

Phytophthora capsici の遊走子の運動に関する研究 III

走 流 性

桂 琦 一・宮 田 善 雄

KIICHI KATSURA and YOSHIO MIYATA: Movements of zoospores
of *Phytophthora capsici* III Rheotaxis

摘要 *Phytophthora capsici* の遊走子の走流性に関する研究を行なった。

ガラス細管の先端より脱イオン水を静かに流出させる装置をつくり、遊走子けんだく液中に挿入して観察したところ、適当な流速のもとで、管口部に顕著な遊走子の集泳が起こった。これは明らかに遊走子が走流性を示したことを意味する。暗視野照明と照度計を組み合わせた測定法によりとらえた遊走子の集泳状態は、さきに報告した走電性や走化性の場合とほぼ同様の様相を呈し、流速が早い場合は特有の阻止帯の形成もみられた。遊走子が集泳を起こす位置は、管口から流出した水の流速が、遊走子の遊泳速度と等しくなる地点とよく一致し、したがって、管内流速がほぼ $130\mu/\text{sec}$ の場合、管口直前に顕著な集泳を起こすことがわかった。このことから、流水の刺激は遊走子の方向性に関与し、運動速度にはほとんど影響を及ぼさないものとする。遊走子が刺激として感ずる流速の最低限界は、明らかになしえなかったが、きわめてわずかな水の流れをも感知するようである。本病菌遊走子が走流性を有することは、降雨時に寄主植物体の上部から下部へ生じた雨水の流れに抗して、遊走子が植物体に到達し、あるいは、それを泳ぎ上る可能性を推察させ、植物疾病の伝播における1つの新たな機構を提起するようと思われる。

I 緒 言

Phytophthora capsici Leon. の遊走子けんだく液中に、各種植物体の実生根部を挿入して、顕微鏡下で観察すると、遊走子が植物体根部に向かって、泳ぎ集まってゆくのわかる^{5,7)}。これは本菌に限らず、広く植物病原菌の遊走子にみられる現象であり、遊走子が根に対してある種の走性を示したことを意味する^{1,3,4,10,11,17)}。*P. capsici* は土壤感染性病原菌に属し、ナス科およびウリ科作物を侵して、ときに甚大な被害を与えるものであるが、本病伝播の主体は遊走子であって、その遊走子のもつ走性は、伝染と密接な関係を有し、したがって、この走性のメカニズムを明らかにすることは、本病の疫学的見地から、きわめて大切なことと云えよう。このような観点から、著者らは、本菌遊走子の走性運動に関する研究に着手し、すでに、23の報告をなしたが^{6,7,8)}、さらに、本菌遊走子が、水の流れに抗して泳ぐ性質(走流性)にもとづくと思われる行動を示すことを観察したので、とくに、微小な水の流れをつくる装置を作製し、明らかに走流性を確認することができた。自由運動性生物の走流性については、すでにいくらかの報告はあるが^{2,12,13,15,16)}、菌

類遊走子のそれに関する知見は未だ見当らず、しかも降雨時を伝播の最好機とする疫病において、その病原菌遊走子が走流性を有することは、伝播機構上、興味ある問題を提起するようと思われるのでここに報告する。

II 材料、装置ならびに方法

本研究室保存の *P. capsici* 第65号菌を、ナスまたはキュウリ果実上に接種し、形成された遊走子のうより遊走子を泳出させて供試した⁹⁾。また、顕微鏡観察には、小室を有する特別のスライドグラス^{6,8)}を使用した。

走流性を確かめるために、ガラス細管を通して小さな水の流れをつくる装置を作製した。すなわち、ガラスシリンダー(内径28mm、長さ45mm)の下端を細く伸ばして、ビニール管を接続し、その先にガラス細管(開口部内径0.1~0.5mm)をとりつけた。さらに、シリンダーは垂直に、ガラス細管は水平になるように顕微鏡ステージに固定した。ここにおける顕微鏡は観察のためではなく、ミクロメニピュレーターに似た操作のために使用した。すなわち、上下微動装置と十字微動装置を適当に操作することにより、観察用スライ

ドグラス上の遊走子けんだく液中の任意の位置に、ガラス細管々口部を挿入することができる。ガラス細管より流出する水の速さを調節するために、ビニール連絡管の2個所にピンチコックをとりつけた。以上の装置は図版1, 2, 3に示すとおりである。照度計を用いて遊走子の集泳状態をとらえる方法については、すでに報告⁶⁾したが、この方法を行なうためには、観察用スライドグラスとガラス細管を同時に移動させる必要があり、別に第1図のような装置も作製し使用した。

