北海道立農試集報　43, 42−51 (1980)

ファージ法によるイネ葉鞘褐変病菌 (*Pseudomonas fuscovaginae* A. Tanii, K. Miyaijma et T. Akita) の生態

宮島邦之*

Ecological Study of *Pseudomonas fuscovaginae*, the Causal Bacterium of Sheath Brown Rot of Rice, by the Phage Method

Kuniyuki MIYAJIMA

東北地方および北海道で分離した葉鞘褐変病菌92菌株は本病原細菌の3系統のファージに対する感受性によって4群のLysotypeに類別され，そのなかでA群は地域分布が広かった。このA群に寄生性のあるFP1(P1)ファージを用いて本病原細菌の検出法とその応用を試みた。本病原細菌がペプトン培地中で他の細菌数と混在する場合に，ファージの増殖は雑菌数が多いほど抑制される傾向にあるが，病菌類が10/mlまたは10^2/mlあれば雑菌数が10^5/mlレベルであってもファージは24時間後には10^5/mlおよび10^7/mlまで増殖した。このファージ法によって，人為接種・自然感染したイネおよび畦畔雑草などでの本病原細菌の動向を検定した結果，本病原細菌は外観健全な分けつ期・減数分裂期のイネやヌカボ，ケンタッキーブルーグラスから検出された。したがって本病原細菌は外観健全なイネで腐生的な着生菌として生存し，穂孕期に達したときに寄生菌として増殖発病すると考えられた。

I　緒　　言

イネ葉鞘褐変病の発生は同一品種または同一地域であっても発生が年毎に激しく変る傾向にあり，その発生要因などは一部明らかになった[5]が，病原細菌の動向についてはまだ不明な点が多く，その一つの理由として細菌検出法の不備があげられる。従来本菌の検出には希釈平板法[6]や感受性植物に対する接種検定法[1]が用いられてきたが，その検出限界や特異性を高めることが望まれている。

多種類の微生物と混在する細菌を検出する方法として特異性の高いファージ[3,8,9]を用いる方法があり，インゲンかさ枯病[4]やイネ白葉枯病[2,12]などでは病原細菌の検定や定量にその有用性が認められている。

筆者はイネ葉鞘褐変病菌のファージを用い，野外圃場に存在する病原細菌の検出を試み，本病の生態を明らかにしようとした。

本研究を行うにあたり多大の便宜をいただいた元北海道立上川農業試験場森哲郎場長，元同農試井上寿病虫予察科長，同農試土屋貞夫病虫予察科長に厚く御礼申し上げる。また本稿をまとめるにあたり御助言を賜った道立北見農試坪木和男病虫予察科長，同農試馬場徹代場長に感謝の意を表する。

II　実験材料および方法

1．供試ファージおよび細菌　罹病止葉葉鞘，腐

1979年11月20日受理

* 北海道立上川農業試験場（現北海道立北見農業試験場，099-14　常呂郡訓子府町）

敗苗および被害種籾から分離した15株のファージは，それぞれの指示菌に対する寄生性によって3系統[7]に類別され，それぞれをFP1, FP2, FP3と命名した。実験にはFP1はP1, FP2はP33, FP3はP51ファージを用いた。本病原細菌は東北地方および北海道の被害イネから分離した92菌株を用いた（Table 1）。

Table 1. Sources of *P. fuscovaginae* isolates

Diseased materials	Number of isolates	Locality	Rice caltivar	Date of isolation
Flag leafsheath	1	Asahikawa	Nōrin-33	1968, 7
	5	〃	Sōhōmochi	1976, 8
	9	〃	Ishikari	〃
	10	Shibetu	〃	〃
	5	Kuroishi	————	1976, 9
	6	Nishikawa	————	〃
Seedling	6	Asahikawa	Ishikari	1976, 6
	7	Takasu	〃	〃
	17	Furano	————	1976, 7
	16	Otofuke	Ishikari	1976, 6
Seed	1	Asahikawa	Ishikari	1976, 5
	3	〃	Yūkara	〃
	3	〃	Eikou	〃
	3	〃	Sasahonami	〃

