

チャ赤焼病病原細菌のファージについて

荒井啓・植原一雄・富田啓文*・野中寿之**

(植物病理学教室)

昭和56年8月10日 受理

Studies on Bacteriophages of *Pseudomonas syringae* pv. *theae* (Hori 1915) Young, Dye and Wilkie

Kei ARAI, Kazuo UEHARA, Hirofumi TOMITA* and Toshiyuki NONAKA**

(Laboratory of Plant Pathology)

緒 言

チャ赤焼病は、1914~1915年にかけて静岡・三重・奈良・京都などの各府県で大発生し^{7,8)}、その後、1955年に静岡県で再び発生が認められた細菌病害である¹⁷⁾。その後、本病の発生は終息したかにみえたが、1977年に南九州の薩摩半島南部に突然発生し、激しい被害をもたらした²⁾。鹿児島県内ではその後も漸増の傾向にある。本病原細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *theae* (Hori 1915) Young, Dye and Wilkie, の諸性質については、岡部ら (1955)¹⁷⁾、荒井ら (1979)²⁾ によって既に報告されたとおりである。しかしながら、本細菌のファージについては、未だ報告がない。そこで、赤焼病病原細菌のファージを分離する目的で実験を行なったところ、2種の性状の異なるファージが得られたので、その結果について報告する。

材料および方法

1. 供試菌

本実験で用いたチャ赤焼病病原細菌は、1977年、鹿児島県揖宿郡頴娃町の茶園で自然発病していた茶樹 *Thea sinensis* L. (品種：ゆたかみどり) から分離し、

本論文の概要は、1979年日本植物病理学会九州部会において発表した。

* 現住所、東北大学農学部、仙台市堤通雨宮町

** Present address, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Tsutsumi-dori Amamiya-cho, Sendai

* 鹿児島県茶業試験場、鹿児島県川辺郡知覧町

** Kagoshima Tea Experiment Station, Chiran-cho, Kagoshima

ジャガイモ煎汁寒天培地 (PDA) で継代保存した24分離株 (E-7701, E-7702, E-7703, E-7704, E-7705, E-7706, E-7707, E-7708, E-7709, E-7710, E-7711, E-7712, E-7713, E-7714, E-7715, E-7716, E-7717, E-7718, E-7719, E-7720, E-7721, E-7722, E-7723, E-7724) と、静岡大学農学部植物病理学教室より分与された2株 (S-1, S-2) の計26株である。

また、ファージの寄生性を調べるために用いた細菌は Table 2 に示すとおりである。これらの細菌は、当教室保存のものおよび九州大学農学部植物病理学教室、農林水産省農業技術研究所細菌第一研究室、鹿児島大学農学部応用微生物学教室より分与されたものである。

2. 培地

本実験で用いた培地の種類と組成は以下に示すとおりである。

(1) PDA 培地：ジャガイモ 200g, ブドウ糖 20g, 寒天 20g, 蒸留水 1 liter.

(2) ペプトン寒天培地：ペプトン 10g, 塩化ナトリウム 5g, 寒天 20g, 蒸留水 1 liter,

(3) CH 培地 (Crosse & Hingorant 培地⁵⁾)：ペプトン 5g, 酵母エキス 3g, グリセリン 2g, 寒天 10g, 蒸留水 1 liter,

なお、上記組成より寒天を除いたものをそれぞれの液体培地として用いた。

3. ファージの分離方法

1977年頴娃町の本病発生茶園で採集した罹病葉を試

料とした。まず、典型的な赤焼症状を示す葉および枝の病斑部分を0.5~1gとり、約10倍量の滅菌水とともに乳鉢で磨砕し、汁液を得た。この汁液を3,000rpmで10分間遠心し、上澄を得た。その上澄2mlとPDA培地で培養した病原菌(分離株E-7701, E-7702, E-7703)のそれぞれ1白金耳量をペプトン液体培地(10ml)に加え、25°Cで24時間振盪培養した。培養後、培養液を10,000rpmで15分遠心分離し、その上澄を滅菌したミリポアフィルター(径0.45 μ m)でろ過し、そのろ液からファージの分離を試みた。本病原細菌を懸濁せしめたペプトン寒天培地10mlをシャーレに流し込んだ平面上に、このろ液を少量滴下し、20°Cで培養した。24時間後に溶菌斑の形成が認められたものについては、その溶菌斑部分を寒天とともに滅菌水に浸し、よく砕いた後、その上澄をとり、普通の溶菌斑計数法の技法¹⁾に従って単溶菌斑を得た。そして代表的な溶菌斑から、単溶菌斑分離を3回繰返し、幾種類かのファージ分離株を得た。

