

サクラてんぐ巢病菌 (Taphrina wiesneri (Rath.) Mix) の培養性質

誌名	日本林學會誌 = Journal of the Japanese Forestry Society
ISSN	0021485X
著者名	庄司,次男 佐藤,邦彦
発行元	日本林學會
巻/号	56巻5号
巻号補足	
掲載ページ	p. 160-164
発行年月	1974年5月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



 論 文

サクラてんぐ巢病菌 (*Taphrina wiesneri* (RATH.)

MIX) の培養性質

庄司次男*・佐藤邦彦*

Cultural Characteristics of *Taphrina wiesneri* (RATH.) MIX,
Causing the Withches' Broom of Cherry

Tsugio SHÔJI* and Kunihiro SATÔ*

Summary: Some cultural experiments were conducted to make clear the physiological nature of *Taphrina wiesneri* (RATH.) MIX, the causal fungus of the cherry witches' broom. Shaking culture of an isolate T₃-7 was used generally in these experiments. The fungus did not form hyphae in solution media, but multiplied conidia directly in a budding way. Amount of conidial multiplication was counted in utilizing THOMAS' haematocytometer. In the other cases, dry weight of conidial masses was measured after centrifugation of the liquid culture.

Results obtained are as follows:

- 1) *T. wiesneri* multiplied well in potato decoction and yeast extract solution and, on the contrary, multiplication of the fungus was poor in RICHARDS' and CZAPEK'S solution. None of multiplication was observed in cherry-leaf decoction.
- 2) Optimum temperatures for the multiplication of *T. wiesneri* were 15°C to 25°C with a range from 0~2°C to 25°C. At 29°C, multiplication did not occur.
- 3) Multiplication of conidia in potato decoction and SAITO's soy medium reached maximum in 7 days after incubation. Then, amount of multiplied conidia did not decrease until 50 days after incubation.
- 4) Multiplication of the fungus occurred at pH value of 3.2 to 8 with optimum value at 3.2 to 7.2. At pH value of 2.1, inoculated conidia did not multiply.
- 5) Addition of glucose to the cherry-leaf decoction up to 10% promoted well the multiplication of *T. wiesneri*, but an ineffective result was obtained from the addition of sucrose.
- 6) Kinds of cherry as the source of leaf-decoction did not influence the multiplication of *T. wiesneri*. Addition of 2% glucose to various cherry-leaf decoctions did not stimulate the multiplication of the fungus, except the decoction obtained from the leaves of *Prunus lannieniana* var. *speciosa*.
- 7) *T. wiesneri* utilized well KNO₃, CO(NH₂)₂, L-glutamine, L-arginine and L-asparagine as the nitrogen sources for its multiplication.
- 8) Good multiplication of *T. wiesneri* was obtained in RICHARDS' solution having mannitol, starch, glycerine, glucose or galactose as its carbon sources.

要 旨: 1) 供試した7種の培地のうち分生胞子の増殖には、ジャガイモせん汁、酵母液および斉藤氏しょう油培地がすぐれ、CZAPEK、RICHARDS 培地は劣った。サクラ葉せん汁での増殖は不良であったが、2% ブドウ糖の加用により著しく良好となった。

2) 本菌は、0~2°C から 25°C の範囲で増殖し、適温は 15~25°C にある。

3) ジャガイモせん汁と斉藤氏しょう油培地での増殖曲線は、2日目で著しく上昇し、7日目までさらに上昇した。しかしそれ以後 50 日目までの増殖曲線はほぼ平衡状態のまま水平に推移した。

