



Title	アズキ落葉病菌の生態に関する研究 : III. アズキ落葉病菌分生胞子の土壌中での発芽と生存
Author(s)	近藤, 則夫; KONDO, Norio; 小林, 喜六 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 14(1), 50-55
Issue Date	1983-12-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/12005
Type	departmental bulletin paper
File Information	14(1)_p50-55.pdf



アズキ落葉病菌の生態に関する研究

III. アズキ落葉病菌分生胞子の土壌中での生存と発芽

近藤 則夫・小林 喜六

(北海道大学農学部植物学教室)

(昭和 58 年 5 月 26 日受理)

Studies on the Ecology of *Cephalosporium gregatum*, the Causal Fungus of Brown Stem Rot of Adzuki Beans in Hokkaido

III. The Longevity and Germination of *Cephalosporium gregatum* Conidia in Soil

Norio KONDO and Kiroku KOBAYASHI

(Department of Botany, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo, Japan)

緒 言

アズキ落葉病菌分生胞子は土壌中で生存するとされる⁶⁾が、その期間と生存条件、とくに湿度と温度については明らかでない。また、本菌には菌核、厚膜胞子などの耐久生存器官の存在は認められていないことから、分生胞子がどのような条件でどの位の期間生存出来るかを明らかにする事は本菌の生態解明にきわめて重要な問題である。土壌中での分生胞子の生存は、発芽とも密接な関係にあるので本研究では分生胞子の生存期間を調べるとともに、土壌中での発芽についても調べた。また、同時にアズキを連作しているにもかかわらず本病の発生が少ない土壌と、激しい土壌とで、分生胞子発芽にどのような違いがあるかをもしらべた。

本研究の供試土壌採集にあたり、種々御協力いただいた北海道立上川農業試験場、病虫科、土屋貞夫氏、田中文夫氏ならびに北海道立十勝農業試験場、病虫科、坪木和夫氏、青田盾彦氏に深く感謝する。

実験材料と方法

(1) 接種分生胞子の生存

供試菌株：1978年北見管内訓子府町のアズキ落葉病罹病茎から分離した菌株、31-2A (Type A)、31-2B (Type B) を用いた。なお、31-2B は北大土壌についてのみ用いた。V-8 ジュース寒天培地に形成された分生胞

子を 3000 rpm, 10 分間遠心分離を 3 回繰り返し洗浄後、懸濁液を作った。

供試土壌：北大農学部圃場内のアズキを栽培したことのない土壌(草地)、上川管内和寒町土壌(10年間アズキ連作後1981年秋コムギ栽培、アズキ落葉病の発生は軽微)、十勝管内池田町土壌(1978年アズキ、1979年テンサイ、1980年インゲン、1981年コムギ、1982年アズキ栽培、発生は軽微)を室温で風乾後、1mm目のふるいを通して供試した。この土壌に本菌分生胞子懸濁液を乾土1g当たり胞子 10^5 個の割合になるように加え、土壌湿度25%になるように水を加えて調整した。この接種土壌を一方はそのままプラスチック容器(直径6cm、高さ6cm)に入れ密封し、他方は1日室温で風乾後、容器に入れ、ふたをせず風乾状態とし、それぞれ-5、4、15、25°Cの恒温機中に置いた。接種した直後(風乾状態の土壌からは1日後も胞子数を定量した)に前報と同様の選択培地を用い土壌稀釈平板法で胞子数を数え、その後一定期間ごとに土壌をとり出し、定量した。また、乾土1g当たり 10^5 個の割合で接種し、水を加えて湿度50%とした土壌を密封して各温度に置き、同様の定量を行なった。

(2) 4°Cで保存した自然汚染土壌からの分離

1080年10月にアズキ連作圃場から採取した土壌(深さ0~7.5cm)を2mm、1mm、0.5mm目のふるいを通して、直径の異なる土壌粒子を集めた。それぞれ密閉容器

