イネ白葉枯病に関する研究 (I)

感染にともなうイネ葉の炭水化物, 窒素化合物, リン酸化合物の変動*

三沢正生**・宮崎栄一郎**

Tadao MISAWA** and Eiichiro MIYAZAKI**: Studies on the Leaf Blight of Rice Plant (I) Alteration of content of carbohydrates, nitrogenous and phosphorus compounds in the diseased leaves

Abstract

Alteration of content of carbohydrates, nitrogenous and phosphorous compounds in rice plant leaves infected by *Xanthomonas oryzae* was investigated.

1. In the inoculated leaves, contents of reducing and unreducing sugar slightly increased at the early stage of the infection. Moreover crude starch content increased, while total carbohydrate and hemicellulose-carbohydrate content decreased by the infection.

2. High accumulation of free ammonia, low contents of water soluble protein and water insoluble protein-nitrogen were characteristic of the inoculated leaves. With the progress of the disease, total nitrogen content decreased gradually. According to the results of molecular weight classification of water soluble protein, the contents of high molecular weight protein, especially "fraction I protein", decreased and low molecular weight protein increased by the infection.

3. At the early stage of the infection, increases of acid soluble phosphorus and inorganic phosphorus contents were observed respectively. During the all experimental periods, there were high contents of total phosphorus and insoluble phosphorus in the inoculated leaves.

(Received January 22, 1972)

I. 緒 言

従来、イネ白葉枯病についての研究はイネ品種間の発病差異、生育時期および施肥法の相違による罹病性あるいは抵抗性の変動^{6, 21)}、発生経過^{2, 7, 24)}、病原細菌の生理^{8, 9, 13, 16)}など多数の報告がある。しかし病原細菌侵入後の寄主の生理変化を追求した研究は少なく、渡辺ら¹⁹⁾の呼吸の変動に関する研究などが主なものである。また、罹病にともなうイネ葉の各種成分の消長についての研究は見当たらない。したがって白葉枯病細菌によるイネ葉の発病機構を考察する資料を得る目的で研究を行なった。

本報告はイネ葉の主要構成成分である炭水化物, 窒

素化合物およびリン酸化合物について、感染による成分含量の変動について実験した結果である。

II. 実験材料および方法

供試イネ品種は感受性の愛知旭である。苗は春日井氏⁵⁾を一部修正した水耕液 (FeCl₂ のかわりにエチレンジアミン4酢酸2Na 3.72 g, FeSO₄·7H₂O 2.78 g, 1 N-NaOH 液 10 ml を蒸留水で 100 ml とし、水耕液 / 当たり 2.2 ml を添加した。水耕液は 100 倍 HCl 稀釈液を用いて pH 5.5 に調製した。) を用い、ガラス室内で育成した。水耕液は 1 週間ごとに交換した。感染率を高め、さらに病斑を拡大させるために接種 10 日前から水耕液中のカリウムを除き、窒素量を 2 倍とし

* 本論文の概要は昭和 46 年 10 月日本植物病理学会東北部会で発表した。

** 東北大学農学部 Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai, Japan.

た。供試菌は強病原性の *Xanthomonas oryzae* H 5809 である。脇本馬鈴蔗半合成培地¹⁸⁾を用い、2日間培養(30C)した斜面培養試験管1本につき、1 mlの生理食塩水を加え、振とうして得た細菌浮遊液を接種液として用いた。

接種方法：穂ばらみ期の株を用い、主稈の止葉から逆にかぞえて2葉と3葉を実験に用いた。半葉法として各葉の片側葉身に基部から先端にわたり約2 cmの間隔で網針10本の針束接種を行ない感染葉身とした。また反対側葉身は生理食塩水で同様な接種操作を行ない、これを非感染葉とした。30Cの接種箱内に各株を48時間保った。その後は温室に移し、病斑を形成させた。

接種後3, 5, 7日の3回接種葉を採取した。毎回トレイシグペーパーを用いて病斑部を写し取り、それを方眼紙に転写し、病斑面積を切り取って秤量し、半葉身面積に対する総病斑面積の割合を求めて、これを病斑面積率とした。

