ダイズと *Fusarium* sp. との相互反応による Phytoalexin の生成について

I. Phytoalexin の生成に及ぼす寄主植物の条件の影響および Phytoalexin の性質についての 2, 3 の実験

植 原 一 雄*

Kazuo UEHARA : On the Phytoalexin production of the soybean pod in reaction
to *Fusarium* sp., the causal fungus of pod blight.

I. Some experiments on the Phytoalexin production as affected by host plant conditions and on the nature of Phytoalexin produced.

I. 緒 言

K. O. Müller¹⁾ はインゲンに対して *Sclerotinia fructicola* 及び *Phytophthora infestans* を用い、また水上^{1,2)} はオオムギに対して *Fusarium nivale* 及び *F. solani* を用いて Phytoalexin (以下 PA と略記する) の存在を確認している。筆者⁴⁾ は水稻に対して *Piricularia oryzae* を用いて PA の生成されることを認めたが、その後更にダイズと *Fusarium* sp. についても同様な事実を認めたので、これに関する 2, 3 の実験を行った。

PA は寄主植物と寄生菌との相互反応によつて、その斗争の場に現われるものであるが、その生成には、寄主植物及び寄生菌の如何なる因子が関与しているかということについては、殆んど知られていない。筆者⁴⁾ は、寄主植物側の因子として、水稻においては品種の稻熱病抵抗性の差異が、稻熱病菌の発芽を抑制する PA の生成に大きく影響することを認めたが、更にダイズを用いて、寄主植物の PA 生成に及ぼす影響について簡単な実験を行い、併せて渗出液中における PA の性質を 1, 2 調べたので、その結果を報告する。

本実験に関して懇篤なる御指導を載っている九州大学吉井甫教授及び野中福次氏並びに本学藤岡保夫助教授に深謝の意を表する。

II. 実験方法及び結果

供試菌には *Fusarium* sp. を用いた。本菌はダイズの莢を侵して赤黴病を起す病原菌であるが、実験を開始する前に、接種試験によつてその病原性を確かめた。本菌は培養基上で胞子を作り難いので、供試胞子は使

用のたびに罹病莢より採取した。

供試植物にはダイズを用いた。品種は実験 1. の一部に朝白を用いた他は、すべて白大八輪である。莢は同一圃場の株から得た。

実験は時日をかえて 3~4 回反覆実施した。また結果の per cent の数字はすべて Bliss の表で変数転換を行つた後、分散分析を行い、検討を加えた。

実験 1. ダイズと *Fusarium* sp. との相互反応によつて PA が生成されることの確認

方法：ダイズは朝白及び白大八輪の 2 品種を用いたが、この 2 つの実験は期を異にして行つた。これらのダイズを種子がまだ十分大きくない未熟な時に採取し、莢の縫合線に沿つてメスで切開して 2 分し、種子を除去した。温室としたシャーレ中のスライドグラス上に、この莢を外表皮を下にして 5 個並べ、毛細管ピペットを用いて *Fusarium* sp. の胞子浮遊液を数滴 (約 0.1 cc) 宛その子室に接種した。この胞子浮遊液は顕微鏡の 150 倍拡大度で 1 視野当り平均胞子数 (以下単に「1 視野」と略記する) が 40~60 個程度の濃度のものを用いた。また対照としては、同じように処理した莢に蒸留水を置いたものと及び温室としたシャーレ中のパラフィンを貼つたスライドグラス上に前記と同一の胞子浮遊液を同じ程度の大きさに置いたものを準備した。なお試験区、対照区共に 1 つの試験区ごとに 3 個のシャーレすなわち 15 個の莢を用いた。

これらのシャーレを 23°C の定温器中に 24 時間保つた後、毛細管ピペットで水滴を集めた。この際寄主組織に接触して傷をつけないように注意した。集めた水滴は直ちに 3000 rpm で 30 分間遠心沈殿し、その上澄を供試液とし、*Fusarium* sp. の分生胞子の発芽試験を行い、PA 生成の有無を検定した。発芽試験は前報⁴⁾ の方法に従つたが、ただ本実験では 23°C の定温

* 広島農業短期大学

Table 1. Inhibitory action of the spore suspension of *Fusarium* sp., placed on the seed room of the soybean pod for 24 hrs. at 23°C., against the spore germination of the same fungus.

