

植物検疫重要細菌病の診断技法に関する研究

第Ⅱ報 *Erwinia amylovora* の検出について*

末 次 哲 雄・佐 藤 成 良

高 山 睦 雄・山 内 淳 司**

横浜植物防疫所

Studies on the Diagnosis of Foreign Bacterial Plant Diseases of Major Plant Quarantine. II. Detection of *Erwinia amylovora*. Tetsuo SUETSUGU, Shigeyoshi SATOH, Mutsuo TAKAYAMA and Atsushi YAMAUCHI. (Phytopathology Section, Yokohama Plant Protection Station) Res. Bull. Pl. Prot. Japan 17: 77-85 (1981)

Abstract: To develop the plant quarantine inspection 12, isolates of *Erwinia amylovora* were imported by the permission of the Minister of Agriculture, Forestry and Fisheries and antisera against their living cells were prepared. In slide-agglutination test, these antisera indicated a relatively high degree of antigenic homogeneity within the species. Therefore, *E. amylovora* can be easily distinguished from other bacteria using antisera against only one isolate. Then, the isolation methods of *E. amylovora* were examined by means of the selective media reported previously. Consequently, Crosse & Goodman (1973)'s medium (C-G medium) enables to isolate all above 12 isolates in spite of some defects but other medium didn't any of them. Accordingly, C-G medium was modified as follows: beef extract, 3 g; peptone, 5 g; sucrose, 200 g; agar, 15 g; tergitol anionic 7, 0.2 ml; 0.5% bromotymol blue, 9 ml; 0.5% neutral red, 2.5 ml; water, 1,000 ml; adjusted to pH 7.0; after autoclaving, 1% thallium nitrate, 1.75 ml; cycloheximide, 50 mg. On this modified medium, yellow or orange colonies of *E. amylovora* appear after incubation at 28 C for 2 or 3 days and characteristic craters are observed on their colonies with stereoscopic microscope more clearly than on the C-G medium. These characteristics enable to isolate a few *E. amylovora* colony among as many as 4.0×10^3 colonies formed in a petri dish, and isolation from the artificially inoculated plants with modified medium was superior to with other media and also was quantitative. The combination of the isolation with modified medium and the confirmation with antiserum is more useful for the correct detection.

は じ め に

火傷病菌 (*Erwinia amylovora* (Burril) Winslow *et al.*) は、1780 年、ニューヨーク近辺で初めて発見され (Hayward & Waterston, 1965)、アメリカ、ヨーロッパ、東アジア、ニュージーランドなど世界各地に広く分布している (CMI, 1979)。本病は、リンゴ、洋ナシなど *Pomoideae* 亜科に属する植物の我国未発生の重要細菌病であり、我国に侵入すればリンゴ、洋ナシ生産に重大な被害が予想されるため、1978 年 12 月特定重要病害虫のひとつに指定され、本病の分布地域から輸入された寄主植物については特定重要病害虫検疫要綱に基づいた検

疫が実施されることになっている。

本病の診断同定方法には、病原細菌を分離し、血清学的方法 (Elrod & Starin, 1941; Lelliot, 1968; Samson & Poutier, 1972; Samson, 1972; Lazăr, 1971; Hendry *et al.*; 1967; Türkçü & Öktem, 1976; Schröder, 1978)、接種試験法 (Billing, 1960; Ritchie & Klos, 1974)、バクテリオファーゼによる方法 (Baldwin & Goodman, 1963; Hendry *et al.*, 1966) などの簡易同定法が報告されている。また、選択培地も各種報告されている (Kado & Heskett, 1970; Miller & Schroth, 1972; Crosse & Goodman, 1973; Ritchie & Klos, 1978)。

現在の輸入検疫における検査方法は、病徴検査と Miller & Schroth (1972) の選択培地 (以下 M-S 培地) による細菌の検出検査によっているが、これらの検査だけでは十分と考えられないので、検疫技法としての診断

* 本報告の概要は、昭和 55 年度日本植物病理学会大会 (1980) において発表した。

** 現在、農林水産省農蚕園芸局植物防疫課

方法を検討するために農林水産大臣の特別許可（農林水産大臣指令 53 横植第 137 号）得て外国から火傷病菌を輸入し、血清学的診断方法および選択培地による分離法を検討し、その改良培地を作製したのでここに報告する。

本研究に当り、終始親切な御指導をいただいた当所調査研究部病菌課長松濤美文博士、貴重な菌株を分譲いただいた新潟大学富永時任博士、北海道立北見農試宮島邦之氏、実験を通じ種々協力賜った当所病菌課西尾 健技官に深甚の謝意を表する。