につめ、4°Cの恒温機中で保存し、(1)と同じ方法で菌量を定量した。

(3) 分生孢子の土壌中での発芽

供試菌株、供試土壌：(1)と同様である。

寒天拡散法³⁾：2%寒天(Difco noble agar)の円板(直径5mm、厚さ2~3mm)を湿室中で24時間、30°Cに保った。V-8ジュース寒天培地に形成させた孢子の懸濁液を3000rpm、10分間遠心分離を3回繰り返して洗浄した後、 $5 \times 10^5/\text{ml}$ の濃度にした分生孢子懸濁液20 μl を寒天円板にのせた。土壌湿度65~75%とした供試土壌50gを9cmベトリ皿につめ、その上に煮沸して可塑剤を除いた殺菌セロファンを敷き、孢子を接種した円板をのせて、22~24時間、4、15、25°Cで培養した。これらをラクトフェノール-コットンブルーで染色し、1枚の円板あたり5カ所、5枚の円板でそれぞれの土壌ごとに孢子の発芽率を測定した。また、2%の寒天を入れたベトリ皿上にスライドグラスを置き、その上に殺菌セロファンを敷いてその上に円板を置いたものを対照とした。

直接法^{1),4)}：同様にして作成した濃度 $2 \times 10^5/\text{ml}$ の懸濁液をメンブランフィルター(直径25mm、 $1.0 \mu\text{m}$; TOYOROSHI)に1ml接種し、吸引して水を除去したものを用意した。これに土壌湿度25%になるように蒸留水を加え、プラスチックの容器につめ、軽く圧して平らにした各土壌の表面に、孢子がのっている面を土壌と接するように置き、その上に同じ土壌を厚さ3cmになるようにのせ、密閉して各温度に1週間おいた。対照と

して2%寒天を入れた9cmベトリ皿中にスライドグラスを入れ、その上にフィルターをおいたものを用いた。

次に、フィルターを丁寧にとり出し、スライドグラス上におき、ラクトフェノール-トリパンブルー(フェノール、11.2ml; グリセリン、10ml; 酢酸、10ml; 蒸留水、8.8ml; トリパンブルー、0.02g)で染色後、70°Cの温湯上で3分間蒸気にあてた。このフィルターを吸引ろ過しながら、清澄なラクトフェノール、次いでグリセリンで洗浄して検鏡し、孢子の発芽を見た。フィルター当

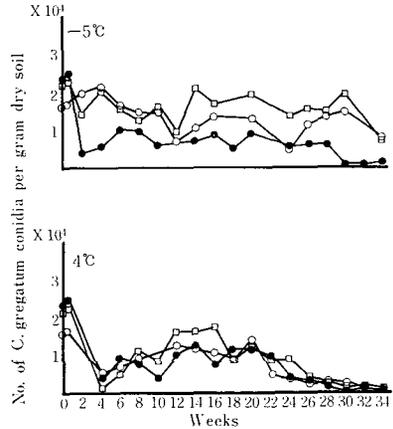


Fig. 1. Longevity of *Cephalosporium gregatum* (Type A) conidia in soil under dry condition.

○—○ Hokudai, ●—● Wassamu, □—□ Ikeda.

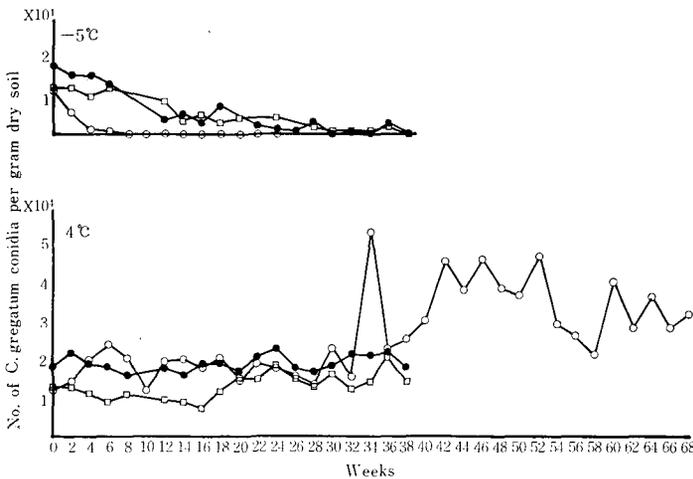


Fig. 2. Longevity of *Cephalosporium gregatum* (Type A) conidia in soil at 25% moisture content (w/w).

○—○ Hokudai, ●—● Wassamu, □—□ Ikeda.

