

疫病菌侵入による過敏現象発現に及ぼす馬鈴薯 DNAフラクションに関する二三の実験

山本 昌木[※]・野津 幹雄[※]・重松 昭世^{※※}

Masaki YAMAMOTO, Mikio NOZU and Akiyo SHIGEMATSU

Experiments on DNA-containing Fraction Obtained from Potatoes
in Relation to the Hypersensitivity of the Resistant Plant to the
Invasion of *Phytophthora infestans*

はじめに

すでに筆者らの一人山本は⁽⁵⁾、馬鈴薯疫病菌侵入に対し、抵抗性 R₁ R₄ 因子を有する *Solanum demissum* × *S. tuberosum* 種間雑種から、THOMAS⁽⁴⁾ または重松ら⁽³⁾ の方法で DNA フラクションを抽出、罹病性 r 因子を持つ品種に塗付後疫病菌遊走子を接種し、過敏型病斑を認めた。今回は、DNA フラクション水溶液の濃度、塗付後の経過時間と水洗との関係、³H-チミジンを取り込ませた馬鈴薯葉先端より DNA フラクションを作成、異品種に塗付した場のマイクロオートラジオグラフィ、抵抗性品種 DNA で処理した同品種および罹病性品種への ³H-シチジンの取り込みについて行なった実験結果について報告する。

放射能の測定とマイクロオートラジオグラフィの実験は結核研究所アイソトープ研究室において行なわれたものであり、同室長豊原希一博士に対し謝意を表する。また DNA フラクション超遠心パターンは東京大学薬学部生理化学教室において撮影され、S 値は大阪府立大学農芸化学教室（元島根大学食品化学研究室）中野長久氏によって計算された。共に感謝する。本報告の一部は既に口頭で日本菌学会（1968年）日本植物病理学会関西西部会（1968年）において発表された。⁽⁷⁾⁽⁶⁾

実験材料・実験方法

疫病菌に対して抵抗性のある種間雑種 1506-b(9)〔抵抗性因子 R₁ R₄〕または罹病性品種農林 1 号（罹病性因子 r）より重松らの方法で抽出した DNA フラクションを、0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0% 水溶液として罹病性

品種紅丸（罹病性因子 r）または抵抗性種間雑種 SH469（抵抗性因子 R₄）の葉に塗付、1 時間後、10—12°C で逸出させた遊走子を 20°C で接種、72 時間後過敏型・罹病型両病斑の出現を調査した。またこの DNA フラクション 1% 水溶液を罹病性品種紅丸に塗付、5, 10, 30 分、1, 2.5, 14 時間後水洗してから疫病菌遊走子を接種し、72 時間後同様に病斑型を調査した。一方、³H-チミジン-6T (2μC/ml) 溶液に馬鈴薯葉（抵抗性品種、罹病性品種）を浸し、4 日後その若葉より DNA フラクションを抽出、このラベルされたフラクション水溶液を同一品種または異品種葉表面に塗付 2 日後の組織についてマイクロオートラジオグラフィを試みた。組織の固定は Carnoy 液、切片の厚さは 5μ、乳剤は富士原子核乾板 ET 2 E のストリッピング型、現像はフジレンドールで 20°C 4 分間停止溶 3 分 フジフィックス 15 分、種間雑種 1506-b(9) からの DNA フラクション 0.4% 水溶液中に同一種間雑種と農林 1 号茎葉を 4 日間浸した後、組織に 2μC/ml ³H-シチジン G-T を 3 時間処理し、その放射能を、液体シンチレーションカウンター（Aloka LSC-201）で測定した。

