

ビワがんしゅ病菌によりビワ葉に形成された ハロー病斑の電子顕微鏡観察

上運天 博*, 後藤 英世**

Electron Microscopic Observation of Halo Lesions on Loquat Leaf Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *eriobotryae*

Hiroshi KAMIJUNTEN and Hideyo GOTO

(平成2年7月2日 受理)

Pseudomonas syringae pv. *eriobotryae* is a pathogenic bacterium causing stem canker of loquat. A group of these canker bacteria incites halo lesion on the loquat leaves. Formative process of halo lesion was studied by electron microscopy. The cells showed ultrastructural changes principally in the chloroplast. Five days after inoculation, degenerative change occurred in some chloroplasts, whereas visible symptoms on the leaves were not observed. Eight to thirteen days after inoculation, yellowish green haloes appeared on the leaves, and enlarged as the disease advanced. In the leaf tissue at this stage, bacterial cells were observed in the intercellular spaces, and various degrees of degeneration were observed in chloroplast. Eighteen days after inoculation, the most advanced chloroplast degeneration was observed. Halo lesion at this stage had turned yellow.

Key words : *Pseudomonas syringae* pv. *eriobotryae*
Halo lesion, Ultrastructure.

緒 言

ビワがんしゅ病は *Pseudomonas syringae* pv. *eriobotryae* によって引き起こされる病気であり、全国各地でその発生が認められている。我が国以外ではアメリカ¹⁾、オーストラリア²⁾において本病の存在が知られている。本菌はビワの芽、枝、幹などの各部位を侵す。芽においては、芽枯れ症状を呈し、枝や幹では表皮が裂け、内部組織が隆起し、その後、乾固、脱落して典型的ながんしゅ症状を呈する。また、本菌の中には、ビワ葉にハロー病斑を形成する系統の存在が

明らかにされている³⁾。このように宿主植物の感染部位によって異なる病徴を示す例は余りない。葉にハロー病斑を形成する系統の菌株は長崎県のビワ集団栽培地からのみ分離されており³⁾、ハロー病斑形成の機構については全く知られていない。そこで、本実験ではハロー病斑形成の機構を明らかにする目的で、ビワ葉組織中における病原細菌の動態および罹病組織の微細構造、特に葉緑体の変化を電子顕微鏡を用いて観察した。

材料および方法

1. 供試細菌

長崎県のビワ葉に発生していたハロー病斑部から病原細菌の分離を行い、ビワ葉に対する病原性および細菌学的諸性質⁴⁾から *P. syringae* pv. *eriobotryae* と同定した M8707 菌株を実験に用いた。

2. 接種葉組織中の細菌の定量

接種源として自然突然変異で得られたストレプトマイシン (SM) 耐性の M8707 を YPA 培地 (酵母エキス 5g, ペプトン 10g, 塩化ナトリウム 5g, 寒天 15g, 蒸留水 1000ml, pH6.8) で 24 時間培養した後、菌体を白金耳でかきとり、約 10^8 /ml の濃度になるように蒸留水に懸濁した。この菌懸濁液をまだ十分に展開していないビワ葉に滴下し、単針接種した後、昼温 25°C、夜温 20°C のファイトトン室に置いた。接種後 30 日まで、経時的に接種部を中心に約 5~10mm 四方に切り取った葉組織片を 3% 次亜塩素酸ソーダで表面殺菌した後、水洗した。このようにして得られた 4 枚の葉組織片を一緒にして滅菌蒸留水を加えながら磨碎して計 10ml とした。この磨碎液を適当に希釈した後、SM ($80 \mu\text{g}/\text{ml}$) を含む YPA 培地と混合し、シャーレに流し込んだ。3 日後に出現したコロニーを数え、1 病斑当たりの細菌数を算出した。

3. 電子顕微鏡観察

M8707 菌株をまだ十分に展開していないビワ葉に単針接種し、ファイトトン室に置いた。接種後 5, 8, 13, 18, および 30 日目に接種部位に隣接した退緑または黄化した葉組織を約 1mm 四方に切り取った。対照として、蒸留水を接種した部位に隣接する葉組織からも同様に切り取った。切り取った葉組織小片を 2.5% グルタルアルデヒドを含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.2) 中に入れ、4°C で 2-3 時間、前固定した。その後、0.1M リン酸緩衝液 (pH7.2) で 5 時間洗浄し、続いて、1% オスミウム酸を含む同緩衝液で 2-3 時間、後固定した。その後、50, 70, 90, 99 および 100% のエタノールシリーズで順次脱水を行い、ルベアック-812 に包埋した。包埋した試料は超ミクロトーム (Sorvall Porter Blum MT-1) で薄切し、メッシュに載せ、酢酸ウラニルと酢酸鉛で二重染色した後、透過型電子顕微鏡 (日立 H-800) で観察した。

