

Studies on the Disease of Root Tumor of Melon(*Cucumis melo* L.)

吉田, 政博

<https://doi.org/10.11501/3106939>

出版情報 : 九州大学, 1995, 博士 (農学), 論文博士
バージョン :
権利関係 :

第5章 病原放線菌の形態形成

前章において、メロンがんしゅ病病原放線菌が *Streptomyces* 属に属することを明らかにするとともに、*Streptomyces* 属菌の新種とみなされることを述べた。また、本病原放線菌はその分類過程において、形態的特徴として疑似胞子嚢を形成することから、最初 *Actinosporangium* 属菌であるとした。その後、分類基準の見直しによる *Actinosporangium* 属の *Streptomyces* 属への移行^{20, 21)} にともない、最終的には *Streptomyces* 属に分類された。

一方、本病の最も大きな特徴は土壌伝染性病害であるということである。そこで重要なことは土壌中における病原菌の生息生態であると考えられるが、このことについては新病害であるために解明されていない。したがって、本菌の培地上での形態的性状の変化を把握し生活環を知ることは、本病の診断上での病原放線菌の同定のみならず、病原放線菌の土壌中における生態解明上にも必要であると考えられる。

このことから、本章ではメロンがんしゅ病菌の胞子の発芽から疑似胞子嚢形成までの過程について、培地上での様相を観察した。

第1節 光学顕微鏡による観察

材料および方法

メロンがんしゅ病菌の供試菌株には、前述の B-9-1 菌株 (Table 9) を用いた。培地への接種のための胞子懸濁液は、供試菌株をイースト・スターチ寒天培地 (酵母エキス 2 g, 可溶性デンプン 10 g, 寒天 15 g, 蒸留水 1,000 ml, pH 7.3) で 28°C, 14日間斜面培養し、形成された気菌糸部分の菌そう (胞子とともに) をすばやく滅菌水に懸濁させて十分に攪はん後、

5 μm のフィルターで2回ろ過して菌糸体を除去する方法により調製した。

培地への接種は、シャーレ中のイースト・スターチ寒天培地にスライドグラスを埋設して培地の薄層を作り、その上に前述の孢子懸濁液を滴下し、白金耳により拡げた。28°Cで1, 3, 6, 12, 24, 48, 72時間および5, 7, 14日間培養後、スライドグラスを回収してカバーグラスをかけ、位相差装置を併用して光学顕微鏡で病原放線菌の形態形成の観察を行った。

結 果

観察結果はPlate Iに示した。

胞子の発芽は培養3時間後から始まり、時間の経過とともに発芽管が伸長して、12時間後には発芽管（発芽菌糸）の分岐も認められた（Plate I-1）。培養24時間後では、発芽菌糸は分岐を繰り返して基生菌糸体形成の初期段階となり（Plate I-2）、培養48時間後では菌糸はさらに増殖して、基生菌糸が緻密に固まった基生菌糸体からなるコロニーを形成した。72時間後では基生菌糸体から気中へ伸びる気菌糸が形成され、その先端はフックあるいはオープンループ状の形状となっていた（Plate I-3）。その後、5日後には気菌糸に隔壁の形成が始まり孢子鎖が認められ（Plate I-4）、7日後では気菌糸中の孢子鎖の中に疑似孢子嚢が確認された（Plate I-5）。さらに、14日後の菌そうでは多数の疑似孢子嚢と粘液状の物質が気菌糸の間を覆っている状態が観察された（Plate I-6）。

第2節 走査型電子顕微鏡による観察

材料および方法

供試菌株、接種源の調製は第1節と同じである。

観察のための培養にはイースト・スターチ寒天培地を用い、寒天薄層法³⁾を改変した手法により病原放線菌の形態形成過程を観察した。シャーレ中の平板培地上に、融解した培地に浸したろ紙片(約1 cm角)を載せ、ろ紙上に培地の薄層を作った。寒天薄層上に孢子懸濁液を滴下し、28°Cで0, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72時間、および5, 7, 10, 14, 21日間培養後、ろ紙片を回収した。回収ろ紙片は、グルタルアルデヒドとオスミウム酸で二重固定後、上昇エタノール系列で脱水し臨界点乾燥を行い、金蒸着をして走査形電子顕微鏡での観察に供試した^{1,4,2)}。

なお、孢子の大きさと発芽管長の測定は、10~30個体の孢子について実施した。

結 果

Plate II, IIIに観察結果を、Table 19に孢子の大きさと発芽管長の推移を示した。

電顕観察でも培養1時間後までの孢子の発芽は認められなかった。培養開始時の孢子の大きさは $0.9\sim 1.1\times 0.7\sim 0.9\mu\text{m}$ (平均 $1.0\times 0.8\mu\text{m}$)であったが(Plate II-7)、培養1時間後の孢子は $1.0\sim 1.4\times 0.7\sim 0.9\mu\text{m}$ (平均 $1.2\times 0.8\mu\text{m}$)となり、やや大きくなっていた。3時間後には孢子の一部から長さ $0.4\sim 0.9\mu\text{m}$ (平均 $0.5\mu\text{m}$)の発芽管がわずかに伸長しており、その時の発芽孢子および未発芽孢子の大きさは、両者とも平均 $1.4\times 0.9\mu\text{m}$ と培養開始時に較べて膨大していた。発芽時には孢子と発芽管の境はややくぼみ(Plate II-8)、伸びた発芽管の幅は孢子の幅より狭く、発芽管の表面に孢子の表鞘の痕跡を残すものも存在した(Plate II-9)。さらに、6時間後には発芽管(発芽菌糸)は伸展して、その長さは $1.0\sim 1.9\mu\text{m}$ (平均 $1.5\mu\text{m}$)となり、それらの発芽孢子は $1.1\sim 2.0\times 0.8\sim 1.1\mu\text{m}$ (平均 $1.4\times 0.8\mu\text{m}$)であった。また、未発芽孢子でもその大きさは $1.2\sim 1.6\times 0.8\sim 1.2\mu\text{m}$ (平均 $1.4\times 0.9\mu\text{m}$)と両者に大きさの著しい差はなかった。培養12

Table 19. Size of spore and length of germ tube during spore germination of the pathogenic *Streptomyces* sp. causing root tumor of melon on the yeast-starch agar medium at 28 °C

| Incubation time (hr) | Size of spore (Mean) | | Length of germ tube | |
|----------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------|-------------------|
| | Ungerminated spore | Germinated spore | Range | Mean |
| | (μm) | (μm) | (μm) | (μm) |
| 0 | 0.9-1.1 x 0.7-0.9 (1.0 x 0.8) | - ^{a)} | - ^{a)} | - |
| 1 | 1.0-1.4 x 0.7-0.9 (1.2 x 0.8) | - | - | - |
| 3 | 1.1-1.7 x 0.7-1.1 (1.4 x 0.9) | 1.1-1.8 x 0.8-1.0 (1.4 x 0.9) | 0.4 - 0.9 | 0.5 ± 0.16 |
| 6 | 1.2-1.6 x 0.8-1.2 (1.4 x 0.9) | 1.1-2.0 x 0.8-1.1 (1.4 x 0.8) | 1.0 - 1.9 | 1.5 ± 0.32 |
| 12 | 1.2-1.5 x 0.6-0.9 (1.3 x 0.8) | S | 6.1 - 61.9 | 21.9 ± 16.78 |
| 24 | NE | M | M | M |

a) -: ungerminated, NE: could not estimate, S, M: unrecorded because of irregular metamorphosed spores (S) and growth of germinated mycelia (M).

時間後になると発芽管は6.1~61.9 μm (平均21.9 μm)の長さになり、その幅は0.4~0.7 μm (平均0.5 μm)で、分岐も認められた (Plate II-10)。一方、この時期の発芽胞子は不整形に変形しており、大きさの測定は困難であった。

また、培養6時間後までは胞子の一端からのみ発芽している胞子が認められていたが、12時間後には両端から発芽管が伸びている胞子と、両端と中央部の三方から発芽している胞子も確認された (Plate II-11)。

24時間後になると、発芽菌糸は著しく増殖して基生菌糸体を形成し、それらの菌糸の幅は0.5~0.7 μm (平均0.5 μm)であったが、一部では、先端がわずかに膨大した基生菌糸も認められた (Plate II-12)。培養48時間後には、膨大した菌糸先端部分が成長して、フック状を呈する気菌糸 (胞

子形成菌糸)を基生菌糸上に形成し、その気菌糸の幅は $0.5\sim 0.9\mu\text{m}$ (平均 $0.7\mu\text{m}$)で、膨大した基生菌糸先端よりさらに大きくなっていた(Plate II-13)。72時間後になると気菌糸の形成は急増し、フック~オーブングループ状を呈した気菌糸が多数みられるようになった(Plate III-14)。その後、5日後では気菌糸の一部がくびれて隔壁の形成が始まり(Plate III-15)、中には完全な孢子鎖の形成も認められ(Plate III-16)、それらの1孢子鎖に形成される孢子は $11\sim 20$ 個(平均 15.3 個)の範囲であった。一方、一部の孢子鎖は互いに絡み合っていた。7日後では形成初期の疑似孢子囊が増加し、孢子鎖の数は減少しており(Plate III-17)、また、基生菌糸の一部は粘液状の物質(ムコイド)で覆われた様相を呈していた。さらに、10日後では表面が粘液物質で覆われた疑似孢子囊も認められ、疑似孢子囊の大きさは $5\mu\text{m}$ 以下のものが多くを占めた(Plate III-18)。14日後および21日後の菌そうでは、マット状の粘液状物質で覆われた基生菌糸上に、疑似孢子囊と孢子塊の形成が進み、この時期には比較的大型の疑似孢子囊も認められ、孢子鎖はさらに減少していた(Plate III-19,20)。

第3節 考 察

メロンがんしゅ病病原放線菌の孢子の発芽は、 28°C の温度条件で培養3時間後から始まることが確認された。発芽過程で孢子の表面構造の変化はとくに認められなかったが、培養開始時に平均 $1.0\times 0.8\mu\text{m}$ であった孢子の大きさが、発芽が始まる3時間後には平均 $1.4\times 0.9\mu\text{m}$ まで肥大した。この現象は未発芽孢子でも同様に観察された。このことは、一般に菌類の孢子は発芽に際し水分吸収によって膨潤する¹⁴³⁾が、本放線菌の場合も孢子の膨潤が発芽前に起こることを示している。また、培養12時間後までの観察において、膨潤しているにもかかわらず発芽しない孢子も少なくなかった。このような孢子は遅れて発芽することも考えられるが、本試験では既に生

育した発芽菌糸により隠ぺいされ観察することが困難であった。しかし、多くの放線菌で孢子の一部が休眠状態にあるとされている^{11, 39, 88)}ことから、これらの未発芽孢子も同様に休眠状態にある可能性も存在する。

一方、電顕観察の結果をまとめると、孢子の発芽は、膨潤に続き孢子の一箇所に発芽管が孢子表面からわずかに現れて発芽が開始される。この時点での発芽管は孢子を覆う表鞘¹⁵⁹⁾に包まれているが、発芽管の伸長にともない表鞘を破り、発芽菌糸が伸展すると考えられる。また、孢子の発芽様式は孢子の1~3箇所から任意に発芽管が出芽したことから、特定の発芽孔や発芽スリットが存在することなく、孢子のどの部分からでも発芽できるものと思われる。すなわち、酵母における多極性発芽¹⁵⁾に類似していた。

培養24~48時間後には、増殖して分岐を繰り返した基生菌糸により明確な菌そうが現れ、その上に先端がフック状の気菌糸を形成するようになる。この時、気菌糸が分化する基生菌糸の先端部分はやや膨大して太くなるが、これは *Streptomyces* 属菌の気菌糸の構造的特徴である表鞘¹⁵⁹⁾の形成によるものと考えられる。その後、72時間後になると、気菌糸では本病原菌の特徴であるフック~オープンループ状の孢子形成菌糸の分化が進み、孢子鎖の原形をつくり、5日目頃までにはそれらの菌糸に隔壁の形成が始まって、単純分岐、らせん状の典型的な Retinaculum-Apertum (RA) 型¹¹⁸⁾の孢子鎖を形造っていくことが明らかとなった。なお、1孢子鎖に形成される孢子数は、供試培地は異なるが第4章第1節の結果とほぼ同じであった。

一方、孢子鎖の形成が盛んになる培養5日後頃からは、疑似孢子囊の形成もみられるようになった。 *Streptomyces* (*Actinosporangium*) 属菌の疑似孢子囊は、基生菌糸、気菌糸あるいはスパイラル状の孢子から形成される3通りの形成過程があるとされている⁴⁰⁾が、本病原放線菌では絡み合った孢子鎖から形成されるタイプが主体であると思われる。このことは、疑似孢子囊の形成にともない孢子鎖が減少していることから明白であった。

