

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3報 腐生的生存菌の感染菌量について

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 豊島,明彦 田中,俊一
発行元	日本植物病理學會
巻/号	44巻2号
巻号補足	
掲載ページ	p. 197-201
発行年月	1978年4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Ⅲ報 腐生的生存菌の感染菌量について*

後藤正夫**・豊島明彦**・田中俊一**

Masao GOTO,** Akihiko TOYOSHIMA** and Shunichi TANAKA** : Studies
on Saprophytic Survival of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson
3. Inoculum Density of the Bacterium Surviving in the Saprophytic Form.

Abstract

This paper describes the results of a study on the possibility of the infection of citrus plants due to *Xanthomonas citri* surviving on the rhizomes of *Zoysia macrostachya*, root systems of host plants, rice straw mulch or plain soils. Those materials put in the boxes of 40×60×15 cm in size were artificially infested by the suspensions of *X. citri*. The Natsudaikai seedlings at the ten-unfolded leaf age were used as the test plants, and weakly wounded by scratching the leaves with a sand paper prior to the inoculation. Six pots of the individual test plants were placed on the surface of the soil in a box. Inoculation of the test plants was made by splashing with shower produced by a DIK automatic rain simulator which was adjusted for the 50mm precipitation per hour. For this splash inoculation, ten-minute shower was given three times at 8-hour intervals. After inoculation, the test plants were transferred to a greenhouse and observed for the disease development. The leaf infiltration technique was applied for assaying the population of *X. citri* in the saprophytic forms. As shown in Figs. 1 to 6, the minimum density of *X. citri* for infection was around 10^2 per gram samples regardless of the kind of the infested materials. Above this level, the infection ratio increased in parallel with the population of *X. citri* surviving under the given conditions. The vegetations, either the rhizomes of *Z. macrostachya* or the root systems of Natsudaikai, substantially increased the infection by the prolonged longevity of the bacterium. The rice straws provided the bacterium with a favorite habitat forming a potential source of infection. The repeated shower over the same boxes with the infested rice straws gave the negligible effects on the population of the bacterium as well as the infection ratio.

(Received February 27, 1978)

緒 言

カンキツ かいよう 病菌 (*Xanthomonas citri*) がカンキツ病斑組織以外に、カンキツ園の土壤、雑草、敷わらなどから高頻度で分離されることが明らかとなり、しかも人工汚染した場合これらの材料で長期間生存しうることが実験的に証明された^{2,4,5)}。したがってこのような生存形態をとる病菌は病斑組織内生存菌

とは異った生態的行動をとるものと考えられ、本菌に腐生的生態型 (Saprophytic ecotype) が存在する可能性が示唆された。腐生的生存形態をとるかいよう病菌が、自然条件下で実際に伝染源としての役割を演ずるとすれば、本病の生態上重要な意味をもってくる。今日まで *X. citri* が非宿主依存型の生存形態をとる可能性についてはくり返し報告されてきた^{2,4,5,6,7)} が、それが伝染環の中で如何なる役割を演じてい

* カンキツかいよう病に関する研究Ⅷ

** 静岡大学農学部 Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Shizuoka, 422, Japan.

るかについての証明は全くなされてきていない。

本報告は種々の腐生の生存形態にあるかいよう病菌の、自然環境条件下における伝染源としての可能性について検討した結果をまとめたものである。本報告をまとめるにあたり研究の実施に際して種々御助言と御援助を賜った故水上武幸博士に深謝の意を表する。

材料および方法

1. 細菌 N93, N1-1, および U15の3菌株(何れもファージ型A)を混合して用いた。菌株の培養保存は1%しょ糖加馬鈴薯寒天高層培地(pH 6.8)を用い、5°Cの冷室で行った。接種源の調製にはペプトン水(ペプトン及びしょ糖各10g, 蒸留水1,000ml, pH6.8)を用いた。

2. 芝草の栽培 オニシバ(*Zoysia macrostachya*)の地下茎から土粒を落してよくほぐし、長さ10cm程度に切断したのち、これを縦、横、深さそれぞれ40, 60および15cmの発泡スチロール箱に約2cm間隔に並べて植え、ガラス室で栽培した。新葉が土面をほぼ全面覆うほどに生長したとき実験に用いた。

