

栄養欠乏状態における *Phytophthora capsici* LEON. の 菌糸生長と遊走子のうの形成* (予報)

正子 朔・近藤 晴彦・今西 満・桂 琦一

HAJIME MASAGO, HARUHIKO KONDO, MITSURU IMANISHI and KIICHI KATSURA:
Mycelial growth and zoosporangial formation of
Phytophthora capsici LEON. under poor nutritional conditions.
(Preliminary report).

要旨: 本報告は培地栄養ひいては体内栄養の欠乏状態に陥った際における *Phytophthora capsici* LEON. の遊走子のう形成について研究を行なったものである。栄養欠乏培地に菌を移植すると、後培地に栄養が含まれているほど遊走子のう形成は遅くなる。したがって素寒天培地よりもアガロース培地で形成量が多い。この場合前培養が栄養欠乏していて菌の発育が弱々しい時は後培地では遊走子のうを形成しないし、菌糸も伸長しない。移植に際して持ち込まれる菌体外栄養を除くため液体中で前培養し、充分水洗して後培地に移すと前培養の栄養に富んでいるところに育ったものほど菌体量が多くなるが遊走子のうの形成は遅れる。前培養の糖濃度は遊走子のう形成には後培養の際ほど影響を与えないが、菌体量が増加することによって間接的には影響しているようである。これらの結果から菌体内の栄養状態と遊走子のう形成との関係を模式図に表わして説明を加えた。

I. 緒 言

疫病菌を土壤中あるいは罹病植物から分離するために供試材料を水に浸漬した上、その菌の寄主とみなされる健全な植物の葉、莖、あるいは果実などを同時にその水中に挿入するという方法がとられる^{5,10)}。この場合の水は2つの役目を果していると考えられる。すなわち1つは遊走子のうの形成促進であり、他の1つは形成された遊走子のうより逸出した遊走子の遊泳媒体としての働きである。しかしこの方法の成否を決定するものは第1段階の遊走子のうの形成促進であることは言うまでもない。この際の遊走子のう形成に寄与しているのは栄養の稀薄化であろうと考えられる。培地栄養物質の水中分散による減少よりも菌体内の細胞質の漏出⁷⁾による体内成分の消耗の方が重要な意味をもっているのかも知れない。

筆者らは、従来の栄養と遊走子のう形成の諸研究に見られるような物質を添加してその効果を調べる方法⁴⁾をとらず、なるべく栄養を制限して、あるいは極端に飢餓状態に陥らしめて外部栄養が貧弱な場合の遊走

子のう形成の機序を明らかにし、ひいては栄養源を欠いた土壤中における生態の研究に資するために本研究を行なった。

II. 実験材料ならびに方法

供試菌は *Phytophthora capsici* LEON. (stock no. 6) であり、前半の固体培地による実験にはオートミール煎汁寒天培地または、Czapek 寒天培地上で 28°C、1週間(後者では2週間)培養したものを移植源として用いた。液体培地による実験にはジャガイモ・グルコース寒天に1~2週間培養したものを素寒天平板培地に接種し、4~5日後菌そう周縁部より、直径3mmのコルクボーラによって切りとった菌そう円板を移植源とした。後の場合はなるべく菌体とともに持ち込む旧培地栄養の影響を無くするためである。

形成された遊走子のう数の算定には、オリンパス顕微鏡(×100, 視野面積 2.60mm²)を用い、1菌そうにつき10視野以上測定し、3~5菌そうの遊走子のう数の平均をもって1視野当りの遊走子のう数とした。但し平板培養では菌そう上の遊走子のうの多く形成さ

* 京都府立大学農学部植物病理学研究室(業績第78号) 本研究は文部省科学研究費の一部で行なった。ここに深謝の意を表す。
Laboratory of Phytopathology, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto, Japan (Contribution No. 78)

昭和43年7月31日受理

れている個所を、液体培養では平均的に形成されていると考えられる部分を選んだ。遊走子のうを水で洗い出してその単位体積当りの数を算定することによって評価することもよくなされているが、手数がかゝったり、洗い残しの遊走子のうができたりするので正確を期し難い。遊走子のうの形成数の多寡を知るのみであれば直接検鏡する方法も信頼できる。なお他の特殊な条件についてはその都度示すことにする。

