

キュウリジュース遠沈上清液で培養した *Phytophthora capsici* の異常遊走子嚢

宮田善雄・桂 琦一

YOSHIO MIYATA and KIICHI KATSURA: Morphology of
abnormal zoosporangium of *Phytophthora capsici* cultured
in the supernatant of cucumber juice

要旨：キュウリジュースの遠沈上清液で培養した *Phytophthora capsici* の菌叢上に形成される遊走子嚢は、遊走子型発芽を行なうことのできない異常遊走子嚢である。この際、菌体乾重や遊走子嚢形成数は、キュウリジュースの場合と比較して、それほど劣ってはいない。これらの異常遊走子嚢と、キュウリジュースで培養した場合の典型的遊走子型発芽を行なう遊走子嚢について形式的比較を行なってみた。異常遊走子嚢は概してやや小さく丸型のものが多いが、外部形態的には、それほど大きな差異は認め難い。内部形態的特徴のひとつは、単位膜に包まれ、内部に様々の小胞や顆粒を充満したがらくた胞の存在である。この胞嚢の大きく発達したものは光学顕微鏡レベルにおいても十分に認められる。同時に、正常な遊走子嚢にはゴルジ装置と、それを中心に発達した小胞の集団が散在しているのに対し、異常遊走子嚢ではそのような構造が認められない。さらに、発芽時の形態的特徴をみると、原形質は個々の遊走子への分割を起こさず、そのまま全体が外へ飛出す原形質型発芽をとることである。そこでこれらの事実から次の仮説を立ててみた。すなわち、正常な遊走子嚢ではゴルジ装置の働きによって膜形成が進行して、遊走子への分割が起こり、典型的な遊走子型発芽が行なわれるのに対し、異常遊走子嚢では、何らかの原因によりゴルジ装置は未発達で、ときには、空胞中に取込まれて、がらくた胞となり、分割が起こらないために、原形質型発芽を行なうことになるのではなかろうか。

I 緒 言

Phytophthora capsici Leon. の遊走子の研究に必要な遊走子嚢を多量に得るために開発した紙蓋培養法においては、キュウリジュースが培地として好適である¹¹⁾。ところが、このキュウリジュースは加熱すると沈澱を生ずるので、それを取除く目的で、遠沈処理を行ない、その上清液を用いて培養してみたところ、形成された遊走子嚢が遊走子型発芽（間接発芽）を行なわないことを知った。その後、遠沈残渣の分析により、キュウリに含まれるステロールが、遊走子型発芽に必要な物質であることが判明した^{9, 10)}。調べてみると、Hendrix (1965)⁹⁾ は2, 3の *Phytophthora* について、これと同様の現象に関する記載を残しており、Lilly (1966)¹⁰⁾ もこれに若干の補足を述べているものの、その後の追究はあまりなされていない。筆者らが今まで行ってきた生化学的手法によるこの遊走子嚢の遊走子型発芽とステロールの関係についての研

究は別に報告を予定しているので、ここでは、遊走子型発芽を行なう遊走子嚢と、それを行なえない異常遊走子嚢の形態的比較について報告することにする。

II 材料ならびに方法

供試菌は従来と同じ *Phytophthora capsici* No.65 (京都府立大学保存菌) である。

供試培地は、市販のキュウリ果実をミキサーで粉碎しガーゼ2枚に包んでしぼり、脱イオン水を等量加えたのち10分間煮沸し、再びミキサーで攪拌したものの（キュウリジュースと呼ぶ）と、その遠沈上清液（10,000rpm, 15分間）の2種類で、培養方法ならびに遊走子嚢形成方法は前報¹¹⁾ 通りであるので省略する。

光学顕微鏡観察はニコン位相差顕微鏡を用い、対物レンズは BM タイプと DLL タイプを使用した。

電子顕微鏡観察においては、試料を2.5% glutar-

aldehyde (りん酸緩衝液, pH 7.2, 0.25 M しょ糖) で前固定, 2% O_3O_4 (りん酸緩衝液 pH 7.2) で後固定ののち, 5% 寒天に埋め, エタノール・アセトン系で脱水処理し, エポキシ樹脂 (エポン812) に包埋したものを, ガラスナイフで超薄切片となし, 必要に応じて酢酸鉛または酢酸ウラニウムで電子染色をほどこした。電子顕微鏡は日本電子製 100B 型を使用した。

