フルオレセイン標識レクチンによる チャ葉組織中のチャ病原糸状菌の蛍光染色

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所

山田 憲 吾*・吉田 克 志**・園田 亮 一*

(平成20年11月12日受理)

Fluorescent Staining of Tea Pathogenic Fungi in Tea Leaves Using Fluorescein-labeled Lectin

Kengo Yamada, Katsuyuki Yoshida and Ryoichi Sonoda
National Institute of Vegetable and Tea Science
National Agriculture and Food Research Organization

Summary

Fluorochrome-labeled lectin, fluorescein conjugated wheat germ agglutinin (F-WGA) was applied to stain tea pathogenic fungi in tea leaf tissue. Infected leaves were fixed and decolorized with a mixture of ethanol and acetic acid, and cleared with 10% KOH for whole mount before staining with F-WGA. Hyphae of *Pestalotiopsis longiseta*, *Pseudocercospora ocellata*, *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum theae-sinensis* fluoresced brightly in whole mount and sectioned samples of infected leaf tissue. In browned tissue, hyphae did not fluoresce frequently in whole mount sample. Autofluorescence of leaf tissue was strong in browned tissue of sections, it was removed by 10% KOH treatment before staining. Penetration hyphae of *C. theae-sinensis* in cell wall of trichome and hyphae in basal part of trichome did not fluoresced frequently. In whole mount samples of tea leaf infected with *Exobasidium vexans* and *E. reticulatum*, hymenia appeared on leaf surface fluoresced, but hyphae in leaf tissue did not fluoresce. In sectioned samples, hyphae fluoresced brightly when sections were treated with 10% KOH before staining.

Keywords : Tea pathogenic fungi, Fluorescent staining, Fluorescein-labeled lectin, Wheat germ agglutinin

キーワード：チャ病原糸状菌，蛍光染色，フルオレセイン標識レクチン，コムギ胚芽凝集素

* 〒428-8501 静岡県島田市金谷2769

** 〒898-0087 鹿児島県枕崎市瀬戸町87

1 緒 言

糸状菌の菌体は多くの場合無色透明であるため、植物組織中の糸状菌を観察するためには染色が必要である。チャの糸状菌病害では、高屋¹⁾がパラフィン包埋切片のラクトフェノールアニリンブルー染色およびサフランインーフアストグリーンFCF 2重染色により、罹病組織中のチャ炭疽病菌を観察している。しかし、これらの染色法では菌体の染色が薄い場合や、葉組織が強く染色されて菌体との識別が困難な場合があり、葉肉組織中では菌糸はほとんど観察されないとしている。また、浜屋²⁾はチャ炭疽病菌について「毛茸細胞内では、あれほどはっきり見えていた本菌の菌糸が、葉組織内では、ほとんど見えないのである」と述べている。このように、チャ罹病組織中の病原糸状菌の観察は依然として困難であった。

レクチンは抗体などの免疫学的産物を除く糖結合タンパク質の総称である。レクチンの一種であるコムギ胚芽凝集素 (wheat germ agglutinin, 以下WGA) は糸状菌の細胞壁成分であるキチンを構成するN-アセチル- β -1,4-グルコサミンと特異的に結合することから、蛍光標識WGAを用いたレクチン結合法により糸状菌を蛍光染色できることが報告されている^{3, 4)}。

そこで、蛍光標識レクチンによるチャ罹病組織中の病原糸状菌の蛍光染色を試みた結果、良好な結果が得られたので報告する。

2 材料および方法

2. 1 チャ罹病葉

野菜茶業研究所金谷茶業研究拠点および周辺圃場において自然発生した輪斑病 (病原菌 *Pestalotiopsis longiseta* (Spegazzini) Dai et Kobayashi), 褐色円星病 (*Pseudocercospora ocellata* (Deighton) Deighton), 灰色かび病 (*Botrytis cinerea* Persoon: Fries), 炭疽病

(*Colletotrichum theae-sinensis* (Miyake) Yamamoto), もち病 (*Exobasidium vexans* Massee), および網もち病 (*E. reticulatum* Ito et Sawada) 罹病葉を用いた。炭疽病については、分生子懸濁液を圃場または鉢植苗の新葉に噴霧接種して得られた罹病葉も併せて用いた。

2. 2 ホールマウント試料の作製

罹病葉片を酢酸エタノール (エタノール: 酢酸 = 96:4, v/v) に浸漬し、酢酸エタノールを毎日交換しながら、完全に脱色されるまで40℃で1-3日間置いた。次いで10%水酸化カリウム水溶液に40℃で1晩浸漬して透明化した後、70%エタノール中で冷蔵保存した。

