トマトかいよう病細菌の検出用選択培地

白川 隆*・佐々木次雄*

Takashi SHIRAKAWA* and Tsugio SASAKI*: A Selective Medium for Isolation of
Corynebacterium michiganense pv. *michiganense*, the Pathogen of Tomato
Bacterial Canker Disease

Abstract

A selective medium for *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* (SMCMM) was developed. The composition of the medium was as follows: peptone 5 g, yeast extract 3 g, K_2HPO_4 2 g, KH_2PO_4 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 g, glycerol 20 g, LiCl 5 g, $K_2Cr_2O_7$ 80 mg, NaN_3 2 mg, nalidixic acid 20 mg, cycloheximide 40 mg, 70% tetrachloroisophthalonitrile hydrate 3 mg, agar 15 g in one liter of distilled water. Recovery of *C.m.* pv. *michiganense* on SMCMM from the pure culture was higher than on D₂ medium by Kado *et al.* and CNS medium by Gross *et al.* *C.m.* pv. *michiganense* grew well on SMCMM and developed to the characteristic fresh yellow colonies. The colony forming efficiency of the general microorganisms on the tomato leaves and soil were very low compared with nutrient agar medium.

Key words: selective medium, *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense*, bacterial canker, tomato.

トマトかいよう病は、日本では 1958 年に北海道で最初に確認され¹⁾、その後東北地方をはじめ全国的にその発生が認められ、トマト栽培で本病による被害が問題となっている。本病の地上部の発生病態に関する研究は近年、佐々木ら^{2,3)} によって行われ、小葉上の病原細菌密度の消長と発病の関係、苗床および圃場における第二次伝染様式などについての解明がなされた。一方、第一次伝染源については、種子伝染と土壌伝染が示唆されている⁴⁻⁷⁾。種子伝染については詳細な研究がされているが、土壌伝染についての報告は数少ない。とくに土壌中の病原細菌の消長と発病の関係は、まだ解明されていない。これらの生態学的研究を推進する上で、植物体や根圏土壌などから本病原細菌を検出・定量する有効な方法が必要なのはいうまでもない。既往の報告では、種子あるいは小葉などの植物体上の

トマトかいよう病細菌 (*Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense*) を検出・定量する場合、Kado ら⁸⁾ による D₂ 培地を使用した希釈平板法が主として用いられてきた。しかし、土壌から検出を試みた場合、D₂ 培地では他の土壌微生物集落の発生が多く、*C.m.* pv. *michiganense* の検出が困難である。他方、これまでに開発された *Corynebacterium* 属細菌に対する選択培地には、*C.m.* pv. *nebraskense* に対して Gross ら⁹⁾ が考案した CNS 培地がある。そこで筆者らは、これらの培地を参考にしながら、土壌中の *C.m.* pv. *michiganense* の検出と定量を目的とした選択培地の作出を試みたので報告する。

選択培地の組成 CNS 培地の組成を参考にして、基礎培地の組成および亜硝酸、コリスチンなど 16 種類の抗菌性物質の濃度と抗菌作用などを検討し、

* 農林水産省野菜・茶業試験場盛岡支場 Morioka Branch, National Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea, Shimokuriyagawa, Morioka, Iwate 020-01, Japan

1) 成田武四・馬場徹代 (1959). 農業及園芸 34: 1701-1704. 2) 佐々木次雄・梅川 学 (1983). 北日本病虫研報 37: 65-67. 3) 佐々木次雄・梅川 学・本田雄一 (1983). 同上 37: 68-70. 4) Strider, D.L. (1969). N.C. Agr. Exp. Sta. Tech. Bull. 193: 1-110. 5) Baker, K.F. and Smith, S.H. (1966). Ann. Rev. Phytopath. 4: 311-334. 6) 植松 勉・藤井 淳・大畑貫一 (1977). 日植病報 43: 412-418. 7) Strider, D.L. (1967). Phytopathology 57: 1067-1071. 8) Kado, C.I. and Heskett, M.G. (1970). *Ibid.* 60: 969-976. 9) Gross, D.C. and Vidaver, A.K. (1979). *Ibid.* 69: 82-87.

