 2 回行った。

実験結果と考察: まず培養期間による菌核様体の大きさと胞子形成 (Table 22) 結果によると, 菌核様体は培養 15 日で直径 5.3 mm 程度に達した。胞子形成は 5 日後では認められず, 10 日後ではわずかに, 15～20 日後でおう盛となり, 25 日後にやや衰えた。これは本項 2-3)-b の結果と同じである。

接種源と各培養期間の菌核様体内含有糖類のガスクロマトグラフのうち, 培養 10 日後の結果 (Fig. 14) では, アラビトール, 果糖, α -ブドウ糖, マニトールおよび β -ブドウ糖が検出され, この他にもいくつ

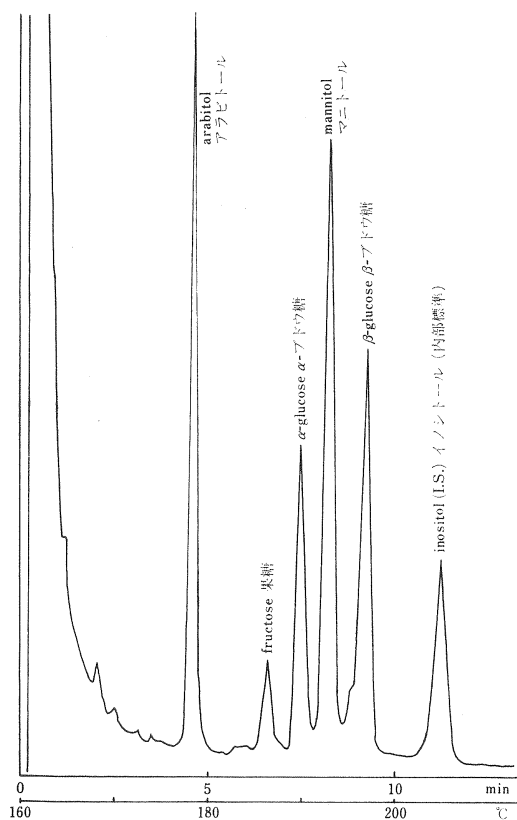


Fig. 14 スギ赤枯病菌の菌核様体に含まれる糖類 (TMSE 誘導体) のガスクロマトグラム (10日間培養)

Gas chromatogram of TMSE derivatives of sugars in the sclerotium-like bodies of *Cercospora sequoiae* (10 days after inoculation).

カラム：内径 3mm, 長さ 2m, ステンレスカラム SE 52 3% on Chromosorb W (60~80 mesh, acid washed), カラム温度 160~210°C, 4°C/min, キャリアガス N₂ 40 ml/min.

Column: 200×0.3 cm stainless steel. 3% SE-52 on 60~80 mesh, acid washed Chromosorb W, with an initial temperature of 160°C, under the program of temperature increase of 4°C per minute. Carrier gas flow, 40ml N₂/minute.

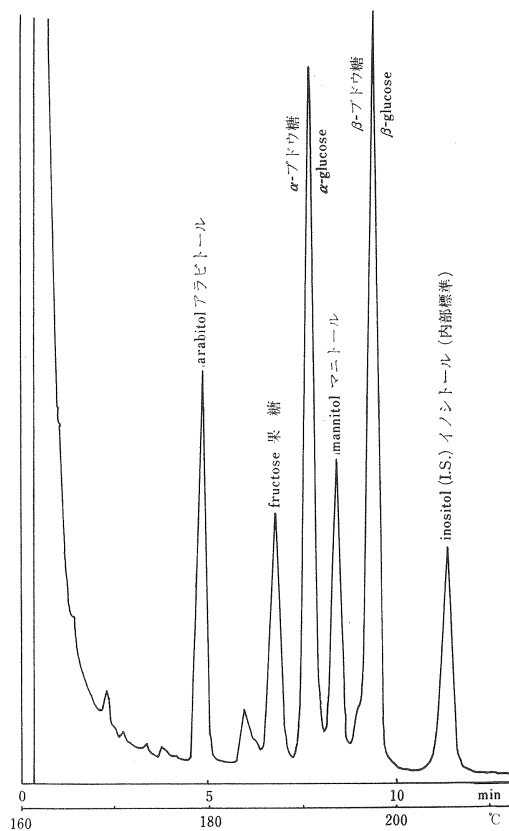


Fig. 15 スギ赤枯病菌の菌核様体に含まれる糖類 (TMSE 誘導体) のガスクロマトグラム (20日間培養)

Gas chromatogram of TMSE derivatives of sugars in the sclerotium-like bodies of *Cercospora sequoiae* (20 days after inoculation).

Table 22. スギ赤枯病菌の分生胞子形成におよぼす培養期間の影響
Effect of shaking period on sporulation of *Cercospora sequoiae*

培養期間 Period shaken (day)	培地の pH 値 pH of medium	菌核様体の直径 Diameter of scl.-like bodies (mm)	胞子形成程度(指数) Index of the amount of sporulation	胞子形成数 No. of conidia produced ($\times 10^4/\text{cm}^2$)
5	5.6	4.5	0	0
10	6.2	4.6	2.5	18.2
15	6.4	5.3	3.0	57.7
20	6.8	5.5	3.0	59.4
25	6.9	5.6	2.9	61.1

かの小さいピークが認められたが、ごく少量のために同定の対象から除外した。これら 4 種の含有量はアラビトール、ブドウ糖 ($\alpha + \beta$) およびマニトールが多く、果糖は少なかった。つぎに、培養 20 日後の結果 (Fig. 15) では、検出された糖の種類は変わらなかったが、含有量には明らかな相違が認められた。すなわち、10 日培養で含有量の多かったアラビトールとマニトールが減少し、ブドウ糖 ($\alpha + \beta$) が増加し、果糖も増加の傾向を示した。

接種源 (0) から培養 25 日までの含有糖類の種類とその消長を菌核様体生体 1 g 当たりの含有量に換算すると (Fig. 16), 全期間を通じて認められたものはアラビトールとブドウ糖で、マニトールは接種源で、果糖は接種源と培養 25 日後で検出されなかった。含有量の消長をみると、アラビトール

は接種源で約 2.6 mg, 10 日後には 6 mg に達し、その後は漸減した。マニトールでは培養 5 日後で最高を示し、その後に漸減した。ブドウ糖 ($\alpha + \beta$) では接種源で約 1.5 mg, 5 日後では約 5 mg に増加し、20 日後で約 8 mg とピークに達し、25 日後に減少した。果糖でも少量ながらブドウ糖の消長傾向に類似した。

つぎに、本項 2-4)-d の方法で同一菌核様体の反復胞子形成を行い、体内糖類の消費傾向を調べた。反復操作による胞子形成数 (Table 23) は、第 1 回目が $36.7 \sim 73.2 \times 10^4$ 個、第 2 回目が $14.2 \sim 29.2 \times 10^4$ 個、第 3 回目が $10.6 \sim 19.3 \times 10^4$ 個と反復によってしだいに減少し、第 4 回目には $1.0 \sim 1.9 \times 10^4$ 個に激

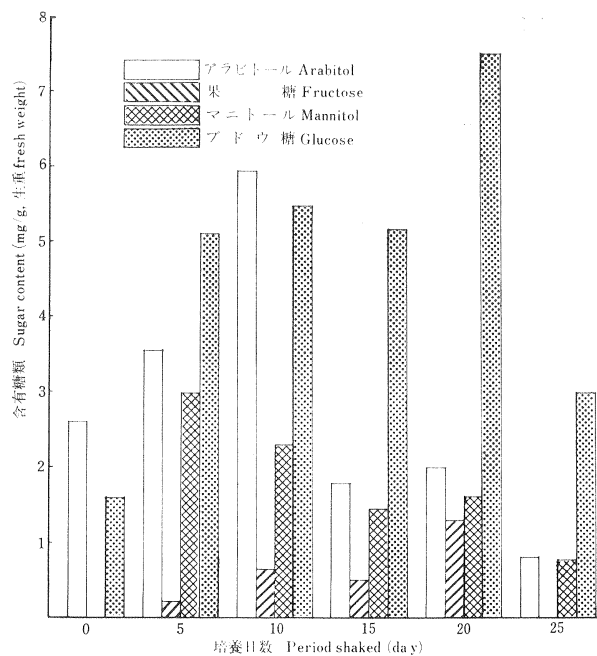


Fig. 16 スギ赤枯病菌の菌核様体の含有糖類と培養期間との関係

Relation between duration of culture and sugar contents of sclerotium-like bodies of *Cercospora sequoiae*.

Table 23. スギ赤枯病菌の菌核様体の反復胞子形成数
The number of conidia of *Cercospora sequoiae* produced by repeating of sclerotium-like bodies

材料番号 Material number	胞子形成数 Number of conidia produced ($\times 10^4/\text{cm}^2$)									
	1*		2		3		4		5	
	範囲 Range	(平均) (Ave.)	範囲 Range	(平均) (Ave.)	範囲 Range	(平均) (Ave.)	範囲 Range	(平均) (Ave.)	範囲 Range	(平均) (Ave.)
1	48.1~108.0	(73.2)								
2	24.3~50.8	(36.7)	11.0~32.1	(21.1)						
3	32.1~103.7	(79.6)	20.6~40.0	(29.2)	10.5~25.2	(19.3)				
4	24.1~89.4	(53.8)	9.5~18.8	(14.2)	8.2~12.0	(10.6)	0.7~3.6	(1.9)		
5	37.0~53.3	(45.2)	8.1~22.8	(14.6)	6.2~25.6	(13.1)	0.9~1.0	(1.0)	0.2~0.3	(0.2)

* 反復回数 Times repeated.

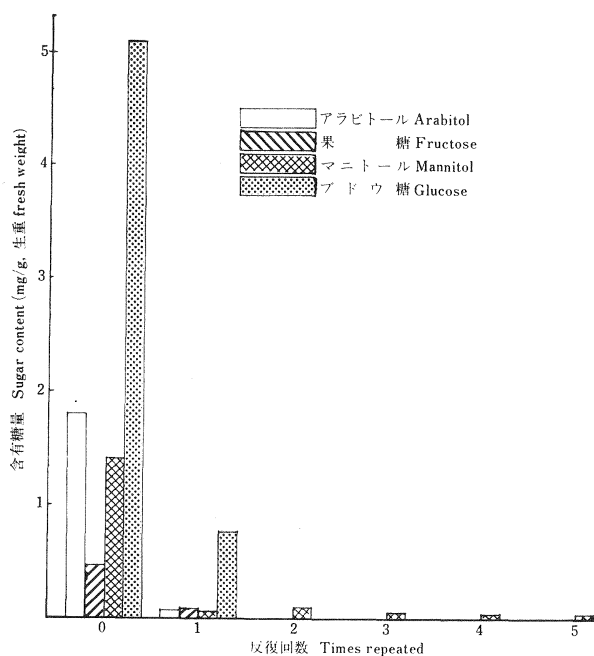


Fig. 17 反復胞子形成によるスギ赤枯病菌の菌核様体含有糖量の変化

Variation in sugar contents in sclerotium-like bodies of *Cercospora sequoiae* by repeated sporulation.

減し、第5回目にはほとんど形成されなくなった。

菌核様体内の含有糖類 (Fig. 17) は、分生胞子形成前に含まれていたアラビトール、果糖、マニトールおよびブドウ糖の4種ともに、第1回の胞子形成できわめてよく利用され、当初の含量の80%以上が消費された。第2回の胞子形成では残された糖類がほとんど消費しつくされ、第3回以降ではマニトールをごくわずかに残すだけとなった。このような反復胞子形成による糖類の消費傾向と胞子形成数減少との間には密接な関係があるとみてよい。

一般にマニトール、アラビトールおよびトレハロースなどの糖類は多くの菌の菌糸中に存在し、このうち、マニトールはブドウ糖培地上で发育した菌糸中に多い⁷⁹⁾。また、しょ糖培地上で

は、*Rhizoctonia solani* の多くの菌株でブドウ糖が、かなり多くの菌株で果糖が検出されている¹⁰⁰⁾。

筆者の実験ではアラビトール、果糖、ブドウ糖およびマニトールが菌核様体菌糸から検出された。これらのうち、アラビトールとマニトールは接種源が菌糸塊に生長する段階の菌糸に多く、菌糸塊が菌核様体に移行して胞子形成能を持つ時期に減少した。一方、ブドウ糖は菌糸塊生長期に少なく、胞子形成期に増加し、胞子形成能の低下とともに減少した。また、培養15日後の菌核様体に反復胞子形成操作を加えて

体内糖を分析した場合、胞子の形成によってこれらの糖類は効率的に消費され、消費しつくされた時点で胞子形成能も消失することが明らかにされた。したがって、これらの糖類はスギ赤枯病菌の分生胞子形成にとって必須栄養源としてきわめて重要な役割を持つと考えられる。

6) スギ赤枯病菌の菌核様体構成菌糸の形態

液体培地に移植された小型の菌そうは連続的な振とうによって球状の菌糸塊となり、しだいに発達して表面黒色、平滑で光沢を有する堅い菌核様体に発達して胞子形成能を具備する。本項では、このような生育過程における菌体構成菌糸の形態的变化と胞子形成との関連を調べた。

栄研ジャガイモ培地を供試し、小型菌そうを1フラスコ当たり10個ずつ移植し、25°Cで5日、10日、15日、20日および25日間振とう培養を行い、形成された菌糸塊を取り出し、カーボワックスで固定し、包埋後、スライディングマイクロームで切片を作成して顕微鏡下で観察した。なお、一部の菌核様体は胞子形成程度の観察に供した。

菌体構成菌糸の観察は Plate 4, A で示す培養10日後の菌核様体断面の特徴、すなわち、菌糸の太さ、色調、配列状態などから、つぎに示す3つの菌糸層に区分して観察した。

a) 外層 (Outer layer -Ol-) : 菌核様体表面とこれに接して太く、褐色～濃褐色で隔膜間は短く、密にからみ合った菌糸層を形成する部分。

b) 中層 (Middle layer -Ml-) : 外層の内部に位置し、外層よりやや細い菌糸群で、菌核様体の中心部から外層に向かって放射状に並列伸長し、最深部は褐色、太い菌糸が多数迷走する部分。

c) 内層 (Inner layer -Il-) : 菌核様体の最深部、すなわち、中心部を構成する菌糸群で、薄膜、透明で細い菌糸がまばらに分布し、中層に接して褐色、太い菌糸が存在する部分。

つぎに、各培養期間における各層菌糸の特徴 (菌糸の太さは Table 24) を述べる。

Table 24. スギ赤枯病菌の菌核様体断面の各層における菌糸の幅 (μm)
Width of mycelium of sclerotium-like bodies of *Cercospora sequoiae*

培養日数 Period shaked (day)	菌糸の色 Colour of mycelium	外 層 Outer layer (平 均) (Ave.)	中 層 Middle layer (平 均) (Ave.)	内 層 Inner layer (平 均) (Ave.)	
				A	B
5	無 色 Hyaline	1.7 ~ 3.0 (2.0)		1.7 ~ 2.5 (1.9)	1.7 ~ 3.3 (2.4)
	褐 色 Brown	3.3 ~ 4.5 (3.8)		4.2 ~ 8.5 (5.5)	
10	無 色 Hyaline	1.7 ~ 2.0 (1.8)	1.7 ~ 2.0 (1.9)	1.7 ~ 2.0 (1.8)	1.7 ~ 4.2 (2.5)
	褐 色 Brown	3.0 ~ 5.0 (3.8)	3.0 ~ 5.0 (3.5)	3.2 ~ 8.0 (5.0)	
15	無 色 Hyaline		1.3 ~ 2.0 (1.7)	1.3 ~ 2.4 (2.0)	
	褐 色 Brown	3.3 ~ 5.8 (5.0)	2.5 ~ 3.8 (3.1)	2.0 ~ 6.3 (4.5)	
20	褐 色 Brown	4.2 ~ 6.7 (5.0)	2.5 ~ 5.0 (4.0)		
25	褐 色 Brown	3.8 ~ 7.5 (5.0)	2.5 ~ 5.0 (3.5)	3.8 ~ 5.0 (4.3)	

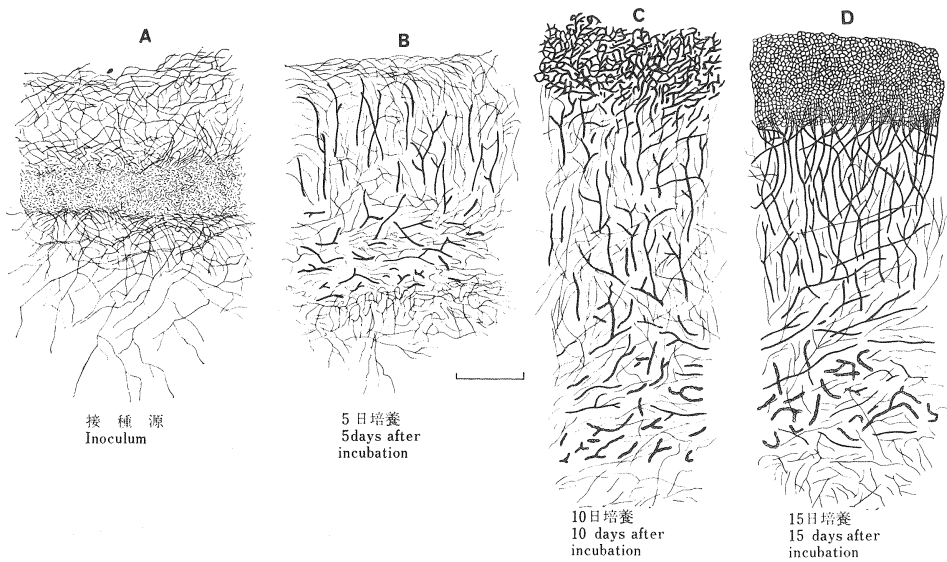


Fig. 18 スギ赤枯病菌の菌核様体の断面
Cross-sections of sclerotium-like body of *Cercospora sequoiae*
(—: 100 μ m).

