

緒 言

Sclerotinia sclerotiorum (LIB.) DE BARY は植物の菌核病菌として著名な子のう菌で、その寄主範囲もきわめて広くまた分布も世界各地に及んでいる。北海道において本菌が加害する主な作物は豆類、ジャガイモおよび各種果菜類などである。とくに豆類においては菌核病発生の多少がその収量を左右すると言っても過言ではない。本邦における豆類菌核病は最初ダイズについて (出田・1903; 半沢, 1906) ついでアズキ (原, 1942), インゲン (鉾方, 1949) などについて記載されている。

豆類菌核病の激発は過去数回記録されているが、昭和40年におけるインゲン菌核病の発生はとくに激しく、防除法が確立されていなかったために甚しい被害をこうむった (成田, 1966)。このため北海道内各研究機関により本病の発生生態および防除確立に関する研究が始められた。その間北海道立十勝農業試験場において本病の発生生態とくに豆類作物の開花と発病との関係が明らかにされ、これに対応して殺菌剤の有効な散布により被害を著しく低減し得るに至った (赤井, 坪木, 1971)。筆者は昭和41年より北海道立中央農業試験場において主として有効な殺菌剤の室内探索法の確立および病原菌 *S. sclerotiorum* の生理生態の解明に関する研究を担当した (斎藤, 1968)。

本病はその名の示すとおり罹病植物体上に黒色、鼠糞状の菌核が形成される。これが土中で越冬し発芽して子のう盤を生じ、それから放出される子のう胞子が殆ど唯一の感染源で他の空気伝染性病害にみられるような病斑上に形成される分生胞子による二次的感染は行なわれない。したがって感染時の環境条件は無視することは出来ないが、菌核の発芽と子のう盤形成に対する環境条件は菌核病の発生に影響するところが大きい。このようなところから本病原菌の寄主範囲、地理的分布の広いことも相まって菌核の発芽および子のう盤形成に関する研究は本邦の内外を問わずきわめて多い。しかし従来の報告の多くは単に子のう盤形成と温度、光など環境要因とに関係するもの

で、菌核の休眠および発芽に關与する内的要因については殆ど知られていない。

本論文はこれらの点を明らかにするため、菌核の成熟現象を発芽能力獲得および構成細胞の構造変化との面より検討し、さらに低温処理の菌核発芽促進機作、菌核組織からの子のう盤組織の分化、貯蔵物質の代謝など菌核発芽に伴う形態学的、生理学的な変化について検討した結果をとりまとめたものである。

本研究を遂行するに当って前北海道立中央農業試験場病虫部長馬場徹代氏 (現道南農業試験場長) には本問題を示唆され、また終始懇切な御指導を賜り、現病虫部長高桑亮博士、北海道大学農学部教授宇井格生博士、帯広畜産大学教授成田武四博士には有益な御助言と御鞭撻を頂いた。

また大阪市立大学理学部教授里村幸男博士、同助教授大井進博士、谷口誠博士には生理化学的実験の遂行に当り絶大な御指導と御援助を頂いた。また北海道大学農学部四方英四郎教授、内記隆博士 (現岐阜大学農学部) ならびに北海道立中央農業試験場玉田哲男博士には電子顕微鏡について種々御教示頂いた。また前農林省園芸試験場盛岡支場長星野好博氏、農林省北海道農業試験場荒木隆男博士、同鈴木孝仁氏、北海道立十勝農業試験場赤井純氏、同北見農業試験場坪木和男氏には研究遂行上種々御指導と御援助を頂いた。以上の各位に対し衷心から謝意を表するとともに本論文の校閲の勞をとられた北海道大学農学部教授宇井格生博士、同岡沢養三博士、同四方英四郎博士に対し重ねて深甚なる謝意を表する次第である。

I 既往の研究

分類的位置

本病原菌は最初1837年 LIBERT により *Peziza sclerotiorum* と命名され、その後1884年 DE BARY により *Sclerotinia sclerotiorum* に改められた。異名として *Sclerotinia libertiana* FUECKEL が用いられていたことがあるが現在では *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) DE BARY が広く採用されている (PURDY, 1955; 成田, 1966)。さらに PURDY (1955) は従来寄主および菌核の大きさなどによっ

て独立種とされていた *S. sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, *S. sativa*, *S. intermedia*, *S. minor* を再検討した結果、今のう、今のう胞子および菌核の計測値によってはこれらの種を明確に区別し得ないとし、これら数種を *S. sclerotiorum* 1種に包括することを提唱したが、まだ一般には認められてはいない (DENNIS, 1956; 山本, 1959; KORF and DUMONT, 1972)。また最近 KORF and DUMONT (1972) は WHETZEL (1945) が *Sclerotinia* を3属すなわち *Sclerotinia*, *Botryotinia*, *Ciborinia* に分割した際、*Sclerotinia* 属の lectotype とされていた *S. candolleana* Fuckel を *Ciborinia* 属に移したので WHETZEL が *Sclerotinia* に所属させた残りの種については国際命名規約に従って新しい属名を付すべきであるとした。そしてこれらの種にはスゲやイグサに寄生するものが含まれているのでこれを *Myriosclerotinia* 属として包括し、*S. sclerotiorum* および類縁種についてはあらたに *Whetzelinia* KORF and DUMONT, gen. nov. を設置するように提案している。これに対し最近 DENNIS (1974) は *S. candolleana* FUECKEL が最初の *Sclerotinia* 属の lectotype にされたこと自体明確な根拠がないことを指摘し KORF ら (1972) がこれを機械的に受け入れ *S. sclerotiorum* を *Whetzelinia sclerotiorum* としたことを批判した。そして *Sclerotinia* 属の lectotype を *S. sclerotiorum* とし、この著名な病原菌の名称を保存すべきであるとした。最近、米国の研究者らにより *Whetzelinia sclerotiorum* が採用されているが (STEADMAN and COOK, 1973; VEGA and Le TOURNEAU, 1974), これら分類学者による論議が充分なされるまで従来の *Sclerotinia sclerotiorum* (I.I.B.) DE BARY を用いることとした。

菌核の形成

菌核形成に関する研究は大別して、その形成機作に関するものと形成条件に関するものがあるが、後者に関する研究が多い。

先ず、形成機作については DE BARY の研究を嚆矢とし、その後 TOWNSEND and WILLETTS (1954) が研究するまで殆ど見る可きものがない。TOWNSEND らは各種菌類の形成過程を比較検討

し、菌核形成が1) 菌糸の不規則な分岐と隔壁形成により開始されるもの、2) 菌糸先端の叉状分岐の反復によって開始されるもの (terminal type) 3) 主軸菌糸およびその側糸の菌糸束形成によって開始されるもの (strand type) の3型に大別した。*Sclerotinia* の菌核形成はおおむね 2) あるいは 3) によるものとされている。さらに最近、WILLETTS and WONG (1971) はこのような菌核形態形成の差異が数種 *Sclerotinia* の分類上の区別点となることを示唆している。

Sclerotinia の菌核形成条件については多くの研究があり、その内容も温度、培地の pH、栄養条件など多岐にわたっている (RAMSEY, 1925; TANNIKUT and VAUGHAN, 1951; DEMETRIADES, 1951, 1952, 1953; BEDI, 1962a; WANG and Le TOURNEAU, 1971, 1972)。しかしこれらは菌核形成の生理的な研究にとどまって居り、これら諸条件と形成された *Sclerotinia* 属の菌核の子実体形成能力との関係については殆ど論及されていない。すなわち既往の研究で扱われていたのは菌核の形成数、大きさあるいは外観上の成熟の速度などであり、本来菌核の成熟を意味する子実体形成能力については全く検討されていない。ただ最近 COOKE (1969) は *S. sclerotiorum* の菌核成熟と含有炭水化物および水分量の変化などとの関係について報告しているが、これらと子実体形成能力との関係についてはふれていない。

菌核の発芽

S. sclerotiorum および類縁種の菌核は発芽に先きだって通常ある期間の経過を必要とする。これは *Sclerotinia* に限らず数種の麦角菌、*Claviceps* の菌核発芽においても認められ (COOKE and MITCHELL, 1969; 1970)、菌核の内因的な休眠によるものと考えられている (成川, 1966; COLEY-SMITH and COOKE, 1971)。菌核発芽に及ぼす温度の影響については多くの研究があり、0°C あるいはその附近の温度に菌核をおくと休眠打破あるいは発芽促進の効果があると報告されている (照井, 原川, 1966; COOKE and MITCHELL, 1969)。一方これに対して低温処理を施さずに容易に菌核を発芽させた例も少なくない (BEDI, 1962b; HENSON and

VALLEAU, 1940)。これらは菌株によって温度に対する感受性がことなるためと考えられるが、麦角菌についても同様の低温の発芽促進効果が認められて居り (GARAY, 1958; MITCHELL and COOKE, 1968), 自然条件下にあって菌核が冬期間低温に遭遇したのち発芽するという生態的な適応の一つとみる考えもある。一方 *S. trifoliorum* については一定期間の変温が菌核の休眠の終了に必要であるとされるが (SPROSTON and PEASE, 1957), しかし他方菌株によっては変温を必要としないものもある (COLEY-SMITH and COOKE, 1971)。

低温以外に紫外線照射 (BEDI, 1958) あるいは DD 処理 (DIJKSTRA, 1966) などの菌核発芽促進作用も報告されているが、その機作については明らかにされていない。

他方これまで述べた内因的休眠の問題にきわめて関係が深いにもかかわらず発芽に至るまでの菌核内部における形態的、生理的な変化についての報告は殆どない。もっともこれは *Sclerotinia* に限らず糸状菌の菌核発芽全般について言えると指摘されている (COLEY-SMITH and COOKE, 1971)。一般に菌糸生育によって発芽する土壤伝染性糸状菌にくらべて、子実体を生ずる菌核は大型である (GARRETT, 1970)。そして貯蔵養分にすこぶる富むが、その主な成分は麦角菌における脂質あるいは *Sclerotinia* における炭水化物など菌の種類により異なる (COOKE and MITCHELL, 1969; COLEY-SMITH and COOKE, 1971)。したがって、*Sclerotinia* の菌核が発芽する際の主要な生理的過程は貯蔵炭水化物の易動化と考えられる。

菌核成分

S. sclerotiorum の菌核成分は他の菌よりも比較的詳しく研究されている。先ず可溶性糖類としては trehalose を主とし, mannitol, arabitol, glycerol など数種の糖アルコールが知られている (北原, 1950 a; 1950 b; Le TOURNEAU, 1966; WANG and Le TOURNEAU, 1971)。*S. sclerotiorum* についてはこれら糖類の菌核発芽時におけるエネルギー源としての役割が推定されているのみで、その利用実態についての報告はない (Le TOURNEAU, 1966) が、*S. cureyana* についてはバーパーク

ロマトグラフィーによる半定量的な研究がある (COOKE and MITCHELL, 1969)。しかし菌核中の炭水化物の主体をなすものはこれら可溶性糖類ではなく不溶性の多糖類と考えられている。*S. sclerotiorum* の菌核中に含まれる多糖類は β -glucan である (北原, 竹内, 1961; Oi ら, 1966)。菌核からアルカリ抽出によって得られる glucan は β -1, 3 結合を持つ glucan で北原らにより “スクレロタン” と命名された (北原, 竹内, 1961)。その後 Oi ら (1966) はさらに別の β -1,3, 1,4, 1,6 結合を持つ glucan を抽出し、これを “イソスクレロタン” と命名した。これら β -glucan が貯蔵炭水化物としての役割を果たしていることは容易に推定できるが、その菌核中における分布および発芽時の消費については全く知られていない。

以上 *S. sclerotiorum* および類縁種に関する既往の研究のうち本報告に関連のあるものについてのみ概述した。

II 菌核の成熟に関する研究

Sclerotinia 属の形成する菌核の外皮 (Rind) は黒色を呈し、この部分は菌核の耐久生存に役立つとされる。この外皮の完成は菌核成熟を知る外観上の目安となっている。*Sclerotinia* の菌核は条件によっては菌糸を生ずることもあるが、機能的には発芽して子のう盤を生ずる。したがって厳密にはこの種の菌核の成熟は菌核が発芽能力を獲得したときに完了すると考えるのが妥当である。

研究材料として使用する菌核を得るための最適培地を検討している間に、形態に殆ど差がなく外観的に成熟していると認められる菌核であっても発芽能力が形成培地の種類によって著しく異なることを知った。すなわち菌核形成に至るまでの栄養条件が上に述べた意味での菌核成熟にかなり影響を与えていると考えられる。

従来 *Sclerotinia* の菌核形成に関する栄養生理学的な研究は多い。しかしその目的とするところは形成される菌核の数あるいは大きさに及ぼす培地栄養条件の影響を検討することであって菌核の成熟に及ぼす影響については殆ど明らかにされていない。

また菌核の形態形成とくにその初期相については、詳細な観察が行なわれているが (TOWNSEND and WILLETTS, 1954; WILLETTS and WONG, 1971) 成熟に至るまでの菌核内部の形態的な変化および成熟菌核を構成する菌糸細胞の生理的な状態については不明な点が多い。

本章においては菌核形成培地の栄養条件が菌核の成熟に及ぼす影響について明らかにし、さらに菌核成熟に関する光学顕微鏡および電子顕微鏡観察の結果について記述する。なお菌核表面の着色など外観的な徴候によって認められる成熟を“外観的成熟”、発芽能力獲得に基くものを“機能的成熟”とそれぞれ定義し以下文中において用いることとした。

1. 菌核形成培地の種類と菌核成熟

Houston 合成培地およびインゲン葉とジャガイモの煎汁培地について形成菌核数と形成された菌核の発芽を比較した。

(1) 実験材料および方法

供試菌株：インゲンは場から採取した子のう盤から得た単一子のう胞子分離菌株 Sm-5 を用いた。

培地：

a) glucose 加用ジャガイモ煎汁：ジャガイモ塊茎細片 200 g を蒸留水 1000 ml 中で1時間煮沸し、ろ液に glucose 20 g を加える。

b) glucose 加用インゲン葉煎汁：インゲン葉の乾燥粉末 36 g を蒸留水 1000 ml 中で1時間煮沸してろ過する。さらに適当量の蒸留水を残渣に加え煮沸してそのろ液を先のろ液と合わせて1000 ml とする。これに glucose 20 g を加える。

c) Houston の合成培地 (PURDY and GROGAN, 1954)； NH_4NO_3 0.7 g, KH_2PO_4 0.3 g, K_2HPO_4 1.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g および $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 各 0.001 g, glucose 40 g, 蒸留水 1000 ml。

培養方法：

上記各培養液をあらかじめ希塩酸および蒸留水で充分洗滌したポリウレタンスポンジの約 1×1 3 cm の細片に吸収させて 500 ml 三角フラスコに入れ、 120°C 10 分間高圧殺菌した。これにあらか

じめ glucose 加用ジャガイモ煎汁寒天 (PDA) 上で培養した Sm-5 菌の菌叢の薄片を接種して 20°C で培養した。2 週間後スポンジの表面に形成された菌核を採取し、低温下 (約 4°C) に保存した。培養の際、各培地を寒天平板としなかった理由はスポンジ細片を用いた方が表面積が大きく、したがって菌核の収量も多いからである。

菌核発芽調査法：

菌核の発芽は菌核の生体重により 1 コ 150 mg 以上、100～150 mg, 100 mg ～以下の3段階のものについてそれぞれ 40 コずつ調査した。12 cm 腰高シャーレの底に入れたポリウレタンスポンジ (厚さ 1 cm) に菌核が埋まる程度に浅く切れ目を入れた。これに水道水を含ませ 120°C , 15 分高圧殺菌した。各スポンジの切れ目に菌核を埋め、 15°C の定温室内で発芽状況を観察した。なお、その際菌核を入れたシャーレの上約 1.5 m から 40 W 白色蛍光灯 2 本で照明した。未熟子のう盤 1 コでも生じた菌核を発芽菌核とみなした。

菌核形成数および乾重：

各培地に寒天を 1.5% 加えた平板上に同一菌株を接種し、 20°C で培養、シャーレ 1 枚当たりの平均菌核数を調査した。また菌核を集め 100°C 24 時間加熱乾燥し菌核 1 コ当りの平均乾燥重を測定した。

(2) 実験結果

Fig. 1 にみられるとおり各培地に形成された菌核の発芽を比較すると、glucose 加用インゲン葉煎汁培地に形成された菌核は発芽開始に至るまでの期間がきわめて短く、置床後 10 日ですでにかなりの発芽菌核が認められた。30 日後には殆どの菌核が発芽するに至った。次いで glucose 加用ジャガイモ煎汁培地に形成された菌核は重量の大なるものでは 7 日で発芽するものも認められたが、インゲン葉煎汁培地に形成され菌核よりも発芽率の増加がおそく 100% 発芽に達する期間も長い。これら半合成培地に比べ Houston の合成培地に形成された菌核の発芽率はきわめて低く、発芽開始までに約 30 日を要した。また各培地に共通することは大型の菌核ほど発芽率がすみやかに増加することである。

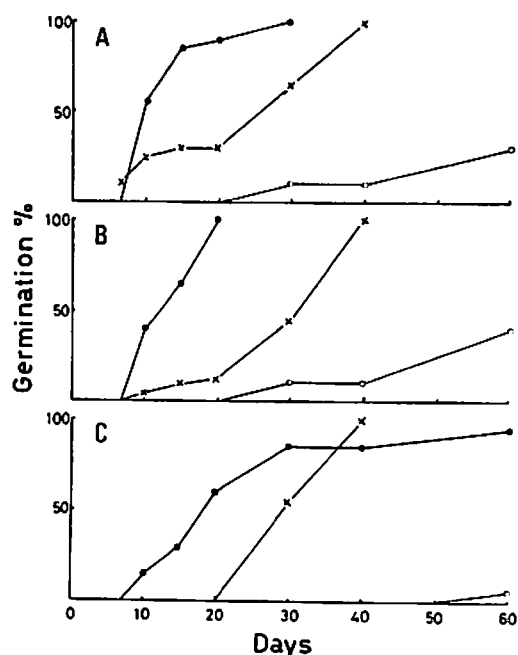


Fig. 1 Germination rates of sclerotia produced on sponge media soaked with different nutrient solutions. Weight class of sclerotia (fresh weight); A, above 150 mg, B, 150-100 mg; C, below 100 mg. Culture media; bean leaf decoction dextrose broth (●); Potato decoction dextrose broth (×); Houston's solution (○)

