

The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield

Frank Waller*†, Beate Achatz*†‡, Helmut Baltruschat*†, Jo zsef Fodor § , Katja Becker¶, Marina Fischer¶, Tobias Heier*, Ralph Hu ckelhoven*, Christina Neumann*, Diter von Wettstein, Philipp Franken‡, and Karl-Heinz Kogel*,**

造林学研究室 3年 荒木基二

論文紹介

- テーマ

内生菌 *Piriformospora indica*によるオオムギの改良
(塩ストレス耐性、病害抵抗性、高収量性への再構築)

- 論文

掲載紙: PNAS (Proceedings of the National Academy of Science) September 20, 2005

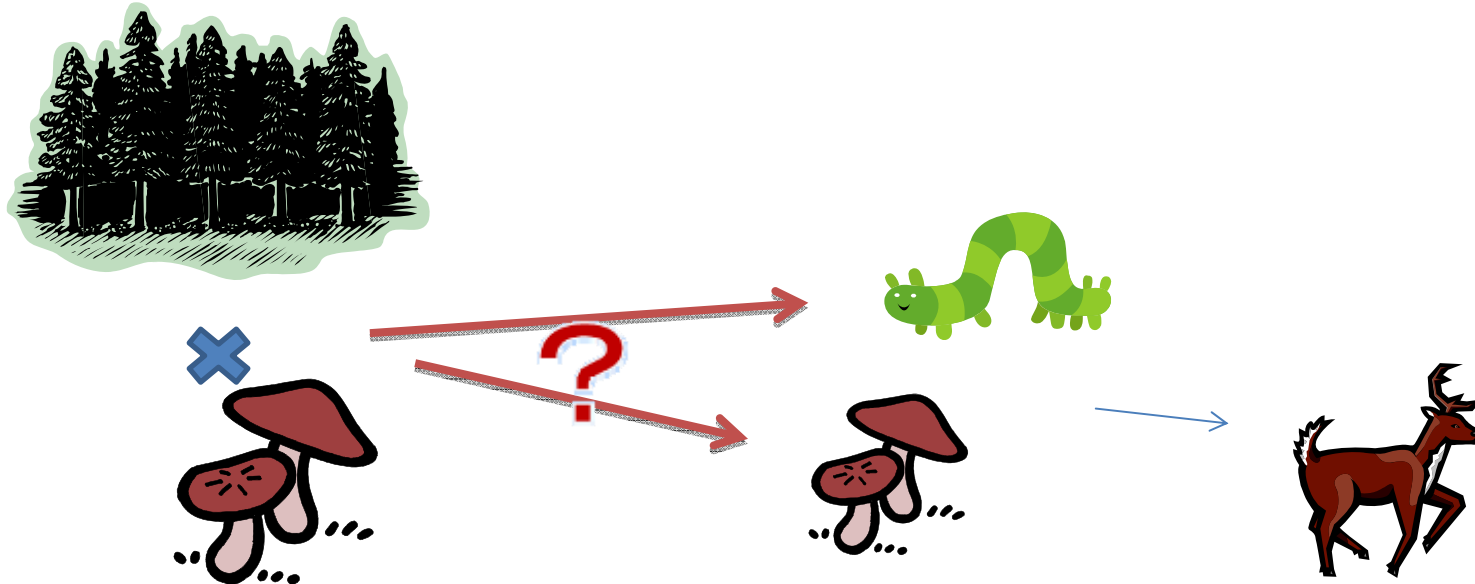
著者: Frank Wallerなど

発刊当時

Institute of Phytopathology and Applied Zoology, University of Giessen

現: ビュルツブルグ大学(ドイツ)

選択理由



論文構成

- 1、背景と実験目的
- 2、材料と方法
 - 植物、菌、培地
 - 生化学的測定
 - 北方BlotとRT-PCR分析
- 3、結果と議論
- - *P.indica*は根の皮層細胞に感染し、オオムギ収量を増加させる
 - *P.indica*接種個体は耐塩性、根の病害耐性の向上が見られる
 - *P.indica*感染根は高い抗酸化作用を示した
 - *P.indica*は全身病害抵抗を誘導する

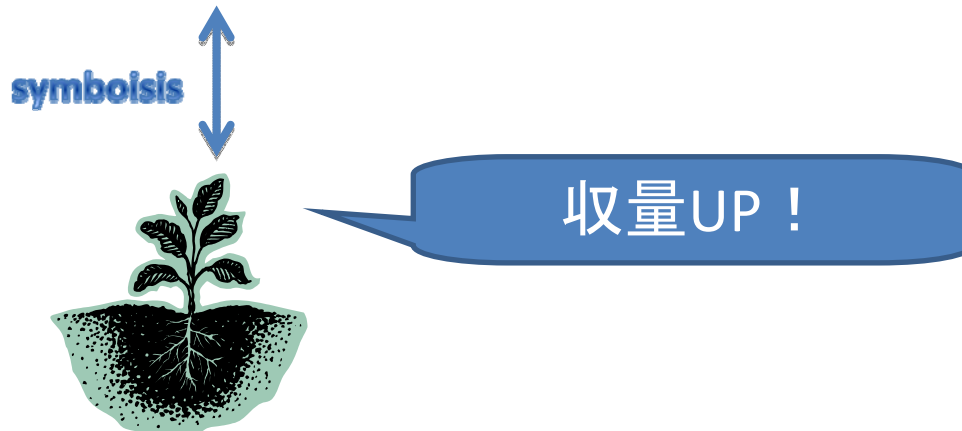
研究の背景

- 穀物の病害抵抗

—————> 減農薬かつ高収量を保持

- 1997年インド、タール砂漠

Piriformospora indica 根感染性の担子菌



Piriformospora indica

- 菌界—担子菌門—ハラタケ亜門—ハラタケ綱—所属不明(亜綱)—ロウタケ目
- 内生菌 (endo(内部)phytic(植物)fungi)

