棉角斑病細菌のバクテリオファージに関する研究

II 變異菌とファージの關係に就て

岡 部 徳 夫

(臺北帝國大學理農學部植物病理學教室)

(昭和 13 年 10 月 17 日 受 領)

Norio OKABE: — Bacteriophage in Relation to
Bacterium malvacearum.

II. Relation between Variants and Phage.*

棉の角斑病細菌 *Bact. malvacearum* は一般の植物病原細菌と違つた非常に特徴ある Colony を肉汁寒天培養基上に形成する。此の特性は屢々病斑に隨伴する腐生性の黄色細菌と區別するのに役立つものであるが、時には全く別種の細菌ではないかと考へられる程著しく異なるものを形成することがある。本菌の特徴は培養後 2—3 日にして現れ、其後は漸次に不明瞭となり、數日後には全く消失するもので Colony の質の不均一性が原因して現れる様である。E. F. SMITH は Rose-window を思はせる此の特異なる Colony に對して “Windowed” Colony なる名稱を付して居る。“Windowed” Colony は少くとも現在知られて居る範圍に於ては角斑病菌にのみ見られる特徴ではあるが、本菌の Colony は必ずしも凡て window を有するとは限らず、中には全く有さないものもあり、又 “Windowed” Colony の中にも仔細に觀察すると window の大きさ、位置、方向、形等に差異があり、是等は發育の初期に於て現れる一時的特性ではあるが、夫々の型によつて一定し、或例外を除いて變化しないものである。

著者は本島に於て分離せる *Bact. malvacearum* の 2 系統を此の特性に依つて分けた處、32 種の Colony variants を得たので、是等が曩に松本、藤岡兩

* From the Phytopathological Laboratory, Taihoku Imperial University, Formosa, Japan.

氏によつて分離された「バクテリオファージ」と如何なる關係にあるかを研究中の處、偶々昭和 13 年 8 月 11 日帝國軍人の一員として〇〇され同月 15 日〇〇聯隊へ〇〇することになり一時研究を中止するの已むなき状態に至つた。夫故一先づ今日迄の研究結果を取纏め、曩に松本、藤岡に依つて發表された棉の角斑病細菌のバクテリオファージに関する研究の續報として、茲に報告する次第である。

I. *Bact. malvacearum* の Colony 變異に就て

本菌の變異に就ては少數の人々が斷片的な研究を發表して居るに過ぎない。E. F. SMITH⁽¹⁵⁾ は 1920 年其著 Bacterial Diseases of plants 中に Colony の寫眞を數葉掲げて居るが、是を見ると本菌の Colony には數種類あることが知られる。1928 年 S. H. EVELYN⁽¹⁾ は Barbados に於ける棉の角斑病を研究し、是の病原菌に對し、var. *barbadense* なる名稱を付して居るが、不幸にも其報告を手にすることが出来ないで詳細な點に就いては知る由もない。1930 年 STOUGHTON⁽⁶⁾ は *Bact. malvacearum* 中には少くとも 3 種の dissociates が存在し、是等は形態的にも培養的にも夫々異なり、A より B、B より C と云ふ様に dissociates を生じ Cycle が閉ぢて居る様であると述べて居る。1931 年には R. E. MASSEY⁽²⁾ が寄主より分離せる細菌は何れも一樣に smooth で病原性を有するが、培養をして行くと次第に種々なる變異菌を生ずると報告してゐる。1932 年 STOUGHTON⁽⁷⁾ は病原性が異なり培養的にも相異なる數種の dissociates を得、強き病原性の Strain よりは non-virulent 菌を生じ、尙是よりは又培養的に異なる virulent 菌を生ずると報告して居る。MASSEY⁽³⁾ は 1934 年 rough colony form は病原性を有さないが、smooth colony form は病原性を有する。R-form 菌にバクテリオファージを作用せしむると永久的透明を起し、之に反し smooth form 菌は一時的透明を起すに過ぎないと述べて居る。

以上に述べた如く、本菌には種々の變異菌が認められて居るが、夫等の性狀に關する具體的の報告は未だ出て居らないので、茲に報告し様とする變異菌と比較することは出来ないけれど、是等の内には上述の變異菌と同一のものと考へられる。

本研究に使用せる細菌は次の2種類である。

Culture No. 427 1931年9月25日 著者分離

Culture No. 450 1937年6月 藤岡分離

變異菌の分離の方法

前記の兩細菌を Bouillon 或は potato dextrose solution に培養し、24 時間後、3 日後、5 日後、10 日後、夫々肉汁寒天 (Plate Culture に移植し、(温度は 25° — 28° C) 2 日目乃至 3 日目に出現せる Colony を擴大鏡にて檢し、形態の異なるものを夫々別々に培養し、尙是等各種の Colony types は更に同様液體培養を試み、再分離をなすと共に、其際生ぜる別の新型分離用にも供した。

Fig 1. 棉角斑病菌の肉汁寒天上に於ける形態 (Culture No. 427.)

