タバコ黒色根腐病菌 *Thielaviopsis basicola* (Berk. et Br.) Ferraris の培養上の2, 3の性質

山口 洋一*

Yoichi YAMAGUCHI: On some cultural characters of tobacco black root rot fungus, *Thielaviopsis basicola* (Berk. et Br.) Ferraris.

タバコ黒色根腐病については多くの報告がなされているが、その病原菌の栄養生理に関しては、Stover¹⁾の栄養と生長および厚膜孢子形成との関係について、Lilly ら²⁾の糖の影響についての報告があるにすぎない。培地上の適温については報告が多いが、それらは必ずしも一致せず、Gilbert³⁾は28~32°C, Johnes ら⁴⁾は28~30°C, Lucas⁵⁾は26°C, 中村⁶⁾は25~28°C, 大谷⁷⁾は20~24°Cであると述べている。培地のpHについての詳細な研究は今まで全くおこなわれていない。筆者は *T. basicola* の培地上の生長におよぼすN源、温度およびpHの影響を検討したのでその結果を報告する。

本研究をおこなうにあたって、御指導を賜わった当場病虫部長日高醇博士に感謝の意を表する。

実験材料と方法

合成培地およびジャガイモ煎汁培地を用いた。合成

培地の組成は次の如くである。蒸溜水 1l, K_2HPO_4 1g, KCl 0.5g, Mg SO_4 0.5g, $FeSO_4$ 0.01 g, thiamine hydrochloride

0.5 mg を基礎成分とし、N源は1gの asparagine monohydrate のN量と当量になるように加えた。C源には2%の sucrose または glucose を用い、固体培地にはさらに2%の寒天を加えた。培地のpHの

調整には1Nの HCl と NaOH とを用い、pH の測定は Beckman pH測定器によつた。培地の滅菌は酸度の高いものを除き、固体培地は加圧蒸気滅菌 (10 lb 15 分) を、その他は 98°C 20 分の間けつ滅菌をおこなつた。平面培養では径9cmのペトリ皿に20 ml の培地を入れ、液体培養では特に記すものを除き、100 ml の三角フラスコに20 ml の培地を入れた。供試菌株を26°Cで14日間ジャガイモ煎汁寒天で平面培養し、この集落を培地とともに径3mmの円盤に切り、接種源として用いた。固体培養では集落の直径を、液体培養では菌体乾燥重を測定して生長量とした。菌体乾燥重は、濾紙で濾別した菌体を稀塩酸で洗い、さらに蒸溜水で充分洗つた後80°Cで恒量になるまで乾燥して秤量した。

供試した *T. basicola* は、罹病したタバコの根から分離した当研究室保存の菌株であつて、そのうち No. 1, No. 11, No. 13 の3株を用い、一度タバコを

No. 1

No. 11

No. 13

Sucrose 加用ジャガイモ煎汁培地に10日間26°Cで培養したもの

第1図 供試菌株の集落

通して使用した。ジャガイモ煎汁寒天培地上の性質は次の如くである (第1図)。No. 1 の集落は灰黒色、表面粉状で扇状の白色変異を生じやすい。No. 11 は暗緑褐色で表面菌糸が多く、内生孢子の形成量が比較的少ない。No. 13 の集落は淡黒褐色である。各菌株

* 秦野たばこ試験場

の病原性は、汚染土壤に植えたタバコの根の罹病度と、タバコの数品種の幼茎に接種した菌の生長とからり No. 11 が他の 2 株よりも弱く、No. 1 と No. 13 は同程度であると考えられた。

