

ウリ類たんそ病菌分生胞子の形成ならびに 胞子内の脂肪と炭水化物含量について

安 盛 博 (植物病学研究室)

Hiroshi YASUMORI

Studies on Some Factors affecting Conidial Formation and Fat and Carbohydrate Content in Conidia of *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ell. et Halst.

緒 言

分生胞子の形成に関する知見は、胞子を用いて行なう種々の実験に必須的なものであり、病原菌の伝播や発病に関する機構解明の基礎となるものと考えられる。*Glomerella* 属菌の系統と子のう胞子形成の関係については古く EDGERTON³⁾ により、またチャのたんそ病菌分生胞子形成に関しては永田⁶⁾、安部らの報告があるが、ウリ類たんそ病菌の分生胞子形成条件あるいはその生理的機構などについて報告されたものはほとんど見当たらない。そこで筆者はウリ類たんそ病菌のうち、従来用いていた菌系 (104-55) と、これから分系したきわめて胞子を形成しやすい菌系 (104-T) と、ほとんど胞子を形成し難い系統 (104-42) の3系につき胞子形成条件を比較した。また胞子形成時の生理的機構究明の一端として、胞子内貯蔵物質の菌糸からの移動をみるため、菌糸および胞子中の脂肪および炭水化物含量を測定し、さらに胞子形成後、胞子中のこれら物質の時間的経過による消長をしらべたので報告する。

稿を草するにあたり終始御指導いただいた山本昌木教授に対し厚く感謝の意を表する。

実験材料および方法

供試菌はウリ類たんそ病菌 *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ell. et Halst., 104-T, 104-55, 104-42の3系で、ジャガイモ煎汁寒天培地に10~15日培養したものをを用いた。胞子形成状態の観察にはトウモロコシ種子、乾アズ果実、ジャガイモ塊茎、麦芽、しょう油+タマネギりん茎、キウリ果汁、リチャーズ合成培地およびこれに粉末乾燥酵母エキス2%を含有せしめたものを使用した。

菌体中の脂肪含量測定には104-Tおよび42の両系を用い、酵母含有リチャーズ液体培地に26°Cで培養し、

一定期間毎に取出し、菌糸は充分水洗し、その洗液は遠心分離して胞子を集め、両者を乾燥秤量した。乾燥菌体は粉末とし一定量 (菌糸では0.5~1.0g, 胞子は0.1~0.4g) を200ccの三角フラスコにとり、96%アルコール40cc, および33% KOH 10ccを加えて逆流冷却器をつけ、湯煎中で30分間はげしく沸騰させて脂肪をけん化し、27% HCl で酸性とし、遊離した脂肪酸を正確に秤取した50ccの石油エーテル (B.P. 40~60°C) に移行させた。静置して完全に石油エーテル層から10ccを取り、フラスコ中でエーテルを徐々に蒸発させた。蒸発後、残留物に中性エチルアルコール約10ccを加え、N/20NaOH⁷⁾ で滴定し、この値から脂肪含有率 (%) を算出した。ただし油分の平均分子量は不明なので便宜上、大豆油の292を計算にあてた。したがって本菌の油分としての絶対量は算出されていないが、本菌脂肪の構成炭素数の平均は大豆油に近いと考えられ (ペーパークロマトの結果)、また実験区の比較にはこの数値は常数となるので差支えないものと考えられる。

脂肪酸の種類を検討するために、別に用意した上記エーテル残留物を再び少量の石油炭化水素 (自動車用ガソリンを分留, B.P. 140~170°C のものを集め、これを濃硫酸、アルカリ、水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水、再蒸留したもの、以下同じ) に溶解し、石油炭化水素を固定層とし、メタノール-石油炭化水素 (4:1) を展開剤とした逆相ペーパークロマトグラフ法により脂肪酸を展開し (30~33°C) 0.2%でプロム・クレゾールグリーン-アルコール溶液を指示薬として発色させた⁴⁾。菌体中炭水化物の定量は Lehmann-Maquenne-schoorl 法によった。

キウリ葉のたんそ病病部、健全部中の脂肪含量測定には104-T菌を7~10日間培養し、形成された胞子をキウリ葉 (圃場で栽培、播種後66日目の成葉) に噴霧接種し、病斑の大きさが約1.5cm になった頃 (12日後) に