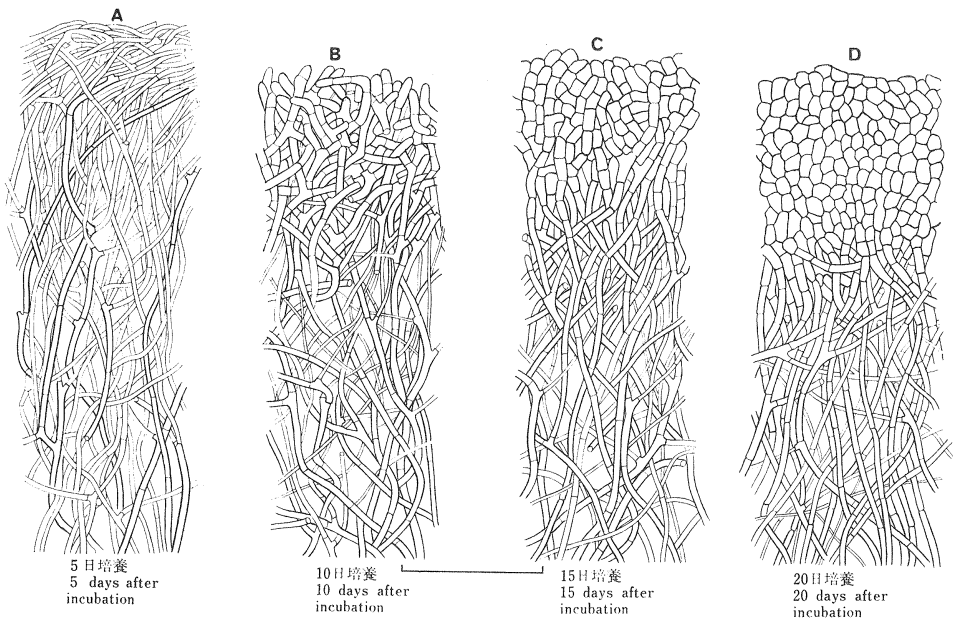


Fig. 19 スギ赤枯病菌の菌核様体の外層菌糸 (OI)
Mycelia in the outer layer (OI) of sclerotium-like bodies of
Cercospora sequoiae (—: 100 μ m).

a. 接種源：寒天培地の表層と、これに接する部分でやや太く、無色、密な菌糸層を形成し、この層を起点として寒天表面から外と内側に向かって幼若な菌糸が発育する (Fig. 18, A)。

b. 培養 5 日後：外層と中層の区別は明らかではない。菌核様体中心部付近に褐色、やや太い菌糸 (太さ $4.2\sim 8.5\mu\text{m}$, 平均 $5.5\mu\text{m}$) が迷走し (Fig. 18, B), これらの菌糸から伸長したとみられる細く幼若な菌糸 ($1.7\sim 3.0\mu\text{m}$, 平均 $2\mu\text{m}$) が体表面に向かって放射状に発達して、もつれ菌糸構造 (*textura intricata*) を呈し体表面付近で密となる。これらの菌糸群が菌糸塊構成菌糸の大部分を占めるが、一部に褐色、太い菌糸 ($3.3\sim 4.5\mu\text{m}$, 平均 $3.8\mu\text{m}$) が混在する (Fig. 19, A, Plate 4, C)。内層菌糸はほとんどが無色、細く、中心部付近でややまばらに存在する (Fig. 18, B)。菌糸塊表面の形状は全体的に膨軟で、弾力性に富む。これをコイトロン (KB-10 型) 内で湿室に保持すると、放射状に並列した菌糸群が伸びて気中菌糸となり、菌糸塊全面を覆い、胞子はまったく形成されない。

c. 培養 10 日後：菌糸塊表面のもつれ菌糸構造はさらに密となって太さを増し、細胞状構造 (*textura epidermoidea*) に近づき、明らかな菌糸層、つまり、外層を形成し始める (Fig. 18, C, 19, B, Plate 4, D)。5 日培養で多数認められた細く幼若な並列菌糸は少数となって褐色菌糸中に混在する (Fig. 19, B)。中層では外層で多数を占めた褐色、太い菌糸 ($3.0\sim 5.0\mu\text{m}$, 平均 $3.5\mu\text{m}$) がややまばらになって幼若菌糸 ($1.7\sim 2.0\mu\text{m}$, 平均 $1.9\mu\text{m}$) を混在しながら体中心から表層に向かって並列する (Fig. 18 C, 19, B)。深部付近では濃褐色、太く、隔膜部で少しくびれる菌糸が不規則に分布する (Fig. 18, C)。内層では中層の褐色菌糸と同様な菌糸 ($3.2\sim 8.0\mu\text{m}$, 平均 $5.0\mu\text{m}$) が伸びて中層深部と変わらないが、中心部付近では無色、薄膜菌糸 ($1.7\sim 4.2\mu\text{m}$, 平均 $2.5\mu\text{m}$) がわずかに存在する。これらの菌核様体を湿室処理すると、分生子梗の形成は局所的で、白色綿状の気中菌糸が発育し、胞子形成は均一性を欠いた。これらの断面をみると、分生子梗は外層の褐色、太い菌糸から形成され、細く幼若な菌糸は盛んに伸長して白色綿状の気中菌糸になる。

d. 培養 15 日後：外層の菌糸群はますます密となり、濃褐色、厚膜、太く ($3.3\sim 5.8\mu\text{m}$, 平均 $5.0\mu\text{m}$)、隔膜部でくびれ、その間隔が短く細胞状構造を呈する (Fig. 18, D, 19, C, Plate 5, A)。これらの形態は、スギ赤枯病菌の寒天培地上に形成される成熟菌糸、すなわち、ゲンメ様体 (*gemmae-like bodies*) または厚膜胞子様体 (*chlamydospore-like bodies*) にも類似する⁴⁶⁾。培養 10 日後に混在していた無色、細い幼若な菌糸はまったく見あたらない。中層では褐色、太い菌糸が多数を占めるが、菌糸の分布は外層に比べてまばらで、太さもやや細い ($2.5\sim 3.8\mu\text{m}$, 平均 $3.1\mu\text{m}$)。そして、表面に向かって並列するが、その配列にやや乱れを生じる (Fig. 18, D, 19, C)。中層深部の濃褐色、太く老熟した菌糸は無色、薄膜菌糸と混在する。内層では 10 日後と著しい変化はないが、薄膜、無色菌糸がさらに減少して空隙が多くなる。これらの菌核様体の胞子形成はきわめておう盛で、体表面に分生子梗を密生し、おびただしい数の分生胞子を形成した (Plate 2, B)。Plate 7 に外層断面、コイトロン内の湿室処理約 20 時間後と 5 日後の分生子梗と分生胞子の走査型顕微鏡像*を示す。この像によって外層の菌糸が厚膜、密にからみあって層をなすこと (A)、体表面の密な菌糸の先端から幼若な分生子梗が伸長し (B)、その頂端に分生胞子を形成する (C) 過程が明確に捕らえられている。

e. 培養 20 日後：外層菌糸はさらに密となり、太さを増して ($4.2\sim 6.7\mu\text{m}$, 平均 $5.0\mu\text{m}$) (Fig. 19,

* 走査電顕像は日製産業株式会社、MSM-2 型 (超コンパクト型) を用いて撮影した。撮影は同社のご協力によるもので関係者各位にあつくお礼を申しあげる。

D, Plate 4, B) 体中心部に向かっていくらか厚みを増す。中層では 15 日とほとんど変わらない。内層では中層深部に接して、いくらかの菌糸を認めるが、中心部ではほとんど消失して空間が多くなる。これらの菌核様体の孢子形成も顕著で、外層菌糸から分生子梗を密生し、多数の孢子が形成され、気中菌糸の生育はほとんどない。

f. 培養 25 日後：外層は培養 20 日後とあまり変わらないが (Plate 5, B), 中層と内層菌糸はごくわずかで、中心部付近は空虚となる。体表面にはしわを生じ、変形、裂開するものも認められ、孢子形成能も衰える。したがって、この時期の菌核様体は老化、衰退現象を起こしていると考えられる。

以上の結果から、振とう培養による菌糸塊形成から菌核様体への発達と成熟までの経過はつぎのように要約される。

接種源である小型の菌そうは、培地の表面付近で密にからみ合った幼若な菌糸塊によって構成されるが、振とう培養によって、これらの菌糸塊を起点として、幼若、無色で綿状の菌糸群が放射状に伸長を開始する。放射状の菌糸は発達を続け、褐色の成熟菌糸を混在し、もつれ菌糸構造を呈して菌糸塊を構成する。菌糸塊はしだいに球状となって表面が褐色～黒色化して菌核状を呈する。体構成菌糸はその大部分を占める放射状菌糸群と体の中心部付近を迷走する褐色、太い菌糸群とに分かれる。培養の継続によって体表面が黒変、球形、堅く、平滑となって大きさの増加がほぼ停止し、それまで体構成菌糸の多くを占めた放射状菌糸群が 2 層に分化する。その一つは菌核様体最外層に、ある一定の厚みをもって発達する褐色、密にからみ合った細胞状構造をもつ外層で、他の一つは中心部から外層に向かって幼若、無色の菌糸から褐色、太い菌糸へと成熟変化する放射状菌糸群である。外層菌糸群はますます密となり、太く、隔膜間もつまってゲンメ様体、厚膜孢子様体あるいは宿主体内に形成される子座状組織に類似した菌体組織となって菌核様体を完成する。

このような経過で形成される菌核様体の外層の偽柔組織 (Pseudo-parenchymatous structure) が分生孢子形成能を有することが明らかにされた。したがって、振とう培養によるスギ赤枯病菌の孢子形成法は、ある特定の培地で振とう培養という一種の機械的刺激を加えて、菌体表面の全面に分生孢子形成の原基とみられる菌体組織を人工的に形成させた点に大きな特徴を持つと考えてよい。

7) スギ赤枯病菌の培養菌株の分生孢子形成

人工培地上における孢子形成の困難な菌類のなかには、孢子形成能を有する特定の培養菌株が存在することがあるといわれ、*Cercospora* 属菌でもこのような菌株の検索によって孢子形成に成功した報告がみられる⁴⁶⁾⁵⁶⁾¹¹⁴⁾¹³⁴⁾。ここでは、振とう培養による孢子形成が特定の菌株に限定されるかどうかを明らかにする目的で実験を行った。

供試菌株は林業試験場樹病研究室で保存培養中の 10 菌株、1972 年秋以降に林業試験場九州、四国、関西および東北の各支場と、九州から東北までの各県林業試験場の関係者に依頼してスギ、ラクウショウの赤枯病苗の送付を受け、筆者が単孢子分離⁴⁰⁾を行った 22 菌株、1973 年秋以降にスギ造林地の溝腐病患部から組織分離¹⁴⁸⁾した 15 菌株の合計 47 菌株とした。これらの菌株の宿主名、樹齡、採取場所および分離年月日などを Table 25 に示す。接種源の培養、振とう培養法は本項 2), 3) に準じた。供試フラスコは各菌株ともに 8～10 本とし、小型菌そうを 1 フラスコ当たり 10 個ずつ移植したので約 100 個の菌核様体が生産された。このうち、10 個で孢子形成数を数え、他は孢子形成度を調べた。

実験結果 (Table 26)：孢子形成が認められた菌株は供試 47 菌株のうち、39 菌株の多数にのぼった。

Table 25. スギ赤枯病菌の分生孢子形成実験に用いた培養菌株
Stock cultures of *Cercospora sequoiae* used in the sporulation experiment

菌株番号 Stock number	宿主 (樹 齡) Host (Age)	採 取 場 所 Locality	分離年月日 Date of isolation
CC- 26	ギガントセコイア <i>Sequoiadendron giganteum</i>	東 京, 田 無 Tanashi, Tokyo	昭38年10月17日 Oct. 17, 1963
CC- 40	サ ワ ラ <i>Chamaecyparis pisifera</i>	Releigh, North carolina, U. S. A.	
CC- 42	ス ギ (3年生) <i>Cryptomeria japonica</i> (3-year-old)	岩 手, 盛 岡 Morioka, Iwate	昭38年10月17日 Oct. 17, 1963
CC- 57	同 (2年生) do. (2-year-old)	東 京, 八王子 Hachioji, Tokyo	昭42年 8 月27日 Aug. 27, 1967
CC- 65	同 (3年生) do. (3-year-old)	北海道, 大 野 Ono, Hokkaido	昭43年11月12日 Nov. 12, 1968
CC- 68	ラクウショウ (6年生) <i>Taxodium distichum</i> (6-year-old)	高 知, 大 津 Otsu, Kochi	昭42年10月31日 Oct. 31, 1967
CC- 69	ス ギ (2年生) <i>Cryptomeria japonica</i> (2-year-old)	岡 山, 勝 央 Shōo, Okayama	昭42年10月31日 Oct. 31, 1967
CC- 70	同 do.	高 知, 高 知 Kochi, Kochi	昭42年 9 月11日 Sept. 11, 1967
CC- 79	同 (10年生) do. (10-year-old)	徳 島, 日和佐 Hiwasa, Tokushima	昭44年11月18日 Nov. 18, 1969
CC- 81	同 (7年生) do. (7-year-old)	愛 媛, 野 村 Nomura, Ehime	昭45年11月11日 Nov. 11, 1970
CC- 84	同 (2年生) do. (2-year-old)	東 京, 目 黒 Meguro, Tokyo	昭47年 8 月25日 Aug. 25, 1972
CC- 85	同 (10年生) do. (10-year-old)	岩 手, 盛 岡 Morioka, Iwate	昭47年 9 月18日 Sept. 18, 1972
CC- 87	同 (3年生) do. (3-year-old)	福 岡, 黒 木 Kuroki, Fukuoka	昭47年10月 8 日 Oct. 8, 1972
CC- 88	同 (2年生) do. (2-year-old)	高 知, 高 知 Kochi, Kochi	昭47年10月 4 日 Oct. 4, 1972
CC- 89	同 do.	徳 島, 徳 島 Tokushima, Tokushima	昭47年10月 5 日 Oct. 5, 1972
CC- 90	同 do.	茨 城, 那 賀 Naka, Ibaraki	昭47年10月 6 日 Oct. 6, 1972
CC- 91	同 do.	三 重, 白 山 Hakusan, Mie	昭47年10月 6 日 Oct. 6, 1972
CC- 92	同 do.	奈 良, 高 取 Takatori, Nara	昭47年10月 6 日 Oct. 6, 1972
CC- 93	同 do.	埼 玉, 寄 居 Yorii, Saitama	昭47年10月10日 Oct. 10, 1972
CC- 94	同 (3年生) do. (3-year-old)	秋 田, 大 館 Odate, Akita	昭47年10月14日 Oct. 14, 1972
CC- 95	同 (2年生) do. (2-year-old)	島 根, 松 江 Matsue, Shimane	昭47年10月19日 Oct. 19, 1972
CC- 96	同 do.	愛 媛, 河 内 Kawauchi, Ehime	昭47年10月19日 Oct. 19, 1972
CC- 97	同 do.	岡 山, 勝 央 Shōo, Okayama	昭47年10月19日 Oct. 19, 1972
CC- 98	同 do.	東 京, 八王子 Hachioji, Tokyo	昭47年10月19日 Oct. 19, 1972
CC- 99	同 (3年生) do. (3-year-old)	熊 本, 熊 本 Kumamoto, Kumamoto	昭47年10月20日 Oct. 20, 1972

Table 25. (つづき) (Continued)

菌株番号 Stock number	宿主 (樹 齢) Host (Age)	採 取 場 所 Locality	分離年月日 Date of isolation
CC-100	スギ (3年生) <i>Cryptomeria japonica</i> (3-year-old)	熊本, 西合志 Nishigoshi, Kumamoto	昭47年10月24日 Oct. 24, 1972
CC-101	同 do.	京都, 伏見 Hushimi, Kyoto	昭47年11月7日 Nov. 7, 1972
CC-102	同 do.	福井, 福井 Fukui, Fukui	昭47年11月15日 Nov. 15, 1972
CC-103	同 (2年生) do. (2-year-old)	新潟, 朝日 Asahi, Niigata	昭47年11月16日 Nov. 16, 1972
CC-104	ラクウショウ (10年生) <i>Taxodium distichum</i> (10-year-old)	高知, 大津 Otsu, Kochi	昭47年12月4日 Dec. 4, 1972
CC-105	スギ (2年生) <i>Cryptomeria japonica</i> (2-year-old)	新潟, 糸魚川 Itoigawa, Niigata	昭48年10月1日 Oct. 1, 1973
CC-106	同 (10年生) do. (10-year-old)	三重, 勢和 Sewa, Mie	昭48年11月9日 Nov. 9, 1973
CC-107	同 (5年生) do. (5-year-old)	同 do.	昭48年11月9日 Nov. 9, 1973
CC-108	同 (20年生) do. (20-year-old)	奈良, 吉野 Yoshino, Nara	昭48年11月7日 Nov. 7, 1973
CC-109	ラクウショウ <i>Taxodium distichum</i>	鹿児島, 蒲生 Gamo, Kagoshima	昭49年6月19日 June 19, 1974
CC-113	スギ (8年生) <i>Cryptomeria japonica</i> (8-year-old)	千葉, 山武 Sanbu, Chiba	昭49年10月16日 Oct. 16, 1974
CC-114	同 (12年生) do. (12-year-old)	千葉, 松尾 Matsuo, Chiba	昭49年10月17日 Oct. 17, 1974
CC-115	同 do.	茨城, 友部 Tomobe, Ibaraki	昭49年11月25日 Nov. 25, 1974
CC-116	同 do.	高知, 物部 Monobe, Kochi	昭50年1月7日 Jan. 7, 1975
CC-117	同 do.	高知, 土佐山田 Tosayamada, Kochi	昭50年1月7日 Jan. 7, 1975
CC-118	同 (5年生) do. (5-year-old)	高知, 高知 Kochi, Kochi	昭50年1月7日 Jan. 7, 1975
CC-119	同 (12年生) do. (12-year-old)	高知, 葉山 Hayama, Kochi	昭50年1月20日 Jan. 20, 1975
CC-120	同 do.	高知, 中村 Nakamura, Kochi	昭50年1月20日 Jan. 20, 1975
CC-121	同 do.	徳島, 日和佐 Hiwasa, Tokushima	昭50年1月10日 Jan. 10, 1975
CC-122	同 do.	徳島, 神山 Kamiyama, Tokushima	昭50年1月13日 Jan. 13, 1975
CC-123	同 (10年生) do. (10-year-old)	同 do.	昭50年1月13日 Jan. 13, 1975
CC-124	同 do.	同 do.	昭50年1月13日 Jan. 13, 1975

Table 26. スギ赤枯病菌の培養菌株による分生胞子形成
Sporulation of several isolates of *Cercospora sequoiae* stored
in the Government Forest Experiment Station, Japan

