

# *Phytophthora capsici* Leonian 菌の被のう

## 胞子の発芽過程における核現象\*

桂 琦 一・奥 野 健 治

KIICHI KATSURA and KENJI OKUNO: Nuclear phenomena in the germination process of cystospore of *Phytophthora capsici* Leonian.

**摘要** 本報告は *Phytophthora capsici* の被のう胞子、その発芽過程および小遊走子のう形成に至る間の現象、とくに核現象について研究を行なったものである。

被のう胞子の発芽は 20°~28°C で良好であり、その発芽管の伸長は 24°C が最適である。被のう胞子の発芽に際し、原形質は発芽管ないし小遊走子のう内へ流動移行するが、栄養を補う以前には原形質量の増加は認められない。

遊走子の核は1つである。しかし被のう胞子が発芽過程に移る際に、被のう胞子内で核分裂がはじまるものと、発芽管の頸部で核分裂がおこるものとが認められるが、発芽管の伸長とともに引続き発芽管内で核分裂が行なわれる。

発芽管内の核分裂は 32°, 24°, 20°C の順に早く行なわれるが、いずれの温度でも18時間後には平均8核になる。

小遊走子のうは比較的高温においてよく形成し、その形成初期から成熟期前にかけて核数は増加し、約3~4個程度に達するが、成熟期に達してのちは核数が減少し、ついに1核になる。この1核になった時期は小遊走子のうの発芽に移る時期とよく一致する。

### I 結 言

*Phytophthora capsici* の遊走子のうは、間接発芽により遊走子を生ずるが、遊走子は水中で活潑に運動したのちに鞭毛を失い、静止して被のう胞子となる。被のう胞子は発芽管をもって発芽し、その発芽管でもって直接寄主体侵入をするもの、発芽管の先端に付着器を形成して寄主体侵入を行なうもの、さらに発芽管の先端もしくは、発芽管の側枝の先端に小遊走子のう (miniature sporangium) を形成し、これが再び1個の遊走子を放出するものの、3つの方法がある<sup>6, 10)</sup>。そして小遊走子のうは、比較的高温の場合やスライドグラス上の水滴をカバーグラスで蔽った場合に形成が多いようである。

*P. infestans* の遊走子の核数については、Graham<sup>4)</sup>によるとすべて1核としたのに対し、Castro<sup>1)</sup>は0.34%が2核を有するとしている。遊走子の核数については両者が異った説を発表している。桂<sup>6)</sup>はさきに *P. capsici* の遊走子のうとその発芽過程における核現象に

ついて研究し、引続き被のう胞子とその発芽における核現象を研究したが、遊走子はすべて1核を有するとした Graham<sup>4)</sup>の説を支持したい。被のう胞子が発芽過程へ移行しようとするときに、核分裂をはじめるものがあり Castro<sup>1)</sup>はこれを含めて観察したのではないかと思われる。

筆者らは遊走子から被のう胞子を経て小遊走子のうの形成およびその発芽に至る間の核現象について追究し、興味ある知見を得たのでここに報告することにした。

なお、本研究は文部省科学研究費の一部をもって行なったが記して深謝の意を表する。

### II 実験材料および実験方法

供試菌は1965年7月本学圃場において発生したナス褐色腐敗病の病斑部から分離した *Phytophthora capsici* である。本菌をキュウリ果実に接種し、28°C 定温器中に、3~5日後に形成した遊走子のうを用い、掻き集めて 20°C に保っておいた管びん中のイオン交換水

\* 京都府立大学農学部植物病理学研究室 (業績第73号)

Laboratory of Phytopathology, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto, Japan  
(Contribution No. 73)

中にけん濁, 45分間 20°C の定温器に保ち遊走子のうの間接発芽を進め, その後ティッシュペーパー 8 枚でもってけん濁液をろ過し, 遊走子のみのけん濁液を得た.

遊走子けん濁液は直ちに 32°C に移し, 強制的に被のうさせて供試したし, 小遊走子のうは, この強制的に被のうさせたけん濁液をそのまま 32°C の定温器内に保って形成させた.