III. 結 果

(1) 各種煎汁培地上における遊走子のう形成

本菌の遊走子のうはオートミール煎汁寒天培地上で多量に形成されるので、我々は経験的にこれを普段使っているが、含有栄養分の異なる他の3種の培地との比較を試みた。①オートミール煎汁寒天培地 ②ジャ

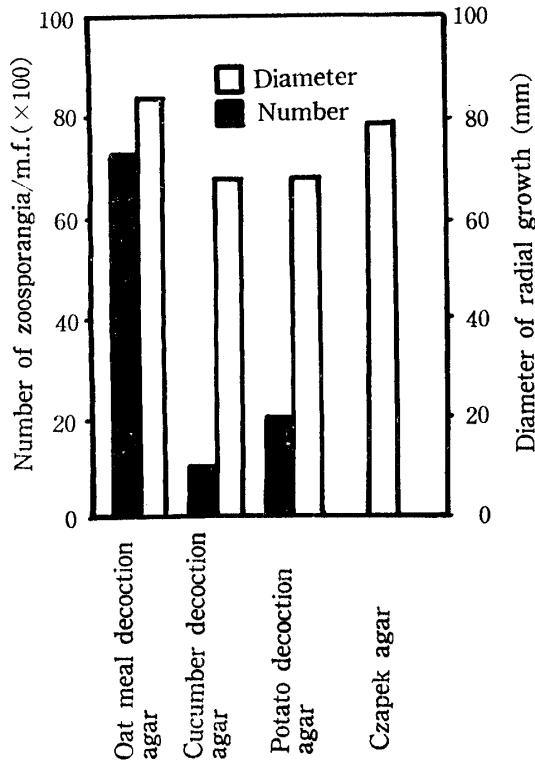


Fig. 1. Zoospore formation and mycelial growth of *Phytophthora capsici* grown on the several agar media at 28°C, 7 days.

ガイモ煎汁寒天培地 ③キュウリ煎汁寒天培地 ④ Czapek 寒天培地であるが、③は通常のジャガイモ煎汁寒天培地すなわち②の場合のジャガイモとキュウリが替っただけで量、製法は同じである。以上4種の培地に菌を移植し 28°C において7日間、暗黒下で培養したところ第1図の結果を得た。菌そうはジャガイモ煎汁培地でもっとも厚く、気中菌糸の形成ももっとも良好であった。菌糸密度の高いものから並べると②>③>①>④である。Czapek 寒天培地で遊走子のうを生じない点が注目される。

(2) 培地中の糖添加量の遊走子のう形成に及ぼす影響

糖は菌の栄養生長を促進せしめるので、これの窒素に対する比率がよく問題にされる。今実験(1)において全然遊走子のうを生じなかった Czapek 寒天培地と もっとも多く遊走子のうを形成したオートミール煎汁寒天培地について糖量の増減を行なった。

i) Czapek 寒天培地

糖を欠いた Czapek 寒天培地 100ml 中にショ糖を 3 (通常的全糖量), 1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01g あて添加した区および無添加区を設けた上、高圧殺菌後菌をペトリ皿中央に移植し、7日間 28°C 暗黒下に保った。なお対照として素寒天区を加えた。結果を第1表に示す。

糖がごく僅かに入っている遊走子のうが形成されないことを示しているが、添加無機成分も若干阻止的に働いていることは素寒天培地で10倍近く形成されていることから知れる。

ii) オートミール煎汁寒天培地

オートミール煎汁寒天培地 100 ml に対してショ糖 3, 5, 10g をそれぞれ添加した区および加えなかった区を設け菌移植後 28°C, 7日間暗黒下で培養し形成された遊走子のう数を測定した。結果を第2表に示す。

通常用いられるオートミール煎汁寒天培地ですら、糖添加によってまったく遊走子のうを形成しなくなる。

(3) 栄養の枯渇と遊走子のう形成

i) Czapek 寒天培地と素寒天培地

糖を豊富に与えることによって菌糸密度は高くなり、

Table 1. Dilution effects of sucrose in Czapek agar media on zoospore formation and mycelial density of *Phytophthora capsici*. (7 days culture at 28°C.)

