

茶天狗巣病に関する研究

Ⅲ. 病原細菌の分離と同定

植原一雄・野中寿之*・荒井 啓

(植物病理学研究室)

昭和53年8月31日 受理

Studies on Witches' Broom of Tea

III. Isolation and Identification of the Causal Bacterium

Kazuo UEHARA, Toshiyuki NONAKA* and Kei ARAI

(Laboratory of Plant Pathology)

緒 言

鹿児島県肝属郡田代町に発生した茶天狗巣病は、急速に広がり、茶栽培上の大きな問題になったが、全く未知の病害であるため、適確な防除対策をとることができなかつた。そこで、筆者らはその病原を明らかにするとともに、生態についても多くのことを知りたいたいと考え、一連の研究を行なった。結果の一部はすでに報告した^{14,15)}が、それらの中で病原に関する知見としてはつぎのようなものが得られた。すなわち、罹病組織汁液を一定の条件下で健全茶樹に付傷接種すると発病が見られること、この汁液中に存在すると思われる病原体は孔径 $0.45\mu\text{m}$ のミリポアフィルターを通らず、 80°C 、20分間の温度処理、1000 ppm の昇汞添加で不活化することなどが明らかになり、本病原体は大きさ $0.45\mu\text{m}$ 以上の微生物であろうと推定された。一方、罹病組織中には糸状菌の菌体らしきものは見られず、四季を通じての観察でも患部に病原体の標兆らしきものを認めることができなかった。したがって、本病原体は糸状菌とは考えにくく、細菌である可能性が非常に強いように思われた。

そこで、罹病組織から得られた多数の細菌分離株を対象に、大規模な接種試験を行なったところ、一部の分離株に強い病原性が認められ、本細菌が本病の病原細菌であることが確認されたので、続いて同定のための諸実験を行ない、本細菌は *Pseudomonas* に属する

新種であることを明らかにすることができた。本報告はその結果をとりまとめたものである。

材 料 と 方 法

1. 病原細菌の分離と接種

罹病組織の小片を、表面殺菌したのち、殺菌水中で碎き、PDA 培地 (バレイシヨ 300g, グルコース 20g, 寒天 15g, 水 1 liter) を用いて、平板希釈法で分離を行なった。得られた数百の細菌分離株を、病原性確認のため、健全茶樹の新梢腋芽基部に付傷接種した。接種は10月、発病調査は翌年5月に行なった。実験法の詳細は既報¹⁵⁾の通りである。

2. 病原細菌の性質

接種試験によって病原性が確認されている当研究室保存の分離株のうち、No. 1~10, 12, 752 の計12株を用い、培養的、生理的および生化学的性質を調べた。各分離株は、YPA 培地 (酵母エキス 3g, ペプトン 10g, 食塩 15g, 寒天 15g, 水 1 liter) または PDA 培地で1~2日間培養したのち実験に供した。実験法は主として Society of American Bacteriologists の Manual¹²⁾ および細菌学実習提要⁷⁾ にしたがったが、べん毛染色¹¹⁾、オキソダーゼの産生⁹⁾、 β -グルコニダーゼの産生⁶⁾、エスクリンの加水分解⁹⁾、Thornley のアルギニン試験¹³⁾、3-ケトラクトースの生成⁷⁾ および2-ケトグルコン酸の生成⁹⁾ については、それぞれ別の文献を参照した。特に指定あるいは制約のない限り、実験は 28°C で行なった。

結 果

1. 病原細菌の分離と接種

本研究は農林省農林水産業特別試験研究費補助金の助成を受けた。

* 鹿児島県茶業試験場, 鹿児島県川辺郡知覧町

Kagoshima Tea Experiment Station, Chiran-cho, Kagoshima

罹病組織から分離された多くの細菌分離株について接種試験を行なった結果、その一部の分離株を接種した茶樹において、新梢の肥大が認められ、この肥大新梢はやがてその基部附近にえい瘤を生じ、典型的な天狗巣症状に発展した。その発病率は、最も低い試験区でも30%、大部分の試験区では60~90%と極めて高く、対照として用いた罹病組織汁液区の10倍以上の高率を示した。

