

カンキツかいよう病菌の拮抗細菌(Pseudomonas sp.)接種カンキツ葉組織内に生成されたファイトアレキシン様物質

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	太田, 孝彦
発行元	日本植物病理學會
巻/号	49巻5号
巻号補足	
掲載ページ	p. 676-682
発行年月	1983年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



カンキツかいよう病菌の拮抗細菌 (*Pseudomonas* sp.) 接種カンキツ葉組織内に生成された ファイトアレキシン様物質

太田孝彦*

Takahiko ÔTA*: Production of Phytoalexin-like Substances
in the Citrus Leaves Inoculated with a Bacterium
(*Pseudomonas* sp.) Antagonistic against
Xanthomonas campestris pv. *citri*

Abstract

Antibacterial substances were produced in the citrus leaves inoculated with *Pseudomonas* sp. which was known as a bacterium antagonistic to the symptom development of citrus canker. The crude extracts from the leaves inoculated with cell suspension of *Pseudomonas* sp. (A-ex), or mixture of *Pseudomonas* sp. and *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (AX-ex) remarkably inhibited the growth of *X. campestris* pv. *citri*, whereas the crude extract from the leaves inoculated with *X. campestris* pv. *citri* alone (X-ex) showed weak inhibition. Several fractions of A-ex by thin layer chromatography (TLC) on a silica gel plate markedly inhibited the growth of *X. campestris* pv. *citri*. From these fractions, two inhibitory substances, CLP-3 and CLP-5, were isolated by TLC with two developing solvent systems. The concentrations of these two substances were extremely high in A-ex and AX-ex, but very low in X-ex. The substances showed higher antibacterial activity against *Pseudomonas* sp. than *X. campestris* pv. *citri*. It suggests that these substances might be phytoalexins. These antibacterial substances produced by inoculation of *Pseudomonas* sp. are considered to play some important roles in the mechanisms of the inhibition toward development of citrus canker.

(Received May 30, 1983)

Key Word: antagonistic bacterium, phytoalexin, *X. campestris* pv. *citri*.

緒 言

カンキツかいよう病斑から分離した拮抗細菌 (*Pseudomonas* sp.) は、カンキツ葉組織内でかいよう病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *citri* の増殖を阻害して、病斑の進展を抑えた¹⁷⁾。一般に植物が病原菌の侵入など外部からのストレスを受けると、侵入前には検出されなかった抗菌性物質が植物体内に生成され、それによって病斑の拡大が阻害されるという現象は、植物の重要な防御反応の一つとして良く知られている。このような抗菌性物質は Müller⁹⁾ によって

ファイトアレキシンと名づけられ、その後多くの植物でその生成が報告されており^{1,4,8,10,18)}、それらの化学構造も明らかにされ、また、病害抵抗性に果す意義についても論じられている^{1,2,5,7)}。

カンキツ葉のかいよう病斑中においても、*Fusarium solani* f. *pisi* や *Colletotrichum gloeosporioides* の胞子発芽と発芽管の伸長を強く阻害する物質^{12,13)}、およびかいよう病菌の増殖を阻害する物質^{6,15)} の存在が明らかにされている。したがって、本実験のように、カンキツかいよう病菌とその拮抗細菌とが共存した場合、かいよう病菌の増殖阻害が組織内に生成されたフ

* 長崎県果樹試験場 Nagasaki Fruit-Tree Experiment Station, Ômura, Nagasaki 856-01, Japan

ファイトアレキシン様物質によって起こることも考えられる。このような観点から、本論文は拮抗細菌を接種したカンキツ葉の組織内に生成されるファイトアレキシン様物質について検討し、その抑制機作を明らかにする目的で行った結果の概要である。

本研究にあたり、終始御指導と御助言をいただいた九州大学農学部脇本 哲教授に心から感謝申し上げます。

実験材料および方法

供試細菌と培養法 拮抗細菌 *Pseudomonas* sp. ABC-NAob-1 の 26-1 株（長崎県試保存株、長崎県南高来郡小浜町の罹病葉から1969年に分離した野生株のうちハロー形成能を消失した変異株）とかいよう病菌 *X. campestris* pv. *citri* NA 6901 株（長崎県試保存株）を用いた。両細菌とも PPS-1A 培地（ポリペプトン 15g, しょ糖 15g, 酵母エキス 2g, グルタミン酸ナトリウム 1g, 硫酸マグネシウム 0.2g, 寒天末 10g, 水 1,000ml, pH 6.5）で 27°C, 2 日間培養後供試した。

