

イネ白葉枯病細菌の増殖におよぼす含硫アミノ酸 およびL-グルタミン酸の影響

野田孝人*・大内昭*

Takahito NODA* and Akira OHUCHI*: Effect of sulfur containing amino acids
and L-glutamic acid on multiplication of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*

Summary

In order to find out more suitable synthetic medium for multiplication of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, the causal bacterium of the bacterial leaf blight of rice, improvements have been made in Watanabe's medium. The best sulfur containing amino acid was found to be methionine, the most suitable concentration being 0.01 per cent. The constitution of the modified synthetic medium for *X. campestris* pv. *oryzae* is to be as follows: L-glutamic acid 0.1%, DL-methionine 0.01%, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.2%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, sucrose 0.5%, pH 6.5-7.0. L-Glutamic acid was not recognized as the essential growth factor for *X. campestris* pv. *oryzae*.

緒言

イネ白葉枯病細菌の栄養条件に関する研究は、これまで数多く報告されている。渡辺^{2,3)}は炭素源および窒素源について詳細な検討を行い、本細菌の増殖に好適な合成培地(渡辺培地)を作製した。しかし、この培地は難水溶性のシスチンを0.05%も含むため、多量の沈渣を生じ、吸光度による菌体増殖量の測定には不適當であった。さらに、渡辺培地^{2,3)}で28°C、3日間振盪培養した後、平板希釈法によって本病原細菌の集落数を計測したところ、明らかな増殖を確認することが困難であった。そこで、本試験では本細菌増殖のための含硫アミノ酸の種類および濃度について再検討を試み、渡辺培地の改良を行うと同時に、改良培地を用いて本細菌のグルタミン酸要求性について検討した。

材料および方法

供試菌株 供試菌株はイネ白葉枯病細菌 *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* T7174 である。ジャガイモ半合成寒天培地で28°C、2日間培養した供試菌株の菌体を殺菌蒸留水で $10^6 \sim 10^7$ 個/ml濃度に希釈し、その細菌懸濁液を移植源とした。

合成培地の改良 渡辺培地の組成を一部改変した基礎培地を本実験で供試した。すなわち、L-グルタミン酸0.1%、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.2%、 KH_2PO_4 0.2%、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1% およびスクロース0.5%とし、pHを6.5

~7.0に調節した。この基礎培地に3種の含硫アミノ酸(シスチン、システインおよびメチオニン)を種々の濃度となるようにそれぞれ別個に加え、最適含硫アミノ酸の種類および濃度を決定した。

菌体増殖量の測定 菌体増殖量の測定は、Boi-photo-recorder(東洋科学産業製)によった。すなわち、40ml容のL字型試験管に分注した培養液12mlに上記の細菌懸濁液0.5mlを移植した後、28°Cに保持したBio-photorecorderに装着して、所定時間培養した。培養は48回/minの上下振盪で行い、10分ごとに増殖量を吸光度(646nm)で求めた。

結果および考察

基礎培地にL-シスチン、L-システインおよびDL-メチオニンを単独でそれぞれ0.02%、0.004%、0.0008%、0.00016%となるように添加し、各培地におけるイネ白葉枯病細菌の増殖量を対比した。その結果(Fig. 1)、供試した含硫アミノ酸のうち、DL-メチオニン0.02および0.004%区で最も高い増殖量が測定された。一方、L-シスチンおよびL-システインでは、いずれも0.0008%区で生育が良好であったが、DL-メチオニン0.0008%区に比べ明らかに増殖量が劣った。L-シスチンの濃度を高めた0.02%区では、培養5日目においてもほとんど増殖が認められなかった。緒言で述べたように、渡辺培地³⁾で本細菌の増殖が認められなかったが、この培地にはL-シスチンが0.05%も含まれているため、L-シスチンによって本細菌の増殖が阻害されたと推察される。

*北陸農業試験場 Hokuriku National Agricultural Experiment Station, Inada, Joetsu, Niigata 943-01

