

チャ赤焼病細菌とチャ樹から分離される氷核活性細菌の関係

3) チャ赤焼病細菌と氷核活性細菌 *Pseudomonas* sp. および氷核活性細菌 *Xanthomonas* sp. の密度推移

富濱 毅・西 八束
(鹿児島県茶業試験場)

Interactions between *Pseudomonas syringae* pv. *theae* and ice nucleation-active bacteria.

3) Population dynamics of *Pseudomonas syringae* pv. *theae*, ice nucleation-active *Pseudomonas* sp. and *Xanthomonas* sp. in tea fields. Tsuyoshi Tomihama and Yatsuka Nishi (Kagoshima Tea Experiment Station, Chiran, Kagoshima 897-0303, Japan)

We have isolated two ice nucleation-active bacteria, *Pseudomonas* sp. (INAP) and *Xanthomonas* sp. (INAX), from tea fields where bacterial shoot blight disease was caused by *Pseudomonas syringae* pv. *theae* (*P.s.t.*). Seasonal population dynamics of *P.s.t.*, INAP and INAX on the phyllosphere were investigated. A major ice nucleation-active bacterium was INAX, which was isolated from 90% of investigated tea fields. On the phyllosphere, the INAX population dynamics were not synchronized with *P.s.t.* population dynamics, and the INAX population increased during summer in mature tea fields. INAX was also detected in disease lesions with *P.s.t.*.

Key words: ice nucleation-active bacteria, *Pseudomonas syringae* pv. *theae*

緒 言

チャ赤焼病はチャ赤焼病細菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *theae* (Hori 1915) Young, Dye and Wilkie 1978) によって引き起こされ、主に晩秋から初春にかけて発生する低温性の病害である。幼木園で発生すると激しく落葉するため成園化が著しく遅れ、成木園で発生すると一番茶が収穫できなくなることもある。病原細菌は、主にチャ葉の摘採・整枝による葉の傷口や葉裏の気孔から感染すると考えられており、防除対策として、秋・春整枝後と強風後に銅剤等の散布が行われているが、効果が低いため有効な防除法の確立が望まれている。

チャ赤焼病の発生要因の一つとして、冬季の低温の影響があげられる。安藤 (1988) はチャ赤焼病の発生が寒霜害発生年に多発することを報告しており、西 (1996) も接種試験等の結果よりチャ赤焼病発生への低温障害の影響を報告している。これらの現象は、低温によってチャ葉の病原細菌に対する抵抗力が低下するためと考えられている (安藤, 1988)。一方、チャ樹には、比較的

高い温度で氷核形成能力を持つ氷核活性細菌の存在が知られており、これまでチャ樹より *Pseudomonas syringae*, *Erwinia ananas* および *Xanthomonas campestris* の3種類の氷核活性細菌が分離されている (後藤ら, 1993)。しかしこれらの氷核活性細菌がチャ赤焼病の発生に関与しているかについては報告されていない。そこで本研究では、チャ園での氷核活性細菌の種類、チャ赤焼病細菌およびチャ園で主に分離される氷核活性細菌の密度推移について調査した。

材料および方法

1. 調査期間およびほ場

細菌密度の調査は、1999年3月から2000年2月まで行った。

調査ほ場 (第1表) として、チャ赤焼病自然発生茶園の知覧町菊永 'かなやみどり' 成木園 (以下、菊永)、知覧町後岳 'やぶきた' 幼木園 (同、後岳)、知覧町後岳頂上 'やぶきた' 幼木園 (同、後岳頂上)、田代町盤山 'やぶきた' 成木園 (同、盤山)、屋久町永野 'ゆた

かみどり'成木園(同,屋久島),枕崎市茅野'ゆたかみどり'成木園(同,茅野),茶業試験場西園'ゆたかみどり'成木園(同,茶試西園)および同試験場中園枕崎22号幼木園(同,茶試中園)の8ほ場を,無発生園として同試験場傾斜地'するがわせ'成木園(同,茶試傾斜地)および知覧町永里放任園(同,永里)の2ほ場を用いた。

2. 細菌密度の測定

調査ほ場あたり3定点を設け,ほぼ1ヶ月間隔で採取した成葉,新葉,枝梢を5mmごとに切断し,5倍量の滅菌した0.01%ツイン20添加0.9%NaCl溶液を加え,超音波処理(26kHz,神明台工業社製)を8分間行った後,1時間振とうした(150回/分,5℃)。この振とう液を,滅菌水を加えて10倍ずつ 10^{-4} まで段階的に希釈し,100 μ lを鹿児島大農・PST4選択培地(プロテオースペプトン20g,グリセリン10ml,リン酸水素二カリウム1.5g,硫酸マグネシウム1.5g,セファレキシム250mg,シクロヘキシミド100mg,寒天15g,蒸留水1,000ml)で培養し,出現したチャ赤焼病細菌のコロニーを計数した。

