クリのクリタマバチ抵抗性に関する研究(第11報)

感受性および抵抗性品種のゴール組織と健全組織のポリフェノール
オキシダーゼおよび 2, 3 のデヒドロゲナーゼ活性について

松井鑄一郎・鳥潟博高
(岐阜大学農学部・名古屋大学農学部)

Studies on the Resistance of Chestnut Trees (*Castanea spp.*) to
Chestnut Gall Wasps (*Dryocosmus kuriphilus* YASUMATSU)

XI. Polyphenoloxidase and Some Dehydrogenase Activities in Gall and Healthy Tissues of Susceptible and Resistant Varieties

Shuichiro MATSUI and *Hirotaka TORIKATA
Faculty of Agriculture, Gifu University, Kagamihara-shi, Gifu
* Faculty of Agriculture, Nagoya University, Chikusa, Nagoya

Summary

In order to clarify the mechanism of necrosis development in the resistant host in response to chestnut gall wasps, polyphenoloxidase and some dehydrogenase activities in gall and healthy tissues of susceptible and resistant varieties were investigated histochemically.

In healthy tissues, polyphenoloxidase (PPO) activity was high in parenchymatous tissues surrounding vascular bundles but low in mesophyll tissues. In general, the activity in gall tissues was reduced as compared with healthy tissues of both susceptible and resistant varieties. But, PPO activity in gall tissues of resistant varieties was higher than that of the susceptible varieties. Also, boundary tissues intervened between healthy and gall tissues of the former varieties, and such boundary tissues consisting of parenchymatous cells around vascular bundles displayed a large increase in activity.

Reduction of tetrazolium salts in gall tissues of susceptible varieties was decreased by treatment with heating, freezing and enzyme poisons. This implies that the reduction is caused by coenzyme requiring enzymes. Dehydrogenase activity was also inhibited by 10^{-3} M tannic acid or 0.4% tannins obtained from the resistant chestnut bark.

Dehydrogenase activity was low in normal young leaf tissues but very high, similar to apical tissue, in the infected tissues (gall tissues) of the susceptible varieties by the parasite. However, dehydrogenase was not activated in those of the resistant varieties.

Healthy tissues were low in NADP-hydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. However, as the normal tissues galled, the tissues of susceptible varieties showed high activities of NAD- and NADP-hydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and iso-citrate dehydrogenase which might play important roles in the physiology of gall formation and nutrition supply for the parasite. On other hand, the tissues of resistant varieties were low in activity in coenzyme requiring enzymes.

緒 言

進行性の病態組織では、核酸の合成(2, 6, 27, 31, 32), タンパク質の増加(2, 14, 30, 31), デヒドロゲナーゼなどの酵素の活性化(4, 5, 29, 40, 41)などが報告されていて、これらは進行性病変に共通の現象と認められる。感受性品種のクリの芽にクリタマバチが寄生して形成されるゴールには、デヒドロゲナーゼやコハク酸デヒドロゲナーゼ活性が強いことをすでに報告してきた(20)。これらの活性は、クリ組織がクリタマバチに対して抵抗性を示す場合に、重要な役割を果たしていると考えられる。

一方、宿主が寄生者に対して抵抗性を示すとき、多くの宿主組織はかつ変することが明らかにされている(7, 29)。クリタマバチ抵抗性品種はゴール組織(以下ゴールと略す)と健全組織の間にかつ変え死組織を形成して、病変した組織とそこに寄生する幼虫を孤立化させるとともに、健全組織を保護することが明らかとなつた(22, 26)。このようなかつ変現象を抵抗性反応Ⅲ型と名づけたが、この反応が起こる場所はゴールと健全組織の間に位置する維管束周辺系組織である。この組織は健全な場合でも、かつ変の基質となるポリフェノール類が多いが、ゴールと健全組織の間に位置する所にはさらに多量存在した。ことにカテコールタンニンが顕著であつた、すなわち、抵抗性品種では寄生者の刺激によつて維管束系の組織がカテコールタンニンを主とするポリフェノールの高い合成能を持つと判断された(26)。

他方、かつ変、換言すれば、ポリフェノールの酸化重合の進行はポリフェノールオキシダーゼによるのみならず、酸化生成物=キノンの還元、すなわち、種々の還元物質の量やキノキシダーゼ活性と関連する(7)。この還元にはアスコルビン酸や NADPH_2 があずかり、後者は非酵素的ならびに酵素的に作用する(7)。 NADPH_2

の生成系は TCA サイクルにもあるが、ペントースリン酸回路(以下 HMP 回路と略す)の寄与が大きい(13)。本報告では、ポリフェノールオキシダーゼ活性の組織内分布、ならびにゴール組織の NADPH_2 や NADPH_2 の生成に関与する反応系について検討した。

材料および方法

ポリフェノールオキシダーゼ (PPO) 活性 (組織化学的手法) : 感受性品種、中生丹波および抵抗性品種、筑波を用い、クリタマバチ幼虫がゴール組織内に寄生を始め、抵抗性品種でかつ変が形成し始める頃の試料について、徒手切片を作製し、0.1% d-カテキンを含む 0.1M リン酸緩衝液、pH 7.4 に浮かべて反応させた。別に感受性品種と抵抗性 6 品種を 9 月 20 日に採芽し、芽全体を凍結ミクロトームで厚さ 250 μ の切片とし、0.1% ジヒドロオキシフェニルアラニンのリン酸緩衝液を浸みこませたる紙上で室温で 3 時間反応させた。反応後、キシロール・アルコール (1:1v/v) で脱水し、キシロールで透徹化してバルサムに封じた。その試料については検鏡すると同時に顕微鏡写真露出計を使つて活性の半定量的な測定を行なつた(26)。また、ゴール形成のさらに進んだ 12 月の中生丹波および筑波について同様に処理し、検鏡した。

デヒドロゲナーゼ活性 (組織化学的方法) : 第 3~5 表に示すような種々の酵素阻害剤、重金属イオン、酸化剤、フェノール類、さらに加熱あるいは凍結によるデヒドロゲナーゼ活性に対する阻害をみるために、表に示す濃度で、感受性品種、傍士 455 あるいはねー17 の新鮮徒手切片を 0.05% テトラゾリウム (TTC) を含む 0.05M リン酸あるいは 0.025M トリス緩衝液に浸し、3 時間後その発色程度を肉眼観察した。

10 月 4 日採取した感受性 2 品種と抵抗性 6 品種につい

Table 1. Conditions of reaction mixtures for 4 dehydrogenases under microscopic observation.