本病原放線菌では基生菌系の分断は起こらなかったが、培養7～10日後頃の基生菌系体の一部では粘液状物質で覆われたマット状を呈し、14日後頃からはその上に疑似孢子囊や孢子塊が多く認められる菌そうとなった。また、21日後の観察でも14日後と同様の状態を確認したことから、そのような菌そうの状態がその後もさらに維持されていくものと考えられる。

本実験において、孢子の形成は培養5日後からみられ、7日後では既に疑似孢子囊の形成も始まり、14日後にはRA型の孢子鎖は少なく、多くは疑似孢子囊へと変化していた。しかし、スターチ・無機塩寒天培地における第4章の観察結果では、28℃、21日間培養の菌そうでもかなりの孢子鎖が認められている。一般に、放線菌の生活環は培地成分や培養温度などの生育環境の影響を受けやすく¹²⁰⁾、*Streptomyces*の孢子形成は貧栄養の固形培地で起こるとされている¹⁶⁰⁾ことから、上述のような培地上での生活環における形態形成の伸展速度の差は、供試培地の栄養条件の相異に起因するものと考えられる。

放線菌の形態形成に関する研究は少なく、植物病原菌ではClark and Lawrence⁹⁾により*S. ipomoeae*の孢子形成過程の観察が行われているにすぎず、これも本実験と同様に培地上での試験である。しかし、このような病原放線菌の形態形成の特徴は、*Streptomyces*属菌における分類と同定において分類学上の主要な判断要素となっているために^{102, 111, 155)}、極めて重要となる。

一般に土壌中の放線菌は生長が遅く、世代時間は日か週の単位であることが知られている¹²⁰⁾が、培地上での形態形成と土壌中での生活環との関係は明らかでない。また、*S. vitaminophilus* (*A. vitaminophilum*)では、疑似孢子囊に水を加えると孢子個体に分散することが知られている¹³⁰⁾。土壌病原菌であるメロンがんしゅ病菌においては、とくに土壌中での生態を解明することは重要であり、本試験で観察された疑似孢子囊や粘液状物質などの構造物の形成が土壌中や宿主植物上でも存在するかどうか、また、生活環の中でどのような役割を果たしているのか、さらなる検討が必要と

なる。

本試験は1菌株による特定の培地上での観察ではあるが、前章の分類学的諸性質の試験結果でも菌株間に大差なかったことから、菌株による形態形成の大きな相違はないものと考えている。また、先にも述べたように、放線菌は培地成分により生活環の影響を受けやすいが、がんしゅ病菌が属する *Streptomyces* 属菌は、*Kitasatosporia* 属菌のように培地の栄養条件により複雑な生活環（多形態性）を示すものではない¹²⁴⁾。したがって、本実験においても胞子の発芽から基生菌糸の形成、気菌糸の分化、胞子鎖の形成といった *Streptomyces* 属菌の一連の生活環を確認することができたが、それらの形態や疑似胞子嚢などの構造物の特徴は、とくに、メロンがんしゅ病菌の培地上での生活環の一部を特徴づけたとももの考える。

第6章 病原放線菌の分離方法

放線菌の選択的分離法の検討は、これまでに多くの研究がなされているが^{12, 19, 31, 38, 51, 67, 103, 158}、放線菌のみを効率よく、しかもすべての種類の分離に適用できるような培地や方法は作出されていない。とくに、植物病原放線菌の分離には、細菌や糸状菌による汚染がともないやすいため、目的とする放線菌のみを効率よく分離する方法が常に問題となっている^{28, 52, 64, 76, 109}。

本病の病原菌分離においても第3章で述べたように、分離時における罹病組織に共存する細菌の速い生育が病原体を分離する過程で障害となり、困難を来してきた。このようなことから、本病原放線菌の確実な分離方法の確立は本病の診断においても必須の課題である。

したがって、本章では希釈平板法による罹病組織からの病原放線菌の分離過程において混入細菌の出現を抑制し、がんしゅ病菌を効率的に確実に分離することを目的として、分離源に対するアルカリ処理およびフェノール処理の効果、分離用培地への添加抗生物質の検索、ならびに分離用基本培地について検討を行った。

第1節 分離源に対する化学処理方法の検討

分離源であるメロンがんしゅ病のこぶ組織の磨砕・搾汁液を処理することにより、分離時の混入細菌量を減少させる方法について検討した。すなわち、水酸化ナトリウム水溶液によるアルカリ処理とフェノール水溶液処理の効果について、比較検討した。

材料および方法

がんしゅ病菌を雑菌混入材料から分離するためには、予めがんしゅ病菌に対する各処理の影響を検定しておく必要がある。この基準菌として B-9-1 菌株 (Table 9) を用い、イースト・麦芽寒天培地¹²³⁾で 28°C, 10~14 日間斜面培養した菌体の懸濁液を基準病原放線菌とした。分離時の混入細菌の出現状況の検定は、現地発生圃場より採取した汚染土壌を用いてガラス温室内で栽培したメロン (品種: 健脚) の発病形成こぶ (直径約 4 mm) について行った。発病こぶは水道水で十分に水洗後滅菌水で 2 回洗浄し、生体重量の 10 倍量となるように滅菌水を加えて乳鉢で磨砕し、その搾汁液を分離源とした。

試験は 3 枚のシャーレ (直径 9 cm) の反復実験とし、結果はそれらの平均値で示した。

1. 水酸化ナトリウム水溶液によるアルカリ処理

処理は、Wakisaka et al.¹⁵²⁾の方法を改変して実施した。濾過滅菌した 9.9 ml の 0.01N NaOH 水溶液と上記の菌体懸濁液、あるいはこぶ組織の磨砕・搾汁液の 0.1 ml を試験管内で混合し、室温下で静置した。静置時間は、1, 3, 5, 10, 30, 50 分とし、また、対照 (無処理) として滅菌水を用いた区を設けた。処理液は、濾過滅菌した 0.1N HCl 水溶液により直ちに中和後、希釈してその 0.1 ml をアルブミン寒天培地¹⁵³⁾上に塗抹した。28°C, 5 日間培養後、出現した病原放線菌あるいは細菌のコロニー数を調査し、無処理区に対するコロニー形成率を算出した。

2. フェノール水溶液処理

処理は、Lawrence⁷⁶⁾の方法を一部改変して行った。病原放線菌懸濁液あるいはこぶ組織の磨砕・搾汁液の 0.1 ml と所定の濃度に調整した 9.9 ml のフェノール水溶液を混合し、室温で 10 分間静置して処理した。フェノール水溶液の濃度は、120, 140, 160, 180, 200, 400, 800 倍 (V/V) とし、また、対照 (無処理) 区として滅菌水を用いた。処理液は直ちに希釈後、1 と同様にそれぞれのコロニー形成率を求めた。

結 果

1. 水酸化ナトリウム水溶液によるアルカリ処理の効果

処理時間と病原放線菌および混入細菌のコロニーの出現状況は、Table 20に示した。

アルカリ処理後の病原放線菌のコロニー形成率は、1分処理ではほとんどその影響はみられなかったが、3分処理では72.6%まで減少し、30~50分処理では約半数のコロニー形成率であった。こぶ組織由来の細菌は、1分処理から約30%が死滅し、5分処理で約半数の菌量に減少し、さらに、30~50分処理では約30%のコロニー形成率まで低下した。一方、混入細菌に対する病原放線菌のコロニー形成率の比率は、30~50分処理で1.66と放線菌のコロニー形成率の方が高くなり、病原放線菌の選択分離には効果的であった。

Table 20. Effects of alkaline treatment with 0.01 N-NaOH on appearance of colonies of the pathogenic *Streptomyces* sp. causing root tumor of melon and contaminant bacteria

| Time of treatment (minutes) | <i>Streptomyces</i> sp. No. of colonies / plate ^{a)} | Bacteria No. of colonies / plate ^{a)} (x10 ⁶ cfu/g of tissues) | Rate of colony forming <i>Streptomyces</i> sp. to bacteria ^{c)} |
|-----------------------------|--|--|--|
| 0 | 247.3(100) ^{b)} | 183.0(100) ^{b)} | 1.00 |
| 1 | 238.3(96.4) | 128.0(69.9) | 1.38 |
| 3 | 180.3(72.9) | 121.0(66.1) | 1.10 |
| 5 | 165.3(66.8) | 94.7(51.7) | 1.29 |
| 10 | 154.0(62.3) | 82.3(45.0) | 1.38 |
| 30 | 123.3(49.9) | 55.0(30.0) | 1.66 |
| 50 | 118.7(48.0) | 53.0(29.0) | 1.66 |

a) Average of three plates.

b) Number in parenthesis is percentage to control (colony forming ratio).

c) Colony forming ratio of *Streptomyces* sp. / colony forming ratio of bacteria in each concentration.

2. フェノール水溶液処理の効果

結果はTable 21に示した。

病原放線菌のコロニー形成率は、400倍液処理までは減少がみられなかったが、200倍液では64.4%まで低下し、さらに、処理液の濃度の上昇にともない減少した。とくに、120倍液では著しく低下し、4.2%のコロニー形成率であった。一方、こぶ由来の細菌は、病原放線菌と同じく800倍と400倍液の処理ではコロニー形成率の低下はみられなかったが、200倍液から減少傾向を示し、120倍液ではまったく細菌の出現は認められなかった。また、両者のコロニー形成率の比率は、400倍液処理までは無処理区とほとんど差はなかったが、200倍液以上の高濃度処理では病原放線菌が細菌のコロニー形成率を上回り、中でも140倍液処理では21.56を示す最高値であった。したがって、本処理では200~140倍液の濃度において有効で、とくに、140倍液処理は効果が高かった。

Table 21. Effects of phenol treatment on appearance of colonies of the pathogenic *Streptomyces* sp. causing root tumor of melon and contaminant bacteria

| Concentration of phenol (diluted factor) | <i>Streptomyces</i> sp. | Bacteria | Rate of colony forming <i>Strep- tomyces</i> sp. to bacteria ^{c)} |
|---|---------------------------------------|--|--|
| | No. of colonies / plate ^{a)} | No. of colonies / plate ^{a)} (x10 ⁷ cfu/g of tissues) | |
| Control | 118.7(100) ^{b)} | 79.3(100) ^{b)} | 1.00 |
| x 800 | 121.7(102.5) | 78.0(98.4) | 1.04 |
| x 400 | 119.0(100.3) | 81.3(102.5) | 0.98 |
| x 200 | 76.7(64.4) | 20.3(25.6) | 2.52 |
| x 180 | 57.7(48.6) | 14.3(18.0) | 2.70 |
| x 160 | 44.7(37.7) | 7.3(9.2) | 4.10 |
| x 140 | 23.0(19.4) | 0.7(0.9) | 21.56 |
| x 120 | 5.0(4.2) | 0 (0) | - |

a),b),c) See Table 20.

第2節 分離用培地への添加抗生物質の検索

分離培地への添加によって分離時の混入汚染細菌量を減少させ、さらに、病原放線菌の生育に影響が低い抗生物質の検索を行った。

材料および方法

供試抗生物質として、デヒドロ酢酸ナトリウム（ナカライテスク）、テトラサイクリン（Sigma）、チロトリシン（Sigma）、コール酸ナトリウム（ナカライテスク）、ストレプトマイシン（明治製菓）、ノボピオシン（Sigma）、リファンピシン（Sigma）、クロラムフェニコール（Sigma）、ナリヂキシン酸（Sigma）、カナマイシン（ナカライテスク）、9-アミノアクリジン（ナカライテスク）、コリスチン（Sigma）、ポリミキシンB（Sigma）、ペニシリンG（ナカライテスク）およびペンタクロロニトロベンゼン（75%水和剤を使用；日産化学）の合計15種について試験した。

それぞれの抗生物質は、所定の濃度の平板培地となるように、各抗生物質の水溶液と約50℃に融解したアルブミン寒天培地¹⁵³⁾を混合して調製した。平板培地には前節と同様に調整したがんしゅ病菌の菌体懸濁液、あるいはこぶ組織の磨砕・搾汁液を塗抹後、病原放線菌と細菌の出現コロニー数とコロニー形成率を調べた。

結果

各種抗生物質に対する病原放線菌ならびに形成こぶ由来の混入細菌の出現状況を調べた結果を、Table 22～Table 36に示した。

テトラサイクリン、ストレプトマイシン、ノボピオシン、リファンピシン、9-アミノアクリジンおよびペンタクロロニトロベンゼンの6種では、試験した低濃度でも病原放線菌の出現抑制が著しく、混入細菌のみの抑制

には効果的でなかった (Table 22~Table 27)。また、チロトリシン、コ
ール酸ナトリウムおよびクロラムフェニコールの3種では、両菌種とも試
験濃度の増加に従いコロニー形成率は低下傾向を認めたが、その傾向は病

Table 22. Effects of tetracycline on appearance of colonies of the pathogenic *Streptomyces* sp. causing root tumor of melon and contaminant bacteria

| Concentration of tetracycline (ppm) | <i>Streptomyces</i> sp. | Bacteria | Rate of colony forming <i>Strep- tomyces</i> sp. to bacteria ^{c)} |
|--|---------------------------------------|--|--|
| | No. of colonies / plate ^{a)} | No. of colonies / plate ^{a)} ($\times 10^7$ cfu/g of tissues) | |
| 0 | 61.0(100) ^{b)} | 63.0(100) ^{b)} | 1.00 |
| 10 | 1.3(2.1) | 14.3(22.7) | 0.09 |
| 25 | 0 (0) | 7.3(11.6) | 0 |
| 50 | 0 (0) | 1.0(1.6) | 0 |
| 100 | 0 (0) | 0.3(0.5) | 0 |
| 150 | 0 (0) | 0 (0) | 0 |
| 200 | 0 (0) | 0 (0) | 0 |
| 250 | 0 (0) | 0 (0) | 0 |

a),b),c) See Table 20.

