

# *Pseudomonas riboflavina* の *Phytophthora capsici* 遊走子のう形成刺激の Viccillin による抑制

正子 朔・伊藤千恵子

HAJIME MASAGO and CHIEKO ITO

Suppression of *Pseudomonas riboflavina*-stimulated zoosporangial  
formation of *Phytophthora capsici* by Viccillin

**要旨:** *Phytophthora* 属菌の遊走子のうの形成促進に *Pseudomonas* 属細菌との接触が有効であることはよく知られている。ここに供試した *Pseudomonas* 14種のうち *Ps. riboflavina* がもっともいちじるしい効果を示した。この細菌による遊走子のうの形成は 16°C のような低温では示されず、本来 *P. capsici* の遊走子のう形成適温 28°C で急増し、細菌の増殖適温である 32°C で最高に達した。また *P. capsici* が細菌に接触するまでの前培養日数は長いほど効果がいちじるしかった。*Ps. riboflavina* による遊走子のう形成刺激を任意の時点で除去するために *P. capsici* 遊走子のうの形成にほとんど影響を与えない Viccillin を用いた。50ppm の Viccillin は *Ps. riboflavina* の増殖を速やかにかつ完全に抑えるので *P. capsici* と *Ps. riboflavina* の系において添加時期を変えて形成刺激を中断したところ菌が細菌と接触して後 4 時間頃までは遊走子のう形成の進行を止めることができるようであるが、それ以後の刺激中断は遊走子のうの形成を中止させることはできないことが明らかとなった。

## 緒 言

Mehrich<sup>1)</sup> が土壌浸出液による *Phytophthora* 属菌の遊走子のう形成刺激を報じて以来、細菌による遊走子のう形成促進について報告が続いている<sup>2)3)4)5)</sup>。

さきに正子ら<sup>5)</sup> は 2 3 の *Pseudomonas* 属細菌のもつ高い刺激能力に注目してその刺激伝達に対する環境条件の影響について種々検討を加えた。さらに細菌の刺激を任意の時点において消失させるべく多くの抗生物質の中から aminobenzyl penicillin (Pentrex, Viccillin など) がこの目的に適うものとして選び出した<sup>6)</sup>。今回はこの抗生物質を用いて細菌の刺激の中断を行なって刺激伝達に必要な時期を明らかにしようとした。

## 材料及び方法

1. 供試菌 京都府立大学植物病理学研究室保存の *Phytophthora capsici* Leon. (002) を用いた。
2. 供試細菌 財団法人発酵研究所より分譲を受けた *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula (IFO 3445), *Ps. aureofaciens* Kluver (IFO 3521), *Ps. caryophylli* (Burkholder) Starr & Burkholder (IFO 13591), *Ps. dacunhae* Gray & Thronton (IFO 12048), *Ps. denitrificans* Bergey et al. (IFO 13302), *Ps. fluorescens* Migula (IFO 3081), *Ps. marginata* (McCulloch) Stapp (IFO 13700), *Ps. putida* (Trevisan) Migula (IFO 3738), *Ps. riboflavina* Foster (IFO 13584), *Ps. stutzeri* (Lehmann & Neumann) Sijderius (IFO 12695), *Ps. syringae* van Hall (IFO 3310),

*Ps. vesicularis* (Büsing et al.) Galarneault & Leifson (IFO 12165) ならびに京都府立大学応用微生物学研究室より分譲を受けた *Ps. fragi* (Eichholz) Gruber (1173) および *Ps. ovalis* Chester (1172) である。

3. 供試薬剤 aminobenzyl penicillin としては明治製菓株式会社より分譲を受けた Viccillin を使用した。使用に際しては滅菌水により供試濃度の倍に調製した上、等量の細菌けん濁液と併せた。

4. 実験方法 PDA 培地に保存した *P. capsici* をオートミール寒天培地を分注したペトリ皿 (径9 cm) の中央に移植し、28°C、暗黒下で5日間前培養をした。一方ブイオン寒天培地に保存した *Pseudomonas* 属細菌をブイオン培地 5 ml 中に1白金耳あて接種し、28°C に48時間培養し、滅菌ピペットにより前記 *Phytophthora* の菌そう上に1滴ずつ滴下したのち暗黒下所定温度に保ち、24時間および48時間後に鏡検し、形成した遊走子のたを1視野当たりの数 (ニコン顕微鏡 100倍) として計数した。比較的群って形成されることが多いので、そのような場所を選び少なくとも10視野以上を調べその平均を求めた。細菌数は、あらかじめ吸光度 (波長400nm) と細菌濃度の関係を求めておき、その直線部分において吸光度より細菌濃度を求めた。

### 実験及び結果

#### 1. *Pseudomonas* 属細菌による *P. capsici* の遊走子のう形成

前述の方法にしたがい14種の *Pseudomonas* 属細菌を

Table. 1. Stimulation of zoosporangial formation of *P. capsici* by various *Pseudomonads*.