採取，病斑部と健全部に分け乾燥，粉碎後，1gを採取し，菌体の場合と同じ操作により脂肪含有率を求めた。

実験結果

A) 胞子形成に及ぼす培地栄養物質の影響

1. 各種培地上における分生胞子の形成

3系統菌をトウモロコシ種子(100g/l)寒天培地，リチャーズ合成培地，およびこれに粉末乾燥酵母エキス2%を含有せしめた培地に培養し，胞子の形成状態を観察した結果は第1表のとおりである。

第1表 ウリ類たんそ病菌3系の培地上での胞子形成

菌系番号	トウモロコシ寒天	リチャーズ寒天(酵母エキス2%)	リチャーズ寒天
104-T	+++	+++	++
104-55	+	-	-
104-42	-	-	-

+++ : 斜面の全面に胞子形成
 ++ : 全面に作るが形成量は多くない
 + : 胞子ついは点状に散在
 - : 胞子形成なし

104-T はいずれの培地上でもよく胞子を形成し，培地上はほとんど胞子でおおわれていたが，粉末乾燥酵母エキスを含まないリチャーズ合成培地上ではややすくなかった。104-55 ではトウモロコシ種子寒天培地上のみ胞子を形成し，その他では形成されなかった。胞子形成状態はさけ肉色の胞子塊が点在して認められた。104-42ではどの培地上でも胞子が形成されなかった。104-55ではこの他種々の培地上で胞子形成を観察したが(第2表)，ほとんど形成は認められなかった。

第2表 各種培地におけるウリ類たんそ病菌(104-55)の発育と胞子形成

培地の種類	菌そう発育状態	胞子形成
乾アズ(15g/l)	白色，後黒色	-
ジャガイモ塊茎(300g/l)	"	-
しょ糖 1%添加	"	-
ぶとう糖 1%添加	"	-
しょう油5%+しょ糖1%	さけ肉色，空中菌糸白	±
しょう油5%+タマネギ煎汁	"，しわ状	±
麦芽(20g/l)	白色，後黒色	-
キウリ葉煎汁	黒色，周辺さけ肉色	-
キウリ葉搾汁(無菌ろ過)	" "	-
リチャーズ，N源をペプトン(1g/l)	さけ肉色，しわ状	-
" "(2g/l)	" "	±

- : 胞子形成せず ± : 黒色菌糸塊散在，まれにわずかに形成

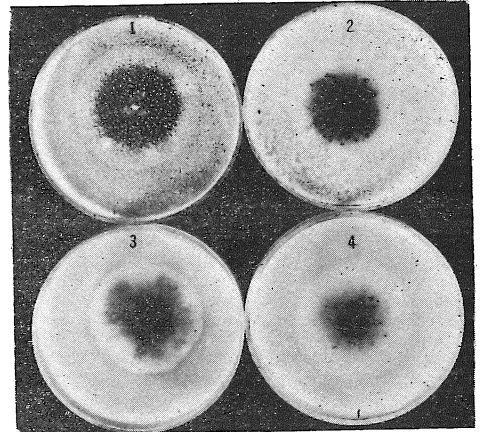
2. 胞子形成に及ぼす培地中トウモロコシ種子の影響

104-55 ではトウモロコシ種子培地上のみで胞子を形成したのでトウモロコシの濃度と胞子形成の関係を検討した。第3表および第1図の結果からトウモロコシ種子は100g/l以上培地に含まれることがこの系統の胞子形成には必要な条件と考えられる。100g/lでろ過した場合および75g/lでは黒色の菌糸塊が多く認められるが胞子はほとんど認められなかった。

第3表 ウリ類たんそ病菌分生胞子形成に及ぼす培地トウモロコシの影響

トウモロコシ濃度 (g/l)	胞子形成
100 (ろ過せず寒天を加え固体培養)	+
100 (ろ過後寒天を加え固体培養)	±
75 (ろ過せず)	±
50 (")	-
25 (")	-

+, - : 第1表参照 ± : きわめてわずかに形成



第1図 ウリ類たんそ病菌分生胞子形成に及ぼすトウモロコシ種子の影響

1. 100g/l (ろ過せず) 2. 75g/l
 3. 50g/l 4. 25g/l

3. トウモロコシ種子の保存期間と胞子形成

トウモロコシ種子入手後，期間を経て使用するとき胞子形成が悪くなることがあるので，104-55を用いて1955~1958年間に入手したトウモロコシ種子(紙袋に入れ室内に放置)を用い，これによる胞子形成状態をしらべたところ，第4表のような結果を得た。

