ジャガイモ培養組織への疫病菌侵入の観察

山本昌木*・北見和光*

Masaki YAMAMOTO* and Kazumitsu KITAMI*: Observations
on the Invasion of *Phytophthora infestans* to
the Cultured Tissues of Potatoes

Abstract

Two types of callus were recognized in cultured tissues of potatoes, i. e., fragile callus on variety Norin No. 1 and Irish Cobbler, and compact callus on Interspecific hybrid 96-56.

Nine and 12 hours after the inoculation with zoospores of *Phytophthora infestans* (Race 0 and Race 1), browning and active protoplasmic streaming were observed in the callus tissue cells of Irish Cobbler and Norin No. 1. When zoospores of *Phytophthora infestans* Race 0 and Race 1 (non-compatible races) were inoculated on interspecific hybrids 96-56 and SH-469, a high grade of browning in the susceptible cells was recognized 6 and 9 hours after inoculation. Resistant hybrid showed dark browning in the infected cells.

Browning was not observed in free cells from potato callus tissues of variety Irish Cobbler obtained by shaken culture, even 72 hours after inoculation with zoospores of *Phytophthora infestans*.

Both types of hypersensitive flecks and susceptible lesions were recognized on the callus in Interspecific hybrid 96-56 after treating with the DNA fraction obtained from variety Norin No. 1.

(Received October 1, 1970)

さきに筆者ら⁶⁾は White 培地上に培養したジャガイモカルスに疫病菌 (Race 0) を接種して経過を観察したが、今回は 2,4-D 添加 Murashige and Skoog 培地に培養したジャガイモカルスおよび異品種から抽出した DNA フラクシオンで処理したカルス上での疫病菌侵入を観察したので報告する。

組織培養についてご教示いただいた農林省農事試験場浜屋悦次技官に感謝する。

材料および方法

疫病菌 Race 0 に親和性の男爵薯、農林 1 号 (罹病性因子 r) と非親和性種間雑種 96-56 (抵抗性因子 R₁) と SH-469 (抵抗性因子 R₄) を使用した。

ジャガイモ塊茎を無菌状態で萌芽させ、アンチホルミンに 5 分間浸漬、無菌水で洗浄した 5 × 5 × 2 mm の組織を 2, 4-D 2 ppm 添加 Murashige and Skoog

培地に移し、暗黒下で 21°C 40 日間培養して得られたカルスを位相差顕微鏡で (15×20, レンズ DLL²⁰) 観察した。

静置培養で得られた農林 1 号、男爵薯、種間雑種 96-56 ならびに SH-469 のカルスを 21°C 暗黒下 120 rpm 2 週間連続振盪培養したものについても同様の観察を行なった。

2 カ月間静置培養して得たカルス農林 1 号、男爵薯種間雑種 96-56、SH-469 にそれぞれ疫病菌 Race 0, Race 1 を接種した。疫病菌は 20°C で 2 週間インゲン培地上で培養したものの懸濁液を作り、10°C で 2 時間放置して遊走子を遊出させた。発芽率は Race 0 で 61%, Race 1 で 58.4% であった。対照区はカルスを無菌水に浸漬したのち、細胞組織の変化を接種区と同様に観察した。

罹病性 r 因子を持つ農林 1 号の葉から抽出した DN A フラクシオン 1% 水溶液を添加した Murashige and Skoog 培地をペトリ皿上の脱脂綿上に注ぎ、この上に農林 1 号、男爵薯、種間雑種 96-56 の 40 日間

* 島根大学農学部 College of Agriculture, Shimane University, Matsue, Japan.