Test	Water agar	Sucrose added to Czapek agar media (g/ml)							
		0	0.005	0.01	0.03	0.1	0.3	1	3
Number of sporangia	53.8	5.9	0	0	0	0	0	0	0
Mycelial density*	+	++	++	++	++	+++	+++	++++	++++

* ++-++++: Grade of mycelial density.

菌糸生長が順調に行なわれるため、遊走子のう形成がいつまでも始まらない。逆に今まででもっとも遊走子のう数の多かったものは素寒天区である。実験(2)の場合には前培養培地を菌体とともに持込んでいるのでこの栄養が遊走子のう形成に役立っているとも考えられる。

今 Czapek 寒天培地に前培養した菌を、2%の寒天を含む素寒天培地および対照として新しい Czapek 寒天培地の中央に移植し、28°C、7日間暗黒下に保った。この際参考のために1800 luxの光(東芝製、白色蛍光灯 20W 型)を照射した区も設けた。

第3表に見るように持込栄養がある場合には素寒天培地上では遊走子のうの形成があり、光によってその形成がさらに促進される。しかし移植源を素寒天培地から得ると 28°C、暗黒下では第4表に示すように移植11日にして漸く少数の遊走子のうを見たが量的に非常に少ない。

栄養状態の悪い菌を飢餓に移しても遊走子のうは生じないことを示している。

ii) アガロース

Czapek 寒天培地上には菌が育つのに、Czapek の液体培地上では本菌が育たないことはよく経験することである。寒天培地上では累代培養しても貧弱ではあるが菌糸が伸長する。このことから寒天中には本菌の生育を支える幾種かの物質が微量含まれていることを示している。今菌体内栄養の適度な消耗が菌の遊走子のう形成への方向づけをするものならば、素寒天培地よりもさらに菌に利用され難い培地を使用することによって、その形成時期を早めることができるであろう。

この目的に沿って一般の菌には利用されず、純度も高いアガロースを使用した。脱イオン水 100ml にアガロース 1g を加え、1気圧15分の殺菌を行なってアガロース培地を調製した。Czapek 寒天培地上に前培養した菌をアガロース平板中央に移植し、28°C、7日間暗黒下に置いた。対照として素寒天培地区を設けた。

第5表に見るように遊走子のう形成数はアガロース培地で多く、菌糸密度も高く、気中菌糸の量も多かった。

しかしこのアガロース培地上に発育した菌そうの縁辺より新しいアガロース培地に菌を移植しても全然発

Table 2. Effects sucrose addition to oat meal decoction agar media on zoosporangial formation and mycelial growth.

Test	Sucrose added to oat meal agar media (g/ml)			
	0	3.0	5.0	10.0
Number of zoosporangia	62.9	38.7	35.9	0
Mycelial density*	+	++	++	++
Diameter of radial growth (mm)	84.8	85.0	85.0	85.0

* +~++: Grade of mycelial density.

Table 3. Zoospore formation of *Phytophthora capsici* on nutrient less media. The fungus was grown for 7 days at 28°C.

Test	Czapek agar media		Water agar media	
	Illuminated	Dark	Illuminated	Dark
Number of zoosporangia	0	0	358.3	29.7

Table 4. Zoosporangial formation of *Phytophthora capsici* on water agar medium to which the fungus transferred from water agar culture.

Test	Day after inoculation		
	10	11	12
Number of zoosporangia	0	1.6	2.1

Table 5. Effects of agarose medium on zoosporangial formation and mycelial growth of *Phytophthora capsici* cultured for 7 days at 28°C.

Test	1% Agarose medium	2% Agarose medium
Number of zoosporangia	146.6	42.1
Diameter of radial growth(mm)	36.6	69.1

育がみとめられなかった。なお今回に限らず素寒天、アガロース上の遊走子のうは小型であって二次、三次の遊走子のう連鎖をなしている場合が多い。

(4) 菌そう発育および遊走子のう形成の温度特性と培地栄養

通常の方法によって調製されたオートミール寒天培地ならびに素寒天培地上に、オートミールに前培養した本菌を移植し、24, 26, 28, 30, 32, 34 および 36°C の各温度に7日間暗黒下で保ち、形成された遊走子のう数および菌そう直径を測定した。その結果を第2,

