

Erwinia carotovora subsp. *carotovora* の接種条件が ストレプトマイシン剤の組織腐敗阻止効果 におよぼす影響*1

田中 民夫*2 青田 盾彦*2

本剤の浸漬処理を行ったダイコン根部切片に軟腐病細菌を接種し、20℃に静置すると切片の腐敗は阻止されたが、温度が高くなるに従い、阻止効果が低下し、腐敗は増加した。同様の腐敗阻止効果の低下は薬剤処理した切片を高温(30℃)に長く置いた場合にも認められた。一方、25℃に静置したとき同一切片に最大5回まで接種をくり返しても腐敗程度は増加しなかったが、接種後に薬剤処理を行うと腐敗は増加した。また、ダイコン根部で培養した細菌けん濁液を培養後7時間目以降に回収し、接種源としたところ、腐敗の増加が認められた。さらに、培養24時間目に細菌けん濁液から病原細菌のみを回収し、接種源としたときにも腐敗の増加が見られた。以上のように、高温条件、接種後の薬剤処理に加えて、ダイコン根部で培養した病原細菌けん濁液および回収細菌を接種源とすることによりストレプトマイシン剤の組織腐敗阻止効果が低下することが明らかになった。

緒 言

ストレプトマイシンは1944年に発見された医薬用抗生物質である。その後、農業用防除薬剤として実用化する目的で、野菜の軟腐病に対しても、本剤の散布時期、散布回数および散布濃度などが検討され^{9,10,23)}、他剤との混用試験が実施された¹⁰⁾。現在では、ストレプトマイシン剤は単剤および他剤との混合剤として多くの細菌性病害に適用されている¹⁶⁾。

ストレプトマイシンはタンパク合成阻害の抗生物質であり、*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* に対し抗菌性を示す^{4,13)}。軟腐性 *Erwinia* 属細菌の一種である *E. carotovora* subsp. *atroseptica* による作物組織の腐敗はストレプトマイシン剤処理により阻止されるが¹²⁾、本剤の組織腐敗阻止効果に影響する要因を詳細に検討した報告は見当たらない。一方、ストレプトマイシン剤散布で十分な防除効果が得られない場合があり、その

原因を解明することは防除対策上重要である。

本報においては、ストレプトマイシン剤の防除効果不安定性の原因を解明するために本剤の組織腐敗阻止効果に影響する要因を検討したので、その結果を報告する。

実験材料および方法

1. 病原細菌

1985年に北海道常呂郡訓子府町で軟腐病罹病ダイコンから分離した *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* を供試した。本細菌を普通寒天斜面培地に移植し、25℃で24時間培養した後、菌体を10 ml の殺菌蒸留水にけん濁し、接種源として供試した(菌密度 2.7×10^8 cfu/ml)。

2. 供試組織

市販ダイコンの根部を厚さ約5 mm で輪切りとし、さらにこれを十字に切斷した切片をそれぞれ供試した。

3. 供試薬剤

市販ストレプトマイシン剤20%水和剤(商品名:アグレプト水和剤)を1,000倍液として供試した。

4. 調査基準

ダイコン根部切片の腐敗程度を表1に示した基

1989年12月1日受理

*1 本報は1989年度日本植物病理学会北海道部会で発表した。

*2 北海道立道南農業試験場, 041-12 亀田郡大野町

表1 腐敗程度指数

指数	腐敗程度*
0	腐敗なし
1	切片の1/4未満が腐敗
2	切片の1/4以上1/2未満が腐敗
3	切片の1/2以上3/4未満が腐敗
4	切片の3/4以上が腐敗

* : 病原細菌を接種した切断面の腐敗程度から指数を決定した。

準で調査した。

5. 薬剤処理法および接種条件

1) 薬剤処理切片の温度処理

ダイコン根部切片40枚をストレプトマイシン剤(1,000倍)(以下、薬液と略記)800ml中に30分間浸漬した後、薬液5mlを入れたペトリ皿中に切片を1枚ずつ移し、病原細菌けん濁液50 μ lを切片上にそれぞれ接種した。この切片を20、25、30および35 $^{\circ}$ Cにそれぞれ10枚ずつ静置し、切片の腐敗程度を調査した(3回反復実験した)。

