

# *Phytophthora castaneae* 卵胞子の多量形成培養法

宮田 善雄・小田桐 幸彦

YOSHIO MIYATA and YUKIHIKO ODAGIRI

A culture method for the mass production of *Phytophthora castaneae* oospores

**要旨：**クリ疫病菌 *Phytophthora castaneae* KATSURA et UCHIDA CCT 691 は、他の多くの疫病菌と異なり、極めて高い卵胞子形成能を有し、卵胞子に関する研究材料として好適である。そこで、本菌を用いて、卵胞子を同調的に、容易に、かつ多量に形成させるための培養方法について検討し、簡便な手順を完成した。すなわち、角型培養びんに、0.1 mg/ml の  $\beta$ -シトステロールを含むキュウリジュース遠沈上清培地をとり、菌体を振とうあるいは静置培養する。菌体量が最大に達したとき、培地を棄て、滅菌脱イオン水で菌体を洗浄し、培養びんを逆さにして、菌体が含まみ得るだけの水分条件として、24~26°C 定温器内にて、3~4日間、さらに培養を行なうと、菌体乾重 1mg 当り  $5 \times 10^4$  個程度の卵胞子が形成され、その成熟度合も70%に達する。その後は密栓して冷蔵(4°C)すれば、3カ月以上、発芽能力は保持され、任意に実験に供し得る。なお、培地はステロールを必要量含むものであれば、既存のいずれのものでもよい。

## 緒 言

クリ疫病菌 *Phytophthora castaneae* KATSURA et UCHIDA<sup>4,9)</sup> は、1950年頃、茨城県下のクリ (*Castanea crenata*) 園においてその成木に激しい胴枯れを起させた疫病菌の一種である<sup>9)</sup>。本種の命名については、分類学上未解決のところもあるが、いずれにせよ、本菌は、他の多くの疫病菌と異なり、極めて容易に、かつ、多量の卵胞子を形成し得ることを特徴としている。一般に、疫病菌の卵胞子に関しては、研究の割には、不明の点が少なくないのは、卵胞子の形成の容易でないことにひとつの原因があると思われる。その点において本菌は、卵胞子に関して研究する上での好材料となり得るものである。筆者らは、疫病菌卵胞子に関する研究を着手するに当たり、まず、本菌において、卵胞子を同調的に、多量に、かつ、簡便に形成させるための培養方法について検討を行ない、一応の満足すべき培養手順を得た。ここにその概要を報告する。

## 材料ならびに方法

供試した菌種は、1969年10月、茨城県下の発病園に

て採取された罹病クリ樹幹から分離したもので、*P. castaneae* CCT 691 と表記する。

基本培地としてキュウリジュース遠沈上清液を用い、ステロールを添加する場合は、100 ppm の Tween 80 水溶液に、少量のアセトンに溶かしたステロールを混合し、その10%量を培地に添加して所定の濃度になるようにした<sup>7)</sup>。供試したステロール、 $\beta$ -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コレステロールはいずれも市販品(半井化学)を求めた。

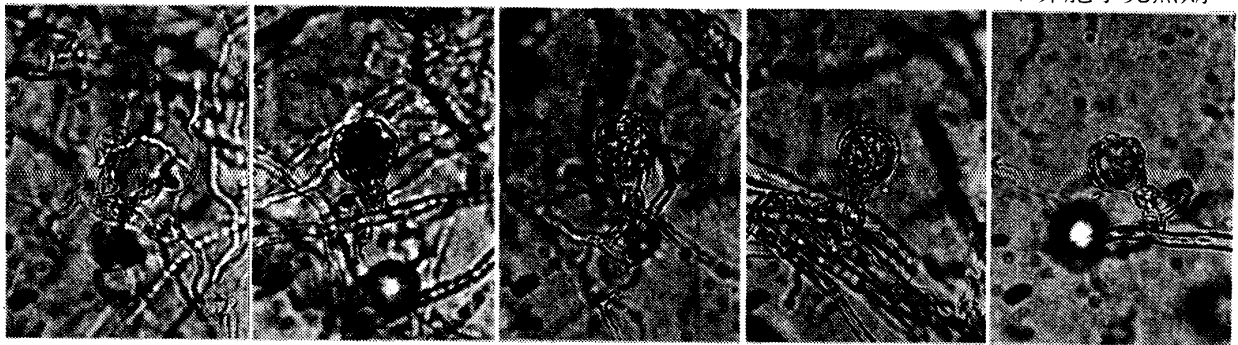
各試験は、原則として、あらかじめ、ジャガイモ煎汁寒天培地(PDA)で培養しておいた菌体を、5 mm 径のステンレスパイプで打ぬき、そのディスクを、前述の液体培地を含む角型培養びんに投入して、振とう培養(28°C, 3日目)した。培養後、培地を棄て、滅菌脱イオン水で2度洗浄し、水を切ったのち、培養びんを逆さにして、24~26°C の定温器に納め、必要時間培養した。前半の菌体育成のための培養を前培養、後半の有性器官形成のための培養を後培養と呼ぶ。光照明の必要な場合は、蛍光灯照明付の定温器(培養位置での照度は1200Lux)を用いた。この場合、対照の暗黒区

