

稻胡麻葉枯病菌の侵入を受けた水稻細胞の顕微化学的観察及び水稻体中の鉄、特に有機態鉄について

達山和紀・山本昌木 (植物病学研究室)

Kadzunori TATSUYAMA and Masaki YAMAMOTO

On the Histochemical Observations of the Suscept Cells Penetrated by *Cochliobolus Miyabeanus*, and the Relation between the Occurrence of Helminthosporiose and Iron, especially Organic Iron, in the Rice Plant

I 緒 論

植物病原菌が感受体 (Suscept) を侵害し疾病を起す時の菌と感受体の攻防の場面は、菌の侵入準備行動期にはじまりいくつかの段階に分けられ、各場面は、菌も感受体も他の場面と大いに関係に動いていると考えられる。先に筆者の一人達山⁽⁹⁾は、稻胡麻葉枯病菌の侵入準備の段階について2, 3の実験を行い、感受体となり得ない植物葉上水滴中では附着器形成の場面で抑制が行われることを報告したが、さらに感受体の細胞と菌が直接接触する場面について観察することは感受体の細胞が感受体生命の最小単位である以上、きわめて重要なことは言う

までもない。筆者らは、稻胡麻葉枯病菌を水稻に接種して感受体細胞の顕微化学的観察を行い、特に鉄について2, 3の実験を行ったのでその結果を報告する。実験の一部である水稻葉の分光分析に当つては島根県警察本郡鑑識課永田技師の援助をいただき、又、プルフリツヒ光度計の使用には本学短期大学部橋本講師に便宜をはかつていただいた。起稿に当つて両氏に御礼申上げる。

II 実験方法及び結果

(実験A) 菌の侵入を受けた水稻 (京都朝日) 葉鞘表皮細胞の顕微化学的観察

供試水稻 (京都朝日) は昭和27年6月24日5万分の1ワグネルポットに播種して普通栽培し9月上旬出穂前の草丈約70cmに達したもので、馬鈴薯寒天培養基上に2週間培養した稻胡麻葉枯病菌 (京大13号菌) 孢子懸濁液を坂本氏の方法で止葉から10~12番目の、長さ7cmに切断した葉鞘内側に接種した。観察は、25°Cの暗定温器中に一定時間放置した後、葉鞘裏面の表皮細胞をピンセットではぎとり検鏡した。大部分は生組織を用いたが、一部はフォルマリン固定後、処理観察したもので、観察結果は第1表の通りである。

(実験B) 菌の侵入を受けた、外国稲を含む8品種の水稻葉鞘表皮細胞の顕微化学的観察

第1表 稻胡麻葉枯病菌の侵害を受けた水稻 (京都朝日) 葉鞘裏面表皮細胞の顕微化学的観察

検出対象	試薬反応	呈色	健全細胞	菌の侵入を受けた細胞		
				接種6時間後	24 "	50 "
K	亜硫酸コバルトカリウム法	—	+*	+	+	+
P ₂ O ₅	モリブデン酸アンモニウム法	—	±	±	±	±
Fe ⁺⁺	赤血塩	青	—	—	—	—
Fe ⁺⁺⁺	黄血塩	青	—	—	—	—
NH ₃ ?	Nessler	黄	+	+	++	++
Phenol	millon	赤煉瓦色	+	+	+	+
"	P-Chinon	黄	±	±	±~+	±
Sugar?	Fehling's solu.	橙赤色	+	+	+	+
Oxydase	Nadi-react	深青	+	+	+	++~+++
Peroxydase	Naphthol Peroxydase.	紫	+	+	+	+
反 応	B. T. B.	—	6.4	6.4	6.4	6.4
染 色 性	methylenblue	—	青	青~緑	緑	緑
"	Safulanin	—	赤	赤	赤~黄橙	赤~黄橙
"	Neutralred	—	赤	赤	赤~黄橙	赤~黄橙

