

チューリップ褐色腐敗病細菌 *Pseudomonas gladioli* の選択培地

守川 俊幸・野村 良邦*

Toshiyuki MORIKAWA and Yoshikuni NOMURA* :

Selective medium of *Pseudomonas gladioli* ; a causal agent of bacterial brown rot of tulip

Summary

A selective medium (SMG-5) was developed for isolation of *Pseudomonas gladioli*, a causal agent of bacterial brown rot of tulip, from infested soil. The composition of the medium was as follows : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (6.0g), K_2HPO_4 (1.5g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1g), NaCl (50mg), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (50mg), L-leucine (0.1mg), melibiose (5g), cycloheximide (20mg), ampicillin sodium salt (10mg), vancomycin (10mg), penicillin G potassium salt (2mg), polymyxin B sulfate (10mg), tropolone (2mg), TPN-benomyl WP (50mg), methyl violet (2mg), phenol red (20mg), agar (15g), pH6.0 in one liter of distilled water. Efficiency of plating of *P. gladioli* on SMG-5 was equal with that of King B medium. Soil bacteria other than *P. gladioli* were strongly inhibited on SMG-5 medium as comparing the growth on King B medium. It was difficult to distinguish between pathovars of *P. gladioli* on SMG-5. In this study, two selective media (SMP and SMC) for isolation of *P. plantarii* and *P. cepacia* were developed, respectively, by modification of carbon source and amendments. Rhamnose (5g) was used as the carbon source in place of melibiose and tropolone (20mg) was added on SMP medium. 2,3-Butanediol (2ml) was used as the carbon source in place of melibiose and kanamycine (5mg) and tropolone (5mg) were added on SMC medium.

褐色腐敗病 (*Pseudomonas gladioli*) は黒腐病 (*P. andropogonis*) と並んで、チューリップの細菌性ポストハーベスト病害として重要である¹⁾。両病害とも球根で伝染し、収穫後の水洗や薬剤浸漬時に感染し、貯蔵中や流通段階で発病して問題となっている。これら病害の病原を検出定量する技術は、発生生態を解明し、効率的な防除方法を確立する上で、極めて有効と考えられる。特定の細菌を検出する手段として、ELISA法のような血清学的手法、選択培地を用いる方法、フェージを用いる方法、PCR法のような遺伝子をターゲットとする方法などがある²⁾³⁾。本研究では *P. gladioli* を検出定量するための選択培地について検討したので報告する。なお、本研究の一部は農業環境技術研究所において依託研究員として研修中に行ったものであり、本研究を遂行するにあたり、農業環境技術研究所西山幸司博士、九州農業試験場畦上耕児博士、生物資源研究所堀田光生氏に

は終始有益なご助言を頂いた。ここに厚く感謝の意を表する。

材料および方法

供試細菌 第2表に示したチューリップ褐色腐敗病細菌 *P. gladioli* BRA-4株を含む7属93種118菌株の細菌を供試し、選択培地上の生育を調査した。

選択培地の組成 Ayerの培地を基本に、第1表に示す窒素源、炭素源、アミノ酸、抗生物質、色素などの種類と量について、本細菌および近縁細菌の生育の良否、土壌細菌の抑制程度を調査し、培地の組成を決定した。なお、培地は栄養源や寒天を含む基本培地を加熱して寒天を溶かし、55~60℃に冷却した後、抗生物質や色素などの識別成分を混合して径9cmのシャーレに12~20ml分注した。

平板効率と土壌細菌の生育抑制率 選択培地の平板効率を知るため、キングB培地、肉エキス・ペプトン寒天培地を対照として、滅菌水に所定の濃度に希釈した *P. gladioli* BRA-4株の細菌懸濁液を塗抹し、25℃4日間培養し、生じたコロニー数を計測した。また、土壌細菌の生育抑制率を知るため、富山県農業技術センター

富山県農業技術センター野菜花き試験場 Toyama Vegetable and Ornamental Crops Experiment Station, Agricultural Research Center, Tonami, Toyama 939-13

* 現在 Present address : 東北農業試験場 Tohoku National Agricultural Experiment Station, Arai, Fukushima 960-21

