

흰가루病菌 分生孢子 ethanol 抽出分割의 大麥葉 螢光化細胞 誘導活性

金基淸* · 獅山慈孝**

Autofluorescence-elicitor activity of ethanol-extract fraction from
conidia of *Erysiphe graminis hordei* to the leaf of barley

Ki Chung Kim* · Jiko Shishiyama**

ABSTRACT

The autofluorescent cells in the penetration area of powdery mildewed leaves of barley had been reported. The present experiments were performed in order to obtain the fluorescence-inducing extract fraction from the conidia. The preparations were made by extractions and residue which were extracted from the conidia of *Erysiphe graminis hordei* race I with water, ethanol, and ethyl ether. Bioassaying was carried out on the cutted-leaf surface of incompatible Turkey 290 and compatible Kobingataki varieties by placing the drops of extract solutions. Fluorescence-elicitor activity was shown only in the ethanol-extract fraction to both varieties. However, fluorescence-eliciting rate was more rapid on the leaves of incompatible variety Turkey 290 than on the those of compatible variety Kobingataki; Turkey 290 less than 8 hours, Kobingataki less than 16 hours.

緒 言

大麥의 葉에 흰가루病菌을 接種하면 非親和性組合에서는 侵入部位의 表皮細胞壁, 表皮細胞 및 葉肉細胞에 自發黃色螢光이 나타난다는 事實이 밝혀진 以來 이러

한 現象과 病抵抗性과의 相關을 追究해 오고 있다^{13,14, 15,16,23} 한편 이 黃色螢光物質을 分離 精製하여 흰가루病菌의 分生孢子에 處理한 結果 高度의 抗菌性을 나타냈다는 報告와 함께 이 螢光物質이 phytoalexin인 可能性도 示唆되고 있다^{22,23}. 1940년에 Müller¹⁸ 및 Böger에 의해 phytoalexin이 發表된 以來 多數의 病

* 全南大學校 農科大學: College of Agriculture, Chonnam National University, Kwangju, Korea

** 京都大學 農學部: Faculty of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Japan

原菌과 植物과의 組合에서 여러가지 種類의 phytoalexin이 分離, 精製되어 그 分子構造까지도 決定되었는데 나아가 이들 phytoalexins의 elicitor까지도 밝혀진 것이 많으며 phytoalexin과 그의 elicitor는 植物의 病抵抗性的의 機作을 解明하는데 여러가지로 寄與해 왔다^{1-12, 19, 21, 24}. 禾本科植物에서의 phytoalexin 生産은 最近 稗 冠銹病에서 알려진 것이 始初인듯한데 Avenarmin이라 命名되어 있다¹⁷. 前述한 黃色螢光物質은 病原菌의 侵入에 依해 나타났으나 後 調査에 依하면 傷處에 依해서도 나타남이 밝혀져²³ 이런 事實들을 綜合해 보면 螢光物質의 出現은 組織의 傷瘻가 그 原因이 아닌가도 생각된다.

本實驗에서는 大麥葉에 螢光反應을 誘導시키는 物質을 分生孢子의 여러가지 抽出分劃에 對하여 檢討한바 몇가지 結果를 얻었으므로 이에 報告한다.

本研究은 1979 年度 文教部 國費國外派遣研究의 一環으로 日本 京都大學 植物病理學研究室에서 實施한 것임을 밝혀두며 아울러 그 研究室의 여러분에게 謝意를 表하는 바이다.

材料 및 方法

供試菌으로서는 *Erysiphe graminis hordei* race I 을, 供試麥으로서는 Turkey 290(incompatible)과 Kobingataki(compatible)를 使用하였다. 먼저 供試麥은 20°C의 流水에서 3日間 浸種催芽시킨 다음 vermiculite 를 담은 clay pot에 播種하고 plant food 1000倍水溶液을 灌注하여 20±1°C, 12時間의 光週期の growth chamber에서 7~9日間 生育시킨다음 미리 준비해둔 稗가루病罹病葉上에 形成된 分生孢子를 口으로 불어 接種시켰다. 多量의 孢子가 形成된 接種 7~8日後 稗바닥에 유리板을 間 Chamber 속에서 口으로 불어 유리板위에 落下시킨 分生孢子를 유리板 그대로 濕室에 넣어 24時間 發芽시킨다음 攄어모으거나(發芽孢子) 혹은 바로 攄어 모아(非發芽孢子) -20°C에 供試할때까지 保存하였다.