実験結果と論議

1) 栄養条件と生長

平面培地上の生長：glucose を C 源とした合成培地を用い集落の生長におよぼす N 源の影響を調べた結果は第 1 表の如くである。

第 1 表 各種 N 源と *T. basicola* の生長および胞子形成量

N 源	集落の直径 (mm)		内生胞子形成量		厚膜胞子形成量	
	No. 11	No. 13	No. 11	No. 13	No. 11	No. 13
KNO ₃	生長せず	生長せず				
NaNO ₃	"	"				
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	"	"				
Mg(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	"	"				
NH ₄ Cl	23	29	+	++	+	卅
(NH ₄) ₂ SO ₄	30	32	±	+	+	卅
(NH ₄) ₂ HPO ₄	33	45	+	++	+	卅
(NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ ·H ₂ O	23	21	+	卅	+	+
(NH ₄) ₂ H·C ₆ H ₅ O ₇	44	64	+	卅	+	++
(CHOHCOONH ₄) ₂	41	56	+	卅	卅	+
dl-alanine	48	66	++	卅	++	++
l-leucine	53	71	+	++	++	±
l-aspartic acid	38	73	+	+	+	+
l-glutamic acid	52	57	++	卅	++	++
l-histidine · HCl·H ₂ O	43	79	+	卅	卅	+
l-arginine·HCl	31	43	+	++	卅	卅
asparagine	39	52	++	卅	卅	卅

備考：26°C で 7 日間培養

胞子形成量の符号は、卅：

極多，卅：多，++：相当量，+：少量，±：稀

T. basicola は NO₃-N を N 源としたときは全く生長しない。NH₄ の有機塩と無機塩とでは生長に大差はなかつたが、アミノ酸およびアミドと比較すると、菌糸の生長、胞子形成量ともに後者がすぐれている場合が多かつた。No. 13 の内生胞子量は (NH₄)₂SO₄、aspartic acid を N 源としたとき著しく少なく、asparagine を用いた培地では多かつた。alanine、glutamic acid および asparagine を用いたとき、No. 11 と No. 13 とのどちらも菌糸の生長と胞子形成量が大であつた。No. 11 の内生胞子形成は No. 13 とほぼ同じ傾向を示したが、形成量は少なく、(NH₄)₂SO₄ を N 源としたときはほとんど見出されなかつた。No. 11 の厚膜胞子はアミノ酸または asparagine を用いた培地に多い傾向を示し、NH₄-N では酒石酸塩

のほかは極めて少なかつた。No. 13 ではこの傾向が逆であつて、とくに NH₄ の無機塩では多量の胞子が観察された。No. 13 の場合にはシュウ酸アンモニウム、aspartic acid および histidine では厚膜胞子が少なく、leucine ではほとんど認められなかつた。以上の結果から alanine、glutamic acid および asparagine がすぐれた N 源であり、また N 源が胞子形成におよぼす影響は、胞子の種類および菌株によって異なつていと考えられる。また厚膜胞子の着色は No. 11 がよく、No. 13 は淡色であつた。NH₄ の無機

塩を N 源としたとき NO. 11 の菌糸が異常を示した。これは Stover⁹⁾ も土壤寒天培地で胞子から伸びた菌糸に認めている。No. 13 ではこのような異常は認められなかつた(第 2 図)。Stover によると、*T. basicola* は glucose 加用ジャガイモ煎汁寒天培地上の形質で褐色型と灰色型にわけられ⁹⁾、これらは生長や厚膜胞子形成におよぼす N 源の影響をも異にすると述べたが¹⁰⁾、本実験に用いた褐色型と思われる 2 菌株の間には胞子形成におよぼす N 源の影響に差が認められた。sucrose または glucose 加用ジャガイモ煎汁寒天培地上では、No. 13 はほとんど扇状の白色変異を生じないが、アミノ酸を N 源

とした合成培地上では発生が多かつた。これからみれば、この変異の出現に栄養条件も関与することが想像される。集落の色は No. 11 は olive brown から olive green を示すものが多く、No. 13 はこれよりも灰褐色がかつていた。

液体培地における生長：用いた培地の組成は第 2 表の如くである。これらの培地を 200 ml の三角フラスコに 100 ml ずつ入れ、No. 11 を接種源とし 26°C で 20 日間培養した。結果は第 3 表に示す。asparagine を N 源とした合成培地に CaCO₃ を加用したとき最もよく生長した。培地に CaCO₃ または Na₂HPO₄ を加えると、pH はアルカリ側に変化し、菌体乾燥量が増加した。しかしこの pH の変化の大きさは N 源に

よつて異なり, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ では 0.39, asparagine では 0.26, aspartic acid では 0.15 であった。菌

