219 植物病原菌の遊走子の誘引物質に対する走化性の可視化

北大農学部 高山智光^{*} 田原哲士 水谷純也

Visualization of chemotaxis of plant pathogen zoospore: response to chemical attractants

Tomohiko TAKAYAMA, Satoshi TAHARA and Junya MIZUTANI

Plant pathogenic Phycomycetes produce zoospores which can move in soil water toward the host plants. The zoospores of *Aphanomyces cochlioides* a causal fungus of the spinach root rot, are attracted to chemotropic stimulants in the host roots and root exudates. Cochliophlin A, 5-hydroxy-6,7-methylenedioxyflavone was identified as one of host specific attractants from the root exudates. The zoospores are attracted topically at some parts of the root surfaces. To visualize the behavior of zoospores, we took microphotographs and recorded on video tapes. The zoospores attracted to drops of fluorocarbon FC-72 solution of cochliophlin A in water aggregated topically on the surface as well as that of host roots. The result of visualization suggested that the topical aggregation on the surfaces of spinach root or the FC-72 solution of cochliophlin A was guided by cochliophlin A and an additional factor like an aggregation pheromone.

1. ホウレンソウ根腐病菌とその遊走子誘引物質

植物の病害は一般に糸状菌(カビ)、細菌(バクテリア)、ウイルスなどの微生物(病原体)が、健全な植物体内に侵入し、寄生することによって引き起こされる。植物病害の中で、土壤中に生存する病原が植物の土壌と接する部分から侵入して起こる病害を土壌伝染性病害、略称、土壌病害という。土壌病害は発病したときには、植物体は既に重篤の状態にあり、手の施しようがない。また、同一作物を連作することによって土壌病害が発生しやすくなり、畑作農家にとって土壌病害は大きな問題となっている。

Fig.1 Life cycle of *Aphanomyces* spp.¹⁾

Faculty of Agriculture, Hokkaido University

ハウレンソウの土壤病害として知られているハウレンソウ根腐病は、ミズカビの一種である *Aphanomyces cochlioides* という糸状菌がハウレンソウの根に寄生して腐敗させることにより引き起こされる。植物病原性の *Aphanomyces* 属菌の生活環をFig. 1に示した¹⁾。このように *A. cochlioides* は無性生殖の手段として水中を遊泳することのできる遊走子を形成する。これはアオカビなど一般になじみのある糸状菌の孢子に相当するものである。この遊走子は、雨が降ったときなどの湿潤な土壌に含まれる水の中を、自らの力で遊泳することによってハウレンソウの根にたどり着き、根の表面に局所的に集合して集積塊を形成し、そこから植物体内に侵入する。植物への感染は専らこの遊走子によって行われる。

植物病原性の *Aphanomyces* 属菌の遊走子はその宿主となる植物に含まれる化学物質に誘引されることが知られている。*A. cochlioides* の遊走子はハウレンソウの根から抽出された5-hydroxy-6, 7-methylenedioxyflavone(cochliophilin A[CA])に誘引される。CAはハウレンソウ1個体の根から1日当たり20–30ng滲出して、 10^{-9} M以上の濃度で遊走子を誘引する²⁾。このような誘引物質の存在は、土壌中で遊走子が自らの宿主を選択する際に重要な役割を果たしているものと考えられる。このように誘引された遊走子は、前述のように根の表面に集積塊を形成するが、このときにも何らかの化学的シグナルが関与しているものと考えられる。

以上のように、*A. cochlioides* が宿主植物に感染する際には、遊走子が誘引物質を認識してそれに対して誘引されるという現象が、重要な役割を果たしている。このような誘引現象の本質を明らかにすることは、化学生態学的にも感染生理学的にも興味のあることである。また、誘引現象を映像で記録することによって可視化することは、本質の解明への強力な手段となっている。

2. 可視化の手法

2-1. 顕微鏡写真撮影

一般的には顕微鏡に専用の写真撮影装置を取り付けて行うが、今回は特に低倍率であることや、取扱が簡便であることから一眼レフカメラをアダプターを介して顕微鏡に取り付けて用いた。使用した機器は次の通り。顕微鏡：BHS-321、暗視野コンデンサー BH2-DCD、対物レンズ DAch 4×, 10×、撮影専用レンズNFK 2.5×LD、顕微鏡アダプター：フォトミクロアダプターL、一眼レフカメラ：OM-2（以上オリンパス）

撮影条件としては暗視野照明の下で1/60sのシャッターを切るために、ISO 1600のフィルムを2倍増感して用いた。

2-2. 顕微鏡ビデオ撮影

ビデオ撮影装置としてはオリンパスカラーテレビカメラシステムICD-740をもちい、VTRにはビクターBR-9000、MR-X3を用いた。顕微鏡は写真撮影に用いたものと同様。

3. 遊走子の誘引と集積塊の形成実験

3-1. ハウレンソウの根に対する反応

トウモロコシ寒天培地を用いて培養した *A. cochlioides* の菌叢を水洗すると遊走子が形成され、遊走子懸濁液が得られた。懸濁液の遊走子密度は 1.5×10^5 /ml程度であった。こ

の遊走子懸濁液の中にホウレンソウの根を投入すると、Fig. 2のように遊走子は根に誘引され、さらにFig. 3のように集積塊が形成された。この集積塊を、小さなピペットを用いて根の表面からはぎとり、根を投入していない遊走子懸濁液の中に移すと、集積塊に遊走子が誘引されることが観察された。

Fig. 2 The zoospores attracted to spinach root

Fig. 3 Topical aggregation of the zoospores on the root

3-2. Cochliophilin A (CA) に対する反応

化学的・生物学的に不活性な液体であるフッ化炭素溶媒のFC-72に、CAを 10^{-6} Mの濃度になるように溶解し、遊走子懸濁液の中に液滴として注入すると、懸濁液との界面に遊走子

が誘引されるのが観察された。さらに、誘引された遊走子はFig. 4のように界面に集積塊を形成した。この集積塊を前項と同様にして取り出し、FC-72溶液を注入していない遊走子懸濁液の中に移すと、集積塊に遊走子が誘引されることが観察された。

Fig. 4 Topical aggregation of the zoospores on the surface of the FC-72 solution of cochliophilin A

4. 集積塊から放出される集合フェロモン様物質

以上の3-1・2の実験から集積塊による遊走子誘引には、CAのような植物由来の誘引物質がかかわっているのではなく、集積塊を形成している遊走子から放出される集合フェロモン様物質が関与しているのではないかと考えられた。そこで遊走子から誘引物質の抽出を試みた結果、有機溶媒に抽出される誘引活性成分の存在が確認された。現在、この成分の分画を検討中である。

参考文献

- 1) 生越明:『北海道畑作物の土壤病害』, 宇井格生 監修
北海道畑作物の土壤病害刊行会編, 札幌, 1983, pp. 53-62
- 2) 堀尾剛、川端潤、水谷純也:日植病報, 58, (1992), 573