

## ビワがんしゅ病菌接種ビワ葉病斑部から抽出される 二種のファイトアレキシンの経時的消長とその抗菌性

森田 昭<sup>1)</sup>\*・野中 福次<sup>2)</sup>

(<sup>1)</sup> 長崎県果樹試験場・<sup>2)</sup> 九州病害虫防除推進協議会)

**Two phytoalexins extracted from leaf lesions of loquat canker and their inhibition of plant bacteria.** Akira Morita <sup>1)</sup>\* and Fukuji Nonaka <sup>2)</sup> (<sup>1)</sup> Nagasaki Fruit-Tree Experiment Station, Omura, 856-0021, Japan. <sup>2)</sup> Kyushu Plant Protection Association, Fukuoka, 810-0001, Japan.)

Aucuparin, one of the phytoalexins produced by the loquat tree (*Eriobotrya japonica*), started to accumulate in the leaves simultaneous with the formation of lesions produced by inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *eriobotryae* a compatible pathovar, and disappeared when the lesions stopped enlarging. In contrast, eriobofuran, another phytoalexin, started to accumulate in the lesion simultaneous with the disappearance of the aucuparin. In the case of inoculation with *P. syringae* pv. *tabaci*, an incompatible pathovar, aucuparin started accumulating in the inoculated leaf (on which lesions did not form), from one day after the inoculation, but eriobofuran did not accumulate in the 60-days following inoculation. Aucuparin more strongly inhibited the multiplication of the incompatible bacterium than eriobofuran did. The inhibitory action of eriobofuran against the compatible bacterium was stronger than that of aucuparin. These results suggest that aucuparin participated in both intrusion and infection of the pathogen, while eriobofuran inhibited lesion enlargement in the host-parasite interaction.

**Key word :** loquat canker, phytoalexin, *Pseudomonas syringae* pv. *eriobotryae*, resistance

### 緒 言

ビワ葉および枝韌皮部に植物病原細菌を接種すると、ビワのファイトアレキシンの一種である aucuparin が接種部位に生成されることを先に報告した(森田ら, 1983; 野中ら, 1982; Watanabe et al, 1982)。この場合、aucuparin の生成は非親和性菌を接種した場合には接種直後から、親和性菌の場合には病斑形成時から、それぞれみられることがわかった(森田ら, 1983)。しかし、病斑形成後の褐変した慢性型病斑からは aucuparin と異なるファイトアレキシンの一種である eriobofuran が検出されることを先に報告した(Miyakado et al, 1985)。

本実験は植物病原細菌を用いて、ビワ葉に親和性のあるがんしゅ病菌と非親和性細菌であるタバコ野火病菌を接種した場合、接種葉内に生成される前記二種のファイト

アレキシンを経時的に抽出・定量して、これら二種のファイトアレキシンの本病抵抗性に働く役割について考察を加えたものである。

### 材料および方法

#### 1. 供試ビワ葉

品種茂木を用い、ポット栽培3年生樹の葉齢VI(森田, 1975)(成葉に対してその葉長が60%)の着生葉を用いた。

#### 2. 供試細菌と接種法

ビワ葉に病原性を示すビワがんしゅ病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *eriobotryae*)のBグループ菌(菌株番号 NAE-1:品種茂木の葉病斑より1972年3月25日分離)と非親和性細菌であるタバコ野火病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*:九州大学農学部植物病理学教室保存菌株)のストレプトマイシン耐性菌株を用いた。菌接種はビワ着生葉に昆虫針(4号)で1葉当たり18か所付傷し、これを細菌懸濁液(10<sup>7</sup>cfu/ml)

\*現在 長崎県立農業大学校

\*Present address: Nagasaki Agricultural College, Isahaya, 854-0062, Japan.

に30秒間浸漬し、25℃の温室内で15時間温室状態に保った後、25℃の人工気象室内においた。

### 3. 接種葉に形成された病斑の大きさの測定

菌接種後8～60日目（8, 14, 19, 24, 29, 34, 44, 49, 55, 60日目）にかけて、形成された病斑の直径を、1葉当たり10個、3葉を測定し、その平均値で示した。

### 4. 接種細菌の葉内における経時的菌量の定量法

接種後1, 4, 8, 14, 19, 24, 29, 34, 44, 49, 55, 60日目に、次のようにして葉内菌量を測定した。それぞれの接種葉を経時的に採取した後、70%エタノール液で表面殺菌し、有傷接種部位10か所を径8mmのリーフパンチで打ち抜き、殺菌水10mlと共に磨砕した液を段階希釈し、これを10ppm 硫酸ストレプトマイシン含有脇本培地〔ジャガイモ（300g）煎汁、硝酸カルシウム5g、シヨ糖15g、蒸留水1,000ml、pH7.0〕に加え、平板培養法により細菌の定量を行った。

