

薩摩半島南部に発生した茶の細菌性病害について

荒井 啓・野中寿之*・三木洋二・植原一雄

(植物病理学研究室)

昭和53年8月31日 受理

Studies on a Bacterial Disease of Tea Occurred in South Kyushu

Kei ARAI, Toshiyuki NONAKA*, Yoji MIKI and Kazuo UEHARA

(Laboratory of Plant Pathology)

緒 言

1975年3月、鹿児島県揖宿郡頰娃町の茶園で、葉の中肋に沿って褐変を呈する病害の発生が認められた。発生面積は頰娃町熊ヶ谷地区を中心に20~30haと推定され、初回整枝前の幼木園では成葉がことごとく落葉し、茶芽および枝梢の枯死を招く激しい被害が認められた。本病は症状および被害状況から、かつて、1914年静岡・三重・奈良・京都などの各府県で大発生したといわれる細菌性病害に極めて類似していた³⁾。この病害は堀^{3,4)}により赤焼病 (Bacterial shoot blight) と命名され、病菌については、その翌年 (1915年) に *Bacillus theae* Hori et Bokura によるものと報告された。その後、本病に関する報告はほとんどなく、追試によって確証を得たという報告も行なわれなかった。1955年になり静岡県で本病類似の病害の発生が再び認められ、岡部ら⁵⁾ がその病原を調べたところ、その病原細菌は *B. theae* とは別種の細菌であることがわかり、*Pseudomonas theae* Okabe et M. Goto による病害であることが報告された。

本実験は、薩摩半島南部に発生した赤焼病類似症状の病害の原因を明らかにするために行なったものである。その結果、本病葉より分離された病原細菌は、*P. theae* であることが確かめられたのでそれらの実験結果を報告することとする。

発生および病徴

本症状は1975年3月、鹿児島県揖宿郡頰娃町熊ヶ谷

地区の茶園で見られた。発生面積は熊ヶ谷地区を中心に20~30ha程度と推定され、被害茶園は風当たりが強いと思われる地形の場合が多く、初回整枝前の幼木園では成葉がことごとく落葉し、茶芽および枝梢の枯死を招くような被害が認められた (Fig. 1)。現地栽培者の話によると、本症状は、前年 (1974年) の10月頃に認められたということから、その年の9月8日に接近した台風18号による強風雨で最初の伝染拡大がおり、その後、早春の寒風によって発生および被害が増大してきたものと推定される。

病徴は比較的若い葉および新梢に認められる例が多く、葉では中肋に沿って暗緑色、水浸状を呈し、やがて暗黒色に変ずる (Fig. 2, 3)。病斑は中肋あるいは葉脈に沿って拡大し、葉柄におよぶことが多い。このような葉は落葉しやすく、暗黒色に枯損した枝のみを残す。茎では主として新梢に認められ、初め円形ないし楕円形の水浸状、暗緑色病斑を形成し、これが拡大すると枝全体をとり囲み、褐変する。症状は春期が最も顕著で、次いで秋期が激しいようである。夏期は、病斑はあまり拡大せず、水浸状の症状で止まることが多い。この場合、枝梢にはあまり認められない。なお、本症状による被害程度は1975年以来漸減の傾向にあるが、被害茶園ではその後も発生が認められており、何らかの原因で大発生することも予想されるので、今後も注意する必要があると思われる。

細菌の分離および接種試験

1. 細菌の分離

頰娃町で自然発病していた茶樹、*Thea sinensis* L. (品種：ゆたかみどり)、を研究室に持ち帰り、分離材料とした。分離は罹病葉病斑部分を軽く滅菌後、滅

*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

菌水中で細切り、段階希釈したものを所定量とり、溶かした PDA 培地 (馬鈴薯; 300g, ブドウ糖; 20g, 寒天; 17g, 蒸留水; 1 liter) とともにペトリ皿に流し込んだ。培地上に形成された白色コロニーより得た13種の分離株 (No. E7701, E7704, E7711, E7712, E7713, E7714, E7715, E7716, E7717, E7718, E7719, E7720, E7721) を実験に用いた。これらの分離株はペプトン寒天培地 (ペプトン; 10g, 塩化ナトリウム; 5g, 寒天; 20g, 蒸留水; 1 liter) で3回単コロニー分離を繰り返したのち実験に供した。培養温度は主として21°Cで行なった。