	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	Shikimate dehydrogenase	Tyrosine oxidase	NADP hydrogenase
Sampling date	Sept. 9	Sept. 23	Sept. 29	Oct. 1
Magnification of microscope	$\times 200$	$\times 200$	$\times 200$	$\times 200$
Yellow filter	without	with	with	with
Reaction mixture (ml)				
TNBT 0.1%	0.2	0.2	0.4	0.2
Tris-buffer, pH 7.4, 0.25 M	0.2	0.2		0.2
Phosphate-buffer, pH 7.6, 0.05 M			0.6	
NADP 5 mg/ml	0.2	0.2		0.2
NAD 5 mg/ml			0.4	
MgCl ₂ 0.05 M	0.1	0.1	0.2	0.1
Substrate 5 mg/ml	0.2	0.2	0.4	—

Handsections were frozen, reacted and then embedded into balsum. Optical density was measured with the exposure meter set to microscope.

Table 2. Polyphenoloxidase activity^z in gall tissues, healthy tissues and the boundary tissue of gall and healthy tissues in susceptible and resistant varieties.

	Gall tissue			Boundary tissue of gall and healthy tissue	Adjacent tissue to browning	Apex	Cambium	Differentiating leaf	Pith
	Nutritive cell layer	Parenchymatous tissue	Border parenchymatous tissue						
Susceptible									
Boji 8	.08	.07	.13				.24	.19	.26
ne-17	.08	.08	.15				.23	.21	.20
Nakatetanba	.08	.08	.10			.18	.15	.12	.15
Av.	.08(47)	.08(47)	.13(76)			.18	.21	.17	.20
Resistant									
Ginrei	.09	.08	.20		.37		.20	.16	.18
Tsukuba	.10	.14	.20	.17		.20	.24	.25	.25
Yamatowase	.19	.18	.20		.49	.18	.31	.24	.28
Tanzawa	.17	.17	.19	.27		.29	.19	.33	.21
Otomune	.22	.13	.21	.40	.34	.19	.19	.26	.27
Ginyose	.22	.22	.22	.31	.27		.39	.28	.32
Av.	.17(68) *	.15(60) *	.20(80) **	.29(116) B*	.37(148) B**	.22 NS	.25 NS	.25 *	.25 NS

^z Samples were collected on Sept. 20, sectioned with freezing microtome in 250 μ . Sections were incubated in 0.1% dihydroxyphenylalanine dissolved in phosphate buffer, pH 7.4 at room temperature for 3 hrs., and then embedded into balsam. Optical density was measured with the exposure meter set to microscope with violet filter, $\times 70$.

NS, non significantly different from susceptible varieties, * and **, significantly different at the 5 and 1% level, respectively. B, as compared with values of the border parenchymatous tissue of galls from susceptible varieties. (), % for values of the differentiating leaves.

Table 3. Inhibition of dehydrogenase activity in gall tissues^z from susceptible variety, Boji 455 by various compounds.

Compounds used	Inhibition to	Concentration (M)	Dehydrogenase activity ^y
NaN ₃	Fe-, Cu-enzyme (enz.)	5 $\times 10^{-3}$	++
KCN	Fe, Cu, Zn, etc. (carbonyl, -SH) in enz.	5 $\times 10^{-3}$	###
NH ₂ OH	Fe, carbonyl in enz.	5 $\times 10^{-3}$	+
α, α' -Dipyridyl	Metal ion (Fe) in enz.	5 $\times 10^{-3}$	###
8-Oxyquinoline	Metal ion in enz.	1.67 $\times 10^{-3}$	++
NaEDTA	Metal ion in enz.	5 $\times 10^{-3}$	###
NaF	Mg ⁺⁺ , Ca ⁺⁺ , etc. Enolase	5 $\times 10^{-3}$	±
2,4-Dinitrophenol	Oxidative phosphorylation	5 $\times 10^{-3}$	+
Na ₂ HAsO ₄	do.	5 $\times 10^{-3}$	###
NaN ₃	do.	5 $\times 10^{-3}$	++
CH ₂ ICOOH	Dehydrogenase, requiring NAD and or flavins, etc. as coenzyme,	5 $\times 10^{-3}$	+
Heat			-
Control			###
AgNO ₃		1 $\times 10^{-2}$	+
HgCl ₂		1 $\times 10^{-2}$	-
CuSO ₄		1 $\times 10^{-2}$	±
FeSO ₄		1 $\times 10^{-2}$	++
ZnSO ₄		1 $\times 10^{-2}$	-*
Control	pH 5.6—5.8 (water)		###
Control	pH 6.8—7.0 (0.05 M phosphate buffer)		###

^z Samples were collected on March 1.

^y -, No reduction of TTC observed, ± to ###, very little to the highest reduction, respectively.

* Showed nearly equal activity to controls after 8 hrs.

て、徒手切片を作製し、0.1%ネオテトラゾリウム(NT)を含む0.1Mリン酸緩衝液、pH 7.4に浸して室温で2時間反応させた後、グリセリンゼリーに封じ、その呈色程度をPPOと同様に測定した。

グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PD), シキミ酸デヒドロゲナーゼ (SD), チロシンオキシダーゼ (TO) および NADPヒドロゲナーゼ (NADPH) 活性(組織化学的方法): 感受性と抵抗性品種それぞれ数種について第1表に示す組成の反応液で36°Cで3時間反応させ、脱水後、パルサムに封じて生成したホルマザンの濃度を顕微鏡写真露出計で測定した。

NADPH, G6PD, SD, TO, NADヒドロゲナーゼ (NADH) およびイソクエン酸デヒドロゲナーゼ (iso-CD) 活性(ツンベルグ管法): 3月中旬から4月上旬にかけて採取した傍士455のゴール(クリ玉)を宿主組織と幼虫に分け、このゴール組織と健全な芽のりんぺん葉を除いた健全組織にそれぞれ生重の倍量の酵素抽出液を加え、ガラスホモジナイザーを用いて氷冷下で磨碎して粗抽出液を得た。酵素抽出液の組成は0.3Mしよ糖, 10mM NaEDTA, 3mM MgCl₂を含む0.05Mトリス緩衝液, pH 7.0である。ツンベルグ管に第9, 10表に示すような反応系を作り、排気後、30°Cで17時間反応させた、生じたTTCホルマザンは酢酸エチルで抽出し、10mlに定容後、520mμで比色定量した。

結 果

1. 健全組織およびゴール組織内のPPO活性

健全組織のPPO活性のもつとも強い組織は維管束系で、次いで表皮であり、ゴール形成の主体となる葉肉組織はもつとも活性が弱かった(第1図)。感受性品種のゴール組織では活性が低いが、健全組織に近づくにつれて漸次活性が増大した(第3図A)。抵抗性品種の場合には、ゴール組織の活性は感受性品種と同様に低いが、健全組織との境界部では活性の顕著な増進が観察された。この組織は第2図に示すように維管束周辺柔組織であった。さらに進んだ時期の試料については第3図Bに示した。かつ変組織の形成がみられるとともにこれに隣接した細胞はPPO活性が著しく高かった。

抵抗性品種では宿主組織の抵抗性反応が進み、え死組織も形成されている9月中旬の試料について、芽内の種々の組織のPPO活性を顕微鏡測光すると第2表のごとくであった。ゴール組織のPPO活性は健全な各組織・器官に比べて低かった。ここでゴールの起源となる分化中の幼葉の活性を100%として、ゴールの栄養細胞、柔組織および周辺各組織におけるPPO活性の低下率をみる

Table 4. Inhibition of dehydrogenase and succinodihydrogenase activities in gall tissues^a from susceptible variety, ne-17 by oxidizing agents.