2．ファージの寄生性および定量法　培地は富沢[10]のペプトン培地（PB)(ポリペプトン10g, グルコース1g, NaCl 3g, $CaCl_2$ 0.1M 1ml, $MgCl_2$ 0.1M 10ml, KH_2PO_4 0.1M 3.2ml pH7.2)，ペプトン寒天培地（1%寒天含有ペプトン培地), ペプトン上層寒天培地(ポリプトン10g, NaCl 5g, 寒天5g, H_2O 1,000ml, pH 7.2）を用いた。FP1，FP2, FP3ファージの寄生性はペトリ皿に予め流し込んで固めておいたペプトン寒天培地上で，指示菌液（$10^{8\sim9}$/ml) 0.1 ml，ファージ液（$10^{3\sim4}$/ml)0.1 mlおよび45Cのペプトン上層寒天培地2.5mlを混和重層して25Cで20時間培養した（以下平板法と呼ぶ)。

定量は指示菌には葉鞘褐変病菌7601菌株，ファージはFP1 (Pl)を用い，細断した試料を含む一定量のペプトン培地に$10^{1\sim4}$/mlのファージ液を添加し，25Cで20～24時間振とう培養してから平板法によって溶菌斑数を計測した（以下ファージ法と呼ぶ)。

3．供試材料 (1) 本病原細菌の越冬調査には前年度（1976年）罹病した株の種籾，わらをそれぞれ30粒，5g用いた。

(2) 葉鞘褐変病菌7601菌株の細菌浮游液（$10^{6\sim8}$/ml)を生育ステージを異にしたイネに噴霧接種し，2日間湿室に保ったのち，温室内で栽培した。検出は径時的に葉身，葉鞘に分けて切り取り，細断してからペプトン培地に加え，前記のファージ法によって定量した。イネは品種「イシカリ」を用い，1/5,000aポット(N, P_2O_5, K_2O 各1g 施肥）の殺菌土に20粒播種し冬期に温室内で栽培した。

(3) 水田のイネは10～30個体の茎葉を細断して用いた。雑草はファージ検出に用いた水田の畦畔に自生しているものを供試し検出に用いた。

(4) 発病調査　病株率は100株，病茎率は全接種茎について調査した。

上記以外の方法はその都度記述する。

Ⅲ 実験結果

1．ファージによる葉鞘褐変病菌の類別とその分布

7市町村から採取した被害イネの止葉葉鞘，腐敗苗，種籾から分離した葉鞘褐変病菌92菌株は，3系統のFP1，FP2，FP3ファージによる寄生性によって4群に分けられ，Lysotype A, B, C, Dと命名した。すなわち，A群はFP1にのみ感受性であってFP2，FP3には抵抗性であった。

分離源は止葉葉鞘と腐敗苗であって供試菌株数の46%を占めていた。B群はFP2にのみ感受性であり，腐敗苗のみから分離された。C群はFP3にのみ感受性であり種籾だけから分離された。D群はいずれのファージにも抵抗性であって，止葉葉鞘，腐敗苗，種籾から分離された(Table 2)。これらのLysotype 4 群の地帯分布についてみるとA群は6市町村に，B，C，D群はそれぞれ4，1，4市町村に分布していた (Table 3)。

Table 2. Classification of the bacterial isolates according to their sensitivity to the phages.

Lysotype	Reaction to phage strains			Number of bacterial isolates under each lysotype
	FP1	FP2	FP3	
A	+	−	−	42 (seedling-10, flag leafsheath-32)
B	−	+	−	24 (seedling-24)
C	−	−	+	9 (seed-9)
D	−	−	−	17 (seed-1, flag leafsheath-4, seedling-12)
Total				92

Table 3. Locality in distribution of *P. fuscovaginae* strains.

Locality	Lysotype				Total
	A	B	C	D	
Asahikawa	14	4	9	4	31
Shibetu	10	0	0	0	10
Furano	9	3	0	5	17
Otofuke	0	11	0	5	16
Takasu	1	6	0	0	7
Kuroishi	2	0	0	3	5
Nishikawa	6	0	0	0	6

Figures show the number of isolates under each lysotype

2．純粋培養および他の細菌類と混在する系でのファージ・細菌の増殖

葉鞘褐変病菌がそれぞれ10^2，10^3，10^4/ml入っているペプトン培地にFP1 (Pl)-ファージを9.2×10^2/mlになるように添加して25Cで振とう培養し，その後の両者の増殖を平板法で定量したところ，初期細菌数が10^2/mlでは13時間後，10^3/mlでは9時間後，10^4/mlでは6時間後に細菌増殖数がそれぞれ10^5/mlに達した。ファージはこの時期になってはじめて増殖が始まり，細菌数が10^4/ml以下の間は10^3/ml以下でとどまっていた。20時間後にはいずれの細菌添加区でもファージ数は10^9/mlに達した (Fig. 1)。

