煙草立枯病菌の寄主體內侵入 及び移動に就て

黄 齊 望

(九大農學部植物病理學教室)
(昭和 12 年 5 月 20 日受領)

WANG GEE VONG:—The entrance and migration
of *Bacterium solanacearum* SMITH in tobacco plants

緒 言

煙草立枯病菌の寄主體內侵入現象に就ては SMITH (8) は蕃茄、馬鈴薯、煙草等に對し接種試験を行ひ之が傷性寄生菌なる事を證明し、HUNGER (4), HUTCHINSON (5) 及び BURRILL (3) 等の實驗觀察の結果も亦 SMITH に一致して居る。然し上田 (10) に據れば本菌は煙草に對し非傷性寄生菌にして且葉に於ては氣孔侵入をもなすと言ふ。而して中田 (6) の實驗結果も亦 SMITH と同じであるが、氏に據れば本病菌を牛乳中に培養すれば寄生力が強化し非傷性寄生をもなし得ると言ふ。最近 WOLF (11) は煙草の健全なる幼根に對する侵入の可能性を憶測して居る。

次に本菌の寄主體內移動に關しては、SMITH (8) は本菌が煙草の維管束に侵入し維管束を褐色に變色し細胞を破壊せしめ次で髓部の組織に及び病組織に細菌窩を形成する事を觀察した。HAAN (2) は本菌が細胞間隙中に在つては旺盛なる繁殖をなし、木質導管では繁殖之に次ぎ、韌皮部は侵害される事が少ない事を報告して居る。而して上田 (10) に據れば本菌は先づ主として木質部に棲息し之より一は髓部に移動し他は韌皮組織に入るが、紡錘細胞は抵抗性が有ると述べて居る。

著者は 1936—1937 年煙草の各部に對する本菌の侵入現象並に侵入後の寄主體內に於ける移動に關し研究する處があつたので此處に報告する次第である。

本研究は中田教授御指導の下に於いて行つたもので此處に深謝の意を表する

次第である。尙吉井助教授は有益なる助言を與へられ、瀧元清透氏は供試材料に就き御厚意を與へられた。尙寫眞撮影には河村榮吉氏を煩はし且氏は隨時種々の助力を與へられた。之等は共に著者の感謝するところである。

材料及び方法

本實驗に使用した *Bacterium solanacearum* は 1936 年瀧元氏が罹病煙草より分離せられたものである。接種用煙草は註記せざるものは何れも秦野種にして草丈 14--15cm の無病のものを用ひた。但し温度と寄主体内移動の關係及び花器接種試験には他の材料を使用した。之に就いては夫々本文中に記す通りである。温度試験の場合の他は接種は 25°C の恒温接種箱内で行つた。接種用の本菌を培養するに用ひた培養基は馬鈴薯寒天、葡萄糖加馬鈴薯煎汁及び牛乳で此等の調製法は瀧元 (9) の著書所載の方法に従つたものである。

觀察材料はフォルマリン、アルコール中で固定し洗滌脱水後常法によりパラフィンに埋藏し厚さ 5--12 μ の切片を製した。但し材料の大なる場合には ZIRKLE 氏法 (13) によりパラフィンに埋藏した。切片は FLEMMING の三重染色法に依つて染色した。尙其他の實驗方法に就ては本文中に記す事とする。

實 驗

I 莖に於ける本菌の侵入及び移動

(1) 莖の維管束の解剖 煙草立枯病菌の寄主体内移動を知らんと欲すれば先づ莖、特にその維管束の解剖をなす必要がある。之に關しては先に AVERY (1) の研究があり、又最近 WOLF (12) は葉の解剖を試みて居るが、之等は煙草の維管束が外部篩部並に内部篩部を有する事を報告して居る。

著者も亦煙草莖の横断面を作り内部構造を検したがその維管束の重要部分は外側より順次に述べれば次の様である。(1) 外部篩部は數群の多角形不規則なる細胞よりなる (第 1 圖 O)。(2) 形成層は 5--6 層の長方形細胞よりなる。(3) 導管部は細胞は多くは六角形を呈し大小不同である (第 1 圖 V)。(4) 内部篩部は不規則細胞よりなり束状をなす (第 1 圖 I)。即ち煙草維管束は複並立維管束を有する。

