

# *Phytophthora castaneae* の卵胞子形成過程

## における微細構造とステロールの有無

宮田 善雄・小田桐 幸彦

YOSHIO MIYATA and YUKIHIKO ODAGIRI

Fine structural comparison of *Phytophthora castaneae*  
oogonia and oospores with or without sterol

要旨：クリ疫病菌 *Phytophthora castaneae* CCT 691 は、先に報告した多量形成培養法において、ステロールの存在しない場合にも多量の有性器官を形成するようになる。この有性器官は外形的には、ステロールの存在する場合のものと、大きな差異はないが、その内容には相当の違いがある。すなわち、ステロール欠蔵卵器は細胞質が粗雑で、四酸化オスミウム染色性の不定形の大きな顆粒を含むのに対し、有ステロール蔵卵器は、細胞質は細密で、全体が均一なオスミウム染色性を示し、成熟卵胞子が形成される。この様相の違いは電子顕微鏡で観察するとさらに明瞭である。すなわち、ステロール欠蔵卵器内においても、核、ミトコンドリア、ER、脂質顆粒などはほぼ正常に存在し、蔵卵器に特有の好オスミウム胞も認められたが、有ステロール蔵卵器において次第に形成されてくるリソゾーム様胞嚢が、ステロール欠蔵卵器では形成されず、そのかわりに、かつて報告した、ステロール欠遊走子嚢で観察されたと同様のがらくた胞や、その内部にみられた不完全小胞群が細胞質の中に散在していた。ステロール欠蔵卵器では、後期になっても、卵胞子は形成されず、好オスミウム胞は次第に融合して、巨大な塊を形成するようになる。これが光学顕微鏡でみられたオスミウム濃染顆粒に相当するものであろう。このように、疫病菌にあっては、ステロールは、正常な卵胞子を形成するためにも必須の物質であると思われる。

### 緒 言

疫病菌は卵菌綱に属するが、その綱名の由来は、卵胞子という特有の胞子を形成するからである。この卵胞子は、厚い細胞壁を有し、極めて耐久的で、疫学上重要な意味をもつばかりでなく、卵胞子形成の様相は、細胞の形態形成や有性現象の上でも、極めて興味深い内容を含んでおり、古来、その研究報告は枚挙にいとまがないほどであるが、その割には、詳細について、いまだ不明の点が少なくない。その理由のひとつに、卵胞子が一般に極めて形成が容易でないことが挙げられよう。

演者らは、クリ疫病菌 *Phytophthora castaneae*

KATSURA et UCHIDA<sup>6)</sup> が極めて容易に多量の卵胞子を形成することに着目し、本菌の多量形成培養法<sup>7)</sup>を開発し、卵胞子形成のメカニズムを解明するための研究に着手した。本報告は、ステロールを含まない培地で培養した菌体が形成する有性器官が、形態的には正常なステロールを含む有性器官に近似するものの、その細胞質の微細構造や、その後の卵胞子形成に至る過程において、著しく異なることを電子顕微鏡を用いて、明らかにしたものである。一般に、疫病菌やピシウム菌において、卵胞子形成にステロールが必要であるとする報告が多いが、ステロールはあってもなくてもよいとする考え方もあった。しかし、ステロールは、正常な遊走子嚢の形成に必須であった<sup>9,10)</sup>と同様に、卵

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57年7月10日受理

胞子の形成にも極めて重要な働きをなすものであった。

### 材料ならびに方法

本研究には、クリ疫病菌 *P. castaneae* CCT 691 を用い、後述する単遊走子分離方法により得た菌株のうち、最も卵孢子形成能の高い菌株 No. 6 を選び、その後の研究にはすべて、この菌株を用いることにした。

卵孢子多量形成培養法<sup>11)</sup>により、卵孢子を形成させた角型培養びん内に、滅菌水を 4 ml 入れ、蛍光灯照明付定温器に移し、28°C、24~48時間培養して遊走子嚢を形成させた。さらに、4 ml の滅菌水を置換して、20°C の定温器に移し、遊走子を発芽させた。この遊走子懸濁液の 0.2 ml をとり、ペトリ皿の素寒天培地上に滴下し、コンラジ棒で全面に均一に拡げた。28°C で18時間培養し、顕微鏡下で、単一の遊走子（被嚢胞子）から生じたことの明らかな菌糸体を探してマークをつけ、周辺に他の菌糸や被嚢胞子のないことを確認した上で、直径 2 mm の金属パイプで打抜き、PDA を分注したペトリ皿に移植した。28°C で培養し、その間、1~2度、検鏡して、他の菌糸の発達がないことを調べ、単一遊走子から由来する菌叢であることを確信できたもののみ、その菌叢周縁より菌体を斜面培地に保存培養した。このような方法により、単一遊走子菌株 No. 1~19 を得た。

電子顕微鏡観察に用いる卵胞子は、ステロールを含むあるいは、含まないアスパラギン・グルコース培地を用いて、卵孢子多量形成培養したものをを用いた。24 および72時間後に、有性器官を形成している菌体を、まず、氷冷下で、2.5%グルタルアルデヒドリン酸緩衝液で、約1時間固定し、洗浄後、さらに、1%四酸化オスミウム水溶液にて固定し、アルコールシリーズにより脱水後、プロピレンオキサイドを経て、シュプール樹脂に包埋し、超薄切片として、酢酸鉛染色のち、電子顕微鏡観察した。

## 結 果

### 1. 単遊走子分離菌株の比較

得られた19菌株について、平面培養における菌叢形態、先端菌糸の形状、菌糸伸長速度（菌叢直径に相当）、有性器官形成能およびその発達段階別構成比などを比較し、最良の供試菌株を選出した。

培地は、0.1 mg/ml の  $\beta$ -シトステロールを含む PDA を用い、28°C で4日間培養した。有性器官形成数は、菌叢の中心より 10 mm はなれた距離において、直径 5 mm のディスク 8 個を打抜き、10%フォルモールカルシウム液で固定後、ラボラトリーエマレーショ

第1表 単遊走子分離菌株の菌糸伸長と有性器官形成

菌株 No.	菌 糸 伸 長	有性器 官 形 成	菌株 番号	菌 糸 伸 長	有性器 官 形 成
1	7.84*	3.04**	11	8.09	5.04
2	7.66	4.88	12	7.91	3.68
3	8.00	3.36	13	8.25	2.08
4	7.91	3.20	14	7.91	2.80
5	8.00	3.04	15	8.25	2.72
6	8.25	6.00	16	7.59	3.36
7	7.59	3.76	17	7.71	2.32
8	7.84	5.12	18	7.84	1.52
9	7.50	1.84	19	7.91	2.64
10	7.88	2.80	親株	7.59	4.40

