

I. 緒 言

ジャガイモはテンサイ、コムギおよび豆類とともに寒冷地としての北海道の畑作を支える基幹作物である。その収益性の面から食用・加工用としての栽培が古くから重視され、より高品質な生産物の供給が強く望まれている。同時に澱粉原料用栽培地域においても食用・加工用への用途転換が産地の強い要望となっている。

一方、ジャガイモのそうか病は*Streptomyces*属の数種の病原細菌による土壤伝染性病害である。本病の最も古い発生報告は1890年のThaxterの報告に始まる。以来、現在まで一世紀以上にわたって膨大とも言える研究報告がなされているが、未だに恒久的な防除対策が確立されないまま、最も難防除な土壤病害の代表例とされている。

本病はこれまで、北米諸国、英国、フランス、ドイツ、ハンガリー、フィンランド、イスラエル、インド、韓国などをはじめ、ほとんどのジャガイモ栽培地域で発生の報告がなされ、世界的な分布を示している。

本邦では1906年に本病の病害標本が北海道殖産共進会に初めて出品され、同年害虫駆除予防法施行規則による駆除対象病害に指定された。明治時代には既に注意を喚起されていた病害ではあるが、その後の発生記録は乏しい。しかし、1970年以降に明らかな増加傾向を示し、近年では1993～1996年に筆者を含め、道立十勝・北見・中央農業試験場が行った全道発生調査においても斜網・根釧地域を中心に著しい多発生の実態が明らかにされた。

本病の被害塊茎は澱粉原料用では澱粉の含量・質の低下を招くばかりではなく、痘瘡状の病斑をその表面に形成するため、食用・加工用としての価値を著しく損なう。そのため、発生面積の拡大に伴い、本道畑作経営の安定化に対する障害となっている。

既に長崎県などでは恒常的な土壤の酸性化とクロルピクリンによる土壤消毒による防除対策が確立されているが、輪作体系下で広大な栽培面積を有し、かつ低コスト栽培を余儀なくされる本道畑作においては適用は困難であり、新たな耕種的対策による総合的防除体系の構築が希求されている。

しかしながら、防除対策の基礎となる本病菌の土壤中における生態に関する知見は極めて乏しいのが現状である。特に本病が難防除土壤病害の代表例とされる一つの理由に、その高い腐生的生存能力が示唆されるが、土壤中での生態は殆ど解明されていない。

その生態解明にとっての隘路は過去の病原菌の分

類・同定の混乱と定量法の未確立にあると考えられた。後述するように、植物病理学の分野においてそうか病菌は1960年代以降、分類学的に混乱を極め、20数種に及ぶ多くの病原菌が報告された。しかし、それらの分類学的位置付けは確定されておらず、病原学的研究のみならず生態に関する研究は大きく阻害された。近年、基準種となる*Streptomyces scabies*の再記載がなされ、さらに新たな分類基準が提案されるに至って、分類学的な混乱に終止符が打たれようとしている。それに伴って、確立されつつある分類基準による新種の報告がなされている。

同時に、そうか病菌の属する*Streptomyces*属菌は土壤中に生息する放線菌の中で卓越して優占する菌群を形成し、その代謝産物に対する産業的な重要性から膨大とも言える種が報告されたが、それらの土壤中における生態に関しては必然的に研究が進展しなかった。

そこで本研究は、新たな分類基準によって本邦に分布する病原菌の種類とその特性を明らかにするとともに、病原菌の土壤中での生態解明の基礎となる識別・定量法を開発すること、ならびに同定された病原菌の生態学的特性に基づいた土壤環境制御による新たな防除法を開発することを目的として実施したものである。

本研究の結果、本邦に分布するジャガイモそうか病菌の生態的特性が明らかにされ、同時に土壤中におけるそうか病菌の動態に関して多くの生態的知見が蓄積されることに伴って、難防除土壤病害の代表とされる本病の恒久的な防除対策が確立される端緒となることを切に希求する次第である。

これまで、元北海道立道南農業試験場の故・谷井昭夫は本道に分布する病原菌の細菌学的性質、発生生態などに関して詳細な研究を行い、本病の研究発展の礎を残した。その後を受けて、北海道立十勝農業試験場研究部病虫科、土壤肥料科、作物科を中心に、同北見農業試験場研究部病虫科、土壤肥料科、作物科、前根釧農業試験場馬鈴しょ科(現道立北見農試馬鈴しょ科)ならびに同中央農業試験場病虫部土壤微生物科が共同して、本病に対する総合防除法を確立するためのプロジェクト研究が1994年より開始された。本論文は、本プロジェクト研究の中およびそれに先立つ予備研究を含め1991年から1998年にかけて実施した試験結果を取り纏めたものである。

II. 研究史

A. ジャガイモそうか病菌の同定と分類に関する研究

本病菌の同定の試みは古く、1890年のThaxter(1890)の記載に始まる。Thaxterはコネチカット州で分離されたそうか病の病原菌を*Oospora scabies* Thaxterと命名したが、基準株は保存されていなかった。その後、Waksman and Henrici(1948)によって*Streptomyces*属に移され、その種名を*Streptomyces scabies*(Thaxter)Waksman et Henriciとされ、さらにWaksmanは1961年に形態的観察および培養試験を十分に行うことなく、病原性に基づいてIMRU3018(=ISP5078)を新基準株に指定し、保存した。この菌株は孢子鎖の形態が直〜波状型でメラニン非産生性であり、原記載と大きく異なっていた(Lambert and Loria,1989a)。このことにより、海外諸国で分離された病原性を有する多数の菌株は細菌学的性質がWaksmanの記載と一致せず、*S.scabies*自体の分類に大きな混乱が見られた。

このような経緯から、本種は国際命名規約に基づき、1980年に発行された細菌学名承認リストから除外され、無効種とされた。

その後はさまざまな病斑型に伴う多くの病原菌の報告がなされた。病斑型は大きく類別して、陥没型(Deep scab)に関する報告が多く、一部に隆起型(Raised scab)があるが、これらはいずれも普通型(Common scab)と称されるのが一般的である。一方で深く陥没した病斑はCommon scabと区別してDeep-pitted scabの呼称が使用され、さらに表面に亀裂を伴う浅い病斑はRusset scabとされている。

Common scabの病原菌に関しては、Millard and Burr(1926)の*S.setoni*,*S.flaveolus*,*S.fimbriatus*,*S.clavifer*,Lyons and Pridham(1961)の*S.albus*(ROSSI-DORIA),Corbaz(1964)の*S.griseus*,*S.aureofaciens*などがある。Deep-pitted scabの病原菌に関しては、Archuleta and Easton(1981)の*S.atroolivaceus*,*S.diastatochromogenes*,*S.lydicus*,*S.resistomycificus*,Doering-Saad et al.(1992)の*S.violaceus*,*S.griseus*,*S.exfoliatus*,*S.rochei*などの報告がある。

これら多くの種が報告された原因は分類学者と植物病理学者の共同の検討がなされなかったことに由来すると指摘されている。

この混乱は1961年以降、約30年間続いたが、その間にもHoffmann(1954,1958)はジャガイモに強い病原性を示すのは*S.scabies*のみであり、その他は弱い感染力を示すことを報告しており、Corbaz(1964)はHoffmannの観察を裏付けて、同時にMcKee(1958)が報告した

*S.scabies*の一部を*S.griseus* および*S.aureofaciens* Duggarと位置付け、それらは弱いながら病原性を示すとしている。

なお、Russet scabの病原菌としてはHarrison(1962)が*Streptomyces* sp.を報告している。彼は本病に関し、圃場含水量が60%以上で甚発生することを観察し、そうか病とは著しく異にする発生様相を明らかにした。しかし、Vrugging and Maat(1968)は*S.scabies*によってもRusset scabの症状が生ずるとした。さらにLabruyere(1971)は病斑型をNormal,Superficial,Russetの3型に区別し、いずれの型も*S.scabies*によって生ずるとしたが、その位置づけは確定的ではなかった(Waksman,1961;Lapwood,1973)。

その後、同様の症状である象皮病に関しては*S.verrucosus* Shibata et Kimura sp.nov.(木村・前川,1972;木村,1976)と同定された。さらに、亀の甲症に関して鬼木ら(1986)は*Streptomyces*属菌の関与を示唆したが、Suzui et al.(1988)により*S.cheloniumii*と同定されるに至った。しかしながら、いずれも細菌学名承認リストには記載されておらず、有効種とはなっていない。今後は北海道に分布するこれらRusset scabの病原菌とHarrison(1962)の菌株との異同を詳細に検討し、病原菌の記載を行う必要がある。

このように、本病の病原菌に関する分類は流動的であり、確定していなかった。しかし、その後Elesawy and Szabo(1979)はハンガリーで分離されたcommon scabの病原菌を*S.scabies*の新基準株とし、*S.scabies* subsp.*achromogenes*と命名した。さらに、Lambert and Loria(1989a)により、分類上混乱を続けた*S.scabies*の再記載がなされ、種名の復活がなされるに至った。

また、酸性土壌条件下で発病を引き起こす病原菌については、既にBonde and MacIntyre(1968)によって報告がなされていたが、Lambert and Loria(1989b)により、土壌pH5.2以下で病原性を有する病原菌の記載がなされ、*S.acidiscabies* Lambert et Loria sp.nov.と命名された。

振り返って、本邦においてはThaxterの最初の報告から20年後の1902年には北海道で既に発生の記録がなされたとされる(成田,1980)。また、その5年後の1907年には上川、空知地方に本病が発見され、1911年には発生が多いとして発生動向に注意が喚起されていた。

一方、谷井(1985a)は、北海道に分布する病原菌の種類、生理・生化学的性質および血清学的性質について、詳細な比較を行い、その代表的な特徴から4種類の病原菌を記載した。すなわち、孢子鎖の形態が螺旋

型でメラニン色素産生菌群、同色素非産生菌群、孢子鎖が直～波状型で緑黄色色素産生菌群、同色素非産生菌群である。しかし、それら菌群と基準株との細菌学的性質、DNA相同性、GC含量などの比較が未了であることから、種の同定を控えてきた。

また、Tashiro et al.(1990)は本邦のジャガイモ分離菌で孢子鎖螺旋型の2菌群およびジャガイモとテンサイより分離した孢子鎖が直～波状型の2菌群におけるDNA相同性の相違から、本邦においては、少なくとも4種の病原菌が発病に関与することを示唆している。

さらに、最近になって諸外国では、Goyer et al.(1996)により、カナダでDeep-pitted scabを形成する新種の病原菌として*S.caviscabies* Goyer et al.sp.nov.が報告された。

フィンランドではLindholm et al.(1997)により、孢子鎖直～波状型の病原菌*Streptomyces* spp.が報告された。今後さらに新種の病原菌の記載がなされることが想像される。

放線菌はその生育形態は糸状菌に似ているが、原核生物であること（核膜やミトコンドリアを持たない）、細胞壁の主成分としてペプチドグリカンが存在すること、リボソームのサブユニットが30sと50sからなり、抗菌菌性物質に感受性であるが抗真菌性物質には非感受性であること等から、細菌の仲間とするのが妥当とされている。しかし、形態の分化が著しいなど、一般細菌とは異なった側面を持ち、また多分に歴史的なものもあって、独特な菌群として放線菌と総称され、現在も取り扱われている。

放線菌（order(目)Actinomycetales）は「分岐したfilamentを形成する細菌、このfilamentは菌によってはmycelium（菌糸）になるものもある」というように、形態によって定義される。しかしこの定義は曖昧で、他の一部のグラム陽性菌との区別は困難とされる（宮下,1985）。

なお、従来の病原放線菌の同定の手法はこれら形態の比較に加えて、Shirling and Gottlieb(1966)およびWilliams et al.(1983)の手法に代表される培養性状、生理・生化学的性状の比較が一般的であったが、Lambert and Loria(1989a,b)は各種抗生物質に対する耐性を重要な項目に取り入れている。さらに、近年は分析手法の進歩に伴い、細胞壁のアミノ酸組成や糖および脂質組成の比較、DNA相同性などの項目が重要視されてきている（清野ら、1985）。

B. ジャガイモそうか病菌の識別と定量に関する研究

そうか病菌に限らず、細菌の識別法はその病原菌の同定手法と密接に関連して、開発される。また、土壤中の病原菌の定量の試みは、言うまでもなく病原菌の分離方法の検討なくしては達成されない。

そうか病菌の分類が混乱をきたしていた時代には、病原菌の識別、検出および定量の手法に関する報告は少なく、あっても検索表の提案(Szabo et al,1975;Elesawy and Szabo,1981) などにとどまっている。

土壌からの分離法に関しては1960年代以降、以下に示す観点に基づいて多くの研究がなされた。(1)分離土壌に対する基質添加(Enrichment), (2)分離土壌の物理的・化学的処理, (3)分離培地の栄養源, (4)分離培地に添加する抗生物質, などの検討である。

分離土壌に対する基質添加(Enrichment)の目的は、放線菌に特異的に利用される基質の添加により、その増殖を促進して優占的に分離することにある。

Jensen(1930)はケラチンの利用、Jensen(1932)およびWilliams et al.(1972b)はキチンの利用により、それぞれ膨大な数の細菌、放線菌が増殖促進されることを観察した。一方、Tsao et al.(1960)は風乾した土壌にCaCO₃を添加して、好適な結果を得た。さらに、EL-Nakeeb and Lechevalier(1963)も同様な結果を報告している。しかし、これらの方法は放線菌の他に細菌も同様に増殖を促すので、さらに選択性の高い培地の開発が不可欠とされた。放線菌の選択的分離培地として、最近ではHayakawa and Momura(1987,1989)の腐植酸およびドデシル硫酸ナトリウムを用いた培地が報告されている。

次に、分離土壌の物理的・化学的処理の目的は分離前に非病原細菌のフローラを減少させることにある。Nuesch(1965)は風乾した後、長期間保存した土壌では*Streptomyces*属菌の菌量が高まることを報告した。Williams et al.(1972)は風乾土壌の熱処理(40-45℃, 2-16hr.)は*Streptomyces*属菌の菌量を変化させずに細菌フローラを著しく減少させることを観察した。さらにLawrence(1956)はフェノール(1.4%)で土壌希釈液を10分間処理することで、細菌および糸状菌を抑制できるとした。EL-Nakeeb and Lechevalier(1963)はLawrenceの方法を必ずしも好適ではないとしたが、この方法は後の研究でも多用されている。

分離培地の栄養源の選択は主に窒素源、炭素源を中心に検討された。放線菌のキチン分解能については多くの研究者が認めるところであるが、Lingappa and Lochwood(1961,1962)は培地へのキチン添加の効果はWater agarに比較して僅かに良好とする結果を報告し

た。一方、Hsu and Lockwood(1975)はキチン粉末の有効性を認めている。その後、Kuster and Williams(1964a)は炭素源としてはデンプン、グリセリン、窒素源としてはカゼイン、アルギニン、硝酸塩が好適とした。このように極く貧栄養の培地が分離に好適とする考え方は現在も変わっていない。

分離培地に添加する抗生物質の検討には多くの報告がある。Corke and Chase(1956)はシクロヘキシミドの添加により、糸状菌の顕著な抑制を見いだした。その後、Porter et al.(1960)はpolyene化合物の中でビマリシン、ナイスタチンは糸状菌の抑制に有効とした。これらの研究により*Streptomyces*属菌に対して抗糸状菌性物質の影響はないが、抗細菌性物質の利用には注意が必要との指摘がなされた。Preobrazhenskaya et al.(1978)は*Actinomycetales*の抗細菌性物質に対する感受性は属によって大きく異なるが、特に*Streptomyces*属菌は最も感受性のグループに属すると指摘している。

そのような背景の中で、William and Davies(1965)が有効としたポリミキシン(5 IU/ml)、ペニシリン(1 IU/ml)はある種の*Streptomyces*にも影響はあるが、細菌を著しく抑制することから現在も汎用されている。また、リファンピシンは有効な抗細菌物質として報告されている(Athalya et al,1981)。その他にCrook et al.(1950)のプロピオン酸ナトリウム(4 g/l)、Ottow(1972)のRose bengal (35 mg/l)などがある。

これらの研究に基づき、病斑から*Streptomyces scabies*を分離する方法として、Loria and Davis(1988)は病斑組織磨砕液のフェノール処理およびWater agarを基本培地とし、ナイスタチン(500 mg/l)、ポリミキンB硫酸塩(50 mg)、ペニシリンGナトリウム(10 mg/l)、シクロヘキシミド(500 mg/l)を添加した培地(NPPC Water agar)を組み合わせる方法を提案した。

一方、後述するように、Kenneth et al.(1998)はシクロヘキシミド、ナイスタチンの他に、NaCl、リファンピシン、ナリジキシン酸を添加した比較的富栄養な培地を用いて、土壌からの*S.scabies*の分離を行った。

本邦でも*Streptomyces*属菌を様々な基質から分離する方法は抗生物質産生菌を対象に精力的に研究されたが、植物病原菌を対象にした研究例は少ない。その中で、メロンがんしゅ病菌*Streptomyces* sp.の病斑からの分離を目的とした吉田・小林(1993)の報告は、フェノール処理後、Lochhead and Chase(1987)のBasal medium-Bにカナマイシン(50 ppm)を添加した培地が有効としている。

ところで、分離された放線菌の中から病原菌を識別する方法に関しては、従来は分離菌の一般的な形態、

生理・生化学的性質を比較検討して行ってきた。これらの中には、土壌中から分離したRusset scabを引き起こす*S.scabies*の中にはメラニン産生能が弱く、血清学的に異なる系統が存在したとするVrugging and Maat(1968)の報告、様々な野菜、イネ科雑草の根圏で腐性的に生存している*S.scabies*を分離したというKenKnight(1941)の報告なども含まれる。

一般に、そうか病菌*S.scabies*の産生する拡散性色素であるメラニンを識別指標に用いた報告が多い。Menzies and Dade(1959)はTyrosine Casein Nitrate(TCN) Medium 上に生育したコロニーの周辺の暗褐色色素を識別指標として提案した。

また、Keinath and Loria(1989)もチロシン含有培地上でのメラニン産生菌を計数し、定量を行った。しかし、*S.scabies*の中にはメラニン産生能を有しない系統が存在すると同時に、他のそうか病菌ではメラニン産生能が認められないことから、それらのそうか病菌に対する適応は難しい。

細菌の簡易識別にはその血清学的特異性を利用した手法が用いられることが多いが、そうか病菌を対象にした研究例は少ない。

Douglas et al.(1954a,b)は一連の研究の中で、*Streptomyces scabies*および他の*Streptomyces*属菌の培養濾液、菌糸体および孢子中に抗原を見出し、そうか病菌は共通の強い抗原群を有すると報告した。また、Bowman and Weinhold(1963)は非病原菌による吸収血清法を用いて血清学的性質を検討したなかで、*S.scabies*は血清学的に近縁な菌群に属するとした。

さらにKwapinski(1972)は*Streptomyces*属菌の抗原解析の結果、本属菌は2~6種類の抗原群を有し、多くの系統が密接に関連していることを指摘した。しかし、現在まで、そうか病菌の血清学的類縁性の検討ならびに識別法への応用はなされていない。

