

植物検疫重要細菌病の診断技法に関する研究 第Ⅶ報

Clavibacter michiganensis subsp. *nebraskensis*の

選択培地と抗血清の作製*

會澤 雅夫・塚本 貴敬**・水野 明文

佐藤 成良・川合 昭

横浜植物防疫所

Studies on the Diagnosis of Foreign Bacterial Diseases of Quarantine Significance VII. Preparation of selective medium and antiserum for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*. Masao AIZAWA, Takanori TSUKAMOTO, Akifumi MIZUNO, Shigeyoshi SATO and Akira KAWAI (Yokohama Plant Protection Station 5-57, Kitanaka-dori, Naka-ku, Yokohama 231, Japan) *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 33: 7-15 (1997)

Abstract: A selective medium (NSM) was developed for isolating *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*, the causal agent of Goss's wilt, which is seedborne and of no occurrence in Japan. Also, antiserum was prepared for diagnosis on it. On NSM, *Cl. m.* subsp. *nebraskensis* formed capitated, smooth and salmon-pink colonies after 3-4 days incubation at 30°C and blackening of the medium around the colonies was observed. Depending on this colony characteristic, *Cl. m.* subsp. *nebraskensis* was easily distinguished from other bacteria such as *Cl. m.* subsp. *michiganensis*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *Rhodococcus fascians* etc., which could grow on NSM. The colony forming efficiency on NSM was 72-177%. In gel-double-diffusion test and slide-agglutination test using the antiserum against this bacterium and various antigen of the other bacteria, it suggested that there was a relatively antigenic homogeneity among all 13 strains of *Cl. m.* subsp. *nebraskensis*. the antiserum absorbed with the antigen of *Cu. fl.* pv. *flaccumfaciens*, which had a weak reaction with crude antiserum, had become more specific on subspecies level. Therefore, NSM and the antiserum are useful for diagnosis of the disease caused by *Cl. m.* subsp. *nebraskensis*.

Key words: isolation, selective medium, antiserum, *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*

緒 言

Clavibacter michiganensis subsp. *nebraskensis* (Vidaver and Mandel 1974) Davis *et al.* 1984によるトウモロコシ (*Zea mays* L.) の葉枯細菌病（仮称）は、1969年にアメリカ合衆国のネブラスカ州中南部で初めて確認され、1972年にはアイオワ、カンザスの2州でも確認された (Wysong *et al.* 1973)。本細菌はトウモロコシのみを侵し、トウモロコシの主要な生産地であるネブラスカ州では、1975～1977年の3年間の被害が約1千万ドルであると試算するものもある (Kennedy and Alcorn, 1980)。本細菌は、り病植物

残さで越冬したものが翌年の伝染源となり、また種子伝染することも知られている (Shurtleff, 1980)。本細菌病は、本邦未発生であり、植物検疫上重要なものと考えられている（病害虫情報）。

植物検疫の現場では、このような病原細菌を迅速かつ的確に検出し、同定する技術が欠かせないところであり、これまで火傷病菌 (*Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow *et al.* 1920) (末次ら 1981)、インゲンマメ萎ちょう細菌病（仮称）(*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges 1922) Collins and Jones 1984) (水野・川合 1993) などの検出・同定に使用するための選択培地と抗血清が開発されている。本細菌の分離選択培地として既にCNS培地が報告され、当該培地上での本細菌の集落形成日数は4～8日である (Gross and Vidaver, 1979)。本試験では、本細菌をより迅速に検出するために選択培地

