

疫病感染ジャガイモの病態生理学的研究

—特に種間雑種 DNA 分画の抵抗性誘導に関連して—

野津 幹雄^{*}・山本 昌木^{***}・大船 重幸^{**}
西村 昭雄^{**}・坂東 俊輝^{**}

Mikio NOZU, Masaki YAMAMOTO, Shigeyuki OFUNE,
Akio NISHIMURA and Toshiteru BANDO
Patho-Physiological Studies on Potato Late Blight, with Special
Reference to the Induction of Resistant Reaction by the
Application of DNA Fraction from the Interspecific Hybrid

従来、筆者らはジャガイモ疫病をモデルとして植物病害抵抗性の本質を究明するため、いろいろの角度から検討して来た。今回は特に抵抗性種間雑種 DNA 分画を罹病性品種に処理した場合に誘導される抵抗性について行った二三の実験結果を報告する。純品リシチンを頂いた名大富山宏平博士、北海道農試石坂信之技官、実験に協力された島根大学植物病学研究室今野清隆氏に感謝する。

実験材料と方法

ジャガイモは抵抗性種間雑種96-56 [R₁ 因子]・SH-469 [R₄ 因子]・1506-b(9) [R₁ R₄ 因子]、疫病菌は Race 0・Race 1 をそれぞれ供試した。疫病菌を酒井氏修正培地に培養した濾液にジャガイモ塊茎組織を浸漬し、10分間減圧浸透させた。菌体磨砕液は、8,000g 15分間遠沈した上清である。パーオキシダーゼ活性は¹⁾Curtis, 可溶性蛋白質は²⁾Lowryら, RNA の抽出は³⁾Kuboら, DNA の抽出は⁴⁾三浦らまたは⁵⁾Thomas 法,⁶⁾ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動法は河田らに従った。カルス形成用組織培養培地には Kinetin 2ppm, 4-D 2ppm 添加 Murashige & Skoog 修正培地を用い、4週間ごとに継代培養した。リシチンの抽出は富山⁷⁾らに従い、500nm において比色定量した。感染初期のファイトアレキシン様物質の検索には、種間雑種塊茎に疫病菌遊走子 (Race 0) 懸濁液を滴下、0~24時間

目に浸出液を 1500rpm 5分間遠沈し、上清を 8000rpm 0°C で30分間冷却遠沈した水層 10μl をスライド上のコロジオン膜にのせ疫病菌分生胞子の発芽率をしらべた。

実験結果

a. 疫病菌培養濾液と疫病菌菌体磨砕液のジャガイモ塊茎組織褐変に及ぼす影響

第1表に示すように、R 因子をもつ種間雑種に対し、疫病菌培養濾液や菌体磨砕液は、r 因子をもつ品種よりも多くの褐変を示した。

第1表 疫病菌培養濾液と菌体磨砕液のジャガイモ塊茎組織褐変に及ぼす影響

品 種	濾液・菌体		培養濾液		菌体磨砕液	
	Race 0	Race 1	Race 0	Race 1	Race 0	Race 1
種間雑種 96-56(R ₁)	++	++	++	++	++	++
種間雑種 1506-b(9)(R ₁ R ₄)	++	++	++	++	++	++
種間雑種 SH-469(R ₄)	++	++	++	++	++	++
紅丸(r)	+	+	+	+	+	+
男爵薯(r)	+	+	+	+	+	+

N. B. 処理後24時間目の調査

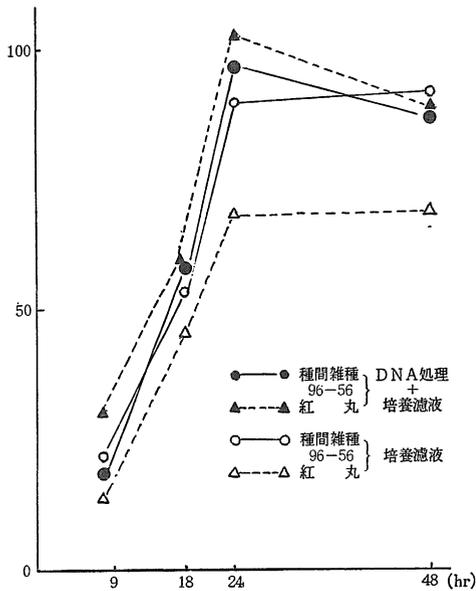
++	0.67cm ² 当り80以上の褐変細胞数
++	0.67cm ² 当り50~80の褐変細胞数
+	0.67cm ² 当り30以下の褐変細胞数

