

キュウリジュース培地遠沈残渣中に存在する *Phytophthora capsici* 遊走子嚢の 遊走子分割必須物質の追跡

宮田善雄・渡辺健三・桂 琦一

YOSHIO MIYATA, KENZO WATANABE and KIICHI KATSURA

The indispensable substances for the zoospore separation of *Phytophthora capsici* zoosporangium, contained in the centrifuged residue of cucumber juice medium.

要旨：キュウリジュース培地は、*Phytophthora capsici* において、間接発芽能力の高い遊走子嚢を多量に形成させるための好適な培地であるが、この遠沈上清液を用いると、遊走子嚢は多量に形成されるが、間接発芽が全く起こらない。これは、形成された遊走子嚢が遊走子への分割能力を欠くためである。分析の結果、遠沈残渣中に存在するステロールが遊走子分割に必須の物質であることがわかった。ガスクロマトグラフィーによると、キュウリ果実中に含まれるステロールは、 β -シトステロールであった。 β -シトステロールと共に、植物体中に広く存在するスチグマステロールも、同様に高い遊走子分割活性を示した。これに対し、動物ステロールのコレステロールはこの活性が低く、菌類ステロールのエルゴステロールや、ステロール前駆体スクワレンや、誘導体カルシフェロール（ビタミンD₂）には、ほとんど活性が認められなかった。菌体内に取込まれた β -シトステロールは、エステル化されるが、それ以外の代謝は受けずに、遊走子嚢の細胞膜形成に関与しているものと考えられる。

緒 言

一般に、疫病菌 (*Phytophthora*) の遊走子嚢は遊走子を生ずる。この現象は一種の発芽とみなされ、間接発芽と呼ばれている。疫病菌では、まず遊走子への分割 (第1図) が起こり、次いで遊走子が放出されるので、遊走子型発芽と称している。この現象は、放出された遊走子が、本病の伝播主体となるため、植物病理学上、重要な研究対象のひとつであり、形態的には微細構造¹⁵⁾に至るまで、よく研究されているが、機制的にはほとんど明らかにされていない。筆者らは、*Phytophthora capsici* を用いて、この間接発芽機構に関する研究に着手した。研究に必要な多量の遊走子嚢を得るために、紙蓋平面培養法⁶⁾を考案したが、それに用いる培地は、キュウリジュースが最も適していた¹⁴⁾。ところが、この培地は、オートクレーブ滅菌後、暗緑色

の沈澱物を生ずるので、それらを遠沈により除去し、その上清液を培地として用いたところ、遊走子嚢は多量に形成されるにもかかわらず、遊走子が全く泳ぎ出してこないことを知った。遠沈残渣部を分析した結果、その原因がステロールの欠如にあることがわかった。調べてみると、ステロールの間接発芽に及ぼす影響については、すでに Hendrix³⁾ や Lilly¹⁰⁾ が、わずかではあるが、記載を残していた。しかし、彼らの研究は、その後、ステロイドホルモンとしての興味から、卵孢子形成とステロールとの関係に展開されているようである。この他、菌類におけるステロールの研究は、なんらかの意味で、卵孢子などの有精器官形成との関係を追求したものがほとんどすべてであると云ってよく、遊走子嚢の間接発芽に関するものは、筆者らの研究を除いてほとんど見当らない。ここでは、キュウリステロールの分析と、ステロール類の遊走子型発芽活

性に関する実験などにおいて得られた知見について報告する。なお、本研究を行なうに当り、ステロールの抽出や分析について、有益な御助言と試料の御提供を賜った本学農学部野田万次郎教授に対し、心から感謝の意を表する次第である。

方 法

供試菌は、*Phytophthora capsici* (京都府大植病研保存菌 No. 002) である。キュウリジュース培地は、市販のキュウリをミキサーで破碎し、ガーゼ4枚で汙過したものである。このキュウリジュースを15分間煮沸し、その遠沈(20,000G, 15分)上清液に等量の脱イオン水を加えて、キュウリ遠沈上清培地をつくり、基本培地とした。このときの遠沈残渣を集め、遊走子型発芽の必須物質の抽出試料とした。試料はエーテルあるいは *n*-ヘキサンを加えて乳鉢で磨碎し、減圧濃縮のち、クロロホルムまたはアセトン溶液として、冷凍庫内に保存した。

