

# ジャガイモ黒あし病に関する研究

## I 病原細菌の細菌学的性質\*

川上清隆\*\*・小林敏郎・小畑琢志\*\*

横浜植物防疫所調査課

富永時任\*\*\*

農業技術研究所

### まえがき

1955年頃、北海道標津郡中標津町にジャガイモ黒あし病類似の病害の発生が認められ(成田:1958)、尾崎ら(1968)により本病が *Erwinia atroseptica* もしくは *Erwinia carotovora* に類した細菌によって起ることが予報された。ついで氏は病原細菌の細菌学性質、血清学的性質および生態的性質とくに伝染様式から、病原細菌を *Erwinia atroseptica* (van HALL) JENNISON (*E. carotovora* var. *atroseptica* (van HALL) DYE) と同定し、病名を「黒脚病(Kokkyaku-byō)」とした(谷井ら:1973)。

一方、富永・西山(1970)は同じ地域から採集した黒あし症状株から病原細菌を分離し、その細菌学的性質から *Erwinia aroideae* (TOWNSEND) HOLLANDの1系統であるとして病名を「黒脚病(Kuroashi-byō)」とした。

北海道における本病の発生がさらに拡大しつつある現在、種馬鈴薯検疫上、病原細菌を同定し本病の検査基準および診断法を確立することが重要と考えられた。本試験は1972年、1973年の両年にわたって、北海道の黒あし病株から分離した病原細菌を、イギリスおよびルーマニア産の黒あし病菌 *Erwinia atroseptica* (前者は neo-type culture)、谷井ら、富永らの分離菌および軟腐病菌と共に比較研究した結果をとりまとめたものである。

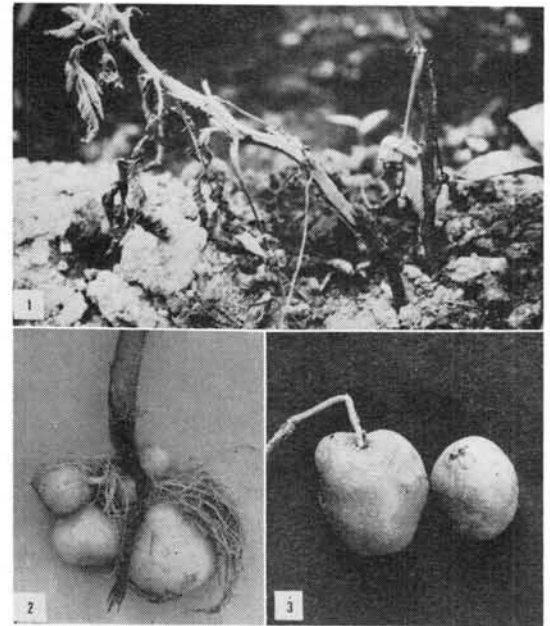
本研究に当たり、貴重な菌株を分譲していただいた Dr. R.A. LELLIOT (National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Harpenden, England)、北海道立十勝農試・谷井昭夫氏、実験上多大の便宜をいただいた当所国際課・松濤美文技官、病害試料の採集に協力いただいた

た当所小樽出張所・南国衛技官および当所千葉出張所・夏井勉技官に深く感謝申し上げる。なお、外国産黒あし病菌は、植物防疫法にもとづく、農林省指令49横植第1815号をもって輸入を許可されたものである。

### 材料および方法

#### 病原細菌の分離

黒あし病症状を示すジャガイモ茎および塊茎(第1図)を表面殺菌するか、または新鮮な病斑部を水洗しそのまま分離材料とした。培地は変法ドリガルスキー培地、一



第1図 ジャガイモ黒あし病の病徴

- (1)圃場における本病の被害株
- (2)ジャガイモ茎の地下部から地際部にかけての黒あし病徴
- (3)子イモの病徴(ストロン着生部の病変)

\*本報告の概要は1970年および1974年度日本植物病理学会で発表した。

\*\*現在 農林省農蚕園芸局植物防疫課

\*\*\*現在 新潟大学農学部

部の材料については同時に0.5%肉汁を加用した Potato semi-synthetic agar (変法P S A) を用いて希釈平板法により行ない、25°Cで3~4日培養後出現したコロニーを変法P S A斜面に移した。

軟腐病細菌として、軟腐症状を示すそ菜などから同様に分離した。

分離細菌は、すべてジャガイモ切片に対して軟腐性を確かめた後以下の試験に供した。

### 接種試験

黒あし病菌と軟腐病菌の病原性の差異を確認するた

め、2区の温度条件下においてジャガイモ茎に対する接種試験を行ない病徴を調べた。供試菌は第1表に示すとおりで、黒あし病株および各種そ菜類などから分離した50菌株、国内外の試験研究機関からの分譲を受けた黒あし病菌と軟腐病菌の5菌株である。接種源は前述の供試菌を変法P S A斜面で培養(25°C・24時間培養。以下全試験を通じ特に記さない限り培養はすべて本方法によった。)した後、1斜面を3mlの殺菌水に懸濁して使用した。接種植物は群馬県産ジャガイモ(品種:農林1号)を25°Cの温室内でポット栽培し、地上部の草丈が約15cmに伸長した時期に供試した。接種は各温度区それぞれ1

