

シラカシ枝枯細菌病菌の分離法と接種法の改良^{*1}石原 誠^{*2} ・ 秋庭満輝^{*2} ・ 佐橋憲生^{*2}

石原誠・秋庭満輝・佐橋憲生：シラカシ枝枯細菌病菌の分離法と接種法の改良 九州森林研究 58：71-74, 2005 シラカシ枝枯細菌病菌（以下枝枯細菌）の分離法について改良を試みた。既存培地の利用は困難であったので、トブラマイシンとシクロヘキシミドを普通栄養寒天培地に加用した培地を試作して分離能について評価した。その結果、この培地は古い病斑組織や罹病枝表面から枝枯細菌を分離する際、有効であった。次に、接種法について検討した。湿室処理下での感染・発病に必要な接種菌濃度は有傷接種でおおむね 10^5 cfu/ml、無傷接種で 10^7 ~ 10^8 cfu/ml 辺りにあった。無傷接種下では湿室処理により、または連続5日間5回接種することにより、発病率が上昇した。有傷接種下では湿室処理により、100%の発病率が得られ、隣接新梢への二次感染率も41.6%と高かった。これらの接種法について大規模な圃場試験で検証したところ、有傷接種枝からの二次感染率は低下したが、無傷湿室処理下の複数回接種で、アラカシ・シラカシの発病率は高い水準を維持出来た。

キーワード：シラカシ枝枯細菌病、分離法、接種法、改良、TCNA

Key words : Oak bacterium, modification, isolation, inoculation, TCNA

I. はじめに

シラカシ枝枯細菌病は1980年代に九州の主要な栽培地で局所的に発生した後、1990年代になって九州一円に拡大していったと推測されている(1)。1996年に筆者らは、*Xanthomonas* 属細菌が病原菌であることを明らかにしたが(2)、その後の調査・研究にもかかわらず、病原菌の生態や効果的な防除方法については、不明な点が多い。この理由として、本菌の識別の困難さに加えて、分離に適した培地の検討が不十分であること、防除試験を行うのに、自然発病圃場を利用したため、十分な試験成績が得られなかったこと等があげられる(3)。本病の防除試験にあたっては圃場レベルで均一に発病させるための人工接種法を工夫する必要がある。本報告では、分離に適した培地、最適な接種菌濃度と接種法について検討を行なった。

II. 材料と方法

1. 供試菌株

シラカシ枝枯細菌病菌（以下枝枯細菌）としてシラカシ罹病枝から分離され、病原性を確認したQM7601, QM7201, QM8218, QM8320, QM8307, QM13002, QM110301を使用した。腐生性細菌はシラカシ罹病枝から分離され、病原性がなく、コロニー形状が枝枯細菌と明らかに異なるQM7202, QM7602, QM7603, QM7605, QM7607, QM8752を使用した。

2. 分離法の改良

(1) 既存の培地の利用可能性

一般細菌用の普通栄養寒天培地（以下NA）と *Xanthomonas* 属細菌用の YDC, GYCA, BS, MD-5, BSCAA, Modified Tween Medium, XPS の7種の培地(4), (5)で枝枯細菌QM7601とQM7201の一定菌量（ 10^6 cfu/mlの菌懸濁液0.2ml）を接種して28℃, 7日間培養し、NAにおけるコロニーの培養形態と比較してこれらの分離培地としての適性を検討した。

(2) 抗生物質感受性の調査

トブラマイシン, セファレキシン, バンコマイシン, カスガマイシン, アンピシリン, ニトロフラントイン, パシトラシン, カナマイシン, エリスロマイシンの9種の抗生物質を、標準的な使用濃度から4倍ずつ段階希釈してNA培地に混和した培地に、枝枯細菌と腐生性細菌を線条接種して28℃, 7日間培養し、これらの最大許容生育濃度（MAC）を推定した。

(3) 分離培地の試作と分離能の評価

枝枯細菌がトブラマイシンに一定の耐性を持つことがわかったので、NAにトブラマイシンと抗真菌剤であるシクロヘキシミドを添加した培地をそれぞれ濃度を変えて試作し、NAに対する平板効率を調べた。その結果、トブラマイシン0.4ppmとシクロヘキシミド100ppmを添加した培地（以下TCNA）の成績が良かったので、以後の分離試験にNAやトブラマイシン0.4ppm添加NA（以下0.4TNA）と共に供試した。そして分離能の評価は以下の通りに行なった。枝枯細菌QM7601を接種したシラカシ罹病枝を摘み取り、常法により表面殺菌した後、新鮮な病斑部分と枯死部分を切り分けて0.5cm長の組織切片にし、これを1%ペプトン

^{*1} Ishihara, M., Akiba M. and Sahashi, N. : Modification of isolation and inoculation techniques of causal bacterium of Bacterial shoot blight of *Quercus myrsinaefolia*

