

台木用ビワ実生苗の地下部に発生した がんしゅ症状から分離された細菌の性状

菅 康弘・福田伸二・富永由紀子¹・根角博久²

Characteristics of Isolated Bacterium from Canker Symptom(s) Observed in the Underground Parts of Loquat Seedlings for Rootstock

Yasuhiro SUGA, Shinji FUKUDA, Yukiko TOMINAGA and Hirohisa NESUMI

緒 言

長崎県のビワ苗木生産圃場で、台木用ビワ実生の地下部（根頭部）に、一見してビワ枝幹部に発生するビワがんしゅ病の病徴に酷似した黒褐色の瘤状組織を形成する症状が発生した。栽培中に視認できない地下部にがんしゅ組織が生じるため、生産者は症状の発生初期にはその被害に気がつくことは少なく、育苗途中で植替作業を行う時に初めて気づくこととなる。また、本症状の発生によって苗木の生育が不良となることから、苗木生産上は健全苗の歩留まりを低下させることが懸念され（根角ら、2005）、発生を抑制するための栽培技術の改善が望まれている。

一般にビワがんしゅ病が枝幹部、葉および果実などの地上部にそれぞれ特徴的な症状

（向、1952）を呈することは知られているが、地下部の発病に関しては石井（1956）によってわずかに記載があるのみで発生状況の詳細は明確ではなかった。また、類似する病害として、ビワ苗木に根頭がんしゅ病が発生するとされる（埼玉県内務部、1934）が、近年わが国での発生報告は見あたらないことから、現在のビワ苗木生産圃場での発生実態は不明である。

本研究では、現在ビワ苗木生産圃場において問題となっているビワ苗木地下部のがんしゅ症状の発生実態と病原を明らかにし、有効な防除対策を構築する目的で、病原体の分離とその性質に関する調査を行い簡易同定を試みた。

材料および方法

1. 供試菌株

がんしゅ様症状を呈した1年生実生から分離した細菌9菌株と、対照に用いたビワがんしゅ病細菌の3種のグループ（森田、1978a）

¹ 現在：長崎県科学技術振興局

² 現在：独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所カンキツ研究興津拠点

に類別される保存菌株 NAE6 (A グループ), NAE57 (C グループ) および NAE89 (B グループ) の計 3 菌株 (森田, 2005) を加えた 12 菌株を供試し, ビワ樹に対する病原性と細菌学的諸性質を調査した。供試菌株の来歴は第 1 表に示した。

2. 分離・接種

平成16年1月および5月に, 長崎県大村市内のビワ苗木生産農家圃場で根頭部にがんしゅ症状を呈した1年生苗木を採取した。採取した苗木は水洗し, 分離に供するまで -80°C で凍結して保存した。分離に供したがんしゅ組織は, 流水で洗浄した後に健全部との境界部分をカッターナイフで削りだし, 70%エタノールと0.5%次亜塩素酸ナトリウムで表面殺菌した後に滅菌水を加えて磨砕した磨砕液を1白金耳採って画線するか, または削りだした罹病部位に直接滅菌針を穿刺してジャガイモ煎汁半合成寒天培地[脇本処方; ジャガイモ 300g煎汁, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.0g, ペプトン 5.0g, スクロース 20.0g, 寒天 15.0g, 蒸留水 1,000ml, pH6.8] (以下 PSA 培地) の平板上に画線した後, 出現したコロニーを釣菌した。釣菌したコロニーは, PSA 平板培地で単コロニー分離を3回繰り返して菌株とした。

接種にはこれらの分離菌株と対照の保存菌株を供試した。ビワ品種‘茂木’の実生苗を供試し, 展開途中の新葉中肋部, 葉肉部および緑枝に, 供試細菌を塗布した柄付針で穿刺して付傷接種を行った。接種後の植物はガラス室内で管理して随時観察を行い, 各接種部位へのがんしゅ組織形成の有無および葉肉部への退緑病斑形成の有無を確認した。