なお接種によって生じた罹病組織からも、類似のコロニー性状を示す細菌が分離され、これにもまた病原性があることが示された。

2. 病原細菌の性質

(1) 形態

各分離株とも、両端の円い短桿状で、単極または両極に2~6本のべん毛を有し、内生孢子を認めず、抗酸性試験は陰性であった。YPA培地の斜面凝結水中で24時間培養したものをメチレンブルーで染色したのち、顕微鏡で測定した大きさは、 $1.5 \sim 2.5 \times 0.6 \sim 0.8 \mu\text{m}$ であった (Fig.1)。

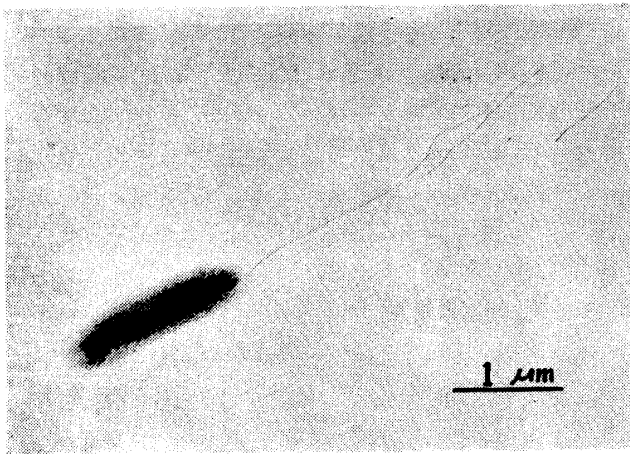


Fig. 1. Electronmicrograph of the causal bacterium.

(2) 培養所見

(a) 平面培養：PDA培地では、コロニーは小円形、低いドーム状、乳白色、不透明、表面は平滑で、光沢を有し、辺縁は平滑、色素を産生しない。またYPA培地では、コロニーがわずかに黄色をおびる以外は、PDA培地と同じ。

(b) 斜面培養：PDA培地では生育は極めて良好、乳白色、不透明、隆起は厚く、表面は平滑で光沢を有し、多量の粘質物を生成、水への懸濁性は良くない。またYPA培地では、隆起がやや薄く、粘質物が少なく、わずかに黄色をおびる以外はPDA培地と同じ。

(c) 高層せんし培養：PDA, YPA両培地とも、表

面では良好な生育を示したが、深部では、せんし線に沿ってわずかに生育が見られただけであった。

(3) 生理的および生化学的性質

大部分の試験項目ではすべての供試分離株が同一傾向の結果を示したが、一部の項目では必ずしも同じ結果を示さず、特に生育温度、耐食塩性、無機窒素の利用、 β -グルコシダーゼの生成、エスクリンの加水分解などでは、No. 1, 2, 3, 6, No. 5, 7, 8, 9, 10, 12 および No. 4, 752 の3つのグループにわかれて、互に異なる反応を示した。供試分離株をこの3つのグループにわけて、各試験項目の結果をまとめると、Table 1の通りである。

考 察

本病の罹病組織からは、高い頻度で小円形、乳白色、ドーム状のコロニーの細菌が分離され、これを健全茶樹に接種すると、本病の典型的な病徴を示した。そして接種によって生じた病組織から細菌の分離を行なったところ、同じコロニー性状の細菌が再分離され、この細菌にも病原性が認められた。これらの結果から、本細菌が本病の病原細菌であることが明らかとなった。

そこで、この病原細菌の同定を行なうために、細菌学的な諸性質をしらべた。そしてTable 1に示す結果が得られたので、これをもとにBergey's Manual (第8版)にしたがって分類を行なったところ、極めて順調に*Pseudomonas*属に到達した。そしてこの属の特徴として記載されている各種の項目にもよく一致した。なお、数項目の試験で、供試細菌の反応が3つのグループにわかれたが、これらの相違点についてはそれぞれの関連文献^{6,8,9)}を参照した結果、“種”をわけねばならぬ程の問題点とは考えられなかった。後に行なったフェージと血清についての実験結果(植原：未発表)から、この3つのグループは系統と考えるのが妥当なように思われる。

ただ、本細菌はコロニー性状が*Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Connによく似ており、病徴も根頭がん腫病を思わせる点があるので、この点について若干の考察を行ないたい。本試験の大部分の項目において、*A. tumefaciens*を参考菌株として用いたが、本細菌との類似点が多く、相違点はべん毛の位置、3-ケトラクトースの生成など数項目にすぎなかった。しかしBernaertsら²⁾は*Agrobacterium*は3-ケトラクトースを生成するが*Pseudomonas*はこれを生成しないことを報告し、またDeLeyら⁴⁾は*Agro-*