この結果によれば1~2年間経過したトウモロコシ種子を培地に使用すると胞子の形成はきめて悪くなることを示した。しかしトウモロコシ種子の種類，および産地によって胞子形成量は必ずしも一定しないようである。

第4表 トウモロコシ種子の保存期間とウリ類たんそ病菌分生孢子形成

試験年度	A (市販・粉末)	B (市販)	C (島根農大三瓶農場)
1955	+	+	
1956	-	+	
1957		±	+
1958		-	+

+ , ± , - : 第1, 2表参照

4. トウモロコシ種子寒天培地作成後の保存期間と孢子形成

トウモロコシ種子の培地を作成し、長く放置すると菌糸は発育しても孢子はしだいに形成し難くなる。培地作成後の放置期間と孢子形成の関係を明らかにするため、試験管に斜面培地としたものを室内に放置し、3~5日ごとに菌を植付けて孢子の形成状態を観察した結果を第5表に示した。

第5表 トウモロコシ種子培地作成後の放置期間と孢子形成状態

放置期間(日)	5	10	15	18	21	24	27	30	33
孢子形成	+	+	+	+	+	+	±	-	-

この結果から1カ月以上培地を放置すると孢子を形成しなくなるものと思われた。

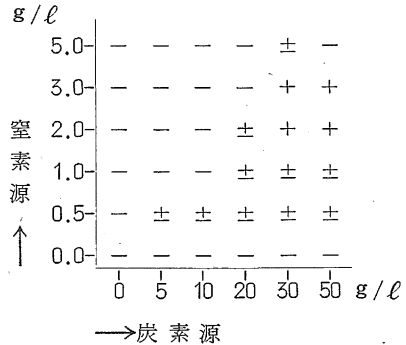
第6表 液体培地におけるウリ類たんそ病菌菌糸の発育と孢子形成量

菌糸番号	培地種類	菌糸・孢子重量	培養日数(日)						
			5	7	10	15	20	25	30
104-T	リチャーズ合成培地 (乾燥酵母 2%)	菌糸重 ※※※	67.5	93.6	102.3	87.9	87.6	90.0	91.3
		孢子重 ※※※(+)	13.0	39.8	22.1	26.8	27.7	9.2	
		総菌体重 ※※※	67.5	106.6	142.1	100.0	114.4	117.7	100.5
	リチャーズ合成培地 (乾燥酵母含まず)	菌糸重	10.0	16.5	58.8	110.0	115.5	110.2	101.0
		孢子重	0	0	1.7	15.3	3.0	5.3	3.7
		総菌体重	10.0	16.5	60.5	125.3	118.5	115.5	104.7
104-42	(乾燥酵母 含有)	菌糸重	24.8	—	51.5	57.6	135.4	119.3	—
	(" 含有せず)	菌糸重	8.3	—	38.5	89.1	134.1	136.8	—

※ フラスコ 1コ当り mg
 ※※ きわめてわずかであつたので定量しなかつた。
 ※※※ 孢子重mg
 総菌体重mg — 孢子量

5. 培地の炭素源、および窒素源の割合と孢子形成

トウモロコシ種子培地はウリ類たんそ病菌 104-55の孢子形成に特殊な効果があるように思われたが、トウモロコシ種子を含まない合成培地上でもきわめてわずかに孢子を形成する場合があります。培地中の栄養物質の割合によるものではないかと思われたので、リチャーズ寒天合成培地の炭素源にはぶどう糖、窒素源にはペプトンを用い、これらの濃度を第2図のように組合せて実験区を設けた。



第2図 合成培地中の炭素源・窒素源の割合とウリ類たんそ病菌分生孢子の形成

+ : わずかに形成(第1図, 2の程度) ± : ごくまれに形成

この結果が示すようにペプトン2.0~3.0g、ぶどう糖30~50g/lの範囲ではわずかながら孢子が形成されるものと思われた。

6. 液体培地における菌糸の発育と孢子形成量

寒天培地上では孢子形成量を定量的に測定し難く、また菌体を生理実験に使用するには不適當である。このため菌糸を液体培地に培養し、菌糸と孢子を別々に分けて測定できれば種々の実験に使用することが可能と考えられる。この点を検討するため、リチャーズ合成培地およびこの培地に粉末乾燥酵母エキスを含有した液体培地に104-Tおよび-42を植え付け、菌体重およ

