

非親和性がんしゅ病菌のビワ葉への 継代接種による病原性の獲得*

森田 昭**
(長崎県果樹試験場)

Acquisition of pathogenicity of incompatible isolate of loquat canker bacterium, *Pseudomonas syringae* pv. *eribotryae*, by repeated inoculation to loquat leaves. Akira Morita** (Nagasaki Fruit-Tree Experiment Station, Omura 856-0021, Japan)

Abstract

Three different incompatible isolates (showing severe, moderate and weak pathogenicity to loquat twigs) of A group of *Pseudomonas syringae* pv. *eribotryae*, the causal bacterium of loquat canker, showed a change of virulence by repeated inoculation to loquat leaves 62, 71 and 117 times, respectively. A negative correlation was detected between the severity of disease on twigs caused by the incompatible isolates and the number of repeated inoculations for acquisition of pathogenicity. The three variant isolates formed similar necrotic lesions without haloes on the leaves. Necrotic and halo lesions were formed on the leaves by mixed inoculation with a bacterial suspension of the variant and the original isolate. No difference in the pathogenicities of the variant isolates to shoots and buds was found in comparison with those of the original isolates 6 months after acquisition of pathogenicity. The phage reaction and bacterial properties of the variant isolates were not different from those of the original isolate.

Key words : pathogenic variation, *Pseudomonas syringae* pv. *eribotryae*, loquat canker

緒 言

ビワがんしゅ病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *eribotryae*) は PSA 培地上での色素産生性と病原性によって A, B, C の 3 グループに類別⁵⁾される。これらの 3 グループ菌はいずれも枝と芽には病原性を示すが、葉に対しては B グループ菌のみが病原性を有し、A, C グループ菌は病原性を示さない。このように同種の病原菌の中で、あるグループの菌だけが同一植物の中で寄生部位を異にし、接種しても部位によっては発病しないという、他の植物病原細菌ではあまり知られていない現象が本病原細菌では認められている。

本報告は、ビワがんしゅ病菌の 3 グループ菌の中で、

葉に大型のハロー病斑を形成せず、また、褐色色素を產生しない A グループ菌株を、ビワ葉に継代接種を繰り返すことによって、葉に対して病原性を獲得するという現象を実証したものである。この病原性を獲得した菌株を変異菌株と称することにし、ここでは変異菌株の病原性、ファージ親和性および細菌学的性質について原菌株と比較検討した。

本研究を遂行するに当り、終始御教示と論文の校閲を賜った佐賀大学名誉教授野中福次博士に深甚なる感謝の意を表する。

材 料 お よ び 方 法

1. ビワ葉に対する原菌株の継代接種法

供試菌として A グループの原菌株のうちの 3 菌株 [NAE-39 : ビワ品種茂木の枝に対する病原性強 (発病度⁵⁾ 82.7), NAE-99 : 枝に対する病原性弱 (発病度 23.6), NAE-109 : 枝に対する病原性中 (発病度 50.7)] を用い、PSA 培地⁵⁾で 48 時間培養した後、菌濃度 10^8 cfu/ml になるように滅菌水で調整した菌液を接種源

*本試験は 1972 年～1975 年に長崎県果樹試験場で実施したものである。

**現在長崎県総合農林試験場東彼杵茶業支場

Present address: Nagasaki Agricultural and Forestry Experiment Station, Higashisonogi Tea Branch, Higashisonogi gun, Nagasaki 859-3801, Japan.

