

特集：ジャガイモそうか病対策に向けた新たな研究

ジャガイモそうか病菌の分離同定および定量

北海道立中央農業試験場 田 中 文 夫

はじめに

多くの病原菌が報告されているジャガイモそうか病菌の同定の試みは、1890年のTHAXTER (1890)の記載に始まる。THAXTERは米国コネチカット州で分離した本病菌を *Oospora scabies* THAXTER と命名したが、基準株は保存されていなかった。さらに本種は WAKSMAN and HENRICI (1948)により *Streptomyces* 属に移され、その種名が *S. scabies* (THAXTER) WAKSMAN et HENRICI とされた。しかし、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、病原性に基いてIMRU3018 (=ISP5078)を新基準株に指定し保存した。この菌株は胞子鎖の形態が直~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。このことが原因で、その後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。その後は様々な病斑型に伴う多くの病原菌が報告された。この混乱は1961年以降、約30年間続いたが、その原因として分類学者と植物病理学者の共同の検討がされなかったことが指摘されている。

その後、LAMBERT and LORIA (1989 a)により、分類上混乱を続けた *S. scabies* の再記載が行われ、種名が復活した。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)によって報告されていたが、LAMBERT and LORIA (1989 b)により、土壌 pH 5.2 以下で病原性を有する病原菌が記載され、*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が記録されている。一方、谷井 (1985) は、北海道に分布する病原菌について詳細な比較を行い、その代表的な特徴から後述する4菌群の性状を記載した。しかし、具体的な種名の提案がなされていなかった。

Identification and Quantification of Potato Scab Pathogens in Japan. By fumio TANAKA

(キーワード：ジャガイモ、そうか病、同定、定量)

そこで本道に分布する病原菌の同定を行い、病原菌の性質を記載することを本研究の目的の一つとした。一方、本病の防除法を確立するうえで、土壌中の病原菌の動態解明が不可欠であることから、土壌中の病原菌の定量法開発を本研究のもう一つの目的と位置付けた。

I 病原菌の分離同定

1974~94年に道内の36市町村から採取した発病イモ(一部にニンジン、ゴボウを含む)をもとに、LORIA and DAVIS (1988)の方法によって分離を行った。分離に供試した病斑は大きく分けて、普通型、陥没型、隆起型の3型に類別された。そのうちの陥没型と普通型はほぼ道央以南に、普通型と隆起型は道東に主に見られた。

分離菌の病原性検定は培養菌体をワグネルポット内の滅菌土壌に混和し、健全種イモを植付け、収穫期に掘り取り、塊茎の発病と病斑型を調査した。その結果、132菌株の病原菌を得て、以下の同定に供することとした。なお、比較のための標準菌株として American Type Culture Collection (ATCC) から輸入した4菌株を用いた(表-1：農林水産省指令6横植2016号)。

そこで本研究では以下の方法で同定を進めた。形態観察は松本の方法により走査型顕微鏡で観察した(口絵①, ②)。培養性質・生理的性質は主に SHIRLING and GOTTLIEB (1966), WILLIAMS et al. (1983), LAMBERT and LORIA (1989 a, b)の方法によった。すなわち、メラニン色素産生はチロシン培地または鉄ペプトン・イースト培地、牛乳の凝固、ペプトン化、色素産生はスキムミルク培地で観察した。硫化水素の産生は KUSTER and WILLIAMS (1964)の方法、硝酸塩の還元は WILLIAMS et al. (1983)の方法に準じた。分解能は合計15物質、抗生物質耐性はオレアンドマイシン、ストレプトマイシンなどの合計15物質について WILLIAMS et al. (1983)などの方法に従

表-1 参考菌株

学名	分離年	場所
<i>S. scabies</i> ATCC49173 ^T	1984	New York
<i>S. scabies</i> ATCC33282	1977	Hungary
<i>S. acidiscabies</i> ATCC49003 ^T	1960	Maine
<i>S. acidiscabies</i> ATCC49004	1960	Maine