*本報告の一部は1995年度日本植物病理学会大会で発表した。

**現在、蚕糸・昆虫農業技術研究所

Table 1. Bacterial strains used in this study

Bacteria	Strain	Host	Origin Country
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i>	ATCC 27794, ATCC 27795, ATCC 27822T ICMP 3294, ICMP 3295, ICMP 3296, ICMP 3299, ICMP 3300, ICMP 3301, ICMP 5367, ICMP 5368, ICMP 5369, ICMP 9112	<i>Zea mays</i> L.	U. S. A.
<i>Cl. m.</i> subsp. <i>michiganensis</i>	YPPS R-1, YPPS K-4, YPPS K1-1	<i>Lycopersicon</i> <i>esculentum</i> Mill.	Japan
<i>Cl. m.</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	YPPS U-18-1	<i>Solanum tuberosum</i> L.	do.
<i>Cl. rathayi</i>	MAFF 301003, MAFF 301004	<i>Triticum aestivum</i> L.	do.
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	NCPPB 178	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	U. S. A.
	NCPPB 1751		Romania
	NCPPB 2344		U. S. A.
<i>Cu. fl.</i> pv. <i>oortii</i>	YPPS Y-3, YPPS T-4, YPPS T-90	<i>Tulipa gesneriana</i> L.	Japan
<i>Rhodococcus fascians</i>	NCPPB 156	<i>Chrysanthemum</i> <i>morifolium</i> Ramat.	U.K.
	NCPPB 469	<i>Fragaria chiloensis</i> Duch.	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	YPPS T-1	<i>Rosa</i> sp.	Japan
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	YPPS C-1-1	<i>Solanum tuberosum</i> L.	do.
<i>E. herbicola</i>	YPPS E-6	unknown	Japan
<i>E. stewartii</i>	ATCC 8199, ATCC 8200, ATCC 29231	<i>Zea mays</i> L.	U. S. A.
<i>Pseudomonas andropogonis</i>	MAFF 301116	<i>Tulipa gesneriana</i> L.	Japan
<i>P. avenae</i>	YPPS P-1, MAFF 301141	<i>Eleusine coracora</i> (L.) Gaertn.	do.
<i>P. marginalis</i> pv. <i>marginalis</i>	MAFF 301519	<i>Cucumis sativus</i> L.	do.
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	MAFF 301315	do.	do.
<i>P. viridiflava</i>	MAFF 301326	do.	do.
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	MAFF 301076	<i>Raphanus sativus</i> L.	do.
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	YPPS X-3	<i>Oryza sativa</i> L.	do.

ATCC: American Type Culture Collection

ICMP: International Collection of Micro-organisms from Plants

YPPS: Yokohama Plant Protection Station

MAFF: Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries

NCPPB: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, UK.

T: Type Strain

の検討を行い、さらに選択培地で分離された細菌の同定に抗血清の利用が可能かを検討した。

材料及び方法

供試菌株

Cl. m. subsp. *nebraskensis* は American Type Culture Collection (ATCC) 及び International Collection of Micro-organisms from Plants (ICMP) から農林水産大臣許可を得て導入した13菌株（農林水産省指令 2

第2372号・5第2502号）を供試した（Table 1）。また、対照細菌として植物病原細菌 7 属15種42菌株を用いた。作製した抗血清の特異性の調査には、これらの対照細菌と併せて本試験で開発した選択培地を用いて輸入トウモロコシ種子から分離した細菌を供試した。供試細菌はジャガイモ半合成寒天斜面培地（PSA）（脇本, 1955）に移植し、30°Cの定温器内で24～48時間培養した後、各試験に用いた。

選択培地

*Cl. m. subsp. nebraskensis*は β -グルコシダーゼ活性およびグラム染色性が陽性であること(Dye and Kemp, 1977)に着目し、CNS培地、トマトかいよう病菌のためのSMCMM培地(白川・佐々木 1988)、植物病原Coryneform bacteriaが良好に生育する523培地(Kado and Heskett, 1970)の組成を参考として選択培地を検討した。炭素源としてグリセリン、増殖因子として酵母エキスおよびカゼイン加水分解物を添加し、 β -グルコシダーゼ活性はエスクリンの加水分解能を指標とすることとした。またグラム陰性細菌の生育を抑制する目的で硫酸ポリミキシンBとナリジキシン酸およびアジ化ナトリウムの添加を検討した。糸状菌の生育を抑制するためにはシクロヘキシミドの添加を検討した。

選択培地の選択性および平板効率

植物病原細菌7属15種42菌株を滅菌水に 1×10^4 cfu/mlとなるように懸濁した細菌液の0.1mlを選択培地平板上にコンラージ棒で塗抹接種した。30°Cで10日間培養し、集落形成の有無および集落の性状について観察し、平板効率を求めた。あわせてCNS培地から塩化リチウムとBravo 6F (tetrachloroisophthalonitrile)を除いた変法CNS培地及びD2培地(Kado and Heskett 1970)を対照として平板効率を比較した。

