

## 桑園から採集されたPseudomonas mori (Boyer et Lambert) Stevensのラフ型集落株

誌名	蠶絲研究
ISSN	00364495
著者	佐藤, 守 高橋, 幸吉
巻/号	90号
掲載ページ	p. 31-39
発行年月	1973年12月

蚕糸研究 第90号 1973年12月  
 Sansi-Kenkyu (Acta Sericologica)  
 No. 90, Dec., 1973

桑園から採集された *Pseudomonas mori* (BOYER et  
 LAMBERT) STEVENS のラフ型集落株

佐藤 守・高橋 幸吉

Rough Colony Type Mutant of *Pseudomonas mori* (BOYER et LAMBERT)  
 STEVENS Collected from Mulberry Field

By

Mamoru SATO and Kokichi TAKAHASHI

著者らはクワ縮葉細菌病菌 *Pseudomonas mori* (BOYER et LAMBERT) STEVENS のうち  
 に、菌体が糸状に生育し、周辺が不整形で表面も粗状の集落をつくる、いわゆるラフ型  
 集落変異株 (R型株) が存在することをすでに報告した<sup>2)</sup>。しかし、このR型株は、培  
 地上で普通のスムーズ型集落株 (S型株) を継代培養している間に、これから変異した  
 もので、それが自然界に分布しているか否かは不明であった。また、これは非運動性で  
 べん毛が無く、アルブチン加水分解能がない点で、他の *P. mori* の標準株とは異なる性  
 状を示したが、これらの性状がR型株固有のものとは断定できなかった。

ところが他の目的で実験中に、桑園からR型株が採集され、自然界にもこれが分布す  
 ることおよび分離された7菌株の細菌学的性状を調べ、新しい知見を得たので、以下に  
 その概要を報告する。

本文に入るに先だち、本稿を校閲していただいた当场病理部長、小林勝利博士に厚く  
 お礼申し上げる。

## 結果と考察

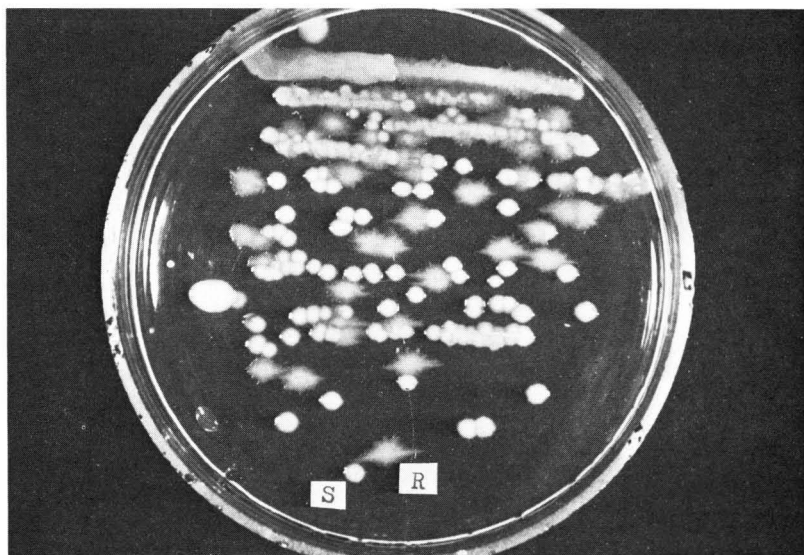
### 1. 分離源

クワの枝・葉を伝わって落ちる雨水中の *P. mori* とそのフェージの时期的変動を調べ  
 ていたところ、1973年5月8日に蚕糸試験場構内桑園 (杉並区) で採集された雨水か  
 ら、*P. mori* のR型株が得られた (第1図)。

