子苗立枯病抵抗性機作に関する研究

第2報 エーテル処理及び異常環境下における寄主感受性の変化

高橋 実・大石 親男*

Minoru TAKAHASHI and Chikao ŌISHI: Studies on the mechanism of damping-off resistance in the plant seedlings. 4. Modification of the susceptibility induced by ether narcosis or abnormal conditions of environment.

甘栗南瓜幼苗は *Pythium* 属菌の侵害に際して被害細胞及び周辺細胞に褐色物質を生成し、病菌の組織内の蔓延を最終的に阻止する。しかし細胞の褐変前または褐変のごく初期においてすでにその菌糸は生育を阻止されている。これらのことから寄主の抵抗性は細胞の褐変過程における中間生産物、或はこれらとは別個に生成されるいわゆる細胞原形質の抗菌物質によると推定された¹⁰⁾。しかも抗菌機能は病菌の侵入初期に著しいようである。罹病組織では呼吸増加, oxidase, peroxidase 活性の増加がみられることから原形質の代謝が活性化され、高エネルギー磷酸化合物が生成に向つていると言える⁹⁾。本報告では麻酔処理或は異常環境においた場合の寄主の感受性の変化および麻酔が組織呼吸に及ぼす影響について述べる。

1. 実験材料及び方法

甘栗南瓜は *Pythium* 属菌に強抵抗性品種で、菊座、鹿ヶ谷南瓜は抵抗性中位である。これらの幼苗が数 cm に伸長したとき供試した。麻酔剤にはエーテル、アルコールとクロロホルムとを用い、予備実験として処理時間と植物に対する被害程度を検討した。幼苗の地ぎわから約 1 cm のところに少量の脱脂綿を巻きつけ、これにピペットで 2 滴ずつ麻酔剤を滴下し、所定時間後に脱脂綿を除き、更に 30 分経過してから接種に供した。処理時間を 5 分間とした場合には、各薬剤共に幼茎の処理部は水浸状化し倒伏枯死した。この状態は 4 分間処理した幼苗にもみられた。2~3 分間処理した苗では組織は一時的に水浸状となるが 3~7 時間後には回復した。しかし完全に常態にかえるためには更に時間の経過を必要とするようである。1 分間処理した場合には短時間で常態にかえり、むしろ病害に対する抵抗性を増加する傾向がみられた。

以上から麻酔剤によつて一時的に細胞の代謝機能を阻害し、その間の病菌の侵入経過を観察するのに、2~3 分間の麻酔処理が適当とみなされた。使用薬剤

中エーテルが最も作用が著しいので、以後の実験はエーテルを用いることにした。麻酔処理後 30 分してから常法にしたがつて培養基と共に細切した *Pythium ultimum* 菌を、土壤表面に撒布し 26°C 前後の接種箱内に保つた。

2. 実験結果

(1) 寄主感受性に及ぼすエーテル処理の影響

甘栗、菊座、鹿ヶ谷の各南瓜品種の幼苗に、常法によつて 2, 3 分間エーテル処理を施してから *Pythium ultimum* 菌を土壤接種した。接種 48 時間後の罹病率を示すと Table 1 の通りである。

Table 1. Influence of ether narcosis upon susceptibility of pumpkin seedling to damping-off by *Pythium ultimum*.

Variety	Narcosis treatment	Inoculated plants	Affected plants	% of affected plant
Amakuri	Treated	12	12	100
	Non-treated	8	0	0
Shikaga tani	Treated	10	10	100
	Non-treated	14	2	14.3
Kikuza	Treated	15	15	100
	Non-treated	13	7	53.8

エーテルで処理した幼茎は各供試植物共に一様に水浸状化するが、数時間後にはすべて常態にもどつた。その後、罹病部位は再び水浸状化し、健全部との境が淡褐色となり、接種 24 時間後には倒伏枯死した。特に菊座南瓜の罹病茎は罹病が著しい。一方甘栗南瓜の無処理苗では被害部の組織は水浸状化することなく、24 時間から 48 時間までに褐変し、強い抵抗性を示した。即ちエーテル麻酔によつて寄主の抵抗機能が阻害され、感受性を増したことが知られる。