結 果

1. 接種葉組織中の細菌数

M8707 菌株をビワ葉に接種すると典型的なハロー病斑を形成した (Fig. 1)。なお、接種後 30 日まで

の葉組織内における細菌の増殖曲線を Fig. 2 に示した。接種 1 日後の 1 病斑当たりの細菌数は約 1.5×10^4 であったが、その後、徐々に増加し、ハロー病斑が出現して来る接種後 8 日目から 13 日にかけて急激に増加した。その後の菌数の増加はゆるやかであったが、30 日後には約 1.5×10^6 に達していた。

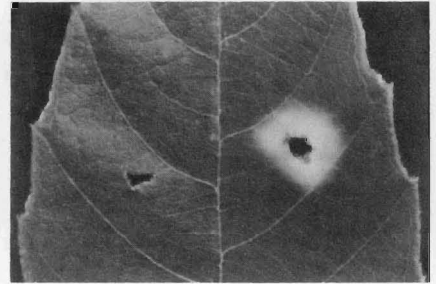


Fig. 1. Symptoms on a loquat leaf 40 days after inoculation with *P. syringae* pv. *eriobotryae* M8707 (right) and water (left).

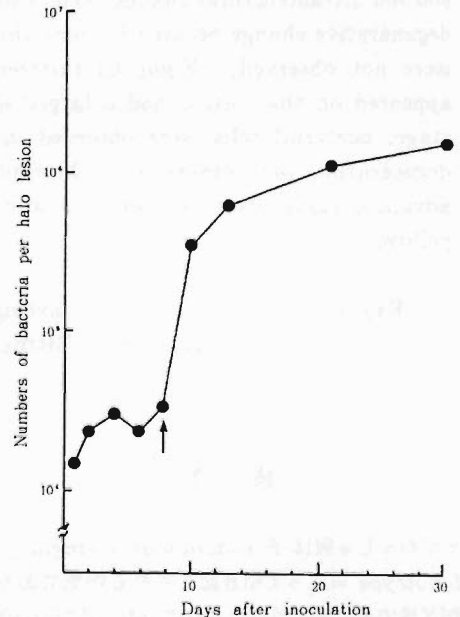


Fig. 2. Multiplication of *P. syringae* pv. *eriobotryae* M8707 in loquat leaves. → Symptom appearance

2. ハロー病斑の電子顕微鏡観察

M8707 菌株の感染によるハロー病斑形成過程の組織学的変化を電子顕微鏡により経時的に観察した。

接種後 5 日目、目にみえる病斑は認められなかったが、既に一部の細胞においては葉緑体の中のグラナの

配列が乱れ始め対照の葉緑体と比べて明らかに異常を呈していた (Fig. 4)。

接種部位の周りが退緑し、ハロー病斑が認められるようになる接種後8日目においては、ほとんどすべての細胞において葉緑体の崩壊が進み、グラナ間ラメラもほとんど認められなかった (Fig. 6)。

黄緑色のハロー病斑がはっきりと認められる接種後13日目の組織で初めて細胞間隙にのみ多数の細菌が認められた (Fig. 8)。細菌が隣接する細胞の葉緑体やミトコンドリアの基本的構造が不明瞭になっていた (Fig. 8)。また、細胞全体の電子密度が高くなった壊死細胞や原形質分離を起こした壊死細胞もしばしば観察されるようになった (Fig. 8, 9)。細胞間隙に細菌が認められない組織においても葉緑体の崩壊はなお一層進み、典型的なチラコイド構造は認められず、グラナ起源と思われる電子密度の高い紡錘形の構造物が認められるようになった (Fig. 10)。

接種後18日目の組織では細胞間隙に認められる細菌数は極めて多く、細菌が激しく増殖していることを示唆していた (Fig. 12)。多数の細菌が認められる細胞間隙は膨潤し、その結果として細胞が変形していた (Fig. 12)。細菌の存在が認められない組織においては、葉緑体がミトコンドリアやマイクロボディを取り囲んでいる像がしばしば観察されるようになった (Fig. 13)。崩壊が最も進んだ葉緑体においては、構造物は全く認められず、好オスミウム性顆粒が多数存在していた (Fig. 14)。なお、この時期のハロー病斑は完全に黄化していた。

