

Erwinia carotovora subsp. *carotovora* による ホワイトレースフラワー軟腐病（新称） の発生について

兼橋和央*・海老原克介**・植松清次***・根岸寛光****・松山宣明****・陶山一雄****

（平成 17 年 11 月 14 日受付/平成 18 年 3 月 10 日受理）

要約：2001 年 10 月，千葉県安房郡丸山町でホワイトレースフラワーの茎および葉柄が軟化腐敗し，悪臭を放つ病害の発生を認めた。本病罹病株から分離した細菌は，ホワイトレースフラワー苗を軟化腐敗させた。分離細菌は，グラム反応陰性，通性嫌気性，37°C で発育し，グルコースを発酵的に分解，硝酸塩を還元，ラクトースを利用し酸を産生したが，インドールを産生せず，酒石酸の利用は認めなかった。以上の結果から，本分離細菌を *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* と同定し，病名をホワイトレースフラワー軟腐病（英名；soft rot）とすることを提案する。

キーワード：軟腐病，ホワイトレースフラワー，*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

緒 言

千葉県南房総地域は，温暖な気候を生かし，各種花卉類の栽培が盛んに行われている。丸山町では特にホワイトレースフラワー (*Ammi majus* L.) を導入，特産地化を目指し，優良な品種の育成を行ってきた。2001 年 10 月，このホワイトレースフラワーの茎および葉柄が軟化腐敗し，上位葉が萎ちょう・枯死する病害の発生を認めた。本病はその後散発的に発生したが，2003 年 11 月下旬には壊滅的な被害が発生した栽培地も認められた。そのため本病の発生は，今後ホワイトレースフラワーの重要な生産阻害要因となることが推測されたので，病原を明らかにするための試験を行った結果，*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones) BERGEY *et al.* 1923 に起因する病害であることを明らかにしたので報告する。

材料および方法

病原の分離：葉，葉柄，茎の新鮮な腐敗組織および茎上部の褐変組織を採取，常法に従い表面殺菌したのち，希釈平板法で分離した。激しく腐敗した組織は少量の滅菌水中で磨砕後，その磨砕液を平板培地に画線し，培養する方法も併用した。分離培地は PPGA 培地を供試し，25°C で培養した。発育した細菌は単集落分離を数回繰り返し，純培養後，病原性検定および細菌学的性質検定試験に供試した。

病原性検定：病原性はホワイトレースフラワーを始め，

ハクサイ (*Brassica campestris* L.)，キュウリ (*Cucumis sativus* L.) に接種した。接種細菌は PPGA で 24 時間培養後，細菌懸濁液 (10^{8-9} CFU/ml) を調整し，この細菌懸濁液を 4~6 葉期のホワイトレースフラワーおよびキュウリの茎および葉柄に滴下後，刺針接種した。ハクサイは，6~8 葉期苗の中肋および地際部に細菌懸濁液を滴下後，刺針接種した。接種株には多量の蒸留水を噴霧し，24~48 時間温室状態に保った。その後，接種株をガラス温室に移して育苗，発病の有無を観察した。

細菌学的性質：ホワイトレースフラワーに軟腐症状を発現した分離菌から 16 菌株を選抜し，細菌学的性質試験に供試した。供試菌は簡易同定で *Erwinia carotovora* に類別されたので東京農業大学植物病理学研究室保存の *E. c.* subsp. *carotovora* (ジャガイモ分離菌：TUAP02001) と *E. chrysanthemi* (ナシ分離菌：梨 1-1) を加え，細菌学的性質を SCHAAD *ら*¹⁴⁾ および後藤・瀧川⁶⁻⁹⁾ の方法に準拠し，検討した。

結果および考察

発生状況および病徴：2001 年 10 月，千葉県安房郡丸山町のビニルハウス栽培ホワイトレースフラワー (*Ammi majus* L.) が軟化腐敗する病害の発生をわが国で初めて認めた。2002 年の発生は散発的であったが，2003 年 11 月にはビニルハウスに栽植されている株の 71% が発病していた (Table 1)。ホワイトレースフラワーは同一施設で連作

* 東京農業大学大学院農学研究科農学専攻

** 千葉県安房農林振興センター

*** 千葉県農業総合研究所暖地園芸試験場

**** 東京農業大学農学部農学科

Table 1 Incidence of white lace flower soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

Research place	Research observed plants	Disease plants	Disease severity index ¹⁾				Disease severity ²⁾	Disease incidence(%)
			0	1	2	3		
Maruyama-cho,HouseA	107	76	30	6	11	60	48.6	71.0
Maruyama-cho,HouseB	101	49	52	9	8	32	30.0	48.5

* Date from Oct.2003.

