

Verticillium albo-atrum
(アルファルファ系) 培養濾液中の萎凋画分

小池正徳・南部耕平・嶋田 徹 (帯広畜産大学)

Wilting fractions of *Verticillium albo-atrum* (Alfalfa strain)
culture filtrate

Masanori KOIKE, Kouhei NANBU and Tohru SHIMADA
Obihiro Univ. of Agric. & Vet. Med.

緒 言

細胞選抜によってアルファルファ・バーティシリウム萎ちょう病抵抗性個体を作成する試みは杉信ら^{1,2)}、Latunede-Dadaら³⁾、Gusevaら⁴⁾ およびKoike & Shimada⁵⁾ によりなされている。杉信らとGusevaらは選抜因子として *Verticillium* 粗培養濾液を用いて、細胞選抜は効果的であると報告しているが、Koike & Shimadaは粗培養濾液、Latunede-Dadaらは低分子画分の毒素を用いて選抜し否定的な結果を報告している。したがって、本病害に対する細胞選抜の効果については、結論が得られていない。そこで、今回は特に細胞選抜に用いる選抜因子としての毒素を探索する目的で、培養濾液を低分子画分から順次透析し、各画分の植物体の萎凋程度を調査した。

材料及び方法

植 物=アルファルファ4品種(5444・Vertus:バーティシリウム萎ちょう病抵抗性、Thor・Europe:感受性)をそれぞれ20個体用いた(ガラス室栽培)。

病 原 菌=*Verticillium albo-atrum* アルファルファ系(北海道農業試験場耐病性研究室・佐藤倫造氏より分譲)をCzapek-Dox 液体培地で3週間培養し、培養濾液を無菌濾過により得た。

透 析=スペクトラム社の透析チューブ(分画分子量 3,500、12-14,000、50,000)で、培養濾液を低分子画分から順次透析した。透析は内液の20倍量の滅菌蒸留水に対して5℃で24時間行った。また透析後の外液は減圧下30℃で濃縮し、内液と同量になるように調整した。透析後の各分画中の糖含量(グルコース当量)はアントロン法、蛋白質含量(アルブミン当量)はLowry法で求めた。

切り枝検定=培養濾液および各画分を蒸留水で20倍に希釈し、各個体の茎を希釈液に72時間水挿しして抵抗性を検定した。抵抗性の判定は北農試耐病性研究室の基準に準じ、0:萎凋なし~5:回復不能の6段階で行った。

結果及び考察

Fig.1にThor(S)とVertus(R)を用いて培養濾液の高分子画分(12-14,000以上)と低分子画分(12-14,000以下)を処理した時の萎凋程度を示した。低分子画分の萎凋程度はThor, Vertusともに低い値を示したが、高分子画分の萎凋程度はThorでは高い値を示し、Vertusでは低い値を示した。

このことから品種特異的な萎凋活性を持つ物質は高分子画分中に存在することが示唆された。

さらに詳しく検討するため、培養濾液を 3,500 以下、3,500~12-14,000、12-14,000~50,000、および 50,000 以上の 4 つの画分に細分画し、4 品種を用いて萎凋程度を調査した (Fig. 2)。抵抗性品種 (Vertus, 5444) においては、培養濾液全画分を含めたすべての画分において萎凋程度は 1.0 以下であったのに対し、感受性品種 (Thor, Europe) においては、3,500~12-14,000、12-14,000~50,000、および 50,000 以上の

3 つの画分において萎凋活性が認められ、なおかつそれぞれの萎凋活性は感受性品種において高い値であった。これらのことから 3,500 以上の 3 つの画分に存在する萎凋活性を持つ物質には品種特異的な作用があると思われる。しかし、培養濾液全画分を凌駕する画分は存在しなかった。

次に、それぞれの画分に熱処理 (100℃、10 min) を施し、熱耐性を調査した。その結果、品種特異的な反応を示した 3,500 以上の 3 つの画分の萎凋活性は減少した (Fig. 3)。それは 3,500 - 12-14,000 の画分において顕著であった (Table 1)。Verticillium 属菌の産出する毒素は低分子化合物^{6, 7, 8}、高分子の多糖類あるいは糖蛋白質^{9, 10}の報告がある。しかし多犯性である本病原菌の特性によるのかもしれないが、いまだ宿主特異的毒素の同定には至っていない。Connel⁸は

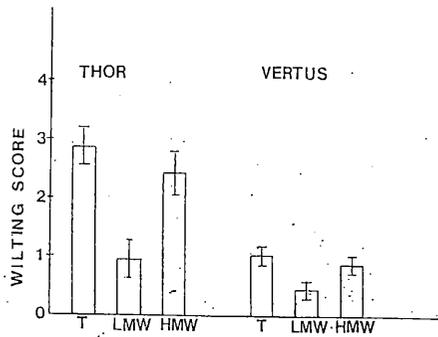


Fig. 1 Wilting activities of *Verticillium* culture filtrate and fractions of different molecular weight (T: Total culture filtrate, LMW: low molecular weight fraction < 12-14,000, HMW: high molecular weight fraction)

