

Phytophthora capsici LEON. の遊走子のう形成に対する riboflavin の促進効果と光によるその抑制*

正子 朔・川原 芳子・桂 琦一

HAIJIME MASAGO, YOSHIKO KAWAHARA and KIICHI KATSURA: Riboflavin stimulation on zoospore formation of *Phytophthora capsici* LEON. and light suppression of the effect.

要旨:本研究は *Phytophthora capsici* Leon. の遊走子のう形成に対する riboflavin の促進効果とその発現に対する光の作用を調べたものである。酵母エキス中の vitamin B 群のうちで riboflavin がもっとも遊走子のう形成に効果を示したが、この効果は暗所でないと現われない。照明下ではむしろ形成に対して阻害的に働く。この阻害的な働きは照明中に riboflavin が光によって分解した結果生ずる物質によるものと考えられ、pH が酸性になるほどいちじるしい。一方 riboflavin のもつ形成促進効果は flavin 酵素系との関連を示唆する如く、FAD, FMN によっても同程度の効果が惹き起こさせる。しかしこの作用は遊走子のう形成のための代謝に対する触媒的なものであって、形成のための素材を提供するものでない。菌の生育のもっともよい温度条件において効果がもっともあらわれやすい。

I. 緒 言

糸状菌の培養に際し胞子を多く得るために培地に酵母エキスを添加することはしばしば行なわれていることである。この酵母エキスの成分中とくに注意すべきものは、thiamine, riboflavin, biotin……などのB群に属する vitamin である。

vitamin 類の *Phytophthora* 属菌の生長に対する影響については、French³⁾, 酒井¹¹⁾, 桂⁹⁾, Roncadori¹⁰⁾, Cameron¹²⁾ らの報告がある。

French³⁾ は *Phytophthora infestans* の生育および遊走子のう形成への影響を調べた結果、菌の系統によって利用度が異なり効果もちがうことを観察している。酒井¹¹⁾, 桂⁹⁾ はそれぞれ *Phytophthora infestans*, *Phytophthora capsici* についていずれもが thiamine を生長に必須要素と認めている。さらに最近になって Roncadori¹⁰⁾ が25種の *Phytophthora* について thiamine の必要性を説いている。またこの thiamine 要求こそは *Phytophthora* と *Pythium* の識別点になり得るという研究も報せられている⁹⁾。Cameron¹²⁾ は、thiamine の生育促進が nicotinic acid によって抑制される傾向を供試した *P. cactorum* はじめ4種の *Phytophthora* に見ており、inosite および biotin が生

育に対してそれほどいちじるしい寄与をしないと報じている。いずれにしても vitamin に関する研究は thiamine を中心としたものであった。ここに筆者らは従来あまり注目をされていなかった riboflavin に焦点を合わせ、この riboflavin が *Phytophthora* の遊走子のう形成に寄与することを明らかにし、さらに同じく形成促進効果をもつ光との関係について知見をまとめて報告する。

II. 実験材料及び方法

京都府立大学植物病学研究室保存の *P. capsici* Leon. (ナス6号菌) を供試菌とし、オートミール煎汁寒天培地上で28°Cにおいて培養し、7~10日目ごとに植え継いだ。遊走子のう数は特記せぬ限りペトリ皿上に FAA 溶液 5ml を注ぎ遊走子のうけん濁液を作り、スポイドで吸いとりスライドグラス上に滴下したものをオリンパス顕微鏡 (10×10) によって1視野 (2.60 mm²) あたりの個数を計数した。実験に用いた培地はオートミール寒天培地であるので、すでに実験対象である vitamin についても含まれているのであるが添加量に比して僅かであること、遊走子のう形成に必要な素材が含まれねばならぬことから、敢えて自然物を用いて培地を調製した。しかし寒天は同時に行なった

*京都府立大学農学部植物病学研究室 (業績第31号)

Laboratory of Phytopathology, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto, Japan. (Contribution No. 81)