Table 1. Bacteriological characteristics of the causal bacterium

Characteristics	Isolates tested		
	No. 1,2,3,6	No. 5,7,8,9,10,12	No. 4,752
Size	Rod shaped 1.5—2.5×0.6—0.8 μ m	Rod shaped 1.5—2.5×0.6—0.8 μ m	Rod shaped 1.5—2.5×0.6—0.8 μ m
Color of colonies	milky white	milky white	milky white
Slime	abundant	abundant	abundant
Gram staining	—	—	—
Fragellation	mono- or bi-polar fragella, 2-6	mono- or bi-polar fragella, 2-6	mono- or bi-polar fragella, 2-6
Acid fast	—	—	—
Endospore	—	—	—
Motility	+	+	+
Optimum temperature (°C)	26—32	26—32	26—32
Growth { at 5°C	+	+	+
at 42°C	+	—	—
pH { optimum	5.5—8.0	6.0—7.0	5.5—8.0
growth range	5.0—8.5	5.5—8.0	5.5—8.5
Tolerance of NaCl { 3.5%	+	+	+
5.0%	variable(+)	variable(-)	+
Utilization of citrate	+	+	+
Utilization of inorganic nitrogen	+	—	variable
Fluorescent pigment	green (weak)	blue (weak)	green (weak)
Acid production from:			
Glucose	+	+	+
Sucrose	—	—	—
Lactose	+	—	—
Mannitol	+	+	+
Voges-Proskauer test	—	—	—
Methyl red test	—	—	—
Reduction of methylene blue	+	+	+
Litmus milk	blue	blue	blue
Liquefaction of gelatin	—	—	—
Hydrolysis of starch	variable (\pm)	variable (+)	variable (-)
Production of:			
Oxidase	+	+	+
Catalase	+	+	+
Lipase	—	+	variable
β -glucosidase	—	+	+
Hydrolysis of aesculin	—	+	+
Egg-yolk test	—	—	—
Production of indole	—	—	—
Reduction of nitrate	—	+	+
Production of H ₂ S	+	—	—
Thornley's arginine test	—	—	—
NH ₃ production from urea	+	+	+
NH ₃ production from peptone	+	+	+
Production of 3-ketolactose	—	—	—
Production of 2-ketogluconate	+	+	+
Production of levan	—	—	—
Soft rot of potato	—	—	—
Tolerance of penicillin	+	+	+

bacterium の基本的条件として3-ケトラクトースの生成のほかに周毛であることをあげている。べん毛の位置を分類の有力な手段とすることには異論⁹⁾もあるが、これらの考え方が Bergey's Manual の第8版にも取り入れられていることから、本細菌は *Pseudomonas*

に属せしめるのが妥当であると思われる。なお、本細菌を *A. tumefaciens* の各種の宿主植物に、また、*A. tumefaciens* を茶樹の新梢に接種したが、両者ともに発病は見られず(植原：未発表)、病原性の類似点は全く認められなかった。

Pseudomonas 属の細菌で茶に寄生するものとして、*Pseudomonas theae* Okabe et Goto がただ一つ記載されているが、これは本細菌とは明らかに異なるものである^{1,10)}。また、茶以外の植物の病原細菌を考えた場合、本細菌と“種”を同じくするかも知れないと思われる程の類似性を持った *Pseudomonas* 属菌は見当らなかった。

以上のことから、本細菌は *Pseudomonas* 属の新種であると判断し、本病が最初に発見された地名をとって、*Pseudomonas tashirensis* Uehara et Nonaka と名づけた。

要 約

天狗巣病罹病茶樹から分離された細菌を健全茶樹に接種したところ、本病の典型的な病徴が現われた。そして、その病組織から同じ細菌が再分離され、その病原性も確認されたので、本細菌を本病の病原細菌と断定した。

本細菌の細菌学的な諸性質を調べたところ、Table 1 に示すような結果が得られた。これをもとに *Bergey's Manual* (第8版) にしたがって分類学的な検討を加えた結果、本細菌は *Pseudomonas* に属するものであるとの結論に達した。そして、*Pseudomonas* に属する細菌の中には、本細菌類似のものが見当たらないので、本細菌を新種と判断し、*Pseudomonas tashirensis* Uehara et Nonaka と名づけた。