血清学的性質

Cl. m. subsp. nebraskensis ATCC 27794をPSA斜面培地で25°C、24時間培養した培養菌体を生理食塩水に懸濁し、遠心を繰り返すことで洗浄して抗原を調整した。家兎への免疫は、初回に 1.0×10^6 cfu/mlの細菌懸濁液1mlと等量のコンプリートアジュバンドで作成したエマルジョンを筋肉注射し、その後は最終濃度 1.0×10^6 cfu/mlの細菌懸濁液1mlを一週間間隔で10回静脈注射し、最終免疫の7日後に全採血して抗血清を得た。抗血清の力価は試験管内混合法での凝集素価により求めた。供試したグラム陽性植物病原細菌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(Ouchterlony法)で調査した。また、Kadotaら(1996)の方法で*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*の生菌体で吸収した抗血清(ATCC 27794)を作製し、同様に調査した。

選択培地によるトウモロコシ種子からの細菌の検出

飼料用に輸入されたトウモロコシ種子50gを粉碎

し、生理食塩水200mlで懸濁した後、ろ紙でろ過して得た懸濁液とその10倍希釈液を用いた。選択培地で分離された細菌は、集落の性状およびその周囲の培地の黒変(β -グルコシダーゼ活性)の有無を観察した。いくつかに類別された集落から代表的なものを釣菌し、PSA培地で培養した。これらの培養細菌の懸濁液を用いて*Cl. m. subsp. nebraskensis*の抗血清との反応をスライド凝集法で調査した。

結 果

選択培地の組成

本細菌の栄養要求性、グラム陰性細菌および糸状菌に対する抗菌成分について検討し、 β -グルコシダーゼ活性をもつグラム陽性細菌の分離を目的とした半選択培地を作成し、NSM培地と名付けた(Table 2)。すなわち、酵母エキス5.0g、カゼイン加水分解物2.0g、グリセリン10 ml、塩化ナトリウム5.0g、エスクリン1.0g、クエン酸第二鉄0.5g、寒天15gを蒸留水1 lに溶解、pH7.1に調整して高圧滅菌(115°C、15分間)後、約50°Cに冷却し、シクロヘキシミド100mg、グラム陰性細菌を抑制する目的で硫酸ポリミキシンB(8,000 USP/mg) 30mg、ナリジキシン酸40mgを無菌的に添加した。ナリジキシン酸は、0.1Nの水酸化ナトリウム水溶液に溶解して添加した。

NSM培地上における各種細菌の培養的性状

NSM培地上の*Cl. m. subsp. nebraskensis*は、30°Cで培養4日目には鮭肉色、円形、全縁、中高、表面平滑で湿光を帯びた直径1~2の集落を形成し、4、5日目には集落の周囲の培地を黒変した(Fig. 1)。対照として供試した菌株のうち、*Cl. m. subsp. michiganensis*および*Cu. fl. pv. flaccumfaciens*は培養4日目で淡黄色あるいは黄色、円形、全縁、中高、表面平滑で湿光を帯びた直径1~2 mmの集落を形成し、4日目には集落の周囲の培地を黒変した。また*Rhodococcus fascians*もNSM培地上で生育したが、その集落はオレンジ色でその周囲の培地の黒変はなかった。その他の供試菌株は全く生育しなかった(Table 3)。

平板効率

NSM培地と対照とした変法CNS培地およびD2培地における*Cl. m. subsp. nebraskensis* 6菌株の平板効率を比較した結果、菌株間における差はあるが、NSM培地では72~177%であり、変法CNS培地は58~118

Table 2. Composition of selective medium(NSM) for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*

Yeast-extract	5	g
Casein hydroxy lysate	2	g
glycerol	10	ml
Sodium Chloride	5	g
Esculin	1	g
Iron(II) Citrate	0.25	g
Cycloheximide*	100	mg
Nalidixic acid*	40	mg
Polymyxin B sulfate(8,000USP Units/mg)*	30	mg
Agar	15	g
Distilled water	1000	ml
	(pH7.1)	

