

稲小粒菌核病と稲線虫心枯病との関係並びに線虫被害稲の呼吸，酵素活性について

野中，福次
九州大学農学部植物病理学教室

<https://doi.org/10.15017/21472>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 17 (1), pp.1-8, 1959-03. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

稻小粒菌核病と稻線虫心枯病との関係並びに 線虫被害稻の呼吸, 酵素活性について^{1,2)}

野 中 福 次

On the relation between the stem rot caused by *Leptosphaeria salvinii* and the rice nematode disease "white tip", and on the changes of the respiration rate and activities of respiratory enzymes of the "white tip" plants

Fukuji Nonaka

I. 緒 言

稻線虫心枯病被害稻は健全稻に比べて葉緑素含量が多く、熟期が非常におくれ、上位より数えて3~5節から高位分けつを起す等の異状生育を示すことを吉井は認めた。¹⁰⁾ 西沢はこのような稻線虫心枯病罹病水稻について稻小粒菌核病の被害度を調査し、線虫罹病稻は菌核病の被害度が少ないという結果を得た。⁷⁾ 著者は稻小粒菌核病と他の水稻病害との関係について一連の実験を行つて来たが、^{8,11)} 本実験では先に西沢が行つた稻線虫心枯病罹病水稻と稻小粒菌核病被害度との関係を再検討し、更にその被害度に及ぼす要因を生化学面から究明するために、線虫罹病稻の呼吸、酵素活性について測定した。

II. 実験材料及び方法

1. 供試水稻：1/1,800反コンクリート槽に、5月23日播種した水稻品種九大旭（前年度稻線虫心枯病被害稻より採取したもの）を6月24日に移植した。対照稻として前記種子粒を冷水温湯処理^{17,18)}（冷水に24時間浸漬した後、予浸を48°Cで1~2分行い、次いで52°C10分浸漬処理）を行つた後に、同様に播種栽培した。施肥量は各槽当り、硫安50g、過石30g、硫加10gを元肥として、又追肥に硫安20gをそれぞれ施用した。

2. 稻小粒菌核病菌の接種：稻わら培養の稻小球菌核病菌 *Leptosphaeria salvinii* の菌核を、7月26日及び8月9日に浮游接種した。

3. 水稻の生育調査：8月1日（伸長生長期）及び9月3日（穂孕期）に草丈、分けつ、茎数の調査を行つた。

1) 九州大学農学部植物病理学教室業績。

2) 本実験を行うに当り、御指導賜つた吉井南教授に深謝の意を表す。

4. 稲葉剪除処理：9月13日（出穂期）に、試験区の一部水稻について止葉を残し、他の全葉身を剪除した。

5. 稲小粒菌核病被害度の調査：9月3日に葉鞘侵入率を、10月20日に被害度の調査を、それぞれ行つた。

6. 呼吸及び酵素活性の測定：呼吸及び酵素活性の測定は polyphenol oxidase を除き、すべて10月30日に、測定はすべて Warburg 検圧計を用い、^{4,18,21} 温度 30°C で行つた。測定の概要は次の通りである。