上記の方法で得た被のう胞子ないし小遊走子のうのけん濁液を, カバーガラス上に点滴し乾燥させたのち, 固定処理を省略し, 1 規定の塩酸 (20°C) 中に 5 分間, ついで同液 (60°C) 中に 7 分間浸し加水分解を行ない, 水道水により急速に水洗して加水分解をとめた. 水洗後にギムザ染色液 (メルク製, pH 7 の Sørensen 燐酸緩衝液にて 20 倍に希釈) に 45~60 分間浸漬して染色を行なった. 染色後の標本は水道水で水洗のち水に封入して鏡検した. なお本染色過程において適宜フェイルゲン反応を用いて核の存在を確かめることに努めた.

### III 被のう胞子の発芽と小遊走子のうの形成

一般に藻菌類の胞子および菌糸の原形質は, 発芽に際しては発芽管内へ, あるいは菌糸の伸長部分ないし新生胞子内へ流動移行することが知られている. 福富ら<sup>9)</sup>は *Sclerophthora macrospora* の被のう胞子発芽過程について, ほとんどの原形質が流動移行したのちの被のう胞子壁の内側に, 原形質膜が残存し, 液胞はかなり電子密度の高い状態で残り, また endoplasmic reticulum や mitochondria などが膜壁に残されるとしている.

#### (1) 被のう胞子の発芽および発芽管伸長に及ぼす温度の影響

32°C において強制的に被のうせしめた供試菌の被

Table 1. Influence of the temperature to the germination of cystospore of *Phytophthora capsici* (%)

Temp. °C	Time (hr.) after zoospores were encysted					
	1	2	3	4	5	6
3~6	0	0	6.9	9.9	21.5	37.6
20	27.0	58.1	87.4	96.4	99.0	99.4
24	25.8	63.6	84.0	95.0	98.9	99.0
28	26.0	60.4	85.3	95.1	98.7	99.2
32*	12.7	35.7	43.5	53.5	58.4	64.2

\* Some of cystospores were burst at 32°C.

のう胞子を, 種々の温度に移して経時的に発芽を調査した. 被のう胞子の測定は 1 回 100 個とし, 3 回実験を繰返した.

その結果, 被のう胞子の発芽は 20°C~28°C において良好で, 5 時間後には 100% に近い発芽率を示した. なお 32°C においては, 被のう胞子が発芽しようとする瞬間に破裂してしまうものがあった.

次に発芽管の伸長に対する温度の影響を, 20°, 24°, 32°C の 3 区について実験を行なった. その結果, 発芽管伸長は 24°C においてもっとも良好であり, 20°C, 32°C の順序であった. ただし 4~5 時間後には 24°C でもっとも早く発芽管伸長は停止するようであり, 20°C や 32°C では 24°C に遅れて頂点に達するものと推察されるが, これは被のう胞子 1 個の有する能力の限界を示すものと思われる. その後の伸長は栄養の補いを要するであろう.

#### (2) 被のう胞子の発芽に伴う原形質の流動移行

被のう胞子の発芽に伴い原形質は被のう胞子から発芽管内へ流動移行する. 第 1 図に示すように, 被のう

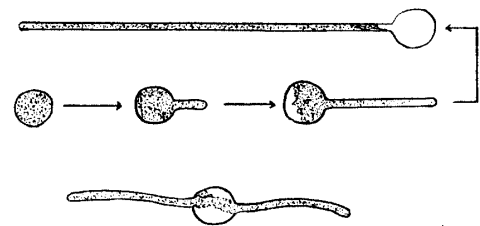


Fig. 1. Cytoplasmic streaming into the germ tube of cystospore of *Phytophthora capsici*.

胞子が単一の発芽管, 複数の発芽管のいずれをもって発芽しても, それぞれの発芽管内へ原形質の流動移行が行なわれるが, その伸長発芽管内の原形質量は, 被のう胞子内にあった原形質の容量とほとんど差がない (第 2 表). 原形質が流動移行した後は液胞になるが, 発芽管を詳細に観察すると, 発芽管内部にもしばしば液胞が観察される. すなわち被のう胞子の発芽に伴う

Table 2. Dimensions of cystospore and its germ tube of *Phytophthora capsici*

Measured characteristic	Minimum Maximum Average		
	μ	μ	μ
Diam. of cystospore	9.4	11.4	10.1
Diam. of germ tube	2.1	2.6	2.2
Length of germ tube	114.4	187.2	148.3
Volume of cystospore	434.7 <sup>μ<sup>3</sup></sup>	683.2 <sup>μ<sup>3</sup></sup>	535.2 <sup>μ<sup>3</sup></sup>
Volume of protoplasm in germ tube	532.5	635.0	563.4

