

助成番号：222

トマト茎えそ症状とその病原細菌の分類・同定

美濃 羊輔

畜産環境学科環境植物学研究室

1. 緒 言

1970年伊達市および江別市において、トマト茎の維管束および髓部が黒褐色に変色し、その後髓部が空洞化する新しい細菌病の発生が認められた。近年同種の病害が本道の各地で発生し始め、大きな問題となりつつある。本州においても千葉県や栃本県などで本病に酷似する病害の発生が報告された。本道においては、本病害が呈する病徴がトマト軟腐病のそれに類似するため、しばしば混同されている場合すらある。しかし、本病に係わる病原細菌の性状については全く明らかにされていない。したがって、本研究では本道各地で発生した罹病トマト茎から病原菌を分離し、それらの病原性、細菌学および血清学的性質を検討し、分類学的所属を明らかにすることを目的とした。

2. 実験材料および方法

供試菌株

実験に用いた菌株 (17 菌株) の来歴を表 1 に示した。

表 1. Source of bacterial isolates

Group	Isolate No.			Host plant	Locality	Date
I	TO 8361	TO 8362	TO 8363	Tomato	Ikeda T.	1983. 6
	TO 8365	TO 8366				
	TO 8374	TO 8376	TO 8378	Tomato	Fukagawa C.	1983. 7
	TO 8379	TO 83712				
II	TO 8371	TO 8382	TO 8383	Tomato	Kushiro C.	1983. 8
	TO 8385					
III	TO 8371	TO 8372		Tomato	Fukagawa C.	1983. 7
IV	TO 8384			Tomato	Kushiro C.	1983. 8

トマト茎部の比較的新鮮な病斑部を少量とり、滅菌乳鉢内で殺菌水と共にすりつぶし、その 1 白金耳をキング B 寒天培地平板に画線した。生じた単コロニーを普通寒天斜面培地で培養したものをを用いた。

接種試験

温室で生育した 4-6 葉期のトマト苗の茎に本菌を多量に塗布した楊枝で穿刺した。接種後 18°C ~ 20°C, 湿度 100% 下に 3-7 日間放置し、外部病徴の変化を観察し、最終日には茎を縦断し内部病徴を調べた。

細菌学的性質

普通寒天斜面培地上で 25°C にて培養した 48 時間以内の菌苔を用い、これを各種の検査培地に接種した。検査方法は米国細菌学者協会の微生物実験法、伝染病研究所学友会の細菌学実習提要などにより行った。

形態学的性質

グラム染色は kopeloff-Beerman の方法、芽胞および莢膜染色はそれぞれ Wiriz および Hiss の方法により行った。鞭毛染色は山中氏変法により行った。Poly- β -hydroxybutyrater (PHB) の菌体内蓄積の有無は Sands の方法により行った。

培養的性質

接種 2 日後に普通寒天斜面培地上の生育菌苔について、生育状態、質、色などを観察調査した。

生理・生化学的性質

糖の酸化・発酵試験は Huhg-Leifson の培地を用いて行った。糖、有機物およびアミノ酸の利用試験は Ayers らの無機合成培地を基礎培地として用いた。レバン産生の有無については Lelliott らの方法により行った。

G-C 含量の測定

昇温装置付分光光度計を用い温度変化に伴う 250nm の吸光度変化を測定し DNA の融解温度 (T_m) を求め、GC (%) = (T_m-70.2)/0.41 の式から計算した。

血清学的性質

寒天ゲル内二重拡散法によった。径 9cm のペトリ皿中の寒天ゲルに、7mm 径の中央穴の周囲に同径の 6 個の穴を 10mm の等間隔に配列し、中央穴には抗血清、周囲穴には各抗原を入れ室温に置き沈降帯の出現を観察した。

3. 実験結果

接種試験の結果を表 2 に示した。いずれの菌群の菌株でも接種約 4 日後からトマト茎の接種部位の上部に気根を生じ、葉に萎凋症状がみられた。また、茎あるいは葉柄の表面に水浸状斑紋が現れる場合があった。茎髄部は消失空洞化し褐変し、さらに維管束部にも褐変が進行するものが観察された。4 回の接種試験の結果から本病に関与する細菌は 4 群に区別され、I・II・III 群の菌は病原性が強く IV 群の菌は弱いことが明らかとなった。

