蓮根腐敗病に於ける抵抗性

下村 徹*・山口 昭*・瓜谷郁三**・平井篤造*

Toru SHIMOMURA, Akira YAMAGUCHI, Ikuzo URITANI and Tokuzo HIRAI:

Resistance of lotus to the rhizome rot caused by *Fusarium bulbigenum*

Wr. var. *nelumbicolum* N. et W.

1. 緒 言

愛知県は全国屈指の蓮根生産県であるが、その栽培面積の 80% 以上が腐敗病罹病田で、同病害による減収は 90% 以上に及ぶと言われる。本病は「古く堀」によりその病原細菌が報告されたが、西門・渡辺^{10,11)}は *Fusarium bulbigenum* var. *nelumbicolum* が本病の第一次病源であるとし、菌の性状及び培養に関して報告した。又西沢^{12,13)}は *Fusarium* sp. の他に *Pythium* sp. もかなりの病原性を持つとし、本病の伝染経路及び防除に就て報告した。愛知県でも昭和 28 年から同病対策委員会が設置され、本病の防除に関し多方面から調査研究が進展している¹⁾。

著者らは本病の防除が極めて困難な所から、抵抗性品種の導入が必要なることを痛感し、その基礎資料を得るため本病抵抗性機作の解明を志した。本報では罹病地下茎の中毒組織に於けるフェノール系物質の集積と代謝異常、並にこれらと抵抗性との相互関連に就いて述べる。なお、供試 *Fusarium* 菌は愛知農試玉野分場から分譲されたもの (24 F-1) である。

起稿に当り実験上の便宜を与えられた、愛知県農業改良課の新庄・刈谷・鈴木の各技師並に玉野分場長中沢氏に、それぞれ深甚の謝意を表する。

2. フェノール系物質の分離

抵抗性品種 (シナ) と罹病性品種 (ウス) を用い、その地下茎を輪切りとして切断面に菌の孢子懸濁液を塗抹して接種した処、次の事実が見られた。即ち前者では褐変部の層は薄く、色は茶褐色で、その部で菌の伸長が止められているようであるが、接種面には白色の気中菌糸が旺盛である。褐変部の組織は後に軟化崩壊する。これに反して後者では褐変部は厚く色は黒褐色で、接種面にあまり気中菌糸を作らない。即ち抵抗性

品種では、中毒部に何等か菌の発育を抑制する物質が集積されるようである。そこでフェノール系物質を探索する目的でペーパークロマトによる分離を試みた。

(1) 方法 蓮根地下茎を厚さ 3 cm に輪切りとし、菌を接種後、腰高ベトリ皿に入れ、25°C で 3 日保ち、接種表層の褐変部とその下層約 0.5 cm の中毒部を得た。健全部は無接種の蓮根から得た。各部は皮を除き、湿重 10~15 g の組織を 3 倍量のエタノールで磨碎し、汙過後汙液を減圧濃縮、その一定量をペーパークロマトにかけた。展開剤はブタノール・醋酸・水 (4:1:5) の混液で、検出には第 3 表の試薬を用いた。又展開部をアセトンで抽出し、スペクトルフォトメーターで紫外部の吸収を調べた。

(2) 抵抗・罹病両品種の比較 褐変・中毒部を合わせて試料とし展開すると第 1 図のようである。その Rf 値及び prussian 青による呈色度を比較すると第 1 表を得る。即ち汙紙上に 5~6 の物質が分離されたが III~V は両品種間に差がなく、I・II ではややシナ>ウスであつた。

(3) 中毒部と健全部の比較 シナ種を用いて中毒部と健全部からフェノール系物質の分離を試みた。結果は第 2 表の如く、健全内部は中毒部に比して濃度がかなり低かつたが、皮部 (地下茎の表皮約 2 mm、やや

Fig 1. Phenolic compounds isolated on filter paper. I to V show the Rf values in table 1. R: resistant variety (Shina), S: susceptible variety (Usu)

* 名古屋大学農学部植物病理学教室

** 同生化学教室

Table 1. Phenolic compounds isolated by use of paper chromatography.

