

## 子苗立枯病抵抗性機作に関する研究 (第3報)\*

罹病南瓜組織の oxidase 活性, polyphenol 成分及び

ascorbic acid の消長

高橋 実, 糸井 節 美

Studies on the Mechanism of Resistance in the Damping-off  
of Cucurbits-seedlings.3. The vicissitudes of oxidase activity, polyphenols and ascorbic acid in the  
seedling-tissues of pumpkin infected by *Pythium ultimum*.

By

Minoru TAKAHASHI and Setsumi ITOI

Department of Plant Pathology, College of Agriculture

(Received October 15, 1956)

- 1) The present paper deals with the results of the writers' experiments on the vicissitudes of oxidase, peroxidase, polyphenols and ascorbic acid in the seedling-tissues of pumpkin affected by *Pythium ultimum*.
- 2) It was ascertained that the oxidase as well as the peroxidase are highly activated and polyphenols are noticeably accumulated in the affected parts in comparison with the un-inoculated tissues as controls.
- 3) In the affected tissues, the total amount of ascorbic acid and the amount of its oxidized form were found to be increased more abundantly after two days than in the controls.

抵抗性寄主が病菌の侵害に対して速かに細胞の褐変を来し、菌の発育を阻止する現象は寄主の抵抗反応である。しかし阪本<sup>8)</sup>が稲熱病に於て抵抗性品種で指摘しているように、寄主細胞内に生成せられる褐色物質は褐変過程における終産物で、このものは病菌の発育阻止に直接関係しないとみられる。したがって抵抗性の本質は褐変過程に於ける細胞内の代謝異常の結果に帰せられると考える。<sup>6,10,11,14)</sup>

細胞褐変の機序並に褐色物質に関しては、近年、生化学的に或は組織細胞化学的に活潑な研究がなされている。DUFRENOY<sup>4)</sup>は代謝異常により細胞内に phenol 化合物が蓄積せられることを明らかにしたが、その後この事実は多くの抵抗性寄主の褐変細胞内に証明せられた。即ち病変細胞では polyphenoloxidase 活性が高まり、<sup>3,9,10,11,12,13)</sup>呼吸増加し、基質の polyphenol 成分が著しく増加する。これは quinone に酸化されるが、一方的に反応が昂進して酸化重合し、更にアミノ酸などのN化合物と、或はリグニンなど縮合してメラニン系の褐色物質を形成して細胞を充填すると考えられている。

これらの現象は *Pythium* 菌の侵害を受けた強抵抗性品種の病変細胞内でも常に観察せられた。本報告では特に酸化酵素系の活性の消長について、その実験結果をのべることにした。

本研究を行うに当り御懇篤なる指導を賜つた逸見教授、京都大学赤井教授並に生物化学研究室本田教授に対し謹んで深謝の意を表する。

## 実験材料及び方法

1. 材料並に酵素液の調製 *Pythium* 菌に強抵抗性の甘栗南瓜が 5~6cm に成長したときに、その幼茎に *P. ultimum* 菌を接種した。細切した罹病茎 2~5g を氷冷乳鉢に入れ、これに氷冷蒸溜水を加えて10分間充分に磨碎し、その遠心分離液を適当に稀めて酵素液とした。

2. oxidase の測定法 瓜谷の方法<sup>13)</sup>を参考にし、Warburg 検圧装置を用いて次の如く実施した。即ち容器の主室に M/15 磷酸塩緩衝液 (pH 6.0) 1.5cc と 0.5% pyrogallol 溶液 1.5cc を加え、側室には酵素液 1cc を入れて、30°C で数分間振盪 (1分間180往復) する。恒温に達してから両者を合し、側室の蓋を開いたまま振盪を続け、10分後に 2N 硫酸 0.5cc を

\* 大阪府立大学植物病理学研究室業績

注加して酵素作用を止め, 生成した purpurogallin をエーテルで数回抽出する. この抽出液を spectrophotometer (430 m $\mu$ , cell 1 cm) で比色定量する. 比色には予め calculation curve を製作したが, これには合成 purpurogallin の 10mg% エーテル溶液を作り, これを一定の割合に稀めた濃度と optical density との関係性を求めた. その結果は比例関係を示したので, これに基づいて purpurogallin を定量した. 酵素力価は試料の乾物量 (g) 並に生体重量 (g) で purpurogallin 量 (mg) を除した値を以て表した. 尚対照として酵素液の代りに蒸留水を用い, 同様に操作してその値を差引いた.

3. peroxidase の測定法 酵素液中に共存する oxidase の影響を除く必要がある. そのためには強度の真空中で実施せねばならないので, 筆者らは Balls 及び Hale<sup>2)</sup>, Mallette<sup>7)</sup> 及び瓜谷<sup>13)</sup>の諸方法を参考にして, 窒素ガス中で実施した. Thunberg tube の主室に酵素液 1cc, M/15 磷酸塩緩衝液 (pH 6.0) 1.5cc を加え, 側室には 0.5% pyrogallol 溶液 1cc, 0.5% 過酸化水素水 0.5cc を加えて, 窒素ガス交換を行った. 30°C の水浴中に数分間浸して恒温に達した後, 両者を合し 5 分間作用させた. 直に 2N 硫酸 1cc を注加して酵素作用を止め, 以下 oxidase の場合と同様に酵素力価を求めた.