接種後30日目の組織は接種後18日目の組織と際立った差は認められなかった。なお、蒸留水を接種した葉を対照とし、接種後5, 8, 13および13日目の電子顕微鏡像をそれぞれFig. 3, 5, 7, 11に示した。いずれも細胞に異常は認められず、葉緑体のグラナ、チラコイド構造は正常であり、澱粉粒もよく形成されていた。

考 察

葉組織内の細菌の増殖とハロー病斑形成との間には密接な関係が認められた。接種部位の周辺がわずかに黄化し始める接種後8日目頃までは、細菌数の増加はゆるやかであったが、ハロー病斑が急激に拡大し、黄化の程度が激しくなる13日目にかけては細菌数も急激に増加していた。その後の病斑の拡大は極めてゆるや

かであり、その間の細菌数の増加もまたゆるやかであった。

ハロー病斑の形成過程を経時的に電子顕微鏡観察した結果、葉緑体の構造的変化が最も顕著であった。接種後5日目の葉には全く病徴は認められなかったが、葉緑体には既に変化の兆しが見られた。ハロー病斑が出現し、更に黄化、拡大していく8日後から13日後にかけて、細菌に囲まれた多くの細胞は壊死を起こし、細胞間隙に細菌が認められない組織においても葉緑体の構造的変化が著しく、正常なグラナやチラコイド構造は全く認められないようになっていた。接種後18日目以降の葉緑体には多数の好オスミウム性顆粒が認められ、崩壊の程度が進んでいることを示しており、その機能を全く果していないようであった。このようにして感染中心部の細胞間隙で細菌が増殖し、その周辺細胞の葉緑体の崩壊を誘発することにより、退緑し、黄色のハロー病斑が形成されるものと推察された。

以上の電子顕微鏡観察の結果から葉緑体の崩壊には病原菌の産生する毒素が重要な働きをするものと思われる。タブトキシン¹⁾、ファゼオロトキシン²⁾およびコロナチン³⁾の産生性を調べたが、いずれも陰性であり、今後、本菌が産生する毒素について更に検討する必要があると思われた。

要 約

Pseudomonas syringae pv. *eriobotryae* はビワがんしゅ病の病原細菌であり、本菌の一つの系統はビワ葉にハロー病斑を作る。電子顕微鏡によりハロー病斑の形成過程を調べた結果、主として葉緑体の微細構造に変化を生じていた。接種5日後、目に見える病徴は認められなかったが、既に、ある細胞の葉緑体では崩壊が起こり始めていた。接種後8日から13日目にかけて、黄緑色のハロー病斑が現れ、さらに拡大し、黄化の程度が激しくなった。この時期の葉組織では細胞間隙に多数の細菌が観察され、種々の程度の葉緑体の崩壊が観察された。接種18日後にはハロー病斑は黄色になっており、最も崩壊の進んだ葉緑体が観察されるようになっていた。

キーワード： ビワがんしゅ病菌、ハロー病斑、
微細構造

引用文献

- 1) Mingtan, L., Morin, C.W. and Weigle, C.G. : Two strain of *Pseudomonas eriobotryae* isolated from loquat cankers in California. *Phytopathology* **62**, 310-313 (1972)
- 2) Wimalajeewa, D.L.S., Pascoe, I.G. and Jones, D. : Bacterial stem canker of loquat. *Australasian Plant Pathology* **7**, 33 (1978)
- 3) 森田 昭 : ピワがんしゅ病に関する研究第2報ピワがんしゅ病菌の色素産生性と病原性による系統類別. 日植病報, **44**, 6-13 (1978)
- 4) 森田 昭 : ピワがんしゅ病菌3系統の細菌学的性質の比較. 九州病害虫研究会報, **28**, 78-80 (1982)
- 5) Fahy, P.C. and Hayward, A.C. : Toxin bioassay ; in Plant bacterial diseases, ed. P.C. Fahy et al., P. 363-365, Academic Press Australila (1983)
- 6) 西山幸司 : ライグラス類かさ枯病細菌における病原性関連物質に関する研究. 農業技術研究所報告 C, **35**, 1-53 (1981)