3. 土壌および芝草の汚染 ペプトン水で28°C 24時間振盪培養(1分間120回往復振盪)した菌液を 10^9 cells/mlに希釈し、これを1箱あたり100mlづつ霧吹きで均一に噴霧し、1日室内に保ったのちガラス室に移し、ベンチ上に保った。汚染した土壌および芝草は乾燥しない程度に適宜灌水した。1処理5~6箱を用意し降雨処理の都度これらの中から無作為に1箱づつをとり出して実験に用いた。

4. 検定植物 本葉10枚程度に生長した実生のナツダイダイ苗を用いた。実験の初期に行った無傷苗による降雨処理実験の結果、極めて発病率が低かったのち、それ以後は検定の直前に葉の裏面をアルコールで消毒したのち、紙ヤスリ(No. 24)で軽く擦傷した苗を用いた。供試試料1箱あたり6個体の苗を鉢ごと植込み、降雨処理した。対照としては細菌液のかわりに滅菌水100mlを噴霧した以外全く同様の処理をほどこした試料を実験に供した。

5. 人工降雨処理 DIK 雨滴発生装置を用い室内で2mの高さから50mm/h (1.5×10^4 雨滴/m²/min)を10分間づつ、8時間間隔で3回処理した。処理後は検定植物を箱から抜きとりガラス室内で発病を観察し、1苗あたり病斑数を数えた。汚染した試料も同時にガラス室に戻し、別の連続降雨処理の実験に用いた。

6. 汚染試料の *X. citri* 密度 芝草など植物材料

は20g、土壌は50gを採取し、既報³⁾の方法に従って葉肉内注射法で検定し、試料1gあたりの菌数で表した。これらの実験は、細菌の培養を除き、すべて夏期温室内で行った。

結 果

1. *X. citri* 汚染土壌を用いた場合のナツダイダイ苗の感染 畑土を *X. citri* で汚染し、1日後、1, 2, 4, 6 および8週間後に人工降雨処理して感染の有無を調べた。結果を示すと第1図のごとくである。

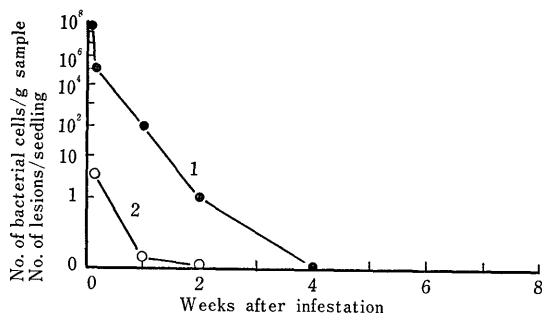


Fig. 1. Infection of the Natsudaidai seedlings placed on the artificially infested soils put in boxes (60×40×15 cm), and inoculated by splashing with shower controlled by an automatic rain simulator. The curve 1 indicates the number of bacterial cells of *X. citri* per gram soil detected by the leaf infiltration technique and the curve 2 the number of lesions per seedling produced by the splash inoculation.

汚染土壌中の菌数は1日目に急減して 10^5 /gのレベルになり、それ以後もほぼ直線的に減少した。2週間後には僅かに検出されるにすぎなかった。ナツダイダイ苗の感染は土壌中病菌濃度が比較的高い1日後では各苗とも均一に感染が起ったが、土壌中病菌密度の低下とともに急減し、 10^2 /g以下になって感染はみられなくなった。

2. 汚染芝草を伝染源とした場合のナツダイダイ苗の感染 芝草を栽培した箱を *X. citri* で汚染し、この中に6個体の付傷ナツダイダイ苗を配置して降雨処理した。結果は第2図のごとくである。

芝草の地上部、地下部における病菌密度の変化は土壌単独の場合よりはるかに安定しており、4週間後においても 10^2 /gのレベルを維持し、6週間後でも僅かながら検出された。この条件下での苗感染も土壌の場合と同様、試料の保菌密度が 10^2 /gに下るまで認められた。

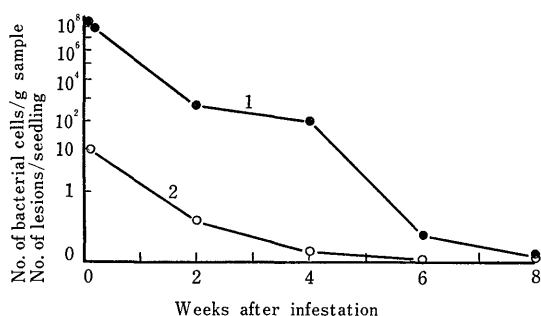


Fig. 2. Infection of the Natsudaidai seedlings placed on the artificially infested weed (*Zoysia macrostachya*) grown in boxes, and inoculated by splashing with shower controlled by an automatic rain simulator. The curve 1 indicates the number of bacterial cells of *X. citri* per gram weed (rhizomes and leaves) detected by the leaf infiltration technique and the curve 2 the number of lesions per seedling produced by the splash inoculation.