Compounds used	Concentration (M)	Condition of treatment		Activity ^b	
		Time (min.)	Temp. (°C)	Dehydrogenase	Succinodihydrogenase
FeCl ₃	10 ⁻²	2	28	+	+
HIO ₄	10 ⁻²	5	28	—	±
K ₂ Mn ₂ O ₈	10 ⁻²	1	28	+	+
Chloramine T	10 ⁻²	5	28	—	+
Heat		0.5	70	—	—
Control				+	+

^a Samples were collected on Sept. 22.

^b After treatment, samples were washed and incubated in phosphate buffer, pH 7.4. —, No activity, ± to +, very low to high activity, respectively.

と、感受性品種でそれぞれ、53, 53 および 24%, 抵抗性品種で32, 40 および 20%であった。すなわち、前者の活性低下率が著しく、統計的に有意差が認められた。抵抗性品種内では、強抵抗性品種の方が弱抵抗性品種より活性の低下は少なかった。さらに、抵抗性品種は、ポリフェノール類の組織内における量的分布で示された(26)と同様に、ゴールと健全組織との境界部で周囲の組織より活性が高まり、かつ変隣接部はゴール組織のほぼ2倍の活性を示し、健全組織に比べても50%近い増加率を与えた。

2. デヒドロゲナーゼ活性に対する阻害実験

ゴール組織ではテトラゾリウムの還元が第3, 4表に示した加熱処理、凍結処理、種々の化合物処理によって阻害、あるいは低下したから、その反応は明らかに酵素によるものと考えられる。

金属酵素と結合し、強い阻害を示すものにはNH₂OHとNaFがあつたが、EDTAをはじめ、他の化合物には阻害効果が少ないかまたは認められなかつたので、この酵素反応にFe, Cuを含む金属酵素の関与する可能性は少ない。酸化的リン酸化を阻害するものには2,4-DNPのように阻害効果の強いものもあつたが、Na₂HAsO₄およびNaN₃では効果は弱かつた。NADなどを助酵素とする酵素系を阻害するヨード酢酸はTTCの還元を低下させた。また、Ag⁺, Hg⁺⁺, Cu⁺⁺など重金属イオン、ことにHg⁺⁺はデヒドロゲナーゼ活性を著しく低下させた(第3表)。さらに、HIO₄, クロラミンTなどの酸化剤の短時間処理によつても活性が低下した(第4表)。以上の結果から、テトラゾリウム塩を還元する酵素には—SH基をもつ可能性が高い。すなわち、NADまたはNADPを助酵素とするデヒドロゲナーゼが主体であると予想される。

Table 5. Inhibition of dehydrogenase activity in gall tissues² from susceptible variety, Boji 455 by phenolics and their oxidized substances.

Compounds used	Concentration	Dehydrogenase activity ³	Concentration	Dehydrogenase activity ³
Phenolics				
p-Coumaric acid	$5 \times 10^{-2} M$	+	$5 \times 10^{-3} M$	+
Coumarin	saturated	+++		
Gallic acid	5×10^{-2}	+	5×10^{-3}	+
Tannic acid	1×10^{-2} (1.7%)	-*	1×10^{-3}	-*
Tannins from chestnut bark ⁴	2%	-*	0.4%	+*
Catechol	$5 \times 10^{-2} M$	±	$5 \times 10^{-3} M$	+
d-Catechin			1×10^{-3}	+
Control		+++		
Oxidized substances by airation for 24 hrs. in alkaline solution				
Gallic acid	$2.5 \times 10^{-2} M$	+	$5 \times 10^{-3} M$	+
Tannic acid	1×10^{-3}	±	1×10^{-4}	+
Tannins from chestnut bark ⁴	0.2%	+	0.04%	+
Catechol	$5 \times 10^{-3} M$	+	$5 \times 10^{-4} M$	+
d-Catechin	1×10^{-3}	+	1×10^{-4}	+
Naphtoquinone-4-sulfonic acid	2.5×10^{-3}	-	2.5×10^{-4}	+
Control		+++		

² Collected on March 4.³ Samples were incubated in 0.025 M tris buffer, pH 6.8—7.0 at 30°C for 3 hrs. — to +, same as in Table 3.⁴ Caused turbidity.⁵ Extracted with 70% methylalcohol from dry powder of current shoots of a resistant variety, Ginyose.

クリの組織は多量のポリフェノール類を含み(19, 25), かつ変にその酸化物が関与し, それらの物質がデヒドロゲナーゼ活性にも影響することが考えられる。すなわち, 第5表に示すようにタンニン酸とクリ新しう樹皮より抽出したタンニンがもつとも阻害作用が強く, 前者は $10^{-3} M$ (0.17%), 後者は 0.4% の濃度であつた。カテコールは $5 \times 10^{-2} M$ でデヒドロゲナーゼ活性を阻害したが, p-クマール酸と没食子酸は $5 \times 10^{-2} M$, d-カテキンは $10^{-3} M$ でも阻害しなかつた。また, 4% Na_2CO_3 を添加してアルカリ性にし, 通気して得られた上記化合物の酸化物による阻害効果は没食子酸では $2.5 \times 10^{-2} M$, タンニン酸では $10^{-3} M$ で認められた。また, カテコールは $5 \times 10^{-3} M$ で, クリタンニンは 0.2% でやや阻害したが, d-カテキンは $10^{-3} M$ でも阻害しなかつた(第5表)。

3. デヒドロゲナーゼ活性の品種間差異

テトラゾリウムの還元反応に感受性と抵抗性品種間で明確な差があることは第2報(20)で報告した。この判定は肉眼によるものであつたから, 今回はより客観的な判断を得る目的で顕微測光をした。

分化発育中の幼葉では TTC 還元反応は高い値を示した。しかし, 肉眼的に見るとこの組織はかつ色に着色していて, NT ホルマザン特有の紫青色を呈していなかつたから, ほとんど活性はないものと思われる。葉組織はポリフェノールが多いので, これがテトラゾリウム塩と結合し, 組織内にかつ変の物質を生じたか, 一部は両者の間で酸化還元が行なわれ, 着色したものと考えられ, デヒドロゲナーゼによる呈色とは思われなかつた。

