秋落稲の胡麻葉枯病罹病性に関する研究

第6報 病態稲の2, 3生理学的観察 (その1)

浅田 泰次*

Yasuji ASADA: Studies on the susceptibility of Akiuchi (autumn-decline) rice plants to *Helminthosporium* blight. (VI). Some physiological observations on the diseased rice plant affected with *Cochliobolus miyabeanus*. (Part 1).

1 緒 言

筆者は、⁹⁾ 稲胡麻葉枯病菌の殺生作用は稲熱病菌の如き特殊な毒素によるものでなく、cellulase, xylanase, pectic enzyme の如き酵素作用が主であり、秋落稲体内では正常稲におけるよりこれら酵素の分泌が多いのではないかと考えてきた。従つて罹病性或は抵抗性を支配する一つの原因には、これらの酵素の不活性化か不作用化に求めることができようがこれにはたとへ菌が酵素を分泌しても作用すべき基質が変質しているか、菌が酵素を分泌し得なくなるか或は両者の合同作用かが考えられる。本報はそのいずれかを知るための実験とその他2, 3の観察結果について述べる。

研究に当り種々御指導御鞭撻を頂いている京都大学赤井重恭教授、本学吉井啓教授、実験に多大の援助を頂いた当研究室木曾皓、徳永省三、加田隆稔、田辺昇、坂本亘の諸君に厚く御礼申上げたい。

2. 病斑に対する病原菌並びに培養沬液の作用

供試稲は常法⁹⁾により水耕、秋落稲は既報⁹⁾の如くにして育成した。供試菌は研究室保存 H-1 号株である。正常稲秋落稲共接種後6日目の病斑部をパンチで

各区50個宛切り取り100°C下で一定重になるまで乾燥後秤量し、千倍昇汞水で表面殺菌して本菌用培地に⁹⁾に加え、病原菌を移植して28°C下20日培養後、各区の健、病葉を取り出し乾燥秤量して重量変化を調べた。結果は第1表の通りである。

即ち正常稲についてみると健全葉は罹病葉に比べて最初の重量は大であるが培養処理による重量減少が大であり、菌の酵素作用によつて葉組織が分解されるものと思われるが、罹病葉の減少が少ないのは体内成分が不溶性の形に変化しているためではないかと考えられる。これに反し秋落稲では健全葉と罹病葉間の重量減少差が少く病斑部近辺でも健全部と同様に菌の攻撃を受け抵抗の体制ができていないことを示している。即ち病斑の小さい正常稲では病斑部近辺組織は既に菌の作用を受けない状態に変質しているが、病斑拡大の著しい秋落稲ではそのような変化を起さず、健全組織はさらに分解を受け重量減少が起ると推定される。しかしここで問題にすべきは病斑部近辺の成分が不溶性に変質しているだけで、それが菌の酵素作用に無関係だとすれば培地に菌を接種しなくても重量減少は少いはずである。又供試葉は予め乾燥してあるため、でき得れば生材料で行いたい。そこで菌の栄養源として大切な窒素を指標として処理前後の葉内窒素の増減を観察した。

即ち酵素の活性が最も著しい培養10日後の沬液⁹⁾に前試験と同様正常稲及び秋落稲の健全葉及び罹病葉を入れ、真空浸透法で液内に沈下せしめ雑菌の混染をさけるためtolueneを加え10日後沬液内の窒素をMicro-Kjeldahl法で定量し最初の窒素量との差を比較した。さらに前述の如く酵素の作用がない時の変化を知るため沬液を100°C下30分加熱して失活させたものを同様に処理し定量した。結果は第2表の通りで、酵素が存在する場合には各区共沬液内

Table 1. Weight of healthy and affected rice leaves before and after inoculation. (unit, mg)

Host plant	Normal leaves		Akiuchi leaves	
	Healthy	Affected	Healthy	Affected
Weight before inoculation	31	27	31	29
Weight after 20days cultured	24	25	24	23
Difference	7	2	7	6

* 愛媛大学農学部植物病理学研究室

Table 2. Nitrogen content in culture filtrate before and after addition of healthy and affected rice leaves. (unit, mg)