Table 23. Effects of streptomycin on appearance of colonies of the pathogenic *Streptomyces* sp. causing root tumor of melon and contaminant bacteria

| Concentration of streptomycin (ppm) | <i>Streptomyces</i> sp. | Bacteria | Rate of colony forming <i>Strep- tomyces</i> sp. to bacteria ^{c)} |
|--|---------------------------------------|--|--|
| | No. of colonies / plate ^{a)} | No. of colonies / plate ^{a)} ($\times 10^7$ cfu/g of tissues) | |
| 0 | 229.3(100) ^{b)} | 27.3(100) ^{b)} | 1.00 |
| 5 | 0 (0) | 18.7(68.5) | 0 |
| 10 | 0 (0) | 7.7(28.2) | 0 |
| 50 | 0 (0) | 7.3(26.7) | 0 |
| 100 | 0 (0) | 5.0(18.3) | 0 |
| 200 | 0 (0) | 2.3(8.4) | 0 |
| 400 | 0 (0) | 0.3(1.1) | 0 |

a),b),c) See Table 20.

Table 24. Effects of novobiocin on appearance of colonies of the pathogenic Streptomyces sp. causing root tumor of melon and contaminant bacteria

| Concentration of novobiocin (ppm) | <u>Streptomyces</u> sp. | Bacteria | Rate of colony forming <u>Streptomyces</u> sp. to Bacteria ^{c)} |
|-----------------------------------|---------------------------------------|---|--|
| | No. of colonies / plate ^{a)} | No. of colonies / plate ^{a)} (x10 ⁷ cfu/g of tissues) | |
| 0 | 159.0(100) ^{b)} | 22.3(100) ^{b)} | 1.00 |
| 0.5 | 0 (0) | 21.7(97.3) | 0 |
| 1.0 | 0 (0) | 14.7(65.9) | 0 |
| 3.0 | 0 (0) | 17.3(77.6) | 0 |
| 5.0 | 0 (0) | 16.3(73.1) | 0 |
| 7.0 | 0 (0) | 9.3(41.7) | 0 |
| 10.0 | 0 (0) | 6.7(30.0) | 0 |

a),b),c) See Table 20.

Table 25. Effects of rifampicin on appearance of colonies of the pathogenic Streptomyces sp. causing root tumor of melon and contaminant bacteria

| Concentration of rifampicin (ppm) | <u>Streptomyces</u> sp. | Bacteria | Rate of colony forming <u>Streptomyces</u> sp. to bacteria ^{c)} |
|-----------------------------------|---------------------------------------|---|--|
| | No. of colonies / plate ^{a)} | No. of colonies / plate ^{a)} (x10 ⁷ cfu/g of tissues) | |
| 0 | 35.7(100) ^{b)} | 48.3(100) ^{b)} | 1.00 |
| 1 | 4.3(12.0) | 39.0(80.7) | 0.15 |
| 5 | 0 (0) | 18.0(37.3) | 0 |
| 10 | 0 (0) | 15.0(31.1) | 0 |
| 25 | 0 (0) | 9.7(20.1) | 0 |
| 50 | 0 (0) | 0.7(1.4) | 0 |
| 100 | 0 (0) | 0 (0) | - |
| 200 | 0 (0) | 0 (0) | - |

a),b),c) See Table 20.

Table 26. Effects of 9-aminoacridine on appearance of colonies of the pathogenic Streptomyces sp. causing root tumor of melon and contaminant bacteria

| Concentration of 9-aminoacridine (ppm) | <u>Streptomyces</u> sp. No. of colonies / plate ^{a)} | Bacteria No. of colonies / plate ^{a)} (x10 ⁶ cfu/g of tissues) | Rate of colony forming <u>Streptomyces</u> sp. to bacteria ^{c)} |
|--|--|--|--|
| 0 | 184.3(100) ^{b)} | 166.3(100) ^{b)} | 1.00 |
| 5 | 0 (0) | 140.7(84.6) | 0 |
| 10 | 0 (0) | 135.0(81.2) | 0 |
| 25 | 0 (0) | 102.3(61.5) | 0 |
| 50 | 0 (0) | 55.7(33.5) | 0 |
| 100 | 0 (0) | 1.0(0.6) | 0 |
| 200 | 0 (0) | 0 (0) | - |
| 400 | 0 (0) | 0 (0) | - |

a),b),c) See Table 20.

Table 27. Effects of pentachloronitrobenzene (PCNB) on appearance of colonies of the pathogenic Streptomyces sp. causing root tumor of melon and contaminant bacteria

| Concentration of PCNB ^{a)} (ppm) | <u>Streptomyces</u> sp. No. of colonies / plate ^{b)} | Bacteria No. of colonies / plate ^{b)} (x10 ⁶ cfu/g of tissues) | Rate of colony forming <u>Streptomyces</u> sp. to bacteria ^{d)} |
|---|--|--|--|
| 0 | 132.7(100) ^{c)} | 79.3(100) ^{c)} | 1.00 |
| 100 | 0 (0) | 75.0(94.6) | 0 |
| 250 | 0 (0) | 75.5(95.2) | 0 |
| 500 | 0 (0) | 75.3(95.0) | 0 |
| 1,000 | 0 (0) | 79.0(99.6) | 0 |
| 1,500 | 0 (0) | 62.0(78.2) | 0 |
| 2,000 | 0 (0) | 61.7(77.8) | 0 |

a) Used PCNB was water dispersible fungicide (75%) for pathogenic fungi in soil.

b) Average of three plates.

c) Number in parenthesis is percentage to control (colony forming ratio).

d) Colony forming ratio of Streptomyces sp. / colony forming ratio of bacteria in each concentration.

Table 28. Effects of tyrothricin on appearance of colonies of the pathogenic Streptomyces sp. causing root tumor of melon and contaminant bacteria

| Concentration of tyrothricin (ppm) | Streptomyces sp. | Bacteria | Rate of colony forming <u>Streptomyces</u> sp. to bacteria ^{c)} |
|------------------------------------|---------------------------------------|---|--|
| | No. of colonies / plate ^{a)} | No. of colonies / plate ^{a)} (x10 ⁷ cfu/g of tissues) | |
| 0 | 253.3(100) ^{b)} | 36.7(100) ^{b)} | 1.00 |
| 1.0 | 143.7(56.7) | 30.0(81.7) | 0.69 |
| 2.5 | 118.3(46.7) | 32.7(89.1) | 0.52 |
| 5.0 | 30.7(12.1) | 30.0(81.7) | 0.15 |
| 10.0 | 2.0(0.8) | 18.0(49.0) | 0.02 |
| 25.0 | 0.3(0.1) | 19.3(52.6) | 0.002 |
| 50.0 | 0 (0) | 13.3(36.2) | 0 |
| 100.0 | 0 (0) | 7.7(21.0) | 0 |

a),b),c) See Table 20.

Table 29. Effects of cholic acid sodium salt on appearance of colonies of the pathogenic Streptomyces sp. causing root tumor of melon and contaminant bacteria

| Concentration of cholic acid sodium salt (ppm) | Streptomyces sp. | Bacteria | Rate of colony forming <u>Streptomyces</u> sp. to bacteria ^{c)} |
|--|---------------------------------------|---|--|
| | No. of colonies / plate ^{a)} | No. of colonies / plate ^{a)} (x10 ⁷ cfu/g of tissues) | |
| 0 | 239.0(100) ^{b)} | 32.0(100) ^{b)} | 1.00 |
| 100 | 196.3(82.1) | 36.0(112.5) | 0.73 |
| 200 | 229.7(96.1) | 33.3(104.1) | 0.92 |
| 500 | 35.7(14.9) | 24.3(75.9) | 0.20 |
| 800 | 0.7(0.3) | 21.7(67.8) | 0.004 |
| 1,000 | 0.7(0.3) | 16.7(52.5) | 0.01 |
| 2,000 | 0 (0) | 13.0(40.6) | 0 |

a),b),c) See Table 20.

Table 30. Effects of chloramphenicol on appearance of colonies of the pathogenic *Streptomyces* sp. causing root tumor of melon and contaminant bacteria

| Concentration of chloramphenicol (ppm) | <i>Streptomyces</i> sp. | Bacteria | Rate of colony forming <i>Streptomyces</i> sp. to bacteria ^{c)} |
|--|---------------------------------------|---|--|
| | No. of colonies / plate ^{a)} | No. of colonies / plate ^{a)} ($\times 10^5$ cfu/g of tissues) | |
| 0 | 69.0(100) ^{b)} | 42.7(100) ^{b)} | 1.00 |
| 1.0 | 28.3(41.0) | 43.3(101.4) | 0.40 |
| 2.5 | 27.7(40.1) | 38.3(89.7) | 0.45 |
| 5.0 | 0 (0) | 27.7(64.9) | 0 |
| 10.0 | 0 (0) | 28.0(65.6) | 0 |

a),b),c) See Table 20.

原放線菌の方が顕著で、細菌に対する病原放線菌のコロニー形成率の比率はすべて1以下であった (Table 28~Table 30)。したがって、これらの物質でも混入細菌の出現抑制処理としての効果は期待できなかった。

一方、抗生物質添加培地上での病原放線菌のコロニー形成率がこぶ由来細菌のコロニー形成率よりも高い値を呈したものは、デヒドロ酢酸ナトリウム、カナマイシン、ナリチキシン酸、コリスチン、ポリミキシンBおよびペニシリンGの6種であり (Table 31~Table 36)、中でもデヒドロ酢酸ナトリウムの500ppmとカナマイシンの10~50ppmでは、その比率がとくに高い値を示した。すなわち、デヒドロ酢酸ナトリウム添加培地では、病原放線菌の出現は250ppmからコロニー形成率の減少がみられ、500ppmで無添加培地の72.4%を示し、さらに、1,000ppmでは8.7%と急激に低下した。細菌は250ppmで86.6%のコロニー形成率であったが、500ppmでは25.9%と著しく減少した。一方、コロニー形成率の比率は500ppmで2.80を示すように、病原放線菌のコロニー形成率が細菌を上回った。

カナマイシン添加培地において、病原放線菌は5~25ppmでコロニー形成率が87.7~56.3%の比較的高い出現が認められ、50ppmでも23.2%を示した。細菌は5ppmで約半数の菌量に低下し、25ppmでは20.1%、さらに、

Table 31. Effects of dehydroacetic acid sodium salt on appearance of colonies of the pathogenic Streptomyces sp. causing root tumor of melon and contaminant bacteria

| Concentration of dehydroacetic acid sodium salt (ppm) | <u>Streptomyces</u> sp. | Bacteria | Rate of colony forming <u>Streptomyces</u> sp. to bacteria ^{c)} |
|---|---------------------------------------|---|--|
| | No. of colonies / plate ^{a)} | No. of colonies / plate ^{a)} (x10 ⁷ cfu/g of tissues) | |
| 0 | 279.3(100) ^{b)} | 32.0(100) ^{b)} | 1.00 |
| 100 | 291.3(104.3) | 33.3(104.1) | 1.00 |
| 250 | 230.3(82.5) | 27.7(86.6) | 0.95 |
| 500 | 202.3(72.4) | 8.3(25.9) | 2.80 |
| 1,000 | 24.3(8.7) | 4.3(13.4) | 0.65 |
| 1,500 | 0 (0) | 3.0(9.4) | 0 |

a),b),c) See Table 20.

