

キウイフルーツ花腐細菌病の罹病花または葉の褐斑症状から分離された数種の *Pseudomonas* 属細菌とその病原性

三好孝典・高梨和雄*・橘泰宣

(愛媛県立果樹試験場, *果樹試験場)

緒 言

キウイフルーツ花腐細菌病は全国的に発生が認められ、愛媛県でも1983年に初発生してから常発・多発の傾向にある(橘, 1988)。発病率が80%以上の園もあり、このような園では収穫は皆無となり甚大な被害が生じている。本病の症状は開花期に雄ずいが褐変し、花弁はカップ状を呈する。激しい場合は花蕾期からがくが褐変し、未開花のまま落下することもある。

本病に細菌が関与することを初めて明らかにしたのは森田ら(1984)であり、その後、カンジャンラトラ(1985)はそれらの分離細菌が *Pseudomonas syringae* の新しい pathovar に属することを明らかにし、病名を「キウイ花腐細菌病」とすることを提唱した。一方、ニュージーランドでは本病に類似した病害(Bacterial blossom rot)の病原菌は *P. viridiflava* であり、花だけでなく、葉にも病徴を示すと報告されている(WILKIE *et al.*, 1973; YOUNG *et al.*, 1988)。そこで、病原細菌には他の *Pseudomonas* 属細菌が介在する可能性もあると予測し、キウイフルーツの花腐症状花および葉のハローを伴う褐斑症状部から分離した白色集落細菌を簡易同定し、その病原性について検討したのでここに報告する。なお、本研究の内容の一部はすでに紹介されている(三好ら, 1988; 橘, 1988)。

本研究を行うに当たり標準菌株として用いた *P. marginalis* NIAES 1137 および *P. viridiflava* NIAES 1157 菌は農業環境研究所(現、農業生物研究所)西山幸司氏から分譲していただいた。記して感謝の意を表す。

材料および方法

1. 罹病標本の採集と細菌の分離

1985, 1986 および 1987 年の 5 月下旬~6 月上旬(開花期)に、自然発生したキウイフルーツの花腐症状花(愛媛県59点, 神奈川県11点採集)およびハローを伴う褐斑症状の葉(愛媛県14点採集)を採集した(第1表)。なお、花からの分離は雄ずいを中心にがくからも行った。常法に従い、キングB培地を用いて1罹病標本から1分離菌株を得た。分離菌株を純粋培養するため、発育してきた微小白色集落をキングB培地に両線培養し、再び発育してきた微小白色集落を釣菌し、PPGA培地(西山, 1978)に移植した。24時間後スキムミルク培地(西山, 1977)に移植し、-20°Cに凍結保存した。

2. 分離菌株の簡易同定

分離菌株(84菌株)を西山の *Pseudomonas* 属細菌類別法(1978, 1986)に従って簡易同定を行った。

Pseudomonas spp. isolated from flowers with bacterial blossom rot and leaves with brown spots in kiwifruit plants.

By Takanori MIYOSHI, Kazuo TAKANASHI and Yasunobu TACHIBANA.

Proc. Assoc. Pl. Protec. Shikoku No. 24: 51~58 (1989).

すなわち、2（検査項目番号、以下同じ）：グラム反応，3：発酵性，5：非水溶性黄色色素産生，6：緑色蛍光色素産生，16：40℃下での発育，17：アルギニンジヒドロラーゼ活性，18：オキシダーゼ活性，19：酒石酸の利用，20：スクロースの利用について検定した。なお，標準菌株として，*P. syringae* pv. *syringae* W 7835，*P. marginalis* NIAES 1137，*P. viridiflava* NIAES 1157を用いた。

3. 花蕾への接種

品種はヘイワードの8年生を使用し，自然感染を防ぐため，ビニールで被覆した雨除け栽培下で接種試験を実施した。被覆は3月中旬～開花まで行った。なお，第3表に示した28分離菌株を接種試験に供試した。