* 植物病学研究室
** 現在京都大学農学部

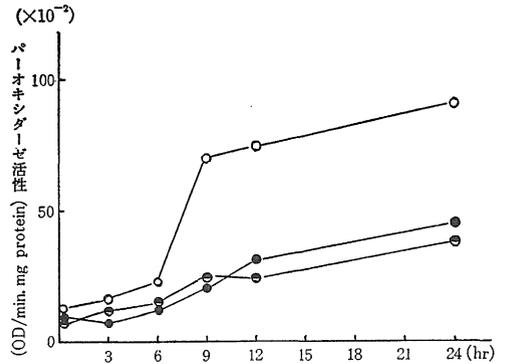
疫病菌培養濾液処理によるジャガイモ塊茎組織の褐変細胞数を経時的にしらべたところ、培養濾液処理をした種間雑種 1506-b(9) では、処理9時間後から褐変細胞が見られ、24時間後まで直線的に増加した。紅丸では12時間後褐変細胞が観察され、24時間後種間雑種 1506-b(9) に比べ約1/2の数であった。静置培養よりも30日間振盪培養したものの方が約2倍の褐変細胞数を示した。

褐変誘起物質の特性をしらべるため、硫酸塩析と有機溶媒による分画を行った。硫酸 0.6-0.8 飽和沈殿分画と、飽和状態での上清で高い褐変誘起作用を認めた。上澄と沈殿をセファデックス G-25 で分画し、種間雑種 96-56に処理すると、上清では分画9、沈殿では分画7が多くの褐変細胞を誘起した。これらの分画を熱処理(120°C 15分間)すると、褐変細胞数は増加した。培養濾液のエタノールやアセトン可溶性分画はジャガイモ葉に壊死を起し、アセトン可溶性分画からエチルアルコールに移る分画も壊死を起した。

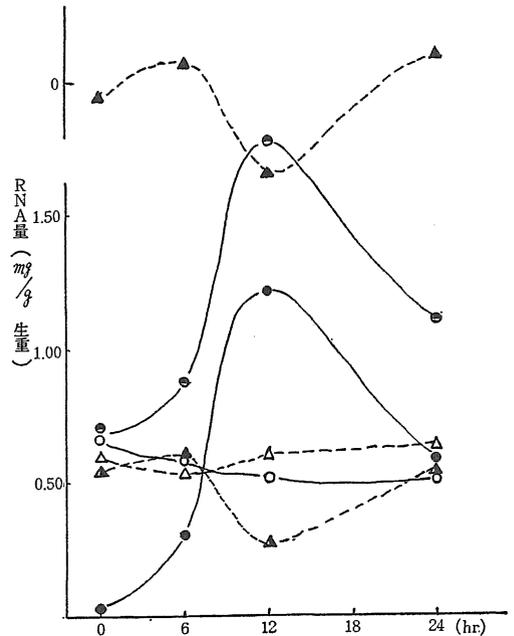
種間雑種 96-56 葉から抽出した DNA 分画 (227 μ g DNA/ml) を種間雑種96-56と紅丸の塊茎組織に処理後、培養濾液を処理して褐変細胞数の経時の変化を観察したところ、第1図に示すように、紅丸に種間雑種96-56の DNA 分画を処理した場合には、処理しない場合



第1図 種間雑種 96-56 DNA 分画処理後疫病菌培養濾液処理によるジャガイモ紅丸組織の褐変細胞数
N. B. 種間雑種 96-56 DNA 分画濃度 227 μ g DNA/ml

