

馬鈴薯疫病病斑の組織化学

山本昌木 (植物病学研究室)

Masaki YAMAMOTO :

Histo-chemistry of Diseased Spots of Potato Late-Blight

馬鈴薯が疫病菌の侵害を受けると特有の病斑を生ずるがその進展速度や褐変程度等は各品種により略々定まつて居り、病原菌に対する組織の抵抗力とも関連性があると思われるのでこの病斑の組織化学的観察を行った。その概要を報告する。本研究の一部は農林省東北農業試験場盛岡試験地に於て行われたもので、御指導を賜つた平井篤造技官又始終御激励下さつた竹崎嘉徳学長並に八

柳三郎技官に深謝する。

馬鈴薯葉に於ける疫病病斑

供試材料は盛岡試験地に栽植した男爵薯及びワーバ葉の疫病病斑を横断又は縦断したものである。実験にはすべて生材料を用いた。観察結果は才1表に示す如くである。

才1表 馬鈴薯疫病病斑の組織化学的観察 (I)

検出成分等	反応又は試薬	健全部	中毒部	え死部	備考
I 無機成分					
a カチオン					
カリウム	Na Cobaltnitrite	—	++	?	
アンモニウム	ピクリン酸アルコール Neßler	++ +	+++ +++	+++ ±	灰化せるもの ×
b アニオン					
フوسفアート	モリブデン酸アンモン	+++	++	+	
モリブデン酸アンモン	ベンチヂン	+++	++	+	×
ニトラート	Diphenylamine	+++	++	±	×
II 有機成分					
脂肪族					
才I, II級アルコール	Dragendorff	±	+	++	×
アルデヒド	Schiff	—	+		
アミノ酸	Nynhydrin	—	+	+	
炭水化物					
糖					
Aldose	Fehling	—	+	+	
	Molisch	—	+	+	
	Nylander	—	+	+	
	Benedict	—	+	+	
	Barfaed	—	+	+	
	Pikrinsäure	—	+	+	
Pentose	Phloroglucin	—	+	+	
Ketose	Pinoff	—	±?	±?	
	Seliwanoff	—	±?	±?	
芳香族					
フェノール	チアゾ化(Sulfanilic acid, NaNO ₂)	—	+	+	

	Milon	-	+	+	
	p-Chinon	-	+?	+?	
	過クロル鉄 Indophenol (NaNO ₂ , 濃硫酸, 2%NaOH)	-	+	+	
III 組織の反応	B.T.B.及びP.R.	6.3-6.4	6.6-7.0	7.6-7.8	×
葉	C.P.R.	6.2		6.8-7.2	×
茎					
III 酸化還元	Eisencyanbild	±	+	?	
	Manganbild Winkler et al	±	+	?	
V 酵素系					
Oxydase (stabil)	Indophenolblau	±	+	?	
(labil)	Graef Gewebe Nadi	-	+	?	
Peroxydase	Benzidin H ₂ O ₂ (Naphtholperoxydase)	-	+	?	
VI 染色性					
	Methylenblau	青	緑		
	Neutralrot	赤(主として表皮)	橙		
	Safranin	赤	橙		
	Thionin	青紫	赤紫		

(註) +, ++, +++は組織の試薬に対する反応の強さを示し, -は実験の範囲内では反応の認められなかつたものである。え死部は病斑中央の褐色の部分, 中毒部はその周辺の褪色部の事である。×印は切片とせず組織全体としての反応である。

以上の結果から次の事が言えるようである。

1. 健全部よりえ死部へと漸次還元状態に移行する。
2. 中毒部では Peroxydase, Oxydase の作用が強くなり, 才1級又は才2級アルコール, アルデヒド, アミノ酸, フェノール等が分布する。
3. アンモニウム塩, カリウム塩は中毒部に於て増加の傾向が認められるが, 燐酸塩, 硝酸塩は健全部に比し

むしろ減少するようである。

4. 健全部より中毒部, え死部へと漸次反応がアルカリ性となる。
比較的抵抗性の強い神谷薯, 金時薯と罹病性のトライアンフ, 男爵薯を用いて観察した結果は才2表の通りである。

才2表 馬鈴薯疫病病斑の組織化学的観察 (I)

