

# 數種の桑樹寄生菌の純粹培養に就て

香 山 護

Mamoru KÔYAMA:—On the pure culture of some parasitic fungi found  
on the mulberry stems

## 緒 言

桑樹に寄生する絲狀菌の培養に就ては茲に蠶業試験場山内技師により、彼の胴枯病菌と稱せらるる *Diaporthe* 菌に就て行はれたるものの外未だ著明なる報告なし。因て予は數種の桑樹寄生菌、即ち桑樹芽枯病菌 (*Gibberella moricola* (De Not.) Sacc.) 同しく瘤腫病菌 (*Nectria cinnabarina* Tode.) 擬似胴枯病菌 (*Cytoplea sinensis* Miyake) 及び胴枯病菌 (*Diaporthe Nomurai* Hara) 等に就て其の純粹培養を試み、其等菌類の生態的性質を調査することとせり。

本實驗を行ふに當り終始御懇篤なる御指導を賜りし遠藤博士並びに倉澤副手に對し深甚の感謝の意を表す。

## I. 材料及び分離培養法

### 1. 材料の採集

本實驗に用ひたる材料は、上田蠶絲専門學校桑園に於て發病せしものにして、昭和10年度春期より夏期に亘り採集し置きしもの及び實驗直前に於て採集せしものなり。

#### a.) 瘤腫病菌 (*Nectria cinnabarina* Tode.)

7月春蠶専用桑園にて未だ株直しを爲さざる桑株中より、本病に罹れる病條を求め來りて、其の中稍々典型的病徴を呈せるもの即ち枝條に赤色の小疹を多數に生ぜるものを選び、各病斑部より分生子を取りて、顯微鏡的検査を行ひ其の正否を確めしものを用ふ。

#### b.) 芽枯病菌 (*Gibberella moricola* (De Not.) Sacc.)

同年春期に於て採集し置かれたりしものにして、病條の表面に紅褐色の小疹(分生子座)を無數に生ぜしものを選び瘤腫病と同様に分生子を取り、顯微鏡的検査をなし其の正否を確めて用ふ。

#### c.) 擬似胴枯病菌 (*Cytoplea sinensis* Miyake.)

7月本實驗を行ふに當り、桑園を巡視し或は春季株直しを爲したる古條を軒下等に積み重ね置きしものの中より求む、病徴は全條に亘り、大小、形狀、共に異なる黑色の疣點を現したるもので、病斑部より胞子を取り、顯微鏡的検査によりて擬似胴枯病菌の1種 *Cytoplea sinensis* Miyake なるを認めこれを用ふ。尙參考として *Phoma moricola* Sacc. をも用ふ。

#### d.) 胴枯病菌 (*Diaporthe Nomurai* Hara)

同年度春期に於て採集し置かれたる材料を使用す、此の材料は大形病斑を生じ、爲めに發芽後數芽を伸すのみにて枯死し、病斑部には本病の特徴とする鮫肌狀の微小突起を生ぜしものを用ふ。

### 2. 培 養 基

本實驗に用ひたる培養基は、通常寒天培養基、桑皮煎汁加寒天培養基、並びに Standard

synthetic medium の3種なり。元來絲狀菌の菌絲の發育は、培養基の反應に大いに關係するものにして一般に微酸性なるを好む如し。故に調整せし培養基は litmus paper によりて檢し、中性若しくは微アルカリ性のものには酒石酸少量を加へて、微酸性となして用ふ。

尙此等培養基にて菌絲の發育を良好ならしむる爲め、砂糖 (cane-sugar) 1.5% を加用せり。

3. 分 離 法

各病菌毎に代表的病徴を現せし部分を取り昇汞水 (0.2%) の中に5分間浸し、外部附着細菌の消毒をなし、次でペトリ皿 (Petri-dish) に殺菌水 (蒸留水) を満したるものの中は、約15分間放置し、附着せる昇汞分を除く。後小片を碎きて、該病原菌の孢子悬浮液を造り、所謂孢子稀釋法によりて稀釋し、平面培養基となして後 28°C の定温器の中に保護す。而して此等の操作は各病原菌毎に培養基3種を用ひたり。