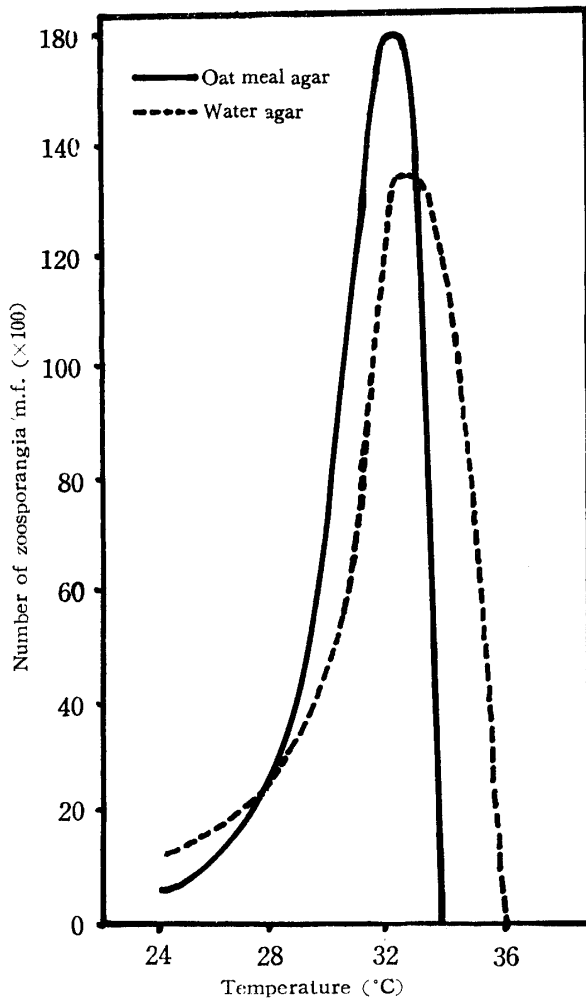


Fig. 2. Effect of temperature on zoospore formation of *Phytophthora capsici* grown on two kinds of agar media for 7 days.

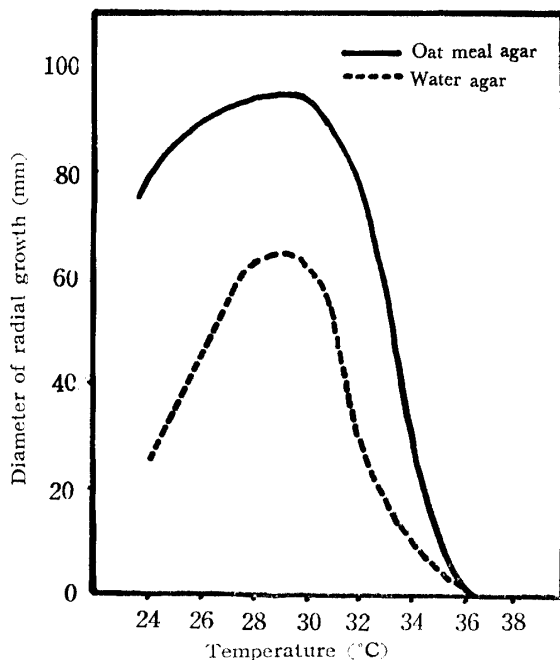


Fig. 3. Effect of temperature on mycelial growth of *Phytophthora capsici* grown on two kinds of agar media for 7 days.

3図に示した。培地が栄養に富むと否にかかわらず菌の発育と温度との関係はまったく同じ傾向を示しているが、遊走子の形成の温度特性は栄養不足の場合や、高温側にずれている。30°C以上で形成した遊走子のうは28°C以下の場合にくらべて小型であった。

(5) 菌体内蓄積養分の枯渇

実験(4)までにおいて菌体とともに持ち込まれた旧培地養分の影響を除去し得なかった。附着養分を十分に除くために前培養・後培養をともに液体を用いることにした。前培養から菌体を取り出して後殺菌脱イオン水によって十分に洗浄し、無菌的に後培養に移す方法をとった。

i) ジャガイモ煎汁培地の希釈が後培養における遊走子のう形成におよぼす効果

ジャガイモ煎汁培地を常法によって調製し、これを原液とし以後脱イオン水をもって順に倍に希釈して行き32倍希釈区まで設けた。それぞれを径18mmの試験管に20mlずつ分注し、1気圧で15分殺菌後菌を移植し28°Cに8日間培養したのち各区の菌体を殺菌脱イオン水によって洗浄した。