變異菌の Colony の特徴

上述の方法に依り得たる變異菌が中性の肉汁寒天平面培養基上に示す形状は別表の如くである (寫眞参照)。是等の特徴は温度及び培養日數により變化する

故凡て同一條件の下で観察した。25°—31°C に於て培養せる場合 2—3 日目に最も差違明瞭にして温度の上昇、日数の経過は特徴を不明瞭ならしむ。大部分の變異菌は夫々の性狀固定して變化せざるも、或ものは不安定にして容易に他の Colony form を生じ、更に二つ以上に分かれる。

第 1 表 Culture No. 427 より得たる變異菌の 31°C に於ける 2 日目の形狀
Tab. 1. Morphological characters of the 2 day-culture (31°C)
of variants derived from strain 427

Type	Diameter (mm)	Shape	Optical characters	Marking
A	1.5	Round, convex, entire margin	Translucent, pearly lustre, Barium yellow	No marking
B	1.0	Round, flatly convex, entire margin	Transparent, pale chalcedony yellow, center: cream color, margin: Etain blue	Large window
C	1.5	Round, convex, entire margin	Translucent, Barium yellow	Many window, rimose in margin
D	1.0	Round, convex, entire margin	Translucent, pale chalcedony yellow, periphery: Etain blue	Small window in periphery
E	1.0	Flatly convex, round, entire margin	Transparent, pale lumine green, slightly pearly lustre	No marking
F	1.5	Flatly convex, round, entire margin	Transparent, pale chalcedony yellow	Chrysanthemum-like marking
G	1.5	Round, flatly convex, entire margin	Transparent, pale chalcedony yellow	Lace-like marking with small window
H	1.0	Round, flatly convex, entire margin	Transparent, pale chalcedony yellow	Window, rimose in periphery
I	1.5	Round, flatly convex, entire margin	Translucent, light chalcedony yellow	Window & striping

第 2 表 Culture No. 450 より得たる變異菌の 25°C に於ける 3 日目の形狀
 Tab. 2. Morphological characters of the 3 day-culture (25°C)
 of variants derived from strain 450

Type	Diameter (mm)	Shape	Optical characters	Marking
A	1.5—2.5	Round, convex, entire, thin margin	Translucent, pale chalcedony yellow, pearly luster	No marking
B	0.5—0.8	Round, raised, lacerate margin	Translucent, Barium yellow	Rugose surface
C	1.5—2.0	Round, convex, entire, thin margin	Translucent, Barium yellow, pearly lustre in periphery	Slightly cross hatching in periphery
D	1.5—2.5	Round, flatly convex, entire, thin margin	Transparent, pale chalcedony yellow	Filamentous marking, window usually absent
E	1.0—1.5	Round, convex, entire, thin margin	Transparent, pale chalcedony yellow, opaline green by reflected light	Cross-hatching with pearly lustre
F	1.0—2.0	Round, convex, entire, thin margin	Translucent, grayish white	Few windows in margin
G	0.6	Round, raised, lacerate margin	Translucent, Barium yellow, Etain blue by transmitted light	Rugose surface
H	1.0—2.0	Round, raised, lacerate margin	Translucent, Barium yellow, grayish white by transmitted light	Rugose surface
I	1.0—2.0	Round, convex, lacerate margin	Translucent, pale chalcedony yellow	Wrinkled marking
J	0.8—1.0	Round, raised, lacerate margin	Transparent, pale dull green-yellow	Granular marking
K	1.5—2.0	Round, convex, entire, thin margin	Translucent, pale chalcedony yellow	Radiate window, center rugose
L	0.8	Round, convex, entire	Translucent, Barium yellow	No marking

