クリのクリタマバチ抵抗性に関する研究(第2報)

クリのクリタマバチ抵抗性とクリの芽の組織化学

松井 鑄一郎・鳥 潟 博 高

(名古屋大農学部付属農場)(名古屋大農学部)

Studies on the resistance of chestnut trees to chestnut gall wasps II.

The resistance of chestnut trees to chestnut gall wasps and histochemistry of chestnut buds

Shuichiro MATSUI and Hirotaka TORIKATA

Faculty of Agriculture, Nagoya University, Chikusa, Nagoya

Summary

Morphological and cytochemical differences between susceptible and resistant varieties were surveyed to clarify the natures of the resistance on the chestnut trees to the gall wasps. Results were as follows.

1. Remarkable differences were found in the size of galls and wasps between susceptible and resistant varieties, and larvae were surviving not only in the susceptible but considerably in the resistant.

2. Nuclei, nucleoli and cytoplasm were rich in the division layer of galls, but with increasing the resistance this inclination decreased.

3. In galls (esp. division layer) of the susceptible, histone, indol and other protein reactions appeared intensively, concluding the protein synthesis.

4. Deposit of cellulose on the cell wall was poor in the susceptible galls (esp. division layer).

5. Dehydrogenase and succinodehydrogenase were extremely active in the susceptible galls, but not at all or scarcely in the resistant.

6. The division layer of the susceptible galls exhibited intensive peroxidase and NADI-oxidase reactions. In the parenchyma tissues, peroxidase was strong in the susceptible but NADI-oxidase, reversibly, in the resistant.

7. Browning associating catechol tannins was occurred at more than 50% in the relative resistant varieties and at beyond 90% in the heavy resistant. Polyphenoloxidase causing browning was slightly more active in the resistant.

I. 緒 言

クリのクリタマバチ抵抗性についての組織学的な研究は福田と奥代によつて行なわれた⁽⁵⁾。それによると抵抗性と感受性の相違は感受性では正常にゴール形成が行なわれるのに反し、抵抗性では組織侵入中や侵入直後死亡し、12月頃までには死滅する、この場合幼虫の死が先か周囲組織の死が先か不明であるという。したがつて筆者らはこの幼虫あるいは周囲の死の遅速の問題、また周囲組織にみられるかつ変とポリフェノール性物質との関係を明らかにするとともに、さらに一般にゴール形成が行なわれるときは核酸^(8,10,13)、インドール酢酸(IAA)^(1,2,17)、その他各種の酵素活性の変化^(10,16,17)などが知られているので、クリの芽がクリタマバチによつてゴールを形成する場合にもこれらの点がみられると考え、組織化学的な検索を行なつた。あわせて抵抗性発現の機構を知ろうとした。

なお、この研究を行なうにあたり、材料の提供をうけた農林省園芸試験場志村勲技官に厚くお礼を申し上げる。

II. 材料および方法

供試材料は平塚市園試の19品種である。採集は10月14日で、酵素の組織化学的検出は生きた芽を順次とり、徒手切片を作り観察した。すべての観察項目が終つたのは11月6日であつた。その他の項目はFAA固定後、パラフィンブロックを作り、切片とし検鏡した。組織化学的な方法はおもにLISON⁽⁶⁾の著書によつたが、それ以外のものについてのべると、-SHまたは-S-S-基はチオグリコール酸で1昼夜処理後、ジメチルホルムアミド飽和のRSR試薬で6時間染色、カテコールタンニン はバニリン0.1%濃塩酸液、コハク酸デヒドロゲナーゼは切片をクロラミンT 10^{-2} Mで3分間処理後ネオテトラジウム0.1%とコハク酸ナトリウム(0.2M)の混合液pH7.4で処理後その被染度によつた。

1969年9月12日受理

III. 結 果

1. ゴールと幼虫の大きさおよび幼虫の生死
これらの結果を表1に示した。感受性品種のゴールは
11月上旬で長径 1.1~1.7 mm 生長しているのに対し、

抵抗性では 0.3~1.0 mm ではほぼ感受性品種の約半分の
大きさである。また銀鈴はゴールの大きさ、その他種々
の点から感受性とみなしてよい条件を備えていた。また
同じように錦秋、筑波、森早生は弱抵抗性、大和早生、

Table 1. Morphological properties of susceptible and resistant
galls and wasps in them.

Var.	Size of galls		Size of wasps		Percent of living wasps
	Vertical	Horizontal	Length	Width	
	mm	mm	mm	mm	
Susceptible					
Boji 480	1.37	.76	.33	.23	100
Taishowase	1.35	.80	.58	.42	100
Shimokatsugi	1.41	.76	.53	.35	100
Osaya	1.71	.68	.59	.42	100
Hayadama	1.65	.71	.58	.38	80
Bonguri	1.15	.64	.51	.39	100
Nakatetanba	1.27	.69	.61	.45	100
Resistant					
Ginrei	1.06	.64	.51	.26	100
Kinshu	.83	.47	.25	.18	50
Tsukuba	.74	.32	.22	.19	67
Moriwase	.84	.57			
Yamatowase	.67	.43	.22	.16	60
i-5	.47	.35			
Ganne	.55	.33			
Arima	.30	.24	.17	.17	100*
Akachu	.56	.32	.14	.14	100*
Imakita	.42	.32	.19	.13	83
Ginyose	.75	.38	.19	.19	100
Tagiriginyose	.59	.33	.17	.16	75

* One wasp.