* 表中符号は呈色の強さ ++>+>±>—

** 分生孢子濃度 1試験管斜面/8cc

植物の成分として鉄が存在し、特に植物生理上不可鉄な要素であることは古くから知られている。(実験A)に於ては細胞内の鉄の動きは確認出来なかつたが鉄酵素である Oxydase, Peroxydase の動きが見られ、疫病による馬鈴薯葉の褐変は鉄と密接に関係していると思われ、⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾ 又、いもち病斑等⁽²⁾ についても同様のことが云われており、稲胡麻葉枯病の発生についても水稻体中の鉄の生理作用が無関係であり得ないと思われるので、外国稲を含むそれぞれ稲胡麻葉枯病に対する抵抗性の異なる品種の水稻について鉄を顕微化学的に観察した。供試水稻は Te tep, 長香稻, Baurash Murai, Karalath, 亀治, 銀坊主, 宇兵衛, 銀糯で、Te tep 及び長香稻は特に稲胡麻葉枯病に対して強抵抗性を示す品種である。実験方法は前記と同じで、水稻は昭和28年5月18日に播種し7月27日草丈59~75cmに達したものを材料とした。結果は第2表の通りである。さらに同じ材料を用いて、鉄酵素である Oxydase Peroxyase を Nadi 試薬, Benzidin で呈色検出した結果菌接種後48時間目の観察でいずれも (+) の結果を得たが、品種間に於いて、呈色部位並びに強さに差がみとめられた。即ち、Oxydase の反応は強抵抗性品種に於て侵入菌糸の周辺に著しく、罹病性のもものでは菌の侵入を受けた細胞全体にわたつて淡くあらわれ、中間の品種では細胞膜にそつて強く反応した。又、Perxoydase の反応は強抵抗性品種に於て侵入細胞の膜の内側に著しく、他の品種では細胞全体にわたつて淡く呈色しているのが観察された。

第2表で示された結果について直ちに結論をのべるこ

第2表 稲胡麻葉枯病菌の侵害を受けた水稻葉鞘裏面表皮細胞の顕微化学的観察

水稻品種	検出対象	接種24時間後			
		健全細胞	侵害を受けた細胞	健全細胞	侵害を受けた細胞
Te tep	Fe ⁺⁺	—※	+	—	—
	Fe ⁺⁺⁺	±	±	±	+
長香稻	Fe ⁺⁺	—	+	—	—
	Fe ⁺⁺⁺	±	+	±	+
Karalath	Fe ⁺⁺	—	±	—	—
	Fe ⁺⁺⁺	—	±	—	—
Bawrash Murai	Fe ⁺⁺	—	±	—	±
	Fe ⁺⁺⁺	—	±	—	—
亀治	Fe ⁺⁺	—	+	—	±
	Fe ⁺⁺⁺	—	±	—	—
銀坊主	Fe ⁺⁺	—	±	—	±
	Fe ⁺⁺⁺	±	±	—	—
宇兵衛	Fe ⁺⁺	—	±	—	—
	Fe ⁺⁺⁺	—	±	—	—
銀糯	Fe ⁺⁺	—	—	—	—
	Fe ⁺⁺⁺	—	—	—	—

※ 符号は呈色の強さ +>+>+>±>±>—>—

とはさけるが、強抵抗性品種例えば Te tep, 長香稻などでは、菌接種後24時間目で2価の鉄が強くあらわれ48時間目では逆に3価の鉄が多く検出される。然るに罹病性の品種ではそのようなはつきりした傾向はたしかめられず、銀糯では全く認めることも出来なかつた。又、これらの鉄の動きと鉄酵素と直接むすびつけることは出来ないが、鉄酵素の様相も又品種間に若干の差の認められることはすでに述べた通りである。

(実験C) 供試水稻体中の鉄量測定及び無機成分の輝線スペクトルによる分光分析

(実験B)の結果にもとづき水稻品種と水稻体中の鉄との関係を更にくわしく知るために、各品種の鉄含量をチオシアン鉄比色法で定量し、又輝線スペクトルによる分光分析によつて鉄及びその他の無機成分について品種間差の有無を検討した。