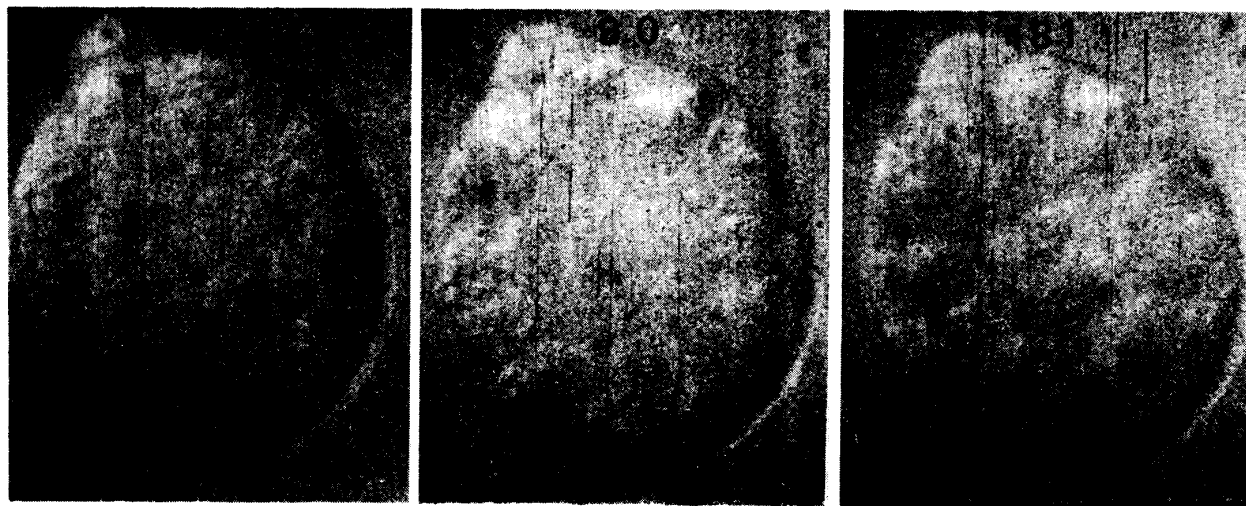
薄層クロマトグラフィーは、シリカゲルG(メルク)を用い、主として、石油エーテル・エーテル・酢酸(82:18:1)で展開し、50%硫酸または1%りんモリブデン酸エタノール溶液を噴霧、加熱(110°C, 10分)発色させた。また、ステロール分画は、かき取って、リーベルマンビュールハート反応¹⁾により検出した。展開したプレートは、両端を切取って発色させ、各バンドに対応する部分を帯状にシリカゲルと共にかき取り、エーテル抽出後、蒸留乾固し、アセトンに溶解して基本培地に加えた。この時のアセトン量は、培地1ml中、4μl以下で、菌体の生育などに影響を及ぼすことはない。各分画を添加した培地に、*P. capsici* の菌叢ディスク(直径5mm)を接種し、その菌体生育

量(乾重)、遊走子嚢形成数および、遊走子型発芽指数を求めて比較した。なお、遊走子型発芽指数とは、遊走子嚢当りの放出された遊走子数のことで、遊走子を含む遊走子嚢懸濁液を、フォルモールカルシウム固定液¹⁾で固定後、Thoma血球計数盤を用いて、単位体積当りの遊走子数と遊走子嚢数を求め、その比で表わしたものである。

供試したステロールのうち、β-シトステロール、スチグマステロール、コレステロール、エルゴステロール、およびステロール関連物質のスクワレンとカルシフェロール(ビタミンD₂)は、いずれも市販品(半井化学)であり、ガスクロマトグラフィーの標品として用いたステロール類、コレステロール、ブラシカステロール、キャンペステロール、スチグマステロール、β-シトステロール、シクロアルテノールおよび2,4-ジメチルシクロアルテノールは本学農学部野田万次郎教授より分譲を受けた。

ガスクロマトグラフィーにおいて、試料はクロロホルム溶液として、1.5~2μl注入した。装置は島津GC-3AFを用いた。カラムはシマライトに吸着させた50%SE-30で、250°Cの条件下で、H₂・N₂・空気(1.6:0.65:1 kg/cm²)の混合気体を109 ml/minの速さで流し、水素炎法で検出した。

また、菌体に取込まれたステロールの追跡においては、β-(4-¹⁴C)シトステロール(比放射能55Ci/mol, 日本放射性同位元素協会)を用い、基本培地(50μg/ml β-シトステロールを含む)に対し、1ml当り0.4 μCiになるように添加して、*P. capsici* を培養した。菌体は乾燥粉末とし、乳鉢を用いて、*n*-ヘキサン抽出し、減圧濃縮後、クロロホルム溶液として保存した。シリカゲルG薄層プレート(メルク TLC ガラスプレ



第1図 *P. capsici* 遊走子嚢の遊走子への分割過程
8ミリ顕微鏡映画フィルムより抜粋、数値は経過時間(分)を表す。

ート60)を用い、前述の展開溶媒により展開した。発色検定後、レントゲン写真フィルム(フジXレイ)を密着させ、冷蔵庫内に2~3週間保ったのち、現像(フジレンドール)した。また、同じプレートについて、クロマトグラムスキャナー(アロカ JTC-203)により放射活性を測定した。