実験結果

DNA フラクション濃度と過敏型または罹病型出現の関係は、実験の範囲内では第 1 表に示すように、濃度の高い程効果があるようであった。

また DNA フラクション 1% 水溶液塗付後 10 分以内に水洗したもので、第 2 表に示すようにその作用はあまり認められなかった。

³H-チミジンを取り込ませて 4 日後新生させた DNA フラクションを同一品種または異品種葉表面に塗付した

※ 植物病理学研究室

※※ 結核予防会結核研究所アイソトープ研究室

第1表 過敏型・罹病型病斑形成に及ぼすDNAフラクション濃度の影響

区	DNA濃度	対照区	0.01	0.05	0.1	0.5	1.0%
		全遊走子数	204	113	154	246	108
侵入遊走子数		48	46	59	48	40	83
種間雑種1506-b(9) DNAを 紅丸(r)に塗付	過敏型病斑	0	4	6	9	5	10
	罹病型病斑	34	11	11	7	3	2
	侵入遊走子数 / 全遊走子数	23.53	40.71	38.31	19.51	37.10	34.16
	過敏型病斑数 / 全遊走子数	0	3.54	3.89	3.66	4.62	5.86
	罹病型病斑数 / 全遊走子数	16.66	9.73	7.14	2.85	2.77	0.82
	全遊走子数	110	88	91	105	205	80
農林1号DNA をSH469(R ₄) に塗付	侵入遊走子数	60	32	36	38	109	28
	過敏型病斑	27	8	8	8	15	6
	罹病型病斑	0	1	9	10	28	11
	侵入遊走子数 / 全遊走子数	54.54	36.36	39.56	36.19	53.17	35.00
	過敏型病斑数 / 全遊走子数	24.54	9.09	8.79	7.52	7.32	7.50
	罹病型病斑数 / 全遊走子数	0	1.14	7.69	9.53	13.66	13.75

N.B. 接種72時間後調査

第2表 馬鈴薯葉上に塗付したDNAフラクションの水洗効果

区	経過時間	対照区	5	10	30分	1	2.5	14時間
		全遊走子数	189	129	68	104	66	136
侵入遊走子数		125	58	50	48	28	50	47
過敏型病斑		0	1	5	10	11	30	21
罹病型病斑		16	7	34	7	3	21	5
侵入遊走子数 / 全遊走子数		62.81	44.95	72.53	46.15	42.42	33.46	60.25
過敏型病斑数 / 全遊走子数		0	7.75	7.53	9.61	16.66	23.08	26.92
罹病型病斑数 / 全遊走子数		8.51	5.42	14.91	6.73	4.55	15.38	6.41

N.B. 種間雑種1506-b(9) より抽出したDNAフラクションを紅丸葉上に塗付

ものでは、塗付葉表面および葉組織内に銀粒子が認められた。

また、種間雑種からのDNAフラクション水溶液中に同一種間雑種または罹病性品種茎葉を浸してから、³H-シチジンで処理したものである、異品種DNAフラクション処理後³H-シチジンで処理したものである、異品種DNAフラクション処理後³H-シチジンを処理したものの方が値が高かった。

DNAフラクションの1%溶液を59,800rpmで超遠

心分離(バックマン Spinco L型)し、8分間隔で写真撮影したパターンについて、計算されたS値は、種間雑種1506-b(9)のS_{20.w.}=40.45Sと57.28Sであり、農林1号のS_{20.w.}=12.06Sと29.37Sであった。

考 察

Solanum demissum × *S. tuberosum* 種間雑種は、親和性のない疫病菌が侵入すると、いわゆる過敏感現象が起り、侵入を受けた感受体細胞は死に、疫病菌は閉じ込