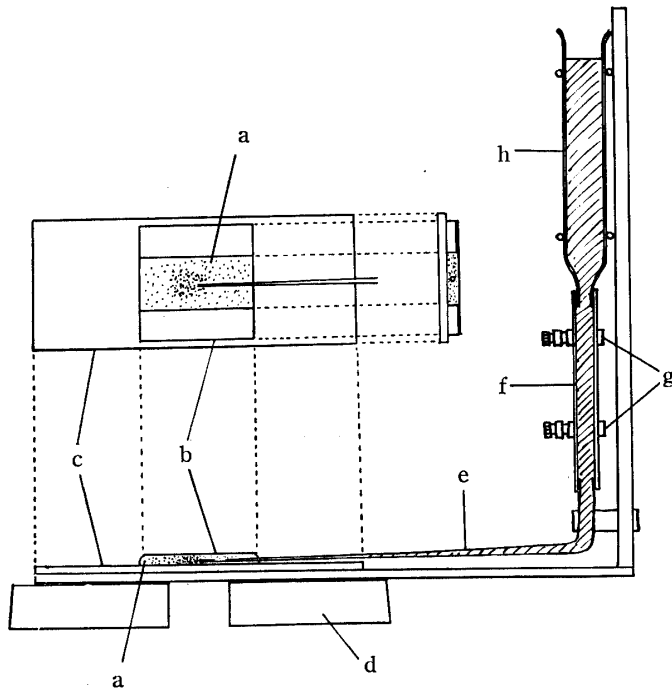


Fig. 1 Apparatus for observing rheotactic aggregation of zoospores

- a: specimen cell containing zoospore suspension
 b: cover glass, c: glass slide,
 d: stage of microscope, e: glass capillary tube,
 f: vinyl tube, g: pinch cock,
 h: glass cylinder filled with deionized water

管口より流出する水の速さを求めるために、暗視野照明下において、水中に浮遊する微粒子の速さを直接または間接的に測定する方法をとった。とくに必要な場合は、少量の *Staphylococcus* をけんだくし、滅菌して使用した。直接測定とは一定倍率のもとで、接眼ミクロメーターの一定目盛区間を粒子が通過するに要する時間をストップウォッチで測る方法であり、間接測定とはモノクロームフィルム（ネオパン SSS）を用いて一定露光時間の撮影を行ない、粒子の軌跡の長さより粒子の移動速度、すなわち水の流速を求める方法である。

なお、ガラス細管内においては、水の流れる速さが管壁部と中央部で異なり、いわゆる“Parabolic velo-

city gradient”を起す。これは管壁のまさつと水の粘性にもとづくものであって不可避の現象であるが、一応、流速は常に管の中央部において求めることにした。

暗視野照明には、既報^{6,8)}と同様に特別のコンデンサーは用いず、ニコン干渉位相差顕微鏡装置の輪状しぼり (Diaphragm, $\times 100$) を使用した。この場合、完全な暗視野照明は得られないが、かえって、焦点深度が比較的深く、1.5mmの厚さの水層中の遊走子の行動を広く観察するのに好都合であった。

III 結 果

1. 遊走子の走流性

シリンダー部に脱イオン水を満たし、2個のピンチコックを適当に調節して、ガラス細管々口部より水をゆっくりと流出させ、観察用スライドグラス上の遊走子けんだく液中に挿入した。コックをさらに微細に加減して適度な流速に達したとき、図版5にみるように顕著な集泳現象を起こした。管口に集泳する遊走子の行動は、先の走化性現象の場合⁶⁾とほとんど変わりはないようであるが、ある程度の集泳状態にまで達する時間が、走化性の場合より遅いこと、および、遊走子の集積 (cluster) の形成が起こらない点が異なる。遊走子の集泳状態は、管口の太さ、管口の位置、流速および遊走子けんだく液の濃度などにより、微妙に変化するが、概して、遊走子濃度が濃く、管口が細いほど著しい集泳が起こるようであった。

2. 走流性にもとづく遊走子の集泳状態

管口より流出する水の速さが適当な場合、図版5にみるような管口部への著しい集泳が起こり、流速が早すぎる場合は、遊走子は管口遠く押し流され、その中間の流速の場合は、図版6に示すように管口と遊走子の集泳位置との間に空白地帯を生じた。これは先に報告した走電性や走化性における阻止帯^{6,7,8)}に相当するものであろう。暗視野照明法と照度計を組合わせた方法⁸⁾を用いて、管口に集泳した場合 (曲線A) と、阻止帯を形成した場合 (曲線B) との遊走子の集泳状態をとらえ、グラフに表わした (第2図)。Aの管口直前に集まった遊走子の濃度は、別に求めた較正曲線⁸⁾より、約 1.7×10^6 個/ml、また、Bの集泳部においては 0.9×10^6 個/ml 程度であり、それぞれ定常域の遊走子濃度 (4.5×10^5 個/ml) の約4倍および2倍の集泳が起こっていたことがわかる。また、集泳域は、Aにおいて管口直前より1.