一方、サツマイモの立枯病菌*S.ipomoea*に関しては、Moyer(1986)により、ELISA法による識別法が報告されている。

*S.scabies*の産生する植物毒素については、Fellows(1926)の示唆以来、いくつかの報告がある。この中にはSakai et al.(1984)の報告も含まれる。その後、King et al.(1989)により単離・同定された本毒素Thaxtominは、そうか病菌における産生能と病原性が完全に一致するとされ(King et al.1991)、マイクロチューバーへの処理により典型的な自然病徴が再現されること(Loria et al.1997)などから、識別指標として重要視されるに至った。Kenneth et al.(1998)は前述の抗生物質を添加した選択培地上に生育した*S.scabies*の識別に Thaxtominの検出

を用いている。

さらに遺伝子診断に関しては、Thaxtomin産生遺伝子 *nec1 gene* が *S. scabies* でクローニングされ、その塩基配列に基づいたPCRがBukhalid et al.(1998)により報告されている。

一方、イネの白葉枯病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* の検出にはバクテリオファージの利用が実用化されているが、同様にアクチノファージによる識別が考えられる。Newbould and Garrard (1953)はそうか病斑から分離した病原株と非病原株に対するアクチノファージの親和性を調査し、寄主特異性は見られないとした。しかし、西脇・美濃(1997a,b)は北海道内の土壤から分離したファージ株の中に、後述する *S. scabies* melanin(-)系統に特異的に寄生性を示す株を見だし、その利用性を検討している。

C. ジャガイモそうか病の防除に関する研究

そうか病の防除に関する研究は土壤水分、土壤理化学性などに関する基本的な発生病態の解明と相俟って、1960年代以降に膨大とも言える報告がなされた。

それらの考え方を大きく区分すると、1)薬剤防除、2)化学的土壤環境制御、3)物理的土壤環境制御、4)耕種的防除、5)生物的防除などに分けられる。

1) 薬剤防除

これには土壤施用、茎葉散布、塊茎処理がある。土壤施用では、Nugent(1956)がPCNB(TERRACLOR)の効果を認めた後、多くの実証的な報告が続いた(Potter et al, 1959; Erickson, 1960; Davis et al, 1974)。その他、McIntosh(1973)はカブタホルの施用効果を認めている。

一方、Potter et al.(1959)はUrea-formaldehydeの効果を報告した。茎葉散布では、McIntosh(1979)のdaminozide, McIntosh et al.(1979)のdaminozideの類似化合物、McIntosh et al.(1980), Burrell(1981)のethionine, McIntosh et al.(1981, 1982, 1985, 1988)の3,5-dichlorophenoxyacetic acid およびその類似化合物に関する一連の報告がある。

塊茎処理(種薯消毒)では、Mohanry et al.(1978)は各種殺菌剤の種薯消毒の効果を認め、さらにMishra et al.(1961)は無機水銀剤の卓効を認めた。

その中でPCNBの土壤施用および無機水銀剤の種薯消毒が実用化されて本邦でも多用されたが、現在はその有害性から使用されていない。

2) 化学的土壤環境制御

これは施肥および土壤改良資材利用などによる土壤理化学性改善に関する研究が主体となる。施肥窒素の形態に関して、硫酸施用は土壤pHを低下させて間接的に発病を抑制するとする報告(Terman et al, 1948; Emilsson

and Gustafsson, 1954; Mygind, 1962; 水野ら, 1995)、効果が無いとする報告(Dippenaar, 1933; Gray et al, 1961)がある。施肥窒素の直接的な影響に関してはLapwood and Dyson(1966)は否定的な見解を述べている。一方、後藤・中村(1993)は植物性蛋白質の施用による効果を認めたが、これは土壤pHの低下に起因すると考えられた。

燐酸に関しては、Davis et al.(1976)は燐酸の多施(86-336Kg/ha)は著しい発病抑制を示し、発病と塊茎表皮のPO₄含量との間に正の相関を認めた。

カリウムに関しては、直接的な影響は無いとする見解(Gusen leitner, 1974; Wenzl and Reichard, 1974; Reichard and Wenzl, 1976)が一般的であり、カルシウムとの関係で論じられるにとどまる。前述のDavis et al.(1976)は発病程度と塊茎表皮のCa:K比に正の相関関係を見出し、またDoyle and MacLean(1960)は土壤pHが一定の条件ではCa:K比は発病に影響を与えないとしている。

Caに関しては主として土壤pHとの関連で多くの研究報告がなされている。土壤に施用されるライム(CaCO₃)に関しては土壤pHの上昇により、施用量に応じて発病が助長されることが多くの研究で確認された(Blodgett and Cowan, 1935; Odland and Albritton, 1950; Goto, 1985)。しかし、土壤pHに影響を与えない条件下での各種Ca資材の施用は発病に影響しない(Blodgett and Cowan, 1935)、塊茎のCa含量とそうか病の感受性は無関係(Houghland and Cash, 1956)とする報告がある一方で、Horsfall et al.(1954)は土壤中のCa含量の増加は塊茎のCa含量の増加による感受性の増大をもたらすことを示唆し、Davis et al.(1976a,b)も土壤中の交換性Ca量と塊茎表皮中のCa含量との間に同様の関係を認めた。また、Goto(1985)は発病と交換性Ca含量(特に150mg/100g soil以上)は土壤pHとよりも相関が高いとした。Caと発病の関係については未だに統一的な見解が得られていないと考えられる。

次にイオウの施用についてはWheeler and Adams (1897)の最も古い報告以来、土壤pHの低下に関連して、数多くの研究がある(Martin, 1920; Martin, 1931; Terman et al, 1948; Hooker and Kent, 1950; Odland and Albritton, 1950; Barnes and Chestnutt, 1966; McCreary, 1967; McAllister, 1971; Barnes and McAllister, 1972)。これらは、*S. scabies* が pH4.9-5.2に調整された培地上で生育が抑制されるとしたWaksman(1922)の観察に基づく圃場での実証であり、土壤施用による土壤病害防除の最初の事例の一つとされる。

その他の微量元素ではマンガンおよび銅の施用による防除効果に関し、多くの報告がある。マンガンの施用では効果有りとする事例(Mortvedt et al, 1963; McGregor and Wilson, 1964; Guntz and Coppenet, 1974)と効果無し、

とする事例(Mortvedt et al,1961;Mygind,1962;Rodger et al,1966;Barnes,1972)に分かれる。しかし、Barnes and McAllister(1972)は、施用により塊茎表皮のマンガン含量は著しく増加したが発病程度は低下しなかったことを観察した。

銅は1990年以前は最も効果的な化合物とされ、硫酸銅の形で種薯浸漬および土壌施用に多用された。そうか病菌に対する殺菌作用が強く、現在も種薯消毒剤として汎用されているが、土壌施用については評価が定まっていない。一例として、Mortvedt et al.(1961)は圃場および温室内で土壌施用(20~50ポンド/エーカー)による防除効果を認めたが、その作用機作は直接的な抗菌効果ではなく、作物の極端な生育抑制に伴う間接的な効果と結論している。

3) 物理的土壌環境制御

これには灌水による土壌水分制御および太陽熱消毒などが含まれる。灌水に関しては、ロザムステッドでのLapwoodおよびその共同研究者による精力的な一連の研究報告がある(Lapwood,1966,1973; Lapwood and Hering,1968,1970;Lapwood et al,1970,1971;Lapwood and Adams,1973)。これらの中で効果的な灌水時期は塊茎形成初期以降であり、その量は0.8 inch soil moisture deficit(S.M.D)で経済的に十分であることが明らかにされ、さらに灌水時期と塊茎上の形成病斑の部位に関する詳細な観察がなされた。Lewis(1970)は灌水の効果は

病原菌に拮抗性の細菌の増殖を促進する結果であることを示唆した。

振り返って、本邦でも船越・松浦(1978)、Kobayashi(1989)はそれぞれ春作、秋作ジャガイモでの灌水の効果を実証した。

太陽熱消毒では山田ら(1986)による兵庫県での試験例における効果が報告されている。

4) 耕種の防除

この中には緑肥栽培、輪作、有機物施用などを含めた。緑肥栽培では、Barak(1986)は少量の緑肥鋤込みは発生を抑制し、麦かん鋤込みは発生を助長するとし、Mercik et al.(1978)もポット試験で緑肥の効果を確認した。さらに、Weinhold and Bowman(1968)は緑肥ダイズの長期間鋤混みによって圃場での発病のbuild-upが抑制され、その土壌中には*Bacillus subtilis*が優占的に検出されると報告している。

5) 生物的防除

生物的防除に関する研究は少なく、最近いくつかの報告がなされた。Tanii et al.(1990)は蛍光性*Pseudomonas* 菌の種薯処理の有効性を報告し、Hayashida et al.(1989)は豚糞に拮抗放線菌*Streptomyces albidoflavus*を施用した堆肥は発病抑制に有効とした。さらに海外諸国ではLiu et al.(1995)は*S.diastatochromogenes*の土壌施用による防除効果を報告している。

Ⅲ. ジャガイモそうか病菌の同定

ジャガイモそうか病菌はその病原菌を *Streptomyces scabies* とした Thaxter(1890) の報告の後、多数の種が報告されたが、それらの多くは分類学的に確定した位置付けが得られなかった。その原因は1960年代以降の分類学的な混乱が主要な要因とされていることは緒言で述べた通りである。しかし、Shirling and Gottlieb(1966), Williams et al.(1983)らの新たな細菌学的分類基準の提案を受けて、Lambert and Loria(1989)により *Streptomyces scabies* Lambert et Loria の再記載がなされ、さらに強酸性土壌条件下で発病する病原菌 *S. acidiscabies* が新種として報告された。

本邦に分布するそうか病菌の種に関しては谷井(1985b), Tashiro et al.(1990)などの報告があるが、種の同定まで至っていない。そこで、本邦に分布するそうか病菌の種を同定し、その分類学的な位置付けと生態的特性を明らかにすることを目的に本研究を行った。

A. 病原菌の分離と病原性検定

北海道に分布するそうか病菌を分離し、その病原性を確認して、以降の同定に供する。

材料と方法

1974～1994年に北海道内35市町村より採種したジャガイモ罹病塊茎および1993～1994年に道内4町村より採種したニンジン、ゴボウ罹病根を分離源として供試した。分離方法は、1974～1980年には病斑部を少量の殺菌水とともに乳鉢内で磨碎し、その数滴をアルブミン寒天培地またはグルコース・アスパラギン寒天培地に塗布して、25℃で培養した後に出現した放線菌コロニーを分離した。1991～1994年は Loria and Davis(1988)の方法によった。すなわち、少量の病斑部を切り取り、1.5%次亜塩素酸ナトリウムで1分間表面殺菌した後、140倍フェノール水5mlとともに乳鉢中で磨碎し、10分間静置した。その一滴をMedium1に示すNPPC water agarの表面に塗布し、25℃で10～14日間培養後、出現した放線菌コロニーを分離した。

得られた放線菌は全て定法に従って単胞子分離を行い、病原性検定に供した。病原性検定はスターチ・無機塩寒天培地(松本, 1979)に画線し、28℃で7日間培養した菌体を寒天ごと磨碎し、殺菌土壌と市販の園芸用育苗培土(加熱滅菌済み)を等量混和した土壌に混合接種した後、1/5000aワグネルポットに充填した。1ポット当たり、シャーレ7枚分の菌体を接種し、1菌株につき2ポットを供試した。接種土壌に1%昇こう水で20

分間表面殺菌した種薯(品種「メークイン」)を植え付け、25℃に保たれたガラス温室内で約2ヶ月間栽培した後、新塊茎の発病を観察した。複数の新塊茎に病斑を形成した菌株のみを病原性(+)と判断した。

結 果

供試した分離菌株のうち132菌株がジャガイモに病原性を示した。その内訳はジャガイモ分離菌120菌株、ニンジン分離菌10菌株およびゴボウ分離菌2菌株であった(Table 1～4)。

Table 1. Potato scab pathogen isolated in Hokkaido (Group A)

Origin	Isolate No.	Year	Location	Pathogenicity
Potato	SKU-6	1980	Kucchan	+
	SNS-26	1980	Niseko	+
	SNS-30	1980	do	+
	SNS-39	1980	do	+
	K(D)75123	1980	Kuriyama	+
	SOT-8201	1982	Otoineppu	+
	SN-2	1979	Naganuma	+
	SBH-2	1980	Bihoro	+
	SFN-3	1980	Nakafurano	+
	SFU-10	1980	Furano	+
	SSY-9	1980	Shari	+
	N-4-1	1992	Naganuma	+
	N-6-6	1992	do	+
	CO-3-1	1992	Memuro	+
	SKA94-1	1994	Sirataki	+
	SKA94-2	1994	do	+
	SKA94-3	1994	do	+
	SKA94-4	1994	do	+
	SKA94-5	1994	do	+
	SKA94-6	1994	do	+
	SKA94-7	1994	do	+
	SSI94-1	1994	Shohoro	+
	SSI94-4	1994	do	+
	NSC-5303	1994	Niseko	+
	KMP-5105	1994	Kimobetsu	+
	YR6153	1994	Yakumo	+
	YR6156	1994	do	+
	KUP6602	1994	Kucchan	+

Table 2. Potato scab pathogen isolated in Hokkaido (Group B)

Origin	Isolate No.	Year	Location	Pathogenicity
Potato	SD-742	1974	Sapporo	+
	SOT-8202	1982	Otoineppu	+
	CH-1	1990	Naganuma	+
	CH-2	1990	do	+
	CH-3	1990	do	+
	DE-1-1	1992	Memuro	+
	DE-1-4	1992	do	+
	N-6-1	1992	Naganuma	+
	N-6-2	1992	do	+
	N-6-3	1992	do	+
	N-6-5	1992	do	+
	KFH9403	1994	Kamifurano	+
	MFT9406	1994	Minamifurano	+
	KWP6205	1994	Kyowa	+
	KUC6601	1994	Kucchan	+
	KUC6602	1994	do	+
	KUC6608	1994	do	+
	KUC6403	1994	do	+
	KWC6101	1994	Kyowa	+
	KWC6102	1994	do	+
	KWC6106	1994	do	+
	KUP6601	1994	Kucchan	+
	KUP6604	1994	do	+
	SET9506	1995	Shibetsu	+

Table 3. Potato scab pathogen isolated in Hokkaido (Group C)

Origin	Isolate No.	Year	Location	Pathogenicity
Potato	SSY-10	1980	Shari	+
	SKS-45	1980	Kiyosato	+
	SHE-50	1980	Toyokoro	+
	SMK-5	1980	Bihoro	+
	SMN-7	1980	Nakashibetsu	+
	SRE-27	1980	Toyokoro	+
	STF-32	1980	do	+
	SKS-15	1980	Kiyosato	+
	SKS-21	1980	do	+
	SKM-4	1980	Nakashibetsu	+
	KI-9102	1991	Kiyosato	+
	KI-9103	1991	do	+
	KI-9107	1991	do	+
	KI-9111	1991	do	+
	KI-9115	1991	do	+
	SY-9101	1991	Shari	+
	SY-9103	1991	do	+
	SY-9107	1991	do	+
	SY-9107	1991	do	+
	SY-9110	1991	do	+
	SY-9112	1991	do	+
	SY-9113	1991	do	+
	SY-9114	1991	do	+
	MT9301	1993	Memuro	+
	MT9302	1993	do	+
	SH9401	1994	Shintoku	+
	SMO9401	1994	Shimizu	+
	SMO9402	1994	do	+
	OAI9401	1994	Obihiro	+
	OIS9401	1994	do	+
	OIS9402	1994	do	+
	MAM9305	1993	Makubetsu	+
	MAY9404	1993	do	+
	SIS9301	1993	Shihoro	+
	TOM9301	1993	Otofuke	+
	TOM9302	1993	do	+
	HOB9401	1994	Honbetsu	+
	HOB9402	1994	do	+
	NSK9407	1994	Nakasatsunai	+
	SAH9301	1993	Sarabetsu	+
	SAY9403	1994	do	+
	SAS9302	1993	do	+

Carrot	SAS9303	1993	Sarabetsu	+
	SHI9301	1993	Shikaoi	+
	CHN9403	1994	Toyokoro	+
	TOD9403	1994	do	+
	TTO9401	1994	do	+
	TTO9402	1994	do	+
	TTY9403	1994	do	+
	TTT9401	1994	do	+
	TTT9403	1994	do	+
	SYM9401	1994	Shari	+
	KAH9403	1994	Kamiyubetsu	+
	KOU9403	1994	Koshimizu	+
	KKO9401	1994	do	+
	TU9401	1994	Tsubetsu	+
	TU9403	1994	do	+
	SIK9401	1994	Shirataki	+
	SIK9402	1994	do	+
	SIK9403	1994	do	+
	KI9401	1994	Kiyosato	+
	KI9402	1994	do	+
	KIO9401	1994	do	+
	KIO9403	1994	do	+
	KT9401	1994	do	+
	KT9402	1994	do	+
	H4	1994	Higashimokoto	+
	H10	1994	do	+
	KC3	1993	Koshimizu	+
	KC4	1993	do	+
	KC7	1993	do	+
	KC8	1993	do	+
	HC13	1993	Higashimokoto	+
	HC16	1993	do	+
	HC18	1993	do	+
	HC19	1993	do	+
	HC36	1993	do	+
	SC13	1994	Shari	+
Giant burdock	Ko-g-2	1993	Koshimizu	+
	Ko-g-6	1993	do	+

Table 4. Potato scab pathogen isolated in Hokkaido (Group D)

Origin	Isolate No.	Year	Location	Pathogenicity
Potato	SHE-13	1980	Shari	+
	STA-15	1980	Nakashibetsu	+
	STF-7	1980	Toyokoro, Tofutsu	+

分離された病原菌の胞子鎖の形態と色素産生能から以下のA～D菌群に類別した。すなわちA菌群は胞子鎖が螺旋型でメラニン色素非産生、B菌群は同じく螺旋型でメラニン色素産生、C菌群は胞子鎖が直～波状型で色素非産生、D菌群は同じく直～波状型で緑黄色色素産生である。

なお、病原性検定で現れた病徴の病斑型は陥没型と隆起型が様々な割合で混在し、分離塊茎の病斑型とは必ずしも一致しなかった。

B. 病原菌の形態と培養性質

放線菌の分類には胞子鎖の形態、胞子の表面形状および培養性質が重要であることから、前項、Ⅲ、Aで得られた病原放線菌についてそれらの性質を調べた。

材料と方法

病原菌の胞子鎖の形態については、最初に全ての供試菌株について光学顕微鏡(×100)で観察した。胞子鎖の形態および胞子表面の形状をさらに詳細に観察するため、Shirling and Gottlieb(1966)の方法に従い、走査型電子顕微鏡にて観察を行った。併せて、基生菌糸の断片化、菌核形成および基生菌糸上の胞子形成についても同時に観察した。

