コンニャク葉枯病細菌の罹病小葉残渣、球茎および 土壌における生存

林 宣夫*

Nobuo HAYASHI*: Survival of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *konjaci*, the Causal Agent of Bacterial Leaf Blight of Konnyaku (*Amorphophallus konjac*), in Residues of Diseased Leaflets, on Corms and in Soil

Abstract

The investigation was conducted to make clear the infection sources of the bacterial leaf blight of konnyaku (*Amorphophallus konjac*) caused by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *konjaci*. Survival of the pathogenic bacterium in the diseased leaflets, on corms and in soil was determined by using a selective medium. The bacterium could be isolated from the diseased leaflets kept for 422 days on the soil surface of natural field, but not be isolated 106 days after the leaflets were buried at a depth of 5 cm in field soil. As the result of application of debris of the diseased leaflets onto soil surface of field immediately after planting corms, the disease occurred obviously on new leaflets grown from corms planted. When artificially infested corms were preserved at 10 C of room temperature or in natural field soil, the bacterium could be recovered until 150 days after, namely until Apr. 14 in next spring. Survival of the bacterium in soil was longer at 5 C than at 25 C, but the bacterium could not be detected after 60 days at 5 C in natural field. These results indicate that the residues of diseased leaflets and corms infested with this bacterium may be served as main infection sources of the next konnyaku cultivation.

(Received June 12, 1989)

Key words: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *konjaci*, bacterial leaf blight of konnyaku, infection source, selective medium.

緒 言

コンニャク葉枯病^{1,4,13,14,16)}は、古くから全国のコンニャク栽培地帯に発生し、腐敗病^{6,7)}と並ぶコンニャクの重要細菌病である。しかし、本病の発生生態に関する報告はほとんどなく、とくに伝染源に関しては、山本・川尻¹⁵⁾が発病畑の土壌あるいは罹病残渣が伝染源になることを報告しているにすぎない。したがって、本病細菌の罹病残渣内、球茎上あるいは土壌中における生存についてはほとんど明らかにされておらず、伝染源に関しては不明な点が多い。そこで、本研究では本病の伝染環解明の一環として、著者の考察した選択培地を用いて本病の伝染源について検討し、各

種条件下における本病細菌の生存期間を明らかにした。

材料および方法

供試菌株 各実験とも、コンニャク葉枯病細菌 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *konjaci*⁴⁾ のストレプトマイシン耐性変異株 7901-400 (群馬県農業総合試験場保存菌株) を供した。供試細菌は、PPGA⁸⁾ 斜面培地で 28 C, 48 時間培養後、所定濃度の懸濁液に調製して実験に用いた。

実験場所 実験はいずれも群馬県前橋市の農業総合試験場内で行った。

罹病小葉組織内における葉枯病細菌の生存期間 ポ

* 群馬県庁 Gunma Prefectural Office, Maebashi, Gunma 371, Japan

ット栽培したコンニャク（品種・はるなくろ）の小葉に 10^7 colony forming units (cfu)/ml の供試細菌を噴霧接種し、病斑形成後に病斑を含む数片の小葉を生重量で約 0.5 g 切り取り、 13×18 cm のナイロンゴースの網袋に入れて、1 区当り 13 袋の罹病小葉入り網袋を処理に供した。処理区は、1) 殺菌土壌埋没区、2) 非殺菌土壌埋没区、3) 非殺菌土壌地表面放置区、4) 実験室内放置区の 4 区とし、土壌埋没区での試料は、供試土壌を $1/2,000$ a ポットに入れ深さ 5 cm の位置に埋没した。処理後ポットは屋外の自然条件下で管理した。なお、殺菌土壌はクロルピクリン 80% 油剤で土壌消毒して作成した。処理は 1984 年 9 月 11 日に行い、処理後、経時的に各処理区からナイロンゴースの網袋を 1 袋ずつ取り出し、罹病小葉の形状、組織の腐朽の程度を観察するとともに、生存本病細菌数を定量した。

