

牧草種子の病原菌検出における寒天培養法

および発芽試験法の検討

前田 篤実・高田 昌稔・後藤 誠

神戸植物防疫所国際課

わが国で栽培される牧草の種子は、ほとんど輸入にたよっている。最近これらの牧草の、病害による被害が聞かれるようになり、これに関する研究報告も多くなってきた。このような実情から、牧草種子の的確な検査方法の必要が痛感せられるようになった。今回の試験は、この検査方法検討の一環として牧草種子に附着している糸状菌を寒天培養法および発芽試験法を用いて調査したものである。

なお、今回検出した糸状菌の同定に際し、財団法人醸酵研究所椿啓介博士に検鏡をお願いしたのもある。ここに記して、深く感謝の意を表する。

I. 調査材料・方法

調査材料

昭和42年5月から11月までに神戸港に輸入された牧草種子で、検査の際、各荷口から1~3kg(3~4l)抽出されたものである。

調査方法

1) 寒天培養法：トウモロコシ寒天培地(トウモロコシ粗粉150g, 寒天20g, 水1l)を滅菌シャーレに流し込み、種子を無消毒のまま、シャーレ1枚に10粒づつ置いた。1試料につき種子100粒を用いた。

2) 発芽試験法：シャーレにろ紙を2枚敷き、蒸留水を注いで温室とした。種子を無消毒のまま、シャーレ1枚に20粒づつ置いた。1試料につき種子100粒を用いた。

調査は、25°Cの定温器(夏期は日光のはいらない室内)で5~7日培養し、その後明るい室内に1~2日放置した後、生育した糸状菌を検鏡して行なった。しかし、分離培養後同定したものもある。

II. 結果と検討

1. 検出された糸状菌の種類

検出された糸状菌の種類と調査粒数に対する割合は、

第1表、第2表に示したとおりである。

1) いね科牧草

いね科牧草からは、寒天培養法で27属、発芽試験法で21属が検出された。同定できなかったものがあるので種類はこれよりも多い。未同定のものの大半は *Basidiomycetes* の菌糸である。両方法とも *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Rhizopus* が割合多く、次いで *Helminthosporium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Stemphylium* などがみられた。試料によって、発芽試験法で *Chaetomium* が多数検出された。検出された糸状菌の多くは腐生菌であった。種名の同定、病原性の確認はしていないが、*Helminthosporium*, *Curvularia*, *Fusarium* および *Stemphylium* の一部、*Cladosporium* の一部、*Nigrospora* の一部は病原菌であると思われる。

i. Rye grass 類：調査試料数が多いので、検出された種類も多かった。寒天培養法では、*Alternaria*, *Aspergillus* が多く、*Cladosporium*, *Helminthosporium*, *Rhizopus*, *Stemphylium* など19属が、発芽試験法では *Alternaria* が多く、*Aspergillus*, *Rhizopus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Penicillium* など14属が検出された。検出割合は少ないが *Helminthosporium* が度々みつかるとは注意を要する。

ii. Orchard grass 寒天培養法、発芽試験法ともに *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* が多く、何れも9属が検出された。デンマーク産のものから *Monofospora* がかなりみられた。一般に *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* が多く検出されるものは、品質管理が不良であるといわれている。

iii. Fescue 類：寒天培養法では *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Stemphylium*, *Mucor* (および *Absidia*) など17属、発芽試験法では、*Alternaria* が多く、*Rhizopus*, *Stemphylium* など9属が検出された。またデンマーク産のものから *Chaetomium* が多数みられた。

iv. Blue grass 類：寒天培養法では、*Cladospo-*

rium, *Alternaria*, *Aspergillus* など8属, 発芽試験法では *Alternaria*, *Cladosporium*, *Stemphylium* など6属が検出された。

V. Bent grass 類 : 寒天培養法では, *Alternaria*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Trichoderma* など11属, 発芽試験法では, *Alternaria*, *Rhizopus* など6属が検出された。

vi. Weeping love grass : 寒天培養法では, *Alternaria*, *Epicouccm*, *Penicillium* など12属, 発芽試験法では *Alternaria*, *Penicillium* など7属が検出された。

vii. その他 : Timothy は寒天培養法で *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* が多かった。

Tall oat grass は, 寒天培養法で *Rhizopus*, *Aspergillus*, 発芽試験法で *Aspergillus* が多かった。

Bermuda grass は, 寒天培養法で *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Penicillium* など, 発芽試験法では *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Aspergillus* などが検出された。

Paspalum 類は, アメリカ産は *Rhizopns*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, オーストラリア産は *Alternaria*, *Rhizopus*, *Aspergillus* が多く, また発芽試験法で, *Chaetomium* が多数検出された。

