西瓜蔓割病の病理化学的研究

(第1報) 西瓜蔓割病菌の分泌する毒素 Phytonivein に就て*

広 江 勇**・西 村 正 陽**

Isamu HIROE and Syoyo NISHIMURA: Pathochemical studies on watermelon wilt.

Part 1. On the wilt toxin, phytonivein produced by the causal fungus.

I. 緒 言

萎凋性植物疾病の萎凋機序に関する研究は過去約30年間に亘り多数の研究が行われて来たが、未だ定説を見るに至らない。いま其の諸説を大別すれば、侵入菌による導管閉塞に主因を置くもの、侵入菌の代謝する萎凋毒素或は酵素類に主因を求めるもの及びそれらの中間説等であろう。その内、代謝物質説に就ては、かつて Hutchinson¹¹⁾, White²¹⁾ 或は Rosen¹⁷⁾ が病原菌培養濾液中に寄主植物を萎凋させる物質の存在を確認して以来多数の報告がなされた^{3,5,7-10,14-16,20,24,26)}。それ等の内近年に至り、トマト萎凋病菌に於ては *Lycomarasmin*¹⁴⁻¹⁶⁾, *Fusarin* 酸^{5,8)}, *Vasinfuscarin*⁷⁾, *Polygalacturonase* 及び *Pectinmethylesterase*^{9,24)} 等, *Ceratostomella Ulmi* の毒素²⁶⁾, 更に亦 *Helminthosporium victoriae* からの *Victorin*²⁰⁾ 等の毒素が分離確認されている。

本報告に於ける西瓜蔓割病菌に就いては、吉井²⁵⁾, 村田及び大原¹²⁾等が該菌培養濾液中に萎凋起因物質の存在を報告した外見るべきものがない。そこで筆者等は、其の物質が如何なる物質であるか、亦 Dimond 氏等³⁾の指摘した *vivo-toxin* であるかどうか等の検討の為に本実験を画てた。本研究の一部は昭和 29 年度日本植物病理学会秋季関西西部会に於て講演した。

II. 実験材料及び方法

供試西瓜蔓割病菌 *Fusarium bulbigenum* var. *niveum* (*F. oxysporum* f. *niveum*) は、鳥取市近郊の被害株から分離したもの、長尾研究所及び武田醗酵研究所保存のもの等の 3 系統であるが、主として鳥取の系統を用いた。培養液は滲透圧或は培地組成成分の関係から合成培養基の Richards 氏液を用いたが、毒素分離の目的の時には多量培養用その他の目的の為に蔗糖

加用馬鈴薯煎汁液を用いた。なお西瓜種子は西瓜の専門家神田武氏に分譲を願つたもので数系統を供試した。

III. 実験結果

A) 培養濾液中の萎凋毒素の確認試験

a) 稀釈試験 供試培養濾液は Richards 氏液体培地に 28°C 25 日間培養したもので、この濾液を原液とし、並にその 2, 4, 8, 16 及び 32 倍に稀釈し、それらに第1表に示す様な西瓜品種の cut stem を挿し 48 時間後における萎凋の程度を観察した。

第1表 培養濾液に対する西瓜品種間抵抗性差異
Table 1. Toxicity of filtrate to watermelon varieties

Watermelon variety	Dilution ratio					
	0	2	4	8	16	32
Colocynth	T	T	T	T	T	T
Colorado preserving citron	T	T	T	T	T	T
Less burg wilt resistant	W	W	T	T	T	T
Sin-Yamato No. 2	W	W	W	W	T	T
Yamato cream No. 2	W	W	W	T	T	T
Yamato No. 4	W	W	W	W	T	T
Otome	W	W	W	W	W	W

Note: T=Turgid, W=Wilt

上表の西瓜品種の配列は従来抵抗性と云われている順に上から並べたものであるが、Colocynth や Colorado preserving citron の cut stem は全く萎凋が認められず、反対に罹病性とされている乙女の場合は非常に弱いことが認められた。即ち従来云われている本病に対する西瓜品種間抵抗性差異と培養濾液中での萎凋程度との間には略々相関関係があることが推定される。

b) 耐熱試験 この実験には濾液に対して中程度の反応を示す新大和 2 号を用いた。濾液を 100°C—10 分間加熱後これを第1表同様各稀釈シリーズ液に挿入し検した処、8 倍稀釈まで萎凋が認められ (第2表 [B])、第2表 [A] と同一稀釈率であることから推