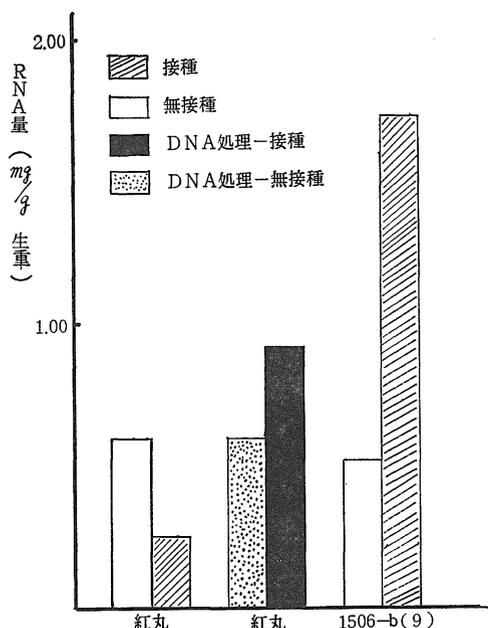


第2図 種間雑種96-56葉 DNA 分画塗布農林1号塊茎パーオキシダーゼ活性
N. B. DNA 分画 (500 μ g DNA/ml) 塗布 2 時間後疫病菌 Race 0 培養濾液減圧処理 (30cm Hg, 5分) 処理面からの厚さ
I 0-2mm (○—○)
II 2-4mm (●—●)
III 4-8mm (●—●)



第3図 疫病感染に伴うジャガイモ葉中全 RNA 量の経時的变化

N.B. 種間雑種 1506-b(9) 紅丸
接種 ○—○ △---△
無接種 ●—● ▲---▲
差 ●—● ▲---▲



第4図 異品種 DNA 処理ジャガイモ葉中の RNA 量 (疫病菌接種12時間後)

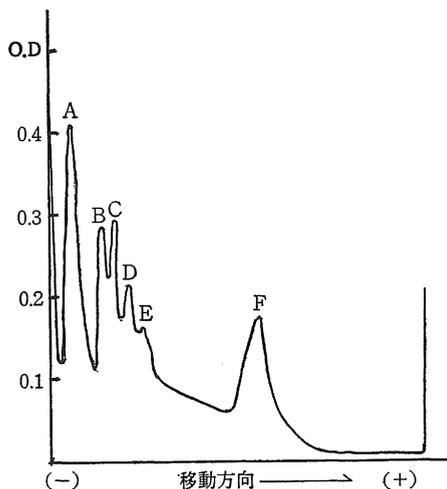
に比べ約1.5倍の褐変細胞数の増加が見られた。

種間雑種 1506-b(9) の DNA 分画 (300 μ g DNA/ml) を紅丸塊茎に減圧浸透後疫病菌培養濾液処理し、パーオキシダーゼ活性を経時的にしらべたところ、第2図に示すように、DNA 分画処理したものは3時間目から活性が増加した。これは種間雑種に培養濾液を処理すると、3時間目から活性が増加する現象と一致したが、DNA 分画を与えても培養濾液処理しないものでは、対照区のトリス塩酸緩衝液と同様に、パーオキシダーゼ活性の増高は認められなかった。

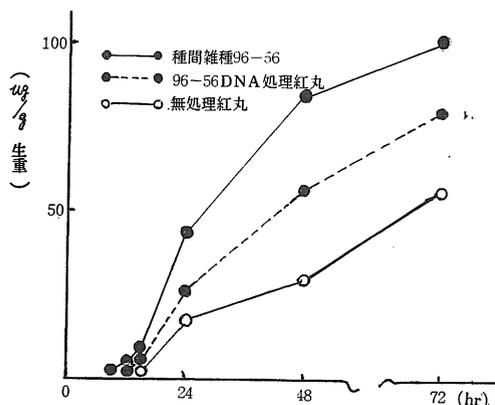
b. 疫病菌感染によるジャガイモ葉中リボ核酸の変化

抵抗性種間雑種 1506-b(9) に疫病菌 Race 0 を接種すると、6時間目から RNA は急激に増加し、12時間目を最高とし、その後24時間目まで減少した。12時間目では無接種区に比べ3倍以上の増加があった。しかし、罹病性品種紅丸では、接種区で6時間目から減少し始め12時間目に最低値を示した。菌侵入後 RNA の変動を第3図に示した。

種間雑種 1506-b(9) DNA 分画 処理紅丸葉に疫病菌を接種し、12時間目の RNA 量を比較した。第4図に示すように、種間雑種 DNA 分画 処理紅丸に対する疫病菌接種区では、種間雑種 1506-b(9) に疫病菌を接種した区と、種間雑種 DNA 分画 無処理紅丸に疫病菌を接種した区との中間値を示した。



