

酵素活性測定によるナス半身萎凋病の診断法

大阪府立農林技術センター かわら だに みつ お
瓦 谷 光 男

はじめに

土壌伝染性病害は防除が難しく、耕種的方法と播種・定植前の土壌消毒が主要な対策となっているが、その一方で、発病初期に被害株の抜き取りや薬剤灌注等により、被害を最少限に食い止めることができる場合があるので、病害の早期診断技術が求められている。通常、土壌伝染性病害の診断は、茎を切断したり、根を掘り上げたりして病変部を観察するか、一部を培地上に置いて病原菌を検出する必要があった。これらは時間と労力を要するうえに、病勢がある程度進行してからでないと判定できないことが多かった。ナスの主要な土壌伝染性病害の半身萎凋病、半枯病、青枯病については、罹病時の酵素活性変化が調べられ、半身萎凋病罹病時に、 β -1,3-グルカナーゼ、ポリガラクトソナーゼ、アミラーゼ等の酵素活性が健全株に比べて顕著に上昇することが明らかとなり、これらの酵素活性の測定により病害診断が可能であることが示された(瓦谷ら, 1994)。これまで化学的な病害診断法として、抗体(抗血清)を用いたもの(君島ら, 1987; 木曾・山岸, 1992)やPCRを用いた遺伝子診断法(CARDER et al, 1994)が開発されているが、これらの方法は、特異性・感度が高い反面、検体中に病原菌が存在することが不可欠であるため、試料の採取部位と時期が制限される。これに対して、酵素活性による診断法は、病原菌が分離できない場合でも、植物自体の酵素活性の変化が認められれば診断可能であるという利点がある。ただ、酵素活性の測定には試薬の調製や発色のための反応等が必要で、実際の病害診断に利用するには手法が煩雑な欠点があった。ナス半身萎凋病罹病時に活性が増加する上記3酵素のうち、病原菌感染との関係が最もよく研究されている β -1,3-グルカナーゼを取り上げ、その簡便な活性測定と診断への利用を試みた。本酵素活性の測定は、基質としてラミナリンを用い、分解により生じた還元糖をDNS試薬と加熱反応させて発色させるDNS法(ABELES and FORRENCE, 1970)が一般的であるが、基質と発色試薬が同一の

-

β -D-ラミナリテトラオシド(pNPG 4, 図-1)を用いた測定法(pNPG 4分解法)が開発されたことにより、簡便に高い精度で β -1,3-グルカナーゼ活性が測定できるようになった(瓦谷ら, 1998)ので、このpNPG 4分解法を簡便法として用いることにした。

I β -1,3-グルカナーゼ活性の測定法

DNS法は、常法に従い、酵素液(または粗抽出液)0.04 mlに、2%ラミナリン水溶液0.2 mlと0.1 M酢酸緩衝液(pH 5.0) 0.8 mlを加え、40°Cで30分間反応させた後、DNS試薬を3 ml加え100°Cで5分間加熱して発色させた。その後直ちに水冷し1時間以内に575 nmの吸光度を測定した。また、DNS法の簡便法として、大日本インキ株式会社で開発されたpNPG 4を用いたpNPG 4分解法は、酵素液0.05 mlに、 β -D-グルコシダーゼ0.1 mgと0.4% pNPG 4 0.5 ml、50 mM酢酸緩衝液(pH 5.5) 0.3 mlを加え(全量1 ml)、35°Cで30分間反応させた後、0.1 N NaOHを4 ml加えて反応を止め、415 nmの吸光度を測定した。グルコシダーゼを添加したのは、 β -1,3-グルカナーゼにより生成した

-

ニトロフェニルグルコースから効率よく発色基の

-

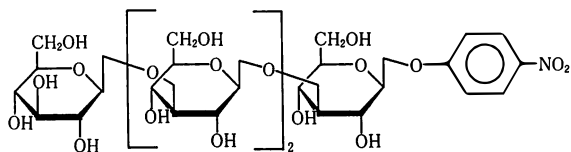


図-1 p -ニトロフェニル- β -D-ラミナリテトラオシドの化学構造

Diagnosis of *Verticillium* Wilt of Eggplant by Analysing an Enzyme Activity. By Mitsuo KAWARADANI

(キーワード: *Verticillium*, ナス, β -1,3-グルカナーゼ, DNS, p -ニトロフェニル- β -D-ラミナリテトラオシド)