材料および方法

供試菌

火傷病菌は、英国 NCPPB (National Collection of Plant Pathogenic Bacteria) に保存されている分離国、分離原の異なる 12 菌株（第 1 表）を輸入し、供試した。また対象菌として国内産植物病原細菌 5 属 20 種 54 菌株を用いた。なお、2291 菌株は Folsom (1970) により *E. amylovora* f.sp. *rubi* として記載されたものである。供試菌はすべてジャガイモ半合成寒天培地（PSA 培地）の斜面培養菌を用い、ことわりのないかぎり培養温度は 25°C とした。

血清試験法

火傷病菌 12 菌株すべての生菌抗血清を作製した。それぞれの斜面培養試験管 1 本当り 10～20 ml の生理的食塩水を加えて作製した細菌懸濁液を生菌抗原として、家兎に 0.5～1.0 ml を 2～7 回の静脈注射で免疫し、常法により全採血を行い、抗血清を得た。血清反応はすべてスライド凝集反応で行い、抗血清作製に用いた生菌抗原と同様に作製した各種細菌の生菌抗原を供試した。

選択培地の改良

火傷病菌の選択培地として報告のある M-S 培地、Crosee & Goodman (1973) の培地（以下、C-G 培地）および Ritchie & Klos (1978) の TTN 培地並びに *Erwinia* 属細菌の選択培地である Kado & Heskett (1970) の D₃ 培地を用いて、それらの性質、作製法および検疫技法としての適否を検討し、C-G 培地を改良した選択培地（以下、改良培地）を作製した。

改良培地による火傷病菌の分離

種々雑多な細菌を多数含む懸濁液に火傷病菌を加え、この液 0.1 ml を C-G 培地および改良培地平板に L 字ガラス棒を用いて塗りつけ、コロニーを形成させ、その中から火傷病菌の分離を行った。なお懸濁液は西洋ナシ腐敗枝葉（約 2 ヶ月温室とした試験管内に保存したもの）、サクラ古葉（秋期落葉寸前のもの）および畑土壌に殺菌水を加え、よく振とう洗浄し、この液を No. 2 口紙で口過して得た。

また、西洋サンザシ枝葉（長さ約 5 cm、落葉寸前のもの）を火傷病菌懸濁液に浸漬し、室内で風乾（約 2 時間）し、保菌植物を作製した。これらの枝葉 3 本に約 100 ml の殺菌水を加え、前記と同様に洗浄液を得、これから各種選択培地を用いて火傷病菌を分離した。なお分離菌は前記抗血清を用いてスライド凝集反応を調べた。

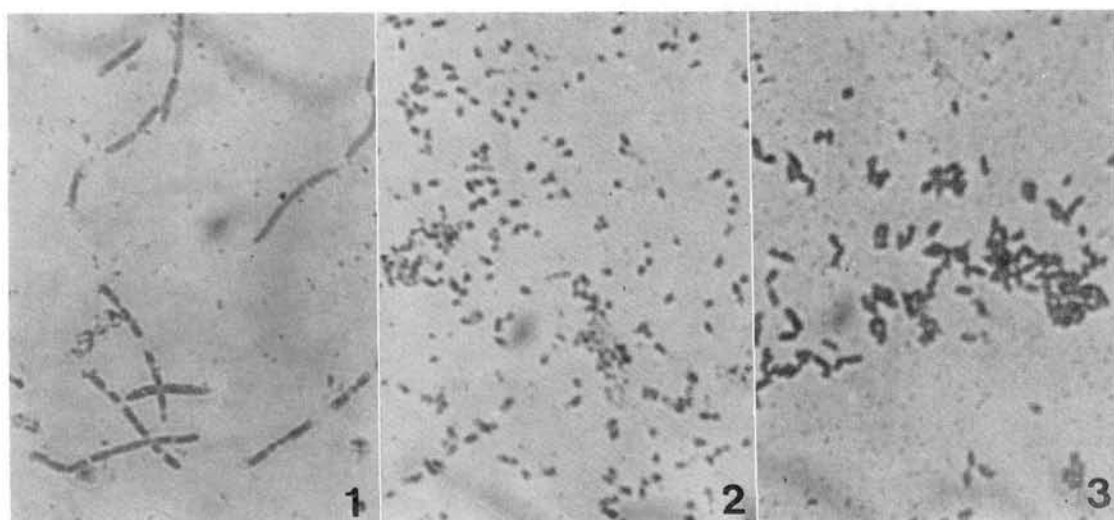
結 果

火傷病菌の性状

供試した火傷病菌は、PSA 斜面培地上での生育は良好で、菌そうの色は乳白色、流動性～ややバター質であった。エジプト産の 1734 菌株は El-Helaly *et al.* (1966) によって報告されている菌株で、PSA 培地上では Rough

