琉球大学学術リポジトリ

ヤマモモこぶ病菌ファージによる数種の樹木こぶ病菌の類別(生産環境学科)

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): ヤマモモこぶ病菌ファージ, ファージタイピング, 数種樹種のこぶ病菌 キーワード (En): Pseudomonas syringae pv. myricae, Yamamomo (Myrica rubra) gall bacteria, Pseudomonas syringae pv. myricae, phagetyping, bacterial gall pathogens of several trees 作成者: 大宜見, 朝栄, 樋口, 浩, 後藤, 正夫, Ogimi, Choei, Higuchi, Hiroshi, Goto, Masao メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3777

ヤマモモこぶ病菌ファージによる数種の樹木こぶ病菌の類別

大宜見朝栄[*1]・樋口　浩[*2]・後藤正夫[*3]

Choei OGIMI, Hiroshi HIGUCHI and Masao GOTO : Phagetyping of several bacterial gall pathogens of forest trees with *Pseudomonas syringae* pv. *myricae* phages

キーワード：ヤマモモこぶ病菌ファージ，*Pseudomonas syringae* pv. *myricae*，ファージタイピング，数種樹種のこぶ病菌

Key words : Yamamomo (*Myrica rubra*) gall bacteria, *Pseudomonas syringae* pv. *myricae*, phagetyping, bacterial gall pathogens of several trees

Summary

Two bacteriophages were isolated from bacterial galls of Yamamomo (*Myrica rubra*) trees and soil samples collected under the diseased Yamamomo trees, respectively.

These phages were tested for their infectivity to 21 isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *myricae* that were collected from different places. These phages differentiated this bacterium into two groups which were obtained in Kyushu, Okinawa and Shizuoka, respectevely.

In addition, 70 isolates belonging to 6 species of bacterial gall pathogens of forest trees were phagetyped with these two phages. The results indicated that these phages also infected some gall pathogens of forest trees belonging to *P. syringae* VAN HALL.

Consequently, the phagetyping with these phages may become a useful tool in future to distinguish the pathovars of *P. syringae* that cause bacterial galls of forest trees.

緒　言

筆者らは，細菌に寄生するウイルスとして知られるバクテリオファージが植物病原細菌の同定と生態学的研究に利用できることに着目し，ヤマモモこぶ病菌のファージの分離を試みた。その結果，罹病組織と土壌から別々にファージを分離することができた。またファージ・タイピングにより，ヤマモモこぶ病菌が地理的に異なる二つの菌系に系統分けできること，および *Pseudomonas syringae* 群のこぶ病菌

*1 琉球大学農学部生産環境学科

*2 前琉球大学農学部林学科

*3 前静岡大学農学部農学科

琉球大学農学部学術報告　**41**：299～304（1994）

を含む数種の菌種の類別にも利用できることが明らかになったので，これらの成果について報告する。

なお，本報告は昭和55年8月～56年2月までに試験研究したものを取りまとめたものである。

実験材料及び方法

1　ヤマモモこぶ病菌のファージのこぶ組織及び土壌からの分離

沖縄県西原町千原に自生していたヤマモモの自然発病樹から採取したこぶ組織片を細片にし，約50mℓの水道水と等量のペプトン水（ポリペプトン10g，ブドウ糖10g，蒸留水1リットル，pH6.8）の混合液を含む三角フラスコに投入し，室温に2～7日間静置した。これを脱脂綿でろ過後，遠沈した（6000rpm 20分間)。この上澄み液をミリポアフィルター（孔径0.22μmまたは0.45μm）でろ過除菌し，ろ液を滅菌試験管に採取した。次に，予め同じ発病樹のこぶから分離しておいた病原細菌の濃厚懸濁液を調整し，この2滴を滅菌シャーレに加え，溶解後，45℃程度に冷却したYPA培地（酵母エキス・ペプトン・寒天培地）を混合し，菌液が均等になるように拡散した。この平板培地が固化した後，さきに調整したろ液を1～2滴滴下した。翌日，ろ液を滴下した部分に細菌の生育していない透明部分（溶菌斑）が観察されたら，透明部分を周囲の寒天培地ごと採取し適量のペプトン水中に投入し定温器内で一晩静置培養した。次に，ファージの単溶菌斑分離を行うため，静置しておいた培養液をよく振とうして，再度遠沈，ミリポアろ過を行った。このろ液を滅菌水で段階的に10倍希釈し，その各々について次の操作を行った。まず，普通の寒天濃度のYPA平板培地を調製し，別に，上層寒天培地とするため，0.5％寒天濃度のYPA培地2.5mℓ入り小試験管を準備し，これを融解した後，約48～52℃の温度に保った。これに，さきに10倍希釈しておいたろ液の0.1mℓと指示菌の濃厚懸濁液の0.1mℓを加えてすばやく混合振とうし，YPA平板上に流し込んで均等に広げて静置し，寒天が完全に固化した後，定温器に移した。翌日，独立した溶菌斑から1個の溶菌斑を選んで切り取り，ペプトン水中で増殖させた（溶菌斑形成法)。一方，土壌からの分離は沖縄県沖縄市内で自生するヤマモモ罹病樹の樹下の土壌を採取し，この約20gを約50mℓのペプトン水と混合し，三角フラスコ中に入れて静置した。以後の操作は，組織片からの分離法と同様である。以上の試験により，こぶ組織片と土壌の2つの分離源から，各1株づつの2種のファージを分離することができた（Fig.）それぞれのファージ株をMP1，MP2と呼ぶこととした。