第1表 ジャガイモカルス組織の品種間差異

品 種	硬 さ	カルスの色	細胞の大きさ	核の大きさ
農林1号	周 辺 部 分 離	淡い象牙色	110.7×35.5 ^μ	14.1 ^μ
男 爵 薯	全体たやすく分離	半透明白色	171.1×39.0	19.1
種間雑種 96-56	周 辺 一 部 分 離	淡い象牙色	83.2×41.6	19.6
種間雑種 SH-469	容易に分離しない	褐 色	51.4×20.5	7.2

観察細胞数 200

第1図 振盪培養で得られたジャガイモカルスの遊離細胞
21°Cで暗黒下毎分 120 回転 2週間培養, 品種男爵薯, 約300倍第2表 振盪培養で得たジャガイモカルス細胞の
品種間差異

品 種	細胞の大きさ	核の大きさ
農林1号	72.2×30.4 ^μ	8.2 ^μ
男 爵 薯	106.6×32.5	10.0
種間雑種 96-56	54.3×27.5	12.9
種間雑種 SH-469	39.3×19.1	6.5

観察細胞数 200

静置培養を移し, さらに2週間培養したカルスに疫病菌 Race 0 を接種し, 6, 9, 12, 24, 48, 72 時間後の組織細胞の変化を位相差顕微鏡で観察した。

実 験 結 果

21°C で 40 日間 2,4-D 2ppm 添加 Murashige and Skoog 培地上に静置培養したカルスの状態は第1表に示すとおりである。

農林1号や男爵薯のように, 柔らかく分離しやすいカルス (fragile callus) は色がうすく, 細胞は大型で球形のものが多かった。

培養1週間めごろからカルス形成が認められ, 2週間-1カ月間がもっとも増殖がさかんであった。

置床 10 日めに不定根が認められ, 羽毛状の側根を生ずるものもあったが, compact callus を形成する種間雑種 SH-469 においては置床後2カ月を経過しても不定根の形成を認めなかった。他の3品種では 40-50% のものが不定根を形成した。

振盪培養したカルス細胞の品種間差異は第2表に示すとおりである。

振盪培養で得られた遊離細胞は静置培養のカルス細胞にくらべ, 4品種とも小形で円形のものが多かった。男爵薯のように fragile callus では, 振盪により容易に遊離単細胞となるが, 種間雑種 SH-469 のような compact callus では振盪しても容易に分離しない。

疫病菌を接種したカルス組織の経時的変化は第3表に示すとおりである。

第3表に示すように, 対照区においても, 褐変度は各品種とも時間の経過とともに上昇した。12 時間で細胞壁の黄褐変が認められたが, 核および細胞質の褐

第 3 表 疫病菌を接種したジャガイモカルス組織の褐変度

区 分	品 種	時 間	6	9	12	24	48	72
対照区	農林 1 号		5.2	7.9	10.1	21.3	47.5	52.8
	男 爵 薯		6.1	11.6	17.2	24.2	38.0	46.1
	種間雑種 96-56		4.7	8.1	13.4	23.7	30.6	39.4
	種間雑種 SH-469		1.9	5.6	19.7	33.0	42.3	47.6
Race 0 接種区	農林 1 号		20.3	36.1	51.0	73.1	84.8	93.4
	男 爵 薯		13.8	21.2	35.8	60.1	72.0	87.4
	種間雑種 96-56		40.2	54.7	67.3	85.2	90.3	96.0
	種間雑種 SH-469		61.0	79.3	84.9	90.8	93.1	98.1
Race 1 接種区	農林 1 号		28.2	41.0	65.3	85.1	90.2	94.8
	男 爵 薯		18.7	30.1	49.6	63.9	71.0	76.2
	種間雑種 96-56		31.0	59.4	75.1	84.3	95.0	100.0
	種間雑種 SH-469		60.2	74.8	80.1	83.3	85.1	90.4

観察細胞数 200

変は認められなかった。24 時間後男爵薯で核の褐変が一部みられたが、72 時間経過しても他の品種では核の褐変は認められなかった。

Race 0 接種区ではつぎのことが観察された。罹病性因子 r を持つ農林 1 号、男爵薯ともに、菌接種後の時間が経過すると褐変が増加する。罹病性品種では、菌侵入後侵入部位の細胞壁が黄褐変を起こし、この褐変が濃化するところからブラウン運動が認められる（ここでブラウン運動というのは径 $1-3 \mu$ ぐらいの顆粒が不規則に運動することをいう）。