菌株番号 Stock number	菌核様体の直径 Diameter of scl.-like bodies (mm)	胞子形成程度 (指数) Index of the amount of sporulation	胞子形成数 No. of conidia produced ($\times 10^4/\text{cm}^2$)	
			範囲 Range	(平均) (Ave.)
CC- 6	5.5	0		
CC- 40	6.1	0		
CC- 42	5.8	3.0	18.8~30.3	(23.3)
CC- 57	6.6	0		
CC- 65	5.7	2.9	23.3~37.7	(31.6)
CC- 68	6.4	0		
CC- 69	4.4	0		
CC- 70	6.9	0		
CC- 79	6.6	0		
CC- 81	3.2	0		
CC- 84	5.1	3.0	14.7~33.7	(25.9)
CC- 85	5.1	3.0	15.5~33.7	(22.2)
CC- 87	5.0	3.0	22.4~40.4	(28.9)
CC- 88	5.2	3.0	11.7~28.2	(16.8)
CC- 89	5.2	2.9	31.2~62.1	(48.4)
CC- 90	5.1	2.5	22.8~34.2	(29.2)
CC- 91	4.9	2.8	10.0~21.1	(16.3)
CC- 92	5.0	3.0	42.0~65.1	(53.1)
CC- 93	5.4	3.0	24.2~64.1	(39.9)
CC- 94	5.3	3.0	47.3~74.4	(58.9)
CC- 95	5.0	3.0	29.0~58.2	(39.1)
CC- 96	5.6	2.6	33.2~69.0	(50.7)
CC- 97	5.4	3.0	50.7~91.2	(68.7)
CC- 98	5.4	3.0	43.4~76.4	(57.5)
CC- 99	5.3	2.7	42.9~62.3	(54.2)
CC-100	5.3	3.0	43.7~62.9	(51.6)
CC-101	5.2	3.0	12.7~23.9	(17.3)
CC-102	5.3	2.8	18.7~27.6	(24.4)
CC-103	5.3	2.9	18.2~29.3	(22.4)
CC-104	5.2	3.0	10.0~19.6	(14.9)
CC-105	5.3	2.7	21.7~34.5	(26.6)
CC-106	5.6	3.0	30.8~70.8	(46.0)
CC-107	5.7	3.0	35.4~61.0	(47.2)
CC-108	5.7	2.8	9.5~49.0	(23.5)
CC-109	5.4	2.9	13.2~46.3	(26.2)
CC-113	5.5	2.9	20.4~43.2	(29.3)
CC-114	5.5	2.9	24.8~47.2	(35.6)
CC-115	5.3	2.9	11.6~47.4	(22.7)
CC-116	5.5	3.0	13.0~43.3	(28.2)
CC-117	5.6	2.7	2.7~9.7	(5.9)
CC-118	5.5	3.0	11.5~32.6	(20.7)
CC-119	5.8	3.0	35.7~55.2	(45.0)
CC-120	6.1	2.5	6.5~46.6	(23.3)
CC-121	5.7	3.0	8.7~23.1	(15.9)
CC-122	5.7	2.9	15.0~32.7	(21.1)
CC-123	5.4	3.0	23.9~43.3	(34.8)
CC-124	5.5	2.5	5.3~14.7	(10.1)

このうち、当研究室で保存中の古い菌株 (CC-26~81) で孢子が形成されたのは 1963 年にスギ苗から分離した CC-42, 1968 年分離の CC-65 の 2 菌株だけであった。CC-42 は川崎らと筆者^{59),141)} が数年にわたり寒天培地上で孢子形成実験に用いてきた菌株で、この間かなりひんばんな移植が繰り返されてきた。しかし、CC-65 は年 1 回程度の移植で約 4 年間保存された古い菌株である。1972 年以降に新しく分離して供試した菌株では、スギ、ラクウショウの罹病葉上の分生孢子から単胞分離した菌株 (CC-84~105)、スギ溝腐病患部から組織分離した菌株 (CC-106~124) の全部でおう盛な孢子形成が認められた。これらの菌株の孢子形成程度を比べると、CC-90, 96, 120 および 124 が体表面に気中菌糸を混在したが、その他の菌株では指数 2.7~3.0 で明らかな違いは認められなかった。孢子形成数は菌株によって異なり、最高は CC-97 の平均形成数 68.7×10^4 , 最低は CC-117 の平均 5.9×10^4 であった。つぎに、菌核様体の大きさを比較すると、直径 5~6 mm の範囲にあって、菌株間に差はほとんど認められなかった。孢子形成が認められなかった古い保存菌株の中には、菌核様体が大型で膨軟になる場合 (CC-70, 57) と、逆に発達不良、小型で球形にならない場合 (CC-81) があった。つぎに、形成された分生孢子の大きさ (Fig. 20) では、長さが 20~65 μm (平均 30~44 μm), 幅が 3.8~7.5 μm (平均 4.6~5.8 μm), 隔膜数が 3~8 個 (平均 4~6 個) で菌株間にあまり差がない。また、これらの測定値は本項 4)-a の結果とほぼ一致した。なお、分生孢子浮遊液を作製して 25°C, 約 20 時間培養後の発芽率を調べた結果 (Fig. 20), 発芽は良好で平均 85% 以上を示し、菌株間には差がなかった。

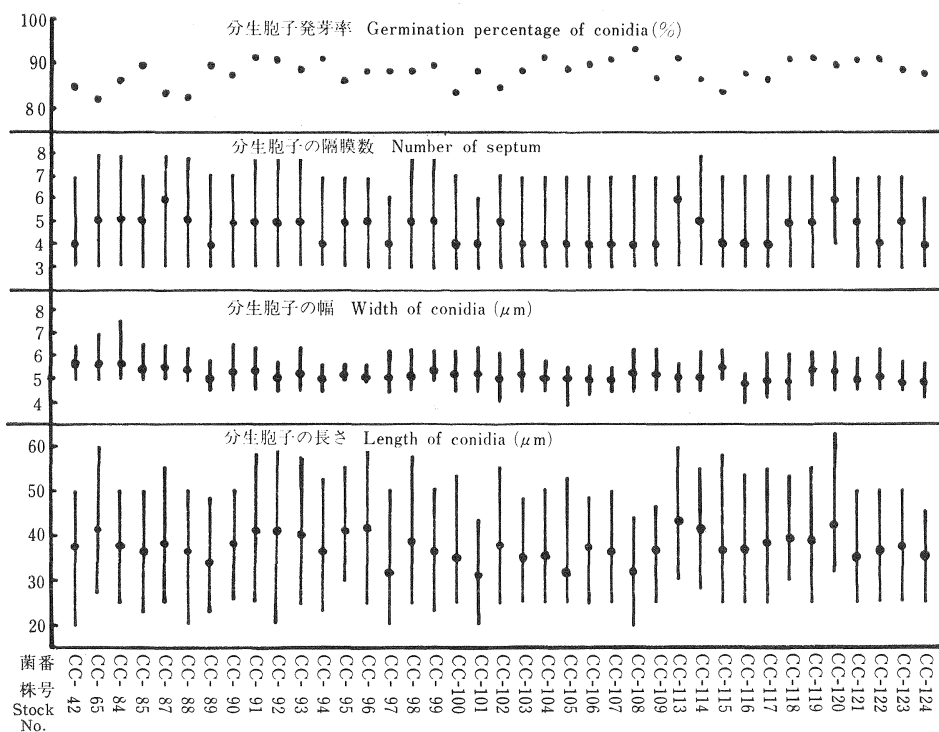


Fig. 20 振とう培養法によって形成されたスギ赤枯病菌分生孢子の大きさと発芽率
Size and germination percentage of conidia of *Cercospora sequoiae* produced by the shaking method.

考察：高井¹²⁰⁾は菌類が胞子を形成するかどうかは、まず、遺伝的にその能力を有することが決定的因子で、胞子形成のための外的条件の付与が周到に行われても、その菌が胞子形成能を備えていなければ問題にならないと述べた。*Cercospora* 属菌では *Cercospora musae* が遺伝的に胞子形成因子を持つ菌糸と持たないものがあり、これらの菌糸の継続培養によって菌糸の選抜を行った報告¹¹⁾やダイズ紫斑病菌で胞子形成能を持つ菌そうを選抜して胞子を形成させた報告⁴⁶⁾がその実例である。このような傾向は単一の分生胞子から純粋分離された培養菌株でも報告がある。すなわち、サトウダイコン褐斑病菌の 198 の分離菌株のうち、胞子形成能を持つものは菌そうの色が灰緑色～濃灰緑色を呈する幾つかの菌株に限られ¹³⁴⁾、マツ葉枯病菌で胞子形成が認められた菌株は 1 菌株に限られ¹¹⁴⁾、スギ赤枯病菌でも寒天培地上ではある特定の菌株だけに胞子形成が認められている⁴⁵⁾。

振とう培養によるスギ赤枯病菌の分生胞子形成法が、このような傾向を持つかどうかを明らかにするために、宿主植物の種類、年齢、採取地、分離培養後の経過年数、分離源などが異なる多数の菌株で実験を行ったところ、供試菌株の約 80% で胞子が形成された。とくに、新しい分離菌株では 100% の形成率を示した。したがって、振とう培養法による場合は上記の知見とはまったく相反する結果が得られたと考える。

振とう培養法で胞子が形成されなかった菌株は、すべて分離後 2 年以上を経過した古いものに限られた。このことは、スギ赤枯病菌が分離初期の菌糸で胞子形成能を有し、培養の経過とともに、しだいにその能力が減退または消失すると考えてよい。ただし、古い菌株のなかでも、少数ではあるが胞子形成能を維持している菌株が存在した。このうちの一つは、筆者らが実験用として常時ひんぱんに移植を繰り返したもので、このような継続的な移植が胞子形成能の維持に役立ったと考えられる⁴⁰⁾⁹⁰⁾。

以上のように、振とう培養による分生胞子形成法は、新しい分離菌株を使用することにより、すべての菌株で、常に多量の分生胞子形成が可能であることが明らかとなった。

8) 振とう培養法によって形成されたスギ赤枯病菌分生胞子の病原性

振とう培養法によって形成されたスギ赤枯病菌の分生胞子は、スギなどの宿主上に形成されたものに比べてやや小型であったが、発芽率はきわめて高く、形態上は正常型胞子⁴⁵⁾といえる。一方、これらの分生胞子は菌核様体の全面に密生するので、菌糸の混在しない高濃度の胞子浮遊液が大量に、容易に得られる。本項では、これらの分生胞子のスギ苗木に対する病原性を明らかにすることを目的として、人工接種試験を行った。

a. 実験材料と方法：スギ苗木は実生苗とさしき苗を用い、実生苗では 1 年生苗木を 4 月上旬に鉢植え（1 鉢当たり 5 本）してガラス室内で養苗した。さしき苗は林業試験場九州と四国支場でスギ赤枯病に対する圃場抵抗性検定を行った結果（未発表）、感受性にかなりの差が認められた精英樹クローン 19 系統を鉢植えとして用いた。これらのさしき苗は苗齢が違うために、春季に所定の位置で剪枝し、新しく伸びた当年生新梢を対象として接種した。供試分生胞子は特別の実験を除いて、実生苗では CC-42 菌株を、さしき苗では CC-85 菌株を用いた。接種は分生胞子浮遊液の噴霧接種法によった。胞子浮遊液は殺菌水または殺菌スギ針葉煎汁液の入った三角フラスコに、分生胞子が形成された菌核様体を入れ、軽く振って約 5°C の冷蔵庫に入れ、約 20 時間保存後に取り出し、十分に振って分生胞子を分生子梗から脱落させてから菌核様体を除いて作製した。分生胞子濃度は 2-1) で述べた方法によって測定した。

接種用苗木は殺菌水で洗浄してから、所定濃度の分生胞子浮遊液を霧吹きで苗木全体に均一に噴霧し、

Table 27. 人工接種試験に用いたスギ赤枯病菌分生胞子の大きさと発芽率

Size and germination of conidia of *Cercospora sequoiae* used in the inoculation experiment

実験番号 Exp. No.	胞子数 Number of conidia ($\times 10^4/\text{ml}$)	分生胞子の大きさ Size of conidia (μm)		発芽率 Germination percentage (%)#	最大発芽管長 Max. length germ-tube (μm)#
		長さ Length	幅 Width		
1	3~5 ¹⁾ 1~8 ²⁾	37.5~67.5	5~6	88.2 81.3	250 270
2	21~22 ¹⁾ 13~24 ²⁾	45.0~67.5	4~6	61.9 64.9	200 170
3	5~8 ¹⁾ 4~13 ²⁾	42.5~67.5	5~8	86.1 89.4	180 200

1) スギ針葉の煎汁 Needle decoction of *Cryptomeria*.

2) 蒸留水 Distilled water.

25°C, 20時間後 At 25°C, after 20 hours.

Table 28. 浮遊液を異にしたスギ赤枯病菌分生胞子のスギ苗木に対する

接種試験結果

Result of inoculation experiments with conidial suspension of *Cercospora sequoiae* to *Cryptomeria* seedlings

胞子浮遊液 Conidial suspension source	処 理 Treatment	接種後の 経過日数 Period lapsed (day)	実験番号 Exp. No.	供試スギ苗木 Seedlings tested		罹病針葉数 Number of needles affected (B)	B/A	被害指数 Index of damage
				供試数 No.	地上高 Top length (A)(cm)			
スギ針葉煎汁 Decoction of <i>Cryptomeria</i>	接 種 Inoculated	20	1	20	10.7	16.1	1.5	
			2	20	11.2	27.8	2.5	1.7
			3	14	10.7	35.9	3.4	1.7
		40	1	20	11.2	49.4	4.4	2.3
			2	20	11.4	46.6	4.1	2.2
			3	14	11.2	63.4	5.7	2.3
	無 接 種 Uninoculated	20	1~3	15	12.0	0		0
		40	1~3	15	12.4	0		0
蒸 留 水 Distilled water	接 種 Inoculated	20	1	20	10.7	12.3	1.2	
			2	20	11.2	21.2	1.9	1.7
		40	1	20	11.0	39.7	3.6	2.1
			2	20	11.2	48.5	4.3	2.1
	無 接 種 Uninoculated	20	1~3	15	11.2	0		0
		40	1~3	15	11.6	0		0

分生胞子浮遊液の噴霧量：スギ苗木 1 本当たり 2 ml。

Amount of conidial suspension sprayed : 2 ml per a seedling.

Table 29. 分生胞子浮遊液の接種量を異にしたスギ赤枯病菌のスギ苗木に対する接種試験結果

Result of inoculation experiments with conidial suspension of *Cercospora sequoiae* to *Cryptomeria* seedlings

胞子浮遊液量 Amount of suspension (ml)	供 試 ス ギ 苗 木 Seedlings tested		罹 病 針 葉 数 Number of needles affected (B)	B/A	被害指数 Index of damage
	供 試 数 No.	地 上 高 Top length (A) (cm)			
4	5	9.8	184	14.9	2.7
	4	9.5 (9.6)	108 (143)		
	5	9.5	136		
2	5	12.6	154	12.3	2.4
	5	10.9 (12.1)	153 (149)		
	4	12.8	139		
1	5	10.6	98	9.2	2.2
	4	7.8 (10.8)	81 (99)		
	4	13.9	117		
0	3	11.0 (11.0)	0		0
	3	11.0			

分生胞子数：胞子浮遊液 1.0 ml 当たり 60×10^4 個。Number of conidia : 60×10^4 per 1 ml of conidial suspension.

Table 30. 分生胞子濃度を異にしたスギ赤枯病菌のスギ苗木に対する接種試験結果

Result of inoculation experiments with various concentrations of conidia of *Cercospora sequoiae* to *Cryptomeria* seedlings

分生胞子数 Number of conidia ($\times 10^4$ /ml)	分生胞子の 発 芽 率 Germination percentage (%)	供 試 ス ギ 苗 木 Seedlings tested		罹 病 針 葉 数 Number of needles affected (B)	B/A	被害指数 Index of damage
		供 試 数 No.	地 上 高 Top length (A) (cm)			
60	84.5	5	9.7	160	13.6	2.7
		5	11.1 (10.4)	168 (141)		
		5	10.3	95		
33	83.3	5	11.0	155	10.4	2.3
		5	10.8 (10.3)	93 (107)		
		4	8.5	73		
12	83.9	4	9.6	45	7.6	1.8
		4	11.0 (10.3)	82 (78)		
		4	10.4	96		
5	84.3	4	12.2	57	3.2	1.5
		4	11.4 (10.8)	24 (35)		
		5	8.9	25		
0		3	11.0 (11.0)	0 (0)		0
		3	11.0	0		

ただちに空調温室内の接種箱（温度 20～30℃）内に入れ、4 日間温室に保った。その後は温室内で管理した。

発病調査は初期病斑が発現する接種約 20 日後と、罹病部に分生子梗と分生胞子が形成される約 30 日後の 2 回行った。発病調査は 2 つの方法を併用した。一つは圃場における本病防除試験で用いられた被害程度表示法⁹⁵⁾の精度をいくらか高めた方法、すなわち、微害から中害までにそれぞれの間値、微～軽害（指数 1.5）と軽～中害（指数 2.5）を設けて表わした。他の一つは、各苗木の罹病葉全数を数え、供試苗木の大きさによる不均衡を軽減させるために、罹病総葉数を苗高で除した数値を発病程度として示した。

さしき苗では苗木が大きいために、屋外で接種した。屋外の場合、直射日光によって温室内の温度が上昇するため、熱透過率の少ないアルミ蒸着フィルム（ピアレスフィルム TS 型）⁸²⁾を用いて苗床全体を覆って温室とした。床面積は 6 m²、供試鉢数 115 鉢に対して胞子浮遊液濃度 30～46×10⁴/ml を 500 ml 噴霧した。その他の処理は実生苗の場合に準じた。

b. 実生苗に対する人工接種

実験 1：分生胞子浮遊液の影響（1971 年）

分生胞子浮遊液に殺菌蒸留水とスギ針葉煎汁（2-3）-a）を使って発病に及ぼす影響を調べた。供試分生胞子の発芽率（Table 27）は実験 2 で劣ったが、胞子浮遊液の違いによる発芽率、発芽管の長さには差がなかった。3 回の接種結果（Table 28）によると、胞子浮遊液の違いによる発病差は認められなかった。

Table 31. 分生胞子濃度を異にしたスギ赤枯病菌のスギ苗木に対する
接種試験結果
Result of inoculation experiments with various concentrations of
conidia of *Cercospora sequoiae* to *Cryptomeria* seedlings

分生胞子数 Number of conidia (×10 ⁴ /ml)	分 生 胞 子 発 芽 率 Germination percentage (%)	供 試 ス ギ 苗 木 Seedlings tested		罹 病 針 葉 数 Number of needles affected (B)	B / A	被害指数 Index of damage
		供 試 数 No.	地 上 高 Top length (A) (cm)			
60	69.9	5	8.7	58	6.2	2.1
		5	10.7	84		
		5	9.1 (9.9)	77 (60.4)		
		5	10.1	38		
		5	11.1	45		
22	69.9	5	10.4	42	6.3	2.1
		5	11.5	93		
		4	9.9 (10.6)	63 (66.8)		
		5	9.9	93		
		4	11.5	43		
12	69.9	5	11.2	15	2.2	1.4
		5	10.7	26		
		5	10.3 (10.4)	14 (2.2)		
		5	10.2	49		
		5	9.4	12		
0		5	10.5 (10.0)	(0)		0
		5	9.6			

被害指数は接種 20 日後で両者ともに 1.7, 軽害に近い発病が認められ, 40 日後では 2.1~2.3 と軽害以上に達し, その後は乾固, 脱落する針葉が現われた。

