

極地産 *Pythium* と *P.iwayamai*, *P.paddicum* の凍結耐性の比較

村上 諒^{1,2}, 東條 元昭³, 星野 保^{2,1}

¹北海道大学生命科学院, ²産業技術総合研究所, ³大阪府立大学

A comparison of cold tolerance of *Pythium* from Polar Regions, *P. iwayamai* and *P. paddicum*

Ryo Murakami^{1,2}, Motoaki Tojo³, Tamotsu Hoshino^{2,1}

¹Hokkaido Univ. , ²AIST Hokkaido. , ³Osaka Pref. Univ.

It is known that several biological species exist in terrestrial ecosystem of Polar Regions after annual snowmelted. *Pythium* is typical plant pathogens and is distributed in worldwide. However, the isolation is necessary to confirm the presence of *Pythium*. Thereby studies on *Pythium* in Polar Regions are fewer than those of other fungi.

Our aim of this study is to elucidate in ecophysiological characteristics of *Pythium* in both Polar Regions. Especially, we investigated how isolates adapted to frozen environment. Moreover, we also observed in *P. iwayamai* and *P. paddicum* that are known snow molds in Northern Hemisphere. We compared frost tolerance of *Pythium* from Polar Regions and snow mold *Pythium*.

Frost tolerance of Hyphal Swellings (HS) and mycelium of tested isolates from Polar Regions were distinct difference from those of snow mold *Pythium*. Mycelium of a few isolates from Polar Regions survived freezing treatment.

北極圏や南極には夏期の融雪後、露岩域に様々な生物種が生息している。しかし、植物病原性を有し、世界各地に分布している *Pythium* は子実体など肉眼で確認できる指標を形成するものとは異なり、分離による確認を必要とするため両極地における研究例は少ない。

本研究では両極地から分離してきた *Pythium* 10 菌株を用い、低温環境下にどのような機構で適応しているのかを生理、生態学的観点から解明することを目的とした。さらに、日本国内にも生息しており、雪腐病を引き起し低温に適応している菌として知られる *P. iwayamai*, *P. paddicum* を凍結耐性の比較対象として用いることで凍結耐性の差を明確にすることを試みた。

各菌株の最適生育温度を調べるため、ポテトデキストロース寒天培地 (PDA) 上で 24 時間おきに 1 週間、 -1°C 、 4°C 、 10°C 、 15°C 、 20°C 、 25°C 、 30°C での菌糸の成長を測定した。各菌株における菌糸の最適生育温度は 20°C 付近にあり、極地産と温帯産種の明確な差は見られなかった。

Hyphal swellings (HS) の凍結耐性を調べるため、V8 ジュース液体培地中 20°C で培養した菌体をホモジナイザーで菌糸を破碎し、 $74\ \mu\text{m}$ 、 $20\ \mu\text{m}$ の篩にかけることで HS を集めた。水で懸濁した HS を -30°C で 2 時間凍結、室温で 1 時間融解を 1 回の処理とした凍結融解サイクルを 3 回行い、生存している数で測定した。極地産の HS は凍結融解サイクル後の生存率は高かったが、*P. iwayamai*, *P. paddicum* の生存率は低く、極地産と温帯産種の凍結に対する明確な差を見出した。

Pythium は菌糸体で生育している。菌糸体を構成している菌糸の凍結耐性を測定するため PDA で培養した各菌株をコルクボーラー（直径 7 mm）で打ち抜き、菌片を上記の凍結融解処理と同様の方法で 3 回行い、生存する菌片数で測定した。*Pythium* の菌糸は隔壁を持っておらず、凍結により容易に死滅すると考えられているが、極地から分離した菌のうち 2 菌株は凍結融解処理後に生存が確認でき、凍結に対する抵抗を保持していることが示唆された。

また、*Pythium* は植物病原性を有しているものが多く、自然環境でも植物に感染して生育しているため、植物に感染させた状態での凍結耐性を測定した。宿主にケンタッキーブルーグラスを用い、感染を確認した後、同様の凍結融解処理を行い生存している個体数で測定を行ったところ、極地産、温帯産の全ての菌株で生存を確認した。

今まで *Pythium* の菌糸は低温や凍結に対する抵抗力が弱く、卵孢子や HS のような耐久器官によって細胞を保護していると考えられていたが、今回の実験結果から極地に生息している *Pythium* の中には凍結耐性の強さに差はあるものの、菌糸自体に耐性を持つものが見つかった。この結果から示唆される凍結耐性の差を明らかにするため、細胞膜構成成分であるリン脂質や脂肪酸に着目し、各菌株における組成の違い、培養温度での組成変化を調べることで凍結環境への適応能力との関係を明らかにしようと試みた。