

# 水耕ミツバの *Pythium* 根ぐされ病

## II. 病原菌の微細構造

宮田善雄・山岡直人・正子 朔

YOSHIO MIYATA, NAOTO YAMAOKA and HAJIME MASAGO

Root rot of Mitsuba (*Cryptotaenia japonica* Hassk.) caused by *Pythium* sp.

II. Fine structure of the pathogen cultured with or without sterol.

**要旨:** ミツバ根ぐされ病菌 *Pythium* sp. (CCR-76) は、糸状遊走子嚢を形成するタイプに属し、遊走子形成に際しては、まず、やや細い菌糸状の逸出管を伸ばし、その先端から、球嚢と呼ばれるプラズモディウムが放出され、その後、個々の遊走子への分割が起こる。この過程の進行には、*Phytophthora* と同様にステロールが重要な役割をはたしている。このステロールを培地に添加する際、従来、アセトンを溶媒として用いていたが、非イオン系界面活性剤 Tween 80 を用いることを検討した。Tween 80 は菌体生育に供試の範囲内では全く影響がないので、この方法により、培養中に任意にステロールの添加が可能となった。本菌の場合、0.1mg/ml の  $\beta$ -シトステロールの1時間の取込みで、すでにかかなりの遊走子形成能が獲得される。本菌では普通の菌糸と遊走子嚢の区別がつきにくい、微細構造から判断して、液胞（内部は薄い均一な海綿状構造がみられる。次第に融合して大型に発達する）を多く含むものが普通の菌糸であり、小胞（おそらく、ライソゾームやファゴゾームならびに遊走子の細胞膜形成に関与するもの）を多数含むものが遊走子嚢と思われ、この様相は、*Phytophthora* のそれに酷似している。水浸3~4時間後には、プラズモディウムが観察され、核は顕著となり、鞭毛の形成が認められる。その後、核を中心として、1個の遊走子に相当する細胞質の周囲に小胞が配列して、次第に融合しながら個々の遊走子に分れてゆくものと思われる。ステロール欠の菌体ではこれらの過程はみられない。またこの頃、細胞壁内面に長いひも状の小胞により充満された胞嚢が残されたままの空の菌糸（逸出管と思われる）がよく認められる。このひも状小胞は二重膜で構造され、マカロニ状である。この小胞を含んだ胞嚢（小胞嚢と呼んでいる）の機能は不明であるが、ステロール含有菌体に顕著であり、プラズモディウムの放出に関与している可能性が推測される。

## I 緒 言

ミツバ根ぐされ病菌 *Pythium* sp. (CCR-76) は糸状の遊走子嚢を形成するグループに属し、その発芽に際しては、まず、逸出管が伸長し、その先端から球嚢が放出され、さらに、その原形質塊が多数の細胞に分割して、遊走子となって発芽してゆく。この発芽機構には *Phytophthora* と同様にステロールが重要な役

割を演じていることがわかった。このことは、筆者らが *P. capsici* を用いて追求している遊走子嚢の遊走型発芽とステロールの関係について、別の角度から検討を加えるための好材料であり得ると共に、本菌が *P. capsici* のように、特別に遊走子嚢を形成させるための培養を必要としないことは、ある意味で非常に有利である。ここでは、従来、ステロール添加に用いていたアセトン法にかえて、界面活性剤 Tween 80 を

京都府立大学農学部植物病理学研究室

Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto, Japan.

昭和52年7月29日受理

用いる方法を検討すると共に、ステロールを添加した培地と、無添加培地上で培養した菌体について、遊走子形成過程を追って、微細構造の観察を行ない、若干の知見を得たので報告する。

## II 材料ならびに方法

供試菌はミツバ罹病根より分離した *Pythium* sp. (CCR-76)<sup>4)</sup> を用いた。まず、アスパラギン・グルコース寒天培地<sup>1)</sup> 上で、28°C、3日間培養した菌叢を、直径5mmのステンレスパイプで打抜いて移植源とした。本菌の実験用の培養は200mlのコニカルビーカーに、キュウリジュース遠沈上清培地<sup>5)</sup> (以下 SCJ 培地と略) を20ml ずつ分注し、滅菌処理後、28°C恒温器内で静置する場合と、小型培養びんに4ml ずつ培地を分注し、滅菌処理後、28°Cで振盪培養する場合があります。主として前者は界面活性剤法の検討に用い、後者は電子顕微鏡観察試料用に用いた。