Variety	Shirodaihachirin												Asaziro											
	spore suspension						distilled water						spore suspension						distilled water					
	on pod			on paraffin			on pod			on paraffin			on pod			on paraffin			on pod			on paraffin		
	T	G	P	T	G	P	T	G	P	T	G	P	T	G	P	T	G	P	T	G	P	T	G	P
1	560	10	1.8	557	396	71.1	313	293	93.6	647	481	74.3	566	16	2.8	437	298	68.2	526	406	77.2	869	651	74.9
2	761	8	1.1	274	210	76.6	341	280	82.1	401	325	81.0	837	109	13.0	504	417	82.7	422	363	86.0	433	368	85.0
3	603	3	0.5	353	324	91.8	398	356	89.4	669	650	97.2	702	32	4.6	361	208	57.6	407	397	97.5	457	421	92.1
4	503	20	4.0	459	400	87.1	367	330	89.9	—	—	—	415	36	8.7	726	652	89.8	607	437	72.0	678	552	81.4
average			1.9			81.6			88.8			84.2			7.3			74.6			83.2			83.4

T: total number of spores measured

G: number of spores germinated

P: percentage of germination

器中に 12 時間保つた後、1%の昇コウ水を加えて発芽を止め検鏡した。なお実験を始める前に、本菌胞子の発芽がその胞子濃度によつて影響を受けるか否かを検した。その結果、1 視野当り 60~70 個と 5~10 個の濃度の間にはその発芽率に有意差が認められなかつたので、本実験ではその中間をとり、20~30個程度になるように注意した。

結果: 結果は第 1 表に示す通りである。統計処理の結果、2 品種とも試験区と対照区との間にはさくぶる顕著な有意差を認めたが、対照として用いた 3 つの区の間には有意差は認められなかつた。

従つて本実験の結果、莢上に 24 時間置いた胞子浮遊液は *Fusarium* sp. の胞子に対して非常に強い発芽抑制作用を示すが、同一時間莢上に置いた蒸留水及びパラフィン上に置いた胞子浮遊液は殆んど胞子の発芽に影響を与えないことがわかつた。

実験 2. 莢の老若と PA 生成との関係

方法: 寄主組織の老化が PA の生成にどの程度の影響を与えるかを調べるために、老若 2 種の莢を用い

て実験を行つた。若い莢には、前の実験に用いた程度の熟度のものを用い、また老成した莢には、種子が十分生長し、莢の色も黄緑色より黄褐色に移りつつある状態のものを用いた。両種の莢は播種期を異にするダイズより得たのであるが、その他の栽培条件は大体同じである。この老若 2 種の莢に、1 視野当り 40~60 個程度の濃度の胞子浮遊液を実験 1. と同様に接種して、生成される PA を発芽試験によつて検定した。対照としては、前記の胞子浮遊液をパラフィン上に置いたもの及び老若 2 種の莢に蒸留水を接種したものを準備した。その他の実験方法は実験 1. と同様である。

結果: 結果は第 2 表に示す通りである。本表より既に明らかであるが、更に統計処理を行つて検討を加えた。その結果、莢上の胞子浮遊液区では、老莢と若莢との間には顕著な有意差を認めたが、莢上の胞子浮遊液区と老莢区と莢上の蒸留水区及びパラフィン上の胞子浮遊液区との 3 者では、その相互間に有意差を認めなかつた。しかし老莢上の胞子浮遊液は、対照区に比して発芽率が低い傾向を示している。

Table 2. Effect of age of pod to the production of Phytoalexin.

treat- ment	spore suspension on						distilled water on						spore suspension		
	old pod			young pod			old pod			young pod			on paraffin		
	T	G	P	T	G	P	T	G	P	T	G	P	T	G	P
1	362	243	67.1	615	13	2.1	335	304	90.7	796	703	88.3	353	324	91.8
2	592	456	77.0	579	65	11.2	508	496	97.6	835	801	95.9	196	127	64.8
3	373	351	94.1	608	373	61.3	577	527	91.3	591	527	89.2	356	242	68.0
4	583	360	61.7	715	30	4.2	—	—	—	488	480	98.4	260	213	81.9
average			75.0			19.7			93.2			93.0			76.6

