

B・E法の利用によるトマトかいよう病菌の簡易検定*

菅 正道*・伊阪実人** (*福井県農業試験場・**福井県立短期大学)

M. KAN and M. ISAKA : Detection of tomato canker caused by *Corynebacterium michiganense* (Smith) Jensen using Bacterial Exudation Method

トマトの全身的な細菌病として、かいよう病、青枯病、軟腐病があるが、とくにハウス栽培においては、これらの症状に各種の変化がみられ、現地では診断に苦慮することが多い。その診断にB・E法 (Bacterial Exudation Method) の利用、とくにトマトかいよう病菌の簡易検定への応用について2・3の実験を試みた。

本実験をおこなうにあたっては農林省農業技術研究所から、かいよう病菌、青枯病菌、軟腐病菌を分譲して頂くなど多くのご援助を頂いた。さらに当農試環境部長奈須田和彦博士には細部にわたって校閲をたまわりここにあわせて深く感謝の意を表する。

I 接種植物からのB・E検出

トマトの全身病的な細菌病であるかいよう病、青枯

病、軟腐病の培養けんたく菌液をトマト、ナス、インゲンの若葉に多針接種して、それからのB・E噴出について調査した。

実験方法 ガラス室内で栽培した、トマト、ナス (本葉3葉期)、インゲン (本葉2葉期) の葉の主脈あるいは支脈維管束に28°C、2日間半合成培地で培養した高濃度菌液 (10⁹ /ml) 以上を多針接種 (昆虫針No. 5, 50本の束針) した。B・Eの検出は接種6日後に接種点から上下1mm前後の部分を切片として観察することによって行なった。供試菌としてトマトかいよう病菌 (農技研C 1-1-7)、トマト青枯病菌 (農技研P 1-18-1) および軟腐病菌 (農技研E 1-1-5) をもちいた。

実験結果 接種植物からのB・E検出の結果は第1

第1表 トマト細菌病菌と各寄主植物とのB・E検出の関係

接種病原菌	検出位置	トマト (幼苗)		トマト (老化苗)		ナス		インゲン	
		検出率	検出度	検出率	検出度	検出率	検出度	検出率	検出度
<i>Corynebacterium michiganense</i>	接種点の上部	100%	冊	100%	冊~冊	0%	—	0%	—
	下部	100	冊	100	冊~冊	0	—	0	—
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	上部	100	—	100	冊	100	冊	100	冊
	下部	100	+~±	100	冊	100	冊	100	冊
<i>Erwinia aroideae</i>	上部	0	—	0	—	0	—	0	—
	下部	10	—	0	—	0	—	10	—~±
刺針のみ	上部	0	—	0	—	0	—	0	—
	下部	0	—	0	—	0	—	0	—

注 幼苗: 4~5葉期 老化苗: 10葉期前後 調査接種点数: 各10点

表のとおりであって、トマトかいよう病菌ではトマト (幼苗および老化苗) からのみB・Eが観察された。トマト青枯病ではトマト (幼苗および老化苗)、ナス、インゲンのいずれからもB・Eが観察された。軟腐病菌の場合にはトマト、インゲンから10%程度検出されたのみであって、その検出の程度も小さかった。また、ナスか

らは検出されなかった。接種部位とB・E検出との関係をみると、葉身先端の側と葉柄側とではいずれの菌でもあきらかな差は認められなかった。

II 接種濃度とB・E検出との関係

トマトかいよう病菌は高濃度接種の場合、トマト葉身組織から顕著なB・E現象が観察される。インゲンの葉身からもわずかにB・Eが検出されたので、トマトとイ

* 本報告の一部は昭和49年度日本植物病理学会において講演発表した。
福井県農業試験場向見昆虫科築設No. 50 (病)

ンゲンをもちいて、かいよう病菌の接種濃度とB・E検出との関係について調査した。

実験方法 かいよう病菌を半合成培地で28°C、48時間培養し、殺菌水で希釈して、病菌数を測定し各濃度菌液をつくった。各濃度菌液をトマトおよびインゲンに多針接種（昆虫針No.5 50本の束針）し、12日後にB・E検出率の比較をおこなった。

実験結果 結果は第2表のようにトマト葉身に接種されたかいよう病菌は10⁹/ml濃度区までB・Eが検出できた。またインゲンでは10⁹/ml濃度区のみB・Eが検出された。

