

Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) 法による オオムギ黄枯病罹病個体の根活性の測定

楠 幹生¹⁾
(香川県農業試験場)

Measurement of Activity of Roots of Browning Root Rot-infected Barley by Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) Method

By Mikio KUSUNOKI (Kagawa Prefectural Agricultural Experiment Station,
Busshozan, Takamatsu 761)

はじめに

植物の根の養分吸収に必要なエネルギーの大部分は、根の呼吸作用によって供給されていることから、呼吸と関連するパーオキシダーゼやコハク酸脱水素酵素の活性を測定し、根の活性程度を判断する手法が開発されており、前者は α -Naphthylamine法、後者はTriphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) 法と呼ばれている(二見, 1991)。オオムギにおいても、遠山・草葉(1964)が α -Naphthylamine法で、河合(1984)はTTC法で萎縮病罹病個体の根の活性を調べている。

ここでは、まず、TTC法を用いたオオムギの根活性測定条件について検討し、ついで黄枯病による根部の褐変程度と根活性の関係を調べたので報告する。

材料および方法

1. TTC 法を用いたオオムギの根活性測定法

1) 供試根の採取

平成5年11月15日に10a当たり12kgのオオムギ(サヌキハダカ *Hordeum vulgare* L.)を全面全層播きし、尿素入り硫化燐安高度化成肥料[ハイパワー-747 (N: 17%, P: 14%, K: 17%)]を10a当たり60kg施用した黄枯病の常発ほ場である香川農試62号地より、平成6年2月から3月にかけてほ場の5か所から10株ずつ採取した。オオムギの株は株分けして流水で土壌を除去し、根を長さ

約2cmに切断して均一に混合したものを供試根とした。

2) フォルマザンの抽出方法

生体重で500mgの根をビーカーに採取し、1%TTC溶液、0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH5~9)および蒸留水をそれぞれ1:4:5の割合に混合した液を20ml加え、根を混合液中に沈めた。そのビーカーを予め20~60°Cに設定をしておいた減圧インキュベーター(タバイエスベック社製)で、液中から気泡の発生が無くなるまで十分脱気し、暗所で反応させた。2N硫酸2mlを加えて反応を停止させた後、根を取り出して水分を十分除去した。その根を少量の石英砂とともに乳鉢に入れて磨砕し、25mlの酢酸エチルでフォルマザンを抽出した。

3) 根活性の測定

分光光度計(島津製作所製)を用い470nmにおける吸光度を測定した。標準液については、既知濃度のTTC溶液の一定量を分液漏斗にとり、一定量の酢酸エチルを加えてハイドロサルファイトソーダ粉末(TTC 0.2mgに対し15~30mg)を加えて振盪した。酢酸エチル層に移ったフォルマザンの一定量をメスフラスコにとり、定容したものをを用いた。

根活性は下に示したように、根(乾物)1g、1時間当たりの生成フォルマザン量(mg)で表示した。

1) 現在 香川県病害虫防除所

$$\text{根活性} = \frac{\text{生成フォルマザン (mg)}}{\text{供試根量 (乾物重 g)} \times \text{反応時間 (h)}}$$

2. 根部の褐変程度の測定

上記の黄枯病の常発ほ場から、平成6年2月20日、3月20日および4月20日の各時期に採取して洗浄したオオムギの株を用いた。表-1に示した基準によって0~4の根部の褐変程度に分け、それぞれの褐変程度の5株についてTTC法による根活性を測定した。

表-1 オオムギ根部の褐変程度の区分

| 指数 | 根部の褐変程度 |
|----|----------------|
| 0 | 発生を認めない |
| 1 | ごく一部の根にわずかに認める |
| 2 | 約1/2の根に明らかに認める |
| 3 | 約2/3の根に明らかに認める |
| 4 | 大部分の根に明らかに認める |

結 果

1. TTCを用いたオオムギの根活性測定法の検討
反応時間については、根を反応液にそれぞれ1, 2, 4, 8および12時間浸漬し、フォルマザンの生成量と根活性を測定した。フォルマザンの生成量は、時間の経過とともに増加したが、フォルマザン生成量の時間当たりの増加割合である根活性は2時間で最大となってそれ以後は減少した(図-1, 2)。

