

植物検疫重要細菌病の診断技法に関する研究 第Ⅵ報 *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* の検出*

水野 明文**・川合 昭

横浜植物防疫所

Studies on the Diagnosis of Foreign Bacterial Diseases of Quarantine Significance VI.
Detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Akifumi MIZUNO and Akira KAWAI
(Yokohama Plant Protection Station)

Abstract: A selective medium (FFSM) and antisera were prepared for detection and identification of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. This medium was made by base of Dye's medium C and by modifying of Kado & Heskett's medium D2 and Takayama's medium CFS. The composition of the medium is as follows; 5g Rhamnose, 2g Yeast extract, 1g KH_2PO_4 , 2g K_2HPO_4 , 1g NH_4Cl , 0.3g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10g LiCl , 1.2g Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 1ml 1.5% BCP-EtOH, 2mg Sodium azide, 100mg Cycloheximide, 40mg Polymyxin B sulfate (8,000 USP unit/mg) and 15g Agar in 1 liter of distilled water. On this medium, capitate, smooth and yellow-colored colonies of *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* appeared after 10 days at 30°C, and color of medium around the colony changed to yellow. But orange strain and violet strain of *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* formed no colonies on FFSM. The colonies of *C. flaccumfaciens* pv. *oortii* and *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* were similar on FFSM. Other bacterial species except *C. flaccumfaciens* pv. *oortii* formed apparently distinguished colonies or no colonies.

Antisera against living cells of the bacteria were prepared. In slide-agglutination test and gel-double-diffusion test, these antisera indicated a relatively tend of antigenic homogeneity within the isolates. Infected seeds were prepared by artificial inoculation of the pathogenic bacterium on the flower stalks of kidney bean plants just before flowering. Mass of the cells of *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* were observed on the freezing sections of the infected seed by indirect immunofluorescence technique. The organisms of the pathogen were recognized in the infected seeds. Therefore, this test shows FFSM and antisera are useful for detection and identification of *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

はじめに

Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* (HEDGES 1922) COLLINS and JONES 1984 は日本を除く大洋州、西アジア、北アメリカ、ヨーロッパに分布 (CMI, 1987) し、インゲンマメ、エンドウ、ダイズ、トウモロコシなどに寄生する。主としてインゲンマメの被害が大きく、甚だしい場合は90%もの減収をもたらす (HEDGES 1922)。

本細菌は寄生植物の導管に侵入し、全身の萎ちょう及び葉の軟腐などの病徴を引き起こし、次世代の植物へも種子により伝染する。感染種子内の本細菌は乾燥

に対する抵抗性が強く、実験室内の保存で24年間生存した記載がある (HEDGES 1926; ZAUMEYER 1932; ZAUMEYER, W. J. and H. R. THOMAS 1957)。このため、我が国の植物検疫では本細菌を侵入を警戒する細菌のひとつとして注目しており、検疫の現場で利用できる確な検出法の開発が望まれている。

我が国の植物検疫においては、*Erwinia amylovora* (BURRILL 1882) WINSLOW et al. 1920の診断同定方法として選択培地及び抗血清による検出方法 (末次ら, 1981) が採用されている。これと同様の手法で、本細菌の検出が可能かどうかを検討した。*Curtobacterium* 属は以前は *Corynebacterium* 属の一部に属しており、分離・検出用としていくつかの選択培地が開発されている (MARTEN et al, 1943; KADO and HESKETT 1970; GROSS and VIDAVER, 1979; 高山ら1985)。中でも KADO and HESKETT の D2 培地と高山らの C F S 培地はグラ

*本報告の一部は、1987年度日本植物病理学会夏期関東部会で発表した。

**現在、農業環境技術研究所

ム陽性植物病原細菌に対する選択性が比較的良好なことから、Dye (1968) の medium C を基礎培地とし、D2 培地あるいは C F S 培地の抗菌物質と微量要素の組成を一部改変したものを加えて、本細菌の検出に適した培地を新たに作製した。また、本選択分離培地により検出された細菌の同定の一手段として抗血清の利用が可能かどうかを検討し、さらに本細菌を開花前のインゲンマメに接種して得た感染種子を用い、間接蛍光抗体法により感染種子内の本細菌の存在部位を明らかにした。