一方, ゴール組織は鮮明な紫青色を呈した。したがつて, ゴール組織はゴールの起源となる葉組織より活性が強いことは明らかであるが, 両者間の差を明確にすることはできなかつた。

感受性品種のゴールの栄養細胞層, 柔組織および周辺組織は抵抗性品種のそれらより活性が強く, 後二者の組織では 1% 水準で統計的に有意差があつた。ことに, 感受性品種のゴール周辺組織は生長点に匹敵するほど活性が増大したが, 抵抗性品種のそれは感受性品種の半分ほどの活性にとどまつた。また, 両品種群とも生長点や形成層における活性は高く, 両者の平均値はほぼ類似していた。

したがつて, 健全組織では感受性と抵抗性品種間のデヒドロゲナーゼに差はないが, 寄生者の侵害を受けて病変すると差異が生じるものと思われる(第6表)。

4. ゴール組織の G 6 PD, SD, TO および NADPH 活性

感受性品種のゴール組織ではデヒドロゲナーゼ活性が極めて強い。この要因として, ゴール組織にペントーズ含量が高い事実(26)や純粋活物寄生菌の寄生組織で HMP 回路の活性化が知られている(36)ことから, HMP 回路の代謝活性の増進が考えられる。そこで G 6 PD 活性を顕微鏡に具えた露出計で測定した。その結果, 感受性品種のゴールは強抵抗性品種に比較して, ゴールの部位によつて 10—20 倍高い活性を示し, ゴールのもとの組織である葉組織よりも数倍高い値を示した。一方, 抵抗性品種は葉組織とはほぼ同じ値であつた(第7表)。図でみると感受性品種のゴールは著しく黒染していた(第4図A)が, 抵抗性品種では弱かつた(第4図B)。感受性品種と強抵抗性品種の間には表に示したごとく顕著な差が存在したが, 弱抵抗性品種はこの中間の反応を示した。筑波の場合を顕微鏡で見ると, ゴール組織は相当に活性を保持していたが, 活性の健全部への拡がりはかつ変組織を境にはばまれていた。同様な傾向は例外的に SD 活性の強い品種, 丹沢のゴールでも観察された(第5図)。

抵抗性品種に生じるかつ変にはポリフェノールの生成

が関与する(26)。そこでフェノール代謝の面から、SD および TO 活性についても測定した(第7表)。それら酵素活性の芽組織内における分布状態とその活性は G6PD の場合と全く同様であつた。

これらの結果から、上記3種の酵素系が無関係に働いているのではなく、NADPの添加で起こる反応系、すなわち、NAD または NADP ヒドロゲナーゼ系によつて NAD H₂ または NADP H₂ が生じ、この還元型助酵素がそのジアホラーゼ的作用によつてテトラゾリウムホルマザンを生成すると推測された。この系は第8表と第6図

に示すように、NADPを除いた凍結切片の活性は著しく低かつたが、添加区は G6PD の場合(第4図A)と同様に強い活性を示し、ゴールの栄養細胞層では対照区の約7倍活性が増加した。この結果から第7表に示した3酵素の反応系は NADP を助酵素とする反応系によるものと判断した。

5. ツンベルグ管による NADH, NADPH, G6PD, SD, TO および iso-CD 活性

上記の組織化学的方法では G6PD, SD および TO がテトラゾリウムの還元反応に関与していたか否かは明ら

Table 6. Dehydrogenase activity² in various tissues of buds from susceptible and resistant varieties.

	Gall tissue			Healthy tissue		
	Nutritive cell layer	Parenchymatous tissue	Border parenchymatous tissue	Apex	Cambium	Differentiating leaf
Susceptible						
Boji 8	.11	.18	.38	.61	.49	.52
Nakatetanba	.13	.21	.47	.49	.34	.43
Av.	.12	.20	.43	.55	.42	.48
Resistant						
Ginrei	.07	.11	.23	.52	.19	.39
Tsukuba	.09	.11	.15	.73	.48	.56
Yamatowase	.13	.14	.16	.82	.52	.77
Tanzawa	.11	.17	.23	.67	.44	.40
Otomune	.07	.12	.11	.40	.37	.31
Ginyose	.09	.11	.15	.46	.30	.12
Av.	.09NS	.13**	.17**	.60NS	.38NS	.43NS

² Samples were collected on Oct. 4. Handsections were incubated in phosphate buffer, pH 7.4 containing 0.1% NT for 2 hrs at room temperature and then embedded into glycerin jelly. Optical density was measured with the exposure meter set to microscope with green filter, $\times 70$.

NS, nonsignificantly different from susceptible varieties, **, significantly different at the 1% level.

Table 7. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, shikimate dehydrogenase and tyrosine oxidase activities in various tissues of buds from susceptible and resistant varieties.

	Gall tissue			Tissue of gall side adjacent to browning	Tissue of healthy side adjacent to browning	Healthy tissue			
	Nutritive cell layer	Parenchymatous tissue	Border parenchymatous tissue			Cambium	Differentiating leaf	Pith	Apex
Glucose-6-phosphate dehydrogenase ²									
Susceptible Taishowase	.48	.14	.37			.21	.10	.13	
Resistant Ginyose	.02	.03	.03	.02	.07	.11	.06	.05	
Shikimate dehydrogenase ²									
Susceptible Taishowase	.34	.12	.27			.10	.05	.01	
ne-17	.63	.12	.23			.04	.04	.05	
Resistant Tanzawa	.19	.10	.12	.15		.13	.04	.04	
Ginyose	.02	.01	.01	.05		.09	.03	.02	
Tyrosine oxidase ²									
Susceptible Taishowase	.53	.20	.40			.17	.12	.09	.31
ne-17	.55	.15	.28			.15	.08	.08	
Resistant Tsukuba	.05	.04	.04	.11		.05	.07	.04	
Otomune	.12	.11	.18	.19		.11	.08	.07	

² See Table 1. The activities were showed by optical density.

- Fig. 1. Polyphenoloxidase (PPO) (substrate : d-catechin) in healthy tissues of the scale was the most active in parenchymatous tissues (p) around vascular bundles (v) and active in epidermis (e), but little in mesophyll tissues (m). Tsukuba, $\times 200$. Collected on Aug. 25.
- Fig. 2. PPO activity in the resistant var., Tsukuba, was relatively diminished in gall tissues (g) similarly to the susceptible var. but rose extremely in parenchymatous tissues (p) around vascular bundles intervened between gall and healthy tissues (h). $\times 70$. Aug. 25.
- Fig. 3. PPO activity in advanced galls of the susceptible var., Nakatetanba, (A) and resistant one, Tsukuba (B) was reduced, but, increased in adjacent tissues to browning (b) of the resistant (B). 1, Larva. Dec. 19.
- Fig. 4. Glucose-6-phosphate dehydrogenase was exhibited intensively in gall tissues of the susceptible var., Taishowase (A) but was not observed in the resistant gall, Ginyose (B). $\times 28$. Sept. 9.
- Fig. 5. Shikimate dehydrogenase in the weak resistant var., Tanzawa, was considerably active but its outspreading to healthy tissues was prevented by browning (b). $\times 28$. Sept. 23.
- Fig. 6. NADP dehydrogenase activity in gall tissues of the susceptible var., Taishowase. $\times 40$. Sept. 23. A, control and B, +NADP.

