

ジャガイモ黒あし病に関する研究

III 黒あし病菌に寄主特異的なファージ*

小林 敏 郎**・川 上 清 隆***

横浜植物防疫所業務部調査課

結 言

ジャガイモ黒あし病の診断に血清学的方法が有効であることは前報で報告した(川上ら, 1977)。従来, 系統も多く, 分類学的に論議の多い soft rot coliform bacteria の同定要素として, ファージは余り重視されていなかったが(GRAHAM, 1964), 本病の診断法として血清学的性質以外に, その簡便なことおよび一般に特異性の高いことから, ファージに対する感受性を利用することは有益なことと考えられる。

そこで, 1973~1974年に北海道における本病発生株から本病原細菌を侵すファージを分離し, その基本的性質, 本病菌の簡易同定法への有用性を検討したので報告する。

本研究に当り, 貴重な菌株を分譲していただいた, 新潟大学 富永時任氏, 岩手大学 津山博之氏, 農業技術研究所 土屋行雄氏, 熱帯農業研究センター 藤井淳氏, 北海道立十勝農業試験場 谷井昭夫氏, ならびにファージ粒子の観察で御協力を賜った横浜植物防疫所 松濤美文, 西尾健の両氏および実験を通じ種々協力を賜った農林省農蚕園芸局植物防疫課 工藤浩平氏に深甚の謝意を表する。

材料および方法

1. ファージの分離 1973 および 74 年に北海道における本病発生圃場から採集した発病茎それぞれ 53 株および 80 株を分離源とした。指示菌は 1973 年の分離時は, 黒あし病原細菌 Ia 型菌 (*Erwinia carotovora* var. *atroseptica*) P-14, N-1-8 の 2 菌株, 1974 年は Ia 型菌 D-3-1 および黒あし病原細菌 Ib 型菌 (*E. carotovora* var. *carotovora* の 1 系統) C-2-2 の 2 菌株をそれぞれ使用した。分離は, 発病茎に変法 PSA (KOBAYASHI

and OBATA, 1974) から寒天を除いた液体培地, 変法 PS3 ml を加えて磨砕し, 汁液を 10,000 rpm, 10 分遠心分離後, 上清にクロロホルム 3 滴を加え攪拌後静置して得た上清 0.1 ml を採取し, プレートして得られた単ブランクからファージを採取増強した。

2. 溶菌斑形成および指示菌用培地は変法 PSA を用い, プレーティングは基層に, 1.5% 寒天変法 PSA, 上層に 0.6% 寒天変法 PSA を使用した重層法によった。指示菌は斜面で 25°C, 1 晩前培養して用い, 溶菌斑形成は, その適温試験以外はすべて 25°C で 24 時間培養とした。

3. 本病原細菌および他の各種植物病原細菌に対する溶菌範囲は, 増強したファージ液を使いドロップ法で行ない溶菌の有無をみた。

4. 溶菌斑形成適温試験は, ファージ液を 0.1 ml プレートし, 15°, 20°, 23°, 25°, 28°, 30°, 35°C の各温度区におけるブランクの数, 大きさ, 透明度を比較した。

5. 物理的諸性質: ファージの不活化温度は, 液体培地に約 10^3 /ml 濃度のファージ液 1 ml 入れた試験管を, 25°, 50°, 52°, 54°, 56°, 58°, 60°, 62°, 64°C の水槽中に各 10 分間保った後, 各 0.1 ml ずつをプレートし, 溶菌斑形成をみた。ファージの pH に対する安定性は, pH 値を 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 に調整した培地各 3 ml に, 約 10^3 /ml 濃度になるようにファージを加え, 25°C で 1 時間振とう後, 0.1 ml をとりプレートした。紫外線感受性試験は, 15 W 殺菌灯下 50 cm の距離に, 約 5×10^3 /ml 濃度になるようにファージを加えた殺菌水 10 ml を含むペトリ皿を置き, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 120, 180 秒間紫外線を照射後, それぞれ 0.1 ml をプレートした。

6. 一段増殖実験は培地 PB (富沢, 1970) を用い, 1 晩同培地で培養した菌を, PB で 100 倍に希釈後さらに 2 時間振とう培養し, 約 10^8 /ml 濃度になるように調整した菌液にファージを吸着させ, 5 分後に 10,000 rpm 5 分間遠心分離, 上清中の遊離ファージ定量後, 再懸濁しその 0.1 ml を培地 9.9 ml を含む希釈管にとった。そ

* 本報告の概要は昭和 50 年度日本植物病理学会大会 (1975) において発表した。

** 現在 横浜植物防疫所業務部国際第二課

*** 現在 農林省農蚕園芸局植物防疫課

の他は ADAMS (1953) によった。

7. ファージ粒子の観察は、増強したファージを液体培地に懸濁し、2% リンタングステン酸でネガティブ染色し、電子顕微鏡で観察し、大きさは各ファージについて、10 個の粒子の平均をとった。

結 果

ファージの分離

指示菌に対する反応の異なる 2 種のファージ AP1 および AP2 が分離された (第 1 表)。AP1 型の溶菌斑を形成し、指示菌に対する反応が同様で AP1 と思われるファージは分離供試茎 133 のうち 40 から分離され、そのほとんどは根釧網地域から採集された茎で、十勝地方から採集した茎からはほとんどファージは分離されなかった。AP2 ファージは 1974 年の供試茎 80 点中ただ 1 例だけから分離された。

溶菌斑の形状およびファージ粒子の形態

第 2 表および第 1 図に示したように、両ファージとも中心部と外周部が透明の 2 重輪状の似た溶菌斑を形成し、粒子の形態も両ファージとも球状であったが、AP1

第 2 表 溶菌斑の形状およびファージ粒子の形態

ファージ	溶 菌 斑		ファージ粒子	
	形態	大 き さ	形態	大 き さ
AP1	2 重輪状	0.8~1.3 mm	球状	75 nm
AP2	2 重輪状	0.8~1.2	球状	65

の方がやや大きかった (第 2 図)。

溶菌斑形成適温

結果は第 3 表に示したように、AP1 は 20~23°C, AP2 は 15~23°C において、溶菌斑形成数が多く、大きさ、鮮明度の点でも良い結果が得られた。

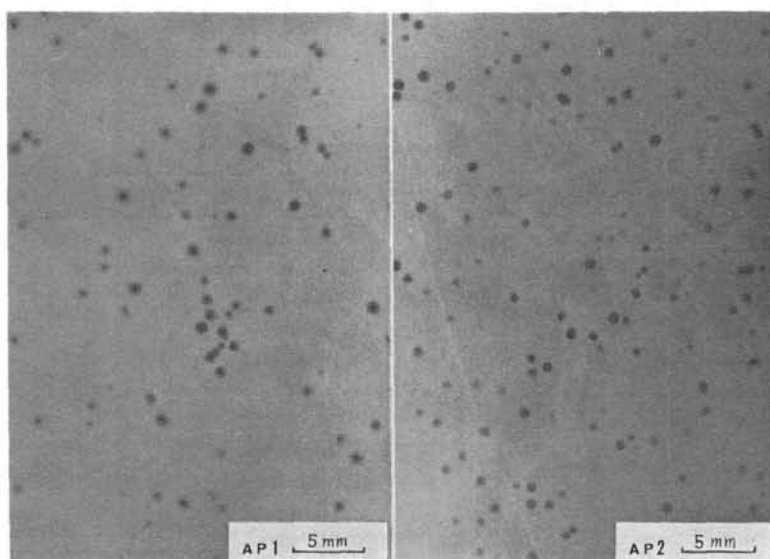
各種植物病原細菌に対する寄生性

第 4 表に示した *Corynebacterium* 属 3 種, *Pseudomonas* 属 8 種, *Xanthomonas* 属 9 種の計 20 種の植物病原細菌に対し、両ファージとも全く寄生しなかった。

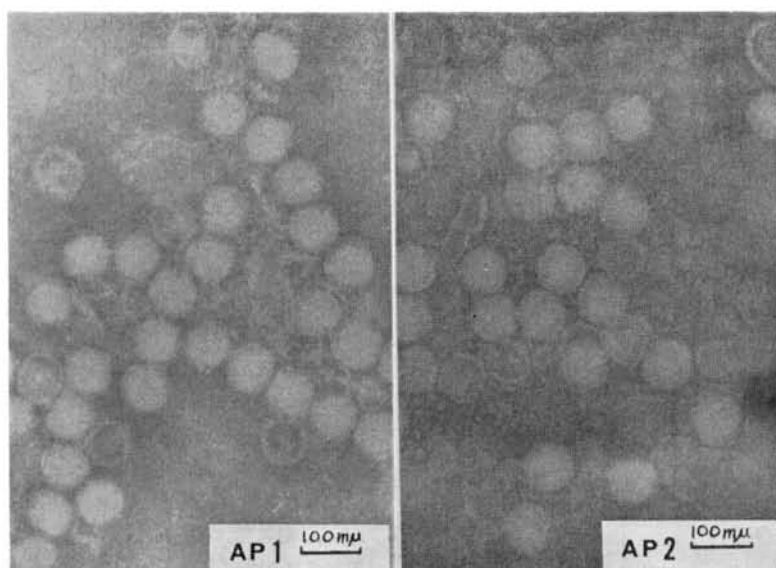
Erwinia 属細菌に対する寄生性は第 5 表に示したが、ファージ AP1 は *E. carotovora* var. *atroseptica* 52 菌株のうち、既報 (川上ら, 1976) で Ia 型とした NCPPB 1449, 549 を含む 17°C 区において黒あし病を発病させる菌株 50 菌株については 90% を溶菌したことになる。AP1 に溶菌されなかった *E. carotovora* var. *atroseptica* 7 菌株のうち 2 菌株は同既報で IIa 型とした菌株で、ジャガイモ発病茎およびダイコンからの分離菌であり、残り 5 菌株はすべて Ia 型菌である。ファージ AP2 は、黒あし病原系の *E. carotovora* var. *carotovora* の菌株を

第 1 表 分離ファージの来歴

ファージ	品 種	採 集 地	分離月日	指示菌
AP1	エニワ	中標津町	1973. 9. 21	P-14
AP2	紅 丸	小清水町	1974. 11. 21	C-2-2



第 1 図 ファージ AP1 および AP2 の溶菌斑



第2図 ファージ AP1 および AP2 の粒子

第3表 AP1・AP2 ファージの溶菌斑形成適温

ファージ		温 度 (°C)						
		15	20	23	25	28	30	35
AP1	溶 菌 斑 数	662	763	715	516	458	66	0
	大 き さ (直径 mm)	1.0	1.2	1.2	0.8	0.2	0.2	0
	鮮 明 度	卅	卅	卅	卅	+	+	—
AP2	溶 菌 斑 数	518	508	435	397	30	2	0
	大 き さ (直径 mm)	1.0	1.0	1.0	0.7	0.2	0.2	0
	鮮 明 度	卅	卅	卅	卅	+	+	—

第4表 各種植物病原細菌に対する寄生性

病 原 細 菌 ^{a)}	AP 1	AP 2	病 原 細 菌 ^{a)}	AP 1	AP 2
<i>Corynebacterium michiganense</i>	—	—	<i>P. solanacearum</i>	—	—
<i>C. sepedonicum</i>	—	—	<i>Xanthomonas phaseoli</i>	—	—
<i>C. oortii</i>	—	—	<i>X. oryzae</i>	—	—
<i>Pseudomonas aptata</i>	—	—	<i>X. pruni</i>	—	—
<i>P. coronafaciens</i>	—	—	<i>X. hyacinthi</i>	—	—
<i>P. caryophylli</i>	—	—	<i>X. campestris</i>	—	—
<i>P. lachrymans</i>	—	—	<i>X. citri</i>	—	—
<i>P. phaseolicola</i>	—	—	<i>X. vesicatoria</i>	—	—
<i>P. mori</i>	—	—	<i>X. translucens</i>	—	—
<i>P. setariae</i>	—	—	<i>X. cucurbitae</i>	—	—

a) 横浜植物防疫所保存菌株

第5表 AP1 および AP2 の黒あし病菌および軟腐病菌に対する溶菌斑菌細^{a)}

細菌	菌株数	溶菌斑菌数	
		AP1	AP2
<i>E. carotovora</i> var. <i>atroseptica</i>	52	45	0
<i>E. carotovora</i> var. <i>carotovora</i> (黒あし病菌系)	8	0	6
<i>E. carotovora</i> var. <i>carotovora</i> (軟腐病菌系)	54	0	0

a) 菌株の来歴

E. carotovora var. *atroseptica*

National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Harpenden, England: 549, 1449.

農業技術研究所：C-1-T.

北海道立中央農業試験場：P-14.

横浜植物防疫所：47 菌株（北海道・ジャガイモから分離），1 菌株（神奈川県・ジャガイモから分離）.

E. carotovora var. *carotovora* (黒あし病菌系)

横浜植物防疫所：8 菌株（北海道・ジャガイモから分離）.

E. carotovora var. *carotovora* (軟腐病菌系)

農業技術研究所：E-1-1-7, E-1-2-2, E7105, E7111, E7115, E7117, E7127, E7143, E7147, E7149, E7154, E7161, E7169, E7182.

岩手大学農学部：ar13, 645ar, H1, T7.

横浜植物防疫所：Al-1-1, Sa-1-1, Hy-3-1, Po-2-4, Ca-1-1, Rh-1-3, Cr-1-3, Ca-2-1, 他の28 菌株（北海道・ジャガイモから分離）.

第6表 AP1, AP2 の温度耐性

ファージ		温度 (°C)							
		25	50	52	54	56	58	60	62
AP 1	溶菌斑数	117	77	70	63	56	46	4	0
	同割合(%)	100	65.4	59.4	53.8	47.9	39.3	3.0	0
AP 2	溶菌斑数	109	79	78	61	9	1	0	0
	同割合(%)	100	72.8	71.9	56.2	8.3	0.9	0	0

第7表 AP 1, AP 2 ファージの pH 感受性

ファージ	pH 域							
	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0
AP 1	2	57	99	107	117	120	129	122
AP 2	4	112	66	128	145	160	119	119

(注) 数値は溶菌斑数

75% 侵し，他のグループには全く寄生しなかった。

ファージの物理的性質

1) 温度耐性について結果を第6表に示した。両ファージとも 50°C 以上で急速に不活化され，AP1 は 62°C,

10 分，AP 2 は 60°C 10 分で完全に不活化された。

2) pH に対する感受性の結果は第7表に示したように両ファージとも比較的アルカリ側で安定性が高く，AP1 は pH 5~10, AP2 は pH 4~10 で安定していた。

第8表 AP1, AP2の紫外線感受性

ファージ		照 射 時 間 (秒)									
		0	10	20	30	40	50	80	120	180	300
AP 1	溶菌斑数	712	222	58	12	7	12	0	0	0	0
	同割合(%)	100	31.1	7.6	1.6	0.9	1.6	0	0	0	0
AP 2	溶菌斑数	514	118	30	12	5	0	0	0	0	0
	同割合(%)	100	22.9	5.7	2.3	0.9	0	0	0	0	0

3) 紫外線に対する感受性は、第8表に示したように両ファージとも同様な傾向を示し、いずれも約30秒の照射ではほとんど不活化され、AP1が80秒、AP2が50秒で完全に不活化された。

一段増殖実験

潜伏期は両ファージとも約80分、上昇期はAP1が40分、AP2が30分で、また平均放出量はAP1が108、AP2が215であった。

考 察

ジャガイモ黒あし病菌に寄生するファージについては、COONS and KOTIRA (1925) の報告および GRAHAM (1964) が掲げているが、ファージの基本的性質については、よく調べられていない。

分離したファージ AP1 および AP2 は、大きさで互いに違いが認められたが、両者とも球状粒子であり、温度耐性、pH 感受性、紫外線感受性においても互いに大きな差異は認められず、培地中または殺菌水中で比較的安定しているといえる。

両ファージの溶菌斑形成適温は 20°C 前後で、寄主細菌の最適発育温度 25~27°C (川上ら, 1976) よりも低い傾向にあり、また蔬菜類軟腐病菌を侵すファージの溶菌斑形成適温 (富樫・鈴木, 1972) よりも若干低めである。

ファージの一段増殖実験から、両ファージの放出量に違いが認められたが、潜伏期は両者とも約80分であり、両ファージは粒子の大きさおよび寄主範囲で互いに異なるほかは、その性質で互いに共通した点が多い。

一般に蔬菜類軟腐病菌に寄生するファージは、溶菌範囲が狭いようである (塩見・藤井, 1972; 富樫・鈴木, 1972) のに比較し、AP1 および AP2 は、他属の植物病原細菌に寄生性がみられず、また供試した蔬菜類軟腐病菌に全く寄生せず、それぞれ NCPPB 1449, 549 を含む黒あし病菌 *E. carotovora* var. *atroseptica* および黒あし病菌系の *E. carotovora* var. *carotovora* を広く侵すところから、本病菌の簡易同定に有効であると考えられ

た。

摘 要

ジャガイモ黒あし病罹病茎からファージ AP1 および AP2 を分離した。AP1 および AP2 は、24 時間培養で大きさがそれぞれ径 0.8~1.3 mm, 0.8~1.2 mm の中心部と外周部が透明の溶菌斑を形成した。溶菌斑形成は AP1 が 20~23°C, AP2 が 15~23°C で、その数、大きさ、透明度の点で良い結果を得た。両ファージ粒子とも球状で、大きさは AP1 が 75 nm, AP2 が 65 nm であった。

AP1 は、NCPPB 1449, 549 菌株を含め、黒あし病原細菌 *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* 52 菌株の 87%, AP2 は *E. c.* var. *carotovora* の黒あし病菌系 8 菌株の 75% を溶菌したほかは、蔬菜類軟腐病菌 *E. c.* var. *carotovora* 54 菌株および *Corynebacterium* 属 3 種、*Pseudomonas* 属 8 種、*Xanthomonas* 属 9 種には全く寄生しなかった。

AP1 および AP2 ファージは、それぞれ 62°C 10 分、60°C 10 分の熱処理、また 80 秒、50 秒の紫外線照射で不活化され、pH に対しては AP1 が pH 5~10, AP2 が pH 4~10 の範囲で比較的安定していた。

AP1 および AP2 の潜伏期は両者とも約 80 分、上昇期はそれぞれ 40 分、30 分、平均放出量はそれぞれ 108, 215 であった。

両ファージはジャガイモ黒あし病菌の簡易同定に有効であると考えられた。

引 用 文 献

- ADAMS, M. H. (1959) Bacteriophages. Interscience Publishers, Inc. New York. 592 pp.
 GRAHAM, D.C. (1964) Taxonomy of the soft rot coliform bacteria. Ann. Rev. Phytopath. 2: 13-42.
 川上清隆・小林敏郎 (1975) ジャガイモ黒脚病菌に寄主特異的なバクテリオファージ (講要) 日植病報 41

- (3): 280-281.
- 川上清隆・小林敏郎・小畑琢志・富永時任 (1976) 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. 植防研報 **13**: 19-30.
- 川上清隆・工藤浩平・小林敏郎 (1977) ジャガイモ黒あし病に関する研究 II. 黒あし病の抗血清による診断. 植防研報 **14**: 24-31.
- KOBAYASHI, T. and T. OBATA (1974) Occurrence of *Corynebacterium oortii* SAALTINK et MAAS GEESTERANUS on tulip in Japan. Res. Bull. Pl. Prot. Japan **12**: 6-15.
- KOONS, G.H. and J.E. KOTILA (1925) The transmissible lytic principle (Bacteriophage) in relation to plant pathogenes. Phytopath. **15**: 357-370.
- 塩見敏樹・藤井 溥 (1972) 野菜軟腐病細菌に寄生するファージについて (講要) 日植病報 **38**(3): 199.
- 富樫二郎・鈴木義久 (1972) 軟腐病菌のファージの分離と 2・3 の性質 (講要) 日植病報 **38**(3): 199.
- 富沢純一 (1970) バクテリオファージの実験. 岩波書店 東京. 200 pp.

SUMMARY

Studies on Potato Blackleg Disease

III Bacteriophages of Blackleg Organisms

Toshiro KOBAYASHI and Kiyotaka KAWAKAMI

Research Division, Yokohama Plant Protection Station

Two bacteriophages designated AP1 and AP2 were isolated from potato stems infected with potato blackleg organisms *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* and a strain of *E. carotovora* var. *carotovora*. Plaques of AP1 and AP2 were 0.8-1.0 mm and 0.8-1.2 mm in diameter respectively after 24 hr incubation, and were both a clear-centered and a clear-margined. The optimum temperature for plaque formation of AP1 and AP2 lay between 20-23°C, 15-23°C respectively.

The particles of phages AP1 and AP2 were found to be both spherical, and 75 nm and 65 nm in diameter respectively.

AP1 was inactivated by heat treatment for 10 min. at 60°C and by ultraviolet irradiation for 80 sec., and most of them kept viable over the range of pH 5-10. The corresponding figures for AP2 were 60°C, 50 sec. and pH 4-10 respectively.

The latent periods of both phages were ca. 80 min., their rise periods AP1: ca. 40 min., AP2: ca. 30 min., and their average burst sizes AP1: ca. 100, AP2: ca. 200 per cell.

Phage AP1 lysed 87% of 52 *E. carotovora* var. *atroseptica* isolates, mostly of Hokkaido origin, including NCPPB 1449 and 549. While phage AP2 lysed 75% of 8 *E. carotovora* var. *carotovora* isolates which were all from Hokkaido and capable of causing potato blackleg disease. However, the both phages did not lyse any of 54 isolates of *E. carotovora* var. *carotovora* capable of causing soft rot, from different localities and various hosts.

Three species of *Corynebacterium*, 8 species of *Pseudomonas* and 9 species of *Xanthomonas* tested were not lysed by the both phages.

These phages were, thus, found to be useful for rapid diagnosis of potato blackleg organisms.