

## ダイコン品種のべと病感受性差異とL-フェニールアラニンによる根柔組織細胞壁の木化促進<sup>1)</sup>

浅田 泰次・松本 勲  
(愛媛大学農学部)

### ま え が き

ダイコンはわが国の重要な野菜の一つとして古くから栽培されてきたが、今日でも野菜の中ではもっとも作付面積が広く、収量もまた多いものである(第46次農林省統計表, 1970)。ダイコンの病害としてはウイルス病による被害が著しく、べと病はそれほどではないようであるが、他の栽培植物、たとえばウリ類ではべと病の被害は無視できない。筆者らは植物病理学上の主要課題の一つである「宿主-寄生者相互作用」の解明を主要な研究テーマとしているが、その材料としてダイコンの根とべと病菌を用いてきた。このような材料を選定したのは、次のような理由からである。すなわち、べと病菌は絶対寄生菌であって、絶対寄生そのものが重要な検討課題であること、そしてその特性のために実験操作が煩雑であって、寄生者として使用する研究者が比較的少なかったこと、また宿主であるダイコンは年間を通じて容易に栽培でき、量的にもかなりの量を供試できること、根には葉緑体がなく、かつ、やわらかいので、化学操作が容易であることなどによる。そして、この系での「宿主-寄生者相互作用」の結果、柔組織細胞壁にリグニン沈着が起こることを見出した(ASADA & MATSUMOTO, 1969)。しかし、この場合の供試材料は市販ダイコンであったので、「宿主-寄生者相互作用」が「gene for gene」のレベルで検討され始めた今日では、まず供試品種を一定にする必要がある。そこで寄生者のレースの問題はあとにして、宿主である供試ダイコン品種を選出すること、葉での発病程度と根でのそれとが一致するかどうかを知ることが目的として、ダイコン品種の葉および根でのべと病感受性差異を検討した。次にリグニン前駆物質の添加が、罹病性品種で柔組織細胞壁の木化促進効果があるかどうかについて検討したので、それらの結果について報告する。

本実験結果の一部は、当研究室専攻学生、挾間渉君と佐々木修君の専攻実験結果であり、また、本研究の一部は昭和45年度および昭和46年度文部省科学研究費(Nos. 86013, 586013)によって行なった。ここに記して感謝の意を表する。

### I ダイコン品種のべと病感受性差異

供試品種は時無(*Raphanus sativus* L. var. *hortensis* BACKER f. *sempervirens* MAKINO), 郡西, 陽春, 大蔵, 美濃早生(*R. sativus hortensis* f. *minowase* KITAM.), 阿波晩生(交雑品種, 宮重×堀江), 白首宮重(*R. sativus hortensis* f. *miyashige* MAKINO), 青首宮重, 皿冠の9品種であつ

- 
- 1) 植物病態組織のリグニン生成に関する研究 第8報. 植物病理学研究室業績, No. 12.  
On the resistance of varieties of Japanese radish to downy mildew and the effect of L-phenylalanine on the lignification of the root parenchyma cell walls. By Yasuji ASADA and Isao MATSUMOTO.  
Proc. Assoc. Pl. Prot. Sikoku, No. 7: 21-30 (1972).

て、これらの外部形態は図版 I に示すとおりである。いずれも市販種子を用いて圃場あるいはポット栽培して実験に供した。なお、北村(1958)によると、日本産のダイコンはすべて *R. sativus* L. var. *hortensis* BACKER の forma として取り扱うべきものであるが、前述の中で学名を記入しなかったものは、北村の記載にないものである。園芸上では、栽培時期によって秋大根(9月播種, 12月収穫)、春大根(10月播種, 3月収穫あるいは4月播種, 7月収穫)、夏大根(6月播種, 9月収穫)の3群に大別している(古里・宮沢, 1958)。この類別によると本供試品種は第1表の備考欄記載のようになる。べと病感受性の品種間差異を比較するに当たっては、圃場栽培のもの自然発

