

## 第4章 病原性の簡易検定

ジャガイモそうか病の病原菌を罹病塊茎の病斑部や発病土壌から分離しようとする場合、土壌中には多数の腐生性 *Streptomyces* 属菌が生息しているために、ジャガイモに病原性を有する *Streptomyces* 属菌以外にも多数の同属菌が分離される。したがって、分離された数多くの *Streptomyces* 属菌の中から病原性を有する菌株を選別するには多大の苦労が必要となってくる。この場合にまず考えられるのは選択培地の利用であるが、この分野の研究は極めて少なく、Menzies ら<sup>105)</sup> による TCN 培地および Conn ら<sup>16)</sup> による STR 培地の例がみられる程度である。それでも、これらの培地だけでは選択性が劣るため、前者では血清学的な判定を組み合わせ<sup>184)</sup>、また、後者では病原性のマーカーとしての毒素生産能の検定を組み合わせ<sup>16)</sup>、それぞれ検出の向上が図られている。さらに、分離菌株の病原性を確認するためには選択培地や血清学的手法では不十分で、接種試験を行うことが必要となってくる。このため、病原性を検定する方法として殺菌土壌にジャガイモ塊茎を植え付けて分離菌株を接種し、そこに形成された塊茎に病斑がみられるかどうかによって判定する方法<sup>48,63,150)</sup> がこれまで一般的に行われてきた。しかし、本法で結果を得るためには2~3か月を要することから、簡便に行えない欠点がある。また、栽培期間中に他の病原 *Streptomyces* 属菌に汚染される可能性があること、さらには、植え付けた塊茎の表面に病原菌が付着していた可能性も考えられることなどから、確実に接種菌株の病原性を検定することは非常に困難である。

そこで、本章ではこれまでの方法よりも極めて簡便で、かつ、汚染の恐れが少ない病原性検定方法の開発を試みた。

### 第1節 萌芽茎における病徴発現

Hooker ら<sup>50)</sup> が報告したように、ジャガイモそうか病菌がジャガイモの萌芽茎にネクロシスを形成するかどうかの確認を行った。

#### 材料および方法

Fig. 6 に示すように、4°Cの低温条件下で休眠期間以上に貯蔵した塊茎（品種：デジマ）を80%エタノールに3分間浸漬して表面殺菌した後、15°C暗黒・乾燥条件下に放置しておく、2~3週間で萌芽が始まる。萌芽茎が3

~4 cm 程度に伸長したとき、本病原菌 *S. scabies*（供試菌株：S-12, S-152）の濃厚孢子懸濁液（約 $10^8$ cfu/ml）に殺菌ティッシュペーパー（KIMWIPER S-200, 1 cm × 5 cm）を浸漬して接種源とし、これを萌芽茎の中央部に巻き付けて、25°C・湿室条件下に保持し、接種部位を経時的に観察した。

### 結 果

接種3~4日後から接種部位にすじ状のネクロシスが認められ、7~10日後には接種部位全面に激しいネクロシスを生じ（Plate II-A）、また、ネクロシス上に気中菌糸が認められ、孢子が形成される場合もあった（Plate II-B）。さらに、これらの部位からは接種菌が再分離されて、Hooker ら<sup>50)</sup> と同様の知見が得られた。

### 第2節 切断萌芽茎を用いた病原性の簡易検定

第1節の結果から、萌芽茎を利用した病原性の検定が可能であると判断されたので、さらに改良を加えた実用的な検定方法について検討した。すなわち、上述の検定方法は土壌を充填したポットに塊茎を植え付ける手順を省いて