検出成分	反応又は試薬	トリアンフ		男爵薯		神谷薯		金時薯	
		上葉	下葉	上葉	下葉	上葉	下葉	上葉	下葉
		健中病	健中病	健中病	健中病	健中病	健中病	健中病	健中病
NH ₃	ネスラー試薬	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
NO ₃	ジフェニルアミン	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
NO ₂	αナフチルアミン	-++	-++	-++	-++	-++	-++	-++	-++
P ₂ O ₅	モリブデン酸アンモン	++±	++±	++±	++±	++±	++±	++±	++±
Fe ⁺⁺⁺	黄血塩	±±±	±±±	±±±	±±±	±±±	±±±	±±±	±±±
Fe ⁺⁺	赤血塩	±±±	±±±	±±±	±±±	±±±	±±±	±±±	±±±
Cytochromoxydase	ヂヂ反応	+++?	+++?	+++	+++	+++?	+++?	+++	+++
Peroxydase	ベンチデン H ₂ O ₂	-++	-++	-++?	-++	-++	-++	-++	-++

Tyrosinase	チロシン	±++	-++	-+++	-++	-++	-+++	-++	-++
Phenol	ミロソ	±++	±++	±++	±++	±+++	±++	±++	±++
	塩化鉄	±++	±++	±++	+++	±++	±++	±++	±++
	ヂアゾ化	±++	±+++	+++	±+++	±++	±++	±++	±++
組織反応	P.R. B.T.B	6.5~7.2	6.5~7.4	6.5~7.8	6.4~7.2	6.4~7.4	6.4~7.4	6.4~7.2	6.4~7.2

抵抗性，罹病性両品種群間の成分的の差異を確立する事は出来なかつたが，同一成分でも品種間又は葉位の上下等による成熟度によつてその含量が変化するのであるから今後の観察にはかかる点に充分顧慮する必要がある。NH₃, Cytochromoxydase, Peroxydase が中毒部で特に強くあらわれる。

馬鈴薯嫩芽に於ける疫病病斑

緑葉では葉緑素の存在の為に観察に困難さを感じたので，馬鈴薯塊茎を暗黒中で萌芽せしめ，切断した嫩芽の一端に疫病菌を接種した。接種した部分は淡褐色に着色するが光に当たるとその色調は強くなる。この褐変部と中心として組織化学的な観察を行った。供試品種は男爵，トライアンフ，及び農林2号であつた。

表3 馬鈴薯嫩芽の疫病菌による褐変部の組織化学的観察

検出成分等	反応又は試薬	細胞中の果粒		細胞膜	
		褐変部	健全部	褐変部	健全部
I無機成分					
a. カチオン					
Fe ²⁺	Ferricyankali	?	-	+	-
Fe ³⁺	Ferrocyankali	+	-	+	-
	K-C-N-S	+	-	+	-
	NaOH	+	-	+	-
Cu	NaCH ₃ COO	-	-	-	-
	15% Ferrocyankali	-	-	-	-
Mn	Benzidin CH ₃ COOH, NaOH	-	-	-	-
カリウム	Sodium cobaltinitrit	++	+	+	-
アンモニウム	Neßler	-	-	-	-
b. アニオン					
P ₂ O ₅	モリブデン酸アンモン			-	-
NO ₃	Diphenylamin Konz. H ₂ SO ₄			-	-
NO ₂	α Naphthylamin, Sulfanilamin	+	-	+	±
II有機成分					
アルデヒド	Schiff	+	± (褐変部の周囲)	+	-
	p-phenylendiamin	+	?	+	-
CO	KOH, Na nitroprussid, H ₂ O ₂	-	-	±?	-
	Resorcin HCl	-	-	±?	-
CH ₃ CO	Na nitroprussid, NaOH, HAc.	-	-	±?	-
Phenol	ヂアゾ化	+	+	+	±
	塩化鉄	-	-	+	±
	ミロソ	+	-	+	±
	p-Quinone	?	?	+	±
アミン					
脂肪族I, II級	Dithiocarbamic acidに誘導	?	-	+	±
脂肪族I級	アセトン Na nitroprussid	?	-	+	-
脂肪族II級	Na nitroprussid, Acetaldehyd	-	-	-	-