実験 2 : 分生胞子濃度の影響 (1972 年)

ここでは二つの実験を行った。一つは分生胞子濃度を約 $60 \times 10^4/\text{ml}$ とし, 苗木 1 本当たりの噴霧量を 1 ml, 2 ml および 4 ml とした。噴霧量 1 ml 区では噴霧された水滴が針葉上にまばらに付着する程度, 4 ml 区では噴霧された水滴の一部が苗木を伝って流失する程度であった。他の一つは, 苗木 1 本当たりの噴霧量を 2 ml とし, 分生胞子濃度を 5×10^4 , 10×10^4 , 20×10^4 , 30×10^4 および $60 \times 10^4/\text{ml}$ に変えて接種した。

接種 30 日後における接種量の結果 (Table 29) は, いずれの接種区ともかなり激しく発病し, 接種量が多いほど激しさを増した。すなわち, 発病程度 (B/A) では 1 ml 噴霧で 9.2, 2 ml 噴霧では 12.3, 4 ml 区では 14.9 に増加し, 被害指数も 1 ml 区の 2.2 から 4 ml 区の 2.7 まで上昇した。罹病葉は苗木の

Table 32. スギ苗木に対する接種試験に用いたスギ赤枯病菌の分生胞子濃度
Concentrations of conidial suspension of *Cercospora sequoiae* used
in the inoculation experiments to *Cryptomeria* seedlings

実験番号 Exp. No.	接種年月日 Date of inoculation	菌株番号 Stock number	接種した分生胞子数 Number of conidia inoculated ($\times 10^4/\text{ml}$)	
			範 囲 Range	(平 均) (Ave.)
I	July 26, 1973	CC- 42	20 ~ 25	(22.5)
		CC- 65	38 ~ 41	(39.8)
		CC- 84	22 ~ 41	(31.3)
		CC- 85	18 ~ 31	(23.3)
		CC- 87	32 ~ 40	(35.0)
II	Aug. 2, 1973	CC- 88	24 ~ 34	(26.8)
		CC- 89	25 ~ 51	(27.3)
		CC- 90	20 ~ 31	(26.0)
		CC- 91	23 ~ 43	(30.8)
		CC- 92	26 ~ 37	(33.0)
		CC- 93	26 ~ 54	(36.3)
		CC- 94	23 ~ 40	(30.3)
		CC- 95	21 ~ 45	(37.3)
		CC- 96	26 ~ 41	(34.0)
		CC- 98	27 ~ 51	(38.3)
III	Aug. 12, 1973	CC- 97	15 ~ 20	(17.8)
		CC- 99	18 ~ 25	(21.5)
		CC-100	15 ~ 24	(20.8)
		CC-101	20 ~ 28	(25.5)
		CC-102	18 ~ 25	(20.8)
IV	Aug. 18, 1973	CC-103	17 ~ 22	(19.5)
		CC-104	18 ~ 22	(20.5)
		CC-105	20 ~ 32	(26.8)

先端または上部の幼針葉に集中し、下部では少なかった。また、幼茎の一部に壊死斑が形成された (Plate 8, B)。

つぎに、分生孢子濃度と発病との関係 (Table 30, 31) は、孢子濃度が低い $5 \sim 12 \times 10^4/\text{ml}$ 区では発病程度 2.2~7.6, 被害指数 1.4~1.8 程度に終わった。孢子濃度が高まるにしたがって発病も増加し、Table 30 の $60 \times 10^4/\text{ml}$ 区では発病程度 13.6, ほば中害程度に達した。

実験 3 : 培養菌株の病原性 (1973, 1974 年)

本項 7) で分生孢子形成が認められた 23 菌株の病原性とその程度を比較した。各菌株の孢子濃度は Table 32 のように、おおよそ $20 \sim 40 \times 10^4/\text{ml}$ に調整した。接種量は苗木 1 本当たり 2 ml とし、7 月上旬から 8 月中旬まで 4 回に分けて接種した。

Table 33. スギ赤枯病菌の培養菌株のスギ苗に対する接種試験結果
Result of inoculation experiments with various isolates of
Cercospora sequoiae to *Cryptomeria* seedlings

実験番号 Exp. No.	菌株番号 Stock No.	供試スギ苗木 Seedlings tested		罹病針葉数 Number of needles affected (B)	B/A	被害指数 Index of damage
		供試本数 Number	地上高 Top length (A) (cm)			
I	CC- 42	15	13.5	26.3	2.0	1.5
	CC- 65	15	13.4	57.1	4.3	2.1
	CC- 84	15	13.3	50.5	3.8	1.8
	CC- 85	15	13.5	86.6	6.4	2.4
	CC- 87	14	13.1	24.8	1.9	1.6
	無接種 Check	6	13.9	0	0	0
II	CC- 88	15	15.5	91.5	5.9	2.4
	CC- 89	15	17.0	17.1	1.0	1.2
	CC- 90	15	15.9	12.3	0.8	1.4
	CC- 91	15	15.9	24.1	1.5	1.6
	CC- 92	15	17.5	52.9	3.0	1.9
	CC- 93	15	15.1	30.9	2.1	1.6
	CC- 94	15	15.9	66.6	4.2	2.1
	CC- 95	15	14.0	68.1	4.9	2.1
	CC- 96	15	14.5	258.2	17.8	3.2
	CC- 98 無接種 Check	15 6	14.3 13.8	122.1 0	8.5 0	2.5 0
III	CC- 97	15	16.0	21.1	1.3	1.4
	CC- 99	15	16.5	12.5	0.8	1.2
	CC-100	15	15.8	20.0	1.3	1.6
	CC-101	15	14.8	33.4	2.3	1.6
	CC-102	15	16.0	9.0	0.6	1.3
	無接種 Check	6	14.3	0	0	0
IV	CC-103	12	14.5	7.4	0.5	1.1
	CC-104	12	15.9	5.3	0.3	1.0
	CC-105	15	15.9	54.9	3.5	1.7
	無接種 Check	6	14.5	0	0	0

接種 30 日後の発病結果 (Table 33) によると、すべての供試菌株の接種で発病が確認され、その程度は培養菌株によって違った。最も激しく発病したのは CC-96 で、発病程度 17.8、被害指数 3.2、中害以上に達し (Plate 8, A)、CC-98, 85 および 88 の軽～中害がこれに続いた。これに比べ CC-103, 102, 104 および 99 では微害程度にとどまった。

この実験は菌株によって接種時期や胞子濃度が異なったので、比較的均一な条件下で再接種を試みた。すなわち、上記の接種試験で発病が激しかった CC-96 から発病が減る順に CC-85, 65, 84, 100, 97 および 104 菌株を用い、各菌株の胞子濃度を第 1 回が $20.5 \sim 24.8 \times 10^4/\text{ml}$ (平均 23.0)、第 2 回が $37.0 \sim 46.5 \times 10^4/\text{ml}$ (平均 41.3) 個に規制して接種した。

この結果 (Table 34)、いずれの菌株も激しく発病し、第 1 回接種では被害指数 2.0～2.5、第 2 回では 2.3～3.3 を示し、菌株間には有意な差は認められなかった。したがって、供試菌株間には明らかな病原性の強弱はないと考える。

c. さしき苗に対するスギ赤枯病菌分生胞子の人工接種 (1973, 1974 年)

同一苗木の新梢に対し 2 年にわたり 2 回接種した。この結果 (Table 35)、供試クローンすべてに発病が認められた。しかし、発病程度は実生苗に比べて全体的に軽微であった。つぎに、供試クローン間では中村 3 号のように被害指数 1.7, 2.6 を示して実生苗に匹敵するものや、県日出 3 号、県八女 12 号の 1974 年の被害指数のように、スギ赤枯病菌に対して感受性のクローンが認められた。

考察：スギ赤枯病菌の人工接種は、これまで寒天培地上の菌糸を破碎して作製した菌糸浮遊液によって行われてきた⁴¹⁾⁴²⁾⁴⁴⁾。分生胞子を用いた例としては、清原・徳重⁶⁸⁾が独自の処法で培地に分生胞子を形成

Table 34. スギ赤枯病菌の培養菌株のスギ苗木に対する接種試験結果
Result of inoculation experiments with spore suspension of various
isolates of *Cercospora sequoiae* to *Cryptomeria* seedlings

菌株番号 Stock No.	実験番号 Exp. No.	供試スギ苗木 Seedlings tested		罹病針葉数 Number of needles affected (B)	B/A	被害指数 Index of damage
		供試本数 No.	地上高 Top length (A) (cm)			
CC- 65	1	15	13.5	137.7	10.2	2.4
	2	13	13.7	218.7	16.0	3.3
CC- 84	1	15	12.6	202.5	16.1	2.4
	2	15	14.5	174.9	12.1	2.5
CC- 85	1	14	11.8	101.2	8.6	2.2
	2	15	13.8	144.3	10.5	2.5
CC- 96	1	13	12.6	143.8	11.4	2.0
	2	13	14.3	107.5	7.5	2.4
CC- 97	1	15	11.5	152.9	13.3	2.6
	2	13	13.6	101.3	7.5	2.4
CC-100	1	15	12.5	161.4	12.9	2.5
	2	15	13.8	172.6	12.5	2.7
CC-104	1	15	13.4	103.7	7.7	2.2
	2	14	13.8	108.7	7.9	2.3
無接種 Check	1	15	12.9	0	0	0
	2	15	12.4	0	0	0

Table 35. スギさしき苗に対するスギ赤枯病菌分生孢子による接種試験結果

Result of inoculation experiments with conidial suspension
of *Cercospora sequoiae* to cultivated cuttings of *Cryptomeria*

供試スギさしき苗 Cultivated cuttings tested			罹病針葉数 Number of needles affected (B)	B/A	被害指数 Index of damage
クローン名 Clone name	本数 No.	主軸の長さ Length of shoot (A) (cm)			
宇和島一1	(10*	16.4	18.7	1.1	1.2
	15**	16.5	32.6	2.0	1.5
宇和島一9	(10	17.3	49.5	2.9	1.9
	8	16.8	36.9	2.2	1.4
上浮名一11	(10	16.3	19.5	1.2	1.3
	12	16.6	21.4	1.3	1.2
周防一16	(10	15.6	8.3	0.5	0.7
	15	17.3	8.9	0.5	1.0
高松一11	(15	13.5	18.3	1.4	1.1
中村一1	(10	16.1	27.3	1.7	1.4
	10	18.6	38.7	2.1	1.5
中村一2	(10	12.3	29.7	2.4	1.8
	10	14.4	24.3	1.7	1.2
中村一3	(15	12.0	53.1	4.4	2.6
	22	13.9	59.8	4.3	1.7
宿毛一4	(16	15.5	29.5	1.9	1.7
	24	15.6	30.3	1.9	1.3
大正一2	(10	13.5	24.1	1.8	1.4
	18	14.4	47.7	3.3	1.5
吾川一2	(10	16.5	23.4	1.4	1.4
	15	16.5	43.7	2.7	1.2
小川一2	(10	14.3	20.9	1.5	1.4
	9	18.5	68.7	3.7	1.7
本山一2	(15	16.1	21.9	1.4	1.3
	24	15.8	21.6	1.4	1.1
大栃一4	(10	15.7	6.8	0.4	0.9
	16	15.1	4.1	0.3	0.8
安芸一3	(10	13.7	14.4	1.1	1.2
	14	12.2	6.6	0.5	0.8
県藤津一2	(10	17.8	18.3	1.0	1.2
	11	16.5	60.8	3.7	1.7
県日出一3	(10	16.4	13.4	0.8	1.0
	11	19.0	75.6	4.0	2.2
県八女一12	(10	15.3	26.8	1.8	1.2
	10	17.5	107.0	6.1	2.5
県竹田一11	(10	12.5	14.2	1.1	1.0
	13	16.7	23.3	1.4	1.3

* 昭和48年7月24日接種

Inoculated on July 24, 1973.

** 昭和49年7月20日接種

Inoculated on July 20, 1974.

させ、これをスギ実生苗に接種して発病を観察し、川崎ら⁵⁹⁾も寒天培地上で形成させた分生胞子をスギ苗に接種して赤枯病の病徴と病原菌子座の形成を認めた。しかし、これらの実験は分生胞子の病原性を確認したのにとどまり、くわしい接種試験が行われていない。この原因は、同氏らの分生胞子形成法では、分生胞子を常時、多量に形成させ、菌糸の混在しない高濃度の胞子浮遊液が得られなかった点にある。振とう培養による分生胞子形成法は均質で、多量の分生胞子が常に得られ、分生胞子浮遊液の調製も容易である。本項で述べたように、これらの分生胞子浮遊液による能率的な人工接種が可能となった。また、スギの実生とさしき苗に対する接種試験で病原性が確認された。

スギさしき苗は一般に赤枯病に抵抗性であるといわれるが¹³²⁾、この接種試験でも全体的に発病は少なかった。しかし、供試クローンすべてに発病が認められ、クローンによっては実生苗と同程度の感受性を示すものがあつた。これは、在来スギさしき品種のなかに本病に弱いものがあるとの報告³⁴⁾¹³³⁾に照らして注目に価する。

IV 数種 *Cercospora* 属菌に対する振とう培養による分生胞子形成法の適用実験

Cercospora 属菌は農作物をはじめ果樹、林木などの葉や幼茎を侵す重要な植物病原菌群であるが、そのいずれも人工培地上に分生胞子を形成しにくい性質を持っている。そして、多くの研究者の努力にもかかわらず、有効適確な分生胞子形成法が確立されていないのが現状である¹²⁰⁾。本項では振とう培養による分生胞子形成法が、スギ赤枯病菌以外の *Cercospora* 属菌に対して適用が可能であるかどうかを明らかにする目的で実験を行った。

1. 樹木を侵害する主な *Cercospora* 属菌

1) 実験材料と方法：供試菌は林業試験場樹病研究室の保存菌株からセンペルセコイア葉枯病菌とマツ類葉枯病菌の2種²⁴⁾³⁸⁾、当研究室で分離培養した緑化樹木や庭園樹木類を侵して葉枯性病害を起こす多数の *Cercospora* 属菌^{50)~52)70)~76)124)137)}、すなわち、ハギ、タチバナモドキ、アメリカシモツケ、ライラック、ヤブデマリおよびレンギョウの褐斑病菌、グミ、ケムリノキ、ウメモドキ、サンシュユおよびツクバネウツギの斑点病菌、ユーカリ、ハナズオウおよびカラスザンショウの角斑病菌、シャシャンボ斑紋病菌、ハコネウツギ灰斑病菌、アメリカイワナンテン紫斑病菌およびユズリハの葉枯性病害を起こす *Cercospora* 属菌の計18種を用いた。供試菌の宿主名、採取場所および分離年月日は Table 36 にまとめた。接種源の培養法、振とう培養温度と期間、コイトロン (KB-10 型) 保持条件などは特別の実験を除いてスギ赤枯病菌の処法に準じた。

2) 実験結果

実験1：榮研ジャガイモ煎汁培地を用いた11種、14菌株の結果 (Table 37) では、ハギ褐斑病菌 *C. latens*、タチバナモドキ褐斑病菌 *C. pyracanthae* およびユーカリ角斑病菌 *C. epicoccoides* でごくわずかながら胞子が形成された (Fig. 21)。その他の菌では菌核様体の表面が白色～淡褐色、密な菌糸に覆われて胞子は形成されなかった。胞子が形成された3種の菌核様体は黒色、球形、表面光沢を有したがやや軟らかであった。他の *Cercospora* 属菌では大型で膨軟、濃緑色～濃褐色で、表面が角状に突起するか、菌糸に覆われるものが多かった (Plate 5, H)。

実験2：実験1の菌核様体は大型、膨軟で胞子形成が認められないものが多かった。そこで、菌核様体

Table 36. 振とう培養による分生孢子形成実験に用いた *Cercospora* 属菌
Cercosporae used in the sporulation experiment with shaking culture

菌株番号 Stock number	菌 名 Fungus	宿 主 Host	採 取 地 Locality	分 離 年 月 日 Date of isolation
CC- 32	<i>C. exosporioides</i>	センペルセコイア <i>Sequoia sempervirens</i>	東 京, 目 黒	昭34年9月10日 Sept. 10, 1959
CC- 33	<i>C. pini-densiflorae</i>	ストロブマツ <i>Pinus strobus</i>	静 岡, 浜 北	昭35年10月12日 Oct. 12, 1960
CC- 43	do.	ク ロ マ ツ <i>P. thunbergii</i>	熊 本, 熊 本	昭39年4月24日 Apr. 24, 1964
CC-110	do.	フランスカイガンマツ <i>P. pinaster</i>	高 知, 高 知	昭49年5月29日 May 29, 1974
CC-112	do.	ムリカタマツ <i>P. muricata</i>	高 知, 高 知	昭49年5月29日 May 29, 1974
CB- 30	<i>C. latens</i>	キ ハ ギ <i>Lespedeza buergeri</i>	熊 本, 熊 本	昭47年11月25日 Nov. 25, 1972
CB- 31	<i>C. pyracanthae</i>	ヒマラヤピラカンサ <i>Pyracantha crenulata</i>	熊 本, 熊 本	昭47年11月8日 Nov. 8, 1972
CB- 32	<i>C. spiraeicola</i>	ケアメリカシモツケ <i>Physocarpus opulifolius</i>	東 京, 目 黒	昭47年11月10日 Nov. 10, 1972
CB- 34	<i>C. epicoccoides</i>	ユーカリ <i>Eucalyptus globulus</i>	東 京, 目 黒	昭47年11月29日 Nov. 29, 1972
CB- 37	<i>C. chionea</i>	ハナズホウ <i>Cercis chinensis</i>	茨 城, 那 珂	昭48年10月15日 Oct. 15, 1973
CB- 40	<i>C. lilais</i>	ムラサキハシドイ <i>Syringa vulgaris</i>	茨 城, 土 浦	昭48年10月17日 Oct. 17, 1973
CB- 43	<i>C. vaccini</i>	シャシャンボ <i>Vaccinium bracteatum</i>	島 根, 出 雲	昭48年10月10日 Dec. 10, 1973
CB- 47	<i>C. elaeagnicola</i>	ナ ツ グ ミ <i>Elaeagnus multiflora</i>	鹿児島, 高尾野	昭49年2月27日 Feb. 27, 1974
CB- 48	<i>C. fagariae</i>	カラスザンショウ <i>Fagara ailanthoides</i>	福 岡, 北九州	昭48年10月14日 Oct. 14, 1973
CB- 54	<i>C. weigeliae</i>	ハコネウツギ <i>Weigela coraeensis</i>	東 京, 目 黒	昭49年10月10日 Oct. 10, 1974
CB- 55	<i>C. naitoi</i>	ウメモドキ <i>Ilex serrata</i>	福 岡, 黒 木	昭49年9月27日 Sept. 27, 1974
CB- 56	<i>C. cotini</i>	ケムリノキ <i>Cotinus coggygia</i>	福 岡, 黒 木	昭49年9月27日 Sept. 27, 1974
CB- 58	<i>C. cornicola</i>	サンシュユ <i>Cornus officinalis</i>	福 岡, 黒 木	昭49年9月27日 Sept. 27, 1974
CB- 60	<i>C. abeliae</i>	ハナゾノツクバネウツギ <i>Abelia grandiflora</i>	福 岡, 黒 木	昭49年9月27日 Sept. 27, 1974
CB- 61	<i>C. leucothoes</i>	アメリカイワナンテン <i>Leucothoe catesbaei</i>	福 岡, 黒 木	昭49年10月8日 Oct. 8, 1974
CB- 62	<i>C. tineae</i>	ヤブデマリ <i>Viburnum plicatum</i> var. <i>tomentosum</i>	福 岡, 黒 木	昭49年10月8日 Oct. 8, 1974
CB- 63	<i>C. forsythiae</i>	レンギョウ <i>Forsythia suspensa</i>	東 京, 調 布	昭49年10月8日 Oct. 8, 1974
CB- 64	<i>C. pyracanthae</i>	タチバナモドキ <i>Pyracantha angustifolia</i>	東 京, 調 布	昭49年9月28日 Sept. 28, 1974
CB- 67	<i>C. sp.</i>	ユズリハ <i>Daphniphyllum</i> <i>macropodium</i>	東 京, 調 布	昭49年9月28日 Sept. 28, 1974