C.m. pv. michiganense に対する選択培地 (SMCMM 培地) を作成した。その組成は以下のとおりである。ペプトン 5 g, 酵母エキス 3 g, K_2HPO_4 2 g, KH_2PO_4 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 g, グリセリン 20 g, LiCl 5 g, 寒天 15 g を蒸留水 1 l に溶解, pH を 7.2 に調整して高圧滅菌 (120°C, 15 分間)。その後約 50°C に冷却し, $K_2Cr_2O_7$ 80 mg, NaN_3 2 mg, ナリジキシン酸 20 mg, シクロヘキシミド 40 mg, 70% テトラクロルイソフタルニトリル (TPN) 水和剤 3 mg を無菌的に添加。なお, ナリジキシン酸は, 0.1 N NaOH 水溶液に溶解して添加した。培地は直径 9 cm のシャーレに約 20 ml ずつ分注し平板として用いた。本試験の供試細菌は, 野菜・茶業試験場盛岡支場で分離保存していた菌株, および以前に他の研究機関から分譲を受け保存していた菌株を使用した。供試細菌はすべてジャガイモペプトングルコース寒天斜面培地で 28°C, 2 日間培養したものを用いた。また, 選択培地の比較試験などの培養も 28°C で行い, 平板上の集落数の測定は 7 日目に行ったが, 生育が遅い CNS 培地では 10 日目に実施した。

SMCMM 培地上での各種細菌の生育様相
SMCMM 培地上で *C.m. pv. michiganense* は, 培養開始後 3~4 日目に肉眼的に確認可能な大きさの集落を形成した。一方, D_2 培地では 4~5 日目に, CNS

培地では 7~10 日目に, 普通寒天培地 (NA) では 2~3 日目に集落を形成した。SMCMM 培地上で 7 日目には直径 2~2.5 mm の円形, 全縁, 中高, 表面が平滑で鮮やかな黄色を呈する集落となった (Fig. 1)。また, 供試した本病原細菌の 11 菌株の集落はすべて同様の様相を呈し, 供試菌株の範囲内で集落の変異は認

Table 1. Colony formation of various bacteria on the selective medium (SMCMM)

Bacteria	Growth
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	— ^{a)}
<i>Corynebacterium michiganense</i> pv. <i>michiganense</i>	+
<i>C. michiganense</i> pv. <i>sepedonicum</i>	—
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	—
<i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	—
<i>Pseudomonas cichorii</i>	—
<i>P. glumae</i>	—
<i>P. marginalis</i> pv. <i>marginalis</i>	—
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	—
<i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i>	—
<i>P. solanacearum</i>	—
<i>P. viridiflava</i>	—
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	—
<i>X. campestris</i> pv. <i>carotae</i>	—
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	—

a) +: formed, —: not grown.

Table 2. Colony forming efficiency^{a)} of *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* on SMCMM

Isolates	Medium			
	SMCMM	CNS	D_2	NA
N 6601	96.1	79.5	40.6	100.0
N 7610	98.3	94.2	37.1	100.0
YM7709	89.1	58.2	37.7	100.0
YM8013	114.4	84.7	26.1	100.0
YM8110	105.3	101.0	75.3	100.0
YM8214	86.0	94.9	60.9	100.0
YM8215	105.8	105.6	69.7	100.0
YM8216	80.7	105.6	67.9	100.0
TC-28	88.9	97.8	58.7	100.0
YM8603	65.1	11.3	42.2	100.0
YM8605	114.9	104.1	48.9	100.0
YM8607	97.5	110.1	79.7	100.0
Average	95.2	97.2	53.7	100.0
Days needed for colony formation	3~4	7~10	4~5	2~3

a) Colony forming efficiency = $\frac{\text{No. of colonies on selective medium}}{\text{No. of colonies on NA medium}} \times 100$

Fig. 1. Colony morphology of *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* on selective medium (SMCMM).

Fig. 2. Comparison of D₂ (D₂), nutrient agar medium (NA) and SMCMM (2) for growth and selection for *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* from naturally infested soil. No. 1 is the SMCMM medium without tetrachloroisophthalonitrate.

められなかった。さらに *C.m.* pv. *sepedonicum* 1 菌株, *C.m.* pv. *michiganense* 11 菌株を含む 5 属 15 種 31 菌株の植物病原細菌 (Table 1) を供試し, SMCMM 培地上での生育を調査した結果, *C.m.* pv. *michiganense* のみが 7 日間以内に集落を形成した。

次に *C.m.* pv. *michiganense* 12 菌株を用いて SMCMM 培地上での平板効率を D₂ 培地, CNS 培地, NA 培地を対照として比較した。その結果, 供試菌株間での相違は存在したが, NA 培地と比較して同等かやや劣り, CNS 培地と同等かそれよりやや優る値を示した (Table 2)。また, D₂ 培地の 1.2~4 倍の平板効率があった。