カンキツ葉に対する接種法 両細菌をそれぞれ滅菌蒸留水に懸濁して、 4.0×10^8 cells/ml のかいよう病菌液、 3.4×10^8 cells/ml の拮抗細菌液を作り、単独接種の場合には、それぞれ滅菌蒸留水で 2 倍に希釈したものを、また、両細菌の混合接種の場合には両者を等量混合したものを用いた。これら 3 種類の細菌液をそれぞれ脱脂綿に含ませ、剣山で全面に付傷したナツダイダイの硬化直後の葉に塗布接種した。塗布接種葉は、バット内の底に敷いた砂（十分に給水したもの）に葉柄部を挿し、飽和湿度状態で 30°C に保った。

抗菌性物質の抽出法と純化法 接種後 4 日目に各接種葉を 50g（31～34枚）とり、これを 300ml の 85% エタノール液に、30°C で 20 時間浸漬して抽出した。抽出液は、野中・松崎¹²⁾の方法に準じ、40°C 減圧下でエタノールを除いて水溶液とし、遠心（10,000rpm, 30分）して上澄液を得た。この上澄液に酢酸エチルを加えて 3 回抽出し、酢酸エチルを集めて純水で 1 回洗浄後、減圧下で濃縮、乾固物とした。この乾固物を 1ml のエタノールに溶解して粗抽出液とした。また、 8.2×10^8 cells/ml の拮抗細菌を接種したナツダイダイ葉 500g（320枚）からの粗抽出液 10ml のうち 6ml を用いて薄層クロマト（TLC）により抗菌性物質を分離した。すなわち、クロロホルム／メタノール（1:1, v/v）で良く洗浄した蛍光指示薬入りシリカゲル（ワコーゲル B-5FM）の厚さ 500 μ 、大きさ 20cm $\times$ 20cm の薄層板に粗抽出液をスポットし、溶媒-I; n-ヘキサ

ン／酢酸エチル／メタノール（60:40:1, v/v）で 3 回多重展開した。この薄層板に紫外線（254nm）を照射し、各スポット（1～3 個）ごとに分取し、これを各々 30ml のエタノールで溶出した。これらの分画液の紫外線吸収スペクトルを調べた後、40°C 減圧下でそれぞれ 0.5ml になるように濃縮した。この分画濃縮液のうち、かいよう病菌に対して抗菌性（検定法は後述）を有しており、その紫外線吸収スペクトルが明らかな極大値、極小値を示したものについて、さらに、溶媒-II; クロロホルム／エタノール（100:3, v/v）、次いで再度溶媒-I で展開して、それぞれの物質ごとに 30ml のエタノール液とした。これらの溶液の紫外線吸収スペクトルを調べた後、減圧下で 0.5ml に濃縮し、次の方法で各抗菌性物質の純度を調べた。すなわち、シリカゲル G の既製の薄層板（シリカゲル 60, メルク社）およびシリカゲル G の厚さ 250 μ m の薄層板（大きさはいずれも 5cm $\times$ 20cm）に前記の 0.5ml の濃縮液から 10 μ l をスポットし、溶媒-I および溶媒-II でそれぞれ 3 回多重展開した。シリカゲル 60 の薄層板で展開したものは、ローダミン B で染色後、紫外線（254nm）下で観察し、また、シリカゲル G の薄層板の場合には 50% 硫酸を噴霧した後、110°C で 5 分間加熱して単一スポットか否かを調べた。

抗菌性の測定法 粗抽出液の抗菌性：かいよう病菌に対する抗菌力の検定は、かいよう病菌を 7.2×10^5 cells/ml の細菌濃度になるように PPS-1 培地（PPS-1A 培地から寒天を除いたもの）に移植し、この 2ml に前記の粗抽出液（エタノール溶液）0.05ml を加え、27°C で 2 日間静置培養した後希釈平板法で細菌数を調べ、対照として同様の培地に 0.05 ml のエタノールを加えた場合の細菌数と比較した。拮抗細菌に対する抗菌力の検定は 1.4×10^5 cells/ml の拮抗細菌を含む PPS-1 培地を用い、かいよう病菌の場合と同様に行なった。