斯くして孢子の發芽を待つ。1日後に於て一小點として孢子の發芽を初めたるを認め、尙保護し、3日目に至りて各聚落毎に分離培養をなす。此の場合同一平面培養基上に同種聚落の多數發生するや否や又は菌絲の状態、性質或は結實体の状態等詳細に檢し右菌の特性によりて菌種を定め、各純粹培養をなす。而して間違なきを期する爲め2~3回に亘り分離培養を繰返す。斯くして得たる各々の菌に就き發育の状態、聚落 (colony) の色澤、或は結實体を形成するや否や、尙其の結實体の發芽或は同孢子の抵抗試驗等をなす。

II. 生態的性質

分離培養を終りし各菌は寒天培養基、糖加麥皮煎汁培養基及び Standard synthetic medium の3種の培養基に移植し、此等に就て調査及び試驗をなせり。其の得たる成績を總括的に1表にて示すと次の如し。

菌別	培養基	培温 發度	接 種 物	可日 視數	菌 絲			結 實
					發育	構 造、 色、 輪層		
胴枯病菌	寒天培養基	28°C	孢子	2	卅	初め白色後稍々灰褐黑色を呈す、輪層明	卅	
	煎汁培養基	同	同	2	卅	白色後灰紅色を帶ぶ、腎皮狀、層中腐	卅	
	St. sy. mc.	同	同	3	+	白色、扁平、後灰色を帶ぶ、層稍々不明	±	
芽枯病菌	寒天培養基	28°C	菌絲	2	卅	紅色裏面鮮紅色にして隆起狀を呈す、層明	—	
	煎汁培養基	同	同	2	卅	淡紅色裏面鮮紅色にして隆起狀を呈す、層明	—	
	St. sy. mc.	同	同	3	卅	淡紅色裏面白色にして波狀を呈す、層明	—	
瘤脈病菌	寒天培養基	28°C	孢子及び菌絲	2	卅	白色、扁平狀なれど後稍々紅色を帶ぶ白色となる、層明	卅	
	煎汁培養基	同	同	2	卅	白色、扁平狀、稍々灰紅色を帶ぶ、層稍々明	卅	
	St. sy. mc.	同	同	2	+	乳白色にして扁平狀、層明	±	
擬枯似病菌	寒天培養基	28°C	孢子	2	卅	白色、波狀を呈す、後帶黃黑色となる、層明	卅	
	煎汁培養基	同	同	2	卅	白色扁平なれど後帶黃黑色となる、層明	卅	
	St. sy. mc.	同	同	3	卅	白色扁平なれど後帶青黑色を呈せり、層稍々不明	卅	

備考 (卅)は發育至つて良好或は結實良好なるを示し、(—)は發育を全くなまざる或は全く結實を爲さざるを示し、(卅)(+)(±)は各々其の中間の程度を示す。

1.) 菌絲の伸長状態

純粹培養せし各病原菌の聚落到就て、其の菌絲の伸長状態を見るに大体中心より周圍に向つて盛に伸びて居るが、特に芽枯病菌は氣中に伸びること多し。癌腫病菌に於ても多少其の傾向あり、胴枯病菌にありては數日後高さ1cmに達したり。

2.) 發育の良否

各病原菌は培養基別により其の發育の度合を異にす。今培養10日目迄の間に於ける菌絲の發育狀況を示すと次の如し。

菌別	培養基	日 數				
		2 日 目	4 日 目	6 日 目	8 日 目	10 日 目
胴枯病菌	寒天培養基	5	24	43	50	50
	煎汁培養基	3.5	15	33	41	50
	St. sy. me.	1.0	1.5	2.0	3.0	5.0
芽枯病菌	寒天培養基	12	28	37	50	50
	煎汁培養基	11	21	31	39	50
	St. sy. me.	4.5	25	38	44	50
癌腫病菌	寒天培養基	5.5	18	33	50	50
	煎汁培養基	6	16	22	36	50
	St. sy. me.	3	6	9	14	28
擬似胴枯病菌	寒天培養基	7	21	42	45	48
	煎汁培養基	6.5	17	45	50	50
	St. sy. me.	6	19	28	35	50