Type	Diameter (mm)	Shape	Optical characters	Marking
M	1—1.5	Round, convex, entire	Translucent, Barium yellow	Striate marking in periphery
N	1—1.5	Round, convex, entire, thin margin	Transparent, Barium yellow	Fish-scale marking
O	1—1.5	Round, flatly convex, entire, thin margin	Translucent, pale dull green-yellow, margin Etain blue	Lace-like growth with window
P	1.0	Round, flatly convex, entire, thin margin	Translucent, pale dull green-yellow	Lace-like growth with large window
Q	1.5—2.5	Round, flatly convex, entire, thin margin	Translucent, pale chalcedony yellow, pearly lustre	No or slightly concentric marking
R	1—1.5	Round, convex, entire, thin margin	Translucent, pale dull green yellow	Radiate window
S	1—2.0	Round, convex, entire, thin margin	Translucent, pale dull green yellow	Centre rugose, window especially in periphery
T	1—1.8	Round, convex, entire margin	Ditto	Lace-like growth with rugose surface
U	1.5—2.5	Round, convex, lacerate margin	Transparent, pale chalcedony yellow	Lace-like growth, window in periphery
V	1.5—2.0	Round, convex, radiately fringed	Translucent, pale chalcedony yellow	No window, centre slightly rugose
W	1—1.8	Round, convex, undulate	Translucent, pale chalcedony yellow	No window, rugose surface

II 變異菌に對するファージの作用

曩に松本、藤岡⁽⁴⁾に依つて *Bact. malvacearum* のバクテリオファーヂュは他の植物病原菌に溶菌作用を示さざることを報告されたが、上述の如くにして得たる變異菌が果してファージの作用を受けるや否やは興味ある事項にして、次の如き方法によつて實驗を行つた。

- A. 各變異菌を potato dextrose solution に植え、同時にファージを接種せる場合

第 3 表 No. 427 菌の變異菌にファージを接種せる場合
 Tab. 3. Phagic activity against the variants of strain 427.

Type	Turbidity of cultures				Type	Turbidity of cultures			
	After 24 hours		After 3 days			After 24 hours		After 3 days	
	Bact.+ phage	Bact. <i>per se</i>	Bact.+ phage	Bact. <i>per se</i>		Bact.+ phage	Bact. <i>per se</i>	Bact.+ phage	Bact. <i>per se</i>
A	1	1	4	4	F	1	1	4	4
B	1	1	3	3	G	1	1	3	3
C	1	1	3	3	H	1	1	4	4
D	1	1	4	4	I	1	1	4	4
E	1	1	3	3					

數字は Turbidity の程度を示し、數字の大なる程大なり

第 4 表 No. 450 菌の變異菌にファージを作用せしめたる場合
 Tab. 4. Phagic activity against the variants of strain 450.

Type	Turbidity of cultures						Type	Turbidity of cultures					
	After 24 hours		After 3 days		After 7 days.			After 24 hours		After 3 days		After 7 days.	
	Bact. + phage	Bact. <i>per se</i>	Bact. + phage	Bact. <i>per se</i>	Bact. + phage	Bact. <i>per se</i>		Bact. + phage	Bact. <i>per se</i>	Bact. + phage	Bact. <i>per se</i>	Bact. + phage	Bact. <i>per se</i>
A	0	1	3	4	4	5	J	0	1	2	3	2	3
B	0	1	2	4	4	4	K	0	1	0	3	1	4
C	0	1	2	4	4	5	M	0	1	2	3	3	3
D	0	1	1	3	2	3	N	0	1	2	3	3	3
E	0	1	1	3	3	3	O	0	1	2	4	3	4
F	0	1	1	2	3	4	P	0	1	2	3	3	4
G	0	1	1	3	2	3	Q	0	1	2	4	4	5
H	0	1	2	5	4	5	S	0	1	2	5	4	5
I	0	1	3	4	4	4	T	0	1	1	4	4	4

B. 24 時間培養にファージを接種せる場合

第5表 No. 450 菌の變異菌の24時間 potato dextrose solution にファージを接種せる場合

Tab. 5. Phagic activity against the 24 hour-potato dextrose solutions of No. 450-variants.

