

# *Phyllosticta Cryptotaeniae* Sawada により起る

## ミツバの円形葉枯病

宮 田 善 雄

YOSHIO MIYATA : Brown spot of Mitsuba (*Cryptotaenia japonica* Makino)  
caused by *Phyllosticta Cryptotaeniae* Sawada

**摘要** 本学構内において発生を認めたミツバ円形葉枯病病原菌について若干の研究を行なったので、ここに報告する。本菌はミツバ葉に円形の黄褐色ないしは黒褐色の病斑を生じ、葉肉組織中に黄褐色、扁球形ないし球形、大きさ平均  $111.7 \times 97.0 \mu$  の柄子殻を形成し、やがてその内部に多数の柄胞子を生ずる。柄胞子は無色、楕円形ないし長楕円形、単胞で大きさ平均  $4.8 \times 2.0 \mu$  を有する。これら病徴および形態から *Phyllosticta Cryptotaeniae* Sawada と推定される。本菌の生育は、ジャガイモ、ミツバ両煎汁寒天培地並びにツアベック寒天培地において良好であり、トウモロコシ、アンズ各煎汁寒天培地では生育が劣った。菌糸の生育適温は  $24 \sim 26^\circ\text{C}$ 、 $34^\circ\text{C}$  ではまったく菌糸の伸長はみられなかった。柄胞子の発芽適温は  $24^\circ\text{C}$  前後であり、 $34^\circ\text{C}$  以上および  $6^\circ\text{C}$  以下では発芽は認められなかった。胞子の生存最高限界温度は  $42 \sim 44^\circ\text{C}$  (1時間処理) の間にあり、低温の場合、 $0^\circ\text{C}$  に12日間置いてもなお発芽能力を保有していた。菌糸の生育に適する水素イオン濃度は pH 7 附近とみられるが、pH 9 以上および pH 3 以下においてもかなりの生育を示した。また光の及ぼす影響については、暗所より明所において生育は良好であった。柄胞子の発芽は蒸留水中に比較してミツバ葉上および同葉煎汁中においてわずかに促進された。

### I 諸 言

ここ数年来、京都府立大学構内に自生するミツバの葉に円形の褐変病斑を生ずる疾病の発生を認めた。本病は病徴および病原菌の形態より *Phyllosticta Cryptotaeniae* Sawada により起るものと同一であると考えられるが、本研究中はその完全時代を確認することは出来なかった。しかし、かつて安部は本病と同一と思われるミツバ葉の病斑部に *Mycosphaerella* 型の子嚢胞子の形成を認めているので、本病病原菌の完全時代は *Mycosphaerella Cryptotaeniae* P. Henn. に相当する可能性が大きい。1960年から1961年にかけて、筆者はその病原菌を分離培養し若干の生理学的性質を調べたので、ここにその結果を報告する。