III 結 果

1. 菌体量, 遊走子嚢形成数および遊走子型発芽指数の比較

キュウリジュースと, その遠沈上清液の場合の, 28°C 1週間後の培養菌体量, 遊走子嚢形成数, および, 遊走子型発芽を示す指数としての遊走子嚢当りの遊走子数は, それぞれ, 次表に示す通りである。菌体量と遊走子嚢形成数はともに遠沈上清液の場合の方がやや劣るが大きな差異ではない。遊走子嚢当りの遊走子数すなわち, 遊走子型発芽指数はジュースの場合 4.6, 遠沈上清液の場合 0 であった。

2. 外部形態的比較

キュウリジュース培地の場合の遊走子嚢に比較して遠沈上清液培地の場合の異常遊走子嚢はやや小さくて丸型のものが多い。それぞれの遊走子嚢の大きさ(長径)と, 長径短径比の測定値(40個平均)を表に挙げているが, それらはこの観察とも一致している。また, 異常遊走子嚢は一般に乳頭突起の未発達なものが幾分多い。図版 2-A, B は, これらの形態的特徴を示している。

Table 1. Some characteristics of *P. capsici* cultured in cucumber juice or the supernatant

	Cucumber the juice	the supernatant
Dry weight of myceria(mg)	156	111
Number of zoosporangia	395×10^4	151×10^4
Long. diameter of zoosporangium (μ)	30.7	27.3
Long./Lati. diam. of sporangium	1.60	1.37
Zoospores/Zoosporangia	4.6	0

3. 内部形態的比較

1) 光学顕微鏡レベルにおける比較

遊走子嚢と異常遊走子嚢の内部形態的比較において気付いた顕著な特徴は, 異常遊走子嚢中にある 1~数個の大きな空胞様の胞のうである。これは位相差顕微鏡, とくに明視野型 (BM 型) のレンズを用いて観察

すると, 明瞭に認めることができる。図版 2-B, C, D はそれを示している。この胞嚢は, キュウリジュース培地の場合の遊走子嚢中にも幾つか認められるが, これの存在する遊走子嚢は, 遊走子型発芽を起こすことがないようである。

2) 電子顕微鏡レベルにおける比較

電子顕微鏡を用いて観察した遊走子嚢の微細構造は一般に, 多核で, クリステのよく発達したミトコンドリアに富み, 電子密度の高い脂質顆粒や, ライソゾームあるいはファゴゾームに相当すると思われる多数の胞嚢, および未知の小胞や顆粒に満たされ, ER がそれらの間をぬって走っている (図版 3 参照)。また, 鞭毛も多数散見される。これらについてはすでに詳しい報告^{4, 14, 16, 17)} がなされており, かつ, 両遊走子嚢においてほとんど差異がないのでここで多くを述べる必要はない。

異常遊走子嚢における特徴のひとつは, 図版 4A に示す中央の大きな胞嚢で, 図版 4-B, C はその拡大であるが, この胞嚢は単位膜から成り, 内部に様々な形の胞や顆粒を充満している。また, これと同様の構造をもつた小型の胞嚢があちこち散在していることから, これらが次第に融合して大型のものに発達するものと推察される。前述の光学顕微鏡観察における空胞様の胞嚢はこれに相当するものと思われる。この胞嚢をがらくた胞 (Rubbish vacuole) と呼ぶことにする。

もう一つの特徴は, 正常な遊走子嚢の核の近辺に見られるゴルジ装置と, それを中心に発達する小胞の集団 (図版 5) が, 異常遊走子嚢中では認め難いことである。

4. 発芽時における形態的比較

正常な遊走子嚢においては, 遊走子への分割が起こるのち, 典型的な遊走子型発芽 (Zoospore-type germination) が行なわれる (図版 1A)。異常遊走子嚢では, その分割が起こらず, 図版 1B に示すように, 大きな原形質塊のまま外部に飛出してゆくことが多い。筆者らは, これを図版 1C の原形質吐出 (Plasmoptysis) と区別して原形質型発芽 (Plasma-type germination) と称している。この原形質型発芽時の様相は, 遊走子型発芽の場合と根本的には酷似していることから, 異常遊走子嚢が遊走子嚢と異なる点は, 遊走子に分割し得るかどうかであって, 遊走子型発芽のメカニズム上の欠損ではないように思われる。