第1表 ダイコン品種のべと病感受性差異

品 種	圃場での自然発病状態 <sup>1)</sup>			葉への接種試験 <sup>3)</sup>			根切片への <sup>4)</sup> 接種試験	備 考
	個 体 数	調査葉数	罹病率 <sup>2)</sup> (%)	個 体 数	調査葉数	罹病率 <sup>2)</sup> (%)	侵害菌糸の先端位置(mm)	
1 時 無	81	592	1.0	40	178	1.0	1.0	春大根
2 都 西	74	699	1.1	38	151	0.7	1.9	?
3 陽 春	84	588	3.7	40	184	1.6	0.8	?
4 大 蔵	59	498	4.0	40	170	3.5	2.9	秋大根
5 美濃早生	71	494	15.5	39	161	8.1	3.8	夏大根
6 阿波晩生	53	434	22.1	41	155	11.6	2.8	秋大根
7 白首宮重	57	277	38.6	40	151	6.6	4.7	秋大根
8 青首宮重	58	381	42.0	40	197	26.9	3.2	秋大根
9 皿 冠	62	512	51.4	39	170	14.7	4.0	秋大根

注 1) 9月21日播種, 10月22日調査。

2) 罹病葉数/調査葉数×100 (病斑数, 病斑面積は考慮せず)。

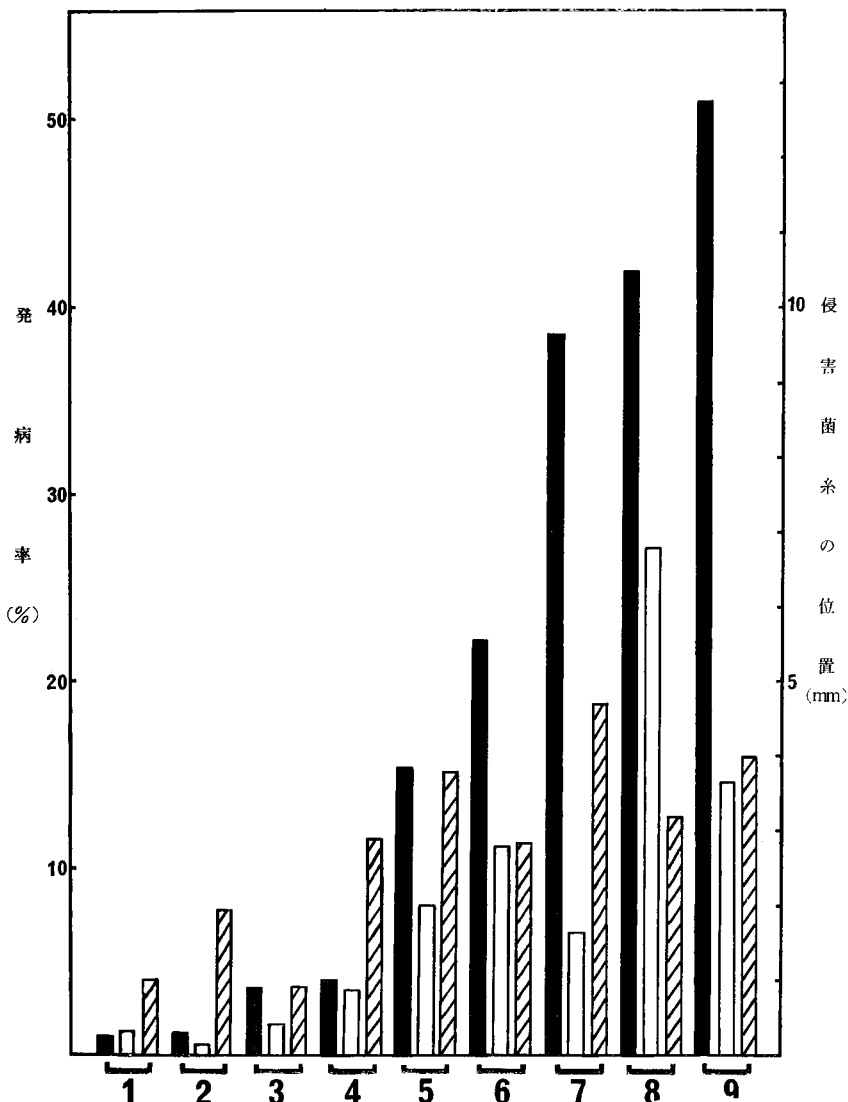
3) 10月1日, 1:50,000ワグネル・ポットを用いて10粒あて播種, 1品種4ポット使用, 10月22日, 分生孢子懸濁液接種, 8日後調査。