表 2. The pathogenicity of causal organism to tomato plant by wound inoculation

Group	Isolate No.		Degree of infection				
			1st	2nd	3rd	4th	
I	TO 8361	TO 8362	TO 8363				
	TO 8365	TO 8366		±	+++	+++	+++
	TO 8374	TO 8378					
	TO 8379	TO 83712					
II	TO 8381	TO 8382	TO 8383	+	+++	+++	+++
	TO 8385						
III	TO 8371	TO 8372		±+++	+---	+++	
IV	TO 8384			±	+	++	++
	Control			-	-	-	-

- Toothpick was stabbed against tomato stem
- No infection
- ± Doubtful infection
- + Slight infection
- ++ Moderate infection
- +++ Severe infection

本実験に用いた病原細菌 17 菌株はすべて、集落が白色～淡褐色で、数本の鞭毛を有するグラム陰性の桿菌であった。上記の結果とグルコースを好氣的に分解する能力を有することから、これらの菌株はすべて *Pseudomonas* 属に所属し、さらに主要な細菌学的性質によって (表-3) 4 群に類別さ

表3. Characteristics of 17 isolates of causal organism

	Group																
	I								II				III		IV		
	TO 8361	TO 8362	TO 8363	TO 8365	TO 8366	TO 8374	TO 8376	TO 8378	TO 8379	TO 83712	TO 8381	TO 8383	TO 8385	TO 8382	TO 8371	TO 8372	TO 8384
Gram stain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Figure of cells	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
No. polarflagella	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PHB accumulation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Utilization of malonate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Levan production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
V-P test	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M-R test	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidation of gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
Aesculin hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Arbutin hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Utilization of asparagine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
H ₂ S production:																	
Cysteine · HCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sodium thiosulphate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Peptone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
Amino acid decarboxylase:																	
L-Lysine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ornithine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arginine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	+	+	-	-	+
Phenylalanine deaminase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Tyrosinase	-	±	±	±	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	+	+	-
Denitrification	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin liquefaction	+	+	+	+	+	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ammonia production	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Starch hydrolysis	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Margarine hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	±	-	-	-
Tween 80 hydrolysis	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Lecithinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
Pectate gel pitting:																	
pH 4.9-5.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-
pH 6.9-7.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
pH 8.3-8.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidation/Fermentation test	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Growth factors																	
BCP milk	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
Pigmentation King medium A	-	b	b	-	b	b	b	b	b	-	-	-	-	-	m	m	-
King medium B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	m.f	m.f	f
Soft rot test: Potato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Onion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	±	±	-
Radish	±	+	+	+	+	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Carrot	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chinese cabbage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-	-	-	-	-
Growth at 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
at 41°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tabacco hypersensitivity	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ Positive reaction, - Negative reaction, ± Weakly positive reaction, R Rod, O Oxidation, b Blue non-diffusible pigment, m Maroon diffusible pigment, f Fluorescein.

表4 The matching coefficient (S_{SM}) of carbohydrate and organic compound between *Ps. fluorescens* biovar. I-V and the present causal organism (Group II-IV)

Group	Isolate No.	Biovar. I	Biovar. II	Biovar. III	Biovar. IV	Biovar. V
II	TO 8381	81.7	85.2	71.4	81.0	80.5
	TO 8383	81.7	85.2	71.4	81.0	80.5
	TO 8385	85.5	81.3	76.9	75.0	80.7
	TO 8382	62.2	75.6	71.7	73.0	77.6
III	TO 8371	77.8	86.3	76.1	81.0	77.8
	TO 8372	76.5	85.0	74.7	79.0	76.2
IV	TO 8384	75.4	82.6	78.7	79.0	74.8

$$(S_{SM}) = \frac{\text{Sum of positive and negative matches}}{\text{Total number of tests} - \text{number of invalid tests}}$$

(by Sokal and Michener)