変温処理試験では、薬剤処理切片に病原細菌を同様に接種し、30 $^{\circ}$ Cに時間別にこの切片を静置した後、20 $^{\circ}$ Cに移し、その後腐敗程度を調査した。

いずれの試験においても蒸留水に同様に浸漬した切片に病原細菌を接種し、対照とした。

2) 薬剤処理切片への病原細菌の連続接種

ダイコン根部切片50枚を薬液1l中に30分間浸漬した後、薬液5mlを入れたペトリ皿中に切片を1枚ずつ移し、25 $^{\circ}$ Cに静置した。その後、表2に示した時期に、これらの切片に接種1回当たり10 μ lの病原細菌液を接種し、その後腐敗程度を調査した。

3) 接種前後の薬剤処理

接種前の薬剤処理では、薬液200mlにダイコン根部切片を10枚ずつ30分間浸漬した後、薬液5mlを入れたペトリ皿に1枚ずつ移し、切片上に病原細菌けん濁液を50 μ l接種し、25 $^{\circ}$ Cに静置した後、腐敗程度を調査した。

接種後の薬剤処理では、殺菌蒸留水30mlを入れた直径12cmのペトリ皿中にダイコン切片を置き(各々10枚)、この切片上に病原細菌けん濁液を50 μ l接種した後、25 $^{\circ}$ Cに静置した。静置後1、3、5、7および9時間目に切片の薬液処理を前と同様に行った後、薬液を5ml入れたペトリ皿中に切片を1枚ずつ移し(25 $^{\circ}$ C)、一定時間後腐敗程度を調査した(2回反復実験した)。

4) ダイコン組織中で培養した細菌による接種

ダイコン根部を横断して長さ15cmとし、一方の切断面にコルクボーラで直径2.0cm深さ6.0cmの穴を開け、この穴の中に病原細菌けん濁液(7.0 \times 10⁸cfu/ml)20mlを注入した。殺菌蒸留水40mlを入れた2lビーカーの中にこの根部を静置し、ビーカーをパラフィルムで覆い、25 $^{\circ}$ Cに静置した。細菌けん濁液を注入した直後、1、3、5、7、9および24時間目に穴の中の細菌けん濁液をそれぞれ50 μ lずつ薬剤処理切片に接種した。薬液5mlを注入したペトリ皿中にこれらの切片を静置した後(25 $^{\circ}$ C)、腐敗程度を調査した(2回反復実験した)。

さらに、図式1に示した方法によりダイコン根部の穴に注入した細菌けん濁液から24時間目に病原細菌を回収して薬剤処理切片に接種を行い、この切片を25 $^{\circ}$ Cに静置した後、腐敗程度を調査した。普通寒天斜面培地で25 $^{\circ}$ C、24時間培養した菌体を

表2 病原細菌の接種回数と時期

処 理	接種回数	薬液処理後の経過時間				
		直 後	3 時間	6 時間	24時間	27時間
薬液	1	○				
	2	○	○			
	3	○	○	○		
	4	○	○	○	○	
	5	○	○	○	○	○
水	1	○				

○は接種

接種量: 接種1回当たり10 μ l

対照として接種に用いた。なお、菌体外に分泌された諸酵素を分解するために、細菌けん濁液のトリプシン処理を行った。

結 果

1. 薬剤処理切片の静置温度と薬剤の効果

ストレプトマイシン剤処理を行わなかった切片では、いずれの温度条件下においても切片全体が腐敗した。25℃では、接種後約7時間目に病徴が発現した。一方、ストレプトマイシン剤で処理したダイコン根部切片にダイコン軟腐病細菌を接種した場合、切片の静置温度が20℃では腐敗は完全に阻止されたが、温度が上昇するに従い、阻止効果が低下し、腐敗は増加した(図1)。同様の腐敗阻止効果の低下は薬剤処理した切片を高温(30℃)に長く置いた場合にも認められた(図2)。

