

トウモロコシ葉からの  
トウモロコシ萎凋細菌病菌の検出診断  
マニュアル

平成 28 年 3 月

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構  
中央農業総合研究センター

## トウモロコシ葉からのトウモロコシ萎凋細菌病菌の検出診断マニュアル

本マニュアルは、植物防疫法に基づき国内への侵入を警戒している重要病害であるトウモロコシ萎凋細菌病（病原：*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*）の侵入に対して、別紙フローに示した緊急的な措置をとるために必要な同定手順の具体的な方法を記載したものである。重要な侵入病害の侵入対策資料として農林水産省より公表されている「火傷病防疫指針」を参考に、簡易同定法による同定結果を開始から3日以内、分離培養による同定結果を開始から1週間以内、精密同定法による確定診断を開始から1ヶ月以内にそれぞれ回答することとした。

「第1 疑似症状葉からの検出と簡易検査」は、LAMP※法でトウモロコシ葉からの直接検出を行う。本法により、国内未発生 of 亜種を含む *Pantoea stewartii* の有無を短時間で検査する。

「第2 分離による同定」では、分離作業を行い、次に、コロニーPCRにより分離細菌の迅速同定を行う。本法は、亜種の識別が可能であり、トウモロコシ萎凋細菌病菌（*P. stewartii* subsp. *stewartii*）のみを検出・同定する。

「第3 精密同定」では、分離細菌について、病原性の確認に加え、原理の異なる2種類の方法で同定を行い、確定診断を行う。

\*LAMPとはLoop-Mediated Isothermal Amplificationの略であり、栄研化学株式会社が独自に開発した、迅速、簡易、精確な遺伝子増幅法である。標的遺伝子の6つの領域に対して4種類のプライマーを設定し、鎖置換反応を利用して一定温度で反応させ、増幅産物の有無により標的遺伝子配列の有無を判定する技術である。（栄研化学HPより抜粋）。

## 目 次

<b>第1 疑似症状葉からの検出と簡易検査</b>	
1. 圃場における疑似症状試料の採取	3
2. トウモロコシ萎凋細菌病に感染した疑いのあるトウモロコシ葉からの LAMP 法による <i>P. stewartii</i> の検出	5
<b>第2 分離及び分離細菌の簡易同定</b>	
1. 細菌分離	9
2. コロニーPCR	12
<b>第3 病原性を含む精密同定</b>	
1. トウモロコシに対する病原性試験	15
2. 確認同定試験（生理・生化学的性状）	17
3. 確認同定試験（血清診断－ELISA）	19
<b>別紙 疑似症状発見から精密同定までの作業と判定のフロー図</b>	20

## 第1 疑似症状葉からの検出と簡易検査

### 1. 圃場における疑似症状試料の採取

#### (1) 病徴

感受性が高い品種では、生育初期の萎れ症状が起こりやすく、葉に不整形又は波形で淡緑色～黄色の条斑を形成し、その条斑は葉の全長にわたり形成される。病徴は、EPPO HP (<http://www.eppo.int/QUARANTINE/listA2.htm>) で確認できる。条斑は乾燥した後は褐色となる。激しく感染した植物の地際部では、茎の内部に空洞が見られることがある。房の包葉には、小型で不整形の水浸状の斑点が形成され、包葉の内側には細菌泥が漏出することがある。

抵抗性が強い品種では、生育初期の萎れ症状は起こりにくく、主に出穂期以降の葉枯れ症状が見られる。媒介虫の食害痕を起点に不整形で淡黄色～黄色の条斑が形成される。条斑の長さには長短がある。

一般的に、スイートコーン等食用品種は感受性が高く、デントコーン等の飼料用・加工用品種は感受性が低いとされる (CABI-CPC)。

#### (2) 試料採取の準備

[必ず必要なもの]

- ・使い捨てのカミソリまたは剪定器具
- ・記録用紙
- ・ビニール袋

[用意できると良いもの]

- ・クーラーボックスと保冷剤
- ・70%エタノール
- ・次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (有効塩素濃度 200ppm 以上)

#### (3) 試料採取の手順

ア. 疑似症状を示す組織を中心にできるだけ広い範囲から採取する。葉の試料採取には、使い捨てのカミソリを使用し、検体毎にカミソリを交換する、または、試料採取に剪定鋏等器具類を使用した場合は、試料毎に、70%エタノール、または有効塩素濃度 200ppm 以上の次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いて消毒する等、コンタミ防止策を講じる。

