

イネ白葉枯病菌の栄養生理学的研究

田中, 行久
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/21613>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 20 (2), pp.151-155, 1963-01. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：



イネ白葉枯病菌の栄養生理学的研究*

I. 窒 素 源

田 中 行 久

Studies on the nutritional physiology of *Xanthomonas oryzae* (Uyeda et Ishiyama) Dowson

I. On the nitrogen sources

Yukihisa Tanaka

緒 言

本病原細菌の栄養源としての窒素化合物は、炭水化物類と共に主要栄養要素の1つであるが、その栄養生理面からの基礎的研究は僅かに向らの報告²⁾があるのみである。

一方、寄主植物である水稻には、多種類のアミノ酸が存在し、その含量も相当高いことが山田⁷⁾や尾崎ら^{8,9)}により明らかにされている。

それ故、本菌のアミノ酸の要求性、並びにその代謝面を調べることは、単に本菌の培養上における性質を知るだけでなく水稻の木病に対する罹病性、或いは抵抗性と関連して重要である。

本実験は、窒素源として与えた各種窒素化合物が本菌の増殖に如何なる役割を果しているかについて、培養試験により検討を加えたものである。

実験材料及び方法

1. 供試基本培地

本実験の基本培地としては、Starr 培地⁵⁾を用いた。すなわちその組成は次のとおりである。

| | | | |
|---------------------------------|-------|--------------------------------|---------|
| Glucose | 0.5 g | H ₃ BO ₃ | 0.5 μg |
| NH ₄ Cl | 0.1 g | CaCO ₃ | 10.0 μg |
| KH ₂ PO ₄ | 0.2 g | CuSO ₄ | 1.0 μg |

* 九州大学農学部植物病理学教室業績。

本実験に当り終始懇篤な御教示を賜わった吉井南教授・木場三朗助教授並びに野中福次氏に対し深甚な謝意を表す。

| | | | |
|--------------------------------------|--------|--|--------------|
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.02 g | FeSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ ·6H ₂ O | 10.0~50.0 μg |
| | | KI | 0.1 μg |
| | | MnSO ₄ ·H ₂ O | 1.0~2.0 μg |
| | | MoO ₃ | 1.0 μg |
| | | ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 5.0 μg |
| 蒸溜水 | 100 ml | pH | 6.8 |

2. 供試窒素化合物の種類

基本培地の窒素化合物を置換えるために次のものを用いた。

A. 無機窒素化合物

- Ammonium oxalate
- Ammonium tartrate
- (NH₄)₂SO₄
- (NH₄)₂HPO₄
- NH₄NO₃
- NH₄Cl
- Ca(NO₃)₂·4H₂O
- NaNO₃
- KNO₃
- NaNO₂
- KNO₂
- Urea

B. 有機窒素化合物

- L-glutamic acid
- L-aspartic acid
- DL-methionine
- L-cystine
- Asparagine
- L-proline

DL-lysine
L-arginine
 β -alanine
Kreatin
DL-norvaline
Tyrosine
DL-leusine
DL-threonine
Glycine
Vitamin free casein hydrolysate

実験に当つては、上記基本培地の glucose を1%の sucrose で置き換え、 NH_4Cl は除いてその代りに各種窒素化合物を0.2%ずつ添加して pH は6.8 に調整した後、100 ml の三角フラスコに20 ml 宛分注し、 $100^\circ\text{C} \cdot 15$ 分・3日間間けつ殺菌した。接種菌株は当教室保存の No. 60 で、この馬鈴薯半合成斜面培地の48時間培養菌を10白金耳量かきとつて10 ml の殺菌蒸留水で均一の細菌濁液とした後、1 ml の殺菌ピペットで0.1 ml 宛接種し、10日目の増殖量並びに pH 値の測定を行なつた。増殖量の測定は日立製光電光度比色計により、この No. 47 (青色) フィルターを使つて濁度を調べ、その増殖度を optical density として示した。同時に日立製ガラス電極 pH メーターによつて培地中の最終 pH 値を測定した。

