

第3章 病原菌の形態と生理的性質および分類学的所属

本章では、ジャガイモそうか病の病原放線菌について、その形態および生理的性質の検討を行うとともに、分子生物学的分類法の一つとして用いられている DNA-DNA 交雑による菌株の類別を試みた。さらに、1974 年以来不確定種とされ、1989 年に Lambert らによって種名が復活された *Streptomyces scabies*⁷²⁾ および新種として提案された *Streptomyces acidiscabies*⁷³⁾ との異同を調べるために、16 S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列を決定し、本病に関与している各病原菌の分類学的所属を明らかにした。

第1節 病原菌の分離と病原性の検討

ジャガイモそうか病罹病塊茎から放線菌を分離し、土壌接種によって病原性を確認した。

材料および方法

1) 病原菌の分離

Harrison の方法⁴⁴⁾ および Lawrence の方法⁸¹⁾ を併用した。すなわち、罹病塊茎を十分に水洗して表面の汚れを除去した後、80%エタノールに1分間浸漬して表面殺菌を行い、病斑部の表面からわずかに褐変が認められる部位まで病患部を除去し、健全部との境界部を 5 mm × 5 mm × 3 mm (深さ) の大きさに切り出し、この切片を 2% 素寒天培地に置床し、25°C に保持した。5 ~ 7 日後に切片上に形成された放線菌の孢子鎖をかき取り、0.5% フェノール水に懸濁したものをエッグアルブミン培地¹⁷⁴⁾ に流し込み、25°C で培養した。5 ~ 7 日後に培地上に形成された放線菌のコロニー上の孢子を再度、エッグアルブミン培地を用いた希釈平板法で分離し、孢子形成培地¹⁰³⁾ に保存した。

2) 病原性の確認

バーミキュライト・ピートモス・鹿沼土を 1 : 1 : 1 の割合で混合して用土とし、これをポット (径 25 cm, 深さ 30 cm) に詰めて高圧滅菌処理した。一方、ジャガイモ塊茎 (品種: デジマ) を 80% エタノールに 3 分間浸漬して表面殺菌を行い、これを先の滅菌土壌に植え付けた。接種源として液体培地 (イーストエキス 4 g, デンプン 15 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, 水 1,000 ml, pH 7.0) で 28°C · 7 日間振とう培養した供試菌株の菌体浮遊液を用い、植え付けた塊茎の周囲に流し込んで接種した。接種後、ポットの上部をポリエチレンフィルムで覆って、供試菌株間の汚染を防止した。植え付け 2 か月後に塊

茎を掘り取り、病斑形成の有無で病原性を確認した。

結 果

接種試験の結果、Table 7 に示すようにジャガイモにそうか病斑を形成する 26 菌株 (佐賀県分離株) が得られた。この他に、ジャガイモそうか病罹病塊茎から農業環境技術研究所鬼木正臣博士、長崎県総合農林試験場木村貞夫氏および広島県立農業試験場後俊孝氏によって分離された 5 菌株、北海道立北見農業試験場阿部秀夫博士 (現在、北海道立道南農業試験場) によってテンサイそうか病罹病塊根か

Table 7. Actinomycetes isolates used in this study

| Isolate | Source | Geographic origin | Year isolated |
|------------|------------|-------------------|---------------|
| S-11 | Potato | Saga Pref. | 1985 |
| S-18 | do. | do. | 1980 |
| S-23 | do. | do. | 1985 |
| S-51 | do. | do. | 1980 |
| S-81 | do. | do. | 1985 |
| S-82 | do. | do. | do. |
| S-111 | do. | do. | do. |
| S-112 | do. | do. | do. |
| S-121 | do. | do. | do. |
| S-131 | do. | do. | do. |
| S-132 | do. | do. | do. |
| S-151 | do. | do. | 1980 |
| S-173 | do. | do. | do. |
| S-211 | do. | do. | 1985 |
| S-212 | do. | do. | do. |
| S-241 | do. | do. | do. |
| S-311 | do. | do. | do. |
| S-312 | do. | do. | do. |
| S-324 | do. | do. | do. |
| S-411 | do. | do. | 1980 |
| S-412 | do. | do. | 1985 |
| S-851 | do. | do. | do. |
| S-852 | do. | do. | do. |
| S-1111 | do. | do. | do. |
| S-1112 | do. | do. | do. |
| S-2422 | do. | do. | do. |
| A-820 | do. | Ibaraki Pref. | 1983 |
| NS-2 | do. | Nagasaki Pref. | 1975 |
| NS-3 | do. | Saga Pref. | do. |
| HS-5 | do. | Hiroshima Pref. | 1981 |
| HS-7 | do. | Ibaraki Pref. | do. |
| S-12 | Sugar beet | Hokkaido | 1978 |
| S-15 | do. | Hokkaido | 1978 |
| ATCC 3352 | | | |
| ATCC 10246 | | | |

ら分離されジャガイモにもそうか病斑を形成する2菌株(S-12, S-15), さらに, *Streptomyces scabies* (ATCC 3352¹⁵⁾, ATCC 10246¹⁵⁾) 2菌株を加えた合計35菌株を本章の第2節から第5節までの実験に供試した。

第2節 病原菌の形態

放線菌の分類・同定の基準として重要な形質である孢子鎖の形態および孢子の表面構造を観察した。

材料および方法

供試菌株をイースト・麦芽寒天培地 (ISP 培地 No. 2)¹⁴⁾ に21日間培養後, 孢子鎖の形態および孢子の表面構造を光学顕微鏡および走査電子顕微鏡 (JSM-F 15) を用い, 常法に従って観察した。

結果

Table 8 に示すように, 供試菌株は孢子鎖の形態がらせん状の27菌株 (S型菌) と直~波状の8菌株 (RF型菌) の2群に大別された。すなわち, ジャガイモ由来の菌株についてみると, 佐賀県から分離された27菌株のうち, 22

菌株はS型菌, 5菌株はRF型菌であり, 長崎県, 広島県および茨城県から分離された4菌株はすべてS型菌であった。また, 北海道のテンサイから分離された2菌株はS型菌とRF型菌であった。対照として用いたATCC 3352およびATCC 10246はともにRF型菌であった。

孢子の表面構造はS型菌, RF型菌ともにすべて平滑であった。このうち, ジャガイモから分離されたS型菌とRF型菌の孢子鎖の形態および孢子表面構造をPlate I に

Table 8. Morphology of spore chain of *Streptomyces* spp., causal pathogens of potato scab

| Morphology type | Number of isolates | Source | Geographic origin |
|--------------------------|--------------------|------------|-------------------|
| Spirale (S-type) | 22 | Potato | Saga pref. |
| | 1 | Potato | Nagasaki pref. |
| | 2 | Potato | Hiroshima pref. |
| | 1 | Potato | Ibaraki pref. |
| | 1 | Sugar beet | Hokkaido |
| Rectiflexibile (RF-type) | 5 | Potato | Saga pref. |
| | 1 | Sugar beet | Hokkaido |
| | 1 | ATCC 3352 | |
| | 1 | ATCC 10246 | |

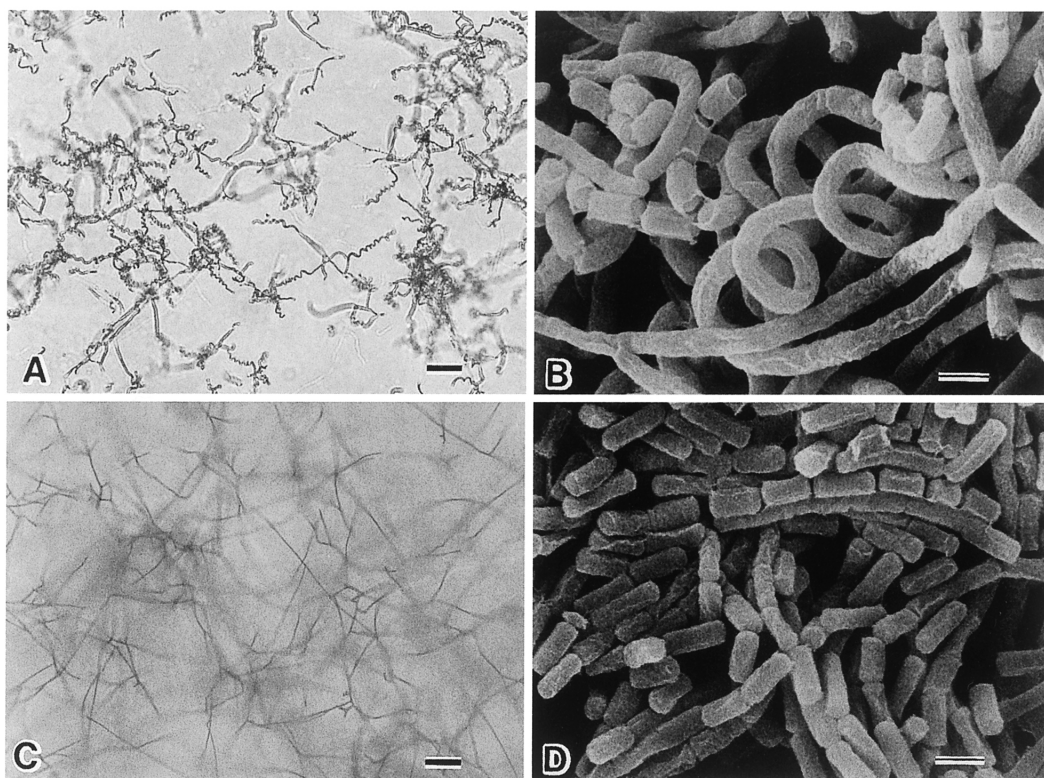


Plate I Spore chains of *Streptomyces* species, the causal organisms of potato scab.