分析のため採取した葉は、分析に供するまで凍結保存した。中肋を除去して健全葉身と罹病葉身に分け、各々について、乾物重に換算して約1 g(葉身50~60枚相当)について分析を行なった。なお接種葉の採取時間は、午前10時と定めて行なった。

炭水化物の分析は、村山ら¹⁰⁾の方法によった。すなわち、採取葉を細切し、石英砂と共に80%エタノールを加えてパルプ状になるまで磨砕し、加熱抽出後遠心分離し、上清を減圧濃縮、さらに除蛋白処理後、一部について Somogyi-Nelson 法¹⁾でグルコースとして定量、これを直接還元糖分画とした。また上記除蛋白液の一部は硫酸で加水分解後同様に定量し、これを全糖分画とした。さらに全糖と直接還元糖の差を非還元糖とした。上記80%エタノール抽出後の残査は糊化して、過塩素酸で抽出を行ない、抽出液の過塩素酸濃度を0.56 Nに調製し、加水分解、中和後同様にグルコースとして定量し、これを粗でんぷん分画とした。全炭水化物含量は葉約0.5 gを細切し、石英砂と共に0.7 N塩酸を加えて乳鉢で磨砕し、加水分解、遠心分離後上清を中和、除蛋白をして同様に定量した。この炭水化物含量値から全糖と粗でんぷん含量値の和を差引いたものをヘミセルロース系炭水化物とした。

窒素化合物の分画は、主に高橋ら¹⁵⁾の方法によった。すなわち、前記と同様に葉を細切し、石英砂・水と共に乳鉢で磨砕する。磨砕液を遠心分離し、残査は数回水で洗滌、上清を合して一定量とする。この一部を分解フラスコにとり、少量の硫酸カリウムを加えて

硫酸分解を行ない、Indophenol 法²⁰⁾により水溶性全窒素を定量した。別に上記上清の一部を取り、富山ら¹⁷⁾の方法によってトリクロル酢酸(TCA)による蛋白沈殿操作を行ない、沈殿を遠心分離後TCA溶液で洗滌し、前記と同様に沈殿を硫酸分解して窒素を定量した。これを水溶性蛋白態窒素とする。アンモニア態窒素は、上記上清の一部につき、アルカリ性で常温による通気操作を24時間行なって留出するアンモニアを捕集し、同様に窒素を定量した。アミド態窒素は、上清の一部を硫酸で加水分解後アルカリ性とし、以下アンモニア態窒素定量の場合と同様に通気操作を行ない、留出してくるアンモニアを捕集し、同じく窒素を定量する。この定量値よりアンモニア態窒素定量値を差引いたものをアミド態窒素とした。水溶性全窒素から、水溶性蛋白態窒素、アミド態窒素およびアンモニア態窒素の定量値を差引いた値を残余窒素とする。別に葉約0.5 gを硫酸分解し、同様に定量を行ない、これを全窒素とし、この全窒素と水溶性全窒素との差を非水溶性蛋白態窒素とした。

窒素化合物のうち水溶性蛋白の分画については下記のように行なった。すなわち、葉約1 gを細切し、冷却下で石英砂および0.1 M トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)を加えて磨砕し、105,000×gで2時間超遠心分離を行なった。上清をDiaflo XM-100 およびPM-30 で処理し、水溶性蛋白質を分子量10万以上、10万-3万および3万以下に分画した。分子量10万以上の蛋白質分画のうち、Jakoby ら⁴⁾の方法によって、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ とエタノールによる沈殿操作をくり返してFraction I 蛋白質の粗抽出物を得た。各分画の蛋白質含量はFolin 試薬³⁾を用いて測定し、牛血清アルブミンに換算した。