なお、雨水採集に用いられたクワは、無作為に4株選出されたもので、これらのクワ

---

本報告は日本蚕糸学会関東支部第24回学術講演会において発表した (1973年11月)。



第1図 桑園から採集された *P. mori*-R 型株の集落

Fig. 1 Colonies of *P. mori*-R type collected from the mulberry field

R : Rough colony type

S : Smooth colony type

のうち、1株(第1表の No.1)のごく一部に本病の病斑が認められたが、他は、外見上すべて健全株であった。

細菌の分離には、変法キング培地(ペプトン 20 g, グリセリン 15 ml, 硫酸マグネシウム 3 g, リン酸二カリ 2 g, 寒天 15 g, 蒸留水 1 l)を用いて画線培養および塗抹培養を行なった。培養温度は、28°Cで、2日後に観察した。

分離結果は、第1表に示されるように、R型株は、8区中3区から、 $10^3 \sim 10^6/ml$ の濃度で分離された。分離株は各区からそれぞれ7株分離し、後述の実験に用いた。

また、非運動性、無べん毛で、正常に分裂するR型株の野性株<sup>2)</sup>が存在するか否かを調べるために、各区からS型株40株を分離して供試した。

## 2. 同定試験

R型株7菌株を同定するために、下記の試験を行なった。詳細な細菌学的性状については、すでに明らかにしている<sup>2)</sup>ので、ここでは必要最少限度の性状を調べた。

### (1) 抗 *P. mori* 血清に対する反応

*P. mori* S 6803号, S 6804号, および S 6807号菌の50倍希釈抗血清<sup>4)</sup>を供試し、R型株7菌株の凝集反応をスライドグラス上で調べた。第2表で示されるように、7菌株とも、3種の抗血清に対し、陽性の凝集反応を示した。

第1表 桑樹を経由した雨水からの *P. mori*-R 型株の分離Table 1. Isolation of *P. mori*-R type from a rain water flowed down mulberry tree

供試桑株番号 No. of tested tree	分離結果 Result of isolation		分離菌株名 No. of bacterial isolates	
	R type	S type	R type	S type
1-a*	-(0)**	+(10 <sup>3</sup> )		S 1 ~ S 10
-b	-(0)	-(0)		
2-a	-(?)	+(10 <sup>6</sup> )		S 11 ~ S 20
-b	-(?)	+(10 <sup>6</sup> )		
3-a	+(10 <sup>6</sup> )	+(10 <sup>6</sup> )	R 1 ~ R 3	S 21 ~ S 30
-b	+(10 <sup>3</sup> )	+(10 <sup>6</sup> )	R 4, R 5	S 31 ~ S 40
4-a	-(?)	+(10 <sup>3</sup> )		
-b	+(10 <sup>3</sup> )	+(10 <sup>3</sup> )	R 6, R 7	

R type: rough type, S type: smooth type

\* a: 桑樹の枝を経由した雨水

A rain water flowed down shoots of mulberry tree

b: 桑樹の葉を経由した雨水

A rain water flowed down leaves of mulberry tree

\*\* ( ) の数字は、雨水 1 ml 中の *P. mori* の概数

The figure parenthesized shows the number of *P. mori* per ml of a rain water.

第2表 *P. mori*-R 型株の抗 *P. mori* 血清に対する凝集反応Table 2. Agglutination reaction on slide to anti-*P. mori* serum of *P. mori*-R type

抗血清 Antiserum	抗原 Antigen	菌株名 Bacterial isolate						
		R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	R 6	R 7
S 6803		+	+	+	+	+	+	+
S 6804		+	+	+	+	+	+	+
S 6807		+	+	+	+	+	+	+

\* +: 陽性反応

Positive reaction

## (2) *P. mori* ファージ感受性

7系統の *P. mori* ファージを供試し、ドロップ法で、これらのファージに対する感受性を調べた。使用培地は、YPDA 培地（酵母粉末 3g, ペプトン 6.6g, グルコース 3g, 寒天 6g, 蒸留水 1ℓ）で、培養温度を 20°C とし、1日後に溶菌斑形成の有無を

