

疫病感染馬鈴薯葉のパーオキシダーゼ活性について

山 本 昌 木[※]

Masaki YAMAMOTO

On the Peroxidase Activity of Potato Leaves
Infected with *Phytophthora infestans*

はじめに

植物の病気とパーオキシダーゼとの関連性については、RUBIN ら¹⁾ のワタ萎凋病、瓜谷ら²⁾ や WEBER・STAHMANN ら³⁾ による甘藷黒斑病、豊田・鈴木ら⁴⁾ によるイネいもち病、LOVREKOVICZ ら⁵⁾ によるタバコ野火病、JENNINGS ら⁶⁾ によるトウモロコシごま葉枯病、LOEBENSTEIN ら⁷⁾、FARKAS ら⁸⁾、NOVACKY ら⁹⁾ によるウイルス病などの研究があり、馬鈴薯疫病については、HENNIGER ら¹⁰⁾、TOMIYAMA・STAHMANN ら¹¹⁾、FEHRMAN・D IMOND ら¹²⁾ の研究がある。

本報においては、アクリルアミドゲルを支持体とした薄層電気泳動法により、馬鈴薯疫病菌 Race 0・Race 1 による親和性・非親和性感受体の感染、接木、異品種 DNA フラクシオン塗付による馬鈴薯葉のパーオキシダーゼ活性の変化をしらべたので、その結果を述べる。

本実験は専攻学生宇佐美達朗・今村好和君の絶大なるご協力を頂いたので謝辞を呈する。

また、ご協力とご教示を頂いた島根大学農学部野津幹雄・大塚範夫両氏、達山和紀・小合龍夫両助教授、農技研生越明・北海道農試荒木隆両技官にそれぞれ感謝する。

実験材料と方法

馬鈴薯塊茎（9月2日植付、10月23・26日採葉）の主として下から第5位または上から第5位葉の頂翼葉と側翼葉を用い、葉位の比較には下から第3、6、9位葉5枚ずつを用いた。供試品種は疫病菌 Race 0 に親和性の農林1号、紅丸、男爵薯、雲仙およびメークイン（罹病性因子 r ）と、非親和性の種間雑種 96-56（抵抗性因子 R_1 ）、SH-469 (R_4) および 1506-(b) 9 [R_1R_4] であ

る。種間雑種 96-56 は因子 R_1 を含むが、疫病菌 Race 1 に対し親和性を有する。

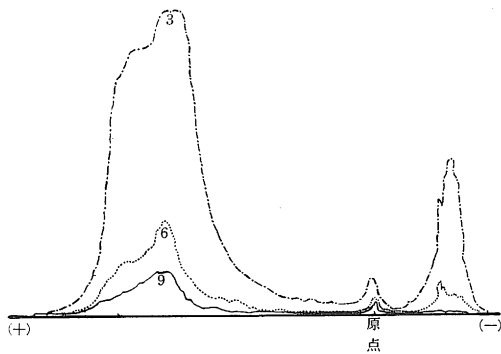
供試疫病菌 (Race 0・Race 1) は、20°C で15日間培養し、孢子懸濁液を 10-11°C で3時間保ち、遊走子を逸出させた懸濁液に浸した馬鈴薯葉を、ビニール袋に包み 20°C において 6、9、12、24、36時間保った後、パーオキシダーゼ活性を測定した。

凍結した馬鈴薯葉に、氷冷した蒸留水と石英砂とを加え、乳鉢で磨砕し、15,000 rpm 50分間遠心分離して上澄液を取り、約12時間透析、凍結乾燥またはアクアサイド（半井化学KK）で8時間濃縮したものを試料とした。パーオキシダーゼの分離は、アクリルアミドを支持体としたゲル薄層電気泳動法によった。ゲルの大きさは 23×12×0.12cm、試料溝は陰極から 7cm のところに設け、大きさ 5×1×0.2cm とした。ゲル濃度は 5%、トリス-EDTA-ホウ酸緩衝液で pH 8.9-9.2 とした。泳動条件は定電流 (24mA/12cm) で 9-10時間泳動させ、ゲルの乾燥を防ぐため、サララップでおおった。