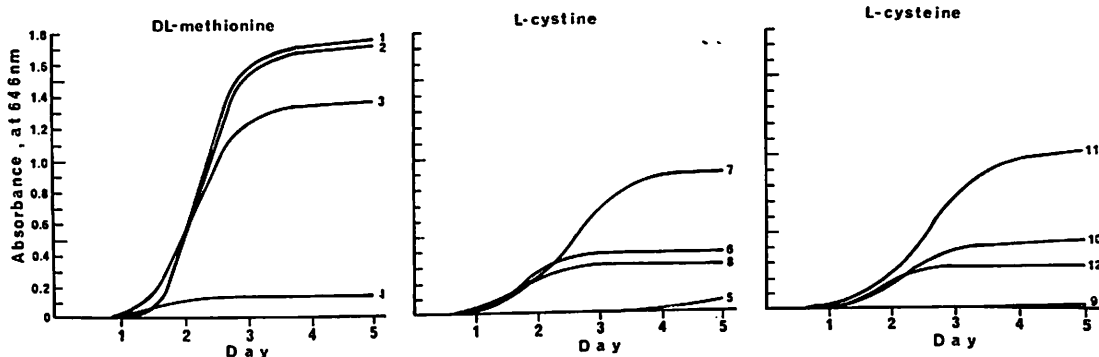


Fig. 1. Growth curves of *X. campestris* pv. *oryzae* in the basal medium containing DL-methionine, L-cystine or L-cysteine.

* Constitution of the basal medium: L-glutamic acid 0.1%, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.2%, KH_2PO_4 0.2%, sucrose 0.5%, pH 6.5-7.0.

** Amount of sulfur containing amino acids.

DL-methionine	1. 0.02%	2. 0.004%	3. 0.0008%	4. 0.00016%
L-cystine	5. 0.02%	6. 0.004%	7. 0.0008%	8. 0.00016%
L-cysteine	9. 0.02%	10. 0.004%	11. 0.0008%	12. 0.00016%

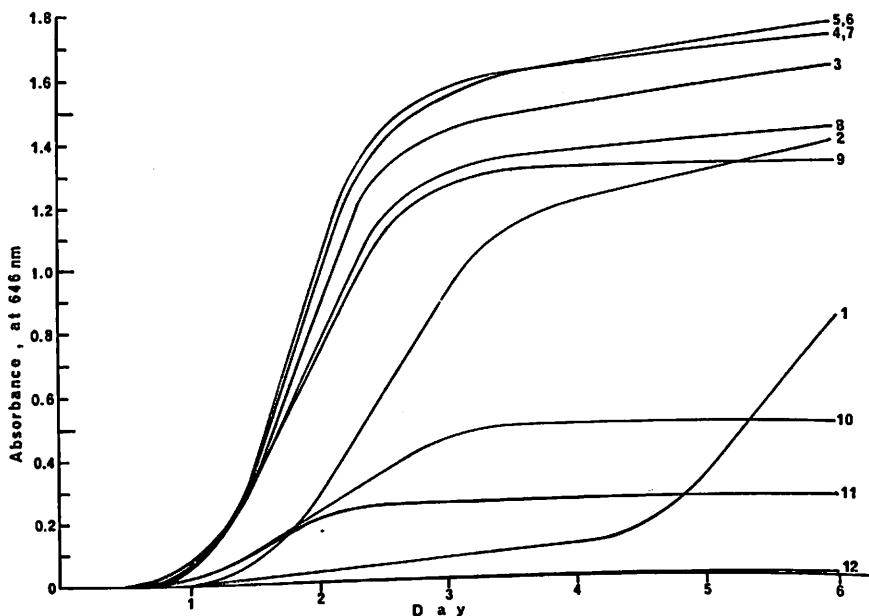


Fig. 2. Effect of concentration of DL-methionine on growth of *X. campestris* pv. *oryzae*.

* Constitution of the basal medium: L-glutamic acid 0.1%, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.2%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, sucrose 0.5%, pH 6.5-7.0.

