

バーティシリウム萎ちょう病菌の培養濾液に対する アルファルファプロトプラストの反応

知野三加子・小池正徳・嶋田 徹 (帯広畜産大学)

Reactions of alfalfa protoplasts to culture
filtrates of *Verticillium albo-atrum*

Mikako CHINO, Masanori KOIKE and Tohru SHIMADA
(Obihiro Univ. 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出する誠みはいくつか報告されている^{1,2,3,4})。杉信らとFrame *et al* は選抜因子として *Verticillium albo-atrum* 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 *et al* は粗培養濾液、Latunde-Dada & Lucas は低分子画分の毒素を用いて選抜し否定的な効果を報告している。したがって、菌培養濾液や毒素を用いた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、今回は細胞選抜に用いる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、各画分に対するアルファルファプロトプラストの反応について調査した。

材料および方法

(植物)

供試植物はアルファルファで、品種 Vertus の抵抗性個体および品種 Thor の感受性個体を用いた。温室内で栽培されたそれぞれの個体の未展開葉を、SH培地 (2, 4-D 2 mg/l, NAA 2 mg/l, Kinetin 2 mg/l) 上に置床、25℃、暗所でカルスを誘導し、誘導1ヶ月後のカルスを使用した。カルスを酵素液 (セルラーゼオノズカRS 2.0%, ドリセラゼ 1.0%, ペクトリアーゼ Y23 0.1%, マニトール13%, pH 5.8) に漬け、常法によりプロトプラストを単離した。

(病原菌)

Verticillium albo-atrum Reinke *et* Bert. アルファルファ分離株 (北農試・耐病性研究室・佐藤倫造氏より分譲) を Czapek-Dox 液体培地で4週間培養し、培養濾液を濾過滅菌し、以下の実験に供試した。

(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) で培養濾液低分子画分から順次透析した。透析は内液の20培量の滅菌蒸留水に対して5℃で16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。

(プロトプラストの生存率および密度の測定)

各画分を20%の濃度でCPW溶液に加え、プロトプラストに処理した。12時間後にエバンスブル

一染色によって死プロトプラスト率を、トーマの血球計算盤によってプロトプラスト密度を測定した。測定は100個前後のプロトプラストを5反復、繰り返しは3回行った。

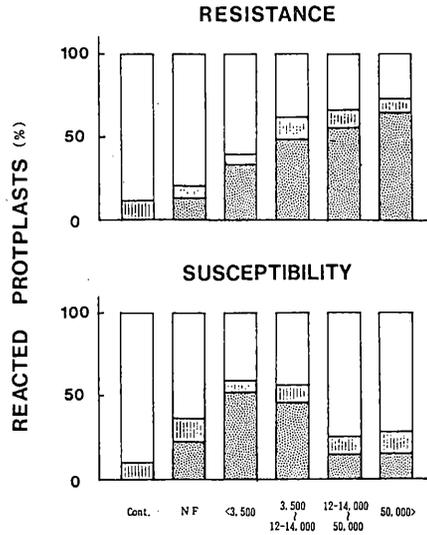


Fig. 1 Percentages of reacted alfalfa protoplasts to *Verticillium albo-atrum* culture filtrates fractionized by dialyses. □ : not affected, ▨ : death, ▩ : collapse. Incubated for 12 hours.

NF:non-fractionized

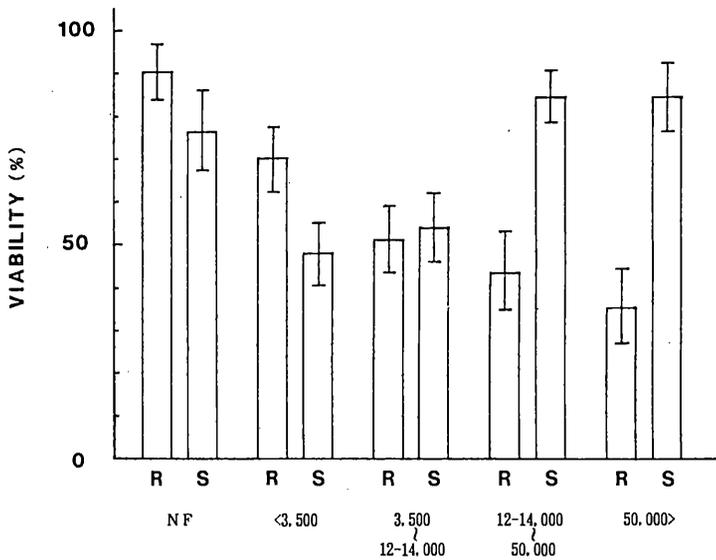


Fig. 2 Percentages of alfalfa protoplast viabilities to *Verticillium albo-atrum* culture filtrates fractionized by dialyses

NF:non-fractionized.