IV 考 察

キュウリジュースで培養した場合, 形成された遊走子嚢は遊走子型発芽を行ない得るのに, その遠沈上清

液を培地とした場合は遊走子囊は遊走子を生ずることができないことから、遠沈残渣の中に遊走子型発芽を左右する物質が存在するものと考え、遠沈残渣の分析を進めそれがキュウリに存在するステロールであることをつきとめた。その研究過程はすでに学会にて報告^{8, 9, 10, 12, 13)}してきたが、それらの研究の詳細や Hendrix (1965)⁹⁾ および Lilly (1966)⁷⁾ の研究との関連性、あるいは、広く菌類の形態形成とステロールの関係を追究した数々の知見^{14, 15)} との関係などについては別に投稿準備中であるので、ここでは省略し、キュウリ遠沈上清培地、つまり、ステロールを欠く培地で培養した菌体によって形成された、遊走子型発芽を行ない得ない異常遊走子囊の形態的特徴についてここに報告した。

異常遊走子囊の外部形態の特徴として挙げた諸点はあまり重要なものではない。なぜなら、遊走子型発芽を行ない得る遊走子囊の中にも、小型で丸く乳頭突起の顕著でないものもあるし、また逆に、異常遊走子囊の中にも乳頭突起が顕著で整ったレモン型のものが存在するからである。

内部微細構造にみられた特徴、すなわち、内部に多くの小胞と顆粒を充満するがらくた胞の存在と、ゴルジ装置の未発達は重要な意味をもっているように思える。つまり、発芽時の形態的比較の項で述べたように、異常遊走子囊が遊走子型発芽を行なえない理由は、発芽機構の欠陥ではなくて、遊走子への分割が起こらないことにあるらしい。ここで、遊走子囊中において、遊走子への分割、すなわち、割溝 (cleavage) の形成は、割溝胞が配列し融合することによって起こるとされる^{4, 16)}ことと、多くの胞囊がゴルジ小胞に由来することが多いこと⁹⁾を考え合わせるとき、ゴルジ装置を欠く異常遊走子囊が遊走子に分割できないことの説明がつく。さらに、筆者らが、がらくた胞と名付けた特異的な胞囊の内部形態は、甲状腺を除去したラットの甲状腺刺激細胞に生ずる変形ゴルジ装置の形態⁶⁾に酷似していること、および、ゴルジ前物質は中性赤で染まり易い (生物学辞典、岩波、359頁) とされるが、実際がらくた胞が中性赤でよく染色されたことを考え合わせるとき、この胞囊はゴルジ装置の変性したものか、まだ未発達のものを取込んだ空胞の一種である可能性もでてくる。これらのことから次のような仮説を立てた。『正常な遊走子囊では、ゴルジ装置の働きによって膜形成が進行して、遊走子の分割が起こり、典型的な遊走子型発芽が行なわれるが、異常遊走

子囊では、何らかの原因により、ゴルジ装置が未発達で、ときには、空胞中に取込まれてがらくた胞となり、そのために、原形質は分割しない状態で外部に飛出し、外形質型発芽を示すことになるのではなかろうか。』

