

リンゴ斑点落葉病菌が生産するAM毒素の宿主
特異的作用に関する細胞・生理学的研究

霜村 典宏

(1 9 9 2)

Cytological and Physiological Studies on Host-Specific

Actions of AM-toxin Produced by *Alternaria*

alternata Apple Pathotype

Norihiro Shimomura

(1 9 9 2)

目次

| | 頁 |
|--|----|
| 第 1 章 緒論 ----- | 1 |
| 第 2 章 光照射葉における AM 毒素作用 ----- | 10 |
| 第 1 節 AM 毒素の原形質膜への作用に対する 光の効果 ----- | 11 |
| 第 2 節 AM 毒素の葉緑体への作用に対する 光の効果 ----- | 16 |
| 1 . 葉緑体微細構造変化に対する 光の効果 ----- | 16 |
| 2 . 明下 CO ₂ 固定阻害に対する光の効果 -- | 18 |
| 第 3 節 考察 ----- | 21 |
| 第 3 章 AM 毒素の 2 つの作用点とその病理的意義 | 29 |
| 第 1 節 宿主および非宿主葉での AM 毒素作用 | 30 |
| 1 . 投与量 - 反応相関からみた AM 毒素作用 の宿主特異性 ----- | 30 |
| 2 . AM 毒素の感染誘発効果と毒素作用点と の関係 ----- | 34 |

| | | |
|-------|-----------------------------------|----|
| 第 2 節 | SH基修飾剤処理葉における AM毒素作用 | 36 |
| 1 . | SH基修飾剤処理葉における AM毒素の 原形質膜への作用 | 37 |
| 2 . | SH基修飾剤処理葉における AM毒素の 葉緑体への作用 | 40 |
| 3 . | SH基修飾剤処理葉での病原菌の 感染行動 | 45 |
| 第 3 節 | 考察 | 47 |
| 第 4 章 | AM毒素処理感受性リンゴ葉における イオン漏出部位 | 54 |
| 第 1 節 | ピロアンチモン酸カリ法によって形成 される反応沈殿物の観察 | 56 |
| 第 2 節 | 分析電顕による反応沈殿物の元素解析 | 59 |
| 第 3 節 | AM毒素処理によって誘起される微細 沈殿の形成時期 | 62 |
| 第 4 節 | 考察 | 63 |
| 第 5 章 | リンゴ葉の原形質膜 ATPase活性に対する AM毒素の効果 | 71 |
| 第 1 節 | <i>in situ</i> ATPase活性に対する効果 | 72 |
| 第 2 節 | <i>in vitro</i> ATPase活性に対する効果 | 80 |

| | |
|------------|-----|
| 第 3 節 考察 | 87 |
| 第 6 章 総合考察 | 97 |
| 要約 | 108 |
| 引用文献 | 114 |

第 1 章 緒 論

リンゴ斑点落葉病は、*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler apple pathotype [39, 44] (旧名 *A. mali* Roberts の特定の系統) によって引き起こされる病害であり、1956年に日本でその発生が記録 [67] されて以来、リンゴ栽培地域における最も重要な病害の 1 つとなっている。本病は、多数のリンゴ品種のうち、インド、デリシャス系の特定の品種だけに激しく発生し、宿主選択性の高い病害として知られている。この顕著な品種選択性は、当時多くの研究者の注目を集め、植物病害における宿主選択機構研究のモデル系として、研究の対象となってきた。

この問題に関して、1966年沢村 [68] は、リンゴ斑点落葉病菌の培養ろ液中に、感受性品種にのみ毒性を示す代謝毒素の存在を明らかにし、本毒素が宿主特異的毒素 (host-

specific toxin、以下 HST と略す) の 1 種であることを示唆した。1970 年代中頃、Okuno ら [48] および Ueno ら [92, 93] はそれぞれ独立に本毒素の構造を決定し、両者の結果が一致した。本毒素は構造類似の 3 種の環状テトラデプシペプチドからなる複合毒素で、AM 毒素 I (alternariolide)、II および III と命名された (Fig. 1)。また、本毒素の全化学合成が行われ、構造の妥当性が証明された [18, 32, 74]。

AM 毒素の発見に先駆け、1964 年、Pringle と Scheffer [65] はエンバク *Victoria blight* 病菌 (*Helminthosporium victoriae*) やモロコシ milo 病菌 (*Periconia circinata*) の毒素の研究から HST の概念を初めて提唱した。Scheffer らは、HST の具備すべき条件として、① 宿主植物にだけ毒性を発揮する病原菌の代謝産物であること、② 病原菌の毒素生産能の有無と病原性が一致すること、③ 宿主品種間の毒素耐性と病害抵抗性の序列が一致すること、④ 感染によって誘起される宿主組織の生化学

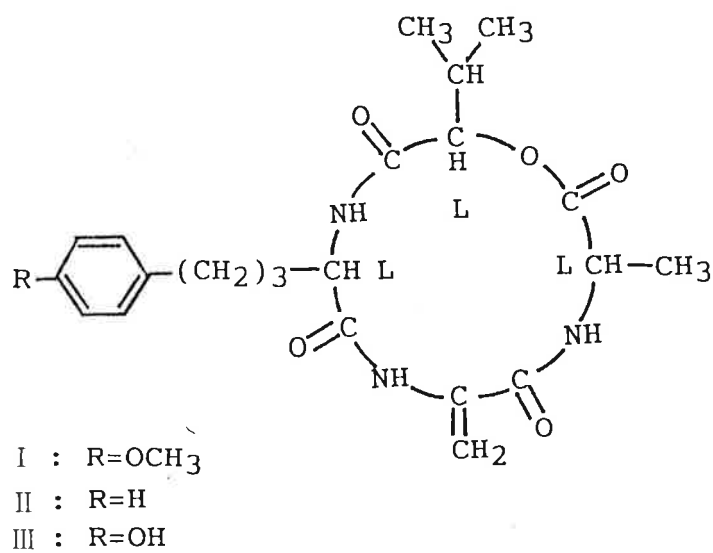


Fig. 1. Chemical structures of AM-toxins.

的諸変化が毒素処理によって再現されることの4つの項目を挙げた。その後、これらの条件に加えて、⑤病原菌胞子発芽時に毒素が放出されること[46]、⑥放出毒素による宿主植物の菌受容化が誘導されること[98]の2つの重要な条件が補足され、HSTの定義が強化された。

このようなHST概念の確立によって、HSTはもはや古典的意味における毒素ではなく、病原菌の病原性発現の第1次決定因子(primary determinant)、感染を成功させるための始動因子(initiation factor)あるいは宿主識別因子(host recognition factor)などと考えられるようになってきている[22, 26, 28, 40, 42, 43, 49, 53]。このようなHSTの概念に適合する毒素の存在は *Alternaria* および *Helminthosporium* 属菌を中心にこれまでに14例明らかとなっている(Table 1)。

AM毒素は斑点落葉病菌の代謝産物であり、宿主リンゴ葉に毒性を発揮する[68]ことから、

Table 1. Host-specific toxins known to date (1991)

| Disease | Pathogen | | Host | | |
|----------------------------------|---|-------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| | Species/Pathotype (previous name) | Toxin (synonymous designation) | Host range (susceptible cultivar) | Genetic background (dominance) | Target site |
| Alternaria blotch of apple | <i>Alternaria alternata</i> Apple pathotype (<i>A. mali</i>) | AM-toxin I, I, & I | Apple (Red Gold, Starking) | Multiple genes (susceptible) | Chloroplast and plasma membrane |
| Alternaria stem canker of tomato | <i>A. alternata</i> Tomato pathotype (<i>A. alternata</i> f.sp. <i>lycopersici</i>) | AL(or AAL)-toxin (I & I or Ta & Tb) | Tomato (Earlypak 7, First) | Single (homo) gene (susceptible) | Mitochondrion? ACFase? |
| Black leaf spot of strawberry | <i>A. alternata</i> Strawberry pathotype | AF-toxin I, I, & I | Strawberry (Morioka-16) | Single (hetero) gene (susceptible) | Plasma membrane |
| Black spot of Japanese pear | <i>A. alternata</i> Japanese pear pathotype (<i>A. kikuchiana</i>) | AK-toxin I & I | Japanese pear (Nijisseiki) | Single (hetero) gene (susceptible) | Plasma membrane |
| Brown spot of rough lemon | <i>A. alternata</i> Rough lemon pathotype, (<i>A. citri</i>) | ACR(L)-toxin I | Rough lemon | --- | Mitochondrion |
| Brown spot of tangerine | <i>A. alternata</i> Tangerine pathotype, (<i>A. citri</i>) | ACT-toxin I & I ACTG-toxin A & B | Tangerine (Dancy) | --- | Plasma membrane |
| Brown spot of tobacco | <i>A. alternata</i> Tobacco pathotype, (<i>A. longipes</i>) | AT-toxin | Tobacco | --- | Mitochondrion |
| Eye spot of sugarcane | <i>Bipolaris sacchari</i> (<i>Helminthosporium sacchari</i>) | HS-toxin A, B, & C | Sugarcane (51-NG97) | --- | Plasma membrane |
| Milo disease of sorghum | <i>Periconia circinata</i> | PC-toxin (Peritoxin A & B) | Grain sorghum (Giant milo) | Single gene (susceptible) | Plasma membrane |
| Northern leaf spot of maize | <i>Cochliobolus carbonum</i> (<i>B. carbonum</i>) race I | HC-toxin I, I, & I | Maize (K-44, K-61) | Multiple genes (resistant) | Plasma membrane |
| Southern leaf spot of maize | <i>C. heterostrophus</i> (<i>B. maydis</i>) race T | HMT-toxin band 1, 2, 3, & 1' | Maize (Tms cytoplasm) | Cytoplasmic | Mitochondrion |
| Target leaf spot of tomato | <i>Corynespora cassicola</i> | CC-toxin | Tomato (Ife no.1) | --- | --- |
| Victoria blight of oats | <i>Cochliobolus victoriae</i> (<i>B. victoriae</i>) | HV-toxin (victorin C) | Oats (Victoria) | Single (hetero) gene (susceptible) | Plasma membrane |
| Yellow leaf blight of maize | <i>Phyllosticta maydis</i> | PM-toxin A, B, C, & D | Maize (Tms cytoplasm) | Cytoplasmic | Mitochondrion |

HST 条件 ① を満たすことは明らかである。上野 [91] は、斑点落葉病菌の強病原性菌株由来の培養ろ液と弱菌株由来の培養ろ液の壊死毒性を比較し、前者が後者に比べて著しい壊死斑を形成させることを明らかにしており、AM毒素は HST の条件 ② を満たすと考えられる。リンゴ品種は斑点落葉病に対して感受性、中程度抵抗性、および抵抗性の 3 群に分類でき、これらは AM毒素反応性による分類と一致する [30, 35]。AM毒素は感受性リンゴ品種葉には 10^{-8} M という極めて低い濃度で、中程度抵抗性リンゴ品種葉には 10^{-5} M で葉脈壊死を引き起こす。しかし、抵抗性品種葉では 10^{-4} M の毒素を処理しても壊死は誘起されない。なお、二十世紀などの数種の日本ナシ品種も中程度抵抗性群に属し、 10^{-5} M の AM毒素に反応を示し、斑点落葉病菌にも中程度の抵抗性を示す [35]。以上のように AM毒素はリンゴ品種に対して顕著な品種特異性を示し、HST の条件 ③ を満たす。Kohmoto ら [23] は斑点落葉

病菌接種感受性葉から電解質が異常漏出するが抵抗性葉からは漏出しないこと、また、そのような機能障害はAM毒素処理感受性葉で認められることを明らかにしている。この結果はAM毒素がHSTの条件④を満たすことを示している。さらに、Kohmotoら[23]はAM毒素が胞子発芽時に分泌されていることを見出し、胞子発芽時の毒素生成の感染場面における重要性を指摘し、AM毒素がHSTの条件⑤を満たすことを明らかにしている。非病原性の *Al-ternaria* にAM毒素を混ぜ、感受性リンゴ葉に噴霧接種すると、あたかも、病原菌のように宿主組織に侵入し病斑を形成する[25]。この結果はAM毒素がリンゴ細胞に菌受容化を誘導したことを示し、AM毒素はHSTの条件⑥を満たすことを表している。

以上の様にAM毒素はHSTの条件をすべて満足していることから本毒素はHSTであり、リンゴ斑点落葉病菌の病原性に、本毒素分子が直接関与していることは明白である。したが

つて、本病で認められる品種特異的な感染機構を解明するためには、まず、AM毒素の宿主リンゴ葉に対する特異的な作用機構を解析する必要がある。

現在まで、AM毒素による宿主リンゴ葉の生理的機能障害や微細構造変化から、毒素の細胞内第1次作用点の解明を中心とした研究が進められ、本毒素が原形質膜と葉緑体の2カ所を初期作用点としていることが明らかとなっている[25, 28, 57, 60]。しかし、AM毒素作用における両作用点の役割、毒素作用部位の細胞内局在性、毒素作用様式など不明な点が数多く残されている。そこで、本論文では、AM毒素が仲介する斑点落葉病菌の宿主選択・感染機構を解明することを目的とし、AM毒素のリンゴ葉に及ぼす特異的作用を生理・生化学的および微細構造学的視点から解析した。

本研究は、鳥取大学大学院農学研究科（昭和62年—平成元年、修士課程）および鳥取大学大学院連合農学研究科（平成元年—4年、

博士課程後期課程)において行ったものである。論文の内容の大部分は、日本植物病理学会、米国植物病理学会において発表した[76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 90]。

本論文を草するにあたり、終始懇切なご指導とご高覧賜わった鳥取大学農学部教授甲元啓介博士、同教授尾谷浩博士ならびに島根大学農学部教授野津幹雄博士に深く感謝の意を表す。また、実験中種々のご助言とご教示を賜わった鳥取大学農学部助手児玉基一朗氏ならびに帝京大学医学部助手朴杓允博士に厚くお礼申し上げる。また、実験に際して熱心な協力をえた鳥取大学農学部植物病学・植物細胞工学両研究室の諸氏に感謝の意を表す。

第 2 章 光照射葉における AM 毒素作用

AM毒素処理リンゴ葉における壊死斑形成は光照射で著しく抑制されることが報告されている [88, 89, 90]。その毒素作用におよぼす光の効果については、これまで次のことが明らかとなっている [90]。①光が関与する過程は毒素処理後 2 ~ 3 時間にある。②壊死斑形成の抑制に有効な光のスペクトルは 570 ~ 680 nmの範囲にあり、602 nm付近で最大の効果が認められる。③本効果は光合成阻害剤の影響を受けない。④毒素処理葉に誘起される電解質の異常漏出には光は影響しない。しかし、光がどのような毒素障害過程に関与するのかについては、全く不明である。そこで、第 2 章では、この問題を明らかにする目的で、特に毒素の初期作用が観察されているオルガネラ、すなわち原形質膜および葉緑体に焦点をあて、これらオルガネラへの毒素作用に対す

る光の効果について解析した [79, 82, 90]。

第 1 節 AM毒素の原形質膜への作用に対する 光の効果

AM毒素の宿主原形質膜への作用としては、電解質の異常漏出のほかに毒素が感受性細胞の原形質膜の陥入を誘起することが知られている [59, 60, 64]。そこで、第 1 節では、原形質膜への毒素作用に対する光の効果について原形質膜の陥入現象を指標として電子顕微鏡下で調査した。

1) 材料および方法

リンゴ葉の表皮にカミソリで傷を付け、そこに 10^{-7} Mの AM毒素 I を、また、対照として脱イオン水を $20 \mu\text{l}$ 処理した。処理葉を暗黒下あるいは光照射下（白色光ランプ、 $630 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, ナショナル）で、 26°C 温室中に 3、6、12、24 時間静置した後、3% グルタルアルデ

ヒドを含む0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.2)で4℃、3時間前固定した。さらに、1%四酸化オスミウムを含む同緩衝液で後固定した。固定試料をアルコールで脱水、次いでスパー樹脂に包埋した。ダイヤモンドナイフ装着のPorter-Blum MT-2で超薄切片(80~100 nm)を作製し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色し、透過型電子顕微鏡(JEM 100CX)で観察した。

2) 実験結果

10^{-7} MのAM毒素Iを感受性リンゴ(品種、レッドゴールド)に処理し暗黒下に静置すると、葉脈壊死が12時間後に形成され、24時間後には葉肉部に拡大した。しかし、光照射下に静置したリンゴ葉での壊死斑形成は24時間後でも著しく抑制された。なお、この濃度のAM毒素で処理された中程度抵抗性(品種、紅玉(ジョナサン))および抵抗性(品種、マヘ7)リンゴ葉では暗黒下でも壊死斑形成は認められなかった。

原形質膜の微細構造変化は、AM毒素処理後暗黒下に3時間静置した感受性リンゴ葉で観察された。毒素は原形質連絡糸近傍で原形質膜の陥入を誘起し、陥入部位ではデスモ小管の突出が観察された (Fig. 2C)。このような原形質膜の陥入は光照射葉でも認められた (Fig. 2E)。なお、水処理の感受性葉や毒素処理抵抗性葉では微細構造変化は認められなかった (Fig. 2A, BおよびD)。次に、原形質連絡糸での原形質膜陥入の出現頻度を継時的に高倍率下 ($\times 94,000$) で求めた。その結果、光照射および暗黒下において原形質膜の陥入はほぼ同じ頻度で認められた (Table 2)。一方、中程度抵抗性および抵抗性葉では原形質膜の陥入は全く認められなかった (Table 2)。

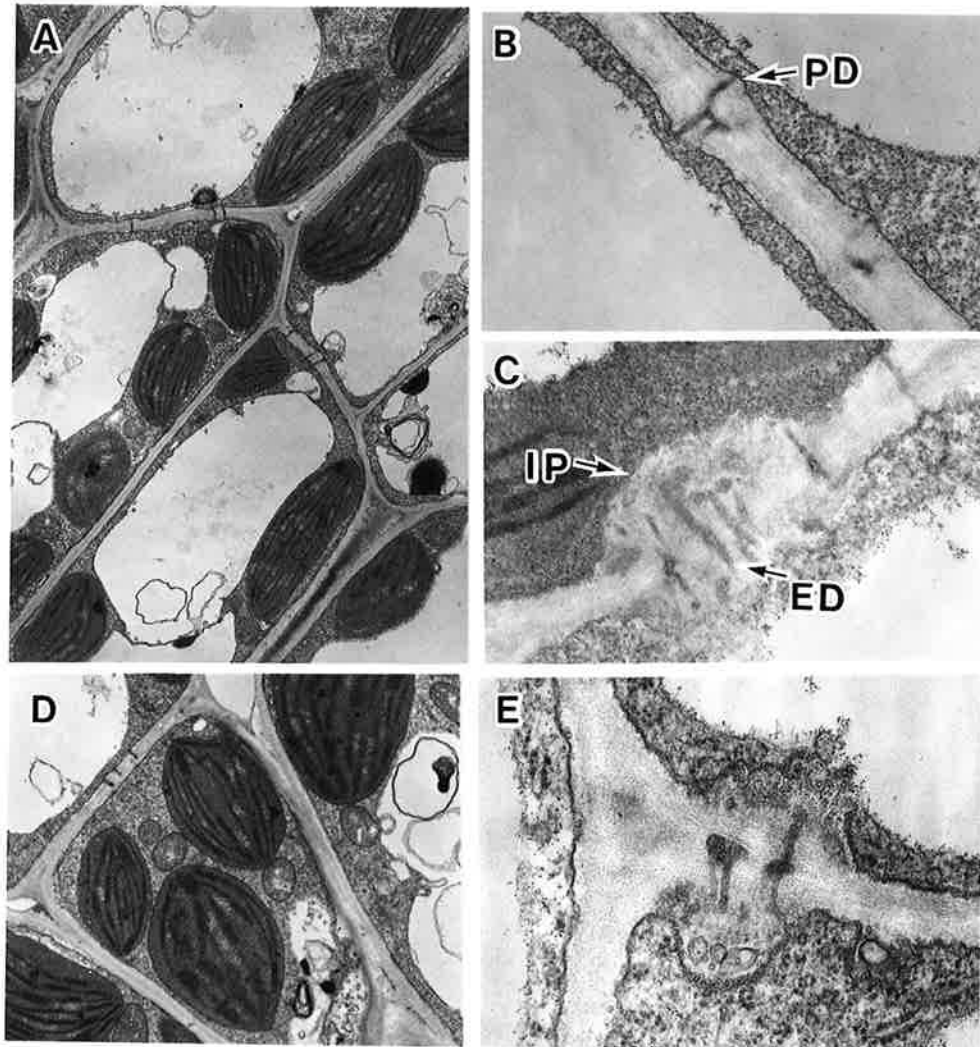


Fig. 2. Effect of light on invagination of plasma membranes in apple leaves. A, Ultrastructure of vascular bundle sheath cells of susceptible apple leaf (cv. Red Gold) treated with deionized water for 24 hr in the dark. ($\times 6,300$). B, Plasma membranes at plasmodesmata (PD) in susceptible apple leaf (cv. Red Gold) treated with deionized water for 24 hr in the dark. ($\times 30,000$). C, Plasma membranes at plasmodesmata in susceptible apple leaf (cv. Red Gold) treated with 10^{-7} M AM-toxin for 24 hr in the dark. The toxin-treated cells show invaginations of plasma membrane (IP). Extended desmotubules (ED) were found at invaginated portions. ($\times 30,000$). D, Resistant apple leaf (cv. Mahe 7) treated with 10^{-7} M AM-toxin for 24 hr in the dark. Ultrastructural changes were not observed in the cells. ($\times 7,400$). E, Plasma membranes at plasmodesmata in susceptible apple leaf (cv. Red Gold) treated with 10^{-7} M AM-toxin for 24 hr in light ($630 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). Light-irradiated leaf had the toxin-induced invagination of plasma membrane. ($\times 30,000$).

Table 2. Effect of light irradiation on plasma membrane invagination at plasmodesmata of apple leaves induced by AM-toxin I^{a)}

| Cultivar | Treatment | Time (hr) | Occurrence of invaginated plasma membrane at plasmodesmata (%) | |
|----------|-----------|-----------|--|------------|
| | | | Dark | Light |
| Red Gold | Toxin | 3 | 6.8 ± 4.8 | 3.1 ± 2.4 |
| | Toxin | 6 | 16.2 ± 0.4 | 12.6 ± 3.5 |
| | Toxin | 12 | 24.5 ± 11.4 | 21.5 ± 8.4 |
| | Toxin | 24 | 33.9 ± 5.5 | 28.7 ± 4.1 |
| | Water | 24 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 |
| Jonathan | Toxin | 24 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 |
| | Water | 24 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 |
| Mahe 7 | Toxin | 24 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 |
| | Water | 24 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 |

a) Apple leaves were treated with 10^{-7} M AM-toxin I, and incubated in the dark or light ($630 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). At least 100 cells, and 100 plasmodesmata were observed for each treatment in one experiment. Values represent the means and standard deviations of three replications.

第 2 節 AM毒素の葉緑体への作用に対する光の効果

AM毒素のもう 1 つの作用点である葉緑体への毒素作用に対する光の効果については、全く明らかにされていない。そこで、第 2 節では毒素が誘起する微細構造変化（葉緑体グラナメラの小胞化）[60]に対する光の効果と毒素による明下 CO₂ 固定阻害[25]に対する光の効果調べた。

1. 葉緑体微細構造変化に対する光の効果

1) 材料および方法

第 2 章第 1 節で作製した電子顕微鏡試料について観察を行った。

2) 実験結果

暗黒下において AM毒素により感受性リンゴ細胞（レッドゴールド）に誘起される葉緑体の微細構造変化はグラナメラの小胞化として観察された (Fig. 3B)。グラナメラの部

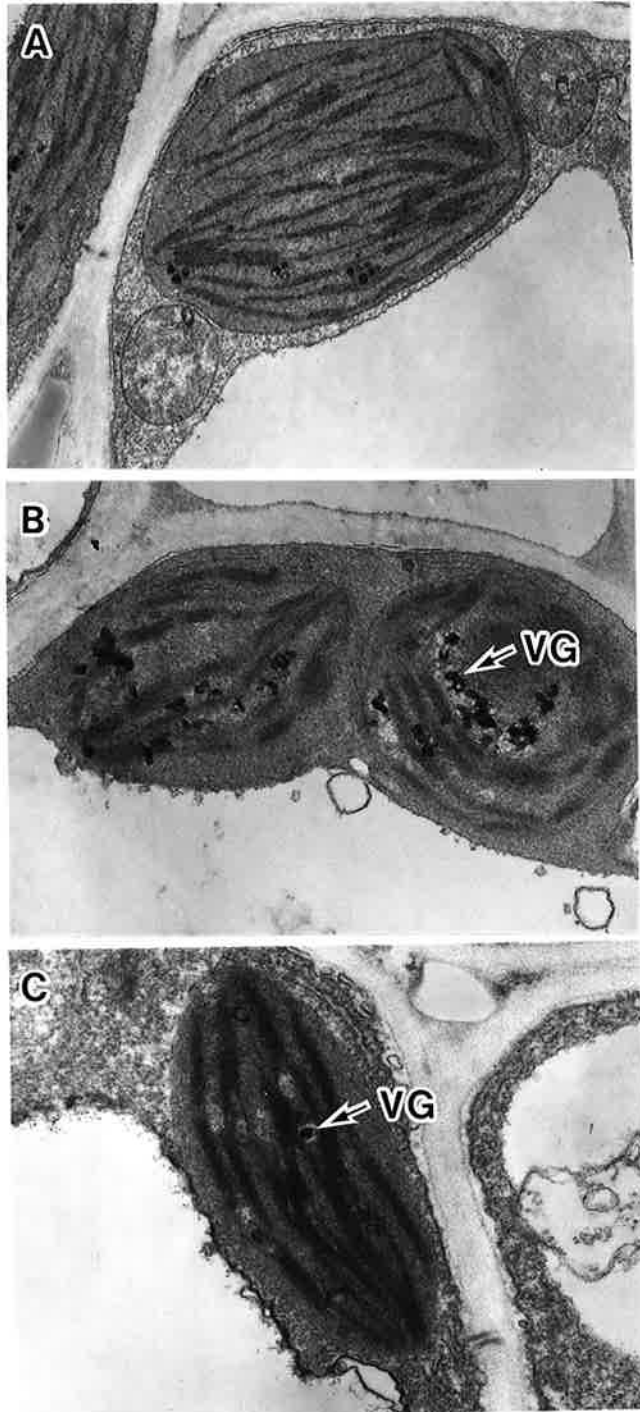


Fig. 3. Effect of light on vesiculation of grana lamellae in chloroplasts of susceptible apple leaves (cv. Red Gold). A, Chloroplasts of susceptible apple leaf treated with deionized water for 24 hr in the dark. No ultrastructural changes were observed. ($\times 18,000$). B, Chloroplasts of apple leaf treated with 10^{-7} M AM-toxin I for 24 hr in the dark. The toxin-treated cell shows vesiculations of grana lamellae (VG) in the matrix of chloroplasts. ($\times 18,000$). C, Chloroplast of apple leaf treated with 10^{-7} M AM-toxin I for 24 hr in light ($630 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). Light-irradiated leaf had the toxin-induced vesiculation of grana lamellae. ($\times 18,000$).

分的破壊と断片化や破壊されたグラナメラ破片周囲の低電子密度ハローの出現が観察された (Fig. 3B)。

AM毒素によって誘起される葉緑体の微細構造変化は、光照射葉でも同じ様に認められた (Fig. 3C)。さらに、感受性葉 (レッドゴールド) での葉緑体変性の頻度を求めた結果、光照射下および暗黒下両処理区において同様に経時的に増大し、24時間後にはそれぞれ約45%および53%に達した (Table 3)。しかし、中程度抵抗性 (紅玉) や抵抗性葉 (マヘ7) での変性はあまり観察されず、その変性頻度は24時間後でも数%にとどまった (Table 3)。

2. 明下CO₂固定阻害に対する光の効果

1) 材料および方法

リンゴおよびナシ葉ディスク (直径7 mm) にAM毒素I溶液または脱イオン水を30分間減圧浸透させ、暗黒下または光照射下 (630 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$)、26°Cに4時間静置した。葉ディスク

Table 3. Effect of light irradiation on vesiculation of grana lamellae in chloroplasts of apple leaves induced by AM-toxin I^{a)}

| Cultivar | Treatment | Time (hr) | Occurrence of vesiculated chloroplasts (%) | |
|----------|-----------|-----------|--|-------------|
| | | | Dark | Light |
| Red Gold | Toxin | 3 | 5.2 ± 3.6 | 3.6 ± 1.9 |
| | Toxin | 6 | 6.7 ± 0.6 | 4.9 ± 0.7 |
| | Toxin | 12 | 12.0 ± 3.5 | 16.2 ± 2.9 |
| | Toxin | 24 | 53.0 ± 7.2 | 44.7 ± 11.2 |
| | Water | 24 | 5.3 ± 2.6 | 3.0 ± 0.4 |
| Jonathan | Toxin | 24 | 4.5 ± 3.6 | 2.4 ± 0.9 |
| | Water | 24 | 4.4 ± 2.0 | 4.6 ± 3.5 |
| Mahe 7 | Toxin | 24 | 2.1 ± 1.0 | 1.4 ± 1.3 |
| | Water | 24 | 1.2 ± 0.8 | 3.2 ± 2.4 |

a) Apple leaves were treated with 10^{-7} M AM-toxin I, and incubated in the dark or light ($630 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). At least 100 cells, and 100 chloroplasts were observed for each treatment in one experiment. Values represent the means and standard deviations of three replications.

を無色透明のチャンバーに置き、2 N 塩酸 1 ml を含むペトリ皿をチャンバーの中央に置いた。マイクロシリンジで 20 μ l $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ 溶液 (3.7 mBq/mmol、1.85 MBq/ml) をペトリ皿に入れ、 $^{14}\text{CO}_2$ ガスを発生させた。チャンバー内の葉ディスクに、室温下で15分間1%硫酸銅5水和物(厚さ2 cm)を通して光照射(10 mW/cm^2)した。 $^{14}\text{CO}_2$ ガスを3 N KOHで回収した後、葉ディスクを0.5 ml の消化液(60% HClO_4 / 30% H_2O_2 、1:2、v/v)に入れ、60°C 下に6時間静置・消化した後、消化試料を10 ml のシンチレーター(トリトン X-100/トルエン、1:2、v/v、4% PPO、0.1% POPOP)に入れ、液体シンチレーションカウンター(Aloka LSC-700)で放射能活性を測定した。

2) 実験結果

AM毒素処理した感受性(レッドゴールド)および中程度抵抗性(紅玉および二十世紀)葉を光照射下および暗黒下に4時間静置し、明下 CO_2 固定能を測定した。その結果、光照

射、暗黒下を問わず、 10^{-8} M以上のAM毒素が感受性葉の、また、 $10^{-7} \sim 10^{-6}$ M以上のAM毒素が中程度抵抗性葉の明下CO₂固定能を阻害した (Fig. 4)。さらに、その阻害率は毒素濃度に依存して増大した (Fig. 4)。

第 3 節 考 察

AM毒素で処理した感受性リンゴ、中程度抵抗性リンゴおよびナシ葉を光照射下に静置すると、毒素による壊死斑形成が抑制されることを田平ら [88, 89, 90] が報告している。また、毒素によって引き起こされる電解質の異常漏出には光照射は影響を示さないことから、光は毒素の原形質膜への作用には直接関与していないものと推察している [88, 90]。そこで本論文の第2章の第1節で、原形質膜の陥入現象を指標として毒素の原形質膜への作用を調べた結果、原形質膜の陥入は光照射下、暗

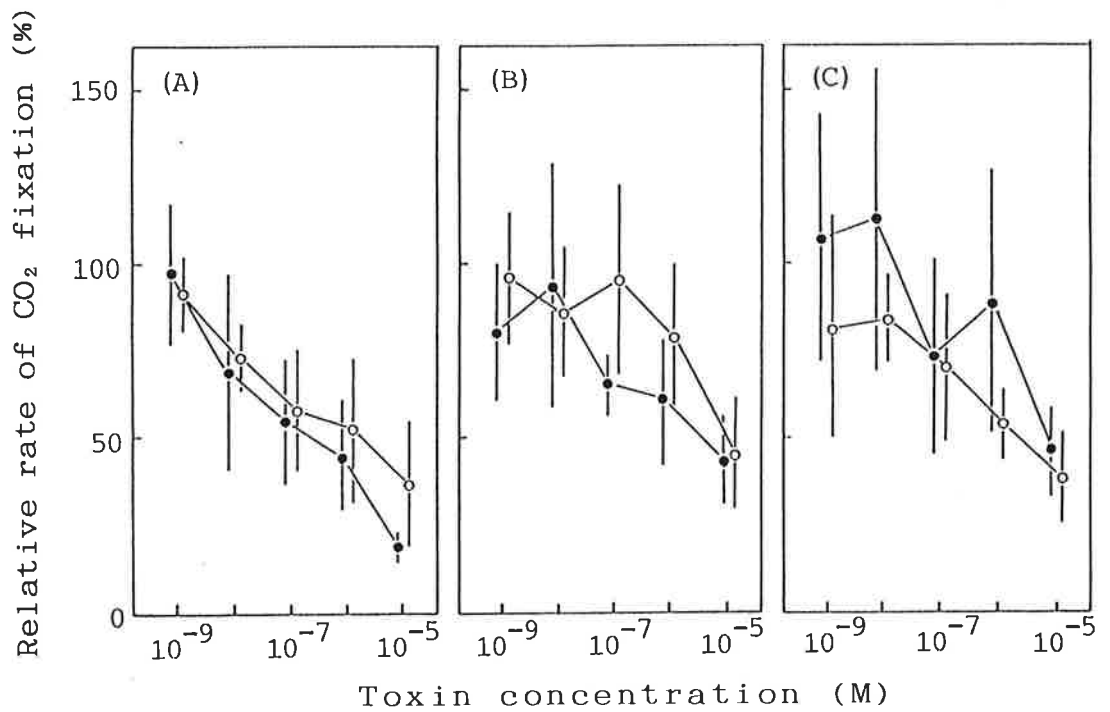


Fig. 4. Effect of light on inhibition of photosynthetic CO₂ fixation in apple cvs. Red Gold (A) and Jonathan (B), and Japanese pear cv. Nijisseiki (C) leaves induced by AM-toxin I. The leaves were treated with AM-toxin I solutions, and incubated in light (630 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) (○) or darkness (●). After 4 hr, CO₂ fixation in the leaves was measured. The vertical bars represent the standard deviations of three experiments.