4) 厚さ約1cmの根切片の切断片表面に分生孢子懸濁液接種, 4日後顕微鏡下で観察, 5個体供試, 1個体より3スライス, 1スライスより2視野観察測定平均値。

病状態, ポット栽培(1:50,000ワグネルポット使用)のものへの病原菌分生孢子接種試験, 根切片(厚さ約1cm)への湿室ベトリ皿内での接種試験の3方法によって検討した。なお, 供試べと病菌分生孢子は, 愛媛大学農学部付属農場において自然発生したダイコン罹病葉を滅菌水で洗浄し, 1日間湿室に保った後形成されたものを用いた。

結果は第1表に示すとおりであって, 時無, 都西, 陽春は抵抗性, 大蔵, 美濃早生, 阿波晩生, 白首宮重, 青首宮重, 皿冠は罹病性と判定された。また各品種間のべと病自然発病状態, 葉への接種試験結果および根切片への病原菌侵入程度は, ほぼ平行関係が認められるので, 天然では発病の起こらない根切片を宿主としても, 葉と同様の結果がえられると思われ, 実験操作の容易な根を使用して差し支えないものと考えられる。第1図はこれらの平行関係を図示したものである。また本実験ではすべての品種を9月下旬に播種して感受性を調べたが, 抵抗性と判定された時無は春大根であって, 必ずしもその品種の特性を示したものは断定できず, いいかえると個体素因に基づく抵抗性かも知れないが, 本実験の目的が「宿主-寄生者相互作用」探究のための所定期間における抵抗性および罹病性品種の選出にあって, 実用を目的とする圃場試験ではないので, 今後の実験材料として抵抗性品種として時無ダイコン, 罹病性品種として白首宮重ダイコンを選出した。この両品種間の自然発病状態, 葉への接種試験結果について,  $\chi^2$ 検定を行なったが, 危険率

1%以下で有意差が認められた。なお、時無の抵抗性が種属素因に基づくかどうかは別に検討することとする。



第1図. ダイコン品種のべと病自然発病, 葉および根への接種結果の平行関係図

数字は第1表の品種数字と同じ. ■ : 自然発病の罹病率(%).

□ : 葉への接種試験の罹病率(%). ▨ : 根への接種による侵害菌糸の深さ(mm)

## II L-フェニールアラニン添加によるべと病罹病ダイコン根柔組織細胞壁の木化促進

近年農薬による公害が大きな社会問題となっているが、今日のような集約化された農業生産体系の下では、農薬なしに作物を栽培することは極めて困難となっている。したがって、いわゆる無公害農薬の早期開発が切望されているが、現在使用されている殺菌剤のほとんどはその殺菌力に依存しており、毒性のない殺菌剤は見当たらない。しかし農業用殺菌剤の場合は、医薬と違って植物体内に侵入した病原菌を完全に殺す必要はなく、作物の収量が保障され、かつ体内に存在する病原菌が著しい第2次伝染源とならなければよいのであるから、植物体内で「防壁形成によ

る病原菌の封じ込め」がその目的を果す一手段と考えられ、そのような働きをする毒性のない薬剤が見出されれば、無公害農薬の一つとなりうる。筆者らは先にダイコン根柔組織細胞壁がべと病菌の感染によって木化(リグニン沈着)することを見出したが(ASADA & MATSUMOTO, 1969), リグニンは植物病原菌類の侵害に対して極めて安定な物質であって、それは侵入菌糸に対して防壁の役割を果しうると推定される(浅田, 1970)。そこで前節既述の抵抗性および罹病性品種根でのべと病菌感染による木化細胞壁生成の差異, 侵入菌糸と生成木化細胞壁の位置, リグニン前駆物質であるL-フェニールアラニン(L-Phe)添加による木化細胞壁生成の変化について実験した。

