

馬鈴薯疫病菌遊走子嚢より遊走子の発出並に同菌の 感受体侵入後の進展についての二、三の観察

山本昌木 (植物病学研究室)

Masaki YAMAMOTO

Some Observation on the Liberation of Zoospores from Zoosporangia of *Phytophthora infestans* (MONT.) DEBARY and the Development of the Pathogens after the Penetration to Their Suscept Plants.

I 緒 言

著者は従来馬鈴薯疫病に関し種々の角度から検討を加えて来たが、今回疫病菌遊走子嚢より遊走子の発出並に同菌の感受体侵入後の進展に就いて位相差及び偏光顕微鏡を用いて観察を行い、若干の知見を得たのでその結果を報告する。本実験の遂行に当り激励を賜つた竹崎学長、偏光顕微鏡の使用に便宜を与えられた島根大学地学教室に深謝する。

II 遊走子嚢より遊走子の発出に関する観察

馬鈴薯塊茎(男爵薯)を約0.5cmの厚さに輪切りにしたものをペトリ皿に入れ、その中央に疫病菌を植え付け、20°Cに10日間培養して遊走子嚢を形成せしめ、滅菌した筆で軽く菌叢表面を撫で遊走子嚢を集め、滅菌水で懸濁液を作り軽く遠心分離したものを0.05% ATP 溶液中で12°Cに保ち発芽せしめた。懸濁液濃度は150×1視野10~15遊走子嚢程度であつた。4時間後の観察結果は第1表の如くである。

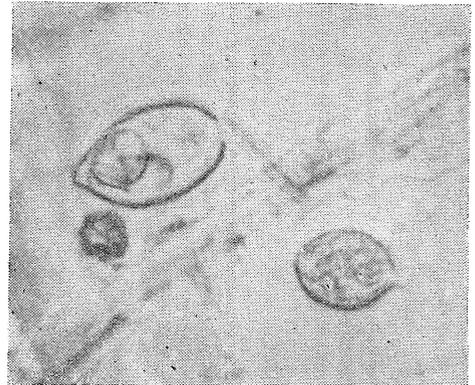
第1表 ATP溶液中に於ける馬鈴薯疫病菌遊走子嚢の発芽 (12°C)

処 理 区	測定孢子数	発芽孢子数	発芽率
A T P	552	170	30.79
対 照	591	84	14.21

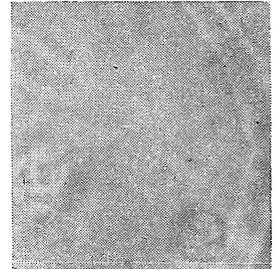
これらの遊走子嚢及び遊走子はNeutral redで内容が明らかに染色され生きている事が確かめられた。又Janus Green B 0.0002%溶液で染色し、位相差顕微鏡で観察すると、対照区よりも Mitochondria の運動が活潑であつた。遊走子が逸出する直前に Mitochondria がぐるぐる廻り初め急に融合して遊走子の形成へと進むものが認められた。逸出した遊走子が活潑に運動している際には鞭毛の動きは速く観察はかなり困難であるが、しばらく

して遊走子の運動が不活潑になり静止する頃になると遊走子の外面に球状の突起物が認められるようになる。これはFERRIS⁽³⁾のPaddle-like structureに相当するものと考えられる。遊走子の発芽について観察したものを第1図に示した。

第1図 馬鈴薯疫病菌遊走子嚢より遊走子の発芽 (位相差顕微鏡による観察)



遊走子の運動がよくなる
Paddle-like structureが
見えて来る。



次いで同上の操作で得られた遊走子嚢懸濁液を5×10⁻⁴モルDNP溶液及び蒸溜水中に於て12°C及び18°Cに於て発芽せしめた。6、24時間後の発芽状況は第2、第3表の如くである。