結 果

1. キュウリジュース培地とその遠沈上清培地で生育した菌体および遊走子嚢の比較。

キュウリジュース培地と、その遠沈上清培地で培養した *P. capsici* について、菌体生育量、遊走子嚢形成数、遊走子嚢の形態と遊走子型発芽指数を調べた(第1表)。

菌体乾重は1個のフラスコでキュウリジュースの場合 150mg、その遠沈上清液では 128mg であり、また、遊走子嚢形成数は、前者が 381.5×10^4 個、後者が 215.7×10^4 個となって、いずれも、後者がやや劣っている程度である。ところが、遊走子型発芽指数となると、前者が13.4であるのに対し、後者は0、すなわち、遊走子が全くみられないことを示している。このとき

第1表 キュウリジュースとその遠沈上清液で培養した遊走子嚢の比較

培地の種類	キュウリジュース	キュウリジュース遠沈上清液
菌体乾重 (mg)	150.0	128.0
遊走子嚢形成数($\times 10^4$)*1	381.5	215.7
遊走子嚢の長径(μm)*2	30.7	27.3
遊走子嚢の長・短径比	1.60	1.37
遊走子型発芽指数*3	13.4	0

*1 培地 20 ml を含む 200 ml マイエルフラスコ当りの数値を示す。

*2 50個平均値

*3 遊走子型発芽指数 = $\frac{\text{単位体積当りの遊走子数}}{\text{単位体積当りの遊走嚢数}}$

の両者の遊走子嚢を形態的に比較すると、遠沈上清液の場合の方が、やや小型で球形に近い。第1表の遊走子嚢の長径とその短径比がそれを示している。しかし、キュウリジュース培地の場合でも、小型球形の遊走子嚢は多数認められ、それらは正常な遊走子型発芽を行なうことから、この外部形態の違いが遊走子型発芽の有無を決定しているのではない。遊走子嚢内部の微細構造の違いはすでに報告^{15,16)}したが、正常な遊走子嚢においては、ゴルジ体を中心に形成された小胞群が、発達して割腔胞となり、相互に並列融合して、割腔が次第に形成され、その完結により遊走子分割が完了するのであるが、遠沈上清液における異常な遊走子嚢では、遊走子分割へ向うこれら一連の過程がみられず、未完成なゴルジ体断片を取込んだと思われる大小様々の特異な胞嚢(がらくた胞)¹⁵⁾が観察されたのである。このことは、キュウリジュース培地を遠沈することにより、その中にあった遊走子分割に必須の物質が遠沈残渣中に移行したことを意味し、その物質を追跡することにより、遊走子分割の機構の一部を明らかにし得るものと考えた。

2. キュウリジュース遠沈残渣中の遊走子分割活性を有する物質の追跡

i) エーテル可溶性分画の比較

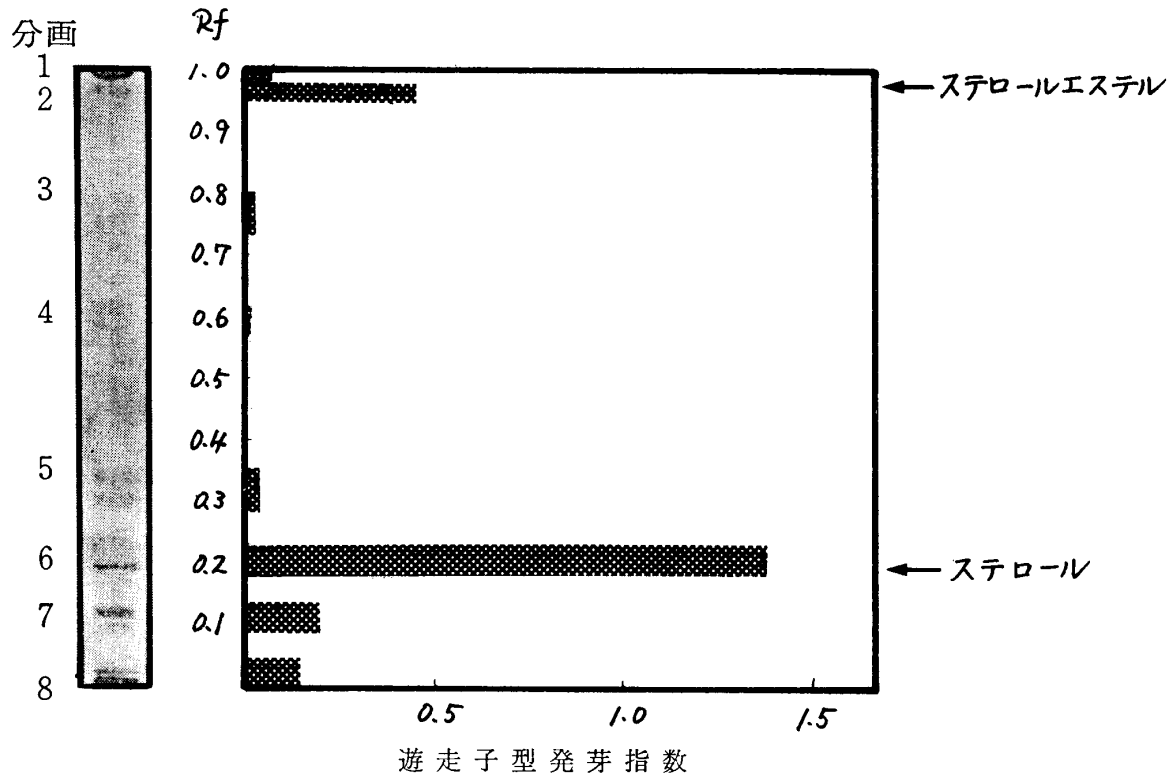
キュウリジュース培地遠沈残渣のエーテル可溶性分画と水可溶性分画を基本培地に添加し、菌体生育量、遊走子嚢形成数および遊走子型発芽能について調べた(第2表)。