前述9品種の根(約3か月間栽培, 直径約6 cm)を無菌的に約1 cmの厚さに切り取り, 圃場で採集したべと病罹病葉を洗浄して1日間湿室内に保ち, 形成された新発生胞子を接種し, 20℃照明下で所定日数間湿室内に保ったものを材料とした。接種根切片は凍結マイクロームを用いて約50μのスライスとし, 顕微鏡で侵入菌糸の深さ(侵害先端位置)を測定し, フロログルシン塩酸試薬(18% HClにフロログルシンを飽和)で木化細胞壁の位置を観察した。次に抵抗性の時無, 罹病性の白首宮重ダイコン根を用いて L-Phe 500ppmを0.3Mしゅ糖液と共に厚さ約1 cmの切片に真空浸透させ, 3日間放置後病原菌を接種し, 4日後の侵入菌糸および木化細胞壁の位置を検鏡観察した。真空浸透処理によるL-Pheの吸収量は根切片容積( $3^2 \times \pi \times 1 \text{cm}^3$ )の約1/30量であり, 吸収部位は切断両面から3~5mmの深さまでであって, ほぼ根切片全体に薬剤が浸透していると考えてよい。これは0.3Mしゅ糖液に500ppm中性赤液を真空浸透させて判定したものである。この着色細胞はもちろん原形質分離を起こすので, 真空浸透処理による宿主の細胞死はまったくない。

供試9品種根切片での先端侵入菌糸および木化細胞壁の位置は第2表に示すとおりである。すなわち, 抵抗性品種では菌糸侵害が少ないのは当然であるが, 木化細胞壁の生成位置が侵害菌糸の先端位置に先立って存在しており, 罹病性品種では菌糸侵害後の柔組織細胞壁が木化している。しかし抵抗性品種の場合でも柔組織細胞壁のすべては木化しないので, 侵入菌糸は木化細胞壁につきあたるとそれをさけ, まだ木化していない細胞壁を貫通して吸器をそう入する。また菌糸侵害後でも未木化細胞壁が木化する。罹病性品種の場合は, 木化細胞壁の細胞間隙に菌糸が認められ, 細胞壁の木化は菌糸侵害後に起こったものと考えられる(図版II)。べと病菌感染に伴う侵入菌糸および木化細胞壁の位置の経時的变化は図版III(A)のとおりであって, 抵抗性の時無では接種5日後でも菌糸は約2mmしか侵入していないが, 罹病性の白首宮重では約8 mmまで菌糸侵害が起こっている。また前者での生成木化細胞壁の位置は侵害菌糸の位置より先立っており, 後者では菌糸侵害後に細胞壁の木化が起こっている。第2図は時無および白首宮重両ダイコン根での接種後5日目のべと病菌侵害程度を示したものであって, 時無では切断表面での菌糸発育が著しく深部への侵害は少ないが, 逆に白首宮重では切断表面よりも深部への菌糸侵害が著しい。

次にL-Pheを添加した結果は図版III(B)に示すとおりである。ダイコン根柔組織細胞の限界原形質分離濃度はしゅ糖液で約0.35Mであるが, 500ppm L-Pheのみを真空浸透させると組織が死

第2表 べと病菌感染によるダイコン各品種根切片での侵入菌糸および木化細胞壁の位置

品 種	侵入菌糸 <sup>1)</sup> の深さ(mm)	木化細胞壁 <sup>2)</sup> の位置(mm)
1 時 無	1.0	1.1
2 都 西	1.9	1.9
3 陽 春	0.8	0.8
4 大 蔵	2.9	3.2
5 美濃早生	3.8	1.2
6 阿波晩生	2.8	2.0
7 白首宮重	4.7	3.8
8 青首宮重	3.2	2.4
9 皿 冠	4.0	3.7