Table 32. Effects of kanamycin on appearance of colonies of the pathogenic Streptomyces sp. causing root tumor of melon and contaminant bacteria

| Concentration of kanamycin (ppm) | <u>Streptomyces</u> sp. | Bacteria | Rate of colony forming <u>Streptomyces</u> sp. to bacteria ^{c)} |
|----------------------------------|---------------------------------------|---|--|
| | No. of colonies / plate ^{a)} | No. of colonies / plate ^{a)} (x10 ⁷ cfu/g of tissues) | |
| 0 | 225.0(100) ^{b)} | 48.3(100) ^{b)} | 1.00 |
| 5 | 197.3(87.7) | 24.0(49.7) | 1.76 |
| 10 | 176.0(78.2) | 15.0(31.1) | 2.51 |
| 25 | 126.7(56.3) | 9.7(20.1) | 2.80 |
| 50 | 52.3(23.2) | 2.0(4.1) | 5.66 |
| 100 | 0.7(0.3) | 1.3(2.7) | 0.14 |
| 200 | 0 (0) | 1.0(2.1) | 0 |
| 400 | 0 (0) | 0 (0) | - |

a),b),c) See Table 20.

Table 33. Effects of nalidixic acid on appearance of colonies of the pathogenic Streptomyces sp. causing root tumor of melon and contaminant bacteria

| Concentration of nalidixic acid (ppm) | <u>Streptomyces</u> sp. No. of colonies / plate ^{a)} | Bacteria No. of colonies / plate ^{a)} (x10 ⁶ cfu/g of tissues) | Rate of colony forming <u>Streptomyces</u> sp. to bacteria ^{c)} |
|---------------------------------------|--|--|--|
| 0 | 105.3(100) ^{b)} | 285.3(100) ^{b)} | 1.00 |
| 1.0 | 100.7(95.6) | 260.7(91.4) | 1.05 |
| 2.5 | 96.3(91.5) | 244.0(85.5) | 1.07 |
| 5.0 | 89.0(84.5) | 229.7(80.5) | 1.05 |
| 10.0 | 87.7(83.3) | 223.0(78.2) | 1.07 |
| 25.0 | 78.0(74.1) | 202.7(71.0) | 1.04 |
| 50.0 | 45.0(42.7) | 155.0(54.3) | 0.79 |
| 100.0 | 3.7(3.5) | 115.7(40.6) | 0.09 |
| 250.0 | 0 | 83.3(29.2) | 0 |

a),b),c) See Table 20.

Table 34. Effects of colistin on appearance of colonies of the pathogenic Streptomyces sp. causing root tumor of melon and contaminant bacteria

| Concentration of colistin (units/ml) | <u>Streptomyces</u> sp. No. of colonies / plate ^{a)} | Bacteria No. of colonies / plate ^{a)} (x10 ⁶ cfu/g of tissues) | Rate of colony forming <u>Streptomyces</u> sp. to bacteria ^{c)} |
|--------------------------------------|--|--|--|
| 0 | 91.3(100) ^{b)} | 133.7(100) ^{b)} | 1.00 |
| 10 | 82.7(90.6) | 119.3(89.2) | 1.02 |
| 25 | 82.7(90.6) | 119.3(89.2) | 1.02 |
| 50 | 81.0(88.7) | 101.0(75.5) | 1.17 |
| 100 | 82.3(90.1) | 94.3(70.5) | 1.28 |
| 250 | 6.3(6.9) | 84.0(62.8) | 0.11 |
| 500 | 0 (0) | 82.0(61.3) | 0 |

a),b),c) See Table 20.

Table 35. Effects of polymyxin B on appearance of colonies of the pathogenic Streptomyces sp. causing root tumor of melon and contaminant bacteria

| Concentration of polymyxin B (units/ml) | <u>Streptomyces</u> sp. | Bacteria | Rate of colony forming <u>Streptomyces</u> sp. to bacteria ^{c)} |
|---|---------------------------------------|---|--|
| | No. of colonies / plate ^{a)} | No. of colonies / plate ^{a)} (x10 ⁶ cfu/g of tissues) | |
| 0 | 112.7(100) ^{b)} | 268.0(100) ^{b)} | 1.00 |
| 10 | 105.7(93.8) | 231.5(86.4) | 1.09 |
| 25 | 106.3(94.3) | 226.3(84.4) | 1.12 |
| 50 | 77.7(68.9) | 224.3(83.7) | 0.82 |
| 100 | 0 (0) | 200.0(74.6) | 0 |
| 250 | 0 (0) | 116.7(43.5) | 0 |
| 500 | 0 (0) | 114.7(42.8) | 0 |
| 1,000 | 0 (0) | 82.3(30.7) | 0 |

a),b),c) See Table 20.

Table 36. Effects of penicillin G on appearance of colonies of the pathogenic Streptomyces sp. causing root tumor of melon and contaminant bacteria

| Concentration of penicillin G (ppm) | <u>Streptomyces</u> sp. | Bacteria | Rate of colony forming <u>Streptomyces</u> sp. to bacteria ^{c)} |
|-------------------------------------|---------------------------------------|---|--|
| | No. of colonies / plate ^{a)} | No. of colonies / plate ^{a)} (x10 ⁶ cfu/g of tissues) | |
| 0 | 30.7(100) ^{b)} | 37.3(100) ^{b)} | 1.00 |
| 1 | 26.3(85.7) | 29.7(79.6) | 1.08 |
| 5 | 22.3(72.6) | 27.3(73.2) | 0.99 |
| 10 | 17.3(56.4) | 23.0(61.7) | 0.91 |
| 25 | 1.3(4.2) | 19.3(51.7) | 0.08 |
| 50 | 0 (0) | 22.0(59.0) | 0 |
| 100 | 0 (0) | 20.0(53.6) | 0 |
| 200 | 0 (0) | 22.7(60.9) | 0 |

a),b),c) See Table 20.

50ppm では 4.1% のコロニー形成率まで減少した。また、細菌に対する病原放線菌のコロニー形成率の比率は、50ppm まで病原放線菌より細菌への生育抑制効果が強く、とくに、50ppm では5.66という高い値を認め、次いで 25ppm、10ppm の順で有効であった。

以上のことから、分離培地添加抗生物質としては 50ppm のカナマイシンが最も効果が高く、次いで 25ppm のカナマイシンならびに 500ppm のデヒドロ酢酸ナトリウムであることが明らかとなった。

第3節 分離用基本培地の比較

本病原放線菌の生育が良好で、しかも分離時の混入汚染細菌の生育が抑えられる培地の検索を行った。

材料および方法

病原放線菌の菌体懸濁液およびこぶ組織の磨砕・搾汁液は、第1節と同様に調整して供試した。

実験 - I : 供試培地にベネット寒天培地³⁰⁾、シュクロース・硝酸塩寒天培地³⁰⁾、グリセリン・アスパラギン寒天培地³⁰⁾、グルコース・アスパラギン寒天培地³⁰⁾、スターチ・硝酸塩・カゼイン寒天培地⁶⁸⁾、Lochhead and Chase⁸⁴⁾の根圏微生物用基本培地(以下B培地と略記する)、マンニット・硝酸塩寒天培地¹⁵⁰⁾、ジャガイモ煎汁半合成寒天培地¹²⁸⁾(以下PSSA培地と略記する)、ワックスマン培地¹⁵⁴⁾、アルブミン寒天培地¹⁵³⁾、キチン培地⁸¹⁾および素寒天培地の12種を用いた。これらの平板培地上に病原放線菌懸濁液あるいはこぶ組織の磨砕・搾汁液を塗抹し、28°Cで培養して、3、5、7、10日後に病原放線菌と細菌のコロニー数、および細菌のコロニー周縁の性状を調査した。

実験 - II : I の結果より、スターチ・硝酸塩・カゼイン寒天培地、B 培地、マンニット・硝酸塩寒天培地、ワックスマン培地、アルブミン寒天培地および素寒天培地の 6 種の培地を選び、現地発生土壌で発病したメロンの形成こぶ組織と健全根部の磨砕・搾汁液をそれぞれ分離源として、各培地上で 28°C、5 日間培養後の放線菌ならびに細菌のコロニー数を調査した。

結 果

実験 - I : 各種培地上での病原放線菌およびこぶ組織からの細菌のコロニー数の比較を Fig. 11 に、細菌のコロニー周縁の性状を Table 37 に、それぞれ示した。

各種培地上での培養日数と病原放線菌のコロニー出現数は、3 日後においてアルブミン寒天培地で最も多く、次いで素寒天培地、マンニット・硝酸塩寒天培地、スターチ・硝酸塩・カゼイン寒天培地、シュクロース・硝酸塩寒天培地でとくに良好であった。また、培養 5 日後まではほとんどの培地において出現コロニー数は増加し、とくにベネット寒天培地、グルコース・アスパラギン寒天培地、ワックスマン培地では 3 日後の 1.9~2.7 倍の出現コロニー数への増加が認められ、次いでグリセリン・アスパラギン寒天培地と B 培地でそれぞれ約 1.6 倍に増加した。しかし、7 日後では、ベネット寒天培地で約 2.5 倍に増加した以外は著しい変化はみられず、さらに、10 日後では全培地で新たなコロニーの形成は少なかった。

細菌のコロニー形成は、P S S A 培地で培養 3 日後から旺盛であったが、キチン培地では培養 10 日後まで著しく少なかった。一方、スターチ・硝酸塩・カゼイン寒天培地、マンニット・硝酸塩寒天培地、B 培地では 3 日後には出現コロニー数は比較的少なかったが、5 日後までにはスターチ・硝酸塩・カゼイン寒天培地における約 5.2 倍の増加割合を最高値として、キチン培地、B 培地、マンニット・硝酸塩寒天培地でも約 2.1~2.2 倍のコロニー数となった。その後、7 日後にキチン培地で 5 日後の約 1.8 倍に増

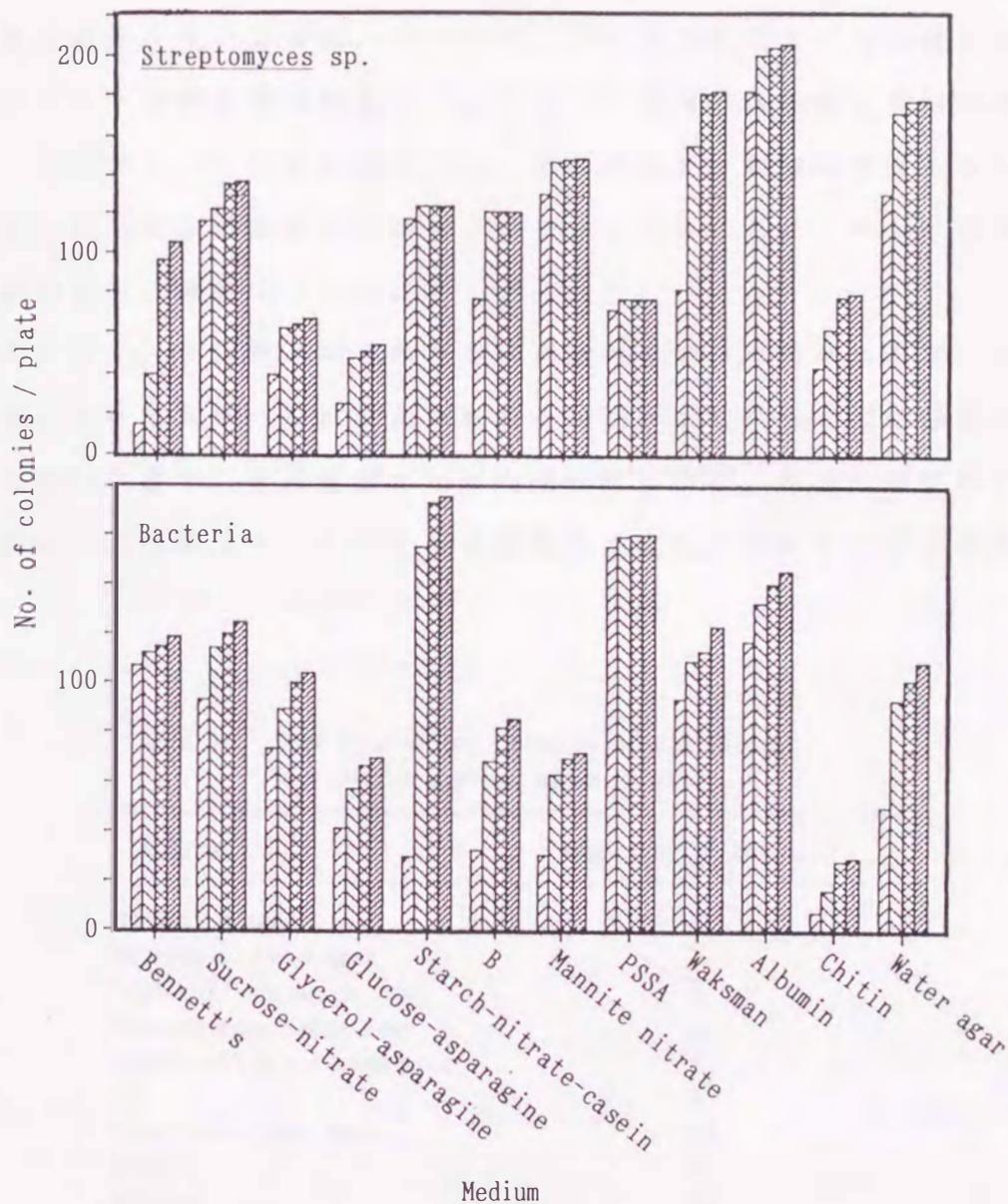


Fig. 11. Appearance of colonies of the pathogenic *Streptomyces* sp. causing root tumor of melon and contaminant bacteria on various media at 28 °C.

