

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de BARYの
菌核形成培地の栄養条件と子のう盤発芽

斎藤 泉†

EFFECT OF SOME NUTRITIONAL CONDITIONS ON THE
FORMATION AND GERMINABILITY OF SCLEROTIA
BY *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de BARY

Izumi SAITO

豆類菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum* の菌核の子のう盤発芽におよぼす各要因を解析するため、まず発芽促進要因について2・3検討を行なった。菌核の発芽能力は菌の系統によって異なるが、さらに菌核形成培地の栄養条件によってもかなり異なることが知られた。すなわち、菜豆葉煎汁培地では馬鈴薯煎汁培地または各種窒素源を加えた合成培地に比較して形成菌核の発芽率がきわめて高く、菌核形成培地として好適であった。また菌核の低温処理による発芽促進効果は湿润状態においてのみ認められた。

I 緒 言

菌核は糸状菌によって形成される耐久生存器官の1つとして定義されているが、豆類菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum* における菌核は、さらに繁殖器官すなわち、子のう盤を生ずる器官としての性質をも有する。しかも感染能力のある分生孢子を寄主体上に生ずることがないので、1作付期間の発病はほとんど子のう孢子による第一次感染に由来している。すなわち、発病に関与する環境要因および寄主側の条件も看過できないが、菌核からの子のう盤形成が菌核病の発生を規制する場合もありうるといえよう。このようなことから、本菌の子のう盤形成に関する研究はかなり多く、また形成その試みも少なからずなされている。

子のう盤形成過程はさらに菌核の発芽、子のう盤柄の伸長、子のう盤の成熟(開盤)、の三相に分けることができ、それぞれ異なった要因がこれら各相について土壤中を含めた自然環境において影

響しているものと考えられる。これら諸要因、とくにいまだ明らかでない発芽における内的、外的要因については今後明らかにする必要があるが、本報告では菌核形成時の基質栄養条件の発芽能力に及ぼす影響について若干の検討を行なった。さらに今後の試験を有効に行なうためには、100%の発芽率を常にうる必要があるため、これら栄養条件に加え、菌系による発芽能力の違い、菌核に対する低温処理の効果などについても再検討を加えた。なお、*S. sclerotiorum* における菌核発芽とは通常、菌核から子のう盤柄を生ずることを指すが、菌核から菌糸を生ずることもあるので²⁾、後者と区別する意味で、ここでは子のう盤発芽という語を用いることとした。

研究を行なうに当たり、この問題に関する示唆を与えられ、また終始ご指導いただいた中央農業試験場病虫部馬場徹代部長ならびに有益なご助言を賜わった北海道大学農学部宇井格生教授、中央農業試験場病理科長高桑亮博士に深甚の謝意を表す。

† 中央農業試験場

II 実験材料ならびに方法

1) 半合成培地および合成培地上に形成された菌核の子のう盤発芽の比較

ほ場で採取した子のう盤からえた単胞子分離系菌株 Sm-5 を供試し、各培地に 20°C で培養して得られた菌核の発芽程度を比較した。用いた培地の処方は次のとおりである。

- a) 馬鈴薯煎汁培地：馬鈴薯細片 200 g を蒸留水中で 1 時間煮沸し濾液にグルコース 20 g を加える。
- b) 菜豆葉煎汁培地：菜豆葉粉末 36 g (または生葉 200 g) を蒸留水 1,000 ml 中で、1 時間煮沸し、濾液に蒸留水を加えて 1,000 ml とする。さらにグルコース 20 g を加える。
- c) Houston の合成培地⁵⁾：NH₄NO₃ 0.7g, KH₂PO₄ 0.3g, K₂HPO₄ 1.2g, MgSO₄ 0.3g, および FeCl₃, CuSO₄, ZnSO₄, MnSO₄, 各 0.001g, グルコース 40g, 蒸留水 1,000 ml。