扱、本病は導管病の一なる故、病菌の移動は導管内を觀察する事が最も重要

第1圖 煙草莖の維管束横断面

O 外部 篩部
V 導管部
I 内部 篩部

である。著者は上述せる大小莖の縦断切片を作つたが常に未だ隔膜の消失しない螺旋紋及び階紋導管を見、又稀に孔紋導管をも見た。此等導管は均しく柔細胞があつて之を支持する。此等導管は微に木化を呈し且各導管の壁膜は相互に接觸する。莖の導管は葉柄を通り葉身に達し、下向するものは根端に入る。

(2) 病菌の侵入及び移動 長さ約 17 cm, 徑約 3mm の健全苗を選び、根部を剪去し蒸溜水を以て洗滌し、之を 2 組に分ち、第 1 組は 32°C にて培養せる馬鈴薯寒天斜面培養の本菌を 2 白金耳鈎取し、莖の表面に塗抹し火焰消毒の針を以て穿刺した。第 2 組は加傷せず單に病菌を莖の表面に塗抹した。之等は水

及び砂を盛つた鉢内に挿し濕氣を保持して接種箱内に放置し、第 1 組は 2 日後第 2 組は 6 日後接種部を含めて長さ 2cm に切り、縦断切片を作り觀察した。

其の結果に依れば、第 2 組では各組織の細胞は未だ何等の變化もなく即ち表皮組織は未だ毫末も破壊せられず、組織内に病菌を認めなかつた。反之、第 1 組は接種 2 日後の切片では接種部は穿刺の爲に皮層柔細胞は多く破壊せられ四形の孔を生じ、維管束も亦多少傷つき、導管内は細菌充滿し、染色後は導管紫黑色を呈する。

更に接種後幾時間を経て病菌は寄主體內を移動し始むるか又移動率は幾何であるかを知らんと欲し次の實驗を行つた。

健全苗を選び上述の方法に依り本菌を接種した。但し莖の全周に淺く穿刺し且縦断切片に於いて上昇或は下降の移動を數字的に測り得る様にし、15 分、4, 14, 24 時の各時間後接種部を剪取固定し、切片を作り觀察した。

其の結果によれば接種後 15 分のものでは傷口に菌體の存するを認めるが、未だ移動の趨向がない。即ち受傷細胞内にも亦細菌を認めない。4 時間後に至れば即ち病菌は傷口に在り繁殖稍旺盛で附近の受傷細胞内及び細胞間隙中に均しく病菌存在し、導管内にも又稀薄な連續せる細菌窩があり、莖の上方及び下方

に向ひ移動して居る。14—24 時間後に至れば受傷細胞及び附近の細胞間隙は均しく病菌充滿する (第 1 圖版の 3)。即ち粘塊 (Zoogloea) を形成し時には細胞破壊され細菌窩を形成する。油浸装置を以つて觀察すれば粘塊の細菌個體を或程度認める事が出来る。

病菌が髓部に侵入すれば細胞膜を破壊し細菌窩を形成し、又細胞内にも常に侵入せることが觀られた (第 2 圖)。此の場合導管の壁膜は常に破壊せられ、又其の局部は破碎せられ或は局部で切斷せられるために細菌は導管外に溢出し、

第 2 圖 煙草莖皮層の 1 細胞内に細菌繁殖し細胞破壊さる

第 3 圖 *Bacterium solanacearum* に依り導管膜破壊されたるもの、細菌窩を形成す

附近の柔細胞も亦之により破壊せられて細菌の充滿せる細菌窩を形成する (第 3 圖) (第 1 圖版の 5)。細菌が導管壁膜を溶解する段階には二あり。一は内より外に向つて破壊する場合、他は管外に附着せる病菌が細胞膜を外部より内部に向つて破壊する場合である。切片觀察の時此の二者は同頻度で現はれた。第 1 圖版の 6 の a は管内に充滿して居る細菌に依つて將に膜壁が内方から一部破壊され病菌が管外に溢出せんとするを示すものである。又導管壁外に細菌附着し管内に向ひ侵入せんとする様なものが見られた。既に受傷せる靱皮細胞も亦常に病菌が侵入する。但し無傷の同種細胞には侵入せるものを未だ見られなかつた。之は靱皮細胞が抵抗力に富む故であると考へる。