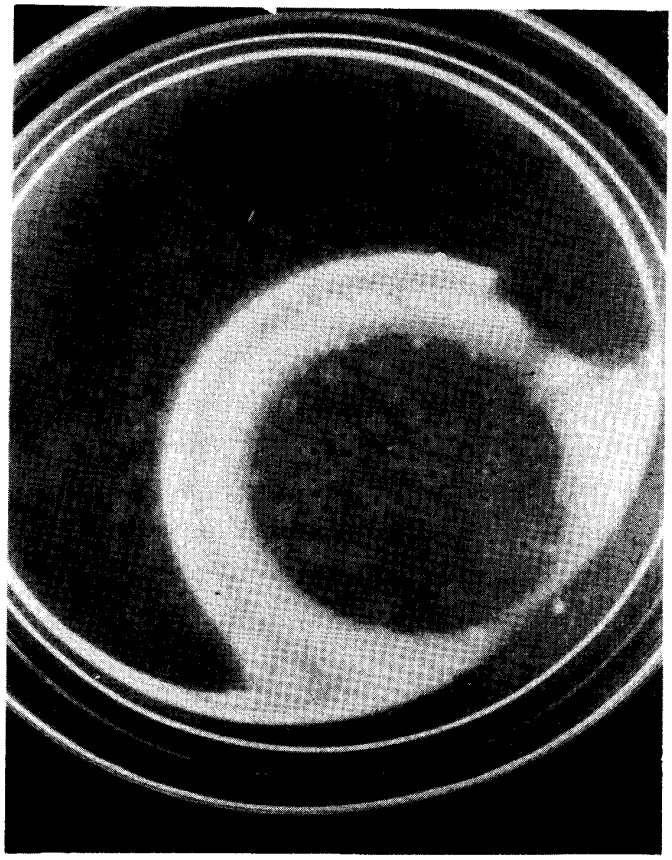

Fig.　Plaques developed by phage MP 1 on *Pseudomonas syringae* pv. *myricae*

2　寄主範囲試験

2株のファージが，未同定種を含む既存の樹木こぶ病菌の各菌株に対して寄生性を有しているか否か，及び，その程度等について調査するため，前記のドロップ法により寄主範囲試験を実施した。

なお，供試したファージ液濃度は，溶菌斑計数法により定量した結果，約10^7～10^8pfu/mℓの範囲にあった。

供試した細菌は次の6菌種70菌株である。

① ヤマモモこぶ病菌……MR 1～21菌株（*Pseudomonas syringae* pv. *myricae*）

② ナカハラクロキ癌種（こぶ）病菌……No.1，11，12a，13c，14，17菌株（*P. symploci* n. sp. ATCC49832，NCPPB3798，ICMP10910）

③ シャリンバイこぶ病菌……No.1～12菌株（*P. syringae* pv. *rhaphiolepidis*）

④ ウラジロエノキこぶ病菌……TO1～3菌株（*P. syringae* pv. *tremae*）

⑤ カクレノミこぶ病菌……DT1～13菌株（*P. syringae* pv. *dendropanacis*）

⑥ センダンこぶ病菌……No.1～15菌株（*P. meliae*）

以上の70菌株の内，ヤマモモこぶ病菌のMR13～19菌株は静岡県内で，MR20は福岡市，MR21とシャリンバイこぶ病菌のNo.12菌株は奄美大島（鹿児島県）でそれぞれ採集したものである。また，ウラジロエノキこぶ病菌は3菌株とも石垣島（沖縄県）で，それ以外の菌株は全て沖縄本島内の各地から採集したものである。