芳香族 I 級	HCl, NaNO ₂ , β Naphthol	+	-	+	-
インドール	Ehrlich	±	-	±	-
α アミノ酸	Nynhydrin	?	-	+	+
カルボン酸	Thionylchlorid, NH ₂ OH, HCl, FeCl ₃	?	?	+ ?	(褐変部に隣接) + ?
糖					
Aldose	Molisch	+	?	+	±
Ketose	SnCl ₂ , Urea, H ₂ SO ₄	-	-	? +	-
	Resorcin, HCl	-	-	±	-
Pentose	Phloroglucin, HCl	+	-	+	-
脂肪リポイド系物質	Sudan III	+	+	+	-
Melanin	Hueck, Courmont-Bauer	+	(褐変部周囲大型) ± ?	+	-
Ⅲ 酵素系					
Cytochromoxydase	Nadi	+	+	?	?
(Indophenoloxidase)	Benydin H ₂ O ₂				
Peroxydase	Resorcin, H ₂ O ₂	+	+	?	?
	Hydroquinone H ₂ O ₂				
Tyrosinase	Tyrosin	+ ?	-	+	+
Ⅲ 酸素還元系色素					(褐変部周囲)
中性赤		+		+(黄)	+(赤)
トルイジン青				+(青)	+(紫)
メチレン青				+(緑)	+(青)
チオニン		+		+(紫)	+(青)
ヤヌス		+	+	+(青)	+(青)
V 組織の反応					

褐変部は着色の為測定困難であつたが、アルカリ側に移行する。

観察結果は右表に示される通りであるが、之を見ると次の事がいえるようである。

1. 褐変部には鉄(特に3価)の反応が認められるが、銅、マンガン等他の重金属の存在は判然としない。
2. 褐変部では加里塩、亜硝酸塩、アンモニウム塩が増加するが、磷酸塩、硝酸塩は減少する。
3. 褐変部ではアルデヒドの反応陽性であるが、ケトン、メチルケトンははつきりしない。
4. フェノール系物質、アミン(脂肪族又は芳香族オ1級アミン)の反応陽性であるがインドールは判然としない。
5. 褐変部又はその周辺にSudan IIIで染色される大きな顆粒のあらわれる事がある。
6. 褐変部にメラニン反応が強くあらわれる。
7. Cytochromoxydase, Peroxydase, Tyrosinaseは褐変部及びその周辺部に反応があらわれる。
8. 褐変部は還元状態にあり、又アルカリ性である。
9. 褐変部又はその周辺のミトコンドリアと考えられる顆粒は種々の試薬に反応性が強く、褐変現象と何等かの関連性があるようである。

Nadi試薬を妨かせる前に5分間 KCN で呼吸阻害を行ったものは反応を示さなかつたので、この試薬に対する

反応は Cytochromoxydase の存在を示すものと考えられる。

褐変部はアルカリ性となり、又鉄(特に3価)の反応陽性でフェノール系物質の存在が肯定されるところから次のモデル実験を行つた。

フェノール系物質及びヒノンの 0.5% (サルチル酸の如き難溶性のものは飽和溶液) 溶液 5 cc に 1% Na OH 0.5cc 宛加え之に Fe⁺⁺ (硫酸才1鉄), Fe⁺⁺⁺ (硫酸才2鉄, 塩化才2鉄) 1% 溶液 1 滴宛を滴下した。

実験結果は才4表に見る如く Fe⁺⁺⁺ はすべてのフェノール、ヒノン類に対しアルカリ性に於て褐色系統の色調を呈した。

馬鈴薯疫病病斑中の鉄

生組織に試薬を妨かせても疫病病斑中に鉄が増加する事が確められたが、Carnoy, Bouin 氏液で固定を行つたものについてパラフィン切片を作り同様に試薬を妨かせて観察したが病斑部の菌糸及び之に接する部分に鉄の増加が認められた。筆者の別の実験に依つても疫病病斑部は健全部よりも著しい鉄の増加が確められているが組織化学的観察ではこの鉄は疫病菌の菌糸中に含まれるものであるか又は馬鈴薯葉組織中の他の部分から転移する

