

植物防疫基礎講座：土壌病害の見分け方(10)

## 放線菌による病害

北海道立中央農業試験場 田 中 文 夫

## はじめに

雨上がりに立ち上る土の香りは主に放線菌の匂いといわれる。土壌を生息場所とする放線菌はほとんどが腐生的生活を営み、有機物分解者として重要な地位を占める。その中でごく限られた種が作物や人畜に病原性を示すことが古くから知られていた。

放線菌はその生育形態は糸状菌に類似するが、①原核生物である、②細胞壁の主成分としてペプチドグリカンが存在する、③リボソームのサブユニットが30sと50sからなる、④抗細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、ことなどの理由で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有し、また多分に歴史的なものもあり、独特な菌群として現在も「放線菌」と総称され、取り扱われている。

20世紀半ば以降、抗生物質の生産菌として一躍注目

を集め、膨大な数の種が報告された。それらの中には十分な形態・培養性質の観察をせずに同定されたものが多く含まれ、分類体系や同定方法の問題と相まって分類学上の大きな混乱を招いてきた経緯がある。

ここでは放線菌による作物の病害について、その分離・培養法および同定法を中心に紹介する。

## I 放線菌による病害と分類状の問題点

表-1にこれまで報告された放線菌による病害の一部を示すが、すべてが *Streptomyces* 属菌で占められる。

ジャガイモのそうか病は1890年のTHAXTERの報告に始まる。その菌名は永く *S. scabies* が用いられてきたが、1974年以降は不確定種となり、1980年に失効した。しかし、1989年にLAMBERT and LORIAによって再記載がなされ、種名が復活した。そのため、1989年以前の *S. scabies* による病害については他の作物も含めて再記載が必要となる。

表-1 放線菌による作物病害

作物名	病名	病原放線菌	発表者
ジャガイモ	そうか病	<i>Streptomyces scabies</i>	LAMBERT and LORIA, 1989
		<i>S. acidiscabies</i>	LAMBERT and LORIA, 1989
		<i>S. turgidiscabies</i>	MIYAJIMA et al., 1998
		<i>S. europaeiscabiei</i>	BOUCHEK-MECHICHE et al., 2000
		<i>S. stelliscabiei</i>	BOUCHEK-MECHICHE et al., 2000
		<i>Streptomyces</i> sp.	田中文夫ら, 1995
	象皮病	<i>S. verrucosus</i> <sup>a)</sup>	木村貞夫, 1976
	亀の甲症	<i>S. cheloniumii</i> <sup>a)</sup>	SUZUI et al., 1988
	Netted scab	<i>S. rediculiscabiei</i>	BOUCHEK-MECHICHE et al., 2000
イネ	土臭黄変米	<i>S. flavovirens</i>	角田 広ら, 1959
サツマイモ	立枯病	<i>S. ipomeae</i>	PERSON et al., 1940
カブ	そうか病	<i>S. scabies</i> <sup>a)</sup>	LEVICK et al., 1981
ダイコン	そうか病	<i>Streptomyces</i> sp.	井上義孝ら, 1962
テンサイ	そうか病	<i>S. scabies</i> <sup>a)</sup>	HOFFMAN, 1958
ニンジン	そうか病	<i>S. turgidiscabies</i>	相馬 潤ら, 1995
	そうか症	<i>Streptomyces</i> sp.	木村貞夫, 1980
ゴボウ	そうか病	<i>S. turgidiscabies</i>	相馬 潤ら, 1995
ヤマノイモ	そうか病	<i>S. scabies</i> <sup>a)</sup>	原 撰祐, 1930
メロン	がんしゅ病	<i>Streptomyces</i> sp.	小林研三ら, 1987

<sup>a)</sup> は無効種であることを示す。

一方、1980年代以降に長崎県で強酸性土壌で発生する本病が問題となっていたが、酸性条件下で発生する病原菌として、*S. acidiscabies* が同じく LAMBERT and LORIA (1989) によって報告された。国内ではこの2種の他に北海道で発生が見られる *S. turgidiscabies* が新種として追加報告された (MIYAJIMA et al., 1998)。