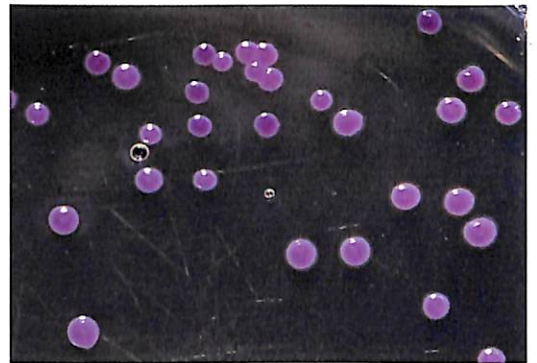
野菜花き試験場のチューリップ圃場の土壌およびチューリップ根圏土壌、収穫後に使用した消毒液（ピリミホスメチル乳剤）を滅菌水に段階希釈し、キングB培地と選択培地上に塗抹し、25°C 4日間培養して生じた土壌細菌の数を計測した。また、褐色腐敗病感染球根（品種：メリーウィドー）を種球根として植え付けた区の根面から、同様に検出を行い、分離された *P. gladioli* をチューリップ球根（品種：メリーウィドー）の背部に付傷接種して病原性の有無を調査した。

結 果

選択培地の組成 チューリップ褐色腐敗病細菌 *P. gladioli* の生育は窒素源については硝酸態よりもアンモニア態で良好であった。炭素源については生育や土壌細菌からの選択性を考慮してメリビオース、シトラコン酸、メサコン酸をまず選抜したが、最終的に *P. cepacia* などの近縁細菌の炭素源の利用能を考慮してメリビオースを選択した。アミノ酸についてはベタインもしくはロイシンを0.1mg/ℓ 添加することにより初期生育が促進された。なお、ロイシンを100mg/ℓ 添加すると、逆に生育が抑制された。抗生物質等については、9種の成分が本細菌の生育に影響を与えず、かつ土壌細菌の生育を抑えることから有効と判断した。なお、硫酸亜鉛は本細菌の選択性に有効に働いたがトロポロンと反応して沈澱を生じることから、また重クロム酸カリウムも有効であったがクロム廃液の問題から除外した。その他、選択しなかったものは、本菌の生育を抑制するか、土壌細菌の生育の抑制があまり認められなかった（第1表）。以上の結果を総合的に検討し、選択培地 SMG-5 を考案した。培地の組成は以下の通りである。(NH₄)₂SO₄ (6.0g), K₂HPO₄ (1.5g), MgSO₄ · 7H₂O (0.1g), NaCl (50mg), CaCl₂ · 2H₂O (50mg), L-ロイシン (0.1mg), メリビオース (5g), シクロヘキシミド (20mg), アンピ

シリンナトリウム (10mg), バンコマイシン (10mg), ペニシリンGカリウム (2mg), ポリミキシンB硫酸塩 (10mg), トロポロン (2mg), TPN・ベノミル水和剤 (50mg), メチルバイオレット (2mg), フェノールレッド (20mg), 寒天 (15g), pH6.0/1ℓ。

平板効率と土壌細菌の生育抑制率 本培地上での本細菌の平板効率はSMG-5を100.0とした場合、キングB培地で100.4、肉エキス・ペプトン寒天培地で101.3とほぼ同等で、培養3～4日(25°C)に直径1～2mmの全縁で表面が平滑な青紫色のコロニーを形成し(1週間程度で表面が皺状となる場合がある)、土壌細菌との識別は容易であった(第1図)。また、7属93種の細菌の本培地上での生育を調査した結果、*P. gladioli*のみが良好に生育した(第2表)。なお、本培地上では*P. gladioli*の pathovar を識別することは困難であった。キングB培地で分離される土壌細菌の92.0～99.999%を本培地は抑制した。また、褐色腐敗病感染球根を種球根に用いた区では、根面から分離された*P. gladioli*