3. 簡易同定

供試細菌の培養には PSA 培地を用い, 細菌学的性質の調査方法は後藤・滝川 (1984a, 1984b, 1984c, 1984d) の方法に従った。すなわち, グラム 反応は, 培養菌体に 3%KOH を滴下

して混合し, 粘濁となったものをグラム陰性と判定した。King's B 培地 [プロテオースペプトン(Difco) 20.0g, K_2HPO_4 2.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5g, グリセリン 10ml, 寒天 20g, 蒸留水 1,000ml, pH7.2] 上での蛍光性色素産生, PSA 培地上での水溶性褐色色素産生, 40°C 下での生育およびジャガイモ塊茎の腐敗は定法に準じて試験し, レバン産生はスクロースを5.0%添加した NA 培地 [肉エキス 10.0g, ペプトン10.0g, NaCl 5.0g, 寒天 15.0g, 蒸留水 1,000ml, pH7.0] を用いて調査した。タバコ過敏感反応にはガラス温室内で育成した鉢植えのタバコ‘Xanti’の展開した葉を供試し, PSA 平板上で培養した菌体 1白金耳を 5ml の滅菌水で希釈した菌液を葉肉に注入し, 24 時間以内に壊死が認められたものを陽性とした。唯一の炭素源としての, スクロース, マルトース, セロビオース, トレハロース, D-アラビノース, L-ラムノース, ソルビトール, イノシトール, ゲラニオール, 安息香酸ナトリウム, L-酒石酸ナトリウムおよび L-アスパラギン酸ナトリウムの利用性の調査には, Ayers et al の培地 [$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1.0g, KCl 0.2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, BTB 0.03g, 寒天 15g, 蒸留水 1,000ml, pH6.8] を用いた。また, 上記以外にもグラム陰性細菌の鑑別用キット (API20NE, ビオメリュー社製) を使用して細菌学的諸性質を調査し, 西山 (1997a, 1997b) の方法に準じて簡易同定を試みた。

結 果

観察されたビワ苗木の地下部の症状は, 播種床で生育した1年生実生と播種床から圃場に移植した2年生実生で確認され (写真1, 写真2), 何れも地下部に形成されたがんしゅ症状は表面が粗造で黒褐色を呈し, 一般にビワの枝幹部で観察されるビワがんしゅ病の病徴に類似していた。調査時に認められた本症状の形成部位は主に根頭部であり, 種子が離

脱した跡ががんしゅ状に肥大している様子が観察された(写真3-1, 写真3-2)。

分離に供した罹病部位からは, PSA 培地または King's B 培地上で白色~蛋白色の平滑なコロニーを形成する細菌(写真4)が高頻度に分離された。葉の中肋部と緑枝の分離細菌を接種した部位は, 接種から約1か月後には表面が粗造で黒褐色のがんしゅ症状(写真5)となり, 対照のビワがんしゅ病細菌を接種した場合と同じ症状を呈した。また, 接種によって形成されたがんしゅ組織からは, 接種菌と同一の細菌が容易に再分離された。葉肉への接種では, 対照のビワがんしゅ病細菌 NAE89 株を接種した場合には退緑病斑を形成した(写真6)が, 他の供試菌株接種では退緑病斑は形成しなかった(第1表)。

供試菌株の細菌学的諸性質について調査した結果を第2表に示した。分離9菌株と対照のビワがんしゅ病細菌3菌株は全てグラム陰性を示し, King's B 培地上で蛍光性色素を産生した。また, 何れの菌株も40℃下で生育せず, ジャガイモ塊茎を腐敗させなかった。スクロースを含む NA 培地でのレバンの産生は供試した全菌株で陽性であったが, PSA 培地上での水溶性褐色色素産生は NAE57 のみが陽性で他は陰性を示した。ガラス温室内で試験したタバコ過敏感反応は, 菌株によって反応の強弱が認められ, NAE6 と NAE57 では明瞭な壊死斑が現れず菌液が浸透したと考えられる範囲が僅かに変色した程度に止まったため擬陽性としたが, 他の菌株は何れも陽性であった。