11-5 号、岸根は中位の抵抗性、
有摩、赤中、今北、銀寄、田尻銀
寄は強抵抗性をもつものとみなし
た。したがって以下の表の品種の
配列は下へゆくほど抵抗性が増す
と考えてよい。

また一芽中のゴールの数につい
てみると、幼虫が存在しているゴ
ールは強抵抗性では1個ないし2
個、弱い錦秋、筑波でも3個程度
が限度で、幼虫のみられない褐変
したゴールは抵抗性が強くなるほ
ど多い（表6参照）。そしておの
おののゴールはそれぞれ独立して
いる場合がほとんどで、同一ゴ
ール内の幼虫も1~2頭と少い。こ
れと逆に感受性品種ではゴールの
数も多く、たがいにく着し、その
中の幼虫数も多い。つぎにクリタ
マバチの生死についてみると、感
受性品種ではほとんどすべてが生
存しているし、抵抗性品種でも相
当高い生存率を示す。また幼虫の

Table 2. Volume of nuclei and nucleoli and cytoplasmic density in susceptible and resistant galls.

Var.	Division layer			Parenchyma tissue			Healthy tissue		
	Nucle- us	Nucle- olus	Cyto- plasm	Nucle- us	Nucle- olus	Cyto- plasm	Nucle- us	Nucle- olus	Cyto- plasm
Susceptible									
Boji 480	11~20	4~6	≡	8~11	2~3	+			
Taishowas	12~21	4~6	≡	10~12	3~4	+	5~7	0	≡
Shimokatsugi	9~20	3~5	≡	9~11	2~3	+			
Osaya	12~17	3~7	≡	9~12	3~4	+			
Hayadama	11~21	3~7	≡	8~11	2~4	+	6	0	≡
Bonguri	11~20	3~9	≡	9~11	2~4	+	5~7	0	≡
Nakatetanba	12~19	3~7	≡	8~12	3~4	+			
Resistant									
Ginrei	9~17	3~5	≡	8~11	2~3	+	5~7	1~0	≡
Kinshu	9~15	3~6	≡	7~8	2~3	+	5	0	≡
Tsukuba	9~13	3~5	+	5~8	1~3	+	5~7	0	≡
Moriwase	9~13	3~4	+	5~9	1~3	+			
Yamatowase	9~15	3~5	+	8~11	2~3	+	7	0	≡
Ganne	7~13	3~4	+	7~9	1~3	+	5~7	0	≡
Arima	7~9	2	+	7~9	2	+			
Ginyose	7~8	2	+	7~8	2	+	5	1~0	≡

* Diameter in micron.

Fig. 1. Nuclei and nucleoli in the susceptible (var. Taishowase) and resistant (var. Ganne) galls with methylgreen-pyronin (MP) staining.

- a. A part of the gall including a dead larva (ld) for some reasons. Taishowase $\times 140$.
 b. A part of the same gall including a normal larva.
 c. Nuclei and so on reduce MP stain. Ganne $\times 300$.

Note (the same as follows):

ap...apex, br...browning part, cm...cell membrane, cp...cytoplasm, dl...division layer of gall, e...epidermis, f...leaf or stipule tissue, g...gall tissue, hpt...healthy parenchyma tissue, l...larva, ld...dead larva, n...nucleolus, nl...nucleus, p...pith, pt...parenchyma tissue of gall, snl...swollen nucleus, vb...vascular bundle.

生長度合を体長でみると、抵抗性品種では感受性品種にくらべ約3分の1位であつた。これらの事実から抵抗性品種ではクリタマバチからある刺激をうけても反応が弱い、感受性品種のゴールはこの刺激をうけると、クリタマバチの栄養源の生成補給を行なうような代謝系がすみやかに形成されるものと考えられる。これに関連して大正早生ゴールでみられた興味ある現象は同一ゴール内でなんらかの原因で死亡している幼虫のまわりの組織(分裂層)はメチルグリーンピロニン(MPと略記)による染色度が極度に落ち、また大型化した核や仁は全くみられなくことである(図1a, b)。これはクリタマバチが何らかの刺激を周囲の宿主細胞に与えていることを暗示している。

2. 核酸

感受性品種はすべて、幼虫のまわりの組織すなわち分裂層はMPによつて非常によく染色される。とくにピロニンの染色性が高い(1b)。また、ピロニンによる染色程度とRNA含量が比例することが知られているの

