

アブラナ科種子からの *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* の検出法について

小林 慶 範* ・ 三 谷 英美子**

小林 儀 信*** ・ 葦 喜 吉

横浜植物防疫所業務部国際第二課

Detection method of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifer seed. Yoshinori KOBAYASHI, Emiko MITANI, Yoshinobu KOBAYASHI and Kiyoshi DAI. (Yokohama Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 30: 131-135 (1994).

Abstract: Detection method of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*X.c.* pv. *c.*) in crucifer seed were studied. Many natural-infected seed lots were assayed by means of FRANKEN *et al.* (1991). Sixty-two starch-hydrolyzing isolates on NSCAA selective medium were gained in this assay. All starch-hydrolyzing isolates were examined on their cultural morphology, serology and pathogenicity. Twenty-six isolates of them were positive in the slide agglutination test by using polyclonal antiserum to *X.c.* pv. *c.*. Also, 23 isolates of them were pathogenic to the young petiole of either broccoli or chinese cabbage seedlings in the pathogenicity test. It was suggested that the serological confirmation of the characteristic starch-hydrolyzing colonies on NSCAA is useful for rapid detection of black rot pathogen in crucifer seed.

Key word: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, crucifer seed, selective medium, serological confirmation

アブラナ科植物の黒腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (PAMMEL, 1985) DOWSON, 1939) は、種子伝染し、その感染種子は本病の第一次伝染源として特に重要である。種子からの本病原細菌の検出法については、素寒天培地上あるいは選択培地上に種子を置床して幼苗を観察する方法 (SRINIVASAN *et al.*, 1973; SCHAAD & KENDRICK, 1975), 種子洗浄液から選択培地を用いて検出する方法 (RANDHARA & SCHAAD, 1984; FRANKEN *et al.*, 1991), 種子洗浄液から蛍光抗体法を用いて検出する方法 (SCHAAD & DONALDSON, 1980) など多数報告されている。これらの報告を調査した結果、FRANKEN (1991) らの方法は、簡便で精度が高い種子検査法と考えられた。

そこで FRANKEN (1991) らの方法に準じて、アブラナ科種子から細菌の検出・分離を試み、分離菌の病原

性および血清学的性質について調査を行い、本法の種子検疫への適用性を検討したので報告する。

本試験を行うにあたり、貴重な菌株および抗血清を分譲していただくとともに終始ご指導を賜った横浜植物防疫所調査研究部病菌課の各位に深く感謝の意を表する。

材料および方法

種子からの細菌分離法

検出方法は、FRANKEN ら (1991) の方法に準じ、(Fig. 1) ロット当たり 40 g (約 10,000 粒に相当) の種子を三角フラスコに採取し、100 ml の生理食塩水 (0.85% NaCl) を加え、5 分間激しく振とう後 2~3 時間静置した。静置後、この種子洗浄液を 10 倍および 100 倍に希釈し、それぞれ 50 μ l を NSCAA 培地 (Nutrient agar 23 g, Soluble starch 25 g, Cycloheximide 200 mg, Nitrofurantoin 10 mg, Vancomycin 0.5 mg, 蒸留水

* 現在横浜植物防疫所東京支所

** 横浜植物防疫所調査研究部

*** 横浜植物防疫所成田支所

10,000 (40 g) seeds
 |
 Add 100 ml of 0.85% NaCl to 10,000 seeds
 |
 Shake for 5 minutes and 2 or 3 hours at room temperature.
 |
 Take sample of 1 ml and dilute serially to 1:100 and plate 50 μ l of 0, 1:10, 1:100 dilutions onto triplicate plate of NSCAA. Incubate plates at 28°C and observe suspected colonies after 3 or 4 days.
 |
 Confirm suspected colonies of *X. campestris* pv. *campestris* in a serological test and pathogenicity test.

Fig. 1. Flow diagram for detecting *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by a plating assay in seed of crucifer.