第1表 供 試 菌 株

供 試 菌 株	植 物	産 地	年	所 属
黒あし病菌				
<i>Erwinia atroseptica</i> 1449	ジャガイモ	ルーマニア	1962	Lazár
<i>Erwinia atroseptica</i> 549	〃	イギリス	1958	Graham
<i>Erwinia atroseptica</i> P-14	〃	北海道	1966	道立中央農試
<i>Erwinia aroideae</i> C-1-T	〃	〃	1968	農技研
軟腐病菌				
<i>Erwinia aroideae</i> 1-1-7	トマト	栃木	1961	農技研
<i>Erwinia carotovora</i> 1-2-2	ハクサイ	山形	1951	〃
Ca-1-1	ハクサイ	神奈川県	1972	横浜植防
Cr-1-3	ニンジン	〃	1973	〃
Hy-3-1	ヒアシンズ	〃	1972	〃
Rh-1-3	ダイコン	〃	1973	〃
Po-2-4	ジャガイモ	福島	1972	〃
黒あし症状株からの分離菌				
A-2-3 A-3 A-4-3	ジャガイモ	北海道 (小清水町)	1972	横浜植防
C-2-2 C-5-1 C-8-3				
D-3-1 D-5-1 D-6-1				
D-6-3 D-8-2 DR-8-1	〃	(清里町)	〃	〃
D-12 D-13-3 DR-17-1				
D-18-1 D-18-2 D-19-1				
D-20-1 D-20-2 D-21-1				
D-23-1 D-24-1 D-25-1				
E-6-2 ER-10-1	〃	(斜里町)	〃	〃
F-4-1 F-5-1 F-6-3	〃	(弟子屈町)	〃	〃
G-3 G-6-2 G-9-1 G-17-1	〃	(中標津町)	〃	〃
N-1-8 N-3-7-1	〃	(中標津町)	1973	〃
SH-1-1-1 SH-1-2-1 SH-1-4	〃	(土幌町)	〃	〃
SH-1-6-1 SH-2-1 SH-2-2				
SH-2-3-1				
SK-1-1-1 SK-1-4-1	〃	(鹿追町)	〃	〃

菌株につき3茎について行ない、ジャガイモ茎の地際部付近の葉柄下5mmの位置に維管束にとどく深さに注射接種(1カ所に10~15針)した。接種後ジャガイモは25°C区(23~26°C)および17°C区(15~18°C)の2温度条件に区分して、人工気象室中で栽培し7日間発病状態を観察した。

### 細菌学的性質

接種試験の結果、病原性の差によって区分されたI群・II群・III群の細菌学的性質を比較し、各群の同定を試みた。供試菌は第3表に掲げる各性質については各群から抽出したA-3, C-5-1, D-3-1, DR-8-1, D-13-3, ER-10-1, G-3, N-3-7-1, SH-1-4, SK-1-1-1, C-2-2, NCPPB 1449, NCPPB 549 (neotype culture), P-14, C-1-T, A-2-3, D-18-2, N-1-8, SK-1-4-1, Ca-1-1, Cr-1-3, Hy-3-1, Po-2-4, Rh-1-3, E-1-1-7, E-1-2-2の計25菌株を使用し、第4表に掲げる各性質については第1表に示す全55菌株を使用した。

また、実験方法は以下の項目別に記した方法以外はすべてManual of Microbiological Methods (1957)に準じ、ゼラチン溶解性(22°Cで培養)および温度試験以外はすべて25°Cで培養した。

1) 菌体の大きさおよび鞭毛の数：各菌株につき電顕像(2000倍で撮影)50菌体の平均測定値を調べた。

2) Potato plug：高圧滅菌したジャガイモ切片に供試菌を接種し、7日間培養してその生育を観察した。

3) 炭素化合物の利用性：1.5%寒天を含有したSimmonsの合成培地に馬尿酸ナトリウム、マロン酸ナトリウム、酒石酸ナトリウム、ゾルチット、エリスリット、エタノールをそれぞれ0.2%の割合に添加した各培地で14日間培養した。

4) オキシダーゼ活性：1% Tetramethyl-p-phenylenediamineを浸みこませた濾紙に培養菌体を塗りつけ青色の発色を観察した。

5) カタラーゼ活性：斜面培養した新しい菌体を3%の過酸化水素水に入れ、発泡の有無により調べた。

6) ジャガイモ切片の軟腐性：1%アンチホルミンに約2分浸漬後、殺菌水で水洗したジャガイモ切片に供試菌を接種し、25°C・湿室条件で2日間静置し観察した。

7) インドール産生：1%ペプトン水に0.1%の割合でトリプトファンを添加した試験培地で、供試菌を48時間振とう培養し、Ehrlich-Bohme法によりインドール産生能を調べた。

8) 5%食塩耐性：1%ペプトン水に、5%の割合で食塩を添加した培地で供試菌を7日間振とう培養し、菌の増殖を調べた。

9) シュークロースからの還元物質産生：1%ペプトン水に、4%の割合でシュークロースを添加した培地で供試菌を48時間振とう培養後、Benedict試薬1mlを滴下し、1~2分間加熱して呈色反応により調べた。

### 血清試験

黒あし病菌および軟腐病菌の血清学的な関連を明らかにするため、スライド凝集反応および寒天ゲル内拡散法による沈降反応を調べた。抗血清は第6表に示した各菌株の生菌抗原により、アジュバントと静注を併用して家兔を免疫して得た計13種類の生菌抗血清(力価1600~12,800倍)を凝集反応用には10倍希釈し、沈降反応用には原液のまま使用した。供試菌は第1表に示す55菌株で、それぞれ斜面培養した後、1斜面につき3mlの生理食塩水に懸濁したものを生菌抗原とし、同菌液を100°C・10分間加熱処理したものを加熱抗原とした。スライド凝集反応には生菌抗原を、ゲル内拡散反応には加熱抗原を用いた。またゲル内拡散反応は、寒天ゲルを常法により作製し、中央のwellと周囲の6個のwellとの間かくは6mmとし、中央に抗血清を、周囲に各供試菌の抗原を入れて室温下で7日間静置した。

## 結 果

### 接種試験

ポット栽培したジャガイモ茎に各供試菌を接種し、17°Cと25°Cの2温度区における病原性の差異を調べたところ次の2種類の病徴型が観察された。すなわち黒褐色の水浸状病変が接種部位を中心として茎の基部および先端部にかけて広く伸展し、倒伏してしまういわゆる黒あし病徴(第2図)と接種部位が黒褐色で、ときにはその