才4表 フェノール、ヒノン系物質溶液の鉄塩に対する反応

鉄塩	フェノール系物質	原液	+NaOH	加鉄塩	
				原液	+NaOH
Fe ²⁺	ピクリン酸	黄	黄 (-)	黄 (-)	褐
	サルチル酸	無色	無色 (-)	無色 (-)	緑褐
	フェノール	無色	無色 (-)	無色 (-)	青緑
	p-ヒノン	淡黄	赤	淡黄 (-)	緑褐
	ヒドロヒノン	無色	黄褐	無色 (-)	青緑
	チロシン	無色	無色 (-)	無色 (-)	青緑
Fe ³⁺	ピクリン酸	黄	黄 (-)	黄	赤褐
	サルチル酸	無色	無色	紫	褐
	フェノール	無色	無色	淡紫	黄褐
	p-ヒノン	淡黄	赤	淡黄 (-)	褐
	ヒドロヒノン	無色	黄褐	淡黄	赤褐
	チロシン	無色	無色	無色	青緑
Fe ³⁺	ピクリン酸	黄	黄 (-)	淡橙	橙-黄褐
	サルチル酸	無色	無色 (-)	紫	橙赤
	フェノール	無色	無色 (-)	淡汚褐	褐
	p-ヒノン	淡黄	赤	淡黄 (-)	褐黒
	ヒドロヒノン	無色	黄褐	淡青	黄褐
	チロシン	無色	無色	無色 (-)	黄褐

(註) (-): 変化のなかつた事を示す

ものか判然としなかつたので馬鈴薯煎汁液に疫病菌を培養しその前後の輝線スペクトルによる分光分析及びピオシアン酸の比色定量を行つた。その結果病斑中の鉄は菌体中の鉄によるよりも他の部分から移行した考える方が妥当と思われた。

Fe と NH₃ とが褐変に関係するように思われたので次のようなモデル実験を行つてみた。即ち NaNO₃ 溶液, FeCl₃ 溶液+NaNO₃ 溶液, NH₄SO₄ 溶液, FeCl₃ 溶液, FeCl₃ 溶液+NH₄SO₄ 溶液, 蒸溜水の各区を作り, 暗黒中で萌芽せしめた馬鈴薯嫩芽 (品種男爵薯) を之に挿し 20°C に 2 週間保つた。NaNO₃ は 200cc 中 48mg, NH₄SO₄ は 200cc 中 70mg, 又 FeCl₃ は 290mg / 100cc 溶液を原液 15cc に対し 2 滴宛滴下した。疫病菌を接種してから 1 週間後観察したが才5表の如き結果を得た。

才5表 鉄塩及びアンモニウム塩の疫病病斑形成に及ぼす影響

區別	対照区	NaNO ₃	FeCl ₃ + NaNO ₃	NH ₄ SO ₄	FeCl ₃	FeCl ₃ + NH ₄ SO ₄
褐変度	±	+	+	++	+	+++

之によるとアンモニウム塩と鉄塩とを吸収したものが褐変度著しいようであつた。

考 察

特に褐変現象について若干の考察を試みたい。褐変部には加里塩, 亜硝酸塩, アンモニウム塩が増加し, 硝酸塩, 磷酸塩が減少するが之は加里が NO₃ → NO₂ → NH₃ と還元的に働くのではあるまいか。健全部より褐変部へと還元状態に移行する。被害部には脂肪族又は芳香族アミンの存在が予想されたが, アンモニヤ, アミン等の影響により組織がアルカリ性に傾く事と関係のあるものである。

病変部にアンモニヤ, アミノ酸, アミン等の増加が認められたが之は蛋白質の分解が大きな原因であろう。アミノ酸がアルカリ性で脱炭酸されてアミンとなる過程も想像せられる。

褐変部には 2 価又は 3 価 (特に 3 価) の鉄の反応が細胞膜並にミトコンドリアと考えられる顆粒体にあられる。フェノール系化合物は菌の侵入により増加する。アンモニウム, アミン等の存在によつて寄主組織がアルカリ性となる事と鉄 (特に 3 価) の増加によつて病組織の褐変が起るらしいが之はモデル実験からも想像せられた。フェノール系化合物の一種チロシンは Tyrosinase の働きにより 3, 4 dihydroxyphenylamin (DOPA) の如きものが出来, 之に Dopafement が働き Melanin の形成されることが褐変の一原因となる事も考えられるが, Dopa より Melanin に移る過程中 5, 6-dihydroxy-dihydroindol-2 carbonic acid, 5, 6-dioxindol 2 carbonic acid 等のインドール化合物の形成が推定されるが, Ehrlich 反応は微弱であるから, 馬鈴薯疫病病斑の形成がかかる経過をたどるものであるかどうか, 今後の研究によつて釈明したいと思う。嫩芽に疫病菌を接種すると淡褐色に変色するが光に当たると褐変の程度が強くなるが之はメラニン形成と関係するのかも知れない。