これらは常法に従って増殖せしめ、4°Cに保存して、以後の実験に用いた。

4. 電子顕微鏡観察

分離したファージは2%リンタングステン酸pH6.5(PTA)によるネガティブ染色法により電顕観察した。方法は溶菌斑計数法によって形成された単溶菌斑部分を寒天とともにとり、スライドガラス上に載せたPTA液のなかでよく砕き、その一部をメッシュに載せ、風乾後観察した。

結 果

1. 分離ファージの寄生性

赤焼病罹病組織より分離したファージは、病原細菌の数種分離株に対して形状が異なる溶菌斑を形成した。すなわち、大型の鮮明な輪郭で透明な溶菌斑を形成するものと、小型の不鮮明な輪郭で不透明な溶菌斑を形成するものである。前者のファージを ϕ 1、後者のファージを ϕ 2と命名した。 ϕ 1、 ϕ 2の形成した溶菌斑の形状はFig. 1, 2に示すとおりである。

つぎに、 ϕ 1、 ϕ 2の寄生性を本病原細菌26分離株と他の6属45種の細菌を用いて調べた。その結果はTable 1, 2に示すとおりである。すなわち、 ϕ 1は本病原細菌の21株および*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*に、 ϕ 2は本病原細菌の18株と*P. syringae* pv. *eriotryae*および*P. syringae* pv. *mori*に寄生性があることが確かめられた。



Fig. 1. Plaques formed by phage ϕ 1 on *P. syringae* pv. *theae* E-7701.

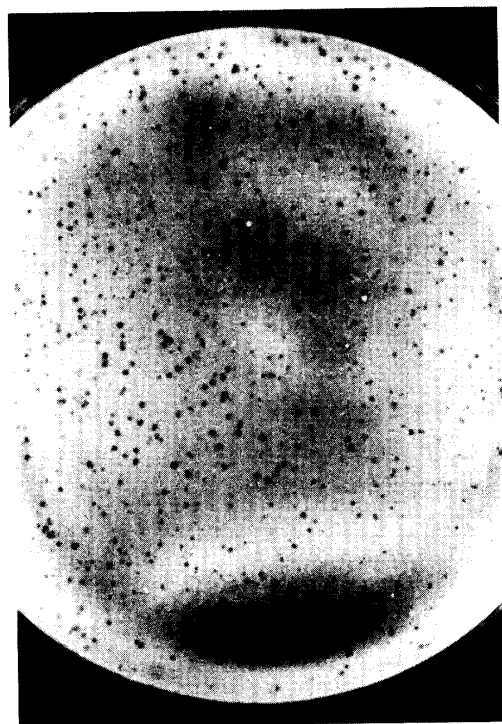


Fig. 2. Plaques formed by phage ϕ 2 on *P. syringae* pv. *theae* E-7701.

Table 1. Plaque-formation of some isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *theae* to its phages, ϕ 1 and ϕ 2

Isolates	Phages		Isolates	Phages	
	ϕ 1	ϕ 2		ϕ 1	ϕ 2
E-7701	+	+	E-7714	+	-
E-7702	+	-	E-7715	+	+
E-7703	+	+	E-7716	+	+
E-7704	+	+	E-7717	+	+
E-7705	+	+	E-7718	+	+
E-7706	+	-	E-7719	+	+
E-7707	+	-	E-7720	+	+
E-7708	+	+	E-7721	+	+
E-7709	+	+	E-7722	+	+
E-7710	-	-	E-7723	+	+
E-7711	-	-	E-7724	+	-
E-7712	-	-	S-1	-	+
E-7713	+	+	S-2	-	+

+ = Plaque-formation, - = No plaque-formation

Each experiment was respectively repeated three times by means of plaque count technique.