とした。接種には、茂木種2年生実生ビワ10樹を用い、それらの樹の葉令VI¹⁾の葉1枚を選び、昆虫針4号で1葉当たり10か所に傷を付けたあと、それらを各菌液に15秒間浸漬して行った。接種後、供試樹全体をビニールフィルムで被覆し、24時間・25℃で湿室状態に保ち、その後25℃のガラス室に隔離した。接種部位からの菌の再分離は、接種24時間後に、接種したビワ10樹中の5樹の1葉よりそれぞれ2接種孔ずつリーフパンチで打ち抜き、合計10個の切片を取り、これを磨碎し、流し込み分離法で行った。残り5樹は病斑発現の有無を検定するためにガラス室内に保存した。その後の再接種と再分離の反復は、再分離した菌を培養して48時間後に現れた10コロニーを混合して、接種および分離と同じ方法を繰り返すことによって行った（これを継代接種という）。この反復接種によってビワ葉に病原性を獲得した変異菌株を得ることが出来た。さらに、この変異株の病原性の強弱および病徵を知るために、葉に大型ハロー病斑を形成するビワがんしゅ病Bグループ菌の病斑と比較した。すなわち、両菌株をそれぞれ16~12×10⁸cfu/mlに調整した菌液各500mlを混合し、濃度10⁸cfu/mlの菌液1,000mlを作り、その菌液中に品種茂木の葉令VIの葉を15秒間浸漬して無傷接種し、接種後に形成される病斑の形状を検討した。また、変異菌株接種によりえぞ状の小型ハロー病斑を形成したビワ樹をガラス室内に隔離し、次季節葉が硬化するまで約30日間その樹体に毎日5分、約20mmの散水を行い、新たに伸長した次季節葉における病斑形成の有無を調べ、接種病斑からの二次感染の有無を検討した。

2. ビワがんしゅ病変異菌株が獲得した病原性の持続期間の検定法

21×200mmの錐栓試験管にPSA培地を15ml注入して高層状にした培地を用いた。その培地上に、葉に対して病原性を獲得したビワがんしゅ病変異菌株を移植し、25℃の定温器で培養・保存した。保存菌は3か月および6か月後にPSA培地に移植して増殖させ、再度前述の方法でビワ葉に接種し、病原性の有無を検定した。

3. ビワがんしゅ病変異菌株のファージ親和性および細菌学的性質の検定法

ビワがんしゅ病菌ファージの3グループ(EP₁, EP₂, EP₃ファージ)³⁾を用い、前記の原菌株、変異菌株、EP₂ファージ親和性菌(NAE-1)およびEP₃ファージ親和性菌(NAE-34)についてdrop method³⁾でファージ親和性の検定を行った。また、変異菌株の細菌学的性質は一般に用いられている方法に準拠⁴⁾して、原菌株を対照として行った。菌体内におけるポリ-β-ヒドロキシ酪

酸の集積はBurdon¹⁾の方法に準拠し、スタンブラックBおよびサフラン溶液で染色した後、顕微鏡下で判定した。ゼラチンの液化以外はすべて25~27℃の恒温器内で行った。

結果

1. ビワ葉に対する非親和性がんしゅ病菌の継代接種による病原性の獲得

ビワ葉に親和性を示さないビワがんしゅ病Aグループ菌をビワ葉に継代接種することによって、ビワ葉に親和性を示すようになることが確認された。病原性獲得に要する接種回数は枝に対する病原性の強弱と相関があり、強い病原性のNAE-39菌株は62回で葉に病原性を獲得したのに対し、中程度のNAE-109菌株は71回、弱いNAE-99菌株は117回を要した（Table 1）。葉に病原性を獲得した変異菌株はBグループ菌が形成するような大型ハロー病斑とは異なり、穿孔性のえぞ状の小型ハロー病斑を形成した。しかし、枝、芽に対しては原菌株と同じ病斑を形成した。また、変異菌株と大型ハロー病斑を形成するBグループ菌株をビワ葉に混合接種すると、上述のような明らかに異なる2種の病斑を同一葉上にそれぞれ形成した（Fig. 1）。

2. ビワがんしゅ病変異菌株の病原性の持続性

ビワがんしゅ病Aグループ菌の変異菌株の葉への病原性は獲得して3か月および6か月後も持続しており、



Fig. 1 Two types of lesions on a loquat leaf formed by mix-inoculation with a variant isolate produced by repetited inoculation of an incompatible isolate of A group of *Pseudomonas syringae* pv. *eribotryae* and an isolate of compatible group B.

A : Necrotic lesions formed by inoculation with the variant isolate of incompatible group A.

B : Halo lesions formed by inoculation with the original isolate of a compatible group B.

Table 1. Relationship between number of repeated inoculations of incompatible isolates of group A of *P. syringae* pv. *eriobotryae* for acquisition of pathogenicity to loquat leaves and degree of disease severity of original isolate to loquat twigs.