抽出分劃의 調製 : Fig. 1에 表示한 바와 같이 發芽孢子(發芽率 30~40%) 2g에 攄換水 10ml를 加하

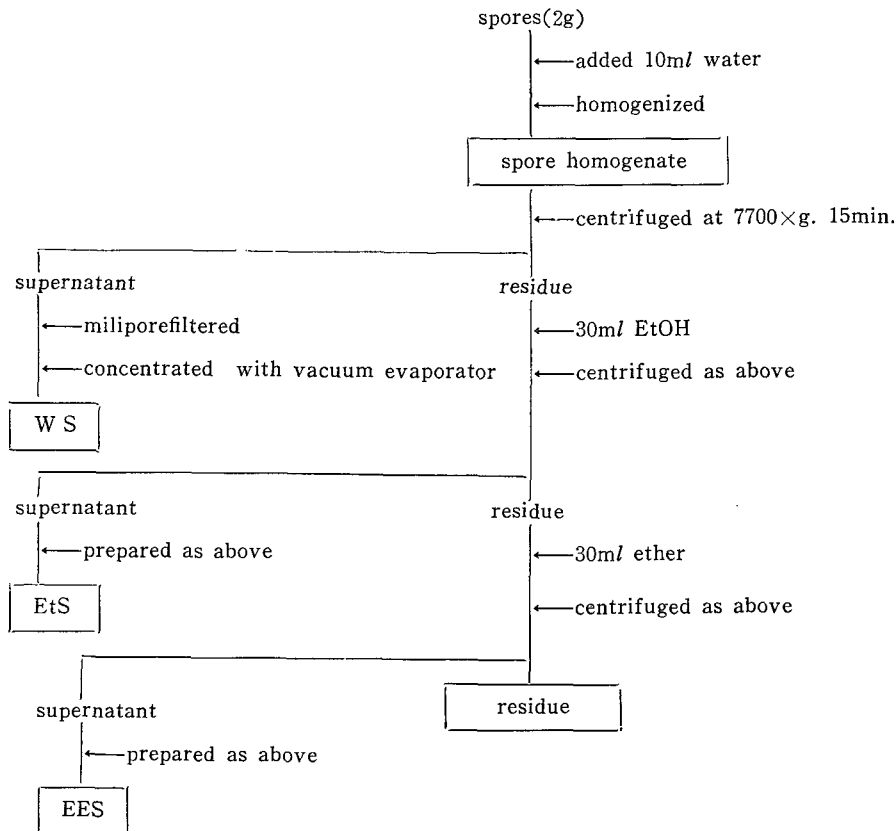


Fig. 1. Extracting-compartmentment of conidia of *Erysiphe graminis hordei*, germinated or ungerminated.

고 glass homogenizer로 3,000rpm 2分間씩 어름속에서 磨碎하여 거의 大部分의 孢子가 破壞되도록 顯微鏡으로 調査하면서 數回 磨碎하였다. 이 磨碎液을 7,700 ×g 15分間 遠沈하여 上澄液과 殘渣를 分離하였다. 다시 殘渣에 水 10ml를 加하여 잘 混和시킨 다음 遠沈洗滌하기를 3回 實施하여 上澄液을 모두 合하여 水抽出分劃(WS)으로 하였다. 殘渣에 다시 ethanol 30ml를 加하여 24時間 4°C에 放置한 다음, 水抽出分劃과 마찬가지로 遠沈하여 上澄液을 ethanol 抽出分劃(EtS)으로 하였다. 그 殘渣에 ethyl ether 30ml를 加하여 4°C에서 24時間 抽出한 다음, 3回 遠沈洗滌하고 上澄液을 ether抽出分劃(EES)으로 하였다.

各抽出分劃은 약간의 混合物이 섞여 있었기 때문에 濾過紙로 걸른 다음 50°C에서 rotary evaporator로 減壓濃縮하여 乾固시킨 다음 水抽出分劃에는 이온交換水 5ml를 加하여 溶解시켜 試驗用液으로 使用하였다. ethanol抽出分劃은 ethanol 0.8ml를 加하여 溶解시킨 다음 水 4.2ml를 加하여 ethanol濃도가 16%되도록 稀釋하여 試驗用液으로 하였다. ether抽出分劃은 水에 溶解되지도 않고 또 ether와 水이 混和하지 않고 分離되기 때문에, 그리고 더우기 ether에 依한 植物組織의 侵害가 커서 이 分劃은 生物檢定에서 除外시키고 말았다. 殘渣는 白色乾固物 5mg을 秤量하여 이온交換水 1ml에 懸濁시켜 이것을 供試液으로 使用하였다.