3. ナツダイダイを移植した汚染土壌における感染
土壌を *X. citri* で汚染した直後にナツダイダイ苗を1箱6個体づつ、葉を汚染しないよう注意深く移植し、その後も茎葉に感染が起らないよう灌水に注意しつつ栽培した。この箱に上述の実験と同様に6個体の付傷したナツダイダイ苗を配置して降雨処理した。結果を示すと第3図の如くである。

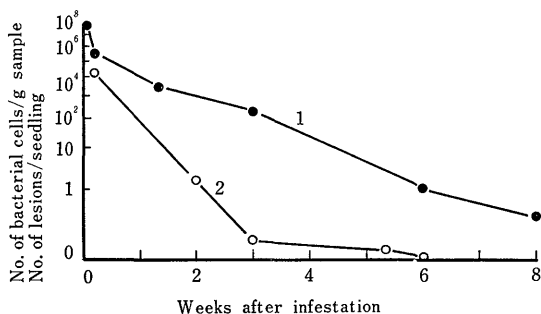


Fig. 3. Infection of the Natsudaidai seedlings placed on the artificially infested soil in which the Natsudaidai seedlings were grown, and inoculated by splashing with shower controlled by an automatic rain simulator. The curve 1 indicates the number of bacterial cells of *X. citri* per gram soil detected by the leaf infiltration technique and the curve 2 the number of lesions per seedling produced by the splash inoculation.

移植したナツダイダイ苗の中間部から採った土壌中の菌数は高い水準を維持し、6週間後も1gあたり10細菌細胞を数えた。汚染1日後の降雨処理によるナツダイダイ苗の感染は激しく、罹病葉はすべて落葉した。しかし土壌中の菌数低下とともに感染量も急減し、5週間後に土壌中の病菌密度が 10^2 /g前後に至って感染がみられなくなった。

4. 芝草およびナツダイダイ苗を混植した場合の感染
汚染した芝草の中に6個体のナツダイダイ苗を葉の感染を起さないよう注意深く移植して栽培した。この箱に6個体の付傷ナツダイダイ苗を配置して降雨処理した。結果を示すと第4図の如くである。

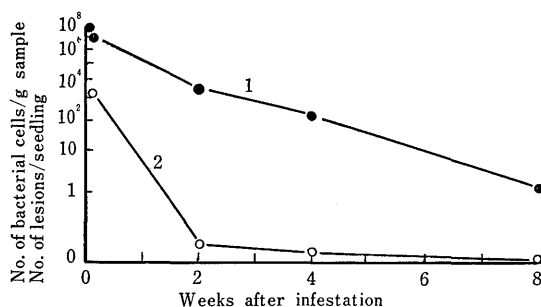


Fig. 4. Infection of the Natsudaidai seedlings placed on the artificially infested soils with a weed (*Zoysia macrostachya*) and the Natsudaidai seedlings grown, and inoculated by splashing with shower controlled by an automatic rain simulator. The curve 1 indicates the number of bacterial cells of *X. citri* per gram weed (rhizomes and leaves) detected by the leaf infiltration technique and the curve 2 the number of lesions per seedling produced by the splash inoculation.