第 1 表 供試火傷病菌の由来

菌株番号	分離源	分離国	同定者
NCPPB			
311	<i>Pyrus communis</i>	Canada	H.R. McLarty (1952)
595	<i>Pyrus communis</i>	U.K.	J. E. Crosse (1958)
1734	<i>Pyrus communis</i>	Egypt	M.K. Abo-el-Dahab (1965)
1591	<i>Pyrus communis</i>	Netherlands	H.P. Mass Geesternaas (1966)
2079	<i>Malus sylvestris</i>	New Zealand	D.W. Dye (1968)
2080	<i>Pyrus communis</i>	New Zealand	D.W. Dye (1968)
2086	<i>Crataegus oxyacantha</i>	New Zealand	D.W. Dye (1968)
717	<i>Crataegus</i> sp.	U.K.	E. Billing (1960)
1952	<i>Crataegus</i> sp.	Netherlands	H.P. Mass Geesternaas (1966)
2135	<i>Pyrus communis</i>	Poland	A. Burkowicz (1968)
2213	<i>Malus sylvestris</i>	Denmark	H.A. Jorgensen (1969)
2291	<i>Rubus idaeus</i>	U.S.A.	D. Folsom (1970)



第1図 火傷病菌の形態, 1, 1734菌株; 2, 1591菌株; 3, 1952菌株

型のコロニーを形成し、細胞を長く連鎖していた(第1図)。他の11菌株はいずれも Smooth 型のコロニーを形成し、細菌は単一または2個連鎖していた。2291菌株は分化型であるが培養の性質には他と差異はなかった。

血清試験

段階希釈した火傷病菌の各抗血清を用いて火傷病菌の生菌抗原のスライド凝集反応を調べ、抗血清と菌株間の最終凝集価を求めた結果を第2図に示した。最終凝集価は、抗血清の種類よりも生菌抗原の種類に依存する傾向があったが、10倍に希釈した抗血清を用いた場合、い

ずれの組合せでも強い凝集反応が認められた。

つぎに火傷病菌2213菌株抗血清の10倍希釈液を用いて各種植物病原細菌のスライド凝集反応を調べた結果を第2表に示した。本抗血清は、火傷病菌とは強く凝集したが、大部分の細菌とは全く反応を示さなかった。なお凝集反応を示した *C. michiganense* pv. *michiganense* の2菌株、*E. bulbicola* および *P. fluorescens* はいずれも弱い凝集反応であった。

選択培地の改良

各種選択培地上に火傷病菌のコロニーを形成させ、その選択培地の特徴および火傷病菌の各菌株の性状を検討し、結果を第3表に示した。既報の選択培地のうち C-G 培地だけがすべての火傷病菌の検出可能であった。本培地上ではすべての菌株はコロニー表面に crater を形成し、この性質は選択的に分離するのに有効な性質であったが、Crosse & Goodman (1973) の観察方法では見にくく、シャーレ下面からの透過照明法で観察すると有効であった。しかしこの crater は培養時間が長くなるに従い不明瞭とかなり改良の余地があった。また他の3種の選択培地は、供試した火傷病菌をすべて検出出来ず、培地の作製方法が複雑であったり、薬品が高価であったり、また選択的分離を可能にする性質が不安定であり選択培地として不十分であった。

以上の結果から、選択性が高く、すべての火傷病菌の検出が可能であり、また簡易かつ経済的な選択培地を作製するために C-G 培地を改良して、第4表に示す改良培地を作製した。nutrient agar(BBL) を肉エキス、ペ

抗 原	抗 血 清										
	311	598	1734	1591	2079	2080	2085	717	1952	2135	2213
311											
595											
1734											
1591											
2079											
2080											
2085											
717											
1952											
2135											
2213											
2291											

■ 1600倍以上, ▨ 400-800倍, □ 200倍以下

第2図 火傷病菌の菌株間の血清反応 (スライド凝集反応による最終凝集価)