備考 本表に於ける數字は聚落の直徑を表したものにして單位は mm なり尙 50mm は max. なり。

上表に於て見る如く全体を通じて寒天培養基にて發育最も良好なり。煎汁培養基は此れに亞ぎ Standard synthetic medium にて發育稍々不良なり。然るに擬似胴枯病菌にては何れの培養基なりとも發育良好なり。

3.) 聚落の厚薄及び硬軟

何れの病原菌の聚落も内部と外部とにては其の厚さを異にす、特に芽枯病菌は非常に中央部隆起し、其の厚さを増す。而して其の質は至つて粗なり。癌腫病菌にては稍々緻密にして隆起すること少し。擬似胴枯病菌にては緻密なれど隆起せず。胴枯病菌は始め隆起せざるも後培養基と共に上向し、培養基の下方に空隙を造り龜裂を生ぜり。

4.) 聚落の形狀及び周縁

聚落の形狀は各病原菌培養基に於ける状態は大體圓形にして時々不正形に發育せり、周縁の構造及び其の發育初期に於ける輪層の明否を示すと次表の如し。

培養基	周縁及び構造	菌 別			
		胴 枯 病 菌	芽 枯 病 菌	癌 腫 病 菌	擬 似 胴 枯 病 菌
寒天培養基	聚落周縁の構造	短毛狀	亂髮狀	短毛狀	絲狀
	聚落の周縁	明	明	明	明

桑皮煎汁培養基	聚落周縁の構造	短毛状	亂髮状	短毛状	絲状
	聚落の周縁	稍々明	明	稍々明	稍々明
St. sy. me.	聚落周縁の構造	短毛状	亂髮状	短毛状	絲状
	聚落の周縁	殆ど不明	明	稍々不明	明

5.) 聚落の色及び構造

各聚落の内部的構造及び色に就て見ると次表の如し、然し色彩は接種當時と其後時日を経過して、繁殖器の形成を始めし時或は形成の最中にあるもの等により大いに差あり、即ち繁殖器官と菌絲とは色彩に於て其の濃度に差ある故なり。

培養基	菌別 項目	胴枯病菌	芽枯病菌	癩腫病菌	擬似胴枯病菌
		寒天培養基	聚落の構造	肥厚、短毛状	最肥厚、絲状
	聚落の色彩	始め白色なれど次第に灰褐色となる	白色より紅色を帯ぶ如くなる後裏面は鮮紅を呈す	始め淡き帯肉紅色なれど後乳白色となる	淡色より次第に濃黒褐色を帯ぶるに至る
桑皮煎汁培養基	聚落の構造	肥厚、靴皮状	最肥厚、絲状	扁平、繭状	扁平、靴皮状
	聚落の色彩	始め紅色なれど後稍々微紅色となる	白色より紅色となる裏面は鮮紅色	帯褐白色より淡褐色となる	淡色より次第に濃くなり後に濃黒褐色となる
St. sy. me.	聚落の構造	扁平、短毛状	肥厚、絲状	扁平、靴皮状	扁平、靴皮状
	聚落の色彩	白色	白色より紅色となる裏面淡紅	淡白色なるも後乳白色を呈するに至る	白色より後白濁黒褐色となる

6.) 結實体及び胞子

純粹培養をなせる此等4種の菌は培養基上にて結實体を形成するものと、せざるものとあり、又其の結實体形成を初むる時日に相當の差あり、今其の成績を一表にて示すと次の如し。