T: total number of spores measured

G: number of spores germinated

P: percentage of germination

Table 3. Changes of Phytoalexin production of soybean pod when spore suspension of *Fusarium* sp. on the seed room were renewed every 24 hrs.

replica- tion	treat- ment	spore suspension on pod												distilled water on pod											
		1st day			2nd day			3rd day			4th day			1st day			2nd day			3rd day			4th day		
		T	G	P	T	G	P	T	G	P	T	G	P	T	G	P	T	G	P	T	G	P	T	G	P
1		839	109	13.0	503	230	45.7	268	255	95.1	367	327	89.1	575	392	68.2	415	370	89.2	309	270	87.4	636	548	86.2
2		603	3	0.5	315	211	67.0	325	208	64.0	417	358	85.9	398	356	89.4	426	372	87.3	313	269	85.9	352	265	75.3
3		400	1	0.3	362	181	50.0	287	150	52.3	301	288	95.7	410	284	69.3	342	313	91.5	260	244	93.8	260	234	90.0
4		503	20	4.0	325	127	39.1	379	269	71.0	254	187	73.6	367	330	89.9	334	305	91.3	324	265	81.8	316	270	85.4
average				4.4			50.5			70.6			86.1			78.9			89.8			87.5			84.2

T : total number of spores measured G : number of spores germinated
P : percentage of germination

従つて本実験の結果から、老莢においては PA は殆んど生成されないか、あるいは生成されてもごく僅かなものであると考えられる。

実験 3. 同一莢に孢子浮遊液を反覆接種した場合の PA 生成量の変化

実験 2. で寄主組織の老若が PA 生成に大きく影響することがわかったが、本実験では同一寄主組織の PA 生成能力の限界について調べた。

方法：未熟の莢に 1 視野当り 40~60 個程度の濃度の孢子浮遊液を接種し、23°C で 24 時間放置後に、その浮遊液を集めて別にとり、再び同じ場所に同濃度の新鮮な孢子浮遊液を接種して 24 時間放置し、この操作を 4 回繰り返した。各回に得た浮遊液は、直ちに遠心沈殿を行つて、発芽試験に供した。対照としては莢に単に蒸留水のみを接種したものを準備し、同様に 24 時間ごとに水滴を更新した。その他の実験方法は前記の通りである。

結果：結果は第 3 表の如くである。本表についても、前回と同様に統計処理を行つた結果、莢上の孢子浮遊液区においては、1 回目と 2 回目との間には顕著な有意差を認め、2 回目と 4 回目との間にも 5% の危

険率で有意差を認めた。しかし 2 回目と 3 回目及び 3 回目と 4 回目との間には有意差は認められなかつた。また莢上の蒸留水区では、4 つの試験区相互間には有意差は認められなかつた。

従つて本実験の結果、ダイズ莢上の孢子浮遊液を 24 時間ごとに更新した場合、PA は 2 回目の接種から急激に減少し、4 回目にはその存在を認め難くなることがわかつた。

実験 4. PA 滲出液の稀釈系列とその発芽抑制作用

莢に孢子浮遊液を接種して得た PA の滲出液を稀釈した場合、その発芽抑制作用がどの程度減退するかを調べた。

方法：1 視野当り 40~60 個程度の濃度の孢子浮遊液を未熟の莢に接種し、24 時間後にその浮遊液を集め、これに蒸留水を加えて 2, 4, 8 倍に稀釈して発芽試験に供した。対照には、供試液の代りに蒸留水を用いたものを準備した。実験方法の詳細は今までと同様である。

結果：結果は第 4 表に示す通りである。前記の方法で統計処理を行い検討を加えた結果、各試験区相互

Table 4. Dilution of the Phytoalexin containing solution and its changes of the inhibiting power against the spore germination of *Fusarium* sp.

replication	dilution	1 : 1			1 : 2			1 : 4			1 : 8			distilled water		
		T			T			T			T			T		
		G	P		G	P		G	P		G	P		G	P	
1		560	10	1.8	289	79	27.3	385	161	41.8	663	530	79.9	869	651	74.9
2		761	8	1.1	672	182	27.1	684	441	64.5	681	569	83.6	433	368	85.0
3		603	3	0.5	456	100	21.9	734	438	59.7	787	691	87.8	457	421	92.1
4		503	20	4.0	334	100	30.0	352	232	65.9	457	371	81.2	678	552	81.4
average				1.9			26.6			58.0			83.1			83.4

