

# *Phytophthora capsici* LEON. の遊走子のう形成機構

## 研究のための抗生物質の利用

正 子 朔・桂 琦 一

HAJIME MASAGO and KIICHI KATSURA : Application of antibiotic substances for the study on the sporulation mechanism of *Phytophthora capsici* LEON.

要旨：菌類の器官形成についての研究は、そのほとんどが形態の観察ならびに代謝産物の増減に関するものであって、形成機構を制御する見地からのものはまだ数少ない。筆者らは *Phytophthora capsici* の無性あるいは有性生殖器官の形成について引き続き研究を行なっているが、<sup>7, 8, 9)</sup>この制御機構の研究のために形成刺激が随時に与えられ、また除かれるような手段が必要になってきた。刺激方法はいろいろとあるが菌の方の反応の速やかさという点から細菌による *P. capsici* の遊走子のうの形成促進効果を指標とすることにした。この細菌による形成刺激を希望する時点でとり除くために抗生物質を用いることにしたが、この物質は 1) *P. capsici* の発育を阻害しない、2) *P. capsici* の遊走子のうの形成能力を低下させない、3) 遊走子のう形成刺激能力をもつ細菌を速かに殺すか、その刺激機能をいちじるしく低下せしめる、などの3つの条件を満たさねばならない。

Penicillin G Na-salt, Polymyxin B sulfate, Vancomycin HCl, Dihydrostreptomycin sulfate, Chloromycetin, Cycloserine, Spiramycin, Gentamicin, Kanamycin, Colistin 及び Pentrex について濃度を変えて刺激除去剤としての効果を検討した結果 Pentrex が比較的良好に上記3条件を満し、使用濃度も 1250 ppm でよいことが判った。

### I 緒 言

糸状菌の器官形成の機構については代謝産物、代謝経路などについて研究が進められているが、通常の菌糸生長の代謝から生殖器官形成への代謝の乗り換えの制御をなす機構についての研究はまだその数が少ない<sup>1)</sup>。筆者らは、その life cycle 中に環境条件の変化によって種々の無性、有性の器官を形成し得る疫病菌についてこの点を明らかにするために研究を進めてきている<sup>7, 8, 9)</sup>。さきに疫病菌は細菌によって遊走子のうの形成が促進されることを明らかにした。その際 *P. capsici* の菌糸は細菌と接触して 20~30 分後に遊走子のう柄を分化させ 120~150 分後に遊走子のうの原基である小球を分画することを報じた。したがって遊走子のう形成への代謝経路の分化はこの 20~30 分以内に決定してしまうことと考えられる。また分生子柄形成刺激と分生子形成刺激は異なることが *Helminthospori-*

*um* などで報じられているが<sup>10)</sup>、この場合の柄の形成と遊走子のうの形成も二段階の刺激によって制御されているものかどうか不明である。いついかなる刺激が与えられるのか、何段階かの刺激が順序だてて与えられる必要があるのか、どの時点でその刺激をとり除くと反応がそのまま進行することが可能なのかというような諸点を明らかにして制御機構の解明に資することにした。この *Phytophthora* の遊走子のう形成は細菌刺激によってのみ誘発されるものとは限らず、光によっても<sup>5)</sup>、培地の栄養の欠乏に<sup>11)</sup> よっても生ずるが、それらは反応の現われかたが緩慢であるために作用時点があいまいになるおそれがある。細菌による場合はすでに述べたように短時間に速やかに器官形成の諸段階を進んで行くので上記のような問題はないが、逆に刺激の除去などをきわめて速やかにすることが肝要になってくる。この刺激除去の方法に抗生物質を使用することが考えられる。しかしその抗生物質の備うべき

京都府立大学農学部植物病理学研究室 (業績第92号)

Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto, Japan (Contribution No. 92).