第5図 農林1号葉から抽出した RNA の電気泳動パターンの吸光度曲線

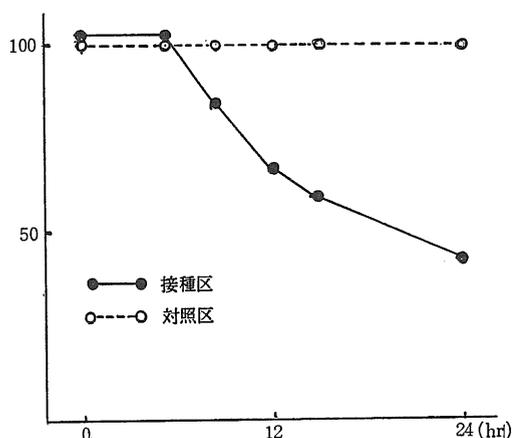


第6図 種間雑種 96-56 DNA 分画処理紅丸塊茎中のリシチン形成

つぎに農林1号葉から抽出した RNA のポリアクリルアミドディスク電気泳動を行い、ゲルを0.2% アクリジンオレンジ (15%酢酸を含む) 液で染色後吸光度をしらべた結果は第5図に示す通りでA~Fのバンドが認められた。

c. 疫病菌感染ジャガイモ塊茎・塊茎カルスにおけるファイトアレキシン形成

疫病菌 Race 0 を種間雑種96-56塊茎に接種したものの、種間雑種96-56 DNA 分画を処理した紅丸と処理しない紅丸塊茎とに疫病菌 Race 0 を接種したものをそれぞれ6、12、15、24、48、72時間後にリシチン量を測定した。第6図に示すように、種間雑種96-56では、接種9時間目で 0.80 μ g/g、種間雑種96-56 DNA 分画



第7図 疫病菌 (Race 0) 接種, 種間雑種 SH-469 塊茎上浸出液中における分生胞子の直接発芽率

処理後疫病菌接種紅丸では12時間後 $1.27\mu\text{g/g}$, 疫病菌感染紅丸では15時間後 $2.61\mu\text{g/g}$ のリシチンが認められた。種間雑種96-56では他の2区より常に多くのリシチンが認められ, 接種72時間目で $100.44\mu\text{g/g}$ のリシチンを測定した。また, 種間雑種96-56のDNA分画処理後疫病菌接種紅丸では対照区の紅丸よりも多くのリシチン形成が認められた。また, 検鏡により, 種間雑種96-56では9時間目, 種間雑種DNA分画処理紅丸では10時間, 無処理対照区の紅丸では12-13時間後に細胞群(2-3個)の褐変が観察された。

種間雑種1506-b(9)塊茎カルスに疫病菌Race 0を接種すると, 15時間目からリシチンが形成され初め, 72時間目に最大量 $10.4\mu\text{g/g}$ となったが, 疫病菌感染塊茎中でのリシチン形成量に比べ約 $1/10$ 量であった。また, 罹病性品種紅丸カルスでは, この実験の範囲内ではまったくリシチンの形成を認めなかった。

疫病菌Race 0を種間雑種SH-469 (R_4 因子) 塊茎に接種後, 6~48時間後に接種液を集め胞子を取り除いた液中で, 疫病菌分生胞子の直接発芽率を時間経過と共にしらべた。第7図に示すように, 接種区の発芽率は対照区のそれと比べて, 接種9時間後で85%, それ以後低下し, 24時間後で48%であった。

考 察

⁸⁾ 山本, ⁷⁾ 富山によると, 疫病菌培養濾液と菌体磨砕液は感受体に対し特異性を示さない。しかし, 本報告に示したように, R因子をもつ種間雑種はr因子をもつ罹病性品種に比べ, 培養濾液で多くの褐変細胞を示した。これは富山⁷⁾の報告と一致する。培養濾液のエタノール可溶性