The rhizome tissue infected with *Fusarium*, together with its adjacent tissue, was macerated with ethanol using resistant or susceptible lotus varieties. Butanol acetic acid-water (4:1:5) as a developing solvent and sprayed with prussian blue reagent.

Rf values	Color intensity	
	resistant var. (Shina)	susceptible var. (Usu)
V	0.65-0.66	+
IV	0.54-0.58	±
III	0.40-0.45	###
II	0.25-0.30 0.17-0.22	++
I	0.05-0.07	##

Table 2. Phenolic compounds isolated by use of paper chromatography.

Using resistant variety (Shina), the healthy rhizome tissues inner or epidermal and the tissue adjacent to infection were tested. The procedure was the same as shown in table 1.

	Color intensity			
	tissue near the infection	Ditto. (boiled)	healthy inner tissue	healthy epidermal tissue
V*	+	+	—~±	+
IV	±	±	—(?)	—(?)
III	###	++	++	##~###
II	++	+~++	+	##
I	##	++~##	+~++	##

* refer to Rf values in table 1.

Table 3. Reaction of the isolated phenolic compounds to various reagents

	Reacted to or stained with							
	prussian blue	FeCl ₃	ammonia	Liebermann's nitroso		Ehrlich's diazo	AgNO ₃	NaOH
				acid	alkali			
V*	+	—	light brown	yellowish brown	light reddish orange	yellow	light brown	—
IV	±	—	do.	do.	do.	?	do.	—
III	###	++ (dark green)	yellow	yellow to yellowish brown	reddish orange	yellow	dark brown	orange to yellow
II	++	++ (dark violet)	brown	yellowish brown	do.	yellow ?	light brown	? —
I	##	++ (do.)	do.	do.	do.	yellow	do.	light pink?

* refer to table 1

外傷があつた)では中毒部と同様又はそれ以上に呈色する。又中毒部抽出液を煮沸するも、呈色部の数には変化なく、一方濃度はⅢがやや減少した。

(4) 分離したフェノール系物質の呈色反応²¹⁾ 第3表のようで、FeCl₃で暗緑となるⅢは diphenol, 暗紫色のⅠ・Ⅱは triphenol, はつきり反応を示さぬⅣ・Ⅴは monophenol 又は OH 基が隣り合わせの位置にないものと思われる。Ⅲはその他の反応及び後述の紫外外部吸収から、ほぼクロロゲン酸と想像される。

(5) 分離物質の紫外外部吸収 第2図に示す通り、濃度はⅢ>Ⅱ>Ⅰ>Ⅴの順で、prussian 青の呈色と一致する。以上4物質の紫外外部吸収は何れも似た曲線で、330mμ附近に最高吸収がある。

3. 中毒部物質の胞子発芽抑制

組織に湿重の3倍量の水を加えて磨碎し、汙液一定量に胞子懸濁液一定量を加え、これを湿室ベトリ

O.D.

Fig. 2. Ultraviolet absorption spectrum of the isolated phenolic compounds.

I to V show the Rf values in table 1. A sharp band at about 330 mμ was found in all compounds tested. Solvent acetone.

皿のスライド上に点滴し、25°C、5 時間後検鏡した、

(1) 健全組織の汁液 シナ及びウスの健全組織の汁液を用いて、菌の発芽試験を行つた結果は第4表の通りで、これらの中には孢子発芽抑制作用はない。

又皮部には前述のようにフェノール系物質が多いのでその汁液を用いて発芽を確かめたが、第5表のように健全皮部にも抑制作用はなかつた。

Table 4. Germination of *Fusarium* spores in the healthy rhizome juice.

Plots	Tap water	Healthy juices of the varieties			
		resistant (Shina)		susceptible (Usu)	
		not treated	boiled	not treated	boiled
1	65.6*	60.4	70.3	65.8	75.4
2	75.7	49.3	69.7	58.0	68.9
3	51.1	67.6	70.4	67.8	60.9
average	64.1	59.1	70.1	63.9	68.3

* Figures show the percentage of germination.

Table 5. Germination of *Fusarium* spores in the juice of healthy epidermal tissue of lotus rhizome.