原形質量の増加は認められないようである。

(3) 小遊走子のう形成

被のう胞子の発芽管に頂生して小遊走子のうを形成する。ある場合には発芽管に側枝を生じ、その側枝に頂生して小遊走子のうを形成する。そのいずれの場合にも被のう胞子内の原形質が発芽管を流動し、新しく生ずる小遊走子のう内へ全部移行したのち、小遊走子のうの基部に隔膜を生ずる。側枝に小遊走子のうの膨らみができると、発芽管先端へ流動しつつあった原形質が、側枝の方へ戻って新生小遊走子のう内へ全部移行し、その基部に隔膜を形成する(第2図)。

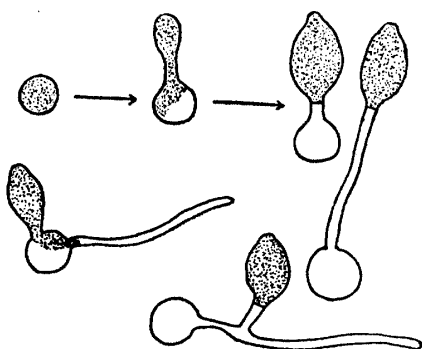


Fig. 2. Formation of the miniature sporangium on the tip of the germ tube of cystospore.

小遊走子のうは形状が一定でなく、楕円形、レモン形、あるいは遊走子のう類似の形を呈し、頂部に多くが小さい乳頭突起を有する。小遊走子のうの大きさは長径が13.5~14.8 $\mu$ 、平均14.0 $\mu$ 、短径が8.0~9.0 $\mu$ 、平均8.4 $\mu$ であり、被のう胞子の大き径9.3~11.2 $\mu$ 、平均10.0 $\mu$ に比べてあまり大きさの差はない。容積を測定した結果、小遊走子のう517.0 $\mu^3$ 、被のう胞子523.2 $\mu^3$ (いずれも20個測定 averages)である。

以上の結果から、被のう胞子は発芽によって原形質量の増加がないことと、被のう胞子の発芽は細胞分裂の結果としておこるのではないことが推定される。しかし、発芽管伸長後の栄養が補なわれる場合は、原形質の増量は当然考えられるであろう。

なお小遊走子のうは1個の遊走子を放出して発芽する。

IV 遊走子、被のう胞子、小遊走子のうの形成過程における核現象

筆者らは遊走子、被のう胞子および小遊走子のうに至る間の核現象について、塩酸ギムザ法による染色をもって追究した。

(1) 遊走子および発芽前の被のう胞子における核現象

既述の方法により得た被のう胞子を、0~8時間の

間、1時間ごとに核染色を行ない核数を測定した。32°Cにおいて強制的に静止被のうさせたものは、すなわち0時間区であるが、遊走子の核数と見なされるであろう。測定に当っては未発芽の被のう胞子のみを選んで観察した(第3表)。

Table 3. The number of nuclei of cystospore changing with the passage of time after zoospores were encysted (%)

Number of nuclei	Time (hr.) after zoospores were encysted								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
1	100	98.6	98.1	87.1	61.0	51.0	47.7	36.4	26.7
2	0	1.4	1.9	12.9	39.0	45.1	48.5	45.5	41.9
3	0	0	0	0	0	3.9	3.8	9.1	18.6
4	0	0	0	0	0	0	0	9.1	12.9

Notes: After zoospores were encysted at 32°C removed to 20°C at once.

その結果運動中の遊走子を32°Cにて強制的に被のうせしめたものは、すべて1核であり、運動中の遊走子は1核を有することが推定せられる。しかし、時間の経過とともに2核、3核、4核のものが見られるが、これは発芽過程への移行を示すのではなからうかと思われる。したがってGraham<sup>4)</sup>や桂ら<sup>7)</sup>の報告と同様に、*P. capsici*の遊走子も1核を有するものと考えられる。

(2) 発芽管伸長過程における核数の経時的推移

前項においては未発芽の被のう胞子のみについて核現象を観察したが、本実験においては発芽後の発芽管伸長過程の核現象を追究することにした。

既述の方法によって得た被のう胞子けん濁液を、発

Table 4. The number of nuclei in the germ tube of cystospore with the time (%)

Number of nuclei	Time (hr.) after zoospores were encysted								
	0	1	2	3	4	5	6	7	18
1	76	53	14	2					
2	19	46	58	24	5	5			
3	5	1	26	55	29	38			
4			2	19	62	36	20	7	
5					4	20	35	22	
6						1	36	44	
7							6	18	14
8							3	9	26
9									10

Notes: After zoospores were encysted at 32°C removed to 24°C at once.

