Pseudomonas marginalis (Brown) Stevens の 一系統によるキュウリ縁枯細菌病(新称)について

太田光輝*・森田 壽*・森 喜作*・後藤正夫**

Kouki OHTA*, Hitoshi MORITA*, Kisaku MORI* and Masao GOTO** :
Marginal Blight of Cucumber Caused by a Strain of *Pseudomonas*
marginalis (Brown) Stevens

Abstract

A bacterial disease was found on matured lower leaves of cucumber grown under vinyl-house conditions in winter of 1974. The disease rarely occurred on immature leaves soon after unfolding. The disease usually started from leaf edges near hydathodes and quickly enlarged to form V-shaped lesions frequently surrounded by chlorotic areas. These lesions finally coalesced to form the severe blight along the whole margin of the leaf. From these symptoms, "marginal blight of cucumber" was proposed as the disease name. The cultural and biochemical characters of the pathogen were compared with those of *Pseudomonas lachrymans*, the pathogen of angular leaf spot of cucumber. These two bacteria differed in the important characteristics such as production of fluorecin, degree of gelatin liquefaction, levan formation, margarine hydrolysis, arginine dihydrolase reaction, potato rot, and utilization of sucrose, sorbitol and tartarate. The marginal blight pathogen was rather close to soft-rotting pseudomonads in bacteriological properties. Although the similarity was not complete, therefore, we are inclined to identify the present bacterium as a strain of *Pseudomonas marginalis* (Brown) Stevens based on the detailed survey of pathological, cultural and physiological characteristics. The isolates of *P. lachrymans* used in the study showed also some conflicts in physiological properties with the description of the type culture suggesting the presence of strains in this bacterium.

(Received April 30, 1975)

緒 言

1974年冬、静岡県農業試験場において、くん炭養液栽培のキュウリの葉に、縁枯れを生ずる一種の細菌病が発生した。そこで病原細菌を分離し、キュウリ斑点細菌病菌 *Pseudomonas lachrymans* と比較検討した。本病は葉に縁枯れ性病斑をつくる点で斑点細菌病とは全く異っていた。病菌の細菌学的性質にも大きな相違が認められ、*Pseudomonas marginalis* の一系統による病害であることが明らかになった。*P. marginalis* によるキュウリの病害はまだ報告がないので、ここに

その病徴および細菌学的性質について記載し、それに基く病菌同定の結果を報告する。

I 発生と病徴

本病が発生したのは、ハウス抑制のくん炭養液栽培のキュウリで、品種は長日落合である。9月21日に播種し、10月15日に定植したのち果実の収穫の始まる11月下旬ごろから発病が認められるようになった。

本病は、葉、茎、葉柄、巻きつる、果実、根などに発生する。葉では下位葉および栄養状態の悪い葉などに発生が多く、若い葉には少ない。病徴は葉の縁から

* 静岡県農業試験場 Shizuoka Agricultural Experiment Station, Shizuoka, Japan

** 静岡大学農学部 Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Shizuoka, Japan

くさび形に大型水浸状の病斑をつくるのが特徴である。すなわち、初め葉縁の水孔付近に水浸状の小斑点を生じ、次第に拡大して、やがて暈紋を伴った不規則な淡褐色の病斑となる。病斑は葉の縁にそって広がるとともに、葉の中心部に向かってくさび形に拡大してゆく。葉縁から発病するのが普通であるが、傷がある場合にはその部分からも発病する。健全部との境は水浸状を呈し、病斑部は褐色の波形を描きながら拡大し、葉脈の線をはっきり残して褐色ないし灰白色に枯死する。

茎や葉柄、巻きつるにも淡褐色水浸状の病斑を生じ、茎を切断すると導管部の褐変が認められる。茎の病斑部からは乳白色のヤニを分泌することがあり、重症の株では萎ちようして下葉から枯れ上る。

果実では、初め果梗の部分が淡褐色水浸状になり、その部分が褐変するとともに、果実全体が黄化萎ちようして軟化ののち、ミイラ状になる。ミイラ状果実は5 cm前後の幼果に多く、10 cm以上の成果には少なかった。腐敗果はみられなかったが、一部に病斑部から乳白色のヤニを分泌しているものがあり、果実を切断してみると病斑部の褐変が認められた。根でも褐色水浸状の病斑をつくり、切断すると導管部の褐変が認められた。

II 実験材料および方法

1. 細菌 典型的な病徴を示す葉、茎、果実、根の罹病部から分離した16菌株を用いた。比較のために用いた *P. lachrymans* は静大保存菌PL01およびPL02の2菌株である。