本試験を行うにあたり、終始適切な御指導をいただいた前当所病菌課長 長尾記明氏及び西尾健博士に親甚の謝意を表する。

材料及び方法

1 供試細菌

C. flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* はイギリスの

National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBP) 及びアメリカ合衆国の American Type Culture Collection (ATCC) から導入した 7 菌株を供試した (Table 1)。また、対照菌として 7 属 10 種 40 菌株を供試した。供試細菌はジャガイモ半合成寒天培地 (PSA 培地) の斜面に移植し、30℃ の定温器内で 2 ~ 3 日間培養した後、各試験に用いた。

2 選択培地の組成

D2 培地、C F S 培地及び medium C の組成をもとに炭素源、その他の成分について検討し、*C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* のための選択培地 (F F S M) を作製した (Table 2)。すなわち、酵母エキス 2 g, K_2HPO_4 2 g, KH_2PO_4 1 g, NH_4Cl 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g, LiCl 10 g, Tris (hydroxymethyl) aminomethane 1.2 g, ブロム・クレゾール・パープル 15 μ g, 寒天 15 g, 蒸留水 1, 000 ml からなる基礎培地に加圧滅菌後、*C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* が本培地中で利用で

Table 1 Strains of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* used in this study

	Host Plant	Country	Strain	
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	USA	NCPBP ^{a)}	178
do	"	Hungary	NCPBP	390
do	"	Germany	NCPBP	567
do	"	Romania	NCPBP	1751
do	<i>Glycine max</i>	USA	ATCC ^{b)}	33802
do (Orange strain)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	"	NCPBP	558
do (Violet strain)	"	"	NCPBP	2344

a) NCPBP: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria

b) ATCC: American Type Culture Collection

Table 2 Composition of the selective medium (FFSM) for isolation and detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Rhamnose	5 g
Yeast-extract ^{a)}	2 g
K_2HPO_4	2 g
KH_2PO_4	1 g
NH_4Cl	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.3 g
LiCl	10 g
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	1.2 g
1.5% Bromocresol purple ethanol solution	1 ml
Sodium azide	2 mg
Cycloheximide	100 mg
Polymyxin B sulfate (8,000 USP Units/mg) ^{b)}	40 mg
Agar	15 g
Distilled water	1,000 ml

a) Difco/Lab., Detroit, Michigan, USA

b) Sigma Chemical Industries LTD., Louis MO USA

きる唯一の炭素源としてラムノース 5 g を加え、さらに雑菌の発育を阻止する目的で、アジ化ナトリウム 2mg, 硫酸ポリミキシン B (8, 000 USP units/mg) 40mg, シクロヘキシミド 100mg を添加した。

3 F F S M の選択効果の検定

植物病原細菌 7 属 10 種 40 菌株を滅菌水に懸濁し、F F S M 平板上に塗抹接種し、30℃で10日間培養し、集落形成の有無及び集落の性状について観察した。また、*C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* 7 菌株の F F S M 上での集落形成効率の良否については、Nutrient Agar (NA) を D2 培地の対照に、同一条件で培養して比較した。

4 血清学的特異性の検討

C. flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* を検出・同定する手段として抗血清が利用できるか否かを検討するため、供試 7 菌株に対する抗血清を作成した。それぞれ P S A 斜面培地で 30℃, 24 時間培養し、生理食塩水に懸濁したものを生菌抗原として、それぞれ 0.5~1.0 ml を 5~7 回、雌ウサギに静脈注射するとともに、4~5 回筋肉注射し、最終回の注射から 1 週間後に全採血して抗血清を得た。抗血清の力価は混合法で測定した。*C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* の菌株間の血清反応については、スライド凝集法と寒天ゲル内二重拡散法で検討した。

5 土壌及び種子磨砕液からの目的細菌の検出

汚染土壌は、乾燥畑土壌 2 g を蒸留水 10 ml に懸濁後、濾紙で濾過し、さらに蒸留水で 10 倍に希釈したものに最終濃度で 1×10^3 cfu/ml になるように *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* NCPPB 390 を添加し作成した。

汚染種子懸濁液は インゲンマメ種子 1 つを蒸留水 5 ml で磨砕し、濾紙で濾過し、さらに蒸留水で 10 倍に希釈したものに、最終濃度で 1×10^3 cfu/ml になるように *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* NCPPB 390 を添加し、作製した。F F S M で検出された集落の確認は NCPPB 390 株で作製した抗血清を用いたスライド凝集法により行った。