実験結果

以上の方法に基づいて行なつた実験結果を示せば次のとおりである。

1. Vitamin free casein hydrolysate の増殖効果

基本培地に接種しても菌の増殖は全くみられないが、これに vitamin free casein hydrolysate を添加することにより増殖が始まる。これはアミノ酸が本菌の増殖と密接な関係にあることを意味し、必須の窒素源として役立つことを示唆している。

Table 1 においては、2%宛添加した場合に最もよい増殖を示した。

2. 各種無機窒素化合物の添加による本菌の増殖

Table 2 に示した12種の窒素化合物の中では、ammonium oxalate にのみかなりの増殖を認めた以外は全く認められない。pH の変化も又同様である。

Table 1. Effect of vitamin free casein hydrolysate on the growth of *X. oryzae*.

| Vitamin free casein hydrolysate (%) | OD* | Final pH of medium |
|-------------------------------------|-------|--------------------|
| 0 | 0 | 6.80 |
| 0.5 | 0.407 | 5.99 |
| 1.0 | 0.458 | 5.05 |
| 2.0 | 0.582 | 5.60 |
| 4.0 | 0.561 | 5.70 |

* OD shows optical density

Table 2. Effect of inorganic nitrogen compounds on the growth of *X. oryzae*.

| Inorganic nitrogen compounds | OD* | Final pH of medium |
|--|-------|--------------------|
| Ammonium oxalate | 0.215 | 5.50 |
| Ammonium tartrate | 0.009 | 6.52 |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 0 | 6.39 |
| $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ | 0 | 6.58 |
| NH_4NO_3 | 0 | 6.38 |
| NH_4Cl | 0 | 6.28 |
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0 | 6.34 |
| NaNO_3 | 0 | 6.65 |
| KNO_3 | 0 | 6.65 |
| NaNO_2 | 0 | 6.68 |
| KNO_2 | 0 | 6.64 |
| Urea | 0 | 7.31 |

*OD shows optical density

3. 各種アミノ酸の添加による本菌の増殖効果

Table 3 に示す様な15種のアミノ酸を基本培地に添加した場合、特に本菌の増殖を促進したものに

Table 3. Effect of amino acids on the growth of *X. oryzae*.

| Amino acids | OD* | Final pH of medium |
|------------------|-------|--------------------|
| Glutamic acid | 0.441 | 5.38 |
| Aspartic acid | 0.441 | 6.11 |
| Methionine | 0.419 | 5.10 |
| Cystine | 0.304 | 5.60 |
| Asparagine | 0.119 | 6.27 |
| Proline | 0.041 | 6.54 |
| Lysine | 0.008 | 6.89 |
| Arginine | 0.002 | 6.87 |
| β -alanine | 0 | 6.83 |
| Kreatin | 0 | 6.82 |
| Norvaline | 0 | 6.88 |
| Tyrosine | 0 | 6.87 |
| Leusine | 0 | 6.83 |
| Threonine | 0 | 6.84 |
| Glycine | 0 | 6.81 |

* OD shows optical density

glutamic acid, aspartic acid, methionine 及び cystine の4種があり、これらには劣るがかなりのよい増殖を示すものに asparagine があつて、これに次いで極めてわずかな増殖を示すものには proline, lysine, arginine がある。

従つて, glutamic acid, aspartic acid, asparagine, methionine, cystine の5種が本菌の増殖に必須の窒素源であり、これらを欠く場合にはほとんど本菌の増殖は認められない。

一方, pH の変化は増殖の盛んな区においてその変化の幅が大きく、就中, glutamic acid, aspartic acid, methionine, cystine, asparagine において著

しかつた。

4. アミノ酸添加培地における本菌増殖の経時的観察

供試アミノ酸としては、前述のように本菌の増殖を促進した glutamic acid, aspartic acid, methionine 及び cystine の4種類を実験に用いた。

この4種のアミノ酸を各0.2%ずつ単独に添加した場合と、これらを混合添加 (glutamic acid 0.05% + aspartic acid 0.05% + methionine 0.05% + cystine 0.05%) した場合の本菌の増殖及び pH の変化を経時的に示したのが, Fig. 1 並びに Fig. 2 である。