Bacteria	Time after inoculation	
	24h	48h
<i>Ps. ovalis</i>	—	—
<i>Ps. fragi</i>	—	—
<i>Ps. caryophylli</i>	—	—
<i>Ps. denitrificans</i>	—	—
<i>Ps. marginata</i>	—	—
<i>Ps. aeruginosa</i>	—	—
<i>Ps. aureofaciens</i>	—	—
<i>Ps. fluorescens</i>	—	—
<i>Ps. putida</i>	—	—
<i>Ps. stutzeri</i>	—	—
<i>Ps. syringae</i>	—	—
<i>Ps. vesicularis</i>	±	±
<i>Ps. dacunhae</i>	±	+
<i>Ps. riboflavina</i>	+	+

*P. capsici* の菌そう上に滴下し、24時間および48時間後に観察したところ Table. 1 に示したように *Ps. riboflavina*, *Ps. dacunhae*, *Ps. vesicularis* の3細菌がもっともいちじるしい効果を示した。この3細菌以外でも長時間 (4~5日) 経てばわずかではあるが遊走子のうを形成するものがある (*Ps. syringae*, *Ps. denitrificans*, *Ps. ovalis*, *Ps. putida* など)。

#### 2. *Ps. riboflavina* による *P. capsici* の遊走子のう形成

遊走子のう形成刺激のもっともいちじるしい *Ps. riboflavina* を *P. capsici* の菌そう上に滴下し、以後2時間ごとに24時間までに形成した遊走子のう数を経時的に測定した。形成は Fig. 1 に示すように両者が接触後約8時間で始まりその後時間ごとに遊走子のう数は急増した。

#### 3. 細菌による遊走子のう形成に対する温度の影響

*Ps. riboflavina* を *P. capsici* の菌そう上に滴下後、16, 20, 24, 28, 32および36°C に24時間保ち形成した遊走子のう数を比較した。Fig. 2 に示す通り 32°C で遊走子のう数はもっとも多く 16°C ではまったく形成されない。32°C で形成された遊走子のうは Fig. 2 にみられるように 28°C 以下に比べて小型化する。

#### 4. *Ps. riboflavina* の刺激に対する *P. capsici* の前培養の影響

2, 4, 6, 8, 10および12日間暗黒化でそれぞれ前培養した *P. capsici* の菌そう上に *Ps. riboflavina* を滴下した場合、24時間後の形成遊走子のうは前培養日数が長くなる程多くなることを Fig. 3 は示している。

#### 5. *Ps. riboflavina* の生育に対する Viccillin の影響

Viccillin は著者らが考案した *Phytophthora* 分離用

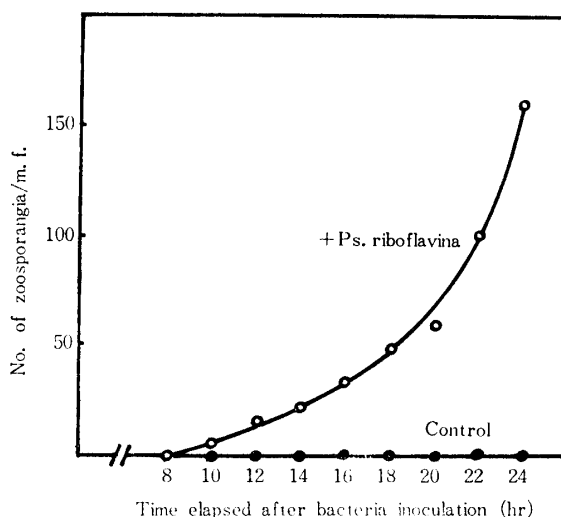


Fig. 1. Stimulation of zoosporangial formation of *P. capsici* by *Ps. riboflavina*.