国外では GOYER et al. (1996) により *S. caviscabies* が報告されたが、筆者としては今後の評価を待ちたい。

そうか病では後述するように病斑型がいくつかのタイプに類別され、病原菌の種との対応が古くから問題視されてきた。それに対する異型 scab として粗皮症状の一種、象皮病が1970年以降に長崎県で発生し、病原菌 *S. verrucosus* (木村, 1979) が提案された。これは網目型 (russet scab) と呼ばれ、イモの表面に浅い網目状の亀裂の入った不正形、黄褐色～褐色の病斑が形成されるのが特徴である。北海道でも亀の甲症と呼ばれる類似症状が確認され、*S. cheloniumii* の種名が提案された (SUZUI et al., 1988)。しかし、いずれも現在は無効種であり、再記載が望まれる。

## II 病徴の見分け方

一般にジャガイモのそうか病では、*S. scabies* による病斑は陥没型 (deep scab, 口絵写真), *S. turgidiscabies* によるものは隆起型 (raised scab, 図-1), *S. acidiscabies* ではその中間が多く見られるが、いずれも広い意味の普通型病斑 (Common scab) の範疇に属する。

さらに *S. scabies* と *S. turgidiscabies* はジャガイモの他、様々な根菜類にそうか病斑を形成する (図-2～4)。ダイコン、カブ、ニンジンではやや隆起したかさぶた状の病斑を形成し、テンサイでは根部に周囲が淡紅色の陥没型、隆起型あるいはこぶ状の病斑を生じる。いずれも根重はほとんど低下しない。ヤマノイモとゴボウでは病斑が隆起することはなく、コルク化した円形～不正形の

かさぶた状病斑となる。地上部の症状は認められない。

本邦で発生する放線菌による病害にサツマイモの立枯病がある。本病は苗の発根と地上部の生育が始まる植付け後2週間～1か月ごろから根腐れによって苗が立ち枯

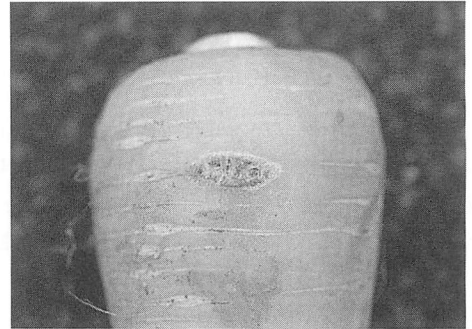


図-2 ニンジンそうか病 (阿部秀夫氏原図)

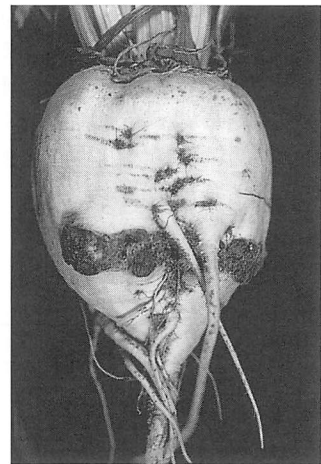


図-3 テンサイそうか病

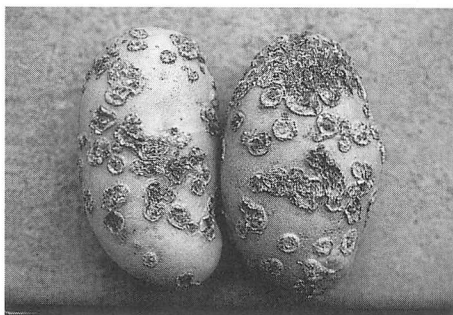


図-1 ジャガイモそうか病 (隆起型病斑)