菌体試料は以下の方法で作成した。スターチ・無機塩寒天培地を9cmシャーレに分注し固化させた表面に、1～2cm角に切り乾熱滅菌した濾紙片を張り付け、その上に胞子懸濁液を接種した。25℃で10日間培養後に濾紙片をはぎ取り、0.1Mの燐酸緩衝液(pH7.0)に溶解させた2% グルタルアルデヒド中で4℃、2時間固定した。その後、エタノール系列で脱水し、液体二酸化炭素で臨界点乾燥後にJOELのイオン蒸着装置を用いて、15mAで金-パラジウムを真空蒸着した。この試料を走査型電子顕微鏡(JSM-5000)を用いて、観察した。

病原菌の培養性質のうち、メラニン様色素産生についてはShirling and Gottlieb(1966)の方法に従い、ペプトン・イースト・鉄寒天培地(Medium 6)上に胞子懸濁液を画線接種し、25℃、2ないし4日間培養後に菌叢周辺に褐色～黒色の明瞭な色素の拡散が認められたものを(+)とした。

Medium 6. Peptone-yeast iron agar
(Shirling and Gottlieb, 1966)

Peptone (Difco)	15.0g
Yeast extract (Difco)	1.0g
Proteose peptone (Difco)	5.0g
Ammonium Fe(III) citrate	0.5g
K ₂ HPO ₄	1.0g
Sodium thiosulphate	0.08g
Agar (Difco)	15.0g
Distilled water	1,000ml

pH 7.1

成熟した胞子、基生菌糸の色および拡散性色素の産生についてはMedium 2,3,4,5(Shirling and Gottlieb, 1966)を用いて培養し、肉眼観察した。

基生菌糸および拡散性色素のpH感受性については着色の見られた培地部分に0.05N NaOHおよび0.05N HClを数滴滴下して変色を観察した。

供試菌株の光学顕微鏡での観察はTable 1～4の全菌株、走査型電子顕微鏡での観察は光顕下の観察で胞子鎖の形態により類別された各菌群を代表して、A群はSNS-26,N-4-1菌株、B群はN-6-2,N-6-3菌株、C群は91Sy-3,91Sy-13菌株、D群はSTA-15,STF-7菌株を供試した。

結 果

胞子鎖の形態および拡散性色素の産生能により道内のジャガイモそうか病菌（一部、ニンジン、ゴボウ分離菌を含む）はTable 1～4に示すA～Dの特徴的な4菌群に類別された。

A 菌群(Table 1)は全て、胞子鎖の形態が螺旋型(Spiral)で胞子表面の形状は平滑(Smooth)であった。メラニン様色素産生は(－)で、その他の拡散性色素産生(－)、胞子の色は灰色、基生菌糸の色は黄色であった(Table 6)。

B 菌群(Table 2)は全て、胞子鎖の形態が螺旋型(Spiral)で胞子表面の形状は平滑(Smooth)であった (Plate 2)。メラニン色素を産生し、その他の拡散性色素産生(－)、胞子の色は灰色、基生菌糸の色は黄色であった (Table 6)。

C 菌群(Table 3)は全て、胞子鎖の形態が直～波状型(Recti-flexuous)で胞子表面の形状は平滑(Smooth)であった (Plate 3)。メラニン色素産生は(－)、その他の拡散性色素産生(－)、胞子の色は灰色、基生菌糸の色は黄色であった (Table 6)。

Table 6. Morphology and pigment production of potato scab pathogens isolated in Hokkaido

Morphology and pigment production	<i>Streptomyces scabies</i> ATCC49173 ^T ATCC33282	<i>S. s. achromogenes</i> ^{a)}	<i>S. acidiscabies</i> ATCC49003 ^T ATCC49004	Group			
				A	B	C	D
Spore chain ^{b)}	S	S	RF	S	S	RF	RF
Ornamentation of spore surface ^{c)}	S	S	S	S	S	S	S
Spore color ^{d)}	G	G	W	G	G	G	G
Color of substrate mycelium ^{e)}	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
Diffused pigment ^{f)}	—	—	R/Y	—	—	—	YG
pH sensitivity	—	—	—	—	—	—	—
Color of substrate mycelium	—	—	—	—	—	—	—
Diffused pigment	—	—	—	—	—	—	—
Melanin production	+	—	—	—	+	—	—
Fragmentation of substrate mycelium	—	—	—	—	—	—	—
Sclerotia formation	—	—	—	—	—	—	—
Sporulation on substrate mycelium	—	—	—	—	—	—	—

^{a)} *S. s. achromogenes*; Elezawy and Szabo(1979)

^{b)} S; Spiral, RF; Recti-Flexuous ^{c)} S; Smooth

^{d)} G; Gray, W; White

D 菌群 (Table 4) は全て、孢子鎖の形態が直～波状型 (Recti-flexuous) で孢子表面の形状は平滑 (Smooth) であった。メラニン色素産生は (－)、黄緑色拡散性色素を産生し、孢子の色は灰色、基生菌糸の色は黄色であった (Table 6)。

なお、A～D 菌群ともに基生菌糸の色および拡散性色素の pH 感受性、基生菌糸の断片化、菌核形成および基生菌糸上の孢子形成は認められなかった。

比較に用いた *S. scabies* ATCC49173^T, ATCC33282 (農林水産省指令6横植2016号) はともに、孢子鎖の形態が螺旋型 (Spiral) で孢子表面の形状は平滑 (Smooth) であった。メラニン色素を産生し、その他の拡散性色素産生 (－)、孢子の色は灰色、基生菌糸の色は黄色であった (Table 6)。また、*S. acidiscabies* ATCC49003^T, ATCC49004 (同上) はともに、孢子鎖の形態が直～波状型 (Recti-flexuous) で孢子表面の形状は平滑 (Smooth) であった。メラニン色素産生は (－)、黄～赤色の拡散性色素を産生し、孢子の色は白色、基生菌糸の色は黄色であった (Table 6)。

C. 生理的性質

北海道内で分離されたジャガイモそうか病菌の生理的性質を調べた。

材料と方法

供試菌株は Table 1～4 に示す、1974～1994 年に北海道内36市町村のジャガイモそうか病罹病塊茎、ニンジンおよびゴボウのそうか病斑から分離された計132菌株である。比較対照としては American Type Culture Collection (ATCC) より輸入した4菌株 (Table 5, 農林水産省指令6横植2016号による輸入菌株) を用いた。

Table 5. The isolates compared to isolates collected in Hokkaido

Test No.	Species	Year	Locatin
101	<i>Sterptomyces scabies</i> ATCC 49173 ^T	1984	New York, USA
103	<i>S. scabies</i> ATCC 33282	1977	Hungary
104	<i>S. acidiscabies</i> ATCC 49003 ^T	1960	Maine, USA
105	<i>S. acidiscabies</i> ATCC 49004	1960	Maine, USA

接種源となる孢子懸濁液はスターチ・無機塩寒天培地で、25℃、7～10日間培養した菌叢上の孢子を殺菌したコンラージ棒で掻き取り、0.001% Triton X-100 溶液中に懸濁させた後に 5.0 μm のポアサイズのメンブランフィルター (Dismic 社) を通過させて菌糸片を除去した。濾過液を再度、遠心洗浄した後に殺菌水に再懸濁させ、吸光度計により孢子濃度 10⁸～10⁹ cfu/ml となるように調整した。

この孢子懸濁液を以下の寒天培地上にマイクロピペットを用いて、単一の画線となるように接種した。な

お、孢子懸濁液は保存せず、試験の都度ごとに調整して供試した。

a. 酵素活性

硫化水素産生能は Medium 8 の Nutrient broth (Kuster and Williams, 1964b) に 0.6% (W/V) 寒天、0.2% (W/V) KNO₃ を添加した試験管内の斜面培地に上記の孢子懸濁液を接種し、25℃で7日間培養した。その後、Küster and Williams (1964) の方法に従い、試験管首部に 10% 酢酸鉛水溶液に浸して乾燥させた 5×50 mm の殺菌濾紙片を挿入して、その変色を観察した。濾紙片全体が黒色に変色したものを (+) と判断した。

牛乳の凝固、消化、色素産生は Medium 9 のミルク培地を用いた。試験管内の本培地に孢子懸濁液を接種し、25℃、3, 7, 10, 14 日目に判定した。

また、硝酸塩の還元は William et al. (1983) の方法に従い、寒天を 0.6% 添加した Nutrient broth に、0.2% (W/V) KNO₃ を加えた試験管内の斜面培地に孢子懸濁液を画線した。その後 25℃ で培養し、7, 14 日目に 0.2 ml の Griess-Ilosvay reagents I, II (Reagent I) をそれぞれ同時に添加し、30 分間静置した。その結果、培地が赤変したものを (+) とした。赤変しなかったものについては、さらに亜鉛粉末を少量加えて、1～2 時間静置して赤変したものを最終的に (－) と判定した。馬尿酸の加水分解は Gordon and Horan (1968) の方法に準じて検定した。すなわち、馬尿酸培地 (Medium 11) に孢子懸濁液を接種して、28℃、6 週間培養した後、培養濾液 1 ml に 1.5 ml の 50% 硫酸溶液を 1.5 ml 添加した。室温で 4 時間静置した後に微細な安息香酸の結晶が観察されたものを (+) とした。

Reagent 1. Griess-Ilosvay reagents

Reagent I :	Sulphanyl acid in 5N Acetic acid
Reagent II :	0.5% α -naphthylamine in 5N Acetic acid

Medium 11. Hippurate broth (Gordon and Horan, 1968)

Tryptone	10g
Beef extract	3g
Yeast extract	1g
Glucose	1g
Na ₂ HPO ₄	5g
Sodium hippurate	10g
Distilled wate	1,000ml

b. 分解能

アデニン(0.5%, W/V), チロシン(0.5%, W/V), ヒポキサンチン(0.4%, W/V), キサンチン(0.4%, W/V), カゼイン(1.0%, W/V)の分解能については、Gordon et al.(1974)の方法に従い、Medium 10の改変ベネット寒天培地(MBA)を用いた。MBAにそれぞれを添加して、9 cmシャーレ中に固化させた培地上に上記の孢子懸濁液を接種し、25℃で7, 14, 21日間培養した後に肉眼観察し、培地の不透明白色部が透明になったものを(+)と判断した。

ゼラチンおよびデンプンの分解能については上記のMBAにそれぞれ0.4%, 1.0%を添加して検定した。また、ゼラチンの液化は、試験管内の高層培地に孢子懸濁液をせん刺接種して、20℃で7, 14, 21日間培養した後に液化の程度を観察した。ゼラチンの分解は7日後に酸性AgCl₃溶液(15%)を菌叢表面に加えて、菌叢周囲に透明帯を形成したものを(+)とした。

デンプンについては平板培地に接種して、25℃で7日間培養した培地表面にルゴール液(Reagent 2)を流し菌叢周辺に透明帯のできるものを(+)とした。

Reagent 2. Lugol's iodine

Iodine	1.0g
KI	2.0g
Distilled water	300ml

DNA(0.2%, W/V)およびRNA(0.3%, W/V)の分解能はそれぞれBact DNase test agar (Difco社)、Medium 12のトリプトン寒天培地(Good-fellow et al.1979)を用いて行った。

Medium 12. Trypton agar
(Goodfellow et al.1979)

Tryptone	20g
NaCl	5g
Agar	15g
Distilled water	1,000ml

pH 7.3

いずれも、25℃、7日間培養後に培地表面に1N HClを流し、菌叢周囲が透明化したものを(+)とした。

アラントインの分解能はGordon(1968), Gordon et al.(1974)のゴードン培地(Medium 13)に、アラントインを0.33%(W/V)、さらに寒天を0.75%(W/V)を加えて、pH6.8に調整した。尿素の分解能はフィルター滅菌した15%尿素水溶液を10mlとオートクレーブ殺菌したゴードン培地75mlを混合した。いずれも試験管に2.5mlずつ入れて接種し、25℃、7, 14, 21日間培養後に橙色が赤、桃赤色、紫色に変化したものを(+)とした。

Medium 13. Gordon's medium
(Gordon, 1968, Gordon et al.1974)

Yeast wextract	0.1g
KH ₂ PO ₄	9.1g
Na ₂ HPO ₄	9.5g
Phenol red	0.01g
Agar	7.5g
Distilled water	1,000ml

pH 6.8

エスクリン(0.1%, W/V)およびアルブチン(0.1%, W/V)の分解能は、Williams et al.(1983)の方法に従い、酵母エキス 0.3%(W/V), 酢酸鉄アンモニウム 0.05%(W/V), 寒天 0.75%(W/V)を含む培地で行った。25℃、7, 14, 21日間培養後に培地が黒褐色に変色したものを(+)とした。

抗生物質耐性はWilliam et al.(1983)の9種類を含む、計15種類の抗生物質を供試した。これらの抗生物質はオートクレーブ殺菌後のMBAに無菌的に添加し、上記の孢子懸濁液を接種後、1, 2, 3, 7日後に生育を観察した。

Medium 14. pH sensitivity test agar
(Williams et al.1983)

Dextrose	10g
L-asparagine	0.5g
Agar	15g
Distilled water	1,000ml

温度反応についてはMBAを用いて、最高生育温度を求めた。pH感受性についてはWilliam et al.(1971)のpH感受性培地(Medium 14)を用いて最小生育pHを求めた。培地のpH調整は40mM KH₂PO₄, K₂HPO₄, Na₂HPO₄をさまざまな量で混合して行った。最終的な微調整は1N HClを用いた。

炭素源利用能についてはMedium 15の炭素源利用能検定培地(Shirling and Gottlieb.1966)を用い、計34種類について行った。酢酸ナトリウム、クエン酸、マロン酸、プロピオン酸およびピルビン酸については0.1%(W/V)、その他については1.0%(W/V)の濃度で、オートクレーブ後の培地中に0.5 μmのポアサイズのメンブランフィルターを通過させて無菌的に添加した。

なお、寒天はAgar noble(Difco社)を用いた。接種後は25℃で培養し、7, 14, 21日目に生育を観察し、炭素源無添加の生育に比較して優るものを(+)と判定した。

Medium 15. Carbon utilization agar
(Shirling and Gottlieb.1966)

(NH ₄) ₂ SO ₄	2.64g
KH ₂ PO ₄	2.38g
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	5.65g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.00g
Trace salts solution (Medium 16)	1ml
Agar	15g

pH 6.8~7.0

Medium 16. Trace salts solution
(Shirling and Gottlieb, 1966)

CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.64g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.11g
MuCl · 4H ₂ O	0.79g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.15g
Distilled water	100ml

pH 6.8 ~ 7.0

窒素源利用能はWilliams et al. (1983)の方法に従い、11種類の窒素化合物を供試した。Williamsの窒素源利用能検定培地 (Medium 16) に各化合物を0.1%(W/V)となるように添加し、25℃、14日間培養後に炭素源と同様に無添加の生育に優るものを(+)と判定した。比較対照にはL-アスパラギン(0.1%, W/V)を用いた。なお、寒天はアガロースNA(Pharmacia社)を用いた。

結 果

生理的性質の比較の結果、胞子鎖が螺旋型でメラニン産生のB菌群は、*S. scabies*の基準菌株と調査項目10が全て一致した(Table 7~11)。また、腐生菌の*S. bottropensis* ATCC25435^T, *S. neyagawaensis* ATCC27449^T, *S. diastatochromogenes* ATCC12309^Tとは調査項目に占める相同性が86~88%と高く、近縁であった。胞子鎖が螺旋型でメラニン非産生のA菌群は、6%NaClに対する耐性が異なる以外はElesawy and Szabo(1979)の報告した*S. scabies* subsp. *achromogenes*に一致した。上記のA菌群とはメラニン色素産生、ミルク培地での黒色リングの形成が異なった(Table 7)。胞子鎖が直~波状型で緑黄色色素非産生のC菌群は、*S. acidiscabies*とは97項目中で19項目が異なった(Table 7~11)。胞子鎖が直~波状型で緑黄色色素産生のD菌群は、多くの調査項目でC菌群と一致したが、供試菌株数が3菌株と少ないことから、結果の記載のみにとどめる(Table 7~11)。

Table 7. Enzyme activity and degradation activity of potato scab pathogens isolated in Hokkaido

Characteristics	<i>Streptomyces scabies</i> ATCC49173 ^T ATCC33282	<i>S. s. achromogenes</i> ^{a)}	<i>S. acidiscabies</i> ATCC49003 ^T ATCC49004	group			
				A	B	C	D
Enzyme activity							
Reduction of nitrate	+	+	+	+	+	-	+
Production of hydrogen sulphate		+	+	+	+	+	+
Milk coagulation	-		+	d	-	d	+
degradation	+		-	d	+	+	+
pigment	+		-	-	+	-	-
Degradation activity							
Adenine	+		+	NT	NT	+	NT
Allantoin	-		-	-	-	+	+
Albutin	P		+	P	P	+	-
Casein	+		+	+	+	+	NT
DNA	+		+	NT	NT	+	+
Esculin	+		+	+	+	+	+
Gelatin	+	+	+	+	+	+	NT
Hippurate	-		-	NT	NT	-	NT
Hypoxanthine			-	+	+	+	+
RNA	+		+	NT	NT	+	+
Starch	+	+	+	+	+	+	+
Tween-80	+		+	NT	NT	+	NT
L-Tyrosine	+		-	+	+	+	±
Urea	+	+	+	NT	NT	+	±
Xanthine	-		-	-	-	-	-

^{a)}*S. s. achromogenes* ; Elesawy and Szabo(1979)

NT ; not tested + ; 90% or more of strains are positive - ; 90% or more of strains are negative

d; 11 ~ 89% of strains are positive

Table 8. Sensitivity to antibiotics of potato scab pathogens isolated in Hokkaido

Antibiotics (μ g/ml)	<i>Streptomyces scabies</i> ATCC49173 ^T ATCC33282	<i>S. s. achromogenes</i> ^{a)}	<i>S. acidiscabies</i> ATCC49003 ^T ATCC49004	Group			
				A	B	C	D
Ampicillin (20)				NT	NT	d	+
Chloramphenicol (30)				NT	NT	—	NT
Gentamycin (20)	—	—		—	—	—	—
Kanamycin (30)				NT	NT	—	NT
Lincomycin (100)	—		+	NT	NT	—	NT
Nalidixic acid (30)	+	+	+	+	+	+	+
Neomycin (20)	—		—	NT	NT	—	NT
Nystatin (100 IU)	+	+	+	+	+	+	+
Oleandomycin (100)	—		—	—	—	—	—
(25)	—		+	—	—	d	—
Penicillin G (10 IU)	—		+	—	—	d	—
(3 IU)	+	+		+	+	+	—
Polymixin B (15)	—	—	+	—	—	—	—
Rifampicin (50)	—		—	NT	NT	—	NT
Streptomycin (30)	—	—		—	—	—	—
(20)	—		+	—	—	—	—
Tobramycin (50)	—	—	—	—	—	—	NT
Vancomycin (50)	—	—	—	—	—	—	—

^{a)}*S.s.achromogenes* ; Elezawy and Szabo(1979)

NT ; not tested + ; 90% or more of strains are positive

— ; 90% or more of strains are negative d ; 11 ~ 89% of strains are positive

Table 9. Tolerance to temperature, sensitivity to pH and toxic compounds of potato scab pathogens isolated in Hokkaido

