

トマト萎凋病発病によりトマト葉に形成される蛍光性物質¹⁾

木谷清美・国安克人²⁾

(四国農業試験場)

緒 言

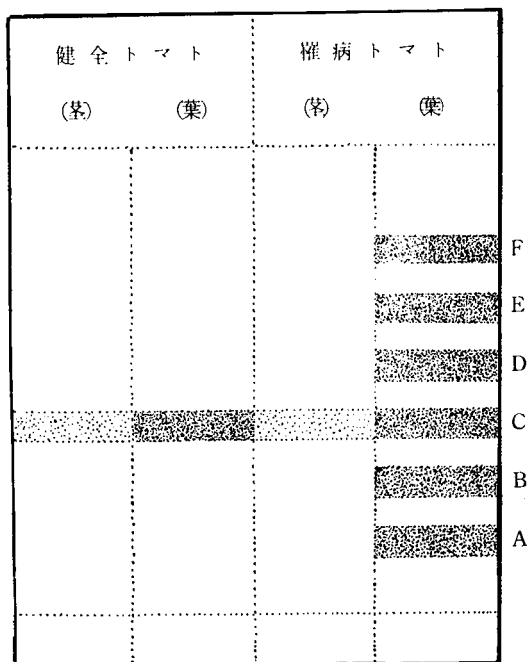
DAVIS(1967)はトマト萎凋病において病原性を示さない他の *Fusarium oxysporum* の race を葉に接種し, ついで病原性のある race を重複接種すると, これに対して抵抗性を示す, いわゆる cross-protection について報告している。

著者らはトマト萎凋病における cross-protection の機作解明の一環として, 罹病トマトに特異的に形成される物質について検討した結果, 数種の蛍光性物質の存在をみとめたので報告する。

当研究室大畑貫一博士には有益な助言を賜ったことを深謝する。

トマト萎凋病罹病茎葉にみられる蛍光性物質

蒸気殺菌砂を用いて育成したトマト苗(品種世界一, 本葉5枚)にトマト萎凋病菌孢子懸濁液を接種し, 地上部茎葉に病徴のあらわれた株から病葉および病茎を採集し, また無接種区から健全茎葉を採集した。これらの供試材料を20gずつとり, 大畑・高坂(1967)の方法に準じて抽出した。すなわち70%メタノールを加えて3分間煮沸し, ブレンダーで磨砕したのち, 一夜放置し, ろ過後残渣をさらに2回メタノールで抽出した。抽出液は50°Cで減圧濃縮し, 残液を1N HClでpH3.0とし, エーテルで4回振出した。エーテル層を濃縮したのち, 5% NaHCO₃で4回振出し, HClでpH3.0とし, さらにエーテルで4回振出した。エーテルを完全に留去したあと, 1mlの70%メタノール溶液とした。これをシリカゲル薄層クロマトグラフィにかけた。なお展開剤としてベンゼン, ギ酸エチル, ギ酸の5:4:1の混合液を用い, 展開後紫外線下における蛍光性を調べた。茎では健, 病ともに蛍光性物質は検出されなかった。葉身では健全葉には1種の蛍光帯がみとめられたが, 罹病葉には6種の明らかな蛍光帯がみとめられた。そのうち1種は健病葉に共通であった。(第1図)。



第1図 健全および罹病トマトにみられる蛍光性物質の薄層クロマトグラム

1) Fluorescent substances observed in tomato leaf infected with tomato *Fusarium wilt*. By Kiyomi KITANI and Katsuto KUNIYASU.

2) 現在, 農林省園芸試験場興津支場.

このように、罹病葉では多くの蛍光性物質の形成がみとめられたので、これらをそれぞれ分画し、Rf値、ジアゾ反応、鉄化第二鉄反応、および萎凋病菌に対する抗菌性について検討した。

病葉100gを前述の方法で処理し、最終的に2mlの70%メタノール溶液としたのち、ベンゼン、ギ酸エチル、ギ酸、5:4:1の展開剤を用いて薄層クロマトグラフィを実施した。つぎにそれぞれの蛍光部を紫外線照射下で切りとりメタノールで抽出し、濃縮したのち別の展開剤(ベンゼン、メタノール、7:3)を用いてそれぞれの分画部について薄層クロマトグラフィを実施し、最も蛍光性の著しい部分のみを切りとり、メタノールで抽出して濃縮したのち、展開剤として70%メタノールを用い、ペーパークロマトグラフィを行なった。結果は第1表に示した。これらの蛍光物質のうち3種はジアゾ反応および塩化第二鉄反応に陽性でフェノール性物質と考えられた。

