

樹木こぶ病病原細菌の培養保存

— 特に凍結乾燥法について —

琉球大学農学部 大宜見朝栄・安里 文一

1. はじめに

植物病原細菌の菌株保存法については、最近の目新しい保存法^{4,5,6)}もあるが、一般的には次の方法が採用されている。^{1,2,3)}すなわち①継代培養 ②冷蔵庫 ③冷凍庫 ④流動パラフィン重層 ⑤滅菌水又は滅菌土壌水 ⑥凍結乾燥

本学森林保護学教室では、分離した数種の樹木こぶ病病原細菌を、上記①～④方法で保存しているが、一長一短もあることから、冷暗所で半永久的に保存が可能であるといわれる⑥の方法も利用して。本方法はまた、細菌菌株の分譲、交換あるいは送付にさいして、細菌学的性質の保持、汚染防止および包装上、最も無難であるといわれる。よって凍結乾燥法について実施したことを報告する。

本報告は主に昭和56年4月～12月までに、試験研究したものを取りまとめたものである。

2. 材料と方法

(1) 供試菌

センダン、ヤマモモ、カクレミノ、ウラジロエノキ、シャリンバイおよびナカハラクロキの各こぶ病細菌⁷⁾

③ 準備

上記6菌株をPDA(半合成バレイシヨ煎汁寒天培地)に、それぞれ斜面培養した。十分に洗滌後乾燥したアンプル(長さ12cm, 直径0.9cm, 特注)に、アルミ箔で少し緩めに栓をした後、乾熱滅菌した。

分散媒(保護剤)として10%スキムミルク水溶液を使用し高圧滅菌した後、0.3～0.5mlあて滅菌アンプルに無菌的に分注した。次に増殖した各こぶ病菌の菌苔を2～3白金耳量投入し、十分に懸濁した。

④ 予備凍結

凍結乾燥器(DC-35, ヤマト科学)のコールドトラップ円筒の中に、寒剤として95%アルコール3lと約5cmぐらいに砕いたドライアイス5kgを入れ混和し、アンプを1回に5本ずつ手に持ったまま挿入し、十分に凍結させた。

◎ 乾燥

予備凍結が終了したらアンプルを多岐管のアンプルジョイントに挿入し、約3時間真空乾燥を続けた(写真-1)。

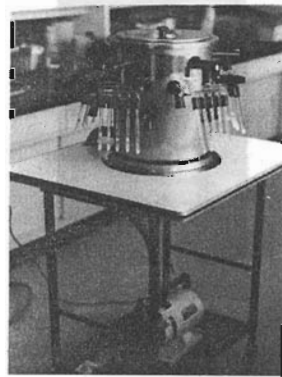


写真-1 アンプルの真空乾燥

④ 熔封

ガスバーナーで火焰を適度に調節し、アンプルの切断しようとするガラス部分を熔融し、切断する。又、保存中のひび割れを防ぐために切断した部分を、弱い火焰で加熱して、肉厚を均等にして形を整えた。

(2) 凍結乾燥用アンプルの種類

アンプルの全長、内径、肉厚、耐熱性、耐圧性などの規格は種々みられる(写真-2)。

(3) アンプルの開封の方法と集落型

熔封、保存したアンプルの開封(復元)の方法は、図-1の通りであった。因にATCCの二重バイアルについては、その添付説明に従うとよい。

植物病原細菌の同定に当っては、国際的保存機関のATCC(American Type Culture Collection, 米国), NCPPB(National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, 英国), PDDCC(Plant Diseases Division Culture Collection, ニュージーランド)等に菌を預託し、登録する必要がある。特にATCCでは、送付した菌を米国で二重バイアルに封じたアンプルを送り返し、当該

菌と送付菌が同一であるか否かの判断を求められる場合もある。ここではヤマモモこぶ病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *myricae*) MRI菌株[®]を例にとり、森林保護教室製とATCC製の両者(写真-2, 上と下)を開封し又、他の方法で保存していた菌との集落型(大きさ、表面の形状等)をPDA, YPA(酵母エキス・ペプトン寒天培地)およびBPA(肉エキス・ペプトン寒天培地)の3画線培地で比較を試みた。その結果は表-1の通りで、いずれも全く同一の細菌学的性状を示し、同一のヤマモモこぶ病菌と考察された。

