

ヒヤシンス黄腐病とその抗血清による診断

小 畑 琢 志

横浜植物防疫所調査課

I. ま え が き

1965年5月新潟県西蒲原郡黒崎村で発見された在来ヒヤシンス(品種 Queen of the Blues)の黄腐病類似株の調査を依頼され病原菌の分離を試みたところ、黄腐病病原細菌と思われる *Xanthomonas* 属菌を分離した。ヒヤシンス黄腐病は従来国内では未発生と考えられ、輸入植物検疫においても重視されて来たヒヤシンスの重要病害であるが、この分離菌の培養的性質、形態、病原性などを検討した結果ヒヤシンス黄腐病に間違いがないことが確認された。新潟県における本病発見の経緯や現地調査の結果などについてはさきに永田(1966)が報告したところであるが、氏の報告には病原菌の同定経緯が充分につくされていない。著者は本報告においてこれをおぎなうとともに、発病に関与する2~3の要因、圃場診断に対する抗血清の利用などを検討したのでとりまとめて報告する。

本研究の一部に協力された現農林省東北農業試験場八重樫博志技官に謝意を表する。

II. 日本における発生記録

ヒヤシンス黄腐病に関する内外の文献の多くが、本病の分布地域のなかに日本を加えている。そこでこれらの文献を調査し、日本における発生の根拠を検討した。すなわち日本において、本病を最初に記載した白井(1903)は“ヒヤシントの腐敗病”として、この病害が1883年に発見され、白腐病と称され、患部に黄白色の粘液を生じ悪臭を発する病害であると述べ、病原細菌は *Pseudomonas hyacinthi* (WAKKER) E. F. SMITH であると紹介している。この記述は明らかに WAKKER および SMITH からの引用であって日本における発生の有無についてはふれていない。本病をヒヤシンス黄腐病として紹介した出田(1909)の記述も前記 WAKKER および SMITH からの引用である。ついで南部(1914)は本病が同年4月下旬東京府立農事試験場において発見された

と述べ、さらに Gardners's Chronicle 誌を引用して本病がアマリスおよびネギ属を侵すと解説している。この寄生性についての記述は現在の知見からすればまったくの誤りであり、同試験場における本病の発見についてもくわしい記述がない。その後、中田(1930, 1931)は本病病原細菌の栄養要求に関する研究を報告した。これは日本においてヒヤシンス黄腐病菌を扱った唯一の報告と考えられるが、供試菌は1920年10月アメリカより取り寄せたものであった。茂木(1932)の記述も、本病の国内発生については述べておらず、本病をヒヤシンスの重要病害として病徴、生態、防除法などを紹介しているにすぎない。このほか石山・向(1941)、岡部(1949)らの記述も前述の文献からの引用であり、さらに最近刊行された日本有用植物病名目録2巻(1965)には前述の白井(1903)、出田(1909)を引用して本病を国内発生病害として採録している。

一方海外の文献では MOORE (1949) が中田(1931)を、ELLIOTT (1951) および STAPP (1961) が出田(1914)をそれぞれ引用して本病の分布に日本を含めているが、いずれも根拠がないことはさきに述べたとおりである。

以上要するに本病の日本における記載はいずれも WAKKER もしくは SMITH からの引用に端を発しており、日本における存在についてはなんら記述がない。わずかに発生報告と認めうるのは南部(1914)の報告であるが、これとて同定の根拠はまったく不十分である。ちなみに横浜税関(1939)発行の「輸移入植物病害害虫目録」によると本病は1914(大正3年)~1937年(昭和12年)の間にオランダからの輸入ヒヤシンスで計9回発見されているが、同日録は本病を国内未発生として取扱っている。さらに河村(1950, 1964)は本病の日本における発生については否定的である。このように本病が日本に存在するとした内外の文献はいずれも根拠がなく、輸入検査における発見を除けば、日本における発生記録はなかったと考えるのが妥当である。したがって本報告はわが国における発生を病原細菌の分離同定の裏付をもって記録する最初の報告である。

III. 病原細菌の同定

1. 病原細菌の分離

新潟県西蒲原郡黒崎村立仏で発見され送られて来たヒヤシンスはいずれも地上部の発育がいちじるしく不良で、葉先は褐色に枯れ上り、球根からの発根も認めなかった。葉や花茎は縦長の水浸条斑が生じ、横断面からは乳濁した粘液が認められた。球根内部は腐敗が進み汚白色で悪臭をはなっていたが、一部鱗片は黄腐れ症状を呈し、導管部に黄色粘液が認められた(図版参照)。

病原細菌の分離はジャガイモ半合成寒天培地を用い、球根断面および葉片断面から黄色粘液を1白金耳とり、常法により稀釈培養した。30°Cに保温して4日後、乳黄色コロニーの発現を認め、しだいに発育して1週間後には円形、鮮黄色の光沢あるもり上ったコロニーを形成した。コロニーの形状から本菌は *Xanthomonas* 属菌の1種と考えられた(図版参照)。

2. 培養的性質

本菌のジャガイモ半合成寒天培地上における発育温度はほぼ5~35°Cの範囲にあり、35°C以上では発育しないが、5°Cでは1カ月後にコロニーの出現が認められた。発育適温は25~30°Cであるが、25°Cの方が良好と認められた。

培地の種類ではジャガイモ半合成培地が最も発育が早く、コロニーの呈色も良好で鮮黄色を呈する。ジャガイモ寒天培地でもよく発育するがコロニーの黄色はやや薄い。肉エキス寒天培地、ジャガイモ輪腐病菌用農技研培地、SKAPTASON培地などでは発育が遅い。Potato cylinder上でもよく発育して濃黄色の菌層を形成する。