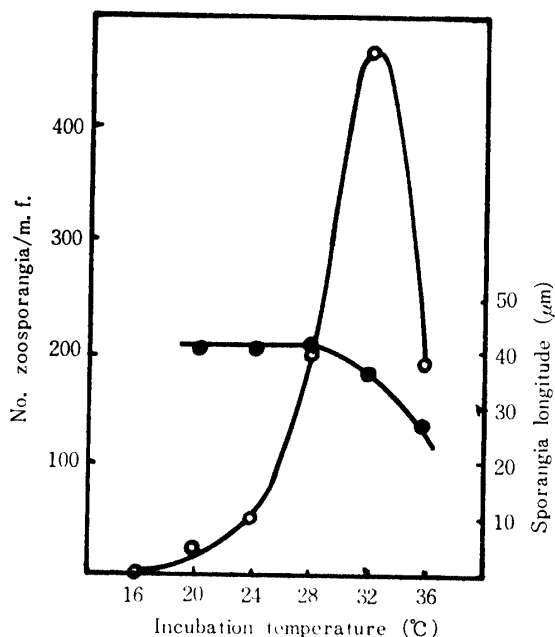


Fig. 2. Effects of different temperature on zoosporangial formation of *P. capsici* stimulated by *Ps. riboflavina* and their longitudes.

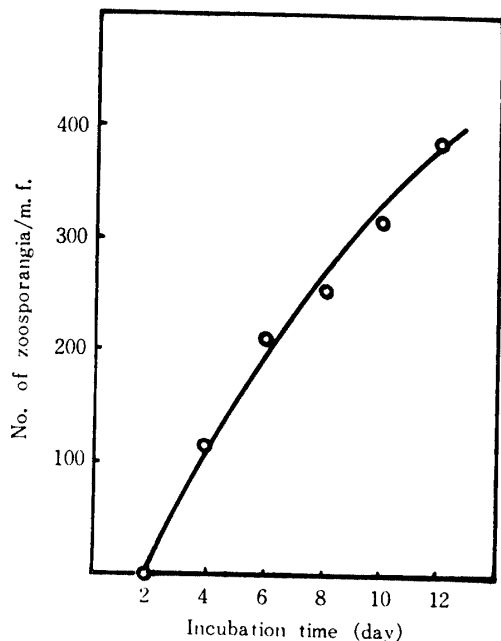


Fig. 3. Effects of pre-incubation periods of *P. capsici* on zoosporangial formation stimulated by *Ps. riboflavina*.

選択培地に加えられる抗生物質で aminobenzyl penicillin の商品名であるが、供試濃度では *Phytophthora* の全生活環を通じて悪影響を与えないことはすでに明らかにしたところである<sup>3)</sup>。移植後48時間経過した *Ps. riboflavina* のブイオン培養に 50ppm および 5 ppm になるように Viccillin を添加し24時間28°Cに保つと

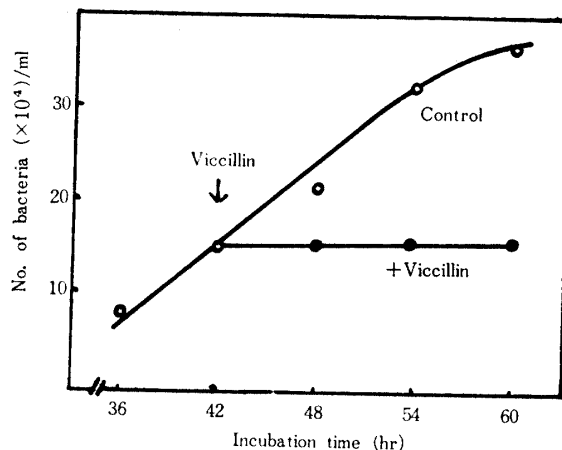


Fig. 4. Effect of Viccillin (50 ppm) on growth of *Ps. riboflavina*.

50ppm では細菌の増殖が完全に止められたが 5 ppm では若干の増殖が認められた。また 50ppm の Viccillin を含むブイオン寒天培地にも *Ps. riboflavina* の発育を認めなかった。Viccillin 添加後細菌が増殖を停止するまでに時間的にずれがあるかを明らかにするために *Ps. riboflavina* をブイオン培地に接種後24時間目から6時間間隔で60時間目まで細菌数の増加を測定したが、途中42時間目に 50ppm になるように Viccillin を添加したところ Fig. 4 に示す結果をえた。*Ps. riboflavina* の増殖は薬剤添加後直ちに停止するようである。しかし90分程度この薬剤に触れていた *Ps. riboflavina* は Viccillin を含まない培地に移した場合再び増殖を始めたことよりみれば短時間では死滅したものとはいえないようである。