Plots	Tap water	Healthy juices of the varieties			
		resistant (Shina)		susceptible (Usu)	
		epidermal	inner	epidermal	inner
1	93.2*	82.6	80.5	78.1	86.8
2	92.6	87.2	82.6	86.8	88.9
3	92.5	83.7	83.4	86.8	87.7
average	92.8	84.5	82.2	83.9	87.8

* Figures show the percentage of germination.

(2) 中毒部組織の汁液 実験の1例を挙げると第6表の通りで、シナの中毒部は強い発芽抑制作用を持っていた。しかしウスにもこの作用があり、且ツシ

ナ・ウス両品種間に第6表のような判然とした有意差が見出されない場合もあつた。又両者共煮沸すると抑制作用は失われる。

Table 6. Germination of *Fusarium* spores in juice of the tissue near the infection in lotus rhizome.

Plots	Tap water	Juices of the varieties			
		resistant (Shina)		susceptible (Usu)	
		not treated	boiled	not treated	boiled
1	86.2*	25.6	85.3	91.2	87.8
2	85.5	42.4	80.4	81.0	93.0
3	85.5	46.3	78.3	87.0	78.0
average	85.8	38.1	81.3	86.4	86.2

* Figures show the percentage of germination.

(3) 抑制作用の品種間差異 以上の実験で抵抗性品種では中毒部に菌の発芽抑制作用が強いことが判明したので、次に種々な品種を用いて実験した。結果

は第7表に示すが、何れの品種も中毒部に発芽抑制作用があつた。しかし抑制作用と圃場抵抗性の観察結果との関係は更に検討を要する。

Table 7. Varietal difference of the inhibition of juice prepared from lotus rhizome to spore germination.

Juices prepared from	Lotus varieties				
	Shina (Edogawa)	Shina (Shizuoka)	Shina × Aka	Tateishi No. 1	Tateishi No. 2
	observed under field to be				
	highly resistant	resistant	comparatively susceptible	resistant	comparatively resistant
Healthy tissue	34.4*	18.5	47.2	10.3	29.5
Tissue near the infection	5.4	3.3	30.6	5.2	2.5

* Figures show the percentage of germination.

4. 中毒部組織の代謝異常

中毒部には菌の侵害に伴つてフェノール系物質が集積することは前述したが、これが如何なる代謝異常により生成され、又それと関連するかを知る為、先ず中毒部組織の磷酸各分劃の変動を調べた。

(1) 磷酸各分劃の定量

最初にシナ及びウス両品種の無機及び酸可溶の有機磷の変動を調べた。即ち組織に湿重の5倍量の水を加えて磨碎し、遠沈上清に就き Schneider⁽⁴⁾の方法で分劃したものを、Allen⁽⁴⁾法で光電管比色計を用いて定量し

た。結果は第8表及び第3図に示される。

次にシナ種の各態磷の変動を調べた。結果は第9表

Fig. 3. Changes in the amounts of inorganic and acid-soluble organic phosphorus compounds in the healthy and affected rhizome tissues of lotus varieties.

Pa.s.: acid-soluble total P, P_i : inorganic P, P_o : organic P

及び第4図である。なおこの場合はホモジナイズ液を

遠沈せず、全液に就て Schneider の分劃法を用いた。

Table 8. The amounts of inorganic and acid-soluble organic phosphorus compounds in the healthy and affected rhizome tissues of lotus varieties. Homogenized juice was centrifuged at 3,000 rpm and the supernatant was fractionated by the method of Schneider. P was determined by Allen's method using electrophotometer.

Phosphorus compounds	Tissues analyzed	48 hrs after infection		Ditto. 72 hrs.		Ditto. 96 hrs.	
		resistant variety	suscept. variety	resistant variety	suscept. variety	resistant variety	suscept. variety
Acid soluble P	healthy*	77.4**	91.3	87.4	95.3	71.5	99.3
	affected	76.5	80.4	76.5	91.3	69.5	85.4
Organic P	healthy	24.8	13.9	33.8	14.9	16.9	14.9
	affected	28.3	6.0	34.8	12.9	22.3	13.9
Inorganic P	healthy	52.6	77.4	53.6	80.4	54.6	84.4
	affected	48.2	74.5	41.7	78.4	47.2	71.5

* affected means the tissue adjacent to the infection and healthy means that not inoculated, but incubated under the same conditions as the affected tissue.