表-2 北海道で分離されたそうか病菌の各種性状

性 状	(1) (2) (3)			A	B	C	D
				菌	菌	菌	菌
胞子の色 ^{d)}	G	G	W	G	G	G	G
胞子鎖の形態 ^{b)}	S	S	RF	S	S	RF	RF
胞子の表面構造	S	S	S	S	RF	S	S
メラニン色素産生	+	-	-	-	+	-	-
拡散性色素 ^{f)}	-		R/Y	-	-	-	YG
炭素源利用							+
L-アラビノース	+	++	+	+	+	+	+
D-フラクトース	+	+	+	+	+	+	+
グルコース	+	+	+	+	+	+	+
D-マンニトール	+	+	+	+	+	+	-
ラフィノース	+	+	-	+	+	+	+
L-ラムノース	+	+	+	+	+	+	+
スクロース	+	+	+	+	+	+	+
D-キシロース	+		+	+	+	+	-
meso-イノシトール	+		+	NT	NT	+	NT
窒素源利用							
L-ヒドロキシプロリン	+		+	+	+	+	-
L-メチオニン	+		+	+	+		-
分解能							
アルブチン	P		+	P	P	+	-
キサンチン	-		-	-	-	-	-
耐酸性 pH 4.0	-		+	-	-	+	+
4.5	-		+	-	-	+	+
5.0	+		+	+	+	+	+
耐性							
食塩 (4.0%)	+	+		d	+	+	+
食塩 (5.0%)	d	-		d	d	-	-
食塩 (6.0%)	d		-	-	-	-	-
食塩 (7.0%)	-		-	-	-	-	-
アジ化Na (10μg)	+		-	d	d	-	-
(20μg)	+		+	d	d	-	-
フェノール (0.1%)	-		-	-	-	-	NT
テルル酸 (10μg)	d		-	+	+	+	+
(100μg)	d		+	-	-	-	-
硝酸カリウム (10μg)	-		-	-	-	-	-
(100μg)	-		+	-	-	-	-
クリスタル (0.5μg)	-		-	-	-	-	-
バイオレット (1.0μg)	-		-	NT	NT	-	NT
オレアンド (100μg/ml)	-		-	-	-	-	-
マイシン (25μg/ml)	-		+	-	-	d	-
ペニシリン G (10IU)	-	+	+	-	-	d	-
(3IU)	+	-		+	+	-	-
ストレプト (30μg/ml)	-		-	-	-	-	-
マイシン (20μg/ml)	-		+	-	-	-	-

(1) *Streptomyces scabies* ATCC49173^T, ATCC33282(2) *S. scabies* subsp. *achromogenes*^{a)}(3) *Streptomyces acidiscabies* ATCC49003^T ATCC49004

a) *S. s. achromogenes*; ELEZAWY and SZABO (1979). b) S; Spiral, RF; Recti-Flexuous. c) S; Smooth. d) G; Gray, W; White. e) Y; Yellow, f) R/Y; Red/Yellow, YG; Yellow Green. NT; 未検討, +; 90%以上の菌株が陽性, -; 90%以上の菌株が陰性, d; 11~89%の菌株が陽性.

い, 改変ベネット培地で検定した。炭素源利用能は合計34物質について SHIRLING and GOTTLIEB (1966) の方法, 窒素源利用能は WILLIAMS et al. (1983) の方法により, 合計11の窒素化合物について検定した。GC含量は高速液体クロマトグラフィー法, 細胞壁成分, 特にジアミノピメリン酸のアイソマータイプの分析は放線菌の同定実験法 (1985) に準じ, 薄層クロマトグラフィー法を用いた。血清学的性質は免疫プロット法によって行ったが, 今回は紙面の都合から省略する。DNA相同性は国永と横沢の DNA/DNA 再会合速度解析法を用いた。