水稻体中の鉄の定量は、実験Bに用いた各品種について8月15日その全葉を80°Cで乾燥し Piper⁽⁸⁾法で分解、チオシアンカリで発色せしめプルフリツヒ光度計によつて比色定量したが、第3表に示す通り稲胡麻葉枯病に対する抵抗性の強弱と各品種間の葉乾量1g中の全鉄量との間に相関関係は見出せなかつた。又、同じ試料の内6品種についての分光分析の結果も、鉄については勿論、他の無機成分例えば Ca, Mg, Mn 等についても、抵抗性の強弱と関聯を持つ様な注目すべき傾向は認められなかつた。

(実験D) 水稻葉中の有機態鉄の定量

先に筆者らは馬鈴薯葉中の鉄量を求め、疫病に対する抵抗性ととの間に相関のみられないことを報告したが⁽¹⁵⁾ (実験C)に示す通り、水稻体中の鉄と稲胡麻葉枯病抵抗性についても同様であつた。然し乍ら、鉄が植物体成分としてその生理上不可欠な要素であつても全鉄の含量だけで鉄の生理作用を論議出来ないことはすでに OSERKOWSKY⁽⁴⁾⁽⁷⁾らによつても述べられており、OSERKOWSKY の活性鉄の概念もこの故に考えられたものであろう。普通、植物体に於ける鉄の存在を大別すると簡単な鉄塩として存在する可溶性のものと錯塩をなすもの、又無機態、有機態鉄があり、植物体中の鉄の生理的意義について考えるには有機態鉄について考察する必要がある。

有機態鉄の⁽¹⁸⁾定量法には試料より有機態鉄を抽出して直接定量する方法と、無機態鉄を抽出定量して間接的に有機態鉄を求める方法⁽¹⁾⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾⁽¹²⁾があるが、筆者らはおおむね金森の方法に従い間接的な定量で水稻葉中の有機態鉄の含量を求めた。即ち1gの試料に硝子粉を加えてよく攪拌し飽和 Na₄P₂O₅ 溶液 5cc と 10% CCl₃COOH 10cc とで之を沈澱管に移し温浴上で正確に7分間沸騰させて直ち

に遠心分離した上澄液を得る。沈澱は更に $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_5$, CCl_3COOH でよく洗滌し洗液と上澄液を合し、次に Conc. HCl 2.5cc を加えて30秒沸騰させた後蒸留水で50ccに補正したものについて、常法に従つてチオシアンカリで発色、比色定量して無機態鉄を求め、前に求めた全鉄量より差引いたものを有機態鉄とした。結果は第3表の通りである。

第3表 水稻葉中の各形態鉄量

水稻品種	鉄形態	全鉄 (a)	無機態鉄 (b)	有機態鉄 (c)	$c/a \times 100$
Te tep		650 ⁽³⁾	291	359	55.2
長香稻		550	283	267	48.5
Karalath		535	375	160	29.9
Baurash Murai		630	385	245	38.9
亀治		590	435	155	26.3
銀坊主		630	488	142	22.5
宇兵衛		550	465	85	14.7
銀糯		540	445	95	17.6

※ 数値は乾量 1g 中 microgram

III 論 議

葉鞘接種による稲胡麻葉枯病菌の感受体への侵入は、供試水稻のすべての品種に於いて接種後24時間目に完了しているが、強抵抗性品種群では50時間に至るまで侵入菌糸が1細胞に止まり、外国稻でも Karalath 等はむしろ日本稻に近く2細胞以上を侵す場合もある。