芝草上の菌濃度は極めて高い水準を保ち、8週間後においても約 10^2 /gレベルを維持した。この場合も1日目の降雨処理では激しい感染が起ったが、汚染材料上の菌数低下とともに感染量も減少し、病菌密度が 10^2 /gレベルに達すると感染はみられなくなった。

5. 汚染イネわらを敷わらとした場合のナツダイダイ苗の感染
イネわらを長さ約5cmに切断し、これに菌液を噴霧して汚染したのち、土壌表面がかくれる程度の厚さに敷きつめた。この箱に6個体のナツダイダイ苗を配置して降雨処理した。結果を示すと第5図の如くである。

イネわら上の病菌密度の変化は比較的緩慢で、8週間後も10細菌細胞/g試料の濃度を維持した。この

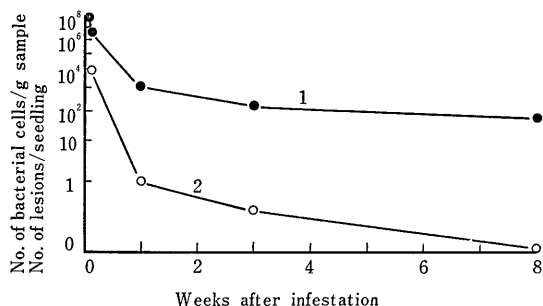


Fig. 5. Infection of the Natsudaaidai seedlings placed on the soils covered with the artificially infested rice straws, and inoculated by splashing with shower controlled by an automatic rain simulator. The curve 1 indicates the number of bacterial cells of *X. citri* per gram straws and the curve 2 the number of lesions per seedling produced by the splash inoculation.

状態における感染は4週間後にもみられ、病菌濃度で 10^2 /g まで感染がみられた。

6. 汚染イネわらからの感染に及ぶ連続降雨の影響

以上の結果は *X. citri* で汚染した試料をガラス室内に保持しておき、一定期間ごとに新たに汚染試料を取出して降雨処理して得た結果である。次に戸外の自然環境下に汚染試料を置いて自然降雨に曝した場合と、同一汚染材料にくり返し人工降雨処理した場合の病菌密度および感染率の変化を、汚染イネわらを材料にして調べた。結果を示すと第6図の如くである。

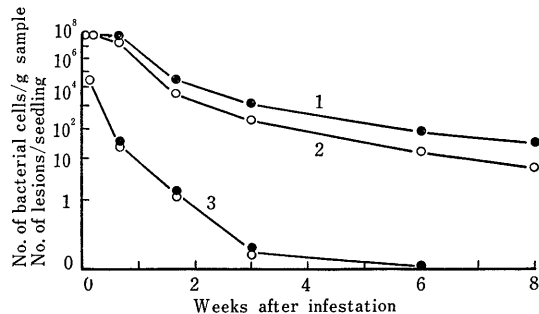


Fig. 6. Infection of the Natsudaaidai seedlings placed on the soils covered with the artificially infested rice straws and inoculated by splashing with shower controlled by an automatic rain simulator. The curves 1 and 2 indicate the number of bacterial cells of *X. citri* per gram straws on the boxes which were maintained in a greenhouse and the outdoor conditions, respectively. The curve 3 indicates the number of lesions per seedling produced by the splash inoculation.

稲わら上の病菌密度は戸外区、戸内区ともに殆んど変化はなく、また人工降雨の連続処理の影響も殆んどみられなかった。感染率においても第5図の結果と比較し連続降雨処理の影響は殆んど無視しうる程度であった。

同様の実験を芝草でも行ったが、結果は全く同じで、生存病菌密度、感染率ともに人工降雨処理や自然降雨の影響はほとんどみられなかった。

考 察

筆者ら^{4,5)} はさきに *X. citri* の腐生的生存期間と生存密度について報告したが、今回の実験結果はこれに比べて生存密度の低下が一般に速かな点で特徴があった。この最も大きな原因は本研究の主眼を病菌の腐生的生存能力よりもむしろ生存菌の感染能力の検討にいたため、実験を感染発病に適した夏季に集中的に行ったためと考えられる。前報で述べたごとく *X. citri* の腐生的生存力は気温によって著しく左右され、低温期に長期に生存することが明らかにされている。また土壌中の生存力については気温とともに土質の相違も大きな要因をなしていたものと考えられる。すなわち今回の実験では団粒性の乏しい粘土質の土壌を使った点が前回の実験と異っていた。