- A. Spiral spore chain (S-131) observed by microscope (Bar=10 μ m)
- B. Spiral spore chain (S-131) observed by scanning electron microscope (Bar=1 μ m)
- C. Rectiflexibile spore chain (S-151) observed by microscope (Bar=10 μ m)
- D. Rectiflexibile spore chain (S-151) observed by scanning electron microscope (Bar=1 μ m)

示した。

第3節 細胞壁成分

放線菌の分類・同定において、属の検索に有用であり、最も重要な化学分類指標とされている全菌体のジアミノピメリン酸異性体の検出を行い、細胞壁タイプを決定した。

材料および方法

1) 供試菌株

ジャガイモそうか病斑から分離された病原菌のうち、孢子鎖の形態が異なる12菌株、すなわち、孢子鎖がらせん状の7菌株（S型菌）と直～波状の5菌株（RF型菌）を供試した。

2) 菌体の調整

供試菌株を28°Cで5日間、液体培地（イーストエキス4g、デンプン15g、 K_2HPO_4 0.5g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g、水1,000ml、pH7.0）で振とう培養後、遠心分離（4°C、12,000rpm、10分）により集菌し、Saline EDTA緩衝液（0.1M EDTA、0.15M NaCl、pH8.0）で3回洗浄後、凍結乾燥した。

3) 試料の調製

乾燥菌体15mgを5mlのアンブルに入れ、6N・HCl 1mlを加え、密封後100°Cで18時間加水分解を行った。冷却後、濾過操作を行い、残渣を除去して得られた濾液を沸騰湯浴中で蒸発乾固させ、さらに、脱塩酸を完全に行うために1mlの蒸留水を加え、蒸発乾固操作を2回繰り返した。

4) ジアミノピメリン酸 (A_2pm) の検出

得られた固形物を0.3mlの蒸留水に溶解し、薄層板にスポット後、展開（展開液はメタノール80：蒸留水26：6N-HCl4：ピリジン10、V/V）した。なお、ジアミノピメリン酸異性体の標準液を同時にスポットした。展開終了後、風乾し、0.2%ニンヒドリン含有アセトンを噴霧して、100°Cで5分間加熱後、発色状況を調べ、ジアミノピメリン酸の異性体を同定した。

結 果

供試菌株はすべて菌体中にLL-ジアミノピメリン酸を含み、これはLechevalierらの分類⁸⁵⁾によると細胞壁タイプI型となり、*Streptomyces* 属に所属することが確認された。

第4節 培養的性質

放線菌の分類の指標となる培養的性質を数種類の培地を用いて調べた。

材料および方法

培養的性質はイースト・麦芽寒天培地（ISP培地No.2）¹⁴³⁾、オートミール寒天培地（ISP培地No.3）¹⁴³⁾、スターチ・無機塩寒天培地（ISP培地No.4）¹⁴³⁾およびグルコース・アスパラギン寒天培地¹⁷⁸⁾を用いて、供試菌株を28°Cで21日間培養後、各培地上での生育状況、気中菌糸の色調および色素の産生状況を観察した。気中菌糸の色調はJIS Z 8271 準拠標準色票⁵⁷⁾を用いて調査した。

結 果

各菌株の培地上における培養的性質はTable 9に示すとおりである。ジャガイモそうか病の病斑から分離された菌株の気中菌糸の形成はS型菌（S-131）、RF型菌（S-151）ともに、イースト・麦芽寒天培地（ISP培地No.2）、オートミール寒天培地（ISP培地No.3）、スターチ・無機塩寒天培地（ISP培地No.4）では良好で、グルコース・アスパラギン寒天培地ではS型菌（S-131）は少なく、RF型菌（S-151）は中程度であった。気中菌糸の色調はS型菌（S-131）では赤色系、RF型菌（S-151）では黄色系であった。色素産生については、S型菌（S-131）はオートミール寒天培地（ISP培地No.3）でのみ褐色色素を産生し、RF型菌（S-151）はイースト・麦芽寒天培地（ISP培地No.2）で黄褐色、オートミール寒天培地（ISP培地No.3）で淡いオレンジ色、また、グルコース・アスパラギン寒天培地で黄褐色の色素をそれぞれ産生した。

次に、テンサイそうか病の病斑から分離された菌株のうち、S型菌（S-12）はジャガイモそうか病斑から分離されたS型菌と培養的性質がすべて一致し、一方、RF型菌（S-15）は気中菌糸の色調が他の菌株と異なっており、色素産生についてはイースト・麦芽寒天培地（ISP培地No.2）でのみ黄褐色色素の産生がみられた。

第5節 生理的性質

Table 7に示したすべての菌株について、その生理的性質の検討をISP (International Streptomyces Program) の方法¹⁴³⁾ および放線菌の同定実験法¹²⁴⁾ に準拠して行った。

Table 9. Cultural characteristics of *Streptomyces* spp., causal pathogens of potato scab

| Medium | | Isolate from potato | | Isolate from sugar beet | |
|---|------------------|-----------------------------------|-----------------------|-------------------------------|---------------------|
| | | S-131 (S-type) | S-151 (RF-type) | S-12 (S-type) | S-15 (RF-type) |
| Yeast extract-malt extract agar (ISP No. 2) | VM ^{a)} | Abundant | Abundant | Abundant | Abundant |
| | AM ^{a)} | Abundant (5P6/1) ^{b)} | Abundant (10YR9/2) | Abundant (5P6/1) | Abundant (7/N) |
| | SP ^{a)} | Brown | Yellow brown | Brown | Yellow Brown |
| Oatmeal agar (ISP No. 3) | VM | Abundant | Abundant | Abundant | Abundant |
| | AM | Abundant (10PB8/1~2.5P8/1) | Abundant (10YR9/2) | Abundant (10PB8/1~2.5P8/1) | Abundant (7/N) |
| | SP | None | Faint orange | None | None |
| Inorganic saltsstarch agar (ISP No. 4) | VM | Abundant | Abundant | Abundant | Abundant |
| | AM | Abundant (10PB7/1~2.5P7/2) | Abundant (10YR9/2) | Abundant (10PB7/1~2.5P7/2) | Abundant (5P7/1) |
| | SP | None | None | None | None |
| Glucose asparagine agar | VM | Moderate | Moderate | Moderate | Moderate |
| | AM | Sparse | Moderate (10YR9/2) | Sparse | Sparse |
| | SP | None | Yellow brown | None | None |

a) VM : vegetative mycelium, AM : aerial mycelium, SP : soluble pigment.

b) Color designation, by JIS Z8271.

材料および方法

1) メラニン様色素生成の判定法

メラニン様色素の生成を判定するために、ペプトン・イースト・鉄寒天培地 (ISP 培地 No. 6)¹⁴³⁾ およびチロシン寒天培地 (ISP 培地 No. 7)¹⁴³⁾ の両斜面培地に供試菌株の孢子懸濁液を塗抹接種し、25°Cで3日間および7日間培養後、未接種の培地を対照として、黒褐色の溶解性色素が生産された場合を陽性と判定した¹²⁴⁾。

2) スターチ加水分解の判定法

ジャガイモデンプン 1.5 g を冷蒸留水 5~10 ml に懸濁し、100 ml の基礎培地 (ペプトン 5 g, 牛肉エキス 5 g, 寒天 15 g, 蒸留水 1,000 ml, pH 7.0) に加え、高圧滅菌処理後、45°Cまで冷やし、デンプンを培地中で均一に拡散させた後、ペトリ皿に分注した。供試菌株の孢子懸濁液を塗抹接種後、25°Cに静置し、5日後、95%エタノールを注ぎ、菌その周囲に透明斑を生じたものを陽性と判定した¹²⁴⁾。

3) カゼイン分解の判定法

10%スキムミルク液と同量の2%素寒天培地とを別々に高圧滅菌処理後、47°Cに冷えてから混合し、ペトリ皿に分注した。供試菌株の孢子懸濁液を塗抹接種後、25°Cに静置し、7日後および14日後に菌その周囲および下部に透明斑を生じたものを陽性と判定した¹²⁴⁾。

