稻熱病斑の組織化學的研究

I. 同一品種上における病斑の進展と病斑上における孢子形成に関する觀察

豊田 榮*・鈴木直治*

Sakae TOYODA and Naoji SUZUKI: Histochemical studies on the lesions of rice blast caused by *Pyricularia oryzae* CAV. I. Some observations on the sporulations on lesions of different types occurring on leaves of the same variety.

1. 緒 論

著者等及び土居は水稻の稻熱病感染によつて細胞、組織内に起る變化を組織化學的に觀察し、それによつて抵抗機作を究明する端緒を得ることを企圖した。

本報においては、その爲の第一着手として、感受性品種、又は條件により感受性の程度を相當廣く變えるような品種を供試し、葉に生ずる色々な病斑を外觀的に類別し、病斑上における孢子形成勢力を組織の抵抗程度の指標とし(Fisher u. Gäumann⁽¹⁾), 病斑の外觀と組織の抵抗との關連を求めて見た結果を報告する。

本稿を草するに當り、適切な批判と教示とを賜つた農業技術研究所病理科長向秀夫氏、東京大學教授明日山秀文氏に厚く謝意を表する。

2. 材料と方法

昭和 26 年 9 月 1 日より 9 月 15 日までの間に千葉縣浦安町の農家園場に栽培された水稻埼玉糯 10 號に自然感染により生じたイモチ病葉を主として實驗に供した。夫々の病斑について既成の分生孢子の有無を検し、既に形成されているものは一旦洗い流した後、第 1 圖に示すような湿室に入れ顯微鏡下に固定し、孢子形成状況を連續觀察した。

湿室は 8×5 cm の 2 枚のガラス板を重ね、その間を 3 mm すかすように 4 方に細長いガラス板片を挿入し、パラフィンで固定したもので、上面のガラス板には中央に徑 8 mm の穴をあけてある。

病斑を中央にして葉片を折りたたみ、病斑部を残して葉片を数枚の濡れた濾紙で挿み、折りまげた端が中央に位するように湿室に水平に入れ、湿室内の残る空間は中央の光の通路だけを残して濡れた濾紙で充填する。このようにした湿室を顯微架臺に固定し、葉の折りまげた端から水平に出て来る孢子梗と孢子を檢鏡した。カバーガラスをかけない、即ち、上面のガラス板に穴をあけて開放したことにより自然條件にも近く、

* 農林省農業技術研究所

第 1 圖 分生孢子形成を連續的に觀察する爲の湿室

a 覆ガラス b 載物ガラス
c 枕ガラス d 小穴
e 濾紙 l 葉の病斑部
L 對物レンズ

又カバーガラスに附着する水滴で檢鏡を妨げられることもなく、好適な觀察を續けることが出來た。

3. 同一品種上における病斑の外觀的類別

第 2 圖 埼玉糯 10 號の葉に生じた色々な病斑

A: 9 月 1 日採取, 1, 2 は下葉で黄綠色。

B: 9 月 10 日採取, 葉の綠色濃く, 褐變も強い。

埼玉糯 10 號の葉に自然感染によつて生じた病斑を多數集めて第 2 圖の如き 5 階級に分けて見た。

第 2 圖に示した各型の病斑は全く元來感受性である

品種に現われたものであつて品種の遺傳的感受性、抵抗性に基く感染型とは區別しなくてはならない。圖の各型の病斑を小野⁽²⁾の病斑の分類によつて見ると

1. 褐點型

- 1'. 慢性型, 1 よりも大形, 褐變部のみよりなる。
2. 慢性型, 中央灰白色, 周邊褐色。
- 2'. 慢性型, 褐變部の周圍を更に黃變部が包圍する。
3. 急性型, 中央灰綠色, 周邊褐變顯著, 外圍を黃變部が包圍する。
4. 急性型, 中央灰綠色, 周邊褐變しはじめている。周圍の黃變顯著。
- 4'. 急性型, 4 と 5 を混ずる。
5. 急性型, 中央灰綠色, 周邊は褐變していない。

以上の各型病斑の中 5, 4, 3, 2' の諸型は初め 5 型の病斑が日數と共に進展した経過を示すものである。1 型は特に黄綠色となつた下葉に生ずるもので葉の老化による抵抗性の結果と見られる。2 型は 1 型に類するものと 3 型を経過して進むものとの中間的なものであろう。

