

# ウリ類たんそ病菌のキウリ葉侵入時に おけるペクチン酸分解酵素の分泌

安 盛 博 (植物病学研究室)

Hiroshi YASUMORI

Production of Pectinolytic Enzyme by the Anthracnose

Fungus in its Invasion on Cucurbit Plants

## 緒 言

病原菌が植物の葉に対し角皮侵入を行なう場合、侵入糸は質の異なった数層の細胞膜を貫通しなければならない。ウリ類たんそ病の場合は、筆者がさきに行なった解剖学的な観察結果から<sup>(6)</sup>、ウリ類たんそ病菌侵入糸は大部分、キウリ細胞縫合部の中層ペクチン質を溶解しながらこれを押し分け、その後繊維素膜を通過して原形質に達することが明らかとなった。細胞中層の溶解は病原菌より分泌されたペクチン質分解酵素によるものと考えられ、この段階は病原菌に対する品種間抵抗性差異を生ずる原因のうちで最も重要なものと思われる<sup>(1)</sup>。ウリ類たんそ病菌はペクチンメチルエステラーゼおよびペクチン酸分解酵素を持つことが報告されているが<sup>(5)</sup>、細胞中層のペクチン物質を低分子に分解するにはペクチン酸分解酵素が最も大きな役割を果すと考えられる。

筆者は分生胞子の発芽時から侵入完了までに本菌が分泌するペクチン酸分解酵素の性質、分泌時期、ならびに活性に及ぼす種々の要因、とくに品種を異にするキウリ葉から受ける影響を調べ、たんそ病に対する品種間抵抗性の原因追求の一助としたいと考え実験を行なった。

稿を草するにあたり助言をいただいた山本昌木教授に感謝の意を表す。

## 実験材料および方法

ウリ類たんそ病菌 (No. 104-T) をリチャーズ液体合成培地 (粉末乾燥酵母エキス2%含有) に 26°C で、15~20日間培養し、形成された分生胞子を水洗して菌糸と分け、この洗液を遠沈後、さらに3回水洗して供試した。分生胞子を一定量とり10ccの滅菌蒸留水に懸濁し、滅菌三角フラスコに入れ綿栓後、Monod式振とう機で20時間振とう (26°C) した。この懸濁液を遠心分離し、

上澄液を酵素液として用いた。遠沈した菌体はふたたび一定量の水に懸濁して発芽率を測定した。振とう時には胞子を含まない試験液を対照区として同様操作したが、雑菌の繁殖やペクチン酸分解酵素活性に影響すると思われる諸要因は認められなかった。

酵素活性の測定は斉藤<sup>(2)</sup>の方法によった。すなわち1ccの酵素液によって30°C、20時間に分解遊離されたガラクトウロン酸のmg当量を酵素活性として比較した。ただし単位が小さいので、この値を10倍して表示 (G. meq×10) した。

## 実験結果

1) ペクチン酸分解酵素活性に及ぼす水素イオン濃度の影響 糸状菌の種類によって、分泌するペクチン酸分解酵素活性の最適水素イオン濃度は異なる<sup>(2)(6)(4)</sup>。本菌の分泌するペクチン酸分解酵素活性と水素イオン濃度の関係を明らかにするため、第1表に示すような水素イオン濃度に調整した1%ペクチン酸溶液10ccを酵素基質として用いた。基質溶液には1ccの酵素液およびトルオールを添加、30°Cに20時間振とうして遊離したガラク

第1表 ウリ類たんそ病菌のペクチン酸分解酵素活性におよぼす水素イオン濃度の影響 \*

pH	酵 素 活 性 (G. meq × 10)
4.0	0.00
4.5	0.06
5.0	0.14
5.5	0.06
6.0	0.04

\* 発芽率2回実験平均91.6%

トウロン酸の量を測定した。発芽胞子は大部分付着器(形態は不完全であるが)を形成し、さらにこれより菌糸を発芽していた。

第1表に示したように、ウリ類たんそ病菌の分解酵素活性は基質の水素イオン濃度によって異なり、pH 4.5~6.0の間で活性を有し、pH 5.0付近で最高となったので、今後の酵素活性測定には基質をpH5.0に調整した。

2) ペクチン酸分解酵素の基質に対する適応性 ウリ類たんそ病菌の分生胞子を蒸留水中で発芽させて得た酵素液はきわめて活性が低かったが、斎藤<sup>1)</sup>は *Aspergillus niger* は基質に対して適応してペクチン酸分解酵素を分泌すると報告しているので、筆者も殺菌蒸留水および1%ペクチン酸溶液に本菌胞子、および培養15日目の菌糸を懸濁または浸漬し、20時間振とうしたのち、遠沈、上澄液を酵素液としてその活性を測定した。上澄液中に含まれるガラクトウロン酸量は別に測定して差し引いた。