Type	Turbidity of cultures				Type	Turbidity of cultures			
	After 24 hours		After 3 days			After 24 hours		After 3 days	
	Bact.+ phage	Bact. <i>per se</i>	Bact.+ phage	Bact. <i>per se</i>		Bact.+ phage	Bact. <i>per se</i>	Bact.+ phage	Bact. <i>per se</i>
A	1	3	3	5	J	1	2	1	3
B	1	4	3	4	K	0	1	2	3
C	1	4	3	5	M	1	2	1	4
D	1	3	2	4	N	2	3	3	4
E	1	3	1	3	O	0	3	2	4
F	1	3	2	5	P	2	4	3	5
G	1	2	1	3	Q	1	4	3	5
H	1	4	3	5	S	1	4	2	5
I	1	4	4	5	T	2	4	3	5

液體培養基に於ては No. 427 の各變異菌は何れもファージの作用を受けない。之に反し No. 450 の菌は第4及び5表に示す如く、多少變異菌によつてその程度は異なるも、いづれも溶菌作用を受ける。然し何れの場合に於ても培養基中に存在する細菌を凡て溶解死滅せしめ、培養液を永久に透明ならしめることはなく、日數の経過と共に所謂抵抗性菌を生じ液は次第に對照と差違なき状態となる。

C. 固形培養基を使用せる場合

No. 427 及び No. 450 の各變異菌を肉汁寒天(斜面培養)に培養し、24時間後 5cc 入の殺菌水に浮遊せしめ、何れも同一の turbidity たらしむ。然る後 是等の液を夫々ベトリ皿に5滴宛滴下し、直ちに豫め稀釋して用意せるファージ液を1滴加へ、又溶解して 50°C に保てる potato dextrose agar を 10cc 宛加へて充分攪拌する。寒天凝固後は 28°C に保温し、一定期間後に觀察した。是の結果の一つを示すと第6表の如くである。但し No. 427 菌を使用した場合は何れも溶菌斑の形成がないから、No. 427 の變異菌はファージの作用を全然受けざるものと考へられる。

第 6 表 No. 450 菌の變異菌のファージの溶菌斑形成

Tab. 6. Plaque formation of the phage against No. 450-variants.

Types of variants	Number of plaques	Diameter of plaques, after			Character of plaques		
		24 hours mm	3 days mm	5 days mm	Size	Margin	Grade of clearness
A	250	0.5	do	do	small	indistinct	weak
B	240	0.5	do	do	small	indistinct	weak
C	240	0.5	do	do	small	indistinct	weak
D	290	1.0—3.5	2.5—5.0	do	medium	distinct	medium
E	9	1.0—3.0	4—6	6—9	large	distinct	strong
F	248	1.0—1.5	2—3.5	do	medium	indistinct	weak
G	221	0.8—2.8	do	do	medium	indistinct	weak
H	251	1.0—2.5	do	do	medium	distinct	medium
I	265	1.0—1.5	2—3	do	medium	indistinct	weak
J	3	1.0—2.5	5—7	9—13	large	distinct	strong
K	235	1.2—3.5	do	do	medium	distinct	medium
L	251	0.5—2.5	1.5—4.0	3—7	large	distinct	strong
M	2	1.5—3.0	4.5—7.0	9—11	large	distinct	strong
N	248	0.5—2.8	do	do	medium	indistinct	weak
O	3	1.5—3.0	2.5—5.0	3.5—7	large	distinct	strong
P	2	1.5—3.0	3.5—6.5	3.5—6.5	large	distinct	strong
Q	216	0.5—1.0	0.5—2.5	do	medium	indistinct	weak
R	250	1.0—1.5	1.5—3.0	do	medium	indistinct	weak
S	223	0.5—2.5	0.5—3.2	1.0—4.0	medium	distinct	strong
T	250	0.8—2.5	1.0—3.0	1.0—4.0	medium	distinct	strong
U	264	0.5—2.5	do	do	medium	indistinct	medium
V	255	0.5—2.0	do	do	medium	indistinct	weak
W	235	1.0—2.2	1.0—2.5	do	medium	indistinct	weak

本研究に使用せるファージは上述の如く No. 450 菌に作用するも No. 427 菌には作用せず、従つて *Bact. malvacearum* の同一種中にもファージに對して異なる行動を採る系統の存在することを知ると同時に、又今日迄報告されて居る植物病原菌のファージと異なり高度の特異性を有するものと認める。

No. 450 の各變異菌に對しては、其作用は液體培養基に於けるよりも固形培養基に於て著しく明瞭に現れ、形成された溶菌斑の數、大きさ、溶菌の程度等に夫々差異のあることを知る。先づ溶菌斑の數に就いて見るに、E, J, M, O, P の各變異菌を使用せる場合は、他の變異菌を使用せる場合に比して著しくその數が減少して居る。又大きさは種々なる條件によつて多少の變化はあるが、大體に大、中、小の3種類に分つことが出来る。大型溶菌斑を形成する菌は E, J, L, M, O, P の6種にして、溶菌斑と菌層との境界は頗る明瞭で、特に E, J, M 菌のそれは日數の経過と共に漸次擴大し、遂には全面溶菌斑となる。中型溶菌斑は一般に初期に擴大するのみで、菌層との境界は明瞭なるものと然らざるものがあり、溶菌作用は S 及び T 菌のみ強く、他は強くない。小型溶菌斑は A, B, 及び C の三菌に於て見られ、是等は日數の経過につれ菌層の發育により漸次不明瞭となる傾向がある。