で⁽⁶⁾感受性ゴールは相当量のRNAが生成されていると推測される。また仁もきわめて大型化しており、大きいものになると12 μ 程度のもが存在する(図3b)。しかし抵抗性品種では抵抗性が増すにつれて仁は小さくなり(図1c)、強抵抗品種では全くみられなくなる。このような異常な仁は健全部の生長点ではみられない。また分裂層の核は感受性の方が大きく、細胞質のピロニン染色性も大である(表2)。

DNAをFEULGEN反応で調べると、もつとも反応が強く出るのは一つの芽の中では生長点および生長中の葉であり、つづいて形成層における被染度が大である。これにくらべればその芽の中に形成されたゴールのDNA反応は弱い。この理由としてゴールの方が細胞が大きく、したがって単

位面積当りの核数は少ないこと、感受性品種ではさらに分裂層の核は膨潤して反応が薄められているためである(図2a, b)。したがって感受性品種と抵抗性品種のゴール間のDNAの差異は少ないが(図2c)、核の形態、機能からいえば重要な質的变化をしているのであろう。さらにまた感受性品種のゴールでは多核の核、あるいは多核の細胞をみることもあり(図3a, b)、このようなことは抵抗性品種のゴールや健全な生長点には全くみられない点である。

3. タンパク質

トリクロル酢酸で核酸を加熱抽出後、ファーストグリーンFCFでヒストンを染色すると、核酸の場合と同様に感受性品種のゴール組織は強く染色され、抵抗性では弱い(図4a, b, c)。強抵抗品種ではこの反応が検出されなくなることがある。ゴールのもとの組織である生長点や生長点の葉(内葉)の反応は感受性品種のゴールの組織ほどではないが強抵抗品種のそれにくらべれば大である。したがってゴール形成、とくにゴールが順調な生

Fig. 2. Feulgen reaction of the susceptible (var. Nakatetanba) and resistant (var. Yamatowase) galls.

a. and b. Of the susceptible. The healthy tissues (an apex and leaves) are concentric and vascular bundles are next. In gall tissues this reaction is reduced and the nuclei become large and swollen and then at the nearest part of the gall the positive reaction scarcely appears. Nakatetanba. $\times 28$ and $\times 280$.

c. Of the resistant. Nuclei are not large. Yamatowase. $\times 70$.

育を示すような感受性品種のゴールでは核酸の生合成と同時にタンパク質の顕著な生成があるといえる。なおこのファーストグリーンによる染色がタンパク質によるものであることはアミノ基、インドール基、グアニジン基、-SH、または -S-S- 基、水酸基の検出を組織化学的に

Fig. 3. Polynuclear cells and dinucleolus nuclei appeared in the division layer of the susceptible galls.

a. Polynuclear (n-1 and n-2) cells. Taishowase. $\times 700$.

b. Dinucleolus (nl-1 and nl-2) nucleus. Osaya. $\times 700$.

なうと感受性品種のゴールは抵抗性品種にくらべ強い反応を示し、ヒストンの呈色と同一の傾向であることから明らかである（表 3、図 5 a, b, c）。これらの反応のうちとくに重要であるのは、ジメチルアミノベンズアルデヒドと酸によるインドール基の反応で、トリプトファンのみならず、IAA も呈色することである。これによって感受性品種のゴールの分裂層および柔組織がよく呈色する（図 5 a）ことからみて、ゴール形成に IAA が関与していることが充分ありうと思われる。つぎに重要であるのは -SH、あるいは -S-S- 基の反応でこの反応がゴール柔組織にあるのでこれらはゴールのかつ変現象（抵抗性反応）に阻害的に作用しているのかも知れない。MILON 反応で感受性品種のゴール分裂層は赤かつ色を呈する（図 5 b）が、抵抗性品種はかつ色である。このかつ色はポリフェノール性物質によるものであることはポリフェノールの多量にふくまれるかつ変部や健全部での呈色と全く同じであることから明らかである。

4. 炭水化物

ゴール形成がおこる場合には細胞分裂および細胞の急

Fig. 4. Histone reaction of the susceptible (var. Nakatetanba) and resistant (var. Moriwase and Ginyose) galls with Fast green FCF.

- a. Of the susceptible (Nakatetanba). Two division layers show strong positive reaction. $\times 100$.
- b. Of the middle resistant (Moriwase). This reaction is weakened in the division layer and parenchyma tissue. $\times 140$.
- c. Of the heavy resistant (Ginyose). This reaction almost disappears. $\times 280$.

In all of cases, cell walls are stained with Safranin O.