T : total number of spores measured G : number of spores germinated
P : percentage of germination

Table 5. Heat stability of the Phytoalexin.

treatment replication	not treated			10min, 60°C			5min, 100°C			10min, 100°C			20min, 100°C			distilled water		
	T	G	P	T	G	P	T	G	P	T	G	P	T	G	P	T	G	P
1	761	8	1.1	568	300	52.8	238	190	79.8	298	245	82.2	424	400	94.3	869	651	74.9
2	603	3	0.5	424	238	56.1	420	320	76.2	589	479	81.3	433	356	82.2	457	421	92.1
3	503	20	4.0	414	288	69.6	272	200	73.5	394	314	79.7	567	436	76.9	687	552	80.3
average			1.9			59.5			76.5			81.1			84.5			85.8

T: total number of spores measured
P: percentage of germination

G: number of spores germinated

間には明瞭な有意差を認めた。しかし蒸留水区と8倍稀釈区との間には有意差は見られなかった。

従つて本実験の結果、PA 滲出液はその稀釈度に比例して発芽抑制作用を失い、8倍に稀釈すると、その作用を殆んど完全に失うことがわかつた。

実験5. PA 滲出液の熱に対する安定度

方法: 実験4.と同様にして莢よりPAの滲出液を得た。この液を60°Cで10分間及び100°Cで5, 10, 20分間加熱し、直ちに水道水で冷却して発芽試験に供し、PAの活性をしらべた。この際、前もつて熱した小試験管の中に少量の滲出液を加え、温度誤差を防ぐように注意した。対照としては、供試液の代りに蒸留水を用いた。実験方法は前実験と同様である。

結果: 結果は第5表に示す通りである。本表について統計処理を行つた結果、無処理区と処理区との間にはすこぶる顕著な有意差を認めた。また処理区では60°C 10分区と、100°C 5分区との間には5%の危険率で有意差を認めた。しかし100°C 5分区、100°C 10分区、100°C 20分区及び蒸留水区相互間には有意差は見られなかった。

従つて本実験の結果から、ダイズ莢より得た滲出液中におけるPAは60°C 10分の処理によつて急激にその力価が衰え、100°C 5分の加熱によつては、殆んどその活性を失うことが明らかとなつた。

III. 考 察

莢上の孢子浮遊液が示す強い発芽抑制作用は、その対照区と合わせ考える時、ダイズと *Fusarium* sp. との相互反応によつて現われたものであり、その作用の本質はPAであると考え。本実験のように、孢子によるBio-assayの方法でPAを検定する場合には、孢子の発芽が良好で、しかも多量の孢子が容易に得られることが必要であるが、この点 *Fusarium* sp. は適当な材料であつた。

ダイズの熟した莢には、PAの生成能力が殆んど認

められなかつた。PAの生成が、寄主植物と寄生菌との相互反応に起因するものである以上、寄主植物の諸種の条件がPAの生成に影響を及ぼすことは当然考えられる。水上²⁾はオオムギの新葉と古葉との間には、PA生成の持続性に差があることを報告している。K. O. Müller³⁾は、「PAは寄生菌の関与によつて、寄主植物の細胞で作られるものであり、寄生菌から直接得られるものではない。」との見解を取つている。かかる見地からすれば、若い生活力の旺盛な組織において、PAの生成が盛んであることはうなづける。更にMüllerは、インゲン莢を41°C 90分熱処理することによつて、PAの生成が非常に弱くなることを報告している。これらの結果は、代謝活動の盛んな若い組織が、病害抵抗性が強いという事実によく一致する。

また莢上の孢子浮遊液を24時間ごとに更新した実験から、ダイズ莢の単位面積当りのPA生成能力には一定の限度があり、PA生成量は2回目以降は急減するように思われる。

更にPAの性質について考察するに、本実験で得られたPAの滲出液は、8倍に稀釈することによつて、また100°Cで5分間熱処理することによつて、孢子に対する発芽抑制作用の大部分を失う。Müller及び水上も大体同様な事実を認めている。これらの事実から、PAが熱に対して不安定なものであることは明らかである。

IV. 摘 要

1. ダイズと *Fusarium* sp. とを用いて Phytoalexin の生成に及ぼす寄主植物の2, 3の影響について実験し、併せて Phytoalexin の性質について2, 3の実験を行つた。