第2表 DNP溶液中での馬鈴薯疫病菌遊走子嚢の発芽

実験 回別	時間	温度 (c)	DNP			対 照		
			測定遊走 子嚢数	発芽遊走 子嚢数	発芽率	測定遊走 子嚢数	発芽遊走 子嚢数	発芽率
I	6	18	574	73	12.72	603	121	20.07
		12	603	121	20.07	571	146	25.57
	24	18	408	59 (+42)	14.14 (25.60)	573	141 (+19)	24.61 (27.92)
		12	362	92 (+46)	25.41 (38.12)	375	177 (+46)	47.20 (59.46)
II	6	18	227	24	10.57	344	61	17.73
		12				263	50	19.01
	24	18	313	33 (+78)	10.54 (35.46)	380	68 (+63)	17.89 (34.47)

N, B (+) は直接発芽, () は間接発芽と直接発芽との合計した発芽率

第3表 遊走子嚢より遊走子の逸出に及ぼすATP, DNPの影響

処理区	測定遊走子嚢	発芽遊走子嚢	発 芽 率
A T P	801	75	41.64
D N P	852	29 (+1)	34.21 (35.21)
対 照	662	24	36.25

III 感受体侵入後菌糸の進展に及ぼす ATP及びDNPの影響

遊走子嚢の蒸留水懸濁液を12°Cで4時間放置し遊走子を逸出せしめ、馬鈴薯(品種男爵薯)葉柄を切断したものを18°Cに於てこの中に浸し遊走子を体内に侵入せしめ3時間後0.05% ATP又は10⁻⁴モルDNP溶液を水流ポンプにより吸引して吸収せしめた。18°Cに一定時間放置後フクシン0.1%水溶液で菌糸を染色しその伸長を測定した。20個体の平均値を第4表に示す。

第4表 馬鈴薯葉柄組織内での疫病菌菌糸の進展に及ぼすDNP及びATPの影響

処理区	5時間後	24時間後
D N P	51.9	68.5 (μ)
A T P	89.9	144.7
対 照	79.9	129.9

表皮上の観察ではATP処理区はDNP処理区よりも表面の褐変が著しく且つlocalizeされた感じを受けた。又対照区とDNP処理区との差はATP処理区とDNP処理区との差に比べて少く、DNP処理区は対照区に比べて褐変は淡く且つ局限されていないようであつた。

III 位相差顕微鏡による馬鈴薯疫病菌の塊茎侵入後の観察

約0.5cmの厚さに輪切りにした馬鈴薯塊茎の中央部に約0.5cm径の馬鈴薯疫病菌叢を植付け、18°Cに放置、一週間後に徒手切片を作り Janus Green B 0.0005% 溶液で生体染色を行い褐変部並にその周辺の状態を位相差顕微鏡を用いて観察を行った。観察当時の室温は18°C~22°Cであつた。観察結果は第5表に示す。

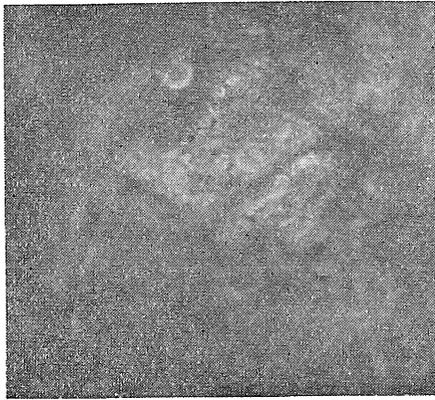
富山は健全部にはブラウン運動が認められないと言っているが、位相差顕微鏡下では認める場合もあつた。尙Neutral redで健全部に迷走する菌糸を染色する事が出来た。

第5表 位相差顕微鏡による馬鈴薯疫病菌侵入部位の観察

	男 爵 薯 4702-7	
褐 変	緩慢である。又褐変部分の巾が広い	強度であり且つ褐変部の巾が狭い
ブラウ ン 運 動	褐変部にはブラウン運動が認められる事があるが、4202-7に於ける如く激しくない。	褐変部の周辺でブラウン運動の激化が認められる。
ミトコ ンドリ ヤ	動きは遅くミコンドリヤ自体はつきりしない。	褐変部の周辺で一定方向に並ぶのが認められる事がある。

第2図 馬鈴薯疫病菌侵入部附近へのミトコンドリアの集合(品種4702-7)