2. 接種方法 健全な鉢植苗にハンドスプレーで噴霧接種し、2日間ポリエチレン袋を覆って多湿状態に保ったのち、温室に移して発病を観察した。各種植物組織の腐敗試験は輪切り又は5×5 cm大に切った組織に穿刺接種し、多湿条件にしたペトリ皿に入れて27℃の定温器内に保った。

3. 細菌学的性質 2ケトグルコン酸塩産生は Arai ら¹⁾の方法、シヨ糖からの還元物質産生は Young¹³⁾の方法、また卵黄およびマーガリンの分解は Lelliott ら⁸⁾の方法によった。炭水化物分解性は基本培地 (NH₄NO₃ 0.1%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄ 7H₂O 0.02%, 寒天1.5%) に炭水化物を1%濃度に加え、B.T.B.を指示薬として加えて斜面培養し、発育の有無と酸産生で判定した。その他の性状は、特に記さない限り Cowan and Steel の Manual⁴⁾によった。

4. タバコ過敏反応 プライトイエローを用い Klement ら⁷⁾の方法により約10⁹/mlの細菌濃度で調べた。

III 結 果

1. 病原性 キュウリに接種した結果は第1表の如くであった。縁枯病菌を噴霧接種した場合2〜7日目ごろより自然発病の病斑と酷似した病斑を葉、茎、葉柄、巻きつる、幼果などに生じ、発病部位から接種細菌と同一の細菌を再分離することができた。*P. lachrymans* は接種後3日目ごろより葉の気孔部分に針頭大の水浸状の斑点を形成し、次第に拡大して暈紋を伴った淡黄色の病斑となった。これはやがて葉脈に限られた角型又は不規則型の褐色病斑に発達した。

このように人工接種の結果、縁枯病菌は縁枯性の病斑のみを形成し、*P. lachrymans* は斑点性の病斑のみを形成することが実証され、2つの病斑型はそれぞれ異なった細菌によって引き起こされる病徴であることが明らかになった。

キュウリ以外の植物に対する噴霧接種試験では縁枯病菌はカボチャの子葉の葉縁にわずかに病斑を形成したが、本葉の発病はみられなかった。スイカ、シロウリ、ヘチマ、トマトでは発病はみられなかった。

P. lachrymans はカボチャ、シロウリの本葉にわずかに小斑点を形成したが、スイカ、ヘチマ、トマトでは発病はみられなかった。

ペトリ皿内での腐敗試験では、縁枯病菌は有傷接種でキュウリ、ジャガイモ、ニンジン、ダイコン、ハクサイ、カンラン、レタス、タマネギを24時間以内に著しく軟化腐敗させた。*P. lachrymans* はキュウリ果実にわずかに腐敗を起したが、縁枯病菌のように組織を軟化崩壊させることはなく、原形を保持した。その他の植物組織には全く変化はなかった。

2. 細菌学的性質 縁枯病菌および*P. lachrymans*の細菌学的性質を比較検討した結果は第2表の如くであった。

a. 形態と染色性。普通寒天斜面培地に27℃、24時間培養した細菌の菌体は両菌とも短桿状で孤立するか対をなし、ともに運動性で縁枯病菌は1〜6本、*P. lachrymans* は1〜3本の単極性の鞭毛をもっていた。ともに芽胞は認められず、グラム染色は陰性であった。

b. 培養的性質。普通寒天平面培地上で、縁枯病菌は24時間後に直径1.3〜1.5 mmの透明中高、汚白色、

Table 1. Pathogenicity of marginal blight pathogen and *P. lachrymans* on cucumber

Isolate		Date of inoculation	Inoculation method	Disease severity		
				Leaf	Stem	Fruit
marginal blight pathogen	KC 11	Feb. 1 Feb. 20 Mar. 6	punctured sprayed ditto	+++ ^{a)} M ^{b)} ++ M +	+ +	++ ++
	KC 15	Feb. 1 Feb. 13 Feb. 20 Mar. 6	punctured sprayed ditto ditto	+++ M ++ M ++ M ++	++ ++ ++	++ ++ ++
	KC 31	Mar. 6	ditto	M +	+	++
	KC 51	Mar. 6	ditto	M +	+	++
	KC 53	Mar. 6	ditto	M +	+	++
	KC 1	Apr. 5	ditto	M +	+	+
	KC 7	Apr. 5	ditto	M +	+	+
	KC 33	Apr. 5	ditto	M +	+	+
<i>P. lachrymans</i>	PL 01	Feb. 21 Mar. 6 Apr. 5	ditto ditto ditto	S ^{c)} ++ S ++ S ++	+ + +	++ ++ +
	PL 02	Feb. 21 Mar. 6	ditto ditto	S ++ S ++	+ +	++ ++
Control (Sterilized water)		Feb. 20 Mar. 6 Apr. 5	ditto ditto ditto	— ^{d)} — —	— — —	— — —

a) +~+++ : Disease severity recorded with arbitrary scales 7~10 days after inoculation.