分画で塊茎に壊死斑が出たことから, 褐変誘起物質は, 核酸系列である可能性があり, また, アセトン・エチルエーテルに可溶性であることから, 蛋白質の性質をもたないと考えられる。硫酸塩析の沈殿分画で褐変を誘起したことから, この物質は蛋白質と一部結合していることも考えられる。種間雑種96-56のDNA分画を紅丸塊茎組織に減圧浸透後疫病菌培養濾液処理すると, 対照区に比べて褐変細胞数が増加したことは, DNA分画が感受体の褐変誘起に何らかの影響を与えるものと考えられた。^{9,10)} 大山は¹¹⁾大腸菌DNAを植物プロトプラストに処理すると, 外生DNAがプロトプラスト核内の内生DNAとhybridし, 大腸菌DNAの遺伝形質が発現するとい¹²⁾い, Gichermanらはタバコに酵母RNA処理後TMVを接種すると, local lesion数が減少するという。本報告の実験結果から, 外生DNAはジャガイモ組織に何らかの影響を与えていると考えられよう。種間雑種1506-b(9)のDNA分画を減圧浸透後, 疫病菌培養濾液処理した紅丸塊茎デスクのパークシダーゼ活性は処理3時間目から高まり, 疫病菌培養濾液処理をした抵抗性種間雑種塊茎のパークシダーゼ活性が処理3時間目から高まるパターンと類似した。¹³⁾ すでに山本は, 抵抗性種間雑種DNA分画を罹病性品種に処理し, 疫病菌を接種すると, 可溶性蛋白質, パークシダーゼ活性, PAL活性の増加を報告したことと関連して, 抵抗性種間雑種DNA分画が罹病性品種の代謝系に何らかの影響を与えているものと考えられる。

今回の実験において, 罹病性品種では疫病菌接種後RNA量の減少が見られたが, 抵抗性種間雑種では菌接種後6-12時間後にRNA量の急激な増加が認められたことは, この時期から抵抗性種間雑種における蛋白質の増加が罹病性品種に比べて大きいことを裏付けるものようである。また抵抗性種間雑種DNA分画処理罹病性品種では処理しないものに比べて3倍以上のRNA量を示した。今回, RNAを泳動した結果, 第7図に示すB, C, D, Eの4ピークはそれぞれ25, 23, 18, 16sのリボソームRNA (rRNA) と考えられ, Aはおそらく低分子化したDNA分画, Fは4~5sあるいは低分子化したRNAと考えられる。植物体には細胞質に25sと18s, 葉緑体には23sと16sの沈殿定数をもつRNAが存在するが,¹⁴⁾ 25, 23, 18, 16sはこれにもとづくものである。筆者らの実験で, 抵抗性種間雑種カルスではリシチンが形成されたが, 罹病性紅丸カルスでは認められなかったことから, Ingramと同様に塊茎カルスでも塊茎と同様抵抗性反応を示すものと考えられる。また, 抵抗性種間雑種DNA分画を罹病性品種に処理することによりリシチン形成が認められたことから, 抵抗

性種間雑種 DNA 分画が罹病性品種 に対し 抵抗性反応 誘導の働きをするものと考えられる。

摘 要

疫病菌に感染したジャガイモの病態生理を特に抵抗性 種間雑種から抽出した DNA 分画を罹病性品種に処理し た場合の変化を中心として検討し、つぎの結果を得た。

1) 疫病菌 (Race 0 と Race 1) は、R 因子をもつジャ ガイモ種間雑種組織に対して、r 因子をもつ品種よりも 多くの褐変を示した。培養濾液を硫酸塩析した上清と沈 殿をセファデックス G25 カラムで分画し、種間雑種 96-56 塊茎組織に処理すると、上清では分画 9、沈殿では分 画 7 に褐変細胞が多く見られた。培養濾液のエタノール やアセトン可溶性分画およびアセトン・エチルエーテル 可溶性分画はジャガイモ葉に壊死を示した。種間雑種 96-56 DNA 分画処理は紅丸の褐変細胞を増加させた。ま たこの処理により 3 時間目からパーオキシダーゼ活性が 高まった。

2) 病原菌 (Race 0) を抵抗性種間雑種 1506-b(9) 葉 に接種、6-12 時間目に RNA 量は激増し、12 時間目には無接種区の 3 倍以上の値を示した。罹病性品種紅丸では 6-12 時間目に減少した。種間雑種 1506-b(9) の DNA 分画処理紅丸葉では、無処理対照区に比べ約 3 倍量の RNA 量を抽出した。

3) 種間雑種 1506-b(9) 塊茎 カルスに疫病菌 Race 0 を接種すると、15 時間目からリシチンが検出され始め、 72 時間目に最高値を示した。しかし、この量は塊茎に形 成されたリシチンよりも少なかった。疫病菌 Race 0 を接種した罹病性品種紅丸塊茎では 15 時間後、抵抗性種 間雑種 96-56 では 9 時間後、抵抗性種間雑種 96-56 の DNA 分画を処理した罹病性品種紅丸塊茎では 12 時間目 にリシチンが検出された。