第3表 *P. mori*-R 型株の *P. mori* ファージに対する感受性Table 3. Sensitivity to *P. mori* phage of *P. mori*-R type

菌 株 名 Bacterial isolates	ファージ株 Phage isolates						
	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	R 6	R 7
E	2+*	2+	3+	3+	4+	3+	3+
Gm-a	2+	2+	3+	3+	3+	3+	3+
T-a	4+	3+	4+	3+	4+	4+	3+
Tc-b-c	3+	3+	4+	4+	4+	3+	3+
Ko-a	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+
SP 7101	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+
SP 7105	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+

\* 2+ : 混だくした溶菌斑      3+ : わずかに混だくした溶菌斑      4+ : 透明な溶菌斑  
Turbid plaque                      Slightly turbid plaque                      Clear plaque

第4表 *P. mori* のR型株のクワに対する病原性Table 4. Pathogenicity to mulberry tree of *P. mori*-R type by artificial inoculation

菌 株 名 Bacterial isolates	供 試 桑 Inoculated mulberry						
	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	R 6	R 7
Ichinose	++*	++	++	++	+	+	++
<i>Morus rubra</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
No. 3162	-	-	-	NT	-	NT	NT

\* 病斑進展程度

The degree of development of necrotic lesion: +++ > ++ > + > - non-symptom;  
NT: Not tested.

判定した。その結果、第3表に示されるように7系統のファージに対し、7菌株とも、それぞれ感受性を示した。

### (3) クワに対する病原性

本病に対してきわめて罹病性の高いロシア産の *Morus rubra*、罹病性の一の瀬および抵抗性の No. 3162 を供試し、7菌株の病原性を多針接種法によって調べた。第4表に示されるように、抵抗性品種 No. 3162 には病原性を示さなかったが、罹病性の2品種に対しては強い病原性を示した。



第2図 変法キング培地での24時間培養後の *P. mori-R* 型株の形態  
 Fig. 2 Morphology of *P. mori-R* type cultured on modified King's medium for 24 hr.

第5表 変法キング培地で24時間培養後の *P. mori-R* 型株の菌体の長さ  
 Table 5. Length of *P. mori-R* type cultured on modified King's medium for 24 hr.

菌株名 Bacterial isolates	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	S1	S11
菌体の長さ Length of bacteria ( $\mu$ )									
About 3	++*	+	++	++	+	++	++	+++	+++
4 to 10	+++	++	++	++	++	++	++	-	-
11 to 50	+	+++	+++	++	++	+++	+	-	-
More than 51	-	+++	-	+	-	-	-	-	-