\* mm/日

\*\*  $\times 10^3/\text{mm}^2$

ン（テラオカ）で分散させ、血球計数盤を用いて測定した。また、有性器官形成能の高い4菌株については、発達段階別構成比を調べて比較した。

その結果、菌叢の形態は、いずれも密で、周縁は雲状型を呈し、バラ花模様 (divergent type) を有し、菌株間にとくに変異はみられなかった。菌糸伸長速度については、8 mm/日を越えるもの (No. 3, 5, 6, 11, 13, 15) から、7.6 mm 以下のやや遅いもの (No. 7, 9, 16) などがみられたが、いずれも大きな相違は認められなかった。また、有性器官形成数ではかなりのバラツキがあり、 $5 \times 10^3/\text{mm}^2$  以上の形成がみられたものは No. 6, 8, 11 であり、No. 2 も比較的少量であった。これに対し、No. 9 ( $1.84 \times 10^3/\text{mm}^2$ ) や No. 18 ( $1.52 \times 10^3/\text{mm}^2$ ) のようになりに少ないものもあった (第1表)。

次に、多数の有性器官を形成した No. 2, 6, 8 および11菌株について、菌叢の中心からの距離別（つまり菌糸の生育齢別）に、有性器官の各発達段階（前報<sup>11)</sup>の規準と代表例参照）の構成比を調べたところ、第2表のようになり、No. 8 のように、すでにV段階に達して完熟卵胞子を形成しているものもあれば、No. 2 のように、ほとんどV段階に達していないものもあった (第1図)。この結果から、有性器官の形成数の最も多い No. 6 菌を今後の供試材料として用いることにした。

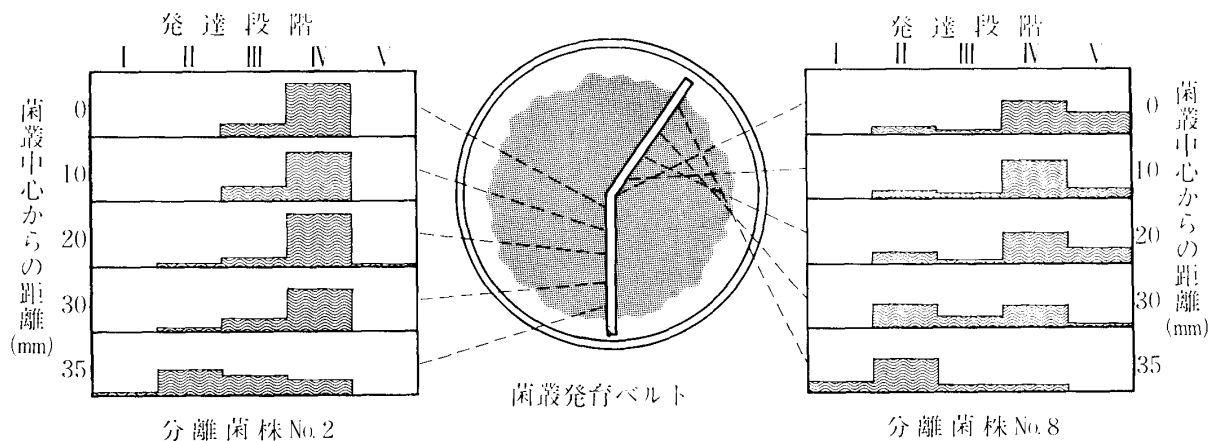
### 2. ステロールの有無と有性器官形成

$\beta$ -シトステロール 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を含む培地に生育した菌体は、後培養に移すと、わずか24時間でかなりの有性器官が形成されるのに対し (図版IV-1, 2)、ステロールを含まない場合は、ほとんど形成をみない (図版