本研究は安部卓爾博士の本学在職中、ご懇篤なご指導を賜ったものであるが桂教授および現近畿大学河野又四氏にもお世話になった。あわせて感謝の意を表す。

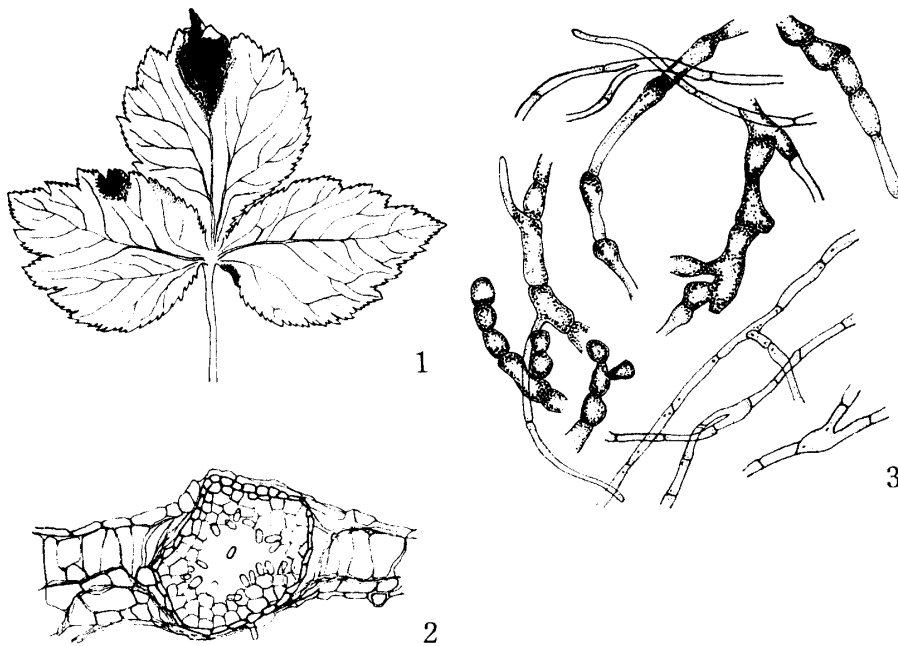
### II 病徴ならびに病原菌の形態

本病菌の侵入をうけたミツバは4月下旬から5月上

旬にかけて円形の黄褐色ないし黒褐色の病斑を生じ、またよく発達したものでは葉の主脈あるいは側脈に沿って扇形の大型病斑を形成する(第1図)。病斑は概して葉の周辺部から発生する傾向が強いが、このことはミツバの葉縁には水孔がよく発達していることと考え合わせると興味深い。病斑は発達するにつれて中央部が灰褐色を呈するようになり、両面性で扁球形ないし球形の柄子殻が形成され、その内部に極めて多数の楕円形の柄胞子を生ずる(第2図)。

### III 病原菌の培地上における形態

常法により病原菌を分離し加糖ジャガイモ煎汁寒天培地上で生育させた。菌そうは初めは無色であるが、しだいに褐色を呈しはじめる。これは生殖生長期の菌糸を生じたものであり、1週間前後で褐色菌そう部に柄子殻の形成が認められる。白色菌糸はなめらかで細長く、褐色菌糸は短大で節がくびれ先端部が膨大して小球をなし、それが密に集合し合わされて球状ないしは扁球状の柄子殻壁を構成し、内部におびただしい数の無色楕円形ないし長楕円形、平滑な柄胞子を生ずる(第3図)。柄子殻の大きさはミツバ葉上に生じたも



ミツバ円形葉枯病

- 第1図 ミツバ円形葉枯病病斑
- 第2図 葉組織中に形成された柄子殻と柄胞子
- 第3図 培地上に生じた白色菌糸および褐色菌糸

のでは、直径平均 $111.7 \times 97.0 \mu$ (最大 $175.0 \times 113.8 \mu$ , 最小  $68.1 \times 61.3 \mu$ ), 柄胞子は  $4.8 \times 2.0 \mu$  (最大 $7.0 \times 2.8 \mu$ , 最小 $3.4 \times 2.1 \mu$ ) であったのに対し、培地上に形成されたものでは、柄胞子の大きさにおいてはほとんど変わらないが、柄子殻の大きさは約2.5倍大きい値を示した。これは培地上では葉組織中の場合と異なり、空間的制限をほとんど受けないことによると考える。

IV 単胞子分離、接種および再分離

病斑部から常法により分離した病原菌を稀釈法により単胞子分離し、そのうちやや形質を異にすると思われる2系統を選び、それぞれ  $P_1$ ,  $P_2$  として以下の実験に供した。  $P_1$  は  $P_2$  に比較して菌そうの色がやや濃く柄子殻の形成が劣る。柄子殻の大きさは  $P_1$  では

平均  $240.5 \times 185.1 \mu$ であるのに対し、  $P_2$  は  $306.2 \times 237.0 \mu$ であってかなり大きい。柄胞子の大きさはよく一致した。

鉢植えのミツバ葉に接種試験を行なった結果、  $P_1$ ,  $P_2$  のいずれも有傷接種の場合のみ陽性であり、さらに接種により生じた病斑部から再分離により同一の菌を得たので、供試菌が本病原菌であることを確認した。