本研究の一部は昭和44年度日本植物病理学会大会で講演した。

昭和46年7月31日受理

要件としては、1) *P. capsici* の発育を阻害しない、2) *P. capsici* の遊走子のうの形成能力を低下させない。3) 遊走子のう形成刺激をもつ細菌を速やかに殺すか、刺激機能をいちじるしく低下せしめるなどのことが考えられる。ここではこの3点を満す抗生物質を市販品の中から求めるために若干の検討を加えた結果を報告する。なお実験に使用した Pentrex は万有製薬KKより提供を受けたものである。

## II. 実験材料および方法

遊走子のうの形成程度を知るために *P. capsici* (ナス65号菌) を用い別記しない限り、オートミール寒天において、4日間28°Cに保って培養した菌そうを使用した。遊走子のう形成の誘起には SPB-3 (*Pseudomonas riboflavina* 類縁細菌) を用いた。細菌はブイヨン5mlに1白金耳あて接種し、28°C 48時間保ったものである。遊走子のう数はオリンパス顕微鏡(10×10)によって観察し、形成数の多い場所を10視野以上計数し平均を求めた。

抗生物質は一旦殺菌脱イオン水に溶かした上、実験目的に応じて殺菌したオートミール寒天あるいはブイ

ヨン培地に所定濃度になるように添加した。用いた抗生物質の力価はつぎの通りである。

Penicillin G Na-salt: 1950 units/mg, Polymyxin B sulfate: 10,000 units/mg, Vancomycin HCl: 1,510 units/mg, Dihydrostreptomycin sulfate: 5 g/vial, Chloromycetin: 50 mg/vial, Cycloserine 250 mg/capsule, Gentamicin: 40 mg/capsule, Colistin M: 1,000,000 units/vial, Spiramycin: 250 mg/capsule, Pentrex: 250 mg/vial

## III. 実験結果

### 1. 抗生物質による *P. capsici* の生育阻害

*P. capsici* に対して生育抑制作用のない抗生物質をえらぶために Penicillin G Na-salt, Polymyxin B sulfate, Vancomycin HCl, Dihydrostreptomycin sulfate, Chloromycetin, Cycloserine, Gentamicin, Spiramycin, Kanamycin, Colistin M および Pentrex の11種類について各々数濃度段階において *P. capsici* の菌そう発育の程度を調べた。記載濃度になるように調製したオートミール寒天培地上に *P. capsici* を移植し24日間、28°C に保った結果を Fig. 1 に示す。