2) まめ科牧草

まめ科牧草からは, 寒天培養法で14属以上, 発芽試験法で13属以上が検出できた。種類数も検出される糸状菌の割合もいね科牧草よりは少ないが, 検出される糸状菌の様相はいね科牧草とはほぼ同様である。Clover 類から検出された *Stemphylium*, *Botrytis* は病原菌であると思われる。

i. Alfalfa *Alternaria*, *Penicillium*, *Trichoderma* など寒天培養法で6属, 発芽試験法で4属が検出された。*Helminthosporium* が検出されたが, 検討しない。

ii. Clover 類 : 寒天培養法では *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium* など11属, 発芽試験法では, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Aspergillus* など11属が検出された。種類数は割合多いが, 検出される割合は少なかった。

iii. Sweet Clover : 発芽試験法で, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Helminthosporium*, *Alternaria* が検出された。

iv. Vetch 類 : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* が多く, 寒天培養法, 発芽試験法ともに5属が検出され

た。

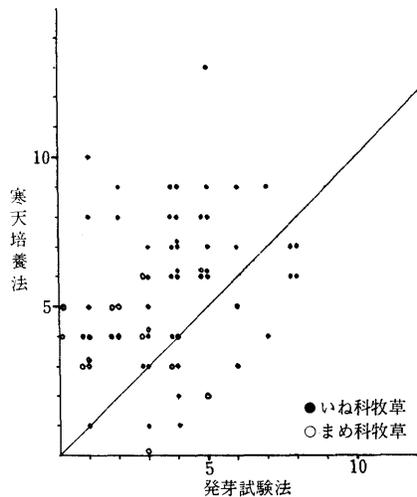
2 寒天培養法と発芽試験法の比較

寒天培養法では, 孢子形成量が多いこと, 菌叢の形態, 菌核の形成, 培地の着色変化が肉眼でみられることなどから種類の同定が容易である。しかし, *Rhizopus*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Neurospora* が生育した場合は4~5日でシャーレ全面を覆い調査が困難となる。またシャーレの滅菌, 培地の作成等準備に手数がかかるのと, 多少の器具器材が必要である。

発芽試験法では, 孢子形成の状態の他に種類を同定する目安がない, 種子表面に菌糸がまつわりついている状態では, たとえ検鏡しても同定が困難である。経験的にいって, 寒天培養法より同定に時間がかかる。しかし, 準備に手数がかからないこと, 器具器材があまり要らないのでどこでも容易に行なえる利点がある。

さらに, 個々の試料について, 寒天培養法と発芽試験法とを比較してみたが明瞭な結果は得られなかった。これは, この2方法の良否よりも調査粒数が少なかったのが原因と思われる。したがって実際の検疫面においていづれの方法を用いるにしても相当調査粒数を多くしなければ汚染の正しい様相を把握することはむづかしいと考えられる。

検出される糸状菌の種類数については, 寒天培養法の方が発芽試験法に比べて多くの種類が検出される場合が多いようである(第1図)。



第1図 個々の試料についての検出された糸状菌の種類数

第1表 寒天培養法により検出された糸状菌の種類とその割合

(数字は調査粒数に対する%)