呼吸作用：小球菌核病の発生する部位である水稻茎基部の稈（地上基部 15 cm）を 5 mm 間隔に切り、この 0.7 g を、phosphate buffer (pH 6.05) 2.0 cc, glucose (1.0%) 1.0 cc, KOH (20%) 0.3 cc を入れたゲフェーズ中で、 Q_{O_2} , Q_{CO_2} , RQ 及び KCN による阻害率をそれぞれ測定した。Polyphenol oxidase：茎葉（後述）を phosphate buffer (pH 7.3) と磨碎し、布で濾過、濾液を生重の 10~20 倍とし、これを酵素液とした。基質は 1/20 M catechol 又は p-phenylenediamine を用い、1 時間当りの O_2 吸収量を以て酵素活性とした。Ascorbic acid oxidase：同上稈基部 1 g に Mc Ilvaine phosphate-citric acid buffer (pH 5.7) を加えて磨碎し、濾過後 20 倍液を酵素液とした。測定の組成は、酵素液 3.0 cc, ascorbic acid (0.5%) 0.5 cc, gelatin (0.5%) 0.5 cc として測定した。Cytochrome c oxidase：同じ材料を phosphate buffer (pH 7.0) と磨碎し、濾過し、20 倍液を酵素液とした。測定の組成は、酵素液 3.0 cc, 0.5% cytochrome c (英国 Light 社製) 0.1 cc, hydrochinone (1/20 M) 0.5 cc, H_2O 0.4 cc として測定。Catalase：同一材料に phosphate buffer (pH 7.3) を添加、磨碎し、濾液を生重の 200 倍液として酵素液とした。この 3.0 cc を基質 H_2O_2 (0.057 M) 0.5 cc に作用させて生成される O_2 量を測定した。Peroxidase：同一材料 1 g を蒸留水と共に磨碎し、濾液を 20 倍液とし、これを酵素液とした。測定は Ettori の方法により、pyrogallol が peroxidase の作用により酸化され ($2C_6H_6O_3 + 3H_2O_2 = C_{11}H_8O_5 + 5H_2O + CO_2$)、この時生成される CO_2 の量を測定した。測定の組成は pyrogallol (0.5%) 0.3 cc, phosphate buffer (pH 6.05) 0.7 cc, H_2O_2 (0.01 M) 3.0 cc, 酵素液 0.5 cc として測定した。

III. 実 験 結 果

1. 稲線虫心枯病被害稲の生育状態

線虫区水稻に於て、7月25日（仲長生長期）に線虫被害の病徴である葉先白枯葉の発生を認め、それ以後生育の進むにつれて、この病徴は次第に激しくなつた。第1表に示すよ

第 1 表. 稲線虫心枯病被害水稻の生育度。

	草 丈		分けつ数(1株当り)	
	8月1日	9月3日	9月3日(A) ¹⁾	9月3日(B)
健全水稻	92.8 ¹⁾ (cm)	128.1	14.9(本)	14.0
線虫水稻	87.0	117.4	19.8	20.6

1) 数値はいずれも 14 株 についての平均値。

2) (A) は 小球菌無接種区, (B) は 同菌接種区。

うに、病徴発現後線虫被害稻は、健全水稻に比べて草丈がやや劣るが、1株当りの分けつ数は、線虫被害稻の方が多く、外観は緑色に富み、粗剛な様相を呈した。

2. 稻小粒菌核病菌の侵入及び被害度

稻小粒菌核病菌の葉鞘侵入率は第2表に示す通り、全侵入率、軽度侵入率、激度侵入率ともに、線虫心枯病罹病稻が健全水稻より少い傾向を示した。収穫時の菌核被害度に於ても第3表に示す通り、線虫罹病稻の被害度が少く、1%水準で有意差が見られた。これら水稻の出穂期に稲葉剪除を行った場合の菌核被害度は、第4表に示すようにその被害度は増大し、両者間に統計処理では有意差は見られないが、線虫罹病稻の方が逆に菌核被害度の増加する傾向を示した。

第2表. 稻線虫心枯病被害水稻の葉鞘に於ける菌核侵入率。

	調査葉数	侵入率率(%)	軽度侵入率 ¹⁾	激度侵入率 ²⁾
健全水稻	98	85.7	67.3	18.4
線虫水稻	144	75.0	62.5	12.5

1) 第5葉鞘に小病斑を認めるもの。

2) 第5葉鞘に大病斑を認めるが、第4葉鞘に病斑を認めるもの。

第3表. 稻線虫心枯病罹病水稻に於ける稻小粒菌核病被害度(稲葉非剪除区)。

	1	2	3	4	5	6	計
健全水稻	66.9	47.6	75.2	65.0	54.0	58.2	366.9
線虫水稻	21.4	15.3	21.4	19.4	22.0	25.2	124.7