ステロールとしては $\beta$ -シトステロール(半井化学)を用い、まず、少量のアセトンに溶かした上、100ppmのTween 80 溶液に添加して乳濁液とした。 $\beta$ -シトステロール量は、培地1ml 当り、乳濁液を0.1ml 添加して、ステロールが0.05あるいは0.1mg/ml となるように加えた。

遊走子形成は、培養した菌体を24°Cの脱イオン水中に移し、3~6時間後に、フォルモールカルシウム液を等量加えて遊走子を固定し、トーマ血球計数盤で測定して形成された遊走子の数で比較した。

電子顕微鏡観察のためには、2~3日間、振盪培養した菌体を、そのまま、あるいは2~4時間、24°Cの脱イオン水に浸漬して、発芽過程を進行させた後、2%グルタルアルデヒド(4°C)にて2時間固定し、pH7.2のりん酸緩衝液で洗浄後、四酸化オスミウムにより後固定(1時間)を行ない、りん酸緩衝液で洗浄し、50, 70, 80, 90, 99および無水エタノールで順次脱水を行ない、プロピレンオキシドで透徹して、エポン812樹脂に置換包埋した。試料はガラスナイフを用いて切片となし、必要に応じてクエン酸鉛で3~5分染色した後、日本電子100B型電子顕微鏡で観察した。

## III 結果ならびに考察

### 1. ステロール添加法の改良 (Tween 80法)

従来のアセトン法にかわり、ステロールを非イオン界面活性剤 (Tween 80) に溶解して添加する方法について検討した。

#### a) Tween 80の菌体生育に及ぼす影響

第1表 *Pythium* に対する Tween 80 の影響

添加の種類	遊走子形成 ( $\times 10^3$ /ml)	菌体乾重 (mg)
Tween 80+ $\beta$ シトステロール	327	9.2
Tween 80+アセトン	0	7.8
Tween 80のみ	0	7.5
対照 (基本培地*のみ)	0	8.1

\* キュウリジュース遠沈上清培地

実験区としては、SCJ 培地を基本として Tween 80 に溶解した $\beta$ -シトステロールを加えた区、Tween 80 だけを加えた区、アセトンのみを加えた区、および、対照として SCJ 培地のみの方の4区に分けた。各區はそれぞれ3本ずつとし、オートクレーブ滅菌後、28°C、3日間培養し、それぞれ菌体乾重と遊走子形成能を測定した。

結果は第1表に示す通りである。菌体生育量について対照区と比較してみると、ステロール添加区が若干多いようであるが、3区とも大きな差はないと云ってよい。なお、アセトン添加区については、アセトンが菌体の生育に影響がないと云うことではなく、オートクレーブ滅菌処理などで、ほとんどが蒸発してしまっているため、この方法ではアセトン添加による影響はみられないことを示している。一方、遊走子形成能については、ステロール添加区のみ、遊走子の形成が認められることより、遊走子の形成には、ステロールが必須であり、Tween 80やアセトンは影響のないことを示している。

#### b) ステロール添加量と遊走子形成能

つぎに、遊走子形成能に対する $\beta$ -シトステロールの最適添加量について検討した。培地に0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4および0.8mg/ml となるように $\beta$ -シトステロールを添加し、小型培養びんで、28°C、48時間の振盪培養を行ない、その培養菌体の遊走子形成量を比較した(第2表)。0.025mg/ml の添加量では、遊

第2表 ステロールの添加量と遊走子形成

添加量 (mg/ml)	遊走子形成数 ( $\times 10^3$ /ml)*
0.025	106
0.05	429
0.1	443
0.2	408
0.4	345
0.8	368
無添加	0

\* 25°C の脱イオン水に水浸、6時間後測定

走子の形成は劣り、0.05~0.2mg/ml 区はいずれも良好で、0.1mg/ml 区が最高の形成数を示した。また、0.4および0.8mg/ml 区では、むしろ形成数が低下する傾向にあった。