パーオキシダーゼの検出には、0.3% 過酸化水素水、トリス酢酸緩衝液 (0.1M トリス 0.525M 酢酸, pH 4.0) および 0.1% 酢酸ベンチゼン水溶液を用いた。泳動終了後、上記トリス緩衝液に約15分間浸漬した後、ベンチゼン溶液に浸し、0.3% 過酸化水素水を 1-3cc 加え、約 30分間反応させた後、水：メタノール：酢酸 5：5：1 溶液に浸して反応を停止させた。デンストメーター（明日香工業KK）570または 610m μ の波長で吸光度をしらべた。

接木に用いた品種は、疫病菌 Race 0 に親和性の農林1号（罹病性因子 r ）、非親和性種間雑種 96-56（抵抗性因子 R_1 ）および 1506-(b) 9 (R_1R_4) である。農林1号を台木とし種間雑種 96-56 と 1506-(b) 9 を接穂とし、

※ 植物病理研究室



第1図 葉位の異なる馬鈴薯葉のパーオキシダーゼ活性品種メーカー
3. 第3位葉 6. 第6位葉 9. 第9位葉

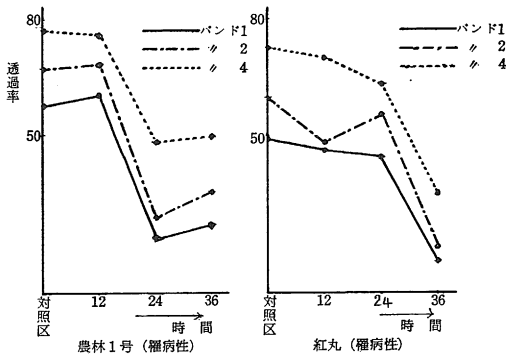
また種間雑種96-56 と 1506-(b)9 を台木として農林1号を接穂としたものを割り接ぎした。台木は上部より第4位葉と第5位葉との間を切断した。農林1号DNAフラクションはフェノール法で抽出¹⁹⁾、1%溶液を馬鈴薯葉に塗付1時間後、疫病菌 Race 0 遊走子を接種した。

実験結果

品種メーカーを用い、葉位の異なる馬鈴薯葉のパーオキシダーゼ活性をしらべた結果は第1図に示すとおりである。

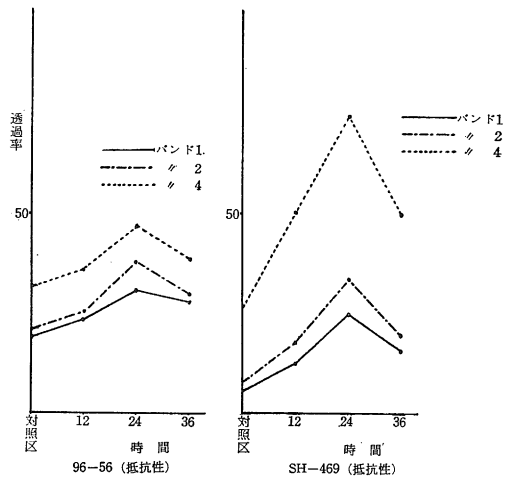
第1図に示すとおり、下から第3, 6, 9位葉と上位になるに従い、パーオキシダーゼ活性は小さくなった。バンド数は、陽極側で5本(1, 2, 3, 4, 5)、陰極側で3, 6位葉では4本(1', 2', 3', 4')あり、9位葉では3', 4'の存在は明らかであったが、バンド1', 2'は明瞭でなかった。