1) Severity scores; 0; No lesions, 1; lesions covering 10~29% of plants, 2; lesions covering 30~49% of plants, 3; lesions covering over 50% of plants

2) Disease severity = $\{(\sum \text{severity scores}) / (\text{total number of plants} \times 4)\} \times 100$

3) Disease incidence(%) = $(\text{Diseased plants} / \text{Research observed plants}) \times 100$

することから、年々発生が多くなる傾向が認められ、本病による被害は、ホワイトレースフラワーの安定生産上大きな問題になると考えられた。

本病は、定植直後の苗から、切花として収穫する株まで発生が認められた。発病初期は、苗に生気が無くなり、茎葉がしおれ気味となる。しおれ症状を呈した苗を観察すると、地際部付近の茎および下葉の葉柄に水浸状斑が認められた (Plate 1-1)。この水浸状斑は速やかに拡大、褐色から暗褐色の大型条斑となり、病斑組織は軟化腐敗した (Plate 1-2, 1-3)。一部の株では、葉、葉柄が軟化腐敗し、枯死した (Plate 1-4)。また、激しく腐敗した組織は軟腐病特有の悪臭を放っていた。

病原の分離と病原性：本病罹病組織を顕鏡すると、観察部位に菌類は観察されなかったが、組織内から多量の細菌の溢出が確認された。組織内の細菌を分離すると、PPGA培地上に円形、白から黄白色集落を形成する細菌が優先的に分離された。

この分離菌をハクサイ中肋に接種すると、24時間以内に淡褐色の水浸状斑を形成した。この病斑は、その後速やかに拡大して軟腐症状を呈し、悪臭を放った。ハクサイの地際部に接種すると、接種部に淡褐色の水浸状斑を形成した。この病斑は速やかに進展、ハクサイの中肋組織を崩壊させながら拡大し、軟化腐敗させた。キュウリの茎に接種すると、接種翌日には接種部に多量の菌泥を溢出させた。その後、茎は軟化腐敗し、上位葉は黄化・萎ちょうし、枯死した (Plate 1-5)。ハクサイ中肋を軟化腐敗させた分離菌から16菌株を選抜し、ホワイトレースフラワーの地際部および葉柄に刺針接種した。その結果、供試16菌株は接種翌日には接種部に暗褐色、水浸状斑を形成した。この病斑は、その後速やかに拡大し、組織は軟化腐敗し崩壊した (Plate 1-6)。接種株の上位葉は、しおれ症状を呈し、葉柄は接種部から垂下した。また、接種細菌が維管束に侵入すると速やかに移動し、葉脈を浸潤し、葉が軟化腐敗した。これらの腐敗部は、軟腐病特有の悪臭を放ち、ホワイトレースフラワーでの原病徴が再現された。以上分離菌は、ホワイトレースフラワー苗に軟化腐敗症状を呈し、原病徴を再現した。また、発病株から接種菌が再分離され、分離菌の病原性が確認された。

細菌学的性質：分離菌16菌株を対照として用いた *E. c.* subsp. *carotovora* および *E. chrysanthemi* の細菌学的性質を Table 2 に示した。分離菌16菌株はグラム陰性、運動性を有し、通性嫌気性、グルコースを発酵的に分解し、37°C で発育した。硫化水素の産生、硝酸塩の還元、エスクリンの分解、アセトイン試験は陽性、オキシダーゼ活性、レシチナーゼ活性、インドール試験、尿素試験は陰性、牛乳培養試験では、酸を生じ凝固した。クエン酸、乳酸、コハク酸を利用したが、酒石酸、マロン酸、酪酸は利用しなかった。グルコース、スクロース、ラクトース、セロピオース、ラフィノースを利用し、酸を産生したが、スターチ、イヌリン、ダルシトール、ソルビトールは利用しなかった。サッカロースからの還元物質の生成、D-マルトースの利用能は菌株により異なった。

病原細菌はその主要な性質から、*E. carotovora* 群に属した。*E. carotovora* 群には *E. c.* subsp. *carotovora* の他に6亜種が知られている^{1,2,4,5,10,11,15} が、今回見出したホワイトレースフラワー軟腐病分離株は病原性、細菌学的性質が他の6亜種とは明らかに異なり *E. c.* subsp. *carotovora* に類似した。既報^{12,13,15-17} の *E. c.* subsp. *carotovora* とはハクサイに対する病原性が一致した。細菌学的性質は、後藤ら⁵ とは乳酸の利用能で、藤井ら³ とは、乳酸およびイノシトールの利用能で異なったが、富樫ら¹⁶ および土屋ら¹⁷ とは一致した。