莖に接種後 24 時間を経過したものでは接種穿刺部の上部に有る葉柄の導管にも既に菌が侵入して居た。此の病菌は莖の導管から分れて移動し葉柄に至つたものである。此の葉柄内の細菌はやがては葉を侵すものと想はれる。莖内に於ける細菌の移動率は、前記各時間に固定した切片に就て、穿刺點から上下に導管内に細菌を認めた末端までの距離を測定し、毎時間平均値を算出する事によつて求められる。其の結果は第 1 表に示す通りである。

此の觀察の結果に依れば病菌は接種 4 時間後には既に導管内を平均 0.9558 mm 移動上昇し又 0.7673mm 移動下降して居る。毎時間移動率を見るに最低 0.1918mm, 最高 0.2692mm で、時間の経過と共に移動率の増大が見られる。

第 1 表 *Bact. solanacearum* の煙草莖内移動率

接種後 経過時間	測定莖数	導管内移動平均距離 (mm)		毎時間移動率 (mm)	
		上 昇	下 降	上 昇	下 降
15 分 間	6	0	0	0	0
4 時 間	6	0.9558	0.7673	0.2389	0.1918
14 時 間	4	3.1195	3.0642	0.2225	0.2189
24 時 間	6	6.4611	6.2070	0.2692	0.2586

尙上昇移動率は下降移動率よりも大である。即ち接種後 24 時間に於ける測定の結果では上昇移動率は毎時間 0.2692mm, 下降移動率は毎時間 0.2586mm であつた。

(3) 病菌の移動と温度との關係 直徑約 5mm の健全苗 (Blight yellow) を選り前實驗同様の方法に依り加傷接種を行ひ, 16, 20, 25, 30, 32, 34, 37°C の各温度の定温器中に放置し, 各區 6 株を供試し, 24 時間後長さ 2cm に剪り固定した。尙, 病菌の移動率は導管内の移動を以て標準とした。

此の實驗結果に依つて次の事實が明かとなつた。即ち 16°C では病菌は僅に受傷の柔細胞内に寥々として見られ尙受傷導管内にも僅に之を認めたが, 移動は痕跡であつた。20°C では病菌は莖の上下の方向に明かに移動し, 傷口附近の細胞間隙は細菌が充滿して居た。更に 32°C に至れば移動最も快速で, 此より温度上昇して 34°C に至れば移動率減少し, 37°C では著しく減少したが, 尙移動して居た。但し 37°C では 20°C に於けるよりも少ない。移動率測定の結果は第 2 表に示す通りである。即ち移動の最適温度は 32°C で其移動率は 20° 及び 37°C の場合の 2 倍以上である。

第 2 表 *Bact. solanacearum* の煙草莖内移動率と温度との關係

接種温度(°C)	測定莖数	導管内移動平均距離(mm)		平均移動率の指數	
		上 昇	下 降	上 昇	下 降
16	6	痕 跡	痕 跡	痕 跡	痕 跡
20	6	3.8583	1.8071	100	100
25	6	6.1337	4.7142	158.97	260.87
30	6	7.4021	5.8770	191.85	325.22
32	6	8.7344	7.3780	226.38	408.28
34	6	4.3867	3.1821	113.70	176.09
37	5	2.9542	0.6286	76.57	34.78