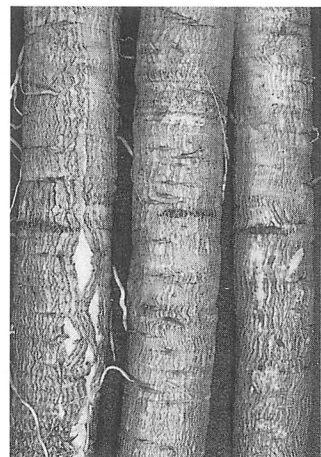


図-4 ゴボウそうか病 (阿部秀夫氏原図)

れる。発病株の葉は褪緑して萎凋し、根はほとんどが黒く腐敗して脱落する（口絵写真）。さらに新しい塊根表面にはほぼ円形でくっきりした黒色の病斑を生ずる。

さらに最近になって、九州地方に発生するメロンのがんしゅ病が放線菌による病害であることが知られた（小林ら, 1987）。本病は1982年に熊本県で初めて発見された比較的新しい病害である。収穫間際になって地上部が一斉に萎凋し始め、根を掘り上げてみるとこぶが認められる。このこぶは根に付着した状態で形成される（口絵写真）。類似症状にネコブセンチュウによるものがあるが、その場合は根そのものが膨らんでいることから識別できる。

### III 病原菌の分離と培養

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 mycerium（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）。そのため、糸状菌や一般細菌を対象とした、定法と呼ばれる分離方法によって未知の病原放線菌の分離を行うことは困難を伴う。幸いに個々の病害に適した選択的分離培地が提案されているので、放線菌による病害が疑われた場合にはその使用が効果的と考える。

ジャガイモそうか病菌では LORIA and DAVIS (1988) の方法が効果的であった。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溶液で1分間表面殺菌した後、140倍に希釈したフェノール水 5 ml とともに乳鉢中で磨砕し、10分間静置する。その1滴を NPPC water agar (LORIA and DAVIS, 1988) の表面に塗布し、25°Cで10~14日間培養後に、出現した白色・粉状のコロニーを分離する。ただし、磨砕液をコンラージ棒等で培地表面に塗布する際はシャーレの外壁際の外縁数 mm は使用しないことが有効であった。その部分には他の細菌が生育せず、病原放線菌が選択的に伸長生育することが多く、純粋培養が得られやすい。

表-2 NPPC water agar の組成 (LORIA and DAVIS, 1988)

ナイスタチン	500 mg *
ポリキシリン B 硫酸塩	50 mg *
ペニシリウム G ナトリウム	10 mg *
シクロヘキシミド	500 mg *
寒天	20 g
蒸留水	1,000 ml

15 lbs で 20 分間オートクレーブ後、45~55°C に冷却して抗生物質 \* を添加。

なお、その後は適当な培地に分離培養するが、良好な孢子形成を期待するためには、既に報告されている松本 (1979) の孢子形成培地が優れる。さらに、病原性検定な

表-3 Basal medium-B (LOCHHEAD and CHASE, 1987)

グルコース	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
KNO <sub>3</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub>	0.2 g
CaCl <sub>2</sub>	0.1 g
NaCl	0.1 g
FeCl <sub>3</sub>	0.01 g
寒天	15 g
蒸留水	1,000 ml

pH 7.0

表-4 放線菌の細胞壁の主要構成成分 (LECHEVALIER and LECHEVALIER, 1970)

細胞壁タイプ	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
2,4-diamino butyric acid (DAB)					+	+	+	
リジン					+			
オルニチン						+	+	+
アスパラギン酸								
グリシン	+	+			a)	a)	a)	a)
2,6-diamino pimelic acid (DAP)								
meso-DAP		+ <sup>b)</sup>	+	+				
LL-DAP	+							
アラビノノース					+			
ガラクトース					+			

他にすべて、アラニン、グルタミン酸、グルコサミンおよびムラミン酸を含む。<sup>a)</sup> 不定、<sup>b)</sup> Hydroxy-DAP を含むことがある。

表-5 放線菌の属の分類のための基準 (宮下, 1985)

