

タマネギ軟腐病細菌の土壤中における 越冬と伝染源としての役割

田中 民夫* 斎藤 泉**

指標菌として用いたタマネギ軟腐病細菌の溶原菌を接種することで発病、まん延した軟腐病罹病株の跡地土壤から同一の溶原菌とみなされる軟腐病細菌が翌年の冬期から春期にかけて連続して分離された。一方、タマネギ移植後2日目に株元土壤に注入した指標菌はその後地下葉鞘・鱗茎部、さらに罹病株からも再分離された。以上の事実に基づき、土壤中でのタマネギ軟腐病細菌の越冬および土壤中の本細菌の伝染源としての役割について論議した。

結 言

多くの野菜などに軟腐病を引き起こす病原細菌 *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* は土壌^{8,10)}、種子⁷⁾、塊茎¹⁰⁾、昆虫^{3,9)}および空中¹¹⁾などのいろいろな分離源から分離される。このうち、土壤中の軟腐病細菌が本病の有力な第1次伝染源の1つであることを示唆する報告がある。すなわち、ジャガイモ軟腐病において、土壤中から分離された軟腐病細菌と同一の血清群に所属する軟腐病細菌が罹病株から分離されること¹⁰⁾、さらに、ハクサイ軟腐病において、は種前に土壤中に埋没された指標菌が罹病株から再分離されること¹⁷⁾である。

ハクサイ軟腐病細菌が土壤中越冬可能なことは前年に畑土壤中に埋没した軟腐病細菌の汚染土から冬期から春期にかけて本菌が再分離されることから明らかにされている⁹⁾。

一方、タマネギ軟腐病では、罹病株が第2次伝染源となり軟腐病がまん延することが明らかにされたが¹³⁾、本病の第1次伝染源について十分に検討されていない。

タマネギ軟腐病細菌の分離菌株の中には、テンペレートファージを生産する菌株（この菌株を溶原菌とよぶ）が存在する¹⁴⁾。しかし、タマネギ軟腐

病細菌の溶原菌は稀にしか存在せず、さらにこの溶原菌が生産するテンペレートファージの宿主域も狭く、特異的であることから¹⁴⁾、溶原菌を指標菌として利用できると思われる。

本報告では、土壤中におけるタマネギ軟腐病細菌の越冬と土壤中の軟腐病細菌の伝染源としての役割について、本細菌の溶原菌を指標菌に用いて検討したので、その結果を報告する。

実験材料および方法

1. 接種病原細菌およびファージの指示菌

接種のための指標菌として軟腐病罹病株由来の *E. carotovora* ssp. *carotovora* の溶原菌 E816 および本菌が生産するテンペレートファージ（以下、ファージと略記）の指示菌として *E. carotovora* ssp. *carotovora* の E8125, E8126, E8127, E8128, E8130, E8131 および E8132 の7菌株を供試した。

2. 土壤中からの軟腐病細菌の分離

北海道常呂郡訓子府町字西富のタマネギ畑 (105 m²) で試験を実施した。1982年7月8日に畦（長さ2.3m, 幅0.3m）のほぼ中央に位置する株を7畦おきにそれぞれ1株ずつ選び、これらの20株のタマネギに溶原菌 E816 を注射接種した。すなわち、1株につき2枚の葉身の中空部に溶原菌の浮遊液 (10⁸/ml) を0.5ml ずつ注入した。その後、接種により発病した株およびその周縁にまん延した軟腐病罹病株の位置を標識した。

1983年1月から時期別に標識地点の土壤を採集

1986年6月30日受理

* 北海道立北見農業試験場（現北海道立道南農業試験場、041-12 亀田郡大野町）

** 同上、099-14 常呂郡訓子府町

し、Meneley ら⁸⁾の変法およびPFD培地¹²⁾を用いて軟腐病細菌を分離した。すなわち、100ml 三角フラスコに土壤8.3gを投入し、殺菌水75mlを加え、よくかくはんした後、さらに Meneley ら⁸⁾に従い可溶性糖類を除去したポリガラクトuron酸ナトリウム塩0.2g、10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.8ml、10% K_2HPO_4 0.8ml および 5% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5ml を添加した。その後、嫌気条件下で25°C、2日間培養し、この培養液の原液および10倍希釈液0.1mlをPFD培地平板に塗布し、さらに嫌気または好気条件下で1～2日間培養した。培養後、培地表面を陥没させた細菌コロニーを解剖顕微鏡下で細いガラス針を用いて釣菌した。この分離菌の単一コロニーを再分離した後、PFD培地に移植し、軟腐病細菌の鑑別に供した¹²⁾。