なお、分離の際に同時に得られた *Alternaria* sp. および *Pestalotia* sp. につい

ても接種試験を行なったが、いずれも陰性に終り病徴の発現には至らなかった。

V 病原菌の生理学的諸性質

1. 各種培地上における菌の生育および形態

5種の培地(ジャガイモ、アズ、トウモロコシ、ミツバ各煎汁加寒天培地およびツアベック合成寒天培地)を作成し、各培地について4枚ずつペトリ皿に分注しこれにジャガイモ平面寒天培地上に形成された菌そうの周辺部より切取った直径2mmの菌そう片を移植し、24°Cの定温器に保ち、定期的に菌そうの生育状態を観察した(第1表)。

菌糸の伸長はジャガイモ、ツアベック、ミツバ各培地において、ほぼ同程度に良好であり、ついでトウモロコシ培地、アズ培地の順であった。菌そうの色は前述のように柄子殻を形成する繁殖菌糸とも云うべき菌糸が褐色を呈することによる色であって、一般に柄子殻形成の豊富なものほど濃褐色を呈した。なおトウモロコシ培地においてはほとんど全面的に白色菌糸か

第1表 各種培地上における菌の発育および形態

培地	菌そうの発育 <sup>a)</sup>	菌そう疎密	菌そうの色	子殻形成	色素産生
ジャガイモ煎汁寒天培地	24.2mm	密	濃緑褐色	多(群生)	中央部に淡橙色々素
アズ煎汁寒天培地	8.8	やや疎	緑褐色	少(散生)	なし
ツアベック合成寒天培地	25.6	密	黒褐色	多(集塊 <sup>b)</sup> 散生)	なし
トウモロコシ煎汁寒天培地	21.4	最も疎	無色	最少(散生)	なし
ミツバ葉煎汁寒天培地	25.6	密	黒褐色	最多(群生)	全面に拡散した黒褐色々素

注 a) 24°C, 4日目の菌そう直径(2回反覆試験の平均)  
 b) 数個ないし十数個ずつ集まった子殻の塊が培地に散生しているもの

第2表 菌糸の生育に及ぼす温度の影響

試験温度	20		24		26		28		30		34°C	
反覆試験	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>
1	19.5△	20.7	23.6	24.6△	21.7△	20.8△	—	—	4.7	5.2	2.0	2.0
2	17.2	17.0	25.7	22.8	21.2	20.3	16.3	15.0	8.3	7.8	2.0	2.0
3	16.7	17.3	21.8	22.0	22.7	22.5	—	—	6.2	5.7	2.0	2.0
平均	17.8	18.2	23.7	23.1	21.9	21.2	16.3	15.0	6.4	6.2	2.0	2.0

注 P<sub>1</sub> および P<sub>2</sub> は供試菌の2系統

数値は各区共ペトリ皿3枚ずつ, 24°C, 72時間目の菌そう直径の平均(単位: mm)

△印はバクテリアが発生したためにペトリ皿2枚ずつの平均値となったもの

ら成りわずかに柄子殻の形成された周囲に褐色菌そうが認められ, またミツバ培地では菌そうの全面に黒褐色色素がジャガイモ培地では中央部に淡橙色の色素がそれぞれ生成された。

### 2. 菌糸の発育に及ぼす温度の影響

直径2mmの菌そう片をペトリ皿平面ジャガイモ培地に移植し, 20, 24, 26, 30および34°Cの各定温器に保ち, 一定時間後の菌そう直径を測定した。ペトリ皿は1区当り3枚を用い, 試験は3回反覆した(第2表)。

本菌菌糸の生育は24°C前後が最適であると思われる, また34°Cではまったく菌糸の生育は認められず, しかも実験後さらに24°Cの定温器に入れておいても菌糸の伸長はみられないことより, 本菌菌糸は34°Cにおいては死滅するものと考えられる。