6 *Ps. riboflavina* による *P. capsici* の遊走子のう形成促進機能に対する Viccillin の抑止効果

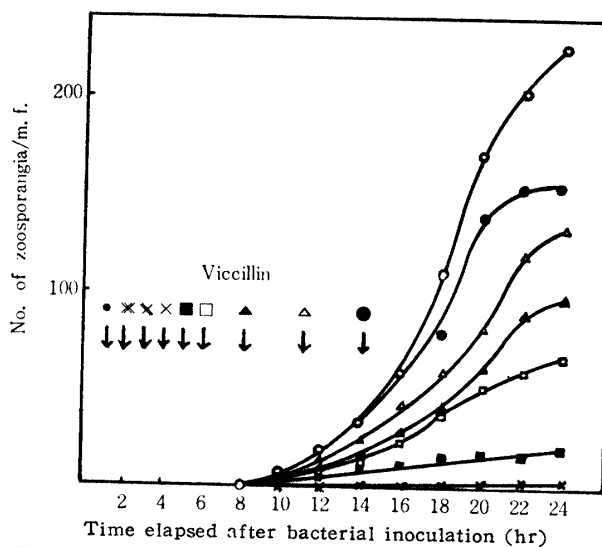


Fig. 5. Effect of Viccillin on zoosporangial formation of *P. capsici* stimulated by *Ps. riboflavina*.

*Ps. riboflavina* のけん濁液を *P. capsici* の菌そう上に滴下後、50ppm の Viccillin を 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 11あるいは14時間後に滴下し、その時点で *Ps. riboflavina* の増殖を停止させた。一方、細菌滴下後2時間ごとに24時間まで薬剤滴下区、対照区ともに遊走子のう数を計数し Fig. 5 にその結果を示した。

*Ps. riboflavina* が *P. capsici* と接触してから約4時間後までに Viccillin によって細菌の増殖を抑えると遊走子のうの形成はほとんど認められなくなるが、薬剤添加時期がこれより遅れるとその時まで形成の経路が「スイッチオン」されていた部位についてはもはや遊走子のうの形成への過程を進むことを止めることはできないようである。

### 考 察

*Ps. riboflavina* による *P. capsici* の遊走子のう形成刺激についてはすでに示唆したところであるが<sup>5)</sup>、本実験の目的は細菌の与える刺激が細菌の増殖停止とともに消滅することを明らかにするとともに、その刺激が開始されてから何時間経過すれば *Phytophthora* の菌体内で遊走子のう形成の過程がもう栄養生長に引き返すことのできない点まで進行するのを知ろうとしたものである Marx ら<sup>3)</sup>は細菌培養の無細胞抽出物で効果があると述べているが、著者らは 0.25 $\mu$ m のメンブランフィルターを通した細菌培養液では無効であったことならびにこの実験で示した抗生物質によって細菌の発育を停止させた時も形成刺激を示さなくなることより細菌そのものの増殖が必要であることを知った。この遊走子のう形成刺激は元来遊走子のうを形成する能力のある *Phytophthora* でなければ効果を示さず、さらに遊走子のうよりも卵胞子を形成し易い *Phytophthora* に対してはその形成促進として働く。また Fig. 3 に示した前培養日数の影響は暗黒下でも徐々にではあるが遊走子のう形成の過程が進んでいる事実(オートミール寒天培地上、暗黒下で 28°C におくと約2週間で遊走子のうの形成が始まる)からその影響とみるべきものであろう。こうしてみればこの刺激伝達には *Phytophthora* の側に遊走子のうを形成し易い条件が揃っている時ほど効果的である。

Fig. 2 を参照した時形成数のもっとも多い 32°C での遊走子のうの小型化が注意を惹く。28°C 以上での *P. capsici* の遊走子のうの小型化は照明下における通常の形成誘導でも同じように起こる。*P. capsici* の側からみれば形成適温は 28-30°C であるが、32°C は *Ps. riboflavina* の増殖適温であることによって形成数の最高値がえられたのであろう。