昭和44年8月31日受理。

vitamin についての研究の必要から Ryan¹²⁾ の方法によって純化してあったものを培地に対し 1% あて添加使用した。

照射に用いた蛍光灯は東芝製 20W 型昼光色のものであり、照度はその都度示すが約 2000lux であった。

III. 実験結果

a. vitamin B 群の *P. capsici* の発育ならびに遊走子のう形成に及ぼす影響。

酵母エキス成分である thiamine, riboflavin, pyridoxine, pantotheic acid, biotin, inosite, nicotinic acid および酵母エキスをそれぞれ 0.02% 含むオートミール煎汁寒天培地上に菌を移植して、28°C 8 日間培養したのち、その発育と遊走子のう形成数を測定した。遊走子のう数は菌そう上を直接検鏡によった値である。

riboflavin 上の培養がもっとも多くの遊走子のうを形成したが、nicotinic acid はいちじるしく発育を抑え遊走子のうの数も少なくした。(Fig. 1)

b. riboflavin 濃度の遊走子のう形成との関係

オートミール煎汁寒天培地 100ml あたりに 10, 20,

40, 80mg の riboflavin を添加し、それぞれ照明区 (2200lux) と暗区とを設け 7 日間 28°C に保って培養をした。Fig. 2. に示すように riboflavin を添加しない場合は照明区の方が形成遊走子のう数は多い。しかし riboflavin を添加することによってこの傾向は逆になる。すなわち暗所では riboflavin が遊走子のう形成を促進するにもかかわらず、照明下ではいちじるしく抑制する。このまったく相反する反応が光によって惹き起されることは riboflavin の光感受性によるものと考えられる。riboflavin の遊走子のう形成促進効果は添加量の増加とともに高まる。

c. 前照射 riboflavin の遊走子のう形成促進効果

100ml の脱イオン水中に riboflavin 20mg を溶かして高圧殺菌後 (1 気圧, 15 分), 2200lux の蛍光下に 7 日間曝した。この溶液を通常の 2 倍濃度のオートミール煎汁寒天培地と等量に混合しペトリ皿に分注し、菌移植後 7 日間 28°C に保った。この間照明区と暗区とを設け、光分解した riboflavin の遊走子のう形成に対する活性の低下を調べた。riboflavin の光による前処理は、遊走子のうの形成をいちじるしく抑える。光の