イ. 試料を採取した植物の圃場内の位置が分かる見取り図を作成する。

ウ. 採取した試料は、ビニール袋に入れ、梱包する。(輸送するまでクーラーボックス等により保冷する。ただし、菌の死滅を避けるため、凍結させてはならない。)

エ. 採取した試料には、個別に試料番号を付し、試料の確認に必要な事項 (採取月日、採

- 取場所、写真等)を別に記録、保管する
- オ. 採取した試料を郵便や宅配便で送付する場合は、冷蔵指定(4℃)する

## 2. トウモロコシ萎凋細菌病に感染した疑いのあるトウモロコシ葉からの LAMP 法 による *P. stewartii* の検出

### (1) 本手法について

本手法を用いて、トウモロコシ萎凋細菌病に感染した疑いがあるトウモロコシの葉から、*P. stewartii* を簡便に検出することができる。(中央農研成果情報 2014)。本手法は、植物防疫所が実施する国内検疫の簡易スクリーニング検査向けに偽陰性結果が少なくなるよう開発されており、2種類のプライマーセットの併用を推奨している。ただし、本手法では、トウモロコシに対して病原性を持たない亜種 *P. stewartii* subsp. *indologenes* も検出されることから、診断の確定には「第2」以降の同定作業が必要である。

### (2) 準備

#### ア. 装置と器具

[必ず必要なもの]

- ・マイクロピペッター
- ・簡易遠心器
- ・ボルテックスミキサー
- ・アイスバケツ (発泡スチロールの箱で代用可)
- ・ピンセット
- ・マイクロチューブ立て
- ・恒温槽等、反応液を 98°C および 63°C 一定に保つことが出来る装置

[用意できると良いもの]

- ・リアルタイム濁度測定装置 (LA200)
- ・サーマルサイクラー
- ・マルチビーズショッカー
- ・ステンレスビーズ (径 3 mm)

#### イ. 消耗品

[必ず必要なもの]

- ・カミソリ
- ・マイクロチップ
- ・マイクロチューブ
- ・ディスポーザブル手袋

[用意できると良いもの]

- ・マルチビーズショッカー専用チューブ

#### ウ. 必要な試薬

- ・ Loopamp DNA 増幅試薬キット (栄研化学)
- ・ 1mM HEPES 緩衝液
- ・ Pnss 細菌懸濁液または抽出 DNA 懸濁液 (陽性コントロールとして使用)
- ・ 合成 DNA (プライマー)
- ・ TE
- ・ 陽性コントロール (*P. stewartii* subsp. *stewartii* 培養菌株または抽出 DNA)

## エ. 試薬の調製

### (ア) プライマーMix の調製

a. 各プライマーの配列は以下のとおり。

プライマー	配列
PnsCps1 プライマーセット(プライマーMix①)	
PnsCps1-FIP	5'-GGTCAGGATAATCGGCTCGACCTACAATTTCCCGTCGGGTTC-3'
PnsCps1-BIP	5'-GCACTGTTTCGGCATGCTGGTCCTGTTTGGTGGAGATGGTG-3'
PnsCps1-F3	5'-GGGCGATCAGGATCTTCCT-3'
PnsCps1-B3	5'-CTTCGTAGCCGACAACCG-3'
PnsCps1-Loop-F	5'-TGTTGCAAATAGTTGGACAGACG-3'
PnsCps1-Loop-B	5'-TTCCTGCTCTATTACCTCTACTACA-3'
PnsPst1 プライマーセット(プライマーMix②)	
PnsPst1-FIP	5'-ACACCTTCAACATCGACGGATGCTCTGGCTATATTGGGT-3'
PnsPst1-BIP	5'-CATGCAAATATCCTCAGTCAACTCGTGCAGGTTATTGATCGTATCC-3'
PnsPst1-F3	5'-CGCAGCTAATAACAGAGGC-3'
PnsPst1-B3	5'-TCGCTGATTTTGCGGTTAG-3'
PnsPst1-Loop-F	5'-GATTGTTTAACGGTGCCGTAAT-3'