以上の培養液をあらかじめ希塩酸および蒸留水で十分洗滌したポリウレタンスポンジの細片に吸収させて、500cc 三角フラスコ中で、120°C 10 分間高圧殺菌した。あらかじめ PDA 平板上で培養した Sm-5 菌を接種して 20°C, 2 週間培養後、スポンジの表面に形成された菌核を剝離し、低温下 (2°C ± 2°C) に保存した。子のう盤発芽能を検討するために菌核は生体重により 1 個 150mg 以上、100~150mg, 100mg 以下にわけ、それぞれ 40 個ずつを供試した。水道水を十分吸収させたポリウレタンスポンジを発芽床として菌核をならべ 12cm 腰高シャーレ中に保ち 15°C における発芽状況を観察した。その場合子のう盤柄を 1 個でも生じた菌核は発芽菌核とみなした。

なお、各培地の寒天 1.5% 平板上に同菌株を 20°C で培養し、供試シャーレ 20 枚当たりの平均形成菌核数、ならびに平均菌核乾燥重を測定した。

2) 菌核の子のう盤発芽に及ぼす菌核形成培地中の窒素源の影響

Houston 培地を基本培地として、NH₄NO₃ の代わりにアミノ態、硝酸態、アンモニウム態窒素をそれぞれ同一窒素含量になるように加えた培地を調

製した。これらの培地は寒天平板 (寒天 1.5%) としたが、寒天は Robbins⁷⁾ の方法にしたがって、あらかじめ純化したものを用いた。供試菌株は Sm-5 とし、9 cm シャーレ 30 枚ずつに 20°C で培養したが、接種源には蒸留水寒天上で培養した菌糸を用いた。約 1 か月培養したのち、形成された菌核を剝離し、前述と同様に低温保存後、15°C における子のう盤発芽を観察した。菌核は極端に小さなものは除き、おのおの 100 個について観察を行なった。なお供試シャーレ中 10 枚については、菌核の平均形成数および平均乾燥重を測定した。

3) 菌株による子のう盤発芽能力の比較

第 4 表に示した各菌株を菜豆葉煎汁寒天上で培養し、約 1 か月培養後、菌核を剝離して低温下に保存した。1 菌株について 120 個の菌核を供試し、前述の方法で 15°C における発芽程度を比較した。

4) 菌核の低温処理が子のう盤発芽に及ぼす影響

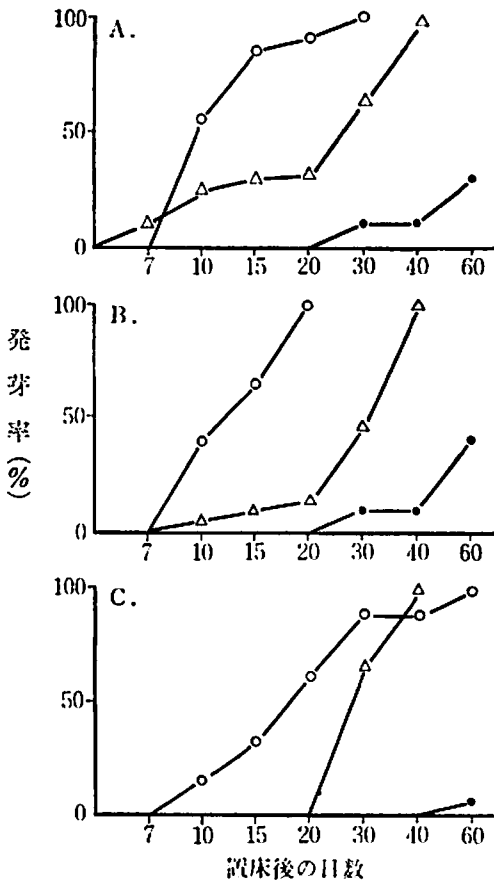
本試験においては比較的多量の菌核を必要とするので、Sm-5 菌を菜豆葉煎汁培地に 2 週間培養 (20°C) して、得られた菌核について以下にのべる低温処理を行なった。菜豆葉煎汁培地は乾燥した菜豆の茎を 2 cm 長に切り、2% グルコース水溶液を十分吸収させた後に、500cc 三角フラスコに入れ、120°C 20 分間高圧殺菌したものである。予備実験によれば菜豆葉煎汁培地には多量の菌核が形成され、かつ菜豆葉煎汁培地で得られた菌核と同様の発芽能力を示した。処理温度および期間は 1) 2°C ± 2°C, 30 日, 2) -10°C, 14 日, 3) -20°C 14 日であるが、2°C ± 2°C のみについてはデシケーターを用いて乾燥および湿潤状態での影響を検討した。すなわち、乾燥区では 9 cm シャーレに菌核を入れ、さらに塩化カルシューム入りのデシケーター中に保持した。また湿潤区では 9 cm シャーレに水で飽和した濾紙を敷き、暫時水に浸漬した菌核をならべて、さらにこれを温室としたデシケーター中に保持した。-10°C および -20°C については 9 cm シャーレに入れた菌核を所定温度の低温室に保持し、湿度は調整しなかった。それ故対照としては室温乾燥区をもうけた。これらの処理の後に、前述の方法で 15°C における子の