[D] $\geq 145.7^{**}$

第4表. 稻線虫心枯病罹病水稻に於ける稻小粒菌核病被害度(稲葉剪除区)。

	1	2	3	4	5	6	計
健全水稻	73.0	70.0	85.7	95.0	73.6	76.3	413.6
線虫水稻	71.1	59.5	120.8	84.6	113.3	103.5	552.8

3. 健病水稻の酸化酵素について

健全及び線虫罹病水稻葉身について、酸化酵素の活性を i) 各種基質を用い、ii) 葉位別について、iii) 阻害剤の影響について、測定した。

i. 各種 polyphenol を基質とした場合の酵素活性。

基質として catechol, hydrochinone, resorcin, pyrogallol, gallic acid, protocatechuic acid, ascorbic acid, phloroglucine の8種を用いた。その結果は第5表に示す通りである。二価の phenol である catechol, hydrochinone 及び resorcin に対しては、本酵素は hydrochinone をよく酸化し(laccase)、次いで catechol をかなり酸化し(tyrosinase)、resorcin を全く酸化しない。三価の phenol である pyrogallol, phloroglucine も非常によく酸化する。又 gallic acid は酸化するが, protocatechuic acid は全く酸化しない。一方酵素液中には ascorbic acid を非常によく酸化する酵素の存在

第 5 表. 各種基質に対する健病水稻葉の酸化酵素活性 (その 1).¹⁾

		Catechol	Hydrochinone	Resorcin	Pyrogallol	Gallic acid	Protocatechuic acid	Ascorbic acid	Phloroglucine
健全水稻	実測値 ²⁾	31.7	56.4	0	199.7	83.4	0	521.0	677.8
	比較値 ³⁾	100	177	0	620	263	0	1,643	2,138
線虫水稻	実測値	31.1	68.5	0	160.9	86.5	0	543.5	693.1
	比較値	100	218	0	517	278	0	1,747	2,228

1) 酵素液は 第 2 葉身の生重 20 倍液とし, この 3cc を供試, 基質濃度 1/20 M, 測定 8 月 26 日.

2) 数値は O₂ 吸収 μ /hr.

3) 基質 catechol の実測値を 100 とした場合の各基質に於ける比較値.

が認められる. 以上のような本酵素液の酸化能力から, 本酵素液中には tyrosinase, laccase, 及び ascorbic acid oxidase の存在することが推測出来る.

次に本酵素液中の tyrosinase 作用と, laccase 作用の活性を比較するために, 基質として catechol と p-phenyldiamine (基質に対する特異性として tyrosinase は catechol のみを, laccase は p-phenyldiamine, hydrochinone をよく酸化する) を用いて測

第 6 表. 各種基質に対する健病水稻葉の酸化酵素活性 (その 2).¹⁾

	Catechol	p-Phenylendiamine
健全水稻	7.2 ²⁾	32.0
線虫水稻	26.6	38.9

1) 酵素液の調整は第 5 表に同じ, 測定 9 月 18 日.

2) 数値は O₂ 吸収 μ /hr.

定を行つた. その結果は第 6 表に示すように, 線虫水稻の方が大きい値を示したが, 基質間に於ては健病葉ともに p-phenyldiamine に対する酸化力が大きかつた. 又第 5 表から判るように, hydrochinone をよく酸化することからも, 本酵素液は tyrosinase 作用より laccase 作用の大きいことを示すようである. しかし, ascorbic acid oxidase の活性に比べれば, 二者とも非常に劣つている.

ii. 葉位別の polyphenol oxidase 活性

8 月 30 日 (穂孕期) に上位より第 2 葉, 第 3 葉, 第 4 葉, 第 5 葉, 第 6 葉について, それぞれの 20 倍液を作り, その 3cc について, 基質を catechol (1/20M) 0.5 cc として測定した. その結果は第 7 表に示す通りである. 葉位別の活性については, 全酵素吸収量を

第 7 表. 健病稲葉位別の polyphenol oxidase 活性.

