

チューリップかいよう病に関する研究

II. 病原細菌に寄生するファージ*

工藤浩平・小林敏郎

横浜植物防疫所調査課

チューリップかいよう病は富山・新潟県はもとより、チューリップ栽培地帯に広く分布し、毎年大きな被害を引きおこし、チューリップ栽培上の重要病害の一つにあげられている。本病は葉、茎および球根等の各部に灰白色斑、亀裂、かいよう、黄色斑(球根)等の症状を呈し、原因不明の生理病とされていたが、KOBAYASHI & OBATA (1974) により、これが *Corynebacterium oortii* SAALTINK et MASS GEESTERANUS による細菌病であることが明らかにされ、本病の生態についてもごしに解明されてきている(草葉・名畑, 1974・1975; 藤井ら, 1975)。しかし、わが国における本菌の発生生態や菌系の分布状況については不明の点も多い。細菌による植物の病害についての発生生態、病原細菌の系統分類などを研究する場合、病原細菌のバクテリオファージの使用は、しばしば有効な方法として利用される。本病の生態についての調査の一環として、富山および新潟産試料から本病原細菌に寄生性のある5種のバクテリオファージを分離し、これらのバクテリオファージについて、物理的性質およびファージによる病原細菌の類別、その分布等について検討したので報告する。起稿にあたり、ファージ粒子の電子顕微鏡観察に御便宜をはかっていたごしに当所国際課松濤美文技官、種々協力された農林省農蚕園芸局植物防疫課川上清隆技官、また、試料を採集された名古屋植物防疫所伏木支所藤井伸泰技官、ならびに当所国際課および同新潟支所の各位に対し、厚く御礼申し上げる。

実験材料および方法

1. ファージの分離

第1表に示したように、新潟産3株、富山産7株のかいよう病罹病チューリップ、および新潟県から採集し、培養中に溶菌現象をおこした *C. oortii* 菌株(N-11)の

*本研究の概要は1974年日本植物病理学会大会(東京都)において発表した。

合計11点をファージ分離のための材料とした。ファージの分離は常法(OKABE & GOTO: 1963)によりおこない、罹病株では葉部の罹病部位を、培養斜面の場合はそのまま分離に供した。ファージ検出のための指示菌として、富山産試料には同一試料から分離された病原細菌を、新潟産試料にはオランダからの導入菌 SI25-VD26、新潟産病原細菌 Y-2 および Y-3 を、また、培養斜面の場合はその培養菌株 N-11 を用いた。以下の試験を通じ、すべて培地は肉汁を0.5%加用した変法 P S A (KOBAYASHI & OBATA: 1974) を使用した。培養は25°Cで24時間おこない、出現した溶菌斑からファージを採集した。

2. 溶菌斑形成適温

培養温度区を20, 23, 25, 27および30°Cの5区とし、基層に変法 P S A, 上層に0.6%寒天変法 P S A を用いて重層法によりおこなった。各温度区で24時間培養後、溶菌斑の大きさ、鮮明度について観察した。なお、以下の試験を通じ溶菌斑の形成はすべて重層法によりおこなった。

第1表 ファージの分離材料

採集地	品 種	指示菌	ファージ	
新潟県 不明	不 明	S 125-V O26	CoP1	
〃 横越村	ウィリアムビット		Y-2	—
〃 荒川町	ゴールドンハーベスト		Y-3	CoP2
富山県立山市	ア ル ビ ノ	T-4	CoP3	
〃 〃	ア ド ル ノ	T-5	CoP4	
〃 〃	チャイナピンク	T-6	—	
〃 〃	オ ラ フ	T-7	—	
〃 〃	マウントエレバス	T-8	—	
〃 氷見市	パールリヒター	T-9	—	
〃 〃	レッドマタドール	T-10	—	
新潟県荒川町	(培養菌株)	N-11	CoP5	

3. 温度耐性

温度区を25, 44, 46, 48, 50, 52, 54および56°Cの8区とした。殺菌水2.9mlにファージ濃度が 10^3 Cells/mlとなるようファージ液を0.1ml加え、各温度区とも恒温水槽中で10分間振盪処理をおこなった後、直ちに冷却した。各温度処理区から0.1ml採取し、25°Cで20時間培養後、活性ファージ数を測定した。