リン酸化合物は、葉1 gの細切片を石英砂と共に冷10% TCA 溶液を加えて冷却下で磨砕し、Schneider¹²⁾の方法によって、遠心分離後、上清は酸溶性リン分画とし、沈殿についてエタノール・エーテル混液、TCA 溶液およびNaOH 溶液による抽出を行ない、脂質リン、核酸リン、蛋白リンおよび不溶性リンに分画した。各分画は湿式灰化後、高橋²²⁾の方法で無機リンとして定量した。酸溶性リン分画の一部を灰化せず直ちに定量したものを無機リン分画とした。また、葉0.5 gを湿式灰化後同様に定量し、これを全リンとした。

III. 実験結果

(1) 病斑形成の経過

前記の実験条件下では接種後2日目に一部の接種葉

で、3日目にはほとんどの接種葉で葉脈に並行したスジ状の水浸状淡黄色病斑が形成した。各病斑は相互に接することなく、また病斑部と健全部との境界も不明瞭であった。接種葉15枚の平均病斑面積率は約14% (病斑1個の平均面積は約25 mm²) であった。接種後5日目には、病斑は黄色となり、多くの病斑では、その両端が互に融合するようになり、また健全部との境界は明瞭となった。平均病斑面積率は約33%に増大した。接種後7日目では、病斑は橙黄色を呈し、一部の葉身では葉縁が灰白色となった。各病斑は、完全に融合して連なり、健全部は中肋に沿った部分でのみ観察された。平均病斑面積率は約65%であった。なお、中肋の反対側の非接種葉身では、特に肉眼的異常は発見できなかった。

(2) 炭水化物の変動

第1表に示すように、全炭水化物は、接種後の日時が経過するにしたがい、わずかに増加する傾向にあるが、罹病葉身は健全葉身に比べて含有率が低かった。直接還元糖、非還元糖など全糖含有率は、罹病の初期において健全葉より若干高いが、後期では逆の傾向を示した。ヘミセルロース系炭水化物は、全炭水化物の

場合と同様に、やはり罹病葉身で低下している。全炭水化物中に占めるヘミセルロース系炭水化物の割合は約60%で、この減少が直接全炭水化物含有率に影響を与えたものであろう。ヘミセルロース系炭水化物の内容は明確でなく、ヘミセルロースのほかにはペントザンセルロースなどと共に細胞壁の構成成分と考えられており、この含有率低下は罹病組織での細胞壁の変化を推定させる。粗でんぷんはいずれの場合でも、非常に低濃度でのみ検出されたが、罹病葉身では常に高い傾向が認められた。本報での粗でんぷん定量法はでんぷんのほかにデキストリン様の多糖類、さらには細胞壁の構成成分の一部も含まれて来る。また、病原細菌の生産する粘性多糖類も粗でんぷんとして含まれた可能性もある。

これらを総合して判断すると、罹病により組織を構成している炭水化物、特に細胞壁の構成成分に変化が生じてくる。一方、正常な代謝系が分解過程に移行し、その結果が全糖などの増加として反映されたものと考えられる。今後は、これらの現象と関連する酵素活性を測定し、それを裏付ける必要があると考えられる。

第1表 罹病にともなう炭水化合物の変動

接種後の日数	3		5		7	
	健全葉	罹病葉	健全葉	罹病葉	健全葉	罹病葉
全炭水化物	23.2 ^a	23.0 ^a (1.0) ^b	25.1	24.7 (1.0)	26.2	25.1 (1.0)
全糖	9.3	10.2 (1.1)	9.6	10.1 (1.1)	10.2	9.7 (1.0)
直接還元糖	3.0	3.4 (1.1)	2.9	3.0 (1.0)	3.6	3.5 (1.0)
非還元糖	6.3	6.8 (1.1)	6.7	7.1 (1.1)	6.6	6.2 (0.9)
粗でんぷん	0.2	0.4 (2.0)	0.2	0.3 (1.5)	0.3	0.5 (1.7)
ヘミセルロース系炭水化物	13.7	12.4 (0.9)	15.3	14.3 (0.9)	15.7	14.9 (1.0)

a 乾物重当りの百分率 b 健全葉に対する比

(3) 窒素化合物の変動

結果を第2表に示した。罹病葉身においては全窒素、水溶性全窒素ともに含有率が低下している。酵素などのイネ生理に重要な影響をもつ蛋白質は水溶性蛋白態窒素分画に属するが、これは罹病の影響を受けやすく、急激に低下する。これに対し、アンモニア態窒素の含有率は他形態の窒素に比較して、元来最も低い、他形態窒素含有率が罹病で低下するのに対し、むしろ増加する傾向が認められた。非水溶性蛋白態窒素は全窒素の大部分を占めているが、全窒素と同様に、実験期間中減少する傾向を示している。その含有率は罹病葉身で低く、葉緑粒など細胞構成成分が破壊され