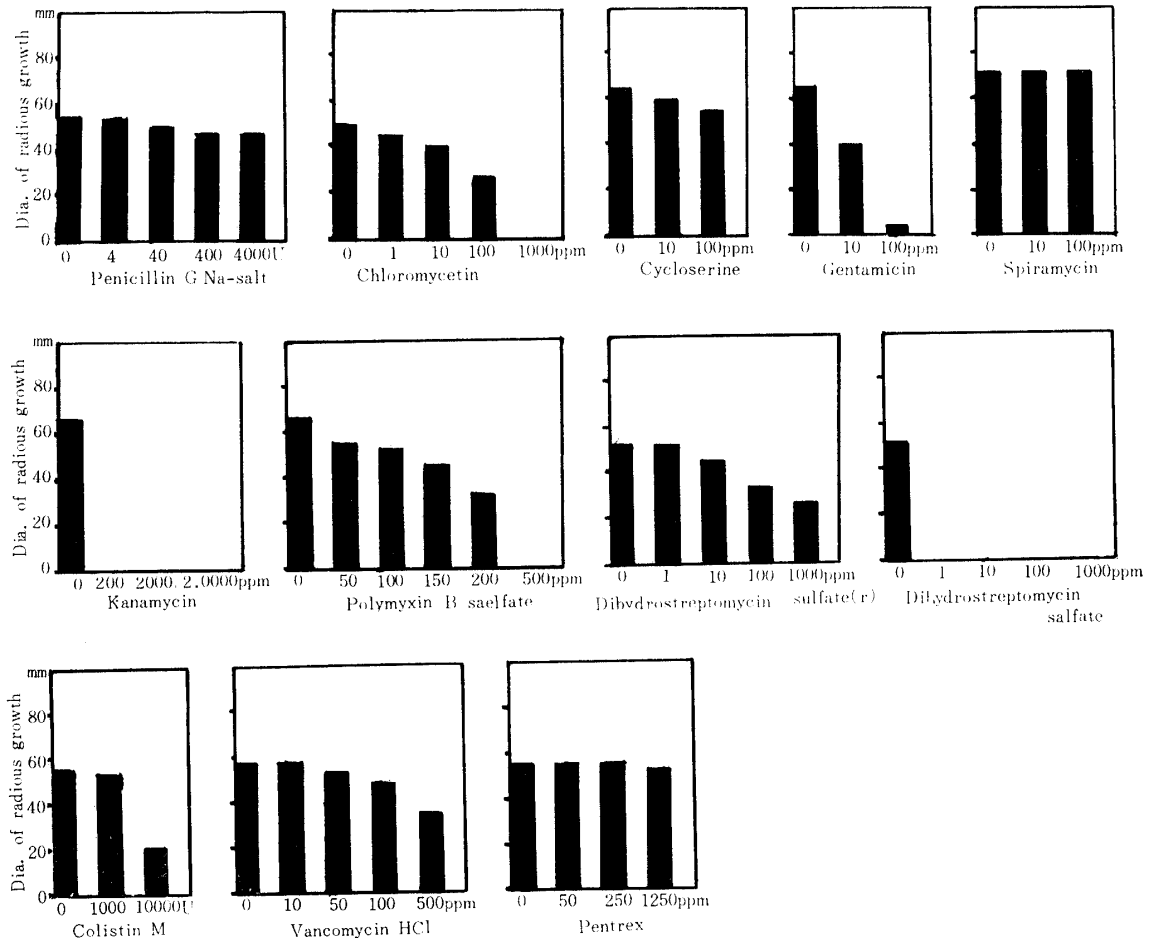


Fig. 1 Growth inhibition of several antibiotics to *Phytophthora capsici*. Oat meal agar cultures were kept at 28°C in dark condition,

ここに用いられた濃度域で *P. capsici* の生長にあまり影響を与えていないのは Penicillin G Na-salt, Pentrex, Vancomycin HCl, Cycloserine, Spiramycin, Polymyxin B sulfate であって、とくに前二者によってはほとんど影響受けないように見える。Kanamycin はいちじるしく阻害効果を示し, Dihydrostreptomycin sulfate は菌の系統によって異なった阻害を示す。この Dihydrostreptomycin sulfate は *P. capsici* に mutation を起し易く 10 ppm の濃度で Fig. 2 に示すように sector を生じる。したがってこのように伸長している菌糸と抑えられている菌糸とを各々 10 代の繰り返し移植をオートミール培地上で行なった結果の両系統の特性はそのままに保持されていた。

2. 抗生物質含有培地上に生育した *P. capsici* の細菌誘発による遊走子のう形成

前実験において *P. capsici* の生長を強くは抑制しなかった Pentrex, Penicillin G Na-salt, Vancomycin

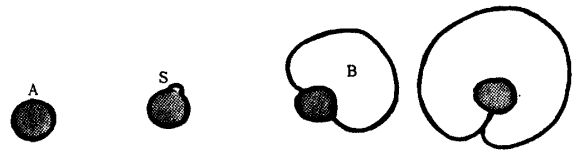


Fig. 2 Sector formation by dihydrostreptomycin sulfate at the edge of colony of *Phytophthora capsici*.

A: Wild type B: Resistant type S: Sector Wild type hypha stop their growth after several times then few sector appeared and these are resistant to dihydrostreptomycin sulfate. Finally resistant type hypha grew well surrounding wild hyphal colony.

HCl, Cycloserine, Spiramycin, Polymyxin B sulfate について SPB-3 による遊走子のうの形成阻害を調べた。抗生物質を含んだオートミール寒天培地上に育てた *P. capsici* の菌そう上に SPB-3 のけん濁液を滴下したのち 28°C に 48 時間保ったものについて遊走子の

