

び 3~5 mm の 2 群に分けて用いた。発芽率が同程度のシャーレ 2 コを一对として撰び、その一方を子のう盤柄除去区、他を放置区とした。除去区については同一シャーレの菌核から生じた子のう盤柄を間隔をおいて 3 回反復除去し、その都度子のう盤柄数を記録した。放置区については菌核上に生じている子のう盤柄と成熟子のう盤数の合計数を除去区と同時に記録した。これらを大型菌核、小型菌核について比較した。

次に生長調整物質の菌核発芽に及ぼす影響については、2, 4 dichlorophenoxyacetic acid (2, 4 D), B-(2 furyl) acrylic acid, gibberellic acid K 塩, indol-3-acetic acid (IAA), maleic hydrazide (MH), 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid (2, 4, 5 TPA), (以上 Nutritional biochemical Co. 製) およびサイトカイニンとして kinetin (武田薬品製) を用いた。また *Sclerotinia sclerotiorum* 自身の生産するホルモン様生理活性物質である sclerin (里村, 1968) も用いた (里村教授より分譲された)。供試物質の吸収を良好にするため菌核はデシケーター中に保ち、乾燥気味にしてのち溶液に浸漬した。供試物質はそれぞれ 1, 10, 100 ppm の蒸留水溶液としたが、水に難溶のものはあらかじめ微量の ethanol または 1 N NaOH に溶かしたのち蒸留水を加えた。なお溶液の pH はとくに調整しなかった。これらの溶液を 100 cc 容三角フラスコに 10 cc ずつ分注しこれに菌核 25 コずつを入れて口をアルミ箔で封じ 15°C における発芽状態を観察した。

## (2) 実験結果

Fig. 13 に示したように発芽中の菌核から子のう盤柄を除去すると再び子のう盤柄が形成される。除去を 3 回反復した結果、菌核の大きさ 6~9 mm の場合除去した子のう盤柄の合計は放置区の約 4 倍となり、3~5 mm の菌核でも放置区の約 2 倍であった。なお反復除去によって無処理より多くの子のう盤柄を生じた菌核も自己崩解しなかった。すなわち、組織学的に明らかにされた菌核組織中の原基数からみれば、なお子のう盤柄の反復形成の余地は残っていると考えられた。

以上の結果から菌核中に生ずる子のう盤柄原基

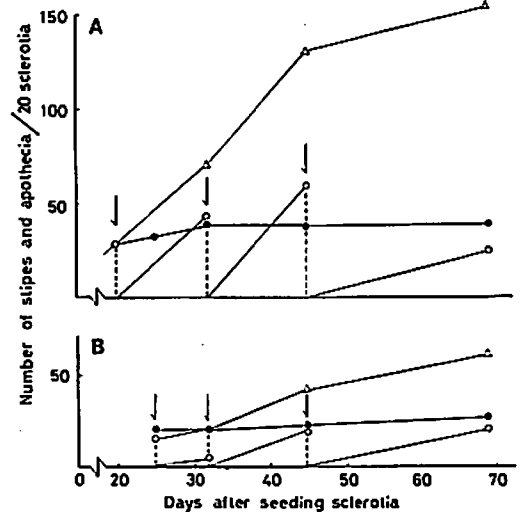


Fig. 13 Repeated stipe recovery from sclerotia after the periodic removal of stipes.  
 —○—Number of stipes removed at each time (arrows); —△—Total number of stipes removed; —●—Number of stipes and apothecia on the control sclerotia.

は第 II 期に至り、褐変して休止状態となり、すでに形成された子のう盤柄あるいは成熟子のう盤が除去されればそれらの原基は順次活性化されるものと考えられる。

子のう盤とその原基との関係は高等植物における頂芽と側芽との関係に類似しており、菌核発芽における生長調整物質が関与する可能性が考えられる。そこで B-(2 furyl) acrylic acid 他 7 物質の菌核発芽に及ぼす影響を検討した (Table 26)。

gibberellic acid は菌核発芽に対してなんらの影響も与えず、kinetin は発芽を阻害した。さらに B-(2 furyl) acrylic acid, 2, 4 D, IAA, MH, 2, 4, 5 TPA によっても阻害がみられ、その濃度が高くなるにつれ阻害は強くなる。すなわち auxin, 抗 auxin の区別なく発芽が阻害された。これに対し sclerin は発芽を促進し、その作用は 100 ppm でとくに顕著であった。

## e. 小括

発芽中の菌核の解剖学的観察はこれまでに *Sclerotinia gladioli* (= *Stromatinia gladioli*) について行なわれている (DRAYTON, 1934)。S. *gladioli* は S. *sclerotiorum* と異なり広義の菌核

Table 26. Effect of plant growth regulators on the germination of sclerotia

| Substances   | Concentration ppm | % Germination*                  |      |      |      |      |      |
|--|-------------------|---------------------------------|------|------|------|------|------|
|  |                   | Days after seeding of sclerotia |      |      |      |      |      |
|  |                   | 17                              | 19   | 21   | 23   | 27   | 31   |
| B-(furyl) acrylic acid                             | 1                 | 0                               | 1.3  | 8.0  | 14.7 | 20.0 | 26.7 |
|  | 10                | 0                               | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
|  | 100               | 0                               | 0    | 0    | 0    | 1.3  | 2.7  |
| Gibberellic acid                                   | 1                 | 0                               | 1.3  | 4.0  | 8.0  | 9.3  | 14.7 |
|  | 10                | 1.3                             | 1.3  | 2.7  | 8.0  | 10.7 | 13.3 |
|  | 100               | 0                               | 2.7  | 5.3  | 6.7  | 12.0 | 13.3 |
| Indol-3-acetic acid (IAA)                          | 1                 | 1.3                             | 1.3  | 2.7  | 2.7  | 8.0  | 12.0 |
|  | 10                | 0                               | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
|  | 100               | 0                               | 0    | 1.3  | 4.0  | 5.3  | 6.7  |
| 2, 4-Dichloro-phenoxyacetic acid (2, 4D)           | 1                 | 0                               | 0    | 0    | 0    | 5.3  | 10.7 |
|  | 10                | 0                               | 0    | 2.7  | 4.0  | 6.7  | 6.7  |
|  | 100               | 0                               | 2.0  | 2.0  | 2.0  | 2.0  | 6.0  |
| Maleic hydrazide (MH)                              | 1                 | 0                               | 0    | 4.0  | 5.3  | 12.0 | 14.0 |
|  | 10                | 0                               | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
|  | 100               | 0                               | 0    | 0    | 0    | 1.3  | 4.0  |
| 2, 4, 5-Trichloro-phenoxyacetic acid (2, 4, 5-TPA) | 1                 | 0                               | 0    | 0    | 1.3  | 1.3  | 2.7  |
|  | 10                | 0                               | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
|  | 100               | 0                               | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| Kinetin  | 1                 | 0                               | 0    | 0    | 1.3  | 8.0  | 8.0  |
|  | 10                | 0                               | 0    | 0    | 0    | 4.0  | 4.0  |
|  | 100               | 0                               | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| Sclerin  | 1                 | 1.3                             | 10.7 | 12.0 | 21.3 | 29.3 | 37.3 |
|  | 10                | 0                               | 1.3  | 1.3  | 6.7  | 13.3 | 18.7 |
|  | 100               | 22.7                            | 34.7 | 44.0 | 54.7 | 60.0 | 66.7 |
| Control  | —                 | 0                               | 5.3  | 9.3  | 14.7 | 18.7 | 18.7 |

\* Mean of 3 flasks

とみなされる stroma 様の組織から子のう盤が生じ、その際小型分生胞子 (spermatia) による受精を必要とする。DRAYTON (1934) は子のう盤柄に相当する受精器官を receptive body と呼びこれが生ずるに先立って菌核外皮層直下の髓組織中に染色性の強い菌糸集団が形成されることを見出しこれを造囊器菌糸 (ascogonial hyphae) とした。DRAYTON (1934) の顕微鏡写真をみると、その染色性の強い菌糸集団は *S. sclerotiorum* の菌核中にみられる子のう盤柄原基としたものに酷似している。しかしすでに知られているように *S. sclerotiorum* および *S. trifoliorum* など二、三の近縁種においては小型分生胞子の性的な機能は退化し

て homothalic に子のう盤を生ずる (GÄUMAN, 1964)。さらに BJÖRLING (1952) によれば *S. sclerotiorum* および *S. trifoliorum* の子のう盤発達過程においては明確な造囊器の分化はなく子のう形成菌糸 (ascogoneous hypha) は未熟子のう盤の子実層下層 (subhymenial layer) 中の細胞質に富んだやや巾の広い菌糸から生ずる。したがって *S. sclerotiorum* および近縁種の菌核中に認められた菌糸集団が、造囊器菌糸とは考え難くまたそれに直接関係のある菌糸細胞とも思われない。すなわち *Sclerotinia* の菌核の髓組織菌糸から分化した菌糸集団は、子のう盤が形成される以前の haploid 組織である子のう盤柄 (BJÖRLING, 1952)

に発達することは明らかであり、ここに“子のう盤柄原基”と称して支障ないものと考えられる。

*S. sclerotiorum* の菌核は形成後ただちに発芽することはまれで通常、発芽に先立ってある期間を必要とする。この期間はただ休眠期間として扱われているが(成田, 1966; COLEY-SMITH and COOKE, 1971), そのなかには菌核内部で子のう盤柄原基の分化とその発達に要する期間が含まれている。本実験においては組織分化のごく初期の段階についての知見は髄組織の細胞との識別が困難であるため得られなかったが、髄組織中に子のう盤柄原基と認められる菌糸集団を識別し得たのは菌核発芽前約7日であった。したがって菌核の機能的成熟と発芽開始との間に休眠状態があるか否かは今後の検討を要するところであるが、髄組織細胞の一部にはかなり早くからなんらかの変化が起きていることは確実である。

菌核内部に形成される原基の数は生ずる子のう盤の数に比較して非常に多い。原基の形成消長をみると褐変した原基(第II期)の数は菌核を置いたのち時間が経つにつれて増加するが、そのうち子のう盤柄組織に発達するもの(第III期)はきわめて少数であり、これは菌核の発芽期間を通じて変らなかった。第II期におこる褐変は菌核の外皮細胞におけると同様、メラニンの生成に起因するものと考えられる(WILLETTS, 1968; JONES, 1970)。糸状菌におけるメラニン生成によるとされる着色は休眠孢子、老令化した菌糸、子実体外壁および菌核外皮などおおむね生理的活性がきわめて低い細胞あるいは組織に限定される(HIRSH, 1954; CANTINO and HORENSTEIN, 1955; KUO and ALEXANDER, 1967; WILSON, 1968; WILLETTS, 1968)。このような褐変の生理的意義および第II期と第III期の原基の間にみられる数的なちがいを考え合せると原基の発達は第II期の段階で休止すると認められる。すなわち、比較的早く形成した子のう盤柄が活発に生長を続けている間は他の多くの原基の発達は抑制されるものと考えられる。

このことは発芽中の菌核から子のう盤柄を反復除去することによって子のう盤柄の生産が増加す

る事実とも符合する。

子のう盤など子実体を形成して発芽する菌核は一般に大型で(GARRETT, 1970), したがって子のう盤の形成は菌核の貯蔵養分に依存するしかなく、いわば完全な閉鎖系である。したがって多数の原基が同時に発育することは貯蔵養分の急激な消耗を来し子のう胞子の有効な伝播のみならず菌核の生存にも不都合ともなる。そのため大部分の原基は休止状態で留まり子のう盤生産の潜在的な原動力となっているものとみなされる。菌核が土壌条件などきびしい条件に置かれた場合、同一年次間に形成される子のう盤数は通常少ないので数年次にわたって反復発芽する潜在能力が保持されていると考えられ、事実 *S. sclerotiorum* および *S. trifoliorum* ではそのような反復発芽が観察されている(WILLIAMS and WESTERN, 1965)。

菌核の反復発芽は *Sclerotinia* 属菌以外にも多くの糸状菌について知られている。すなわち、発芽して菌糸を生ずるものでは *Rhizoctonia* (PITT, 1964), 分生子梗を生ずるものでは *Verticillium*, *Botrytis* (YU, 1945; FARLEY, ら, 1971; JACKSON, 1972), 子実体を生ずるものでは *Typhula*, *Claviceps* (MACONALD, 1934; COOKE and MITCHELL, 1967) など発芽様式も多岐にわたっている。これらのうち反復発芽回数を示した報告は少ないが、子実体を生ずる菌核の反復発芽能力は分生子梗を生ずるものより劣るようで発芽に要するエネルギー量の差を反映しているものと言えよう。

低温による菌核発芽の促進はその事実が知られているだけで促進の機作を解明しようとする試みは従来殆どなされていない。ただ、麦角菌(*Claviceps purpurea*)については低温による lipase の活性化あるいは糖—糖アルコール転換経路における阻害要因の除去などが考えられているが、何れも実験的裏付けはなされていない(COOKE and MITCHELL, 1969; COLEY-SMITH, and COOKE, 1971)。

本実験の結果から *S. sclerotiorum* の場合、子のう盤発芽に対する低温促進の機作を形態学のある程度説明することは可能である。すなわち、菌核中における原基の形成は 4°C 程度の低温に

においても可能であり、菌核発芽適温の 15°C におけるとほぼ等しい程度の原基形成量が認められる。しかも形成された原基は低温下でかなり生長を続けるが褐変は全くおきない。そのためこれらの原基は子のう盤に発達することなくそのままの状態に留まるが、その数は次第に増加する。このような原基数の増加した菌核を 15°C に置けば生長はかなり進んでいる原基の速やかな生育により子のう盤柄の形成は早く、その結果肉眼で認め得る菌核の発芽に要する時間も短縮される。また原基数の増加によって菌核個体間に発芽速度の差がなくなり、発芽が齊一になると同時に低温処理の行なわれない菌核に比較して発芽率も高くなるものと考えられる。

#### 4. 発芽に伴う菌核貯蔵養分の消費

糸状菌菌核はその貯蔵物質によって脂質型、多糖類型および両者を含む型に大別される (COLEY-SMITH and COOKE, 1971)。菌核発芽におけるこれら貯蔵物質の利用についての知見は少なく *Phymatotrichum omnivorum* について ERGLE (1948) の報告があるに過ぎない。

*Sclerotinia sclerotiorum* の菌核は多糖類型に属し、貯蔵物質の主体は肥厚した髄組織菌糸の細胞壁およびそれを囲む繊維層の成分、 $\beta$ -1,3 glucan であり、そのほか細胞質中には若干の glycogen が含まれていることはすでに前章で明らかにした。菌核の発芽、子のう盤の形成に伴ないこれら貯蔵多糖類の易動化が予想される。

本節においては菌核発芽間における菌核の炭水化物粗分画の量的な変化とこれに関連する加水分解酵素活性の消長について検討した。

##### a. 菌核乾重の減少

*Sclerotinia* における子のう盤形成は菌核内部の貯蔵物質を利用して行なわれるから、菌糸発芽をする菌核のように発芽開始時に外的な栄養供給を必要とするものにくらべれば発芽時の貯蔵物質消費の解析は容易であると考えられる。この間の物質的変化を解明するに当り、まず子のう盤発芽の間の菌核重量の減少を検討した。

##### (1) 実験材料および方法

Sm-5 菌株をインゲン茎培地に 20°C で約 2 週

間培養した菌核を用いた。発芽に伴う菌核重量の変化は次のようにして測定した。12 cm 腰高シャーレにあらかじめ乾燥重を秤量したポリウレタンスポンジ (1 cm 厚) を入れ、蒸留水を加え 10 分間 120°C で高圧殺菌した。ほぼ同じ大きさの菌核をろ紙で余分の水滴をとり、生重で約 3 g ずつをとり、その生重を正確に秤量、記録したのち上記の発芽床に置いた。またシャーレ 5 コ分の菌核を 100°C で乾燥して乾重を求め、これと生重とから実験開始時における供試菌核の乾重比を求めた。発芽床に置いた菌核は 4°C で 1 カ月間低温処理したのち、15°C で発芽させた。なお本実験では発芽後、形成された子のう盤を充分成熟させるため、発芽床の上約 1.5 m から 40 W 白色蛍光管 2 本で照明した。置床後 10 日毎にシャーレ 3 コの菌核をとり出し、各シャーレ別に菌核の生重を測定した。次いで発芽した菌核については菌核部分と子のう盤を分け、それぞれの乾重を秤量した。この際子のう盤は未熟のものと成熟したものとを分けずに乾重を測った。これらのうち菌核部分は乾重秤量後、ウイリー型粉碎機および鉄製乳鉢で粉碎し、100 メッシュのふるいを通して炭水化物分画の抽出材料として用いた。

##### (2) 実験結果

Table 27 に示すように供試菌核は置床 10 日でその半数が発芽し、30 日後の発芽率はほぼ最高に達した。一方、成熟子のう盤は菌核発芽開始後 10 日後ごろより認められ、そのシャーレ当りの最高の形成数は 40 日後の 108 コであった。

Table 27 に示すように発芽初期に子のう盤柄がかなり現われているにもかかわらず、菌核部分の乾重の減少はさほど顕著ではなかった。すなわち、菌核置床後 10 日での子のう盤柄 121 本の形成をみたが、総重量に対する子のう盤重量比 (G) はわずか 2.3% であった。しかし、その後子のう盤の生育が進むにつれて子のう盤重量は漸増し、40 日後には約 15% に達した。なお、置床後 50 日の子のう盤形成数および乾重が少ないのはこのときに供試したシャーレの菌核は発芽率が低かったためである。