て行くことを推定させる。アンモニア態窒素の増加は、これら蛋白質の分解産物と考えられる。坂本¹¹⁾によれば、イネ体内に蓄積されたアンモニアは、細胞原形質に有害な作用をおよぼすので、本病においても、遊離アンモニアの増加が、罹病程度の増大に関係する要因の一つとも思われる。一方、残余窒素はアミノ酸がその主体と考えられるが、アミド態窒素と共に罹病葉身において、増加が認められない。これはアミド、アミノ酸がアンモニア態窒素と比較して、本病細菌にとり込まれ易いか、あるいは他組織に転流され易いためであろう。

第2表 罹病にともなう窒素化合物の変動

接種後の日数	3		5		7	
	健全葉	罹病葉	健全葉	罹病葉	健全葉	罹病葉
全 窒 素	3.85 ^a	3.73 ^a (1.0) ^b	3.67	3.01 (0.8)	3.32	2.32 (0.7)
水溶性全窒素	0.65	0.58 (0.9)	0.60	0.50 (0.8)	0.61	0.46 (0.8)
水溶性蛋白態窒素	0.18	0.11 (0.6)	0.17	0.07 (0.4)	0.16	0.05 (0.3)
アミノアミド態窒素	0.05	0.06 (1.2)	0.05	0.12 (2.4)	0.06	0.11 (1.8)
アミド態窒素	0.06	0.06 (1.0)	0.05	0.04 (0.8)	0.05	0.05 (1.0)
残 余 窒 素	0.36	0.35 (1.0)	0.33	0.27 (0.8)	0.34	0.25 (0.7)
非水溶性蛋白態窒素	3.20	3.15 (1.0)	3.07	2.51 (0.8)	2.71	1.86 (0.7)

a 乾物重当りの百分率 b 健全葉に対する比

(4) 水溶性蛋白質組成の変動

第2表の結果から、罹病葉身において水溶性蛋白態窒素の減少が特に顕著に認められたので、どのように蛋白質組成が変化しているかを知るため、分子量による分画を試みた。結果を第3表に示した。分画操作において他分画成分の相互混入を防ぐため、各分画操作を数回くり返すなど充分注意したが、Diaflo による分画は厳密なものとはいえず、いく分かの混入は避けられない。しかし、この分画操作は Sephadex などによるカラムクロマトグラフィー、超遠心分離による分画と本質的には同じであり、本実験目的には充分有

用であると思われる。第3表の結果によると、罹病葉身の蛋白質のうち分子量10万以上の高分子蛋白質の減少がいちぢるしく、特に Fraction I 蛋白質に相当する分画の減少が顕著であった。Fraction I 蛋白質は、最近その本体がカルボキシディスムターゼであるといわれ、この分画の減少は罹病葉での光合成の低下が予想される。一方、これら分子量10万以上の蛋白質分画の減少に対して、分子量3~10万と3万以下の蛋白質分画が増大しており、罹病により高分子蛋白質の低分子化が起っていると考えられる。

第3表 罹病にともなう水溶性蛋白質組成の変動

接種後の日数	3		5		7	
	健全葉	罹病葉	健全葉	罹病葉	健全葉	罹病葉
分子量10万以上分画	37.6	32.9	36.3	30.2	38.5	26.4
Fraction I 蛋白質分画	(36.7)	(32.2)	(35.8)	(3.5)	(37.6)	(0.6)
分子量3~10万分画	19.5	21.3	20.2	18.9	19.0	12.4
分子量3万以下分画	42.9	45.8	42.5	50.9	42.5	61.2