Incubation time (day); ▨:3, ▩:5, ▤:7, ▥:10.

B:basal medium for rhizosphere microorganisms by Lochhead and Chase⁸⁴), PSSA:potato semi-synthetic agar medium.

加した以外は、ほとんどの培地で新しいコロニーの出現は極めて少なかった。

また、出現した細菌のコロニー周縁の性状は、スターチ・硝酸塩・カゼイン寒天培地，キチン培地，B培地および素寒天培地では局限性を示し、マンニット・硝酸塩寒天培地とワックスマン培地では比較的局限的であった。一方、アルブミン寒天培地では、培養初期では局限的であったが、培養日数とともに拡散性を示す細菌コロニーも認められた。その他の培地では拡散性を示す細菌コロニーが多くを占めた。

このように、放線菌と細菌の出現状況は培地により異なったが、放線菌の出現が良好であり、それに比べ細菌の出現が乏しく、さらに細菌コロニーの形態が小型で、その性状が比較的局限性を示し、周辺への拡散も少ない培地は、B培地，マンニット・硝酸塩寒天培地，ワックスマン培地，ア

Table 37. Edge type of the colonies of contaminant bacteria on various media at 28 °C.

| Medium | Edge type of colonies ^{a)} |
|----------------------------|-------------------------------------|
| Bennett's agar | S |
| Sucrose-nitrate agar | S |
| Glycerol-asparagine agar | S |
| Glucose-asparagine agar | S |
| Starch-nitrate-casein agar | R |
| B ^{b)} | R |
| Mannite nitrate agar | RS |
| PSSA ^{b)} | S |
| Waksman | RS |
| Albumin agar | SR |
| Chitin | R |
| Water agar | R |

a) S:spreading, R:restricted, SR:relatively spreading, RS:relatively restricted.

b) B:basal medium for rhizosphere microorganisms by Lochhead and Chase⁸⁴⁾, PSSA:potato semi-synthetic agar medium.

ルブミン寒天培地であった。一方、スターチ・硝酸塩・カゼイン寒天培地と素寒天培地では細菌のコロニー数は比較的多かったが、そのコロニー周縁の性状は局限性を呈していた。

以上のことから、アルブミン寒天培地、素寒天培地、ワックスマン培地、マンニット・硝酸塩寒天培地、スターチ・硝酸塩・カゼイン寒天培地、B培地が病原放線菌分離用基本培地としてより適切であり、それらの培養日数は5日間が良好であった。

実験 - II: Iの結果より選抜した6種の培地上における罹病こぶ組織と健全根部からの放線菌と細菌の出現状況をTable 38に示した。

こぶ組織を分離源とした場合、放線菌の出現はB培地で最も多く、1gのこぶ組織当り 25.3×10^5 cfuであった。次いでワックスマン培地、マンニット・硝酸塩寒天培地の順で多かったが、素寒天培地、アルブミン寒天培地およびスターチ・硝酸塩・カゼイン寒天培地では著しく少なかった。また、同時に出現する混入細菌は供試6培地において大差なく、1シャーレ当り300前後のコロニーが検出された。

Table 38. Number of colonies of actinomycetes and bacteria appeared with dilution plate technique on various media from the tissues of diseased root tumor and healthy root of melon

| Medium | No. of colonies / plate ^{a)} ($\times 10^5$ cfu/g of tissues) | | | |
|----------------------------|---|----------|---------------|----------|
| | Root tumor | | Healthy root | |
| | Actinomycetes | Bacteria | Actinomycetes | Bacteria |
| Albumin agar | 7.7 | 322.7 | 1.3 | 122.7 |
| Water agar | 10.7 | 266.0 | 0.7 | 75.3 |
| Waksman | 18.3 | 267.7 | 7.3 | 93.0 |
| Mannite nitrate agar | 16.0 | 316.0 | 4.7 | 62.3 |
| Starch-nitrate-casein agar | 4.7 | 315.3 | 1.7 | 102.7 |
| B ^{b)} | 25.3 | 335.3 | 4.0 | 102.3 |

a) Average of three plates.

b) Basal medium for rhizosphere microorganisms by Lochhead and Chase⁸⁴⁾.

一方、健全根部からの出現コロニー数は、両菌種ともこぶ組織からのそれに較べ全般的に著しく少数であった。しかし、放線菌の出現はこぶ組織からと同様に、素寒天培地、アルブミン寒天培地、スターチ・硝酸塩・カゼイン寒天培地の3種で少なく、ワックスマン培地では、1gの根部組織当たり 7.3×10^5 cfuで、最も多いコロニーが認められた。また、細菌コロニー数は培地により差異がみられた。

以上のように、上記の6種の培地においては、罹病こぶ組織からの放線菌の検出はB培地で最も良好であるが、その時の混入細菌の出現には培地間で著しい差異は認められなかった。さらに、健全根からの放線菌の検出においてもB培地は、マンニット・硝酸塩寒天培地と同様のコロニー数を示した。

健全根部から検出される放線菌はがんしゅ病菌のほか、普通に根面に生息する一般の放線菌が主体である可能性が高く、一方、こぶ組織からは一般の放線菌も検出されるが、健全根に比べ増加した出現放線菌はがんしゅ病の発病に起因していると推察される。よって、両組織からの出現放線菌数の差が大きいB培地が分離用基本培地として最適と判断された。

第4節 化学処理効果の比較

前節までの結果よりB培地を分離用基本培地として、各種処理によるがんしゅ病菌の分離状況を比較した。

材料および方法

B培地を分離用基本培地とし、140倍フェノール水溶液による分離源の前処理、ならびに、分離培地への500ppmデヒドロ酢酸ナトリウム添加あるいは25ppmおよび50ppmのカナマイシン添加処理におけるがんしゅ病菌の

分離状況を、発病こぶ組織を分離源とした希釈平板法⁶¹⁾により比較した。平板培地は28°C、5日間培養後、各希釈段階において1シャーレ当りの出現細菌数と放線菌数を調査した。さらに、出現した放線菌は釣菌後、第4章第5節と同一の方法によりメロンへの接種試験に供試して病原性の有無を調べ、がんしゅ病菌の判定を行った。

結 果

分離状況の比較はTable 39に示した。

B培地上での無処理区では、分離源を 10^{-5} に希釈した時にはじめて独立した放線菌コロニーの出現が認められ、1シャーレ当たり平均13菌株が分離された。しかし、同じ希釈段階において約108個の細菌コロニーが出現し、それより濃い希釈段階では混入細菌のコロニーが多く、放線菌の分離は不可能であった。また、フェノール処理区とカナマイシンの両濃度添加区では、 10^{-4} の希釈段階から放線菌の単独のコロニーの出現がみられた。とくに、フェノール処理では、 10^{-4} 希釈段階で平均36個の放線菌コロニーの出現に対し、細菌のコロニーは平均4.7個と著しく少なかった。デヒドロ酢酸ナトリウム添加区では無処理区と同じ希釈段階において1シャーレ当たり5菌株の放線菌の分離が可能であった。

一方、全分離放線菌中のがんしゅ病菌の占める割合は、50ppm カナマイシン添加区の 10^{-4} 希釈段階で分離された平均5.7菌株のすべてががんしゅ病菌であった。また、フェノール処理およびデヒドロ酢酸ナトリウム添加区では、出現放線菌の約50%ががんしゅ病菌であり、 10^{-4} および 10^{-5} 希釈段階において1シャーレ当たりそれぞれ平均18.0菌株と2.3菌株が分離された。しかし、25ppm カナマイシン添加区ではがんしゅ病菌はまったく分離されず、無処理区でも13菌株中3菌株の低い割合であった。

このように、分離源のフェノール処理は主に細菌の出現抑制に効果的で、効率よく多くのがんしゅ病菌株を分離することが可能であった。また、50

Table 39. Effects of various treatments in appearance of colonies of total bacteria, actinomycetes and the pathogenic Streptomyces sp. isolated from diseased tissues of root tumor of melon with dilution plate technique on basal medium of Lochhead and Chase

| Dilution of root tumor tissue ^{c)} | Number of colonies per plate ^{a)} | | | | | | | | | |
|---|--|----------------------|--|----------------------|-------------------------|----------------------|------------------|----------------------|------------------|----------------------|
| | Phenol ^{c)} (x140) | | Dehydroacetic acid sodium salt ^{b)} (500 ppm) | | Kanamycin ^{b)} | | | | Control | |
| | | | | | 50 ppm | | 25 ppm | | | |
| | TB ^{d)} | TA(PS) ^{d)} | TB ^{d)} | TA(PS) ^{d)} | TB ^{d)} | TA(PS) ^{d)} | TB ^{d)} | TA(PS) ^{d)} | TB ^{d)} | TA(PS) ^{d)} |
| 10 ⁻³ | A | A | B | B | B | B | B | B | B | B |
| 10 ⁻⁴ | 4.7 | 36.0(18.0) | B | B | 117.0 | 5.7(5.7) | 152.7 | 9.7(0) | B | B |
| 10 ⁻⁵ | 0.3 | 7.3(3.7) | 21.3 | 5.0(2.3) | 17.3 | 0.7(0.7) | 17.3 | 0.3(0) | 108.3 | 13.0(3.0) |

- a) Average of three plates. Figures show number of appeared colonies per plate smeared with 0.1 ml of the diluent of isolating source. A and B show unrecorded colonies because of too many of actinomycetes and bacteria, respectively.
- b) Phenol treatment was based on Lawrence's method⁷⁶⁾, dehydroacetic acid sodium salt and kanamycin were added to the isolating medium with respective concentrations.
- c) Dilution was carried out with volume to weight of diseased fresh tissues of root tumors.
- d) TB:total bacteria, TA:total actinomycetes, (PS):pathogenic Streptomyces sp. causing root tumor of melon.

ppm のカナマイシン添加は全放線菌中のがんしゅ病菌の出現割合の増加に有効であり、より確実ながんしゅ病菌の検出には効果が高かった。

第5節 分離精度の実証

これまでに得られた結果を総合し、実際の実験においてその精度を比較、確認した。

材料および方法

140倍フェノール水溶液で前処理した分離源からのB培地上での分離、50ppmカナマイシン添加B培地上での直接分離、およびフェノール処理後カナマイシン添加B培地上での分離という3通りの希釈平板法¹²⁾により、異なった4～7か所の圃場から採取した発生土壌における罹病メロンのこぶを分離源として、がんしゅ病菌の分離を試みた。

分離結果は、それぞれ、より多くの釣菌可能な独立のコロニー形成がみられる分離源の希釈段階において、分離培地上に出現した1シャーレ当りの細菌ならびに放線菌のコロニー数を調査した。さらに、分離放線菌については前節と同様にメロンへの接種試験を行い、その結果から出現放線菌中に占めるがんしゅ病菌の割合を求めた。

結果

がんしゅ病菌の分離結果とその状況はTable 40に示した。また、フェノール処理とカナマイシン添加培地を組み合わせた分離平板の写真を、対照無処理区のそれと比較して Fig. 12に示した。

フェノール無処理の分離源からカナマイシン無添加培地上で分離した対

Table 40. Result of isolation tests of the pathogenic *Streptomyces* sp. causing root tumor of melon from different diseased samples by dilution plate technique with treatments of phenol and kanamycin on basal medium of Lochhead and Chase

| Treatment ^{a)} | Isolation ratio ^{b)} (%) | Isolation of pathogenic <i>Streptomyces</i> sp. | |
|-------------------------|-----------------------------------|---|--|
| | | Percentage in total actinomycetes | Range of number of the isolates per plate ^{c)} (mean) |
| Phenol (x140) | 5 / 7 (71.4) | 14.5 | 0.8 - 45.7 (11.0) |
| Kanamycin (50 ppm) | 4 / 7 (57.1) | 67.0 | 0.7 - 5.2 (2.4) |
| Phenol + Kanamycin | 4 / 4 (100) | 71.2 | 5.3 - 271.3 (80.6) |
| Control | 3 / 7 (42.9) | 12.5 | 0.2 - 0.3 (0.3) |

a) Treatment with phenol was based on Lawrence's method⁷⁶⁾, and kanamycine was added to medium for isolation.

b) Number of successful isolation tests / number of isolation tests.

c) Average of three plates.