V 偏光顕微鏡による馬鈴薯疫病菌の感受体侵入部位の観察

供試材料はⅢと同じである。観察はLeitz及びWetzler偏光顕微鏡を用いて行つた。観察結果は次の如くである。即ち健全全部病変部共に澱粉及び細胞膜は複屈折を示した。褐変部で澱粉が複屈折を示す場合もあるが、その程度が弱められている場合が多かつた。又菌の侵入に対する感受体の反応の強さと複屈折の強さとは関係があるようで、抵抗性品種では褐変部及び普通生物学用顕微鏡では褐変を認めない部分にも複屈折が認められた。これらの観察結果から強抵抗性品種に疫病菌が侵入するとその部分が異方性を示すらしい事がわかつた。

VI 考 察

位相差顕微鏡による馬鈴薯疫病菌の観察については既にFERRIS, HIDDEMAの報告があり、又*Phytophthora capsici*に就いては桂, 原田, 村上が述べている。然しこれらの発芽機構については充分調べられていない。著者は馬鈴薯疫病菌遊走子嚢より遊走子の発出はDNPで抑えられ、ATPで促進される事を見たので、発芽には酸化的燐酸化が関係し、これに伴うエネルギーの必要性が想像する。石田, RUNNSTRÖMらはウニの卵割阻害がATPにより回復する事を認め、卵割のエネルギーの一部は表面から供給されるとしている。

BLACKら, GRATAMらにより馬鈴薯疫病菌に於けるRaceの問題が議論せられ、又高桑らにより我国に於ても新しい系統の発見が報告されているが、本論文に於て抵抗性と称するのは馬鈴薯疫病菌の普通系統に対する抵抗性を指すものである。

著者の実験ではDNP処理により菌糸の感受体内の進展は抑えられ、ATP処理により促進せられた。DNP 10^{-4} ~ 10^{-5} モル程度では菌の発育は阻止されると考えられるのが、ATPは細胞内に入り難いと思われるので、

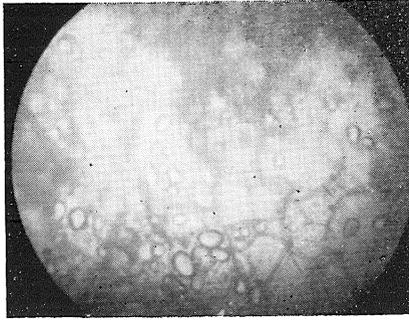
菌糸の発育が良好になつたように見えたのはATPが細胞界面に働き内部の代謝が昂進されたものであるか否かは今後の研究にまたねばならない。富山はDNP処理により抵抗性品種に於て細胞の過敏感死が著しく遅延するのを見た。又菌系統により細胞内の菌糸伸長量は異なるが、抵抗性との間には相関が無いとしている。

偏光顕微鏡を用いての植物組織の観察に関しては、NAGELIによる細胞膜、HARTMANによるCelluloseの存在、PFEIFFERによる配偶体やミトコンドリア等がある。又伊倉は羊歯類の前葉体及び精子の構造を偏光顕微鏡で観察し、中村は生体細胞中に於ける染色体並に非染色像についてその複屈折をしらべ、井上及び団は細胞分裂に於ける複屈折現象を研究し、偏光顕微鏡の技術が生命のより動的な面を把握せられれば、形態学の領域から一躍して生理学の武器となり、而もこの方法はその性質上個々の細胞、否進んで細胞内の各構造に直接さしこめる最も鋭いメスとなると述べている。HILL及びORTONはBlue stem病にかゝつた馬鈴薯塊茎ではえ死した部分で澱粉が完全に溶解される場合のあるのを見ていて、著者の観察でもえ死部では澱粉が少なくなつている事が多かつた。彼等はえ死部の篩部及び柔組織ではスベリンの沈積の為にCelluloseの異方性が判然としなないといつてゐる。著者の実験では罹病性の男爵薯では菌侵入部でも複屈折が明瞭でない事が多かつたが、抵抗性の種間雑種では菌侵入部附近に強い複屈折が認められた。然し著者の別の実験で表皮に菌が侵入しえ死した部分では複屈折が消えているし、又HILLらの結果から見ても今回の実験に供した切片が厚すぎたものであるか否かは今後検討する必要がある。何れにしても強抵抗性品種の菌侵入部附近で複屈折が強くなるのは原形質内のミセル構造に変動が起つている事を暗示する。BENSLEYは一樣に見える原形質にも構造があり、この働きが総合して生命現象となり、原形質中の微細構造は細長いミセル或は巨大分子によるもので、その長いミセルが多くは水素結合とかVan der Waals力、時にはもつと強い化学結合によつて結合しているが、この横の結合の強さや分子の折れ方、長さ等が変るとゾルからゲルに又はその逆の変化が現れ、又ミセル相互の間隙は 150\AA 程度で、原形質の粘着性もこれらのミセルによつて生ずるものらしいとしている。