次に他の細菌類と混在する場合のファージの増殖を検討するため，分けつ期のイネ体表面洗浄液

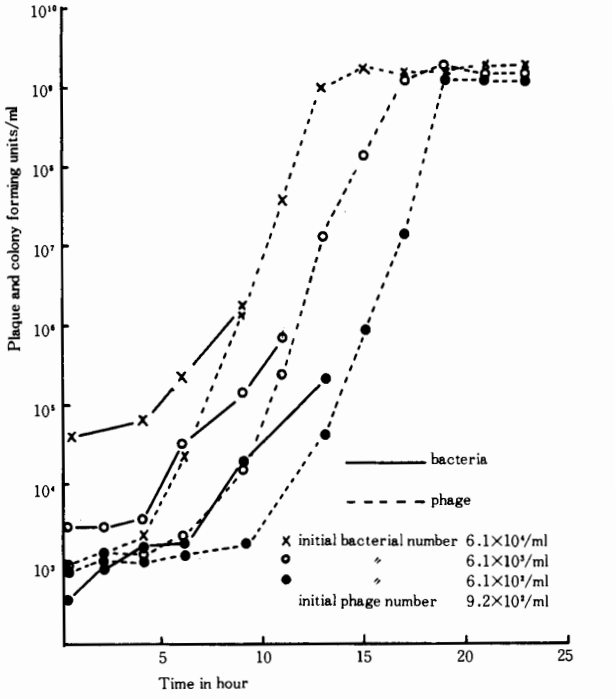

Fig. 1 Growth of *P. fuscovaginae* (isolate 7601) and its phage (P 1)

をペプトン培地で10倍段階に希釈し，雑菌原液とした。これらに0.7～7×10^5/mlの7段階になるように葉鞘褐変病菌を加えて良く混合したのち，これらのすべてに一定量のファージを加えて25Cで振とう培養した。24時間後にクロロホルム0.5mlを試料5mlに加えて強振したのち数分間静置した。クロロホルムが沈んだのち，水層をファージ液として定量した。

本病原細菌数が7/mlの場合には，雑菌を含まないときファージ数は24時間後には10^7/mlにまで

増殖したが，雑菌が10^5/ml混在しているときにはファージ数は10^2/mlと少くなった。病菌数が7×10/mlの場合で雑菌数が0，10^5/mlのときにはファージ数は10^6/ml, 10^5/mlまで増殖した(Table 4)。

Table 4. Phage propagation in the open system with the different population of the saprophytes and *P. fuscovaginae*.

Number of saprophytes	Time in hour	Initial cell number of *P. fuscovaginae*/ml							Phage control
		0.7	7.0	7.0×10	7.0×10²	7.0×10³	7.0×10⁴	7.0×10⁵	
0(ml)	0	5.3×10²	5.5×10²	9.0×10²	8.0×10²	6.9×10²	8.2×10²	6.9×10²	6.9×10²
	24	2.1×10⁵	1.5×10⁷	6.0×10⁶	4.0×10⁸	1.3×10⁹	1.8×10⁹	4.2×10⁸	6.9×10²
6.8×10	0	6.9×10²	4.7×10²	9.1×10²	6.6×10²	6.8×10²	7.2×10²	6.2×10²	
	24	4.0×10⁴	7.0×10⁶	1.0×10⁸	1.2×10⁹	2.8×10⁹	2.0×10⁹	1.1×10⁹	
6.8×10²	0	5.3×10²	6.5×10²	5.6×10²	6.9×10²	5.5×10²	7.3×10²	6.3×10²	
	24	4.7×10²	6.0×10⁵	1.7×10⁷	1.1×10⁹	1.7×10⁹	2.7×10⁹	2.9×10⁹	
6.8×10³	0	3.6×10²	7.4×10²	7.3×10²	7.9×10²	5.2×10²	8.0×10²	7.8×10²	
	24	5.2×10²	8.1×10⁴	2.5×10⁵	7.3×10⁷	3.3×10⁸	3.8×10⁸	5.3×10⁸	
6.8×10⁵	0	4.7×10²	6.9×10²	9.8×10²	3.5×10²	3.3×10²	6.1×10²	6.5×10²	
	24	1.8×10²	8.0×10²	2.7×10⁵	2.6×10⁷	8.4×10⁷	3.6×10⁸	3.9×10⁸	