6 インゲンマメ種子内の *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* NCPPB 390 の所在の確認

感染種子の作成は、インゲンマメ品種ケンタッキーワンダーを用い、植松ら (1977) のトマトかいよう病感染種子の作製方法を参考として試みた。すなわち、インゲンマメの蕾が形成された時点で蕾から 2~3

cm 下方の茎の部分に 5×10^7 cfu/ml の細菌懸濁液を注射接種し、種子が成熟するのを待って収穫し、シリカゲルの入ったデシケーター内で保存した (植松ら, 1977)

C. flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* の種子への感染は、種子 1 粒を 0.5~1.0 ml の滅菌水とともに乳鉢で磨砕し、C F S 培地上に画線し、30℃で 5 日間培養し、形成された集落を NCPPB 390 株で作成した抗血清とスライド凝集反応させる方法で検定した。

感染種子内の本細菌の観察は、間接蛍光抗体法で行った。すなわち、感染種子から凍結切片を作製し、スライドガラス上で一晚乾燥させ、5~8 回火炎固定し、同菌株の純化 IgG 100 µg/PBS 1 ml (PBS: 0.02 M リン酸緩衝生理食塩水 pH 6.8) を一次抗体とし、37℃, 10 分間反応させた。PBS で洗浄後、二次抗体として FITC 標識ヤギ抗ウサギ 1 gG と反応させ、再度 PBS で洗浄後、風乾して蛍光顕微鏡で観察した。

結 果

1 F F S M 上における各種細菌の培養的性質

F F S M 上で 30℃, 10 日間培養した *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* は、黄色、円形、全縁、半球形で湿光を帯びた直径約 1~2 mm の集落を形成し、集落の周囲の培地は黄色に変色した (Fig. 1)。供試菌株のうち、F F S M 上で *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* と類似した性状の集落を形成したのは、*C. flaccumfaciens* pv. *oortii* 8 菌株のみであった。これらは集落の性状では区別できなかった。他に *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 3 菌株は培養 5 日目までは淡黄色、円形、全縁、半球形で湿光を帯びた直径約 0.5 mm 以上の集落を形成し、*C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* の集落と区別が不可能であったが、その後の集落の生育は認められず、培養 10 日目には *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* の集落と明らかに区別できた。その他に *Rhodococcus fascians* 4 菌株並びに *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1 菌株は F F S M 上で生育が認められたが、ラフ型であり、*C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* 5 菌株及び *C. flaccumfaciens* pv. *oortii* 8 菌株の集落とは明らかにその性状で区別できた (Table 3)。その他の 26 菌株は生育しなかった。

2 F F S M と他種培地における *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* の発育の比較

F F S M, D2 培地及び NA 培地上における本細菌 7 菌株の集落の形成率を比較した結果、菌株間にお

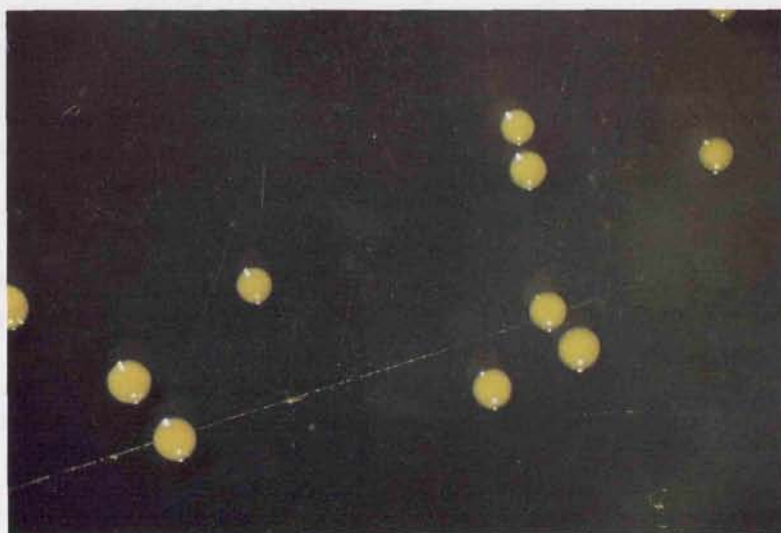


Fig. 1 Colonies of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* NCPPB 390 on FFSM