このほかゼラチン液化(+), 硝酸還元(-), 牛乳凝固(+), でんぷん分解(-)であった。

3. 形態

本菌の形態を小型電子顕微鏡で観察した結果、桿状、大きさ約2.0×0.6μ, 長い1本の鞭毛をもった細菌であり、*Xanthomonas*属菌の形態に一致することを確認した(図版参照)。

4. 病原性

方法: 本菌でジャガイモ半合成斜面に25°C, 48時間培養したもの1本に殺菌水20mlを加えてつくった菌液を注射器を用いて、表面殺菌したヒヤシンス球根(品

種 *Edelweiss*) の側部から中心部へ穿刺接種した。接種は1965年7月31日実施し30球を用いた。接種球は陰乾後紙袋につめて室温保存し、11月5日無菌土壌にポット栽植し、ビニールハウスに入れた。

結果: 植付前の観察では接種球の多くが穿刺部位に褐変を生じていたので、その程度のいちじるしいものを5球切開したところいずれも鱗片の一部および根盤部に黄腐れ症状が生じており、この部分から接種菌の再分離に成功した。植付けた球根は発芽不良で22/25球は不発芽となった。1966年全球掘り上げて調査した結果、いずれも発根を認めず、球根内部は2次寄生菌による腐敗がいちじるしく進行して暗褐色を呈していたが、いずれも一部鱗片に黄腐れ部分があり、この部分から接種菌の抗血清(後述)を用いて病原細菌を検出した(図版参照)。

5. 考察

新潟県下で発見された在来ヒヤシンスの黄腐病類似株から分離した *Xanthomonas* 属菌の1種は培地上のコロニーの色沢形状、細菌の形態、発育温度その他の培養的性質がヒヤシンス黄腐病菌の記載によく一致する上、ヒヤシンスに病原性を有することが判明したので、ここにヒヤシンス黄腐病菌 *Xanthomonas hyacinthi* (HASSE) DOWSON と同定される。本菌を後述の試験における供試菌株との関係上、以下 PQ-1 菌と呼ぶことにする。

IV. 感染発病に関与する2, 3の要因

ヒヤシンス球根および生育中の茎葉に対する各種の接種試験を行ない、病徴を観察するとともに、感染および発病に関与する2~3の要因を検討した。

1. 傷と感染

a. 球根接種

方法: *Xanthomonas hyacinthi* PQ-1 のジャガイモ半合成斜面培養1本に殺菌水20mlを加えて懸濁液をつくり接種源とした。ヒヤシンス球根(品種 *Edelweiss*) を昇永アルコールで表面殺菌したのち、無傷のまま1分間浸漬する方法、注射器を用いて穿刺する方法、メスに接種源をぬりつけ球根頂部に縦に切傷を入れる方法、同じく根盤部に切傷を入れる方法などで接種した。接種は一部は1965年7月31日貯蔵前に接種し、一部は植付前に接種した。植付は11月5~19日間にビニールハウス内のポットに栽植し発病状況を観察した。1966年4月18日球根を掘り上げ最終調査を実施した。

結果：第1表のとおり有傷接種の場合はいずれの方法でも100%またはそれに近い発病を示し、無傷のままでも夏季接種の場合46.7%、植付前接種の場合25%の発病を示した。

球根の穿刺接種による発病はほとんど不発芽となり、掘り上げ調査のさいには球根の中心柱部分は二次寄生菌による腐敗が進み、黄腐病の標徴はほとんど消失していたが、一部の鱗片に黄腐れ症状が認められた。これに対し根盤部付傷による接種は発芽阻害が少なく、二次寄生菌による汚染も少なく、発病球根は本病の標徴をよく残していた。しかし有傷接種の場合は発芽してもその後の生育は進まず、葉先から褐変し、しだいに全葉が黄化して立枯れとなり、完全に開花しなかった。なかには茎葉の地際部に水浸状の条斑を生じ、のちに淡黄色粘液を生ずる株も認められた。

無傷接種の場合の発病は緩慢で、生育は開花まで無接種対照区と差を認めなかった。しかし開花期以降しだいに茎葉頂部が黄化し、軽い立枯れ症状を示したものが発病株の約半数を占め、他は外観に異常はないが球根を切断して調べた結果一部鱗片に黄腐れ部分が認められた。

b. 茎葉接種

方法：X. hyacinthi PQ-1 のジャガイモ半合成液体地

第1表 球根に対する無傷および有傷接種結果

接種方法	接種球数	発病球数	発病率
菌液浸漬	30*	14	46.7%
	20	5	25
菌液注射	30*	30	100
	30	30	100
頂部切傷	30*	30	100
根盤部切傷	20	19	95
無接種対照	30	0	0

* 印は7月、他は11月接種

第2表 茎葉に対する無傷および有傷接種結果

接種方法	接種株数	発病株数	発病株率	発病程度
無傷噴霧	20	20	100%	+
スリ傷噴霧	16	16	100	卍
スリ傷塗抹	22	22	100	卍
切傷塗抹	10	10	100	卍
針傷穿刺	10	10	100	卍
無接種対照	20	0	0	-

のしんとう培養48時間/25°Cを接種源として、ヒヤシンス(品種 Edelweiss)の開花前後の茎葉に接種した。接種には茎葉に対して無傷のまま噴霧する方法、カーボランダムで葉の全面をこすってから噴霧する方法、菌液にカーボランダムを混じ綿球を浸してこする方法、メスに菌液をぬって切傷を入れる方法、針束を菌液に浸して穿刺する方法などを用いた。接種後は25°Cの湿室に48時間置いたのちビニールハウス内に移した。本実験はすべて1966年2月に接種をおこなったものである。