b) M: Marginal blight symptom c) S: Leaf spot symptom

d) —: No symptom

内容均一で表面に格子状模様を有する集落を形成した。48時間後には直径3~4mmとなり表面平滑、湿光を有し、周辺は僅かに波状を呈した。さらに時間が経過すると集落は淡黄褐色になった。*P. lachrymans* はやや発育が遅く、48時間で直径1.8~2.0mmに発達した。前者のように集落が淡黄褐色に変色することはない。汚白色のままであった。その他の集落性状は前者に類似していた。

ブイヨンおよびペプトン水培養では、両菌とも発育中庸で液面発育はなく、一様に混濁し、少量の粘りような沈でんを生じた。

両菌とも4%の食塩含量で僅かに発育し、5%では発育しなかった。

縁枯病菌はフルオレシンを産生して牛乳培地を黄変したが、*P. lachrymans* は着色しなかった。両菌とも牛乳の凝固、消化はみられなかった。リトマス牛乳

とともに青変し、のち色素を還元し脱色した。

フェルミ氏液には両菌とも生育したが、発色はみられなかった。

コーン氏液には *P. lachrymans* は中庸の発育を示し白濁したが、縁枯病菌は発育しなかった。

ウシンスキー氏液には両菌とも中庸の発育を示し、縁枯病菌は培地を淡緑色に着色したが、*P. lachrymans* では着色がみられなかった。

c. 生理的性質。縁枯病菌はキングB培地、牛乳培地などで黄緑色の蛍光色素を生産したが、*P. lachrymans* では色素の生産は認められなかった。縁枯病菌はまた Kovacs のオキシダーゼ反応、アルギニン分解反応、ソルビット分解性でも陽性の反応を示したが、*P. lachrymans* は陰性であった。2-ケトグルコン酸はベネディクト試薬で調べた場合、縁枯病菌のみ弱い陽性反応を呈した。すなわち反応液は黄褐色に変った

Table 2. Comparison of bacteriological characters of marginal blight pathogen of cucumber with those of *P. lachrymans*

Character	Marginal blight pathogen	<i>P. lachrymans</i>	Character	Marginal blight pathogen	<i>P. lachrymans</i>
Gram stain	—	—	Carbohydrate utilization		
Spore formation	—	—	Ribose	+	+
Flagellation	1—6	1—3	Arabinose	+	+
Reducing substance from sucrose	—	+	Xylose	+	+
Nitrate reduction	—	—	Glucose	+	+
Litmus milk	B,D ^{a)}	B,D	Fructose	+	+
Kovacs' oxidase	+	—	Galactose	+	+
Fluorescence	+	—	Mannose	+	+
Gelatin liquefaction	+ ^{b)}	+ ^{c)}	Rhamnose	—	—
Levan formation	—	+	Sucrose	—	+
2-keto-gluconate production	+	—	Maltose	—	—
Margarine reaction	—	+	Lactose	—	—
Egg-yolk reaction	—	—	Trehalose	—	—
Arginine dihydrolase	+	—	Cellobiose	—	—
Potato rot	+	—	Melibiose	—	—
Hypersensitivity reaction	+ ^{d)}	+	Raffinose	—	—
Catalase reaction	+	+	Dextrin	—	—
Starch hydrolysis	—	—	Inulin	—	—
Aescurin hydrolysis	+V ^{e)}	—	Glycogen	—	—
H ₂ S production	—	—	Starch	—	—
Indole production	—	—	Glycerol	+	+
Tyrosinase production	—	—	Adonitol	—	—
Oxygen relation	+	+	Dorcitol	—	—
NaCl tolerance	4 %	4 %	Mannitol	+	+
Optimum temperature	25C	25C	Sorbitol	+	—
Maximum temperature	38C	38C	Inositol	+	+
Minimum temperature	3C	3C	Salicin	—	—
Methyl red test	—	—	Succinate	+	+
Voges-Proskauer test	—	—	Malate	+	+
			Citrate	+	+
			Tartarate	—	+

a) B-blue, D-decolourization

b) Rapid and stratiform liquefaction

c) Slow and fusiform liquefaction

d) Reactions varied depending on tobacco plants used

e) Positive reactions with exception of a few isolates

が沈でんは生じなかった。*P. lachrymans* は青色のままで全く変色はみられなかった。エスクリン反応は縁枯病菌の大部分が陽性反応を示したが、中に陰性反応を示すものが2菌株あった。エスクリン分解性の菌株でも、分解速度は菌株によって異なり、24時間以内で反応が現われるものから、3～4日を要するものまでまちまちであった。*P. lachrymans* のエスクリ