Table 3 Properties of colonies on FFSM

Properties of colony	Bacteria species
yellow-color, capitate, smooth	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> NCPPB 178, 390, 567, 1751, ATCC 33802 <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>oortii</i> YPPS T-4, T-21, T-90, Y-3, N-8, N-26, N-33, NB-2
light-yellow-color, capitate, smooth	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> YPPS K1-1, K-3, R-1
growth of orange, rough colonies are stopped after 5 days.	<i>Rhizoglyphus solani</i> NCPPB 158, 469, 1488, 2210
green-brown, rough	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> NIAES 1023

Stocked culture of YPPS: Yokohama Plant Protection Station

NIAES: National Institute of Agro-Environmental Sciences, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries

ける差は認められたが、FFSMはNA培地の0.3～61%の集落形成率であり、D2培地とは菌株により大きな差はあるが、平均すると、ほぼ同程度の集落形成率を示した(table 4)。しかし、FFSMでの集落の形成速度はD2培地より3～4日間遅かった。

3 血清学的性質

供試7菌株の抗血清に対する力価はTable 5に示す通りであった。

スライド凝集法によって調べた *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* 7菌株間の反応結果はTable 6に示すとおりであった。すなわち、供試抗血清には菌株に対する特異性が認められ、NCPPB 390株の抗血清を除けば、供試7菌株のすべてと凝集反応する抗血清はなかった。

スライド凝集法によって調べた他種細菌との反応結果はTable 7に示した。

寒天ゲル内二重拡散法によって調べた結果 *C. flac-*

Table 4 Comparison of colony formation of seven strains of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* on selective and nonselective media

Strain			medium ^{a)}		
			FFSM	D2	NA
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	NCPBP	178	61	11	100(%) ^{b)}
do	NCPBP	390	0.3	5	100
do	NCPBP	567	14	12	100
do	NCPBP	1751	21	76	100
do (orange strain)	NCPBP	558	0	Nt ^{c)}	100
do (violet strain)	NCPBP	2344	0	Nt	100
<i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	ATCC	33802	49	22	100

a) FFSM = *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* selective medium

D2 = Kado & Heskett's medium D2

NA = Nutrient Agar (Difco Lab.)

b) Colony efficiency = $\frac{\text{Ave. number of colonies on FFSM or D2}}{\text{Ave. number of colonies on NA}} \times 10^2$

c) Not test

Table 5 Titer of antisera of seven strains of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (tube precipitin test)

strains			titer
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	NCPBP	178	5,120
do	NCPBP	390	10,240
do	NCPBP	567	2,560
do	NCPBP	1751	640
do (orange strain)	NCPBP	558	5,120
do (violet strain)	NCPBP	2344	2,560
<i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	ATCC	33802	1,280

Table 6 Slide agglutination test between antisera and strains of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Antisera		Antigen ^{c)}						
		NCPBP 178	390	567	1751	558	2344	ATCC 33802
NCPBP	178	5	0 ^{a)}	0	1 ^{b)}	0	0	0
	390	3	6	5	1	3	3	4
	567	6	4	6	3	1	0	4
	1751	4	0	0	6	0	4	0
	558	0	3	3	0	4	0	4
	2344	2	1	3	6	2	6	3
ATCC	33802	6	3	2	0	3	0	6

a) 0: No reaction

b) One, 2, 3, 4, 5 and 6 show the positive reaction to the diluted antisera as 1/10, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400 and 1/800 respectively.