TLC による分画濃縮液の抗菌性：純化を 1 回行って得られた分画濃縮液（Table 2）の抗菌力の検定は 5.8×10^5 cells/ml のかいよう病菌を含む PPS-1 培地を用い、粗抽出液の場合と同様に行なった。3 回純化したものについては、前記の 0.5ml の濃縮液に再度エタノールを加えて 30ml とし、紫外線吸収スペクトルを測定後、3 波長プログラムモードで分画物質 CLP-5 は 271nm, CLP-3 は 269 nm における吸光度（OD）を求め、前者は OD=10, 後者は OD=100 の濃厚液を減圧濃縮して作製した。その一定量を直径 12 mm の滅菌試験管に入れ、減圧下で溶媒を除いて

乾固し、これに 0.3% メチルセルロース加用50%エタノール液を 0.02ml 加えて管底の乾固物を溶解した。この試験管に所定濃度の細菌を移植した PPS-100 培地¹⁶⁾ (PPS-1 培地を100倍希釈したもの) 0.5ml を加え、30C で2日間静地培養後希釈平板法で細菌数を調べた。なお、この場合の培地中の細菌濃度は、かいよ

う病菌では、 6.2×10^5 cells/ml、拮抗細菌では 4.5×10^5 cells/ml とした。

実験結果

細菌接種カンキツ葉から得た粗抽出液の抗菌性

拮抗細菌接種葉から得た粗抽出液 (A-ex) および

Table 1. Inhibitory effect of the crude extracts from the citrus leaves inoculated with antagonistic bacterium, *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and mixtures of both by needle pricking on bacterial growth

Crude extracts ^{a)} (diluted 40-fold)	Bacterial growth (cells/ml)	
	<i>X. campestris</i> pv. <i>citri</i>	Antagonistic bacterium
A-ex	1.3×10^4	0
AX-ex	5.5×10^4	0
X-ex	5.4×10^7	3.6×10^8
W-ex	3.6×10^7	6.5×10^5
Check (ethyl alcohol)	1.6×10^8	1.6×10^8

a) A-ex: crude extract from the leaves inoculated with antagonistic bacterium

AX-ex: crude extract from the leaves mixed-inoculated with antagonistic bacterium and *X. campestris* pv. *citri*

X-ex: crude extract from the leaves inoculated with *X. campestris* pv. *citri*

W-ex: crude extract from the leaves inoculated with water

Table 2. Inhibitory effect of the thin layer chromatography fractionated extracts from the citrus leaves inoculated with antagonistic bacterium on the growth of *X. campestris* pv. *citri*

Fraction No.	Number of spot ^{a)}	Growth of <i>X. campestris</i> pv. <i>citri</i> (cells/ml)
13	3	4.1×10^2
12	1	3.7×10^7
11	1	3.8×10^9
10	1	2.2×10^{10}
9	1	6.1×10^6
8	1	7.2×10^9
7	1 (CLP-7)	3.1×10^{10}
6	1	2.7×10^{10}
5	1 (CLP-5)	1.2×10^3
4	2 or 3 (CLP-4, etc.)	1.0×10^1
3	1 (CLP-3)	0.8×10^1
2	2	2.5×10^8
1	2 or 3	1.8×10^2
Origin	—	1.1×10^1
Check (ethyl alcohol)	—	5.8×10^8

a) detected under ultraviolet light with 254 nm

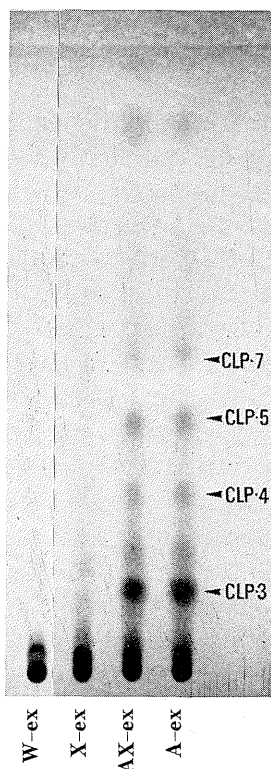


Fig. 1. Thin layer chromatograms (TLC) on silica gel 60 of the extracts from the leaves inoculated with antagonistic bacterium in solvent system: n-hexan/ethyl acetate/methyl alcohol (60:40:1, v/v). Materials applied were A-ex, AX-ex, X-ex and W-ex (refer to Table 1). Spots on the plate of TLC were detected in the ultraviolet light with 254 nm after stained with Rhodamine B.