芽管伸長に最適である 24°C 定温器中に移し、被のう後 1 時間ごとに 8 時間後まで、また 18 時間後にそれぞれ核染色を行ない核数を測定した (第 4 表)。

実験結果によると、発芽を開始しつつある被のう胞子は 1 核のものが 76% あるのに対し、2 核のものが 19%、3 核のものが 5% あった。そして時間の経過とともに、また発芽管の伸長とともに核数の増加が見られるが、18 時間後の平均核数は 7.9 個となり、第 5 表に示す 24 時間後の平均核数 8.0 と比べ、ほとんど変化がない。

Table 5. The number of nuclei of germinated cystospores of *Phytophthora capsici* after 24 hours

Number of nuclei	6	7	8	9	10
Number of individuals	1	8	31	8	2

Notes: Apply correspondingly to table 2.

第 5 表に示す実験は、第 4 表に示す実験とは別個に行なったものであるが、特に被のう胞子発芽過程において栄養を与えない場合は、ほぼ 18 時間程度の核数増加が限度になるものようであり、平均核数はほぼ 8 個である。

なお核は分裂開始前においては、赤紫色の球形の染色像を得るが、分裂開始後のそれは不定形の楕円状またはコマ状であり、核が引きちぎられるような形になる。しかし、長時間経過後はふたたび球形に近い状態をとるようになる。分裂時における染色体の観察は得られなかった。

(3) 発芽管伸長過程における核分裂に及ぼす温度の影響

前項において発芽管伸長過程における核数について観察したが、ここにはその核数の温度による影響を調べるために、次の実験を行なった。

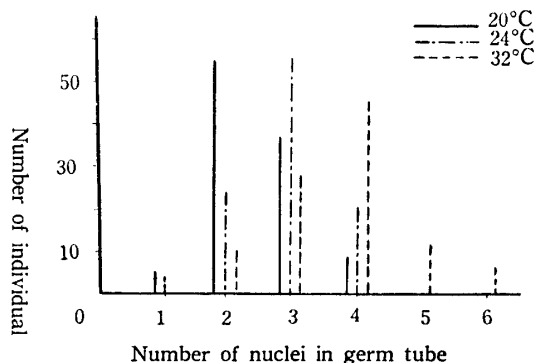


Fig. 3. Influence of the temperature to the nuclei division in germ tube of cystospore of *Phytophthora capsici*.

既述の方法で得た被のう胞子けん濁液を、あらかじめ 20°C, 24°C, 32°C の温度に保っておいた管びんに移し、その後それぞれの定温器に保った。被のう直後から 1 時間ごとに 7 時間後までと 18 時間後にそれぞれ核染色を行ない、発芽管中の核数の測定を行なった。

その結果、32°C, 24°C, 20°C の順に核分裂が早く行なわれる。その差のもっとも大きく現われるのは、被のう後約 3 時間であるが、第 3 図はその 3 時間後における核数の分布を示したもので、32°C においてももっとも早く核分裂が進んでいる。しかし、その後は時間の経過とともに、温度 3 区間の差が小さくなり、18 時間後には 3 区間の値がほとんど同一になる。

以上の結果から、温度は核分裂の速度に対してのみ影響を及ぼし、分裂の回数には影響がないようである。

(4) 小遊走子のう形成に至る間の核現象

一般に小遊走子のうは被のう後 7~10 時間で形成がはじまる。よって核染色は被のう後 10 時間を経過した後にはじめ、以後 2 時間ごとに 20 時間後まで、また 24 時間後に、それぞれ核染色を行なった。小遊走子のうは被のう胞子発芽後、間もなく発芽管に頂生して生ずるものが多いが、調査は主として発芽管の短いものを選んで核数を測定した (第 6 表および第 4 図)。

Table 6. Increase and decrease of number of nuclei in miniature sporangium of *Phytophthora capsici*

Number of nuclei	Time (hr.) after zoospores were encysted						
	10	12	14	16	18	20	24
0	34						
1	12	3	9	39	41	45	50
2	3	14	37	9	7	5	
3	1	31	13	2	2		
4		2	1				