### 3. 柄胞子の発芽に及ぼす温度の影響

ジャガイモ培地上に形成された柄子殻を殺菌水中でつぶして胞子懸濁液をつくり, スライドガラス上に毛管スポイトを用いて2滴ずつ点滴し, 水を含ませた濾紙を敷いて湿室としたペトリ皿中に納め, 各温度に調節した定温器又はアイスボックス中に保ち, 24時間後に取出してホルマリン固定の後発芽率を測定した。各試験毎に1区当りスライド3枚ずつを用い胞子は300~1000個を数え実験は5回反覆した(第3表)。

柄胞子の発芽適温は20~28°Cであるとみられ, とくに24°Cが最も好適であった。また胞子の発芽は34°C以上および6°C以下で認められなかった。

### 4. 胞子生存の最高限界温度

胞子懸濁液を1ccずつ試験管にとり, それぞれ定められた温度(20, 30, 34, 38, 40, 42, 44および50°C)の恒温槽中に1時間保った後, 前項に準ずる方法で発芽試験に供した。胞子の死滅を確実にとらえるために発芽試験と同時に各処理胞子懸濁液を3白金耳(ループ内径1.5mm)ずつ殺菌濾紙円板に含ませてジャガイモ寒天培地上に並べ, 24°Cの定温器に数日間保って菌そうが形成されるか否かをもって生死判

第3表 柄胞子の発芽に及ぼす温度の影響

試験温度	供試菌P <sub>1</sub>	供試菌P <sub>2</sub>	平均
0	0	0	0
6	+※	+	+
12	33.6	48.8	41.3
20	44.9	38.7	41.8
24	63.8	48.8	56.3
26	48.5	46.1	47.3
28	44.1	41.0	42.6
30	23.9	27.0	25.8
34	0	0	0

注 数値は24時間後の分生胞子発芽率(%), 各々5回反覆試験の平均値 ※+はわずかであるが胞子の発芽を認めたもの

定した(第4表)。

第4表 柄胞子生存の最高限界温度

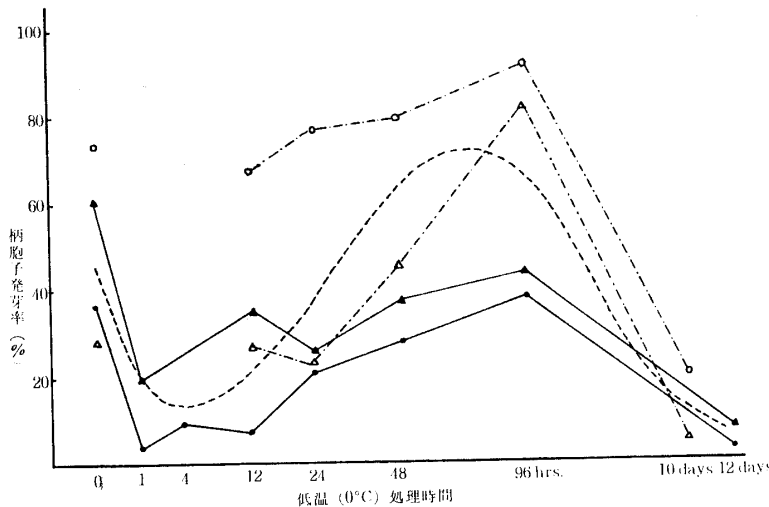
供試菌	P <sub>1</sub>			P <sub>2</sub>			
	1	2	3	1	2	3	
反覆試験	1	2	3	1	2	3	
試験温度(°C)	20	—	72.8 (+)	69.2 (+)	—	59.3 (+)	71.2 (+)
	30	32.7 (+)	—	—	30.2 (+)	—	—
	34	—	54.9 (+)	—	—	44.0 (+)	—
	38	21.1 (+)	19.0 (+)	—	17.7 (+)	22.9 (+)	—
	40	—	8.1 (+)	23.7 (+)	—	11.8 (+)	15.5 (+)
	42	—	2.1 (+)	+	—	+	+
	44	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
	46	0 (-)	—	—	0 (-)	—	—
	48	—	—	—	—	—	—
	50	—	—	—	—	—	—