第2図 No. 11 の菌糸

A: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ をN源とした合成培地で生長の初期に認められた異常菌糸
B: sucrose 加用ジャガイモ煎汁寒天培地で生長した正常な菌糸

第2表 実験に用いた液体培地のN源の種類および CaCO_3 , Na_2HPO_4 との組合せ

培地 種類の	N 源				その他の成分	
	asparagine monohydrate	aspartic acid	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	CaCO_3	Na_2HPO_4
a-1	+					
a-2	+				+	
a-3	+				+	+
b-1		+				
b-2		+			+	
c-1			+			
c-2			+		+	
c-3			+		+	+
c-4			+			+
d-1				+		
d-2				+	+	
p-s	sucrose 加用ジャガイモ煎汁					
p-g	glucose 加用ジャガイモ煎汁					

備考: a~b の培地の基礎成分は実験法の項に記した。

C源は2%量の glucose である。 CaCO_3 と Na_2HPO_4 との濃度はいずれも 1g/l である。

体重の増加はそれぞれ 80 %, 42 % および 61 % であつて, その増加は必ずしも pH 値の上昇によるもので

はないようである。glucose 加用ジャガイモ煎汁培

第3表 N源を異にした液体培地に 20 日間培養した No. 11 の菌体乾燥重

培地の種類	接種前の pH	培養後の pH	菌体乾燥重
a-1	7.02	4.63	575 mg
a-2	7.28	6.61	814
a-3	7.40	6.34	743
b-1	7.29	5.59	419
b-2	7.44	5.95	676
c-1	6.94	3.67	187
c-2	7.33	6.42	336
c-3	7.61	6.55	292
c-4	7.12	3.40	234
d-1	7.00	—	—
b-2	7.05	—	—
p-s	6.71	4.41	333
p-g	6.53	4.20	267

— は生長を全く認めなかつたもの, 培養温度は 26°C

地に CaCO_3 を加えたものの pH の経時変化は CaCO_3 を加えないものよりも常に小さく, また asparagine をN源とし CaCO_3 を加えたときの pH の経時変化の幅が小さいことが認められた (第3図)。Steinberg⁵⁾ の記したように Ca に微量元素としての役目もあるかもしれないが, 菌体重の増加の理由の一部は, CaCO_3 によつて pH の酸性側への変動が少なく

り, 好適な pH に保たれるためであると思われる。Stover¹⁰⁾ は $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ をN源としたとき Na_2HPO_4 加用により, またはN源に $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ を用いることによつて, 合成培地に緩衝能を与えると菌体重が増加すると述べた。本実験でも Na_2HPO_4 加用の培地では菌体重が増加したが, 培養中の pH の変化がかなり大きいので, この増加が緩衝作用による

ものであるとは考えられない。

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ をN源とすると, No. 11 は固体

培地ではかなりよく生長したが、液体培地では生長し 関係: No. 11 を用いた実験結果を第4表と第4図と

第3図 No. 13 の生長と培地の pH の変化

実線は pH, 破線は菌体乾燥重, 培養温度は 26°C 図中例えば pH 7 が示す破線は接種時の pH が 7 の合成培地 (N源は asparagine, CaCO₃ 加用) における菌体乾燥重を表す。Pg は glucose 加用ジャガイモ煎汁培地, Pg+Ca は CaCO₃ 加用培地である。

なかつた。この原因については明らかでない。(NH₄)₂SO₄ を N源とした合成培地に CaCO₃ と Na₂HPO₄ とを同時に加用したとき、菌体重は Na₂HPO₄ の単用よりも多かつたが、CaCO₃ の単用よりも少なかつた。培地の pH は培養によつていずれも酸性側に变化したが、生長量の多いものほど培養のはじめと終りとの差が少なかつた。