実験開始前に求めた菌核の乾重比と各シャーレ

Table 27. Effects of germination and apothecial production on the dry weight of sclerotia

|   | Days after seeding of sclerotia |        |        |        |        |
|---|---------------------------------|--------|--------|--------|--------|
|   | 10                              | 20     | 30     | 40     | 50     |
| A. % Germination of sclerotia   | 51.3                            | 67.4   | 91.1   | 91.1   | 86.0   |
| B. Number of immature apothecia   | 121.0                           | 130.3  | 88.0   | 66.0   | 8.7    |
| C. Number of mature apothecia   | 0                               | 5.3    | 69.0   | 108.3  | 66.3   |
| D. Dry weight of sclerotia (mg)   | 1462.4                          | 1602.9 | 1410.2 | 1208.8 | 1112.8 |
| E. Dry weight of apothecia (mg)   | 9.6                             | 86.1   | 239.4  | 215.3  | 145.8  |
| F. Dry weight ratio of sclerotia to total dry weight (%)<br>$D \div (D+E) \times 100$ | 97.7                            | 95.0   | 85.2   | 84.8   | 88.3   |
| G. Dry weight ratio of apothecia to total dry weight (%)<br>$E \div (E+D) \times 100$ | 2.3                             | 5.0    | 14.8   | 15.2   | 11.7   |
| % Dry weight of sclerotia to the initial dry weight                                   | 102.4                           | 99.1   | 83.6   | 67.8   | 71.9   |

B, C=Average number per petri dish

D, E=Average dry weight per petri dish

に置床する前に秤量した菌核生重から実験開始時における菌核の乾重を算出した。これに対する子のおう盤を除いた菌核部分の乾重の比を各調査時期毎に求め、Table 27 の最下欄に示した。すなわち菌核部分の乾重は成熟子のおう盤数の増加に比例して減少し、菌核置床後 40~50 日で最初の乾重の約 30% に相当する貯蔵物質が消費されると推定した。

### b. 菌核中の炭水化物成分の消長

子のおう盤形成に伴なう菌核の乾物重の減少は菌核中のいかなる成分の消費によるかを検討した。

#### (1) 実験材料および方法

前項の実験に用いた菌核部分の乾燥粉末 1g を再び 100°C 24 時間乾燥し秤量した。これを 50 cc 容ガラス製遠沈管に入れ Schema 1 に示した順序で分画抽出した。

Ethanol 可溶分画は減圧濃縮し、遊離還元糖を SOMOGI & NELSON 法により、全糖をフェノール硫酸法 (福井, 1969) により既知濃度の glucose を標準にして日立 101 型分光光度計を用いて比色定量した。全糖量から遊離還元糖量を差し引いた値を非還元糖量とした。

熱水可溶分画は蒸留水により一定量に希釈し、フェノール硫酸法により全糖量を定量した。

アルカリ可溶分画については 3 倍容の ethanol を加え生ずる沈澱を ethanol および冷蒸留水で洗

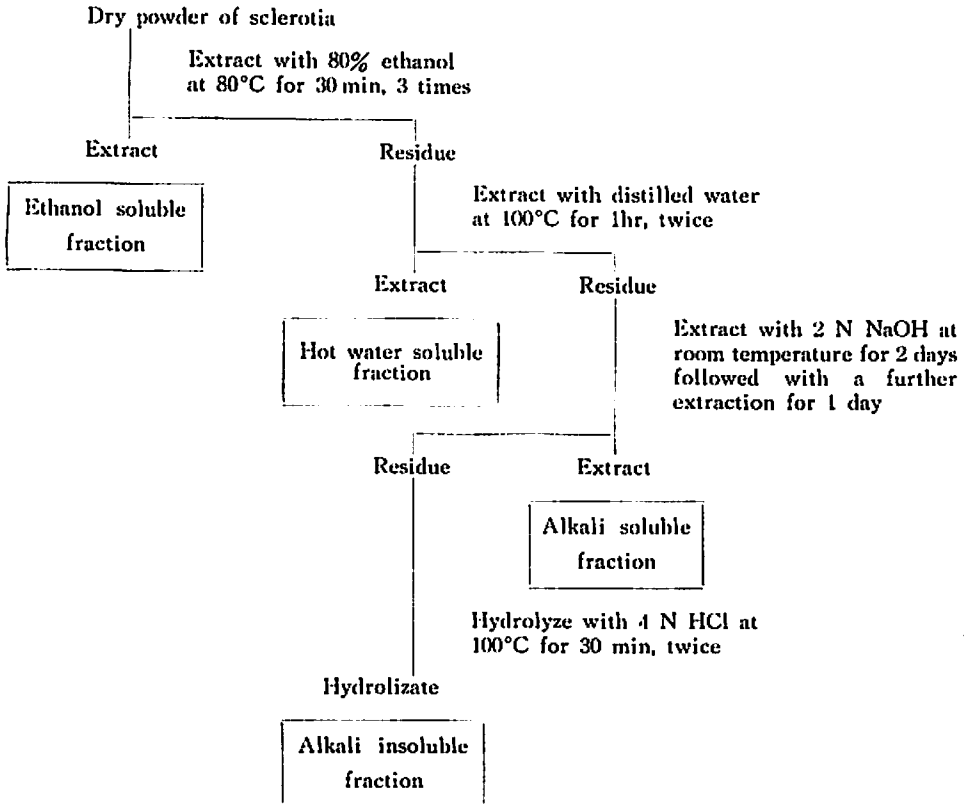
滌液が中性になるまで遠沈洗滌した。沈澱の主体をなすものは  $\beta$ -1,3 glucan と考えられるが (北原, 竹内, 1957), 熱水にも殆ど溶解しないのでホモジオイザーにより蒸留水中に懸濁させた。懸濁液を蒸留水で一定量に希釈し、その 1 ml を 8 N  $H_2SO_4$  1 ml を加え封管中で約 10 時間 100°C で加水分解した。これをさらに一定量に希釈し、フェノール硫酸法により全糖を定量した。

アルカリ不溶分画は減圧下で HCl を除去し、濃縮後、蒸留水で一定量に希釈し、フェノール硫酸法により全糖を定量した。

#### (2) 実験結果

菌核中の各炭水化物分画は glucose 量に換算し菌核生重当りの百分率で示した。これらの菌核発芽に伴なう変化を Fig. 14 に示した。またこの間における子のおう盤の形成量を菌核部分に対する乾重比として示した。

Ethanol 可溶分画中の遊離還元糖はおおむね glucose とみなされる (北原, 1950 b; WANG and Le TOURNEAU; 1971) が、痕跡程度の量しか認められず、その量も発芽中の全期間を通じて殆ど変化しなかった。また trehalose と推定される (北原, 1950 a; Le TOURNEAU, 1966) ethanol 可溶分画中の非還元糖は生重の約 1.3% (乾物の 2.4%) を占めるが、その量は発芽期間中殆ど変化しなかった。



Schema 1. Extraction procedure of component carbohydrates fraction of sclerotia.

アルカリ可溶分画は菌核発芽後、子のう盤の形成数が増加するに伴ない明らかに減少した。この分画は北原、竹内(1957)が菌核中の  $\beta$ -1, 3 glucan (Sclerotan) を抽出したのと同じ条件で抽出したので、その主体をなすものは  $\beta$ -1, 3 glucan と考えられる。

北原、竹内(1957)はアルカリ抽出後の残渣について検討していないので本実験で得たアルカリ不溶分画の本質については不明であるが、アルカリ抽出によって容易に遊離しない、細胞壁を構成する多糖と考えられる。この分画は子のう盤形成後も殆ど減少しなかった。

熱水可溶分画の菌核発芽期間中における変化は明らかではなかった。この分画の組成を推定するため  $\alpha$ -amylase および  $\beta$ -1, 3 glucanase による消化実験を行なった。供試酵素は何れも II 章における菌核切片の消化実験と同じものを用いた。すなわち、熱水可溶分画 7.5 ml, 0.1 M 酢酸緩衝

Table 28. Reducing sugars (mg) liberated from a hot water soluble fraction with enzymes

| Enzyme                 | Concentration* | Reaction time (hrs) |      |      |
|------------------------|----------------|---------------------|------|------|
|                        |                | 3                   | 5    | 27   |
| $\alpha$ -Amylase      | 0.02 %         | trace               | 0.14 | 0.12 |
|                        | 0.2            | 0.06                | 0.07 | 0.11 |
|                        | 1.0            | 0.07                | 0.14 | 0.15 |
| $\beta$ -1,3 Glucanase | —              | 1.14                | 1.67 | 3.92 |

\* Final concentration in the reaction mixture

液 (pH 5.0) 4.5 ml, 酵素溶液 3.0 ml を混和し、toluene 1 滴を加えて 37°C に保った。供試酵素のうち  $\alpha$ -amylase は反応液中最終濃度が 0.02%, 0.2%, 1.0% になるように加え、 $\beta$ -1, 3 glucanase は原液をそのまま酵素溶液とした。一定時間後、反応液を Somogi 法 (福井, 1969) により除たんばくし、SOMOGI & NELSON 法により生成還元糖を比色定量した。各反応時間における値から反応 0 時間における値を差し引き Table 28 に示した。

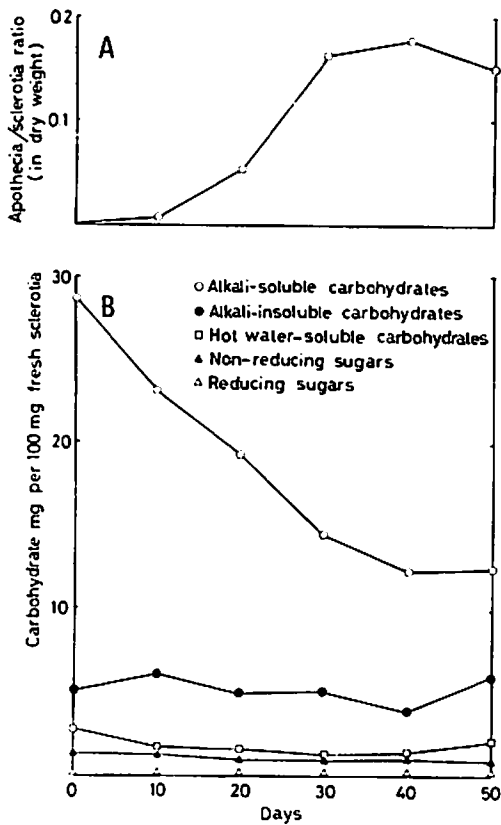


Fig. 14 Changes in various carbohydrate fractions of sclerotia during the sclerotial germination and development of apothecia  
A) Apothecial production  
B) Quantitative changes of carbohydrates in sclerotia.

$\alpha$ -amylase 処理により若干量の還元糖が遊離することから熱水可溶性区画中には glycogen が含まれていることは明らかではあるが、その量が多いとは認められない。一方、 $\beta$ -1, 3 glucanase 処理により相当量の還元糖が遊離するのでこの分画の主体をなすものは  $\beta$ -1, 3 glucan と推定される。

### c. 発芽における加水分解酵素活性の消長

前項で明らかにしたように菌核が発芽し子う盤が形成される間に菌核中の  $\beta$ -1, 3 glucan に相当する分画が減少することから  $\beta$ -1, 3 glucanase の発芽時における活性化が考えられる。また、glycogen, trehalose なども菌核中に含まれているので amylase, trehalase あるいは  $\beta$ -glucosidase などの酵素の発芽時における活性化も考えられる。よって本項においては菌核の発芽に際するこ

れら加水分解酵素活性の消長について検討した。

### (1) 実験材料および方法

供試菌株および菌核形成条件はすべて a, b 項と同様であるが、菌核の発芽を室内散光下に置いた人工気象箱 (コイトロン KB 型) 中で行なったので光量は充分ではなかった。

置床後 3 日毎に任意の菌核を採取し、余分の水をろ紙でとり、4 g (生重) を試料とした。これと平行して菌核発芽率および菌核から生じた子う盤柄数を記録した。なお発芽中の菌核は秤量の前に生じている子う盤柄のすべてを除去した。菌核部分は石英砂 2 g と共に冷却した乳鉢で 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を加えつつ磨砕し、全量を同じ緩衝液で 40 ml として 2000 XG, 4°C で 20 分間遠沈した。この上清を酵素抽出液とした。

活性を測定した酵素と基質は以下の通りである。

$\beta$ -1, 3 glucanase — Laminarin (K&K LABORATORY CO.);  $\beta$ -glucosidase — cellobiose (和光純薬); amylase — 可溶性澱粉 (和光純薬); trehalase — trehalose (和光純薬)。

基質溶液 (0.5%) 2.0 ml, 酵素抽出液 1.0 ml, 酢酸緩衝液 1.5 ml を混和し、37°C に 2 時間保った後、沸とう水浴中で 15 分間加熱し反応を止めた。反応液中の遊離還元糖を既知の glucose 溶液を標準として SOMOGI & NELSON 法 (福井, 1969) により比色定量した。基質溶液のかわりに同量の緩衝液を加えたものを対照とした。基質を加えた反応液中の糖量から反応時間 0 における糖量および対照液中の糖量を差し引いて、37°C 2 時間に遊離した還元糖量とした。なお  $\beta$ -glucosidase のみについては遊離した glucose は glucose oxidase, O-anisidine 系による酵素法により Glucostat (Worthington Biochemical Corp.) を用いて定量した (福井, 1969)。

### (2) 実験結果

本実験に供試した菌核は置床後 4~5 日で発芽し始め、Fig. 15-A に示したように 12 日目でその殆どが発芽した。一方、子う盤柄数は発芽後急増し、12 日目には菌核当たり平均 7.8 本となったが、光量が不足したため実験期間中子う盤の成熟に

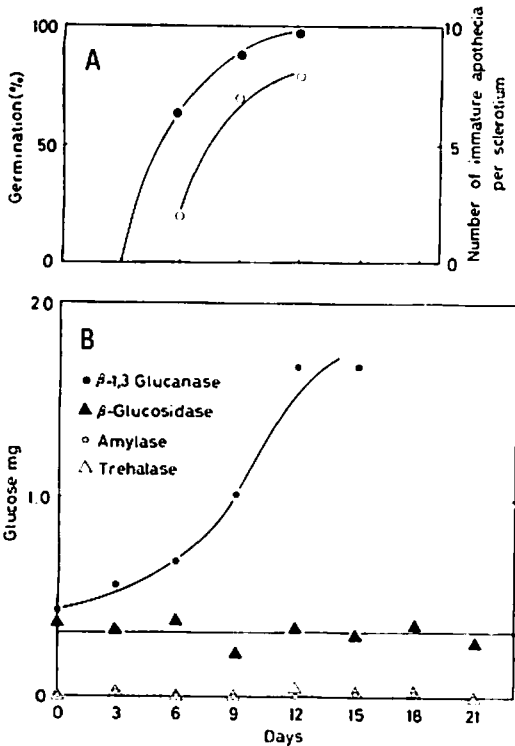


Fig. 15 Changes in the activities of various carbohydrases in sclerotia during germination and apothecial production. A, germination and apothecial production; B, enzyme activities.

は至らなかった。

各酵素活性は酵素反応液 1 ml 当りの遊離還元糖量 (glucose 当量) として示した。すなわち, Fig. 15-B にみられるように未発芽菌核には検出可能な程度の  $\beta$ -1, 3 glucanase および  $\beta$ -glucosidase の活性は認められたが amylase および trehalase の活性は全く認められなかった。これら酵素のうち、発芽に伴ない活性が明らかに増加したものは  $\beta$ -1, 3 glucanase のみであった。しかしその活性の増加は発芽が開始するときよりも子のう盤柄の形成数が増加するときに著しかった。一方、 $\beta$ -glucosidase 活性は発芽前と変わらず、発芽に伴ない増加する傾向はみられなかった。amylase および trehalase の活性は菌核発芽率が最高に達しても殆ど増加しなかった。

次に菌核中の  $\beta$ -1, 3 glucanase による 2 種の  $\beta$ -glucan の分解産物について薄層クロマトグラフ

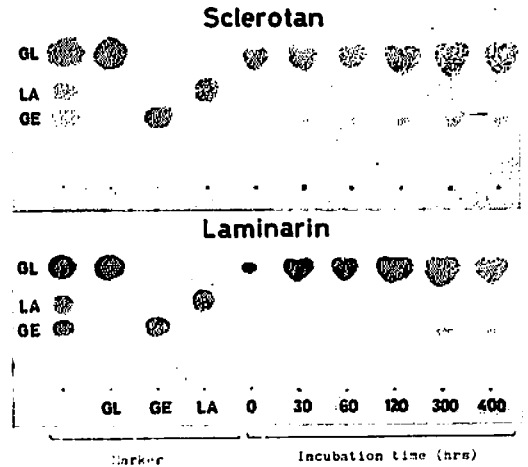


Fig. 16 Thin layer chromatograms of hydrolyzates of laminarin and sclerotan with sclerotial  $\beta$ -1, 3 glucanase. GL=glucose; LA=laminarin; GE=gentiobiose.