第3表 種間雑種DNAフラクション処理をした種間雑種1506-b(9) および農林1号葉と茎への³H-シチジン処理の影響

実験区	A	B
1	001648C	001662C
2	002681C	002631C
3	031408C	031547C

N. B. 2回測定の前平均値

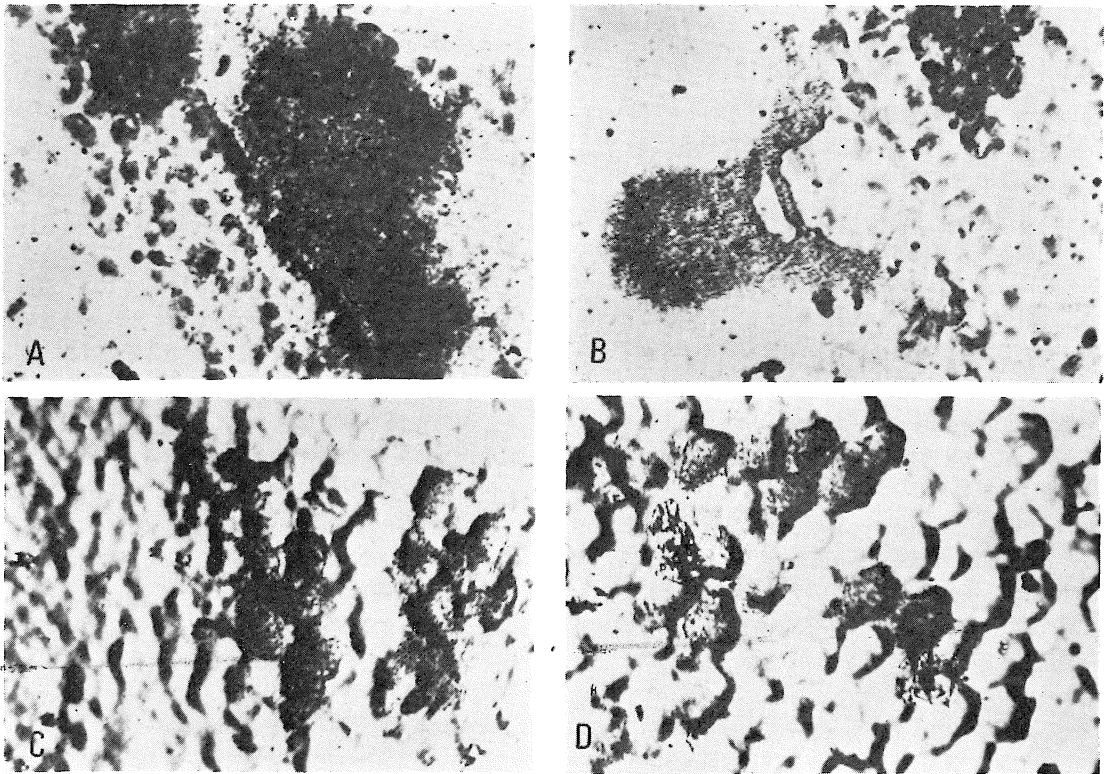
A = ³H-全放射能 × 28% + 全自然計数

B = ³H-ほとんど全部の放射能 × 30.6% +
ごく一部の自然計数

1. 種間雑種1506-b(9)DNA → 種間雑種1506-b(9)葉
2. 種間雑種1506-b(9)DNA → 農林1号葉
3. 種間雑種1506-b(9)DNA → 農林1号茎

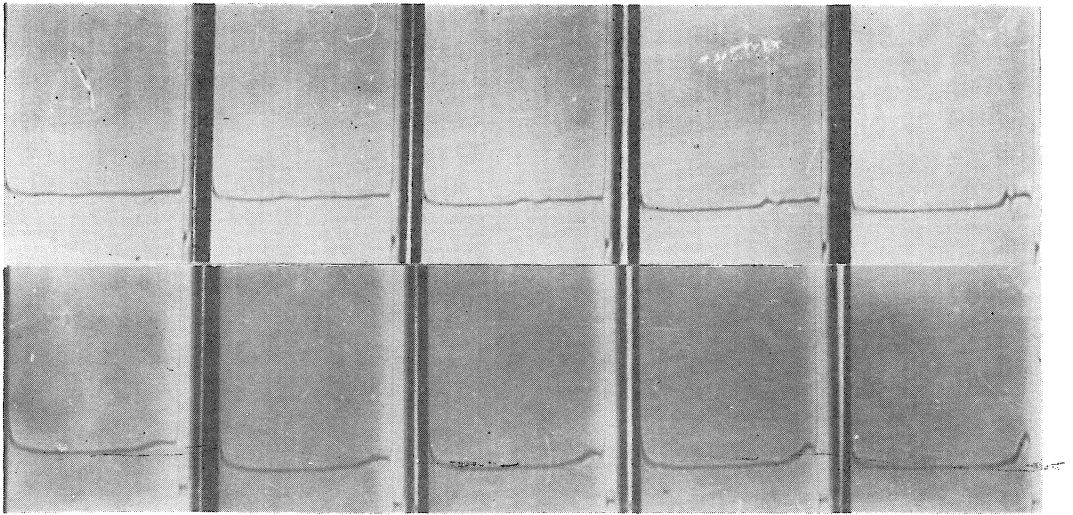
められて殺される。過敏感現象に伴う各種の代謝高揚について、筆者ら⁽⁵⁾はいろいろの角度から検討して来たが、これらは過敏感現象の成立した結果を追っかけているので、過敏感現象が成立するか否かの根本的考察には役立たない。