3．越冬した種籾およびわらでのファージの増殖

1年間屋内に放置した種籾，わらでのファージの増殖を検討した。イネはFP 1 (Pl)ファージを分離した同一圃場産の「イシカリ」を用いた。それぞれの種籾，わらをファージ液と一緒にペプトン培地に添加し25℃24時間振とう培養した。一方，被害籾の一部はペプトン培地に加えたのち115℃で3分間加熱処理を行い，放冷後ファージ液を添加した。

被害籾，わらではファージ数は$10^{7\sim8}$/mlまで増殖したが，健全籾，加熱処理した籾では増殖しなかった（Table 5）。

Table 5. Overwintering of *P. fuscovaginae* in infected rice plants kept indoor (1977).

Date of isolation	Materials	Time in hour	Plaque forming units /ml
June 17	Infected grains	0	2.5 × 10²
		24	8.9 × 10⁷
June 17	Infected grains heated at 115℃-3 min	0	3.7 × 10²
		24	2.0 × 10²
June 17	Healthy grains	0	2.2 × 10²
		24	1.0 × 10²
June 25	Infected leafsheathes	0	1.5 × 10⁴
		24	1.0 × 10⁸

4．人為接種したイネ体での葉鞘褐変病菌の生存

本病原細菌浮游液（$10^{6\sim8}$/ml）を種籾，分けつ期，減数分裂期のイネに浸漬または噴霧接種してその後の生存をファージ法によって検討した。接種後16日間異なる温度条件下で育苗したイネでのファージの増殖を検討した結果，12～25℃で育苗した苗ではファージは増殖した。しかし28℃で育成した苗ではファージは11日まで増殖し，16日後には増殖しなかった（Table 6－1）。5葉令期に接種したとき，18日後に下位葉身で，72日後穂孕期に上位葉鞘でファージの増殖があった（Table 6－2）。7葉令期に接種した場合，34日後までファージの増殖はあったが，45～50日後穂孕期にはいずれの部位でも増殖しなかった(Table 6—3)。

減数分裂期接種では16日間葉身，葉鞘でファージの増殖が認められた（Table 6－4）。

分けつ期，減数分裂期に接種したイネが穂揃期になったときの発病は，5葉令期接種イネは病茎率が15%，7葉令期は0%，減数分裂期は5%であった。

Table 6-1. Detection *P. fuscovaginae* from healthy seedlings immersion inoculated at seeds.

Temperature (℃)	Time in hour	Plaque forming unitng units/ml 6	11	16 (days)	Diseased plant (%)
12	0	5.4×10^{2}	0×10	1.2×10^{2}	0
	24	1.4×10^{6}	1.3×10^{6}	2.2×10^{6}	
20	0	3.6×10^{2}	0×10	8×10	0
	24	2.3×10^{3}	1.6×10^{3}	6.5×10^{4}	
25	0	4.3×10^{2}	5×10	6×10	0
	24	3.0×10^{3}	2.1×10^{3}	1.2×10^{3}	
28	0	6.0×10^{2}	3.1×10^{2}	1.9×10^{2}	0
	24	1.2×10^{6}	5.7×10^{4}	7.0×10^{2}	

Table 6-2. Detection of *P. fuscovaginae* from healthy rice plants spray inoculated at 5 leaves age.

Days after inoculation	Time in hour	Plaque forming units /ml ULB	LLB	ULS	LLS*	Diseased plant (%)
0	0	6×10	1.7×10^{2}	1.1×10^{2}	8×10	0
	24	3.1×10^{6}	1.4×10^{6}	4.1×10^{2}	5.0×10^{5}	
3	0	4×10	4×10	1.0×10^{2}	3×10	0
	24	1.9×10^{2}	2.0×10^{2}	1.9×10^{2}	1.5×10^{2}	
7.	0	1.2×10^{3}	9.7×10^{2}	1.1×10^{3}	8.0×10^{2}	0
	24	1.1×10^{3}	1.2×10^{3}	1.0×10^{3}	7.2×10^{2}	
18	0	1×10	2×10	3×10	0×10	0
	24	4×10	3.0×10^{2}	1×10	3×10	
72	0	5.2×10^{2}	6.6×10^{2}	7.9×10^{2}	7.0×10^{2}	10
	24	4.7×10^{2}	1.7×10^{2}	4.9×10^{6}	2.7×10^{2}	
77	0	2.1×10^{2}	1.7×10^{2}	8×10	8×10	15
	24	1.5×10	1.1×10^{2}	3.0×10^{4}	1.7×10^{2}	

* ULB: Upper leafblade, LLB: Lower leafblade
ULS: Upper leafsheath, LLS: Lower leafsheath

Table 6-3. Detection of *P. fuscovaginae* from healthy rice plants spray inoculated at 7 leaves age.