謝 辞

本研究を行なうに当り、元九大教授故吉井甫先生、元農林省農業技術研究所病理昆虫部長故水上武幸博士、同病理科長吉村彰治博士、元鹿大教授故徳重陽山博士、九大教授脇本哲博士、東京農大教授藤井溥博士、鹿児島県茶業試験場長岡村克郎氏、その他大勢の方々に御指導いただいた。記して感謝の意を表する。

文 献

- 1) 荒井啓・野中寿之・三木洋二・植原一雄：薩摩半島南部に発生した茶の細菌性病害について。鹿大農学術報告，29，55-61(1979)
- 2) Bernaerts, M. J. and DeLey, J.: A biochemical test for crown gall bacteria. *Nature*, 197, 406-407 (1963)
- 3) Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (8th Ed.). William & Wilkins Co., Baltimore (1974)
- 4) DeLey, J., Bernaerts, M., Rassel, A. and Guilmet, J.: Approach to an improved taxonomy of the genus *Agrobacterium*. *J. gen. Microbiol.*, 43, 7-17 (1966)
- 5) Harrigan, W. F. and McCane, M. E.: *Laboratory Methods in Microbiology*. Acad. Press, London & New York (1966)
- 6) Hildebrand, D. C. and Schroth, M. N.: β -glucosidase activity in phytopathogenic bacteria. *Appl. Microbiol.*, 12, 487-491 (1964)
- 7) 医科学研究所学友会：細菌学実習提要。丸善，東京 (1970)
- 8) Lelliott, R. A., Billing, E. and Hayward, A. C.: A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J. appl. Bacteriol.*, 29, 470-489 (1966)
- 9) Lysenko, O.: *Pseudomonas* —An attempt at a general classification. *J. gen. Microbiol.*, 25, 379-408 (1961)
- 10) 岡部徳夫・後藤正夫：日本に於ける植物細菌病害。Ⅳ。茶樹の赤焼病について。静岡大農研報，5，96-99 (1955)
- 11) Rhodes, M. E.: The cytology of *Pseudomonas* spp. as revealed by a silver-plating staining method. *J. gen. Microbiol.*, 18, 639-648 (1958)
- 12) Society of American Bacteriologists: *Manual of Microbiological Methods*. McGraw-Hill Book Co., New York (1957)
- 13) Thornley, M. J.: The differentiation of *Pseudomonas* from other gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *J. appl. Bacteriol.*, 23, 37-52 (1960)
- 14) 植原一雄・野中寿之：茶の天狗巣病に関する研究。Ⅰ。発生の状況、病徴およびその他の2, 3の知見について。鹿大農学術報告，20，113-121 (1970)
- 15) 植原一雄・野中寿之・河鍋征人：茶の天狗巣病に関する研究。Ⅱ。罹病組織汁液による茶樹への各種の接種試験。鹿大農学術報告，21，87-97 (1971)

Summary

Many bacterial isolates were obtained from naturally affected tissues of tea plant by dilution-plate method using potato-dextrose-agar medium, and they were inoculated to young shoots of healthy plant by needle prick technique in October. The next spring, the typical symptoms of the disease appeared, in a high percentage, from the shoots inoculated with certain isolates. From the diseased tissues, the same bacterium was re-isolated and this isolate showed a pathogenicity to tea plant. From these results, it was ascertained that the bacterium was the causal organism of witches' broom in tea.

The bacteriological characteristics of the bacterium were tested by techniques described in the *Manual of Microbiological Methods* and others. The results obtained are shown in Table 1. Basing on the results, classifi-

cation of the bacterium was estimated by means of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology and others, with the conclusion that the bacterium should belong to the genus *Pseudomonas*.

Pseudomonas theae has been described for a *Pseudomonas* affected to tea plants, and there are some species of *Pseudomonas* causing hyperplasia or hypertrophy in other plants in the same as the tested bacterium. But, judging from the descriptions of Bergey's Manual, it was concluded that the tested bacterium was different from any of bacteria put under comparison, belonging to a new species of the genus *Pseudomonas*. We named the bacterium *Pseudomonas tashirensis* Uehara et Nonaka in memory of "Tashiro Town" where witches' broom in tea was first discovered.