### 5. ピワ葉からのファイトアレキシンの抽出・定量法

ピワ葉に親和性のあるピワがんしゅ病菌（前記と同じNAE-1）と非親和性細菌であるタバコ野火病菌（前記と同じ）を前述の方法で接種し、接種後菌量測定時と同時に葉接種部位を径8mmのリーフパンチで打ち抜き10gを採取して、aucuparinおよびeriobofuranの抽出を既報（野中ら、1982）に準拠して行った。抽出物を2mlの純エタノールに溶かして薄層クロマトグラフィーで純化を行い、それぞれ最終的に0.2mlの原液とした。また、その紫外線吸収曲線によりaucuparinとeriobofuranを確認し、その吸光度から生成量を測定して、その量を $\mu\text{g/g}$ （生重）で表示した。

### 6. Aucuparin と eriobofuran の抗菌性の測定法

#### 1) 平板培養によるコロニー形成阻害率測定法

50℃の溶解脇本培地9.7mlに、aucuparinとeriobofuranの前記原液をそれぞれ0.2mlとり、これに検定細菌の浮遊液0.1ml（細菌濃度 $10^3\text{cfu/ml}$ ）を加えて全量を10mlとし、これを直径9cmのペトリー皿に流し込み、25℃で5日間培養し、次式により阻害率を求め、aucuparinおよびeriobofuranの検出量の経時的な比較を行った。なお、対照培地として脇本培地9.8mlに純エタノール0.2mlを加えたものを用いた。

$$\text{コロニー形成阻害} = 1 - \frac{\text{ファイトアレキシン粗抽出液添加培地の集落数}}{\text{対照培地の集落数}} \times 100$$

#### 2) 液体培養による抗菌活性の測定法

前記と同様に親和性細菌であるピワがんしゅ病菌と非親和性細菌であるタバコ野火病菌および*Pseudomonas flagi*（九州大学農学部植物病理学教室保存菌株）をそれ

ぞれ菌濃度が $10^7\text{cfu/ml}$ になるように脇本液体培地で調整した。一方、aucuparinとeriobofuranをエタノールにそれぞれ溶解し、それらの0.2mlを前に調整した脇本液体培地9.8mlに添加して全量を10mlとし、最終濃度がaucuparinは166ppm、eriobofuranは144ppmになるように調整した。この溶液を25℃で24時間振とう培養し、コロニーカウント法（森田ら、1983）で菌量を測定した。対照としてはエタノール含量2%脇本液体培地を用いた。

## 結 果

### 1. ピワがんしゅ病菌接種ピワ葉における病斑形成と接種部位から検出されるファイトアレキシンの経時的消長

ピワ葉に親和性のあるピワがんしゅ病菌（NAE-1菌株）を接種後、接種葉に形成された病斑の大きさ、検出されるファイトアレキシン（aucuparinとeriobofuran）量を経時的に測定した結果がFig.1である。菌接種葉に病斑が肉眼で明確に確認できたのは菌接種後8日目で、その後14, 19日目と次第に病斑は拡大し、24日目には直径5mmに達するが、その後の病斑拡大は僅かで、菌接種60日目には約5.5mmであった。ファイトアレキシンの検出についてみると、aucuparinは菌接種14日目に $0.32\mu\text{g/g}$ 検出され、さらに19日目には増加して $0.57\mu\text{g/g}$ に達したが、病斑の拡大がほとんど停止した24日目には検出されなくなった。これに対して、eriobofuranは病斑が現れても検出されず、病斑拡大停止の菌接種24日目になって $0.64\mu\text{g/g}$ 検出され、それ以後は時間の経過とともに増加して、39日目には最高の $1.33\mu\text{g/g}$ に達した。その後は漸減するが、60日目でも $1.0\mu\text{g/g}$ 検出された。

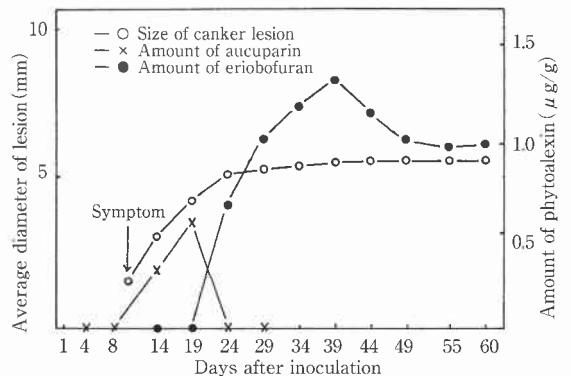


Fig. 1. Size of lesions formed and amount of phytoalexins (aucuparin and eriobofuran) accumulated on loquat leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *eriobotryae*