注 数値は胞子発芽率(%), +は極くわずかであるが発芽胞子を認めたもの, (-)内は温度処理した胞子懸濁液を含ませた濾紙円板上における菌そうの形成で, (+)は形成されたもの, (-)は形成を認めなかったものを表わす

この結果, 柄胞子の生存限界温度は1時間その温度にさらされた場合, 42~44°Cの範囲にあるとみられる。なお温度処理した胞子懸濁液を含ませた濾紙円板はいずれの試験においても42°C以下の場合にのみ菌

その形成が認められて発芽試験の結果とよく一致した。

6. 氷点 (0°C) における処理時間と柄胞子の発芽  
前記第3項で示したように、柄胞子は0°Cでは発芽が認められなくなるが、これが死滅を意味するとは考えられない。この点を明らかにするために柄胞子懸濁液を作り、前記第5項の要領で0±0.5°Cに保ったまほうびん内の水中に一定時間浸漬した後、発芽試験により発芽能力を調べた(第4図)。



第4図 低温(0°C)処理時間と柄胞子の発芽率  
注. 各低温処理時間後、24°Cにおいて24時間発芽させた場合の発芽率  
●—●—● P<sub>1</sub> } 第1回, ○—○—○ P<sub>1</sub> } 第2回試験結果  
▲—▲—▲ P<sub>2</sub> } 第1回, △—△—△ P<sub>2</sub> } 第2回試験結果  
----- 推定曲線

第4図にみられるように胞子懸濁液を数時間低温(0°C)処理すると、処理しないものに比べて発芽率がかなり低下したが、低温処理がさらに長くなるに従

い発芽能力は次第に回復し、96時間処理では処理しない場合とほぼ等しいか、あるいはそれ以上の発芽率を示すにいたった。しかし処理時間が10日にも及ぶと発芽能力は再び顕著に低下した。

7. 菌の発育と水素イオン濃度

菌の発育に及ぼす水素イオン濃度の影響を調べた。50mlのフラスコにジャガイモ煎汁を30mlずつ分注し、 $\frac{1}{2}$ N・HClまたはNaOHを適量加えて各段階のpH値に調整したのち、500mgずつのガラスウールを入れて中央部に高みをつくり、その上に直径2mmの菌そう片を1個ずつ移植して24°C定温器に保ち、2~3週間後取出して乾燥させ、菌そうをガラスウールと共に重量測定して生育した菌そうの乾燥重量を求めた。なおpH値はガラス電極pHメーター(堀場式)を用いて測定した。結果は第5表に示す通りである。

菌糸の生育はpH7前後が最もよいが、pH2.5あるいはpH10のようになり酸性または塩基性の高い培地中でも生育は可能であった。また培地のpHは培養日数の経過と共に次第に中性すなわち菌の生育に適する値に変化してゆくことが認められ、したがって培養期間が長くなるほど各pH階級間の菌体量の差は

縮まってきた。筆者は別に簡単な実験を行なって酸性および塩基性の培地が菌の生育につれて次第に中性に近づくのに対し、菌を移植しない培地ではほとんどpH

第5表 菌の生育とpHとの関係

実験	供試菌	pH段階	1	2	3	4	5	6	培養日数	培養温度(°C)
1	P <sub>2</sub>	pH 菌体重量	2.5 254	3.5 260	5.7 280	7.0 299	8.6 283	9.7 259	21	26~28
2	P <sub>1</sub>	pH 菌体重量	— —	4.5 (6.0) 258	6.0 (6.0) 287	7.2 (6.1) 289	8.8 (6.2) 292	10.0 (6.3) 263	21	24.5
3	P <sub>2</sub>	pH 菌体重量	2.9 (5.8) 241	4.5 (6.0) 240	6.1 (6.0) 270	7.2 (6.1) 273	8.8 (6.2) 279	10.0 (6.5) 251	21	24
4	P <sub>1</sub>	pH 菌体重量	2.4 (2.6) 0	4.6 (7.3) 144	6.0 (7.3) 169	6.6 (7.1) 170	7.4 (7.8) 190	8.9 (8.4) 70	15	26
5	P <sub>2</sub>	pH 菌体重量	2.7 (4.7) 100	4.2 (6.7) 159	5.9 (6.8) 161	6.7 (7.2) 208	7.4 (7.5) 197	8.9 (7.5) 112	15	26

