

酵素活性を指標とした土壌伝染性病害診断の試み

大阪府立農林技術センター ^{かわら} 瓦 ^{だに} 谷 ^{みつ} 光 ^お 勇

はじめに

植物の病害を早期に的確に診断することは、病害防除にとって重要である。病害の中でも、地上部に特徴的な病斑を形成するものは比較的診断が容易であるが、全身的な症状を示す土壌伝染性病害、なかでも導管病は相互に区別の困難なものが多い。これら土壌伝染性病害の診断は、普通罹病組織を培養して病原菌を検出することにより行われるが、この方法では培養のために時間を要する。最近では、抗原抗体反応（木曾・峰，1992）を利用したり、菌の遺伝子を検出（高橋，1986）したりすることにより病害を診断する方法が試みられているが、これらの方法は非特異的の反応が生じたり、試薬が高価であるなどの欠点があり、より安価で迅速な方法の開発が求められている。

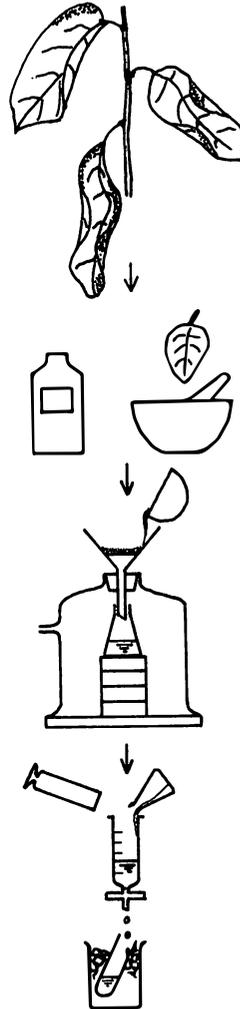
植物は病原菌の感染を受けると、種々の代謝的な変化を示すが、それらの中にはその病害に特有のものがあることも考えられ、それを検出することができれば、病害診断に利用できる。このような考えのもとに、ナスの主要な土壌伝染性病害3種について、罹病植物中の数種の酵素活性の変化を調べた。病原菌の感染時には、ファイトアレキシン生成やリグニン化に関わりの深いペルオキシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ、 β -1, 3-グルカナーゼ等の活性が高まることや、抵抗性反応の引き金となるスーパーオキシドの代謝酵素スーパーオキシドジスムターゼ活性の高まることが知られている。また罹病組織ではペクチン分解酵素（ポリガラクトツロナーゼ、ペクチン酸リアーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ等）やデンプン分解酵素（アミラーゼ）等の活性が上昇することも知られている。今回人工的に病原菌を接種して、ナス半身萎ちょう病、半枯病、青枯病を起こさせ、その罹病株の葉における上記8種の酵素活性を測定したところ、5種類に活性上昇がみられたので、これらの酵素活性の測定から病害を診断する方法について紹介する。

I 罹病植物

本葉が5~7枚展開した高さ30~40cmのナス苗（品

Attempt on the Diagnosis of Soilborne Diseases by the Enzyme Activities. By Mitsuo KAWARADANI

種千両二号)の根を洗浄後、軽く断根して各病原菌の懸濁液に浸した。病原菌を接種したナスの苗は、室温25~35°Cの温室内で栽培した。本条件下では青枯病なら1~2週間、半枯病と半身萎ちょう病は2~4週間後に病徴が現れるので、罹病株から症状の激しい葉、軽い葉、症状のほとんどみられない葉をそれぞれ採取した。これらをリン酸緩衝液(pH5.5)中で磨砕し、メンブランフィルターでろ過した液を酵素活性測定用の試料とした(図-1)。本試験では、簡便性を優先するため、すべての酵素活性の測定に同一の抽出法で得られた磨砕液を供試し