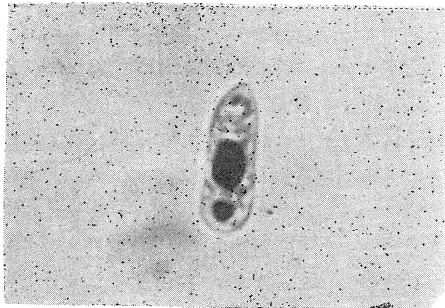
び胞子重を測定し、培養日数による胞子量の変化をしらべた。1回の実験に1区当り7~20コのフラスコを用いた。結果は第6表に示した。

104-Tでは酵母エキスを含有した培地で発育はきわめて盛んで、10日目には菌体重が最高となり、以後減少して一定値となった。胞子の形成も盛んで10日目には総菌体重の約30%に達し、その後25日目まではほぼ一定値であったが30日目には胞子重量が急激に減少した。酵母エキスを含まない場合は菌糸の発育がやや悪く、15日目で最高であり、胞子の形成量は悪く15日目の最高でも酵母含有培地の約半量であった。104-42では全く胞子を形成せず、また菌糸の発育もおそく20日目でようやく最高に達した。しかしこの時の菌体重量は104-Tとほぼ同じであり、粉末乾燥酵母エキスの発育に及ぼす影響は発育初期をのぞいてほとんど認められなかった。

B) 胞子形成と菌体中脂肪および炭水化物含量

1. 成熟に伴う胞子中脂肪含量の変化

たんそ病菌分生胞子中には眼点が認められ、これをズダンIIIで染色すると明瞭に着色され、成分は脂肪であることがわかる(第3図)。このように胞子中には多量の



第3図 ウリ類たんそ病菌分生胞子油滴のズダンIIIによる染色(黒い部分が染着部)

脂肪が含まれることに着目し、また前述のように胞子を菌糸とわけて大量に秤量し得ることがわかったので、酵母含有リチャーズ液体培地を用い、成熟に伴う胞子中の脂肪含量の変化を測定した。結果を第7表に示した。

胞子形成初期においては脂肪含量はきわめて多く、15

第7表 ウリ類たんそ病菌分生胞子中の脂肪含量

培養日数	脂肪含有率(%)
7	49.2
10	49.3
15	34.1
20	31.2
25	31.7
30	23.3

~25日間ではこれより減じほぼ一定値となった。30日目には初期の約半量に減少した。

2. 菌糸中の脂肪含量

胞子中の脂肪はなんらかの形で菌糸中から移動したものと考えられるので、胞子を形成する菌糸と、形成しない菌糸間の菌糸中脂肪含量を測定比較した結果を第8表に示した。104-Tでは胞子も含めた総菌体中脂肪含有率も表示した。

第8表 ウリ類たんそ病菌菌糸中の脂肪含量

培養日数	脂肪含有率(%)		
	104-T菌糸	104-T菌糸+胞子	104-42菌糸
5	18.5	18.5	—
7	25.2	28.1	—
10	26.6	33.0	4.7
15	22.7	25.2	21.9
20	15.1	18.8	23.1
25	11.4	16.2	18.7
30	11.1	12.2	19.0

菌糸中の脂肪含量は発育初期には少ないが、発育と共に多くなり104-T、104-42では10日目、20日目にそれぞれ最高値に達した。その値は104-Tで3.5%大きかったが、胞子を含めた全菌体中の脂肪は胞子を形成しない104-42の菌糸に比べ約10%多い33.0%に達した。

3. 菌体内脂肪酸の種類

さきに用いた脂肪加水分解物中の脂肪酸を逆層ペーパークロマトグラフにより検索した。第9表に示すように、104-T菌糸および胞子中にある第2、第3の発色

第9表 ウリ類たんそ病菌の菌体内脂肪酸の逆層ペーパークロマトグラフィー

発色班番号	Rf		
	104-42菌糸	104-T菌糸	104-T胞子
1	60~67	66~70	?
2	45~49	51~58	54~58
3	18~21	21~25	26

