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

II. Phytoalexin 生成に影響を及ぼす寄生菌胞子浮遊液の状態

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.

II. On the effect of conditions of the spore suspension of the
causal fungus upon Phytoalexin production.

I. 結 言

筆者は前報告⁴⁾において、ダイズと *Fusarium* sp. との相互反応によって Phytoalexin (以下 PA と略記する) が生成されることを認め、PA の生成と寄主植物との関係及び PA の性質に関する幾つかの実験について報告したが、本報告においては、PA の生成に及ぼす寄生菌胞子浮遊液の影響について行つた 2, 3 の実験の結果を報告する。

本研究に関して、懇篤なる御指導を戴いている九州大学吉井甫教授、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

実験材料は前の実験⁴⁾と同じである。すなわち供試菌にはダイズ赤黴病菌 *Fusarium* sp. を、供試植物には同一圃場から採つたダイズ (品種白大八輪) を用いた。ダイズの未熟な莢を、その縫合線に沿つてメスで切開して 2 分し、種子を取り出し、この莢を外表皮を下にして、シャーレで作つた湿室中のスライドグラス上に並べ、その子室に試験液の水滴を接種して 23°C に保つた。24 時間後に水滴を集めて遠心沈殿を行い、上澄を得た。この上澄に *Fusarium* sp. を接種して発芽状態を調べ、PA の検定を行つた。必要な場合には、対照として、湿室中の莢あるいはパラフィンを貼つたスライドグラス上に蒸留水またはその他目的にかなつた液を接種したものを準備し、同様に操作して発芽率を測定した。なお 1 つの試験区ごとに 15 個の莢を用いて、供試莢の個体間の誤差を防ぐように注意した。その他実験方法の詳細については既報⁴⁾の通りで

ある。

実験は時日をかえて 3 回ないし 4 回反覆実施し、実験結果はすべて統計処理を行つた。すなわちその発芽率を Bliss の表で変数転換した後分散分析を行い、その結果について各試験区間の有意差を検討した。

実験 1. 胞子浮遊液の濃度が PA の生成に及ぼす影響 莢に接種する胞子浮遊液の濃度によって PA の生成がどのような影響を受けるかを知るために本実験を行つた。

方法: 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) 3~6 個, 40~60 個, 200~400 個の 3 種類の濃度の胞子浮遊液を調製し、これらをそれぞれ莢の子室に約 0.1 cc ずつ接種して 23°C で 24 時間保つた後、その水滴を集めて発芽試験を行い (23°C で 12 時間)、その中に現われる PA の力価を比較した。対照としては、莢及びパラフィン上に蒸留水を接種したもの、及びパラフィン上に前記 3 種の胞子浮遊液を置いたものを準備した。

結果: 結果は第 1 表に示す通りである。本表について統計処理を行つて検討を加えた結果、莢上の胞子浮遊液区においては 3~6 個区と 40~60 個, 200~400 個区との間にはすこぶる顕著な有意差を認めたが、40~60 個区と 200~400 個区との間には有意差が認められなかつた。また 3 つの対照区相互間にも有意差は認められなかつた。更に 3~6 個の濃度について、莢上及びパラフィン上の胞子浮遊液及び莢上の蒸留水の 3 つの場合を比較したが、その間にも有意差は認められなかつた。

従つて本実験の結果から、3~6 個程度の低い胞子濃度では PA の生成は認められないが、40~60 個の濃度では非常に強い PA が認められることが分つた。しかし、更に濃度を高くして、200~400 個としても

* 広島農業短期大学植物病理学研究室

第1表 莢上に置いた孢子浮遊液の濃度が Phytoalexin 生成に及ぼす影響

Table 1. Inhibitory action of the supernatant of the spore suspensions, in different spore densities, placed on the soybean pod, against the spore germination of *Fusarium* sp.