広義：植物の生きた組織内部で生息

- ・菌根菌とは区別
- ・寄生菌を含まない

研究目的

*P.indica*の潜在力

- 菌類病害抵抗性(resistance to fungal disease)への影響
- 塩耐性(salt tolerance)への影響



仮説

収量増加の理由

- 病害抵抗性の向上 = 収量逡減の抑制
- *P.indica*の抗生物質？

- 植物の抗酸化力が向上

グルタチオンーアスコルビン酸回路

誘導全身抵抗性 (ISR) の発現

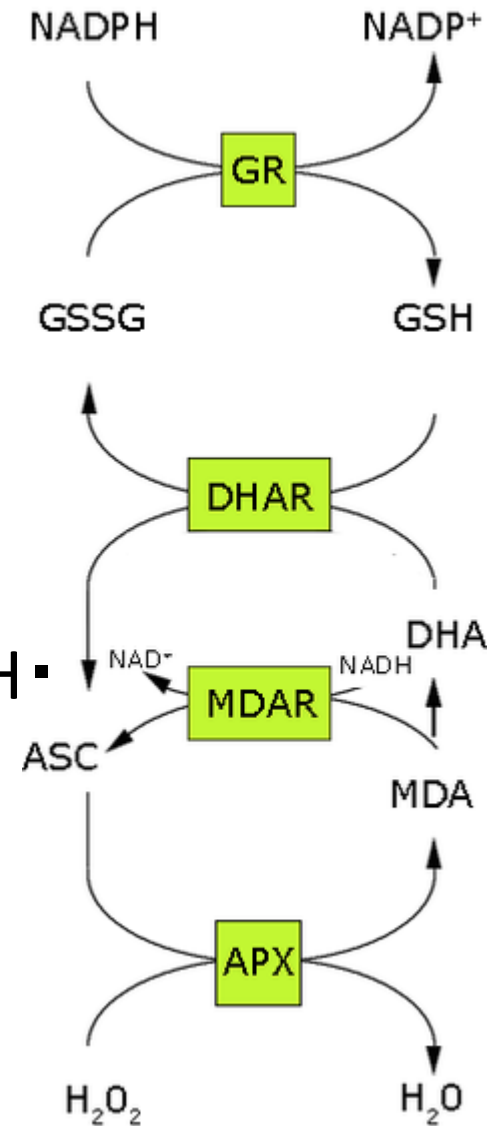


寄生菌の戦略

- ・活性酸素の生産
- ・ホスト細胞の壊死

植物の抗酸化作用

- グルタチオン-アスコルビン酸回路
過酸化水素の解毒化
グルタチオンとアスコルビン酸は
再利用可能
- 関連する要素
アスコルビン酸・グルタチオン・NADPH・
代謝に関連する酵素



実験 (Materials&Methods)

- Plants&Fungal Material

チャンバー内

4週間後

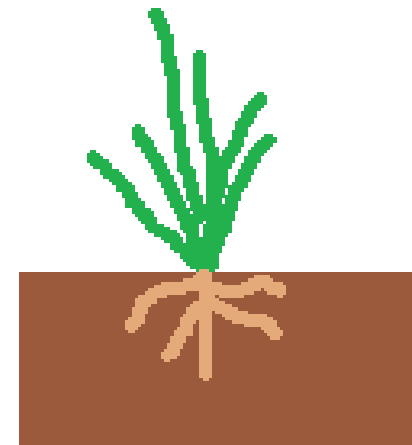
野外

2:1で膨張粘土と乾性油の混合物

- ・チャンバー内で21°C/18°C day/nightのサイクル
- ・60%の相対湿度
- ・16時間の光周期
($240 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ photon flux density)
- ・20mlの0.1%ワックス溶液(N/P/K:12:4:6)で施肥
- ・収量比較評価のために
300gの基質につき4gの菌糸体を含む土
- ・チャンバー内で4週間生育

- ・6L/6個体のMitscherlich pot
- ・1:2でローム土と砂
- ・前にその土壌で育成されていたのはジャガイモである
- ・土壌添加物は
0.25gN,0.4gP,1.6gK,0.2gMg

- ・農薬散布(土壌には届かず)
- ・殺虫剤使用
- ・P.indicaの状態は顕微鏡調査



うどんこ病害調査

- 葉の採取
- 切片の作製 (寒天培地0.4%benzimidazole含)
- うどんこ病菌の接種 (*B. graminis f.sp. hordei*)