第 2 表 植物病原細菌の火傷病菌抗血清への反応と改良培地上でのコロニー形成

種	各	供試菌株数	スライド凝集反応	改良培地上でのコロニー	種名	供試菌株数	スライド凝集反応	改良培地上でのコロニー
<i>Agr. tumefaciens</i>		2	—*	—**	<i>Ps. syringae</i> pv. <i>atropurpurea</i>	1	—	—
<i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>oortii</i>		1	—	—	pv. <i>coronafaciens</i>	1	—	—
<i>C. michiganense</i> pv. <i>michiganense</i>		4	+/-	—	pv. <i>erobotryae</i>	1	—	+
pv. <i>sepedonicum</i>		1	—	—	pv. <i>lachrymans</i>	1	—	+
<i>E. amylovora</i>		12	卅	⊕	pv. <i>phaseolicola</i>	1	—	—
<i>E. bulbicola</i>		1	+	+	pv. <i>tabaci</i>	2	—	—
<i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>		3	—	+	<i>Ps. viridiflava</i>	1	—	+
<i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>		7	—	+	<i>Ps. woodsii</i>	1	—	+
<i>E. chrysanthemi</i> pv. <i>chrysanthemi</i>		2	—	+	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	1	—	—
<i>E. herbicola</i>		2	—	+	pv. <i>citri</i>	1	—	—
<i>Ps. avenae</i>		1	—	—	pv. <i>cucurbitae</i>	1	—	—
<i>Ps. caryophylli</i>		1	—	—	pv. <i>hordei</i>	1	—	—
<i>Ps. cichorii</i>		1	—	—	pv. <i>hyacinthi</i>	1	—	—
<i>Ps. fluorescens</i>		1	+	+	pv. <i>oryzae</i>	1	—	—
<i>Ps. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>		1	—	—	pv. <i>phaseoli</i>	2	—	—
<i>Ps. glumae</i>		1	—	—	pv. <i>physalidicola</i>	1	—	—
<i>Ps. marginalis</i> pv. <i>marginalis</i>		1	—	+	pv. <i>pisi</i>	1	—	—
<i>Ps. solanacearum</i>		1	—	—	pv. <i>pruni</i>	1	—	—
<i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i>		1	—	—	pv. <i>vesicatoria</i>	1	—	—
pv. <i>aptata</i>		1	—	—	pv. <i>vitians</i>	1	—	—
pv. <i>atrofaciens</i>		1	—	—				

*—：反応なし，+：弱い反応，卅：強い反応。

**—：コロニー成しない，+：コロニーを形成する，⊕：コロニーを形成し，その表面に crater を生じた。

第 3 表 既報の選択培地上での火傷病菌株の性状

培地	培養条件		選択培地上の火傷病菌の特徴	各菌株の性状
	温度	時間		
C—G	28C	48～60hr	コロニー表面上の crater	12 菌株はすべて crater を形成した。
M—S	28C	48～72hr	赤橙色，円形，全縁コロニー。	S 型 11 菌株はすべて特徴あるコロニーを形成したが，R 報の 717 菌株は他との区別が不可能であった。また， <i>E. herbicola</i> との差がない。
TTM	22～23C	48hr	ドーナツ型コロニー。	菌株によりドーナツ型のコロニーを生じないものがあり，また同じ菌株でも各種のコロニー型があった。
D ₃	28C	72～96hr	<i>Erwinia</i> 属菌の選別培地で，火傷病菌だけの特徴なし。	菌株により，全くコロニーを生じないものもあった。

プトンおよび寒天で代用し，ショ糖を減らし，crystal violet の代りに硝酸タリウムおよび sodium heptadecyl sulfate を加え他の細菌の生育を抑え，bromotymol blue をよび neutral red の指示薬を加えてコロニーに着色した。

本改良培地上に 28C で培養すると火傷病菌は 2 日目から黄～橙色のコロニーが出現し，解剖顕微鏡（×20～30）で観察すると第 3 図に示すようにその表面に crater が容易に認められ，さらに培養すると crater は重なり合い不明瞭になるが，コロニー上にコブ状に小コロニーが

第4表 改良培地の組成

肉エキス	3 g
ペプトン	5 g
寒天	15 g
シロ糖	200 g
Sodium heptadecyl sulfate (Tergitol anionic 7)	0.2 ml
Bromotymol blue (0.5% 水溶液)	9 ml
Neutral Red (0.5% 水溶液)	2.5 ml