2) 培養条件と生長

平面培養における温度および培地の pH と生長と

第4表 平面培養における No. 11 の生長と温度および pH との関係

pH \ 温度	18°C	20°C	22°C	24°C	26°C	28°C	30°C	32°C
5.0	28mm	30mm	33mm	30mm	27mm	8mm	3mm	3mm
5.5	24	24	26	37	32	20		
6.0	24	26	28	35	33	16	4	4
6.5	29		33	33	38	26		4
7.0	24		26	37	38	12		4
7.5			31	29	28	10	4	5

pH \ 温度	8°C	10°C	12°C	16°C
5.5	3mm	3mm	6mm	19mm
6.5	3	4	6	24
8.5	3	4	4	17

備考: 測定値は集落の平均直径である。測定は接種後6日目におこなつた。

に示した。菌糸は 18°C~26°C の間でよい生長を示したが、その範囲では 18°C~20°C がやや劣っていた。28°C では急に生長が悪くなり、30°C および 32°C では極めて悪かつた。37°C に6日間保つたときは死滅した。また 8°C では生存するが生長は全く認められなかつた。接種したとき pH 5.0 ないし pH 7.0 では集落の状態が大きく異なることはなかつたが、アルカリ性の培地では、pH 値が増すに従つて集落がうすくなり、色も暗緑褐色から白色へ変化する傾向を示した。以上のことから No. 11 が生長し得る温度範囲は 8°C~10°C と 32°C の間であると思われる。本実験の結果は菌糸の生長には、pH よりも温度の影響が大きいことを示しているが、最適温度は pH 5.5~7.0 の間では 26°C, pH 5.0 と pH 7.5 では 22°C であつた。

培地の pH と培養温度が内生胞

子形成におよぼす影響をするために、次の方法によつて胞子数を算出した。各 pH および温度で 12 日間平面培養した集落の表面を白金線てこすりとり、殺菌水で十分に洗い、その洗液を 4 重にしたガーゼで濾過した。濾液から遠心分離した胞子を一定量の殺菌水に懸濁し、血球計算板で胞子数を測定した。20 回の測定をおこない、その胞子数を同一面積の集落に換算し第5表に示した。内生胞子の形成に対する温度と pH の影響がみとめられる。

なお No. 1, No. 11 および No. 13 の3菌株の平面培養における生長を比較した結果を要約すると、各温度とも No. 11 は最も劣り、No. 1 と No. 13 は各 pH ともほぼ同程度の生長を示したが、高温では No. 1 が、低温では No. 13 が僅かにすぐれていた。

液体培養における温度および pH と生長との関係: sucrose 加用ジャガイモ煎汁培地で No. 11

を 20 日間培養した結果を第 6 表に示した。菌体乾燥 重によつては後期にアルカリ 側に変化することがある。

第 4 図 平面培養における温度および pH と No. 11 の生長との関係 (使用した培地は sucrose 加用ジャガイモ煎汁寒天培地である)

重は平面培養における集落の直径に比較すれば、温度の影響が大きく、また温度が高いほど培養の始めと終りとの pH の差が大きくなつてた。

液体培地で培養中の pH の経時変化は、第 3 図と第 5 図に示したが、はじめは酸性側に変化し、温度に

No. 11 では 8°C から 26°C までの間では温度が高いほど pH の変化は大きい。また培地の種類によつて pH の変化型は異なり、合成培地では少なく、ジャガイモ煎汁培地では大きく変化した。pH 値の酸性側への変化は菌の生長の最も盛んな時期に起りはじめ、菌体乾燥重の増加が頂点に近づく頃に上昇することが多かつた。また培養液の色が培養の経過に従つて、暗褐色を帯びることが観察された。

培地の pH の実験に緩衝液を加えることはすでに報告されている^{4,5,11}。筆者も 3/50 M クエン酸および 6/50 M 第 2 燐酸ソーダによる緩衝液を用いたが、比較的高いイオン濃度を必要とするためか菌の生長が悪かつた。

摘 要

Thielaviopsis basicola の 3 菌株を用い、in vitro における菌糸の生長と胞子形成におよぼす栄養、温度および pH の影響を研究した。

1. *T. basicola* は NO_3^- N を N 源とするときは全く生長しないが、 NH_4^+ N

ではかなりよく生長する。アミノ酸の多くは N 源としてすぐれていた。菌糸の生長量と胞子形成量とからみれば、供試した N 源のうち alanine, glutamic acid および asparagine が最もすぐれた N 源であると思われる。