## 2. ビワがんしゅ病菌接種葉における細菌量および接種部位から検出されるファイトアレキシンの経時的消長

Fig. 2に示すとおり、ビワがんしゅ病菌をビワ葉に接種して、接種部位の菌量の消長を追跡した結果、菌接種後1日目は $10^2$ cfu/mlであったが、病斑形成がみられる8日目には $5 \times 10^4$ cfu/mlと増殖し、14日目には更に増殖して $10^7$ cfu/mlに達し、その後は60日目まで大きな変動はみられず、60日目は $2 \times 10^7$ cfu/mlであった。

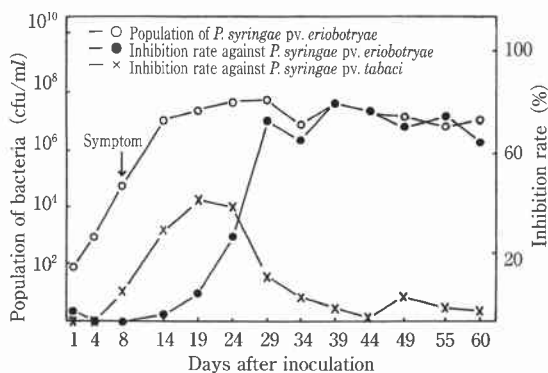


Fig. 2. Multiplication of *Pseudomonas syringae* pv. *eriobotryae* in the inoculated loquat leaves and rates of inhibition of *P. syringae* pv. *eriobotryae* by an extract from the leaves inoculated with *P. syringae* pv. *eriobotryae*

菌接種葉に生成されたファイトアレキシンを抽出し、その抗菌活性を増殖阻害効果により経時的に検討した。その結果、ビワがんしゅ病菌に対しては、接種後14日目まではほとんど増殖阻害効果がみられないが、19日目以降は急に増大し、29日目には阻害率は70%以上に達し、それ以降は大きな変動はなく、60日目でも60%以上の阻害率を示した。これに対し、タバコ野火病菌に対する阻害作用は、接種8日目から明確に現れて、その後急増し、19日目には阻害率は40%に達したが、その後は急速に減少し、44日目にはわずかで、その後もこの状態が続いた。

## 3. タバコ野火病菌接種ビワ葉から検出されるファイトアレキシンの経時的消長

タバコ野火病菌を接種した場合は病斑の形成はみられないが、Fig. 3に示すとおり、接種したタバコ野火病菌は接種して8日目に最高の $3 \times 10^8$ cfu/mlとなり、その後は漸減し、44日目にはほとんど検出されなくなった。一方、葉からファイトアレキシンを抽出すると、aucuparinが接種後1日目から検出され、4日目に最高の $1.62 \mu\text{g/g}$ に達し、29日目まで漸減するが、それ以降は急速に減少し、44日目には検出されなくなった。

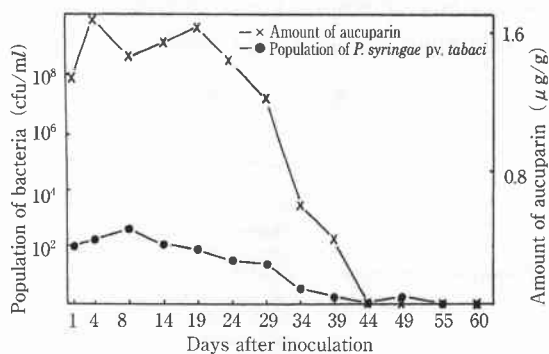


Fig. 3. Relationship between the multiplication of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* and the amount of aucuparin in loquat leaves inoculated with *P. syringae* pv. *tabaci*

菌接種葉からのファイトアレキシ抽出液がタバコ野火病菌に示す抗菌性はFig. 4に示すとおりである。菌接種1日目で約60%という高い阻害率を示し、4日目には最高値の99%に達して、その後は漸減し、特に29日目以降は急減して、39日目には阻害率は11%となり、その後も60日目まで低下した。これに対し、同じファイトアレキシ抽出液のビワがんしゅ病菌に対する阻害率は、接種1日目から16%みられ、14日目まで同じ傾向であったが、19日目以降はほとんど阻害を示さなかった。

