

わが国におけるタバコ角斑病の発生について

田中行久

Yukihisa TANAKA: Occurrence of Angular Leaf Spot
Disease of Tobacco in Japan

Abstract

An unfamiliar disease of tobacco plants, the symptom of which is brownish or blackish angular spot on the leaves, occurred in Yamaguchi prefecture in 1970. The author obtained five bacterial isolates from the diseased leaves, and tested their characteristics in comparison with *Pseudomonas tabaci*.

Not any differences were observed between the pathogenic isolates and *P. tabaci* in bacteriological and serological characteristics.

Angular leaf spot symptoms produced by these pathogenic isolates were found to be apparently distinguishable from those produced by *P. tabaci*.

From these results, the pathogenic isolates were tentatively identified as *P. angulata* causing angular leaf spot disease of tobacco. (Received June 30, 1972)

1970年、山口県阿武郡福栄村のタバコ(品種 Hicks)畑 368 a に、黒褐色～茶褐色の角形斑点およびえそを生ずる病害が発生した。その被害葉から細菌が分離されたので、接種試験によって病原性を確認するとともに、細菌学的ならびに血清学的性質について調査した結果、従来わが国では発生が認められなかった病害であることを認めたので、その概要を報告する。

報告にあたって、供試菌株の収集にご協力いただいた日本専売公社萩出張所技術課の各位をはじめ、病原の電子顕微鏡撮影の労をとられた九州大学農学部長尾記明氏に深甚なる謝意を表わす。

I. 発生と病徴

病徴は地表面に近い下位葉にまず現われる。はじめは水浸状の斑点であるが、次第に黒褐色～茶褐色の角形を呈するようになり、古くなるとその中心部は白化してぬける (Fig. 1)。しかし、野火病 (Fig. 2) のように病斑の周囲に黄色のかさ(量)を生ずることはない。葉の先端部と基部とでは、先端部に多くの病斑が形成される傾向がある。下位葉の病斑は次第に上位葉へと進展するが、病徴の特徴はかわらない。病勢が激しいと病斑が拡大して相互にゆかし、その部分は褐変枯死して、遠方からは赤く焼けたように見える。これらの

病徴は Angular leaf spot^{1,11,17}) に類似している。本病は5月中下旬頃から発生しはじめ、梅雨期頃に最も激しく発生して蔓延する。窒素過多のタバコ葉では特

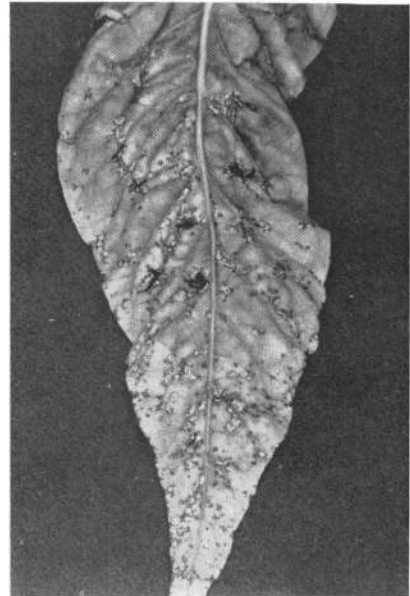


Fig. 1. Symptom of angular leaf spots on the leaf of field grown tobacco (*Nicotiana tabacum* var. Hicks).

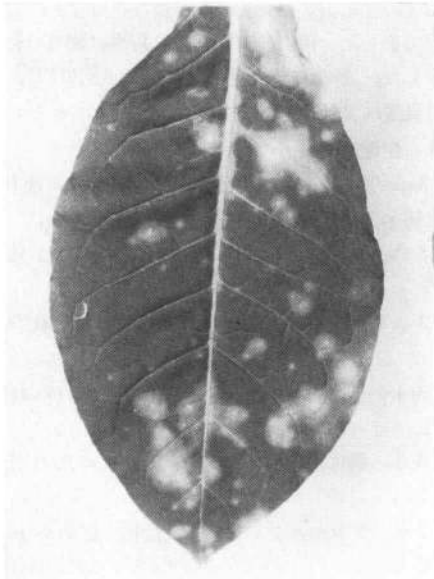


Fig. 2. Symptom of wildfire on the leaf of tobacco (*N. tabacum* var. Hicks) inoculated by *P. tabaci* (isolate T 4).