4) 尿素分解の判定法

ミリポアフィルターで濾過した尿素の15%溶液 10 ml

と液体培地 (KH₂PO₄ 10 g, Na₂HPO₄ 9.5 g, イーストエキス 1 g, フェノールレッド 0.04%溶液 20 ml, 蒸留水 1,000 ml, pH 6.7) 75 ml を混合し、試験管に 2.5 ml ずつ分注した。供試菌株の孢子懸濁液を接種後、25°Cで28日間培養し、ピンクあるいは赤の着色が認められた場合を陽性と判定した¹²⁴⁾。

5) 硝酸塩還元法の判定法

0.1%硝酸カリウム含有液体培地 (ペプトン 5 g, 硝酸カリウム 1 g, 牛肉エキス 3 g, 蒸留水 1,000 ml, pH 7.0) 10 ml に供試菌株の孢子懸濁液を接種し、培養7日後、14日後、21日後に第1液 (スルファニル酸 8 g, 5 N 酢酸 1,000 ml) を加えてよく振とうし、次に第2液 (ジメチル・アルファ・ナフチルアミン 6 g, 5 N 酢酸 1,000 ml) を入れて振とう後、ピンクあるいは赤に着色した場合を陽性と判定した¹²⁴⁾。着色がみられない場合には亜鉛末を加え、赤色を呈した場合には硝酸塩の存在が認められるので、陰性と判定した¹²⁴⁾。変化が認められない場合は硝酸塩の還元が進みすぎて、亜硝酸より更に分解されたと考えられることから陽性と判定した¹²⁴⁾。

6) アデニン、チロシン、キサンチンおよびハイポキサンチン分解の判定法

基礎培地 (ペプトン 5 g, 牛肉エキス 3 g, 寒天 15 g, 蒸留水 1,000 ml, pH 7.0) にそれぞれアデニン 5 g, チロシン 5 g, キサンチン 4 g, ハイポキサンチン 5 g を加え、結晶を均一に浮遊させて平板に固め、供試菌株の孢子懸濁

液を接種後、25°Cで14日間培養し、菌そうの周囲および下部の結晶が溶解した場合を陽性と判定した¹²⁴⁾。

7) 炭素源の利用および分解の判定法

プリドハム・ゴトリーブ基礎寒天培地 (ISP 培地 No. 9)¹⁴³⁾ を溶解し、60°Cに保った後、Table 4 に示すミリポアフィルターで除菌した23種類の炭素源の10%溶液を最終濃度が1%となるように1/10量加え、よく混和して平板とした。洗浄した供試菌株の孢子懸濁液を塗抹接種し、25°Cで14日間培養後、基礎培地上での生育を陰性対照、D-グルコースを加えた培地上での生育を陽性対照として

判定した¹²⁴⁾。

結 果

供試菌株の各種生理的性質を Table 10 に示した。

1) メラニン様色素の生成

佐賀県で分離された *Streptomyces* 属菌のなかで、孢子鎖がらせん状のS型菌22菌株、長崎、広島、茨城の各県および北海道で分離されたS型菌5菌株の計27菌株はすべて、ISP 培地 No. 6 および ISP 培地 No. 7 上でメラニン様色素を生成する chromogenic type であった。これに

Table 10. Physiological properties of *Streptomyces* spp., causal pathogens of potato scab

| Characteristics | Isolate from potato | | Isolate from sugar beet | | ATCC 3352 | ATCC 10246 |
|----------------------------------|-----------------------------|------------|-------------------------|-----------|-----------|------------|
| | S-type | RF-type | S-12 (S) | S-15 (RF) | | |
| Melanin formation | | | | | | |
| on ISP medium No. 6 | + | - | + | - | - | - |
| on ISP medium No. 7 | + | - | + | - | - | - |
| Decomposition of : | | | | | | |
| Adenine | +24/26, -2/26 ^{a)} | + | + | - | - | - |
| Tyrosine | +25/26, -1/26 | +4/5, -1/5 | + | + | + | + |
| Xanthine | - | - | - | - | + | + |
| Hypoxanthine | +24/26, -2/26 | +2/5, -3/5 | + | + | + | + |
| Urea | +22/26, -4/26 | + | - | + | + | + |
| Casein | + | + | + | + | + | + |
| Starch hydrolysis | + | + | + | + | + | + |
| Nitrate reduction | + | +2/5, -3/5 | + | - | + | - |
| Utilization of | | | | | | |
| D-Glucose | + | + | + | + | + | + |
| D-Xylose | + | + | + | + | + | + |
| L-Arabinose | + | + | + | + | + | + |
| Rhamnose | + | + | + | + | + | - |
| D-Fructose | + | + | + | + | + | + |
| D-Galactose | + | + | + | + | + | + |
| Raffinose | + | +4/5, -1/5 | + | + | - | - |
| Melibiose | + | + | + | + | - | - |
| D-Mannitol | + | + | - | + | + | + |
| <i>i</i> -Inositol | + | + | + | + | - | - |
| Glycerol | + | + | + | + | + | + |
| D-Mannose | + | + | + | + | + | + |
| Salicin | + | + | + | + | - | + |
| Lactose | + | + | + | + | + | + |
| Sucrose | + | + | + | + | + | + |
| D-Dulcitol | - | - | - | - | - | - |
| Adonitol | - | - | - | - | - | - |
| <i>meso</i> -Erythritol | - | - | - | - | - | - |
| Maltose | + | + | + | + | + | + |
| α - <i>m</i> -D-Glucoside | - | + | - | - | - | - |
| Trehalose | +25/26, -1/26 | + | - | + | - | + |
| L-Sorbose | - | - | - | - | - | - |
| D-Sorbit | - | - | - | - | - | - |

a) + : positive, - : negative, +24/26 : positive 24 isolates /26 isolates tested.

対して、佐賀県および北海道で分離された孢子鎖が直〜波状の RF 型菌 6 菌株および ATCC 3352, ATCC 10246 はメラニン様色素を生成しなかった。

2) スターチの加水分解

供試した S 型菌 27 菌株, RF 型菌 6 菌株および ATCC 3352, ATCC 10246 の全 35 菌株はすべてスターチを分解した。

3) カゼインの分解

長崎県で分離された NS-2 を除き, S 型菌 26 菌株, RF 型菌 6 菌株および ATCC 3352, ATCC 10246 はすべてカゼインを分解した。

4) 尿素の分解

S 型菌 27 菌株のなかで, 24 菌株は尿素の分解が認められたが, 佐賀県の S-121, 長崎県の NS-2, 広島県の HS-5, 北海道の S-12 の計 4 菌株での分解は認められず, S 型菌株群のなかでも菌株によって差がみられた。RF 型菌の 6 菌株すべて, および ATCC 3352, ATCC 10246 は尿素を分解した。

5) 硝酸塩の還元

S 型菌 27 菌株はすべて硝酸塩を還元した。RF 型菌のなかで S-51 および S-411 の 2 菌株は硝酸塩を還元したが, S-15, S-18, S-151 および S-173 の 4 菌株では硝酸塩の還元は認められず, 菌株間に差がみられた。また, ATCC 3352 は還元し, ATCC 10246 では認められなかった。

6) アデニン, チロシン, キサンチンおよびハイポキサンチンの分解

アデニンの分解は S 型菌の S-11 および S-241 の 2 菌株を除いて他の S 型菌, RF 型菌および ATCC 3352, ATCC 10246 の計 33 菌株で認められた。

チロシンの分解は S 型菌の NS-2 および RF 型菌の S-411 の計 2 菌株を除く他の S 型菌, RF 型菌および ATCC 3352, ATCC 10246 の計 33 菌株で認められた。

キサンチンは ATCC 3352 および ATCC 10246 の 2 菌株で分解されたが, 他の菌株での分解は認められなかった。

ハイポキサンチンの分解は S 型菌のなかで NS-2 および HS-5 の 2 菌株を除く 25 菌株で認められた。RF 型菌では 6 菌株のなかの 3 菌株で分解が認められたが, 他の 3 菌株では分解されず, 菌株によって差が認められた。ATCC 3352 および ATCC 10246 の 2 菌株はともに分解した。

7) 炭素源の利用

S 型菌 27 菌株は D-グルコース, D-キシロース, L-アラビノース, ラムノース, D-フルクトース, ラフィノース, メリビオース, *i*-イノシトール, グリセロール, D-

マンノース, ラクトースおよびシュクロースを強く利用した。サリシンについては強く利用する 8 菌株と弱く利用する 19 菌株に分かれ, 菌株によって利用程度に差がみられた。マルトースおよびトレハロースを大部分の菌株は強く利用したが, マルトースでは A-820 および HS-7 の 2 菌株が利用せず, トレハロースでは A-820 および S-12 が利用しなかった。D-マンニトールについてはジャガイモからの分離菌はすべて強く利用したが, テンサイからの分離菌である S-12 は利用しなかった。D-グルシトール, アドニトール, *meso*-エリトリトール, L-ソルボース, D-ソルビットについてはすべての菌株が利用しなかった。