形態的性質による基準
菌糸の形態の有無
孢子柄の形（輪生枝の有無）
孢子の数、位置、構造
孢子のうの有無とその形態、大きさ
基生菌糸の分断の有無
孢子の運動性有無
化学成分組成による分類
細胞壁タイプ
全細胞加水分解液中の糖の構成パターン
ミコール酸
リン脂質タイプ
メナキノン
その他基準
抗酸性
生態

のために大量の孢子が必要な場合には土壤・ふすま培地が適する。

一方、メロンのがんしゅ病では吉田・小林(1987)は LOCHHEAD and CHASE (1987) の Basal Medium-B にカナマイシン 50 ppm を添加した培地を用いている。この方法は選択性が極めて高く、病斑の磨砕液を塗布することにより、ほぼ純粋な分離が可能である。本病菌はこの培地上で 28°C, 5 日間の培養後に薄い白色のかび状のコロニーとして出現する。

良好な孢子形成を期待するにはイースト・デンプン培地が有効である。

#### IV 病原放線菌の同定

##### 1 *Streptomyces* 属の特徴

*Streptomyces* は現在約 50 属ある放線菌の属の中で卓越して大きな属であり、定法で土壤から分離される放線菌の 8~9 割を占めるとされる(宮下, 1985)。

*Streptomyces* 属の形態的特徴として、①典型的な基生菌糸および気菌糸を有し、②基生菌糸の分断はまれであり、③気菌糸上の孢子柄に分節孢子の長い連鎖を形成する。その孢子鎖の形態は直線状または波状、環状あるいは鉤状など多様である。孢子の表面は鞘 (sheath) で覆

表-6 *Streptomyces* の種の基準 (宮下, 1985)

* 気菌糸の色	(White, Gray, Yellow, Red, Blue, Green, Violet)
*メラノイド色素 産生の有無	
* 孢子の表面構造	(Smooth, Warty, Spiny, Hairy)
* 孢子鎖の形態	(Spira, Retinaculum-Apertum, Rectus, Flexibilis)
* 糖の資化性	(D-Glucose, D-Xylose, L-Arabinose, L-Rhamnose, D-Fructose, D-Galactose, Raffinose, D-Mannitol, i-Inositol, Salicin, Sucrose etc.)

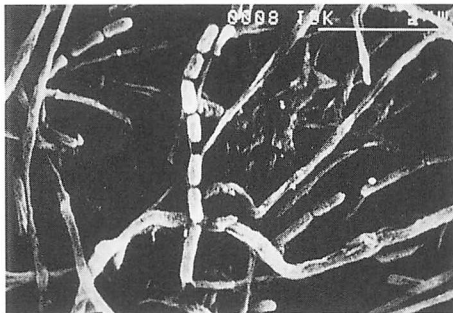


図-5 *S. turgidiscabies* の孢子の形態 (SEM 観察, 宮島邦之氏原図)

われ、平滑 (smooth) なものから、いぼ状 (warty), とげ状 (spiny), 毛状 (hairy) など、その形態も多様である (表-6, 図-5~7)。

一方、化学的分類基準としては細胞壁タイプが I 型 (*Streptomyces* 型) で、LL-型のジアミノピメリン酸を有することから、薄層クロマトグラフィーなどを用いて確認する (図-8)。

脂肪酸はイソ・アンテイソの分岐酸タイプ、メナキノ

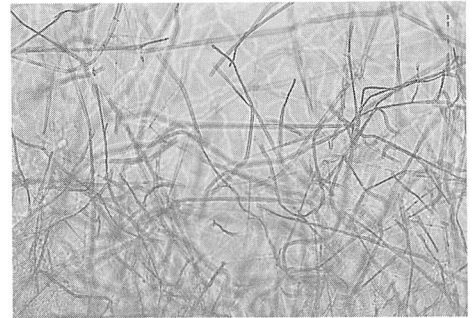


図-6 *S. turgidiscabies* の直~波状型孢子鎖 (光顕観察, 阿部秀夫氏原図)