ィー (T. L. C.) を行なった。発芽中の菌核から 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で抽出し、同様の緩衝液に対して 17 時間透析したものを酵素液とした。基質は laminarin および成熟菌核から抽出、精製した  $\beta$ -glucan である Sclerotan (北原, 竹内, 1957) を用いた。酵素反応液は 30 分, 60 分, 120 分, 300 分, 400 分後にそれぞれ採取し SOMOGI 法 (福井, 1969) により除たんぱく後、一定量に希釈し、展開試料とした。試料はアビセル SF の薄層上で n-butanol : acetic acid : H<sub>2</sub>O (4 : 1 : 2) で 3 回 10 cm 展開し、AgNO<sub>3</sub> の acetone 溶液および 0.4% NaOH methanol 溶液で発色させた (阿武, 瀬野, 1968)。

Fig. 16 にみられるように供試した laminarin は遊離 glucose を若干含むが、反応が進むとともに明らかに glucose のスポットの大きさは増し、発色も強くなる。一方、glucose より発色の弱いスポットが検出され、反応が進むにつれ呈色度も増加する。このスポットは対照の gentiobiose に一致する。一方、laminarinibiose に相当するスポットのみならずその他のオリゴ糖は全く検出されなかった。このような傾向は同時に行なった Sclerotan の分解産物についても認められた。

d. 子のう盤組織における酵素活性

前項では発芽時における菌核部分の加水分解酵



素活性の動向について明らかにしたが、子のう盤における炭水化物代謝については検討しなかった。よって本項では子のう盤組織における各種加水分解酵素ならびに glucose-6-phosphate 脱水素酵素の活性をしらべ、子のう盤を生じている菌核部分との差を比較した。

(1) 実験材料および方法

a 項と同様の人工照明下で置床後約3週間経過した菌核で子のう盤柄および成熟子のう盤を生じているものを材料とした。

加水分解酵素測定のため、子のう盤柄、成熟子のう盤および菌核部分に分けてそれぞれから前項の方法に準じて酵素液を抽出した。酵素活性の測定は前項で述べた方法により行なったが、各部位の水分含量が著しく異なるので酵素抽出液中のたんぱく mg 当りに生成された還元糖量 (glucose 当量) で各酵素活性を比較した。酵素抽出液中のたんぱく含量は既知濃度の牛血清アルブミンを標準として LOWRY 法によるフェノール試薬 (副島, 菅原, 1972) によって比色定量した。フェノール試薬は市販品 (第一化学薬品) を2倍に希釈して用いた。

次に glucose-6-phosphate 脱水素酵素については子のう盤 (未熟のものを含む)、子のう盤をとり去った菌核部分および置床直後の未発芽菌核について検討した。試料は生重の半量 (W/W) の石英砂を用い冷却した乳鉢で 0.05 M tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を加えつつ磨砕し、磨砕液を 2000×G で20分 (4°C) 遠沈後、その上清をさらに 15,000×G で30分 (4°C) 遠沈して、その上清を酵素抽出液とした。抽出液中のたんぱく含量はフェノール試薬法により比色定量した。

酵素活性測定のために反応系は次の通りである。

0.05 M triethanolamine 緩衝液, pH 7.4, 2.4 ml; 0.1 M MgCl<sub>2</sub>, 0.2 ml; glucose-6-phosphate Na (10 mg/ml) 0.1 ml; NADP (10 mg/ml) 0.1 ml; 酵素抽出液 0.2 ml。

これらの中で基質および補酵素は Sigma Chemical Co. のものを用いた。

反応系中の 25°C における NADPH 生成量を

島津 UV 200 型 double beam 自記分光光度計により測定した。すなわち、酵素抽出液を加えない反応系を入れた吸光セルを 25°C 恒温水槽中に5分間保ったのち、酵素液を加えて 340nm における吸光度の増加を記録した。基質を加えない系の測定値を差し引き、得られた ΔOD 340 から NADPH の分子吸光係数  $6.22 \times 10^3$  を用いて1分間当り生ずる NADPH の μmol 数を算出した。比活性は μmol NADPH/min/mg たんぱくとして示した。

(2) 実験結果

発芽菌核、子のう盤柄および成熟子のう盤における各種加水分解酵素の活性を比較した結果を Fig. 17 に示した。

β-1, 3 glucanase の活性は発芽中の菌核部分において最も高く、子のう盤柄および成熟子のう盤

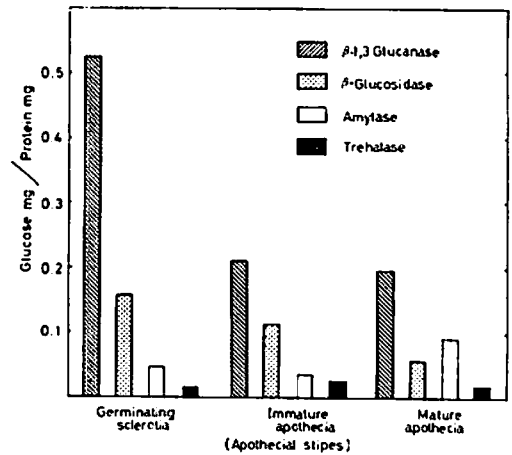


Fig. 17 Comparison between carbohydrase activities of germinating sclerotia, immature and mature apothecia.

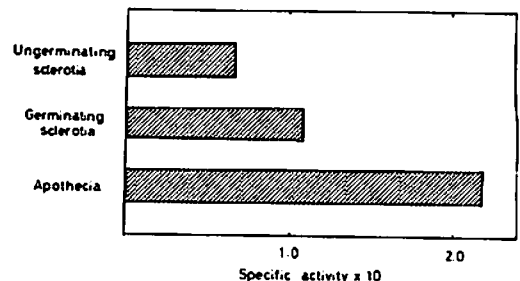


Fig. 18 Activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase in ungerminating and germinating sclerotia and apothecia.

の2倍以上の活性を認めた。 $\beta$ -glucosidase 活性については菌核部分と子のう盤の間には顕著な差はみられないが、成熟子のう盤における活性はこれより低い。一方、菌核中には trehalase および amylase の活性が認められた。前項で示したように両酵素活性はともに発芽時には殆ど認められなかったが、子のう盤が成熟する段階ではある程度活性が増大するものと考えられる。trehalase 活性は部位によって大きな差はみられないが、子のう盤柄においてやや高い。また amylase 活性は成熟子のう盤において最も高く、この部位における glycogen の蓄積を示すものと考えられる。

glucose-6-phosphate 脱水素酵素活性についての結果を Fig. 18 に示した。未発芽菌核と発芽して子のう盤を生じている菌核との間には活性に明らかな差がみられた。また、子のう盤における活性は発芽中の菌核よりもかなり高いと認められた。

#### e. 小 括

4節で明らかにしたように肉眼で認め得るいわゆる発芽に先立って菌核内部には多数の子のう盤柄原基が形成されるが、各原基は同調的 (synchronous) に生育しないため発達段階の異なる原基が同一菌核中に存在することになる。したがって発芽初期の菌核における生理的変化の段階を菌核レベルで示すことは難しく、磨砕抽出した系においてはこれら発達段階の様々な原基の示す生理的活性の総和あるいは平均値のみを見ることになる。

しかし、菌核発芽後子のう盤の生産に伴って菌核の乾重は減少し、それは主として  $\beta$ -1,3 glucan に相当する分画の減少であることが知られた。他方、laminarin を基質として菌核中の  $\beta$ -1,3 glucanase 活性をみると、発芽開始後子のう盤柄の形成数がふえるに伴ない活性が増大する。これらの事実から子のう盤形成に菌核中の  $\beta$ -1,3 glucan が利用されていると考えられる。 $\beta$ -1,3 glucan は藻類においては褐藻の laminarin (NISHIZAWA, 1940 a, b) Euglena の paramylon (MARECHAL and GOLDBERG, 1964) など貯蔵多糖と考えられているが、II章で明らかにしたように *S. sclerotiorum* の菌核においては  $\beta$ -1,3 glucan は菌糸細胞質には含まれず、肥厚した細胞壁およびその外側の繊維

層中に分布する。すなわち多くの糸状菌において認められているように *S. sclerotiorum* の菌核中における  $\beta$ -1,3 glucan は構成多糖として存在しているように考えられる (POTGIETER and ALEXANDER, 1965; MANOKA and COLVIN, 1967; CHET and HENIS, 1968)。

一般に細胞壁肥厚の意義は厚膜胞子あるいはそれに準ずる休眠器官におけるように耐久生存力の強化にあると思われるが、*S. sclerotiorum* の菌核では表面が発達しメラニンの沈着した外皮層に覆われているので個々の菌核構成細胞の細胞壁肥厚は耐久生存力の強化のためのみ行なわれているとは考えられない。スエヒロタケ、*Schizophyllum commune* の子実体形成においても栄養菌糸の細胞壁中の  $\beta$ -glucan が利用される事が報告されており (NIEDERRPUEM and WESSELS, 1969) *S. sclerotiorum* の菌核における髓組織菌糸の細胞壁肥厚および繊維層の形成はエネルギー蓄積の様式とみることも出来る。この点については発芽菌核の電顕観察の結果と関連し次節でさらに論議する。

菌核中の  $\beta$ -1,3 glucanase による laminarin および Sclerotan の分解産物は glucose および gentiobiose のみであり、laminaribiose その他  $\beta$ -1,3 結合を持つ少糖類は認められなかった。一方 Sclerotan の構造は北原、竹内 (1961) によれば約8ヶの  $\beta$ -1,3 結合を有する glucose 残基が約3コに1コの割合で  $\beta$ -1,6 結合 (gentiobiose 部分) により分岐する。また laminarin にも  $\beta$ -1,3 結合のほか少量の  $\beta$ -1,6 結合を含むとされている (三崎, 1969)。したがって *S. sclerotiorum* のフスマ培養から抽出された菌体外酵素 (SATOMURA 1960; EPATA and SATOMURA, 1963, a, b) と同様、菌核中の酵素も恐らくエキソ型の  $\beta$ -1,3 と推定される。

菌核の髓組織菌糸内には細胞化学的に glycogen が検出されるが、発芽初期における amylase 活性は殆ど認められず、成熟子のう盤の形成時に始めて微弱な活性を認めた。一方、成熟菌核の熱水可溶分画の amylase 消化実験の結果からは glycogen が菌核中に多量に含まれているとは考

えられない。*S. sclerotiorum* におけるこれらの結果は *Phymatotrichum omnivorum* の菌核発芽における傾向とはきわめて対照的である (ERGLE, 1948)。すなわち *P. omnivorum* の菌核には熱水不溶性および可溶性の glycogen が含まれ、かつ発芽時には amylase 活性が著しく増加すると同時に glycogen 含量も減少する。

このほか発芽時の利用について検討されていないが *Poria cocos* の菌核中には  $\beta$ -1, 3 glucan の Pachyman が含まれ、貯蔵炭水化物と推定されている (REESE and MANDELS, 1959)。

これらから、含有する菌核貯蔵物質により多糖類型 (COLEY-SMITH and COOKE, 1971) とされている菌でも *P. omnivorum* など主として glycogen を発芽時に利用するものと *S. sclerotiorum* など  $\beta$ -1, 3 glucan を主として利用するものとに分けられる。

Trehalose は *S. sclerotiorum* の菌核における主要な可溶性糖類であり、発芽時におけるその利用が示唆されているが (北原, 1950 b; Le TOURNEAU, 1966)、本実験では発芽時におけるその行動および役割については明確な結果を得ることが出来なかった。この糖は多くの糸状菌の胞子中に内蔵され、発芽時には trehalase により水解されて利用される (HANKS and SUSSMAN, 1969)。しかし菌核発芽時における trehalase 活性は微弱で発芽後期になってもむしろ子のう盤柄および成熟子のう盤よりも低い。恐らく原基周辺に局在する酵素活性が菌核の磨砕抽出系では平均化されてしまうか、あるいは trehalose として直接子のう盤柄に転流することも考えられる (COLEY-SMITH and COOKE, 1971)。

glucose-6-phosphate 脱水素酵素活性は発芽床に置いて間もない未発芽菌核にくらべ発芽して子のう盤を形成している菌核部分でやや高く、さらに子のう盤ではきわめて高いことが知られた。このことから菌核細胞から子のう盤組織へと分化していく過程で5炭糖磷酸経路の代謝が主体的になり、核酸合成系の活性化が進むことが推定される。

## 5. 発芽中の菌核の微細構造および組織化学

これまでに明らかにしたように子のう盤柄原基は菌核髓組織を構成する厚膜化した菌糸細胞のうち、外皮層に近いものから生じ、その発達にともなって  $\beta$ -1, 3 glucanase 活性が増大する。一方、菌核中における  $\beta$ -1, 3 glucan の分布は肥厚した細胞壁およびその外側に形成される繊維層に限られるが、これらは炭水化物貯蔵の一型式であると推定した。したがって原基形成および発達に伴って菌糸細胞壁とその周辺にはなんらかの変化が生ずると考えられる。また原基は周囲の髓組織菌糸より強く染色されるが、これは髓組織における原基の分化が単に形態的なものに留らず、それを構成している細胞になんらかの生理的な変化を生じていることを示すものである。

本節においてはこれらの点を明らかにするため、発芽中の菌核の外皮層に近い髓組織部分および子のう盤の微細構造を観察し、さらにこれらの部分におけるたんぱく、リボ核酸、多糖類などの分布あるいはコハク酸脱水素活性の強弱などについて組織化学的観察を行なった。

### a. 微細構造

#### (1) 実験材料および方法

供試菌核は Sm-5 をインゲン葉煎汁寒天に培養し、形成させたものである。菌核は保湿低温処理後、常法により 15°C で発芽させ、最初の子のう盤柄形成が肉眼で認められたものを材料として固定・包埋した。固定は II 章で述べた方法に従って glutaraldehyde + acrolein および OsO<sub>4</sub> による二重固定と KMnO<sub>4</sub> による単独固定の二通り行なった。なお包埋に用いた Epon 混合液は重合後の硬度がややかためになるように配合した。すなわち、エポキシ樹脂混合液 A: Epon 812 62 ml, DDSA 100 ml; B: Epon 812 100ml, MNA 89ml として A: B=1:1.4 になるように配合した。以下、包埋、超薄切片の作製、電子染色および観察はすべて II 章で述べた方法に従って行なった。

#### (2) 結果

発芽菌核の髓組織菌糸の構造:

発芽中の菌核における髓組織菌糸の微細構造を

みると大部分の菌糸の構造は未発芽の成熟菌核とほぼ同様であった。すなわち、II章で示したような退化したミトコンドリアが認められ、ポリリン酸様物質の蓄積した液胞 (V) も多数認められた (Plate 14)。しかし発芽菌核中には小胞体 (ER, endoplasmic reticulum) が著しく発達した菌糸細胞がしばしば認められた。これらは細胞の横断像、縦断像の何れにも層状に重なって認められるので、細胞内のかなりの部分にわたって連続的に発達しているものと考えられる (Plate 14; Plate 15-1)。

また *Sclerotinia allii* および *S. borealis* の発芽菌核を  $\text{NMnO}_4$  固定した電顕像もほぼ *S. sclerotiorum* と類似している。すなわち多くの髓組織菌糸細胞中にはミトコンドリアは見られず、ポリリン酸様物質の蓄積した液胞に相当すると思われる構造 (V) が見出され、さらに肥厚した細胞壁 (CW) の外側には繊維状の物質 (FL) が観察された (Plate 15-3, 4)。これらは互に融合した状態にあり、細胞間げきが明らかでないがこれが発芽時における状態であるのか、あるいは *S. sclerotiorum* とは異なった種の特徴であるかについてはさらに検討を要する。

発芽菌核の細胞質に関するその他の所見としては細胞質の変性あるいは消失した菌糸細胞が散見されることである。そして明らかに Woronin body (WB) の隔壁孔閉塞によると思われる細胞質変性も観察された (Plate 16-1, 2)。

未発芽の成熟菌核では単一の均質な層として認められていた髓組織菌糸の細胞壁は発芽菌核においては電子密度の異なる層が生じているものがしばしば見出された。すなわち細胞壁 (CW) の中間に電子密度の高い層が現われている場合 (Plate 14)、あるいは明らかに2層に分かれている場合もみられた (Plate 15-2)。また、細胞壁を覆っている繊維層が溶解している細胞がまれに見出された (Plate 15-2)。この場合、細胞壁の厚さは通常成熟菌核の髓組織菌糸とほぼ同等であって成熟後あらたに生じた菌糸細胞とは考え難く、また繊維層を形成しつつある菌糸細胞とも考えられない。これらの細胞のその後の変化を推定するに足

る十分な観察結果は得られなかった。

子のう盤柄原基の構造:

発芽中の菌核において外皮層に近い髓組織中に周辺の菌糸細胞とは異なるきわめて特異的な一群の細胞が見出された (Plate 16-3; Plate 17)。これは菌核中における位置および形状から光学顕鏡レベルですでに観察した子のう盤柄原基に相当する細胞群と考えられる。

先ず、原基を構成する細胞の形は未分化の髓組織菌糸に比らべてきわめて不規則であり、かつその大きさには著しい差異がみられる。Plate 16-3に示した電顕像は  $\text{KMnO}_4$  固定菌核中の原基であるが、比較的初期の発育段階にあり恐らく第 I 期に相当するものと考えられる。この場合固定が過度になったため細胞質の微細構造は不明瞭であるが、その細胞壁は周囲の髓組織菌糸のものよりも薄く電子密度が低い。また Plate 17 に示した電顕像はアルデヒド系および  $\text{OsO}_4$  による二重固定菌核中に見出された原基であるが、後で述べるように電子密度の高い物質の沈着 (DED) がみられるのでその発育段階は恐らく第 II 期に相当するものと考えられる。この場合も  $\text{KMnO}_4$  固定と同様、原基細胞は電子密度の低い均質な細胞壁を有し、かつその厚さは周囲の髓組織細胞 (MC) よりも薄い。

原基を構成する細胞 (PC) の大部分は細胞壁の外側に繊維層を欠く点が髓組織菌糸細胞 (MC) との大きな差異の一つである。しかし原基細胞とくに原基周辺部にあるものにはときに細胞壁が繊維層で覆われているものがあり、周囲の髓組織との境界が不明瞭である (Plate 17)。これらの細胞の細胞質微細構造は通常髓組織菌糸のものとは明らかに異なり、恐らくいずれは繊維層を失なうものと推定される。

原基発達の第 II 期においてみられる原基の褐変は光学顕微鏡レベルにおいては細胞壁そのものが褐変しているように見受けられたが、微細構造的には細胞間げきに電子密度の非常に高い物質が沈着すること (DED) によって起きるものと思われる (Plate 18-1)。この高電子密度の物質は4節で示唆したようにメラニン様の物質と思われる

が、原基周辺の髓組織菌糸を覆っている繊維層にまで“メラニン化”が及んでいるものも見出された (Plate 18-2)。

また原基の出現していない髓組織においては各菌糸の繊維層は互にその境界が明瞭であり、細胞間げきも明らかに認められるが (Plate 14), 原基の附近では各細胞の繊維層相互の境界は不明瞭となって一見繊維状の細胞間げき物質の中に髓組織菌糸が埋没しているような状態となり、繊維層の溶解が起るものと考えられる (Plate 16; Plate 17)。