結　果

1　クロロホルム耐性試験

ファージの中にはクロロホルムに耐性のものがあり，分離されたファージにこの性質があれば，ミリポアフィルターを使用せずに，より簡易な方法で分離や増殖時の除菌操作ができることから，次の方法によりクロロホルム耐性試験を実施した。MP1，MP2の2種のファージ液のそれぞれに指示菌を混合し，その培養液からファージ液を適量調製し，これに1/20量のクロロホルムを加え，1分間よく振とうした。ドロップ法により，活性の有無を調べた結果，2種のファージとも処理前と同様に溶菌斑を形成したので，クロロホルム耐性があるものと判定した。

2　溶液斑の測定

前記の溶菌斑形成法により，出現させた溶菌斑の大きさを測定した結果，MP1，MP2ファージの溶菌斑は，それぞれ直径0.2～4.2mm（平均2.5mm），0.3～2.7mm（平均1.7mm）であった。MP1ファージは，MP2ファージよりも大きな溶菌斑を形成した。

3　MP1，MP2ファージのヤマモモこぶ病菌の各菌株に対する寄生性

寄主範囲試験の結果，2種のファージのヤマモモこぶ病菌に対する寄生性は，Table 1のとおりであっ

Table 1 Host range of phage MP 1 and MP 2 on the isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *myricae*

Locailty	Okinawa												shizuoka							Fukuoka	Amami
Isolates	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
MP 1	+	+	+	+	W	+	+	+	W	+	+	+	−	−	−	−	+	−	−	+	+
MP 2	+	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	−	−	−	−	+	−	−	W	W

Note:　+: positive　−: negative　W: weekly positive

た。すなわち，沖縄で分離されたMR1～MR12菌株の内，MR5とMR9菌株を除く全菌株，及び静岡菌のMR17と鹿児島菌のMR21，福岡菌のMR20には寄生性があったが，MR5とMR9に対するMP1ファージの寄生性は弱く，MP2ファージは全く溶菌しなかった。また，静岡菌の7菌株の内MR17を除く6菌株は，いずれのファージに対しても全く溶菌されなかった。さらに詳細に観察すると，福岡菌MR20と鹿児島菌MR21での反応は，沖縄菌で感受性の反応を示した場合のスポット部分全体が透明になる状態に比べて，スポットの中に独立した溶菌斑が散在するという弱い反応であった。その程度は，MR21がMR20よりも密に分散しているのが認められ，MP2ファージにもその傾向があったが，MP1ファージに対する反応よりもさらに弱い反応であった。

4 その他の樹木こぶ病菌に対する寄生性

ヤマモモこぶ病菌以外の細菌に起因する樹木こぶ病菌に対する2種のファージの寄生性は，Table 2のとおりであった。すなわち，センダンこぶ病菌とナカハラクロキ癌種（こぶ）病菌の2種のいずれの菌株に対しても，2種のファージは全く寄生性がなかった。しかし，ウラジロエノキこぶ病菌，カクレミノこぶ病菌，及びシャリンバイこぶ病菌の各菌株に対する試験では，全菌株かまたは，9割以上の菌株に寄生性があった。わずかに非感受性かまたは，弱い感受性を示す菌株があったが，その採集地にヤマモモこぶ病菌のような一定の傾向は見いだせなかった。

Table 2 Host range of phage MP 1 snd MP 2 on bacterial gall pathogens of forest trees

Isolates of *P. meliae*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
MP1	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
MP2	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

Isolates of P. *symploci*	1	11	12a	13c	14	17
MP 1	−	−	−	−	−	−
MP 2	−	−	−	−	−	−

Isolates of *P. syringae* pv. *tremae*	TO1	TO1	TO1
MP1	+	+	+
MP2	+	+	+

Isolates of *P. syringae* pv. *dendropanacis*	DT1	DT2	DT3	DT4	DT5	DT6	DT7	DT8	DT9	DT10	DT11	DT12	DT13
MP 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+
MP 2	+	+	+	W	+	+	+	+	W	W	−	+	+