たり8カ所から計100個程度胞子を検鏡し、各実験には2枚以上フィルターを用いた。

実験結果

(1) 接種土壤中での分生胞子の生存

Type A の分生胞子を接種後、風乾状態で放置した土壤中では15°C、25°C共に生存出来るのはせいぜい2~3週までで、それ以後はほとんど検出されなくなった。一方-5°Cのときは、和寒土以外は34週まで接種時と同じ胞子量であった。また4°Cでも34週まで検出され、胞

子密度に土壤による差は特に認められなかった (Fig. 1)。

湿度25%の土壤において、-5°Cでは北大土から検出される胞子密度は急激に減少し、10週以後は分離されなかった。一方、和寒土、池田土では30週以後も分離され、北大土ほど急激に減少しなかった。4°C、15°Cでは、北大土からは68週後でも分離され、和寒土、池田土中でも北大土中の胞子密度と差はなく、38週以上生存した。25°Cでは、いずれの土壤でも次第に減少し、北大土の胞子は36週以降ほとんど分離されなかった (Fig. 2, 3)。

土壤湿度50%の条件では、-5°C、4°C共にいずれの

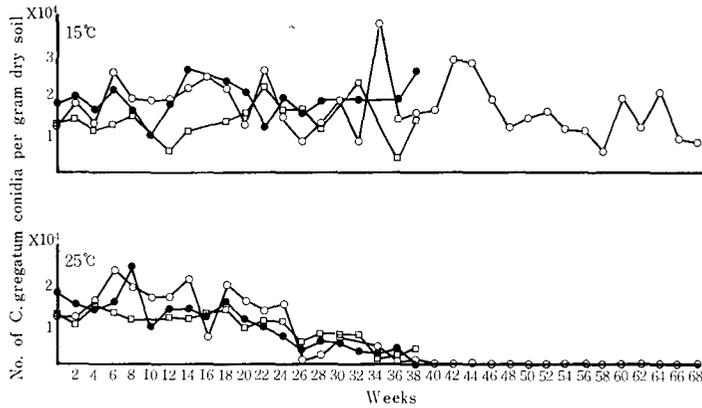


Fig. 3. Longevity of *Cephalosporium gregatum* (Type A) conidia in soil at 25% moisture content (w/w).

○—○ Hokudai, ●—● Wassamu, □—□ Ikeda

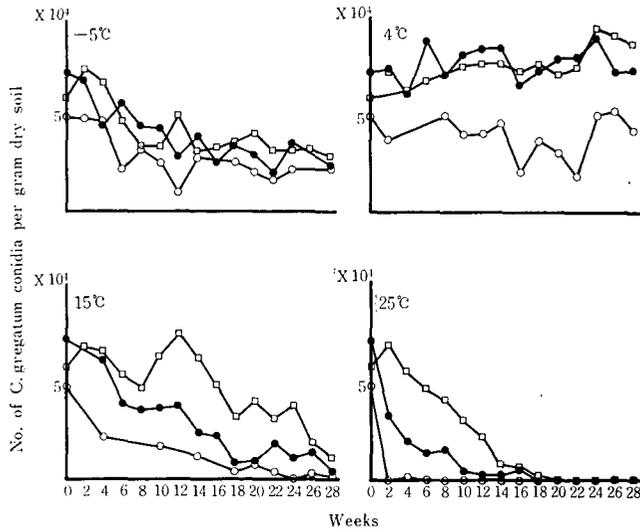


Fig. 4. Longevity of *Cephalosporium gregatum* (Type A) conidia in soil at 50% moisture content (w/w).

○—○ Hokudai, ●—● Wassamu, □—□ Ikeda

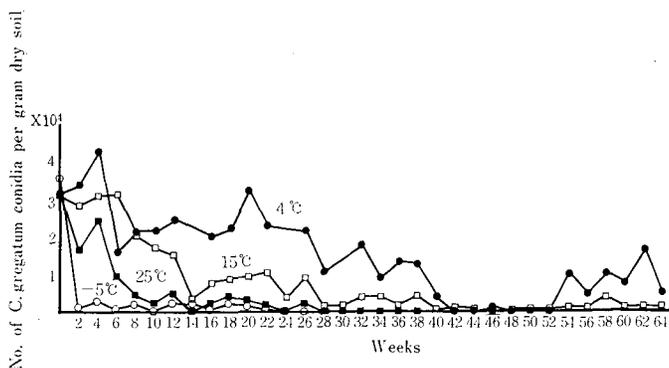


Fig. 5. Longevity of *Cephalosporium gregatum* (Type B) conidia in Hokudai soil at 25% moisture content (w/w).