採取した葉を、氷冷した乳鉢を用い、50mMリン酸緩衝液pH5.5(葉1g当り5ml)中で磨砕する。

吸引ろ過により残渣を除く。

孔径0.8 μ mのメンブランフィルターでろ過後、氷水中に保存しただちに、酵素活性を測定する。

図-1 酵素活性測定用試料の調製方法

た。いくつかの酵素にとってはこのpH 5.5のリン酸緩衝液は、抽出効率や安定性の点でやや不安は残るが、酵素反応の際には文献記載の緩衝液と同じになるようにpHを調整した。

II 酵素活性の測定とその結果

1 ペルオキシダーゼ (POX)

試料液 5 μ l を VETTER (1958) の方法に準じて、0-フ

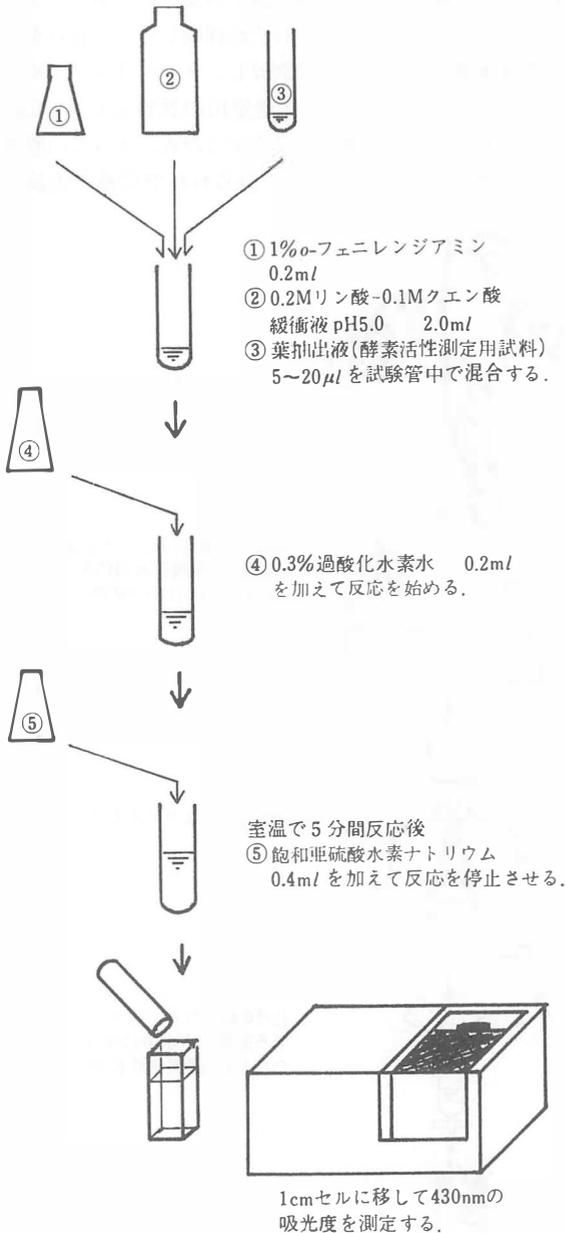


図-2 ペルオキシダーゼ活性測定の手順

フェニレンジアミン、過酸化水素と反応させ、430 nm の吸光度を測定した (図-2)。図-3 に示したように、健全株に比べて、青枯病罹病株から採取した葉は有意に POX の活性が増加した。また、半身萎ちょう病、半枯病罹病株も健全株に比べて活性が高い傾向がみられたが明らかな差とはいえなかった。それゆえ、供試葉、特に無症葉の POX 活性が健全株より高ければ青枯病の可能性が高いが、半枯病、半身萎ちょう病の可能性も否定できないので、本酵素の活性だけで判定することはできない。ペルオキシダーゼは基質特異性が低く、生体内で種々の化合物の酸化を行う。なかでもフェニル化合物の水酸化とモノフェノールの酸化は、病原菌の感染時にフェノール物質を蓄積したり、それらのラジカル重合によってリグニンを生成することにより、植物の抵抗反応に密接に関わっている。病原菌感染時に POX が増加する例は、サツマイモ黒斑病、トウモロコシごま葉枯病等多くの例で知られており、このときの POX は非感染時とは違ったアイソザイム組成を持つことも報告されている。またジャガイモ疫病やウリ類炭そ病においては、病原菌の感染部位から離れた部位で POX 活性が増加し、これが全身的誘導抵抗性に関与していると考えられている。