** Amount of DL-methionine.

1. 0.2%	2. 0.1%	3. 0.05%	4. 0.025%	5. 0.013%	6. 0.0063%
7. 0.0031%	8. 0.0016%	9. 0.00078%	10. 0.00039%	11. 0.00020%	12. 0%

次に、DL-メチオニンの濃度を0~0.2%まで段階的に高めて、増殖に最適な濃度を検討した結果 (Fig. 2)、0.01%前後の濃度で最大値が得られた。

以上の結果から、合成培地の組成を L-グルタミン酸

0.1%、DL-メチオニン 0.01%、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.2%、 KH_2PO_4 0.2%、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1%、スクロース0.5%および pH 6.5~7.0 と改善することにより、イネ白葉枯病細菌の増殖が飛躍的に向上することが判明した。さ

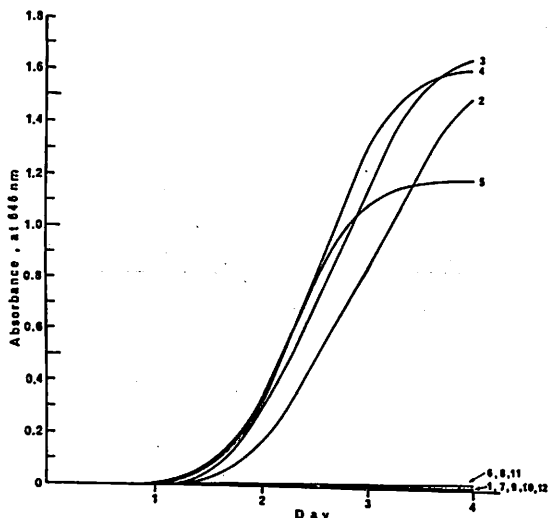


Fig. 3. Growth curves of *X. campestris* pv. *oryzae* in the basal medium containing DL-methionine or L-glutamic acid.

* Constitution of the basal medium: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.2%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, sucrose 0.5%, pH 6.5-7.0.

** Amount of DL-methionine.
1. 0.5%, 2. 0.1%, 3. 0.02%, 4. 0.004%,
5. 0.0008%, 6. 0%.

*** Amount of L-glutamic acid.
7. 0.5%, 8. 0.1%, 9. 0.02%, 10. 0.004%,
11. 0.0008%, 12. 0%.

らに、本培地は渡辺培地³⁾と比較して成分の種類が少なく作製が容易で、吸光度の測定を妨害する沈査が少ないなど、優れた特性を備えている。

L-グルタミン酸は本細菌の増殖に不可欠の必須要素であると報告^{1,3)}されている。しかし、L-グルタミン酸を含む培地でも、DL-メチオニンが無添加の場合、本細菌の増殖が全く認められなかった (Fig. 2)。この結果は既往の知見と著しく矛盾している。そこで、両アミノ酸を除去した上述の改良培地に、L-グルタミン酸あ

るいはDL-メチオニンをそれぞれ別個に加え、本細菌増殖の有無を再検討した。その結果 (Fig. 3)、L-グルタミン酸を種々の濃度に添加してもDL-メチオニンを含まない場合、細菌は全く増殖しなかった。一方、DL-メチオニンを添加した場合、L-グルタミン酸が存在しなくても顕著な増殖が認められた。以上の結果から、L-グルタミン酸は本細菌の必須要素とは考えられなかった。

摘 要

1 既報の合成培地を改良し、イネ白葉枯病細菌の増殖がより良好な合成培地を作製した。組成は、L-グルタミン酸 0.1%、DL-メチオニン 0.01%、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.2%、 KH_2PO_4 0.2%、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1%、スクロース 0.5%、pH 6.5~7.0である。

2 上記培地からDL-メチオニンを除去した場合、本細菌は増殖しなかった。一方、DL-メチオニンを添加した場合、L-グルタミン酸が欠除した培地においても本細菌は良好な増殖を示した。以上の結果から、L-グルタミン酸は本細菌の必須要素とは考えられなかった。

引用文献

- 1) Krishna Rao, N. S. R. and Nayudu, M. V. (1977) In vitro nutrition of *Xanthomonas oryzae* (Uyeda and Ishiyama) Dowson, inducing paddy bacterial leaf blight. *Indian J. Exp. Biol.* 16: 133~135.
- 2) 渡辺実 (1963) イネ白葉枯病病原細菌の栄養生理に関する研究 I. 細菌の増殖に及ぼす無機塩類およびビタミンの影響. *日植病報* 28: 175~181.
- 3) 渡辺実 (1963) イネ白葉枯病病原細菌の栄養生理に関する研究 II. 細菌の増殖に及ぼす炭素源および窒素源の影響. *日植病報* 28: 201~208.

(昭和58年7月28日受領)