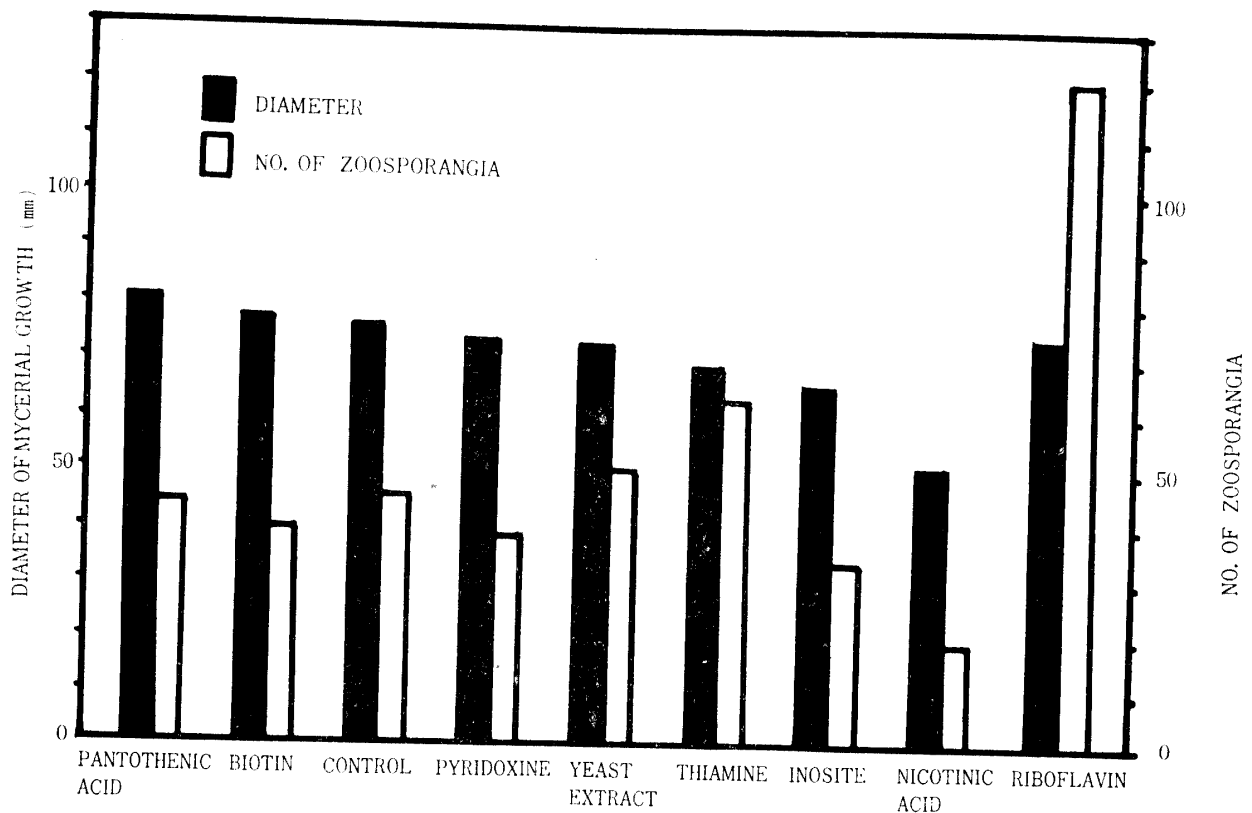


Fig. 1. Zoospore formation and mycelial growth of *Phytophthora capsici* grown on the several kinds of oatmeal agar media containing vitamin B member (0.02%) at 28°C, 8 days in dark.

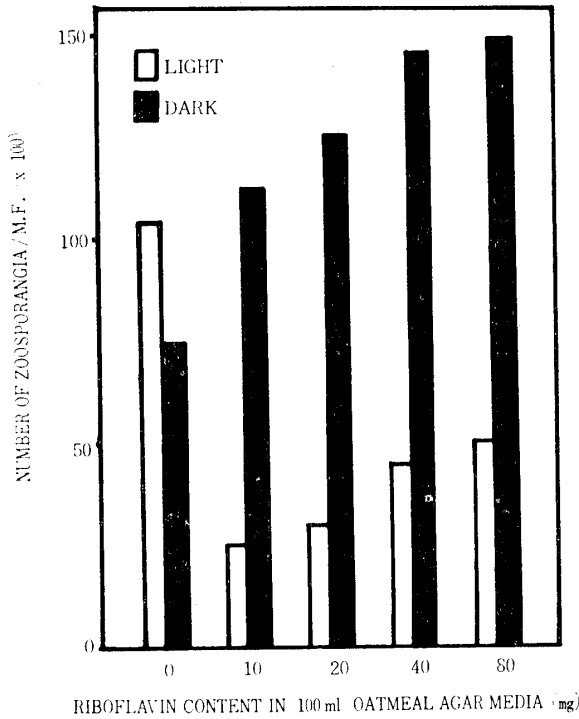


Fig. 2. Modification of the riboflavin stimulation on zoospore formation of *Phytophthora capsici* by daylight type fluorescent irradiation (2200 lux. 7 days.)