Table 1. Sclerotial formation on different agar plate media

Media	Average number of sclerotia per petri dish	Average dry weight of sclerotium mg
Bean leaf decoction dextrose agar	7.0	12.2
Potato dextrose agar (PDA)	9.6	12.5
Houston's agar	16.8	9.4

また用いた各培地の寒天平板上に形成された菌核の平均乾燥重および1シャーレ当りの形成数をTable 1 に示した。半合成培地2種にくらべてHouston 合成培地では菌核形成数は多いがやや小型であった。

なお、用いた2種の半合成培地の全窒素をセミマイクロケルダール法で測定した結果、インゲン葉煎汁培地では0.261%、ジャガイモ煎汁培地では0.187%であった。

(3) 小 括

本実験の結果からインゲン葉煎汁は発芽の良好な菌核を得るために最も適することが知られた。

ことなる培地に形成された菌核の発芽を比較した研究は少ないが、*Sclerotinia minor* および *S. sclerotiorum* について PDA 上に形成された菌核の発芽は天然培地あるいは寄主植物体上に形成された菌核にくらべて劣ることが認められている (PURDY, 1956; 千葉, 1967)。これらの事例から菌核形成培地の成分によって菌核になんらかの質的差異が生ずることが示唆される。一方 Le TOURNEAU (1966) は罹病したエンドウから採取した菌核と PDA および glucose を炭素源とした合成培地上に形成された菌核について糖および糖アルコール類成分の比較を行なったところ、何れの培養菌核にも arabitol および glycerol が欠けていることを見出した。これら2種の糖アルコールは寄主-寄生者の相互関係において生成されるものと推定しているが、形成菌核の発芽との関係についてはふれていない。他方、本実験に用いた培地中の窒素含量についてみるとインゲン葉煎汁中の含量は Houston 培地とほぼ等しく、またジャガイモ煎汁にくらべ約1.4倍であった。Houston 培地は PURDY (1954) らにより *S. sclerotiorum* の菌糸生長および菌核形成の栄養生理に関する研究に用いられた培地であるが、添加 glucose は通常の植物煎汁培地に加える量の2倍である。またジャガイモ塊茎中の澱粉含量からその煎汁中の全糖量は当然インゲン葉煎汁より高い。TOWNSEND (1957) によれば培地の C/N 比が高い場合、二、三の糸状菌の菌核形成数は増加するが菌核の着色により判定される成熟はおくれるという。本実験にいては菌核形成に至るまでの時間を検討しなかったのでこのような“外観的成熟”に及ぼす培地の影響は明らかではない。しかし用いた培地の種類によって菌核の発芽率が著しく異なる事実から菌核の“機能的成熟”には培地の栄養条件がかなり関与しているものと推定される。

2. 菌核の成熟に及ぼす培地栄養条件の影響

同一の菌株においても用いる培地の種類によって形成された菌核の発芽率が著しく異なることを

前節で明らかにし、これには菌核の成熟が関係していることを予測した。

本節においては Houston の合成培地を基本培地とし、アミノ態、硝酸態、アンモニア態の窒素各種糖類およびビタミン類の菌核成熟に及ぼす影響を検討した。さらに菌核形成までの時間的要素を加え“外観的成熟”と“機能的成熟”との関係を明らかにしようとした。なお本節では菌核形成培地はすべて寒天平板とした。

a. 窒素源

実験 I

(1) 実験材料および方法

菌核形成培地: Houston の合成培地を基本培地として NH_4NO_3 のかわりにこれと窒素含量の等しいアミノ態、硝酸態あるいはアンモニア態窒素を含む培地を調製した。これらの培地の pH はとくに調整しなかった。菌核形成にはこれらを含む寒天平板(寒天含量 1.5%)を用いた。寒天は市販試薬 1 級の粉末をさらに ROFINS (1939) の方法にしたがって純化し、含まれるビタミンなどを除去したものである。

培養方法: 単一子のう胞子分離系 Sm-5 菌を蒸留水寒天平板上で培養した菌叢を接種源とし、各窒素源ごとに 9 cm シャーレ 30 枚を用い 20°C で約 1 カ月培養した。各区のシャーレの一部は菌核形成数および平均乾燥重測定にあて、残りのシャーレからはぎとった菌核はシャーレに入れ約 4°C に保存した。

菌核発芽調査法: 菌核は極端に小型のものは除き、前述の方法により 15°C における発芽を観察した。実験はアミノ態窒素と硝酸態およびアンモニア態窒素とに分けて行ない前者における対照は NH_4NO_3 とインゲン葉煎汁寒天、後者では Bactocasamino acids (Vitamin free) とインゲン葉煎汁寒天である。なお供試菌核数は各区とも 100 コとしたが、窒素源の種類によって菌核形成数の少ない場合はこれに満たないものもある。

(2) 実験結果

Houston の合成培地を基本培地として各種アミノ態窒素の菌核の形成数および重量に及ぼす影響について検討した結果を Table 2 に示した。アミ

Table 2. Effects of various nitrogen sources on the production of sclerotia
— Amino acids —

Nitrogen sources	Average number of sclerotia/ petri dish	Average dry weight of sclerotium
L-Alanine	22.4	7.0 ^{mg}
γ -Aminobutyric acid	17.8	9.5
ϵ -Aminocaproic acid	0	0
L-Aspartic acid Na	19.8	6.8
L-Arginine HCl	14.1	5.7
L-Citrulline	17.7	5.5
L-Cysteine	5.6	7.9
L-Cystine	2.7	4.6
L-Glutamic acid Na	11.7	17.2
Glycine	18.4	5.2
L-Histidine HCl	10.7	9.6
L-Homoserine	9.2	6.1
L-Leucine	10.8	6.6
L-Lysine HCl	0	0
L-Methionine	15.8	5.2
L-Ornithine	12.5	9.5
L-Proline	13.8	8.3
L-Phenylalanine	8.9	9.3
L-Threonine	10.0	2.6
L-Tryptophan	21.3	3.3
L-Tyrosine	16.1	8.6
L-Valine	7.8	8.0
NH_4NO_3	19.8	6.2
Bean leaf decoction dextrose agar	6.4	10.0

Nitrogen content, 245 mg/1000 ml

ノ態窒素により形成される菌核の数、重量は著しく異なるが、 NH_4NO_3 を窒素源とした場合に比べ glycine, alanine, aspartic acid, tryptophan, citrulline, γ -aminobutyric acid では形成数が多く、cysteine および cystine では少ない。lysine では接種源からの菌糸伸長が抑圧され、phenylalanine では菌糸密度の高い菌叢を生じるがその拡大は抑制され、 ϵ -aminocaproic acid では菌糸の分岐がきわめて少なく菌核は全く形成されなかった。菌核の乾燥重は glutamic acid が最も大きく threonine, tryptophan は最少であるが、一般に形成数が多いと菌核は小型になる傾向が認められた。

次に各種硝酸態およびアンモニア態窒素の菌核形成に及ぼす影響についての実験結果は Table 3 に示した。

Table 3. Effects of various nitrogen sources on the production of sclerotia
— Ammonium salts and nitrates —

Nitrogen sources	Average number of sclerotia/ petri dish	Average dry weight of sclerotium
NH ₄ NO ₃	11.6	9.0 mg
(NH ₄) ₂ SO ₄	13.3	9.3
(NH ₄) ₂ HPO ₄	8.3	8.2
CH ₃ COONH ₄	12.8	5.1
(NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ ·H ₂ O	14.6	4.3
(NH ₄) ₂ HC ₆ H ₅ O ₇	11.5	9.8
(NH ₄) ₂ C ₄ H ₄ O ₆	13.1	4.6
KNO ₃	13.7	12.2
Ca(NO ₃) ₂	14.2	13.1
NaNO ₃	14.8	9.4
Casamino acids	7.8	19.4

Nitrogen content, 245 mg/1000 ml

これらの塩類には lysine, ϵ -aminocaproic acid, phenylalanine のような生育抑制するものはみられず、いずれも菌糸生育および菌核形成に利用さ

れる。

次に、窒素源を異にする培地上に形成された菌核の発芽を検討した。その結果を Table 4 および Table 5 に示した。

アミノ態窒素を利用して形成された菌核の発芽は arginine, cysteine, ornithine のとききわめて不良で cystine ではまったく認められなかった。一方, aspartic acid, γ -aminobutyric acid, glutamic acid, glycine を用いて形成された菌核は NH₄NO₃ にくらべてよく発芽した。しかし何れの場合もインゲン葉煎汁寒天上に形成されたものにくらべて劣った。次いで硝酸態およびアンモニア態窒素について検討した結果、一般にアミノ態窒素にくらべて発芽が不良であり両者の何れが菌核の機能的成熟に有利であるかは明らかでない。この実験においてもインゲン葉煎汁寒天上に形成された菌核の発芽はきわめて良好であった。

なお本実験を通じて認められたことは窒素源の

Table 4. Difference in the germinability of sclerotia produced utilizing various nitrogen sources — Amino acids —

Nitrogen sources	Germination %						
	Days after seeding of sclerotia						
	14	22	27	34	40	47	56
L-Alanine	0	7.0	11.0	13.0	18.0	37.0	42.0
γ -Aminobutyric acid	0	2.0	11.0	14.0	38.0	71.0	72.0
L-Aspartic acid Na	0	0	0	1.0	2.0	65.0	76.0
L-Arginine HCl	0	0	0	0	0	2.0	3.0
L-Citrulline	0	0	0	1.0	2.0	3.0	9.0
L-Cysteine	0	0	0	0	0	0	1.0
L-Cystine	0	0	0	0	0	0	0
L-Glutamic acid Na	0	4.0	6.0	15.0	47.0	67.0	70.0
Glycine	0	7.0	7.0	15.0	21.0	60.0	68.0
L-Histidine HCl	0	9.0	11.0	13.0	19.0	25.0	30.0
L-Homoserine	0	0	1.0	2.0	6.0	11.0	16.0
L-Methionine	0	2.0	3.0	10.0	16.0	44.0	54.0
L-Ornithine	0	0	0	0	1.0	1.0	1.0
L-Threonine	0	0	0	3.0	5.0	12.0	20.0
L-Tryptophan	0	1.0	5.0	8.0	11.0	20.0	24.0
L-Tyrosine	0	3.0	3.0	5.0	9.0	29.0	43.0
L-Valine	0	2.0	4.0	5.0	8.0	15.0	21.0
NH ₄ NO ₃	2.0	8.0	14.0	16.0	21.0	44.0	53.0
Bean leaf decoction dextrose agar	5.0	10.0	16.0	25.0	45.0	75.0	100

Table 5. Difference in the germinability of sclerotia produced utilizing various nitrogen sources — Ammonium salts and nitrates —

Nitrogen sources	Germination %						
	Days after seeding of sclerotia						
	8	14	21	27	34	56	69
NH ₄ NO ₃	0	0	2.0	8.0	18.0	35.0	35.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0	0	0	0	0	0	1.0
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0	0	0	2.0	7.0	20.0	22.0
CH ₃ COONH ₄	0	0	1.0	3.0	4.0	9.0	9.0
(NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ ·H ₂ O	0	0	0	0	0	0	2.0
(NH ₄) ₂ HC ₈ H ₃ O ₇	0	0	0	0	3.0	6.0	12.0
(NH ₄) ₂ C ₄ H ₄ O ₆	0	0	3.0	7.0	8.0	19.0	31.0
KNO ₃	0	0	0	0	0	5.0	10.0
Ca(NO ₃) ₂	0	0	0	3.0	10.0	18.0	19.0
NaNO ₃	0	0	0	0	0	0	0
Casamino acids	0	0	1.0	4.0	15.0	27.0	27.0
Bean leaf decoction dextrose agar	34.0	87.0	99.0	99.0	100	100	100

種類によっては表面が完全に黒変し、外観的に成熟した菌核とされるものでも菌叢から容易に剝離し難いものがあり、それらはおおむね発芽が不良であった。

実 験 II

実験 I においては菌核の外観的成熟までの時間的要素を全く考慮せず、培養 1 カ月後の菌核について発芽率を比較したが、ここではアミノ態窒素の代表的なものについて菌核形成開始、着色までの時間、表面に溢液液滴 (exudate droplets; COOKE, 1970) の存在する時間を比較した。これらと菌核の発芽と対比し、菌核の外観的成熟と機能的成熟の関係を知らうとした。

(1) 実験材料および方法

本実験においては HOUSTON の合成培地の量を半量とし、窒素源については同一含量とした。培地の調製法はすでに述べたとおりである。供試菌株および培養条件は実験 I と同様であるが、菌叢からはがした菌核はただちにポリウレタンの発芽床におき、4°C 1 カ月間低温処理した。

この実験における菌核形成開始時期は識別可能な白色の菌糸塊が菌叢表面に形成されたときとした。溢液液滴については出現と消失の時間をしらべその間を液滴溢液期間とした。菌核の着色完了期は菌叢を裏面から見て菌核全面が黒色に着色したときである。

(2) 実験結果

11 種のアミノ態窒素を加えた Houston 合成培地上での菌核形成開始時期、溢液液滴存在期間および着色完了期を Table 6 に示した。菌核形成開始は glutamic acid および arginine で最も早く、培養 4 日後に認められた。次いで aspartic acid, histidine, alanine=tyrosine, serine=tryptophan の順でおそくなり、glycine, cysteine および cystine は開始まで 8 日間であった。

菌核表面に液滴が溢液している期間は aspartic

Tabl 6. Effect of amino acid nitrogens on initiation and externally visible maturation of sclerotia

Nitrogen sources	Days to initiate sclerotia	Duration of exudation period (days)	Days of pigmentation
L-Alanine	6	8	15
L-Aspartic acid Na	5	3	8
L-Arginine HCl	4	5	11
L-Cysteine	8	6	13
L-Cystine	8	10	17
L-Glutamic acid Na	4	6	11
Glycine	8	6	15
L-Histidine HCl	5	8	13
L-Serine	7	7	15
L-Tryptophan	7	5	15
L-Tyrosine	6	6	15

Nitrogen content, 245 mg/1000 ml

Table 7. Difference in the germinability of sclerotia produced on agar plates utilizing various nitrogen sources

Nitrogen sources	Germination % Days after seeding of sclerotia					
	6	8	11	13	15	23
L-Alanine	0	0	0	1.5	1.5	18.5
L-Aspartic acid	10.1	26.1	44.2	52.2	63.3	63.3
L-Arginine HCl	30.3	54.9	57.4	57.4	60.7	63.0
L-Cysteine	0	0	0	0	0	0
L-Cystine	0	0	0	0	0	0
L-Glutamic acid Na	5.7	20.6	21.6	34.3	40.2	47.1
Glycine	4.0	19.2	27.3	32.3	34.3	38.4
L-Histidine HCl	2.9	5.8	7.9	9.4	14.4	22.9
L-Serine	34.3	51.8	77.4	78.8	82.5	82.5
L-Tryptophan	6.6	15.6	18.0	20.5	24.6	25.4
L-Tyrosine	77.6	83.2	87.9	88.6	88.6	88.6

acid で最も早く 3 日であった。次で arginine, cysteine=glutamic acid=glycine=tyrosine, serine, histidine=alanine, cystine の順に液滴溢泌期間は長くなる。

次に菌核着色完了までの時間は aspartic acid が最も早く、培養 8 日後であった。次で glutamic acid, arginine, histidine, cysteine, glycine=alanine=serine, tyrosine=tryptophan, cystine の順に着色がおくれた。

これらの結果から培地の窒素源の種類による菌核の外観的成熟の遅速を判定することは容易でないが、少なくとも aspartic acid, glutamic acid, arginine では成熟が早く alanine, cystine, histidine, serine, tyrosine, tryptophan では遅いと言える。

次にこれら窒素源を異にした培地上で得られた菌核の 15°C における発芽を Table 7 に示した。実験 I と異なり、保湿状態で 1 カ月低温処理したので一部のアミノ酸については菌核の発芽開始が早かった。すなわち菌核を 15°C においてから 6 日後に tyrosine では 77.9%, serine では 34.3% arginine では 30.3% の発芽率を示した。最終的な発芽率は tyrosine>serine>aspartic acid=arginine>alanine の順で cystine および cystine を窒素源とした菌核は 23 日後まで全く発芽しなかった。本実験に用いた培地の glucose の濃度は実験 I の半分で、培地の C/N 比は低いにもかかわらず cystine, histidine, tryptophan を利用して形成

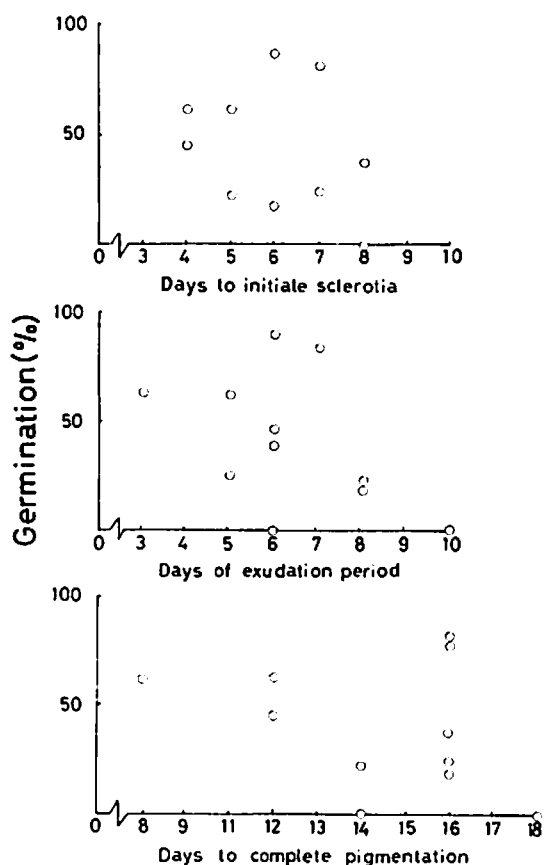


Fig. 2 Relation between the acquirement of germinability of sclerotia and the time to initiation and externally visible maturation of sclerotia which were produced varying nitrogen nutritions.