疫病菌 Race 0 に対し抵抗性種間雑種・罹病性品種とも、いずれも陽極に5バンド(1, 2, 3, 4, 5)、



第2図 疫病菌接種後の馬鈴薯葉パーオキシダーゼ活性

親和性(農林1号・紅丸)
疫病菌 Race 0



第3図 疫病菌接種後の馬鈴薯葉パーオキシダーゼ活性
非親和性種間雑種96-56・SH-469
疫病菌 Race 0

陰極に4バンド(1', 2', 3', 4')を認めたが、種間雑種 1506-(b)9 ではこのほか陽極側にバンド6を認めた。抵抗性種間雑種 SH-469・96-56 では、接種24時間後までは活性が増加し、24時間以後活性が低下した。疫病菌 Race 0 に対し罹病性の農林1号・紅丸、抵抗性種間雑種96-56・SH-469 について、パーオキシダーゼ泳動バンド1, 2, 4, 活性の消長を示したのが第2～3図である。

Race 1 感染に伴なうパーオキシダーゼ活性測定結果は第1表に示すとおりである。

疫病菌 Race 1 に対し親和性の農林1号と種間雑種96-56 では接種後パーオキシダーゼ活性は減少の傾向を示したが、非親和性の種間雑種 SH-469 (R₄) および 1506-(b)9 (R₁R₄) では、疫病菌接種後6, 12時間までは、パーオキシダーゼ活性は急激に増加したのちに減少の傾向を示した、接木を行なったもののパーオキシダーゼ活性は第2～4表に示すとおりである。

第1表 疫病菌 Race 1 を接種した馬鈴薯葉のパーオキシダーゼ活性

品種	泳動帯					
	対照区	6	9	12	24	36
農林1号※	1.42	1.43	1.31	1.30	1.22	1.15
種間雑種 96-56 ※	1.34	1.31	1.23	1.19	1.13	1.12
種間雑種 SH-469 ※	1.11	1.25	1.22	1.20	1.16	1.09
種間雑種 1506-(b)9 ※	1.16	1.33	1.42	1.48	1.46	1.32

※ 泳動帯 2

※※ 泳動帯 6

数値はデンスitomーター透過率%(T) フィルターは610mμ

第2表 接木を行なった種間雑種96-56のパーオキシダーゼ活性

接穂 / 台木	泳動帯		
	1	2	4
農林1号/種間雑種96-56	0.93	0.93	0.66
種間雑種96-56/農林1号	0.92	0.89	0.52
対照区	0.79	0.80	0.26

数値はデンストメーター透過率%(T)
フィルターは570m μ

第3表 接木を行なった種間雑種 1506-(b)9 のパーオキシダーゼ活性および農林1号DNAフラクションを塗付した種間雑種1506-(b)9のパーオキシダーゼ活性

接穂 / 台木	泳動帯			
	1	2	4	6
農林1号 / 種間雑種 1506-(b)9	0.75	0.75	0.40	0.84
種間雑種 1506-(b)9 / 農林1号	0.72	0.68	0.19	0.75
農林1号DNAフラクション塗付区	0.97	0.97	0.39	0.71
対照区	0.39	0.21	0.10	0.49

数値はデンストメーター透過率%(T)
フィルターは570m μ

第4表 接木を行なった農林1号のパーオキシダーゼ活性および種間雑種 1506-(b)9 のDNAフラクションを塗付した農林1号のパーオキシダーゼ活性

接穂 / 台木	泳動帯		
	1	2	4
種間雑種96-56/農林1号	0.82	0.79	0.68
農林1号/種間雑種96-56	0.70	0.62	0.37
種間雑種 1506-(b)9 / 農林1号	0.79	0.75	0.68
農林1号 / 種間雑種 1506-(b)9	0.75	0.68	0.48
種間雑種 1506-(b)9 の DNAフラクション塗付区	0.81	0.69	0.38
対照区	0.63	0.54	0.40

数値はデンストメーター透過率%(T)
フィルターは570m μ

疫病菌 Race 0 に対し親和性の農林1号を台木とし、非親和性の種間雑種96-56、および 1506-(b)9 を接穂としたとき、農林1号・パーオキシダーゼ活性は、種間雑種96-56 および 1506-(b)9 を台木とし農林1号を接穂