Table 37. 数種 *Cercospora* 属菌の分生孢子形成
Sporulation of *Cercosporae* by the shaking method

実験番号 Exp. No.	菌株番号 Stock No.	菌名 Fungus	培地の種類 Kind of medium	菌核様体の直径 Diam. of scl.-like bodies (mm)	孢子形成程度 Degree of sporulation
I	CC- 32	<i>C. exosporioides</i>	E	5.1	—*
	CC- 33	<i>C. pini-densiflorae</i>		7.4	—
	CC- 43	do.		4.9	—
	CC-110	do.		7.8	—
	CC-112	do.		8.7	—
	CB- 30	<i>C. latens</i>		7.0	+
	CB- 31	<i>C. pyracanthae</i>		7.4	+
	CB- 32	<i>C. apiraeicola</i>		6.9	—
	CB- 34	<i>C. epicoccoides</i>		6.2	+
	CB- 37	<i>C. chionea</i>		7.7	—
	CB- 40	<i>C. lilais</i>		5.9	—
	CB- 43	<i>C. vaccini</i>		6.3	—
	CB- 47	<i>C. elaeagnicola</i>		5.0	—
	CB- 48	<i>C. fagariae</i>		3.9	—
II	CB- 54	<i>C. weigeliae</i>	R E'	5.1 5.4	— —
	CB- 55	<i>C. naitoi</i>	R E'	5.1 10.0	+ —
	CB- 56	<i>C. cotini</i>	R E'	4.5 4.9	+~++ +~++
	CB- 58	<i>C. cornicola</i>	R E'	5.5 9.5	— —
	CB- 60	<i>C. abeliae</i>	R E'	10.0 12.3	— —
	CB- 61	<i>C. leucothoes</i>	R E'	5.1 10.0	+ —
	CB- 62	<i>C. tineae</i>	R E'	7.7 9.3	— —
	CB- 63	<i>C. forsythiae</i>	R E'	7.1 8.8	— —
	CB- 64	<i>C. pyracanthae</i>	R E'	5.5 7.6	— —
	CB- 67	<i>C. sp. on Daphni- phyllum macropo- dum</i>	R E'	5.4 5.8	— —

E: 栄研ジャガイモ煎汁培地 (ジャガイモ煎汁粉末 4 g, ブドウ糖 10 g, 水 1 l)

Eiken's potato-extract solution (Eiken potato-extract 4 g, glucose 10 g)

R: リチャード氏変法培地 (KNO₃ 10 g, KH₂PO₄ 5 g, MgSO₄·7 H₂O 2.5 g, しょ糖 10 g, 水 1 l)Modified RICHARDS' solution (KNO₃ 10 g, KH₂PO₄ 5 g, MgSO₄·7 H₂O 2.5 g, sucrose 10 g, water 1,000 ml)E': 栄研ジャガイモ煎汁変法培地 (ジャガイモ煎汁粉末 2 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄·7 H₂O 0.5 g, ブドウ糖 5 g, 水 1 l)Modified Eiken's potato-extract solution (Eiken potato-extract 2 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄·7 H₂O 0.5 g, glucose 5 g, water 1,000 ml)

*: — なし Non, + わずか形成 Very few, ++ やや多い形成 Moderate

の発達の抑制と成熟をはかる目的で、スギ赤枯病菌の実験で比較的小型の菌核様体を形成し、孢子形成がすぐれた培地のうち、炭素源を減量したリチャード氏培地と栄研ジャガイモ煎汁変法培地（栄研ジャガイモ煎汁粉末 2.0 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, ブドウ糖 10 g, 水 1 l）を用いた。また、接種源培養用の PDA 培地もスギ赤枯病菌培養の 1/3 濃度に減じた。この結果（Table 37），ウメモドキ斑点病菌 *C. naitoi* とアメリカイワナンテン紫斑病菌 *C. leucothoes* がリチャード氏変法培地上で、ケムリノキ斑点病菌 *C. cotini* は両培地上で孢子が形成された。とくに、ケムリノキ斑点病菌では菌核様体上の各所に多数の分生孢子が群生して最もおう盛であった。これら 3 種の菌核様体の大きさは直径 4.5～5.1 mm で、球形、黒色、表面平滑で光沢があった（Plate 5, E～G）。分生孢子の大きさはケムリノキ斑点病菌が、長さ 25～95 μm （平均 60.6 μm ），幅 2.0～2.8 μm （平均 2.5 μm ），隔膜数 3～11（平均 8），ウメモドキ斑点病菌が長さ 25～100 μm （平均 50.1 μm ），幅 2.0～2.8 μm （平均 2.7 μm ），隔膜数 3～9（平均 5），アメリカイワナンテン紫斑病菌では長さ 25～100 μm （平均 52.2 μm ），幅 2.0～2.5 μm （平均 2.4 μm ），隔膜数 3～8（平均 5）で、その形状は Fig. 22 に示す。他の 7 種の *Cercospora* 属菌では菌糸塊が大型、

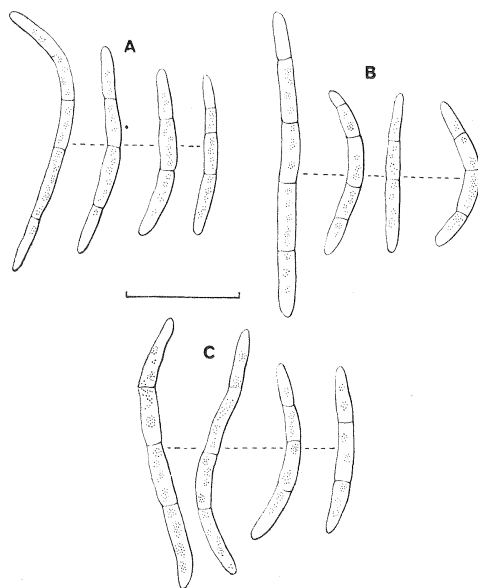


Fig. 21 振とう培養法によって形成された

Cercospora 属菌の分生孢子

Conidia of *Cercosporae* produced by the shaking method (—: 25 μm).

A : *Cercospora epicoccoides*

(ユーカリ角斑病菌)

B : *C. latens* (ハギ褐斑病菌)

C : *C. pyracanthae*

(タチバナモドキ褐斑病菌)

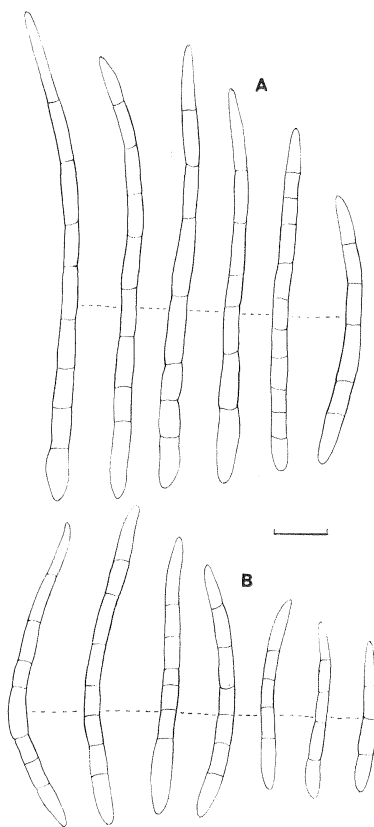


Fig. 22 振とう培養法によって形成された

Cercospora 属菌の分生孢子

Conidia of *Cercosporae* produced by the shaking method (—: 10 μm).

A : *Cercospora cotini*

(ケムリノキ斑点病菌)

B : *C. naitoi* (ウメモドキ斑点病菌)

膨軟か、小型で膨軟、表面粗、菌糸を密生して胞子は形成されなかった。

実験 3：実験 2 で胞子形成が認められたケムリノキとウメモドキ斑点病菌およびアメリカワナンテン紫斑病菌 3 種の振とう培養期間の影響を調べた。この結果 (Table 38), ケムリノキ斑点病菌では 20 日間培養で胞子数が増加し、とくに、栄研ジャガイモ煎汁変法培地では平均胞子形成数が $41.9 \times 10^4/\text{cm}^2$ 個にも達し、III で述べたスギ赤枯病菌の形成数に匹敵した。ウメモドキ斑点病菌とアメリカワナンテン紫斑病菌では胞子数が少なく、培養期間の影響は現われなかった。

実験 4：清原・徳重⁶⁸⁾ が試みた培養菌そうに対する切断、乾燥などの物理的刺激の付与操作を参考とし、実験 3 の菌核様体を殺菌ろ紙を入れたシャーレに収め、室内（シャーレのふたを取ってデシケータ内またはコイトロン (KB-10) 内）に置いて、4～5 日乾燥後に殺菌水を注加して湿室とし、コイトロン (KB-10) 内で胞子形成を促した。この結果 (Table 39), 3 菌ともに前 2 回の実験に比較して胞子形成数が増加した。すなわち、ケムリノキ斑点病菌 (CB-56) では両培地の 15 日と 20 日間培養でおう盛な胞子形成が認められ、実験 3 で胞子が形成されなかったウメモドキ斑点病菌 (CB-55) では、リチャード氏変法培地の 15 日間培養で平均胞子形成数 $20 \times 10^4/\text{cm}^2$ 個に達した。しかし、菌核様体の切断処理は切断面が菌糸に覆われ、胞子形成を促進しなかった。

Table 38. 数種 *Cercospora* 属菌の分生胞子形成
Sporulation of *Cercosporae* by the shaking method

菌株番号 Stock number	供試菌 Fungus	培地の種類 Kind of medium	培養日数 Duration (day)	菌核様体の直径 Diam. of scl.-like bodies (mm)	胞子形成程度 Degree of sporulation	胞子形成数 No. of conidia produced ($\times 10^4/\text{cm}^2$)
CB-55	<i>C. naitoi</i>	R	15	6.3	—*	
			20	6.6	—	
		E	15	7.3	—	
			20	8.1	—	
CB-56	<i>C. cotini</i>	R	15	4.9	+	0～1.3 (0.8)
			20	4.9	+	0～3.5 (1.6)
		E	15	5.0	+	2.5～10.1 (5.9)
			20	5.0	++	15.8～81.8 (41.9)
CB-61	<i>C. leucothoes</i>	R	15	5.1	—	
			20	5.4	+	0～1.9 (0.7)
		E	15	7.0	—	
			20	5.6	—	

R：リチャード氏変法培地 (KNO_3 10 g, KH_2PO_4 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5 g, しょ糖 10 g, 水 1 l)

Modified RICHARDS' solution (KNO_3 10 g, KH_2PO_4 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5 g, sucrose 10 g, water 1,000 ml)

E：栄研ジャガイモ煎汁変法培地 (栄研ジャガイモ煎汁粉末 2 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, ブドウ糖 5 g, 水 1 l)

Modified Eiken's potato-extract solution (Eiken potato-extract 2 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, glucose 5 g, water 1,000 ml)

*：— 胞子なし Non, + 胞子わずかに Very few, ++ 胞子やや多い Moderate

2. 果樹と農作物を侵害する *Cercospora* 属菌

1) 実験材料と方法

カンキツ黄斑病菌 *Mycosphaerella horii* (不完全時代 *Cercospora* sp.), カキ角斑病菌 *Cercospora kakivora*, トマトすすかび病菌 *C. fuligena*, ナスすす斑病菌 *Cercospora* sp., ジャガイモ褐斑病菌 *C. concors*, サトウダイコン褐斑病菌 *C. beticola*, チャ緑斑病菌 *Cercospora* sp. および近縁菌としてミブナ白斑病菌 *Cercospora brassicae* の 8 種を供試した*。供試菌の分離後の経過年数はジャガイモ褐斑病菌とミブナ白斑病菌は 2～3 年で、他は比較的新しい。培地は栄研ジャガイモ煎汁培地、本項 1 で用いたリチャード氏変法培地と栄研ジャガイモ煎汁変法培地を使用した。また、サトウダイコン褐斑病菌などの

Table 39. 振とう培養法による数種 *Cercospora* 属菌の分生孢子形成
Sporulation of *Cercosporae* by the shaking method

菌株番号 Stock number	供試菌 Fungus	培地の種類 Kind of medium	培養日数 Duration (Day)	菌核様体の直径 Diam. of scl.-like bodies (mm)	孢子形成程度 Degree of sporulation	孢子形成数 No. of conidia produced ($\times 10^4/\text{cm}^2$)
CB-55	<i>C. naitoi</i>	R	15	6.3	++*	14.3～27.1 (20.0)
			20	5.1 6.6	— —	
		E	15	7.3	+	3.5～10.9 (7.3)
			20	10.0 8.1	— —	
CB-56	<i>C. cotini</i>	R	15	4.9	++	7.6～21.5 (14.9)
			20	4.5 4.9	+～++ +	10.3～25.3 (18.0) 3.2～19.0 (9.9)
		E	15	5.0	++	6.3～15.8 (11.4)
			20	4.9 5.0	+ ++	1.2～8.1 (4.5) 13.9～41.8 (26.0)
CB-61	<i>C. leucothoes</i>	R	15	4.7	+	0～2.1 (0.8)
			20	5.1 6.3	+ +	0～1.9 (1.3)
		E	15	9.3	—	
			20	7.0 8.4	— —	

R: リチャード氏変法培地 (KNO_3 10 g, KH_2PO_4 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5 g, しょ糖 10 g, 水 1 l)

Modified RICHARDS' solution (KNO_3 10 g, KH_2PO_4 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5 g, sucrose 10 g, water 1,000 ml)

E: 栄研ジャガイモ煎汁変法培地 (栄研ジャガイモ煎汁粉末 2 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, ブドウ糖 5 g, 水 1 l)

Modified Eiken's potato-extract solution (Eiken potato-extract 2.0 g, KH_2PO_4 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, glucose 5 g, water 1,000 ml)

*: — 孢子なし Non, + 孢子わずかに Very few, ++ 孢子やや多い Moderate

* これらの菌は農林省果樹試験場興津支場、野菜試験場および北海道農業試験場から分譲を受けたが、カンキツ黄斑病菌の不完全時代とカキ角斑病菌は病葉の送付を受けて筆者が分生孢子から単孢子分離した。

胞子形成培地⁽⁸⁴⁾⁸⁸⁾¹⁰⁸⁾¹¹¹⁾¹¹³⁾¹³⁵⁾のなかからハウレンソウ煎汁培地 (ハウレンソウ葉煎汁 200 g, しょ糖 10 g), ニンジン煎汁培地 (ニンジン 100 g, しょ糖 10 g), V₈ジュース培地 (V₈ジュース 250 g, 水 750 ml), エンバク煎汁培地 (皮付きエンバク種子 300 g, ブドウ糖 10 g), アスパラギン培地 (L-アスパラギン 5 g, FeCl₂ 2%液数滴, KH₂PO₄ 5 g, MgSO₄·7H₂O 2.5 g) を選んだ。接種源の前培養, 振とう培養期間は IV-1 実験 2 に準じたが, 菌そうと菌糸塊を観察しながら適宜加減した。また, 菌核様体の乾燥処理はコイトロン (KB-10 型) で 3 日間行った。

2) 実験結果: カンキツ黄斑病菌では形成された菌核様体の大きさが 5~6 mm 程度で, 黒色, 堅く, 表面平滑となったが (Plate 6, F), 分生胞子は形成されなかった (Table 40)。カキ角斑病菌 (Table

Table 40. 振とう培養法による数種 *Cercospora* 属菌の分生胞子形成
Sporulation of *Cercosporae* by the shaking method

供 試 菌 Fungus	培養日数 Duration (day)	培地の種類 Kind of medium	菌核様体の 直 径 Diam. of scl.-like bodies (mm)	分生胞子形成程度 # Degree of sporulation	
				標 準* Standard	乾 燥** Dried
カンキツ黄斑病菌 <i>Mycosphaerella horii</i> (<i>Cercospora</i>)	10	E	5.7	—	—
		E'	5.5	—	—
		R	4.5	—	—
	15	E	6.4	—	—
		E'	5.7	—	—
		R	5.4	—	—
	20	E	6.2	—	—
		E'	6.0	—	—
		R	5.7	—	—
	25	R	5.7	—	—
カキ角斑病菌 <i>Cercospora kakivora</i>	16	E	9.8	—	—
		E'	10.4	—	—
		R	5.5	—	+~++
	23	E	8.9	—	—
		E'	8.6	—	—
		R	5.1	—	+
トマトすすかび病菌 <i>C. fuligena</i>	20	E	5.4	—	+
		E'	5.7	—	+
		R	4.9	—	+~++
		C	5.3	—	+

E: 栄研ジャガイモ煎汁培地

Eiken's potato-extract solution.

E': 栄研ジャガイモ煎汁変法培地

Modified Eiken's potato-extract solution.

R: リチャード氏変法培地

Modified RICHARDS' solution.

C: ニンジン煎汁培地

Carrot decoction.

*: 培地から取り出して, ただちに湿室に移した。

Placed in humidity chamber immediately after taking out from medium.

** : 培地から取り出し室内で 3 日間乾燥後に湿室に移した。

Dried in a room for 3 days after taking out from medium.