3. 株元土壤への軟腐病細菌の注入とタマネギ

地下葉鞘・鱗莖部および罹病株からの再分離

1985年5月16日に北海道常呂郡訓子府町字弥生の試験畑2aにタマネギ苗を定植した。5月18日に溶原菌E816の細菌液 ($8.5 \times 10^7/\text{ml}$) 1mlを0.4aのタマネギの株元土壤に注射器で注入した。残り1.6aの畑は非注入区とした。その後、時期別に株を採集して付着土壤を除去し、図1のように地上部および根部を除いた後、葉鞘・鱗莖部を3～10mlの殺菌水で1回洗浄した。この葉鞘・鱗莖部をさらに3～10mlの殺菌水中に投入、かくはん

して洗浄した後、この洗浄液を10倍希釈し、この0.1mlをPFD培地平板に塗布、培養後、前述した方法により軟腐病細菌の分離、鑑別を行なった。また、軟腐病細菌を株元土壤に注入することで発病した株から軟腐病細菌の分離をPFD培地を用いて行なった。

7. 細菌学的性質

前報¹²⁾の方法に準拠した。

8. 溶原菌の検出

土壤・葉鞘・鱗莖部および罹病株から分離した軟腐病細菌が溶原菌であるか否か確認するため、 λ 寒天培地¹⁸⁾平板にそれぞれ穿刺し、20°Cで24時間培養した。その後ペトリ皿を反転し、その蓋にクロロホルムを少量静置し、数10分間殺菌処理した後、ペトリ皿を開放してクロロホルムを除去した。その後、指示菌(E8125, E8126, E8127, E8128, E8130, E8131およびE8132)をそれぞれ添加した λ 上層寒天培地¹⁸⁾約3mlを平板上に重層した。上層寒天培地が固化した後、20°Cで24時間培養し、分離細菌の菌叢の周縁に溶菌斑が形成された場合、その分離細菌を溶原菌と判定した。

結 果

1. 罹病株跡地土壤からの指標菌の再分離

前年の罹病株の跡地土壤から軟腐病細菌を時期別に分離した。1983年1月6日から土壤の採取を開始したが、採取期間中、土壤は完全に凍結していた。ただし、4月20日には、少なくとも土壤採取の対象となる表層土の凍結は融解していた。このような土壤の凍結条件下において、罹病株の跡地土壤から軟腐病細菌が低率(10%)ではあるが連続して分離された(表1)。また、土壤の凍結が融解した4月20日には、30%の分離率で軟腐病細菌が分離された。一方、2月15日には、タマネギ畑の通路の土壤からも軟腐病細菌を分離した。

表1 罹病株跡地土壤からの軟腐病細菌の分離

分離年月日	分離率 ^{a)}	土壤の凍結状況
1983年1月6日	10%	凍 結
1月24日	10	"
2月1日	10	"
3月8日	10	"
4月20日	30	非凍結

a) 土壤10検体あたり

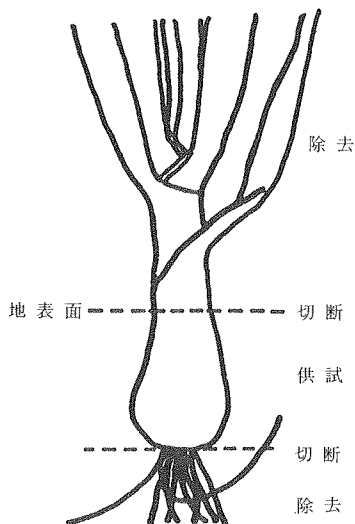


図1 地下葉鞘・鱗莖部の採集部位

接種に用いた指標菌と1月から4月に土壌から分離した軟腐病細菌（表2）の細菌学的性質を比較すると、土壌中から分離した10菌株の中に指標菌と同一の性質を示す5菌株が存在した（表3）。さらに、その5菌株の中の4菌株（S834, S837, S838, S839）は溶原菌であり、これらの溶原菌が生産するファージの宿主域は指標菌のファージと一致した（表4）。すなわち、接種菌が土壌から再分離されたとみなされる。

表2 分離菌の由来

菌株名	分離年月日	分離源
S831	1983年1月6日	罹病株の跡地土壌
S832	"	"
S833	"	"
S834	1月24日	"
S835	2月1日	"
S836	2月15日	通 路
S837	3月8日	罹病株の跡地土壌
S838	4月20日	"
S839	"	"
S8310	"	"