う盤発芽を検討した。

III 試験結果

1) 半合成培地および合成培地上に形成された菌核の子のう盤発芽の比較

第1図 各種培地に形成された菌核の子のう盤発芽



- A 菌核生重150mg以上
- B 100~150mg C 100mg以下
- 菜豆葉煎汁培地
- △— 馬鈴薯煎汁培地
- Houston培地

第1図にみられるとおり、各培地に形成された菌核の子のう盤発芽の程度を比較すると、菜豆葉煎汁培地に形成された菌核は発芽開始に到るまでの期間がきわめて短く、置床後10日ですでにかなりの発芽が認められた。さらに30日後にはほとんどの菌核が発芽するにいたった。ついで馬鈴薯煎

汁培地に形成された菌核は菌核重量の大なるものでは7日で発芽するものも認められたが、菜豆葉煎汁培地に形成された菌核に比較して発芽率の上昇がゆるやかで100%発芽に達する期間も長い。これら半合成培地にくらべ、Houstonの培地に形成された菌核は発芽力がきわめて低く、発芽開始に約30日を要した。さらに菌核の重量別に発芽程度を比較すると、重量の重い菌核(サイズが大きい)ほど発芽率の上昇が早い。これら3種の寒天平板培地上に形成された菌核の平均乾燥重および1シャーレ当たりの平均形成数はHouston培地では半合成培地2種にくらべて菌核形成数は多いが乾燥重が少ない(第1表)。

第1表 各種培地上での菌核形成数および乾燥重

培地	1シャーレ当平均菌核数	平均乾燥重mg
菜豆葉煎汁寒天	7.0	12.2
馬鈴薯煎汁寒天	9.6	12.5
Houston寒天	16.8	9.4

なお、用いた2種の半合成培地中の全窒素をセミマイクロケルダール法により測定した結果、菜豆葉煎汁培地では0.261%、馬鈴薯煎汁培地では0.187%であった。

2) 菌核の子のう盤発芽能力に及ぼす菌核形成培地中の窒素源の影響

Houstonの培地を基本培地として各種アミノ酸の菌核形成数および菌核乾燥重に及ぼす影響をみると、アミノ酸の種類によってかなり異なる(第2表)。すなわち、数値が連続的であり個々について比較することは困難であるが、Houstonの培地および菜豆葉煎汁寒天培地に比してグリシン、アラニン、アスパラギン酸、トリプトファン、シトルリン、γ-アミノ酪酸使用培地では形成数が多く、シスチン、およびシステインでは少ない。リジンでは接種源からの菌糸伸長の抑制、フェニルアラニンでは菌叢(菌糸密度はかなり高い)の拡大の抑制が認められた。後者においては接種源の周囲のみ菌核が形成されたが、発芽試験には用いなかった。ε-アミノカプロン酸では分岐の乏しい菌糸のみが生育し、菌核の形成はまったく認められなかった。さらに菌核の乾燥重についてみる

第2表 各種窒素源の菌核形成および菌核の子の
う盤発芽能力に及ぼす影響—1)

