

氏名	ぬるん なはる かなむ NURUN NAHAR KHANAM
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	甲第391号
学位授与年月日	平成17年 9月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Studies on Red Light-Induced Resistance in Broad Bean (<i>Vicia faba</i> L.) against <i>Botrytis cinerea</i> (灰色かび病菌に対するソラマメの光誘導抵抗性に関する研究)
学位論文審査委員	(主査) 荒瀬 栄 (副査) 田中秀平 尾谷 浩 本田雄一 木原 淳一

学位論文の内容の要旨

Red light-induced resistance is a potential defense mechanism in broad bean against *Botrytis cinerea* (B304). In this study, host mechanisms and fungal determinants involved in red light-induced resistance were determined using avirulent and virulent strains of *Botrytis cinerea*.

When detached broad bean leaves were pre-inoculated with virulent strain B304 of *Botrytis cinerea* 24 h before a challenge inoculation with strain B304, lesion formation by B304 was significantly inhibited in red light, but not in the dark. In leaves that were pre-inoculated with avirulent strain 021R, then challenged by B304, however, lesion formation was not inhibited even under red light. Such differences in lesion formation after the challenge inoculation with avirulent strains were also observed with lesions caused by *Alternaria alternata*, a nonpathogen of broad bean and by avirulent strain 021R in the presence of spores germination fluid from strains B304 and 021R. These results suggest the possibility that virulent *B. cinerea* produced a suppressor involved in induced susceptibility and an elicitor involved in resistance induced by red light during spore germination.

One leaflet (Leaf 1) of detached compound leaves of broad bean was pre-inoculated with a pathogenic (B304) or non-pathogenic (021R) strain of *B. cinerea* for 24 h under red light or in the dark and then another leaflet (Leaf 2) was post-inoculated with pathogenic strain B304 of *B. cinerea*. In pre-inoculation with a pathogenic strain B304, lesion formation by

challenger was significantly inhibited under red light, but not in the dark. In a non-pathogenic strain 021R, however, lesion formation was significantly enhanced even under red light. On the other hand, when L2 of the compound leaves with L1 pre-treated with spore germination fluid (SGF) from strains B304 and 021R for 24 h was post-inoculated with a pathogenic strain B304, lesion formation by challenger was significantly enhanced in the dark. Under red light, however, lesion formation by challenger was significantly enhanced in the compound leaves with Leaf 1 pre-treated with 021R SGF, but not in that pre-treated with B304 SGF. Same phenomena were also observed in Leaf 2 post-inoculated with non-pathogenic *Alternaria alternata*. These results show that suppressor and elicitor functions by *B. cinerea* infection and spore germination fluid are systemically transferred to uninfected or untreated tissues of broad bean.

The effect of salicylic acid (SA) on red light-induced resistance in broad beans to *Botrytis cinerea* was investigated. Both lesion formation and fungal development were suppressed on broad bean leaves kept under red light, producing antifungal compound(s). However, SA pre-treatment inhibited expression of red light-induced resistance dose-dependently, generating hydrogen peroxide (H_2O_2). Red light-induced resistance was recovered in the presence of a H_2O_2 scavenger, ascorbic acid or a NADPH oxidase inhibitor, diphenylene iodonium even in SA-pre-treated broad bean leaves. These results suggest that breakdown of red light-induced resistance in broad beans to *B. cinerea* is induced by membrane-mediated H_2O_2 generation. On the other hand, catalase activity in broad bean leaves was significantly enhanced under red light, but not in those pre-treated with SA and aminotriazole. We hypothesize that enhanced antioxidant enzyme catalase activity contributes to the inhibition of cell death in broad beans scavenging endogenous H_2O_2 generated by *B. cinerea* infection and to elicitor-dependent production of antifungal component(s) by living host cells; as a consequence, red light-induced resistance may be established.

Our study concluded that virulent *B. cinerea* spores produced suppressor and elicitor during germination, regardless of the light conditions. Elicitor is playing an important role in local and systemic induction of resistance, which was supported by antioxidant system such as enhanced catalase activity, in broad bean by red light.

