馬鈴薯疫病菌の生理学的研究

第2報・馬鈴薯疫病菌の窒素源

酒井隆太郎*

Ryutaro SAKAI: Physiological studies on the *Phytophthora infestans* (Mont.) de BARY

Part 2. Nitrogen source of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary.

1. 緒言

合成培養液を基本培養液として馬鈴薯疫病菌の炭素源に関して行つた実験結果¹⁾は既に報告したが、引続き窒素源に関する実験結果を報告する。前報に述べた如く、本菌は生長素として thiamine を必要とし、その存在の下に正常な発育を遂げるが、thiamine を構成する pyrimidine 及び thiazole を利用せず、又之等から thiamine を合成する能力を有しない²⁾。培養基に添加される thiamine の量は、菌糸の生育及び孢子形成に影響を及ぼすが、その適量は培養基作成に用いた糖分含量、及びその他の条件に依つて異なるので、先ず本実験で使用する培養液に於ける thiamine の最適添加量を定め、これを基本培養液として種々の窒素化合物を窒素源として、菌糸の生育並に孢子形成に対する優劣を調査した。

馬鈴薯疫病菌はその生活上のエネルギー源を主として窒素源に求めることは明かであるが³⁾、窒素化合物として非蛋白態窒素を利用し、特にアミノ酸類が栄養源として有効である³⁾。之等の結果に基づき、本実験に用いたアミノ酸は馬鈴薯植物に含有されるものの中 19 種類を用いた。

2. 実験材料及び実験方法

供試した馬鈴薯疫病菌は従前に同じ北海道農試病理研究室保存1号菌(H₁)である。

基本培養液としては枋内、中野氏液を使用した。但し炭素源の sucrose を同量の glucose で置き換えた。その組成は次の如くである。

KNO₃ 2.0 g, KH₂PO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7 H₂O 0.5 g, CaCl₂·2 H₂O 0.5 g, glucose 30.0 g, FeCl₃ trace, 蒸留水 1000 cc.

なお vitamin B₁ としては thiamine chloride, hydrochloride を使用した。之等は予め蒸留水に溶解し各培養液に一定量添加した。又窒素源として用いた種々形態の窒素化合物の添加量は、基本培養液中の窒素量と当量を与えるようにした。尚培養液の pH は

HCl 及び NaOH を用いて 5.5 乃至 5.6 に調整した。培養容器は 100 ml 三角壺を使用し、これに培養液 20 ml を分注し、3 回蒸気殺菌を行つた。接種源は馬鈴薯煎汁寒天に培養した菌糸の小片を用いた。培養温度 19°C で 35 日間培養した後に、菌体を注意して汙過し熱水で充分洗滌後、汙紙で水分を取り、秤量管で 80°乃至 90°C で恒量に至る迄乾燥して秤量し、同時に培養液の pH 及び菌体の孢子形成に就て調査した。

窒素源として供試した無機窒素化合物は硝酸態として KNO₃, NaNO₃ を、アムモニヤ態は (NH₄)₂SO₄, (NH₄)₂HPO₄ を、又硝酸態並びにアムモニヤ態の両者を含む窒素化合物として NH₄NO₃ を、亜硝酸態窒素化合物として KNO₂, NaNO₂ を使用した。又有機窒素化合物としては次のアミノ酸態、アミド態窒素化合物を使用した。

dl-alanine, l-arginine monohydrochloride, l-aspartic acid, l-cystine, l-glutamic acid, glycine, l-leucine, l-lysine monohydrochloride, l-methionine, l-phenylalanine, l-proline, dl-tryptophan, dl-valine, l-isoleucine, dl-serine, dl-threonine, l-tyrosine, asparagine, glutamine, pepton.