京都府立大学農学部植物病学研究室

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

昭和57年7月10日受理

I 有性器官形成期 II 有性器官完成期 III 蔵卵器成熟期 IV 卵胞子形成期 V 卵胞子完熟期



未熟な有性器官  
 蔵卵器の大きさは最大に達しているが、頸部に細胞質を残している。  
 細胞質は蔵卵器の頭部にのみ充滿している。  
 蔵卵器の中に卵胞子が分化しているが、完熟には達していない。  
 卵胞子は成熟し厚い細胞壁をもち、内部が透明化している。

第1図 有性器官における卵胞子への発達段階表示

は、培養びんをアルミホイルで包むようにした。

卵胞子を形成した菌体に 10 ml の脱イオン水を加えて、ラボラトリーエマレーション（テラオカ製）、15000 RPM、60秒間処理にて破碎し、トーマ血球計数盤を用いて計数した。また、發育段階別構成比を求める場合は、次のような規準により判別した。すなわち

〈卵胞子形成における發育段階〉

- 段階 I：有性器官は發育期にある。
- Ⅱ：有性器官は完熟期に達しているが、原形質はまだ頸部に残されている。
- Ⅲ：蔵卵器頸部は空白となり、原形質は蔵卵器頭部のみに充滿している。
- Ⅳ：蔵卵器の中に卵胞子が分化しつつある。原形質は不透明で濃密である。
- Ⅴ：卵胞子の内容は無構造となって透明化し、厚い卵胞子壁が形成されて完熟に達している。（第1図参照）

菌体乾重は、破碎後の菌体をすべてガラス繊維濾過、乾燥ののち、計測して求めた。

結 果

1. 前培養期間

前培養の温度は 26~28°C が生育適温とされているので、一応、28°C とすることにした。培養びんを斜45度に設置して振とう培養を開始し、24、48、72および96時間後に菌体を取り出し、3本分まとめてガラス繊維濾紙上に集め、熱乾燥後、重量測定した。

その結果は、第1表のようになり、菌体量は72時

間後にほぼピークに達するようであり、培養時間は72時間（3日）とすることにした。

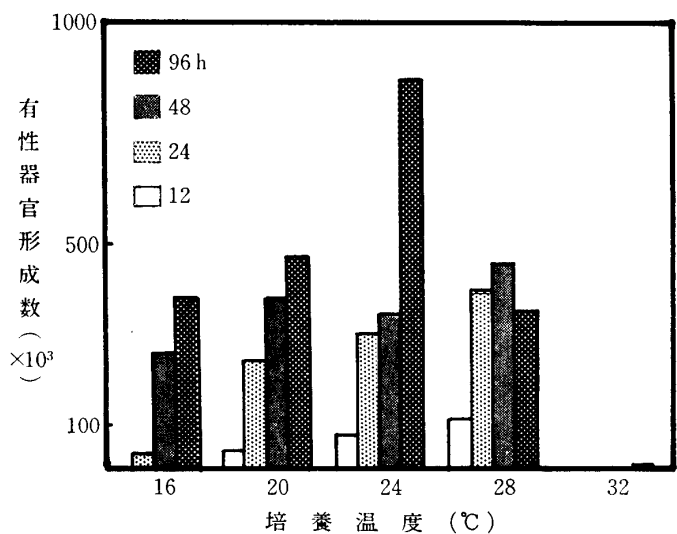
2. 後培養期間

後培養すなわち、有性器官形成培養に適切な温度と

第1表 前培養期間と菌体生育量

試 験	前 培 養 期 間 (時間)			
	24	48	72	96
1	—	2.3	4.3	4.8
2	—	1.2	3.7	4.8
3	2.5	2.5	5.5	5.0
平均	—	2.0	4.5	4.9