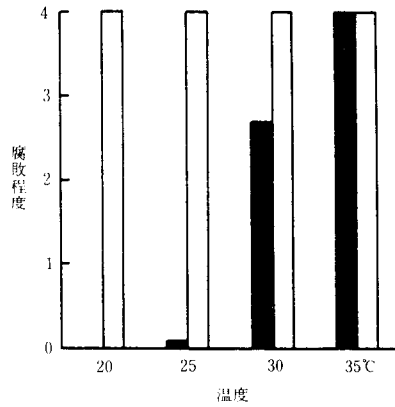
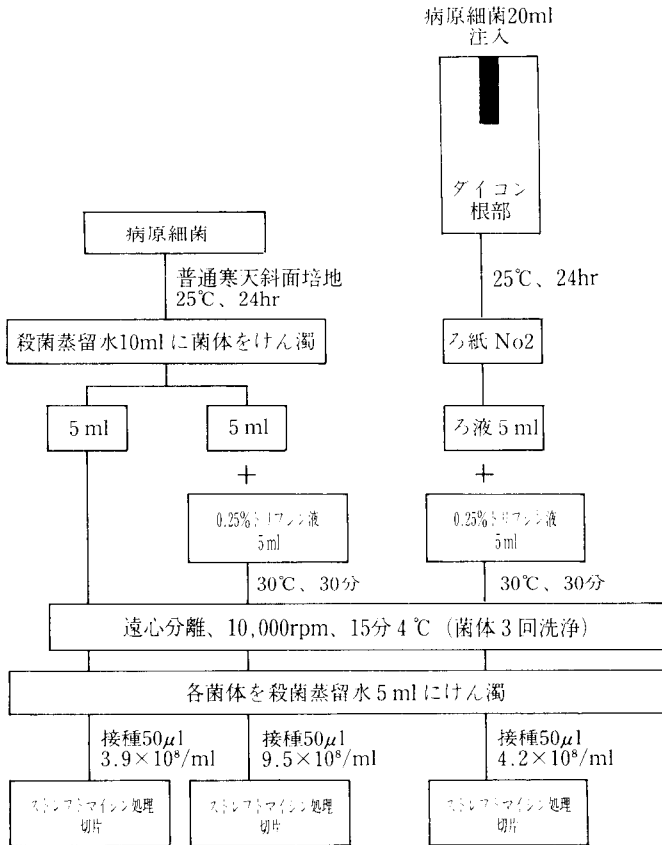


図1 ストレプトマイシン剤の組織腐敗阻止効果におよぼす温度の影響

■：ストレプトマイシン剤処理
□：無処理
腐敗程度：接種後96時間目に調査、切片10枚の平均値



図式1 組織中の病原細菌の回収・接種方法

トリプシン液：千葉県血清研究所

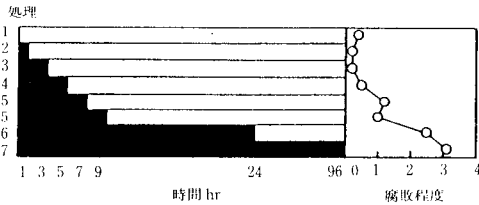


図2 高温処理時間がストレプトマイシン剤の組織腐敗阻止効果におよぼす影響

■ : 30°C
 □ : 20°C
 腐敗程度 : 接種後96時間目に調査, 切片10枚の平均値

2. 病原細菌の接種回数と薬剤の効果

25℃に静置したとき, 同一切片 (ストレプトマイシン剤処理) に最大5回まで接種をくり返しても腐敗程度は増加しなかった (図3)。

3. 薬剤処理時期と薬剤の効果

軟腐病細菌を接種する以前に切片をストレプトマイシン剤で処理すると, 切片の腐敗は完全に阻止された (図4)。一方, 薬剤処理以前に接種を行った場合には, その後の薬剤処理が遅れるほど切片の腐敗は増加した (図4)。