窒 素 源	1シャー レ当平均 菌核数	平 均 乾 重 mg	置床後56 日におけ る発芽率 %
グリン	18.4	5.2	68.0
L-アラニン	22.4	7.0	42.0
L-バリン	7.8	8.0	21.0
L-ロイシン	10.8	6.6	9.0
L-スレオニン	10.0	2.6	20.0
L-シスチン	2.7	4.6	0.0
L-システイン	5.6	7.9	1.0
L-メチオニン	15.8	5.2	54.0
L-アスパラギン酸	19.8	6.8	76.0
L-グルタミン酸	11.7	17.2	70.0
L-アルギニン HCl	14.1	5.7	3.0
L-リジン HCl	0	—	—
L-ヒスチジン HCl	10.7	9.6	30.0
L-フェニルアラニン	8.9	9.3	—
L-チロシン	16.1	8.6	43.0
L-トリプトファン	21.3	3.3	24.0
L-プロリン	13.8	8.3	61.0
L-シトルリン	17.7	5.5	9.0
L-ホモセリン	9.2	6.1	16.0
L-オルニチン HCl	12.5	9.5	1.0
γ-アミノ酪酸	17.8	9.5	72.0
ε-アミノカプロン酸	0	—	—
硝酸アンモニア	19.8	6.2	53.0
菜豆葉煎汁寒天	6.4	10.0	100

と、グルタミン酸が最も多く、スレオニン、トリプトファンでは少ないが、一般に菌核形成数が多いと菌核は小型となる傾向が認められた。他方置床56日後の子のう盤発芽の程度を比較すると、アルギニン、シスチン、オルニチンではかなり発芽力が劣り、シスチンではまったく発芽がみられなかったが、アスパラギン酸、γ-アミノ酪酸、グルタミン酸、グリン、プロリンに形成された菌核の発芽は良好であった。しかしいずれの場合も菜豆葉煎汁寒天で形成された菌核の発芽力にくらべ劣った。

同様にして硝酸態およびアンモニア態窒素について検討した結果、菌核形成数については第2リン酸アンモニアのみがやや少なく、ほかは明らか

な差がみられなかった。乾燥重についてみると、硝酸カルシューム、硝酸カリで多く、クエン酸アンモニアを除く有機態アンモニアでは少ない。またアミノ酸の混合物としてカサミノ酸を比較に用いたが、菌核形成数が少ない反面、大形の菌核が形成された。さらに子のう盤発芽の程度を比較すると、いずれの窒素源を用いて得られた菌核も菜豆葉煎汁寒天上に形成された菌核には及ばなかったが、硝酸アンモニアおよびカサミノ酸で形成されたものは、ほかの塩類にくらべて発芽率が高かった(第3表)。

第3表 各種窒素源の菌核形成および菌核の子の
う盤発芽能力に及ぼす影響—2)

窒 素 源	1シャー レ当平均 菌核数	平 均 乾 重 mg	置床後56 日におけ る発芽率 %
硝酸アンモニア	11.6	9.0	35.0
硝酸カリ	13.7	12.2	5.0
硝酸カルシューム	14.2	13.1	19.0
硝酸ナトリウム	14.8	9.4	0.0
硫酸アンモニア	13.3	9.3	0.0
磷酸2アンモニア	8.3	8.2	20.0
酢酸アンモニア	12.8	5.1	9.0
蔞酸アンモニア	14.6	4.3	0.0
クエン酸アンモニア	11.5	9.8	6.0
酒石酸アンモニア	13.1	4.6	19.0
カサミノ酸	7.8	19.4	27.0
菜豆葉煎汁寒天	—	—	100