Days after inoculation	Time in hour	Plaque forming units /ml ULB	LLB	ULS	LLS	Diseased plant (%)
2	0	6×10	4×10	2×10	7×10*	0
	24	7.3×10^{2}	N $\times10^{4}$	2.1×10^{3}	1.0×10^{5}	
6	0	1.3×10^{2}	1.3×10^{2}	1.3×10^{2}	1.3×10^{2}	0
	24	N $\times10^{4}$	1.4×10^{2}	3.1×10^{2}	N $\times10^{4}$	
21	0	3.0×10^{2}	2.2×10^{2}	3.2×10^{2}	5.3×10^{2}	0
	24	4.4×10^{4}	8.4×10^{2}	6.7×10^{2}	7.8×10^{2}	
34	0	2.1×10^{3}	2.1×10^{3}	1.1×10^{3}	1.9×10^{3}	0
	24	2.0×10^{3}	2.5×10^{3}	1.7×10^{3}	6.2×10^{4}	
45	0	6.0×10^{2}	6.6×10^{2}	6.4×10^{2}	5.5×10^{2}	0
	24	6.5×10^{2}	3.9×10^{2}	1.4×10^{2}	4×10	
50	0	1.2×10^{2}	1.5×10^{2}	1.0×10^{2}	5×10	0
	24	2.3×10^{2}	2.2×10^{2}	8×10	2.2×10^{2}	

* N: Numerous, confluent plaques

Table 6-4. Detection of *P. fuscovaginae* from healthy rice plants spray inoculated at meiosis stage.

Days after inoculation	Time in hour	Plaque forming units /ml		Diseased plant (%)
		Leafblade	Leafsheath	
2	0	2 ×10	0 ×10	0
	24	2.0×10^{7}	2.0×10^{7}	
7	0	1.2×10^{2}	1.3×10^{2}	0
	24	1.3×10^{5}	7.1×10^{7}	
12	0	8 ×10	8 ×10	2
	24	5.0×10^{5}	1.3×10^{4}	
16	0	6.9×10^{2}	4.0×10^{2}	5
	24	3.5×10^{4}	1.2×10^{3}	

5．自然感染したイネ体での葉鞘褐変病菌の動向

供試イネは前年(1976年)FP1(Pl)ファージを分離した圃場産の種籾を用い，同じ圃場で栽培した。

5月19日に移植した「イシカリ」では6月以降7月14日までの期間ファージ数は増加しなかったが，7月22日になってから増加した。「北海231号」，「双豊糯」では遅れて8月1日になって増加した。6月16日移植の保菌籾「イシカリ」では7月22日に，健全籾の「イシカリ」より10日早くファージの増殖が始まった。また各品種の発病は1～4％の病株率であり極めて少発生であった。初発生は5月19日移植の「イシカリ」で7月30日に認められた（Table 7）。

Table 7. Detection of *P. fuscovaginae* from healthy rice plants in paddy field (1977).

Date	Time in hour	Plaque forming units /ml				
		1	2	3	4	5*
6.20	0	8 ×10	8 ×10	6 ×10	1.0×10^{2}	3 ×10
	24	0 ×10	0 ×10	0 ×10	0 ×10	0 ×10
6.25	0	2.2×10^{3}	1.2×10^{3}	2.2×10^{3}	1.9×10^{3}	1.4×10^{3}
	24	1.9×10^{3}	1.8×10^{3}	2.0×10^{3}	1.3×10^{3}	1.3×10^{3}
7.4	0	9 ×10	3.4×10^{2}	1.7×10^{2}	1.5×10^{2}	1.5×10^{2}
	24	1.2×10^{2}	2.7×10^{2}	2.1×10^{2}	1.6×10^{2}	2.1×10^{2}
7.14	0	9.4×10^{2}	—	1.0×10^{3}	8.7×10^{2}	7.1×10^{2}
	24	9 ×10	—	7 ×10	1.3×10^{2}	4 ×10
7.22	0	0 ×10	0 ×10	0 ×10	1 ×10	5 ×10
	24	4.0×10^{5}	0 ×10	1 ×10	4.9×10^{2}	0 ×10
7.28	0	—	1.6×10^{2}	9 ×10	1.1×10^{2}	2.3×10^{2}
	24	—	2 ×10	0 ×10	3 ×10	0 ×10
8.1	0	8 ×10	1 ×10	3 ×10	4 ×10	7 ×10
	24	1.1×10^{5}	2.0×10^{4}	5.6×10^{4}	1.1×10^{6}	1.8×10^{5}
Diseased plant (%)		1.0	1.0	1.0	3.0	4.0