FLOR⁽¹⁾は *Melampsora lini* Desm. 菌に対する *Linum usitatissimum* L. の抵抗性を決定する遺伝因子は特異なもので、抵抗反応は特定の抵抗性遺伝子を持つ感受体と、それに対する非病原性遺伝子を持つ菌糸とが接種するときのみ成立すると Gene-for-gene 説を提唱した。TOXOPEUS⁽²⁾は、FLOR のこの関係が、疫病菌—馬鈴薯系でも起ると考えた。さきに YAMAMOTO⁽⁶⁾は、遺伝子の情報伝達に関係すると考えられるDNAにつき予備的実験を行ない、抵抗性遺伝因子 R₁ R₄ 罹病性遺伝因子 r を有する品種からそれぞれDNAフラクションを抽出し、異品種葉に塗付したところ、今まで認め



第1図 ³H-チミジンを取り込ませた馬鈴薯若葉より抽出したDNAフラクションを塗付した馬鈴薯葉、またこのフラクション中に浸漬した馬鈴薯の生長点付近のマイクロオートラジオグラフィ

- A. B. 種間雑種1506 b(9)茎葉を³H-チミジン2 μ C/ml溶液に4日間浸し、その先端部若葉より抽出したDNAフラクションを馬鈴薯(農林1号)表面に塗付したもの(2日後)のマイクロオートラジオグラフ
- C. 農林1号茎葉を³H-チミジン(2 μ C/ml)溶液に4日間浸漬し、先端部若葉より抽出したDNAフラクション0.4%水溶液に種間雑種1506-b(9)茎葉を4日間浸したものの先端生長点付近のマイクロオートラジオグラフ
- D. 種間雑種1506-b(9)を³H-チミジン(2 μ C/ml)溶液に4日間浸漬し、先端部若葉より抽出したDNAフラクション0.4%水溶液に農林1号茎葉を4日間浸したものの生長点付近のマイクロオートラジオグラフ



第2図 馬鈴薯より抽出したDNAフラクションの超遠心分離パターン
 上 種間雑種1506-b(9) (遺伝因子 R_1R_4)
 下 農林1号 (遺伝因子 r)
 回転数 毎分59,800 rpm 右より左へ8分間隔で撮影

られなかった型の病斑が混在した。対照として用いたニシン精虫DNAではこのような特異的作用はなかった。

馬鈴薯より抽出したDNAフラクションが異品種の体内に入り得るものであるか、あるいは感受体表面にあって疫病菌に対する抵抗性を左右する変化を与えるものであるかは、今後の問題であり、現在までの実験結果では、葉面上に塗付したDNAフラクションが感受体内に入ったという確証はない。しかし、マイクロオートラジオグラフィーを試みた結果、DNAフラクション塗付葉表面および葉組織内に銀粒子が認められたが、実際DNAフラクションが植物体に取り込まれるか否かについては今後多くの実験を行ない証明する必要がある。また、異品種DNAフラクション処理後、 3H -シチジンで処理したものが放射能の値が高かったことは、あるいは metabolic change を示すものであるかも知れない。またDNAフラクション中の低分子物質の混入については今後精製を繰り返したものにつき実験を行ない確かめて行きたい。DNAフラクションを葉上塗付後10分以内に水洗したのではあまり効果を示さなかったのは、塗付した水滴が乾かないので洗い流される部分が多かったためであるかも知れない。