4) 培地の pH との関係では、pH 2.5 ではほとんど増殖せず、pH 3.2~8.0 の範囲で増殖し、酸性側で良く、アルカリ側で劣る傾向がみられた。

5) オオシマザクラ葉せん汁液でのショ糖とブドウ糖の含量との関係では、0~10% の範囲で、量が増すと増殖する傾向がみられ、この傾向はブドウ糖で強く現れた。

6) 供試した無機、有機の窒素化合物ではいずれも増殖がみられたが、特に KNO₃ と CO(NH₂)₂

* 林業試験場東北支場 Tohoku Branch Sta., Gov. For. Sta., Morioka

が良く、またアミノ酸類では、*l*-arginine, *l*-glutamine および *l*-asparagine で増殖が良好であった。

7) 炭素源との関係では、供試したいずれの炭素源でも増殖した。しかし maltose での増殖はやや劣った。

8) サクラとリンゴ葉せん汁では、サクラの種類による増殖の差は認められず、オオシマザクラ葉せん汁を除いてはこれに 2% のブドウ糖を加用しても増殖量に変化がなかった。

I. ま え が き

本菌の生理的性質については、主として生長促進物質の生成と諸性質^{1,2,3)} および若干の栄養生理^{4,5)} について報告があるが、まだ未解明の分野が多く残されている。筆者らは 1971 年来、本菌の研究に着手し、その一環としてすすめている病原菌の培養性質について若干の知見が得られたので報告する。

II. 材料および実験方法

供試菌は 1971 年 5 月に東北支場構内のソメイヨシノ (*Prunus yedoensis*) 上の子のう胞子から分離した菌株 (東北支場樹病研究室保存番号 T₃-7) を用いた。分生胞子をジャガイモせん汁培地と RICHARDS 培地に 20°C で振とう培養して増殖させたものを各種実験の inoculum とした。

50 ml/3 角フラスコ内の 20~30 ml の殺菌培地に 0.5~1 ml の inoculum を接種して培養した。培養方法は、分生胞子の増殖には振とう培養が適していることが確かめられている⁴⁾ので、培養期間中連続振とうすることにした。

温度試験については、50 ml/3 角フラスコ内の PDA 平板培地に 0.5 ml の inoculum を接種して所定の温度で培養した。

窒素源および炭素源と増殖との関係実験では、殺菌後の培地の pH を 4~5 の範囲になるように調整して用いた。

分生胞子の増殖量の測定には、胞子数を THOMA 血球計数器で計数し inoculum を 100 とした指数 (増殖指数) で表す方法と、培養液を遠心分離器にかけて胞子を分離し、60°C で乾燥して菌体の絶乾重量を測定する方法を用いた。

温度試験では、分生胞子を純水とともにやわらかい毛筆で洗い落とし前述の方法で菌体重量を測定した。

なおこれらの実験結果は、処理ごと 3 コのフラスコの平均値をもって示した。

III. 実験結果

1. 各種培地における分生胞子の増殖

培養後 2 日目の結果を表-1 に示す。ジャガイモせん

表-1. 各種液体培地におけるサクラてんぐ巢病菌の増殖 (20°C, 2 日後)

Table 1. Multiplication of *Taphrina wiesneri* in various nutrient solutions (after 2 days incubation at 20°C)

Nutrient solution	Initial pH	Final pH	Index of increase
Potato decoction	6.2	6.3	8,900
SAITO's soy medium	5.2	5.5	2,500
Yeast extract solution*	5.1	5.5	8,000
CZAPEK's solution	5.8	7.4	900
RICHARDS' solution	5.4	4.7	800
Cherry leaves decoction** (a)	5.4	6.3	100
(a)+2% glucose	5.2	6.5	5,200
Inoculum			100

Note: Index of increase

$$= \frac{\text{Number of conidia in nutrient solution}}{\text{Number of conidia in inoculum}} \times 100$$

* Dried extract of yeast 3g, starch 10g, MgSO₄ 0.25g, sugar 10g, dist. water 1l

** Leaves of *Prunus lannesiana* var. *speciosa* 50g, water 1l

表-2. サクラてんぐ巢病菌の増殖と温度 (PDA 平板培地 11 日後)

Table 2. Multiplication of *Taphrina wiesneri* on PDA kept at various temperatures on PDA kept at various temperatures (after 11 days incubation)