↓ 7日後

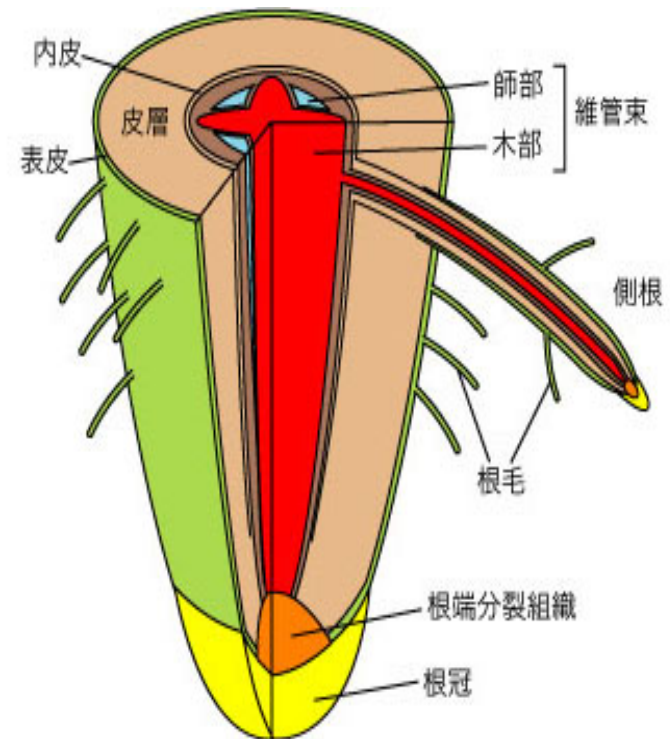
- コロニー数をカウント
- 頻度
 - ・過敏反応 (hypersensitive response)
 - ・侵入不可細胞 (Non-penetrated cells)
 - ・吸器の数

Biochemical Measurement

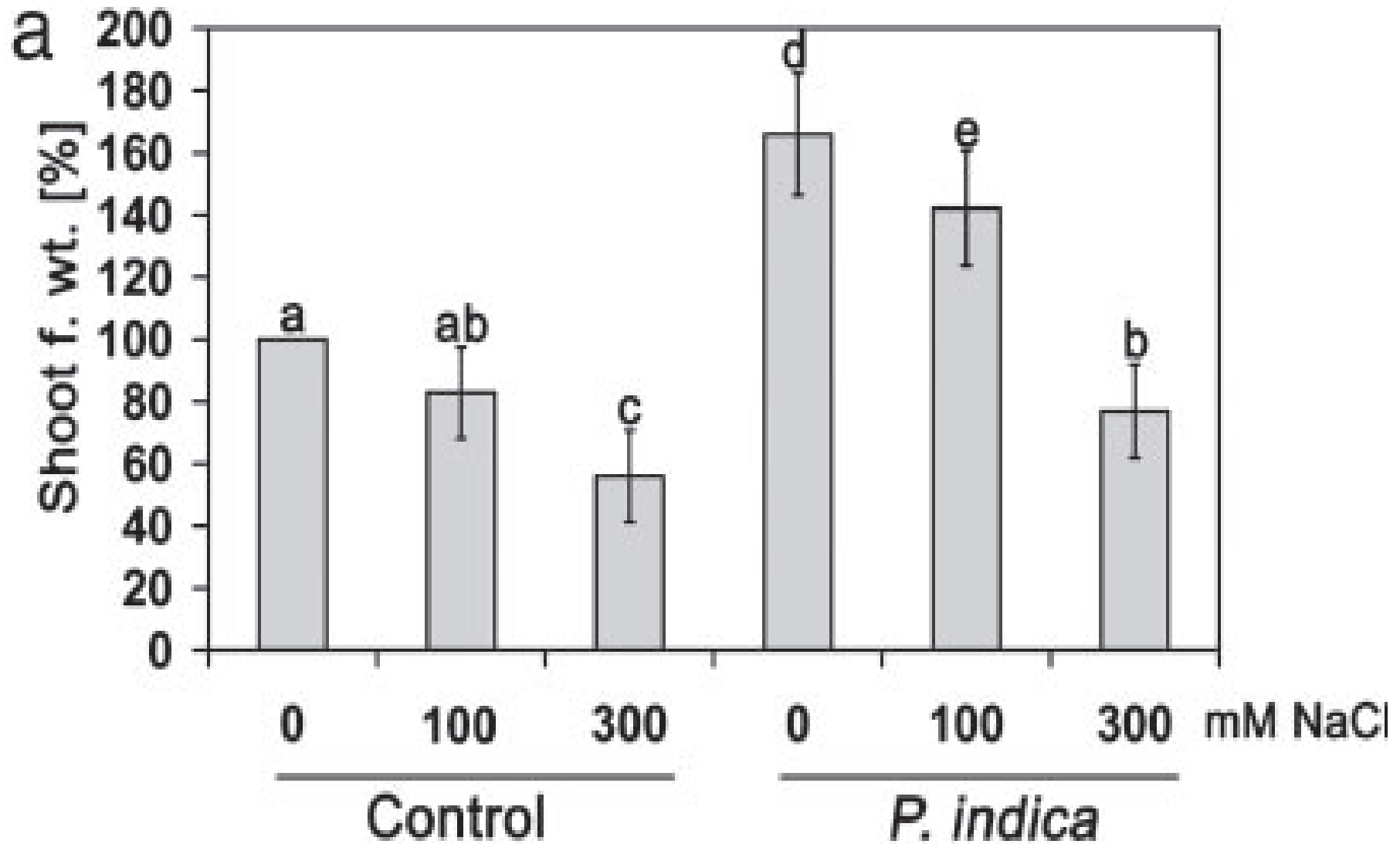
- アスコルビン酸の定量
ビピリジル法
- 脱水素アスコルビン酸還元剤 (DHA reductase) 活性
分光測定(265nm = GSH依存型の脱水素アスコルビン酸の酸化反応時に放出)
- グルタチオンの定量
- グルタチオン還元剤 (GR) 活性