Charavteristics	<i>Streptomyces scabies</i> ATCC49173 ^T ATCC33282	<i>S. s. achromogenes</i> ^{a)}	<i>S. acidiscabies</i> ATCC49003 ^T ATCC49004	Group			
				A	B	C	D
37℃	+	+	+	+	+	—	—
38℃	+		+	+	d	—	—
39℃	—		—	—	—	—	—
pH 4.0	—		+	—	—	+	+
pH 4.5	—		+	—	—	+	+
pH 5.0	+		+	+	+	+	+
Tolerance to							
NaCl (4.0%)	+			d	+	+	+
NaCl (5.0%)	d			d	d	—	—
NaCl (6.0%)	d	+		—	—	—	—
NaCl (7.0%)	—	—	—	—	—	—	—
NaN ₃ (10 μ g)	+		—	d	d	—	—
(20 μ g)	+		—	d	d	—	—
Phenol (0.1%)	—		+	—	—	—	NT
Tellurite (10 μ g)	d			+	+	+	+
(100 μ g)	d		—	—	—	—	—
Nitrate thallium							
(10 μ g)	—		+	—	—	—	—
(100 μ g)	—		—	—	—	—	—
Crystal violet							
(0.5 μ g)	—		+	—	—	—	—
(1.0 μ g)			—	NT	NT	—	NT

^{a)}*S.s.achromogenes* ; Elezawy and Szabo(1979)

NT ; not tested + ; 90% or more of strains are positive

— ; 90% or more of strains are negative d ; 11 ~ 89% of strains are positive

Table 10. Nitrogen source utilization of potato scab pathogens isolated in Hokkaido

Nitrogen source (0.1%)	<i>Streptomyces scabies</i> ATCC49173 ^T ATCC33282	<i>S. s. achromogenes</i> ^{a)}	<i>S. acidiscabies</i> ATCC49003 ^T ATCC49004	Group			
				A	B	C	D
DL-2-Aminobutyric acid	+		+	NT	NT	+	NT
L-Asparagine	+		+	NT	NT	+	NT
L-Cystein	—		—	NT	NT	—	NT
L-Histidine	+		+	NT	NT	—	+
L-Hidroxypoline	+		+	+	+	+	—
L-Methionine	+		+	+	+	+	—
Potassium nitrate	+	+	+	+	+	+	+
L-Phenylalanine	+		+	NT	NT	+	±
L-Serine	+		+	NT	NT	+	NT
L-Threonine	+		+	NT	NT	+	NT
L-Varine	+		+	NT	NT	+	+

^{a)}*S.s.achromogenes* ; Elezawy and Szabo(1979)

NT ; not detremined + ; 90% or more of strains are positive

— ; 90% or more of strains are negative d ; 11 ~ 89% of strains are positive

Table 11. Carbon source utilization of potato scab pathogens isolated in Hokkaido

Carbon source (1%)	<i>Streptomyces scabies</i> ATCC49173 ^T ATCC33282	<i>S. s. achromogenes</i> ^{aj}	<i>S. acidiscabies</i> ATCC49003 ^T ATCC49004	Group			
				A	B	C	D
Adonitol	—		—	—	—	—	—
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+		+	+	+	+	+
Dextran	—		—	NT	NT	—	—
Dextrin	+	+	+	NT	NT	+	+
Dulcitol	—	—	—	—	—	—	—
Erithritol	—		—	NT	NT	—	—
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+
D-Garactose	+		+	+	+	+	—
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
iso-inositol	+	+	+	+	+	+	+
meso-inositol	+		+	NT	NT	+	NT
Inulin	+		+	NT	NT	+	+
D-Lactose	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	d
Mannitol	+	+	+	+	+	+	—
Mannose	+	+	+	+	+	+	+
D-Melezitose	—		—	—	—	—	—
D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	NT
α -m-D-Glucoside [*]	—		—	NT	NT	—	—
Raffinose	+	+	—	+	+	+	+
L-Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+
D-Ribose	—		—	NT	NTT	—	NT
Salicin	+		—	+	+	+	—
Sorbitol	—		—	NT	NT	—	—
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+
Treharose	+		+	+	d	+	—
Xylitol	—		—	—	—	—	—
D-Xylose	+	+	+	+	+	+	—
Acetic acid (0.1%)	+		+	+	+	d	—
Citrate (0.1%)	+		+	+	+	+	—
Malonate (0.1%)	+		+	+	+	—	—
Propionate (0.1%)	—		+	—	—	d	—
Piruvate (0.1%)	—		+	—	—	+	+

^a*S.s.achromogenes*; Elezawy and Szabo(1979)

NT ; not detremined + ; 90% or more of strains are positive

— ; 90% or more of strains are negative d ; 11 ~ 89% of strains are positive

D. GC含量

DNAのGC含量は、もはや細菌分類学では不可欠の記載事項となっている。一般に*Streptomyces*属菌のDNAは70%前後のGC含量を有し、細菌DNAの約25~75%に比較すると高い方にまとまっており、識別や同定の特に有効な手段とは言えないが、属レベルにおいてある程度の傾向は示される。そこで、北海道で分離されたジャガイモそうか病菌のGC含量について既知の他の病原菌と比較を行った。

材料及び方法

最初に供試菌株のDNA抽出を行った。イースト・麦芽液体培地 (Medium 2,ISP培地 No.2に準じる) を用い、28℃で5日間振とう培養した菌体を遠心分離(8,000rpm,10min.)により集菌し、再び殺菌水にて遠心洗浄した。得られた菌体を凍結乾燥後、乳鉢中で十分に磨砕した。30~40 mgの磨砕菌体を1.5 mlのチューブに入れ、10mM Tris-HCl (pH8.0)に25% シュークロースを添加した液および0.1M EDTA(pH 8.0)を5:4で混合した緩衝液675 μ l、30% SDS溶液 50 μ l、6mg/mlのプロテ

ナーゼK溶液 25 μ lを加えて、ガラス棒でよく攪拌した。それを55℃で12時間インキュベートした。その後、750 μ lのフェノール/クロロホルム(1:1)を加えて、よく攪拌し、遠心分離(12,000rpm,30min.)によって得られた上清(水層)を回収する操作を6~7回繰り返した。その後、1/10容の3M 酢酸ナトリウムと等量の冷イソプロパノールで沈殿させ、遠心分離(3,000rpm,1min.)で回収した沈殿を70%エタノールで洗浄(3,000rpm,1sec.)し、室温で乾燥させた。

次にRNase処理を行った。上記の乾燥後の試料に5 mlの50mM Tris-1mM EDTA-200ug/ml RNase溶液に溶解し、4℃で12時間放置してRNA除去を行った後、再び750 μ lのフェノール/クロロホルム(1:1)を加えてよく攪拌し、遠心分離(12,000rpm,30min.)した。その上清を回収し、1/10容の3M 酢酸ナトリウムと2倍量の冷エタノールを加えて沈殿させ、再び遠心分離(3,000rpm,1min.)で回収した沈殿を70%エタノールで洗浄(3,000rpm,1sec.)し、室温で乾燥させた。このRNase処理を2回繰り返した。最終的に得られた試料を少量のTE

緩衝液に溶解させ、ゲノムDNA試料とした。

このようにして得られた精製DNAを用い、Kaneko et al.(1986), Katayama-Fujimura et al.(1984)の方法に従って、GC含量の測定を行った。すなわち、精製DNA試料を吸光光度計により $OD_{260}=7\sim10$ となる濃度に1/10希釈SSCに溶解させ、沸騰水中で10分間保った後に氷水中で急冷して熱変性させる。これに等量の0.1% (40mM 酢酸ナトリウム+2mM $ZnSO_4$, pH5.3)のヌクレアーゼP1溶液を加えて、50℃で1時間反応させてヌクレオチド化し、それを逆相分配のカラム (WAKO SIL 5C-18)を用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析した。

分析条件は0.2M $NH_4H_2PO_4$ 溶液(pH4.5)を溶出溶媒とし、送液速度1.0ml/min、検出波長は270nm、カラム温度20℃で行った。なお、比較のためにニシン精子DNA(GCmol%=約40%)を用いた。検定菌株はそれぞれの菌群を代表して、A菌群ではSFN-7, Ch-2, SD742, B菌群ではSNS-30, K(D)12375, SNS-39, C菌群ではSKS-43, SY9113, SY9103, D菌群ではSTA-15, STF-7を用いた。

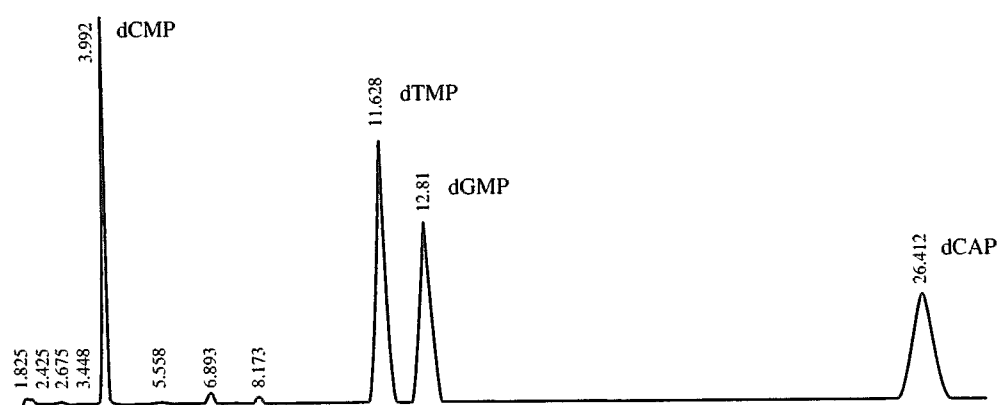
結 果

上記の分析条件におけるHPLCクロマトグラムおよび計算結果を図1に示す。試料注入後、約3～4分後、11～12分後、12～13分後、26～27分後にそれぞれdCMP、dTMP、dGMP、dAMPが溶出した。キャリブレーション分析の結果、供試菌株のGC含量はA菌群では70.9～71.1 mol%、B菌群では68.3～69.1 mol%、C菌群では70.9～72.5 mol%、D菌群では66.1 mol%と高く、*Streptomyces*属菌の一般的な値に類似した (Table 12)。

Table 12. DNA base composition(GC contents) of potato scab pathogens isolated in Hokkaido

Group	Isolate tested	GC contents(mol%)
Group A	SFN-7	86.4
	Ch-2	68.3
	SD742	69.1
Group B	SNS-30	70.9
	K(D)12375	71.1
	SNS-39	70.9
Group C	SKS-43	64.6
	SY9113	72.5
	SY9103	70.9
Group D	STA-15	63.7
	STF-7	68.5

Fig 1. The HPLC chromatogram of nuclease P1 hydrolysate of DNA eluted from a potato scab pathogen.



CULCULATION REPORT

PKNO	TIME	AREA	MK	CONC	MAME
5	3.992	5717		18.5065	dCMP
9	11.628	9420		29.7502	dTMP
10	12.810	7512	V	23.7252	dGMP
11	26.412	8349		26.3684	dAMP
TOTAL		30998			

E. 病原菌の細胞壁成分

放線菌の中で最大の菌種を抱える *Streptomyces* 属菌株は細胞壁のアミノ酸組成としてLL-ジアミノピメリン酸(LL-A₂pm)を有し、他のほとんどの属の菌株がmeso-A₂pmを持つこと、そしてA₂pmの異性体を分別するのに簡便な方法(Becker et al.1964)があることにより、分類法として汎用されている。ここではジャガイモより分離されたそうか病菌の細胞壁のアミノ酸組成を明らかにする。

材料及び方法

イースト・麦芽液体培地 (ISP培地 No.2に準じる) を用い、28℃で7日間振とう培養した菌体を濾紙上で集菌し、菌体量の10倍以上の殺菌水を用いて洗浄した。室温で約1時間風乾後、その300mgをネジ付き試薬瓶に入れ、12mlの6N 塩酸を加え、テフロン製のキャップで密閉した。それを高温乾燥器中で105℃、12時間保って菌体を加水分解した後、濾紙を用いた濾過操作で残渣を除去し、上清を得た。その上清を試験管濃縮機(東京理化社製)で減圧乾固させて固形物とし、それを1.5mlの水に溶かして乾燥菌体換算で50mg/mlの溶液を調整した。

ジアミノピメリン酸の分析は薄層クロマトグラフィーによった。薄層には市販のCellulose-coated aluminium (Merk.No.5552)を使用し、展開溶媒はメタノール：水：10N 塩酸：ピリジン (32:7:1:4)を用いた。菌体試料についてはその5～10μlを、5mg/mlに調整した市販のA₂pm標準品(和光純薬社、DD-,LL-,meso-体混合物)については2μlをスポットし、上昇法で約3時間展開した後、50℃の乾燥器で約30分間乾燥させ、0.2% ニンヒドリン含有アセトンを噴霧して発色を観察した。供試菌株はTable 1～4に示す、全ての菌株である。

結 果

上記の分析条件におけるTLC クロマトグラムを図版4に示す。一般にメタノール・水・塩酸ピリジン系の溶媒におけるA₂pm関連化合物の移動順位はLL-A₂pm,meso-A₂pm,3-OH-A₂pmの順とされ、異性体のDD-A₂pmは本溶媒系ではmeso-A₂pmと区別できないとされる。分析の結果、供試した全ての菌株でLL-A₂pmが検出された(Plate 4)。

F. 血清学的性質

血清学的性質は細菌の分類基準として重要視されるが、放線菌の分類では明らかにされないことが多い。そこで、北海道で分離されたジャガイモそうか病菌の血清学的性質を他の病原菌および非病原菌と比較して明らかにし、さらに血清学的識別法開発の基礎とすることを目的に実験を行った。

材料および方法

北海道内のジャガイモ罹病塊茎から分離されたA菌群の1菌株SNS-26、C菌群の1菌株SSY-10および *S.acidiscabies* の1菌株4030に対する抗血清を作成した。作成方法は予めイースト・麦芽液体培地 (Medium 2,ISP培地 No.2に準じる) を用い、28℃で5日間振とう培養した菌体を遠心分離(8,000rpm,10min.)により集菌し、再び殺菌水にて遠心洗浄した。菌体に等量の10mM Tris-HCl緩衝液(pH8.2)を加えて、超音波破碎(60W,10min.)し、さらに等量のFreund不完全アジュバント(Difco社)を加えてエマルジョン化した懸濁液2mlを家兎に皮下注射した。これを一週間間隔で4回行った。5週目に4mlを注射し、その一週間後に採血した。採取血液は37℃で2時間静置して凝血分離させ、その血清を以下の試験に用いた。

最初に硫酸塩析法によるIgGの非特異的な精製を行った。本血清1mlに9mlの蒸留水を加え、10mlの飽和硫酸溶液を攪拌しながら加え、室温で60分間静置した後、遠心分離(8,000rpm,20min.)により得られた沈殿を2mlの1/2希釈PBSに溶解して透析チューブに入れ、1/2希釈PBSに対して透析(4℃,24min.)したものを一次抗体として用いた。

血清学的性質の比較にはイミュノブロット法を用いた。上記と同様に培養し、超音波破碎した菌体破碎液を遠心分離(8,000rpm,10min.)して得られた上清に最終濃度80%となるように硫酸を加えて硫酸塩析を行った。その沈殿を遠心分離(8,000rpm,10min.)にて回収し、少量の10mM Tris-HCl緩衝液(pH8.2)に再懸濁させ、同緩衝液中で一昼夜透析した。

得られた蛋白質画分を吸光光度計を用い、OD₂₈₀ = 0.72～1.40となるように希釈して抗原とした。これをLaemmli(1970)の方法にしたがって、12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEを行った。泳動後はゲルからニトロセルロースメンブラン (NCM)へのエレクトロトランスファー(10V,4℃, 15hr.)を行い、さらに口野ら(1987)の方法にしたがって、イミュノデテクションを行った。

まず、転写後のNCMを室温で15分間乾燥させ、2% BSAを加えたTBSでブロッキング(25℃,1hr.)した後、一次抗体処理を行った。一次抗体は5μg/mlの濃度にTBST/BSA/PVPで希釈したものを室温で1時間反応させた。3回洗浄後、同液で800倍に希釈した市販のALP標識抗ウサギ・ヤギ抗体(生化学工業社)を二次抗体として、同様に室温で1時間反応させた。3回洗浄後、発色剤としてTris-HCl緩衝液(pH8.2)に溶解した6mg/mlのFast Red TR salt(Sigma社)、基質として同じく1mg/mlの

Naphthol AS-NX phosphate (Sigma社) を等量混合した基質溶液を室温で約20分間処理した後にNCM上での発色を観察した。供試菌株はそれぞれの菌群を代表して、A 菌群ではSFN-7, Ch-2, Ch-3, SD742, B 菌群ではSNS-30, K(D)12375, SNA-39, SNS-26, C 菌群ではSKS-43, SY9113, SY9103, 91Ki-13 D 菌群ではSTA-15, STF-7, SHE-13を用いた。

比較にはTable 7に示す輸入菌株および*S. sampsonii* ATCC25495^T, *S. setonii* ATCC25497^T, *S. griseus* ATCC23345^T, *S. tendae* ATCC19812^T, *S. bottropensis* ATCC25435^T, *S. neyagawaensis* ATCC27449^T, *S. diastatochromogenes* ATCC12309^Tを供試した。

結 果

イミュノプロット法により比較した、供試菌株の血清学的類縁性をPlate 5～11に示す。

抗SNS-26抗体を用いた抗原解析の結果、A 菌群の6菌株およびB 菌群の6菌株ともに抗原構造がほぼ完全に一致した (Plate 5)。また、A, B 菌群と非病原性菌*S. bottropensis* ATCC25435^T, *S. neyagawaensis* ATCC27449^T, *S. diastatochromogenes* ATCC12309^Tは互いに血清学的性質が類似した。特に*S. diastatochromogenes* ATCC12309^Tとは類似度が高く、血清学的に近縁な種と考えられた (Plate 6)。

抗SSY-10抗体を用いた抗原解析では、C 菌群は菌群内では血清学的に均一な種と考えられたが (Plate 7)、A, B 菌群および直～波状型の孢子鎖を有する*S. acidiscabies* ATCC49003^T, *S. sampsonii* ATCC25495^T, *S. setonii* ATCC25497^T, *S. griseus* ATCC23345^T, *S. tendae* ATCC19812^Tとは抗原構造が大きく異なり、血清学的に特異な菌群と考えられた (Plate 9)。なお、D 菌群とは血清学的性質はほぼ一致した (Plate 8)。

さらに、抗*S. acidiscabies*(4030)抗体を用いた抗原解析でも、*S. acidiscabies*と比較菌株間では抗原構造が大きく異なり、本菌種もまた血清学的に特異な菌群と考えられた (Plate 10, 11)。以上の結果から、上記の3種のそうか病菌はそれぞれ血清学的に類縁性が低く、特異的な性質を有することが明らかであった。