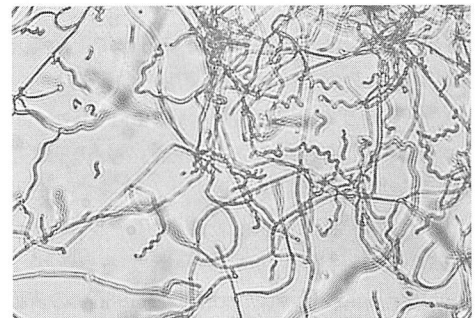


図-7 *S. scabies* のらせん型孢子鎖 (光顕観察, 阿部秀夫氏原図)

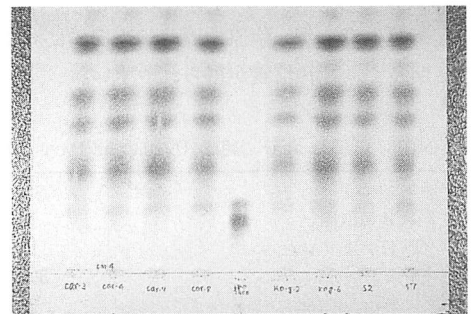


図-8 薄層クロマトによるジアミノピメリン酸の検出 (中央: 上から LL-DAP, meso-DAP, 市販標品)

ンはMK-9, G+C含量は69~78 mol%とされる。後二者の分析にはHPLC, 前者の分析にはガスクロマトグラフィーの使用が一般的である。

冒頭に述べたように、*Streptomyces* 属菌は工業的な重要性もあり、これまで多数の種が報告された。その数は約3,000種以上に上るが無効種が大部分であり、それを除いてもおそらくは800種を超える構成種を有するとされる。

過去の分類上の混乱を解決するために、1964年に国際微生物学会議の放線菌命名委員会の国際共同研究International Streptomyces Project (ISP) が企画された。その目的は分類・同定の試験を統一条件下で行い、菌株に対する信頼できる記載を確立することにあった。過去の混乱を繰り返さないためにも、*Streptomyces* 属の分類・同定には検定培地を含めてISPの方法に準じた試験を行い、その結果をもとにBurgeys Manual第9版やその他の検索式に従って大方の目途をつけ、その他の記載との比較を行うことが推奨される。その方法は日本放線菌研究会編集の『放線菌の同定実験法』(清野ら, 1985)に詳述されている。

## 2 *Streptomyces* 属の種の同定

*Streptomyces* 属の種の基準としては前記の観察に加えて、①孢子鎖の形態、②孢子表面構造などの形態の比較を行う。さらにSHARLING and GOTTLIEB (1966) および WILLIAMS et al. (1983) の手法に代表される、③培養性状、④生理・生化学的性状の比較が一般的である。なお、LAMBERT and LORIA (1989 a; b) は各種抗生物質に対する耐性を重要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、⑤DNA類縁性比較、⑥16S rRNA 遺伝子の塩基配列比較などの項目が重要視されている。

ここでは同定手法の詳細を記載することは紙面の都合で困難であるが、その手順を概略する。

### (1) 孢子鎖の形態

孢子鎖の形態の他、孢子柄の分岐法、形、大きさ、鞭毛などの観察は光学顕微鏡に観察が可能であるが、後述の孢子表面構造の観察とともに走査型電子顕微鏡観察が有効である。その際にはWater agar, 1/20希釈V-8 Juice agarなどの好適な培地で培養したコロニーを用いる。

### (2) 孢子表面構造

孢子鎖の形態と同様に観察する。

### (3) 培養性状

気菌糸の色、発育の色、可溶性色素の色、コロニーの性状などを観察する。特に気菌糸の色は重要な観察項目

の一つである。ISPではDifco社に依頼して作った“ISP培地”を推奨して標準化を図っているが、培養性状の観察にはISP培地のNo.1~No.9をできる限り使用するのが望ましい。乾燥した培地表面に被検菌懸濁液を白金耳で画線した後、27~37°Cで培養し、7日ごと3週間観察する。発育(基生菌糸)および可溶性色素についても同様である。色の観察結果は個人差や観察条件による差が大きいが、ISPでは「TAYLORら編」のColor Harmony Manualを標準として用いた識別を勧めている。