RF 型菌 6 菌株のなかで, ジャガイモから分離された 5 菌株は D-グルコース, D-キシロース, L-アラビノース, ラムノース, D-フルクトース, D-ガラクトース, メリビオース, D-マンニトール, *i*-イノシトール, グリセロール, D-マンノース, サリシン, ラクトース, シュクロース, マルトース, α -メチル-D-グルコシド, トレハロースを強く利用した。ラフィノースについては S-18, S-151, S-173 および S-411 の 4 菌株が利用し, S-51 は利用せず, 菌株によって差がみられた。テンサイから分離した S-15 はジャガイモからの分離菌が利用する 16 種類の炭素源のなかのラフィノースを強く利用したが, マルトースおよび α -メチル-D-グルコシドは利用せず, RF 型菌のなかでもジャガイモからの分離菌とテンサイからの分離菌とではこれら 3 種類の炭素源の利用能において違いが認められた。

第6節 DNA の相同性

放線菌の分類には形態が重要視されており, 第3節に示すようにジャガイモにそうか病斑を形成する *Streptomyces* 属菌は孢子鎖の形態から 2 群に大別された。しかし, 形態は絶対的な分類基準とはなり得ない場合もあり^{179,185,186)}, 培養的性質および生理的性質については第4節および第5節に示すように両者間に顕著な差異は認められなかった。そこで, 分子生物学的分類法の一つとして用いられており, 種以下のレベルの分類に適している DNA-DNA 相同性^{38,71)} を指標とした菌株の類別を試みた。

材料および方法

1) DNA の抽出

ジャガイモにそうか病斑を形成する 9 菌株と ATCC 3352 の計 10 菌株を供試し, その菌体から全 DNA を抽出した。全 DNA の抽出は Fig. 3 に示すように, Marmur の方法⁹⁹⁾ に改良を加えて行った。抽出後, ³H 標識に用い

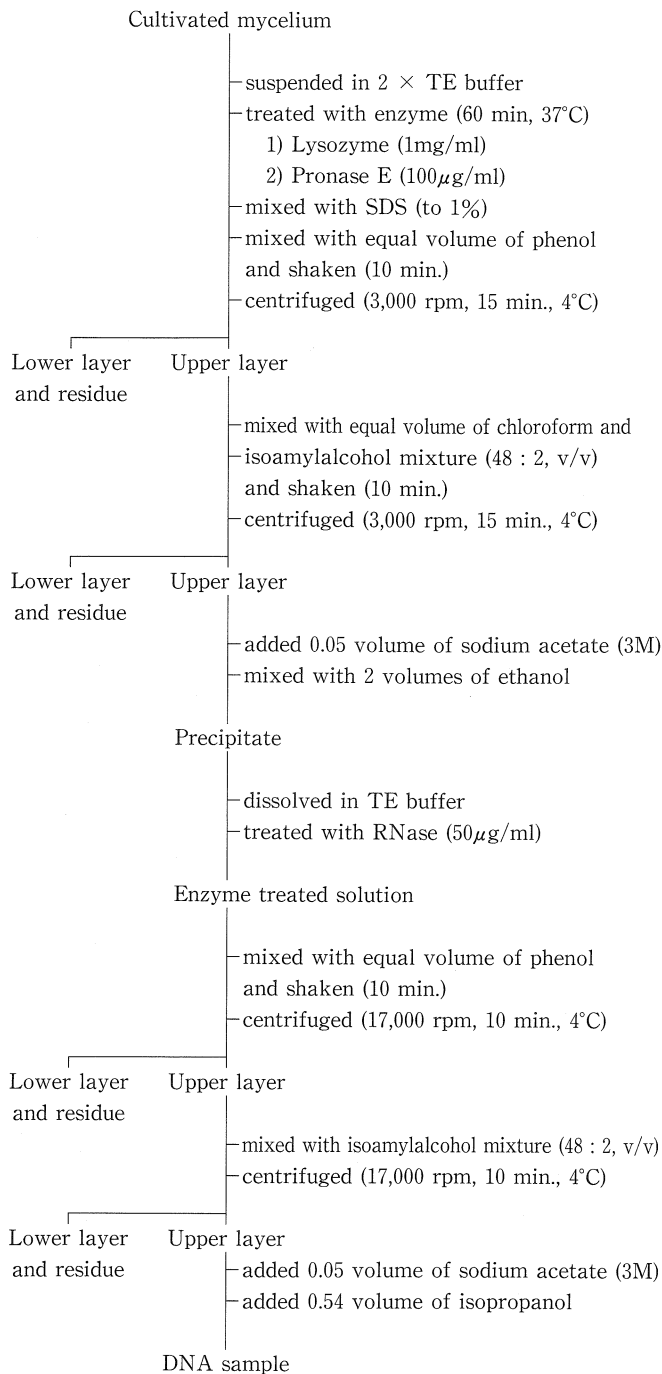


Fig. 3. Procedure for extraction of DNA from *Streptomyces* isolate.

る DNA は TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) に溶解して 48 時間透析した。無標識 DNA は 0.42 M NaCl に溶解して同様に 48 時間透析した。

2) ニックトランスレーションによる DNA の ³H 標識
Maniatis らの方法⁹⁷⁾ に従い、TE 緩衝液に溶解した DNA を Amersham International plc (Amersham, UK.) の Nick Translation Kit N. 5000 と deoxy [1', 2', 5-3

H] cytidine 5'-triphosphate ammonium salt を用いて、ニックトランスレーションによる DNA の ³H 標識を行った。反応の停止は 0.2 M EDTA (pH 8.0) 10 µl を加えることによって行い、TE 飽和フェノールで除タンパク処理を行った。処理後、水層を Sephadex G-50 カラム (0.7 × 10 cm) に通し、TE 緩衝液で溶出して放射能活性の最も高い画分を集めて ³H 標識 DNA を分離した。

3) S1 ヌクレアーゼ法による DNA-DNA 相同性の測定

DNA-DNA の相同値は Barth and Grinter の S1 ヌクレアーゼ法⁹⁾ によって求めた。すなわち、ニックトランスレーションによって ³H 標識した DNA と無標識 DNA を超音波処理によって約 300 塩基対に切断し、キャップ付きのポリプロピレン製チューブに ³H 標識 DNA 0.05 µl, 無標識 DNA 20 µl および 0.42 M NaCl 0.4 ml を加え、この混合液を 10 分間煮沸することにより DNA を熱変性させて 1 本鎖 DNA とし、ただちに 65°C で 40 時間反応させて DNA-DNA 交雑を行った。交雑終了後、S1 緩衝液 600 µl (50 mM 酢酸ナトリウム pH 4.8, 1.67 mM ZnSO₄, 超音波処理による切断後熱変性させたサケ精巢 DNA 33 µg/ml) を加え反応を停止させ、さらに、5 U の S1 エンドヌクレアーゼを加え 65°C で 30 分間反応させて交雑しなかった 1 本鎖 DNA を分解した。冷却した 10% トリクロロ酢酸 (TCA) を 1 ml 加えて反応を停止させ、チューブを 0°C に 30 分間保持し、交雑した DNA を沈澱させた。沈澱した DNA をよく攪はんした後、CF/C フィルター (Whatman, 径 25 mm) 上に真空吸引して集め、10 ml の 20 mM チミンを含む 5% TCA で 2 回、2.5 ml のアセトンで 1 回、それぞれ洗浄し、65°C で 30 分間乾燥後、このフィルターを 10 ml のシンチレーション溶液を分注したバイアルに入れ、液体シンチレーションカウンター (Aloka LSC-673) で交雑した DNA 量を測定した。実験は 3 回反復で行い、結果はその平均値で示した。

結 果

各菌株から DNA を抽出して DNA-DNA 交雑を行い、その相同値を比較した結果を Table 11 に示した。ジャガイモそうか病から分離された S 型菌と RF 型菌、テンサイそうか病から分離された S 型菌 (S-12) と RF 型菌 (S-15) のこれら 4 者間における DNA-DNA 相同値は 12~41% でその値は低く、一方、ジャガイモそうか病から分離された S 型菌 6 菌株間の DNA-DNA 相同値は 64% 以上でその値は高かった。対照として用いた ATCC 3352 とジャガイモおよびテンサイのそうか病から分離された各菌株との DNA-DNA 相同値は 13~29% と極めて低かった。

Table 11. Degree of DNA-DNA homology among *Streptomyces* spp., causal pathogens of potato scab

| Isolation source | Unlabeled DNA | ³ H labeled DNA | | | | |
|--------------------|----------------|----------------------------|-------|------|------|------|
| | | S-131 | S-851 | S-51 | S-12 | S-15 |
| Potato common scab | SN-1 (S-type) | 92 | 84 | 14 | 36 | 30 |
| | SN-2 (S-type) | 86 | 84 | 15 | 27 | 27 |
| | SH-1 (S-type) | 91 | 66 | 12 | 32 | 26 |
| | A-820 (S-type) | 79 | 83 | 17 | 40 | 30 |
| | S-131 (S-type) | 100 | 87 | 14 | 38 | 36 |
| | S-851 (S-type) | 84 | 100 | 14 | 38 | 27 |
| | S-51 (RF-type) | 23 | 21 | 100 | 24 | 25 |
| Sugar beet scab | S-12 (S-type) | 41 | 29 | 15 | 100 | 31 |
| | S-15 (RF-type) | 34 | 14 | 14 | 28 | 100 |
| | ATCC 3352 | 29 | 13 | 15 | 25 | 28 |

a) DNA-DNA homology values were expressed as percentages of the isohomologous reassociation value taken as 100.