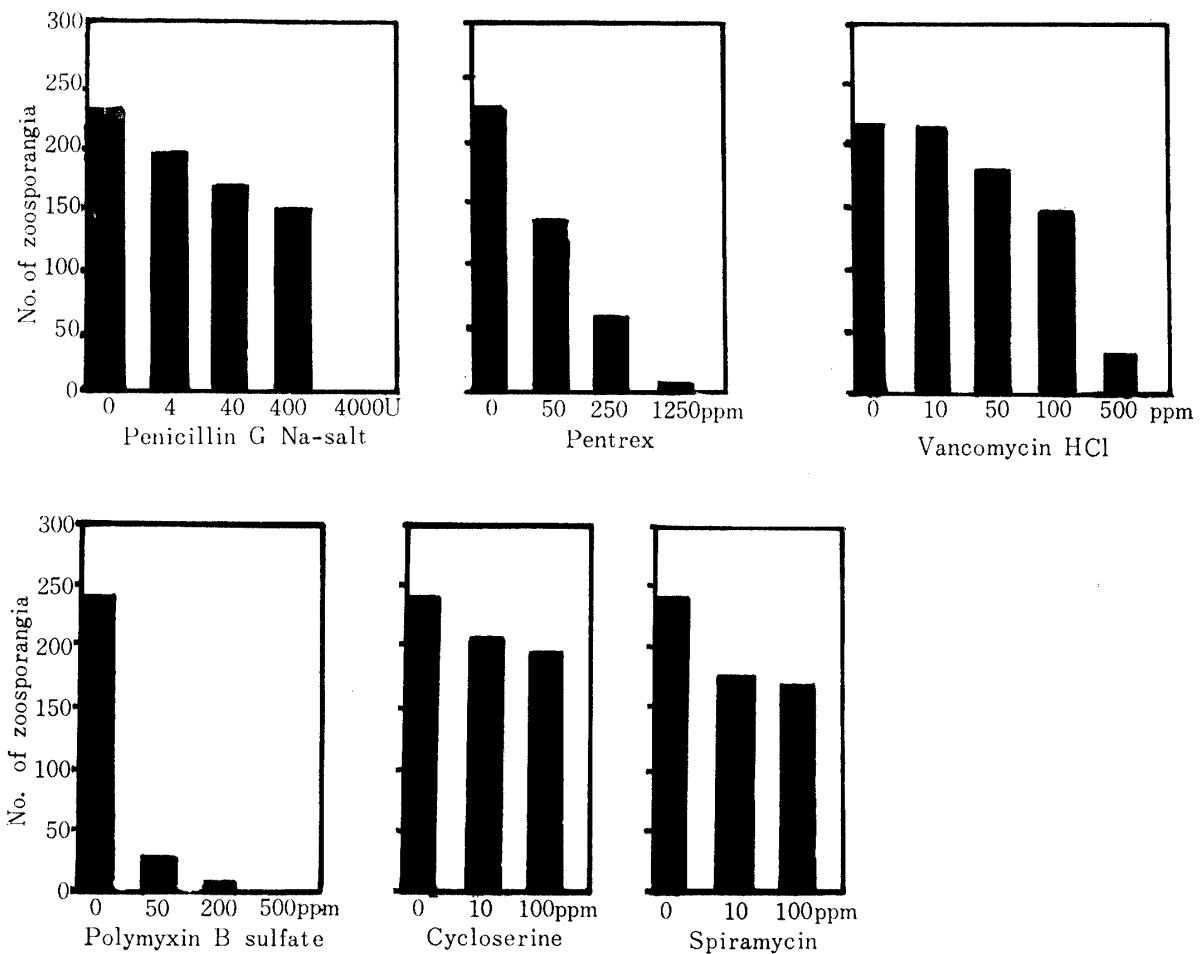


Fig. 3 Zoosporangial production by stimulatory bacteria, SPB-3, on oatmeal agar media contained several antibiotics. SPB-3 dropped on the 4 days culture of *Phytophthora capsici*, and the culture were kept 48 hr at 28 °C in dark condition.

う数を計数し Fig. 3 に示した。Polymyxin B sulfate, Vancomycin HCl, Pentrex など高濃度になると遊走子のうは減少する。これでは疫病菌の遊走子のう形成能力が低下した為によるものか, 細菌の刺激能力低下によるものか不明であるゆえつぎの実験を行なった。

### 3. 抗生物質添加培地における光による遊走子のう形成

抗生物質が光照射によって分解し, 遊走子のう形成に阻害的あるいは促進的に働く場合のあろうことを無視して前記6種の抗生物質について 28°C において4日間暗黒下で育ったのち, さらに4日間 2000 lux の“Plantlux”(Toshiba Electric Co.)の蛍光に曝露した。Fig. 4 に示すように Pentrex の場合にはその濃度にか

かわらずほとんど同程度の遊走子のうを形成した。すなわち, Pentrex を用いても菌自身の遊走子のうを形成する能力は低下していないことを示している。

### 4. SPB-3 の各種抗生物質による生育阻害

a. 液体培養における抗生物質の SPB-3 生育抑制  
所定濃度になるように抗生物質を添加したブイヨン培地に SPB-3 を1白金耳あて移植し, 28°C に5日間保ったのちその濁度により細菌増殖の程度を調べた。結果を Table 1 に示す。Pentrex 1250 ppm においては SPB-3 の増殖はみとめられない。