表3 罹病株跡地土壌から分離した軟腐病細菌の諸性質

	分離菌								指標菌
	S831	S834	S835	S836	S837	S838	S839	S8310	E816
分離時期	1.6	1.24	2.1	2.15	3.8	4.20	4.20	4.20	
分離源	D	D	D	R	D	D	D	D	
形態	短桿	短桿	短桿	短桿	短桿	短桿	短桿	短桿	短桿
ペン毛	周毛	周毛	周毛	周毛	周毛	周毛	周毛	周毛	周毛
OF試験	F	F	F	F	F	F	F	F	F
グラム染色	—	—	—	—	—	—	—	—	—
黄色色素	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ゼラチン溶解	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ジャガイモ塊茎腐敗	+	+	+	+	+	+	+	+	+
36℃生育	+	+	+	+	+	+	+	+	+
サッカロースからの還元物質	—	—	+	—	—	—	—	—	—
酸生産									
ラクトース	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α -メチルグルコシド	—	—	—	—	—	—	—	—	—
トレハロース	—	+	+	—	+	+	+	+	+
マルトース	—	—	—	—	—	—	—	—	—

D：罹病株の跡地土壌

R：通路の土壌

表4 土壌から分離した軟腐病細菌の溶菌斑形成スペクトラム

指示菌	分離菌										指標菌
	S831	S832	S833	S834	S835	S836	S837	S838	S839	S8310	E816
E8125	—	—	—	+	—	—	+	+	+	—	+
E8126	—	—	—	+	—	—	+	+	+	—	+
E8127	—	—	—	+	—	—	+	+	+	—	+
E8128	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
E8130	—	—	—	+	—	—	+	+	+	—	+
E8131	—	—	—	+	—	—	+	+	+	—	+
E8132	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

+：溶菌斑形成，—：溶菌斑非形成

2. 地下葉鞘・鱗茎部および罹病株からの指標菌の再分離

軟腐病細菌は冬期の凍結土壌さらに春期のタマネギが定植される以前の畑土壌から分離された。これら土壌中に生息する軟腐病細菌がその後タマネギに定着し、発病を引き起こすことができるか否かを明らかにするために、溶原菌を指標菌としてタマネギ株元土壌に注入した後、地下葉鞘・鱗茎部と罹病株から本菌を時期別に再分離することを試みた。表5に示したとおり、5月および6月

表5 軟腐病細菌の時期別分離

分離月日	軟腐病細菌注入区		軟腐病細菌非注入区	
	タマネギ株数	軟腐病細菌検出株数	タマネギ株数	軟腐病細菌検出株数
5月31日	10	5	—	—
6月4日	—	—	10	0
6月13日	10	4	—	—
6月14日	—	—	10	0
6月24日	—	—	10	0
7月4日	10	0	—	—
7月12日	10	0	—	—
7月17日	10	2	—	—
計	50	11	30	0

注：タマネギの地下葉鞘および鱗茎部から軟腐病細菌を分離した。

に、健全株のほぼ半数から軟腐病細菌が分離された。7月に入り、軟腐病細菌が1時期分離できなかったことがあったが、7月中旬に本細菌を分離した。指標菌を注入しなかった株からは、少なくとも6月下旬まで軟腐病細菌は分離できなかった。地下葉鞘・鱗茎部から分離した81菌株の軟腐

表6 健全株から分離した軟腐病細菌と指標菌の溶菌斑形成スペクトラムの比較

時 期	タマネギ 個体番号	分 離 菌株数	指 標 菌 と 同 じ 溶菌斑形成スペクトラム を示す菌株の数
5月31日	1	7	7
	2	7	7
	3	1	1
	4	8	8
	5	10	10
6月13日	1	7	6
	2	10	9
	3	10	10
	4	8	8
7月17日	1	5	5
	2	8	8
計		81	79

注：タマネギの地下葉鞘・鱗茎部から軟腐病細菌を分離した。

病細菌のうち、79菌株が溶原性を示し、これらの溶原菌が生産するファージの宿主域は指標菌のファージと同一であった(表6)。

一方、指標菌として溶原菌を5月18日に株元土壌に注入した試験区における軟腐病の発生はきわめて少なかったが、7月20日以降に認められた。また、指標菌を注入しなかった試験区においては軟腐病の発生は認められなかった。罹病株から分離した軟腐病細菌の溶原性を検定した結果、分離菌の多くが溶原性を示し、さらにこれらの溶原菌の生産するファージの宿主域は指標菌ファージと同一であった(表7)。

表7 罹病株から分離した軟腐病細菌と指標菌の溶菌斑形成スペクトラム

時 期	病 株 数	軟腐病細菌 検出株数	タ マ ネ ギ 分 個 体 番 号 菌 株 数	指 標 菌 と 同 じ 溶菌斑形成スペクトラム を示す菌株の数
7月20日	2	2	1	20
			2	20
7月25日	2	2	1	20
			2	20
8月16日	8	2	1	0
			2	1
計	12	6	82	81