罹病小葉残渣の圃場接種と発病 前項と同様に作成した罹病小葉を 30×40 cm のナイロンゴースの網袋に入れ、1987 年 12 月 21 日から 1988 年 5 月 19 日まで圃場の地表面に放置した。そして、1988 年 5 月 19 日にコンニャク栽培歴のない圃場の 12 m^2 ($3 \times 4 \text{ m}$) に 150 個のコンニャク種球（品種・はるなくろ、2 年生）を植え付け、覆土直後に試験区の中央部分の地表面に上記罹病小葉残渣 140 g を接種した。また、対照として無接種区を設けた。なお、作成した罹病小葉残渣からは、生重量 1 g 当り 2.4×10^8 cfu の本病細菌が検出された。発病調査はコンニャクの小葉が展開した後に、定期的に全株について行った。

コンニャク球茎上における葉枯病細菌の生存期間 1985 年 11 月 14 日に、コンニャク（品種・はるなくろ、2 年生）の約 50 g の球茎を約 10^7 cfu/ml の本病細菌液に室温で 1 時間浸漬し、風乾後実験に供した。処理区は 1) 10°C のコンニャク種球専用貯蔵庫内⁴⁾ 区、2) 25°C の実験室内区、3) 屋外地表放置区、4) 屋外土壌埋没区とした。なお、1 区当り 16 個の球茎を処理に供した。屋外に設置した区は、いずれも土壌を入れた $1/2,000$ a ポットで実験を行い、土壌埋没区は深さ 10 cm の位置に供試球茎を埋没した。その後、経時的に各処理区から球茎を 1 個ずつ取り出して、主芽の伸長や球茎表面の腐敗の状況を調査するとともに、生存本病細菌数を定量した。

また、各処理区から採種した球茎を 1986 年 5 月 10 日に高圧蒸気殺菌した土壌に植え付け、小葉が展開した後の 8 月 28 日に発病の有無を調査した。

土壌灌注した葉枯病細菌の生存期間 非殺菌土壌と

高圧蒸気殺菌土壌に供試細菌を灌注接種して、乾土 1 g 当り約 10^6 cfu の本病細菌を含む汚染土壌を作成し、200 ml 容三角フラスコに 120 g ずつ入れた。これらを、 5°C および 25°C の定温器内に 1 区当り 12 本保存し、経時的にフラスコを 1 本ずつ取り出して土壌中の生存本病細菌数を定量した。なお、実験開始時における汚染土壌の含水比は約 27% であった。

葉枯病細菌数の定量 罹病小葉組織内の生存本病細菌数の定量は、ナイロンゴースの網袋の罹病小葉約 0.5 g を殺菌乳鉢に入れ、10 ml の殺菌水を用いて磨砕し、希釈原液とした。球茎上の生存本病細菌数の定量は、球茎の皮をむき、その皮を 300 ml 容三角フラスコ中の 50 ml の殺菌水に入れて 10 分間振とうし、5 分間静置後、上澄液を希釈原液とした。土壌中の生存本病細菌数の定量は、土壌 5 g を 300 ml 容三角フラスコ中の 45 ml の殺菌水に入れて、10 分間振とうしたのち、5 分間静置し、その上澄液を希釈原液とした。いずれの場合でも、分離用培地にはストレプトマイシン $400 \mu\text{g/ml}$ 加用葉枯病細菌検出用選択培地⁵⁾ を用いた。この培地を平板とし、各希釈原液の段階希釈液 0.1 ml をコンラージ棒を用いて、ターンテーブル上で全面に塗抹した。 28°C 、5 日間培養後出現した本病細菌のコロニーを計数した。なお、本病原細菌と酷似したコロニーの一部を PGGA 斜面培地に移植・培養後、ポット栽培したコンニャクの小葉に針接種して、病原性を確認した。