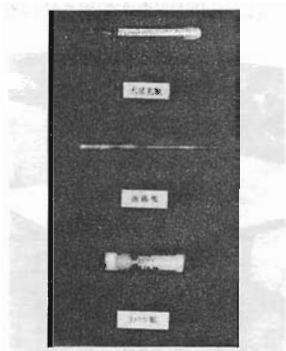


写真-2 凍結乾燥菌アンプル
上より疏大(大宜見製), 静大(後藤製), ATCC製

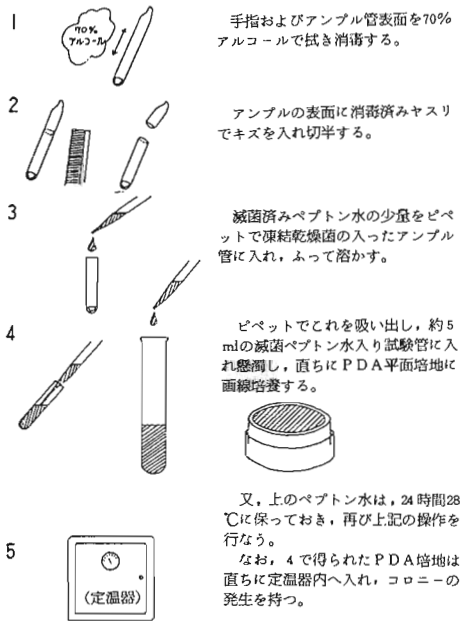


図-1 アンプルの開封の方法

表-1 開封後の集落型の比較 (mm)

供試菌 ヤマモモ Pathotype strain (MR1)
ATCC(No. 33544) NCPPB(No. 3143) PDDCC(No. 7118)

PDA (ラフ型)

| | 森林保護教室製 | U.S.A.製 | 保存菌株 |
|-----|---------|---------|---------|
| 1日目 | 0.2~0.3 | 0.2~0.3 | 0.2~0.3 |
| 3日目 | 1.4~2.5 | 1.5~2.5 | 1.5~2.3 |

YPA (ラフ型)

| | 森林保護教室製 | U.S.A.製 | 保存菌株 |
|-----|---------|---------|---------|
| 1日目 | 0.1~0.3 | 0.1~0.3 | 0.1~0.3 |
| 3日目 | 0.9~1.5 | 0.8~1.4 | 0.7~1.4 |

BPA (スムーズ型)

| | 森林保護教室製 | U.S.A.製 | 保存菌株 |
|-----|---------|---------|---------|
| 1日目 | ~0.2 | ~0.2 | ~0.2 |
| 3日目 | 0.8~1.4 | 0.7~1.3 | 0.7~1.3 |

3. おわりに

アンプルに封じた凍結乾燥菌の保存(室内, 冷蔵および冷凍)温度の違いによる保存成績について、今後、他の保存法をも含めて長期間、定期的な追跡調査を実施する予定である。

本研究を遂行するにあたり、静岡大学農学部後藤正夫教授には、有益なご指導を賜った。又、大学院生樋口浩君の協力をいただいた。ここに謝意を表する。

引用文献

- (1) 後藤正夫: 新植物細菌病学, 22~23, ソフトサイエンス社 東京, 1981
- (2) 医科学研究所学友会編: 改訂5版細菌学実習提要, 159~165, 379~393, 丸善 東京, 1981
- (3) 根井外喜男ほか: 微生物の保存法, 3~47, 149~160 東京大学出版会 東京, 1977
- (4) 農林水産省農業環境技術研究所: 微生物の長期保存法-農林水産関連-, 1~30, 60~68, 農林水産省農業環境技術研究所 茨城, 1987
- (5) 沼野井春雄ほか: 現代生物学大系, 別巻, 補遺, 249~258, 中山書店 東京, 1986
- (6) 大宜見朝栄・樋口 浩: 日植病報, 47(4), 443~448, 1981
- (7) 樋口 浩・大宜見朝栄: 日林九支研論, 43, 121~122, 1990
- (8) 土屋行夫: 植物防疫 41(5), 239~242, 1987