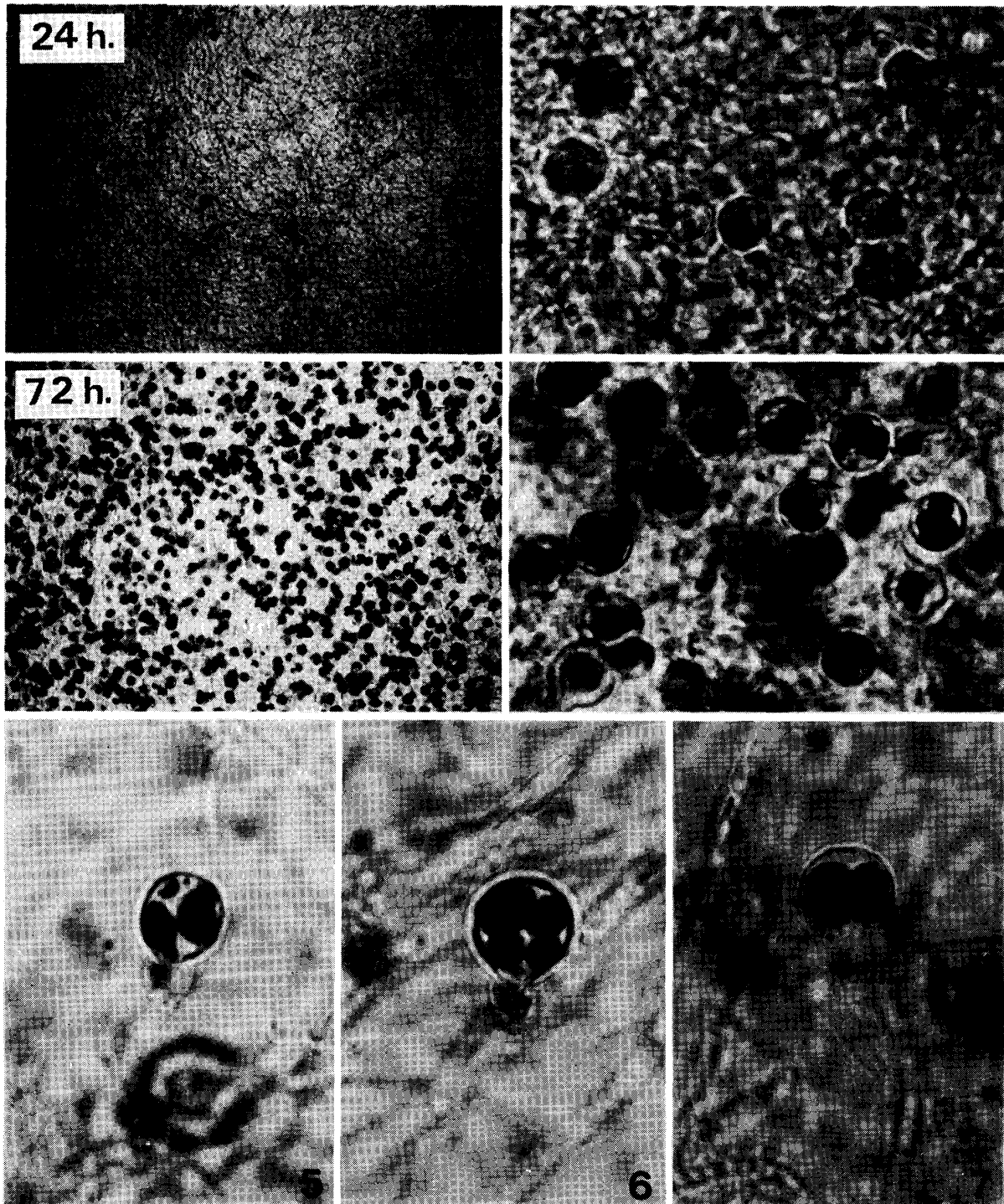
第2表 有性器官形成能の高い4種の菌株における発達段階構成比

菌株 No.	中心からの距離	発達段階構成比 (%)					有性器官数
		I	II	III	IV	V	
2	0 mm	0*	0	19.4	80.6	0	86**
	10	0	0	22.2	77.8	0	107
	20	0	7.7	7.7	80.8	3.8	85
	30	0	8.0	20.0	72.0	0	73
	35	4.2	39.6	29.2	27.0	0	76
6	0	7.4	18.5	14.8	59.3	0	179
	10	0	11.5	0	76.9	11.5	378
	20	0	10.0	7.5	70.0	12.5	334
	30	0	27.0	10.8	56.8	5.4	312
	35	10.0	23.3	36.7	30.0	0	50
8	0	0	12.5	4.2	50.0	33.3	100
	10	0	13.6	9.1	59.1	18.2	134
	20	0	20.7	6.9	48.3	24.1	93
	30	0	40.0	20.0	36.0	8.0	87
	35	17.2	55.2	13.8	13.8	0	57
11	0	0	0	50.0	20.0	30.0	73
	10	5.5	16.7	16.7	44.4	16.7	61
	20	6.6	46.7	26.7	20.0	0	63
	30	20.0	20.0	33.3	26.7	0	38
	35	46.7	40.0	13.3	0	0	52
親株	0	0	11.8	23.5	64.7	0	208
	10	3.7	14.8	7.4	74.1	0	197
	20	0	0	25.8	67.7	6.5	133
	30	0	17.5	2.5	80.0	0	105
	35	0	8.0	24.0	68.0	0	150

\* 有性器官総数に対する各発達段階にある器官の百分率  
 \*\* mm<sup>2</sup> 当りの有性器官数



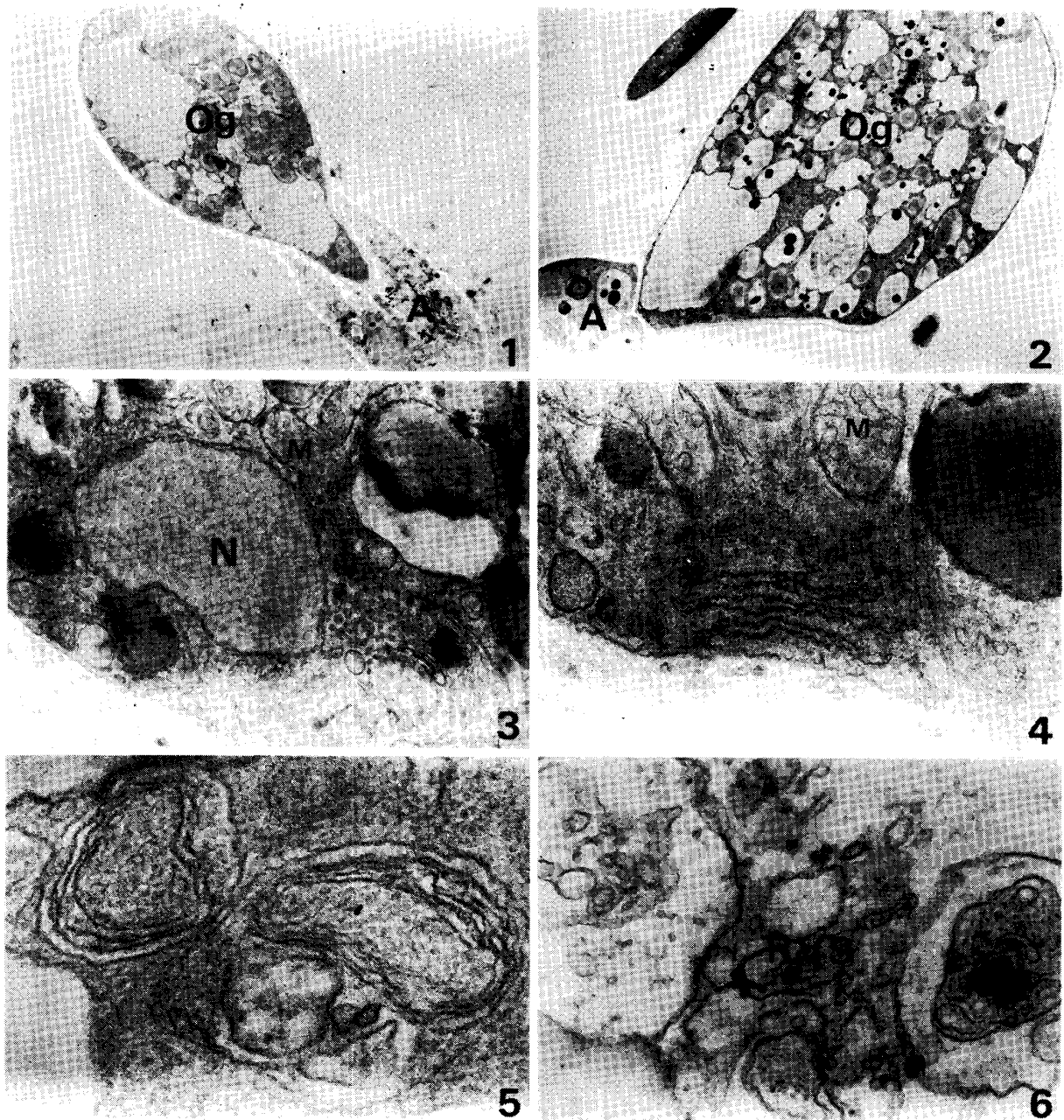
第1図 有性器官形成能の高い2菌株における卵胞子形成への発達段階別構成比



図版I ステロール欠有性器官  
四酸化オスミウム染色（光学顕微鏡観察）

I-1, 2)。ところが、72時間後になると、ステロール欠においても、多数の有性器官が認められ（I-3）、数の上では、有ステロール区に相当する（IV-3）ほどの量に達することもある。このことから、ステロールは、有性器官の形成に必ずしも必要なものではなく、ただ形成を促進するにすぎないようにも見える。しかしながら、これらを四酸化オスミウムで固定染色して観察