: — 胞子なし Non, + 胞子わずかに Very few, ++ 胞子やや多い Moderate

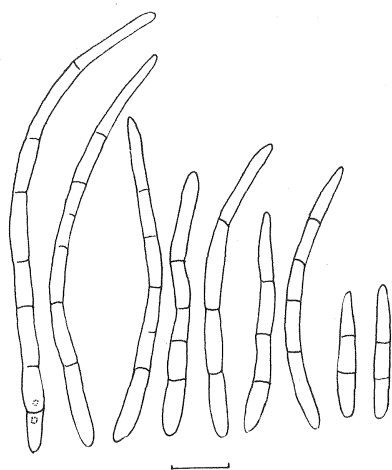


Fig. 23 振とう培養法によって形成されたカキ角斑病菌の分生孢子
Conidia of *Cercospora kakiwora* produced by the shaking method (—: 10 μ m).

40) は、リチャード氏変法培地で産生された菌核様体 (Plate 5, I) を 3 日間乾燥処理後の湿室処理で多くの孢子が形成された。この分生孢子の大きさは長さ 30~100 μ m (平均 58.4 μ m), 幅 2.3~2.8 μ m (平均 2.5 μ m), 隔膜数 2~8 (平均 5) であった (Fig. 23)。

野菜類を侵す *Cercospora* 属菌 4 種では (Table 40), トマトすすかび病菌で孢子形成が認められた。本菌の場合には栄研ジャガイモ煎汁培地とその変法培地, リチャード氏培地およびニンジン煎汁培地ともに黒色, 球形, 堅く光沢ある菌核様体を形成し (Plate 6, G), 孢子形成はカキ角斑病菌と同様に, 菌核様体の乾燥処理に続く湿室処理が有効であった。分生孢子は汚緑色~ネズミ色の菌糸と混在したが, 菌核様体によって局部的に形状の異なった菌糸が群生した (Plate 6, H)。分生孢子の大きさは長さ 33~70 μ m (平均 52.7 μ m), 幅 2.5~3.8 μ m (平均 2.9 μ m), 隔膜数 3~7 (平均 5) で, やや太く, 棍棒状に近いものが多かった (Fig. 24)。

ナスすす斑病菌, サトウダイコン褐斑病菌, ジャガイモ褐斑病菌, ミブナ白斑病菌およびチャ緑斑病菌ではそれぞれ特徴のある菌糸塊を形成したが, 孢子形成はまったく認められなかった (Plate 6, A~E)。

3. 考 察

樹木, 果樹および農作物を侵す 28 種 (32 菌株) の *Cercospora* 属菌について, 振とう培養による分生

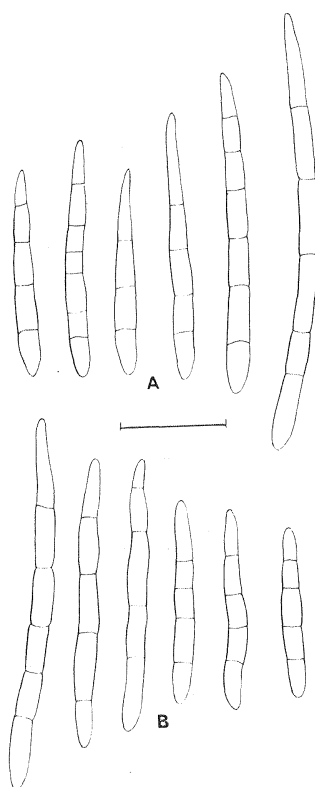


Fig. 24 振とう培養法によって形成されたトマトすすかび病菌の分生孢子

Conidia of *Cercospora fuligena* produced by the shaking method (—: 20 μ m).

- A: リチャード氏変法培地に形成された分生孢子
Conidia produced on modified RICHARDS' solution.
- B: 栄研ジャガイモ煎汁培地に形成された分生孢子
Conidia produced on Eiken's potato-extract solution.

胞子形成法の適用を検討した結果、胞子形成量の多少を別にすれば、樹木類ではケムリノキとウメモドキ斑点病菌、アメリカイワナンテン紫斑病菌、タチバナモドキとハギ褐斑病菌およびユーカリ類角斑病菌の6種で、果樹、野菜類ではカキ角斑病菌とトマトすすかび病菌の2種の合計8種で胞子形成が認められ、振とう培養による胞子形成法はスギ赤枯病菌以外の *Cercospora* 属菌に対しても適用できることが明らかにされた。

この振とう培養法を今後さらに多くの *Cercospora* 属菌に適用させ、精度を高めるためにはつぎのような検討を加える必要がある。すなわち、振とう培養段階では胞子形成能を有する菌糸塊、つまり、黒色、堅く表面平滑、光沢を有する球状の菌核様体を形成させる培地と培養条件の探索が必要である。培地は *Cercospora* 属菌の種によって異なると思われるが、本実験で試みたリチャード氏変法培地は応用性が広いと考えている。つぎに、胞子形成の段階では菌核様体に物理的刺激を与えることが胞子形成とその増進に役立つようで、本実験で有効だった菌核様体の一時的な乾燥処理のほかに機械的損傷の付与、紫外線照射、熱、低温などの刺激、乾湿の繰り返し、切断なども考えられる。振とう培養による胞子形成法がさらに多くの *Cercospora* 属菌に適用できるためには、これらの諸点について今後の検討が必要となろう。

V 総合考察とまとめ

本論文はスギ赤枯病菌 *Cercospora sequoiae* 分生胞子の人工培地における新しい多量形成法の開発研究について述べた。

本文で述べたスギ赤枯病菌分生胞子形成法の操作手順は、詳述した実験結果からつぎのように要約される。

1. 接種源の培養

1) スギ赤枯病菌の単胞子分離によって得られた菌糸の試験管斜面培養（PDA 培地，25°C，約15日間）。

2) 菌糸浮遊液を作製し、シャーレ（PDA 平面培地）に流し込み培養（25°C，10～15日間）。

3) 小型菌そう（接種源）生育。

2. 振とう培養による菌核様体の産生

1) 接種源の振とうフラスコ（500 ml 容）への移植（栄研ジャガイモ煎汁培地 100 ml，小型菌そう直径2～3 mm を10～15個）。

2) 振とう培養（往復式振とう培養機，100回/分，25°C，15～20日）。

3) 菌核様体（球状，黒色，表面平滑，光沢，堅い）産生。

3. 菌核様体上の分生胞子形成

1) 培地から菌核様体の取り出し，洗浄，乾燥。

2) 菌核様体の湿室（3%平面寒天のシャーレ）保持。

3) コイトロン KB-型（室内，25°C，5日間）または，恒温室（25°C，前半2日間40 W 蛍光灯照射，後半3日間暗黒）に納入，保持。

4) 菌核様体上に分生胞子形成

以上の手順によって形成されるスギ赤枯病菌の分生胞子数は菌核様体（直径約5 mm）1個あたり2～5×10⁶個程度に達し，菌核様体全面に密生して暗緑色を呈する。つぎに，この菌核様体を殺菌水中に投

入し、所定時間約 5℃ 下に収めた後に取り出し、静かに振ってすべての分生胞子を分生子梗から離脱させ、菌糸の混入しない分生胞子浮遊液が必要に応じて多量に供給できる。これらの分生胞子はよく発芽し、スギに対して強い病原性を有する。

この分生胞子形成法の開発によって、従来、分生胞子が得られないために実行が不可能であった諸研究、たとえば、室内の薬剤スクリーニングテストや宿主体の抵抗性に関する研究が可能となり、スギ赤枯病研究の新しい進展が期待される。

Cercospora 属菌分生胞子の培地上形成に関する従来の研究は、寒天培地を用いて、培地の栄養、培養方法その他の条件に検討を加え、そこに生育する菌糸から直接に分生胞子を形成させる試みが多く、液体培地を用いた報告はほとんどない。これは、固体培地では通気、水分の蒸発など、胞子形成に適した条件が液体培地よりも有利であるためと考えられてきた⁸¹⁾。さらに、液体振とう培養による胞子形成の試みは、*Cercospora* 属菌以外の菌で、特殊な目的のために行った例⁸²⁾を除いて内外の文献に見あたらない。

上述の手順でわかるように、本報で述べた振とう培養による分生胞子形成法はいくつの特徴をもつ。その一つに、振とう培養による菌核様体の形成がある。スギ赤枯病菌は宿主体上や固体培地上には菌核が形成されない。ただ、ある種のアミノ酸を窒素源として液体静置培養を行うと、培地上にマリモ状の菌糸塊が形成される¹¹⁹⁾。しかし、これも単なる菌糸の塊りで菌核状には発達しないし、胞子形成能も持たない。したがって、振とう培地内に菌核様体が形成される一つの条件として、培地の連続的な振とうによる菌糸への刺激と、菌糸塊（菌そう）のフラスコ壁面への接触、衝突などの物理的な要因が考えられる。しかし、単なる物理的要因だけでは胞子形成能を持つ菌核様体は産生されない。すなわち、培地の栄養が菌核様体の形成、発達と成熟に大きな影響を及ぼす。本文で詳述したように、好適培地として栄研ジャガイモ煎汁培地が選択された。この培地組成のうち、窒素と炭素源が必須栄養源であることを明らかにしたが、窒素源と考えられるジャガイモ煎汁の多用とサイアミンの添加は胞子形成能の低下を招くが、炭素源ではその弊害はほとんど現われない。このことは、培地のブドウ糖消費経過と菌核様体内の含有糖量によって説明できる。接種された小型菌そうが菌糸塊に発達する時期には培地中のブドウ糖を積極的に消費するが、菌核様体成熟期には培地中の残存糖類とは無関係にブドウ糖消費量は低下する。一方、体内含有糖量はこの時期に最高に達し、胞子形成にあたっては、これらの体内糖を効率的に消費し、体内糖の消失によって胞子形成能も消滅する。

ジャガイモ煎汁培地で菌核をよく形成するイネ小球菌核病菌 *Leptosphaeria salvinii*、イネ小黒菌核病菌 *Helminthosporium sigmoideum* のうち、小黒菌核病菌ではブドウ糖や他の炭素源をまったく欠いても菌核形成量が増進するといわれ¹⁰⁴⁾、スギ赤枯病菌の菌核様体形成条件とは明らかな相違が認められる。

スギ赤枯病菌の成熟した菌核様体構成菌糸は形態的に異なる 3 つの層を持っているが、とくに、一定の厚みのある褐色、太く密な菌糸で構成され、細胞上構造を呈する外層が特徴的である。この外層が宿主の組織内に形成される子座と同様に、分生子梗形成の原基となる点については本文で詳述した。このような構造は、菌糸体外層菌糸が空胞化し、あるいは長頸を持って水上に浮上するイネ紋枯病菌 *Rhizoctonia solani* やイネ小球菌核病菌 *Nagnaporthe salvinii* の菌核²³⁾⁶⁹⁾ 構造とは異質で、最外層に rind が形成され、その内層が放射状菌糸組織になるイネ葉しょう網斑病菌 *Cylindrocladium scoparium* の菌核構造に近い構造を持つとみてよい⁴⁷⁾。

つぎに、菌核様体上での分生胞子形成要因として、温度、湿度条件、とくに、光がきわめて重要である

ことが明らかにされた。光条件のうち、有効波長域については本文で述べたように、多くの植物病原菌類のそれと大きな差を示さなかったが、明暗の周期を必要とする点は *Cercospora* 属菌での新発見である。すなわち、胞子形成処理期間中の前半 (2 日) 光照射、後半 (3 日) 暗黒処理で分生胞子が形成され、この逆周期や光の連続照射は連続暗黒処理と同様に胞子形成をほぼ完全に抑制する事実である。

BARNETT・LILLY⁴⁾ は *Choanephora cucurbitarum* の胞子形成実験結果から、菌類の胞子形成に対する光の反応について一つの概念を提起した。すなわち、この菌を培地に移植後 2 日間光照射 (反応 1) した後、2 日間暗黒下 (反応 2) に置くと胞子を形成するが、逆の操作では形成されない。また、650 lux 白色光の連続照射 (反応 1) と連続暗黒 (反応 2) でも形成されないところから、この菌の胞子形成には 2 つの反応系が関係し、反応系 1 の進行には光を必要とし、暗黒下で進行する反応系 2 では光が阻害的要因として働く、つまり、胞子形成には光反応系とそれに続く暗反応系が必要で、この逆は成立しないと述べた。スギ赤枯病菌の胞子形成にこのような光反応系が関係するかどうかについては、今後のくわしい実験が必要である。

菌核様体上での分生胞子の形成経過を観察したところ、菌核様体表面に伸長した分生子梗頂端に幼若な分生胞子が形成される (Plate 2, D)。この分生胞子が成熟すると分生子梗は分生胞子の側方に伸びて、頂端につぎの分生胞子を形成する。この結果、分生子梗はジグザグ状に伸長する (Plate 2, E, 5, D)。一方、宿主上での分生胞子形成経過を調べた寺下^{126)~128)} の報告によると、子座から伸びた分生子梗の先端に細い突起物 (分生胞子原基) が現われ、これが膨らみ、伸びて分生子梗との間がくびれ、楕円形〜紡錘形となる。普通、1 個の分生子梗に数個の分生胞子が順次形成され、第 2 番目以下の分生胞子は、第 1 番目の分生胞子が成熟後、分生子梗の先端が伸長して、その先端に形成される。

HUGHES⁸⁰⁾ は不完全菌類を分生胞子形成機構によって分類することを提案した。同氏による *Cercospora* 属菌の分生胞子形成は「1 本あるいは分岐した分生子梗の先端、およびすでに形成された分生胞子の側方に伸び、かつ継続的に形成される新しい生長点の先端に分生胞子が形成される」ことを特徴としてあげている。その後、椿¹²³⁾ は HUGHES 方式に検討を加え、HUGHES が提案した 8 つのセクションを 9 つとする試案を発表した。*Cercospora* 属菌については、出芽型の分生子が分生子柄に次々と位置を変えて形成され、分生子柄はジグザグ状または小歯芽状に伸びるとし、HUGHES 氏方式を変えてはいない。

菌核様体上に形成されるスギ赤枯病菌の分生子梗と分生胞子の形成状態はスギ病針葉上におけるそれとまったく一致し、HUGHES、椿らの *Cercospora* 属菌の分生胞子形成機構をよく備えているといえよう。

引用文献

- 1) ARAGAKI, M. : Relation of radiation and temperature to the sporulation of *Alternaria tomato* and other fungi, *Phytopathology*, **54**, 565~569 pp., (1964)
- 2) 荒木幹男 : タバコ白星病菌の培地上での分生胞子形成について, *日植病報*, **37**, 375, (1971)
- 3) 明日山秀文ら : 植物病理実験法, 日本植物防疫協会, 843 pp., (1962)
- 4) BARNETT, H. L. and V. G. LILLY : Influence of nutritional and environmental factors upon asexual reproduction of *Choanephora cucurbitarum* in culture, *Phytopathology*, **40**, 80~89, (1950)
- 5) BAXTER, J. W. : *Cercospora* black stem of alfalfa, *Ibid.*, **46**, 398~400, (1956)
- 6) BERGER, R. D. and E. W. HANSON : Relation of environmental factors to growth and sporulation of *Cercospora zebrina*, *Ibid.*, **53**, 286~294, (1963)

- 7) BERGER, R. C. : Sporulation and stroma development by *Cercospora herpotrichoides*, Ibid., **55**, 127, (1965)
- 8) BLOSS, H. E. and H. W. CRITTENDEN : Growth of *Cercospora kikuchii* and *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* with amino acids and sugars in nutrient media, Ibid., **50**, 569, (1960)
- 9) 卜蔵梅之丞 : 杉赤枯病に就て, 病虫害雑, **4**, 281~282, (1917)
- 10) BRILLOVA, D. : Free amino acids in sugar beet leaves and their effect upon growth of (parasitic fungus) *Cercospora beticola* Sacc., Biologis, Bratisl. Ser. A **25**, 453~460, (1970) (Rev. Plant Path., **50**, 66, 1971)
- 11) CALPOUZOS, L. : Controlled sporulation of *Cercospora musae* ZIMM in pure culture, Nature, **173**, 1084~1086, (1954)
- 12) ————— and G. F. STALLKNECHT : Sporulation of *Cercospora beticola* affected by light and darkness, Phytopathology, **54**, 890, (1964)
- 13) ————— and ————— : Sporulation of *Cercospora beticola* affected by an interaction between light and temperature, Ibid., **55**, 1370~1371, (1965)
- 14) ————— and ————— : Effects of light on sporulation of *Cercospora beticola*, symptoms of *Cercospora* leaf spot of sugar beet influenced by light intensity, Ibid., **57**, 679~681, (1967)
- 15) 千葉 茂 : スギ赤枯病抵抗性個体の選抜, 日林誌, **37**, 510~512, (1955)
- 16) DIACHUM, S. and W. D. VALLEAU : Conidial production on culture by *Cercospora nicotianae*, Phytopathology, **31**, 97~98, (1941)
- 17) DOUGLAS, D. R. : The effect of light and temperature on the sporulation of different isolates of *Alternaria solani*, Cana. J. Bot., **50**, 629~634, (1972)
- 18) 藤井伴助 : 杉赤枯病予防駆除私見, 大日本山林会報, **418**, 25~30, (1917)
- 19) 福田陸男 : タバコ赤星病菌の胞子形成に対する殺菌灯の影響, 日植病報, **30**, 266, (1965)
- 20) GARRAWAY, M. G. : Sporulation in *Helminthosporium maydis*, inhibition by thiamine, Phytopathology, **63**, 900~902, (1973)
- 21) GEMAWAT, P. D. and PRASAD, N. : Response of vitamins on growth and sporulation of *Alternaria burnsii*, Indian J. Mycol. Pl. Path., **1**, 149~150, (1971) (Rev. Plant Path. **51**, 820, 1972)
- 22) 長谷川孝三 : スギ赤枯病予防試験特に剪枝法に就て, 皇室林野林試報, **1**(1), 17~29, (1925)
- 23) 羽柴輝良・茂木静夫 : イネ紋枯病菌菌核形成経過と内部形態の変化, 日植病報, **38**, 78, (1972)
- 24) 橋本平一 : *Cercospora* 菌に基因するセンペルセコイアの葉枯病について, 福岡県林試時報, **11**, 19~30, (1959)
- 25) 原 摂祐 : 樹病学各論, 吉見書店, 281 pp., (1923)
- 26) 本田雄一・坂本正幸 : *Helminthosporium oryzae* の胞子形成に及ぼす光の影響, 日植病報, **30**, 276, (1965)
- 27) —————・————— : *Helminthosporium oryzae* における青色光による胞子形成の抑制作用について, 同, **34**, 328~335, (1968)
- 28) HOPKINS, F. F. : Studies on the *Cercospora* leaf spot of bur clover, Phytopathology, **11**, 311~318, (1921)
- 29) HOUSTON, B. R. and J. W. OSWALD : The effect of light and temperature on conidium production by *Helminthosporium*, Ibid., **36**, 1049~1055, (1946)
- 30) HUGHES, S. J. : Conidiophores, conidia, and classification, Can. J. Bot., **31**, 577~659, (1953)
- 31) 今枝直視 : スギ赤枯病の駆除予防ニ関スル研究, 林試報, **14**, 19~29, (1916)
- 32) 糸井節美 : 培養液の水素イオン濃度の変化に影響を及ぼす要因とその蚕豆褐斑病菌の発育との関係