第2表 接種株の病徴による菌株の類別

温度区	発 現 病 徴*		
	I群	II群	III群
17°C	BL	+	+
25°C	BL	BL	+

\* BL：接種部位を中心として茎の上下に黒褐色の病変が進行し、いわゆる黒あし症状を呈するもの

＋：接種部のみ局部的に黒褐変するが伸展性がなく後に乾燥して治癒するもの



第2図 17°C区における接種茎の病数

- (1) I群菌 (G-3)  
(2) II群菌 (A-2-3)

部分の柔組織が崩壊し茎の髓部まで達する場合が多いが、後に茎の上下へ進行せず治癒してしまうやや乾性の局部的病変を生じるもの(第2図)の2種類であった。

黒あし病微までの病徴進行は、接種後ジャガイモの生育は停止してstunt状となり、接種部は1~2日目まで水浸状となって下葉から萎凋しはじめ、4~5日目には茎の上下方に黒褐色で湿性の病変が伸展し倒伏するものもあり、7日目には完全な黒あし症状となり、その後徐々に乾燥し枯死する。一方、局部的な病変のみに終る症状のものは、接種後1~2日目までは黒あし病徴を示すものと区別ができないが、4日目頃には茎の接種部のみ局部的に褐色ないし黒褐色で水浸状の髓部に達する陥没病変になり、葉も一時的に萎凋しているが、それ以後の病変伸展はなく、7日目には病変部は乾性となり治癒し、その後植物体は生育を続けてゆく。

17°Cと25°Cの両温度区において黒あし病徴を示す菌株をI群、25°Cで黒あし病徴、17°Cで局部的病徴のみ示す菌株をII群、両温度区で局部的病徴のみ示す菌株をIII群とすると(第2表)、黒あし症状株からの分離菌45菌株のうち36菌株がI群、6菌株がII群、2菌株がIII群であった。また分譲を受けた黒あし病菌3菌株はいずれも両温度区で黒あし病徴を示しI群に、各種野菜類の軟腐病菌5菌株はII群に、軟腐病菌E-1-2-2はIII群に属した。

第3表 各群の細菌学的性質(1)

項 目	供試菌株 (I~III群)	Bergey's Manual (1974)	
		var. <i>atroseptica</i>	var. <i>carotovora</i>
菌体の大きさ(μ)	0.5×0.5~4.0	0.5~1.0×1.3~3.0	0.5~1.0×1.3~3.0
鞭毛	周毛(1~6本)	周毛(数本)	周毛(数本)
運動性	+	+	+
グラム染色性	-	-	-
Potato plug	+	•	•
リトマスミルク還元	+	•	•
酸素との関係	通性好気性	通性好気性	通性好気性
ペクチン溶解性	+	+	+
ゼラチン溶解性	+	+	+
硫化水素の産生	±	+	+
硝酸塩の還元	+	+	+
MR試験	+	•	•
V-P反応	-	•	•
O/F試験(グルコース)	F	F <sub>1</sub>	F <sub>1</sub>
最低発育温度(°C)	3	•	•
最高発育温度(°C)	32~35	35	37~40
最適発育温度(°C)	25~27	27~30	27~30
オキシダーゼ活性	-	-	-

カタラーゼ活性	+	+	+
糖・炭素化合物の分解			
グルコース	+	+	+
フラクトース	+	+	+
マンノース	+	+	+
キシロース	+	+	+
シュークローズ	+	+	+
グリセロール	±	-	-
マンニット	+	+	+
馬尿酸塩	-	•	•
マロン酸塩	-	-	-
酒石酸塩	-	-	-
ゾルチット	-	-	-
エリスリット	-	•	•
エタノール*	d	•	•

\* d : 菌株によって異なる反応を示した。

第4表 各群の細菌学的性質(2)

項 目	I群(40)*		II群(12)*		III群(3)*	Bergey's Manual (1974)		
	Ia(35)	Ib(5)	IIa(2)	IIb(10)		var. atro-septica	var. caro-tovora	<i>E. chrys-anthemi</i>
ジャガイモ切片の軟腐性	+	+	+	+	+	+	+	+
インドール産生	-	-	-	-	-	-	-	+
5%食塩耐性	+	+	+	+	+	+	+	-
ラクトース分解利用	+	+	+	+	+	+	+	-
トレハロース	+	+	+	+	+	•	•	•
マルトース	+	+ <sup>(1)</sup> -(5)	+	-	-	+	d	-
α-メチルグルコシド	+	-	+	-	-	+	-	-
シュークローズからの還元物質産生	+ <sup>(34)</sup> -(1)	-	+	+ <sup>(1)</sup> -(9)	-	+	-	d

\* ( ) 内は菌株数

第5表 Ia・Ib・IIa・IIb・III群に所属した菌株

群	菌 株 記 号						
Ia群	A-3	C-5-1	D-3-1	D-6-1	D-6-3	D-8-2	DR-8-1
	D-12	D-13-3	DR-17-1	D-18-1	D-20-1	D-20-2	D-23-1
	D-24-1	ER-10-1	F-4-1	F-5-1	G-3	G-6-2	G-9-1
	G-17-1	SK-1-1-1	SH-1-1-1	SH-1-2-1	SH-1-4	SH-1-6-1	SH-2-1
	SH-2-2	SH-2-3-1	N-3-7-1	1449	549	P-14	C-1-T
Ib群	C-2-2	C-8-3	D-5-1	D-25-1	F-6-3		
IIa群	N-1-8	Rh-1-3					
IIb群	A-2-3	D-18-2	D-21-1	E-6-2	SK-1-4-1	Ca-1-1	Cr-1-3
	Hy-3-1	Po-2-4	E-1-1-7				
III群	A-4-3	D-19-1	E-1-2-2				