班は104-42に比べRfが若干大きかった。104-Tの菌糸、胞子中では脂肪酸の種類には大差ないように思われるが、第1の発色班がきわめて不明瞭であった。また104-42で第1の発色班、104-Tでは第2の発色班が他に比べやや濃色にあらわれた。

4. キウリ葉中の脂肪含量

キウリ葉り病部には多くの胞子が形成されるが、この部分に脂肪物質が集積して菌に利用される場合も考えら

れるので、葉中脂肪含量を健全部と比較測定した。第10表に示すように病部と健全部で大差はなく、病部で

第10表 ウリ類たんそ病菌によるキウリ葉の病部および健全部の脂肪含量

測定部位	脂肪含量 (%)
り病部	4.11
健全部	4.67

わずかに少ないが有意性についてはなお検討を要すると思われた。

5. 菌体中炭水化物含量

胞子が形成されるためには菌糸より胞子中に貯蔵物質が十分送り込まねばならないと考えられる。上述のようにウリ類たんそ病菌分生胞子では脂肪が重要な役割をはたしていると思われるが、他の炭素源である炭水化物含量についても菌糸および胞子で比較検討した。104-Tをリチャーズ合成培地(粉末乾燥酵母エキス2%を含む)に培養し、胞子と菌糸を分け、25% HClで2.5時間加水分解し、それぞれの全糖量を求め、また検体を40°C、1時間、水で抽出し、可溶性糖量を測定した。結果は第11表に示した。

第11表 ウリ類たんそ病菌菌体中の炭水化物含量

糖の種類	胞子			菌糸		
	7日	15日	30日	7日	15日	30日
全糖 (%)	18.2	17.0	35.0	19.9	23.7	25.0
不溶性糖 (%)	—	8.6	—	16.7	20.3	—
可溶性糖	非還元糖 (%)	—	5.9	—	2.0	2.2
	還元糖 (%)	—	2.5	—	1.2	1.2

培養後7日目、すなわち胞子形成初期には胞子と菌糸中の全糖量には大差なく、15日目には菌糸中の全糖量が胞子中より多くなっていた。このことから炭水化物は貯蔵物質として、菌糸から胞子に送り込まれないので脂肪のように胞子中に偏在することがないと考えられた。培養後30日目に得た胞子では全糖量がきわめて多いように見えるが、この時期では胞子重が急激に減少し、同時に脂肪含量も少なくなるのに比べ炭水化物量が減少しないためと思われる。また胞子中の可溶性糖は全糖中の約50%を占めるが、菌糸中ではわずかに10%程度であった。これは胞子中の炭水化物が貯蔵物質としてよりむしろ利用され易いかたちで存在するものと思われる。

考 察

ウリ類たんそ病菌の胞子形成量は菌の系統ならびに培養条件によって異なるもので、104-Tでは種々の培地で胞子を形成し、とくに粉末乾燥酵母およびトウモロコシ培地で形成が盛んであった。104-55ではトウモロコシ種子培地上のみで形成し、粉末乾燥酵母は効果がなかった。また104-42ではどの培地でも胞子を形成しなかった。培地中のトウモロコシ種子の含量を多くすると胞子形成がよくなることから、トウモロコシ種子中には胞子形成に関与する物質が含まれるものと思われるが、自然光や空气中に放置すると胞子形成能が低下する性質は香月⁸⁾により報告された *Pythium* 菌の胞子形成促進に有効な物質ときわめて類似するようと思われる。また104-55でトウモロコシ種子や粉末乾燥酵母エキスを含まない培地でも栄養条件によりわずかに胞子を形成することから、トウモロコシ中の有効物質は胞子形成に必須的なものではなく、形成を促進するものと考えるのが妥当のようである。また病葉上には盛んに胞子を形成しているにもかかわらず、キウリ葉搾汁でも胞子を形成し得ないのは胞子形成に有効な物質が健全植物中できわめて不安定か、あるいは存在せず、病葉中ではじめて形成されるとも考えられるが、この点については更に検討を要する。

胞子中貯蔵炭水化物として強アルカリ耐性の多糖類を認めている報告があるが、ウリ類たんそ病菌の場合は胞子中炭水化物含量が菌糸中より少なく、また胞子中の糖は可溶性のものが多く、および脂肪含量が炭水化物含量に比べ多いことなどから胞子中のエネルギー源はおもに脂肪であると考えられる。さらに胞子を形成する菌糸の菌糸中にはしないものより脂肪含量が多いので、胞子形成時には脂肪代謝がきわめて盛んになり、胞子中に大量に送り込まれるものと思われる。脂肪を構成する脂肪酸の種類についてはなお種々の方法によって検討する必要があるので構成炭素数および構成物質の同定はさけたいが、104-42では第1、104-Tでは第2の色班がやや濃色にあらわれたので、104-Tではより高級な脂肪酸が多く、このことが胞子形成に必要な条件となることも考えられる。