\* 数値は菌体乾重 (mg)



第2図 後培養における培養温度別有性器官形成の経時変化

第2表 有性器官の発達段階構成比の経時変化

後培養時間	発達段階別構成比 (%)				
	I	II	III	IV	V
48	7.9	52.4	20.6	11.9	7.2*
72	5.4	16.2	17.8	50.8	4.3
96	0.5	12.2	11.2	16.0	58.0

\* 3培養びん別測定値の形成総数に対する百分率

期間を求めるため、16, 20, 24, 28および32°C の恒温器に納めて、12, 24, 48, 96時間後に、それぞれ培養びん3個ずつについて、形成され有性器官の数を測定した。

結果は第2図に示すように、有性器官の形成は、温度の上昇と共に増加して、24°C 附近においてピークに達し、28°C では逆に減少して、32°C では全く形成されないようであり、また、時間に対しては、経時的に増大することは当然であるが、概して、48時間から96時間の間で伸びが鈍化するの、後培養に適する温度と時間は 24°C, 72時間程度ということになる。

### 3. 後培養時間と卵胞子の成熟度合

前実験より、後培養時間は一応72~96時間の範囲としたが、形成された有性器官の数で調べたものである。そこで、実際に必要であるのは、成熟した卵胞子の数である。そこで、後培養後48, 72, 96時間後に、前述の形態的類別にもとづき、それぞれ発達段階別構成比を求めた。

その結果(第2表)、48時間頃には、卵胞子の形成される以前の状態のものが、全体の80%以上をしめているが、72時間後には、ほぼ半数が卵胞子となり、96時間後には75%近くが卵胞子となって、完熟卵胞子も50%を越えることがわかった。このことから、完熟卵胞子を必要とする場合は、後培養期間は少なくとも96時間(4日)が好ましいことになる。

### 4. 後培養における明暗条件

一般に菌類の胞子形成は光により様々の影響を受けるが、概して促進されるものが多い。本菌卵胞子の場合はどうであろうか。後培養の段階で蛍光灯照明を与えるものと、アルミホイルで包んで暗黒とするものに分けた。

結果は第3表に示すように、有性器官の形成は、平均値において、明条件下では  $51.1 \times 10^3$  個(乾燥菌体重 mg 当り)であったのに対し、暗条件下

第3表 明・暗条件における有性器官形成

試験	暗条件		明条件**	
	有性器官数	菌体重量	有性器官数	菌体重量
1	124.8	3.1 <sup>mg</sup>	65.5	3.2*
2	140.6	4.3	61.5	2.9
3	94.8	2.9	26.4	3.5
平均	120.1	3.4	51.1	3.2

\*  $\times 10^3$ /mg 菌体乾重

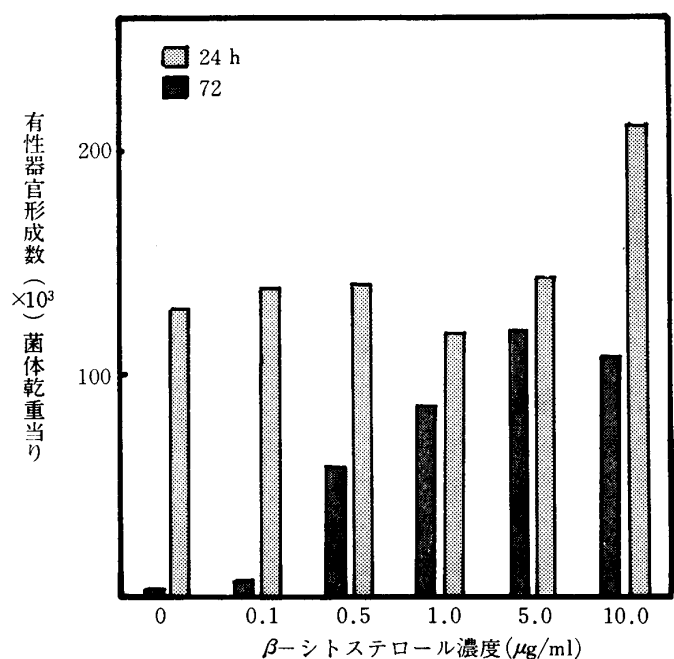
\*\* 蛍光灯照明(1200 Lux)