結 果

罹病小葉組織内における葉枯病細菌の生存期間

各処理区の罹病小葉の状態を各調査時期に観察した結果、非殺菌土壌埋没区は、処理後 21 日で、小葉の葉肉部分が 3 分の 1 程度腐朽し脱落した。処理後 106 日では、葉肉部分はほとんど消失し、葉脈だけが網目状に残った。しかし、殺菌土壌中埋没区は、処理後 135 日でも小葉の大部分が処理時の形状を保っており、また、非殺菌土壌地表面放置区も、処理後 330 日でも、小葉の形状が確認できた。また、実験室内放置区は、処理後 330 日でも完全に小葉の形を保っており、病斑部も識別できた。

罹病小葉組織内の生存本病細菌数を経時的に調査した結果を Table 1 に示した。本病細菌の生存期間は、非殺菌土壌埋没区がもっとも短く、処理後 106 日以降検出できなかった。それに対し、殺菌土壌埋没区は、処理後 244 日でも検出できた。しかし、処理後 330 日以降では検出できなかった。一方、非殺菌土壌地表

Table 1. Survival of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *konjaci* in diseased konnyaku leaflets kept under four different conditions

Date of measurement	Days after treatment	Buried into a)		Put onto surface of nonsterilized soil	In laboratory room
		sterilized soil	nonsterilized soil		
Sept. 11, 1984	0	7,570.00 ^{b)}	7,570.00	7,570.00	7,570.00
Oct. 2, 1984	21	334.00	4,040.00	1,080.00	96.90
Dec. 26, 1984	106	3.58	ND ^{c)}	22.80	1,070.00
Jan. 24, 1985	135	17.90	ND	178.00	113.00
Mar. 30, 1985	200	0.46	ND	221.00	105.00
May 13, 1985	244	0.22	ND	56.50	0.41
Aug. 7, 1985	330	ND	ND	1.85	0.02
Nov. 7, 1985	422	ND	ND	1.00	0.11
Jan. 29, 1986	505	ND	ND	ND	ND

a) Diseased konnyaku leaflets were buried at a depth of 5 cm in soil.

b) Number of colony forming units (cfu) per 1 g of samples ($\times 10^5$).

c) Not detected.

4 5 4 4 4 5 4 3 3 3 2 3 4
 4 4 4 4 4 4 4 3 2 2 2 2 2 2 1 2 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 4
 4 3 4 4 4 3 3 2 2 2 2 2 2 2 1 1 2 1 2 2 2 2 2 2 3 3 3 4 2 3 3
 5 5 5 4 5 5 5 4 3 3 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 3 2 3 3 3 4 3 3
 5 5 5 4 4 2 3 2 4 4 4 4 4 4 4 2 2 4 3 4 3 3 3 3 4 4 4 4 4

Fig. 1. Effect of residues of diseased konnyaku leaflet (infection source) on the occurrence of bacterial leaf blight. Infection source was prepared by leaving the diseased leaflets on soil surface of field from Dec. 21, 1987 to May 19, 1988. Then, it was applied to the soil surface of center area marked with (□) at immediately after planting of konnyaku corms. Numbers of 1, 2, 3, 4 and 5 in the figure show the dates of disease occurrence, and represent 1: Aug. 19, 2: Aug. 30, 3: Sept. 5, 4: Sept. 13 and 5: Sept. 28, respectively.

面放置区は、処理後 200 日でも罹病小葉 1 g 当り 2.2×10^7 cfu の本病細菌が検出され、その後、菌数は減少したものの処理後 422 日まで生存が確認できた。また、実験室内放置区においても 422 日まで生存が確認された。

罹病小葉残渣の圃場接種と発病

コンニャク栽培歴のない圃場の地表面に罹病小葉残渣を接種した結果を Fig. 1 に示した。

罹病小葉残渣無接種区ではまったく発病が認められなかったが、接種区では罹病小葉残渣を接種した場所およびその隣接部のコンニャクに植付け後 92 日に発病が認められ、その後、それら発病株を中心に発生が周囲へと拡大した。