温度条件については、20, 40, 50および60℃で

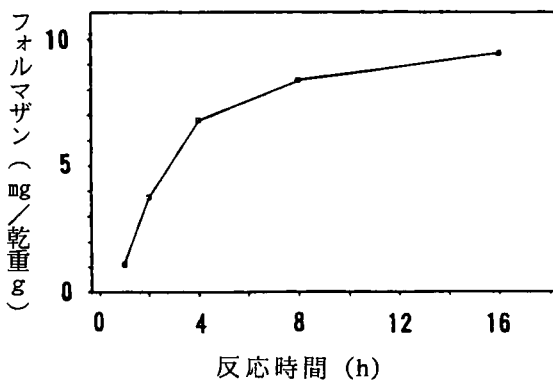


図-1 フォルマザン生成量の経時変化

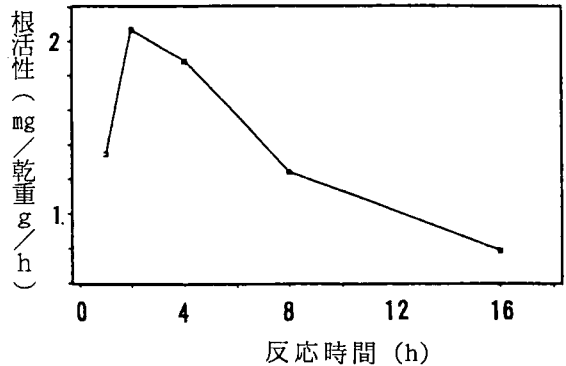


図-2 根活性の経時変化

4時間反応させて根活性を調べたところ、40℃付近で最も高い反応を示した(図-3)。pH条件については、反応液の0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液のpHを5, 7, 8および9とし、pHが反応に及ぼす影響を調べたところ、pH7付近で最も高い反応を示した(図-4)。

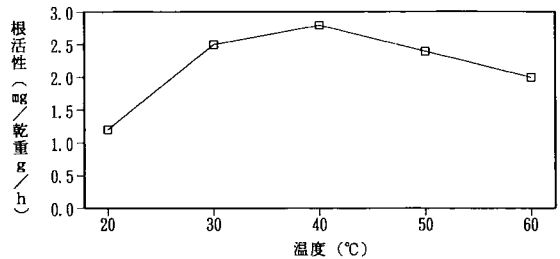


図-3 温度の根活性に及ぼす影響

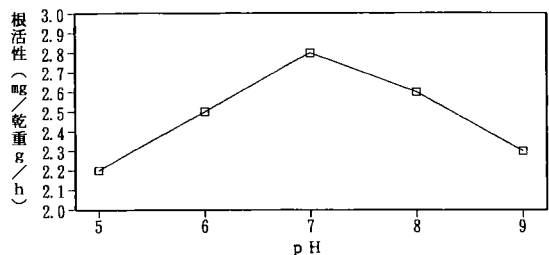


図-4 pHの根活性に及ぼす影響

2. 根部の褐変程度と根活性との関係

調査日に関わらずTTC法による根活性は、根部の褐変程度と1%の危険率で負の相関が認められた

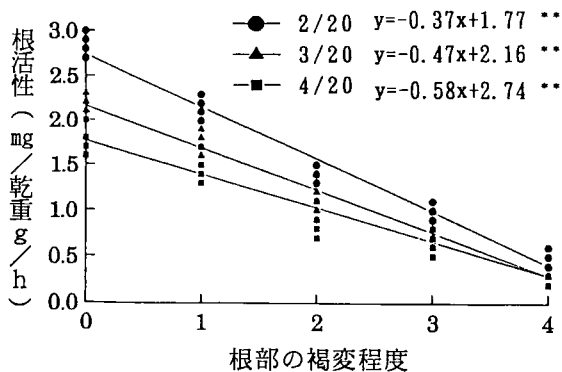


図-5 根部の褐変程度と根活性との関係

考 察

本実験の結果より、オオムギの根活性の測定条件は、反応時間については2~4時間、反応温度は40℃付近、反応液のpH値は7が最適と考えられた。TTC法を用いた根活性の測定について、相見・藤巻(1960)は水稻の根活性の測定について同様の検討を行っている。反応時間及び反応温度については、本実験の結果と一致したが、反応液のpHの影響については、相見・藤巻(1960)は酸性側よりもアルカリ度が高くなるほど反応が強くなると報

告しているが、本実験ではpH7以上で根活性の値が低くなり、異なる結果であった。この様に、植物により根活性の測定条件は異なり、測定する植物によって反応条件を検討する必要があると思われる。

河合(1984)はオオムギのTTC反応による着色状況について調べ、オオムギ縞萎縮病に罹病した株は健全株に比較して着色した根が少ないと報告している。本試験ではTTC反応により着色したオオムギの根からフォルマザンを抽出し、その株の根活性を数値化し、個体ごとの比較を行った。この根活性の値は、根部の褐変程度と負の相関があり、根部の障害の指標となると考えられた。

引 用 文 献

- 相見 霊三・藤巻 和子 (1960) : TTCによる根の活力診断法。農業及び園芸, 35 : 1345 ~ 1346.
- 二見 啓三 (1991) : 植物栄養実験法 : 根活性診断法。白友社, 東京, P.49-64.
- 河合 洋 (1984) : 二条オオムギにおける縞萎縮病の被害様相と発生環境に関する研究。(著者自刊) : 88pp.
- 遠山 明・草葉 敏彦 (1964) : オオムギ縞萎縮病根の α -Naphthylamineの酸化力について。中国農業研究, 30 : 42~44.