4. pHに対する安定性

pH3.0~10.0の8区に調整した液体培地の変法PS2.9mlに温度耐性試験と同様、各ファージ液を0.1ml加えた。25°Cに1時間保った後、活性ファージ数を測定した。

5. 紫外線に対する感受性

紫外線照射は積算時間で10, 50, 80秒とした。殺菌水各10mlを小型ペトリ皿にとり、これに $10^8 \sim 10^9$ Cells/ml濃度のファージ液を0.1ml加えた。暗室内でペトリ皿のふたをとり、15Wの殺菌灯を真上50cmの路離から所定時間照射後各0.1ml採取し活性ファージ数を測定した。

6. *C. oortii* および他植物病原細菌に対する寄生性

富山、新潟、福島、兵庫、鳥取の各県産罹病チューリップから分離された病原細菌およびオランダから導入した菌株のほか、輸入検疫時に罹病植物から採集し、オランダ産と考えられる菌株合計94菌株について、各ファージの寄生性を調べた。なお、供試した全菌株についてチューリップへ接種、発病させ、*C. oortii*であることを確認した。各菌株とも25°C、24時間斜面培養したものを用い、drop methodにより、各ファージ濃厚液($10^8 \sim 10^9$ cells/ml)をそれぞれ1滴滴下し、25°Cで15~20時間培養後、溶菌斑形成の有無を調べた。次に、ファージの寄生特異性を調べるため、第9表に示すように、本病原細菌以外の植物病原細菌4属21種1変種について同様な方法によりファージの寄生性を調べた。

結 果

1. 分離されたファージ

ファージ分離の結果、溶菌タイプの異なる5種のファージが分離された。第1表に示したように、分離されたこれら5種のファージをCoP1~5と命名した。溶菌斑の形態は第2表および第1図に示した。CoP1・2はいずれも中型でほぼ同じ大きさの溶菌斑を形成し、CoP1が二重輪型、CoP2は全体が透明となる。これに対し、CoP3・4・5はいずれも小型・透明の溶菌斑を形成する。また、ファージ粒子の形態および大きさについては

第2表 *C. oortii* ファージ溶菌斑の性状

ファージ	形 態	大 き さ	指示菌
CoP 1	中型・二重輪状	1.0~2.4nm	Y-3
CoP 2	中型・透 明	1.2~2.4	Y-3
CoP 3	小型・透 明	0.2~0.6	T-4
CoP 4	小型・透 明	0.1~0.2	T-5
CoP 5	小型・透 明	0.3~1.0	N-11

第3表 *C. oortii* ファージ粒子の形態

ファージ	形 態	大 き さ	
		頭 部	尾 部
CoP 1	精 虫 型	69~73nm	15×250~280nm
CoP 2	精 虫 型	75~79	15×250~280
CoP 3	精 虫 型	63~67	15×110~130
CoP 4	球 状	47~57	
CoP 5	精 虫 型	65~70	15×200~230

第3表および第2図に示した。CoP1・2・3・5の4種ファージがいずれも尾部を有する精虫型で、頭部は多面体を呈し、CoP1・2は頭部・尾部ともほぼ同じ大きさであるが、CoP3・5はやや小型で、特にCoP3の尾部はCoP1・2のほぼ2分の1と短い。これに対し、CoP4は尾部を有しない多面体の頭部のみで、他4種ファージよりもやや小型である。