G. DNA相同性

北海道で分離されたジャガイモそうか病菌と既に報告されているそうか病菌のDNA相同性を検討し、その異同を明らかにする目的で実験を行った。

材料と方法

菌体DNAの抽出は以下の方法で行った。トリプトン 5 gと酵母エキス 3 gを1,000 mlの蒸留水に加えて殺菌したトリプトン・イーストブロス (ISP培地No.1に準ずる) に供試菌株を接種し、25℃で48時間培養後に遠心分離

により集菌し、殺菌水で2度洗浄した。その菌体を-20℃で凍結後に凍結乾燥を行い、乳鉢中で磨砕した。さらに、菌体粉末200～250 mgを1.5ml容のエッペンドルフチューブに入れ、675 μ lのTSE buffer(10mM Tris-HCl, 25% sucrose, 0.1M EDTA)を加えて攪拌し、50 μ lの30% SDSと25 μ lのProtanase K(最終濃度 0.2mg/ml)を加えて再度攪拌後、55℃で12時間培養した。

遠心(10,000 rpm, 30min.)後の上清を等量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(50:48:2)で2回抽出を行った後に、さらに遠心分離 (10,000 rpm, 30 min.)により上清を得た。その上清に1/10容の3M酢酸ナトリウムと0.54容のイソプロパノールを加えて沈殿させ、70%エタノールでリンスした後、減圧下で乾燥させた。

DNA相同性はSeidler and Mandel(1971), Seidler et al.(1975)の方法を改良した、国永・横沢(1982)のDNA-DNA再会合反応速度解析法により、昇降温式吸光度計を用いて行った。

上記のDNA試料を氷上にて超音波処理(Bronson Sonifir, Model B-12)を行い、分子量約 5.5×10^5 ダルトンに断片化させた後、75～86 μ g/mlとなるように $5 \times$ SSC (Standard Saline Citrate: 150 mM NaCl, 15mM sodium citrate, pH7.0)に溶解させた。再会合速度を早めるために20% DMSO(dimethylsulfoxide)を加えた。作成した試料を同一菌株の場合には単独(900 μ l)で、異なる菌株の比較には等量混合(各450 μ l)して石英セル中に封入し、昇降温式吸光度計(MPS-5000)に装填し、95℃で10分間保ってデネイチャーさせた後に65℃まで降温させて再会合させ、50%が会合を終了するまで、吸光度(OD₂₆₀)の減少を観察した。その減少に要する時間を測定し、Seidler and Mandel(1971)の反応式によってDNA相同値を算出した。

供試菌株はTable 13～15に示す計22菌株である。

Table 13. DNA relatedness(%), based on DNA/DNA reassociation, among *Streptomyces* spp. causing potato scab(No.1)

Group · Species · Isolate No.		% relatedness												
		SNS	SBH	K(D)	B-4	SD	4029	SH18	91Ki	91Sy	STA	SH13	STF	4030 4031
Group A	SNS-26	100												
	SBH-3	100	100											
	K(D)75123	99	99	100										
Group B	B-4	97	98	95	100									
	SD742	97	98	99	94	100								
	<i>S. scabies</i> 4029	97	98	98	98	99	100							
Group C	SHE-18	14	16	ND	15	13	15	100						
	91Ki-11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	99	100					
	91Sy-13	17	16	17	16	18	16	96	98	100				
Group D	STA-15	12	ND	ND	14	13	16	63	63	62	100			
	SHE-13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	64	64	61	94	100		
	STF-7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	65	62	64	93	94	100	
<i>S. acidiscabies</i>	4030	15	ND	ND	14	11	18	17	ND	15	16	ND	ND	100
	4031	17	11	ND	15	15	16	16	ND	16	ND	ND	ND	95 100

ND ; not determined

Table 14. DNA relatedness(%), based on DNA/DNA reassociation, among *Streptomyces* spp. causing potato scab(No.2)

Group · Species Isolate No.		% relatedness												
		SNS	SBH	K(D)	B-4	SD	4029	49173	91Sy	SHE	91Ki	49003	4030	4031 51928
Group A	SNS-26	100												
	SBH-3	100	100											
	K(D)75123	99	99	100										
Group B	B-4	97	98	95	100									
	SD742	97	98	99	94	100								
	<i>S. scabies</i> 4029	97	98	98	98	99	100							
Group C	ATCC49173 ^T	96	94	94	98	99	96	100						
	91Sy-13	17	16	17	16	18	16	18	100					
	SHE-18	14	16	ND	15	13	15	17	96	100				
<i>S. acidiscabies</i>	ATCC49003 ^T	19	ND	ND	ND	ND	ND	19	18	22	16	100		
	4030	15	ND	ND	14	11	18	11	15	17	ND	95	100	
	4031	17	11	ND	15	15	16	ND	15	16	ND	95	95	100
<i>S. caviscabies</i>	ATCC51928 ^T	14	ND	ND	ND	ND	ND	11	13	12	14	10	13	ND 100

ND ; not determined

Table 15. DNA relatedness(%), based on DNA/DNA reassociation, among potato scab pathogens group-C,D and other *Streptomyces* spp. which have Recti-flexous type spore chain

Group	Isolate No.	%relatedness						
		91Sy-3	STA-15	<i>S. acidiscabies</i> ATCC49004 ^T	<i>S. sampsonii</i> ATCC25495 ^T	<i>S. setonii</i> ATCC25497 ^T	<i>S. griseus</i> ATCC23345 ^T	<i>S. tendae</i> ATCC19812 ^T
Group C	91Sy-3	100	ND	9.4	0	14.1	4.9	21.4
Group D	STA-15	ND	100	0	0	21.0	22.9	11.2

ND ; not determined

結 果

供試したA～Dの各菌群ともに、北海道内の様々な地点から分離されたにも関わらず、菌群内でのDNA相同性が高かった。A菌群内では99%以上、B菌群内では94%以上、C菌群内では96%以上、D菌群内では93%以上の相同値を示した。

菌群間の比較では、孢子鎖が螺旋型に属するAとB間では95%以上と高く、またいずれの菌株も*S.scabies* ATCC49173^Tとは94%以上の相同値を示した(Table 13,14)。

孢子鎖が直～波状型に属するCとD間では61～64%と比較的低かった。また*S.acidiscabies* ATCC49003^T, *S.caviscabies* ATCC51928^Tとはいずれの菌株も22%以下の値を示し、遺伝的類縁性が低かった(Table 13,14)。

さらに、直～波状型の他の*Streptomyces*属菌である*S.sampsonii*, *S.setonii*, *S.griseus*, *S.tendae*との比較でも相同値は最大で22.9%と低い値を示した(Table 15)。

Table 18. The criteria for the classification of species of Genus *Streptomyces*

*Color of substrate mycelium (White, Gray, Yellow, Red, Blue, Green, Violet)
*Production of melanoid like pigment
*Ornamentation of spore surface (Smooth, Warty, Spiny, Hairy)
*Morphology of spore chain (Spira, Retinuculum-Apertum, Rectus, Flexibilis)
*Utility of sugars (D-Glucose, D-Xylose, L-Arabinose, L-Rhamnose, D-Fructose, D-Galactose, Raffinose, D-Mannitol, i-Inositol, Salicin, Sucrose etc.)

(Miyasita, S.1985)

H. 考 察

放線菌の属の数は、現在まで約50にも達する。このように属の数が多くなったのは、産業上の理由で膨大な数の菌株がスクリーニングに供試されたのが大きな理由ではあるが、それと同時に細菌に比較して著しく多様な形態を有しているためとされる。事実、多くの属は形態により定義されてきた。

放線菌の属の分類基準で現在最も重要なのは、Table 17に示す通り、その形態的特性ならびに化学組成のうちで細胞壁組成、全細胞加水分解液の糖組成である(宮下.1985)。

分離した放線菌を同定する場合、以下の様なステップで行うのが一般的である。

- ①全菌体の加水分解液のジアミノピメリン酸の異性体の型を調べ、形態観察を行う。
- ②全菌体加水分解液の糖組成を分析する。
- ③必要に応じてその他の化学成分の分析、生理試験等を行う。

このうち土壌等から圧倒的頻度で分離される*Streptomyces*属は、大抵の場合①の段階で同定できる。

そこで、本試験においても形態的性質がその基準を

Table 17. The criteria for the classification of genus of actinomycetes

Morphology
Formation of substrate mycelium
Sporophore
Number of spore, location, Surface ornamentation
Formation of sporangium, Morphology, Size
Fragmentation of substrate mycelium
Mobility of spore (Zoospore in Sporangia)
Chemical components
Cell wall type(Composition of Diamino pimelic acid)
Sugars in hydrolysate of the cell
Micoric acid
Phospholipid type
Mena-quinone
Other criteria
Tolerance to low pH
Ecology

(Miyasita, S.1985)

満たすと同時に全菌体のジアミノピメリン酸がLL-A₂pmで、Lechevalier and Lechevalier(1970)の9種の細胞壁型のI型に区分されることから、*Streptomyces*属と同定し、上記②以下の手順を省略した。

1974～1994年に北海道内で分離されたジャガイモそうか病菌（一部ニンジン、ゴボウ分離菌を含む）の形態、培養性質、生理的性質、GC含量、細胞壁成分、DNA相同性の結果、Table 1～4に示した菌群は以下のように同定された。

孢子鎖がらせん型でメラニン非産生のA菌群 (Table 1) は、生理的性質の比較の中で6%NaClに対する耐性が異なる以外はElesawy and Szabo(1979)の*S.scabies* subsp.*achromogenes*の記載に一致することから同種と考えられる (田中ら.1994c)。

孢子鎖がらせん型でメラニン産生のB菌群 (Table 2) は、*S.scabies* ATCC 49173^T, 33282の基準菌株とは115の調査項目が全て一致することから、*Streptomyces scabies* と同定された (田中ら.1994c)。

孢子鎖が直～波状型で緑黄色色素非産生のC菌群 (Table 3) と6種類のそうか病菌を対象にLambert and Loria(1989)の方法により、単純共有度係数法(SMC)による相似度係数を比較検討した(Table 16)。その結果、*S.acidiscabies* ATCC49003^Tとは79項目中73項目が同じで、相似度係数は75%であった。*S.aureofaciens*(russet scab)とは48項目中385項目が同一で、79%であった。*S.griseus* ATCC10246^Tとは42項目中24項目が同一で、57%と低かった。*S.setonii* ATCC25497^Tとは88項目中58項目が同一で、66%と低かった。*S.tendae* ATCC19812^Tとは79項目中61項目が同一で、77%の値を示した。Waksmanが1961年に*S.scabies*とし、その後Elesawy & Szabo(1979)がネオタイプとしたIMRU 3018 (=ISP 5078)は現在*S.albidoflavus* groupに所属するとされているが、

本菌とは39項目中24項目が同一で、相同性は62%と低かった。以上のことから、本菌種に一致する菌種は見当たらなかった(田中ら,1995a)。

Table 16. Levels of similarity between *Streptomyces turgidiscabies* and scab pathogens or the clusters selected by Williams et al.^{a)} based on the simple matching coefficient analysis^{b)}

Species, Isolate, Cluster	% of simple matching coefficient ^{c)}
<i>S. turgidiscabies</i>	99.5
<i>S. acidiscabies</i> ATCC 49003 ^T	75.3
<i>S. scabies</i> ATCC 49173 ^T	87.5
<i>S. setonii</i> ATCC 25497 ^T	65.9
<i>S. tendae</i> ATCC 19812 ^T	77.2
<i>S. griseus</i> ATCC 10246 ^T	57.1
<i>S. scabies</i> ^{d)} IMRU 3018 ^{d)}	61.5
Cluster group 1 (<i>S. albidoflavus</i>)	86.5
Cluster group 2 (<i>S. olivovorticillatum</i>)	71.9
Cluster group 3 (<i>S. atroolivaceus</i>)	75.0
Cluster group 5 (<i>S. exfoliatus</i>)	81.3
Cluster group 6 (<i>S. violaceus</i>)	85.3
Cluster group 7 (<i>S. roseus</i>)	72.4
Cluster group 10 (<i>S. fulvissimus</i>)	75.0
Cluster group 14 (<i>S. aureofaciens</i>)	78.9
Cluster group 15 (<i>S. chromofuscus</i>)	93.3
Cluster group 18 (<i>S. cianeus</i>)	92.5
Cluster group 19 (<i>S. diastaticus</i>)	88.9
Cluster group 21 (<i>S. griseoruber</i>)	73.5
Cluster group 23 (<i>S. microflavus</i>)	91.1
Cluster group 24 (<i>S. flaveolus</i>)	83.7
Cluster group 29 (<i>S. lydicus</i>)	85.4
Cluster group 37 (<i>S. griseoflavus</i>)	74.6
Cluster group 40 (<i>S. phaeochromogenes</i>)	84.6
Cluster group 42 (<i>S. rimosus</i>)	74.1
Cluster group 64 (<i>S. bikiniensis</i>)	72.9
Cluster group 66 (<i>S. misakiensis</i>)	77.4

^{a)} Williams et al.(1983)

^{b)} Lambert and Loria(1989)

^{c)} The table includes pathogenic organisms and clusters which exhibit at least 70% similarity to *S. turgidiscabies*.

^{d)} Inverted commas indicated that a strain does not belong in the revived species *S. scabies*.

したがって、本病原菌は新種と考えられ、*S. turgidiscabies* Miyajima et al.sp.nov.と命名することを提案した(Miyajima et al,1998)。

孢子鎖が直～波状型で緑黄色色素産生のD菌群(Table 4)は新種と考えられるが、現存菌株数が3菌株と少ないため、今後菌株数を多くしてさらに検討すべきと考え、記載のみにとどめた。

ところで、A菌群とB菌群は検査項目115の内でメラニン色素産生およびミルク培地での黒色リングの形成のみが異なり、他の項目は全て一致した。両菌群間のDNA相同性は菌群内と同様に高く(95～98%)、血清学的性質においても抗原構造が完全に一致した。さらに後述するように、両菌群の道内での地理的分布には偏りが見られず、生態的にも同一の地位を有すると考えられる。そこで、B菌群は Elesawy and Szabo(1979)の提案した*S. scabies*の亜種subsp.*achromogenes*とするのは妥当ではなく、両菌群をメラニン産生能を異にする系統と位置づけ、A菌群を*S. scabies melanin(+)*系統、B菌群を*S. scabies melanin(-)*系統とすることを提案した

い。

一方、道内で分離された*S. scabies*の2系統の菌群内でのDNA相同性は極めて高く、遺伝学的に均一な集団を形成していると考えられる。これは、米国産の*S. scabies melanin(+)*系統内での相同性に約70～100%と比較的大きな変異が見られる(Healy et al.1991)の対照的である。*S. scabies melanin(-)*系統の分布の報告は少なく、本道における*S. scabies*の両系統の侵入、定着の過程に関して非常に興味深い。

なお、*S. scabies melanin(+)*系統は、腐生菌の*S. bottropensis* ATCC25435^T, *S. neyagawaensis* ATCC27449^T, *S. diastatochromogenes* ATCC12309^Tとは調査項目に占める相同性が86～88%と高く、近縁であった。これは、血清学的性質および後述するように、16S rRNAの塩基配列の比較においても同様であった(Takeuchi et al.1996)。

現在、*S. turgidiscabies*は他府県ならび海外での発生報告はなされていない。しかし、Lindholm et al.(1997)の報告したフィンランドの分離菌が本種である可能性が高く、韓国では次章で述べる遺伝子診断の結果で本種と一致する反応を示す菌株が分離されている(Lim and Tanaka,未発表)。今後の調査が待たれるが、*S. scabies*と同様に病原菌の進化過程および本邦への侵入、定着過程に関して深い興味を持たれる問題である。

今回、同定を控えたD菌群は1980年に十勝管内豊頃町平和、同十勝ならびに根室管内中標津町俵橋の3地点で分離された3菌株のみであり、その後の数度にわたる調査にも関わらず、再度分離されるに至っていない。しかし、この菌群の有する緑黄色色素産生能は継代培養を重ねても安定しており、その培養・生理的性質ならびDNA相同性の比較においても多少の差異が見られることから、*S. turgidiscabies*の亜種とすべきか、新種とするのが妥当か、論議の分かれるところであるが、種の概念として重要視される生態的な分布とその地位が明らかでない現状では判断を控えた。今後の検討が必要である。

また、*S. acidiscabies*は本道での分布が確認されなかった。田代は長崎県で本種と同一のITS領域の塩基配列を示す病原菌の分布を確認しており(田代、私信)、他府県での調査が待たれるが、九州地方での本種の定着過程に関しては本道からの種薯の移動が原因とは考えられず、他の要因が重要と思われる。

さらに、道東地方で分離されたニンジン、ゴボウのそうか病菌は*S. turgidiscabies*と同定され(相馬ら,1995)、この他にも菌種は不明であるがテンサイ(阿部・石川,1979)、ダイコン(夏目,1970)で発生が認められており、

多発生地域における輪作体系の中での作目の選択に注意が必要と考えられた。

IV. ジャガイモそうか病菌の識別・定量

前章において、本邦に分布する複数のそうか病菌の種が明らかにされ、その生理的な特性に関する知見が得られた。本病菌のみならず、各種の植物病原性細菌の同定には多大な労力を要し、その生態学的な研究の進展を阻害してきた。その隘路を解決するために、近年は血清学的手法および遺伝子診断の技術が提案され、多くの植物病原菌に対する簡易で高精度な識別・検出のための技術が利用されている。

振り返って、本病に代表される *Streptomyces* 属菌の生態学的な研究には、土壤中における病原菌の動態に関する知見が不可欠である。それらの知見は輪作体系ならび後述する各種の土壌環境制御による防除技術の作用機作に対する生態学的な根拠を与える。しかしながら、本病菌に関する生態的な知見の報告は他の土壌伝染性病害に比較して極端に少ない。

そこで、本章においては各種そうか病菌の血清学的手法および遺伝子診断法による簡易識別と土壤中における菌量評価に関する手法の開発を目的として研究を行った。

A. 血清学的手法による識別

a. 寒天ゲル二重拡散法による抗原解析

Streptomyces 属菌には共通抗原の存在が知られている。一般に、血清学的手法による細菌の識別には、種特異的な抗原に対する抗体の作成が前提となる。そこで複数のそうか病菌の種間における共通抗原および種特異的な抗原の有無を明らかにし、種特異性の高い抗体作成を試みた。

材料と方法

供試した抗血清は、前項Ⅲ.Fで作成した *S. scabies* melanin(-)系統に属する SNS-26 菌株および *S. turgidiscabies* の SSY-10 菌株の菌体破碎上清をそれぞれ家兎に免疫して得られた抗 SNS-26 抗体、抗 SSY-10 抗体である。

菌体抗原の調整は以下の方法で行った。SNS-26 菌株を、イースト・麦芽液体培地 (ISP 培地 No.2 に準じる) を用い、28℃ で 5 日間振とう培養した後に遠心分離より集菌し、再び殺菌水にて遠心洗浄した菌体に等量の 10mM Tris-HCl 緩衝液 (pH6.8) を加えて、超音波破碎 (60W, 10min.) した。さらに菌体破碎液を遠心分離 (8,000rpm, 20min.) して得られた上清に、粉末硫酸を加えて、最終濃度 20, 30, 50, 60, 70% となるように連続的に添加量を増加して塩析し、それぞれの濃度における沈殿を回収した。なお、タンパクの可溶化を促すために 0.2M NaCl を添加した。