尙此の實驗結果でも上昇移動率は下降移動率よりも大であつた。第 4 圖は此

等の關係をグラフで示したものである。

第4圖 *Bact. solanacearum* の
煙草莖内移動率と温度との關係
——向上移動
……下降移動

II 本菌の花器侵入

(1) 花器の解剖 今花器の構造中主として病原菌の侵入に關係ある部分に就て見るに、煙草の雌蕊は2心皮から成り複雌蕊である。柱頭は橢圓形にして表面狗牙狀の乳頭細胞を有する。但し開花2, 3日後には原形を具へず、柱頭の中央は凹入して漏斗狀を呈し花柱は圓筒形を呈し、筒壁は5, 6層の長形細胞が密接して居る。此の壁中に螺旋紋導管があり、筒の中央は原形質に富む紡錘形の細胞即ち Prosenchymatous cells から成る。此の細胞は花柱全體を縦貫し時日を経過すれば漸次破壊するに至る。花柱中央の孔は増大して中

中央腔を形成する。開花2, 3日後には此の紡錘形細胞は破壊される。

(2) 病菌の侵入及び移動 煙草 (Blight yellow) の花の柱頭に馬鈴薯寒天培養の本菌を軽く塗抹し、之を次の2組とした。第1組は無傷の儘とし第2組は軽く穿刺した。之等は1, 3, 5 各日後固定し切片を作つた。其の結果に依れば第1組では1日後細菌は柱頭表面に盛に繁殖し漸次内部組織間に侵入して居るものがあつた。而して柱頭表面の細胞は破壊せられ (第5圖) 細胞内に充滿した細菌は柱頭内の紡錘形組織内に長形の細菌窩を形成して居る (第1圖版の1)。2日後には此の紡錘組織内に細菌侵入し大多數の細胞は其の膜が溶解されて居る。而して病菌は紡錘細胞の間隙内に侵入して居る (第6圖)。然し花柱壁の細

第5圖 *Bact. solanacearum* が煙草柱頭表面に繁殖し細胞内部に侵入せんとするもの

第6圖 花柱の紡錘細胞内の *Bact. solanacearum*

胞は未だ全く侵されて居ない。5 日後には子房細胞間隙内に病菌の存在を認め、小形の細菌窩も亦常に形成されて居る。第 2 組のものでは 2 日後柱頭細胞は多くは破壊され細胞膜は識別し難く原形を呈せず、組織は何れも細菌が充満して居り、5 日後には子房に侵入した (第 1 圖版の 2)。

牛乳培養の本菌を以て同様の接種をなしたが、其結果も亦上述の實驗結果と一致した。

III 本菌の葉に於ける侵入及び移動

煙草の健全な成葉に馬鈴薯寒天培養の本菌を指先で軽く塗抹し、25°C に保ち 5 日後固定し切片を製した。之を觀察した結果に依れば、氣孔中に細菌の侵入を認めず、葉肉細胞は原形を維持して居た。

次に鉢植煙草を接種箱内に置き早朝葉縁に溢出して居る水滴中に馬鈴薯寒天培養の本菌を混じり 5 日後固定した。此の材料を鏡檢した結果水孔中に侵入して居る細菌を認めなかつた。

葉の表面中肋上に馬鈴薯寒天培養の本菌を塗抹し穿刺した後 25°C の接種箱に納め 2 及び 4 日後之を固定した。之を鏡檢するに病菌は葉脈に沿ひ盛に繁殖し維管束の側の柔膜細胞を破壊して大型の細菌窩を形成し 4 日後には尙中肋の兩側に向ひ侵入移動の傾向が見られた (第 1 圖版の 4)。

IV 本菌の幼根に於ける侵入及び移動

長さ約 1—5cm の健全煙草苗を蒸留水中に挿入し 10 日間放置して新根の發生せるものを接種材料に用ひた。葡萄糖加馬鈴薯煎汁 48 時間培養の本菌を 9cc 取り之を蒸留水 300cc に加入し此の細菌浮游液に上記の煙草苗を挿入し、其の一部は根端を剪取り他は無傷の儘とし 1 及び 2 日後幼根を固定した。此の材料を觀察した處無傷の場合は細胞全く病變なく、ただ細菌が表皮上に附着して居るのが見られた、然るに加傷のものにあつては病菌が細胞内に充満し原初中心柱の細胞間隙内に侵入移動したものを認めた。但し稚幼な導管内には未だ細菌の存在を認めなかつた。細菌窩は原初中心柱及び原初皮層に見られた。