洗浄を終った菌体を無菌的に20mlの殺菌脱イオン水の入った試験管に移した。菌体が培養液表面に出ると遊走子のうをつくり易くなり結果のふれが大きくなるので前後両培養とも菌体を液中に沈めて培養するように注意した。28°Cに20日間、暗黒に保ったが3日、10日後の遊走子のう形成状態も併せて観察したところ第4図の結果を得た。前培養液濃度の希薄なほど水に

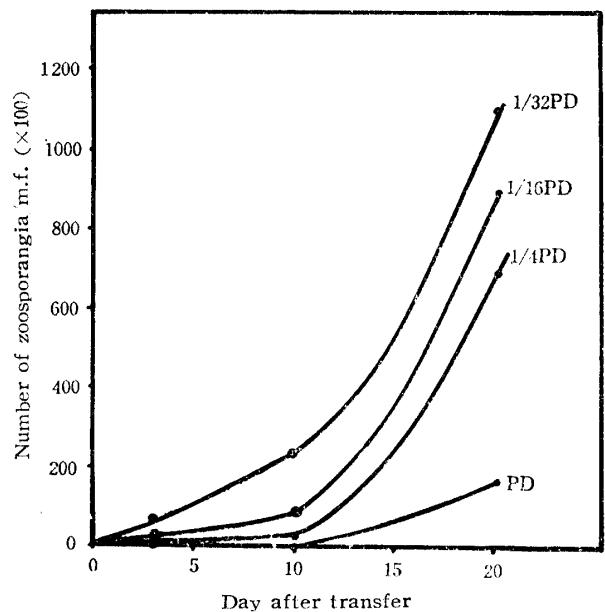


Fig. 4. Dilution effect of potato decoction media on zoospore formation of *Phytophthora capsici*. Mycelial mats of 8-days old culture in these media were transferred to water and incubated for 20 days at 28°C.

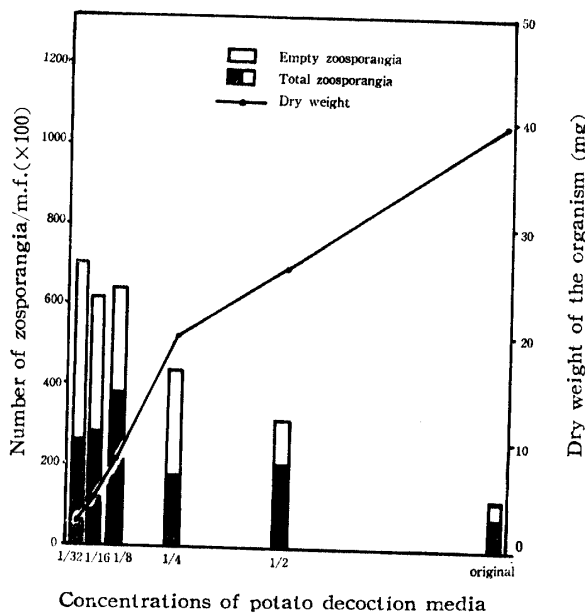


Fig. 5. Dilution effect of potato decoction media on zoosporangial formation and mycelial growth of *Phytophthora capsici*. Mycelial mats of 8 days old culture in these media were transferred into water and incubated for 20 days, at 28°C.

移してから早く遊走子のうを形成していた。第5図は20日後の状態を示しているが、希薄培養液ほど移植時に菌体量が少ないにもかかわらず遊走子のうの形成は多い。しかも空の遊走子のうがかなりあるのはほとんどが連鎖した遊走子のうで直接発芽したあとのものである。

ii) グルコース加用ジャガイモ煎汁培地の糖希釈が後培養における遊走子のう形成におよぼす効果

ジャガイモ煎汁培地 100ml につき 2g のグルコースを加えたものを基準にして、糖量のみを順に半減して行き 1/32 の量になるまでの6区を設けた。これを前培養液として前項と同じく培養し、洗浄移植後20日間保った後の結果を第6図に示す。この場合はベースになっているジャガイモ煎汁培地の濃度には変りがないので糖のみの希釈効果が出ている。菌体重量には前項ほどの減少が見られないし、遊走子のう形成は中高の曲線を示している。

iii) グルコース加用ジャガイモ煎汁培地の希釈が後培養における遊走子のう形成におよぼす効果

前項では糖のみを減少したが、今回はジャガイモ煎汁培地とともに減少させた。通常のジャガイモ煎汁培地 100ml につき 2g のグルコースを加えたものを原液として、以後順に倍希釈をくり返して32倍希釈液までを調製した。