結果：第2表のとおりである。有傷接種、無傷接種ともに発病株は100%を示したが、症状はカーボランダムによるスリ傷塗抹接種が最もはげしく、ついでスリ傷噴霧、針傷、切傷の順であった。

有傷接種の場合病徴は7~10日後から認められた。最初は水浸状の小斑点(径1~2mm)が無数に現れ、しだいに拡大して中心部は褐色のえそ状になり、縦長の水浸条斑やえそ条斑に移行する。病斑はえそ状に移行する頃から多くは表皮が裂開するのがひとつの特徴である。発病後1カ月で病斑多数の場合は葉先や葉縁が黄化したり、条斑が互いにゆ合して大型の褐色条斑を生じ、全体として激しい立枯れになる(図版参照)。

無傷接種の場合の発病は潜伏期間が長く、接種後40日頃になってようやく水浸状の斑点が1株当たり7~22個生じ、しだいにえそ状の斑点に移行したが、進展は遅く、有傷の場合のように葉枯れを生ずるには至らなかった。

本試験で観察された病徴は本病の発生圃場において生育後期に目立つ茎葉の病徴に一致し、これが生育中の感染によって起ることを示すものである。茎葉接種の場合の潜伏期間は有傷の場合2月中旬接種(ビニールハウス内)で7~10日間、無傷の場合は40日間であったが、別の実施した試験において4月初旬に露地植のヒヤシンスに有傷接種した結果15~20日間であった。

2. 保菌土壌と感染

方法：(試験 a) X. hyacinthi PQ-1 の半合成液体培地に48時間/25°Cでしんとう培養した培養液を1965年11月12日殺菌土壌1ポット当たり50ml灌注してよく混じ、さらに3日後50mlを追加灌注し、ヒヤシンス球根(品種 Edelweiss および L'Innocence)を植付けた。球根は無傷のものおよび根盤部をメスで切傷をつけたものを設けた。1966年4月18日掘り上げて発病調査を実施した。

(試験 b) 1965年度の球根接種試験において発病した試験区のポットに調査を終えた発病球をもどし、さらに

これに病原細菌の培養液を1ポット当り 50 ml 灌注したのち、過度の乾燥をさけるため露地に埋めて保存し、1966年11月4日ヒヤシンス（品種 Edelweiss）を無傷のままポット当り3球、計30球植付けた。

結果：試験aの結果は第3表に示すとおり、有傷植付の場合は半数に近い発病を示し、無傷の場合でも Edelweiss では10%の発病が得られた。有傷の場合の発病株は発芽しても生育が悪く、開花したのは発病株の約半数であった。この結果から保菌土壌が植付けられた球根に感染の機会を与えることが明らかである。

試験bについては1967年5月22日掘り上げ調査を実施したが、まったく発病球は得られなかった。この結果からみて本病の発生地でも保菌球の掘り残しをしない限り、病土内で病原菌が夏を越し、翌作の植付球根に感染することはまずないものと推定される。

第3表 土壌接種と球根の発病

接種方法	品 種	接種球数	発病球数	発病率
菌液灌注, 球根無傷	{Edelweiss	20	2	10%
	{L'Innocence	10	0	0
菌液灌注, 球根有傷	{Edelweiss	20	10	50
	{L'Innocence	10	4	40

3. 品種と発病

方法：X. *hyacinthi* PQ-1 のジャガイモ半合成培地のしんとう培養液（48時間、25°C）に1966年7月25日各品種の球根を1分間無傷浸漬したのち陰乾貯蔵し、11月4日露地に栽植し、1967年4月19日掘り上げ調査を実施した。

結果：第4表のとおりである。品種によって発病率が

第4表 球根接種による品種と発病

品 種	接種球数	発病株数	発病率
Pink Pearl	27	0	0%
King of the Blues	30	1	3.3
Delft's Blawu	29	1	3.4
Edelweiss	29	3	10.3
Jan Bos	29	3	10.3
Queen of the Blues	29	9	17.2
Queen of the Pinks	29	6	20.7
Lady Derby	30	7	23.3
Carnegie	29	8	27.6
La Victoire	30	10	33.3

異なり、0~33%の中があった。この結果から品種の抵抗性を論ずることはできないが、さらに品種および球数を増すことによって、この方法により球根の本病抵抗性を検討することができると考えられる。

4. 茎葉発病と次年度の球根発病

方法：生育中のヒヤシンス（品種 Edelweiss）に病原菌のしんとう培養液を用いて無傷および有傷接種し発病させた株を掘り上げ、秋季に無菌土壌に栽植して発病の有無を調べた。

結果：第5表のとおりである。茎葉に感染発病をみたヒヤシンスにあっては病原菌が球根に侵入し、翌年発病の原因になることが明らかである。

第5表 茎葉発病と次年度の球根発病

接種方法	接種月日	供試株数	茎 葉 発病株	次年度 発病球
無 傷 噴 霧	1966.2.15.	20	20	2 (10%)
スリ傷噴霧	1966.2.15.	20	20	5 (25%)
スリ傷塗抹	1966.2.25.	22	22	6 (27%)
スリ傷塗抹	1966.4.15.	20	20	6 (30%)
無接種対照	—	20	20	0