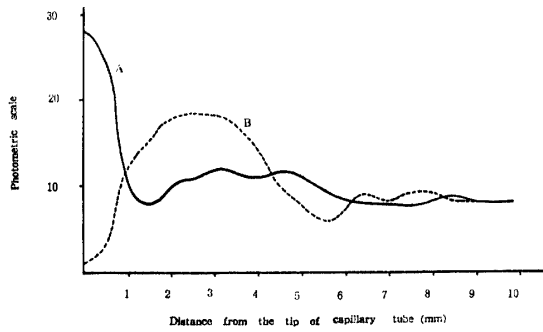


Fig. 2. Zoospore aggregation in water current

A : Aggregation of zoospores was occurred at tip of capillary tube.

B : Repulsion zone was formed at 1 mm distant from the tip of the tube.

* See the previous paper⁹⁾.

mm まで、Bにおいては1 mm より4.5mm の範囲にあった。

3. 管内流速と遊走子の集泳位置

ガラス細管より種々の速さで脱イオン水を流出させ、管内における流速を直接的に測定し、同時に管口から遊走子の集泳が起こっている位置までの距離を測定し、両者の関係を求めた(第3図)。これによると、

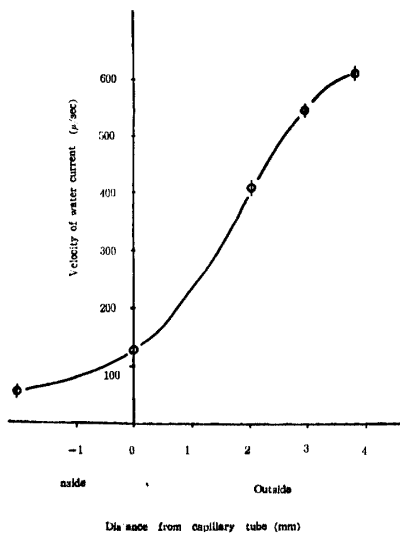


Fig. 3 Velocity of water current at the tip of capillary tube and top positions of aggregating zoospores

Marks (φ) show the top positions of aggregating zoospores

管内流速が600および400 μ /sec の場合、遊走子はそれぞれ管口より350および200 μ の位置に集泳を起こし、流速が100~150 μ /sec の場合、遊走子は管口に集泳した。別に求めた遊走子の遊泳速度は130~140 μ /sec (20°C)であるから、遊走子の速度と流速とが等しい場合遊走子はガラス管口に集泳を起こすことがわかる。もちろん、流速が遊泳速度より遅い場合は、遊走子は管内にまで泳ぎ込んだ。

4. 流速分布と遊走子の集泳位置

ガラス細管々口部より流出した水は、次第に速度を減じつつ八方に拡散する。管口部附近では、この流れによって対流を生じ(図版4)、遊走子是对流に流されあるいは逆らって遊泳し、様々の集泳模様を呈する。先の実験で管内流速と遊走子の集泳位置の関係を求めたが、流速が遊走子の遊泳速度を上まわる場合の遊走子の集泳位置は、管口より流出した水が次第に低下して、ちょうど、遊走子の速度と一致するようになった地点であるはずである。そこで、管口より流出した水速度分布を間接法により測定し、同時に、それぞれの場合の遊走子の集泳部最先端の位置を求めた。管口より流出した水速度は、縦軸に流速、横軸に管口よりの距離をとると、第4図のような曲線を示