* 1 : Ishikari transplanted at May 19
2 : Hokkai 231 transplanted at May 19
3 : Sōhōmochi transplanted at May 19
4 : Diseased Ishikari transplanted at June 16
5 : Healthy Ishikari transplanted at June 16

6．イネ科雑草からの葉鞘褐変病菌の検出

畦畔，用水路に自生し，水面に垂れているヌカボ，ケンタッキーブルーグラス，エゾノサヤヌカグサを6月20日から8月1日まで7回採集し10～30茎葉についてファージ法で検定した。用水路のヌカボでは6月25日にファージの増殖があったが

その後は増殖しなかった。用水路のケンタッキーブルーグラスでは7月4日，7月22日にファージの増殖があった。しかしこの溶菌斑の形態は添加したFP1ファージの溶菌斑ではなくFP2系統に類似したピンホール型であった。畦畔のヌカボ，ケンタッキーブルーグラスやエゾノサヤヌカグサではファージの増殖はまったくなかった。

その後，根雪前の10月29日と11月1日に，本病が多発した冷水田の畦畔，用水路と前記少発生田の畦畔，用水路の雑草を主にしてファージの増殖を検討した結果，ヌカボでは7ヵ所のうち4ヵ所，ケンタッキーブルーグラスでは3ヵ所のうち2ヵ所，水田土壌では2ヵ所のうち1ヵ所でファージの増殖があった。これらの溶菌斑も添加したFP1ファージとは異なり全てピンホール型であった。その他のエゾノサヤヌカグサ，オーチャードグラス，トールフエスク，スズメノカタビラおよびイネの落穂の空籾ではまったくファージの増殖はなかった（Table 8－1，8－2）。

Table 8-1. Detection of *P. fuscovaginae* from weeds grown in balk, footpath and paddy field (1977).

Weed	Time in hour	Plaque forming units /ml						
		6.20	6.25	7.4	7.14	7.22	7.28	8.1
Nukabo in footpath	0	1.1×10^{2}	1.3×10^{3}	2.4×10^{2}	6.8×10^{2}	1×10	5.8×10^{2}	1.1×10^{2}
	24	0×10^{2}	0×10	1.4×10^{2}	2×10	0×10	4.5×10^{2}	0×10
Kentucky bluegrass	0	—	1.5×10^{3}	1.5×10^{2}	5.8×10^{2}	6×10	3.4×10^{2}	5×10
in footpath	24	—	0×10	7×10	1×10^{2}	1×10	1.4×10^{2}	0×10
Nukabo in balk	0	—	1.5×10^{3}	1.8×10^{2}	7.6×10^{2}	—	9.5×10^{2}	9×10
	24	—	2.2×10^{5}	0×10	5×10	—	1×10	0×10
Kentucky bluegrass	0	—	1.5×10^{3}	2.0×10^{2}	8.4×10^{2}	4×10	7.5×10^{2}	7×10
in balk	24	—	4×10^{3}	7.1×10^{4}	1.2×10^{2}	4.7×10^{4}	1×10	0×10
Rice cutgrass in balk	0	6×10	1.5×10^{3}	2.0×10^{2}	7.9×10^{2}	2×10	1.7×10^{2}	4×10
	24	0×10	1.8×10^{2}	3.3×10^{2}	2×10	1×10	0×10	0×10
Rice cutgrass	0	7×10	1.3×10^{3}	1.0×10^{2}	1.1×10^{3}	—	—	8×10
in paddy field	24	0×10	5.0×10^{3}	1.2×10^{2}	7×10	—	—	0×10

Table 8-2. Detection of *P. fuscovaginae* from hulls, soils and weeds (1977).