2. 3 切片試料の作製

前項同様に酢酸エタノールで固定した罹病葉片もしくは新鮮罹病葉を5%寒天に埋め込み、マイクロスライサー (ZERO 1, 堂坂イーエム) を用いて20-50 μ m厚の切片を作製した。新鮮罹病葉切片は99%エタノールに1晩浸漬して固定・脱色した。切片は70%エタノール中で冷蔵保存した。

水酸化カリウム処理は、染色前に切片を10%水酸化カリウム水溶液に10-60分間浸漬して行った。

2. 4 染色および観察

蛍光標識レクチンとしてフルオレセイン標識コムギ胚芽凝集素 (wheat germ agglutinin, fluorescein conjugate [Molecular Probes, Inc., Cat. No. W-834], 以下F-WGA) を用いた。70%エタノール中で保存した罹病組織試料をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で3回洗浄し、F-WGA溶液 (PBSに溶解、濃度10 μ g/ml) に10分間浸漬した後、水洗して水または50%グリセリンでマウントした。顕微鏡観察および写真撮影には落射蛍光顕微鏡ECLIPSE 80i (ニコン) およびデジタルカメラDXM1200F

(ニコン)を使用し、B励起(B-2A蛍光フィルターキューブ[EX 450-490nm, DM 505nm, BA 520nm])により蛍光観察した。

ラクトフェノールアニリンブルー染色¹⁾には、ラクトフェノールに溶解したアニリンブルー(和光純薬, Cat. No.012-04042)の0.5%溶液を用いた。試料を3回水洗した後、染色液でマウントし、明視野で観察した。

Uvitex 2B染色⁵⁾には、0.1M Tris/HClバッファー(pH8.5)に溶解したUvitex 2B(Polysciences, Inc., Cat. No.19517)の0.1%溶液を用いた。試料をバッファーで3回洗浄した後、染色液に5分間浸漬し、3回水洗して50%グリセリンでマウントし、UV励起(UV-1A蛍光フィルターキューブ[EX 365/10nm, DM 400nm, BA 400nm])により蛍光観察した。

3 結果および考察

チャ罹病組織中の病原糸状菌に対する各種染色法の染色性を比較した結果、ラクトフェノールアニリンブルー染色およびUvitex 2B染色では葉組織が強く染色され、菌体の判別は困難であったのに対し、F-WGA染色では菌体のみが緑色の蛍光を発し、菌体を明瞭に観察することができた(写真1)。そこで、種々のチャ罹病組織試料に対してF-WGA染色を試みた。

輪斑病、褐色円星病の緑斑症状および褐色円星症状、ならびに灰色かび病罹病組織のホールマウント試料では、葉組織中の菌糸を明瞭に観察できた(写真2-4)。一方、輪斑病菌分生子の有色細胞は蛍光反応を示さず、輪斑病菌分生子層および褐色円星病菌分生子座も一部が蛍光反応を示さないことがあった(写真2, 3)。炭疽病罹病組織のホールマウント試料では、毛茸上の分生子や毛茸、小病斑、葉脈および大型壊死病斑中の菌糸を明瞭に観察できた(写真5)。毛茸細胞壁中の貫入菌糸および毛茸基部付近の菌糸は蛍光反応

を示さないことがあった。また、罹病組織の褐変の著しい部位では、組織中の菌糸は蛍光反応を示さず、観察は困難であった(写真4)。もち病および網もち病罹病組織のホールマウント試料では、葉表面に露出した子実層は蛍光反応を示した(写真6, 7)。一方、葉組織中の菌糸は、もち病病斑の周縁部では蛍光反応を示したが、もち病病斑中心部および網もち病では蛍光反応はほとんど認められなかった(写真7b)。

輪斑病、褐色円星病および炭疽病罹病組織の切片試料では、菌体は蛍光反応を示すものの、罹病組織褐変部の自家蛍光が強く、菌体の蛍光反応は切片の表面付近に限られていた(写真8-11)。切片を水酸化カリウムで処理すると褐変部が脱色され(写真8d)、切片内部の菌体も明瞭に観察できた(写真8c)。輪斑病菌および炭疽病菌分生子層中の未熟分生子ならびに褐色円星病菌の分生子柄は蛍光反応を示さず、これらの器官では細胞壁の成分あるいは構造が菌糸とは異なる可能性が示唆された(写真9, 10)。もち病および網もち病罹病組織の切片試料では菌体の蛍光反応は微弱であったが(写真12a)、水酸化カリウム処理により蛍光反応が増強され、菌体を明瞭に観察できた(写真12b, 13)。これは、水酸化カリウム処理により菌体の細胞壁が部分分解され、細胞壁中のWGA結合部位が露出したためと考えられた。切片試料ではクチクラ層および葉脈木部が黄色の自家蛍光を示したが、菌体との識別は容易であり、炭疽病および網もち病罹病組織では葉脈中の菌糸を明瞭に観察できた(写真11, 13)。