Item	Isolate		
	NAE-39	NAE-109	NAE-99
Repetition times of inoculation with original isolates for acquisition of pathogenicity to loquat leaf	62	71	117
Degree of disease severity of original isolates on loquat twig	Severe	Moderate	Weak

Table 2. Persistence of pathogenicity of variant isolates of A group of *P. syringae* pv. *eriobotryae*

Variant	Pathogenicity after		Secondary infection
	3 months	6 months	
NAE-39	+	+	+
NAE-99	+	+	+
NAE-109	+	+	+

a) + : Pathogenicity, - : Not pathogenicity

えそ状の小型ハロー病斑を形成した (Table 2)。また、接種葉の病斑と同一の病斑を次季節葉にも形成した。

3. ビワがんしゅ病変異菌株のファージ親和性および細菌学的性質

ビワがんしゅ病変異菌株のファージ親和性は原菌株のファージ親和性と一致して, EP₁ ファージのみに親和性を示し, EP₂, EP₃ ファージには親和性を示さず, 変異菌株のファージに対する親和性の変異は認められなかった (Table 3)。また, 変異菌株の細菌学的性質も原菌株と全く差がなく, 同じ性質を示した (Table 4)。

Table 3. Phage susceptibility of original isolates of group A, B, C and variant isolates of group A of *P. syringae* pv. *eriobotryae*

Phage	Group A			Group B		Group C	
	NAE-39 ^{a)}	NAE-99 ^{a)}	NAE-109 ^{a)}	NAE-1 ^{a)}	NAE-34 ^{a)}		
	I ^{b)}	II ^{c)}	I ^{b)}	II ^{c)}	I ^{b)}	II ^{c)}	
EP ₁	+	+	+	+	+	+	-
EP ₂	-	-	-	-	-	-	+
EP ₃	-	-	-	-	-	-	+

a) Isolate number

b) Original isolate

c) Variant isolate

d) + : Susceptible, - : Not susceptible

考 察

ビワがんしゅ病はビワ葉に対する病原性と PSA 培地での褐色色素産生性によって A, B, C, の 3 グループに分けられ, A グループ菌はビワ葉に病原性を示さないこ

とを先に報告した⁵⁾。そこで、葉に病原性を示さない A グループ菌 3 菌株をビワ葉に継代接種を繰り返すことにより、3 菌株のいずれも葉に病原性を示すようになった。しかし、その病斑は B グループ菌のような大型のハロー病斑でなく、えそ状の小型ハロー病斑であった。その病斑から再分離された細菌は葉に前と同様のえそ状の小型ハロー病斑を形成し、病原性獲得 6 か月後でも葉にえそ状の小型ハロー病斑を形成した。さらに、変異菌株の接種によって形成された病斑と同一の病斑が次季節葉にも形成されることから、変異菌株が獲得したえそ状の小型ハロー病斑形成能は安定していることが明らかとなった。また、原菌株が葉に対する病原性獲得に要する接種回数は枝に対する病原性の強弱と密接な相関関係があり、枝に対する病原性が強い菌株は葉に対する病原性の獲得に要する接種回数が少ないのでに対して、病原性の弱い菌株は接種回数が多く、両者の間に逆相関がみられた。一方、変異菌株は枝や葉に対する病原性には原菌株と差異はみられず、さらに、ファージ親和性および細菌学的性質においても原菌株と同一であった。これらのことから、この変異菌株は葉に対する病原性に変異がみられるのみで、他の性質は変化することなく安定していることがわかった。

これらの現象は脇本⁹⁾によって報告されているイネ白葉枯病菌が病原性を示さないイネ抵抗性品種に継代接種することによって抵抗性品種にも病原性を示すようになると述べている現象と類似している。脇本はこの現象を彷徨変異によるものであろうと考察している。本試験において原菌株が継代接種で葉に病原性をもつようになったことも彷徨変異によるものかどうか、原菌株と変異菌株の遺伝子構造を比較検討する必要がある。また、上運天²⁾によるとビワがんしゅ病の C グループ菌は 85Mdal プラスミドが欠落すると枝に対して病原性を失い、病原性の成立にはこのプラスミドの保有が必要であることを報告している。佐藤ら^{6,7)}はクワ縮葉細菌病菌にはハロー病斑形成菌株とえそ病斑形成菌株があり、これらの菌株からプラスミドの検出を行い、ハロー病斑形成菌株はいずれも最大プラスミドを共通して所有し、こ

Table 4. Bacterial characteristics of original and variant isolates of A group of *P. syringae* pv. *eribotryae*.