考 察

タマネギ軟腐病細菌の土壤中における越冬と土壌中の軟腐病細菌が第1次伝染源になり得るかどうかを溶原菌を指標菌に用いて検討した。

タマネギ軟腐病細菌の場合、溶原菌は指標菌としてのきわめてすぐれた特性をもっているように思われる。すなわち、第1に罹病タマネギから分離される溶原菌はきわめて少ないこと、第2に溶原菌が生産するファージの宿主域も狭く、特異的であること、第3に溶原性は遺伝的に安定した性質で、溶原菌自身は自己の生産するファージに免疫性であることである¹⁴⁾。

春期に土壌中から軟腐病細菌が分離できないので、本菌は土壌中で越冬できないのではないかという報告がある^{2,7)}。これらの報告では、軟腐病細菌の分離を選択培地を用いて試みている。しかし、冬期または春期に土壌から軟腐病細菌の分離に成功したという報告をみると、いずれも選択培地だけでなく、Soil enrichment techniqueや増菌法を併用して軟腐病細菌の検出を行なっている^{6,8,10)}。本報告でも、soil enrichment techniqueと軟腐病の診断培地であるPFD培地を併用することで冬期から春期に土壌中から軟腐病細菌を分離できた。Soil enrichment techniqueでは、乾土1 gあたり0.3から1.5細胞の*Erwinia* sp.が存在したときの本菌の回収率は11%とされている⁸⁾。本試験では、軟腐病細菌は罹病株跡地の凍結土壌から連続して分離された。しかし、分離率は10%であったので前述したSoil enrichment techniqueにおける*Erwinia* sp.の菌密度と回収率との関係に基づく、罹病株跡地土壌中で冬期間に生存している軟腐病細菌の菌密度はきわめて低いと考えられる。このようなわずかの軟腐病細菌が土壌のいかなる部位で生存しているかについては現在のところ不明であり、今後、検討を要する問題である。

冬期から春期にかけて、罹病株跡地土壌から分離された軟腐病細菌の中に溶原菌が存在した。これらの溶原菌の細菌学的性質は指標菌のそれと一致し、しかも溶原菌の生産するファージの宿主域も指標菌のファージと同一であった。すなわち、罹病株の跡地土壌から分離した溶原菌は前年接種に用いた指標菌であると考えられる。したがって、生育期にタマネギを発病させた軟腐病細菌は土壌

中で生存し、翌春まで越冬できると考えられる。冬期間、土壌が凍結する地域では、軟腐病細菌は生理的に休止した状態で越冬するのであろう。

菊本らは、軟腐病細菌を接種した土壌で生育したタマネギの根圏およびハクサイ軟腐病常発畑に生育したタマネギの根圏から軟腐病細菌はいずれも検出されなかったと報告している^{4,5)}。しかし、この試験では、指標菌として溶原菌を株元土壌に注入した後、株の地下葉鞘・鱗茎部から軟腐病細菌が時期別に分離された。さらに、指標菌を株元土壌に注入した試験区における罹病株からも軟腐病細菌が分離された。これらの軟腐病細菌の多くは溶原菌であり、しかも溶原菌が生産するファージの宿主域は指標菌のファージと同一であった。したがって、定植数日後に株元土壌に注入した指標菌は、少なくとも7月中旬までタマネギの地下葉鞘・鱗茎部で生存し、さらに本菌がタマネギに軟腐病を引き起こしたことは明らかである。

以上から、前年にタマネギを発病させた軟腐病細菌は土壌中で越冬し、それがタマネギ定植後、再び地下葉鞘・鱗茎部に定着、生存し、軟腐病の伝染源になり得ることが明らかとなった。

謝 辞 本報告のとりまとめに際して北見農業試験場後木利三場長には貴重な御助言と御校閲を賜った。ここに深く感謝の意を表する。

引 用 文 献

- 1) Burr, T. J.; Schroth, M. N. "Occurrence of soft rot *Erwinia* spp. in soil and plant material". *Phytopathology*. 67, 1382-1387 (1977).
- 2) Cuppels, D.; Kelman, A. "Evaluation of selective media for isolation of soft-rot bacteria from soil and plant tissue". *Phytopathology*. 64, 468-475 (1974).
- 3) Graham, D. C.; Quinn, C. E.; Harrison, M. D. "Recurrence of soft rot coliform bacterial infections in potato stem cuttings: an epidemiological study on the central nuclear stock production farm in Scotland 1967-74". *Potato Res.* 19, 3-20 (1976).
- 4) 菊本敏夫, 坂本正幸. "そ業類軟腐病細菌の生態的研究, 第6報 各種植物の生育が導入細菌 *Erwinia aroideae* の生存に及ぼす影響", *日植病報*. 35, 29-35 (1969).
- 5) 菊本敏夫, 坂本正幸. "そ業類軟腐病細菌の生態的研究, 第7報 作物および雑草根圏における軟腐