\* 細菌の出現程度

The grade of population of bacteria: +++ > ++ > + > -

以上の結果からR型株7株は、*Pseudomonas mori* と同定された。

### 3. 集落および菌体の形態

R型株7株は、前報<sup>2)</sup>と同様、変法キング平板培地上で、第1図に示されるような周辺が不整形、表面も粗状の集落をつくった。

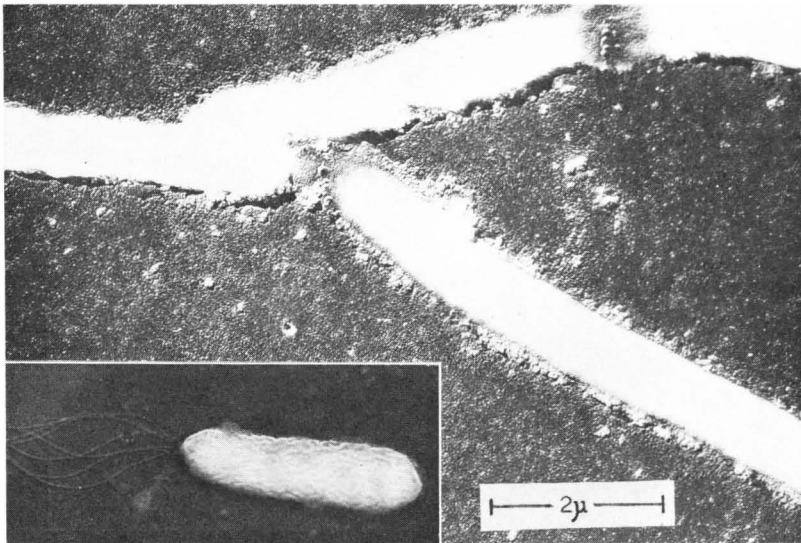
7株を変法キング培地で28°C、24時間培養し、それを光学顕微鏡で観察し、異常伸長の程度を調べた。第5表に示されるように、S型株は、全く伸長菌体が認められないが、R型株は、すべて第2図に示されるような異常伸長が認められ、11~50 $\mu$ の長さのものが比較的多数観察された。菌株間に程度の差異が認められたが、これは安定した性質でなく、わずかな培養条件の差によって容易に変化するものであった。

同様にして得られた菌体を、シャドウィング法で電子顕微鏡観察を行なった。第3図に示されるように、菌体は長く伸長し、菌体幅は、0.6~1.1 $\mu$ で平均0.8 $\mu$ であった。標準株の菌体幅の平均値は、0.9 $\mu$ であることから<sup>3)</sup>ほとんど同じといつてよい。

べん毛は全く観察されなかった。

### 4. 運動性とアルブチン加水分解能

R型株7株のほか、その野性株が含まれている可能性のある分離区のS型株20株(S21~S40)とR型株が見出されなかった区のS型株20株(S11~S20)を用いて、



第3図 *P. mori*-R 型株の電顕像  
 Fig. 3 Electronmicrograph of *P. mori*-R type  
 Left corner : *P. mori*-wild type

運動性とアルブチン加水分解能を調べた。運動性の確認は、検鏡により、アルブチン加水分解能は、富永の方法<sup>5)</sup>によった。すなわちアルブチン加水分解能培地（アルブチン 5g, ペプトン 10g, 酵母エキス 3g, ブドウ糖 1g, クエン酸第二鉄 0.5g, 蒸留水 1l) 10 ml に, 28°C, 24 時間培養した菌を 1 白金耳植え, 25°C に保ち, 10 日間培養し, 培地が暗褐色となったものを陽性とした。第 6 表に示されるように, 運動性は, S 型株においてすべて認められ, 野性株と考えられるものは, 確認できなかった。しかし R 型株は, すべて運動性がなく, この点は前報<sup>2)</sup>と同様であった。

アルブチン加水分解能は, S 型株 40 株すべてが陽性であったが, R 型株は 7 株中 3 株が陽性であった。これにより, 陰性株がきわめて少ない例に属することは, 再確認されたが, R 型株のすべてが陰性でなく, この性状が R 型株固有のものではないことが明らかになった。

以上の結果から, *P. mori* の R 型株は, 非運動性で無べん毛であることが確実となった。前報<sup>2)</sup>では触れなかったが, 無べん毛の *Pseudomonas* 属細菌の変異株は, これまでに発見されていない<sup>6)</sup>ことから, この無べん毛でかつ糸状に生育する変異株は, これが *Pseudomonas* では最初の例と思われる。しかし他の細菌, たとえば *Salmonella* では, 無べん毛性の変異株は, 普通にみられるし, その中には, 糸状に生育するものもある<sup>7)</sup>。したがって, *Pseudomonas* においても, このような変異株が存在することは, 当然, 考えられることである。

今回の実験で, 非運動性, 無べん毛で, かつ正常に分裂する菌株が検出されなかったが, 検出不可能な低い濃度で存在していたのかも知れない。いずれにしても, この変異株と標準株および R 型株の 3 者の関連を今後明らかにしたい。