第2表 かいよう病菌濃度とB・E検出率

かいよう病菌濃度 (/ml)	トマト		
	耐病新宝冠1号	インゲン トップクローブ	インゲン 尺五寸菜豆
10 ⁹	—%	0%	4%
10 ⁸	—	0	0
10 ⁷	—	0	0
10 ⁶	—	—	—
10 ⁵	100	—	—
10 ⁴	64	—	—
10 ³	40	—	—
10 ²	32	—	—
10	0	—	—

調査接種点数：25点

III 接種後の経過日数とB・E検出との関係

かいよう病菌接種後の経過日数とB・E検出との関係について培養菌をもちいて実験した。

実験方法 ガラス室内で栽培したトマト幼苗（本葉4～5葉期）をもちいて、その葉身主脈の維管束に各濃度のかいよう病菌を多針接種（木綿針中ちまぼ10本の束針）した。接種菌は半合成培地に本病原細菌を移植し、28°Cで24時間培養したものをもちいた。それに10mlの殺菌水を注入し、斜面上に発育した本病原細菌をかきと

第3表 かいよう病菌の濃度とB・E検出までの期間

菌濃度	B・E検出までの期間				
	1日後	3日後	5日後	7日後	10日後
接種点の上部					
原液 (10 ⁹ /ml以上)	10%	30%	70%	90%	100%
原液の1/10	0	40	50	80	100
原液の1/10 ²	0	10	60	50	90
原液の1/10 ³	0	0	50	70	100
刺針のみ	0	0	0	0	0
接種点の下部					
原液 (10 ⁹ /ml以上)	10	40	90	90	100
原液の1/10	0	10	60	80	100
原液の1/10 ²	0	10	60	70	80
原液の1/10 ³	0	10	50	80	80
刺針のみ	0	0	0	0	0

注 調査接種点数：10点 検定植物：トマト（品種耐病新宝冠1号）

ってけんたくし、それを原液として各濃度菌液をつくった。

実験結果 結果は第3表のように、本病原細菌のB・Eは接種1日後から検出され、5日後からはかなり検出率が高まった。最も検出率が高まるのは7～10日後であった。接種点の葉身先端側と葉柄側における検出の差はほとんどみられなかった。

IV トマト青枯病菌の接種濃度とインゲン品種間におけるB・E検出の関係

前項まではトマトかいよう病菌のB・E検出について試験してきたが、第1表に示したように青枯病菌もトマトからB・Eが検出され、しかもインゲンからも同様に検出された。したがって青枯病菌とトマトかいよう病菌の判別にはインゲンを利用すればよいことがわかった。このようなことから、インゲンの各品種と青枯病菌のB・E検出との関係について実験をおこなった。

実験方法 青枯病り病トマト（品種不明）の茎50gに殺菌水150mlを加え、ホモジナイザー（パーチス製）でまさい後、サラシ布2枚でろ過したろ液を原液とした。これの各希釈液をつくり半合成培地の平板培養によって各々の細菌数を測定した。調製した各濃度菌液をインゲンの各品種に接種し、B・E検出をおこなった。

第4表 青枯病菌の濃度とインゲン品種間におけるB・E検出との関係

細菌濃度	インゲン					
	トマト 耐病新宝冠1号	尺五寸菜豆 (有)	黒衣笠菜豆 (有)	山城黒三度 (無)	江戸川菜豆 (無)	トップクローブ (無)
.5×10 ⁹ /ml	100%	100%	76%	60%	92%	84%
3.5×10 ⁸	100	100	72	56	80	88
3.5×10 ⁷	100	92	68	24	88	88
3.5×10 ⁶	100	84	72	76	68	28
3.5×10 ⁵	88	56	76	48	52	4
3.5×10 ⁴	32	32	4	0	4	0
3.5×10 ³	12	4	0	0	0	0

注 調査接種点数：各25点 接種針：昆虫針No.5, 50本の束針 B・E調査 9～12日後調査 (有)つるあり (無)つるなし

実験結果 結果は第4表のように、トマトの「耐病新宝冠1号」とインゲンつるあり「尺五寸菜豆」では10⁹/mlの菌濃度までB・Eが検出された。つるあり「黒衣笠菜豆」、つるなし「江戸川菜豆」では10⁴/mlの濃度までであり、つるなし「トップクローブ」、つるなし「山城黒三度」では10⁵/mlの細菌数を要した。すなわちインゲンのつるあり「尺五寸菜豆」が検定品種としては適しているようであった。