上記以外に調査した細菌学的諸性質は, 供試菌株間で概ね一致していたが, イノシトール, n-カプリン酸および L-酒石酸ナトリウムの利用性は菌株によって異なる場合が見られた。

考 察

本症状は, ビワ樹の地下部に形成されることを除けば一見して枝幹部に形成されるがんしゅ病の症状に酷似していたことから, ビワがんしゅ病細菌による症状であることが容易に想定された。このため, 既存のビワがんしゅ病細菌を対照菌株として, 接種をはじめとする各種試験を行った。分離した菌株は PSA 培地上に白色~蛋白色の平滑な集落を形成することで対照に用いたビワがんしゅ病細菌3菌株に極めてよく一致し, グラム陰性, 好気性および蛍光性色素を産生する点なども一致していた。ビワ樹の各部位へ接種すると, 中肋と緑枝にがんしゅ症状を呈することから, ビワ樹に対して強い病原性を有することが明らかとなった。レバン産生, オキシターゼ活性, ジャガイモ塊茎腐敗, アルギニンジヒドロラーゼ活性およびタバコ過敏感反応の各種試験(LOPAT 試験)の結果から, 分離菌株は全て + - - - + となること, ならびに西山の鑑別法(簡易同定78)による簡易同定の結果は, 何れも分離菌株が *Pseudomonas syringae* に所属する可能性が高いことを示唆していた。また, API20NE の判定結果から算定した供試菌株のプロフィールインデックスは, 0447451 (菌株 05R001, 05R002, 05R003, BG4, BG6, BG9, BG10, BG7, NAE89, NAE6), 0445451 (BG8) および 0447441 (NAE57) の3種の値をとったが, これらのプロフィールインデックスは何れも *P. syringae* に属する細菌に特徴的な指標であった(對馬, 私信)。以上の結果と他の細菌学的性質が対照のビワがんしゅ病細菌とよく一致していたことから, 分離9菌株はビワがんしゅ病細菌 *P. syringae* pv. *eriotryae* と鑑別された。

ビワがんしゅ病細菌は森田(1978a)によって PSA 培地上で褐色色素を産生せず, ビワ葉に退緑病斑を形成しない A グループ, 褐色色素を産生せず退緑病斑を形成する B グループ, 褐色色素を産生し退緑病斑を形成しない C グループの3グループに類別されている。対照

菌株の NAE6, NAE89 および NAE57 はそれぞれ A, B, C の各グループに属するが、分離細菌 9 菌株は何れも PSA 培地上に褐色色素を産生せず、葉に退緑病斑を形成しないことから、NAE6 と同じ A グループに属するものと思われた。

西山 (1997a) によると *P. syringae* はタバコ葉肉に注入すると過敏感反応を誘発するが、本報告のタバコ過敏感反応の結果では、対照菌株のうち NAE6 と NAE57 は擬陽性と判定した。この原因は判然としないが、供試したタバコの品種の影響か、または保存菌株の変異の可能性も考えられる。

石井 (1960) は、ビワがんしゅ病細菌の性状を調べ、菌株によってスクロースとアラビノースの利用性に違いを認めているが、森田 (1982) は炭素源の利用性については各グループの供試菌株間に差異は認めていない。本試験で供試した菌株の各種炭素源の利用性は概ね一致していたが、L-酒石酸ナトリウム、イノシトール、n-カプリン酸で菌株によって利用性に違いが認められた。これらのことは、供試菌株間の相違を反映していると思われるため、多数の菌株を供試した場合には細部で相違点が生じる可能性を示唆している。また同時に、本病原細菌の分類学的な位置づけには影響しないものの、本細菌の多様性や類別群の意義などについて、さらに研究すべき課題があることを示すものである。