黒下に静置したリンゴ葉で同様に認められ、毒素の原形質膜への作用には光が無関与であることを微細構造学的にも確認した。さらに、毒素のもう1つの作用点である葉緑体への毒素作用について調べた。毒素の葉緑体への作用を明下CO₂固定阻害と葉緑体グラナメラの崩壊で調べたが、毒素の葉緑体への作用にも光は全く関与しないことが示唆された。一方、田平ら[88,90]はAM毒素作用において光が抑制する過程は毒素処理2~3時間後にあることを報告している。したがって、AM毒素が原形質膜、葉緑体の両初期作用点に作用した後、光によって抑制される毒素作用過程が存在し、その過程を経て壊死に到るものと考察した。

Penicillium citrinum は citrinin[41]を、*A. alternata* は非特異的毒素 phenylacetic acid[37]および tenuazonic acid [19]を生産する。そこで、Tabiraら[90]は、これら非特異的な毒素によるリンゴ葉での壊死斑形成に

対する光の効果調べ、光は抑制効果を示さないことを明らかにし、光による壊死抑制効果はAM毒素作用に関連した特異的現象であることを指摘している。

植物において光利用の代謝系として葉緑体での光合成系があり、AM毒素作用における壊死抑制効果と光合成系との関連性が予想される。しかし、光合成電子伝達系の阻害剤であるDCMU、CAT、CCCP処理葉でも光抑制効果は認められる[90]。さらに、AM毒素作用における光抑制の有効スペクトルは570～680 nm (Max. 602 nm)であるのに対して[89, 90]、高等植物での光合成の有効スペクトルは600～680 nm (Max. 約 650 nm)であり[16]、両者の間には最大有効スペクトルが若干異なっている。以上のことから、AM毒素処理リンゴ葉での光による壊死抑制効果に、光合成系関与の可能性は少ないものと推察される。

AM毒素に加え他のHST研究においても毒素作用に対する光の効果は認められている。カ

ンキツ brown spot 病菌 タンジェリン 系統 (*A. alternata tangerine pathotype*) が生産する ACT 毒素 Ib と タンジェリン 葉 [17]、カンキツ brown spot 病菌 ラフレモン 系統 (*A. alternata rough lemon pathotype*) の ACR 毒素 と ラフレモン 葉 [27]、また、トウモロコシ ぐま 葉 枯 病菌 (*H. maydis* race T) が生成する HMT 毒素 と Texas 型 細胞質 雄性 不稔 系統 トウモロコシ 葉 [27] では、光によって毒素作用が抑制される。すなわち、HMT [6] および ACR [1] 毒素はいずれも感受性細胞の単離ミトコンドリアに初期作用を示すが、その初期作用には光は影響を示さない。しかし、ミトコンドリア作用後の両毒素によるそれぞれの感受性組織からの電解質の異常漏出と壊死斑形成は光照射によって抑制される [27]。これらの結果から、毒素によるミトコンドリア変調から原形質膜透過機能障害や壊死に至る信号伝達過程が光によって阻止されるものと考えられている。一方、Earle ら [11] は HMT 毒素の初期作用点で

あるミトコンドリアは毒素により著しく不活性化されているにもかかわらず、プロトプラストの崩壊は、光照射で抑制されることを明らかにしている。また、MacRae と Yoder [34] は HMT 毒素処理前にプロトプラストに光照射をすると毒素に対する感受性が鈍ることを明らかにした。Waltonら [94] は HMT 毒素はプロトプラスト内の ATP 含量の減少を誘起すること、また ATP 含量の減少は光照射によって抑制されるが、光合成電子伝達系の阻害剤である DCMU 処理によって光による抑制効果がキャンセルされることを明らかにしている。このことから、光の抑制効果は、毒素によるミトコンドリアの酸化リン酸化反応の不活性化による ATP の減少を、光照射によって活性化される光リン酸化反応が補償する仮説で説明されている [94]。しかし、AM 毒素作用における光抑制効果には光合成系は関与しないと思われ、本仮説では抑制効果を説明することは難しいものと思われる。

一方、トマトアルターナリア茎枯病菌 (*A. alternata* tomato pathotype、別名 *A. alternata* f. sp. *lycopersici*) の生産する AL (AAL) 毒素処理トマト葉 [36]、および、イネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) の生産する毒素処理イネ葉 [4] での壊死斑形成は光照射により促進される。しかし、これらの促進作用の機構に関しては全く明らかにされていない。

光によるエネルギー生産あるいは生体調節機能には、光合成以外の光化学反応系が関与していると考えられるが、フィトクロム [96] はそのような作用を営む生体色素の 1 例である。そこで、AM 毒素によって誘起された原形質膜あるいは葉緑体での機能障害の後、細胞死に至る信号伝達過程を、光によって励起あるいは活性化されたフィトクロムや他の光化学反応系が阻止していることも考えられる。しかし、現在のところ、この仮説を支持する結果は得られていない。今後、このような観

点からの研究により、AM毒素処理葉で見られる光による壊死抑制機構がさらに明らかにされるものと思われる。

第 3 章 AM 毒素の 2 つの作用点とその病理的意義

前章で述べたように、AM毒素は感受性リンゴ葉の原形質膜と葉緑体の 2 ヲ所に初期作用を示し、それぞれ電解質の異常漏出 [23]、原形質膜の陥入 [57, 59, 60, 64]、また、明下 CO₂ 固定阻害 [25] や葉緑体グラナメラの小胞化 [60] を誘起する。しかし、AM毒素作用において原形質膜あるいは葉緑体の機能障害や変調がどのように毒素の宿主特異性発現に関連するのか、また、菌の受容化にどの毒素作用が関与するのか全く不明である。そこで、第 3 章では、原形質膜と葉緑体に対する AM毒素作用に焦点をあて、毒素の示す宿主特異性と毒素作用点との関係、さらに毒素による感染誘発との関係について検討した [78, 81, 82]。

第 1 節 宿主および非宿主葉での AM 毒素作用

第 1 節では、AM 毒素作用の宿主特異性を調べるため、宿主および非宿主葉における原形質膜と葉緑体の機能障害と AM 毒素濃度の関係を詳細に比較した。さらに、毒素による菌の感染誘発と毒素作用点との関係について調べた。

1. 投与量 - 反応相関からみた AM 毒素作用の宿主特異性

1) 材料および方法

検定葉の裏面の中心部に、ピンセットを用いて付傷し、そこに 25 μ l の AM 毒素 I 溶液を滴下した。暗黒下で 25℃ 48 時間湿室中に静置後、出現した壊死斑の面積を測定した。

毒素によって誘起される電解質の異常漏出を以下のように測定した。10 枚の検定葉ディスク（直径 10 mm）に脱イオン水または AM 毒素 I 溶液を 30 分間減圧浸透した。処理葉を脱

イオン水で洗浄し、20 ml の脱イオン水を入れた 50 ml 三角フラスコに入れ、26℃で4時間往復振盪した後、外液の電解質量を電気伝導度計（M & S, CD-MII, $k=1.0$ ）で測定した。

毒素による明下CO₂固定阻害は処理葉を暗黒下で静置すること以外、第2章第2節に述べた方法に従って行なった。

2) 実験結果

10^{-5} M AM毒素 I を感受性（レッドゴールド）葉に処理すると、処理後1時間目から電解質の異常漏出と明下CO₂固定阻害が観察された。これらの障害は毒素処理4時間後に顕著となった。

AM毒素の初期作用点（原形質膜と葉緑体）と宿主特異性との関係を調べるため、リンゴ、ナシ葉の他、非宿主としてトウモロコシ、トマト、タバコ、カンキツ葉に各種濃度のAM毒素 I を処理し、明下CO₂固定能と電解質の異常漏出を4時間後に測定した。壊死斑形成は毒素処理48時間後に測定した。

10^{-8} MのAM毒素Iは感受性（レッドゴールド）葉に壊死斑形成、電解質の異常漏出、明下CO₂固定阻害を誘起した（Fig. 5A）。毒素濃度が増大するに従い、これらの反応性も増大した。中程度抵抗性のリンゴ（紅玉）、ナシ（二十世紀）葉での電解質の異常漏出と壊死斑形成は 10^{-5} Mの毒素によって誘起されたが、明下CO₂固定能は 10^{-7} ～ 10^{-6} Mの毒素によって阻害された（Fig. 5B および C）。抵抗性リンゴ（マヘ7）やナシ（長十郎）葉、さらに、非宿主のトウモロコシ（A295 × W64A）、トマト（アーリーパック7）葉では、電解質の異常漏出と壊死斑形成は全く認められなかったが、明下CO₂固定阻害は 10^{-6} ～ 10^{-5} Mの毒素によって誘起された（Fig. 5D, E, F および G.）。なお、非宿主のタバコ（バーレー21）やエンペラーマンダリン葉ではどの毒素障害も認められなかった（Fig. 5H および I）。

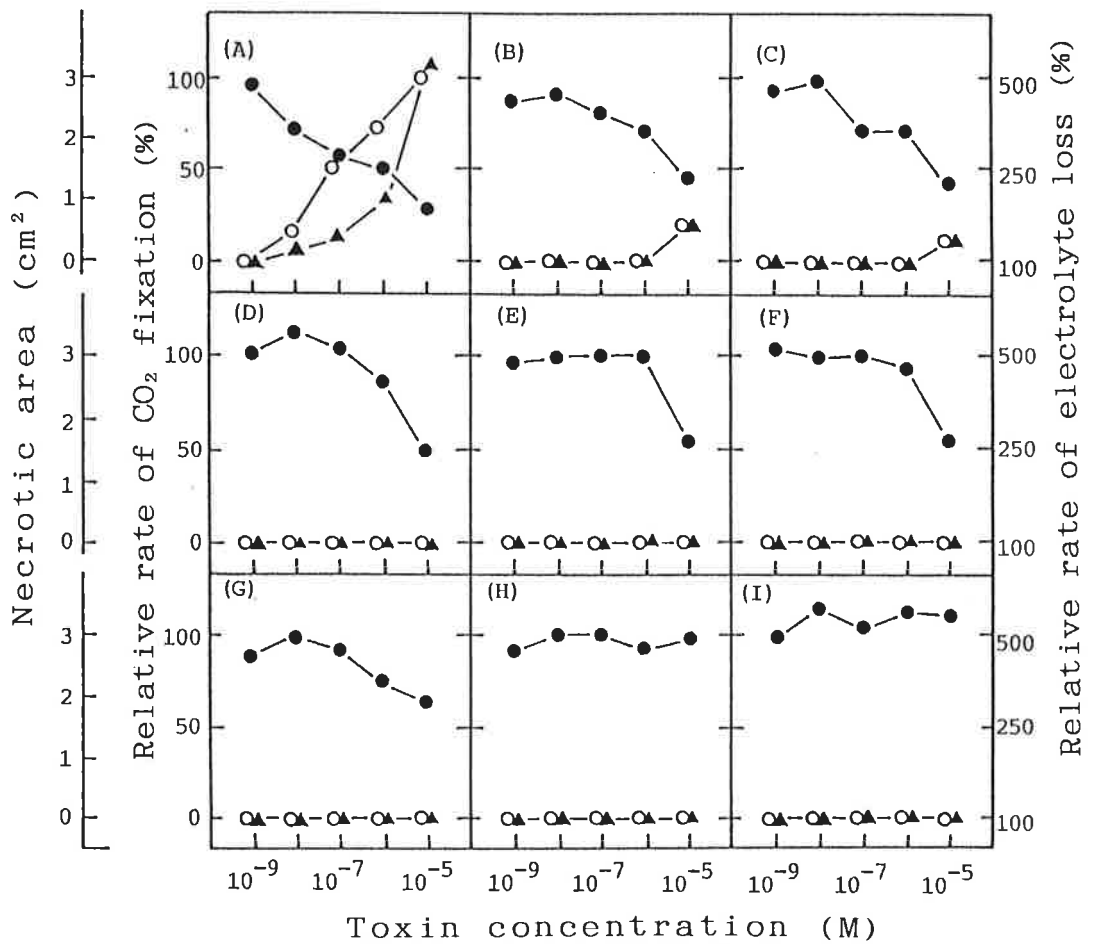


Fig. 5. Comparative effects of AM-toxin I on necrosis formation (▲), rate of electrolyte loss (○) and rate of photosynthetic CO₂ fixation (●) in host and non-host leaves. Leaves were treated with toxin solution or deionized water, and photosynthetic CO₂ fixation and electrolyte loss were measured 4 hr-incubation in the dark. Relative rate of CO₂ fixation and electrolyte loss of toxin-treated leaves were calculated as compared to net values of untreated leaves. A, apple cv. Red Gold; B, apple cv. Jonathan; C, Japanese pear cv. Nijisseiki; D, apple cv. Mahe 7; E, Japanese pear cv. Chojuro; F, corn cv. A295 X W64A; G, tomato cv. Earlypak 7; H, tobacco cv. Burley 21; I, Emperor mandarin. Each point is the mean of two or three experiments.

2 . AM毒素の感染誘発効果と毒素作用点との関係

1) 材料および方法

*A. alternata*の非病原性菌株(0-94)の胞子を Kohmotoらの方法[23]で得た。得られた胞子を3回遠心分離(800 × g、3分間)を繰り返すことによって洗浄した。胞子をAM毒素I溶液または脱イオン水に懸濁(胞子濃度、 5×10^5 個/ml)し、検定植物の裏面に2ml噴霧接種した。接種葉を暗黒下26℃に24時間静置した後、1 cm²の葉組織表面に出現した病斑数を記録した。

2) 実験結果

AM毒素の感染誘発効果を、非病原性菌の感染によって形成される病斑数を指標として調べた。その結果、感受性リンゴ(レッドゴールド)葉では 10^{-7} Mで、中程度抵抗性リンゴ(紅玉)とナシ(二十世紀)葉では 10^{-5} MのAM毒素で、非病原性の*A. alternata*の感染が誘発された(Table 4)。一方、抵抗性のリ

Table 4. Effect of AM-toxin I on lesion formation by avirulent *A. alternata* on host and non-host leaves

| Plant and cultivar | Inoculation with avirulent spores plus ^{a)} : | No. of lesions per cm ² leaf ^{b)} |
|--------------------|--|---|
| Apple | | |
| Red Gold | Toxin (10 ⁻⁷ M) | 23.7 ± 2.5 |
| | Water | 0.0 ± 0.0 |
| Jonathan | Toxin (10 ⁻⁵ M) | 38.4 ± 23.3 |
| | Water | 4.3 ± 7.5 |
| Mahe 7 | Toxin (10 ⁻⁵ M) | 0.0 ± 0.0 |
| | Water | 0.0 ± 0.0 |
| Japanese pear | | |
| Nijisseiki | Toxin (10 ⁻⁵ M) | 32.1 ± 18.1 |
| | Water | 5.3 ± 3.4 |
| Chojuro | Toxin (10 ⁻⁵ M) | 0.0 ± 0.0 |
| | Water | 0.0 ± 0.0 |
| Corn | | |
| A295 x W64A | Toxin (10 ⁻⁵ M) | 0.0 ± 0.0 |
| | Water | 0.0 ± 0.0 |
| Tomato | | |
| Earlypak 7 | Toxin (10 ⁻⁵ M) | 0.0 ± 0.0 |
| | Water | 0.0 ± 0.0 |
| Tobacco | | |
| Burley 21 | Toxin (10 ⁻⁵ M) | 0.0 ± 0.0 |
| | Water | 0.0 ± 0.0 |
| Citrus | | |
| Emperor mandarin | Toxin (10 ⁻⁵ M) | 0.0 ± 0.0 |
| | Water | 0.0 ± 0.0 |

- a) Avirulent spores (0-94) were suspended in deionized water or AM-toxin I solution and inoculated on leaves by spraying.
- b) After incubation for 24 hr at 26 °C, lesions on leaves were counted. Values represent the means and standard deviations of three leaves.

ンゴ（マヘ7）やナシ（長十郎）、またトウモロコシ（A295 X W64A）、トマト（アーリーパック7）などの非宿主葉では、 10^{-5} MのAM毒素Iでも全く感染は誘発されなかった（Table 4）。

第2節 SH基修飾剤処理葉におけるAM毒素作用

感受性リンゴ葉にSH基修飾剤を処理すると、AM毒素による壊死斑形成が抑制されることが報告されている[87]。そこで、本節ではSH基修飾剤処理葉（壊死斑形成抑制葉）でのAM毒素の原形質膜および葉緑体への作用を比較し、壊死斑形成と関連している毒素作用の探索を行なった。また、修飾剤処理葉上の病原菌の感染行動を調べ、毒素による感染誘発と毒素作用点との関係を調べた。

1 . SH基修飾剤処理葉におけるAM毒素の原形質膜への作用

1) 材料および方法

AM毒素の誘起する電解質の異常漏出に対するSH基修飾剤の効果を、Otaniらの方法[50]に従って調べた。すなわち、感受性リンゴ(レッドゴールド)葉ディスク(直径10 mm)に0.1 mMヨードアセトアミド溶液を、また、対照として脱イオン水を30分間減圧浸透した。処理葉を26℃で30分間風乾させ、AM毒素I溶液、または、脱イオン水を再び30分間減圧浸透した。次に、第3章、第1節で述べた方法で、毒素による電解質の漏出量を1時間毎に測定した。一方、SH基修飾剤とAM毒素との同時処理では、修飾剤と毒素の混合液をリンゴ葉ディスクに減圧浸透処理し、同じ方法で電解質漏出量を測定した。

電解質の異常漏出に対する修飾剤の効果に加えて、毒素による原形質膜の陥入に対する修飾剤の効果もあわせて検討した。0.1 mMヨ

ードアセトアミド溶液を感受性リンゴ葉に減圧浸透処理し、風乾させたのち、AM毒素 I あるいは脱イオン水を $20 \mu\text{l}$ 処理した。次に、第 2 章、第 1 節に述べた方法で電子顕微鏡観察用の試料を作成し観察した。

2) 実験結果

10^{-6} M の AM 毒素 I を感受性リンゴ葉に処理すると、毒素処理 1 時間目から電解質の異常漏出が認められた (Fig. 6A)。一方、ヨードアセトアミド前処理葉での毒素による電解質漏出量は脱イオン水前処理葉での毒素による電解質漏出よりも低い値を示し、修飾剤の保護効果が認められた (Fig. 6A)。同時処理の場合、修飾剤と毒素の混合液処理葉での電解質漏出量は毒素だけによるそれと同じであり、修飾剤による保護効果は認められなかった (Fig. 6B)。

SH 基修飾剤だけを感受性リンゴ葉に処理し、電子顕微鏡で観察した。その結果、本修飾剤は細胞の微細構造に変化を誘起しなかった

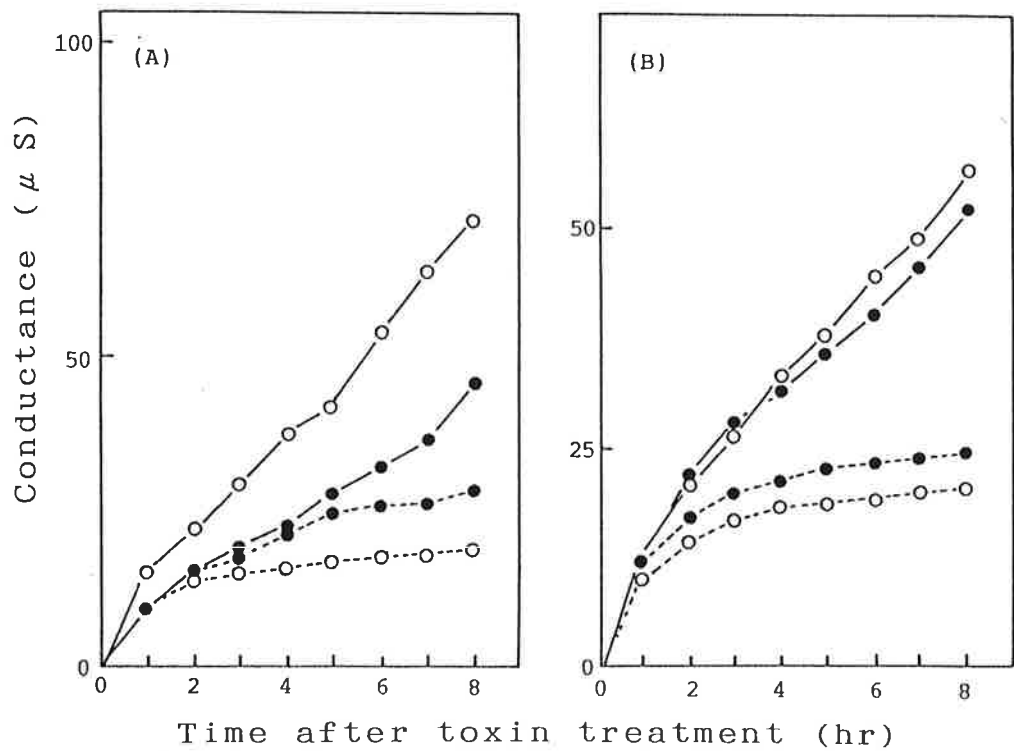


Fig. 6. Effect of pre (A) and simultaneous (B) treatments with iodoacetamide on AM-toxin-induced electrolyte loss from susceptible leaf tissues. Treatments are as follows:—●—, iodoacetamide 0.1 mM and toxin (10^{-6} M);—○—, toxin (10^{-6} M);---●---, iodoacetamide 0.1 mM;---○---, water. Each point is the mean of two experiments.

(Fig. 7A)。そこで、 10^{-7} M AM毒素 I の誘起する原形質膜の陥入に対するSH基修飾剤の効果を、第2章第1節に述べた方法（原形質連絡糸での原形質膜陥入の出現頻度）で調べた。脱イオン水前処理リンゴ葉での毒素による原形質膜陥入頻度は毒素処理12時間目でおよそ30%であった (Table 5)。これに対し、修飾剤前処理葉での陥入頻度は毒素処理後12時間目で2%であり、修飾剤による保護効果がみられた (Fig. 7B および Table 5)。

2. SH基修飾剤処理葉におけるAM毒素の葉緑体への作用

1) 材料および方法

リンゴ葉に減圧浸透処理を2回行なうと物理的障害のため明下CO₂固定能が阻害されたので、次の方法でAM毒素による明下CO₂固定阻害に対するSH基修飾剤の効果を調べた。感受性リンゴ（レッドゴールド）葉ディスク（直径10 mm）に0.1 mM ヨードアセトアミド溶

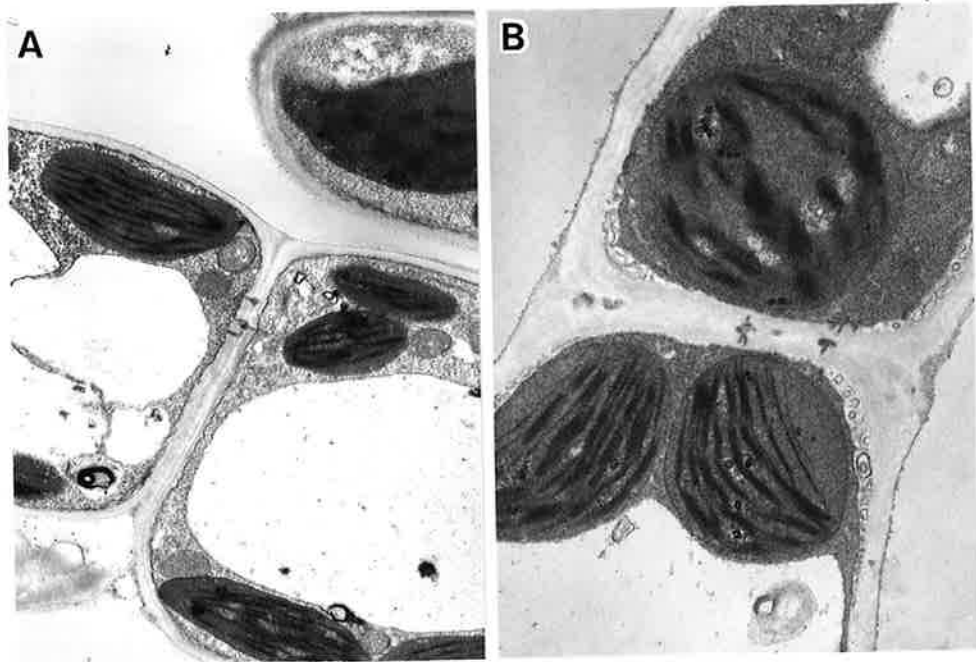


Fig. 7. Effect of pretreatment of iodoacetamide on AM-toxin-induced ultrastructural changes in susceptible apple leaf (cv. Red Gold). A, Apple leaf pretreated with 0.1 mM iodoacetamide followed by treatment with deionized water for 24 hr. No ultrastructural change was observed in the cells. (X 9,400). B, Apple leaf pretreated with 0.1 mM iodoacetamide followed by treatment with 10^{-7} M AM-toxin for 24 hr. Vesiculation of grana lamellae but no invagination of plasma membrane was observed in the cells. (X 13,000).

Table 5. Effect of pretreatment of iodoacetamide on plasma membrane invagination at plasmodesmata of susceptible apple leaves induced by AM-toxin I^{a)}

| Post-Treatment | Time (hr) | Occurrence of invaginated plasma membrane at plasmodesmata (%) | | | |
|----------------|-----------|--|------|---------------|-----|
| | | Water | | iodoacetamide | |
| Toxin | 3 | 10.9 ± | 5.5 | 2.8 ± | 2.0 |
| Toxin | 6 | 18.0 ± | 6.6 | 1.4 ± | 1.4 |
| Toxin | 12 | 32.6 ± | 10.0 | 2.2 ± | 0.5 |
| Toxin | 24 | 36.1 ± | 7.0 | 8.4 ± | 2.9 |
| Water | 24 | 0.0 ± | 0.0 | 0.0 ± | 0.0 |

a) Apple leaves (cv. Red Gold) were pretreated with 0.1 mM iodoacetamide, and then treated with 10^{-7} M AM-toxin I. The treated leaves were incubated in the dark. At least 100 cells, and 100 plasmodesmata were observed for each treatment in one experiment. Values represent the means and standard deviations of three replications.

液を、また、対照として脱イオン水を、30分間減圧浸透した。その処理葉をAM毒素I溶液あるいは脱イオン水に入れ30分間振盪した。次に、第2章第2節に述べた方法で処理葉の明下CO₂固定能を調べた。

AM毒素による葉緑体グラナメラの小胞化に対するSH基修飾剤の効果を、第3章第2節の1で作成した試料を用いて調べた。

2) 実験結果

ヨードアセトアミド処理のみでもリンゴ葉での明下CO₂固定能が阻害された(Table 6)。しかし、修飾剤処理葉に10⁻⁵ M AM毒素Iを処理するとさらに明下CO₂固定能の阻害が認められた。その阻害率は脱イオン水処理葉に毒素を処理した場合の阻害率と同じであった(Table 6.)。

次に、AM毒素の誘起する葉緑体グラナメラの小胞化に対するSH基修飾剤の効果を、第2章第2節に述べた方法(変性葉緑体の出現頻度)で調べた。その結果、修飾剤前処理葉

Table 6. Effect of pretreatment with iodoacetamide on AM-toxin-induced inhibition of photosynthetic CO₂ fixation in leaf tissues of susceptible apple cv. Red Gold

| Pre-treatment ^{a)} | Post-treatment ^{b)} | Radioactivity ^{c)} incorporation ($\times 10^{-3}$ dpm) | Relative CO ₂ fixation (%) |
|-----------------------------|------------------------------|---|---|
| Water | Water | 4.3 \pm 0.1 | 100 |
| | AM-toxin I (10^{-6} M) | 4.3 \pm 1.4 | 100 |
| | AM-toxin I (10^{-5} M) | 2.5 \pm 0.7 | 58 |
| Iodoacetamide | Water | 1.4 \pm 0.2 | 100 |
| | AM-toxin I (10^{-6} M) | 1.4 \pm 0.5 | 100 |
| | AM-toxin I (10^{-5} M) | 0.8 \pm 0.1 | 57 |

- a) Leaf disks were vacuum-infiltrated with 0.1 mM iodoacetamide solution or water.
- b) Pre-treated leaf disks were incubated in toxin solutions or water for 30 min at 26 °C.
- c) After incubation for 4 hr in a moist chamber at 26 °C, CO₂ fixation in the leaves was measured. Values represent the means and standard deviations of three experiments.

での変性葉緑体の出現頻度は脱イオン水前処理葉でのそれとほぼ同じであった (Table 7)。なお、Fig. 7B は SH基修飾剤前処理葉での毒素による微細構造変化を示しており、葉緑体グラナメラの小胞化は認められるが、原形質膜の陥入は認められない。

3. SH基修飾剤処理葉での病原菌の感染行動

1) 材料および方法

感受性リンゴ葉 (レッドゴールド) の葉片にヨードアセトアミド溶液、または、脱イオン水を減圧浸透処理し30分間風乾させた。その処理葉に、第3章第1節に述べた方法で調製したリンゴ斑点落葉病菌 (*A. alternata* apple pathotype, 0-159) の孢子懸濁液を噴霧接種した。接種葉を暗黒下26℃に24時間静置した後、葉組織表面に出現した病斑数を記録した。次に、接種葉を0.1% コットンブルー液中に浸漬して菌を染色後、葉をラクトフェノール・エタノール溶液 (1:2, V/V) 中で

Table 7. Effect of pretreatment of iodoacetamide on vesiculation of grana lamellae in chloroplasts of susceptible apple leaves induced by AM-toxin I^{a)}

| Post-Treatment | Time (hr) | Occurrence of vesiculated chloroplasts (%) | |
|----------------|-----------|--|---------------|
| | | Water | iodoacetamide |
| Toxin | 3 | 5.0 ± 0.9 | 4.0 ± 2.2 |
| Toxin | 6 | 3.1 ± 1.8 | 4.7 ± 1.2 |
| Toxin | 12 | 32.8 ± 13.3 | 27.7 ± 10.7 |
| Toxin | 24 | 35.2 ± 18.3 | 34.3 ± 15.0 |
| Water | 24 | 0.9 ± 0.7 | 1.3 ± 1.1 |

a) Apple leaves (cv. Red Gold) were pretreated with 0.1 mM iodoacetamide, and then treated with 10^{-7} M AM-toxin I. The treated leaves were incubated in the dark. At least 100 cells, and 100 chloroplasts were observed for each treatment in one experiment. Values represent the means and standard deviations of three replications.

クロロフィルが除去されるまで煮沸処理した。葉組織をラクトフェノールで洗った後、光学顕微鏡下で菌の侵入行動を観察した。

2) 実験結果

病原菌の胞子発芽や付着器形成にはヨードアセトアミド(0.1および0.25 mM)の影響は認められなかった(Table 8)。一方、0.1 mM 修飾剤処理葉では、リンゴ葉組織内への侵入菌糸形成率の低下や病斑数の減少が認められ、修飾剤の濃度が高くなると抑制効果も増大した(Table 8)。

第3節 考 察

AM毒素 I は感受性リンゴ葉には明下CO₂ 固定阻害、電解質の異常漏出、壊死斑形成をいずれも10⁻⁶ Mで誘起した。しかし、中程度抵抗性品種葉では、明下CO₂ 固定は10⁻⁷ ~ 10⁻⁶ MのAM毒素 I により阻害されたが、電解質の異常漏出と壊死斑形成は10⁻⁵ Mより誘起され

Table 8. Effect of pretreatment with iodoacetamide on infection behavior of *A. alternata* apple pathotype and lesion formation on susceptible apple cv. Red Gold^{a)}

| Concentration of iodoacetamide (mM) | Spore germination (%) ^{b)} | Appressorium formation (%) ^{c)} | Infection hypha formed (%) ^{d)} | No. of lesions per cm ² leaf |
|-------------------------------------|-------------------------------------|--|--|---|
| 0 | 89.5 ± 8.6 | 36.2 ± 4.3 | 35.2 ± 5.6 | 27.3 ± 8.6 |
| 0.1 | 88.9 ± 7.4 | 31.5 ± 4.0 | 17.3 ± 3.3 | 9.8 ± 4.4 |
| 0.25 | 90.5 ± 2.4 | 39.0 ± 3.5 | 12.8 ± 5.3 | 9.3 ± 1.8 |

a) Leaves were vacuum-infiltrated with iodoacetamide solution, and were inoculated with virulent spores (0-159) by spraying. After incubation for 24 hr at 26 °C, infection behavior of the spores and number of lesions were observed. Values represent the means and standard deviations of three leaves.

b) (No. of germinating spores / Total no. of spores) × 100.

c) (No. of appressoria / No. of germ tubes) × 100.

d) (No. of infection hyphae / No. of appressoria) × 100.