第1図 SMG-5培地上のチューリップ褐色腐敗病細菌 *Pseudomonas gladioli*

第1表 選択培地作製に供試した試薬

窒素源	NH ₄ Cl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , NH ₄ H ₂ PO ₄ , NaNH ₄ HPO ₄ · 4H ₂ O, NH ₄ NO ₃ , Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O, NaNO ₃
炭素源	シトラコン酸, 酒石酸, メサコン酸, <u>メリビオース</u> , 2,3-ブタンジオール, ラムノース他
アミノ酸	ベタイン, オルニチン, プロリン, リジン, シスチン, バリン, ヒスチジン, <u>ロイシン</u>
抗生物質他	<u>アンピシリンナトリウム</u> , <u>バンコマイシン</u> , <u>ペニシリンGカリウム</u> , <u>ポリミキシンB硫酸塩</u> , カナマイシン, ナリジキン酸, 塩化トリフェニルテトラゾリウム, アジ化ナトリウム, リファピシン, ピマリシン, <u>トロポロン</u> , 塩化コバルト, オキソリニック酸, 重クロム酸カリウム, ペンタシアノニトロシル鉄(III)酸ナトリウム, ジョードサリチル酸ナトリウム, ほう酸, 塩化リチウム, 塩化セシウム, 硫酸マンガ、硫酸亜鉛, メチルグリーン, <u>メチルバイオレット</u> , <u>フェノールレッド</u> , <u>TPN・ベノミル</u> , <u>シクロヘキシミド</u>

~~~~~ : 選択した試薬

第2表 選択培地上での供試細菌の生育

| 供試細菌 <sup>a)</sup>                                             | 培地              |     |     |  |  |  |
|----------------------------------------------------------------|-----------------|-----|-----|--|--|--|
|                                                                | SMG             | SMC | SMP |  |  |  |
| <i>Agrobacterium radiobacter</i> (ATCC 19358T)                 | - <sup>b)</sup> | -   | -   |  |  |  |
| <i>A. rhizogenes</i> (ATCC 11325T)                             | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>A. rubi</i> (ATCC 13335T)                                   | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>A. tumefaciens</i> (ATCC 23308T)                            | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>Bacillus cereus</i> (JCM 2152T)                             | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>B. megaterium</i> (JCM 2506T)                               | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>B. polymyxa</i> (JCM 2507T)                                 | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>B. subtilis</i> (ATCC 6051T)                                | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>B. thuringiensis</i> (ATCC 10792T)                          | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>Corynebacterium beticola</i> (NCPPB 2256)                   | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>C. illicis</i> (ATCC 14264T)                                | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>C. insidiosum</i> (NCPPB 1109T)                             | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>C. michiganense</i> (NCPPB 2979T)                           | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>C. nebraskense</i> (NCPPB 2581T)                            | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>C. rathayi</i> (NCPPB 2980T)                                | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>C. oortii</i> (ATCC 25283)                                  | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>C. poinsettiae</i> (ATCC 9682)                              | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>C. sepedonicum</i> (ATCC 33113T)                            | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>C. tritici</i> (ATCC 11403T)                                | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>Erwinia ananas</i> (NCPPB 1846T)                            | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>E. cancerogena</i> (NCPPB 2176T)                            | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>E. carnegiana</i> (NCPB 439T)                               | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>E. carotovora</i> subsp. <i>atrosentica</i> (NCPPB 549T)    | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> (ATCC 15713T)    | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>E. chrysanthemi</i> (ATCC 11663T)                           | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>E. cypripedii</i> (PDDCC 1591T)                             | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>E. herbicola</i> (NCPPB 2971T)                              | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>E. mallotivora</i> (ATCC 29573T)                            | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>E. milletiae</i> (NCPPB 2519)                               | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>E. nigrifluens</i> (ATCC 13028T)                            | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>E. nimipressuralis</i> (ATCC 9912T)                         | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>E. paradisiaca</i> (NCPPB 2511T)                            | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>E. quercina</i> (ATCC 