培養基	菌種	胴枯病菌		芽枯病菌		癩腫病菌		擬似胴枯病菌	
		寒天培養基	卅	9日目	—	—	卅	9日目	卅
桑皮煎汁培養基	卅	10日目	—	—	卅	5日目	卅	5日目	
St. sy. me.	士	18日目	—	—	+	15日目	卅	5日目	

備考 (卅)は結實体形成最良を示し (—)は形成なきを、(卅)(+)(士)各は其の中間の程度を示す、尙胴枯病菌及擬似胴枯病菌は分生子殻、癩腫病菌は擔子梗胞子を形成せり。

胴枯病菌にては培養9日目(寒天培養基)に聚落上に同心圓的に小點の輪の如きものを現す、色は黒褐色を呈し、此のものは次第に大きく成長せり。此れを尙良く観察する時、柄子殻(Pycnidium)なるを知る、其の中に多數の Phoma 型の胞子を藏す、而して此等の胞子は各々2個或は數個の油滴を含むを見る、又時として Pycnidium 中の Phoma 型の胞子に混じり Rhabdospora 型の胞子をも發見せり、或は又 Phoma 型のものと Rhabdospora 型の胞子との中間に位するが如き型の胞子をも見る、而して此等胞子の大きさは天然産のものと同様なり。即ち天然に於ける小形 Phoma 型の胞子の大きさは (5~6.8~8) × (1.5~2.4~3.0) μ たり、又普通型の Phoma 型の胞子中大形に屬するものは (7.7~11~13.2) × (3.3~3.9~4.4) μ

なり。培養せる孢子にては(6日目測定)(8.15~11.34~12.8) $\mu$ なる長徑で、短徑は(3.38~3.78~4.31) $\mu$ なりき。尙胴枯病菌の菌絲の太さは3.9 $\mu$ で擔子梗の長さは約20~30 $\mu$ あり自然産のものより著しく長し。即ち自然産のものは擔子梗の長さ(12~15~19) $\mu$ なり。尙本試験中に於ては子囊殼の發生を見ず。

病腫病菌にては培養4日目頃から聚落上に多少色の異りたる部分を生じ、此の部分で白金耳にて取り、鏡檢する時多數の孢子と擔子梗を觀察することが出來たり。即ち分生子座を形成せしものにして培養5日目のものを取りて測定せる所によると孢子の大きさは(3.5~7.2~10.2) $\times$ (1.8~3.04~4.0) $\mu$ にして自然産のもの(6 $\times$ 2.6) $\mu$ と殆ど同様なり。尙擔子梗の長さは(150~240) $\mu$ 内外にして其の中は25 $\mu$ 位、7~10個位の節膜(Septum)を有す。菌絲の太さは3.5 $\mu$ 位あり。本菌は子囊殼 perithecium を形成する筈なるも人造培養基上にては其の形成を見ず。

芽枯病菌にては菌絲非常に良く發育せしも孢子及び子囊形成を見ず。培養菌絲の太さは約4.5 $\mu$ 内外あり。

擬似胴枯病菌(Cytoplea sinensis)は各培養基に於て培養5日目に到り孢子を形成せり。自然産のものは(14~16.9~20) $\times$ (5~6.85~8) $\mu$ なれども、本培養試験の結果によるものは其れよりも稍小形にして(5.9~12.59) $\times$ (7.8~3.3) $\mu$ なり。尙菌絲の太さは10 $\mu$ 内外にて擔子梗の長さは40 $\mu$ 位なり。而して天然産の孢子は濃褐色を呈し居るも培養せしものにありては稍着色せる程度にして着色せざりしものも尠からず。

尙擬似胴枯病菌の一種 Phoma moricola Sacc. をも培養す。此のものの天然産の孢子は長楕圓形にして(7~8) $\times$ (2.5~3) $\mu$ にして、油球を含み無色透明なり。而して培養せしものは長楕圓形にして、油球を含むこと同様なるも大さやや大なり。即ち(6~10) $\times$ (3~3.5) $\mu$ にて菌絲の直徑は6.5 $\mu$ 内外なり。