このような条件下での実験ではあったが、腐生的生存菌の密度と、これによる感染率との間には明らかな関係がみられた。すなわち病菌の生存場所が、土壌、雑草、宿主根系またはイネわらの何れであっても感染が成立する病菌の最低密度は 10^2 cells/g 試料のオーダーにあった。この実験では紙ヤスリによる軽い擦傷を葉裏に与えた。本菌の水懸濁液による傷感染の最少菌量が 10^2 /ml レベルであるのに対し、気孔感染のそれが 10^5 /ml レベルを要することは既に明らかにされており¹⁾、今回の実験結果もこれと一致している。ただし葉肉注射接種法の検出精度³⁾ から、腐生的生存菌の感染限界域の病菌密度は $10^2 \sim 10^3$ /g と考えるのが妥当であろう。既報^{2,4)} のごとく自然状態における *X. citri* の腐生的生存密度は一般に 10^3 /g 以下であるので、本実験結果から、自然界における本菌の腐生的生存密度は傷感染の限界付近にあるということができる。したがって柑橘園で地表面に接する若葉によくみられる発病は、病斑由来の濃厚な菌液を含む雨滴の飛沫によるものか、または地表面との接触による微細な傷からの腐生的生存菌による感染と考えるのが妥当であろう。

このように腐生的生存菌による感染はたとえ起ったとしても、多くの場合少数の病斑が形成されるにすぎないものと考えられる。しかしこのことは、伝染環の中でも腐生的生存菌の役割を過少評価してよいことを必ずしも意味していない。その理由の一つは感受性のカンキツの場合、形成される病斑が極めて少数でもその後の伝搬に果す役割は重大であるからであり、別の理由は *X. citri* の宿主表面における行動が全く解明されていないからである。すなわち、ダイズにおける *Pseudomonas glycinea* のように植物体表面における病菌の活発な増殖が成立する場合には、腐生的生存菌の存在は全く別の生態的評価を加えなければならない。

本実験を通じて植生が *X. citri* の腐生的生存に大きな役割を演ずることが再確認された。特にカンキツの根系は土壤中の病菌密度を維持するのに甚だ有効であることが明らかとなった。今後はこれらの根系表面での生存形態を直接実証することが必要である。

X. citri で汚染した試料を戸外に保って自然降雨にさらしても、またくり返し人工降雨にあてても顕著な菌数低下はみられなかった。このことは植物材料、土壤に付着した細菌が簡単に降雨で流亡するような形で存在するものでないことを示唆する。しかし、一方雨滴の反発によって検定植物が感染する事実は、これらの細菌が水によって簡単に支持体から離れ得る形で存在することをも示唆する。この一見矛盾した事実は、*X. citri* が腐生的条件で部分的にもせよ増殖形態をとることを意味する。特にイネわら、カンキツ根系等植物体表面では病菌が単に休止細胞の集団として付着しているのではなく、増殖形態をとっていることを示唆しており、これが他の微生物フロラとの相互作用の中で除々に密度を低下してゆくものと考えられる。今後、カンキツかいよう病の生態の中で、腐生的生存菌

のもつ意義を完全に把握するためにはこの点の解明が必要であろう。

摘 要

腐生的生存形態にある *X. citri* の伝染源としての役割を検討した。平箱に土壤を入れ *X. citri* の懸濁液で汚染した。別に同様に用意した箱に芝草またはカンキツ苗を移植してこれらの根部を汚染し、さらに別の箱では汚染したイネわらで土壤表面を覆った。何れもガラス室内に保った。一定期間ごとにこれらの箱に、予め葉裏に軽い擦傷を付したナツダイダイ苗を6本ずつ植え込み、人工降雨により感染させた。人工降雨は DIK 雨滴発生装置により、1日3回10分間ずつ50mm/hrの水滴をあてたのち、ガラス室に移し発病を調べた。何れの場合も、汚染試料中の病菌密度が 10^2 細菌細胞/g試料レベル以下に下ると感染は起らなくなった。このレベル以上では感染量は病菌密度に比例して増大した。植生およびイネわらは病菌の腐生的生存密度の安定化を助け、感染の成立を長期にわたって維持する傾向が認められた。

引 用 文 献

1. 後藤正夫 (1962). 静大農研報 12:3-72.
2. 後藤正夫 (1970). 静大農研報 20:21-29.
3. 後藤正夫・芹沢拙夫・森田正人 (1970). 静大農研報 20:1-19.
4. 後藤正夫・太田光輝・岡部徳夫 (1975). 日植病報 41:9-14.
5. 後藤正夫・太田光輝・岡部徳夫 (1975). 日植病報 41:141-147.
6. Stevens, H. E. (1915). Fl. Agr. Exp. Sta. Bull. 128:20.
7. Stirling F. (1915). Proc. Ann. Meeting Fl. State Hort. Soc. 28:85-89.