以上のように、蛍光標識レクチンによる病原糸状菌の蛍光染色は、チャ罹病組織中の病原糸状菌を観察する手法として非常に有効であった。本法は切片試料だけでなくホールマウント試料に対しても適用できる点で特に優れており、レーザー共焦点顕微鏡による3次元画像の取得にも応用できると考えられる。

これらのことから、本法はチャ病原糸状菌の感染過程、特にこれまで観察がほとんど不可能であった植物体内への侵入後の菌の動態の解明に大きく寄与するものと考ええる。

4 引用文献

- 1) 高屋茂雄(1974)：茶炭そ病の病葉中における菌糸の観察。茶業技術研究, 47, 74-81.
- 2) 浜屋悦次(1984)：チャ炭そ病菌の侵入機作。植物防疫, 38, 188-191.
- 3) Sengbusch, P. V., J. Hechler and U. Müller (1983)：Molecular architecture of fungal cell walls. An approach by use of fluorescent markers. Eur. J. Cell Biol., 30, 305-312.
- 4) Kunoh, H., J. Y. Shirota and H. Ishizaki (1984)：Fluorescent responses of intact hyphae and protoplast-associated structures of *Pyricularia oryzae* and *Colletotrichum lagenarium* induced by calcofluor white and FITC-labeled lectins. Trans. Mycol. Soc. Japan, 25, 413-423.
- 5) Niks, R. E. and R. G. Dekens (1991)：Prehaustorial and posthaustorial resistance to wheat leaf rust in diploid wheat seedlings. Phytopathology, 81, 847-851.

写真1 チャ輪斑病罹病組織における染色法の比較

F-WGAはB励起，ラクトフェノールアニリンブルーは明視野，Uvitex 2BはUV励起で観察．
F-WGAおよびラクトフェノールアニリンブルーは切片を水酸化カリウム処理後に染色．
Bar = 100 μ m.

写真2-7 チャ罹病組織ホルマウント試料のF-WGAによる蛍光染色

写真2 輪斑病 a 菌糸および分生子層 (矢印). b 分生子層および分生子.

写真3 褐色円星病 a 緑斑症状部の菌糸. b 褐色円星症状部の分生子座 (矢印) および菌糸.

写真4 灰色かび病 a 病斑中の菌糸の蛍光像. b 同一部位の明視野像. *: 葉組織の褐変が強く, 菌糸の蛍光反応が見られない部位.

Bar = 200 μ m (写真2a, 3, 4), 50 μ m (写真2b).

写真5 炭疽病 a毛茸上の分生子 (c), 貫入菌糸 (ph) および感染菌糸 (ih). b小病斑および毛茸 (矢印) 中の菌糸. c葉脈 (矢印) および葉肉中の菌糸.

写真6 網もち病 病斑上の子実層.

写真7 もち病 a病斑上の子実層. b葉肉中の菌糸.

Bar = 100 μ m (写真5bc, 6, 7), 10 μ m (写真5a).

写真 8-13 チャ罹病組織切片試料のF-WGAによる蛍光染色

写真 8 輪斑病罹病組織に対する水酸化カリウム処理の影響 a, b 無処理. c, d 水酸化カリウム処理. a, c 蛍光像. b, d 明視野像.

写真 9 輪斑病菌の未熟分生子 a 蛍光像. b 明視野像. 矢印: 未熟分生子.

写真 10 褐色円星病菌の分生子座 a 蛍光像. b 明視野像. 矢印: 分生子柄.

Bar = 100 μ m (写真 8), 20 μ m (写真 9, 10).

写真11 炭疽病 a 葉肉および葉脈中の菌糸および分生子層. b 葉脈中の菌糸 (矢印).
写真12 もち病菌に対する水酸化カリウム処理の影響 a 無処理. b 水酸化カリウム処理.
写真13 網もち病 a 葉脈の縦断面. b 葉脈の横断面. いずれも水酸化カリウム処理.
Bar = 100 μ m (写真11a, 12, 13), 20 μ m (写真11b).