

カンキツかいよう病菌 *Xanthomonas citri*(Hasse)Dowsom の腐生的生存に関する研究 第1報

シバからのかいよう病菌の検出

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	後藤,正夫 太田,光輝 岡部,徳夫
発行元	日本植物病理學會
巻/号	41巻1号
巻号補足	
掲載ページ	p. 9-14
発行年月	1975年1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 *Xanthomonas citri* (Hasse)

Dowson の腐生的生存に関する研究

第1報 シバからのかいよう病菌の検出*

後藤正夫**・太田光輝**・岡部徳夫**

Masao GOTO, Kouki OHTA and Norio OKABE: Studies on Saprophytic

Survival of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson

1. Detection of the bacterium from a grass (*Zoysia japonica*)

Abstract

Xanthomonas citri (Hasse) Dowson could be detected from a grass, *Zoysia japonica*, growing along the paths in citrus groves all the year round. The isolates obtained from the grass were phage-typed. Frequency of each phage-type was as follow: phage-type A...11 isolates (38%), B...13 isolates (45%) and C...5 isolates (17%). Population density surviving on the grass was generally less than 10^3 cells per gram samples. It was interested that the isolation frequency of phage-type C from the grass was higher than that from diseased citrus plants.

Detection ratio of *X. citri* from *Zoysia japonica* was generally higher in late autumn through winter than in summer. Phage-type A and C were frequently detected in winter, whereas phage-type B in summer.

To investigate whether *X. citri* detected from the grass had originated in direct dispersion from the canker lesions by rain splash, the phage-types isolated from *Zoysia japonica* were compared with those from diseased citrus trees grown nearby. Only the isolates belonged to phage-type B were isolated from canker lesions on Unshu trees which were grown most close to the grass. On the other hand, phage-type A was found on the other citrus trees such as navel orange, lemons, Natsudaikai etc., which were grown 80 to 100 m away from the colonies of the grass, and interrupted by the three lines of tall trees of *Pondocarpus chinensis* planted as wind breaks. No isolate of phage-type C was detected from any citrus plants. From these facts, it was considered that the phage-type C had been surviving on *Zoysia japonica* independently from the diseased citrus trees. The phage-type A was also assumed to survive fairly long period of time on the grass because it was repeatedly detected from the grass even several months after typhoon which might be responsible for dispersion of the bacterium from the lesions. The population density of phage-type B in canker lesions of Unshu trees quickly declined by autumn so that the isolation of the bacterium after late autumn became very difficult by the conventional methods. Nevertheless, the phage-type B was isolated from the grass in winter through the next spring. Therefore, the phage-type B was also considered to survive on the grass for at least several months under natural conditions.

X. citri could be isolated from the colonies of *Zoysia japonica* which were collected at the distance of 600 m from citrus trees. However, detection of the bacterium was difficult from the grass in area where no citrus tree was grown.

(Received March 1, 1974)

* カンキツかいよう病に関する研究 V

** 静岡大学農学部 Faculty of Agriculture, Shizuoka University Shizuoka, Japan.

植物病原細菌が非寄主植物の葉面や根圏において腐生的に長期間生存する事実は、*Pseudomonas tabaci*^{1,10)}, *P. angulata*^{1,10)}, *Xanthomonas vesicatoria*^{1,10)}, *X. malvacearum*⁸⁾, *X. oryzae*^{2,5)}, *Erwinia aroideae*^{6,9)} などでくわしく研究されている。これらは何れも寄主植物以外の作物や雑草が病原細菌の生活史のなかで果している重要な役割について多くの問題を提示してきた。カンキツかいよう病でも後藤³⁾は葉肉注射接種法を用いて、第一次伝染が起る前のカンキツ園で採集した土壌、カンキツ根部、コヒルガオ等多数の雑草から高頻度に *X. citri* が検出されることを明らかにし、これらの病菌が降雨によって病斑から飛散したのち長期間腐生的に生存してきたものであろうと報告した。筆者らは、その後もカンキツ園における *X. citri* と雑草との関連について引き続き研究を続けた結果、シバ (*Zoysia japonica*) から本菌が高い頻度で検出される事実を明らかにすることができた。そこで *X. citri* の生存とシバの関係に焦点をあて、生態的研究を行ったのでその結果を報告する。