2 β -1, 3-グルカナーゼ (Glc)

試料液 5 μ l を ABELES and FORRENCE (1970) の方法に準じてラミナリンと反応させ、生じた還元糖を DNS 試薬によって定量することにより本酵素の活性を測定した。図-4 に示したように、半身萎ちょう病株では、どの症状程度の葉においても健全株に比べて本酵素活性の明らかな増加がみられた。特に、無・軽症葉での活性の高さは、Glc が半身萎ちょう病の判定に有用な酵素であることを示している。半枯病、青枯病罹病株においてもやや活性が高い傾向はみられたが、判別に有効とは思われなかった。本酵素は、感染初期に菌の細胞壁に作用してエリッターを遊離させる因子として、植物の抵抗反応に密接に関与している。そのためこれら病原菌の感染時にも活性が高まることが予想されたが、半枯病、青枯病では明らかな増加はみられなかった。これには、感染から発病までの時間経過や葉における菌密度等が関係していると思われる。

3 スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)

キサンチン-キサンチンオキシダーゼ系で生成されたスーパーオキシドによるチトクロム C の還元に対する阻害率として、SOD の活性を測定した (浅田, 1976)。図-5 には、標準の SOD 1 単位の活性 (阻害率) を基準にした単位で表示した。青枯病株の軽症葉と重症葉で SOD 活性の顕著な上昇が認められた。これは青枯病に特徴的

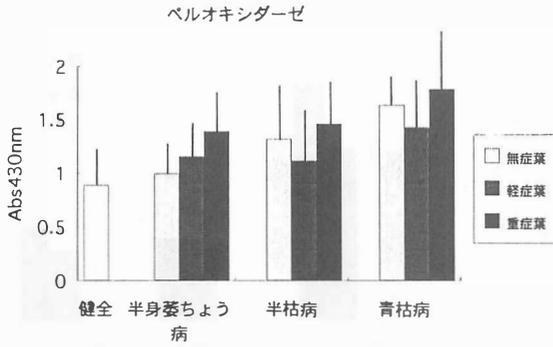


図-3 健全株及び罹病株から採取した葉のペルオキシダーゼ活性
各カラム上の棒線は標準偏差を表す (以下の各図とも同じ)