なお、対照菌として、静岡大学農学部より分与された2分離株 (便宜上, S-1, S-2 とする) を用いた。

2. 接種試験

全ての供試菌について病原性を調べるため茶樹に対する接種試験を行なった。その方法は、ほぼ 10^8 cells/ml 濃度に調整した細菌懸濁液をツベルクリン用注射器にて茶樹の若葉裏面の中肋附近および新梢皮層部に注入した。用いた茶樹は露地植えの高さ 50cm 位の 6~7年生樹で、品種は“やぶきた”および“あさつゆ”である。上記方法で春期および秋期に接種した場合には、接種後1~2日で暗緑色の水浸状病斑を生じ、2~3日後に褐変が認められた。新梢に接種した場合、接種部分で3~4日後に褐変が認められた。しかしながら、葉にくらべて新梢では病徴が現われにくい傾向にあった。夏期に野外で接種した場合には病徴が認められないことが多く、この場合には新梢を切り取り、水差しにした状態で接種し、20°C 前後に置けば3~4日後に発病が認められ、いずれも褐変した。

なお、接種により発病した病斑からは、接種菌と同様のコロニー性状を示す細菌が多数分離され、再分離菌の病原性も確認された。

分離菌の細菌学的性質

分離菌の細菌学的性質は Bergey の便覧 (第8版)¹⁾, W. F. Harrigan らの実験法²⁾, 米国細菌学者協会の実験法³⁾などをその都度参考にして行なった。供試した13分離株の細菌学的諸性質は以下に述べておられる。

1. 形態

PDA 斜面培地24時間培養の菌体について、2%リントングステン酸 (pH 7.0) によるネガティブ染色法と、クローム蒸着法による電顕観察を行なった。その結果、分離菌は、大きさ $1.1\sim 2.2 \times 0.3\sim 0.7 \mu\text{m}$ (平均 $1.7 \times 0.5 \mu\text{m}$) で、両端の丸い桿状菌で、1~7本の

べん毛を単極からだしているのが多く、時には両極よりだしているのが認められた (Fig. 4)。なお、分離株間に形態で顕著な差異は認められなかった。また、分離菌を Kopeloff-Beerman の変法によりグラム染色したところ、いずれの分離株も陰性であった。

2. 培養的性質

各分離株を各種培地で 21°C で培養した結果は以下に述べるとおりである。

- (1) ブイヨン寒天平面：培養3日目に 2.0~3.0mm の白色コロニーを形成した。円形で丘状を呈し、中央部は不透明で、表面、周縁ともに平滑であった。
- (2) PDA 平面：培養2日目に 2.0~3.0mm の白色コロニーを形成した。円形で丘状を呈し、中央部は不透明で、周縁は透明であった。表面、周縁ともに平滑で光沢を有した。
- (3) ペプトン水：24時間で混濁し、生育は良好、初期に菌膜を形成するが、後これが沈殿し、2日目頃より顆粒状の沈殿が認められた。
- (4) ブイヨン：24時間で混濁し、生育は比較的良好、2日目ぐらゐまで菌膜が認められるが、後に沈殿となった。
- (5) コーン氏液：生育が認められなかった。
- (6) フェルミ氏液：24時間でわずかに混濁が認められた。生育は良好。細かい沈殿が多数認められフルオレンを産生した。
- (7) ウシンスキー氏液：生育比較的良好で、混濁、沈殿ともに顕著に認められた。4日目頃より培地の緑色化が認められた。

3. 生理的性質

常法により各分離株の生理的諸性質を調べた。その結果は以下に述べておられる。

- (1) 蛍光色素の産生：King 氏の B 培地をペトリ皿に流し込み、画線接種し、21°C 7日間培養後、紫外線を照射し蛍光色素の産生を調べたところ、いずれの分離株でも色素の産生は認められなかった。
- (2) ゼラチンの液化：ペプトン培地にゼラチンを加え21°C 4日間穿刺培養したところ、大部分の分離株で液化が認められた。
- (3) エスクリンの加水分解：ペプトン・エスクリン・クエン酸鉄の培地で 21°C 14日間培養し、培地の変色を観察したところ、いずれの分離株もよく生育したが、培地の変色は認められず、エスクリンを加水分解しなかった。
- (4) 糖から酸の生成：0.2%ブロムチモルブルーおよび1%の糖 (グルコース, ラクトース, サッカロ