VII 摘 要

12°C に於て馬鈴薯疫病菌遊走子嚢を0.05% ATP溶液及び 5×10^{-4} モルDNP溶液中に浮遊させ、一定時間後ヤヌス緑B0.0005%溶液で生体染色を行い、位相差顕微鏡

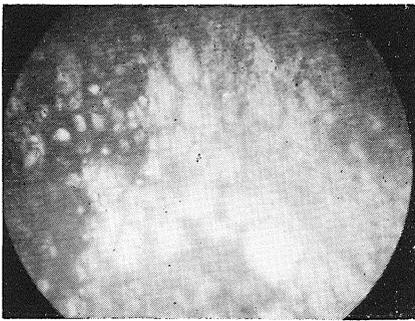
第3図 馬鈴薯病疫病菌の感受体侵入部位の偏光顕微鏡による観察



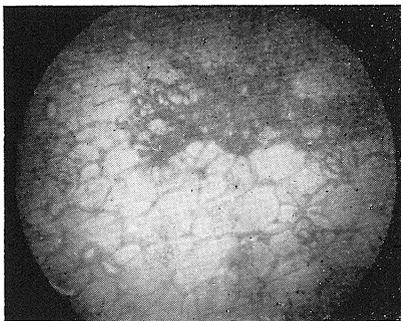
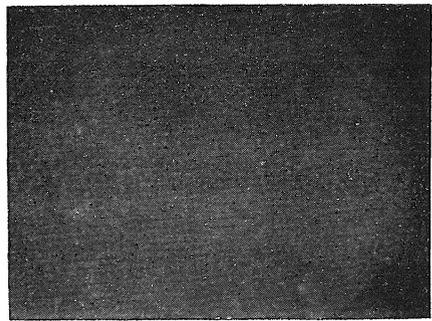
明視野 ←



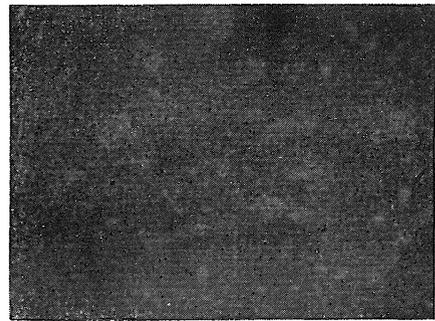
→ 偏光



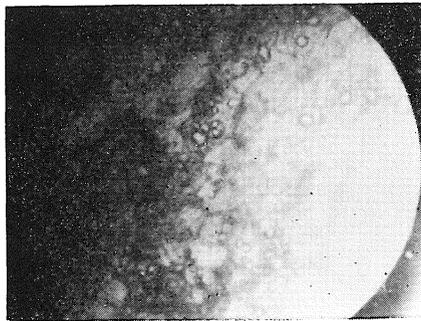
ケネベツク



明視野 ←



→ 偏光



男爵薯



下で之等より遊走子の発出状態を観察したが、ATP添加によりミトコンドリアと思われる顆粒の活動は劇しくなり、遊走子の発芽率は高められた。又 DNP 添加により遊走子の発出率は低下した。12°C に於ては遊走子を男爵薯の葉柄切断面に接種後 DNP を吸引注入したものは感受体内で菌糸の進展は遅延した。抵抗性品種としては種間雑種のケネベック、4702-7, 41089-8, 罹病性品種としては男爵薯を用い、その塊茎の切断面に疫病菌を植付け、20°C に保ち一週間後に位相差顕微鏡を用い観察を行つたが、抵抗性品種では罹病性品種に比べて、褐変部及びその周辺に複屈折が強くあらわれた。この事から原形質のミセル構造の変動との関連性が想像せられた。