に蔓延が激しい。梅雨期が過ぎて降雨量が少なくなり、気温が上昇すると、発生蔓延が止まる。苗床での発生は確認されていない。当該地方のタバコに本病がはじめて発生したのは1967年頃で、1971年までの発生面積は拡大しつつあるようである。

II. 病原細菌の分離と接種

Sucrose 加用ジャガイモ寒天培地 (以下 PSA 培地と略す) を用い希釈平板法によって、初期病斑から白色の集落を作る細菌5菌株 (H1, H2, H3, H4, H5) を分離した。これらの分離菌株と対照に用いた野火病菌 (菌株 T 4) の来歴は Table 1 に示すとおりである。これらの菌株は滅菌脱イオン水に浮遊して 20C

で保存した。この保存菌株は、一たん PSA 斜面培地に移して 30C で 48 時間培養後、その発育菌を白金耳で滅菌水に浮遊させ、手で 4~5 回振とうして均一な濃度の細菌浮遊液としたのち、接種源として用いた。接種試験は 25C の空気が調和ガラス室内で行ない、挿種後 8 週間を経過したタバコ (品種 Hicks, 15~16 葉苗) の最大葉に各分離菌株の接種源をスプレーで噴霧接種した。接種後は乾燥防止のため、直ちに大型のビニール袋で 3 日間おとした。その結果、3~7 日目頃より自然発病葉の病斑に類似の病斑 (Fig. 3) が生じ、その病斑からは再び接種細菌と同一の細菌を分離することができた。

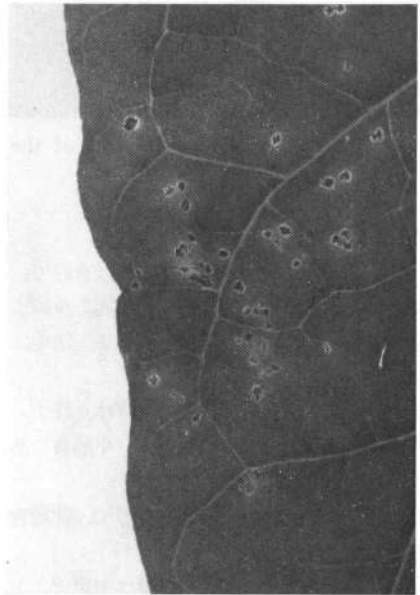


Fig. 3. Angular leaf spots on the leaf of tobacco (*N. tabacum* var. Hicks) inoculated by the isolate H 1.

Table 1. Origin of the bacterial isolates

Isolate	Tobacco variety	Year of collection	Place of collection
H 1, H 2	Hicks	1970	Fukue, Abu, Yamaguchi
H 3, H 4, H 5	Hicks	1971	Fukuga, Abu, Yamaguchi
<i>P. tabaci</i> (T 4)	Bright Yellow	1966	Kawabe, Kita, Ehime

III. 病原細菌の性質

分離菌株 (H1, H2, H3, H4, H5) のほかに対照として野火病菌 (菌株 T 4) を用いた。特に記した以外の

事項はすべて米国細菌学者協会の実験法¹⁶⁾に準拠し、30C で実験した。菌株名は菌株間に差異が認められた場合にのみ記した。

A. 細菌学的性質

1. 形態: PSA 斜面培地で 30C 48 時間培養後の菌体 (H1) について、電子顕微鏡観察を行なった。本細菌は桿状で 2~8 本の単極性べん毛を有し、大きさは平均 $2.5 \times 0.8 \mu\text{m}$ であった (Fig. 4)。グラム陰性で、芽胞を形成しない。

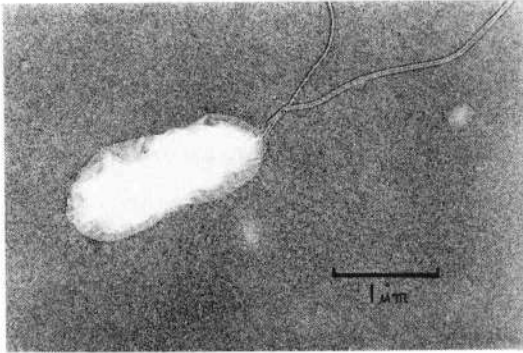


Fig. 4. Electron micrograph of the isolate H 1.