結 果

Fig.1に感受性個体(Thor)、抵抗性個体(Vertus)由来のプロトプラストを用いて、4つの分画に細分画した培養濾液を処理した時の反応プロトプラスト率を示した。分画分子量3,500以下の低分子画分において、感受性個体の反応プロトプラスト率(59.1%)が抵抗性個体のそれ(39.3%)に比べ高い値を示した。それとは逆に、12-14,000から50,000、50,000以上の2つの高分子画分では、抵抗性個体の反応プロトプラスト率(それぞれ66.3%、72.8%)が感受性個体のそれら(それぞれ26.0%、29.4%)に比べ高い反応率を示した。

次に、プロトプラストの生存率についてのみのグラフを示した(Fig.2)。3,500以下の低分子画分では感受性個体の生存率(48.0%)が抵抗性個体のそれ(70.0%)に比べ有意に低かった。それとは逆に12-14,000から50,000、50,000以上の2つの高分子画分において、抵抗性個体の生存率(それぞれ43.9%、35.6%)が感受性個体のそれら(それぞれ84.7%、84.3%)に比べ有意に低かった。また全画分および3,500から12-14,000の画分において抵抗性、感受性の生存率に有意な差は認められなかった。

考 察

本実験の結果により、*Verticillium albo-atrum* 培養濾液の分画分子量3,500以下、12,000-14,000から50,000および50,000以上の3つの画分に対するアルファルファプロトプラストの反応において、遺伝子型特異性が認められた。低分子画分(3,500以下)に対して感受性個体由来のプロトプラストが顕著に反応したことから、個体の抵抗性と一致したことは、品種特異的な毒素がこの画分に存在する事を示唆している。Connel et al⁵⁾は、細胞レベルにおけるホップ-*Verticillium albo-atrum* の関係について報告し、分画分子量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し、今回の報告と同様な結果を得ている。その他 *Verticillium* 属菌の産出する毒素は低分子化合物^{6,7)}。高分子の糖あるいは糖蛋白質の報告がある^{8,9)}。しかし多侵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。また高分子画分(12-14,000から50,000、50,000以上)に対して抵抗性プロトプラストが顕著に反応した。このことは、高分子画分に存在する菌代謝産物に対する速やかな反応(過敏反応)による結果と考えられ、それらの過敏反応を誘導する品種特異的な抵抗性誘導因子(エリシター)の存在を示唆している。

遺伝子型レベルで行った本実験では、分画分子量3,500以下の低分子画分に個体の抵抗性と一致する毒性が認められた。培養濾液全画分で各遺伝子型の反応に差が認められなかったのは、培養濾液中の低分子画分の毒素(感受性細胞に毒性)と高分子画分のエリシター(抵抗性細胞死)の作用が混合してしまったためと思われる。このことから、細胞選抜の因子としては培養濾液の全画分を用いるよりは高分子画分を除去した低分子を用いた方が効果的であると思われる。しかし、昨年度の小池らの報告では¹⁰⁾ 感受性品種の植物体を萎ちょうさせる毒素は高分子画分に存在しており、植物体レベルで行った今回の報告とは異なった結果であった。この点について、今後更に検討していきたい。

Summary

Alfalfa protoplast reaction to *Verticillium albo-atrum* culture filtrate which was fractionated by dialysis (MW 3,500, 12-14,000, 50,000) was assayed by using calli derived from two genotypes (resistant genotype cv. Vertus, susceptible cv. Thor). Protoplasts derived from a susceptible genotype reacted to a low molecular weight fraction (3,500) and those derived from a resistant genotype reacted to two high molecular weight fractions (12-14,000 ~ 50,000, > 50,000).

引用文献

- 1) 杉信賢・島貫忠幸・高溝 正・大杉 立 (1989)
日草誌 35 (別) : 283-284.
- 2) Frame, B., Kang-fu YU, B.R.Christie and K.P.Pauls (1991)
Physiological and Molecular Plant Pathology 39 : 325-340.
- 3) Latunde-Dada, A. O. (1988) Plant Science 58 : 111-119.
- 4) Koike M., Y. Yoshida, Y. Kagaya and T. Shimada (1991)
Plant Tissue Culture Letters 8 (3):152-157.
- 5) Connel S. A., T. Legg, J. B. Heale (1990) Plant Pathol. 39:92-101
- 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) Nachimias A., Buchner V. Krikun J. (1982)
Physiol. Plant Path. 20:213-221.
- 9) Nachimias A., Buchner V., Burnstein Y. (1985)
Physiol. Plant Path. 26:43-55.
- 10) 小池正徳・南部耕平・嶋田 徹 (1991) 北草研報 25 : 134-136