c) Bacterial concentration was 10^{9-10} cfu/ml

Table 7 Slide agglutination test between other genus, species and pathovars of bacteria and antisera of seven strains of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Antigen				Antisera						
				NCPPB 178	390	567	1751	558	2344	ATCC 33802
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>oortii</i>	YPPS	T-4		+	—	—	+	—	—	—
	YPPS	T-21		+	—	—	+	—	—	—
	YPPS	T-90		—	—	—	+	—	+	—
	YPPS	Y-3		+	—	—	—	—	—	—
	YPPS	N-8		—	—	—	—	—	—	—
	YPPS	N-26		+	—	—	—	—	—	—
	YPPS	N-33		+	—	—	+	—	—	—
	YPPS	NB-2		+	+	—	+	—	—	—
<i>Rhodococcus fascians</i>	NCPPB	156		—	—	—	—	—	—	—
	NCPPB	469		—	—	—	—	—	—	—
	NCPPB	1488		—	—	—	—	—	—	—
	NCPPB	2210		—	—	—	—	—	—	—
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>										
	YPPS	K1-1		—	—	—	—	—	+	—
	YPPS	K-3		—	—	—	—	—	—	—
	YPPS	R-1		—	—	—	—	—	—	+
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	YPPS	H-10-1		—	—	—	—	—	—	—
	YPPS	U-10-1		—	—	—	—	—	—	—
<i>C. rathyi</i>	NIAES	1003		—	—	—	—	—	—	—
	NIAES	1004		—	—	—	—	—	—	—
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	YPPS	Hy31		—	—	—	—	—	—	—
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	YPPS	S1		—	—	—	—	—	—	—
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	NIAES	1090		—	—	—	—	—	—	—
<i>X. campestris</i> v. <i>cucurbitae</i>	NIAES	1081		—	—	—	—	—	—	—
<i>X. campestris</i> pv. <i>vitians</i>				—	—	—	—	—	—	—
<i>X. campestris</i> pv. <i>oryzae</i>	NIAES	1086		—	—	—	—	—	—	—
<i>X. campestris</i> pv. <i>hyacinth</i>	YPPS	EB-2-1		—	—	—	—	—	—	—
<i>X. campestris</i> pv. <i>hordei</i>	NIAES	1035		—	—	—	—	—	—	—
<i>X. campestris</i> pv. <i>carotae</i>				—	—	—	—	—	—	—
<i>X. campestris</i> pv. <i>pruni</i>	NIAES	1092		—	—	—	—	—	—	—
<i>X. campestris</i> pv. <i>pisi</i>				—	—	—	—	—	—	—
<i>X. campestris</i> pv. <i>alfalfae</i>	NIAES	1090		—	—	—	—	—	—	—
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i>				—	—	—	—	—	—	—
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	NIAES	7246		—	—	—	—	—	—	—
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	NIAES	1023		—	—	—	—	—	—	—
<i>P. syringae</i> pv. <i>eryobotryae</i>				+	—	—	—	—	—	—
<i>P. solanacearum</i>				—	—	—	—	—	—	—
<i>P. albobipitans</i>				—	—	—	—	—	—	—
<i>P. angulata</i>				—	—	—	—	—	—	—
<i>P. glumae</i>				—	—	—	—	—	—	—
<i>P. marginalis</i> pv. <i>marginalis</i>				—	—	—	—	—	—	—

cumfaciens pv. *flaccumfaciens* NCPPB 390の抗血清を用いた反応では, *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

7 菌株及び *C. flaccumfaciens* pv. *oortii* 4 菌株に共通の抗原が存在することが確認された (Fig. 2)。

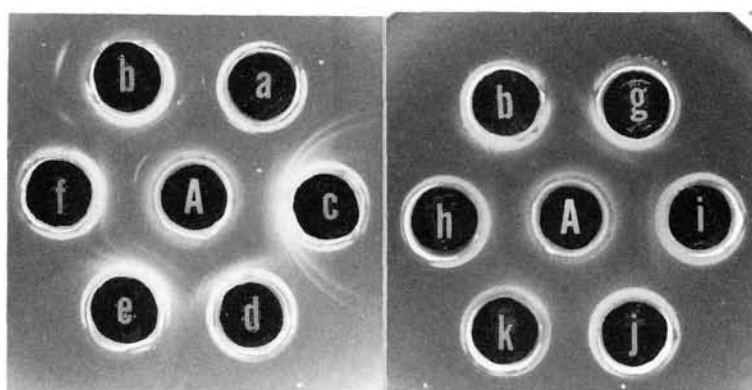


Fig. 2 Serological reactions in agar gel double diffusion test.

The wells contain:

- A: Antiserum of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* NCPPB 390
 a: Living cells (antigen) of *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* NCPPB 390
 b: Living cells (antigen) of *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* NCPPB 178
 c: Living cells (antigen) of *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* NCPPB 567
 d: Living cells (antigen) of *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* NCPPB 1751
 e: Living cells (antigen) of *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* NCPPB 558 (orange strain)
 f: Living cells (antigen) of *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* NCPPB 2344 (violet strain)
 g: Living cells (antigen) of *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* ATCC 33802
 h: Living cells (antigen) of *C. flaccumfaciens* pv. *oortii* YPPS Y-3
 i: Living cells (antigen) of *C. flaccumfaciens* pv. *oortii* YPPS T-4
 j: Living cells (antigen) of *C. flaccumfaciens* pv. *oortii* YPPS T-90
 k: Living cells (antigen) of *C. flaccumfaciens* pv. *oortii* YPPS N-8