- に関する研究, 日植病報, **19**, 41~44, (1954)
- 33) 伊藤一雄: スギ造林木溝腐病の病因について, 植物防疫, **6**, 170~179, (1953)
- 34) ———: 図説樹病新講, 地球出版, 344 pp., (1962)
- 35) ———: 日本における樹病学発達の展望—日本樹病学史—(I), 林試研報, **174**, 59~162, (1965)
- 36) ———: 同(II), 同, **181**, 1~176, (1965)
- 37) ———: スギ赤枯病, 日植病報, **31**, 242~247, (1965)
- 38) ———: *Cercospora* needle blight of pines in Japan, Bull. Gov. For. Exp. Sta., **246**, 21~33, (1972)
- 39) ———・林 弘子: カラマツ先枯病菌の培地における胞子形成, 林試研報, **236**, 93~113, (1971)
- 40) ——— and Y. Hosaka: Notes on some leaf-spot diseases of broadleaved trees-1 *Cercospora* leaf-spot of plane trees, Ibid, **46**, 17~32, (1952)
- 41) ———・T. Kobayashi and K. Shibukawa: Etiological and pathological studies on the needle blight of *Cryptomeria japonica* III, A comparison between *Cercospora cryptomeriae* Shirai and *Cercospora sequoiae* Ellis et Everhart, Ibid, **204**, 73~90, (1967)
- 42) ———・渋谷浩三・小林享夫: スギの赤枯病に関する病原学的並に病理学的研究 (I) 赤枯症状部に認められる菌類の形態及び病原性, 林試研報, **52**, 77~151, (1952)
- 43) ———・—————: *Cercospora cryptomeriae* Shirai によるギガントセコイア苗の赤枯病, 日林誌, **40**, 407~410, (1958)
- 44) ———・—————: スギ赤枯病に関する病原学的ならびに病理学的研究 (IV), *Cercospora sequoiae* Ellis et Everhart (*C. cryptomeriae* Shirai) による赤枯病と溝腐病, 林試研報, **268**, 81~134, (1974)
- 45) ———・—————・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), *Cercospora cryptomeriae* Shirai の生理生態的性質, 同, **76**, 27~61, (1954)
- 46) Jones, J. P.: Isolation of sporulating strain of *Cercospora*, Phytopathology, **48**, 287~288, (1958)
- 47) 加来久敏・野中福次: イネ葉しょう網斑病病斑の解剖, 葉しょう内菌糸塊と菌核の形成過程, 日植病報, **38**, 178, (1972)
- 48) 笠井幹夫: 鉄道防雪林杉苗枯死の原因調査報告, 大日本山林会報, **388**, 60~70, (1915)
- 49) 加藤 肇: カビの生殖生長に関する 2, 3 の要因, 植物防疫, **24**, 227~230, (1970)
- 50) Katsuki, S.: *Cercosporae* of Japan, Trans. Mycol. Soc. Japan, Extra Issue, **1**, 1~100, (1965)
- 51) ——— and T. Kobayashi: *Cercosporae* of Japan and allied genera (Supplement 3), Ibid., **16**, 1~15, (1975)
- 52) ——— and ———: *Cercosporae* of Japan and allied genera (Supplement 4), Ibid., **17**, 272~279, (1977)
- 53) 川村清一: 杉赤枯病調査報告, 大日本山林会報, **253**, 87~94, (1912)
- 54) ———: 杉赤枯病ノ研究, 林試報, **10**, 91~107, (1913)
- 55) ———: The red plague of "Sugi" (*Cryptomeria japonica*), 欧文林試報抄報 **1**, 131~133, (1915)
- 56) 川崎俊郎・西村鳩子: *Cercospora cryptomeriae* Shirai の sporulation media に関する研究 (III), 日林大講集, **78**, 208~209, (1967)
- 57) ———・—————・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)
- 58) ———・—————・—————: スギ赤枯病菌の人工培地上における分生胞子形成に関する研究, 日林大講集, **77**, 293~295, (1966)
- 59) ———・—————・—————: 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及ぼす培地組成および培養条件, 林試研報, **232**, 13~24, (1970)
- 60) 川崎俊郎・陳野好之・西村鳩子: スギ赤枯病の薬剤防除に関する研究-1, 同, **266**, 19~32, (1974)
- 61) KILPATRICK, R. A. and H. W. JOHNSON: Purple stain of legume seeds caused by *Cercospora* isolates, *Phytopathology*, **43**, 477, (1953)
- 62) ————— and —————: Sporulation of *Cercospora* species on carrot leaf decoction agar, *Ibid.*, **46**, 180~181, (1956)
- 63) 北島君三: すぎ苗赤枯病の研究 (第2回報告), 林試報, **14**, 31~48, (1916)
- 64) —————: すぎ苗赤枯病ニ就キテ, 植雑, **30**, 411~414, (1916)
- 65) —————: 各地方の森林に於て近年注意せらるるに至りたる新病害に就て, 林学会雑, **9**, 34~42, (1927)
- 66) —————: 森林病害の研究, 高知営林局報, **3**, (1928)
- 67) 清原友也・堂園安生・徳重陽山: スギ在来品種の赤枯病に対する抵抗性, 日林九支研論集, **25**, 196~197, (1971)
- 68) —————・徳重陽山: マツ葉枯病菌 *Cercospora pini-densiflorae* HORI et NAMBU とスギ赤枯病菌 *C. sequoiae* ELLIS et EVERHART の培地上孢子形成 (1), 日林誌, **51**, 98~101, (1969)
- 69) KRAUSE R. A. and R. K. WEBSTER: The morphology, taxonomy and sexuality of the rice stem rot fungus, *Magnaporthe salvinii* (*Leptosphaeria salvinii*), *Mycologia*, **64**, 103~114, (1972)
- 70) 小林享夫: サーコスボラ属菌による2, 3庭園樹の斑点性病害, 森林防疫, **20**, 264~266, (1971)
- 71) —————: 同, 続の1, 同, **22**, 115~119, (1973)
- 72) —————: 同, 続の2, 同, **22**, 273~276, (1973)
- 73) —————: 同, 続の4, 同, **23**, 179~182, (1974)
- 74) —————: 同, 続の6, 同, **25**, 3~6, (1976)
- 75) —————: 緑化樹の病虫害 (XI), 病害の部, 林業と薬剤, **50**, 13~16, (1974)
- 76) —————: 緑化樹木の *Cercospora* 属菌による斑点性病害, 植物防疫, **29**, 318~322, (1975)
- 77) LANDERS, J. E.: Growth of *Cercospora arachidicola* in a glucose-phosphate-thiamine-agar medium, *Phytopathology*, **54**, 1236~1239, (1964)
- 78) LEONIAN, L. H. and V. G. LILLY: Studies on the nutrition of fungi 1. Thiamine, its constituents, and the source of nitrogen, *Ibid.*, **28**, 531~548, (1938)
- 79) LEWIS, D. H. and D. C. SMITH: Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plants, *New phytol.*, **66**, 143~184, (1967)
- 80) LEWIS, R. W.: A method of inducing spore production by *Cercospora apii* FRESS, in pure culture, *Phytopathology*, **30**, 623, (1940)
- 81) LILLY, V. G. and H. L. BARNETT: Physiology of the fungi, New York, 464 pp., (1951)
- 82) 松田松二: 金属蒸着フィルムによるハウス内環境の変化, 農業および園芸, **47**, 1591~1592, (1972)
- 83) 松浦一穂: 糸状菌の Synchronous spore の形成, 日植病報, **30**, 266, (1965)
- 84) MILLER, J. W.: Cultural conditions affecting sporulation of *Cercospora gossypina*, *Phytopathology*, **59**, 511, (1969)
- 85) 三輪和雄・安村 明: 生物学実験法講座, 6, 炭水化物実験法, 中山書店, 東京, 33 pp., (1955)
- 86) 見里朝臣・原 薫: 稲熱病菌孢子形成培地について, 農業及園芸, **32**, 797~798, (1957)
- 87) NAIR, N. C. and J. SAM RAJ: Growth and sporulation of three common species of *Cercospora* in culture, *Agric. Res. Jul. Kerala.*, **6**, 113~116, (1969) (*Rev. Plant Path.*, **49**, 15, 1970)
- 88) 内藤中人・高原 弘: *Cercospora beticola* の培地上における孢子形成並孢子の形態に及ぼす2, 3の要因について, 香川農大大学術報, **6**, 173~183, (1974), 283~288, (1955)
- 89) NAGEL, C. M.: Conidial production in species of *Cercospora* in pure culture, *Phytopathology*, **24**, 1101~1110, (1934)

- 90) NAGEL, C. M. and S. M. DIETZ : Sporulation of 5 species of *Cercospora* in pure culture, *Ibid.*, **22**, 20, (1932)
- 91) 中田覚五郎・中島友輔・滝本清透 : 甜菜の褐斑病に関する調査(二), 病虫害雑誌, **10**, 67~71, (1923)
- 92) 野原勇太 : 実験スギ赤枯病の防除, 農林出版, 東京, 149 pp., (1956)
- 93) ———・伊藤勝夫 : スギ赤枯病防除に関する研究 第IV報, ボルドー液散布後の消失について, 林試研報, **87**, 59~65, (1956)
- 94) ———・——— : 同, 第V報, 粉剤散布後の消失について, 同, **87**, 67~73, (1956)
- 95) ———・陳野好之 : 同, 第I報, 同, **52**, 159~178, (1952)
- 96) ———・——— : 同, 第II報, 同, **62**, 47~58, (1953)
- 97) ———・——— : 同, 第III報, 同, **81**, 31~42, (1955)
- 98) ———・——— : 同, 第VI報, 粉剤の施用量ならびに施用回数について, 同, **112**, 1~10, (1959)
- 99) 尾田義治 : 菌類における光形態形成反応, 科学, **39**, 78~85, (1969)
- 100) 小倉寛典・赤井重恭・佐藤 徹 : *Pellicularia filamentosa* (PAT.) ROGERS に関する研究, 第2報 *P. filamentosa* の遊離アミノ酸ならびに糖類の消長, 日植病報, **26**, 31~36, (1961)
- 101) 大森 薫 : *Fusarium* spp. の胞子形成に及ぼす光の影響, 同, **37**, 370, (1971)
- 102) ———・中島三夫 : ナシ黒斑病菌の胞子形成に及ぼす光の影響, 同, **36**, 11~16, (1970)
- 103) ———・——— : イネいもち病菌の胞子形成に及ぼす光の影響, 同, **36**, 319~324, (1970)
- 104) 小野小三郎・鈴木穂積 : 稲熱病及び稲小粒菌核病の発生機作並びに発生生態に関する研究, 農林省振興局, 病虫害発生予察特報, **4**, 1~156, (1960)
- 105) PANG CHANG, E. V. and L. J. TYLER : Sporulation by *Cercospora herpotrichoides* on artificial media, *Phytopathology*, **54**, 729~735, (1964)
- 106) RICHARDS, M. C. : Ozone as a stimulant for fungus sporulation, *Ibid.*, **39**, 20, (1949)
- 107) 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**, 1~158, (1961)
- 108) 桜井 寿 : テンサイ褐斑病菌の胞子形成培地について, 日植病報, **24**, 290, (1964)
- 109) 四手井綱英・塩田 勇・児玉武男 : 苗畑における施肥がスギ赤枯病に及ぼす影響, 日林誌, **36**, 214~216, (1954)
- 110) SINGH, B. H. : Inducing sporulation in different strains of *Alternaria solani* 1. Effect of visible light, *Mycopath. Mycol. Appl.* **31**, 144~150, (1967) (*Rev. Appl. Myco.* **46**, 464, 1967)
- 111) STAVELY, J. R. : Effects of temperature upon growth and sporulation of *Cercospora nicotianae*, *Phytopathology*, **59**, 496~498, (1969)
- 112) ——— and J. A. NIMMO : Effects of various nitrogen sources on growth and sporulation of *Cercospora nicotianae* in culture, *Ibid.*, **58**, 887, (1968)
- 113) ——— and ——— : Relation of pH and nutrition to growth and sporulation of *Cercospora nicotianae*, *Ibid.*, **58**, 1372~1376, (1968)
- 114) 周藤靖雄 : マツ葉枯病菌 *Cercospora pini-densiflorae* HORI et NAMBU の培地上における胞子形成, 日林誌, **53**, 319~326, (1971)
- 115) SUZUKI, K. and O. CHIBA : Studies on the susceptibility to poplar leaf rust influenced by different nutrient conditions II, Effect of changes in sugar level in leaves, *J. Jap. Fors. Soc.*, **55**, 105~111, (1973)
- 116) 高橋幸吉 : カーボワックス包埋による植物組織標本作成法, 日植病報, **21**, 201~203, (1956)
- 117) 高橋信雄・吉田正行 : 百日草の新病害白星病, 植物防疫, **7**, 17~20, (1953)
- 118) 高井省三 : *Cercospora* 属2菌の発育におよぼす thiamine の影響, 日林誌, **39**, 361~363, (1957)
- 119) ——— : スギ赤枯病菌 *Cercospora cryptomeriae* SHIRAI の栄養学的研究, 林試研報, **111**, 43~50, (1959)
- 120) ——— : *Cercospora* 属菌の分生胞子の形成に関与する諸因子, 日林誌, **42**, 28~35, (1960)

- 121) 高梨和雄：ナシ黒星病菌の培地上での孢子形成について，日植病報，**30**，265～266，(1965)
- 122) 田中正三・香月祐彦・香月文子：稲熱病の生化学的研究（第 4 報），稲熱病菌の栄養吸収に及ぼすアンモニア態及び硝酸態窒素の影響，同，**16**，103～106，(1952)
- 123) TUBAKI, K. : Studies on the Japanese hyphomycetes V. leaf and stem group with a discussion of the classification of hyphomycetes and their perfect stage, 服部植物研究所報，**20**，142～243，(1958)
- 124) 寺下隆喜代：ユーカリの病害，森林防疫ニュース，**22**，197～201，(1954)
- 125) ————：暖地におけるスギ赤枯病菌の生態（1），スギノハダニによる分生孢子の伝播，日林誌，**54**，408～411，(1972)
- 126) ————：同，(Ⅲ)，分生孢子の個体生長，同，**55**，124～131，(1973)
- 127) ————：同，(Ⅳ)，分生孢子の順次形成および再形成，同，**56**，63～67，(1974)
- 128) ————：同，(Ⅴ)，異なる温度における分生孢子形成，同，**57**，384～389，(1975)
- 129) ————：片岡清澄：同，(Ⅱ)，分生孢子形の変化，同，**55**，15～20，(1973)
- 130) THINK, T. S. and C. L. MANDAHAR : The influence of various carbon sources on the growth of *Cercospora* spp., The influence of different sources of nitrogen on the growth of *Cercospora* sp., Proc. natn. Acad. Sci. India, Set. B. **34**，387～393，(1964)，**35**，248～253，(1965) (Rev. Appl. Myco. **45**，531，1966)
- 131) 枅内吉彦・竹内昭四郎：甜菜褐斑病菌の孢子形成促進物質について，日植病報，**17**，186，(1953)
- 132) 徳重陽山：九州の森林病害，森防ニュース，**7**，58～62，(1958)
- 133) ————：堂園安生・清原友也：みぞ腐病とスギの品種，林試九支場年報，**15**，(1967)
- 134) WIESNER, K. : Zur Frage der Rassenbildung bei *Cercospora beticola*, Biul. Inst. Hod. Aklim. Rosl., 1961 (3～4)，13～18，(1961) (Rev. Appl. Myco. **44**，112，1965)
- 135) 山田峻一：*Cercospora* 属菌によるトマトの新病害，日植病報，**15**，61～66，(1951)
- 136) 山口辰良：一般微生物学，技報堂，398 pp.，(1968)
- 137) 山本和太郎・前田巳の助：日本における *Cercospora* 属の種類，兵庫農大研報，**4**，41～91，(1960)
- 138) ZENTMYER, G. A., W. C. SNYDER and H. N. HANSEN : Use of natural media for inducing sporulation in fungi, Phytopathology, **40**，971，(1950)
- 139) 陳野好之：スギ赤枯病菌 *Cercospora cryptomeriae* SHIRAI 分生孢子の分散に関する研究，林試研報，**144**，31～52，(1962)
- 140) ————：A needle blight of *Taxodium distichum* RICH. caused by *Cercospora sequoiae* ELLIS et EVERHART, J. Jap. Fors. Soc., **51**，183～187，(1969)
- 141) ————：スギ赤枯病菌 *Cercospora sequoiae* ELLIS et EVERHART の新しい分生孢子形成法（Ⅰ），同，**52**，306～309，(1970)
- 142) ————：同（Ⅴ），日林大講集，**84**，301～304，(1973)
- 143) ————：同（Ⅵ），同，**86**，383～384，(1975)
- 144) ————：同（Ⅶ），同，**86**，385～386，(1975)
- 145) ————：伊藤一雄：プラストサイジン-S のスギ赤枯病防除効果について，同，**72**，274～276，(1962)
- 146) ————：川崎俊郎：新薬によるスギ赤枯病防除効果の検討（予報），日林誌，**48**，293～297，(1966)
- 147) ————：鈴木和夫：スギ赤枯病菌 *Cercospora sequoiae* ELLIS et EVERHART の新しい分生孢子形成法（Ⅳ），日林大講集，**84**，299～301，(1973)
- 148) ————：高橋昌隆・中野 子：スギ溝腐被害林における 2，3 の観察—徳島県下での 1 例—，森林防疫，**21**，42～46，(1972)
- 149) 林 野 庁：森林病虫害等被害報告，(1964～1973)
- 150) 島津科学器械 K. K. : タン白アミノ酸のガスクロマトグラフィー（抄訳），島津科学機械ニュース，**11**(10)，9～13，(1969)

図 版 説 明

Explanation of plates

Plate 1

- A : PDA 培地上に生育したスギ赤枯病菌の接種源 (小型菌そう) $\times 1.5$
 Small mycelial colonies of *Cercospora sequoiae* growing on potato-dextrose agar used for inocula.
- B, C : 振とう培養によって形成されたスギ赤枯病菌の菌核様体 (B : 10 日培養, C : 15 日培養)
 $B \times 8, C \times 10$
 Sclerotium-like bodies (stroma like bodies) of *Cercospora sequoiae* produced by shaking method (B : 10 days after incubation, C : 15 days after incubation).
- D, E : 接種源の大きさとスギ赤枯病菌の菌核様体発達との関係 (D : 接種源の直径約 5 mm, E : おなじく約 10 mm)
 Relation between size of inoculum and growth of sclerotium-like bodies of *Cercospora sequoiae* (D : diam. of inocula, about 5 mm, E : about 10 mm).
- F : 菌核様体上に形成されたスギ赤枯病菌の分生胞子 (c) と気中菌糸 (m) $\times 20$
 Conidia (c) and aerial mycelia (m) produced on sclerotium-like bodies of *Cercospora sequoiae*.