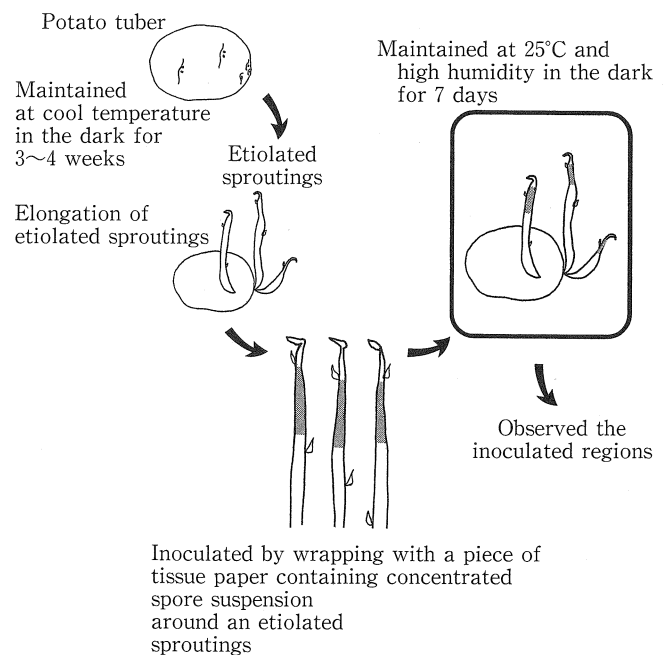


Fig. 6. Schema of assessment for pathogenicity of *Streptomyces* spp. using etiolated sproutings of potato tubers.

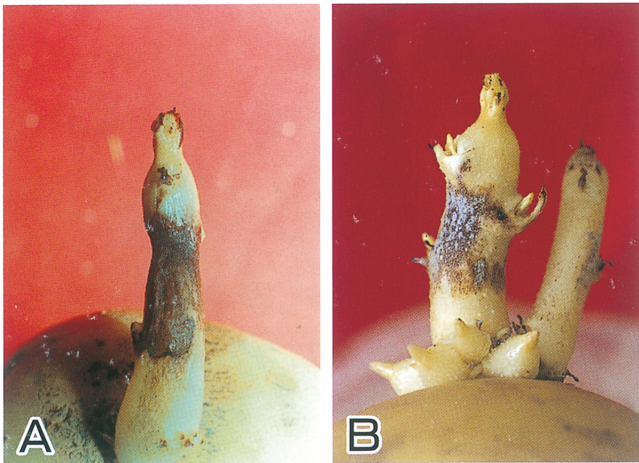


Plate II

- A. Necrotic black lesion induced by inoculation with *Streptomyces scabies* (S-12) on an etiolated sprouting of potato.  
 B. Tufts with aerial mycelia and spores on a necrotic lesion.

いるため、Hooker らの方法<sup>50)</sup>よりもさらに簡便で、土壌からの汚染の問題もないが、ネクロシス部位に形成された孢子からの汚染の可能性もあるために同一萌芽茎をその後の検定に利用できず、一塊茎から利用できる茎数が制限されること、さらに、塊茎から伸ばした萌芽茎をそのまま用いるために多数の菌株の検定を行う場合には広い場所を必要とすることなどが問題となる。そこで、塊茎から切り取った切断萌芽茎を用いる検定方法を試みた。

### 材料および方法

Fig. 7 に簡易検定の手順を示した。まず、80%エタノールで表面殺菌した塊茎から萌芽茎を伸ばさせ (Plate III-A)、その先端部から6~8 cmの長さに切断し、その切断萌芽茎のそれぞれに、濃厚孢子懸濁液に浸漬したティッシュペーパーを巻きつけて接種した。これらの接種萌芽茎を約1 cmの深さに殺菌水を入れた100 ml ビーカーに移し、接種部位の乾燥を防ぐためにビーカー上部にスチレン製コップをかぶせて湿室状態とし (Plate III-B)、25°Cに静置して、7日後に接種部位における病変を観察した。

### 結 果

Table 13 に示すように、ジャガイモのそうか病斑から分離され、接種試験の結果、ジャガイモ塊茎にそうか病斑を再現することができて病原性があると思われた *Streptomyces* 属菌 35 菌株は、すべて切断萌芽茎の接種部位にネクロシス (Plate III-D, E) を形成する能力を有していた。また、テンサイそうか病<sup>1)</sup>から分離されてジャガイモにもそうか病斑を形成する *S. turugidiscabies* (S-15, 北海道立中央農試阿部秀夫博士からの分譲菌) では接種部位の褐変は認められなかったが、接種部位の隆起が認められた (Plate III-F)。これに対して、ジャガイモにそうか病斑を形成せず、病原性がないと思われる *Streptomyces* 属菌 12 菌株の場合には、接種部位になんらの変化も認めら

