稲胡麻葉枯病における脱水素酵素の組織化学的証明*

野 津 幹 雄**

Mikio Nozu: Histochemical demonstrations of dehydrogenases in the
rice plant tissues affected by *Cochliobolus miyabeanus*
and in the causal fungus.

テトラゾリウム塩による植物の組織化学的観察は従来から行われており, Seligman らは triphenyl tetrazolium chloride (TTC) を用い⁵, Dayer は 3,5—diphenyl tetrazolium chloride (blue tetrazolium, BT) を用いて¹⁾, それぞれ実験している。植物病理学の分野では鈴木がイモチ病に³, また Mustakario が甘藷紫紋羽病に³⁾, それぞれ TTC を用いている。また生化学的には各種の病害または病原菌において脱水素酵素の活性が追究されている^{9,10)}。筆者は脱水素酵素と特異的に反応するといわれている BT²⁾ を用い, 稲胡麻葉枯病病斑拡大と本酵素の活性部位との関係を中心に, 若干の実験を行つたのでここにその結果を報告する。

起稿にあたり御薫陶を賜つた島根農科大学山本昌木教授ならびに実験を指導された名古屋大学農学部平井篤造, 瓜谷郁三両教授に厚く感謝の意を表する。

I. 実験材料および方法

供試水稻の品種は愛知旭で, $\frac{1}{5}$ ワグネルポットに 50 粒づつ播種した。供試葉身および葉鞘は第 10 葉が展開しつつある稲の第 8 葉および第 9 葉のものである。酵素活性の存在部位を知るためには, 比較的大きな葉緑体をもっているホーレンソウ (*Spinacia oleracea* Mill.) およびダイズ (*Glycine max* Merr.) を併用した。

稲胡麻葉枯病菌は 1956 年 1 月罹病稲から, 筆者が純粋分離した菌株である。本病菌を稲藁煮汁寒天で 30°C で 10 日間培養し, 新たに形成された分生胞子を接種ならびに菌の組織化学的観察に用いた。脱水素酵素の組織化学的検出は次のように行つた^{1,5)}。0.1% BT 溶液 1 cc + 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) 1 cc + 0.2 M コハク酸ナトリウム 溶液 1 cc + 蒸留水 1 cc =

計 4 cc をツンベルグ管に入れ, その中に供試材料を投入し, 水銀柱 3~5 mm で材料中に試験液を真空透入させた。30°C, 2 時間後試料を取り出し, 通常これを徒手切片として検鏡, 観察した。

II. 実験結果および考察

1. 稲葉組織の BT 反応に要する時間ならびに着色部位

稲葉各部から切片を作り, 30~32°C 明所または暗所で BT 溶液と反応させ, 時間の経過にともなう着色度合を顕微鏡下で観察した。その結果は第 1 表に示した。筆者の実験では反応度合は BT 溶液処理 8 時間後で一定となり, 反応しうる細胞は濃青紫色になった。しかし BT 処理 4 時間後は着色部分に変化はなく, 処理 2 時間後で観察に充分な反応が一応見られた。ホーレンソウおよびダイズでも反応にはほぼ同様の時間を要した。

第 1 表 稲葉における BT の反応所要時間

材料 \ 反応時間		01246824						
		0	1	2	4	6	8	24
明所	9 葉 (中央)	—	+	++	++	++	+++	+++
	10 葉 葉 鞘	±	+	++	+++	+++	+++	+++
	4 葉 (先端)	—	±	+	+	+	++	+++
	4 葉 (中央)	—	±	+	+	+	+	++
暗所	9 葉 (中央)	—	±	+	++	++	++	+++
	10 葉 葉 鞘	±	+	++	+++	+++	+++	+++
	4 葉 (先端)	—	—	±	±	+	+	+
	4 葉 (中央)	—	—	±	+	+	+	+

備考: +~+++ は反応の強さの程度を示す

水稻葉身の BT 反応は葉緑体を含む細胞に顕著であつて (第 1 図, a, b), 表皮細胞, 厚膜細胞, 機動細胞および維管束組織には明らかでなかつた (第 1 図, b)。また展開前の葉鞘には特に強い反応が見られ