かでない。そこで幼虫を取り出したゴール組織を用いて第9表に示す反応系で実験した。それぞれの系の活性を反応3時間後に肉眼観察するとともに17時間後に生成したホルマゼンを比色定量した。すなわち、ゴールを酵素抽出液と磨砕してえた粗酵素液と加熱粗酵素液の区は3時間後の肉眼判定でホルマゼンを生成していなかった。しかし、NADPの添加区はわずかに着色し、NADPとG-6-Pの添加区はもつとも強く着色していた。また

Table 8. NADP-hydrogenase activity* in susceptible variety, ne-17.

Addition of NADP	Gall tissue			Healthy tissue	
	Nutritive cell layer	Parenchymatous tissue	Border parenchymatous tissue	Cambium	Differentiating leaf
—	.06	.05	.10	.07	.07
+	.44	.08	.09	.13	

* See Table 1. The activity was showed by optical density.

比色した結果では、G-6-PとNADPを添加した区の対照との差吸収(OD)は1.206、NADP単独区は0.207であつた。その差、すなわち、G6PD活性は0.999となり、G-6-PとNADP添加区の活性の5/6を占めた。健全組織はいずれの反応区とも活性が弱く、G-6-PとNADP添加区はゴール組織の活性の1/23にすぎなかつた。以上から、ゴール組織はG6PD活性が顕著に高まつていることが明らかとなつた。また、ゴール組織でNADP単独区で活性が示されたことは、NADPの酸化還元に共役する酸化還元系またはそれを助酵素として反応する酵素基質が存在することを意味すると考えられる。

ゴール組織はNADPHのみならずNADH活性も示した。NAD単独添加区の対象との差吸収(OD)は0.204で、NADPHとはほぼ同じ吸光度を与えた。TOのそれは0.260で、NADHの活性よりやや高いにすぎず、TOの活性は弱いものと判断された。同様に、SDの活性はNADPHのそれに近似し、活性は著しく弱かつた(第10

Table 9. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in gall and healthy tissues from susceptible variety, Boji 455.

		Constituent of reaction mixture (ml)*						Activity after 3 hrs	Optical density at 520m μ	Difference from	
		enzyme ext.	heated enzyme ext.	0.1% TTC	H ₂ O	NADP (5mg/ml)	G-6-P (5mg/ml)			Aor E	C
Gall tissue	A	1	—	1	0.6	—	—	—	0.070		
	B	—	1	1	0.6	—	—	—	0.116	0.046	
	C	1	—	1	0.2	0.4	—	+	0.277	0.207 (NADH)	
	D	1	—	1	—	0.4	0.2	卅	1.276	1.206	0.999 (G6PD)
Healthy tissue	E	1	—	1	0.6	—	—	—	0.059		
	F	—	1	1	0.6	—	—	—	0.070	0.011	
	G	1	—	1	—	0.4	0.2	±	0.112	0.053	

* All treatments contained 2 drops of phenazine mesosulfate solution (0.1 mg/ml). Incubation temperature, 30 C, time, 17 hrs.

Table 10. Iso-citrate dehydrogenase, tyrosine oxidase and shikimate dehydrogenase activities in gall tissues from susceptible variety, Boji 455.

	Constituent of reaction mixture (ml)*					Activity after 3 hrs	Optical density at 520m μ	Difference from	
	enzyme ext.	0.1% TTC	H ₂ O	Coenzyme (5 mg/ml)	Substrate			A	B
A	1	1	0.6	—	—	—	0.073		
B	1	1	0.2	NAD 0.4	—	±	0.277	0.204 (NADH)	
C	1	1	—	◇	10 ⁻² M Iso-citrate 0.2	卅	0.780	0.707	0.503 (iso-CD)
D	1	1	—	◇	10 ⁻² M Tyrosine 0.2	±	0.333	0.260	0.056 (TO)
E	1	1	—	NADP 0.4	5 mg/ml Shikimate 0.2	±	0.290	0.220 ^y	0.013 ^x (SD)

* All treatments contained 2 drops of phenazine mesosulfate solution (0.1 mg/ml). Incubation temperature, 30 C, time, 17 hrs.

^y Difference from A in Table 9.

^x Difference from C in Table 9.

表)。

TCA サイクルに存在する iso-CD 活性は第 10 表にみるように著しく強かつた。しかし、G6PD によるものとみなされるホルマザン生成量と比較すると、その活性は G6PD の 50% であつた。

考 察

クリタマバチに対する宿主の抵抗反応は、葉あるいはたく葉でゴールと健全組織の境界部に形成される抵抗性反応Ⅲ型のかつ変が重要である(22, 26)。このかつ変は維管束周辺柔組織から始まる。寄生者の害を受けていない葉の維管束周辺柔組織でもポリフェノールの反応は強いが、寄生を受けると抵抗性品種の場合は一層顕著になる。これに対し、感受性品種の場合には変化が少ない。とくにカテコールタンニンは感受性、抵抗性両品種ともに、ゴール形成をしていない葉組織の健全部にはほとんど存在しないが、クリタマバチの寄生を受けると抵抗性品種ではゴールと健全組織の間に著しく生成される。同様に、かつ変部およびその隣接部ともにカテコールタンニンの反応が認められ、かつ変にこのタンニンが明らかに関与する。

かつ変現象には基質のみならず、酵素のポリフェノールオキシダーゼ活性も関係する。本研究で行なつた組織化学的検出法は、厳密に言えば、ポリフェノールオキシダーゼによる酸化のみならず、キノンの還元との複合反応として示される。感受性品種のゴールではアスコルビン酸に由来すると考えられる酸性硝酸銀反応が強く(20)、また、本報告で明らかにしたように、NADPH₂ などの生成系の活性も高い。したがつて、感受性品種のゴール組織は見かけの活性よりさらに強いかも知れない。一方、抵抗性品種のゴールは還元力が弱いから、ほぼポリフェノールオキシダーゼそのものの活性を示していると考えられる。しかしながら、従来の病斑部周辺組織の抵抗性反応にあずかるポリフェノールオキシダーゼ活性の意義を考えると、本酵素活性が隣接する健全組織の細胞で高かつたことは、植物疾病における抵抗反応とよく一致する。すなわち、この活性は抵抗性品種でやや高いとすでに報告してきたが(20)、顕微測光による今回の結果からも抵抗性品種が感受性品種より活性が高いことを認めた。その組織はポリフェノールの生成、集積が多いゴールと健全組織の境界部に位置する維管束周辺柔組織(26)と一致し、しかもそこでは健全組織より活性が高かつた。したがつて、その部分にかつ変が起つているものと判断されるとともに、抵抗性品種では感受性品種よりかつ変にかかわる基質の生成、酵素活性がともに大であると結論される。