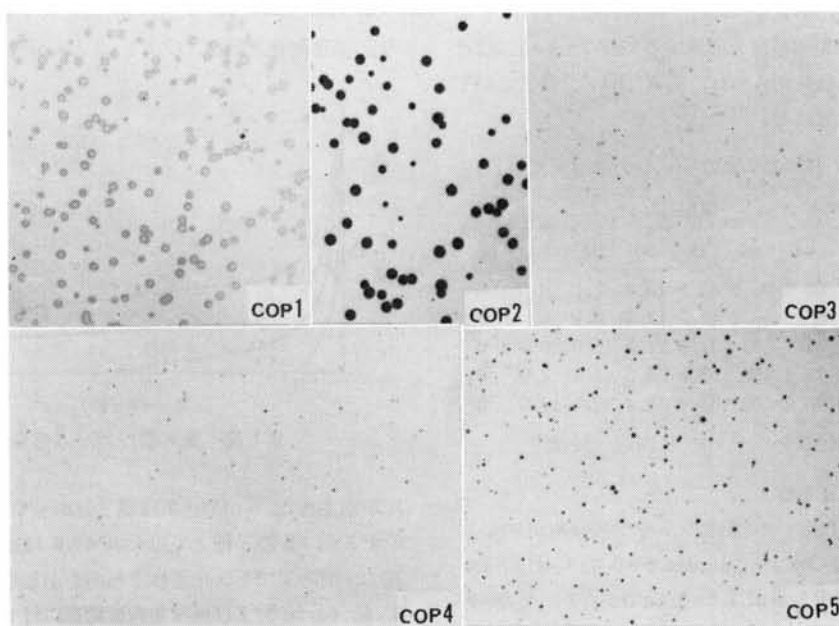
2. 溶菌斑形成適温

結果は第4表の通りである。CoP1 および CoP2は25, 27°C区で明瞭な溶菌斑を形成し、溶菌斑の大きさも最大となる。また、CoP1ではこのファージの溶菌斑の特徴である二重輪型がはっきりする。CoP3は20, 23°C区で、CoP4は23, 25°C区で、CoP5は25°C以上の温度区でそれぞれ溶菌斑の形成が良好であった。

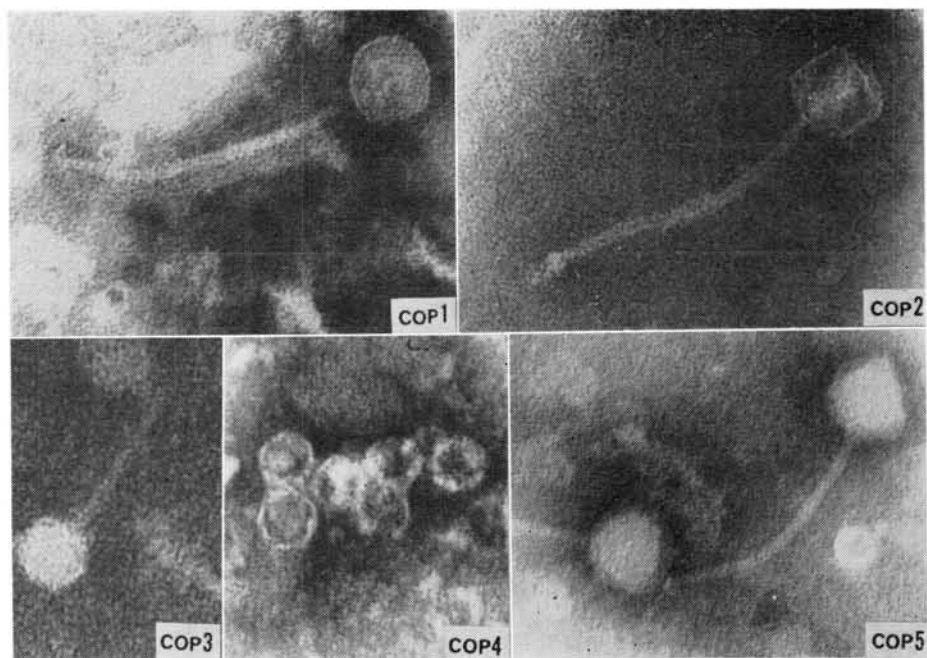
第4表 *C. oortii* ファージの溶菌斑形成適温

ファージ	温 度 (°C)				
	20	23	25	27	30
CoP 1	++*	++	+++	+++	+
CoP 2	++	++	+++	+++	+
CoP 3	+++	+++	++	+	+
CoP 4	++	+++	+++	+	+
CoP 5	+	++	+++	+++	+++

* +++: 溶菌斑形成明瞭, ++: やや不明瞭
+: 不明瞭



第1図 *C. oortii* ファージ溶菌斑



第2図 *C. oortii* ファージ粒子 (×160,000)

3. 温度耐性

結果は第5表に示すように、中型溶菌斑を形成するCoP 1・2と、小型溶菌斑を形成するCoP 3・4・5にはそれぞれ共通した傾向がみられ、前者は54℃、後者は56℃で完全に不活化された。