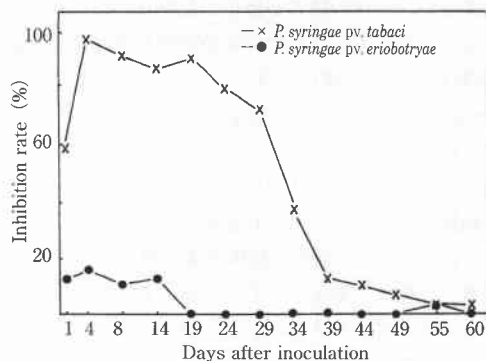


Fig. 4. Inhibition of *Pseudomonas syringae* pv. *eriobotryae* and *P. syringae* pv. *tabaci* by phytoalexin produced in loquat leaves inoculated with *P. syringae* pv. *tabaci*

## 4. Aucuparinとeriobofuranの細菌に対する抗菌性の比較

Table 1に示すように、aucuparin 166ppm液はビワ葉に親和性細菌のビワがんしゅ病菌の増殖をほとんど阻害しなかったが、非親和性細菌のタバコ野火病菌および*P. flagi*は阻害した。一方、eriobofuran 144ppm液はビワ

がんしゅ病菌の増殖を阻害したが、非親和性菌であるタバコ野火病菌や *P. fragi* はほとんど阻害しなかった。

### 考 察

Table 1. Antibiotic activity of aucuparin and eriobofuran against bacteria on media

Bacteria tested	Phytoalexin tested <sup>a)</sup>	Incubation time(hr)	
		0	24
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>eriobotryae</i>	control <sup>b)</sup>	$6.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^9$
	aucuparin <sup>c)</sup>	do.	$7.2 \times 10^9$
	eriobofuran <sup>d)</sup>	do.	$2.4 \times 10^7$
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	control <sup>b)</sup>	$6.0 \times 10^7$	$5.4 \times 10^9$
	aucuparin <sup>c)</sup>	do.	$9.0 \times 10^7$
	eriobofuran <sup>d)</sup>	do.	$9.7 \times 10^8$
<i>Pseudomonas fragi</i>	control <sup>b)</sup>	$5.0 \times 10^7$	$4.4 \times 10^9$
	aucuparin <sup>c)</sup>	do.	$8.4 \times 10^7$
	eriobofuran <sup>d)</sup>	do.	$5.5 \times 10^8$

- a) All test solutions contained 2 % ethanol.  
 b) Not containing phytoalexin.  
 c) Concentration of aucuparin : 166 ppm.  
 d) Concentration of eriobofuran : 144 ppm.

ピワ葉に親和性を有するピワがんしゅ病菌Bグループ菌を接種すると、前報(森田ら, 1983)と同様に、ピワのファイトアレキシンの一種である aucuparin が病斑形成後の14日目から検出されるようになり、その後生成量は高まるが、病斑の拡大が停止した24日目には検出されなくなった。一方、ピワ葉に非親和性のタバコ野火病菌を接種すると、病斑は形成されないが、接種直後から aucuparin が検出され、接種菌が検出されなくなるまで検出されるが、eriobofuran は全く検出されなかった。また、eriobofuran は親和性菌を接種して病斑が形成された後、病斑が拡大停止してから検出された。これらのことから、aucuparin の生成は病斑形成が絶対条件ではなく、ピワ葉上に生きた菌が生存して、常に葉に刺激を与えるという条件が必要であるのに対して、eriobofuran は病斑形成が必要条件と思われる。また、aucuparin と eriobofuran の抗菌性を比較すると、前者は親和性細菌に対する細菌増殖阻害率(抗菌性)は低くて非親和性細菌に対する細菌増殖阻害率(抗菌性)は高いのに対して、後者は親和性細菌の阻害率が高く、非親和性細菌の阻害率が低いと言う逆の抗菌性を示すことも明らかとなった。この現象は、ピワと同じバラ科のシャリンバイのファイトアレキシシンでも報告(Widyastuti et al, 1991)され、その結果と一致する。すなわち、シャリンバイに病原性を有するシャリンバイごま色斑点病菌(*Entomosporium mespili*)を接種したシャリンバイ葉