実験材料および方法

1. 試料採集地

本実験に用いたシバその他の雑草は主に静岡県磐田市の旧静岡大学農学部附属農場カンキツ園およびその周辺地域で採集した。

2. 雑草および土壌の採集

紫外線 (ナショナル殺菌灯 GL-15) で殺菌したポリエチレン袋に雑草および土壌を採取し、24時間以内に実験に供した。雑草は軽く振って根部土壌粒子を落とし、殺菌したハサミで地上部と地下部に分けて用いた。土壌は篩にかけ植物の残根その他のきょう雑物を除いてから用いた。

3. 接種源の調製

雑草の地上部は10g、地下部は20g、また土壌は50gを殺菌した200ml容量の広口瓶に入れ、100mlの殺菌水を加えて10分間強振して洗滌した。洗滌液は5分間静置したのち上澄液を2,000 rpm (450×g) 20分間遠心沈澱して、粗大粒子を沈澱させた。この上澄液に1mlのペプトン水を加え、28℃に3時間保ったのち、6,000 rpm (4,000×g) 20分間遠心沈澱させた。この沈澱を1mlのペプトン水に懸濁し、直ちにカンキツの葉に注射接種した。

4. 接 種

葉肉注射法によった⁴⁾。それぞれ煮沸滅菌した1/4注射針と0.5ml注射筒を使用した。70%アルコール

で表面消毒した葉の裏面の中肋部から注入した。接種した植物は温室に移すことなく、そのままガラス室に保ち、発病経過を観察しながら、1ヶ月後単位面積あたり病斑数を記録した。

5. 検 定 植 物

実生のナツダイダイ (*Citrus natsudaidai*) を用いた。実生苗は直径15cmの植木鉢に1鉢4本ずつ移植し、窒素肥料を充分与えて育苗し、幼生葉を除いた若い展開葉のみに接種した。冬期は、ガラス室内に置いた電熱加温接種箱 (温度15~30℃) で育苗と接種を行った。

6. 培 地

使用した培地の組成は次の如くである。

ペプトン・しょ糖寒天培地: ペプトン10g, しょ糖10g, 寒天15g, 蒸溜水1,000ml, pH 6.8。

ペプトン水: ペプトン10g, しょ糖10g, 蒸溜水1,000ml, pH 6.8。

マンニット分解能判定用基本培地: NH_4NO_3 1g, K_2HPO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, 寒天15g, 蒸溜水1,000ml。この基本培地にマンニットを0.5%濃度に加え、0.4% BTB 溶液を2ml/l加えて斜面培養し、酸生成と発育の有無で判定した。

7. ファージ型の同定

ブルーレント・ファージ CP1 および CP2 を用いた。ファージの保存液は、単一溶菌斑からペプトン水で24時間培養増殖したものをクロロホルム処理したのち、5℃の冷蔵庫に保存した。スポットテストによってファージ感受性を調べた。

実験 結 果

1. カンキツ園で採集したシバおよびその根圏土壌からの *X. citri* の検出

X. citri の検出に用いたシバは旧静岡大学農学部附属農場カンキツ園通路に、幅5m、長さ40mにわたって自生していた集落で、最も近いウンシュウの罹病樹からは3m離れた位置にあり、その間には生垣等は存在しなかった。またネーブル、レモン、ナツダイダイ、ハッサク等の雑柑類の罹病樹からは80~100m離れた位置にあったが、これらとの間には高さ4~5mのマキの生垣3列が約40m間隔で存在した。冬期はシバの地上部が枯死したので、12月上旬以後春季新芽が出るまでの期間は地上部はこれらの枯死葉を供試した。かいよう病菌の検出結果を示すと第1表の如くである。

シバおよびその根圏土壌からはほぼ周年 *X. citri*

Table 1. Detection of *Xanthomonas citri* from foliages, rhizomes and rhizosphere soils of *Zoysia japonica* growing in the citrus groves