病斑は常に 5→4→3→2' と進むものとは限らず、栽培條件によつては 5 型より速に 3 型に進むこともある。

以上、病斑の進展に伴つて先ず灰綠色部を生じ、次いで周圍が黄變し、次に灰綠色部と黄色部との境界に褐變が起り、褐變が進むに従つて病勢は衰えて行くことが見られる。

4. 3—4 型病斑上における分生孢子形成順序

第 2 圖に示す 3—4 型病斑は感受性を代表するもので、この上での孢子形成は典型的なものと思われる。そこでこの種の病斑を擇び前記の濕室に入れて観察と同時に顯微攝影裝置により一定時間おきに撮影した。その代表的な例を第 3 圖に示す。

第 3 圖において 1 本の孢子梗の上で孢子が 3 箇形成されるまでの経過が見られるが、このように順次に孢子が形成され、6 箇から 7 箇に及ぶ例が多く見られた。連續観察中 24 時間を経ても孢子の脱落するのを認め得なかつた。

第 3 圖の例を含む多くの觀察の結果では第 1 の孢子は約 40 分で完成され、それに直ぐ續いて第 2 の孢子が約 1 時間で完成された。

分生孢子梗は病斑を濕室に入れてから約 10 時間後に密に叢生した。

孢子形成の経過は大體において Henry 等⁽³⁾の觀察

と一致し、分枝が發達して主軸狀になる點から假軸分枝法によると云える。

5. 分生孢子の異常形成

以上の觀察を行つている途上不完全な孢子が *Alternaria* 狀に連鎖して形成されるのが見られた。この場合普通の孢子と同様に分生孢子梗の先端に小突起を生じ、それが膨大しはじめるが、完全な孢子の形にならない中にその先端に再び小突起を生じ、それが伸長膨大して正常な孢子に發達する。

6. 各型病斑上における孢子形成狀況の比較

第 2 圖に示した各型を代表するような病斑を濕室に仕込んで 1 時間おきに孢子形成狀況を觀察した結果は第 4 圖の通りである。

第 4 圖 各型病斑上における孢子形成狀況の比較

すなわち、孢子梗の出現は 4 型で最も早く約 5 時間後にはじまつた。5 型、3 型ではこれよりやや遅れて 6 時間後に、2 型では 11 時間後にはじまつた。1 型では全く出現しなかつた。

分生孢子の形成は 4 型で最も早く 8 時間後にはじまり、5 型は 9 時間後に、3 型は 11 時間後に、2 型は 15 時間後に極めて疎に、形成された。

*分生孢子梗の叢生狀況は 4 型で最も速く、盛であり、5 型がこれに次ぎ、3 型はそれより 3—4 時間おくれ

て同程度となる。

以上の観察結果により、病斑の胞子形成勢力は4型が最も強く、5型がこれに次ぎ、3型はそれより稍々劣り、2型では極めて弱いことが明かとなった。1型では全く胞子が形成されない。

更に同一病斑上の何れの部分に分生胞子が形成されるかを観察した結果は第1表の通りである。

第1表 各型病斑上における胞子形成部位

病斑型	中央部	褐 變 部	黄 變 部
5	++++	褐變していない	
4	++++	—	—
3	+++	+	+
2	—	+	黄變は著しくない
1	—	—	黄變部はない

第1表により明かなように病斑が3, 2型に推移するに従つて中央部の胞子形成が減退し、周囲の褐變部に形成されるようになるがその程度は著しく低下してくる。

7. 考 察

著者等は稻熱病に對して抵抗性のあまり強くない水稻品種について、施肥、日射等の條件により、又生育時期、葉序を異にするに従つて、葉の病斑の外観が色々に變化することを見、なるべく多くの病斑を集めて外観から1より5までの型に分類した。1型はそれ以上病斑が進展せず、胞子形成が全く起らない點から明かに葉自身の持つ抵抗性に基因するものである。2'以下5型までは5型からはじまつた病斑が日數の経過と共に、遲速の差はあれ、逐次推移して來たものであり、葉の感受性に基因するものである。

感受性なる葉においても病斑の進展に伴つて、病斑自體の中では局部的に組織の抵抗が増して行く。このことは4, 3, 2の順に胞子形成阻止の程度が増していることから察知される。