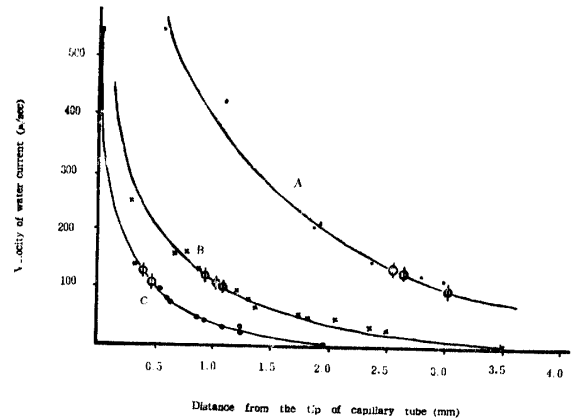


Fig. 4 Decrease of velocity of current with distance from the tip of capillary tube and the top positions of aggregating zoospores

Marks (φ) show the top positions of aggregating zoospores

して漸減する。直接測定により、Cの場合の管内流速は550 μ /secであったが、AおよびBは流速が早すぎて測定不可能であった。各管内流速に対して遊走子の集泳部最先端の位置は、図上にφの記号により示してあるが、予想どおり、流速が100~130 μ /secに低下する地点であった。

5. 走性の刺激としての流速

これまでの結果より、走流性において遊走子の集泳を起こす位置は、流速と遊走子速度の一致する地点であることがわかったが、それでは、遊走子が刺激として感知し走性を示すに要する最低限界速度はどの程度であろうか。

第2図の曲線Bにおいて、遊走子の集泳が再び減少して、定常域とほぼ等しくなるのは、管口より4.5~5.0mmの距離の所であり、一応、この地点が刺激の及ぶ最外域であると考えられる。このとき集泳部最先端は、管口より約1 mmの位置にあるから、第4図に

において曲線Bがそれにあたる。しかし、Bでは約3～3.5mmの位置で、すでに流速はほぼ0に近い値をとる。したがって、現在著者らの行なっている方法では測定不可能なほど極くわずかな速度の水の流れをも、遊走子は刺激として感じて行動するものと思われるがそれを明確にするためには、より精巧な水流装置並びに流速測定法を必要とする。

IV 考 察

自由運動性の遊泳生物の走流性に関しては、すでにいくつかの報告がある。例えば、変形菌類の変形体は水の流れ落ちるろ紙片をはい上り、正の走流性を示す¹⁵⁾。また、川をさかのぼる魚の走流性については、その要因分析まで進んでいる¹⁵⁾。ミジンコやエビ類の幼生のそれに関する報告もある^{13,14)}。しかしながら、もっともよく研究されているのは、哺乳類の精子についてであり、これは、精子の走流性と受精現象の関連性が、多くの研究者の興味を喚起したことによるらしい。とくに近年の研究では、Walton¹²⁾は、ウシの精子が生死いずれのものも、ほとんど同様に流れに対して逆向きの姿勢を保つことから、これが精子の独特の体形(頭部と尾部)にもとづく慣性の結果であると考えたのに対し、Bretherton および Rothschild²⁾は、生きた精子(ウシ、その他)は正の走流性を有するが、死んだ精子は、流れの上部と下部で逆の方向性を示すことを観察して、さらに粘性をも考慮に入れるべきであると述べた。著者らの実験装置において、ガラス細管々口部から流れ出る小さな水の流れに対して、遊走子の顕著な集泳を認めたことは、明らかに本菌遊走子もまた走流性を有することを証明するものであろう。同じ走流性といっても、魚やミジンコの類と精子とでは、機構もかなり違うはずであり、本菌遊走子の場合には、むしろ、精子に類似の機構をもつと考えられる。実際、走電性に関する研究結果⁶⁾は、多くの点で両者に一致がみられた。しかしながら、本菌遊走子は体形的に精子と異なり、体側より2本の鞭毛を出し、1本は前方に、他の1本は後方にのばした形で遊泳しているので、Waltonらの慣性力や、Brethertonらの粘性にもとづく“Parabolic velocity gradient”説では、説明がかなり困難になるのではないかと。変形体、精子、菌類遊走子は鞭毛の有無の違いはあるが、いずれも単細胞生物体であって、それらが示す走流性はすべて同じ機構によるとは考えられないにしても、基本的には多くの点で共通するところがあるに違いない。そうだとすれば、走流性現象において、流水を刺激と感じて方向づけが起こるのは、鞭毛ではなく本体であって、鞭毛はただ本体を単に前進させていることになろう。

ただし、遊走子の運動を観察していると、明らかに鞭毛が異物に触れたために、方向転換を起こすことがしばしばあって、鞭毛が方向性に関与しないとは云いきれない。結局、走流性の機構を明らかにするのは今後の課題ということになる。なお、流速の刺激に感応した遊走子が集泳を起こすのは、流速がちょうど遊泳速度と一致する地点であることは、遊走子が水流という刺激を受けて方向性を獲得することが、走流性の起こる理由であって、遊泳速度は影響を受けないことを表わしており、Yamane および Ito¹⁶⁾のウマの精子が流れの刺激をうけて遊泳速度が促進されたという知見と結果を異にする。

