

## 青枯病防除のための土壌からのバクテリオファージの分離

瀧川 義浩<sup>1</sup>

### 要 旨

青枯病菌に感染した植物体から分離した細菌、KR<sub>s</sub>L-001, KR<sub>s</sub>L-003 および KR<sub>s</sub>L-004 に感染するバクテリオファージ (ファージ) を土壌より分離した。分離したファージのうち、KR<sub>s</sub>L-001 に感染するファージは 17 種類、KR<sub>s</sub>L-003 に感染するファージは 1 種類、KR<sub>s</sub>L-004 に感染するファージは 84 種類であった。これらファージが形成するプラーク形状は、周縁輪郭が明瞭なもの、および不明瞭なもの 2 種類に分類され、ファージの種類と使用する宿主菌によって形成されるプラークの特徴は異なることが明らかとなった。

キーワード：バクテリオファージ、青枯病菌

### 1. 緒 論

青枯病菌 *Ralstonia solanacearum*<sup>1)</sup> は、主にナス科植物に萎凋症状を引き起こす土壌伝染性の病原細菌である。本病原菌に対する防除手法は、間作、輪作、土壌改良などの耕種的防除法から、拮抗微生物を用いた生物防除法の適用も試みられている<sup>2)</sup>。しかしながら、本病原菌の発生を安定的、かつ効果的に抑えることは困難であり有効な防除手法の開発が望まれている。

筆者らは、採取した土壌より青枯病菌を培養するために用いられている培地を用いて青枯病菌の分離を試みたところ、供試した土壌のほとんどから青枯様の形状をした青枯様細菌が大量に分離できることを確認している (瀧川ら、未発表)。青枯病菌は宿主範囲、地理的分布、病原性ならびに生理・生化学的性質等の異なる系統の存在が知られている<sup>3)</sup>ことを考慮すると、土壌から大量に青枯様細菌が分離できることは、青枯様細菌あるいは青枯病菌は普遍的に土壌に生息していると予想される。そのため、土壌中におけるこれら青枯様細菌が栽培作物に対して病気を引き起こす可能性は十分に考えられる。このような観点から土壌中に生息している青枯様細菌および青枯病菌が増殖しないような、あるいはこれら細菌群のみを可能な限り排除し、栽培作物に接触させない手段を講じることが重要である。

近年、青枯病菌を防除する手法としてバクテリオファージ (ファージ) が改めて着目されている<sup>4,5,6)</sup>。植物病原細菌を宿主とするファージについては、イネ白葉枯病菌をはじめとする多くの細菌で報告がされている<sup>7)</sup>。筆者の研究グループでもファージを利用した青枯病菌の生物防除の可能性について 1990 年代から着目しており、青枯病菌汚染圃場から効果的に青枯病菌 (K-101 株) を溶菌するファージ (PK-101) について報告している<sup>8)</sup>。さらに PK-101 とは異なる性質をもつファージの異なる青枯病菌に対する感染性についても報告している<sup>7)</sup>。上述したように、土壌中からは青枯様細菌が常に分離可能であることから、そのような細菌に感染するファージの分離や、分離したファージの青枯病菌に対する感染性の調査は重要であると考えられる。そこで本研究では、青枯様細菌を使用して感染性のあるファージの分離を行い、若干の知見が得られたので報告する。

## 2. 材料および方法

### 供試菌と供試土壌

本研究室で保存している青枯様細菌 KR<sub>s</sub>L-001, KR<sub>s</sub>L-003 および KR<sub>s</sub>L-004 株をファージの宿主菌として使用した。これらは青枯病が発病したトウガラシから分離後、保存した菌株であるが、接種試験による病徴の再確認をしていないので本研究では青枯様細菌とした。ファージの分離に使用した土壌は、主に大阪府および和歌山県を中心に、作物が栽培されている場所の土壌を採取し、それらを単体あるいは複数の場所の土壌を混合したものを使用した（地域非公開）。

