馬鈴薯疫病抵抗性の細胞生理学的研究

VII 抵抗性および罹病性を示す馬鈴薯葉柄生細胞内に於ける 疫病菌菌糸伸長の比較

富 山 宏 平*

Kohei TOMIYAMA: Cell physiological studies on resistance of potato plants to

Phytophthora infestans.

VII. Growth of intracellular hyphae of *Phytophthora infestans* in the living potato plant cells which are resistant or susceptible to the infection of them.

前報告³⁾で筆者は、疫病菌の侵入を受けた抵抗性馬鈴薯品種の細胞が過敏感死を示す時期に、大部分の侵入菌糸は生きており、かつ伸長能力をもっていることを示した。そこで疑問となることは、寄主細胞の過敏感死以前に抵抗性の細胞内の菌糸の伸長が何らかの阻害を受けていないかと云うことであろう。ここに述べる実験はこの点を明かにしようとする目的でなされた。

I. 実験法

前報告³⁾における供試部位は稚葉の中肋表皮細胞であつた。この細胞は菌侵入後の過敏感反応がきわめて速やかで⁴⁾、過敏感死以前の菌糸伸長の測定は困難である。そこで今回は葉柄を剃刃で縦断し、その切断面の破壊細胞の内容を除くために流水洗し、その皮層組織に疫病菌の遊走子浮遊液を接種した。接種後検鏡すると、この切断面の細胞は生きていて(生体染色、原形質流動により確認)、遊走子は大部分、この生細胞壁に附着器をつくつて侵入し、稀にある空細胞(破壊細胞)壁に附着器をつくつて侵入したものとは形態を全く異にしているから、生細胞内の菌糸を測定できる。

Infected by race 41 Infected by race 1
Fig.1. Distribution of the length of intracellular hyphae in the cells of Hokkai No. 10, 6 hrs. after inoculation

この組織では被害細胞の死はほぼ 10~15 時間後⁵⁾

に起るから充分に過敏感死前の生細胞内菌糸伸長を測定する時間がある。これを 19°C の定温器に入れて処定時間後とり出して剃刃で検鏡用切片をつくり直ちに Bouin 固定液(第2, 3 表の実験)あるいは Formalin-acetic-alcohol(6.5:2.5:100)固定液(第4表の実験)で固定した。Bouin 固定液の場合は 70%エチルアルコールで洗滌したのち検鏡し、Formalin-acetic-alcohol の場合はそのまま検鏡した。接種後 6 時間程度では菌糸は分岐著しく少なく、且つ比較的屈曲少なく、伸長するので接種後および、4 6 時間目に固定した。疫病菌の細胞内侵入はこれらの材料ではほぼ 2~2.5 時間で完了する⁶⁾。

Fig.2. Intracellular hyphae of *Phytophthora infestans*.

A: appressorium
H: intracellular hyphae
Z: zoospore

この場合菌糸の進入角度、屈曲が測定上の誤差の原因となることは云う迄もないが、しかし条件は抵抗性、罹病性で同じなので、誤差も同じと見做される。したがって充分比較に耐えると考えられる。測定はマイクロメーターにより階級に分けて測定したのち平均した。観察細胞数は各反覆でおのおの 100~130 で時にそれより少ない場合もあつた。菌糸の状態の一例を Fig. 2.

* 北海道農業試験場

Table 1. Reactions of the potato varieties used in the present experiments to races of *P. infestans*.

Varieties	Irish Cobbler	Hokkai No. 10	48005-46, Hokkai No. 17	41089-8
Genotypes *	r	R ₁	R ₄	R ₁ R ₄
Reactions to the race *				
Race 0	S	R	R	R
Race 1	S	S	R	R
Race 4	S	R	S	R
Race 1,4	S	S	S	S

Remark: * According to the international nomenclature proposed by Black et al.