生物檢定法: 20°C, 12時間의 光週期인 growth chamber內에서 2週間 育苗한 大麥의 第2葉을 先端에서 부터 5~6cm 길이로 切取하였다. 濕室로 한 petri dish에 U管을 놓고 그 위에 切取葉片을 3枚씩 配列한 다음 各葉片의 表面에 3個所씩 30μl의 위에서 調製한 試驗液을 滴下한 다음 뚜껑을 덮고 aluminum foil로 싸서 暗黑으로 하여 20°C에 20~24時間 靜置한 後 alcohol lactophenol solution에 넣고 靚여 葉綠素를 脫色시킨 다음 螢光顯微鏡下에서 處理組織에 螢光誘導 與否를 調査하였다.

結果 및 考察

各分劃의 螢光反應誘導能: 葉表面에 各分劃의 試驗液을 滴下處理하는 生物檢定에 있어서의 結果는 Table 1.에 表示한 바와 같이 非發芽孢子와 發芽孢자의 兩 ethanol 抽出分劃 모두에서 螢光反應을 나타냈고 水抽出分劃이나 抽出殘渣에서는 거의 혹은 全혀 反應을 나타내지 않았다. 이 反應은 非發芽孢자의 抽出分劃에서 보다는 發芽孢자의 抽出分劃에서 훨씬 더 強하게 나타났으며 試驗液의 40倍稀釋液에서까지 明確한 陽性反應을 보였다. 한편 對照로서 ethanol 15% 및 20%, 그리고 이온交換水의 處理에서는 全혀 陰性反應이었다.

水抽出分劃에서 多少陽性反應이었던 것은 分別過程에서 약간 汚染되지 않았나 생각된다. 그런데 病原菌 race 1과 非親和性品種인 Turkey 290에서나, 親和性品種인 Kobingataki에서나 反應에 있어서 24時間處理後의 結果로는 뚜렷한 差異가 없었다.

Table 1. Autofluorescence-elicitor activity of each fraction prepared from conidia of *Erysiphe graminis hordei* race 1, to the leaf cells of Barley.

Tested spore	Fraction	Diluted (folds)	Fluorescence response	
			Turkey 290 (incompatible)	Kobingataki (compatible)
Ungerminated	WS	1	±	±
		5	-	-
		5	+	+
		10	+	+
		20	+	+
		40	±	±
	80	-	-	
	Residue	1	-	-
Germinated	EtS	1	+	+
		5	-	-
		5	++++	++++
		10	+++	+++
		20	++	++
		40	+	+
	80	-	-	
	Residue	1	-	-
Control	EtOH	15%	-	-
		20%	-	-
		Water	-	-

各抽出分劃 그自體의 螢光性: 前實驗에서 ethanol抽出分劃에서만 螢光反應을 나타냈는데 이 螢光反應이 ethanol抽出分劃의 誘導에 依해 表面組織에서 生成된 것인지 아니면 그 抽出分劃自體가 螢光性인 어떤 物質이어서 이것이 組織에 浸透되어 螢光을 發하는 것인지를 밝히기 爲하여 各抽出分劃自體의 螢光性을 調査하였다. 그結果 Table 2에서 보는 바와 같이 水抽出分劃과 ether抽出分劃은 螢光을 發하고 있었으나 ethanol抽出分劃과 抽出殘渣는 螢光性을 가지고 있지 않았다.

螢光反應誘導에 要하는 期間: 發芽孢자의 磨碎液을 葉表面에 處理하여 螢光反應의 誘導에 要하는 期間을 調査한 結果 Table 3에 表示한 바와 같이 處理 8時間에 incompatible인 Turkey 290에서는 螢光反應이 뚜렷하

Table 2. Autofluorescence of each extract-fraction itself of *Erysiphe graminis hordei* under the fluorescence microscope.

Fraction	FL response
WS	+++
EtS	±
EES	++++
residue	±

게 認定되었으나 Compatible인 Kobingataki品種에서는 反應이 認定되지 않은것 같았다. 그러나 處理16時間以後에는 兩品種 모두 同一하게 螢光反應을 나타냈었다.