29281T)                               | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>E. rhapontici</i> (ATCC 29283T)                             | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>E. rubrifaciens</i> (ATCC 29291T)                           | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>E. salicis</i> (ATCC 15712T)                                | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>E. uredoovora</i> (ATCC 19321T)                             | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>Methylobacterium extorquens</i> (JCM 2811T)                 | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>M. extorquens</i> (JCM 2830)                                | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>Pseudomonas acidophila</i> (ATCC 31363T)                    | ±               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. acidovorans</i> (JCM 5833T)                              | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145T)                             | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. agarici</i> (ATCC 25941T)                                | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. alcaligenes</i> (JCM 5967)                               | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. aminovorans</i> (ATCC 23314T)                            | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. amygdali</i> (NCPPB 2607T)                               | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. andropogonis</i> (ATCC 23061T)                           | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. andropogonis</i> (Qn21)                                  | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. asplenii</i> (ATCC 23835T)                               | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. aurofaciens</i> (IFO 3521T)                              | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. avenae</i> (NEPPB 1011T)                                 | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. azotoformans</i> (JCM 2777T)                             | ±               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. betle</i> (ATCC 19861T)                                  | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. caricapapayae</i> (NCPB 1873T)                           | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. caryophylli</i> (PDDCC 512T)                             | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. cattleyae</i> (PDDCC 2826T)                              | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. cepacia</i> (PDDCC 5796T)                                | ±               | ◎   | ±   |  |  |  |
| <i>P. cepacia</i> (TM18001)                                    | ±               | ◎   | ±   |  |  |  |
| <i>P. cepacia</i> (TM18002)                                    | ±               | ◎   | ±   |  |  |  |
| <i>P. cichorii</i> (ATCC 10857T)                               | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. cissicola</i> (NCPB 2982T)                               | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. corrugata</i> (ATCC 29736T)                              | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. delafieldii</i> (ATCC 17505T)                            | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. facilis</i> (ATCC 11228T)                                | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. flectens</i> (ATCC 12775T)                               | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. fluorescens</i> (JCM 5963T)                              | ±               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. fragi</i> (IFO 3458T)                                    | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. fulva</i> (JCM 2780)                                     | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. fuscovaginae</i> (NIAES 1177T)                           | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. gladioli</i> (BRA4)                                      | ◎               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. gladioli</i> (TM18013)                                   | ◎               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. gladioli</i> (TM18014)                                   | ◎               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. gladioli</i> (TM18062)                                   | ◎               | -   | ±   |  |  |  |