第5表 C. oortii ファージの温度耐性

ファージ	温度 (°C)							
	25	44	46	48	50	52	54	56
CoP 1	100*	86.6	95.5	43.3	13.4	1.5	0	0
CoP 2	100	85.0	66.4	40.7	13.3	0.9	0	0
CoP 3	51.1	39.1	100	31.3	21.3	15.0	0.4	0
CoP 4	93.0	75.6	100	93.9	58.3	47.1	1.0	0
CoP 5	96.6	98.9	100	63.4	53.4	30.7	15.9	0

* 活性ファージ数をパーセントであらわした

4. pHに対する安定性

結果は第6表に示した。活性ファージ残存率が50%以上となるpH域はCoP 1・2がpH4.0~9.0, CoP 3・4がpH5.0~8.0, CoP 5がpH5.0~10.0であった。また、いずれのファージもアルカリ側で安定な傾向がみられた。

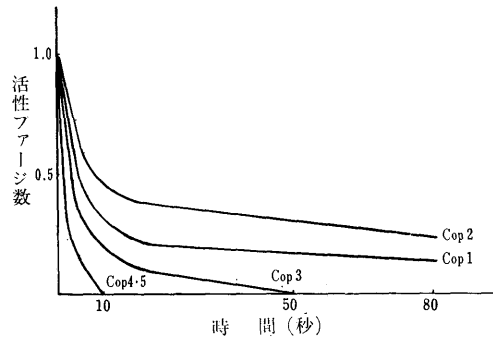
第6表 C. oortii ファージのpHに対する安定性

ファージ	pH								
	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	
CoP 1	5.6*	56.7	76.9	75.5	100	89.6	71.3	40.3	
CoP 2	2.2	62.2	96.9	100	99.6	96.3	86.5	42.0	
CoP 3	8.1	15.3	87.1	100	62.9	54.0	26.6	15.3	
CoP 4	17.0	18.4	75.5	100	85.8	67.9	32.1	26.9	
CoP 5	0	30.8	79.2	99.2	100	86.2	72.3	60.8	

* 活性ファージ数をパーセントであらわした

5. 紫外線に対する感受性

第3図に示したように、紫外線に対する感受性により、温度耐性と同様、CoP 1・2とCoP 3・4・5の2群



第5図 紫外線に対する感受性

に類別された。CoP 1・2は感受性がやや低いのに対し、CoP 3・4・5の3種とくにCoP 4・5は感受性が比較的高く、短時間で不活化される傾向を示した。

6. C. oortii および他植物病原細菌に対する寄生性

第7表に示したように、供試したC. oortii 94菌株すべてに寄生するファージはなく、最も多くの菌株を侵し得たファージはCoP 4で69菌株であった。これに対し、最も寄生範囲のせまいのはCoP 5で16菌株に反応を示し

第7表 C. oortii ファージの溶菌株数

	CoP 1	CoP 2	CoP 3	Cop 4	Cop 5
溶菌株数	53	57	46	69	16

第8表 C. oortii の Lysotype

Lysotype	ファージ反応					採集地別菌株数						
	CoP 1	CoP 2	CoP 3	CoP 4	Cop 5	福島	兵庫	鳥取	新潟	富山	オランダ	計
A	+	+	+	+	+	0	0	0	3	2	0	5
B	+	+	+	+	-	1	1	0	4	15	0	21
C	+	+	-	-	-	0	0	0	3	3	0	6
D	-	-	+	+	-	0	0	0	5	11	1*	17
E	-	-	-	-	+	0	0	0	2	0	1	3
F	+	+	-	+	-	0	0	0	8	7	0	15
G	-	-	-	+	-	0	0	0	1	0	0	1
H	-	+	-	+	-	0	0	0	2	1	0	3
I	-	-	+	+	+	0	1	0	0	0	1	2
J	-	+	-	-	+	0	0	0	1	0	0	1
K	+	+	-	-	+	0	0	0	0	0	1	1
L	+	+	-	+	+	0	0	0	3	0	1	4
M	-	+	+	-	-	0	0	0	1	0	0	1
N	+	-	-	+	-	0	0	0	0	1	0	1
O	-	-	-	-	-	0	2	1	2	8	0	13