3) 菌株による子のう盤発芽能力の比較

第4表 各菌株の子のう盤発芽能力の比較

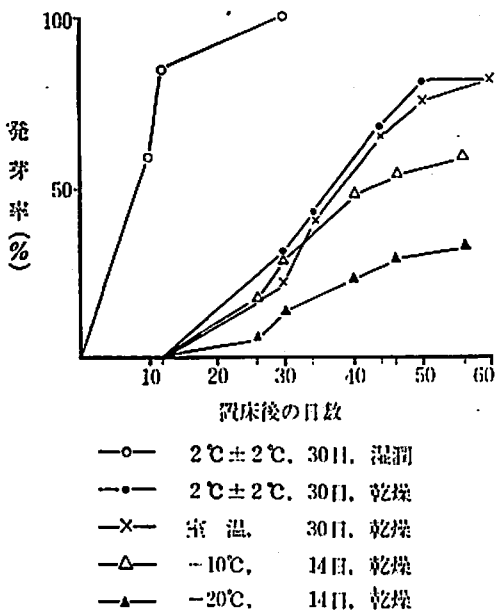
供 試 菌 性	山 米	置床後の日数と 子のう盤発芽率%			
		20日	27日	40日	50日
ST1	菜 豆 立枯病状	10.8	92.5	100	100
ST2	ク	0.0	5.8	100	100
ST3	ク	63.3	95.0	100	100
ST4	ク	59.2	95.8	100	100
S 1	ア カ ク ロ ー バ	12.5	13.3	13.3	13.3
S 2	キ ニ ウ リ	11.7	27.5	33.3	41.7
S P	馬 鈴 薯	97.5	100	100	100
S E	サ ス	25.0	78.3	99.2	99.2
S R	籾 糠 ナ タ キ 菜 上 の 菌 核	0.0	0.0	0.0	0.0
S m 5	甲 子 の う 盤 子 分 離 系	22.5	50.0	86.3	100

第4表にみられるように、15°Cにおける菌核の発芽程度は、菌株によってかなり異なる。すなわち立枯症状を呈した菜豆より分離したST1~ST4、パレイシヨより分離したSP、ナスより分離したSE、および単孢子分離系菌株Sm-5では良好な発芽が認められたが、アカローバから分離したS-1、キュウリからのS-2では発芽が不良であった。またSRのみは菌核組織から分離した菌株であるが、置床後56日でもなお発芽がまったく認められなかった。

4) 菌核に対する低温処理の子のう盤発芽に及ぼす影響

室温乾燥保存区を対照として低温処理の影響を比較すると、2°C ± 2°C の低温下に30日乾燥状態で保った菌核の発芽は対照との差が明らかでなく、同様の温度および期間に湿潤状態で菌核を保った場合にのみ明らかな発芽促進効果が認められた。また-10°C、-20°Cにそれぞれ2週間保った菌核は、発芽開始がややおくれる傾向が認められた。

第2図 菌核に対する低温処理と子のう盤発芽



IV 考 察

S. sclerotiorum および類縁菌の菌核発芽は土壤中で行なわれるが、その菌核の機能は、いわ

る土壤伝染性糸状菌によって形成されるものとは異なり、菌核から菌糸を生ずることもあるが⁸⁾、その主要な役割は子のう盤形成にある。さらに土壤伝染性糸状菌においては寄主あるいは利用する栄養源の存在下で resting もしくは Dormant な状態から脱するが、*Sclerotinia* の子のう盤発芽においてはそのような外部からの栄養供給を必要としないし、好適な条件下においても形成直後の菌核では子のう盤発芽をすぐ起こすことはほとんどない。すなわち発芽開始に先立って、ある適当な長さのいわゆる Dormant period (休眠期間) を必要とすると考えられる。このような状態は糸状菌胞子における Dormancy (休眠) の概念にあてはめれば、Afterripening (後熟)²¹⁾ の期間に相当するかも知れないし、また内的な Dormancy⁹⁾ に因るものであるかも知れない。いずれにしても菌核の子のう盤発芽には内的な要因もかなり関与しているものと考えられる。従来子のう盤形成に関する報告は多いが、発芽に関与する内的要因について論及しているものはきわめて少ない⁹⁾。