#### b. 生育抑制細菌の遊走子のう形成刺激

上記 Pentrex 1250 ppm に培養した SPB-3 を殺菌水で洗浄の上 *P. capsici* の菌そう上に滴下したが細

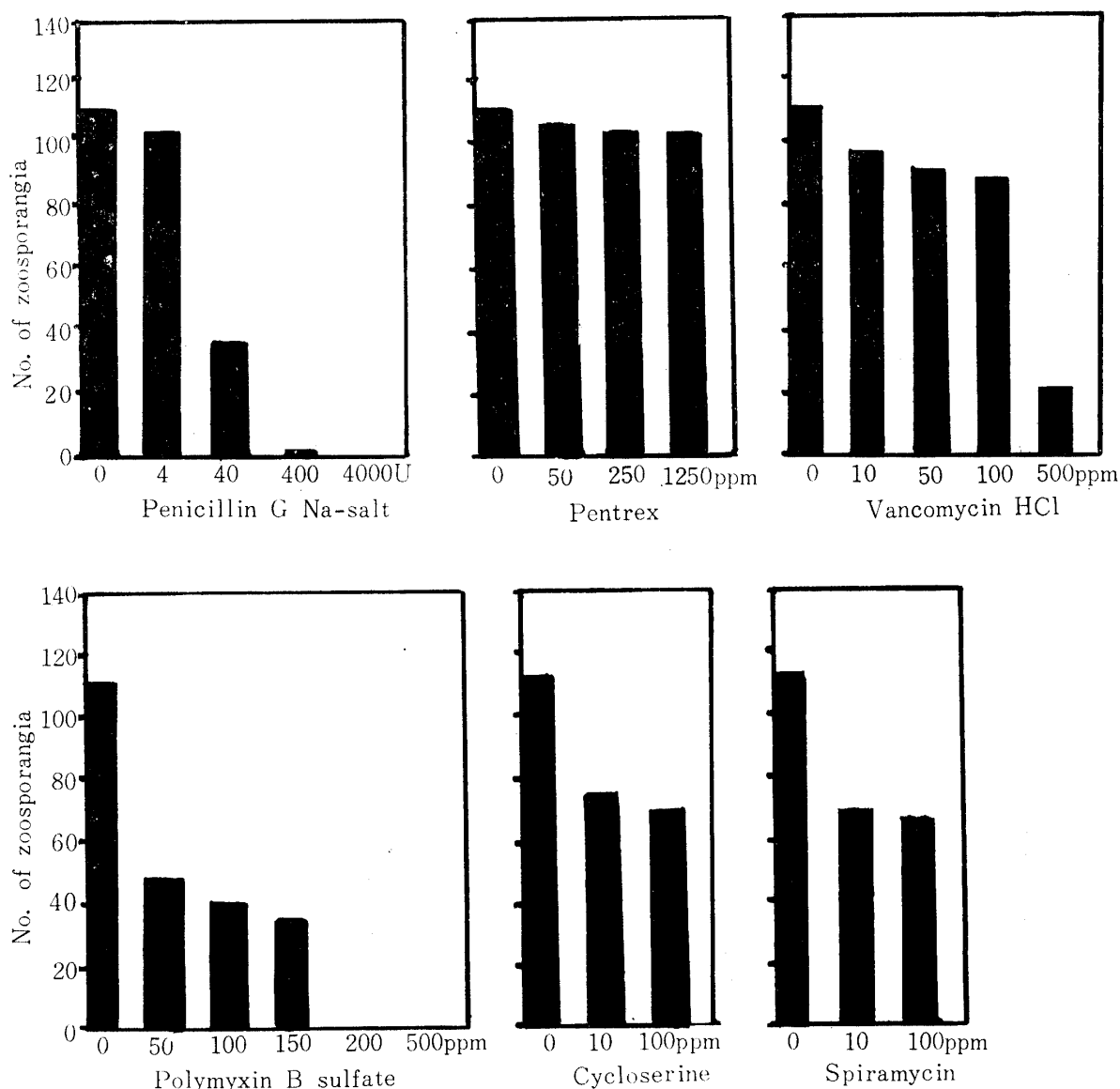


Fig. 4 Zoosporangia production of *Phytophthora capsici* by photo induction on oatmeal agar media contained several antibiotics.

The fungi were precultured for 4 days at 28 °C and exposed to plantlux fluorescent lamp (2000 lux) for more 4 days at 28 °C.

Table 1 Inhibitory action of some antibiotics on the stimulatory bacteria, SPB-3.

