

Phytophthora vignae Purssの卵胞子発芽とその要因

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	石黒, 潔 宇井, 格生
発行元	日本植物病理學會
巻/号	47巻2号
巻号補足	
掲載ページ	p. 213-217
発行年月	1981年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



Phytophthora vignae Purss の卵胞子発芽とその要因*

石黒 潔**・宇井格生***

Kiyoshi ISHIGURO** and Tadao UI***: Factors Influencing the Germination of Oospore of *Phytophthora vignae* Purss*

Abstract

Oospores of *Phytophthora vignae* were prepared by repeated floatation and sedimentation of macerated colonies on V-8 Juice agar containing β -sitosterol. Approximately 10^6 of almost pure oospores were harvested from an agar plated culture in 9 cm Petri-dish. Some of the oospores formed in the dark at 25 C, germinated even 10 days after they were produced. The percentage of germination increased with their age, being highest from 20 to 90 days after they were produced. Oospores, 30 days old, germinated with or without light during their production and germination, though it stimulated the germination and increased the percentage.

(Received November 14, 1980)

緒 言

近年北海道で発見されたアズキ茎疫病菌は *Phytophthora vignae* の一系統とされているが^{6,7)}、本菌は homothallic な菌で、圃場においてアズキ茎の罹病組織内に多数の卵胞子を形成する。この卵胞子は本菌の耐久生存器官であり、その発芽によって第一次感染が起こると考えられ、本病の生態を解明するためには卵胞子の発芽とそれに影響する要因について研究する必要がある。また本菌の遺伝学的研究を行うにも卵胞子を高率に発芽させる方法を知る必要がある。

Phytophthora 属の卵胞子を高率に発芽させることは一般に困難とされ¹⁶⁾、光の照射^{2,11,12)}、 β -glucuronidase などの酵素処理^{1,14)} による発芽の促進が試みられている。また、発芽は卵胞子の齢が進むにつれ増加することも知られている¹⁵⁾。

本論文では *P. vignae* の卵胞子発芽に対する光および温度の影響、卵胞子の加齢と発芽率の変化について検討した。

実験材料と方法

使用菌株 北海道上川支庁永山町、および十勝支庁芽室町の圃場のアズキから分離した菌から得た単遊走子分離株 VN, VM を使用した。

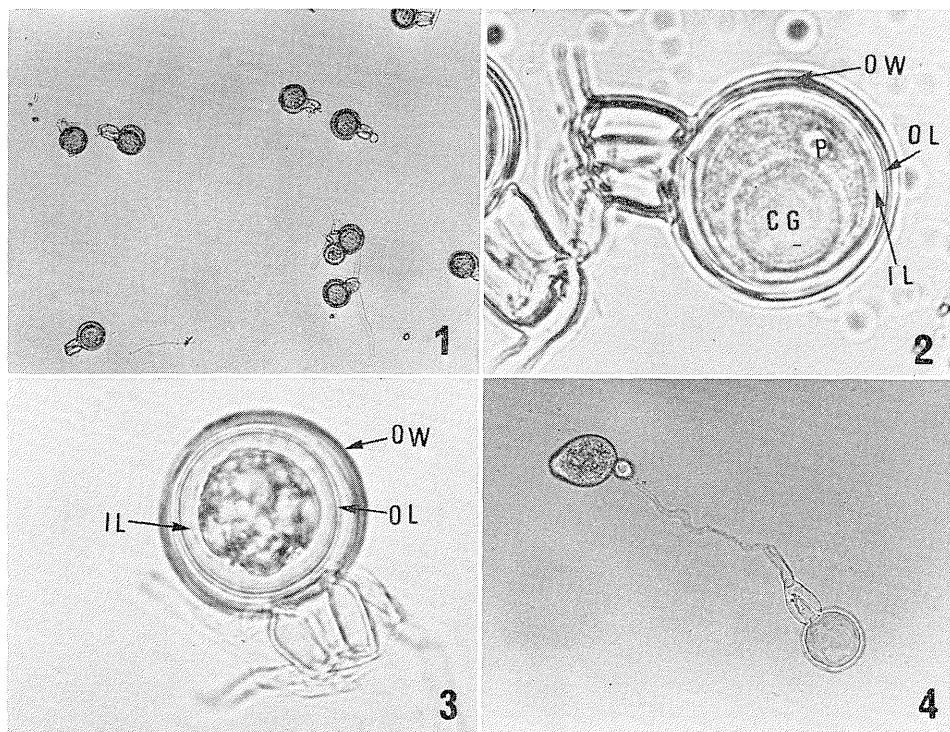
卵胞子の形成 β -sitosterol 30mg/l 加用の V8 ジュース寒天培地 (V8-JA)⁵⁾ を 9 cm のペトリ皿に普通の場合には約 10ml、長期間培養する場合には約 20ml 分注して卵胞子形成用培地とした。接種源にはあらかじめ V8-JA で培養した菌そうの先端部を 5 mm のコルクボーラーで打ち抜いたものを用いた。特に言及しない限り 25 C の暗所で卵胞子を形成させた。照明する場合は白色蛍光灯をペトリ皿の上から照射し、培地面の照度を約 1,500 lux とした。菌そうは約 1 週間でペトリ皿全面に拡がり、すでに多数の卵胞子を形成していた。予備実験において移植後 10 日目と 30 日目の培地の単位面積当たりの卵胞子数はほぼ同じであったから、卵胞子は移植後 10 日目以内にすでに形成していたと認められる。