された菌核の発芽は前と同様に不良であった。しかし tyrosine, arginine では良好となった。

以上の結果から菌核形成開始までの期間、菌核よりの液滴溢泌期間および菌核着色完了までの期間とそれら菌核の発芽率との相関を求めた。Fig. 2 にみられるように菌核形成開始までの期間と発芽率との間には殆ど相関がみられない。すなわち菌核形成開始が早くても機能的成熟を早める要因とはならない。液滴溢泌期間および着色完了までの期間と発芽率との関係をみると前者で負の相関がわずかに認められるが、後者では全く認められない。すなわち菌核着色によって判定される外観的成熟は機能的成熟の完了とは無関係である。

b. 炭 素 源

(1) 実験材料および方法

Houston 合成培地の NH_4NO_3 を窒素量と同じにして glutamic acid に替え、炭素源を glucose 当量の 1/2 に相当する arabinose ほか 13 種類の糖および galactitol ほか 5 種類の糖アルコールとした寒天平板に培養した菌核について前項と同様

の実験を行なった。したがってこの実験に用いた培地の C/N 比は前項実験 I に用いた培地よりも低い。供試菌株および培養条件は前述と同様であり、菌叢からはがした菌核はただちにポリウレタン発芽床に置き 1 カ月間 4°C に低温処理した。

菌核の形成および成熟については前項と同様の観察を行なった。

(2) 実験結果

8 種類の単糖類について比較すると Table 8 に示したとおり菌核形成数および平均乾燥重は糖の種類により明らかに差があり arabinose, fructose, galactose, glucose, mannose 上の菌核は大きく ramnose および xylose では小型であった。またこの実験でも形成数が少ないほど菌核は大型であった。

glucose については本節 a, 実験 I で得られた結果とことなり大型の菌核が形成されたが、この実験に用いた培地の C/N 比が低くなったためと考えられる。一方 sorbose を炭素源とすると菌糸は生育せず、菌核の形成もみられなかった。次に

Table 8. Effects of various carbon sources on the initiation, the number, the dry weight and the externally visible maturation of sclerotia. — Monosaccharides —

Carbon sources	Average number/petri dish	Average dry weight of sclerotium	Days of initiation	Duration of exudation period (days)	Days of pigmentation
Arabinose	9.3	8.2 mg	6	6	9
Fructose	8.0	11.9	4	8	10
Galactose	8.5	11.7	5	11	12
Glucose	7.0	13.5	4	10	10
Mannose	5.6	14.6	4	12	12
Ramnose	20.4	3.2	4	8	7
Sorbose	—	—	—	—	—
Xylose	18.1	1.6	5	7	9

Table 9. Effects of various carbon sources on the initiation, the number, the dry weight and the externally visible maturation of sclerotia — Di- and polysaccharides —

Carbon sources	Average number/petri dish	Average dry weight of sclerotium	Days of initiation	Duration of exudation period (days)	Days of pigmentation
Lactose	5.7	13.0 mg	4	10	11
Maltose	12.9	7.7	4	8	10
Sucrose	5.4	17.0	6	5	12
Dextrin	11.4	8.7	4	8	10
Inulin	13.2	6.0	4	8	9
Soluble starch	5.1	11.4	5	7	11

Table 10. Effects of various carbon sources on the initiation, the number, the dry weight and the externally visible maturation of sclerotia — Polyols —

Carbon sources	Average number/petri dish	Average dry weight of sclerotium	Days of initiation	Duration of exudation period (days)	Days of pigmentation
Galactitol	2.7	4.9 mg	5	7	9
Erythritol	—	—	—	—	—
Glycerol	6.0	13.1	4	5	7
Inositol	1.8	1.7	6	6	9
Mannitol	1.7	2.1	4	6	7
Sorbitol	7.6	9.1	4	8	9

Table 11. Difference in the germinability of sclerotia produced on agar plates utilizing various carbon sources

Carbon sources	Germination % Days after seeding of sclerotia					
	6	8	10	12	14	16
Arabinose	27.5	59.5	79.0	94.0	98.5	99.0
Fructose	33.6	49.3	65.7	75.0	84.3	89.3
Galactose	30.2	43.6	49.7	57.7	73.8	85.9
Glucose	38.3	71.3	85.1	93.6	95.7	97.9
Mannose	39.1	60.0	79.1	82.6	88.7	97.4
Ramnose	6.9	20.6	29.9	39.5	54.8	71.0
Xylose	18.8	34.8	46.5	61.5	79.4	96.0
Lactose	7.1	21.4	24.1	33.9	34.8	38.4
Maltose	1.8	10.1	15.1	26.0	33.8	41.6
Sucrose	18.6	34.9	66.3	90.7	96.5	97.7
Dextrin	54.4	59.7	75.2	86.9	92.7	97.1
Inulin	4.9	19.2	23.6	38.9	40.9	55.2
Soluble starch	21.5	45.6	64.6	72.2	84.3	88.6
Galactitol	1.2	—	4.9	4.9	—	25.6
Glycerol	0	0	0	0	—	7.5
Inositol	0	0	0	1.2	—	16.7
Mannitol	0	0	0	0	—	16.1
Sorbitol	4.9	11.8	32.4	43.1	54.9	58.8

菌核形成開始時期をみると fructose, mannose, ramnose が最も早く 4 日目、次いで galactose, xylose, arabinose の順におくれる。菌核の着色完了は ramnose が 7 日で最も早く以下 arabinose, xylose, fructose, glucose, galactose, mannose の順におそくなる。また液滴溢泌期間は arabinose が最も短かく 6 日、次で xylose, fructose, ramnose, glucose, galactose, mannose の順に長くなる。

次に複糖および多糖類については Table 9 に示した。lactose, soluble starch, sucrose では形成数は少ないが菌核が大型で、dextrin, inulin および maltose では形成数は多いがやや小型の菌核と

なる。一方、菌核の形成および成熟の速さを比較すると菌核形成開始期は最も早いものは dextrin, inulin, lactose, maltose で、次いで soluble starch, sucrose の順におそく、菌核の着色は inulin, dextrin, maltose, lactose, soluble starch, sucrose の順におそかった。また液滴溢泌期間は lactose で最も長く、次いで dextrin, inulin, maltose, soluble starch, sucrose の順となる。これらから菌核形成やその成熟は個々の糖の間で異なり、また単糖類、複糖類、多糖類の間における差も明らかではない。

一方、糖アルコールを炭素源としたときの結果

は Table 10 に示した。この表から明らかなように erythritol では菌核が全く形成されず, galactitol, inositol, mannitol でも形成はきわめて不良であった。しかし glycerol と sorbitol 上の菌核は形成数および大きさも他の糖類で形成されたものに匹敵する。また、これら糖アルコールで形成された菌核の着色はすみやかにおこる。

次に異なる炭素源を利用して作られた菌核の発芽率を比較した結果を Table 11 に示した。

単糖類についてみると、どの糖を利用して形成された菌核もよく発芽した。複糖類では sucrose

によって形成された菌核の発芽が良好なのに比べて lactose および maltose では発芽率が低い。次に多糖類では dextrin および soluble starch で菌核発芽が良好であるが inulin では劣った。最終的な発芽率で比較すると、arabinose, dextrin, glucose mannose, sucrose, xylose で最も発芽率が高く、次いで fructose, galactose, soluble starch, ramnose, inulin, maltose, lactose の順であった。一方、これらの糖類にくらべて糖アルコールでは sorbitol を除いて菌核の発芽はきわめて不良であった。

これら炭素源の異なる培地に形成された菌核の発芽率と菌核形成開始、液溢滴泌期間および菌核着色完了までの期間との関係を Fig. 3 にまとめた。

これらの結果は窒素源について得られた結果と同様、菌核の外観的成熟が機能的成熟と無関係であることを示している。

c. ビタミン類

ビタミンが菌核の機能的成熟に影響を与えるか否かを知るため、チアミンほか2種の微量要素を添加した Houston 合成培地について検討した。

(1) 実験材料および方法

基本培地は Houston 合成培地に寒天 1.5% を加えたものである。ビタミン類はメンブランフィルターで滅菌ろ過したものを同化直前の寒天培地に混入した。供試ビタミンおよび添加濃度は Table 12 に示した通りである。

供試菌株、培養条件は前と同じである。形成された菌核はとくに保湿せず実験開始までシャーレに入れて低温下に保存した。菌核の形成数および乾燥重も前の実験と同様測定した。菌核はポリウレタン発芽床に置き、15°C で発芽させた。

一方これと同時に供試ビタミンの菌糸生育におよぼす影響を基本培地を用い液体静置培養により比較した。接種源、培養温度など寒天平板培養と同様である。培地は 300 ml 三角フラスコに 25 ml ずつ分注し、120°C、7 分間高圧滅菌後滅菌ろ過したビタミンを添加した。接種後、所定期日ごとに菌体を取り出し常法に従って菌体乾重を測定した。

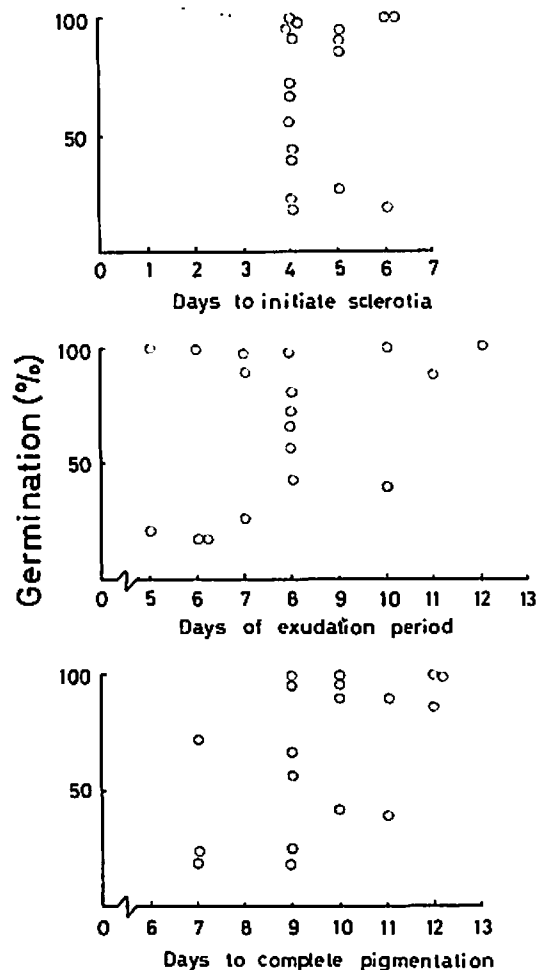


Fig. 3 Relation between the acquirement of germinability of sclerotia and the time to initiation and externally visible maturation of sclerotia which were produced varying carbon nutritions.

(2) 実験結果

ビタミン類を添加した培地における菌核形成数および平均乾燥重を Table 12 に示した。形成数は何れのビタミン添加区も対照とほぼ同様であった。また乾燥重は thiamine で対照よりやや少、biotin および pyridoxine でやや大となった。

次に菌核の発芽率を比較すると Table 13 にみられるようにビタミン添加培地で形成された菌

Table 12 Effect of vitamins on the production of sclerotia

Vitamins	Concentration	Average number of sclerotia/petri dish	Average dry weight of sclerotia
Biotin	0.05ppm	10.9	11.2 mg
Pyridoxine	0.1	13.9	12.2
Thiamine	0.1	10.9	7.4
Control	—	12.0	9.2

Table 13. Germination of sclerotia produced on the vitamin-added basal medium

Vitamins	Germination %						
	Days after seeding of sclerotia						
	8	14	21	27	34	56	69
Biotin	0	0	0	1.0	3.0	6.0	8.0
Pyridoxine	0	0	9.0	23.0	29.0	41.0	44.0
Thiamine	0	0	0	0	0	1.0	2.0
Control	0	0	2.0	7.0	20.0	35.0	38.0

Table 14. Effect of vitamins on the mycelial growth

Vitamins	Mycelial dry weight (mg)					
	Days of culture					
	3	6	9	12	16	22
Biotin	23.5	259.0	289.1	312.7	358.5	338.9
Pyridoxine	25.2	306.6	349.4	367.2	343.8	348.8
Thiamine	18.0	236.2	343.7	360.9	352.0	352.5
Control	36.0	49.9	34.6	104.4	227.9	246.8
Bean leaf decoct, dextrose broth	36.0	234.9	219.0	223.3	215.6	215.8

核の発芽は対照と比較して大差がなく、むしろ biotin, thiamine では発芽が不良となった。

次に菌糸生育に及ぼすビタミンの影響を Table 14 に示す。この実験では無添加のほかインゲン葉煎汁培地も対照とした。菌糸生育に対する促進効果は biotin, pyridoxine および thiamine で顕著であり無添加区にくらべて生育量が急激に増加する時期が約 6 日早く、しかも菌体重ははるかに多い。

他方、インゲン葉煎汁培地上の初期生育は biotin, pyridoxine, thiamine 各添加区とはほぼ等しいが、培養 6 日後にこれらビタミン添加区よりも生育量の少ないまま定常状態になり、むしろ菌体重はやや減少した。この減少は菌核形成後の菌糸の自己溶解に起因するものである。すなわちインゲン葉煎汁培地上においてはビタミン添加した Houston 合成培地におけるよりも菌糸自己溶解が早い。

d. 小 括

糸状菌の菌核形成が培地栄養の種類によって左右されることはすでによく知られた事実である (PURDY and GROGAN, 1954; TOWNSEND, 1957; WHEELER and SHARAN, 1955)。この分野の研究には材料として *S. sclerotiorum* がしばしば用いられている (TANRIKUT and VAUCHAN, 1951; DEMETRIADES, 1952, 1953; WANG and Le TOURNEAU, 1971, 1972)。

菌糸生育に全く利用されないものは別として、菌核形成にとって不適当な窒素源として報告されているのは cysteine, cystine, leucine, methionine, tryptophan NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ などであるが (DEMETRIADES, 1953; WANG and Le TOURNEAU, 1972), このうち本実験において同様の結果が得られたのは cysteine および cystine のみであった。 NH_4NO_3 については菌核形成によく利用されているとしている報告があり (TANRIKUT and VAU-

GHAN, 1951; PURDY and GROGAN, 1954), 本実験の結果からもとくに菌核形成にとって不適当な窒素源とは考えられない。

また inulin は炭素源として比較的よく利用されるが、菌核形成に不適当としている報告もある (WANG and Le TOURNEAU, 1971)。

このように菌核形成における栄養源の利用に關する結論が研究者により異なるのは用いる基本培地および菌核形成を判定する基準が同一でないことにもよるが HELD (1955) が指摘しているような菌系による栄養源の利用能力の差も関係していると考えられる。

これら菌核形成に及ぼす影響とは別に、形成された菌核の発芽能力は培地中の栄養源の種類により著しく異なることが本実験の結果から明らかになった。すなわち、窒素源については一般にアンモニア態および硝酸態窒素よりも aspartic acid, glutamic acid などアミノ態窒素のなかに発芽の良好な菌核を生ずるものが多い。一方、炭素源では窒素源のような顕著な差はみられず、単糖、複糖、多糖の何れを問わず菌核形成が良好な場合にはその発芽も良好であった。糖アルコールでは一般に菌系生育に利用され難いものが多く、形成された菌核の発芽も不良となる。

菌核形成に対し不適当な一部のアミノ酸および糖アルコールは別として、供試した硝酸態およびアンモニア態窒素あるいは一部の糖を利用して作られた菌核は形態的には正常であっても発芽が著しく劣る。この実験で用いた菌核は一定期間培養の後、同時に菌叢からはがしたものであるが、培地の糖あるいは窒素の種類によっては菌叢からはがし難いものがあつた。このような場合、菌核を保持している菌系の生理活性がまだ十分に保たれていると考えられる。例えば NH_4NO_3 を窒素源とする合成培地にビタミンを添加すると菌系生育が促進され、溶菌は遅れるが、それに伴って形成された菌核の発芽は概して不良となる。これに対してインゲン葉煎汁培地上の菌核は容易に剝離されるが、その菌叢の菌糸は菌核形成後すみやかに溶菌する。

これらの事実から自然条件下で形成される菌核

も寄主植物の種類あるいは生育時期によってその発芽能力に差異が生じていることが示唆される。

また、菌核の発芽実験にあっては培地の種類による菌核の成熟程度、それに伴う発芽能力の差を考慮する必要がある。従来 *Sclerotinia* の菌核成熟は外皮層の形成すなわち菌核表面が黒色に着色することで完了すると考えられていた (TOWNSEND and WILLETTS, 1954; WILLETTS, 1968; WILLETTS and WONG, 1971)。また COOKE (1970) は菌核表面における溢泌液滴の形成とそれに伴う菌核水分の減少が菌核の着色とともに成熟の主要な過程であると述べている。しかし以上の実験の結果はこれら外部的な基準により菌核成熟を判定することは適当でないことを示している。すなわち菌核の着色完了 (外皮層の形成) は必ずしも発芽能力の獲得、換言すれば菌核の“機能的成熟”を意味するものではない。

3. 成熟に伴う菌核細胞の変化

Sclerotinia sclerotiorum の菌核が子のう盤を形成し得る状態すなわち菌核の“機能的成熟”は外部形態による成熟完了とは必ずしも一致しないことを前節で明らかにした。このことから *Sclerotinia* の菌核発芽は菌核内部における組織分化を含む複雑な過程を経るものと考えられる。したがって本菌の菌核発芽の機作を調らべるに先立って菌核の成熟における内部変化を明らかにする必要がある。

本節においては菌核形成培地としてインゲン葉煎汁寒天を用い、成熟に伴う菌核の内部構造および構成細胞の微細構造の変化を検討した。また菌核を構成する細胞の細胞壁成分および細胞内貯蔵物質に関する細胞化学的観察もあわせて行なった。

a. 菌核の内部構造

(1) 実験材料および方法

Sm-5 菌をインゲン葉煎汁寒天上、 20°C で培養し、形成された菌核をその外観的な成熟の程度別に順次採取し FAA で固定した。菌核の外観的な成熟程度は便宜上次の3段階に分けた。

(1) 白色期; 菌核の肥大はほぼ停止し、液滴が溢泌しているが表面の着色はまだ全く認め

られない時期。

(2) 着色開始期; 菌核表面にわずかに着色がみられる時期。

(3) 成熟期; 菌核表面が完全に着色し、液滴が消失するなど“外観的成熟”が完了した時期。菌核は容易に菌叢から剝離される。

なお、これらに加えて液滴の溢泌が認められるがまだ白色期に至っていない時期、すなわちまだ生長を続けている菌核についても比較のため観察した。

固定した菌核は ethanol, n-butanol 系列で脱水後、パラフィンに包埋し、Minot 型ミクロトームで厚さ約 10 μm の切片にした。なお成熟期の菌核は脱水、包埋すると非常に固くなり切片を作り難いので SASS (1951) の方法に準じて菌核組織を再び水にもどし軟化した。すなわち、パラフィンブロックの端を切りとり、菌核組織の一部を露出させ、4°C の蒸留水中に 1~2 日浸漬後、常法通り切片とした。切片は Haupt の貼付液 (JENSEN, 1962) を用いてスライドガラスにはりつけ、乳酸で酸性にした 1% aniline blue 水溶液で染色し、検鏡した。

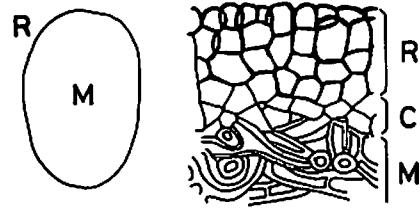
(2) 結 果

生長中の菌核においては構成する菌糸細胞数が少ないため空けきが目立ち、表面と内部における細胞の形態的な差は全くみられない (Plate 1-1)。

白色期; 菌核表面では細胞の aniline blue 染色性が強くなり、隔壁形成が行なわれて円型ないしだ円型の細胞が多数形成される。これに対して内部の細胞は菌糸の形態を保持しているが、その密度は低い (Plate 1-2)。

着色開始期; 菌核表面の円型細胞中には液胞が多数認められ、細胞壁の褐変、厚膜化が始まる。内部の菌糸細胞にも多数の液胞がみられるが、菌糸の周囲には aniline blue によって殆ど染色されない層が形成され菌核内部の空けきは少なくなる (Plate 1-3)。

成熟期; 菌核表面の細胞における細胞壁褐変と厚膜化が 2 ないし 6 細胞層に及び、顕著な外皮層 (Rind) が形成され、その厚さは 15~40 μm である (Plate 1-4)。外皮層細胞には細胞質が殆ど認め



R=Rind C=Cortex M=Medulla

Fig. 4 Diagram illustrating structure of a mature sclerotium. Cellular differentiation in a peripheral part (right) and a whole figure of vertical section of sclerotium (left).