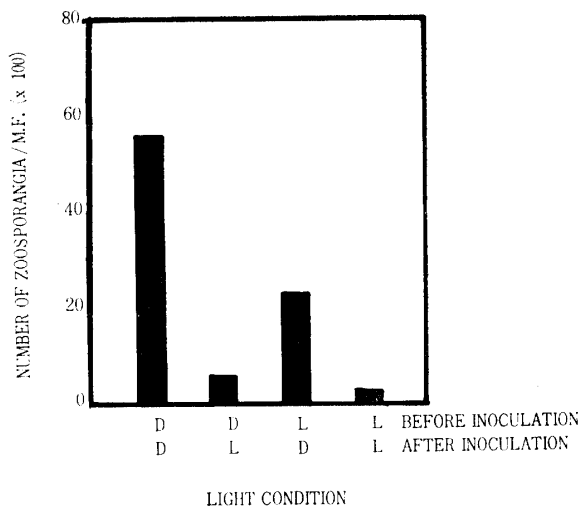


Fig. 3. Modification of the stimulation effect of riboflavin on zoospore formation of *P. capsici* by light irradiation to the media before and or after inoculation. D: dark for 7 days; L: light irradiation for 7 days (2200 lux)

与える形成刺激を打消すだけの物質が光によって生じていると考えた方がよいようである。(Fig.3.)

d. riboflavin 関連物質による遊走子のう形成の促進
 riboflavin のもつ遊走子のう形成刺激は、この分子の flavin 部分に負うものと考えられるので、flavin

adenin dinucleotide (FAD), flavin mono nucleotide (FMN) および riboflavin をオートミール煎汁寒天培地, Czapek 寒天培地 100ml にそれぞれ 10mg 添加した。Czapek 培地では本菌は生育しないのでくに精製をしない寒天を加えて寒天培地とし菌糸の疎にして薄い菌そうを得ることとした。28°C 5日間暗黒下に保った上、形成遊走子のう数を計数した。

Fig. 4. に示すように Czapek 寒天培地では添加効

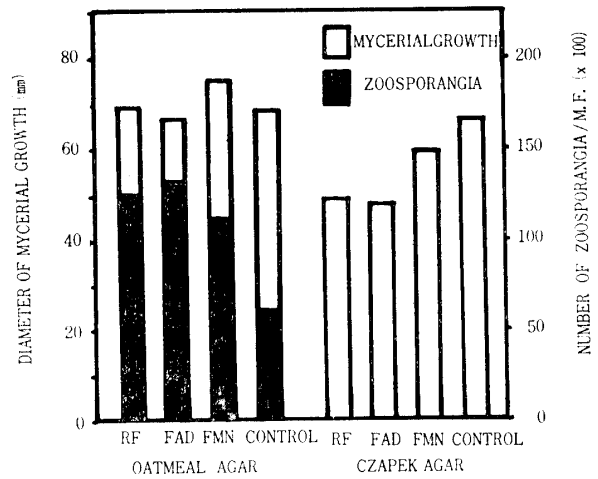


Fig. 4. Stimulation effect of flavin derivatives on zoospore formation of *P. capsici* grown on oatmeal agar and Czapek agar media at 28°C, 5 days in dark.

果はあらわれずオートミール煎汁寒天培地に遊走子のうが形成されたが、3物質とともに殆んど同程度の効果を示した。

e. riboflavin 効果の温度特性

オートミール煎汁寒天培地 100ml に riboflavin を 10mg の割に添加し、菌移植後 20°, 24°, 28°, 32° および 36°C にそれぞれ 7日間保った。Fig.5. に示すように、本菌の発育の最適と思われる 28°C 付近においてもっともよく riboflavin 効果があらわれる。対照区では 32°C になると形成される遊走子のう数こそ多いが小型であって、典型的な *P. capsici* の形を示すものは少ない。20°C では遊走子のうは形成されず、36°C では菌の生育がみとめられない。

f. riboflavin 効果の pH 特性

riboflavin 10mg をオートミール煎汁寒天培地 100 ml に添加したのち、pH を N-HCl および N-NaOH によって 4.5~9.5 の間 pH1 ごとに 6区を調製の上、高圧殺菌をしたところ殺菌後の pH は、5.0, 5.5, 5.7, 6.1, 7.1 および 7.5 となった。照明区 (2200lux) と暗区とを設け、7日間 28°C に保った上遊走子のう数を計数した。Fig. 6. に示すように、暗区では全 pH