としたときの農林1号のパーオキシダーゼ活性よりも大であった。

さらに、接穂や台木としたときの農林1号のパーオキシダーゼ活性は、対照区のパーオキシダーゼ活性よりも大であった。同様に疫病菌 Race 0 に対し、非親和性種間雑種96-56 および 1506-(b)9 のパーオキシダーゼ活性は農林1号を台木とし、種間雑種96-56 および 1506-(b)9 を接穂としたときの種間雑種96-56 および 1506-(b)9 のパーオキシダーゼ活性よりも大であった。

接穂および台木としたときの種間雑種 96-56 および 1506-(b)9 のパーオキシダーゼ活性は対照区のパーオキシダーゼ活性よりも大であった。

第3・4表に示すように、DNAフラクションを種間雑種 1506-(b)9 に、種間雑種 1506-(b)9 農林1号DNAフラクションを農林1号にそれぞれ塗付したもののパーオキシダーゼ活性はそれぞれ対照区よりも大きかった。

考 察

TOMIYAMA ら¹¹⁾は馬鈴薯上位葉は下位葉よりもパーオキシダーゼ活性が低いというが、FEHRMAN ら¹²⁾は頂葉が中位葉よりも活性大であるという。本実験の結果は富山らの結果と一致した。

TOMIYAMA ら¹¹⁾は、非親和性疫病菌の侵入した馬鈴薯茎葉はパーオキシダーゼ活性が増大したが、親和性品種では、活性の増大が認められないという。筆者らの Race 0 に抵抗性種間雑種 SH-469、96-56葉における実験結果もこれと一致した。Race 1 に対し非親和性種間雑種 SH-469(R₄) と 1506-(b)9 (R₁R₄) のパーオキシダーゼ活性は、9-12時間まで増加、その後減少の傾向であったが、TOMIYAMA らの報告と一致する。

接木を行なった場合、接穂よりも台木のほうがパーオキシダーゼ活性が高いようであるが、TOMIYAMA ら¹¹⁾や HENNIGER らが、感受体成熟に伴うパーオキシダーゼ活性が高まるという結果と一致する。

RUBIN, UMAERUS, GRETSCHENKOFF, KAMMERMAN, KEDAR らは馬鈴薯疫病抵抗性とパーオキシダーゼ活性とは正の相関があると述べているが、一方 HENNIGER は圃場抵抗性とパーオキシダーゼ活性とは無関係であると述べているので今後の検討を要する。

今関ら¹⁷⁾によると、サツマイモ黒斑病に抵抗性の Sunnyside では罹病性の Julian よりもエチレンが多く形成され、非親和性系統の場合エチレン生産は大であり、エチレン処理サツマイモ塊根ではパーオキシダーゼやポリフェノールオキシダーゼ活性は増大するという。また傷ついた薄片からのDNAフラクションが代謝活性

を促進するに十分なエチレンを生産し、パーオキシダーゼ活性の増加に及ぼす促進効果は、エチレンが disc に存在するときに限られるという¹⁸⁾。筆者の実験で他品種 DNA フラクシオン塗付によりパーオキシダーゼ活性の増大が認められた。エチレンが環境条件の変化により細胞の生化学的反応に重要な役割を果たすであろうが、DNA フラクシオンとどのような関連性があるかについては今後の検討をまちたい。

摘 要

品種や熟度を異にする馬鈴薯葉や、疫病菌侵入、接木、異品種 DNA フラクシオン塗付後の馬鈴薯葉パーオキシダーゼ活性をポリアクリルアミドゲル薄層電気泳動法によりしらべた。

パーオキシダーゼ泳動分画は健全対照区で、農林 1 号、紅丸、男爵薯、雲仙およびメークイン種間雑種 96-56 と SH-469 では 9、種間雑種 1506-(b) 9 では 10 得られたが、感染に伴う泳動分画の数の変化は認められなかった。また、上位葉は下位葉に比べてパーオキシダーゼ活性が低い。

