

Verticillium albo-atrum が アルファルファ培養細胞のPAL活性に及ぼす影響

南部 耕平・小池 正徳・嶋田 徹 (帯広畜大)

Responses of phenylalanine ammonia-lyase in suspension-cultured alfalfa cells to

Verticillium albo-atrum

Kouhei Nanbu, Masanori Koike and Tohru Simada

(Obihiro Univ. Agric & Vet. Med)

緒 言

植物が病原菌の感染を受けるとリグニン化、抗菌性物質(ファイトアレキシン)生成などさまざまな防御反応を誘導する。これらの防御反応を誘発する物質は、一般にエリシターと呼ばれ、病原菌の接触時に誘導される菌体細胞壁成分などが考えられている¹⁾²⁾。この抗菌生物質生成には、フェニルアラニンを出発物質とするフェニルプロパノイド生合成経路の多くの酵素が関与している。著者らは、アルファルファ培養細胞と *Verticillium albo-atrum* の相互関係の一連の実験において抵抗性品種由来カルスに *V. albo-atrum* 菌細胞壁成分を処理した時、フェニルプロパノイド生合成経路のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)が短期間のうちに特異的に誘導されることを確認し、それに伴い抗菌性物質が蓄積することをすでに報告した³⁾⁴⁾。

今回は、品種キタワカバ、バータスそれぞれの抵抗性、感受性個体から誘導した懸濁培養細胞系統に *Verticillium albo-atrum* の分生孢子、菌体細胞壁成分を処理し、それぞれの細胞系統におけるPAL活性の変動を比較した。

材料及び方法

〔植 物〕

アルファルファは、品種キタワカバ、バータスそれぞれの抵抗性、感受性個体を用い、未展開葉を殺菌後、SH寒天培地(2,4-D 2 mg/l, Kinetin 0.2 mg/l)上に置床、25°C、暗所でカルスを誘導した。

〔懸濁培養細胞の作出〕

カルス誘導した系統の *V. albo-atrum* に対する抵抗性の有無を確認するため菌体コロニーマツト接種試験⁵⁾を行い、その後、それぞれのカルス系統をSH液体培地に移植し、懸濁培養細胞を作出した。

〔病 原 菌〕

Verticillium albo-atrum アルファルファ分離株(北海道農業試験場・佐藤倫造氏より分譲)をCzapek-Dox液体培地で1週間培養し、その胞子を懸濁培養に 5×10^4 個/mlの濃度になるように接種した。

〔菌体細胞壁成分抽出〕

菌体細胞壁成分は、Buiattiらの方法⁶⁾を修正して抽出した。すなわち、菌体をホモジナイスし、その菌体懸濁液を超音波処理後、遠心分離し、その残差を洗浄後、15分間高圧滅菌して抽出

した³⁾。懸濁培養細胞への処理濃度は、グルコース等量 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ とした。

〔PAL活性測定〕

L-フェニルアラニンを基質として細胞抽出液1時間当りの桂皮酸生量を測定した⁴⁾。

結果及び考察

カルス誘導したキタワカバ、バークスそれぞれの抵抗性、感受性細胞系統における菌の生育度合をFig.1に示した。キタワカバ、バークスの抵抗性細胞系統において菌糸の生育抑制が認められた。また、これらの抵抗性系統では、菌接種2日目からか敏感反応と思われる褐変が認められた。PAL活性の測定には、これらの細胞系統を懸濁培養し、供試した。

キタワカバ、バークスの両系統に *V. albo-atrum* の分生胞子を接種したときのPAL活性の変動をFig.2に示した。キタワカバにおいて抵抗性系統K45-2で分生胞子接種12時間後、K19-1で24時間後までにPAL活性の増加が認められ、その後徐々に減少した。それに対し、感受性系統では、接種12時間後までに増加したが、抵抗性系統に比べ顕著に低い値を示した。また、バークスにおいては、胞子接種以前にPAL活性に有意差が認められたが、抵抗性系統において接種12時間後活性の増加が認められ48時間まで続いた。しかし、感受性系統では、ほとんど活性の増加が認められなかった。

V. albo-atrum の菌体細胞壁成分を処理したときのPAL活性の変動をFig.3に示した。キタワカバにおいて、抵抗性系統で処理12時間後までに活性の増加が認められた。しかし、感受性系統では、ほとんど活性の増加が認められなかった。

また、バークスにおいても抵抗性系統でPALの増加が48時間まで認められたが、感受性系統で

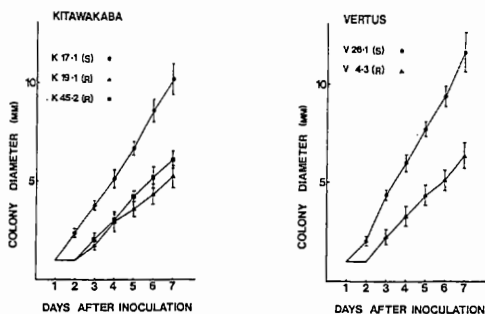


Fig.1. Mycelial development of *Verticillium albo-atrum* on alfalfa callus.