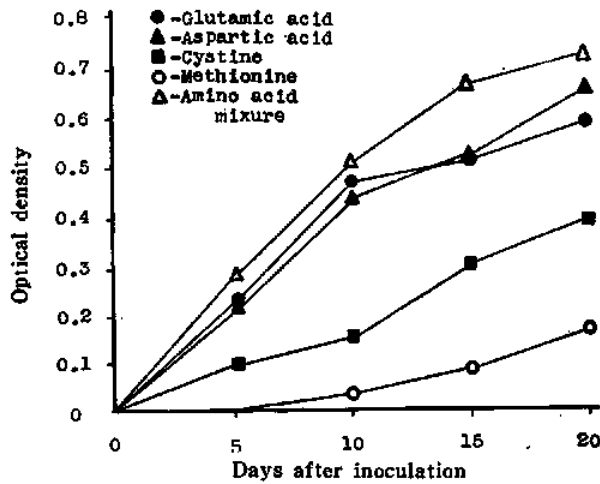


Fig. 1. Different amino acids and the growth of *X. oryzae* with the lapse of time.

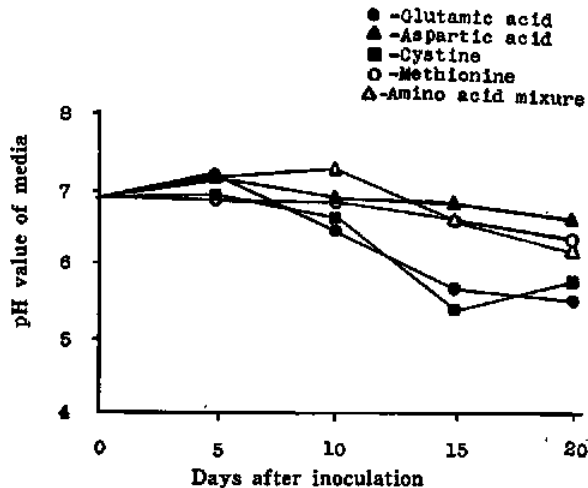


Fig. 2. Different amino acids and pH change of media with the lapse of time.

Fig. 1 より明らかなように、培養5日目からアミノ酸を単独に添加した場合よりも、これら4種のアミノ酸を混合添加した場合の方がよい増殖を示し、その後10日、15日、20日と日を経るに至つてもその優位性は変わらずよい増殖を続けた。これに次いで *aspartic acid*, *glutamic acid*, *methionine* 及び *cystine* がよい増殖を示した。

一方 pH は、菌の増殖につれて変化し始め、いずれのアミノ酸添加の場合においても共通に日を経るに従つて経時的に低下するが、加えたアミノ酸の種類によつてはその変化の幅の大きいことが認められ *glutamic acid* や、*cystine* において特に著しい。

考 察

イネ白葉枯病菌 *Xanthomonas oryzae* No. 60 の増殖には、窒素化合物、特にアミノ酸が必須の窒素源である。

アミノ酸以外の窒素化合物の中で、本細菌の増殖を促進する物質には *ammonium oxalate* があるが、その増殖量はアミノ酸に比して非常に劣る。

本細菌の増殖を促進するアミノ酸には、*glutamic acid*, *aspartic acid*, *methionine*, *cystine* 及び *asparagine* の5種があつて、これらを添加することによりよい増殖を始め、木菌のエネルギー代謝には欠くことの出来ない物質であることを認めた。これらの必須アミノ酸は各単独の形で添加した場合よりも、これら数種のアミノ酸を混合添加した場合の方が、培養初期から優れた増殖を始め、培養後期の20日に至つてもその優位性は変わらずよい生育を示した。

これは、アミノ酸の混合培養によりビタミンの生成が行なわれるとする M. R. Bovarnick の報告¹⁾があるもので、その様なことが原因しているものと考えられる。