以上の如く No. 450 菌の變異菌は夫々ファージに作用せしむると異なる結果を示すが、是が原因は各變異菌によりファージに對する感受性が異なる點もあらうが、溶菌斑數の著しく相違する點より見て、ファージ夫れ自身にも何か複雑な關係が存在して居るのではないかと想像せられる。例へば動物の腸内細菌の或ファージには溶菌斑の大きさにより數種の elemental phage の存在することが知られて居る様に、著者の場合にも恐らくはかゝるファージが存在するのではなからうかと考へて、次に述べる様な方法で elemental phage の分離を行つた。

III. Elemental phage に関する研究

A. 分離の方法

溶菌斑の大きさ、性状はファージの種類を決定するのに重大なる要素の一つである。従つて第6表に示すが如き數種の異なる溶菌斑の存在はこのファージの單一種でないことを暗示するものであると想像される。それで出来るだけ代表的な數種の溶菌斑を一つ宛、各々別々に殺菌せる白金線にて寒天もろとも釣取し potato dextrose solution に加へて破碎し、同時に夫々の變異菌を接種してファージの増殖を試みた。斯くして得たるファージは A', D', E', J', O' 及び S' の6種にして、是等は夫々 A, D, E, J, O, S の各菌にファージ

ヂュを作用せしめて得たる單一溶菌斑より分離せるものである。

B. Elemental phage.

上記6種のフアーヂュを夫々互に6種の變異菌に作用せしめたるに次表の如き結果を得た。

第7表 各種フアーヂュの變異菌に對する作用

Tab. 7. Activity of several phages against the variants of No. 450.

Bact. \ Phage	A'	D'	E'	J'	O'	S'
A	+	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+	+
E	-	-	+	+	+	-
J	-	-	+	+	+	-
O	-	-	+	+	+	-
S	+	+	+	+	+	+

+ = positive, - = negative

此の表より本フアーヂュは E, J, O 菌等に作用するものとせざるものとの2種よりなることが知られる。E', J', 及び O' フアーヂュは凡ての變異菌に對して作用するが, A', D', S' 等のフアーヂュは E, J, O 菌に對して作用しない。此の結果を第6表の成績と合せて考へるに, 元來原フアーヂュは上記2種のフアーヂュの混合より成り, E, J, M, O, P 菌に作用し得る elemental phage を少數含むと同時に, 他の全部の變異菌に對して作用する elemental phage をも多數に含むものと推察される。これが溶菌斑形成數に著しき差を生ぜる原因で, 溶菌斑の性状の使用せる菌型によつて夫々異なる所以は, 菌型により感受性を異にする爲であらう。依つて得たる elemental phage を凡ての變異菌に作用せしめ, 形成された溶菌斑の大きさ, 數, 性状等を調査して, 此の考の正否を知らんと試みた。その結果の一つを示すと次表の如くである。

Elemental phage A' を使用せる場合は第8表の示す如く第6表の結果とは多少異つて居る。溶菌斑の數は少々不同ではあるが, 大體近似して居り, E, J, M, O 及び P 菌には溶菌作用を示して居らない。又溶菌斑は一般に小さく溶菌作用は強くない様である。Elemental phage J' を作用せしめたる場合は A' フアーヂュの作用をしない E, J, M, O 及び P 菌に作用を有する以外に大した相違は見出せない。フアーヂュに對する感受性の強弱は, 形成された溶菌斑の大きさ, 擴大性の有無, 溶菌の程度等に依つて推察することが出来るが, 又

第 8 表 Elemental phage A' の各變異菌に對する作用 (溫度 28°C)
 Tab. 8. Activity of elemental phage A' against the variants of No. 450.