卵胞子の単離 卵胞子を形成している菌そうを寒天培地ごとペトリ皿からはがし、ペトリ皿 1 枚当たり

* 本研究の一部は昭和55年度日本植物病理学会北海道部会で発表した。

,* 北海道大学農学部 Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan

*** 現在農林水産省北陸農業試験場 Present address: Hokuriku National Agricultural Experiment Station, Joetsu, Niigata 943-01, Japan



Figs. 1, 2, 3, 4. Oospores of *Phytophthora vignae*

1. Oospores obtained by repeated floatation and sedimentation of a homogenized colony.
2. A normal oospore with central reserve globule (CG), pellucid body (P), inner layer (IL) and outer layer (OL) of oospore wall. OW: oogonial wall.
3. An abortive oospore with abnormally thickened innerlayer of oospore wall (IL).
4. Germinated oospore with terminal sporangium.

約150mlの殺菌水を加えてワーリングブレンダーで約5分間磨砕し、それを $5,500 \times g$ で遠沈、分離した3層のうち上清部と中層の菌糸片を含む寒天層を除き、底部の黄褐色の卵胞子層を殺菌水に再懸濁した。以下同様の操作を数度繰り返すと菌糸片や寒天を含まないほぼ純粋な卵胞子懸濁液が得られた (Fig. 1)。これらの操作はすべて無菌的に行うことが可能で、ペトリ皿1枚当たり約100万個の卵胞子を採取できた。

卵胞子の発芽試験 所定の濃度に調製した卵胞子懸濁液 1~2ml をスポイトで採り、あらかじめ準備した1.5%素寒天平板 (WA) 上に注ぎ、全面に拡げて数時間静置した。その後ペトリ皿を傾けて余分の水を除き、特に言及しない限り25°Cの暗所で10日間保った。照明をする場合は、卵胞子形成のときと同じく培地面の照度を約1,500 luxとした。所定日数経過後寒天培地を適当な大きさに切り取り検鏡して発芽率を調べた。

卵胞子の染色による生死判別 Ribeiro¹³⁾の方法

に従い pH5.8 の0.1M 磷酸緩衝液に0.1%になるよう 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) を溶かしその0.5ml と卵胞子懸濁液 0.5ml を混合し、35°Cの恒温水槽の中で12時間振盪し、細胞質の染色の有無からその生死を判別した。また、発芽しない卵胞子のうちその壁が異常に肥厚し、細胞質内の各種構造も全く認められないもの (Fig. 3) は死滅したと判定した。

実験結果

卵胞子の発芽に対する光の影響

分離菌株 VM, VN を30日間暗所で培養して形成させた卵胞子と、20日間暗所次いで10日間照明下において形成させたものの2種を使用し、それぞれの卵胞子について暗所および照明下の発芽を比較した (Table 1)。培養後半、あるいは発芽床中のいずれかの時期に光を受けた卵胞子とはともに約90%の発芽率を示し、そ

Table 1. The effect of light on germination of oospore of *Phytophthora vignae*

Light treatment during		Germination of oospore % ^{a)}	
Development and maturation of oospores	Incubation for germination	Isolate VN	Isolate VM
20 days dark followed by 10 days light	10 days light	94.0 x ^{b)}	88.4 x
	10 days dark	91.6 x	89.6 x
30 days dark	10 days light	92.6 x	85.6 x
	10 days dark	72.8 y	73.2 y

a) One hundred oospores were scored in each of the five microscopic observations; the mean percentage is shown.

b) Numbers within a column followed by the same letter are not significantly different ($P=0.05$) as determined by Duncan's multiple-range test.