Temperature (°C)	Dry weight (mg)
0~2	49.6
5	70.3
10	55.1
15	85.6
20	92.2
25	98.9
29	14.0
Inoculum	10.1

汁、酵母液では約 90 倍に増殖し、次いで斉藤氏しょう油培地が良く、RICHARDS, CZAPEK 培地での増殖は著しくない。さらにオオシマザクラ (*Prunus lannesiana* var. *speciosa*) 葉せん汁液ではほとんど増殖せず、これに 2% ブドウ糖を加用すると良好な増殖を示した。

2. 分生胞子の増殖と温度との関係

11 日間培養した結果を表-2 に示した。これによると本菌は 0~2°C から 25°C までの範囲で増殖し、最適温度は 15°C~25°C 付近にある。

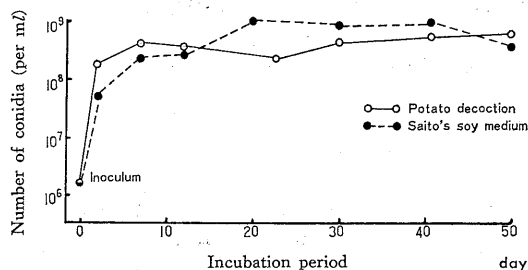


図-1. サクラてんぐ巢病菌の増殖曲線

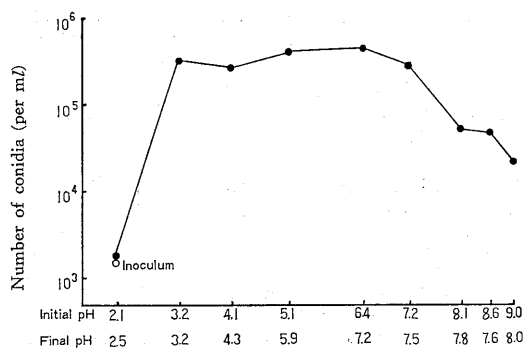
Fig. 1. Multiplication curve of *Taphrina wiesneri*

図-2. サクラてんぐ巢病菌の増殖と水素イオン濃度 (ジャガイモせん汁 5 日後, 16~20°C)

Fig. 2. Multiplication of *Taphrina wiesneri* in potato decoction regulated at different H-ion concentrations (after 5 days incubation at 16~20°C)

3. 分生胞子の増殖と培養時間

ジャガイモせん汁と斉藤氏しょう油液を用いて 50 日間の増殖経過を調べ、その増殖曲線を図-1 に示した。両培地ともに 2 日目で著しく上昇し、7 日目でさらに上昇した。しかしここではほぼ平衡に達し、その後の曲線はほぼ水平に推移した。

4. 分生胞子の増殖と培地の pH

ジャガイモせん汁を培地として、HCl, NaOH で所定の pH 濃度に調整された培地において、5 日間培養後の増殖結果を図-2 に示した。pH 2.5 ではほとんど増殖しないが、pH 3.2~8 の範囲で増殖し、傾向としては酸性側で良く、アルカリ側で劣る。

5. ショ糖およびブドウ糖の含量と分生胞子の増殖

1 の実験において、オオシマザクラ葉せん汁に 2% ブドウ糖を加用することによって著しい増殖が認められたので、これを基本培地として糖の含量と増殖との関係を確かめた。7 日間培養後の結果は表-3 に示すように、両糖とも量が増すことによって増殖する傾向が見られ、この傾向はブドウ糖でやや著しい。

6. 窒素源と分生胞子の増殖

各種の無機、有機窒素化合物およびアミノ酸類を窒素源として分生胞子の増殖を 7~10 日間培養して調べた結果

表-3. サクラてんぐ巢病菌の増殖とサクラ葉せん汁に加用するしょ糖およびブドウ糖の濃度 (20°C 7 日後)

Table 3. Multiplication of *Taphrina wiesneri* in cherry-leave decoction having different sugar concentrations (after 7 days incubation at 20°C)