抵抗性品種の組織でオキシダーゼ活性が増大することは線虫(1, 9)やダニ(12)などの動物寄生者についても知られているが、植物疾病の病斑部についてみた場合はさらにその例は多い(7, 37)。

こうした寄生者の侵入にともなう宿主組織でのポリフェノールの増加、オキシダーゼの活性化やえ死組織の形成は、過敏性反応の一つと見なしてよいと思われる。病原菌による過敏性反応は代謝活性の高いときに急速であるとされる(39)が、また一方において、抗生物質、菌の摩砕物、熱処理でえ死反応が起つたり(16)、逆に、薬物(39)、遊走子の摩砕上澄液(3)、親和レースの接種(35, 38)などによつて低下することが報告され、過敏性反応、すなわち宿主細胞のえ死が養分の供給を断ち、あるいはファイトアレキシンの生成を導き、菌の生育を抑制するとする従来の考え方(18)に対し、宿主細胞のえ死前にすでに非親和性菌は生育が阻害され、殺されていて、え死は抵抗性反応の結果であり(16)、決定的な役割をもっていない(34)とする報告もある。このような点の明確な結論は今後に残された重要な課題であろう。本研究の場合は病原菌の場合といくらかの点で様相を異にしていると考えられる。例えば、病原菌の場合、え死は接種後時間単位で起るけれども、クリ組織では日または月単位で起る(20)。寄生者の生死についてみればかつ変形成時にもクリタマバチ幼虫は生存している。このような点と、前報でのべたようなかつ変の意義(26)から考えると、本研究では、過敏性反応原因説を採用した方が抵抗性反応を説明しやすいように思われる。

また他方、かつ変え死組織の形成は健全組織あるいはゴール組織の還元的な代謝系との関係でとらえる必要もあろう。

若い組織では種々のデヒドロゲナーゼ活性が高く、TTC 反応が種子の生死や根の活性の判定などに利用されることは周知のことである。ゴールの起源となる幼葉ではこの活性は弱かつた。ところが、ゴール組織になると感受性品種の場合は生長点に匹敵する活性を示すようになった。この反応系を明らかにすることは、ゴールの生理を理解する上で重要である。平井(11)は植物組織のテトラゾリウム還元反応が NAD または NADP を必要とするデヒドロゲナーゼによるのかコハク酸デヒドロゲナーゼによるか議論の別れるところと述べている。クリのゴール組織の場合には、ヨード酢酸、重金属イオン、酸化剤などによる阻害効果が高いので、NAD や NADP を助酵素とするヒドロゲナーゼが主体であると推察した。凍結処理によつてその活性が消失することは Endogenous reductase である可能性を示し、NAD や NADP

の添加によつてその活性が回復することもその酵素の存在の傍証となろう。

健全な葉組織では種々のデヒドロゲナーゼ活性が弱い。ゴール化した組織、とくに感受性品種の場合は NADH , NADPH , G 6 PD , iso-CD , SD および TO などの酵素活性が顕著に現われた。後二者の組織化学的ならびに酵素化学的な実験結果を比較したところ、それらの活性がどの程度あるかは断じ難く、とくに TO の場合にはクロシンが酸化されているにもかかわらず、ゴール内にクロシンが多く存在する(24)ので酵素と基質の局在性やクロシン合成の turn-over について検討する必要がある。

うどんこ病などの絶体寄生菌による宿主・病原菌相互作用の組織では HMP 回路が活性化することが知られている(36)。クリの場合も、ゴール組織では G 6 PD 活性が健全組織の 23 倍に達し、 HMP 回路が活性化していた。 TCA サイクルの iso-CD 活性も著しく強いが、 TTC ホルマゼンの生成量は G 6 PD の半分であつた。したがつて、この反応から考えると、ゴール組織では HMP 回路の活性が EMP 回路より増大していると想像された。 Endo ら(4, 5)は根こぶ線虫あるいはシスト線虫の寄生したダイズで、 Veech ら(40)は根こぶ線虫の寄生したダイズで G 6 PD や 6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ活性が強いことを報告している。しかし、 iso-CD 活性も強く、 HMP 回路の活性が TCA サイクルより大であるかどうかは明らかでないと述べている。以上のことから、ゴール組織では健全組織より HMP 回路ならびに TCA サイクルがともに活性化していることは事実であろう。

一方、抵抗性品種のゴールでは G 6 PD を初め、種々のデヒドロゲナーゼ活性が低く、同様な例は根こぶ線虫の寄生したダイズの場合(5, 40)において認められている。したがつて、抵抗性品種では組織の肥大(ゴール)が持続するのに必要な物質代謝は行なわれ難いと推測される。

感受性品種のゴールでは HMP 回路が活性化するが、このことは前報(24)で明らかにしたように感受性品種のゴールで 5 単糖やアミノ酸が多い事実とよく符合し、抵抗性品種のそれは健全組織の活性に類似し、5 単糖やアミノ酸の少ないことと一致する。

この HMP 回路は 5 単糖、核酸、芳香属アミノ酸などの合成系として重要であるばかりでなく、 NADP H_2 の生成系としての意義も大きい。これは NAD H_2 とともにゴール組織で長鎖脂肪酸の合成やキノンの還元にも関与するのであろう。感受性品種のゴール栄養細胞層はズダンブラック B でよく染色される(26)ので脂質の多いこ

とが考えられる。ヒマ子実で長鎖脂肪酸への標識酢酸の取り込みは NAD H_2 や NADP と G-6-P の添加で増加する(28)ので、クリゴールでも同様のことが想像される。一方、抵抗性品種ではゴール組織はズダンブラック B の被染度が低い、ゴールと健全組織の間の維管束周辺柔組織に染色性を著しく示す細胞群が観察される。この細胞群は、また、ケトン基の存在を示し、パニリン-HCl 試薬と反応する(26)。すなわち、還元力が低いため長鎖脂肪酸とならず、ケトン基を示す脂質となり、環状化合物を生成し、カテコールタンニンとなり(10)、抵抗性宿主はこれを PPO によつて酸化重合し、え死細胞を形成して、抵抗性を発現するのであろう。これに反し、感受性品種の場合には、たとえ酸化が起こつたとしても、キノノ類はゴール組織内に生成した NADP H_2 などによつて酵素的あるいは非酵素的にポリフェノールに還元され、酸化された NADP は再び HMP 回路で利用されるものと考えられる(下図参照)。