照無処理区におけるがんしゅ病菌は、7地点のサンプル中3サンプルから分離され、その分離率は42.9%であった。また、それらのがんしゅ病菌の出現状況は、全出現放線菌の12.5%の割合を占めたが、1シャーレ当りの分離がんしゅ病菌数は、平均0.3菌株と極めて低い値であった。

一方、フェノール処理区では、がんしゅ病菌は7サンプル中5サンプル(71.4%)から分離され、全出現放線菌の14.5%を占め、1シャーレ当たり0.8~45.7菌株(平均11.0菌株)が分離できた。

50ppmカナマイシン添加培地区では、分離率は7サンプル中4サンプルの57.1%とフェノール処理区よりもやや低下し、分離がんしゅ病菌も平均2.4菌株と減少したが、出現放線菌に占める割合は67.0%の高い値を認めた。

さらに、フェノール処理と50ppmカナマイシン添加分離培地を組み合わせ

た結果では、がんしゅ病菌は供試したすべてのサンプルから分離され、出現放線菌の71.2%を占め、1シャーレ当たり5.3~271.3菌株(平均80.6菌株)を分離することができた。

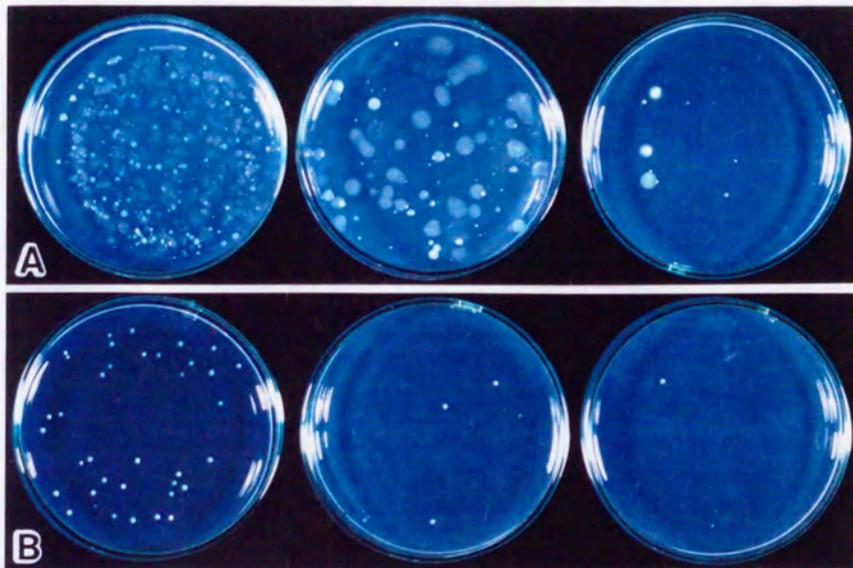


Fig. 12. Plate cultures obtained with the improved isolation method for the pathogenic *Streptomyces* sp. causing root tumor of melon from the diseased tissues on basal medium of Lochhead and Chase incubated at 28 °C for 5 days.

- A. Control (not improved isolation method).
- B. Improved isolation method by the treatment with x140 phenol and 50 ppm kanamycin. Dilution ratio were 10^{-3} , 10^{-4} and 10^{-5} from the left plate.

第6節 考 察

メロンがんしゅ病菌の分離は、1982年にがんしゅ病が原因不明の病害として初発生して以来、いくつかの試験研究機関で試みられていたが、1986年までいずれも病原菌の分離は不成功に終わっている⁵⁷⁾。病原菌が放線

菌であることが明らかになってからは、その目的とする分離対象物が絞られたことによって分離は比較的容易になったように思われるが⁴⁸⁾、実際に分離を試みても常に分離時の細菌混入が著しく、病原放線菌の分離に支障をきたす場合が多いのが実状であった。また、本試験の結果からもみられるように、通常の希釈平板法において分離平板培地上で放線菌の独立のコロニーを形成する濃度まで希釈した分離源からは、本病原放線菌はほとんど出現せず、たとえ出現した場合でもそれらの培地上では1シャーレ当たり平均0.3菌株ときわめて低率である。このように、本菌の分離は非常に困難で、分離時に混入する細菌のみならず他の放線菌に比べてかなりの低密度でこぶ組織に存在するか、あるいは、分離時に他の微生物による出現抑制を受けやすい性質を有するものと考えられた。

このような観点から、分離時の混入細菌の出現を減少させる分離方法の検討を行ったが、細菌のみを選択的に完全に抑制することは困難であった。そこで、がんしゅ病菌と混入細菌との種々の処理に対するコロニー形成率の相違を調べた。その結果から、分離源に対する前処理では、140倍フェノール水溶液による10分間処理で細菌よりがんしゅ病菌のコロニー形成率が高くなることから、混入細菌の出現を効果的に減少させることができるものと考えられた。この濃度は、ジャガイモにおけるそうか病菌⁷⁶⁾と亀の甲症の病原放線菌¹⁴⁹⁾の分離方法の報告と一致するものであった。また、分離用培地への添加抗生物質は、試験した多くが混入細菌と同様にかんしゅ病菌の生育も著しく抑制したが、25~50ppmのカナマイシンと500ppmのデヒドロ酢酸ナトリウムは比較的にかんしゅ病菌への影響が少なく、中でも50ppmカナマイシンは添加抗生物質としての効果が期待されると推察された。一方、分離用基本培地としては、混入細菌の出現が乏しく、とくに、細菌のコロニーはできる限り拡散せず、がんしゅ病菌の出現も良好であったことから、B培地が最適であり、その培養期間は、両菌の出現経過より5日間が良好と判断した。

次に、発病したメロンのこぶ組織から実際にかんしゅ病菌の分離を行い、

処理効果を比較した。その結果、分離源の希釈段階が低く、菌濃度が比較的濃い分離源から放線菌の単独のコロニー形成が良好であったフェノール処理によって、効率よく多数の病原放線菌を分離できることが確認された。また、分離培地への50ppmカナマイシン添加は、1シャーレ当りの分離菌株数はフェノール処理に比べると約3分の1に減少するが、出現放線菌中のがんしゅ病菌の占める割合を高め、確実な検出を目的とする場合は有効であると判断された。

さらに、140倍フェノール水溶液による前処理、B培地への50ppmカナマイシン添加、および、その両処理を組み合わせた方法により、異なった発生地点の発病メロンを分離源として、分離効率を比較した。すなわち、無処理では7地点のサンプル中3サンプルからがんしゅ病菌が分離されたが、各々の微生物が単コロニーを呈する釣菌可能な希釈段階では、1シャーレ当りに出現する放線菌のコロニー数は1~8個と少なく、さらに、がんしゅ病菌の占める割合は、その12.5%（平均0.3菌株）に過ぎなかった。一方、分離源をフェノール処理した場合には、7サンプル中5サンプルからがんしゅ病菌が分離され、無処理区に比べると比較的高い分離率となった。しかし、がんしゅ病菌は1シャーレ当り平均11菌株で、出現放線菌に対するその割合は無処理区と大差なかった。このことは、フェノール処理が主に混入細菌の密度低下に作用し、釣菌可能な希釈段階濃度を高め、分離対象となる放線菌数を増加させる結果になったのではないかと考えられる。また、50ppmカナマイシン添加区では、7サンプル中4サンプルからがんしゅ病菌が分離され、フェノール処理区よりもやや低い分離率となり、分離されるがんしゅ病菌数も減少したが、出現した放線菌に占める割合は高くなっている。これは、50ppmのカナマイシンがフェノール処理に比べ、混入細菌以上に比較的がんしゅ病菌以外の放線菌に対して抑制効果を示したためと思われる。

総合的には、フェノール処理と50ppmカナマイシン添加B培地を併用した分離法によって、供試したすべてのサンプルからがんしゅ病菌が1シャ

一レ当り平均80.6菌株分離され、放線菌に対する割合も71.2%で、最も高い値を得ることができるようになった。つまり、両処理を併用することにより個々の処理効果以上にかんしゅ病菌以外の混入微生物を減少させ、無処理区の10~1,000倍の濃い希釈段階濃度から釣菌可能になった。

以上のことから、かんしゅ病菌の分離は、新鮮な罹病こぶ組織を洗浄後、滅菌水で磨砕した搾汁液を140倍フェノール水溶液で10分間前処理した後、50ppmカナマイシン添加B培地上に塗抹し、28°C、5日間培養して分離することによって、効率よく分離できることが明らかとなった。本分離方法では当初の分離確率に比べると、罹病組織からかんしゅ病菌をより確実に分離するという目的は達成された。また、分離培地上でのかんしゅ病菌のコロニーの特徴を理解することによって、さらに分離効率の向上も期待できる。

野々村^{10,3)}は、土壤放線菌の分離試料の前処理として土壤細菌の殺菌のほかに、放線菌の胞子の活性化による発芽の向上と種々の処理に対する特定放線菌群の耐性を利用した選択分離の方法を論じ、Hayakawa and Nonomura³¹⁾はそれらの併用法を示しているが、本病原放線菌分離へのその適用については、現在検討中である。

本実験において構築した分離方法は、定性的な分離を目的とするもので、定量的な検出には利用できないが、かんしゅ病の診断のためには十分に活用できるものと考ええる。

今後は、本菌の特性や本病の生態的特徴を利用したさらに有効な選択的分離方法への改善と、土壤中の病原放線菌の定量方法についての検討が必要である。

第7章 病原放線菌胞子の発芽とその活性化

放線菌は主に胞子の状態で生息し、その一部は休眠状態にあると考えられている^{11, 39, 88)}。また、第5章において、本病原放線菌の胞子が培地上で膨潤しているが発芽しない場合も認められた。したがって、メロンがんしゅ病菌に休眠状態の胞子が存在するならば、その発芽の活性化法を確立することは、病原放線菌の検出、定量法の開発および防除の面で有意義であると考えられる。

本章では、メロンがんしゅ病菌の胞子の発芽状況を調査し、未発芽胞子（休眠胞子）を確認後、それらの胞子に対する活性化処理^{26, 31, 34, 35)}の効果について検討した。

第1節 新生胞子と冷蔵胞子の発芽状況

培地上での胞子の発芽状況を新生胞子と冷蔵胞子について試験し、発芽しない胞子の有無とその割合を比較検討した。

材料および方法

メロンがんしゅ病菌はB-9-1菌株（Table 9）を用い、2種の方法で調製した胞子を供試した。すなわち、イースト・スターチ寒天培地（酵母エキス2g，可溶性デンプン10g，寒天15g，蒸留水1,000ml，pH 7.3、以下YS培地と呼ぶ）で28℃，14日間平板培養して形成された気菌糸部分の菌そう（胞子とともに）をすばやく滅菌水に懸濁し、十分に攪はん後、5μmのフィルターで2回ろ過して菌糸体を除去し、このろ液を胞子（以下新生胞子と呼ぶ）懸濁液とした。また、同培地で28℃，28日間平板培養し

て形成された菌そうをさらに5℃で28日間冷蔵後、前と同様に調製した孢子³¹⁾ (以下冷蔵孢子と呼ぶ)懸濁液を供試した。

発芽用培地には、Y S培地およびLochhead and Chaseの根圏微生物用の基本培地⁸⁴⁾ (以下B培地と呼ぶ)を供試した。

シャーレ中に供試培地を流し込み、この平板培地上にスライドグラスを置き、さらに、同培地を流し込んでスライドグラス上に薄層を作り、その培地上に孢子懸濁液を滴下し白金耳で拡げた。28℃で培養して、0, 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72時間後にスライドグラス上の孢子発芽の有無を位相差顕微鏡により観察した。発芽率は1視野当り任意に100~150個体、3視野の孢子について調査した。