* 本実験の一部は昭和 33 年度日本植物病理学会大会において発表した。名大植病教室業績第 38 号

** 名古屋大学農学部植物病理学教室, 現在 島根農科大学

第1図 稲におけるBT反応部位

a : 葉身における反応部位 (反応処理4時間)
c : 展開前の葉鞘におけるBT反応

b : BT反応によつて着色した葉緑体を含む細胞

た(第1図, c)。

上記の着色反応は試料のホルマリン処理(10%, 1時間)または熱処理(50~60°C, 10分)によつて消失した。一般にBT溶液による反応至適温度は37°Cとされているが²⁾, 本実験では20°Cから観察に十分な反応が見られた。しかし供試材料が稲であることを考慮して本実験は30°Cで行つた。また低温(冷蔵庫内)ではこの反応は認められなかつた。以上の観察から本実験のBT反応に関与する酵素系はコハク酸脱水素酵素であると考えられるが, 本反応は基質(コハク酸ナトリウム)を加えなくても着色が認められるので,

ここでは単に脱水素酵素として取り扱うこととする。

2. 稲葉における脱水素酵素の存在場所

前述のようにBT反応は葉緑体を含む細胞において顕著であつたが, 更に細部にわたつてこれを観察するため, 市販のホーレンソウおよびダイズの子葉を併用した。その結果, BT反応部位は明かに葉緑体であり(第2図), 着色顆粒は形態学的に葉緑体のグラナに相当すると思われた(第2図, c, 矢印)。Dayerはテトラゾリウム塩の光化学的還元は緑色植物ではgrana like regionに局在し, ある種の細胞では3~4μの直径をもつleucoplastに脱水素酵素活性があると述

第2図 葉緑体を含む細胞における脱水素酵素の存在部位

a : 稲 b : ホーレンソウ c : ダイズ

べている¹⁾。筆者はいまだ本酵素活性の所在がグラナにあると結論する確証をもたないので, BT反応はグラナに相当する部位に顕著であつた事実を述べるにとどめたい。

3. 稲胡麻葉枯病病斑の形成と脱水素酵素の活性部位

葉身に稲胡麻葉枯病菌を接種し, 病斑形成過程と本

酵素活性部位との関係を観察した。この場合, 病斑部の断面が直接反応溶液にふれるように組織片を作り, 組織片のままBT溶液で処理し, 処理後直ちにそれから切片を作つて検鏡した。稲胡麻葉枯病病斑は接種後20時間以内に肉眼で認められる大きさになるが, 水浸状であつて葉脈間に限られ, 接種後24~48時間で葉脈を通りこして拡大する。72時間(3日)後病

斑部の褐変は顕著になり、中毒部との境界が明瞭になった。中毒部は葉緑体の形態的異常のみから観察すると、細胞にして7層内外であつた。本実験では接種後96時間(4日目)と168時間(7日目)の材料において、病斑の大きさはほぼ同じであつた。

一方脱水素酵素の活性は病斑拡大初期、すなわち機動細胞の一部が褐変した程度では機動細胞に隣接した細胞にのみ強い反応が現われた(第3図, a)。機動細胞全体が褐変すると、褐変機動細胞を含む葉脈間の緑色組織に強い反応が現われた(第3図, b)。接種後24時間経過して1葉脈を通り越した病斑においては、病

斑の周辺に隣接する2つの葉脈間の組織に強い反応がみられた。接種後48時間の病斑は次第に拡大しつつあるが、BT反応部分に関して接種後24時間のものと大差はなかつた。それ以後病斑の大きさに比較してBT反応部分は小さくなり、72~96時間の病斑では褐変部に接した組織にのみ反応が認められた(第3図, c)。これ以後病斑周辺におけるBT反応は健全組織における反応と区別できなかつた。なお接種後5~7日の典型的病斑では、褐変部細胞にはBT反応は認められず、中毒部細胞におけるそれは健全組織のものより弱かつた。

第3図 稻胡麻葉枯病の病斑形成と脱水素酵素の活性部位

a: 接種後20時間の反応 m: 機動細胞, 矢印は反応部位 b: 接種後24時間の反応
v: 葉脈, 矢印は反応部位 c: 接種後72~96時間の反応, ただし病斑周辺のBT反応(矢印)

4. 葉鞘裏面表皮細胞への菌糸の侵入と脱水素酵素反応

以上のように葉身における病斑拡大過程と本酵素活性部分の消長とが密接に関係していることは認められたが、菌糸の侵入部位と酵素活性との関係を観察することは困難であつた。そこで葉鞘裏面表皮組織を使用した。しかし該表皮細胞における本酵素活性は極めて