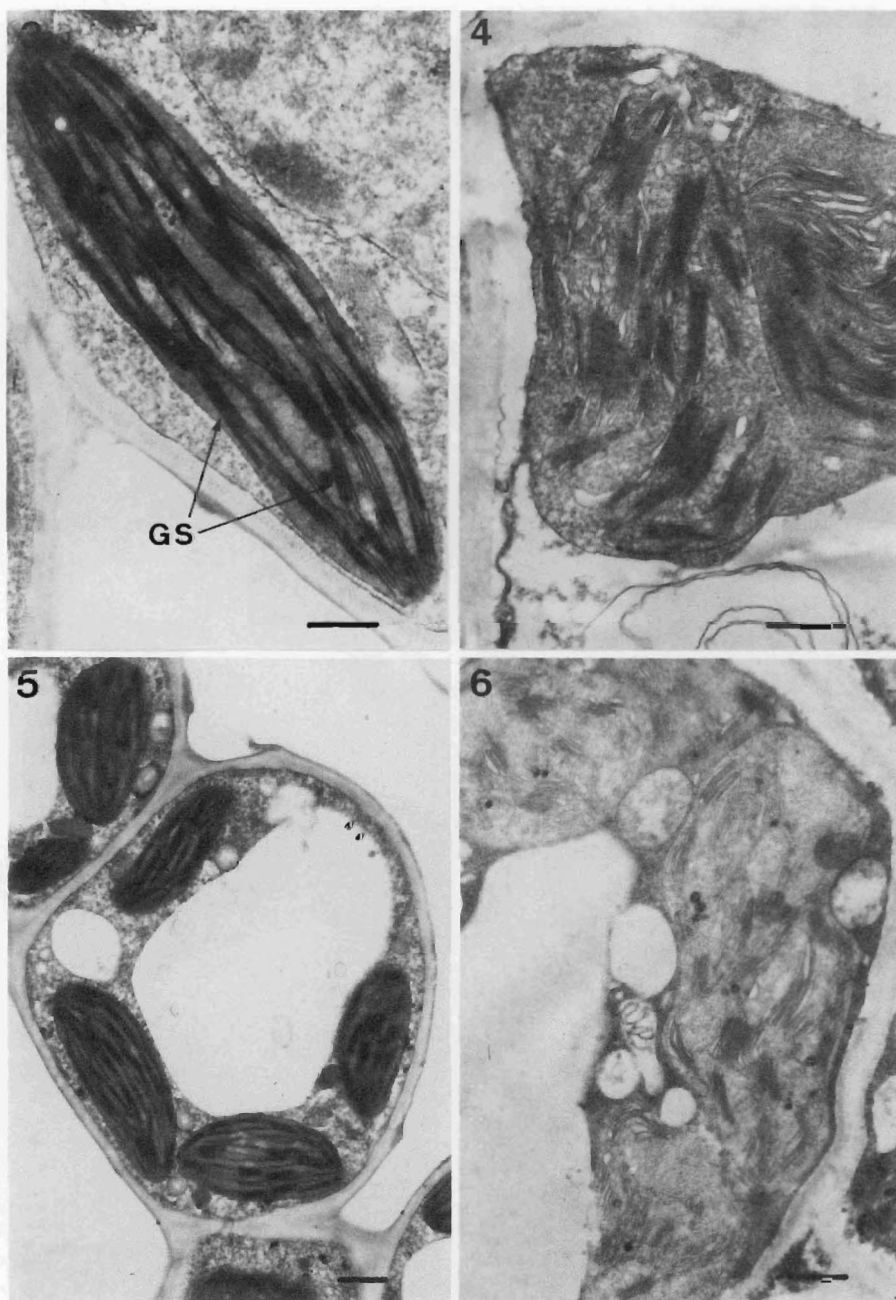


Fig. 3. Part of a mesophyll cell 5 days after inoculation with water. Chloroplast was regularly shaped and formed normal grana stacks (GS). Bar: $0.5\mu\text{m}$.

Fig. 4. Part of a mesophyll cell 5 days after inoculation with *P. syringae* pv. *eriobotryae* M8707. Degenerative changes of chloroplast occurred in some cells. Bar: $0.5\mu\text{m}$.

Fig. 5. Transverse section of leaves 8 days after inoculation with water. No effects were observed in mesophyll cells. Bar: $1\mu\text{m}$.

Fig. 6. Part of a mesophyll cells 8 days after inoculation with M8707. Degeneration of chloroplasts were observed in all cells. Bar: $0.5\mu\text{m}$.