Date of collection	Sample No.	Result		
		Foliage	Rhizome	Rhizosphere
May 1, 1970	1	+ (4.5)	+ (1.3)	
May 1	2	+ (1.0)	+ (2.0)	
Jul. 2		+ (0.6)	—	—
Jul. 7		—	+ (0.5)	
Oct. 12		+ (12.0)	+ (14.0)	
Oct. 13		+ (1.0)	—	
Nov. 4	1	+ A (0.5)	—	
Nov. 4	2	—	+ (0.2)	
Nov. 4	3	+ (0.2)	+ (0.2)	
Nov. 27	1	—	+ (0.2)	
Nov. 27	2	—	+ C (1.0)	
Dec. 9	1	+ (0.5)	—	
Dec. 9	2	—	+ (0.3)	
Dec. 22	1	+ C (0.2)	+ A (0.4)	
Dec. 22	2	+ C (4.5)	—	
Jan. 15, 1971	1	+ A (0.2)	—	
Jan. 15	2	+ A (0.5)	+ A (0.7)	
Jan. 22		+ A (0.2)	—	
Feb. 12		+ A (3.0)	—	
Feb. 13				+ C (0.2)
Mar. 20	1		+ AB (0.3)	
Mar. 20	2		+ AB (1.1)	
Mar. 20	3		+ B (0.2)	
Apr. 7		—	+ B (3.0)	—
Apr. 19	1	—	—	+ B (0.2)
Apr. 19	2	—	—	+ B (0.2)
Apr. 19	3	—	—	+ B (0.2)
Jun. 14	1	—	—	+ B (0.2)
Jun. 14	2	—	—	+ B (0.2)
Jun. 14	3	—	—	+ B (0.1)
Jul. 16	1	—	—	+ C (0.2)
Jul. 16	2	—	+ B (0.2)	—
Sep. 13	1	—	+ B (0.2)	—
Sep. 13	2	—	—	+ B (0.2)
Sep. 23	1	—	+ B (1.2)	—
Sep. 23	2	—	+ A (3.0)	—
Sep. 23	3	—	—	+ A (0.2)

() ; average number of lesions per leaf inoculated by the infiltration technique.

A ; phage-type A (CP1+, CP2-). B ; phage-type B (CP1-, CP2+).

C ; phage-type C (CP1-, CP2-).

が検出されたが、検出頻度は季節的に若干異り、冬期に高く夏期に低い傾向がみられた。地上部・地下部および根圏土壌から検出された病菌数には明瞭な差はみられなかった。1接種葉あたり平均病斑数から計算した病菌濃度はいずれも低く、一般に試料1gあたり 10^3 個以下と考えられた。

これらのシバから検出された *X. citri* が、単に罹病樹の病斑から直接飛散し、汚染した直後のものであるか、それとも汚染後シバの上で長期間生存を続けてきたものであるかという問題、さらにはシバおよびその根圏で *X. citri* が増殖形態をとり得るか否か等の問題は、かいよう病菌の生態研究上、きわめて重要な

点である。これらの点を究明するために、次にシバから得た病菌の系統とカンキツ罹病樹から得た病菌の系統を相互に比較することによって検討した。シバおよびその根圏土壌から分離した29菌株についてCP1およびCP2両ファージでファージタイピングし、このファージ型をマンニット分解能で確認した。その結果、A型(CP1+, CP2-) 11菌株、B型(CP1-, CP2+) 13菌株、C型(CP1-, CP2-) 5菌株が同定された(第1表)。秋から冬にかけてAおよびC型が、春から夏にかけてB型が多く検出される傾向が認められたが、一般に検出頻度は冬期に高く、夏期に低い傾向がみられた。

Table 2. Phage-type make-up of *Xanthomonas citri* isolates found on a grass, *Zoysia japonica*, and citrus plants located in various distances from the grass.

Plant	Distance from colonies of <i>Zoysia japonica</i>	No. of isolate	Phage-type		
			A	B	C
<i>Zoysia japonica</i>	—	29	11	13	5
Unshu	3~50 m	42	0	42	0
Navel	80	31	41	0	0
Lemon	100	20	20	0	0
Natsudaiddai	80	17	17	0	0