### 7.) 孢子の發芽

斯くして得た所の孢子に對し適溫適濕を與へて其の發芽試験を行ひたり。其の發芽狀態は、胴枯病菌に於ては孢子の1端又は兩端より菌絲を伸し發芽せり。病腫病菌にては其の分生子は此れを水中に置く時は水分を吸收して膨大し2晝夜位にして孢子の1端又は兩端から發芽管を出して發芽す(28°Cの定溫器中に保護す)。擬似胴枯病菌にても前二者同様に發芽をなすも、發芽までに時間を長く要せり。即ち3晝夜乃至4晝夜を費したり。

## III. 抵抗試験

(培養孢子の熱に對する抵抗力試験)

人工培養基上に生ぜし孢子を採り、無菌水(蒸溜水)中に入れて相當に薄き孢子の浮遊液を造り、試験管内に入れ此のものを一定目的溫度に保てる溫槽中に入れ一定時間經過せる毎に1白金耳量を取りて、此れを懸滴標本檢査法によりて其の孢子の生死を調査す、即ち其の1白金耳量を Cover-glass に取り懸滴し此のものを28°Cの定溫槽中に保護し、胴枯病菌及び病腫病菌は48時間後に、擬似胴枯病菌は72時間後に此等の懸滴を鏡檢し、發芽せるや否やに就きて調査せり。其の成績は次の如し。

菌別	接觸溫度	接觸時間				
		0分	3分	5分	10分	20分
胴枯病菌	60°C	100	0	0	0	0
	50°C	100	4	2	0	0
	40°C	100	100	100	90	70

癌腫病菌	60°C	100	0	0	0	0
	50°C	100	0	0	0	0
	40°C	100	45	40	10	8
擬枯 似病 菌	60°C	100	0	0	0	0
	50°C	100	20	0	0	0
	40°C	100	100	40	25	20

備考 上表に於ける数字は、0分區即ち熱に對し無接觸の區に於て1視野毎に其の發育胞子數を調査し、平均價を求め、此れを100とせしものである。

尙各菌各温度各時間毎に3枚の標本を造りて調査し其の平均數字なり。

表によりて知る如く、胸枯病菌は 50°C 5 分間以上及び 60°C 以上に接觸せしむる時は直ちに死滅す。癌腫病菌にては 50°C 以上、擬似胸枯病菌は 50°C 3 分間以上に接觸せしむる時は即時に死滅するもの如し。

斯の如き熱に對する抵抗力は之等菌類の稀釋培養等を行ふ場合に於て相當考慮するべきものにして、此の抵抗力以上の温度にて稀釋する時は完全に其等の胞子は死滅することとなる。

### 總 括 及 び 結 論

- 1.) 以上の實驗結果を見るに、芽枯病菌、癌腫病菌、擬似胸枯病菌、胸枯病菌等は人工培養基上に良く發育成長するものなるを認む。
- 2.) 而して此等の菌類は人工培養基の種類により其の發育狀態を異にす。即ち寒天培養基、桑皮煎汁加寒天培養基、及び Standard synthetic medium の3種のものの中では、大體寒天培養基にて發育最良にして桑皮煎汁加培養基此れに亞ぎ、Standard synthetic medium にては其の發育稍々悪く、特に胸枯病菌なる Diaporthe 菌及び癌腫病菌悪きが如し。而して擬似胸枯病菌は稍々發育劣る程度にして芽枯病菌は殆ど他の培養基との差を見ず。
- 3.) 聚落に就て見ると以上4種の菌の聚落は質稍々緻密にして特に芽枯病菌にては隆起し高は 1 cm に達するものあり。周縁は一般に Standard synthetic medium にて稍不明、構造は絲狀又は韃皮狀乃至短毛狀をなし。形狀は丸形なり。聚落の色は一般に始め淡色にして次第に發育するにつれて濃色となる。各菌共大體に於て自然病條に於けると同様の色を現せり、而して培養基の種類により多少色合を異にす。
- 4.) 培養せし結果該菌の結實體を得しものは、胸枯病菌、癌腫病菌、擬似胸枯病菌の3種にして芽枯病菌にては結實體を見ず。胸枯病菌及び擬似胸枯病菌のものは Pycnidium にして癌腫病菌のものは分生子なり。而して胸枯病菌は主に Phoma 型の胞子にて自然産の胞子と殆ど同形にして平均  $(11.34 \times 3.78) \mu$  なり。尙本實驗の範圍にては子囊殼の形成は觀察せず。癌腫病菌に於ては分生子座を形成して分生子を生じ自然産の胞子と殆ど同様の形狀なり  $(7.2 \times 3.0) \mu$ 。擬似胸枯病菌 (Cytoplea sinensis) にては柄子殻を生じ胞子は天然産のものより小形にして  $(5.9 \sim 12.59) \times (3.3 \sim 7.8) \mu$  あり、自然産のものに比し着色淡し。
- 5.) 此等の菌の熱(濕熱)に對する抵抗力は胸枯病菌を見ると 50°C で5分間、又は 60°C 以上にては瞬間接觸せしむると死滅す、癌腫病菌にては 50°C 以上、擬似胸枯病菌は 50°C 3分間 60°C 以上に接觸することにより直ちに死滅するが如し。