Table 1. Serological reactions of anti-*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (X1-1-1) serum against Xanthomonads and some other bacteria

Species	Number of strains	Agglutination test
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	X1-1-1	+
	1285	+
	1289	+
	1152	+
	1153	+
<i>X. c.</i> pv. <i>citri</i>	N6101	+
<i>X. c.</i> pv. <i>cucurbitae</i>	1081	+
<i>X. c.</i> pv. <i>hordei</i>	1035	+
<i>X. c.</i> pv. <i>hyacinthi</i>	EB-2-1	+
<i>X. c.</i> pv. <i>oryzae</i>	1086	+
<i>X. c.</i> pv. <i>phaseoli</i>	alfalfa	+
<i>X. c.</i> pv. <i>physalidicola</i>	X-7	+
<i>X. c.</i> pv. <i>pisii</i>	X-8	+
<i>X. c.</i> pv. <i>pruni</i>	1092	+
<i>X. c.</i> pv. <i>translucens</i>	X-1-11-2	+
<i>X. c.</i> pv. <i>vesicatoria</i>	X-11	+
<i>X. c.</i> pv. <i>vitians</i>	NL7790	+
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		-
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>oortii</i>		-
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>		-
<i>Pseudomonas angulata</i>		-
<i>P. syringae</i> pv. <i>mori</i>		-
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>		+

+ : positive reaction. - : negative reaction.

Table 2. Result of serological test and pathogenicity test of bacterial isolates from crucifer seed

Isolate Number	Host	Serological test	Pathogenicity to	
			Broccoli	C. cabbage
217E1	<i>Brassica campestris</i> var. <i>pekinensis</i> (Chinese cabbage)	+	+	-
217E2		+	+	+
220C1		+	-	+
224H1		+	+	+
224H2		+	-	+
304H1		+	+	-
304H2		+	-	+
304H3		+	+	-
304H4		+	-	-
304K1		+	+	+
304k2		-	-	-
327A1		-	-	-
327A2		+	-	+
423S1		+	+	+
423S2		+	+	+
423X1		+	+	-
304G1		-	-	-
304G2		-	-	-
423Z1		-	-	-
928A1		+	+	-
423P1		+	-	-
224L1		-	-	-
224B2		<i>B. campestris</i> (Chinese mustard)	+	-
224J2	+		-	+
224K1	-		-	-
224K2	-		-	-
224K3	-		-	-
224K5	-		-	-
423J1	-		-	-
423J2	-		-	-
423J3	-		-	-
423J4	-		-	-
423R1	-	-	-	
304J1	-	-	-	
304A1	<i>B. campestris</i> (Pak Choi)	-	-	-
304A2		-	-	-
423K1	<i>B. campestris</i> (Tingensasi)	-	-	-
423K2		+	+	+
228L1	<i>B. campestris</i> (Tsai Sin)	-	-	-
423G1	<i>B. campestris</i> (Turnip)	+	-	+
423G2		-	-	-
423W1		-	-	-

Table 2. Continued

Isolate Number	Host	Serological test	Pathogenicity to	
			Broccoli	C. cabbage
304I1	<i>B. juncea</i> (Leaf mustard)	+	+	-
304I2		+	-	-
304I3		+	+	-
224I1	<i>B. napus</i> (Rutabaga)	-	-	-
224I2		-	-	-
423F2	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> (Broccoli)	-	-	-
423L1		-	-	-
423V1		-	-	-
52104		-	-	-
224F1	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (Cabbage)	-	-	-
224F2		+	+	-
224F3		-	-	-
224F4		+	+	-
224F6		+	+	-
304D1		-	-	-
423H1		-	-	-
521J1		-	-	-
304F1	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (Kale)	-	-	-
228J1	<i>B. oleracea</i> var. <i>gouglodes</i> (Kohlrabi)	-	-	-
42302	<i>Brassica</i> sp. (Mustard)	-	-	-

Serological test: + positive - negative. Pathogenicity test: + infected - not infected

1,000 ml)上にL字棒で塗布し、28°Cで3~5日間培養した。培養後、集落周辺部のデンプンを分解することにより生じた透明帯を伴う円形集落から細菌を無作為に分離し、以下の接種試験および血清試験に供試した。なお、本試験にはハクサイ、タイサイ、キャベツ、ブロッコリー、カブ等のアブラナ科種子140ロットを供試した。