られない。また外皮層の下に褐変、厚膜化しない、細胞質に富む細胞の層が認められる。この層は、皮質 (Cortex) として扱われているが (WILLETTS and WONG, 1971)、その下の菌糸細胞からなる組織との境界は不明瞭であり、その厚さも一定していない。内部の菌糸細胞には液胞が殆ど認められなくなり、それぞれ染色性のない肥厚した層で囲まれている。菌核内部は大部分をこれら菌糸細胞で占められ髓組織 (Medulla) をなしている。これら成熟菌核の内部構造を Fig. 4 に模式的に示した。

以上を要するに、菌核成熟に伴う顕著な変化は表面に近い部分の菌糸が隔壁形成によって外皮細胞に分化することと、内部においては菌糸の形態を保持した細胞が徐々に密度を増し、各細胞の周囲には染色性を欠く肥厚した層が形成される。

b. 菌核細胞の微細構造

菌核表面に近い部分の髓組織菌糸細胞を主として観察した。

(1) 実験材料および方法

観察材料には白色期、着色開始期および成熟期の菌核と培養 2 日後の菌叢から得た菌糸を用いた。これらは 1×1×3 mm の小片とし 1/15 M 磷酸緩衝液に glutaraldehyde と acrolein を各々 3% になるように溶解した混合液 (以下 GA+AC と略) で 21 時間固定した。固定後、上述の緩衝液で 1.5 時間ずつ 3 回洗滌したのち、2% OsO₄ 水溶液で 4 時間固定した。また菌核についてはこのほか 1% KMnO₄ 水溶液、30 分間固定したものも用いた。何れの固定も約 4°C で行なった。固定した材料はエタノール系列により脱水し、n-butylgly-

cidylether を置換剤として Epon 812 に包埋した (中田, 1971)。超薄切片は Porter Blum MT-1 ウльтраミクロトームにより作製し Formvar 支持膜を張ったシートメッシュ上に付着させた。切片は5%酢酸ウラニルで2時間、次いで Millonig B 法 (中田, 1971) による酢酸鉛染色を15分間行ない、日立 HS7D 電子顕微鏡を用いて 50 KV の加速電圧のもとで観察した。

なお、検鏡材料を得ると同時に、菌核成熟に伴う呼吸の変化をワールブルグ検圧計を用いて常法により測定した。すなわち、容器の主室には 0.2 ml の蒸留水と共に 16~18 コの菌核を入れ、副室には 10% KOH 水溶液で湿した濾紙の小片を入れた。O₂ 吸収は 20°C で測定し、その後、菌核の乾燥重を測った。

(2) 結 果

〔細胞壁の微細構造〕

栄養菌糸；細胞壁 (CW) は厚さ 0.09~0.18 μm の均一な層として認められる (Plate 2-1, 3)。また隔壁 (S) は子のう菌特有の単孔 (P) を有するが、しばしば孔紋には *Sordaria fimicola* の隔壁孔で観察されている電子密度の高い物質 (FORTADO, 1971) の沈積 (DED) が認められた (Plate 2-2; Plate 3-1)。しかしこれは栄養菌糸にのみ見られ菌核を構成する菌糸細胞の隔壁には認められなかった。

白色期菌核；髓組織菌糸は栄養菌糸とほぼ同じ厚さの細胞壁を有するが、その周囲には繊維構造をもった物質が現われ細胞によっては顕著な層をなしている部分も認められる (Plate 3-2)。これは前項で示した染色性を欠く層に相当する。また髓組織菌糸には未完成の隔壁が時折みられるがこれは光学顕微鏡下で認められた外皮細胞分化に伴う隔壁形成のみならず髓組織菌糸においても成熟過程で新たな隔壁形成が行なわれることを示すものである (Plate 4-3)。

着色開始期菌核；髓組織菌糸の細胞壁は成熟期菌核におけるものと比較して薄く、したがって細胞壁の肥厚はこの時期にはまだ完了しないものと考えられる (Plate 5-1, 2, 3)。他方繊維構造を有する物質の層 (FL) (以下繊維層と呼ぶ) について

はそれまで粗であった層の周辺がさらに電子密度の高い薄い層 (EDL) で覆われる (Plate 6-1)。したがって繊維層の発達はこの時期にはほぼ終了するものと認められる。

成熟期菌核；髓組織菌糸細胞壁は肥厚し、厚さ 0.25~0.46 μm となり、その周囲は厚さ 1.21~2.8 μm の繊維層で覆われさらに電子密度の高い薄い層で覆われる (Plate 7-1)。また髓組織菌糸の細胞間げきには不定型物質など充てん物は認められなかった (Plate 7-2)。また成熟期菌核における髓組織菌糸の隔壁 (S) (Plate 8-1, 2) は栄養菌糸および白色期菌核における隔壁 (Plate 3-1; Plate 4-4) に比較して肥厚しているので、菌核成熟に伴って隔壁も肥厚するとみなされる。

外皮細胞の細胞壁は電子密度が高い (Plate 7-3)。その厚さは約 0.8 μm で微細な繊維構造を有し、さらに内外両面には電子密度のさらに高い粒状構造をもった層が認められる (Plate 7-4)。

〔細胞質の変化〕

栄養菌糸細胞；GA+AC および OsO₄ で固定した電顕像 (Plate 2) から明らかなように *S. sclerotiorum* の栄養菌糸細胞中には糸状菌一般に知られている種々の構造が認められる。すなわち、ミトコンドリア (M)、リボゾーム (RIB)、液胞 (V)、粗面小胞体 (ER)、明瞭な二重構造をもつ核膜 (NM) に包まれる核 (N) などである (Plate 2-1, 3, 4)。またロマゾーム (LO) は細胞壁 (CW) と原形質膜 (PM) の間に独立した小胞として認められる (Plate 2-3)。このほか隔壁 (S) 附近には電子密度の高い球状の構造がみられるが、これは子のう菌に特有な Woronin body (WB) とみなされる (Plate 2-2)。これは栄養菌糸のみならず菌核を構成する菌糸中にも観察される (Plate 8-2)。

菌核を構成する菌糸細胞；原形質膜 (PM) の状態は菌核の成熟程度により異なり、白色期および着色開始期では原形質膜 (PM) が細胞内面に不規則に陥入しているのが (INV) 認められる (Plate 4-1; Plate 5-2)。しかし成熟期菌核における原形質膜はおおむね平滑となる (Plate 6-2)。このような原形質膜陥入は GA+AC および OsO₄ によるよりも KMnO₄ 固定の細胞で顕著に見られる

(Plate 4-1)。

ロマゾーム (LO) は白色期菌核の細胞中でしばしば見出されるが、栄養菌糸において観察されたものと異なり膜で囲まれた多胞状あるいは多管状の小体として細胞壁附近に認められる (Plate 4-2, 4)。

白色期菌核において繊維層が発達し始めた菌糸細胞は細胞質密度が高いが、繊維層の発達につれて細胞質構造の密度は低下する (Plate 3-2)。

生理的な意義は不明であるが、GA+AC および OsO_4 固定した菌核細胞中には成熟程度に関係なくしばしば特異的に多種膜構造 (CMS) が細胞質中あるいは液胞 (V) 中に見出される (Plate 5-1; Plate 6-1)。しかしこの構造をアルデヒド系固定による人工産物とみる研究者もある (BRACKER, 私信)。

菌核成熟に伴ない最も顕著な変化がみられたのは液胞とミトコンドリアであった。

すなわち GA+AC および OsO_4 固定した材料では電子密度の高い不定形の物質 (AM) が液胞 (V) 中に認められ、成熟が進むにつれてその量は増加する (Plate 5-1, 2, 3)。そして成熟期に至るとそのような物質で満たされた多数の液胞 (V) が菌糸細胞中にみられるようになる (Plate 8-1)。なおこれらの物質は KMnO_4 固定した成熟期菌核の菌糸細胞中では液胞 (V) 中に不規則に散在した状態で見出された (Plate 8-2)。

着色開始期における菌核の髓組織菌糸中には多くのミトコンドリア (M) がやや長く伸びた状態となって認められ、クリステも明瞭である (Plate 5-3)。しかし成熟期に至るとクリステが不明瞭となりミトコンドリアは細胞質中で見分け難くなる。Plate 6-2 に成熟期菌核中のミトコンドリアと思われる構造 (M) を示した。なお菌核の外観的成熟過程における酸素吸収をみると Fig. 5 に示したように吸収率は成熟の進行とともに急激に減少し、電顕観察によって認められたミトコンドリアの退化とよく符合する。

成熟期菌核の髓組織菌糸中に特異的に見出される細胞包含物として結晶構造を有する大きさ約 $0.5 \mu\text{m}$ の顆粒体 (CR) がある (Plate 6-2, 3)。こ

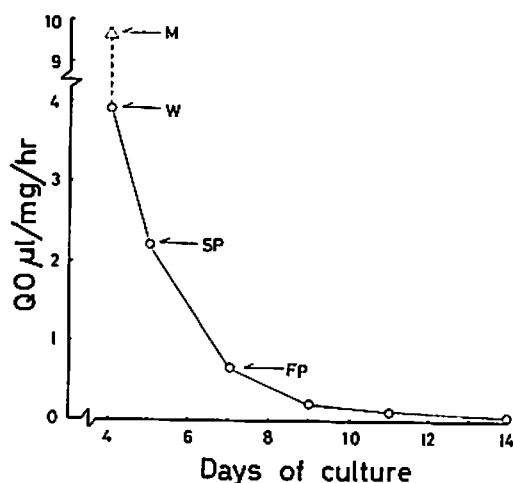


Fig. 5 Changes in the respiration rate of sclerotia during maturation. Abbreviations used in figure: M, mycelium; W, white sclerotium; SP, slightly pigmented sclerotium; FP, fully pigmented sclerotium.

れは *S. fructicola* および *Neurospora* の菌糸中に見出されたエルゴステロイドの結晶 (TSUDA and TATUM, 1961; CALLONGE, 1968) と同様のものか、あるいは *S. sclerotiorum* の栄養菌糸中にみられた microbody (MAXWELL ら, 1970) に相当するものと推定されるがさらに検討を要する。

次の節で記すように光学顕微鏡レベルでは細胞化学的にグリコーゲンの存在が証明されたが電顕観察においてはいわゆる“グリコーゲン顆粒”は菌核細胞中で識別することは出来なかった。

c. 菌核細胞の細胞化学

(1) 実験材料および方法

検鏡材料は前項におけるのと同様である。

固定および包埋法;

菌核組織は原則として glutaraldehyde と acrolein を $1/15 \text{ M}$ 磷酸緩衝液 (pH 6.9) に各々の最終濃度が 3% になるように溶解した混合液で 4°C , 16~24 時間固定し、洗滌後 ethanol, n-butanol 系列で脱水してパラフィン包埋した。このほか目的によっては凍結置換法 (Freeze substitution; JENSEN, 1962) も用いた。すなわち $1 \times 1 \times 3 \text{ mm}$ の大きさに切りとった菌核組織片をガーゼの小片の一端に付着させ、あらかじめ液体窒素で冷却しておいた 8% methylcyclohexane を含む isopentane 中に投入し、急激に凍結させる。次いでドライア

イス-aceton を入れた大型広口のまほうびんの内のビーカー中で無水 ethanol により約3日間凍結置換を行なった。凍結置換後の材料は徐々に室温にもどし、toluene を誘導剤としてパラフィンに包埋した。

パラフィン包埋した菌核のうち成熟期のものについては前項で述べた方法により軟化した。これらは Minot 型マイクロームで $5\sim 8\mu\text{m}$ の切片とした。

細胞内の異染性顆粒を観察する場合に薄い切片を必要とするので樹脂包埋した材料を用いた。すなわち、GA+AC 混合液で固定した材料を polyethylene glycol 200 で脱水し、親水性樹脂である hydroxy propyl methacrylate (以下 HPMA と略) に包埋した。方法は串田(1971)に従い、2-2-azobisisobutyronitrile を触媒とし、polyethylene glycol 200-dimethacrylate を架橋剤として 55°C で重合させた。重合ブロックはガラスナイフを用いて Porter Blum MT-1 ウルトラマイクロームで約 $1\mu\text{m}$ の切片とした。

得られた切片は原則として Haupt の貼付液 (JENSEN, 1962; 但し phenol は入れない) を用いてスライドガラスにはりつけた。

細胞化学的観察は以下の項目について行なった：

① 細胞質および細胞壁中の多糖類；

2, 4-dinitrophenyl hydrazine による aldehyde 除去処理 (FEDER and O'BRIEN, 1968) の後、過ヨウ酸 Schiff 反応 (PAS 反応) による。細胞質中の多糖類の場合は GA+AC 固定のパラフィン切片をセロイジン被覆した (JENSEN, 1962)。

② β -1, 3 glucan; aniline blue 染色による蛍光の発現 (CURRIER, 1957; FAULKNER ら, 1973) によった。すなわち、凍結置換法で固定した材料の切片を脱パラフィン後、約 pH 9.0 の $1/15\text{ M}$ 磷酸緩衝液に溶解した 0.01% の水溶性 aniline blue で染色し、千代田光学製 FM-200 A 型蛍光顕微鏡により観察した。UV 励起フィルターは波長 $370\mu\text{m}$ 付近に透過ピークをもつものを用い、スライドガラスは蛍光の少ないもの (松波ガラス工業 K. K. 製, No. 1) を用いた。

③ ムコ多糖類; alcian blue 8 GX を pH 2.5 の酢酸緩衝液で 1% 溶液で染色した。材料は GA+AC 固定のパラフィン切片を用いた。

④ 細胞質中の異染性顆粒; 0.5% toluidine blue O (pH 4.4 の酢酸緩衝液中) (FEDER and O'BRIEN, 1968)。材料は GA+AC 固定、HPMA 切片とした。

⑤ 細胞壁中のキチン; GA+AC 固定のパラフィン切片 (厚さ $10\mu\text{m}$) を脱パラフィン後、濃 KOH 液 (約 23 M) 中で 2 時間、 120°C オートクレーブする。切片を蒸留水で洗滌してスライドガラス上で I-KI および 1% H_2SO_4 で処理し chitosan 反応の有無をみた (JENSEN, 1962)。

菌核切片に対する抽出および酵素による消化：

凍結置換法により固定した成熟菌核の切片に以下のような処理を施し、細胞成分の存在の有無を検討した。

① Schweizer 氏液 (アンモニア性酸化銅溶液) による cellulose の抽出 (JENSEN, 1962); 切片を Schweizer 氏液に約 6 時間浸漬し、水洗後菌糸細胞の変化を観察した。切片は染色せざる紙の小片を同じ試薬に同時間浸漬し、完全に溶解したことによって試薬の強度を確めた。

② α -amylase による glycogen の消化; 切片を 1.0% α -amylase (0.1 M 酢酸緩衝液, pH 5.0) 中で 37°C , 2 時間処理する。対照として酵素を含まない緩衝液を用いた。処理後の切片は celloidin 被覆したのち、前述の方法で PAS 反応を調べた。

③ β -1, 3 glucanase による菌核細胞の分解; β -1, 3 glucanase の部分純化標本 (大阪市立大、大井進博士より分譲された) により切片を処理した。この酵素は次の方法により得られたものである。すなわち *S. sclerotiorum* のふすま培養粉末 (EBATA and SATOMURA, 1963 a, b) の水抽出液を 0.25~0.55 飽和の硫酸で塩析し、沈澱を水にとかして透析後、酢酸酸性 (pH 3.5) にし Duolite A₂ カラムに 0.1 M 酢酸緩衝液, pH 3.5 とともに通す。流下液をさらに Duolite CS 101 のカラムにかけるが、その際 pH を段階的に上げて pH 5.0 附近の流下液を集める。これをそのまま酵素液と