第7節 Type strain との比較

佐賀県で見出されたそうか病の病原菌であるS型菌およびRF型菌と Lambert らが基準種を提出して種名を復活させた *Streptomyces scabies*⁷²⁾ および新種として提案した強耐酸性のそうか病菌 *S. acidiscabies*⁷³⁾ とを形態および生理的性質について比較した。

材料および方法

1) 供試菌株

佐賀県で分離されたS型菌9菌株とRF型菌10菌株に、*S. scabies* (ATCC 49173) と *S. acidiscabies* (ATCC 49003) を加えた計21菌株を供試した。

2) 形態および生理的性質の調査

胞子の色および胞子鎖の形態については、アルブミン寒天培地を用いて、Shirling らの方法¹⁴³⁾ に従って観察した。

3) 生理的性質の調査

本節における生理的性質の調査項目は既知種である *S. scabies* および *S. acidiscabies* の記載と比較するために Lambert らが用いた方法^{72,73)} に従った。すなわち、メラニン様色素生産能は Shirling らの方法¹⁴³⁾ に従いペプトン・イースト・鉄寒天培地 (ISP 培地 No. 6) およびチロシン寒天培地 (ISP 培地 No. 7) で調べた。炭素源の利用は Pridham ら¹³¹⁾ の方法に、窒素源の利用、ポリガラクトン酸およびキサンチン、キシランの資化性および生育阻害物質耐性能は Williams らの方法¹⁸⁵⁾ に従って行った。

4) 低 pH 域における生育限界の調査

低 pH 域での生育限界は Williams らの方法¹⁸⁵⁾ に準じて調べた。すなわち、高圧蒸気滅菌処理した 50 mM リン酸 2 カリウムと濾過滅菌した 50 mM コハク酸を pH 6.0

になるように無菌的に混合し、この溶液と高圧蒸気滅菌した Williams らの基礎液体培地を 4 : 1 の比率で混合した。この溶液に水酸化ナトリウムまたは塩酸溶液を加えて、pH 3.5~6.0 の領域を 0.5 pH 間隔に調整した。この培地に供試菌株の胞子懸濁液を接種し、25°C で 5~7 日間培養して生育の有無を確認した。

結 果

供試菌株の形態および生理的性質について調査した結果を Table 12 に示した。

1) 胞子鎖の形態および胞子の色調

S型菌はらせん状の、RF型菌は直~波状の胞子鎖を形成した。胞子の表面構造はともに平滑、胞子の色調はS型菌で灰色、RF型菌では白色であった。これらの形質はS型菌が *S. scabies* に、RF型菌が *S. acidiscabies* に一致した。

2) 色素産生

S型菌および *S. scabies* は ISP 培地 No. 6 および No. 7 上でメラニン様色素を生成した。これに対して、RF型菌および *S. acidiscabies* ではメラニン様色素の生成は認められなかった。

3) 炭素源および窒素源の利用ならびにその他有機化合物の分解

S型菌は供試した10種類の炭素源の中で、 α -メチル-D-グルコシドを除くL-アラビノース、D-フルクトース、D-グルコース、D-マンニトール、ラフィノース、ラムノース、シュクロース、D-キシロース、*meso*-イノシトールの9種類の炭素源を利用し、*S. scabies* と一致した。一方、RF型菌はラフィノースの利用能について菌株による違いがみられたが、他の炭素源についてはすべて利用することから *S. acidiscabies* と一致した。窒素源についてはL-ヒドロキシプロリン、L-メチオニンとともにすべての菌株が利用し、差は認められなかった。アルブチンはすべての菌株で利用され、ポリガラクトン酸はS型菌は利用しなかったが、他の菌株はすべて利用した。キサンチンはすべての菌株で利用せず、キシランについてはRF型菌以外の菌株が利用した。

4) 低 pH 域における生育限界の調査

S型菌と *S. scabies* は pH 5.0 以上で生育したが、RF型菌は pH 3.5 まで、*S. acidiscabies* では pH 4.0 まで生育し、低 pH 域での生育が良好であった。

5) 生育阻害物質に対する耐性

① 食塩耐性

すべての菌株で6%までは耐性で、7%では生育せず、差は認められなかった。

Table 12. Comparison of physiological properties of *Streptomyces* spp., causal pathogens of potato scab isolated from Saga Pref. and those of type strains

| Characteristics | Isolates from Saga Pref. | | <i>S. scabies</i> | <i>S. acidiscabies</i> |
|---------------------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------|------------------------|
| | S-type | RF-type | ATCC 49173 | ATCC 49003 |
| Spore color | Grey | White | Grey | White |
| Spore chain | Spiral | Rectiflexuous | Spiral | Rectiflexuous |
| Spore ornamentation | Smooth | Smooth | Smooth | Smooth |
| Pigment on PYIA (ISP No. 6) | + | - | + | - |
| Melanin on TA (ISP No. 7) | + | - | + | - |
| Carbon usage | | | | |
| L-Arabinose | + | + | + | + |
| D-Fructose | + | + | + | + |
| D-Glucose | + | + | + | + |
| D-Mannitol | + | + | + | + |
| Raffinose | + | +8/10, -2/10 ^{a)} | + | - |
| Rhamnose | + | + | + | + |
| Sucrose | + | + | + | + |
| D-Xylose | + | + | + | + |
| meso-Inositol | + | + | + | + |
| α -D-Glucoside | - | + | - | + |
| Nitrogen usage | | | | |
| L-Hydroxyproline | + | + | + | + |
| L-Methionine | + | + | + | + |
| Degradation of : | | | | |
| Arubutin | + | + | + | + |
| Polygalacturonate | - | + | + | + |
| Xanthine | - | - | - | - |
| Xylan | + | - | + | + |
| Minimum growth pH | 5.0 | 3.5 | 5.0 | 4.0 |
| Growth with : | | | | |
| 5%NaCl | + | + | + | + |
| 6%NaCl | + | + | + | + |
| 7%NaCl | - | - | - | - |
| Thallium (10 μ g/ml) | + | + | + | + |
| Thallium (100 μ g/ml) | - | - | - | - |
| Crystal violet (0.5 μ g/ml) | + | + | - | + |
| Crystal violet (1.0 μ g/ml) | + | + | - | + |
| Phenol (0.1%) | - | + | - | + |
| Penicillin (10IU/ml) | + | + | - | + |
| Oleandomycin (25 μ g/ml) | + | + | + | + |
| Oleandomycin (100 μ g/ml) | - | + | - | + |
| Streptomycin (20 μ g/ml) | + | + | - | + |

a) + : positive, - : negative, +8/10 : positive 8 isolates/10 isolates tested.

- ② タリウム耐性
すべての菌株で 10 μ g/ml までは耐性で、100 μ g/ml では生育せず、差は認められなかった。
- ③ クリスタルバイオレット耐性
S 型菌, RF 型菌, *S. acidiscabies* は 0.5 μ g/ml, 1.0

μ g/ml ともに耐性であったが、*S. scabies* は 0.5 μ g/ml でも生育しなかった。

④ フェノール耐性

RF 型菌および *S. acidiscabies* は 0.1% で生育したが、S 型菌および *S. scabies* の生育は認められなかった。

⑤ ペニシリン耐性

S. scabies 以外のすべての菌株が 10 IU/ml で生育した。

⑥ オレアンドマイシン耐性

25 $\mu\text{g/ml}$ ではすべての菌株が生育し、差は認めなかったが、100 $\mu\text{g/ml}$ では RF 型菌および *S. acidiscabies* が耐性であったのに対して、S 型菌および *S. scabies* は生育しなかった。

⑦ ストレプトマイシン耐性

S. scabies を除くすべての菌株が 20 $\mu\text{g/ml}$ で生育した。

以上のように、RF 型菌では供試したすべての生育阻害物質に対する反応が *S. acidiscabies* と一致した。S 型菌と *S. scabies* はペニシリン (10 IU/ml) とストレプトマイシン (20 $\mu\text{g/ml}$) に対する反応で一致しなかったが、他の生育阻害物質については同一の反応を示した。