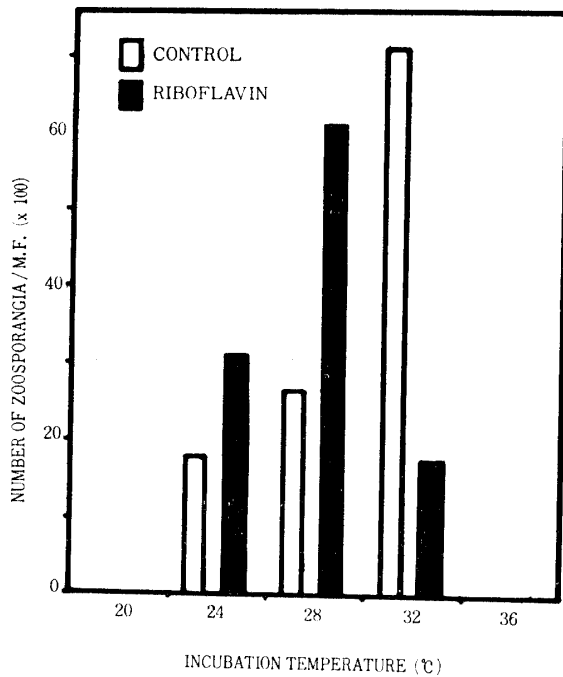


Fig. 5. Stimulation effect on zoosporangia formation of *P. capsici* grown on oatmeal agar media containing riboflavin (10mg 100ml media) at several temperature.

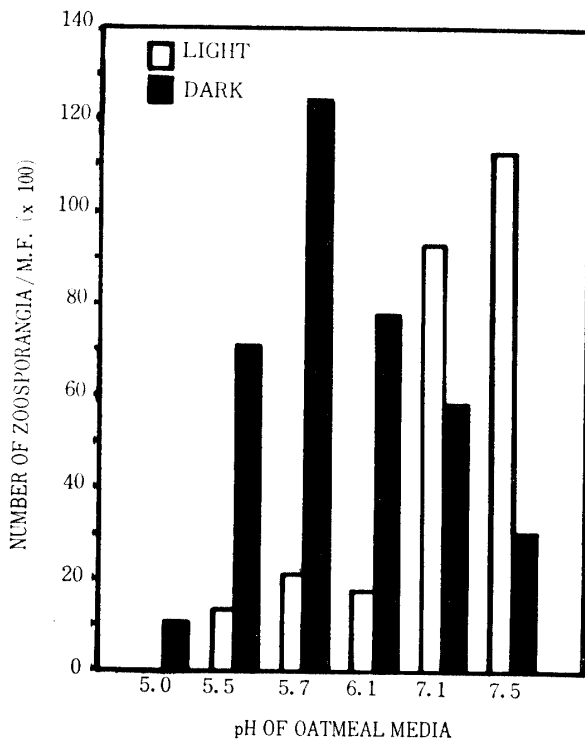


Fig. 6. Stimulation effect of riboflavin on zoosporangia formation of *P. capsici* grown on oatmeal agar media adjusted to several pH at 28°C, 7 days.