して用いた。この酵素液は $\text{exo-}\beta\text{-1, 3 glucanase}$ を含み, Laminarin (K & K LABORATORY) を基質としてたんばく mg 当り glucose 107.5 mg/hr を生成する力価を有する。切片の処理は pH 5.0 酢酸緩衝液を対照にして 37°C , 43 時間行なったがババイン (1:350) を 5% になるように加えた区ももうけた。なお処理中の細菌の増殖を防止するために酵素液に streptomycin, aureomycin, chloramphenicol を各々 100 ppm の割合で加えた。処理後、切片は水洗し細胞壁の PAS 反応をみるか、あるいは無染色切片を位相差顕微鏡で観察した。

(2) 結 果

細胞壁および繊維層;

PAS 反応についてみると細胞壁および隔壁は陽性、繊維層は陰性であった (Plate 9-1; Plate 10-1)。

髓組織の菌糸細胞を濃 KOH 水溶液で 2 時間処理すると繊維層は殆ど溶解し、細胞壁および隔壁のみが残った。この残存物を I-KI 溶液および 1% H_2SO_4 で処理すると紫ないし紫褐色に発色して chitosan が検出された (Plate 9-6)。また同様の材料を 5% 酢酸で洗滌すると細胞壁は崩解し、chitosan 反応もみられなくなる。これらの事実および PAS 反応陽性から髓組織を構成する菌糸の細胞壁および隔壁の構成成分の一つとして chitin が考えられる。

細胞壁にくらべて繊維層は一般に色素に対する親和力が非常に低く toluidine blue O (Plate 9-3, 4, 5) alcian blue 8 GX の何れによっても殆ど染色されなかった。

0.01% aniline blue で菌糸細胞を染色すると紫外線下で特異な緑黄色の蛍光を発する。蛍光は細胞壁で明瞭であり、繊維層では微弱ながら認められた (Plate 9-7, 8)。すなわち繊維層は aniline blue に対して若干親和性があると認められる。一方、*S. sclerotiorum* の成熟菌核から抽出した $\beta\text{-1, 3 glucan}$ の Sclerotan (大阪市立大、里村教授より分譲された) も aniline blue で染色すると同様の蛍光が認められた (Plate 9-9)。これらの事実から細胞壁および繊維層における $\beta\text{-1, 3 glucan}$

の存在が推定される。なお細胞質中には aniline blue 染色で同様の蛍光を発する物質は認められなかった。

次に酵素処理をした髓組織菌糸の分解についてみると $\beta\text{-1, 3 glucanase}$ の 37°C , 43 時間の処理のみでは繊維層がわずかに分解するだけで顕著な変化はみられなかった (Plate 10-2, 5)。また 5% ババインの単独処理によっても殆ど変化がみられなかった。しかし両酵素を同時に作用させると繊維層と細胞壁はある程度分解する (Plate 10-3, 6)。これらの事実は $\beta\text{-1, 3 glucan}$ がたんばくと共存して細胞壁および繊維層に分布していることを示している。

一方、細胞壁および繊維層は Schweizer 氏液処理によってその構造にはなんらの影響も認められないので cellulose は何れの部分にも存在しないものと考えられる。

細胞質;

髓組織の菌糸細胞における PAS 反応は細胞壁のみならず細胞質中にも認められるが、とくに菌核切片を celloidin 被覆したとき細胞質に PAS 反応がより強く現われる (Plate 9-1)。このことは細胞質中における PAS 陽性の高分子物質の存在を示すが、糸状菌の場合これは glycogen とされる (EARGLE, 1948; COCHRANE, 1958; MOTTA, 1971)。このことを確かめるため切片を 1% $\alpha\text{-amylase}$ で処理したところ明らかに細胞質の PAS 反応は弱まるか、あるいは殆どみられなくなった (Plate 9-2)。

次に髓組織菌糸の細胞質には PAS 陰性の顆粒が多数認められ $\alpha\text{-amylase}$ 処理後も消失しない (Plate 9-1, 2)。一方、この顆粒は弱酸性条件下で toluidine blue に対して著しい異染色性を示し、しかも菌核成熟にともなってその数は増加した (Plate 9-3, 4, 5)。成熟菌核中における分布および数から、これらの顆粒は前項で示した高電子密度の物質が充満した液胞に相当すると考えられる。

d. 小 括

菌核の外観的成熟の徴候となる外皮細胞の分化に加えて菌核内部における顕著な変化は髓組織菌糸の細胞壁の肥厚とそれを覆う繊維層の形成である。筆者は先の報告 (SAITO, 1974) においてこれ

ら細胞壁部分をそれぞれ内層 (inner layer) および外層 (outer layer) と記載したが、これより適当な名称として前者については細胞壁、後者については繊維層を用いることとした。

菌核における細胞壁肥厚は *S. sclerotiorum* も含めずで二、三の糸状菌について報告があるが、その機作に関し論及しているものは少ない (ARIMURA and KIHARA, 1968; CHETら, 1969; JONES, 1970; WATERS, 1972)。WATERSら (1972) は細胞壁肥厚の様式が菌により異なることを指摘し、菌核構成菌糸の細胞壁の単純な肥厚、細胞壁の層の一部肥厚あるいは細胞壁内面に異質な物質が沈着して起る肥厚などの例をあげている。すなわち、後の場合のように肥厚の結果、最初の細胞壁とは全く異なった構造になる場合もあるが *S. sclerotiorum* の髓組織菌糸では細胞壁は均質であり最初の細胞壁の単純な肥厚によるものである。

細胞壁は PAS 反応陽性、chitosan の検出、aniline blue 染色による蛍光発現あるいは酵素による分解などから chitin, β -1, 3 glucan およびたんばくなどから成ると推定した。これらは栄養菌糸の細胞壁成分と同様であり (THOMAS, 1930)、栄養菌糸が髓組織菌糸に分化しても細胞壁の構成成分については大きな変化はないものと考えられる。

これに対して繊維層は菌核成熟中に繊維構造を有する物質が髓組織菌糸の表面に蓄積して二次的に生ずる層である。従来この層を細胞壁と区別した報告 (ARIMURA and KIHARA, 1968) と非常に肥厚した細胞壁の一部とみなした報告 (JONES, 1970) があるが、その形成過程をみれば細胞外被覆 (extracellular coat) の一種であり細胞壁とは区別すべきものと思われる。

繊維層の化学的組成については PAS 反応陰性 KOH 水溶液による溶解などから chitin は含まれず、aniline blue 染色における微弱な蛍光および酵素による部分的分解などから β -1, 3 glucan, たんばくが含まれていると推定した。ただ、 β -1, 3 glucanase およびパパインの組合せによっても完全には分解しないことからこれらの物質以外のものも存在すると考えられる。また繊維層は色素に

対する親和性にきわめて乏しく、*S. sclerotiorum* の栄養菌糸において示唆されているように色素との結合を妨害する脂質なども含まれている可能性がある (THOMAS, 1930)。

一方、COLLOTELO (1974) は成熟過程にある *S. sclerotiorum* の菌核断面を走査型電子顕微鏡により観察し、未熟菌核髓組織中の空けきは液状の物質で満たされ、成熟に伴ない液状物質は固化し不定型物質として髓組織細胞間けきを埋めるとしている。筆者が超薄切片について観察した結果はこれと異なり、繊維状物質は不定型ではなく明瞭な繊維層として個々の髓組織菌糸の周囲に形成され細胞間けきも明らかに認められた。したがって COLLOTELO (1974) の結論は正確とはいえないが、繊維層がゲル状の性質を有することが示唆される。また WILLETTTS and WONG (1971) は *S. sclerotiorum* の成熟菌核の髓組織の一部はゼラチン状物質に埋没していると述べ、toluidine blue により染色されるのでムコ多糖類であると推定している。筆者の得た結果では繊維層は toluidine blue のみならずムコ多糖の染色に汎用されている alcian blue 8 GX (AMINOFF ら; 1970) によっても染色されないのでムコ多糖類が主成分であるとは認め難い。

S. sclerotiorum の栄養菌糸および菌核の細胞質の微細構造は多くの子実菌について報告されているものとおおむね同様である (MOORE, 1965; BRACKER, 1967; LOWRY and SUSSMAN, 1967; FURTADO, 1971)。

ロマゾームは栄養菌糸細胞においては原形質膜と細胞壁との間に小胞 (vesicle) として認められることが多いが、成熟途上にある菌核の構成細胞では膜に囲まれた小胞の集団として細胞壁あるいは隔壁の附近に頻繁に見出される。後者はいわゆる multivesicular body と称するものに該当すると思われるが、このほか未熟菌核中にはロマゾームの一形態として扱われている (BRACKER, 1967) 膜に囲まれた多管状の構造も認められる。ロマゾームの機能については従来種々の論議がなされて来たが (BRACKER, 1967)、細胞壁の形成に関与しているとする研究者が多い (MARCHANT ら, 1967;)

KHAN and ALDRICH, 1973; BUSSEL and SOMMER, 1973)。そのなかで MARCHANT ら (1967) は multivesicular body が菌糸先端よりやや生長段階の進んだ菌糸部分で見出されることから細胞壁の二次的な肥厚における chitin の集積に関与していると推定した。その見解に従えば、未熟菌核の菌糸細胞中に認められる multivesicular body は細胞壁の肥厚に関与しているものとする事が出来る。

菌核成熟過程に認められる顕著な変化はミトコンドリアの退化と液胞における高電子密度の物質の蓄積である。後者は *Neurospora* あるいは *Schizophyllum commune* の液胞で観察されているが (LOWRY and SUSSMAN, 1967; AITKEN and NIEDERPRUEM, 1970), その生理的意義については明らかにされていない。本実験では液胞中に充滿している高電子密度の物質は toluidine blue に対して異染性 (metachromasy) を示す細胞内顆粒に相当することが認められた。toluidine blue に対して異染性を有する顆粒は従来多くの微生物細胞中に見出されており、その主成分はポリリン酸と同定されている (WIAME, 1949; 柳田, 1962)。また ZALOKAR (1965) は貯蔵物質を蓄積する場としての液胞の役割をあげポリリン酸も蓄積されるとしている。したがって菌核の成熟過程で液胞中に蓄積される物質はポリリン酸と推定され、菌核の発芽時においてエネルギー源として利用されるものと考えられる。

以上のことから菌核の成熟過程は外皮層の形成と着色のほか、内部の髓組織を構成する菌糸細胞壁の肥厚および β -1, 3 glucan, たんぱくなどから成る顕著な繊維層の形成が進み、一方細胞内ではミトコンドリアの退化と同時にポリリン酸あるいは glycogen などの貯蔵養分が蓄積される。

III 菌核の発芽に関する研究

糸状菌の形成する菌核の発芽様式は発芽の結果、進行する菌の世代によって 1) 菌糸発芽 (myceliogenic germination) 2) 分生子梗発芽 (sporogenic germination) 3) 子実体発芽 (carpogenic germination) に大別される (COLEY-SMITH and COOKE, 1971)。

一般にこれら菌核には種子、胞子などと同様休眠状態がみられるが、その発芽を誘発する要因は発芽様式によって大きく異なる。すなわち菌糸発芽する多くの土壤伝染性糸状菌の菌核は小型で貯蔵物質も少なく外部栄養の供給あるいは寄主植物から分泌される特殊な物質などが発芽誘発の大きな要因となっている (GARRETT, 1970; COLEY-SMITH and COOKE, 1971)。これに対し *Sclerotinia* など子実体発芽する菌核は一般に大型で貯蔵物質に富み外部から供給される栄養が発芽を誘発することはないが、菌核に対する低温あるいは変温処理が発芽を促進するという報告が多い (COLEY-SMITH and COOKE, 1971)。このような特殊な環境要因に対する感応あるいは II 章で明らかにしたように“外観的成熟”と“機能的成熟”のちがひがある事実は *Sclerotinia* などの菌核発芽およびその過程で内的要因がかなり関与し、複雑なことを示している。従来 *S. sclerotiorum* の子のう盤形成に関する報告はきわめて多いが、菌核の休眠より子のう盤形成に至るまでの菌核の形態的、生理的变化についての知見は殆どなく、また菌核に対する低温処理の発芽促進機作を明らかにしようとする試みはなされていない。

本章においては低温処理についての既往の結果をさらに処理条件などの面で再検討するとともに菌核からの栄養生長と子のう盤形成との関係、菌核組織における子のう盤組織の分化とその時間経過および組織化学的变化、発芽中の貯蔵物質の代謝などの諸点について検討することを目的とした。

1. 菌核に対する低温処理の発芽に及ぼす影響

S. sclerotiorum の菌核は休眠終了には低温に遭遇することが必須条件ではないが (成田, 1966), 菌核に対する低温処理が発芽を促進するという報告は少なくない (照井, 原田, 1966; COLEY-SMITH and COOKE, 1971)。また麦角菌, *Claviceps purpurea* では同様の低温による発芽促進がみられるが、菌核を乾燥状態で低温処理した場合には発芽促進効果が全くみられない (MITCHELL and COOKE, 1968; COOKE and MITCHELL, 1970)。S.

sclerotiorum についてはこのような菌核に対する低温処理時の水分条件は検討されていない(照井, 原田, 1966)。よって本節においては発芽床におく前の低温処理の条件を温度, 処理時間, 水分などをかえて比較した。

(1) 実験材料および方法

供試菌株 Sm-5 をインゲン葉煎汁寒天あるいはインゲン茎培地で 20°C で培養し菌核を得た。インゲン茎培地は 2~3 cm に切断した乾燥インゲン茎を 2% glucose 水溶液に浸し, 充分吸収させた後とり出し, 500 ml 三角フラスコに適量ずつ入れて綿栓をして常法により高圧殺菌したものである。なお, この培地は表面積が大きいため菌核は寒天平板より多く形成され, その発芽率はインゲン葉煎汁寒天上のものと同様であった。

インゲン茎培地より集めた菌核は次のような処理を行なった;

- (1) 乾燥状態で 30 日間約 4°C に保つ。
- (2) 湿潤状態で 30 日間約 4°C に保つ。
- (3) 菌核採取後, 室温に 16 日間おいたのち -10°C に 14 日間保つ。
- (4) 菌核採取後, 室温に 16 日間おいたのち -20°C に 14 日間保つ。
- (5) 乾燥状態で室温下に 30 日間保つ。

(1) および (5) の乾燥区は 9 cm シャーレに菌核を入れ, さらに塩化カルシュウムを入れたデシケーター中に保った。また (2) の湿潤区は 9 cm シャーレに水で飽和した濾紙を敷き, 暫時水に浸漬した菌核をならべて, さらにこれを湿室としたデシケーター中に保った。(3) および (4) の -10°C と -20°C 区は 9 cm シャーレに入れた菌核を所定温度の低温室に保持した。これらの処理後菌核はポリウレタン発芽床におき 15°C における発芽率を調査した。

次に湿潤-低温処理の時間の長さと発芽との関係を見るためインゲン葉煎汁寒天上から採取した菌核を吸水ポリウレタン発芽床におき, 約 4°C に 5~30 日間保って, その後 15°C に移し発芽率を調査した。

(2) 実験結果

Fig. 6 にみられるとおり室温で乾燥状態に保つ

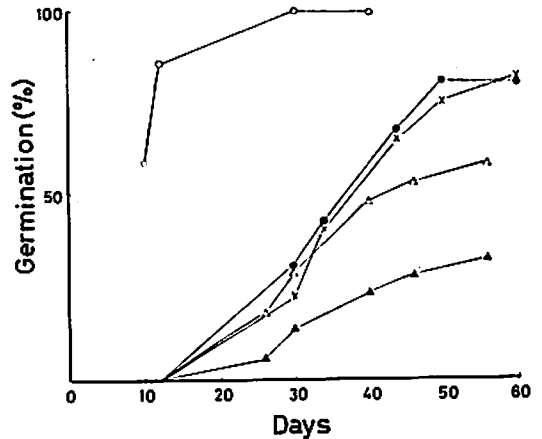


Fig. 6 Effect of pre-temperature treatments to sclerotia on the germination at 15°C.

Temperature treatments:

—○—, 4°C, moistend; —●—, 4°C, drying;
—×—, room temperature, drying; —△—,
—10°C; —▲—, —20°C.