### (4) 生理・生化学的性状

日本放線菌研究会では、生育温度範囲、タンパク質分解力、スターチの加水分解、セルロースの分解、炭素源の利用と分解、メラノイド様色素の生成、硝酸塩の還元、耐塩性、硫化水素の生産性、キサンチンの溶解、カタラーゼの活性、窒素源の利用性、生育pH範囲などを観察項目としている。

この中で、タンパク質分解力は通常、ゼラチンの液化およびミルクの凝固・ペプトン化で判定する。スターチの加水分解はスターチ・無機塩寒天培地 (ISP培地 No. 4) などを用い、ルゴール液で判定する。炭素源の利用性は重要な分類基準であり、PRIDHAM and GOTTLIEB (1948) の基礎培地 (ISP培地 No. 9) に炭素源を加える方法が広範に用いられている。IPSシステムではL-アラビノース、D-キシロース、D-グルコース、D-フラクトース、シュークロース、L-ラムノース、ラフィノース、イノシトール、D-マンニトールの9種の炭素源が供試される。

メラノイド色素生成の有無も重要項目である。一般にタンパク質などの有機物を多く含む培地で生産される黒褐色の色素はメラニン様色素であり、これを産生する菌種(株)をchromogenic typeと呼んでいる。判定にはチロシン寒天培地 (ISP培地 No. 7) の他、ペプトン・イースト・鉄寒天培地 (IPS培地 No. 6)、トリプトン・イースト・プロス (ISP培地 No. 1) など複数の培地を用いる。培養後2~4日目に観察する。

耐塩性は供試菌株が良好に生育する培地に食塩を加えて生育を観察する。添加する食塩濃度は普通4, 7, 10, 13%程度である。生育した培地の最終塩濃度で判定する。

これら以外の項目は現在はほとんど用いられていないが、生育pH範囲はジャガイモそうか病菌では重要指標となっている。これは同様に生育に適した寒天培地を滅菌後にpH調整して試験する。

LAMBERT and LORIA (1989 a; b) は *Streptomyces*

*scabies* および *S. acidiscabies* の分類指標として亜テルル酸、酢酸タリウム、クリスタルバイオレット、フェノール、ペニシリン、オレアンドマイシン、ストレプトマイシンなどの抗生物質耐性を記載している。これは WILLIAMS et al. (1967) の方法に準じて培地上の生育阻止径から感受性を判定する。

#### (5) DNA 類縁性比較

近年は DNA 交雑 (DNA hybridization) 実験による DNA 相同性比較により微生物間の系統関係を明らかにすることが可能になり、新しい知見が得られている。最近の『International Journal of Systematic Bacteriology』には DNA 相同値による類縁性を基にして各種の細菌の分類を検討した報告が数を増している。手法的には一本鎖 DNA を分解する S1 ヌクレアーゼの利用による方法 (S1 ヌクレアーゼ法) が広範に用いられている。*S. scabies* の種内における遺伝的多様性を報告した HEALY and LAMBERT (1991)、新種のそうか病菌 *S. europaeiscabiei* を報告した BOUCHEK-MECHICHE et al. (2000) も本法を用いている。

#### (6) 16 S rRNA 遺伝子の塩基配列比較

DNA 相同性に加えて、近年は多用されている手法である。TAKEUCHI et al. (1996) は数種のジャガイモそうか病菌間の遺伝的類縁性の比較に、BOUCHEK-MECHICHE et al. (2000) は Netted scab の新病原菌 *S. reticuliscabiei* の記載に用いた。その分類上の意義はともかく、今後も重要視される項目であることは間違いない。