(Takase²⁾, Takakuwa and Takase³⁾)

に示した。

供試馬鈴薯品種としては抵抗性因子 R₁ および R₄ を各単独に、または併せもつたもの (高瀬²⁾) を用い、それらに対して病原性をもつ疫病菌系統および病原性をもたぬ系統を接種した。これら供試材料の性質を第 1 表に示した。

実験は 1955~56 の間に 3 回行つた。各実験でそれぞれ 2~3 回の接種試験をくり返した。

2 実験結果

細胞内における菌糸の伸長程度を観測すると、侵入

場合とで差を見なかつた。したがつてこれらの測定値から平均値を計算することによつて、抵抗性と罹病性の場合における生細胞内の菌糸伸長を比較することができるであろう。

生細胞内の菌糸伸長の測定結果を Table 2~4 に示した。これらの諸表から、各系統の疫病菌の生細胞内の伸長速度は品種間では統計的に意義のある差を見ず特に抵抗性との間には全く相関を認めない。ここで興味があるのは疫病菌の系統によつて生細胞内の菌糸伸長が異なる点である。すなわち Table 3 では race 4 の伸長が悪く、Table 4 では race 1, 4 の伸長が悪い

Table 2. The length of intracellular hyphae of *Phytophthora infestans* in the cells of cortex layer of petioles of potato variety Hokkai No. 10.

Hrs. after inoculation	4		6		The difference between 4 and 6 (Growth rate for 2 hrs.)	
Races of <i>P. infestans</i>	Race 0	Race 1	Race 0	Race 1	Race 0	Race 1
Reactions of host plant	R	S	R	S	R	S
I (Means)	17.5 μ	21.6 μ	30.6 μ	27.5 μ	13.1 μ	5.9 μ
II (")	21.3	20.5	32.7	35.6	11.4	15.1
Means	19.4	21.1	31.7	31.6	12.3	10.5

これらの場合にそれぞれの系統は分離後日が浅く、馬鈴薯生塊茎上での菌糸発育は不良であつた。これらの菌系統の発育が罹病性細胞の中でも抵抗性細胞の中と同様に著しく悪いと云うことは、菌の生細胞内の発育速度と R 因子による抵抗性が一応無関係であることを示しているように思われる。

3 論 議

以上述べた実験結果から、R₁、及び R₄ 因子に基く疫病抵抗性では、侵入後少なくとも約 4 時間以内には、

侵入菌糸の伸長阻害は認められない。これらの材料では、寄主細胞の過敏感死はおおむね 10~15 時間⁵⁾であるから、寄主細胞の過敏感死の直前に菌糸伸長の阻害があるかどうかについては、この実験結果からは云うことができない。しかし過敏感死が始まる時期の観察によれば、細胞内の菌糸の蔓延状況については特別に抵抗性及び罹病性間に差があるようには見えない。

現在迄のところもつとも抵抗性と密接な関係があると思われる細胞学的な現象は寄主細胞の過敏感死に要する時間である^{4, 5, 6)}。

直後のものから、相当に伸長したもので種々の長さのものが混在している。この長さの分布の一例を図示すると Fig. 1 のようになる。全体の測定を通覧するにこの分布の形は抵抗性を示す場合と罹病性を示す

Table 3. The length of intracellular hyphae of *Phytophthora infestans* in the cells of cortex layer of petioles of potato varieties Hokkai No. 10 and 48005-46.

Potato varieties	Hokkai No. 10		48005-46	
Races of <i>P. infestans</i>	Race 4	Race 1	Race 4	Race 1
Reactions of host plant	R	S	S	R
Hrs. after inoculation				
4 { I (Means)	16.85 μ	13.35 μ	17.00 μ	16.18 μ
II (")	15.25	10.83	13.82	15.39
III (")	(27.52)*	14.74	17.66	16.19
Means	16.05	12.97	16.16	15.92
6 { I (Means)	31.87	42.70	32.17	42.36
II (")	30.58	39.38	28.43	38.65
III (")	30.21	38.98	34.41	35.97
Means	30.88	40.35	31.67	38.99
Difference between 4 and 6 (Growth rates for 2 hrs)	14.83	27.38	15.51	23.07

Remarks: 1) * This figure was omitted from calculation of mean, because of the small number of observed cells.

2) Statistical significance of the difference between mean values of growth rate for two hours is : —

Between varieties : insignificant { $F_0=2.14$, $F_{\frac{1}{6}}(0.05)=5.99$ }

Between races : highly significant { $F_0=82.1$, $F_{\frac{1}{6}}(0.01)=13.74$ }

Interaction between varieties and races : insignificant { $F_0=5.55$, $F_{\frac{1}{6}}(0.05)=5.99$ }

すなわち抵抗性を示す場合には菌侵入に伴う過敏死が速やかで、罹病性を示す場合には遅い。前報告³⁾で、“寄主細胞の死直後（褐変初期）に侵入菌糸は生きていて、かつ伸長能力を持っている”ことを証明したが、本実験の結果は寄主細胞が生きている場合には菌糸の伸長の阻害すらも殆ど起っていないことを示している。

寄主細胞の過敏死以後に急激な菌糸伸長の阻害が認められるが、これらの現象については別に報告した^{8, 6, 7)}。

4 摘 要

1. 馬鈴薯葉柄を縦断し、その切断面生細胞に病原性を異にした疫病菌の各系統を接種し4及び6時間後に固定し、皮層細胞内の菌糸伸長を測定した。

2. その結果 R_1 および R_4 因子による抵抗性にお

いては寄主細胞の過敏死以前の時期には、少くも侵入後約4時間以内では侵入菌糸伸長阻害は認められないことが明らかになった。(1956年11月30日受理)

引 用 文 献

- 1) 高桑亮・富山宏平：北海道農試彙報, 73:94~99. (1957); 日植病報, 21: 37. (1956).
- 2) 高瀬昇：育種学雑誌, 6 (別刷): 12. (1956)
- 3) 富山宏平：日植病報, 19: 149~154. (1955)
- 4) ———：同上, 20: 165~169. (1956).
- 5) ———：日植病学会北海道部会31年度講演(1956).
- 6) ———：農業技術, 11: 63~67. (1956).
- 7) ———・高瀬昇・酒井隆太郎・高桑亮・竹森俊彦：日植病報, 21: 109. (1956).
- 8) 高桑亮・高瀬昇：北農研究抄報, 3号.

Table 4. The length of intracellular hyphae of *P. infestans* in cells of cortex layer of petioles of potato varieties, Irish Cobbler, Hokkai No. 10, Hokkai No. 17 and 41089-8.

Races of <i>P. infestans</i> inoculated	Hrs. after inoc.	Potato varieties			
		Irish Cobbler	Hokkai No. 10	Hokkai No. 17	41089-8
Race 1	4	I (Means) (S) 23.25 μ	(S) 22.79 μ	(R) 21.86 μ	(R) 23.40 μ
		II (") 22.71	20.91	22.72	25.55
		III (") 17.48	—	16.47	16.26
		Means 21.15	21.85	20.35	21.74
	6	I (Means) 40.07	38.49	36.38	38.97
		II (") 31.69	31.86	34.11	36.22
		III (") 28.33	33.13	36.37	—
		Means 33.36	34.49	35.62	37.59
	Difference between 4 and 6		12.21	12.64	15.27
					15.85
Race 4	4	I (") (S) 17.89	(R) 25.19	(S) 16.32	(R) 21.18
		II (") —	19.75	—	18.21
		III (") 20.16	22.69	20.21	21.03
		Means 19.03	22.54	18.26	20.14
	6	I (Means) 39.39	42.25	34.85	36.99
		II (") 31.58	37.76	29.80	32.77
		III (") 26.10	31.67	31.96	34.19
		Means 32.35	37.23	32.20	34.65
	Difference between 4 and 6		13.32	14.69	13.94
					14.51
Race 1, 4	4	I (Means) (S) 16.76	(S) 20.36	(S) 14.32	(S) 23.36
		II (") 17.48	—	14.24	18.30
		III (") 15.32	15.72	13.00	19.44
		Means 16.52	18.04	13.85	20.36
	6	I (Means) 27.51	23.62	25.78	30.70
		II (") 21.35	20.08	19.96	24.01
		III (") 21.24	26.54	26.27	21.56
		Means 23.37	23.41	24.00	25.42
	Difference between 4 and 6		6.85	5.37	10.15
					5.06

Remark: Statistical significance of the difference between the length of intracellular hyphae 6 hrs. after inoculation is:

Between varieties: insignificant $\{F_0=1.497, F_{22}^3 (0.05)=3.05\}$

Between races : significant $\{F_0=57.19, F_{22}^2 (0.01)=5.72\}$

Interaction between varieties and races, insignificant $\{F_0=0.89, F_{22}^6 (0.05)=2.55\}$

Résumé

In the previous paper³), it was shown by means of vital staining that the majority of the intracellular hyphae of *Phytophthora infestans* in cells of a resistant potato variety were still living at an early stage of necrosis of host cell.