本報告に記載した長崎県の苗木生産圃場で認められたビワ苗地下部のがんしゅ症状は、生産農家では経験的にがんしゅ病であるとの認識であったが、伝染経路が判然としないことも相俟って具体的な対策は講じられていなかった。また、ビワ栽培に精通した技術者には、苗木地下部に生じた瘤ががんしゅ病であることは直感的に理解されるが、過去にビワ樹の地下部に発生したがんしゅ病に関する報告は極めて少ない。森田 (1978b) は、ビワがんしゅ病に抵抗性の品種の実生を台木に利用

する試験を行い、接木部のがんしゅ病罹病率が低下することを報告しているが、台木用実生苗の地下部におけるがんしゅ病の発生については記述していない。これらのことから、台木となる実生苗のがんしゅ病の被害に関しては、今まで重要視されていなかったものと推察される。しかしながら、根角ら (2005) によって、‘茂木’実生 2 年生苗の地下部のがんしゅ症状発症率が 21.6% にも上ることが指摘されていることから、ビワ苗木生産の作業過程で罹病苗を選別して廃棄する手間を考慮すると、本病がビワ苗木生産の生産効率を著しく阻害することが懸念される。このため、台木用実生苗の根頭部に発生した本症状はビワがんしゅ病の重要な症状の一つとして認識を改める必要がある。

ビワ実生苗の地下部のがんしゅ症状がビワがんしゅ病細菌によることが明らかになったことから、ビワ台木に既知のビワがんしゅ病抵抗性品種 (森田, 1980) の実生苗を利用することで、本症状による苗木の被害を防止できる可能性が示唆される。このため、今後は台木品種が穂木の果実品質や栽培特性に及ぼす影響を吟味しながら、抵抗性台木の利用を推進することが望まれる。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、宮崎大学農学部、上運天博教授には貴重な保存菌株を分譲して頂いた。独立行政法人農業環境研究所、對馬誠也上席研究員には細菌の簡易同定に関する御教示を頂いた。また、前記二者と森田昭博士には、研究全般に関して示唆に富むご指導をいただいた。記して厚く御礼申し上げます。

摘 要

ビワ台木用に育成中のビワ実生 1～2 年生苗の地下部 (根頭部) が黒褐色に変色して肥大し表面が粗造となるがんしゅ症状が認めら

れた。がんしゅ症状部位からは、グラム陰性、好気性の細菌が優占的に分離され、分離菌をビワ葉の中肋部に針接種したところ病原性が確認された。分離菌株は King' s B 培地上で蛍光性色素を産生し LOPAT 試験の結果が + - - - + であった。また、西山の方法で検索すると *Pseudomonas syringae* の何れかの pathovar である可能性が示唆された。さらに、生理的性質や各種炭素源の利用性は既存の *P. syringae* pv. *eriobotryae* 菌株とよく一致し、ビワ樹に病原性を示すことから、本細菌はビワがんしゅ病細菌であることが明らかとなった。既報では、本病は枝、幹、葉、果実などビワ樹地上部の各部位に発生することは知られているが、苗木の地下部（根頭部）での発生と苗木生産における被害については初めての報告である。このため、今後は本病の症状に根頭部のがんしゅ症状を加える必要があるものと思われる。