- b. 上表の配列の合成 DNA (乾燥品) に TE を加え 100  $\mu$ M に調製する。
- c. b で調製した各プライマーを以下の濃度になるように TE で希釈する。  
 FIP (BIP) : 40  $\mu$ M、F3 (B3) : 5  $\mu$ M、Loop-F (Loop-B) : 30  $\mu$ M
- d. c で調製した各プライマーを等量ずつ加え十分に混合する。調製した各プライマーは、 $-20\sim-25^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫で保管する。

### (3) 手順

#### ア. 試料の調製

(ア) トウモロコシ葉から疑似症状を示す部分を、適当な大きさに切断する。(0.05g、大きさで 3 cm  $\times$  1 cm 程度)。

(イ) 以下の a、b のいずれかの方法で調製する

a. 裁断浸漬 : 切断切片を葉脈に対し垂直方向の 1 mm 幅に裁断し、1mM HEPES 緩衝液 500  $\mu$ l に浸す。10 分後、ボルテックスミキサーで攪拌し、上清 15  $\mu$ l をマイクロチューブに分注。

b. マルチビーズショッカー（安井器械）を用いた磨砕：専用の 2 ml チューブに切断切片並びに径 3 mm のステンレスビーズ 2 つ及び 1mM HEPES バッファー 500  $\mu$ l を入れ、2000 rpm・15 秒間の条件で破砕する。軽くスピンドウンして、上清 15  $\mu$ l をマイクロチューブに分注する。

（ウ）サーマルサイクラー等を用いて 98 °C 10 分間処理する。

（エ）陽性対照液には細菌懸濁液もしくは抽出 DNA 懸濁液を用いる。細菌懸濁液を用いる場合は、 $10^7$  cfu/ml 程度の細菌懸濁液を作成し、上記と同様に 98 °C 10 分間処理する。

#### イ. 反応試薬の調製

（ア）試薬の調整は氷上で行う。下記の組成で反応液を調製する。反応試薬は、必要量（検体数+陽性対照区数+陰性対照区数）に 1 検体分加えた量をまとめて調製する（例：試料 5 検体に、陰性・陽性対照区それぞれ 1 区の場合は、5+1+1+1 の合計 8 検体分をまとめて調製する）。

ピペッティングまたはタッピングで混合した後、スピンドウンを行う。これを検査溶液とし、氷上に静置する。

試薬	1テストあたりの量 (プライマー-Mix①)	1テストあたりの量 (プライマー-Mix②)
2 × Reaction Mix	12.5 $\mu$ l	12.5 $\mu$ l
プライマー-Mix ※	6.0 $\mu$ l	5.0 $\mu$ l
Bst DNA polymerase	1.0 $\mu$ l	1.0 $\mu$ l
D.W.	0.5 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l
検査溶液合計	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l

※プライマー-Mix①では使用する Loop プライマーが 2 種類、②では 1 種類であることから、添加量が異なるので注意。

（ウ）LAMP 検査用チューブに 20  $\mu$ l ずつ分注する。

（エ）陰性対照区には、試料の代わりに、1mM HEPES 緩衝液 5.0  $\mu$ l を添加し、フタをする。

（オ）試料液 5.0  $\mu$ l を添加し、フタをする。

（カ）陽性対照区液を 5.0  $\mu$ l を添加し、フタをする。

（キ）軽くタッピングして反応液を混ぜた後、スピンドウンする。

#### ウ. 検査反応

（ア）恒温槽等により 63 °C で 60 分間保温する。

（イ）目視で判定する場合は、さらに 80 °C で 2 分間の熱処理により検査反応を停止する。

LA200 を利用する場合は、その必要はない。

#### エ. 判定

- (ア) LA200 を使用した場合は濁度測定によって陽性を判断。
- (イ) 目視では白濁の有無によって陽性を判断。
- (ウ) 2 種類のプライマーを使用した結果のうち、少なくとも一つが陽性反応を示した場合に、*P. stewartii* が検出されたと判定する。

#### (4) 参考文献

- ・栄研化学株式会社 <http://www.loopamp.eiken.co.jp/lamp/index.html>
- ・中央農研成果情報 (2014) トウモロコシ萎凋細菌病菌を迅速かつ簡便に検出する LAMP 法 ([http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/narc/2014/narc14\\_s28.html](http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/narc/2014/narc14_s28.html))
- ・ Uematsu H. et al. (2015) J. Gen. Plant Pathol. doi: 10.1007/s10327-015-0580-4