* 農作物病害の病理化学的研究 (邦文篇) 第II報

** 鳥取大学農学部植物病理学研究室

して、萎凋物質はすべて耐熱性であると推定された。

c) 揮発試験 次にこの物質は揮発性か否かを知る為に、汙液を蒸溜し、溜出液を第1及び第2分溜部分に分け検したがどちらにも毒性なく、一方蒸溜残渣を蒸溜前の原液濃度、2, 4, 8 及び 16 倍と稀釈した処、第2表 [C] の様に R0 及び R2 即ち原液2倍稀釈液迄有効であつた（本来は R8 まで稀釈可能と思われたが、長時間の加熱の為幾分不活性化したと解釈される）。この結果不揮発性物質と推定された。

第2表 培養汙液中の萎凋起因物質の確認試験
Table 2. Identification of wilt-toxin in filtrate

[A] Dilution test						
Cont.(Richards')	0	2	4	8	16	
T	W	W	W	W	T	
[B] Thermo-stability test (100°C—10 min.)						
Cont.(Richards')	0	2	4	8	16	
T	W	W	W	W	T	
[C] Volatility test						
D1	D2	R0	R2	R4	R8	R16
T	T	W	W	T	T	T
[D] Dialyzation test						
Exo 2		End 2	End 4	End 8	End 16	
W		W	W	W	T	

Note: D1 & D2: first and second distilled sol., R: distilled residue, Exo & End: dialyzed and non-dialyzed parts

d) 透析試験 汙液をコロチオン膜静置法で 48 時間透析後の膜外液に挿した処、Exo 2 の様に萎凋が認められた（第2表 [C]）。この Exo 2 は透析物質が略々半分出て平衡状態となつたと考えられるので原液2倍稀釈液に当る訳で、これを加熱しても依然活性であつた。反対に膜内液を検した処、その 4 倍稀釈（End 8 即ち原液 8 倍稀釈に相当）まで有効であり、第2表 [A] と同一稀釈率を示し、逆にこの膜内液稀釈試験から萎凋起因物質はすべて透析性であることが立証された。なお流水法で 48 時間透析した場合も同様に cut stem 及び西瓜幼植物に対して膜内液は毒性を示さなかつた。

また汙液にアセトン或はアルコールを注加して生ずる沈澱物は毒性を示さなかつたことから推して萎凋起因物質はトマト萎凋病に於ける様な Pectin 分解酵素類⁹⁾とは異なることが判つた。

e) 活性炭吸着試験 汙液を夫々酸性 (pH 3.5), 中性, アルカリ性 (pH 8.5) とし 2% 活性炭で吸着を試みた処、アルカリ性下に於てのみ有効物質がよく

吸着されることを知つた。

B. 基凋起因物質の分離

第1図の様に先ず培養汙液を NaOH で pH 8.5 に調節し 2% 活性炭で吸着させ、後その吸着炭から pH 3.0 前後のアセトンで溶出した。このアセトン溜去（減圧下）後の残渣 (Rich water) を重曹アルカ

第1図 萎凋毒素 (Phytonivein) の分離
Fig. 1. Isolation of wilttoxin, phytonivein

第2図 Phytonivein の結晶
Fig. 2. Crystals of phytonivein

り性 (pH 8.5) 下でエーテル浸出し有効物質をエーテル層に移行せしめ、そのエーテル溶液を除々に濃縮すると着色した粗結晶性の有効成分を得た。これをアセトン或はエーテル・アルコール混液から反復再結晶すると、融点 $138^{\circ}\sim 9^{\circ}\text{C}$ の無色長柱状の結晶物質を得ることが出来た (第2図)。

しかし以上の様に培養液から物質分離を行うよりも、該菌体から出発の方が高収量であつた。即ち先ず乾燥粉末菌体を温アセトンで反復抽出し以後液からの場合と同様な操作を行う。収量は乾燥菌体約 100 gram (液 20 l に相当) から 50 mg 前後であつた。この物質はアルコール類、アセトン、エーテル、ベンゼン、クロロホルム等に易溶、水、リグロイン、酸及びアルカリに不溶である。この萎凋毒素に対して本菌の学名にちなんで *Phytonivein* と命名した。