から、4-methoxyaucuparin と rhapsiolepsin の2種のファイトアレキシシンを抽出、同定し、前者は菌接種後1日目から検出され、6日目には最高に達した後漸減するのに対し、後者は菌接種後8日目から検出され、その後28日目まで漸増するとしている。さらに、その細菌増殖阻害率(抗菌性)についても、前者は親和性菌より非親和性菌が高く、後者は非親和性菌より親和性菌が高いと報告している。これらの結果は本実験結果と一致しているところも多いが、Widyastuti et al. (1991) はこれら2つのファイトアレキシシンと病斑形成および拡大停止との関連性については記述していない。これらのことから、aucuparin はピワ葉に親和性菌や非親和性菌などを問わず菌の攻撃を受けた場合に、これに反応して初めに検出されるファイトアレキシシンであり、その検出量は非親和性菌を接種した場合に1日目から多量にみられる(Fig. 4) ことからわかるように、親和性菌に対してよりも非親和性菌に対して、ピワ葉への侵入をより強く阻止するものと思われる。また、親和性菌を接種した場合は8日目になって初めて検出されることから、この間親和性菌は aucuparin の検出を阻止する働きをしていると想定される。一方、eriobofuran は aucuparin が生成された後、次に生成されるファイトアレキシシンであり、親和性菌の侵入感染によって病斑が形成された後、病斑の拡大が停止した時点から検出され、細菌増殖阻害率(抗菌性)は非親和性菌よりも親和性菌が高いことから、eriobofuran は病斑拡大阻止に大きく働いていると考えられる。これらの現象は、Oku et al. (1975) や Sirane et al. (1981) が、第1相のファイトアレキシシンは非親和性寄主での感染の成否に関与し、第2相のそれは親和性寄主での病斑拡大抑制に関与していると報告しているファイトアレキシシンの2相性の現象と類似している。しかし、Oku et al. (1975) の報告では感染初期から病斑形成、病斑拡大停止まで同一のファイトアレキシシンが抽出され、抵抗反応に関与するとしており、病斑拡大停止以降については記述していない。

本実験によって得られた結果から最も興味あることは、ピワ葉に親和性細菌を接種して病斑形成と同時に検出された初めのファイトアレキシシンである aucuparin が病斑拡大停止と共に消失し、これに代わって次のファイトアレキシシンである eriobofuran が検出されること、およびこの両ファイトアレキシシンは親和性菌と非親和性菌に対する抗菌性が逆になる現象である。両者が示す生成・消失過程とその抗菌スペクトルから aucuparin は eriobofuran の precursor ではないかとの想定もされ、両者の関係は今後の研究課題である。

## 摘 要

ビワ葉に親和性細菌であるビワがんしゅ病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *eriobotryae*) B グループ菌を接種すると、ビワのファイトアレキシンである aucuparin が病斑発現とともに検出されるが、病斑拡大停止時には消失し、これに代わって、eriobofuran が検出されるようになった。ビワ葉に非親和性細菌であるタバコ野火病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) を接種すると、病斑は形成されないが接種直後から aucuparin が検出され、eriobofuran は検出されなかった。これらのことから、aucuparin は病原菌の侵入・感染に、eriobofuran は病斑拡大阻止に関与していると考察した。

## 引用文献

- Miyakado, M., K. Watanabe, N. Ohno, F. Nonaka and A. Morita (1985) Isolation and structural determination of eriobofuran, a New dibenzofuran phytoalexin from leaves of loquat, *Eriobotrya japonica* L. J. Pesticide Sci. 10 : 101-106.
- 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・野中福次・牧角啓一 (1983) ビワがんしゅ病菌のビワ葉組織内での増殖と aucuparin 生成との関係. 日植病報49 : 587-592.
- 野中福次・牧角啓一・森田 昭 (1982) ビワのファイトアレキシン, aucuparin, の抗菌性について. 佐大農彙報53 : 27-36.
- Oku, H., S. Ouchi, T. Shiraishi, Y. Komoto and K. Oki (1975) Phytoalexin activity in barley powdery mildew. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 41 : 185-191.
- Shirane, N., T. Shiraishi, H. Oku and S. Ouchi (1981) Synthesis and degradation of pisatin in pea leaves inoculated with powdery mildew fungi. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 47 : 222-227.
- Watanabe, K., Y. Ishiguri, F. Nonaka and A. Morita (1982) Solution of aucuparin as a phytoalexin from *Eriobotrya japonica* L. Agric. Biol. Chem. 46 : 567-568.
- Widyastuti, S. M., F. Nonaka, K. Watanabe, E. Maruyama and N. Sako (1991) Accumulation and antifungal spectrum of raphiolepsin as a second new phytoalexin in *Rhaphiolepis umbellata* Makino. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 57 : 641-648.

(2003年5月1日受領; 7月14日受理)