沈殿を 10mM Tris-HCl (pH6.8) に再懸濁させて、同緩衝液中で透析 (4℃, overnight) を行い、最終的に OD₂₈₀ ≒ 4.0 程度のタンパク溶液となるように調整した。比較のための SSY-10 菌株および D 菌群の STA-15 菌株の抗原は同様に培養し、超音波で破碎した菌体の遠心上清を用いた。これら抗原液と上記の抗血清をもとに寒天ゲル二重拡散法により抗原活性を検定した。

結果

上記 3 菌株の菌体破碎液の遠心上清と抗 SNS-26 血清との沈降反応の結果、SNS-26 では 4 本、SSY-10 で 2 本、STA-15 で 0 本、抗 SSY-10 血清とは SNS-26 で 2 本、SSY-10 で 4 本、STA-15 で 3 本の沈降線が観察された (Fig.2)。これらの中には、3 種に共通の抗原の他に種特異的な活性の強い抗原が存在することが明らかであった。

一方、硫酸塩析沈殿を用いた場合、SNS-26 菌と抗 SNS-26 血清の沈降反応のパターンは硫酸塩析濃度により異なった。20%~30%、50% および 70% 飽和硫酸沈殿画分ではそれぞれ SNS-26 菌に特有の活性の高い抗原が見られた (Fig.3)。さらに抗 SSY-10 血清との沈降反応を Fig.3 に示すが、SNS-26 菌の 50% および 60% 画分では SSY-10 菌と共通の抗原が見られるが、20~30% 画分

Fig 2. The antigen analysis of potato scab pathogens by the double diffusion gel assay

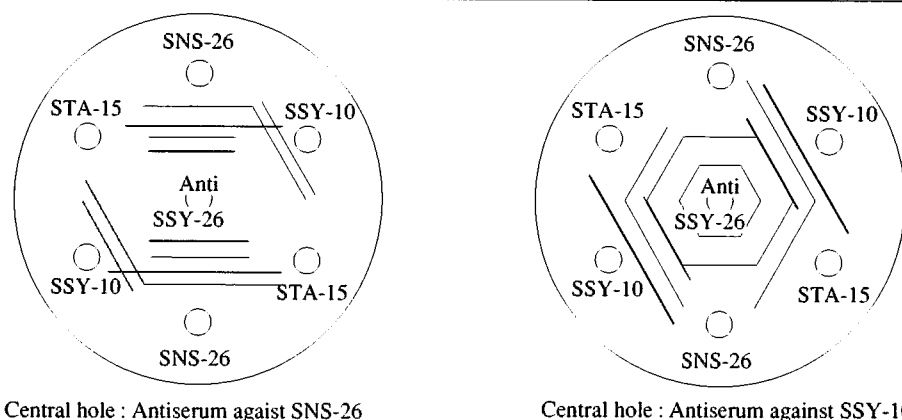
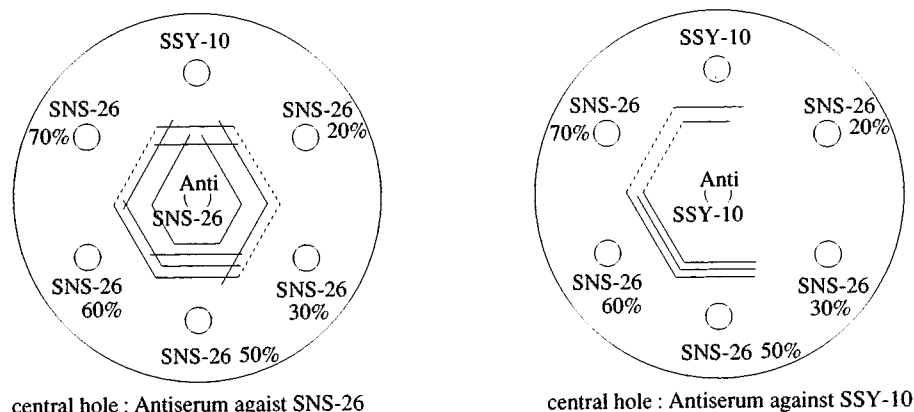


Fig 3. The antigen analysis of fractions by ammonium sulphate dialyze of *Streptomyces scabies*

よび70%画分には共通抗原が観察されなかった。

前述のように、*S. scabies*は血清学的に均一な集団を形成していると考えられることから、20～30%飽和硫酸沈殿画分を用いて、本種に対してより特異性の高い抗血清を作成することが可能であると考えられた。

b. 吸収血清法による特異抗体の作成

血清学的に類似した抗原群を有する細菌などに対する抗体の特異性を高めるために、近縁な細菌またはその抗原を抗血清に処理して非特異的抗体を吸収させ、除去する吸収血清法がある。そこで*Streptomyces*属菌の共通抗原に対する抗体を除去することを目的に本法の有効性を検討した。

材料と方法

抗SNS-26血清にSSY-10菌体を、抗SSY-10血清にSNS-26菌体を処理して共通抗原に対する非特異抗体を吸収させた。

SNS-26菌株およびSSY-10菌株をそれぞれイースト・麦芽液体培地で振とう培養(25℃,5日間)した生菌体を遠心分離により集菌し、再び殺菌水を加えて遠心洗浄した生菌体を用いた。

上記の血清各1 mlに4 mlのPBSを加えた希釈液に生菌

体をそれぞれ3gずつ添加し、十分に攪拌した後に、37℃で3時間反応させた。その後、遠心分離(8,000rpm,20min.)して得られた上清に再び各2gの菌体を加えて攪拌し、同様に37℃、3時間反応させ、引き続き4℃で12時間静置した。処理後は遠心分離を行い吸収血清を得た。

その吸収血清を用いて、寒天ゲル二重拡散法におけるそれぞれの破碎菌体上清との沈降反応を観察した。

供試菌株は上記のSNS-26,SSY-10の他に比較としてD菌群のSTA-15を用いた。

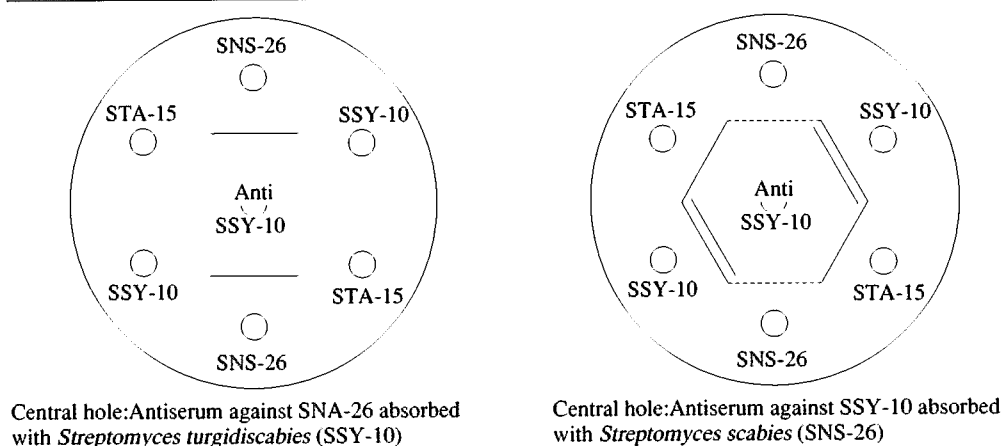
結 果

前項.a.の結果、抗SNS-26血清とSNS-26は4本、SSY-10は2本の沈降線が観察されているが、抗SNS-26血清をSSY-10菌体で吸収させた血清はSSY-10とは反応が見られず、かつSNS-26とは単一の沈降線を形成し、特異性が期待された (Fig. 4)。

同様に抗SSY-10血清とSNS-26は2本、SSY-10は4本の沈降線が観察されているが、抗SSY-10血清をSNS-26菌体で吸収させた血清はSNS-26と弱い反応を示すにとどまり、同様に特異性が期待された (Fig. 4)。

そこで、*S. turgidiscabies*では基本的には血清の特異性が高いこと、吸収血清による特異性の向上が期待され

Fig 4. Reaction in the double diffusion gel assay with absorbed antibodies and potato scab pathogens



ることから、免疫源としての抗原の粗分画は不必要と考えられた。

c. ELISA法による識別

ウイルス、細菌などの検出・同定に多用されているELISA法によるそうか病菌の識別を行うとともに、作成した抗体の特異性を検定して、病原菌定量法開発の基礎とする目的で実験を行った。

材料と方法

供試菌株をTable 19,20に示す。これらは主に1975～1993年に分離された道内産の発病塊茎からの分離株(非病原菌16菌株を含む)、ATCC所蔵の種名既知の*Streptomyces*属菌、財団法人発酵研究所・農林水産省農業環境技術研究所からの分譲菌株である。

*S.scabies*に対する抗血清は、*S.scabies melanin*(-)系統に属するSNS-26菌株の菌体磨砕液を遠心分離(8,000rpm,20min.)した上清中の可溶性画分を30%飽和硫酸で塩析し、沈殿した粗精製抗原を家兎に免疫して作成した。その作成方法を図.5に示す。以下、この抗血清を抗SNS-26-30血清と呼称する。

*S.turgidiscabies*に対する抗血清はSSY-10菌株の菌体磨砕液中の可溶性画分を80%飽和硫酸で塩析し、沈殿

した粗精製抗原を家兎に免疫して作成した。その作成方法をFig.6に示す。以下、この抗血清を抗SSY-10-80血清と呼称する。

*S.acidiscabies*に対する抗血清は、農環研より分譲の*S.acidiscabies*の1菌株4030の菌体磨砕液を家兎に免疫して作成した。その作成方法をFig7に示す。以下、この抗血清を抗4030血清と呼称する。

それぞれのそうか病菌に対する特異抗体は、培養菌体により非特異抗原の吸収を行う吸収血清法によって作成した。

即ち、抗*S.scabies*特異抗体は抗SNS-26-30血清を最初に*S.turgidiscabies*(SSY-10)菌体で吸収し、さらに*S.scabies*と抗原構造が類似した*S.diastatochromogenes*(ATCC12309^T)、*S.bottropensis*(ATCC25435^T)の培養菌体で連続的に吸収を行って作成した(Fig5)。

抗*S.turgidiscabies*特異抗体は、抗SSY-10-80血清を予備試験で非特異反応が認められた*S.griseus*(IFO13304)、*S.diastatochromogenes*(ATCC12309^T)および*S.scabies*(SNS-26)の培養菌体で上記と同様に連続的に吸収血清を行って作成した(Fig6)。

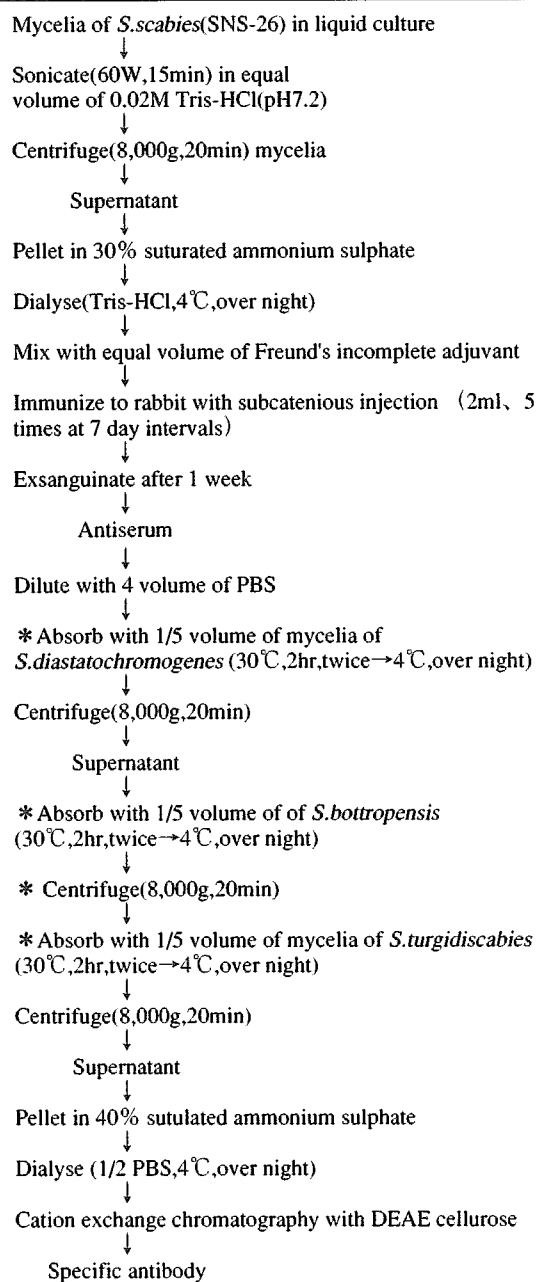
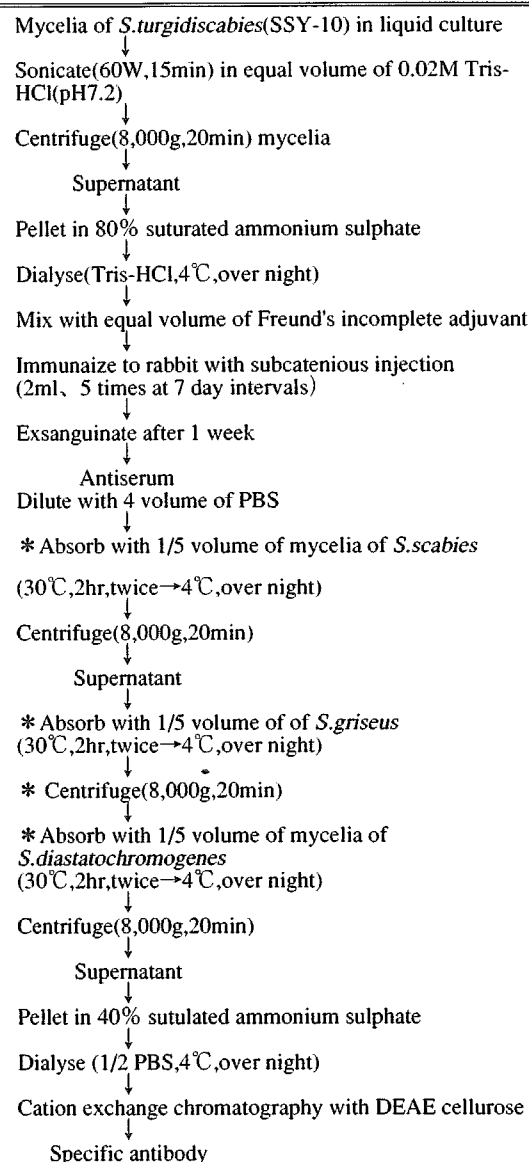
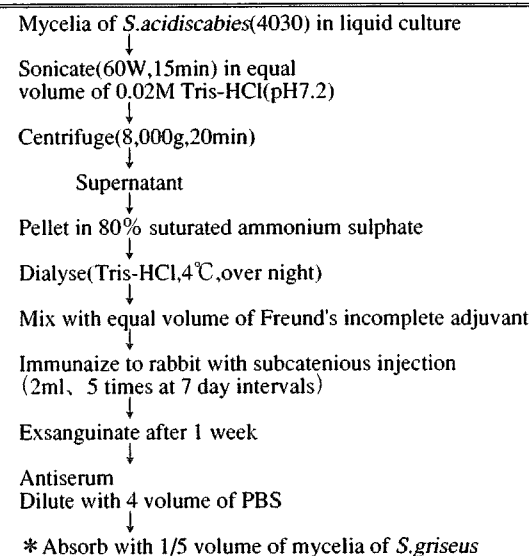
抗*S.acidiscabies*特異抗体の作成は、抗4030血清を予

Table 19. The isolates tested for the ELISA(No.1)

Group (Species)	Isolate No.	Location
<i>Streptomyces turgidiscabies</i>	SRE-27, SKS-17, SMK-5, SRE-9, SKS-15, SKS-21, SKS-30, SSY-10, SKS-6, SHE-33, AHE-8, STF-6, SY9103, SY9104, SY9113, 91Ki-1, 91Ki-3, 91Ki-5, SKS-6, SRE-14, SSY-4, SMN-2, SRE-29, STS-10, STA-13	Hokkaido
<i>Streptomyces</i> sp. (Group D)	STA-15, SHE-13, STF-7	do
<i>S. acidiscabies</i>	4030, 4031	Saga prefecture
<i>S. scabies melanin</i> (-)	SNS-30, SNS-26, SN-2, SBH-3, N-6-6, SNS-8, SFU-10, N-4-1, K(D)75123, SKY-1, CO-3-1, SFU-18, N-4-2	Hokkaido
<i>S.scabies melanin</i> (+)	SD-742, Ch-1, Ch-2, Ch-3, N-6-3, D-1-4, De-1-4, De-1-1	
<i>S.scabies</i>	4017, 4029, IFO-13767	Saga prefecture
<i>S.cheloniumii</i> (russet scab)	PSK-8494, RNA-8493, RBI-8481, RMT-84915, RKU-8483, RKU-8484, RNA-8492, RM-8492, RB-8485	IFO isolate Hokkaido
<i>S. griseus</i>	IFO-13304, IFO-13189	IFO isolate
<i>S. flaveoles</i>	IFO-3408	do
<i>S. tumuli</i>	IFO-13492	do
<i>S. anulatus</i>	IFO-13369	do
<i>S. aureofaciens</i>	IFO-3712	do
<i>S. eurythermus</i>	IFO-12764	do
<i>S. neyagawaensis</i>	IFO-13477	do
<i>S. bottropensis</i>	IFO-13023	do
<i>S. diastatochromogenes</i>	IFO-3337	do
<i>S. d. subsp. luteus</i>	IFO-13814	do
<i>S. antibioticus</i>	IFO-12838	do
<i>Nocardia brasiliensis</i>	IFO-14402	do
Unidentified	ME-8905, ME-8903, ME-8910, ME-8915, ME-8911, ME-8934, ME-8912, ME-9809, ME-8920, ME-8944, ME-8933, ME-8941, ME-9830, ME-8914, ME-8913, ME-8917	Hokkaido

Table 20. The isolates tested for the ELISA(No.2)

Species	Isolate No.	Location
<i>Streptomyces acidiscabies</i>	ATCC 49003 ^T	Maine, U.S.A
	ATCC 49004 ^T	Maine, U.S.A
<i>S. scabies</i>	ATCC 49173 ^T	New York, U.S.A
	ATCC 33282	Keszthely, Hungary
<i>S. sampsonii</i>	ATCC 25495 ^T	
<i>S. setonii</i>	ATCC 25497 ^T	
<i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i>	ATCC 23345 ^T	
<i>S. tendae</i>	ATCC 19812 ^T	
<i>S. bottropensis</i>	ATCC 25435 ^T	
<i>S. eurythermus</i>	ATCC 14975 ^T	
<i>S. neyagawaensis</i>	ATCC 27449 ^T	
<i>S. diastatochromogenes</i>	ATCC 12309 ^T	

^Ttype strainFig 5. Steps for producing the specific antibody against *Streptomyces scabies*Fig 6. Steps for producing the specific antibody against *Streptomyces turgidiscabies*Fig 7. Steps for producing the specific antibody against *Streptomyces acidiscabies*