5. 考 察

ヒヤシンス黄腐病菌はヒヤシンスに対し非常に強力な病原性を持ち、植付前の球根および生育中の地上部に付傷接種するとつねに100%近い感染を起す。また無傷の場合でも茎葉は100%感染し、無傷球根に対しても感染能力をもっている。球根の付傷接種はほとんど不発芽となり、発芽しても生育が遅れ、葉は先端が枯れ、黄化して、ついには立枯れとなる。本病発生地において生育初期にみられる発病は主としてこの型であるところから、これらは罹病種球に由来する発病型と考えられる。

地上部の感染は葉に水浸状またはえそ状の斑点や条斑を生ずるが、この病徴は圃場では主として4月下旬頃から認められる。これは罹病種球に由来する発病株が伝染源となって感染したいわゆる2次感染型の病徴といえることができる。2次感染の機会は明らかに傷によっていちじるしく増大するが、無傷接種の場合もよく感染することは、傷口侵入のほか気孔侵入による感染もありうることを示すものであろう。

本病の2次感染の場合の潜伏期間は冬季（2月中旬）のビニールハウス内の付傷接種の場合7~10日、春季（4月初旬）露地の場合は15~20日間を要した。2次感

染の病徴は新潟県下では4月下旬頃に目立ってくるが、感染はこれよりかなり以前、おそらく春季の生育開始後まもない時期に起っているものと推定される。

茎葉部に発病したヒヤシンスを翌年の種球とした場合一部に発病を認めた。このなかには前作の掘り取り時にすでに球根の罹病が確認されたものもあるが、いずれにせよ発生圃場から得られた種球を用いることは本病防除の上からは絶対に避ける必要のあることを示唆するものである。

接種土壤に植付けた球根も有傷の場合は発病し、無傷の場合でも感染の可能性のあることが示された。しかし春季に病土をさらに接種して秋季に植付けた結果はまったく発病を認めなかった。発生圃場においては球根の掘り上げの時に罹病球が残って越年しない限り、土壤伝染が本病の伝染環をなすことはほとんどないと考えられ、P. K. SCHENK の私信 (1966) によるとオランダでは土壤伝染はしない由である。

V. 抗血清による診断

ヒヤシンス黄腐病に侵された球根は通常特徴ある黄腐れ症状を生ずるので判定は比較的容易であるが、2次感染による茎葉部の病徴では判定困難なことがある。本病防除のためには2次感染の発病初期に適確な診断を下して措置を構ずる必要があるが、初期病徴の判定は初心者にはとくに困難であり、また開花期以降になるとウイルス病の多発する圃場では本病によるえそ斑点またはえそ条斑がウイルス病による類似症状と見わけのつかない

ことがある。このような難点を補ない、診断の精度を高めるために抗血清の利用を検討した。

1. 抗血清の作製

方法：抗原は *Xanthomonas hyacinthi* PQ-1 菌および PQ-2 菌 (1965年東京都下隔離ヒヤシンスより分離) を用いた。

免疫方法はジャガイモ半合成斜面に 48 時間/25°C 培養した病原菌に生理食塩水 5 ml を加えてつくった懸濁液を家免に、0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 ml の計5回、4~5日おきに耳脈から注射し、最終回の注射から7日後全採血し抗血清を得た。

結果：力価は第6表のとおり PQ-1 菌および PQ-2 菌の両抗血清の力価はともに7,000 倍であった。またスライド凝集反応における反応終末点は第7表のとおり 2,560 倍、肉眼では 640 倍まで凝集を識別することができた。

2. 病源細菌の検出能力

a. 切除病病数とスライド凝集反応

方法： *X. hyacinthi* PQ-1 菌を有傷噴霧接種して発病させたヒヤシンス葉の水浸状斑点を切りとり、スライドグラス上の水マウントのなかですりつぶし、PQ-1 菌抗血清の10倍稀釈液を1~2滴滴下し凝集反応を観察した。

結果：第8表のとおり1マウント当り病斑数2個以上になると肉眼でつねに明瞭な凝集が認められた。病斑1個でも拡大鏡を用いればすべて反応は陽性であった。病斑数が充分に得られない試料の場合はこの方法で検出で

第6表 抗血清の力価(混合法)

抗血清	抗血清希釈倍数											
	10	100	1,000	2,000	3,000	4,000	5,000	6,000	7,000	8,000	9,000	10,000
抗血清 PQ-1	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	+	±	-	-
抗血清 PQ-2	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	+	+	-	-

第7表 スライド法による凝集

抗原	抗血清希釈倍数*										
	10	20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120	
<i>X. hyacinthi</i> PQ-1	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	+	+	-	
<i>X. hyacinthi</i> PQ-2	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	+	+	-	

* 抗血清は PQ-1 菌抗血清

きると考えられる。

b. 単位葉面積当り病斑数とスライド凝集反応

方法：病斑を有する葉片を、水でぬらしてかたくしぼったガーゼに包んでしぼった汁液をフライドグラス上に1~2滴落し、抗血清10倍液を滴下して病斑数と反応との関係を調べた。

結果：第9表のとおり、凝集は病斑数5個以上/10cm²の場合につねに明瞭に出現し、試料が充分ある場合はこ

第8表 切除病斑数とスライド凝集反応

凝集反応	病斑数（1マウント当り）		
	1	2	3
+	7	10	10
±	3*	0	0
-	0	0	0
計	10	10	10

* 拡大鏡ではいずれも（+）である。

の方法で簡便に検出できることが判明した。

c. 病斑の有無とスライド凝集反応

方法：罹病葉を先端から5cmづつ等分し、各部分における病斑の有無、形状、数と凝集との関係を調べた。試料の調製はbに準じた。

結果：代表的な結果の例を示すと第10、11表のとおりである。すなわち水浸状斑点、水浸状条斑のいずれの場合も病斑を含む葉片からは検出され、含まない葉片からは検出されなかった。えそ状に移行した斑点または条斑の場合も、葉のかわりに罹病花茎を用いた場合も結果に差が認められなかった。簡便さを要求される圃場診断においては實際上病斑を数個以上含む葉片をこの方法で判定すればよいと考えられる。