* オランダからの導入菌

第9表 *C. oortii* フェージの寄主範囲

病原細菌	フェージ				
	CoP 1	CoP 2	CoP 3	CoP 4	CoP 5
<i>Pseudomonas phaseolicola</i>	—	—	—	—	—
<i>P. setariae</i>	—	—	—	—	—
<i>P. aptata</i>	—	—	—	—	—
<i>P. mori</i>	—	—	—	—	—
<i>P. coronafaciens</i>	—	—	—	—	—
<i>P. coronafaciens</i> var. <i>atropurpurea</i>	—	—	—	—	—
<i>P. solanacearum</i>	—	—	—	—	—
<i>P. lachrymans</i>	—	—	—	—	—
<i>Xanthomonas citri</i> N6101	—	—	—	—	—
N6119	—	—	—	—	—
<i>X. phaseori</i>	—	—	—	—	—
<i>X. oryzae</i>	—	—	—	—	—
<i>X. pruni</i>	—	—	—	—	—
<i>X. hyaeintha</i>	—	—	—	—	—
<i>X. campestris</i>	—	—	—	—	—
<i>X. cucurbitae</i>	—	—	—	—	—
<i>X. vesicatoria</i>	—	—	—	—	—
<i>X. translucens</i> f. sp. <i>hordei</i>	—	—	—	—	—
<i>Corynebacterium michiganense</i>	—	—	—	—	—
<i>C. sepedonicum</i>	—	—	—	—	—
<i>Erwinia aroideae</i> E1-1-7	—	—	—	—	—
<i>E. carotivora</i> E1-2-2	—	—	—	—	—
<i>E. atroseptica</i> 549	—	—	—	—	—

たのみであった。5種フェージに対する感受性により、*C. oortii* 94菌株は第8表に示したように、15の Lysotypeに類別された。これらの Lysotype のうち、比較的多くみられる Lysotype は B, D, F および O型であった。いずれのフェージにも感受性を示した菌株は5菌株のみであり、逆に5種フェージに感受性を示さない菌株（O型）は13菌株あった。Lysotype について採集地域別にみると、富山産48菌株は8、新潟産35菌株は12の type にそれぞれ類別され、このうち7 type が両県に共通であった。これら両県共通の各 type に属した菌株は比較的多い傾向がみられた。一方、富山産のみにみられる type は1 type のみであり、これに対し、富山産にみられず、新潟産にみられる type は5 type あり、これらの地域的に遍する type に含まれる菌株は各 type とも1～3株と少なかった。また、オランダからの導入菌および輸入検疫のための隔離栽培株から分離された5菌株はいずれも互いに異なる type に属し、このうち2菌株は新潟産菌株にのみみられる type に含まれた。しかし、日本産菌株にみられない type も1 type 存在した。次に5種フェージに対する他植物病原細菌の感受性試験の結果について第9表に示した。供試した *Pseudomonas* 属

7種1変種、*Xanthomonas* 属9種、*Corynebacterium* 属2種、*Erwinia* 属3種合計4属21種1変種の病原細菌はいずれのフェージに対しても感受性を示さず、分離されたこれら5種フェージはいずれも種特異性の高いフェージと考えられる。

考 察

植物病原細菌の多くの種類について、それに寄生するフェージが報告されている (OKABE & GOTO: 1963) が、*C. oortii* を侵すフェージについての報告はみあたらない。

今回分離した5種のフェージについての諸性質を示すと第10表のようになり、CoP 1 および CoP 2 は、不活化温度、pH の変化に対する感受性、紫外線感受性などの物理的性質のほか、フェージ粒子の形態、溶菌斑形成適温、寄主範囲で類似した性質を有し、他の3種とは区別される。これら両フェージは、溶菌斑の形状が異なる互いに近縁のフェージと考えられる。これに対し、CoP 3, CoP 4, CoP 5 はいずれも小型の透明な溶菌斑を形成し、物理的諸性質も互いに類似した点がみられたが CoP 4 は

第10表 *C. oortii* フェージの性質

フェージ	溶菌斑形成適温	溶菌斑の形態	不活化温度	pH安定性*	紫外線感受性**	溶菌株数
CoP 1	25°C	中型・二重輪型	54°C	4～9	S	53
CoP 2	25	中型・透明	54	4～9	S	57
CoP 3	23	小型・透明	56	5～9	H S	46
CoP 4	25	小型・透明	56	5～8	H S	69
CoP 5	25	小型・透明	56	5～10	H S	16