(30℃, 2hr, twice → 4℃, over night)
 ↓
 Centrifuge(8,000g, 20min)
 ↓
 Supernatant
 ↓
 * Absorb with 1/5 volume of mycelia of *S. scabies*
 (30℃, 2hr, twice → 4℃, over night)
 ↓
 * Centrifuge(8,000g, 20min)
 ↓
 Supernatant
 ↓
 Pellet in 40% saturated ammonium sulphate
 ↓
 Dialyse (1/2 PBS, 4℃, over night)
 ↓
 Cation exchange chromatography with DEAE cellulose
 ↓
 Specific antibody

Fig 8. The method of the indirect ELISA for the differentiation of potato scab pathogens

Cultured mycelia
 ↓
 Macerate in carbonate buffer(pH 9.6)
 ↓
 Centrifuge(10,000rpm, 3min)
 ↓
 Dilute with 9 volume of carbonate buffer
 ↓
 Antigen treatment(4℃, 12hr)
 ↓
 Wash(PBST, 3 times)
 ↓
 Blocking(1% BSA-PBS, 30℃, 3hr)
 ↓
 Wash(PBST, 3 times)
 ↓
 Primary antibody(IgG 5.0 μg/ml, PBST/BSA/PVP, 30℃, 3hr)
 ↓
 Wash(PBST, 3 times)
 ↓
 Secondary antibody
 ↓
 (ALP-Anti-rabbit-goat, ×800, PBST/BSA/PVP, 30℃, 3hr)
 ↓
 Wash(PBST, 3 times)
 ↓
 Substrate(30℃, 30min)
 ↓
 Measurement(405nm)

備試験で非特異反応が認められた *S. griseus*(IFO13304)および *S. scabies*(SNS-26)の培養菌体で同様に連続的に吸血清を行って作成した(Fig.7)。

これらの特異抗体を基にした精製抗体を用いて *S. scabies*, *S. turgidiscabies* および *S. acidiscabies* の識別を試みた。ELISA検定の方法は間接抗原吸着法を用いた。その方法をFig.8に示す。

結 果

抗 *S. scabies* 特異抗体を用いたELISA法における反応性は *S. scabies* で高く、特異的な識別が可能であった(Table 21)。しかし、同時に *S. diastatochromogenes* でやや強い非特異反応が認められた。

S. diastatochromogenes は *S. scabies* と血清学的、遺伝学的にも近縁な種と考えられることから、本法では非特異反応を抑制することが困難と考えられ、さらに特異性を高めるためにはモノクローナル抗体などの検討が必要と考えられた。

抗 *S. turgidiscabies* 特異抗体を用いたELISA法における反応性は *S. turgidiscabies* で特異的に高く、選択的な識別が可能であった(Table 22, 23)。

さらに抗 *S. acidiscabies* 特異抗体を用いたELISA法における反応性は、*S. acidiscabies* で特異的に高く、同様に選択的な識別が可能であった(Table 24)。

Table 21. Reactivity of the potato scab pathogens to the specific antibody against *Streptomyces scabies* by ELISA

Species	No. of isolate	Location	Absorbance(405nm)	Average
<i>S. scabies</i> melanin (+)	10	ATCC, Hokkaido	1.14 ~ 2.0 <	1.54
<i>S. scabies</i> melanin (-)	13	Hokkaido	1.20 ~ 2.0 <	1.62
<i>S. acidiscabies</i>	4	ATCC	0.10 ~ 0.18	0.12
<i>S. turgidiscabies</i>	24	Hokkaido	0.07 ~ 0.15	0.08
<i>S. aureofaciens</i>	1	IFO	0.08	0.08
<i>S. flaveolus</i>	1	IFO	0.07	0.07
<i>S. griseus</i>	3	ATCC, IFO	0.07 ~ 0.12	0.09
<i>S. eurythermus</i>	2	ATCC, IFO	0.07 ~ 0.08	0.08
<i>S. neyagawaensis</i>	2	ATCC, IFO	0.14 ~ 0.22	0.18
<i>S. bottropensis</i>	2	ATCC, IFO	0.18 ~ 0.25	0.22
<i>S. diastatochromogenes</i>	2	AYCC, IFO	0.64 ~ 0.98	0.81
<i>S. d. subsp. luteus</i>	1	IFO	0.08	0.08
<i>S. sampsonii</i>	1	ATCC	0.08	0.08
<i>S. tendae</i>	1	ATCC	0.07	0.07
<i>S. setonii</i>	1	ATCC	0.09	0.09
<i>S. antibioticus</i>	1	IFO	0.08	0.08
<i>Nocardia brasiliensis</i>	1	IFO	0.09	0.09
<i>S. cheloniumii</i> (russet scab)	1	Hokkaido	0.09 ~ 0.15	0.10
Non pathogenic actinomycetes (unidentified)	16	do	0.07 ~ 0.23	0.13

Table 22. Reactivity of potato scab pathogens to the specific antibody against *Streptomyces turgidiscabies* by ELISA(No.1)

Species(Group)	No.of isolate	Absorbance (405nm)	Average
<i>Streptomyces turgidiscabies</i>	24	0.15 ~ 1.81	1.12
<i>Streptomyces</i> sp.	3	1.45 ~ 1.62	1.54
<i>S. acidiscabies</i>	4	0.12 ~ 0.13	0.12
<i>S. scabies</i> melanin (—)	13	0.10 ~ 0.18	0.13
<i>S. scabies</i> melanin (+)	8	0.09 ~ 0.15	0.10
<i>S. cheloniumii</i> (russet scab)	9	0.07 ~ 0.17	0.12
<i>S. griseus</i>	3	0.05 ~ 0.07	0.06
<i>S. flaveolus</i>	1	0.07 ~ 0.08	0.08
<i>S. tumuli</i>	1	0.07	0.07
<i>S. anulatus</i>	1	0.07	0.07
Non pathogenic actinomyces (unidentified)	16	0.05 ~ 0.16	0.08

Table 23. Reactivity of potato scab pathogens to the specific antibody against *Streptomyces turgidiscabies* by ELISA(No.2)

Species(Group)	No.of isolate	Absorbance (405nm)	Average
<i>Streptomyces turgidiscabies</i>	1	1.68	1.68
<i>S. acidiscabies</i> ^{a)}	2	0.04 ~ 0.32	0.36
<i>S. scabies</i> ^{a)}	3	0.09 ~ 0.16	0.12
<i>S. sampsonii</i> ^{a)}	1	0.12	0.12
<i>S. setonii</i> ^{a)}	1	0.14	0.14
<i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> ^{a)}	2	0.18 ~ 0.26	0.22
<i>S. tendae</i> ^{a)}	1	0.17	0.17
<i>S. bottropensis</i> ^{a)}	1	0.15	0.15
<i>S. eurythermus</i> ^{a)}	1	0.17	0.17
<i>S. neyagawaensis</i> ^{a)}	1	0.23	0.23
<i>S. diastatochromogenes</i> ^{a)}	1	0.34	0.34

^{a)} included type strainTable 24. Reactivity of potato scab pathogens to the specific antibody against *Streptomyces acidiscabies* with ELISA

Species(Group)	No.of isolate	Absorbance (405nm)	Average
<i>Streptomyces acidiscabies</i> ^{a)}	3	1.11 ~ 1.21	1.17
<i>S. turgidiscabies</i>	2	0.07 ~ 0.09	0.08
<i>S. scabies</i> ^{a)}	2	0.09 ~ 0.10	0.09
<i>S. scabies</i> melanin (—)	13	0.08 ~ 0.10	0.09
<i>S. scabies</i> melanin (+)	10	0.09 ~ 0.12	0.10
<i>Streptomyces</i> sp. (Group D)	3	0.08 ~ 0.12	0.10
<i>S. sampsonii</i> ^{a)}	1	0.10	0.10
<i>S. setonii</i> ^{a)}	1	0.20	0.20
<i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> ^{a)}	2	0.07 ~ 0.12	0.10
<i>S. griseus</i>	1	0.08	0.08
<i>S. tendae</i> ^{a)}	1	0.12	0.12
<i>S. bottropensis</i> ^{a)}	1	0.05	0.05
<i>S. eurythermus</i> ^{a)}	1	0.03	0.03
<i>S. neyagawaensis</i> ^{a)}	1	0.04	0.04
<i>S. diastatochromogenes</i> ^{a)}	1	0.02	0.02
<i>S. flaveolus</i>	3	0.07 ~ 0.08	0.08
<i>S. tumuli</i>	1	0.07	0.07
<i>S. anulatus</i>	1	0.12	0.12
<i>S. cheloniumii</i> (russet scab)	10	0.07 ~ 0.09	0.08

^{a)} included type strain

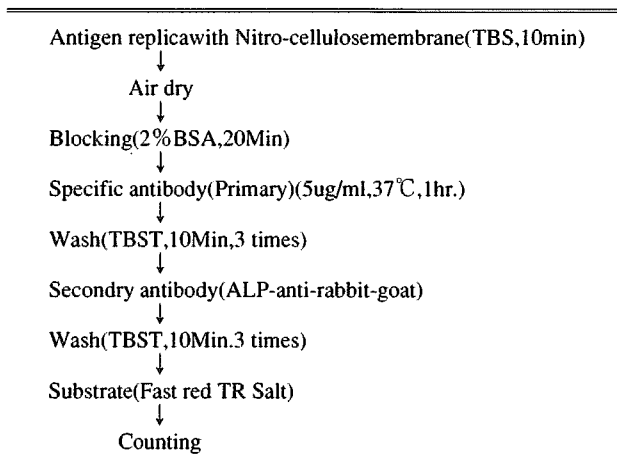
d. コロニーELISA法による識別

そうか病菌の定量法として選択培地と血清学的手法を組み合わせた方法が有効と考えられた。そこで、特異抗体を用いたコロニーELISA法の有効性を検討した。

材料と方法

供試菌株はTable 25に示した計13菌株である。予め、スターチ・無機塩寒天培地（ISP培地，No.8に準ず）に各菌株を画線して、2週間生育させたコロニー表面にニトロセルロース膜を約10分間密着させ、Fig.9に示す方法で検出を行った。使用した抗体は前項.c.で作成した抗*S.turgidiscabies*特異抗体である。

Fig 9. Procedure of the colony ELISA



結 果

予め、平板上で培養した各種*Streptomyces*属菌13菌株の中で、*S.turgidiscabies*のコロニーの反応性（赤色の発

Table 25. Reactivity of potato scab pathogens by colony ELISA to the specific antibody against *Streptomyces turgidiscabies*

Species	No. of isolate	Reactivity
<i>S. turgidiscabies</i>	14	+++
<i>S. acidiscabies</i> ^{a)}	2	±
<i>S. scabies</i>	9	±~+
<i>S. sampsonii</i> ^{a)}	1	+
<i>S. setonii</i> ^{a)}	1	±
<i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> ^{a)}	2	±
<i>S. tendae</i> ^{a)}	1	±
<i>S. bottropensis</i> ^{a)}	1	±
<i>S. eurythermus</i> ^{a)}	1	±
<i>S. neyagawaensis</i> ^{a)}	1	±
<i>S. diastatochromogenes</i> ^{a)}	1	+
Non pathogenic actinomycetes (unidentified)	23	±~+

^{a)} included type strain

色) が強く認められ、識別が可能であった (Table 25)。しかし、コロニーの培養期間、胞子・気中菌糸の有無などによって他の菌種でも弱い非特異反応が見られる

ことがあり、培養期間と抗体の濃度、ブロッキングの強度などについて更に詳細な条件設定が必要である。また、土壌中の菌量を評価する方法に応用するには土壌細菌の生育を抑制する放線菌用の半選択培地の開発が必要と考えられた。

B. PCR法による識別

a. PCRによるそうか病菌の識別

PCR (Polymerase chain reaction) は植物病原菌の検出および識別などの目的に対して、その高い検出精度により多用されている。そこで、複数の病原菌が存在するそうか病の識別に対する有効性と定量法開発への応用性を検討した。

材料と方法

筆者らは、*S. scabies*, *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies* の3種のそうか病菌を含む計12種の*Streptomyces*属菌の16S-23SリボソームRNA遺伝子間に存在するスペーサー領域の塩基配列を比較し、上記3種に特異的な塩基配列の存在を明らかにした (Takeuchi et al. 1996)。それをもとにして、そうか病菌に特異的なプライマーを設計した (Table 26)。

Table 26. Sequences of primers for specific amplification of rDNA of potato scab pathogens by PCR assay

Streptomyces scabies

SC-05: 5'-CCG GTA GCC CAA CCC GTA AG-3'
SC-06: 5'-GTA GTA CTC ACA GCC TCC GG-3'

S. turgidiscabies

TU-02: 5'-GGA AAC ATC CAG AGA TGG GTG-3'
TU-01: 5'-GAC AGT ACT GGA AGG AGA AGA C-3'

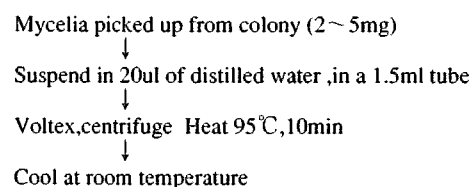
S. acidiscabies

AC-03: 5'-TAC CGG ATA TCA CTC CTG CCT-3'
AC-04: 5'-GGC GAC CAT CTC TGG CCG TT-3'

そこでこれらのプライマーを用いたPCRによる3種の病原菌の識別を試みた。

供試菌株は主として、前項.c.のTable 19,20に示す、1975~1993年に道内18市町村の発病塊茎からの分離株87菌株、ATCC所蔵の種名既知の*Streptomyces*属菌13菌株、発酵研・農環研分譲の14菌株、道内で分離された

Fig 10. Preparation of the template DNA fraction from cultures of isolates for PCR assay



亀の甲病菌11菌株および未同定非病原菌30菌株の計114菌株である。

培養菌体からのテンプレートの調整法をFig.10に示す。検定菌株はDNAフリーのアガロースを用いたスターチ・無機塩寒天培地で予め、28℃、5～7日間培養した菌体を供試した。

PCRの条件はFig.11に示す。アニール温度は65℃とし、30～35cycleの増幅を行った。PCR反応液の組成はTable 27に示す通りである。この反応液に上記のテンプレートを5μl加えて、増幅を行った。反応後はアガロースゲル電気泳動(100V,20min)を行い、エチジウムブロマイドで染色後、紫外線ランプ下で観察した。

Fig 11. Procedure for PCR assay

95℃	2min.	30sec	
↓			
95℃	1min.		30～35cycle
↓			
65℃	1min.		
↓			
72℃	2min.		
↓			
72℃	5min.		
↓			
4℃	continued		

Table 27. Recipe of the PCR reagents

Distilled water		
10×buffer	(Nippon Gene)	2.0 μl
dNTPs	250uM	1.6 μl
Forward primer	20pmol	0.5 μl
Reverse primer	20pmol	0.5 μl
10%Skim milk		0.5 μl
Tappolymerase		0.1 μl
	total	15 μl

結 果

培養菌体を用いたPCRの結果、3種のそうか病菌でそれぞれ特異的なDNAの増幅が認められた。

*S.scabies*特異的プライマーを用いた場合、*S.scabies*では236 bp.の単一の増幅断片が観察され、特異的識別が可能であった (Table 28,Plate 12)。本プライマーは *S.scabies* melanin(-),(+)の系統は識別しない。

*S.turgidiscabies*特異的プライマーでは *S.turgidiscabies* と D 菌群を特異的に識別することが可能であった (Table 28,Plate 12)。本プライマーは、*S.turgidiscabies* と D 菌群を識別しない。両種とも686 bp.の特異的な単一のバンドとして検出される。

*S.acidiscabies*特異的プライマーでは、基準株の2菌株を含む4菌株のみ供試したが、いずれも836 bp.の特異的な単一の増幅断片として検出された (Table 28,Plate 12)。

以上のことから、上記3種のプライマーを用いたPCRにより、病原菌の簡易識別が可能と考えられた。

Table 28. Reactivity of potato scab pathogens in the PCR assay

Species	No.of isolate	Location · Origin	PCR ^{a)}		
			S. a-P	S. t-P	S. a-P
<i>Streptomyces scabies</i>					
melanin (+)	18	Hokkaido, ATCC, IFO	+	(18/18)	—
melanin (—)	26	Hokkaido	+	(26/26)	—
<i>S. turgidiscabies</i>	43	do	—	+	(43/43)
<i>Streptomyces</i> sp. (Group D)	3	do	—	+	(3/3)
<i>S. acidiscabies</i>	4	ATCC	—	—	+
<i>S. aureofaciens</i>	1	IFO	—	—	(4/4)
<i>S. flaveolus</i>	1	IFO	—	—	—
<i>S. griseus</i>	3	ATCC, IFO	—	—	—
<i>S. eurythermus</i>	2	ATCC, IFO	—	—	—
<i>S. neyagawaensis</i>	2	ATCC, IFO	—	—	—
<i>S. bottropensis</i>	2	ATCC, IFO	—	—	—
<i>S. diastatochromogenes</i>	2	ATCC, IFO	—	—	—
<i>S. d. subsp. luteus</i>	1	IFO	—	—	—
<i>S. sampsonii</i>	1	ATCC	—	—	—
<i>S. tendae</i>	1	ATCC	—	—	—
<i>S. setonii</i>	1	ATCC	—	—	—
<i>S. antibioticus</i>	1	IFO	—	—	—
<i>Nocardia brasiliensis</i>	1	IFO	—	—	—
<i>S. cheloniumii</i>	11	Hokkaido	—	—	—
Non pathogenic actinomycetes(unidentified)	30	do	—	—	—

^{a)} S.s-P,S.t-P,S.a-P ; specific primers for *S.scabies*,*S.turgidiscabies*,
S.acidiscabies, respectively
() ;No.of isolates detected/No.of isolates tested

b. P C Rによる病斑からの病原菌の検出

ジャガイモ塊茎上の病斑からのそうか病菌の特異的な検出を目的としてP C Rの有効性を検討した。

材料と方法

1995年に斜里町の4地点、清里町の3地点、1996年に倶知安町の1地点、京極町の3地点、中標津町の8地点、芽室町の2地点、長沼町（中央農試）の1地点の合計22地点のジャガイモ栽培圃場で採取した病薯上の病斑を供試した。水道水で軽く水洗して付着土を洗い流した後、ティッシュペーパーで水分を除いた病薯上の病斑部をカミソリで浅く切り取って供試した。

病斑からのテンプレートの調整方法をFig.12,13に示す。本法での検出精度を確認するため、同一病薯上の病斑を用いてⅢ.A.と同様にLoria and Davis(1988)の方法によって病原菌の分離を行い、分離菌の培養菌体を用いたPCRの結果と比較した。PCRの条件、反応液組成は上記と同様である。

Fig 13. Preparation of the template DNA fraction from a single lesion on the diseased tuber for PCR assay (No.2)