V 軟腐病菌接種後の湿室処理と B・E 検出との関係

これまでの試験によってトマトの全身的な病害のうち、かいよう病菌、青枯病菌については B・E 法によって、その判別ができたが、軟腐病については高濃度菌液の接種においてのみわずかに B・E が検出されただけである。したがって、トマト軟腐病の発病条件の一つである高温多湿の処理をおこなった場合の B・E 検出がどのようになるかを観察した。

実験方法 本葉 4～5 葉期のトマト（品種耐病新冠 1 号）および本葉 2 葉展開したインゲン（トップクローブ）に高濃度（ $10^9/ml$ 以上）のかいよう病菌および軟腐病菌を多針接種して、 $28^{\circ}C$ 、24 時間湿室においた。接種後はガラス室に放置し、7 日を経過して B・E 検出をおこなった。

第 5 表 湿室条件下での軟腐病菌接種と B・E 検出との関係

検 定 植 物	接種後被覆湿室処理 ($28^{\circ}C$)		接種後無接種 ($28^{\circ}C$)	
	かいよう病菌	軟腐病菌	かいよう病菌	軟腐病菌
ト マ ト (耐病新冠 1 号)	90%	0%*	100%	0%
インゲン (トップクローブ)	0	0	0	0

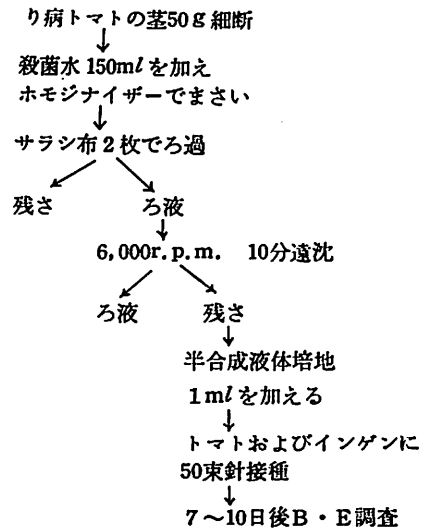
注 調査接種点数：各 20 点 湿室処理期間： $28^{\circ}C$ 24 時間
B・E 調査 7 日後調査 *接種点の上下に 5 mm 前後の稠化した病斑形成

実験結果 軟腐病菌の濃厚けんたく液を多針接種直後から 24 時間湿室処理した場合には、接種点の上下に病斑は形成されるが、病斑の外側では B・E の検出はできなかった（第 5 表）。また形成された病斑を湿室処理後ガラス室に放置したところ病斑の進展はみられなかった。

VI B・E 法によるトマトかいよう病の診断

施設栽培に発生する細菌性病害には類似した病徴を示す場合が多くあり現地ではその診断に苦慮することが多い。そこで各県農試、普及所、防除所から送付を受けたトマトかいよう病のり病標本から B・E 検出を試みた。ここに試料を送付していただいた各位に深く感謝の意を表す。

実験方法 トマトかいよう病として各地で採集されたり病標本の送付をうけその病茎をもちいて第 1 図の手順で B・E の検出を試みた。さらに病茎の一部は半合成培地をもちいて病原細菌の分離をおこなった。分離された菌は劉の方法によってグラム鑑別をおこない、さらに



第 1 図 り病トマトからの B・E 検出の方法

本病原細菌血清反応をも実施した。

実験結果 B・E 法をもちいて、本病の診断を試みた結果では 3 タイプにわけられた（第 6 表）。すなわち検定植物のトマトから B・E が検出され、インゲンからは検出されないグループ、両検定植物に B・E が検出されるグループと、検出されないグループであった。

またトマトのみに B・E を検出しインゲンからは検出

第 6 表 外見上トマトかいよう病と診断された トマトまさい液接種による B・E 検出

供試材料・供試菌	B・E 検出		分離菌 のグラム 鑑別	かいよう 病血清 反応
	トマト	インゲン		
C - 1	+	-	+	+
C - 3	+	-	+	+
C - 4	+	-	+	+
C - 5	+	-	+	+
C - 6	+	-	+	+
C - 8	+	-	+	+
C - 9	+	-	+	+
C - 11	+	-	+	+
C - 12	+	-	+	+
C - 13	+	-	+	+
C - 15	+	-	+	+
C - 17	+	-	+	+
C - 18	+	-	+	+
<i>Corynebacterium michiganense</i>	+	-	+	+
C - 2	+	+	-	-
C - 20	+	+	-	-
C - 21	+	+	-	-
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	+	+	-	-
C - 10	-	-	-	-
C - 19	-	-	-	-
C - 22	-	-	-	-
C - 23	-	-	-	-
<i>Erwinia aroideae</i>	-	-	-	-

されないグループではグラム鑑別およびトマトかいよう病菌血清反応は陽性であり、他の2グループは陰性であった。この3タイプは供試標準菌と同一の傾向を示した。

以上の結果から供試標本20個体中13個体(65%)がかいよう病菌にり病していたものと診断された。

Ⅶ 考 察

自然界の微生物相から、特定の病原細菌のみを検出することはかなりの困難をとまなうことが多い。とくに形態的に識別の困難な細菌の場合にはその検出や同定に著しい時間と労力を要することになる。近年のハウス栽培の隆盛はそこに発生する病害の病徴にも変化をもたらし、現地ではその診断に苦慮することが多い。したがってハウスに発生する細菌病のうち、症状の類似するトマトかいよう病、青枯病、軟腐病の類別と鑑定方法についてB・E法による簡易検定を試みた。細菌の類別には生理的性質による分類があり血清の利用あるいはファージ法がある。形態的な手法としては電子顕微鏡による観察があげられる。また検出方法としては菊本らの蛍光抗体法、津山らのニンジン円盤法などが創案されている。また岡部はトマト幼苗をもちいて土壌中の青枯病菌の検出を試みている。しかしながら、これらの方法には利用場面でそれぞれ長短があって、筆者らの目的とした簡易検定には必ずしも一致しない点もあって、B・E法の利用を試みた。

トマトかいよう病菌はトマト以外の植物を侵す報告もあるが、トマトを単一の寄生植物と考えた場合、検定植物としては好都合である。B・E法を利用した本実験では検出までの生育条件、検出時期などによって検出精度に差が生じることも考えられるが、第2表から $10^8/ml$ の低濃度までかいよう病菌が検出されること、トマト品種耐病新宝冠1号は栽培が容易である点から検定に適しているように思われる。青枯病菌は多犯性であって多くの検定植物が考えられるが、本実験ではトマト、インゲン、ナスにB・Eが観察され、いずれも検定植物として用いることができた。しかしナスは検定に供試できるまでの生育期間が長いために不適当と思われる。インゲンは播種してから検定に利用されるまでの期間が短かく、本葉2葉展開後は新芽を摘芽することによって大きく生長することもなくB・Eの検定植物としては適している。しかも品種つるあり「尺五寸菜豆」は $10^8/ml$ の低濃度まで青枯病菌を検出できることから最適と思われる。また青枯病菌の高濃度のものを高温時にトマト、インゲンに多針接種した場合にはトマト、インゲンのいずれもが萎ちよう枯死する場合があります、これによってもある程

度の判定が可能であった。

つぎに軟腐病菌については第5表に示したように高温多湿条件下で接種点附近に病斑を形成させたのちガラス室に放置しておいたものでも病斑部の外側では維管束の導管部からB・Eが観察されなかったことからトマト、インゲンの両検定植物にB・Eが観察されることはほとんどおこらないものと思われる。このことは軟腐病菌が導管増殖性の細菌でないことに由来しているものと考えられる。しかしながら、病斑部におけるB・Eについてはさらに検討を要する。

以上のことからトマト(品種:耐病新宝冠1号)、インゲン(つるあり「尺五寸菜豆」)を用いて、トマトにB・Eが観察され、しかもインゲンから検出されない場合にはトマトかいよう病と判定できることがわかった。また上記両種の検定植物にB・Eが認められる場合には青枯病であって、いずれの検定植物にもB・Eが認められない場合には軟腐病と診断できた。またB・E検出までの期間はガラス室内で接種後7~10日が適当と思われる。

これらの結果を利用して実際のほ場における検診をおこなってみたが(第6表)各地から送付をうけたかいよう病と思われる標本はB・E法によって3タイプに分けられた。このことはかいよう病の判定にB・E法を利用することが可能なことを実証したものであろう。このことから供試点数の35%がかいよう病以外の病害であったことは、今後トマトかいよう病の診断にあたって十分に注意すべき問題点であろう。なおこれら3種のトマト細菌病菌、あるいはその他の細菌病菌との混合感染によるB・Eが観察された場合の判別方法についてはさらに追試を要する。