C. *Phytonivein* の萎凋性毒性試験 *Phytonivein* は水に不溶の極少量のアルコールに溶かし、それを水中に懸濁して供試液とした。*Phytonivein* の西瓜 cut stem 萎凋有効限界濃度は、新大和2号に於ては 10^{-5} 前後であり、しかも永久萎凋が認められた

類^{1,9)}, *epinasty* を起因すると云われる代謝揮発性物質⁴⁾及びいわゆる代謝萎凋毒素^{2,6)}等の諸説が提出されている。トマト萎凋病の場合に於ては近年、罹病導管内に病原菌菌糸の存在は認めるが、それによつて直接的に導管閉塞を起す程度の蔓延は見られないとなすものが多い^{18,22,23)}。

本報告の *Phytonivein* が実際に如何なる役目を演じているかの詳細の検討は後報にゆずるが、ただ *Phytonivein* は *Catalase*, *Dehydrogenase* 等の強力な阻害剤であることを附記して置く。

V. 摘 要

- 1) 本報告に於て、西瓜蔓割病菌培養液中に分泌される西瓜萎凋起因物質の確認及びその単離に就いて述べる。
- 2) 培養液中に該菌が分泌する萎凋起因物質は耐熱性、不揮発性、透析性の物質でアルカリ性下でよく活性炭に吸着される。
- 3) 西瓜蔓割病菌に対する西瓜品種間抵抗性差異とその培養液中での萎凋程度との間には略々相関関係が認められる。

4) 培養液及び菌体から萎凋起因物質を単離し *Phytonivein* と命名したが、このものは無色長柱状結晶、融点 $138^{\circ}\sim 9^{\circ}\text{C}$ 、アルコール類、アセトン、エーテル、クロロホルム、四塩化炭素及びベンゼン等に可溶であるが、水、酸、アルカリ及びリグロイン等には不溶である。

5) *Phytonivein* の西瓜 cut stem 萎凋限界有効濃度は 10^{-5} 前後であり、而も永久萎凋が認められ

る。尚幼植物或は植木鉢栽植西瓜に対しても同様効果が見られた。

(1955 年 9 月 5 日受理)

引 用 文 献

- 1) Davis, D.: *Phytopath.*, 43: 470. (1953).
- 2) Dimond, A. E. & P. E. Waggoner: *ibid.*, 43: 195~199. (1953).
- 3) — & —: *ibid.*, 43: 229~235. (1953).
- 4) — & —: *ibid.*, 43: 471. (1953).
- 5) Gäumann, E., S. Naef-Roth & H. Kobel: *C. R. Acad. Sci.*, 234: 276~278. (1952).
- 6) —, — & G. Miescher: *Phytopath. Zeitschr.*, 16: 257~288. (1950).
- 7) —, C. Stoll & H. Kern: *ibid.*, 20: 345~

第3図 *Phytonivein* の萎凋毒性試験
Fig. 3. Wilting toxicity of *phytonivein*

1/8000 1/16000 1/32000 1/64000 1/128000 1/256000

(第3図)。また植木鉢栽植西瓜幼植物に対しても土壌内に *Phytonivein* 液を注入した場合には腰折れ現象が観察された。その他西瓜種子発芽抑制或は生育阻害作用等も認められたが、*Phytonivein* の生理作用の詳細については後報にゆずる。

IV. 考 察

所謂萎凋性植物疾病の萎凋原因に就いては過去多数の報文が発表されたが、近年に於ても病原菌の菌糸伸長による直接的導管閉塞¹⁹⁾、導管隣接細胞から *tylosis* による *plugging*¹⁸⁾、寄主又は寄生菌の生産するゴム様物質による *gummosis*^{1,13)}、病原菌の分泌する酵素