た菌核は発芽床において 12 日後には発芽が認められず 30 日後には発芽率 22%, 60 日後には 81% に達した。これに対し 4°C 湿潤状態に保った菌核の発芽開始は著しく早く, 置床 10 日後ですでに 59% が発芽し, 30 日後にはすべての菌核が発芽した。しかし 4°C であっても乾燥状態に保った菌核は置床 12 日後にはまだ発芽がみられず, その後の発芽推移も室温乾燥区との明らかな差はなかった。一方, -10°C と -20°C においた菌核の発芽は室温乾燥状態においたものとくらべて明らかに劣り, とくに -20°C 区でこの傾向が著しかった。

菌核は低温処理することによって発芽が促進されると言われて来たが, その間菌核を乾燥状態としたのでは効果がなく約 4°C で湿潤状態においたときのみ低温による促進が認められた。

次に処理期間の長さと発芽の速さについて検討した。

Fig. 7 にみられるように対照とした 15°C, 充分な水湿のもとにおいた菌核でも正常に発芽が行なわれる。しかしこの場合の発芽はきわめて緩慢で置床後約 2 ヶ月経過してもその発芽率は 30% に留まった。一方, 菌核を保湿して低温下に置く時間が長いほど 15°C に移したのちの発芽がすみやかに起り, かつ発芽菌核の割合も急激に増加す

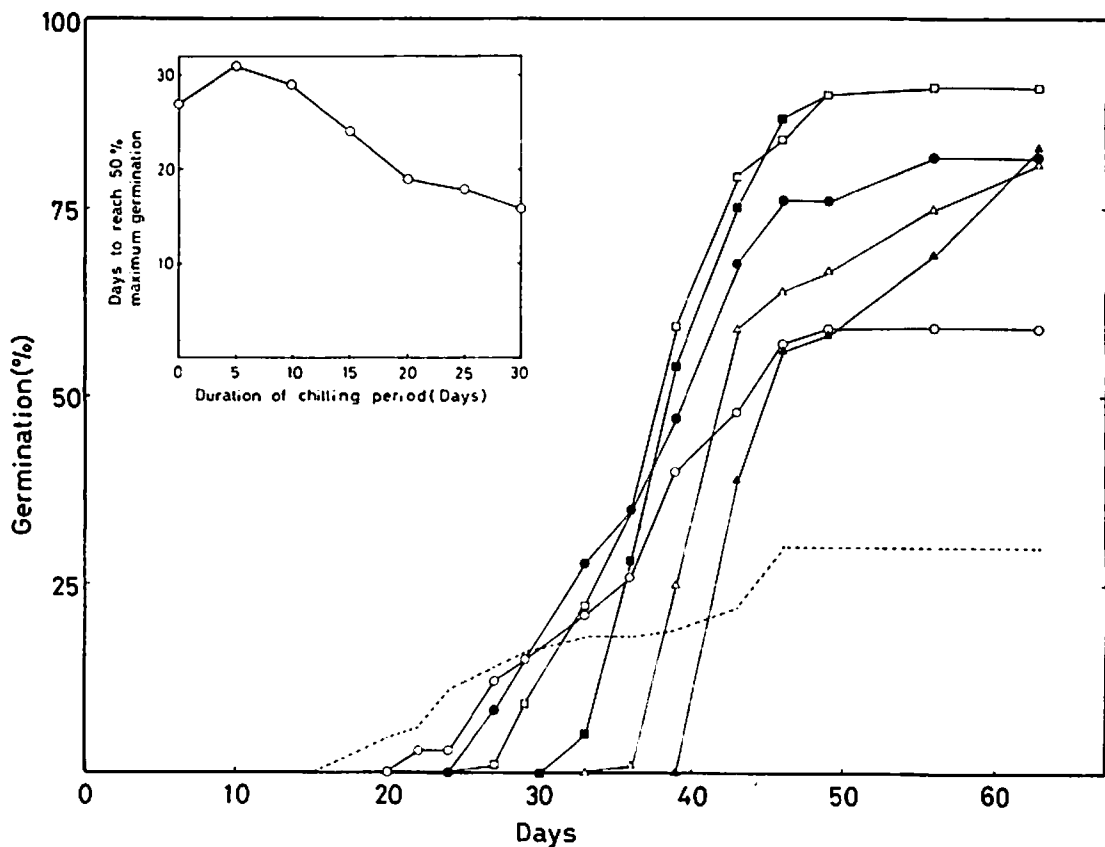


Fig. 7 Relation between the duration of low temperature treatment to sclerotia and the germination rate at 15°C. Duration: —○—5 days; —●—10 days; —□—15 days; —■—20 days; —△—25 days; —▲—30 days; ... control. Inset; Relation between the duration of chilling period and the velocity of sclerotial germination.

る。なお一部の菌核を 4°C に放置し約 1 年間観察したが発芽は全く認められなかった。これを 15°C に移したところ 45 日後に 42.6% の菌核が発芽した。

(3) 小 括

Sclerotinia sclerotiorum と類縁種の菌核発芽に関し発芽開始までの時間は研究者によって著しく異なり、菌核形成後すみやかに発芽した例から数カ月以上を要するものまで様々である (岡本, 1938; HENSON and VALLEAU, 1940; PURDY, 1956; 照井, 原田, 1966)。しかし一般に発芽開始までにある期間を必要とすることが多く、これは内因的な休眠によるものと考えられている (成田, 1966; COLEY-SMITH and COOKE, 1971)。休眠の打破あるいは終了には必ずしも外的な刺激を必要としない

ことは既往の報告からも明らかであるが (COLEY-SMITH and COOKE, 1971), 同時に低温あるいは変温などの刺激がいわゆる休眠期間を短縮するという報告も少なくない (SPROSTON and PEASF, 1957; 照井, 原田, 1962)。低温処理による発芽促進作用については報告者により対照区の発芽所要時間が一様でないので疑問視するものもあるが (COLEY-SMITH and COOKE, 1971), 筆者の行なった実験では明らかな発芽促進作用が認められた。しかしその場合菌核を湿潤状態で低温処理することが必要な条件であり、麦角菌, *Claviceps purpurea* における結果と一致する (MITCHELL and COOKE, 1968; COOKE and MITCHELL, 1970)。照井, 原田 (1966) は *S. sclerotiorum* の菌核を培地上で 20°C に 3 カ月、続いて 0°C に 3 カ月処

理したとき発芽床においた後の発芽が早く開始されたとし、これを低温の発芽促進作用によると結論した。しかし 0°C に3カ月または6カ月おいた菌核が不良であることについて説明がなされていないし、長期間培地上に菌核が乾燥状態におかれていたと考えられるので低温処理の効果が現われたとは認め難い。

高等植物の種子発芽においては層積埋蔵法(stratification)にみられるような低温、保湿による種子後熟の促進がよく知られており(中山, 1966), *S. sclerotiorum* の菌核の低温、保湿に対する感応も現象的にはこれに類似している。菌核発芽に対する低温処理の促進機作については発芽時における菌核内部の形態的变化に関連して第3節においてさらに論議する。いずれにしても菌核の発芽を均一かつ迅速にするためには菌核形成培地の選択などとともに菌核に対する低温処理も必要な方法である。

2. 菌核からの菌糸生長と菌核発芽との関係

Sclerotinia sclerotiorum の菌核はその機能上発芽して子のう盤を生ずるものであるが、しばしば菌糸を生ずることもある。この現象は休止状態にある菌核細胞が活性化し菌糸生長を再開するのであるから菌糸発芽 (myceliogenic germination) の一種と考えられる。

自然条件でも土壤中あるいは表面の菌核から直接菌糸を生ずることはすでに認められている(MUJICA, 1955; 杉本, 1959; 成田, 1966)。しかし従来の研究はこの現象を感染機作の面からとらえており、成田(1966)も指摘しているように菌核から菌糸を生ずる条件および菌糸生育と子のう盤形成との関係については殆ど検討されていない。

このため本節では菌核からの菌糸生育の程度と子のう盤形成との関係を検討し、後者が菌糸生育により阻害されることを明らかにした。また、土壌に対する炭素源添加の菌糸生育、子のう盤形成および菌核の生存に及ぼす影響を検討し、さらに菌核表面の傷の有無、外部栄養の供給など菌核からの菌糸を生ずる条件を検討した結果を記述する。

なお菌核からの菌糸生育を便宜上“菌糸発芽”と呼び、これに対していわゆる菌核発芽は本節においては“子のう盤発芽”と呼んで区別することとした。

a. 菌糸生長の程度と子のう盤発芽との関係

菌糸発芽は本節 c 項で述べるように栄養供給、菌核外皮の損傷などの要因によって促進されることもあるが、そのような要因を人為的に作らない場合にも自発的な菌糸発生がみられることがある。ここではインゲン菜培地に形成された菌核を水中で選別し、よく水洗した場合に菌糸発芽が認められたので菌糸発生程度の程度と子のう盤発芽との関係をしらべた。

(1) 実験材料および方法

Sm-5 菌をインゲン菜培地で 20°C, 2 週間培養後、形成された菌核をインゲン菜に付けたまま約 1 カ月間低温保存した。これを水道水中でよく攪拌し、培地としたインゲン菜を除き、菌核を集め流水で充分洗滌した。菌核は保湿したポリウレタン発芽床におき、15°C で発芽させた。調査は置床 33 日後に行なった。

(2) 結果

実験に供試した総計 168 コの菌核のうち、菌糸発芽したものが 58 コ、子のう盤発芽したものが 120 コあった。これらのなかには菌糸および子のう盤発芽が同一の菌核で認められるものも含まれる。

これらの菌核について Fig. 8 に示したように菌糸を全く生じていないものを 0 とし、菌糸発生の程度を 3 段階に分け、その程度別に子のう盤発芽した菌核数を Table 15 に示した。この結果が

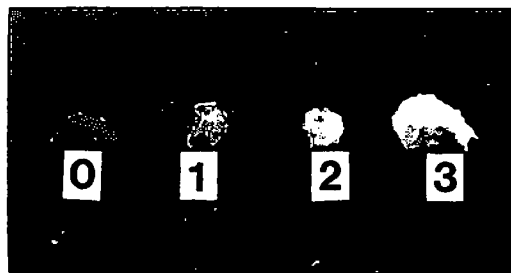


Fig. 8 Degree of mycelial growth from sclerotia.

Table 15. Inhibition of apothecial production (carpogenic germination) by mycelial growth from sclerotia (myceliogenic germination)

Experiment	No. sclerotia observed	No. sclerotia germinated						
		Degree of mycelial growth						
		0	1	2	3			
		A*	M**	A+M	M	A+M	M	A+M
1	48	32	2	5	2	1	2	1
2	66	31	3	5	2	3	12	0
3	54	34	0	5	4	3	8	0
Total	168	97	5	15	8	7	22	1

A*=Number of carpogenic germination; M**=Number of myceliogenic germination

ら菌糸発芽した菌核は子のう盤発芽するものが少なく、菌糸発生の程度が大になるにつれて子のう盤発芽するものはさらに少なくなった。すなわち菌核からの菌糸形成は子のう盤形成に対して阻害的に働くものと考えられる。

次に菌糸発芽した菌核（菌糸発生程度：2～3）を FAA で固定後常法によりパラフィン包埋して切片を作り aniline blue で染色して観察した。その結果、菌核の外皮層が部分的に破れて菌糸が派生し髓組織も崩解していた (Plate 1-5)。なおこれより菌糸発生程度の軽い菌核では固定、包埋の過程で菌核表面から菌糸が離脱するため、菌糸発生の最初の状態を明らかにすることは出来なかった。

次に菌核組織を構成する細胞のうち何れから菌糸を生ずるかをしらべるため以下のような実験を行なった。すなわち、成熟菌核を 0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 約 6.0) と共にホモジナイザーで約 2 分間破碎し、三重にしたガーゼで濾過した後、再び緩衝液を加え遠沈洗滌した。以上の操作はすべて無菌的に行なった。次いで 2% glucose および 0.5% peptone を添加した寒天平板上に菌核細胞を流して 20°C で 20 時間培養後、菌糸発生の有無を顕微鏡下で観察した。その結果、あらたに菌糸生育を開始したのは皮質を構成する細胞および髓組織細胞であった。後者は破碎による菌糸細胞の損傷が甚しく、菌糸を生じているのはある程度の細胞の集合した組織片に限られた。

b. 土壌中における菌糸生長と菌核発芽との関係

S. sclerotium の菌核は自然土壌中では殆ど

菌糸を生ずることはないが、炭素源を土壌に添加すると菌糸生育が認められると言う（杉本, 1959）。すなわち、菌糸生育にとって不適当な環境である自然土壌を発芽の場とすれば有機物添加の有無によって菌糸発芽と子のう盤発芽との拮抗的な関係がより明確になるものと考えられる。そのため以下のような実験を行なった。

(1) 実験材料および方法

Sm-5 菌をインゲン茎培地で 20°C、2 週間培養して菌核を形成させた。これを容器ごと約 1 カ月低温下に保存し、のち菌核を選別した。菌核は表面に付着している菌糸を殺すため 1,000 倍昇汞液に 1～2 分間浸漬し、さらに殺菌水で充分洗滌して実験に用いた。

実験は菌核発芽床、添加物の種類および量を変えて 2 回行なったが供試土壌は何れも腐植に富んだ植壤土を用いた。

実験-1;

菌核発芽床として殺菌砂、殺菌土壌および無殺菌土壌を用い、それぞれ glucose およびインゲン葉粉末を添加した。土壌および砂は最大容水量の 70% となるように水分を調整した。添加物は土壌に対しては乾土当り 5% (W/W) を加え、砂に対しては乾土と同一容積に対して乾土に添加したと等重量 (W/V で約 3%) を加えた。これらの砂あるいは土壌は直径 9 cm の腰高シャーレに入れ、殺菌する場合は 120°C、30 分高温殺菌し、シャーレの重量を測り、殺菌前の重量との差に相当する水を殺菌水でおぎなった。菌核は 1 シャーレ当り 20 コ、土壌あるいは砂に浅く埋め、1 処理につき 5 反復（合計 100 菌核）した。

実験-2;

発芽床として無殺菌土壌を用い、添加物としては glucose、インゲン葉粉末および米ぬかをそれぞれ乾土当り 1, 2, 5% (W/W) 加えた。水分調整および殺菌は 実験-1 と同様に行なった。菌核は 1 シャーレ当り 25 コ、1 処理につき 4 反復した。菌核をおいたシャーレは 15°C に保ち、発芽を観察した。

次に菌核からの菌糸生育に対する土壌静菌作用 (DOBBS and HINSON, 1953; JACKSON, 1958) を寒天円板法 (宇井, 1967) により検討した。すなわち直径 15 cm のシャーレに約 2 cm の深さに土壌を入れて表面を平らにならし、濾紙を置き、さらにその上に直径 2.5 cm, 厚さ約 2.0 mm の蒸留水寒天円板を置き、約 4°C に 16 時間保った。その後、円板の上に菌核から切りとった約 1.5 mm 角の髓組織片を置いた。土壌は無殺菌土壌および殺菌土壌を用い、それぞれ glucose 5% (W/W) を添加した区をもうけた。2 日間 20°C に保ったのち、菌叢の直径を測定した。同時に対照のため *S. sclerotiorum* の子のう胞子および *Penicillium* sp. の分生胞子の懸濁液を円板表面に塗抹し、20°C 16 時間保った後、胞子発芽率をしらべた。

(2) 結 果

実験-1;

Table 16 にみられるように菌核の菌糸発芽は

発芽床として用いた砂あるいは土壌に有機物を添加したときに促進される傾向が認められる。殺菌砂および殺菌土壌においてはインゲン葉粉末添加区は glucose 添加区よりも菌糸発芽率がやや高いが、無殺菌土壌の場合は逆で、glucose 添加区では明らかに菌糸発芽が促進され、インゲン葉粉末添加区ではむしろ抑制された。また無添加土壌の殺菌の有無について比較すると土壌殺菌により菌糸発芽およびその後の菌糸生育は促進された。

一方、子のう盤発芽はこれら有機物添加によって菌糸発芽が促進されたときは明らかに抑制された。この傾向は殺菌砂にインゲン葉粉末添加区において最も顕著で、子のう盤発芽は全く認められなかった。また無殺菌土壌では子のう盤発芽率が最も高いが、glucose 添加により菌糸発芽が促進されると子のう盤発芽は著しく阻害される。しかしインゲン葉粉末添加区では菌糸発芽率が低いにもかかわらず子のう盤発芽率は低かった。

実験-2;

この実験においては無殺菌土壌のみを用い、有機物の添加量と菌糸発芽、子のう盤発芽との関係を検討した。なおインゲン葉粉末および米ぬか添加区では *Sclerotinia* 以外の糸状菌菌糸の蔓延が甚しいため子のう盤発芽に及ぼす影響のみ検討した。

実験-2 においては Table 17 に示すように無添

Table 16. Percentages of myceliogenic and carpogenic germination of sclerotia in sterilized sand, sterilized and nonsterilized soil with organic amendments

Media	Amendments	Days after seeding of sclerotia									
		6		10		14		27		42	
		A*	M*	A	M	A	M	A	M	A	M
Sterilized sand	Non	0	11.0	2.0	27.0	9.0	30.0	15.0	29.0	41.0	34.0
	Glucose	0	26.0	0	46.0	1.0	46.0	1.0	82.0	—**	—
	Bean leaf powder	0	62.0	0	64.0	0	67.0	0	93.0	—	—
Sterilized soil	Non	0	10.0	5.0	21.0	7.0	21.0	—	—	—	—
	Glucose	0	13.0	0	19.0	0	35.0	—	—	—	—
	Bean leaf powder	0	28.0	2.0	36.0	2.0	—**	—	—	—	—
Nonsterilized soil	Non	0	6.0	12.0	13.0	15.0	23.0	50.0	19.0	66.0	12.0
	Glucose	0	40.0	1.0	47.0	2.0	49.0	5.0	52.0	3.0	52.0
	Bean leaf powder	0	17.0	1.0	17.0	1.0	7.0	1.0	—***	1.0	—

* A, Carpogenic germination; M, Myceliogenic germination

** Further observation was interrupted by mycelial growth over the medium

*** Mycelium of *S. sclerotium* was not distinguished from the another soil fungi over the soil

Table 17. Percentages of myceliogenic and carpogenic germination of sclerotia in nonsterilized soil with organic amendments

Amendments		Days after seeding of sclerotia							
		10		15		28		40	
		A*	M*	A	M	A	M	A	M
Glucose	1 %	0	5.0	26.0	0	81.0	0	87.0	0
	2 %	0	29.0	12.0	17.0	71.0	10.0	84.0	7.0
	5 %	0	41.0	0	51.0	2.0	91.0	2.0	80.0
Bean leaf powder	1 %	0	—	5.0	—	70.0	—	89.0	—
	2 %	0	—	9.0	—	62.0	—	77.0	—
	5 %	0	—	0	—	31.0	—	46.0	—
Rice bran	1 %	0	—	23.0	—	75.0	—	79.0	—
	2 %	0	—	5.0	—	77.0	—	89.0	—
	5 %	0	—	4.0	—	54.0	—	70.0	—
Control		0	0	34.0	0	84.0	0	93.0	0

* A, Carpogenic germination; M, Myceliogenic germination

加土壌における自発的な菌糸発生は全く認められず、子のう盤発芽はきわめて良好であった。一方 glucose の添加は菌糸発芽を促進したが、著しい発芽の増加がみられたのは 5% 添加区のみで 1% および 2% 添加では最初に生じた菌糸が徐々に消失する菌核がみられ菌糸発芽に対する促進作用は顕著ではなかった。したがって子のう盤発芽の抑制がみられたのは 5% 添加区のみであった。またインゲン葉粉末および米ぬか添加区では添加量がふえるにしたがって子のう盤発芽率が低くなったが glucose 5% 添加区に比較すると発芽抑制の程度は少ない。

Table 18. Survival of sclerotia in amended nonsterilized soil

Amendment	Living sclerotia	Dead sclerotia
Glucose 5 %	35.8 %	64.2 %
Bean leaf powder	65.6	34.4
Control	68.3	31.7