その結果, 供試した132菌株は胞子鎖が螺旋型の A, B と同じく直~波状型の C, D の4菌群に類別された。

まず, 胞子色はいずれの菌群も灰色で, 胞子の表面構造は平滑であった。炭素源の利用能では合計34の糖を供試した中で, A~C菌群のいずれも LAMBERT and LORIA (1989 a, b) の用いた八つの糖のすべてを利用した。しかし, D菌群はD-マンニトールとD-キシロースを利用しなかった。窒素源利用能ではL-ヒドロキシキサンチン, L-メチオニンをA~C菌群は利用したが, D菌群は利用しなかった。pH耐性に関して, A~C菌群は5.0以上で生育したが, C, D菌群では4.0でも生育可能であった。食塩耐性ではA, B菌群は6.0%以上で, C, D菌群では5.0%以上で生育不能であった。抗生物質耐性では, A, B菌群はペニシリンG3 unitで生育したことが特徴であった。GC含量はA, B菌群が70.9~71.1, C菌群が68.3~69.1, D菌群が70.9~72.5 mol%と一般的な *Streptomyces* 属菌の値に類似した。細胞壁成分ではいずれの菌株も同属菌の特徴とされる LL-A₂pm 型のジアミノピメリン酸を有した。

DNA相同性では, A~D菌群ともそれぞれのグループ内では高い相同性を示した。その値はA, B, C, D菌群内でそれぞれ93%以上を示した。またA菌群とB菌群間でも95%以上, A, B菌群と *S. scabies* ATCC49173^T でも94%以上の高い値であった。しかし, C, D菌群とのA, B菌群間の相同性は低い値であった。また, C, D菌群と *S. acidiscabies* 間も低い値を示した。

以上の結果からA~D菌群を次のように同定した。まず, A, B菌群は *S. scabies* と同定した。特にB菌群は検定した101項目のすべてで標準菌株の ATCC49173^T および ATCC33282 と一致した。また, A菌群とB菌群間に見られた相違はメラニン産生能のみであった。本菌種は九州を含め我が国の各地で分布が確認されている。

次にC菌群は供試した97項目のうちの90項目において, 同様の胞子鎖の形態を有する *S. acidiscabies* ATCC49003^T, 49004 と異なったことから新種と考え,

Streptomyces turgidiscabies sp. nov.として報告した。本種はその後、フィンランド、韓国での生息が確認されており、その起源を考えるうえで興味もたれる。

D 菌群は多くの項目でC 菌群と類似したが、菌株が3 菌株しかないために同定を保留した。将来的に新たな分布が確認されたときに種名を与えたいと考える。

これらの菌種の道内における分布には大きな偏りが見られ、*S. scabies* は主として道央以南に*S. turgidiscabies* は道東に分布する(田中, 2003)。しかし、それぞれの菌種はいずれの土壤に接種しても生存は可能であった。

前述の病斑型との関係では*S. turgidiscabies* による病斑は一般に隆起型～普通型が多く、*S. scabies* では陥没型～普通型が多い傾向が認められた。また、*S. acidiscabies* では表面型の比較的浅い病斑が形成されることが知られている。

II 病原菌の定量法

土壤中の菌量の定量は、病原菌の動態を把握するうえで非常に有効な知見を与えることは言及を待たない。そうか病菌の定量法に関しては既にKENNETH et al. (1998)の報告がある。彼らは自然土壤からの*S. scabies*の定量を目的として半選択培地(STR 培地)を開発し、土壤希釈平板法による分離菌の病原性のマーカーとしてそうか病菌が産生する植物毒素サクストミンの検出を行った。KING et al.により単離・同定された本毒素は*S. scabies*における産生能と病原性が完全に一致するとされ、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から、識別指標として重要視されるに至っている。

その他の手法を用いた事例として、西脇・美濃(1997)のアクチノファージによる識別の試みがある。さらに、田中ら(1995)、前田ら(1999)はそうか病菌*S. turgidiscabies*、*S. scabies*の血清学的性質を検討して、ポリクローナル抗体・モノクローナル抗体を利用したELISA法による識別を試みた。

さらに遺伝子診断法、特にPCR (polymerase chain reaction) に関して、TAKEUCHI et al. (1996)は3種のそうか病菌を含む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することにより、上記3種に特異的な塩基配列の存在を明らかにした。それをもとに設計した特異的プライマーによるPCRを行った結果、培養菌体を用いた高精度な種の識別が可能であった。さらに病斑からの識別も可能であった。そこで精度の高さと簡便さを重視し、PCR法による定量法の開発を試みた。