菌体の生育は、もとのキュウリジュース培地において最も旺盛であり、その遠沈上清液では最も少ない。残渣成分を添加すると、菌体の生育は回復し、とくに、水溶性分画の添加による生育増大が著しい。遊走子嚢形成数においてもほぼ同様の傾向にあるが、この場合は、エーテル可溶性分画の添加の方が、量的回復が顕著である。さて、遊走子型発芽指数を比較すると、もとのキュウリジュース培地で4.6であったのに対し、

第2表 キュウリジュース培地と、その遠沈残渣のエーテルおよび水抽出分画を添加した遠沈上清培地における菌体比較

培地の種類	菌体生育* (乾重 mg)	遊走子嚢形成数* ($\times 10^4$)	遊走子型 発芽指数
キュウリジュース培地	155.5	394.5	4.60
キュウリジュース遠沈上清培地	110.5	151.0	0
同上+残渣エーテル可溶分画	123.0	289.5	3.25
+残渣水可溶分画	147.0	208.5	0.2

* いずれも培地 25ml を含む 200ml マイエルフラスコ当りの数値を示す



第2図 キュウリ脂質の TLC 分画と遊走子囊の遊走子型発芽活性
(石油エーテル・エーテル・酢酸=82:18:1)

同遠沈上清液では0であり、遊走子の放出はみられないが、エーテル可溶性分画を添加すると、3.2.となり、盛んな遊走子型発芽がみられるのに対し、水可溶性分画の添加では0.2，すなわち、ほとんど遊走子型発芽が認められないことを示している。このことは、遊走子囊の遊走子型発芽に必須の物質は遠沈残渣中の脂質成分の中に含まれることを意味している。

ii) キュウリ脂質の薄層クロマトグラム分画の遊走子型発芽活性の比較

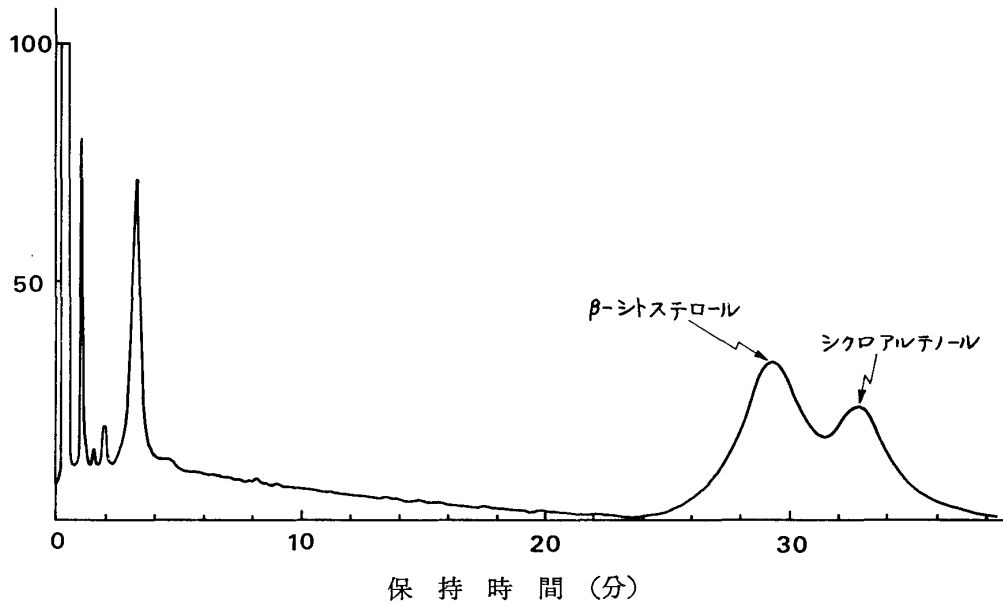
キュウリジュース培地遠沈残渣の*n*-ヘキサン抽出物を、シリカゲル薄層クロマトグラフに展開し、その各バンドをかき取って、アセトンで再抽出し、基本培地に添加した。培養により形成された遊走子囊の遊走子型発芽指数を求めた結果は第2図の通りである。左端に示したのは薄層クロマトグラムであるが、それぞれ、上から、カロチノイド、ステロールエステル、トリグリセライド、脂肪酸、モノグリセライド、ステロール、クロロフィルおよび基底部の糖脂質分画である。棒グラフにみられるように、遊走子型発芽活性の高いバンドが2カ所認められるが、このバンドはいずれも、50%硫酸で紫色、25%三塩化アンチモンクロホルム試薬で赤紫色の反応を示し、かつ、かき取ってクロホルム溶液とし、リーベルマンビューハート反応を行なうと青緑色の反応を示して、いずれもステロールに相

