

抗血清によるカーネーション萎ちょう細菌病菌の検出*

佐 藤 成 良・村 岡 力**
(横浜植物防疫所・横浜植物防疫所羽田支所)

Serological detection of carnation bacterial wilt, *Pseudomonas caryophylli*. Shigeyoshi SATOH (Phytopathology section, Yokohama Plant Protection Station), and Tsutomu MURAOKA (Haneda Branch, Yokohama Plant Protection Station) Res. Bull. Pl. Prot. Japan 16: 27~34 (1979)

Abstract: The antiserum against the antigen of living *P. caryophylli* was prepared and was made use of detection of bacteria in the symptomless carnation cuttings or rooted cuttings. The detection in the imported carnations was employed with the culture-indexing method using antiserum. This method was very useful but some group-agglutinative bacteria which were non-pathogenic *Pseudomonas* were sometimes isolated. The absorption test with one of these bacterial antigens was effective. Subsequently, the serological reaction of this antiserum to many phytopathogenic bacteria have been studied with the slide agglutination, the gel diffusion test, and the fluorescent antibody staining. Both the slide agglutination and the gel diffusion test showed some heterologous antigens in the Genus *Pseudomonas* but direct fluorescent antibody staining was highly specific to *P. caryophylli*. Although the homologous antigens reacted with a high titer (1:1,280), the heterologous antigens reacted with low titers (1:20~80). Also the gel diffusion tests showed that the heated antigens were more specific than the crude antigens with some exceptions. Fluorescing bacteria were detected on prepared slide-glass in the crude stem juice containing as few as 2.3×10^3 cells/ml in a short time. Direct fluorescent antibody staining provides a rapid and accurate detection.

はじめに

最近、神奈川県をはじめ全国各地のカーネーション栽培地において、萎ちょう細菌病菌 (*Pseudomonas caryophylli* Burkholder) による被害が目立っている (鍵渡ら, 1968; 西村, 1973; 大田, 1978)。本病はカーネーション栽培上最も重要な病害のひとつで (第3図・1), 土壌伝染性の細菌による導管病である。また本病は挿穂・苗によって伝播され、栽培中の発生に対しては満足な防除手段がなく、本病を予防するためには健全な挿穂・苗を用いることが極めて重要となっている (Nelson, et al., 1960; 西村, 1971)。近年、外国から大量の挿穂・苗が航空貨物として輸入されているが、これらに対しても厳重な検疫が要求されている。しかし、本病は挿穂・苗においては外観だけによる検査は極めて困難であるうえ、一時に大量に輸入されるため、適当な検査方法がないのが現状である。そこで迅速で精度の高い検査

方法として血清学的方法について検討した。西村(1971)の抗血清併用切片法を用いて輸入カーネーションの挿穂・苗から苗の検出を行い、また蛍光抗体を作製し、蛍光抗体染色法による検出法について検討したので、ここに報告する。

本研究に当たり、終始親切な御指導をいただいた当所調査研究部松濤美文病菌課長、貴重な菌株を分譲いただいた農業技術研究所土屋行夫氏、神奈川県芸試験場青野信男氏、静岡農業試験場森田 傳氏、岡山たばこ試験場小野邦明氏、輸入カーネーションの保菌検定に多大な御助力をいただいた当所札幌支所吉田英男技官、塩釜支所青森出張所佐藤康昭技官、那覇植物防疫事務所渡辺哲夫技官、実験を通じ種々協力を賜った当所病菌課高山睦雄技官に深甚の謝意を表する。

材料および方法

供 試 菌

抗血清作製には神奈川県試より分譲を受けた萎ちょう細菌病菌 (KY 41 菌株) のジャガイモ煎汁寒天培地 (PDA) 斜面培養菌を用い、血清試験には第1表に示し

* 本報告の概要は、昭和 54 年度日本植物病理学会大会 (1979) において発表した。

** 現在、横浜植物防疫所東京支所晴海出張所。

第1表 菌株の来歴

Corynebacterium michiganense (R-1), *C. oortii* (Y-1), *C. sependonicum* (U-18-1), *Erwinia carotovora* (Hy-3-1), *E. carotovora* var. *atroseptica* (D-3-1), *E. carotovora* var. *carotovora* (C-2-2), *Pseudomonas caryophylli* (Pcy-23 ほか菌4株), *P. solanacearum* (P-2-1), *P. syringae* (A-1), *Xanthomonas campestris* (K-1-2), *X. hyacinthi* (EB-2-1), 以上病菌課保存。