結 果

培養時間と孢子発芽率の推移をFig. 13に示した。

新生孢子では両供試培地において培養1時間後まで発芽は認められなかった。しかし、培養3時間後からそれぞれ1%前後の孢子が発芽を開始し、発芽率は培養時間の経過とともに急激に増加していった。すなわち、Y S培地上での発芽率は培養12時間後までに66.4%に増加し、24時間後には86.5%に達したが、36時間後ではその値はほとんど変化なかった。一方、B培地上での発芽率は培養12時間後に50.3%に急増後、36時間後の81.7%まで直線的に増大したが、その後、48時間後までには約2%の増加に過ぎなかった。なお、Y S培地上での培養48時間後以降およびB培地上での培養72時間後には、すでに発芽した菌糸の伸長のために発芽率の調査は困難であった。このように、B培地上での新生孢子ではY S培地に比べ、発芽率が最高値に達するまでに約12時間の遅延が認められた。

冷蔵孢子の場合には2種の培地間で発芽率の推移にはほとんど差はなかった。すなわち、新生孢子と同様に培養3時間後から孢子の発芽が認められ、48時間後の約70%の発芽率まで直線的に増加した。しかし、72時間後

にはその増加傾向は低下し、発芽率の推移は新生胞子に比べて比較的緩やかであった。

本観察における胞子の発芽率は、新生胞子が Y S 培地上で 87.0%、B 培地上で 84.0% を示し、また、冷蔵胞子ではそれぞれ 81.2% と 83.3% であった。

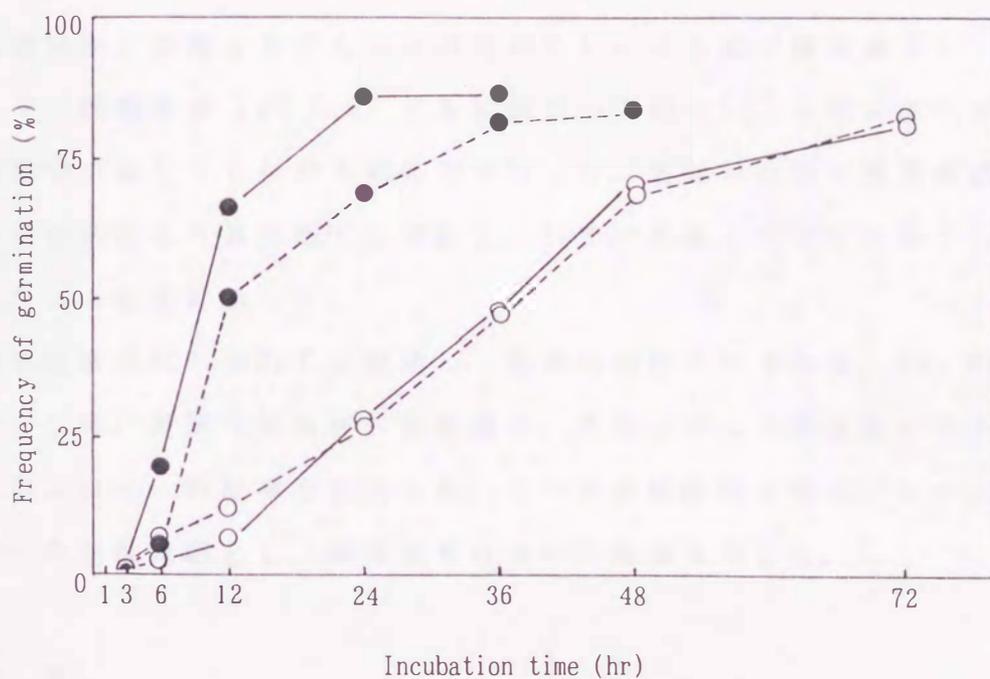


Fig. 13. Promotion of spore germination of the pathogenic *Streptomyces* sp. causing root tumor of melon on 2 media at 28 °C.

- : spore formed with culture at 28 °C for 14 days,
- : spore stored at 5 °C for 28 days after sporulation with culture at 28 °C for 28 days,
- : incubated on the yeast-starch agar medium.
- : incubated on the basal medium for rizosphere microorganisms by Lochhead and Chase.

第2節 熱処理による孢子発芽の活性化

前節で発芽困難な孢子の存在が確認されたため、孢子を加熱処理することによってそれらの発芽活性を促し、孢子発芽率を高めることを試みた。

材料および方法

前節同様に調製したがんしゅ病菌の0.3 mlの各孢子懸濁液と2.7 mlの5 mM-リン酸緩衝液 (pH 7.0) とを試験管中で混合し、処理温度に設定した湯煎器中で振とうしながら熱処理を行った。処理した孢子懸濁液は直ちに希釈平板法によりB培地上に塗抹し、28°Cで培養して5日後と7日後に出現コロニー数を計測した。

処理温度は40°Cと50°Cに設定し、処理時間はそれぞれ5, 10, 20, 30, 40分とした。対照(無処理)区を設け、そのコロニー形成数に対する処理孢子のコロニー形成率を算出した。すべての試験は3枚のシャーレ(直径9 cm)の反復実験とし、結果はそれらの平均値で示した。

結 果

処理時間と出現コロニー数をTable 41に示した。出現コロニー数は培養5日後と7日後に調査したが、両者に著しい相違は認められなかったので培養5日後の結果をFig. 14に示した。

新生孢子の40°C処理では処理時間が20分まで形成コロニー数は徐々に増加し、無処理区での346.0に対して398.3になり、115.1%のコロニー形成率に達した。しかし、30分処理からはコロニー数は減少し、無処理区より低いコロニー形成率となった。また、50°C処理では5分間処理からコロニー数は急減した。

一方、冷蔵孢子では40°Cの5~10分間処理でコロニー数が無処理区より

Table 41. Effect of heat treatment on spore germination activity of the 2 types spores (NS, MS) of the pathogenic Streptomyces sp. causing root tumor of melon

| Tested spore types ^{a)} | Treatment temperatures (°C) | Incubation time (day) | Treatment time (min) | | | | | | |
|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------|-------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | | | 0(Control) | 5 | 10 | 20 | 30 | 40 | |
| NS | 40 | 5 | 346.0 ^{b)} (100) | 359.3 (103.8) | 387.7 (112.0) | 398.3 (115.1) | 326.3 (94.3) | 315.3 (91.1) | |
| | | 7 | 354.7 (100) | 376.3 (106.0) | 405.0 (114.2) | 403.3 (113.7) | 334.0 (94.2) | 320.7 (90.4) | |
| | 50 | 5 | 346.0 (100) | 95.7 (27.5) | 51.7 (14.9) | 27.0 (7.8) | 22.7 (6.6) | 21.3 (6.2) | |
| | | 7 | 350.7 (100) | 106.0 (30.2) | 56.0 (16.0) | 29.3 (8.4) | 26.0 (7.4) | 22.0 (6.3) | |
| | MS | 40 | 5 | 239.0 (100) | 229.7 (96.1) | 231.7 (96.9) | 263.0 (110.0) | 257.3 (107.7) | 241.7 (101.1) |
| | | | 7 | 243.0 (100) | 237.7 (97.8) | 246.0 (101.2) | 266.0 (109.5) | 261.3 (107.5) | 247.3 (101.8) |
| 50 | | 5 | 239.0 (100) | 69.3 (29.0) | 13.3 (5.6) | 1.7 (0.7) | 0.3 (0.1) | 0 (0) | |
| | | 7 | 243.0 (100) | 72.0 (29.6) | 14.7 (6.0) | 2.0 (0.8) | 0.7 (0.3) | 0.3 (0.1) | |

a) NS:spore formed with culture at 28 °C for 14 days, MS:spore stored at 5 °C for 28 days after sporulation with culture at 28 °C for 28 days.

b) Figures show mean number of appeared colonies per plate, and ones in parenthesis are percentage to control.

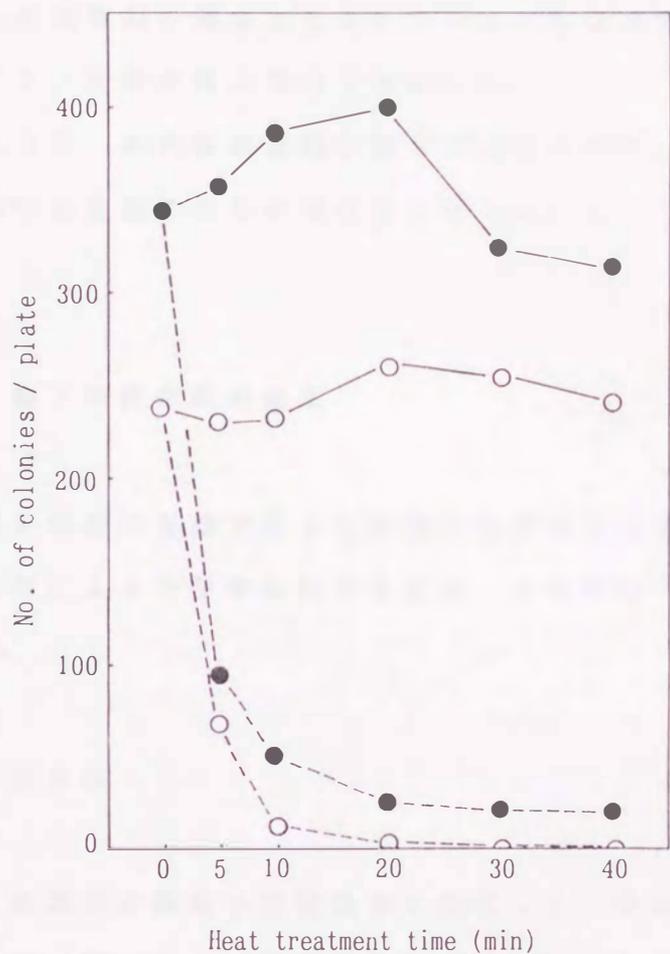


Fig. 14. Effect of heat treatment on spore germination activity of the pathogenic *Streptomyces* sp. causing root tumor of melon.

- : spore formed with culture at 28 °C for 14 days,
- : spore stored at 5 °C for 28 days after sporulation with culture at 28 °C for 28 days,
- : treatment at 40 °C,
- : treatment at 50 °C.

The plates were incubated at 28 °C for 5 days.

わずかに減少したが、20分間処理では無処理区の239.0に対して263.0と最も多いコロニー数を認め、110.0%のコロニー形成率であった。その後、40分間処理までコロニー数は徐々に減少した。また、50°Cの処理では5分間処理から処理時間の増加とともにコロニー数は急減し、20分間以上の処理ではコロニー形成率は1%以下を示した。

以上のように、本病原放線菌の胞子の発芽は40°C、20分間の熱処理によって最も活性化されることが明らかとなった。

第3節 胞子活性化剤の効果

前節で胞子発芽に有効であった加熱の処理条件を基本として、さらに、胞子活性化剤による発芽率の向上を試み、未発芽胞子の発芽活性化処理法を検討した。

材料および方法

がんしゅ病菌の冷蔵胞子の懸濁液を供試して、培地、調査方法およびコロニー形成率の算出法などは前試験と同様に行った。

試験-I：胞子活性化剤として、酵母エキス（YE；Difco）、フミン酸（HA；東京化成）、L-バリン（Va；和光純薬）、カザミノ酸（CA；Difco）、メルカプトエタノール（Me；和光純薬）およびドデシル硫酸ナトリウム（SDS；東京化成）の6種について試験した。

各胞子活性化剤は、最終添加濃度がTable 42～Table 47に示した所定の濃度となるように5 mM-リン酸緩衝液（pH 7.0）に溶解（HAは10倍量の2 N-NaOH水溶液で予め溶解する）し、pH 7.0に調整後オートクレーブ滅菌したものを胞子活性化剤溶液とした。なお、ME溶液はオートクレーブ滅菌のリン酸緩衝液で希釈し、pH 7.0に調整後ろ過滅菌した。

処理は、0.3 mlの孢子懸濁液と2.7 mlの孢子活性化剤溶液を試験管中で混合し、40℃で20分間振とう（前節の結果）の熱処理を加えた。処理液は同様に培地上での出現コロニー数を計測し、孢子発芽の活性の有無を調査した。なお、熱処理のみを加えた孢子活性化剤無添加区を対照区とした。

試験 - II：試験 - Iの結果より、高い活性化の効果が認められた0.025%のSDSと0.5~8.0%の濃度のYEとの組み合わせ処理（40℃，20分）による活性化の比較を前試験と同様に行った。対照区として熱処理のみの区とSDS単独処理（熱処理をする）区を設けた。