速な伸長がある。したがって膜物質としてのセルローズ、ペクチン等には何らかの変化があると思われるが、全炭水化物を HIO_4 処理後の Schiff の試薬 (PAS) および HIO_4 -ナフトエヒドラジドで検出してみると感受性品種のゴールの分裂層では沈着が少ない (図 6a) が、抵抗性品種のゴールや健全組織の生長点が多い。この違いはペクチン物質によるものではなく、セルローズの沈着によるものである。すなわち、ルテニウム赤による染色性はゴール分裂層でも相当みられる (図 6b) のに対し、塩化亜鉛ヨード液ではほとんど染色されないからである (図 6c)。

つぎにアスコルビン酸を酢酸酸性の硝酸銀で検出するとクリのゴールでは二種の反応があらわれる。1つは処理後 20 分以内に起る黒色の反応とそれ以後におこる茶色の反応である。前者はアスコルビン酸そのものの反応であると考えられるが、これは感受性品種のゴールに多く、しかも分裂層よりも柔組織とくに表皮近くの柔組織に顕著である。これに反し後者の反応は抵抗性品種のゴ

ールに多くゴール全体に広がっている。この反応は抵抗性発現に何らかの役割をもっているかも知れない。

5. デヒドロゲナーゼとコハク酸デヒドロゲナーゼ

デヒドロゲナーゼ還元反応の本体は明らかになっていないが、組織の還元力の目安とみてよいであろう。この還元反応は感受性品種と抵抗性品種ではきわめて顕著な差異を示した。すなわち感受性品種のゴールではすべてこの反応があるのに対し、抵抗性品種では弱抵抗性の銀鈴と錦秋をのぞき他の品種はほとんど活性がないかあるいは全くない。また生長点の反応は感受性品種で強いことから感受性品種はもともこの還元反応が活性化されやすい素因をもつて

いるものと考えられる。コハク酸デヒドロゲナーゼについての結果もデヒドロゲナーゼの場合と同様であつた。すなわち感受性品種では抵抗性品種にくらべきわめて強い呈色がみられるが、抵抗性の弱い品種ではいく分活性がみられるものを除き他の品種は全くみられない。生長点や形成層の活性にくらべ感受性品種のゴールの活性がきわめて高いことから (表 4) ゴールの代謝は異状である。また生理的な意義を考えると、これらの活性はゴール分裂層が強く、柔組織ではゴール表面近くに多いことから、かつ変の阻害作用を強くもつていると推測される。

6. パーオキシダーゼと NADI-オキシダーゼ

感受性品種のゴール分裂層のパーオキシダーゼ活性はきわめて強く、健全部の生長点あるいは若い葉などより強い、抵抗性品種でも弱い品種は感受性品種ぐらい活性があるが、強いものになると低下する。ゴール柔組織での活性は抵抗性品種では相当低下していて、生長点より弱い (表 5)。NADI-オキシダーゼすなわちチトクロ

Table 3. Reactions of protein in susceptible and resistant galls.

Var.	Histone			Indol-base			Hydroxy-base		
	Div.*	Par.**	H.***	Div.*	Par.**	H.***	Div.*	Par.**	H.***
Susceptible									
Boji 480	++	+		++	+		+	+	
Taishowase	+++	++		+	+		++	+	
Shimokatsugi	+++	++		++	+		++	+	
Osaya	+++	+		++	+		++	—	
Hayadama	+++	+		+	+		++	±	
Bonguri	+++	+		++	+		+	+	
Nakatetanba	+++	++		++	+		+	+	
Resistant									
Ginrei	+++	+		+	±		+	±	+b
Kinshu	++	+		++	+	±	+	+	
Tsukuba	++	+	++	+	—		+	+b	+b
Moriwase	++	±	++	±	—	+	+	+b	+b
Yamatowase	++	±	++	±	—		+	+b	+b
Ganne	+	±	++	—	±	±	+	+b	+b
Arima	—	—	++	+++r	—	±	+	+b	+b
Imakita	—	±		—	—	+		+b	
Ginyose	+	±	++	—	—	+	+	+b	+b

* Division layer of galls.

** Parenchyma tissue of galls.

*** Healthy tissue of buds (apex or young leaf).

b Brown, indicating phenolics.

r Red, indicating catechol tannins.

Table 4. Activities of dehydrogenase and succinodehydrogenase in galls of susceptible and resistant varieties.

Var.	Dehydrogenase*			Succinodehydrogenase**		
	Div.	Par.	Apex	Div.	Par.	Apex
Susceptible						
Boji 480	+++	+~++	++	+++	+++	+
Taishowase	+++	+~++	+	+++	+++	+
Shimokatsugi	+++	++	+	++	++	+
Osaya	+++	++~+++	++	++	+++	++
Hayadama	++	++	+	+++	++	+++
Bonguri	++	+~++	+	++	+	+
Nakatetanba	+++	++	++	++	++	+
Resistant						
Ginrei	+~++	—~+	—	+	+	±
Kinshu	—~+	—~+	—	—	+	++
Tsukuba	—~±	±	—	—	±	±
Morimase	—	—	—	—	+	+
Yamatowase	—	±	+	—	±	±
i-5	—	—	—	—	±	+
Ganne	—	—	—	—	±	+
Arima	—	—	—	—	±	++
Akachu	—	—	—	—	—	±
Imakita	—	—	—	—	±	+
Ginyose	—	—	—	—	—	±
Tajiriginyose	—	—	—			

* Neotetrazolium test.