第2表に示したように、ウリ類たんそ病菌の分生胞子

第2表 ウリ類たんそ病菌の分泌するペクチン酸分解酵素の基質に対する適応性

供試菌体	懸濁液の種類	酵素活性 (G.meq×10)	胞子発芽率 (%)
胞子	蒸留水	0.16	91.1
	ペクチン酸1%溶液	0.26	89.0
菌糸*	蒸留水	0.40	
	ペクチン酸1%溶液	0.56	

\* 生体0.2g

第3表 ガラス板上水滴中のたんそ病菌分生胞子発芽に伴うペクチン酸分解酵素の基質に対する適応性

懸濁液の種類	酵素活性 (G.meq×10)	胞子発芽率 (%)
蒸留水	0.08	63.0
ペクチン酸1.00%溶液	0.44	71.1
ペクチン酸0.50%	0.34	60.0
ぶどう糖0.50%		
ペクチン酸0.25%	0.12	62.5
ぶどう糖0.75%		
ぶどう糖1.00%	0.10	58.9

は発芽しながら基質に適応して分解酵素を分泌し、その活性は蒸留水に比べ約2倍となった。また菌糸中の活性も蒸留水中より、ペクチン酸を含んだ溶液中で高かったので、酵素の分泌は基質に適応的であると考えられた。

以上の実験は胞子を振とうした場合の実験であったが、胞子が野外で植物体に侵入する場合は、葉上にある静止した水滴中で発芽し、侵入が完成される。この条件に近づけるため、実験室内でキウリ葉のかわりにガラス板を用い、静止水滴中でペクチン酸分解酵素の分泌および基質に対する適応性を調べた。すなわち、各試験区の分生胞子懸濁液中の炭素源にペクチン酸およびぶどう糖を用い、第3表のように混合して総炭素源が1%になるように調整した。これらの懸濁液を15×10cmのガラス板上に流し、水平にして薄い水膜とし、温室に30時間、28°Cに保って発芽させたのち、上澄液を集めて酵素液とし、活性を測定した。同時にガラス板上の発芽率を鏡により測定した。

第3表を見ると、酵素の活性はペクチン酸1%溶液で最高であり、濃度の減少に伴って活性も比例的に減少するものと思われる。発芽率はペクチン酸、ぶどう糖の相互によって大きな影響をうけないものとみられるので、この場合にも本菌のペクチン酸分解酵素の分泌は基質に対し適応的であると判断された。なお供試したガラス板上の菌はふたたび蒸留水を補って温室に置き、最初から42時間後にペクチン酸分解酵素活性を測定したが、いずれの区においてもいちじるしく減少し、ペクチン酸とぶどう糖を含む区でわずかに認められた程度であった。

3) ペクチン酸溶液中に懸濁した胞子の病原性、ウリ類たんそ病菌は基質に適応してペクチン酸分解酵素を分泌することがわかったので、あらかじめこの基質に適応しながら発芽した病原菌分生胞子はペクチン酸分解酵素を多く分泌し、病原性に変化を生ずるのではないかと考えられた。この点を明らかにするため、ペクチン酸1%溶液に懸濁した分生胞子をキウリ(四葉)成葉に噴霧接種し、7日後に病斑数を測定した。対照区には蒸留水に胞子を懸濁したものをを用いた。病斑の測定法は品種間差異の検定のとおりに行なったのと同じ方法によった。<sup>4)</sup>

第4表 ペクチン酸溶液に懸濁したウリ類たんそ病菌分生胞子の病原性

胞子懸濁液	供試葉数	10cm <sup>2</sup> 当 病斑数
ペクチン酸1%溶液	19	2.3
蒸留水	16	2.1

分生胞子の病原性は第4表の通り、ほとんど差は認められなかった。これは菌の基質に対する適応性が病原性と直接関係しないことを示している。

4) 病原菌接種後の葉上水滴中に分泌されるペクチン酸分解酵素活性 ウリ類たんそ病菌をキウリ葉上に噴霧接種した場合は、分生胞子が発芽して付着器を形成するまでの間、菌体は植物体外にある。したがって分生胞子の発芽から付着器形成までの間にペクチン酸分解酵素を分泌すれば、接種後葉上水滴中にペクチン酸分解酵素の活性を認めなければならない。そこでガラス板上で行なった実験と同じ胞子濃度でキウリ葉上に噴霧接種し、17、24、48時間後に葉上水滴を集め、この水滴についてペクチン酸分解酵素の活性を測定した。キウリは四葉、津田三尺の2品種を用い、葉上水滴を集めるとき、葉面に多数の付着器を形成していることを確かめた。対照区にはガラス板上に懸濁液を噴霧したものをを用いた。

その結果、接種後48時間を経過しても、両品種ともペクチン酸分解酵素の活性を認めることはできなかった。対照区には付着器の発芽したものが多く、酵素の活性も認めているので、この菌は付着器形成までには、ほとんど酵素を分泌しないか、またきわめて微弱であり、付着器発芽以後に分泌するものと考えられた。