### c) ステロールの添加時期と遊走子形成能

従来のアセトン法では、アセトンの害作用のため、培養の途中からステロールを添加して、その効果を比較することはできなかったが、今回の Tween 80法では、あらかじめ、湿熱滅菌しておけば、任意に添加が可能である。そこで、菌体生育培養から遊走子形成培養に移る24, 12, 6, 3, および1時間前に、それぞれステロールを添加して、とり込み時間と遊走子形成能の関係を調べてみた(第3表)。

この結果から判断すれば、24時間前に添加するよりもむしろ、12~6時間前の添加の方が、遊走子形成は良好であり、わずか1時間前に添加しても、かなりの遊走子形成能を獲得できることがわかる。

### 2. 菌体の微細構造(ステロールの添加の有無との比較において)

前項で明らかなように、本菌は、ステロール( $\beta$ -シトステロール)を添加した培地で培養した場合、正常に遊走子形成の過程が進行するが、ステロールを欠く培地では、菌体の生育は劣らないのに、遊走子は形成されない。そこで、両者の微細構造の違いを調べてみた。

ステロールを含む菌糸は、概して、原形質はマイクロオルガネラに富み、よく詰って密な構造をしている(図版I-1)。この写真では液胞をかなり多く含み、菌糸としては盛熟末期のものであろう。本菌は生育がすこぶる旺盛であるが、また、老化も早く、光学顕微鏡的にも、内容を失った空虚な菌糸が目立ってくる。この状態の微細構造が図版I-2, 3であり、液胞は次第に融合して巨大化し、終には、菌体は液胞で満たされる。ただし、このような状態になっても、細胞壁の内側には、わずかに原形質が残されており、その中を数層のER様の構造が長く走っているのが見られる。

第3表 ステロール取込み時間と発芽能

取込時間(h)	遊走子形成能( $\times 10^3/ml$ )*
24	430
12	993
6	862
3	439
1	347
無添加	0

\* 24°Cの脱イオン水に浸漬、6時間後に測定

菌体間は液胞で遮断されているように見えても、物質や情報の伝達が密接になされているのであろう。菌糸の細胞質はクリステのよく発達したミトコンドリアに富み、また、同程度の大きさの小胞が多数認められる(図版II-1)。このミトコンドリアや小胞に、とくに富む原形質は、おそらく糸状の遊走子嚢に相当するものと思われ、*Phytophthora*のそれと微細構造が酷似している<sup>6)</sup>。これらの小胞は、リソゾームあるいはファゴゾーム<sup>7)</sup>であり、また、のちに遊走子に分割する際の細胞膜の構成に関与する小胞<sup>3, 9)</sup>であろう。この小胞は、前述の液胞に発達するものとは別種であり、図版II-2に示すように、液胞は小型から大型に至るまで、いずれも均一な海綿状の内容物を含んでいるので容易に区別される。ステロールを欠く菌体においても、基本的には、前述のステロールを含む菌体の構造と同じであり、ミトコンドリアのクリステもよく発達している。異なる点としてかなり顕著であるのは、ゴルジ体(*Phytophthora*<sup>6)</sup>に比べてラメラの発達は、ステロール含有菌体の場合でも劣っている)が僅少で、構造が貧弱であること、小胞が少ないこと、および、細胞質が概して粗雑で、マイクロオルガネラの断片様の顆粒を多数含んだ嚢胞がしばしば認められる(図版III-1)ことなどが挙げられる。

水浸3~4時間後の菌体では、球嚢が観察される。一種のプラズモディウムであり、その微細構造は*Phytophthora*の遊走子嚢<sup>2)</sup>(遊走子に分化する以前の状態)によく似ている(図版III-2)。核が顕著になり、ミトコンドリアや小胞に富み、多数の脂質顆粒を含んでいる(III-3)。また、典型的な9+2構造を呈する鞭毛の形成も認められた(III-4)。プラズモディウムは、次第に分割して遊走子となるが、核を中心に1個の遊走子に相当する細胞質の周囲に小胞が配列し、それらが融合しながら、個々の細胞に分れてゆくものようである(III-5, 6)。ステロールを含まない菌体では、これらのプラズモディウムや、遊走子への分割の過程も全く見られない。菌体の微細構造は、前述のように、ステロール欠の*Phytophthora*の遊走子嚢に似ているが、がらくた胞<sup>6)</sup>(未発達なゴルジ体<sup>5)</sup>に酷似した顆粒を多数含んだ嚢胞)と類似のものは見られない。ただ、図版III-1のように、様々の形態の顆粒や小胞が、無秩序に、あるいは膜に包まれた状態で分散した構造がしばしば認められる。