Materials	Time in hour	PFU (ml)	Materials	Time in hour	PFU (ml)
Paddy field soil－1	0	3.0×10^{2}	Kentucky bluegrass	0	1.8×10^{2}
	24	9.6×10^{5}	in footpath－1	24	8.5×10^{4}
Paddy field soil－2	0	1.2×10^{3}	〃 －2	0	1.3×10^{2}
	24	6×10		24	0×10
Nukabo in footpath－1	0	1.2×10^{3}	Kentucky bluegrass	0	7×10
	24	0×10	in balk	24	6.5×10^{5}
〃 －2	0	6.8×10^{2}	Rice cutgrass	0	4×10
	24	6.0×10^{5}	in footpath	24	0×10
〃 －3	0	3.0×10^{2}	Orchard grass	0	2.0×10^{2}
	24	9.6×10^{5}	in balk	24	0×10
〃 －4	0	8×10	Tall fescue	0	8.3×10^{2}
	24	0×10	in balk	24	2.7×10^{2}
〃 －5	0	1.1×10^{2}	Annual bluegrass	0	3×10
	24	1×10	in balk	24	0×10
Nukabo in balk－1	0	6×10	Hull in paddy field	0	3×10
	24	1.2×10^{5}		24	8×10
〃 －2	0	8×10			
	24	3.9×10^{4}			

Ⅳ 考　　察

イネ葉鞘褐変病の生態を明らかにするためには病原細菌を簡単に分離同定できる精度の高い検定法を開発することが必要である。そこで本病原細菌の3系統のファージ[7]を用い検定法について検討した。東北地方および北海道から分離した92菌株の本病原細菌は3系統のファージに対する感受性によって4群のLysotypeに類別された。

このLysotype間には地域分布に差異があるが，イネの品種やAgeとの関係については不明である。この3系統のファージは系統特異性が高いので，検出法としてファージを用いるのには限られたファージ・細菌の組合せのなかでのみ有効であって，抵抗性菌の存在する場では使用できない。したがって，溶菌範囲が広くまた広い地域に分布しているFP1ファージを用い細菌とファージの増殖の関係について検討した。純粋培養の場合ファージは寄主細菌濃度が10^5/ml以上に増菌後増殖が認められた。同様のことが*Xanthomonas citri*[3]，*X. oryzae*[2]では10^5/ml，*Erwinia sp.*[9]では10^4/mlレベルでファージの増殖が始まることが報告されている。

他の細菌類と混在する場合には，雑菌数が多いほどファージの増殖は抑制される傾向にあるが，寄主細菌の初期濃度が7×10/mlのとき雑菌数が7×10^5/mlであっても24時間後にはファージは10^5/mlレベルまで増殖した。

ファージの増殖は他の微生物や培地のpHの変化など種々の要因[2,3,9,13]によって影響されるが，雑菌によるファージの増殖の抑制はファージによってその程度が異なり，抑制の弱い場合[4,9]や強いこと[3,13]がある。FP1ファージは前者に類似し，自然界から葉鞘褐変病菌を検出しようとする場合には試料中の雑菌濃度は$10^{5\sim6}$/mlレベルと考えられるので，このファージによる検出限界は10/ml附近にあるといえよう。ただし本試験では増菌法をとっているため結果は定性的検定であり，菌量を把握するためには定量法[8,12]を用いることが必要である。

本病原細菌の検出法として他に稲苗注射接種法[1]がある。この注射法の検出限界は10^2/mlであり，また特異性[11]については検討を要しようが，実用的な方法である。

このファージ法によってLysotype Aを検出した圃場で葉鞘褐変病菌の越冬，イネ・雑草での動向について調査した。前年罹病株から採集し屋内に放置した種籾・わらではファージは増殖し，希釈平板法で判定されたと同様に越冬源となっているものと推定される。苗・分けつ期，減数分裂期に噴霧・浸漬接種したとき，本病原細菌は苗では少くとも16日後まで，5葉令期のイネでは77日後，7葉令期のイネでは34日後まで生存しており，5葉令期接種イネは穂孕期になってから発病した。減数分裂期のイネでは16日後まで生存し発病にいたった。本実験は冬期温室で行ったため，野外圃場の場合にくらべて穂孕期までの日数が長期間を要し，また本病原細菌のイネ体上での生存に影響をおよぼす太陽光線や湿度，温度など種々の要因が異なるが，本病原細菌は苗，分けつ期，減数分裂期の外観健全なイネ体上で着生菌（Epiphyte）として生存し，穂孕期になって寄生菌として増殖し発病にいたると考えられる。