原形質流動は疫病菌接種 9-12 時間経過したところでもっとも激しく、農林 1 号では $15.6-19.2 \mu/\text{分}$ 、男爵薯では $19.2-25.8 \mu/\text{分}$ であった。疫病菌侵入後は時間の経過とともに顆粒が増加し、細胞壁が厚くなり、褐変が濃化した。このころの原形質流動は農林 1 号では $7.2-12.6 \mu/\text{分}$ 、男爵薯では $9.6-15.6 \mu/\text{分}$ とやや遅くなった。

抵抗性因子 R_1 を持つ種間雑種 96-56、 R_4 を持つ SH-469 では、農林 1 号や男爵薯にくらべ、菌接種後 6-9 時間の褐変度がいちじるしく高い。原形質流動も菌接種後 6 時間をもっとも早く、種間雑種 96-56 では $19.2-25.2 \mu/\text{分}$ 、SH-469 では $27.0-38.4 \mu/\text{分}$ と動きが活発となった。種間雑種 SH-469 では接種 9 時間ころから濃褐変がみられたが、種間雑種 SH-469 では接種 6 時間後すでに濃褐変が起り、過敏型の病斑を示した。

Race 1 接種区では次のようなことが観察された。原形質の流動は菌接種後 9-12 時間をもっとも活発で

農林 1 号では $19.2-25.2 \mu/\text{分}$ 、男爵薯では $24.1-38.4 \mu/\text{分}$ であり、Race 0 を接種した場合よりも早い。

疫病菌 Race 1 に対し親和性の遺伝因子 R_1 を持つ種間雑種 96-56 は農林 1 号、男爵薯にくらべ褐変の度合は高いがやはり罹病型の病斑を示した。4 品種中ブラウン運動はもっとも緩慢であった。原形質流動は 12 時間後 $15.6-19.2 \mu/\text{分}$ で他の 4 品種にくらべゆるやかであった。

疫病菌 Race 1 に対し非親和性因子 R_4 を持つ種間雑種 SH-469 では接種後 6 時間で細胞壁にも細胞質にも濃褐変がみられた。最初は微小な顆粒が多数みられるが、やがて大きさを増しはげしいブラウン運動をする。原形質流動は接種後 6 時間で $38.4-78.0 \mu/\text{分}$ であり、4 品種中もっとも活発であった。菌接種 9 時間で褐変程度が強かった。

農林 1 号 DNA フラクシオン 1% 水溶液で 2 週間処理したカルス組織に疫病菌 Race 0 を接種した結果は第 4 表に示すとおりである。

第 4 表に示すように、6-12 時間までは、罹病性品種の農林 1 号、男爵薯でも褐変度は高まるが、24 時間後の褐変度は逆に低くなった。

疫病菌 Race 0 に対し非親和性因子 R_1 をもつ種間雑種 96-56 では、農林 1 号 DNA フラクシオン処理による褐変細胞は増加し、接種 12 時間後に過敏型と罹病型の二つの病斑が混在して認められた。

考 察

ジャガイモカルスに疫病菌 Race 0、Race 1 接種

第4表 農林1号 DNA フラクシオンで処理したジャガイモカルス組織の褐変度

区 分	品 種	時間	6	9	12	24	48	72
接種区	農林1号		41.3	49.3	58.4	69.3	73.4	87.3
	男爵薯		36.9	42.1	53.0	58.7	64.1	78.1
	種間雑種 96-56		41.8	65.2	79.8	94.2	100.0	100.0
対照区	農林1号		20.3	36.1	51.0	73.1	84.8	93.4
	男爵薯		13.8	21.2	35.8	60.1	72.0	87.4
	種間雑種 96-56		40.2	54.7	67.3	85.2	90.3	96.0