また、この時期の菌体では、通常の菌糸よりやや細目で、内容を失なって空白となった菌糸体が多数認められる。非常に特徴的なのは、これらの菌糸の細胞内壁には原形質層がほとんど失なわれているのに、極めて典

型的なひも状小胞を多数含んだ胞嚢があちこちにとり残されていることである(図版IV-1)。その胞嚢内に充満している小胞は長いひも状(IV-2, 3)で、ときには短い断片となっていることもあるが、いずれも、その断面は二重膜構造で、マカロニ状を呈している(IV-4, 5)。この胞嚢を仮に小胞嚢と呼んでいる。これは、細胞質の存在する菌体中でも認められる。ステロールを含まない菌体では、この小胞嚢の認められる機会は非常に少なく、また、内部のひも状構造は、細くて粗な状態にあった。これらの小胞嚢を含む菌糸はおそらく逸出管であろう。

#### IV 結 語

*Pythium* と *Phytophthora* は非常に近縁な関係にあって、前者は、遊走子嚢の間接発芽において、プラズモディウム(球嚢と呼ばれている)の形で放出されたのち、個々の遊走子への分割が起こるのに対し、後者は、遊走子嚢中で、遊走子への分割が起こり、遊走子となって放出される点が、大きな区別点となっている。したがって、ステロールの有無による、細胞の微細構造の相違は、*Phytophthora*<sup>6)</sup> におけるそれとよく一致していた。ただ、ステロールが、遊走子への分割に関与している<sup>7)</sup>とすれば、ステロール欠の菌体であっても、プラズモディウムの放出はみられるはずであるが、予想に反して、それは認められなかった。発芽過程の中で、逸出管という、*Phytophthora* ではみられない器官が存在するが、ステロール欠の菌体では、その形成も劣っている。プラズモディウムの放出のみられないのも、そのためのものである。逸出管と思われる菌糸の内壁に残されているマカロニ様の小胞を含んだ胞嚢(小胞嚢)は非常に特徴的であるが、その機能は不明である。しかし、単に老廃物が残されたと云うより、もう少し、積極的な意味をもつ器官、すなわち、プラズモディウムの放出機構と密接な関係が存在する器官である可能性もあり、さらに追求してゆきたい。これらの間接発芽機構におけるステロールの意義

については、単に細胞内容物の漏出の難易<sup>8)</sup>のような消極的なものではなく、細膜胞内にとり込まれて、重要な生理活性を荷っていると考えるべきであろう。ただし、ここでは報告しなかったが、ミツバの抽出脂質の薄層クロマトグラフィーにおいて、トリグリセライド分画附近に、ステロール分画と同様に、本菌の遊走子形成能を与える物質の存在が予想される結果を得ている。ステロール以外にも有効な物質があるのかもしれない。現在追求中であるので追って報告する。ステロールを添加する方法として、今回、Tween 80を用いてみて、従来のアセトン法より、はるかに取扱いが容易となることがわかった。培養中に、生育に影響を与えずに、任意に添加が可能である。ラジオアイソトープを用いたトレーサー実験などが一層やりやすくなるので、今後は、*Phytophthora capsici* のみならず、この *Pythium* sp. を適宜供試して、ステロールと遊走子形成との関係について、さらに研究を進めてゆくことになろう。

#### 引用文献

- 1) Bartnichi—Gracia S. (1966) J. Gen. Microbiol. 42 : 57—69.
- 2) Child J. J. G. D. Fago and R H. Haskins (1968) Can. J., Microbiol. 15 : 599—603.
- 3) Hole H. R. and S. T. Hamamoto (1967) Am. J. Bot. 54 : 1131—1139.
- 4) 黒住一昌 (1970) 細胞 2 (10) : 2—14.
- 5) 宮田善雄・桂 琦一・室川嗣夫 (1970) 京府大学報・農22 : 27—30.
- 6) ———— (1972) 同上24 : 33—36.
- 7) ————・正子 朔 (1975) 同上27 : 32—36.
- 8) ————・長田竜太郎・正子 朔 (1977) 同上29 : 印刷中.
- 9) Williams W. T. (1968) Can. J. Bot. 48 : 221 — 227.