4. polyphenol 成分の分析 瓜谷の方法<sup>13)</sup>に従い次の如く実施した. 試料 10g を乳鉢に入れ, 75% アルコール 20cc を加えて十分に磨砕する. これを 75% アルコール 30cc でコルベンに流し込み, air condenser を附し 1 時間 70°C の水浴中で加熱浸出する. 遠心分離後上澄液を減圧濃縮し, 少量の水を加えて再び濃縮しアルコールを除いて水溶液にする.

次に醋酸エチル 100 cc で数回に分けて抽出し, その抽出液を減圧濃縮し, 更に少量の蒸留水を加えて再び濃縮して, 醋酸エチルを完全に除いて水溶液にする. これに 10% 醋酸鉛液を過剰に加え, アンモニヤ水で pH 8.5 にする. 生成する黄色の鉛塩を遠心分離して分け, 沈澱を適量の水に懸濁して 10% 硫酸で pH 2.0 にする. 遠心分離により上澄液を採り, 適当に稀めて供試液とする. 次に供試液 5cc, 磷酸塩緩衝液 (pH 6.8) 5cc, 0.1M 赤血塩溶液 1cc を Thunberg tube にとり密閉後 80°C の水浴中で 20 分間反応させる. 10 分間急冷し 5% 硫酸第二鉄の稀磷酸溶液 2cc を加え発色する prussian blue の色を spectrophotometer (670m $\mu$ , cell 1cm) を用いて比色定量した.

5. アスコルビン酸の定量 アスコルビン酸の定量

はインドフェノール法<sup>5)</sup>によつた. 試料 4g を乳鉢に入れ 5% メタ磷酸 8cc を加え十分に磨砕し, 更に水 8cc を添加して, よく混和し遠心分離してから, 上澄液を供試液とした. 先づ還元型を測定し, 次に H<sub>2</sub>S を作用せしめて, 酸化型アスコルビン酸を定量的に還元型に変化せしめた後, 総量を測定して, 総量から還元型を差引いたものを酸化型とした.

### 実験結果

1. oxidase 及び peroxidase 活性 罹病並に健全茎組織に於ける oxidase, peroxidase の消長は第 1, 第 2 表に示す通りである. 即ち oxidase, peroxidase 共に罹病組織では健全組織に比して約 2, 3 倍の活性度を示している.

Table 1. Oxidase activity in the healthy and infected tissues of pumpkin seedlings

Experiment	Infected		Healthy	
	Dry matter	Wet matter	Dry matter	Wet matter
I	70.3	1.56	38.5	0.53
II	62.0	1.34	28.6	0.38
III	83.8	1.84	43.7	0.60

Table 2. Peroxidase activity in the healthy and infected tissues of pumpkin seedlings

Experiment	Infected		Healthy	
	Dry matter	Wet matter	Dry matter	Wet matter
I	11930	265	6180	85
II	15874	350	7205	98
III	9355	205	5264	72

Table 3. The vicissitude of polyphenols in the healthy and infected seedling tissues of pumpkin (mg%)

Experiment	Infected		Healthy	
	Dry matter	Wet matter	Dry matter	Wet matter
I	12.19	0.33	8.34	0.19
II	26.38	0.73	12.61	0.44

2. polyphenol 成分の消長 罹病並に健全茎組織の polyphenol 成分の測定値は第 3 表に示す如くである. 即ち罹病組織では健全茎に比して 1.5~2 倍の polyphenol 成分の蓄積がみとめられる.

3. アスコルビン酸の消長 罹病並に健全茎組織のアスコルビン酸の測定値は第 4 表に示す如くである. 表によれば接種後 2 日目で既にアスコルビン酸の総量並に酸化型の増加がみとめられ, 4 日目では著しく酸化型が増加するも総量では 2 日目と変りはなかつた.

### 考 察

甘栗南瓜罹病茎の組織解剖の結果から明らかなよう

Table 4. The vicissitude of ascorbic acid in the healthy and infected seedling tissues of pumpkin (mg%)

Days after inoculation Types of ascorbic acid	Experiment I					Experiment II				
	0		2		4	0		2		4
	Healthy	Infected	Healthy	Infected	Healthy	Healthy	Infected	Healthy	Infected	Healthy
Reduced	3.91	4.98	3.93	3.14	2.89	4.29	5.29	4.11	2.79	2.63
Oxidized	2.30	4.06	2.03	6.18	4.17	2.26	3.12	2.59	6.14	4.73
Total	6.21	9.04	5.96	9.32	7.06	6.55	8.41	6.70	8.93	7.36