replication	treatment			spore suspension on pod									spore suspension on paraffin									distilled water on pod			distilled water on paraffin		
				3~6 *			40~60			200~400			3~6			40~60			200~400								
	T	G	%	T	G	%	T	G	%	T	G	%	T	G	%	T	G	%	T	G	%						
1	388	269	69.3	380	4	1.1	218	18	8.3	285	267	93.7	274	210	76.6	364	287	78.8	341	280	82.1	341 280 82.1			401 325 81.0		
2	432	358	82.9	227	8	3.5	420	7	1.7	327	296	90.5	320	300	93.8	539	350	64.9	427	375	87.8	427 375 87.8			300 270 90.0		
3	494	389	78.7	400	1	0.3	310	41	13.2	500	403	80.6	392	254	64.8	349	240	68.8	410	284	69.3	410 284 69.3			638 598 93.7		
4	680	526	77.4	503	20	4.0	—	—	—	441	400	90.7	459	400	87.1	—	—	—	367	330	89.9	367 330 89.9			— — —		
average	77.1			2.2			7.7			88.9			80.6			70.8			82.4			82.4			88.2		

T : total number of spores measured. G : number of spores germinated.

* Number of spores per one field under microscope at 150-fold magnification.

PA の生成量の増加は見られない。またパラフィン上に置いた孢子浮遊液では各濃度間に有意差は認められないが、高濃度の方が発芽を抑制する傾向を示した。

実験 2. 孢子浮遊液の熱処理が PA 生成に及ぼす影響 孢子浮遊液を接種前に熱処理することによつて、PA の生成反応が如何なる影響を受けるかを調べた。

方法：1 視野当り 40~60 個程度の濃度に調製した孢子浮遊液を 100°C の熱湯中に 10 分間保ち、直ちに水道水で冷却して莢に接種（約 0.1 cc）し、24 時間後に水滴を集めて前実験と同様にして発芽試験を行つ

た。対照としては、無処理の孢子浮遊液を莢及びパラフィン上に置いたもの、並びに蒸留水を莢及びパラフィン上に置いたものの 4 種を準備した。

結果：結果は第 2 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、莢上の無処理孢子浮遊液区と他の 4 つの試験区との間には顕著な有意差が見られるが、この 4 つの試験区すなわち莢上及びパラフィン上の蒸留水並びに莢上及びパラフィン上の熱処理孢子浮遊液相互間には有意差が認められなかつた。

以上の結果から、100°C 10 分間加熱した孢子浮遊液によつては、PA は生成されないことが分つた。

第2表 孢子浮遊液の熱処理が Phytoalexin の生成に及ぼす影響

Table 2. Effect of heat treatment (100°C, 10 min.) of spore suspension upon the production of Phytoalexin.

treatment	heat treated spore suspension on pod			heat treated spore suspension on paraffin			not treated spore suspension on pod			distilled water on pod			distilled water on paraffin		
	T	G	%	T	G	%	T	G	%	T	G	%	T	G	%
1	268	189	70.5	286	235	82.2	560	10	1.8	313	293	93.6	647	481	74.3
2	604	383	63.4	376	300	79.8	380	4	1.1	341	280	82.1	401	325	81.0
3	589	479	81.3	458	406	88.6	615	13	2.1	398	356	89.4	669	550	82.2
4	371	295	79.5	367	298	81.2	400	1	0.3	410	284	69.3	638	598	93.7
average	73.7			83.0			1.3			83.6			82.8		

T : total number of spores measured. G : number of spores germinated.

実験 3. 磨砕した孢子の滲出液が PA 生成に及ぼす影響 磨砕した孢子の滲出液を莢に接種することによつて、PA が生成されるか否かを調べるために本実験を行つた。

方法：メスを用いて、罹病莢上の孢子塊を表皮の一部と共に削り取り、その 0.1 g にガラス粉末 0.5 g を

加えて乳鉢中で磨砕した。原形をとどめる孢子が見当らない程度になつた時、3 cc の蒸留水を加え約 10 分間振りまぜた後、3000 rpm で 20 分間遠心沈殿し、その上澄を莢に接種した。対照として、パラフィン上に同一上澄液を置いたもの、莢上に 1 視野当り 40~60 個の濃度の孢子浮遊液を置いたもの、および莢に

蒸留水を置いたものの3種を準備した。一般操作は前実験の通りである。

結果：結果は第3表に示す。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を除く3つの試験区相互間には有意差は認められなかつた。