(1) がく裂開前接種

分離菌株のうち10菌株を選び，PPGA培地で24時間培養後，滅菌水で約 10^8 cfu/mlに調整し，がく裂開前の花蕾に噴霧接種した（1987年5月7日）。接種後，湿室状態で1日間保った。なお，接種花蕾数は1菌株につき5～10花蕾を用い，5月29日～31日の開花時期に雄ずいの発病を調査した。

(2) がく裂開後接種

分離菌株の病原性をさらに詳細に検討するため，28菌株を選び開花直前の花蕾（5～10花蕾）に浸漬接種した（1987年5月26日）。接種後の湿室保持等はがく裂開前接種と同様とし，調査は5月29日～31日の開花時期に行った。

(3) 分離菌株の濃度別接種

208株（西山の簡易同定によってH-11群と類別された菌株。以下同じ），2-5株（E群），301株（H-2群）の3菌株を用い，滅菌水で 10^8 ， 10^6 ， 10^4 ， 10^2 ， 10^1 cfu/mlに調整後，Tween 20（10,000倍）を加用し，がく裂開前の花蕾に噴霧接種した（1989年4月20日）。なお，接種花蕾は1接種区当たり新梢3本（約12花蕾）を用い，接種菌濃度は平板希釈法で求めた。接種後の湿室保持等は前述と同様に行い，5月29日～31日の開花時期に雄ずい，花卉，がくの発病を調査した。

また，がく裂開後に同上の3菌株を用い， 10^7 ， 10^5 ， 10^3 cfu/mlに調整後，花蕾に浸漬接種した（1988年5月27日）。調査等は前述と同様に行った。

4. 葉への接種

1986年6月，17菌株の菌液（ 10^6 ～ 10^7 cfu/ml）を用い，ポット植えヘイワードの若葉を針束付傷させた後，ゴムプレス改良法（富永ら，1983）で接種した。10日後，接種部の発病程度を調査した。発病程度の基準は， \pm ：付傷部がゆがみ，径1cm大の病斑形成，+：付傷部がゆがみ1病斑形成， \pm ：

第1表 罹病標本の採集部位，年月，場所

部位	年 月	場 所	点数
花	1985年6月	神奈川県小田原市	2
	1985年6月	神奈川県足柄市	2
	1986年5月	神奈川県中井町	7
	1986年5月	愛媛県松山市	3
	1986年5月	愛媛県北条市	1
	1986年5月	愛媛県大西町	1
	1986年5月	愛媛県砥部町	5
	1986年5月	愛媛県伊予市	1
	1987年6月	愛媛県双海町	8
	1987年6月	愛媛県松山市	18
	1987年6月	愛媛県大西町	4
	1987年6月	愛媛県丹原町	1
	1987年6月	愛媛県吉田町	4
	1987年6月	愛媛県伊予市	5
	1987年6月	愛媛県八幡浜市	4
1987年6月	愛媛県菊間町	3	
1987年6月	愛媛県西条市	1	
小 計			70
葉	1986年5月	愛媛県松山市	4
	1986年5月	愛媛県伊予市	2
	1987年6月	愛媛県松山市	1
	1987年6月	愛媛県双海町	5
	1987年6月	愛媛県今治市	1
	1987年6月	愛媛県東予市	1
小 計			14

付傷部の一部が褐点病斑となる。－：付傷部の傷のみ，とした。

(2) 無傷接種

花蕾への噴霧接種を行った10菌株および濃度別接種を行った3菌株の菌液を用いた。花蕾への接種時に、花蕾近傍の葉にも菌液を噴霧し、開花時期に発病の有無を調査した。

結 果

1. 分離菌株の簡易同定

分離菌株(84菌株)を西山の*Pseudomonas*属細菌類別法に従って簡易同定した結果、供試菌はすべてグラム陰性、発酵性陰性、非水溶性黄色色素非産生、緑色蛍光色素の産生などから*Pseudomonas*属と簡易判定された。さらに、40℃下での発育、アルギニンジヒドロラーゼ活性、オキシダーゼ活性、酒石酸の利用およびスクロースの利用の違いから、6群に分けられた。これらは西山による類別に従えばH-11群(*P. syringae*類縁菌)、E群(*P. marginalis*類縁菌)、H-2群(*P. viridiflava*類縁菌)の大きく3群に類別された(第2表)。花からの分離頻度はH-11群(43菌株)が最も多く、次にE群(27菌株)であった。葉からの分離頻度はH-2群(7菌株)、H-11群(5菌株)、E群(2菌株)の順であった。H-2群は葉からのみ分離された。これらの中で接種試験に用いた28分離菌株の来歴を第3表に示した。