すると、ステロールを有する蔵卵器（以下、ステロール蔵卵器と称する）においては、均一に細胞質がオスミウムで染色されており、やがて、厚い細胞壁をもった卵胞子が形成され、その細胞質も一様に黒染されて見える（IV-2, 4~7）。ところが、ステロールを欠く蔵卵器（以下ステロール欠蔵卵器を称する）は、黒色の大型、不定形の顆粒が不均一に存在し、完全な型の卵



図版Ⅱ 若いステロール欠蔵卵器の微細構造

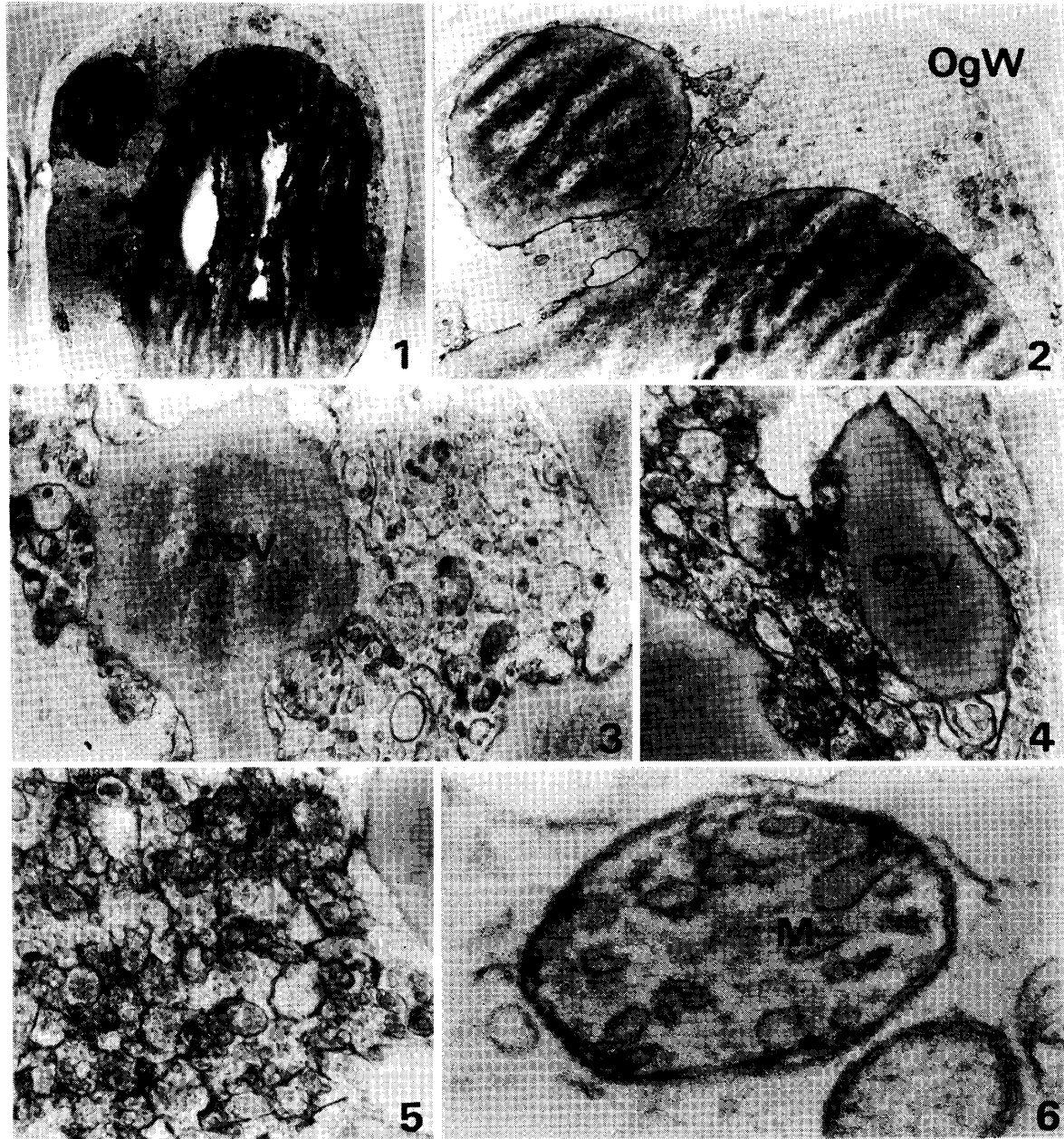
Og: 蔵卵器, A: 蔵精器, N: 核, M: ミトコンドリア, ER: 小胞体  
OSV: 好オスミウム胞, RVS: がらくた胞様構造

胞子が形成されることはない (I-4~7)。さらに、ステロール蔵卵器の表面に発達するコブ状の突起が、ステロール欠蔵卵器ではみられないことも、ひとつの相違点である。

### 3. 若いステロール欠蔵卵器の微細構造

図版Ⅱ-1, 2に示す蔵卵器 (oogonium, OG) は、まだ頸部に細胞質を残し、蔵精器 (antheridium, A) の細胞質もオルガネラに富むので、若い時代である。細胞内には、大きな液胞が存在し、全般的に粗雑な感じはするが、核、ミトコンドリア、ERなどのオルガネラ

は完備しており、脂質に富むと思われる好オスミウム胞 (osmiophilic vacuole, OSV) も多数散見される (Ⅱ-3, 4) などステロール蔵卵器 (後述、図版Ⅴ参照) と本質的に異なる点もあるが、とくに、細胞質内には、崩壊中あるいは未完成のオルガネラ断片と思われる膜構造や小胞群が、胞嚢に包まれたり、あるいは遊離して存在する点は、ステロール蔵卵器と異なる。この異様な構造は、かつて、ステロール欠蔵遊走子嚢内で観察されたがらくた胞 (rabish vacuole) によく似ている。



図版Ⅲ 老化ステロール欠蔵卵器の微細構造

OSV: 好オスミウム胞, OgW: 蔵卵器壁, Mn: ミトコンドリア

#### 4. 古いステロール欠蔵卵器の微細構造

ステロール欠蔵卵器では、老化するに従い、ミトコンドリアにおいては、クリステは断片に分かれ、膜構造が崩れて、消失してゆく(図版Ⅲ)。と共に、多くのオルガネラ類は次第に崩壊しはじめ、好オスミウム胞のみが、次々と融合して巨大な胞裏に発達し、細胞質の中でひときわ目立つようになる。膨大化した好オスミウム胞は、光学顕微鏡観察時に認められた不定形の大きな顆粒に相当するものであろう。