pH 7.0 に修正し、オートクレーブ後、Cycloheximide 50mg および硝酸タリウム (1% 水溶液) 1.75 ml を無菌的に加える。

出現し、特異な形状を呈してくる。第2表に本改良培地上での各種植物病原細菌の生育を示めた。*Erwinia* 属

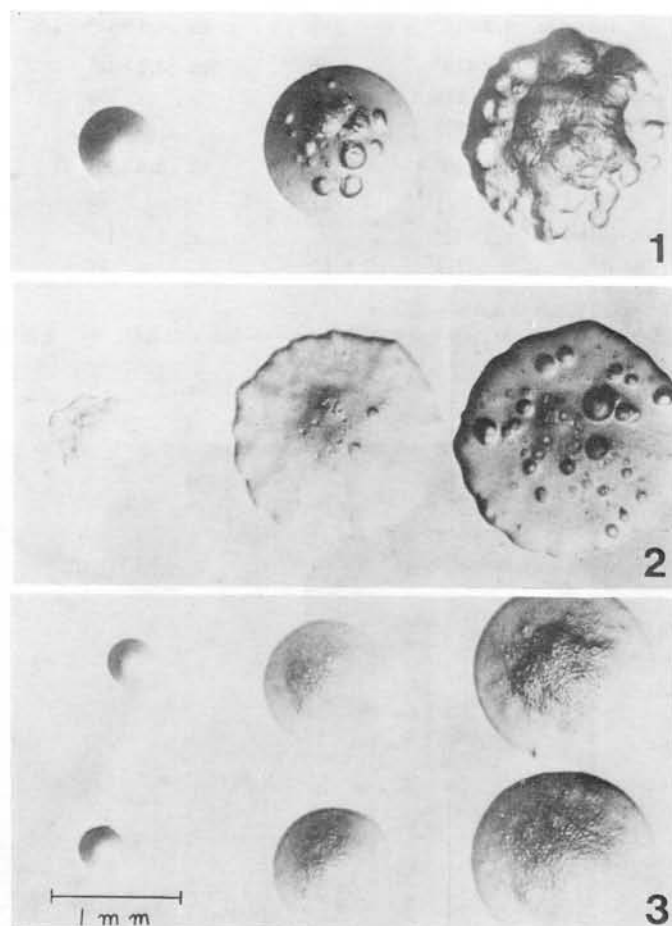
菌すべてと *Pseudomonas* の一部の細菌だけがコロニーを形成したが、火傷病菌だけが特徴ある crater を形成した。なお *Erwinia* 属細菌は黄～橙色のコロニーであったが、*Pseudomonas* 属菌は赤色・青色などあり、一定していなかった。

本改良培地および各種選択培地のコロニー形成能力を第6表に示した。改良培地は C-G 培地とはほぼ同様の結果であった。

改良培地による火傷病菌の分離

種々の細菌の懸濁液中に混入している火傷病菌の分離能力を調べた結果を第6表に示めた。各種の細菌懸濁液を1シャーレの選択培地平板に塗布し、形成された約 4.0×10^8 個のコロニーの間にあるわずか1個の火傷病菌 (第4図) の分離も可能であった。

つぎに寄主植物表面に付着する火傷病菌の分離を行っ



第3図 改良培地上での火傷病菌の生育、左から2, 3, 4日後のコロニーの形成
1, 2135 菌株; 2, 1734 菌株; 3, 2291 菌株

第 5 表 火傷病菌の各種選択培地上でのコロニー形成

菌 株	コ ロ ニ ー 形 成 率*					
	PSA	改良培地	C-G 培地	M-S 培地	TTM 培地	D ₃ 培地
1952	100	114.2	114.2	93.6	108.2	0
2135	100	113.3	114.3	118.2	109.5	0
2291	100	136.6	157.0	95.4	183.5	95.6

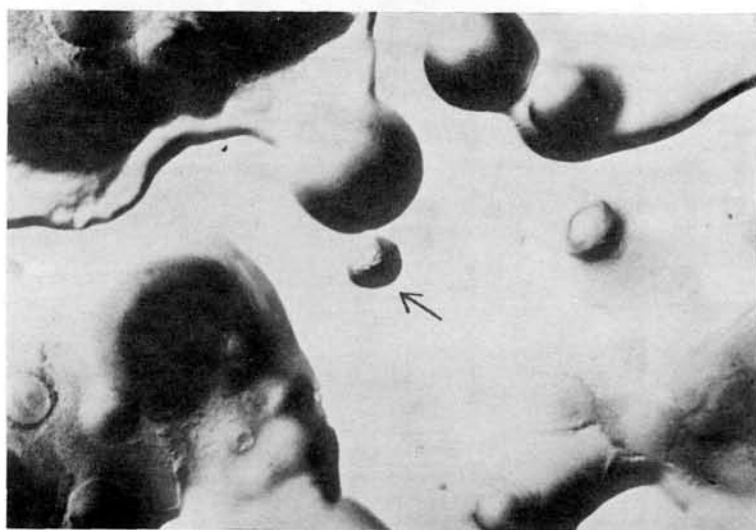
* PSA 培地上のコロニー形成数に対する比。

第 6 表 各種細菌懸濁液中に混在する火傷病菌の検出

細菌懸濁液	希釈倍数	C - G 培 地		改 良 培 地	
		全コロニー数	火傷病菌コロニー数	全コロニー数	火傷病菌コロニー数
殺菌水		22*	22**	23	23
洋ナシ腐敗 枝葉洗浄水	$\times 10^0$	ca. 4.2×10^4	—	ca. 4.1×10^4	—
	$\times 10^1$	ca. 4.2×10^3	+	ca. 4.1×10^3	+
	$\times 10^2$	439	21	380	21
	"	389	22	439	30
サクラ古葉 洗 浄 水	$\times 10^0$	ca. 6.3×10^3	—	ca. 3.5×10^3	+
	$\times 10^2$	63	44	35	23
土壌洗浄水	$\times 10^0$	ca. 2.1×10^4	+	ca. 8.4×10^3	+
	$\times 10^2$	212	22	84	17