Enzyme	Treatment	Host plant		Normal leaves		Akiuchi leaves	
		Healthy	Affected	Healthy	Affected	Healthy	Affected
Present	Before			0.801			
	After	0.891	0.848	0.900	0.883		
	Difference	+ 0.090	+ 0.047	+ 0.099	+ 0.082		
Absent	Before			0.983			
	After	0.640	0.796	0.675	0.952		
	Difference	- 0.343	- 0.187	- 0.308	- 0.031		

に窒素の溶出が起るが濾液を熱処理したものでは反対に葉組織が窒素を吸収する。これで酵素作用によつて始めて組織の分解が行われ単なる溶媒の存在による浸出ではないことがわかる。一方酵素の存在する場合では正常稲の罹病部は健全部に比べて窒素の溶出少く秋落稲の罹病部は健全部との差が少い。これは正常稲の罹病部では窒素化合物が不溶性になつており、これには病原菌の分泌した酵素が作用せず反対に秋落稲の罹病部では不溶性にならず健全部と同様に窒素の溶出が起るのではないかと考えられる。酵素が存在しない場合には当然葉は殺生を受けず培地より窒素その他の養分を吸収しておりそのため培地の窒素減少が起るものと考えられる。罹病葉でその吸収が少いのは壊死組織が多いためであり秋落稲の罹病葉で吸収がより少いのは壊死組織が多いためと思われる。

3. 感染に伴う thiamine の減少

本菌はその発育に thiamine (B_1) を必須とするが³⁾、寄主体内における B_1 の多少は当然菌の発育に影響し発育が不充分だとそれだけ酵素の分泌が少く殺生が行われ難いと思われる。又感染によつて増加する polyphenol やその quinoid 型は B_1 を破壊する可能性がありさらに carboxylase の素材である B_1 は呼吸増加と密接な関係を持つている。そこでこのような B_1 が感染に伴つてどう変化するか正常稲と秋落稲でどのような違いがあるかを調べた。供試稲は前節同様で接種後 2, 4, 6 日目の葉内 B_1 量を桜井氏法¹⁷⁾ で測定し別に試料に一定の B_1 液を加えて磨砕し、その減少をみた。即ち生葉 10g を蒸留水 (D.W.) 40ml 或は B_1 液 40ml (10 μ を含む) でホモジナイズし 50ml にして diastase 0.5g を加え塩酸 (1:3) で pH4.5

とし toluene 3 ml を加えて攪拌、12時間 40°C に放置後濾過する。これより 25ml とり酸性白土 0.2g を加え攪拌後遠沈し稀塩酸で洗滌し、D.W. 4 ml, A 液 (phenol 1 g を 95% alcohol 200ml に溶解したもの) 4 ml を加え別に B 液 (p-aminoacetophenon 0.6g を濃塩酸 9 ml に溶解し D.W. で 100ml にする) 0.2ml, 23% NaNO₂ 0.2ml, D.W. 10ml, C 液 (NaOH 20g, NaHCO₃ 23g を