(於 上田蠶絲專門學校)

## 参 考 文 献

- 山内爲壽：寒枯桑樹に見出さる Diaporthe 菌に就て 蠶業試験場報告 Vol.8, No.1 (1930)
- 鈴木重禮：{農業醸造細菌研究法及び検査法 (大正2年)
- 湯川又夫：{
- 遠藤保太郎：桑樹病理學 (昭和2年)
- 秋田縣蠶業試験場：桑樹凋枯病に關する試験成績 (昭和9年) 秋田縣蠶業試験場報告 第一號
- 新潟縣桑樹試験場：桑樹凋枯病に關する研究 (大正13年) 同場報告第一號
- The Journal of the College of Science Imperial University of Tokyo, Japan (1904)
- (Lo. Vol. XVIII Article 5)
- Ward (Giltner) : Laboratory manual in general microbiology. (1916.)
- (受理 昭和11年6月1日)

On the pure culture of some parasitic fungi  
found on the mulberry stems

Mamoru KÔYAMA

(Received, June 1, 1936)

Résumé

This report is concerned with the pure cultures of 4 parasitic fungi, i. e., *Gibberella moricola* (De Not.) Sacc., *Nectria cinnabarina* Tode., *Cytoplea sinensis* Miyake, and *Diaporthe Nomurai* Hara. These fungi are commonly found on the mulberry stems. Where the last species has ever been demonstrated with the pure culture by Dr. Yamanoichi, but the others have scarcely been cultivated in success or never tried.

The writer used, as cultural media, the ordinary bouillon agar, agar added with mulberry bark decoction and the standard synthetic medium. Among these media the first one was most suitable for every fungus, and the last one less good except the case of *Gibberella*.

*Diaporthe Nomurai* produced pycnidia of *Phoma* type whose conidia being almost the same shape and size ( $11.34 \times 3.78 \mu$ ) with natural ones. *Nectria cinnabarina* produced conidial stroma, conidia being  $7.2 \times 3.04 \mu$  in size. *Cytoplea sinensis* produced pycnidia, conidia being smaller ( $5.9 \sim 12.59$ )  $\times$  ( $3.3 \sim 7.8$ )  $\mu$  and pale colored in comparison with natural ones. *Gibberella moricola* produced abundant mycelia but no reproductive organ.

Experimental results about the resistance of these conidia to moist heat showed that, *Diaporthe Nomurai* was killed for 5 minutes at  $50^\circ\text{C}$  and instantly over  $60^\circ\text{C}$ . *Nectria cinnabarina* and *cytoplea sinensis* for 3 minutes at  $50^\circ\text{C}$ .

(College of Sericulture and Silk-industry, Uyeda, Japan.)