(2) 衰弱状態が寄主の感受性に及ぼす影響

植物が極度の衰弱状態に置かれた場合には寄主の抵抗性は減退する⁴⁾。甘栗南瓜を抜きとつて昇汞アルコールで消毒し、これを予め大型シャーレ内に培養して

* 大阪府立大学農学部

あつた *P. ultimum* 菌叢上に横たえて置けば, Table 2 に示すように 48 時間後には完全に罹病する。供試苗は白色綿様の気中菌糸で覆われ, 罹病組織は水浸状化して枯死する。しかし処理後 24 時間から 36 時間頃までは罹病率が少ない。これは抜きとられた苗が異常環境下でも, なお相当抵抗性を示していることを暗示している。

Table 2. Infection of the pumpkin seedlings, uprooted and laid on the colony of *Pythium ultimum*.

Hrs. after inoculation	Inoculated plants	Affected plants	% of affected plant
8	20	0	0
24	20	8	40
48	20	20	100

(3) 高温処理が寄主の感受性に及ぼす影響 寄主の感受性が組織の高温処理によつて増加することは多くの報告から明らかである^{6,13,14}。甘栗南瓜幼苗を抜取つて消毒後, これを夫々 40°C, 60°C, 80°C の温湯中に 10 分間浸漬した後直ちに冷水に投入し, 前記のシャーレ接種法によつて *P. ultimum* 菌を接種した。なお対照として熱処理しない苗を用いた。罹病率を 24 時間後に観察したがその結果は Table 3 の通りである。表から明かなように無処理苗でも 40% の罹病率を示したが, これは前述の通

Table 3. Influence of the pretreatment with hot water for 10 minutes upon susceptibility of pumpkin seedling.

Temperature °C	Inoculated plants	Affected plants	% of affected plant
40	42	20	48
60	72	58	80.6
80	58	48	84
Control	40	16	40

り極端な衰弱状態に苗を置いたためである。60°C 以上の高温では急速に罹病率が増加するが, これは 60°C 前後で寄主細胞の抵抗性機能が急激に減退したものと考えられる。即ち高温処理によつて寄主の感受性が増すといえる。

(4) エーテル処理苗に侵入した病菌の行動並に組織のリグニン反応

Pythium 菌の寄主体侵入経過と寄主反応についてはすでに報告したり。更にエーテル麻醉によつて感受性を増した甘栗南瓜内の *P. ultimum* 菌の行動と組織のリグニン反応について比較検討した。無処理茎に接種した場合には, 菌糸は角皮侵入によつて表皮を貫

Fig. 1. Hyphae were checked their growth by the browning of host cells in the check plant.

通し表皮細胞および柔細胞内に侵入する。侵入菌糸は 1~3 細胞を侵した後はその伸展を阻止されている (Fig. 1)。即ち被侵入細胞とその周辺細胞とは, 原形質の抗菌機能と細胞の褐変によつて完全に菌糸の発育を阻害するとみなされる。しかるにエーテル処理苗に接種すると, 菌糸は表皮細胞に侵入後は何等の障害を受けることなく, 接種 24 時間後には組織内を広く伸展し, 深部組織まで蔓延する (Fig. 2)。被害細胞のリグニン反応は処理苗で陽性を示すが, 菌糸はこれらのリグニン陽性細胞を通して伸長している。

Fig. 2. Non hindered growth of hyphae in the tissue treated with ether.

(5) 寄主組織の呼吸に及ぼすエーテル麻醉の影響

組織の呼吸測定は Warburg 検圧計により 1 時間の酸素吸収量を以て表わした。即ち容器の主室に pH 5.9 とした M/15. Phosphate buffer 2cc を入れ, これに甘栗南瓜幼茎の約 0.5mm 幅の切片 30 個を投入し, 30°C の水槽中で 1 時間振盪してその間の吸収した酸素量を求めた。先ずエーテル処理後 30 分, 1 時間, 2 時間, 4 時間, 8 時間経過した供試苗について酸素吸収量を測定した。結果は Table 4 の通りで呼吸量は処理直後から 2 時間にかけてかなり低下し, 4

Table 4. O₂ uptake by 30 chopped-pieces of young stem of pumpkin seedling treated with ether narcosis.