自然感染の場合についてみると初発生（7月30日）の10日前に始めて検出され，発病後にはすべての健全イネから検出された。ファージ法の検出限界からみて，本病原細菌のイネ体着生密度は10/ml以下のレベルと考えられるが，腐敗苗の発生田および多発病圃場での消長について調査する必要がある。水田周辺雑草では6月下旬や7月上，中旬にヌカボ，ケンタッキーブルーグラスから病原細菌の存在が推定され，また根雪前の時期には水田土壌でも生存が認められた。しかし，これらのファージは大部分がFP2に類似したピンホール型であり，Lysotype A群に寄生性のある新たなファージの存在が示唆される。

引　用　文　献

1) 秋田忠彦，沢崎　彬．“稲葉鞘褐変病の検出方法について（第1報）”．北日本病虫研報．**23**，153 (1972)．（講要）

2) 後藤正夫．“イネ白葉枯病菌，*Xanthomonas oryzae* (Uyeda et Ishiyama) Dowson における phage-bacteria interaction の生態”．静大農研報．**19**，31—67 (1969)．

3) 後藤正夫，芦沢拙夫，森田正人．“カンキツかいよう病に関する研究　Ⅱ，葉肉注射法による *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson の検出特にファージ法との比較について”．静大農研報．**20**，1—20 (1970)．

4) Katznelson, H. and Sutton. M. D. "A rapid phage plaque count method for the detection of bacteria as applied to the demonstration of internally borne bacterial infections of seed". J. bact. **61**, 689—701 (1951).
5) 宮島邦之, 秋田忠彦. "イネ葉鞘褐変病の発生におよぼす気象要因". 北海道立農試集報. **31**, 67—76 (1975).
6) 宮島邦之, 秋田忠彦. "イネ葉鞘褐変病の発病過程と病原細菌の増殖". 北海道立農試集報. **32**, 53—59 (1975).
7) 宮島邦之. "イネ葉鞘褐変病原細菌のファージ". 日植病報. **43**, 110 (1977). (講要)
8) 小野邦明. "タバコ野火病の発生生態に関する研究". 盛岡たばこ試報. **11**, 1—52 (1976).
9) 富樫二郎. "ファージ法による土壌中の軟腐病菌の検出法". 山形大農紀要. **7** (3), 31—50 (1976).
10) 富沢純一. "バクテリオファージの実験". 岩波書店, 1970 p. 5—96.
11) 植松 勉, 大畑貫一. "イネ籾枯細菌病菌の簡易検定法". 日植病報. **43**, 348 (1977). (講要)
12) 脇本 哲, 吉井 甫. "Bacteriophage による Bacteria の定量". 九大農学芸誌. **15**, 161—169 (1955).
13) 脇本 哲. "ファージによる稲白葉枯病菌の生存の検定". 九大農学芸誌. **14**, 495—498 (1954).

Ecological Study of *Pseudomonas fuscovaginae*, the Causal Bacterium of Sheath Brown Rot of Rice, by the Phage Method

Kuniyuki MIYAJIMA

Summary

The bacterial isolates, the pathogen of sheath brown rot of rice, collected from various localities of northern Japan were divided into four lysotypes based on sensitivity to three strains of phage.

The phage-bacteria interaction in the closed and open system were conducted. In the closed system, the phage population increased only when the bacterial population reached the level of 10^5/ml. The increase of the phage FPl in the open system with a different population of saprophytes and the host bacterium was observed. After 24 hour incubation, the increase of phage occurred in the PB medium consisting of the initial bacteria at 10/ml mixed with the saprophytes at 10^5/ml.

This phage method was conducted to detect *P. fuscovaginae* in rice and weeds. When seed and rice plants at tillering and meiosis stage were inoculated with bacterial suspension (10^{6-8}/ml), the bacterium was detected from healthy plants after 16, 77 and 16 days of inoculation, respectively, and subsequent outbreaks of the disease appeared during the booting to flowering periods. In the paddy fields, the bacterium was also detected from healthy plants before the outbreak of the disease. *P. fuscovaginae* could overwinter in infected rice plant kept indoor. *P. fuscovaginae* was detected from Nukabo (*Agrostis clavata var. nukabo* OHWI) and Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) grown on the field banks and foot path, and from paddy field soil.

The phage method was effective to detect low populations of *P. fuscovaginae* mixed with high populations of saprophytes, whereas the phages were strain specific, it failed to detect the bacterium other than those sensitive to the phages.

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