当することが判明した。Rf 値の低いバンドは遊離のステロール、高い方はステロールエステルである。分画1および7で、わずかながら活性がみられるのは、バンドが接近しているため、ステロールエステルまたはステロールが若干混入したものと思われる。また、8はステロール配糖体が存在していた可能性がある。

3. キュウリステロールのガスクロマトグラフィー

先の実験から、キュウリ果実中に含まれるステロールが、遊走子囊の遊走子型発芽に重要な働きをしていることがわかったが、そのステロールの種類を明らかにするために、ガスクロマトグラフィーを行なった。試料はあらかじめ薄層クロマトグラフィーを行なって、前述のステロールバンド部分を集め、クロホルム溶液として保存しておいたものである。

キュウリステロールのガスクロマトグラムは第3図のようになり、保持時間の29.9分と33.9分の位置に2つのピークが認められる。このピークに相当するステロールを同定するために、既知の植物ステロールとその関連物質数種を選び、同一条件下でガスクロマトグラフィーを行ない、保持時間を求めて、 β -シトステロールに対する比保持時間を比較した(第4表)。その結果、キュウリのステロールのガスクロマトグラフィーにおける2つのピークは、それぞれ、 β -シトステロールと、その前駆体シクロアルテノールに相当するも



第3図 キュウリ脂質のガスクロマトグラム
島津ガスクロ (GC・3AF), 50%SE-30, シマライト, $H_2 \cdot N_2 \cdot$
Air (1.6 : 0.65 : 1kg/cm²) 109ml/min, 25°C

第3表 キュウリストステロールとステロール標品とのガスクロマトグラム保持時間の比較

ステロールの種類	保 持 時 間* (比 保 持 時 間**)
キュウリストステロール (果実)	29.9 33.9 (1.58)(1.79)
ステロール標品	
コレステロール	18.9 (1.00)
ブラシカステロール	20.2 (1.07)
キャンペステロール	24.4 (1.29)
スチグマステロール	26.2 (1.38)
β-シトステロール	29.6 (1.57)
シクロアルテノール	33.4 (1.77)
2,4-ジメチルシクロアルテノール	37.8 (2.00)

* 条件は第3図に同じ, 単位は min

** コレステロールを1.00とした相対保持時間

のと判定された。

4. 各種ステロールおよびその関連物質の遊走子型発芽活性

キュウリのステロールは β-シトステロールであることがわかったが, その他のステロール類にも, 遊走子型発芽活性があるかどうかを知るため, 市販の代表的ステロールおよびその関連物質を用いて検定を行なった。その結果を第4表に示した。植物体に広く分布するスチグマステロールも, β-シトステロールと同程度の高い遊走子型発芽活性を発揮した。それに対して,