かいよう病菌との混合接種葉からの粗抽出液 (AX-ex) は、かいよう病菌に対して強い抗菌力を示し、両者のうちでは A-ex の方がやや強い傾向を示した (Table 1)。これに対し、かいよう病菌接種葉からの粗抽出液 (X-ex) および水処理葉からの粗抽出液 (W-ex) のかいよう病菌に対する抗菌力は前二者に比べて著しく弱かった。

一方、拮抗細菌に対しては、A-ex および AX-ex とともに、さらに強い抗菌力を示し、これら抽出液を加えて培養した場合には菌の検出ができなかった。W-ex も抗菌力を示したが、前二者よりもかなり弱かった。X-ex は拮抗細菌に対して全く抗菌力を示さなかった。

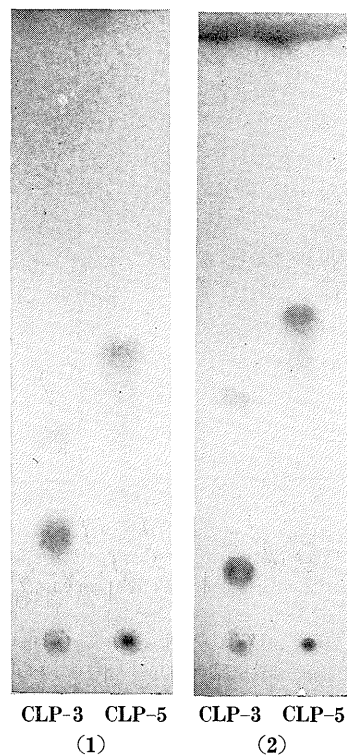


Fig. 2. Thin layer chromatograms on silica gel 60 of the phytoalexin-like substances, CLP-3 and CLP-5, in solvent system: (1) n-hexan/ethyl acetate/methyl alcohol (60:40:1, v/v), (2) chloroform/ethyl alcohol (100:3, v/v). Spots on the plate of TLC were detected in the ultraviolet light with 254 nm after stained with Rhodamine B.

TLC によって得られた粗抽出液中の成分とその抗菌性

4種の粗抽出液 (A-ex, AX-ex, X-ex, W-ex) の 5 μ l をシリカゲル薄層板にスポットして、溶媒-I で展開し、ローダミンBで染色後紫外線を照射した結果を Fig. 1 に示した。A-ex および AX-ex では薄層板上に CLP-3, CLP-4, CLP-5, CLP-7 などの鮮明なスポットが認められたが、X-ex および W-ex ではこれらのスポットは検出できなかった。

Fig. 1 の各分画のかいよう病菌に対する抗菌性を示したのが Table 2 である。抗菌力は原点の他に分画 1, 3 (CLP-3 のスポット), 4 (CLP-4 他), 5 (CLP-5), 9, 12 および 13 で認められ、とくに、原

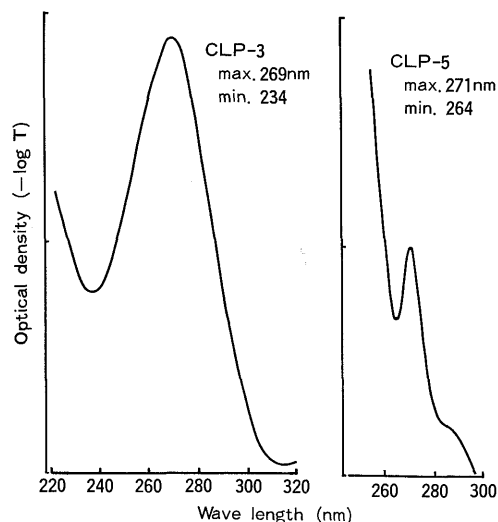


Fig. 3. The ultraviolet absorption spectra of the antibacterial substances, CLP-3 and CLP-5, purified by thin layer chromatography from the citrus leaves inoculated with antagonistic bacterium.