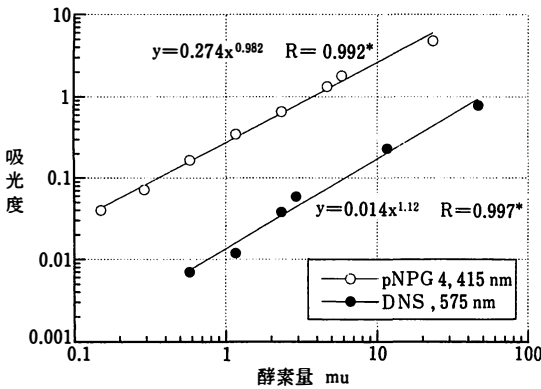


図-2 *Herix pomatia* 由来 β -1,3-グルカナーゼを酵素源にしたときの pNPG 4 分解法と DNS 法の定量性の比較

* 0.1%水準で相関性あり。

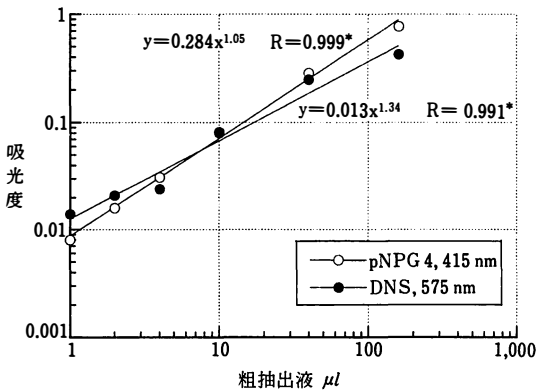


図-3 ナス葉粗抽出液を酵素源にしたときの pNPG 4 分解法と DNS 法の定量性の比較

* 0.1%水準で相関性あり。

加に伴って 575 nm の吸光度が直線的に増加し、pNPG 4 分解法では、0.2~20 mu まで、同様の直線性を示した (図-2)。図中のプロットは直線性の高い部分のみを表示したが、酵素活性の検出感度の点で、pNPG 4 分解法のほうがより少ない酵素量まで、定量的な検出が可能であった。ナス葉の粗抽出液を酵素源とした場合にも、pNPG 4 分解法は従来の DNS 法と同様、酵素量と吸光度は高い相関性があり、1~200 μ l 範囲でナス葉抽出液の増加に伴って 415 nm の吸光度は直線的に増加し、良好な定量性を示した (図-3)。

β -1,3-グルカナーゼ活性の測定は、従来、粘度法と DNS 法が主に用いられていたが、前者は感度が高い反面測定に時間がかかり、後者は試薬の調製や発色のための加熱等煩雑な操作が多かった。今回検討した pNPG 4 分解法は、DNS 法に比べて感度が高く、より広い濃度

範囲で直線性がよく、そのうえ加熱や試薬調製の煩雑さが少ないので、病害診断を前提にした測定法としては利用性が高い。また、反応温度は通常の気温範囲の 10~40°C で、反応時間に長短はあるものの支障なく行える。pNPG 4 分解法で用いる基質 pNPG 4 は、 β -1,3-グルカナーゼにより糖鎖が切断された後、 β -グルコシダーゼにより *p*-ニトロフェノールが遊離して発色すると考えられる。pNPG 4 には、 β -グルコシダーゼはほとんど作用せず、他の糖質分解酵素もほとんど活性を示さないため、pNPG 4 は β -1,3-グルカナーゼの基質として高い特異性を有している。これらのことから、pNPG 4 分解法は DNS 法に代わる β -1,3-グルカナーゼ活性測定法といえる。

II 罹病植物の β -1,3-グルカナーゼ活性

ナスは品種千両二号を用い、本葉 4~5 枚展開した苗を掘り上げ、根を十分洗って付着物を除き、先端部を 1~2 cm 切除して半身萎凋病菌 (*V. dahliae*) 孢子懸濁液 (10⁶/ml 程度) に根部を浸漬した。15~20 時間後、市販の培土に移植し 3 日間湿室に置いた後、ガラス温室で栽培した。接種 5, 10, 15, 20, 25, 30 日後に、頂部から 3~5 枚目の病徴の現れていない葉 (後述するように、無病徴の葉の β -1,3-グルカナーゼ活性が上昇するのが半身萎凋病の特徴) を採取し、秤量後直ちに、または、-85°C に冷凍後 1 週間以内に、新鮮重 1 g 当たり 5 ml の 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5) 中で磨砕し、10,000×g で 15 分間遠心した。この上清を孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過して粗抽出液とし、pNPG 4 分解法により β -1,3-グルカナーゼ活性を測定した。半身萎凋病菌無接種株では、接種 5 日後から 30 日後まで酵素活性に大きな変動はなく、415 nm の吸光度で 0.07 から 0.1 の間であった。これに対し接種株では、接種 15 日目と 20 日目に活性増加が検出され、無接種株の吸光度の 1.5 倍以上となった。発病は、図中の矢印で示したように、接種 14, 15, 19 日後に確認されたので、病徴発現の 4 日前~翌日の間に酵素活性が増加したことを示している (図-4)。このように、酵素活性の増加と発病が密接に関係していることが明らかになったので、健全株と比較して被検株の β -1,3-グルカナーゼ活性が 1.5 倍程度高い場合には、本病に感染していると考えることができる。

自然感染株として、本病汚染圃場に定植されたナス (千両二号、ヒラナス台) から 7 本を選び、定植 2 か月程度後の 6 月下旬から 2 週間おきに中位以上の葉位の無病徴の葉を採取し、上記と同様に酵素活性を測定した。