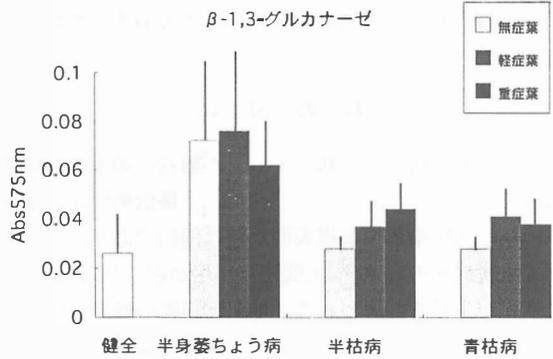


図-4 健全株及び罹病株から採取した葉のβ-1,3-グルカナーゼ活性

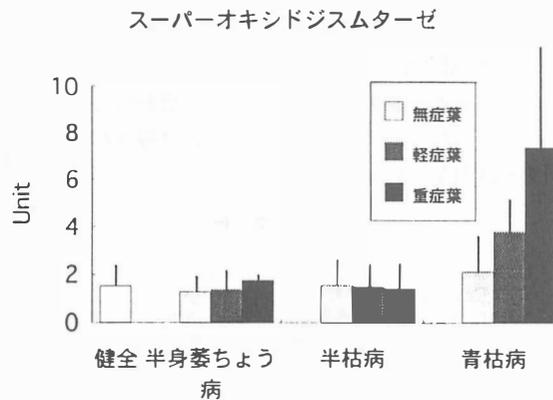


図-5 健全株及び罹病株から採取した葉のスーパーオキシドジスムターゼ活性

SODは活性酸素の一つであるスーパーオキシドを H_2O_2 と O_2 に不均化する酵素である(H_2O_2 はカタラーゼ、ペルオキシダーゼにより分解される)。スーパーオキシドは脂質酸化により膜透過性を変化させ電解質漏失等を起こさせる原因となり、生体にとって毒性が高い。スーパーオキシドは通常、細胞内器官で種々の反応により作られているが、病原菌の感染時には、初期にNADPH酸化酵素系によるスーパーオキシドの産生が増え、これが過敏反応の引き金になるといわれている。この早い時期のスーパーオキシドの産生に続いて、SODの活性の上昇がみられ、イネいもち病やインゲンマメさび病では数日間高い活性が続くことが知られている。また、このSOD活性の上昇から少し遅れてPOX活性の上昇が起こることも知られている。青枯病の場合、感染後早いもので1週間程度で病徴(しおれ)が現れ、この時期に採取した葉で高い活性がみられたことは上記のSOD活性の継続期間を支持していると思われる。一方、半身萎ちょう病と半枯病では病徴発現まで2週間以上かかることが多いため、SODの活性がすでに平常値に戻っていたと考えられる。

4 ポリガラクトツロナーゼ (PG)

HANCOCK and MILLAR (1965)の方法に準じ、ペクチン酸と試料液を反応させ、生じた還元糖をDNS試薬により定量した。図-6に示したように、半身萎ちょう病株の軽症葉と重症葉で本酵素の顕著な活性増加がみられた。半枯病と青枯病においても活性が高い場合がみられたので、本酵素の活性が高いことだけで半身萎ちょう病と判定することはできないが、十分高い活性は本病に特徴的である。菌類は植物に感染し増殖する際に、細胞間接着物質であるペクチン質を分解する。この分解に関与する酵素には、ポリガラクトツロナーゼ(PG)、ペクチン酸リアーゼ(PL)、ペクチンリアーゼ(PNL)、ペクチンメチルエステラーゼ(PME)等が知られている。Erwinia属菌による軟腐はPLが主因といわれており、糸状菌ではPGとPNLを産生するものが多い。本試験においては、PGのほかにPLとPMEの活性も測定したが、PLはほとんど活性がみられず、PMEは健全株と罹病株の間に活性の差がみられなかった。半身萎ちょう病株にみられたPG活性の増加は、他の2病害に比べて本病で葉の部分的なえ死が起こりやすいことと関係があると思われる。

5 アミラーゼ (Amy)

試料液0.1mlをデンプン溶液と反応させ、生じた還元糖をOKAMOTO and AKAZAWA (1978)の方法で定量した。図-7に示したように、各罹病株とも、症状が激しくなるに従って本酵素活性も増加する傾向がみられた。また、病徴の現れている葉はどれも健全株に比べて高い活