このような酸化と還元作用に著しい差があると抵抗性と感受性に分かれるが、両作用が伯仲すると抵抗力は弱められる。たとえば、筑波や丹沢において寄生幼虫の出ずゴール誘導物質は健全組織に近いゴール基部に移行し、そこに形成されるえ死組織に隣接した細胞のデヒドロゲナーゼ活性を著しく強めて、かつ変の進展を阻止しようとしているかに観察された。反面、かつ変部およびその近辺の細胞は、ポリフェノール性物質が多く(25, 26)、本研究で明らかにした *in vitro* の結果からデヒドロゲナーゼの活性を低下させる機能を果していると思われる。

ゴール組織で NADP や NAD を助酵素とする反応系が活性化する理由は次のように考えられる。すなわち、 NAA 処理したジャガイモがカルス化する際に G-6-PD 活性が強まり、 HMP 回路が活発になることが報告されている(15)。一方、著者らはクリタマバチがクリ組織に対してゴール誘導物質、サイトカイニン活性を示す物質(23)、を分泌してゴール形成を促すのであろうと報告してきた(21, 22)。倉石によれば、サイトカイニンは NADP , NAD など酸化型助酵素を増加させ(17)、 HMP 回路などの酵素系を活性化させる。また、ライムギの発芽のとき、光合成に関与する NADP 依存酵素の活性はカイネチン処理で増し、オーキシシンでは低下する。また、光合

成に関係のない G6PD 活性もカイネチンがオーキシニンやクロラムフェニコールと共存すると増加することが報告されている(8)。すなわち、ゴール中のサイトカイニンやオーキシニンのレベルが助酵素の量や酸化・還元型の比を調節して代謝の制御をしているものと思われる。

本研究のこれまでの一連の研究結果から、クリ組織がクリタマバチに対して抵抗性を発現する機構を模式的に示すと第7図のようになる。まず、幼虫は口よりサイトカイニン様のゴール誘導物質を分泌し、宿主組織に作用する。宿主の反応は組織の age によつて三つのタイプに分けられる。成熟したあるいはごく若い組織はそれぞれ、抵抗反応ⅠおよびⅡ型のかつ変を生じてゴールを形成しないか形成しても途中で停止する。しかし、若い分化発育中の葉組織などではゴールができるが、ゴール形成は感受性か抵抗性品種かによつて二つに分けられる。

感受性品種の場合、ゴール細胞の核や仁は著しく肥大し、ピロニンの染色性が増し、核の機能変化と核酸の合成が起こる。こうして、タンパク質の合成が盛んとなり、呼吸、HMP 回路の活性化にともなつて変化し、また、ゴール組織のデヒドロゲナーゼは活性化する。ゴール内では自からの合成によるのみならず、連絡した維管束を通じて健全組織からアミノ酸や糖が移行増加する。これらによつて、ゴールの肥大は進行する。一方、幼虫は宿主組織より豊富な栄養分を摂食し、発育を続ける。発育した幼虫はさらに多くの刺激を宿主に与えるであろう。こうしてより一層進行性病変が進む結果となる。これに対して、抵抗性品種の場合には感受性品種にみられるような生理的变化が不十分であるばかりでなく、ゴールと健全組織の境界部にある維管束系にサフラニンやズダンブラック B に対する被染性の高い細胞が生じ、ポリフェノール、とくにカテコールタンニンも形成される。これは同様に活性化したポリフェノールオキシダーゼによつてキノンに酸化され、さらにその重合、縮合によつてかつ変え死組織が形成される（抵抗性反応Ⅲ型）。一方、感受性品種においてもこの組織にはポリフェノールとそれら酵素があるから酸化は起こりうる。しかし、ゴール組織にはアスコルビン酸や多量に生成される NADPH₂ によつて酸化物（キノン類）は非酵素的あるいは酵素的に還元されるので、見かけ上酸化は起こらず、かつ変化するしない。抵抗性品種の維管束周辺柔組織から始まったえ死は速度が早く、維管束全体におよび、健全組織の維管束系との連絡がしや断される。このため、健全組織からゴール組織への養分の供給とゴールから健全組織へのゴール誘導物質の移行は阻害され、ゴールの肥大は健全組織へ広がらず、停止するとともに、寄生者も発育阻害

をうける。また、萌芽時にはえ死組織間の細胞壁が薄くなり、ゴールは健全組織より脱離が容易となる。抵抗性品種ではこうした退行性病変が進み、抵抗性を発現するものと考察される。

摘 要

感受性品種と抵抗性品種のゴール組織と健全組織のポリフェノールオキシダーゼおよび 2, 3 のデヒドロゲナーゼ活性を組織化学的に測定した。

健全組織のポリフェノールオキシダーゼは維管束周辺柔組織に活性が強く、葉肉組織で弱かつた。ゴール組織は感受性、抵抗性品種とも健全組織より活性が低下していた。しかし、後者の方がその程度は低かつた。また、後者のゴール組織と健全組織の間ではかつ変形成前にすでに活性の著しい増進が観察された。この組織は維管束周辺柔組織であつた。

ゴール組織で示されるテトラゾリウム還元反応は加熱や凍結処理によつて消失し、NH₂OH, NaF, 2, 4-DNP, ヨード酢酸, 重金属イオン, 酸化剤によつて失活または活性が低下した。タンニン酸は 10⁻³M, クリ樹皮から得たタンニンは 0.4% でデヒドロゲナーゼ活性を阻害した。ゴールの起源となる幼葉のデヒドロゲナーゼ活性は弱い。感受性品種のゴール組織のそれは強く、生長点の活性に匹敵した。一方、抵抗性品種は感受性品種の半分程度の活性であつた。

健全組織における NADP ヒドロゲナーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼなどの活性は弱い。感受性品種のゴール組織では NAD と NADP ヒドロゲナーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼなどの活性は著しく強かつた。しかし、抵抗性品種のゴール組織では本実験で測定したデヒドロゲナーゼ活性に関する限り弱かつた。

謝 辞 本研究に当つて、示唆に富んだ教示と懇切なご校閲をたまわつた京都大学駒山慈孝助教授に深謝の意を表します。

引用文献

1. ACEDO, J. R., and R. A. ROHDE. 1971. Histochemical root pathology of *Brassica oleracea* L. infected by *Pratylenchus penetrans* (Cobb.) Filipjev and Schuurmans Stekhoven (Nematoda: Tylenchidae). J. Nematol. 3: 62—68.
2. BIRD, A. F. 1961. The ultrastructure and histochemistry of a nematode induced giant cell. J. Biophys. Biochem. Cytol. 11: 701—715.
3. DOKE, N. 1975. Prevention of the hypersensitive reaction of potato cells to infection with an incompatible race of *Phytophthora infectans* by constituents of the zoospores. Physiol. Plant