第2表 キウイフルーツの花腐症状花及び葉の褐斑症状から分離された細菌の簡易同定

分離 菌株数	分離部位			検 査 項 目 ^{a)}								西山(1978, 1986) による類別群	
	雄ずい	がく	葉	2	3	5	6	16	17	18	19		20
48	36	7	5	— ^{b)}	—	—	+	—	—	—	+	+	H-11
13	12	1	0	—	—	—	+	—	+	+	—	+	E
11	8	1	2	—	—	—	+	—	+	+	—	—	E
4	3	1	0	—	—	—	+	—	+	+	+	+	E
1	1	0	0	—	—	—	+	—	+	+	+	—	E
7	0	0	7	—	—	—	+	—	—	—	—	—	H-2

(標準菌株)													
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> W 7835			—	—	—	+	—	—	—	—	+	H-12
	<i>P. marginalis</i> NIAES 1137			—	—	—	+	—	+	+	—	+	E
	<i>P. viridiflava</i> NIAES 1157			—	—	—	+	—	—	—	—	—	H-2

a) 2：グラム反応，3：発酵性，5：非水溶性黄色色素産生，6：緑色蛍光色素産生，16：40℃下での発育，17：アルギニンジヒドロラーゼ活性，18：オキシダーゼ活性，19：酒石酸の利用，20：スクロースの利用

b) +：陽性，—：陰性

2. 花蕾に対する病原性

(1) がく裂開前接種

H-11群では供試したすべての菌株に病原性が認められ、E群では5菌株中4菌株に病原性が認められた。また、葉から分離されたH-2群の2菌株も病原性が認められた。標準菌株の*P. syringae* pv. *syringae* W7835, *P. marginalis* NIAES 1137, *P. viridiflava* NIAES 1157の3者とも病原性が

第3表 接種試験に用いた分離菌株の来歴

菌株名(類別群 ^{a)})	採集年月	採集地	分離部位
1-3 (H-11)	1985年6月	神奈川県小田原市	雄ずい
204~210 (H-11)	1986年5月	神奈川県中井町	がく
377, 9-2 (H-11)	1986年5月	愛媛県松山市	雄ずい
13-1 (H-11)	1986年5月	愛媛県北条市	雄ずい
14-1 (H-11)	1986年5月	愛媛県大西町	雄ずい
1-7 (E)	1985年6月	神奈川県小田原市	雄ずい
347 (E)	1986年5月	愛媛県砥部町	がく
365 (E)	1986年5月	愛媛県松山市	雄ずい
357 (E)	1986年5月	愛媛県伊予市	がく
22-1, 25-1 (E)	1986年5月	愛媛県砥部町	雄ずい
2-2, 2-5 (E)	1985年5月	神奈川県足柄市	雄ずい
341 (E)	1986年5月	愛媛県砥部町	雄ずい
346 (E)	1986年5月	愛媛県砥部町	がく
301~304 (H-2)	1986年5月	愛媛県松山市	葉
320, 328 (H-2)	1986年5月	愛媛県伊予市	葉

a) 西山(1978, 1986)の方法による。

第4表 がく裂開前の噴霧接種による分離菌株の病原性

菌株名(類別群)	発病雄ずい率	発病葉率
	(%)	(%)
204 (H-11)	44.4	0
1-3 (H-11)	16.7	0
9-2 (H-11)	28.6	0
1-7 (E)	33.3	0
341 (E)	0	0
346 (E)	40.0	0
347 (E)	50.0	0
365 (E)	14.3	0
301 (H-2)	80.0	0
302 (H-2)	37.5	0
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> W 7835	11.1	0
<i>P. marginalis</i> NIAES 1137	12.5	0
<i>P. viridiflava</i> NIAES 1157	42.9	0
滅菌水	0	0