弱く、菌糸の侵入による寄主細胞の酵素活性を観察する試みは不可能であつた。一方侵入菌糸には強い反応が認められ、侵入菌糸全体が濃青紫色になることが多かつた(第4図, a)。また侵入菌糸の着色の強さはBTによる着色顆粒の多少によるもので、侵入菌糸内には大小の反応陽性顆粒が散在していた(第4図, b)。

鈴木⁸⁾の報告によれば、イモチ病菌を接種した葉鞘裏

第4図 葉鞘接種とBT反応

a: 侵入菌糸におけるBT反応 b: 侵入菌糸内の着色顆粒

面細胞において、まず附着器に脱水素酵素作用が強く現れ、菌の侵入部位に接した稲細胞内の粒子に強い反応が出ている。筆者の実験では附着器に関しては上と同じであるが、侵入部位に接した寄主細胞に強い反応は認め難く、健全部の反応と区別できなかった。この相違はおそらく使用した稲品種の本病菌に対する反応の差違に基づくものであろう。しかし侵入菌糸内部には強い反応が認められた。

5. 稻胡麻葉枯病菌分生孢子の発芽と脱水素酵素

前述のように侵入菌糸において本酵素活性が顕著であつたので、菌のみを対象として観察した。スライドガラス上に孢子懸濁液を噴霧し、暗所 30°C 湿室に放

置し、2時間ごとにスライドをとり出し、反応溶液を加え、ツンベルグ管の代りに真空デシケーターを使用して反応せしめた。その結果 BT 反応は孢子の細胞質内にもみ現れた(第5図, a)。発芽処理2時間後、孢子の両端の原形質において極めて強い反応が現れ、発芽管の反応は皆無に近かつた(第5図, b)。4時間後、孢子の両端の原形質では2時間後のものと変わらず、発芽管においては先端部よりも基部に反応が強かつた。また孢子全体の反応は強くなつた。6時間後、孢子の両端の原形質と特に附着器において顕著な反応が現われた(第5図, c)。孢子においても侵入菌糸と同様な反応陽性の着色顆粒が認められた。高等動植物

第5図 孢子の発芽とBT反応

a : 発芽処理直後、反応は弱いが一様に着色する

b : 同2時間後、孢子の両端が特に強い

c : 同6時間後、孢子の両端および附着器が着色する

の場合、ミトコンドリアはテトラゾリウム塩を還元する⁶⁾、また組織をホモジェネートしたものでは、大部分のコハク酸脱水素酵素の活性はミトコンドリアの分割に見出されている⁷⁾。稻胡麻葉枯病菌分生孢子にミトコンドリアが存在することは確認しているので⁴⁾、本病菌における脱水素酵素の存在場所はミトコンドリアであると思われる。

III. 摘 要

病植物異常代謝を追究する一端として、稻胡麻葉枯病罹病葉における脱水素酵素の活性を、blue tetrazolium (BT) を用いて組織化学的に観察した。その結果、稻葉における BT 反応の存在は柔組織細胞であつて、導管、厚膜細胞、機動細胞、表皮細胞において認められなかつた。稻葉の病斑拡大と関連して組織の褐変部分の周辺に強い反応が現れ、病斑が一定の大きさになるに従つて反応部分は消失した。接種5日以後の典型的病斑において BT 反応は褐変細胞には認められず、中毒部の反応は健全部より弱かつた。葉鞘裏面表皮細胞には極めて弱い反応があるのみで、菌糸が侵入してもそれによつて特別な反応は現われなかつ

た。一方侵入菌糸には極めて強い反応があつた。孢子の発芽過程においては、孢子の両端の原形質に強い反応があり、それにもまして附着器における反応は顕著であつた。なお BT 反応によつて認められる本酵素の存在は稻葉では葉緑体のグラナに相当する部分であり、稻胡麻葉枯病菌ではミトコンドリアであると推察された。

(1959年3月20日受理)

引用文献

- 1) Dayer, M. T. (1959), Amer. J. Botany, 40 : 20.
- 2) Lison, L. (1956), Histochemie et cytochimie, principes et méthodes, (今泉正訳) 白水社, p. 436.
- 3) Mustakallio, K. K. and Telkkä, A. (1953). Science, 118 : 320.
- 4) 野津幹雄・松井千秋(1959), 日植病報, 印刷中.
- 5) Seligman, A. M. and Rutenburg, A. M. (1951), Science, 113 : 317.
- 6) 新家浪雄 (1957), 細胞学, 岩波書店, p. 52.