た。さらに、 $10^{-6} \sim 10^{-5}$ MのAM毒素Iで処理した抵抗性葉やトマト、トウモロコシなどの非宿主葉では電解質の異常漏出や壊死斑形成が認められないにもかかわらず、明下CO₂固定阻害は認められた。このように、感受性品種以外の葉緑体への毒素作用には明確な特異性は認められなかった。

一方、ヨードアセトアミドのようなSH基修飾剤を前処理した感受性リンゴ葉では毒素による原形質膜機能障害と壊死斑形成は抑制されたが、葉緑体の機能障害は修飾剤の影響を全く受けなかった。また、修飾剤の抑制効果は修飾剤と毒素との同時処理では認められなかった。これらの結果から、原形質膜に対するAM毒素作用には宿主細胞に存在するSH基が関与しており、毒素による原形質膜機能障害と壊死斑形成の間に密接な関係があるものと考えられた。

AM毒素による原形質膜機能障害はSH基修飾剤の前処理によって抑制され、同時処理では

その抑制効果は認められなかった。この結果から、SH基関与の過程は、毒素が宿主細胞に接触後かなり初期にあるものと考えられる。ナシ黒斑病菌 (*A. alternata* Japanese pear pathotype) が生産する AK毒素 [50]、エンバク *Victoria blight* 病菌が生産する HV毒素 [13] の第1次作用点は宿主原形質膜とされている。これらの毒素に関する研究でも、SH基修飾剤が毒素による電解質の異常漏出と壊死斑形成を抑制することが明らかにされている。このような毒素に対する宿主細胞の不感受化誘導は、修飾剤による原形質膜上のSH基関与分子（おそらく毒素受容体）の変性によるものではないかと仮定されている [13, 50]。本論文の第3章の結果は、AK毒素やHV毒素での結果とよく一致しており、AM毒素の感受性原形質膜への作用はAK毒素やHV毒素でのそれと酷似しているものと考えられる。

一方、感受性リンゴ品種はAM毒素に対して著しい器官特異性をもち、葉など葉緑体のあ

る組織はAM毒素反応性を示すが、花卉などは無反応である[35]。一方、中程度抵抗性品種の花弁は葉組織と同じようにAM毒素反応性を示す。さらに、感受性品種の葉および花弁から誘導した白色のカルスは毒素に無反応であるが緑色カルスは毒素反応性を示すこと、また、中程度抵抗性リンゴの葉および花弁から誘導した白色カルスは緑色カルスと同じように毒素反応性を示すことが明らかとなっている[51, 76, 77]。これらの結果は、感受性品種では毒素作用に葉緑体が関与している可能性を示している。毒素による葉緑体の機能障害がどのようにAM毒素作用に関連しているのか今後単離葉緑体を用いての詳細な検討が必要である。

AM毒素は病原菌の感染誘導因子としての役割を担っていることは既に明らかとなっている[25]。宿主および非宿主葉に非病原性の胞子を毒素と共に接種すると、感受性品種では 10^{-7} Mの毒素で、中程度抵抗性品種では 10^{-5}

Mの毒素で菌が感染した。しかしながら、葉緑体の機能障害が十分認められる 10^{-5} Mの毒素でも抵抗性品種葉や非宿主葉では全く感染は誘発されなかった。さらに、毒素による原形質膜機能障害を抑制するSH基修飾剤は病原菌の感染を抑制した。一方、AM毒素による壊死斑形成を抑制する光照射は、病原菌の感染には効果を示さないことが明らかになっている[27, 90]。これらの結果から、毒素による病原菌の感染誘導には細胞死は必要とせず、毒素による原形質膜機能障害が大きく関わっているものと推察された。

病原菌の感染場面における原形質膜機能障害の重要性は、AK毒素、ACR毒素、さらにはHMT毒素に関する研究[27]やエンドウ褐紋病菌(*Mycosphaerella pinodes*)の生成する病原性因子(サブレッサー)に関する研究においても示唆されている[85, 86]。AK毒素による電解質の異常漏出を抑制するSH基修飾剤を処理した感受性ナシ葉では病原菌の感染が抑制

される。また、電解質の異常漏出には影響を示さず壊死斑形成を抑制するサリチルアルドキシムや硫化ナトリウムなどの銅および鉄酵素修飾剤は菌の感染には何ら効果を示さなかった[27]。一方、第2章第3節でも述べたように、ACR毒素は電解質の異常漏出を誘起するが[29]、光照射によってその作用が抑制される[27]。非病原性の胞子を毒素と共に感受性葉に接種すると、暗黒下では誘発された菌の感染が光照射下では著しく抑制された[27]。ACR毒素と同じようにミトコンドリアに初期作用を示すHMT毒素での研究でも、同様な結果が得られている[27]。一方、褐紋病菌サプレッサーは原形質膜ATPase活性(細胞の基礎的な代謝)を攪乱することによって菌の感染を誘導するものと考えられている[85, 86, 100]。これらHSTやサプレッサーによる菌受容化に関する一連の結果から、病原菌によって分泌された病原性因子によって直接、あるいは、間接的に誘起される原形質膜機能障害が菌の受容化を誘起するもの結論した。

第 4 章 AM毒素処理感受性リンゴ葉におけるイオン漏出部位

リンゴ斑点落葉病菌が生成するAM毒素の初期作用点はこれまで感受性細胞の原形質膜と葉緑体の2カ所にあるものと考えられてきた。しかし、本論文の第3章では、AM毒素による壊死斑形成や感受性品種での菌受容化現象には毒素の原形質膜への作用が関連していると結論できた。そこで、第4章では、AM毒素による原形質膜機能障害に対する作用機構の解析に研究対象を絞ってみた。

AM毒素による原形質膜機能障害として、感受性細胞からの著しい電解質イオンの異常漏出が報告されており、AM毒素は感受性細胞の膜透過性を選択的に阻害しているものと考えられる[23]。

一方、ナシ黒斑病菌のAK毒素もまた、感受性ナシ葉から著しい電解質イオンの異常漏出

を引き起こす [55]。そこで、Parkら [62]は、特定のイオンを検出する固定法（ピロアンチモン酸カリ固定法 [20]）を用いて AK毒素を処理した感受性ナシ葉を調べ、イオン漏出部位の探索を試みた。用いられたイオン検出の原理は次の通りである。固定液に入れたピロアンチモン酸カリは細胞イオン (Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+}) とよく反応し、イオン濃度が高い場合には反応沈殿物（ピロアンチモン酸塩）を形成する [20]。そのため、イオンを沈殿物としてとらえることが可能となる。そこで、Parkら [62]は AK毒素処理ナシ葉を本固定法で固定し観察した結果、感受性ナシ細胞に5分間 AK毒素を処理するだけで原形質連絡糸近傍の細胞壁に多量のピロアンチモン酸塩の沈殿が特異的に出現することを認め、感受性細胞のイオン漏出部位が原形質連絡糸近傍の原形質膜にあること、さらに本部位が AK毒素の作用点である可能性を示唆した。

そこで、第4章においては AM毒素処理リン

ゴ葉をピロアンチモン酸カリ固定法で処理し、電顕下で細胞内イオンの漏出部位の探索を行なった [83, 84]。

第 1 節 ピロアンチモン酸カリ固定法によって形成される反応沈殿物の観察

本節では、ピロアンチモン酸カリ固定法 [20] によって固定したリンゴ葉の微細構造を電顕下で観察した。また、その微細構造に AM 毒素がどのような変化を誘起するのかを調べた。

1) 材料および方法

リンゴ葉の表皮をカミソリで傷を付け、そこに 10^{-5} M の AM 毒素 I または対照として脱イオン水を 20 μ l 処理した。処理葉を室温下で 5、15、30、60 分間湿室中に静置した。2% 四酸化オスミウムと 2% ピロアンチモン酸カリを 0.01 N の酢酸で pH を 7.2 に調整したピロ

アンチモン酸カリ固定液で、その処理葉を0℃、2時間固定した。固定試料を冷水で1分間1回洗浄し、アルコールで脱水し、次いでスパー樹脂に包埋した。超薄切片(100~150nm)を第2章第1節で述べた方法で作成し、無染色で観察した。

2) 実験結果

10^{-5} MのAM毒素を感受性リンゴ(レッドゴールド)葉に15分間処理し、ピロアンチモン酸カリ固定法で固定し、無染色で維管束細胞を観察した。本固定法で固定した毒素処理葉では2種類の沈殿が観察された。細胞内の液胞膜、原形質膜、細胞質では粗大な粒子(直径約20-50nm)が認められた(Fig. 8A)。一方、原形質膜近傍の細胞壁では、微細な粒子(直径約2-5nm)が観察された(Fig. 8AおよびB)。

一方、脱イオン水処理の感受性葉や毒素処理の抵抗性葉(マヘ7)では粗大粒子は観察されるものの、原形質連絡系近傍での微細沈

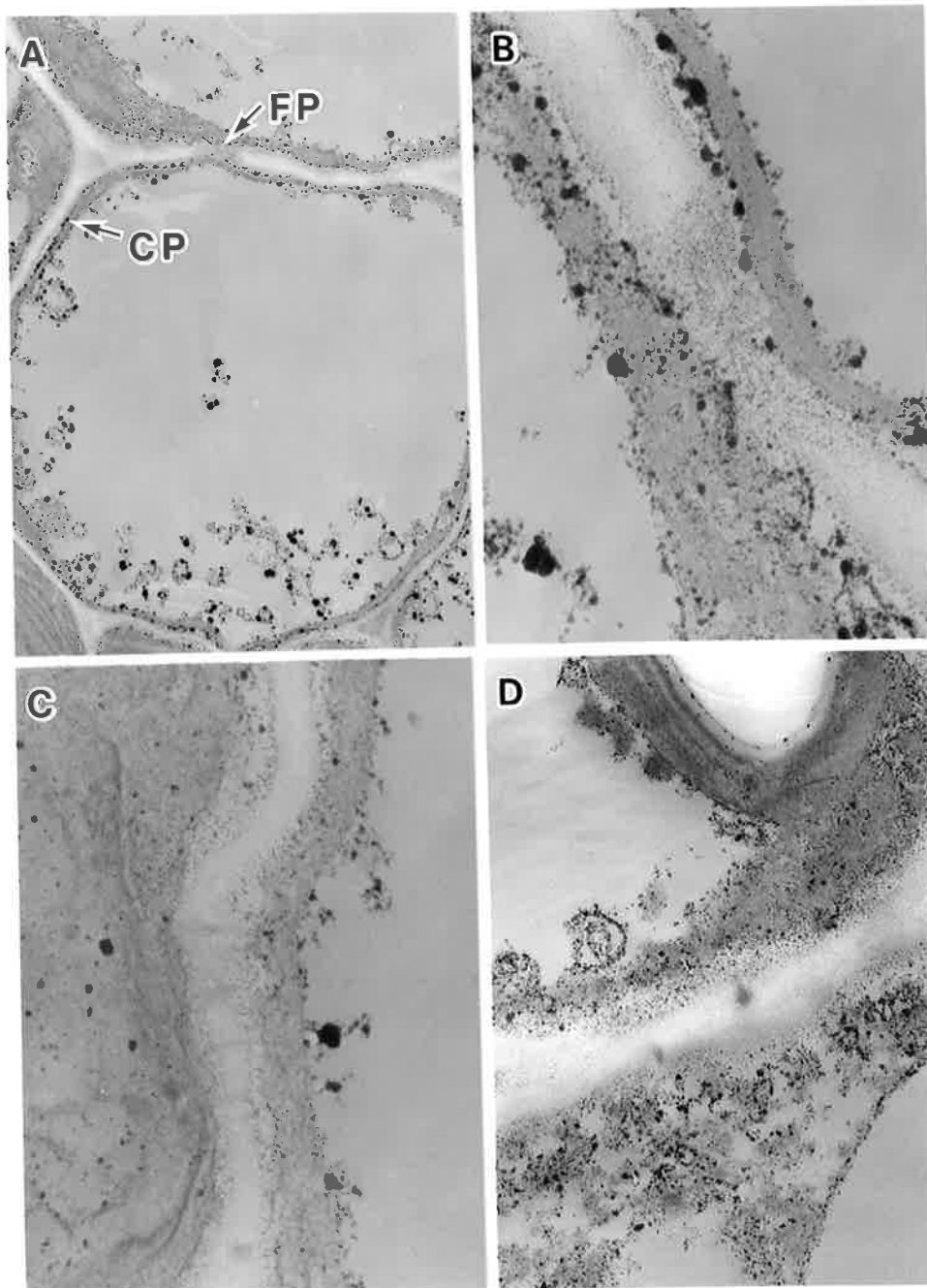


Fig. 8. Ultrastructure of apple leaves treated with AM-toxin I or deionized water. The tissues were fixed with OsO_4 -potassium pyroantimonate. A, Susceptible apple leaf (cv. Red Gold) treated with 10^{-5} M AM-toxin I for 15 min. Coarse precipitates (CP) were observed on plasma membranes and vacuoles, while fine precipitates (FP) were found in the cell walls. (X 7,600). B, Enlargement of fine precipitates in Fig. 8A. The precipitates were found in cell wall near plasmodesmal regions and appeared to spread from plasmodesmata to the neighboring cell wall. (X 45,000). C, Plasmodesmal region in susceptible apple leaf cells (cv. Red Gold) treated with deionized water for 5 min. Plasmodesmata did not have precipitates. (X 45,000). D, Resistant apple leaf cells (cv. Mahe 7) treated with 10^{-5} M AM-toxin I for 5 min. The cell walls contained no precipitates. (X 25,000).

殿は認められなかった (Fig. 8C および D)。

第 2 節 分析電顕による反応沈殿物の元素解析

ピロアンチモン酸カリ固定法はイオンと反応して微細な沈殿を形成することを原理としているが、それ以外にも、局所のほんの僅かな pH の低下や脱水に用いるアルコールとの反応で非特異的なピロアンチモン酸自身の沈殿、 $\text{HSb}(\text{OH})_2$ を形成する [20]。このようなことから、沈殿形成が起こったからといって必ずしもその部位で細胞起源のイオンが反応していると断定するのは困難であり、形成された沈殿の元素を分析する必要がある。そこで、第 2 節では分析電顕を用いて反応沈殿物の、元素解析を行った。

1) 材料および方法

第 4 章第 1 節で作成した同じ試料を用いた。

超薄切片をニッケルグリッドに取った。電子顕微鏡 (JEM 2000 FX) に装置したエネルギー分散型 X 線元素分析器 (TN5500) を用いて反応沈殿物を分析した。

2) 実験結果

AM毒素 I で処理した感受性リンゴ葉 (レッドゴールド) に観察された原形質膜上の粗大粒子を分析電顕で元素分析をした結果、Os、Cl、K および Sb が検出された (Fig. 9A)。一方、原形質連絡糸近傍の細胞壁での微細沈殿では、Os、Cl、Sb、Ni、S、K および Mg のピークが認められた (Fig. 9B)。次に、脱イオン水を処理した感受性リンゴ葉および毒素処理抵抗性葉 (マヘ 7) の原形質連絡糸近傍を同じように元素分析した結果、Os、S、Cl、K、Sb は検出されたが、Mg は認められなかった (Fig. 9C および D)。

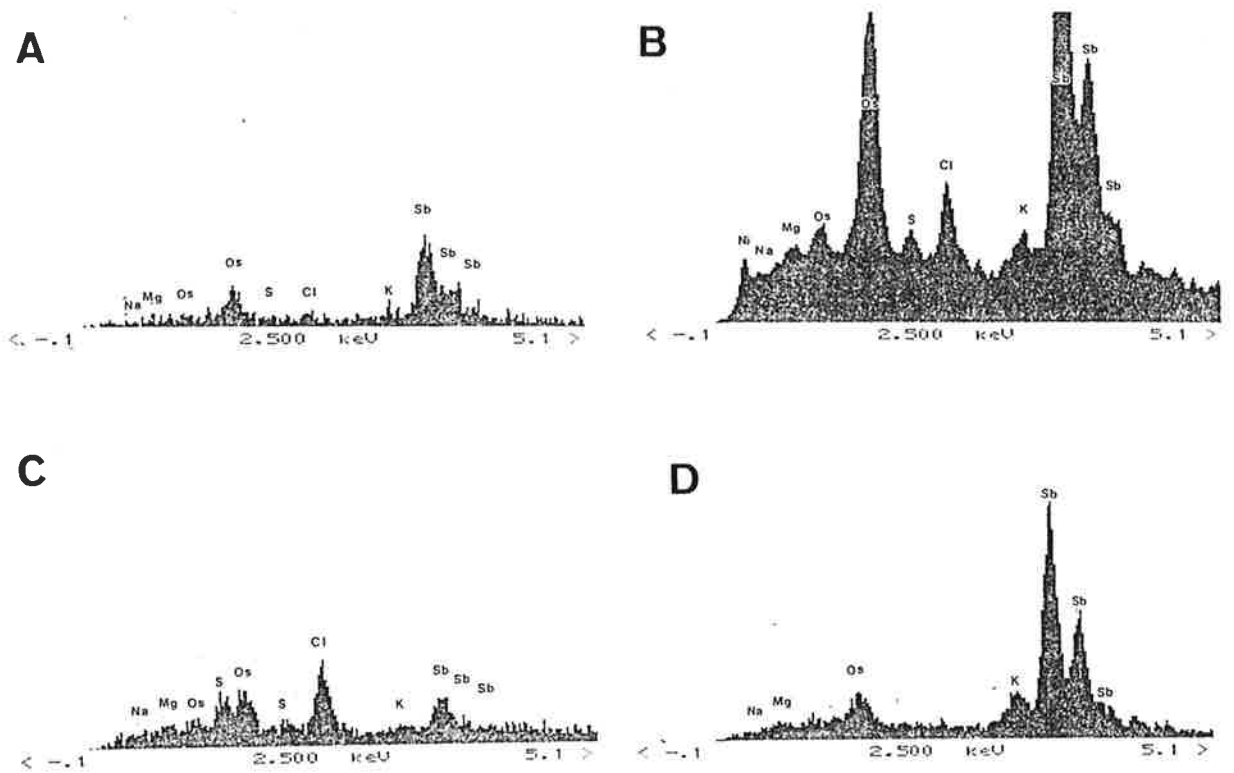


Fig. 9. X-ray spectra of coarse and fine precipitates, and plasmodesmata in apple leaf cells treated with AM-toxin I or deionized water. A, Coarse precipitates in susceptible apple leaf cells (cv. Red Gold) treated with 10^{-5} M AM-toxin I for 15 min. B, Fine precipitates in susceptible apple leaf cells (cv. Red Gold) treated with 10^{-5} M AM-toxin I for 15 min. C, Plasmodesmatal region in susceptible apple leaf cells (cv. Red Gold) treated with deionized water for 5 min. D, Plasmodesmatal region in resistant apple leaf cells (cv. Mahe 7) treated with 10^{-5} M AM-toxin I for 5 min.

第 3 節 AM毒素処理によって誘起される微細沈殿の形成時期

AM毒素を感受性リンゴ葉に処理すると原形質連絡糸近傍の細胞壁にMgイオンの特異的存在が示唆された。そこで、第3節では微細沈殿形成の時間的経過を調査した。

1) 材料および方法

第4章第1節で作成した電子顕微鏡試料を用いた。第4章第1および2節で述べた特異的反応沈殿物（微細粒子）を伴う原形質連絡糸の出現頻度を高倍率（ $\times 94,000$ ）下で調べた。なお、AM毒素による原形質膜の陥入は主に維管束細胞で認められることが報告されている[60, 64]ので、第3節でも細胞内観察部位を維管束細胞とした。

2) 実験結果

感受性リンゴ葉（レッドゴールド）において、維管束細胞の特異的反応沈殿物は毒素処

理 5 分 とい っ た 極 め て 早 い 時 期 に 観 察 さ れ 、
そ の 後 経 時 的 に 減 少 し た (Table 9)。 な お 、
毒 素 処 理 5 分 の 葉 細 胞 で は 毒 素 に よ る 原 形 質
膜 の 陥 入 は 認 め ら れ な か っ た 。 一 方 、 脱 イ オ
ン 水 処 理 感 受 性 葉 で の 反 応 沈 殿 物 の 形 成 頻 度
は 2-4% で あ り 沈 殿 物 は ほ と ん ど 観 察 さ れ な か
っ た (Table 9)。 ま た 、 中 程 度 抵 抗 性 品 種 葉
(紅 玉) で は 毒 素 処 理 に よ り 維 管 束 細 胞 に 沈
殿 形 成 が 認 め ら れ た が 、 そ の 頻 度 は 感 受 性 品
種 で の 沈 殿 形 成 率 (84%) と 比 較 す る と 49% と 低
い 値 を 示 し た (Table 9)。 さ ら に 、 抵 抗 性 リ
ン ゴ 葉 (マ ハ 7) で は 、 毒 素 処 理 に よ る 沈 殿
物 は ほ と ん ど 観 察 さ れ な か っ た (Table 9)。

第 4 節 考 察

AM 毒 素 処 理 感 受 性 リンゴ葉をピロアンチモ
ン酸カリ固定法で固定し、電子顕微鏡で観察
す る と 2 種 類 の 沈 殿 が 認 め ら れ た 。 1 つ は 液
胞 膜 、 原 形 質 膜 で 認 め ら れ る 粗 大 粒 子 で あ る 。

Table 9. Frequency of appearance of fine precipitates on cell wall near plasmodesmata in vascular bundle sheath cells of apple leaves treated with 10^{-5} M AM-toxin I or water

| Cultivar | Treatment and time (min) | No. of observed plasmodesmata | No. of plasmodesmata with precipitates | % |
|----------|--------------------------|-------------------------------|--|----|
| Red Gold | Water (5) | 86 | 3 | 4 |
| Red Gold | Water (60) | 92 | 2 | 2 |
| Red Gold | Toxin (5) | 87 | 73 | 84 |
| Red Gold | Toxin (15) | 85 | 61 | 72 |
| Red Gold | Toxin (30) | 89 | 47 | 53 |
| Red Gold | Toxin (60) | 68 | 14 | 21 |
| Jonathan | Water (5) | 62 | 1 | 2 |
| Jonathan | Toxin (5) | 61 | 31 | 49 |
| Mahe 7 | Water (5) | 78 | 0 | 0 |
| Mahe 7 | Toxin (5) | 79 | 3 | 4 |

粗大粒子は脱イオン水処理感受性葉や抵抗性葉でも認められ、非特異的な沈殿であるものと思われた。もう1つは、原形質連絡糸近傍の細胞壁で観察される微細粒子である。微細粒子は毒素処理感受性リンゴ葉でのみ認められ、毒素効果を反映しているものと思われた。

微細粒子の元素を分析した結果、Ni、Mg、Os、S、Cl、K、Sbのピークが検出された。検出されたピークの内、Os、K、Sbのピークは固定液、Clは樹脂、Sは細胞壁中のタンパク質、Niはニッケルグリット由来のものと思われた。一方、他のピークとしてMgが検出されたが、Mgは固定液や樹脂などには含まれておらず、Mgのピークはピロアンチモン酸イオンと宿主細胞の Mg^{2+} 間の無機化学的反応に由来するものと考えられる。なお、粗大粒子の元素分析では毒素処理にのみ特異的に存在するイオンは全く検出することはできなかった。以上の結果から、原形質連絡糸近傍の細胞壁に認められた微細粒子はAM毒素処理によって

リンゴ細胞から漏出した Mg イオンがピロアンチモン酸と反応し、細胞壁のセルロース繊維間に捕捉・集積することにより形成されたものと推察される。

細胞壁で認められる微細沈殿が、AM毒素作用を微細構造的また生理的側面から解析する上で有用な指標となることが明らかとなったので、AM毒素を処理したリンゴ葉での微細沈殿の形成時間について調べた。特異的微細沈殿は、AM毒素を5分といった極めて短時間処理した感受性リンゴ葉で最も多く観察され、その後その形成頻度は継時的に減少していった。この結果は、AM毒素が5分以内に原形質膜の透過機能障害を誘起することを示している。一方、毒素による原形質膜の陥入や電解質の異常漏出は、測定方法自体で制限があるが、少なくとも5分以内では認められていない[23, 60, 64]。したがって、ピロアンチモン酸固定法で認められる細胞壁での微細沈殿形成はこれまでのAM毒素効果と比較してみても

極めて早い毒素障害を検出しているものと考えられた。

Kobayashi[21]と甲元ら[24]はAM毒素処理リンゴ葉から漏出するイオン主成分は K^+ であり、次いで Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} であることを明らかにしている。主成分である K^+ を指標とした解析が望まれるが、今回用いたピロアンチモン酸カリ固定法では、固定液自身に K^+ が含まれているため K^+ 漏出を調べることができなかった。しかしながら、 K^+ の約1/15ではあるが異常漏出の認められる Mg^{2+} を検出することができた。したがって、今回の実験は、AM毒素による電解質異常漏出部位を微量に漏出する Mg^{2+} を指標として明らかにしたものであると考える。主成分である K^+ を指標として毒素作用を解析すると新たな結果が得られるかもしれないが、電子顕微鏡レベルで K^+ を検出する有効な方法は現在のところ無い。

ナシ黒斑病菌のAK毒素は感受性ナシ葉から著しい電解質の異常漏出[55]や原形質膜の陥

入 [57, 58] を誘起することが知られている。そこで、Parkら [62] は、ピロアンチモン酸カリ固定法を用いて、AK毒素による電解質イオン漏出部位の探索を行い Na、Mgを伴う微細沈殿を原形質連絡糸近傍で認めている。さらに、イチゴ黒斑病菌 (*A. alternata* strawberry pathotype) の生産する AF毒素処理感受性イチゴ葉でも Na、Mgを伴う微細沈殿が原形質連絡糸近傍で認められている [61]。AM毒素処理リンゴ葉の場合には Naは検出されなかったものの、微細沈殿の局在性や形成時間は AK毒素処理ナシ葉の場合と非常によく類似していた。一方、Langsdorfら [31] は *Alternaria solani* の生成する alternaric acid が感受性トマト細胞の原形質膜の陥入を誘起すること、また、本毒素処理トマト葉をイオン沈殿固定法で固定し観察すると微細沈殿が原形質連絡糸で認められ、その沈殿には Naは含まれず、Mgを含むことを明らかにしている。以上のよう
うに AM毒素、AK毒素、AF毒素および alter-

naric acid処理感受性葉をピロアンチモン酸カリ固定法で固定すると、共通して微細沈殿が原形質連絡糸で認められる。また、沈殿の元素組成においては、AK毒素処理ナシ葉、AF毒素処理イチゴ葉でNaが検出されるものの、共通してMgが認められている。

一方、これまでのAM毒素に関する微細構造学的研究では、毒素微細構造変化（原形質膜の陥入）は原形質連絡糸で最も多く認められている[60, 64]。これらの結果と、本論文の第4章の結果を総合考察すると、何故AM毒素の効果は原形質連絡糸近傍に限定されているのかといった興味深い疑問が持ちあがる。この疑問に関して、3つの仮説が提唱できる。1つは、リンゴ細胞の原形質連絡糸またはその近傍が物理的または生理的に弱く、毒素障害を受けやすいこと。2つ目は、原形質連絡糸は細胞と細胞間の物質輸送に関与しているため、AM毒素が原形質連絡糸またその近傍の原形質膜に接触する機会が多く、毒素障害が生

じやすいこと。3つ目は、毒素の標的（毒素受容体）が感受性細胞の原形質連絡糸またはその近傍に局在していることである。以上の仮説のうちどの仮説が有望なのか現在のところ決定はできないが、今後の細胞あるいは分子レベルでの詳細な解析で明らかにされるものと思われる。

第 5 章 リンゴ葉の原形質膜 ATPase 活性に対する AM 毒素の効果

高等植物の原形質膜 ATPase の生理学的機能については Serrano [70] の総説に述べられているように、いわゆる "master enzyme" として種々のイオンや物質の能動輸送、成長、電氣的ポテンシャル形成などの細胞の多くの重要な機能を制御しているものと考えられている。リンゴ斑点落葉病菌の生成する AM 毒素は感受性リンゴ細胞の原形質膜に初期作用を示し、膜透過機能障害を誘起する [23]。したがって、AM 毒素による原形質膜 ATPase 活性阻害が膜透過機能障害を誘起することが十分考えられる。そこで、第 5 章では原形質膜 ATPase 活性に対する AM 毒素の効果を調べた [80]。第 1 節では *in situ* での毒素効果を、第 2 節では *in vitro* での効果を検討した。

第 1 節 *in situ* ATPase 活性 に対する 効果

AM毒素を感受性細胞に処理すると原形質膜の陥入が原形質連絡糸近傍で引き起こされることが知られている [60, 64]。また、第 4 章ではピロアンチモン酸カリ固定法を用いて、毒素が維管束細胞の原形質連絡糸近傍からイオン漏出を誘起することを明らかにした。以上のように、AM毒素の感受性細胞に及ぼす効果の電子顕微鏡所見は、毒素効果が宿主細胞の原形質連絡糸付近に局在して発現していることを示唆している。そこで、ATPase 活性に対する毒素効果も原形質連絡糸部位に局在している可能性が考えられるので、第 1 節では毒素の *in situ* ATPase 活性に対する効果を細胞化学的手法を用いて調べた。

1) 材料および方法

in situ ATPase 活性を Balsamo と Uribe の方法 [5] に従って調べた。リンゴ葉の表皮にカ

ミソリで傷を付け、そこに 10^{-5} M の AM 毒素 I、または $200 \mu\text{M}$ オルトバナジン酸ナトリウム（原形質膜 ATPase 活性の阻害剤）を、また対照として脱イオン水を $20 \mu\text{l}$ 処理した。処理葉を 26°C の湿室中に 1, 3, 6, 12 時間静置した後、 0.5% グルタルアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.2）で 4°C 、2 時間前固定した。固定葉に反応液（ 2 mM クエン酸鉛、 2 mM ATP、 50 mM Hepes-KOH、pH 7.1）を減圧浸透し、 25°C に 2 時間静置した後、 1% 四酸化オスミウムを含むリン酸緩衝液で後固定した。以上のように処理したリンゴ葉から第 2 章第 1 節の方法に従って電子顕微鏡試料を作成し電顕下で観察した。

2) 実験結果

作成した電子顕微鏡試料を無染色で観察した。脱イオン水処理リンゴ葉の試料を低倍率で観察したが、低倍率では ATPase 活性を示す沈殿は認められなかった（Fig. 10A）。そこで、高倍率で観察したところ、原形質膜と原

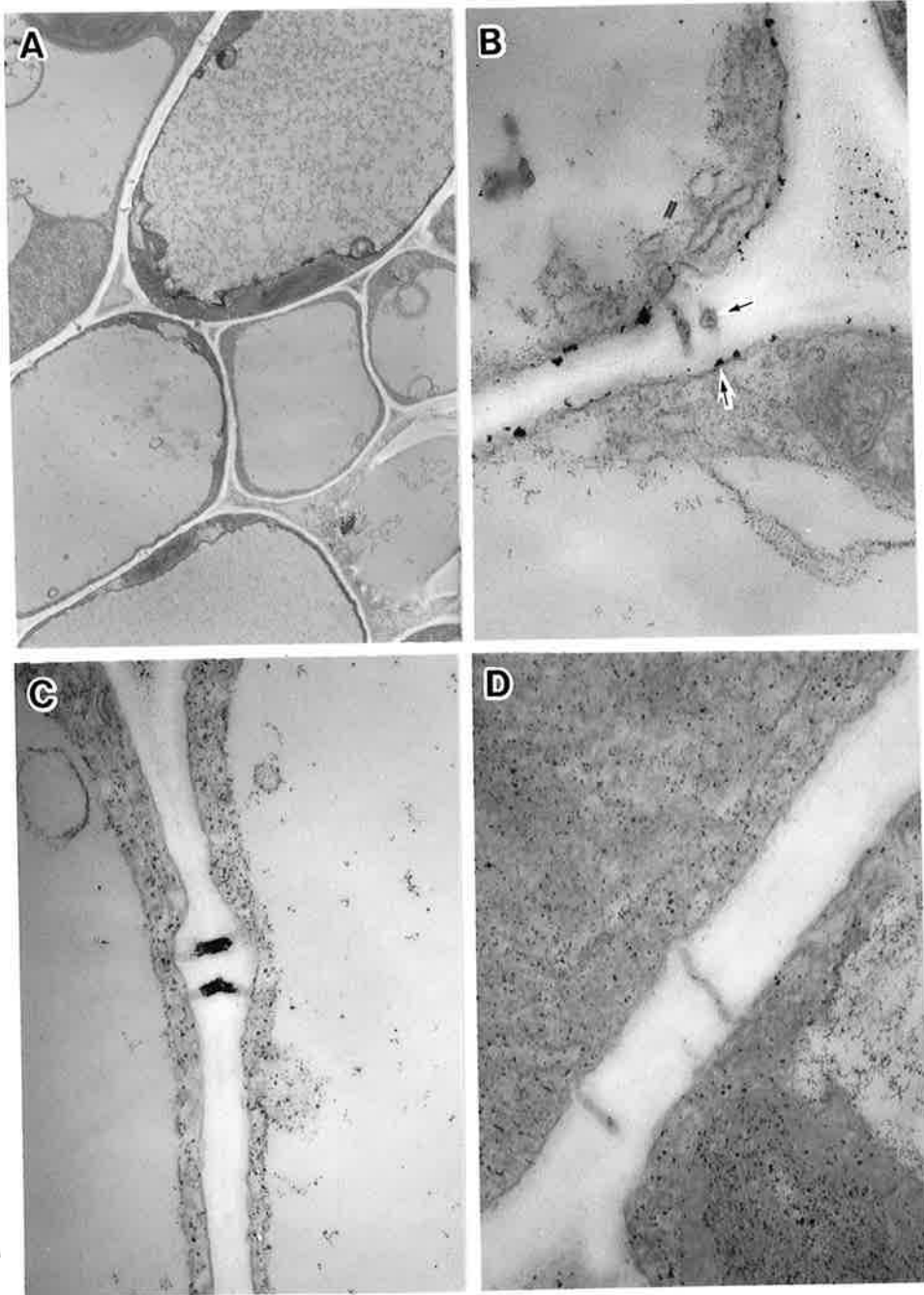


Fig. 10. Ultrastructure of apple leaves (cv. Red Gold) treated with Na_3VO_4 or deionized water. The tissues were treated with ATPase reaction mixture. A, Vascular bundle sheath cells of apple treated with deionized water for 3 hr. At this magnification, precipitates were not observed. ($\times 6,300$). B, Enlargement of apple leaf cells treated with deionized water for 3 hr. The leaf cells showed deposition of precipitates (arrows) on plasma membrane and plasmodesmata, indicating ATPase activity. ($\times 48,000$). C, Typical precipitates in plasmodesmata in apple leaf cells treated with deionized water for 3 hr. ($\times 48,000$). D, Plasma membranes and plasmodesmata in apple leaf cells treated with $200 \mu\text{M Na}_3\text{VO}_4$ for 3 hr. The leaf cells did not show precipitates on plasma membrane and plasmodesmata, indicating inhibition of ATPase activity by Na_3VO_4 . ($\times 48,000$).

形質連絡系で沈殿が観察された (Fig. 10B)。Fig. 10C は原形質連絡系での典型的な沈殿を示している。次に、沈殿が ATPase 活性を反映しているかどうかを調べるため、原形質膜 ATPase の特異的阻害剤であるオルトバナジン酸ナトリウム処理葉を同様に観察した。その結果、脱イオン水処理葉で観察された沈殿は認められなかった (Fig. 10D)。

次に、原形質連絡系での沈殿形成の出現頻度を高倍率 ($\times 130,000$) で調べた。脱イオン水処理葉において、沈殿形成が最も多く観察されたのは維管束細胞で 74%、ついで、隣接細胞で 63%、そして維管束から離れた細胞では 33% と維管束から離れるに従って、沈殿形成の頻度が低下した (Table 10)。一方、オルトバナジン酸ナトリウム処理葉での沈殿形成頻度を調べるとそれぞれ、22%、17%、および 5% であった (Table 10)。したがって、本法で調査した沈殿形成頻度が原形質膜 *in situ* ATPase 活性を反映していることが明らかとな

Table 10. Frequency of occurrence of the plasmodesmata with precipitates per observed plasmodesmata in susceptible apple cv. Red Gold leaves treated with water or Na_3VO_4 for 3 hr.

| Treatment | Occurrence of plasmodesmata with precipitate (%) | | | | | | | |
|-----------------------------|--|---------------------------------------|---|-------------------------------|---------------------------------------|---|-------------------------------|---------------------------------------|
| | Vascular bundle sheath cells | | Mesophyll cells adjacent to bundle sheath | | | Mesophyll cells remote from bundle sheath | | |
| | No. of observed plasmodesmata | No. of plasmodesmata with precipitate | % | No. of observed plasmodesmata | No. of plasmodesmata with precipitate | % | No. of observed plasmodesmata | No. of plasmodesmata with precipitate |
| Water | 76 | 56 | 74 | 63 | 40 | 63 | 76 | 25 |
| Na_3VO_4 a) | 114 | 25 | 22 | 81 | 14 | 17 | 102 | 5 |
| | | | | | | | | 33 |
| | | | | | | | | 5 |

a) Concentration of Na_3VO_4 was 200 μM .