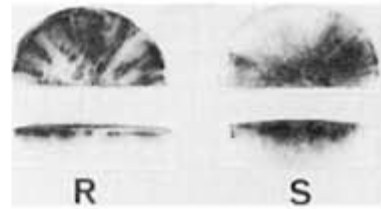
注 1) 接種後4日目の材料, 観察は第1表注4)と同じ。

2) フロログルシン塩酸試薬による。

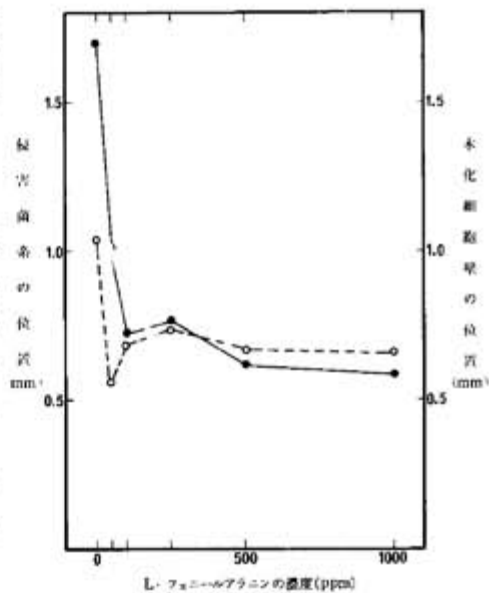
減するので、等張に近い0.3M  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  糖液を共に加えて処理した。無接種区(N)では時無、白首宮重両品種とも切断面でも柔組織細胞壁の木化がみられないが、接種区(I)では著しい細胞壁の木化が起こる。そして罹病性品種にL-Pheを添加した場合の菌糸侵害度は抵抗性品種とほぼ同程度に菌糸侵害が抑えられ、さらに細胞壁の木化が菌糸侵害に先立って起こっている。リグニン前駆物質であるL-Pheの添加によって木化が著しくなり菌糸侵害が少なくなることは、防壁形成による菌糸の伸展阻止が起こっていると考えられる。

このように罹病性品種ではL-Phe添加の効果が極めて著しいが、抵抗性品種ではL-Phe添加の効果がほとんどみられない。なお、0.3M  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  糖を真空浸透させた場合は、抵抗性、罹病性両品種とも菌糸伸展がやや著しい傾向がみられたが、0.3M濃度は約10%濃度となるので、多量の $\text{Li}_2\text{SO}_4$ 糖の存在がべと病菌の生長に好適なのか、あるいは $\text{Li}_2\text{SO}_4$ 糖添加によって宿主の抵抗が弱まるのかいずれかであろう。筆者ら(浅田・村上、未発表)は半寄生菌であるオオムギ裸黒穂病菌の発育最適 $\text{Li}_2\text{SO}_4$ 糖濃度を検討したが、15%が最も良好であった。人工培養可能な殺生菌では、通常 $\text{Li}_2\text{SO}_4$ 糖濃度は2~5%程度であるから、寄生菌の発育にはかなり高濃度の糖が必要ではないかとも想像される。次にL-Phe添加濃度を50, 100, 250, 500, 1,000 (ppm)としてその効果を検討したところ、50~250ppmでもかなり菌糸伸展が抑制されたが、500ppmで始めて木化細胞壁の生成が菌糸侵害に先立って生じた(第3図)。

筆者ら(ASADA & KUGOH, 1971)は先にL-Pheがべと病罹病ダイコン根木化柔組織細胞壁に取りこまれていることをみ、それは単にL-Pheが木化細胞壁に吸着した結果ではなく、リグニンとなって存在すると考えた。さらに筆者ら(浅田・松本・田代, 1971)はべと病罹病ダイコン根でリグニン前駆物質であるp-クマール酸やコヒー酸を見出しているが、これらの芳香族有機酸はL-Pheから生成するものであって、L-Pheをトランス桂皮酸に転換する酵素、フェニルアラニンアンモニアライエースの罹病による活性増大を認めている(浅田・松本・黒田, 1971)。見里(1971)はN-ラウロイル-L-パリン、N-ラウロイル-L-フェニルアラニンがいもち病に対してすぐれた防除効果を示すことを発見し、無公害農薬としてのアミノ酸農薬開発の可能性を示唆した。植物病に対するアミノ酸の化学療法的効果についてはANDEL (1966)の抄録があり、DL- $\alpha$ -フェニル- $\alpha$ -アラニン、DL- $\beta$ -フェニル- $\beta$ -アラニンがリンゴ黒星病、キュウリ黒星病、ウリ類炭そ病、トマト疫病、ジャガイモ疫病に対して治療効果があると報告されてい