5型病斑は常に4, 3, 2'の順を経て進展するものとは限らない。例えば數日間遮蔽下におき、接種して5型病斑を作らせた後日照下に出すときは速に3型になることがある。

次に各型病斑の外観上の特徴を見ると、1型は褐色

點狀病斑であり、5型は灰綠色浸潤性病斑である。5型より4, 3, 2型に移るに従つて中央灰綠色部周囲の褐變が顯著になる。

以上の觀察から、外圍條件により抵抗性又は感受性の變化を起し易い品種においては、寄主組織が抵抗性である場合は病原菌の侵害により褐變が速に起り、感受性なる場合においても褐變が進むに従つて病變組織内で局部的に抵抗が高まつて來るものと推論される。

8. 要 約

1) 葉イモチ病斑上における分生胞子形成狀況を連續的に觀察する裝置を考案し、一定時間おきに顯微攝影を行つて胞子形成順序を明かにした。

2) 埼玉糯10號の葉に生じた病斑を外観から分類して1より5までの型を圖示した。農林3號, 1號に見られる病斑も大體これらの中に包含される。

3) 感受性品種に最も普通に見られる3~4型病斑では濕室に入れてから約5時間後に分生胞子梗の出現が始り、7~8時間後に胞子形成が開始される。分生胞子は胞子梗先端に小突起の出現を認めてから40分で完成され第2の胞子はそれから1時間後に完成される。1本の胞子梗上に屢々6~7箇の胞子が形成された。13~15時間後に胞子梗の叢生は最高限に達した。24時間の連續觀察中胞子の脱落するものは見られなかつた。胞子梗の分枝法は假軸分枝法と云える。

4) 1型病斑上では胞子は形成されない。2型より5型までの病斑上では胞子が形成されるが、その程度は $5 < 4 > 3 > 2$ の順である。従つて、病斑の進展に伴い病斑部組織に局部的に抵抗が増して來るものと云える。

5) 病斑の周囲の褐變は胞子形成を阻止する重要な要因と思われる。

引 用 文 献

1. Fischer, E. u. Gäumann, E.: Biologie der pflanzenbewohnenden parasitischen Pilze. (1929)
2. 小野小三郎: 日植病報. 15, 43 (1950)
3. Henry B. W., & Anderson, A. L.: Phytopath. 38: 260 (1948)

Résumé

Leaf lesions of blast, caused by *Piricularia oryzae*, on a susceptible variety of rice were grouped into five classes according to the degree of brown coloration and size of the lesions (see Fig. 2)

Sporulation process on a single lesion of class 4 was observed and microphotographed at definite intervals. After a lesion was placed in a moist chamber, specially designed for the present purpose as shown in Fig. 1, a conidiophore began to emerge

in about six hours, and produced the first conidium at its apex one hour later which reached its full size in 40 minutes. Soon after, a branch developed from the conidiophore just below the point of attachment of the first conidium, and the second conidium was formed at its apex.

In the same manner, process of conidial formation continued to form 7 to 9 conidia on one conidiophore, each being formed at about an hour's interval. The mode of branching of the conidiophore is sympodial in accord with the observations

of Henry et al. (1948).

Sporulation intensities of lesions of different classes were compared. Sporulation was most rapid and abundant on 4, less on 5 and 3, and very scarce in 2, whereas entirely absent on 1. It seems likely that the browning of the lesion could retard the spread and normal growth of the mycelia in the host tissue, and, consequently, the sporulation on the lesion.

(National Institute of Agricultural Sciences)

第3圖 病斑上に於ける分生孢子形成順序

- (1) 装置後4時間頃から分生孢子梗の出現が始まり、6時間後には図の様に相當生育するのが見られる。
- (2) 分生孢子形成を初める直前の孢子梗で、この時孢子梗先端の原形質に光を強く屈折する小球が一個現れている。
- (3) 孢子梗の先端に出来た小球は伸長して孢子梗の頂端から外に突出し、小突起状となる。
- (4) 突出した小突起の先端が膨れて光を強く屈折する小球となる。
- (5) 小球は速やかに膨大して5分後には2倍以上の大きさになる。
- (6) 球は膨大しながら長さを増して楕圓形となる。この時原形質を見ると頂端の部分に光を強く屈折する小球が一個現れている。
- (7) 強く光を屈折する小球は膨大しながら伸長して、孢子は卵形を呈して来る。
- (8) 孢子は隔膜を生じてほぼ完全な形となり、一方孢子梗上の孢子着生部直下の側方に突起を生ずる。
- (9) 突起は次第に伸長する。
- (10) 伸長した孢子梗の先端から第一の孢子形成さ