3. 実験結果

(1) Thiamine の最適量 馬鈴薯疫病菌は発育の生長素として thiamine を必要とすることは前述の如くであるが、本実験に使用する基本培養液中に於ける thiamine の最適量を決定するため次の実験を行つた。培養は 100 cc 三角壺を使用し、培養液 20 cc 中の thiamine 含量を 0, 2, 4, 8, 16 及び 32 γ の 6 区を設けた。接種法は前述の如くであるが、菌糸に附随した寒天中に存在する thiamine 量を考慮して、出来るだけ寒天層を薄くしその影響を最少限とするようにした。培養 25 日後に於ける菌体乾燥重量、孢子の形成及び培養後の pH の測定結果は第1表の如くである。

尚、培養 50 日後に於ける thiamine 0 γ 及び 2 γ の菌糸生育状況は第1図の如くである。

尚実験は各区共 3 個冠培養した菌体の平均値を示し

* 北海道農業試験場病害第2研究室

第1表 基本培養液中の Thiamine 含量に
対する菌糸の生育

基本培養液 20 cc 中 Thiamine	菌体乾燥重量 (mg)	胞子形成	pH
0r	8.0	+	6.1
2	17.0	+	6.3
4	13.5	+	6.3
8	13.5	+	6.2
16	13.5	+	6.3
32	9.5	+	6.2

(培養前 pH 5.6 培養期間 25 日)

(1) (2)
(1) thiamine 0r
(2) " 2r
(培養 50 日後)

第1図 菌糸の生育と
Thiamine 含量の関係

られる。培養 50 日後に於ける菌体重量は 0r で殆んど増加せず、2r 区では 112mg に達した(第1図参照)。

(2) 窒素源について thiamine 2r を添加した基本培養液の窒素源を前述の種々の形態の窒素源と置換して培養を行い、本菌に対する各種窒素化合物の価値を検討した。培養は無機窒素化合物とアミノ態、アミド態窒素に分けて行つた。

無機窒素化合物を窒素源として 35 日間培養後の菌体重量、胞子形成の有無及び培養液の pH を測定した結果を第2表に、菌糸の發育状態を観察した結果を第3表に示す。

第2表に見られるように硝酸態窒素化合物を窒素源とした場合の菌糸の發育は良好で、殊に NaNO_3 は各種無機窒素化合物中最高菌体重量を示した。之に対しアムモニヤ態窒素化合物を用いた時の菌体重量は硝酸態窒素化合物を窒素源とした時と略近似しているが、培養の後半期に至り菌体は異常となり、培養液は褐色を呈した。殊にこの傾向は $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ のときに顕著であつた。 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ では若干の菌糸の發育を示

第2表 無機窒素源と菌糸の發育

窒素源	菌体乾燥重量	胞子形成	pH
KNO_3	12.5	+	4.6
NaNO_3	14.0	+	5.1
NH_4NO_3	13.5	-	3.8
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	12.0	+	3.5
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	2.5	+	5.1
KNO_2	0.0	-	6.1
NaNO_2	0.0	-	6.2

(培養前 pH 5.5 培養期間 35 日)

第3表 各種無機窒素源に於ける菌糸の生育状況

窒素源	4日目	7日目	10日目	25日目	35日目
KNO_3	+	++	++	+++	+++
NaNO_3	±	±	+	++	+++
NH_4NO_3	++	++	+++	+++	+++
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	++	+++	+++	+++	+++
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	+	+	+	+	++
KNO_2	-	-	-	-	-
NaNO_2	-	-	-	-	-

(培養前 pH 5.5 培養期間 35 日)

した。又亜硝酸態窒素化合物を窒素源とした場合、全く菌糸の發育はみられなかつた。尙、培養液の pH は硝酸態、アムモニヤ態窒素化合物では一般に酸性に傾く傾向があり、特にアムモニヤ態の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3 の場合の pH の低下は著しい。分生胞子は KNO_3 、 NaNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ を窒素源としたとき僅か認めた。尙菌糸の生長速度は(第3表参照)アムモニヤ態窒素化合物を窒素源とした場合、培養初期の菌体生長は著しく、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ では培養 10 日間で既に最大生長量に達し、以後の生育は殆んど認められない。一方、硝酸態窒素化合物を窒素源とした場合培養初期の菌糸の發育は緩慢で、 NaNO_3 で培養 20 日間後菌体の生育が増進された。又アムモニヤ態、硝酸態の両者を含む NH_4NO_3 の場合の菌糸の生育速度は最大成長量に達する迄略平均している。