論文審査の結果の要旨

本研究は、灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. に対するソラマメの赤色光誘導抵抗性の発現機構を解析したもので、その成果は以下の様に要約される。

赤色光照射下又は暗黒下で病原性菌株 B304 及び非病原性菌株 021R を前接種し、24 時間後に後

接種した B304 の病斑形成を調査すると、B304 前接種葉では単独接種と同様、赤色光下では病斑形成の抑制が観察されたが、暗黒下では抑制は観察されなかった。一方、021R 前接種葉では、赤色光照射下においてさえも抵抗性の誘導が抑制され、B304 による多数の病斑が形成された。このような現象を解明する目的で、B304 菌株の 50 倍濃縮胞子発芽液 (SGF) に非病原性の *Alternaria alternata* の胞子を懸濁後、ソラマメ葉に接種すると、暗黒下では *Alternaria* による病斑形成が誘導されたが、赤色光下では誘導は認められなかった。一方、021R 菌株 SGF では光の条件に関係なく *Alternaria* による病斑形成が誘導された。この結果は、病原性の B304 菌株は、ソラマメに対し 2 つの異なった作用を示す物質 (一つは病原性に係わるサプレッサーと、もう一つは、光誘導抵抗性に関係するエリシター) を生成し、赤色光下ではエリシター活性がサプレッサー活性よりも優先的に機能することを示した。

2 枚の小葉 (Leaf1 と Leaf2) からなるソラマメの複葉を用いて赤色光誘導抵抗性の伝達様式を検討した。B304 及び 021R を Leaf1 にそれぞれ前接種後、Leaf2 に B304 を後接種した。Leaf1 における B304 の病斑形成は上記と同様、赤色光下では抑制、暗黒下では誘導された。021R 菌株を Leaf1 に前接種した場合、Leaf1 における 021R の病斑形成は認められないにもかかわらず、Leaf2 における後接種菌 B304 の病斑形成は暗黒下だけでなく赤色光照射下でさえも顕著に誘導された。これらの結果は、ソラマメ葉での病斑形成の誘導と抑制は全身的に伝達され、それには菌側の因子が関与していることを示唆した。

サリチル酸 (SA) を処理したソラマメ葉を赤色光下および暗黒下に 24 時間保った後、*B. cinerea* を接種し、赤色光下および暗黒下に保つと病斑形成に於いて大きな違いが観察された。即ち、暗黒下では SA 濃度に関係なく *B. cinerea* による多数の病斑が形成された。しかし、赤色光下では対照区 (0mMSA) で見られた誘導抵抗性が SA 濃度依存的に抑制され、病斑形成が誘導された。このような病斑形成における違いは、侵入菌糸形成においても同様に認められた。また、対照区 (0mMSA) のソラマメ葉上から回収した接種液においては、*B. cinerea* の発芽を抑制する強い抗菌活性が認められたが、SA 処理葉からのそれでは濃度依存的に抗菌活性は消失していた。1mMSA 処理葉を赤色光下に保つと、処理後 6 時間から DAB 陽性反応が認められ、それはその後の *B. cinerea* 接種によりさらに強くなった。これらの結果は SA 前処理葉では H_2O_2 が生成されていることを示唆した。

SA と同様の赤色光誘導抵抗性の抑制は、カタラーゼの阻害剤であるアミノトリアゾール (400 μ M) や H_2O_2 (5mM) の前接種葉においても認められた。しかし、SA やアミノトリアゾールによる抵抗性の抑制効果はアスコルビン酸やジフェニルイオドニウム存在下では打ち消された。また、ソラマメ葉におけるカタラーゼ活性を調査すると、0mMSA 処理葉においては高い値を示したが、1mMSA 処理葉ではその活性は著しく低下していた。これらの結果は、SA 前処理葉における H_2O_2 生成はカタラーゼ活性の低下によるものであることが示唆された。結果として殺生的病原菌である *B. cinerea* の感染は促進された。

結論として、1) 病原性 *B. cinerea* (B304) は光条件に関係なく胞子発芽時に少なくとも感染を誘発するサプレッサーと抵抗性を誘導するエリシターという 2 つの異なる代謝産物を生産する。

2) *B. cinerea* の生産するこれら 2 つの因子によるソラマメに対する抵抗性あるいは感受性の誘導効果は全身的に伝達されるが、赤色光下ではエリシター活性がサプレッサー活性より優先的に作用して抵抗性が誘導される。3) SA 処理ソラマメ葉では、カタラーゼ活性の低下による H_2O_2 の蓄積が起こり、ソラマメ葉では細胞死が誘導され、このことが殺生的病原菌である *B. cinerea* の感染を促進させたと考えられた。

本研究は、カタラーゼ活性の高まりが *B. cinerea* に対する抵抗性に深く関わっているという、抗酸化機構が病害抵抗性に貢献していることを示した初めての研究業績であり、植物の病害抵抗性機構の解明という植物病理学の重要課題の解明に寄与する新知見であり、博士（農学）の学位を与えるに十分な価値を持つものと判定した。