結論・議論

- *P.indica*は根の**皮層細胞**に感染し、オオムギ収量を増加させる



収量増加について、塩害耐性について



5-week-old plants

(最後の2週間は塩濃度に変化を加えて栽培)

- 2種の栽培品種を用いて春夏に穂を含めた収量調査(2004年)

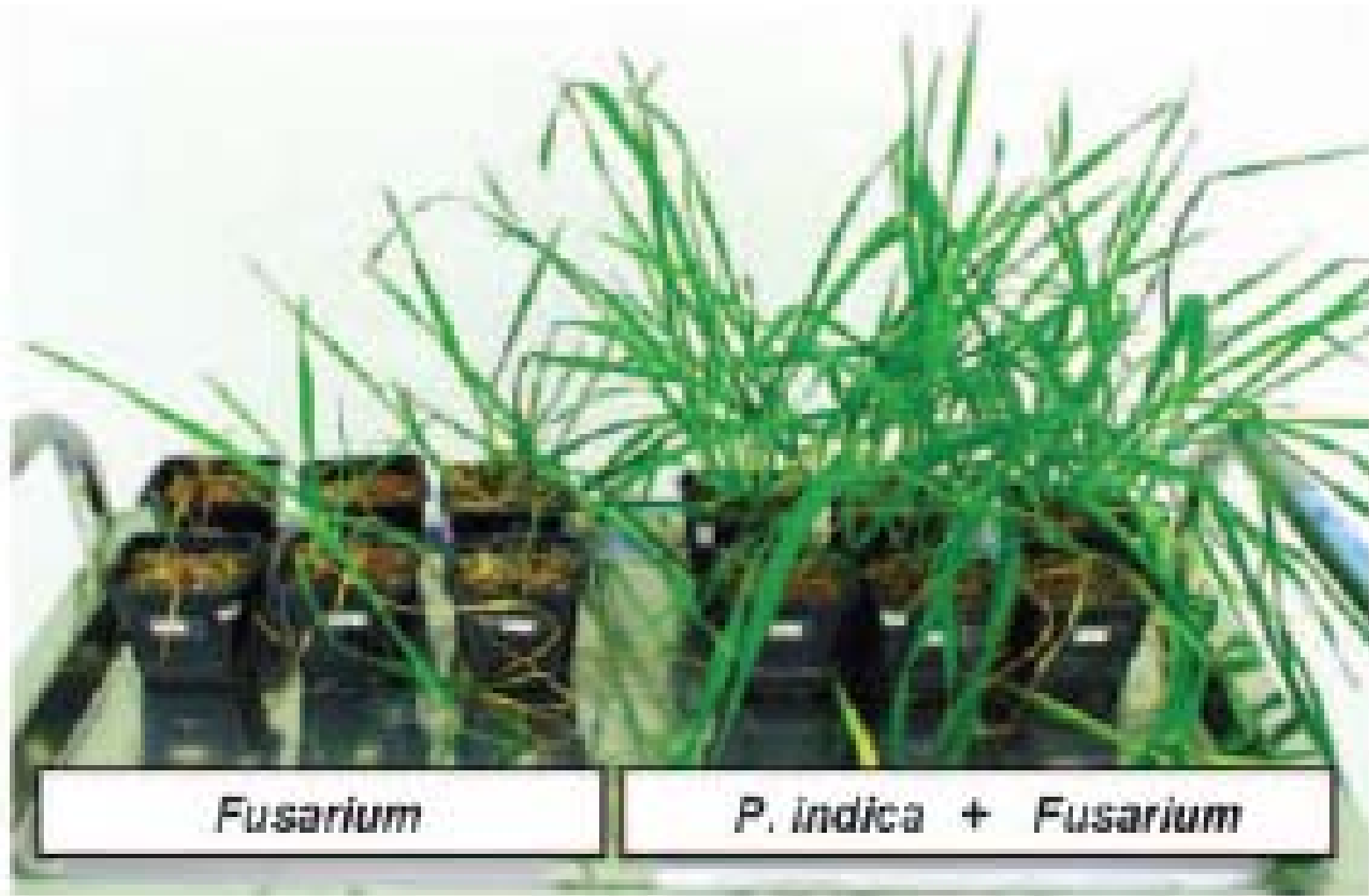
Table 1. Effect of *P. indica* infestation on yield parameters in barley