種間雑種に非親和性疫病菌が侵入した場合、パーオキシダーゼ活性は増大し、その後徐々に減少する。

接木を行なうことにより、接穂・台木ともパーオキシダーゼ活性は増加した。また接穂よりも台木のパーオキシダーゼ活性は大きかった。

異品種 DNA フラクシオンを塗付することにより、パーオキシダーゼ活性は増大した。

引用文献

- RUBIN, B. A. et al.: Dokl. Akad. Nauk. SSSR **60**: 421-427, 1948.
- 瓜谷郁三・川島伸磨・兵藤 宏・旭 正: 日本植物生理学会第 4 回シンポジウム 植物と窒素 5-8, 1963.
- WERER, D. and STAHMANN, M. A.: Science **146**: 929-931, 1964.
- TOYODA, S. and SUZUKI, N.: Ann. Phytopath. Soc. Japan **25** (4): 172-177, 1960.
- LOVREKOVICZ, L. and MACKO, V.: Biochemical Regulation in Diseased Plants or Injury. Phytopath. Soc. Japan 263-274, 1968.
- JENNINGS, P. H., BRANNAMAN, B. L. and ZCHEILE, F. P. Jr.: Phytopathology **59** (7): 963-967, 1969.
- LOEBENSTEIN, G. and LINSEY, N.: Israel J. Bot. **15**: 163-167, 1966.
- FARKAS, G. L. and STAHMANN, M. A. Phytopathology **56**: 669-677, 1966.
- NOVACKY, A. and HAMPTON, R. E.: Phytopathology **58** (3): 301-305, 1968.
- HENNIGER, H. and BARTAL, W.: Die Züchter **33** (2): 86-91, 1963.
- TOMIYAMA, K. and STAHMANN, M. A.: Plant Physiol. **39**: 483-490, 1964.
- FEHMAN, H. and DIMOND, A. E.: Phytopathology **57** (1): 67-72, 1967.
- UMAERUS, V.: Amer. Potato J. **36**: 124-131, 1959.
- GRETSCHUSCHIKOFF, A. I.: Compt. Rend. Acad. Sci. USSR U. S. **25**: 685-689, 1939.
- KAMMERMANN, N.: Medd. Statens Vaxtskyddanst., Stockholm **58**: 1-31, 1951.
- KEDAR, N.: Amer. Potato J. **36**: 315-324, 1959.
- 今関英雄: 植物病理 化学談話会 夏の学校 23-37, 1969.
- IMASEKI, H., ASAHI, T. and URITANI, I.: Biochemical Regulation in Diseased Plants or Injury. Phytopath. Soc. Japan 189-201, 1968.
- SHIGEMATSU, A., MIZUSAWA, Y. and HIRAI, T.: Virology **28**: 331-338, 1966.

Summary

Peroxidase isozymes in healthy potato leaves of *Solanum tuberosum* (Norin No. 1, Irish Cobbler and Benimaru) and interspecific hybrids between *S. demissum* and *S. tuberosum* (SH-469, 96-56 and 1506-(b)9), and those infected with *Phytophthora infestans*, were separated with acrylamide-gel electrophoresis and stained with benzidine acetate and hydrogen-peroxide.

Nine bands of peroxidase isozymes were recognized from *Solanum tuberosum* (Norin No. 1) and interspecific hybrids between *S. demissum* and *S. tuberosum* (96-56 and SH-

469) and ten bands were found on interspecific hybrid 1506-(b)9.

Peroxidase activity was higher on lower leaves than on upper ones. The increase of peroxidase activity was recognized on potato hybrid leaves infected with *Phytophthora infestans* (Race 0). The increase of the activity was also recognized on the interspecific hybrid 1506-(b)9 (incompatible to Race 1) infected with Race 1 of *Phytophthora infestans*, but the increase was not found on susceptible Norin No. 1 and interspecific hybrid 96-56 (compatible to Race 1).

Leaves of grafted potatoes (common varieties and hybrids) showed higher activity of peroxidase than the control. Peroxidase activity on the grafted plants was higher in stocks than in scions.

Higher activity was found on potato leaves placed the DNA-containing fraction of different varieties.