第2図 時無(R)および白首宮重(S)両ダイコン根切片でのべと病菌侵害度の比較写真  
接種5日目の材料。Rでは接種表面での病原菌発育が著しいが、Sでは深部への侵害が著しい。



第3図 L-フェニルアラニン添加濃度の相違による白首宮重ダイコン根切片でのべと病菌菌糸侵害度と生成木化細胞壁の位置

0.3M  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ 糖と共に真空浸透、3日間放置後接種し3日後観察。各区3切片供試、おのおの3か所からスライスを作り、1スライスの2視野を観察測定して得られた平均値。

● : 侵害菌糸の先端位置  
○ : 先端木化細胞壁の位置

る。また江川(1969)は通常自然界には存在しないD-アミノ酸が、植物病原菌によって L-アミノ酸と同程度に利用されることを見出しているが、これは病原菌の栄養源としてのD-アミノ酸の利用であって、宿主体内でのリグニン前駆物質としてのL-Pheの意義とは直接には関係がない。しかし、微生物がD型アミノ酸を利用するのであれば、高等植物でもD型の吸収利用がありうるかも知れない。KUC, WILLIAMS & SHAG (1957)はDL-およびD-Pheをリングに施用すると黒星病に対して抵抗性を示し、L-Pheは無効果であったと述べており、DL-およびD-Pheはあるいは宿主体内においてL-Pheとは異なった役割を演じているとも思われる。BHCの殺虫力がア-異性体のみに見られることと考え合わせて興味深い。L-Pheはまた植物体内におけるフェニールプロパノイドの前駆物質であって、多くのファイトアレキシンが、フェニールプロパノイド起源であることから抗菌性物質生成が起る可能性もある。

以上のように、(1) 罹病性品種にL-Pheを与えると抵抗性品種と同程度の抵抗性を示すこと、(2) 罹病性品種では柔組織細胞壁の木化は菌糸侵害後に起こるが、L-Pheの添加によって細胞壁の木化が菌糸侵害に先立って起こること、(3) 木化細胞壁は菌糸侵害に対して防壁の役割を果しうること、(4) この生成防壁はすべての柔組織細胞壁で完全に生成されないの、木化細胞壁につきあつた菌糸はそれをさけ、未木化細胞壁を貫通して吸器をそう入すること、(5) したがって罹病性品種にL-Pheを与えた場合でも完全に菌糸伸展を阻止できないことなどが明らかとなった。そしてこのような働きを持つ薬剤は、いわゆる無公害農薬の一つとして開発の可能性を持っていると考えられる。

## 要 約

- 1 ダイコン9品種を用いてべと病感受性の品種間差異を検討し、抵抗性品種として時無ダイコン、罹病性品種として白首宮重ダイコンを選出した。この選出過程で葉に対する接種試験結果が根に対するそれと一致したので、根を感受性検討の実験材料としても、天然でみられる葉での発病現象と同様な考察が可能である。
- 2 根への接種で抵抗性品種では菌糸侵害に先立って柔組織細胞壁の木化が起こるが、罹病性品種では菌糸侵害後の細胞壁が木化した。前者の場合はもちろん菌糸侵害度が低い。後者の場合は一種の“delayed resistance-type response”と考えられる。
- 3 罹病性品種の根にL-フェニールアラニン500ppmを0.3Mし<sub>2</sub>糖液と共に真空浸透させると、菌糸侵害に先立って柔組織細胞壁の木化が起こり、かつ病原菌菌糸の伸展度が抵抗性品種の場合とほぼ同程度となり、L-フェニールアラニンの菌糸伸展阻止効果が認められた。