| 牧草の種類 | 生産国 | 試料数 | 糸状菌の種類 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 計 | | | | |
|--------------------|-------------|-----|-------------------|--------------------|-----------------|----------------------|-----------------------|-------------------|---------------------|---------------------|-------------------|------------------|-----------------|-----------------|-------------------------|-------------------|------------------|----------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|------------------|--------------------|-------------------|--------------|-------------------|-----------------|-----|-------------------|---------------------|--------------------|------------------|
| | | | <i>Alternaria</i> | <i>Aspergillus</i> | <i>Botrytis</i> | <i>Brachysporium</i> | <i>Cephalothecium</i> | <i>Chaetomium</i> | <i>Cladosporium</i> | <i>Coniothecium</i> | <i>Curvularia</i> | <i>Epicoccum</i> | <i>Fusarium</i> | <i>Fusidium</i> | <i>Helminthosporium</i> | <i>Microascus</i> | <i>Monospora</i> | <i>Mucor & Absidia</i> | <i>Myrothecium</i> | <i>Neurospora</i> | <i>Nigrospora</i> | <i>Papulaspora</i> | <i>Popularia</i> | <i>Penicillium</i> | <i>Pestalotia</i> | <i>Phoma</i> | <i>Pithomyces</i> | <i>Rhizopus</i> | | <i>Septoria ?</i> | <i>Stachybotrys</i> | <i>Stemphylium</i> | <i>Styanus ?</i> |
| Rye grass 類 | USA | 19 | 13.4 | 5.7 | | | 2.1 | | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.05 | 1.4 | | 0.2 | 0.9 | | 0.6 | 0.8 | | 0.05 | 2.9 | | 0.1 | | 1.7 | | 1.7 | | 1.0 | 0.05 | 4.8 | 39.0 |
| | New Zealand | 1 | | 24.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 46.0 | | | | | 8.0 | | | | | 2.0 | 80.0 |
| Orchard grass | USA | 2 | | 27.0 | | | 1.5 | 0.5 | | | | | 0.5 | | | | | | | | | 9.5 | | | | | 28.5 | | | | | | 67.5 |
| | Denmark | 3 | 0.3 | 23.3 | | | | | | | | | 0.3 | | | | | 0.3 | | | | 7.0 | | | | | 19.3 | | | 1.3 | | | 52.0 |
| Fescue 類 | USA | 5 | 10.6 | 4.2 | | | 1.4 | 0.8 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | | 0.8 | | 1.0 | 1.4 | 0.2 | | | | 2.0 | 4.2 | | | | 1.2 | 0.2 | 1.8 | 0.6 | 10.0 | | 41.6 | |
| | Denmark | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Blue grass | USA | 3 | 3.0 | 2.3 | | 0.3 | | 8.0 | | | | | | | | | | | 0.3 | | | 0.3 | 1.3 | | | | 0.7 | | | 1.7 | 0.7 | 19.0 | |
| Timothy | USA | 2 | 0.5 | 18.0 | | | | | | | | | 1.5 | | 0.5 | | | | | | | 16.5 | | | | | 6.0 | | | | 2.5 | 45.5 | |
| Bent grass 類 | USA | 5 | 15.8 | 1.0 | | | | 3.2 | | | | | 0.2 | 0.2 | | | | | | 0.4 | | 10.6 | | 0.6 | | 0.4 | | 0.2 | 1.6 | 1.2 | 35.8 | | |
| Tall oat grass | Holland | 1 | | 17.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 4.0 | | | | 56.0 | | | | | | 77.0 | |
| Reed canary grass | USA | 1 | | 2.0 | | | | | | | | | 2.0 | | | | | | | | | | | | | 26.0 | | | | | 19.0 | 49.0 | |
| Weeping love grass | USA | 4 | 7.0 | 0.3 | | | 1.0 | | 6.3 | | | | 0.3 | | | | | 0.3 | | | | 1.8 | | | | 1.0 | | 0.3 | 1.0 | 2.0 | | 21.3 | |
| | Argentina | 1 | 2.0 | 3.0 | | | | | | 2.0 | | | | | | | | | | | | 1.0 | | | | 2.0 | | | | | | 10.0 | |
| Bermuda grass | USA | 1 | 43.0 | 2.0 | | | 2.0 | | | | 6.0 | | 4.0 | | | | | | | | | 4.0 | | | 1.0 | | | | 1.0 | | | 62.0 | |
| Paspalum 類 | USA | 1 | 1.0 | 6.0 | | | | | | | 1.0 | | 1.0 | | | | | | | | | 2.0 | | | | 49.0 | | | | | | 60.0 | |
| | Australia | 2 | 11.0 | 7.0 | | | 1.0 | | | | 0.5 | | 3.5 | | 5.0 | | | | | | | | | 4.0 | | 11.0 | 5.0 | | 3.5 | 3.0 | 50.0 | | |
| Alfalfa | USA | 2 | 1.5 | 0.5 | | | | | | | | | | | | | | 1.0 | | | | | | | | 0.5 | | 0.5 | 2.0 | 4.0 | 10.0 | | |
| Clover 類 | USA | 5 | 2.2 | 3.8 | | | 0.2 | 4.6 | 0.2 | | | | 0.2 | 0.2 | | | | | | | 0.2 | 2.6 | | | | 1.5 | | 1.5 | | 1.2 | 16.6 | | |
| | Canada | 1 | | 1.0 | | | | 1.0 | | | | | | | | 1.0 | | | | | | | | | | 1.0 | | | | | 4.0 | | |
| Sweet Clover | Canada | 1 | | 1.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1.0 | 4.0 | | |
| Vetch 類 | USA | 4 | 0.3 | 13.5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 23.5 | | | | 21.5 | | | | | | 58.8 | |
| | Hungary | 1 | 1.0 | 11.0 | | | | | | | | | | | 1.0 | | | | | | | | 27.0 | | | 5.0 | | | | 2.0 | 47.0 | | |