引用文献

- 1) Gottlieb, D. (1970) : Morphological and biochemical events in plant-parasite interaction. ed. by Akai and Ouchi, Phytopathol. Soc. Japan, Tokyo : 153—179.
- 2) Hendrix, J. W. (1965) : Phytopathol. **55** : 790—797.
- 3) ——— (1970) : Ann. Rev. Phytopathol. **8** : 111—130.
- 4) Hohl, H. R. and S. T. Hamamoto (1967) : Am. J. Bot. **54** : 1131—1139.
- 5) Katsura, K. and Y. Miyata (1971) : Morphological and biochemical events in plant-parasite interaction. ed. by Akai and Ouchi, Phytopathol. Soc. Japan, Tokyo : 107—128.
- 6) 黒住一昌 (1970) : 細胞 **2**(10) : 2—14.
- 7) Lilly, V. G. (1966) : The fungus spore, ed. by Madelins, M. F., Butterworths, London : 259—271.
- 8) 宮田善雄・桂 琦一・三谷隆彦 (1969) : 日植病報 **35** : 96—97 (講要).
- 9) ———・桂 琦一・渡辺健三 (1969) : 日植病報 **35** : 377 (講要).
- 10) ———・桂 琦一・渡辺健三 (1970) : 日本植物生理学会講要集 : 27.
- 11) ———・桂 琦一・室川嗣夫 (1970) : 京府大学報・農 **22** : 27—30.
- 12) ———・桂 琦一・野田万次郎・谷 利一・吉川正明 (1971) : 日植病報 **37** : 384—385 (講要).
- 13) ———・桂 琦一・石井英夫 (1972) : 日本植物病理学会講要集 : 95.
- 14) 向 秀夫・黄金池 (1972) : 日本植物病理学会講要集 : 38.
- 15) 鈴木郁男 (1970) : 細胞 **2**(10) : 15—27.
- 16) Williams, W. T. (1968) : Can. J. Bot. **48** : 221—227.
- 17) 山本昌木・他 (1972) : 日本植物病理学会講要集 : 37.

Explanation of plates

Plate I

Photo. 1. Three types of plasma liberation from zoosporangium of *Phytophthora capsici*.

A: Zoospore-type germination

B: Plasma-type germination

C: Plasmoptysis

Photo. 2. Normal and abnormal zoosporangia under phase contrast microscope.

A: Normal zoosporangia produced by the myceria grown in cucumber juice medium.

B, C, D: Abnormal zoosporangia produced by the myceria grown in the supernatant of cucumber juice. The large vacuole ("Rubbish vacuole") situated in the center of sporangia are noticeable.

Plate II

Photo. 3. Fine structure of cytoplasm of zoosporangium.

N: nucleus M: mitochondrion ER: endoplasmic reticulum L: lysosome

P: phagosome LP: lipid body

Plate III

Photo. 4. Large vacuoles containing multiple vesicles and granules in the cytoplasm of abnormal zoosporangia. The large vacuole was proposed to be termed "Rubbish vacuole".

Plate IV

Photo. 5. Fine structure of Golgi apparatus and neighboring vesicle colony situated near nucleus in the cytoplasm of zoosporangium.

G: Golgi apparatus Pa: papilla

VC: vesicle colony

Summary

Abnormal zoosporangia of *Phytophthora capsici* formed on the mycerial mat cultured in the supernatant of cucumber juice can not liberate zoospores. This phenomenon is caused by lack of sterols, β -sitosterol and stigmasterol for example, in the supernatant, and similar observations were reported by Hendrix (1965) and Lilly (1966). Morphological comparisons between normal zoosporangium in the cucumber juice and abnormal one in the supernatant were reported in this paper.

On the external morphology, there were generally more numbers of abnormal zoosporangia, slightly small, spherical or without papilla, than those of normal ones. But these morphological characteristics are estimated to have little significance for the reason that abnormal sporangium can not liberate zoospores. On the internal morphology, three notable distinctions between normal sporangium and abnormal one. At the first distinction, one or a few

peculiar vacuoles (proposed as rubbish vacuoles) covered with a unit membrane, containing numerous vesicles and granules were electron-microscopically observed in abnormal zoosporangium. The second distinction was that Golgi apparatus which were popular in normal sporangium were hardly detected in abnormal one. On the third distinct point, protoplasma of abnormal sporangium never divided to individual zoospores. Additionally it is characterized on the germinating mode of zoosporangium that release of a plasma sphere from abnormal sporangium (proposed as plasma-type germination) was noticeable in the contrast to that of zoospores from normal one (zoospore-type germination).

It is inferred from those observations that there is some correlation between the failure in protoplasmic division of abnormal zoosporangium and the undeveloped Golgi apparatus.