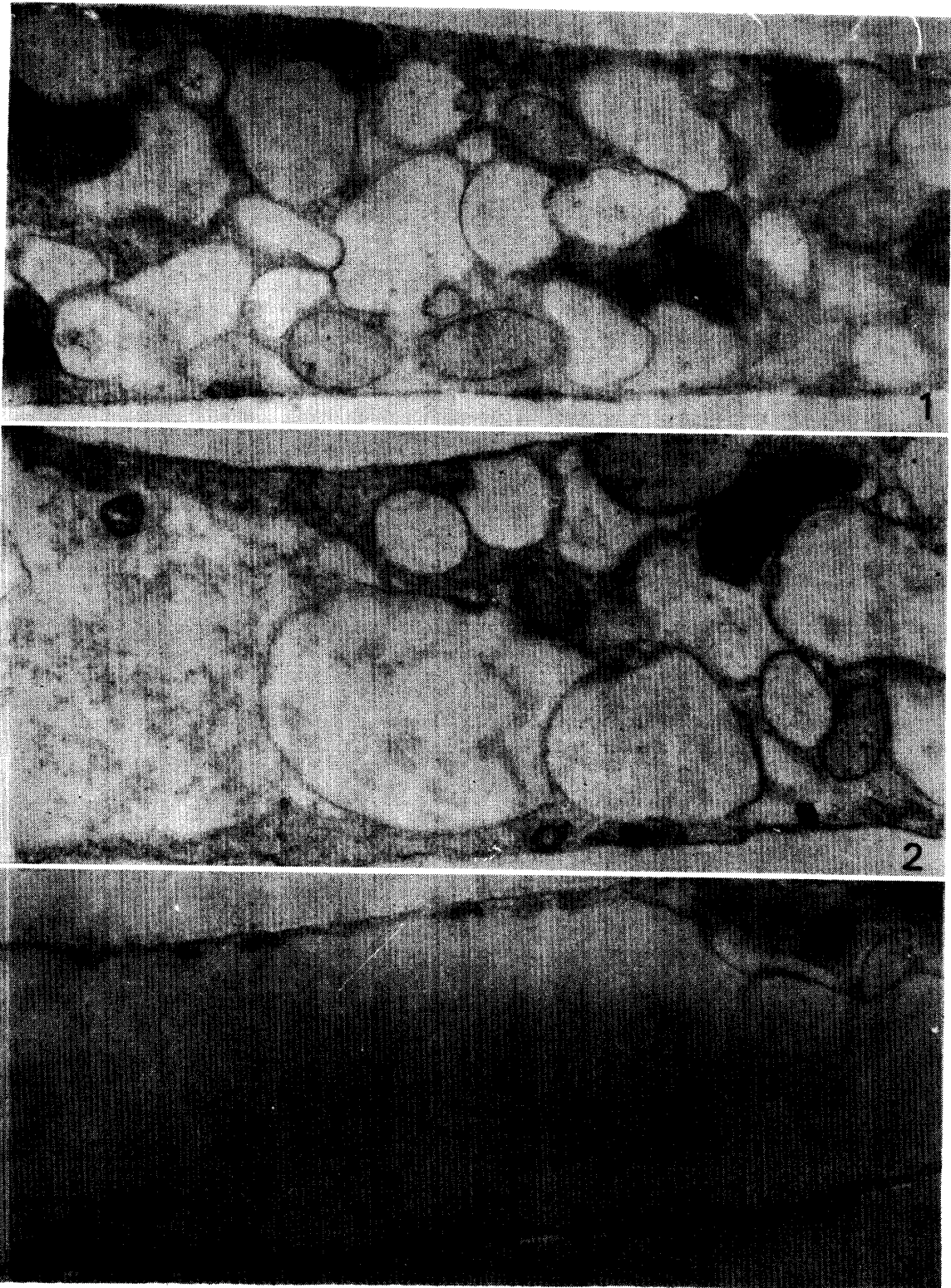
#### Summary

Filamentous zoosporangia of *Pythium* sp. (CCR-76), a pathogenic fungus of Mitsuba plant (*Cryptotaenia japonica*), cultured in the supernatant medium of cucumber juice can not liberate zoospores. This phenomenon is probably caused by lack of sterols same as in *Phytophthora*. The myceria with or without sterol ( $\beta$ -sitosterol) were morphologically compared by electron microscopy. (1) Peculiar