次に原基細胞の細胞質の微細構造のうち最も特徴的なものはミトコンドリアおよびリボソームである。ミトコンドリア (M) のクリスタは多くは比較的よく発達している (Plate 19-1, 2)。またリボソーム (RIB) はその数が多いと認められる (Plate 19-2)。

液胞 (V) も原基細胞中に多数見出されるが、その中には不定形の物質が若干含まれている (Plate 19-1)。なお、原基に接している菌糸細胞の液胞 (V) の中にはポリリン酸様の電子密度の高い物質の量が少ない (Plate 17)。すなわち、原基周辺の髓組織菌糸におけるポリリン酸の消費が示唆される。

また、菌核の成熟過程においてアルデヒド系  $\text{OsO}_4$  固定を行なった場合にしばしば認められた多重膜構造 (concentric membranous structure) は原基細胞中にはきわめてまれにしかみられなかった。

以上のことから子のう盤柄原基を構成する細胞は未分化の髓組織菌糸細胞と異なり、細胞壁が薄く繊維層を欠くとともに、細胞質中には発達したミトコンドリアおよび多くのリボソームが認められる。すなわち原基細胞においては代謝活性がきわめて高いことを示している。

#### 内生菌糸様細胞:

発芽菌核の髓組織には内生菌糸 (菌糸内菌糸; intrahyphal hyphae) 様の細胞がしばしば見出された。これは菌糸細胞の横断像によって判断したものであるが、1本の母細胞に1~2ヶの細胞が含まれているのが観察された (Plate 20-1)。他方2層の細胞壁が部分的に離反している菌糸細胞が見

出され、内生菌糸様細胞形成の過程にあると考えられる (Plate 20-2, 3)。これらの菌糸細胞においてはリボソーム様粒子 (RIB) も比較的多く、クリスタはあまり発達していないがミトコンドリア (M) も認められる。この場合、離反した細胞隙間 (MCW と CW の間) には電子密度の高い部分が見られるが、どのような物質で満たされているかは不明である。なお、*Sclerotinia borealis* の発芽菌核中にも同様の内生菌糸様細胞が見出された (Plate 20-4)。

#### 子のう盤柄組織:

子のう盤柄の組織には細胞分化がみられ、生長の方向に柵状に並んでいる長い細胞とそれを囲むやや大型、長円型の細胞があるが、観察は前者について行った。この細胞の細胞壁 (CW) の厚さは  $0.4\sim 0.6\ \mu\text{m}$  で栄養菌糸にくらべてやや厚い (Plate 21-1, 2)。その微細構造は栄養菌糸と異なり、2層ないしはそれ以上の層が認められた。また細胞間げきには菌核の髓組織菌糸にみられるものと同様の繊維状物質 (FM) が認められた (Plate 21-1)。一方、細胞質中にはきわめて多数のミトコンドリア (M) およびリボソーム (RIB) がみられ、代謝活性の高いことを示している (Plate 21-1, 2)。

子のう盤柄と菌核組織の接点における微細構造:

若い子のう盤柄が菌核から生じているものを固定し、子のう盤柄のつけねの菌核髓組織の微細構造を観察した。すなわち、この部分においては髓組織菌糸の形を保持した細胞と子のう盤柄組織を構成する菌糸細胞の一部が互に交錯し共存しているのが認められた (Plate 22)。後者は明らかに繊維層を欠いており、髓組織菌糸の細胞間げきを縫って伸長しているため著しく圧縮され不規則な形となっている。またこの部分の髓組織菌糸はまだ繊維層 (FL), ポリリン酸様物質を含んだ液胞 (V) がみられるなど多分に髓組織菌糸の性質を残しているが、細胞壁 (CW) に明らかな二重構造が現われているものがしばしば見出された (Plate 22; Plate 23-1)。

#### 崩解時期菌核の内部構造:

長期間子のう盤を生産し、崩解しかけた菌核の内部微細構造を  $\text{KMnO}_4$  固定したものについて観察した。

子のう盤を生産し、その機能を果たした菌核の内部はほとんどの髓組織菌糸が消失するとともに繊維層も分解されてその繊維構造が失われている (Plate 23-2, 4)。また生活力を保有していると思われる菌糸がまれに見出されるが、その細胞壁は比較的薄くクリステの発達したミトコンドリア (M) が少なからず認められることから恐らく二次的に生じた栄養菌糸と推定される。一方、繊維層がほとんど分解されず、その繊維構造を保っているものもまれに見出された (Plate 23-3)。

## b. 組織化学

### (1) 実験材料および方法

Sm-5 菌株の発芽中の菌核を用い FAA あるいは glutaraldehyde-acrolein 混液 (II 章, 3 節で処方方を記した) で固定した。固定は FAA で 2 日間, glutaraldehyde-acrolein 混液 (以下 GA+AC と略) では約 1 週間,  $4^\circ\text{C}$  で保存をかねて行なった。FAA 固定では 50% ethanol, GA+AC 固定では 5% 酢酸緩衝液 (1/15 M, pH 6.9) で洗滌し, ethanol, n-butanol 系列で脱水, 常法によりパラフィン包埋した。このほか GA+AC 固定試料の一部は II 章で述べた方法により HPMA 包埋も行なった。

組織化学的観察は以下の各項目について行なった。

#### (1) 細胞壁中の不溶性多糖

GA+AC 混液で固定したパラフィン切片について PAS 反応 (FEDER and O'BRIEN, 1968) による。

#### (2) たんぱく

GA+AC 混液で固定したパラフィン切片を mercury bromphenol blue (MAZIA ら, 1958) で染色した。すなわち 10%  $\text{HgCl}_2$  (95% ethanol 中) に bromphenol blue を 1% になるように溶かした液で切片を 15 分染色し, 5% 酢酸で洗滌して中性ないし弱アルカリ性で発色させる。原法では中性の緩衝液で発色させることになっているが、その間かなり脱色されるのでアルカリ性にした 95% ethanol で発色させた。

#### (3) Tyrosine を含むたんぱく

GA+AC 混液で固定したパラフィン切片について Millon 反応 (JENSEN, 1962) をみた。

#### (4) リボ核酸 (RNA)

FAA ないしは GA+AC 固定したパラフィン切片を用いた。染色は 0.05% toluidine blue O あるいは 0.25% pyronine により行なったがいずれも pH 4.6, 0.1 M 酢酸緩衝液中に溶解したものを用いた。染色時間は 30 分とし, toluidine blue O については染色後切片を 4% モリブデン酸アンモン水溶液で処理し, 色調を固定した (LISON, 1953)。なお, これら色素による染色性が RNA の存在によるものか否かを確かめるため切片を ribonuclease で処理した。すなわち, スライドグラスに切片をはりつけ, 脱パラフィンしたものをろ紙を敷いて湿室とした大型シャーレ中に置き, 各スライドグラス上に ribonuclease 1% 蒸留水溶液を盛った。酵素を含まない蒸留水を対照にして  $40^\circ\text{C}$  の恒温室中に 1~2 時間保った後, 水洗し上記色素により染色を行なった。なお供試した酵素は Sigma 社製, ribonuclease, type A である。

#### (5) ポリリン酸様異染顆粒

GA+AC 混液固定の HPMA 包埋切片について 0.05% toluidine blue O (pH 4.6, 0.1 M 5% 酢酸緩衝液中) による染色を行なった。

#### (6) フェノール化合物あるいはメラニン様物質

FAA 固定のパラフィン切片について Masson の銀親和反応 (LISON, 1953; 岡本ら, 1958) による。切片を蒸留水で 2 時間洗滌したものをアンモニア性硝酸銀液 (Fontana 氏銀液) で暗黒下, 約 36 時間処理し蒸留水で洗滌後, 5% 亜硫酸ソーダ水溶液で固定した。用いたアンモニア性硝酸銀は以下のようにして調製した: 5% 硝酸銀水溶液に濃アンモニア水を加え, 生じた沈澱が消えるまで滴下する。次いで透明な溶液がわずかに白濁するまで滴下し, 使用前にろ過する。

#### (7) コハク酸脱水素酵素活性の検出

発芽中の菌核部分および若い子のう盤柄の組織中の酵素活性を nitroblue tetrazolium を水素受容体としてしらべた (JENSEN, 1962)。すなわち, 0.2 M 5% 酢酸緩衝液 (pH 7.6) および 0.2 M コハク

酸ソーダの等量混合液に対して 0.1% nitroblue tetrazolium 水溶液を 1/2 容加えた混合液中に約 2mm の厚さの菌核組織片あるいは子のう盤柄全体を投入し約 30 分間減圧下に置いてから 37°C に 30 分間保った (煮沸した組織を対照とした)。反応後, GA+AC 混液で組織を固定し, polyethylene glycol 200 で脱水後, HPMA 包埋した。重合後のサンプルはガラスナイフを用いて約 1 $\mu$ m の切片にし観察した。

以上の組織化学反応を行なった切片はすべて xyene で透明にし, ビオライト (合成樹脂封入剤; 応研商事 K. K) で封じて観察した。

## (2) 結 果

子のう盤柄原基が出現している部分の PAS 反応は周囲の髓組織よりも強い (Plate 24-1)。すでに明らかにしたように髓組織菌糸の繊維層は PAS 反応陰性であり, 細胞壁のみが陽性となる。したがって繊維層をほとんど持たない菌糸細胞の集合である原基では色調が強調される傾向があるとしても原基細胞の細胞壁の反応は周囲の髓組織菌糸より顕著であると認められた。

Bromphenol blue による染色では子のう盤柄原基の発達段階が第 I および第 II 期に相当する原基においては原基細胞と髓組織菌糸との間に染色性に著しい差はみられなかった (Plate 24-2, 3)。しかし, 発育が進み子のう盤柄様の組織に発達した原基ではやや染色性が強くなる (Plate 24-4)。

また Millon 反応についてみても bromphenol blue 染色におけるとはほぼ同様の傾向が認められた (Plate 25-1, 2, 3)。この反応の結果, 赤褐色に発色するが, 第 II 期以降の発達段階では原基自身の褐変部分では当然色調が強調される (Plate 25-3)。

何れにしても子のう盤柄原基におけるたんぱく質の含量はその生育初期においては髓組織菌糸と大差がないが, 子のう盤柄様の組織に発達するにつれてその量が増加し, とくに子のう盤柄先端において盛に合成されているものと推定される。

次に pyronine に対する染色性をみると原基発達の初期 (第 I 期) においてすでに周囲の髓組織菌糸細胞よりも著しく強い染色性がみられた (Plate

25-4, 5)。若い子のう盤柄組織においては先端部の染色性がとくに強く, また基部により近い部分においても強く染色される菌糸細胞が散在している (Plate 26-1)。また toluidine blue による染色性もおおむね pyronine と同様であった (Plate 25-6)。

次にこれら塩基性色素による染色性すなわち好塩基性がリボ核酸 (以下 RNA と略) の存在によるものか否かをみるため切片を ribonuclease で処理した。その結果若い子のう盤柄における好塩基性 (pyronine による) は明らかに減少した (Plate 26-2)。次に toluidine blue 染色は第 II 期の状態にある原基および周囲の染色性は酵素処理後著しく減少し, その他の髓組織菌糸における染色性は対照切片に比較してやや赤紫色がかかった色調を帯びるような傾向がみられた (Plate 26-3, 4)。この ribonuclease 耐性の異染色性は前にも述べたようにポリリン酸様物質によるものである。

これらの事実から子のう盤柄およびその原基の細胞にみられる好塩基性はほぼ RNA の存在に因ることは明らかである。

次に子のう盤柄原基細胞と周囲の髓組織菌糸細胞におけるポリリン酸様異染色性顆粒の分布をみるため HPMA 包埋切片を toluidine blue 染色して観察した。その結果, 原基細胞は青色に染色され RNA が多いことを示すとともに異染色性顆粒は認められなかった (Plate 25-7)。この結果は前節で明らかにした高電子密度物質の充満した液胞の原基附近における分布と一致する。なお, 原基附近の髓組織菌糸のなかに異染色性顆粒が少なく, やや青色がかかった色調に染色されているものがみられたが, これは細胞の活性化が周辺の菌糸細胞にも徐々に及んでいくことを示すものと考えられる (Plate 25-7)。

また, 発芽菌核中の髓組織においては好塩基性の不定形物質が細胞間げきに部分的に認められた (Plate 27-1, 2)。そしてこれは toluidine blue に対して異染色性を示した。

次に, 銀視和性反応について検討した結果, 第 II 期の状態にある原基および菌核の外皮層において著しい硝酸銀の還元が認められた (Plate 26-5)。

この反応はおおむねフェノール基を持つ物質の存在によるとされ (LISON, 1953), すでに推定したように原基の褐変はポリフェノールの酸化重合によるメラニン生成に基くものと考えられる。

コハク酸脱水素酵素の活性の分布は酵素反応によるとみなされる nitroblue tetrazolium の還元により判断すると, 子のう盤柄組織中の柵状に並んで伸長している細胞には認められるが, 子のう盤柄外周のやや大型, 長円型の細胞では顕著ではなかった (Plate 27-3)。また原基が出現していない菌核の髓組織には酵素活性はほとんど認められなかった (Plate 27-4)。

### c. 小 括

菌核が発芽を開始するに至ってもその髓組織を構成する菌糸細胞の大部分のものは代謝活性のきわめて低い状態にあることが微細構造からも推定される。このような状態の髓組織中において子のう盤柄原基を構成する一群の細胞を電子顕微鏡で識別することは比較的容易であった。すなわち, これらの細胞中において多数のリボゾームおよびクリステの発達したミトコンドリアが認められるからである。リボゾームについては原基部分に RNA とみなされる好塩性物質が周囲の髓組織よりも多く組織化学的に見出される事実と符合する。また, たんぱくも原基発達とともに増加していくことが組織化学的に観察された。これらのことから原基細胞はきわめて高い代謝機能を有することが推定される。

髓組織菌糸中に普遍的に見出されるポリリン酸と考えられる異染性顆粒は原基細胞中には全く認められず, また周囲の髓組織細胞のなかにもこの顆粒が減少しているものが見出された。これらの事実から原基細胞の生長に伴うポリリン酸の利用が示唆される。恐らく細胞の諸代謝の高揚と相まってエネルギー供給源としての役割を果たすとともに RNA などへの磷酸供給源としての役割も持っていると考えられる (吉田, 1959)。また, *Sclerotinia allii* および *S. borealis* の菌核中にも異染性顆粒に相当する構造が見出されることから, 菌核細胞中におけるポリリン酸の蓄積は *Sclerotinia* 属菌に共通した現象と推定される。

これらの生化学的な特質に加えて原基細胞と髓組織菌糸細胞との著しい差はその比較的薄い細胞壁の外側に繊維層を持たないことである。このような細胞が髓組織中に生ずる機作として 1) 髓組織菌糸の繊維層が酵素的に分解されながら新たな細胞生長を再開すること, または 2) 髓組織菌糸内に内生菌糸を生じ, それが母菌糸細胞壁と繊維層を分解し生長を開始することの二通り考えられる。

最初の可能性は髓組織の一部に繊維層の溶解している菌糸が見出されるので否定は出来ないが, きわめてまれにしか見られないことと, このような菌糸からの直接生長を示す像が見出せなかったことから原基細胞がこのような機作で分化する可能性は少ないと考えられる。

一方, 内生菌糸様細胞についてはこれを見出す頻度が比較的多く *S. borealis* の発芽菌核中にも見られることから髓組織菌糸内に生じた細胞から原基細胞が分化する可能性は高いと考えられる。内生菌糸形成については BULLER (1933) 以来多くの糸状菌について報告があるが (MILLER and ALEXANDER, 1961; KENDRICK and MOLNAR, 1965; LOWRY and SUSSMAN, 1966; CHAN and STEPHEN, 1967; CALONGE, 1968; BOLLER and SCHROEDER, 1972), 何れも栄養菌糸についての観察であり, なかには電子顕微鏡レベルで行なっているものもある。その形成を誘発する原因としては一部の細胞の傷害による死 (BULLER, 1933), あるいは *Neurospora* および *S. fructigena* におけるように Woronin body が隔壁孔をふさぎ, その結果として起る細胞質の変性 (LOWRY and SUSSMAN, 1966; CALONGE, 1968) などとされているが, 何れも一部の死細胞中に隣接健全細胞が生長していく点では一致している。*S. sclerotiorum* の発芽菌核中にも Woronin body の隔壁孔閉塞によると思われる細胞質の変性を来した菌糸細胞が見出されるが, これと内生菌糸様細胞の形成とを結びつける形態的な所見は得られなかった。ただ, 発芽菌核の髓組織菌糸の細胞壁に異なる層が生じ, それがかんりの部分にわたって離反している電顕像がみられることと, 未発芽菌核にはみ



られない細胞壁の二次構造ないしは層化がしばしば発芽菌核の髓組織菌糸に起きている事実は菌核中における内生菌糸様細胞形成の一つの方向を示しているように思われる。したがって BULLER (1933) をはじめとする諸研究者によって取扱われた、いわゆる内生菌糸の範疇に入れるよりはむしろ“脱皮”と呼ぶ方が適当であるかも知れない。そしてこのような細胞壁の二次構造の変化およびその後起きると考えられる“脱皮”に際しても  $\beta$ -1, 3 glucanase が関与しているものと考えられる。