以上の結果, SMCMM 培地は, これまで *C.m.* pv.

michiganense の検出と定量に使用されてきた D₂ 培地と比較して増殖速度と平板効率の上で優れていた。また, CNS 培地に比べて増殖が早く, 有利であった。

罹病植物および土壌中からの検出 露地栽培による夏秋トマト (品種: 大型福寿) に *C.m.* pv. *michiganense* (N6601) の 10⁸ cfu/ml 程度の細菌浮遊液を噴霧接種し, 葉縁部に褐色病斑が認められた小葉から SMCMM 培地を用いて本病原細菌の検出と定量を試みた。トマト小葉の細菌の分離方法は, 佐々木ら²⁾の方法に準拠し, トマト小葉 10 g を 1 cm 角に切断して 100 ml の殺菌水を含む 200 ml 容三角フラスコに入れ, 25 C, 100 rpm で 30 分間往復振盪した。その上清を順次希釈し, その一定量を各選択培地に塗抹した。

Table 3. Isolation of *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* from artificially inoculated tomato leaves with selective media

Medium	<i>C.m. pv. michiganense</i>		Other bacteria on the leaves	
	No. of colonies ^{a)}	Colony forming efficiency ^{b)}	No. of colonies ^{a)}	Colony forming efficiency ^{b)}
SMCMM	9.43×10^7	85.0	4.50×10^5	4.1
CNS	6.57×10^7	59.0	3.75×10^5	3.4
D ₂	4.28×10^7	38.6	7.75×10^5	7.2
NA	1.11×10^8	100.0	1.09×10^7	100

a) No. of colonies per 1 g of fresh leaflet (cfu/g).

b) Colony forming efficiency = $\frac{\text{No. of colonies on selective medium}}{\text{No. of colonies on NA medium}} \times 100$.Table 4. Isolation of *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* on selective media from artificially infested tomato rhizosphere soil

Medium	<i>C.m. pv. michiganense</i>		Soil bacteria	
	No. of colonies ^{a)}	Colony forming efficiency ^{b)}	No. of colonies ^{a)}	Colony forming efficiency ^{b)}
SMCMM	1.40×10^6	183	4.13×10^5	2.7
CNS	1.50×10^6	196	5.25×10^5	3.4
D ₂	0	0	1.81×10^6	12.0
NA	7.65×10^5	100	1.51×10^7	100

a, b) See Table 3.

結果は、Table 3 に示した。NA 培地での集落数を 100 とした場合の *C.m. pv. michiganense* の検出効率は、D₂ 培地で 38.6、CNS 培地で 59.0 であったが、SMCMM 培地ではそれより高い 85.0 であった。一方、他の葉面細菌の検出効率は、NA 培地での値を 100 とした場合、SMCMM 培地は 4.1 を示し、CNS 培地で 3.4、D₂ 培地で 7.2 であった。

次に、野菜・茶業試験場盛岡支場内圃場の黒ぼく土壌に *C.m. pv. michiganense* (N6601) を人工接種し、これから常法¹⁰⁾により検出した結果を Table 4 に示した。SMCMM 培地での *C.m. pv. michiganense* の検出効率は、NA 培地での値を 100 とした場合に 183 であり、CNS 培地の 196 に若干及ばないが高い値を示した。他方、D₂ 培地では他の土壌微生物の増殖が著しく、本病原細菌は検出されなかった。また、他の土

壌細菌の検出効率は、NA 培地での値を 100 とした場合、SMCMM 培地で 2.7、CNS 培地で 3.5、D₂ 培地で 7.3 を示した。また、SMCMM 培地上で *C.m. pv. michiganense* の集落は、その特徴から、他の土壌細菌集落と容易に識別することができた (Fig. 2)。

以上の結果、SMCMM 培地は D₂ 培地と比較して選択性に優れ、かつ効率よく *C.m. pv. michiganense* を検出できた。また、CNS 培地と比較した場合、これと同等の選択性と本病原細菌の検出能力を示したが、増殖速度は SMCMM 培地が勝っていた。これらの結果から、SMCMM 培地は植物体および土壌などの試料からの *C.m. pv. michiganense* の検出と定量に有効で、トマトかいよう病の発生生態解明において実用性が高いものと考えられる。

(昭和 63 年 3 月 28 日受理)

10) 近藤 熙・加藤邦彦 (1979). 土壌微生物実験法 (土壌微生物研究会編). 養賢堂, 東京. pp. 21-25.