8日間の前培養によって得た菌体重量は第7図に示

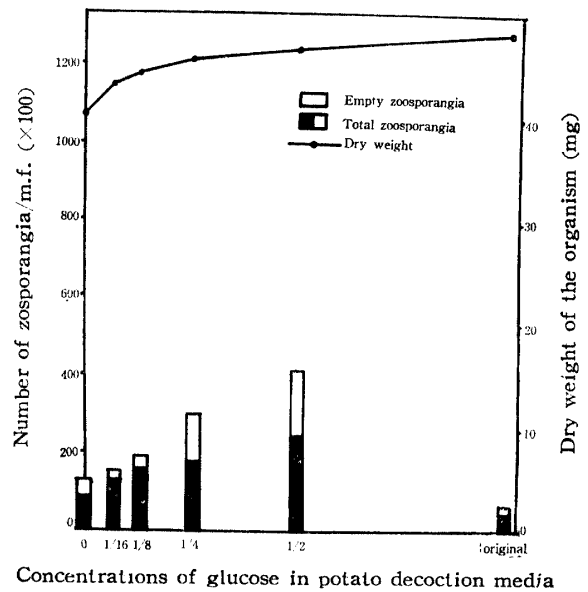


Fig. 6. Sugar dilution effect in potato dextrose media on zoosporangial formation and growth of *Phytophthora capsici*. Treatments are shown in Fig. 5.

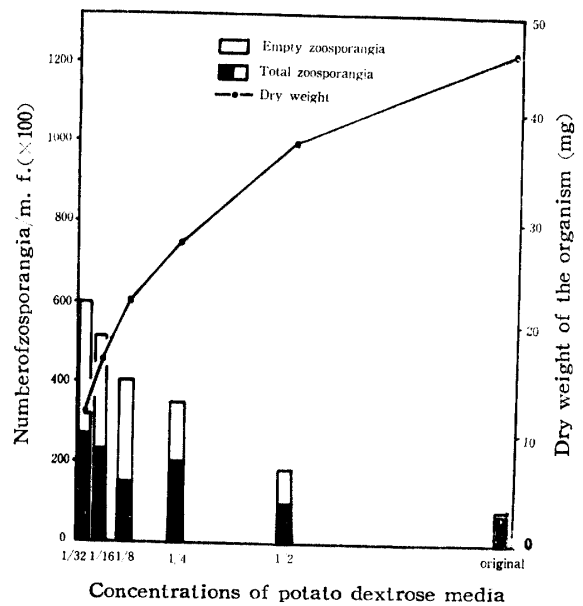


Fig. 7. Dilution effect of potato dextrose media on zoosporangial formation and growth of *Phytophthora capsici*. Treatments are shown in Fig. 5.

すようにジャガイモ煎汁培地希釈の場合と同じ傾向を示した。遊走子のう形成も基本的にはこれと同じであるが糖の影響分だけの相違を生じているようである。

IV. 考 察

疫病菌は Czapek 液体培地中では発育しない。これはこの菌が無機態窒素源よりも有機態窒素(例: L-アスパラギン)をよく利用することや生育にチアミンを

必要とするということに原因があるのかも知れない。しかし第1図に示したように Czapek 寒天培地(寒天2%)上では菌糸は密度こそきわめて疎であるが伸長することが認められる。

これは固化に用いた寒天夾雑物によるものであろうことは Czapek アガロース培地では菌の生長が全然認められないので推察される。オートミールがもっともよく遊走子のうを形成せしめたのは各種ステロールのような形成促進物質の存在することも一因であろうが、培地中の C/N 率によるものと考え。第2表に示すように糖を加えて C/N 率を増加させると遂には遊走子のうを形成しなくなる Czapek 寒天培地は菌の利用しにくい NO_3 態窒素を含んでいるため菌糸生育が悪い。糖源を減じて遊走子のうの形成には影響がなく糖を全然加えないことによって初めて遊走子のうの形成を見ている。培地の C/N 率に関しては酒井¹⁰⁾が *Phytophthora infestans* において遊走子のう形成のための適当な値は7.7であると述べている。C/N 率の増高とともに菌糸直径、気中菌糸ともに増加しているのは本実験の場合も同じであってこれは一般的な傾向である。

