

リンゴ生果実内部からの火傷病菌 (*Erwinia amylovora* (BURRILL 1882) WINSLOW *et al.*, 1920) の検出方法

水野明文・塚本貴敬・川合 昭

横浜植物防疫所

Detecting Method of *Erwinia amylovora* from Internal Tissues of Mature Apple Fruits. Akifumi MIZUNO, Takanori TSUKAMOTO and Akira KAWAI (Research Division, Yokohama Plant Protection Station, 1-16-10, Shinyamashita, Yokohama 231-0801, Japan). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 38: 9-12 (2002).

Abstract: Miller-Schroth medium (MS) was modified in order to develop the detection method of *Erwinia amylovora* from internal tissues of apple fruits. Plating efficiency of modified-MS medium (M-MS) was equivalent to MS. Colony formation of *E. amylovora* on M-MS was 1-2 days faster than that on MS and *E. amylovora* colonies could be distinguished from other bacterial colonies accompanied with apple fruits. Moreover, Colony-DIBA was useful as a detection method of small number colonies of *E. amylovora* from numerous other bacterial colonies on M-MS.

Key words: *Erwinia amylovora*, selective medium, DIBA, detection

火傷病菌 (*Erwinia amylovora* (BURRILL 1882) WINSLOW *et al.*, 1920) は、ナシ、リンゴなどのナシ亜科植物の重要な病原細菌である。このため、火傷病菌の生態研究あるいは検疫などのためにいくつかの選択培地が開発されている (CROSSE and GOODMAN, 1973; ISHIMARU and KLOS, 1984; MILLER and SCHROTH, 1972; 末次ら, 1981)。ROBERTS ら (1989) は、アメリカ合衆国ワシントン州産リンゴ生果実の表面および内部における火傷病菌の存在を調査するため、Miller-Schroth 培地 (MS 培地: MILLER and SCHROTH, 1972) あるいは CCT 培地 (ISHIMARU and KLOS, 1984) を用いて検出する方法を考案している。しかし、彼らの報告では、検出感度の評価試験 (Determination of assay sensitivities) でリンゴ生果実内部からの火傷病菌の回収率を求めた方法と、1987 年および 1988 年に実際に園地から収穫したリンゴ生果実内部から火傷病菌の検出に用いた方法で、緩衝液、振とう時間、培地などに一貫性がない。日本産リンゴ生果実 (品種: アルプス乙女) を用いて ROBERTS らの方法 (1989) を一部試みたが、果実表面に生息する細菌の集落が多く形成され、添加した火傷病菌を、MS 培地上の集落の性状から識別することは困難で、火傷病菌を高率に回収することはできなかった。このため ROBERTS らの方法 (1989) を著者らの計画するワシントン州のリン

ゴ園地における火傷病菌の飛散調査のための当菌検出法に適用することはできないと考えられた。そこで、著者らはリンゴ生果実の表面および内部からの火傷病菌の検出方法を開発することを目的として MS 培地を改良し、血清反応と組み合わせた検出方法を検討したので、その結果を報告する。

選択培地の改良

火傷病菌の選択培地として報告のある高濃度しょ糖培地 (CROSSE and GOODMAN, 1973; 末次ら, 1981)、CCT 培地および MS 培地を改良培地の候補として、段階希釈した火傷病菌懸濁液を塗布したリンゴ果実表面 (品種: アルプス乙女) から ROBERTS らの方法 (1989) で火傷病菌の回収を試みた。その結果、高濃度しょ糖培地あるいは CCT 培地は培養 2 日目で火傷病菌以外の細菌がプレート一面を覆うほどに生育してしまい火傷病菌の集落を識別できなかった。MS 培地は候補培地の中で最も火傷病菌以外の微生物の生育を阻止したが、*E. herbicola* などの Enterobacteriaceae の細菌集落の形成は阻止できず、火傷病菌の集落と識別ができなかった。また、火傷病菌の集落が肉眼で確認できるまでには 4 日間以上の培養が必要であった。そこで火傷病菌と他の細菌、特に火傷病菌以外の Enterobacteriaceae の細菌集落との識別ができ、火

Table 1. *Erwinia amylovora* strains used in this study

Strain	Source plant	Origin
NCPPB 683 ^T	<i>Pyrus communis</i>	U.K.
ICMP 1499	<i>Malus sylvestris</i>	New Zealand
88-125	<i>Pyrus communis</i>	U.S.A.