なお、褐色にかわいて枯れ上った罹病葉で病斑を確認できない場合でも、水を加えて搾汁をつくり検定すれば凝集反応が認められた。対照として健全葉の枯死部分あるいは切りとって乾燥したものについて検定した結果は反応陰性であった。なお刈り取って乾燥した罹病葉は3

第9表 単位葉面積当り病斑数とスライド凝集反応

試料番号	病 斑 数（10cm ² 当り）				健 全 葉	
	5	10	20	25		
1	2/6 +	2/5 +	5/5 ++	5/5 ++	5/5 卅	0/5 -
2	6/6 +	2/5 +	5/5 ++	3/5 ++	5/5 卅	0/5 -
3	6/6 ++	4/5 ++	5/5 ++	5/5 ++	5/5 卅	0/5 -
4	6/6 ++	4/5 ++	5/6 ++	5/5 ++	6/6 卅	0/5 -
5	3/6 +	6/6 ++	5/5 ++	5/5 ++	6/6 卅	0/5 -
総合判定	+~++	+~++	++	++	卅	-

表中分母は反応させたマウント数、分母は凝集したマウント数、（+）（-）は凝集程度

第10表 水浸状斑点の有無と凝集反応

葉先からの部位	病 徴	凝 集 反 応	
		5分	15分
10cm	枯死部	5/5 +	5/5 ++
10	病斑10~30個	5/5 +	5/5 ++
10~15	10~30個	5/5 +	5/5 ++
15~20	7~10個	5/5 +	5/5 ++
20~25	なし	0/5 -	0/5 -
25~30	なし	0/5 -	0/5 -

第11表 水浸状条斑の有無と凝集反応

葉先からの部位	病 徴	凝 集 反 応	
		5分	15分
5cm	病徴なし	0/5 -	0/5 -
5~10	枯死部および条斑 2~4本	5/5 +	5/5 ++
10~15	枯死部および条斑 4~7本	5/5 +	5/5 ++
15~20	緑色、条斑 1~3本	0/5 -	0/5 -
20~25	病斑なし	0/5 -	0/5 -
25~30	病斑なし	0/5 -	0/5 -

カ月後でも抗原性を残していた。枯死葉あるいは乾燥葉からの検出は実用上の意義は少ないが、この結果は TIPOGRAF (1941) がジャガイモ輪腐病の血清診断において乾燥した罹病組織からの検出に成功したのと相通するものである。

3. 黄腐病菌の血清学的菌型

およそ抗血清を診断に応用する当って想定される大きな障害は血清学的反応を異にする菌型の自然における存在である。そこで各地から菌株を採集し、PQ-1 抗血清に対する抗原性を調査した。

方法：新潟県産 10 菌株，富山県産 9 菌株，静岡県産 2 菌株，東京都産 1 菌株，京都産 1 菌株，輸入検査で採集した 1 菌株，計 24 菌株を用いた。各菌株のジャガイモ半合成培地斜面の 48 時間/25°C 培養 1 本に生理食塩水 5 ml を加えてつくった懸濁液を抗原とし，混合法に

より PQ-1 抗血清に対する凝集限界および凝集程度を観察した。

結果：第 11 表のとおりである。各菌株はいずれも凝集反応に有意な差異が認められず，抗原性において同型と認められる。この結果から黄腐病菌に血清学的異型の菌系が存在しないと結論することはできないが，抗血清の診断への利用上の障害はないものと推定される。

4. 圃場検査への応用

1966年5月新潟県下ヒヤシンス栽培地全域にわたる本病の発生調査を実施した際，発生を認めた 10 市町村 16 地区の圃場で計 46 点の黄腐病株および類似株を抗血清（スライド法）により検定した結果 43 点は反応陽性で本病と断定することができた。また富山県下 2 市から送付された被害株 12 点もすべて反応陽性であった。

第 11 表 X. hyacinthi PQ-1 菌抗血清に対する分離菌株の反応

X. hyacinthi 菌 株	採 集 地	抗 血 清 希 釈 倍 数								
		100	200	400	800	1,600	3,200	6,400	12,800	
PQ-1	新潟県西蒲原郡黒崎村	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	
-2	東京都西多摩郡瑞穂町	+++	+++	+++	+++	++	++'	-	-	
-3 a	新潟県白根市上八枚	+++	+++	+++	+++	+++'	++	-	-	
-3 b	" "	+++	+++	+++	+++'	++	+	-	-	
-3 c	" "	+++	+++	+++	+++'	++	+	-	-	
-3 d	" "	+++	+++	+++	+++'	++	++'	-	-	
-5 a	" 佐渡郡小木町	+++	+++	+++	+++	+++'	++	-	-	
-5 b	" "	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	
-5 c	" "	+++	+++	+++	+++	+++	++	±	-	
-10	" 白根市笠巻新田	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	
-11	" " 中塩俵	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	
-12	" 西蒲原郡黒崎村立仏	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	
-6 a	富山県黒部市萩生	+++	+++	+++	+++	+++'	+	-	-	
-6 b	" "	+++	+++	+++	+++'	++	+	-	-	
-6 c	" "	+++	+++	+++	+++	+++'	++	±	-	
-6 d	" "	+++	+++	+++	+++'	++	+	-	-	
-7 a	" 水見市加納	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	
-7 b	" "	+++	+++	+++	+++	+++'	+	-	-	
-7 c	" "	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	
-8	" 東砺波郡福野町	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	
-9	" 砺波市南高木	+++	+++	+++	+++	+++'	++	-	-	
-4 a	静岡県浜松市櫛	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	
-4 b	" "	+++	+++	+++	+++	+++'	++	±	-	
-13	京都市与謝郡岩竜町	+++	+++	+++	+++	+++'	++	±	-	
-14	1966年輸入球根(オランダ産)	+++	+++	+++	+++	+++'	++'	±	-	