本病は主として降雨と共に伝播され、まん延するのであるが、その過程にはいくつかの段階が考えられる。すなわち、降雨によって生じた水中において、まず、遊走子のうより遊走子が泳出し、雨水と共に押し流され、広域への伝搬が起こる。ついで、寄生植物への到達であるが、この場合、雨水の流れに乗って偶然植物体に達することであろうし、雨滴のはねあがりと共に寄主植物の葉、その他地上部分に附着することであろう。本病やべと病の多くが下葉の裏面から発生しやすいことは、それを十分に裏づけるものである。これらはいずれも受動的であるが、ここに遊走子の走流性にもとづいて、能動的到達の新たな可能性が考えられる。寄主植物体上に落下した雨滴は、基部に向かって流れを生ずるが、とくに雨後は、その流れも次第に緩慢となり、流速が遊走子の遊泳速度を下まわった時遊走子は走流性を発現して、地面より茎の基部へ、あるいは、植物体の下部から上部へ泳ぎ上り、そこでシストして侵入を開始する可能性である。これは疫病菌のみならず、ピミウム病菌やべと病菌など多くの自由運動性細胞の時代を有する植物病原菌の伝播上にも同様に考えられることであり、新たに1つの植物疾病伝播機構を提起するものであると思うが、その実証は今後に残されている。

引用文献

1. 赤井重恭・福富雅夫(1964): 病害虫発生予察特報 17: 47-54.
2. Bretherton, F. P. & L. Rothschild(1961), Proc. Roy. Soc. Ser. B 153: 409-502.
3. Cunningham, J. L. & D. J. Hagedorn(1962): Phytopathol. 52: 616-618.
4. Dukes, P. D. & J. L. Apple (1961): Phytopathol. 51: 195-197.
5. 桂 琦一・細見忠男(1963): 京都府大学報・農15: 27-32.

6. 桂 琦一・正子 朔・宮田善雄(1966): 日植病報 32: 215-222.
7. 桂 琦一・宮田善雄(1966): 日植病報30: 296(講要).
8. 桂 琦一・宮田善雄・宮越 盈(1966): 日植病報 (投稿中).
9. 正子 朔・桂 琦一・宮田善雄(1965): 日植病報 関西支部会講要集 P. 98-110.
10. Royle, D. J. & C. J. Hickman (1963): Can. J. Microbiol. 10: 151-162.
11. 遠山 明・高津 覚(1964): 病害虫発生予察特報 17: 74-80.
12. Walton, A. (1952): J. Exp. Biol. 29: 520-531.
13. Wantier, J. (1959): Bull. Mens. Soc. Linn. Lyon. 19 (8): 186-188.
14. ———(1959), ibid. 19 (9): 199-201.
15. 山田常雄・他(1960): 岩波生物学辞典, 東京, 613 P
16. Yamane, J. & T. Ito.(1932): Cytologia, Tokyo. 3: 188-199.
17. Zentmyer, G. A. (1961): Science 133: 1595-1596.