次にアミノ酸、アミド類を窒素源として 40 日間培養した結果は第4表に示す如くである。

第4表の結果より見るとアミノ酸、アミドの種類によつて菌糸の發育はまちまちであるが、菌体の發育程度によつて区分すると次の如くである(第2図参照)。

l-arginine monohydrochloride, *l*-aspartic acid, *l*-glutamic acid, asparagin では菌糸の發育極めて良好で、pepton を窒素源とした場合の菌体重量に匹敵する。次で *l*-proline, glutamine, *l*-phenyl alanine

第4表 各種窒素源と馬鈴薯疫病菌糸の生育状況

窒素源	菌体乾燥重量 (mg)	孢子形成	pH
<i>dl</i> -alanine	0.5	+	5.5
<i>l</i> -arginine mono-hydrochloride	215.0	+	6.4
<i>l</i> -aspartic acid	266.0	+	7.4
<i>l</i> -cystine	2.0	+	4.9
<i>l</i> -glutamic acid	234.0	+	5.7
glycine	1.5	+	5.3
<i>l</i> -isoleucine	7.5	-	4.7
<i>l</i> -leucine	1.0	-	5.0
<i>l</i> -lysine mono-hydrochloride	7.5	-	4.2
<i>l</i> -methionine	2.5	-	5.0
<i>l</i> -phenyl alanine	66.0	-	5.3
<i>l</i> -proline	106.0	+	5.1
<i>dl</i> -serine	0.0	-	5.7
<i>dl</i> -threonine	0.0	-	5.7
<i>dl</i> -tryptophan	6.8	+	4.7
<i>l</i> -tyrosine	0.0	-	5.7
<i>dl</i> -valine	8.5	-	5.0
glutamine	81.0	-	4.2
asparagine	189.0	+	5.1
pepton	298.0	+	4.9
KNO ₃	12.0	-	5.7
none-N	0.0	-	4.3

(培養開始時 pH 5.7)

(培養期間 40 日.)

も本菌の窒素源として優れている。之等は硝酸態窒素化合物を窒素源とした場合に比して遙かに良好な菌糸の生育を示した。

l-isoleucine, *l*-lysine mono-hydrochloride, *dl*-tryptophan, *dl*-valine は略 KNO₃ を窒素源とした場合に等しく、*dl*-alanine, *l*-cystine, glycine,

l-leucine, *l*-methionine では菌糸の発育は少い。又 *dl*-serine, *dl*-threonine, *l*-tyrosine では菌糸の発育は殆んど認められない。培養液の pH は *l*-aspartic acid, *l*-arginine monohydrochloride でアルカリ性に傾くが、他は pH の低下が認められた。孢子形成は *l*-arginine, *l*-cystine, *l*-aspartic acid に比較的多く、*l*-glutamic acid, glycine, *l*-proline, *dl*-tryptophan, asparagine で僅少なながら認められた。

第2図 各種アミノ酸、アミドに於ける馬鈴薯疫病菌の生育状況 (培養35日目)

4. 考 察

thiamine は馬鈴薯疫病菌発育の生長素として不可欠であり、この適量の存在の下に本菌は正常な発育を遂げるが、Payett 及び Perrault (1944)²⁾ は asparagine を窒素源とした合成培養液で thiamine 0.2 p.p.m. を最適量とし、又 Alex (1953)¹⁾ は 1.0 p.p.m. を使用している。本実験によると thiamine 0.1 p.p.m. (2 r 区) で最大菌糸生育量を示し、0.1~1.0 p.p.m. (20 r 区)

では菌糸の生育量は略等しく、之より高濃度になると菌糸の生育は少々減少する傾向を示す。尙 William (1939)¹³⁾ は寒天中に含まれる菌体發育の生長素に thiamine が存在することを明かにしたが、本実験でも菌接種の際に伴なわれた僅少の寒天中の thiamine が初期の菌糸の發育を可なり促進したように考えられる。