コンニャク球茎上における葉枯病細菌の生存期間

各処理区におけるコンニャク球茎の状態を調査した結果、10 C のコンニャク種球専用貯蔵庫内区の球茎は、処理後、150 日まで主芽の伸長や球茎表面の腐敗等

がなく貯蔵開始時と同様な状態にあった。25 C の実験室内区の場合は主芽の伸長が認められ、球茎が乾燥しやや小さくなった。屋外地表面放置区の球茎は、処理後 34 日の時点で表面が凍害により軟化し、処理後 150 日では球茎全体が軟化腐敗した。屋外土壌埋没区の球茎は、一部に軟化腐敗したものもあったが、大部分が処理後 150 日まで処理開始時のものと同様な状態にあった。

次に、各処理区から採取した球茎上の生存本病細菌数を経時的に調査した結果を Table 2 に示した。10 C コンニャク種球専用貯蔵庫内区と屋外土壌埋没区では、接種後 150 日でも $10^3 \sim 10^4$ cfu の本病細菌が検出された。一方、25 C の実験室内区および屋外地表面放置区は、接種後 76 日まで生存が確認されたが、150 日後には検出できなくなった。

屋外地表面放置区を除く各処理区から採取した球茎を殺菌土壌に植え付け、その後展開した小葉におけ

Table 2. Survival of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *konjaci* on artificially infested konnyaku corms kept under four different conditions

Date of measurement	Days after treatment	Room temperature at		Natural field soil	
		10 C	25 C	on surface	in soil ^{a)}
Nov. 14, 1985	0	46,156 ^{b)}	46,156	46,156	46,156
Dec. 18, 1985	34	4,320	1,800	1,103	14,800
Jan. 29, 1986	76	326	80	207	295
Apr. 14, 1986	150	18	ND ^{c)}	ND	250

a) Konnyaku corms were buried at a depth of 10 cm in soil.

b) Number of colony forming units (cfu) per the peel of about 50 g weight corm ($\times 10^3$).

c) Not detected.

Table 3. Disease occurrence in konnyaku leaflets grown from artificially infested corms preserved under different conditions

Konnyaku corms ^{a)} preserved at	No. of corms planted	No. of diseased plants
10 C in room	11	5
25 C in room	12	0
Soil surface of natural field	0 ^{b)}	—
In natural field soil ^{c)}	5	3

a) Corms were inoculated by soaking in the bacterial suspension and preserved under four different conditions from Nov. 14, 1985 to May 10, 1986. After that, they were planted to the sterilized soil on May 10, 1986, and the disease occurrence of konnyaku leaflets was observed on Aug. 28, 1986.

b) All corms were died during the preservation.

c) At a depth of 10 cm.

Table 4. Survival of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *konjaci* in artificially infested soil

Date of measurement	Days after treatment	In sterilized soil		In nonsterilized soil	
		5C ^{a)}	25C	5C	25C
Nov. 21, 1987	0	8.83×10^6 ^{b)}	8.83×10^6	6.49×10^6	6.49×10^6
Dec. 1, 1987	10	7.85×10^6	3.47×10^7	1.88×10^6	7.57×10^5
Dec. 19, 1987	28	4.58×10^5	3.38×10^5	2.03×10^3	ND ^{c)}
Jan. 20, 1988	60	3.06×10^4	1.76×10^3	ND	ND
Mar. 18, 1988	118	9.72×10^3	2.70×10^2	ND	ND
Apr. 23, 1988	136	5.57×10^3	ND	ND	ND

a) Soil temperature.

b) Number of colony forming units (cfu) per 1 g of dry soil.

c) Not detected.

る発病の有無を調査した結果をTable 3 に示した。

発病は 10 C のコンニャク種球専用貯蔵庫内区および屋外土壌埋没区の球茎で認められ、25 C の実験室内区の球茎ではまったく発病が認められなかった。なお、屋外地表面放置区の球茎は軟化腐敗したため、植付けできなかった。

土壌灌注した葉枯病細菌の生存期間

土壌に灌注した本病細菌の生存菌数を経時的に調査

した結果を Table 4 に示した。

殺菌土壌に灌注し、その後 5 C に保った場合は、灌注後 136 日でも乾土 1 g 当り 5.5×10^3 cfu の本病細菌が検出されたが、非殺菌土壌の場合は灌注後 60 日で検出されなくなった。また、25 C の場合は殺菌土壌、非殺菌土壌とも 5 C に比べ生存期間が短く、非殺菌土壌では灌注後 28 日で生存菌は検出できなかった。