D.W. 350ml に溶解したもの) 6 ml を先に加え 1 分振盪 1 時間放置後遠沈し、70% alcohol 6 ml, xylene 5 ml を加え 2 分振盪後遠沈し xylene 層を光電比色計で比色した。結果は第 3 表の如く秋落稲は最初から B_1 が多いが感染に伴つて正常稲と同様に減少する。しかし秋落稲に B_1 が多いからといつて直ちにそれだけ菌の発育が良好になり病斑拡大を結果するとはいえない。即ち本菌は菌体 1g 生長するために約 60 μ の B_1 を必要とするが³⁾、病斑内の菌体は非常に少いから正常稲内の B_1 量でも菌の発育には充分であるかも知れない。所で、 B_1 の破壊は正常稲では感染初期に著しく多く秋落稲では少い。これは寄主体内に侵入して足場を作つた菌が次々と健全組織を殺生分解するための酵素の分泌にはそれだけ初期の充分な菌体の発育が必要となりこの時期における寄主体内の B_1 の破壊は菌の発育、ひいては酵素分泌に大きな障害となる。即ち菌侵入前の寄主体内 B_1 量の多少から罹病性を論ずるより感染直後の破壊がより大切な意味を持つものと考えられる。このような B_1 破壊物質は恐らく phenol 系或は quinone 系物質と思われるが、この生成を予想できる phenol oxidase や peroxidase の活性が感染によつて非常に高まつており正常稲では秋落稲より著しい事実がある³⁾。秋落稲に最初から B_1 が多いのは正常稲の場合合成された B_1 が TCA 回路のビルヴィン酸の分解触媒である carboxylase の素材となつて次々と利用されて行くのに対し秋落稲では稲自体の生理的衰弱によつて以前に合成された B_1 がそのまま残つていてのではないかと考えられる。そして感染による代謝の高揚 (呼吸増加) は B_1 利用系の活性化によつてその消耗が行われ同時に polyphenol やその quinoid 型によつて B_1 の破壊が起るものと推定される。このように正常稲の病斑が小さい原因の一つに寄

Table 3. Changes of thiamine content and thiamine-destroyed substance in normal and Akiuchi rice leaves accompanied with the infection of *C. miyabeanus*. (unit, γ)

Host plant	Normal leaves				Akiuchi leaves				
Days after inoculation	0	2	4	6	0	2	4	6	
Thiamine content	4.5	3.0	3.0	3.0	7.5	4.5	3.0	3.0	
Thiamine added	Theoritical value	9.5	8.0	8.0	8.0	12.5	9.5	8.0	8.0
	Measured value	9.0	4.5	6.0	6.0	12.0	9.0	6.0	7.0
	Destroyed value	0.5	3.5	2.0	2.0	0.5	0.5	2.0	1.0

主体内における菌の生育因子である B_1 の破壊によって菌の発育ひいては殺生が不十分になるという仮定が成立しうる。

4. 感染に伴う酸化の磷酸化の変動

罹病稲は正常秋落稲共に呼吸が高まることは既に報告した⁹⁾。しかし呼吸の増大がそれだけ ATP の再生を伴っているか否かが問題である。酸化の磷酸化は酸化のエネルギーを活性磷酸結合 ($\sim P$) のエネルギーとして蓄えるもので呼吸で吸収した酸素とエステル化した磷酸との比が大きいと呼吸による $\sim P$ のプールが有効に行われていることになる。この測定は主として動物組織について行われたが、丸尾^{15,16)} によつて植物での測定法が明かにされた。筆者は正常及び秋落稲を用いて感染後 2, 4, 6 日目の酸化の磷酸化を測定し

た。6 日目で測定が終つているのはこの時期で病斑の拡大がほぼ停止するからである。方法は次の通りである。生葉 5 g を 0.3M NaF 5 ml, 0.9 % KCl 25 ml, 0.07M 磷酸緩衝液 (pH7.0) 5 ml を加えて冷却下ホモジナイズし遠沈上清を cycrophorase 酵素液とした。ワールブルグ検圧計を用い主室に 0.001M $MgSO_4$ 0.7aq 0.2 ml, 0.3 M 磷酸緩衝液 (pH7.0) 0.2 ml, 0.15M Na-glutamate 0.2 ml, 0.4M glucose 0.2 ml, 0.25M KCl 0.3 ml, 0.015 M ATP (片山化学社製) 0.2 ml, 5 % hexokinase (市販 yeast より自製¹⁸⁾) 0.2 ml, 0.2M NaF 0.2 ml, D.W. 0.1 ml, cycrophorase 酵素液 1 ml を加える。側室には 87.5 % トリクロール酢酸 (TCA) 0.5 ml, 副室は 10 % KOH 0.5 ml 及び濾紙片。温度 30°C, 20, 40, 60 分後酸素吸収を測定後 TCA を加えて反応を止め 10 分間氷冷して

Table 4. Changes of oxidative phosphorylation in normal and Akiuchi rice leaves accompanied with the infection of *C. miyabeanus*.