- Pathol. 7: 1—7.
4. ENDO, B. Y., and J. A. VEECH. 1969. The histochemical localization of oxidoreductive enzymes of soybeans infected with the root knot nematode *Meloidogyne incognita acrita*. Phytopathology 59: 418—425.
 5. ———, and ———. 1970. Morphology and histochemistry of soybean roots infected with *Heterodera glycines*. Ibid. 60: 1493—1498.
 6. ———. 1971. Synthesis of nucleic acids at infection sites of soybean roots parasitized by *Heterodera glycines*. Ibid. 61: 395—399.
 7. FARKAS, G. L., and Z. KIRÁLY. 1962. Role of phenolic compounds in the physiology of plant disease and disease resistance. Phytopathol. Z. 44: 105—150.
 8. FEIERABEND, J. 1970. Characterization of cytokinin action on enzyme formation during the development of the photosynthetic apparatus in rye seedlings. Planta 94: 1—15.
 9. GIEBEL, J., J. KRENZ and A. WILSKI. 1971. Localization of some enzymes in roots of susceptible and resistant potatoes infected with *Heterodera rostochiensis*. Nematologica 17: 29—33.
 10. 樋口隆昌. 1963. 樹木生化学 pp. 112—133. 共立出版.
 11. 平井篤造. 1963. 植物病理の生化学(後編). 平井, 鈴木編. pp. 155—180. 農業技術協会.
 12. ISHAIYA, I., and M. STERNLICHT. 1971. Oxidative enzyme, ribonuclease and amylase in lemon buds infected with *Aceria sheldoni* (Ewing) (Acarina: Eriophyidae). J. Exptl. Bot. 22: 146—152.
 13. 石本 真, 水上茂樹, 水島昭二, 和田 博 編. 1966. メタボリックマップ・蛋・核・酵・別冊. 共立出版.
 14. 逸見武雄. 1935. 植物病理学汎論. pp. 210—219. 岩波書店.
 15. KIKUTA, Y., T. AKEMINE and T. TAGAWA. 1971. Role of the pentose phosphate pathway during callus development in explants from potato tube. Plant and Cell Physiol. 12: 73—79.
 16. KIRÁLY, Z., B. BARNA and T. ERSÉK. 1972. Hypersensitivity as a consequence, not the cause, of plant resistance to infection. Nature 239: 456—458.
 17. 倉石 晋. 1969. サイトカイニン. 化学と生物 7: 21—26.
 18. MACLEAN, D. J., J. A. SARGENT, I. C. TOMMERUP and D. S. INGRAM. 1974. Hypersensitivity as a primary event in resistance to fungal parasites. Nature 249: 186—187.
 19. 松井鈺一郎, 島湯博高. 1963. クリのクリタマバチ抵抗性に関する研究(第1報). シバグリ新梢樹皮中のポリフェノール性物質の季節的变化. 園学雑誌 37: 95—101.
 20. ———, ———. 1970. 同上(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. Ibid. 39: 44—54.
 21. ———, ———. 1970. 同上(第3報). クリタマバチおよびグリゴール組織中にふくまれる植物ホルモンについて. Ibid. 39: 115—128.
 22. ———, ———. 1972. 同上(第4報). クリタマバチによる感受性および抵抗性品種のゴール形成. Ibid. 41: 344—352.
 23. ———, ———, 宗像 桂. 1975. 同上(第5報). クリタマバチ幼虫に含まれるサイトカイニン活性物質ならびに幼虫抽出液によるクリのカルス形成. Ibid. 43: 415—422.
 24. ———, ———. 1976. 同上(第8報). クリの健全組織およびゴール組織ならびにクリタマバチ幼虫中の糖およびアミノ酸について. Ibid. 44: 347—354.
 25. ———, ———. 1976. 同上(第9報). 感受性および抵抗性品種の芽のポリフェノール含量について. Ibid. 45: 7—14.
 26. ———, ———. 1976. 同上(第10報). 芽組織のかつ変形成とポリフェノール性物質の組織内分布. Ibid. 45: 107—115.
 27. MATSUYAMA, N., and T. MISAWA. 1966. Studies on the hypertrophic disease caused by *Taphrina species*. (V). Tohoku J. Agr. Res. 17: 109—115.
 28. NAKAMURA, Y., and M. YAMADA. 1974. Long chain fatty acid synthesis in developing castor bean seeds I. Plant and Cell Physiol. 15: 37—48.
 29. 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回シンポジウム要旨. pp. 17—23.
 30. ———. 1959. 植物ガンの形成機構. 蛋・核・酵. 4(増刊号): 82—95.
 31. OWENS, R. G., and H. N. SPECHT. 1966. Biochemical alternations induced in host tissues by root knot nematodes. Contr. Boyce Thompson Inst. 23: 181—198.
 32. RUBINSTEIN, J. H., and R. G. OWENS. 1964. Thimidine and uridine incorporation in relation to the ontogeny of root knot syncytia. Ibid. 22: 491—502.
 33. 玉利勤次郎. 1970. 感染の生化学—植物—. 平井, 鈴木編. pp. 191—230. 農業技術協会.
 34. TANI, T., H. YAMAMOTO, T. ONOE and N. NAITO. 1975. Initiation of resistance and host cell collapse in the hypersensitive reaction of oat leaves against *Puccinia coronata avenae*. Physiol. Plant Pathol. 7: 231—242.
 35. ———, S. OUCHI, T. ONOE and N. NAITO.

1975. Irreversible recognition demonstrated in the hypersensitive response of oat leaves against the crown rust fungus. *Phytopathology* 65 : 1190—1193.
36. 富山宏平. 1933. 植物病理の生化学（後編）. 平井, 鈴木編. pp.126—154. 農業技術協会.
37. ———. 1970. 感染の生化学—植物—. 平井, 鈴木編. pp.69—102. 農業技術協会.
38. TOMIYAMA, K. 1966. Double infection by an incompatible race of *Phytophthora infestans* of a potato plant cell which has previously been infected by a compatible race. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 32 : 181—185.
39. ———. 1967. Further observations on the time requirement for hypersensitive cell death of potatoes infected by *Phytophthora infestans* and its relation to metabolic activity. *Phytopathol. Z.* 58 : 367—378.
40. VEECH, J. A., and B. Y. ENDO. 1970. Comparative morphology and enzyme histochemistry in root knot resistant and susceptible soybeans. *Phytopathology* 60 : 896—602.
41. 湯川敬夫. 1958. イスノキ虫エイの植物病態生理学的研究. 第1報. 山口大農学学術報告 9 : 971—974.