引用文献

- (1) BENSLEY, R. R.: Biol. Symp. 10: 323, 1943
- (2) BLACK, W, MASTENBROEK, C, MILLS, W. R. & PETERSON, L. C.: Euphytica 2: 173—179, 1953
- (3) FERRIS, V. R.: Science 120 (3106): 71—72, 1954
- (4) GRAHAM, K. M.: Amer. Potato Journ. 32 (8): 277—282, 1952
- (5) HIDDENMA, J. & KOLE, A. P.: Tijdschrift over Pflanzenziekten 60 (3): 138—139, 1954
- (6) HILL, L. M. & ORTON, C. R.: Journ. Agr. Res. 57 (5): 387—392, 1938
- (7) IGURA, I.: Bot. Mag., Tokyo 69 (812): 47—58, 1956
- (8) 井上信也・団勝磨: 科学 19 (3): 111—122, 1949
- (9) 石田寿虎: 生化学 25 (6): 289—316, 1954
- (10) 桂琦一・原田賢二・井上道夫: 日植病報 21 (2, 3): 71—73, 1956
- (11) MONNE, L.: Adv. Enzymol. 8: 1—69, 1948
- (12) NAKAMURA, T.: Bull. Kyoto Gakugei Univ. 1: 82—88, 1951
- (13) RUNNSTRÖM, J. & KRIST, G.: Exp. Cell Res. 1: 497—499, 1950
- (14) 佐藤七郎: 植雑 69 (812): 87—90, 1956
- (15) 高桑亮・高瀬昇・富山宏平: 日植病報 19 (3, 4): 114—116, 1955
- (16) 富山宏平: 日植病報 19 (3, 4): 149—154, 1954
- (17) 富山宏平: 北海道農試彙報 67: 28—38, 1954
- (18) 富山宏平: 農業技術 10 (4): 1—3, 1955
- (19) TOMIYAMA, K.: 日植病報 21 (2, 3): 54—62, 1956
- (20) 山本昌木・木村幹夫: 東北農試研究報告 4: 34—40, 1955
- (21) 山本昌木: 東北農試研究報告 4: 41—52, 1955
- (22) 山本昌木・達山和紀: 科学 24: 88, 1954
- (23) YAMAMOTO, M. & TATSUYAMA, K.: 柄内福士両教授還暦記念論文集 85—91, 1955
- (24) 山本昌木・小林裕: 東北農業 7 (1): 23—25, 1953
- (25) 山本昌木・達山和紀 島根農大研究報告 4: 59—62, 1956
- (26) 山本昌木: 島根農大研究報告 3: 54—59, 1955
- (27) 山本昌木: 島根農大研究報告 3: 60—62, 1955
- (28) 山本昌木: 日本植物病理学会関西部会講演 1956

Summary

Observations of the germination of zoospores from the zoosporangia of *Phytophthora infestans* (MONT.) DEBARY, which were suspended in 0.005% ATP and 5×10^{-4} M DNP solution, were carried out under phase-contrast microscope. The movement of granules (which seemed to be mitochondria through vital staining of 0.0005% Janus Green B solution) and the percentage of sporangial germination was raised by the addition of ATP and was inhibited by DNP solution.

After the zoospores were inoculated to the surface of the cut end of the leaf petiole of potato plants (Variety Irish Cobbler), DNP and ATP were introduced to them with pressure. In the former case, the mycelial growth of the pathogen within the susceptible plants was delayed, and in the latter case it was accelerated.

To investigate the invasion of pathogens to potato tubers, the late-blight fungus was inoculated to the cut surface of potato tubers (Varieties used were — Kennebec, Hybrid 4702—7 and 41089—8 as resistant; Irish Cobbler as susceptible) and they were kept at 20°C for 7 days. Observations were undertaken under phase-contrast and polarization microscopes. Double refraction in the invaded parts in the resistant varieties was stronger than in the susceptible one. The possibility of the change of micellar arrangement or structure in the cytoplasm of resistant varieties was taken into consideration from these investigations.