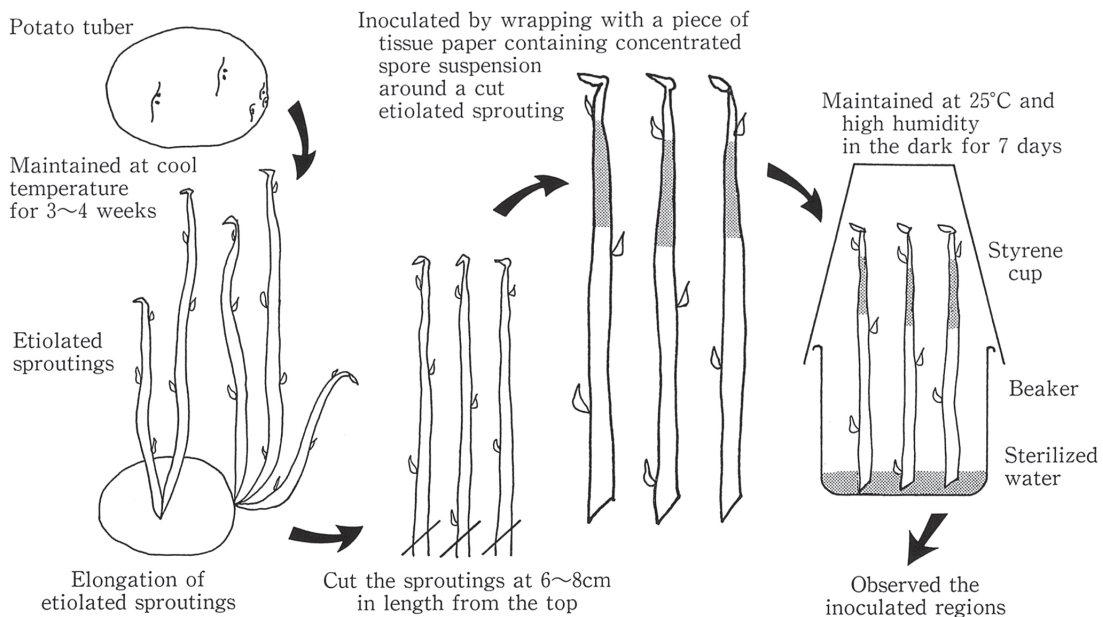


Fig. 7. Schema of a simple method of assessment for pathogenicity of potato-scab causing *Streptomyces* spp. using etiolated sproutings of potato tubers.

Table 13. The relationship of the pathogenicity of *Streptomyces* spp. isolated from potato and sugar beet scab and the ability to induce necrotic lesions on the cutting stems of potato

Source	Isolate	Induction of scab lesion on potato tuber	Induction of necrotic lesion on the cutting stems of potato <sup>a)</sup>
Potato	S-11	+	5 / 5
do.	S-18	+	5 / 5
do.	S-19	+	5 / 5
do.	S-22	+	5 / 5
do.	S-23	+	5 / 5
do.	S-51	+	5 / 5
do.	S-52	+	5 / 5
do.	S-71	+	5 / 5
do.	S-72	+	5 / 5
do.	S-81	+	5 / 5
do.	S-82	+	5 / 5
do.	S-96	+	5 / 5
do.	S-97	+	5 / 5
do.	S-111	+	5 / 5
do.	S-112	+	5 / 5
do.	S-121	+	5 / 5
do.	S-122	+	5 / 5
do.	S-131	+	5 / 5
do.	S-132	+	5 / 5
do.	S-151	+	5 / 5
do.	S-152	+	5 / 5
do.	S-173	+	5 / 5
do.	S-211	+	5 / 5
do.	S-212	+	5 / 5
do.	S-241	+	5 / 5
do.	S-311	+	5 / 5
do.	S-312	+	5 / 5
do.	S-324	+	5 / 5
do.	S-411	+	5 / 5
do.	S-422	+	5 / 5
do.	S-851	+	5 / 5
do.	S-852	+	5 / 5
do.	S-1111	+	5 / 5
do.	S-1112	+	5 / 5
do.	S-2422	+	5 / 5
Sugar beet	S-12	+	5 / 5
do.	S-15	+	5 / 5 <sup>b)</sup>
Potato	S-15	-	0 / 5
do.	S-16	-	0 / 5
do.	S-26	-	0 / 5
do.	S-27	-	0 / 5
do.	S-61	-	0 / 5
do.	S-62	-	0 / 5
do.	S-78	-	0 / 5
do.	S-86	-	0 / 5
do.	S-91	-	0 / 5
do.	S-182	-	0 / 5
do.	S-565	-	0 / 5
do.	S-772	-	0 / 5