小遊走子のうの形成開始とともに、被のう胞子の核は発芽管萌出部附近で分裂を行ない、発芽管伸長とともに先端方向へ移行がはじまり、小遊走子のう形成とともにその内部へ移行する。小遊走子のう形成初期から中期にかけて、核数は次第に増加するが、小遊走子のうの形成が完全に終り、成熟後は核数の減少がはじまり、ついにはすべてのものが 1 核を有するに至る。

ただし、被のう胞子の発芽後間もなく小遊走子のうを形成する場合の核数は最高 4 であるが、発芽管が長く伸長してその先端部に小遊走子のうを形成した場合や、発芽管の側枝に小遊走子のうを形成する場合には、核数は最高 6 を有するものを認めた。

核数の増加はすべて小遊走子のう形成途中におこり、

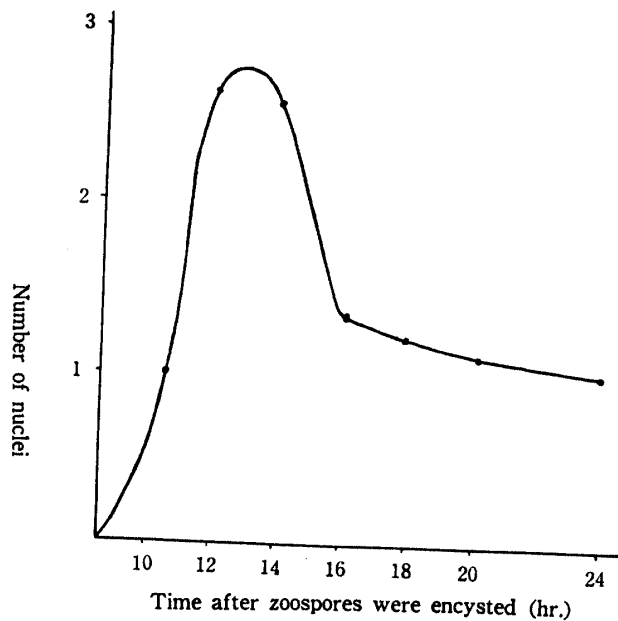


Fig. 4. Increase and decrease of nuclei numbers in miniature sporangium of *Phytophthora capsici*.

小遊走子のう内へ原形質の移行が終り、発芽管との間に明確な隔膜を生じたのちには、核数の減少がはじまるものようである。

小遊走子のうは水中において、つねに1個の遊走子を放出して発芽し、この再出遊走子はすべて1核であった。

## V 考 察

*Phytophthora capsici* の遊走子のう形成以後は、無性的に次のような器官を経過する。すなわち間接発芽によって生じた遊官子は、活潑な運動のちに静止し、被のう胞子になり、次いで被のう胞子は発芽管で発芽し、直接寄主体侵入するか、一旦附着器を形成して侵入するか、または小遊走子のうを形成し、再出遊走子によって発芽する。これらの過程において小遊走子のうを形成するのは、環境が比較的高温であるかあるいは酸素供給のやや不十分な場合に認められた。

筆者らは以上の過程のうち、被のう胞子、その発芽と小遊走子のうの形成に至る間の現象とくに核現象について研究を行なった。この間の過程は被のう胞子の有する能力の限りにおいて行なわれ、栄養の補いを得ずに推移するようである。しかも筆者らの実験結果によると、被のう胞子の原形質はほとんどすべて発芽管内へ流動移行する。後述するがこの間しばしば核分裂が行なわれるにもかかわらず、原形質量の増加は認めにくい。被のう胞子が単一であっても複数であっても、被のう胞子内の原形質はそのいずれへも流動移行するが、その流動移行した原形質量はほとんど被のう胞子

内の原形質量と同様である。しかしたとえ複数の発芽管であっても、一つの発芽管に小遊走子のうを頂生する場合は、あるいは発芽管の側枝に小遊走子のうを頂生する場合でも、すべて原形質はその1個の小遊走子のう内へ流動移行してしまい、小遊走子のう内への移行が終るとその基部に、発芽管と分つ隔膜を生ずることは興味あることである。

筆者らはこの間の核現象について追ってみた。核現象の研究に最近塩酸ギムザ染色が好結果を得ていることが報告<sup>2,5,7,9)</sup>されており、また Knox-Davies<sup>8)</sup>は *Helminthosporium triticum* の染色体を鮮明に染色している。しかし *Phytophthora* ではまだ染色体が認められていない。