5. 考 察

植物病原細菌の同定分類に対する血清学的手法の利用は広く行なわれているが、その実用面のひとつである圃場診断への応用に関する報告はかなり限られている。TIPOGRAF (1941) はジャガイモ輪腐病の抗血清による診断がグラム染色法の精度にほぼ近く、迅速で確実な診断法であることを報告した。また抗血清の特異性については罹病株から分離した 60 系統の細菌中 59 系統に対して陰性であり輪腐病菌にのみ反応陽性であった。さらに抗血清により外観健全なジャガイモ株の 22.9% が罹病個体であることを検出し得たと述べている。同じくジャガイモ輪腐病の診断について松瀧ら (1963) は抗血清が病徴発現株の場合はグラム染色とほぼ同じ検出能力を示したが、未発病株ではかなり劣ること、青枯病との判別に有用なこと、菌株によって凝集反応に差があり、抗血清作製のさいに抗原菌の選択に留意する必要があることを報告している。小畑ら (1967) はトマト潰瘍病の診断に抗血清を検討したが、やはり未発病株からの検出はグラム染色法よりはるかに劣る結果であった。

ヒヤシンス黄腐病の診断に対する抗血清利用の試みはこれまでのところ報告がない。本病は球根においては特有の黄腐れ症状を呈するので容易に診断できるが、立毛中の感染によって生ずる初期病徴はややもすれば困難であり、とくに開花期以降になるとウイルス病による類似症状との判別に迷うことが多い。本病には現在有効な薬剤防除法がなく、オランダで行なわれている貯蔵種球の高温処理なども直ちに導入し得ない現状では、なによりもまず圃場発生を早期かつ確実に診断し、適切な措置を構ることによってまん延を防ぐとともに、発生圃場からの種球の使用を避けることによって伝染環を断ち切る努力が必要である。ここに報告した血清診断法は未発病個体の検定には役立たないが、病斑が 1~2 個でもあれば診断可能であり、病斑がさらに多数あれば葉片の搾汁を用いる方法 (小畑, 1966) によって簡便に検定することができる。また調査した範囲では菌株による抗原性の違いも認められず、この点でも安心して使用することができると思われるので、肉眼検査の有力な補助手段として一般の圃場診断あるいは植物検疫における隔離栽培地検査などに大いに利用すべき方法であろう。

VI. 摘 要

1. 1965年5月新潟県西蒲郡黒崎村で発見された在来

ヒヤシンスの黄腐病類似株から *Xanthomonas* 属菌の 1 種を分離し同定を試みた結果、従来国内における発生未記録のヒヤシンス黄腐病 (*Xanthomonas hyacinthi* (HASSE) DOWSON) であることを確認するとともに、感染発病に関与する 2~3 の要因を調べ、さらに本病の圃場診断に対する抗血清の応用を検討した。

2. 本菌はジャガイモ半合成培地上に鮮黄色、円形、光沢のあるもり上ったコロニーを形成し、形態は長い単極毛を有する桿状細菌 (約 $2.0 \times 0.6 \mu$) で、発育温度 $5 \sim 35^{\circ}\text{C}$ 、適温 $25 \sim 30^{\circ}\text{C}$ 、ゼラチン分解 (+)、硝酸還元 (-)、牛乳凝固 (+)、でんぷん分解 (-) であった。

3. ヒヤシンスに対しては強力な病原性を有し、球根に付傷接種するとつねに 100% 近く感染し、無傷のままでも最高 50% 発病し特有の菌腐れ症状を呈する。生育中の茎葉も付傷により 100% 感染し、潜伏期間 7~10 日で水浸状斑点を生じ、しだいに拡大してえそ状の条斑に移行する。病斑の多い場合は葉先や葉縁から黄化し、互いにゆ合して大型のえそ条斑になり、黄褐色を呈して枯れ上る。無傷接種の場合もよく感染するが潜伏期間は長く、症状も軽微である。

4. 球根は植付前の土壌接種により発病するが、病土に連作した場合の発病はみられなかった。病原菌が土壌中で越冬し翌作の発病原因となることはないと考えられる。

5. 茎葉に接種し発病させた株から得た球根を次年度植付けた場合一部に発病を認めた。

6. 抗血清のスライド法による圃場診断への応用を検討した結果、病斑を切りとって検定する場合は 2 個以上、葉片の搾汁を用いた場合は 5 個以上/ 10 cm^2 でつねに明瞭な凝集を認めた。

7. 新潟、富山、静岡、京都、東京の各都府県から採集した黄腐病菌計 24 株は凝集限界に差を認めず、血清学的には同型であった。

8. 新潟県下の発生調査の際、10 市町村 16 地区において計 46 点の黄腐病株または類似株を抗血清を用いて検定した結果 43 点は明瞭な反応を示した。富山県下から送られた被害株計 12 点も抗血清により本病と判定することができた。抗血清による方法は操作も簡便で精度も高く、ヒヤシンス黄腐病の圃場検査において肉眼診断を補う方法としてきわめて有効である。