った。

そこで、同様にして AM毒素 I を処理したリ
ンゴ葉での *in situ* ATPase 活性を調べた。そ
の結果、AM毒素を 12 時間処理した感受性品種
葉（レッドゴールド）では原形質連絡糸での
沈殿はほとんど認められず、AM毒素が ATPase
活性を阻害したことを示した（Fig. 11A）。一
方、抵抗性品種葉（マヘ 7）では毒素を 12 時
間処理しても原形質連絡糸で著しい沈殿が形
成され、ATPase 活性の存在することを示した
（Fig. 11B）。

次に、AM毒素が毒素処理後何時間頃から
ATPase 活性を阻害するのかという問題につい
て、最も沈殿が多く観察された維管束細胞で調
べた。その結果、感受性品種（レッドゴールド）
の脱イオン水処理葉では、1、3、6、12
時間のいずれの毒素処理時間においても、
60-80%の原形質連絡糸で沈殿形成が認められ
たが、毒素処理葉では、6 時間目以降から沈
殿形成頻度が低下した（Fig. 12A）。一方、抵

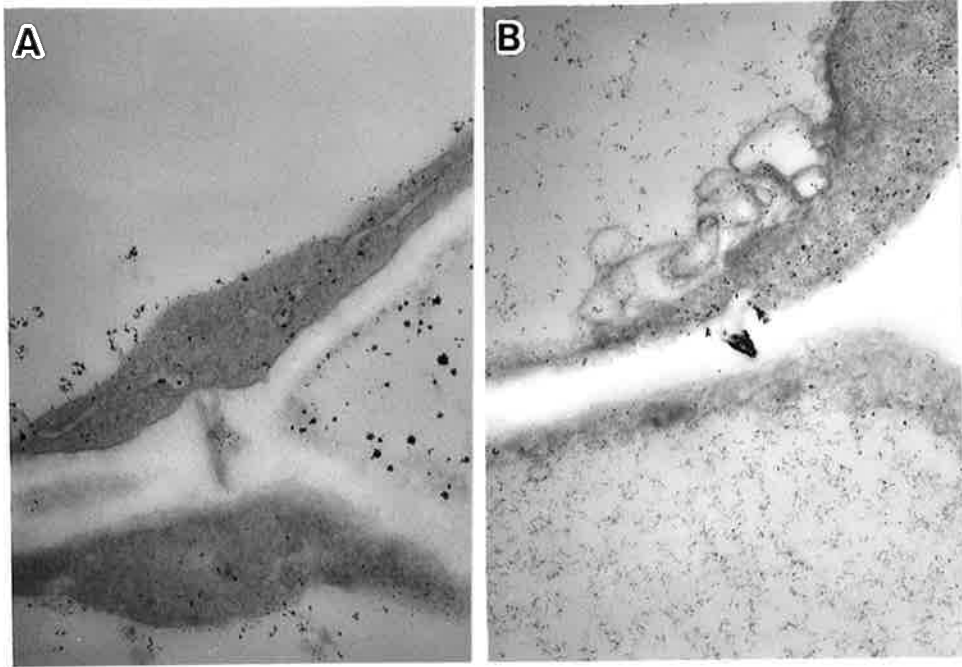


Fig. 11. ATPase activity of susceptible (A) (cv. Red Gold) and resistant (B) (cv. Mahe 7) apple leaves treated with 10^{-5} M AM-toxin I for 12 hr. A, Susceptible cells showed less precipitates, indicating inhibition of ATPase activity by AM-toxin. ($\times 48,000$). B, Resistant cells showed massive deposition of precipitates at plasmodesmata, indicating no effect of AM-toxin on ATPase activity. ($\times 48,000$).

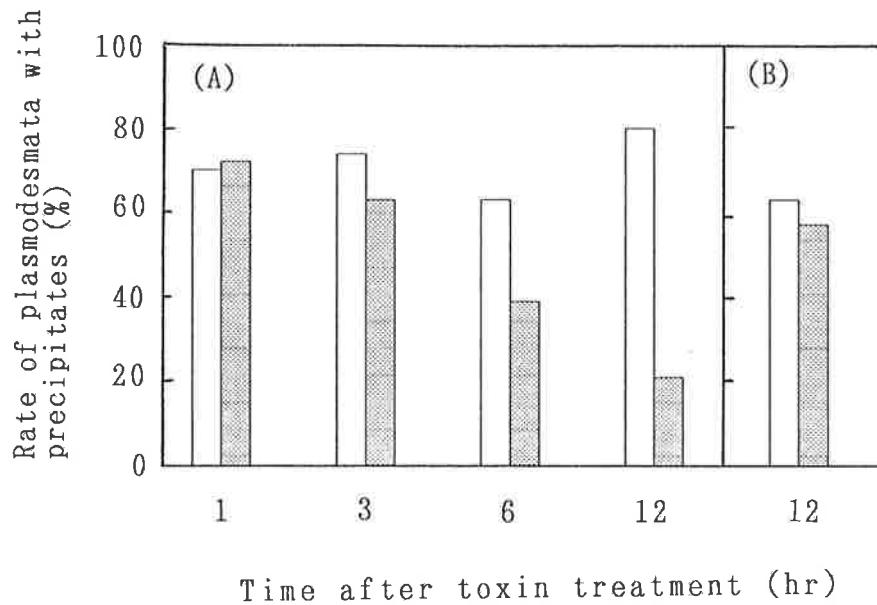


Fig. 12. Effect of AM-toxin on *in situ* ATPase activity at plasmodesmata of susceptible (A) (cv. Red Gold) and resistant (B) (cv. Mahe 7) apple leaves. Apple leaves were treated with deionized water (□) or 10⁻⁵ M AM-toxin I (▨), and incubated for indicated times. The specimens were treated according to the method of Balsamo and Uribe [5]. Rate of plasmodesmata with precipitates = (No. of plasmodesmata with precipitates / No. of observed plasmodesmata) × 100.

抗性品種葉（マヘ7）では12時間の毒素処理でも、沈殿形成頻度に大差は認められなかった（Fig. 12B）。

第2節 *in vitro* ATPase活性に対する効果

第5章第1節ではAM毒素が処理後6時間目頃より *in situ* ATPase活性を阻害することを明らかにした。そこで、第2節ではAM毒素が感受性細胞のATPase活性を直接阻害するのかどうかを調べるため、単離原形質膜ATPase活性に対するAM毒素の効果について調べた。

従来、植物からの原形質膜の単離には、シヨ糖密度勾配遠心法が用いられてきたが、最近水性二層分配法を利用した原形質膜の単離法が報告され、比較的容易に高純度の原形質膜が得られるようになってきている[15]。そこで、第2節では本法を用いてリンゴ葉原形質膜小胞を単離し、単離原形質膜ATPase活性に対するAM毒素の効果について検討した。

1) 材料および方法

リンゴ葉の原形質膜を Yoshidaら [99] の水性二層分配改良法に従って単離した。リンゴ葉を水道水、次いで脱イオン水で洗浄しペーパータオルで水分を取り除いた後、 -83°C に保存した。凍結保存したリンゴ葉を細断し、破碎用緩衝液 (0.25 M ショ糖、2 mM EDTA、12 mM メルカプトエタノール、30 mM L-アスコルビン酸、1% ポリエチレングリコール 4000、20 mM リン酸緩衝液 pH 7.8) に入れ、Vir-Tis 45 ホモジナイザーを用いて高速で60秒間破碎した。破碎液を200 μm のナイロンメッシュでろ過し、ろ液を遠心分離 (10,000 \times g、10分間) した。次に、その上清を遠心分離 (100,000 \times g、1時間) し、原形質膜小胞を含む沈殿を得た。沈殿に0.25 M ショ糖を含むリン酸緩衝液 pH 7.8 に入れ、テフロンホモジナイザーを用いて均一に懸濁し、これを粗膜画分とした。粗膜画分 5 ml を 20 g の 5.6% ポリマー溶液 (最終濃度として 5.6% ポリエ

チレングリコール Sigma P-3350、5.6% デキストラン T500 Pharmacia Fine Chemicals、0.25 M ショ糖、30 mM 塩化ナトリウム) に加え、30回反転しながら混合し、遠心(880 × g 10分間)した。遠心後、上層(ポリエチレングリコール層)を回収した。膜面分を含まない緩衝液だけを加えて作った下層(デキストラン層)に上層を加え、再び遠心(880 × g 10分間)した。上層を0.25 M ショ糖を含む HEPES-BTP 緩衝液(pH7.2)で2倍以上に希釈し、遠心分離(100,000 × g、1時間)した。沈殿を同 HEPES 緩衝液で懸濁し、再び遠心分離(100,000 × g、1時間)した。得られた沈殿を同 HEPES 緩衝液で懸濁し、これを原形質膜面分とした。原形質膜面分は使用するまで-83℃で保存した。

得られた原形質膜面分を以下の方法で電子顕微鏡で観察した。原形質膜面分を遠心分離(100,000 × g、1時間)し、第2章第1節で述べた方法に従って沈殿の電子顕微鏡試料

を作成した。超薄切片を酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色し観察した。

原形質膜画分のATPase活性を以下の方法で測定した。即ち、180 μ lの反応液（反応液の組成（最終濃度）3 mM ATP \cdot 2Na、3 mM硫酸マグネシウム、50 mM塩化カリウム、0.03%トリトンX-100を含む30 mM Tris-Mes緩衝液、pH 6.5）に原形質膜画分20 μ lを添加することにより反応を開始し、38 $^{\circ}$ Cで30分間行った。遊離無機リンの定量はFiske and Subbarowの方法[12]を改良し行った。反応液に400 μ l停止液（5% SDS、0.833% モリブデン酸アンモニウム、1.67 N硫酸）を添加し、次いで、80 μ l発色液（0.154% 1-アミノ-2-ナフトール-4-スルホン酸、0.923% 亜硫酸ナトリウム、0.923% 亜硫酸水素ナトリウム）を添加した後、26 $^{\circ}$ Cで35分間静置し、発色させた。660 nmでの吸光度を測定することにより無機リンの定量を行った。タンパク質濃度は、クマシーブリアントブルーG（Sigma）を用いるBradfordの

方法 [8] に従って定量した。

2) 実験結果

原形質膜画分を電子顕微鏡で観察し、純度検定を行った。その結果、本画分の大半は閉じた小胞で成立っており、純度の高い膜画分であることが明らかとなった (Fig. 13)。

次に、原形質膜画分の ATPase 活性に対する各種特異的阻害剤の効果について調べた。即ち、液胞膜の ATPase 阻害剤である硝酸カリ、ミトコンドリアの ATPase 阻害剤であるアジ化ナトリウム、および、原形質膜の ATPase 阻害剤であるオルトバナジン酸ナトリウムをそれぞれ反応液に添加し ATPase 活性を測定した。その結果、ATPase 活性は 1 mM アジ化ナトリウムでは全く阻害されず、100 mM 硝酸カリで若干 (5-10%) 阻害された。一方、100 μ M オルトバナジン酸ナトリウムで 75-85% 阻害された。したがって、本画分が純度の高い原形質膜標品であることが明らかとなった (Table 11)。

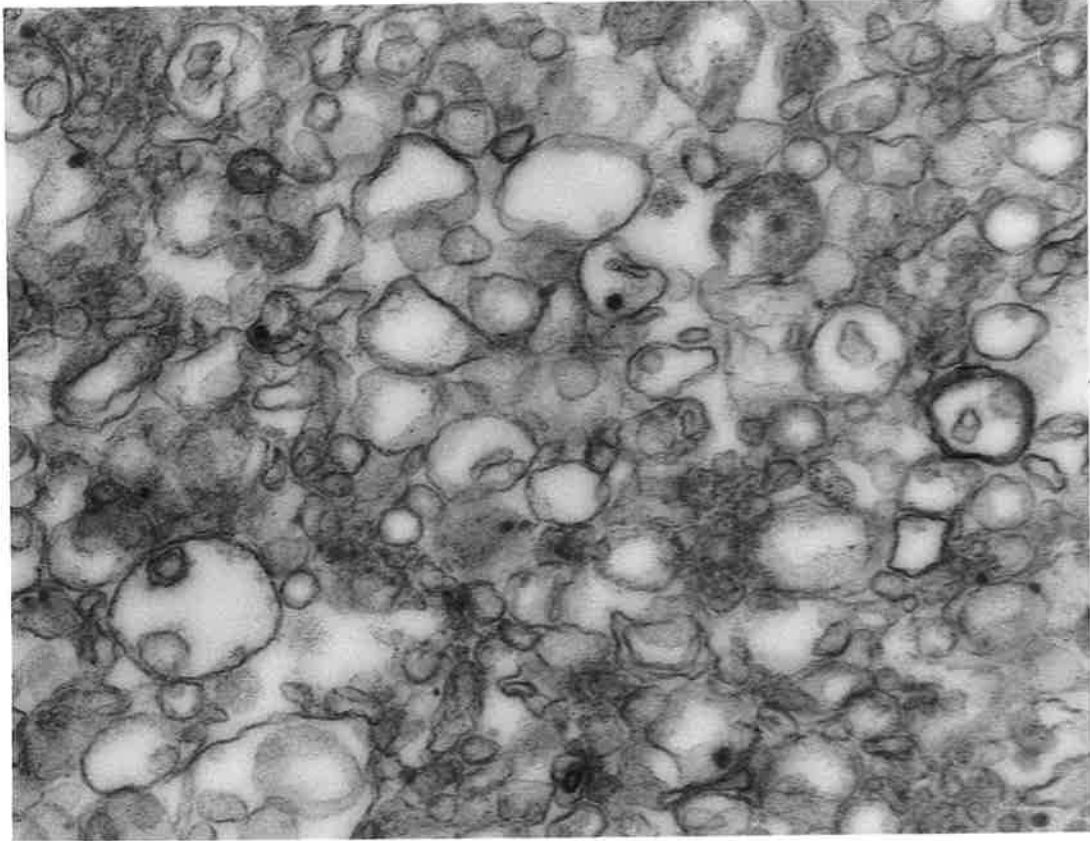


Fig. 13. Electron microscopic profile of plasma membrane fraction obtained from apple leaves (cv. Red Gold). The preparation shows vesicles. (X 40,000).

Table 11. Effects of inhibitors and AM-toxin on ATPase activity of plasma membranes from apple leaves

| Treatment | ATPase activity ^{a)} ($\mu\text{mol Pi/mg protein/h}$) | | |
|---|---|------------------------------------|------------------------------------|
| | Red Gold | Jonathan | Mahe 7 |
| Control | 33.7 \pm 8.6 (100) ^{b)} | 26.5 \pm 1.8 (100) ^{b)} | 32.8 \pm 0.4 (100) ^{c)} |
| +acetone (1%) | 35.4 \pm 8.1 (105) | 29.4 \pm 0.4 (110) | 33.7 \pm 1.8 (103) |
| +Na ₃ VO ₄ (100 μM) | 9.2 \pm 3.2 (27) | 3.5 \pm 0.2 (13) | 5.7 \pm 0.1 (17) |
| +KNO ₃ (100 mM) | 31.3 \pm 8.9 (93) | 25.8 \pm 0.2 (97) | 29.1 \pm 1.2 (89) |
| +NaN ₃ (1 mM) | 35.7 \pm 9.0 (106) | 28.4 \pm 3.1 (107) | 31.7 \pm 2.1 (96) |
| +AM-toxin (10 ⁻⁵ M) | 35.6 \pm 9.5 (106) | 28.2 \pm 1.8 (107) | 34.5 \pm 1.9 (105) |

a) Assayed in the presence of 3 mM NaATP, 30 mM Tris-Mes (pH 6.5), 3 mM MgSO₄, 50 mM KCl and 0.03% (v/v) Triton X-100 at 38 °C.

b) Per cent of control. Values represent the means and standard deviations of three replications.

そこで、本原形質膜標品のATPase活性に対するAM毒素Iの効果について調べた。その結果、感受性品種（レッドゴールド）、中程度抵抗性品種（紅玉）、および抵抗性品種（マヘ7）のいずれの原形質膜面分においても、高濃度AM毒素（ 10^{-5} M）によるATPase活性の変動は全く認められなかった（Table 11）。

次に、感受性品種（レッドゴールド）の原形質膜面分にAM毒素を前処理し、一定時間後にATPase活性を測定した。その結果、AM毒素を原形質膜に12時間処理しても活性の変動は全く認められなかった（Fig. 14）。

第3節 考 察

BalsamoとUribeの方法[5]によって固定したリンゴ葉の*in situ* ATPase活性を電子顕微鏡で調べると、原形質膜、原形質連絡糸で沈殿が認められた。その沈殿は原形質膜ATPaseの特異的阻害剤であるオルトバナジン酸ナト

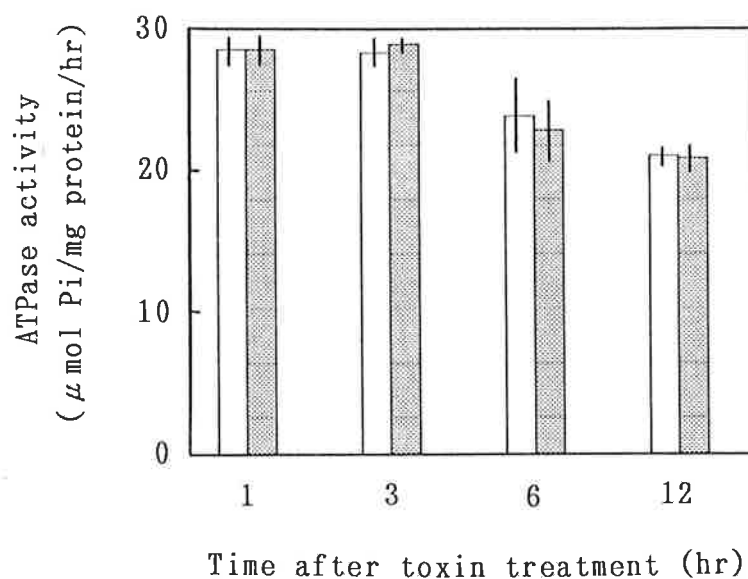


Fig. 14. Effect of pretreatment of AM-toxin I on *in vitro* ATPase activity of plasma membranes from susceptible apple leaves (cv. Red Gold). Plasma membranes were treated with deionized water (□) or 10^{-5} M AM-toxin I (▨), and incubated at 25 °C for indicated times. After the incubation, ATPase activity was measured. Values represent the mean of three replications and their standard deviations.

リウム処理により消失したことから、本沈殿がATPase活性を反映していることが明らかとなった。しかし、著しい沈殿形成が原形質連絡系で観察されたが、原形質膜での沈殿は微量であった。今回用いた試料はATPase反応を行った後に樹脂包埋するpreembeddingで作成したため、試料作成の操作（特に水洗、脱水）により、原形質膜での沈殿は流失し、原形質連絡系での沈殿は取れ難く保持されており、原形質連絡系に沈殿が局在しているように観察されたものと考えた。沈殿形成の組織内分布を調べると沈殿形成はリンゴ組織の維管束細胞で多く認められ、維管束から離れるに従って減少した。維管束細胞にATPaseが局在していると考えるのは難しく、むしろ維管束細胞が組織内の物質輸送細胞であるため反応液との接触機会が多いためと考えるのが無難であろう。沈殿形成は原形質膜や原形質連絡系で認められたが、液胞膜ではあまり認められなかった。BalsamoとUribe[5]は*Karanchoe*の

プロトプラスト内の液胞膜 ATPase 活性を本法で検出しているが、原形質膜での沈殿形成と比べて約 1/3 であることを明らかにし、反応液中の鉛の細胞内への難浸透性を示唆した。今回の実験では、プロトプラストではなくリンゴ葉組織を用いたため、さらに細胞内への鉛の浸透性が悪く液胞膜での ATPase 活性を検出できなかったものと思われる。

感受性リンゴ細胞での沈殿形成は 6 時間以上の AM 毒素処理により減少したが、抵抗性品種では減少しなかった。このことは AM 毒素がリンゴ細胞の *in situ* ATPase 活性を特異的に阻害することを示している。一方、 10^{-5} M の AM 毒素 I による壊死斑が形成され始める時間はおおよそ毒素処理後 6 時間であり、*in situ* ATPase 活性の低下時間帯と一致する。このことは、*in situ* ATPase 活性の低下は毒素の初期作用ではなく毒素による細胞死と関連しているものと思われる。

一方、Parkら [63] は AK 毒素処理ナシ葉で細

胞活性を原形質膜に融合したゴルジ小胞の数を計測することにより調べ、AK毒素処理後3～6時間以内であれば、感受性細胞のゴルジ小胞生産を増大させることを見出した。しかも、ゴルジ小胞は原形質膜直下に均一に分布するのではなく、毒素によって陥入した原形質膜近傍に集中していて旺盛な分泌活性を行っており、原形質膜にゴルジ小胞を融合させて内部の物質を分泌させる能力を持っていることを明らかにした。しかし、毒素処理10時間後では、細胞の壊死とともにゴルジ小胞はほとんど消失していることから、ゴルジ活性はほとんど無くなっているものと考えられている[63]。*in situ* ATPase活性がAM毒素によって阻害された第5章第1節での結果とParkら[63]の実験結果との間には、毒素と検定植物の違いはあるものの、共通して6～10時間目で毒素による細胞活性の低下が認められる。AM毒素によって約6時間以降に誘起された細胞活性の全体の低下の結果、ATPase活性ある

いはゴルジ活性の低下などの2次的毒素障害が生じ、その後壊死が誘起されるものと思われる。

一方、Kohmotoら[27]はHSTによる菌の感染誘導には細胞死は必要とせず、毒素によって早期に誘導された微少な膜機能障害が重要であると指摘している。したがって、毒素処理後6時間以降に誘導されたATPase活性の阻害は、斑点落葉病菌の感染の有無を決定する毒素障害ではなく、むしろ、病徴発現に関与していると考えられる。

なお、病原菌由来の病原性因子処理によって *in situ* ATPase 活性が低下することはエンドウ褐紋病菌のサプレッサーで処理したエンドウ葉でも認められている[3, 85]。褐紋病菌のサプレッサーは本病原菌の宿主であるエンドウ、および非宿主であるインゲン、ササゲ、ダイズ、オオムギなどから調製した原形質膜画分の *in vitro* ATPase活性を非特異的に阻害する。しかし、*in situ* ATPase活性は、

宿主であるエンドウに限りサプレッサーによる阻害が認められ、サプレッサーの原形質膜 ATPase に対する阻害作用の特異性は、組織レベルにおいて初めて認められることを明らかにしている [3, 85]。

AM毒素による *in situ* ATPase 活性の低下は毒素処理後 6 時間以降で認めれることから、毒素の 2 次的現象であるものと推察されたが、毒素が直接 ATPase 活性を阻害している可能性は必ずしも否定できない。そこで、毒素が直接 ATPase に作用しているかどうかを調べるため単離原形質膜 ATPase 活性に対する毒素効果を調べた。

原形質膜の単離には Yoshida ら [99] の水性二層分配法を用いた。水性二層分配における膜顆粒の上下層への分配は、膜表面の物理化学的性質、特に表面電荷と疎水性などに支配されているといわれている。強い電荷を持つ膜は、上層へ分配される傾向が強い。原形質膜表面は一般に陰性の電荷を帯びているので

上層へと分配されるが、断片化したり、inside-outの膜小胞は逆に下層へと分配される。本法によって得られた膜面分を電子顕微鏡で観察すると、ほとんどが閉じた小胞であり断片化した膜面分は含まれておらず、純度の高い標品であるものと思われた。また、膜面分のATPase活性に対する特異的阻害剤の効果について調べた結果、原形質膜ATPase特異的阻害剤オルトバナジン酸ナトリウムに著しく感受性であり、本面分が高純度の原形質膜面分であることが明らかとなった。そこで、ATPase活性に対するAM毒素の効果調べたが、何ら影響は認められなかった。これらの結果から、毒素による*in situ* ATPase活性の低下は、毒素によって間接的に引き起こされる二次的現象であるものと結論した。

一方、*Fusicoccum amygdali* Del.が生成する非特異的毒素(fusicoccin)は広範囲の高等植物において、膜電位の過分極と原形質膜ATPase活性の増大を誘起する[7]。また褐紋

病菌のサプレサーは、原形質膜の本酵素系を阻害することが明らかとなっている[100]。

一方、AK毒素は感受性ナシ葉の膜電位の脱分極を誘起するが[56]、ATPase活性には効果を示さない[54]。さらに、AF毒素処理イチゴ葉でも毒素による膜電位の脱分極は認められるが[38]、ATPase活性は阻害されない[33]。

一方、サトウキビ眼点病菌(*H. sacchari*)のHS毒素に関する研究においても、本毒素は膜電位の脱分極を誘起するが、ATPaseには効果を示さないことが報告されている[69]。現在までのところ、AM毒素を含めたHSTは、*in situ* ATPase活性の低下や、膜電位の変化を誘起するものの、ATPaseに直接的作用を示さない。したがって、毒素と毒素受容体から始まる細胞内での一連の事象を経て *in situ* ATPase活性の低下や原形質膜膜電位の脱分極が間接的に誘起されるものと考えられるが、その分子機構は依然として不明のままである。

一方、バリノマイシンやモナクチンなどの

イオノフォアは環状ペプチドであり、解離しうる残基をもたず、分子の外側にメチル基など疎水性基が配列し、AM毒素の構造と類似している[66]。このようなイオノフォアは K^+ など陽イオンをその環状構造の中に包み込み、脂溶性の K^+ の包接化合物をつくり、膜の疎水性領域を通過することによってイオンの透過性を高める働きをする[66]。分子構造の類似性から考えると、AM毒素もイオノフォアの様に包接化合物をつくり、リンゴ細胞の原形質膜に作用する可能性が考えられるが、現在のところ、AM毒素の単離原形質膜に対する直接作用は認められていない。今後、AM毒素がリンゴ細胞の原形質膜を第1次作用点としていのかどうかを調べるためには、単離原形質膜小胞を用いて、 H^+ あるいはイオン輸送に対する毒素効果を検討しなければならないものと思われる。

第 6 章 総 合 考 察

自然界に常発している数多くの農作物病害では、特定の微生物種が特定の植物あるいは栽培品種を選択して実害を与えている。例えば、いもち病菌はイネを侵すが、ダイコンには決して実害を与えない。リンゴ斑点落葉病菌はリンゴのうち、レッドゴールドなど特定のリンゴ品種だけを侵害する。

植物糸状菌病にみられる寄生性の特異性は、まず病原菌側から何らかの化学物質的な信号の提供があり、それに応答し得る受容機構を具備した植物のみが、自己組織内に異物（病原菌）を受容するものと概念的には考えられる。HST生成菌の感染機構に関しては次のような基本概念が提唱されている [22, 26, 28, 42, 43, 45, 49, 52, 53]。すなわち、① 宿主植物侵入に先立つ事前行動として、病原菌による HSTの放出。② 宿主による HST情報の選択的受

容。③ HST情報の伝達による糸状菌の貫入に対する宿主側の受容性体制の醸成である。

AM毒素によって仲介される斑点落葉病菌の感染機構においては、基本概念①に係わる病原信号因子としてのAM毒素分子が単離・構造決定[48, 92, 93]、化学合成[18, 32, 74]されている。さらに、アナログ[47, 71, 72, 73, 75]や鏡像異性体[2]を用いた分子構造と活性相関の研究も行われ、AM毒素分子の化学的基礎は既に構築されている。

一方、基本概念②に関して、これまでAM毒素のリンゴ細胞におよぼす特異的生理機能障害や微細構造変化の研究が行われた。毒素障害は感受性リンゴ葉の原形質膜と葉緑体で認められることが明らかとなり[25, 60]、AM毒素の初期作用点はこれら両オルガネラであると考えられるようになった。また、感受性リンゴ品種はAM毒素に対して器官特異性を示し、葉緑体を持つ葉は毒素反応性を示すが、花卉は反応しないことが認められ[35]、この結果

からは、AM毒素の葉緑体への作用が特異性発現に重要であることが示唆された。さらに、毒素による壊死斑形成は光照射によって抑制されるという結果が得られており[88, 89, 90]、毒素の初期作用点と光の関係が注目を浴びるようになってきた。

そこで本研究では、基本概念②に関連した以上のような過去の研究結果を踏まえて、AM毒素の宿主特異的作用機構について細胞・生理学的に実験を展開した。まず、第1章において、AM毒素の初期作用に対する光の効果について調査した。ここでは、毒素の原形質膜機能障害には光は無関与であることが明らかとなっていたので[90]、さらに、微細構造学的にこの結果を補強した。一方、もう1つの作用点である葉緑体での毒素障害に対する光の影響については今まで全く明らかにされていなかった。しかし、葉緑体が光受容オルガネラであることを考慮すると、毒素による葉緑体機能障害は光によって左右されることが

予想された。そこで、葉緑体機能障害に対する光の効果調べた結果、光の影響を全く受けず、光による壊死斑抑制現象と毒素による葉緑体機能障害との関連性は無いことが明らかとなり、壊死斑形成抑制には葉緑体以外の光化学反応系が関与するものと推察した。

AM毒素は原形質膜と葉緑体の2カ所に初期作用を示すことは明らかとなっているが[25, 60]、毒素による原形質膜機能障害あるいは葉緑体の機能障害や変調がどのうようにAM毒素の宿主特異性発現に関連するのか、また、菌の受容化にどの毒素障害が関与するのか全く明らかにされていない。そこで、第3章では両オルガネラでの毒素障害に焦点を絞り、両作用点の病理的評価を行った。毒素投与量—反応相関からみたAM毒素作用およびSH基修飾剤処理葉でのAM毒素作用を検討したところ、毒素の原形質膜への作用が壊死斑形成に重要であることを見出した。また、毒素の原形質膜への作用はSH基修飾剤の前処理で抑制され、

同時処理で抑制されないことから、AM毒素の原形質膜への初期作用（毒素分子の認識あるいは毒素認識後瞬時に誘起される情報伝達）にSH基分子が関与すると推察した。一方、毒素障害と菌受容化との関連性を解析したところ、毒素による原形質膜機能障害が菌受容化に必須であることを明らかにした。第3章での結果をもとにAM毒素の感受性リンゴ葉に対する作用機構の模式図をFig. 15に示した。

AM毒素の作用機構において、原形質膜機能障害の重要性を第3章で指摘した。しかし、毒素による原形質膜機能障害として明らかにされている事象は、毒素による原形質膜の微細構造変化（原形質膜の陥入）[60, 64]や膜透過機能障害[21, 23, 24]などである。これまでの膜透過機能障害に関する研究では、葉組織から外部に漏出するイオンを分析する方法が用いられてきた。したがって、得られた結果は組織全体で引き起こされた膜透過機能障

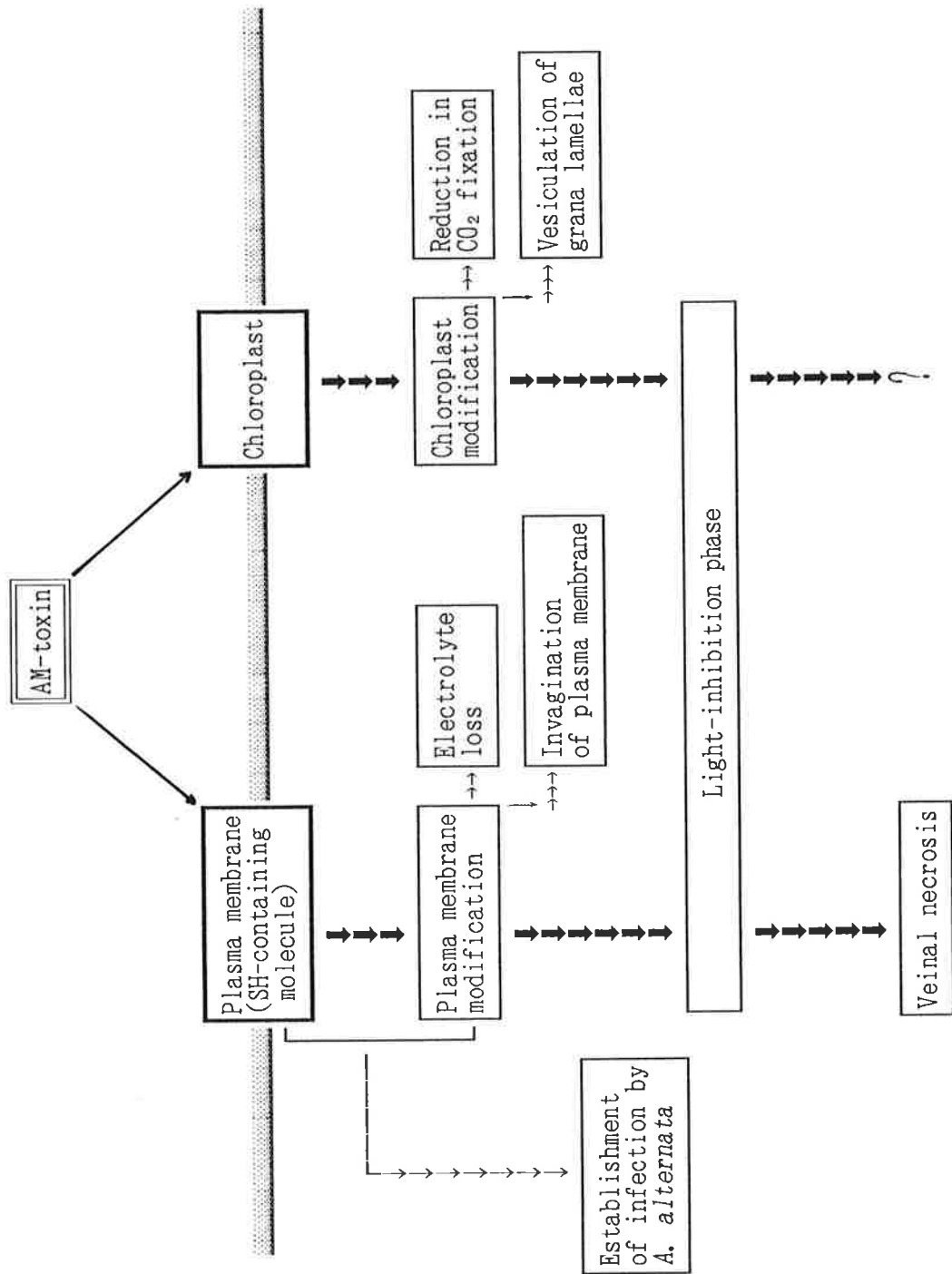


Fig. 15. A scheme for the mechanism of action of AM-toxin in susceptible apple leaves.