域に涉って riboflavin の促進効果があらわれているが、pH 5.7~6.1 付近においてその効果がいちじるしい。

しかし、pH がアルカリ側においては照明区の方が遊走子のう形成数を増すのは注目すべき点である。

III. 論 議

菌類の孢子形成と無機あるいは有機栄養との関係については現在までに多くの研究がなされている⁹⁾。しかし、vitamin については非常に少ない。筆者らは酵母エキスが遊走子のう形成を促進することに注目して riboflavin の効果を認めたのである。Fig. 5. に見るように thiamine も若干の効果を示すが riboflavin には及ばない。riboflavin の促進効果は暗黒下で発揮されるものであり、この実験の範囲内では riboflavin 濃度の増加とともに遊走子のう数も増える。*Phytophthora* の遊走子のうが光によって形成をいちじるしく促進される^{4, 8)}のとまったく対照的である。この riboflavin の促進効果は FAD, FMN によっても同程度に見られることから考えて、遊走子のう形成に対する flavin 酵素系の関与を推察させる。しかしこの場合照明によって遊走子のう形成数が逆に低下することは、riboflavin が光によって分解され、阻害因子が生成されるのよることが Fig. 6. より明らかである。この光で生成する物質は pH によって異なるものであるらしいことは、Fig. 6. で明らかである。riboflavin の光分解物である lumichrom は riboflavin の働きと拮抗する²⁾。lumichrom と同様に riboflavin と拮抗する mepacrine は *Hypomyces solani* f. *cucurbitae* の子のう殻形成に阻害的に働き、形成促進をする riboflavin の働きを減殺することが知られている¹³⁾。lumichrom にもこのような作用は当然考えられる。riboflavin は中、酸性で光分解されると lumichrom に、アルカリ性では lumiflavin に分解され易い。Fig. 6. にあらわれた pH 7 付近における riboflavin の効果の逆転はこのようにところに原因をもつものかも知れない。

riboflavin の効果はその温度特性から考えて *P. capsici* の発育の旺盛な環境でもっともよく発揮されるといえるが、これは遊走子のう形成の素材が与えられていた場合のことであって、Fig. 4. に見られるように合成培地では無効のようである。したがって riboflavin は cholesterol などのように器官形成の素材¹¹⁾となるものでなく、その形成のための代謝に対して促進させるという触媒的機能をもっているものといえる。これらの機構については今後研究を進めたい。また、遊走子のうを形成する素材を与えておく必要から天然培地をベースにしたが、この素材が明らかにされた時点において合成培地について riboflavin のもつこの働きを再検討したい。

引用文献

- 1) Cameron, H.K. (1966) : *Phytopathol.*, 56 : 812-815.
- 2) Carlile, M.J. (1962) : *J. Gen. Microbiol.*, 28 : 161-167.
- 3) French, A.M. (1953) : *Phytopathol.*, 43 : 513-516.
- 4) Harnish, W.W. (1965) : *Mycologia*, 57 : 85-90.
- 5) Hawker, L.E. (1966) : *The Fungi*, p. 435-469, Academic Press, New York and London.
- 6) 桂 琦一・高橋啓允 (1958) : 西京大学学術報告. 10 : 86-92.
- 7) Leal, J.A. (1964) : *Nature*, 203, 545-546.
- 8) 正子 朔・桂 琦一 : 未発表
- 9) Ridings, W.H. and H. L. Barnett (1965) : *Phytopathol.*, 55 : 1073 (abstr.)
- 10) Roncadori, R.W. (1965) : *Phytopathol.*, 55 : 595-599.
- 11) 酒井隆太郎 (1957) : 北海道農試彙報73 : 88-93.
- 12) 富山宏平・他(1962) : 植物病理実験法(明日山秀文・他編) p. 350, 日本植物防疫協会. 東京.
- 13) Tschbold, E. (1967) : *Phytopathol.*, 57 : 1140-1141.

Summary

The stimulatory effect of riboflavin on the zoosporangia formation of *Phytophthora capsici* Leon. (stock No. 6) were studied under light and dark conditions.

Among vitamin B groups contained in yeast extract, riboflavin is the most effective one for stimulating the zoosporangia production of the fungus.

This effect was much remarkable at higher concentrations of riboflavin in dark, but was suppressed by exposing to light.

When the media containing riboflavin was exposed to fluorescent lamp for 7 days, before inoculation of the fungus, the stimulatory effect fell down to one-3rd of the non-exposed control, suggesting that acts as an inhibitor for the zoosporangia production.

On the oatmeal decoction agar media of acidic side, riboflavin stimulated the sporulation in dark, but inhibited it in light. But on the neutral and weak alkali media of same components the riboflavin effect were entirely reversed.

As FAD and FMN showed the same effect as riboflavin, it was assumed that flavin enzyme system might be intimately related to the stimulatory effect.

Considering the fact that the stimulatory effects of these flavin compounds was not recognized on Czapek agar, riboflavin could hardly be the constriactional material of zoosporangia, but certainly is a accerelating agent for the production of the zoosporangia.