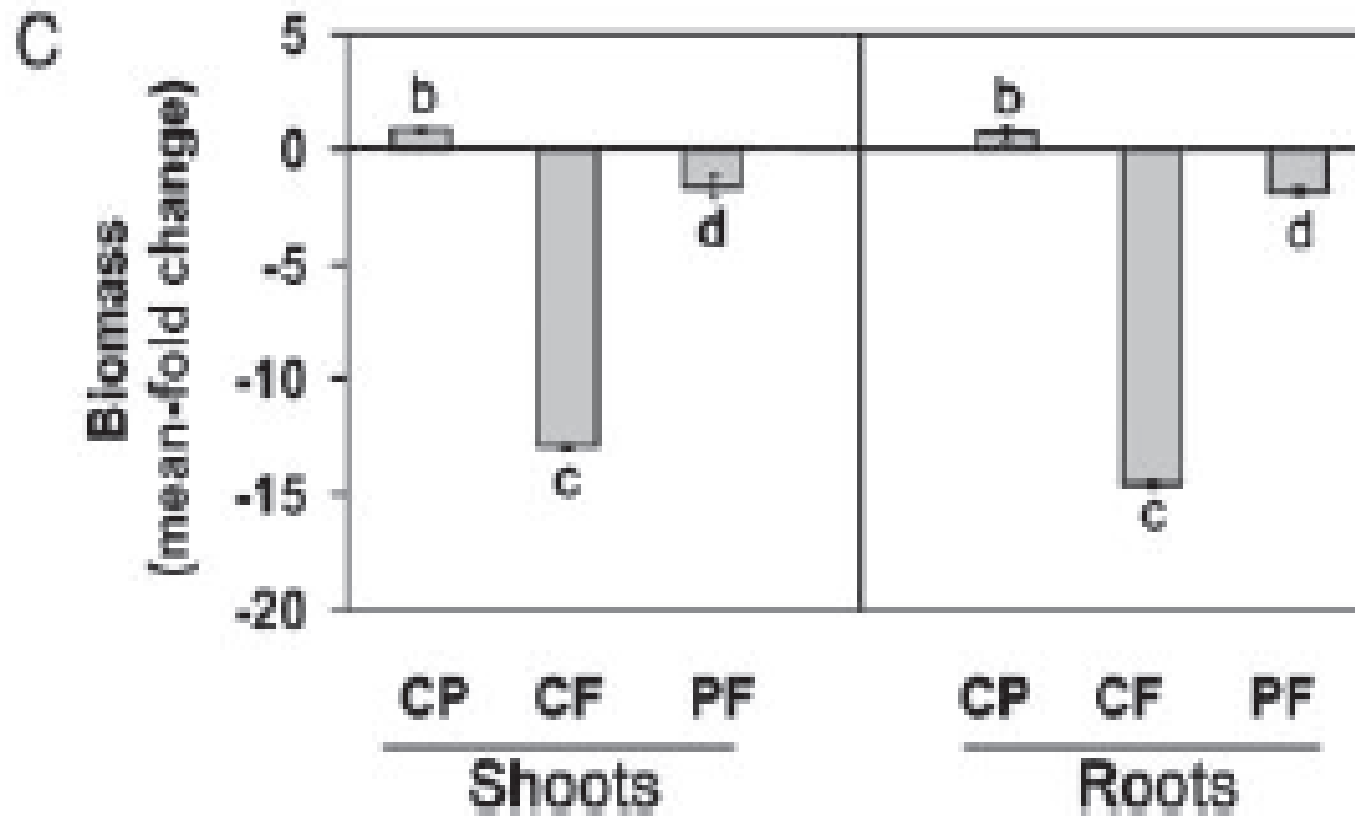
Cultivar	<i>P. indica</i>	Yield, g per pot ⁻¹	Straw yield, g per pot ⁻¹	Harvest index	TGW, g	Ears per pot	Grains per ear
Ingrid	-	50.3 ± 1.56	52.4 ± 3.14	0.96 ± 0.04	48.0 ± 0.90	47.8 ± 2.22	22.4 ± 0.93
	+	53.1 ± 2.76	53.2 ± 1.02	0.99 ± 0.06	48.1 ± 0.65	51.5 ± 1.29*	22.5 ± 1.86
Annabell	-	53.9 ± 3.61	46.4 ± 3.46	1.17 ± 0.11	50.6 ± 1.28	47.3 ± 3.50	23.1 ± 1.41
	+	59.9 ± 1.73**	48.0 ± 1.35	1.25 ± 0.04	50.6 ± 0.96	50.0 ± 2.45	23.7 ± 0.98

To assess whether *P. indica* infestation affects yields, elite barley cultivar Annabell (Saatzucht Ackermann, Irlbach, Germany) and cultivar Ingrid were grown in soil containing mycelium inoculum of *P. indica* in Mitscherlich pots at an open-air field station near Marburg, central Hesse, Germany. Values given are means of six pots (with six plants per pot). TGW, thousand-grain weight; * and ** indicate statistically significant differences between infested and noninfested plants (unpaired Student t test; * $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