4. ダイコン根部で培養した病原細菌けん濁液および回収細菌の接種と薬剤の効果

ダイコン根部で培養した病原細菌けん濁液を経

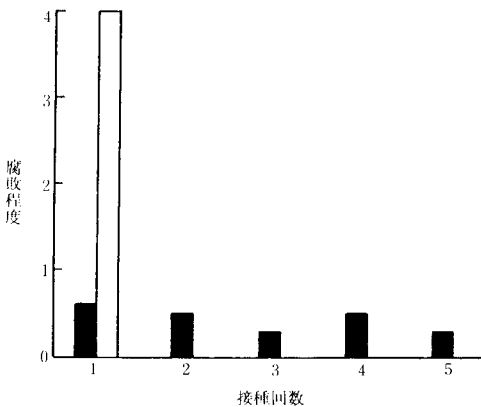


図3 病原細菌の接種回数がストレプトマイシン剤の組織腐敗阻止効果におよぼす影響

■ : ストレプトマイシン剤処理
 □ : 無処理
 腐敗程度 : 第1回接種から103時間目に調査, 切片10枚の平均値

時的に回収し, 接種源としたところ, 培養7時間目以降で腐敗の増加が見られ, 24時間目の接種源では, ストレプトマイシン剤処理切片全体が腐敗した (図5)。このダイコン根部から培養24時間目に細菌けん濁液を採取し, 病原細菌のみを回収した後, この回収細菌を接種源としたところ, 薬剤処理切片の腐敗の増加が見られた (図6)。対照として普通寒天斜面培地培養菌体を接種した場合, 腐敗程度は低く推移した (図6)。