The present experiments have been carried out, in order to ascertain, furthermore, whether the growth of intracellular hyphae is inhibited or not, before the hyper-sensitive dea-

th of host cell.

A petiole of potato leaf was cut longitudinally with a razor, and washed with streaming water in order to eliminate the contents of destroyed cells. The cut surface of the petioles, almost all the cells of which were living, was inoculated with *P. infestans*. Four and 6 hours after inoculation, microscopical sections of the inoculated materials were prepared and fixed with Bouin or Formalin-acetic-alcohol, and

then the length of intracellular hyphae was measured with a micrometer. As the hyper-sensitive death of the host cells, caused by infection with the incompatible race of *P. infestans*, occurs about 10-15 hours after inoculation, the values thus obtained may indicate the growth rate of the fungus in living cells. In the materials used in the present experiments, penetration took place about 2-2.5 hours after inoculation.

The varieties tested were Irish Cobbler (r), Hokdai No. 10 (R_1), Hokkai No. 17 (R_4), 48005-46 (R_4) and 41089-8 (R_1R_4). These varieties were inoculated with compatible or incompatible races of *P. infestans*: race 0, race 1, race 4 and race 1, 4.

The results obtained are as follows. The differences in the growth rate of the hyphae in the living cells is statistically highly significant

between races, but not between varieties.

The interaction between varieties and races is not statistically significant.

From these results, it may be concluded that, even when the host plant cells show resistance to infection by *P. infestans* owing to presence of resistant genes R_1 and R_4 , the growth of intracellular hyphae of the pathogen is not inhibited, at least, within about 4 hours after penetration.

From the accumulated knowledge in this respect, it seems that the most evident cytological phenomenon having close connection with late blight resistance is the time elapsed from penetration of the fungus to the hyper-sensitive death of a host cell.^{3,6,7)}

(Hokkaido National Agricultural
Experiment Station, Sapporo)

雑 録

タバコ黒色根腐病菌の新単離法

Tadao SHIMIZU: A new method for isolation of *Tielaviopsis basicola*.

清水 忠 夫 *

タバコ黒色根腐病菌 *Tielaviopsis basicola* はおかす部分が土壌中の部分であるから単離が困難な菌のひとつである。従来その単離には特殊な培地を用いたり、またペトリ皿に濾紙をおき、その上でタバコを発芽させ、発芽直後の子葉に孢子浮游液を散布する方法が用いられている。著者は本病におかされたタバコの根および土壌から本菌を容易に単離し、同時に病原性の検定にも応用できるひとつの新しいタバコの茎を用いた方法を考案した。この方法によれば極めて簡単に確実に単離されるようである。

まず根の病斑部から分離しようとするならば、無病と思われる本病に感受性の高い品種の若いタバコ（草丈20cm, 幹径0.8—1.0cm）の葉を除いた茎を、0.1%昇汞水に浸漬し蒸留水で洗滌した後、消毒した刃物で5.6cmぐらいの長さに切る。その中間に70%アルコールで消毒した三角刀をもつて、縦に約1cm深さ髓に達する傷をつけて病組織片を挿入する。接種した茎は、

* 秦野たばこ試験場

水を含ませた濾紙（石英砂でもよい）を入れた、予め消毒しておいたペトリ皿に入れる。それを20°—26° Cの恒温器におけば2日ないし6日で病組織片を挿入した部分と両端の切口とに、内生孢子および厚膜孢子とを生ずる。これらの孢子のうち切口に生じた部分から白金耳で殺菌水に移し、さらに馬鈴薯寒天培地に移せば純粋培養がえられる。土壌よりの分離は、ササゲ (*Vigna sinensis*) を発病させ、その病斑部から前記の方法で単離できる。菌はタバコの茎のなかを通つて両端に出てくるが、そのとき他のタバコに寄生性のない菌は、タバコの茎のなかを通ることができないから、たやすく純粋培養がえられる。

この方法によれば、孢子形成の良好なものは、いずれも感受性品種であり、抵抗性の強いものは菌の生長がわるい。抵抗性の差が孢子形成の多少、または菌の生長によつて認められるから、この方法によつて抵抗性品種のある程度の室内検定に適用することができると思われる。