4 土壌及び種子磨砕液からの検出

結果はTable 8に示した。

FFSM上に生育した集落は、土壌及び種子磨砕液

のいずれにおいても *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* NCPPB 390のみが生育し、その回収は滅菌水に懸濁した場合の回収率と同等であった。

Table 8 Recovery of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* NCPPB 390 from soil and triturated seed artificially contaminated with the bacterium.

sample	medium	concentration of added bacteria			
		0	10^3	10^4	(cells/ml)
control ^{a)}	NA	0	211 ^{d)}	∞ ^{e)}	(members of colonies)
control	FFSM	0	7	65	
soil ^{b)}	FFSM	0	9	47	
seed ^{c)}	FFSM	0	11	68	

a) The bacterial solution of same concentrations in saline were used as the control.

b) The field soil (2g) was suspended in 100ml of distilled water and the bacterial cells were added in the soil solution to contrive the concentration of the bacteria as 0, 10^3 , 10^4 cells/ml.

c) A healthy bean seed was ground in 50ml of distilled water and the bacterial cells were added in the seed mixture to contrive the concentration of the bacteria as 0, 10^3 , 10^4 cells/ml.

d) Average number of colonies per plate from four plates.

Individual samples of 0.1ml were inoculated on the four plate of the media. Colonies were counted after inoculation for 8 days at 25C.