** Succinic acid and neotetrazolium.

ムオキシダーゼの活性はゴール分裂層では感受性品種、弱～中位の抵抗性品種とも大差はないが、強抵抗性品種の今北、銀寄、田尻銀寄では活性が落ちる。ゴール柔組織の活性はパーオキシダーゼの場合と逆に弱あるいは中位の抵抗性品種の方が強く、強抵抗性品種では弱くなる。これは強抵抗性品種ゴールそのものの機能が衰えているためであろう（表5）。

7. カテコールタンニンポリフェノールオキシダーゼとかつ変

これら一連の観察項目のうち最も顕著な差異の一つは感受性品種と抵抗性品種のかつ変率の相違である。ここでのうかつ変とはゴールの生長あるいは幼虫の生育をさまたげ

るようなかつ変のことである。すなわち、ゴール全体がかつ変を起こしているもの、幼虫のまわりいいかえればゴール分裂層がかつ変を起こしているもの（図7b）、ゴールと健全部の境界にかつ変を起こしているもの（図7c）である。感受性品種でも幼虫の侵入部分の痕跡はかつ変しているがこれは含くまれない。このようなかつ変率をみると感受性品種は全くないか1～2割程度であるのに対し、抵抗性品種では5割以上、強抵抗性品種になると9割以上がかつ変を起こしている（表6）。これらの調査を行ったのは10月下旬であるから抵抗性品種ではこれ以後もかつ変が進んで翌春になつてもゴールの肥大は起こらず、これは葉の一部にそのままの状態でのこるか、褐変部位より先は離脱するのであろう。

このかつ変がカテコールタンニンと関係があることはこのかつ変部分が非常に強いバニリン反応を示すこ

Fig. 5. Protein reactions of the susceptible galls.

- a. Indole-base reaction with Ehrlich reagent. Nakatetanba, $\times 70$.
- b. Hydroxy-base reaction with Milon reagent. Osaya. $\times 150$.

c. Amino-base reaction with chrolamine T-Schiff reagent. Bonguri. $\times 70$.
The division layers indicate the strong positive reaction about all of the reactions.

Fig. 6. Carbohydrate reactions of the galls.

- a. Carbohydrate with PAS. Division layers are weak. Shimokatsugi. $\times 60$.
- b. Pectin with Rutenium red. Division layers are stained good. Hayadama. $\times 60$.
- c. Cellulose with I_2-ZnCl_2 . A division layer is not stained. Ginrei. $\times 28$.

Table 5. Peroxidase and NADI-oxidase reaction of susceptible and resistant galls.

Var.	Peroxidase*			NADI-oxidase**		
	Div.	Par.	Apex	Div.	Par.	Apex
Susceptible						
Taishowase	≡	≡	≡	≡	++	≡
Osaya	≡	++~≡	+	≡	++	≡
Hayadama	≡	≡	++	≡	+	++
Relative resistant						
Kinshu	++~≡	++~≡	++	≡	≡	++
Monwase	++~≡	++	+	≡	≡	≡
Middle resistant						
Yamatowase	++	~++	++	≡	≡	≡
i-5	++	++	++	++	≡	++
Heavy resistant						
Imakita	≡	+	≡	+	+	++
Tajiriginyose	++	+	++	+	+	++

* Naphtol-H₂O₂ method.

** Naphtol-dimethylamino-paraaniline method.

Table 6. Browning, catechol tannin and polyphenoloxidase reaction in galls of susceptible and resistant varieties.

Var.	Percent of browned gall*	Catechol tannin		Polyphenoloxidase***		
		a**	b**	Div.	Par.	Inner leaf
Susceptible						
Boji 480	20	—	+	±~+	~±	++
Taishowase	0	—	++	±	~±	++
Shimokatsugi	0	—	≡	±	~±	++
Osaya	0	—	++	~±	~±	++
Hayadama	0	—	≡	~±	~±	++
Bonguri	10	—	++	±	±~+	+
Nakatetanba	10	—	≡	±~++	±	++
Resistant						
Ginrei	20	—	≡	±~+	~±	≡
Kinshu	50	~±	≡	±~++	±~++	++
Tsukuba	60	~±	≡	+	+	++
Moriwase	70	—	≡	±~+	±~+	+
Yamatowase	80	—	≡	±~++	±~++	++
i-5	70	~±	≡	±	±	++
Ganne	80	—	≡	±~+	±~+	++
Arima	100	—	≡	+	±~++	++
Akachu	90	—	≡	+	++	≡
Imakita	90	—	≡	+	±~++	++
Ginyose	90	—	≡	++	±~++	≡
Tajiriginyose	90	—	±	+	++	++

* This indicates the whole discoloration of gall or the browning barrier formed between the gall and the healthy tissue of leaf.