次に牛乳培養の本菌を用ひ同様の方法により無傷接種のみを行つた處接種 2 日後細胞は根冠に聚集して根冠細胞を破壊し、表皮外に附着せる細菌は表皮細胞膜を破壊し細菌は細胞内に侵入繁殖し之れより更に原初皮層及び原初中心柱に入れるを認めた。被害細胞は屢原形質消失し核も亦消失して居た。

考 察

以上述べた如く著者の實驗結果では煙草の根、莖、葉の各部に對して、馬鈴薯寒天培養の本菌は傷性寄生の性質を示し、自然の門戸なる水孔及び氣孔よりは侵入する事がない。之等は SMITH (8), HUNGER (4), HUTCHISON (5) 及び BURRILL (3) 等の實驗結果と一致するところである。而してこの事實が上田の結果と相反する理に就ては明かでないが、中田 (7) によれば上田の菌は *Bact. solanacearum* ではなく恐らく *Bac. aroideae* であると推定してゐる。又著者の病菌侵入の移動徑路及び病理解剖の所見は HUNGER (4), BRED A DE HAAN (2), SMITH (8), 上田 (10) の結果と一致しこの點では新知見はない。

而して莖の細胞間隙に存する細菌粘塊の移動は次の如き機構によるものと推察される。即ち粘塊の形が細胞間隙の形に従ひ異なることより推察するに、粘塊は半流動性なるべく、細菌の繁殖するに従ひ空間愈小となり、ために壓力を生じ粘塊は空間に向ひ前進するものであらう。

組織内の本菌移動率に就ては SMITH (8) の研究があり、その一例では氏は馬鈴薯の莖を用ひ接種 18 日後本菌は下向 15 吋の距離に達した事を觀察して居るが、詳細の研究はない。著者の煙草莖を用ひた結果では病菌移動率は比較的小で、下向移動率の方が上向の場合よりも小であつた。但し本實驗は根部を剪除せる莖を用ひてなされたるものなる故、維管束内に於ける菌の移動率は多少天然の場合と異なるところある可きも、その趨勢は本實驗によつても知り得るであらう。

溫度と病菌移動との關係を見るに、本實驗の範圍では 32°C に於て移動率最大である。而して本菌の發育適溫は著者の實驗では 32—34°C であつた。故に本菌移動の適溫は發育適溫の附近にあるものと認められる。

本菌の花器接種に就ては從來研究がなく、著者の實驗に依れば牛乳培養のみならず、之より寄生力の弱いと考へられる馬鈴薯寒天培養の本菌も柱頭に對して非傷性寄生性を示し子房を侵す事を觀察した。尙花柱壁の細菌が侵され難いのは、この部分に殆ど細胞間隙の存せざるによるものであらう。

摘 要

1. 馬鈴薯寒天或は葡萄糖加馬鈴薯煎汁培養の煙草立枯病菌(*Bacterium solanacearum* SMITH) は煙草の根、莖、葉の各部に對して傷性寄生の性質を示し、柱頭上では非傷性寄生性を示した。又本菌の牛乳培養は幼根及び柱頭に對して非傷性寄生性を示した。
2. 本菌は煙草の葉及び莖に侵入後は、先づ導管を侵して導管内を移動し、次で莖にありては皮層髓部及び其等の細胞間隙内に侵入する。
3. 煙草の幼莖に本菌を接種すれば、 25°C にて4時間後には莖の上方及び下方に移動を開始し、24時間内の測定の結果では上方に毎時間平均 0.2692mm 、下方に 0.2586mm の移動を示した。それより溫度上昇するに隨ひ移動率増大し、 32°C に於ては最大に達し、 37°C では 20°C の場合よりも小であつた。