で、他の2病害においては活性増加はみられなかった。で、本酵素は単独でも青枯病の判定に有効と思われる。

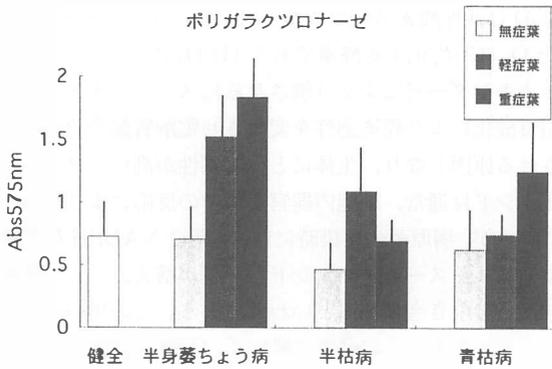


図-6 健全株及び罹病株から採取した葉のポリガラクトンナーゼ活性

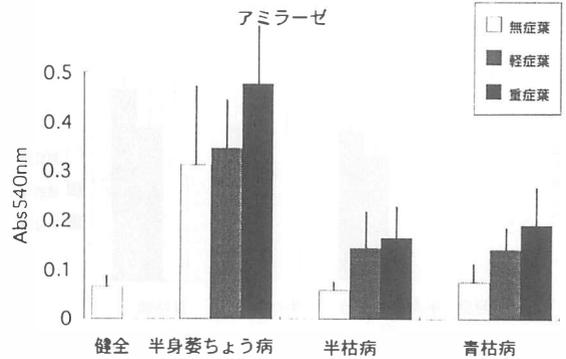


図-7 健全株及び罹病株から採取した葉のアミラーゼ活性

性を示した。アミラーゼはデンプンを加水分解する酵素であり、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、グルコアミラーゼ等がある。植物では α -アミラーゼと枝切り酵素、 α -グルコシダーゼによってデンプンがグルコースにまで分解されエネルギー源として利用される。菌類ではグルコアミラーゼによってデンプンが分解されることが多い。本試験では酵素活性を、反応生成物の還元力で測定しているので、これらアミラーゼの種類は区別できない。アミラーゼは直接病原性には関与しないが、感染組織での呼吸量の増大に伴う基質の供給に関与しているといわれている。本試験において、どの病害でもアミラーゼの高い活性がみられたのは、アミラーゼの上記のような性質によると思われる。この中で、半身萎ちょう病株における活性はほかの比べて際立って高く、本病の判定に Amy 活性測定が有用な手段となることを示唆している。この傾向は PG の場合と同様、半身萎ちょう病罹病株においては他 2 病害に比べてしばしば組織のえ死がみられることと関係があると思われる。

III 病害診断への適用

これらをまとめると、罹病株から採取した葉の Glc, PG, Amy の活性が健全株に比べて高い場合は半身萎ちょう病, Amy の活性のみ高いのは半枯病, POX, SOD, Amy の活性が高いものは青枯病と推定することができる。また、POX 以外の酵素活性は軽症葉でも無症葉とは十分差が認められるので、発病初期でも確認でき、早期判定が可能となる。ただここで述べた 5 種類の酵素は、それぞれ単独では病害以外の原因によっても活性変化が起こるので、正確な判定には同程度の病徴を示す葉数枚について、複数の酵素活性の変化を測定することが必要である。今回測定した残りの 3 種の酵素には、健全株や罹病株間に明りょうな活性の差がみられなかったので、

判定に利用することはできなかったが、これら以外にも感染や病徴発現に関与する酵素は多く知られており、その中にはさらに病害判定に有効なものもあると思われる、今後の検討課題としたい。

おわりに

土壌伝染性病害の診断法として、植物の地上部の酵素活性を調べる方法について述べた。土壌伝染性病害は本来、第一次感染部位が根表面または傷口であり、その場所ですまず最初の病原-宿主間相互作用が起こり、代謝活性に変化が生じるとされる。地上部組織の酵素活性の変化は、組織内への侵入に成功した菌またはその分泌物が導管を通過して地上部に移動して、多くの細胞と相互作用するか、根部の感染時に全身的な反応が誘導されるかに起因して生じると考えられる。前者の場合には、感染から葉の酵素活性の変化までに時間がかかり、後者の場合には早い時期(病徴発現以前)に変化が現れると予想される。本試験は、発病した株から葉を採取しているため、主に前者の変化をとらえていると思われる。より早期の診断のためには、後者の全身的に誘導される反応に関する詳細な知見が必要である。

引用文献

- 1) ABELES, F. B. and L. E. FORRENCE (1970): Plant Physiol. 45: 395~400.
- 2) 浅田浩二(香川靖雄ら編)(1976): 生化学実験講座 12 エネルギー代謝と生体酸化(下). 東京化学同人, 東京. pp. 734~744.
- 3) HANCOCK, J. G. and R. L. MILLAR (1965): Phytopathology 55: 346~355.
- 4) 木曾 皓・山岸久芳(1992): 日植防研報 6: 35~48.
- 5) OKAMOTO, K. and T. AKAZAWA (1978): Agric. Biol. Chem. 42: 1379~1384.
- 6) 高橋 壮(1986): 植物防疫 40(11): 531~539.
- 7) VETTER, J. L. et al. (1958): J. Agric. Food Chem. 6: 39~41.