認められた。なお、対照の滅菌水噴霧区ではまったく発病は認められなかった(第4表)。

(2) がく裂開後接種

H-11群では12菌株中6菌株で病原性が認められ、特に3菌株が80%以上の発病雄ずい率で強い病原性を示した。E群では10菌株中8菌株に病原性が認められたが、その病原性はH-11群の分離株より弱い傾向であった。葉から分離されたH-2群の分離株は6菌株中4菌株に病原性が認められたが、強い病原性を示したのは1菌株のみであった(第5表)。

第5表 かく裂開後の浸漬接種による分離菌株の病原性

菌株名(類別群)	発病雄ずい率 (%)	菌株名(類別群)	発病雄ずい率 (%)
204 (H-11)	16.7	346 (E)	25.0
205 (H-11)	0	2-2 (E)	40.0
206 (H-11)	0	2-5 (E)	60.0
207 (H-11)	83.3	22-1 (E)	60.0
208 (H-11)	100.0	25-1 (E)	16.7
209 (H-11)	20.0	357 (E)	20.0
210 (H-11)	0	301 (H-2)	75.0
1-3 (H-11)	0	302 (H-2)	33.3
9-2 (H-11)	0	303 (H-2)	16.7
13-1 (H-11)	100.0	304 (H-2)	0
14-1 (H-11)	60.0	320 (H-2)	0
377 (H-11)	0	328 (H-2)	40.0
1-7 (E)	0	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> W7835	10.0
347 (E)	20.0	<i>P. marginalis</i> NIAES 1137	18.2
365 (E)	0	<i>P. viridiflava</i> NIAES 1157	60.0
341 (E)	20.0	滅菌水	0

第6表 分離菌株の時期別および濃度別接種による花および葉の発病率

菌株名 (類別群)	かく裂開前の噴霧接種 ^{a)}				かく裂開後の浸漬接種 ^{b)}			
	菌濃度 ^{c)}	雄ずい (%)	がく (%)	葉 (%)	菌濃度 ^{c)}	雄ずい (%)	花弁 (%)	がく (%)
208 (H-11)	4.3×10^8	42.9	7.1	0	1.0×10^7	41.7	83.3	0
	4.3×10^6	46.7	0	0	1.0×10^5	71.4	78.6	0
	4.3×10^4	33.3	0	0	1.0×10^3	23.1	61.5	0
	4.3×10^2	9.1	0	0				
	4.3×10	14.3	0	0				
2-5 (E)	3.0×10^8	64.3	0	0	8.5×10^6	64.3	0	0
	3.0×10^6	42.9	0	0	8.5×10^4	21.4	0	0
	3.0×10^4	0	0	0	8.5×10^2	15.4	0	0
	3.0×10^2	7.7	0	0				
	3.0×10	7.7	0	0				
301 (H-2)	3.8×10^8	81.8	63.6	0	1.0×10^7	45.5	18.2	0
	3.8×10^6	60.0	10.0	0	1.0×10^5	16.7	0	0
	3.8×10^4	7.7	0	0	1.0×10^3	8.3	0	0
	3.8×10^2	7.7	0	0				
	3.8×10	0	0	0				
滅菌水		8.3	0	0		0	0	0

a) 1989年4月20日接種

b) 1988年5月27日接種

c) cfu/ml

(3) 分離菌株の濃度別接種

さらに病原性を比較検討するため、類別された3群の各代表菌株を供試して時期別および濃度別の接種試験を行った結果を第6表に示した。かく裂開前接種(1989年)では、対照の滅菌水噴霧区より高い発病率を示した濃度は208株(H-11群)で 10^4 cfu/ml、2-5株(E群)および301株(H-2群)では 10^6 cfu/mlであり、H-11群の菌株がより低い濃度で病原性を示した。また、かくが褐変する症状は208株および301株で認められ、後者のほうが顕著であった。なお、花卉が褐変する症状の調査は未開花のまま落下するものが多く、明確にできなかった。