引 用 文 獻

1. AVERY, G. S. : Structure and germination of tobacco seed and the development anatomy of the seedling plant, American Jour. of Bot. Vol. XX, p. 308, 1933.
2. BREDA DE HAAN : Dutch East Indian Journal Teysmannia, Ref. SMITH E. F. : Bacteria in relation to plant diseases, Vol. III, p. 221, 1914.
3. BURRILL, T. J. : An additional note on the rot of potatoes, Proc. Soc. Prom. Agric. Soc. Vol. for 1891—1892. Ref. SMITH, E. F. : Bacteria in relation to plant diseases, Vol. III, p. 181, 1914.
4. HUNGER, F. W. T. : Ref. SMITH, E. F. : Bacteria in relation to plant diseases, Vol. III, p. 224, 1914.
5. HUTCHINSON, C. M. : Rangpur tobacco wilt, Memoirs of the Dept. of Agric. in India, Bacteriological series, Vol. I, no. 2, 1913.
6. 中田覺五郎 : 煙草の立枯病原菌 (*Bacterium solanacearum* SMITH) の生活力並に寄生力に就て, 日本植物病理學會報第 I 卷第 6 號, 53 頁, 1927.
7. ———— : 煙草立枯病菌特に病原菌に就て, 農學會報, 第 294 號, 210 頁, 1927.
8. SMITH, E. F. : Bacteria in relation to plant diseases, Vol. III, p. 179, 183, 227, 229, 1914.
9. 瀧元清透 : 微生物及植物病理學實驗法, 307 頁, 1930.
10. 上田榮次郎 : 煙草立枯病菌に關する研究報告, 農事試驗場報告, 第 33 號, 115, 117 頁, 1905.
11. WOLF, F. A. : Tobacco diseases and decays, p. 204, 1935.
12. ———— : Flue-cured tobacco : A comparative study of structural responses by topping and suckering, Bull. of the Torrey Bot. Club, Vol.

第 I 圖 版 説 明

1. *Bact. solanacearum* 接種 2 日後の煙草柱頭の縦断面, a 細菌が柔細胞を侵し細胞破壊せられたもの, b 細菌窩。
2. *Bact. solanacearum* 柱頭接種 5 日後の煙草子房の横断面, a 細胞間隙が細菌にて充滿せるもの。
3. *Bact. solanacearum* 接種 2 日後の煙草莖の皮層柔細胞縦断面, a 細胞間隙内の粘塊。
4. *Bact. solanacearum* 接種 4 日後の煙草葉の横断面, a 細菌の侵入せる維管束。
5. *Bact. solanacearum* 接種 5 日後の煙草莖の横断面, a 螺旋紋導管, b 螺旋紋導管の壁膜破壊せられ細菌窩を形成せんとするもの。
6. 同上, 但し接種 2 日後の縦横切片, a 細菌は螺旋紋導管中に繁殖し下の螺旋紋導管に侵入せんとするもの, b 螺旋紋導管膜を溶解し細菌窩を形成せるもの。

XLIV, p. 117, 1937.

13. ZIRKLE, C. : The use of N-butyl alcohol in dehydrating woody tissues for paraffin section, Science. Vol. XXI, p. 103, 1930.

Résumé

This paper deals with the entrance and migration of *Bacterium solanacearum* SMITH in tobacco plants.

The inoculation on stems, roots, and leaves made with the organism cultured on potato agar or potato decoction showed that infection took place only through the wound and never occurred in the stomata or water pores except in the case of stigma where infection occurred without wound. The unwound roots, however, have been infected by the bacteria cultured in milk which makes them more virulent than potato agar or potato decoction.

In young stems and leaves the bacteria at first occupied the xylem tubes, entering through the wound and then grew outwards from these tubes to the surrounding tissues, which were found to be badly disintegrated. The bacterial cavities were often observed within the pith and cortex of the stems.

The distance of the downward movement of the bacteria in the xylem tubes is greater than that of upward movement. After 24 hours from inoculation on the young stems kept at 25°C, the bacteria moved upwards and downwards at the rates of 0.2586mm and 0.2692 mm an hour respectively.

The rate of migration was the most rapid at 32°C and slower at 37°C than at 20°C, the maximum and minimum rates for migration being considered at 15°C and 40°C.