ス、マンニット)を添加したペプトン培地を用い、好気的あるいは嫌気的条件下で 21°C 5日間培養したところ、ほとんどの分離株では好気的条件下で、グルコース、サッカロース、マンニットは利用されたが、ラクトースは利用されなかった。

(5) エタノールおよびフェノールの酸化: 酵母エキス・ペプトン・ブロムチモルブルー培地に、エタノールあるいはフェノールを加え、21°C 7日間培養し培地の変色を観察したところ、いずれの分離株でもエタノールおよびフェノールを酸化しなかった。

(6) インドールの産生: トリプトン培地を用い、21°C 5日間振盪培養したのち、Kovac 試薬で判定したところ、いずれの分離株でもインドールの産生は認められなかった。

(7) カタラーゼの産生: PDA 培地で 21°C 24時間培養したものに10%過酸化水素水を用いて発泡の有無を調べたところ、ほとんどの分離株でカタラーゼの存在が認められた。

(8) リパーゼの産生: Sierra 氏の培地を用い、Tween 80の加水分解を調べたところ、ほとんどの分離株で混濁帯が認められ、リパーゼの存在が認められた。

(9) ペプトンからアンモニアの生成: ペプトン水で 21°C 7日間振盪培養し、ネスラー試薬でアンモニアの生成を調べたところいずれの分離株でもアンモニアの生成が認められた。

(10) 硫化水素の生成: ペプトン水を用い、21°C 5日間振盪培養し、酢酸塩試験紙の黒変を観察したところ、いずれの分離株でも黒変は認められなかった。

(11) 硝酸塩の還元: 0.1%硝酸カリウムを添加したペプトン培地を用い、21°C 5日間振盪培養した後、スルファニル酸およびアルファナフチルアミンを加えて判定したところ、いずれの分離株も硝酸塩を還元しないことが確かめられた。

(12) メチレンブルーの還元: 酵母エキス・ペプトン培地で 21°C 24時間振盪培養後、1%メチレンブルーを添加し色素の脱色を調べたところ、いずれの分離株でも脱色が認められ、メチレンブルーを還元することが確かめられた。

(13) リトマスミルク試験: 脱脂粉乳にリトマス2%を添加し、21°C 14日間培養したところ、初めやや青色となったが、後、リトマスを還元し、凝固することなく徐々に消化した。

(14) 無機窒素の利用: Holding の無機窒素培地を用い、21°C 10日間振盪培養し、濁りの程度で判定したところ、いずれの分離株でも培地に白色沈殿が生じ、

細菌の増殖も認められたことから、無機窒素を利用するものと判断された。

(15) メチルレッド (MR) 試験および Voges-Proskauer (VP) 反応: グルコース・リン酸塩・ペプトン水を用い、21°C 7日間振盪培養し、MR 試験はメチルレッドで、VP 反応は α -ナフトール・アルコール溶液で判定したところ、いずれの分離株も、ともに陰性であった。

(16) Thornley のアルギニン試験: Thornley の半固体培地で 21°C 7日間培養し、アルギニンよりアンモニアの生成を調べたところ、好気条件下では生成することが確かめられたが、嫌気条件下では生成が認められず、アルギニン試験は陰性と判断された。

(17) 抗生物質に対する感受性: 酵母エキス・ペプトン寒天培地を細菌懸濁液とともにペトリ皿に流し込み、各種薬剤をしみこませたろ紙を寒天平面上に置き 21°C 3日間培養し、阻止帯が形成されるかどうかを観察した。その結果、いずれの分離株でも、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、ジヒドロストレプトマイシンには感受性で、ペニシリンには耐性を示した。

以上17項目について調べた結果は Table 1 に示すとおりである。その結果、用いた分離株のなかで、E 7711が、若干他の分離株と生理的性質で異なる結果が得られたが、他の分離株は対照として用いた S-1, S-2, と同じ反応を示した。