VII. 引用文献

- ELLIOT, C. (1951) Manual of Bacterial Plant

- Pathogens, Waltham, 117 pp.
- 出田 新 (1909) 日本植物病理学 (上), 東京, 92 pp.
- 石山信一・向 秀夫 (1941) 植物病原細菌誌, 東京, 560 pp.
- 河村貞之助・高橋雄一 (1950) 花の病害虫と防除, 東京, 27 pp.
- 河村貞之助 (1964) 見えざる密航者, 東京, 96 pp.
- 茂木正夫 (1932) ヒヤシンス黄腐病. 実地園芸, **13**: 157~158.
- MOORE, W. C. (1949) Diseases of Bulbs. Ministry of Agriculture and Fisheries, Bulletin No. 117: 1~6.
- 松濤美文・佐々木邦雄 (1963) 圃場検査におけるジャガイモ輪腐病の血清による診断方法. 植防研報, No. 2: 33~40.
- 永田利美 (1966) 新潟県下に発生したヒヤシンス黄腐病. 植物防疫, **20** (4): 173~175.
- 南部信方 (1914) ヒヤシンス黄腐病. 日本園芸雑誌, **29** (10): 16.
- 中田覚五郎 (1930) *Bacterium hyacinthi* の繁殖と副栄養素. 日植病報., **2**: 285.
- 中田覚五郎 (1931) ヒヤシンス黄腐病菌 (*Bacterium hyacinthi*) の繁殖と副栄養素. 日植病報, **2**: 339~349.
- 日本植物病理学会編 (1965) 日本有用植物病名目録 (II). 東京, 145 pp.
- 岡部徳夫 (1949) 植物細菌病学. 東京, 366 pp.
- 小畑琢志 (1966) ヒヤシンス黄腐病とその診断. 横浜植物防疫ニコース, No. 312: 2.
- 小畑琢志 (1966) ヒヤシンス黄腐病とその抗血清による診断について (講要). 日植病報, **32**: 296.
- 小畑琢志・山本洋祐 (1967) トマト潰瘍病の抗血清による診断について. 関東病虫研報., **14** 集: 39.
- 白井光太郎 (1903) 最近植物病理学, 東京, 258 pp.
- STAPP, C. (1961) Bacterial Plant Pathogens. London, 255 pp.
- TIPOGRAF, D. Y. (1941) A rapid method of diagnosing ring rot of potato. C. R. Pan-Sov. V. I. Lenin Acad. agric. Sci., Moscow, **5**: 35~38.
- 横浜税関 (1939) 輸移入植物病菌害虫目録. 横浜, 240 pp.

Summary

Studies on the Hyacinth Yellows and the Use of Antiserum as an Aid to its Diagnosis in the Field

By

Takushi OBATA

Research Division, Yokohama Plant Protection Station

A severe infestation of commercial hyacinth plantings by a yellows-like disease was discovered in Niigata Prefecture in April, 1965 and some affected bulbs were sent to the author for identification. These bulbs showed a stunted growth of leaves and flower stalks with a few water-soaked streaks stretching up from the ground level. The bulbs, when cut open, revealed a soft yellow rot of inner scales. Cut surfaces of leaves and stalks also exposed a yellowish bacterial exudation. Isolation trials from the fresh bacterial ooze frequently yielded a bacterium with round, bright yellow, convex colonies rich in lustre, suggesting strongly of those of the *Xanthomonas* group. The growth temperature of this isolate ranged from 5 to 35°C with the optimum between 25 and 30°C. Other cultural characteristics included positive coagulation of milk, positive decomposition of gelatin, negative reduction of nitrate and negative hydrolysis of starch. The identity of this isolate with the *Xanthomonas* was further confirmed by its morphology of cylindrical cells with rounded ends (ca 2.0×0.6 μ) and with one long polar flagellum.