*: added after autoclaving

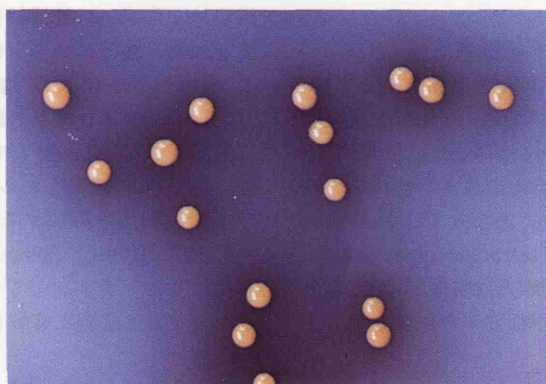


Fig. 1 Colonies of *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* ATCC 27794 on NSM

%, D2培地では5~60%であった。また, NSM培地での集落の形成は3~4日, 変法CNS培地で5~7日, D2培地では7~10日であった (Table 4)。

血清学的性質

作製した抗血清は, 免疫に用いた*Cl. m. subsp. nebraskensis* ATCC 27794の生菌体に対する試験管内凝集素価により, 力価は640倍であった。

スライド凝集法では, 本抗血清は*Cl. m. subsp. nebraskensis* 13菌株のすべてと反応し, *Cl. m. subsp. michiganensis* 3菌株と*Cu. fl. pv. flaccumfaciens* 2菌株とも反応した。

寒天ゲル内二重拡散法では, 13菌株の*Cl. m. subsp. nebraskensis*間でいずれも連続する1~数本の沈降帯を形成し, 3菌株の*Cl. m. subsp. michiganensis*とは一部連続した沈降帯を形成した。*Cu. fl. pv. flaccumfaciens* 3菌株とは交差する沈降帯を形成した (Fig.

2)。交差する沈降帯を形成した*Cu. fl. pv. flaccumfaciens* NCPBB 1751の生菌体で本抗血清を吸収して作製した吸収抗血清は, *Cl. m. subsp. nebraskensis*の供試菌すべてと連続した1本の沈降帯を形成した。また, *Cl. m. subsp. michiganensis* YPPS K1-1とも連続した沈降帯を形成した。この抗血清はスライド凝集法でも寒天ゲル内二重拡散法と同様に反応した (Table 5)。

選択培地によるトウモロコシ種子からの細菌の検出

トウモロコシ種子からNSM培地で分離された細菌は, 集落の性状から7種類に類別された (Table 6)。それぞれから代表的な1菌株を釣菌し, Ryu(1940)の方法でグラム反応を調べた結果, いずれもグラム陽性細菌であった。また, スライド凝集法では*Cl. m. subsp. nebraskensis*の抗血清と反応しなかった

Table 3. Growth of various bacteria on NSM

Bacteria(No. of tested strain)	Growth	Properties of colony
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> (13)	+	salmon-pink-color, circular, capitate, smooth
<i>Cl. m. subsp. michiganensis</i> (3)	+	yellow-color, circular, capitate, smooth
<i>Cl. m. subsp. sepedonicus</i> (1)	—	
<i>Cl. rathayi</i> (2)	—	
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> (3)	+	yellow-color, circular, capitate, smooth
<i>Cu. fl. pv. oortii</i> (3)	—	
<i>Rhodococcus fascians</i> (2)	+	orange-color, circular, capitate
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (1)	—	
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> (1)	—	
<i>E. herbicola</i> (1)	—	
<i>E. stewartii</i> (3)	—	
<i>Pseudomonas andropogonis</i> (2)	—	
<i>P. avenae</i> (2)	—	
<i>P. marginalis</i> pv. <i>marginalis</i> (2)	—	
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> (1)	—	
<i>P. viridiflava</i> (1)	—	
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (1)	—	
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (1)	—	

Table 4. Colony. forming efficiency of *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* on NSM

Strain	Medium ^{a)}			
	NSM	D2	CNS (modified)	NA
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i>				
ICMP 3296	102 ^{b)}	21	82	100
do.	87	33	85	100
do.	72	5	58	100
do.	88	14	81	100
do.	90	60	101	100
do.	177	14	118	100
Days needed for colony formation	3~4	7~10	5~7	2~4

a) NSM=*Cl. m. subsp. nebraskensis* semi-selective medium

D2=Kado & Heskett's (1970) medium D2

CNS (modified)=Gross & Vidaver's (1979) medium CNS. LiCl and Bravo 6F removed

NA=Nutrient Agar (Difco Lab.)