第 6 表 *P. mori*-R 型株および S 型株の運動性とアルブチン加水分解能  
Table 6. Motility and hydrolysis of arbutin of *P. mori*-R type and S type

性 状 Property	各性状に該当する菌株名 Bacterial isolates corresponded to the properties	
運 動 性 Motility	+	S 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40
	-	R 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
アルブチン加水 分解能 Hydrolysis of arubtin	+	S 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 R 4, 5, 6
	-	R 1, 2, 3, 7



## 摘 要

クワ縮葉細菌病菌 *Pseudomonas mori* のラフ型集落変異株 (R型株) が蚕糸試験場内の桑園のクワを經由した雨水から分離された。これによりR型株の自然界での分布が初めて明らかにされ、また分離された7菌株の2~3の性状が調べられた。

R型株はすべて非運動性で、糸状に異常伸長し、菌体幅は0.6~1.1 $\mu$ 、平均0.8 $\mu$ であり、べん毛はみられなかった。アルブチン加水分解能は7株のうち4株は陰性で、3株は陽性であった。これによって、非運動性、無べん毛がR型株固有の特徴であることが明らかにされたが、アルブチン加水分解能は、固有の特性でないことが明らかにされた。

## 文 献

- 1) Enomoto, M. and T. Iino 1963. Colonial dimorphism in non-motile *Salmonella* J. Bacteriol. 86 : 473-477
- 2) 佐藤 守・高橋幸吉 1973. クワ縮葉細菌病菌 *Pseudomonas mori* のラフ型集落変異株 日植病報 39 : 425-428
- 3) 佐藤 守・高橋幸吉・脇本 哲 1971. クワ縮葉細菌病の病原細菌とそのフェージの性状 日植病報 37 : 128-135
- 4) 高橋幸吉・佐藤 守 1969. クワ縮葉細菌病に関する研究 第2報 クワ縮葉細菌病菌の抗血清について 日蚕学会関東支部講要 (20) : 26
- 5) 富永時任 1971. 日本における牧草および飼料作物の病害に関する研究 II. 日本における牧草および飼料作物細菌病の病原学的研究 農技研報告C (25) : 205-306
- 6) 富永時任 1973. やさしい植物病原細菌および糸状菌の分類 I. 植物病原細菌の分類 農業時代 (114) : 19-26

## Summary

### Rough Colony Type Mutant of *Pseudomonas mori* (BOYER et LAMBERT) STEVENS Collected from Mulberry Field

By

Mamoru SATO and Kokichi TAKAHASHI

As reported in the previous paper (SATO and TAKAHASHI, 1973) rough colony type (R type) mutant of *Pseudomonas mori* (BOYER et LAMBERT) STEVENS of which rough surfaced colony with irregular margin formed on modified King's medium was isolated from a subculture of *P. mori* S 6914-1. The R type mutant differed entirely from the wild type in some characteristics, such as non-motility, non-flagellum,

and non-hydrolysis of arbutin.

However, it was unknown that whether or not the mutant survives in the field and their characteristics are specific as R type mutant.

The authors have been isolated accidentally R type from a rain water flowed down leaves and shoots of mulberry tree in the field. Seven isolates of R type mutant were separated and studied on their properties. They showed positive reaction on agglutination test by anti-*P. mori* serum and sensitivities to seven strains of *P. mori* phage by drop method showing pathogenicity to mulberry tree by artificial inoculation. From the results mentioned above, these isolates were identified as a mutant of *Pseudomonas mori*.

All of seven isolates obtained from mulberry field were non-motility, non-flagellum and grew up long filaments, 11 to 50  $\mu$  in length and 0.8  $\mu$  in width. Though four isolate of them were unable to hydrolyze arbutin as the same as in the previous report (SATO and TAKAHASHI, 1973), three were able to hydrolyze. The foregoing results showed that both properties non-motility and non-flagellum were specific as R type mutant excepting chemical properties to arbutin hydrolysis.