後岳頂上,茅野および茶試中園については,一番茶葉に発病したチャ赤焼病葉を採取し,病斑内の細菌密度を同様の方法で調査した。病斑内における細菌の存在形態については,1999年12月に後岳頂上で発病した葉を採取し,病斑の周縁部および中央部に分けて,細菌密度を調査した。

3. 氷核活性細菌の分離

PST4培地上に現れたチャ赤焼病細菌以外のコロニーをすべてKing's B培地上で培養後,約 10^6 cfu/mlとなるように滅菌水で調整し,毛細管(NARISHIGE社製)に封入し, $-2 \sim -4$ ℃の温度範囲で3分以内に氷核を形成するものを氷核活性細菌とし,細菌密度を算出した。氷核の形成は毛細管中液体の体積増加によって判定し,冷却器としてNASLAB(エムエス精機社製),溶

媒としてメタノールを用いた。また,氷核活性細菌はAPI20NEキットを用いて西山(1996)の方法に従い簡易同定を行った。

結 果

1. チャ園から分離された氷核活性細菌

チャ園からは,*Pseudomonas* sp. (以下,INAP)と*Xanthomonas* sp. (同,INAX)および未同定細菌の3種類の氷核活性細菌が分離された(第1表)。INAPとINAXの氷核形成温度はそれぞれ -2 ℃と -2.5 ℃であった。

INAPはチャ赤焼病発生園である菊永と後岳頂上からのみ分離され,INAXはチャ赤焼病の発生に関わらず,茶試中園を除くすべてのほ場から分離された(第1表)。PST4培地上では,INAPが2日後に白色,円形コロニー(緑色蛍光色素を産生)を,INAXが4日後に黄色,小円形コロニーを形成した。両氷核活性細菌のPST4培地での平板効率は,INAPが1.2(対King's B培地),INAXが0.9(対YPA培地)であったため,PST4培地上でのコロニー数によってその後の細菌数の測定を行った。

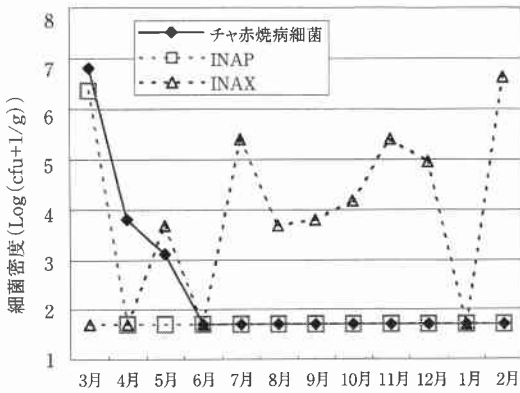
2. 成木園におけるチャ赤焼病細菌,INAPおよびINAXの密度推移

成木園である菊永(チャ赤焼病発生園)では,平成11年3月にチャ赤焼病が最も発病した定点において,チャ赤焼病細菌と同程度の密度のINAPが分離され,その後両細菌は同調するように減少し,6月以降は検出限界以下となり,翌年の2月まで検出されなかった(図1)。これは,6月に地上25cmの位置より深刈り更新を行ったことにより,両細菌の密度が低減されたためと思われる。また,INAXは5月以降,6月および1月を除いて $10^4 \sim 10^6$ cfu/gの濃度で分離され,翌年まで高い密度を維持していた(図1)。

第1表 調査ほ場と氷核活性細菌の分離状況

調査ほ場	チャ園の形態	品 種	チャ赤焼病細菌	INAP ^{a)}	INAX ^{b)}	未同定 ^{c)}
発生園	菊永	成木園	'かなやみどり'	+	+	-
	後岳	幼木園	'やぶきた'	+	-	+
	後岳頂上	幼木園	'やぶきた'	+	+	-
	盤山	幼木園	'やぶきた'	+	-	+
	屋久島	幼木園	'やぶきた'	+	-	-
	茅野	成木園	'ゆたかみどり'	+	-	-
	茶試西園	成木園	'ゆたかみどり'	+	-	+
	茶試中園	幼木園	枕崎22号	+	-	-
	無発生	茶試傾斜地	成木園	'するがわせ'	-	+
永里		幼木園	'やぶきた'	-	+	+