以上の結果から、分離細菌を *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (JONES, 1901) BERGEY *et al.* 1923 と同定した。これまでわが国ではホワイトレースフラワーに発生する細菌病の記載は無く、本病をホワイトレースフラワー軟腐病 (英名: Soft rot) と呼称することを提案する。

謝辞：本研究の一部は東京農業大学学術フロンティア共同研究費の補助で行われた。ここに記して謝意を表す。

Table 2 Bacteriological characteristics of the strains used in this study

Characteristic	Present isolate n=16	Present data ¹⁾		<i>E. c.</i> subsp. <i>carotovora</i> ²⁾			
		<i>E.c.c.</i> n=1	<i>E.ch.</i> n=1	1	2	3	4
Motility	+ ³⁾	+	+	+	+	+	
Anaerobic growth	+	+	+			+	
Gram reaction	-	-	-		-	-	-
Yellow pigment	-	-	-		-	-	-
Mucoid growth	-	-	-		-	-	-
Growth at 37°C	+	+	+	+	+	+	
O-F test	F ⁴⁾	F	F		F	F	F
5% salt tolerance	+	+	-	+		+	
Oxidase	-	-	-		-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-		-	-	-
Production of:							
hydrogen sulfide	+	+	+		+	+	+
indole	-	-	+	-	-	-	V
2-keto gluconate	-	-	-		-	-	-
3-keto lactose	-	-	-		-	-	-
Hydrolysis of:							
aesculin	+	+	+		+	+	
albutin	-	-	-		-	-	
starch	-	-	-		-	-	
tween80	-	-	-	-	-	-	
margarine	-	-	-		-	-	
Reduction of nitrate	+	+	+		+	+	+
Nitrate respiration	+	+	+				+
Reducing substances from sucrose	V	-	-	V		-	
Voges-Proskauer reaction	+	+	-	V	+	+	+
Methyl red test	+	+	-	+	V	V	+
Phenylalanine deaminase test	-	-	-	-		-	
Phosphatase test	-	-	+	-		-	
Urease test	-	-	-			-	+
Tyrosinase ativity	-	-	-		-	-	
Lecithinase activity	-	-	+	-	-	-	
Liquefaction of gelatin	+	+	+	+	+	+	+
BTB milk	AC ⁵⁾ ,C ⁶⁾	AC,C	AC,C	AC,C		AC	
Utilization of:							
D-tartrate	-	-	-	-	-	-	-
L-tartrate	-	-	+	-			
citrate	+	+	+	+	+		
malonate	-	-	+	-	-	-	-
lactate	+	+	+	-	-		
succinate	+	+	+			+	
butyrate	-	-	-				
D-arabinose	-	-	+	-			
L-arabinose	+	+	+	+	+		
D-xylose	+	+	+	+	+	+	+
L-rhamnose	+	+	+	+	+	+	+
D-glucose	+	+	+	+	+	+	
D-fructose	+	+	+	+	+		+
D-mannose	+	+	+	+	+		
D-galactose	+	+	+	+	+		
ribose	+	+	+	+	+		
sucrose	+	+	+	+	+	+	+
lactose	+	+	+	+	+	+	+
D-maltose	V	-	+	-	-	V	V
trehalose	+	+	-	V			
D-cellobiose	+	+	+	+	+	+	+
melibiose	+	+	+	+	+		
raffinose	+	+	+	+	+	+	+
melezitose	-	-	-	-	-		
starch	-	-	-	-	-		
inulin	-	-	+	-	-		
dulcitol	-	-	-	-	-	-	-
glycerol	+	+	+	+	+		
myo-inositol	+	+	+	+	-	+	+
erythritol	-	-	-	-	-		
D-solubitol	-	-	-	-	-	V	V
α-methyl-D-glucoside	-	-	-	-	-		

1) Present data: used strain: *E.c.c.*: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Potato isolate: TUAPO02001), *E.ch.*: *E. chrysanthemi* (Pears isolate: TUAPE8311)

2) *E.c.* subsp. *carotovora* cited from 1: Goto *et al* 1987., 2: Fujii *et al* 2002., 3: Togashi *et al* 1993., 4: Tutiya *et al* 1979.