** Tested with vanillin reagent, a ; healthy tissue and b ; browning portion of galls.

*** Substrate was dihydroxyphenylalanine (DOPA).

とから明らかである。しかしカテコールタンニンそのものは感受性、抵抗性いずれの品種のゴールにも全く存在

しないかほとんどないので、ゴールに含まれるカテコールタンニンがかつ変に関与するのではなく、その部分に新たに生成されるタンニンが関与すると考えられる。しかもその生成はほとんど健全組織において生成され、ゴール中ではほとんど生成を行なわれないと考えられる事実がある（図7c）。すなわちかつ変周囲部とくにその健全組織は膜、核、質とも塩化鉄、ジアゾニウム塩、パニリン試薬などに対する好染性が増しフェノール物質がきわめて多く集積されている。またかつ変はポリフェノールオキシダーゼが関与していることはよく知られているが、この活性についてみるとゴールのどの部分でもいくらか活性がみられるが、抵抗性では活性がいく分か強くなっている。これらのことから抵抗性品種でかつ変が起るのはカテコールタンニンの生成が大であることとポリフェノールオキシダーゼの活性が強いことがあげられるであろう。

IV. 考 察

クリタマバチ幼虫は抵抗性品種では10月下旬以降ではほとんど死亡するものと奥代ら⁽⁶⁾は推測しているが、パーオキシダーゼの活性で幼虫の生死を判別してみると11月上旬でも抵抗性品種の大多数のゴール中の幼虫は生きていて、抵抗性の強弱と生存率の間に明確な関係があるとは思われない。同様のことは佐藤らも調査している⁽¹⁸⁾。すなわち一度ゴール形成が行なわれるとその中の幼虫はかなり遅くまで（おそらくは翌春まで）生きつづけるものと思われる。しかし抵抗性品種では幼虫は生きているといつても生長の程度からいえば同氏ら⁽⁶⁾がいうように感受性品種にくらべれば顕著に小さく、ゴールも同様に小さい。したがって

ゴールと幼虫の間には栄養的に共生関係が存在する。この共生関係が宿主の方から一方的に破られてゆく過程が

Fig. 7. Types (I-III) of the browning in the resistant varieties.

- a. Type I...browning of the leaf, stipule and/or forming gall, resistant to the invasion of a larva. Arima $\times 70$, stained with Fast green FCF, Feulgen reaction and Safranin O.
- b. Type II...browning of the division layer of galls, surrounding a larva. Tsukuba $\times 70$, stained with Feulgen reaction.
- c. Type III...browning of the leaf or stipule, separating the gall. Yamatowase $\times 140$, stained with periodic acid-2-naphtol-3-carboxylhydrazine method.

In this method diazonium salt staining phenolics is used as a coupling reagent of 2-naphtol-3-carboxylhydrazine. This diazonium salt couples tannins in the tissue, therefore, blackness of the leaf tissue in this photo indicates that the leaf tissue contains more tannins than the gall tissue.

抵抗性発現の1要因であると著者らは考えている。この共性関係すなわち進行性病徴を物質代謝の面からみると、まず核酸物質の生成と集積がある。たとえば進行性病徴を示すモモ縮葉病にかかった組織では FEULGEN 反応やピロニンによる染色性が増すことが示されている⁽⁸⁾。また根こぶ線虫のゴールでは放射性磷の核酸分画へのとりこみがきわめて大きいことが示された⁽¹⁰⁾。同様に、OWENS and SPECHT⁽¹³⁾の分析でもゴール組織の方が健全組織よりヌクレオチド、DNA および RNA を多くふんでいる。このように一般に組織の肥大、増殖には核酸の合成あるいは集積があるが、クリのゴールの場合も MP 染色でみると感受性品種のゴールは RNA の染色が強く、とくに幼虫のまわりのゴールの分裂層において顕著である。しかし、これも抵抗性が増すにつれて弱くなり、健全組織の像と似てくる。DNA は FEULGEN 反応でみるかぎりではゴール組織(感受性あるいは抵抗性であるを問わずに)で増加しているとはいえないが、核の形態変化が著しいこと、また多核化した細胞や多仁化した核などが観察されるので、核の機能変化が起ついていると推察される。なおこのような現象は他の進行性病害⁽⁸⁾でもみられ、進行性病害の共通的な現象であろう。

このような核酸の生成と同時にタンパク質の合成が盛んになることはよく知られているが、クリのゴールでも観察され、抵抗性品種よりも感受性品種でタンパク反応は顕著である。このタンパク質は酵素タンパクとしてゴールの肥大伸長に必要な構成物質あるいはエネルギーを生産する一方、幼虫の栄養源としても大きな役割を持つているのであろう。ことにゴールの分裂組織は根こぶ線虫によつて形成された巨大細胞と同様の機能をもつていると考えられる。そしてまたこの分化の悪い抵抗性品種のゴール組織ではタンパク合成が少なく幼虫の生育はさまたげられると解釈される。

さらに、生活力の大きい若い組織では種々の脱水素酵素の活性が高い。根こぶ線虫によるサツマイモおよびホウセンカのゴールで脱水素酵素活性が健全部より数倍も高いことがすでに示されている⁽¹⁰⁾が、クリのゴールの場合も感受性品種のゴールはデヒドロゲナーゼ活性が健全部より強く、また抵抗性品種のゴールよりもきわめて強いことが明らかになった。このような染色法によるデヒドロゲナーゼは DPNH あるいは TPNH を必要とするデヒドロゲナーゼか、あるいはコハク酸脱水素酵素が関与しているともいはれている⁽⁴⁾ので、かつ変を阻害するキノリダクターゼの活性が強く、これに関連する補酵素の DPNH あるいは TPNH の生成もさかんであるのではないかと推測される。このように考えると感受性品