かく裂開後接種(1988年)では、3菌株とも 10^3 cfu/mlでも病原性が確認でき、この濃度で208株が最も高い発病率を示した。また、208株と301株では花卉が褐変する症状が認められ、前者のほうが顕著であった。なお、かくが褐変する症状は3菌株とも認められなかった。

3. 葉に対する病原性

(1) 有傷接種

花および葉から分離した分離菌株の有傷接種による病原性を検討した結果を第7表に示した。花から分離したH-11群の分離菌株は強い病原性を示したが、E群の分離菌株は弱い病原性しか示さなかった。また、葉から分離したH-2群の分離菌株は強い病原性を示した。

(2) 無傷接種

3群の分離菌株の噴霧接種による病原性を検討した結果を第4表および第6表に示した。葉に対する接種は花蕾に対する接種と同時にしたが、すべての試験で発病はまったく認められなかった。

第7表 分離菌株の葉に対する病原性(付傷接種)

菌 株 名(類別群)	発病程度
204~210(H-11)	+
341, 346, 347, 357, 365(E)	±~+
301~304, 320, 328(H-2)	+~++
滅菌水	-

++: 付傷部がゆ合集し、径1cm大の病斑を形成

+: 付傷部がゆ合集した1病斑を形成

±: 付傷部の一部が褐点病斑となる

-: 付傷部の傷のみ

考 察

今回、キウイフルーツの花腐症状花から分離された細菌(70菌株)を西山(1978, 1986)の細菌類別法で簡易同定したところ、すべて *Pseudomonas* 属細菌でH-11群(43菌株)、E群(27菌株)に類別された(第2表)。分離率の最も高かったH-11群は *P. syringae* 類縁菌であり、E群は *P. marginalis* 類縁菌であると推定された。H-11群およびE群に属する菌株は、花に対していずれも病原性が認められた(第4, 5表)。H-11群の分離菌株のほうがE群の分離菌株より強い病原性を有していた(第6表)。カンジャンラト(1985)、西山ら(1988)および北ら(1989)は *P. syringae* を本病の病原としているが、今回の結果も *P. syringae* 類縁菌のH-11群細菌が主因であると思われる、過去の報告と一致した。また、西山ら(1988)は *P. marginalis* も本病罹病花から分離しており、今回の試験でも *P. marginalis* 類縁菌のE群がかなりの率で分離され、病原性も認められた。したがって、*P. marginalis* も本病に関与している可能性がある。今回分離されたH-11群とE群は、それぞれ *P. syringae* と *P. marginalis* の類縁菌と推定されるが、種と pathovar の同定についてさらに検討が必要である。

葉の褐斑症状から分離された細菌(14菌株)は、H-2群に類別された菌株が最も多く(7菌株)、ついでH-11群(5菌株)、E群(2菌株)であった(第2表)。H-2群に類別された分離株を供試して有傷接種によって葉に対する病原性を調べたところ、すべての分離株で明瞭に病原性が認められた(第7表)。H-2群は *P. viridiflava* の類縁菌と推定された。したがって、褐斑症状は *P. viridiflava*

が関与するものと思われる。ニュージーランドでは、*P. viridiflava* は花と葉に病原性を有するとされているが、葉から分離した菌株の花に対する病原性は検討しているが、葉に対する病原性は検討していない (YOUNG *et al.*, 1988)。葉から分離された H-2 群に属する分離菌株も花に対して病原性が認められたが、花からは分離されなかった。しかし、西山ら (1988) は罹病花から *P. viridiflava* を分離したことを報告している。このことより、*P. viridiflava* 類縁菌の H-2 群も花腐症状に関与する可能性がある。今後、菌種の同定を行い、ニュージーランドにおける類似病害の病原細菌との異同について検討する必要がある。