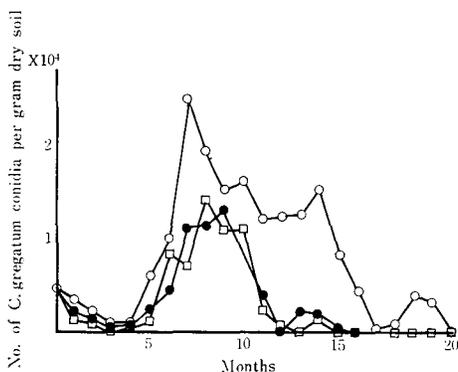


Fig. 6. Levels of *Cephalosporium gregatum* (Type A) propagules in field soil incubated at 4°C.
 ○—○ Soil passed through 2-mm sieve.
 ●—● Soil passed through 1-mm sieve.
 □—□ Soil passed through 0.5-mm sieve.

Table 1. Germination of *Cephalosporium gregatum* conidia on soil by agar diffusion method

	Germination %			
	Control	Hokudai	Soil Wassamu	Ikeda
4°C	0	0	0	0
15°C	89.9±3.3	55.9±3.0	83.5±3.3	59.1±10.5
25°C	97.0±1.3	73.2±3.9	85.4±2.5	89.9±1.9

土壌中でも 28 週まで孢子密度は変わらなかった。15°C のときは、いずれの土壌中でも時間とともに次第に減少した。25°C のときは、北大土壌中の孢子は 6 週以後検出

Table 2. Germination of *Cephalosporium gregatum* conidia on soil by direct method

	Germination %			
	Control	Hokudai	Soil Wassamu	Ikeda
4°C	40.7±4.6	4.2±1.4	9.1±4.1	2.1±0.8
15°C	91.4±1.3	81.4±3.8	77.6±5.2	85.1±2.7
25°C	96.0±1.5	90.4±2.4	89.9±2.4	90.0±3.4

Table 3. Germination of *Cephalosporium gregatum* conidia in soil by direct method

	Germination %		
	Hokudai	Soil Wassamu	Ikeda
4°C	0.4±0.5	0.7±0.5	0.2±0.2
15°C	1.0±0.7	0.9±0.6	0.4±0.5
25°C	2.2±1.0	2.7±1.6	2.9±0.9

されず、他の土壌中でも次第に減少し、20 週以後検出されなくなった (Fig. 4)。

これらの結果は、低温下、特に土壌凍結しない積雪下ならびに春先の土壌温度は分生孢子の越冬生存に好適で、しかも前報でものべた様に、残渣上での孢子形成にもきわめて好適な事を示している。

Type B の分生孢子は、-5°C、25°C で 24 週から 28 週以後ほとんど検出されなくなったが、4°C、15°C では

64週目でもわずかながら検出された (Fig. 5)。

(2) 4°Cで保存した自然汚染土壌からの分離

Type A の菌量は、4カ月まで 5×10^3 以下であったが、5カ月以後増加し、特に2mm目のふるいを通した土壌中の菌量は、7カ月後には最高 2.5×10^4 になり、17カ月まで 10^4 のレベルであった。また1mm, 0.5mm目のふるいを通した土壌中菌量も10カ月まで 10^4 以上であり、残渣の大きさと、孢子形成量との間には密接な関係が存在する (Fig. 6)。

Type B は、いずれの粒径の土壌中からもほとんど分離されなかった。

(3) 分生胞子の発芽に対する土壌の影響

寒天拡散法では、4°C のとき対照も含めて、いずれの土壌中でも分生胞子の発芽は認められなかった。分生胞子は和寒土壌中では15°C, 25°C 共に高率に発芽し差はなかったが、北大土壌中と池田土壌中では15°C より25°C において発芽率が高かった。また北大土壌中での発芽率は和寒、池田土壌中に比べ一般に低かった (Table 1)。

直接法によると分生胞子の発芽は、各温度で土壌中よりも土壌表面で著しく良好であった (Table 2, 3)。しかし土壌による発芽率の差はみとめられなかった。

論 議

本菌の分生胞子は、風乾状態の土壌中では15°C, 25°C でほとんど生存できなかったが、湿潤状態では25°C でも200日以上生存する場合があった。また、湿潤状態において4°C, 15°C では1年半以上生存するなど、温度、湿度とも広い範囲で分生胞子が長期間生存した (Fig. 1, 2, 3, 4)。

Helminthosporium sativum の分生胞子が、室温において乾燥した土壌中で9カ月以上生存する例がある²⁾ が、一般に分生胞子がこのような条件で長期間生存する例は少なく⁵⁾、分生胞子の土壌中における長期間の生存は本菌の特徴と考えられる。すなわち、本菌分生胞子は耐久生存する能力をもつものと考えられる。