摘 要

1. 疫病菌 (Race O) に対し抵抗性遺伝因子 R_1R_4 を有する馬鈴薯種間雑種 1506-b(9) と罹病性遺伝因子 r を有する農林1号とよりDNAフラクションを抽出

し、1% 溶液を 59,800rpm ベックマン Spinco L 型超遠心機で分離したパターンよりS値を計算したところ、前者では $S_{20.w.}=40.45S$ と $57.28S$ 、後者では $S_{20.w.}=12.06S$ と $29.37S$ とを得た。

2. 抵抗性種間雑種 1506-b(9) より抽出したDNAフラクションの0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0% 水溶液を罹病性品種紅丸 (r) 葉上に塗付、1時間後疫病菌 (Race O) 遊走子を接種したところ濃度の高い方が過敏型病斑の出現率が高かった。
3. 抵抗性種間雑種 1506-b(9) より抽出したDNAフラクション1%水溶液を罹病性品種紅丸葉上に塗付5, 10, 30分、1, 2.5, 14時間後水洗してから疫病菌 (Race O) 遊走子を接種すると、10分以内に水洗したものではDNAフラクションによる過敏型病斑のあらわれ方が顕著でなかった。
4. 3H -チミジン ($2\mu C/ml$) 溶液に馬鈴薯莖葉を浸し、4日後、その若葉よりDNAフラクションを抽出、ラベルされたフラクションの0.4% 水溶液に馬鈴薯莖葉を4日間浸した先端部組織について、またはこのフラクション水溶液を葉表面に塗付した組織についてマイクロオートラジオグラフィーを行なったところ、塗付葉表面および組織内に銀粒子が認められた。
5. 種間雑種DNAフラクション処理をした種間雑種 1506-b(9) および農林1号莖葉への 3H -シチジンが入るかどうかをしらべたところ、異品種DNAフラクション処理後取り込ませたものが放射能値が高かつ

た。

引用文献

1. FLOR, H. H. : Adv. Genetics 8 : 29-54, 1956
2. TOXOPEUS, H. : Euphytica 7 (2) : 123-130, 1958
3. SHIGEMATSU, A., MIZUSAWA, Y. and HIRAI, T. : Virology 28 : 331-338, 1966
4. THOMAS, J. J. : Arch. Biochem. Biophys. 79 : 102-104, 1959
5. YAMAMOTO, M. : Tagungsberichte Nr. 74, Biochem. Proben krank. pflanze : 175 - 199, Aschersleben. 1965
6. YAMAMOTO, M. : Biochemical Regulations in Diseased Plants or Injury Phytopath. Soc. Japan : 335-342, 1968
7. 山本昌木 : 日本菌学会 第12回大会講演要旨集 40-41, 1968
8. 山本昌木・野津幹雄・重松昭世 : 日本植物病理学会 関西部会講演要旨集 A-13, 1968

Summary

1. Ultracentrifuge pattern (59,800 rpm) of DNA-containing fraction obtained from Interspecific hybrid between *Solanum demissum* × *S. tuberosum* 1506-b(9) (Genotype R₁R₄) and Norin No. 1 (Genotype r) showed S_{20,w.} = 40.45S and 57.28S, S_{20,w.} = 12.06S and 29.37S, respectively.
2. Placing of 1% solution of DNA-containing fraction from resistant Interspecific hybrid 1506-b(9) on susceptible Benimaru gave abundant hypersensitive flecks than any other more dilute concentration of DNA.
3. Washing within 10 minutes after placing the DNA-containing fraction from resistant interspecific hybrid 1506-b(9) on susceptible Benimaru, the appearance of hypersensitive flecks was checked easily.
4. Potato cuttings were placed on ³H-thymidine solution (2μC/ml) for 4 days and DNA-containing fraction was obtained from these young leaves. Another potato cuttings were placed on 0.4% solution of the DNA-containing fraction. Microautoradiography was carried out on the tissues on which epidermis the DNA-containing fraction was placed or the apical tissues of leaves which were placed on the DNA-containing fraction. Silver grains were recognized on these tissues and on the epidermal surface.
5. High radioactivity of ³H-cytidine was observed on the plot treated with DNA-containing fraction of other variety.