最初の試みとして、前述のKENNETH et al.の選択培地を*S. turgidiscabies*用に改変した培地上の分離菌を上記のプライマーを用いたPCRで検定することにより定量が可能であった。しかし、本法は熟練と長期間(約10日間)を要するという欠点があった。そこで、それを補うために田中ら(2002)はMPN-PCRという方法を開発した。MPN-PCRは、最確値法(MPN: Most Probable Number)とPCR (polymerase chain reaction)とを組み合わせた簡易な定量法である。最確値とは最も確からしい値のことで、最確値表(表-5)で求める。

実際のMPN-PCRの手法を図-1, 2, 表-3, 4に示す。ただし、ここでは木口のプライマー29-48と431-411を用いた。なおテンプレートの作成に用いる土壤希釈液の前培養は寒天をアガロースに置換したツアベック培地を使用している。この場合、*S. turgidiscabies*では約600 bpの特異的なバンドとして検出される。

実際の結果の一例を図-3に示す。ここでは 10^3 , 10^4 , 10^5 倍の土壤希釈液をもとに作成したテンプレートを使用し、それぞれ5反復でPCRを行った結果である。この例では5反復のうち、 10^3 倍希釈では5本、 10^4 倍希

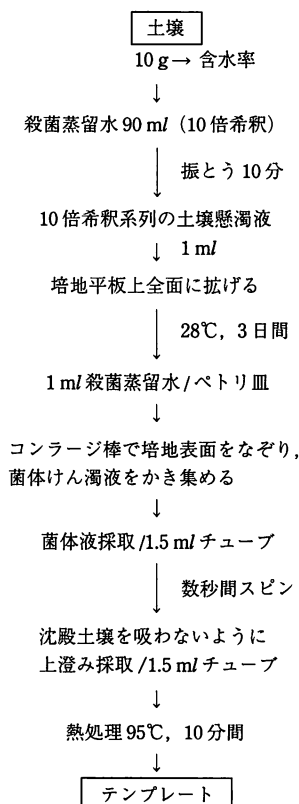


図-1 MPN-PCRに用いるテンプレートの調整法

① 95℃ 9分 ホットスタート DNA ポリメラーゼの活性化

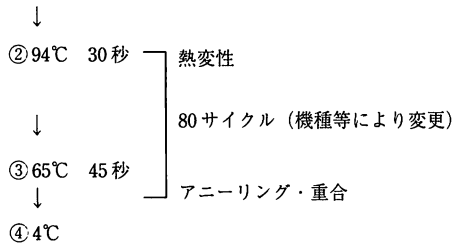


図-2 PCR の条件

表-3 ツアベック培地の組成

NaNO ₃	3 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
KCl	0.5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g
スクロース	30 g
アガロース	15 g
蒸留水	1 l

最終 pH 7.3

表-4 PCR 反応液の組成

滅菌蒸留水	20.6 μl
10 × PCR バッファー II	4.0 μl
2 mM dNTPs	4.0 μl
25 mM MgCl ₂	3.2 μl
木口プライマー 29-48	2.0 μl
木口プライマー 431-411	2.0 μl
dimethyl sulfoxide (DMSO)	2.0 μl
ホットスタート DNA ポリメラーゼ	0.2 μl
計	38.0 μl

テンプレート 2 μl

木口プライマー 29-48 :

GAGCTGCGGGGTGAGGAGTT

木口プライマー 431-411 :

GAAGCACCCAAGGAGCGTCAT

表-5 最確値 (Most Probable Number) 表 (1.10 倍希釈 5 連の場合)