菌体外の C/N 率が体内の代謝機構あるいは基質の量に影響を与えることは当然と考えられるが、筆者らは菌体内の C/N 率について眼を向けたい。たゞ現在のところでは菌体内のどのような形の C, N についてその比率を考えるべきかは判っていないが、現象的には素寒天、アガロース培地上における遊走子のうの多量形成がこれを示唆している。Czapek よりも無糖 Czapek、無糖 Czapek よりも素寒天、素寒天よりもアガロースと云う遊走子のう形成効果の増大傾向は、たゞ菌に利用可能な栄養の存否に支配されている現象であることを物語っている。(第1, 3, 5表)。アガロース培地上においては累代培養が不可能であることは、この培地上に伸展した菌糸、形成された遊走子のうが菌移植に際して菌体とともに持ちこまれた栄養によっていたことを示すと同時に貧弱な体内の物質からはもはや遊走子のう形成はおろか菌糸の伸長すら得られないことが知れる。したがってこゝに菌体内に保持されている物質の質と量と遊走子のう形成との関係を明らかにするためには移植に際して菌体外の持ち込み栄養を極力除くべきであって、そのために前培養を液体培養とする方法がとられたのである(実験5)。

現在までに固体培養の菌糸を剃ぎとって水とか、無機塩類の希薄溶液に浸漬して遊走子のうを形成させる方法は Faucett¹¹⁾, Gooding²⁾, Kennedy⁶⁾らによって報告され *Phytophthora citrophthora*, *Phytophthora*

parasitica var. *nicotianae* *Phytophthora cryptogea*, においてそれぞれ成功している。遊走子のう形成法としては重宝であるが、形成の機構を研究する場合には前述したような培地からの養分混入が防ぎ難い欠点がある。液体培養からの移植については本実験進行中に Sciffmann-Nadel¹²⁾が報告を出した。

筆者らと同様にグルコース加用ジャガイモ煎汁培地を使用して *P. citrophthora* の遊走子のうを形成させている。しかしその報告では詳細が不明である。筆者らの結果を総合すると前培養液の濃度が原液に近いほど菌体生育は良いが、後培養に移すと遊走子のう形成まで時間がかかる(第4図)。グルコース加用ジャガイモ煎汁培地では、糖量を減ずるほど遊走子のう形成量が増加するというような結果は出なかったが、これはジャガイモ煎汁中のデンプンが豊富な糖源として働いているので影響が少なかったものと思う。しかしグルコース加用ジャガイモ煎汁培地そのものを希釈した場合にはそれぞれジャガイモ煎汁の希釈の際より少ない遊走子のうを形成しているので、糖の影響を少し見出すことができる。筆者らは今後菌体内の C/N 率に関与する成分の解明ならびにその量的なものについて研究を進めるつもりであるが、今後適宜修正することを前提として第8図に示したような模式図を想定した。

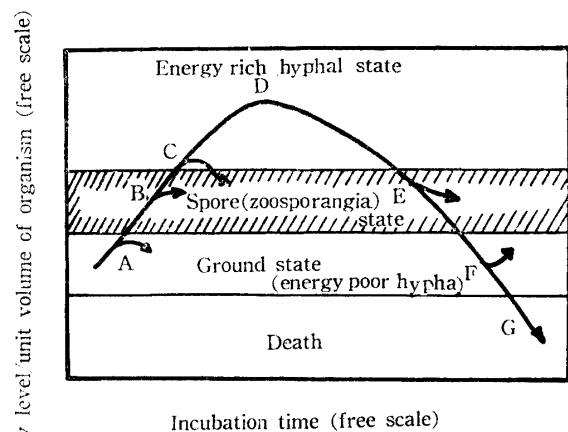


Fig. 8. Schematic diagram for spore (zoosporangium) formation and nutritional condition within an organism.

When the organism was transferred to nutrient deficient at B-E points respectively, spore (zoosporangium) formation occurs. At A, F, and G no spore can be seen.