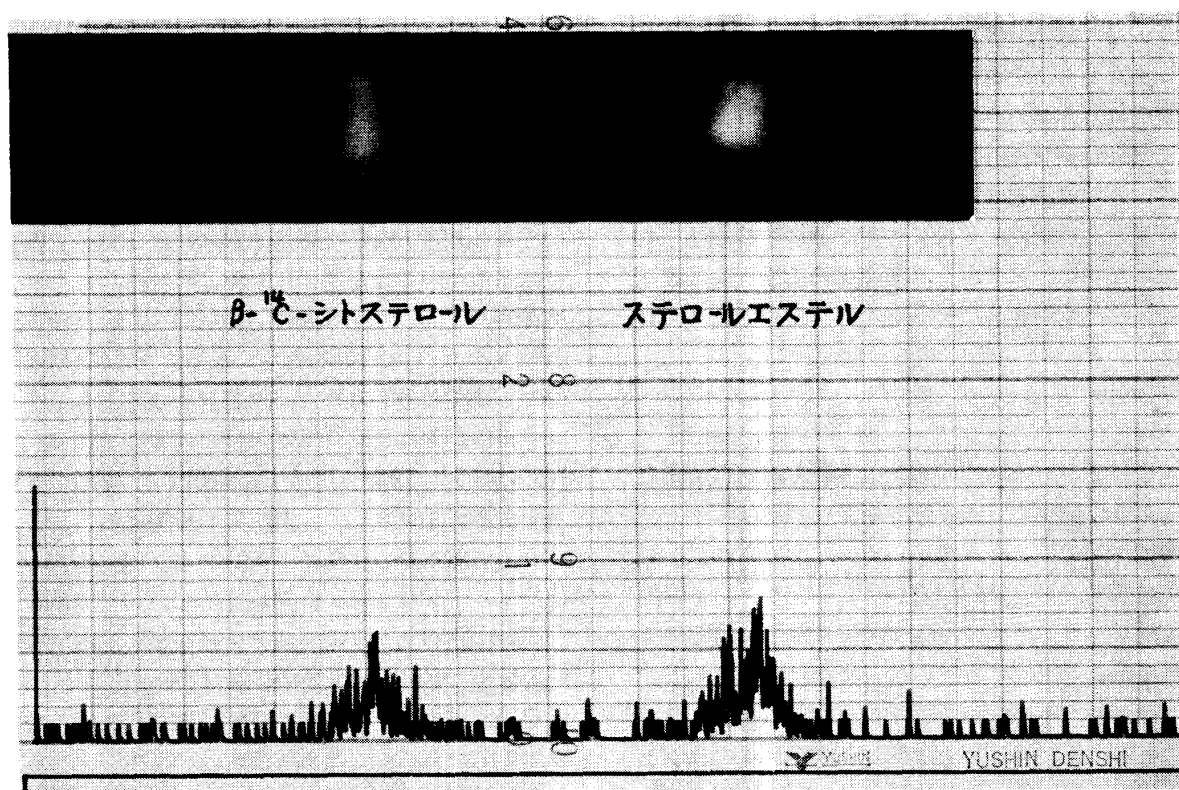
動物ステロールと称されるコレステロールの活性は低く, 菌類ステロールとも云うべきエルゴステロールはほとんど活性が認められなかった。また, ステロール前駆体の スクワレン および 誘導体 カルシフェロール (ビタミン D₂) も全く効果を示さなかった。

5. 菌体内取込みステロールの代謝変換

植物ステロールとも云うべき β-シトステロールやスチグマステロールが, 菌体内に取込まれて, 遊走子型発芽に重要な働きをなしていることがわかったが, その取込まれたステロールがどのように代謝変換され

第4表 名種ステロール類の添加と遊走子型発芽

基 本 培 地	添 加 物 質*	菌 体 乾 重 (mg)	遊 走 子 嚢 数 ($\times 10^4$)	遊 走 子 数 ($\times 10^4$)	遊 走 子 型 発 芽 指 数
キュウリジュース培地	—	155.5	394.5	1814.7	4.60
	—	110.5	151.0	0	0
	キュウリ脂質	123.0	289.5	911.9	3.15
	β -シトステロール	109.5	206.5	588.5	2.85
キュウリジュース	スチグマステロール	127.3	257.3	771.9	3.00
遠心上清培地	コレステロール	117.5	154.0	69.3	0.45
	エルゴステロール	119.0	188.5	56.6	0.30
	カルシフェロール	123.0	231.0	0	0
	スクワレン	116.5	257.0	0	0

* 200 μ g/ml 培地

第4図 菌体脂質の TLC オートラジオグラム
 展開溶媒：ベンゼン・酢エチ=5:1 (メルクシリカゲル G)
 下のグラフはクロマトグラムスキャナーの放射能測定値

ているかを知ることは、ステロールの働きを知る上で重要である。

β -シトステロールを含む基本培地に、 β -4- 14 C- β -シトステロール (0.05Ci/ml) を添加し、2週間、菌体を培養した。菌体は脱イオン水で十分に洗浄後、前述の方法で脂質抽出し、シリカゲルG薄層クロマトグラムをつくり、レントゲン写真フィルムを密着させて、オートラジオグラムを作成した。また、クロマトグラムスキャナーで、直接、放射活性を測定した。結果は

第4図に示した。上の写真の白いスポットの部分が放射活性のみられることを示しており、それぞれ、左から、遊離ステロールおよびステロールエステル部分に相当する。クロマトグラムスキャナーによる測定も、同じ位置に活性のみられることを示している。ここで注目すべきは、ステロールエステルのスポットの放射活性は、菌体に取り込まれたのち生じたものであることで、菌体培養しなかった培地から再抽出したものでは、遊離ステロールの位置にのみ、スポットと放射活性が

認められ、ステロールエステルは存在しなかったことを確認している。しかも、クロマトグラムの他の部分には放射活性が認められないので、菌体に取り込まれたステロールは、単にエステル化される以外に、大きな代謝変換を受けることがないものと思われる。

6. 菌体ステロールのガスクロマトグラフィー

先の実験から、ステロールは、エステル化される以外に大きな代謝変化は受けないようであったが、ステロール構造の範囲内では、変換が起こっている可能性はあるので、菌体に取り込ませたステロールを再抽出して、ガスクロマトグラフィーを行なってみた。培地に与えたステロールは、 β -シトステロール(C_{28})とキャンペステロール(C_{28})である。