点, 分画 1, 3, 4, 5, 13 が強かった。これら分画について, さらに 2 回 TLC で純化を行った結果, CLP-3 と CLP-5 が単一物質として分離された (Fig. 2) ので, この両物質について検討した。CLP-3 と CLP-5 を紫外線 (254nm) 下で観察すると, ワコーゲル B-5FM の薄層板上で, 前者は Rf 値 0.1 付近に灰青色のスポットとして, 後者は RF 値 0.4 前後に暗青色のスポットとして, それぞれ確認できた。また, 可視光線では CLP-5 は黄色のスポットとして判別できたが, CLP-3 は確認できなかった。両物質の紫外線吸収スペクトルは Fig. 3 に示すように, CLP-3 は 269nm に極大値, 234nm に極小値を示し, CLP-5 は 271nm に極大値, 264nm に極小値を示した。

抗菌性物質 (CLP-3, CLP-5) の抗菌性

Table 3 に示すように, CLP-3 はかいよう病菌に対して 269nm における吸光度が 16 以上で, また, 拮抗細菌に対しては吸光度が 8 以上で抗菌力を示した。CLP-5 は両細菌に対して吸光度が 0.5 で抗菌力を示し, その抗菌力は濃度に比例して増大した。また, 両物質ともに同一濃度ではかいよう病菌に対してよりも

Table 3. Inhibitory effect of the extracts purified by thin layer chromatography from the citrus leaves inoculated with antagonistic bacterium

Purified extracts	Relative concentration (in optical density)	Bacterial growth (cells/ml)	
		<i>X. campestris</i> pv. <i>citri</i>	Antagonistic bacterium
CLP-3	32	2.1×10^2	0
	16	1.3×10^7	4.6×10^3
	8	2.3×10^8	4.3×10^6
	4	6.8×10^8	1.1×10^8
CLP-5	4	1.4×10^3	2.6×10^2
	2	6.2×10^5	4.5×10^4
	1	2.1×10^7	4.6×10^6
	0.5	5.0×10^7	6.2×10^7
Check (ethyl alcohol)		6.4×10^8	3.7×10^8

Table 4. Optical density of the purified extracts from the citrus leaves inoculated with antagonistic bacterium, *X. campestris* pv. *citri* or both mixture by needle pricking

Crude extracts ^{a)}	Antibacterial substances	
	CLP-3	CLP-5
A-ex	2.20 ^{b)}	0.18 ^{c)}
AX-ex	2.04	0.14
X-ex	0.06	0
W-ex	0.08	0

a) refer to footnotes of Table 1

b) optical density at 269 nm

c) optical density at 271 nm

拮抗細菌に対して強い抗菌力を示した。

カンキツ葉に生成される CLP-3, CLP-5 の相対量

Table 4 に示すように、CLP-3 は A-ex 中に最も多く、AX-ex においてはこれよりやや少なく、また、X-ex および W-ex では非常に少なかった。CLP-5 は CLP-3 に比べて吸光度で比較すると低い値を示し、A-ex と AX-ex から検出されたが、X-ex と W-ex からは検出されなかった。

考 察

本試験は拮抗細菌によるかいよう病の発病抑制機作を明らかにするため、拮抗細菌あるいは拮抗細菌とかいよう病菌の混合菌液をカンキツ葉に接種して、葉組織内に生成される抗菌性物質を抽出し、その抗菌性について検討したものである。

拮抗細菌を単独、またはかいよう病菌と混合接種して、4日後のカンキツ葉のエタノール抽出液 (A-ex または AX-ex) は、かいよう病菌の単独接種葉の抽出液 (X-ex) および水処理葉の抽出液 (W-ex) に比べて、かいよう病菌の増殖を強く阻害した。このことは拮抗細菌を接種すると、葉中に抗菌性物質が生成されることを示すものである。この抽出液中の成分を TLC により薄層板上で比較すると、A-ex および AX-ex 中には X-ex および W-ex 中に検出されなかった数種の新規物質の存在が明らかとなった。これらの物質の中には抗菌力を示すものが数種類含まれていたが、それらの中で単離できた 2 物質を再度 TLC で純化、単離しその抗菌力を確認した。このことから、これら 2 つの物質、すなわち、CLP-3 および CLP-5 は拮抗細菌の接種によってカンキツ葉中に新生されたものであり、また、両物質は、いずれもカンキツに親和性のあるかいよう病菌に対してよりも、非親和性の拮抗細菌に対してより強い抗菌力を示す³⁾ことから、これらの物質はファイトアレキシンの一種であると考えられた。