* 50%以上活性フェージ数が認められるpH範囲

** Sは感受性, H Sは高感受性

球状フェージで他のフェージと区別され、CoP3とCoP5もフェージ粒子の尾部の長さ、溶菌斑の大きさ、溶菌斑形成適温が互いに異なり、それぞれ異なる種類のフェージであると認められる。また不活化温度は、CoP1, CoP2がともに54°C、CoP3～5が56°Cであり、寄主細菌 *C. oortii* の死滅温度54°C (KOBAYASHI & OBATA: 1974) と前2者は一致し、後3者はそれよりもやや高い傾向にある。

これら5種のフェージに対する反応から寄主細菌が15の菌系に分かれ、本菌に多数の菌系が存在することが判明した。富山、新潟両県の間には、多数の菌株が属する菌系の分布に差は認められなかったが、新潟県下から採集した菌株は、菌株数の割には富山県の菌に比し、菌系統数が多く、少数の菌株が属する特異な菌系の分布が多い特徴があった。この両県における菌系の分布の差異が何によるものであるかは、両県のチューリップ栽培の歴史、品種構成、栽培条件等種々の要因について検討した上でないと結論は出せない。しかし、富山県に比し、新潟県は栽培品種の更新が遅れているといわれ、古くから栽培されている品種が多く、生産者の組織化も十分進んでいない現状にあるといわれ、個々の生産者が、汚染種球を更新せず、その間菌系の多様化が進んだとも推察される。わが国の菌が、そもそもオランダからの侵入菌と考えられるにもかかわらず、オランダからの4菌株のうち3菌株は、少数菌系に属したことは興味あることであるが、日本の菌とオランダの菌との差異については、オランダからの菌をさらに多数調査した上でないと明らかでない。また、新潟、富山の両県以外の菌系分布についても同様である。

寄主細菌の血清型と Lysotype との関係について検討した報告も他種細菌についてはいくつかある (DYE et al: 1964, LOVREKOVICH & KLEMENT: 1965, BILLING: 1970) ようである。本菌の場合、血清型 (工藤・小林: 1975) と Lysotype との関係については、本報告では

示さなかったが、特記すべき一定の傾向は認められず、詳細についてはふれない。

本試験で使用した菌株はすべてチューリップに病原性を有することは確認してあるが、病原力および生理的諸性質は明らかにしておらず、これらの性質と Lysotype との関係については明らかでない。しかし、本フェージは、生態的研究への応用また寄主範囲の比較的広い、CoP1, CoP2, CoP4 などのフェージを使用することによって、病原細菌の簡易同定に有効であると考えられる。

摘 要

チューリップかいよう病菌 *Corynebacterium oortii* SAALTINK et MASS GEESTERANUS を侵す5種類のフェージを分離し、それぞれCoP1・2・3・4・5と命名した。CoP1・2は新潟産、CoP3・4産は富山産罹病株から分離し、CoP5は新潟産菌株から分離したものである。溶菌斑形成適温はCoP1・2・4・5が25°C、CoP3が23°Cで、溶菌斑はCoP1・2が中型で前者が二重輪型、後者は透明となり、CoP3・4・5はいずれも小型・透明となる。フェージの形態はCoP4が球状であるのに対し、他4種フェージはいずれも尾部を有する精虫型である。以上の結果および、温度耐性、紫外線感受性、pHに対する安定性から、CoP1とCoP2は溶菌斑の形状が異なる近縁のフェージであり、他の3フェージはそれぞれ別の種類のフェージと認められた。新潟、富山、福島、兵庫、鳥取およびオランダ産 *C. oortii* 94菌株について、CoP1は53、CoP2は57、CoP3は46、CoP4は69、CoP5は16菌株をそれぞれ溶菌したが、全株を溶菌するフェージはない。また、これら5種フェージは供試した他植物病原細菌4属22種を溶菌せず、いずれも種特異性が高い。供試した *C. oortii* 94菌株は、これらフェージに対する反応から、15の Lysotype に類別され、本菌に多数