e) numerous

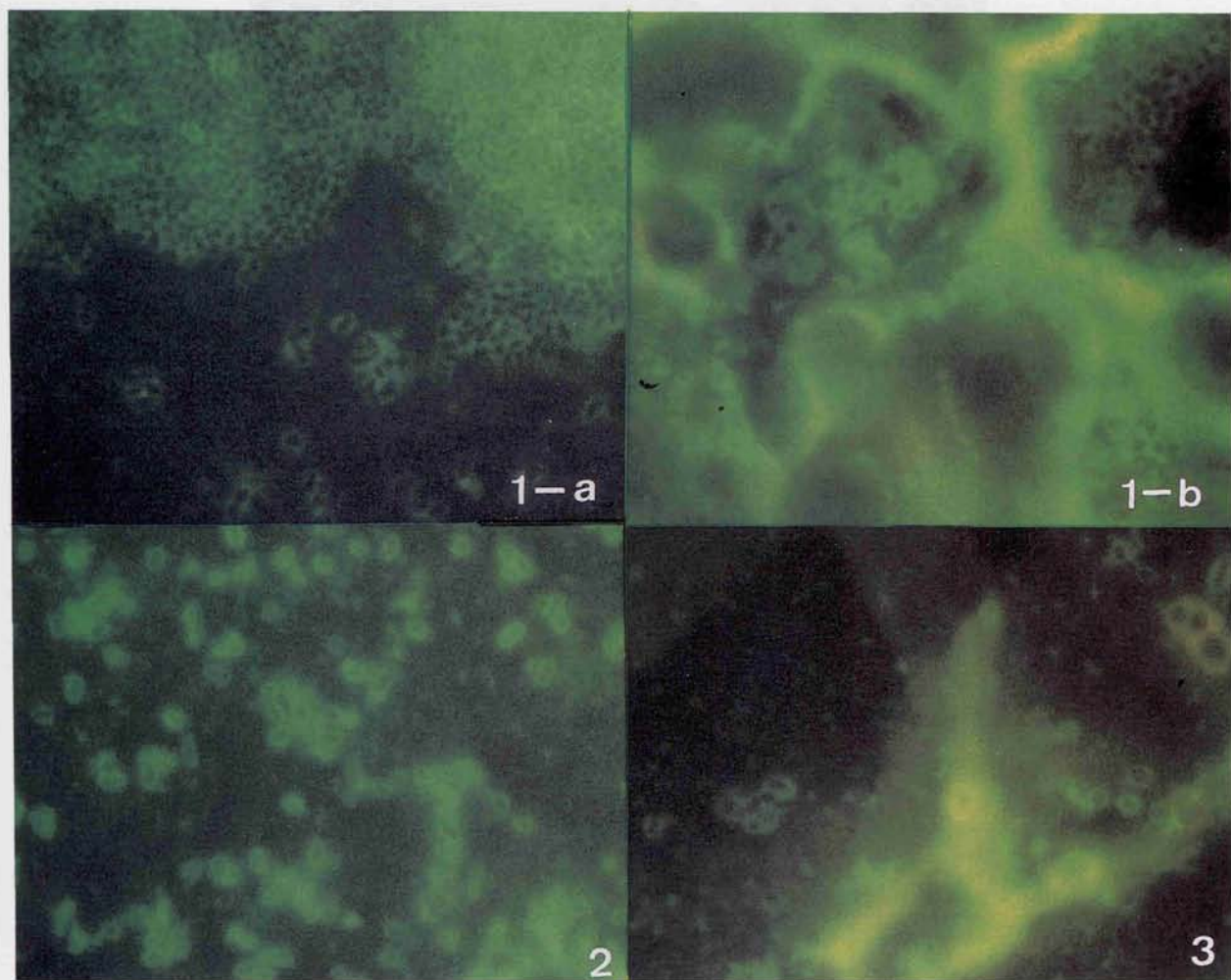


Fig. 3 1-a, b: Bacterial cells between testa and cotyledons of infected seed with *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* on indirect immunofluorescent microscopy.
2: Bacterial cells in cotyledons of infected seed with *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.
3: Bacterial cells in radicle of infected seed with *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

5 インゲンマメ種子内の *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* の所在

人工接種により調製した感染種子から、F F S M上で黄色、円形、全縁、半球型を呈する多数の細菌が分離された。それらの集落はスライド凝集法により、*C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* NCPPB 390 の抗血清とすべて反応した。

本種子の凍結切片を間接蛍光抗体法により観察した結果、Fig 3の1-a 及びbのように種皮と胚乳の間に最も多量の細菌が観察され、Fig 3の2 及び3に示すように子葉及び幼根にも本細菌の存在が確認された。

考 察

C. flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* の orange strain である NCPPB 558 及び violet strain である NCPPB 2344 は F F S M上で生育しなかった。これは F F S Mの炭素源に起因すると考えられる。炭素源としてグルコースを用いている D2 培地上においては、培養4日目から orange strain の場合、その特徴であるピンク色の集落が、violet strain の場合は、その特徴である紫色の水溶性色素を産生するクリーム色の集落がそれぞれ形成された。この集落の特徴は P S A 培地上での集落の性状と同じであり、他の供試菌とは容易に区別された。従って、orange strain, violet strain の検出に F F S Mを用いるには炭素源等の再検討が必要であると考えられる。

F F S Mでの *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* 及び *C. flaccumfaciens* pv. *oortii* の生育は、他の生育可能な供試菌より良好であり大きな集落を形成した。また、集落が同程度の大きさの場合でもその性状から他の生育可能な供試菌とは識別可能であった。さらに D2 培地、C F S 培地と比較した場合、*C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* 及び *C. flaccumfaciens* pv. *oortii* に対する選択性は優れていた。

また、*C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* 7 菌株の血清学的特異性については、スライド凝集法、寒天ゲル内二重拡散法による試験の結果から菌株特異性が高い傾向にあることがわかった。近年、*Erwinia amylovora* (Lin et al., 1987), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *oryzae* (BENEDIET et al., 1989), *X. campestris* pv. *begoniae* (BENEDIET et al., 1990) において、種特異的あるいは pathovar 特異的モノクローナル抗体が作成されている。*C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* においても供試 7 菌株に共通

の抗原を検出することを目的としたモノクローナル抗体を作成すれば、本細菌の検出に対する抗血清の利用により有効な手段となり得ると考えられる。

C. flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* 感染種子は、間接蛍光抗体法による観察の結果、種子内全体が本細菌に汚染されていることが確認された。

以上の結果から F F S M, 抗血清を利用した *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* の分離検出は、技法の簡便さ、確実性の点から植物検疫において利用価値があると判断される。しかし、実用化に先だって、上記の方法により作成した *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* に感染した種子を用い、F F S M及び抗血清による検出手順、精度管理および検出限界について検討しておく必要がある。