害を総合したものであり、毒素障害の細胞内局在性に関しては不明のままであった。そこで第4章では、イオン沈殿固定法（ピロアンチモン酸カリ固定法）[20]を用いて、毒素によるイオン漏出部位の局在性を電子顕微鏡下で調べた。本手法により、毒素によるイオン漏出部位は主に原形質連絡糸近傍に局在していることを明らかにした。また、このことから、AM毒素初期作用部位（毒素受容体）も原形質連絡糸に局在している可能性が示唆された。以上のように、第4章では細胞レベルでのAM毒素の作用機構にメスをいれた。

一方、AM毒素によって膜透過機能障害が誘起されることは現象的に把握されているものの、その原因となる機構については全く明らかにされていない。1つの可能性として、毒素が原形質膜ATPase活性を阻害することが予想されたので、第5章では本酵素に対する毒素効果を調べた。*in situ* ATPase活性は毒素処理6時間以降に阻害されたが、単離原形質

膜での *in vitro* ATPase 活性には何ら効果を示さなかった。これらの結果から、AM毒素は ATPase 活性を 2 次的に阻害することを明らかにした。また、毒素作用部位と考えられている原形質膜の単離に成功し、*in vitro*での毒素作用解析を可能にした。

以上のように本研究において、AM毒素のリンゴ細胞におよぼす作用を細胞・生理学的に解析し、先に述べた感染機構の基本概念②に具体性を与えた。さらに、このような研究は基本概念②に関するさらなる詳細な研究、あるいは、基本概念③を解明する上で有用な情報を提供できたものと考ええる。

一方、基本概念②にあげられている選択的受容に関して、HSTの示す宿主特異性は”感受性植物にはHSTを認識する因子（毒素受容体）が存在し、抵抗性植物ではこれを欠く”とする毒素受容体説[65]で説明されるようになってきている。WolpartとMacko[95]はHV毒素と結合する100kDのタンパク質を感受性工

ンパク葉より見出し、本タンパク質がHV毒素受容体である可能性を示した。また、Deweyら[10]は、HMT毒素感受性のTexas型細胞質雄性不稔系統トウモロコシのミトコンドリアに特異的に存在する13kDのポリペプチドをコードする遺伝子(*T-urf13*)をクローニングし、それを大腸菌に導入すると、大腸菌がHMT毒素反応性を示すことを明らかにした。また、Braunら[9]は、宿主ミトコンドリアや遺伝子導入大腸菌において、HMT毒素が13kDポリペプチドと結合することを見出し、本ペプチドが毒素受容体であることを明らかにした。近年、Otaniら[53, 54]はナシ組織から原形質膜面分を単離し、単離原形質膜にAK毒素受容体が存在することを明らかにしている。一方、AM毒素に関する研究では、アナログ[47, 71, 72, 73, 75]や鏡像異性体[2]を用いた分子構造と活性相関の研究などから、毒素受容体の存在が示唆されている。また、矢内ら[97]は感受性細胞の原形質膜部分にAM毒素結合タンパ

ク質が存在する可能性を示している。AM毒素の示す特異性決定の分子機構についてはまだ十分解明されていないが、本論文で得られた結果は、このような研究を展開するうえで、有益な知見を提供するものと確信する。

一方、基本概念③においては、本概念を支持する実験結果は、リンゴ斑点落葉病菌ーリンゴ細胞系においてはあまり得られていない。しかし、AK毒素と感受性ナシ葉では、AK毒素はナシ葉の原形質膜に作用を示し、原形質膜機能障害を引き起こす。これがナシ細胞の異物拒絶系の始動を停止させ、菌の感染を導くことが明らかとなっている[14, 28, 43]。AM毒素による感染機構にもAK毒素と同じように原形質膜機能障害が重要であることが本論文の第3章によって明らかとなっており、AK毒素による感染機構との類似性が示唆された。今後、リンゴ細胞の持つ異物拒絶反応の実体の解明、さらに、AM毒素による原形質膜機能障害と異物拒絶反応との相互関係の解析が必要

である。

今後のAM毒素作用に関する詳細な研究により、毒素によって仲介された斑点落葉病菌の感染機構の基本概念がより具体性が帯び、宿主－寄生者相互関係の理解が深まることを期待している。それによって、斑点落葉病の宿主選択・感染機構の解明という基礎的な問題だけでなく、農業生態系における栽培作物と病原菌の相互依存性を利用した新しい病害防除への活用構想が展開されるものと思われる。

要 約

本論文は、リンゴ斑点落葉病菌が生産するAM毒素のリンゴ細胞に及ぼす特異的作用を生理・生化学的および微細構造学的に解析したものである。その概要は以下の通りである。

1. 光照射葉におけるAM毒素作用

AM毒素による宿主葉での壊死斑形成は、光照射で著しく抑制されるが、毒素による電解質の異常漏出には光は影響しないことが報告されている。そこで、光による壊死抑制機構をさらに明らかにする目的で、原形質膜および葉緑体への毒素作用に対する光の効果について解析した。毒素による原形質膜の陥入現象には光の抑制効果は全く認められなかった。また、毒素による葉緑体グラナラムラの小胞化と明下CO₂固定能の阻害も光は全く影響を示さなかった。以上の結果から、光の抑制機構は両標的小器官上で進行するAM毒素初期作

用過程を経た後の細胞壊死過程に働くものと思われた。

2. AM毒素の2つの作用点とその病理的意義

AM毒素は宿主原形質膜と葉緑体に初期作用を示すが、毒素作用における両作用点の役割については全く不明である。そこで、原形質膜と葉緑体に対する毒素作用に焦点をあて、毒素が介在する高い選択的認識機構と毒素作用点との関係、また、感染場面での役割について検討した。その結果、毒素は、感受性リンゴ葉には 10^{-8} Mの低濃度まで電解質異常漏出や明下 CO_2 固定阻害を引き起こし、壊死斑を形成した。一方、中程度抵抗性リンゴやナシ葉では、電解質の異常漏出と壊死斑形成は 10^{-5} Mの毒素濃度で誘起されたが、明下 CO_2 固定阻害は、 10^{-7} - 10^{-6} Mの濃度でも認められた。さらに、 10^{-6} - 10^{-5} Mの毒素で処理した抵抗性や非宿主葉では、電解質の異常漏出や壊死斑形成は誘起されなかったが、 CO_2 固定阻害が認められた。また、感受性や中程

度抵抗性葉では、電解質異常漏出や壊死斑の誘起される毒素濃度で非病原菌の感染が誘発されたが、抵抗性や非宿主葉では、CO₂固定阻害のみられる毒素濃度でも感染誘発は起こらなかった。一方、SH基修飾剤で処理した感受性葉では、毒素による壊死斑形成や電解質異常漏出は顕著に抑制されたが、明下CO₂固定阻害は抑制されなかった。また、このような修飾剤処理葉では、病原菌の感染が抑制された。以上の結果から、AM毒素による壊死斑形成には、毒素の原形質膜への作用が重要であること、また、毒素による原形質膜機能の障害が菌の感染を誘発することが示唆された。

3. AM毒素処理感受性リンゴ葉におけるイオン漏出部位

AM毒素の感受性細胞の原形質膜に対する初期作用として、葉組織からの著しいイオン漏出が誘起される。そこで、イオン沈殿固定法を用いて、AM毒素による細胞内イオン漏出部位の同定を行った。AM毒素処理リンゴ葉を

$\text{OsO}_4 - \text{KSb}(\text{OH})_6$ で固定し、電子顕微鏡で観察した結果、反応沈殿物の集積が感受性細胞の原形質連絡系近傍の細胞壁で観察された。なお、脱イオン水処理感受性葉や毒素処理抵抗性葉の細胞壁ではこのような沈殿物はほとんど観察されなかった。反応沈殿物の集積は毒素処理後5分で著しく認められ、その後経時的に減少した。さらに、反応沈殿物を分析電顕で解析した結果、Mgが特異的に検出され、漏出中の Mg^{2+} が $\text{KSb}(\text{OH})_6$ と反応して $\text{Mg}[\text{Sb}(\text{OH})_6]_2$ を形成し細胞壁に沈澱したことを示した。以上の結果から、感受性細胞ではAM毒素処理後5分以内に原形質連絡系近傍から細胞内イオンが漏出しているものと考えられ、原形質連絡系近傍の原形質膜が毒素の作用部位である可能性を示した。

4. リンゴ葉の原形質膜ATPase活性に対するAM毒素の効果

AM毒素は感受性リンゴ細胞の原形質膜に初期作用を示すが、その障害の機構については

不明である。一つの可能性として、毒素が原形質膜 ATPase 活性の阻害することが予想される。そこで、原形質膜 ATPase 活性に対する AM 毒素の効果を調べるため、まずリンゴ葉に ATP とクエン酸鉛を処理して活性染色を行ない、*in situ* ATPase 活性を電顕下で観察した。その結果、ATPase 活性を示す反応沈殿物が原形質膜や原形質連絡系で認められたが、原形質膜 ATPase 活性阻害剤の Na_3VO_4 処理を行なうと、これらの沈殿は消失した。そこで、AM 毒素処理葉での ATPase 活性染色を行なった結果、抵抗性細胞では反応沈殿物が形成されたのに対して、感受性細胞では毒素処理後 6 時間以降から沈殿物の形成頻度が減少した。次に、*in vitro* ATPase 活性に対する毒素効果を調べるため、リンゴ葉から水性二層分配系によって原形質膜画分を得た。本画分の ATPase 活性に対する毒素効果を調べたが、毒素による活性の低下は認められなかった。以上の結果から、AM 毒素によって *in situ* ATP

ase 活性は感受性細胞のみ特異的に阻害されるが、この活性阻害は毒素の2次的作用であるものと思われる。

引用文献

1. Akimitsu, K., Kohmoto, K., Otani, H. and Nishimura, S. (1989). Host-specific effects of toxin from the rough lemon pathotype of *Alternaria alternata* on mitochondria. *Plant Physiol.* 89:925-931.
2. Aoyagi, H., Mihara, H., Kato, T., Yamada, M. and Ueno, T. (1987). Synthesis of enantio AM-toxin I. *Agric. Biol. Chem.* 51:1707-1709.
3. 荒木美和・吉岡博文・小林一成・白石友紀・山田哲治・一瀬勇規・久野均・奥八郎 (1991). エンドウ褐紋病菌Suppressorの作用機構 (4) - Suppressorの原形質膜ATPase阻害活性の特異性について - . *日本植物病理学会報* 57:110-111 (講要) .
4. Arase, S., Kondo, K., Honda, Y., Nozu, M. and Nishimura, S. (1990). Studies on host-selective infection mechanism of *Pyricularia oryzae* Cavara (3) Light-dependency of leaf necrosis formation by toxin(s) from germinating spores. *Ann Phytopath. Soc. Japan* 56:346-350.
5. Balsamo, R. A. and Uribe, E. G. (1988). Plasmalemma- and tonoplast-ATPase activity in mesophyll protoplasts, vacuoles and microsomes of the Crassulacean-acid-metabolism plant *Kalanchoe daigremontiana*. *Planta* 173:190-196.
6. Bednarski, M. A., Izawa, S. and Scheffer, R. P. (1977). Reversible effects of toxin from *Helminthosporium maydis* race T on oxidative phosphorylation by mitochondria from maize. *Plant Physiol.* 59:540-545.
7. de Boer, A. H., Watson, B. A. and Cleland, R. E. (1989). Purification and identification of the fusicoicin binding protein from oat root plasma membrane. *Plant Physiol.* 89:250-259.
8. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
9. Braun, C. J., Siedow, J. N. and Levings III, C. S. (1990). Fungal toxins bind to the URF13 protein in maize mitochondria and *Escherichia coli*. *Plant cell* 2:153-161.
10. Dewey, R. E., Siedow, J. N. Timothy, C. S. and Levings III, C. S. (1988). A 13-kilodalton maize mitochondrial

- protein in *E. coli* confers sensitivity to *Bipolaris maydis* toxin. *Science* 239:293-295.
11. Earle, E. D., Gracen, V. E., Yoder, O. C. and Gemmill, K. P. (1978). Cytoplasm-specific effects of *Helminthosporium maydis* race T toxin on survival of corn mesophyll protoplasts. *Plant Physiol.* 61:420-424.
 12. Fiske, C. M. and Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66:375.
 13. Gardner, J. M. and Scheffer, R. P. (1973). Effect of cycloheximide and sulfhydryl-binding compounds on sensitivity of oat tissues to *Helminthosporium victoriae* toxin. *Physiol. Plant Pathol.* 3:147-157.
 14. Hayami, C., Otani, H., Nishimura, S. and Kohmoto, K. (1982). Induced resistance in pear leaves by spore germination fluids of nonpathogens to *Alternaria alternata*, Japanese pear pathotype and suppression of the induction by AK-toxin. *J. Fac. Agric. Tottori Univ.* 17:9-18.
 15. Holdges, T. K. and Mills, D. (1986). Isolation of the plasma membrane. *Methods Enzymol.* 118:41-54.
 16. Inada, K. (1976). Action spectra for photosynthesis in higher plants. *Plant and Cell Physiol.* 17:355-365.
 17. 伊藤靖夫・霜村典宏・甲元啓介・尾谷 浩・児玉基一朗・中塚進一 (1991). 感受性カンキツおよび日本ナシに対するACT毒素作用の比較. *日本植物病理学会報* 57:106 (講要).
 18. Kanmera, T., Aoyagi, H., Waki, T., Kato, N., Izumiya, N., Noda, K. and Ueno, T (1981). Syntheses of AM-toxin III and its analogs using the Hofmann degradation. *Tetrahedron Lett.* 1981:3625-3628.
 19. Kinoshita, T., Renbutsu, Y., Taniguchi, T., and Nishimura, S. (1972). Distribution of tenuazonic acid production in the genus *Alternaria* and its pathological evaluation. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 38:397-404.
 20. Klein, R. J., Yen, S-S. and Åsa T-K. (1972). Critique on the K-pyroantimonate method for semiquantitative estimation of cations in conjunction with electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 20:65-78.
 21. Kobayashi, H. (1977). Mode of action of *Alternaria mali* toxins: Ca²⁺-stimulated and K⁺-inhibited electrolyte leakages from apple leaf tissues. Thesis for Bachelor of

Agriculture, Tottori University.

22. 甲元啓介 (1990). 病原菌の病原性決定因子. (西村正暘・大内成志編) 文永堂出版, 東京. pp.172-204.
23. Kohmoto, K., Khan, I. D., Renbutsu, Y., Taniguchi, T. and Nishimura, S. (1976). Multiple host-specific toxins of *Alternaria mali* and their effect on the permeability of host cells. *Physiol. Plant Pathol.* 8:141-153.
24. 甲元啓介・小林裕和・西村正暘 (1977). AM-toxin 処理リンゴ組織におけるKイオンの異常漏出とCaイオンによるその賦活化. 日本植物病理学会報 43:97-98 (講要).
25. Kohmoto, K., Nishimura, S. and Otani, H. (1982). Action sites for AM-toxins produced by the apple pathotype of *Alternaria alternata*. In *Plant Infection: The Physiological and Biochemical Basis*. (Asada, Y. et al. eds.). Japan Sci. Soc. Press / Springer-Verlag, Tokyo / Berlin. pp.127-143.
26. Kohmoto, K. and Otani, H. (1991). Host recognition by toxigenic plant pathogens. *Experientia* 47:755-764.
27. Kohmoto, K., Otani, H., Kodama, M. and Nishimura, S. (1989). Host recognition: Can accessibility to fungal invasion be induced by host-specific toxins without necessitating necrotic cell death? In *Phytotoxins and Plant Pathogenesis*, NATO ASI Series, Vol. H27 (Graniti, A. et al. eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp.249-265.
28. Kohmoto, K., Otani, H. and Nishimura, S. (1987). Primary action sites for host-specific toxins produced by *Alternaria* species. In *Molecular Determinants of Plant Disease*. (Nishimura, S. et al. eds.). Japan Sci. Soc. Press / Springer-Verlag, Tokyo / Berlin. pp.11-26.
29. Kohmoto, K., Scheffer, R. P. and Whiteside, J. O. (1979). Host-specific toxin from *Alternaria citri*. *Phytopathology* 69:667-671.
30. Kohmoto, K., Taniguchi, T. and Nishimura, S. (1977). Correlation between the susceptibility of apple cultivars to *Alternaria mali* and their sensitivity to AM-toxin I. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 43:65-68.
31. Langsdorf, G., Park, P. and Nishimura, S. (1991). Investigations on *Alternaria solani* infections: Effect of alternaric acid on the ultrastructure of tomato cells. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 57:32-40.

32. Lee, S., Aoyagi, H., Shimohigashi, Y., Izumuya, N., Ueno, T. and Fukami, H. (1976). Syntheses of cyclotetra-depsipeptides, AM-toxin I and its analogs. *Tetrahedron Lett.* 1976:843-846.
33. 李 星淑・朴 杓允・柘植尚志・中塚進一・道家紀志・西村正暘 (1990). AF-毒素の作用機構：イチゴ原形質膜のATPase活性に及ぼす作用. *日本植物病理学会報* 56:367 (講要).
34. MacRae, W. D. and Yoder, O. C. (1988). Light has opposite effects on sensitivity of maize protoplasts to T-toxin from *Cochliobolus heterostrophus*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 32:293-300.
35. Maeno, S., Kohmoto, K., Otani, H. and Nishimura, S. (1984). Different sensitivities among apple and pear cultivars to AM-toxin produced by *Alternaria alternata* apple pathotype. *J. Fac. Agric. Tottori Univ.* 19:8-19.
36. Moussatos, L., Witsenboer, H., Hille, J. and Gilchrist, D. Tomato disease resistance gene *Asc* is active in whole plants and individual cells. (Personal communication).
37. 村岡 尚・木下忠孝・西村正暘・甲元啓介 (1971). ナシ黒斑病菌の菌株間にみられる生理的諸性質の差異について. *日本植物病理学会報* 37:388-389 (講要).
38. Namiki, F., Okamoto, H., Katou, K., Yamamoto, M., Nishimura, S., Nakatsuka, S., Goto, T., Kohmoto, K., Otani, H. and Novacky, A. (1986). Studies on host-specific AF-toxins produced by *Alternaria alternata* strawberry pathotype causing *Alternaria* black spot of strawberry (V). Effect of toxins on membrane potential of susceptible plants as assessed by electrophysiological method. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 52:428-436.
39. Nishimura, S. (1980). Host-specific toxins from *Alternaria alternata*. Problems and prospects. *Proc. Japan Acad.* 56B:362-366.
40. Nishimura, S. (1987). Recent development of host-specific toxin research in Japan and its agricultural use. In *Molecular Determinants of Plant Disease*. (Nishimura, S. et al. eds.). Japan Sci. Soc. Press / Springer-Verlag, Tokyo / Berlin. pp.11-26.
41. 西村正暘・甲元啓介 (1974). Citrinin—その *Alternaria kikuchiana* 毒素の病原性との類似性. *日本植物病理学会報* 40:174 (講要).

42. Nishimura, S. and Kohmoto, K. (1983). Host-specific toxins and chemical structures from *Alternaria* species. *Annu. Rev. Phytopathol.* 21:87-116.
43. Nishimura, S. and Kohmoto, K. (1983). Roles of toxins in pathogenesis. *In Toxin and Plant Pathogenesis.* (Daly, J. M. and Deverall, B. J. eds.). Academic Press, Sydney / New York / London. pp.137-157.
44. Nishimura, S. Kohmoto, K. and Otani, H. (1978) The role of host-specific toxins in saprophytic pathogens. *In Recognition and Specificity in Plant Host-Parasite Interaction.* (Daly, J. M. and Uritani, I. eds.). Japan Sci. Soc. Press / Univ. Park, Tokyo / Baltimore. pp.133-145.
45. Nishimura, S., Kohmoto, K., Otani, H., Ramachandran, P. and Tamura, F. (1982). Pathological and epidemiological aspects of *Alternaria alternata* infection depending on a host-specific toxin. *In Plant Infection: The Physiological and Biochemical Basis.* (Asada, Y. et al. eds.). Japan Sci. Soc. Press / Springer-Verlag, Tokyo / Berlin. pp.199-214.
46. Nishimura, S. and Scheffer, R. P. (1965). Interactions between *Helminthosporium victoriae* spores and oat tissue. *Phytopathology* 55:629-634.
47. Noda, K., Shibata, Y., Shimohigashi, Y. and Izumiya, N. (1980). Synthesis of cyclotetrapeptides, AM-toxin analogs, containing α -hydroxyalanine. *Tetrahedron Lett.* 1980:763-766.
48. Okuno, T., Ishita, Y., Sawai, K. and Matsumoto, T. (1974). Characterization of alternariolide, a host-specific toxin produced by *Alternaria mali* Roberts. *Chem. Lett.* 1974:635-638.
49. 尾谷 浩 (1991). 宿主特異的毒素作用の分子機構. (奥 八郎ら編) 植物感染生理学最近の進歩刊行会, 名古屋. pp. 13-22.
50. Otani, H., Haramoto, M., Kohmoto, K. and Nishimura, S. (1985). Two different phases in host cell damages induced by AK-toxin of *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. *J. Fac. Agric., Tottori Univ.* 20:8-17.
51. 尾谷 浩・小早川敬子・霜村典宏・田平弘基・児玉基一朗・甲元啓介 (1991). AM毒素の作用機構: カルス反応性からみたリンゴ品種の器官特異性. 平成3年度日本植物病理学会関西部会

講演要旨予稿集 pp.22 (講要)。

52. 尾谷 浩・甲元啓介 (1990). 宿主特異的毒素についての最近の研究成果. 植物防疫 44:450-454.
53. Otani, H., Kohmoto, K., Kodama, M. and Nishimura, S. (1990). Role of host-specific toxins in the pathogenesis of *Alternaria alternata*. In Molecular Strategies of Pathogens and Host Plants. (Patil, S. S. et al. eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp.139-149.
54. Otani, H., Kohmoto, K. and Nishimura, S. (1988). Action sites for AK-toxin produced by the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. In Host-Specific Toxins: Recognition and Specificity Factors in Plant Disease. (Kohmoto, K. and Durbin, R. D. eds.). Tottori Univ. Press, Tottori. pp.107-120.
55. Otani, H., Kohmoto, K., Nishimura, S., Nakashima, T., Ueno, T. and Fukami, H. (1985). Biological activities of AK-toxin I and II, host-specific toxins from *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. Ann. Phytopath. Soc. Japan 51:285-293.
56. Otani, H., Tomiyama, K., Okamoto, H., Nishimura, S. and Kohmoto, K. (1989). Effect of AK-toxin produced by *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype on membrane potential of pear cell. Ann. Phytopath. Soc. Japan 55:466-468.
57. Park, P. (1989). Ultrastructural studies on the mode-of-action of *Alternaria* host-specific toxins. In Host-Specific Toxins: Recognition and Specificity Factors in Plant Disease. (Kohmoto, K. and Durbin, R. D. eds.). Tottori Univ. Press, Tottori. pp.121-133.
58. Park, P., Fukutomi, M., Akai, S. and Nishimura, S. (1976). Effects of the host-specific toxin from *Alternaria kikuchiana* on the ultrastructure of plasma membrane of cells in leaves of Japanese pear. Physiol. Plant Pathol. 9:167-174.
59. Park, P., Nishimura, S., Kohmoto, K. and Otani, H. (1981). Comparative effects of host-specific toxins from four pathotypes of *Alternaria alternata* on the ultrastructure of host cells. Ann. Phytopathol. Soc. Japan 47:488-500.
60. Park, P., Nishimura, S., Kohmoto, K., Otani, H. and

- Tsujimoto, K. (1981). Two action sites of AM-toxin I produced by apple pathotype of *Alternaria alternata* in host cells: an ultrastructural study. *Can. J. Bot.* 59:301-310.
61. 朴 杓允・大野藤吾・李 星淑・柘植尚志・西村正暘・尾谷 浩・甲元啓介 (1990). AF-毒素 I を処理した感受性イチゴ葉細胞における電解質漏出部位. *日本植物病理学会報* 56:367 (講要).
62. Park, P., Ohno, T., Nishimura, S., Kohmoto, K. and Otani, H. (1987). Leakage of sodium ions from plasma membrane modification, associated with permeability change, in host cells treated with a host-specific toxin from a Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Can. J. Bot.* 65:330-339.
63. Park, P., Ohno, T., Nishimura, S., Kohmoto, K. and Otani, H. (1988). Golgi vesicles fused with invaginated plasma membranes in host cells treated with a host-specific toxin from the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 54:493-502.
64. Park, P., Tsuda, M., Hayashi, Y. and Ueno, T. (1977). Effect of a host-specific toxin (AM-toxin I) produced by *Alternaria mali*, an apple pathogen, on the ultrastructure of plasma membrane of cells in apple and Japanese pear leaves. *Can. J. Bot.* 55:2383-2393.
65. Pringle, P. B. and Scheffer, R. P. (1964). Host-specific plant toxins. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2:133-156.
66. Reed, P. W. (1979). Ionophores. *Methods Enzymol.* 55:435-454.
67. 沢村健三 (1962). リンゴ斑点性病害に関する研究. 第1報 斑点性落葉病(仮称)の病原体について. *東北農業試験場研究報告* 23:163-175.
68. 沢村健三 (1966). リンゴ斑点性病害に関する研究. 第6報 斑点病菌(*Alternaria mali* Rob.)の代謝毒素. *園芸試験場報告* C 4:43-59.
69. Schröter, H., Novacky, A. and Macko, V. (1985). Effect of *Helminthosporium sacchari*-toxin on cell membrane potential of susceptible sugarcane. *Physiol. Plant Pathol.* 26:165-174.
70. Serrano, R. (1989). Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:61-94.
71. Shimohigashi, Y. and Izumiya, N. (1978). Cyclic

- peptides. V. Synthesis of AM-toxin II and its analog. Int. J. Peptide Protein Res. 12:7-16.
72. Shimohigashi, Y., Lee, S., Aoyagi, H., Kato, T. and Izumiya, N. (1977). Cyclic peptides. I. Synthesis of AM-toxin analog containing O-methyl-L-tryrosine. Int. J. Peptide Protein Res. 10:197-205.
73. Shimohigashi, Y., Lee, S., Kato, T., Izumiya, N. (1978). Cyclic peptides. IV. Synthesis of diastomeric dihydro-AM-toxin I and its analogs. Bull. Chem. Soc. Japan 51:584-588.
74. Shimohigashi, Y., Lee, S., Kato, T., Izumiya, N., Ueno, T. and Fukami, H. (1977). Synthesis of cyclotetra-depsipeptides, AM-toxin II and its analog. Chem. Lett. 1977:1411-1414.
75. Shimohigashi, Y., Lee, S., Kato, T., Izumiya, N., Ueno, T. and Fukami, H. (1977). Synthesis and necrotic activity of dihydro-AM-toxin I. Agric. Biol. Chem. 41:1533-1534.
76. Shimomura, N., Kohmoto, K., Otani, H. and Kodama, M. (1991). Different modes of action of AM-toxin produced by the apple pathotype of *Alternaria alternata* among apple cultivars. Phytopathology 81:1197 (Abstr.).
77. 霜村典宏・三浦かおる・間下なぎさ・尾谷 浩・児玉基一朗・甲元啓介 (1990). AM毒素に対する高度感受性および中程度抵抗性リンゴ品種の反応性の差異. 日本植物病理学会報 56:367-368 (講要).
78. 霜村典宏・尾谷 浩・児玉基一朗・甲元啓介・西村正暘 (1990). AM毒素作用の宿主細胞膜および葉緑体に対する作用とその病理的意義. 日本植物病理学会報 55:367-368 (講要).
79. 霜村典宏・尾谷 浩・朴 杓允・児玉基一朗・甲元啓介・西村正暘 (1989). リンゴ葉の葉緑体へのAM毒素作用に及ぼす光の影響. 日本植物病理学会報 55:95 (講要).
80. 霜村典宏・尾谷 浩・朴 杓允・児玉基一朗・甲元啓介 (1991). リンゴ葉の原形質膜ATPase活性に対するAM毒素の効果. 平成3年度日本植物病理学会関西部会 講演要旨予稿集 pp.21 (講要).
81. Shimomura, N., Otani, H., Tabira, H., Kodama, M. and Kohmoto, K. (1991). Two primary action sites for AM-toxin produced by *Alternaria alternata* apple pathotype and their pathological significance. Ann. Phytopath. Soc. Japan 57:247-255.

82. Shimomura, N., Park, P., Otani, H. Kodama, M. and Kohmoto, K. Effects of light and SH-reagent on ultra-structural changes in leaf cells induced by AM-toxin from *Alternaria alternata* apple pathotype. Ann. Phytopath. Soc. Japan (In press).
83. 霜村典宏・朴 杓允・尾谷 浩・児玉基一朗・甲元啓介・大野藤吾 (1991). AM毒素処理感受性リンゴ葉におけるイオン漏出部位. 日本植物病理学会報 57:106 (講要).
84. Shimomura, N., Park, P., Otani, H. Kodama, M. Kohmoto, K. and Ohno, T. An ultrastructural site of electrolyte leakage in susceptible apple leaf cells treated with AM-toxin I from *Alternaria alternata* apple pathotype. Ann. Phytopath. Soc. Japan (In preparation).
85. 白石友紀 (1991). 病原性とサプレッサー. (奥 八郎ら編) 植物感染生理学最近の進歩刊行会, 名古屋. pp.55-65.
86. Shiraishi, T., Yamada, T., Oku, H. and Yoshioka, H. (1990). Suppressor production as a key factor for fungal pathogenesis. In Molecular Strategies of Pathogens and Host Plants. (Patil, S. S. et al. eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp.151-162.
87. Tabira, H. (1987). Elucidation of AM-toxin induced pathological processes in apple and pear cultivars differing in susceptibility. Thesis for Master of Agriculture, Tottori University.
88. 田平弘基・影井正則・尾谷 浩・甲元啓介・西村正暘 (1986). AM毒素によるリンゴ葉の壊死過程と光の関係. 日本植物病理学会報 52:132-133 (講要).
89. 田平弘基・尾谷 浩・甲元啓介・西村正暘 (1986). AM毒素によるリンゴ葉の壊死過程と光の関係 (続報). 日本植物病理学会報 52:526 (講要).
90. Tabira, H., Otani, H., Shimomura, N., Kodama, M., Kohmoto, K. and Nishimura, S. (1989). Light-induced insensitivity of apple and Japanese pear leaves to AM-toxin from *Alternaria alternata* apple pathotype. Ann. Phytopath. Soc. Japan 55:567-578.
91. 上野民夫 (1976). *Alternaria*属植物病原菌の宿主選択に関する化学的研究. 日本農芸化学会誌 50:59-66.
92. Ueno, T., Nakashima, T., Hayashi, Y. and Fukami, H. (1975). Structures of AM-toxin I and II, host-specific phytotoxic metabolites produced by *Alternaria mali*.

- Agric. Biol. Chem. 39:1115-1122.
93. Ueno, T., Nakashima, T., Hayashi, Y. and Fukami, H. (1975). Isolation and structure of AM-toxin III, a host-specific phytotoxic metabolite produced by *Alternaria mali*. Agric. Biol. Chem. 39:2081-2082.
 94. Walton, J. D., Earle, E. D., Yoder, O. C. and Spanswich, R. M. (1979). Reduction of adenosine triphosphate levels in susceptible maize mesophyll protoplasts by *Helminthosporium maydis* race T toxin. Plant Physiol. 63:806-810.
 95. Wolpart, T. J. and Macko, V. (1989). Specific binding of victorin to a 100-kDa protein from oats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:4092-4096.
 96. 山本興太郎、古谷雅樹 (1977). フィトクロムと生体膜. 化学の領域 31:452-465.
 97. 矢内浩二・石川勝規・宮入一夫・奥野智且 (1991). リンゴ斑点落葉病菌の生産する宿主特異的毒素の宿主植物に対する作用機構の研究. 日本農芸化学会誌 65:324 (講要).
 98. Yoder, O. C. and Scheffer, R. P. (1969). Role of toxin in early interactions of *Helminthosporium victoriae* with susceptible and resistant oat tissues. Phytopathology 59:1954-1959.
 99. Yoshida, S., Uemura, M., Niki, T., Sakai, A. and Gusta, L. V. (1983). Partition of membrane particles in aqueous two-polymer phase system and its practical use for purification of plasma membranes from plants. Plant Physiol. 72:105-114.
 100. Yoshioka, H., Shiraishi, T., Yamada, T., Ichinose, Y. and Oku, H. (1990). Suppression of pisatin production and ATPase activity in pea plasma membrane by orthovanadate, verapamil and a suppressor from *Mycosphaerella pinodes*. Plant Cell Physiol. 31:1139-1146.

学位論文の基礎となる学術論文目録

1. Shimomura, N., Otani, H., Tabira, H., Kodama, M and Kohmoto, K. (1991). Two primary action sites for AM-toxin produced by *Alternaria alternata* apple pathotype and their pathological significance. Ann. Phytopath. Soc. Japan 57:247-255.
2. Shimomura, N., Park, P., Otani, H., Kodama, M. and Kohmoto, K. Effect of light and SH-reagent on ultrastructural changes in leaf cells induced by AM-toxin from *Alternaria alternata* apple pathotype. Ann. Phytopath. Soc. Japan (In press)

Two Primary Action Sites for AM-toxin Produced
by *Alternaria alternata* Apple Pathotype and
Their Pathological Significance

Norihiro SHIMOMURA , Hiroshi OTANI , Hiroki TABIRA ,
Motoichiro KODAMA and Keisuke KOHMOTO

霜村典宏・尾谷 浩・田平弘基・児玉基一朗・甲元啓介：リンゴ斑点落葉病菌が生成する AM 毒素の二つの初期作用点とその病理的意義

日本植物病理学会報 第57巻 第2号 別刷

平成3年4月

Reprinted from Annals of the Phytopathological Society of Japan
Vol. 57, No. 2. April, 1991.

Two Primary Action Sites for AM-toxin Produced by *Alternaria alternata* Apple Pathotype and Their Pathological Significance*

Norihiro SHIMOMURA**, Hiroshi OTANI**, Hiroki TABIRA**,†,
Motoichiro KODAMA** and Keisuke KOHMOTO**

Abstract

A host-specific toxin (AM-toxin) produced by *Alternaria alternata* apple pathotype has two primary action sites: plasma membranes and chloroplasts where the toxin induces electrolyte loss and inhibition of photosynthetic CO₂ fixation, respectively. AM-toxin I at a concentration of 10⁻⁸ M caused an increase in electrolyte loss and an inhibition of CO₂ fixation as well as necrosis in susceptible apple leaves. Electrolyte loss and necrosis in moderately resistant apple and Japanese pear leaves were induced at 10⁻⁵ M, while CO₂ fixation was significantly inhibited at 10⁻⁷-10⁻⁶ M. Furthermore, CO₂ fixation was affected at the concentrations of 10⁻⁶-10⁻⁵ M in resistant and some non-host leaves, without causing electrolyte loss and necrosis. AM-toxin induced infection with avirulent spores in susceptible and moderately resistant leaves at 10⁻⁷ and 10⁻⁵ M, respectively. However, 10⁻⁵ M AM-toxin I did not show the infection-inducing activity in resistant and non-host leaves. SH-reagents such as iodoacetamide gave a remarkable protection against AM-toxin-induced electrolyte loss and necrosis formation in susceptible leaves, only when the leaves were treated before toxin exposure. On the contrary, the inhibition of photosynthetic CO₂ fixation induced by the toxin was not affected by the reagent. When susceptible leaves pre-treated with the reagent were inoculated with virulent spores, the spores failed to invade the tissues. These results indicate that a role of host-specificity factor of AM-toxin I is dependent on toxin action to plasma membranes rather than chloroplasts, and hence, an accessibility of cells for invading fungi necessitates the plasma membrane dysfunction caused by the toxin.