b) Colony forming efficiency = $\frac{\text{average number of colonies on selective medium} \times 10^2}{\text{average number of colonies on NA}}$

(Table 5)。

考 察

NSM培地の作製にあたっては、植物検疫での必要性からトウモロコシ種子からの本細菌の検出に主眼を置き、選択性より検出時間の短縮を目標とした。このため、既報のCNS培地に加えて*Cl. m. subsp.*

*michiganensis*の選択培地であるSMCMM培地での生育性および選択性を参考に検討を行った。本細菌はグラム陽性細菌であることとβ-グルコシダーゼ活性を有することから、これらの特性を選択培地の改善に利用することとした。β-グルコシダーゼ活性は、エスクリンの加水分解能を調査するための培地 (Sneath, 1956) で確認することとし、これを基本培地として検討した。選択培地の炭素源は、グリセリンがスクロー

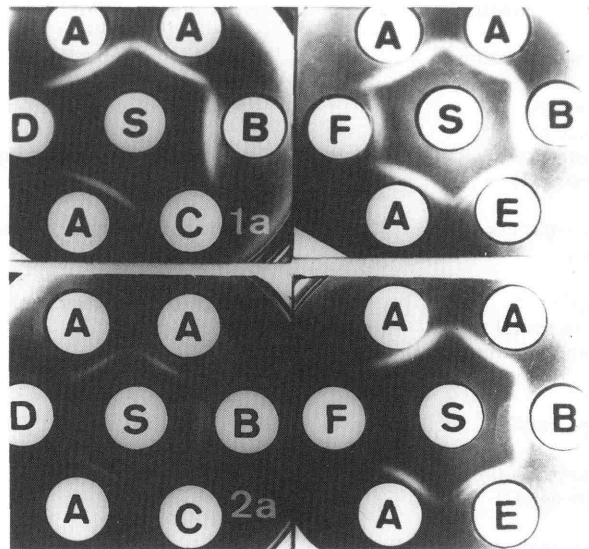


Fig. 2 Serological reactions in agar gel double diffusion test

The wells contain:

Center: Antiserum of *Cl. m. subsp. nebraskensis* ATCC 27794 (Plate 1)

Antiserum of *Cl. m. subsp. nebraskensis* ATCC 27794

absorbed with *Cu. fl. pv. flaccumfaciens* NCPPB 1751 (Plate 2)

A: Living cells (antigen) of *Cl. m. subsp. nebraskensis* ATCC 27794

B: Living cells (antigen) of *Cl. m. subsp. nebraskensis* ICMP 3296

C: Living cells (antigen) of *Cl. m. subsp. sepedonicus* YPPS U-18-1

D: Living cells (antigen) of *Cu. fl. pv. flaccumfaciens* NCPPB 1751

E: Living cells (antigen) of *Cl. m. subsp. michiganensis* YPPS R-1

F: Living cells (antigen) of *Cl. m. subsp. michiganensis* YPPS K-4

スよりも本菌の生育に適し、増殖因子は、酵母エキスとカゼイン加水分解物の組み合わせが、酵母エキスとペプトンの組み合わせよりも適していた。糸状菌およびグラム陰性細菌の生育抑制のためにシクロヘキシミド、アジ化ナトリウム、硫酸ポリミキシンBそしてナリジキシン酸の添加を検討した。硫酸ポリミキシンBとナリジキシン酸の組み合わせにより供試したグラム陰性植物病原細菌の生育は抑えられ、*Cl. m. subsp. nebraskensis*は4, 5日で集落を形成した。そこで、この選択性を維持しつつ、集落の形成を早めるためにこれらの抗菌物質の添加量を検討し、硫酸ポリミキシンB (30mg/l) とナリジキシン酸 (40mg/l) が最適であり、これ以上であれば本細菌の生育を阻害した。*Cl. m. subsp. nebraskensis*は、NSM培地上では、変法CNS培地、D2培地に比べ集落の形成が4日と早く、また、変法CNS培地上では菌株により大きさが不均一な集落が本NSM培地では均一な集落を形成した。NSM培地上では数種のグラム陽性植物病原細菌が集落を形成したが、その集落の色や集落周囲の培地の黒