## 細菌学的性質

病原性の差によって区分したⅠ・Ⅱ・Ⅲ群の細菌学的性質は第3表と第4表に示すとおりである。第3表に示すエタノール分解能以外の性質および第4表に示した性質のうちジャガイモ切片の軟腐性、ラクトースとトレハロースの分解利用性、インドール産生能、5%食塩耐性の合計37種類の各性質については3群とも全く同一の性質を示し、各群間の違いは認められなかった。つぎに、第4表に示した性質のうちマルトース、 $\alpha$ -メチルグリコシッドの分解利用能およびシュークローズからの還元物質産生についてみると、これらの性質が陽性的ものと陰性的ものとに区分された。これを病原性によって類別した群別にみると第4表・第5表に示すとおりで、Ⅰ群は陽性的の性質を示す菌株(Ⅰa群:35菌株)と陰性菌(Ⅰb群:5菌株)、Ⅱ群は陽性菌(Ⅱa群:2菌株)と陰性菌(Ⅱb群:10菌株)、Ⅲ群はすべて陰性菌(3菌株)であ

った。またヨーロッパおよび国内からの分譲菌の黒あし病菌3菌株はすべてⅠa群に属し軟腐病菌7菌株は陽性のⅡa群に1菌株(Rh-1-3)、陰性のⅡb群、Ⅲ群にそれぞれ5菌株、1菌株が属していた。また、エタノール分解利用能でも菌株により差異がみられたが、Ⅰa、ⅡaおよびⅡb各同一群内にも陰陽それぞれの性質を有する菌株が混っていた。

## 血清試験

1) スライド凝集反応の結果は第6表に示すとおりである。Ⅰa群菌はいずれも7種類のⅠa群抗血清に強く凝集し、Hy-3-1抗血清に不完全に凝集する以外は他群の抗血清に対して全く反応しなかった。またⅠb群菌はⅠb群菌抗血清に強く凝集したが、Ⅰa群、Ⅱa群、Ⅲ群の各抗血清とは全く凝集しなかった。これに対してⅡ・Ⅲ群菌は他群の抗血清と凝集するものも多く、また同一群の

第6表 各群のスライド凝集反応

生菌抗血清*	各群菌抗原				
	Ⅰa群(35)**	Ⅰb群(2)**	Ⅱa群(2)**	Ⅱb群(10)**	Ⅲ群(3)**
E. atroseptica 1449 (Ⅰa)	卅	-	-	卅 (5) - (5)	卅 (2) - (1)
E. atroseptica 549 (Ⅰa)	卅	-	+ (1) - (1)	- (9) + (1)	-
E. atroseptica P-14 (Ⅰa)	卅	-	-	卅 (5) - (5)	卅 (2) - (1)
E. aroideae C-1-T (Ⅰa)	卅	-	-	卅 (7) - (3)	+ (2) - (1)
Isolate D-3-1 (Ⅰa)	卅	-	-	卅 (5) - (4)	卅 (2) - (1)
Isolate D-13-3 (Ⅰa)	卅	-	-	卅 (6) - (4)	卅 (2) - (1)
Isolate A-3 (Ⅰa)	卅	-	+ (1) - (1)	卅 (8) - (2)	卅 (2) - (1)
Isolate C-2-2 (Ⅰb)	-	卅	-	卅 (1) - (1) - (8)	-
E. aroideae E-1-1-7 (Ⅱb)	-	-	+ (1) - (1)	卅 (1) + (4) - (5)	卅 (1) - (2)
Isolate Po-2-4 (Ⅱb)	-	-	-	+ (3) - (7)	-
Isolate Hy-3-1 (Ⅱb)	+	-	+ (1) - (1)	卅 (7) - (3)	卅 (2) + (1)
Isolate A-2-3 (Ⅱb)	-	-	-	卅 (3) + (1) - (6)	+ (1) - (2)
E. carotovora E-1-2-2 (Ⅲ)	-	-	-	+ (3) - (7)	卅 (2) - (1)

\*:( )内は菌株の所属する菌群名

\*\*:( )内は菌株数

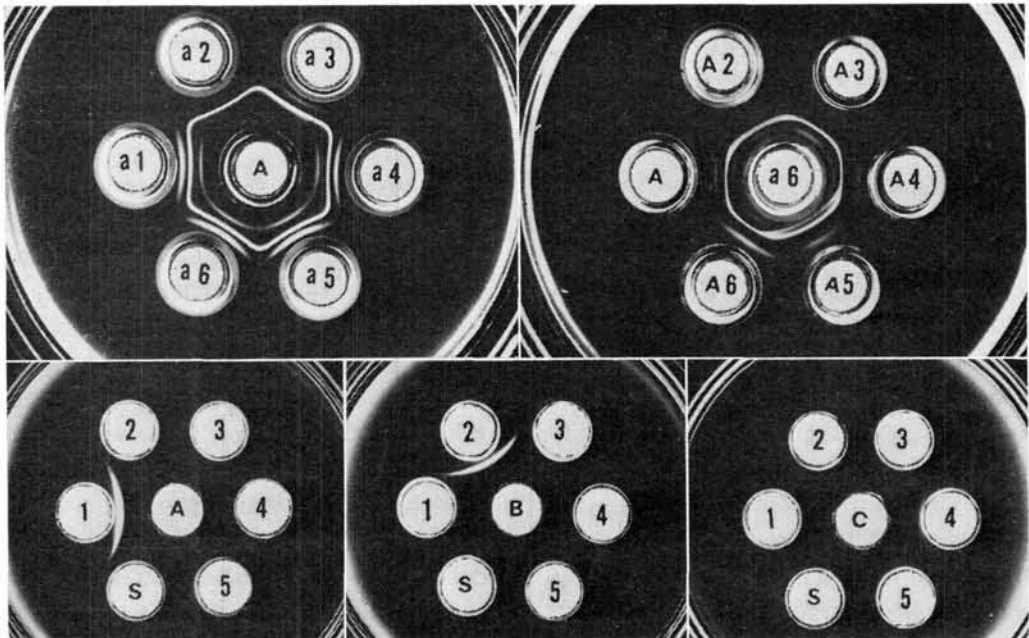
第7表 各群のゲル内拡散反応

生菌抗血清	各群の抗原				
	Ia群(35)*	Ib群(5)*	IIa群(2)*	IIb群(10)*	III群(3)*
<i>E. atroseptica</i> 1449 (Ia)**	A***	—	—	d (6) — (4)	d (2) — (1)
<i>E. atroseptica</i> 549 (Ia)	A	—	—	—	—
<i>E. atroseptica</i> P-14 (Ia)	A	—	d	d (5) — (5)	d
<i>E. aroideae</i> C-1-T (Ia)	A	—	—	d (6) — (4)	d (2) — (1)
Isolate D-3-1 (Ia)	A	d (4) — (1)	d	d (9) — (1)	d (2) — (1)
Isolate D-13-3 (Ia)	A	—	—	d (6) — (4)	d (2) — (1)
Isolate A-3 (Ia)	A	d	d	d	d
Isolate C-2-2 (Ib)	d	B	d	d	d
<i>E. aroideae</i> E-1-1-7 (IIb)	d	d	d	d	d
Isolate Hy-3-1 (IIb)	d	d	d	d (5) — (5)	d
<i>E. carotovora</i> E-1-2-2 (III)	d (10) — (25)	d	d	d	d

\* ( ) 内は菌株数

\*\* ( ) 内は菌株の所属する菌群名

\*\*\* A, BはそれぞれIa群, Ib群の特異的沈降帯, dは非特異的沈降帯



第3図 各群の寒天ゲル内拡散反応

A, A2, A3, A4, A5, A6, B, Cはそれぞれ*E. atroseptica* 1449, *E. atroseptica* 549, *E. atroseptica* P-14, *E. aroideae* C-1-T, Isolate D-3-1, Isolate D-13-3, Isolate C-2-2, *E. aroideae* E-1-1-7の生菌抗血清。a1, a2, a3, a4, a5, a6, 1, 2, 3, 4, 5, はそれぞれ*E. atroseptica* 1449, *E. atroseptica* 549, *E. atroseptica* P-14, *E. aroideae* C-1-T, Isolate D-3-1, Isolate SH-1-4, Isolate D-3-1, Isolate C-2-2, Isolate Rh-1-3, *E. aroideae* E-1-1-7, Isolate A-4-3の加熱菌抗原, Sは生理食塩水

抗血清との凝集反応も整一性がなく、血清的に heterogeneous な系統を含む菌群であった。

2) 寒天ゲル内拡散反応の結果は第7表, 第3図に示すとおりである。Ia群菌, Ib群菌はそれぞれ同一群の抗血清によって血清 well と抗原 well の間の抗原側に寄った位置に鮮明な特異的沈降帯を生じたが, 他群の抗血清との組合せではいずれも特異的沈降帯を生じなかった。これに対して II・III群菌は Ia・Ib 群の抗血清との組合せでは特異的沈降帯を生ぜずまた同一群の抗血清との組合せによっても沈降帯を生ずるものとそうでないものがあった。

以上のことから, Ia群・Ib群はそれぞれ血清学的に整一な菌群であり, II・III群は血清学的には多くのグループを含んだ菌群であった。また各群菌と他群の抗血清との間に, 全群に共通性のある1~数本の弱く不鮮明な沈降反応が生ずる場合があった。

## 考 察

分離菌はグラム陰性, 桿状の周毛細菌でジャガイモ塊茎を腐敗させるので, soft rot coli-form bacteria で *Erwinia* 属菌である。

ジャガイモ黒あし病の病原細菌の種名については, soft rot coli-form bacteria の分類学的位置とともに古くから多くの意見があり, これらに関しては随時総括されている (LEACH: 1930, 後藤: 1956, DOWSON: 1957, GRAHAM: 1964, DYE: 1969, FREDRICKS & METCALF: 1970) が, 近年の主な論議は BURKHOLDER および DOWSON をそれぞれ中心とする2つの主張に分れた (後藤: 1956)。すなわち, 前者の主張は黒あし病原細菌を *Erwinia atroseptica* とし, 黒あし病を生じない軟腐病菌 *Erwinia carotovora* と区別できるとした (BURKHOLDER & SMITH: 1949) のに対し, 後者のそれは *E. carotovora* も黒あし症状を起しうるとし, 両種は互いに別種として区別できないとした (LEACH: 1927, BONDE: 1939, HELLMERS & DOWSON: 1953)。しかし, 最近になって GRAHAM & DOWSON (1960), DYE (1969), GRAHAM (1972) は, 世界各地で分離同定された *Erwinia* 属の植物病原細菌の病原性および細菌学的性質について研究し, *E. atroseptica* と *E. carotovora* の分類基準となる数種類の性質を指摘し, 黒あし病菌を *E. carotovora* の変種として区別した。最近出版された Bergey's Manual の第8版 (1974) でも, 彼らの意見が採用され, 本病原細菌を *E. carotovora* var. *atroseptica* (van HALL) DYE, 軟腐病菌を *E. carotovora* var.

*carotovora* (JONES) DYE と分類しており, 本試験も彼らの分類基準に沿って進めてみた。

GRAHAM & DOWSON (1960) によれば, var. *atroseptica* と var. *carotovora* の病原性の差は温度条件が重要であるとし, 66°F (19°C) 以下の低温区と 76°F (24.5°C) 以上の高温区におけるジャガイモ茎での接種発病を比較すると, var. *atroseptica* は高低両温度区で黒あし症状を示し, var. *carotovora* および var. *chrysanthemi* (Bergey's Manual (1974) では *E. chrysanthemi*) は高温区のみで黒あし症状を示したとしている。この GRAHAM & DOWSON による温度と病原性との関係から判断すると, 本試験の I 群菌は var. *atroseptica*, II 群および III 群菌は var. *carotovora* か *E. chrysanthemi* を主体とした菌群であると考えられる。

黒あし病罹病株からの分離菌は, GRAHAM 説によればすべて I 群に属す菌であるべきにもかかわらず, 今回の分離菌は II, III 群に属するものがあった。細菌学的性質を検討した結果, 第3表, 第4表に示すとおりで, 供試菌株は, 第3表のうちエタノール分解能以外の31種の性質では変異は認められなかった。また, ラクトース, トレハロースの分解能を有し, インドールを産生せず, 5% 食塩耐性を有するところから, DYE (1969), GRAHAM (1972) および Bergey's Manual (1974) によれば, これらの菌株は *carotovora* グループの中の *E. chrysanthemi* ではなく, var. *atroseptica* か var. *carotovora* のいずれかである。

var. *atroseptica* と var. *carotovora* の生理的性質の差についてみると, BURKHOLDER and SMITH (1949) のあげたズルチット, エリスリット, マロン酸塩, 馬尿酸塩およびエタノールの分解利用性については, エタノール (後述) を除き, 他の研究者の追試の結果は両菌種の類別基準としては否定されており, 本研究でも neo-type strain の var. *atroseptica* を含めて供試菌株間に差異がなかった。DYE (1969) は  $\alpha$ -メチルグリコシッドの分解能およびシュエクロースからの還元物質の産生能の差を指摘したほか, 培養的性質の差異として 36°C における生育の有無をあげ, Bergey's Manual (1974) ではこれらの性質を重要な分類基準として採用している。GRAHAM (1972) は 36°C における生育の有無は両者の区別点として変異が多いとして採用しなかったが, 古く DOWSON (1941) などが指摘した, マルトースの分解利用能をとりあげている。供試菌は  $\alpha$ -メチルグリコシッドおよびマルトースの利用能およびシュエクロースからの還元物質産生能で差異がみられ, 病原性で類別した各群のうち, I 群および II 群には, これらの3種類の性質



が陽性のvar. *atroseptica* (Ia, IIa)と陰性のvar. *carotovora* (Ib, IIb)の両変種が存在する。またIII群の2菌株はいずれも陰性のvar. *carotovora*であった。

これらの3種類の生理的性質のほかに供試菌はエタノールの分解利用能でも差異がみられたが、以上の分類による各変種内でも同時に差異がみられたので、この性質は、両変種を区別する性質とはなせず、エタノールの分解能が両変種の類別基準として有効であるとしたBURKHOLDER & SMITH (1949)、谷井ら(1973)の見解とは異なった。また36°Cにおける生育の有無については、供試菌は各群とも生育最高温度は35°Cで、この性質により両変種を区別できるとしたDYE (1969)、Bergey's Manual (1974)の説は再検討を要すると考える。

各群に属する菌株を整理すると第5表のようになる。これによると、Ia群(35菌株)、Ib群(5菌株)の全菌株およびIIa, IIb, III群菌のほぼ半数は黒あし症状のジャガイモから分離されている。このようにジャガイモからの分離菌が各群にわたっていることは、ジャガイモからの分離される菌はほとんどが均一な性質を示したとするGRAHAM (1972)および黒あし病原細菌がかなり均一であるとした谷井ら(1973)とは著しく異なった点である。第5表のうち対照としての軟腐病細菌7菌株を除けば、Ia群の割合は73%で、この中には、var. *atroseptica*のneotype strainであるNCPBP 549とLAZARの分離したNCPBP 1449、谷井ら、富永らの分離菌が含まれているので、北海道では、var. *atroseptica*のneotype strainと全く同一性質の黒あし病菌が主流をなしていることがわかる。Ib菌すなわちvar. *carotovora*が、その割合は10%と低いが分離されたことは興味深い。すなわちGRAHAM and DOWSON (1960)は同菌は高温では黒あし病をおこすが、低温では病原となりえないとしたが、var. *carotovora*にはvar. *atroseptica*同様に高低両温度で典型的黒あし病をひきおこす系統も存在することが明らかとなった。最近、STANGHELLINI & MENELEY (1975)も北米でvar. *carotovora*が高率に黒あし病をひきおこすことを報告し、谷井・赤井(1975)もvar. *carotovora*の1系統による黒あし病の存在を認めている。

さらに血清学的性質についてみた場合、スライド凝集反応および寒天ゲル内沈降反応のいずれによっても、Ia, Ib群菌はそれぞれ特異性の高い整一な反応を示し、まとまりがみられ、血清学的にも互いに異なる系統の黒あし病菌であることがわかった。これに対し、II, III群菌は両血清反応とも整一性がなく、反応域の狭い多くの血清的系統を含んでおり、IaおよびIbとは対照的であった。

これらの結果は、Ibをvar. *carotovora*の、IIaをvar. *atroseptica*のそれぞれ特異な1系統とすれば、*E. atroseptica*の抗原がかなり特異的で均一性が高いのに反し*E. carotovora*および*E. aroideae*が変異に富んでいるとしたLAZAR (1972)の報告と傾向を同じくしている。また、黒あし病菌の同定に抗血清が有効であるとしたNOVAKOVA (1957)、GRAHAM (1963, 1972)、谷井ら(1973)の報告とIa群について一致し、また黒あし病菌にはIb群のようにIa群と違った血清学的性質を有する菌株があることがわかったので、北海道においては、抗血清による黒あし病の診断には、Ia群菌の抗血清のほかにIb群菌の抗血清を使用することが必要となる。なお、ELROD (1941)、岡部・後藤(1956)は軟腐性細菌が血清学的に多くの系統に分かれるが、マルトース分解性の菌群は血清学的にある程度のまとまりがみられることを報告している。彼らの菌株がここでのいずれの変種に属するか不明であり、直接比較はできないが、マルトース分解性を有した菌株(Ia, IIa群)はIIa群の2菌株を除いて血清学的に整一であったのに対し、マルトース非分解性の菌はIb群が整一、IIbおよびIII群が整一性がなく全体としてみれば、血清学的に種々の性質の菌を含んでいたことは興味あることといえる。

Ia群のvar. *atroseptica*およびIb群のvar. *carotovora*による、ジャガイモ茎での黒あし症状については外観上区別できない。谷井ら(1973)はそ菜より分離したvar. *carotovora*は茎接種によって軟腐症状を生ずるとしたが、本試験の結果では、高温条件下ではvar. *atroseptica*の同条件での病徴と変わりなく、低温条件下では局部的に黒褐変するが伸展せず、後に病徴部は治癒した。これは自然発病の黒あし症状とは異なっている。このことはLEACH (1930)、BONDE (1939)、HELLMERS & DOWSON (1957)、岡部・後藤(1955)が、var. *carotovora* (*E. carotovora*)によってもジャガイモ茎に黒変病徴を生ずるとしたことと一致する。本試験において北海道で採集した黒あし症状株からもII・III群に属する菌が分離され少なくとも栽培後期の高温下ではvar. *atroseptica*とIb群菌以外のvar. *carotovora*の混合感染株が存在する。またIb群以外のvar. *carotovora*単独感染によっても茎の地際部より上部に黒あし症状類似株があることが確認されている(川上・小林:1974)。これらは本病の診断に際し問題を生ずる点であるが、両菌種の血清学的性質の相違から判別は可能である(川上・小林:1974)。

## 病名

soft rot coli-form bacteria によるジャガイモ茎の黒変症状に対して、英名では black leg が使用される。本邦では、日本有用植物病名目録 I (1960) および谷井ら (1973) は黒脚病 (Kokkyaku-byō) とし、富永・西山 (1970) は黒脚病 (Kuroashi-byō) を提案していた。最近改訂出版された同目録 I では、黒あし病を採用しているのをこれを使用したい。

## 摘要

北海道におけるジャガイモ黒あし病の病原細菌を明らかにするため、本病被害株からの分離菌 (IS) 45 菌株、国内外の試験研究機関から分譲を受けた neotype culture を含む黒あし病菌 (AT) 3 菌株および野菜類の軟腐病菌 (CA) 7 菌株、計 55 菌株の *Erwinia* 属細菌を供試し、病原性・生理的性質および血清学的性質を試験した。

ジャガイモ茎への接種試験の結果、25°C、17°C の両温度区で黒あし症状を示す群 (I 群)、25°C で黒あし症状を示し 17°C で局所的なえ痘病斑だけを示す群 (II 群)、両温度区で局所的なえ痘病斑だけを示す群 (III 群) の 3 菌群に分かれた。各群について生理的性質を調べた結果、I 群はマルトース、 $\alpha$ -メチルグリコシッドの分解利用能およびシュークローズからの還元物質産生能が陽性の var. *atroseptica* 型の性質を示す Ia 群 35 菌株 (IS=32, AT=3 と陰性の var. *carotovora* 型の性質を示す Ib 群 5 菌株 (IS=5) に、II 群は陽性の II a 群 2 菌株 (IS=1, CA=1) と陰性の II b 群 10 菌株 (IS=5, CA=5) に、III 群はすべて陰性の 3 菌株 (IS=2, CA=1) に区分された。試験したその他 38 種類の性質については、エタノール分解能で若干の変異がみられたほか全菌株が *E. carotovora* グループの var. *atroseptica* と var. *carotovora* に共通の性質を示した。つぎに、各群の生菌抗血清 (13 種類) による試験の結果、Ia と Ib 群はそれぞれ同一群の抗血清に強く凝集反応し、寒天ゲル内拡散反応で特異的沈降帯を生じ、それぞれ整一な特異的抗原性を有したが、II と III 群は反応域が狭く統一性がなかった。

以上のことから Ia, II a 群は *E. carotovora* var. *atroseptica*、Ib, II b, III 群は *E. carotovora* var. *carotovora* と同定された。北海道における本病原細菌には、*E. carotovora* var. *atroseptica* の neotype 菌と同一性質の黒あし病 (Ia 菌型) 菌のほか *E. carotovora* var. *carotovora* (Ib 型菌) 1 の系統とが存在することが判明した。後者は血清学的性質が整一で特異的抗原性をもつ

ことで、そ菜類から分離される同一菌種と区別された。

## 引用文献

- BONDE, R. (1939) Comparative studies of the bacteria associated with potato blackleg and seed piece decay. *Phytopathology* 29: 831-851.
- BUCHANAN, R. E. et al (1974) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- BURKHOLDER, W. H. and W. L. SMITH (1949) *Erwinia atroseptica* (VAN HALL) JENNISON, and *E. carotovora* (JONES) HOLLAND. *Phytopathology* 39: 887-897.
- DOWSON, W. J. (1941) The identification of bacteria commonly causing soft-rot in plants. *Ann. Appl. Biol.* 28: 102.
- DOWSON, W. J. (1957) *Plant diseases due to Bacteria*. 2nd ed. Cambridge University Press, 232 pp. Cambridge.
- DYE, D. W. (1969) A taxonomic study of the genus *Erwinia*. II. The '*carotovora*' group. *N. Z. J. Sci.* 11: 590-607.
- ELROD, R. P. (1941) Serological study of the *Erwiniae*. II. Soft rot group: with some biological considerations. *Bot. Gaz.* 103: 266-279.
- FREDRICKS, A. L. & H. N. METCALF (1970) Potato blackleg disease. 47: 337-343.
- 後藤正夫 (1956) 最近に於ける植物病原細菌の分類について 1 周毛性植物細菌病 日植病報 21: 92-96.
- GRAHAM, D. C. & W. J. DOWSON (1960) The coliform bacteria associated with potato black-leg and other soft rot. *Ann. Appl. Biol.* 48: 51-57.
- GRAHAM, D. C. (1963) Serological diagnosis potato blackleg and tuber soft rot. *Plant Path.* 12: 142-144.
- GRAHAM, D. C. (1964) Taxonomy of the soft rot coliform bacteria. *Ann. Rev. Phytopath.* 2: 13-42.
- GRAHAM, D. C. (1972) Identification of soft rot coliform bacteria. *Proc. Third. Int. Conf. Pl. Path. Bact.*, 273-279 pp. Wageningen.
- HELLMERS, E. and W. J. DOWSON (1953) Further investigations of potato black-leg. *Acta. Agric. Scand.* 3: 103-112.
- 川上清隆・小林敏郎・小畑琢志・富永時任 (1974) 北海