数値は全水溶性蛋白質に対する各分画の百分率

第4表 罹病にともなうリン酸化合物の変動

接種後の日数	3		5		7	
	健全葉	罹病葉	健全葉	罹病葉	健全葉	罹病葉
全 リ ン	0.18 ^a	0.22 ^a (1.2) ^b	0.18	0.24 (1.3)	0.17	0.18 (1.1)
酸 溶 性 リ ン	0.13	0.15 (1.2)	0.13	0.13 (1.0)	0.12	0.10 (0.8)
無 機 リ ン	0.09	0.10 (1.1)	0.09	0.08 (0.9)	0.09	0.07 (0.8)
脂 質 リ ン	0.01	0.01 (1.0)	0.01	0.02 (2.0)	0.01	0.01 (1.0)
核 酸 リ ン	0.02	0.02 (1.0)	0.02	0.03 (1.5)	0.02	0.02 (1.0)
蛋 白 リ ン	0.01	0.01 (1.0)	0.01	0.01 (1.0)	0.01	0.01 (1.0)
不 溶 性 リ ン	0.01	0.03 (3.0)	0.01	0.05 (5.0)	0.01	0.04 (4.0)

a 乾物重当りの百分率 b 健全葉に対する比

(5) リン酸化合物の変動

罹病にともなうリン酸化合物の変動を第4表に示した。全リンは実験期間を通じて大きな変動はなかったが、罹病葉身では健全葉身に比較して、常に含有率が高い傾向にあった。この傾向は不溶性リンで顕著で、常に4~5倍の含有率を保っている。蛋白リンは罹病、健全葉身間で差がなく、脂質リン、核酸リンは含有率が高い。酸溶性リン、無機リンは大体同じ様な消長をたどり、初期の罹病葉身で含有率が高く、病状が進行するのにしたがって逆の傾向を示すようになる。酸溶性リンは、エネルギー代謝などに必須な各種リン酸化合物を含み、罹病初期に含有率が増加している。このことは渡辺ら¹⁹⁾の稲白葉枯病感染初期葉で呼吸の高まりが観察されたことと一致する。ただし、いずれの場合にも罹病葉の分析においては混在している病原細菌も共に分析しているわけであり、酸溶性リンなどの増加が稲葉組織単独のものであるかどうかは明白でない。

VI. 論 義

イネ白葉枯病に感染した感受性品種、愛知旭を用い、発病にともなう葉内成分について感染後経的に測定した。したがって抵抗反応が小さく、病斑の拡大しやすい状態での成分変動を示すものである。接種3日後の罹病初期葉において、炭水化物では直接還元糖、非還元糖など全糖が若干増加しており、窒素化合物では水溶性蛋白態窒素の減少とアンモニア態窒素の増加、リン酸化合物では酸溶性リン酸化合物の増加、特に無機リン酸の増加などが特徴的である。一般に蛋白質が分解減少して行くときは蛋白質がアミノ酸に分解し、さらにアミノ酸が有機酸とアンモニアに分解する過程を経るが、イネ白葉枯病感染葉の場合も水溶性蛋白質の減少、アンモニア態窒素の増加が観察されることから同様の過程を経ているものと思われる。さらに減少が顕著な水溶性蛋白質は、病症の進展にともない低分子化していることがわかる。これら分解反応は病原細菌の生産する蛋白分解酵素が関与しているものと思われるが、寄主体側にも自己分解作用としての蛋白質分解反応が存在するから、現段階ではどちらかが主体的であるか不明である。同様のことは、直接還元糖や非還元糖などの増加から炭水化物の場合にも考えられる。リン酸化合物のうち、酸溶性リンの増加は罹病組織での呼吸上昇を推定させるが、その場合無機リンの増加と関連して、リン酸を効果的に有機化する作用は低下しているものと予想される。