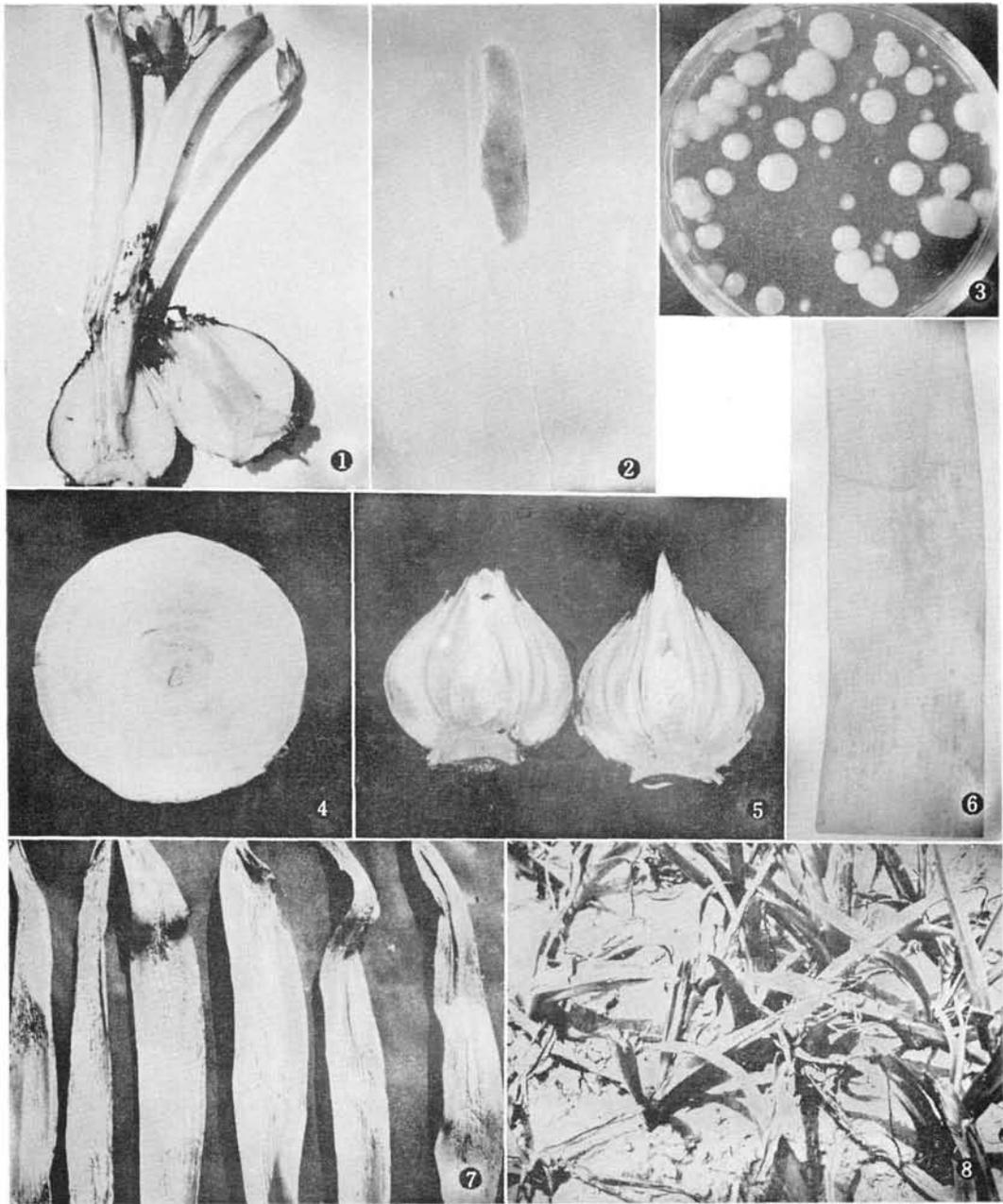
Inoculation experiments have shown that this isolate is highly pathogenic to both lifted bulbs and growing leaves of hyacinth. On the evidence of the cultural characteristics, morphology and pathogenicity, this isolate was determined to be the causal organism of hyacinth yellows, *Xanthomonas hyacinthi* (HASSE) DOWSON. A critical review of the past literature disclosed no valid records of the presence of this disease to any extent in commercial plantings of hyacinth in Japan. The present paper, therefore, is the first account ever to describe its occurrence upon the basis of isolation and identification of the causal bacteria.

In the studies on some factors relating to infection and disease development, wound inoculation of lifted bulbs always resulted in 100% infection and produced yellow rot of inner scales. Inoculated bulbs, when planted, frequently showed no emergence of shoots, meagre or no root development and the eventual complete decay of the whole bulbs. Inoculation of unwounded bulbs also resulted in the maximum infection of 50%. In this case, however, the visible sign of infection did not appear until after the blooming time and the reliable recognition of infection had to be done by dissecting the bulbs upon lifting.

Rubbing inoculation of growing leaves produced numerous water-soaked lesions in 7 to 10 days. These lesions gradually developed into elongated streaks along the veins, turned necrotic at the center and, very often, showed ruptured epidermis. Broad necrotic patches often appeared through the merging of adjoining lesions and, in the course of four weeks, the tip and periphery of affected leaves yellowed and shrivelled and the eventual death of the whole leaves followed. Unwounded inoculation also resulted in 100% infection but required a longer latent period and the resultant symptom was milder.

A low percentage infection of bulbs was obtained by the soil inoculation just prior to the planting. Diseased soil from the previous crop, however, did not induce infection, thus indicating little or no chance of the bacterial survival in any effective concentration to the next crops. Seed bulbs from affected plants, on the other hand, gave rise to the maximum disease development of 30% in the following season and were shown to constitute an important infection cycle of this disease.

An antiserum with a titre of 7,000 was prepared and its possible use as a diagnostic tool for the field inspection was studied. By the slide agglutination test, this antiserum showed a visible reaction with more than two dissected lesions and, when the sap from affected leaves was tested, a consistent positive reaction was obtained with the leaf strip having more than 5/10 cm² lesions. All of the 12 isolates of *X. hyacinthi* from Niigata, 9 from Toyama, 2 from Shizuoka, 1 each from Tokyo and Kyoto and 1 from imported Dutch bulbs were found to be serologically homologous with the antigen source strain. Forty-three out of 46 affected plants representing 16 localities of Niigata Prefecture and all of the 12 plants from 2 localities in Toyama Prefecture reacted positively with this antiserum and thus were identified to be yellows. From the results obtained, there seems to be no serious hazard in the use of antiserum and the method will provide a rapid and accurate detection as an aid to the visual inspection of this disease in hyacinth fields.



1. 種球の罹病による自然発病株，地上部の伸長は止まり葉先は枯れる。球根の中心部および根盤部は腐敗し，黄色粘液が充満している。発根は認めない。
2. 病原細菌の形態（約10,000倍）。
3. 病原細菌の培地上の集落。
4. 接種発病球の横断面，鱗片にそって黄色水浸状のしみが生じる。
5. 接種発病球の縦断面，腐敗は根盤から鱗片にそって上方に進む。
6. 葉の水浸状斑点（接種7～10日後）。
7. 葉の後期病徴，斑点はえそ状になり，葉先や葉縁が枯れる（発病約1ヵ月後）。
8. 新潟県下の激発圃場の発病状況。