- 道におけるジャガイモ黒脚病について (講要) 日植病報 40 : 201.
- 川上清隆・小林敏郎 (1975) ジャガイモ黒脚病の抗血清による診断 (講要) 日植病報 41 : 120.
- LAZAR, I. (1972) Serological relationships between the 'amylovora', 'carotovora' and 'herbicola' groups of the genus *Erwinia*. Proc. Third. Int. Conf. Pl. Path. Bact., Wageningen. pp. 131-141.
- LEACH, J. G. (1972) The identity of the potato blackleg pathogen. *Phytopathology* 20 : 743-751.
- 成田武四 (1958) 北海道における馬鈴薯の細菌病に関する研究 道立農試報告 8 : 65-66.
- 日本植物病理学会 (1960) 日本有用植物病名目録第1巻 日本植物病理学会, 東京, p. 135.
- 日本植物病理学会 (1975) 日本有用植物病名目録第1巻 (第2版) 日本植物病理学会, 東京, p. 59.
- NOVAKOVA, J. (1957) A new method of isolation of blackleg-pathogens from diseased plants. *Phytopath. Z.* 29 : 72-74.
- 岡部徳夫・後藤和夫 (1955) 日本における細菌病 III. *Pseudomonas* 属細菌による腐敗病について. 静岡大農研報告 5 : 87-95.
- 岡部徳夫・後藤和夫 (1956) 軟腐病菌の系統に関する研究. I. 鞭毛の抗原構造並びにそれらの病原性及び麦芽糖分解能に対する関係. 静岡大農研報告 6 : 16-32.
- 尾崎政春・谷井昭夫・馬場徹代・土屋貞夫 (1968) ジャガイモ黒脚病とその病原細菌 (講要) 日植病報 34 : 362.
- Society of American Bacteriologists (1957) Manual of Microbiological Method. McGraw Hill Book Co. 315 pp, New York.
- STANGHELLINI, M. E. and J. C. MENELEY (1975) Identification of soft-rot *Erwinia* associated with blackleg of potato in Arizona. *Phytopathology* 65 : 86-87.
- 谷井昭夫・尾崎政春・馬場徹代 (1973) ジャガイモの黒脚病 日植病報 39 : 351-360.
- 谷井昭夫・赤井純 (1975) *E. carotovora* var. *carotovora* の1系統によるジャガイモの黒脚病 (講要) 日植病報 31 : 280.
- 富永時任・西山幸二 (1970) ジャガイモ黒脚病 (講要) 日植病報 36 : 337.

## Summary

### Studies on Potato Blackleg Disease

#### I Bacteriological Characteristics of the Causal Organisms

Kiyotaka KAWAKAMI, Toshiro KOBAYASHI and Takushi OBATA

Research Division, Yokohama Plant Protection Station

Tokito TOMINAGA

National Institute of Agricultural Sciences

For the elucidation of bacteriological identity of the causal organism associated with potato blackleg disease in Hokkaido, 45 *Erwinia* isolates (IS) from blackleg potatoes, 3 cultures of blackleg bacteria (AT) provided from other workers in Japan and Europe and 7 isolates of *Erwinia carotovora* (CA) from several other soft rot plants were comparatively tested for their pathogenicity, physiological properties and serological interrelationships.

By inoculation into the stem of growing potato shoots, these isolates were classified into three groups. Group I developed typical blackleg symptoms at both 17°C and 25°C. Group II produced blackleg symptoms at 25°C, but only small necrotic lesions at the site of inoculation at 17°C.

Group III incited only necrotic lesions at both temperatures.

In the physiological studies, each one of the test isolates possessed in common all but three properties, i.e. formation of acid from maltose and  $\alpha$ -methylglucoside and production of reducing substances from sucrose. On the basis of these differential criteria, each one of the test isolates fell into group a which reacted positive or group b which reacted negative. Thus, Group I was divided into subgroup Ia involving 35 isolates (IS 32, AT 3) and Ib involving 5 isolates (IS 5). Group II was separated into subgroup IIa involving 2 isolates (IS 1, CA 1) and IIb involving 10 isolates (IS 5, CA 5). All isolates of Group III reacted negative to these criteria.

In the serological studies, the isolates of subgroup Ia and Ib showed an independently specific reaction within each group in both agglutination and gel-diffusion test. Group II and III were not serologically uniform and involved a number of heterologous strains.

From the results obtained, Subgroups Ia and IIa were identified to be *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* while Subgroup Ib and IIb and Group III were classified as *E. carotova* var. *carotovora*. Subgroup Ib of Group I has consistent capability to produce typical blackleg symptoms. Nonetheless, it may well be included in var. *carotovora* because of its physiological and serological distinction from var. *atroseptica*. Blackleg disease of potatoes in Hokkaido is thus caused by *E. carotovora* var. *atroseptica* and a strain of var. *carotovora*.