ン分解性は陰性であった。一方レバン産生、ショ糖からの還元物質の産生、ショ糖利用性等の各性質は *P. lachrymans* のみにみられ、縁枯病菌はすべて陰性であった。*P. lachrymans* はこの他、リパーゼの反応、酒石酸の利用などでも陽性反応を示し、縁枯病菌とは異っていた。

3. タバコ過敏反応 両菌とも陽性反応を示した

が、緑枯病菌の場合、植物個体や接種条件によっては陰性を示す場合があった。

IV 同 定

緑枯病菌はグラム陰性桿菌で、数本の極毛を有し、蛍光色素を産生する点で *Pseudomonas* 属細菌の一種であることは疑いの余地がない。キュウリに自然発病する *Pseudomonas* 属細菌としては *P. lachrymans* がある。しかし、緑枯病菌は病原性においても、細菌学的性質においても *P. lachrymans* とは異なり、別の *Pseudomonas* 属細菌であることは明らかである。

本菌は各種の植物組織を軟化崩壊せしめる特徴を有し、いわゆる軟腐型 pseudomonads に属するものである。Lelliott⁸⁾ は蛍光色素を生産する pseudomonads の鑑別性状について研究しているが、緑枯病菌の

性状をこれらと比較検討すると、IV_b グループに近いことがわかる。一方 Lelliott⁸⁾ が IV_a として上げた *P. marginalis* と多くの性状で一致することも事実である。

Shinde¹⁰⁾ はアルファルファの根部から分離した病原細菌が、アルギニン分解性およびタバコ過敏反応で異なるにもかかわらず *P. marginalis* 群に入ると判定し、*P. marginalis* var. *alfalfae* と命名した。また宮島⁹⁾ はイネ葉しょう褐変病菌について、レバン産生、硝酸塩還元性およびタバコ過敏反応などで異なるが他の性質の多くで一致するとの理由から、この細菌を *P. marginalis* の一系統と同定している。キュウリ緑枯病菌の細菌学的性状を *P. marginalis* の既往の記載と比較し、相違点をあげると第3表の如くである。Bergey's manual.²⁾ では硝酸塩還元性は

Table 3. Summary of differences of bacteriological characters between the marginal blight pathogen of cucumber and *P. marginalis*

	Marginal blight pathogen of cucumber	Bergey's manual (1957)	Lelliott et al. (1966)	Miyazima and Baba (1972)	Shinde and Lukezic (1974)
Flagellation	1 - 6	1 - 3		1 - 3	3 - 6
Reducing substance from sucrose	—			—	+
Levan from sucrose	—			—	+
Sucrose utilization	—	-(+, Clara)+V ^{a)}		—	+
Nitrate reduction	—	+(-, Clara)+V		—	+
Arginine dihydrolase	+		+	+	—
NaCl tolerance	4 %			5 %	
Rhamnose utilization	—			+	
Cellobiose utilization	—			—	+
Salicin utilization	—				+
Tartarate utilization	—			+	
Tobacco hypersensitivity	+ ^{b)}		—	+	+

a) Variation between and/or within laboratories.

b) Reactions varied depending on tobacco plants used.

陽性であるが、Clara³⁾ は陰性と記載している。一方、ショ糖分解性について Clara は陽性としているが、Bergey's manual. や Dowson⁵⁾ や Elliott⁶⁾ の報告では陰性の記載をしている。また Lelliott⁸⁾ はこれらの性状が菌株によって変化するものであることを示した。このようにこれまで *P. marginalis* と同定された菌が必ずしも硝酸塩還元性やショ糖分解性で同一反応を示すものばかりではないことが判る。タバコ過敏反応については緑枯病菌では反応が陽性であるが、植物個体や接種条件によっては陰性の反応を示す場合があった。この他、レバン、リパーゼ等でも緑