観察細胞数 200

第2図 疫病菌を接種しないジャガイモカルスの褐変度

第3図 疫病菌 Race 0 を接種したジャガイモカルスの褐変度

区ともに、非親和性遺伝因子 R_4 を持つ種間雑種 SH-469 が、菌接種後もっとも短時間で褐変が起り、罹病性のものは褐変が遅かった。これはジャガイモ中肋表皮に疫病菌を接種したものと同様の結果であった(富山^{2,3}, 山本^{4,5})。これをみると、カルス細胞は、普通細胞にくらべ、形・大きさなど異なっているが、遺伝的な性質に変化はないものようであった。

第4図 疫病菌 Race 1 を接種したジャガイモカルスの褐変度

非親和性の感受体・病原体の組合せでは、褐変が早くあらわれ、過敏型の病斑を示した。親和性の感受体・病原体の組合せでは、褐変の出現は遅く、黄褐色罹病型の病斑を示した。しかし、罹病性品種 DNA フラクシオン処理をした種間雑種 SH-469 カルスでは疫病菌 Race 0 接種により罹病型・過敏型両型病斑の混在が認められたことは、筆者らの DNA フラクシオンのジャガイモ葉塗付実験の結果とも一致するものと考えられるが、この点については今後の検討を待ちたい。

カルス組織に接種したものでは、褐変が認められたが、振盪培養で遊離細胞となったものでは、接種 72 時間経過しても褐変は起こらなかった。このことは 10-15 個以上の細胞がないと抵抗反応が起こらないという富山⁸の実験や遊離細胞では病徴があらわれないという Ingram らの報告¹⁾と一致するものと考えられる。

摘 要

1. 2,4-D 2 ppm 添加 Murashige and Skoog 培地上で形成されたジャガイモカルスを観察した。

第 5 図 A 疫病菌接種後 12 時間でみられた核の褐変 (農林 1 号).
 B 疫病菌 Race 0 を農林 1 号カルスに接種して認められた罹病型病斑.
 C 疫病菌 Race 0 を種間雑種 96-56 カルスに接種して認められた過敏型病斑.
 約 300 倍

農林 1 号や男爵薯では fragile callus, 種間雑種 96-56 では fragile callus と compact callus, 種間雑種 SH-469 では compact callus が形成された。

2. 疫病菌 Race 0, Race 1 接種区とも, 農林 1 号, 男爵薯では, 9-12 時間で褐変がいちじるしく, 原形質流動も活発であった。

3. 種間雑種 96-56, SH-469 では疫病菌 Race 0, Race 1 接種区とも 6-9 時間で褐変がもっともいじるしく, 原形質流動も活発であった。

4. 非親和性感受体・病原体の組合せで過敏型, 親和性感受体・病原体の組合せで罹病型の病斑が認められた。

5. 振盪培養で得られた遊離細胞に疫病菌が侵入しても褐変が認められなかった。

6. 農林 1 号 DNA フラクシオンで処理した種間雑種 96-56 のカルスに, 疫病菌 Race 0 を接種したと

ころ 12 時間後に過敏型と罹病型の病斑が認められた。

引用文献

1. Ingram, D.S. and Robertson, N.F. (1965). J. Gen. Microbiol. 40: 431-437.
2. 富山宏平 (1954). 北海道農試彙報 67: 28-38.
3. Tomiyama, K., Takakuwa, M. and Takase, N. (1958). Phytopath. Zeitschr. 31: 237-250.
4. Yamamoto, M. (1957). Ann. Phytopath. Soc. Japan 22: 148-152.
5. 山本昌木 (1961). 島根農大植病研特報 1: 1-151.
6. 山本昌木・多智花俊裕 (1968). 第 1 回植物組織培養シンポジウム講演要旨: 19.