種のゴールの周辺部で脱水素酵素作用が強いことは抗かつ変作用が強いことを意味し、これによつて健全部とゴールとの境に、抵抗性種のようにかは変がおきないのではないかと思う。

なお、このような異常な核酸合成あるいはタンパク質合成には幼虫からの連続した刺激が必要であることは本研究でも観察され、他の虫エイでも示されている^(11, 14)。この刺激としてすべての場合に於てはまるのではないが一般的にはインドール酢酸などオーキシンの作用が重要視されている^(9, 12, 17, 21)。クリのゴールの場合はこの刺激が物理あるいは化学的な刺激であるかどうかは解明されておらず今後に残された課題ではあるが、1つの可能性として IAA の存在が予想される。すなわち感受性品種のゴールの分裂層は EHRlich 試薬で青色を呈した。この呈色はパラフィンブロックの作製条件など考えると IAA によるものとはいえないが、ゴール中にトリプトファンが相当多量に存在することは明らかで、これが IAA の先駆物質であること、昆虫のだ腺でトリプトファンが IAA に変化する事実が知られている⁽⁹⁾ので、このトリプトファンを含むタンパク質を摂食した幼虫が、組織に対して IAA を分泌していることも十分考えられる。

つぎに炭水化物についてみると、酢酸酸性硝酸銀によるアスコルビン酸の呈色は2種類あり、いずれがアスコルビン酸によるものか判然とはしないが、両者には差があり、抵抗性と関係が強いようにみえる。細胞膜のセルロースとペクチンの沈着をみると感受性品種のゴールの分裂層ではセルロースの沈着はわるい。これらの点は根こぶ線虫でできたゴールでもみられ⁽¹²⁾、組織の若い細胞の肥大にはペクチンが主に関与していることを示しているのではないかと考えられる。

さらに末端呼吸系としてのチトクロームオキシダーゼとパーオキシダーゼの活性をみると、健全部とゴール部（おもに柔組織）では両者の活性が逆である。この理由として健全部とゴール部で呼吸の主経路が変つたためではなかろうか、すでにこのような呼吸系の変化は根頭が腫れでみられ、これでは鉄をふくむあるいは CO に阻害されない酵素が減り銅酵素が増加するという⁽¹⁶⁾。またパーオキシダーゼは木化に関与しているといわれるが⁽¹⁹⁾、ゴール分裂層の活性が強いことは翌春になつてからこの部分が木化するのに都合がよい。しかしゴールの肥大という面からはパーオキシダーゼは IAA を不活性化することが知られているので感受性ゴールで活性が強いのは不利ではあるが、この活性と IAA の分解能力とは必ずしも一致していないという報告もあるので⁽¹⁷⁾、この点

は今後の研究にまたねばならない。さらに植物病虫害の抵抗性発現でもつとも重要視されているのが過敏性反応とかつ変現象であろう^(3, 10, 15, 20)。たとえばキクの葉枯れ線虫の場合、抵抗性品種では侵入部位がかつ変し、線虫はこの部分から動き出すことができなくなる。同様な組織のかつ変がアルファルファの茎の線虫、マリーゴールドの根こぶ線虫とダイズの根こぶ線虫、サツマイモ根こぶ線虫などでみられるという^(10, 14)。クリのゴールの場合も抵抗性品種では 10 月下旬ですでに半数以上がかつ変を起しており、抵抗性が強いものほど大である。さらにまた、有摩などでは幼虫のまわりの組織が完全にかつ変しているゴール（あるいはゴール形成途中の組織）があり、これらは、侵入抵抗とみなされるものである。このかつ変は多くは初め、健全組織とゴールの間に広がるがこれによつてゴールへの養分供給は十分に行なわれなくなり、ゴール組織および幼虫は飢餓状態になる。また、感受性品種のゴールではここに維管束系が十分発達するのに対し、抵抗性品種のゴールでは全く形成されない。したがつてゴールの発達も悪く、これによつて虫の飢餓状態は一層ひどくなるのであろう。このかつ変が進むとゴール全体が健全組織から切りはなされ、幼虫は死滅し、つづいて幼虫のまわりの組織もかつ変をはじめ、葉から脱離する。このかつ変は時にはゴール分裂層からはじまることもある。このかつ変にはフェノール性物質とポリフェノールオキシダーゼが関与しているのはよく知られており、クリの場合はポリフェノールオキシダーゼによつてカテコールタンニンが酸化され、重合してフロバフェン様物質が細胞に集積されて起るものである。そしてポリフェノールオキシダーゼは抵抗性品種の健全部で反応がやや強い。カテコールタンニンはパニリン試薬でみるとかつ変部とその近くの組織のみに存在し、それ以外の組織には存在しないことから、ゴールやゴールの形成が起る前の健全組織にもともとあるものでなく、ゴールと健全部の境界部分（とくに健全部）に新たに合成されるカテコールタンニンが重要であると推測される。したがつてカテコールタンニンの合成能力の差が抵抗性に関与しているとみなされ、著者らの前報⁽⁷⁾におけるカテコールタンニンの意義もこの点にあるものと考えられる。