考 察

コンニャク葉枯病の伝染源に関して、汚染土壌を付着させた種球や、罹病小葉を埋没した土壌に植え付けた種球での発病が報告されている¹⁵⁾。しかし、本病細菌の各種条件下における生存期間については明らかにされていない。そこで本研究では、本病の伝染源について検討を行い、罹病小葉残渣内、球茎上および土壌中における本病細菌の生存期間を明らかにした。

本病の罹病小葉を各種条件下で処理し、経時的に本病細菌の生存菌数を調査した結果、非殺菌土壌に埋没した場合は処理後約3カ月で検出されなかった。それに対して、殺菌土壌に埋没した場合には処理後約8カ月、非殺菌土壌の表面および実験室内に放置した場合には約14カ月後でも本病細菌の生存が確認された。また、地表面に放置された罹病小葉残渣を植付け直後のコンニャク圃場の地表面に接種した結果、実際に発病が認められた。レタス腐敗病の病原細菌の一種である *Pseudomonas cichorii* は、乾燥罹病葉を土壌中に埋没した場合6カ月間の生存が確認されている¹¹⁾。しかし、本試験では罹病小葉を非殺菌土壌中に埋没した場合、土壌表面や実験室内に放置した場合に比べ、罹病小葉の腐朽が速いことから、土壌中の各種微生物により葉肉組織が腐朽し、それにともない本病細菌が急激に死滅したものと思われた。これと同様に *Xanthomonas campestris* pv. *citri* は、罹病葉を土壌中に埋没すると葉の腐朽とともに急速に死滅する¹²⁾が、イネワラやシバに付着したものは、乾燥条件では雑菌との共存下でも長期間生存する⁹⁾。また、*X. c.* pv. *glycines* に罹病したダイズ葉を深さ15あるいは30 cmの地中に埋めた場合は3カ月しか生存しなかったが、地表面に置いた場合は7カ月の生存が確認されている⁹⁾。本病細菌の場合も、罹病小葉中での生存菌数は小葉の腐朽の進行とともに減少するものと思われるが、地表面に存在する罹病小葉中には、コンニャクの植付け時期である翌年の4~5月でも本病細菌が生存しており、かつ、実際に伝染源として発病をもたらし能力を有していた。したがって、地表面に残存する罹病小葉は本病の伝染源になることが明らかになった。

コンニャクの球茎上における本病細菌の生存期間について調査した結果、10℃のコンニャク種球専用貯蔵庫内区と屋外土壌中埋没区で、コンニャクの植付け時期である4月までは本病細菌の球茎上での生存が確認され、さらに、両処理区の球茎を5月に殺菌土壌に植え付けた結果、その後伸長した株の小葉に発病が

認められた。一方、25℃の実験室内および屋外地表面放置区は、4月には本病細菌の検出がなく、25℃の実験室内放置区の球茎を殺菌土壌に植え付けた結果でも発病が認められなかった。したがって、本病細菌は高温条件下で菌数の減少が速く、生存には25℃よりも10℃前後の方が適していると思われた。また、地表面に放置された球茎は、冬期間に凍害を受け、4月の時点ですべてが腐敗・枯死したが、土壌中に埋没した球茎は大部分が球茎の腐敗もなく、主芽も貯蔵開始時と同様な状態を維持していた。すなわち、土壌中に埋没された球茎は外気温の影響を受けにくいと、貯蔵開始時と同様な状態で越冬が可能であり、球茎表面における腐生的な微生物の増殖が少なく、本病細菌の生存にも好条件となったものと思われた。それに対して地表面に放置された球茎は、凍害に起因する腐敗の進行とともに生存本病細菌数が減少したものと思われた。