その結果、再抽出した菌体ステロールのガスクロマトグラムは、保持時間24.9および29.9分の位置に2つのピークがあり、それらのコレステロールに対する比保持時間は、それぞれ1.31および1.58であり、最初に培地に与えたキャンペステロールと β -シトステロールのピークの位置および比保持時間に一致した。これ以外にピークは認められないので、菌体内に取り込まれたステロールは、ステロール構造の範囲内でも代謝変換されずに、そのまま用いられているものと考えられる。

考 察

キュウリジュース培地の遠沈上清液を用いて培養を行なうより以前から、ある種の培地（例えば、オートミル培地やV-8ジュース培地）では、形成された遊走子嚢は正常な遊走子型発芽を行なうのに、ある培地（例えばジャガイモ煎汁培地や酵母でんぷん培地）では遊走子が泳ぎ出してこないことに気付いていた¹¹⁾。しかしながら、その原因を探るため培地のあらゆる成分を分析し、比較することは困難と思われ、それ以上の追求は行なわなかった。ジャガイモ煎汁培地や酵母でんぷん培地の場合も、キュウリ遠沈上清液の場合と同様に、ステロールの欠如にもとづくものであり、 β -シトステロールの添加により、遊走子型発芽能は回復する。オートミル培地やV-8ジュース培地は、加熱後、遠心分離を行なっても、その上清液で培養した菌体の形成した遊走子嚢は遊走子型発芽能力を有している。この上清液中には薄層クロマトグラフィーにおいてステロールのバンドが認められる。古くより、遊走子嚢や卵胞子形成用の培地として、オートミル培地やV-8ジュース培地が用いられていたのは経験的ではあったが、そのような理由によっていたのである。

ステロールが培地に欠けると形成された遊走子嚢か

ら遊走子が生じないことは、すでに Hendrix (1965)³⁾ は、植物油やコレステロールが *Pythium* や *Phytophthora* の器官形成に及ぼす影響に関する報告の中に、わずかながら記載を残していた。Lilly (1965)⁸⁾ は β -シトステロールもまた同様の効果のあることを明らかにした。しかしながら、彼らの研究は、他の多くの菌類とステロールに関する研究と同様に、その後は、卵胞子形成などの有性器官形成の方向に進み^{2, 4)}、遊走子嚢の間接発芽との関係についての報告は、筆者らの研究を除いて、その後はほとんど皆無である。

Phytophthora はステロールの合成系を欠くため、必要なステロールを外部から取込まねばならない。Richards (1972)²⁰⁾ は前駆物質であるスクワレンも合成できないと述べているが、Wood (1978)^{22, 23)} はスクワレンまでは合成できるが、エポキシダーゼを欠くために、それ以降の代謝過程が進行せず、スクワレンはそのまま水溶性物質にまで分解されてしまうことを明らかにした。Knight ら (1976)⁸⁾ によれば、*P. cactorum* では Δ^5 ステロールは最も取込まれやすく、 Δ^7 がそれに次ぎ、 $\Delta^{5,7}$ は取込まれにくいという。筆者らの結果もそのことを示している。しかも、 Δ^7 や $\Delta^{5,7}$ は菌体内で Δ^5 への変換を受けるらしく、菌体内に $\Delta^{5,7}$ ステロールが見られなくなる。今回の研究でこのことは確かめられなかったが、少なくとも Δ^5 ステロールは、変換を受けることはないようである。いずれにしても、隔膜を形成する菌類では $\Delta^{5,7}$ ステロールであるエルゴステールが、最も普通にみられるステロールであるのとは極めて対照的に、*Phytophthora* では、エルゴステロールは必要としないようである。

前報に述べたように、ステロールを欠く培地で育った菌体から形成された遊走子嚢は、遊走子を放出しないが、これは、遊走子への分割が起こらないのであって、放出能力を欠くためではない。現在のところ、ステロールがなぜ遊走子の細胞膜形成に必要であるのか、また、そのうちでも植物ステロールがとくに好ましいのかはよくわかっていない。有性器官形成や卵胞子形成では、コレステロールも β -シトステロールと同様に有効である^{2, 4)}ので、本菌の遊走子細胞膜の形成とは若干異なるようである。疫病菌の場合、ステロールが無くとも、栄養生長は続け得る。しかし、酵母のステロール要求突然変異株の場合⁵⁾、ステロールを欠くと、一世代以上の生育が不可能であるという。昆虫の中にも、ステロールを要求するものがあり、例えば、アゾキゾウムシの幼虫には、ステロール、とくに、植物ステロールが必要であることが知られている。もし、ステロールがないと1齢だけで死亡する。ステロール