Types of variants	Number of plaques	Diameter of plaques, after			Characters of plaques		
		24 hours mm	3 days mm	5 days mm	Size	Margin	Grade of clearness
A	75	0.5	do	do	small	indistinct	weak
B	76	0.5	0.5	0.5	small	indistinct	weak
C	86	0.2—0.8	do	do	small	indistinct	weak
D	75	0.5—3.0	do	do	medium	distinct	medium
E	0						
F	82	1.0—1.5	2—3.5	do	medium	indistinct	weak
G	59	1.0—2.5	do	do	medium	indistinct	weak
H	62	0.5—1.5	0.5—2.0	do	medium	distinct	medium
I	74	1.0—1.5	2—3	do	medium	indistinct	weak
J	0						
K	85	1.2—3.5	do	do	medium	distinct	medium
L	54	1—2.5	do	do	medium	indistinct	weak
M	0						
N	72	0.2	0.5	do	small	indistinct	weak
O	0						
P	0						
Q	96	0.5	do	do	small	indistinct	weak
R	95	1.0—2.8	1.2—3.0	do	medium	distinct	medium
S	94	0.5—3.0	1.0—3.5	do	medium	distinct	medium
T	76	0.5—1.5	do	do	small	indistinct	weak
U	134	0.5—1.5	do	do	small	indistinct	weak
V	86	0.2—0.8	do	do	small	indistinct	weak
W	84	0.5—1.5	do	do	small	indistinct	weak

發育せる菌層にファージを接種することに依つても知り得る。バクテリアとファージを混合後直ちに potato dextrose agar に plate culture する時は溶菌斑は明瞭且つ容易に形成されるものであるが、數時間經過せる後ファージを接種せる場合は一般に形成されないか、或は不明瞭になる傾向がある。

又感受性の異なる細菌程，溶菌作用は細菌の發育程度に左右されることが多い。依つて potato dextrose agar に豫め各變異菌を加へ plate culture をなし 18 時間及び 24 時間後にフアーヂュを接種して溶菌作用を受けたるや否やを調べて見た。此の結果に依ると，18 時間後には其の程度に差はあるが，殆ど全部の變異菌が溶菌作用を受けて居る。小型溶菌斑を形成する變異菌は中型溶菌斑を形成する變異菌より溶菌作用を受ける程度が弱く，大型溶菌斑を形成する變異菌は最も高い透明度を示して居る。24 時間後の場合には D, E, J, M の 4 菌にのみ現れ，K, O, P, S の 4 菌には極めて僅に見られるのみである。是より最もフアーヂュの作用を受け易い變異菌は D, E, J, M で，次いで K, O, P, S であると云ふことが出来る。尙フアーヂュがかかる發育せる細菌に働いて溶菌作用を現すには titre の強弱が非常に關係するので，上述の實驗には titre の高い A' フアーヂュ，及び J' フアーヂュを使用した。titre の弱いフアーヂュを使用した場合は何れも negative に終つた。

C. フアーヂュと温度との關係

Elemental phage A' 及び J' を以て溶菌斑の數，大きさと温度の關係を知るために次の如き方法により實驗を行つた。供試菌は感受性強き J 型菌及び弱き A 型菌で，是等の 24 時間肉汁寒天斜面培養を殺菌水にて浮遊せしめ各々 5 滴宛をベトリ皿に入れ，同時に一定濃度のフアーヂュを 1 滴宛滴下し，常法に依つて 10cc 馬鈴薯蔗糖寒天を加へて充分攪拌し，凝固した後，各温度に保たしめた。

第 9 表 フアーヂュと温度との關係 (A 菌に A' フアーヂュを作用せしめたる場合)

Tab. 9. Temperature relation (A' phage against variant A)

Temperature °C	After 24 hours		After 48 hours	
	Number	Size mm	Number	Size mm
34°	137	0.2—0.5	137	0.2—0.5
31°	762	0.5	764	0.5—0.8
28°	1360	0.5	1368	0.5—0.8
25°	1280	0.5—0.8	1285	0.5—1.0
22°	1250	0.5	1256	0.5—1.0
19°	1190	0.5	1192	0.5—1.0
16°	980	0.5	989	0.5—1.0

第 10 表 ファージと温度との関係 (J 菌に J' ファージを作用せしめたる場合)
 Tab. 10. Temperature relation (J' phage against variant J)