	全酵素吸収量					Catechol の酸化に消費された酸素量					自動酸化 (酵素自体の酸化量)				
	2葉	3葉	4葉	5葉	6葉	2葉	3葉	4葉	5葉	6葉	2葉	3葉	4葉	5葉	6葉
健全水稻	15.8 ¹⁾	18.2	...	32.6	44.8	3.4	9.8	17.6	12.4	22.8	27.2
線虫水稻	23.4	26.2	29.2	40.4	46.8	6.8	0	11.6	19.4	4.4	16.6	26.2	17.6	21.0	42.4

1) 数値は O₂ 吸収 μ /hr.

見た場合、下位葉程大きい。然しこの中には基質として catechol を添加しない場合の酸素吸収量即ち、酵素液自体の酸素吸収も含まれており、その量が過半数を占める。従つて catechol の酸化に消費された酸素量 (polyphenol oxidase の活性) は比較的少い。然しこの場合も全般的に線虫被害稻の活性が高い傾向を示した。

iii. Polyphenol oxidase の阻害作用

Polyphenol oxidase の阻害剤として Na-diethyldithiocarbamate (DIECA), 及び p-nitrophenol の 10^{-2} , 10^{-3} M 液を用いて阻害率を測定した。測定結果は第 8 表に示す通りである。DIECA では 10^{-3} M で 20% 前後, 10^{-2} M で 50% 以上の阻害を見るのに

第 8 表. 健病水稻の polyphenol oxidase 阻害率.

	酸素吸収量	阻 害 率 (%)			
		DIECA		p-Nitrophenol	
		10^{-3} M	10^{-2} M	10^{-3} M	10^{-2} M
健全水稻	43.4 ¹⁾	20.1 ²⁾	54.3	0	28.3
線虫水稻	49.2	14.7	62.6	0	23.6

1) O_2 吸収量 $\mu l/hr.$ 2) 阻害率 (%).

対し, p-nitrophenol では 10^{-3} M で阻害は全く見られず, 10^{-2} M で 20~30% の阻害をうける。DIECA による阻害率が p-nitrophenol のそれより大きいことは, laccase 作用の大きいことを示すように思われる。

4. 健病水稻莖基部の呼吸及び酵素活性

健全水稻及び線虫罹病水稻の稈茎基部について、その呼吸及び酵素活性を測定した。実験の方法はすでに述べた通りである。

i. 呼吸作用

実験結果は第 9 表に示す通りである。酸素吸収量、炭酸ガス排出量ともに、線虫罹病水稻が大きい。RQ は両区とも 1 より大きい値を示すが、両者間の差異は見られない。KCN による阻害率は線虫心枯病稻がやや高い。

第 9 表. 健病水稻基部の呼吸量及び阻害率.

	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	RQ	KCN 10^{-2} M 阻害	
				Q_{O_2}	阻害率(%)
健全水稻	76.0 ¹⁾	113.0	1.48	44.8	41.1
線虫水稻	97.6	138.4	1.41	42.6	56.4

1) O_2 吸収 又は CO_2 排出量 $\mu l/hr.$

ii. 酵素活性

酸化酵素 polyphenol oxidase, ascorbic acid oxidase, cytochrome c oxidase, のいずれも線虫罹病稻に多く、特に ascorbic acid oxidase では健全水稻の 2 倍以上の活性を有している。又 respiratory enzymes としての catalase, peroxidase に於てもこの傾向が認められた。

第10表. 健病水稲基部の酵素活性

	Polyphenol ¹⁾ oxidase	Ascorbic acid oxidase	Cytochrome C oxidase	Catalase	Peroxidase
健全水稲	14.5 ²⁾	58.6	51.6	116.1	104.2
線虫水稲	26.5	128.6	73.0	140.0	112.0

1) 基質は 1/20 M p-phenyldiamine.

2) 数値は O₂ 吸収 又は CO₂ 排出量 μ l/hr.