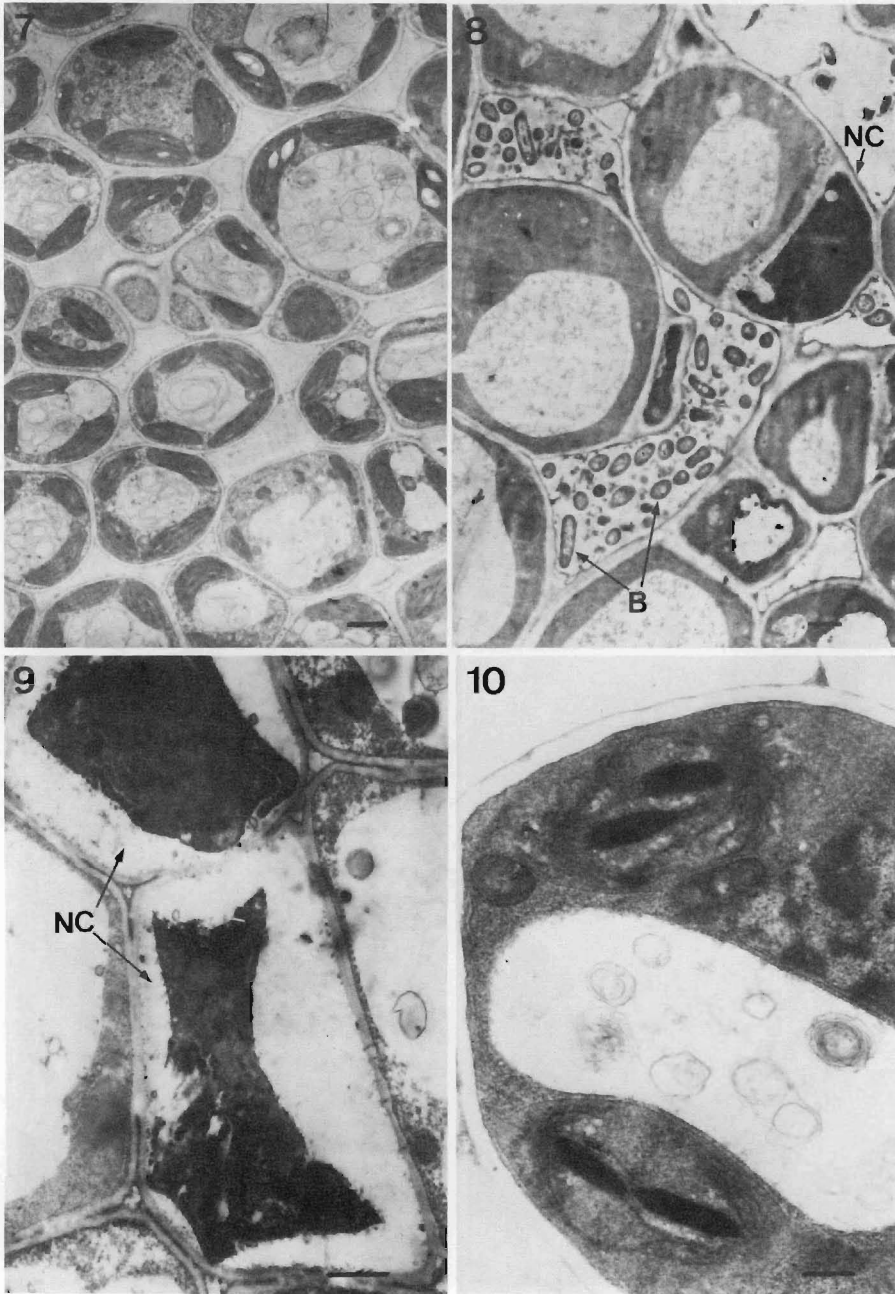
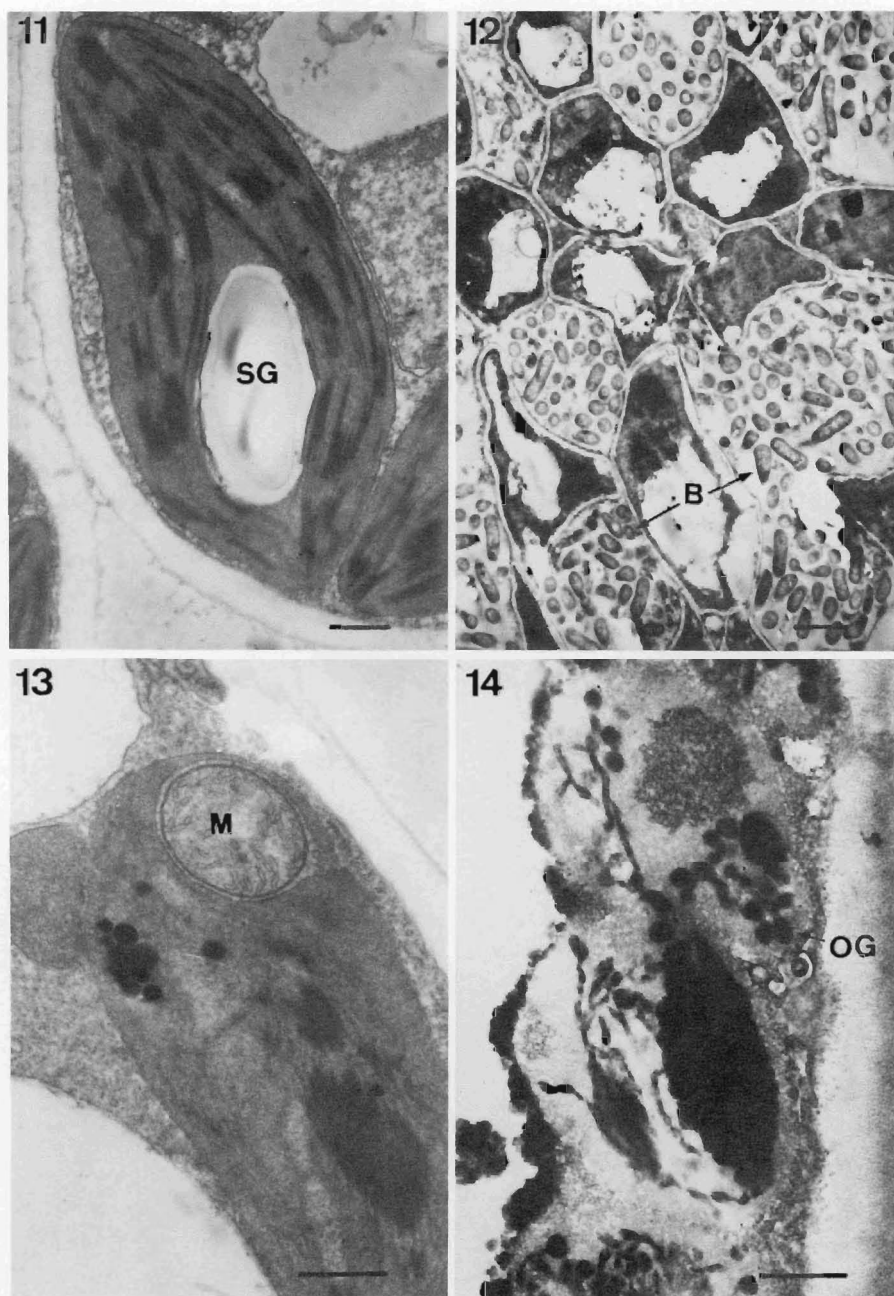


Fig. 7. Transverse section of leaves 13 days after inoculation with water. No effects were observed in cell contents. Bar : $2 \mu\text{m}$.

Fig. 8. Bacteria (B) in the intercellular spaces (13 days after inoculation with M8707). Bar : $1 \mu\text{m}$.

Fig. 9. Necrotic cells (NC) observed in mesophyll cells (13 days after inoculation with M8707). Bar : $1 \mu\text{m}$.

Fig. 10. Chloroplasts in advanced stage of degeneration. Detailed structure could not be seen (13 days after inoculation with M8707). Bar : $0.5 \mu\text{m}$.



- Fig. 11. Normal chloroplasts with starch grain (SG) (18 days after inoculation with water). Bar: $0.5 \mu\text{m}$.
- Fig. 12. Multiplied bacteria (B) in the intercellular spaces and collapsed host cells (18 days after inoculation with M8707). Bar: $2 \mu\text{m}$.
- Fig. 13. Mitochondrion (M) enclosed in chloroplast (18 days after inoculation with M8707). Bar: $0.5 \mu\text{m}$.
- Fig. 14. Chloroplast in the most advanced stage of degeneration and accumulated osmiophilic granules (OG) (18 days after inoculation with M8707). Bar: $0.5 \mu\text{m}$.