* 1 シャレーに形成されたコロニー数

** 火傷病菌のコロニー数, — : 全く火傷病菌コロニーがなかったもの, + : 1 個でも火傷病菌があったもの



第 4 図 各種コロニー中の火傷病菌のコロニー (矢印)

第7表 各種選択培地による浸漬接種した西洋サンザシからの火傷病菌の分離

浸漬菌濃度	希釈倍数	PSA	改良培地	C-G 培地	M-S 培地	TTN培地	D ₃ 培地
3.3×10^6	$\times 10^1$	1 670*(-)	162 (119)	390 (119)	171 (56)	194 (38)	122 (0)
		2 820 (-)	127 (88)	352 (111)	180 (92)	189 (27)	121 (0)
	$\times 10^2$	1 126 (*)	10 (7)	36 (13)	20 (6)	19 (8)	9 (0)
		2 107 (-)	14 (13)	30 (4)	10 (6)	14 (5)	13 (0)
3.3×10^4	$\times 10^0$	1 卅 (-)	34 (23)	241 (33)	89 (15)	131 (4)	162 (0)
		2 卅 (-)	38 (28)	215 (25)	69 (11)	156 (10)	124 (0)
	$\times 10$	302 (-)	11 (0)	18 (2)	5 (0)	11 (0)	17 (0)
	$\times 10^1$	卅 (-)	160 (0)	1600 (0)	700 (0)	929 (0)	1100 (0)
	$\times 10^2$	509 (-)	9 (0)	122 (0)	34 (0)	35 (0)	62 (0)

* 1 シャレ内のコロニー数、() 内は火傷病菌のコロニー数。

第8表 各種選択培地の西洋サンザシ付着細菌の抑制率

選択培地	改良培地	C-G	M-S	TTN	D ₃
抑制率	97.9	82.8	92.0	88.7	87.4

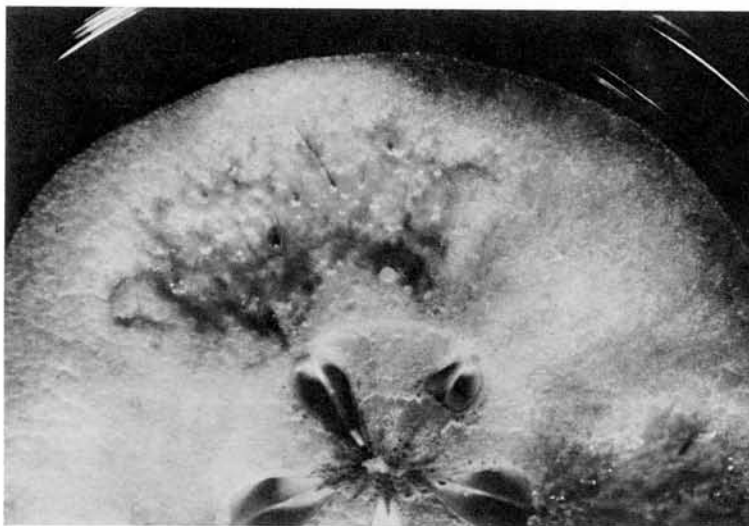
$$\text{抑制率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{選択培地上の全コロニー数}}{\text{PSA培地上の全コロニー数}} \right) \times 100$$

た結果を第7表に示めた。D₃培地を除くといずれの選択培地でも火傷病菌を分離したが、C-G培地および改良培地は分離効率が優れ、ほぼ定量的に分離出来た。また火傷病菌以外の細菌の生育は、改良培地で最も強く阻止され、改良培地の選択性が最も優れていた(第8表)。

考 察

火傷病菌は血清学的に種特異的なグループに属し、簡易同定法として抗血清の有効なことが報告され、診断方法のひとつに取入れられている。

今回作製した産地および分離原の異なる12菌株の抗血清は、それぞれ他の菌株の生菌抗原との最終凝集価は異なるが、10倍希釈した抗血清を用いた場合、火傷病とはいずれも強い凝集反応を示めたが、他の細菌とは弱い凝集反応を示めず菌株が若干あっただけである。以上のことから、本抗血清は生菌抗原を免疫に用いたにもかかわらず種特異性が高く、簡易同定にも充分使用出来るものと考えられる。一部に認められた非特異的反応は、Schröder(1978)が報告しているような吸収試験により除去出来るものと考えられる。