- Annabell : 11% 増収量
- Ingrid : 5.5% 増収量

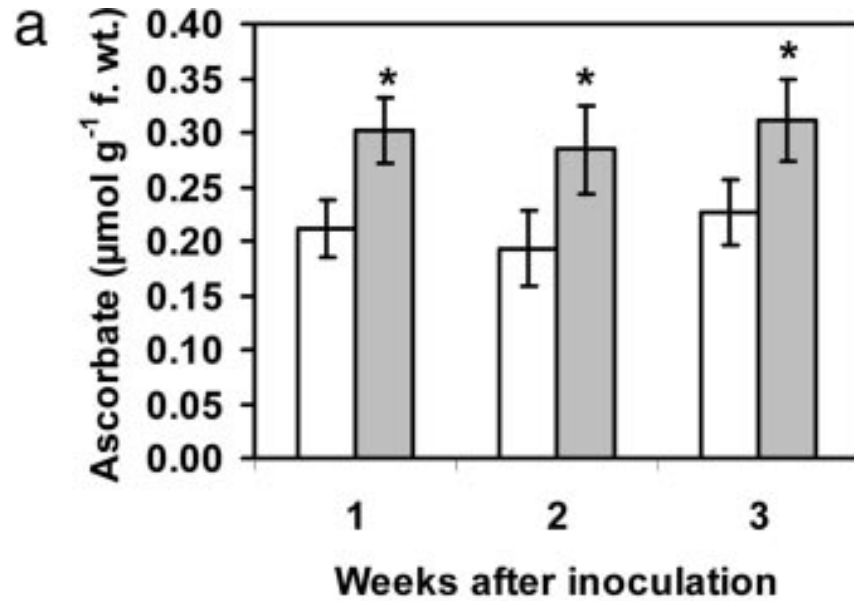
b





(c) Mean fold change of root and shoot weights relative to noninfested (no *P. indica* or *F. culmorum*) 4-week-old plants. CP, *P. indica*-infested; CF, *Fusarium*-infested; PF, *P. indica*-infested, *Fusarium*-infested. Error bars, SD. Columns labeled with the same letter represent not-significantly-different means, according to multiple unpaired Student *t* tests ($P < 0.05$), after ANOVA.

いずれも根の濃度

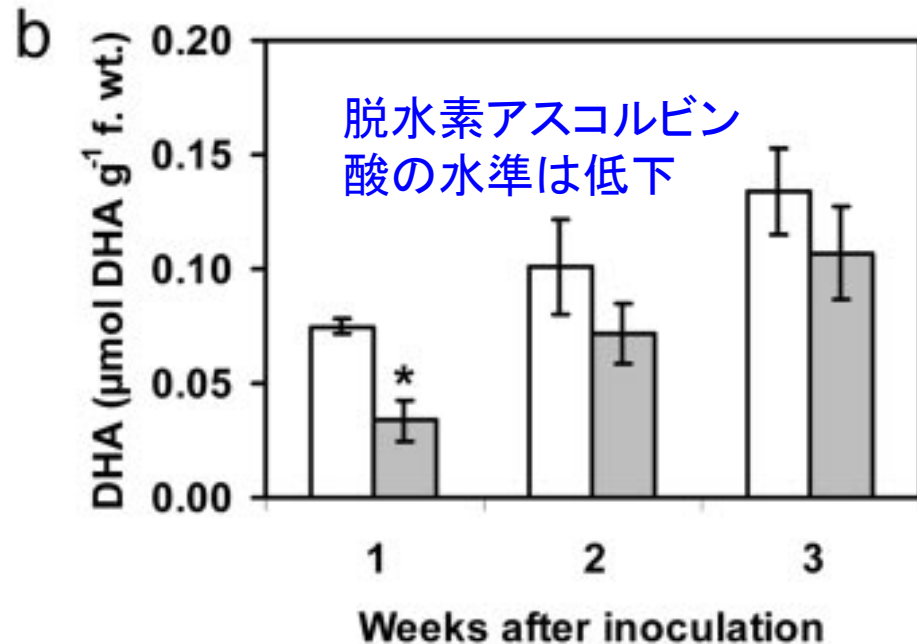


アスコルビン酸の水準
は1~3週間とも高い

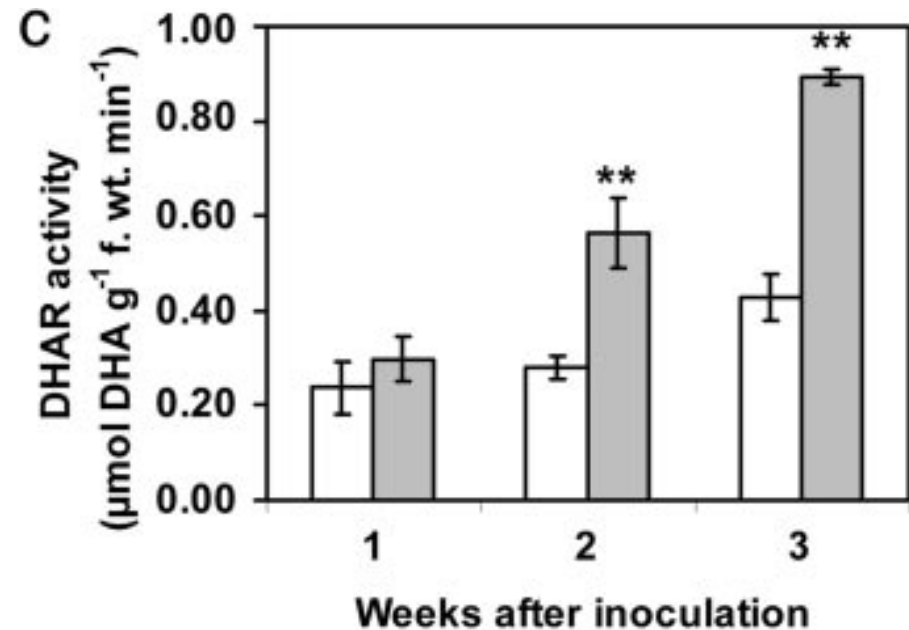
unpaired Student *t*
test; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$
error bar: SD