vacuoles covered with a unit membrane containing numerous vesicles and granules were often observed in sterol-less myceria. (2) Golgi apparatus were hardly detected in sterol-less ones. (3) Mitochondria with well-developed cristae were observed in both myceria. (4) The parts of the hyphae with sterol were rich in numerous small vesicles. They are probably filamentous zoosporangia. (5) Significant

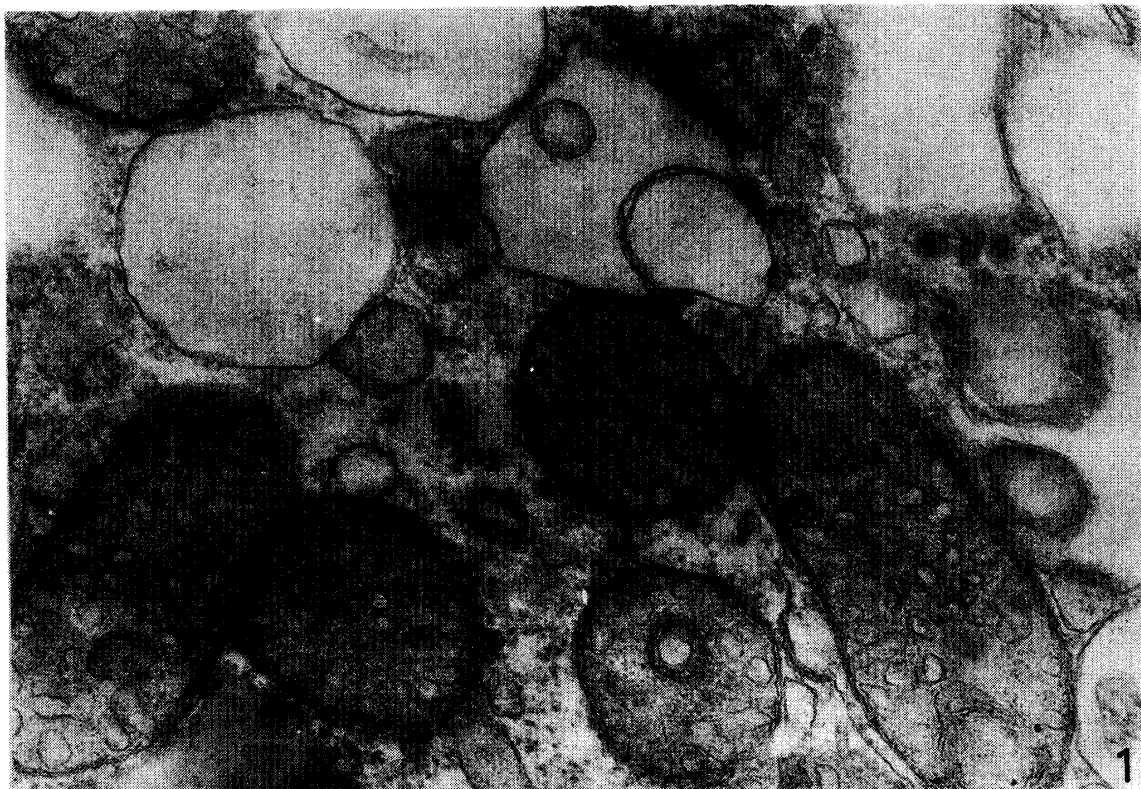
vacuoles containing with a number of spaghetti-like vesicles were frequently observed in myceria with sterol. The vacuoles were closely contact with

the inner surface of cell walls. The role of this vesicular vacuoles are not clear.