考 察

鹿児島県揖宿郡額娃町の茶園で発生した赤焼症状から分離された細菌13菌株は、いずれも茶樹に強い病原性を示し、発病葉から再分離されたことから、本症状の病原細菌であることが確かめられた。さらに各分離株は、分離株間で培養所見、生理的性質などでわずかに差異が認められたが、決定的な相違点はなく、いずれも同種の菌と考えてよさそうである。また、これら分離株は対照として用いた *P. theae* と形態、培養的性質、生理的性質などで酷似しており、同種の菌と考えられた。

以上の結果より、1975年に鹿児島県で発生した病害は、*Pseudomonas theae* Okabe et M. Goto による「赤焼病」と同定された。

これまで、茶の赤焼病については、堀^{3,4)}や岡部ら⁵⁾の報告しかなく、本病の防除法や病原細菌の生態など不明の点が多い。本県では、今後も本病の発生が予想されるので、これらの点についてさらに検討する必要

Table 1. Characteristics of isolates

	E-7701	E-7704	E-7711	E-7712	E-7713	E-7714	E-7715	E-7716	E-7717	E-7718	E-7719	E-7720	E-7721	S-1	S-2
No. of flagella	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
Fluorescent pigments	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolysis of:															
Gelatin	+	±	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aesculin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidation of:															
Glucose	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
aerobic	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
anaerobic	+	+	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
aerobic	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
anaerobic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	+	+	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
aerobic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
anaerobic	+	+	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
aerobic	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
anaerobic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
Phenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Production of:															
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lipase	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ammonia from peptone	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrogen sulfide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reduction of:															
Nitrate	±	±	-	-	-	-	±	-	±	-	-	-	-	-	-
Methylene blue	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Litmus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Utilization of inorganic nitrogen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methyl red test	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer test	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thornley's arginine test	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sensitivity of antibiotics:															
Tetracycline	30 μg	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Chloramphenicol	30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Erythromycin	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	±	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Penicillin	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dihydrostreptomycin	50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Note; > = one or more, + = positive reaction, - = negative reaction, ± = indistinct reaction, B = blue alteration of media

があるように思われる。

要 約

本実験は、薩摩半島南部（鹿児島県揖宿郡頰娃町）で発生した細菌性病害の原因を調べたものである。得られた結果を要約すると以下のとおりである。

1. 本病は、鹿児島県下で1975年3月に始めて認め

られ、その後、毎年発生が確認されている。病徴は比較的若い葉および新梢に顕著に現われ、中肋あるいは葉脈に沿って拡大する。この病斑はやがて暗黒色に変じ、いわゆるえそ症状となる。新梢では、初め円形ないし楕円形の水浸状、暗緑色病斑が認められ、次第に拡大し褐変する。本症状は春期に最も顕著で、秋期がこれに次ぎ、夏期、冬期には、病徴の進展が止まるこ

とが多い。

2. 罹病葉より、常法により細菌の分離をすると、高頻度で白色コロニーの細菌が分離され、茶樹に付傷接種すると容易に発病が認められた。接種後1週間以内で原病徴を再現し、病斑部分より同種の細菌が再分離された。

3. 病原細菌の形態、培養の性質、生理的性質を調べた。本菌は、大きさ $1.1\sim 2.2\times 0.3\sim 0.7\mu\text{m}$ (平均 $1.7\times 0.5\mu\text{m}$) の桿菌で、1~7本のべん毛を単極あるいは両極よりだしていた。グラム陰性である。ブイヨン、PDA 寒天平面でともに白色円形コロニーを形成した。ペプトン水、フェルミ氏液、ウシンスキー氏液で生育良好であり、コーン氏液では生育しなかった。蛍光色素の産生は認められなかった。ゼラチンを液化し、エスクリンを加水分解しなかった。グルコース、サッカロース、マンニットを好氣的に酸化し、ラクトース、エタノール、フェノールを酸化しなかった。カタラーゼ、リパーゼの産生が認められ、インドール、硫化水素を産生しなかった。無機窒素を利用し、ペプトンよりアンモニアを産生した。硝酸塩を還元せず、メチレンブルー、リトマスを還元した。メチルレッド試験、V-P 試験、Thornley のアルギニン試験はいずれも陰性であった。抗生物質に対しては、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、