枯病菌は Lelliott⁸⁾ の記載による *P. marginalis* とは異なっていた。一方、緑枯病菌は宮島⁹⁾ の菌とはよく一致したが、Shinde¹⁰⁾ の菌とはレバン産生、アルギニン・デハイドロレース反応、鞭毛の数およびショ糖、セロビオース、サリシン等の利用性などで異っていた。Lelliott⁸⁾ は、これらの性質は菌株による違いがあるとの理由で、分類上補助的な意味しか認めていない。本実験でも、エスクリン分解や2ケトグルコン酸産生は実験方法、菌株によっては緑枯病菌の中にも陰性反応を示すものがあつた。したがってこれらの性状は、実験方法を厳密に同一にしない限り変異する要

因があるといえよう。前述のタバコ過敏反応も同様である。

ここにあげた各種性状の特徴を *P. marginalis* の鑑別性状として厳密に規定すべきであるか否かについては意見が分れるところであろう。軟腐型 *pseudomonads* には *fluorescent pseudomonads* の重要鑑別性状の一部を異にするものが多くこれらに高い比重をおいて分類すると、多数の *taxa* を設けなければならなくなる。しかしこれらの細分された *taxa* は植物病理学の立場からはあまり意味があるものとは考えられず、むしろ混乱を増幅する結果となり兼ねない。*P. marginalis* は植物に対する病原性を除けば *P. fluorescens* と区別し得ないほど近似しているが、この *P. fluorescens* はそれぞれ主要な細菌学的性質の一部を少しづつ異にした多くの系統の集合体である¹¹⁾。筆者らは *P. marginalis* が多数の植物に病原性を有し、軟腐病や縁枯病の原因をなしている点で、これを *P. fluorescens* とは独立した種と認める考え方を支持する。そして本菌は細菌学的性状を少しづつ異にしたいいくつかの系統の集合体であるとする考え方を

妥当であるとする。

一方、筆者らが供試した *P. lachrymans* もリパーゼ、蛍光色素産生など2・3の性質で既往の記載^{2, 8, 12)}と一致しない点があった。これは、本菌に系統の存在を示唆するものであり、今後さらにくわしく研究する必要がある。

以上のように、*P. marginalis* は、細菌学的性状にある程度の幅をもった細菌であると考えられるので、病原性および細菌学的性状のパターンからみて、キュウリ縁枯病菌を *P. marginalis* の一系統と同定することにした。

なお本病の病徴から、病名をキュウリ縁枯細菌病と命名することにした。

V 摘 要

ハウス栽培のキュウリに斑点細菌病とは異なり、葉の縁枯れ症状を特徴とする一種の細菌病が発生した。病原細菌の病原性、細菌学的性状を斑点細菌病菌 *P. lachrymans* と比較した結果、本菌を *P. marginalis* (Brown) Stevens の一系統と同定した。また本病をキュウリ縁枯細菌病と命名することにした。

VI 引 用 文 献

- 1) Arai, T., Enomoto, S., and Kuwahara, S. (1970). Japan. J. Microbiol., 14: 49.
- 2) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th ed. (1957). The Williams and Wilkins Co.
- 3) Clara, F. M. (1934). Cornell Univ. Agr. Exp. Sta. Mem., 159: 14—29.
- 4) Cowan, S. T. and Steel, K. J. (1966). Manual for the Identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press.
- 5) Dowson, W. J. (1941). Trans. Brit. Mycol. Soc. 25: 215—216.
- 6) Elliott, C. (1951). Manual of Bacterial Plant Pathogens. Chron. Bot. Co.
- 7) Klement, Z., Farkas, G. L. and Lovrekovich, L. (1964). Phytopathology 54: 474—477.
- 8) Lelliott, R. A., Billing, E. and Hayward, A. C. (1966). J. appl. Bact. 29: 470—489.
- 9) 宮島邦之・馬場徹代(1972). 日植病報 38: 201(講演要旨)
- 10) Shinde, P. A. and Lukezic, F. L. (1974). Phytopathology 64: 1169—1174.
- 11) Stanier, R. Y., Palleroni, N. J. and Doudoroff, M. (1966). J. gen. Microbiol. 43: 159—271.
- 12) 谷井昭夫・馬場徹代(1973). 北海道立農試報 28: 70—80.
- 13) Young, J. M. (1970). N. Z. J. Agr. Res. 13: 977—990.

Explanation of Plate

- 1.3.4.5. Symptoms of marginal blight of cucumber produced by natural infection under vinyl-house condition.
2. Symptoms of angular leaf spot produced by artificial inoculation of *P. lachrymans*.
6. Symptoms of marginal blight produced by artificial inoculation of Marginal blight pathogen.
7. Fruit rot symptoms produced by artificial inoculation of Marginal blight pathogen.