(S) : susceptible cell line, (R) : resistant cell line, Vertical bars indicate standard errors.

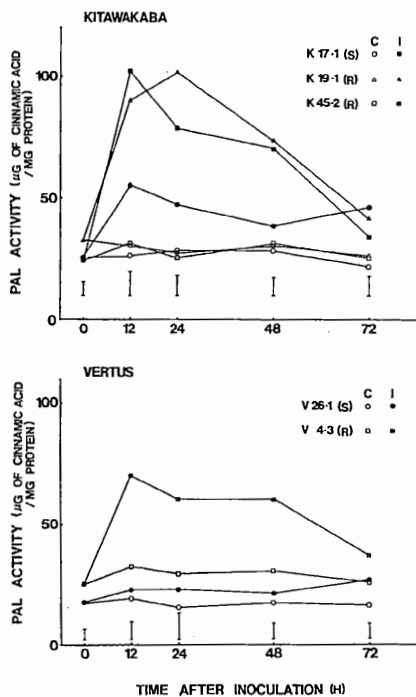


Fig.2. Phenylalanine ammonia lyase activity in alfalfa callus after inoculation with *V. albo-atrum* spore.

(S) : susceptible cell line, (R) : resistant cell line, C : control (water treatment), I : *V. a.* spore inoculation. Vertical bars indicate L. S. D. (0.05).

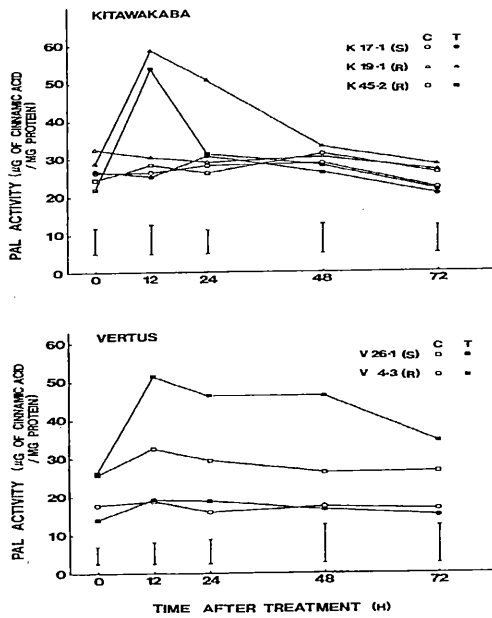


Fig.3. Pheylalanine ammonia lyase activity in alfalfa callus after tretment with *V. albo-atrum* cell wall components. (S) : susceptible cell line, (R) : resistant cell kine, C : control T : elicitor treatment. Vertical bars indicate L. S. D. (0.05)

は、ほとんど認められなかった。

Latunde - Dataらの報告⁶⁾では、抵抗性と感受性の細胞系統でPAL活性の量的な差がほとんど認められず抵抗性細胞系統ではPALが感受性系統よりもきわめて速く増加しており、PAL活性の増加の速さが抵抗性の原因とされている。本実験の結果とやや異なっているが、PAL活性の増加の速さが抵抗性反応に強く関与していることは明白である。Onuorah⁷⁾は組織レベルにおいて、Koikeら⁸⁾は細胞レベルにおいて、*V. albo-atrum*の培養濾液を処理することによってアルファルファのファイトアレキシンであるメディカルピンが蓄積されることを報告した。今回用いた物質が細胞に作用しているか否かは明らかではない。現在、実際の感染場面に作用していると思われる孢子発芽液、培養濾液などを用いて検討中である。

Summary

Responses of phenylalanine ammonia - lyase (PAL) of the phenylpropanoid pathway was examined in resistant and susceptible suspension - cultured cell lines of alfalfa following challenge with the fungus *Verticillium albo-atrum* spore and to the fungal cell wall components. PAL activities in resistant cell lines increased specifically after treatment with *V. albo-atrum* spore and the fungal cell wall component.

引用文献

- 1) Kombrink. E, K. Hahlbrock (1986) Plant Physiol 81 :216-221
- 2) Hahlbrock. K, C. J. Lamb, C. Purwin, J. Ebel, E. Fautz and E. Schafer (1981) Prant Physiol 67 :768 - 773
- 3) Koike. M, K. Nanbu, T. Shimada (1992) J. Japan. Grassl. Sci 37 (4) :412 - 419
- 4) Koike. M, T. Shimada (1992) Prant Tissue Culture Letters 9 (2) : 81-85
- 5) Buiatti. M, A. Scala, P. Bettini, G. Nasvari, R. Morpurgo, P. Bogani, G. Pellegrini, F. Gimell, R. Ventura (1985) Theor. Appl. Genet. 70 :42-47
- 6) Latunde - Data. A. O, R. A. Dixon and J. A. Lucas (1987) Physiological and Molecular Plant Pathology 31 :15-23
- 7) Onuorah. O. M. O. (1987) Acta Biologica Hungarica 38 (2) : 247 - 256
- 8) Koike. M, J. Saitoh, T. Shimada (1992) Res. Bull. Obihiro Univ. Natural Science 18 :35-39