ジヒドロストレプトマイシンなどに感受性で、ペニシリンには耐性を示した。これらの結果は対照菌として用いた *Pseudomonas theae* と酷似していた。

以上の結果より、本症状は *Pseudomonas theae* Okabe et M. Goto による「チャ赤焼病」と同定された。

謝 辞

本実験を行なうにあたり、静岡大学農学部後藤正夫教授より、*P. theae* の分離株を分与して戴き実験に供した。記して感謝の意を表する。

文 献

- 1) Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Eighth Ed.). p. 217-243, Williams & Wilkins Co., Baltimore (1974)
- 2) Harrigan, W. F. and McCance, M. E.: *Laboratory Methods in Microbiology*. p. 3-195, Academic Press, London and New York (1966)
- 3) 堀正太郎：細菌の寄生に基く茶樹の一大病害（赤焼病）。病虫害雑誌, 1, 247-252 (1914)
- 4) 堀正太郎：細菌の寄生に基く茶樹の一大病害（3号の続き）。病虫害雑誌, 2, 1-7 (1915)
- 5) 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。静大農研報, 5, 96-99 (1955)
- 6) Society of American Bacteriologists: *Manual of Microbiological Methods*. p. 1-198, McGraw-Hill Book Co., New York, Toronto and London (1957)

Summary

In 1975, a bacterial disease of tea plants, *Thea sinensis* L., was observed in South Kyushu. Investigation was carried out to find out the identity of the causal agent of the disease.

The results are summarized as follows:

1. It was ascertained that the disease had occurred at several tea plantations in Ei-cho in Kagoshima. In this district, this disease was noted to have occurred every year since 1975.
2. At first, small, dark green and water-soaked spots appear on the young leaves and shoots. This spot gradually increases in size especially taking on elongate shape along the midrib or vein of the leaf, and then turns black. Such symptoms are also seen on shoots and petioles. In such cases, almost all of the leaves have fallen. Tea plants are damaged remarkably by defoliation and are often dead. The symptom appears severely in spring and mildly in autumn, and does not develop much in summer or in winter.
3. A bacterium was isolated from the diseased tissues by using nutrient broth or potato dextrose agar. The isolated bacterium makes a white, round, raised, smooth surfaced and glistening colony. These bacterium isolates were inoculated in tea plants by an injection technique with syringe, and original symptoms appeared on leaves and shoots 3-4 days after the inoculation. The bacterium from the new symptom made such similar colonies when re-isolated as before. From these observations of isolation and inoculation, it was concluded that this bacterium was the causal agent of this disease.
4. Morphological and bacteriological characteristics of the pathogenic bacterium were investigated by using *Pseudomonas theae* as a control. The pathogen was rod shaped, $1.1\sim 2.2\times 0.3\sim 0.7\mu\text{m}$ (av. $1.7\times 0.5\mu\text{m}$) in size with polar flagella, and was Gram-negative. It was aerobic and made a white, round colony on nutrient broth agar and potato dextrose agar. It grew well in peptone water, nutrient broth, Fermi's and Ushinsky's

solution, but not in Cohn's solution. Fluorescent pigments were not produced on King's B medium. Gelatin was moderately liquefied and aesculin was not hydrolyzed. Glucose, saccharose, mannitol, and inorganic nitrogen were utilized under aerobic condition, but lactose, ethanol and phenol were not. Catalase and lipase reaction were positive. The production of indole and that of hydrogen sulfide were negative. Ammonia from peptone was produced. Methylene blue test V-P test and Thornley's arginine test were respectively negative. It was susceptible to tetracycline, chloramphenicol erythromycin and dihydrostreptomycin, but resistant to penicillin. These results resembled closely those from *P. theae* used as a control, which were isolated by Okabe et al.

From these views of cultivation, this bacterium was identified to be *Pseudomonas theae* Okabe et M. Goto and this disease was concluded "Bacterial Stem Blight of Tea".

Explanation of figures

- Fig. 1. Young tea plantation damaged by the disease.
- Fig. 2. Symptom of young leaves. Development of symptom as seen along midrib or vein.
- Fig. 3. Symptom of leaves. Symptom is clearly seen on the lower surface of leaf.
- Fig. 4. Electron micrograph of the causal bacterium negatively stained with 2% phosphotungstic acid.