第5表 温度とpHとを異にした平面培養における No.11 の内生孢子形成量の比較

温度 \ pH	5.0	5.5	6.0
18°C	16%	26%	21%
20	—	45	59
22	14	38	72
24	44	60	100

24°C pH6.0 の区の孢子量を 100%とする

第6表 sucrose 加用ジャガイモ煎汁培地における No.11 の生長

培養温度	12°C		26°C			28°C
培地の接種前	3.64	6.64	3.64	6.64	7.89	6.64
pH 培養後	3.67	5.49	3.52	5.26	5.15	5.10
菌体乾燥重	30mg	52mg	39mg	244mg	168mg	66mg

第5図 培地の pH の経時変化と温度との関係
供試菌株は No.11, sucrose 加用ジャガイモ煎汁培地を使用した。

2. N源が孢子形成におよぼす影響は、菌株によって異なり、No.13 は NH_4 の無機塩をN源とするとき多量の厚膜孢子を形成するが、No.11 では少なく、histidine では逆の結果を示した。また leucine ではNo.11 は相当量の厚膜孢子を形成したが、No.13 はほとんど形成しなかつた。N源の影響は孢子の種類によっても異なり、No.13 では NH_4 の無機塩をN源とするとき厚膜孢子が多く内生孢子が少なかつたが、有機塩では逆であつた。

3. 液体培地に Na_2HPO_4 または CaCO_3 を加えるといずれも生長量を増加した。両者を併用すると生長量は、 Na_2HPO_4 の単用よりも増加したが、 CaCO_3 の単用よりも減少した。合成培地のN源に $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ を用いたとき、固体培地ではかなりよく生長したが、液体培地では全く生長しなかつた。

4. No.11 の生長の最低温度は $8\sim 10^\circ\text{C}$ 、最高は 32°C と思われる。最適温度は固体培地では pH 5.5 $\sim$ 7.0 のとき 26°C 、pH5.0 または pH 7.5 のとき 22°C であるが、pH 5.0 $\sim$ 7.0 で $18\sim 26^\circ\text{C}$ の範囲ではかなりよく生長する。菌糸の生長には pH よりも温度の影響が大きい、内生孢子形成には pH の影響も大きいようである。

5. pH は培養の始めに酸性側に変化し、後期にアルカリ側に変化することが多い。変化は培地によって異なり、その幅は 8°C から 26°C までの温度では温度の高い方が著しい。

(1957 年 10 月 30 日受理)

引用文献

- 1) Gilbert, W. W. : U. S. Dept. Agr. Bur. Plant Ind. Bull., 158. (1909).
- 2) Johnes, L. R., Johnson, J. and J. G. Dickson: Agr. Exp. Univ. Wisconsin, Res. Bull., 71:40~48. (1926).
- 3) Lily, V. G. and H. L. Barnett: West Virginia Univ. Agr. Expt. Sta. Bull. 362T. (1953).
- 4) Lucas, G. B. : Mycologia, 47: 793~798. (1955).
- 5) Mader, E. O. and M. M. Teller: Phytopath., 37: 15. (1947).
- 6) 中村寿夫: 秦野試報, 933: 1~51. (1934).
- 7) 大谷快夫: 葉タバコ研究, 10: 66~70. (1956).
- 8) Steinberg, R. A. : Science, 107. (1948).
- 9) Stover, R. H. : Canad. J. Res., C. 28: 445~470. (1950).
- 10) Stover, R. H. : Canad. J. Bot., 34: 459~472. (1956).
- 11) White, A. G. C., R. H. Steele and W. A. Pierce, Jr. : J. Bact., 70: 82~86. (1955).

Summary

The effects of nitrogen source, temperature and pH upon growth and spore formation of *Thielaviopsis basicola* in culture were studied. Three isolates from diseased tobacco roots, different in cultural characters, namely No. 1, No. 11 and No. 13, were used, throughout the experiment.

None of the three isolates used did utilize nitrate as nitrogen source. Asparagine and amino acids tested had a better effect on the mycelial growth than ammonium salts. Formation of chlamydospores and endoconidia of the fungus was influenced greatly by the nitrogen source. For example, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ blocked endoconidial formation of No. 11 and 1-leucine blocked chlamydospore formation of No. 13. When inorganic salts were used, No. 13 produced many chlamydospores and few endoconidia, but organic ammonium salts affected the spore formation in the reverse. Among the compounds tested, D,L-alanine, glutamic acid and asparagine were considered to be the best nitrogen sources. CaCO_3 and Na_2HPO_4 increased the mycelial weight in liquid culture,

but the latter had apparently antagonistic effect on the former.