2. 培養的性質

2-1. 普通寒天平面培養: 発育は良好で、培地の表面に形成される集落は、円形、中高、全縁で、その表面は平滑、湿光をおび牛酪質である。培地は変色することなく、悪臭もない。

2-2. 普通寒天斜面培養: 発育は良好で、集落は糸状、中高、表面平滑で湿光をおび牛酪質である。色は汚白色で、悪臭はない。

2-3. ブイヨン培養: 発育良好で、沈殿物の形成が多い。悪臭はない。

2-4. ペプトン水培養: 発育は中庸で、かなりの沈殿物を生ずる。悪臭はない。

2-5. 牛乳培養: 牛乳のペプトン化が認められた。

2-6. ウシンスキー氏液培養: わずかに発育が認められた。

2-7. コーン氏液培養: 発育は中庸で沈殿物は少ない。

2-8. フェルミ氏液培養: わずかに発育が認められた。

2-9. 発育と温度との関係: 径 18mm の L 字型試験管に液体培地 (sucrose 10g, aspartic acid 2g, KH_2PO_4 2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, 蒸溜水 1l, pH 7.0) を 15ml ずつ分注し、高圧滅菌後、PSA 斜面培地で 30C 48 時間培養の分離菌株 (H1) の浮遊液 (滅菌脱イオン水に浮遊、濃度約 $10^7/\text{ml}$) 0.5ml ずつ加えて、振

盪温度勾配培養装置 (東洋科学製 TN-3 型) により 3 日間培養した。菌の発育の有無、程度は濁度計により判定した。その結果、発育温度域は 5~36.7C, 最適発育温度は 26.0~27.3C であった。

3. 生理的性質

3-1. 色素の産生: 分離菌株はキング培地 B 中に野火病菌と同程度の緑色蛍光色素を産生した。

3-2. ゼラチンの液化: すべての菌株が液化した。

3-3. 硝酸塩の還元: 還元性が認められなかった。

3-4. インドールの産生: 産生が認められなかった。

3-5. 硫化水素の産生: 産生が認められなかった。

3-6. アンモニアの産生: 産生が認められなかった。

3-7. 炭水化物の分解: Ayers, Rupp, and Johnson 培地¹⁶⁾ 100 ml に、指示薬 Bromo-thymol blue (0.2% 液) 1 ml と各種の炭水化物を 1% となるように加え、20 日間培養した。その結果、lactose だけに酸の産生が認められなかった。いずれの培地にせん刺培養した場合でも、ガスの産生は認められなかった。

3-8. デンプンの加水分解: まったく認められなかった。

3-9. レバンの産生⁹⁾: 5% sucrose 加用普通寒天培地にレバンを産生した。

3-10. グルコン酸の酸化⁴⁾: 酸化が認められなかった。

3-11. オキシダーゼ反応⁸⁾: 陰性であった。

3-12. アルギニン・ディヒドロラーゼ活性¹⁹⁾: 活性が認められなかった。

3-13. リパーゼ活性⁹⁾: 活性が認められなかった。

3-14. ベーター・グルコシダーゼ活性⁵⁾: 活性が認められた。

3-15. グルコースの分解形式⁷⁾ (O-Ftest): Hugh and Leifson 培地で酸化的分解が認められた。

以上の結果を既報の *P. angulata*^{1,6)} および *P. tabaci*^{1,6,20)} と対比して示せば Table 2 のとおりである。Table 2 で明らかなように、供試分離菌株と野火病菌の生理的性質はわが国における既報の *P. tabaci*²⁰⁾ のそれとほとんど一致した。

B. 血清学的性質

P. angulata および *P. tabaci* の加熱処理抗原は種特異性を示すといわれているので¹⁰⁾, 120C で 20 分間

Table 3. Agglutination reactions of the bacterial isolates to antiserum of *P. tabaci*

Antiserum	Isolate	Serum dilution 1									
		10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120
<i>P. tabaci</i> (T 4)	H 1~H 5	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄	+	+	-
	<i>P. tabaci</i> (T 4)	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄	+	+	-

Degree of the reaction: 卄, marked; 卄, moderate; +, slight; -, none.