Antibiotics	Concn.	SPB-3
Polymyxin B sulfate	0 ppm	+
	50	+
	200	+
	500	+
Penicillin G Na-salt	0 U	+
	4	+
	40	+
	400	+
	4000	+
Pentrex	0 ppm	+
	50	+
	250	±
	1250	-

Antibiotics	Concn.	SPB-3
Spiramycin	0 ppm	+
	10	+
	100	+
Cycloserin	0 ppm	+
	10	+
	100	+
Vancomycin HCl	0 ppm	+
	10	+
	50	+
	100	+
	500	±

The bacteria were cultivated for 5 days at 28°C

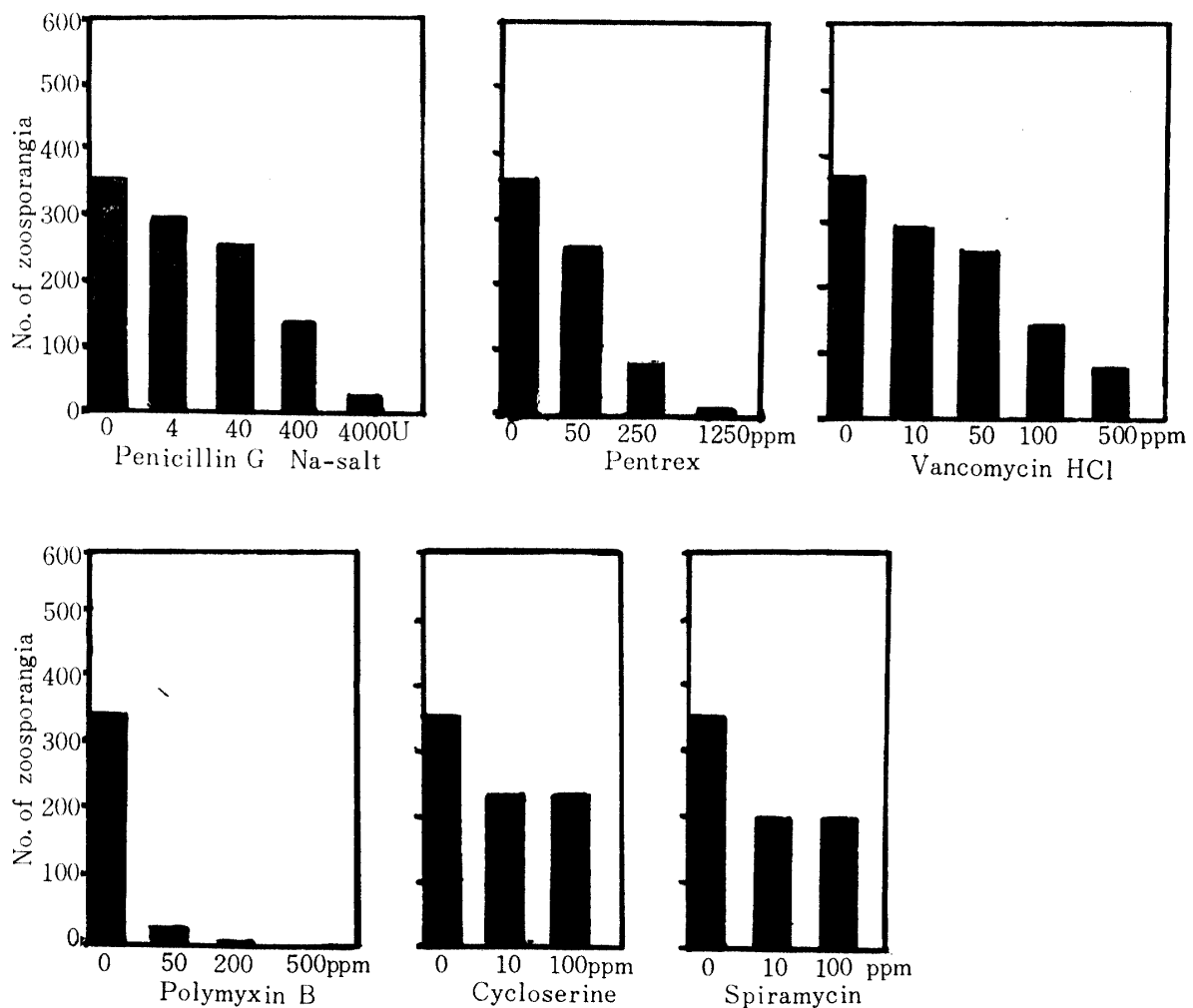


Fig. 5 Zoosporangial production of *Phytophthora capsici* by the stimulous bacteria, SPB-3, pre cultured in Bouillon media contained antibiotics. SPB-3 were cultivated for 48 hrs at 28°C and then dropped to *Phytophthora capsici*. The combined culture were kept fore more 40 hrs at 28°C.