これに対してカンキツ類のかいよう病病斑内のファージ型を調べた結果は第2表の如くである。まずシバから3~50m離れたウンシュウ上の病斑から分離した42菌株はすべてB型から構成されており、また80~100m離れた雑柑類上の病斑から分離した68菌株はいずれもA型であった。このようにウンシュウと雑柑類の間ではファージ型に判然たる相違がみられた。最もシバに近接しているウンシュウ罹病樹の病斑から分離した菌もすべてB型菌であった。これらの事実から、シバおよびその根圏土壌から検出されたA型菌、B型菌は罹病樹から直接飛散して短期的にこれらを汚染していたものとするよりも、むしろシバおよび土壌中で長期間生存していたものとする方が、より妥当であろうと考えられた。他方、シバから分離されたC型菌は、ウンシュウ、雑柑類からは全く分離されなかったもので、この系統はカンキツとは全く無関係にシバで腐生的に生存していたものと考えてさしつかえないであろう。

2. シバからの *X. citri* 検出の有無と、カンキツ園からの距離との関係

前項の実験で、カンキツ園のシバおよびその根圏土壌中で *X. citri* が生存している事実が明らかにされたので、次にカンキツ園から遠く離れた場所や、附近にカンキツが全く生育していない地域のシバおよび雑草から *X. citri* の検出分離を試みた。旧静大農学部敷地を中心に磐田市、豊田町および福田町の20カ所からシバを採集して調べた。その結果、第3表に示す如く、カンキツ樹から最高600mの範囲内で採集した6点のシバ試料から *X. citri* が検出された。これらのファージ型を調べたところ、A型が37菌株、B型が11菌株、C型が3菌株であった。病菌密度はいずれも低かったが、1カ所だけ大学農場牧草地(クローバー)通路で4月10日に採取したものに高密度のものがあつた。さらに磐田市周辺のカンキツ非栽培地域15カ所から、12月~5月にかけて検出分離を試みたが、いずれも *X. citri* の検出は不成功に終わった。以上の事実は、シバから検出される *X. citri* が、カンキツ罹病樹からの短期直接汚染によるという可能性は少ないが、両者の間に何らかの関連があることを示唆している。

Table 3. Phage-type make-up of *Xanthomonas citri* isolated from *Zoysia japonica* collected at the distant places from citrus groves

No. of sample	1	2	3	4	5	6
Date of collection	Dec. 24, 1971	Sep. 25, 1972	Apr. 10, 1972	Apr. 10, 1972	Jan. 19, 1972	Apr. 10, 1972
Locality	Kegahigashi, Toyoda-cho	University campus	University campus	University farm	University farm	University campus
Distance from closest citrus tree	30 m	100 m	300 m	400 m	400 m	600 m
Phage-type isolated from closest diseased citrus tree	A	A, B	A	A	A	A
Average number of lesion per leaf inoculated	1.0	1.8	0.07	26.0	2.0	3.1
Number of isolates obtained	3	9	1	26	5	7
Number of isolates belonged to phage- type:	A 0 B 0 C 3	4 5 0	1 0 0	25 1 0	0 5 0	7 0 0

考 察

これまでカンキツかいよう病菌の生態的研究の中で、あまり注意を払われてこなかった非宿主植物上での腐生的生存が、葉肉注射接種法の考案によって明らかにされた³⁾。とくに本研究で、カンキツ園のシバで得た結果は、*X. citri* の生態研究に多くの問題を提示している。シバおよびその根圏土壌からは、ほぼ周年 *X. citri* が検出されたが、特に冬期での検出率が高かった。これは病斑組織内の病菌密度の消長に逆行するものであり、原因としては多分、土壌中における他の微生物の活動が低温により低下し、それらとの間の相互作用が不活発になるためであると考えられる。これは葉肉組織に注射接種された病菌が、増殖して病斑形成に至るまでの間にも大きく影響するものと考えられる。秋から冬にかけてファージ型 A および C、春から夏にかけて B 型が多く検出される傾向が認められた点も注目された。シバ附近にあるウンシュウの病斑からはすべて B 型が、また約 80~100 m 離れた雑柑類の病斑からはすべて A 型が分離され、カンキツの種類によって著しくファージ型の分布が異っていた。しかし A 型菌によって侵された雑柑類と、本実験で供試したシバとの間には高い防風効果をもつ樹高 4~5 m のマキの生垣が約 40 m ごとに 3 列配置されており、シバから分離された A 型菌がこれら罹病雑柑類から飛散したものとは考え難い。実際台風通過後数カ月以上をへた冬期および翌春でもシバから A 型菌が分離された事実は、これらの菌が仮に罹病雑柑に由来するものとしても、きわめて長期間生存可能であるこ