アスコルビン酸をリサイクル
するデヒドロアスコルビン酸リ
ダクターゼの活性が上昇

(3週間後は2.2倍)



脱水素アスコルビン
酸の水準は低下



総グルタチオン濃度のわずかな上昇
(しかし顕著ではなかった)

Table 2. Glutathione content in *P. indica*-infested barley roots and leaves

Time after sowing, weeks	[Glutathione], nmol-g ⁻¹ f.wt. in roots			[Glutathione], nmol-g ⁻¹ f.wt. in leaves		
	Control	<i>P. indica</i>	% of control	Control	<i>P. indica</i>	% of control
1	200 ± 42	205 ± 16	103	405 ± 67	403 ± 54	99.5
2	230 ± 32	273 ± 35	119	370 ± 78	467 ± 48	126.3
3	223 ± 46	309 ± 49	139	510 ± 54	798 ± 113	156.5*

Table 3. GR activity in *P. indica*-infested barley roots and leaves

Time after sowing, weeks	GR activity in roots, milliunits/mg protein			GR activity in leaves, milliunits/mg protein		
	Control	<i>P. indica</i>	% of control	Control	<i>P. indica</i>	% of control
1	24.7 ± 11.0	32.6 ± 15.9	132	11.5 ± 9.2	22.8 ± 9.0	198*
2	44.3 ± 9.8	44.6 ± 11.5	101	7.9 ± 4.2	22.4 ± 6.0	284**
3	47.5 ± 7.5	37.5 ± 12.2	79	9.5 ± 5.0	16.2 ± 6.0	171

Total GR activity was measured according to procedures described in ref. 20. Values are means of three samples. Similar results were obtained with two independent sets of experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$; for intercohortal analyses, the unpaired Student *t* test was applied.

Together with the biochemical data (see Tables 2 and 3), these data substantiate that the systemic plant response, leading to a reduction of powdery mildew infection, is the result of induced resistance rather than being caused by antibiotics secreted by *P. indica*.