V. 要 約

クリタマバチ感受性および抵抗性品種の芽およびそこに形成されるクリタマバチによるゴールについて組織化学的な観察を行ない、両者の相異を明らかにした。

1. 両種にはゴールおよびクリタマバチ幼虫の大きさについて顕著な差がある。しかし幼虫は抵抗性品種でも 11 月上旬において相当多数のものが生存している。

2. 核酸とくにピロニン染色による RNA がゴールで多い。またゴール分裂層では仁および核が大型化している。ときには多核細胞、多仁の核がみられる場合がある。細胞質も同様に多い。この現象は抵抗性が増すにつれみられなくなる。

3. 感受性品種のゴール、とくにその分裂層ではヒストン、インドールの反応などタンパク質反応が大で、この合成が盛んである。

4. 炭水化物について感受性品種のゴールことに分裂層はセルロースの沈澱が悪い。酸性硝酸銀による反応は2種類あり、感受性品種と抵抗性品種のゴールでは反応が異なる。

5. デヒドロゲナーゼとコハク酸脱水素酵素活性は感受性品種のゴールで顕著であるが、抵抗性品種のゴールには全くないかほとんどない。

6. 感受性品種のゴールの分裂層はパーオキシダーゼおよびNADIオキシダーゼの活性が強い。ゴール柔組織のそれらの活性は感受性品種ではパーオキシダーゼの活性が大で、NADI オキシダーゼの活性は弱い。抵抗性品種はこの逆である。

7. 抵抗性品種のゴールは抵抗性の弱いものでも50%以上、強いものになると90%以上がかつ変を起している。このかつ変はカタコールタンニンが関与している。ポリフェノールオキシダーゼは抵抗性品種の方がいく分活性が大である。

引用文献

- BALASUBRAMANIAN, M., and G. RANGASWAMI. 1962. Presence of indole compound in nematode galls. *Nature* 194 : 774—775.
- CUTLER, H. G., and L. R. KRUSEBERG. 1968. Plant growth regulators in *Ditylencus dipsaci*, *Ditylencus triformis* and host tissues. *Plant and Cell Physiol.* 9 : 479—497.
- FARKAS, G. L., and Z. KIRÁLY. 1965. Role of phenolic compounds in the physiology of plant diseases and disease resistant. *Phytopath. Z.* 44 : 105—150.
- 平井篤造. 1963. 植物病理の生化学後編. 平井・鈴木編. p. 155—180. (農業技術協会)
- 梶浦 実編. 1964. 福田仁郎博士果樹害虫研究集録.
- LISON, L. 1962 *Histochimie et cytochimie animales.* (白水社)
- 松井鑄一郎・鳥潟博高. 1968. クリのクリタマバチ抵抗性に関する研究 (第1報) 園学雑 37 : 95—101.
- 松山宜明. 1967. 寄主, 病原菌相互作用解明へのアプローチ. 日植病学会編. 夏の学校. 79—101.
- MILES, P. W. 1968. Studies on the salivary physiology of plant-bugs. *J. Insect Physiol.* 14 : 97—96.
- 西沢 務. 1957. 農業における線虫の問題点. 線虫の植物加害機構. 日応動学会第1回シンポジウム 17—23.
- . 1959. 植物ガンの形成機構. 蛋. 核. 酵. 4 (増刊号) : 82—95.
- OWENS, R. G., and R. F. BOTTINO. 1966. Changes in host cell wall composition induced by root-knot nematodes. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* 23 : 171—180.
- . and H. N. SPECHT. 1966. Biochemical alternations induced in host tissues by root-knot nematodes. *ibid.* 23 : 181—198.
- ROHDE, R. A. 1965. The nature of resistance in plants to nematodes. *Phytopathology* 55 : 1159—1162.
- ROSS, J. P. 1958. Host parasite relationships of the soy-bean cyst-nematodes in resistant soy-bean roots. *Phytopathology* 48 : 578—579.
- 佐藤満考. 1963. 植物しゅようの生理 (I) 生物と科学 15 : 2—8.
- . 1963. 植物しゅようの生理 (II) *ibid.* 15 : 114—121.
- 佐藤末吉・前田正孝. 1967. 栗の抵抗性品種に対するクリタマバチの寄生現象について. 日林学会東北支部会第19回大会講演集.
- 富山宏平. 1963. 植物病物の生化学 (後編), 平井, 鈴木編 p. 126—154 (農業技術協会)
- VANGUNDY, S. D., and J. D. KIRKPATRICK. 1964. Nature of resistance in certain citrus root stocks to citrus nematodes. *Phytopathology* 54 : 419—427.
- YU, P. K., and D. R. VIGLIERCHIO. 1964. Plant growth substances and parasitic nematodes I. *Exp. parasitol* 19 : 242—248.