とを示している。さらに病斑内の病菌密度が著しく低下して、通常分離法では殆んどウンシュウ病斑から病菌を検出し得なくなる晩秋以降も、引続きその附近のシバから検出されたことは、最もシバに近接している罹病ウンシュウの病斑から病菌が、調査の直前に飛散・汚染したものではなく、シバおよび土壌中で長期間生存していたものであるという考え方を支持するものとする。カンキツ園から 30~600 m 離れた畑、牧草地、通路などに自生しているシバから 6 回にわたって *X. citri* が検出されたことも、シバ上での長期間生存の可能性を強く示唆している。

しかし、一般的にカンキツ非栽培地域のシバおよびその根圏土壌からは *X. citri* が検出されなかったことから、雑草から検出された病菌の起原はいずれにしても、カンキツ罹病樹にあると考えるのが妥当であろう。両者の結びつきが如何なる経路と時間的間隔で成立するものであるかは、今後種々の角度からの検討を要する問題であると考ええる。シバおよびその根圏土壌から検出された 29 菌株には C 型菌が 5 菌株 (約 17%) 含まれていた。これはカンキツ園における自然発病の C 型頻度 2~3%⁷⁾ と比較して著しく高い点で興味がある。このことは *X. citri* のファージ型間に腐生能力において程度を異にするものがあることを示唆している。

シバおよびその根圏土壌から検出された *X. citri* の密度はいずれも低く、試料 1 g あたり 10^3 個以下と考えられたが、1 例のみカンキツ園から約 400 m 離れた牧草地 (クローバー) の通路のシバから、本菌が高密度で検出された。本菌の腐生生活の形態については

まだ全く未知の領域に属するが、このような結果は本菌が増殖形態をとってシバの一部でコロニーを形成している可能性を示唆する。このように土壌や雑草上で生存を続ける病菌は、それがたとえ低密度であっても寄主植物との接触場面で増殖し、伝染に結びつく場面があるとすれば、本病の発生生態上重要な意味をもってくることになる。筆者らはこれまでに、刈取り雑草を敷草に用いた場合、時としてそれに接した葉に局部的に感染が起る事実をウンシュウで観察してきたが、この事実は雑草上での *X. citri* の腐生生活が本病生態上軽視できないことを示しているといえよう。

摘 要

1. カンキツ園の通路に自生するシバおよび根圏土壌から年間を通じて *X. citri* を検出することができた。これらの菌株のファージ型構成は、A型が11菌株(38%)、B型が13菌株(45%)、C型が5菌株(17%)であった。いずれも菌濃度は低く、試料1gあたり 10^3 個以下の場合が多かった。

2. シバとその根圏土壌からの *X. citri* の検出頻度は季節的に異なり、冬期に高く、夏期に低い傾向がみられた。またファージ型は秋から冬にかけてAおよびC型が、春から夏にかけてB型が多く検出される傾向が認められた。

3. シバから分離されるファージ型を附近の罹病カ

ンキツ上のそれと比較した結果、シバに近接した発病樹からの直接汚染とは限らないことが強く示唆された。そして、*X. citri* はシバおよび根圏土壌で長期間生存可能であると考えられた。

4. カンキツ園から600m程離れた場所のシバからも *X. citri* を分離することができたが、一般的にカンキツが栽培されていない地域では、シバからの *X. citri* の検出は認められなかった。

引用文献

- 1) Diachun, S. and Valteau, W. D. (1946). Phytopathology 36: 277-280.
- 2) 後藤和夫・深津量栄・大畑貫一 (1953). 日植病報 17: 154 (講要).
- 3) 後藤正夫 (1970). 静大農研報 20: 21-29.
- 4) 後藤正夫・芹沢拙夫・森田正人 (1970). 静大農研報 20: 1-19.
- 5) 伊阪実人 (1969). 北陸病虫研会報 17: 14-19.
- 6) 菊本敏雄・坂本正幸 (1969). 日植病報 35: 29-35.
- 7) 芹沢拙夫 (1971). 静柑試報 9: 89-96.
- 8) Smith, T. E. (1962). Phytopathology 52: 1313-1314.
- 9) 津山博之 (1962). 東北大農研彙報 13: 221-345.
- 10) Valteau, W. D., Johnson, E. M. and Diachun, S. (1944). Phytopathology 34: 163-164.