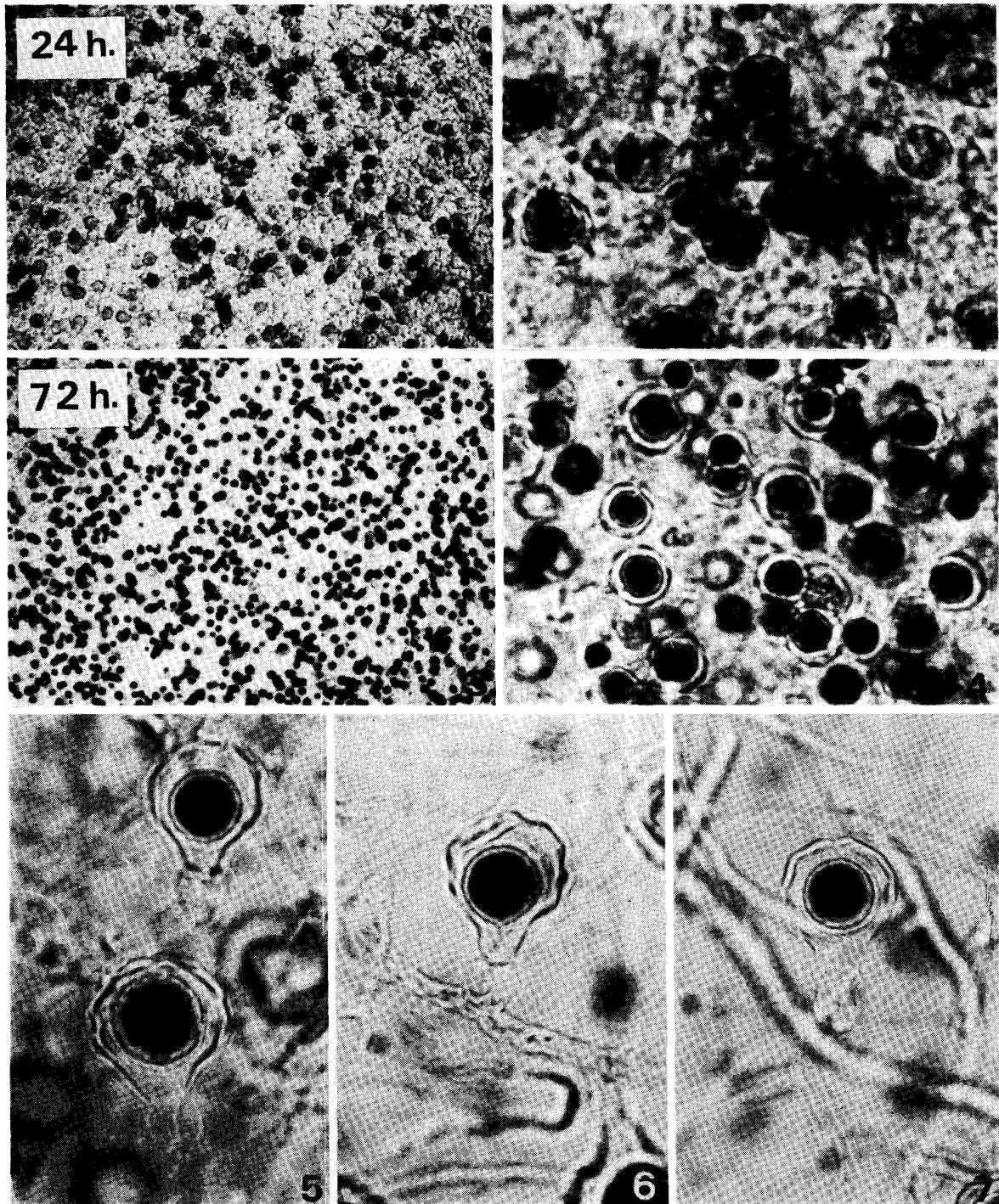
#### 5. 若いステロール蔵卵器の微細構造

図版Ⅴ-1は若い蔵卵器であり、底部の蔵精器内にも

細胞質は充満している。Ⅴ-IIの中心には核が認められ、Ⅴ-3にみられるようにクリステのよく発達したミトコンドリアやERに富み、細胞は旺盛な活動状態にあることを示している。また好オスミウム胞も多数散見される。とくにステロール蔵卵器に特徴的であるのは、リソゾーム様胞囊 (lisosome-like vacuole, LIV) であり(Ⅴ-3, 4)、その内部には脂質様顆粒 (lipid-like body, LB) が取り込まれ、さらに、その分解過程を思わせる像をも認められた。