** Figures show γ of phosphorus in juice 1 ml.

Table 9. The amounts of various types of phosphorus compounds in the healthy and affected rhizome tissues of resistant lotus variety. The procedure was the same as in table 8, except the homogenized juice (not centrifuging) was fractionated.

Types of phosphorus compounds	24 hrs after infection		Ditto. 48 hrs.		Ditto. 72 hrs.	
	healthy tissue	affected**	healthy tissue	affected	healthy tissue	affected
Total-P	79.4*	80.9	79.7	71.8	75.3	77.1
Inorganic-P	41.8	41.1	38.0	31.7	48.9	34.9
Organic-P	26.9	29.8	33.3	31.8	18.4	34.2
Lipid-P	4.1	4.0	4.7	4.1	4.7	4.3
Nucleic acid-P	4.9	4.4	2.8	3.0	2.5	2.7
Protein-P	1.9	1.7	0.8	1.3	0.7	1.0

* ** Note in table 8.

Fig. 4 Changes in the amounts of various types of phosphorus compounds in the healthy and affected rhizome tissues of resistant lotus variety.

P_t: total P, P_i: Inorganic P, P_o: acid-soluble organic P

以上を通覧すると全磷酸は健全・中毒兩組織間に差がないが、無機磷は健全部が多く、反対に酸可溶の有機磷は特に抵抗性品種で中毒部に多い。核酸その他の磷については兩組織間に一定の関係がないようであるが、更に追試を要する。

(2) 脱水素酵素 地下茎組織を 0.1 M 磷酸バッファ (pH 7.4) ですりつぶし、遠沈上清を粗酵素液とした。これに 0.1% TTC 水溶液を加え、ツンベルグ管に入れ排気後 27°C に保ち、一定時間後取出して還元されたフォルマザンを比色定量した。

先ず数種の品種を用いて健全部と中毒部で比較するに、顕著な差は見出し得なかつた。次にシナ・ウス兩品種で接種に伴う中毒部の酵素作用を測定した。結果は第 10 表の如く、兩品種共接種 2 日目に上昇し以後

Table 10 Dehydrogenase activity in the affected rhizome tissues of lotus varieties.

Juice prepared from the tissue near the infection was mixed with phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) and 0.1% TTC solution and placed in Thunberg's tube. Readings were taken after 4 hours incubating at 27°C.

Tissues infected for	Optical density in electrophotometer (filter S ₄₈)	
	resistant var. (Shina)	susceptible var. (Usu)
1 days	0.102	0.077
2	0.110	0.085
3	0.072	0.047
4	0.089	0.064

はやや低下する。且つシナはウスより常に活性が大であつた。しかし健全組織で見てもシナ>ウスの結果が得られる。

(3) 呼吸量 被害部と更に隣接健全部 (0.5 mm) を除き、それより内部から厚さ 0.5 mm の切片を 5 個取つた。このような薄片 (径 6.0 mm) を 20 個と 0.03 M 磷酸バッファ (pH 5.5) 2.0 ml を用い、ワールブルグ呼吸計で 30°C で酸素吸収を測定した。結果は第 11 表及び第 5 図である。即ち被害部隣接部では呼吸の増加が見られる。これはシナ・ウス兩品種共にあるが、前者の増加率がやや高い。又感染 72 時間迄は、時間の増加と共に呼吸の増加するのが見られた。

Table 11 Increased rate of respiration in lotus rhizome infected with *Fusarium*.

Each vessel of the manometric apparatus contained 20 slices of rhizome tissue healthy or affected (diam. 6.0 mm, thickness 0.5 mm) and 2.0 ml of 0.03 M phosphate buffer (pH 5.5).

Tissues selected	O ₂ uptake after 90 min. at 30°C (μl)	
	resistant var. (Shina)	susceptible var. (Usu)
Sound	20-50	55
Healthy, incubated for 24 hrs.	50	—
Do. 48	60	70
Infected for 24 hrs	70 (40%)*	—
Do. 48	110 (84)	112 (60%)
Do. 72	115 (92)	120 (72)

* Parentheses show the percentage of increased.