Temperature °C	After 24 hours		After 3 days		After 6 days	
	Number	Size mm	Number	Size mm	Number	Size mm
34	6	0.2—0.8 (0.5)	6	0.5—0.8 (0.5)	6	0.2—0.5 (0.3)
31	79	0.5—2.5 (2.0)	81	0.5—2.5 (2.0)	81	0.5—2.5 (1.8)
28	108	0.8—2.8 (2.5)	111	0.8—3.5 (3.0)	111	4.0—10.0 (8.0)
25	142	0.8—2.5 (2.2)	150	1.2—4.0 (3.5)	150	4.0—11.0 (8.5)
22	114	0.8—2.2 (2.0)	126	1.5—4.5 (4.0)	126	4.0—10.0 (8.2)
19	117	0.5—2.0 (1.5)	120	1.5—4.2 (3.8)	120	2.0—8.0 (6.2)
16	102	0.5—2.0 (1.2)	107	2.0—3.5 (3.0)	107	2.0—5.0 (4.4)
13	—	—	105	1.0—3.0 (2.5)	105	1.5—4.8 (4.2)

(括弧内は平均の大きさを示す)

第 9 及び第 10 表に示す如く温度と溶菌斑の数と大きさとの間には明らかに一定の関係が存在する。温度の上昇はファージを弱らしめ、溶菌斑数のみならず、形を小さくし、且溶菌作用を衰へさせて居る。温度の低い場合は假令へ數に於て多少の違はあるにしても、溶菌斑は明瞭で溶菌作用の弱らざることを示してゐる。溶菌作用の最適温度は 28°—22°C の間に存在する。

D. 細菌の量と溶菌斑の関係

J 菌に J' ファージを作用せしめたる場合は溶菌斑が大きくて、實驗の結果を明瞭にするので、是を使用して菌量と溶菌斑の数、大きさとの関係を調べて見た。實驗方法は大體前者と同様で、只菌量だけ相違して居る。温度は 28°C に保たした。此の結果は第 11 表の如くである。

第 11 表 菌量と溶菌斑の關係

Tab. 11. Effect of the amount of bacteria on plaque formation.

	1 drop		2 drops		4 drops	
	Number	Diameter mm	Number	Diameter mm	Number	Diameter mm
After 24 hours	138	1.0—3.8 (3.2)	131	0.8—3.2 (2.8)	129	0.6—3.2 (2.5)
After 2 days	140	2.0—5.0 (4)	133	1.2—4.5 (3.5)	130	1.0—4.0 (3.2)
After 5 days	do	3.5—14 (8.5)	do	3.5—12 (7.5)	do	3.0—9.0 (6.2)

	8 drops		16 Drops		32 drops	
	Number	Diameter mm	Number	Diameter mm	Number	Diameter mm
After 24 hours	118	0.5—2.5 (2.1)	109	0.5—2.0 (1.8)	96	0.5—1.8 (1.5)
After 2 days	120	0.8—3.5 (2.8)	111	0.6—2.8 (2.2)	98	0.5—2.2 (1.8)
After 5 days	do	2.5—7.5 (5.0)	do	2.5—7.0 (4.5)	do	2.0—6.5 (4.2)

(括弧内は平均の大きさ)

溶菌斑の大きさ及び数は温度の影響を非常に蒙るが、更に使用せる菌量によつても變化して來るもので、一般に或限界はあるけれど、菌量の少いもの程大きな溶菌斑を形成することが本實驗に依つて知られる。又溶菌斑の数は温度の場合の様に著しい差異は示さないが、菌量の増加に依つて漸次減少して居る。

IV. ファーヂュ抵抗性菌の Colony form.

第 3 表乃至 5 表の示す如く、各菌にファーヂュを作用せしむると、初めの間は生育に著しい影響を與へ、大部分のものは死滅するに至るが、漸次に抵抗性菌を生じ、遂には對照と差異なき迄となる。又寒天培養基上に形成された溶菌斑について見るも、日數の経過するにつれ漸次中央部より抵抗性菌の出現するを認める。是等の菌種が果して如何なる Colony form を有するかと云ふ點は又興味あることで、次の如き方法によつて分離をなし、Colony form を調べると同時に、ファーヂュとの關係を研究した。Potato dextrose solution に各變異菌を植え、24 時間後ファーヂュを接種し、10 日經たる後、肉汁寒天に平

面培養をして、出現せる Colony を多數分離すると同時に、又一方溶菌斑の中央から發育せる菌をも同様に取扱つた。斯くして約 40 種の變異菌を液體培養基より、23種の變異菌を溶菌斑より分離したが、是等は凡てファージの作用を受けず、Colony の形態は液體培養基に於ては1變異菌より數種の異なるものを得られたが、溶菌斑よりは夫々の菌と同一の形態を有する Colony のみを見出した。即ち肉眼的に全く同一の形態を示す Colony が一はファージに對して感受性で一は抵抗性なる事を知つた。