#### 6. ステロール蔵卵器の成熟期の微細構造

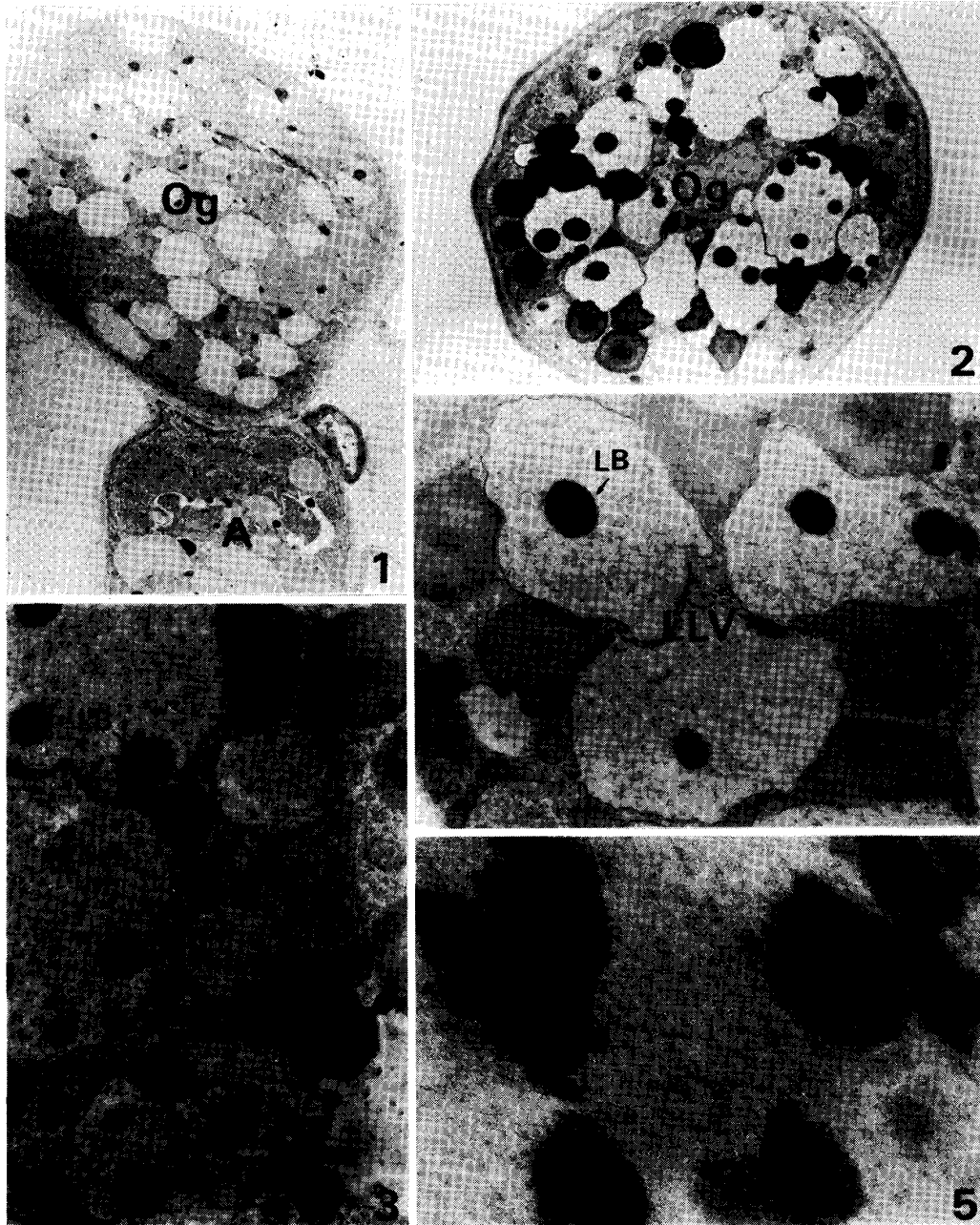
蔵卵器が成熟期に達すると、好オスミウム胞はいくつ



図版Ⅳ ステロール有性器官  
 四酸化オスミウム染色（光学顕微鏡観察）

か融合して、やや大型化することもあるが、ステロール欠蔵卵器のように巨大化することはない。リソゾーム様胞囊の中では、とり込まれた脂質様顆粒はさらに分解が進み、淡色の結晶様構造となって、内部の繊維質部分に拡散する。また、ミトコンドリアやその他のオルガネラ類も次第に崩壊または消失し、濃い微小顆粒が、好オスミウム胞やリソゾーム様胞囊の間隙を埋めるようになる（図版Ⅵ-1, 2）。この頃、これらの細胞

質をとりかこむように、卵孢子の細胞壁の外層が形成される（Ⅵ-3, 4）。この外層が、内部から形成されるのか、外側の蔵卵器の細胞質の働きにより形成されるのかは不明であるが、この外層の形成される時期には、蔵卵器の細胞質内は液泡で占められるようになるが、なお多数のミトコンドリアやその他のオルガネラ類を含んで、活発な細胞活動を保持する様相を示し、とくに、外層付近には、多数の微小顆粒が集積し、また、



図版V 若いステロール蔵卵器の微細構造

Og: 蔵卵器, A: 蔵精器, LB: 脂質様顆粒, LLV: リソゾーム様胞嚢

隣接して ER 様構造が走ることから、むしろ蔵卵器側から形成される可能性が強いように思う。

#### 7. 古いステロール蔵卵器の微細構造

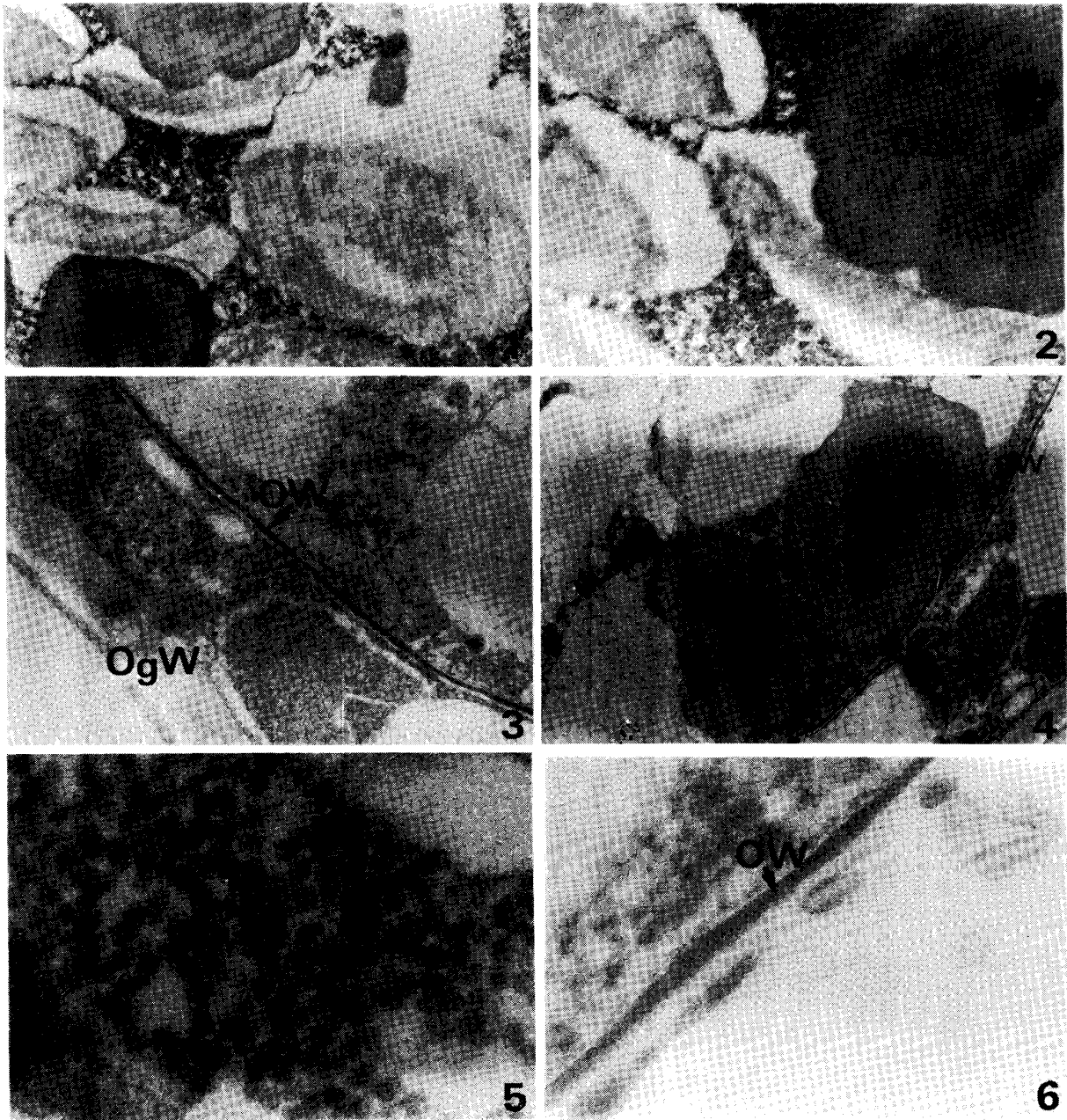
卵胞子の細胞壁の外層と内層が構築されて、卵胞子が完成に近づく頃、蔵卵器の細胞質において、活発な活動期にあったミトコンドリア (VII-2) は、次第にクリスタが不明瞭となり (VII-3)、ラメラ構造となって崩壊し (VII-4)、やがて、蔵卵器壁と卵胞子壁の間は、すべて融合した液胞に占められてしまうようになる。一方、卵胞子では厚い細胞壁が完成し、内部は大きく発達した好オスミウム胞によって、その大部分を占めら