の Lysotype の存在することが判明した。普遍的にみられる type は B, D, F および O の 4 type であり, 全ファージに溶菌される菌株は 5, 全く溶菌されない菌株は 13 菌株であった。type の分布に地域的特徴はみられないが新潟産菌株に type の多様化がみられた。

引用文献

- BILLING, E. (1970) Further studies on the phage sensitivity and the determination of phytopathogenic *Pseudomonas* spp. J. appl. Bact. 33: 478-491.
- DYE, D. W., M. P. STARD and H. STOLD (1964) Taxonomic clarification of *Xanthomonas vesicatoria* based upon host specificity, bacteriophage sensitivity, and cultural characteristics. Phytopathol. Z. 51: 394-407.
- 藤井伸泰ら (1976) チューリップかいよう病の発生生態植防研報 13: 31-40.
- KOBAYASHI, T. and T. OZATA (1974) Occurrence of *Corynebacterium oortii* SAALTINK et MAAS GEESTERANUS on tulip in Japan. Res. Bull. Pl. Prot. Japan 12: 6-15.
- 工藤浩平・小林敏郎 (1975) チューリップのかいよう病菌について (Ⅲ) 病原細菌の血清型 (講要), 日植病報 41 (3): 280.
- 草葉敏彦・名畑清信 (1974) チューリップ潰よう病の伝染経路について (講要), 日植病報 40 (3): 196-197.
- 草葉敏彦・名畑清信 (1975) チューリップ潰よう病に関する研究. 昭和49年度病害虫関係専門別総括検討会議資料 No. 285, 農技研編.
- LOVREKOVICH, L. and Z. KLEMENT (1965) Serological and bacteriophage sensitivity studies on *Xanthomonas vesicatoria* strains isolated from tomato and pepper. Phytopathol. Z. 52: 222-228.
- OKABE, and M. GOTO (1963) Bacteriophages of plant pathogens. Ann. Rev. Phytopath. 1: 397-418.

Summary

Studies on Bacterial Disease of Tulip

II. Bacteriophages of *Corynebacterium oortii* SAALTINK et MASS GEESTERANUS

Kohei KUDO and Toshiro KOBAYASHI

Research Division, Yokohama Plant Protection Station

Five bacteriophages designated CoP1, CoP2, CoP3, CoP4 and CoP5 which attack *Corynebacterium oortii* were isolated and characterized.

Four phages CoP1, CoP2, CoP3 and CoP4 were obtained from infected tulip leaf, and CoP5 was obtained from *C. oortii* isolate N-11 culture. Optimum temperature for plaque formation of CoP3 and other four phages is 23 °C and 25 °C respectively. Of all phages, CoP1 and CoP2 form middle size plaque, and the former produces double ring-shaped plaques, but the latter's plaques are clear lytic spot. The other three phages form pinhead or small, and clear plaques. The shape of the particles of CoP4 phage is polyhedral head with no tail, and that of other 4 phages are all tadpole. CoP1 and CoP2 are closely related with each other with respect to thermal inactivation, effect of ultraviolet irradiation and pH on phage stability, host range, phage morphology and plaque size except plaque morphology. Other three phages are different from one another.

All of these five phages did not lyse 21 species and 1 variety of plant pathogenic bacteria, i.e. 7 species and 1 variety of *Pseudomonas*, 9 of *Xanthomonas*, 2 of *Corynebacterium* other than *C. oortii*, 3 of *Erwinia* used in this experiment. These phages were thus found to be specific to *C. oortii*.

No phages attacked all of 94 isolates of *C. oortii* which were collected from Niigata, Toyama, Fukushima, Hyogo and Tottori in Japan and from the Netherlands. Of 5 phages, CoP4 lysed 69 isolates and has the widest host range. On the contrary, CoP5 lysed only 16 isolates and has the narrowest host range. Ninety four bacterial isolates were divided into 15 lysotypes by sensitivity to these five phages. The most common phage susceptibility types of these isolates are: CoP1. 2. 3. 4, CoP3. 4, and CoP1. 2. 4. Only 5 isolates are susceptible to all phages and none of phage attacked 13 isolates.

No specific geographical distribution of the lysotypes was observed except the fact that isolates collected in Niigata were classified to more lysotypes than those in Toyama.