次に thiamine を添加した合成培養液に於ける本菌の窒素源の実験結果は、無機窒素化合物では硝酸態窒素が本菌の窒素源として良好であり、 NaNO_3 で最大生育量を示した。アムモニヤ態窒素を窒素源とした場合、本実験の培養期間では硝酸態を用いた場合に略々等しい菌糸生育量を示したが、培養の後半期には菌糸は異常形態を呈し、且つ培養液が褐色化して菌糸は自己消化の段階にあるように見える。之はアムモニヤ態窒素の不均等吸収により培養液の pH が低下し、本菌生育の酸性の限界を越すため發育が阻害された為と思われる。これよりみるとアムモニヤ態窒素は一見本菌の窒素源として不良のようであるが、その同化利用は硝酸態窒素より早く、もしこの様な培養液の酸性化防止を考慮するならばアムモニヤ態窒素は本菌の良き窒素源になると考えられる。田中、香月¹⁴⁾ は稲熱病菌で同様のことを報告している。亜硝酸態窒素は本菌の窒素源として不適当であるように考えられる。胞子の形成は硝酸態、アムモニヤ態の両窒素とした場合にも認められるがこの数は僅少である。

アミノ酸類、アミド類を本菌の窒素源としての価値はまちまちである。*l*-aspartic acid, *l*-glutamic acid, *l*-arginine monohydrochloride, asparagine は特に優秀な窒素源であり、且つ菌糸の發育は硝酸態窒素を窒素源とした場合に比し遙かに良好である。

Alten 及び Orth (1941)²⁾ は本菌の窒素源としてアミノ酸の中 arginine が本菌の胞子発芽を阻害することを報告しているが、本実験では同濃度の arginine でも菌糸の發育は良好であつて、之は菌の生態型によるものか、或は其他の条件によるかは不明である。次いで glutamine, *l*-phenyl alanine, *l*-proline では菌糸の生育は秀れている。しかし *l*-phenyl alanine は培養後期に菌体の異常、及び培養液の褐変を来し良好なる窒素源とはいえない。又 *dl*-tryptophan にも同様の現象が認められた。*dl*-alanine, *l*-cystine, glycine, *l*-isoleucine, *l*-leucine, *l*-methionine, *dl*-valine は略々 KNO_3 を窒素源とした場合と同程度の生育を示した。又 *l*-tyrosine, *dl*-serine では全く菌糸の發育が認められないが、之等は本培養液中に

於ける溶解度の小さい為である。

今菌体重量が KNO_3 を窒素源とした場合をこえるアミノ酸類及びアミド類を菌体重量の大きいものから順に示すと次の如くである。

- 1) pepton, 2) *l*-aspartic acid, 3) *l*-glutamic acid, 4) *l*-arginine monohydrochloride, 5) asparagine, 6) *l*-proline, 7) glutamine, 8) *l*-phenyl alanine, 9) KNO_3 .

之等の結果より総括的に考察すると、本菌の窒素源としてアミノ酸類、アミド類は無機窒素化合物に比し良好なるもの多く、且つ速かに同化利用される事が明かである。

5. 摘 要

1. 本実験は合成培養液を使用し、窒素源として種々の窒素化合物を用い、馬鈴薯疫病菌を培養し、本菌々糸の生育並に胞子形成に対する影響を調べた。
2. 合成培養液中に加えた thiamine は本菌々糸の生育を促進した。供試培養液中の本菌々糸の生育に対する thiamine の最適濃度は大体 0.1 p.p.m. である。
3. 無機窒素化合物では本菌の窒素源として硝酸態窒素が良好である。アムモニヤ態窒素も培養液の酸性化防止によつて、よき窒素源となるように考えられる。
4. アミノ酸、アミド類は本菌の窒素としては無機態窒素化合物より秀れ、特に *l*-aspartic acid, *l*-glutamic acid, *l*-arginine monohydrochloride, 及び asparagine は本菌の窒素源として優秀である。

(1955年1月7日受理)