PURDY は高圧殺菌したセルリーに培養して得られた *S. minor* の菌核は PDA に形成されたものにくらべて発芽開始が早いことを報告している⁹⁾。筆者の得た結果では菜豆葉煎汁培地に形成された菌核は PDA および HOUSTON の培地に形成されたものと比較して発芽開始がすみやかであり、しかも均一であった。PURDY の用いた菌の種類および培養条件とは異なるが、これらの結果は菌核が形成される際の栄養条件によって菌核になんらかの質的な差異が生ずることを暗示するものである。発芽に関連した質的な差異がどこにあるかについては、さらに検討を要するところであるが、最近 Le TOURNEAU は罹病した豆類から採取した自然菌核と PDA およびグルコース加用の合成培地に形成された菌核について糖および糖アルコール類成分の比較を行なった結果、培養菌核にはアラビトール、グリセロールが欠けていることを見出した。これら2種の糖アルコールの合成は Host-parasite relationship にもとづくものと推論しているが、発芽との関連についてはふれていない¹²⁾。

S. sclerotiorum および類縁菌による各種窒素源

の利用、菌核形成への影響などについては、すでに 2,3 の報告¹³⁾¹³⁾があるが、菌核形成について若干異なる結果が得られた。すなわち硫酸アンモニア、硝酸アンモニア、メチオニン、トリプトファン、ロイシンは菌核形成にとり好適でないと言われているが¹⁾、筆者の得た結果ではいずれもその形成数において劣るものではなかった。これらについては、供試培地の C 源含量なども異なるので同時に論ずることは適当でないかも知れないが、菌株による N 源利用の差も認められている³⁾¹³⁾。さらに子のう盤発芽についてみると、硝酸態およびアンモニア態 N に比べ、アミノ態 N には形成菌核の発芽を良好にするものが多い。しかしいずれの場合も、菜豆葉煎汁培地に形成された菌核の発芽にはおよばなかった。

HOUSTON 培地の N 含量は菜豆葉煎汁培地中の全 N 含量にはほぼ等しいが、添加グルコース量は 2 倍である。したがって煎汁中の天然 C 源の量を無視すれば、HOUSTON 培地の C/N 比は菜豆葉煎汁培地の約 2 倍高い。また TOWNSEND¹⁰⁾によれば、培地の C/N 比が高い場合、2,3 の糸状菌の菌核形成数は増加するが成熟 (Maturation) はおくれるという。筆者の行なった実験では菌核形成の時間的要素を加味しなかったため、菌核の成熟度に差異を生じたことも否定できない。しかし N 源の種類によって形成菌核の発芽力にかなり差がみられるので、菜豆葉煎汁中の促進要因の本質については、C/N 比との関連性も含めてさらに検討する必要がある。

系統による発芽能力の差については、すでに報告があるが⁹⁾、筆者の実験においても、供試した 10 菌株について明らかな差が認められた。SR のみは菌核組織から分離した菌株であるが、試験期間中まったく発芽がみられなかった。このことは立枯症状を呈する菜豆から分離した ST 1~ST 4 が、明らかに子のう胞子感染によると思われる罹病植物から分離した SP, SE と同様発芽能力が高いことと比較して興味ぶかい事象である。

照井ら¹⁴⁾は、PDA 上に形成した菌核ならびに罹病ナタネから集めた自然菌核を低温処理することによって、子のう盤発芽が良好になると報告して

いるが、筆者の得た結果では、乾燥状態で $2^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ の低温処理を行っても、室温保存菌核との間になんらの差も認められなかった。一方、湿润状態での低温処理菌核においては、発芽開始が明らかに促進された。また -10°C 、 -20°C での処理をした菌核では、発芽開始のおくれが認められたが、寒冷地における土壌凍結および期間にも関連があり、菌核病の発生生態の見地からさらに検討する必要があるものと考えられる。

V 摘 要

1. 各種培地上に形成された、*S. sclerotiorum* の菌核の子のう盤発芽を比較した結果、馬鈴薯煎汁培地および HOUSTON の合成培地に比べて、菜豆葉煎汁培地に形成された菌核は、子のう盤発芽の開始が早く、かつ均一であった。

2. HOUSTON 培地を基本培地として菌核形成培地中の窒素源の子のう盤発芽能力におよぼす影響を検討した結果、菌核の子のう盤発芽を良好にする窒素源は、アンモニア態、および硝酸態窒素よりも、アミノ態窒素のものに多かった。培地の C/N 比が異なることも 1 つの原因とみられるが、これらのアミノ酸を窒素源とした場合においても、形成菌核の子のう盤発芽は菜豆葉煎汁培地で得られた菌核に比して明らかに劣った。