れた。I群は種々の試験の結果を総合すると既知種とは異なるものであることが明らかとなった。II群は *Ps. marginalis* pv. *marginalis*, III群は *Ps. fluorescens* biovar. II, IV群は *Ps. fluorescens*

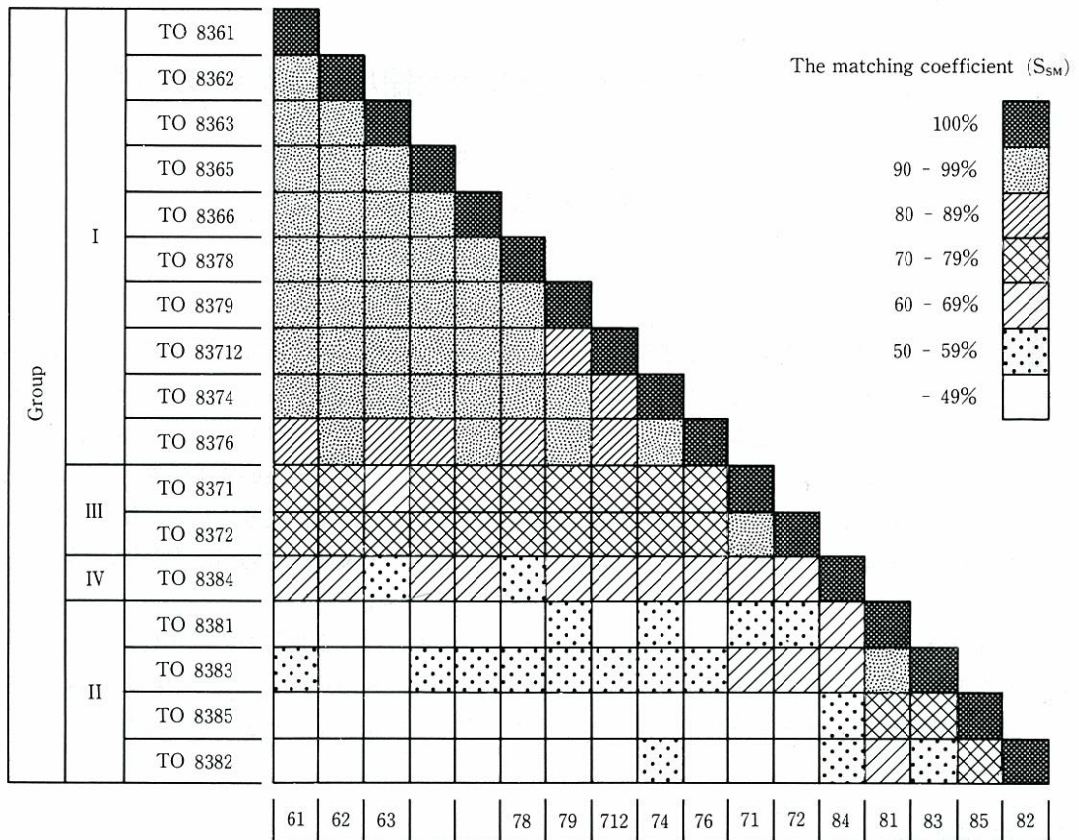


図1 Shaded matrix of tomato pith necrosis pathogens
 $(S_{SM}) = \frac{\text{Sum of positive and negative matches}}{\text{Total number of testes} - \text{number of invalid tests}}$

biovar. IIIと同定された。以上のことから、トマト茎えそ症状は、茎が空洞化するという共通の病徴を示すにもかかわらず、複数種の *Pseudomonas* 属細菌で起されていることが明らかとなった。また血清学的には、I群には少なくとも2つの Serotype が存在すること、III群は異質な集団からなること、III群は同質な集団からなることも明らかにされた。GC含量の面からも、I～IV群は明らかに異

表5 Mol% G+C of DNA

Group	I	II	III	IV
Isolate No.	TO 8362	TO 8383	TO 8372	TO 8384
	57.3	63.7	59.8	58.31

なる集団であることが確認された。また、本実験は十勝農試谷井昭夫博士の指導の下に行われたことを付記する。