接種試験

接種試験は、育苗ポットで栽培した本葉3~4枚頃のブロッコリーおよびハクサイ苗の葉柄部に多針で付傷する方法により行った。各分離細菌をPSA斜面培地で48時間培養し、生理食塩水で菌濃度を 10^9 cfu/mlに調整後、細菌懸濁液を含ませた脱脂綿を付傷した葉柄部に接種した。接種後、接種植物を温室で2日間静置し、脱脂綿を除去した後、室内で2週間観察した。病原性の有無は、発病が確認された部位より病原細菌を再分離することにより判定した。

血清反応試験

Xanthomonas campestris pv. *campestris* X1-1-1に対する抗血清を用いて、スライド凝集反応により種子からの各分離細菌との血清反応試験を行った。本抗血清の10倍希釈液と各種植物病原細菌とのスライド凝集反応の結果は、Table 1に示すとおり、供試した*Xanthomonas campestris*のすべてのpathovarに陽性反応を示し、また*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*に陽性反応を示した。

結果および考察

供試した140ロットのうち34ロットからNSCAA培地に生育細菌のデンプン分解能による培地の透明化を伴う円形集落が検出され、これらの集落から62菌株を分離した (Table 2)。NSCAA培地上での分離菌の集落の形態は、平滑、円形、全縁であったが、高さは中高または偏平、色は白色、クリーム色、黄色、オレンジ色に類別された。分離した62菌株のうち供試抗血清に陽性反応を示した菌株は、26菌株であった。これ

らの集落の形態は、すべて平滑、中高、光沢を有し、粘液質で非水溶性黄色色素を産生した。

また、分離細菌62菌株のハクサイおよびブロッコリーへの接種試験の結果、23菌株が病原性を示した。

ハクサイまたはブロッコリーに病原性を示したこれら23菌株は、すべて *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (X1-1-1) 抗血清に陽性反応を示したことから、*X. campestris* pv. *campestris* と考えられる。

種子からの *X. campestris* pv. *campestris* の検出は、洗浄法が最も信頼性があり、効率的であると考えられている (SCHAAD, 1980)。FRANKEN (1991) らは、洗浄法での種子の洗浄条件を検討し、サンプル種子10,000粒を生理食塩水100 mlに加え、よく振とう後、21°Cで2.5時間静置することにより本細菌の検出率が上がると報告し、さらに NSCAA 培地は、絶対的な選択培地ではないため同培地での分離細菌の確認には病原性試験、YDC 培地による培養試験等が必要とも報告している。今回の調査では、NSCAA 培地上の生育細菌について血清試験および病原性試験の結果がほぼ一致した。同培地上での集落の形態により、一定の識別は可能と考えられるが、簡易なスライド凝集反応による血清反応が有効なことが明らかになった。

本試験での血清反応は、スライド凝集法により行ったが、血清反応が陽性の菌株のなかで病原性を示さないものが3菌株あった。これらの3菌株は、供試抗血清の特異性によるものか、または病原性試験の方法に問題があるものか検討する必要がある。

本法ではサンプルの採取から検出した *X. campestris* pv. *campestris* の確認まで3~4日で実施可能で、

特別の技術、器具、器材等を要しない簡易なものであることが確認された。今後、検疫現場に本法を導入するためには、本法の検出精度とり病種子の Inoculum potential の関係の評価を行い、具体的な検疫方法を検討する必要があると思われる。

引用文献

- FRANKEN, A.A.J.M., C. VAN ZEIJL, J.G.P.M. VAN BILSEN, A. NEUVEL, R. DE VOGEL, Y. van WINGERDEN, Y.E. BIRNBAUM, J. VAN HATEREN and P.S. VAN DER ZOUWEN (1991) Evaluation of a plating assay for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Seed science and technology 19: 215-226.
- RANDHARA, P.S. and N.W. SCHAAD (1984) Selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. Phytopathology 74: 268-272.
- SCHAAD, N.W. and R.C. DONALDSON (1980) Comparison of two methods for detection of *Xanthomonas campestris* in infected crucifer seeds. Seed science and technology 8: 383-391.
- SCHAAD, N.W. and R. KENDRICK (1975) A qualitative method for detecting *Xanthomonas campestris* in crucifer seed. Phytopathology 65: 1034-1036.
- SRINIVASAN, M.C., P. NEERGAAD and S.B. MATHUR (1973) A technique for detection of *Xanthomonas campestris* in routine seed health testing of crucifers. Seed science and technology 1: 853-859.