(Received August 24, 1990)

Key words: *Alternaria alternata* apple pathotype, AM-toxin, electrolyte loss, inhibition of photosynthetic CO₂ fixation, induction of fungal infection.

INTRODUCTION

Alternaria blotch of apple (*Malus pumila* Mill. var. *domestica* Schneid.) caused by a distinct pathotype of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler (previously *A. mali* Roberts), is one of the most serious diseases of apple¹⁾. The causal fungus produces multiple host-specific toxins, AM-toxins I (alternariolide), II and III, which selectively affect apple cultivars²⁾. These toxins were isolated in crystalline form and their chemical structures were established¹⁶⁾; AM-toxin I is a four-membered cyclic depsipeptide, and AM-toxins II and III are derivatives of AM-toxin I. Of these toxins, AM-toxin I is the major toxin in germination fluids and culture filtrates of the

* This work was supported in part by Research Grant Nos. 63440010 and 01304014 from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan.

** Faculty of Agriculture, Tottori University, Tottori 680, Japan 鳥取大学農学部

† Present address: Laboratory of Biotechnology, Tottori Horticultural Experiment Station, Kurayoshi, Tottori 682, Japan 現在: 鳥取県園芸試験場生物工学研究室

pathogen¹⁵⁾.

AM-toxin I causes veinal necrosis on leaves of susceptible cvs. Orei and Red Gold at 10^{-8} M; of moderately resistant cvs. American Summer Pearmain and Jonathan at 10^{-5} M; but not at all on those of resistant cvs. Mahe 7 and Megumi even at 10^{-4} M⁷⁾. Additionally, certain cvs. of Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.) including Nijisseiki are as sensitive to the toxin and to attack by the apple pathogen as moderately resistant apple cultivars^{2,8)}.

AM-toxin is known to have two primary action sites in host cells based on electron microscopic and physiological studies. One site is at the plasma membrane where the toxin causes invagination of plasma membranes and cell wall degradation¹⁰⁾ which may be associated with an increase in electrolytes loss²⁾. The other site is in the chloroplast where the toxin induces detachment and vesiculation of grana lamellae¹⁰⁾ which may be associated with a reduction in photosynthetic CO₂ fixation⁵⁾.

AM-toxin is released from germinating spores of virulent isolates, but not from avirulent isolates²⁾. When avirulent spores were inoculated together with the toxin, however, the spores could invade into susceptible tissues, as did virulent spores³⁾. Thus, AM-toxin appeared to play significant roles for the fungal colonization in host tissues and for the induction of disease.

To date, however, it is not clear whether the dysfunctions of plasma membrane and/or chloroplast by the toxin are responsible for the determination of host specificity and induction of fungal infection. In this study, we elucidated AM-toxin-action sites, that is, plasma membrane and chloroplast, in relation to the host specificity and the accessibility of cells for invading fungi by the comparison of the toxin-actions in host and non-host leaves, and by the regulation of early events of toxin-action when leaf tissues were treated with SH-reagents. Some parts of this work have been briefly published¹²⁾.

MATERIALS AND METHODS

Plants. Apple cvs. susceptible (Red Gold), moderately resistant (Jonathan) and resistant (Mahe 7) to *A. alternata* apple pathotype were used in this study. Moderately resistant and resistant Japanese pear cvs., Nijisseiki and Chojuro, respectively, were also used. Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Earlypak 7, tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. Burley 21, corn (*Zea mays* L.) cv. A295 × W64A, and Emperor mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) were used as non-host plants. These plants were grown in a greenhouse, and their young leaves were used.

Toxin. A highly virulent isolate (O-159) of *A. alternata* apple pathotype was grown on Richards' medium for 20 days at 26°C, and AM-toxin I was isolated from the culture filtrates by Ueno's method¹⁶⁾. The toxin was dissolved in acetone and adjusted to 10^{-3} M. The toxin solution was stored at -20°C and diluted to various concentrations with deionized water before use.

Treatment with SH-reagents. Leaves were vacuum-infiltrated for 30 min with solution of SH-reagents or deionized water as a control. The leaves were treated with AM-toxin after air-dried for 30 min at 26°C, and were tested for electrolyte loss assay, necrosis formation and fungal invasion on the leaves. For the measurement of photosynthetic CO₂ fixation, leaves treated with SH-reagent were subsequently incubated in toxin solution for 30 min at 26°C.

Leaf necrosis assay. The lower surface of leaves was slightly wounded crosswise at the center of laminae with a keen edge of tweezers, and was placed in a moist chamber. These leaves were applied with one drop (25 μl) of toxin solution at the wounded site and incubated for 48 hr at 26°C under the dark. After incubation, the area of necrosis on each leaf was measured.

Electrolyte loss. Ten leaf disks (10 mm in diameter) were vacuum-infiltrated with toxin solution or deionized water for 30 min, rinsed with deionized water, and incubated in 50-

ml flask containing 20 ml of deionized water on a reciprocal shaker (100 strokes/min) at 26°C. The amount of electrolytes in the resulting ambient solution was measured by a conductivity meter (M&S, CD-MII) using a dip type cell ($k=1.0$).

Photosynthetic CO₂ fixation. Activity of photosynthetic CO₂ fixation in leaves was measured as previously described unless stated otherwise¹⁴.

Infection behavior of *A. alternata*. Spores of a virulent isolate (O-159) and an avirulent isolate (O-94) of *A. alternata* were obtained as described previously⁹. The spores were washed thoroughly by centrifugation. Virulent spores were suspended in deionized water, while avirulent spores were suspended in deionized water or toxin solution. Spore concentration was adjusted to 5×10^5 spores/ml, using Thoma's hemacytometer. The lower surface of leaves was sprayed with 2 ml of the spore suspension. After incubation in a moist chamber for 24 hr at 26°C, the number of lesions per cm² of leaf area was recorded. The incubated leaves were then boiled in lactophenol-ethanol solution until chlorophyll was removed. Spores on the leaves were stained with 0.1% cotton blue in lactophenol, and the fungal behavior was observed under a light microscope.

RESULTS

Comparison of AM-toxin actions to host and non-host leaves

Susceptible apple leaves treated with AM-toxin began to show an increase in electrolyte loss and a reduction in photosynthetic CO₂ fixation at 1 hr after the toxin treatment. The both physiological disorders became evident with time, and were clearly detected at 4 hr after the toxin treatment.

To investigate the relationship between the action sites for AM-toxin, that is, plasma membranes and/or chloroplasts, and host-specificity, leaves of apple, Japanese pear and non-hosts were treated with several concentrations of the toxin, and photosynthetic CO₂ fixation and electrolyte loss were evaluated 4 hr after the toxin treatment. Necrosis on the leaves was also examined 48 hr after the toxin treatment.

AM-toxin I at a concentration of 10^{-8} M caused necrosis, an inhibition in photosynthetic CO₂ fixation and an increase of electrolyte loss in the susceptible apple leaves (Fig. 1A). These reactions induced by the toxin became more evident with an increase in the toxin concentration. Electrolyte loss and necrosis in moderately resistant apple and Japanese pear leaves induced by AM-toxin were observed at a concentration of 10^{-5} M toxin, while photosynthetic CO₂ fixation was significantly inhibited with 10^{-7} – 10^{-6} M toxin (Fig. 1B and C). In resistant apple and Japanese pear, and some non-host leaves, 10^{-6} – 10^{-5} M toxin affected the photosynthetic CO₂ fixation without causing electrolyte loss and necrosis (Fig. 1D, E, F and G). Tobacco and Emperor mandarin leaves were not affected by the toxin (Fig. 1H and I).

Infection-inducing activity of AM-toxin on host and non-host leaves

Infection-inducing activity of AM-toxin on host and non-host leaves was examined using lesion formation by fungal infection as a marker. AM-toxin I induced infection of avirulent *A. alternata* (O-94) at 10^{-7} M on the susceptible leaves, and at 10^{-5} M on the moderately resistant apple and Japanese pear leaves (Table 1). No infection was observed on the resistant apple and Japanese pear, and non-hosts leaves treated with the toxin at 10^{-5} M (Table 1).

Effect of SH-reagents on AM-toxin actions to susceptible apple leaves

1) **Effect on AM-toxin-induced necrosis.** Various SH-reagents were treated on apple leaves before toxin exposure, and their counteractive effect on toxin-induced necrosis was evaluated. AM-toxin-induced veinal necrosis on susceptible apple leaves was protected by pre-treatment with SH-reagents (Table 2). Especially, an inhibition rate of more than 80% was evident when the apple leaves were pre-treated with 1 mM bromoacetic acid, 0.5 mM iodoacetamide, 0.5 mM iodoacetic acid or 0.05% iodomethane. On the other hand, these reagents gave no protection on AM-toxin-induced necrosis on moderately resistant apple

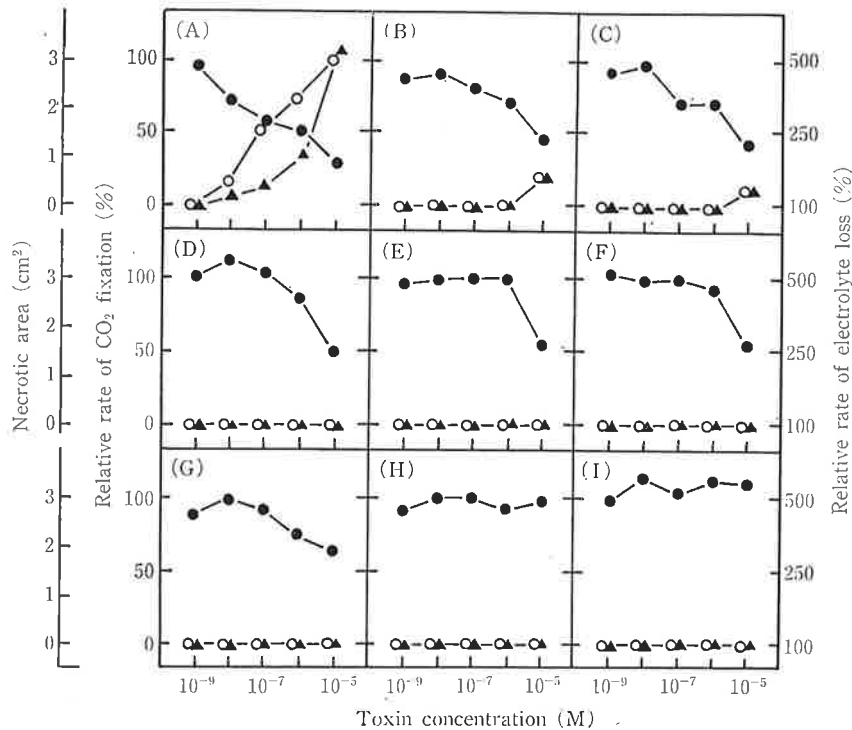


Fig. 1. Comparative effects of AM-toxin I on necrosis formation (\blacktriangle), rate of electrolyte loss (\circ) and rate of photosynthetic CO_2 fixation (\bullet) in host and non-host leaves. Leaves were treated with toxin solution or water, and photosynthetic CO_2 fixation and electrolyte loss were measured 4 hr-incubation in the dark. Relative rates of CO_2 fixation and electrolyte loss of toxin-treated leaves were calculated as compared to net values of untreated leaves. A, apple cv. Red Gold; B, apple cv. Jonathan; C, Japanese pear cv. Nijisseiki; D, apple cv. Mahe 7; E, Japanese pear cv. Chojuro; F, corn cv. A295 \times W64A; G, tomato cv. Earlypak 7; H, tobacco cv. Burley 21; I, Emperor mandarin. Each point is the mean of two or three experiments.

(Table 2).

2) **Effect on AM-toxin-induced electrolyte loss.** The susceptible apple leaves pre-treated with iodoacetamide were examined for toxin-induced electrolyte loss. Iodoacetamide (0.1 mM) gave a remarkable suppression against the electrolyte loss (Fig. 2A). In the case of simultaneous treatment, the suppressive effect of the reagent was not detected (Fig. 2B).

3) **Effect on AM-toxin-induced inhibition of photosynthetic CO_2 fixation.** To avoid tissue damages due to double infiltrations with SH-reagent and toxin, apple leaf disks were vacuum-infiltrated with iodoacetamide or deionized water, and then shaken in AM-toxin solution or deionized water. After incubation for 4 hr in a moist chamber at 26°C , activity of photosynthetic CO_2 fixation of the leaf disks was measured. Iodoacetamide itself inhibited photosynthetic CO_2 fixation of the leaves (Table 3). The activity of photosynthetic CO_2 fixation was further inhibited by the treatment with 10^{-5} M toxin. The relative inhibition rate was almost the same between the reagent-treated leaves and non-treated ones.

4) **Effect on infection of pathogen.** Susceptible apple leaves were treated with iodoacetamide prior to inoculation with spores of *A. alternata* apple pathotype (O-159), and infection behavior and lesion formation on the leaves were evaluated 24 hr after inoculation. Treatment of iodoacetamide did not affect spore germination and appressorium formation of the fungus, but greatly reduced the rates of infection hypha and lesion formation (Table 4).

Table 1. Effect of AM-toxin on lesion formation by avirulent *A. alternata* on host and non-host leaves

| Plant and cultivar | Inoculation with avirulent spores plus a): | No. of lesions per cm ² leaf ^{b)} |
|--------------------|--|---|
| Apple | | |
| Red Gold | Toxin (10 ⁻⁷ M) | 23.7 ± 2.5 |
| | Water | 0.0 ± 0.0 |
| Jonathan | Toxin (10 ⁻⁵ M) | 38.4 ± 23.3 |
| | Water | 4.3 ± 7.5 |
| Mahe 7 | Toxin (10 ⁻⁵ M) | 0.0 ± 0.0 |
| | Water | 0.0 ± 0.0 |
| Japanese pear | | |
| Nijisseiki | Toxin (10 ⁻⁵ M) | 32.1 ± 18.1 |
| | Water | 5.3 ± 3.4 |
| Chojuro | Toxin (10 ⁻⁵ M) | 0.0 ± 0.0 |
| | Water | 0.0 ± 0.0 |
| Corn | | |
| A295 × W64A | Toxin (10 ⁻⁵ M) | 0.0 ± 0.0 |
| | Water | 0.0 ± 0.0 |
| Tomato | | |
| Earlypak 7 | Toxin (10 ⁻⁵ M) | 0.0 ± 0.0 |
| | Water | 0.0 ± 0.0 |
| Tobacco | | |
| Burley 21 | Toxin (10 ⁻⁵ M) | 0.0 ± 0.0 |
| | Water | 0.0 ± 0.0 |
| Citrus | | |
| Emperor mandarin | Toxin (10 ⁻⁵ M) | 0.0 ± 0.0 |
| | Water | 0.0 ± 0.0 |

a) Avirulent spores (0-94) were suspended in deionized water or AM-toxin solution and inoculated on leaves by spraying.

b) After incubation for 24 hr at 26°C, lesions on leaves were counted. Values represent the means and standard deviations of three leaves.

Table 2. Effect of pre-treatment with SH-reagents on AM-toxin-induced veinal necrosis on susceptible (cv. Red Gold) and moderately resistant (cv. Jonathan) apple leaves^{a)}

| Chemical | Concentration | Inhibition rate (%) ^{b)} | |
|------------------|---------------|-----------------------------------|--------------|
| | | cv. Red Gold | cv. Jonathan |
| Bromoacetic acid | 1.0 mM | 91.7 ± 13.2 | 7.9 ± 4.3 |
| | 0.5 mM | 77.8 ± 12.1 | -5.4 ± 9.7 |
| | 0.1 mM | -5.2 ± 13.5 | -5.5 ± 9.2 |
| Iodoacetamide | 0.5 mM | 94.6 ± 1.2 | 1.6 ± 4.2 |
| | 0.1 mM | 75.7 ± 16.2 | 0.5 ± 12.3 |
| | 0.05 mM | 30.5 ± 15.2 | -11.5 ± 33.3 |
| Iodoacetic acid | 0.5 mM | 85.1 ± 13.4 | 2.8 ± 8.6 |
| | 0.1 mM | 26.7 ± 24.4 | 1.6 ± 4.6 |
| | 0.05 mM | 19.1 ± 16.2 | -7.9 ± 8.7 |
| Iodomethane | 0.1 % | 91.5 ± 9.6 | -13.8 ± 22.6 |
| | 0.05 % | 75.6 ± 27.6 | -7.5 ± 13.3 |
| | 0.01 % | 43.5 ± 21.1 | 3.1 ± 15.8 |

a) Leaves were vacuum-infiltrated with reagent solutions, and were treated with AM-toxin I at 10⁻⁶ M for Red Gold and at 5 × 10⁻⁵ M for Jonathan.

b) Expressed as inhibition rate to AM-toxin-induced leaf necrosis on leaves pre-treated with water. Values represent the means and standard deviations of five leaves.

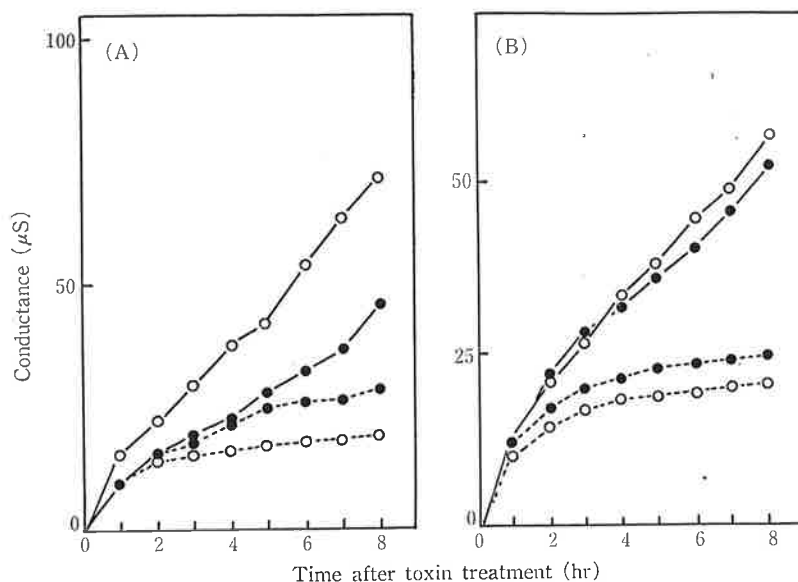


Fig. 2. Effect of pre- (A) and simultaneous (B) treatments with iodoacetamide on AM-toxin-induced electrolyte loss from susceptible leaf tissues. Treatments are as follows: —●—, iodoacetamide (0.1 mM) and toxin (10^{-6} M); —○—, toxin (10^{-6} M); - - - ● - - -, iodoacetamide (0.1 mM); - - - ○ - - -, water. Each point is the mean of two experiments.

Table 3. Effect of pre-treatment with iodoacetamide on AM-toxin-induced inhibition of photosynthetic CO_2 fixation in leaf tissues of susceptible apple cv. Red Gold

| Pre-treatment ^{a)} | Post-treatment ^{b)} | Radioactivity ^{c)} incorporation ($\times 10^{-3}$ dpm) | Relative CO_2 fixation (%) |
|-----------------------------|------------------------------|---|---|
| Water | Water | 4.3 ± 0.1 | 100 |
| | AM-toxin I (10^{-6} M) | 4.3 ± 1.4 | 100 |
| | AM-toxin I (10^{-5} M) | 2.5 ± 0.7 | 58 |
| Iodoacetamide | Water | 1.4 ± 0.2 | 100 |
| | AM-toxin I (10^{-6} M) | 1.4 ± 0.5 | 100 |
| | AM-toxin I (10^{-5} M) | 0.8 ± 0.1 | 57 |

- a) Leaf disks were vacuum-infiltrated with iodoacetamide solution (0.1 mM) or water.
 b) Pre-treated leaf disks were incubated in toxin solutions or water for 30 min at 26°C .
 c) After incubation for 4 hr in a moist chamber at 26°C , CO_2 fixation in the leaves was measured. Values represent the means and standard deviations of three experiments.

Table 4. Effect of pre-treatment with iodoacetamide on infection behavior of *A. alternata* apple pathotype and lesion formation on susceptible apple cv. Red Gold ^{a)}

| Concentration of iodoacetamide (mM) | Spore germination (%) ^{b)} | Appressorium formation (%) ^{c)} | Infection hypha formed (%) ^{d)} | No. of lesions per cm^2 leaf |
|--|--|---|---|--|
| 0 | 89.5 ± 8.6 | 36.2 ± 4.3 | 35.2 ± 5.6 | 27.3 ± 8.6 |
| 0.1 | 88.9 ± 7.4 | 31.5 ± 4.0 | 17.3 ± 3.3 | 9.8 ± 4.4 |
| 0.25 | 90.5 ± 2.4 | 39.0 ± 3.5 | 12.8 ± 5.3 | 9.3 ± 1.8 |

- a) Leaves were vacuum-infiltrated with iodoacetamide solution, and were inoculated with virulent spores (0-159) by spraying. After incubation for 24 hr at 26°C , infection behavior of the spores and number of lesions were observed. Values represent the means and standard deviations of three leaves.
 b) (No. of germinating spores/Total no. of spores) $\times 100$.
 c) (No. of appressoria/No. of germ tubes) $\times 100$.
 d) (No. of infection hyphae/No. of appressoria) $\times 100$.

DISCUSSION

The action spectrum of AM-toxin I for electrolyte loss from host and non-host leaves was coordinated with that for necrosis formation. On the contrary, the toxin-induced inhibition of photosynthetic CO₂ fixation was somewhat different. AM-toxin I at 10⁻⁸ M inhibited photosynthetic CO₂ fixation and caused an increase in electrolyte loss as well as necrosis in susceptible apple leaves. However, AM-toxin I at concentrations of 10⁻⁷–10⁻⁶ M inhibited the CO₂ fixation in moderately resistant leaves, but did not induce an increase in electrolyte loss and necrosis. Furthermore, an inhibition of CO₂ fixation was observed even in resistant and some non-host leaves treated with 10⁻⁶–10⁻⁵ M toxin.

Susceptible leaves pre-treated with SH-reagents such as iodoacetamide, were protected from AM-toxin-induced electrolyte loss as well as necrosis formation. The protective effects were not observed by the simultaneous treatment with SH-reagent and toxin. On the contrary, the toxin-induced inhibition of photosynthetic CO₂ fixation was not protected by the pre-treatment with iodoacetamide. Besides, these reagents did not affect the toxin actions to moderately resistant leaves. These results suggest that the expression of host-specificity by AM-toxin is closely associated with toxin-induced dysfunction of plasma membranes rather than that of chloroplasts in host cells, and suggest that the modes of action of AM-toxin to susceptible and moderately resistant cvs. are different.

HV-toxin produced by *Helminthosporium victoriae*¹⁾ and AK-toxin produced by *A. alternata* Japanese pear pathotype⁹⁾ have a target site on plasma membrane. Early works on these toxins^{1,9)} showed that SH-reagents gave a protection against toxin-induced electrolyte loss and necrosis formation. The induced insensitivity of host leaves to these toxins has been explained by the hypothesis that SH-containing molecules on plasma membranes are denatured by the reagents. The present results are consistent with those of HV- and AK-toxins. Therefore, the action of AM-toxin on plasma membrane in susceptible apple leaves may be basically identical with those of HV- and AK-toxins.

Susceptible apple cultivars have a marked tissue specificity in relation to AM-toxin action⁸⁾. No detectable reactions are noted in susceptible non-green tissues such as petals, whereas green tissues such as leaf are sensitive to the toxin. On the other hand, non-green tissues of moderately resistant apple have the same sensitivity as green tissues. Recently, Shimomura *et al.*¹³⁾ showed that white calli derived from susceptible leaf and petal were insensitive to the toxin, while those from moderately resistant cultivar were sensitive to the toxin. These results suggest that chloroplasts in susceptible apple might contribute toward signal transduction from toxin recognition on plasma membrane to next step. Thus, complicated mode of action of AM-toxin is still unclear.

Pathologically, AM-toxin plays a role as an inducing factor for infection by pathogen³⁾. When avirulent spores were inoculated in the concomitant presence of AM-toxin on host and non-host leaves, the spores could invade the susceptible leaves with 10⁻⁷ M toxin, and the moderately resistant leaves with 10⁻⁵ M toxin. However, the toxin at 10⁻⁵ M did not induce infection on resistant apple and Japanese pear, and non-host leaves, where the toxin caused chloroplast dysfunction. On the other hand, the pathogen failed to invade iodoacetamide-pretreated leaves, which were protected from AM-toxin-induced electrolyte loss and necrosis. Recently, Tabira *et al.*¹⁴⁾ reported that light had an inhibitory effect on AM-toxin-induced necrosis in susceptible leaves, but did not affect toxin-induced inhibition of CO₂ fixation and an increase in electrolyte loss. However, when the leaves were inoculated with the pathogen, light had no protective effect on fungal invasion. These results lead to the conclusion that disorder of plasma membranes, but not chloroplasts, induces the accessibility of the host cells for the invading fungi, without necessitating necrosis.

The importance of plasma membrane dysfunction by host-specific toxins for fungal invasion

has been demonstrated in the studies with AK-toxin, ACR-toxin produced by *A. alternata* rough lemon pathotype and HMT-toxin produced by *H. maydis* race T⁴). Treatments of susceptible pear leaves with SH-reagents, that protect from the AK-toxin-induced electrolyte loss, inhibited also infection of the pathogen⁴). Copper- and iron-chelating agents such as salicylaldehyde and sodium sulfide, which suppress the toxin-induced necrosis but not electrolyte loss, did not affect the infection. On the other hand, ACR-toxin whose primary target is mitochondria induced a rapid electrolyte loss and eventually necrosis on susceptible rough lemon leaves⁶). Both toxin-induced electrolyte loss and necrosis were markedly suppressed by light, while the toxin action on mitochondria was not influenced by light. When the susceptible leaves were inoculated with avirulent spore suspension including ACR-toxin, light significantly decreased the fungal invasion⁴). The same results as observed with ACR-toxin were also obtained in the study with HMT-toxin which primarily affects mitochondria⁴). Thus, these results strongly support the hypothesis that plasma membrane disorders, directly or indirectly caused by toxins, are key and central events in early pathogenesis.

In the case of infection of *A. alternata* Japanese pear pathotype, it has been recently postulated that the host tissues possess a potential resistance mechanism to fungal invasion, and dysfunction of plasma membranes by AK-toxin results in abolishing the induction of a resistance mechanism in susceptible pear tissues⁵). Therefore, the mechanism of such a series of reactions remains to be elucidated.

Literature cited

1. Gardner, J.M. and Scheffer, R.P. (1973). Effect of cycloheximide and sulfhydryl-binding compounds on sensitivity of oat tissues to *Helminthosporium victoriae* toxin. *Physiol. Plant Pathol.* 3: 147-157.
2. Kohmoto, K., Khan, I.D., Renbutsu, Y., Taniguchi, T. and Nishimura, S. (1976). Multiple host-specific toxins of *Alternaria mali* and their effect on the permeability of host cells. *Physiol. Plant Pathol.* 8: 141-153.
3. Kohmoto, K., Nishimura, S. and Otani, H. (1982). Action sites for AM-toxins produced by the apple pathotype of *Alternaria alternata*. In *Plant Infection: The Physiological and Biochemical Basis* (Asada, Y. *et al.* eds.). Japan Scientific Societies Press, Tokyo and Springer-Verlag, Berlin. pp. 253-263.
4. Kohmoto, K., Otani, H., Kodama, M. and Nishimura, S. (1989). Host recognition: Can accessibility to fungal invasion be induced by host-specific toxins without necessitating necrotic cell death? In *Phytotoxins and Plant Pathogenesis*, NATO ASI Series, Vol. H27 (Graniti, A. *et al.* eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp. 249-265.
5. Kohmoto, K., Otani, H. and Nishimura, S. (1987). Primary action sites for host-specific toxins produced by *Alternaria* species. In *Molecular Determinants of Plant Diseases* (Nishimura, S. *et al.* eds.). Japan Scientific Societies Press, Tokyo and Springer-Verlag, Berlin. pp. 127-143.
6. Kohmoto, K., Scheffer, R.P. and Whiteside, J.O. (1979). Host-specific toxin from *Alternaria citri*. *Phytopathology* 69: 667-671.
7. Kohmoto, K., Taniguchi, T. and Nishimura, S. (1977). Correlation between the susceptibility of apple cultivars to *Alternaria mali* and their sensitivity to AM-toxin I. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 43: 65-68.
8. Maeno, S., Kohmoto, K., Otani, H. and Nishimura, S. (1984). Different sensitivities among apple and pear cultivars to AM-toxin produced by *Alternaria alternata* apple pathotype. *J. Fac. Agric. Tottori Univ.* 19: 8-19.
9. Otani, H., Haramoto, M., Kohmoto, K. and Nishimura, S. (1985). Two different phases in host cell damages induced by AK-toxin of *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. *J. Fac. Agric. Tottori Univ.* 20: 8-17.
10. Park, P., Nishimura, S., Kohmoto, K., Otani, H. and Tsujimoto, K. (1981). Two action sites of AM-toxin I produced by apple pathotype of *Alternaria alternata* in host cells: an ultrastructural study. *Can. J. Bot.* 59: 301-310.
11. Sawamura, K. (1966). Studies on spotted diseases of apple. 6. On the host-specific toxin of *Alternaria mali* Roberts. *Bull. Hort. Res. Stan. Japan* C4: 43-59.

12. Shimomura, N., Otani, H., Kodama, M., Kohmoto, K. and Nishimura, S. (1989). AM-toxin actions to plasma membranes and chloroplasts in host cells, and their pathological significance. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 55: 482 (Abstr. in Japanese).
13. Shimomura, N., Miura, K., Mashita, N., Otani, H., Kodama, M. and Kohmoto, K. (1990). Different responses to AM-toxin between susceptible and moderately resistant apples to *Alternaria blotch*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 55: 367-368 (Abstr. in Japanese).
14. Tabira, H., Otani, H., Shimomura, N., Kodama, M., Kohmoto, K. and Nishimura, S. (1989). Light-induced insensitivity of apple and Japanese pear leaves to AM-toxin from *Alternaria alternata* apple pathotype. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 55: 567-578.
15. Ueno, T., Hayasi, Y., Fukami, H., Nishimura, S., Kohmoto, K. and Sekiguchi, A. (1975). Isolation of AM-toxin I, a new phytotoxic metabolite from *Alternaria mali*. *Phytopathology* 65: 82-83.
16. Ueno, T., Nakashima, T. and Fukami, H. (1982). Chemical basis of host recognition by *Alternaria* species. In *Plant Infection: The Physiological and Biochemical Basis* (Asada, Y. *et al.* eds.). Japan Scientific Societies Press, Tokyo and Springer-Verlag, Berlin. pp. 235-251.

和 文 摘 要

霜村典宏・尾谷 浩・田平弘基・児玉基一朗・甲元啓介：リンゴ斑点落葉病菌が生成する AM 毒素の二つの初期作用点とその病理的意義

リンゴ斑点落葉病菌が生成する AM 毒素は宿主細胞の細胞膜と葉緑体の 2 カ所に初期作用を示し、それぞれ電解質異常漏出と明下 CO₂ 固定阻害を誘起する。AM 毒素 I は、感受性リンゴ葉には 10⁻⁸ M の低濃度まで電解質異常漏出や明下 CO₂ 固定阻害を引き起こし、壊死斑を形成した。一方、中程度抵抗性リンゴやナン葉では、電解質の異常漏出と壊死斑形成は 10⁻⁶ M の毒素濃度で誘起されたが、明下 CO₂ 固定阻害は、10⁻⁷~10⁻⁶ M の濃度でも認められた。さらに、10⁻⁶~10⁻⁵ M の毒素で処理した抵抗性や非宿主葉では、電解質の異常漏出や壊死斑形成は誘起されなかったが、CO₂ 固定阻害が認められた。また、感受性や中程度抵抗性葉では、電解質異常漏出や壊死斑の誘起される毒素濃度で非病原菌の感染が誘発されたが、抵抗性や非宿主葉では、CO₂ 固定阻害のみられる毒素濃度でも感染誘発は起こらなかった。一方、SH 基修飾剤で処理した感受性葉では、毒素による壊死斑形成や電解質異常漏出は顕著に抑制されたが、明下 CO₂ 固定阻害は抑制されなかった。また、このような修飾剤処理葉では、病原菌の感染が抑制された。以上の結果から、AM 毒素は宿主細胞膜と葉緑体に初期作用を示すが、毒素が宿主特異性決定因子の役割を果たすためには細胞膜への作用が重要であり、毒素による細胞膜機能の障害が菌の感染を誘発することが示唆された。

短報

Effects of Light and SH-reagent on Ultrastructural Changes in Leaf Cells Induced
by AM-toxin from *Alternaria alternata* Apple Pathotype*

Norihiro SHIMOMURA**, Pyoyun PARK***, Hiroshi OTANI**, Motoichiro KODAMA** and
Keisuke KOHIMOTO**

Key words: AM-toxin, light, SH-reagent, plasma membrane modification,
chloroplast modification

* This work was supported in part by Research Grant Nos. 02044099 and
02304019 from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan.

** Faculty of Agriculture, Tottori University, Tottori 680, Japan
鳥取大学農学部

*** Electron Microscopy Section, Department of Orthopaedic Surgery, Teikyo
University School of Medicine, Tokyo 173, Japan 帝京大学医学部

A distinct pathotype of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler (formerly, *A. mali* Roberts), the causal fungus of Alternaria leaf blotch of apple (*Malus pumila* Mill. var. *domestica* Schneid.)⁵⁾, produces multiple host-specific toxins: AM toxin I (alternariolide), II and III^{3, 4, 9)}. Two action sites for AM-toxins in susceptible apple leaf cells have been suggested from electron microscopic and physiological studies. Plasma membrane invagination⁴⁾ and increase in electrolytes loss¹⁾ caused by the toxin showed that the plasma membrane may be one of the action sites. The other site may be located in the chloroplast, because the toxin induced both vesiculation of grana lamellae⁴⁾ and decrease in photosynthetic CO₂ fixation activity²⁾.

Recently, the process of host cell damage caused by AM-toxin was characterized by examining counteractive effects of light and SH-reagents. In light, toxin-induced necrosis was inhibited, but the loss of electrolytes and the reduction in photosynthetic CO₂ fixation were not affected⁷⁾. From these results, it can be concluded that light inhibits the process of dysfunctions of primary action site(s) to cell death. On the other hand, SH-reagents inhibited necrosis formation and electrolyte loss, but not reduction in photosynthetic CO₂ fixation in the toxin-treated leaves⁶⁾. These results indicate that necrosis comes of the plasma membrane disorders brought about by the toxin rather than the chloroplast damages. To clarify relationships among early cellular events induced by AM-toxin, we examined effects of light and an SH-reagent on the ultrastructural changes, invagination of plasma membranes and vesiculation of chloroplasts, in apple leaf cells.