Fig. 5 Increased rate of respiration in the affected rhizome slices of resistant variety of lotus.

(4) フォスファターゼ フォスファターゼは体内磷酸の変換に大きな役割をするので、感染に伴うその変化をシナ地下茎を用いて調べた。即ち組織に4倍量の水を加えてホモジナイズし、遠沈上清に0.6飽和の硫酸を加えて沈澱を取り、これを水にとかして粗酵素液とした。基質は β -グリセロ磷酸及びパイロ磷酸とし、酸性及びアルカリ性を測定した。結果は第12表の通りで、中毒部の活性を健全部に対する比率で図示すると第6図である。即ち酸性及びアルカリ性パイロフォスファターゼは、接種60時間迄は中毒部で増加する傾向が見られた。

Table 12 Phosphatase activities of rhizome tissue in resistant variety of lotus.

Homogenized juice was centrifuged at 3,000 rpm and ammonium sulphate was added to its supernatant up to 0.6 saturated. The precipitate dissolving in water, together with substrate and buffer solution were incubated at 25°C for 2 hours. Liberated P was determined by Allen's method.

P-ases	Tissues tested	P mg per tissue 1 g		
		infected for 36 hrs.	ditto. 60 hrs.	ditto. 108 hrs.
Acid glycerophosphatase	healthy*	5.00	12.6	15.4
	affected	5.36	10.8	10.0
Acid pyrophosphatase	healthy	71.7	93.4	88.2
	affected	89.3	136.2	88.4
Alkali pyrophosphatase	healthy	24.4	111.0	98.4
	affected	38.9	119.4	99.4

* Healthy means apparently healthy tissue apart from the inoculated surface, and affected means tissue adjacent to the infection.

Fig. 6 Phosphatase activities of affected rhizome tissue in resistant variety of lotus compared with those of healthy tissue (healthy 100 %).

Ac. PP-ase: acid pyrophosphatase,
Al. PP-ase: alkali pyrophosphatase,
Ac. GP-ase: acid glycerophosphatase

4. 論議及び結論

抵抗性品種中にフェノール系物質が含まれるとする報告は多いが^{8,9,24}、これが直接菌に阻害的に働いて抵抗性の原因になるという考え方に対して、日本の学者の多くは批判的である^{5,18,19,20}。本病に於ても所謂中毒部から5種のフェノール系物質が検出され、それらは健全部に少なかったが、罹病性品種でも中毒部には見られ、抵抗・罹病両品種の中毒部に於ける差が量的に極めて僅かである。中毒部汁液は又菌の発芽を抑制

することがわかったが、類似の現象は他の病害でも認められ¹⁶、又その物質は熱によつて作用を失うとも述べられている²³。われわれの取扱つた中毒部汁液の発芽抑制作用は同様に易熱性であつたが、この作用は健全部汁液でも多少認められる場合があり、又抵抗・罹病両品種間に抑制作用の有意差が存することもあるが、実験によつては全然差のない場合もあつた。これは本物質が極めて分解し易く、分離操作中に不活性化する場合があると思われるが、フェノール系物質の耐熱性と考え合せると、抑制作用の実体をクロマトによつて分離された物質に帰することはできない。何れにしても抵抗性の品種間差異はフェノール物質の多少からのみ説明されるとは考え難い。

以上の前提から抵抗場面で起こる代謝変調に研究が向けられるべきであるが、本報告では菌侵害隣接部に於ける呼吸増加、脱水素酵素及びフォスファターゼなどの酵素活性の上昇、並に磷酸特に酸可溶性有機磷酸の多少の増加を証明し得た。罹病組織での呼吸増加は既に多数報告され^{3,15,22}、又、脱水素酵素の上昇も述べられている¹⁵。これらの増加が正常な代謝に結ばれているならば、phosphorylationの促進、即ち無機磷酸の減少と有機磷酸の増加が見られ²、従つてフォスファターゼの活性増加も存する筈であるが、それらの証明は不十分ながら本報で与えられた。勿論これらは更に確認されるべきであるが、抵抗性品種の中毒部でこの