Host plant	Normal leaves				Akiuchi leaves			
Days after inoculation	0	2	4	6	0	2	4	6
P decreased (γ)	7.0	13.7	24.9	10.6	5.6	6.0	5.8	8.6
O_2 uptake (μl)	14.0	14.2	19.2	19.6	14.0	14.8	18.0	18.0
Ratio	0.5	0.9	1.3	0.5	0.5	0.4	0.3	0.4

蛋白を沈澱させ濾過後上清を 5 倍に希釈し減少した無機磷酸を Fiske-Sabbarow 法¹¹⁾で定量した。即ち試験液 0.5 ml に 2.5 % ammonium molybdate 0.8 ml, F-S 試薬 (aminonaphthol sulfonic acid 0.5 g を 15% $NaHSO_4$ 195 ml に溶解し 20 % Na_2SO_4 5 ml を加える) 0.4 ml を加え D.W. で全量を 10 ml とし 20°C に 10 分保ち光電比色計で比色定量した。結果は第 4 表の通りで 60 分後の測定値を示した。即ち秋落稲は感染によつて呼吸の増大があつてもそれに伴う磷酸エステル化が不十分で呼吸基質が無駄に消費され

ており、正常稲では反対に磷酸の Turnover が有効である。病斑部近辺における澱粉の蓄積⁹⁾は amylase 阻害による転流阻害と別にこうして生じた ATP によつて glucose-1-P が作られさらに phosphorylase を介して澱粉が合成されているのではないと思われる。こうした磷酸代謝の高揚は核酸代謝さらに蛋白代謝に共転し前述の病斑部近辺における体内成分の不溶性化に寄与し菌への養分供給の遮断を起すものと考えられ

* 感染によつて一時光合成が高まる。(赤井, 田中: 植物病害研究, 5 (3): 95~104. 1955)

る。又秋落稲の uncoupling は ADP そのものの濃度が低いか或は根から滲透した H_2S が影響しているのではないと思われる。菌の代謝産物中には秋落稲にだけ特に uncoupler となるものが考えられない。

5. 無酸素下*における病斑の拡大停止

寄主が抵抗するためには酸素吸収の増加が必要であるから無酸素下*では抵抗が無く病斑拡大が著しいのではないかと考え、接種後 24 時間目の罹病葉を少量の水を加えたツンベルグ管に入れ一方は排気し他は排気せずに 28°C の定温器に入れ病斑拡大度を比較した。排気しない区は 5～6 日後まで病斑拡大が起り葉は黄化するが、排気区は全然病斑拡大がなく葉は緑色を保ち予想と正反対であった。空中窒素は緑色植物葉の代謝に直接関係しないから排気即ち無酸素下*と考えてよく又無酸素下では抵抗が著しいために病斑が伸びないとは思えない。即ち寄主は醗酵を行い pasteur 効果は阻害されていると考えねばならないからである。これは菌が寄主体内で发育するためには空中の酸素が必須であることを意味しており好気性菌である本菌が嫌気状態で发育しないのはむしろ当然である。稲葉細胞での光合成や呼吸のための CO_2 , O_2 の出入は気孔を門戸として細胞間隙を通じて行われる。本菌はこの細胞間隙の O_2 を利用し炭素源、窒素源、微量要素等を殺生した寄主から吸収していると考えられる。

6. 考 察

稲葉上に飛来した分生胞子は適当な水分の存在によって発芽し¹²⁾附着器を機動細胞上或は気孔上に形成する¹³⁾。この時までに発芽率、附着器形成率等の差が発芽抵抗となりうるが¹⁴⁾本病の場合この抵抗はみられない^{1,2)}。次に穿入糸から恐らく cellulase 等の分泌によって機動細胞膜を分解貫通し寄主侵入を行うのであろうが、この過程において機動細胞膜の珪質化、クチクラ層や細胞膜の厚さ硬さ等が侵入抵抗として存在する^{1,2)}。次に葉肉組織の細胞間隙まで菌糸（発芽管）が伸長し殺生を始めるが、細胞相互間を連絡している中葉成分はペクチン分解酵素及び有機酸に^{9,18)}よって加水分解され細胞相互間の連絡が遮断される。高橋²⁰⁾は微針で 1 細胞を物理的に傷つけても周囲の細胞まで変性凝固が起ることをみているが、これは又菌糸の通った 1 機動細胞の物理的な傷は細胞相互間の動的平衡を破