第6表に示した胞子量は胞子数を示さないが、胞子量が最高になった後は新たに胞子形成が起ることはすくないと考えられるので、以後の胞子数はほぼ一定で、胞子内の物質、とくに脂肪が自己消化した結果重量が減少し、炭水化物は比較的長期にわたり残存するようである。

以上のことから菌糸中の脂肪代謝が盛んであることが

胞子形成に必要な条件と考えられるが、これだけでは形成が充分達せられるのではなく、栄養細胞を胞子へと分化させる一連の過程があって、トウモロコシ種子中の物質がその一部に関与すると思われる。

摘 要

1. 本報告はウリ類たんそ病菌の胞子形成条件と胞子形成時における菌体中の脂肪および炭水化物含量を測定した結果である。

2. ウリ類たんそ病菌 104-T は、種々の培地、とくにトウモロコシ寒天培地および粉末乾燥酵母エキス2%を含んだ培地上でよく胞子を形成した。104-55はトウモロコシ種子上のみで胞子を形成し、また104-42はどの培地上でも胞子を形成しなかった。

3. 104-55ではトウモロコシ種子が100g/ℓ以上培地に含まれた時、胞子形成がよく、またトウモロコシ種子をそのまま放置、あるいは培地にして長く放置すると胞子は形成されなくなった。

4. 104-55では培地中のぶどう糖30~50g/ℓ、ペプトン2~3g/ℓの範囲ではトウモロコシ種子がなくても、わずかに胞子を形成した。

5. 104-Tは液体培地でも胞子をよく形成し、培養10日目で最高に達し、乾燥胞子重は全菌体重の28%となり、以後減少した。

6. 形成初期の胞子中には49%の脂肪が含まれ、日数の経過とともに脂肪含量は減少した。

7. 胞子を形成する菌糸の菌糸中には形成しない菌糸に比べ脂肪含量が多かった。また菌糸中の脂肪は大量に胞子中に移動し、より高級な脂肪となるようである。

8. 胞子中の炭水化物含量は菌糸中より少なく、総炭水化物中、可溶性のもの占める割合は約50%で菌糸中の炭水化物の場合より多かった。

引用文献

1. 安部卓爾・河野又四：西京大学報 農学，8：81—88，1956
2. 安部卓爾・河野又四：西京大学報 農学，10：68—76，1958
3. EDGERTON, C.W. : Amer. J. Bot. 1 : 244—254, 1914
4. 江上不二夫ら編：標準生化学実験，1953 東京 PP47—49
5. 香月裕彦・木村一雄：日植病報 19：165，1954
6. 永田利美：東海近畿農試報，茶業部，2：97—129，1954
7. 新田一彦：農園 31：991—992，1956
8. 奥 八郎：日植病報 25：51—52，1960

Summary

The conidial formation of *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ell. et Halst. (strain No. 104-T) was favorable on various media, especially on corn meal agar and Richards medium with 2 per cent yeast extract. The conidia of the strain No. 104-55 were formed only on corn meal agar but as to the strain No. 104-42, the conidial formation was not made on all media used in these experiments. For the conidial formation of the strain No. 104-55, it was necessary that corn meal contained more than 100g/ℓ in the medium, and the effect of corn meal upon the formation of conidia decreased by preserving the corn for long period.

The quantity of fatty substances in the mycelium of the strain No. 104-T increased than that of the strain No. 104-42, and fatty substances might be moved to conidia as main energy source for vital phenomena. A great quantity of fatty substances was recognized in conidia (49%) than in mycelia (27%) of strain No. 104-T. And a possibility of existence of more higher fatty substances was suggested in conidia than in mycelia. On the contrary, total carbohydrates in conidia than in mycelia decreased, but among them, soluble components of carbohydrates increased in conidia. These results indicated that fat metabolism of the present fungus might be stimulated in the mycelium of the strain which was able to form conidia than that of non-conidia strain.