Table 2. Host range of *Pseudomonas syringae* pv. *theae* phages, ϕ 1 and ϕ 2

Bacteria	Phages		Bacteria	Phages	
	ϕ 1	ϕ 2		ϕ 1	ϕ 2
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	-	<i>Pseudomonas rugosa</i>	-	-
<i>Corynebacterium michiganense</i>	-	-	<i>Pseudomonas saccharophila</i>	-	-
<i>Corynebacterium sepedonicum</i>	-	-	<i>Pseudomonas schuylkilliensis</i>	-	-
<i>Erwinia carotovora</i>	-	-	<i>Pseudomonas smaragdina</i>	-	-
<i>Escherichia coli</i> B	-	-	<i>Pseudomonas solanacearum</i>	-	-
<i>Escherichia coli</i> K12	-	-	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i>	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	-	-
<i>Pseudomonas cruciviae</i>	-	-	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i>	-	-
<i>Pseudomonas desmolytica</i>	-	-	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>eriobotryae</i>	-	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	+	-
<i>Pseudomonas fragi</i>	-	-	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i>	-	+
<i>Pseudomonas glaveolens</i>	-	-	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>striaefaciens</i>	-	-
<i>Pseudomonas jaggeri</i>	-	-	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	-	-
<i>Pseudomonas marginalis</i>	-	-	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	-	-
<i>Pseudomonas melanogenum</i>	-	-	<i>Pseudomonas tashirensis</i>	-	-
<i>Pseudomonas mildenbergii</i>	-	-	<i>Pseudomonas todinum</i>	-	-
<i>Pseudomonas myxogenes</i>	-	-	<i>Pseudomonas xanthe</i>	-	-
<i>Pseudomonas orydicola</i>	-	-	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>oryzae</i>	-	-
<i>Pseudomonas ovalis</i>	-	-	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>sojensis</i>	-	-
<i>Pseudomonas pavonaceae</i>	-	-	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>theaecola</i>	-	-
<i>Pseudomonas putrefaciens</i>	-	-	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-			
<i>Pseudomonas rubescens</i>	-	-			

+ = Clear plaque-formation, - = No plaque-formation

Each experiment was respectively repeated three times by means of plaque count technique.

2. ファージの形態

φ1, φ2はいずれも多面体の頭部と尾部を有する精虫形であった。これらのファージは大きさにいくぶんばらつきが認められたが、φ1は、頭部約80nm、尾部は幅約27nm長さ約184nmで、φ2は、頭部約95nm、尾部は幅約25nm、長さ約110nmであった (Fig. 3, 4)。また、いずれのファージにも尾部末端にスパイク状の構造 (tail pin) があるように思われた。さらに、電顕試料のなかには、いわゆるゴースト粒子や、尾部が短いものや、尾部殻 (tail core) の露出したものが認められ、本ファージは、いずれも収縮性の鞘 (sheath) を有するものと思われる。



Fig. 3. Electronmicrograph of phage φ1 negatively stained with 2% phosphotungstic acid.

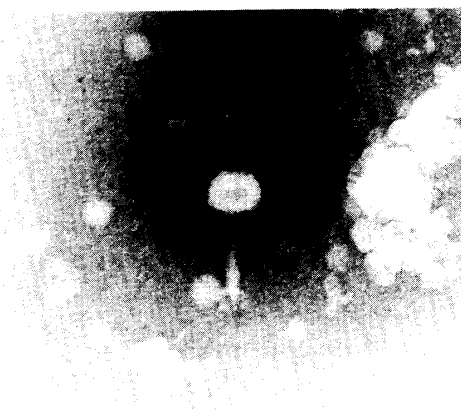


Fig. 4. Electronmicrograph of phage φ2 negatively stained with 2% phosphotungstic acid.

3. ファージの不活化温度

本ファージの不活化温度を調べた結果は、Table 3に示すとおりである。すなわち、φ1, φ2はともに50°Cで不活化が起こり、60°Cでは完全に不活化された。

Table 3. Thermal inactivation of φ1 and φ2

Temperature (°C)	φ1: dilution ^a			φ2: dilution ^b		
	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶
20	N ^c	n ^c	131 ^d	N	n	20
40	N	n	80	N	n	18
45	N	n	43	N	n	8
50	N	308	5	n	212	0
55	n	0	0	11	0	0
60	0	0	0	0	0	0
65	0	0	0	0	0	0

a: Original phage concentration is ca. 1.5×10^9 PFU/ml.

b: Original phage concentration is ca. 2.0×10^8 PFU/ml.

c: N, n = numerous ($N > n$)

d: Plaque numbers are average values of three replicates.

e: Bacteria concentration is ca. 1.0×10^8 cells/ml.