347. (1953).
- 8) —, S. Naef-Roth & H. Kern: C. R. Acad. Sci., 234: 173~174. (1952).
- 9) Gothoskar, S. S. & R. P. Scheffer: Phytopath., 43: 472. (1953).
- 10) Gottlieb, D.: ibid., 34: 41~59. (1944).
- 11) Hutchinson, C. M.: Memoir Dept. Agr. India, Bot. Ser., 1: 67~83. (1913).
- 12) 村田寿太郎・大原清: 奈良農試臨時報告, 6: 1~162. (1936).
- 13) Ludwig, R. A.: Tech. Bull. MacDonald Agr. Coll., 20: 39. (1936).
- 14) Plattner, P. A. & N. Clauson-Kaas: Helv. Chim. Acta, 28: 188~195. (1944).
- 15) — & —: Experimentia, 1: 195~196. (1945).
- 16) —, —, A. Boller & U. Neger: Helv. Chim. Acta, 31: 860~869. (1948).
- 17) Rosen, H. G.: Jour. Agr. Res., 33: 1143~1162. (1926).
- 18) Scheffer, R. P. & J. C. Walker: Phytopath., 43: 116~124. (1953).
- 19) Struckmeyer, B. E., C. H. Beckman, J. E. Kuntz & A. J. Riker: ibid., 44: 148~153. (1954).
- 20) Wheeler, H. E. & H. H. Luke: ibid., 44: 334. (1954).
- 21) White, R. P.: Jour. Agr. Res., 34: 197~239. (1927).
- 22) Winstead, N. N. & J. C. Walker: Phytopath., 43: 489. (1953).
- 23) — & —: ibid., 43: 490. (1953).
- 24) — & —: ibid., 44: 153~158. (1954).
- 25) 吉井甫: 九大農芸雑誌, 6: 331~347. (1935).
- 26) Zentmeyer, G. A.: Science, 95: 512~513. (1942).

Résumé

1) In the present paper, the authors deal with the results of the experiments on the identification and isolation of wilt toxin by *Fusarium bulbigenum* var. *niveum* causing watermelon wilt.

2) It was recognized that the wilt toxin, metabolized in the cultured filtrate was thermostable, non-volatile, dialyzable and adsorbed by 2% active carbon under an alkaline condition.

3) Parallel was probably established between resistance and susceptibility of watermelon varieties to *Fusarium* wilt and sensitivity to cultured filtrate injury.

4) Isolation processes of wilt toxin involved in the cultured filtrate or its mycelial mats were summarized as follows: The filtrate adjusted at pH 8.5 was adsorbed by 2% active carbon, its adsorbed carbon or dried mycelial mats were

then eluted by acetone. Acetone solution was concentrated and dried up under a diminished pressure, resulted rich water residue was adjusted by NaHCO_3 at pH 8.5, and then effective principle was extracted with ether. When ether solution was slowly concentrated, effective principle substance was precipitated. By recrystallizing from acetone, wilt toxin was obtained as crystal. The substance was prism like crystal, m. p. 138~9°C., and soluble in alcohols, acetone, ether, chloroform, carbon tetrachloride or benzene, and insoluble in water, acid, alkali or ligroin.

5) The present wilt toxin isolated was designated by the authors phytonivein. Watermelon cut stems and seedlings were permanently wilted by 10^{-5} phytonivein solution.

文献紹介

モモの X-disease (Yellow-red) について

E. M. Hildebrand: Yellow-red or X-disease of Peach.
Cornell Agr. Exp. Sta. Mem. 323: 1~54. (1953).

X-disease は U. S. A. の北東部の諸州でモモ及び野生の chokecherry (*Prunus virginiana* L.) に発生する。モモでの病徴は、春先葉がやゝ淡緑色となり、その後樹の上部の葉に黄〜赤色の斑点が生じ、時に葉が捲く。一般に若い樹や若い葉で病徴が明瞭であり、葉は遂には全体が黄化して落葉する。普通は果実は着かず、たとえ着いても味が悪く、且種子は発芽しない。本病はバイラスによるもので、芽接ぎによりモモの健全実生苗に接種すれば約6カ月後に発病をみる。しかし、芽接ぎ後に芽を接いだ部分から上部の枝または葉を切りとるか、葉を遮光すると、潜伏期間は1カ月位に短縮する。ネナシカ

ズラ (*Cuscuta campestris* Yunck.) により接種すればトマトは感染し発病する。また、*Scaphytopius acutus* Say. により媒介される。自然での伝染源は病気に罹つた chokecherry であり、果樹園から chokecherry をとり除くことが本病防除上有効である。但し自然ではモモからモモへの伝染はおこらない。このバイラスは熱に弱く、苗木を 50°C. の湯に6分浸漬すると、中のバイラスは不活性化される。U. S. A. の西部諸州でモモに発生する Western X-disease をおこすバイラスは本病バイラスと strain 関係にあるのかも知れない。(与良 清)