褐変部には Peroxydase, Cytochromoxydase, Tyrosinase 等の働きが強くなるが, 前 2 者は鉄の活性化と関連性があるので興味がある。但し鉄が病斑中で組織化学的に認められる事と直ちに結びつけられるかどうかはわからない。

摘 要

1. 本論文では馬鈴薯疫病病斑について組織化学的観察を行つた結果を報告する。
2. 馬鈴薯葉上の疫病病斑では健全部よえ死部へと漸次還元状態に移行し, 中毒部では Peroxydase, Oxyda-

seの作用が強くなり、アンモニウム塩、カリウム塩は中毒部に於て増加の傾向が認められるが、磷酸塩、硝酸塩は健全部に比べてむしろ減少するようである。又健全部より中毒部、え死部へと漸次反応がアルカリ性となる。

3. 同一成分でも品種又は成熟度によつてその全量は変化する。
4. 嫩芽に疫病菌を接種したものの病変部では鉄の反応が認められたが、マンガ、銅等の重金属の存在は不明であつた。褐変部では加里塩、亜硝酸、アンモニウム塩が増加するが、磷酸塩、硝酸塩、磷酸塩は減少する。フェノール系物質の反応陽性であるがインドールは判然としな。褐変部又はその周辺部に Sudan III によく染色される大きな顆粒のあらわれる事がある。Cytochromoxydase, Peroxydase, Tyrosinase の働きが褐変部又はその周辺部にあらわれる。
5. フェノール系物質、鉄（特に3価）の存在、組織反応のアルカリ性に傾く事が病斑組織の褐変と関係あるようである。
6. 疫病病斑中の鉄は菌糸中のそれ由来するよりも寧ろ他の部分から移行したもののようである。
7. 下からアンモニウム塩、純塩を吸収させたものに疫

病菌を接種すると褐変の程度が強かつた。

文 献

- (1) 土居養二・鈴木直治：稲熱病斑の組織化学的研究 農技研中間報告 5, 268-286, 1952
- II. 感染部位の組成化学的観察
- (2) 木村次郎・岡島秀夫：水稻に於ける磷酸及び鉄分養の吸収機構に関する研究 東北大農研彙報 2(2) 163-178, 1950
- (3) 三沢正生：稲胡麻葉枯病病斑組織の顕微化学的観察 植病会報 15(1) 42, 1950
- (4) 岡島秀夫・木村次郎：————— 3(1) 1-12, 1951
- (5) 新家浪雄・平岡俊佑：ナチ反応に関する細胞化学的研究 植雑 63(741-742) 52, 1950
- (6) 鈴木直治：甘藷紫紋羽病感染部位の組織化学的研究 農技研中間報告 4: 146-148, 1951
- (7) 山本昌木・達山和紀：馬鈴薯疫病病斑中にあらわれる鉄について 日植病報
- (8) 吉井啓：梨赤星病並に桃縮葉病被害葉に於ける無機塩含有量変化の組織化学的観察に就て 植病研究 4: 91-92, 1951

SUMMARY

Results of histo-chemical investigations on the diseased leaves attacked by the late-blight fungus and shoots inoculated with *Phytophthora infestans* were reported.

In the diseased leaves, the reaction of the tissues become gradually alkali side from sound part to poisoning and necrotic part.

In the poisoning part, the activity of peroxydase, cytochromoxydase are enhanced, primary or secondary alcohol, aldehyde, amino acid, sugars and phenol etc. are distributed. Ammonium salts were increased but phosphate and nitrate were decreased.

In the brown part of the shoots inoculated with late-blight fungus, the reaction of iron is positive but reaction of other heavy metals, e. g. Cu, Mn, etc., were uncertain. Potassium, nitrite and am-

monium salts were increased but phosphate and nitrate salts were decreased. The reaction of aldehyde, phenol, (fatty or primary aromatic) amine and melanin were positive but reaction of ketone, methylketone, indole etc. were quite uncertain.

Rather large granule which can be stained with Sudan III often appeared in the brown part or its neighboring part. The activities of cytochromoxydase, peroxydase, tyrosinase were enhanced.

The poisoning part and browned part show alkali reaction in reductive condition.

Cell membrane and granule, which is regarded as mitochondria, appearing to various chemicals, and the correlation to the browning phenomena was suggested from these investigations.