引用文献

- 後藤正夫・滝川雄一. 1984a. 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べ方 (1). 植物防疫. 38(7):339-344
- 後藤正夫・滝川雄一. 1984b. 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べ方 (2). 植物防疫. 38(8):385-389
- 後藤正夫・滝川雄一. 1984c. 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べ方 (3). 植物防疫. 38(9):432-437
- 後藤正夫・滝川雄一. 1984d. 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べ方 (4). 植物防疫. 38(10):479-484
- 石井良武. 1956. ビワ癌腫病の病原菌に関する研究 (要旨). 九農研. 17:104
- 石井良武. 1960. ビワ癌腫病の病原菌に関する研究. 長崎農試彙報. 9:20-29
- 森田 昭. 1978a. 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(1): 6-13
- 森田 昭. 1978b. ビワ苗木畑防除体系確立に関する研究 第 4 報 接ぎ木とがんしゅ病の発病. 九病虫研報. 24:67-69
- 森田 昭. 1980. ビワがんしゅ病抵抗性のビワ品種間差異. 九農研 42: 53
- 森田 昭. 1982. ビワがんしゅ病菌 3 系統の細菌学的比較. 九病虫研会報 28:77-80
- 森田 昭. 2005. ビワがんしゅ病に関する研究. 長崎果樹試研報. 特別報告 2. 36-39
- 向 秀夫. 1952. ビワの癌腫病原細菌に関する研究. 農技研報. C1:1-82
- 根角博久・福田伸二・富永由紀子・菅 康弘. 2005. 第 68 回 (平成 17 年度) 九州農業研究発表会専門部会講演要旨集. 248
- 西山幸司. 1997a. アピ 20NE キットおよび追加した 11 項目の細菌学的性状に基づく簡易同定法による植物病原細菌の鑑別表の作成. 農環研報. 14:1-35
- 西山幸司. 1997b. 鑑別表データを利用した植物病原細菌の簡易同定法. 農環研報. 14:36-48
- 埼玉県内務部. 1934. 苗木病虫害防除法 (二). 病虫雑. 21(2):150

第1表 分離菌株の来歴と病原性

No.	菌株名	来歴
1	05R001	大村市荒瀬 2005年3月採集, 分離
2	05R002	〃
3	05R003	〃
4	BG4	大村市荒瀬 2005年5月採集, 9月分離
5	BG6	〃
6	BG7	〃
7	BG8	〃
8	BG9	〃
9	BG10	〃
10	NAE6	ビワがんしゅ病細菌保存株 (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>eriobotryae</i> ; 森田, 2005)
11	NAE57	〃
12	NAE89	〃

(第1表 つづき)

No.	病原性			備考
	中肋	緑枝	葉肉	
1	+	+	-	
2	+	+	-	
3	+	+	-	
4	+	+	-	
5	+	+	-	
6	+	+	-	
7	+	+	-	
8	+	+	-	
9	+	+	-	
10	+	+	-	宮崎大学保存菌株より分譲 Aグループ菌
11	+	+	-	〃 Cグループ菌
12	+	+	+	〃 Bグループ菌

第2表 分離菌株の細菌学的諸性質

項目	05R001, 05R002, 05R003	BG4,B G6,BG 9,BG10	BG7	BG8	<i>P.syringae</i> pv. <i>eriobotrya</i>		
					NAE6	NAE57	NAE89
グラム 反応	-	-	-	-	-	-	-
蛍光性色素産生	+	+	+	+	+	+	+
PSA 培地上での水溶性褐色色素産生	-	-	-	-	-	+	-
40℃下での生育	-	-	-	-	-	-	-
レバン産生	+	+	+	+	+	+	+
ジャガイモ塊茎腐敗	-	-	-	-	-	-	-
タバコ過敏感反応	+	+	+	+	±	±	+
硝酸塩の還元	-	-	-	-	-	-	-
インドール産生	-	-	-	-	-	-	-
オキシダーゼ活性	-	-	-	-	-	-	-
発酵性	-	-	-	-	-	-	-
アルギニンジヒドロラーゼ活性	-	-	-	-	-	-	-
ウレアーゼ活性	-	-	-	-	-	-	-
エスクリンの加水分解	+	+	+	+	+	+	+
ゼラチンの加水分解	-	-	-	-	-	-	-
β-ガラクトシダーゼ活性	-	-	-	-	-	-	-
炭素源の利用性							
D-グルコース	+	+	+	+	+	+	+
サッカロース	+	+	+	+	+	+	+
D-アラビノース	-	-	-	-	-	-	-
L-アラビノース	+	+	+	+	+	+	+
D-マンノース	+	+	+	-(+)*	+	+	+
マルトース	-	-	-	-	-	-	-
セロビオース	-	-	-	-	-	-	-
トレハロース	-	-	-	-	-	-	-
L-ラムノース	-	-	-	-	-	-	-
ソルビトール	+	+	+	+	+	+	+
D-マンニトール	+	+	+	+	+	+	+
イノシトール	+	+	-	+	+	+	+
N-アセチル-D-グルコサミン	-	-	-	-	-	-	-
グルコン酸カリウム	+	+	+	+	+	+	+
n-カプリン酸	+	+	+	+	+	-	+
アジピン酸	-	-	-	-	-	-	-
d L-リンゴ酸	+	+	+	+	+	+	+
クエン酸ナトリウム	+	+	+	+	+	+	+
酢酸フェニル	-	-	-	-	-	-	-
マルトース	-	-	-	-	-	-	-
ゲラニオール	-	-	-	-	-	-	-
安息香酸ナトリウム	-	-	-	-	-	-	-
L-酒石酸ナトリウム	-	+	+	+	+	+	+
L-アスパラギン酸ナトリウム	+	+	+	+	+	+	+