5) ペクチン酸分解酵素分泌におよぼすキウリ各品種葉上水滴の影響 ペクチン酸分解酵素は付着器形成以後分泌されることが明らかとなったが、その分泌量は分生胞子が種々の品種葉上にある間に影響を受け、ペクチン酸分解酵素分泌量に差を生じ、侵入に難易ができた結果、品種間に罹病性の差を示す場合も考えられる。そこでキウリ四葉(罹病性)、落合(中間)、津田三尺(抵抗性)

成葉上に蒸留水およびペクチン酸1%溶液を噴霧し、17時間温室に保ったのち、この葉上水滴に胞子を懸濁した。胞子懸濁液は20時間振とうして発芽させ、得た酵素液について活性を測定した。(第5表)

この結果から明らかなように、葉上水滴中にペクチン酸を含むとき、分解酵素活性は葉上水滴のみに比べて増大するが、品種によって特別な影響を受けることはないと考えられる。

## 考 察

ウリ類たんそ病菌のペクチン酸分解酵素の分泌は、おもに侵入糸形成以後に認められ、分生胞子の発芽から付着器形成までにはほとんど分泌されないものと考えられる。本酵素は基質に適応して分泌されるので、侵入糸が細胞中層に達したのち、急速に分泌量を増し、活性が高まるものと思われる。分生胞子をペクチン酸溶液に懸濁して接種しても、蒸留水に懸濁したときとその病原性に差を認めないことは、分生胞子発芽から付着器形成までには本酵素の生成がないためではないかと考えられる。また酵素の分泌量はキウリ葉の品種の違いによっても影響を受けないものと考えられる。

以上のことから、たんそ病菌はどの品種の葉上にあってもひとしく活動しうる能力を持つものと考えられる。しかし品種間抵抗性の差異は、付着器形成以後、侵入糸が細胞原形質に達するまでの間に現れることは明らかである<sup>(10)</sup>ので、その原因は病原菌の攻撃能力の差によるのではなく、これに対する植物体、とくに細胞中層の変化が問題になると思われる。

## 摘 要

1) ウリ類たんそ病菌の分泌するペクチン酸分解酵素は pH 4.5~6.0 の間で活性を有し、pH 5.0 付近が最適と思われた。

2) 本酵素は基質の存在に適応して分泌された。

3) ペクチン酸溶液に胞子を懸濁して、あらかじめ基質に適応させても、病原性は増大しなかった。

4) 病原菌が付着器から侵入糸を発芽するまでは本酵素の分泌は認められなかった。

5) 酵素の分泌にはキウリの品種による影響はないと思われた。

## 引用文献

- AKAI, S., YASUMORI, H. and TERASAWA, H. : Plant Dis. Repr. 42 (9) : 1074-1079, 1958
- 斎藤日向・蓑田泰治・丸茂博太 : 日農化 28 (10) : 810-814, 1954

第5表 ウリ類たんそ病菌のペクチン酸分解酵素分泌におよぼすキウリ葉上水滴の影響

キウリ品種	胞子懸濁液の種類	酵素活性 (G.meq×10)	発芽率 (%)
四 葉	葉上水滴(蒸留水)	0.06	94.2
	〃 (ペクチン酸1%)	0.30	84.8
落 合	葉上水滴(蒸留水)	0.04	82.1
	〃 (ペクチン酸1%)	0.28	94.1
津田三尺	葉上水滴(蒸留水)	0.06	79.7
	〃 (ペクチン酸1%)	0.32	71.7
対 照 区	蒸 留 水	0.04	88.4
	1% ペクチン酸	0.18	84.8

3. SPALDING, D. H., BRUEHL, G. W. and FOSTER, R. J. : *Phytopathology* 51 (4) : 227-235, 1961
4. WEINTRAUB, M. and REGETLI, H. W. J. : *Phytopathology*. 51 (4) : 215-219, 1961
5. WINSTEAD, N. N. and MC COMBS, C. L. : Abs. in *Phytopathology* 50 (9) : 659, 1960
6. 安盛博 : 日植病報 22 (3) : 119-122, 1957
7. 安盛博 : 日植病報 25 (2) : 103-104, 1960

### Summary

The anthracnose fungus of cucurbits produced galacturonogenic polygalacturonase (GPG) in the case of forming the infection hypha from appressorium, but did not produce it during the conidial germination and appressorial formation. Since this enzyme was secreted by the fungus adaptively into the substrate, this fungus seems to increase GPG production abundantly when the infection hypha forced its way into the middle lamella of cucurbit leaves. The pathogenicity of this fungus of which conidia was suspended in pectic solution showed no great difference from that was suspended in distilled water. The grade of GPG production by the fungus was not affected by the susceptibility of cucumber plants to the anthracnose fungus.

Judging from these results, this fungus seems to have the equal ability to attack the cucumber leaves regardless of the susceptible varieties, and the varietal difference in the susceptibility of cucumber plants might be due to the response of the susceptible tissue, particularly, of the middle lamella to the pathogen.