度を調べた。凝集反応はどの組み合わせでも認められ、しかも、その最終力価には菌株間の差異が認められなかった (Table 3)。

2. 寒天ゲル拡散法による分離菌株の血清反応:

90×20 mm のペトリ皿の中央およびその周囲に、あらかじめペニシリンカップ (内径 6 mm) 計 7 個をおいて、このなかに直接入らないように注意しながら、0.01% のマーゾニンを含む 15% の寒天液 (pH 6.0 のりん酸緩衝液に Difco 精製寒天粉末を加えて 100°C で加熱溶解したもの) 30 ml を注入し、凝固後そのカップを取り除くことによって寒天平板に凹みを作った。中央の凹みに生理的食塩水で 10 倍希釈した抗血清 (抗体) を、周囲の 6 個の凹みにはおのおの加熱処理菌浮遊液 (抗原、濃度約 10⁹/ml) を入れ、室温で 2 週間保って抗原抗体反応が出現する経過を調査し

た。反応は供試したすべての抗原と抗体との間で 2 日目頃から白色の沈降帯として認められ、分離菌株と野火病菌との反応帯が相互にゆかし、交叉することはない (Fig. 5)。

IV. 考 察

分離菌株は 2~8 本の極性べん毛を有する短桿菌で、PSA 平板培地地上には白色の集落を形成し、緑色蛍光色素を産生する植物寄生性細菌であるので *Pseudomonas* 属細菌である。

タバコ葉に感染し、被害をもたらすことが知られている病原細菌には、*Pseudomonas angulata*, *P. mellea*, *P. nicotianae*, *P. polycolor*, *P. pseudozoogloecae*, *P. tabaci* などがあるとされている^{2,11,17}。これらのうち、わが国に分布しているものとして *P. mellea*¹⁵, *P. nicotianae*²¹, *P. tabaci*^{14,18,20} などが報告されている。黒褐色~茶褐色の角形斑点を生ずる本分離菌株はそれらの細菌と明らかに異なる病徴を示すほか、わが国に分布していない *P. pseudozoogloecae*, *P. polycolor* の病徴とも異なるため¹¹, *P. angulata* である可能性が高い。

P. angulata, *P. mellea*, *P. pseudozoogloecae*, *P. tabaci* に関する報告のなかで、大部分はこれらの細菌が相互を識別できないほど類似した細菌学的ならびに血清学的性質を有していると述べているが^{6,11,17}、本研究においても分離菌株とその対照に用いた *P. tabaci* との細菌学的ならびに血清学的性質の相違を認めることができなかった。したがって、分離菌株は *P. tabaci* に近縁の細菌であると思われる。しかしタバコ葉に現わす両者の病徴には著しい差異が認められる。すなわち、*P. tabaci* の寄生によって生ずる斑点またはえその周囲には黄色のかさ (暈) がみられるが、分離菌株のそれにはみられない。黄色のかさは、クロロフィルを分解する一種の毒素 (wilfire toxin) によって生ずるものとされているので^{11,17}、両者の主な相違点は毒素生産性の有無に集約されるものと考えられ

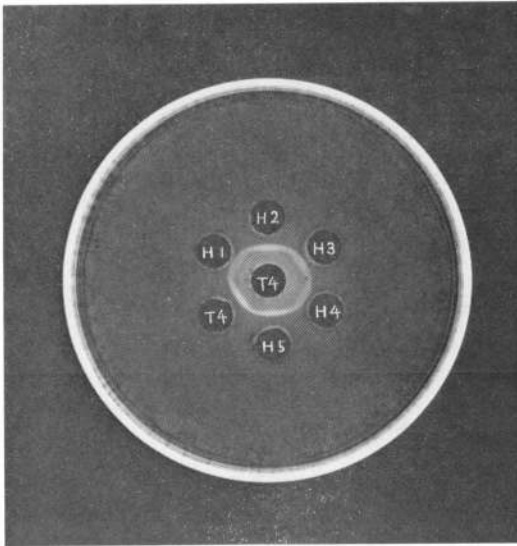


Fig. 5. Serological reactions between the isolates and antiserum of *P. tabaci*.

Center well: Antiserum of isolate T 4 (×10).
Outer well: T 4 (*P. tabaci*), H 1, H 2, H 3, H 4, H 5 (isolates obtained from angular leaf spot).