では  $120.1 \times 10^3$  となり、明らかに、明条件下では有性器官の形成が抑制されていることを示していた。

### 5. ステロールの種類と添加量

本菌はステロールの合成系を欠くため、必要なステロールを栄養として摂取しなければならない。遊走子囊の遊走子の形成に必須であることは既に報告した。卵胞子の形成にも必要であるとする報告が多いが、必ずしも必要でないとするものもある。

結果を第4表に示す。生育菌体量はステロールの有無や種類と関係なく、総平均にして 3.1 mg のほぼ同じ値を示す。一方、有性器官の方は、ステロールの有無によって、極端な差異を示し、ステロールの含まれないものや、前駆体スクワレンの場合には、ほとんど形成されないのに対し、コレステロール、シトステロール、スチグマステロール、エルゴステロールを含む場合は、いずれも、極めて旺盛な形成が認められ、ス



第3図 β-シトステロールの限界有効濃度

第4表 ステロールの種類と添加量別有性器官形成数

ステロール類	試 験	ステロール添加量 (μg/ml)				
		100	50	25	12.5	6.3
コレステロール	1	110.0*	77.5	85.6	40.5	73.8
	2	92.1	46.4	64.1	31.6	18.7
	3	—	61.8	68.2	52.1	85.7
	平均	101.1	61.9	72.6	41.4	59.4
β-シトステロール	1	98.4	72.7	99.2	68.7	109.0
	2	45.7	51.5	71.8	45.4	23.0
	3	—	76.0	92.1	68.9	108.3
	平均	72.1	66.7	87.7	61.0	80.1
スチグマステロール	1	89.1	178.1	101.6	87.8	112.6
	2	76.2	83.2	36.8	75.9	61.8
	3	—	66.3	69.5	72.1	40.3
	平均	82.7	109.2	69.3	67.4	71.6
エルゴステロール	1	76.5	106.0	72.0	85.3	96.5
	2	57.0	45.4	57.0	30.8	59.2
	3	—	43.3	29.0	12.0	61.8
	平均	66.8	64.9	52.7	42.7	72.5
スクワレン	1	3.5	0.7	0.3	0.4	0.8
	2	0.8	0.2	5.5	0.0	0.9
	3	—	4.5	7.8	4.7	6.4
	平均	2.2	1.8	4.5	1.7	2.7

\* 数値は有性器官形成数 (×10<sup>3</sup>/mg 菌体乾重)

対照無添加区の値は各試験において、それぞれ 0, 0.2, 5.7, 平均 2.0

テロール間には、その形成量にほとんど違いは見られなかった。また、濃度が低くなるほど、若干形成量も低下する傾向はあるが、顕著でなく、これは、有効限界濃度がさらにもっと低いところにあるためであろう。

#### 6. ステロールの有効限界濃度

先の実験から、ステロールの有効限界濃度は、6.25 μg/ml よりも低いところにあると思われたので、低濃度で最も高い効果の認められた β-シトステロールについて、さらに低い濃度で、有性器官形成を調べてみた。

結果は第3図にみられるように、後培養24時間では5 μg/ml を境として、有性器官の形成量は低下しはじめるが、0.1 μg/ml の濃度でも、なお若干の形成量の増大が認められた。このように、有効限界濃度は、明確には定め難いが、一応 0.1~0.5 μg/ml の附近にあると考えられる。なお、意外なことに、後培養72時間後には、ステロールを添加しない区においても、添加した区とほぼ同量の多数の有性器官の形成が認められ

たことであり、このことは、ステロールの効果が有性器官の形成にあるのではなく、形成促進にあることを示しているように見える。しかし、形成された有性器官をよく観察すると、ステロールのない場合には、蔵卵器は大きな顆粒を含み、内容がやや粗雑である上、第1図Vのような完全な卵胞子を形成することがなく、質的にかなりの相違が認められた。