第1表に示した水稻(京都朝日)1品種のみの顕微化学的観察で菌の侵入に伴う物質変化を系統づけることは危険であるので表示するにとどめる。この観察結果は、三沢⁽⁵⁾が稲胡麻葉枯病病斑組織を組織化学的に観察した、中毒部の状態と、組織が還元状態になること、Oxydase, peroxydase の作用が強くなること等から同一の状態とも考えられるが、筆者らの観察は限られた特殊な場の観察であるから之を前記の中毒部と同一にし得ないかも知れない。稲熱病菌の感受体侵入に於けるような細胞の早期の褐変は認められなかつた。

(実験B)以後に供試した8品種の内、Te tep. 長香稻は、昭和26年中国農試で行つた耐病度の検定結果によると、特に稲胡麻葉枯病に対し強抵抗のものであり、Te tep, 長香稻のような高度の抵抗性を持つ品種は日本稻にはないと考えられている。

鉄についての顕微化学的観察の結果を総合すると、反応呈色部は主として侵入菌糸の周辺部であるが、稲胡麻葉枯病に抵抗性の強い品種ほど菌の侵入に伴う組織内の鉄の動きが大きいことが考えられる。即ち、Te tep, 長香稻について云えば菌を接種後24時間目に侵入菌糸の

周辺に2価の鉄の反応が強くあらわれ48時間では逆に3価の鉄の反応が強くあらわれるのに対し、抵抗性の極めて弱い宇兵衛、銀糯ではそのような現象が認められない。この現象は更に多くの品種について検討してみる必要があるが、筆者らの用いた8品種による実験結果から考えて最強品種群にみられる2価の鉄のあらわれる経過が、抵抗性の弱い品種ほどおそく始まるから或いは鉄の動きが極めて微弱で顕微化学的観察によつて認め難いことが考えられる。

水稻体中に含まれる全鉄量と稲胡麻葉枯病に対する抵抗性との間に著しい傾向のみとめられないことは、筆者らの馬鈴薯疫病についての報告と一致する。又、島根県⁽¹⁶⁾の秋落地帯の水稻の分光分析を行つた筆者らの実験結果についても同様な結果を得た。

本実験に於て、筆者らは水稻葉中に含まれる鉄を一応無機態鉄と有機態鉄とに分けて考え、稲胡麻葉枯病に対する水稻の抵抗性の強弱との関係を検討してみた。その結果、筆者らの実験に用いた水稻8品種について云えば、稲胡麻葉枯病に対する抵抗性の強いTe tep, 長香稻の有機態鉄含量、特に有機態鉄/全鉄の比の値は日本稻にくらべて著しく大であり、外国稻でも比較的抵抗性の弱い Karalath, Baurash Murai のそれはむしろ日本稻に近い値を示している。又、亀治は有機態鉄の含量が日本稻の中で最も多く、水稻葉中の有機鉄の含量の品種間差異が稲胡麻葉枯病に対する抵抗性の差異と何らかの関係があるように考えられる。⁽⁷⁾

先にのべた OSERKAWSKY は梨の葉のクロロシスと云う一つの生理現象と関係のある鉄の形態として活性鉄を定義し、岡島⁽⁶⁾らは同じく活性鉄を鉄酵素の酵素力という考えの一部とむすびつけ、又、筆者らは馬鈴薯疫病に対する馬鈴薯葉の抵抗性と活性鉄/全鉄の関係について考察した。⁽¹⁷⁾

疫病に対する抵抗性の問題を一要素のみで論ずる事は困難であるが、顕微化学的観察に於ける2価及び3価の鉄の動きは、Oxydase, Peroxydase の反応と考えあわせてそれら酵素の補欠分子簇として考えられる有機態鉄が、稲胡麻葉枯病菌の侵入時の感受体細胞の反応乃至は抵抗性の問題とむすびつくように考えられる。

III 摘 要

本論文は、稲胡麻葉枯病菌の侵入した感受体細胞を顕微化学的に観察し、さらに稲胡麻葉枯病の発生と水稻葉中の鉄、特に有機態鉄との関係について実験した結果を報告したものである。