a) Stems on which necrotic lesions were induced/tested stems.  
b) Raised lesions were induced.

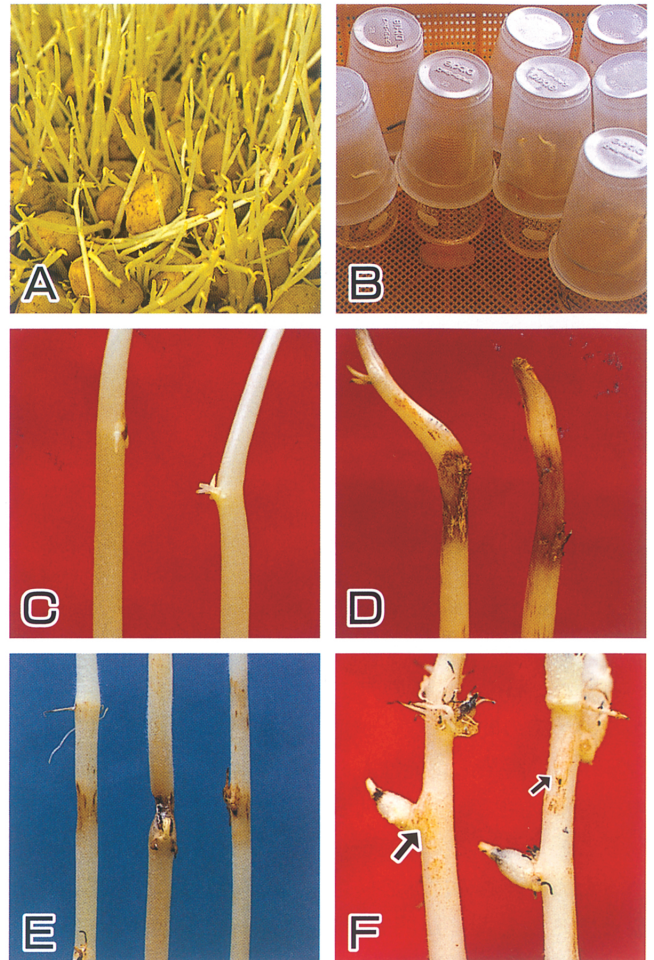


Plate III

- A. Elongation of etiolated sproutings from potato tubers.
- B. Maintenance of sprout cutting inoculated with pathogenic *S. scabies* under high humidity condition.
- C. Sproutings inoculated with non-pathogenic *Streptomyces* sp..
- D. Necrotic lesions induced by *S. scabies* (S-12) on etiolated sproutings.
- E. Necrotic lesions and tufts of aerial mycelia induced by *S. acidiscabies* (S-51) on etiolated sproutings.
- F. Raised lesions (arrows) induced by *S. turgidiscabies* (S-15) causing sugar beet scab and potato scab on etiolated sproutings.