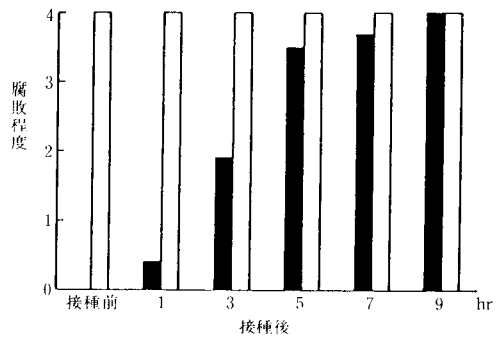


図4 ストレプトマイシン剤の処理時期と本剤の組織腐敗阻止効果との関係

■ : ストレプトマイシン剤処理
 □ : 無処理
 腐敗程度 : 接種後24時間目に調査, 切片10枚の平均値

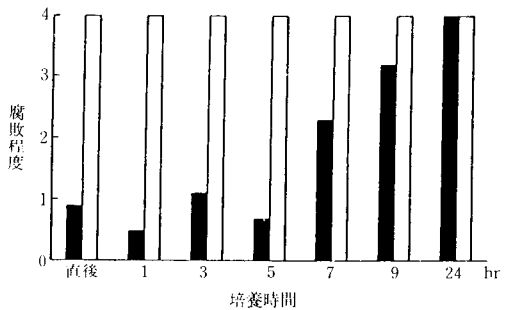


図5 ダイコン組織中で培養した細菌けん濁液の接種がストレプトマイシン剤の組織腐敗阻止効果におよぼす影響

■ : ストレプトマイシン剤処理
 □ : 無処理
 腐敗程度 : 接種後72時間目に調査, 切片10枚の平均値

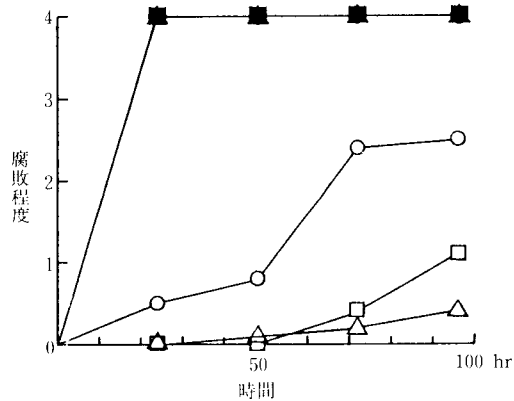


図6 タイコン組織中の細菌けん濁液から回収した病原細菌の接種が
 ストレプトマイシン剤の組織腐敗阻止効果におよぼす影響

記号	接種源		切片
	種類	処理	
○	回収細菌	トリプシン→洗浄	ストレプトマイシン処理
△	N A B	洗浄	ストレプトマイシン処理
□	N A B	トリプシン→洗浄	ストレプトマイシン処理
●	回収細菌	トリプシン→洗浄	無処理
▲	N A B	洗浄	無処理
■	N A B	トリプシン→洗浄	無処理

N A B：普通寒天斜面培地培養細菌
 腐敗程度：切片10枚の平均値

考 察

ストレプトマイシンは *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* に抗菌性を示し、その最小生育阻止濃度(MIC)は6.25ppm以下とされる^{4,13)}。*E. carotovora* subsp. *atroseptica* による作物組織の腐敗は本剤処理により阻止されることが示された¹²⁾。しかし、ストレプトマイシンの組織腐敗阻止効果は高温条件下において著しく低下することが本報告で明かにされた。ストレプトマイシン剤は高温条件下で比較的安定とされており¹⁷⁾、高温により抗菌力が低下したため、本剤の組織腐敗阻止効果が低下したとは考え難い。むしろ高温条件下で *E. carotovora* subsp. *carotovora* による組織腐敗が促進される結果^{9,11,19)}、ストレプトマイシン剤の薬効が相対的に低下した可能性がある。ストレプトマイシン剤の薬効低下現象が夏期の高温時には場で発現するかどうかは防除上重要な問題である。

薬剤処理切片に *E. carotovora* subsp. *car-*

otovora を経時的に5回連続接種した場合、腐敗の増加は認められなかった。したがって、ストレプトマイシン剤の残効がある間は、本細菌の連続的伝染が起こったとしても、腐敗が促進される可能性は少ない。

殺菌剤一般に言える事ではあるが、ストレプトマイシン剤においても *E. carotovora* subsp. *carotovora* 接種後の処理では薬効は著しく低下した。*E. amylovora* では、組織内の細菌が対数増殖期に入るとストレプトマイシン剤の効果が見られなくなるという⁸⁾。ストレプトマイシン剤は組織中を浸透・移行して効果を示すことが知られているが¹⁴⁾、*E. carotovora* subsp. *carotovora* の組織内移行²⁾が先に起こると、薬剤処理の遅れで薬効が発揮されない可能性がある。

ストレプトマイシン剤処理切片にダイコン根部で培養した細菌けん濁液を培養7時間目以降に接種すると薬効の低下が認められた。培養始めの菌密度は 7.0×10^8 cfu/ml と高く、培養期間中のけん濁液における生菌数の増加は見られなかった²¹⁾。

したがって、ダイコン根部で培養した細菌けん濁液による薬効の低下現象は細菌数では説明できない。また、根部の細菌けん濁液から調製した無菌ろ液によるストレプトマイシンの不活化ならびに病原細菌のストレプトマイシンに対する感受性低下はいずれも認められなかった²¹⁾。無処理切片では、25℃で接種後7時間目ころから病徴発現が認められるので、病徴が発現する時期の細菌けん濁液の接種により、薬効が著しく低下すると考えられる。タマネギ軟腐病においても罹病葉接触による発病はストレプトマイシン剤散布により抑止できなかった²⁰⁾。軟腐病病徴発現には、病原細菌の生産するペクチナーゼが重要な役割を果たすとされている^{1,2,3,6,15,24)}。したがって、病徴発現時に細菌けん濁液中に存在すると考えられるペクチナーゼの組織腐敗作用により発病に好適な条件が作られ、このため相対的にストレプトマイシン剤の薬効が低下した可能性がある。なお、根部の細菌けん濁液から調製した無菌ろ液を接種源に添加するとストレプトマイシン剤の顕著な薬効低下が生じることを認めている²¹⁾。