^{a)} 氷核活性細菌 *Pseudomonas* sp. ^{b)} 氷核活性細菌 *Xanthomonas* sp. ^{c)} 未同定氷核活性細菌



第1図 菊永におけるチャ赤焼病細菌, INAPおよびINAXの密度推移 (各細菌の検出限界は1.71である)

成木園である茶試西園 (チャ赤焼病発生園) および茶試傾斜地 (同無発生園) においては, INAPは検出されず, INAXが主な氷核活性細菌であった。INAXは, 両ほ場とも夏場にかけて密度増加の明瞭なピークがみとめられ, その後同様の密度推移を示した (図2)。

3. 幼木園におけるチャ赤焼病細菌およびINAXの密度推移

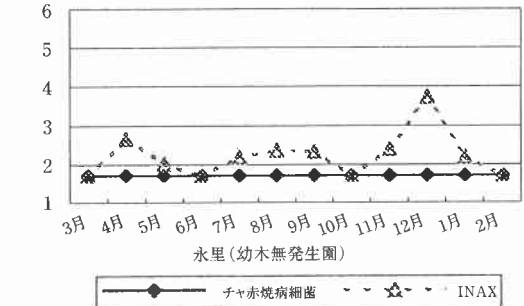
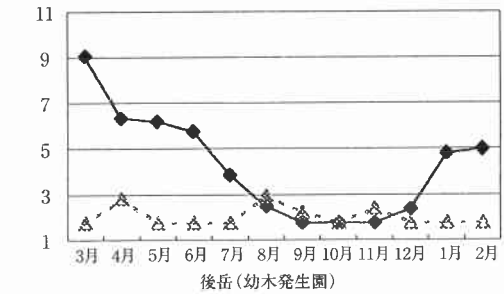
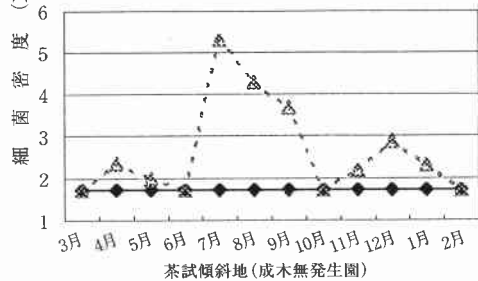
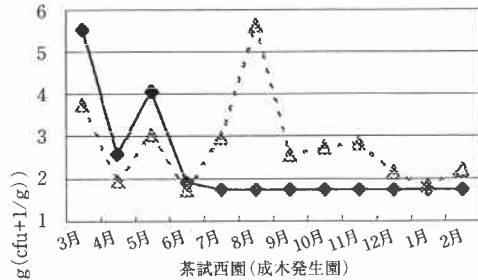
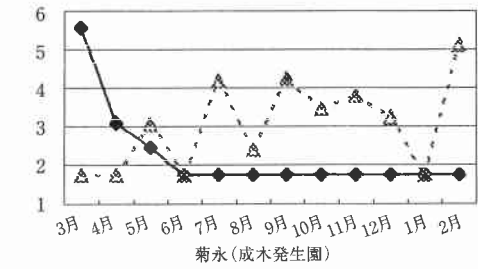
幼木園である後岳 (チャ赤焼病発生園) では, チャ赤焼病細菌は3月には約 10^6 cfu/gと非常に高い密度であったが, 徐々に減少し, 9月には検出限界以下となったものの, 12月から再び密度が回復し始めた (図2)。

このチャ赤焼病細菌の密度推移は, 成木園である菊永や西園とは異なるが, その要因として幼木園ではチャの摘採作業がないことが挙げられる。

INAXは, 後岳および永里 (チャ赤焼病無発生園) のいずれのほ場でも, 一年を通じて低密度で推移した (図2)。

4. 病斑内におけるチャ赤焼病細菌とINAXの存在形態

後岳頂上 (チャ赤焼病発生園) において, チャ赤焼病細菌とINAXが常に分離される病斑と, チャ赤焼病細菌のみが分離される病斑とが存在した。チャ赤焼病細菌とINAXの両方が分離された病斑では, 病斑中央部および周縁部のいずれにおいてもチャ赤焼病細菌の密度の方が高かった (第2表)。また, チャ赤焼病細菌とINAXの両方が分離された病斑とチャ赤焼病細菌だけが分離された病斑で, チャ赤焼病細菌の密度に差はなかった (第2表)。