## 第2 分離及び分離細菌の簡易同定

### 1. 細菌分離

#### (1) 本手法について

細菌分離法は、トウモロコシ萎凋細菌病菌の感染が疑われるトウモロコシ葉より病原細菌を培地上に分離・増殖する方法である。分離用の試料として、細菌分離の定法で調整した試料、または「第1-(3)-ア」でDNA抽出試料調製の残りを使用してもよい。分離培地には調製が容易な普通寒天培地を推奨するが、古い病斑等、雑菌による拮抗によって分離が困難になると予想される場合は、NSVC選択培地を用いる。

#### (2) 普通寒天培地とNSVC選択培地について

普通寒天培地は、一般的に細菌の分離培養に使用される培地である。また、NSVC選択培地は、*Pantoea ananatis*の分離用に開発された選択培地で、国内既発生のトウモロコシの病原・表生細菌の生育を抑制するが、国内未発生のトウモロコシ萎凋細菌病菌の生育に影響が少なく、本病原菌に対する分離・検出用培地として適しているとされる（中央農研成果情報 2010）。

#### (3) 準備

##### ア. 装置と器具

[必ず必要なもの]

- ・ガスバーナー
- ・三角フラスコ
- ・葉さじ
- ・微量天秤
- ・オートクレーブ
- ・白金耳
- ・マイクロピペッター（選択培地作成に使用）
- ・マイクロチューブ立て（選択培地作成に使用）

[用意できると良いもの]

- ・クリーンベンチ
- ・生物顕微鏡
- ・ウォーターバス
- ・培養機

##### イ. 消耗品

- ・カミソリ
- ・薬包紙
- ・アルミホイル
- ・ディスポーザブルシャーレ
- ・マイクロチューブ（選択培地作成に使用）
- ・マイクロチップ（選択培地作成に使用）

#### ウ．必要な試薬

- ・蒸留水
- ・NB (Nutrient Broth)
- ・寒天
- ・NaCl（選択培地作成に使用）
- ・バンコマイシン（選択培地作成に使用）
- ・シクロヘキシミド（選択培地作成に使用）

#### エ．試薬の調製

##### （ア）普通寒天培地

NB 8g、寒天 15g に蒸留水を加え 1 L とし 121°C20 分間滅菌。プレートに注ぎ平板培地とする。

##### （イ）NSVC 選択培地

NB 8g、NaCl 50g、寒天 15g に蒸留水を加え 1 L とし、121°C20 分間滅菌。ウォーターバス等で 50°C に冷やした後、バンコマイシン 100mg、シクロヘキシミド 100mg を加える。プレートに注ぎ平板培地とする。

#### （４）手順

ア．以下 2 通りの調整方法のいずれかで調整

（ア）症状部と健全部の境目部分をカミソリで 0.5cm 角程度の切片に切断し、切片の半分を顕鏡し、細菌泥の漏出が確認する。細菌泥の漏出が確認された残りの切片を分離に用いる。0.5ml の滅菌水中で磨砕し、分離用試料とする。

（イ）「第 1 - 2. (3) - (ア) または (イ)」の残りの試料を分離用試料とする。

イ．分離用試料を普通寒天培地または NSVC 選択培地に画線分離する。

ウ．培地を 28°C で培養する。なお、普通寒天培地で約 3 日間、NSVC 培地で約 7 日間培養後に小型、円形、淡黄色のコロニーが形成される。

#### （５）参考文献

- ・中央農研成果情報（2010）トウモロコシ萎凋細菌病菌の分離・検出に NSVC 選択培地が適している

<http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/narc/2010/narc10-10.html>

- Goto et al. (1990) Selective Media for Ice Nucleation-active Bacteria of Tea Buds. 日植病報 56 : 515-522

## 2. コロニーPCR

### (1) 本手法について

本手法は、上記で分離した細菌コロニーの識別の方法である。第1の LAMP 法では種 (*Panotea stewartii*) 検出用プライマーを使用したのに対し、ここで使用するプライマーは、トウモロコシ萎凋細菌病菌 (*P. stewartii* subsp. *stewartii*) のみを検出する (Gehring 2014 を一部改変)。