V. 總 括

本島に於て分離せる棉角斑病菌 *Bact. malvacearum* の2系統を Colony form によつて分けた處、合計 32 種の變異菌を得たので、是がバクテリオファージとの關係を研究した。No. 427 の9變異菌は凡てファージの作用を受けず、No. 450 の23變異菌は凡て感受性ではあるが、其程度には夫々差がある。感受性の最も強い菌は大なる溶菌斑を形成し、弱きものは小なる溶菌斑を形成し、又弱い溶菌作用を示す。同一濃度のファージを作用せしめたるに、變異菌により出現する溶菌斑の數著しく減少せるものがある。依つて是が原因を研究せるに、ファージに2種類の elemental phage の存在することを知つた。即ち凡ての變異菌に作用するファージと E, J, M, O 及び P 菌に作用せざるファージとがある。凡ての菌型の内、D, E, J, M の4種が最もファージの作用を受け易い。E, J, M 菌に作用せしめた場合は溶菌斑は日數の経過と共に漸次擴大して非常に大きくなる。溶菌斑の大きさは是が檢出に使用せる菌型の種類により著しく異なるが、其他細菌の量、寒天の濃度、ファージの titre、溫度等によつて變つて來る。寒天との關係は第1報に於て報告せるを以て、菌量及び溫度の關係を溶菌斑の増減と併せて研究した。其の結果に依ると、菌量の増加は溶菌斑の大きさのみならず、數の減少を來し、溫度の増加も亦同様な作用を與へる。但し溫度の場合は菌量の場合より溶菌斑の數の減少に大なる影響をあたへる。ファージ抵抗性菌を液體培養基及び溶菌斑より多數分離せるが、前者に於ては1菌型より數種の抵抗性菌を生じ、後者よりは同一形態の抵抗性菌のみが生じた。抵抗性菌は形態的には全く感受性菌と區別することが出来ない。

引用文獻

1. EVELYN, S. H. Mycological work—Ann. Report. Dept. of Agric. Barbados for the year 1926—27. p. 15. 1928. (R. A. M. 8:20)
2. MASSEY, R. E. Studies of Blackarm Diseases of Cotton II. The Empire Cotton Growing Review 8: 1—27, 1931.
3. ——— Sections of Botany and Plant Pathology. G. A. R. S. Final Report on experimental work in 1932—33. Ann. Rept. Gezira Agric. Res. Serv. for the year ended 31 st. December, 1933. pp 126—146, 1934 (R. A. M. 13: 696)
4. MATSUMOTO, T. & HUZIOKA, Y. Bacteriophage in relation to *Bact. malvacearum* E. F. S. I. Preliminary Study. Ann. Phytopath. Soc. of Japan 7: 193—202, 1938.
5. SMITH, E. F. Bacterial Diseases of plants. pp. 314—339, 1920.
6. STOUGHTON, R. H. Angular Leaf-spot of Cotton. Nature 125: 350—351, 1930.
7. ——— Rothamstead Experimental Station Report for 1931, p. 199. 1932 (R. A. M. 12: 141)

Résumé

Thirty-two colony variants were obtained from the two different strains of *Bacterium malvacearum* which were isolated from the angular spots of cotton at Taihoku; viz. 9 variants (A-I in fig. 1) from culture strain 427 and 23 variants (A-W in pl. II) from culture strain 450. All the variants derived from the former are resistant to the phage which was isolated from the diseased leaves by MATSUMOTO and HUZIOKA,⁽⁴⁾ while any of the latter are susceptible to it, though somewhat different in susceptibility and size of plaque produced, generally more susceptible variants producing larger plaques (table 6). The plaques produced on the cultures of variants E, J, and M enlarge to a great extent with the increase of the incubation period (table 6). The phage in question proved to be consisted of at least two elemental phages. The one is active against all the variants, and the other is only active against those except E, J, M, O, and P variants (tables 7—8). The size and number of plaques are more or less decreased with the increase of the amount of bacteria used (table 11). The same is true with the temperature within a certain limit, although in this case the effect is more remarkable on the number of plaques. Resistant strains developed from the phage-bacterial cultures are not apparently different in morphological characters from their original susceptible bacteria.

第 II 圖 版 棉角斑病菌の肉汁寒天上に於ける形態 Culture No. 450.