従つてこの結果から、本実験の方法で磨砕した胞子の滲出液上澄によつては、PAが生成されないことが分つた。

実験 4. 胞子浮遊液の浸出物が PA 生成に及ぼす影響 胞子からその浮遊液中に浸出する物質が、PAの生成に影響を及ぼすか否かを調べるために、この試験を行つた。

方法：1視野当り80~100個程度の濃度に調製した胞子浮遊液を試験管に取り、23°Cの定温器中で24時間保つた後、3000 rpmで20分間の遠心沈殿を2回繰

り返して上澄を得た。この上澄を莢に接種し、既述の方法で実験を行つた。対照として、この上澄をパラフィン上に置いたもの、莢上に1視野当り40~60個の濃度の胞子浮遊液および蒸留水を置いたものを準備した。

結果：第4表の結果において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、莢上の遠心上澄区は、パラフィン上の遠心上澄区および莢上の蒸留水区の2区に対しては顕著な差を認めたが、莢上の胞子浮遊液区に対しては有意の差を認めなかつた。

従つて本実験の結果、調製後24時間経過した胞子浮遊液の遠心上澄を莢に接種することによつてPAが生成されること、そしてその強さは、莢に胞子浮遊液を直接接種した場合と大差ないことが判明した。

第3表 磨砕した胞子の滲出液が Phytoalexin の生成に及ぼす影響

Table 3. Effect of maceration of spores upon the Phytoalexin production in the spore suspension.

treatment replication	crushed spore suspension on pod			crushed spore suspension on paraffin			intact spore suspension on pod *			distilled water on pod		
	T	G	%	T	G	%	T	G	%	T	G	%
1	394	359	91.1	390	294	75.4	430	25	5.8	650	541	83.2
2	290	277	96.2	268	252	94.0	379	12	3.2	408	396	97.1
3	449	395	88.0	388	285	73.5	562	5	0.9	345	264	76.5
4	401	359	89.0	364	327	89.8	—	—	—	304	233	76.6
average			90.8			83.2			3.3			83.4

T: total number of spores measured. G: number of spores germinated.

* The density of spore suspension; 40~60 spores per one field under microscope at 150-fold magnification.

第4表 胞子浮遊液の滲出物が Phytoalexin の生成に及ぼす影響

Table 4. Effect of the diffusate from the spore suspension left for 24 hours at 23°C, upon the production of Phytoalexin.

treatment replication	supernatant on pod			supernatant on paraffin			spore suspension on pod *			distilled water on pod		
	T	G	%	T	G	%	T	G	%	T	G	%
1	251	21	8.4	263	247	93.9	280	5	1.8	313	293	93.6
2	472	32	6.8	—	—	—	603	3	0.5	398	356	89.4
3	670	63	9.4	476	420	88.2	454	16	3.5	427	375	87.8
4	431	6	1.4	316	204	64.6	562	5	0.9	345	264	76.5
average			6.5			82.2			1.7			86.8

T: total number of spores measured. G: number of spores germinated.

* The density of spore suspension containing 40~60 spores per one field under microscope at 150-fold magnification.

実験 5. 胞子浮遊液の遠心上澄中に存在する PA 生成誘発因子の耐熱性 実験 4. の結果から、胞子浮遊液の遠心上澄中には、PA 生成を誘発する因子の存在することが認められたが、本実験ではこの因子の熱に対する安定度を調べた。

方法：実験 4. と同様な方法で得た胞子浮遊液の遠心上澄を、60℃ および 100℃ で 10 分間処理した後、莢に接種し、前述の方法で PA を検定した。対照として、この上澄を無処理のまま莢およびパラフィン上に置いたもの、熱処理した上澄をパラフィン上に置いたものおよび 1 視野当り 40～60 個の濃度の胞子浮遊液と蒸留水を莢上に置いたものを準備した。

結果：結果は第 5 表の通りである。本表について

統計処理を行つた結果、莢上の遠心上澄区においては、無処理区と処理区との間に顕著な有意差を認めたが、2 つの処理区相互間には有意差は認められなかつた。またパラフィン上の遠心上澄区においては、3 つの試験区相互間には有意差を認めなかつた。更に莢上に無処理の遠心上澄を接種した区と、胞子浮遊液を接種した区との間には有意差が認められなかつた。