文 献

- 1) Alten, F. and Orth, H.: Phytopath. Zeit., 13: 243~271. (1941).
- 2) French, A. M.: Phytopath., 43: 513~516. (1953).
- 3) Gäumann, E.: Principle of plant infection. (1950).
- 4) Hagenguth, K. and Griesinger, R.: Phytopath. Zeit., 13: 517~529. (1941).
- 5) Leonian, L. H. and Lilly, V. G.: Phytopath., 28: 531~548. (1938).
- 6) _____: Amer. Jour. Bot., 27: 18~26. (1940).
- 7) Lilly, V. G. and Barnett, H. L.: Physiology of the Fungi. (1951).
- 8) Newton, W. and Lopatecki, L. E.: Proc. Canad. Phytopath., 20: 20. (1953).
- 9) 大谷吉雄: 日植病報, 17: 9~15. (1952).
- 10) Payett, A. and Perrault: Canad. Jour. Res., Sect. 22: 127~132. (1944)

- 11) 酒井隆太郎：北海道農業試験場彙報, 68: 61~65. (1954).
 12) 田中正三：日植病報, 16: 103~106. (1952).

- 13) 富沢長次郎：日植病報, 17: 113~118. (1953).
 14) William, J. R.: Amer. Jour. Bot., 26: 772. (1939).

Résumé

It has been shown that *Phytophthora infestans* uses the nitrogen-containing fraction as its main source of energy, especially the amino-acid of the host tissues, and can not grow on a synthetic medium unless thiamine is added.

However the optimum amount of thiamine varies with the amount of sugar in the medium and with other conditions.

The present experiments were carried out to study the nitrogen sources of *Phytophthora infestans*, using synthetic culture solutions containing thiamine hydrochloride. The results obtained may be summarized as follows:

1. Optimum concentration of thiamine hydrochloride for this fungus is about 1 γ in 10 ml of culture solution.
2. Nitrate is a good nitrogen source for this fungus. Ammonium salt is not good, probably

because the fungus is not able to assimilate ammonium salt completely owing to the fall in pH of the medium which is resulted from the initial uptake of ammonia.

This fungus can not assimilate nitrite.

3. The various amino-acids and amides differ in value from each other as nitrogen source for this fungus.

Asparagine, *l*-aspartic acid, *l*-glutamic acid, *l*-arginine monohydrochloride are utilized more efficiently than nitrate.

The worth of glutamine, *l*-phenyl alanine, *l*-proline as nitrogen source is inferior to that of nitrate and *dl*-valine, *l*-isoleucine, *l*-lysine, *dl*-tryptophan, *l*-methionine, *l*-cystine, glycine and *l*-leucine are found inadequate for a nitrogen source.

第2回関東東山病虫害研究会講演会

昭和 30 年 2 月 10 日、茨城県土浦市で開催されたが、当日報告されたものの内、植物病理関係の題目を以下紹介する。

株腐敗病罹病期と麦の生態的一観察について 青柳寅雄 (群馬農試)

大麦白沢病及び銹病の薬剤防除 安正純・吉野正義 (埼玉農試)

大麦の黄枯病の被害軽減と栽培条件 安正純・吉野正義 (埼玉農試)

小麦の稈黒穂病の防除について 島田昌一・内田和馬 (茨城農試)

稲麴病の発生と肥料との関係 (予報) 吉野正義・安正純 (埼玉農試)

稲麴病菌々核の生存期間 山本勉・吉野正義 (埼玉農試)

キウリ炭疽病、露菌病の発生と気象との関係 本橋精一・横浜正彦 (東京農試)

落花生黒渋病並に黒斑病に対する水銀剤の効果に

ついて 二宮融・原田俊男・鍵渡徳次 (神奈川農試)

ナンキンマメ茎腐病の第一次伝染経路について 沼田巖 (千葉農試)

十字科ネギ根瘤病に対する昇汞の効果 本橋精一 (東京農試)

Pellicularia filamentosa の系統と亜硝酸生成 松浦義・高橋錦治 (茨城大農)

糸状菌と昆虫との関係について (Ⅲ) 青木清・中里泰夫・笹本馨 (蚕試)

黄変米菌の寄生部位に関する研究 三宅市郎・松濤誠道・若松秀行 (東京農大)

稲縞葉枯病の被害解析 安尾俊・山口富夫 (関東々山農試)

ミスト機散布による作物病害防除 安正純 (埼玉農試)

【特別講演】稲縞葉枯病とヒメトビウンカとの関係 新海昭 (農技研)