第5図 火傷病菌を接種した洋ナン未熟果

各菌株の抗血清と各菌株の生菌抗原との最終凝集価は、菌株に依存して異なっている傾向が認められたが、これは Hendry *et al* (1967) のいう “blocking antigen” のようなものと考えられるが、今回これについては確認していないので今後検討する必要がある。

また今回はスライド凝集反応により血清学的性質を検討したが、血清型の存在は認められなかった。Samson (1972) は吸収試験により抗原構造を分析し、火傷病菌はすべての菌株に共通する抗原の存在を確認している。この共通抗原が存在するために、すべての菌株が一つの抗血清と反応するものと考えられ、また今後この共通抗原の利用すればより種特異的な抗血清の作製が期待できるものと考えられる。

本実験において作製した改良培地は、C-G 培地上のコロニー表面の crater を作る火傷病菌の性質を生かし、C-G 培地の組成を変え、選択性を高め、分離を容易にしたものである。

C-G 培地は、約 40% のショ糖を含有し、特徴的な培地であるが、これは火傷病菌のショ糖耐性 (Ark, 1937) を利用し、葉上細菌などの生育を抑えるために加えられたものである。この培地の特徴である火傷病菌の crater を形成する性質は、ショ糖含量が 5% 程度でも生能初期には明瞭に認められ、後には不明瞭となったが、ショ糖含量とは無関係であると考えられた。また、ショ糖含量が 40% 近い C-G 培地でも長時間培養すると Ducek & Quamme (1973) が報告しているようにコロニー表面は筋を引いたようになり、分離を困難にする恐れがあると考えられた。

crater を見やすく、また培地作製を容易にするために、ショ糖含量を減らし、その代りに抗菌物質として他の選択培地に用いられている硝酸タリウムを用いた。多量の硝酸タリウムを培地に加えると火傷病菌の生育を阻害するが、適度に加えるとコロニー表面の crater を明瞭に発現させ、長時間培養するとコロニー上にコブ状に小コロニーを作り、分離を容易にし、選択培地に有用な抗菌物質であることが確認された。また指示薬を加えることにより培地上の火傷病菌コロニーが捜しやすく、また crater も見やすくなり有効な方法であった。なお、グラム陽性菌を抑える crystal violet は培地を着色するため sodium heptadecyl sulfate を代用した。

本改良培地では、1シャーレに 4.0×10^3 個の種々の細菌コロニーがあっても 1 個の火傷病菌でも分離は可能であった。これはコロニーが重り合っても crater が容易に観察されるためであった。なお、実際は 90% 以上の細菌の生育が選択培地によって抑制されているため 4×10^6 /ml 以上の細菌の中のわずかな火傷病菌も検出出来

るものと考えられる。

寄主植物体表面に付着する火傷病菌は、改良培地による回収率は最も良好で定量的に回収されていることから、他の培地より優れているものと考えられる。

今回の実験で改良培地により火傷病菌として分離された菌は、すべて抗血清によるスライド凝集反応でいずれも火傷病菌であることが確認されたが、正確な同定には Billing (1960) の報告しているように寄主植物である洋ナシ未熟果に分離菌を接種し、発病させ (第 5 図) 病原性を確認し、各種細菌学的方法で同定する必要がある。しかし生植物の検疫には、迅速性が要求されるため、抗血清により分離菌を確認することは有効な手段であると考えられる。

なお、本実験の火傷病菌の供試菌株は、産地および寄主植物の異なる 12 菌株であり、血清反応および選択培地による分離では整一な結果を得たが、検疫技法として利用するは不充分であり、今後多くの菌株を供試して検討する必要がある。

摘 要

我国に未発生のリンゴ・洋ナシの火傷病菌 (*Erwinia amylovora* (Burril) Winslow *et al.*) の検疫的診断技法を確立するために、農林水産大臣の特別許可を受け、外国産火傷病菌を輸入し、抗血清を作製し、また選択培地による分離法を検討した。

作製した抗血清は、種特異的であり、1 種の抗血清ですべての火傷病菌菌株と凝集反応を示めし、簡易診断に利用出来るものであった。

つぎに、既報の火傷病菌選択培地について検討したところ、Crosse & Goodman (1973) の培地は 12 菌すべてを分離可能であったが、他の選択培地では分離不能の菌株があった。