### 供試菌の培養方法

ファージを分離する前に KR<sub>s</sub>L-001, KR<sub>s</sub>L-003 および KR<sub>s</sub>L-004 の培養は 1% テトラゾリウムクロライドを含む CPG 固形培地<sup>9)</sup> (10g ペプトン, 1g カザミノ酸, 5g グルコースを 1ℓ の蒸留水に溶解し、15g 寒天で固形培地とした) に塗抹植菌し、30℃で培養を行った。その後、単一コロニーを白金耳で採取し、CPG 液体培地中で培養してファージの分離のための宿主菌液とした。

### ファージの分離

大阪府ならびに和歌山県の各作物栽培土壌から採取した土壌をガラス容器の中に入れて後、30℃の条件で 16 時間培養した KR<sub>s</sub>L-001, KR<sub>s</sub>L-003 および KR<sub>s</sub>L-004 の培養液 10 mL を入れて懸濁した後、24 時間、室温で静置培養を行った。その後、遠心分離し、上清のみを回収した後、55℃、15 分間の熱処理を行うことで混入している細菌類の不活化を行い、ファージ溶液とした。次に、KR<sub>s</sub>L-001, KR<sub>s</sub>L-003 および KR<sub>s</sub>L-004 のみを重層寒天法を用いて作製したファージ検出プレート (1.5% CPG 固形培地に KR<sub>s</sub>L-001, KR<sub>s</sub>L-003 および KR<sub>s</sub>L-004 のみを含む 0.8% CPG 固形培地を重層したもの) を作製し、得られた 10 ~ 20 μL のファージ溶液をそのプレートに滴下 (スポット法) し、室温で 16 時間培養した。その後、ファージの感染と宿主菌の溶菌により生じたプラークの形成を確認した。次に、ファージ検出プレート上に形成されたプラークからファージを分離するために竹串を用いてプラークを穿刺し、ファージ粒子の回収を行った。その後、竹串を SM バッファー (0.1M NaCl, 7mM MgSO<sub>4</sub>, 0.01% Gelatin, 50mM Tris-HCl pH 7.5) 中で懸濁することによりファージ粒子を拡散させ、重層寒天法のファージ溶液とした。

## 3. 結果および考察

### 青枯様細菌に感染するファージの分離と特徴

土壌中におけるファージ数は極めて少ないと予想されることから、本研究では宿主菌となる菌培養液を



図 1. スポット法により検出されたバクテリオファージのプラーク形成  
指示菌として KR<sub>s</sub>L-001, KR<sub>s</sub>L-003 および KR<sub>s</sub>L-004 のみを重層寒天法を用いて作製したファージ検出プレート上に土壌と指示菌培養液を混合して培養後に上清をスポットした。矢印はプラークを示す。

土壌中に投入し、培養液中で宿主菌との感染を起こさせ、ファージ数を増加させることとした。その結果、多数のファージ検出プレート上でスポットをした全ての箇所ですべて非常に大きなプラーク形成が認められた(図1)。

このプラーク中には、数種類のファージが存在すると思われるので、検出されたプラークを穿刺し、SMバッファーに懸濁した後、既報<sup>8)</sup>にしたがって、重層寒天法で単プラークが形成されるかを検討した。その結果、それぞれの宿主菌を用いたプレートで多数の単プラークが形成されることが明らかとなった。

上記の操作をファージ検出プレートから複数回行い、検出されたプラークを無作為に選択し、数回の単プラーク分離を繰り返した後、最終的に KRSL-001 では 17 種類、KRSL-003 では 1 種類および KRSL-004 では 84 種類のファージを分離することができた。また、分離したファージのプラークは、周縁輪郭が明瞭なもの、および不明瞭なものも存在しており、ファージの種類と宿主菌によって形成されるプラークの特徴も異なることが明らかとなった(図2)。