- 病細菌の増殖”。日植病報, **35**, 36-40 (1969).
- 6) 菊本敏夫, 坂本正幸, “そ菜類軟腐病細菌の生態的研究, (12) 深さを変えて畑土壌に埋没した *Erwinia aroideae* の生存”, 東北大農研報, **23**, 159-172 (1972).
 - 7) McIntyre, J. L.; Sands, D. C.; Taylor, G. S. “Overwintering, seed disinfestation, and pathogenicity studies of the tobacco hollow stalk pathogen, *Erwinia carotovora* var. *carotovora*”. Phytopathology, **68**, 435-440 (1978).
 - 8) Meneley, J.C.; Stanghellini, M.E. “Isolation of soft-rot *Erwinia* spp. from agricultural soils using an enrichment technique”. Phytopathology, **66**, 367-370 (1976).
 - 9) Phillips, J. A.; Kelman, A. “Direct fluorescent antibody stain procedure applied to insect transmission of *Erwinia carotovora*”. Phytopathology, **72**, 898-901 (1982).
 - 10) Powelson, M. L.; Apple, J. D. “Soil and seed tubers as sources of inoculum of *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* for stem soft rot of potatoes”. Phytopathology, **74**, 429-432 (1984).
 - 11) Quinn, C. E.; Sells, I.A.; Graham, D.C. “Soft rot *Erwinia* bacteria in the atmospheric bacterial aerosol”. J. Appl. Bacteriol., **49**, 175-181 (1980).
 - 12) 田中民夫, 坪木和男, “タマネギ軟腐病のペクチン質含有培地を用いた簡易診断”, 北海道立農試集報, **48**, 32-39 (1982).
 - 13) 田中民夫, 斎藤 泉, “ほ場におけるタマネギ軟腐病のまん延機作”, 北海道立農試集報, **53**, 61-66 (1985).
 - 14) 田中民夫, 未発表.
 - 15) 富樫二郎, “ファージによる土壌中の軟腐病菌の検出法”, 山形大学紀要 (農学), **7**, 31-50 (1976).
 - 16) Togashi, J. “Studies on relationship between varietal difference of chinese cabbage in resistance to the soft rot disease and growth of the causal organism (*Erwinia carotovora*) in rhizosphere soils”. Bull. Yamagata Univ., Agri. Sci., **8**, 657-663 (1981).
 - 17) 富樫二郎, “ハクサイ根圏土壌における軟腐病菌系統間の増殖の差異”, 山形大学紀要 (農学), **9**, 127-135 (1983).
 - 18) 富沢純一, “バクテリオファージの実験”, 岩波書店, 東京, 1970, 189p.

Survival of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* in Onion Field Soil during Winter and the Role as a Primary Inoculum of the Survived Bacteria

Tamio TANAKA* and Izumi SAITO**

Summary

During the period from January to April 1983, the lysogenic bacteria of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* were isolated from several soil samples from standing points of onion plants which had been infested with a lysogenic bacterium of *E. carotovora* ssp. *carotovora* used as a mark bacterium during summer of 1982. The bacteriological properties of these isolated lysogenic bacteria coincided with those of the mark bacterium, and the host ranges of temperate phages from the lysogenic bacteria were identical with that of a phage from the mark bacterium. When the cell suspensions of the mark bacterium were poured into the soils at the base of onion plants 2 days after transplanting at 16 May 1985, the lysogenic bacteria were reisolated from the healthy underground sheaths and bulbs during the period from May to July 1985, and finally from the diseased onion plants. The host ranges of temperate phages from these lysogenic bacteria were identical with that of a phage from the mark bacterium. On the basis of these results, it was suggested that *E. carotovora* ssp. *carotovora* was able to survive in onion field soil during winter and the survived bacteria had the role as a primary inoculum for incidence of bacterial soft rot of onions.

*Hokkaido Prefectural Dounan Agricultural Experiment Station, Oono, Hokkaido, 041-12, Japan

**Hokkaido Prefectural Kitami Agricultural Experiment Station, Kunneppu, Hokkaido, 099-14, Japan