### (2) コロニーPCR について

PCR (Polymerase chain reaction) は、耐熱性 DNA ポリメラーゼ(主に Taq polymerase) と特異的プライマーを用いて、DNA の特定の領域を増幅する手法である。コロニーPCR は、平板培地上の細菌コロニーの懸濁液を PCR の試料にする方法で、細菌の純化とその後の検査の前に、菌株の選抜が可能である。

### (3) 準備

#### ア. 装置と器具

[必ず必要なもの]

- ・ガスバーナー
- ・マイクロチューブ立て
- ・ボルテックス
- ・マイクロピペッター
- ・サーマルサイクラー
- ・電気泳動装置
- ・ゲルメーカーセット
- ・タッパー
- ・ゲル撮影装置

[用意できると良いもの]

- ・クリーンベンチ
- ・アイスバケツ

#### イ. 消耗品

- ・ディスポーザブルシャーレ
- ・滅菌済み爪楊枝
- ・マイクロチューブ
- ・マイクロチップ
- ・ディスポーザブルグローブ

ウ. 必要な試薬

- ・ NB (Nutrient Broth)
- ・ 寒天
- ・ 滅菌水
- ・ 耐熱性 DNA ポリメラーゼ
- ・ 専用バッファー
- ・ dNTP Mixture
- ・ ゲルローディング・ダイ (6×)
- ・ エチジウムブロマイド溶液 (2µg/ml)
- ・ 50×TAE
- ・ アガロース (アガロース S (ニッポンジーン) もしくは同等品)

エ. 試薬の調製

(ア) プライマーの調製

- a. プライマーの配列は以下のとおり。

プライマー	配列
DC283gaIE 2	CGACCTGTTTGCCTCTCTCT <sup>※</sup>
DC283gaIEc 2	CATCAGCTTGGAGGTGGCA

※下線部を原著から改変

- b. 合成 DNA (乾燥品) に TE を加え 100 µM に調製する。
- c. b で調製した各プライマーを 25 µM の濃度になるように TE で希釈する。調製した各プライマーは、-20~-25°C の冷凍庫で保管する。
- (イ) 泳動用緩衝液の調製及び泳動用ゲルの作成
- a. 50×TAE を 50 倍希釈し、泳動用緩衝液とする。
- b. 上記緩衝液を用いて、1%アガロースゲルを作成する。

(4) 手順

ア. 試料の調製

- (ア) 滅菌した爪楊枝を用いて、第 2-1 で平板培地上に形成された小型、淡黄色、円形のコロニーから菌体を少量採取し、100 µL の滅菌水に懸濁する。(懸濁後の爪楊枝でマスタープレートを作成すると以後の試験に使用するにあたり便利である。)
- (イ) 懸濁液 5 µl をマイクロチューブに分注。
- (ウ) サーマルサイクラー等を用いて 98 °C 10 分間処理する。
- (エ) 陽性対照液には細菌懸濁液もしくは抽出 DNA 懸濁液を用いる。細菌懸濁液を用いる

場合は、 $10^7$  cfu/ml 程度の細菌懸濁液を作成し、上記と同様に 98 °C 10 分間処理する。

#### イ. 反応試薬の調製

(ア) 反応試薬を氷上で完全に融解する。なお、酵素は-20°Cでは凍結しないため、使用直前に冷凍庫から取り出す。

(イ) 試薬の調整は氷上で行う。下記の組成で反応液を調整する。サンプル数+陽性コントロール+陰性コントロール+1をまとめて調製する。ピペッティングまたはタッピングで混合した後、遠心機にかけて底部に溶液を集める。これを検査溶液とし、氷上に静置する。

試薬	1テストあたりの量
10 × Ex Taq Buffer (20 mM Mg <sup>2+</sup> plus)	2.0 μl
dNTP Mixture (各2.5 mM)	1.6 μl
DC283galE2 (25 μM)	0.4 μl
DC283galEc2 (25 μM)	0.4 μl
Bst DNA polymerase	0.1 μl
D.W.	10.5 μl
検査溶液合計	15 μl