次に子のう盤柄原基の電子顕微鏡観察の結果得られた興味ある事実は原基発達の第 II 期でみられる褐変が細胞壁ではなく細胞間げきにおける高電子密度の物質の沈着により起きていることである。一方、第 II 期の原基においては Masson の銀親和性反応が強く現われることから、これら高電子密度の物質はほぼポリフェノールの酸化重合によって生じたメラニンかあるいは類似物質と考えられる。また Millon の反応による原基部分における呈色もチロシンを含むたんばくのみならず、その他のフェノール化合物の存在も同時に示しているのであろう。このように原基にみられる褐変は成熟菌核の外皮層を構成する細胞の褐変とは大部その趣を異にしている。また“メラニン化”の起る場所は原基細胞間に残る繊維状の物質あるいは周囲の髓組織菌糸の繊維層の一部である。すなわち、繊維状の物質は  $\beta$ -1, 3 glucan, たんばくなどからなることが II 章において示唆されたが、上記の事実はさらにフェノール化合物の存在も示すものである。この点と繊維層が好塩基性を示さないこと (II 章) とは矛盾するが、色素との結合を妨害するような、脂質のような物質の介在も考えられる。発芽中の菌核の髓組織菌糸がしばしば好塩基性の不定型物質に埋没している場面がみられるが、これは繊維層が部分的に分解され塩基性色素との結合が容易になった状態を示すものと云えるであろう。この好塩基性は *Armillaria mellea* の根状菌糸束の細胞間げきにみられる  $\beta$ -1, 3 glucan と同様メラニンの存在によるものと推定される (MORTA, 1971)。

長期間子のう盤を生産し、崩解しかけた菌核の内部の微細構造をみると、多くの髓組織菌糸が消失するとともに繊維層が分解され繊維構造を失っているものが認められた。このことは子のう盤生産中の  $\beta$ -1, 3 glucanase 活性の増大と  $\beta$ -1, 3 glucan に相当する分画の減少する事実と符合するが、なお未分解の繊維層が一部残っているのが認められた。恐らく繊維層を構成する  $\beta$ -1, 3 glucan, たんばくなどの物質はエネルギー源として完全に消費されるものではなく、そのゲル状の性質から鞘菌類の子実体において推定されているような乾湿の変化に耐えるための水分保持の役割も同時に果たしていると推定される (INGOLD, 1959; MOORE, 1965)。

菌核から生じた若い子のう盤柄の組織の主体をなすものは束状に伸長している長い一群の細胞であり、これらは基部に近い部分のものを除き、繊維状の物質で覆われていない点で明らかに髓組織菌糸とは異なり、また細胞壁の厚さと二次構造が認められる点で栄養菌糸の細胞とも異なっている。さらにこれら子のう盤柄を構成している細胞中にはクリステの発達したミトコンドリアが多量認められ、組織化学的にコハク酸脱水素酵素活性の高い事実ともよく一致する。したがって前節で明らかにした組織の磨砕抽出系における glucose-6-phosphate 脱水素酵素活性の増加も加味すれば、菌核細胞が子のう盤柄組織に分化していく過程で物質代謝が異化作用を主体とするものから同化作用へと変化し、組織化学的観察からも明らかのように核酸あるいはたんばくなどの生合成が盛んになっていくものと思われる。

#### IV 総括

*Sclerotinia sclerotiorum* における菌核発芽とは菌核内部を構成する代謝活性の低い、ち密な菌糸組織から子のう盤という全く異質の組織が発生する現象であると言える。本論文はこの発芽現象を菌核の成熟も含めて形態学的、生理学的に検討した結果をとりまとめたものである。

従来、糸状菌核の成熟は主として外部的形態を指標にして判定され、それぞれの菌核が果たす

機能との関連についてはほとんど着目されなかった。*S. sclerotiorum* の菌核においては通常メラニン化した外皮の形成が成熟の徴候とされている。しかし栄養条件の異なる培地に形成された菌核は外観的にほとんど差がないにもかかわらず、発芽能力は著しく異なっている。すなわち *S. sclerotiorum* の菌核については“外観的成熟”と発芽能力の獲得に基く“機能的成熟”とが考えられる。後者については菌核の発芽率を指標にしてのみ判定し得る。また“機能的成熟”の本質については全く検討を加えなかったが、ビタミン添加など栄養生長を促進する条件下で形成された菌核の発芽は概して劣ることから、菌核細胞の栄養生長的な状態からの脱却と“機能的成熟”の進行方向とは一致するように思われる。しかし、“機能的成熟”が菌糸と菌核との連絡が失われた時点で終るのか、あるいは菌叢から離脱した後でいわゆる後熟のような状態で進行するかについてはさらに検討を要するところである。

なお“機能的成熟”に最も好適なインゲン葉煎汁培地上で形成された菌核の髓組織菌糸細胞はミトコンドリアの退化、リボゾームの減少などによって示されるようにきわめて代謝活性の低い状態にあると同時にポリリン酸様物質、glycogen の蓄積および細胞壁の肥厚などにみられるようにエネルギー源に富んだ状態にある。そして髓組織細胞の何れもこのような貯蔵細胞的な性格を保持し、*Typhula* sp. の成熟菌核について報告されているような髓組織細胞の機能的な分化すなわち貯蔵細胞と非貯蔵細胞の分化 (SURTJ and CONVERSO, 1965) は明らかではなかった。

発芽とは一般的には種子における幼根の伸長あるいは胞子における発芽管の出現によって認識される“発芽”を指すが、より広い意味ではそれに至るまでの生理的、形態的な変化を含めた一連の過程が発芽現象であると言える。この意味において *Sclerotinia* の菌核内部における子う盤柄原基の分化と発達は菌核の発芽過程に含めるべきものである。しかし、その様式が種子あるいは胞子における発芽とは全く異質なので一般的な発芽の範疇に当てはめることは難しい。すなわち、その

特異的な面をあげれば 1) 髓組織において活性化するのは特定の細胞ではなく、また活性化がoccurる位置は表面からの深さを除いて全く不定である。2) このようにして生じた原基から子う盤への発育はその途中に一種の休眠的な時期があるため連続的ではない。3) 菌核中にある多くの原基の発達は同調的 (synchronous) でない。4) 原基の形成が開始されても髓組織における大部分の細胞の代謝活性レベルは菌核成熟時のそれと大差がない。すなわち、この時期においても菌核単位でみた代謝活性の変化は目立たない。などである。

本研究においては菌核の休眠についてとくに検討を加えなかったが、形成後まもない菌核を発芽に好適な条件下 (恒湿条件下) に置くと、光学顕微鏡下で識別し得る原基細胞の分化は比較的早いので菌核の外観的成熟と髓組織細胞の活性化との間に明確な休眠期間が存在するか否かは疑問である。上に述べたように形成された個々の原基は発達の過程で休眠状態となるが、そのうちのあるものは生長を続け一種の生長相関のような状態となっているので、菌核全体の発芽活動が休止するのではない。しかし、自然状態では寄主植物体上で形成された菌核の発芽には長期間を要するのが普通で、少なくとも越冬してから発芽するものが多い。一般にはこの状態は内因的な休眠として理解されているが (COLEY-SMITH and COOKE, 1971), 菌核組織中における原基形成の適温範囲が広い事実から子う盤形成に不適当な温度条件でも原基分化が開始されている可能性がある。

十分に吸水し原基が形成されるようになった菌核においても組織化学的に推定される代謝活性の高揚は原基および近接する髓組織細胞に限られる。そして子う盤柄の発生が肉眼で認められるようになっても大部分の髓組織細胞における変化は肥厚した細胞壁の層化 (zonation) を除いては明らかではない。これらの事実は菌核の磨砕抽出液を用いて加水分解酵素活性を測定した結果、とくに発芽開始時の前後で発芽に直接関与すると考えられる酵素活性の動きがみられなかった事実と符合する。すなわち、ここで測定される活性は菌核

組織全体の平均値で、原基およびその周辺に局在する酵素活性は隠蔽されてしまうと考えられる。すなわち、*S. sclerotium* の菌核発芽の初期段階においては菌核組織全体として統一的に進行するような生理的变化は明確には認め難い。

一方、加水分解酵素のうち  $\beta$ -1, 3 glucanase 活性のみは菌核発芽後子う盤の生長に伴ない著しく増大した。発芽後の菌核部分では  $\beta$ -1, 3 glucan に相当するとされるアルカリ可溶の炭水化物分画が子う盤の生産にもなって減少することから  $\beta$ -1, 3 glucanase の活性化の意義は第一義的には髓組織菌糸の肥厚した細胞壁および繊維層に分布する  $\beta$ -1, 3 glucan の分解、利用にあると考えられ、第二義的には肥厚した細胞壁における層化にみられるような二次構造の出現あるいは内生菌糸様細胞の形成などにも関与していることが推定される。しかし細胞化学的な観察結果から推定される  $\beta$ -1, 3 glucan の存在状態は単純ではなく、共存物質としてたんぱく、キチンあるいは脂質なども考えられるのでこれら物質の分解にあずかる酵素活性の動向についても検討する必要がある。

*S. sclerotium* の菌核の機能はこれまで述べたとおり子う盤の形成にあるが、菌糸を生ずる場合もしばしば認められる。従来この現象は主として感染機作の問題として扱われ、子う盤形成との関係については何ら検討されたものはない。

菌核から菌糸が生長するのは菌核外皮の損傷あるいは glucose の添加などによって起るが、自発的に行なわれる場合もしばしばある。その要因について充分明らかにすることは出来なかったが、ただ菌糸発芽によって 1) 子う盤の形成が阻害されることと、2) その菌核の自然土壤中における生存期間は子う盤を形成中のものに比較して著しく短くなる。子う盤形成阻害の機作について考えてみると、子う盤柄原基の形成位置が髓組織の周辺に分布していることから同一部分からの菌糸生長による単純な栄養の奪取が考えられる。しかし、本来子う盤柄原基に分化するべき髓組織細胞が栄養生長を再開するのであるから、代謝転換も含めた複雑な要因が関与しているものと推定される。

一方、菌糸発芽が菌核の生存にとって不利な要因となるのは貯蔵養分の消費が子う盤形成におけるよりも急激なためと考えられる。また土壌表面を菌糸が匍伏伸長して植物を加害することがあるとしても(杉本, 1959; 成田, 1966), 病原菌の広範囲な分散という意味では子う盤飛散より劣ることは言うまでもない。したがって土壌に対する炭素源の施与など菌糸発生をうながす方法によって“生物学的に防除”することも不可能ではないと考えられる。

## V 摘 要

豆類菌核病菌, *Sclerotinia sclerotium* (LIB.) DE BARY の菌核成熟と発芽に関する形態学的、生理学的な研究をとりまとめた。

### 1. 菌核形成培地の種類と菌核成熟

(1) 異なる培地に形成された菌核の外観的形態には明らかな差異がみられないが、発芽能力には著しい差異がみられた。

(2) glucose 加用インゲン葉煎汁培地に形成された菌核は発芽が最も良好で、glucose 加用ジャガイモ煎汁培地のものがこれに次ぎ、Houston 合成培地上の菌核は最も劣った。

### 2. 菌核の成熟に及ぼす培地栄養条件の影響

(1) 菌核の外観的成熟に対して発芽能力の獲得に基づく成熟を“機能的成熟”とした。

(2) Houston 合成培地を基本培地として窒素源および炭素源の種類をかえたとき、形成された菌核の機能的成熟はアンモニア態および硝酸態窒素よりアミノ態窒素により良好になるものが多い。単糖、少糖および多糖は種類を問わず菌核形成に利用し得るもの間には著しい差異は認められなかった。糖アルコールは菌核形成に利用され難かった。

(3) Houston 合成培地を基本培地としてビタミン類の影響をみると菌糸生長は著しく促進されるが、形成された菌核の機能的成熟は概して不良となる。

(4) 菌核表面の溢泌液滴 (exudate droplet) の消失および着色完了など外観的成熟の遅速と菌核の機能的成熟との間には明らかな関係が認められ

なかった。

### 3. 成熟に伴う菌核細胞の変化

(1) 菌核構成細胞の変化として周辺菌糸細胞が成熟に伴ない外皮細胞に分化するほか、内部にあっては髓組織菌糸細胞の分化が起る。

(2) 髓組織菌糸細胞は成熟とともにその細胞壁が肥厚し、厚さ 0.25~0.46  $\mu\text{m}$  の均質な層となる。また同時に細胞壁外周には繊維構造を有する物質が生じ、厚さ 1.21~2.8  $\mu\text{m}$  の顕著な繊維層を形成する。繊維層はさらに電子密度の高い非常に薄い層で覆われ互に融合することはなく、また細胞間げきも認められた。

(3) 髓組織の細胞壁は chitin,  $\beta$ -1, 3 glucan, たんぱくなどから、また繊維層は  $\beta$ -1, 3 glucan, たんぱくなどから成ると推定した。

(4) 髓組織菌糸の細胞質にあっては成熟に伴ってミトコンドリアの退化、glycogen およびポリリン酸様物質の蓄積が行なわれる。

### 4. 菌核に対する低温処理の発芽に及ぼす影響

(1) 菌核に対する低温処理は湿潤状態でのみ明らかな発芽促進効果を示し、また処理期間が長くなるほど発芽開始が早くなる傾向がみられた。

### 5. 菌核からの菌糸生長と菌核発芽との関係

(1) 菌核から栄養菌糸が生ずる現象を“菌糸発芽”と呼んで“子のう盤発芽”と区別し、相互の関係を検討した。

(2) 菌糸発芽は明らかに子のう盤発芽を阻害した。

(3) 自然土壤に置いた菌核は土壤に対する glucose など炭素源の添加によって菌糸発芽が促進される。

(4) 菌核からの菌糸生長は土壤静菌作用により著しく抑制されるが、土壤に対する glucose の添加により若干緩和される。

(5) 炭素源添加により菌糸発芽した菌核の土壤中における生存率はきわめて低い。

(6) 外部からの栄養供給のほかに菌核外皮の損傷も菌糸発芽を誘発する要因となるが、何れが菌糸発芽にとって重要な要因であるかについては明らかに出来なかった。

### 6. 菌核発芽における子のう盤発生の過程とそれに関する要因

(1) 菌核発芽にあたって子のう盤柄原基の形成は最初に外皮層直下の髓組織中に染色性の強い細胞集団として認められる(第I期)。次いで原基周辺あるいは内部に褐変がおこる(第II期)。次に褐変した原基から染色性の強い菌糸細胞が生じ、外皮層直下に髓組織とは明らかに異なる組織を形成する(第III期)。次に外皮を破って若い子のう盤柄として生長を始める(第IV期)。

(2) 原基の発達を経時的にみると第II期から第III期への移行はごく一部の原基においてのみ起り、大部分の原基の発達は第II期で休止していると推定した。

(3) 髓組織における原基分化の温度範囲は 4~25°C と広いが、4°C の低温における方が原基分化に好適である。

(4) 発芽適温の 15°C に菌核を置いた場合には原基から子のう盤柄に発達するが、4°C では原基の発達は第I期で留まり、その数は時間とともに増加する。しかし同様の菌核を 15°C に移すとただちに褐変し、第II期となる。

(5) 菌核に対する発芽促進は低温下に保つ間、菌核中に活性を維持した原基の数が増加することに起因すると推定した。

(6) 発芽中の菌核から生じている子のう盤柄を常に除去すると、その子のう盤柄の累積数は対照の菌核上に生ずる子のう盤柄数より著しく多くなる。このことから発芽菌核中に存在する多数の第II期原基は生長中の子のう盤柄の存在によりその後の発達が抑制されていると推定した。

(7) 菌核組織中における原基分化は外皮から 50  $\mu\text{m}$  前後の深さのところ以最もさかんであった。

(8) 成熟菌核から髓組織のみの小片をつくり 15°C に保つとやがて外皮が再生し、発芽した。このことから髓組織細胞の何れも子のう盤柄に分化する能力を有すると推定した。

(9) *S. allii*, *S. borealis*, *S. trifoliorum*, *Monilinia mali* の4種の発芽菌核について解剖観察した結果、子のう盤柄原基の菌核中における分化の

位置およびの発達過程はほぼ *S. sclerotiorum* と同様であった。

#### 7. 菌核発芽に伴う貯蔵養分の消費

(1) 子のう盤の生産に伴ない菌核の乾物重は減少した。

(2) 菌核中の各炭水化物分画のうち、子のう盤の生産に伴なって明らかに減少したのは  $\beta$ -1, 3 glucan に相当するアルカリ可溶分画であり、ethanol および熱水可溶分画あるいはアルカリ不溶分画の減少は明らかではなかった。

(3) 菌核の磨砕抽出系における各種加水分解酵素の活性をみると、発芽床に置く直前には  $\beta$ -1, 3 glucanase および  $\beta$ -glucosidase の微弱な活性が認められたが、trehalase と amylase の活性は全く認められなかった。

(4) これらのうち発芽後明らかに活性の増大したのは  $\beta$ -1, 3 glucanase のみであった。

(5) trehalase および amylase は菌核発芽率が最大になっても活性がきわめて低かった。

(6) 菌核の  $\beta$ -1, 3 glucanase によって laminarin と Sclerotan (*S. sclerotiorum* の菌核中の  $\beta$ -1, 3 glucan) の分解産物を T. L. C. によりしらべた結果、生成される糖は glucose と少量の gentiobiose であり、したがって菌核中の  $\beta$ -1, 3 glucanase はエキソ型と推定した。

(7) 菌核上に生じている子のう盤と菌核部分における酵素活性を比較した結果、 $\beta$ -1, 3 glucanase 活性は菌核部分で高く、trehalase と amylase 活性は子のう盤部分でやや高かった。

(8) glucose-6-phosphate 脱水素酵素の活性は未発芽のものより発芽菌核においてやや高く、さらに発芽菌核より子のう盤部分で著しく高かった。

#### 8. 発芽中の菌核の微細構造および組織化学

(1) 発芽中の菌核の髓組織菌糸では細胞壁に電子密度の異なる層の分化あるいはそれに類した二次構造の発現が認められた。

(2) 発芽菌核髓組織の菌糸細胞には未発芽菌核と同様ポリリン酸様物質の蓄積した多数の液胞と退化したミトコンドリアが認められ代謝活性は発芽後もきわめて低いと認められた。

(3) 子のう盤柄原基の細胞壁は周囲の髓組織菌

糸よりも薄く、均質であった。また原基細胞の殆どは髓組織菌糸におけるような繊維層がみられなかった。

(4) 第 II 期に相当する原基においては細胞間げきに高電子密度の物質の沈着がみられ、これは周囲の髓組織菌糸の繊維層の一部にまで及んでいるものも認められた。

(5) 組織化学的観察により第 II 期原基には銀親和性物質に富むことから、高電子密度物質の沈着による原基褐変はメラニンによると推定した。

(6) 原基細胞中には多数のリボゾームとクリステの発達したミトコンドリアがみられ、組織化学的には RNA とみられる好塩基性物質およびたんぱくが認められることから代謝活性がきわめて高いと推定した。