次にこれら土壌添加物によって菌糸発芽の促進あるいは子のう盤発芽の抑制を受けた菌核の生存について検討した。すなわち glucose 5%, インゲン葉粉末 5% を加えた無殺菌土壌および無添加土壌に 130 日間おいた菌核のうち、子のう盤を生じているものをまず生存菌核とみなし、次に菌核をピンセットで採取する際に全く崩解しているものは死菌核とみなした。その他の菌核は 1,000 倍

昇水液で表面殺菌後、半分に切断し酸性 PDA 平板上に伏せて菌糸伸長の有無により生死を判別した。

Table 18 にみられるように菌糸発芽が促進された glucose 5% 添加区の菌核の死菌核率が最も高かった。インゲン葉粉末添加区における死菌核率は子のう盤発芽が抑制されたにもかかわらず少なかった。これらの結果から菌糸発芽は子のう盤発芽よりも菌核の死を早めることが明らかである。

次に菌核からの菌糸生育に及ぼす土壌静菌作用の影響を検討した。

Table 19. Mycelial growth from medullary tissues of sclerotia on agar disks over soil with or without glucose amendment

	Sterilized soil		Nonsterilized soil	
	Glucose 5%	Non	Glucose 5%	Non
Average diam. of colonies	8.5 mm	9.5 mm	4.9 mm	±

Table 19 に示したように無殺菌土壌中の静菌因子は寒天円板中に移行し、円板上に置いた菌核組織からの菌糸生育を著しく抑制した。一方、glucose 5% の添加はこのような菌糸生育の抑制を弱めるが、菌叢の直径は殺菌土壌上の寒天円板における菌叢と比較すると小さい。

次に同じ土壌の静菌作用を *Penicillium* sp. の分生孢子および *S. sclerotiorum* の子のう孢子を

Table 20. The conidial germination of *Penicillium* sp. on agar disks over soil varying the soil treatments

Treatments to soil		No. conidia observed	No. conidia germinated	Germination rates (%)
Sterilized soil	Glucose 5% amended	369	319	86.4
	Nonamended	419	287	68.5
Nonsterilized soil	Glucose 5% amended	332	0	0
	Nonamended	301	0	0

Table 21. The germination of ascospores of *S. sclerotiorum* on agar disks over soil varying the soil treatments

Treatments to soil		No. ascospores observed	No. ascospores germinated	Germination rate (%)	Average length of germ tubes μm
Sterilized soil	Glucose 5% amended	318	318	100	213.4
	Nonamended	338	335	99.1	338.9
Nonsterilized soil	Glucose 5% amended	236	233	98.7	151.1
	Nonamended	220	214	97.4	107.4

Table 22. Effect of artificial wounding and glucose supply to sclerotia on myceliogenic germination (%)*

Wounding	glucose	Days after seeding of sclerotia				
		3	5	7	10	17
Control	+	3.3	31.7	35.0	51.7	70.0
	-	0	13.3	26.7	28.3	28.3
Wounded with needle	+	13.3	21.7	31.7	46.7	46.7
	-	11.6	20.0	30.0	36.7	40.0
Wounded with carborundum	+	15.0	23.3	23.3	23.3	30.0
	-	13.0	13.3	15.0	15.0	20.0

* Mean of 3 petri dishes

用い検討し、Table 20 および Table 21 に示した。

Table 20 に示すように *Penicillium* sp. の分生胞子の発芽は土壌静菌作用によって完全に抑制され、glucose 5%の添加は抑制を緩和することはなかった。

S. sclerotiorum の子嚢胞子は静菌作用の影響を殆ど受けず、殺菌土壌と同程度に発芽したが、発芽管の生長は著しく抑制された。しかし glucose 5%の添加によって抑制はわずかに緩和された。LINGAPPA and LOCKWOOD (1963) によって報告された *Neurospora tetrasperma* の子嚢胞子が静菌作用に対して感受性がない事実と同じく *S. sclerotiorum* の子嚢胞子も静菌作用に対しては非感受性と考えられる。

c. 菌糸発芽の開始に関与二、三の要因

菌核が菌糸発芽する場合、外皮層が部分的に破れたところから菌糸伸長がみられること、および外部栄養の供給によって菌糸発芽率が増加することを前項で明らかにした。これらの事実は菌核の菌糸発芽が外皮層の損傷あるいは外部栄養の供給によって始動されることを示すものである。よって本項では菌核に対する付傷および発芽床に施した glucose の菌糸発芽に対する影響について検討した。

(1) 実験材料および方法

菌株は Sm-5 を用い、インゲン葉煎汁寒天土 20°C で菌核を形成させた。菌核は 1,000 倍昇汞液による表面殺菌後、殺菌した針およびガーボラン

ダム (500 メッシュ) を用い菌核表面に傷を付けた。これらの発芽床としたポリウレタンスポンジは 9 cm シャーレに入れ、蒸留水あるいは 2% glucose (蒸留水中) を十分に吸収させて、120°C 10 分高圧殺菌したものである。菌核は 1 シャーレ当たり 20 コ、1 処理につきシャーレ 3 枚を用いた。置床後の菌核は 15°C に保ち、間隔をおいて発芽を調査した。

(2) 結 果

傷を付けた菌核は無傷のものにくらべて菌糸発芽の早い傾向が認められた。また glucose 添加により菌糸発芽が促進される傾向もみられた。とくに glucose 添加の無傷菌核からの菌糸発芽は有傷菌核よりも多かった。これらから傷および外部栄養の供給が菌核の菌糸発芽を促すと考えられるが、その何れが重要であるかあるいはその相乗的な効果の有無については本実験の結果からは明らかにし難い (Table 22)。

d. 小 括

菌核からの菌糸発芽は子う盤発芽を抑制し *S. sclerotium* の菌核の機能上いわば異常な現象である。寒天円板法による土壤静菌作用の実験結果から菌糸生育は明らかに阻害されるので菌核発芽にとり本来の場である自然土壤は菌糸生育に不適当な環境であると考えられる。したがって通常の条件下では菌糸発芽によって子う盤発芽が抑制されることは少ないと認められる。一般に自然土壤に glucose を添加した場合、静菌作用が低下するとされる (DOBBS, HINSON and BYWATER, 1960; GRIFITHS, 1966)。また菌核組織からの菌糸生育に対する静菌作用も同様に glucose 添加により低下した。すなわち、glucose 添加土壤における菌核の菌糸発芽は静菌作用の一時的な除去により誘起されたと考えられる。ところが加熱殺菌して土壤静菌作用が除去された土壤における菌糸生育はこれにさらに glucose を加えたときより劣る。このことから自然土壤に添加した glucose は静菌作用の部分的な除去のほかに菌核に対する栄養となっていると考えられる。

Sclerotinia 属の形成する菌核は菌糸発芽を行なう土壤伝染性糸状菌の菌核にくらべて一般に大型

で貯蔵養分にも富んでいる。*S. sclerotium* の菌核中に含まれる可溶性糖類は trehalose および mannitol であり、glucose などの単糖はきわめてわずかしき含まれず (北原ら, 1950 a, 1950 b; Le TOURNEAU, 1966; WANG and Le TOURNEAU, 1971), trehalose と mannitol は培地上の菌糸生育には利用され難い (WANG and Le TOURNEAU, 1971)。これら 2 種の糖を主な可溶性貯蔵物質とする菌核の菌糸発芽を外から与えられた glucose が誘発している可能性も考えられる。

外部からの栄養供給に加えて菌核表面の傷の有無も菌糸発芽の誘起に関与している。すなわち、発達した *S. sclerotium* の菌核の外皮を構成している暗色、厚膜の細胞は栄養を与えても菌糸を生じないが、皮質を構成する細胞は細胞質に富み、菌糸を生ずる能力を有することが明らかになった。したがって CHET (1968) が *Sclerotium rolfii* について推定しているように外皮層が水分あるいは栄養吸収に対する機械的障壁の役を果し、下層の細胞の菌糸化にとっても障壁になっていることは針あるいはカーボランダムにより外皮を附傷した菌核は菌糸発芽が速やかにおこることからも証明される。しかし、これら処理をしない場合にもしばしば自発的な菌糸発芽がおこったことは菌核を表面殺菌する際の攪拌などにより外皮層が損傷を受けたことも一つの原因と考えられる。一方、自然土壤中においてはダニなど mycophagus な小動物の食痕、土壤微生物の着生などによる外皮の損傷、また菌核の一部から子う盤が発生する際の外皮層の破開などもあり、これらが菌糸発芽の原因となるであろう。

菌糸発芽は子う盤発芽を抑制するが、菌糸生育程度が少ない菌核は子う盤発芽がおこる場合もある。しかし菌糸がある程度旺盛に生育した菌核にはもはや子う盤発芽はおこらない。菌糸発芽のみをした菌核の自然土壤中における生存率は子う盤発芽をしている菌核にくらべてきわめて低い。一般に土壤中に生育した菌糸が寄生的にあるいは腐生的に増殖出来ない場合に菌は土壤中で死滅する。したがって菌糸により寄生し得る寄主植物が附近に存在しなければ菌糸発芽は *S.*

sclerotiorum の生存にとって不利になると認められる。

3. 菌核発芽における子のう盤発生の過程 とそれに関与する要因

成熟菌核は構成菌糸細胞を覆う繊維層として β -1, 3 glucan が蓄積し、細胞内にはポリリン酸、glycogen などが蓄積するなどエネルギー源に富んだ状態にあるが、個々の菌糸細胞はミトコンドリアの退化によっても推定されるように生理的にはきわめて不活性な状態にある。かかる休止状態にある菌核細胞から子のう盤が生ずる機作を明らかにするためには子のう盤発芽の過程について形態的にまた貯蔵物質の代謝の面から検討する必要がある。

本節においては菌核を構成する組織のどの細胞から子のう盤発芽が開始されるか、またどのような過程で行なわれるかを光学顕微鏡レベルで観察し、あわせて温度など発芽過程に関与している要因について検討した。

a. 子のう盤柄原基の形成および発達

子のう盤は菌核が発芽して生ずる肉質、柱状の器官の先端部から発達する。この際光線を必要とし、暗黒下では柱状のまま伸長する (BJÖRLING, 1952)。すなわち柱状器官の生長と子のう盤の発達とは相 (phase) を異にする。子のう盤の発達していない柱状器官を子器原基 (小河原, 松浦, 1939) あるいは未成熟子のう盤 (池上, 1959) とした報告があるが、これらは形態学的、発生学的には正確な名称とは考えられない。最近これを菌柄 (成田, 1966) あるいは柱状体 (本田ら, 1974) とした研究者もいるが、ここでは外国で一般に用いられている apothecial stipe (HENSON and VALLEAU, 1940; HENDERSON, 1962) または Apothecienstiele (BJÖRLING, 1952) に当たる語として“子のう盤柄”を用いることとした。本項では菌核組織から子のう盤柄組織が発生する位置、発達の時間経過などについて検討するが、そのような菌核組織中で分化し、将来子のう盤柄に発達する細胞集団を“子のう盤柄原基” (apothecial stipe primordia) と呼ぶことにした。

(1) 実験材料および方法

供試菌核は Sm-5 菌株をインゲン葉煎汁寒天上で形成させたものである。菌核は実験開始までシャーレに入れ、保湿せず低温下に保存した。ポリウレタンスポンジ発芽床に菌核を置き、15°C に保った。置床した菌核のうち100コを発芽率記録用にあて、残りの菌核から10ケずつ任意に1~2日間隔で採取し、固定した。なお菌核の採取、固定は置床直前から対照菌核の発芽率がほぼ最高に達するまで続けた。すべての菌核は FAA で固定し、ethanol, n-butanol 系列で脱水後パラフィン包埋した。切片作製を容易にするため前章で述べた方法により材料を軟化し、Minot 型ミクロームで厚さ約 10 μ m の切片にした。

菌核中の子のう盤柄原基の計数および大きさの測定は菌核切片上でのみ可能となる。したがって誤差をなるべく少なくするために厚さにむらのない、状態の良い連続切片を菌核一コにつき100~150枚供試した。切片は Haupt の貼付液 (JENSEN 1962) を用いスライドグラスにはりつけ、乳酸で酸性にした1% aniline blue 水溶液で染色後、常法によりカナダバルサムで封じ、検鏡した。

(2) 結 果

子のう盤柄原基の発達過程を4期に分け Fig. 9 に模式的に示した。

子のう盤柄原基の発達は次のような過程を経て行なわれる。

第 I 期：髓組織の外皮層に近い部分に巾約 1.0 μ m の菌糸細胞が生じ、次第にその数を増して分裂組織状の菌糸集団となる (Plate 11-1, 2)。このときに巾 2.0~2.5 μ m の菌糸細胞が周辺部ときには内部にも生じているのが認められる。これら光学顕微鏡下で髓組織菌糸と識別し得る菌糸細胞の発生から明らかな分裂組織状を呈するまでを原基発達の第 I 期とした。原基細胞は髓組織菌糸と異なり繊維層を欠き、かつ染色性が強いことから細胞質に富むと認められる。

第 II 期：次いで原基の周辺部に褐変が起り (Plate 11-3)、あるものは原基の内部にまで褐変が進行していた (Plate 11-4)。この褐変は褐変、厚膜化した細胞の出現によるように見られるが、光学顕微鏡によっては充分にその状態を明らかにし

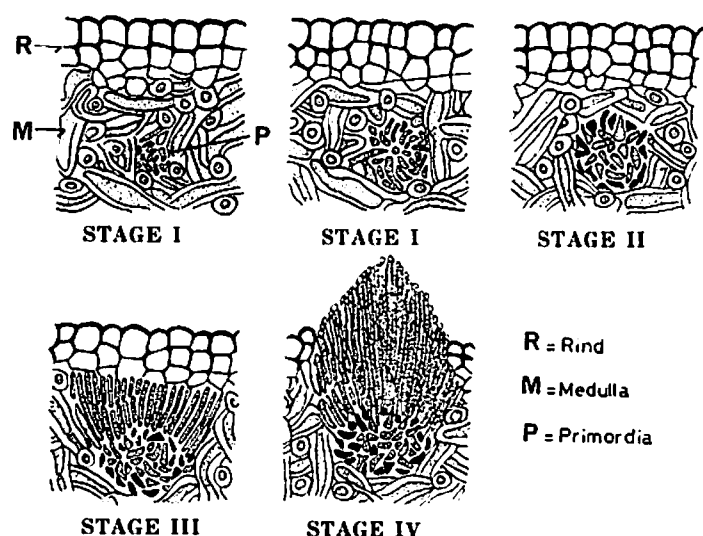


Fig. 9 Diagram illustrating a developmental sequence of apothecial stipe primordium.

来なかった（本章第5節で電子顕微鏡観察の結果に基き論議する）。

第 III 期；周囲の褐変した原基から染色性の強い菌糸が外皮層に向って生育し髓組織とは明らかに異なる組織を外皮層の直下に形成する（Plate 11-5）。

第 IV 期；第 III 期の原基はさらに発達し、若い子のう盤柄となって生長を開始し、外皮層を破って外部に現われる（Plate 11-6）。

次にこれら各発達段階を経過する時間をみるため発達期別の原基数の増減をしらべ Fig. 10-B に示した。原基数は菌核 1 コから得られた切片 100 枚当りに認められた原基の数であり、その菌核 10 コの平均値を図中に示した。

第 I 期の状態を示す原基は菌核を発芽床において 2 日後に認められた。その後、原基数は急激に増加し約 3 日後に最大に達してのち次第に減少した。すなわち、次期への移行が進んでいるとみられる。

第 II 期の状態を示す原基は第 I 期の原基が最初に認められてから約 2 日後に出現する。その数は第 I 期の状態にある原基が少なくなるとともに増加する。すなわち、第 I 期の原基は時間の経過とともに褐変して第 II 期の状態となる。しかし第 II 期の状態にある原基の数は第 I 期にあると認めた原基の数よりもなお多くなる。このことは

あとで述べるように第 I 期原基の形成は菌核発芽の間にも引続きおこること、また第 II 期の状態から次の段階への移行がきわめて緩慢であることに起因すると考えられる。

第 III 期の原基は第 I 期の原基が最初に出現してから約 3 日後（菌核置床後 5 日）に認められるが、発現後その数の増加は緩慢であり、第 II 期の状態となるものが増加するのに対しその数はきわめて少ない。すなわち、第 III 期への原基の発達はある程度に抑制されているとみられる。

第 IV 期の状態となる時期と肉眼で認められる菌核発芽の時期との関係は Fig. 10-A に示した。すなわち、原基が第 IV 期の状態になる時期は菌核の肉眼で判定し得る発芽より約 2 日早く、菌核置床後 7 日であった。

以上の結果から、菌核の肉眼観察で認められる発芽に先立って菌核内部で原基が生じ、一連の過程を経て発達することは明らかである。しかし、菌核中に生じた原基のすべてが同調的（synchronous）に発達するのではない。

次に個々の原基の生長（growth）と次の発達期への移行との時間的關係をみるため、出現するすべての原基の大きさを発達期別に経時的にしらべ Fig. 11 に示した。

第 I 期の状態にある原基は最初に識別されるときにはすでに直径 20.8~46.8 μ m（平均 31.8 μ m）に

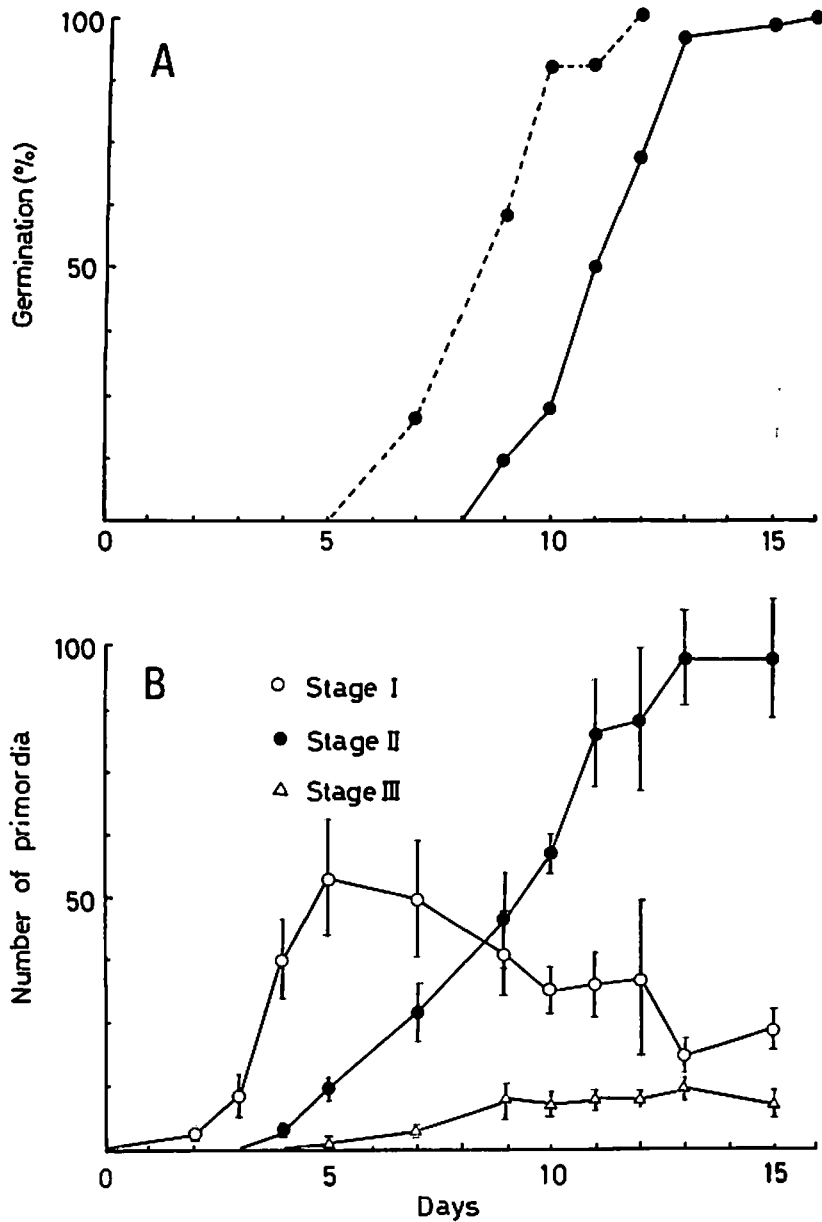


Fig. 10 Comparative time requirement for sclerotial germination and for stipe primordium formation in sclerotial tissue.