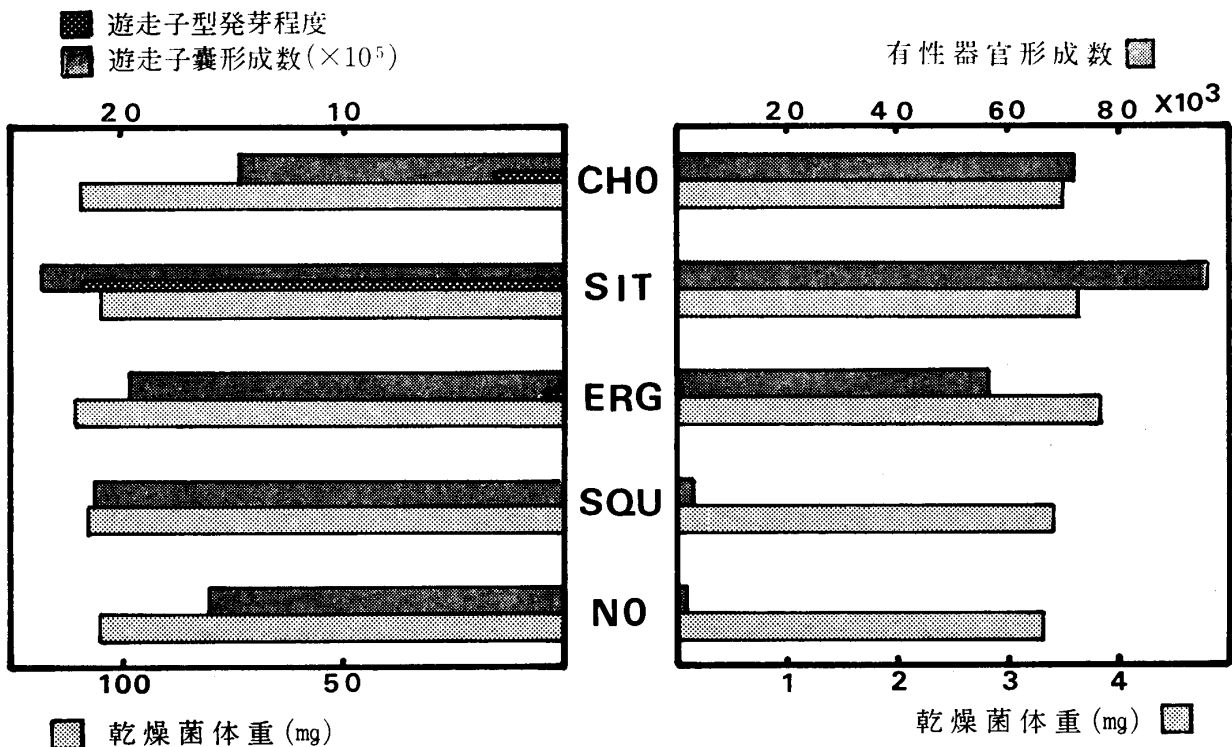
#### 考 察

緒言において、少し述べたように、本菌の種名である *P. castaneae* は、現在、命名上に若干問題が生じている。すなわち、本菌の種名は、桂・内田<sup>9)</sup>により、1969年に新種として提案され、1976年には、日本菌学会報にラテン語説明を付して報告<sup>4)</sup>された。しかるに、1979年、Ko ら<sup>5)</sup>は *P. castaneae* なる種名はすでに Clements ら<sup>1)</sup>の “The genera of fungi” に記載済みであり、無効であるとし、新たに、*P. katsurae* Ko et Chang を提案した。しかしながら、前記 Clements ら