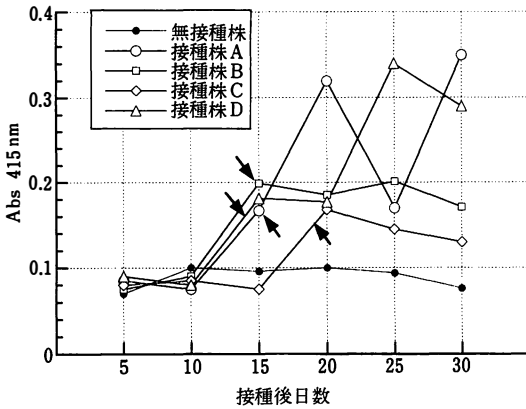


図-4 半身萎凋病菌接種後のナス葉中の β -1,3-グルカンナーゼ活性の変化
矢印は、その株に病徴が現れた日。

表-1 半身萎凋病汚染圃場に定植されたナスにおける β -1,3-グルカンナーゼ活性の変化

採取日	吸光度 415 nm						
	株番号						
	1	2	3	4	5	6	7
6/26	0.119	0.139	0.130	0.128	0.141	0.130	0.142
7/10	0.141	0.221	0.127	0.115	0.278	0.411	0.157
7/24	0.113	0.369	0.173	0.212	0.262	0.258	0.257

下線を伏した数値は、その採取日に下位葉に病徴が現れていたものを示す。

本圃場では6月26日には発病は見られず、酵素活性の増加も見られなかったが、7月10日には3株で発病と酵素活性の増加が見られた。さらに7月24日には6株に発病が認められ、その内5株に酵素活性の増加が見られたが、内1株(No.3株)の活性増加の程度は低かった(表-1)。自然発病株においても、上記の接種試験と同様、健全株の1.5倍程度の活性増加を目安にすると、この酵素活性増加が半身萎凋病の感染を反映していると考えられる。

Ⅲ 診断への利用

本試験では、 β -1,3-グルカンナーゼ活性の測定は、接種株では5日間隔、自然感染株では2週間間隔で行ったため、厳密な初発と酵素活性上昇の前後関係は不明であるが、株に病徴が現れるのとほぼ同時にそれ以前に、 β -1,3-グルカンナーゼ活性が増加する結果が得られた。

このことは、株の一部に萎凋症状が現れた時点で、無症状の葉の本酵素活性を測定することにより、半身萎凋病の診断ができることを示している。類似した病徴を示す青枯病や半枯病では、無症状の葉での β -1,3-グルカンナーゼ活性の上昇は認められないので、半身萎凋病と区別されるが、葉の表面に他の病害の明瞭な病徴や生理的な傷害が現れている場合は、本酵素の活性に影響を与える可能性があるため、そのような葉は診断に用いるべきではない。また、ナスに萎凋症状を現す病害として、頻度は少ないがこのほかに根腐疫病、黒点根腐病、茎えそ細菌病等があるが、今回これらについて β -1,3-グルカンナーゼ活性の測定を行わなかったため、これらの可能性がある場合には判定に注意を要する。このほか、ナスの品種や菌系による反応の違いの可能性など、本法が半身萎凋病の判定に普遍的に用いられるにはまだ解決しなければならない問題が残されている。

おわりに

病原菌感染時に、抵抗性誘導や組織え死に関連して活性が高まる酵素類が多く知られている(道家, 1991)が、発病初期に発病部位以外で活性の増加する酵素は少ない。 β -1,3-グルカンナーゼは、それ自身抗菌活性があり、菌体壁からのエリシター遊離にも関与し、病原菌感染の早期に活性が高まることが知られている(COLLINGE and SLUSARENKO, 1987; MAUCH et al., 1988)。本試験において、比較的発病初期に無病徴部位で β -1,3-グルカンナーゼ活性増加が測定できたことは、上記の事実を裏付けており、さらにその後の発病とも密接に関係していることから、本酵素活性が病害診断に利用できるものと思われる。

引用文献

- 1) ABELES, F. B. and L. E. FORRENCE (1970): Plant Physiol. 45: 395~400.
- 2) CARDER, J. H. et al. (1994): Identification, Detection and Quantification, CAB INTERNATIONAL, Wallingford, pp. 91~97.
- 3) COLLINGE, D. B. and A. J. SLUSARENKO (1987): Plant Mol. Biol. 9: 389~410.
- 4) 道家紀志 (1991): 植物感染生理学最近の進歩, 植物感染生理学最近の進歩刊行会, 名古屋, pp. 81~93.
- 5) 瓦谷光男ら (1994): 日植病報 60: 507~513.
- 6) ————ら (1998): 同上 64: 489~493.
- 7) 君島悦夫ら (1987): 植物防疫 41: 442~448.
- 8) 木曾 皓・山岸久芳 (1992): 日植防研報 6: 35~48.
- 9) MAUCH, F. et al. (1988): Plant Physiol. 88: 936~942.