それと共に、組織中で病原細菌の生理的变化が起り、これが原因で薬効が低下することが考えられる。これはダイコン根部で培養した病原細菌けん濁液から回収・洗浄した細菌の接種によりストレプトマイシン剤の薬効が低下する事実から示唆される。軟腐性 *Erwinia* 属細菌のペクチナーゼ産生は組織中で誘発され^{2,18,14)}、これらの酵素は組織の軟化をもたらし、病徴発現に重要な役割を果たしている^{1,2,3,6,15,24)}。したがって、*E. carotovora* subsp. *carotovora* が組織中でペクチナーゼの誘導的生産を開始すると、病原細菌の病原力が著しく増加し、ストレプトマイシン剤の薬効が低下する可能性がある。

土壌伝染性病害である軟腐病は難防除病害の一つである。軟腐病に対する防除薬剤としては、現在のところストレプトマイシン剤を含めた数種の抗生物質剤および銅剤があるのみで、新たな防除薬剤の開発が望まれる。一度に多数の切片が得られる点で、ダイコン根部は薬剤スクリーニング用の材料として優れている。本報告において、高温条件、接種後の薬剤処理に加えて、ダイコン根部で培養した病原細菌けん濁液および回収細菌を接種源とすることによりストレプトマイシン剤の薬

効が低下することが明らかにされた。したがって、軟腐病に対する防除効果の高い薬剤をスクリーニングする上で、温度条件を高温にしたり、接種源として組織中で培養した病原細菌を用いる方法は有用であろうと考えられる。

謝辞 道南農試大垣昭一場長、中央農試齊藤泉病虫部長ならびに成田秀雄園芸部長には本報告の御校閲をいただいた。ここに深く感謝の意を表する。

引用文献

- 1) Basham, H. G. and D. F. Bateman. "Killing of plant cells by pectic enzymes: the lack of direct injurious interaction between pectic enzymes or their soluble reaction products and plant cells". *Phytopathology* **65**, 141-153 (1975).
- 2) Garibaldi, A. and D. F. Bateman. "Pectic enzymes produced by *Erwinia chrysanthemi* and their effects on plant tissue". *Physiol. Plant Pathol.* **1**, 25-40 (1971).
- 3) Hall, J. A. and R. K. S. Wood. "Plant cells killed by soft rot parasites". *Nature* **227**, 1266-1267 (1970).
- 4) 林 宣夫, 費田裕行. "ストレプトマイシン耐性コンニャク腐敗病菌に関する知見". *日植病報*, **46**, 409 (1980). (講要)
- 5) 伊藤 信. "白菜軟腐病に対するアグリマイシン100の圃場試験". *農業及園芸*, **34**, 1283-1284 (1959).
- 6) Kamimiya, S., T. Nishiya, K. Izaki and H. Takahashi. "Purification and properties of a pectin *trans*-eliminase in *Erwinia aroideae* formed in the presence of nalidixic acid". *Agric. Biol. Chem.* **38**, 1071-1078 (1974).
- 7) 菊本敏雄. "そ菜類軟腐病細菌の生態的研究(17) ハクサイ体内における軟腐病細菌の増殖と移行". *東北大農研報*, **34**, 81-91 (1983).
- 8) Knösel, D. and H. Cornils. "Development of cell numbers of *Erwinia amylovora* in plant tissue under influence of streptomycin treatment". *Proc. 4 th Int. Conf. Plant Path. Bact. Angers*, 461-466 (1978).
- 9) 木場三郎. "*Bac. aroideae* の侵蝕力と温度との関係". *農業及園芸*, **15**, 1275-1278 (1940).
- 10) 小林研三. "白菜軟腐病に関する研究". 熊本県農