考 察

本実験で、赤焼病罹病組織より分離された2種のファージは、溶菌斑の形状、寄生性およびその形態の違いから、系統が異なることが確かめられ、それぞれを *Pseudomonas syringae* pv. *theae* phage φ1, φ2と命名した。

φ1は本病原細菌の21分離株に対し、大型の鮮明な輪郭で透明な溶菌斑を形成し、φ2は18分離株に対し、小型の不鮮明な輪郭で不透明な溶菌斑を形成した。これら2種のファージの赤焼病細菌(26株)に対する寄生性を調べた結果、ファージに対する感受性の違いから、赤焼病細菌は4つのファージ型に分けることができる。

I. φ1, φ2のいずれにも感受性を示すもの(16株)。

II. φ1に対してのみ感受性を示すもの(5株)。

III. φ2に対してのみ感受性を示すもの(2株)。

IV. φ1, φ2のいずれにも感受性を示さないもの(3株)。

このなかで鹿児島で分離された株は、I, II, IV群

に属し、静岡で分離された株は、Ⅲ群に属する。このことから、鹿児島株と静岡株はフェージの感受性に差があり、地域によって、本病原細菌のフェージ感受性が異なるものと考えられる。著者らが、以前に本実験で用いた株のなかで静岡株を含む15株の細菌学的性質を調べた結果では、分離株間にはほとんど差を認めていない²⁾。従って、これらの分離株は単にフェージの感受性だけが異なるものと考えられる。

つぎに、本病原細菌以外の *Pseudomonas* 属細菌を主体に、6属45種の細菌に対する寄生性を調べた結果、 $\phi 1$ は、本細菌以外の *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* に、 $\phi 2$ は、*P. syringae* pv. *eriotryae* と *P. syringae* pv. *mori* にそれぞれ寄生性が認められた。*Pseudomonas* 属細菌のフェージのなかには、種特異性の高いもの^{1, 3, 13, 14, 15, 16, 18, 19)} と、そうでないもの^{3, 6, 9, 10, 12, 14, 15)} が報告されており、本病原細菌のフェージ、 $\phi 1$ 、 $\phi 2$ はいずれも後者に属するものと考えられる。

また、形態的な面では、 $\phi 1$ 、 $\phi 2$ はいずれも、多面体の頭部と尾部を有する精虫形で、尾部末端にスパイク状の構造 (tail pin) を持ち、鞘 (sheath) が収縮性であることから、Bradley (1967)⁴⁾ の A 群、Tikhonenko (1970)²¹⁾ の V 群に分類されるべきものと考えられる。

要 約

チャ赤焼病罹病組織より、その病原細菌のフェージを、2種類分離し、それぞれ *Pseudomonas syringae* pv. *theae* phage $\phi 1$ 、 $\phi 2$ と命名し、それらの性質について調べた。得られた結果を要約すると以下のとおりである。

1. 赤焼病病原細菌の分離株に対し、 $\phi 1$ は、大型の鮮明な輪郭で透明な溶菌斑を形成し、 $\phi 2$ は小型の不鮮明な輪郭で不透明な溶菌斑を形成した。

また、フェージの寄生性を調べた結果、 $\phi 1$ は、本病原細菌の21分離株と *P. syringae* pv. *lachrymans* に、 $\phi 2$ は本病原細菌の18分離株と、*P. syringae* pv. *eriotryae* および *P. syringae* pv. *mori* に寄生性が認められた。

2. 本フェージの形態は、いずれも多面体の頭部と尾部を有する精虫形である。その大きさは、 $\phi 1$ は、頭部約 80nm、尾部は幅約 27nm 長さ約 184nm で、 $\phi 2$ は、頭部約 90nm、尾部は幅約 25nm、長さ約 110nm であった。

3. フェージの不活化は、いずれも 50°C で起こりはじめ、60°C では完全に不活化された。

謝 辞

本実験を行なうにあたり、静岡大学農学部後藤正夫教授、九州大学農学部脇本哲教授、農林水産省農業技術研究所土屋行夫主任研究員、鹿児島大学農学部大西博教授より各種細菌の分離株を分与して戴き実験に供した。記して感謝の意を表する。