### おわりに

放線菌による作物病害の見分け方と同定の手法を概観してきたが、その過程で病理学的に最も重要なことは病

原性の評価と思われる。*Streptomyces* 属の病原菌の分類学上の混乱は病原性の評価が十分でなかったり、その方法の不備が一因とされている。その轍を踏まないためにも、普通の生育を示す植物体を供試し、自然発病に近い条件下で病原性を確認する必要がある。

### 引用文献

- 1) BOUCHEK-MECHICHE, et al. (2000) : Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **50**: 91~99.
- 2) CORBAZ, R. (1964) : Phytopathol. Z. **51**: 351~360.
- 3) GOYER, C. E. et al. (1996) : Int. J. Syst. Bacteriol. **46**: 635~639.
- 4) HEALY, F. G. and D. H. LAMBERT (1991) : ibid **41**: 479~482.
- 5) 木村貞夫 (1976) : 九病虫研会報 **22**: 51~54.
- 6) LAMBERT, D. H. and R. LORIA (1989 a) : Int. J. Syst. Bacteriol. **39**: 387~392.
- 7) ——— and ——— (1989 b) : ibid **39**: 393~396.
- 8) LECHEVALIER, M. P. and H. A. LECHEVALIER (1970) : Int. J. Bacteriol. **20**: 435~443.
- 9) LOCHHEAD, A. G. and F. E. CHASE (1987) : Soil Sci. **55**: 185~195.
- 10) LORIA, R. and J. R. DAVIS (1988) : Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 2nd eds. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, p. 114~119.
- 11) 松本和夫 (1979) : 植物防疫 **33**: 461~463.
- 12) MIYAJIMA, K. et al. (1998) : Int. J. Syst. Bacteriol. **48**: 495~502.
- 13) 宮下清貴 (1985) : 農林水産技術研究ジャーナル **8**: 10~13.
- 14) 清野昭雄ら (1985) : 放線菌同定実験法, 放線菌研究会編, 東京, p. 58~171.
- 15) SHIRLING, E. B. and D. GOTTLIEB (1966) : Int. J. Syst. Bacteriol. **16**: 313~340.
- 16) 相馬 潤ら (1995) : 日植病報 **61**: 648~649.
- 17) SUZUI, T. et al. (1988) : 5 th Int. Cong. Plant Pathology : 177.
- 18) TAKEUCHI, T. et al. (1996) : Int. J. Syst. Bacteriol. **46**: 476~479.
- 19) TASHIRO, N. et al. (1990) : Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. **56**: 73~82.
- 20) THAXTER, R. L. (1890) : Ann. Rept. Conn. Agr. Exp. Sta. **1890**: 81~95.
- 21) WILLIAMS, S. T. et al. (1983) : J. gen. Microbiol. **129**: 1743~1813.
- 22) 吉田政博・小林研三 (1993) : 日植病報 **59**: 573~580.

### 発行図書

## 日本植物病名目録(初版)

日本植物病理学会 編 B5判 本文734頁+索引約124頁  
定価 11,550円税込み (本体11,000円) 送料サービス

1960年から発行された日本有用植物病名目録: 第1巻(食用作物・特用作物・牧草・芝草), 第2巻(野菜および草花), 第3巻(果樹), 第4巻(針葉樹, 竹笹), 第5巻の広葉樹(林木・観賞樹木)までの全5巻に新規に「きのこ」を追加して一冊に纏めた見やすい大植物病名目録です。掲載内容は, 食用作物, 特用作物, 牧草及び芝草, 野草, 野菜, きんこ, 草花, 果樹, 針葉樹, 竹笹, 広葉樹, 索引(宿主和名, 宿主学名, 病原学名, 病原和名, ウイルス・ウイロイドの種名・略号・和名・科名および属名一覧表。

お申し込みは直接当協会へ, 前金(現金書留・郵便振替)で申し込むか, お近くの書店でお取り寄せ下さい。  
社団法人 日本植物防疫協会 出版情報グループ 〒170-8484 東京都豊島区駒込 1-43-11  
郵便振替口座 00110-7-177867 TEL (03)3944-1561(代) FAX (03)3944-2103 メール: order@jppa.or.jp