Ten-day-old leaves of apple were injured slightly with a razor blade. A drop of 10⁻⁷ M AM-toxin I or distilled water was placed on the wounded site, and the leaves were incubated in a moist chamber at 26 °C for 3, 6, 12 and 24 hr

in the dark or light (daylight-color lamp, $630 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). The procedures for preparing thin sections for electron microscopy were the same as those described previously by Park *et al.*⁴⁾. The sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, and observed under a JEOL 100 CX electron microscope.

In the dark, necrosis appeared at vein of young leaves of susceptible apple (cv. Red Gold) 12 hr after the toxin treatment, and then expanded to mesophyll cells in 24 hr after the treatment. At such concentration of the toxin, necrosis was not induced in moderately resistant (cv. Jonathan) and resistant (cv. Mabe 7) leaves. The earliest changes were detected as modifications of both plasma membranes and chloroplasts in susceptible cells under an electron microscope at 3 hr after the toxin treatment. The toxin caused plasma membrane invaginations at plasmodesmata, and membrane fragments and extended desmotubules were observed in invaginated sites (Fig. 1). The toxin also caused partial disorganization of chloroplasts, where grana lamella-fragments were found in stroma (Fig. 2). However, no changes appeared in susceptible control and the toxin-treated resistant leaves (Figs. 3 and 4).

Though necrosis was markedly inhibited by light-irradiation, invaginations of plasma membranes were observed in toxin-treated susceptible leaves even under 24 hr-illumination (Fig. 5). The number of plasmodesmata with invaginations were counted at a high magnification ($\times 94,000$). The invaginations around plasmodesmata were observed in the susceptible apple leaves treated with the toxin both in the light and dark. Light gave no significant inhibition of the invagination of plasma membranes (Table 1). On the other hand, the invaginations were not detected in the moderately resistant and resistant apple leaves treated with the toxin.

The chloroplast modifications induced by the toxin were also detected in

light-irradiated susceptible leaves (Fig. 6). The modification in the toxin-treated susceptible leaves increased both in the light and dark with time (Table 1). The modification of chloroplasts was rarely observed 24 hr after toxin treatment in the moderately resistant and resistant apple leaves. These results coincide with the physiological data reported by Tabira *et al.*⁷⁾, and confirm the previous conclusion that early events in the toxin actions in plasma membrane and chloroplasts are not affected by light. However, the mechanism in inhibition of the toxigenic necrosis by illumination has been unknown yet.

To examine the effect of an SH-reagent on toxin-induced ultrastructural changes, 0.1 mM iodoacetamide solution was infiltrated into susceptible leaves under reduced pressure for 30 min. The leaves were treated with 10^{-7} M AM-toxin and incubated in a moist chamber at 26 °C in the dark. Iodoacetamide apparently inhibited toxin-induced veinal necrosis in the susceptible leaves. The treated leaves were prepared for observation by electron microscopy. Treatment of the chemical alone did not cause any apparent ultrastructural changes in apple leaves (Fig. 7). The frequency of plasma membrane invaginations in the susceptible leaves without the chemical pretreatment reached to approximately 30% at 12 hr after the toxin treatment (Table 2). In contrast, only a few invaginations were induced by the toxin in the chemical-pretreated leaves. On the other hand, the chemical did not inhibit chloroplast modification induced by the toxin (Table 2). Thus, iodoacetamide suppressed the plasma membrane modification, but not chloroplast one (Fig. 8).

We reported previously that an SH-reagent inhibited AM-toxin-induced electrolyte loss as well as necrosis formation, but failed to reduce the toxigenic inhibition of photosynthetic CO_2 fixation⁶⁾. We suggested that

plasma membrane dysfunctions caused by the toxin may be closely correlated with necrosis⁶⁾. The protection was detected only when leaves were treated with SH-reagent before toxin exposure, indicating that SH containing molecules may be involved in an early recognition between AM-toxin and susceptible apple cells. This view⁶⁾ is additionally supported by the present ultrastructural study because the SH-reagent inhibited the plasma membrane modifications but not chloroplast ones.

We reported previously that AM-toxin affects chloroplasts in host and non-host leaves, but does not induce necrosis and fungal infection on such non-host leaves, indicating that the toxin may have a non-selective effect on chloroplasts⁶⁾. However, there is a differential toxin sensitivity in chloroplasts between susceptible apple and others⁶⁾. In the case of susceptible apple, the effect of the toxin appears on both plasma membranes and chloroplasts at 10^{-8} M. On the contrary, the toxin at 10^{-6} - 10^{-5} M affects plasma membranes and chloroplasts of moderately resistant apple, while at the same concentration, the toxin causes chloroplast dysfunctions of resistant apple and some non-hosts without inducing plasma membrane lesion. The results imply that chloroplast dysfunctions in susceptible apple may contribute for host-specific action of AM-toxin. Therefore, further studies of the mechanism of AM-toxin actions using isolated chloroplasts remain to be done.

Literature cited

1. Kohmoto, K., Khan, I.D., Renbutsu, Y., Taniguchi, T. and Nishimura, S. (1976). Multiple host-specific toxins of *Alternaria mali* and their effect on the permeability of host cells. *Physiol. Plant Pathol.* 8:141-153.

2. Kohmoto, K., Otani, H. and Nishimura, S. (1987). Primary action sites for host-specific toxins produced by Alternaria species. In Molecular Determinants of Plant Diseases (Nishimura, S. et al. eds.). Japan Sci. Soc. Press, Tokyo and Springer-Verlag, Berlin. pp.127-143.
3. Okuno, T., Ishita, Y., Sawai, K. and Matsumoto, T. (1974). Characterization of alternariolide, a host-specific toxin produced by Alternaria mali Roberts. Chem. Lett. 1974:635-638.
4. Park, P., Nishimura, S., Kohmoto, K., Otani, H. and Tsujimoto, K. (1981). Two action sites of AM-toxin I produced by apple pathotype of Alternaria alternata in host cells: an ultrastructural study. Can. J. Bot. 59:301-310.
5. Sawamura, K. (1966). Studies on spotted diseases of apple. VI On the host-specific toxin of Alternaria mali Roberts. Bull. Hort. Res. Stan. Japan 64:43-59.
6. Shimomura, N., Otani, H., Tabira, H., Kodama, M. and Kohmoto, K. (1991). Two primary action sites for AM-toxin produced by Alternaria alternata apple pathotype and their pathological significance. Ann. Phytopath. Soc. Japan 57:247-255.
7. Tabira, H., Otani, H., Shimomura, N., Kodama, M., Kohmoto, K. and Nishimura, S. (1989). Light-induced insensitivity of apple and Japanese pear leaves to AM-toxin from Alternaria alternata apple pathotype. Ann. Phytopath. Soc. Japan 55: 567-578.
8. Ueno, T., Nakashima, T. Hayashi, Y. and Fukami, H. (1975). Structures of AM-toxin I and II, host-specific phytotoxic metabolites produced by Alternaria mali. Agr. Biol. Chem. 39:1115-1122.
9. Ueno, T., Nakashima, T. Hayashi, Y. and Fukami, H. (1975). Isolation and structure of AM-toxin III, a host-specific phytotoxic metabolite produced by Alternaria mali. Agr. Biol. Chem. 39:2081-2082.

和文摘要

霜村典宏・朴 杓允・尾谷 浩・兎玉基一朗・甲
元啓介：AM毒素による感受性リンゴ細胞の微細構
造変化に対する光およびSII基修飾剤の効果

リンゴ斑点落葉病菌のAM毒素で処理された感受性
リンゴ葉を処理直後から光照射下に静置すると、
毒素による壊死斑形成は抑制されたが、原形質膜
の陥入や葉緑体グラナラメラの小胞化は抑制され
なかった。一方、SII基修飾剤処理葉では壊死斑形
成と原形質膜の陥入が抑制されたが、葉緑体グラ
ナラメラの小胞化は全く抑制されなかった。以上
の結果は、毒素による生理機能障害を指標とした
既報の結果とよく一致し、AM毒素は葉緑体と原形
質膜の2カ所に初期作用を示すが、毒素による壊
死斑形成には毒素の細胞膜への作用が重要である
こと、細胞膜機能障害後、光によって阻害される
過程を経て壊死に至ることが微細構造の観察から
も確認された。

(Received _____)

Table 1. Effect of light irradiation on plasma membrane invagination at plasmodesmata and vesiculation of grana lamellae in chloroplasts of apple leaves induced by AM-toxin I^{a)}

| Cultivar | Treatment | Time (hr) | Occurrence of invaginated plasma membrane at plasmodesmata (%) | | Occurrence of vesiculated chloroplasts (%) | | | | | |
|----------|-----------|-----------|--|-------|--|-------|--------|-----|--------|------|
| | | | Dark | Light | Dark | Light | | | | |
| Red Gold | Toxin | 3 | 6.8 = | 4.8 | 3.1 = | 2.4 | 5.2 = | 3.6 | 3.6 = | 1.9 |
| | Toxin | 6 | 16.2 = | 0.4 | 12.6 = | 3.5 | 6.7 = | 0.6 | 4.9 = | 0.7 |
| | Toxin | 12 | 24.5 = | 11.4 | 21.5 = | 8.4 | 12.0 = | 3.5 | 16.2 = | 2.9 |
| | Toxin | 24 | 33.9 = | 5.5 | 28.7 = | 4.1 | 53.0 = | 7.2 | 44.7 = | 11.2 |
| | Water | 24 | 0.0 = | 0.0 | 0.0 = | 0.0 | 5.3 = | 2.6 | 3.0 = | 0.4 |
| | Water | 24 | 0.0 = | 0.0 | 0.0 = | 0.0 | 4.5 = | 3.6 | 2.4 = | 0.9 |
| Jonathan | Water | 24 | 0.0 = | 0.0 | 0.0 = | 0.0 | 4.4 = | 2.0 | 4.6 = | 3.5 |
| | Toxin | 24 | 0.0 = | 0.0 | 0.0 = | 0.0 | 2.1 = | 1.0 | 1.4 = | 1.3 |
| Mahe 7 | Toxin | 24 | 0.0 = | 0.0 | 0.0 = | 0.0 | 1.2 = | 0.8 | 3.2 = | 2.4 |
| | Water | 24 | 0.0 = | 0.0 | 0.0 = | 0.0 | | | | |

a) Apple leaves were treated with 10^{-7} M AM-toxin I, and incubated in the dark or light ($630 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). At least 100 cells, and 100 plasmodesmata or chloroplasts were observed for each treatment in one experiment. Values represent the means and standard deviations of three replications.

Table 2. Effect of pretreatment of iodacetamide on plasma membrane invagination at plasmodesmata and vesiculation of grana lamellae in chloroplasts of susceptible apple leaves induced by AM-toxin I.*)

| Post- Treatment | Time (hr) | Occurrence of invaginated plasma membrane at plasmodesmata (%) | | Occurrence of vesiculated chloroplasts (%) | |
|--------------------|--------------|---|---------------|---|---------------|
| | | Water | Iodoacetamide | Water | Iodoacetamide |
| Toxin | 3 | 10.9 = | 5.5 = | 2.8 = | 2.0 = |
| Toxin | 6 | 18.0 = | 5.6 = | 1.4 = | 1.4 = |
| Toxin | 12 | 32.6 = | 10.0 = | 2.2 = | 0.5 = |
| Toxin | 24 | 36.1 = | 7.0 = | 8.4 = | 2.9 = |
| Water | 24 | 0.0 = | 0.0 = | 0.0 = | 0.0 = |

a) Apple leaves (cv. Red Gold) were pretreated with 0.1 mM iodacetamide, and then treated with 10^{-7} M AM-toxin I. The treated leaves were incubated in the dark.
At least 100 cells, and 100 plasmodesmata or chloroplasts were observed for each treatment in one experiment. Values represent the means and standard deviations of three replications.

Explanation of plate

Plate I.

Figs. 1 and 2. Susceptible apple leaves treated with 10^{-7} M AM-toxin, and incubated for 24 hr in the dark.

Fig. 1. A slightly modification of plasma membrane in susceptible apple. Vesicles and extended desmotubules were observed in the space between invaginated plasma membranes and cell walls. (X 34,000).

Fig. 2. Marked vesiculation of grana lamellae in the matrix of chloroplasts. Membrane fragments were present the matrix. (X 18,000).

Fig. 3. Susceptible apple leaves treated with water. Leaves were incubated for 24 hr in the dark. No ultrastructural change were observed in plasma membranes, cell walls, vacuoles, mitochondria and chloroplasts. (X 7,200).

Fig. 4. Resistant apple leaves treated with 10^{-7} M AM-toxin, and incubated for 24 hr in the dark. No ultrastructural change was observed in the cells. (X 9,200).

Figs. 5 and 6. Susceptible apple leaves treated with 10^{-7} M AM-toxin. Leaves were incubated for 24 hr in the light ($630 \mu\text{w}/\text{cm}^2$).

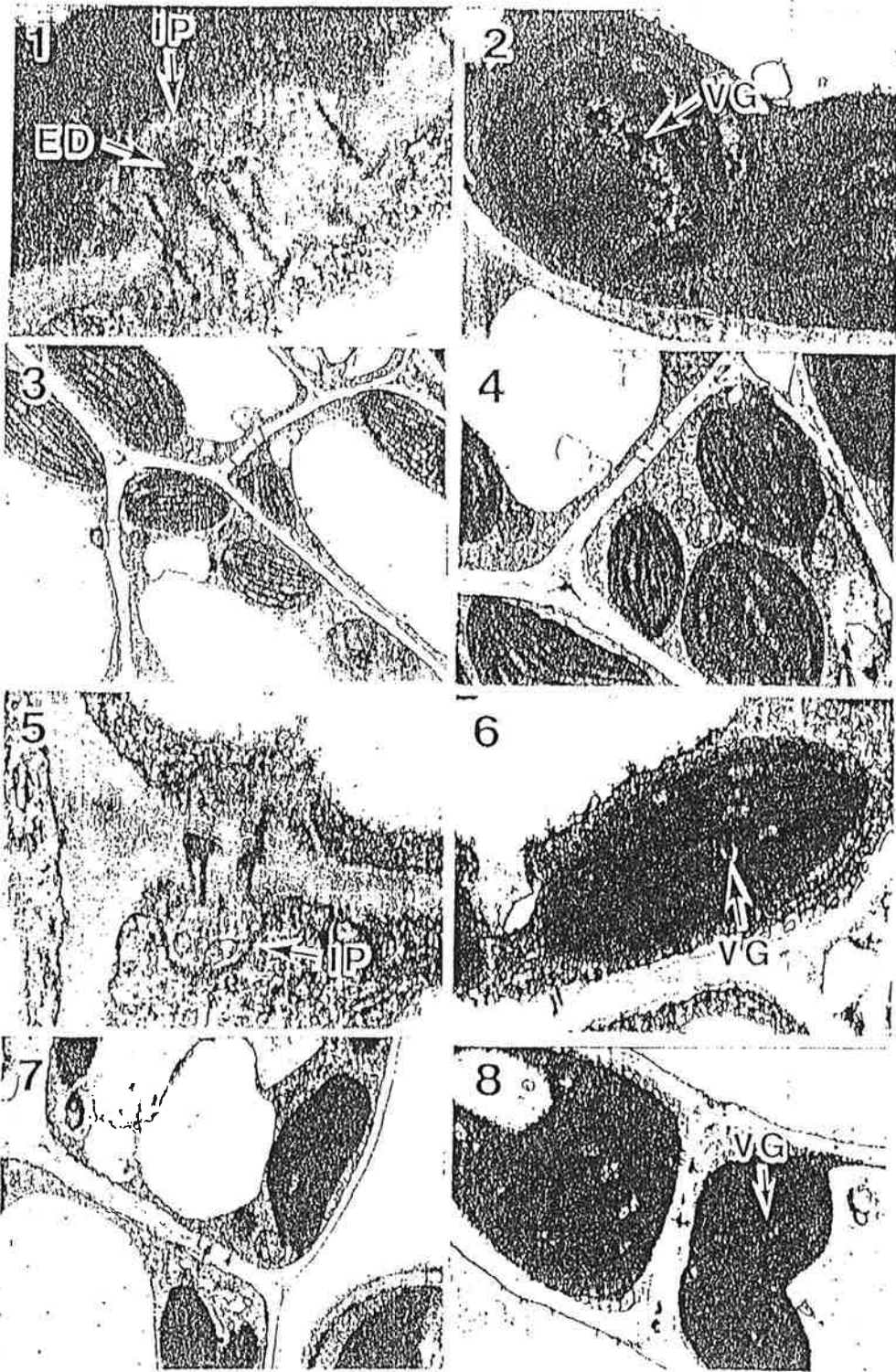
Fig. 5. Invagination of plasma membranes. Invagination of plasma membranes was induced by the toxin in light-irradiated leaves. (X 34,000).

Fig. 6. The vesicles derived from grana lamellae. Vesiculation of grana lamellae was induced by the toxin in light-irradiated leaves. (X 16,000).

Fig. 7. Susceptible apple leaves pretreated with 0.1 mM iodoacetamide followed by treatment with water for 24 hr. No ultrastructural change was observed in the cells. (X 8,700).

Fig. 8. Susceptible apple leaves pretreated with 0.1 mM iodoacetamide, followed by treatment with 10^{-7} M AM-toxin for 24 hr. Vesiculation of grana lamellae but no invagination of plasma membranes was observed in the cells. (X 8,700).

Abbreviations used in plates: ED, Extended desmotuble; IP, Invaginated plasma membrane; VG, Vesiculated grana lamella.



参考論文目録

1. Tabira, H., Otani, H., Shimomura, N., Kodama, M., Kohmoto, K. and Nishimura, S. (1989). Light-induced in sensitivity of apple and Japanese pear leaves to AM-toxin from *Alternaria alternata* apple pathotype. Ann. Phytopath. Soc. Japan 55:567-578.

Light-Induced Insensitivity of Apple and Japanese Pear Leaves to AM-toxin from *Alternaria alternata* Apple Pathotype*

Hiroki TABIRA**†, Hiroshi OTANI**, Norihiro SHIMOMURA**,
Motoichiro KODAMA**, Keisuke KOHMOTO** and Syoyo NISHIMURA***

Abstract

Effect of light on sensitivity of apple and Japanese pear leaves to AM-toxin from *Alternaria alternata* apple pathotype was investigated. Continuous irradiation of light to leaves immediately after toxin exposure inhibited toxin-induced necrosis on susceptible apple and moderately resistant apple and pear leaves. When light irradiation was interrupted by inserting with darkness for specified times immediately after toxin exposure, a period of darkness longer than 5 hr was required for necrosis development. However, the required period became shortened to about 3 hr if light-cut-off started later than 2 hr after toxin exposure. The action spectrum for the photo-protection was estimated to be 570-680 nm; the most effective wavelength was near 602 nm. The effective light was very specific to the necrosis induced by AM-toxin, and was not affected by treatment with photosynthetic inhibitors. Moreover, light did not affect toxin-induced electrolyte loss and reduction of photosynthetic CO₂ fixation, early events in toxin action. When the leaves were inoculated with virulent spores or avirulent spores plus AM-toxin, light had no protective effect on fungal invasion, but inhibited the lesion development.

(Received March 16, 1989)

Key words: AM-toxin, light-induced toxin insensitivity, toxin-induced necrosis.

INTRODUCTION

A distinct pathotype of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler (previously called *A. mali* Roberts), the causal fungus of Alternaria leaf blotch of apple (*Malus pumila* Mill. var. *domestica* Schneid.)^{1,2}, produces multiple host-specific toxins, AM-toxin I (Alternariolide), II and III, which are essential for the fungal colonization in host tissues and for the induction of disease^{6,7}. These toxins were isolated in crystalline form, and their chemical structures were established as closely related cyclic depsipeptides, by analyzing spectral data and chemical synthesis^{3,4}.

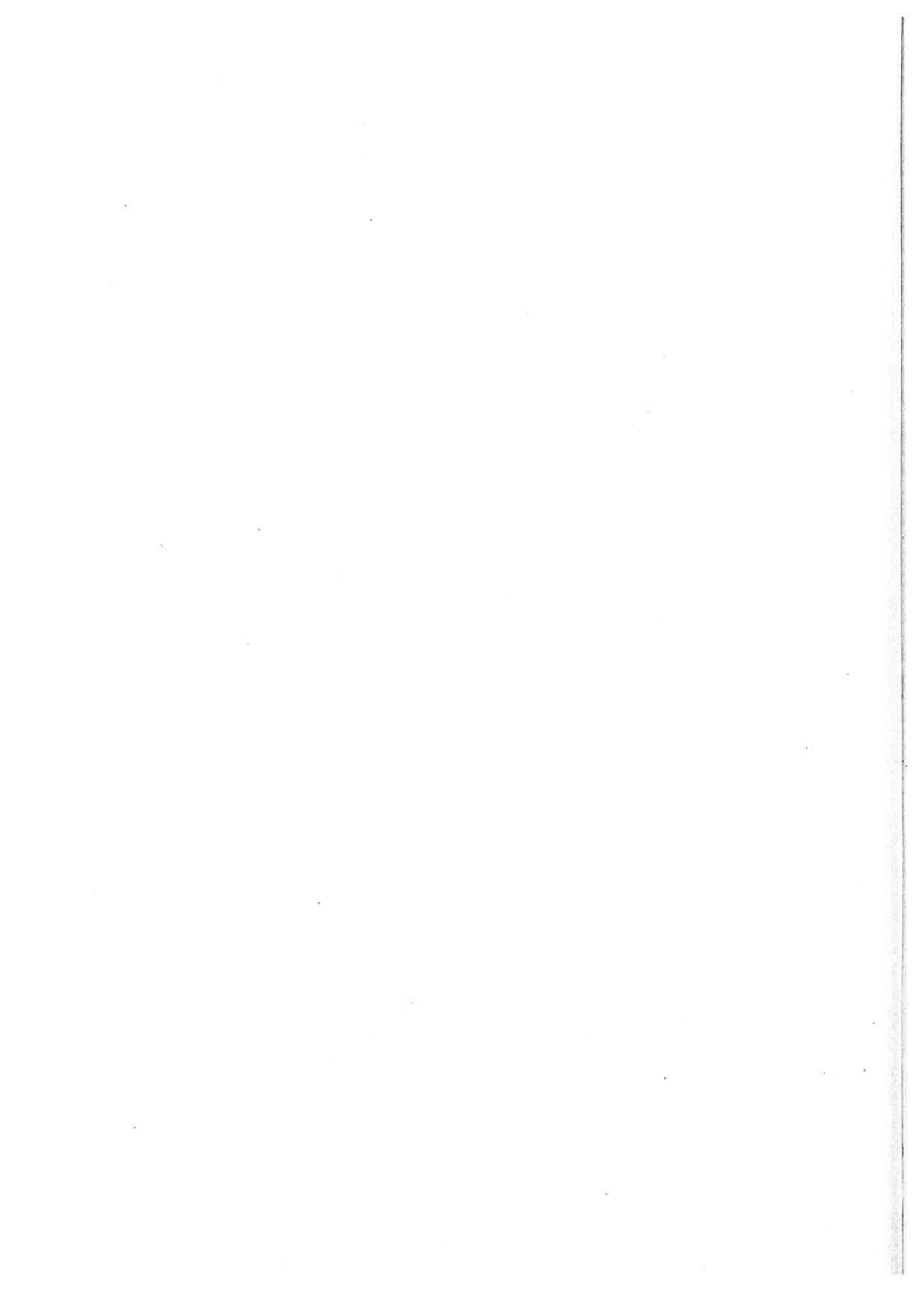
Based on varietal differences in susceptibility to the pathogen, apple cultivars are classified into 3 groups: susceptible, moderately resistant and resistant⁵. This classification is in harmony with the varietal differences in sensitivity of apple to AM-toxins⁹. Susceptible cultivars such as Orei and Red Gold are affected by AM-toxin I at 10⁻⁸ M, and a typical vein necrosis is induced on leaves 48 hr after toxin treatment. Leaves of moderately resistant cultivars such

* This work was supported in part by Research Grant No. 61480047, No. 62304015 and No. 6344-0010 from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan.

** Faculty of Agriculture, Tottori University, Tottori 680, Japan 鳥取大学農学部

*** Faculty of Agriculture, Nagoya University, Nagoya 464, Japan 名古屋大学農学部

† Present address: Laboratory of Biotechnology, Tottori Fruit, Vegetable and Flower Experiment Station, Kurayoshi, Tottori 682, Japan 現在: 鳥取県果樹野菜試験場生物工学研究室



as American Summer Pearmain and Jonathan are sensitive to the toxin at 10^{-5} M. In contrast, resistant cultivars such as Mahe 7 and Megumi exhibit no visible reaction to the toxin even at 10^{-4} M. On the other hand, some cultivars of Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.) including Nijisseiki are also sensitive to the toxin and to the attack by the apple pathogen as moderately resistant apple cultivars^{6,11}).

Strangely enough, susceptible apple cultivars have a marked tissue-specificity in relation to AM-toxin action¹¹. No detectable reactions were noted in susceptible non-green tissues, e.g., filaments, petals, styles and flesh cells, while green and non-green tissues of moderately resistant apple cultivars had almost the same sensitivity to the toxin.

Two primary sites for AM-toxin action in host cells have been suggested by electron microscopic and physiological studies. One site is in the chloroplast where the toxin induces detachment and vesiculation of grana lamellae¹⁶, and a decrease in photosynthetic CO_2 fixation activity⁸. The other is in the plasma membrane where the toxin causes invagination of membranes¹⁶ and loss of electrolytes⁶. However, the mechanism of AM-toxin action in host cells has not yet been elucidated clearly.

Recently, we found out an interesting fact that the leaf necrosis induced by AM-toxin is significantly inhibited under light irradiation. In this paper, we report on light-induced insensitivity of apple and Japanese pear leaves to AM-toxin as an approach to the possible mechanism of AM-toxin action. Some parts of this work have been briefly published¹⁸⁻²⁰.

MATERIALS AND METHODS

Plants. Apple cultivars susceptible (Red Gold), moderately resistant (Jonathan) and resistant (Mahe 7) to *A. alternata* apple pathotype were used in this study. Moderately resistant and resistant Japanese pear cultivars, Nijisseiki and Chojuro, respectively, were also used. These plants were grown in a greenhouse and young leaves were harvested. Petals were also used in an experiment of tissue-specificity to AM-toxin.

Toxins. AM-toxin 1 was purified from culture filtrates of a virulent isolate (O-159), according to the procedures described previously²¹. The toxin was dissolved in acetone and adjusted to 10^{-4} M with deionized water. The toxin solution containing 5% acetone was diluted to various concentrations with deionized water. AK-toxin I¹⁴, citrinin¹³, phenylacetic acid¹² and tenuazonic acid⁵ were also isolated as reported previously.

Light irradiation. A daylight-color lamp whose spectrum is similar to that of the sun, was used as a light source in almost all experiments. The lamp was suspended above leaves in a moist transparent chamber. Light intensity at leaf surface was measured with a thermocouple radiometer (Eko, MS-41), and adjusted to give $630 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ by controlling the distance between the leaves and the lamp.

A series of interference filters was used to obtain monochromatic radiation with a halogen lamp as a light source. Detached leaves in a moist chamber were exposed to light beam passed through interference filters. Spectral energy distribution, median wavelength and half-band width of the monochromatic light passed through the filter were measured by a spectro multi-channel photodetector (Union Giken, MCPD-110A). Intensity of the monochromatic radiation was measured by an optical powermeter with a silicon photodiode sensor (Photodyne, 44XLA), and adjusted to $80 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ at leaf surface.

In order to obtain a continuous spectrum for irradiation, the beam from a halogen lamp was dispersed by a prism (60°) and the continuous spectrum was directed to leaves. Light intensity ($285 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) at the point of prism was measured by the optical powermeter, and wavelength of the spectrum on the leaves was determined by using interference filters under the prism.

Treatment with photosynthetic inhibitors. Carbonylcyanide-*m*-chlorophenylhydrazine (CCCP), 2-chloro-4,6-bis(ethylamino)-*s*-triazine (CAT), 3,4-dichlorophenyl dimethylurea (DCMU), 3-(3,4-dichlorophenyl)-1-methoxy-1-methylurea (linuron), isopropyl-*N*-(3,4-dichloro-

phenyl)-carbamate (3,4-DCIPC) and *o*-phenanthroline were used as photosynthetic inhibitors. Leaves were vacuum-infiltrated with the inhibitor solution for 30 min, rinsed with deionized water and air-dried for 20 min at 26 C.

Leaf-necrosis assay. Two methods were used for toxin treatment of leaves to analyze the effect of light on the toxin-induced necrosis.

(1) Leaves were slightly wounded at the center of their laminas with a glass capillary, and applied with one drop (10 μ l) of toxin solution at the wounded site.

(2) Leaf disks (1.2 cm in diameter) were cut out from leaves with a leaf punch, and vacuum-infiltrated with toxin solution for 30 min. After rinsing with deionized water, the disks were air-dried for 20 min at 26 C.

These toxin-treated leaves were placed in moist transparent chambers, and incubated at 26 C under light and dark conditions. After incubation for specified times, necrotic area appeared on the leaves was measured.

Electrolyte loss. Twenty leaf disks (1.2 cm in diameter) were vacuum-infiltrated with toxin solution or deionized water for 30 min. After rinsing with deionized water, the leaf disks were placed in flasks containing 10 ml deionized water, and incubated at 26 C on a shaker in light (500 μ W/cm²) and darkness. Conductance of each ambient solution was measured at specific intervals by a conductivity meter (M&S, CD-MII) using a dip type cell ($k=1.0$).

Photosynthetic CO₂ fixation. Leaf disks (7 mm in diameter) were vacuum-infiltrated with toxin solution or deionized water for 30 min, and incubated in light (630 μ W/cm²) and darkness at 26 C for 4 hr. The leaf disks were transferred into a transparent chamber, and a small petri dish containing 1 ml of 2 N HCl was placed on the center in the chamber. Gas of ¹⁴CO₂ was released by injecting 20 μ l NaH¹⁴CO₃ solution (50 μ Ci/ml) in the petri dish by a microsyringe through a silicon cap. The leaf disks were illuminated with a photorelector lamp (10 mW/cm²) through a water phase containing 1% CuSO₄ for 15 min at room temperature. Unfixed ¹⁴CO₂ gas was trapped with 3 N KOH. The leaf disks were transferred to a scintillation-counting vial containing 0.5 ml of digestion mixture (60% HClO₄/30% H₂O₂, 1:2, v/v), and then incubated for 6 hr at 60 C. After cooling, the digested aqueous samples were mixed with 10 ml of scintillation fluid consisted of one part of Triton X-100 and two parts of toluene containing 4 g of PPO and 100 mg of POPOP per liter. Radioactivity was measured on a liquid scintillation spectrometer (Aloka, LSC-700).

Cell viability. The toxin-treated leaves were separated into lower epidermal and mesophyll layers mildly using with adhesive cellophane tape. The epidermal layer was stained with 0.01% fluorescein diacetate (FDA) solution, and observed under a fluorescence microscope (Nikon, EFD2) with the excitation filter (EX 450-490) and barrier filter (BA 520). Cell viability was assessed by the ability to stain with FDA.

Infection behavior of *A. alternata*. Spores of two virulent isolates (M-71 and O-159) and a saprophytic isolate (O-94) of *A. alternata* were obtained as described previously⁹). The spores were washed thoroughly by centrifugation, and suspended in deionized water. The saprophytic spores were also suspended in toxin solution. Spore concentration was adjusted to 5×10^5 spores/ml, using Thoma's hemacytometer. The spore suspensions were sprayed on the lower surface of the leaves, and the leaves were placed in moist transparent chambers and incubated for 18 hr at 26 C in light (1 mW/cm²) and darkness. The number and size of visible lesions appeared on the leaves were measured. The leaves were then immersed in 0.1% cotton blue in lactophenol for 2 hr, and boiled in lactophenol-ethanol solution until the chlorophyll was removed. After rinsing with fresh lactophenol-ethanol, infection behavior of the spores on the leaves was observed microscopically.

RESULTS

Effect of light on AM-toxin-induced necrosis

1) *Light irradiation before toxin treatment.* Apple and pear leaves were pre-incubated in light and darkness for 48 hr, and treated with AM-toxin I solutions by drop method. Then, the leaves were incubated under dark condition for 48 hr, and the toxin-induced necrosis was examined. No difference was observed in the sensitivity of the leaves to the toxin regardless of the pre-treatment.

2) *Light irradiation after toxin treatment.* AM-toxin I solutions were dropped on apple and pear leaves, and the leaves were incubated in light and darkness. After incubation for 50 hr, necrosis on the leaves was examined. Under dark condition, AM-toxin I induced necrosis on susceptible apple leaves at 10^{-8} M, and on moderately resistant apple and pear leaves at 5×10^{-6} M (Fig. 1A), while leaves incubated under light irradiation were remarkably protected from the toxin-induced necrosis (Fig. 1A). When these necrosis-inhibited leaves were kept in the darkness for 50 hr, necrosis developed on the susceptible leaves, but not on the moderately

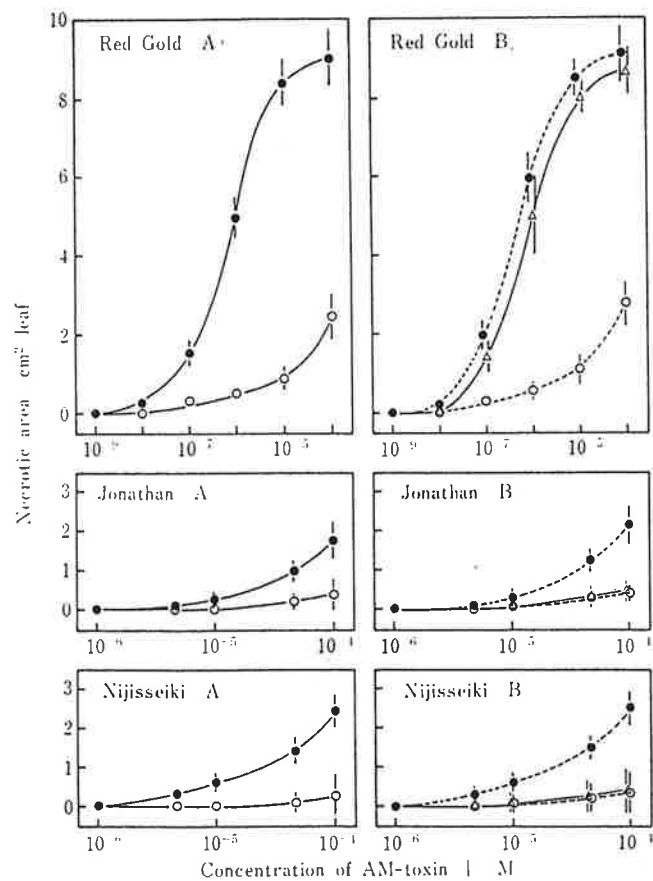


Fig. 1. Effect of light on leaf necrosis of apple cvs. Red Gold and Jonathan, and Japanese pear cv. Nijisseiki induced by AM-toxin I. The leaves were treated with AM-toxin I solutions, and incubated in light ($630 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) (○—) or darkness (●—). After 50 hr, necrotic area on the leaves was measured (A). The leaves held in light for 50 hr were incubated further for 50 hr in darkness (Δ —), and necrotic area was measured (B). Necrotic area on the leaves incubated continuously for 100 hr in light (○---) or darkness (●---) after toxin treatment is also shown (B). The vertical bars represent the standard deviations of six experiments.

resistant leaves (Fig. 1B). Resistant apple and pear leaves under both conditions were completely insensitive to AM-toxin I even at 10^{-4} M.