また、今回葉から H-11 群 (*P. syringae* 類縁菌) および E 群 (*P. marginalis* 類縁菌) も分離されたが、病原性の検定を行っていない。花から分離された H-11 群の分離菌株は葉に対しても病原性を有し、同様に E 群の分離菌株もやや弱い病原性が認められた (第 7 表)。このことは、花腐細菌病の病原体と思われる *P. syringae* と一部に関与すると考えられる *P. marginalis* が葉にも感染する可能性を示唆している。福富ら (1989) は、本病の病原菌によって葉裏の葉脈が淡黄緑色にやや隆起し、支脈に緑色水浸状小斑点が形成され、やがて褐色となる病徴を記載している。愛媛県で発生している葉の褐斑症状はこれと異なり、YOUNG *et al.* (1988) の報告に類似している。今後、葉の症状に関与する細菌の菌種を同定するとともに花の症状との関連を明らかにする必要がある。

摘 要

キウイフルーツ花腐細菌病の罹病花および葉のハローを伴う褐斑症状部から細菌を分離し、西山の方法で簡易同定するとともに花と葉に対する病原性を調べた。分離菌株 (84 菌株) はすべて *Pseudomonas* 属細菌であった。罹病花から分離された細菌 70 菌株のうち、H-11 群に類別された細菌が 48 株、E 群に類別された細菌が 27 株であった。両群の分離菌株とも病原性が認められたが、H-11 群の分離菌株の病原性がより強かった。H-11 群の分離菌株は *P. syringae* 類縁菌、E 群の分離菌株は *P. marginalis* 類縁菌であり、本病は *P. syringae* に起因し、*P. marginalis* も関与するものと思われた。葉の褐斑症状部から分離された 14 菌株のうち、H-2 群が 7 菌株、H-11 群が 5 菌株、E 群が 2 菌株であった。H-2 群の分離菌株は *P. viridiflava* 類縁菌であり、有傷接種によって葉に病原性が認められ、花に対しても病原性を有していた。

引 用 文 献

- 福富雅夫・森川千春・松代平治・田知本正夫 (1989) : キウイフルーツ花腐細菌病に関する研究 (第 2 報) 伝染環. 石川農短農資研報, 1 : 41~47.
- 北 宣裕・牛山欽司・陶山一雄・青野信男・高梨和雄・藤井 溥 (1989) : キウイ花腐れ症状から検出された病原細菌. 日植病報, 55 : 123 (講要).
- 三好孝典・高梨和雄・橘 泰宣・佐川正典 (1988) : キウイフルーツ花腐細菌病に関する研究 (1) キウイフルーツ花腐細菌病の病原について. 日植病報, 54 : 378 (講要).
- 森田 昭・林田誠剛 (1984) : キウイの花腐れ症 (仮称) 及び奇形果の発生とその部位から分離される一種の細菌. 日植病報, 50 : 103 (講要).
- 西山幸司 (1977) : 凍結法による植物病原細菌の保存. 植物防疫, 31 : 465~467.
- 西山幸司 (1978) : 植物病原細菌簡易同定法の試案. 植物防疫, 32 : 283~288.
- 西山幸司 (1986) : 簡易同定法による本邦産 *Pseudomonas* 属細菌の類別. 植物防疫, 40 : 296~298.
- 西山幸司・赤山喜一郎・畔上耕児・田部井英夫 (1988) : キウイ花腐細菌病に罹病した花蕾から分離

- した細菌の性質. 日植病報, 54 : 119 (講要).
- スラン カンジャナラト・森田 昭・土屋健一・永野道昭・脇本 哲 (1985) : キウイ花腐れ細菌病 (新称) 菌の細菌学的性質. 九州病虫研報, 31 : 229 (講要).
- 橘 泰宣 (1988) : キウイフルーツ花腐細菌病の発生と防除. 植物防疫, 42 : 182~186.
- 富永時任・高梨和雄・西山幸司・岸 國平 (1983) : ウメかいよう病細菌の同定. 日植病報, 49 : 627~632.
- WILKIE, J. P., D. W. DYE and D. R. W. WATSON (1973) : Further hosts of *Pseudomonas viridiflava*. N. Z. Journal of Agricultural Reserch, 16 : 315~323.
- YOUNG, J. M., G. J. CHEESMUR, F. V. WELHAM and W. R. HENSHALL (1988) : Bacterial blight of kiwifruit. Ann. appl. Biol., 112 : 91~105.