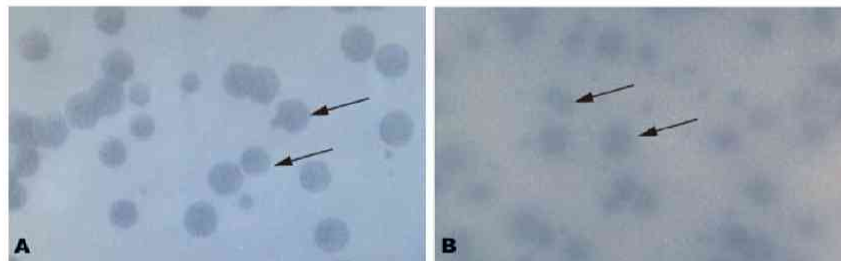


図2. 分離ファージのプラーク形状の差異  
 (A) 周縁輪郭が明瞭なプラーク (B) 周縁輪郭が不明瞭なプラーク  
 プラーク形成は重層寒天法により形成させた。矢印はそれぞれプラークを示す。

これらの特徴は、青枯病菌(K-101株)汚染圃場から分離されたファージにおいても本研究と類似の結果を得られている<sup>7)</sup>ことから、ファージの構造に差異があると予想される。

#### 4. 結 論

本研究では、土壌から KRSL-001, KRSL-003 および KRSL-004 に感染する 102 種類のファージを分離することに成功した。分離したそれぞれのファージの形態を電子顕微鏡により明らかにすることや、様々な系統の青枯病菌への感染範囲の検討は今後の課題として重要である。

#### 5. 参考文献

1. Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H., Nishiuchi, Y. (1995) Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. Nov. *Microbiology and Immunology* 39, 897-904.
2. 堀田光生、土屋健一(2012) 青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* 微生物遺伝資源利用マニュアル(12) 改訂第2版
3. 堀田光生、土屋健一(2009) 青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* の分類の現状と課題 日本植物病理学会報 75, 297-306.

- 4 . Fujiwara, A., Fujisawa, M., Hamasaki, R., Kawasaki, T., Fujie, M., Yamada, T. (2011) Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 4155-4162.
- 5 . Fujie, M., Takamoto, H., Kawasaki, T., Fujiwara, A., Yamada, T. (2010) Monitoring growth and movement of *Ralstonia solanacearum* cells harboring plasmid pRSS12 derived from bacteriophage  $\Phi$ RSS1. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 109, 153-158.
- 6 . Murugaiyan, S., Bae, J. Y., Wu, J., Lee, S. D., Um, H. Y., Choi, H. K., Chung, E., Lee, J. -H., Lee, S. -W. (2010) Characterization of filamentous bacteriophage PE226 infecting *Ralstonia solanacearum* strains. *Journal of Applied Microbiology* 110, 296-303.
- 7 . 角谷晃司、豊田秀吉、後藤幸雄、大内成志 (1994) トマト青枯病菌汚染圃場から分離された溶菌型バクテリオファージの諸特性 日本植物病理学会報 60, 531-534.
- 8 . Toyoda, H., Kakutani, K., Ikeda, S., Goto, S., Tanaka, H., Ouchi, S. (1991) Characterization of deoxyribonucleic acid of virulent bacteriophage and its infectivity to host bacteria, *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Phytopathology* 131, 11-21.
- 9 . Kelman, A. (1954) The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44, 693-695.

## 英文抄録

## Isolation of bacteriophages from field soil for bacterial wilt disease control

Yoshihiro Takikawa<sup>1</sup>

This study isolated bacteriophages (phages) from field soil for use in the biological control of the bacterial wilt disease pathogen *Ralstonia solanacearum*. Soil collected from the field was mixed with host bacteria culture solution (KRSL-001, -003, and -004) to increase the numbers of infectious phages, and incubated at room temperature for 24 h. The supernatant collected from the mixture was spotted on phage-detection plates and incubated at room temperature for 16 h. Plaques that formed on the plates were isolated as phages that could infect KRSL-001, -003, and -004. More than 100 phages were obtained from the phage-detection plates. These phages were classified into transparent or turbid plaque types based on their plaque morphology.

Key words: bacteriophages, *Ralstonia solanacearum*

---

1. Plant Center, Institute of Advanced Technology, Kinki University, Wakayama 642-0017, Japan