Isolates of *P. syringae* pv. *rhaphiolepidis*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MP1	W	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
MP2	W	+	W	−	+	+	+	+	+	+	+	+

Note: +: positive, −: negative, W: weekly positive

考　察

ヤマモモこぶ病菌[3]は，ファージ寄生性によって概ね九州・沖縄系と静岡系の菌株系統に区別することができた。すなわち，MP1，MP2ファージは，ヤマモモこぶ病菌に対して系統特異性があるといえる。

また，福岡菌と鹿児島菌は，各1菌株を供試したにすぎないが，地理的に沖縄から遠方になるにつれ溶菌反応が弱くなる傾向が見られたことは興味深い。

さらに，センダンこぶ病菌[1]とナカハラクロキ癌種（こぶ）病菌[2]は，ヤマモモこぶ病菌とは全く別種ではないかと間接的に推定できた。直接的には，この2菌種は，細菌学的性状の差異から，ヤマモモこぶ病菌とは別種であると証明されている。一方，ウラジロエノキこぶ病菌[4]，カクレミノこぶ病菌[5]，及びシャリンバイこぶ病菌[6]の3菌種は，ヤマモモこぶ病菌とは，極めて近い菌種に属しているのではないかと推定できた。その後の研究成果によってこの3菌種については，細菌学的性状から，ヤマモモこぶ病菌と同様の *P. syringae* 群の一病原型（pathovar）であることが証明されている。*P. syringae* 群の樹木こぶ病菌をファージによって系統分けする試みは，ビワがんしゅ病[7]以外にはこれまでにあまり例がなかったが，今回分離されたファージを使った一連の試験調査によって，新たな研究課題と示唆を得ることができた。すなわち，ヤマモモこぶ病菌は，*P. syringae* 群の一病原型に属しており，そのファージは，同じ *P. syringae* 群に属する数種の樹木こぶ病菌に対しても同様に寄生性を示したことから，*P. syringae* 群と疑われる病害（こぶ病）について本ファージの寄生試験を実施する価値があると考えられる。

また，今後の課題としてヤマモモこぶ病菌についてファージ寄生性による上記の2系統以外にも，系統が存在するか否か，さらに調査する必要があろう。これらの課題を追試するためには，既存の採集地域以外から分離した病原細菌菌株及びその他の *P. syringae* 群の樹木こぶ病菌に対するヤマモモこぶ病菌のファージによる寄主範囲を調査する必要があろう。また，発生地域の異なる他の分離源由来のファージを得て，その系統別に既存のヤマモモこぶ病菌菌株，*P. syrinsae* 群の各病原型（pathovar）及びその他の植物病原細菌に対するより詳細な寄主範囲を調査し，さらにその他の同じ病原型由来のこぶ病からファージを分離し，その寄主範囲を調査する必要があろう。

要　約

ヤマモモこぶ病のこぶ組織と土壌からファージを別々に分離した。この2株のファージを採集場所の違う複数のヤマモモこぶ病菌の21菌株に対して寄主範囲試験を実施した結果，ファージの寄生性によって，こぶ病菌を九州・沖縄と静岡の2系統に区別することができた。

さらに，既存の樹木こぶ病菌6種70菌株に対して寄主範囲試験を行った結果，このファージは *P. syringae* 群の樹木こぶ病菌に対して種特異性があると推定できた。これらのことから，本ファージによる寄主範囲試験が将来，*P. syringae* 群の病原細菌に起因する樹木こぶ病を判別するための有効な手段となる可能性のあることが示唆された。

引用文献

1．大宜見朝栄　1977　センダンこぶ病に関する研究，琉大農学報**24**：497－556
2．――――　1991　ナカハラクロキ癌種（こぶ）細菌病の病原と生態，平成元・2年度文部省科学研究費補助金（一般研究C）研究成果報告書　研究課題番号01560173
3．――――・樋口　浩　1981　ヤマモモのこぶ病（新称），日植病報**47**：443－448

4．――――・――――・瀧川雄一 1988 ウラジロエノキこぶ病（新称），日林誌**70**：441－446
5．――――・――――・―――― 1988 カクレミノこぶ病（新称），日植病報**54**：296－302
6．――――・川野千尋・――――・―――― 1992 シャリンバイこぶ病（新称），
日林誌**74**：308－313
7．森田 昭 1978 ビワがんしゅ病に関する研究 第2報，日植病報**44**：6－13