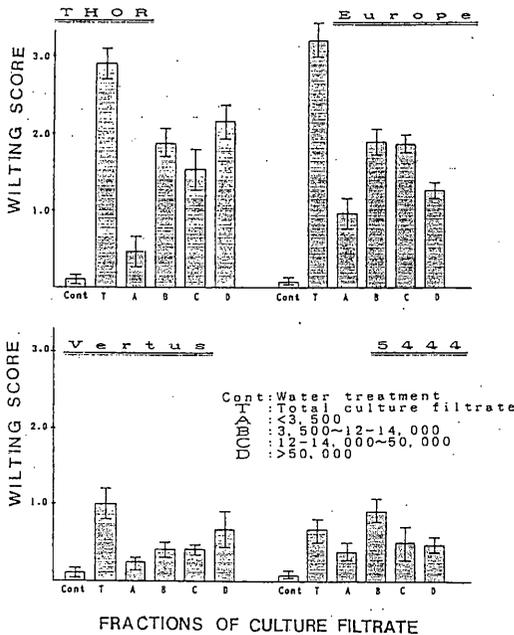


Fig. 2 Wilting activities of *Verticillium* culture filtrate and fractions of different molecular weight

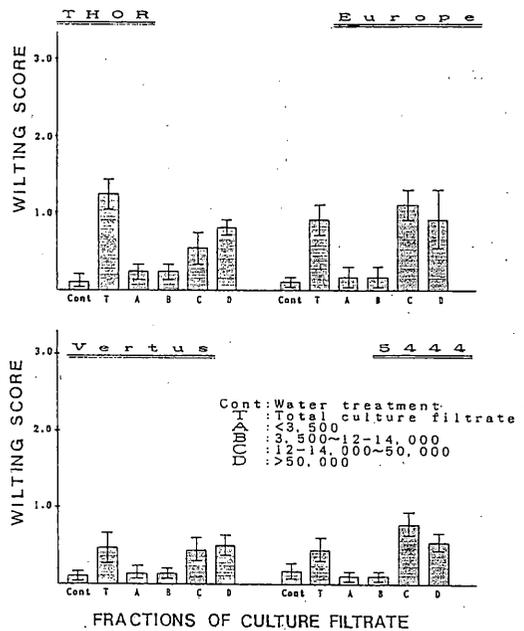


Fig. 3 Wilting activities of *Verticillium* culture filtrate and fractions of different molecular weight (Heat treatment 100℃ 10 min)

Table 1 Wilting activity of *Verticillium albo-atrum* culture filtrate and fractions of different molecular weight

Fraction M. W.	Glucose equiv. ($\mu\text{g}/\text{m}\ell$)	Proteins ($\mu\text{g}/\text{m}\ell$)	Wilting(%) ^a activity	Wilt.act. ^b (heat) ^o
>50,000	87.7	175.6	1.14(59.1)	0.63(32.6)
12-14,000 ~50,000	45.1	72.2	1.04(53.9)	0.71(36.8)
3,500 ~12-14,000	95.1	106.7	1.29(66.8)	0.18(9.3)
<3,500	492.3	338.6	0.53(27.5)	0.69(35.8)
Total culture filtrate	778.7	448.3	1.93(100.0)	0.74(38.3)

a: percent of non-heat treatment Total culture filtrate.

b:100°C 10 min

ホップ-*Verticillium*の関係において、細胞レベルではあるけれども5,000以下の画分に品種抵抗性と一致した毒性があったと報告しており、今回の報告と異なった結果を得ている。今回の実験では植物体レベルでの毒性しか検討していないので、今後細胞レベルでの各画分の毒性について検討していきたい。

Summary

Verticillium albo-atrum culture filtrate was fractionated by dialysis (3,500, 12/14,000, 50,000). Wilting activity of each fraction was assayed by using four alfalfa cultivars (resistant cvs 5444, Vertus / susceptible cvs Europe, Thor). High molecular weight fractions (3,500-12/14,000, 12/14,000-50,000, >50,000) had cultivar specific wilting activity and their activities were heat reliable.

引用文献

- 1) 杉信賢・島貫忠幸・高溝 正・大杉 立(1988)日草誌 34(別):63-64.
- 2) 杉信賢・島貫忠幸・高溝 正・大杉 立(1989)日草誌 35(別):283-284.
- 3) Latunede-Dada, A.O. (1988) Plant Science 58:111-119.
- 4) Guseva N.N., Belyavsky Yu.V. (1990) 5th International *Verticillium* Symposium:71(abstract).
- 5) Koike M., T. Shimada (submitted).
- 6) L.N. Ten, N. N. Stepanichenko, Kh. A. Aslanov (1990) 5th International. *Verticillium* Symposium:58(abstract).
- 7) 北農試牧草病害研究室(1988)アルファルファ・パーティシリウム萎ちょう病の発生生態と防除に関する試験成績書.
- 8) Connel S. A., T. Legg, J. B. Heale (1990) Plant Pathol. 39:92-91.
- 9) Nachimias A., Buchner V. Krikun J. (1982) Physiol. Plant Path. 20:213-221.
- 10) Nachimias A., Buchner V. Burnstein Y. (1985) Physiol. Plant Path. 26:43-55.