水稻京都朝日について顕微化学的観察を行つた結果、菌接種後24時間で感受体細胞は還元状態となり、24~50

時間でNessler反応物質, Phenol, oxydase, peroxydaseの反応が強くなる。細胞内水素イオン濃度は50時間に至るまで6.4であつた。

更に Te tep 等外国稲8品種について菌を接種した細胞を観察した結果では、抵抗性の強い品種に於て24時間で侵入菌糸の周辺に2価の鉄の反応強く、48時間では逆に3価の鉄の反応が強くあらわれた。之は菌侵入時に於ける感受体の抵抗性と鉄の間に何らかの関聯性の存在することを予想させるが、分光分析の結果では各品種間で鉄及びその他の無機成分に一定の傾向はみとめられず、ロダン鉄比色法による全鉄量も同様であつたので、有機態鉄について検討した結果、有機態鉄/全鉄の値と抵抗性の強弱の間に同じ様な傾向を認めることが出来た。

V 引用文献

- (1) BRÜKMAN, G. & S. C. ZONDER : J. Biol. Chem., 135 : 23, 1940
- (2) 土居養二, 鈴木直治 : 農林省農技研病理科中間報告 5 : 268-286, 1952
- (3) 金森正雄 : 西京大学學術報告, 2 : 64-74, 1952
- (4) Mc GEORGE W. T. : Soil. Sci., 68 : 381, 1949
- (5) 三沢正雄 : 日植病報, 15 : 42-43, 1950
- (6) 岡島秀夫, 木村次郎 : 東北大農研彙報, 3 : 1-12, 1951
- (7) OSERKOWSKY, J. : Plant Physiol., 8 : 449, 1933
- (8) PIPER, C. S. : Soil and plant analysis, 338, 1950
- (9) 達山和紀 : 植物病害研究, 5 : 67-70, 1955
- (10) TINGY : J. Ment Sc., 83 : 452, 1937
- (11) TINGY : J. Ment Sc., 84 : 980, 1938
- (12) TOMSETT, S. L. : Biochem. J., 29 : 480, 1934
- (13) 山本昌木 : 日植病報, 17 : 33-34, 1952
- (14) YAMAMOTO, M. & TATSUTAMA, K. : Jubilee publication in Commemoration of the Sixtieth Birthday of Prof. Tochinai & Prof. Fukushi, 85-91, 1955
- (15) 山本昌木, 達山和紀 : 科学, 24 : 88, 1954
- (16) 山本昌木, 達山和紀 : 島根農大研究報告, 4 : 55-58, 1956
- (17) 山本昌木, 達山和紀 : 島根農大研究報告, 4 : 59-62, 1956
- (18) YABUSOF : Biochem., Z., 157 : 388, 1925

Summary

This paper deals with the results of histochemical observations on the penetration of *Cochliobolus Miyabeanus* to the suscept-cells, and the relation between the occurrence of Helminthosporiose of rice plant and iron, especially organic iron in the rice plant.

Suscept-cell (variety Kyoto-Asahi) invaded by the fungus, became reductive states after 24 to 50 hours. As to K, Fe, and P_2O_5 , no significant change were observed even after 50 hours. Hydrogen-ion concentration in the suscept-cell was about 6.4.

Other test plants — Te tep, Chowcowtow, Karalath, Baurash Murai (foreign varieties), Kameji, Ginbodzu, Uhei, Ginmochi (Japanese varieties), — were grown in Wagner's pots and histochemical observations on the diseased tissues penetrated by the pathogen using leaf sheath method, spectrographical analysis by line spectrum, quantitative analysis of iron using pulfurich's photometer, were carried out.

Through histochemical observations, resistant varieties, especially in foreign varieties, strong Fe^{++} reaction in the suscept tissues after 48 hours around the penetrated hyphae was ascertained.

Although the result of spectrographical and quantitative analysis of iron did not show any definite tendency between the rice varieties and total iron contents, the ratio of organic iron; total iron was clarified and it was suggested that these ratio might play a significant role in the resistance mechanism.