に、寄主体に侵入した *Pythium ultimum* 菌は1~数細胞内に伸長後その発育を阻止せられた。<sup>1)</sup> 病変組織の表皮細胞及び皮層細胞の2, 3層は崩壊し、その内層及び隣接細胞は褐色壊死帯を生じ、更にこれに接した数細胞は病原菌の侵入がないにもかかわらず、中毒症状を示している。中毒部細胞内の状態は褐色壊死を生ずる前駆症状であつて、褐色物質の生成過程に於ける中間的狀態であると見做される。したがつて阪本<sup>8)</sup>が指摘する通り、褐色物質を代謝の最終産物とするならば、この褐変の中間過程に於ける phenol の集積と細胞内の代謝異常による酵素系活性化の機序を明らかにすることが、寄主の抵抗反応の本質を知る上に重要である。

鈴木,<sup>10)</sup> 土居, 豊田, 後藤ら<sup>12)</sup>は稲熱病抵抗性稲の褐変組織の生成機序に関し詳細な報告をなしているが、氏らは中毒部細胞内に quinone 及び oxidase の存在を予想し、更にその外圍に phenol 類の集積を確め、健全部との境界は脱水素酵素の異常昂進を認めて、細胞褐変の機序は菌刺戟→脱水素酵素能昂進→異常呼吸→呼吸材料の涸渇→phenol 生成→自己消化的酸化→褐変の如く系統づけた。瓜谷ら<sup>14, 15)</sup>は黒斑病罹病甘藷の呼吸酵素系について実験して、罹病甘藷は oxidase 系の活性化及び中間基質の polyphenol 成分の増加並に酸化還元系に關与する ascorbic acid の増加を認めた。然るにこれらと同じような事実が本実験の結果から明らかになつた。即ち抵抗性品種の病変組織は健全組織に比して、2, 3倍の polyphenol oxidase 及び peroxidase 活性の増加を示し、更に中間基質である polyphenol 成分の著しい蓄積がみられた。したがつて細胞呼吸は異常に増加し、polyphenol 成分は益々酸化されて、細胞内には quinone 型が一方的に増加する。quinone 型は脱水素酵素或は ascorbic acid などの還元反応により、polyphenol に還元せられるのであるが、実際には病変組織にみられるように、ascorbic acid の総量並に酸化型は接種後2日目で既にその増加が認められ、4日目では一層顕著な増加を示している。たゞその総量が2日目と殆んど

変化しない。このことは瓜谷ら<sup>14, 15)</sup>が黒斑病罹病甘藷に於て、又鈴木ら<sup>10)</sup>が紫紋羽病罹病甘藷に於て得た実験結果と略々一致するもので、polyphenol と ascorbic acid との間の酸化還元反応の關係が認められる。

いずれにしても病変細胞内では常に polyphenol 成分が quinone 型に酸化せられ、quinone 型が更に酸化、重合し或は phenol 系のアミノ酸などが縮合してメラニン系の褐色物質が沈積せられると考えられる。この褐変過程は既に報告されている通りである。<sup>4, 8, 11, 14)</sup>しかし褐色物質が寄主の抵抗反応にあずかる機序については未だ結論を得ていない。たゞ褐変過程に於ける細胞内の代謝異常が細胞質内容を変化せしめる結果、そこに生成せられた中間物質が病菌の生理に有害に作用することは考えられる。

## 摘 要

1. *Pythium* 菌に強抵抗性を示す甘藷南瓜罹病組織の oxidase, peroxidase の活性, polyphenol 成分及び ascorbic acid の消長について検討した。

2. 罹病組織の oxidase 及び peroxidase 活性は健全組織の2倍乃至3倍に増高し、約2倍量の polyphenol 成分の蓄積がみとめられる。

3. 罹病組織では接種後2日目に ascorbic acid の総量並に酸化型の増加がみとめられ、4日目では酸化型のみが更に増加した。

## 引用文献

- 1) 赤井重恭, 高橋美, 竹内高明: 植物病害研究 6: 1~5 (1956)
- 2) Balls, A. K. and W. S. Hale: J. Assoc. Eff. Agr. Chem. 220: 69 (1933)
- 3) 土居養二, 鈴木直治: 日植病報 18:76 (1953)
- 4) Dufrenoy, J.: Amer. Jour. Bot. 23: 70 (1936)
- 5) 藤田秋治: 医学と生物学 2: 279~284 (1942)
- 6) 平井篤造: 植物の病害抵抗機作に関する研究 (1955)
- 7) Mallette, M. et al.: Ind. Eng. Chem. 38: 437 (1946)
- 8) 阪本正幸: 日植病報 15: 101 (1951)
- 9) 下村徹, 山口昭, 瓜谷郁三, 平井篤造: 日植病報 20: 47~53, (1955)
- 10) 鈴木直治: 栃内, 福士両教授還暦記念論文集 227~235 (1955)
- 11) 富山宏平, 高瀬昇, 酒井隆太郎, 高桑亮: 日植病報 20: 59~64 (1955)
- 12) 豊田栄, 土居養二, 後藤和夫: 日植病報 18:162 (1954)
- 13) 瓜谷郁三, 村邊敬一郎: 日農化 26:289~295 (1952)
- 14) 瓜谷郁三, 赤沢堯: 科学 25: 614~620 (1955)
- 15) 瓜谷郁三, 家近恵子: 日農化 27:688~692 (1953)