第8節 病原菌の 16 S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列

リボソーム RNA は全生物に普遍的に存在し¹²⁶⁾、微生物の進化、系統研究に有効な分子マーカーとして使用されている^{47,126)}。このうち、16 S リボソーム RNA は細菌の分類・同定に応用されている^{38,130,137,139)}。第4節および第5節においていろいろの指標、すなわち、培養的性質および生理・生化学的性質についてジャガイモそうか病を引き起こす各菌株間の差異の検討を行ってきたが、これらの性質は多数の表現形質の中のごく一部に過ぎず、培養条件によってその結果は一致しない場合があり、さらに判定が実験者の経験に左右されたり、主観が入りやすいという欠点があった¹¹²⁾。これに対して、16 S リボソーム RNA はすべての細菌が持っている生物にとって必須の共通の機能を担っている、塩基の置換速度が極めて遅く塩基配列の原型がよく保存されている、水平伝達がない等の特徴があり、生物間の系統関係を知る分子時計として最も優れているとされている^{38,126)}。このため、現在の細菌の分類体系は 16 S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列に基づいている。さらに、16 S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列は一義的な情報であるために対照実験が不要であり、解釈が客観的に行えるという利点がある。そこで、本節ではジャガイモそうか病の病原菌について、その 16 S リボソーム RNA 遺伝子の部分塩基配列を比較し、種の同定の資料とした。

材料および方法

1) 全 DNA の抽出

孢子鎖の形態が直～波状の、強酸性土壌においても本病を引き起こす病原菌 (RF 型菌) である S-31 と S-173、

および孢子鎖の形態がらせん状の病原菌 (S 型菌) である S-851 の計 3 菌株を供試し、その菌体から全 DNA を抽出した。全 DNA の抽出は第6節で示したように、Marmur の方法⁹⁹⁾ に改良を加えて行った。

2) PCR 反応による 16 S リボソーム RNA 遺伝子の増幅

抽出した全 DNA を鋳型として、PCR 法によって 16 S リボソーム RNA 遺伝子の増幅を行った。プライマーには真正細菌を通じて高度に保存されている領域を基に設計された 27f プライマー (5-AGATTTGATC(CA)TGGCTCAG)³⁵⁾ と 1492r プライマー (5-TACGG(CT)TACCTTGTTACGACTT)³⁵⁾ を使用した。反応は以下の系で行った。PCR 反応には KOD ポリメラーゼ (TOYOBO, Japan) を用いた。

〈シーケンス反応液の組成〉

| | |
|---|-------------------------------------|
| Total DNA | 1 μl (<1 μg) |
| 10 \times buffer (for KOD) | 10 μl |
| 27 f-primer (10 pmol/ μl) | 8 μl |
| 1492 r-primer (10 pmol/ μl) | 8 μl |
| dNTP mix (2 mM each) | 10 μl |
| KOD polymerase | 1 μl |
| Sterilized distilled water | 62 μl |
| Total | 100 μl |

〈サイクル反応プログラム〉

| | |
|-------------|-----------|
| 95°C 3 min | 1 cycle |
| ↓ | |
| 95°C 30 sec | 30 cycles |
| 55°C 30 sec | |
| 72°C 30 sec | |
| ↓ | |
| 72°C 2 min | 1 cycle |

3) PCR 産物の精製

PCR 産物を電気泳動した結果、エキストラバンドが存在したため、以下のようにして精製を行った。すなわち、PCR 産物をアガロースゲル (0.8%) で電気泳動後、目的のサイズのバンド (約 1.4 kb) を切り出した。切り出したゲルから、GeneClean II kit (BIO 101, USA) を用いてガラスパウダー法によって DNA を回収し、精製した。

4) 16 S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列の決定

塩基配列の決定は、精製した PCR 産物を鋳型としたダイレクトシーケンシングによって行った。プライマーには

27f プライマー (5-AGATTTGATC (CA) TGGCTCA G)³⁵⁾ と 519r プライマー (5-G(AT)ATTACCGCGGC (GT)TG)³⁵⁾ を使用した。シーケンス反応は蛍光基質を用いたダイターミネーター法 (dye terminator method)¹⁵⁶⁾ により行い、電気泳動と解析は、DNA シークエンサー DSQ-2000 L (島津製作所、日本) を用いて行った。これにより、大腸菌の 16 S リボソーム RNA 遺伝子のナンバリングで 32 から 530 の領域の塩基配列を決定した。

5) 塩基配列に基づく系統樹の作成

得られた塩基配列について、データベース (DDBJ: DNA Data Bank of Japan, 国立遺伝学研究所) を用いて相同性検索を行い、*Streptomyces* 属菌のなかで相同性の高い配列データを選択した。また、*Streptomyces* 属菌の代表的な種の 16 S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列を任意に選択した。これらの配列について、GENETIX-MAC (日本ソフトウェア開発) を用いてアラインメントを行った。さらに、肉眼によってアラインメントの補正を行い、それを基に、近隣結合法 (Neighbor-Joining method)¹³³⁾ によって系統樹を作成した。

結 果

佐賀県で分離されたジャガイモそうか病菌である *Streptomyces* 属菌 S-31, S-173 および S-851 の 16 S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列を決定し、Fig. 4 に示した。孢子鎖の形態が直〜波状の菌株 (RF 型菌) である S-31 と S-173 の塩基配列は同一で、強酸性土壌においても強い病原性を有する *S. acidiscabies* の type strain ATCC 49003 の塩基配列¹⁵⁴⁾ と完全に一致した。一方、孢子鎖の形態がらせん状の菌株 (S 型菌) である S-851 については *S. scabies* の type strain ATCC 33282 および ATCC 49173 の塩基配列¹⁵⁴⁾ と完全に一致した。

次に、16 S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列データに基づき、近隣結合法を用いて作成した分子系統樹を Fig. 5 に示した。本系統樹上ではジャガイモそうか病の病原菌である *S. scabies* (ATCC 33282, ATCC 49173, S-851), *S. acidiscabies* (ATCC 49003, S-31, S-173) および *S. turgidiscabies* はお互いに離れたクラスターを形成した。

第 9 節 考 察

これまで、ジャガイモそうか病の病原菌については Thaxter¹⁷⁰⁾ が *Oospora scabies* と記載し、その後、種名が *Streptomyces scabies* と変更¹¹⁾ された病原菌以外に、複数の *Streptomyces* 属菌がその病原として存在している可能性のあることが指摘されてきた。すなわち、Millard ら¹⁰⁷⁾

はジャガイモそうか病の各種病斑から 24 株の放線菌を分離し、そのうちの 19 種を新種として命名して、11 種に病原性を認めている。また、Corbaz¹⁷⁾ は *S. scabies* が本病の主な病原ではあるが、*S. griseus*, *S. aureofaciens* および *S. flaveolus* も弱い病原性を有しているとし、Bonde ら¹⁰⁾ は強酸性の土壌でも発生する *Streptomyces* sp. を報告している。さらに、Elesawy ら²⁸⁾ は本病原菌の type strain および neotype strain として *S. scabies* と *S. scabies* var. *achromogenes* var. nov を提案し、Dey ら²⁴⁾ は *S. griseus*, *S. longisporoflavus*, *S. colinus* および *S. cinereus* の 4 種が本病の病原菌であるとしている。他に、Krasil'nikov ら⁶⁸⁾ は 9 種の *Streptomyces* 属菌が本病を引き起こすとしており、また、本病には *S. albus*, *S. lavendulae*, *S. griseus* および *S. diastaticus* が関与している³⁷⁾ ともいわれている。一方、我が国において阿部ら¹⁾ は、テンサイそうか病の病原菌としている 4 種の *Streptomyces* 属菌がジャガイモそうか病の病原菌でもあると報告しており、また、鈴木ら¹⁵¹⁾ は北海道において形態および生理的性質の異なる 2 群の病原 *Streptomyces* 属菌を明らかにしている。

これに対して、Hoffman⁴⁸⁾ は病斑部から 12 種類の *Streptomyces* 属菌が分離されたが、そのうち、*S. scabies* のみに病原性が認められたとしている。また、品種抵抗性の違いから Leach ら⁸⁴⁾ は *Streptomyces scabies* に 2 種類のレース、Thomas¹⁷¹⁾ は 6 種類のレースが存在することを報告している。

このように、多くの *Streptomyces* 属菌が病原菌として記載され、ジャガイモそうか病の病原放線菌の分類学的所屬については不明確のままとなっていたが、1989 年に Lambert ら⁷²⁾ が 1974 年以降は不確定種とされてきた種名である *Streptomyces scabies* を復活させ、さらに、*Streptomyces acidiscabies* を新種として提案した⁷³⁾。その後、Miyajima ら¹¹⁰⁾ は北海道で発生しているジャガイモそうか病から病原 *Streptomyces* 属菌を分離して新種であることを認め、*Streptomyces turgidiscabies* と命名した。また、Goyer ら⁴⁰⁾ は deep scab の病原菌として *Streptomyces cavi-scabies* を提案している。

本研究において、ジャガイモにそうか病斑を形成する供試菌株はすべて細胞壁タイプ I 型であることから *Streptomyces* 属に所屬しており、孢子鎖の形態から少なくとも 2 群の *Streptomyces* 属菌に分けることができるものと考えられた。しかし、気中菌糸の色調および一部の生理的性質を除いてはこれらの菌群間の相異が判然としなかった。