Cell viability in the photo-protected leaves was determined by FDA staining. The cells of toxin-treated leaves kept in the light as well as non-treated control leaves were stained fully with FDA, indicating that the leaves were viable.

To investigate effect of light on tissue-specific response of host to AM-toxin, apple and pear petals were dropped with AM-toxin I solutions, and incubated in light and darkness for 24 hr. Although the toxin at 5×10^{-6} M caused necrosis only on moderately resistant apple petals, there was no difference between light and dark treatments.

3) *Relationship between the irradiation period and the leaf necrosis.* Susceptible apple leaf disks were vacuum-infiltrated with AM-toxin I at 10^{-6} M, and incubated in light. During the 24 hr of incubation under light, increasing periods of darkness were inserted at 0, 1, 2, 3, 6 and 12 hr after toxin treatments, as shown in Fig. 2. When the disks were kept in the darkness immediately after toxin treatment, a period of darkness longer than 5 hr was required for necrosis development (Fig. 2). The required dark period, however, reduced to about 3 hr when the light was turned off later than 2 hr after toxin treatment (Fig. 2).

4) *Action spectrum for the photo-protection of leaf necrosis.* The action spectrum for the photo-protection to AM-toxin-induced necrosis on susceptible and moderately

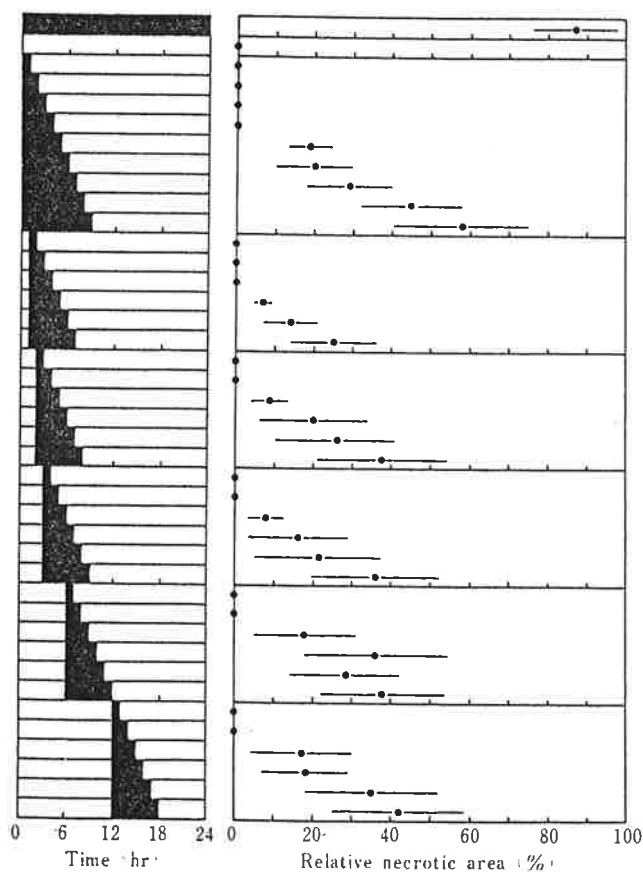


Fig. 2. Relationship between irradiation period of light and inhibition in leaf necrosis of apple cv. Red Gold induced by AM-toxin I. Leaf disks were vacuum-infiltrated with 10^{-6} M AM-toxin I, and incubated in light ($630 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) (□). During the incubation period for 24 hr, darkness (■) was inserted for time period indicated. Necrotic area on the disks was measured and calculated as percent of total leaf area. An average (●) and its standard deviation (horizontal bar) are based on reading with forty disks.

Table 1. Effect of monochromatic radiation on leaf necrosis of apple and Japanese pear induced by AM-toxin I^{a)}

| Monochromatic radiation ^{b)} | | Inhibition rate of necrosis (%) ^{c)} | | |
|---------------------------------------|----------------------|---|--------------------|---------------------|
| Median wavelength (nm) | Half-band width (nm) | Apple cv. Red Gold | Apple cv. Jonathan | Pear cv. Nijisseiki |
| 499 | 11 | 1.8 ± 5.2 | 1.3 ± 6.9 | 3.9 ± 7.6 |
| 553 | 14 | 13.2 ± 9.0 | 29.3 ± 18.3 | 10.5 ± 10.0 |
| 602 | 16 | 79.7 ± 8.0 | 85.8 ± 8.3 | 87.3 ± 8.2 |
| 646 | 13 | 38.3 ± 16.0 | 57.7 ± 18.0 | 76.6 ± 9.4 |
| 703 | 12 | 6.6 ± 9.0 | 18.2 ± 12.2 | 16.8 ± 8.7 |
| 776 | 11 | 2.3 ± 5.3 | 3.7 ± 4.8 | 2.3 ± 5.6 |

a) Leaf disks were treated with AM-toxin I at 10^{-6} M for Red Gold and at 5×10^{-5} M for Jonathan and Nijisseiki, and were incubated under monochromatic radiation passed through interference filters for 36 hr at 26 C.

b) Intensity of the radiation was adjusted to $80 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ at leaf surface.

c) Expressed as inhibition rate to AM-toxin-induced leaf necrosis in darkness. Values represent the means and standard deviations of twelve leaves.

Table 2. Effect of photosynthetic inhibitors on photo-protection to AM-toxin-induced leaf necrosis of apple cv. Red Gold

| Treatment ^{a)} | | Necrotic area (cm^2) ^{b)} | | Inhibition rate of necrosis (%) ^{c)} |
|-------------------------|---------------------------------|---|-------------|---|
| Inhibitor | Concentration (μM) | Light | Dark | |
| CAT | 10 | 0.89 ± 0.59 | 4.43 ± 1.03 | 79.9 |
| | 1 | 1.19 ± 0.51 | 4.38 ± 1.10 | 72.8 |
| | 0 (Water) | 0.93 ± 0.24 | 5.00 ± 0.94 | 81.4 |
| CCCP | 10 | 0.54 ± 0.24 | 4.45 ± 1.51 | 87.9 |
| | 1 | 0.67 ± 0.41 | 3.88 ± 1.26 | 82.7 |
| | 0 (Water) | 0.99 ± 0.52 | 4.58 ± 1.47 | 78.4 |
| 3,4-DCIPC | 10 | 0.93 ± 0.38 | 3.72 ± 1.18 | 75.0 |
| | 1 | 1.10 ± 0.46 | 4.44 ± 1.20 | 75.2 |
| | 0 (Water) | 1.28 ± 0.41 | 3.81 ± 1.36 | 66.4 |
| DCMU | 1 | 0.52 ± 0.67 | 3.58 ± 0.59 | 85.5 |
| | 0.1 | 0.69 ± 0.31 | 4.13 ± 0.99 | 83.3 |
| | 0 (Water) | 0.27 ± 0.10 | 3.56 ± 0.51 | 92.4 |
| Linuron | 10 | 0.40 ± 0.13 | 3.20 ± 1.00 | 87.5 |
| | 1 | 0.52 ± 0.14 | 3.23 ± 0.77 | 83.9 |
| | 0 (Water) | 0.60 ± 0.15 | 3.70 ± 0.84 | 83.8 |
| o-Phenanthroline | 10 | 0.89 ± 0.26 | 3.36 ± 1.22 | 73.5 |
| | 1 | 0.91 ± 0.26 | 3.82 ± 0.80 | 76.2 |
| | 0 (Water) | 0.80 ± 0.19 | 3.12 ± 0.69 | 74.4 |

a) The leaves were pre-treated with inhibitors, and then treated with AM-toxin I at 10^{-6} M.

b) The leaves were incubated in light ($630 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) and darkness for 48 hr, and necrotic area on the leaves was measured. Values represent the means of twenty leaves and their standard deviations.

c) Inhibition rate was calculated on the basis of necrotic areas on leaves in light and those incubated in darkness.

resistant leaves was studied by using monochromatic radiation passed through various interference filters. In the three cultivars tested, the most effective wavelength was estimated to be near 602 nm, followed by 646 nm; no effect was seen at 499 and 776 nm, and little at 553 and 703 nm (Table 1).

To test photo-spectral range effective for inhibiting necrosis, susceptible apple leaves were vacuum-infiltrated with AM-toxin I at 10^{-6} M, and irradiated with continuous spectral light

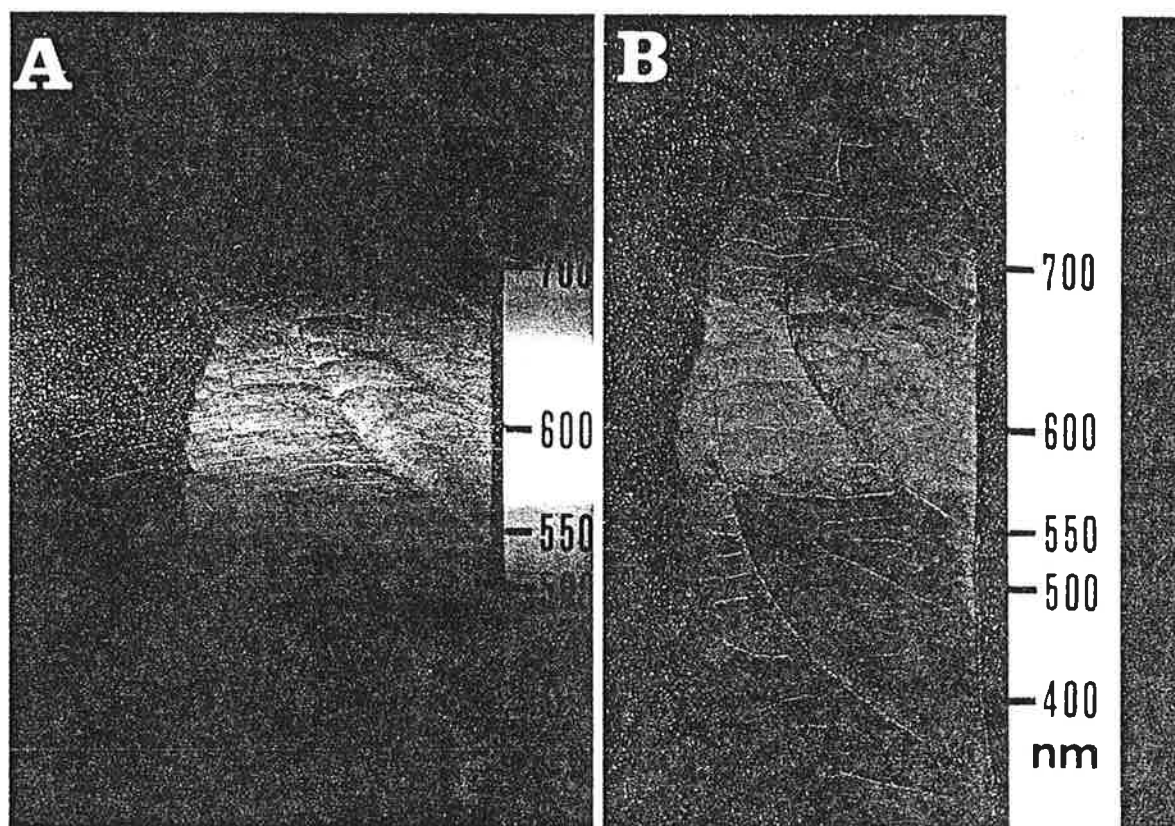


Fig. 3. Effect of irradiation with continuous spectral light on leaf necrosis of apple cv. Red Gold induced by AM-toxin I. The leaf was vacuum-infiltrated with AM-toxin I at 10^{-6} M, irradiated with spectral light dispersed by a prism (60°) (A), and incubated for 36 hr at 26 C (B). Light intensity was $285 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ at the point of prism.

(Fig. 3A). The toxin-induced leaf necrosis was completely inhibited on the portion irradiated with spectral light of 570–680 nm (Fig. 3B). Similar reproducible results were obtained in moderately resistant apple and pear leaves.

5) *Effect of photosynthetic inhibitors on the photo-protection of leaf necrosis.*

To investigate whether the counteractive effect of light to AM-toxin-induced necrosis is associated with photosynthetic reaction in chloroplasts, susceptible apple leaves were treated with photosynthetic inhibitors before toxin exposure, and incubated in light and darkness. The results (Table 2) showed that all chemicals tested had no effect on the photo-protection.

Effect of light on AM-toxin-induced electrolyte loss

Electrolyte loss from susceptible and moderately resistant leaves treated with AM-toxin I at 10^{-6} M and 5×10^{-5} M, respectively, was monitored under light and dark conditions. Unlike the case of leaf necrosis, light gave no significant inhibition of the toxin-induced electrolyte loss from the leaves (Fig. 4).

Effect of light on AM-toxin-induced inhibition of photosynthetic CO_2 fixation

Susceptible and moderately resistant leaves were incubated in light and darkness for 4 hr after treatments with AM-toxin I solutions, and tested for photosynthetic CO_2 fixation. In both conditions, CO_2 fixation was significantly inhibited at concentrations of AM-toxin I of 10^{-8} M for susceptible leaves and 10^{-7} – 10^{-6} M for moderately resistant leaves, and the inhibition rate gradually increased in parallel with an increase in toxin concentrations (Fig. 5).

*Effect of light on infection behavior of *A. alternata**

Infection behavior of the pathogens (M-71 and O-159) and saprophytic *A. alternata* (O-94) with or without AM-toxin I on susceptible and moderately resistant leaves was investigated in light and darkness. Light had no effect on penetration into host tissues of spores of the patho-

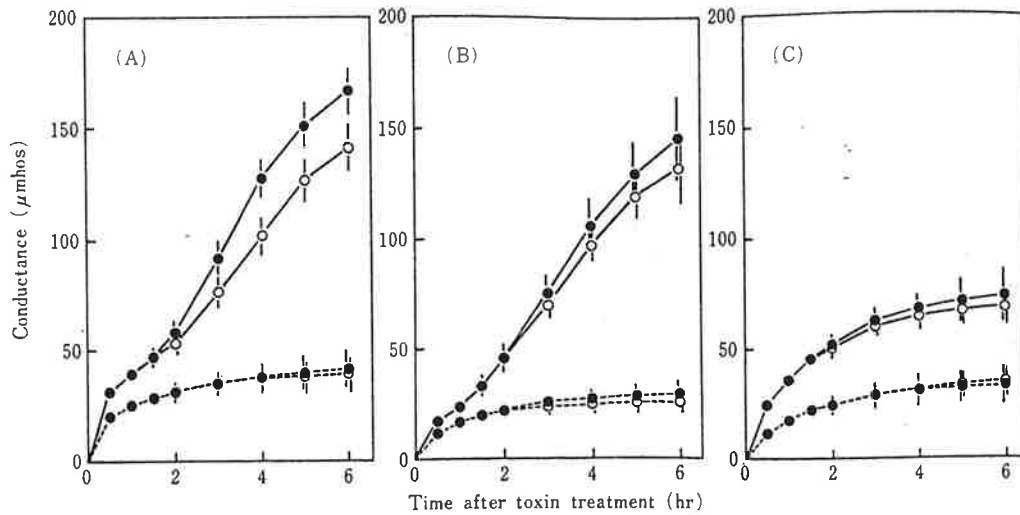


Fig. 4. Effect of light on electrolyte loss from apple cvs. Red Gold (A) and Jonathan (B), and Japanese pear cv. Nijisseiki (C) leaves induced by AM-toxin I. The leaf disks were treated with AM-toxin I at 10^{-6} M for Red Gold and at 5×10^{-5} M for Jonathan and Nijisseiki, leached in deionized water in light ($500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) (\circ —) or darkness (\bullet —), and monitored at intervals for electrolyte loss. Leakages from control leaves without toxin in light (\circ ---) and darkness (\bullet ---) are also shown. The vertical bars represent the standard deviations of five experiments.

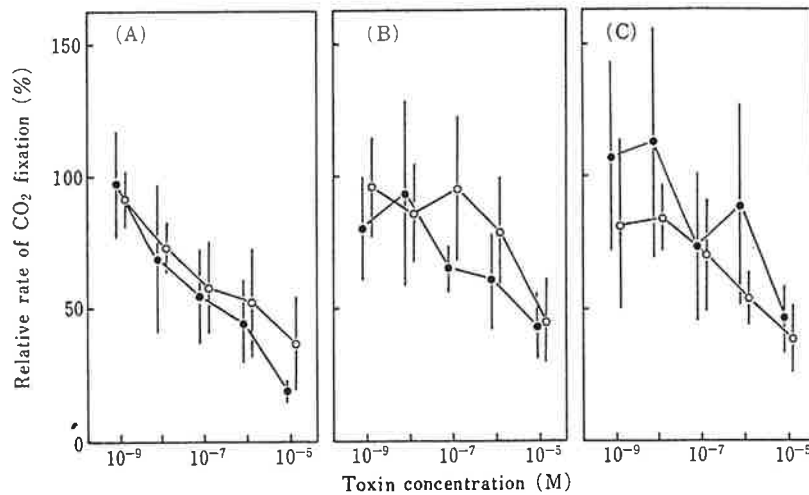


Fig. 5. Effect of light on inhibition of photosynthetic CO_2 fixation in apple cvs. Red Gold (A) and Jonathan (B), and Japanese pear cv. Nijisseiki (C) leaves induced by AM-toxin I. The leaves were treated with AM-toxin I solutions, and incubated in light ($630 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) (\circ) or darkness (\bullet). After 4 hr, CO_2 fixation in the leaves was measured. The vertical bars represent the standard deviations of three experiments.

gens (Table 3). Similarly, the toxin-induced penetration of the saprophytic spores was not affected by light. On leaves incubated with pathogen or saprophyte with the toxin, the numbers of necrotic spots were almost the same in both conditions, although size of the spots significantly reduced in the light (Table 3).

We reported previously that heat-treated leaves became susceptible to *A. alternata* independent of the pathogenicity¹⁵⁾. To investigate effect of light on infection and lesion development without involving AM-toxin, leaves were pre-treated with mild heat (for 3 sec in 55 C water), inoculated with saprophytic spores, and incubated in light and darkness. Results (Table 3)

Table 3. Effect of light on infection behavior of *Alternaria alternata* and development of lesions on apple and Japanese pear leaves.^{a)}

| Inoculation | Cultivar | Spore germination (%) | | Appressorium formation (%) | | Infection hypha formation (%) | | No. of lesions per cm ² leaf | | Diameter of lesions (μ m) | |
|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------|------|----------------------------|------|-------------------------------|------|---|------|--------------------------------|------|
| | | Light | Dark | Light | Dark | Light | Dark | Light | Dark | Light | Dark |
| M-71 | Red Gold | 84.6 | 86.7 | 35.1 | 34.1 | 19.4 | 18.6 | 21.3 | 20.1 | 124 | 475 |
| | Jonathan | 90.0 | 94.3 | 31.8 | 33.1 | 10.5 | 8.1 | 1.3 | 1.2 | 122 | 175 |
| | Nijisseiki | 87.7 | 89.2 | 29.3 | 32.8 | 12.8 | 11.7 | 0.8 | 1.0 | 125 | 130 |
| O-159 | Red Gold | 87.9 | 86.8 | 42.0 | 43.5 | 34.7 | 35.3 | 34.0 | 32.0 | 134 | 432 |
| | Jonathan | 90.6 | 89.3 | 43.1 | 39.7 | 9.3 | 11.0 | 1.1 | 1.4 | 86 | 113 |
| | Nijisseiki | 92.9 | 84.7 | 34.3 | 37.3 | 8.7 | 10.7 | 0.7 | 0.7 | 99 | 130 |
| O-94 + AM-toxin I ^{b)} | Red Gold | 94.1 | 90.1 | 39.5 | 37.8 | 28.8 | 29.8 | 27.0 | 26.3 | 130 | 314 |
| | Jonathan | 94.0 | 96.3 | 30.8 | 36.1 | 26.1 | 29.2 | 6.3 | 7.5 | 119 | 301 |
| | Nijisseiki | 92.3 | 93.4 | 35.7 | 38.1 | 19.6 | 18.7 | 3.9 | 3.9 | 112 | 314 |
| O-94 | Red Gold | 92.3 | 88.6 | 38.5 | 35.9 | 7.1 | 5.0 | 0.1 | 0.1 | 85 | 85 |
| | Jonathan | 87.7 | 93.7 | 31.3 | 33.8 | 5.0 | 4.8 | 0.0 | 0.0 | — | — |
| | Nijisseiki | 85.6 | 90.9 | 38.8 | 41.9 | 8.9 | 9.4 | 0.3 | 0.2 | 90 | 95 |
| O-94 | Ht ^{c)} : Red Gold | 94.6 | 97.4 | 39.4 | 39.5 | 38.8 | 39.9 | 26.0 | 25.3 | 94 | 97 |
| | Ht: Jonathan | 95.7 | 96.6 | 34.8 | 36.9 | 27.1 | 28.6 | 11.6 | 12.4 | 96 | 98 |
| | Ht: Nijisseiki | 93.1 | 94.2 | 35.7 | 35.3 | 26.2 | 28.1 | 11.7 | 13.5 | 110 | 115 |

a) Leaves of apple cvs. Red Gold and Jonathan, and Japanese pear cv. Nijisseiki were inoculated with spore suspensions (5×10^5 spores/ml) of virulent (M-71 and O-159) and saprophytic (O-94) isolates, and incubated in light (1 mW/cm²) and darkness for 18 hr at 26 C. Values in the table represent the means of five observed leaves.

b) Spores were suspended in AM-toxin I solution at 10^{-7} M for Red Gold and at 10^{-5} M for Jonathan and Nijisseiki.

c) Leaves were pre-treated for 3 sec in 55 C water.

Table 4. Effect of light on leaf necrosis of apple and Japanese pear induced by toxic fungal metabolites^{a)}

| Toxic metabolite | Concentration | Necrotic area (mm ²) | | | | | | | | |
|-------------------|--------------------|----------------------------------|------|-----------------|--------------------|------|-----------------|---------------------|-------|-----------------|
| | | Apple cv. Red Gold | | | Apple cv. Jonathan | | | Pear cv. Nijisseiki | | |
| | | Light | Dark | % ^{b)} | Light | Dark | % ^{b)} | Light | Dark | % ^{b)} |
| AK-toxin I | 10 ⁻⁶ M | 0.0 | 0.0 | | 0.0 | 0.0 | | 236.5 | 216.3 | -7.3 |
| | 10 ⁻⁸ | 0.0 | 0.0 | | 0.0 | 0.0 | | 7.0 | 8.3 | 16.6 |
| Citric acid | 10 ⁻³ M | 1.0 | 1.0 | 0.0 | 2.0 | 1.8 | -11.1 | 194.5 | 240.3 | 19.1 |
| | 10 ⁻⁴ | 0.0 | 0.0 | | 0.0 | 0.0 | | 56.0 | 65.0 | 13.8 |
| Phenylacetic acid | 1000 µg/ml | 9.5 | 8.5 | -11.8 | 5.0 | 4.0 | -4.0 | 6.0 | 5.5 | -7.1 |
| | 500 | 3.0 | 2.8 | -7.1 | 1.0 | 1.0 | 0.0 | 1.0 | 1.0 | 0.0 |
| Tenuazonic acid | 1000 µg/ml | 4.0 | 4.5 | 11.1 | 6.0 | 7.0 | 14.3 | 13.5 | 16.5 | 18.2 |
| | 500 | 0.0 | 0.0 | | 1.0 | 1.3 | 23.1 | 4.8 | 5.3 | 9.4 |

a) Leaves were treated with fungal toxins, and incubated in light (1 mW/cm²) or darkness at 26 C. After 48 hr, necrotic area was measured. Values in the table represent the means of twenty leaves.

b) Inhibition rate to dark treatment.

showed that no photo-protection was observed on the heated leaves.

Effect of light on some fungal toxin-induced necroses

AK-toxin I, a host-specific toxin produced by *A. alternata* Japanese pear pathotype causes veinal necrosis on susceptible pear cv. Nijisseiki leaves¹⁴⁾. Citric acid, which is produced by *Penicillium citrinum*, also induces similar necrosis on Nijisseiki leaves¹³⁾. Since *A. alternata* is known to produce some non-specific fungal toxins, such as phenylacetic acid¹²⁾ and tenuazonic acid⁵⁾, an experiment was made to determine whether or not light has protective effect on the necrosis induced by these fungal toxins. When susceptible and moderately resistant leaves were incubated for 48 hr in light and darkness after treated with these toxins, no difference in necrosis was observed between light and darkness (Table 4).

DISCUSSION

Susceptible apple, and moderately resistant apple and pear leaves incubated in light immediately after AM-toxin exposure were protected from toxin-induced necrosis. When the leaves were kept in darkness for specified times immediately after toxin exposure and then transferred in light, a period of darkness longer than 5 hr was required for necrosis development. The time required for necrosis development, however, reduced to about 3 hr when darkness started later than 2 hr after toxin exposure. The toxin-induced electrolyte loss from leaves and reduction of photosynthetic CO₂ fixation in leaves, early events in the toxin action, were not affected by light. These results indicate that there are at least two phases in the effect of light during the action process of AM-toxin: one is a light-independent phase that starts immediately after toxin exposure and causes dysfunction of plasma membranes and chloroplasts, and the other is a light-inhibited phase that begins about 2 hr after toxin exposure and continues for about 3 hr.

Susceptible apple cultivars have a striking tissue-specificity with respect to the action of AM-toxin¹¹⁾; the leaves are sensitive, but the petals are insensitive, to the toxin. On the contrary, leaves and petals of moderately resistant apple cultivars have almost the same sensitivity to the toxin¹¹⁾. When the petals of moderately resistant apple were incubated in light after toxin exposure, light gave no protection on the toxin-induced necrosis. The protective effect of light on leaf necrosis was very specific to AM-toxin. No such effect was observed on the necrosis caused by non-specific phytotoxins. Moreover, pear leaf necrosis induced by AK-toxin¹⁴⁾ and citric acid¹³⁾, which have action sites on plasma membranes, was not affected by light.

These results suggest that the protective effect of light may be closely associated with AM-toxin action to chloroplasts in host cells.

The importance of light in the action of host-specific toxin has been reported in the combination of Tms-cytoplasm corn and HMT-toxin produced by *Helminthosporium maydis* race T. Bhullar *et al.*¹⁾ demonstrated that the toxin induced chlorotic lesions on corn leaves in light, whereas leaves kept in darkness retained chlorophyll. Daly and Barna²⁾ observed that the toxin inhibited both dark CO₂ and photosynthetic CO₂ fixations of corn leaf slices, but the inhibition in photosynthetic CO₂ fixation was light-dependent. On the other hand, protective effect of light on the toxin action have been also reported. Earle *et al.*³⁾ showed that collapse of the toxin-treated leaf protoplasts was protected in light, although the mitochondria, the action site of the toxin, were damaged severely. MacRae and Yoder¹⁰⁾ indicated that the protoplasts exposed to light before toxin treatment became insensitive to the toxin. Walton *et al.*²²⁾ found that the toxin-induced reduction in ATP level of protoplasts incubated in darkness was protected in light, but the light effect was abolished by the presence of DCMU, an inhibitor of photosynthetic electron transport. These effects of light have been explained by the proposal that light-driven photophosphorylation compensates for toxin-induced inactivation of oxidative phosphorylation²²⁾.

The results with AM-toxin are different from those with HMT-toxin in many ways. i) AM-toxin-treated leaves did not show chlorosis in light condition; rather, the result with FDA-staining indicated that the leaves were viable. ii) AM-toxin action to photosynthetic CO₂ fixation was not light-dependent during pre-incubation with toxin. iii) The protective effect of light was detectable only at early stages (2–5 hr) of toxin action process. iv) Some photosynthetic inhibitors containing DCMU did not affect the light effect on AM-toxin action. In addition to these observations, the action spectrum for photo-protection from AM-toxin was 570–680 nm, and the most effective wavelength was 602 nm. The spectrum, however, seems to be different from that for photosynthesis in higher plants⁴⁾. Thus, the mechanism of light effect on AM-toxin action is still unclear.

Apple cultivars are divided into three groups, susceptible, moderately resistant and resistant cultivars, on the basis of responses to AM-toxin and pathogen⁹⁾. Some cultivars of Japanese pear also have the same toxin-sensitivity as moderately resistant apple cultivars^{6,11)}. When leaves of these cultivars were incubated in light for 50 hr after toxin exposure and then kept in darkness for an additional 50 hr, necrosis developed on the susceptible leaves, but not on moderately resistant apple and pear leaves. This result suggests that there exists a reversible mechanism from toxin damages in moderately resistant cultivars. The different effects of light may offer an interesting experimental system for elucidating differences in toxin sensitivity between susceptible and moderately resistant cultivars.

We have pointed out the importance of AM-toxin released from germinating spores of the pathogen^{6,7)}. The toxin is released from germinating spores of virulent isolate, but not by avirulent ones⁶⁾. When avirulent spores were inoculated with AM-toxin, the spores invaded host tissues, just like virulent spores⁷⁾. Thus, AM-toxin is considered to be an initiation factor for successful pathogenesis. In the present experiments, light did not affect toxin-induced fungal invasion and lesion formation. The lesion size, however, significantly reduced in light. This suggests that host cell death induced by AM-toxin is not a prerequisite for the colonization of the pathogen, but necessary for lesion development. In infection of *A. alternata* Japanese pear pathotype which produces AK-toxin, it has been postulated recently that the key role of AK-toxin in pathogenesis is in the suppression of resistant mechanisms in pear plants⁸⁾. Therefore, AM-toxin action as a suppressor for the resistant mechanism remains to be elucidated.

We are grateful to Dr. Y. Honda, Faculty of Agriculture, Shimane University for his valuable suggestion on this work, and to Mr. E. Iri, Mitsubishi Cable Industries Ltd. for the use of spectro multi-channel photodetector.

Literature cited

1. Bhullar, B.S., Daly, J.M. and Rehfeld, D.W. (1975). *Plant Physiol.* 56: 1-7.
2. Daly, J.M. and Barna, B. (1980). *Ibid.* 66: 580-583.
3. Earle, E.D., Gracen, V.E., Yoder, O.C. and Gemmill, K.P. (1978). *Ibid.* 61: 420-424.
4. Inada, K. (1976). *Plant and Cell Physiol.* 17: 355-365.
5. Kinoshita, T., Renbutsu, Y., Khan, I.D., Kohmoto, K. and Nishimura, S. (1972). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 38: 397-404.
6. Kohmoto, K., Khan, I.D., Renbutsu, Y., Taniguchi, T. and Nishimura, S. (1976). *Physiol. Plant Pathol.* 8: 141-153.
7. Kohmoto, K., Nishimura, S. and Otani, H. (1982). *In Plant Infection: The Physiological and Biochemical Basis* (Asada, Y. *et al. eds.*). Japan Scientific Societies Press, Tokyo and Springer-Verlag, Berlin. pp. 253-263.
8. Kohmoto, K., Otani, H. and Nishimura, S. (1987). *In Molecular Determinants of Plant Diseases* (Nishimura, S. *et al. eds.*). Japan Scientific Societies Press, Tokyo and Springer-Verlag, Berlin. pp. 127-143.
9. Kohmoto, K., Taniguchi, T. and Nishimura, S. (1977). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 43: 65-68.
10. MacRae, W.D. and Yoder, O.C. (1988). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 32: 293-300.
11. Maeno, S., Kohmoto, K., Otani, H. and Nishimura, S. (1984). *J. Fac. Agric. Tottori Univ.* 19: 8-19.
12. Muraoka, T., Kinoshita, T., Nishimura, S. and Kohmoto, K. (1971). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 37: 388-389 (Abstr. in Japanese).
13. Nishimura, S. and Kohmoto, K. (1974). *Ibid.* 40: 174 (Abstr. in Japanese).
14. Otani, H., Kohmoto, K., Nishimura, S., Nakashima, T., Ueno, T. and Fukami, H. (1985). *Ibid.* 51: 285-293.
15. Otani, H., Nishimura, S. and Kohmoto, K. (1983). *J. Fac. Agric. Tottori Univ.* 18: 1-8.
16. Park, P., Nishimura, S., Kohmoto, K., Otani, H. and Tsujimoto, K. (1981). *Can. J. Bot.* 59: 301-310.
17. Sawamura, K. (1966). *Bull. Hort. Res. Stan. Japan* C4: 43-59.
18. Shimomura, N., Otani, H., Park, P., Kodama, M., Kohmoto, K. and Nishimura, S. (1989). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 55: 95 (Abstr. in Japanese).
19. Tabira, H., Kagei, M., Otani, H., Kohmoto, K. and Nishimura, S. (1986). *Ibid.* 52: 132-133 (Abstr. in Japanese).
20. Tabira, H., Otani, H., Kohmoto, K. and Nishimura, S. (1986). *Ibid.* 52: 526 (Abstr. in Japanese).
21. Ueno, T., Nakashima, T. and Fukami, H. (1982). *In Plant Infection: The Physiological and Biochemical Basis* (Asada, Y. *et al. eds.*). Japan Scientific Societies Press, Tokyo and Springer-Verlag, Berlin. pp. 235-251.
22. Walton, J.D., Earle, E.D., Yoder, O.C. and Spanswich, R.M. (1979). *Plant Physiol.* 63: 806-810.

和 文 摘 要

田平弘基・尾谷 浩・霜村典宏・兎玉基一朗・甲元啓介・西村正暘：光によって誘導されるリンゴおよびナシ葉の AM 毒素不感受性化

リンゴ斑点落葉病菌の AM 毒素で処理した感受性リンゴ、中程度抵抗性リンゴおよびナシ葉を光照射下に静置すると、毒素による壊死斑形成は著しく抑制された。毒素処理葉を処理直後より暗黒下に置き一定時間後に光照射下に移すと、壊死斑形成には5時間以上の暗期が必要であった。しかし、毒素処理2時間以降に暗期を入れると、壊死斑形成に要する暗期の時間は約3時間に短縮された。壊死斑形成に有効な光のスペクトルは570~680 nmの範囲にあり、602 nm付近で最大の抑制効果が認められた。一方、光の抑制効果はAM毒素による壊死斑形成に特異的であったが、光合成阻害剤処理による影響は受けなかった。また、毒素の初期作用である電解質異常漏洩や光合成 CO₂ 固定の阻害には光は抑制効果を示さなかった。なお、病原菌の宿主葉への初期感染には光の効果はみられなかったが、病斑の拡大は抑制された。