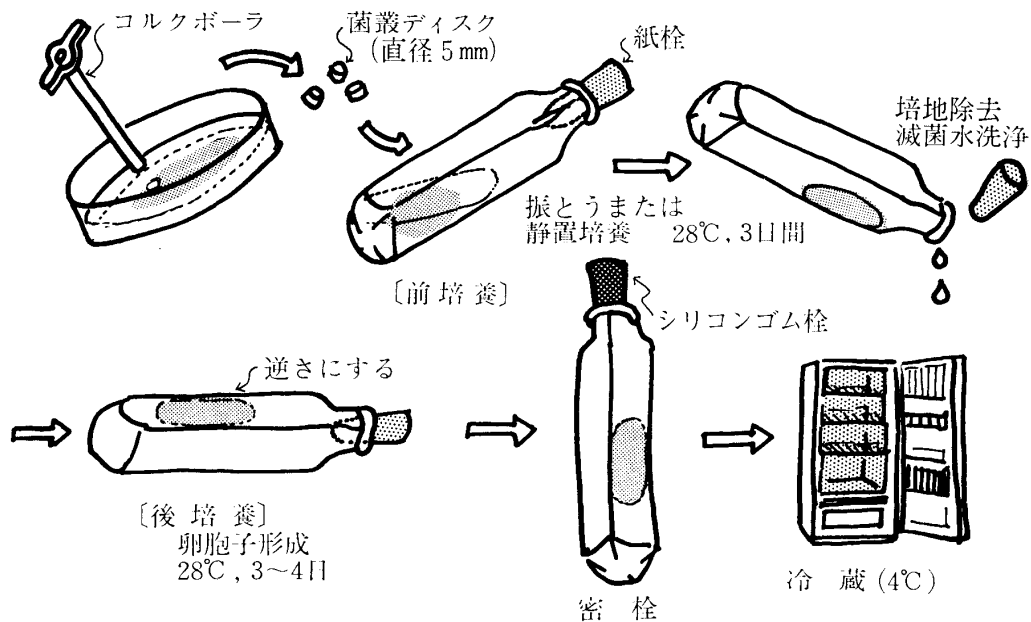
の記載においては、*Mycelophagus castaneae* Mangin が、*Phytophthora* に属するかも知れないとする菌類の項中に入れられているだけで、正式に *Phytophthora* に変更されたわけではなく、原典の記載も、分類学的に十分なものではないと見受けられる。命名者より未だに何らの反論も訂正も述べられていないが、筆者らの見解は、*P. castaneae* は、(1) *Mycelophagus* が *Phytophthora* と同一であるとの証明がなされないかぎり、異種のものであると考える。(2) *P. Katsurae* と同種であるとするには、検討が不充分である。記載しか残っていない場合はともかく、菌株が現存するものである以上、少なくとも対比培養がなされるべきである。因みに *P. Katsurae* は台湾の土中から分離されたものであって、クリの病原菌でない。(3)分類学において、病原性は下位の形質に属するが、本菌は疫病菌の中でもめずらしく特異性の高い病原性をもつものであって、寄生範囲はほとんどクリとその近縁種に限られており、*P. castaneae* の種名を与えるにふさわしい疫病菌であると考え。以上の理由により、筆者らは、今後とも従来通りの種名を用い、当菌株については、種名のあとに由来と分離を区別する記号番号を付した *P. castaneae* CCT 691 をもって表示することにする。

さて、一般に、菌類の胞子を多量に形成させる際に、基本的であるのは、(1)十分な栄養条件下で栄養生長を

豊富に行なわせること、(2)次いで、栄養生長から生殖生長への代謝変化を一気に行なわせること（一般に栄養を断つことであり、飢餓培養と呼ばれる）。(3)このとき、胞子形成の好適な環境を与えることである。本菌の卵胞子形成培養においても、この原則はあてはまり、後述する多量形成培養法の骨子をなすものであるが、いささか本菌に特有の条件も加えられている。すなわち、前培養におけるステロールの添加と、後培養における半乾燥条件である。とくに、ステロールについては、本菌においては、スクワレンからステロール合成系に至る最初の酵素エポキシダーゼを欠くために、ステロールを合成することができず<sup>10)</sup>、それを外部から取り込む必要があった。このステロールは、遊走子嚢の遊走子型発芽において、遊走子への分割、すなわち、遊走子の細胞膜の構成成分として必須であるが、今回の実験から、卵胞子形成の上でも、かなりの重要な働きをもつことが容易に推察される(第4図)。ただし、遊走子嚢における遊走子の分割には、 $\beta$ -シトステロールやステグマステロールが必要で、コレステロールは効果が低く、エルゴステロールはほとんど無効であったが、卵胞子形成においては、これらのステロールはいずれも有効に作用する点異なる。また、ステロールの有効濃度は、遊走子嚢の遊走子型発芽指数が  $3 \mu\text{g/ml}$  ぐらいから限界に達するものに対し、