- 7) 新家浪雄 (1956), 同上, p. 56. 9) 高村芳三郎 (1957), 日植病報, 22: 225.
 8) 鈴木直治 (1953), 農技研研究報告, 7: 64. 10) 山口昭 (1955), Virus (Japan), 6: 1.

Summary

Dehydrogenase activity in the rice plant tissues inoculated with *Cochliobolus miyabeanus* (*Helminthosporium* leaf-spot fungus) and in the causal fungus was investigated using blue tetrazolium (BT). This reaction was positive in the sections of healthy leaf tissues after 2 hours' incubation at 30~32°C and the rate of the staining became constant after 8 hours' incubation. The reaction was negative when the sections were pretreated with formalin (10%, 1 hr.) or treated at 50~60°C, 10 min. In leaf tissues, the parenchymatous cells were most strongly stained and the sites of the enzyme activity seemed to lie on grana-like region in chloroplasts.

The leaf spot caused by the present fungus became visible 20 hours after inoculation. The dehydrogenase activity in this early stage of infection was demonstrated in cells near browned epidermis. With the enlargement of spotted area, the tissue around the lesion stained with BT; but the reaction became constant 48 hours after inoculation, although the enlargement of the lesion was still proceeding. In the typical leaf spot produced 5~7 days after inoculation, localization and intensity of formazan deposition could not be distinguished from those in healthy leaf tissue.

The reaction was weak in leaf-sheath cells even when the pathogen penetrated them. On the other hand, the penetrating hyphae, especially the appressoria and the germ tubes, showed strong reaction. When the spores germinated on slide-glass, the reaction was detected on the terminal cells of the spores and on the germ tubes as well as on the appressoria. This positive reaction on spores of the present fungus seemed to localize on mitochondria of the fungus. (*Plant Pathology Laboratory, Faculty of Agriculture, Nagoya University, Anzjo, Aichi-Ken*)

文 献 紹 介

Alternaria solani の細胞学的研究

Stall, R.E.: An investigation of nuclear number in *Alternaria solani*. Amer. J. Bot., 45: 657~659. (1958).

この報告は *A. solani* にみられる変異がヘテロカリオシスに基づくことを細胞学的に証明せんとしたものである。供試菌は改修 Hrushovetz 法 (3% クロリンで 15 分間滅菌した 1×2 cm のセロファンを平面培地上に無菌的に置き、培地に菌を接種、セロファン上へ発育させる) でセロファン上に菌が適度に発育した時セロファンと共に Craf 液で固定、水洗、NaOH の微量を加えた 2% H₂O₂ で漂白、デラフィールドヘマトキシリンで染色、1 夜水中に漬け、5 秒間酸性水中に入れて細胞質を脱色、0.5% LiCO₃ 中に 1 分間入れて核の染色を強化、脱水後 diaphane でマウントした。

菌糸細胞中の核数は 1~7 個、普通 1~3 個、ただし先端細胞は 1~9 個、普通 4~6 個; 担子梗細

胞中の核数は 1~4 個、普通 1 あるいは 2 個; 分生胞子原基は 1~3 核であつた。成熟した分生胞子の細胞も多核で基部のものほど多く (最多 8), 先端のものは 1~2 個、核の多いものほど細胞は大きかつた。発芽管はどの細胞からも形成され、その核数は菌糸と同様であつたが、分生胞子の細胞から発芽管中へ移行する核は 1 個以上らしい。

菌糸はよく anastomosis を行い、完全に細胞質が連結するが、連結の起らない pseudoanastomosis もみられた。菌糸でも担子梗でも伸長、多核となつてから隔膜で区切られるので細胞は 1 または多核となる。隔膜には孔があり、これを通して核は移動する。

上述のように細胞は多核で hyphal anastomosis 及び隔膜孔を通して核の交換移動が行われヘテロカリオンが形成され、dissociation が起つて変異が起ると考えられる。単核の細胞から形成される菌糸あるいは分生胞子は遺伝的に安定であらう。

(鈴木橋 雄)