(7) 原基に接した髓組織菌糸には液胞中のポリリン酸様物質の少ないものがあり、ポリリン酸のエネルギー源としての利用が示唆される。

(8) 発芽菌核の髓組織中には内生菌糸 (intra-hyphal hyphae) 様の細胞がしばしば見出され、この形成を原基細胞分化のための髓組織菌糸の“若返り”の様式と推定した。また *S. borealis* の発芽菌核中にも同様の細胞が見出された。

(9) 若い子のう盤柄組織ではコハク酸脱水素酵素活性が高く、発芽菌核髓組織の原基に分化していない部分ではきわめて低いことが組織化学的に観察された。

(10) 長期間子のう盤を生産し、崩解しかけた菌核の髓組織の微細構造をみると、菌糸細胞はおおむね消失し繊維層も分解されていたが、一部の繊維層は分解の進んでいないものもみられた。

## 引用文献

- 1) AITKEN, W. B. and NIEDERPRUEM, D. J. (1970). Ultrastructural changes and biochemical events in basidiospore germination of *Schizophyllum commune*. J. Bacteriol., 104: 981-988.
- 2) 赤井 純, 坪木和男 (1971). 豆類菌核病菌の防除技術に関する試験. 北農, 38: 1-10
- 3) AMINOFF, D., BINKLEY, W. W., SCHAFFER, R. and MOWRY, R. W. (1970). Analytical methods for carbohydrates. In The carbohydrates. Vol. II B: 740-807. Edited by Pigman, W. and Horton, D., Academic Press, New York.
- 4) ARIMURA, M. and KIHARA, H. (1968). Ultrastructure of *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) DE BARY. The Memoirs of the Faculty of Agr. Kagoshima University, 5: 79-81.
- 5) 阿武喜美子, 瀬野信子 (1968). 糖類の分離分析, 実験化学講座, 生物化学I, 333-343. 日本化学会編. 九章, 東京.
- 6) BEDI, K. S. (1958). Effect of ultra-violet radiation of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* DE BARY on speed of their germination and apothecial development. Indian Phytopathology, 11: 37-39.
- 7) ——— (1962 a). Effect of temperature on the formation of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) DE BARY. Indian Phytopathology, 15: 55-60 (R. A. M., 42: 100).
- 8) ——— (1962 b). Temperature in relation to the formation of apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) DE BARY. Indian Acad. Sci., Sec B, 55: 244-250 (R. A. M., 42: 1).
- 9) BJÖRLING, K. (1952). Über die Entwicklungsgeschichte, Variabilität und Pathogenität von *Sclerotinia trifoliorum* ERIKS. Phytopath. Zeitsch., 18: 129-156.
- 10) BOLLER, R. A. and SCHROEDER, H. W. (1972). Self-parasitism in *Aspergillus flavus*. Mycologia, 64: 433-437.
- 11) BRACKER, C. E. (1967). Ultrastructure of fungi. In Annu. Rev. Phytopath., 5: 343-374.
- 12) BULLER, A. H. R. (1933). Reserches on fungi. Vol. 5. Longmans, Green and Co., London.
- 13) BUSSEL, J. and SOMMER, N. F. (1973). Lomasome development in *Rhizopus stromifer* sporangio-phores during anaerobiosis. Can. J. Microbiol., 19: 905-907.
- 14) CALONGE, F. D. (1968). Origin and development of intrahyphal hyphae in *Sclerotinia fructigena*. Mycologia, 60: 932-942.
- 15) CANTINO, E. C. and HORENSTEIN, E. A. (1955). The role of ketoglutarate and polyphenol oxidase in the synthesis of melamin during morphogenesis in *Blastocladiella emersonii*. Physiol. Plantarum, 8: 189-221.
- 16) CHAN, C. and STEPHEN, R. C. (1967). Intrahyphal hyphae in the genus *Linderina*. Can. J. Bot., 45: 1995-1998.
- 17) CHET, I. (1968). The role of sclerotial rind in the germinability of *Sclerotium rolfii*. Can. J. Bot., 47: 593-595.
- 18) ——— and HENIS, Y. (1968). X-Ray analysis of hyphal and sclerotial walls of *Sclerotium rolfii* Sacc. Can. J. Microbiol. 14: 815-816.
- 19) ——— and KISLEV, N. (1969). Ultrastructure of sclerotia and hyphae of *Sclerotium rolfii* SACC. J. Gen. Microbiol., 143-147.
- 20) 千葉信一 (1967). タバコ菌核病菌の菌核における前処理が子のう盤形成に及ぼす影響について (講要). 日植病報, 33: 90.
- 21) COCHRANE, V. W. (1958). Physiology of fungi. John Willey and Sons, Inc., New York.
- 22) COLEY-SMITH, J. R. and COOKE, R. C. (1971). Survival and germination of fungal sclerotia. Annu. Rev. Phytopath., 9: 65-92.
- 23) COLOTELO, N. (1974). A scanning electron microscope study of developing *Sclerotinia sclerotiorum*. Can. J. Bot., 1127-1130.
- 24) COOKE, R. C. (1969). Changes in soluble carbohydrates during sclerotium formation by *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. trifoliorum*. Trans. Br. Mycol. Soc., 53: 77-86.
- 25) ——— (1970). Physiological aspects of sclerotium growth in *Sclerotinia sclerotiorum* Trans. Br. Mycol. Soc., 54: 361-365.
- 26) COOKE, R. C. and MITCHELL, D. T. (1967). Germination pattern and capacity for repeated stroma formation in *Claviceps purpurea*. Trans. Br. Mycol. Soc., 50: 275-283.

- 27) ——— and ——— (1969). Sugars and polyols in sclerotia of *Claviceps purpurea* and *C. nigricans* and *Sclerotinia cureyana* during germination. Trans. Br. Mycol. Soc., 52: 365-372.
- 28) ——— and ——— (1970). Carbohydrate physiology of *Claviceps purpurea* during dormancy and germination. Trans. Br. Mycol. Soc. 54: 93-99.
- 29) CURRIER, H. B. (1957). Callose substance in plant cells. Amer. J. Bot., 44: 478-488.
- 30) DEMETRIADES, S. D. (1951). Studies on the biology of *Sclerotinia sclerotium* (LIB.) MASSE. I. The effect of the osmotic pressure of the medium. Ann. Inst. Phytopath. Benaki, 5: 65-75 (R. A. M., 32: 272).
- 31) ——— (1952). Studies on the biology of *Sclerotinia sclerotium* (LIB.) MASSE. II. The utilization of various carbon sources. Ann. Inst. Phytopath. Benaki, 6: 51-59 (R. A. M., 34: 101).
- 32) ——— (1953). Studies on the biology of *Sclerotinia sclerotium* (LIB.) MASSE. IV. The utilization of various nitrogen sources. Ann. Inst. Phytopath. Benaki, 7: 27-35 (R. A. M., 741).
- 33) DENNIS, R. W. G. (1956). A revision of the British *Helotiaceae* in the herbarium of the Royal Botanic Gardens, Kew, with notes of related European species. Mycol. Pap. 62: 1-206.
- 34) ——— (1974). *Whetzelinia* KORF and DUMONT, a superfluous name. Kew Bull., 29: 89-91.
- 35) DIJKSTRA, J. E. (1966). Acceleration of apothecia development *Sclerotinia trifoliorum*. Neth. J. Pl. Path., 72: 203 (R. A. M., 50: 45).
- 36) DOBBS, C. G. and HINSON, W. H. (1953). A widespread soil fungistasis. Nature, 172: 197-199.
- 37) ——— and BYWATER, J. (1960). Inhibition of fungal growth in soils. In the Ecology of soil fungi. 130-147. ed. by Parkinson, D. and Waid, J. P., Liverpool Univ. Press, Liverpool.
- 38) DRAYTON, F. L. (1934). The sexual mechanism of *Sclerotinia glaboli*. Mycologia, 26: 46-72.
- 39) EBATA, J. and SATOMURA, Y. (1963a). Studies on the glucanase of *Sclerotinia libertiana*. part III. Digestibility of yeast and chlorella cells with the glucanase. Agr. Biol. Chem., 27: 471-477.
- 40) ——— and ——— (1963). B. Studies on the glucanase of *Sclerotinia libertiana*. Part IV. Purification and some properties of the enzyme. Agr. Biol. Chem., 27: 478-483.
- 41) ERGLE, D. R. (1948). The carbohydrate metabolism of germinating *Phymatotrichum* sclerotia with special reference to glycogen. Phytopathology, 38: 142-151.
- 42) FARLEY, J. D., WILHELM, S. and SNYDER, W. D. (1971). Repeated germination and sporulation of microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* in soil. Phytopathology, 61: 260-264.
- 43) FAULKNER, G., KIMMINS, W. C. and BROWN, R. G. (1973). The use of fluorochromes for the identification of  $\beta$  (1-3) glucans. Can. J. Bot., 51: 1503-1504.
- 44) FEDER, N. and O'BRIEN, T. P. (1968). Plant microtechnique: Some principles and new methods. Amer. J. Bot., 55: 123-142.
- 45) 福井作蔵 (1969). 還元糖の定量法. 東京大学出版局, 東京.
- 46) FURTADO, J. S. (1971). The septal pore and other ultrastructural features of the *Pyrenomycelle Sorcharia fimicola*. Mycologia, 63: 104-113.
- 47) GARAY, A. S. (1958). Der Zusammenhang zwischen Fruchtkörperbildung und Atmung in Falle des Mutterkorns unter besonderer Berücksichtigung der Bedeutung der Fumarsäure. Physiol. Plant., 11: 48-55.
- 48) GARRETT, S. D. (1970). Pathogenic root-infecting fungi. Cambridge at the University Press.
- 49) GÄUMAN, E. (1964). Die Pilze. Birkhäuser Verlag, Basel.
- 50) GRIFITHS, D. A. (1966). Relationships between mycostasis and free monosaccharides in soils. Nature, 199: 408.
- 51) HANKS, D. L. and SUSSMAN, A. S. (1969). The relation between growth, conidiation and trehalase activity in *Neurospora crassa*. Amer. J. Bot., 56: 1152-1159.
- 52) 半沢 洵 (1906). 大豆菌核病についての研究. 北海道農会報, 6: 1-17.
- 53) 原 摂祐 (1942). 小豆の病害と其防除法. 農業及園芸, 17: 627-632.

- 54) HELD, V. M. (1955). Physiological differences between a normal and a degenerate strain of *Sclerotinia trifoliorum*. *Phytopathology*, 45: 39-42.
- 55) HENDERSON, R. M. (1962). An inhibitory growth correlation in the apothecial stipe of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Nature*, 195: 826.
- 56) HENSON, L. and VALLEAU, W. D. (1940). The production of apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. trifoliorum* in culture. *Phytopathology*, 30: 869-873.
- 57) HIRSH, H. M. (1954). Environmental factors influencing the differentiation of protoperithecia and their relation to tyrosinase and melanin formation in *Neurospora crassa*. *Physiol. Plant.*, 7: 72-96.
- 58) 本田雄一, 楠木利文 (1974). クローバ菌核病菌 (*Sclerotinia trifoliorum* ERIKS.)の柱状体の趨光性に及ぼす単色光の影響 (講要). *日植病報*, 40: 170.
- 59) 出田 新 (1903). *日本植物病理学*, 正編, 裳華房, 東京.
- 60) 鈞方末彦 (1949). *食用作物病学*, 上, 朝倉書店, 東京.
- 61) 池上八郎 (1959). レンゲ菌核病菌の子のう盤の成熟に及ぼす光線の影響. *日植病報*, 24: 273-280.
- 62) INGOLD, C. T. (1959). Jelly as a water-reserve in fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 42: 475-478.
- 63) JACKSON R. M. (1958). An investigation of fungistasis in Nigerian soils. *J. Gen. Microbiol.*, 18: 248-258.
- 64) JACKSON, R. S. (1972). Repeated germination of sclerotia of *Botrytis convoluta* to produce successive crops of conidia. *Can. J. Bot.*, 50: 985-989.
- 65) JENSEN, W. A. (1962). *Botanical histochemistry*. Freeman, San Francisco and London.
- 66) JONES, D. (1970). Ultrastructure and composition of the cell walls of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 54: 351-360.
- 67) KHAN, S. R. and ALDRICH, H. C. (1973). Conidiogenesis in *Termitaria snyderi* (Fungi imperfecti). *Can. J. Bot.*, 51: 2307-2314.
- 68) KENDRICK, W. B. and MOLNAR, A. C. (1965). A new *Ceratoystis* and its veticicliadiella imperfect state associated with the bark beetle *Dryocoetes confusus* on *Alies lasiocarpa*. *Can. J. Bot.* 43: 39-43.
- 69) 北原増雄 (1950 a). *Sclerotinia libertiana* の菌核成分の研究. 第3報. トレハロースについて. 岐阜大学農学部学術報告. 68: 64-67.
- 70) ——— (1950 b). *Sclerotinia libertiana* の菌核成分の研究. 第4報. 数種溶剤抽出物中の炭水化物について. 同上. 68: 117-123.
- 71) ——— 竹内良光. (1957). ナクネ菌核病菌の菌核成分の研究. 第6報. ポリグルコザンについて (その1). 岐阜大学農学部研究報告, 8: 100-105.
- 72) ——— (1961). ナクネ菌核病菌の菌核多糖類に関する研究 (第1報). ポリグルコザンの部分加水分解によって得られる糖類. *農芸化学会誌*, 35: 468-474.
- 73) KORF, P. P. and DUMONT, K. P. (1972). *Whetzelinia*, a new generic name for *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. tuberosa*. *Mycologia*, 64: 248-251.
- 74) KUO, M. J. and ALEXANDER, M. (1967). Inhibition of the lysis of fungi by melanins. *J. Bacteriol.*, 94: 624-629.
- 75) 串田 弘 (1971). *電子顕微鏡の試料作製法*. ニューサイエンス社, 東京.
- 76) Le TOURNEAU, D. (1966). Trehalose and acyclic polyols in sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycologia*, 58: 934-942.
- 77) LINGAPPA, B. T. and LOCKWOOD, J. L. (1963). Direct assay of soils for fungistasis. *Phytopathology*, 53: 529-531
- 78) LISON, L. (1953). *組織化学および細胞化学: 理論と方法* (今泉 正訳). 白水社, 東京.
- 79) LOWRY, R. J. and SUSSMAN, A. S. (1966). Intra-hyphal hyphae in "Clock" mutants of *Neurospora*. *Mycologia*, 58: 541-548.
- 80) ——— (1967). Ultrastructural changes during germination of ascospores of *Neurospora tetrasperma*. *J. Gen. Microbiol.* 51: 403-409.
- 81) MACDONALD, J. A. (1934). The life history and cultural characteristics of *Typhula gyrans* (BATSCH) FRIES. *Ann. Appl. Biol.*, 21: 590-613.
- 82) MANOKA, M. S. and COLVIN, J. R. (1967). Structure and composition of the cell wall of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.*, 94: 202-212.



- 83) MARCHANT, R., PEAT, A. and BUNBURY, G. H. (1967). The ultrastructural basis of hyphal growth. *New Phytol.* 66: 623-629.
- 84) MARECHAL, L. and GOLDEMBERG, S. H. (1964). Uridine diphosphate glucose  $\beta$ -1, 3 glucan  $\beta$ -3-glucosyl-transferase from *Euglena gracilis*. *J. Biol. Chem.*, 239: 3163-3167.
- 85) MAXWELL, D. P., WILLIAMS, P. H. and MAXWELL, M. D. (1970). Microbodies and lipid bodies in the hyphal tips of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Bot.*, 48: 1689-1691.
- 86) MAZIA, D., BREWER, Ph. A. and ALFERT, M. 1958. The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromphenol blue. *Biol. Bull.* 104, 57-67.
- 87) MILLER, C. W. and ALEXANDER, N. A. 1961. Proliferation of conidiophores and intrahyphal hyphae in *Aspergillus niger*. *Mycologia*, 53: 433-436.
- 88) 三崎 旭 (1969). 種々のグルカン, 多糖生化学 1. 化学編, 鈴木 旺, 松村 剛, 山科郁男編集, 共立出版社, 東京.
- 89) MITCHELL, D. T. and COOKE, R. C. (1968). Some effect of temperature on germination and longevity of sclerotia in *Claviceps purpurea*. *Trans. Br. Myco. Soc.*, 51: 721-729.
- 90) MOORE, E. J. (1965). Fungal gel tissue ontogenesis. *Amer. J. Bot.*, 52: 389-395.
- 91) MOORE, R. T. (1965). The ultrastructure of fungal cells. *In* The fungi, an advanced treatise. Vol. I. edited by Ainsworth, G. C. and Sussman, A. S., Academic Press, New York.
- 92) MOTTA, J. J. (1971). Histochemistry of the rizomorph meristem of *Armillaria mellea*. *Amer. J. Bot.*, 58: 80-87.
- 93) MUJKA, R. F. (1955). Studies on Sclerotinosis. *Agric. tec. Santiago*, 15: 64-74 (R. A. M., 37: 266.).
- 94) 中山 包 (1966). 発芽生理学. 内田老鶴閣新社, 東京.
- 95) 成田武四 (1966). *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) DE BARY による豆類その他の作物の菌核病に関する研究総説. 北海道立十勝農業試験場資料第 2 号.
- 96) NIEDERPRUEM, D. J. and WESSELS J. G. (1969). Cytodifferentiation and morphogenesis in *Schizopyllum commune*. *Bacteriol. Rev.*, 33: 505-535.
- 97) NISHIZAWA, K. (1940 a). Physiological studies on Laminarin and mannitol of brown algae. II. The seasonal variation of their content in *Eisenia bicyclis*. *Science Report, Tokyo Bunrika Daigaku, Sect. B*, 5: 9-14.
- 98) — — (1940 b). Physiological studies on Laminarin and mannitol of brown algae, III. Variation of their content in *Eisenia bicyclis* through various stages of growth. *Science Report, Tokyo Bunrika Daigaku, Sect. B*, 5: 15-19.
- 99) 小笠原 進, 松浦 義 (1939). 菜種菌核病に関する研究 (第 1 報). 福井県農業試験場調査報告, 23: 1-191.
- 100) OI, S., KONISHI, I. and SATOMURA Y. (1966). Structural studies on "Isosclerotan", a new glucan isolated from *Sclerotinia* fungus, by physical, chemical and enzymatic methods. *Agr. Biol. Chem.*, 30: 266-273.
- 101) 岡本 弘 (1938). 沖縄本島における *Sclerotinia libertiana* Fuckel の子のう盤の形成について. 日植病報, 8: 249-250.
- 102) 岡本耕造, 上田政雄, 前田隆英 (1958). 顕微鏡的組織化学, 第 2 版. 医学書院, 東京.
- 103) PITT, D. (1964). Studies on sharp eyspot diseases of cereals. II. Variability of sclerotia: persistence of the causal fungus, *Rhizoctonia solani* Kühn. *Ann. Appl. Biol.*, 54: 231-240.
- 104) POTGIETER, H. J. and ALEXANDER, M. (1965). Polysaccharide components of *Neurospora crassa* hyphal walls. *Can. J. Microbiol.* 11: 122-125.
- 105) PURDY, L. H. (1955). A broader concept of the species *Sclerotinia sclerotiorum* based on variability. *Phytopathology*, 45: 421-427.
- 106) PURDY, L. H. (1956). Factors affecting apothecial production by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, 46: 409-410.
- 107) PURDY, L. H. and GROGAN, R. G. (1954). Physiological studies of *Sclerotinia sclerotiorum* in liquid and agar culture. *Phytopathology*, 44: 36-38.
- 108) RAMSEY, G. B. (1925). *Sclerotinia* species causing decay of vegetables under transit and market conditions. *J. Agric. Res.*, 31: 579-632.
- 109) REESE, E. T. and MANDELS, M. (1959).