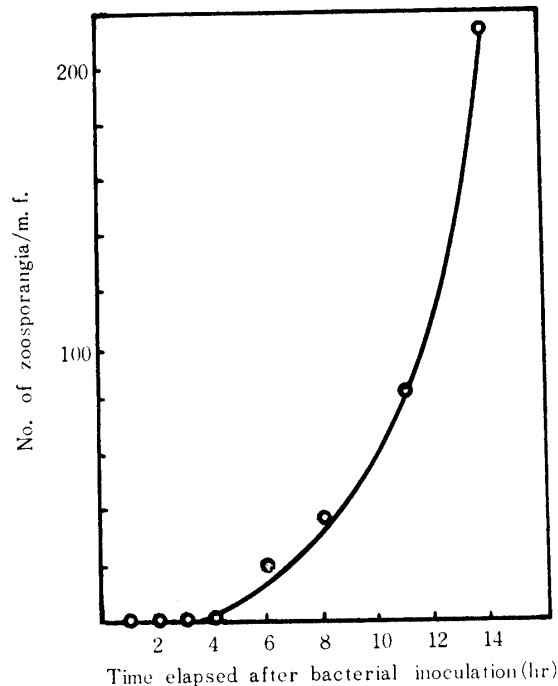


Fig. 6. Time effect of Viccillin addition on bacterial stimulation of the sporulation of *P. capsici*. The ordinate represents number of zoosporangia formed at 9 hr after each addition of Viccillin.

細菌の増殖を止めて形成刺激を除くためには ① *P. capsici* の発育を阻害せず ② その遊走子のう形成能力をも低下させず ③ 自らは遊走子のう形成促進効果を有さず ④ 形成促進効果を有する細菌を速やかに殺すか、その促進機能を停止させる 以上4条件を備えた薬物を選択する必要があった。ここに aminobenzyl penicillin (Viccillin) が選ばれたが Viccillin は 50 ppm で *Ps. riboflavina* の増殖を速やかに抑えることは図4より明らかである。これを *Ps. riboflavina* と *P. capsici* の接触後の時間を変えて添加した結果を示す Fig. 5 あるいはこの図に基いて作成した Fig. 6 (Viccillin 添下9時間後の各区の遊走子のう数)より考察すると、接触後4時間程度では刺激をとり去るとまた菌糸生育に戻ってしまうことが可能であるが、この時間以後最初の遊走子のうの出現する8時間目までの間にもはや栄養生長には戻れない過程に進入してしまうのであろう。

### 引用文献

- 1) Mehrlich, F. P. (1935) Nonsterile soil leachate stimulatory to zoosporangia production by *Phytophthora* sp., *Phytopathology*, **25**, 432-435.
- 2) Chee, K. H. and F. J. Newhook (1966) Rela-

- tionship of microorganisms to sporulation of *Phytophthora cinnamomi* Rands, N. Z. J1. agric. Res., **9**, 32-43.
- 3) Marx, D. H. and F. A. Haasis (1965) Induction of aseptical sporangial formation in *Phytophthora cinnamomi* by metabolic diffusates of soil microorganisms, Nature, Lond., **206** (4985), 673-674.
- 4) Zentmyer, G. A. (1965) Bacterial stimulation of sporangial production in *Phytophthora cinnamomi*, Science, **150** (3700), 1178-1179.
- 5) 正子 朔・桂 琦一 (1970) *Pseudomonas* sp. による *Phytophthora capsici* Leon. の遊走子のう形成刺激, 京都府大学報・農, **22**号, 17-26.
- 6) 正子 朔・桂 琦一 (1971) *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, 京都府大学報・農, **23**号, 39-45.

### Summary

The stimulatory effect of Pseudomonads on the sporulation of *P. capsici* and the inhibitory action of aminobenzyl penicillin on the bacteria without growth inhibition on *Phytophthora* were previously reported.

Among 14 species of Pseudomonads tested, *Ps. riboflavina* revealed the most active stimulatory effect on the sporulation of *P. capsici*. Sporulation by the bacterial stimulation did not occur at 16°C while number of zoosporangia increased at 28°C which is the optimum temperature for sporulation of the fungus. It came to maximum at 32°C

which is optimum for the bacterial multiplication.

Vicillin (aminobenzyl penicillin) was chosen to remove the bacterial stimulation by *Ps. riboflavina* because it satisfied the condition described above. At 50ppm Vicillin stopped the multiplication of *Ps. riboflavina* quickly and completely without inhibitory effect on *P. capsici*.

Until 4hr after the fungus had contacted with the bacteria, Vicillin of this concentration interrupted the bacterial stimulatory effect. But after that time it could not stop the sporulation process completely.