4) 疫病菌 Race 0 を種間雑種 SH-469 塊茎上に接種後 浸出液中で疫病菌分生胞子を発芽させたところ、接種後 9 時間目の浸出液中での発芽率は対照区よりも低下し、 それ以後も低下をつづけた。

引用文献

1. CURTIS, C. R. : Can. J. Bot. **49** : 333-337, 1971.
2. LOWRY, O. H., ROSENBOUGH, N. J. and FARR, A. C. : J. Biol. Chem. **193** : 265-275, 1951.
3. KUBO, S., TOMARU, K., NITTA, T., SHIROYA, T. and HIDAKA, Z. : Virology **26** : 406-412, 1965.
4. 三浦謙一郎 : 核酸蛋白質研究法 I 生物物理学講座 吉岡書店 京都 1968, p. 5-19
5. THOMAS, J. J. : Arch. Biochem. Biophys. **79** : 102-104, 1959.
6. 河田いこひ : 蛋白質・核酸・酵素 **15** : 1025-1031, 1970.
7. TOMIYAMA, K. : Morphological and Biochemical Events in Plant-Parasite Interaction (Eds. Akai, S. and Ouchi, S.) Phytopath. Soc. Japan. Tokyo 1971, p. 387-401
8. 山本昌木 : 島根農大 植病研特報 **1** : 1-151, 1961.
9. 山本昌木・大塚範夫 : 日植病報 **37** : 84-90, 1971.
10. YAMAMOTO, M. and HATTA, S. : Bull. Fac. Agr. Shimane Univ. **8** : 28-40, 1974.
11. 大山莞爾 : 化学と生物 **12** : 652-658, 1974.
12. GICHERMAN, G. and LOEBENSTEIN, G. : Phytopathology **58** : 405-409, 1968.
13. YAMAMOTO, M. and KONNO, K. : Biochemistry and Cytology of Plant-Parasite Interaction (Eds. Tomiyama, K., Daly, J. M., Uritani, I., Oku, H. and Ouchi, S.) Kodansha Tokyo and Elsevier Scientific Publ. Amsterdam 1976, p. 195-197
14. LOENING, U. E. : Ann. Rev. Plant Physiol. **19** : 37-70, 1969.
15. INGRAM, D. S. and ROBERTSON, N. F. : J. Gen. Microbiol. **49** : 99-108, 1967.

Summary

This paper deals with the response of potato tuber and leaves invaded by *Phytophthora infestans*, with special reference to the application of DNA fraction of resistant interspecific hybrid to the susceptible cultivars.

1) Potato tuber discs interspecific hybrid (R_1 , R_1 , R_1R_1 genes) and cultivars (r gene) were treated with the culture filtrate of *P. infestans* (Race 0 and Race 1). Much more spots on the discs of interspecific hybrids having R gene were observed than those of cultivars having r gene 24 hours after the treatment of culture filtrate. Nature of the culture filtrate was examined by means of salting-out with ammonium sulfate and fractionation by organic solvents.

- 2) An increase in the brown spots was observed on the discs of the cultivar Benimaru which was applied with the DNA fraction of the interspecific hybrid 96-56 before treating with the culture filtrate of *P. infestans*. An increase in peroxidase activity was observed on the discs of cultivar Benimaru 3 hours after applied with the DNA fraction from interspecific hybrid 1506-b(9) before the treatment of the culture filtrate of *P. infestans*.
- 3) The amount of RNA in potato tubers (cultivar Benimaru) decreased 6-12 hours after inoculation of *P. infestans*. (Race 0), but the amount of RNA in the resistant interspecific hybrid 1506-b(9) increased 6-12 hours after inoculation. After treating with the DNA fraction from the interspecific hybrid 1506-b(9), the amount of RNA in the cultivar inoculated by *P. infestans* increased 3 times at 12 hours after inoculation compared with the cultivar Benimaru without the treatment of DNA fraction from the hybrid.
- 4) Rishitin was detected in the calli of the interspecific hybrid 1506-b(9) tuber infected with *P. infestans* but not detected in that of the cultivar Benimaru calli infected with the fungus or non-infected control plot. An amount of rishitin was recognized in the tuber of cultivar Benimaru treated with the DNA fraction from interspecific hybrid before the inoculation of *P. infestans*.
- 5) The conidial germination of *P. infestans* was inhibited in the water diffusate from the tuber of the interspecific hybrid SH-469 on which *P. infestans* was inoculated for 9 hours.