Plate 2

- A, B : 分生胞子を密生したスギ赤枯病菌の菌核様体 $A \times 10, B \times 40$
 Conidia and conidiophores produced abundantly on sclerotium-like body of *Cercospora sequoiae*.
- C : 振とうフラスコ内に形成されたスギ赤枯病菌の菌核様体
 Sclerotium-like bodies of *Cercospora sequoiae* produced in a shaking flask.
- D, E : 栄研ジャガイモ煎汁培地に形成されたスギ赤枯病菌の菌核様体上の分生子梗 (p) と分生胞子 (c)
 Conidia (c) and conidiophores (p) produced on sclerotium-like body of *Cercospora sequoiae* in Eiken's potato-extract solution.
- D : 幼若な分生子梗 (p) と分生胞子 (c) $\times 100$
 Immature conidia (c) and conidiophores (p).
- E : 成熟した分生子梗 (p) と分生胞子 (c)
 Mature conidia (c) and conidiophores (p).

Plate 3

- A, B : サイアミン添加がスギ赤枯病菌の菌核様体の発達におよぼす影響 $\times 8$
 Effect of thiamine upon the growth of sclerotium-like bodies of *Cercospora sequoiae*.
 A : サイアミン無添加 Thiamine non
 B : サイアミン 1,000 ppm Thiamine 1,000 ppm
- C ~ E : Difco 製ジャガイモ煎汁粉末の濃度とスギ赤枯病菌の菌核様体発達との関係 $\times 7$
 Relation between amount of the dehydrated potato extract (Difco Laboratories, U. S. A.) and growth of sclerotium-like bodies of *Cercospora sequoiae*.
 C : Difco 製ジャガイモ煎汁粉末 1 g.
 Difco's potato-extract dust.

D : Difco 製ジャガイモ煎汁粉末 3g.

Difco's potato-extract dust.

E : Difco 製ジャガイモ煎汁粉末 6g.

Difco's potato-extract dust.

F ~ I : 培地の水素イオン濃度とスギ赤枯病菌の菌核様体発達との関係 ×10

Relation between pH value of medium and growth of sclerotium-like bodies of *Cercospora sequoiae*.

F : pH 3, G : pH 5, H : pH 7, I : pH 9.

Plate 4

A : スギ赤枯病菌の菌核様体の断面 (10 日間培養, Ol : 外層, Ml : 中間層, Il : 中心層) (— : 1,500 μ m)

A cross-section of sclerotium-like body of *Cercospora sequoiae* cultured for 10 days (Ol : Outer layer, Ml : Middle layer, Il : Inner layer).

B : スギ赤枯病菌の菌核様体の外層菌糸 (20 日間培養) (— : 20 μ m)

Mycelia of the outer layer of sclerotium-like body of *Cercospora sequoiae* cultured for 20 days.

C, D : スギ赤枯病菌の菌核様体構成菌糸の特徴 (— : 50 μ m)

Mycelial appearances of sclerotium-like body of *Cercospora sequoiae*.

C : 5 日間培養 5 days after incubation.

D : 10 日間 " 10 days after incubation.

Plate 5

A, B : スギ赤枯病菌の菌核様体構成菌糸の特徴 (— : 50 μ m)

Mycelial appearances of sclerotium-like body of *Cercospora sequoiae*.

A : 15 日間培養 15 days after incubation.

B : 25 日間 " 25 days after incubation.

C, D : 明暗がスギ赤枯病菌分生子梗の発育に及ぼす影響 (— : 50 μ m)

Effect of light and darkness upon development of conidiophores of *Cercospora sequoiae*.

C : 暗黒区の分生子梗の発育 (5 日後)

Conidiophores growing under the continuous darkness for 5 days lapsed.

D : 明区の分生子梗の発育 (5 日後)

Conidiophores growing under the light conditions for 5 days lapsed.

E ~ I : 振とう培養法によって形成された数種の *Cercospora* 属菌の菌核様体

Sclerotium-like bodies of several *Cercosporae* produced by the shaking method.

E : ケムリノキ斑点病菌 *Cercospora cotini* (CB-56) ×6

F : ウメモドキ斑点病菌 *Cercospora nailoi* (CB-55) ×6

G : アメリカイワナンテン紫斑病菌 *Cercospora leucothoes* (CB-61) ×6

H : タチバナモドキ褐斑病菌 *Cercospora pyracanthae* (CB-64) ×6

I : カキ角斑病菌 *Cercospora kakivora* ×8

Plate 6

A ~ G : 振とう培養法によって形成された数種の *Cercospora* 属菌の菌核様体

Sclerotium-like bodies of several *Cercosporae* produced by the shaking method.

- A : サトウダイコン褐斑病菌 *Cercospora beticola*. ×6
 B : ミブナ白斑病菌 *Cercospora brassicae*. ×6
 C : ジャガイモ褐斑病菌 *Cercospora* sp. on *Solanum tuberosum*. ×7
 D : ナスすす斑病菌 *Cercospora* sp. on *Solanum melongena*. ×7
 E : チャ緑斑病菌 *Cercospora* sp. on *Thea sinensis*. ×10
 F : カンキツ黄斑病菌 *Mycosphaerella horii* (*Cercospora* sp.) ×10
 G : トマトすすかび病菌 *Cercospora fuligena*. ×10
 H : トマトすすかび病菌の菌核様体上に形成された分生胞子と菌糸 ×15
 Conidia and mycelia produced on sclerotium-like body of *Cercospora fuligena* by the shaking method.

Plate 7

走査顕微鏡によって観察したスギ赤枯病菌の菌核様体の構成菌糸 (外層) と分生胞子
 Mycelia and conidia of sclerotium-like body of *Cercospora sequoiae* under the scanning microscope.

- A : 外層の菌糸 ×3,000
 Mycelia of outer layer of sclerotium-like body.
 B : 幼若な分生子梗 Immature conidiophores. ×2,000
 C : 分生胞子 Conidium. ×3,000

Plate 8

振とう培養によって形成されたスギ赤枯病菌分生胞子によるスギ苗に対する人工接種試験結果
 Results of artificial inoculations with conidia of *Cercospora sequoiae* produced by the shaking method to 2-years-old *Cryptomeria* seedlings.

- A : 培養菌株 No. 96 の接種結果
 Inoculation with conidia of stock culture No. CC-96.
 B : 緑色主軸上に形成された壊死斑
 Necrotic lesions on green shoot by artificial inoculation.

**Studies on Artificial Sporulation of *Cercospora sequoiae* ELLIS et
EVERHART, the Needle Blight Fungus of *Cryptomeria japonica***

Yoshiyuki ZINNO⁽¹⁾

Summary

The needle blight of *Cryptomeria*-seedlings caused by *Cercospora sequoiae* ELLIS et EVERHART has been well known as the most important disease in Japanese forest nurseries by Japanese foresters and plant pathologists. The damage by the disease has severely occurred on *Cryptomeria*-seedlings in nurseries throughout almost all parts of the mainland, Honshu, Shikoku and Kyushu in Japan. Unless protective measures by fungicides are taken, all of the seedlings will become severely affected by the disease in nurseries where the disease is more prevalent.

This paper deals with the results of the artificial sporulation on the causal fungus, *Cercospora sequoiae* ELLIS et EVERHART.

It is well known that many species of *Cercospora* scarcely produce conidia on artificial media. Therefore, considerable difficulty has been encountered in obtaining conidia of the fungus in pure culture in connection with studies on artificial inoculations and screening-tests for detecting preventive fungicides. The author discovered a new method for conidial production with "sclerotium-like body" mycelial mass of the fungus obtained by shaking in a liquid medium.

The author's new method for conidial production of the fungus is divided into three steps : 1) preculture of inocula, 2) production of sclerotium-like bodies in liquid medium with shaking and 3) sporulation from sclerotium-like bodies in the growth cabinet.

1) **Pre-culture of inocula**

Mono-conidial isolate of the fungus was cultured on potato-dextrose-agar slant in test-tube at 25°C for about 15 days, then the sterile distilled water with about 10 ml was added to this test-tube, and growing mycelia of the fungus was carefully crushed with nichrome wire. The mycelial suspension of the fungus was inoculated on the entire surface of the potato-dextrose agar plate in a Petri dish and immediately incubated for 10 to 15 days at 25°C. During this period, numerous small colonies developed on the surface of the medium (Plate 1, A). As inocula, these small colonies, 2 to 3 mm in diameter, were transferred to liquid medium in a shaking flask with 10 to 15 colonies per flask.

2) **Production of sclerotium-like body in liquid medium by shaking culture**

(1) Media

Among many kinds of liquid media tested, Eiken's potato-extract solution (Eiken's potato-extract powder 4 g, glucose 10 g, distilled water 1,000 ml) and Difco's potato-extract solution (Difco's potato-extract powder 4~6 g, glucose 10 g, distilled water 1,000 ml) were best for growth and production of sclerotium-like bodies.

(2) Temperature and duration of culture

The mature sclerotium-like bodies were produced at temperatures ranging from 15 to 30°C,

Received April 19, 1978

(1) Forest Protection Division

with the optimum at 25°C, under favorable duration of shaking. Immature sclerotium-like bodies began to form after 5 to 7 day's shaking, and a few of the conidia were produced on sclerotium-like bodies after 10 day's shaking. Most of the conidia were observed on them after 15 to 20 day's shaking.

(3) H-ion concentration in medium

The effect of H-ion concentration on the production of sclerotium-like bodies was tested on Eiken's potato-extract solution medium at various pH, ranging from 3 to 9 (Table 11). The sclerotium-like bodies grew at all H-ion levels tested. The initial optimum pH of the medium for conidial production was about 5.0, and numerous conidia occurred at initial pH 3 to 6, while a few of them were observed at pH 7 to 9.

(4) Effect of carbon and nitrogen sources on medium

a) Carbon sources

Eiken's potato-extract solution medium without carbohydrate was used as the basal medium and carbohydrates were supplied from various sources at the rate of 10 g per liter of medium. The sclerotium-like bodies grew well in medium containing various sources of carbon tested. Conidia were abundantly produced on sclerotium-like bodies produced in the medium containing glucose, fructose, galactose and sucrose, respectively, but very few in medium containing xylose (Table 8).

b) Nitrogen sources

Nitrate was supplied as KNO_3 , nitrite as KNO_2 , and ammonium nitrogen as $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Several kinds of free amino acids as organic nitrogen sources were also tested (Table 10). HOPKIN's liquid medium without nitrogen source was used as the basal medium, and various nitrogen sources were added to the medium containing 2.5 g/l KNO_3 .

Generally, the growth of sclerotium-like bodies was poor in all media tested. Conidial formation occurred moderately on sclerotium-like bodies produced in media containing $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and poorly in media containing KNO_3 . No conidia was observed in medium containing KNO_2 . Among free amino acids, L-glutamine and L-phenylalanine were the best source, followed by L-glutamic acid, L-isoleucine, L-serine, L-alanine and DL-valine, but L-leucine, DL-threonine and L-proline were the poor sources for sporulation.

(5) Addition of vitamins on medium

Effects of thiamine and biotin on growth and sporulation of sclerotium-like bodies were tested. Thiamine was one of the best sources for growth of sclerotium-like bodies, but for sporulation it appeared somewhat inhibitory. No effect of biotin was observed for growth and sporulation of sclerotium-like bodies.

3. Sporulation on sclerotium-like body in a growth cabinet

(1) Effects of incubation period in moist chamber

Some mature sclerotium-like bodies on 3% agar-agar plate in a Petri dish were incubated at about 25°C in the growth cabinet (Koitozon KB-10). Two days after incubation, a few of the conidia began to develop on conidiophores grown on the entire surface of sclerotium-like bodies. Sporulation abundantly occurred 5 days after incubation.

(2) Effects of temperature and relative humidity

Sporulation was greatly affected by temperature and relative humidity. Abundant sporulation was observed on the sclerotium-like bodies incubated at 25°C for 5 days, while less sporulation occurred at 20°C, 30°C and 35°C. Sporulation occurred well at 100% relative humidity, and the amount of conidia decreased in lower relative humidities (Tables 15, 16).

(3) Effect of light

a) When sclerotium-like bodies were exposed to daylight, conidia were abundantly formed, and the amount of conidia decreased with the decrease in the exposure time to daylight. It was strikingly suppressed when kept in continuous darkness (Table 18, Fig. 11).

From the results of the experiments, it was indicated that light was an important factor for sporulation on sclerotium-like bodies of the fungus.

b) Effects of various wavelengths on sporulation of the fungus were investigated by using some acryl films with transmission curves of wavelength (Fig. 12). Petri dishes containing sclerotium-like bodies on 3% agar-agar plate were immediately transferred in the box which was wrapped up in an acryl film, and then these boxes were placed in a growth cabinet (Koitozon 3S) out of doors.

Conidial formation occurred normally on sclerotium-like bodies wrapped with CF 112-4 and CF 112-5 acryl films as well as unwrapped, while a few conidia were formed on them wrapped with CF 112-1 and CF 112-2 acryl films (Table 19). From the tests, it is clear that the effective wavelength of radiation for sporulation was approximately 400 to 500 nm, namely, from near-ultraviolet to short wave region of visible light.

c) Effects of exposure period to light were tested under the artificial light conditions. The sclerotium-like bodies kept in the moisture chamber were placed at 30 cm under a 40-watt daylight fluorescent tube at 25°C for 5 days. When sclerotium-like bodies were exposed to light for 2 days followed by 3 days in darkness, abundant conidia were produced on sclerotium-like bodies wrapped with CF 112-4 and CF 112-5 acryl films, as well as on unwrapped ones. When 2 days in darkness was followed by continuous light a few or no conidia were formed. The same result was obtained under continuous light and continuous darkness (Table 20). It may be suggested that the light is apparently necessary at the growing stage of conidiophores on sclerotium-like bodies of the fungus, but it inhibits the conidial production on conidiophores.

(4) Variation in sporulation ability by repeated culture of sclerotium-like bodies

Sclerotium-like bodies formed conidia which were removed. After this, conidia were left to form on the same sclerotium-like bodies and were again removed. This was repeated up to the 5th time. There were no remarkable differences in sporulation between the 1st and 2nd culture. The degree of sporulation was markedly decreased, however, in the 3rd, 4th and 5th cultures (Fig. 13).

4) The relation between the sporulation and the sugar content in sclerotium-like bodies

Relation between the sporulation and the sugar content in sclerotium-like bodies was investigated by gas chromatography. From the results of gas chromatographic separation, arabinol, fructose, α - and β -glucose and mannitol were detected (Figs. 14~16). It is also shown that the amount of each sugar varied during the culture periods. Until 10 days after incubation, at the initial stage of development, the sugars found in sclerotium-like bodies were arabinol and mannitol and rest were glucose and fructose. After 15 to 20 days' shaking at the maturity of sclerotium-like bodies, however, amount of arabinol and mannitol decreased, while glucose (α - and β -) and fructose increased considerably. It may be said that these four sugars in sclerotium-like bodies were effectively consumed for sporulation of the fungus (Fig. 17).

5) Morphological changes in hyphae composing a sclerotium-like body

The structural change in a sclerotium-like body relating to the sporulation was observed microscopically.

- a) Inoculum : The inoculum was a younger hyphal mass (Fig. 18, A).
- b) After about 5 days' shaking : A globular mycelial mass was formed with hyaline younger and brownish mature hyphae (Fig. 18, B, Fig. 19, A and Plate 4, C).
- c) After about 10 days' shaking : At this time, the sclerotium-like body fully developed and stopped its enlargement. The sclerotium-like body was structurally divided into three layers as follows : the outer layer (Ol), the middle layer (Ml) and the inner layer (Il) (Plate 4, A, Figs. 18~19). The outer layer was characterized by closely packed brown to brownish-black hyphae (Fig. 19, B, Plate 4, D). The middle layer consisted of radial hyphae growing from the center of sclerotium-like body (Fig. 18, C, Plate 4, D), and the inner layer, the neighboring hyphae occupied the central part of the body.
- d) After about 15 to 20 days' shaking : The sclerotium-like body matured satisfactorily and was globoid in shape, black in color, smooth, glossy and very hard on the surface (Plate 1, C). The hyphae in the outer layer became larger in size, and darker in color and more closely packed in structure than those after 10 days' shaking. The hyphae were microscopically very similar to those of the gemmae-like bodies or chlamydospore-like bodies produced in the old culture and the mycelial mass formed in the affected needle of *Cryptomeria*-seedlings (Fig. 19, C, D, Plate 5 A, B).

6) Sporulation of several isolates of the fungus

The experiment made on 47 isolates of the fungus obtained from diseased needles of *Cryptomeria japonica*, *Taxodium distichum*, *Chamaecyparis pisifera* (U. S. A.) and *Sequoiadendron giganteum* and from the inner bark of stem cankers of 5- to 10-year old *Cryptomeria* trees collected in many districts of Japan.

Conidial production was observed on all of the isolates which had been newly isolated before the experiment, except for two isolates for a long time in the laboratory (Table 26). Generally, it is very difficult to obtain conidia from old stock cultures of the fungus which has been consecutively transferred on agar medium under laboratory conditions.

7) Pathogenicity of conidia of the fungus produced by the method presented here

In the artificial inoculations, conidial suspension of the fungus produced by the method described was sprayed on seedlings and root cuttings of *Cryptomeria* in the summer of 1974 and 1975. The inoculated plants were kept for 4 days in an incubation chamber which was regulated at about 100% in relative humidity and at 25°C to 30°C. The incipient symptoms were observed about one month after the inoculation on all seedlings and root cuttings tested. At the end of the experiment, 40 to 50 days after the inoculation, the mature conidia of the fungus were produced on the lesion of infected needles and green shoots of the seedlings. Among the isolates of the fungus tested, there were no remarkable differences on the virulence of pathogenicity (Tables 28~35).

8) Test of the sporulation method applied to some other Cercosporae

The sporulation of several Cercosporae causing leaf-spot diseases in crops, vegetables, fruit trees and orchard trees, etc. was examined by the author's method. Conidial production was observed on the following species : *Cercospora cotini* (*Cotinus coggygria*), *C. naitoi* (*Ilex serrata*), *C. leucothoes* (*Leucothoe catesbaei*), *C. pyracanthae* (*Pyracantha angustifolia*), *C. epicoccoides* (*Eucalyptus globulus*), *C. kakiwora* (*Diospyros kaki* var. *domestica*) and *C. fuligena* (*Lycopersicon esculentum*).