そこで C-G 培地を改良し、次の改良培地を作製した。改良培地の組成：内エキス、3g；ペプトン、5g；ショ糖、200g；Tergitol anionic 7 0.2ml；0.5% bromotymol blue, 0.5% neutral red, 2.5ml；寒天、15g；H₂O, 1,000ml；pH 7.0 に修正し、殺菌後、1% 硝酸タリウム、1.75ml；シクロヘキシミド、50mg を加える。

火傷病菌を本改良培地で 28°C、2～3 日間培養すると、黄～橙色のコロニーを形成し、透過照明法の解剖顕微鏡 ($\times 20 \sim 30$) で観察すると、その表面に特徴ある crater を形成した。また、1シャーレに 4.0×10^3 個のコロニーが形成されていても火傷病菌は crater の存在で分離が可能であった。

寄主植物表面に付着する火傷病菌も容易に分離可能であり、また分離率は他の選択培地に比べ、優れ、定量的

に分離された。

本改良培地により火傷病菌を分離し、抗血清を用いて確認することにより、より正確な診断が期待出来る。

引用文献

- ARK, P.A. (1937) Variability in the fire-blight organism, *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* **27**: 1-28.
- BALDWIN Jr., C.H. and R.N. GOODMAN (1963) Prevalence of *Erwinia amylovora* in apple buds as detected by phage typing. *Phytopathology* **53**: 1299-1303.
- BILLING, E. (1960) Laboratory diagnosis of fire blight and bacterial blossom blight. *Pl. Path.* **9**: 19-25.
- CMI (Commonwealth Mycological Institute) (1979) *Erwinia amylovora* Distribution maps of plant diseases. No. 2, 6th. ed.
- CROSSE, J.E. and GOODMAN (1973) A selective medium for and a definitive colony characteristic of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* **63**: 1425-1426.
- DUECK, J. and H.A. QUAMME (1974) Fireblight in Ontario in 1972. *Can. Plant Dis. Surv.* **53**: 101-104.
- EL-HELALY, A.F., M.K. ABO-EL-DAHAB and M.A. EL-GOORANI (1966) Nutritional Requirements of isolates of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* **56**: 845-849.
- ELROD, R.P. and W.A. STARIN (1941) A serological study of *Erwinia amylovora*. *J. Bact.* **41**: 87-88.
- HAYWARD, A.C. and J.M. WATERSTON (1965) *Erwinia amylovora*. CMI Descript. Path. Fung. Bact. No. 44.
- HENDRY, A.T., J.A. CARPENTER and E.H. GARRARD (1966) Bacteriophage studies of isolates from fireblight sources. *Can. J. Microbiol.* **13**: 1357-1364.
- KADO, C.I. and M.G. HESKETT (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology* **60**: 969-976.
- LAZAR, I. (1971) Serological relationships between the *amylovora*, *'carotovora'*, and *'herbicola'*, groups of the genus *Erwinia*. *Proc. Third Int. conf. Pl. Path. Bact.*, Wageningen, 1971, pp. 131-141.
- LELLIOT, R.A. (1968) The diagnosis of fireblight (*Erwinia amylovora*) and some diseases caused by *Pseudomonas syringae*. *Rep. Eur. Medit. Pl. Prot. Org. Conf. Fireblight*. **45**: 27-35.
- MILLER, T.D. and M.N. SCHROTH (1972) Monitoring the epiphytic population of *Erwinia amylovora* on pear with a selective medium. *Phytopathology* **62**: 1175-1182.
- RITCHIE, D.F. and E.J. KLOS (1974) A laboratory method of testing pathogenicity of suspected *Erwinia amylovora* isolates. *Pl. Dis. Reprtr.* **58**: 181-183.
- RITCHIE, D.F. and E.J. KLOS (1978) Differential medium for isolation of *Erwinia amylovora*. *Pl. Dis. Reprtr.* **62**: 167-169.
- SAMSON, R. (1972) Hétérogénéité des antigènes thermostables de surface chez *Erwinia amylovora*. *Ann. Phytopath.* **4**: 157-163.
- SAMSON, R. and F. POUTIER (1972) Les antigènes polysidiques d' *Erwinia amylovora*. *Ann. Phytopath.* **4**: 197.
- SCHRÖDER, C.M. (1978) Serologische Testmethoden zum Nachweis Feuerbrande reger: *Erwinia amylovora*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **85**: 393-403.
- STARR, M.P., C. CARDONA and D. FOLSOM (1951) Bacterial fire blight of raspberry. *Phytopathology* **41**: 915-919.
- TÜRKÖGLÜ, K. and Y.E. ÖKTEM (1976) Experiments on preparation of antisera for the identification of the causal agent of fire blight (*Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow *et al.*) *Bitti Koruma Bülteni* **16**: 101-106.