Ⅷ 摘 要

1 トマトかいよう病菌の簡易検診をおこなうために検定植物としてトマト、インゲンの幼苗をもちいてB・E法による検定をおこなったところ次の結果を得た。

かいよう病菌はトマトのみにB・Eが観察され $10^8/ml$ の低濃度まで検出できた。青枯病菌はトマト、インゲンの両種にB・Eが観察され、 $10^8/ml$ の濃度まで検出できた。軟腐病菌については両検定植物のいずれからもほとんどB・Eが観察されなかった。またこのB・E検出までの期間はガラス室内で7~10日を要した。

2 トマトかいよう病として各地で採集された標本のり病茎を本方法によって診断したところ65%がかいよう病菌によるものであり、残りは青枯病と軟腐病菌によるものであった。このことからかいよう病の診断にあたっては十分に注意する必要がある。

引用文献

1) Baines, R. C. (1947) Perennial nightshade, a host for *Corynebacterium michiganense*. Phytopath. 37 : 359. 2) Echandi, E. and Sun, M. (1973) Isolation and characterization of a bacteriophage for the identification of *Corynebacterium michiganense*. Phytopath. 63 : 1398~1401. 3) 伊阪実人 (1973) イネ白葉枯病の予察方法に関する研究, とくに噴出菌泥検鏡法の開発とその利用について. 福井農試特別報告 4 : 1~165. 4) 菅正道・伊

阪実人 (1974) B・E法によるトマト細菌病害の一簡易診断について (講要). 日植病報 40(3) : 196. 5) 菊本敏雄・坂本正幸 (1967) そ菜軟腐病細菌の生態的研究 第3報 *Erwinia aroideae* の検出, 定量への蛍光抗体法の応用. 日植病報 33(3) : 181~186. 6) 岡部徳夫 (1969) *Pseudomonas solanacearum* の土壌中における増殖性について. 静大農研報 19 : 1~29. 7) 坂崎利一 (1969) 腸内細菌とその類似菌の簡単なしらべ方, 49p 栄研化学株式会社, 東京, 112pp. 8) 津山博之 (1962) 白菜軟腐病に関する研究. 東北大農研彙報13(4) : 221~345. (1975年7月18日受領)

機械油散布によるチューリップ・ブレイキング・ウイルスの防除について

草葉敏彦・名畑清信 (富山県農業試験場)

TOSHIHIKO KUSABA and KIYONOBU NAHATA : Control of tulip breaking virus by mineral oil spray

Summary

The control of tulip breaking virus (TBV) by mineral oil spray and several actions of oil concerning inhibited aphid transmission was reported in this paper.

Mineral oil (Albo-oil) was markedly reduced TBV infection when they were sprayed 7 times at weekly intervals from early May to mid-June. But period of die off of tulip plant was about 7 days earlier in oil sprayed plot than unsprayed.

Mineral oil did not affect to the virus activity because there were no marked differences between both treatment in the infectivity when the virus was inoculated mechanically to healthy plant with diseased leaf juice only or the juice added oil.

Mineral oil did not play the action for insecticide and repellent.

More-over, the ratio of aphid transmission markedly reduced when oil sprayed healthy plants were inoculated the virus by viruliferous aphids, and also the acquisitive ratio of the virus from oil sprayed infected plants markedly reduced.

チューリップ・ブレイキング・ウイルス (TBV) の防除方法として, 現在伝染源となる罹病株の抜取りが最も有効な手段とされている。しかしこの病株の抜取りには多くの時間と労力を要するばかりでなく, 花に明瞭なブレイキングを示さない白や黄花の品種では診断が非常に困難であり, さらに品種によっては葉にまぎらわしい条斑を生じるものもあって一層困難なものとなっている。それ故, 病株の抜取りのみでなく, これと併用すべきより有効な防除方法の確立が望まれている。

著者らは非永続型伝播をする多くのウイルスに対して伝播抑制効果を示すことが知られている機械油を用いて試験を行なったところ, 圃場試験で顕著な防除効果が認められ, 伝播抑制の機作についても2, 3の知見が得られたのでここに報告する。

I 材料および方法

圃場試験 チューリップ品種ローズビューティーを1973年に普通栽培と同一様式で栽培し, 1区面積5.0m²