* 排気しただけで少量の酸素は残っている。

壊し菌糸の直接作用のない附近の組織までも類壊死状態となるものと思われる。こうした変性細胞に菌糸が到達すると cellulase, xylanase によつて細胞膜の一部分解が起つて細胞内容物の菌による吸収利用が起ると推定される。細胞膜の全体的な分解がない証拠には病斑に崩壊部がないことで示される。以上の時期までの菌の行動のためのエネルギーは胞子自体が持つていた養分に依存しているが、ここで吸収された養分は菌が次の細胞を侵すための pectic enzyme や cellulase 等の分泌のエネルギー源となるであろう。秋落稲のように最初から可溶性の窒素や糖が多く蓄積していると⁹⁾菌の酵素分泌はさらに著しくなる可能性がある⁷⁾。スライド上での発芽胞子は寄主侵入及び蔓延時間（1 週間前後）よりずっと長く生存しているから⁹⁾、胞子自体にそれだけの内部エネルギーの存在を仮定して不自然でない。以上が菌側の初期の行動と思われるが、寄主側ではこれに対応して次のような反応が起るのではないかと推定される。初めて菌の攻撃を受けた一細胞の周辺組織が類壊死状態になると附近の細胞から原形質成分の転流を受ける。（例えば Fe^{2+} , P , S^{2-} ）。このような転流仕事のエネルギー源として当然呼吸の増加が起り酸化的磷酸化によつてエネルギーの再成が行われている。原形質内容物の供出を行つた細胞では polyphenol の集積が起り¹⁰⁾ thiamine を破壊し酸化還元平衡が破れ、さらに病斑部より健全部へ脱流した可溶性窒素は不溶性に変る。 Fe や P , S 或は Zn ⁹⁾が病斑部へ集るにも拘らず病斑部の重さが同面積の健全部より軽いのはかかる窒素の脱流があるためと考えられる。病斑内部の菌糸は皆生存しているから⁹⁾かかる蓄積成分が殺菌的に働くとは考えられない。故に不溶性になった窒素や糖は菌に利用され難く菌糸はかかる不溶性物質蓄積組織内に封じ込められそのため酵素の新生と分泌がなくなり病斑拡大の停止となり、病斑内の菌糸は栄養生長から生殖生長への切換が行われ次代の分生胞子を葉上に作るべく自己変化するのではないと思われる。胞子形成の悪い菌糸を飢餓状態に置くと胞子を多く作ること、スライド上の発芽胞子は 6 日後発芽管から 2 次分生胞子を作ること⁹⁾等はこの推定を裏づける。一部の菌糸はそのまま組織内で越冬すると考えられる¹⁴⁾。前報⁹⁾で考察した防禦層とはかかる不溶性物質蓄積層を意味し、酵素が作用し得ないと考えるより防禦層による封じ込めによつて酵素の分泌がなくなると考える方が自然かも知れない。何故なら本菌は細胞間隙を伸長するから蓄積成分が細胞

間隙にも蓄積するならば酵素が働き得ないという推定も可能であるが、それより窒素や糖の不溶性化は細胞内或は細胞膜セルロースのミセル空間で起つていてのではないかと思われるからである。秋落稲の病斑が大きいのは抵抗の質的な違いによるとは考えられず、窒素化合物その他成分の不溶性化が早いか遅いか、多いか少いかという時間的量的差違によるとと思われる。そしてその様な違いは結局根腐れによる稲自体の不健全さ、栄養失調、体内代謝の分解的方向の促進, uncoupling などがそれを原因しているのではないかと考えられる。

7. 摘 要

本報告は胡麻葉枯病罹病稲の2, 3生理学的観察について述べた。

1. 稲胡麻葉枯病菌の培養濾液内に正常及び秋落稲の健全部及び罹病部を入れその重量変化並びに溶出した窒素量を測定すると健全部及び秋落稲罹病部は重量減少、窒素の溶出が大で正常稲の罹病部は少なかつた。即ち正常稲の病斑部近辺では窒素化合物は不溶性になっていると考えられる。