P ₁	P ₂	P ₃					
		0	1	2	3	4	5
0	0	—	0.018	0.036	0.054	0.072	0.090
0	1	(0.018)	0.036	0.055	0.073	0.091	0.11
0	2	0.037	0.055	0.074	0.092	0.11	0.13
0	3	0.056	0.074	0.093	0.11	0.13	0.15
0	4	0.075	0.094	0.11	0.13	0.15	0.17
0	5	0.094	0.11	0.13	0.15	0.17	0.19
1	0	(0.020)	0.040	0.060	0.080	0.10	0.120
1	1	(0.040)	0.061	0.081	0.10	0.12	0.14
1	2	0.061	0.082	0.10	0.12	0.15	0.17
1	3	0.083	0.10	0.13	0.15	0.17	0.19
1	4	0.11	0.13	0.15	0.17	0.19	0.22
1	5	0.13	0.15	0.17	0.19	0.22	0.24
2	0	(0.045)	(0.068)	0.091	0.12	0.14	0.16
2	1	(0.068)	0.092	0.12	0.14	0.17	0.19
2	2	(0.093)	0.12	0.14	0.17	0.19	0.22
2	3	0.12	0.14	0.17	0.20	0.22	0.25
2	4	0.15	0.17	0.20	0.23	0.25	0.28
2	5	0.17	0.20	0.23	0.26	0.29	0.32
3	0	(0.078)	(0.11)	0.13	0.16	0.20	0.23
3	1	(0.11)	0.14	0.17	0.20	0.23	0.27
3	2	(0.14)	0.17	0.20	0.24	0.27	0.31
3	3	0.17	0.21	0.24	0.28	0.31	0.35
3	4	0.21	0.24	0.28	0.32	0.36	0.40
3	5	0.25	0.29	0.32	0.37	0.41	0.45
4	0	(0.13)	(0.17)	0.21	0.25	0.30	0.36
4	1	(0.17)	(0.21)	0.26	0.31	0.36	0.42
4	2	(0.22)	(0.27)	0.32	0.38	0.44	0.50
4	3	(0.27)	0.33	0.39	0.45	0.52	0.59
4	4	0.34	0.4	0.47	0.54	0.62	0.69
4	5	0.41	0.48	0.56	0.64	0.72	0.81
5	0	(0.23)	(0.31)	0.43	0.58	0.76	0.95
5	1	(0.33)	(0.46)	0.64	0.84	1.1	1.3
5	2	(0.49)	(0.70)	(0.95)	1.2	1.5	1.8
5	3	(0.79)	(1.1)	(1.4)	1.8	2.1	2.5
5	4	(1.3)	(1.7)	(2.2)	(2.8)	3.5	4.3
5	5	(2.4)	(3.5)	(5.4)	(9.2)	(16)	—

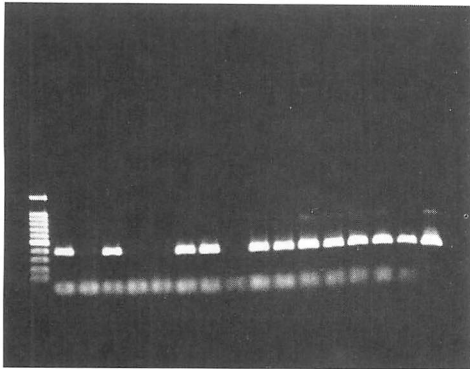
積では 4 本, 0105 倍希釈では 2 本のバンドが検出されている。

その場合には表-5 の最確値表の P₁, P₂, P₃ にそれぞれ 5, 4, 2 を当てはめると, 最も確からしい値として 2.2 が得られることになる。さらに土壤水分による補正を行って乾土 g 当たり換算し, 菌量は 3.3 × 10⁴/g 乾土と推定される仕組みである。

本法の検出効率 (定量限界菌密度) は 10³~⁵ 希釈, 5 連で推定菌数 200 cfu/g であり, また作業効率は培養に

3 日, PCR に 1 日の 4 日間で定量が完了することから前述の従来法に比較して精度および迅速性に優れている。

そこで本法の有効性を検討するために, 従来から土壤菌量の定量に用いる土壤希釈平板法との比較を行った。すなわち, 同数のそうか病菌を混和した無殺菌土と殺菌土について前者の菌数を MPN-PCR によって定量し, 後者を希釈平板法で定量したところ, 両者ともに同一レ



希釈倍数 10⁵倍 10⁴倍 10³倍
 (検出バンド数) (2本) (4本) (5本)