れなかった (Plate III-C)。

### 第3節 切断萌芽茎上での病徴発現に及ぼす温度の影響

切断萌芽茎上における病徴発現に最適な温度条件について検討を加えた。

#### 材料および方法

供試菌株として *S. scabies* (S-12) および *S. acidiscabies*

Table 14. Relationship between the induction of necrotic lesions by inoculation with pathogenic *Streptomyces* spp. and incubation temperature

Isolate <sup>a)</sup>	Days after inoculation	Incubation temperature (°C)			
		15	20	25	30
<i>S. scabies</i> (S-12)	5	+ <sup>b)</sup>	+	++	+++
	7	+	+	+++	+++
<i>S. acidiscabies</i> (S-17)	5	-	-	+	+
	7	-	+	+++	++

a) S-12, S-17 : isolates from potato scab.

b) - : no change, + : small necrotic spots on the inoculated region, ++ : intermediate necrotic lesions on the inoculated region, +++ : large necrotic lesions all over the inoculated region.

(S-17) の 2 菌株を用い、第 2 節で示した方法に準じて切断萌芽茎に濃厚孢子懸濁液を接種した。15, 20, 25, 30°C の各温度条件下に保持し、5 日後および 7 日後に以下に示す基準に従って接種部位における病徴発現の程度を調査した。なお、各温度処理について 5 本の萌芽茎を用いた。

- : 変化なし

+ : 接種部位に微小なネクロシスの形成がみられる

++ : 接種部位にネクロシスが散在している

+++ : 接種部位全面にネクロシスがみられる

## 結 果

Table 14 に示すように、供試した 2 菌株ともに 20°C 以下ではネクロシスの形成は少なかったが、25°C 以上では明瞭に形成された。しかし、30°C では切断萌芽茎の傷みが認められ、ネクロシスの発現には 25°C が適温であった。

## 第 4 節 考 察

ジャガイモそうか病菌の病原性を簡易に検定する手法として、Hooker ら<sup>50)</sup> は本病原菌がジャガイモの茎部にネクロシスを引き起こすことを利用した手法を開発している。その方法は殺菌土壤に供試菌株を接種し、ジャガイモ塊茎を植え付けて、土壤中に伸長してきた茎にネクロシスが形

成されるかどうかによって病原性の有無を判定するものである。また、Barker ら<sup>8)</sup> は試験管内で無菌的にジャガイモのシュートから誘導した塊茎<sup>7)</sup> に供試菌株を接種して病原性の検定を行っている。しかし、前者は新塊茎上での病斑形成を見る必要がないため、従来の方法よりは日時を要しないものの、殺菌土壤に供試菌株を接種し、塊茎を植え付けて茎を伸長させる必要があり、土壤および植え付ける塊茎のいずれにも汚染の問題がなお残されている。また、後者では汚染が無い状態で検定できるが、塊茎形成までには数週間を要し、さらに、その手法も簡便でないことが難点である。一方、Loria ら<sup>90)</sup> は切断した茎から生じる塊茎を用いて供試菌株の病原性を検定しているが、塊茎形成までに 2 週間、接種から病原性の判定までに 3 週間を要している。

今回新たに開発した病原性の検定手法では、供試菌株がジャガイモ塊茎にどのような形状の病斑を形成するかについての検定はできないが、ジャガイモに対する病原性の検定を室内で簡易に、また、7 日間という極めて短期間のうちに、しかも、大量に行えるという利点があり、病原性を有する菌株の選抜には極めて有効であると思われる。さらに、ジャガイモ塊茎を低温状態で保存さえしておけば、常時検定が行えること、萌芽茎を先端部で切断してもすぐに切断部直下の節から次の茎の伸長が始まり、再度利用できることなどの利点を有している。

このため、このジャガイモの切断萌芽茎を用いての *Streptomyces* 属菌の病原性簡易検定法は実用性が高いものと考えられ、本検定法を‘切断萌芽茎接種法’と呼称したい。今後、本法は病原性の検定ばかりでなく、感染機作解明のための実験系や抵抗反応の解析および品種抵抗性の検定、さらには薬剤のスクリーニングにも応用できるのではないかと期待される。なお、沢田ら<sup>138)</sup>、植松ら<sup>173)</sup> は本法をジャガイモそうか病斑から分離された放線菌の病原性検定に利用しており、さらに、高橋ら<sup>152)</sup> は本法が品種抵抗性検定にも利用できることを認め、汚染土壤を用いた検定の補助手段として強罹病性品種・系統の選別除去への利用が考えられるとしている。