変の有無から*Cl. m. subsp. nebraskensis*と容易に区別できた。平板効率では、NSM培地は変法CNS培地、D2培地に比べ優れていた。

Cl. m. subsp. nebraskensis ATCC 27794の抗血清は、いずれの供試13菌株に対して共通な沈降帯を形成したことから、同亜種に特異性が高く、亜種内に共通する抗原物質の存在が推察され、本菌の同定に利用できると判断した。しかしながら、*Cl. m. subsp. michiganensis*とは一部連続する沈降帯を形成し、また*Cu. fl. pv. flaccumfaciens*とは交差する沈降帯を形成することから、同抗血清の非特異的反応を排除するために吸収抗血清を作製した。*Cu. fl. pv. flaccumfaciens* NCPPB 1751で吸収した抗血清は、*Cl. michiganensis*の他の亜種とほとんど反応しなくなったが、*Cl. m. subsp. michiganensis* YPPS K1-1とは連続した沈降帯を形成した。このため、本吸収抗血清を単独で利用することには問題があるが、開発したNSM培地と組み合わせることにより本細菌の同定に利用できるものとする。また、寒天ゲル内二重拡散法およびスライド

Table 5. Slide agglutination test between other genus, species and pathovars of bacteria and antiserum of *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* ATCC 27794

Antigen ^{c)}	strain	antiserum ^{d)}	absorbed antiserum ^{e)}
<i>Clavibacter michiganensis</i>			
subsp. <i>nebraskensis</i>	ATCC 27794	+ a)	+
do.	ATCC 27795	+	+
do.	ATCC 27822 ^T	+	+
do.	ICMP 3294	+	+
do.	ICMP 3295	+	+
do.	ICMP 3296	+	+
do.	ICMP 3299	+	+
do.	ICMP 3300	+	+
do.	ICMP 3301	+	+
do.	ICMP 5367	+	+
do.	ICMP 5368	+	+
do.	ICMP 5369	+	+
do.	ICMP 9112	+	+
<i>Cl. m.</i> subsp. <i>michiganensis</i>	YPPS R-1	+	— b)
do.	YPPS K-4	+	—
do.	YPPS K1-1	+	+
<i>Cl. m.</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	YPPS U-18-1	—	—
<i>Cl. rathayi</i>	MAFF 301003	—	—
do.	MAFF 301004	—	—
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>			
pv. <i>flaccumfaciens</i>	NCPPB 178	—	—
do.	NCPPB 1751	+	—
do.	NCPPB 2344	+	—
<i>Cu. fl.</i> pv. <i>oortii</i>	YPPS Y-3	—	—
do.	YPPS T-4	—	—
do.	YPPS T-90	—	—
<i>Rhodococcus fascians</i>	NCPPB 156	—	—
do.	NCPPB 469	—	—
7 colony-type-bacteria			
acompanied with corn seed		—	—
15 other bacteria		—	—

a) Positive reaction

b) Negative reaction

c) bacterial concentration was 10¹⁰ cfu/ml.

d) Antiserum was dilluted as 1/20.

e) 1/20 dillution of antiserum was absorbed with living cells of *Cu. fl.* pv. *flaccumfaciens* NCPPB 1751 at 37°C for 2 hrs.

凝集法での結果が一致することから、抗血清の反応はより簡便なスライド凝集法で十分な信頼性が得られるものと期待できる。

開発したNSM培地および作製抗血清の利用については、種子からの*Cl. m.* subsp. *nebraskensis*の検出への利用が期待されることから、NSM培地を用いて輸入トウモロコシ種子から随伴する細菌7種類を分離したが、集落の色は*Cl. m.* subsp. *nebraskensis*とは異なり、また抗血清とは全く反応しなかった。これらのことから、本NSM培地および抗血清は種子からの本細菌の検出のために有効なものとなることが期待できる。

摘 要

Cl. m. subsp. *nebraskensis*の分離のための選択培地(NSM培地)と分離菌の同定のための抗血清を作製した。培地の組成は、酵母エキス5g、カゼイン加水分解物2.0g、グリセリン10g、塩化ナトリウム5.0g、エスクリン1.0g、クエン酸第二鉄0.5g、シクロヘキシミド100mg、硫酸ポリリキシンB (8,000USP/mg) 30mg、ナリジキシン酸40mg、寒天15g、蒸留水1,000mlである。同細菌は本NSM培地上で3, 4日で鮭肉色、中高の集落を形成し、集落の周囲の培地を黒変し