の間に有意差は認められなかったが、まったく光を受けなかった卵胞子の発芽率は約70%で他の処理と有意差が認められた。光を受けなかった VN 株の卵胞子の暗所における発芽は3日以内に始まり、その後徐々に発芽率が高まり約8日で最高の一定値となるが、発芽は同調的でなかった (Fig. 5)。

卵胞子は蔵卵器内を充満せず、卵胞子壁は光学顕微鏡的には2層が認められ、細胞質内部には central reserve globule と呼ばれる大型の球状構造や、核が

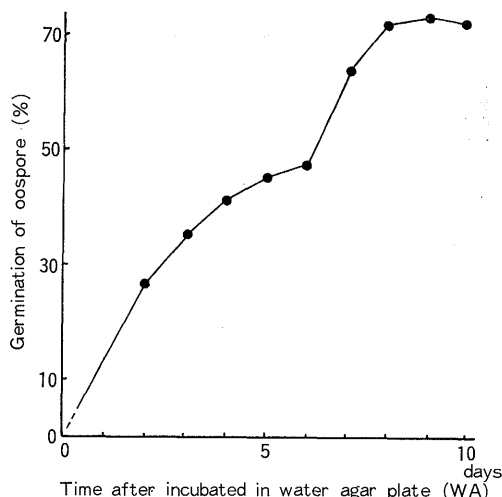


Fig. 5. Germination of oospore of *Phytophthora vignae*, produced in the dark at 25°C. Germination were examined on WA in the dark at 25°C. One hundred oospores were scored in each of the five microscopic observations; the mean percentage is shown.

その中にあるとされている pellucid body⁴⁾ が観察される (Fig. 2)。発芽の過程は *Phytophthora drechsleri* で報告されている¹⁶⁾様に胞子壁内層が消失して薄くなり、卵胞子が蔵卵器内を充満し、発芽管はほとんどの場合蔵卵器柄を貫通して現われ、その長さはまちまちであるが、先端に遊走子のうを形成した (Fig. 4)。

卵胞子発芽に対する温度の影響

20日間暗所次いで10日間照明下25°Cで培養して形成させた VN 株の卵胞子を各温度下の暗所で発芽させ発芽率を比較した、比較のため、それぞれの温度下の V8-JA上の菌糸伸長、培養20日目の単位面積当たりの卵胞子形成数も調べた (Fig. 6)。卵胞子は15~30°Cの範囲で発芽が認められ、25°C付近が最適で菌糸伸長とはほぼ一致したが、卵胞子形成の適温はそれより低く、20°C付近であった。

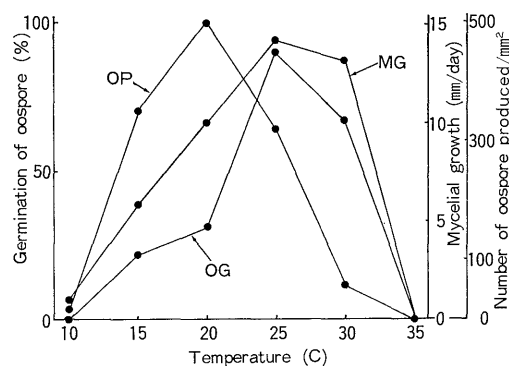


Fig. 6. The effect of temperature on oospore germination (OG), oospore production (OP), and mycelial growth (MG) of *Phytophthora vignae*

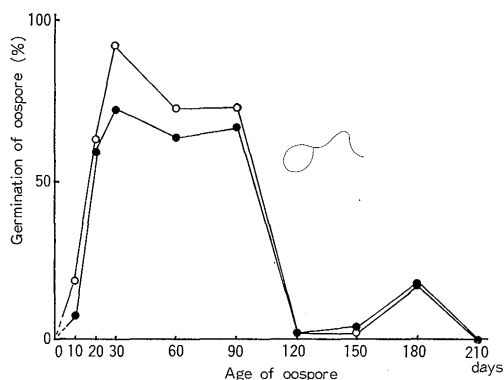


Fig. 7. Germination of oospore of *Phytophthora vignae* in various ages. Days after inoculation on V8-JA is shown. Germination were examined in the dark (●) or under the light (○).

卵胞子の齢と発芽率

暗所で培養し形成させた卵胞子の齢と発芽率の関係を調べた。供試菌株はVN株で、発芽は暗所と照明下で行った (Fig. 7)。培養開始後10日目までに形成していた卵胞子 (齢は10日以内) は低率ながら発芽能力があり、同じく20日目以降90日までのものは60%以上の高率で発芽した。特に30日目の卵胞子は照明下で約90%、暗所でも約70%発芽した。120日目以後になると発芽率は急激に低下し、210日目にはまったく発芽しなくなった。

培養30日目と180日目の卵胞子の形態を比べると、30日目の卵胞子は前述の様に正常な形態で、MTTで処理すると全部発色したが、180日目の卵胞子の約80%は卵胞子壁が異常に肥厚し内部の構造も壊れており (Fig. 3)、これらは全く発芽せず、MTTにより発色もしなかった。残りの形態、発色ともに正常な卵胞子のうち発芽したものは85%であった。すなわち、この時期までに大部分の卵胞子は死滅したと考えられる。