## 引 用 文 献

- ANDEL VAN, O. M.(1966): Amino acids and plant diseases. *Ann. Rev. Phytopath.* 4:349~368.
- 浅田泰次(1970): 植物細胞壁の木化と病害抵抗性, 農業および園芸, 45: 1035~1040.
- ASADA, Y. and I. MATSUMOTO (1969): Formation of lignin-like substance in the root tissues of Japanese radish infected by downy mildew fungus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 35: 160~167.
- ASADA, Y. and T. KUGOH (1971): Incorporation of tritiated phenylalanine into lignified cell walls of Japanese radish root infected by *Peronospora parasitica*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 37: 311~313.
- 浅田泰次・松本勲・黒田憲三(1971): 植物病態組織のリグニン生成に関する研究(IX) べと病罹病ダイコン根

- のフェニールアラニンアンモニオライエースについて。日植病報, 37: 181 (講演要旨)。
- 浅田泰次・松本勲・田代哲二(1971): 植物病態組織のリグニン生成に関する研究(XI) べと病罹病ダイコン根のポリフェノール生成について。日植病報, 37: 387 (講演要旨)。
- 浅田泰次・村上翼(未発表): オオムギ裸黒穂病菌の栄養生理。
- 江川宏(1969): 植物病原菌による窒素化合物の利用に関する研究—とくにD-アミノ酸利用についての考察, pp. 1~79., (京都大学学位論文)。
- 古里和夫・宮沢明(1958): 園芸上からみた日本の大根品種。“日本の大根”(西山市三編), 東京, 日本学術振興会, pp.138~161. Pl. I~XI.
- 北村四郎(1958): 大根の品種とその変遷。“日本の大根”(西山市三編), 東京, 日本学術振興会, pp.1~19.
- KUC, J., E. B. WILLIAMS and J. R. SHAG (1957): Increase of resistance to apple scab following infection of host with phenylthiourea and D-phenylalanine. *Phytopathology*. 47: 21~22. (Abstract).
- 見里朝正(1971): これからの無公害農業。化学, 26: 1111~1117.
- 農林省農林経済局統計調査部編(1970): 第46次農林省統計表, 昭和44~45年。東京, 農林統計協会, p.83.

(1972年1月13日 受 領)

## 図 版 説 明

### 図版 I 供試ダイコン品種の外部形態

1: 時無, 2: 都西, 3: 陽春, 4: 大蔵, 5: 美濃早生, 6: 阿波晩生, 7: 白首宮重, 8: 青首宮重, 9: 皿冠(9月下旬播種, 12月上旬採取のもの)。

### 図版 II 抵抗性品種(時無)および罹病性品種(白首宮重)ダイコン根切片におけるべと病菌菌糸と木化細胞壁の相互存在位置の顕微鏡写真

1, 2: 時無ダイコン, 3, 4: 白首宮重ダイコン。矢印は木化細胞壁を示す。2では木化細胞壁につきあつた菌糸がみられる。各写真上部が接種面。

### 図版 III (A) べと病菌感染に伴なう時無(R) および白首宮重(S) 両ダイコン根切片での侵害菌糸と木化細胞壁の位置変化模型図

Cは切断のみの無接種区, 切片2個を用いておのおの3か所からスライスを作り, 1スライスの2視野を銃鏡してえられた平均値。破線は生成木化細胞壁, 太い実線と矢印は侵害菌糸の位置を示す。横数字は接種後日数。

### 図版 III (B) 時無(R) および白首宮重(S) 両ダイコン根切片へのL-フェニールアラニン添加によるべと病菌菌糸の侵害度と生成木化細胞壁の位置変化模型図

C: 切断, MS: 0.3M  $\text{Li}_2\text{S}_2\text{O}_8$  糖真空浸透, MS+P: 0.3M  $\text{Li}_2\text{S}_2\text{O}_8$  糖と500ppm L-フェニールアラニン真空浸透, N: 無接種区, I: 接種区, 切断あるいは薬剤処理後3日間温室に保ちその後病原菌を接種。接種後4日目の材料, 測定条件は図版III(A)の説明に同じ。破線は生成木化細胞壁, 太い実線と矢印は侵害菌糸の位置を示す。

图版 I