Table 6. Properties of bacteria isolated from corn seeds on NSM

Type of colony	properties of colonies	hydrolysis of esculine	Gram reaction
1	white-color, un-circular, flat, rough	— a)	+ b)
2	milky-white-color, circular, capitate, smooth	++ c)	+
3	light-brown-color, circular, capitate, smooth	+	+
4	milky-white-color, circular, capitate, smooth	++	+
5	yellow-color, circular, capitate, smooth	+	+
6	white-color, circular, capitate, rough	—	+
7	orange-color, circular, capitate, smooth	+	+

a) Negative

b) Positive

c) Positive (strong)

た。他の数種のグラム陽性植物病原細菌の生育も生育するが、いずれも集落の性状と β -グルコシダーゼ活性の有無で識別できた。NSM培地上での本細菌の平板効率は、普通寒天培地と同程度であり、集落形成日数は3、4日であった。作製した*Cl. m. subsp. nebraskensis*の抗血清は、スライド凝集反応および寒天ゲル内二重拡散法で*Cl. m. subsp. nebraskensis*と他のグラム陽性植物病原細菌数種と反応したが、寒天ゲル内二重拡散法で同菌は血清学的に均一であることが示唆された。そのため、本抗血清を交差する沈降帯を形成した*Cu. fl. pv. flaccumfaciens*の生菌抗原で吸収した結果、*Cl. m. subsp. michiganensis*の1菌株と反応するが、*Cl. m. subsp. nebraskensis*のすべての供試菌株とに反応するものとなり、血清学的な同定に利用できるものと期待される。

引用文献

- CARLSON, R. R. and A. K. VIDAVER (1982): Taxonomy of *Corynebacterium* plant pathogens, including a new pathogen of wheat, based on polyacrylamide gel electrophoresis of cellular proteins. *Int. J. syst. bacteriol.* 32: 315-326
- DYE, D. W. and W. J. KEMP (1977): A taxonomic study of plant pathogenic *Corynebacterium* species. *N.Z. J. Agri. Res.* 20: 563-582
- GROSS, D. W. and A. K. VIDAVER (1979): A selective medium for isolation of *Clavibacter nebraskense* from soil and plant parts. *Phytopathology* 69: 82-87
- KADO, C. I. and M. G. HESKETT (1970): A selective medium for isolating *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*, *Phytopathology* 60: 969-976
- KADOTA, I., A. MIZUNO, and K. NISHIYAMA (1996): Detection of a protein specific to the strain of *Pseudomonas avenae* Manns 1909 pathogenic to rice. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 62: 425-428
- KENNEDEY, B. W. (1980): Estimates of U.S. crop losses to procaryote plant pathogens, *Plant Dis.* 64: 674-676
- RYU, E. (1940): A simple method of differentiation between Gram-positive and Gram-negative organisms without staining. *Kitasato Arch. Exp. Med.* 17: 58-63
- SNEATH, P. H. A. (1956): Cultural and biochemical characteristics of the genus *Chromobacterium*. *J. Gen. Microbiol.* 15: 70-98
- SHURTLEFF, M. C. (1980): Compendium of Corn diseases. *APS.* pp. 7-8
- WYSONG, D. S., A. K. VIDAVER, H. STEVENS and D. STENBERG (1973): Occurrence and spread of an underscribed species of *Corynebacterium* pathogenic on corn in the western corn belt. *Plant Dis. Repr.* 57: 291-294
- 植物検疫重要病害虫解説 (1989): 植防資料第4号 追補 病菌-125
- 白川隆, 佐々木次雄 (1988): トマトかいよう病細菌の検出用選択培地 *日植病報* 54: 540-543
- 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 *植防研報* 17: 77-85
- 水野明文, 川合昭 (1993): 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 *植防研報* 29: 27-36

脇本哲 (1955) : OP₁ phage (*Xanthomonas oryzae* bacteriophage)の増殖に関する研究 I. 種々の条件下

の一段増殖実験 九大農学芸誌15(2) : 151-160