接種7日後の罹病後期葉では、ほとんどの諸成分が健全葉より低下しており、細胞の代謝を維持する種々の生理機能があらゆる面で低下し、さらに構造の構成成分などの崩壊も進行する。接種5日後の罹病中期葉では罹病初期葉の分析値とかなり類似した結果を示し、この時期を境にして、より急速に分解過程が進行するものと思われた。

以上の結果を病斑面積率と関連させて考察すると、これら諸成分の増減が病斑部でだけ生じている現象ならば、その増減の比率は病斑面積率と一致するはずである。ところが、初期葉では大体一致しているが、罹病中期と後期葉では必ずしも一致しない。また葉の老化にともなって最も敏感に減少するといわれている Fraction I 蛋白質は、本病原細菌には存在していないと考えられるから、この減少の割合が最も良く病斑面積率と一致するはずである。Fraction I 蛋白質の減少率と病斑面積率を比較してみると罹病初期葉では一致しているが、罹病中期および後期葉では病斑面積率を上まわった Fraction I 蛋白質の減少が認められ、この時期には病斑部以外の健全部でも罹病の影響を受けていることが予想される。

V. 摘 要

本報告は稲白葉枯病罹病にともなう水稲葉の炭水化物、窒素化合物、リン酸化合物の変動について述べた。

1) 炭水化物 罹病初期で全糖の含有率増加が認められたが、罹病後期では全糖の含有率はむしろ健全葉より低下する。粗でんぷんはいずれの時期でも罹病葉で含有率が高い。また、全炭水化物およびヘミセルロース系炭水化物は罹病により若干低下する。

2) 窒素化合物 罹病葉では水溶性蛋白態窒素および非水溶性蛋白態窒素の低下が顕著で、逆にアンモニア態窒素の増加が認められた。罹病が進行するにしたがって、全窒素が減少した。水溶性蛋白質を分子量の大小に分画して定量すると、分子量10万以上の、特に Fraction I 蛋白質部分の減少が観察され、一方分子量3万以下の低分子蛋白質の割合が増加した。

3) リン酸化合物 罹病初期で酸溶性リン、無機リンの増加が認められた。全リン、不溶性リンは実験期間中では常に罹病葉で含有率が高い傾向にあった。

文 献

- 1) 福井作蔵 (1969). 還元糖の定量法. 東京, pp. 10.
- 2) 後藤和夫ら (1953). 日植病報 18: 82.
- 3) 萩原文二ら (1964). 酵素研究法 II (赤堀四郎編)

- 東京, pp. 237.
- 4) Jakoby, W. B. *et al* (1956). J. Biol. Chem. 218: 811-822.
- 5) 春日井新一郎 (1939). 土肥誌 13: 669-822.
- 6) 近藤源吉・香村敏郎 (1953). 愛知農試彙報 8: 21-34.
- 7) 久原重松・関谷直正 (1957). 日植病報 22: 9.
- 8) 水上武幸 (1961). 佐賀大学農学部彙報 13: 1-85.
- 9) 向 秀夫・伊阪実人 (1964). 日植病報 29: 13-19.
- 10) 村山 登ら (1955). 農技研報告 B 4: 123-166.
- 11) 坂本正幸 (1968). 坂本教授還暦記念論文集. 仙台, pp. 93.
- 12) Schneider, W. C. (1945). J. Biol. Chem. 161: 293-303.
- 13) 諏訪隆之 (1962). 日植病報 27: 165-171.
- 14) 田上義也ら (1957). 日植病報 22: 8.
- 15) 高橋治助ら (1955). 農技研報告 B 4: 85-122.
- 16) 田中行久 (1963). 九大農学芸誌 20: 151-155.
- 17) 富山宏平ら (1955). 日植病報 20: 59.
- 18) 脇本 哲 (1955). 九大農学芸誌 15: 151-160.
- 19) 渡辺実ら (1968). 日植病報 34: 186.
- 20) 八木国夫・奥田 潤 (1959). 蛋・核・酵 4: 139-141.
- 21) 山中 達ら (1952). 日植病報 16: 191.
- 22) 吉川春寿・高橋泰常 (1958). 磷酸代謝実験法. 東京, pp. 29.