第1表 トマト健全葉およびトマト萎凋病罹病葉にみられる蛍光性物質

項目 蛍光物質	存在		薄層クロマトグラフィ			ペーパー クロマトグラフィ		塩化第二鉄 反 応	ジアゾ反応
	健全葉	病 葉	展開剤 ¹⁾ R f 値	展開剤 ²⁾ R f 値	蛍光色 ³⁾	R f 値	蛍光色 ³⁾		
A	—	+	0.19	0.28	帯黄青	0.63	淡 黄	—	—
B	—	+	0.35	0.62	帯黄青	0.65	淡 青	+(黄褐色)	+(赤褐色)
C	+	+	0.55	0.18	青	0.67	帯黄青	—	—
D	—	+	0.63	0.57	帯黄青	0.61	青	+(黄褐色)	+(赤褐色)
E	—	+	0.73	0.67	淡 青	0.67	青	—	—
F	—	+	0.82	0.36	青	0.72	青	+(紫 色)	+(赤褐色)

注：1) 展開剤 ベンゼン 5
 ギ 酸 4
 ギ酸エチル 1

2) 展開剤 ベンゼン 7
 70%メタノール 3

3) 2536Åの紫外線下の蛍光色。

菌体および培養ろ液中にみられる蛍光性物質

罹病葉にみられる蛍光性物質は、罹病によって葉中に形成されるものであるか、あるいは病菌自体によって生産されるものであるかを調べるため、菌体および培養ろ液中の蛍光物質の検出を試みた。

トマト萎凋病菌(32号菌)をツァベックドックス培地で約2週間静置培養し、菌体と培養ろ液を別したのち、菌体は蒸留水で洗った。生菌体約20gをとり、70%メタノールを加えて乳鉢で磨砕しながら、抽出を3回くり返し、遠沈して上清をえた。上清を50℃で減圧濃縮し、HClでpH3.0とし、エーテルで3回振出してエーテルの留去後、少量の70%メタノールに溶かして前述の方法によってペーパークロマトグラフィを実施した。培養ろ液も遠沈して菌体をのぞいたあと減圧濃縮し、HClでpH3.0とし、エーテルで3回振出した。エーテルを留去したのち、少量の70%メタノール溶液とし、ペーパークロマトグ

第2表 トマト萎凋病菌菌体および培養ろ液中にみられた
蛍光物質

材料別	項目 蛍光物質	R f 値 (ペーパー クロマト グラフィ)	ジアゾ反応	鉄化第二鉄 反 応	蛍光色
菌 体	1	0.96	—	—	青
	2	0.86	+(褐色)	—	青
	3	0.44	—	—	淡青
培 養 ろ 液	1	0.64	—	—	黄
	2	0.51	+(褐色)	—	濃黄
	3	0.38	—	—	青

ラフイにかけた。対照としては、罹病葉を用いた。

第2表に示したように、ろ液および菌体抽出物からそれぞれ3種ずつの蛍光性物質の存在がみとめられ、これらのうち1種に弱いジアゾ反応をみとめたが、塩化第二鉄にはすべて陰性で、罹病葉にみられる蛍光性物質とは異なるようであった。

接種後の経過日数と蛍光物質の生成

これら蛍光性物質の経時的形成について知るために、前記に準じてトマトを育苗して病菌を接種し、接種後5日毎に20日後までの採集葉で病徴のみられない材料と、接種30日後葉に病徴の発現した材料を用いて蛍光性物質の形成を追跡した。第3表に示したように、健康葉に共通のCの他にDは接種後5日目からすでに形成がみとめられ、10日後ではAの形成がみられ、他のものは接種後30日目の葉に病徴が発現した場合にはじめてその形成がみられた。

第3表 接種後の経過日数と蛍光物質の生成

項目 接種後日数 蛍光物質	経時的形成状況				
	5日	10日	15日	20日	30日
A	—	—	—	—	+
B	+	+	+	±	+
C	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+
E	—	—	—	±	+
F	—	—	—	—	+