NCPPB: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, U.K., ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants, New Zealand. T: Type strain.

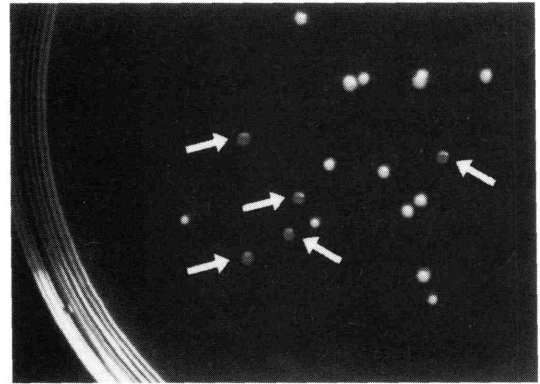
Table 2. Plating efficiency

Strain	CCT	MS	Modified-MS	Sucrose-YNA
NCPPB 683 ^{T*}	44%**	25	35	100
ICMP 1499	67	69	66	100
88-125	52	35	34	100

*: About 100 cfu of each *E. amylovora* strain were spread on each medium.

** : Relative values (%) were calculated based on Sucrose-YNA from averages of numbers of colonies on 3 plates of CCT, MS or Modified-MS medium.

傷病菌の集落が4日間以内に生育できることを目的として、MS培地を改良した。改良MS培地(M-MS培地)の組成は、蒸留水にソルビトール 40 g, 0.25% クリスタルバイオレット液 0.8 ml, ニコチン酸 0.5 g, 2% ニトリロ三酢酸液 10.0 ml, L-アスパラギン 1.5 g, 1 N 水酸化ナトリウム液 5.0 ml, リン酸水素二カリウム 2.0 g, 硫酸マグネシウム 0.2 g, 14 mM 塩化コバルト 50.0 ml, タウロコウル酸ナトリウム 2.5 g, 寒天 15.0 g を加えて総量 1,000 ml とし, 121°C, 15 分間, 高圧滅菌した後, 1% 硝酸タリウム液 1.75 ml, シクロヘキシミド 50.0 mg, ドデシル硫酸ナトリウム 100.0 mg を添加したものである。なお, ソルビトールおよびドデシル硫酸ナトリウムの添加量については佐藤が火傷病菌の硝酸タリウム耐性を調査した際に供試した TCS 培地(佐藤章夫, 私信)を参考にした。本培地上で火傷病菌は3~4日目に薄紫がかった半透明, 円形, 全縁, 中高, 表面平滑で湿光を帯びた直径 1 mm 以上の集落を形成した。本培地上での平板効率を火傷病菌3菌株(Table 1)を供試し, Sucrose-YNA 培地(ショ糖 10 g, 酵母エキス 5 g, 肉エキス 3 g, ペプトン 5 g, 寒天 20 g, 蒸留水 1,000 ml, pH 7.2)を基準として, CCT 培地および MS 培地と比較し, その結果を Table 2 に示した。また, MIZUNO

**Fig. 1.** Colony morphology of *Erwinia amylovora* (arrow) on M-MS medium.

et al. (2000) で供試された火傷病菌 50 菌株を本培地に塗抹して(約 1,000 cfu/プレート)生育を調査した結果, 培養 4 日以内に平板効率を求めた 3 菌株と同様の性状を示す集落が良好に形成された。

次に, リンゴ生果実からの検出を想定した試験を行った。日本産リンゴ生果実(品種: 'Jonathan', 'Jonagold' および 'Gala')をヘタの部分からがくあ部に向けてコルクボーラでくり抜き, ヘタ部とがくあ部を取り除いた後, 1~1.5 cm にスライスし, 10 ml の滅菌水に入れ, 試験管ミキサーにより攪拌し 1 分間超音波処理した試料に 1×10^5 cfu の火傷病菌(ICMP 1499)を添加し原液を作製した。これを 10^{-1} および 10^{-2} に希釈し, それぞれの 0.1 ml を M-MS 培地および Sucrose-YNA 培地に塗抹して集落形成を調査した。その結果, Sucrose-YNA 培地ではいずれの希釈倍率でも独立した集落にならない程度に多くの細菌集落が形成された。M-MS 培地では原液および 10^{-1} 希釈のものからは, 独立した集落にならない程度に多くの細菌集落が形成されたが, 10^{-2} 希釈では, 火傷病菌特有の独立集落が観察された(Fig. 1)。