考 察

P. vignae の卵胞子は適当な齢であれば特別な栄養や前処理、照明などがなくても約70%が発芽した。ほぼ同様の条件で *Phytophthora megasperma* var. *sojae* は50%弱発芽する¹²⁾のに比べるとかなり高い発芽率であった。ただし、*P. megasperma* var. *sojae* などで報告されていると同様、*P. vignae* の場合も卵胞子の発芽は同調的ではなかった。培養開始後30日目までに形成した卵胞子は培養の後半あるいは発芽床上で光を受

けると発芽率が約90%まで高まり、光による発芽促進作用が認められたが、発芽に光は必須ではなく、また他の齢の卵胞子では光による有意な発芽促進作用は見られなかった。

卵胞子の発芽率は温度により変化し、その傾向は *P. drechsleri* の場合と同様であった。一方卵胞子の発芽と菌糸伸長の最適温度は等しく、卵胞子の形成適温はそれより低かった。

卵胞子の発芽率の齢による推移を長期間調べた報告は少ないが、形成直後の卵胞子は発芽率が低いとする報告がある¹³⁾。本菌の場合、卵胞子は形成10日目以内でも低率ながら発芽したので成熟にはさほど日数を要しないものと認められる。120日目以降は発芽率が急激に低下したが、発芽しない卵胞子は大部分 MTT 処理してもまったく発色せず、卵胞子壁は異常に肥厚し、その内部形態も含め *Phytophthora cactorum*³⁾ や *Sclerospora sorghi*¹⁰⁾ の「死んだ卵胞子」とされるものと同じであることとあわせ、すでに死滅したものと考えられる。しかし MTT が卵胞子細胞質内まで浸透しないので発色しなかった可能性もあるが、発芽率低下の原因についてはさらに検討が必要であろう。

摘 要

1. アズキ茎疫病菌, *Phytophthora vignae* の卵胞子の発芽とその要因について検討した。
2. β -sitosterol 30mg/l 加用の V8-JA に形成した卵胞子を培地と共に磨砕し、その懸濁液を繰り返し遠沈洗浄すると沈澱部は夾雑物を含まない卵胞子のみになった。
3. 卵胞子は多くの場合蔵卵器柄を貫通して発芽し、その発芽管のほとんどは末端に遊走子のうを形成した。
4. 培養30日目に培地上に形成していた卵胞子は培養中および発芽時に光の照射を行わなくても高率に発芽するが、培養後半あるいは発芽時に光を照射するとさらに発芽促進効果が認められた。
5. 25℃の暗所で10日間培養したとき卵胞子はすでに形成されており、それらは低率ながら発芽能力があり、20日目以降90日目までは高率に発芽したが、120日目以降はほとんど発芽しなくなった。
6. 卵胞子発芽の適温は25℃付近で、菌糸伸長の適温とはほぼ一致したが、卵胞子形成が最も多かったのは20℃付近であった。

引用文献

1. Banihashemi, Z. and Mitchell, J. E. (1976). *Phytopathology* 66: 1083-1084.
2. Berg, L. A. and Gallegly, M. E. (1966). *Ibid.* 56: 583 (Abstr.).
3. Blackwell, E. (1943). *Trans. Br. mycol. Soc.* 26: 71-89.
4. Dick, M. W. (1969). *New Phytol.* 68: 751-775.
5. Kamjaipai, W. and Ui, T. (1978). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 44: 111-118.
6. 北沢健治・土屋貞夫・児玉不二雄・Kamjaipai, W.・生越 明・柳田騏策(1978). *日植病報* 44: 528-531.
7. Kitazawa, K., Suzui, T. and Yanagita, K. (1979). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 45: 406-408.
8. Klisiewicz, J. M. (1970). *Phytopathology* 60: 1738-1742.
9. Long, M., Keen, N. T., Ribeiro, O. K., Leary, D. C., Erwin, D. C. and Zentmyer, G. A. (1975). *Ibid.* 65: 592-597.
10. Pratt, R. G. (1978). *Ibid.* 68: 1606-1613.
11. Ribeiro, O. K., Zentmyer, G. A. and Erwin, D. C. (1975). *Ibid.* 65: 904-907.
12. Ribeiro, O. K., Zentmyer, G. A. and Erwin, D. C. (1976). *Mycologia* 68: 1162-1173.
13. Ribeiro, O. K. (1978). *A Source Book of the Genus Phytophthora*. J. Cramer, Vaduz. pp. 162.
14. Salvatore, M. A., Gray, F. A. and Hine, R. B. (1973). *Phytopathology* 63: 1083-1084.
15. Satour, M. M. and Butler, E. E. (1968). *Ibid.* 58: 183-192.
16. Zentmyer, G. A. and Erwin, D. C. (1970). *Ibid.* 60: 1120-1127.