れてしまうようになる。この頃から、厚い細胞壁が樹脂の通過を困難にするためであろうか、良好な超薄切片が得られず、微細構造の観察は容易でなくなる。

#### 考 察

卵胞子形成能にすぐれたクリ疫病菌は卵胞子の研究材料として好適である。前報<sup>1)</sup>で卵胞子を同調的に多量に形成させる方法について述べた。今後は、この培養法により得た卵胞子を用いて、卵胞子の形成から成熟、発芽に至る過程を追究してゆくことになるが、その際に用いる菌株も、さらに安定したものである必



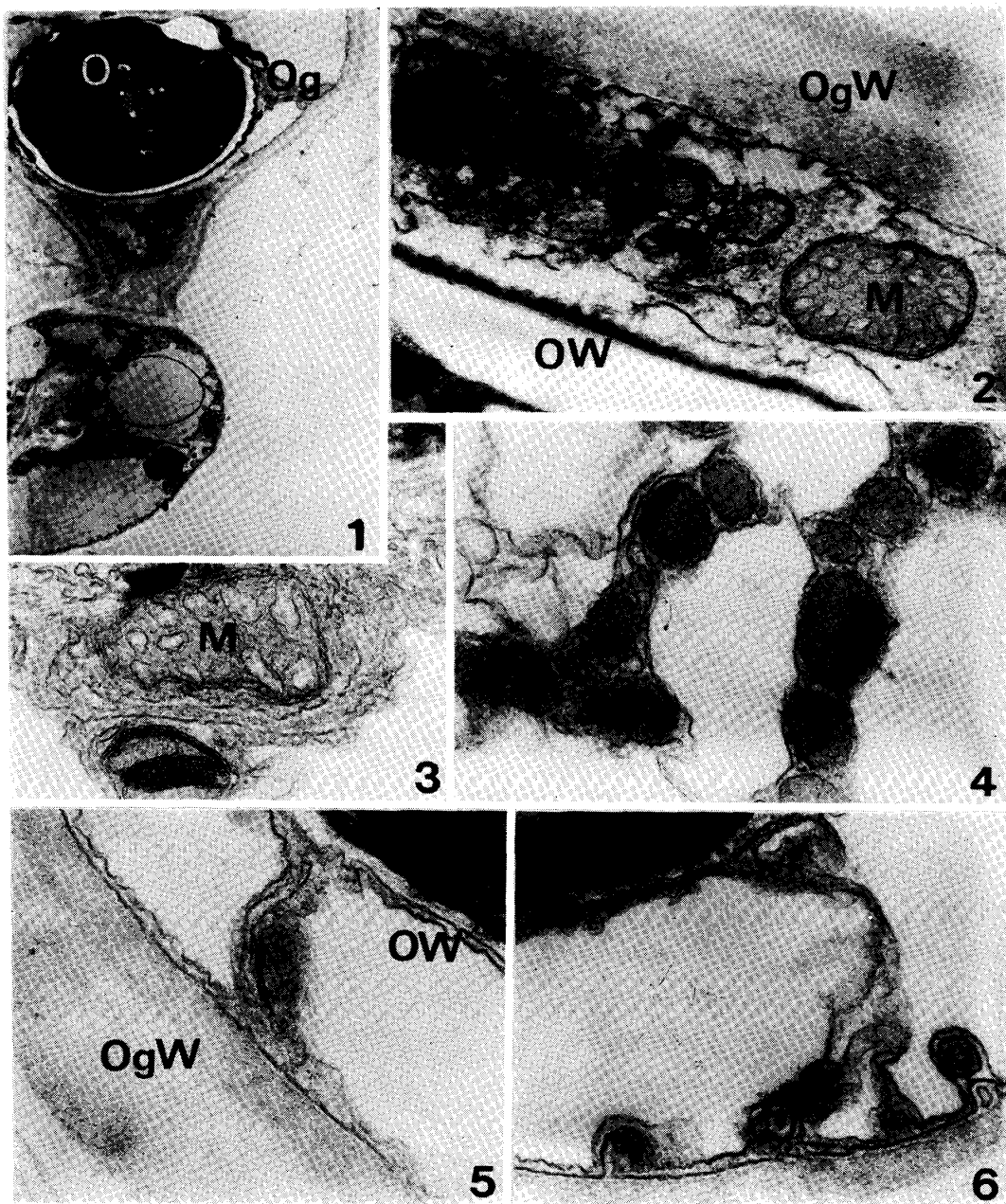


図版Ⅳ ステロール蔵卵器内における卵孢子形成初期の微細構造  
OSV: 好オスミウム胞, OgW: 蔵卵器壁, OW: 卵孢子壁 (外層)

要があるので、本研究では、はじめに単遊走子分離を行なった。単遊走子分離菌株を得ることは、本菌が卵孢子形成において同株性 (Homothallic) であるか、異株性 (Heterothallic) であるのかを明らかにするためにも重要である。今回用いた分離方法は、マニピュレーターのような道具を用いない簡便な方法であるが、確実性に欠けるものではない。ただし、同一の遊走子嚢に由来する遊走子を複数に捕獲する可能性がある。今回の場合で、その確率はほぼ1.8%以下である。

このようにして得た単遊走子菌株間では、菌叢形態や菌糸伸長速度においては、大きな差異はみられな

ったが、有性器官形成では、かなりの変異がみられた。また、有性器官形成能の高いものの間でも、さらに、発達段階構成比においてかなりの違いがあり、結局、形成量が多く、かつ、発達段階も比較的早く経過する No. 6 菌株を、以後の供試株として選出した。なお、単遊走子分離菌株の菌糸伸長速度の比較において興味あることは、親株より早いものが多数あったことで、親株として複数で存在しているときは、その伸長速度の遅いものに制限律速される可能性が認められたことである。ただし単分離株を再び混合したとき、その因子が働くかどうかを確認する必要がある。