本試験において, リンゴ生果実表面に生息する細菌は本培地上で黄濁した集落を形成することから火傷病菌との識別は MS 培地より容易であった。また, 火傷病菌の集落形成は MS 培地よりも 1~2 日速かった。ただし, 本培地の火傷病菌以外の細菌集落の生育阻止効果は火傷病菌以外の微生物による汚染が激しい試料の場合, MS 培地より若干劣る傾向があった。

血清学的手法による検出

M-MS 培地は, リンゴ果実表面に生息する細菌の集落から火傷病菌の集落を識別するのに MS 培地よりも有利であるが, 他の選択培地と同様に火傷病菌以外

1. Colonies on M-MS medium are covered with a wet nitrocellulose membrane with PBS buffer.
2. Membrane is soaked in PBS buffer containing 3% skim milk and 0.05% Tween 20 (TPBS) for blocking for over night at 4°C.
3. Membrane is soaked in TPBS buffer which adds the first antibody (NCPBP 683^T antiserum is used in 1 µg/ml), and shaken at the room temperature for 60 min.
4. Membrane is shaken in TPBS buffer for 30 min or more at the room temperature. TPBS buffer is changed three times or more.
5. Membrane is shaken in TPBS buffer which adds biotin-labelled second antibody of ABC-kit for 30 min at the room temperature.
6. Membrane is washed by the same method as No. 4.
7. Membrane is shaken in TPBS buffer which adds ABC reagent for 30 min at the room temperature.
8. Membrane is washed by the same method as No. 4.
9. Membrane is soaked for detection of *E. amylovora* colonies in PBS 10 ml containing 30% hydrogen peroxide 5 µl which adds 4-chloro-1-nathtol (3 mg/ml methanol) solution 2 ml for about 15 min at the room temperature.

Fig. 2. Protocol of Colony-DIBA.

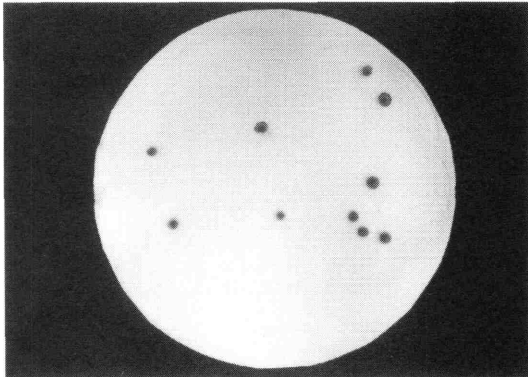


Fig. 3. Result of Colony-DIBA.

の細菌の集落形成を完全に阻止できるほどの選択性はなかった。そこで実際の園地調査でリンゴ果実に多くの随伴細菌があり、その細菌集落の影響で集落観察に困難が生じた場合を想定し、M-MS培地上の集落をニトロセルロース膜に転写し、転写された火傷病菌をDIBA法(日比, 1984)で識別する方法(Colony-DIBA)を開発した(Fig. 2)。その結果、M-MS培地上に出現した多数の集落の中から火傷病菌の集落を検出することが可能であった。本法は、リンゴ果実に多数の随伴細菌が生息していた場合でもM-MS培地上に形成される集落数が個々に独立している程度(< 1,000集落/プレート)であれば、火傷病菌が10集落

程度でも検出可能であった(Fig. 3)。

本試験の結果から、M-MS培地およびColony-DIBAを用いる検出方法は、アメリカ合衆国ワシントン州におけるリンゴ果実を指標植物とした火傷病菌の飛散調査に利用できると考えられた。

引用文献

- CROSSE, J. E. and R. N. GOODMAN (1973) A selective medium for and a definitive colony characteristic of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* **63**: 1425-1426.
- 日比忠明(1984) DIBA法による植物ウイルスの検出法. *植物防疫* **38**: 380-382.
- ISHIMARU, C. and E. J. KLOS (1984) New medium for detecting *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological studies. *Phytopathology* **74**: 1342-1345.
- 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.
- MIZUNO, A., S. SATO, A. KAWAI and K. NISHIYAMA (2000) Taxonomic position of the causal pathogen of bacterial shoot blight of pear. *J. Gen. Plant Pathol.* **66**: 48-58.
- ROBERTS, R. G., S. T. REYMOND and R. J. McLAUGHIN (1989) Evaluation of mature apple fruit from Washington state for the presence of *Erwinia*

amylovora. *Plant Dis.* 73: 917-921.
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.