ような各種代謝の高揚が見られることは、該部に於ける呼吸増加の少く共一部が、有効に又合成的に消費されているのを示すものであろう^{2,6,17}。問題は菌の具体的な発育阻害が、このような代謝異常のどこに求められるか、又果して代謝異常の中に存するかであるが、この点は改めて検討する予定である。

(1955年6月27日受理)

引用文献

- 1) 愛知県農業改良課：蓮根腐敗病対策中間報告。(1954).
- 2) 赤沢堯・瓜谷郁三：農化，29：381。(1955).
- 3) Allen, P. J.: *Phytopath.*, 43: 221. (1950).
- 4) Allen, R. J. L.: *Biochem. J.*, 34: 858. (1940).
- 5) 土居養二・鈴木直治：日植病報，18: 76. (1953).
- 6) 平井篤造：植物の病害抵抗性機作に関する研究（未発表）。
- 7) 堀正太郎：大日本農會報，319, 322. (1907).
- 8) Johnson, G.: *Science*, 115: 627. (1952).
- 9) Müller, K. D. and Behr, L.: *Nature*, 163:

498. (1949).
- 10) 西門義一・渡辺清志：農学研究，40: 115. (1952).
- 11) ————：同誌，42: 49. (1954).
- 12) 西沢正洋：九州農試彙，2: 131. (1954).
- 13) ————：植物防疫，8: 248. (1954).
- 14) Schneider, W. C.: *J. B. C.*, 161: 293. (1945).
- 15) 鈴木直治：栃内・福土記念論集：227. (1955).
- 16) 富山宏平・赤井純・鷲尾徹：北海道農試彙，63: 1. (1952).
- 17) ————・高桑亮その他：昭30年日植病大会講演。
- 18) 豊田栄・土居養二・後藤和夫：日植病報，18: 162. (1954).
- 19) 瓜谷郁三・村松敬一郎：農化，26: 289. (1954).
- 20) ————：同誌，27: 57. (1953).
- 21) ————：同誌，27: 165. (1953).
- 22) ————・滝田智久：同誌，27: 168. (1953).
- 23) ————・赤沢堯その他：昭30年日植病大会講演。
- 24) Walker, J. C. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 15: 845. (1929).

Summary

Five phenolic compounds were isolated using paper chromatography from the tissue affected with rhizome rot fungus of lotus, *Fusarium bulbigenum* var. *nelumbicolum* (table 1 and figure 1). The compounds were found to exist as much in the resistant variety (Shina) as in the susceptible (Usu), except two of them existed comparatively less in the latter variety. Healthy inner tissue of rhizome contains less of such compounds, whereas healthy epidermal tissue contains the same amount as affected tissue (table 2). One of the compounds was identified as chlorogenic acid from its ultraviolet absorption and by use of various reagents (table 3 and figure 2).

Juice prepared from the tissue near the infection showed a inhibitive effect against spore germination of the causal fungus, although when boiled they lost the ability (table 6). Juice from the healthy tissues both inner or epidermal had little effect (tables 4 and 5).

Abnormal metabolism in the tissue near the infection in resistant variety were also investigated. The results were as follows:

1) The amount of inorganic phosphorus compounds was less in the tissue just beyond the infection than in the healthy, and that of acid-

soluble organic phosphorus compounds was much in the former, especially in resistant variety. Concerning the amounts of nucleic acid, lipid, and protein phosphorus compounds, no determinative results were obtained (tables 8 and 9, figures 3 and 4).

2) Dehydrogenase activity in the resistant variety was somewhat higher than in the susceptible and it was raised two days after infected (table 10).

3) More increased rate of respiration was observed in the tissue near the infection than in the healthy tissue, especially in resistant variety (table 11 and figure 5).

4) Phosphatase activities showed an increase from 36 to 60 hours after infection in resistant variety (table 12 and figure 6).

The results just outlined would suggest that the phenolic compounds found in the tissue near the infection have no closer correlation with a inhibitive action of resistant variety against the causal fungus. Rather than this, numerous efforts must be paid in future to confirm the abnormal metabolism between host-parasite interaction, only in which the basic mechanism of resistance in plants may be sought.