培地中における pH 値の低下は、培地中に炭素源として加えた *sucrose* の分解により生ずる有機酸類によるものと考えられるが、²⁾ Fig. 2 よりみると必ずしもそのみが主要原因をなしているとは考えられず、添加したアミノ酸の種類によつては異なつた値を示していることより、アミノ酸代謝によることもかなり大きいものと推察される。

本実験では生育が経時的に増加しているのに対して pH 値は逆に低下の域をたどつていく。これは細菌による基質の分解が、増殖量の増加に比例して行なわ

れ、結果的にはそれが原因で pH 値の下降を招来したものである。

一方、寄主植物の水稲葉には数種のアミノ酸が遊離状に存在し、量的にも豊富であることが山田や、³⁾ 尾崎ら⁴⁾ により明らかにされている。そこで本菌が寄主植物に侵入し、増殖蔓延してやがて発病に至る場合においては、これらのアミノ酸は何らかの形で利用されるものと考えられる。特に *glutamic acid* や、*aspartic acid* 及びこれらのアミドは、寄主植物の窒素代謝上必須の物質であり、常に存在し絶えず生成されるものであることより、本菌の侵入後の増殖とこれらのアミノ酸との間には密接な関係があるものと思考される。

しかしながら、本実験はあくまでも *in vitro* 内の一定条件下の実験であり、動的な植物体内における本菌の増殖が栄養要求という全く同一の範疇に入れて解釈するには、尚多くの問題が残るものと思われる。従つて、これらの点は今後の研究により漸次解決して行きたい。

摘 要

Starr の培地を基本培地とし、これに各種の窒素源を添加して、*Xanthomonas oryzae* No. 60 の増殖を調べた。

1. 基本培地のみでは全く本菌の増殖を認めることは出来ないが、*vitamin free casein hydrolysate* を添加することによつて増殖がみられる。

これはアミノ酸が本菌の増殖に必須の物質であることを示唆している。

2. 12種の無機窒素化合物中では、*ammonium oxalate* がかなりの増殖の促進を示し、窒素源として良好であることが認められた。

3. 15種のアミノ酸中、本菌の増殖を促進するものには、*glutamic acid*, *aspartic acid*, *methionine* 及び *cystine* の4種があり、*asparagine* もかなりのよい増殖の促進を示した。

4. *Glutamic acid*, *aspartic acid*, *methionine* 及び *cystine* の4種は、いずれも培養開始と共によい増殖を始め、培養20日に至るまでその増殖量の増加を示しているが、これらのアミノ酸は各単独に添加した場合よりも、混合添加した場合の方がよりよい増殖を示した。

参 考 文 献

1. Bovarnick, M. R. (1944). J. B. C., **153**: 1-3.
2. 向 秀夫・渡辺 実, (1958). 日植病報(講要), **23** (1): 9.
3. 尾崎 清・森山貞明 (1951). 日土肥学誌, **22**: 323-326.
4. ----- (1952). Ibid., **23**: 9-14.
5. Starr, M. P. (1946). J. Bact., **51**: 131-143.
6. Oginsky, E. L. and Umbreit, W. W. (1954). An introduction to bacterial physiology.
7. 山田 登 (1959). 農技研報告, D8号: 1-110.

Summary

The results of the experiment concerning the nutritional requirement of *Xanthomonas oryzae* on various nitrogen compounds were described.

1. The bacterium failed to grow in Starr's basal medium, while vigorous growth was obtained when vitamin free casein hydrolysate was added to the basal medium.

2. Among twelve inorganic nitrogen compounds, fairly good growth occurred in the basal medium with ammonium oxalate as the nitrogen source, while, there was no growth with the other inorganic nitrogen compounds.

3. Among fifteen amino acids examined, vigorous growth occurred with the following amino acids: glutamic acid, aspartic acid, methionine, cystine and asparagine, but not with the other amino acids: proline, lysine, arginine, β -alanine, kreatin, norvaline, tyrosine, leusine, threonine and glycine.

4. More vigorous growth occurred in culture with four amino acid mixtures than with a single addition of each of the amino acids: glutamic acid, aspartic acid, methionine and cystine.

Laboratory of Plant Pathology,
Faculty of Agriculture,
Kyushu University