Kinds of sugar	Concentration	0	0.5	2.0	5.0	7.0	10.0(%)
	Index of increase	200*	200	300	400	400	700
Sucrose		200	300	1,300	2,400	5,500	6,000
Glucose							

* Index of increase

表-4. サクラてんぐ巢病菌の増殖と無機チッソ源の種類 (リチャーズ氏液, 20°C 7 日後)

Table 4. Multiplication of *Taphrina wiesneri* in RICHARDS' solution having different inorganic nitrogens (after 7 days incubation at 20°C)

Nitrogen source	Final pH	Dry weight (mg)
KNO ₃	6.6	152.4
NaNO ₃	6.5	118.2
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.4	111.8
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2.6	111.2
NH ₄ Cl	2.1	129.9
CO(NH ₂) ₂	7.2	152.7
Without nitrogen		46.4
Inoculum		20.2

Note: Initial pH was adjusted so as to become pH 4-5 after sterilization

表-5. サクラてんぐ巢病菌の増殖と有機チッソ源の種類 (リチャーズ氏液, 20°C 7 日後)

Table 5. Multiplication of *Taphrina wiesneri* in RICHARDS' solution having different organic nitrogens (after 7 days incubation at 20°C)

Nitrogen source	Final pH	Index of increase
L-asparagine	3.2	1,330
L-glutamine	3.5	1,400
L-glutamic acid	3.0	690
L-arginine	3.5	1,670
L-lysine	3.5	370
glycine (aminoacetic acid)	3.7	310
Hydroxy-L-proline	4.0	440
L-histidine	6.2	270
L-tryptophan	3.0	440
L-serine	3.7	220
Without nitrogen	4.5	130
Inoculum		100

Note: Initial pH was adjusted so as to become pH 4-5 after sterilization

果を表-4, 5 に示す。この結果から供試したすべての無機、有機窒素化合物において増殖が見られ、特に KNO_3 と $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ が良好であり、ほかのものでは大差がなかった。またアミノ酸類では、*L*-arginine, *L*-glutamine および *L*-asparagine で良く増殖した。

7. 炭素源と分生胞子の増殖

7種の炭素源を用いて分生胞子の増殖を10日間培養して調べた結果を表-6に示した。最も良く増殖したのは、mannital と glycerine で、次いで starch であり、glucose, galactose および sucrose もよいが、maltose ではやや劣る。

8. 各種サクラの葉およびリンゴ葉せん汁液における分生胞子の増殖

各種サクラの葉およびリンゴ葉せん汁を用いて分生胞子の増殖を5日間培養して調べた結果を表-7に示す。

表-6. サクラてんぐ巢病菌の増殖と炭素源の種類
(リチャーズ氏液, 20°C 10日後)

Table 6. Multiplication of *Taphrina wiesneri* in RICHARDS solution having different carbon sources (after 10 days incubation at 20°C)

Carbon source	Final pH	Dry weight (mg)
Galactose	4.5	134.2
Maltose	5.4	50.2
Glucose	3.4	136.8
Sucrose	3.3	113.0
Starch	5.7	145.8
Mannitol	5.1	230.5
Glycerin	3.2	168.1
Without carbon		10.1
Inoculum		11.4

Note: Initial pH was adjusted so as to become pH 4-5 after sterilization

表-7. 各種サクラ葉せん汁におけるサクラてんぐ巢病菌の増殖 (20°C 5日後)

Table 7. Multiplication of *Taphrina wiesneri* in the leaf-decoctions made from various species of cherry (after 5 days incubation at 20°C)