土壌に灌注された本病細菌は、非殺菌土壌中では急激に密度が低下し、とくに高温条件下で速やかであった。一方、殺菌土壌の場合は菌密度低下の速度が遅かった。*P. s.* pv. *lachrymans* あるいは、*P. s.* pv. *tabaci* は土壌に灌注された場合、いずれも殺菌土壌に比べ非殺菌土壌で菌密度の低下が速いことが確認されている^{9,10)}。したがって、自然条件下では、コンニャクの球茎や小葉等の組織を離れた土壌中の本病細菌は、翌年の伝染源になる可能性は少ないと思われた。

以上の結果から、宿主組織から離れて土壌中に存在する本病細菌は、次作の伝染源となる可能性は低いが、地表面に残存する罹病小葉残渣およびコンニャク貯蔵庫内の種球あるいは収穫時に掘り残された土壌中の球茎上に存在する本病細菌は、次作の伝染源になる可能性があると思われた。

摘 要

Pseudomonas pseudoalcaligenes subsp. *konjaci* によるコンニャク葉枯病の伝染源を明らかにするため、罹病小葉組織内、球茎上および土壌中における病原細菌の生存期間を本病細菌検出用選択培地を用いて検討した。9月に罹病小葉を非殺菌土壌中に埋没した場合は、処理後106日以降には病原細菌が検出できなかったが、殺菌土壌に埋没した場合は処理後244日でも検出された。一方、屋外の地表面あるいは実験室内に置いた場合は、処理後422日まで本病細菌が検出された。また、罹病小葉を12月から翌年5月まで圃場地表面に放置した罹病小葉残渣を、本病未発生圃場の種

球植付け直後の地表面に接種した結果、これが伝染源となって本病が発生したことを確認した。球茎を11月に本病細菌液に浸漬接種したのち、10℃のコンニャク種球専用貯蔵庫および屋外土壌中(地表下10 cm)に保存した場合は翌年の4月でも本病細菌が検出されたが、25℃の室内および屋外の地表面に放置した場合は、翌年の1月まで本病細菌を検出したものの、それ

以降は検出されなかった。土壌中に灌注された本病細菌は、25℃に比べ5℃で生存期間が長かったが、非殺菌土壌中では5℃でも接種60日目には検出されなかった。以上の実験結果から、地表面に残存する罹病小葉残渣中およびコンニャク種球専用貯蔵庫内(10℃)あるいは土壌中の球茎上に存在する本病細菌は、次作の伝染源になる可能性があると推定された。

引用文献

1. 新井吾郎・山賀一郎・五味美知男 (1975). コンニャク栽培の新技术. 群馬県農業改良協会, 前橋. pp. 161-246.
2. Fett, W.F. (1979). *Plant Dis. Rep.* 63: 79-83.
3. 後藤正夫・太田光輝・岡部徳夫 (1975). *日植病報* 41: 141-147.
4. Goto, M. (1983). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33: 539-545.
5. 林 宣夫 (1987). *日植病報* 53: 489-494.
6. 平田栄吉 (1927). *農事試報* 48: 1-45.
7. 鑄方末彦 (1935). *農及園* 10: 1695-1702.
8. 西山幸司・江塚昭典 (1977). *日植病報* 43: 426-431.
9. 小川 奎・駒田 旦・竹内昭士郎 (1981). *農事試研報* 35: 155-177.
10. 小野邦明 (1976). *盛岡たばこ試報* 11: 1-52.
11. 大畑貫一・芹沢拙夫・白田 昭 (1982). *農技研報 C* 36: 75-80.
12. Peltier, G.L. and Frederich, W.J. (1926). *Jour. Agr. Res.* 32: 335-345.
13. 上田栄次郎 (1910). *植物学雑誌* 24 (281): 177-182.
14. 若林重道 (1957). 最新コンニャク栽培と加工. 産業図書, 東京. pp. 128-130.
15. 山本 勉・川尻啓介 (1967). *四国植物防疫研究* 2: 61-72.
16. 山本 勉・川尻啓介 (1967). *徳島農試報* 9: 27-33.