(ウ) PCR 検査用チューブに 15 μl ずつ分注する。

(エ) 陰性対照区として、蒸留水 5.0 μl を添加し、フタをする。

(オ) 検査溶液 5.0 μl を添加し、フタをする。

(カ) 陽性対照液を 5.0 μl を添加し、フタをする。

(キ) チューブを指ではじいて反応液を混ぜた後、遠心機で溶液をチューブの底に集める。

#### ウ. 検査反応

サーマルサイクラーで 94 °C 2 分間処理後、94 °C 20 秒間/64 °C 30 秒間/72°C 30 秒間の反応を 30 回繰り返す。

#### エ. 電気泳動、判定

(ア) 反応液とゲルローディング・ダイ (6×) を 5 : 1 になるように混合し、電気泳動を行う。

(イ) エチジウムブロマイド液 (2μg/ml) に浸し 20 分間染色後、ゲル撮影装置で約 400bp の PCR 産物の有無を確認する。PCR 産物が得られた場合はトウモロコシ萎凋細菌病菌であると判定される。

#### (5) 参考文献

- Gehring et al. (2014) Molecular differentiation of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* from subspecies *stewartii* and identification of new isolates from maize seeds. J. Applied Microbiol. 116(6) : 1553-1562.

### 第3 病原性を含む精密同定

※以下の検査の前には、単集落分離を実施し、細菌の純化を行う。

#### 1. トウモロコシに対する病原性試験

##### (1) 本手法について

第2-1によって分離した細菌株がトウモロコシに対して病原性を有するかを確認する方法である。トウモロコシの幼苗に細菌懸濁液を穿刺接種することで、病徴発現の有無により病原性を判定する。接種から病徴発現までの期間は3~4日間程度で、接種用植物体の準備から結果の確認まで、全体で約2週間程度の時間を要する。

##### (2) 接種試験について

接種試験に用いるトウモロコシ品種は、感受性が高いスイートコーンを使用することを推奨する。本マニュアルでは、「ハニーバンタム」を使用している。なお、接種細菌はトウモロコシ萎凋細菌病菌である可能性が高いことから、散逸防止について、万全の措置を行うこと。

##### (3) 準備

###### ア. 装置と器具

- ・試験管
- ・白金耳
- ・ガスバーナー
- ・十本針
- ・受け皿
- ・マイクロピペッター
- ・人工気象器または隔離温室

###### イ. 消耗品

- ・培養土
- ・トウモロコシ種子（「ハニーバンタム」等スイートコーン品種）
- ・マイクロチップ

###### ウ. 必要な試薬

- ・増殖用培地（LB培地, Miller等）

#### (4) 手順

##### ア. トウモロコシの栽培

直径 9cm のプラスチックポットに培養土を詰め、種子を 1 粒ずつ播種し、第 4 葉が展開するまで栽培する。室温 25°C の温室で栽培した場合、約 1 週間程度で接種できる大きさになる。

##### イ. 分離菌の培養

LB 斜面培地に移植後、28°C の培養器で 2~3 日間培養する。

##### ウ. 接種～判定

(ア) 培養菌を白金耳でかきとり試験管に入った滅菌水に懸濁する。濃度は、目視で白く濁る程度 (約  $10^7 \sim 10^8 \text{cfu/ml}$ ) にする。

(イ) マイクロピペッターで、第 1 葉の付け根に 10 $\mu\text{l}$  の細菌懸濁液を載せ、懸濁液の上から軸に向かって十本針を突き刺す要領で接種する。

(ウ) 28°C、12 時間光条件 / 12 時間暗黒条件の人工気象器で栽培する。

(エ) 通常 3~4 日後に葉脈に沿って水浸状の病斑が形成される。

## 2. 確認同定試験（生理・生化学的性状）

### （1）本手法について

細菌の同定にあたっては生物学的に原理の異なる複数の手法で確認することが望ましいとされる。そこで、本手法では、上記によって分離及び病原性を確認した細菌株の種及び亜種を生理・生化学的性状に基づき同定する。

### （2）生理・生化学的性状の項目について

はじめに、西山の二分検索法を用いて菌種を絞り込む。黄緑色蛍光色素の産生、グラム反応、発酵試験及び黄色色素産生を調査し、黄緑色蛍光色素の産生：陽性、グラム反応：陰性、発酵試験：発酵型、黄色色素産生：陽性となった場合、「トウモロコシ萎凋細菌病菌の可能性あり」として、次の同定作業を行う。