IV. 考 察

稲線虫心枯病被害水稲は二次的に高位節より分けつを起し、健全水稲に比べ葉緑素含量が2~3倍も多く、熟期が非常におくれることを吉井は報告し、¹⁹⁾ 著者の本実験に於ける生育調査では、線虫水稲は草丈はやや低いが1株当りの分けつ数が多く、外観上粗剛な様相を呈することを認めた。このような線虫被害水稲に、稲小球菌核病菌を接種した場合、健全水稲に比べて菌の葉鞘侵入が少く、収穫時の菌核病被害度が非常に減少する結果を得た。これは西沢の得た結果⁷⁾と同様である。著者は先に水稲の熟度が小粒菌核病被害度と密接な関係を有し、熟度が進むと本病の被害が激増することを明らかにしたが、¹²⁾ 吉井も認めているように、線虫被害水稲の熟期がおくれることが本病の被害度を軽減せしめる大きな原因と思われる。出穂期に稲葉剪除を行えば、菌核病の被害度が非常に増大することは度々報告したが、^{5,8,10)} 線虫罹病水稲について同処理を行つた場合も、被害度は激増し、健全水稲について剪除を行つた場合よりもやや被害度の増大する傾向さえ示した。

上述のように線虫被害水稲の稈が収穫時まで緑色に富み、活潑な生育を続けていることは、小粒菌核病の被害度を軽減せしめる大きな原因と考えられるが、これを水稲の代謝活性の面から明らかにするために、健病水稲の呼吸及び酵素活性について調べた。先ず健病水稲葉身の酸化酵素の測定を行つた。本酵素液は複合酵素液として多くの酸化酵素を含んでいられると思われ、基質として各種の polyphenol を用いた場合、本酵素液が catechol よりも hydroquinone や p-phenyldiamine をよく酸化し、protocatechuic acid を酸化し得ないことから、tyrosinase 作用よりも laccase 作用の強いことが考えられる。⁹⁾ このことは阻害剤による試験で、DIECA による阻害率が p-nitrophenol のそれよりも大きいことから推察される。葉位別の活性については下葉の方がその作用の大きい傾向を示した。宇佐美は小麦の幼苗で、生育の進むにつれて terminal oxidase は銅酵素主体から cytochrome 系(鉄ポルフィリン系)の酵素主体に移ることを明らかにしたが、¹⁵⁾ 水稲の葉位(老若)によつては量的のみでなく、質的な酵素の転換も行われることが考えられるので、更に各酵素について検討をこころみることが必要のようである。然し、これらの polyphenol oxidase の活性は ascorbic acid oxidase の活性に比べると非常に弱い。次に水稲の黄熟期(10月18日)に稈の呼吸及び酵素活性を測定した。その結果、呼吸量(Q_{O₂}, Q_{CO₂})、酸化酵素(polyphenol oxidase, ascorbic acid oxidase, cytochrome c oxidase)及び植物の呼吸と密接な関係を持つと考えられている catalase, peroxidase⁶⁾ のいずれも、線虫被害水稲の方が大であることが判つた。馬場は水稲の赤枯病に関する栄養生理の研究に於て、赤枯病が発生するときは cytochrome c oxidase, ascorbic acid oxidase の

作用が低下することを報告し、²⁾ 吉井(啓)は稻萎縮病罹病稻の示す分けつ及び緑色度の増加は、稻が旺盛な栄養生長を行つていることを示し、特に ascorbic acid oxidase 活性の高いことをあげ、terminal oxidase の1つとなり得る可能性を強調した。²⁰⁾ 稻の terminal oxidase としては、鉄ポルフィリン系酵素として cytochrome c oxidase, 銅酵素として ascorbic acid oxidase 及び polyphenol oxidase が考えられている。本実験の結果からみると、ascorbic acid oxidase の活性が線虫水稻に於て、健全水稻より2倍以上もあり、cytochrome c oxidase の活性も大きい。Oxidative phosphorylation と結びついた代謝系列と考えられている cytochrome c oxidase, ascorbic acid oxidase の活性が大きいことから、線虫水稻が収穫時に近づくもなお健全稻に比べて一層旺盛な生育を営んでいることが予想される。Polyphenol oxidase についても同様な傾向が見られたが、その活性は前二者に比べて弱く、その代謝に関与する機作については更に検討を要する。以上のように稻線虫被害稻が健全稻に比べて成熟期までなお旺盛な代謝を行つているのは、病原線虫の寄生によつて誘起されたものであると考えられ、これが如何なる物質又は機作によるかは今後に残された興味ある問題である。