- $\beta$ -d-1, 3 glucanase in fungi. Can. J. Microbiol., 5: 173-185.
- 110) ROBINS, W. J. (1939). Growth substances in agar. Amer. J. Bot., 26: 772-778.
- 111) 斎藤 泉 (1939). 豆類菌核病防除薬剤の室内検定法. 道立農業試験場集報, 18: 98-106.
- 112) SAITO, I. (1974). Ultrastructural aspects of the maturation of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) DE BARY. 日本菌学会会報, 15: 384-400.
- 113) SASS, J. E. (1951). Botanical microtechnique. Iowa State College Press, Iowa.
- 114) 里村幸男 (1968). スクレリンの生理作用. 植物の化学調節, 3: 127-135.
- 115) SATOMURA, Y., ONO, M. and FUKUMOTO, J. (1960). Studies on the glucanase of *Sclerotinia libertiana*. Part I. Activity of the glucanase on glucans of yeast and sclerotia of the fungus. Bull. Agric. Chem. Soc. Japan, 24: 317-321.
- 116) SCURTI, J. C. and CONVERSO, L. (1965). Sulla struttura microscopica ultramicroscopica degli sclerozi di *Typhula* sp. Caryologia 18: 263-284.
- 117) 副島正美, 菅原 潔 (1972). 蛋白質の定量法, 東京大学出版会, 東京.
- 118) SPROSTON, T. and PEASE, D. C. (1957). Thermoperiods and production of apothecial initials in the fungus *Sclerotinia trifoliorum* ERIKS. Science, 125: 599-600.
- 119) STEADMAN, J. R. and COOK, G. E. (1973). A simple method for collecting ascospores of *Whetzelinia sclerotiorum*. Plant Dis. Repr., 58: 190.
- 120) 杉本利哉 (1959). 豆類菌核病の発生と病原菌の菌糸伸長との関係について. 北大農学部邦文紀要.
- 121) TANRIKUT, S. and VAUGHAN, E. K. (1951). Studies on the physiology of *Sclerotinia sclerotiorum*. Phytopathology, 41: 1099-1103.
- 122) 照井陸奥生, 原田幸雄 (1966). ナタネ菌核病菌の菌核低温処理と子のう盤産生. 弘前大学農学部学術報告, 12: 24-30.
- 123) THOMAS, R. C. (1930). Composition of fungus hyphae. II. *Sclerotinia*. Amer. J. Bot., 17: 779-787.
- 124) TOWNSEND B. B. (1957). Nutritional factors influencing the production of sclerotia by certain fungi. Ann. Bot., 21: 153-166.
- 125) TOWNSEND, B. B. and WILLETTS, H. J. (1954). The development of sclerotia of certain fungi. Trans. Br. Mycol. Soc., 37: 213-221.
- 126) TSUDA, S. and TATUM, E. L. (1961). Intracellular crystalline ergosterol in *Neurospora*. J. Biophys. Biochem. Cytol. 11: 171-177.
- 127) 宇井格生 (1967). 土壤の静菌作用と測定法, 土壤病害の手引, III. 日本植物防疫協会, 東京.
- 128) VEGA, R. R. and Le TOURNEAU, D. (1974). The effect of zinc on growth and sclerotial formation in *Whetzelinia sclerotiorum*. Mycologia, 66: 256-264.
- 129) WANG, S. C. and Le TOURNEAU, D. (1971). Carbon sources, growth, sclerotial formation and carbohydrate composition of *Sclerotinia sclerotiorum*. Arch. Microbiol., 80: 219-233.
- 130) ———— (1972). Amino acids as nitrogen sources for growth and sclerotium formation in *Sclerotinia sclerotiorum*. Trans. Br. Mycol. Soc., 59: 509-512.
- 131) WATERS, H., BUTLER, R. D. and MOORE, D. (1972). Thick-walled sclerotial medullary cells in *Coprinus lagopus*. Trans. Br. Mycol. Soc., 59: 167-169.
- 132) WHEELER, B. E. and SHARAN, N. (1965). The production of sclerotia by *Sclerotium rolfsii*. I. Effect of varying the supply of nutrients in an agar medium. Trans. Br. Mycol. Soc., 48: 291-302.
- 133) WHETZEL, H. H. (1945). A synopsis of the genera and species of the *Sclerotiniaceae*, a family of stromatic inoperculate Discomycetes. Mycologia, 37: 648-714.
- 134) WIAME, J. M. (1949). The occurrence and physiological behavior of two metaphosphate fractions in yeast. J. Biol. Chem., 178: 919-929.
- 135) WILLETTS, H. J. (1968). Factors influencing the production of stromata and microconidia by *Sclerotinia fructicola* (WINT.) REHM. Ann. Bot., 32: 219-232.
- 136) WILLETTS, H. J. and WONG, A. L. (1971). Ontogenetic diversity of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* and related species. Trans. Br. Mycol. Soc., 57: 515-524.

- 137) WILLIAMS, G. J. and WESTERN, J. H. (1965). The biology of *Sclerotinia trifoliorum* Eriks. and other species of sclerotium-forming fungi. I. Apothecium formation from sclerotia. Ann. Appl. Biol., 56: 253-260.
- 138) WILSON, D. M. (1968). Physiology of sexual reproduction in *Hytomyces solani* f. *cucurbitae*. V. Influence of tyrosinase on perithecial primordium formation. Phytopathology, 58: 1697-1699.
- 139) 山本和太郎 (1959). 日本における菌核病菌科の種類. 日本菌学会報, 2: 2-8.
- 140) 柳田友道 (1962). 糸状菌集落の発育と構造. 微生物の構造 (応用微生物研究所シンポジウム第3集).
- 141) 吉田 昭 (1959). ポリリン酸 — bacterial phosphagen — の生化学. 蛋白質, 核酸, 酵素, 4: 39-48.
- 142) YU, T. F. (1945). The red-spot disease of broad beans (*Vicia fabae* L.) caused by *Botrytis fabae* SARDINA in China. Phytopathology, 35: 945-954.
- 143) ZALOKAR, M. (1965). Integration of cellular metabolism. In The fungi, an advanced treatise. Vol. I. edited by Ainsworth, G. C. Sussman, A. S. Academic Press, New York.

Studies on the maturation and germination of sclerotia of  
*Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) DE BARY, a causal  
fungus of bean stem rot

by  
Izumi SAITO

Summary

Since the first description by Libert, *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) DE BARY has been recognized as an important plant pathogen by many workers of the world because of its very wide host range and the difficulty in controlling the diseases caused by the organism. Thus, a number of studies have been made on almost all aspects of *Sclerotinia* disease or the causal fungus itself, but many problems still remain to be resolved.

The fungus produces black-colored sclerotia on the infected host plants. The sclerotia germinate, usually after over-wintering in most temperate regions, to form apothecia from which ascospores are discharged. Although infection of host plants with mycelium developed from sclerotia has been considered as a possible mean of infection, the major source of inoculum is ascospores. Consequently, it might be said that the factors affecting sclerotial germination, including apothecial development, could determine disease incidence during one crop season. Because of the importance of apothecial formation in epidemic development, many reports have been published on this phase of the life cycle of the fungus. However, these are mainly concerned with the effects of such external factors as light, moisture and temperature on apothecial development; there are few reports concerned with the internal factors involved in sclerotial germination.

In order to clarify the latter aspects of the fungus, I studied the morphology and physiology of sclerotial germination of *S. sclerotiorum*. In this project, however, some aspects of sclerotial maturation were also investigated because this phase seemed to be closely related to the function of sclerotia. The present study is comprised of two parts. First the effects of nutritional conditions on the maturation of sclerotia, especially as maturation relates to germinability, and the ultrastructural and cytochemical changes of sclerotia during maturation were investigated. Secondly, temperature requirements, the development of stipes, storage product metabolism and the ultrastructural and histochemical changes during sclerotial germination were investigated. These results are summarized as follows:

**Part. I. Maturation of sclerotia**

**1. Effects of nutritional conditions on the maturation of sclerotia.**

The germinability of sclerotia was found to be significantly affected by the kind of culture media upon which sclerotia were formed, even though there was no visible difference in their appearance, such as color and shape. In an experiment using nutrient solutions absorbed on sponges, the most favorable medium for sclerotia to acquire a high germinability was bean leaf decoction dextrose broth, and it was followed by potato dextrose broth (Fig. 1). In contrast, sclerotia produced on Houston's solution, a synthetic medium, germinated poorly, though they appeared to be normally

mature. These results suggest that such conventional indicators of maturity as development of dark pigments or disappearance of liquid droplets over the surface of sclerotia do not necessarily indicate the ability to germinate. Thus, in the case of *Sclerotinia*, when a sclerotium can germinate to from apothecia, it has matured. The term 'functional maturation' may be used to indicate such a situation.

The effects of nitrogen and carbon sources on the above mentioned maturity were investigated using Houston's agar as a basal medium.

The most favorable nitrogen sources for 'functional maturation' were found to be amino acids (Table 4). In contrast, nitrate and ammonium nitrogen were not favorable, although the sclerotia produced were normally mature, at least from external appearance (Table 5).

Besides nitrogen nutrition, the C/N ratio also seemed to affect 'functional maturation' of sclerotia.

The effects of carbon sources on sclerotial maturation were examined using glutamic acid as the sole nitrogen source (Table 8-11). Whenever a given carbon source was utilizable for mycelial growth and sclerotial production, sclerotia were functionally mature. Thus, sclerotia were produced on the medium containing all poly-, di- and monosaccharides examined, except for sorbose on which the fungus did not grow, and germinated normally. Polyols were not favorable for production of 'functional maturation' of sclerotia, except for sorbitol on which functionally mature sclerotia were produced.

The time required for the initiation and pigment development of sclerotia and the duration of droplet exudation over the sclerotia were also determined for each amino acid and carbohydrate studied (Table 6, 8-10). There was no relationship between the time thus determined and the 'functional maturity' of sclerotia, i. e. percentage of maximum germination (Fig. 2, 3).

In the nutritional aspects mentioned above, it is suggested that under natural conditions 'functional maturity' is altered in proportion to the difference of host plants or the growth stage of a single plant. The nature of 'functional maturation' is obscure, but it is likely that this phase is different than that of vegetative growth, since the addition of vitamins to a medium is usually favorable for mycelial growth but not for 'functional maturation' of sclerotia produced (Table, 13, 14).

## 2. Morphology and cytochemistry of sclerotial maturation

The cellular changes of sclerotia during maturation were studied by electron and light microscopy. Sclerotia were allowed to mature on bean leaf decoction dextrose agar, a most favorable medium for 'functional maturation'.

### 1) Tissue differentiation of sclerotia and ultrastructural changes of component cells

A. The marginal cells of immature sclerotia lost their filamentous nature by repeated septation ('white' sclerotia), and the outermost cells changed into slightly thick-walled, globose cells ('slightly pigmented' sclerotia). This was followed by the differentiation of rind consisting of darkly pigmented, thick-walled cells. At this time sclerotia were easily separated from the underlying colony ('mature' sclerotia). In parallel with rind differentiation, the inner cells retained their filamentous nature, but a layer which was not stained with dye gradually developed around them, and the large central zone of sclerotia was finally occupied with such cells to form a medullary tissue (Plate 1-1~4).

B. Electron microscopy was carried out mainly with the medullary cells of sclerotia at each

of the arbitrary stages mentioned above and undifferentiating vegetative hyphae.

#### *Changes in the Cell Wall*

The cell wall of vegetative hyphae appeared to have a one-layered, homogeneous zone from 0.09 to 0.18  $\mu\text{m}$  in thickness. A simple, single perforated septum characteristic of ascomycetous fungi was present (Plate 2).

In 'white' sclerotia, the cell wall of most of the inner cells (medullary cells) had a thickness similar to that of vegetative hyphae. However, they were enveloped with a fibrous material in various degrees, and in some cases the fibrous material developed into a conspicuous layer (Plate 3-2). Subsequently, with the development of the fibrous layer, thickening of the cell wall progressed. In 'slightly pigmented' sclerotia, the development of such a fibrous layer almost terminated and in some cases its outer surface was further enveloped with a very thin, electron dense layer, even though cell wall thickening still appeared to continue (Plate 5; Plate 6-1). As the result of such changes, medullary cells of 'mature' sclerotia have two major layers; a thickened, homogeneous cell wall and a very thickened, fibrous layer corresponding to the non-stainable layer which was observed under a light microscope (Plate 7). A non-cellular matrix was lacking and thus intercellular spaces were evident.

#### *Changes in cytoplasm*

Various organelles common in fungi were seen in the cytoplasm of vegetative hyphae; mitochondria, ribosomes, vacuoles, endoplasmic reticulum, lomasomes, etc (Plate 2).

The septal pore was often seen associated with a small deposit of electron dense, amorphous materials on the pore rim and with a number of electron dense Woronin bodies (Plate 2-2; Plate 3-1).

Cytoplasmic features of medullary cells of 'white' sclerotia were generally similar to that of vegetative hyphae, except that electron dense materials disappeared on the pore rim and lomasomes were seen to have more developed structure as multivesicular and multitubular bodies (Plate 4). Significant changes occurred in mitochondria and vacuoles during sclerotial maturation. Mitochondria with distinct cristae, usually more elongated, were still abundant in the medullary cells of 'slightly pigmented' sclerotia (Plate 5-3). However, the cristae of mitochondria in 'mature' sclerotia were indistinct, and thus it was not easy to discern this organelle at this stage (Plate 6-2). Such a change in the mitochondrial structure reflects the decrease of  $\text{O}_2$  uptake by sclerotia with maturation (Fig 5). In vacuoles, electron dense, amorphous materials were deposited, and their volume increased as sclerotia matured (Plate 5; Plate 6). In 'mature' sclerotia, numerous vacuoles almost filled with such materials were evident (Plate 6-2; Plate 8).

#### 2) Cytochemistry of medullary cells of sclerotia

The fibrous layer of medullary cells was found to be PAS negative and dissolved completely in ca 23 M KOH after 2hr in the autoclave (Plate 9). Cell walls and septa were PAS positive and remained after autoclaving in the KOH solution. In the remaining cell walls and septa, chitosan was detected using IKI in 1%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Under ultraviolet light, yellow fluorescence was seen in both the cell wall and the fibrous layer, if cells were stained with dilute aniline blue. This suggests the inclusion of  $\beta$ -1,3 glucans in both layers despite the faint fluorescence in the latter. Medullary cells were subjected to digestion by partially purified  $\beta$ -1,3 glucanase with or without papain

(Plate 10). It was found that incomplete lysis of these layers occurred only by the combination of the two enzymes. From these results it was concluded that the walls of medullary cells contained chitin,  $\beta$ -1, 3 glucans and protein as components. The fibrous layer appeared to have a somewhat gelatinous nature, but it was not stained with toluidine blue O or alcian blue 8 GX. On the basis of the cytochemical reactions mentioned above, the fibrous layer seemed to have  $\beta$ -1, 3 glucans and proteins as components.

Cytoplasm of medullary cells of 'mature' sclerotia was found to contain PAS positive materials (Plate 9). Since the PAS stainability was reduced or occasionally disappeared after  $\alpha$ -amylase digestion of cells, such materials were considered to be glycogen (Plate 9). In 'mature' sclerotia, the medullary cells contained many granules which showed a significant metachromasy with toluidine blue O, PH 4.4 (Plate 9). Such granules increased in number as sclerotia matured, and probably correspond to vacuoles containing electron-dense, amorphous materials which were observed under the electron microscope. These results suggested that polyphosphates accumulated in vacuoles of mature sclerotia. Such substances may have a role as 'reserve phosphorous' as shown in bacteria, yeast and some filamentous fungi.