Mergaert et al. (1993)の報告に基づき、近縁種、特に亜種を安定して識別することができるマルトース、アルブチン、サリシン及びラフィノースの分解能を調査する。トウモロコシ萎凋細菌病菌である場合は、マルトース、アルブチン及びサリシンの分解は陰性、ラフィノースの分解は陽性となる。なお、同種で別亜種の *P. stewartii* subsp. *indologenes* は4項目すべて陽性となり区別される。

### （3）準備及び手順

#### ア. 黄緑色蛍光色素の産生

キング B 培地（栄研化学）の斜面培地で培養する。培養温度は 28°C（以下の試験も同温度で培養）。培養 2 日後に紫外線下で黄緑色を呈する物質が培地中に生じたものを陽性とする。

#### イ. グラム反応（簡易法）

移植後 24 時間以内の培養細菌の 1～2 白金耳をスライドグラス上で 3% KOH 水溶液と混和する。混和液が粘ちょうになり白金耳を持ち上げた際に糸を引くようになったものをグラム陰性と判断する。グラム陽性菌は糸を引かない。

#### ウ. 発酵試験

##### （ア）培地

バクトペプトン 2g、NaCl 5g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3g、グルコース 10g、ブロムチモールブルー 0.03g に蒸留水を加え 1 L とする。pH は 7.1。培地 5ml を試験管に分注後、さらに乾熱滅菌した流動パラフィンに分注（深さ 1～2 cm）し、121°C 20 分間滅菌する。

##### （イ）手順及び判定

移植後 2～3 日目の培養細菌（培地は問わない）を滅菌水中に 10<sup>9</sup>cfu/ml 程度の濃度になるように懸濁し、白金線を用いて、上記培地に穿刺培養する。培養 3 日目に培地が黄色になったものを陽性、変色しないかごくわずかに黄緑色になったものを陰性とする。

#### エ. 黄色色素産生

十分な栄養価のある培地上で培養する。培養3日目に黄色色素を産生し、集落が黄色に着色したものを陽性とする。

#### オ. マルトース、アルブチン、サリシン及びラフィノースの分解能

##### (ア) 培地

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  1g、KCl 0.2g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g、ブロモチモールブルー 0.03g、寒天 15g を基本培地とし、上記の糖のいずれか 5g を加えたものに蒸留水を加え 1 L とする。pH は 6.8。培地 5ml を試験管に分注し、 $121^\circ\text{C}$  20 分間滅菌後、斜面培地とする。

##### (イ) 手順及び判定

移植後 2～3 日目の培養細菌（培地は問わない）を滅菌水中に  $10^9\text{cfu/ml}$  程度の濃度になるように懸濁し、白金線を用いて、上記培地の斜面部分に 1 本線を引くように培養する。移植後 14 日間観察し、細菌の増殖と培地の黄変が見られるものを陽性とする。

#### (4) 参考文献

- ・後藤正夫・瀧川雄一（1984）植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べ方（3）植物防疫 38: 432-437.
- ・後藤正夫・瀧川雄一（1984）植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べ方（4）植物防疫 38: 479-484.
- ・田部井英夫ら（1991）作物の細菌病－診断と防除－：38-50.

### 3. 確認同定試験（血清診断－ELISA）

#### （1）本手法について

細菌の同定にあたっては生物学的に原理の異なる複数の手法で確認することが望ましいとされている。遺伝子の検出による同定、生物学的・生化学的性質による同定以外の方法として、酵素結合抗体法（ELISA）による同定も一般に行われており、専用に ELISA キットが市販されている。