V. 摘 要

1. 線虫心枯病被害稻は健全水稻より、稻小球菌核病に冒され難く、菌核病の被害度が小さい。
2. 線虫心枯病被害稻は健全稻に比べ、呼吸作用及び呼吸に関与する諸酵素即ち、polyphenol oxidase, ascorbic acid oxidase, cytochrome c oxidase, catalase, 及び peroxidase の活性がいずれも大である。
3. 水稻の polyphenol oxidase の中、laccase 作用が tyrosinase 作用より大きく、又下葉の活性がやや強い傾向を示した。
4. 線虫心枯病被害稻が稻小球菌核病に冒され難いのは、線虫心枯病被害稻の組織が線虫寄生による誘発の結果、収穫期直前までなお旺盛な代謝を行つていからであると結論した。

文 献

1. 赤瀬四郎瀧, 1956. 酵素研究法(2), 朝倉書店.
2. 馬場 越・高橋保夫・稲田勝美, 1958. 日作紀, 26(3): 190~192.
3. Bonner, J., 1952. Plant Biochemistry, Academic Press.
4. 藤田秋治, 1949. 検出法と其応用, 岩波書店.
5. James, W. O. and Cragy, J. M. 1941. Nature, 148: 726.
6. Lardy, H. A. 1950. Respiratory Enzymes, Burgess Pub. Comp.
7. 西沢正洋, 1953. 日植病報, 17(3~4): 137~140.
8. 野中福次, 1955. 九大農学芸誌, 15(1): 7~14.
9. 野中福次, 1955. 農及園, 30(1): 71~72.
10. 野中福次, 1956. 九大農学芸誌, 15(4): 431~435.
11. 野中福次, 1957. 日植病報, 22(4~5): 265~267.

12. 野中福次, 1958. 九大農学芸誌, 16(3): 439~445.
13. 関根等編, 1955. 続ワールブルグ検圧計, 南江堂.
14. Sumner, J. B. and Somer. G. P., 1947. Chemistry and methods of enzymes, Academic Press.
15. 宇佐美正一郎, 1954. 自然, 9(11): 46~53.
16. Umbreit, W. W., Burris, R. H. and Stanffer, J. F., 1951. Manometric techniques and tissue metabolism, Burgess.
17. Yoshii, H. and Yamamoto, S., 1950. Jour. Fac. Agr. Kyushu Univ., 9: 293~310.
18. 吉井 甫・山本重雄, 1951. 九大農学芸誌, 12(2): 123~131.
19. 吉井 甫, 1951. 九大農学芸誌, 12(2): 133~141.
20. 吉井 啓, 1958. ウイルス, 8(5): 394~405.
21. 吉川等編, 1954. ワールブルグ検圧計, 南江堂.

R é s u m é

The severity of rice stem rot (*Leptosphaeria salvinii*) was decreased when the plant had been affected with "white tip", the rice nematode disease caused by *Aphelenchoides besseyi*.

Both respiration rate and activity of respiratory enzymes (ascorbic acid oxidase, cytochrome c oxidase, polyphenol oxidase, catalase, and peroxidase) of rice plant were found to be promoted when the latter was affected by the white tip disease. When compared the activities of the two polyphenol oxidases of leaves it was found that laccase activity was stronger than that of tyrosinase, and the polyphenol oxidase activity of lower leaf of a plant was stronger than that of the upper.

Considering the results¹²⁾ that the severity of the stem rot was increased with the advance of the ripening of rice plants, it was concluded that the resistance against the stem rot of the white tip diseased plant was caused by the vigorous metabolism of the rice stem tissue, induced by the nematode invaded, during the season from tillering till harvest time.

Laboratory of Plant Pathology,
Faculty of Agriculture,
Kyushu University