## Part II. Germination of sclerotia

### 1. Effect of the low temperature pretreatment on the germination of sclerotia.

Sclerotia harvested from bean stem cultures were stored at 4°C with or without a water supply, -10°C and -20°C for 1 month, respectively. The sclerotia were placed at 15°C and their germination was compared to control sclerotia stored at room temperature (Fig 6). The stimulatory effect of low temperature treatment (chilling) at 4°C was evident when sclerotia were soaked in water and stored in a moist chamber through the pretreatment period. In contrast, if lacking moisture, there was no effect due to chilling, and the germination rate at 15°C was almost the same as that of the control sclerotia. Pretreatments at -10 and -20°C were found to be rather inhibitive to sclerotial germination at 15°C.

The relation between the germination rate at 15°C and the duration of chilling with moisture within a range from 0 to 30 days was investigated. The time required to reach maximum germination was apparently reduced with the extension of the chilling period (Fig 7).

### 2. The development of mycelium from sclerotia and its effect on the production of apothecia

Although sclerotia of *S. sclerotiorum* germinate to form apothecia, mycelial production is also frequently observed over the surface of sclerotia (Fig 8). This phenomenon is considered to occur as a renewed growth of inactive sclerotial cells, and thus might be included in the category of germination. The germination of fungal sclerotia to form mycelia has already been termed 'myceliogenic germination' (Coley-Smith and Cooke, 1972). In this study, the above mentioned phenomenon was termed 'myceliogenic germination' to distinguish it from the formation of apothecia which was in turn termed 'carpogenic germination.' 'Myceliogenic germination' in *S. sclerotiorum* has so far been treated as a problem of the infection mechanism by the fungus. However, its effect on or relation to apothecial production is quite obscure.

'Myceliogenic germination' sometimes occurred in sclerotia seeded on moistened sponges or sand, but more frequently when nutrients such as glucose or bean leaf powder were added to the medium,

and apothecial production was inhibited (Table 16). There seemed to be an antagonistic relation between the two modes of germination (Table 15). Thus, the production of apothecia was suppressed in proportion to the degree of mycelial growth, and, in turn, little, if any, mycelial growth was noted on scleroia actively producing apothecia. The coexistence of the two modes of germination in a single sclerotium was rare.

Such a relation was most evident on natural soil with or without glucose amendment, because nonamended soil was not a favorable medium for the development of mycelium. 'Myceliogenic germination' of sclerotia occurred vigorously on natural soil amended with 5% (w/w) glucose and apothecial production was completely inhibited (Table 17). Amendments with bean leaf powder or rice bran also inhibited apothecium production, but whether the inhibition resulted from 'myceliogenic germination' could not be determined because of the vigorous growth of the other soil fungi. 'Myceliogenic germination' was found to affect the survival of sclerotia. About 60% of sclerotia thus germinated were dead 130 days after seeding on the glucose amended soil. On non-amended soil, only about 30% of the sclerotia which germinated to form apothecia were dead (Table 18). This suggests the rapid exhaustion of reserves during 'myceliogenic germination' of sclerotia in *S. sclerotiorum*.

Fungistasis of the soil used was investigated by the agar disk method. Mycelial growth of *S. sclerotiorum* from medullary tissue blocks and conidial germination of *Penicillium spp.* were apparently inhibited on disks of water agar (2.0 mm thickness) which had been in contact with the soil (Table 19, 20). Autoclaving the soil almost removed both types of inhibition, but a 5% amendment of glucose partially reduced the inhibition of mycelial growth. In contrast, the germination of ascospores of *S. sclerotiorum* was found to be immune to soil fungistasis, though there was a slight inhibition of germ tube growth which was removed with glucose amendment (Table 21). These results indicate that natural soil is a favorable medium for the functional germination of sclerotia of *S. sclerotiorum*.

Since the wounding of the sclerotial rind with a needle or carborundum stimulated 'myceliogenic germination', rind destruction was considered as one of the triggering factors (Table 22). However, future research is necessary to determine whether rind destruction or the exogenous nutrient supply is of importance.

### 3. The ontogeny of apothecial stipes in sclerotial germination and factors

Carpogenic germination of a sclerotium of *S. sclerotiorum* is apparent when an apothecial stipe protrudes from the sclerotium. In this study, how, where and when stipes develop from sclerotial tissue and what factors affect the development were investigated.

#### 1) The initiation and development of stipe primordia in sclerotia

Light microscopy of paraffin sections of sclerotia during germination indicated that four stages were involved in stipe genesis (Fig 9; Plate 11):

The first evidence of primordium formation was detected as deeply stained areas in the medulla near the rind of the sclerotium. These areas were composed of both narrow and somewhat broader, thin-walled cells with dense cytoplasm (Stage I). Subsequently, dark pigments developed around or inside the primordia (Stage II); this seemed to result from the formation of darkly pigmented, thick-walled cells, but their precise nature was not determined under a light microscope. A mass



of thin-walled hyphae with dense cytoplasm arose from the stage II-primordia and developed into a tissue having a structure which was clearly distinguished from the medulla beneath the rind of the sclerotia (Stage III). Primordia ruptured the rind and began to grow as young apothecial stipes (Stage IV).

The dynamics of primordial development were investigated by counting primordia of each respective stage seen in sclerotial sections throughout the germination period (Fig. 10, 11). It was found that the initiation and development of primordia were not synchronized. Stage I-primordia were first detected two days after seeding the sclerotia and increased in number. The pigmented primordia (Stage II) increased with the gradual decrease of stage I-primordia indicating the advance of stage II. However, the number of stage III-primordia was low in contrast to that of stage II, and it remained almost constant until the experiment was finished. Thus, pigmented primordia became abundant in a single sclerotium with incubation time. From these results, it was suggested that the development of primordia was suspended at stage II, and that most of such pigmented primordia remained dormant while stipes initiated earlier continued to grow actively.

The distance of the initiation site of the stipe primordia from the surface of sclerotia was determined (Fig. 12). It ranged from 37.5 to 450.0  $\mu\text{m}$  with a maximum frequency of approximately 55  $\mu\text{m}$ . Small cubes of medullary tissue obtained from mature sclerotia germinated after the surface became darkly pigmented or after the rind regenerated, subsequently produced normal apothecia (Plate 12). In such medullary tissue cubes, primordia were also initiated near the regenerated rind. These results indicate that any part of the medulla has the potential for primordium initiation and that the location of the initiation closely relates to the site of rind differentiation.

## 2) Primordium development in sclerotia of related species

Light microscopy was carried out with sections obtained from germinating sclerotia of *S. allii*, *S. borealis*, *S. trifoliorum* and *Monilinia mali* (Plate 13). In these species, stipe primordia were also seen as cell clusters with dense cytoplasm in medullary tissue near the rind of sclerotia. Pigmentation was also observed in some of these primordia; young apothecial stipes originated from darkly pigmented cell clusters. This shows that the developmental sequence of primordia in *S. sclerotiorum* is common to other species of *Sclerotinia* or related genera.

## 3) The effect of temperature on the development of stipe primordia

As stated earlier, chilling moist sclerotia stimulated the subsequent germination of sclerotia at 15°C. In order to clarify the stimulative mechanism of chilling, sections of sclerotia were made during the preincubation and germination periods. The preincubation temperatures were 4°C, 15°C (control) and 25°C, and sclerotia were germinated at 15°C. These sections were then examined by light microscopy. Although sclerotia did not germinate during preincubation at 4°C and 25°C, primordia were produced in these sclerotia (Table 24, 25). At both 4°C and 25°C, the number of primordia gradually increased with time. However, pigmentation (stage II) did not occur and they continued to grow as stage I primordia reaching the maximum size unless the sclerotia were transferred to the optimum temperature for germination. At 25°C, the developmental pattern of primordial formation was the same as at 4°C, but there were few primordia. Thus, pigmentation occurs in only actively germinating sclerotia, and this in turn supports the earlier mentioned idea that the pigmented stage (stage II) of primordial formation is an intermediate stage and the further development

of such primordia is controlled by actively growing stipes. On the basis of these results, low-temperature stimulation in a moistened condition is probably attributed to two major factors: (1) the initiation of stipe primordia even at low temperature which are above freezing but not favorable for the usual metabolic activity, and (2) the elimination of self-inhibition in primordial growth that is seen as dark pigmentation. This results in the accumulation of highly activated primordia in a single sclerotium. If such sclerotia are transferred to the optimum temperature, they germinate readily and synchronously resulting in a high percentage of germination.

#### 4) Regulation of stipe production from sclerotia

It was suggested that many pigmented primordia remained dormant under the influence of some stipes initiated earlier in a sclerotium. In order to confirm this hypothesis, the effect of removal of stipes on stipe production by sclerotia was investigated. It was found that repeated removal of stipes from germinating sclerotia resulted in the increased output of stipes in comparison with that produced on the control sclerotia. If stipes were removed there was a fourfold increase in the total number of stipes produced over that observed when stipes were never removed (Fig 13). This suggests an inhibitive growth correlation between stipes and the pigmented primordia in sclerotia. A similar inhibitive correlation has already been demonstrated by HENDERSON (1962) between a stipe and its lateral branch. It was of interest, therefore, to determine whether sclerotia of *S. sclerotium* reacted to known plant growth regulators. Air dried sclerotia were soaked with and allowed to germinate in solutions of 1 to 100 ppm of gibberellic acid, kinetin, auxins, anti-auxins and sclerin. Of these, the only substance to stimulate germination was sclerin, a metabolite of *S. sclerotiorum* which is known to be a physiologically active substance (Table 26).

#### 4. Carbohydrate metabolism during germination

Although much is known about the component carbohydrates of sclerotia of *S. sclerotium*, their utilization during germination has received little attention. In order to study this aspect of sclerotial germination, changes in the dry weight, enzyme activity and the component carbohydrates of sclerotia were determined during germination.

##### 1) Changes in dry weight

The dry weight of sclerotia decreased gradually but steadily with the production of apothecia.

##### 2) Quantitative changes in component carbohydrates.

A sample of powdered sclerotia was successively extracted with boiling 80% ethanol, distilled water at 100°C and 2 N NaOH at room temperature. The residues were further hydrolyzed with 4 N HCl at 100°C. Of these fractions that extracted with 2 N NaOH was found to be a major component of sclerotia and likely to correspond to Sclerotan, a  $\beta$ -1, 3 glucan which had already been isolated by Kitahara and Takeuchi (1962) under the same conditions. Only this fraction decreased markedly in parallel with apothecial production (Fig 14). This indicates that the above mentioned reduction in sclerotial dry weight is mainly due to the utilization of  $\beta$ -1, 3 glucans for apothecial production.

Quantitative changes in other fractions were not significant during germination and apothecial production.

##### 3) Changes in enzyme activity

The activity of several carbohydrases in 0.1 M, pH 5.0 acetate buffer extracts was determined

(Fig. 15). Mature sclerotia, immediately prior to seeding, had weak but detectable  $\beta$ -1, 3 glucanase and  $\beta$ -glucosidase activity, but there was no amylase or trehalase activity. With the beginning of germination, the activity of  $\beta$ -1, 3 glucanase apparently increased, whereas  $\beta$ -glucosidase activity remained at the initial level until the experiment was terminated. The increase in  $\beta$ -1, 3 glucanase activity was most pronounced when apothecial stipes were actively produced. This agrees well with the reduction in amounts of the  $\beta$ -1, 3 glucan fraction. Probably,  $\beta$ -1, 3 glucans involved in cell walls or fibrous layers of medullary cells are modified by  $\beta$ -1, 3 glucanase and utilized for apothecial production. On the other hand, amylase and trehalase activity were very weak during the experimental period. As glycogen is detected cytochemically in medullary cells, its phosphorylation is expected. Trehalose is also a well known soluble component of sclerotia. However, its role and behavior in germination were not apparent from the present results and further studies are required.

The activities of enzymes of carbohydrate metabolism were compared between the different parts of germinating sclerotia where mature apothecia were seen, i. e. mature apothecia, stipes (immature apothecia) and sclerotia (Fig. 17). The specific activities of  $\beta$ -1, 3 glucanase and  $\beta$ -glucosidase were highest in the sclerotia. At later periods of germination, when most stipes had developed into mature apothecia, weak, but detectable amylase and trehalase activity were found in the respective parts. In this state, the specific activity of amylase was highest in mature apothecia, but the trehalase activity was almost equal in the three parts.

The specific activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase was also compared in ungerminating, germinating sclerotia and apothecia including stipes (Fig. 18). The highest activity was found in apothecia. By contrast, in germinating sclerotia, activity was very low, though somewhat higher than in ungerminating sclerotia.

These results clearly show the difference of physiological states between apothecia and sclerotia; the biosynthesis of materials needed for cellular construction is promoted in stipes and apothecia. In contrast, the catabolism of endogeneous reserves takes place mainly in the medullary cells of sclerotia.

## 5. Electron microscopy and histochemistry of germinating sclerotia

### 1) Electron microscopy

As stated earlier, stipe primordia differentiate from medullary cells near the rind of sclerotia. Therefore, electron microscopy was carried out with sections taken from the circumference of the medulla of germinating sclerotia.

In most of the medullary cells of germinating sclerotia, vacuoles filled with polyphosphate-like substances were still prominent in the cytoplasm and mitochondrial degeneration was still evident (Plate 14). Thus, there is not a significant difference between the metabolic activities in most of the medullary cells of germinating sclerotia and those of matured but ungerminating sclerotia. However, a remarkable development of endoplasmic reticulum and zonation of cell wall characteristically seen in the former.

On the other hand, the cells composing the stipe primordia were easily distinguished from such undifferentiated medullary cells (Plate 16-3; Plate 17). The primordial cells were quite irregular in their shape and size, and had thin homogeneous walls lacking fibrous layers. More characteristically,

there were many ribosomes and mitochondria with distinctive cristae reflecting their high metabolic activities (Plate 19). Polyphosphate-like substances were not seen in vacuoles of primordial cells. Such substance were found to decrease in volume in the vacuoles of some adjoining medullary cells, suggesting their utilization as energy sources.

Stage II like primordia with electron-dense deposits were occasionally observed (Plate 18). However, such deposition occurred not in the cell walls but in the intercellular matrix of the primordia; it appeared in fibrous materials remaining among cells or also in the fibrous layer of adjoining medullary cells. Thus, pigmentation observed with light microscopy may have originated in fibrous materials, presumably from their melanization.

It was of interest to know how primordial cells, thin-walled and lacking fibrous layers, are differentiated from medullary cells. Direct outgrowths of medullary cells could not be found. However, there were some endo-hyphae like cells which appeared to be produced by separation of two different layers occurring in the thickened wall of medullary cells (Plate 20). Such endo-hyphae like cells seemed to have higher metabolic activities than undifferentiated medullary cells, because they had many ribosomes and mitochondria in the cytoplasm. Thus, it is suggested that the development of endo-hyphae like cells is the initial step of cellular differentiation. Cells thus grow from inert medullary cells, lysing their mother cell wall and the fibrous layer. If these suggested processes are correct, the zonation in medullary cell walls mentioned earlier is a prerequisite for cellular differentiation, and in turn  $\beta$ -1, 3 glucanase also functions in such processes. As in many fungi, endo-hyphae occur in a dead cell by cell protrusion through the septal pore from an adjoining living cell. Consequently, the above mentioned situation may be termed 'ecdysis' of cells rather than endo-hyphae formation.

An electron microscope study was carried out with decayed sclerotia from which many apothecia were produced. In the medulla of such sclerotia, cell walls had almost disappeared and fibrous layers were largely decomposed (Plate 23). These results indicate the consumption of component materials such as  $\beta$ -glucans or proteins of such cells during apothecial production. However, fibrous layers were sometimes seen to be intact. This suggests that fibrous materials are not completely consumed as reserves and have another function. Presumably, they also have a role as water reservoirs to tolerate dry conditions, since they are somewhat gelatinous in nature.

The ultrastructure of young apothecial stipes was also investigated. Numerous mitochondria and ribosomes were observed in the cells constituting stipe tissue, indicative of the active synthesis of ribonucleic acids and high metabolic activities in such cells (Plate 21).

## 2) Histochemistry

An intensive PAS reaction was detected in stipe primordia (Plate 24). Since the sections were not celloidin-coated, such PAS positive materials are likely to be insoluble polysaccharides of the cell wall.

Mercuric bromphenol blue and the Millon reaction showed that protein concentration was not high in primordia at stage I. However, the reaction became more intense in primordia as they developed and was most intense in the apical regions of young growing stipes (Plate 24; Plate 25).

Ribonucleic acid (RNA) distribution was studied by pyronin or toluidine blue staining and its specificity was confirmed by ribonuclease treatment of sections (Plate 25; Plate 26). There was a

remarkable difference of RNA content between primordial and non-primordial regions of the medulla indicating the active synthesis of RNA in primordial cells. In young apothecial stipes, intense staining with pyronin was in the apical region and in some cells distributed in the central zone. The use of toluidine blue gave a differential staining effect to distinguish between RNA which stained blue and polyphosphate like granules which stained reddish purple. Such granules were not found in primordia and decreased in some adjoining medullary cells. These distribution patterns of RNA and polyphosphate-like granules correlate well with the results of electron microscopy on the primordia and surrounding medullary cells which showed an increase of ribosomes and decrease in the contents of vacuoles.

The use of Masson's ammoniacal silver nitrate reagent gave an intense black depositions in primordia, especially in those pigmented (stage II) as well as rind cells (Plate 26). This suggests that phenolic compounds are localized in primordia, and that their pigmentation at stage II resulted from melanin formation from the oxidative polymerization of polyphenols. Since pigmentation of primordia is restricted within the fibrous materials, as was indicated with electron microscopy, phenolic compounds are probably contained in such materials.

Succinate dehydrogenase activity was histochemically investigated using nitroblue tetrazolium (Plate 27). Blue black depositons of formazan were detected in the cells composing the central region of young apothecial stipes. However, no detectable activity was detected in the non-primordial region in the medulla of germinating sclerotia. These results correlate well not only with the ultrastructural evidence of mitochondrial development but also with the promotion of G-6-P dehydrogenase activities in apothecial tissues.