以上の結果를 考察해 보건데 브리퀸가루病菌의 侵入部位에 出現하는 抗菌性螢光物質은 分生孢子的 ethanol抽出物에 의해 誘導됨이 明白해졌다. 이 ethanol抽出物이 어떠한 化合物인지는 아직 알 수 없지만 여러가지 操作上으로 보아 比較的 安定된 物質인듯 하다 이와는 別途實驗에 依하면 大麥葉의 菌侵入部の 螢光化는 病原菌이 아닌 人爲的인 傷處에 依해서도 나타난다²⁴⁾. 그런데 侵入部の 表皮細胞나 葉肉細胞에 나타난 螢光이나 傷處에 依해 나타난 葉肉細胞의 螢光이나 모두 545nm에서 最大値를 나타내는 螢光 spectrum을 가지고 있다고 한다²⁴⁾. 本實驗의 ethanol抽出分劃에 依해 誘導된 螢光도 마찬가지로 545nm에서 最大値를 가지고 있다. 따라서 이 螢光物質 역시 病原菌의 侵入이나 傷處에 依해 誘導된 螢光物質과 同一한 것이라 생각된다.

現在까지 相當數의 phytoalexin elicitor가 報告되어 왔는데 그 大部分이 病原菌의 細胞壁에서 抽出되었고^{2-12, 17, 19, 20, 21)} glycoprotein인 것이 많은 것 같다. 本實驗에서 抽出된 elicitor가 어떤 物質인가는 아직 論議할 단계에 있지 않으나 分生孢子的 細胞壁의 어떤 物質이

Table 3. Period for induction of fluorescence to the leaf cells of Barley by the spore homogenate of *Erysiphe graminis hordei*

Periods treated	Fluorescence activity	
	Turkey 290 (incompatible)	kobingataki (compatible)
4hr	--	-
8	+	±
16	++	++
20	+++	+++
24	++	++

란 것만은 明白하다. 그리고 實施해은 抽出過程의 여러가지 操作을 考慮해 볼때 比較的 安定된 物質이 아닌가 생각되기도 한다.

Ethanol抽出分劃의 處理에 依한 螢光化細胞의 誘導는 Table 3에서와 같이 處理 16時間後에는 incompatible인 Turkey 290品種이나 compatible인 Kobingataki品種이 똑같이 陽性反應을 나타내고 있다. 다만 處理 8時間까지의 反應에서 差異가 있는 것으로 보아 抵抗性과 螢光化細胞誘導能間의 相關은 感染初期에 있지 않다는가 생각된다. 다시 말하면 抵抗性品種에서는 螢光化細胞의 出現이 感受性品種에서 보다 빨리 나타나며 이로 인해 病原菌의 細胞內進展이 抑制되지 않는가 생각할 수도 있다. 그러나 本實驗의 結果만으로는 아직 무엇이라고 確實한 結論을 誘出하기란 어려우며 앞으로 보다 詳細한 實驗結果에 對期待를 거는 바이다. 뿐만 아니라 elicitor의 分離, 精製 및 分子構造가 계속해서 檢討되어야 할 것으로 생각된다.

摘 要

브리퀸가루病(*Erysiphe graminis hordei* race I)에 依한 大麥葉侵入部に 抗菌性 螢光化細胞를 誘導하는 物質의 抽出分劃을 얻기 爲하여 實驗을 實施한 結果 分生孢子的 ethanol抽出分劃이 螢光化細胞의 誘導活性을 가지고 있음이 밝혀졌다. 이 分劃은 非親和性인 Turkey 290品種이나 親和性品種이나 마찬가지로 螢光化細胞 誘導活性을 나타냈으나 그 誘導에 要하는 時間은 Turkey 290에서 8時間以內 Kobingataki에서 16時間以內이었다.

參 考 文 獻

1. Anderson-Prouty, A.J. and P. Albersheim: Host-pathogen interactions. VIII. Isolation of a pathogen-synthesized fraction rich in glucan that elicits a defense response in the pathogen's host. *Plant Physiol.* 56 : 286~291, 1975.
2. Anderson, A.J.: Isolation from three species of *Celletotrichum* of glucan-containing polysaccharides that elicit browning and phytoalexin production in bean. *Phytopathology* 68 : 189~194, 1978.
3. Anderson, A.J.: Elicitor activity of cell wall preparations from *Fusarium* species(abstract). *Phytopathology News* 12 : 258, 1978.
4. Ayers, A.R., J. Ebel, F. Finelli, N. Berger and