The growth in plate cultures was good at 18–26°C. The optimum temperature for mycelial development of No. 11 was 26°C at pH 5.5–7.0, and 22°C at pH 5.0 and 7.5. Growth rate of the mycelium decreased rapidly at 28°C., and at 30°C and 32°C it became very slow; at 8°C the mycelium could not develop. At 37°C the fungus was unable to survive.

Although pH of solid medium affected the mycelial growth less than temperature, endoconidial formation was controlled by pH as well as temperature. It was often observed that pH of liquid media changed towards the acid side at first and then towards the alkaline side, which was accompanied by an increase of mycelial weight. The variation of pH was greater in liquid potato media than in synthetic media used, and when culturing temperature was between 8–26°C, variation was increasing with the temperature.

(Hatano Tobacco Experiment Station)

文 献 紹 介

Bisdithiocarbamate の殺菌機構

Ludwig, R. A., G. D. Thorn and C. H. Unwin: Studies on the mechanism of fungicidal action of metallic ethylenedisbisdithiocarbamates.

Canad. J. Bot., 33 (1): 42–59. (1955).

前報では nabam の通気による E. T. M. の生成について述べ、これが殺菌機構を考える上に都合であることを示唆したが、通常圃場では亜鉛、マンガン、又は鉄塩に変えて用いられているので今回はこれらについての研究を行った。先ず硫酸亜鉛、硫酸マンガン、硫酸鉄と nabam の滴定反応を調べた。反応の推移を追求するためには光電分光光度計を使用した。その結果マンガンとの反応の場合を除き沈澱物は単一ではないことを示した。次に ethylenedisbisdithiocarbamic acid の3つの重金属塩の通気による影響を検討した。亜鉛塩 (zineb) は水に極めて難溶でこの水懸濁液は何等の変化を示さなかったが稀アルカリ (NaOH) に懸濁させると急に特性的な nabam の吸収スペクトルがあらわれた。これを通気すると E. T. M. の山に変化することがみられ、*Monilinia fructicola* による発芽試験と汙液の Chloroform 抽出によつて得た結晶の確認によつて E. T. M. の生成が明らかになった。マンガン塩 (maneb) の水溶液は直ちに nabam の吸収スペクトルを示した。通気によつて E. T. M. の山に入れかわり、この試料からも E. T. M. の結

晶を得た。第二鉄塩の場合は nabam の山は存在しなかつたけれども通気によつて E. T. M. の山を確認し、Chloroform 抽出によつて黄色物質を得たが同定はしていない。汙液の ED 50 (0.09 ppm 以下) は E. T. M. 以外の殺菌物質の存在を示唆した。硫酸第一鉄でも E. T. M. の山を生じた。この中で ethylenedisbisdithiocarbamic acid の重金属塩の通気によつて生じた E. T. M. の含量 (紫外線吸収スペクトルによる) は屢々生物検定からの推定量より低く、金属が E. T. M. の殺菌効果に影響すると思われたので E. T. M. を稀水酸化亜鉛に懸濁させたところ少量の亜鉛の存在によつて効果の増すことが明らかになり、鉄の場合も同様であつた。又 E. T. M. の Chloroform 溶液に無水硫酸第二鉄を加えて3日間烈しくかきまぜ、その汙液を濃縮して紫外線吸収スペクトルを調べた結果、或種の isothiocyanate の特性帯が認められ、硫酸亜鉛との混合でも同様な結果を得た。

以上の事実を考察して maneb と zineb はその母体である nabam が通気によつて E. T. M. を生ずると同じ様式で殺菌力を発現し、重金属塩は散布後の持続性を増すのに有利で、更に dithiocarbamate 自身からと同様に E. T. M. から一層強い殺菌力をもつ isothiocyanate の形成 (Van der Kerk らの持説) を促進するのであろうと結論した。

(中村広明)