蛍光性物質が病菌胞子の発芽に及ぼす影響

健全葉および病葉100gを採集し、前項に準じて抽出し、ベンゼン、ギ酸エチル、およびギ酸の5:4:1の混合液を展開剤として薄層クロマトグラフィーを行なった。展開後罹病葉区における蛍光部位およびそれらに対応する部位を健全葉区から切りとり、メタノールで溶出し、最終的に1mlの70%メタノール溶液とし、これを原液として胞子の発芽試験に供した。

供試菌は当研究室保存のもの(32号菌)を用い、オートミール培地で培養した胞子を蒸留水で十分洗い、1視野(150倍)当り15~20個の小型分生胞子浮遊液とした。上記原液を蒸留水で、2, 4, 8倍に段階稀釈し、スライドグラス上に2点ずつ滴下し、一旦室温で乾燥させたのち、その上に胞子浮遊液を1滴ずつおき、28℃、24時間保ったのち胞子の発芽を調査した。調査胞子数は150個以上とし、2回反覆した。

結果は第4表に示したが、分離したすべての蛍光性物質は、胞子の発芽抑制作用を示さなかった。

第4表 蛍光性物質のトマト萎凋病胞子の発芽に及ぼす影響(発芽率%)

部位 稀釈度 蛍光物質別	罹病部			健全部		
	1/2	1/4	1/8	1/2	1/4	1/8
A	29.7	20.6	22.0	39.5	50.0	36.7
B	31.9	40.7	43.5	41.1	39.8	37.9
C	40.9	35.6	36.2	42.6	36.5	33.6
D	34.4	45.1	34.6	45.5	37.5	47.2
E	24.4	27.2	35.2	40.5	38.2	45.0
F	31.0	47.7	49.4	23.6	39.6	41.4

水 40.4

青枯病罹病トマト葉にみられる蛍光性物質および品種間差異

圃場でトマト品種世界一、興津6号およびアナフに自然発病した青枯病罹病葉を採集し、前項と同様の方法で抽出し、ベンゼン、ギ酸エチル、およびギ酸の5:4:1の混合液を展開剤としてシリカゲル薄層クロマトグラフィーを行なった。対照としてトマト萎凋病葉(世界一)抽出物を用いた。

青枯病および萎凋病罹病葉にみられる蛍光性物質はRf値、蛍光色、ジアゾ反応、および塩化第二鉄反応に相違がみとめられず、病原菌が異なってもトマト罹病葉には同種の蛍光性物質の形成がみ

られるようである。なおトマト品種間においても相違はみとめられなかった。

考 察

萎凋病罹病トマト葉身には、健全葉ではみられない5種類の蛍光性物質の存在を確認し、そのうち3種はジアゾ反応および塩化第二鉄反応陽性を示すことから、フェノール性物質であると推定した。これら5種の蛍光性物質は萎凋病菌自体の生成物質ではなく、罹病したトマト葉組織で生成される。またこれらの物質はいずれも青枯病罹病トマトでも検出されることから、萎凋病に特異的なものではないと考えられる。

上記5種の蛍光性物質は、萎凋病菌の胞子発芽に対しては抑制作用を示さず、また罹病茎では検出されないことから、これらの物質がDAVIS(1967)が指摘した cross-protection にその抗菌作用を通じて直接関与しているとは考え難い。しかし、これらの物質が感染場において病原菌の生成する酵素あるいは寄主組織の酵素に対する作用を通じて病徴の発現、病勢の進展に影響を及ぼしていることは容易に想像され、今後の検討がまたれる。

摘 要

萎凋病罹病トマトの葉身において健全葉にはみられない5種の蛍光性物質を検出したが、これらの物質は青枯病罹病トマトでも認められた。そのうち3種はジアゾ反応および塩化第二鉄反応陽性でフェノール性物質と推定された。また5種の蛍光性物質はトマト萎凋病菌胞子の発芽を抑制することはなかった。

引 用 文 献

- DAVIS, David (1967) : *Phytopath.* 57 : 311~317.
大畑貫一・高坂淳爾(1967) : 農業技術研究所報告C, No. 21 : 111~132.

(1969年2月1日 受領)