| <i>P. gladioli</i> (TM18063)                                   | ◎               | -   | ±   |  |  |  |
| <i>P. gladioli</i> (TM18064)                                   | ◎               | -   | ±   |  |  |  |
| <i>P. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> (PDDCC 3950T)           | ◎               | -   | ±   |  |  |  |
| <i>P. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> (Pgg-1)                 | ◎               | -   | ±   |  |  |  |
| <i>P. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> (03-01064)              | ◎               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> (03-01065)              | ◎               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> (03-01580)              | ◎               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> (03-01581)              | ◎               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> (03-01584)              | ◎               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> (03-01585)              | ◎               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> (03-01589)              | ◎               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> (03-01728)              | ±               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> (03-01729)              | ±               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. glumae</i> (NIAES 1169T)                                 | ±               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. huttienensis</i> (ATCC 14670T)                           | ±               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. lanceolata</i> (ATCC 14669T)                             | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. marginalis</i> (ATCC 10844)                              | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. meliae</i> (NIAES 1463T)                                 | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. mendosina</i> (IFO 14162T)                               | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. mesoacidophila</i> (ATCC 31433T)                         | ±               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. mesophilica</i> (ATCC 29983T)                            | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. palleronii</i> (ATCC 17724T)                             | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. pichetti</i> (JCM 5969T)                                 | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. pictorum</i> (ATCC 23328T)                               | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. plantarii</i> (NIAES 1723T)                              | ±               | -   | ◎   |  |  |  |
| <i>P. pseudoalcaligenes</i> (JCM 5968T)                        | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. pseudoalcaligenes</i> subsp. <i>citulli</i> (ATCC 29625) | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. putida</i> (JCM 3967T)                                   | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. pyrocinia</i> (ATCC 15958T)                              | ±               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. resinovorans</i> (ATCC 14235T)                           | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. rubrilineans</i> (ATCC 19307T)                           | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. saccharophila</i> (ATCC 15946T)                          | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. solanacearum</i> (ATCC 11696T)                           | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. straminea</i> (JCM 2783T)                                | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. stutzeri</i> (JCM 5965T)                                 | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. syringae</i> (ATCC 19310T)                               | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. syringae</i> pv. <i>myricae</i> (NIAES 1464)             | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. syringae</i> pv. <i>myricae</i> (NIAES 1464T)            | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. testosteroni</i> (JCM 5832T)                             | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. tolaasii</i> (NCPB 2192T)                                | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. viridiflava</i> (ATCC 13223T)                            | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>P. woodsii</i> (ATCC 19311T)                                | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>Xanthomonas maltophilia</i> (ATCC 19867)                    | -               | -   | -   |  |  |  |