Summary

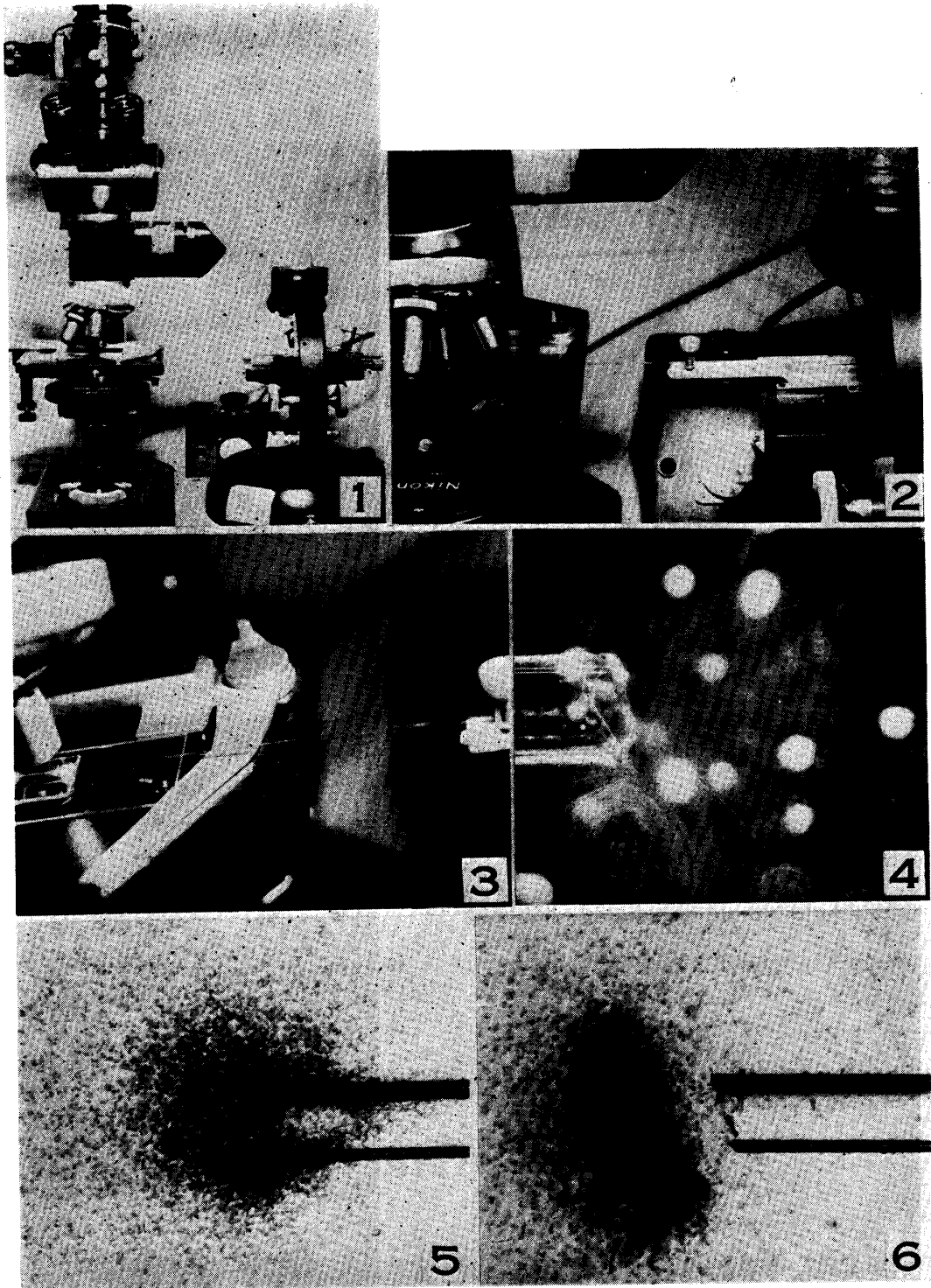
Rheotaxis of zoospores of *Phytophthora capsici* Leon. was described in this paper.

The apparatus for generating microcurrent of deionized water through a glass capillary tube was prepared. Specimen cell for microscopic observation was devised by combining glass slide with cover glass.

When the tip of capillary tube was introduced into the specimen cell containing zoospore suspension, massive aggregation of zoospores at the tip of the tube was obviously observed under the dark ground illumination of Nikon phase contrast microscope. The velocity of water current at the tip of the capillary tube was about $130\mu/\text{sec}$, and nearly equal to the swimming velocity of zoospores. Increasing the velocity of current at the tip of the tube slightly, repulsion zone was formed as in that

of electro taxis and chemotaxis reported previously, and zoospores swam to aggregate around the zone. Repeated measurements indicated that the velocity of water current at the circumference of repulsion zone was about $130\mu/\text{sec}$. These results suggest that the rate of movement of zoospores is independent of the velocity of the current, and rheotaxis of zoospores is merely a phenomenon of orientation. The minimum velocity of water current as a stimulus for rheotaxis might be presumably too slow to detect by the measurements in this experiment.

Rheotaxis of zoospores offers a insight to the process of spread of the pathogenic fungi, i. e. zoospores might be capable of swimming up along the stems of host plants against the water current after rainfall.



- 1: Apparatus for observing rheotaxis of zoospores
- 2: Close-up photography of the apparatus
- 3: Glass capillary tube introduced into specimen cell on microscopic stage
- 4: Pattern of water current around the tip of capillary tube (photographed under dark ground illumination)
- 5: Massive aggregation of zoospores at the mouth of capillary tube
- 6: Repulsion zone formation between the tip of capillary tube and the aggregation zone of zoospores