3) +: Positive, -: Negative, V: Variable reaction

4) F: Fermentation

5) AC: Acid formation

6) C: Coagulation

引用文献

- 1) BRADBURY, J.E., 1986. *Erwinia*, In Guide to Plant Pathogenic Bacteria. CAB International Mycological Institute, London., pp. 61-92.
- 2) DYE, D.W., 1969. A taxonomic study of genus *Erwinia*. II. The carotovora group. N.Z. J. Sci., 12, 81-97.
- 3) 藤井直哉・篠原弘亮・塩谷純一朗・佐山 玲・深谷富夫・西山公司, 2002. 秋田県で発生したアスパラガス軟腐病 (新称), 北日本病虫研報, 52, 80-84.
- 4) GALLOIS, A., SAMSON, R., AGARON, E. and GRIMONT, P.A.D., 1992. *Erwinia carotovora* subsp. *odorifera* subsp. nov., associated with odorous soft rot of chicory (*Chichorium intybus* L.). Int. J. Syst. Bacteriol., 42, 582-588.
- 5) GOTO, M. and MATSUMOTO, K., 1987. *Erwinia carotovora* subsp. *wasabiae* subsp. nov. isolated from disease rhizomes and fibrous roots of Japanese horseradish (*Eutrema wasabi* Maxim). Int. J. Syst. Bacteriol., 37, 130-135.
- 6) 後藤正夫・瀧川雄一, 1984. 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べ方 (1), 植物防疫, 38, 339-344.
- 7) 後藤正夫・瀧川雄一, 1984. 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べ方 (2), 植物防疫, 38, 385-389.
- 8) 後藤正夫・瀧川雄一, 1984. 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べ方 (3), 植物防疫, 38, 432-438.
- 9) 後藤正夫・瀧川雄一, 1984. 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べ方 (4), 植物防疫, 38, 479-484.
- 10) GRAHAM, D.C., 1972. Identification of soft rot bacteria. Pro. 3rd., Int. Conf. Plantpath. Bact., pp. 273-279.
- 11) HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T. and WILLIAMS, S.T., 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth edition, Williams & Wilkins, Baltimor, MD.
- 12) 木村俊夫・橋本 保, 1981. ニンニク病害に関する研究—(Ⅲ). *Erwinia carotovora* によるニンニク軟化腐敗症状について—, 宮城農短大報, 28, 17-23.
- 13) 奈須田和彦・川端顕子・富永時任, 1975. ハウス栽培におけるメロン軟腐病の発生, 北陸病虫研報, 23, 92-95.
- 14) SCHAAD, N.W., JONES, J.B. and CHUN, W., 2001. *Erwinia*, In Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria 3rd. ed., Aps press., pp 56-72.
- 15) 高橋幸吉・佐藤 守, 1978. *Erwinia carotovora* var. *carotovora* (JONES) Dye によるクワ枝軟腐病 (新称), 日蚕雑, 47 (2), 43-153.
- 16) 富樫二郎・五十嵐徹・生井恒雄, 1993. 山形県で発生したカラー軟腐病, 山形大紀要, 11 (4), 771-775.
- 17) 土屋行夫・大畑貢一・家村浩海・実松孝明・白田 昭・藤井 溥, 1979. レタスに腐敗をおこす病原細菌の同定, 農技研報 C, 33, 77-99.