3. 各種罹病作物から分離した菌株および単胞子分離系菌株においては、程度の差はあるが、いずれも子のう盤発芽能力を有していたのに比して、菌核から分離した菌株 SR のみは試験期間を通じてまったく発芽しなかった。

4. 菌核に対する低温処理の子のう盤発芽促進効果を検討した結果、乾燥状態における処理では効果が明らかでなかったのに対し、湿润状態における処理では明らかな発芽促進効果が認められた。

引用文献

- 1) DÉMÉTRIATÈS, S. D., 1953; Studies on the biology of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) Masse. IV. Utilization of various nitrogen sources. Ann. Inst. Phytopath.

- Benaki, 7:27-35. (R. A. M. 34:741,1955).
- 2) GARRETT, S. D., 1956; "Biology of root-infecting fungi" 293 pp. Cambridge University Press, London and New York.
 - 3) HELD, H. M., 1955; Physiological difference between a normal and a degenerate strain of *Sclerotinia trifoliorum*. Phytopathology, 45:39-42.
 - 4) OBREITER, J. B. and T. SPROSTON, 1964; Amino acids in relation to thermoperiod-cycling in *Sclerotinia trifoliorum*. Phytopathology, 54:1395-1397.
 - 5) PURDY, L. H. and R. G. GROGAN, 1954; Physiological studies of *Sclerotinia sclerotiorum*. Phytopathology, 44:36-38.
 - 6) PURDY, L. H., 1956; Factors affecting apothecial production by *Sclerotinia sclerotiorum*. phytopathology, 46:409-410.
 - 7) ROBINS, W. J., 1939; Growth substances in agar. Amer. Jour. Bot., 26:772-778.
 - 8) 杉木利哉, 1959; 豆類菌核病の発生と病原菌の菌糸伸長について, 北大農学部報文紀要, 3:114~120.
 - 9) SUSSMAN, A. S., 1966; Dormancy and spore germination, in "The Fungi" (Ainthrow, G. C. and A. S. Sussman, ed.) Vol. II, pp. 733-764. Academic Press, New York and London.
 - 10) TOWNSEND, B. B., 1957; Nutritional factors influencing the production of sclerotia by certain fungi. Annals of Botany, N. S., 21:153-166.
 - 11) 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, 弓前大学農学部学術報告, 12:24~30.
 - 12) LE TOURNEAU, D., 1966; Trehalose and acyclic poliols in sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. Mycologia, 58:934-942.
 - 13) WILLIS, C. B., 1968; Effect of various nitrogen sources on growth of *Sclerotinia*. Canad. Jour. Microbiol., 14:1035-1037.

Summary

The rate of germination of sclerotia at 15°C by *Sclerotinia sclerotiorum* varied considerably, depending on the nutritional condition of substrate in which sclerotia was produced and on the isolate used. The sclerotia which was produced on the Bean leaf decoction dextrose broth germinated more rapidly than those of produced on potato dextrose broth and HOUSTON'S solution. The germinability of sclerotia was also affected by the nitrogenous nutrition of sclerotia-forming medium, when HOUSTON'S agar was used as the basal medium. Good sources of nitrogen in this respect were found in amino nitrogens but not in nitrate or ammonium salts. These amino acids were glycine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, γ -amino butyric acid and L-proline. However, the germinability of sclerotia which was produced on the media containing these amino acids was not as good as that produced on the Bean leaf decoction dextrose agar.

Among isolates used, that differ in rate of germination, the only one isolate which originated in sclerotial tissue produced no apothecial stipes during all the experimental periods.

In addition, the results from the experiment on the effect of low temperature treatment (at 2°C \pm 2°C, during 30 days) to sclerotia on germination showed that the treatment affects the rate of germination, depending on the moisture condition. The low temperature treatment under moist conditions accelerated the rate of germination, whereas no effect of the treatment under dry condition was found. The germination of sclerotia stored under dry condition at -10°C and -20°C respectively was slightly inhibited.