第2図 調査5ほ場のチャ赤焼病細菌とINAXの密度推移 (値は3定点の細菌密度の平均で, 各細菌の検出限界は1.71である)

第2表 チャ赤焼病病斑内の細菌密度
(後岳頂上, 1999年12月)

細菌の共存	病斑周縁部		病斑中央部	
	<i>P.s.t.</i>	INAX	<i>P.s.t.</i>	INAX
<i>P.s.t.</i> のみ	9.68±0.39 ^{a)}	—	9.34±0.40	—
<i>P.s.t.</i> と INAX	8.19±0.29	5.54±1.84	9.21±0.05	6.00±2.04

^{a)} Log(cfu+1/g) ± S.D.

考 察

1. チャ赤焼病細菌と氷核活性細菌 *Pseudomonas* sp. の関係について

菊永で1999年3月に最もチャ赤焼病の発病の多かった定点においてチャ赤焼病細菌と同程度の密度の氷核活性細菌 *Pseudomonas* sp. が分離された。菊永のこの定点は毎年発病が見られ、1999年3月には、葉裏の表皮が斑点状に浮き上がり、その周縁にチャ赤焼病の水浸状病斑ができるという病状であった。後藤ら(1993)は、氷核活性細菌のチャ芽の霜害への関与については否定しているものの、チャ赤焼病への関与については明らかにしていない。菊永におけるチャ赤焼病発病の状況が氷核活性細菌の影響によるものか、今後接種試験等で確認する必要がある。

2. チャ赤焼病細菌と氷核活性細菌 *Xanthomonas* sp. の関係について

調査した10ほ場のうち、チャ赤焼病の発生に関係なく、9ほ場から氷核活性細菌 *Xanthomonas* sp. が分離された。調査5ほ場での氷核活性細菌 *Xanthomonas* sp. の密度は、成木園である菊永、茶試中園および茶試傾斜地では夏場に高くなり、幼木園である後岳および永里ではいずれの時期も低密度であった。また、氷核活性細菌 *Xanthomonas* sp. の密度推移がチャ赤焼病細菌の密度推移と同調することはなかった。

後藤(1981)によると、*Xanthomonas* 属は25~27℃が増殖適温とされており、成木園における密度推移はこれによく当てはまる。また後藤ら(1993)は、チャ園より分離される主要な氷核活性細菌は *Xanthomonas*

campestris であること、これは成木園のチャ芽から高頻度で分離されること、放任園ではあまり分離されないこと、チャ芽の霜害発生には関与していないこと等を明らかにしている。今回、チャ園より分離した氷核活性細菌 *Xanthomonas* sp. の分離頻度および密度推移は、後藤ら(1993)の報告と同様の結果となった。

一方、後岳頂上において、チャ赤焼病細菌と氷核活性細菌 *Xanthomonas* sp. が常に分離される病斑と、チャ赤焼病細菌のみが分離される病斑とが存在した。このことは、チャ赤焼病の発病に氷核活性細菌 *Xanthomonas* sp. が必ずしも必要でないことを示唆する。富浜(1999)も接種試験において、氷核活性細菌 *Xanthomonas* sp. が低温処理後チャ赤焼病の発病を助長することはなかったと報告している。

しかし富浜(1999)は、病斑内でのチャ赤焼病細菌と氷核活性細菌 *Xanthomonas* sp. の共存が、チャ赤焼病細菌の夏場の生存に有利に働く可能性を示唆している。このため、チャ赤焼病細菌の病原性発現期のみでなく、病斑内や葉、枝での生存期に及ぼす氷核活性細菌 *Xanthomonas* sp. の影響についても検討する必要がある。

引用文献

- 安藤康雄(1998)霜寒害年におけるチャ赤焼病の激発。野菜・茶業試験場報告 Ser. B. 2 : 41-46.
- 後藤正夫(1981)新植物細菌病学, ソフトサイエンス社, pp. 33.
- 後藤正夫・駒場雅彦・堀川知廣・中村順行(1993) The role of ice nucleation-active bacteria on frost damage of tea plants. 日植病報 59 : 535-543.
- 富浜 毅(1999)平成11年度鹿児島県茶業試験場病害虫に関する成績書 8-23.
- 西 八東(1996)平成8年度鹿児島県茶業試験場病害虫に関する成績書 1-52.
- 西山幸司(1996)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植物病原細菌の鑑別表の作成。農業環境技術研究所報告 14 : 1-35.

(2000年4月28日 受領)