結 果

試験 - I：孢子発芽に対する孢子活性化剤の影響をTable 42~Table 47に示した。

6種の孢子活性化剤のうちVA，CAおよびMeの3種では、試験した添加濃度の上昇にともないコロニー形成率は低下傾向を示して孢子の発芽活性化の効果は認められず、むしろ孢子の発芽を阻害した。また、HA処理ではすべての添加濃度においてコロニー形成率にほとんど変化なく、孢子の発芽活性化の効果はみられなかった。

一方、YE処理では1.0%溶液においてコロニー形成率は103.3%とわずかに高くなり、2.0%溶液で109.4%の最も高いコロニー形成率を示した。しかし、4.0~8.0%溶液処理では添加濃度の増加にしたがいコロニー形成率は低下した。

SDS処理は0.00625%から0.2%までの濃度溶液で処理した結果、コロニー形成率は0.0125%までは約102~103%であったが、0.025%溶液処理で121.2%に急増した。しかし、その後は、処理溶液の添加濃度がさらに上昇するとともに徐々にコロニー形成率は低下傾向を示した。

試験 - II：0.025% SDS溶液と各種濃度のYEとの組み合わせ処理の結果は、Table 48に示した。

Table 42. Effect of yeast extract (YE) on spore germination activity of the pathogenic *Streptomyces* sp. causing root tumor of melon

| Incubation time (days) | Concentration (%) of YE at 40 °C for 20 min | | | | | |
|------------------------|---|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 0(Control) | 1.0 | 2.0 | 4.0 | 6.0 | 8.0 |
| 5 | 162.7 ^{a)} (100) | 168.0 (103.3) | 178.0 (109.4) | 164.3 (101.0) | 135.7 (83.4) | 143.0 (87.9) |
| 7 | 172.3 (100) | 175.3 (101.7) | 186.7 (108.4) | 174.3 (101.2) | 143.3 (83.2) | 152.0 (88.2) |

a) Figures show average number of colonies appeared on each plate, and ones in parenthesis are percentage to control.

Table 43. Effect of humic acid (HA) on spore germination activity of the pathogenic *Streptomyces* sp. causing root tumor of melon

| Incubation time (days) | Concentration (%) of HA at 40 °C for 20 min | | | |
|------------------------|---|------------------|------------------|------------------|
| | 0(Control) | 0.2 | 1.0 | 2.0 |
| 5 | 295.3 ^{a)} (100) | 294.3 (99.7) | 295.3 (100.0) | 298.3 (101.0) |
| 7 | 304.3 (100) | 302.3 (99.3) | 302.0 (99.2) | 304.0 (99.9) |

a) See Table 42.

Table 44. Effect of valine (VA) on spore germination activity of the pathogenic *Streptomyces* sp. causing root tumor of melon

| Incubation time (days) | Concentration (%) of VA at 40 °C for 20 min | | | | |
|------------------------|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 0(Control) | 0.1 | 0.2 | 0.5 | 1.0 |
| 5 | 60.7 ^{a)} (100) | 55.7 (91.8) | 51.7 (85.2) | 52.0 (85.7) | 50.0 (82.4) |
| 7 | 61.3 (100) | 56.7 (92.5) | 52.7 (86.0) | 53.3 (86.9) | 51.7 (84.3) |

a) See Table 42.

Table 45. Effect of casamino acid (CA) on spore germination activity of the pathogenic *Streptomyces* sp. causing root tumor of melon

| Incubation time (days) | Concentration (%) of CA at 40 °C for 20 min | | | | |
|------------------------|---|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 0(Control) | 0.5 | 1.0 | 2.0 | 4.0 |
| 5 | 231.3 ^{a)} (100) | 231.3 (100.0) | 226.0 (97.7) | 221.3 (95.7) | 208.0 (90.0) |
| 7 | 237.7 (100) | 237.7 (100.0) | 231.3 (97.3) | 226.0 (95.1) | 212.0 (89.2) |

a) See Table 42.

Table 46. Effect of mercaptoethanol (Me) on spore germination activity of the pathogenic *Streptomyces* sp. causing root tumor of melon

| Incubation time (days) | Concentration (%) of Me at 40 °C for 20 min | | | | |
|------------------------|---|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 0(Control) | 0.1 | 0.2 | 0.4 | 0.8 |
| 5 | 497.7 ^{a)} (100) | 477.3 (95.9) | 440.0 (88.4) | 388.3 (78.0) | 380.7 (76.5) |
| 7 | 506.0 (100) | 486.7 (96.2) | 451.3 (89.2) | 398.0 (78.7) | 391.7 (77.4) |

a) See Table 42.

Table 47. Effect of sodium dodecyl sulfate (SDS) on spore germination activity of the pathogenic *Streptomyces* sp. causing root tumor of melon

| Incubation time (days) | Concentration (%) of SDS at 40 °C for 20 min | | | | | | |
|------------------------|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 0(Control) | 0.00625 | 0.0125 | 0.025 | 0.05 | 0.1 | 0.2 |
| 5 | 168.3 ^{a)} (100) | 172.0 (102.2) | 173.0 (102.8) | 204.0 (121.2) | 177.7 (105.6) | 165.7 (98.5) | 156.0 (92.7) |
| 7 | 171.7 (100) | 176.0 (102.5) | 174.7 (101.7) | 208.3 (121.3) | 180.3 (105.0) | 168.0 (97.8) | 158.7 (92.4) |

a) See Table 42.

Table 48. Effect of different concentrations of yeast extract (YE) added into sodium dodecyl sulfate (SDS) solution on spore germination activity of the pathogenic Streptomyces sp. causing root tumor of melon

| Incubation time (days) | Control ^{a)} | Concentration (%) of YE added to SDS (0.025%) at 40 °C for 20 min | | | | | | |
|------------------------------|-----------------------|---|---------|---------|--------------|---------|---------|---------|
| | | 0 | 0.5 | 1.0 | 2.0 | 4.0 | 6.0 | 8.0 |
| 5 | 490.3 ^{b)} | 572.0 | 296.3 | 293.7 | 278.7 | 267.7 | 262.3 | 254.7 |
| | (100) | (116.7) | (60.4) | (59.9) | (56.8) | (54.6) | (53.5) | (52.0) |
| 7 | 499.0 | 595.0 | 320.3 | 301.7 | 290.3 | 283.3 | 275.3 | 270.3 |
| | (100) | (119.2) | (64.2) | (60.5) | (58.2) | (56.8) | (55.2) | (54.2) |

a) Only treated with heat.

b) Figures show average number of colonies appeared on each plate, and ones in parenthesis are percentage to control.

培養5日後の調査において、0.025% SDS溶液のみによる40°C、20分間の処理では熱処理のみの対照区に対して116.7%のコロニー形成率を認め、SDS処理による孢子発芽の活性化が確認された。しかし、0.025%のSDS溶液に0.5~8.0%の濃度のYEを添加して同様に処理した結果、コロニー形成率は0.5%のYE添加区で60.4%に激減し、その後、添加したYEの濃度の増加にしたがいさらに低下した。また、培養7日後では各試験区において5日後よりわずかにコロニー数の増加はみられたが、コロニー形成率は5日後と大差なかった。

第4節 考 察

休眠状態の放線菌孢子は、加熱処理やある種のアミノ酸などの化学物質（活性化剤）で処理することにより休眠が打破されて発芽が誘導、または活性化されることが知られている^{26, 31, 34, 35, 160}。

そこで、メロンがんしゅ病菌の休眠状態の孢子（未発芽孢子）の有無を確認するために、まず、本病原放線菌孢子的発芽状況を調べた。その結果、孢子的保存状態や発芽培地の栄養条件により培養時間と発芽率の推移に相違は認められたが、最終的な発芽率は試験した新生孢子と冷蔵孢子的間、および、供試したYS培地とB培地の発芽培地的間においてほとんど差はみられないものと思われた。また、孢子的発芽は両孢子ともに28°Cで培養3時間後から始まり、このことは第5章の結果と一致していた。一方、新生孢子的発芽は多くが培養24~36時間後までに起こり、その後はほとんど行われなことが明らかとなった。これに対し、冷蔵孢子的発芽率は培養3時間後から48時間後まで徐々に直線的に増加し、その後の24時間では増加傾向は緩やかとなった。このように、冷蔵孢子では発芽が比較的ゆっくりと進み、最高発芽率に達するまでに新生孢子に比べて約1~2日の遅延がみられた。

胞子の発芽率は新生胞子ではおよそ85%であり、胞子形成後低温に保存した冷蔵胞子でも大差なかった。しかし、前述したように、それらの発芽率に達するまでの所要時間には違いがみられ、冷蔵胞子の方が発芽が不揃い（非同調的）であった。このことから、冷蔵胞子にはより休眠状態に近い胞子が多く存在するのではないかと考えられた。また、本試験では新生胞子で84.0～87.0%、冷蔵胞子で81.2～83.3%の発芽率まで観察されたが、その後発芽率は一定となったので、それ以上の発芽率の増加の可能性は低いものと思われる。

そこで、それらの未発芽状態の胞子の発芽を加熱処理によって活性化した結果、新生胞子と冷蔵胞子ともに40℃、20分間の熱処理がコロニー形成率を無処理区の1.1～1.15倍まで増加させることができ、胞子発芽の活性化に有効であった。さらに、発芽が非同調的であった冷蔵胞子を用いて、40℃、20分間の加熱を基本処理とした活性化剤による発芽活性化を試みた。その結果、0.025%のSDS添加処理と2.0%のYE添加処理では、それぞれ熱処理のみを加えた胞子の約1.2倍と約1.1倍のコロニー形成率を示し、がんしゅ病菌の胞子活性化剤として0.025%のSDS添加と2.0%のYE添加が有効であると考えられた。一方、活性化処理後のコロニー形成率から無処理区での胞子発芽率を算出したところ、約75～83%の値が得られた。この値は前述の胞子発芽率の調査結果と近似しており、このことから未発芽状態のほぼすべての胞子が発芽活性化されていることが推察される。また、このような処理により胞子の発芽が明らかに活性化されたことは、本病原放線菌の未発芽胞子が休眠状態にあることを明確に示したものと思われる。

Hayakawa and Nonomura³¹⁾は休眠している胞子の発芽を活性化する土壤放線菌の体系的な選択分離法を開発し、0.05%のSDSと6%のYEとの混合液による40℃、20分間の処理により、*Streptomyces*属菌を中心とした一般土壤放線菌の出現数を約40%増加することができたとしている。したがって、この報告をもとに0.025%のSDSと各種濃度のYEを組み合わせ

た併用処理（40℃，20分）のがんしゅ病菌孢子への効果を調べたが、発芽の活性化は認められず、むしろ両活性化剤を併用することで発芽は著しく阻害されることが明らかとなった。このことは、本病原放線菌が土壌生息の *Streptomyces* sp. であるにもかかわらず、上記の選択分離法ではきわめて分離が困難と予想される。

植物放線菌病の場合、混入微生物によって病原菌のみを効率よく分離することが困難とされ、その分離方法が常に問題となってきた^{28, 52, 64-76, 109}。メロンがんしゅ病においては罹病組織からの病原放線菌の効率的分離方法は前章で検討したが、その分離方法でも混入細菌と同時に病原放線菌の出現もある程度抑制されるため、病原菌密度が低い分離源からの検出に不適であるほか、定量的検出には利用できない。

このことから、メロンがんしゅ病菌のより効率的な分離法への改善や生態学的研究のためには、分離培地上にできる限り本病原放線菌のみを、また、生息するなるべくすべてのがんしゅ病菌を分離生育させることが重要となる。

Hayakawa and Nonomura³¹⁾は、0.05～0.1%のSDS処理（40℃，20分）が土壌からの分離平板上で細菌の出現を無処理区の1/10に抑えたことを示し、著者も0.025%のSDS処理（40℃，20分）がメロンがんしゅ病菌の分離時の混入細菌の出現を培地上で50～60%抑制することを確認している（未発表）。

本実験では、メロンがんしゅ病病原放線菌孢子には培地上で容易に発芽しない休眠状態の孢子が含まれていることを明らかにし、その休眠打破には0.025%のSDS溶液あるいは2.0%のYE溶液による40℃，20分間の処理が有効であることを解明したが、上述したような他の細菌の出現を抑制する効果を考慮すると、SDS溶液処理の方が最適であると思われる。したがって、本孢子活性化処理法はメロンがんしゅ病菌の分離・検出手法への適用の可能性が高いと考えられた。