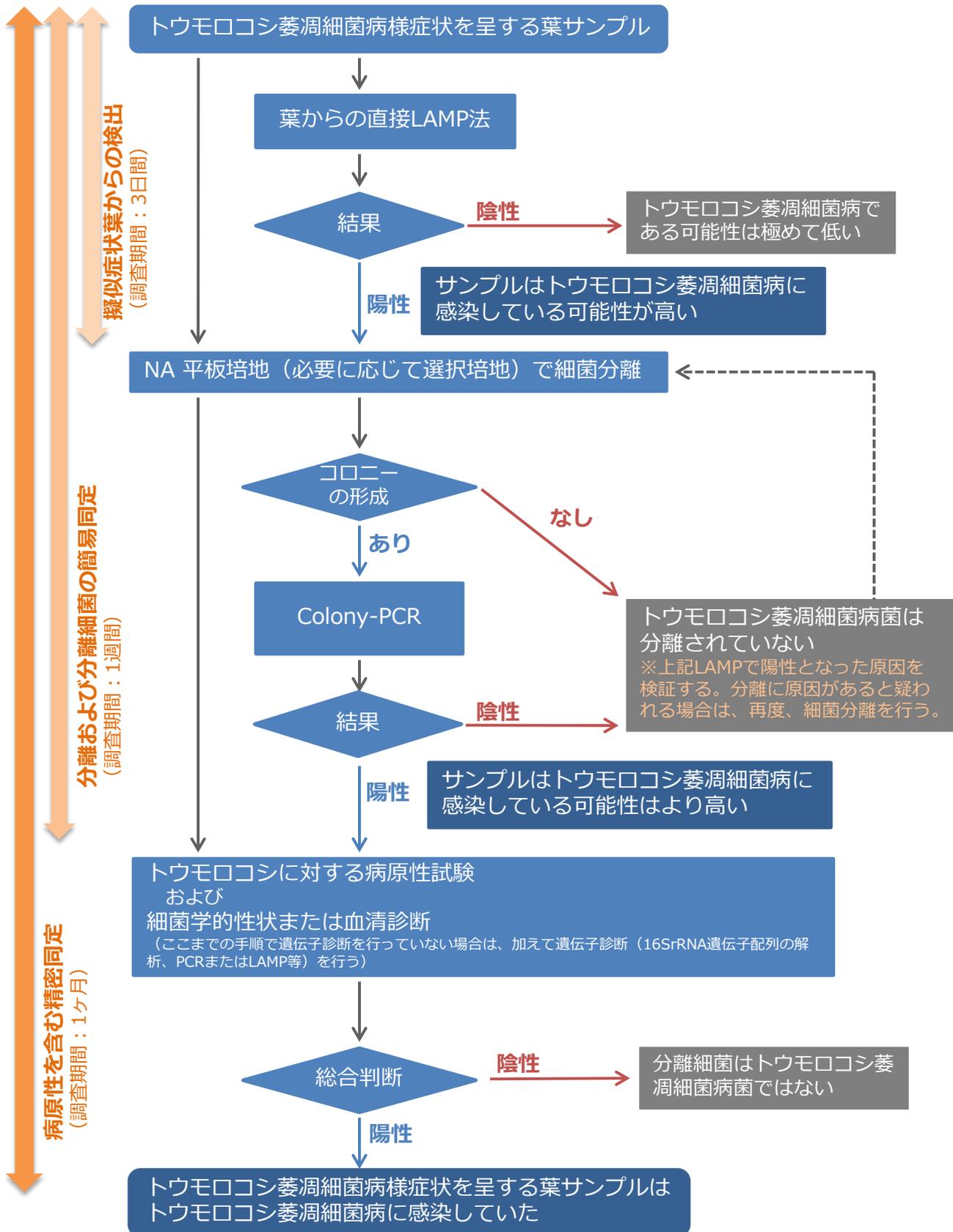
#### （2）ELISA（二重結合法）について

酵素を結合させた抗体を用いて抗原を検出する方法。マイクロプレート壁面に吸着させた抗体に抗原を結合させた後、酵素結合抗体を結合させる。次いで、抗原と結合していない酵素結合抗体を除去した後、酵素基質を入れ、酵素の作用による基質の発色をもって判定を行う。Agdia 社の ELISA キットは、日本の代理店から購入できる。キットの検出可能検体数は 96/500/1000/5000 のいずれかを選択できる。方法の詳細、準備及び手順については、製造元の Agdia 社から英語のマニュアルが入手できる。

（上松 寛\*・大藤泰雄）

\*現 農林水産省横浜植物防疫所

別紙 疑似症状発見から精密同定までの作業と判定のフロー図



本マニュアルは、「私的使用」または「引用」など著作権法上認められた場合を除き、無断で転載、複製、放送、販売などの利用をすることは出来ません。

-----  
平成 28 年 3 月 1 日発行

お問い合わせ先／

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 中央農業総合研究センター  
病虫害研究領域 大藤泰雄

〒305-8666 茨城県つくば市観音台3-1-1

Tel 029-838-8481 / Fax 029-838-8484