2. 感染に伴う稲葉内 thiamine 量の変化及び thiamine 破壊物質の生成をみると秋落稲は最初から thiamine 量多く、正常稲では感染初期に著しい thiamine の破壊が行われるが、秋落稲では破壊が少い。

3. 正常及び秋落稲共に感染によって呼吸が増大するが正常稲は呼吸に伴う磷酸の Turnover が有効であり秋落稲では不十分で呼吸基質を無駄に消耗している。

4. 無酸素下では病斑の拡大が全く起らない。

Summary

The present paper deals with some physiological observations on the normal and the Akiochi (autumn-decline) rice plants affected with *Cochliobolus miyabeanus*.

1. Healthy and affected leaves of the both plants were immersed in the culture filtrate of *C. miyabeanus*, and the change of their weight and the amount of nitrogen dissolved in media were measured. Healthy leaves of normal plant and affected leaves of Akiochi plant showed the decrease of leaf weight as well as the much amount of soluble nitrogen, but affected leaves of normal plant was not. The nitrogen in diseased part of normal rice plant, therefore, seems to be changed in the insoluble form.

2. Changes of thiamine contents and thiamine-destroyed substances in rice plant accom-

- (1957 年 4 月 13 日受理).
- ### 引用文献
- 1) 赤井重恭・浅田泰次: 植物病害研究, 5:1~14. (1954).
 - 2) 浅田泰次・赤井重恭: 日植病報, 18: 109~112. (1954).
 - 3) 浅田泰次: 日植病報, 21: 68~70. (1956).
 - 4) ———: 植物防疫, 10: 464~466. (1956).
 - 5) ———: 日植病報, 21: 191~193. (1956).
 - 6) ———: 同上, 22: 103~106. (1957).
 - 7) ———: 植物病害研究投稿中
 - 8) ———: 愛媛大学紀要(農学編)投稿中
 - 9) ———: 未発表
 - 10) Dufrénoy, J. & H.S. Reed: Phytopath., 32: 568~579. (1942).
 - 11) Fiske, C.M. & Y. Sabbarow: J. Biol. Chem., 66: 375~400. (1925).
 - 12) 逸見武雄・野島友雄: 植物病害研究, 1: 84~89. (1931).
 - 13) 飯田格・古山清・綾正弘: 日植病報, 15: 178. (1951).
 - 14) 伊藤誠哉: 北海道農試特別報告, 28. (1932).
 - 15) 丸尾文治: 標準生化学実験, 東京. (1953). p. 403.
 - 16) 丸尾文治・松橋通生: 農化, 27: 215~218. (1953).
 - 17) 永原友郎: 食糧分析, 東京. (1948). p. 135.
 - 18) 西門義一: 大原農研特別報告, 4. (1928).
 - 19) 小野小三郎: 農学, 3: 28~34. (1949).
 - 20) 高橋喜夫: 栃内, 富士両教授還歴記念論文集, 245~248. (1955).
 - 21) 達山和紀: 植物病害研究, 5: 67~70. (1955).
 - 22) 達山和紀・山本昌木: 日植病報, 18: 165. (1954).
 - 23) 吉井甫・徳重陽山・野中福次: 日植病報, 20: 10~20. (1955).

panied with the infection were observed. Thiamine, which is the essential substance for the growth of *C. miyabeanus*, is much contained in the Akiochi leaves, but in the normal leaves it is remarkably destroyed at the early stage of the infection. There is a little destruction of thiamine in Akiochi rice leaves.

3. Accompanying with the infection, respiration is increased in the both plants. In normal rice leaves the oxidative phosphorylation caused by respiration takes place more effectively, but in Akiochi leaves it is not so effective and substrates of respiration are uselessly consumed.

4. Diseased spot is not enlarged, when it is kept in the oxygen free condition.

(Coll. Agr., Ehime Univ.)