拮抗細菌をかいよう病菌と混合接種した葉では、そ

の単独接種葉に比べて両抗菌性物質の量はわずかに少ない傾向があり、この傾向はそれぞれの接種葉から得た粗抽出液の抗菌力においても同じように認められた。この原因がピサチンの病原菌による分解^{11,19)}の例にみられるように、拮抗細菌によって生成された抗菌性物質がそこに共存するかいよう病菌によって分解されるためによるものか、また、奥ら¹⁴⁾のいう寄生菌による第 1 相のファイトアレキシン生成の抑制現象にみられるように、共存するかいよう病菌によってその生成が抑制されることによるものかは明らかでない。

いずれにしても、抗菌性物質は拮抗細菌とかいよう病菌が共存している場合に生成されることから、拮抗細菌によるカンキツかいよう病の抑制は、拮抗細菌の誘導によって、CLP-3 および CLP-5 に代表される数種の抗菌性物質が病斑部に生成され、それによってかいよう病菌の増殖が阻害されるためであると考えられる。

摘 要

拮抗細菌 (*Pseudomonas* sp.) によるかいよう病発病抑制機作を明らかにするため、拮抗細菌を接種したカンキツ葉に生成されるファイトアレキシン様物質について検討した。拮抗細菌を単独およびかいよう病菌と混合して接種した葉からの粗抽出液 (A-ex, AX-ex) は、かいよう病菌単独接種葉からの粗抽出液 (X-ex) および水処理葉からの粗抽出液 (W-ex) に比べて著しく強い抗菌力を示した。A-ex から薄層クロマト法によって単離した 2 種類の抗菌性物質、CLP-3 および CLP-5 はかいよう病菌よりも拮抗細菌の増殖を強く阻害することから、ファイトアレキシン様物質と思われる。これら 2 種類の抗菌性物質は A-ex および AX-ex に多量に含まれていたが、X-ex および W-ex には極めて微量であった。これらの結果から、拮抗細菌がかいよう病の発病を抑える機作の 1 つとして、拮抗細菌の侵入後組織内に生成されるファイトアレキシン様物質が深く関与していることが考えられる。

引 用 文 献

1. Cartwright, D., Langcake, P., Pryce, R. J., Leworthy, D. P. and Ride, J. P. (1977). Nature 267: 511-513.
2. Cruickshank, I. A. M. and Rerrin, D. R. (1960). Ibid. 187: 799-800.
3. Cruickshank, I. A. M. (1962). Aust. J. Biol. Sci. 15: 147-159.
4. 樋浦 誠 (1943). 岐阜高農学報 50: 1.
5. Katsui, N., Murai, A., Takasugi, M., Imazumi, K., Masamune, T. and Tomiyama, K. (1968). Chem. Comm. 43-44.

6. 禧久 保・河野通昭 (1980). 九州病虫研会報 26: 78-80.
7. 久保田尚志・山口八郎・納谷恵三・松浦輝男 (1952). 日化 73: 897.
8. 水上武幸 (1953). 日植病報 17: 57-60.
9. Müller, K. O. and Böger, H. (1940). Arb. Biol. Reichsanstalt. Landw. Forstwirtschaft., Berlin 23: 189-231.
10. Müller, K. O. (1956). Phytopath. Z. 27: 237-254.
11. 野中福次 (1967). 佐賀大農彙 24: 109-121.
12. 野中福次・松崎正文 (1973). 九州病虫研会報 19: 8-10.
13. 野中福次・松崎正文・太田孝彦 (1974). 同上 20: 97-99.
14. Oku, H., Ouchi, S., Shiraishi, T., Baba, T. and Miyagawa, H. (1975). Proc. Japan Acad. 51: 198-201.
15. 太田孝彦 (1981). 九州病虫研会報 27: 55-57.
16. 太田孝彦 (1982). 同上 28: 83-85.
17. 太田孝彦 (1983). 日植病報 49: 308-315.
18. Sato, N., Tomiyama, K., Katsui, N. and Masamune, T. (1968). Ann. Phytopath. Soc. Japan 34: 344-345.
19. 植原一雄 (1964). 日植病報 29: 103-110.