A) Germination rates of sclerotia determined by externally visible stipe protrusions (solid line), and by formation of stage IV-primordia in sclerotia (dotted line). The former determination was made with 100 sclerotia and the latter was microscopically with 10 of those collected at each examination time correspondingly to that shown in B).

B) number of the stipe primordia in the developmental stages. The figure indicates the number of primordia found in 100 sections of sclerotia at each examination time. The vertical line at each point indicates standard error.

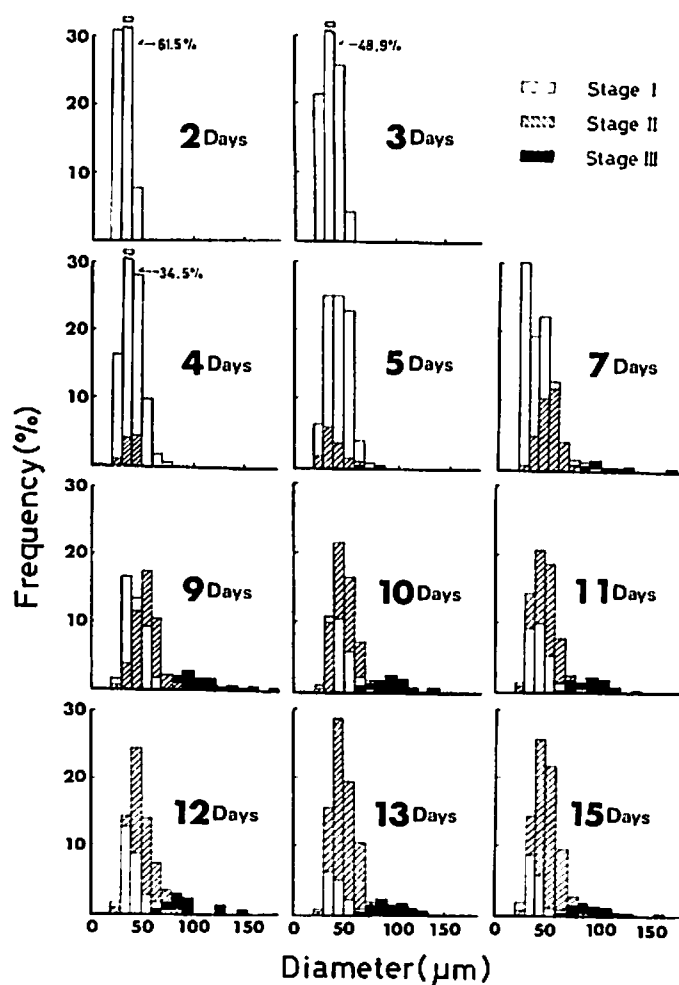


Fig. 11 Size distribution of stipe primordia in the developmental stages at each examination time. The measurements were made for all of those found in the given sections of sclerotia.

達していた。その後、第 I 期原基は直径が大きくなることから明らかに生長しているとみられるが、一方その後も直径の小さな原基が引続き現われる。そのためすべての第 I 期原基を平均したとき直径の増加は顕著ではない。すなわち、菌核置床後 7 日に直径は $20.8 \sim 98.8 \mu\text{m}$ の間にあり一部のものは最大になるが、その平均値は $44.5 \mu\text{m}$ で最初に第 I 期原基が識別されたときの平均直径 $31.8 \mu\text{m}$ よりあまり増加していない。この小型の原基は実験期間を通じて認められたが、このことは菌核が発芽した後も新しい原基の分化が継続して行なわれるとした前の観察結果を裏付ける。

最初に出現した第 II 期の原基は直径 $20.8 \sim 46.8$

μm (平均 $37.8 \mu\text{m}$) であった。しかしその後、平均直径は終始第 I 期原基よりもやや大きい、その直径の分布は第 I 期におけるほぼ同一の範囲内にあった。このように第 I 期と第 II 期の状態を示す原基の直径の分布が重なり合うことは第 I 期から第 II 期への移行すなわち原基の褐変が原基の大きさの増加と無関係に行なわれていることを示している。

第 III 期原基については不整形のものが多く、その大きさを示すため第 II 期原基であった部分も含めて外皮に対して垂直および水平方向にそれぞれの最大長を測定し、その平均を直径とした。その結果、最初の直径は $65.0 \sim 85.8 \mu\text{m}$ (平均 78.0

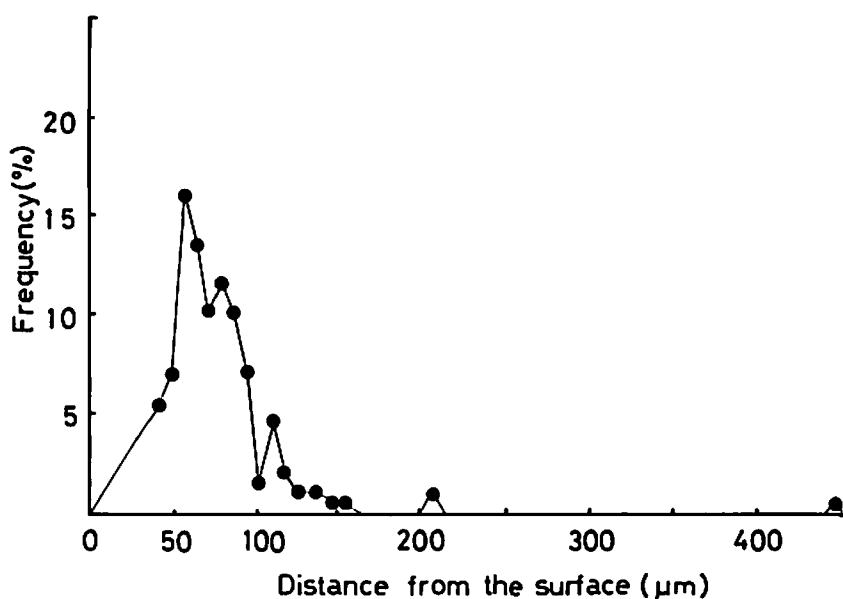


Fig. 12 Depth distribution of the initiation sites of stipe primordia in sclerotial tissue. Two hundred measurements were made for the stage II-primordia arising in the sclerotia incubated for 11 days.

Table 23. Number of apothecial stipes produced from medullary tissue blocks in various size *

Size of blocks	Days of incubation on urethane sponges				
	16	24	30	36	120
Under 1 mm	0	0 (43)**	0	0	1
1—1.5	0	0 (28)	0	0	3
1.5—2	0	0 (10)	0	1	9
Over 3 mm	0	4 (3)	5	6	12
Intact sclerotia	6	26 (—)	40	49	60

* Observations were made for 60 blocks for each size range

** (), Number of tissues autolysed

μm) でその後徐々に増大した。

以上各発達期にある原基の大きさについての結果も先の実験結果と同じく原基発達が同調的に進行しないことを裏付ける。

次に菌核の髓組織から原基が分化する位置および髓組織の菌糸が原基に分化し得る能力について実験を行なった。原基分化の位置については発芽床において 11 日目の菌核切片にみられた合計 200 個の原基について菌核表面からの距離を測定した。

Fig. 12 に示したように原基はおおむね菌核表面から 50~90 μm の深さのものが最も多く、外皮層の厚さは 17.0~50.0 μm の間にあるから原基の形成は髓組織の表面にきわめて近い部分で起

る。まれに 450 μm のところにも認められたが、菌核全体の大きさからむしろ表面に近い位置である。一方、原基形成部位すなわち菌核を置床した際の菌核の上面と下面では原基形成頻度にちがいは認められなかった。

これらの結果から髓組織周辺部の菌糸細胞は何れも子のう盤柄原基に分化する能力を持つ可能性があると考えられるが、内部の菌糸細胞にはその能力が全くないのか、換言すれば菌核が形成されるときにすでに周辺部菌糸細胞の分化能力が決定されるか否かは明らかではない。この点を検討するため以下の実験を行なった。

先ず、外観的に完全に成熟した菌核を半截し、切断面を上に向けて保湿したポリウレタンスポン

ジ上に置き、15°C に保った。その結果切断面には外皮層が再生し、約1カ月後には正常な子とう盤柄が生じた (Plate 12-1)。

次にインゲン菜培地上に形成された菌核の比較的大型のものを撰び、殺菌したかみそりでその髓組織より一辺1 mm 以下、1~1.5 mm、1.5~2 mm、3 mm 以上の4種の立方体を切り出した。これらの組織片をそれぞれ60 コずつ保湿ポリウレタンスポンジ上に置き、約4°C に1カ月保った。その後15°C に移して発芽を観察した。対照は無傷菌核とした。

Table 23 に示したように1 mm 以下の組織片は殆どが自己崩解したが、わずかなものは残り、120日後には子とう盤を形成した。組織片の自己崩解は外皮再生後に菌糸生育しておこるものもあるが、再生前に組織片表面から菌糸が生育し崩解したことが多い。一方、組織片の大きいものほど子とう盤柄を生ずるものが増え、それらは正常な子とう盤に発達したが (Plate 12-4)、無傷菌核に比較すると形成する割合は少なかった。これらの組織片のバラフィン切片について観察した結果、子とう盤柄は無傷菌核と同様に再生した外皮直下の髓組織から生じている (Plate 12-2, 3)。

b. 近縁種の菌核中における子とう盤柄原基の形成

S. trifoliorum 他3種について観察した。

(1) 実験材料および方法

S. trifoliorum; 赤クローバ罹病組織より分離し、さらに単子う胞子分離した菌株、*S. alii*; タマネギ葉上に形成された菌核より得た単子う胞子分離株、*S. borealis*; オーチャードグラス雪腐罹病株上の菌核より生じた子とう盤柄組織片の分離株、*Monilinia mali*; 発芽菌核を70% ethanol で固定保存した標本 (星野好博氏の御好意による)。

これらの菌株は *M. mali* を除いてインゲン菜煎汁寒天上で菌核を形成させ、*S. sclerotium* と同じ条件で発芽させた。すべての菌核は FAA で固定し、前述の方法でバラフィン切片とした。切片は *M. mali* のみは 0.05% toluidine blue (pH 4.6 酢酸緩衝液中)、他は 1.0% aniline blue で染

色、検鏡した。

(2) 結 果

Sclerotinia trifoliorum, *S. alii*, *S. borealis* の何れの発芽中の菌核もその外皮層に近い髓組織中には周囲の組織よりち密な、染色性の強い菌糸集団がしばしば認められ、なかには褐変のみられるものもあった (Plate 13-3, 7)。外皮層を破った状態の若い子とう盤柄の基部にはすべて褐変した細胞集団が認められた (Plate 13-2)。すなわち、これらの種の菌核発芽においても *S. sclerotium* と同様の過程を経ると推定される。一方、*M. mali* の菌核の髓組織は pseudoparenchymatous であり *Sclerotinia* とは異なるが、子とう盤柄原基はやはり髓組織の周辺部に生じ、その発達過程で褐変する (Plate 13-5, 6)。

c. 子とう盤柄原基の発達に及ぼす温度の影響

菌核を発芽床に置く前に低温下で多湿に保つとき、その期間に比例して菌核の発芽が速くなる。多湿低温の発芽促進作用を解明するため、これまでに行なった発芽温度 15°C と異なる温度においた菌核について原基の形成を検討した。

(1) 実験材料および方法

Sm-5 菌株をインゲン菜煎汁寒天に 20°C で培養し、菌核を形成させた。菌核は 9 cm 腰高シャーレ中の保湿したポリウレタンスポンジ上に置き、4°C、15°C、25°C に30日間保ち、その後15°C に移した。子とう盤柄原基の形成をみるため置床直後より5日間隔で10コずつの菌核を採取し、FAA で固定した。またこれと同時に各温度においた菌核60コについて発芽率の推移を肉眼観察により調査した。切片の作製、染色その他はすべて前項と同様である。

(2) 結 果

Table 24 に示したように4°C および25°C では肉眼で認め得る菌核発芽は全くみられないが、15°C に移すと、4°C に置かれていた菌核は急激に発芽し、その率は対照とした15°C に置いたものよりまさった。一方、25°C に置かれていた菌核も15°C において急激に発芽したが、4°C 前処理区の菌核より発芽がややおくれ、最終的な発芽

Table 24. % Germination of sclerotia during pre-incubation period at different temperatures and post-incubation period at 15°C

Pre-incubation temperatures	Days after seeding of sclerotia												
	Pre-incubation period						Post-incubation period at 15°C						
	5	10	15	20	25	30	31	33	35	38	40	52	54
15°C (Control)	0	0	0	15.0	40.0	48.3	53.3	55.0	58.3	61.6	63.3	63.3	65.0
4°C	0	0	0	0	0	0	0	0	88.3	90.0	98.3	98.3	100
25°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	51.7	65.0	68.3

Table 25. No. primordia occurred in sclerotia during pre-incubation period at different temperatures and post-incubation period at 15°C*

Pre-incubation temperatures	Developmental stages	Days after seeding of sclerotia												
		Pre-incubation period						Post-incubation period at 15°C						
		5	10	15	20	25	30	31	33	35	38	40	52	54
15°C (Control)	I	15.4	31.3	24.0	9.1	10.5	3.8	10.8	6.8	6.4	6.1	2.9	4.6	5.1
	II	0	25.0	75.0	81.0	105.7	77.9	81.7	77.9	69.9	92.0	68.2	95.8	100.4
	III	0	0.6	0.3	4.8	3.4	4.1	5.6	3.7	4.0	1.7	2.7	4.8	3.4
4°C	I	3.4	4.7	12.1	26.8	23.5	23.7	24.5	10.1	9.1	8.3	7.2	7.3	6.9
	II	0	0	0	0	0	0	1.2	17.3	53.6	28.3	77.4	40.8	55.3
	III	0	0	0	0	0	0	2.8	6.7	7.4	6.8	6.8	11.7	6.6
25°C	I	2.4	3.0	1.2	2.4	6.9	8.1	8.6	7.7	13.9	26.0	27.9	17.4	10.6
	II	0	0	0	0	0	0	0.2	0.2	1.6	11.0	26.5	36.1	44.9
	III	0	0	0	0	0	0	0.2	0.1	3.7	3.6	5.9	2.9	2.7

* No. primordia/100 sections of sclerotia

率も低かった。

次に菌核内部における子のう盤柄原基の形成消長を検討した結果を Table 25 に示した。すなわち、4°C および 25°C に置いた菌核は発芽が全く認められなかったにもかかわらず菌核置床 5 日目ですでに原基の形成が認められた。4°C においては 15°C に比較してやや緩慢ではあるが、原基形成は順調に行なわれ 30 日後にはかなりの数に達した。一方 25°C においては原基形成はみられるがその数は常に少なかった。これらの事実から原基形成の可能な温度範囲は広いが、その適温は 25°C よりも低いと推定される。

他方 4°C および 25°C における原基形成数は異なるが、何れの温度においても原基の発達は第 I 期に留まり、褐変は全く認められなかった。しかし 4°C ではかなり大型の第 I 期原基がしばしば見出されることから第 I 期の状態で原基の生長 (growth) は続くものと考えられる。しかしこれらの菌核を 15°C に移すと原基の褐変が始まり、同時に子のう盤柄様の組織形成 (第 III 期) も開始

される。とくに 4°C に置いた菌核では第 III 期の出現が早い。

d. 子のう盤形成の制御に関与する要因

発芽中の菌核内部には褐変した原基が多数認められるが、実際に生じる子のう盤の数は少ない。このことから、子のう盤の形成により菌核中にある多くの原基は発達が抑制されている可能性がある。

この可能性について、形成された子のう盤を除去するときあらたな子のう盤の形成すなわち原基のあらたな発育開始の可能性をしらべ、さらに菌核に対する各種生長調整物質が菌核発芽に及ぼす影響もあわせて検討した。

(1) 実験材料および方法

供試菌核および菌核形成法は前に述べたものと同様である。

まず、子のう盤除去の影響を調べるため、9 cm シャーレに入れた保湿ポリウレタンスポンジ上に菌核を 20 ヶずつ置き 1 カ月 4°C で低温処理したのち、15°C で発芽させた。菌核は 6~9 mm およ