図-3 MPN-PCRによる検定結果の一例

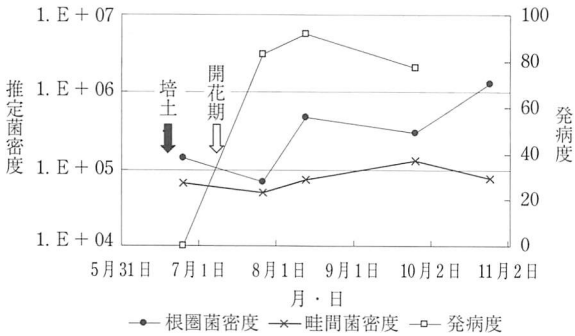


図-4 ジャガイモの生育期間中における土壌中のそうか病菌数の推移

ベルの菌数が検出されたことから、MPN-PCRは従来の有効な検出法である土壌希釈平板法と比較して検出効率は同等と評価した。

そこで、本法を用いてジャガイモ栽培土壌中の *S. turgidiscabies* 菌数の推移を調査した。その結果を図-4に示す。ジャガイモ生育期間中の根圏域の菌数は、生育

に従って増加する傾向にあった。しかし、畝間土壌中のそうか病菌数は生育に関係なく、ほぼ一定の傾向を示した。

本法は *S. turgidiscabies* を対象とした定量法であるが、他の菌種でもそれぞれに特有のプライマーを用いて定量が可能と考える。今後は本法による菌量の評価が容易となり、そうか病菌の動態と発病との関係についてより理解が深まることが期待される。

最後に本報告は阿部秀夫博士（元：道立北見農業試験場）、木口忠彦氏（同）、国永史朗博士（北海道医療大学）、前田征之博士（現：新潟県農業試験場）、宮島邦夫博士（元：道立十勝農業試験場）、竹内徹氏（道立中央農業試験場）、田中民夫氏（元：道立十勝農業試験場）、谷井昭夫博士（故人）、相馬純博士（元：道立北見農業試験場）の研究成果を代表して報告した。さらに発生実態調査に伴う病イモなどの採取にご協力いただいた各農業改良普及センターの方々に深く感謝申し上げる次第である。

引用文献

- 1) BONDE, M. R. and G. A. McINTYRE (1968): Am. Potato J. 45: 273 ~ 278.
- 2) KENNETH, L. C. et al. (1998): Plant Dis. 82: 631 ~ 638.
- 3) KING, R. R. et al. (1989): Chem. Commun. 13: 849 ~ 850.
- 4) KUSTER, E. and S. T. WILLIAMS (1964): Appl. Micro-biol. 12: 46 ~ 52.
- 5) LAMBERT, D. H. and R. LORIA (1989 a): Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 387 ~ 392.
- 6) ————— (1989 b): Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 393 ~ 396.
- 7) LORIA, R. and J. R. DAVIS (1988): Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS, St. Paul, Minnesota.
- 8) 前田征之ら (1999): 日植病報 65: 361.
- 9) MIYAJIMA, K. et al. (1998): Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 495 ~ 502.
- 10) 西脇由恵・美濃健一 (1997): 日植病報 63: 255.
- 11) 放線菌研究会編 (1985): 放線菌の同定実験法, 放線菌研究会, 東京, p. 58 ~ 171.
- 12) SHIRLING, E. B. and D. GOTTLIEB (1966): Int. J. Syst. Bacteriol. 16: 313 ~ 340.
- 13) TAKEUCHI, T. et al. (1996): ibid. 46: 476 ~ 479.
- 14) 田中文夫 (2003): 土と微生物 48: 69 ~ 77.
- 15) —————ら (1995): 日植病報 60: 795.
- 16) 田中民夫ら (2002): 同上 68: 103.
- 17) 谷井昭夫 (1985): 放線菌の分類と特性研究会資料, p. 31 ~ 52.
- 18) WILLIAMS, S.T. et al. (1983): J. gen. Microbiol. 129: 1743 ~ 1813.

！日本産植物細菌病の図鑑/目録/分離・同定法！

CD-ROM版 作物の細菌病 —病徴診断と病原の同定—
 (for Windows) **2004年追補3版**

西山幸司・高橋幸吉・高梨和雄 編
 定価 2,100円 (税込み) 送料 200円

2001年追補版に①病徴写真370余枚 ②2000年以降発表の新病害 ③初心者向け推奨分離法 ④非病原細菌のプロフィールインデックスを新たに追加しました。