注 pHの( )内は実験終了時の培地pHである  
菌体重量の菌糸の乾燥重量で単位はmg

の変化が認められないことを確認しているのので、この培地 pH の変化は菌自体の働きによるものと考えられる。

#### 8. 菌糸の生育と光との関係

バクテリアの発生を抑えるためにローズベンガル・ストレプトマイシン液を添加したジャガイモ煎汁寒天培地をペトリ皿に分注の後、直径2mmの菌そう片を1個ずつ移植して、各々硫酸紙で包み、そのうち半分は果汁をぬって遮光し暗処理区とした。これらを窓ぎわに置いた前面ガラスの定温器中に2列に並べて置き一定期間放置した後、菌そうの伸びを比較した。ペトリ皿は時々位置を任意に並べ換えた。実験中は2本の温度計の球部を一方は硫酸紙そのまま、他方は黒く塗った硫酸紙で包んだものを添え、時々温度を記録したが両者の間にはほとんど温度の差はなかった。

第6表 菌の発育と明暗の関係

処理区	明処理区		暗処理区		培養条件		
	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	日数	温度(°C)	
実験回数	1	53.5	41.5	39.0	39.8	21	28.3
	2	38.3	39.7	36.2	32.0	8	27
	3	44.0	41.7	36.7	28.7	8	27

注 数値はペトリ皿培養各區3枚の平均菌そう直径(mm)、培地はローズベンガルストレプトマイシン加用ジャガイモ煎汁寒天培地

第6表に示すように概して本菌の生育は光のあたる方が良好であった。なお本実験中、明処理区において日数の経過と共に培地のローズベンガルによる鮮やかな紅色が次第に退色する現象を認めたが、別に実験を行なって、それが光の作用によるものであることを確認した。しかもこの退色した培地上では本菌の生育が阻害される傾向を示したが、その詳細については今後の報告にまちなたい。

#### 9. 柄胞子の発芽と寄主体成分との関係

柄胞子の発芽が寄主の分泌物や構成成分により影響をうけるかどうかを調べた。スライドグラス上に胞子を懸濁した殺菌蒸留水を滴下した区、ミツバ葉上に胞子懸濁液を滴下した区、およびミツバ煎汁中の胞子懸濁液をスライドグラス上に滴下した区の3区を設け、それぞれ水を含ませた濾紙を敷いて湿室としたペトリ皿中に納めて24時間24°Cに保ち胞子の発芽を調べた(第7表)。

その結果、胞子発芽率は殺菌蒸留水中に比べて、ミツバ葉上あるいはミツバ葉煎汁中において若干良好であり、胞子の発芽は寄主体に基づくなんらかの物質に

より促進作用を受けるものと考えられる。

第7表 胞子の発芽に及ぼす寄主植物の影響

実験区別 菌別	殺菌蒸留水区		ミツバ葉上区		ミツバ煎汁区	
	1※	2※	1	2	1	2
P <sub>1</sub>	34.6	38.6	37.1	51.6	46.1	43.5
P <sub>2</sub>	38.6	43.1	44.0	47.4	49.4	57.9
平均	36.3	40.8	40.6	49.6	47.7	50.7

注 数値は胞子発芽率(%), 24°C, 24時間後の値である。  
※1, 2は実験回数を表わす

## V 考 察

本報告の初頭において述べたように、筆者らの分離した本病原菌は *Phyllosticta Cryptotaeniae* Sawada の記載とほとんど一致するから該菌と同定して差支えないと思う。本実験に供試した2系統の菌 P<sub>1</sub> および P<sub>2</sub> については第IV章に述べたように、ジャガイモ寒天培地上において菌そうの色、子殻の形成程度および大きさが若干異なるほかは、菌糸および柄胞子の形態あるいは大きさにおいてはほとんど等しく、接種試験による病斑形成状態や生理学的諸性質についても、多くの場合目立った相違は認められずこれらの点を総合して、P<sub>1</sub> および P<sub>2</sub> 菌は同一種に属するものと考えられる。