2. 老成した莢には Phytoalexin の生成が認められなかった。

3. 莢のうちの同一部分の Phytoalexin 生成能力の容量は、かなり小さいものである。

4. 滲出液中の Phytoalexin は、熱に対して不安

定で、100°C 5分間の処理でその活性を殆んど失う。

(1958年2月12日受理)

引用文献

1) 水上武幸：日植病報，17：57～60。(1953)。

2) ———：日植病報，17：141～143。(1953)。

3) Müller, K. O.: Phytopath. Ztschr., 27: 237～254。(1954)。

4) 植原一雄：日植病報，23(3)：127～130。(1958)。

Summary

Phytoalexin (PA for short) has been defined by Müller (1954) as antibiotics which are the result of an interaction between the host and the parasite, and which inhibit the growth of microorganism pathogenic to plants. In the present paper the results are dealt, of a study on the rate of production of PA, as affected by host plant conditions, and activities of PA, using soybean (*Glycine max* Mer.) and *Fusarium* sp. which causes pod blight.

Drops of spore suspension of *Fusarium* were mounted on the inner surface of the seed rooms of the pods at different ages, and after centrifuging, the supernatant was tested for inhibitory action on the germination of fresh spores of *Fusarium*. It was found that the PA diffused dist-

inctly into the drops placed on the young, un-matured pods, while hardly or not in the drops on the mature pods.

The PA productivity of the host tissue was determined by changing daily the drops placed on given points of young pods with new spore suspension, and by measuring the inhibitory action of the diffusates on each day. It was shown that the production of PA decreased remarkably on the second day, and sank nearly to zero on the fourth day.

PA in the diffusate from the pods lost most of its inhibitory activity, when heated at 100°C for 5 minutes or diluted to 1:8.

(Hiroshima Agricultural College, Saijo,
Hiroshima Prefecture)

新刊紹介

原色日本植物図鑑(上) 草本編(1) 合弁花類(保育社の原色図鑑15), 北村四郎・村田源・堀勝共著, 石津博典画。図版70, 297頁。保育社(大阪)1300円。

日本産植物の原色図鑑は今までもいくつか出されているが、この図鑑の出来ばえは抜群である。図は生の材料から画いたものと腊葉標本から画いたものと両方あると書いてあるが、どれも特徴がよく表わされている他、排列も大体自然分類に従いながら、同じ属のものをできるだけ同じ図版の中に並べて比べられるように配慮されている。本文説明は簡潔で植物体の大きさに関する数字、分布、類似種との区別点など手際よく書かれている。図版に入れられた種類は比較的普通なものを中心に600種に充たないが、随所に検索表を挿入して、図示されなかつた類似種の同定もできるようにしてあるなど、本邦既知種の全部が一応取扱われている。又和名・学名の他に英仏独及び中国名もあげられている。巻末には標本のつくり方と植物の分布についての解説、及び学名索引・英仏独名索引・和名索引がついている。あと中・下2冊で完結する事になっているのかと思

うが、全部揃うと便利になるであろう。(飯田俊武)

Advances in Virus Research Smith, K. M. & Lauffer, M. A. 編集。Academic Press, New York.

この叢書のVol.1については19巻103頁に紹介を書いたが、その後Vol.2(1954), Vol.3(1955), Vol.4(1957), Vol.5(1958)が順次刊行された。各Vol.毎7乃至9篇の綜説が収録されているが、そのうち特に植物ウイルスの問題を取扱つたものに次の7篇がある。Vol.2—Holmes, F. O.: 植物のウイルス病抵抗性の遺伝, Bawden, F. C.: 植物ウイルスと阻害物質。Vol.3—Maramorosch, K.: 植物ウイルスの昆虫体内での増殖。Kunkel, L. O.: 萎黄型ウイルス系統間のcross protection。Vol.4—Pirie, N. W.: タバコ・モザイク・ウイルスの解剖, Kas-sanis, B.: 植物ウイルス病に及ぼす温度変化の影響, Yarwood, C. E.: 植物ウイルスの機械的伝播。Vol.5には直接植物関係のものは収録されていない。この他にも基礎的問題を取扱つたもので植物ウイルスに関する事項の引用の多い論文が多数ある。

(飯田俊武)