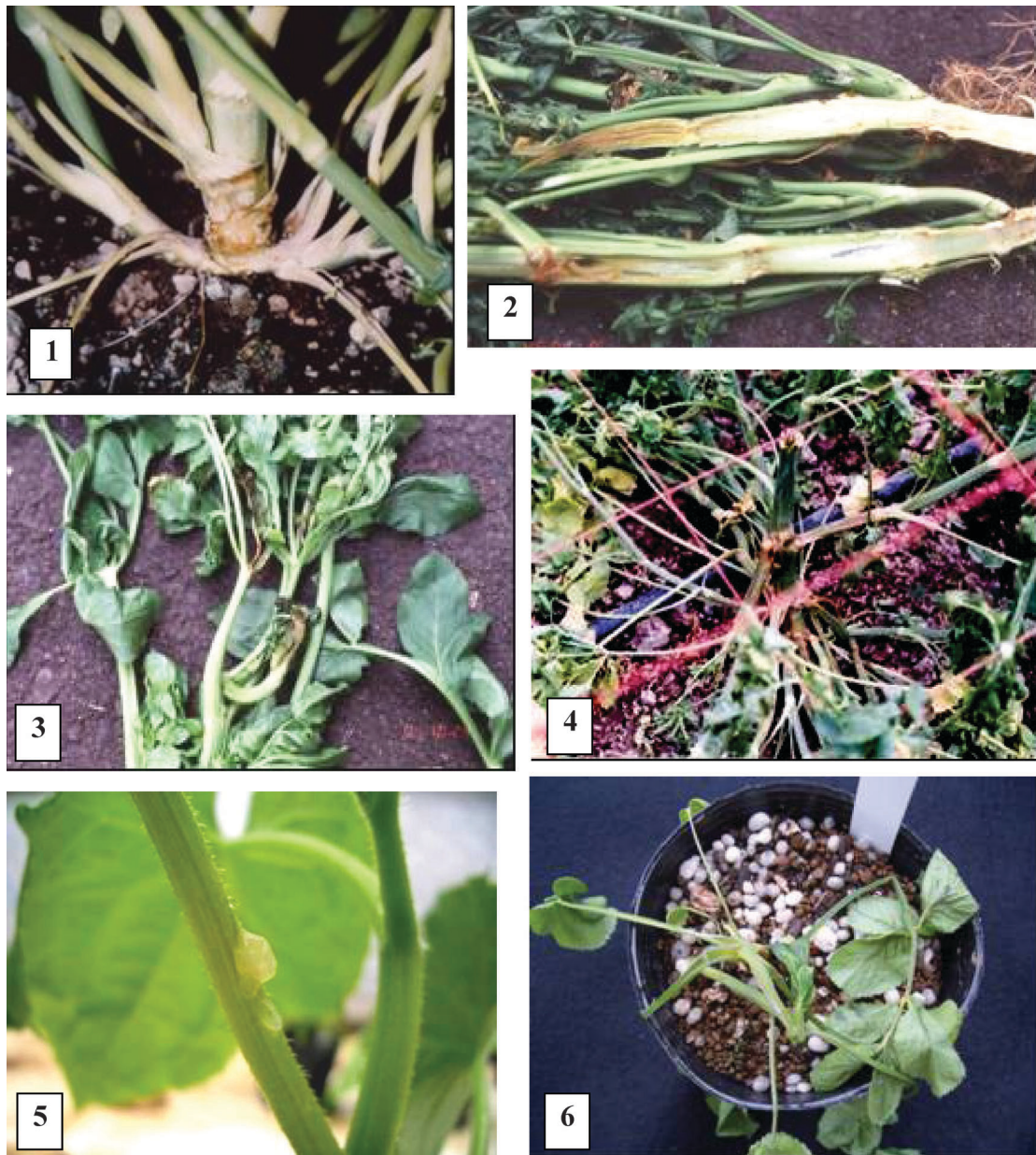


Plate 1 Symptoms appeared on white lace flower

1. Dark-brown water soaked lesions seen on leaves, petioles and stem near soil.
- 2, 3. Rotten symptom appeared on stem, leaves and petioles.
4. Soft rot and break down of stem appeared in severe damaged plant.
5. Soft rot and bacteria ooze exudation seen on cucumber stem artificially inoculated with TUAWL03006.
6. Soft rot symptom produced on young seedling of white lace flower artificially inoculated with TUAWL03006 strain.

Soft rot Disease Occurred on
White Lace Flower (*Ammi majus* L.)
Caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

By

Kazuo KANEHASHI*, Yoshiyuki EBIHARA**, Seiji UEMATSU***,
Hiromitsu NEGISHI****, Nobuaki MATSUYAMA**** and Kazuo SUYAMA****

(Received November 14, 2005/Accepted March 10, 2006)

Summary : On October in 2001, a new rotting disease was found on white lace flower (*Ammi majus* L.) in Chiba prefecture, Japan. The diseased plant primarily showed water-soaked brown spots on the stem, petioles and leaves near the soil. The diseased tissues were rotten with peculiar odor and the whole of the plant finally wilted. Bacteria isolated from rotten tissues and isolated bacteria produced rotten symptoms on the white lace flower, chinese cabbage and cucumber plants by artificial inoculation. The causal bacterium was identified as *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones) BERGEY *et.al.* 1923 according to its pathogenicity and bacteriological characteristics. Bacterial disease of white lace flower has not been recorded in Japan, therefore we proposed the name “soft rot” for this disease.

Key words : Soft rot, White lace flower, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

* Department of Agriculture Science, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

** Awa Agricultural Extension Center, Chiba, Japan

*** Southern Prefectural Horticulture Institute, Chiba Prefectural Agriculture Research Center, Chiba, Japan

**** Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture