馬鈴薯疫病菌の卵胞子形成について

堀 正 侃*・吉田三千子**

Masaakira HORI and Michiko YOSHIDA: On the formation of the oospore of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary.

馬鈴薯疫病菌 (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) の卵胞子形成については、1890 年に於ける Smorawski¹⁾ の報告が最初である。その後もこの問題に関しては種々研究されていたようであるが、卵胞子形成の詳細については不明であつた。Clinton³⁾ が Oat-agar 上で Antheridium を持つ Oogonium を形成させ、この Antheridium が基着であることを報告してから卵胞子の形成及びその過程の観察が報告され始めた。^{2,4,7,8)} Rosenbaum⁹⁾ は Antheridium の附着していない卵胞子の形成を見たが、Antheridium を持つ卵胞子の形成を確認せずその形成を疑問であるとした。Tucker¹²⁾ も同じ見解を示した。Clinton は Oogonium を形成する菌株と Antheridium を形成する菌株とは異なるものであろうとし、本菌が Heterothallic な菌であることを提唱した。殊に *P. phaseoli* と対峙培養した場合に Antheridium を持つ卵胞子が形成されることをみたが、Heterothallism として

証明しきれなかつたのは、Antheridium 形成力の劣化に疑問を持つたためのものである。更に Barret¹⁾ も他種との交配による卵胞子の形成に成功している。しかし Leonian⁶⁾ は本菌が Homothallic であると述べ、正常の卵胞子形成は内・外要因に左右されるものであるとした。

何れにしても本菌が Homothallic であるか、或は Heterothallic であるかの点については最近まで結論が下されていなかった。

わが国では、本菌卵胞子の形成についての報文は見られないが、著者の 1 人堀¹³⁾ はすでに以前から培地上で少数ながら卵胞子の形成を観察し、1938 年度本

学会講演会で簡単な報告を行つた。

著者等は本菌生活史研究の一項目として卵胞子形成に関しての実験を行つているが、諸報告に見られる培養方法によつては卵胞子を全く或は十分に得ることが出来なかつた。処が特殊の培養を行うことにより卵胞子を多数形成させることを得、かつ本菌が Heterothallic な菌である成績を得たのでその結果をここに報告する次第である。

なお著者等の実験とは別箇であるが、全く同時に Gallegly と Galindo⁵⁾ 及び Smoot¹⁰⁾ 等は、メキシコならびに米国において性別が異ると見られる 2 種の

第 1 表 堆肥培地上の不完全型卵胞子の大きさ

型	種 類	大 き さ(長径×短径)		膜 の 厚 さ	
		範 囲 (μ)	平均 (μ)	範囲 (μ)	平均 (μ)
(A)	卵胞子	16.4~43.1×16.4~42.2	27.1×25.8	1.2~4.1	2.0
(B)	卵胞子	24.6~34.9×22.6~34.0	29.0×28.7	3.3~5.3	4.1
(C)	卵胞子	24.6~32.8×22.6~30.8	28.3×26.7	0.8~2.0	1.2
	藏卵器	29.9~36.9×28.7~36.9	33.2×32.4	—	—
(D)	卵胞子	24.6~32.8×22.6~30.8	29.5×27.9	0.8~1.2	1.2
	藏卵器	30.8~49.2×30.8~47.2	41.8×39.4	—	—

菌系統が存在し、それらの対峙培養によつて卵胞子が多数形成される結果を得たことを報告している。

I. 不完全型卵胞子の形成

(1) 不完全型卵胞子の形状 Antheridium の附着していないものをかりに不完全型卵胞子と呼ぶことにする。培地上及び罹病組織内に見られる不完全型卵胞子には 4 種類の型のあることが観察された。堆肥培地(主として禾本科作物を素材とする)上に形成された不完全型卵胞子の大きさは第 1 表に示す通りである。

A 型: 外膜が薄く無色, 内胞が淡黄褐色のもの(第 1 図)。

B 型: 外膜が淡褐色, 内胞が褐色のもの。

* 農林省振興局植物防疫課

** 東北大学農学部

C型：無色～淡褐色の Oogonium に内蔵され、卵胞子は淡黄褐色～黄褐色に着色、顆粒状物が見られるもの。

D型：赤褐色～褐色の Oogonium に内蔵され、淡黄褐色～黄褐色に着色し、顆粒状物が見られるもの（第2図）。

第1図 不完全型卵胞子—A型

第2図 不完全型卵胞子—D型

A・B型は裸出した卵胞子のように見えるが、これらの性状は現在不明である。C型の1部及びD型は完全に成熟していると見られるが、Antheridiumが附着していない。従つて、未受精の卵胞子と思われるものである。著者等が用いた多数の天然培地のうち、12種類の培地上と罹病馬鈴薯茎葉及びトマト果肉内にはA・B型だけが認められた。C・D型は堆肥培地上に他の二型と共に形成された。しかし形成数は、いずれの型も少数である。

(2) D型卵胞子の形成 D型卵胞子を多数形成させる方法を探索しているうちに、一定期間前培養した後、別種の培地に後培養すると、D型卵胞子が多数形成されることを見出した。

A) 前培地の種類と影響 前培地は第2表に示すように、抽出液又は煎汁培地である。後培地はオートミール抽出液寒天培地（寒天 1.5% 加用）である。前培地の作製は次の通りである。茎葉の場合には、生

第2表 前培地の種類と不完全型卵胞子形成との関係（菌株 P-1）

前 培 地	Oogonium			Antheridium	備考
	10日	15	25		
稲 茎 葉 煎 汁	—	+	+	—	不完全型
いんげん茎葉同上	—	+	+	—	〳
とうもろこし茎葉同上	—	+	+	—	〳
大 豆 葉 同 上	—	+	+	—	〳
いんげん豆抽出液	±	+	+	—	〳
大 豆 同 上	—	+	+	—	〳
そらまめ 同 上	—	+	+	—	〳
いんげん豆煎汁	—	±	±	—	〳
大 豆 同 上	—	±	+	—	〳
そらまめ 同 上	—	±	+	—	〳
えんどう 同 上	—	±	+	—	〳
黒 豆 同 上	—	±	±	—	〳
粟 抽出液	±	+	+	—	〳
稗 同 上	±	+	+	—	〳
米 同 上	±	+	+	—	〳
粟 煎 汁	—	±	±	—	〳
稗 同 上	±	+	+	—	〳
米 同 上	±	+	+	—	〳
とうもろこし同上	—	+	+	—	〳
ワックスマン	±	+	+	—	〳
クラインスキー	±	+	+	—	〳

注：—：形成せず，±：僅かに形成，+：形成する。

以下各表共表中の記号は同じ。

茎葉 50 g に蒸留水 100 cc を加え 1 時間煮沸浸出した。豆及び穀類は細粉とし、その 15 g を同様に処理した。抽出液は、蒸留水 100 cc を加え 1 時間振盪後遠沈し、上澄液を用いた。いずれも寒天は 1.5% の割合に添加した。前培養は 18°C 20 日間、後培養は 18°C である。

第2表に示すように、後培養開始後 10～15 日目頃から形成が始まる。穀類の煎汁及び抽出液培地に最も多く形成する傾向が見られた。

B) 後培地の種類とその影響 後培地としては、第3表に示すような種類を使用した。培地の作製・培養条件は、前培養の実験と同じである。前培地は、トウモロコシ抽出液寒天培地（寒天 1.5% 加用）である。結果は第3表の通りである。卵胞子は前実験と同様に培養後 10～15 日目位から形成し始めるが、後培地としては不適なものが多い。形成をみたのは穀類煎汁

第3表 後培地の種類と不完全型卵孢子形成との関係（菌株 P-1）

後 培 地	Oogonium			Antheridium	備考
	10日	15	25		
稲 茎 葉 煎 汁	—	±	±	—	不完 全型
いんげん葉 同 上	—	—	—	—	
とうもろこし 茎 葉 同 上	—	—	—	—	
大 豆 葉 同 上	—	—	—	—	
クローバー 茎 葉 同 上	—	—	—	—	
いんげん豆抽出液	—	—	—	—	
大 豆 同 上	—	—	—	—	
そらまめ 同 上	—	—	—	—	
いんげん豆 煎 汁	—	—	+	—	
大 豆 同 上	—	—	—	—	
そらまめ 同 上	—	—	—	—	不完 全型
えんどう 同 上	—	—	—	—	
黒 豆 同 上	—	—	—	—	
粟 抽出液	—	±	+	—	
稗 同 上	—	±	+	—	
米 同 上	—	±	±	—	
オートミール 抽出液	—	+	+	—	
粟 煎 汁	±	+	+	—	
稗 同 上	—	±	+	—	
米 同 上	—	±	+	—	
ワックスマン	—	—	—	—	不完 全型
クラインスキー	—	—	—	—	

注：第2表と同じ。

及びその抽出液培地と稲茎葉煎汁培地のみであつた。その中でもオートミール抽出液培地に最も多く形成された。その形成状態を示したものが第3図である。

C) 前・後培地の組合せ トウモロコシ抽出液培地とオートミール抽出液培地とを組合せた場合に、D型卵孢子の形成が多いので、いずれを前培地に使用するのがよいかを比較した。結果は第4表に示す通りである。培養条件等は前実験と同じである。卵孢子はトウモロコシ抽出液を前培地とし、後培地にオートミール抽出液を組合せた時のみ形成した。この逆の場合には畸型なものが少数見られたに過ぎない。この関係については今後検討を要するが、恐らく栄養的な関係があるのではないかと考えられる。移植の刺戟或は代謝産物の蓄積等も考えられるが、同種の培地を使用し

第3図 培地上のD型卵孢子の形成状態

第4表 前後培地の組合せと不完全型卵孢子形成との関係

前 培 地	後 培 地	後 培 養 日 数		
		10日	20	30
とうもろこし 抽 出 液	とうもろこし 抽 出 液	—	—	—
同 上	オートミール 抽 出 液	—	+	+
オートミール 抽 出 液	とうもろこし 抽 出 液	—	—	—*
同 上	オートミール 抽 出 液	—	—	—

注：第2表と同じ。

* 着色した膨大菌糸が少数見られる。

ては形成しないのであるからこれらのことが原因になるとは思われない。なお corn steep liquor を前培地に用いても形成する。

D) 培養期間の関係

前培養期間が D 型卵孢子の形成にどのように影響するかを見る為に実験を行つた。培地は前培地にトウモロコシ抽出液寒天培地、後培地はオートミール抽出液寒天培地である。結果は第5表の通りである。前培

第5表 前培養期間の不完全型卵孢子形成に及ぼす影響

後培養 前培養	10日	15	20	25	30	40
日						
10	—	—	—	—	±	+
20	—	±	+	+	+	+
30	±	+	+	+	+	+
40	±	+	+	+	+	+

注：第2表と同じ。

養期間が長いほど短い期間の後培養で形成が見られ

た。菌糸の成熟度が関係するかも知れる。

II. 完全型卵胞子の形成

ここで完全型卵胞子と呼んだのは、Antheridium の附着した Oogonium に内蔵されたいわゆる授精の行われた結果形成されたと考えられる卵胞子のことで、Antheridium の附着しないものを不完全型とした為の名称である。

今まで述べて来た実験には、総べて P-1 系統（保存株番号）を使用したのであるが、D型卵胞子の形成条件が、各分離系統株の一般的性質であるか否か疑問であつた。その為保存中の諸系統株について D 型卵胞子形成の有無を調査した。結果は第6表の通りであ

第6表 菌株間の不完全型卵胞子形成の差異

菌 株	後 培 養 の 期 間			
	10日	20	30	40
P — 1	—	+	+	+
P — 2	—	—	—	±?
P — 3	—	—	—	±
P — 5	—	±	±	±
P — 6	—	+	+	+
P — c	—	±	+	+
T — 1	—	—	—*	—*
T — 2	—	—	—	—

注：第2表と同じ。

*：菌糸の膨大したようなものを僅かながら見る。

±?：卵胞子に極めて似たものが出来るが、多少疑問がある。

る。表示のように、8系統株中、明らかに形成の見られなかつたのは2系統(T-1, T-2 株)であつた。この結果から著者等は菌株に性別があるのであろうと想定し形成しない系統は Antheridium を形成するのではないかと考えた。D型卵胞子を形成する系統株を(—)系統、形成しない系統株を(+)系統として、両系統株の対峙培養を行つた。別箇に前培養し、後培地上で対峙させたものである。この結果は第7表に示す通りである。(—)系統株間の組合せでは、D型卵胞子は形成するが完全型卵胞子は形成しない。(—)系統株と(+)系統株との組合せにおいて、はじめて完全型卵胞子の形成が見られた。形成状態を比較すると系統株により形成数に差が見られ、(—)系統株の D 型卵胞子形成力の多少と平行して完全型卵胞

第7表 対峙培養による完全型卵胞子の形成

菌株の組合	卵胞子(不完全)			卵胞子(完全)		
	10日	20	30	30	40	50
(—)×(—)						
P—2×P—1	—	+	+	—	—	—
P—2×P—5	—	±	+	—	—	—
P—2×P—6	—	+	+	—	—	—
(+)×(—)						
T—1×P—1	—	+	+	±	+	+
T—1×P—2	—	—	±	—	±	+
T—1×P—5	—	±	±	—	±	±
T—1×P—6	—	+	+	—	+	+
(+)×(—)						
T—2×P—1	—	+	+	—	±	+
T—2×P—2	—	—	—*	—	—	—
T—2×P—5	—	±	±	—	—	—
T—2×P—6	—	+	+	—	—	+

注：第2表と同じ。

* 着色した膨大菌糸が少数見られる。

子数が増減しているようである。形成した完成型卵胞子を第4・5図に示すが、Antheridium が基着しており、従来の報告中の記載と形・大きさが一致している

第4図 完全型卵胞子

(第8表)。然し対峙培養した場合に、形成する卵胞子の全部が完全型卵胞子ではなく、不完全型と混在する。この場合の不完全型卵胞子は(+)系統の菌糸と

第5図 藏精器の細部を示す

第8表 対峙培養により形成した
完全卵胞子の大きさ

種 類	大 き さ (長径×短径)	
	範 囲 (μ)	平均 (μ)
藏 卵 器	41.7~59.2×39.6~58.4	47.1×45.9
卵 胞 子	29.2~44.2×29.2~42.5	37.5×35.4
卵胞子膜	1.3~2.9	1.8

接触する機会のなかつたものか、接触前形成されたものと考えられる。完全型卵胞子の形成割合は全形成卵胞子数の凡そ 3~4 割位である。

Gallegly 等の報告が出たので、その方法を追試した。即ち市販の V-8 juice 罐詰から作製した V-8 juice agar 上で (+)・(-) 系統を対峙させ連続培養したが、完全型卵胞子を得られなかつた。又 (-) 系統株の単独培養でも不完全型卵胞子の形成が認められなかつた。前培地として V-8 juice agar を使用し、後培地にオートミール抽出液寒天培地に移した場合にのみ形成が得られたのである。この結果については系統の差異に基づくものか、V-8 juice の成分の差によるものかは、今の所不明である。

なお、本実験に供試した P 系は馬鈴薯から分離した系統、T 系はトマトから分離したもので一見馬鈴薯とトマトとで性別があるかのように見えるが、その後の実験では P 系にも (+) のものがあり、T 系中にも (-) のもののあることを附記する。

III. 考 察

著者等が分離した菌株を用いた実験では、特定の培地を組合せて特殊の培養方法を行うことにより、単一系統株から多数の不完全型卵胞子の形成を得た。普通行われる単一培地を用いた連続培養では卵胞子を殆んど得ることが出来なかつた。この事から卵胞子の形成には何か特殊の栄養物質を生育の或る時期に必要とするのではないと思われる。また Clinton³⁾ の述べているように卵胞子形成力が劣化している為とも考えられるが、かりに劣化しているとしてもその原因は不明である。我々の得たこの不完全型卵胞子は、Clinton³⁾、Rosenbaum⁹⁾ 等のいう卵胞子様物或は耐久胞子に相当するものと思われる。なお著者の 1 人 (堀) が従来観察したものもこれであつた。

不完全型卵胞子は比較的に形成し易いのであるが、Antheridium は培養条件だけでは形成が見られない。性的に異なる系統株の混在により、始めて形成される。相対する性の菌株の一方が Antheridium を形成するような現象である。本実験において、常に Oogonium のみを形成する菌株と全く形成しない菌株とが得られた。これは恐らくは本菌が Heterothallic であることを示すものであらうと考えられる。このことは、両系統株の混在により始めて完全型卵胞子が得られたことから十分窺われることである。

Leonian は、*P. omnivora* で Heterothallism を研究し菌糸により性別不定のものが存在すると述べている。著者等の扱った範囲の菌株には不定型のものは見受けられなかつた。しかし、より多数の分離菌株を扱えば性別不定の株が発見されるかも知れない。

罹病植物及び天然培地上に 4 種類の卵胞子が認められたが、その内 2 種類についてはその性質が現在分らない。然し裸出した卵胞子と思われるものが組織内に形成されることは事実である。大きさは完全型卵胞子よりも幾分小形である。Antheridium の附着していない藏卵器 (卵胞子) は、発芽力を持っており、菌糸を直接生ずる場合及び遊走子嚢を生ずる場合との 2 種類の型の発芽を行う。一種の耐久胞子の役割を持つのではないと思われる。

IV. 摘 要

1) 馬鈴薯疫病菌は、培地上及び馬鈴薯・トマト果肉の罹病組織に 4 種類の不完全型卵胞子を形成する。

2) 不完全型卵胞子の内 2 種類は藏卵器内に内蔵されている。外観・大きさ共に成熟したと見られる卵胞

子である。但し藏精器を有していない。

3) 不完全型の成熟卵胞子は、特殊の培養法により多数形成させることが出来る。

4) 栄養条件が不完全型成熟卵胞子の形成を促進すると思われる。

5) 本菌は性別から見て2種類の系統が存在する。藏卵器を形成する系統と藏精器を形成する系統とである。

6) 性的に相対する2系統を対峙培養することにより完全型卵胞子(藏精器基着)を形成させることが出来る。(1959年1月19日受理)

V. 引用文献

- 1) Barret, J. T. (1948), *Phytopath.*, 38 : 918. (Abstract).
- 2) Berg, A. (1926), *West. Va. Univ. Agr. Expt. Sta. Bull.*, 205, 31 p.
- 3) Clinton, G. P. (1911), *Ann. Rept. Conn. Agr. Expt. Sta.*, 1909/10 : 753~774.

- 4) DeBruyn, H. L. G. (1926), *Phytopath.*, 16 : 121~140.
- 5) Gallegly, M. E. & J. Galindo (1957), *Phytopath.*, 47 : 13. (Abstract).
- 6) Leonian, L. H. (1931), *Phytopath.*, 21 : 941~955.
- 7) Murphy, P. A. (1922), *Sci. Proc. Roy. Dub. Soc.*, 16 : 442~466.
- 8) Pethybridge, G. H. & P. A. Murphy (1913), *Sci. Proc. Roy. Dub. Soc.*, 13 : 566~588.
- 9) Rosenbaum, J. (1917), *Jour. Agr. Res.*, 8 : 233~276.
- 10) Smoot, J. J., F. J. Gough, H. A. Lamey, J. J. Eichenmuller & M. E. Gallegly (1958), *Phytopath.*, 48 : 165~171.
- 11) Smorawaki, J. (1911), *Landwirtsch. Jahrb.*, 19 : 1~12.
- 12) Tucker, C. M. (1931), *Missouri Univ. Agr. Expt. Sta. Bull.* 153 : 208.
- 13) 堀正侃 (1938), *日植病報*, 8(1) : 66.

Summary

Oospore-like bodies (imperfect oospores) of the late blight fungus are formed both on the artificial cultures and on the diseased tissues of potato leaves and stems, and tomato fruits. These imperfect oospores are sorted into 4 types, as follows :

A-type : Outer wall of the spore is thin and not colored. Protoplasmic content is light yellowish brown. Without oogonium and antheridium formation.

B-type : Outer wall of the spore is light brown. Protoplasmic content is brown. Without oogonium and antheridium formation.

C-type : Outer wall of oogonium is colorless or light brown. Inner content of oospore is light to dark yellowish brown and granular. Without antheridium formation.

D-type : Oogonium is reddish brown or brown. The content of oospore is light or dark yellowish brown and granular. Without antheridium formation.

The physiology of A and B type oospores are not yet thoroughly studied. C and D type oospores are seemed to be formed parthenogenetically. Imperfect oospores (D type) are produced in abundance by the following culture method. When the fungus is cultured on corn extract agar for 20 to 30 days at 18°C and then transferred on oat-meal extract agar, oogonia containing oospore are found abundantly. On the contrary, when the fungus is cultured continuously on the same substrata, the oogonium is not produced. So, it seems likely that there are some stimulating actions of some nutrients on the formation of oospores.

The imperfect oospore (without antheridium) can germinate producing the germ tube or forming the sporangium.

Some of the isolates of the fungus produce only oospores but others not. When compatible isolates were paired on the same medium by means of the writers' cultural method, oogonium with the amphigenous antheridium was produced. It seems likely that the late blight fungus is heterothallic, because of the presence of the self incompatible isolates.

(Plant Protection Section, Ministry of Agriculture and Forestry, Tokyo, Japan, and Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai, Japan)