菌は発育せず遊走子のうも形成されなかった。この濃度では SPB-3 は死滅したものと考えられる。

#### 5. 各種抗生物質中で培養した SPB-3 の遊走子形成刺激

Pentrex, Penicillin G Na-salt, Vancomycin HCl, Cycloserine, Spiramycin, Polymyxin B sulfate の6種類の抗生物質をそれに含むブイヨン培地に、SPB-3 を1白金耳ずつ移植し 28°C, 48時間保ったのち、*P. capsici* の菌そう上に滴下して遊走子のう形成数を40時間後に測定した。結果を Fig. 5 に示す。

この場合は細菌の生死と、抗生物質の *P. capsici* に対する働きかけが輻輳するので Penicillin G Na-salt, Polymyxin B sulfate, Pentrex などの効果がいちじるしくあらわれる。

### IV. 考 察

糸状菌の器官形成についての機構的な研究は最近漸く活潑になされるようになってきた<sup>1, 2, 4, 10, 11, 12</sup>。しかし形成刺激の速やかなる加除方法は非常にむづかしい。望む時点において必要とする時間だけ刺激を加えることができるという点では、光<sup>3</sup>, 温度<sup>11</sup>などがよいと考えられるが後者などは若干の慣性をゆるさなければならぬ。しかし両者ともその刺激が与えられてから可視的变化が現われるまでかなりの時間を要する。筆者らの用いようとする細菌による刺激は比較的速やかに菌体内に反応をひき起させて4~5時間内で器官形成を終らせるほどである。したがって菌糸—遊走子のう柄分岐—柄伸長—遊走子のう原基分画—遊走子のう肥大充実—遊走子のう完成の諸段階が短時間に転移してゆくために制御方法さえ適当に選べば比較的理想的に近い刺激方法である。制御方法としては、遊走子のうを形成する本体である *P. capsici* を殺したり、いちじるしい生理的変動をもたらすようなことでは不適であるので、加熱、放射線照射などによって刺激源である細菌を殺すことはできない。以上のことからいささか危険ではあるが、抗生物質を用いることにした。しかし用いる抗生物質には前述したように3つの要件が備わっていないとなければならない。さらに加えるならば、抗生物質自体に遊走子のう形成刺激を備えていてはならないことである。この要求から、まず疫病菌に対して抑制的に働く抗生物質<sup>3, 6, 13</sup>を除いた、これは細菌の発育を抑える濃度域で阻害作用を有していなければよい訳であるが、従来の報告も参照してこれらの中から Penicillin G Na-salt 以下6種を残した。大体において *P. capsici* はグラム陰性細菌に活性を示す抗生物質には阻害を受け易く、刺激細菌 SPB-3

もグラム陰性であるという点において抗生物質選択のむづかしさが存するのである。ついで *P. capsici* の遊走子のう形成能力を失わしめる物質は除くべきであり、光による形成試験をした。これはあくまでも光刺激と細菌刺激とが遊走子のう形成の本質的なところでは帰一すると仮定して行なったものである。供試薬剤は低濃度では形成能を失わせなかったが、Pentrex に及ぶものはなかった。またそれぞれの抗生物質含有培地に細菌を滴下した場合 Penicillin G Na-salt, Cycloserine, Spiramycin は刺激効果を保持していたが、残りの3物質は濃度とともに非常に効果を低下した。これは、Polymyxin B sulfate, および Vancomycin HCl の場合には菌側の形成能力の低下が細菌の生育阻害に重なっているのであるが、Pentrex の場合は細菌の能力低下あるいは死のみに関係していると考えられる。さらに液体培養実験およびその培養液の疫病菌菌そうへの滴下実験で細菌の死を確かめたことなどにより、Pentrex を 1250 ppm の濃度で使用することが所

#### Pentrex

#### 6 [D(-)- $\alpha$ -aminophenylacetamido] penicillanic acid

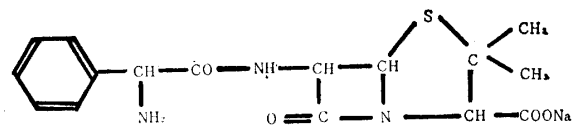


Fig. 6 Chemical formula of Pentrex.