従つて本実験の結果から、胞子浮遊液の遠心上澄を 60℃ で 10 分間処理することによつて、PA の生成が認められなくなることが分つた。なお遠心沈殿を行う際の胞子浮遊液中での胞子の発芽率は、反覆第 1 回が 46.9 %、第 2 回目が 35.2 %、第 3 回目が 50.4 % であつた。

第 5 表 胞子浮遊液の遠心上澄中に存在する Phytoalexin 生成誘発因子の耐熱性

Table 5. Heat stability of the factor for inducing Phytoalexin production in the supernatant of spore suspension*.

placed on inoculum replication	pod									paraffin									pod								
	not treated supernatant			treated supernatant 60°C, 10 min			treated supernatant 100°C, 10 min			not treated supernatant			treated supernatant 60°C, 10 min			treated supernatant 100°C, 10 min			spore suspension**			distilled water					
	T	G	%	T	G	%	T	G	%	T	G	%	T	G	%	T	G	%	T	G	%	T	G	%	T	G	%
1	309	7	2.3	407	388	95.3	316	257	81.3	240	215	89.6	386	296	76.7	267	230	86.1	562	5	0.9	304	233	76.6			
2	345	5	1.4	259	224	86.5	296	293	99.0	335	150	44.8	336	321	95.5	379	330	87.1	384	6	1.6	364	258	70.9			
3	279	9	3.2	363	340	93.7	300	292	97.3	518	236	45.6	267	255	95.5	390	362	92.8	330	13	3.9	315	280	88.9			
average			2.3			91.8			92.5			60.0			89.2			88.7			2.1			78.8			

T : total number of spores measured. G : number of spores germinated.

* The suspension was left for 24 hrs. at 23°C.

** Density of spore suspension containing 40～60 spores per one field under microscope at 150-fold magnification.

III. 考 察

実験 1. の結果から、PA の生成量はある程度までは *Fusarium* sp. の胞子の増加に従つて増えるように思われる。これは、寄生菌に対して寄主が反応する場合、寄生菌の相当量の存在が必要であることを示している。しかし浮遊液中の胞子の数が一定量（1 視野当り 40～60 個）以上増加しても、PA の生成量が増加しないのは、寄主植物側の PA 生成作用に限界があることによると考えられる。またパラフィン上に置いた胞子浮遊液区において、高濃度の浮遊液の方が発芽率の低い傾向を示しているのは、胞子の自家中毒的作用によるものであろう⁹⁾。

胞子浮遊液は、100℃ 10 分の熱処理によつて PA 生成誘発能を失うことが認められたが(実験 2.)、この原因については、PA 生成を誘発する物質自体が熱によつて直接不活性化されるためか、あるいは胞子の死

によつて誘発因子の生成が妨げられるためか、の 2 つの場合が想定される。また胞子の磨砕実験において、磨砕した胞子液の上澄中には、PA 生成の誘発因子は認められなかつた。従つて本因子は、胞子中に既存する物質ではないように思われる(実験 3.)。ただし、本実験はなお不備な点が多いので、更に精密な追試を必要とするものと考ええる。また遠心上澄の実験において、調製後 23℃ で 24 時間を経た胞子浮遊液の遠心上澄中に、PA 生成の誘発因子が存在することが認められた(実験 4.)。このことは、PA 生成の誘発因子は、菌が寄主と直接接しなくても生成されるものであることを示している。更に、本上澄中のこの因子は 60℃ 10 分の加熱によつて殆んど完全に不活性化することが分つた(実験 5.)。

以上のことから、PA 生成に関与する病原菌側の因子は、その胞子から水中に滲出するものであり、恐らくは、その代謝活動によつて生ずるところの熱に対し

て非常に不安定なものであると推察される。

摘 要

1) ダイズと *Fusarium* sp. とを用いて, Phytoalexin (PA) 生成に関与する病原菌の側の因子について調べた。

2) PA の生成は, 胞子の濃度が 1 視野当り 3~6 個の時は認められず, 40 個以上の時に顕著に認められる。

3) 胞子浮遊液を 100°C 10 分加熱すると, PA 生成を誘発する能力を失い, 磨砕した胞子液の遠心上澄にも, PA 生成を誘発する能力が認められない。

4) 調製後 23°C で 24 時間経た 胞子浮遊液の遠心上澄は PA 生成を誘発する能力を有している。しかし, この上澄を 60°C で 10 分加熱するとこの能力を失う。