第4図 各種ステロールが遊走子嚢形成、遊走子型発芽、有性器官形成および菌体生育に及ぼす影響  
 CHO: コレステロール SIT: シトステロール ERG: エルゴステロール  
 SQU: スクワレン NO: 無添加 (いずれも  $25 \mu\text{g/ml}$  添加)



第5図 卵胞子多量形成培養法

- 1) PDA 上にて平面培養しておいた *P. castaneae* の菌そう周縁より、直径 5 mm のステンレスパイプで菌そうディスクを打抜く。
- 2) 25  $\mu\text{g/ml}$  の  $\beta$ -シトステロールを含むキュウリジュース遠沈上清液を入れて角型培養びんに移植し、3~4 日間、28°C で前培養を行なう。
- 3) 培地を棄て、滅菌水で 2 度洗浄する。
- 4) 培養びんを逆さにして、菌体を天井側の内壁にへばりつくような状態で後培養に移す。培養温度は 24~26°C、暗黒条件がよく、3~4 日培養を続ける。
- 5) 卵胞子の形成を確認した上、シリコンゴム栓をして冷蔵庫 (4°C) 内に保存する。成熟した卵胞子は 3 カ月以上発芽能力を失わなない。任意に取出して実験に供する。

卵胞子形成の場合、0.5~0.1  $\mu\text{g/ml}$  において、効力を有する点でも若干差異を感じる。なお、ステロールを含まない区においても、培養時間が長くなると、有性器官を多数形成するようになる。このようなことから、卵胞子の形成にはステロールは必ずしも必要でないとする考え方もあるが、これらの有性器官は光学顕微鏡観察においても、細胞質は粗雑な様相を示し、完全な卵胞子を形成することがない。ちょうど、ステロールを含まない遊走子嚢がかなり多量に形成され、また、外形的にも、正常な遊走子嚢とよく似てはいるが、内容的には、粗雑で、オルガネラにとぼしく、不完全な膜構造をとり込んだ“がらくた胞”を内包するのによく似た状態である。これらの点については引続き微細構造観察結果として報告するつもりである。

以上のように、クリ疫病菌の卵胞子を容易に多量に培養し、任意に供試することができるようになった。方法的にも、また、形成される卵胞子の数量などにおいても、まだまだ検討を要する点がないこともみないが、一応、この方法により形成させた卵胞子を用いて、卵胞子の形成や、その微細構造の変化や耐久性のメカ

ニズム、あるいは、発芽過程などに関する一連の研究を進めつつある。

#### 引用文献

- 1) Clements, F. E. and C. L. Shear (1931) The Genera of Fungi, Wilson.
- 2) Elliott, C. G. (1972) J. Gen. Microbiol. 72: 321-327.
- 3) 本田雄一 (1979) 植物防疫 33: 430-438.
- 4) Katsura, K. (1976) Trans. Mycol. Soc. Japan 17: 238-242.
- 5) Ko, W. H. and H. S. Chang (1979) Mycologia 71: 840-844.
- 6) 宮田善雄・渡辺健三・正子 朔 (1980) 京府大学報・農 32: 30-38.
- 7) Pratt, G. R. and J. E. Mitchell (1973) Can. J. Bot. 51: 595-599.
- 8) Ribeiro, O. K. (1978) The source book of the genus *Phytophthora*.
- 9) 内田和馬 (1967) 植物防疫 21: 383-387.
- 10) Wood, S. G. and D. Gottlieb (1978) Biochem. J. 170: 343-354.

### Summary

The pathogenic fungus *Phytophthora castaneae* CCT691 that causes chestnut trunk rot differs from of the many other Phytophthora in that it produces oospores extremely easily, and is a favorable material for the study of oospores. We developed a culture method of this organism by which a large amount of oospores were easily produced in synchronization.

The Phytophthora was cultured by shaking culture in a square vial containing the centrifuged supernatant medium of cucumber juice with 0.1 mg/ml of  $\beta$ -sitosterol added. When the fungal body attained its

maximum size, the medium was discarded, and the fungal body was washed with sterilized deionized water. The culture vial was then overturned to remove the water except that the fungal body could retain. After a 3- to 4-day dark culture in this water condition, about  $5 \times 10^4$  oospores per 1 mg fungal bodies were produced, with a maturation rate of 70%. These oospores retained their ability to germinate for at least 3 months when they were sealed and kept refrigerated (4°C), and could be used for experimentation as needed.