文 献

- 1) 青田盾彦・真野豊：インゲンかさ枯病菌に寄生するフェージの検出 (予報). 日植病報, 37, 404 (講要) (1971)
- 2) 荒井啓・野中寿之・三木洋二・植原一雄：薩摩半島南部に発生した茶の細菌性病害について, 鹿大農学術報告, No. 29, 55-61 (1979)
- 3) Billing, E.: Further studies on the phage sensitivity and the determination of phytopathogenic *Pseudomonas* spp. *J. appl. Bact.*, 33, 478-491 (1970)
- 4) Bradley, D.E.: Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriol. Rev.*, 31, 230-314 (1967)
- 5) Crosse, J.E. and Hingorant, M.K.: A method for isolating *Pseudomonas mors-prunorum* phage from the soil. *Nature*, 181, 60-61 (1958)
- 6) Fulton, R.W.: Bacteriophages attacking *Pseudomonas tabaci* and *P. angulatum*. *Phytopathology*, 40, 936-949 (1950)
- 7) 堀正太郎：細菌の寄生に基く茶樹の一大病害 (赤焼病), 病虫雑, 1, 247-252 (1914)
- 8) 堀正太郎：細菌の寄生に基く茶樹の一大病害 (3号の続き). 病虫雑, 2, 1-7 (1915)
- 9) 上運天博・脇本哲：ムギ類黒節病病原細菌の諸性質とフェージについて. 日植病報, 43, 116 (講要) (1977)
- 10) 菅正道・松崎正文：ムギ類黒節病病原細菌フェージについて. 日植病報, 43, 117 (講要) (1977)
- 11) Király, Z., Klement, F., Solymosy, F. and Vörös, J.: Methods in Plant Pathology. p. 183-192, Elsevier Scient. Publ. Comp., Ams.-New York-London (1974)
- 12) Klement, Z., Lovrekovitch, L. and Hevesi, M.: Studies on the biochemistry, phage sensitivity and serological properties of *Pseudomonas* pathogenic to mulberry. *Phytopath. Z.*, 38, 18-32 (1960)
- 13) 宮島邦之：イネ葉鞘褐変病菌 *Pseudomonas fuscovaginae* に寄生するフェージの分離とその諸性質. 日植病報, 46, 132-139 (1980)
- 14) 森田昭：ピワがんしゅ病に関する研究, 第1報. ピワがんしゅ病菌フェージの寄生性と形態. 日植病報, 40, 401-411 (1974)
- 15) 向秀夫・鍵渡徳次・陶山一雄・小林照二：キュウリ斑点細菌病に関する研究, フェージについて. 日植病報, 42, 114 (講要) (1976)
- 16) 西村十郎・脇本哲：カーネーション萎ちょう細菌病の発生生態に関する研究. 1. カーネーション萎ちょう細菌病フェージの特性および増殖について. 日植病報, 37, 301-306 (1971)
- 17) 岡部徳夫・後藤正夫：日本に於ける植物細菌病害. IV. 茶樹の赤焼病について. 静大農研報, 5, 96-99 (1955)
- 18) 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)

- 19) 佐藤守・高橋幸吉・脇本哲：クワ縮葉細菌病の病原細菌とそのファージの性状。日植病報, **37**, 128-135 (1971)
- 20) 佐藤守・高橋幸吉：クワ縮葉細菌病の発生生態に関する研究。(1). 病原細菌の越冬。日蚕雑, **41**, 285-293 (1972)
- 21) Thikhonenko, A.S.: Ultrastructure of Bacterial Viruses (translated by Haigh, B.) p. 1-294, Plenum Press, New York-London (1970)

Summary

Two phages of *Pseudomonas syringae* pv. *theae* (the pathogen of bacterial stem blight of tea) were isolated from the diseased leaves and stems adopted in South Kyushu. Some characteristics of these phages, $\phi 1$ and $\phi 2$, were investigated. The results are summarized as follows.

1. Phage strain $\phi 1$ formed transparent and clear plaques on the plate seeded with *P. syringae* pv. *theae* isolate, while $\phi 2$ formed small, turbid and irregular plaques on same plate.
2. The pathogenicities of $\phi 1$ and $\phi 2$ were investigated with 26 isolates of *P. syringae* pv. *theae* and 45 species in 6 genus of other bacteria. $\phi 1$ attacked 21 isolates of *P. syringae* pv. *theae* and *P. syringae* pv. *lachrymans*. $\phi 2$ attacked 18 isolates of *P. syringae* pv. *theae*, *P. syringae* pv. *eriobotryae* and *P. syringae* pv. *mori*.
3. The phage particles of $\phi 1$ and $\phi 2$ are tadpole-shaped, consisting of one polyhedral head and one contractile tail. $\phi 1$ is in possession of one head of about 80 nm in diameter, with one tail of about 27 nm in width, and 184 nm in length. $\phi 2$ is in possession of one head of about 95 nm in diameter, with one tail of about 25 nm in width, and 110 nm in length.
4. The thermal inactivation was investigated. Both $\phi 1$ and $\phi 2$ occurred at 50°C and were perfectly inactivated at 60°C.