*Phytophthora infestans* の遊走子の核数については、Graham<sup>4)</sup>も桂および安味<sup>7)</sup>も1核としたが、Castro<sup>1)</sup>は2核のものが0.34%あったとしている。筆者らがここに供試した *P. capsici* は、遊走子はすべて1核であった。これは運動中の遊走子を強制的に静止させることによって、すでに静止し被のうしたものを含まないようにすると、すべて1核である。しかし被のう胞子は遊走子の運動停止すなわち被のう胞子となつてから1時間を経たものは、すでに2核のものが認められ、7時間後には平均4核(まれに5, 6核のものあり)を有するものが認められる。このことから Castro<sup>1)</sup>は遊走子にいくらかの被のう胞子を含めて観察したのではないかという疑いが持てる。遊走子は運動時間が不整で、環境に敏感であり静止被のうの遅速が目立つ。したがって被のう後間もなく発芽へ移るし、発芽へ移る場合に核分裂がはじまるものと推定される。

被のう胞子内で核分裂がおこり2核になるものと、発芽管の頸部附近ではじめて2核になるものとの2つの場合がある。発芽管伸長過程における核分裂は、栄養の補いのない場合平均8核になるまで引続きおこり、それ以上の分裂は見られなかった。このことは核酸を合成する被のう胞子内の塩基量の限界を示すのであろう。しかしここで栄養の補いがあれば、引続き発芽管の伸長と核分裂が行なわれるであろう。

次に小遊走子のう形成に至る間の核現象を観察すると、小遊走子のうの成熟前は核数が増加するが、成熟後には核数が減少する。核数が減少して1核になる時期と、小遊走子のうが発生する時期とはよく一致する。核数の減少の理由は新たな立場から研究を進めたいが、その機作は遊走子のうの核数が発芽時に減少する現象、あるいは蔵卵器内の核が減数分裂後1核を卵核として残し、他の核が消失する現象などと類似するのではないかと推察される。小遊走子のうの核数の減少が、核

分裂後の再融合によるのか、退化消失によるものかについては、いまだ明らかにしていない。

### 引用文献

- 1) Castro, J. (1963): *Phytopathol.* **53**: 24.
- 2) Chattopadhyay, S. B. & J. G. Dickson (1960): *Ibid.* **50**: 439-442.
- 3) 福富雅夫・赤井重恭(1965): *日植病報* **32**: 322~323.
- 4) Graham, K. M. (1954): *Phytopathol.* **44**: 490.
- 5) Hrushovetz, S. B. (1956): *Canad. Jour. Botany* **34**: 321-327.
- 6) 桂 琦一(1961): *京府大農植病研特報* **1**: 1~70.
- 7) 桂 琦一・安味 宏(1964): *日植病報* **29**: 70.
- 8) Knox-Davies, P. S. & J. G. Dickson (1960): *Amer. J. Botany* **47**: 328-339.
- 9) Roane, C. W. (1952): *Phytopathol.* **42**: 480.
- 10) Waterhouse, G. H. (1936): *Misc. Pub. Commonwealth Myc. Inst.* **12**: 1-120.

### Summary

The germination of cystospore and the formation of miniature sporangium of *Phytophthora capsici* Leonian have been studied with special emphasis on the nuclear phenomena in those processes.

The cystospore germinated in the temperature range of 20°~25°C, but the germ tube elongation was best demonstrated at 24°C. On cystospore germination cytoplasmic contents were translocated to the germ tube and then to the miniature sporangium formed on the tip of the germ tube or its branch. No increment in the cytoplasmic volume was observed if nutrient was deprived of the germination medium.

Zoospore and encysted zoospore have one nucleus. The nuclear division was observed to be initiated either in the cystospore or in the constricted part of the germ tube. In either case

divisions were continued in the germ tube as it elongated. The time of division cycle seemed to be dependent on temperature. It was shortest at 32°C followed by 24°C and 20°C in the order. The number of nuclei, however, reached to 8 in average after 18 hrs incubation at any temperature tested.

Relatively higher temperature seems to be favorable for the formation of miniature sporangia. Number of nuclei in the miniature sporangia increased to 3 or 4 in the early stage of their formation, but it decreased as the sporangia grew to the maturity, finally becoming to one. Judging from the time sequence, germination of miniature sporangia seems to be initiated as soon as number of nucleus decreased to one.