摘 要

Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* の分離・検出及び簡易同定のために選択培地 (F F S M) と抗血清を作成した。培地組成はラムノース 5 g, 酵母エキス 2 g, K_2HPO_4 2 g, KH_2PO_4 1 g, NH_4Cl 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g, LiCl 10 g, Tris(hydroxymethyl)aminomethane 1.2 g, ブロム・クレゾール・パープル 15 μ g, アジ化ナトリウム 2 mg, 硫酸ポリミキシン B (8,000 USP units/mg) 40 mg, シクロヘキシミド 100 mg, 寒天 15 g, 蒸留水 1,000 ml である。F F S Mにおいて 30℃で 10日間培養すると、黄色、半球型の集落を形成し、集落の周囲の培地の色は黄色に変色した。*C. flaccumfaciens* pv. *oortii* は本細菌と同様な性状の集落を形成したが他の供試細菌は異なる性状の集落を形成したか、もしくは集落を形成する。F F S Mと D2 培地と比較した場合、集落の形成率はほぼ同程度であったが、*C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* に対する選択性は F F S Mの方が優れていた。しかし、orange strain 及び violet strain は F F S Mでは生育しなかった。

作成した *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* 7 菌株の抗血清は、スライド凝集法及び寒天ゲル内二重拡散法により検討した結果、菌株特異的な傾向が見られた。

開花前のインゲンマメの蕾の下部に本菌を接種して得た汚染種子を凍結切片とし、間接蛍光抗体法で観察したところ、種子内全体に本菌が観察された。

以上のことから、*C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* の感染種子における検出・同定に F F S M及び抗血清を用いることは、迅速な処理を要求される植物検疫に有効な手段になり得ると判断した。

引用文献

- BENEDICT, A. A., A. M. ALVARE, J. BERESTECKY, W. IMANAKA, C. Y. MIZUMOTO, L. W. POLLARD, T. W. MEW and C. F. GONZALEZ (1988): Pathovar-Specific Monoclonal Antibodies for *Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*. *Phytopathology* 79: 322-328
- BENEDICT, A. A., A. M. ALVARE and L. W. POLLARD (1990): Pathovar-specific Antigens of *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae* and *X. campestris* pv. *pelaogonii* Detected with Monoclonal Antibodies. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 572-574
- CMI (Commonwealth Mycological Institute) (1987): *Curtobacterium flaccumfaciens* Distribution Maps of Plant Diseases. No. 370, 4th. ed.
- DYE, D. W. (1968): A taxonomic study of the genus *Erwinia* I. The "amylovora" group.
- GROSS, D. C. and A. K. VIAVER (1979): A selective medium for isolation of *Curtobacterium nebraskense* from soil and plant parts. *Phytopathology* 69: 82-87
- HEDGES, F. (1922): A bacterial wilt of bean caused by *Bacterium flaccumfaciens* nov. sp. *Science* 55: 433-434
- HEDGES, F. (1926): Bacterial wilt of beans (*Bacterium flaccumfaciens*), including comparisons with *Bacterium phaseoli*. *Phytopathology* 16: 1-25
- KADO, C. I. and M. G. HESKETT (1970): A selective medium for isolating *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969-976
- LIN, C. P., T. A. CHEN, J. M. WELLS and T. VAN DER ZWET (1987): Identification and Detection of *Erwinia amylovora* with Monoclonal Antibodies. *Phytopathology* 77: 376-380
- MARTEN, E. A., C. V. LOWTHER and J. G. LEACH (1943): A differential medium for the isolation of *Phytomonas sepedonica*. *Phytopathology* 33: 406-407
- 末次哲雄, 佐藤成良, 高山睦雄, 山内淳司 (1981): 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。植物防疫所調査研究報告 17: 77-85
- 高山睦雄, 川合昭, 末次哲雄 (1985): 植物検疫重要細菌病の診断技法に関する研究。第Ⅴ報 *Corynebacterium fascians* の選択培地 植物防疫所調査研究報告 21: 33-40
- 植松勉, 藤井薄, 大畑貫一 (1977): トマト潰瘍病菌 *Corynebacterium michiganense* の接種方法と種子感染 日本植物病理学会報 43: 412-418
- ZAUMEYER, W. J. (1932): Comparative pathological history of these bacterial diseases of bean. *Journal of Agricultural Research* 44(8): 605-632
- ZAUMEYER, W. J. and H. R. THOMAS (1952) A monographic of bean diseases and method for their control. Technical Bulletin U. S. Department of Agriculture No. 865, 255