胞子形成に関しては Hawker¹³⁾のすぐれた模式図があるが、異なった見地から考えたものである。これはこの予備実験を通じて得たものを加味して組立てたものであるし、不明確な点が多いが若干の説明を加える。

縦軸は菌体単位体積当りの蓄積エネルギー準位を示し、斜線部が遊走子のもつその範囲である。(こ、でいう蓄積エネルギーとはまだ概念的なものである)。

栄養を与えられて生長しつゝある菌糸がAでそれを断ち切られるとそのまゝ蓄積エネルギーは下降して基底状態に至り死ぬ。しかしBまで蓄積していると直ちに遊走子のう形成に入れる。Cまで進んでいたとすると遊走子のう形成まで若干の時間がかかる。もし豊富な栄養状態におかれているとその菌のエネルギー準位の最高Dに至りこの状態が長く続く訳である。やがて養分欠乏を来たすとともにEFGと下降するが通常はEで遊走子のう形成に入る。しかし遺伝的に遊走子のう形成能力を欠失していた場合にはF、Gと下降して死に至る。もしGまでの状態で外部栄養を与えられるとふたゝび矢印のように上昇する。そして斜線部で遊走子のうを形成し始めた場合は、この下降の傾きが遙かに緩やかになって、温度、水分などの影響で発芽が起きない限りこのなだらかな下降線をたどる。しかし適当な時期に発芽の条件が整わなければ遊走子のうの外観を保ったまゝ、基底状態までエネルギー準位が下降して発芽不能に陥る。この模式図だけでは解決を見ないことも多いが、今後それぞれの時点で働く要素、具体的な数値などについて解明して行きたい。

また同じく胞子である卵胞子、厚膜胞子などについての適用も考えねばならないことである。

引用文献

- 1) Fauceit, H. S., & L. J. Klotz. (1934): *Phytopathol.* **24**: 693-694.
- 2) Gooding, G. V., & G. B. Lucas. (1959): *Phytopathol.* **49**: 277-281.
- 3) Hawker, L. E., & P. M. Heden. (1962): *Ann. Botany (London)[N.S.]* **26**: 619-632.
- 4) Hendrix, J. W. (1964): *Science* **144** (3621): 1028-1029.
- 5) 桂 琦一(1968): 関西病虫害研究会報. **10**, 101-103.
- 6) Kennedy, B. W., & D. C. Erwin. (1960): *Phytopathol.* **60**: 641.
- 7) Page, O. T., & F. A. Wood. (1963): *Phytopathol.* **53**: 946-949.
- 8) 酒井隆太郎(1961): 北海道農試報告. **57**, 1-158.
- 9) Schiffmann-Nadel, M., & E. Cohen. (1968): *Phytopathol.* **58**: 550.
- 10) Tsao, P. H. (1960): *Phytopathol.* **50**: 717-724.

Summary

Zoosporangia formation of *Phytophthora capsici* LEON. (stock no.6) under poor nutritional conditions were studied.

Mycelial development of the fungus was measured on several agar media such as oat meal decoction, Czapek, cucumber decoction and potato decoction. Among these, oat meal decoction agar was most effective for both mycelial growth and zoosporangia formation. On Czapek medium hypha grew rapidly but the mycelium was not so dense as on other media and zoosporangia were not produced.

When sucrose was removed from Czapek medium, hypha became more thin but formed many zoosporangia. Water agar was more effective than no sugar Czapek medium for the zoosporangia formation. Water agarose (1%) was the most effective. In these experiments, carryover of nutrients by the inoculum was suspected to con-

tribute to the growth and zoosporangia formation.

Mycelial mat was thoroughly washed with sterile distilled water in two bottles to remove the effect of preculture medium and transferred to distilled water to see the net contribution of stored substance to the hyphal growth and zoosporangia formation.

The fungus grown in common potato decoction medium took more days to produce zoosporangia after transfer to the second medium than the diluted ones. Dilution of potato dextrose medium decreased the growth of fungus but accelerated the production of zoosporangia.

When the fungus was precultured in a poor nutrient medium, the growth after transference was poor and no zoosporangium was produced. From these results we proposed a schematic diagram for the growth and zoosporangia formation of this fungus under different nutritional conditions,