土屋⁶⁾ は殺菌土壌と無殺菌土壌に胞子を接種して、7月下旬から翌年4月中旬まで野外に放置すると、殺菌土壌で270日以上、無殺菌土壌でも100日以上胞子が生存することを報告している。

この長期間の生存能力が、土壌表面と比較して土壌中での分生胞子の発芽率が著しく低い (Table 3) ことや、さらに、土壌表面においても4°C での発芽率が15°C, 25°C に比べ低い (Table 2) ことと何らかの関係があるものと考えられる。

一方、アズキ落葉病の発生が少ない池田土壌、和寒土壌中での分生胞子の生存は、本病の発生が激しい北大土壌中と同様な変動を示し (Fig. 1, 2, 3), 条件によっては北大土壌以上に生存する場合 (Fig. 4) もあり、各土壌中での本病発生程度と土壌中の分生胞子生存率とは直接関係が見出されなかった。

摘 要

1. 土壌に接種した Type A 分生胞子は、風乾状態において -5°C と 4°C で 34 週以上生存したが、15°C, 25°C では 2 週以後検出されなくなった。

2. 湿度 25% 土壌においては 4°C, 15°C で北大土では 63 週まで、25°C でも 30 週まで分離されるなど、各土壌で長期間生存したが、-5°C では北大土において 10 週以後分離されなかった。

3. 湿度 50% 土壌においては -5°C, 4°C では 28 週まで孢子密度は変わらず、15°C, 25°C では次第に減少した。

4. Type B の場合、4°C, 15°C では 64 週後も検出されたが、-5°C, 25°C で 24, 28 週以後検出されなくなった。

5. 自然汚染土壌を 2, 1, 0.5 mm 目のふるいを通し、各粒径の土壌を 4°C で保存したところ、2 mm 目のふるいを通した土壌中菌量は、保存後 14 カ月まで 10^4 以上、他の土壌でも 10 カ月まで 10^4 以上であった。Type B はいずれの土壌からも分離されなかった。

6. 寒天拡散法では、4°C のとき各土壌で分生胞子の発芽は認められなかったが、15°C, 25°C では、北大土の発芽率は和寒土、池田土に比べ低かった。直接法によると、各温度で土壌中よりも土壌表面において著しく良好だった。

引用文献

- ADAMS, P. B.: A Buried Membrane Method for Studying Behavior of Soil Fungi, *Phytopathology*, **57**: 602-603. 1967
- CHINN, S. H. F. and LEDINGHAM, R. J.: Application of a New Laboratory Method for the Determination of the Survival of *Helminthosporium sativum* Spores in Soil, *Can. J. Bot.* **36**: 289-295. 1958
- HORA, T. S. and BAKER, R.: Soil Fungistasis, Microflora Producing a Volatile Inhibitor, *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **59**: 491-500. 1972
- LAI, P. V. and DUNLEAVY, J. M.: Growth

and Sporulation of *Cephalosporium gregatum* on Various Media and Buried Soybean Straw., *Phytopathology*, 59: 1950-1953. 1969

5. SUSSMAN, A. S. and HALVORSON, H. O.: Spores, Their Dormancy and Germination, Harper & Row Publishers. New York and London, 1966
6. 土屋貞夫：アズキ落葉病について，第8回土壤伝染病談話会資料，p. 14-18. 1976

Summary

The longevity and germination of *Cephalosporium gregatum* conidia in three different soils (Hokudai, Wassamu and Ikeda soils) at different temperatures and moisture levels were tested.

1. *C. gregatum* Type A conidia in dry soil could survive for at least 34 weeks or more at -5 and 5°C , but for only 2-3 weeks at 15 and 25°C , respectively.

2. *C. gregatum* Type A conidia in 25% moist soil could also survive more than 68 weeks at 4 and 5°C and then 39 weeks at 25°C under laboratory condition.

3. In 50% moist soil held at -5 and 4°C the initial population level of conidia was held by 28 weeks, but not at 15 and 25°C .

4. The number of *C. gregatum* Type A propagules in naturally infested field soil passed through 0.5-2.0 mm sieve increased from 0.5×10^4 to $1.0-2.5 \times 10^4$ during 4-10 months incubation at 4°C and then declined.

5. *C. gregatum* conidia did not germinate in three different soils held at 4°C by agar diffusion method, but at 15 and 25°C they germinated better in Wassamu and Ikeda soil than in Hokudai soil.

6. Germination of conidia by direct method was better on soil than into soil.