^{*2} 森林総合研究所九州支所 Kyushu Res. Center, For. and Forest Prod. Res. Inst., Kumamoto 860-0862

水0.4ml中で磨砕して組織磨砕液とした。この組織磨砕液からNA, 0.4TNAとTCNAを用いた希釈平板法により、枝枯細菌を再分離し、組織内の菌濃度を推定した。また接種罹病枝から流下する雨水を採取して希釈平板法により、枝枯細菌を再分離し、流下雨水中の菌濃度を推定した。なお、再分離された枝枯細菌の分離菌株は一部を抽出して接種試験で病原性を確認した。

3. 接種法の改良

(1) 接種菌濃度と発病率の関係

枝枯細菌 QM7601の培養菌体から、 $1.9 \times 10^2 \sim 1.9 \times 10^{10}$ までの9段階に希釈した菌懸濁液を作成し、伸長後7日程度経過したシラカシ新梢20本に、有傷または無傷で接種を行なった。有傷接種は菌懸濁液を塗布後、梢の先半分を単針で10ヵ所刺傷した。接種後、湿度を保つため、内部を湿らせたポリエチレンバックを被せて1晩放置した。接種は1999年9月7日に、調査はその2ヶ月後に行った。発病の有無を確かめると共に接種枝の発病率を算出した。

(2) 接種法と発病率の関係

接種源は枝枯細菌 QM7601の培養菌体を用いた。有傷接種はシラカシ1個体につき、伸長後7日程度経過した新梢3本、全3個体計9本に対して行い、湿室処理を施した。無傷接種では、3個体の伸長後10日以内の全新梢に対して、湿室処理と無処理、1回接種処理と連続5日間5回接種処理を組み合わせて行った。なお、接種菌濃度は 10^8 cfu/mlに保った。接種は2003年5月22日に、調査はその2ヶ月後に行い、発病の有無を確かめると共に接種枝に対する発病率を算出した。なお、有傷接種では接種4ヶ月後に二次感染した隣接新梢の発病率を算出した。

(3) 圃場試験での接種法の評価

接種源は枝枯細菌 QM7601の培養菌体を用いた。有傷接種は2003年にのみ行い、シラカシ1個体につき、伸長後7日程度経過した新梢3本、全15個体計45本に対して行い、湿室処理を施した。無傷接種は全て湿室処理で行い、カシ類の15個体のうち、伸長後10日以内の全新梢に対して、2003年には一週間毎に計5回、2004年には2週間毎に計2回の複数回接種を行なった。接種菌濃度は 10^8 cfu/mlに保った。接種は8月の第1週から開始し、調査は接種開始2ヶ月後に行い、発病の有無を確かめるとともに、発病率

を算出した。なお、有傷接種では接種を開始して4ヶ月後に二次感染した隣接新梢の発病率を算出した。

Ⅲ. 結果

(1) 分離法の改良

NA, YDC, GYCA, BS, MD-5, BSCAA, XPSの7種の培地を用いて枝枯細菌を培養した結果、NA以外の培地では全く生育しないか、生育しても、コロニーが矮化したり、コロニー数がNAと比較して顕著に減った。

9種の抗生物質における最大許容生育濃度を表-1に示す。供試した9種の抗生物質のうち、枝枯細菌の最大許容生育濃度が腐生性細菌と比べて高かったのはトブラマイシンであった。

次に、TCNAの分離能力を評価した結果を表-2に示す。病斑組織では、枝枯細菌の分離率はNA, 0.4TNA, TCNA共にほとんど変わらず、 $10^7 \sim 10^8$ cfu/mlと高かった。これに対して腐生性細菌の分離率は0.4TNA, TCNAでNAより低下傾向にあり、腐生性細菌を全く分離出来ない試料もあった。次に壊死組織の場合、相対的に腐生性細菌の密度が高くなる傾向にあり、試料6, 試料8, 試料10では0.4TNAとTCNAで枝枯細菌が低率で分離されたが、NAでは腐生性細菌の生育がおう盛であるため、枝枯細菌を識別・分離することが出来なかった。接種罹病枝流下雨水からの分離の場合、試料11のように枝枯細菌の推定菌濃度が 10^6 以下に低下してくると、糸状菌類の繁殖により、NA, 0.4TNAでは計測不能になる場合があった。

(2) 接種法の改良

接種菌の濃度と発病との関係を調べた結果を表-3に示す。有傷接種下では、 10^8 cfu/mから罹病する枝が低率で認められ、 10^9 から 10^7 まで漸増し、 10^8 から 10^{10} までは100%近い高い発病率を示した。一方、無傷接種下では 10^8 cfu/mから罹病する枝が低率で認められ、 10^7 から 10^9 まで漸増し、 10^9 と 10^{10} は40%台の発病率であった。次に接種法と発病の関係調べた結果を表-4に示す。無傷接種においては、湿室処理を施すことにより、発病率は0%から2.9%に上昇し、さらに接種を5回連続して繰り返すことにより、湿室処理下では2.9%から31.8%、無処理下では0%か