- P. Albersheim. Host-Pathogen interactions. IX. Quantitative assay of elicitor activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. Plant Physiol. 57 : 751~759, 1976.
5. Ayers, A.R., B. Valent, J. Ebel, and P. Albersheim. Host-pathogen interactions. XI. Composition and Structure of wall-released elicitor fractions. Plant Physiol. 57 : 766~774, 1976.
 6. Ayers, A.R., J. Ebel, B. Valent, and P. Albersheim. Host-pathogen interactions. X. Fractionation and biological activity of an elicitor isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. Plant Physiol. 57 : 760~765, 1976.
 7. Bostock, R., J.W. Henfling, and J.Kuč. Release and fractionation of components from mycelial cell walls of *Phytophthora infestans* which elicit the accumulation of sesquiterpenoid stress metabolites in potato (abstract). Phytopathology News 12 : 161, 1978.
 8. Frank, J.A. and J.D. Paxton. An inducer of soybean phytoalexin and its role in the resistance of soybeans to *Phytophthora* rot. Phytopathology 61 : 945~958, 1971.
 9. Henfling, J.W., and R. Bostock. Zoospores and zoosporangia of *Phytophthora infestans* as elicitors of terpenoid accumulation in potato tubers (abstract). Phytopathology News 12 : 161, 1978.
 10. Keen, N.T. Specific elicitors of plant phytoalexin production: determinants of race specificity in pathogen. Science 187 : 74~75, 1975.
 11. Keen, N.T. Surface glycoproteins of *Phytophthora megasperma* var. *sojae* function as race specific glyceollin elicitors in soybean (abstract). Phytopathology News 12 : 221, 1978.
 12. Lisker, N. and J. Kuč. Elicitor of terpenoid accumulation in potato tuber slices. Phytopathology 67 : 1356~1359, 1977.
 13. Mayama, S., and J. Shishiyama. Histological observation of cellular responses of barley leaves to powdery mildew infection by UV-fluorescence microscopy. Ann. Phytopath. Soc. Japan 42 : 591~596, 1976.
 14. Mayama, S., and J. Shishiyama. Detection of cellular collapse in albino barley leaves inoculated with *Erysiphe graminis hordei* by UV-fluorescence microscopy. Ann. Phytopath. Soc. Japan 42 : 618~620, 1976.
 15. Mayama, S., H. Doyota, and J. Shishiyama. Fluorescent microscopic studies on the hypersensitive necrosis in powdery-mildewed barley leaves. Phytopath. Z. 92 : 125~131, 1978.
 16. Mayama, S., J. Shishiyama. Localized accumulation of fluorescent and UV-absorbing compounds at penetration sites in barley leaves infected with *Erysiphe graminis hordei*. Physiological plant pathology. 13 : 347~354, 1978.
 17. 眞山滋志, 谷利一 松浦克典 上野民父, エンパク冠銹菌感染初期におけるフィトアレキシンアベナルミン類生成様相. 日本植物病理学会大会プログラム講演要旨豫稿集 II-1項 1979.
 18. Müller, K.O., Einige einfache Versuche zum Nachweis von Phytoalexinen. Phytopath. Z. 27 : 237~253, 1956.
 19. 佐藤研二, フィトアレキシンのエリシター, その一般的性質と作用機作を中心に. 化学と生物 16 : 566~568, 1978.
 20. Schwochau, M.E., and Hardwiger, L.A. Stimulation of pisatin production in *Pisum Sativum* by actinomycin D and other compounds. Archives of Biochemistry and Biophysics 126 : 731~733, 1968.
 21. Stekoll, M. and C. A. West, Purification and properties of an elicitor of castor bean phytoalexin from culture filtrates of the fungus *Rhizopus stolonifer*. Plant Physiol. 61 : 38~45, 1978.
 22. 豊田秀吉, 北宜裕, 金基清, 獅山慈孝, オオムぎょうどんこ病感染葉における抗菌性蛍光物質の分離, 日本植物病理学会大会プログラム講演要旨豫稿集 II-7項. 1979.
 23. 豊田秀吉, 北宜裕, 獅山慈孝, 感染反応の蛍光顕微鏡による細胞化学的研究, 日本植物病理学会. 昭和54年度植物感染機作病理化学談話会, 植物感染における制禦機構 pp.35~40, 1979.
 24. Yoshikawa, M. Diverse modes of action of biotic and abiotic phytoalexin elicitors. Nature 275 : 546~547, 1978.