- 業試験場彙報, 1, 1-76 (1962).
- 11) 工藤祐基, 坂本正幸, “土壤伝染性植物病原細菌に関する研究 第7報 白菜軟腐病発生の生育期による変動と, 病斑の形成と進展に及ぼす温度と湿度の影響について”. 東北大農研彙報, 11, 1-17 (1959).
 - 12) Malcolmson, J. F. and R. Bonde “Studies in the control of bacterial and fungous decay of potato seed pieces”. Plant Disease Reporter, 40, 708-713 (1956).
 - 13) 松崎正文, 畔上耕児, 大畑貫一, “レタスを侵す病原細菌におけるストレプトマイシン耐性菌の存在と分布”. 日植病報, 47, 297-300 (1981).
 - 14) 見里朝正, “農業用抗生物質ハンドブック”. アグリマイシン普及会, 1980, p. 47-48.
 - 15) Mount, M. S., D. F. Bateman and H. G. Basham, “Induction of electrolyte loss, tissue maceration and cellular death of potato tissue by an endopolygalacturonate trans-eliminase”. Phytopathology, 60, 924-931 (1970).
 - 16) 農林水産省農業検査所監修 “農業適用一覽表”. 日本植物防疫協会, 1989.
 - 17) 大畑貫一, “細菌病に対する抗生物質の効果”. 農業用抗生物質ハンドブック (見里朝正編). アグリマイシン普及会, 1980, p. 123.
 - 18) Pupillo, P., U. Mazzucchi and G. Pierini, “Pectic lyase isozymes produced by *Erwinia chrysanthemi* Burkh. et al. in polypectate broth or in Dieffenbachia leaves”. Physiol. Plant Pathol. 9, 113-120 (1976).
 - 19) 田中民夫, 菊本敏雄, “そ菜類軟腐病菌病斑進展に影響する諸要因, とくに葉の水分状態の影響について”. 東北大農研報, 27, 1-12 (1975).
 - 20) 田中民夫, 齊藤 泉, “ほ場におけるタマネギ軟腐病のまん延機作”. 北海道立農試集報, 53, 61-66 (1985).
 - 21) 田中民夫, 未発表.
 - 22) Tseng, T. C. and M. S. Mount, “Toxicity of endopolygalacturonate trans-eliminase, phosphatidase and protease to potato and cucumber tissue”. Phytopathology, 64, 229-236 (1974).
 - 23) 坪井二郎, “白菜軟腐病と防除法”. 農業及園芸, 34, 1559-1563 (1959).
 - 24) Tsuyumu, S., T. Funakubo, K. Hori, Y. Takikawa and M. Goto, “Presence of DNA damaging agents in plants as the possible inducers of pectin lyases of soft-rot *Erwinia*”. Ann. Phytopath. Soc. Japan, 51, 294-302 (1985).

Effects of the Inoculation Conditions of *Erwinia carotovora*
subsp. *carotovora* on the Inhibition
of Tissue Decay with Streptomycin

Tamio TANAKA*¹ and Tatehiko AOTA*¹

Summary

Factors affecting tissue decay inhibition with streptomycin were examined to determine the reason for the failure in controlling bacterial soft rot with streptomycin. At 20°C, streptomycin completely inhibited tissue decay caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Decay, however, increased progressively with rise in temperature. In incubating slices for different periods at 30°C and later at 20°C, longer incubation at 30°C also promoted tissue decay. Although repeated inoculation for as many as 5 times failed to promote decay, delayed treatment of streptomycin following inoculation resulted in extensive decay. Inoculation with a bacterial suspension incubated for more than 7 hours in the Japanese radish root caused extensive decay. The inoculation of bacterial cells collected from a bacterial suspension 24 hours after incubation also caused extensive decay. High temperature, delay in streptomycin treatment following inoculation, and inoculation with bacterial suspension and bacterial cells incubated in the tissue lessened the extent of tissue decay inhibition with streptomycin.

*¹Hokkaido Prefectural Dounan Agricultural Experiment Station, Oono, Hokkaido, 041-12, Japan