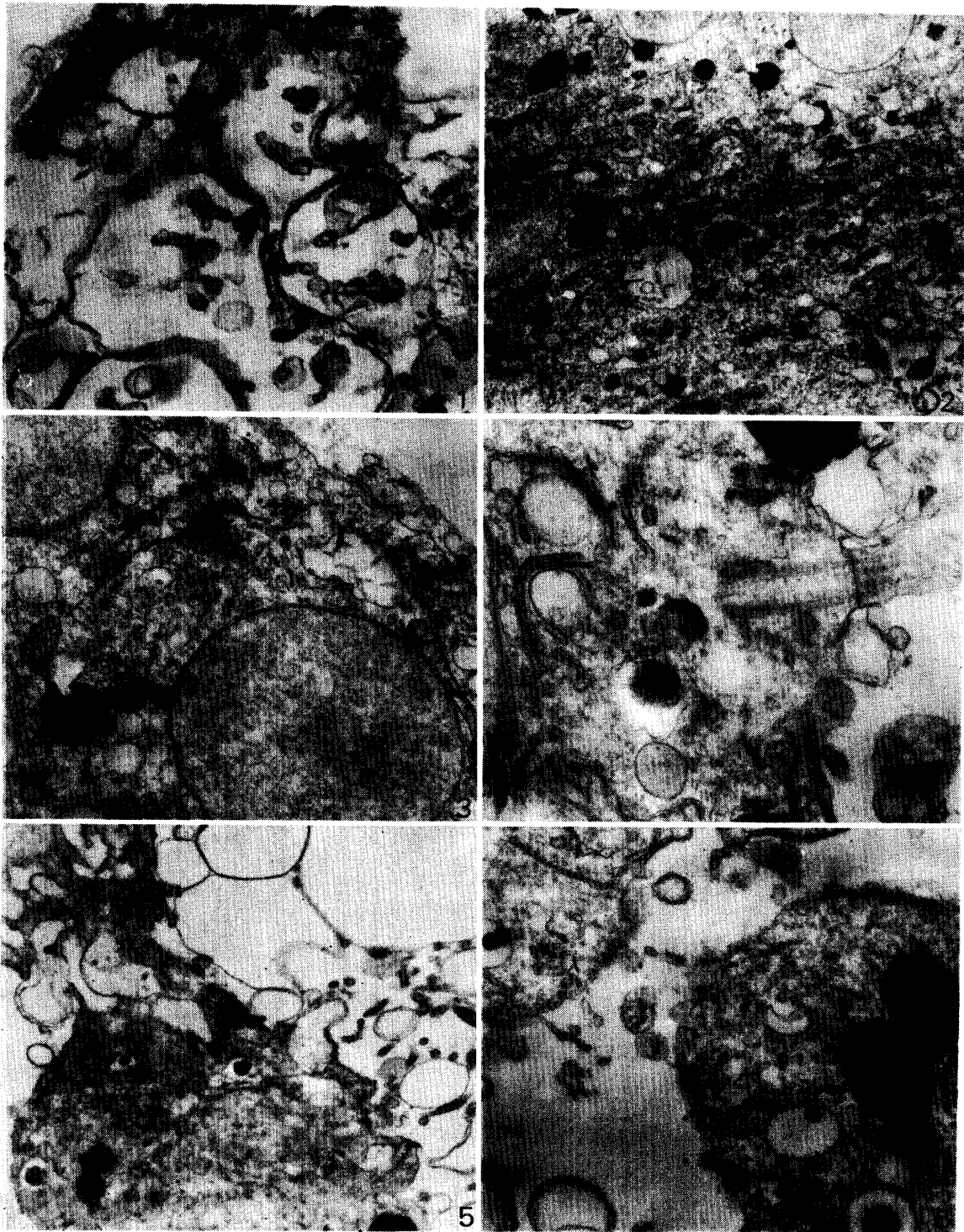
### I. 菌糸の微細構造

- 1 : 内容に富む菌糸
- 2 : 液胞が融合して次第に大きくなる
- 3 : 空になった菌糸



## II. 菌糸の細胞質の微細構造

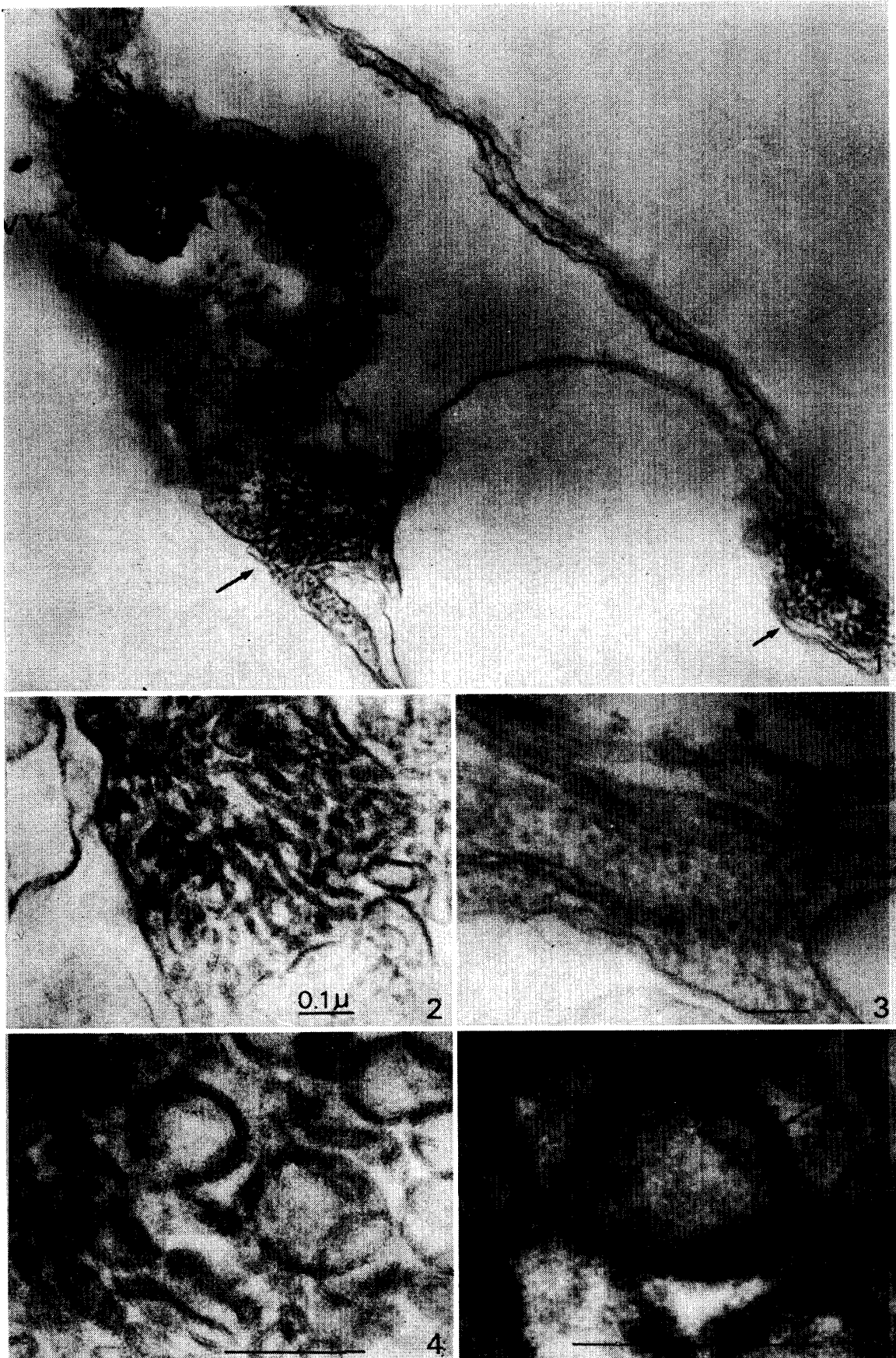
1. ミトコンドリアや小胞に富んでいる
2. 液胞は均一な海綿状構造を含んでいる



### Ⅲ. 球嚢のプラズモディウムと遊走子への分割

1. ステロール欠菌体の異常細胞質
2. 3. プラズモディウム
4. 鞭毛基部構造がみられる
5. 6. 遊走子への分割過程





IV. 逸出管壁の内側に残された小胞囊 (VV)

細長いひも状構造の小胞が充満しているが、この小胞は二重膜から成り、マカロニ状である。