同様に小突起を生ずる。

- (11) 小突起の先端は次第に肥大して球状となる。
- (12) 球は肥大しつつ楕圓形となり、同時に第一の孢子はその附着する角度を變える。この角度の變化は瞬間的に起り、前、後、又は出来かけた孢子と反対側に傾き、空間的に孢子形成が容易となる。
- (13) 第一の孢子の場合と同様に球の頂端が伸長して卵形となる。
- (14) 頂端はさらに伸長しかつ隔膜を生じて第二の孢子が完成する。
- (15) 第二の孢子直下の孢子梗から前同さ同様の突起が生ずる。
- (16) 突起は次第に伸長する。
- (17) 伸長した孢子梗の頂端に前さ全く同様の順序で第三の孢子となるべき小球が出来る。
- (18) 小球は次第に肥大して行き第二の孢子はその附着する角度を變えて傾く。この様にして第三、第四さ次第に孢子形成が行われて行く。
- (19) 装置後9時間の孢子形成状況。
- (20) 装置後15時間の孢子形成状況。

雑 録

抗生物質の一濃度測定法(重層法)

抗生物質の濃度測定法について Penicillin 以來各國の學者によつて數多くの仕事が発表されて居るが、大別して生物學的檢定法と化學的檢定法とに分れるようである。しかし後者については更に新しい發見或は改善のない限り、現在の狀態では前者に比して著しく感度が低く、實際に利用するには困難な點が多い。生物學的檢定法としては擴散を利用した Cup 法、その變法としての Paper disc 法及 Pulp disc 法、重層法、稀釋法、slide cell culture 法、比濁法等が挙げられ夫々一長一短をもっている。ここに紹介する重層法は Penicillin に關して 1947 年藤正氏等によつて創案され、鳥居、川上、増山氏等により拓かれた一次元擴散を利用した優れた方法で、小試験管(村田氏小試験管: 4~5 mm × 88 mm 又は 8~9 mm × 88 mm 等)に被檢菌(Penicillin の場合は黃色葡萄球菌 F.D.A 209 p; Hertley 株寺島株等、Streptomycin の場合にはそれらの他に枯草菌 P.C.I. 219 菌等)を含んだ培地(普通寒天培地; NaNO₃ や指示薬を添加することもある)を

分注し、培地が十分固つた後、抗生物質の標準稀釋系列及び被檢液を同一濃度溶液につき各々 3~4 本宛重層し、37°C (又は 30°C) に 12~16 時間培養すると重層液中の抗生物質は高層寒天中に擴散して菌の發育阻止帶を生ずる。その阻止帶長と抗生物質の濃度の間には一定の函數關係が存在し、阻止帶長の測定によつて抗生物質の濃度を計算することが出来る。嚴密な無菌操作を要せず、操作が簡單で、相當廣範圍の濃度の測定も可能であり、被檢液の量も少量でよく、しかも精度の高い點等から醫學に於ては血液、尿、喀痰、體液中の抗生物質の濃度測定等臨床應用方面に廣く利用されて居る。植物疾病の抗生物質利用による内科的療法其の他に於て、植物體内に吸収された抗生物質の各部汁液中の濃度測定には最も便利な方法と考へられ、又植物病理學の他の實驗分野にも應用價值があるものと思はれる。現在吾々の研究室に於て、汁液成分のこの方法に及ぼす影響について實驗中であるが、10~100 倍の稀釋液と重層することにより或程度迄その影響を除去し得ている。(吉田孝二)

1) 6 h 00 m 2) 7 h 15 m 3) 7 h 25 m 4) 7 h 35 m 5) 7 h 40 m

6) 7 h 50 m 7) 8 h 00 m 8) 8 h 10 m 9) 8 h 20 m 10) 8 h 30 m

11) 8 h 40 m 12) 8 h 50 m 13) 9 h 10 m 14) 9 h 10 m 15) 9 h 30 m

16) 9 h 40 m 17) 9 h 50 m 18) 10 h 00 m 19) 9 h 00 m 20) 15 h 00 m

第3図 病斑上における分生胞子の形成順序