| <i>X. maltophilia</i> (JCM 1975T)                              | -               | -   | -   |  |  |  |

注 a) 供試細菌の学名は現在使われていないものや別の種に移されたものがあるが、本報告では菌株保存機関から送付を受けた段階の学名をそのまま用いた

b) 25℃下4日間培養後の生育。◎：生育良好(径1mm以上)、±：生育不良(径1mm未満)、-：生育しない

( $3.2 \times 10^6$  CFU/根1g)の95% (95/100分離株)に病原性が認められた。

## 考 察

ELISA法のような血清学的手法は迅速な検出定量が行えるが死菌までも検出する可能性があり、かつ血清学的に異なるいくつかの系統が存在する細菌の場合では、複数の抗体もしくは共通抗原に反応する抗体を用いる必要がある<sup>7,13</sup>。また、非病原性株と病原性株を識別することができない場合も想定される。ファージを用いる方法では、細菌やファージの系統の組み合わせによっては検出が困難であったり、検出限界が低い上に、検出値は2次的なもので定量するには精度に問題がある。また、PCR法は特別な実験装置と高価な試薬を必要とし、目的とする種もしくはpathovarのみを検出する特異的なプライマーのデザインが難しい上に、定量的な実験には向いていない<sup>10</sup>。それに対して、選択培地はコロニーが生じるのに数日を要し、非病原性株と病原性株を識別するのが困難であり、また生じた雑菌と目的細菌を見分けるのに「慣れ」が必要であるが、特別な装置を必要とせず直接的に密度を知ることができる点で優れている。本研究ではチューリップ根面土壌から分離された*P. gladioli*の95%はチューリップに病原性を示した。供試点数が限られていることから、今後の試験結果によっては非病原性の*P. gladioli*の優先して生育する試料がある可能性は否定できないが、少なくとも本病の発生生態を解明する目的で行うモデル系では十分な威力を発揮するものと考えられた。

基本培地をキングB培地とした場合、試料によっては雑菌の生育が著しかったり、コロニーの形状が類似する*P. cepacia*が生育したりして計測が困難な場合があるが、本細菌のコロニー表面が皺状となることから、他の平滑なコロニーを形成する*P. gladioli*とは識別が容易であった。よって、本培地と併用することにより、更に検出精度が高まるものと考えられた。また、グラジオラス首腐病細菌*P. gladioli* pv. *gladioli*、タマネギりん片腐敗病細菌*P. gladioli*、アスパラガス腐敗茎やネギ根圏土壌から分離した*P. gladioli*は、チューリップ球根に接種しても、褐色腐敗病のような病斑の形成は認められない<sup>8</sup>。供試菌株が少なく断定はできないが、チューリップ褐色腐敗病細菌は、他の*P. gladioli*が保有していない、特異的な病原性遺伝子を有している可能性がある。もしこの病原性遺伝子が明らかとなれば、それに相補的なプローブを用いたコロニーハイブリダイゼーション法によって、本選択培地上のチューリップ褐色腐敗病細菌を特異的に検出することが可能となり、検出定量の精度が飛躍的に向上すると期待される。

近年、*P. gladioli*は作物病害の生物防除に有効な微生物資材として利用されている<sup>11</sup>。チューリップにおいても、チューリップ褐色腐敗病細菌*P. gladioli*が*P. andropogonis*による黒腐病に対して極めて高い防除効果を示している<sup>9</sup>。こうした、病害防除に有効な*P. gladioli*を自然界から収集する際にも、SMG-5培地が役に立つものと考えられる。

本研究を行う過程で、*P. gladioli*近縁種である*P. cepacia*と*P. plantarii*を検出するのに有効と考えられる選択培地も同時に作製した(第1表)。すなわち、*P. cepacia*選択培地(SMC培地)は、SMG-5培地の炭素源を2,3-ブタンジオール(2ml/l)に置換し、トロポロンは5mg/lに増量、新たにカナマイシンを5mg/l添加した。*P. plantarii*選択培地(SMP培地)は同様に炭素源をラムノース(5g/l)に置換し、トロポロンを20mg/lに増量した。本研究では既存の*P. cepacia*選択培地<sup>14</sup>、*P. plantarii*選択培地<sup>15</sup>との比較や実際の検出定量を行っていないことから、有効性は不明であり、今後その実用性について検討する必要がある。

これまでに、多くの病害でその病原体の選択培地が開発されたことによって、発生生態が明らかとなり、効率的な防除対策が確立された<sup>3-6,11,12,14,15</sup>。本研究において、開発した*P. gladioli*選択培地SMG-5がチューリップ褐色腐敗病ばかりでなく*P. gladioli*が病原となっている病害の発生生態の解明に大きく寄与する事が期待される。

## 摘 要

チューリップ褐色腐敗病細菌*Pseudomonas gladioli*を土壌などから検出定量できる選択培地SMG-5培地を考案した。本培地上で*P. gladioli*は青紫色のコロニーを形成し、土壌中の他の細菌との識別が容易であったが、*P. gladioli*のpathovarを分けることはできなかった。

## 引用文献

- 1) 有江 力・難波成任・山下修一・土居養二・木嶋利男(1987). *Pseudomonas gladioli*を定着させたネギまたはニラの混植によるユウガオつる割病の生物的防除. 日植病報 53: 531-539.
- 2) 畔上耕児・西山幸司・加藤 肇(1987). イネ立枯細菌病の選択培地とそれを用いた分離結果. 日植病報 53: 70.
- 3) Cuppels, D. A. and Kelman, A. (1974). Evaluation of selective media for isolation of soft-rot bacteria from soil and plant tissue. Phytopa-

- thology 64 : 468-475.
- 4) 原 秀紀・小野邦明 (1984). タバコ立枯病の新しい選択培地による検出定量法. 植物防疫 38 : 76-79.
  - 5) 林 宣夫 (1987). コンニャク葉枯病細菌の検出用選択培地. 日植病報 53 : 489-494.
  - 6) 林 宣夫 (1989). コンニャク葉枯病細菌の罹病小葉残渣, 球茎および土壌における生存. 日植病報 55 : 609-614.
  - 7) Kadota, I., Ohuchi, A. and Nishiyama, K. (1991). Serological properties and specificity of *Pseudomonas avenae* Manns 1909, the causal agent of bacterial brown stripe of rice. Ann. Phytopath. Soc. Japan 57 : 268-273.
  - 8) 守川俊幸・山本孝彗・福田徳治・野村良邦・稲垣佳世子 (1993). 収穫後のチューリップ球根に黒褐色病斑を形成させる細菌病. 日植病報 59 : 10-17.
  - 9) 守川俊幸・野村良邦 (1994). *Pseudomonas gladioli* を用いたチューリップ黒腐病の生物防除. 日植病報 60 : 372.
  - 10) Prosen, D., Hatziloukas, E., Schaad, N.W. and Panopoulos, N.J. (1993). Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* DNA in bean seed by polymerase chain reaction-based amplification of a phaseolotoxin gene region. Phytopathology 83 : 965-970.
  - 11) Saettler, A.W., Schaad, N.W. and Roth, D.A. eds. (1989). Detection of bacteria in seed and other planting material. APS press, Minnesota. 122pp.
  - 12) Surico, G. and Lavermicocca, P. (1989). A semiselective medium for the isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. Phytopathology 79 : 185-190.
  - 13) Tsuchiya, K., Takahashi Y., Shohara, K., Homma Y. and Suzui T. (1991). Rapid and simple ELISA procedure for the specific detection of *Pseudomonas cepacia* in soil. Ann. Phytopath. Soc. Japan 57 : 196-202.
  - 14) 対馬誠也・脇本 哲・茂木静夫 (1986). イネもみ枯細菌病菌検出のための選択培地. 日植病報 52 : 253-259.
  - 15) Uematsu, T., Takatsu, A. and Ohata, K. (1982). A medium for the selective isolation of *Pseudomonas cichorii*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 48 : 425-432.
  - 16) Wu, B.J. and Thompson, S.T. (1984). Selective medium for *Pseudomonas cepacia* containing 9-chloro-9-(4-diethylaminophenyl)-10-phenylacridan and polymyxin B sulfate. Appl. Env. Microbiol 48 : 743-746.

(1994年7月25日受領)