5) PA 生成を誘発する因子は熱に対して非常に不安定なものである。 (1958 年 2 月 15 日受理)

引 用 文 献

- 1) 水上武幸 (1953), 日植病報, 17 : 57~60.
- 2) 水上武幸 (1953), 日植病報, 17 : 141~143.
- 3) Müller, K. O. (1954), Phytopath. Ztschr., 27: 237~254.
- 4) 植原一雄 (1958), 日植病報, 23 : 225~229.
- 5) Yarwood, C. E. (1956), Mycologia, 48 : 20~24.

(附記) 本報文投稿後に接した Müller* の報告によつて, 胞子濃度と PA 生成との関係は, インゲンと *Phytophthora infestans* の場合においても, 本報告の結果とほぼ同様な傾向を示すことを知つた。

* Müller, K. O. (1958), Nature, 182 : 167~168.

Summary

Phytoalexin (PA for short) production of the soybean pod in reaction to *Fusarium* sp., as affected by conditions of spore suspension, was studied. PA was produced remarkably when suspensions containing spores more than 40 per one microscopic field at 150-fold magnification, were placed on the soybean pod, while not at all when suspension with 3~6 spores per one microscopic field was used. Both spore suspension heated at 100°C for 10 minutes and supernatant of suspension suspended with macerated spores, failed to induce production of PA. The supernatant of spore suspension, incubated for 24 hours at 23°C, revealed to possess ability to induce PA production, but lost the ability when the supernatant was heated at 60°C for 10 minutes.

(Hiroshima Agr. Coll., Saijo, Hiroshima-ken, Japan)

文 献 紹 介

Aphis fabae の畑への飛来様式

Müller, H. J. (1957) Ueber die Entwicklung erhöhten Randbefalls von Ackerbohnen-Beständen durch *Aphis fabae* Scop.
Zeit. Pflanzenkrankh. u. Pflanzensch., 64 : 593-599.

C. G. Johnson は畑への有翅アブラムシの初期着生は, 10 m 以上の高空に浮遊するアブラムシの垂直降下に始まると主張している。しかし, 実際にはそうとばかり考えられない例が多い。筆者はヨーロッパで広汎な作物を加害する *Aphis fabae* のソラマメ畑への飛来様相を全株調査によつてしらべたところ, 畑の周囲の株には有意に飛来数が多いことがわかつた。これは, 本種の畑への感染が低空を横ばいに飛んでくる有翅虫によるためである。Johnson の説とこの事実との矛盾は, Moericke のアブラムシの飛翔の二相説から説明できる。すなわち“Flug-phase”にあるアブラムシが“Befallsphase”に移るときは, 垂直降下が, それ以後は地表近くの水平移動がみられるのであろう。[この事実は間作によるウイルス病減少へのひとつの説明になると思われる] (伊藤嘉昭)

健全株に寄生できない種のヨコバイが ウイルス罹病株に寄生する一例

Maramorosch, K. (1958) Beneficial effect of virus-diseased plants on non-vector insects.
Tijd. Pl.-ziekten, 64 : 383-391.

ヨコバイの 1 種 *Dalbulus maidis* はトウモロコシの stunt virus を媒介するが, その寄主範囲はイネ科植物にかぎられていて, アスターには寄生できない。ところが, アスターを aster yellows virus に感染させておくと, 寄生できるようになる。すなわちアスターの健全株では放飼した成虫の全部が 4 日で死んでしまうが, 罹病株では 4 日後にも全部生きていて, 42 日後にしらべたところ, トウモロコシを用いた対照区と殆んど同じ約 80 % の生存率を示した。全く同様な結果は若虫でも得られた。前もつて, アスターのウイルス罹病株を摂食させておいた昆虫は, 健全株に移しても, 直接トウモロコシからアスターに移した場合よりずっと高い生存率を示した。この虫によつてウイルスは伝播されないのので, 以上の結果は, 罹病葉がヨコバイにとつて生理的に好適な状態にあることを示す。 (伊藤嘉昭)