* 欄内の-は API の結果を示した。(+)は定法による再試験の結果を示した。



写真 1



写真 2



写真 3 - 1



写真 3 - 2



写真 4



写真 5 - 1

長崎台木用ビワ実生苗の地下部に発生したがんしゅ症状から分離された細菌の性状)



写真 5 - 2



写真 6

- 写真1 :1年生ビワ実生苗の地下部に発生したがんしゅ症状
- 写真2 :2年生ビワ実生苗の地下部に発生したがんしゅ症状
- 写真3-1 :実生苗の種子が離脱した跡に生じたがんしゅ症状(被害1年生実生)
- 写真3-2 :健全1年生実生苗
- 写真4 :Kings' B培地上に画線して培養した分離細菌の集落形態
- 写真5-1 :葉の中肋部に形成されたがんしゅ症状と退緑病斑を形成しない葉肉部の接種部位
- 写真5-2 :緑枝に形成されたがんしゅ症状
- 写真6 :Bグループ菌(NAE89)接種による葉肉部に形成された退緑病斑

Bull. Nagasaki Fruit Tree Exp. Stn.10:30-40. 2007.

Characteristics of Isolated Bacterium from Canker Symptom(s) Observed in the Underground Parts of Loquat Seedlings for Rootstock

Yasuhiro SUGA, Shinji FUKUDA, Yukiko TOMINAGA and Hirohisa NESUMI

Nagasaki Fruit Tree Experiment Station, 1370 Onibashi-cho, Omura, Nagasaki, 856-0021, Japan

Summary

We observed the canker symptoms that were formed on the underground part (crown) of 1 or 2 year-old loquat seedlings, discolored to blackish brown, enlarged and had rough surface. A gram-negative, aerobic bacterium was isolated from the symptoms, and this bacterium showed pathogenicity to inoculated mid-ribs of loquat leaves. The fluorescent pigment was produced on King's B medium by the bacterium strains and the result of the LOPAT test were indicated +, -, -, -, +. The results of Nishiyama's methods for rapid identification of phytopathogenic bacteria suggested that the bacterium belong to either one of *Pseudomonas syringae* pathovars. In addition, the isolates were identified as *P. syringae* pv. *erobotryae*, the causal agent of stem canker of loquat, based on the physiological characters, utilization of carbon sources and pathogenicity to the loquat tree.

It has been well known that the symptoms of loquat canker is observed on loquat tree's branch, trunk, leaf, and fruits. But, in this paper, we revealed the symptoms of underground part of loquat tree, so the canker symptoms generated on crown of loquat seedling should be add to one of symptoms of loquat bacterial canker disease.