Hrs. after treatment	O ₂ uptake (μl/hr.)
8	50.4
4	45.9
2	39.5
1	34.4
0.5	37.9
Control	46.2

Table 5. O₂ uptake by the chopped-pieces of young stem of pumpkin seedling treated with ether narcosis for different lengths of time.

Duration of ether narcosis (min.)	O ₂ uptake (μl/hr.)*
5	41.6
2	41.1
Control	65.0

* 1 hour after treatment

時間以降では殆んど差を認めない。次にエーテル処理時間を2分、5分とに分けて処理1時間後に酸素吸収量を測定した結果は Table 5 に示す通りである。処理時間を2分と5分とに分けることにより苗の症状は著しい差を示すにも拘らず、それらの酸素吸収量には大差がない。次にエーテル処理後1時間経過してから接種を行ったものと、無処理・接種の場合との酸素吸収量の差異を24時間後に測定した。その結果は Table 6 に示す通りで、エーテル処理・接種苗の呼吸は無処理・接種苗にくらべてかなり減少している。

Table 6. O₂ uptake by the chopped-pieces of young stem in pumpkin seedlings, as influenced by ether narcosis treatment before inoculation with *Pythium ultimum*.

No. of Experiment	Hrs. after inoculation	O ₂ uptake (μl/hr.)			
		Narcotized with ether		Not narcotized	
		Inoculated	Non-inoculated	Inoculated	Non-inoculated
1	24	40.8	33.8	47.8	31.8
2	24	45.9	36.0	57.7	31.8
3	24	77.6	—	91.0	37.3
4	24	81.5	—	93.2	38.4

3. 考 察

寄主の病害感受性が植物の麻酔処理、高温処理或は衰弱状態などによつて増すことは多くの報告から明かである^{2,4,6,7,8,12,14}。同じ現象は *Pythium* 属菌に強抵

抗性を示す甘栗南瓜幼苗をエーテル処理および高温処理することによつても認められる。すでに報告¹⁰)したように甘栗南瓜の抵抗性は被害組織の褐変による機械的防禦の外に、細胞原形質の抗菌機能によると解さるので、組織の麻酔は細胞原形質の抗菌機能を抑制するものと考えられる。析内¹²⁾は麻酔による罹病率の増加は細胞原形体の機能を一時的に麻酔せしめて、その抗菌的な働きを抑制するためであると述べている。細胞内の抗菌物質の生成が組織の麻酔によつて阻害されることとした報告はないが、麻酔処理によつて組織呼吸が低下し合成に向う代謝機能が阻害されると言われている^{3,14}。甘栗南瓜幼茎の被害部及びその周辺細胞は呼吸増加を示し oxidase, peroxidase 等の呼吸酵素系の活性化を増進し、この代謝活性化に伴つて抗菌性物質の生成が促進されることが考えられる¹¹⁾。しかるにエーテル麻酔をした組織では処理後2時間までは呼吸の低下が見られ、組織内には、病菌が蔓延している。以上の結果から麻酔によつて呼吸酵素系の働きが阻害され、これに伴つて原形質内の代謝の活性化もまた阻害されるために、抗菌機能も抑制されたとみることが出来る。

4. 摘 要

1. 本報告では *Pythium ultimum* 菌に対する寄主の感受性に及ぼす植物組織の麻酔処理、高温処理及び異常環境の影響、更にエーテル麻酔による組織の呼吸異常について検討した。

2. 強抵抗性の甘栗南瓜幼苗はエーテル、アルコール及びクロロホルムを以て処理した場合にその感受性を増加した。

3. エーテル処理した組織に於ては被害細胞は褐変し、菌糸はよく生育して、褐変細胞を通して進展した。

4. 高温処理した強抵抗性品種の幼苗はその感受性を増加した。

5. エーテル処理した組織の呼吸は低下する。これは細胞原形質の機能の低下を意味している。

6. 以上の結果から細胞内には麻酔処理或は高温処理によつて抑制される原形質の抗菌性があることが認められる。

終りにのぞみ終始御指導を賜つた逸見教授並びに京都大学農学部赤井教授に感謝の意を表する。

(1958年1月20日受理)

引用文献

- 1) 赤井重恭・高橋実・竹内高明：植物病害研究，6：1. (1956).