Species of cherry	Index of increase	
	No glucose	2% glucose
<i>Prunus leveilleana</i> (Kasumi-zakura)	1,100	1,500
<i>P. sargentii</i> (Ezo-yama-zakura)	1,100	1,600
<i>P. lannesiana</i> var. <i>speciosa</i> (Oshima-zakura)	1,500	5,300
<i>P. lannesiana</i> (Sekiyama)	1,200	1,300
<i>P. yedoensis</i> (Somei-yoshino)	1,400	1,300
<i>P. × subhirtella</i> (Ko-higan)	1,300	1,700
<i>P. pendula</i> (Ito-zakura)	1,500	1,300
<i>Malus punila</i> var. <i>dulcissima</i> (Ringo)	2,100	2,600
Inoculum	100	100

この結果からすべての種類のサクラ葉およびリンゴ葉せん汁間の増殖には差はなかった。また2%ブドウ糖を加用したものではオオシマザクラ葉せん汁だけが増殖を促進されたが、ほかのものでは大差がなかった。

IV. 考察および結論

田中ら⁵⁾は、分生胞子の増殖には天然培地が適し、特に酵母培地で著しいとし、合成培地は劣ることを報告している。本実験結果もこの報告とよく一致する。松山ら⁴⁾は、増殖に好適な合成培地を報告している。次に田中ら⁵⁾は、ソメイヨシノ葉せん汁液では、胞子の増殖は著しくないと述べ、高圧滅菌後のせん汁液は鮮明なブドウ酒色を呈し、強い芳香を感じたことからある種フェノール物質が含有されているものと推定している。本実験で用いられたサクラの各樹種のせん汁液でも同様な芳香を有し、分生胞子の増殖は良好でなかった。しかしオオシマザクラ葉せん汁だけは2%ブドウ糖を加用することによって著しい増殖がみられた。この原因については、本実験の範囲内では述べるべき根拠がなく今後検討を要しよう。

これまでの諸報告では、本菌の培養適温を実験的に示した報告が見あたらない。本実験において15°C~25°C付近が適温であることが実験的に確かめられた。

50日間の培養期間で分生胞子の増殖経過を調べた結果から、微生物の一般の経過で示される定常期が著しく長く、死滅期は明らかでなかった。このことについては田中ら⁵⁾も22日間の培養期間で同様な結果を得ている。

松山ら⁴⁾によれば、実験開始時のpH 1.85でも増殖し、最適pHは2.6~6.5であると報告している。本実験でもpH 2.5を除いてほぼ一致している。さらにpH 7.5~8のアルカリ側でも増殖できた。

微生物の合成培地では無機窒素化合物には一般に KNO_3 が用いられているが、本菌もこの物質で最も良く増殖した。

炭素源では良く増殖できる物質として松山ら⁴⁾は sucrose, maltose および starch を、またあまり増殖できないものとして glycerol, lactose をあげている。本実験では starch は同様であるが、mannitol が最も良く、glycerin も比較的良く、maltose は供試されたものの中では最も増殖しなかった。この違いは使用された基本培地に起因しているものと思われる。

引用文献

- 1) 服部静夫・木下三郎：さくらノ天狗巢病菌 *Taphrina ceraci* ノ作用物質ニツイテ (予報), 植物学雑誌 54(638):

- 58~63, 1940
- 2) 平田正一: 病態植物の植物ホルモンに関する研究 (第3報) *Exobasidium*, *Taphrina* 及び *Ustilago* 属菌の培養基上における生長素の産生, 日植病報 22(3): 153~158, 1957
 - 3) MATSUYAMA N. and MISAWA T.: Studies on the hypertrophic disease caused by *Taphrina* species II. A plant growth substance excreted by the pathogens, Tohoku Jour. Agr. Res. 14(1): 1~12, 1963
 - 4) MATSUYAMA N. and MISAWA T.: Studies on the hypertrophic disease caused by *Taphrina* species I. Nutritional behaviour of pathogens, Tohoku Jour. Agr. Res. 13(4): 293~304, 1962
 - 5) 田中 潔・紺谷修治: サクラのてんぐす病—罹病枝葉の観察と胞子の培養実験 (予報) 一, 日林関西支講 22: 161~163, 1971

(1973年11月26日受理)