Characters	Original isolate			Variant isolate		
	NAE-39	NAE-99	NAE-109	NAE-39	NAE-99	NAE-109
Reducing substance from						
Sucrose	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+
No. of flagella	1~7	1~7	1~7	1~7	1~7	1~7
Gram reaction	-	-	-	-	-	-
Poly-β-hydroxybutyrate	-	-	-	-	-	-
Fluorescent pigment	-	-	-	-	-	-
Pyocyanine	-	-	-	-	-	-
Growth at 41°C	-	-	-	-	-	-
Levan formation from sucrose	+	+	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-	-
Oxidase reaction	-	-	-	-	-	-
Hydrolysis of						
Gelatin	-	-	-	-	-	-
Starch	-	-	-	-	-	-
Carbon sources for growth :						
Glucose	+	+	+	+	+	+
Trehalose	-	-	-	-	-	-
2-Ketogluconate	-	-	-	-	-	-
meso-Inositol	+	+	+	+	+	+
Geraniol	-	-	-	-	-	-
L-Valine	-	-	-	-	-	-
β-Alanine	-	-	-	-	-	-
DL-Arginine	-	-	-	-	-	-
Potato soft rot	-	-	-	-	-	-

の病斑形成にはプラスミド支配の可能性があると述べている。そこで、ビワ葉に継代接種することにより葉にえそ状の小型ハロー病斑形成能を獲得したがんしゅ病Aグループ変異菌株がそのプラスミドに変化をきたしているかどうかについて検討することは興味ある問題である。

摘要

ビワ葉に非親和性のがんしゅ病Aグループ菌3菌株をビワ葉に62~117回継代接種を行うことにより、いずれの非親和性菌もビワ葉に対し病原性を獲得し、葉にえそ状の小型ハロー病斑を形成するようになることが確認された。このとき、非親和性菌の病原性獲得に要する接種回数と枝に対する病原性の強弱とには逆相関がみられた。この変異菌株は葉にえそ状の小型ハロー病斑を形成するが、変異菌株とハロー病斑形成のBグループ菌株とを混合接種すると、同一葉上にそれぞれの病斑を形成した。この変異菌株の枝、芽に対する病原性は原菌株と同

じであり、その病原性は病原性獲得6か月後にもみられた。また、変異菌株のファージ反応および細菌学的性質は原菌株と同じであった。

引用文献

- Burdon, K. L. (1946). J. Bacteriol. 52: 665-678.
- 上運天 博(1990). *Pseudomonas syringae* pv. *eribotryae* のプラスミドの欠落に伴う病徵の変化. 日植病報 56: 645-650.
- 森田 昭 (1974). ビワがんしゅ病に関する研究第1報 ビワがんしゅ病菌ファージの寄生性と形態. 日植病報 40: 401-411.
- 森田 昭 (1975). ビワがんしゅ病菌の葉への感染発病時期. 九病虫研会報 21: 118-120.
- 森田 昭 (1978). ビワがんしゅ病に関する研究第2報 ビ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.

6. 佐藤 守・B. J. Staskawicz and N. J. Panopoulos (1981). クワ縮葉細菌病および野火病における伝達性プラスミドの検出. 日植病報 47: 395 (講要).
7. 佐藤 守 (1988). 植物内における *Pseudomonas syringae* pv. *atropurpurea* の病原性遺伝子の菌株間移行. 日植病報 54: 20-24.
8. 富永時任 (1971). 日本における牧草および飼料作物の病害に関する研究・II 日本における牧草および飼料作物の細菌の病原学的研究. 農技研報告 C. 25: 205-306.
9. 脇本 哲・吉井 甫 (1954). 稲白葉枯病菌に於て抵抗性罹病性両水稻品種を通過させて起こる寄生力の変化. 九州大学学芸雑誌 14: 479-484.

(2000年4月30日受領；8月3日受理)