- 2) Gäumann, E. : Pflanzliche Infektionslehre, II Aufl. p. 554 (1951).
- 3) Gothoskar, S.S., R.P. Scheffer, M.A. Stahmann and J. C. Walker : Phytopath., 45 : 303. (1955).
- 4) 平井篤造 : 植物の病害抵抗性機作に関する研究 (1955).
- 5) 糸井節美・高橋實 : 日植病報, 21 : 107. (1956).
- 6) 水上武幸 : 九大農学部学芸雑誌, 12 : 177. (1952).
- 7) — : 同上, 12 : 181. (1952).
- 8) Salmon, E.S. : Ann. Bot., 19 : 125. (1905).
- 9) Scheffer R. P. and J. C. Walker : Phytopath., 44 : 94. (1954).
- 10) 高橋實 : 日植病報, 15 : 38. (1950).
- 11) —・糸井節美 : 大阪府立大学紀要, Series B, 6 : 123. (1956).
- 12) 柄内吉彦 : 植物病害研究 4 : 1. (1951).
- 13) 富山宏平・高桑亮・高瀬昇・酒井隆太郎 : 日植病報, 21 : 17. (1956).
- 14) —・酒井隆太郎・高瀬昇・高桑亮 : 同上, 21 : 153. (1956).

Summary

The present paper deals with the influence of the treatment with narcotics, high temperature or of abnormal environmental conditions on the susceptibility of *Cucurbita Pepo* to *Pythium ultimum*. The change in the tissue respiration under the ether narcosis is also reported.

The young seedlings of highly resistant variety "Amakuri" which was treated with ether, ethanol or chloroform, became susceptible to the disease.

In the tissues of the seedling treated with ether, unlike those of nontreated, the *Pythium* hyphae were not checked their growth. The susceptibility of the seedling also increased by the

treatment with high temperature.

The respiration of the tissue of the host plant decreased when the seedling was treated with ether. This may suggest that the metabolic activity in the host cells is reduced by narcosis.

From these results, it is recognized in the pumpkin seedlings that there exists a functional resistance of protoplasm of the host cells which can be easily abated by treating with narcotics and high temperature.

(Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Osaka Prefectural University
Sakai, Japan)

文献紹介

ウィルスの汁液接種法の一案

Hildebrand, E.M. : Rapid inoculation techniques for mechanical transmission of sweetpotato internal cork virus. Plant. Dis. Repr. 40(6): 527-530. (1956).

植物ウィルスの汁液接種をする際、普通には病葉を少量の水を加えてすりつぶし、その汁を健全植物にすりつける方法が行われているが、そういう方法でうまく接種できない場合にも往々成功するというのがこの方法である。先ず病葉の一部を切りとつてそれを小さな巻紙状にまき、安全かみそりの刃で輪切の切り口をつくる。切り口のすぐそばを先端の平たいピンセット(例えば切手蒐集家が使うような型)で強くおさえて、切口から汁をしみ出させながら、それを健全植物にすりつけるのである。健全植物の葉には予めカーボランダムを粉をまぶし、その上に磷酸緩衝液(1%, pH 6~7)を軽く噴霧しておく。

葉に目に見える傷が残らない程度に軽くこすれば充分である。ピンセットは使用の都度アルコールに浸してから焰を通し、又手指は石鹼で洗う。普通の方法とちがつて、組織をつぶして汁が出たのをすぐ接種するので、ウィルスが不活性化を受ける機会が少ないと考えられるのがみそである。昨年筆者等が Hildebrand 氏を訪ねた折、この方法を実演入りで説明されたが、その時には磷酸緩衝液の中に更に還元剤(アスコルビン酸だつたかと思う)を加えて噴霧していた。但しこれはオマジナイだそうで、ただの水でも効果はどうも同じらしいとの事であつた。Wenatchee の Lindner 氏も果樹からキウリにウィルスを接種するのにこの方法を使つておられたが特にこの方法だとうつりやすいという気はしないけれども、手軽でいいからよく使うという話であつた。

(飯田俊武)