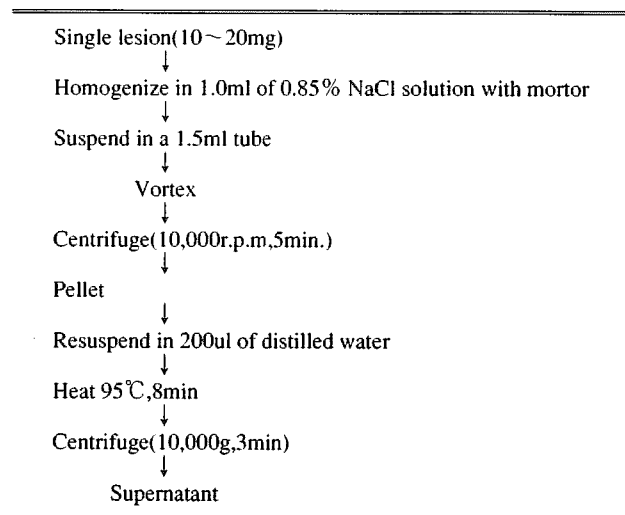
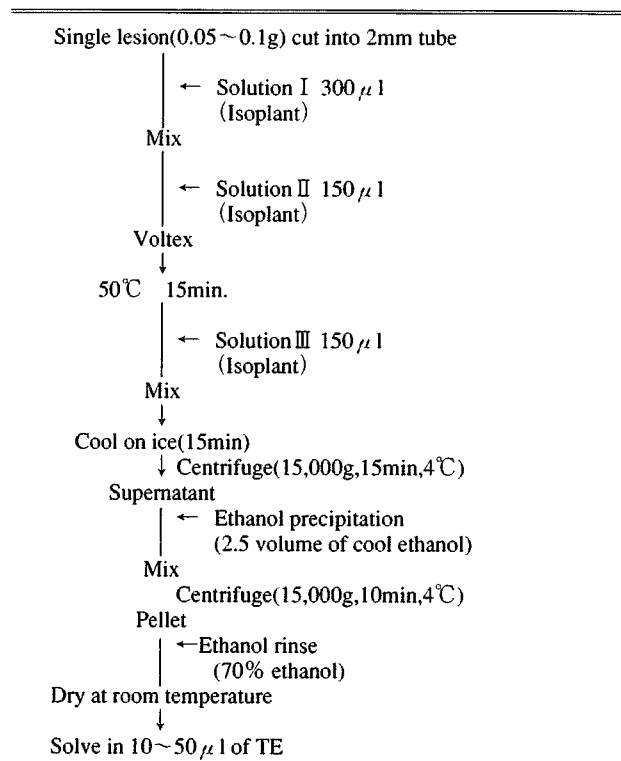


Fig 12. Preparation of template DNA fraction from a single lesion on the diseased tuber for PCR assay(No.1,with"Isoplant")



結 果

病斑からのPCRの結果、培養菌体からの識別と同様に特異的な増幅が見られた。上記2種類のテンプレートの調整法の差は見られなかった。病斑からの検出結果

と同一病斑から分離された放線菌培養菌体からの識別結果はほぼ一致し、検出精度が高いものと考えられた (Table 29)。

Table 29. Detection of scab pathogens from a lesion on the diseased tuber by PCR

Year	Location		Positive lesion by PCR *			Pathogen isolated from the same lesion (PCR with corony)
			S. s-P	S. t-P	S. a-P	
1995	Syari	1	0/3	3/3	0/3	<i>S. turgidiscabies</i>
		2	0/3	2/3	0/3	do
		3	0/3	3/3	0/3	do
		4	0/3	0/3	0/3	not isolated
	Kiyosato	1	0/3	3/3	0/3	<i>S. turgidiscabies</i>
		2	0/3	2/3	0/3	not isolated
		3	0/3	3/3	0/3	<i>S. turgidiscabies</i>
	Kucchan	1	5/5	0/5	0/5	<i>S. scabies</i>
		2	5/5	0/5	0/5	do
		3	5/5	0/5	0/5	do
1996	Nakashibetu	1	0/5	5/5	0/5	<i>S. turgidiscabies</i>
		2	0/5	5/5	0/5	do
		3	0/5	5/5	0/5	do
		4	0/5	5/5	0/5	do
		5	0/5	5/5	0/5	not isolated
		6	0/5	5/5	0/5	〃
		7	0/5	0/5	0/5	〃
		8	0/5	0/5	0/5	〃
	Memuro	1	0/5	5/5	0/5	<i>S. turgidiscabies</i>
		2	0/5	5/5	0/5	〃
	Naganuma	1	5/5	0/5	0/5	<i>S. scabies</i>

* : S.s-P, S.t-P, S.a-P ; The primer sets for *S.scabies*, *S.turgidiscabies*, *S.aciscabies*, respectively

C.病原菌の定量

a.選択培地の作成

そうか病菌の土壤中の菌量を定量する方法として、土壤希釈平板法による病原菌のコロニー形成とPCR法またはコロニーELISA法による病原菌の識別の組み合わせの有効性が示唆された。そのためには選択的な分離方法が不可欠であることから、細菌、糸状菌および非病原放線菌の生育を可能な限り抑制する選択分離地を作成することを目的に実験を行った。

材料と方法

Kenneth et al.(1998)のSTR培地は*S.scabies*の定量を目的とした半選択分離培地であり、糸状菌および細菌の生育抑制に優れる。そこで本培地を基本培地として用い、さらに各種の抗生物質などを添加して*S.turgidiscabies*のコロニー形成に適する半選択培地の作成を試みた。STR培地の組成をTable 30に示す。

添加抗生物質としては、STRの組成に含まれるシクロヘキシミド、ナイスタチン、ナリジキシ酸、リファンピシンの他に、LiCl、メチシリン、デヒドロ酢酸

Table 30. Composition of STR medium (Kenneth et al.1998)

Soluble potato starch	5.0g
Yeast extract(Difco)	4.0g
Bact peptone(Difco)	0.6g
Proteose peptone No.3(Difco)	0.6g
NaCl	10 g
K ₂ HPO ₄	1.0g
MgSO ₄	0.5g
Agar (E. Merck)	17 g
Distilled water	1,000ml

pH 7.2

FeSO₄ 10mg, ZnSO₄ 1mg, MnCl 1mg
cycloheximide 200ppm, nystatin 5.6ppm,
rifampicin 0.6ppm, naridixic acid 15ppm

ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、ニトリロ三酢酸ナトリウム、ブリアント・クレシル・ブルーを供試した。

各抗生物質を添加した培地上での微生物フローラの生育抑制効果は、土壤希釈平板法(10⁴~10⁶倍希釈)を用いて、25℃、約10日間培養した後に出現したコロニー数を計測して評価した。供試土壌は1998年10月に採取した芽室町博進のそうか病多発圃場の褐色乾性火山

性土である。

そうか病菌 *S.turgidiscabies* のコロニー形成に対する影響は、スターチ・無機塩寒天培地で培養したSY9113菌株の孢子懸濁液を1,000～2,000孢子/mlに調整して、その100 μ lを培地上に接種し、同様に25℃、約10日間培養した後に出現したコロニー数により評価した。

結 果

そうか病菌が特異的に利用可能な栄養源を探索するため、Ⅲ.C.b.で用いた各種炭素源および窒素源について検討した、そうか病菌が選択的に利用可能な基質は見い出せなかった（宮島、未発表）。しかし、土壤細菌の選択的抑制を目的として、36種の抗生物質・農薬および24種の色素・阻害剤の効果を比較した結果、上述の物質がそうか病菌の生育を抑制せずに有効と考えられた（宮島、未発表）。

そこで前述のKenneth et al.の基本培地組成をもとにして、添加する抗生物質の相互作用による選択的抑制効

果を求めた。Table 31に示す通り、STRは土壤細菌の選択的抑制に優れ、放線菌の選択的分離に適する培地であった。しかし、同時に *S.turgidiscabies* の生育抑制が強く認められることから改良が望まれた。土壤細菌およびそうか病菌の両者に対する生育抑制効果は、添加する4種の抗生物質のうちでリファンピシン0.6 ppmによるところが大であった（Table 31）。

そのため、リファンピシンに代替し得る抗生物質としてLiCl 5,000 ppmおよびデヒドロ酢酸ナトリウム1,000 ppmが細菌の生育を抑制し、そうか病菌の生育を阻害せず、有効と考えられた（Table 32）。その効果を増強するために、グラム陽性菌に抗菌スペクトラムを有するメチシリンをさらに添加した結果をTable 33に示す。そうか病菌の生育に対する抑制を最小限とするために、LiCl 5,000ppm+デヒドロ酢酸ナトリウム 1,000 ppm+メチシリン 0.5 ppmがリファンピシンに代替可能な抗生物質と考えられた。

Table 31. Inhibitory effect of STR on the growth of the bacteria and the actinomycetes by the soil dilution plate method

Soil treatment	Medium	Number of colonies			
		Fungi ($\times 10^5$ cfu)	Actinomycetes ($\times 10^5$ cfu)	Bacteria ($\times 10^5$ cfu)	<i>S. turgi</i> ^{a)} <i>discabies</i>
Phenol	STR	0.2	13.5	3.0	7.8
	STR non cycloheximide	1.3	9.3	2.3	5.0
	STR non nalidixic acid	0	9.7	9.0	4.3
	STR non rifampicin	0	12.0	81.3	49.7
	STR non nystatin	0.3	10.7	2.7	4.3
	STR non all antibiotics	22.3	NC	NC	42.6
	Starch medium	30.0	NC	NC	45.8
Control	STR	0.2	14.3	1.7	7.8
	STR non cycloheximide	2.0	10.7	2.0	5.0
	STR non nalidixic acid	0	14.7	9.3	4.3
	STR non rifampicin	0.3	17.0	60.7	49.7
	STR non nystatin	0.7	12.7	3.7	4.3
	STR non all antibiotics	31.2	NC	NC	42.6
	Starch medium	28.5	NC	NC	45.8

^{a)}No.of colony involved spore inoculation, NC;not countable because of large number

Table 32. Inhibitory effect of STR on growth of the bacteria and the actinomycetes with amendment of the antibiotic agents by the soil dilution plate method (No.1)

Basal medium · Antibiotics	Number of colonies			
	Fungi ($\times 10^4$ cfu)	Actinomycetes ($\times 10^4$ cfu)	Bacteria ($\times 10^4$ cfu)	<i>S. turgi</i> ^{a)} <i>discabies</i>
STR non rifampicin				
LiCl 5,000ppm	0	10.0	91.2	182.3
LiCl 5,000ppm + Sodium dehydroacetic acid 1,000ppm	0	5.8	58.0	179.7
LiCl 5,000ppm + SDS 50ppm	0	8.8	72.2	156.7
Sodium nitrilo 3 acetic acid 100ppm	0	3.0	297.0	201.3
do 50ppm	0	3.0	268.0	190.7
Methicilin 50ppm	0	9.4	24.4	0
do 5ppm	0	35.0	95.8	94.3
Brilliant cresyl blue 5ppm	0	4.8	70.0	156.7
STR	0	23.8	26.4	85.3
Starch medium	NC	NC	NC	228.0
STR non all antibiotics	NC	NC	NC	197.3

^{a)} No.of colony involved spore inoculation, NC;not countable because of large number

Table 33. Inhibitory effect of STR on the growth of the bacteria and the actinomycetes with amendment of the antibiotic agents by the soil dilution plate method (No.2)

Basal medium			Number of colonies			
Concentration (ppm)			Fungi	Actinomycetes	Bacteria	<i>S. turgidiscabies</i> ^{a)}
Methicilin	LiCl	Na dehydroacetic acid	($\times 10^4$ cfu)	($\times 10^4$ cfu)	($\times 10^4$ cfu)	
STR non rifampicin						
5	5,000	1,000	0	6.2	17.8	0
1	5,000	1,000	0	5.8	18.6	54.7
0.5	5,000	1,000	0	5.2	23.8	76.7
0.1	5,000	1,000	0	2.7	63.6	82.7
5	0	0	0	26.6	86.8	27.0
0	5,000	1,000	0	5.2	78.6	101.3
STR non all antibiotics			NC	NC	NC	83.5
STR			0	22.6	7.0	27.3

^{a)} No. of colony involved spore inoculation, NC; not countable because of large number

b. そうか病菌の定量

土壤中の病原菌定量法の開発は病原菌の動態解明に必須である。そこで半選択分離培地を用いた土壤希釈平板法による分離とPCR法による識別の組み合わせによってそうか病菌 *S. turgidiscabies* の土壤中の菌量を定量した。

材料と方法

供試土壤は1998年10～11月に採取した、本病が多発する3圃場の土壤であり、いずれも *S. turgidiscabies* が優占する。土性は芽室町十勝農試圃場および芽室町博進が褐色乾性火山性土、訓子府町北見農試圃場が黒色湿性火山性土である。各土壤30gを270 mlの殺菌水に希釈した後、振とう機を用いて30分間振とうし、殺菌水で10倍の系列で連続的に希釈した。 10^{-1} ～ 10^{-4} 倍希釈液を直径9 cmペトリ皿当たり100 μ lずつ滴下し、コンラージ棒で培地表面に塗布した。1土壤当たり10枚のペトリ皿を供試した。

供試培地は上記STRのリファンピシンをLiCl 5,000 ppm, デヒドロ酢酸ナトリウム 1,000 ppm, メチシリン 0.5 ppmで代替した改変STRである。25℃で約10日間培養後に出現した放線菌菌叢のうちから *S. turgidiscabies* に類似する菌株を分離し、スターチ・無機塩寒天培地で培養

(25℃, 4日間) した。その後、肉眼的に培養性質が本菌に類似する分離菌について、前項IV.B.a.の方法に準じてPCR法による識別を行った。

なお、PCR法によってそうか病菌と識別された分離菌については、ポット接種による病原性の確認を行った。

結 果

25℃で約10日間の培養の後、*S. turgidiscabies* は改変STR上で直径2～3mm程度の表面が白色、皺を有し、やや盛り上がった菌叢を形成する。予備試験の結果、供試土壤の風乾は細菌の生育抑制に有効であったが、102倍希釈の段階での10分間、140倍フェノール水処理はそうか病菌のコロニー出現数を著しく抑制した。

PCR法によってそうか病菌 *S. turgidiscabies* と識別された分離菌株数をもとに、定法に従って土壤水分補正を行い算出した検出菌量をTable 34に示す。土壤採取年の1998年は生育全般を通じて降水量が比較的が多く、本病が多発しにくい気象条件下であったが、これらの壤では本病が激発～多発したことから、汚染程度は非常に高い土壤と推定されるが、秋期の収穫後の土壤中の菌量は 10^3 ～ 10^4 程度と比較的低い値を示したことが特徴であった。

Table 34. Number of *Streptomyces turgidiscabies* in the naturally infested soils(1998)

Location of tested soils	Severity	Disease ^{a)} index(1998)	Sampling	No. of pathogens detected (cfu/g · dry soil)
Memuro(Sinsei)	Severe	100	1998.11. 8	1.7×10^5
Kunneppu(Yayoi)	Severe	70	1998.10.10	1.2×10^4
Memuro(Hakusin)	Severe	30	1998.10.12	2.3×10^3

a) Cultivated variety 「Danshaku-imo」

D. 考 察

放線菌の属の数は、現在までに約50に達する。そのなかで*Streptomyces*属は最大の属であり、これまで3,000以上の種が記載されたとされている(宮下,1985)。

しかしながら、*Streptomyces*属の中では孢子鎖の形態、孢子の表面構造が重視されるのみであり、植物病原菌の識別のための基準には乏しく、多大な労力を要する各種の培養・生理的性質、病原性などの数多くの同定項目の比較が必要である。

したがって病原性*Streptomyces*属菌の生態研究には簡易識別法の開発が強く望まれる。この目的のために血清学的手法による識別・検出がその反応の鋭敏さと高い特異性から、多くの植物病原性細菌で広く用いられている。

しかし、植物病原性の放線菌を対象とした研究は少なく、血清学的性質の記載にとどまり、識別法への応用はサツマイモ立枯病菌*S.ipomoea*に対するMoyer(1986)の報告などに過ぎない。その理由として、*Streptomyces*属菌が2~6種類の抗原群を有し、それらが互いに密接に関連している(Bowman and Weinhold,1963)ことから特異性を得難いことが一因と考える。

本研究においても*S.scabies*と*S.diastatochromogenes*, *S.bottropensis*および*S.neyagawaensis*は血清学的に近縁であり、特に*S.diastatochromogenes*はELISA法において、*S.scabies*に比較して弱いながらも無視できない非特異反応が認められた(田中ら,1994a)。

しかし、*S.scabies*は孢子鎖が螺旋型であるのに対し、*S.diastatochromogenes*は緩い螺旋型であることから、形態観察とELISA法の組み合わせによる*S.scabies*の識別は可能であった。今後、さらに特異抗原の精製あるいはモノクローナル抗体の利用などによりこの問題を解決し得ると考える。

なお、抗*S.turgidiscabies*特異抗体(田中ら,1994b)および抗*S.acidiscabies*特異抗体はいずれも識別性に優れ、血清学的識別に利用が可能と考えられた。

一方、PCR法に代表される遺伝子診断法はその高い検出精度から植物病理学分野でも多用されているが、複数の病原菌が存在するジャガイモそうか病菌においても有効であった。同様に、木口(未発表)は土壌希釈液の培地上での前培養およびCompetitive PCR法による*S.scabies*の定量を行い、その有効性を認めている。

本試験では選択分離培地のグラム陽性細菌生育抑制能が十分で無いことから、病原菌の分離とPCR法による識別という方法で定量を行った。しかし、選択分離培地はさらに改良が可能であり、一層の選択性の向上が期待される。残されたグラム陽性細菌の生育が十分

に抑制された場合には前述のコロニーELISA法が簡便で省力的な方法として確立され、作付け前の土壌検診への応用の道も開けると考えられる。

また、分離効率を高める土壌の前処理について検討する必要がある。Lawrence(1956)の報告した土壌希釈液のフェノール処理(1.4%,10分間)に対しては評価が分かれるが、本研究ではそうか病菌の出現コロニー数の極端な減少を招き、有効ではなかった。しかし、Neusch(1965)は風乾後、長期間保存した土壌では*Streptomyces*の菌量が高まること、Williams et al.(1972)は風乾土壌の熱処理(40-45℃,2-16hr)は*Streptomyces*の菌量を変化させずに非病原性細菌のフローラを著しく減少させることを観察した。本研究においては土壌の風乾処理については結果を示さなかったが、効果が認められており、今後の再検討が望まれる。

ところで、*S.scabies*の定量にはKenneth et al.(1998)のSTRによる分離菌のThaxtomin産生能による識別が報告されているが、前田ら(1999)はモノクローナル抗体による識別を試みており、今後の研究の進展が期待される。さらに、本試験で検出されたそうか病菌の土壌中の菌量は新塊茎周辺以外の土壌中では比較的低く、圃場の汚染程度によっては 10^3 cfu/g・dry soil,以下の菌量も想定される。その場合には土壌希釈平板法の適用の限界も想定し、Nested PCRなどによる土壌からの直接的な検出が必要と考えられた。

いずれにしても、本病の生態解明の基礎となる土壌菌量の評価は緒についたばかりであり、今後の精力的な調査が希求される。