表-1. 供試菌株の抗生物質感受性

		最大許容生育濃度 (ppm)								
		ト ブ ラ マ イ シ ン	セ フ ア レ キ シ ン	バ ン コ マ イ シ ン	カ ス ガ マ イ シ ン	ニ ト ロ フ ラ ン ト イ ン	ア ン ピ シ リ ン	バ シ ト ラ シ ン	カ ナ マ イ シ ン	エ リ ス ロ マ イ シ ン
シ ラ カ シ 病 菌 枝 枯	QM7201	6.4	≥26.5	6.4	≥26.5	≥26.5	1.6	≥26.5	0.4	1.6
	QM7601	6.4	≥26.5	6.4	≥26.5	≥26.5	0.4	≥26.5	0.4	1.6
	QM8320	6.4	≥26.5	6.4	≥26.5	≥26.5	1.6	≥26.5	0.4	0.1
	QM8622	1.6	≥26.5	6.4	≥26.5	≥26.5	≥26.5	≥26.5	0.4	0.4
	QM13002	6.4	≥26.5	≥26.5	≥26.5	≥26.5	≥26.5	≥26.5	1.6	6.4
	QM7202	0.4	6.4	≥26.5	≥26.5	≥26.5	6.4	≥26.5	0.4	1.6
腐 生 性 細 菌	QM7602	0.4	1.6	≥26.5	≥26.5	≥26.5	≥26.5	≥26.5	1.6	≥26.5
	QM7603	0.1	≥26.5	≥26.5	≥26.5	≥26.5	≥26.5	≥26.5	0.4	6.4
	QM7605	1.6	≥26.5	≥26.5	≥26.5	≥26.5	≥26.5	≥26.5	≥26.5	≥26.5
	QM7607	≥26.5	≥26.5	0.4	≥26.5	≥26.5	6.4	1.6	0.4	0.03
	QM8752	1.6	≥26.5	≥26.5	≥26.5	≥26.5	≥26.5	≥26.5	6.4	≥26.5

ら15.4%に発病率が上昇した。有傷湿室処理接種においては100%の発病率が得られ、隣接新梢への二次感染も41.6%と高いものとなった。

これらの高い発病率が得られた接種法を用いて、圃場規模の接種試験を行なった結果を表-5に示す。2003年度は有傷接種と無傷接種の2法を試した。その結果、無傷湿室処理下の5週連続の接種によって62.7%という高い発病率を得た。一方、有傷湿室処理下の接種における二次感染率は7%と、予備試験時の41.6%に比較して低いものとなった。2004年は無傷湿室処理の隔週2回接種で3樹種を試験した結果、シラカシで75%、アラカシでも69%の高い発病率を得た。これに対して、イチイガシは3.4%の発病率となった。

IV. 考察

枝枯細菌は *Xanthomonas* 属細菌であるが、本属菌の分離に推奨される YDC は、枝枯細菌の生育が極めて悪いので、この培地の使用は避けた方がよい。罹病枝からの分離に際して、新鮮病斑のように枝枯細菌の密度が高く、腐生性細菌の密度が低いと予想される場合は、NA で十分であるが、罹病が進んで組織が壊死・腐敗したような試料では、枝枯細菌の密度が低下し、相対的に腐

生性細菌の密度が高くなっているため、TCNA を使用するか、糸状菌汚染の心配がない場合はトブラマイシンのみ0.4ppm 加用した培地を使用することで分離が容易になると考えられる。さらに罹病枝表面を流下した雨水などのように、糸状菌類の分生子による汚染が懸念される場合は、抗真菌剤の入った TCNA の使用が適切である。以上のように、TCNA は簡便に調整出来るわりには、罹病組織や枝表面に存在する腐生性の細菌や糸状菌類に一定の生育抑制効果を持つことが判った。今後は、枝枯細菌の生態研究や診断に活用されていくものと思われる。一般に細菌が植物へ感染する場合は、高湿条件が植物体表面上での細菌の生存率を高め、感染機会を増大させると考えられる。従って、今回の試験では湿室処理を前提にして、枝枯細菌の感染・発病能力について調べた。その結果、感染・発病に必要な接種菌濃度はおおむね、有傷接種下で 10^5 cfu/ml、無傷接種下では $10^7 \sim 10^8$ cfu/ml 辺りにあることがわかった。このように高い発病率が得られる有傷接種であるが、薬剤効果試験への利用は、薬液に暴露されないうま菌が植物体に侵入してしまうので好ましくない。そこで、高い発病率を利用して接種枝から隣接新梢への二次感染による接種法を検討した。ところが、予備試験の段階では、40%台の発病率を確保できたが、圃場規模での接種試験に適用した事例では満足のいく発病率は得られなかった。筆者らの観察によれば、無傷接種下では伸長後