の働きとして、植物サポニンの無毒化やビタミンDの供給源ということも考えられたが、いずれも否定的であり、結局、脱皮ホルモンのエクジソン²¹⁾の原料として必要であることが判明した。しかし、量的にはホルモンをつくるよりはるかに多量に要求するのでそれ以外にも作用があると考えられ、この点で本菌の場合と類似する。昆虫においてステロールの要求性のないように見えるものでも、実際は体内に酵母様の共生者が居り、それからステロールの供給を受けているという報告¹⁷⁾もみられる。いずれにしても、ステロール合成系をもたない生物において、ステロールは、生命を維持する上で絶対に必要なものではないが、種属の維持や増殖のための各種形態形成のために必要であり、なんらかの方法でこれを外部より獲得せねばならない。植物病原菌の場合、植物体への寄生によって、このステロールを獲得しているものと思われる。うどんこ病菌において、その吸器が寄生植物細胞のミトコンドリアを、直接捕獲吸収していることが電子顕微鏡観察において認められている⁹⁾。このような手段で寄生体よりミクロオルガナラの膜系を取込み、ステロールの獲得が行なわれているのであろう。

引用文献

- 1) 安藤鋭郎・寺山 宏・西沢一俊・山川民夫(1967) 生化学研究法 I, 朝倉書店: 50-51.
- 2) Gottlieb, D. (1969) Function of sterol in fungi. In Morphological and biochemical events in plant-parasite interaction ed. by Akai, S. and S. Ouchi, Phytopathol. Soc. Japan (Tokyo): 153-179.
- 3) Hendrix, J. W. (1965) Phytopathol. 55: 790-797.
- 4) Hendrix, J. W. (1970) Ann. Rev. Phytopathol. 8: 111-130.
- 5) Karst, F. and F. Lacroute (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 59: 370-376.
- 6) 桂 琦一・宮田善雄・三谷隆彦 (1968) 京都府大学報・農20: 32-36.
- 7) 桐潤寿子・中村道徳 (1970) 肥質とその周辺, 爪谷・原・福場編, 共立出版(東京): 1-46.
- 8) Knights, B. A. and C. G. Elliott (1976) Biochem. Biophys. Acta 441: 341-346.
- 9) Kunoh, H. (1972) Bull. Fac. Agr. Mie Univ. 44: 141-224.
- 10) Lilly, V. G. (1965) In The fungus spore, Proc. Symp. Colston Res. Soc. 18th., Bristol, England: 259-271.
- 11) Lison, L. (1962) 組織化学および細胞化学 (今泉正訳), 白水社 (東京): 425-426.
- 12) 宮田善雄・桂 琦一・渡辺健三 (1969) 日植病報 35: 376.
- 13) 宮田善雄・桂 琦一・三谷隆彦 (1969) 日植病報 35: 96.
- 14) 宮田善雄・桂 琦一・室川嗣夫 (1970) 京都府大学報・農22: 27-30.
- 15) 宮田善雄・桂 琦一 (1972) 京都府大学報・農24: 33-36.
- 16) 宮田善雄・正子 朔 (1975) 京都府大学報・農27: 32-36.
- 17) Noda, H., K. Wada and T. Saito (1979) J. Insect Physiol. 25: 443-447.
- 18) 野田万次郎 (1967) 脂質実験法, 蛋白質・核酸・酵素別刷, 共立出版(東京): 3-29.
- 19) 小田桐幸彦・宮田善雄・正子 朔 (1980) 日植病大会講要集 2: 21.
- 20) Richards, J. B. and F. W. Hemming (1972) Biochem. J. 128: 1345-1352
- 21) Robbins, W. F., J. N. Kaplanis, J. A. Svoboda and M. J. Tompson (1971) Ann. Rev. Entomology 16: 53-72
- 22) Wood, S. G. and D. Gottlieb (1978) Biochem. J. 170: 343-354.
- 23) Wood, S. G. and D. Gottlieb (1979) Biochem. J. 170: 355-363.
- 24) Williams, W. T. and R. K. Webster (1970) Can. J. Bot. 48: 221-227.

Summary

The fruit juice of cucumber is one of the best culture media for the production of *Phytophthora capsici* zoosporangia which possess the high ability of zoospore formation. On the other hand, a plenty of sporangia produced in the centrifuged super-

natant of this juice medium could not germinate by zoospores. It is because these sporangial protoplasts are unable to separate to individual zoospores.

Sterols were revealed to be the indispensable substances for the zoospore separation by the ana-

lysis of the centrifuged residue of the juice. Cucumber sterol was identified as β -sitosterol by the gas-liquid chromatography. Another plant sterol, stigmasterol was also very effective for the separation to zoospores in the sporangial cells. Cholesterol (an animal sterol) and ergosterol (a fungal sterol)

were gently effective. No stimulation was observed on the zoospore reproduction by squalene, as a precursor and calciferol (vitamin D₂), as a derivative. These indispensable sterols are probably utilized as a kind of structural elements at the cell membrane of zoospores.