すなわち、ジャガイモそうか病から分離された S 型菌と RF 型菌の生理的性質を比較すると、S 型菌はメラニン様

色素の生成+, α -メチル-D-グルコシドの利用性-であるのに対して, RF 型菌はメラニン様色素の生成-, α -メチル-D-グルコシドの利用性+であり, この2項目についてのみ明瞭な差異が認められたが, 他の項目についての差は判然としなかった。同時に比較したテンサイそうか病から分離されたS型菌 (S-12) はD-マンニトールの利用性

が-である点を除いてジャガイモから分離されたS型菌とその生理的性質は一致した。一方, テンサイそうか病から分離されたRF型菌 (S-15) はメラニン様色素の生成-, 硝酸塩の還元-の2項目を除きその生理的性質はジャガイモから分離されたS型菌と一致した。このように, 我が国のジャガイモおよびテンサイのそうか病から分離される病

| | | |
|----------------------------------|---|----|
| <u>S-31</u> | 1 AACGCTGGCG GCGTGCCTAA CACATGCAAG TCGAACGATG AAGCC-CTTC GGGGTGG-AT | 58 |
| <u>S-173</u> | 1 | 58 |
| <u>S. acidiscabies ATCC49003</u> | 1 | 58 |
| <u>S-851</u> | 1 | 58 |
| <u>S. scabies ATCC33282</u> | 1 | 58 |
| <u>S. scabies ATCC49173</u> | 1 | 58 |
| <u>S. bototropensis</u> | 1 | 58 |
| <u>S. vellosus</u> | 1 | 60 |
| <u>S. hygroscopicus</u> | 1 | 58 |
| <u>S. coelicolor</u> | 1 | 60 |
| <u>S. turgidiscabies</u> | 1 | 58 |
| <u>S. lavendulae</u> | 1 | 58 |
| <u>S. subrutilus</u> | 1 | 58 |
| <u>S. griseus</u> | 1 | 58 |

| | | |
|----------------------------------|--|-----|
| <u>S-31</u> | 59 TAGTGGCGAA CGGGTGAGTA ACACGTGGGC AATCTGCCCT TCACTCTGGG ACAAGCCCTG | 118 |
| <u>S-173</u> | 59 | 118 |
| <u>S. acidiscabies ATCC49003</u> | 59 | 118 |
| <u>S-851</u> | 59 | 118 |
| <u>S. scabies ATCC33282</u> | 59 | 118 |
| <u>S. scabies ATCC49173</u> | 59 | 118 |
| <u>S. bototropensis</u> | 59 | 118 |
| <u>S. vellosus</u> | 61 | 120 |
| <u>S. hygroscopicus</u> | 59 | 118 |
| <u>S. coelicolor</u> | 61 | 120 |
| <u>S. turgidiscabies</u> | 59 | 118 |
| <u>S. lavendulae</u> | 59 | 118 |
| <u>S. subrutilus</u> | 59 | 118 |
| <u>S. griseus</u> | 59 | 118 |

| | | |
|----------------------------------|--|-----|
| <u>S-31</u> | 119 GAAACGGGGT CTAATACCG ATATCACTCC TGCTGCATG GCGGGGGTC G-AAAGCTCC | 177 |
| <u>S-173</u> | 119 | 177 |
| <u>S. acidiscabies ATCC49003</u> | 119 | 177 |
| <u>S-851</u> | 119 | 178 |
| <u>S. scabies ATCC33282</u> | 119 | 178 |
| <u>S. scabies ATCC49173</u> | 119 | 178 |
| <u>S. bototropensis</u> | 119 | 178 |
| <u>S. vellosus</u> | 121 | 180 |
| <u>S. hygroscopicus</u> | 119 | 177 |
| <u>S. coelicolor</u> | 121 | 179 |
| <u>S. turgidiscabies</u> | 119 | 177 |
| <u>S. lavendulae</u> | 119 | 177 |
| <u>S. subrutilus</u> | 119 | 177 |
| <u>S. griseus</u> | 119 | 177 |

| | | |
|----------------------------------|--|-----|
| <u>S-31</u> | 178 GCGGGTGAAG GATGAGCCCG CGGCCTATCA GCTTGTGGT GAGGTAATGG CTCACCAAGG | 237 |
| <u>S-173</u> | 178 | 237 |
| <u>S. acidiscabies ATCC49003</u> | 178 | 237 |
| <u>S-851</u> | 179 | 238 |
| <u>S. scabies ATCC33282</u> | 179 | 238 |
| <u>S. scabies ATCC49173</u> | 179 | 238 |
| <u>S. bototropensis</u> | 179 | 238 |
| <u>S. vellosus</u> | 181 | 240 |
| <u>S. hygroscopicus</u> | 178 | 237 |
| <u>S. coelicolor</u> | 180 | 239 |
| <u>S. turgidiscabies</u> | 178 | 237 |
| <u>S. lavendulae</u> | 178 | 237 |
| <u>S. subrutilus</u> | 178 | 237 |
| <u>S. griseus</u> | 178 | 237 |

| | | |
|---|---|-----|
| <u>S-31</u> | 238 CGACGACGGG TAGCCGGCCT GAGAGGGCGA CCGGCCACAC TGGGACTGAG ACACGGCCCA | 297 |
| <u>S-173</u> | 238 | 297 |
| <u><i>S. acidiscabies</i> ATCC49003</u> | 238 | 297 |
| <u>S-851</u> | 239 | 298 |
| <u><i>S. scabies</i> ATCC33282</u> | 239 | 298 |
| <u><i>S. scabies</i> ATCC49173</u> | 239 | 298 |
| <i>S. bottropensis</i> | 239 | 298 |
| <i>S. vellosus</i> | 241 | 300 |
| <i>S. hygroscopicus</i> | 238 | 297 |
| <i>S. coelicolor</i> | 240 | 299 |
| <i>S. turgidiscabies</i> | 238 | 297 |
| <i>S. lavendulae</i> | 238 | 297 |
| <i>S. subbrutilus</i> | 238 | 297 |
| <i>S. griseus</i> | 238 | 297 |
| | | |
| <u>S-31</u> | 298 GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGAATA TTGCACAATG GCGGAAGCC TGATGCAGCG | 357 |
| <u>S-173</u> | 298 | 357 |
| <u><i>S. acidiscabies</i> ATCC49003</u> | 298 | 357 |
| <u>S-851</u> | 299 | 358 |
| <u><i>S. scabies</i> ATCC33282</u> | 299 | 358 |
| <u><i>S. scabies</i> ATCC49173</u> | 299 | 358 |
| <i>S. bottropensis</i> | 299 | 358 |
| <i>S. vellosus</i> | 301 | 360 |
| <i>S. hygroscopicus</i> | 298 | 357 |
| <i>S. coelicolor</i> | 300 | 359 |
| <i>S. turgidiscabies</i> | 298 | 357 |
| <i>S. lavendulae</i> | 298 | 357 |
| <i>S. subbrutilus</i> | 298 | 357 |
| <i>S. griseus</i> | 298 | 357 |
| | | |
| <u>S-31</u> | 358 ACGCCGCGTG AGGGATGACG GCCTTCGGGT TGTAACCTC TTTCAGCAGG GAAGAAGCGA | 417 |
| <u>S-173</u> | 358 | 417 |
| <u><i>S. acidiscabies</i> ATCC49003</u> | 358 | 417 |
| <u>S-851</u> | 359 | 418 |
| <u><i>S. scabies</i> ATCC33282</u> | 359 | 418 |
| <u><i>S. scabies</i> ATCC49173</u> | 359 | 418 |
| <i>S. bottropensis</i> | 359 | 418 |
| <i>S. vellosus</i> | 361 | 420 |
| <i>S. hygroscopicus</i> | 358 | 417 |
| <i>S. coelicolor</i> | 360 | 419 |
| <i>S. turgidiscabies</i> | 358 | 417 |
| <i>S. lavendulae</i> | 358 | 417 |
| <i>S. subbrutilus</i> | 358 | 417 |
| <i>S. griseus</i> | 358 | 417 |
| | | |
| <u>S-31</u> | 418 AAGTGACGGT ACCTGCAGAA GAAGCGCCGG CTAACACTCGT GCCAGCAGCC GCGG | 471 |
| <u>S-173</u> | 418 | 471 |
| <u><i>S. acidiscabies</i> ATCC49003</u> | 418 | 471 |
| <u>S-851</u> | 419 | 472 |
| <u><i>S. scabies</i> ATCC33282</u> | 419 | 472 |
| <u><i>S. scabies</i> ATCC49173</u> | 419 | 472 |
| <i>S. bottropensis</i> | 419 | 472 |
| <i>S. vellosus</i> | 421 | 474 |
| <i>S. hygroscopicus</i> | 418 | 471 |
| <i>S. coelicolor</i> | 420 | 473 |
| <i>S. turgidiscabies</i> | 418 | 471 |
| <i>S. lavendulae</i> | 418 | 471 |
| <i>S. subbrutilus</i> | 418 | 471 |
| <i>S. griseus</i> | 418 G..... | 471 |

Fig. 4 Sequence alignment of 16S rRNAs encoding DNAs for 14 strains of *Streptomyces* spp. including potato scab pathogens. The sequences are aligned with the sequence of S-31 (a pathogenic *Streptomyces* sp. forming rectiflexible spore chains). Only the nucleotides that differ from those of S-31 are shown, identical nucleotides are indicated by dots, and deletions are indicated by dashes.