表-2. 各種分離培地を用いたシラカシ枝枯細菌病菌の推定菌濃度

試料番号	試料内訳	推定菌濃度 (cfu/ml)					
		枝枯細菌			腐生性細菌		
		NA	0.4TNA	TCNA	NA	0.4TNA	TCNA
試料1	病斑	10^7	10^7	10^7	10^6	10^5	10^5
試料2	病斑	10^8	10^8	10^7	10^7	分離不能	分離不能
試料3	病斑	10^7	10^7	10^7	10^8	10^7	10^7
試料4	病斑	10^8	10^8	10^8	分離不能	分離不能	分離不能
試料5	病斑	10^8	10^8	10^8	10^7	分離不能	分離不能
試料6	壊死部	分離不能	10^6	10^6	10^8	10^7	10^7
試料7	壊死部	10^7	10^8	10^7	10^8	10^6	10^6
試料8	壊死部	分離不能	10^4	10^4	10^5	10^5	10^5
試料9	壊死部	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	10^1	$<10^1$	$<10^1$
試料10	壊死部	分離不能	10^3	10^3	10^7	10^5	10^5
試料11	流下雨水	計測不能	計測不能	10^5	計測不能	計測不能	10^6
試料12	流下雨水	10^4	10^4	10^4	10^5	10^4	10^4
試料13	流下雨水	10^6	10^6	10^5	10^6	10^4	10^5
試料14	流下雨水	10^6	10^6	10^6	10^6	10^5	10^5
試料15	流下雨水	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6

表-3. 異なる接種菌濃度におけるシラカシ枝枯細菌病菌の発病率

接種菌濃度 (cfu/ml)	発病率 (%)	
	有傷接種	無傷接種
1.9×10^{10}	100	45
1.9×10^9	92	41
1.9×10^8	95	27
1.9×10^7	88	15
1.9×10^6	36	4
1.9×10^5	27	6
1.9×10^4	6	0
1.9×10^3	7	0
1.9×10^2	0	0

表-4. 異なる接種法がシラカシ枝枯細菌病菌の発病率に及ぼす影響

接種法			発病率 (%)	
有傷処理	湿室処理	接種回数	接種枝	隣接新梢
-	+	1	2.9	
-	-	1	0	
-	+	5	31.8	
-	-	5	15.4	
+	+	1	100	41.6

表-5. 圃場での人工接種による枝枯細菌病菌の発病率

接種年	接種対象	接種法		菌濃度 (cfu/ml)	発病率 (%)	
		有傷処理	湿室処理		接種回数	接種枝
2003年	シラカシ	-	+	毎週5回	$2.8 \sim 9.2 \times 10^8$	62.7
2003年	シラカシ	+	+	1回	5.4×10^8	100 7
2004年	シラカシ	-	+	隔週2回	$1.4 \sim 4.7 \times 10^8$	75
2004年	アラカシ	-	+	隔週2回	$1.4 \sim 4.7 \times 10^8$	69
2004年	イチイガシ	-	+	隔週2回	$1.4 \sim 4.7 \times 10^8$	3.4

一ヶ月を経過したような成熟した枝では感染が起きない現象が観察されており、感染を成功させるにはできるだけ新しい新梢を用いることが好ましいと考えられる（筆者ら未発表）。つまり、二次感染枝を接種試験へ利用する場合、接種すべき新梢の伸長時期と二次感染させるべき新梢の伸長時期に時間差がないと、枝枯細菌がうまく感染出来ない。このことが、隣接新梢で発病率が低かった主な原因であると推察される。一方で、無傷接種では温室処理と複数回接種により、発病率が上昇することが判り、その後の2カ年にわたる圃場規模での接種試験において、安定した成績をおさめた。この理由として、剪定によって新梢伸長期の斉一化を図ったことに加えて、感染機会を複数回とることによって、遅れて伸長してきた新梢へ確実に感染させることが出来たためと考えられる。

引用文献

- (1) 石原誠ほか (1999) 日林九支研論52：97-98.
- (2) 石原誠ほか (1996) 日植病報（講要）62：304.
- (3) 讚井孝義ほか (1998) 林業と薬剤143：1-7.
- (4) Schaad, N.W. *et al.* (1988) Laboratory Guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria Second Edition. Schaad, N.W. *et al.*, APS Press, Minnesota) ,81 - 103.
- (5) Schaad, N.W. *et al.* (2001) Laboratory Guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria Third Edition. Schaad, N.W. *et al.*, APS Press, Minnesota) ,175 - 200.

(2004年11月8日 受付；2004年11月30日 受理)