図版Ⅶ 老化ステロール欠卵器の細胞質の崩壊と卵胞子の成熟（微細構造）

O: 卵胞子, Og: 蔵卵器, A: 蔵精器, OgW: 蔵卵器壁  
OW: 卵胞子壁（外層）, M: ミトコンドリア

なお、今回の単遊走子分離菌株は、すべて単独で卵胞子形成に至った。従って、本クリ疫病菌は同株性であることが証明された。

すでに報告したように、遊走子嚢の遊走子型発芽にはステロール、とくに  $\beta$ -シトステロールやスチグマステロールのような  $C_{29}$  ステロールが必須であった。卵胞子形成にとっては、ステロールは一般に必要なとする報告が多い<sup>5)</sup> が、必ずしも必要がないとする説<sup>3,4)</sup> もある。これは、ステロールの存在しない条件下でも、一応、有性器官の形成が認められることで、

ときには、不完全ながら卵胞子様球体が形成されることもあって、これらを誤認したものであろう。筆者らが行なったように、四酸化オスミウムで染色して、光学顕微鏡観察しただけでも、ステロール欠蔵卵器の異常性は明らかであった。さらに、微細構造においては、その異常性は明瞭であり、ステロールは卵胞子形成においても必須であることを示している。

ステロールは卵胞子形成において、どのような働きを有しているのであろうか。遊走子嚢の遊走子型発芽においては、遊走子の細胞膜の形成に関与<sup>9,10)</sup> してい

るようであるが、卵孢子の場合も同様である可能性はある。ただし、コレステロールやエルゴステロールなども、 $\beta$ -シトステロールとはほぼ同等の効果があるので、単なる膜の構築というより、さらに、なんらかの代謝を受けている可能性がある。必要限界量も  $0.5 \mu\text{g/ml}$  程度と極めて微量であるので、ホルモン等の素材としての可能性も否定できない。

ステロール欠蔵卵器がステロール蔵卵器と異なる点はいくつかあるが、筆者らが、リソゾーム様胞嚢と呼んでいる胞嚢が形成されない点が最も特徴的であると思われる。この胞嚢は、脂質と思われる顆粒（脂質様顆粒）をとり込んで分解し、内部に結晶様構造が生ずるようになるため、指紋胞 (finger print vacuole<sup>1)</sup>) と呼ばれる。また dense-body vesicle<sup>2)</sup> と称することもあるがあまり適切でない。これとよく似た胞嚢は、遊走子嚢内でも観察され、脂質を含む膜素材の一時貯蔵形態のように思われる。

この他、オスミウム染色性の高い好オスミウム胞の巨大化もステロール欠蔵卵器の特徴であるが、これは卵孢子形成への過程が進行しないために、細胞質のバランスが崩れ、物理的に融合が促進されたためであろう。卵孢子壁が形成に至らないことなどもあるが、いずれも形態形成にいたる流れの停止の結果と考えてよからう。また、ステロールの作用は、蔵卵器の外壁の突起形成にも及ぶようであるが、ステロールが直接作用しているのではなく、卵孢子の形成過程と併行した蔵卵器の成熟経過の進行の結果と考える方がよい。

卵孢子形成におけるステロールの役割を解く上でも卵孢子の誕生から成熟、さらには発芽に至る過程についての基本的な詳細な研究を必要とするが、残念ながら、卵孢子は成熟に至ると共に、厚い細胞壁が形成され、

そのために樹脂や種々の試薬類の通過がさまたげられ、一種のブラックボックスになることになる。それを打解するためには細胞壁をなんらかの方法で分解あるいは粗雑にする必要がある。すでにカタツムリ消化処理や超音波処理などが試みられているが、筆者らの開発したサカマキガイ処理はこれらに勝る有力な手段と云える。すでに、ある程度の内部の詳細をつかみつつあるが、次の機会にあわせて報告することになる。

## 引用文献

- 1) Bartnicki-Garcia, S. and D. E. Hemess (1976) *The fungal spore*, John Wiley and Sons, New York.
- 2) Beakes, G. W. (1980) *Can. J. Bot.* 58: 209-227.
- 3) Child (1971) *Can. J. Bot.* 49: 329.
- 4) Elliott, C. G. (1972) *J. Gen. Microbiol.* 72: 321-327.
- 5) Hendrix, J. W. (1970) *Ann. Rev. Phytopathol.* 8: 111-130.
- 6) Katsura, K. (1978) *Trans. Mycol. Soc. Japzn* 17: 238-241.
- 7) 宮田善雄・桂 瑋一・室川嗣夫 (1970) 京府大学報・農 22: 27-30.
- 8) 宮田善雄・桂 瑋一 (1972) 京府大学報・農 24: 33-36.
- 9) 宮田善雄・渡辺健三・桂 瑋一 (1980) 同上 32: 30-38.
- 10) 宮田善雄・大杉 武・正子 朔 (1980) 同上 32: 39-50.
- 11) 宮田善雄・小田桐幸彦 (1982) 同上 34: 28-34.
- 12) 宮田善雄・高野仁孝・正子 朔 (1981) 日植病報 47: 378.
- 13) Pratt, G. R. and J. E. Mitchell (1973) *Can. J. Bot.* 51: 595-599.
- 14) Ribeiro, O. K. (1978) *The source book of the genus Phytophthora.*

## Summary

Abundant oogonia of *Phytophthora castaneae* CCT 691 were formed even when sterol was omitted from the centrifuged supernatant medium of cucumber juice. In external appearance these oogonia resembled those produced in the medium containing sterol, but they were different in cell content.

The oogonium produced in the medium lacking sterol had a rough cytoplasm containing several large osmiophilic granules, whereas that produced in the medium containing sterol had a dense uniformly osmiophilic cytoplasm. Mature oospores are produced in the latter oogonium. The difference between these two types of oogonia was clear even in the fine structure by the observation of electron microscope. The

oogonium produced in the medium lacking sterol had the osmiophilic vacuoles as well as a nucleus, mitochondria, ER, and lipid-like granules, but lacked the lysosome-like vacuoles characteristic of the oogonium produced in the medium containing sterol. In the oogonium produced in the medium lacking sterol, rubbish vacuoles and irregular vesicles were distributed sporadically in the cytoplasm, the oospore wall was not produced even at the late stage, and the osmiophilic vacuoles were finally fused and developed into a giant mass. This giant mass was the osmiophilic granules observed under the light microscope.

This finding indicate that sterol is essential for the production of oospores in this fungus.