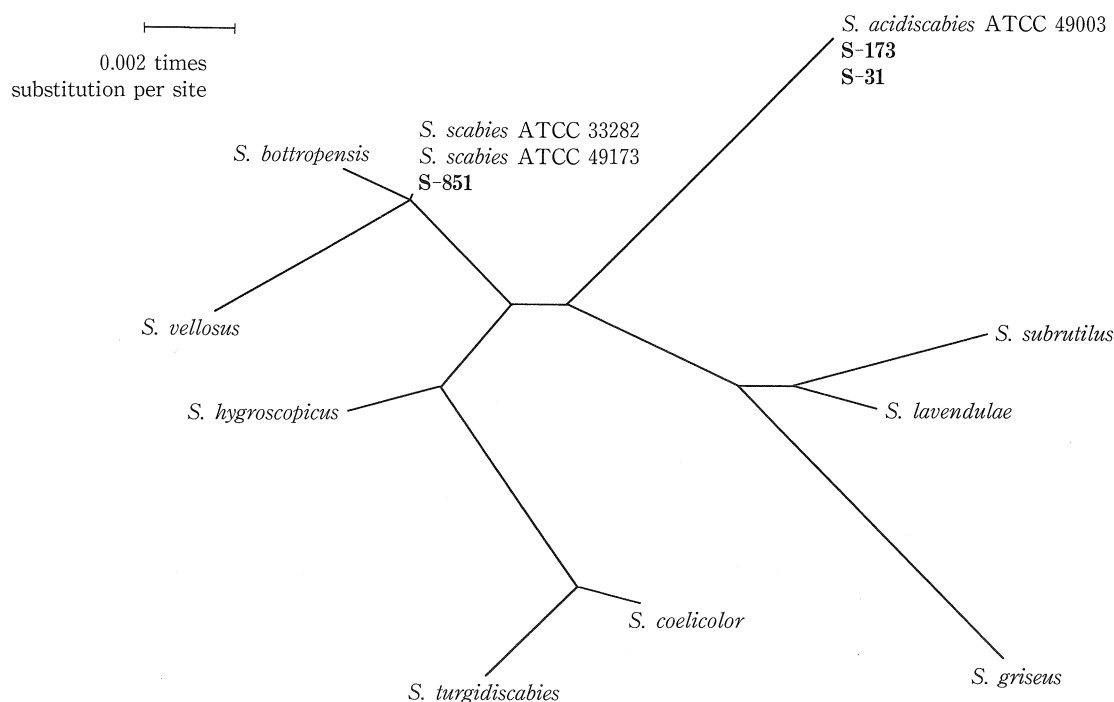


Fig. 5. Phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of the partial 16S rDNA of *Streptomyces* species. The tree was constructed by the neighbour-joining method.

原菌の各菌型間には生理的性質に明確な差異は認められなかった。

なお、ATCC 3352 と ATCC 10246 との生理的性質はよく一致していたが、ジャガイモそうか病から分離された S 型菌とは形態を含め 6 項目で、RF 型菌とは ATCC 3352 が 7 項目、ATCC 10246 では 6 項目で異なっており、生理的性質の面からは我が国で分離されるそうか病菌とは異なると判断された。

現在、*Streptomyces* の種の基準として用いられている項目は孢子鎖の形態、孢子の表面構造、気中菌糸の色、メラニン色素生成の有無、および糖の資化性であるが、この中には変異しやすい性質もいくつか存在する。Williams ら^{185,186)} は *Streptomyces* の分類体系を抜本的に見直す試みの中で、約 500 菌株について多数の形質を調べて数値分類を行った結果、従来用いられていた基準のうち、孢子鎖の形態、孢子の表面構造、気中菌糸の色、メラニン色素生成などは分類の基準として不相当であるとしている。

そこで本研究では、分子生物学的分類の一つとして DNA-DNA 交雑を行い、全 DNA の塩基配列の相同値を比較して菌株間の遺伝的類縁関係を明らかにすることを試みた。DNA-DNA 交雑を行った場合、これまでの報告では一般に相同値が 70% 以上であれば同一種であるとみなされている^{5,18,25,58)}。これに対して、相同値が 60% 以下ではその値が高くなるほど近縁ではあるがあくまでも別種と

考えるべきである^{12,18,19,25)}とされている。このような基準にあてはめると、本研究ではジャガイモそうか病の病原である S 型菌と RF 型菌およびテンサイそうか病の病原である S 型菌 (S-12) と RF 型菌 (S-15) のこれら 4 菌間における DNA-DNA 相同値は 12~41% の範囲にあつて極めて低いことから、それぞれ別種の菌と判断された。一方、ジャガイモそうか病の病原の一つである S 型菌株間の DNA-DNA 相同値は一部の菌株で 64~66% とやや低かったが、大部分の菌株では 80% 以上と高いことから同一種であると考えられた。

以上の結果は、これまで不明確であったジャガイモそうか病の病原菌として我が国には遺伝的類縁関係の異なる少なくとも 4 種の *Streptomyces* 属菌が存在することを明確に示すものであると思われる。このうち、佐賀県のジャガイモそうか病から分離された S 型菌は長崎、広島、茨城の各県で分離された S 型菌株と高い DNA-DNA 相同値を有していることから、S 型菌は我が国に広く分布していると推測されるが、この点については今後各地からさらに多数の菌株を分離して比較検討することが必要である。一方、対照として用いた ATCC 3352 と他の菌株との DNA-DNA 相同値は極めて低いことから、ATCC 3352 は我が国のそうか病の病原菌である *Streptomyces* 属菌とは異なることが明らかとなった。なお ATCC 3352 については *S. griseus* ではないかとの指摘³⁷⁾ がなされており、今回行っ

た接種試験の結果からも病原性を確認することができず、今後その分類学的所属を明確にする必要があると思われる。また、テンサイそうか病の病原である S 型菌 (S-12) は阿部ら¹⁾ によって *Streptomyces scabies* と同定されており、本研究でもジャガイモそうか病から分離された S 型菌とは形態および生理的性質がほとんど一致していたが、両者の DNA-DNA 相同値は大きく異なっていた。このことから、従来の分類方法で菌株間の区別が困難である場合、両者の DNA-DNA 相同値を比較することによりその類縁関係を明らかにすることが可能で、この方法は菌を類別するための有効な手段になり得るものと思われる。

今回供試した菌株のなかで、佐賀県のジャガイモそうか病から分離された S 型菌と RF 型菌について、Lambert らが種名を復活した *Streptomyces scabies*⁷²⁾ および新たに提案した *Streptomyces acidiscabies*⁷³⁾ との異同を形態、および生理的性質の各項目について検討した結果、S 型菌は *Streptomyces scabies* ATCC49173、RF 型菌は *Streptomyces acidiscabies* ATCC 49003 とほぼ一致した。さらに、S 型菌、RF 型菌の 16 S リボソーム RNA 遺伝子の部分塩基配列 (471 塩基) は S 型菌が *S. scabies* ATCC 49173 および ATCC 33282 と、RF 型菌は *S. acidiscabies* ATCC 49003 と完全に一致した。ところで、これまで種以上の分類群間の系統関係を解析するためには一般に 1,000 塩基以上の 16 S リボソーム RNA 遺伝子の配列を決定すること

が望ましいとされてきた。しかし、Kataoka ら⁶⁰⁾ は *Streptomyces* 属菌については変異が多くみられる部位を含む 120 塩基程度の部分塩基配列を比較することで、種の同定に利用できることを明らかにしている。今回、決定した 16 S リボソーム RNA 遺伝子の 471 塩基の配列については、Kataoka ら⁶⁰⁾ の指摘する領域を含んでおり、上述のように type strain と完全に一致していることから、佐賀県の畑作地帯に存在するジャガイモそうか病菌は *S. scabies* および *S. acidiscabies* であると判断してよいものと考えられる。

S. acidiscabies の存在が明らかになったのはアメリカ北東部およびカナダ以外の地域では初めてのことで、地理的に遠く隔たった地域に同一種の病原菌が存在するということが、さらに、本研究で明らかになったように、ジャガイモにそうか病斑を形成することのできる複数の遺伝的類縁関係の異なる病原菌が存在することは、病原菌の進化の問題、さらには、自然界の微生物間における遺伝子の伝達機構の問題をも含めて極めて興味を持たれる現象である。

なお、本県の畑作地帯に、Miyajima ら¹¹⁰⁾ が北海道に広く分布しているとする *S. turgidiscabies*、およびカナダで Goyer ら⁴⁰⁾ によって報告された *S. caviscabies* が存在しているかどうかについては今後さらに検討していく必要がある。