- うどん粉病感染の減少

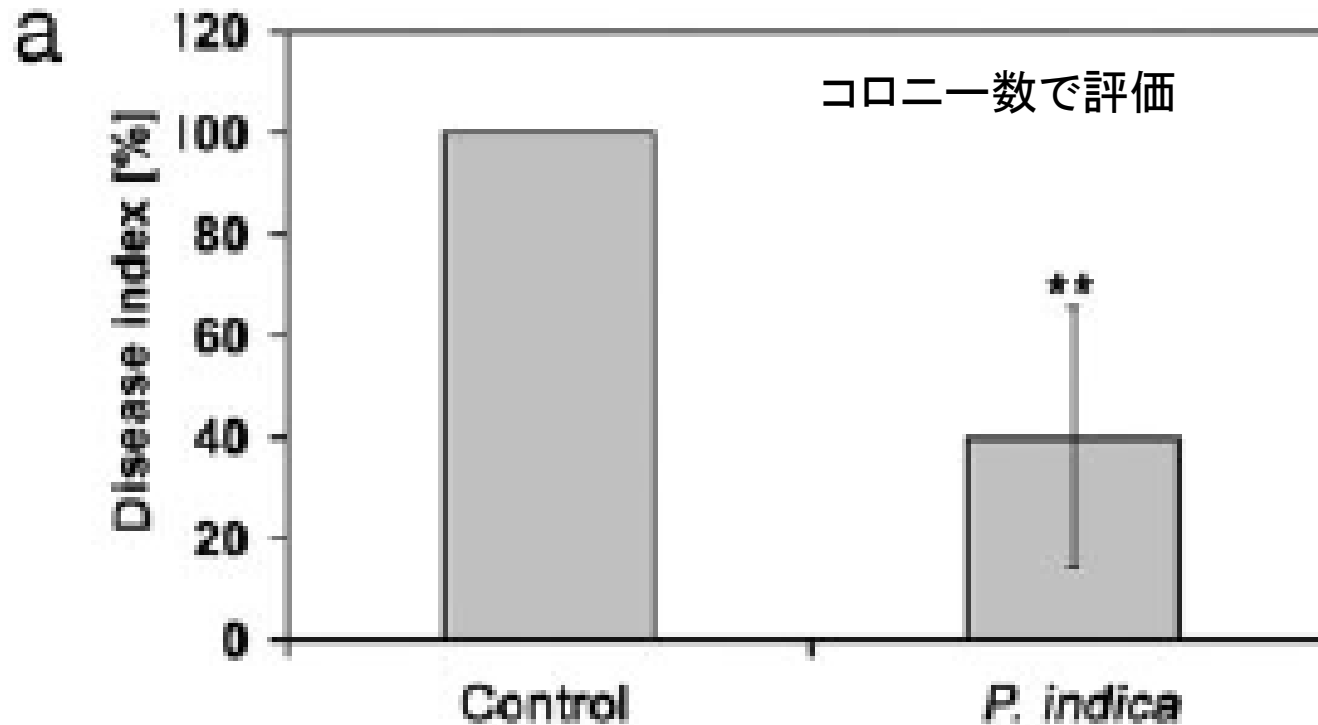
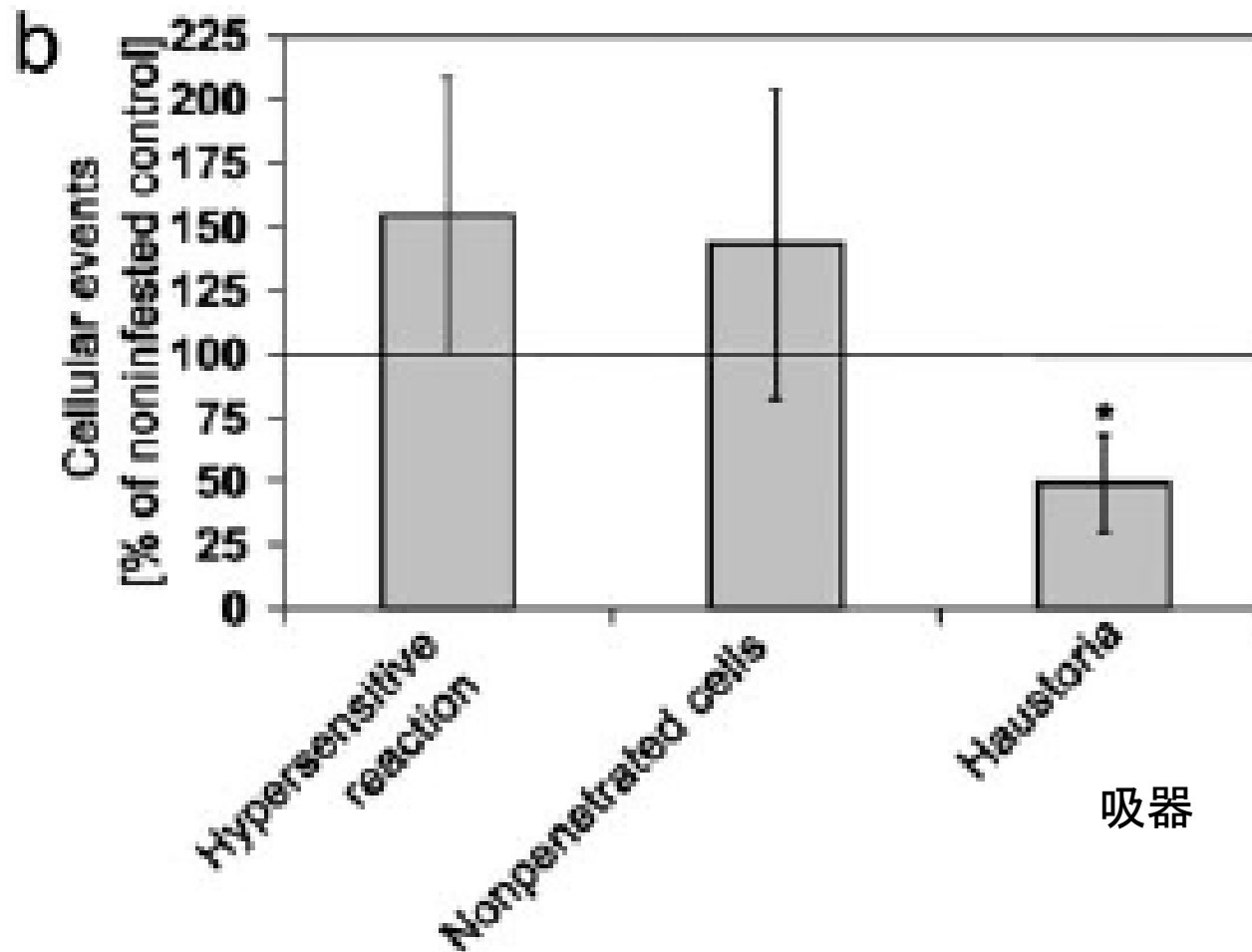


Fig. 4. Systemic disease resistance conferred by *P. indica*. (a) Severity of powdery mildew infection (disease index) was calculated as colonies produced by *B. graminis* on the youngest leaf of 3-week-old barley plants (cultivar Ingrid), with roots either not infested (Control) or infested (*P. indica*). (b)

3週間生の*P.indica*感染個体のコロニー数

2番目に若い葉の48%、最も若い葉の58%(コントロール比)



Cellular responses to powdery mildew attack were evaluated by counting cells showing an active defense response, a hypersensitive response of the whole cell (Hypersensitive reaction), a local defense stopping a penetration attempt (Nonpenetrated cell), or a successful penetration (Haustoria), visible as the successful formation of a fungal haustorium in the cell. Error bars, SD. * and ** indicate statistically significant differences between leaves of infested and noninfested plants (unpaired Student *t* test; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

まとめ

- 担子菌類*P.indica*の根感染
- 抵抗性誘導: グルタチオンアスコルビン酸回路に基づく抗酸化力活性化の可能性
- うどんこ病のコロニー形成数の減少
→ 誘導全身抵抗性強化の可能性
- 病害減少・収量の増加