本病原菌の生理学的諸性質の実験については、胞子の低温(0°C)処理時間と発芽能力の関係において、興味ある結果を得た。すなわち低温処理を行なうことにより胞子の発芽率は極端に低下するが、処理時間の経過と共に胞子発芽率はかえって上昇し、最初の発芽率に等しいかあるいはそれを上回る値にまで達した後、再び低下に至る。この関係は第4図に推定曲線として描いたとおりである。このような結果を示す原因として考えられることの一つは、胞子が未熟であって低温処理期間中に成熟が進み発芽力の上昇を示すが、その後は低温による阻害効果が現われて次第に発芽能力の低下を示す場合であり、この場合は成熟過程もまた一連の化学反応であるとすれば、それが低温下で進行するという考え方に若干の無理を生ずる。もう一つは、低温処理により直接あるいは間接的に発芽能力が高められる場合である。しかし、そのいずれにしても、それがどのような作用機作に基づくものであるかはすべて今後の研究にまたねばならない。

また胞子の発芽は殺菌蒸留水中より、ミツバ葉上あるいはその煎汁中におけるほうがやや良好であるという結果を得た。かつて河村・小野<sup>2)</sup>は稲葉上水滴がいもち病菌胞子の発芽を促進することを述べ、この促進作用の強度と菌侵入の多少との間に相関々係を認めている。同様な胞子発芽の促進効果は寄主植物の水浸液<sup>3)</sup>搾汁<sup>4)</sup>にも認められ、また達山<sup>5)</sup>は寄主以外の植物の

葉上水滴もごま葉枯病菌胞子の発芽を促進することを認め、とくにイネの葉上水滴中では附着器の形成が一層促進されることを報告している。このように、一般に病原菌は寄主植物に基づくなんらかの物質により胞子の発芽や生育に影響をうけるものと考えられ、病原菌に対する寄主の抵抗性機作解明の試みの中において、ある程度考慮に入れねばならない問題であると考ええる。

## 引用文献

- 1) 浅田泰次・赤井重恭(1955) 植物病害研究, **5**: 63—6.
- 2) 石崎 寛(1950) 三重大農学報, **1**: 36—40.
- 3) 河村栄吉・小野小三郎(1948) 農試彙報, **4**(1): 1—12.
- 4) Saccardo, P. A. (1913): *Sylloge Fungorum*, **22**: 131.
- 5) 沢田兼吉(1943) 台湾総督府農試報, 85.
- 6) 達山和記(1955) 植物病害研究, **5**: 67—70.

## Summary

Some morphological and physiological studies on the causal fungus of brown spots on Mitsuba, *Cryptotaenia japonica* Makino, grown in the campus of Kyoto Prefectural University were investigated.

The symptoms of the disease are distinguished by brown spots with indistinct margins on the leaves of host plants and numerous pycnidia forming in the center of the spots. Pycnidia are yellow-brown in color, roundish and  $111.7 \times 97.0 \mu$  in diameter in average. Pycnosporos are hyaline, one-cellulated and ellipsoidal or long-ellipsoidal, measuring  $4.8 \times 2.0 \mu$  in average. The perfect stage has not been found on the diseased plants nor on culture medium. Judging from the symptoms of the disease and other morphological characters, this fungus was identified with *Phy-*

*losticta Cryptotaeniae* Sawada.

The organism grew well on potato sucrose agar, Mitsuba decoction agar and Czapek's agar media, but slightly on corn and apricot decoction agar media. Optimum temperature for the mycelial growth of the fungus was 24 to 26°C. Optimum temperature for germinations of pycnosporos was 20 to 28°C. Maximum survival temperature of spores was 42 to 44°C for 1 hour, and the spores kept at 0°C for 12 days survived. Optimum hydrogenion concentration for the growth of the fungus in potato medium was about pH 7. The organism grew better in light than in dark. The pycnosporos were more germinated on the leaves of Mitsuba and in the decoction of the plant than in the distilled water.