期の目的に適うと結論づけられそうである。しかしこのものを固体培地に前もって加えておく場合と後に菌そう上部より滴下するのではその効果に遅速があるので添加法については今後さらに検討したい。なお Pentrex は Fig. 6 に示す構造をもった Aminobenzyl Penicillin の商品名であり、他に取り扱い社によってピクシリン、シレラール、ペンブリチンの異名をもっている。

### 引用文献

- 1) Cantino, E. C. (1966) : The fungi, 2 : 283-337, Academic Press, New York and London.
- 2) Chee, K. H. and F. J. Newhook (1966) : N. Z. Jr. Agric. Res., 9 (1) : 32-43.
- 3) Eckert, J. W. and P. H. Tsao (1962) : Phytopath., 52 771-777.
- 4) 北本 豊(1970) : 化学と生物, 8 : 444-449.

- 5) Lilly, V. G. (1966) : The fungus spore, 259-272, Butterworths & Co., London.
- 6) Mannig, W. J. and D. F. Crossan (1966) : Phytopath., **56** : 235-237.
- 7) 正子 朔・近藤晴彦・今西 満・桂 琦一(1968) : 京府大学報・農, **20** : 37-43.
- 8) 正子 朔・川田芳子・桂 琦一(1969) : 京府大学報・農, **21** : 32-36.
- 9) 正子 朔・桂 琦一(1970) : 京府大学報・農, **22** : 17-26.
- 10) 尾田義治(1970) : 自然, **25** : 56-64.
- 11) Ojha, M. N. and G. Turian (1968) : Archiv. für Mikrobiologie. **63** : 232-241.
- 12) Trione, E. J., C. M. Leach, and J. T. Match (1966) : Nature, **212** (5086) : 163-164.
- 13) Tsao, P. H. (1966) : Phytopath., **56** : 152.

#### Summary

Regulatory system on the sporulation of fungi was investigated in *Phytophthora capsici* LEON. with reference to the application of antibiotics. For the induction of sporulation it is necessary to utilize adequate stimulants and inhibitors. Light stimulation is not suitable for this study, because the morphological change in the fungus proceeds too slowly after irradiation. By the same reason, temperature regulation and the dilution of nutrition in culture media are not unfavorable. On the contrary bacteria, SPB-3, inoculated together stimulate sporulation of the fungus rapidly and zoosporengia are formed completely within 120-150 min after contact with the bacterium.

For further study it is desirable to get the substances which stop the bacterial stimulation to the fungus whenever occasion arises. Therefore, effects of some antibiotics on the growth of *P. capsici* and SPB-3 were investigated in regards to following 3 conditions to be required: 1) hyphal growth of *P. capsici* is not inhibited by antibiotic substance and 3) stimulatory bacteria for sporulation are killed or the stimulatory function is destroyed by the substance immediately after the substance is added to the fungal colony.

Penicillin G Na. salt, Polymyxin B sulfate, Vancomycin HCl, Cycloserine, Colistin, Spiramycin, Dihydrostreptomycin sulfate, Kanamycin, Chloromycetin, Gentamicin, and Pentrex are tested in line with conditions described above. In Penicillin G Na. salt, *P. capsici* grow well at concentrations tested, but the sporulation ability is reduced with increasing concentration and SPB-3 is not killed even at high concentration. In Polymyxin B sulfate, the growth of *P. capsici* is not inhibited so markedly, but the sporulation ability of the fungus is reduced at high concentration. In Vancomycin HCl, Cycloserine, Colistin and Spiramycin, SPB-3 is not killed. In Dihydrostreptomycin sulfate, the growth of *P. capsici* is completely inhibited even at low concentration, but resistant mutants are grown frequently. In Kanamycin, *P. capsici* don't grow. In Chloromycetin and Gentamicin, the fungus don't grow well. In Pentrex, *P. capsici* grow well at high level and the sporulation ability of the fungus is not lost. In addition SPB-3 is killed at high concentration. From these result on 3 conditions mentioned above, Pentrex 1250 ppm is recommended for the study of the regulatory system of the sporulation of *P. capsici*.