Erwinia millettiae, *Pseudomonas alboprecipitans* (NL-10), *P. aptata*, *P. cichorii* (Lp 7630), *P. coronafaciens*, *P. coronafaciens* var. *atropurpurea*, *P. eriobotryae* (18), *P. fluorescens* (1201), *P. glumae* (N 7401), *P. lachrymans*, *P. marginalis* (Lp 7635), *P. marginata* (A-1), *P. mori*, *P. phaseolicola* (P-1-14-2), *P. setariae* (P-1-17-1), *P. strifaciens* var. *japonica*, *P. viridiflava* (Lp 7608), *Xanthomonas citri* (N 6101), *X. cucurbitae* (X-1-3-1), *X. oryzae* (H 5809), *X. phaseoli* var. *sojensis* (X-1-7-1), *X. pruni* (X-10-1), *X. translucens* var. *hordei* (X-1-11-1), *X. vesicatoria*, 以上農技研より分譲。

Pseudomonas angulata (井原, 山口), *P. tabaci* (6602, 6606, 7246) 以上岡山たばこ試より分譲。

Pseudomonas caryophylli (KY 14 他 8 菌株), 神奈川園試より分譲。

Pseudomonas woodsii (PW-19), 静岡農試より分譲。

た *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, ならびに *Xanthomonas* 属の各種植物病原細菌のジャガイモ半合成寒地培地 (PSA) の斜面培養菌を用いた。

供試植物

輸入カーネーションの抗血清併用切片テスト法には, 輸入検査時に産地別・品種別に挿穂・苗を採取し, 4℃の冷蔵庫に保存しておいて用いた。接種および検出法の検討には, 温室内に栽培した鉢植えカーネーション (品種: Tony tgr.) の苗 (20~30cm) を用いた。接種は木綿針による有傷接種を行い, 接種後24時間温室に保ち保菌植物を作製した。

抗血清の作製

萎ちょう細菌の PDA 斜面培養菌に生理食塩水を加えて作製した生菌抗原により, アジュバント筋注と静注を併用して家兎を免疫して得た。この抗血清の力価はスライド凝集反応で1,280倍であり, 神奈川県産萎ちょう細菌病菌に菌株と強く反応した。

抗血清併用切片テスト法

挿穂・苗の節間部から厚さ約3mmの切片を採取し, 70% エチルアルコール5秒間, 0.1% 昇コウ水2分間の表面殺菌を行い, 殺菌水での5分間の洗浄を2回繰返し, PD 培地 (pH 7.0) 6ml を分注した試験管に投入し, 25℃で2~3日培養した後, この培養液の細菌による懸濁を確認し, この培養液をスライドグラスに約0.1ml 程度取り出し, 10倍に希釈した抗萎ちょう細菌病菌血清を約0.1ml 落とし, スライド凝集反応により, 保菌検定を行った。

蛍光抗体の作製方法

劉 (1970) の方法に従い, 4℃の冷室内で抗萎ちょう細菌病菌血清に飽和硫酸溶液を加え, γ-グロブリンを分画し, これを生理食塩水に対し, 24時間透析した。つぎに硫酸の溶脱を確め, 精製γ-グロブリン液を得た。こ

の精製γ-グロブリン液中のタンパク濃度の測定は, 生理食塩水で希釈し, 分光光度計で280nmの吸光度(OD)を読み次式により求めた。

$$\text{タンパク濃度 (mg/ml)} = \frac{\text{OD} \times \text{希釈倍数}}{1.8}$$

(1.8 家兎のγ-グロブリンの extinction coefficient)

γ-グロブリンへの蛍光色素 FITC (fluorescent isothiocyanate) の結合は, 精製γ-グロブリン液1mlにFITCの0.1N・Na₂HPO₄溶液0.4mlをかきまぜながら1滴ずつ加えたのち, 0.2mlの0.1N・Na₂HPO₄溶液を加え, さらに0.04N・NaOH溶液0.2mlを加えpH9.5に調整し, 室温で30分間静置して行なった。なお, FITCは精製γ-グロブリン1gに15mg結合するように, あらかじめ計算してFITC溶液を作製しておいた。

つぎに, この結合液をセファデックス G-25 カラムと DEAE セルロースカラムとによって精製した (国立予防衛生研編, ウイルス実験学総論)。試料は0.05Mリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) によって溶出し, 蛍光色の強いピークの部分を採取して, 蛍光抗体を得, これに0.1%の窒化ナトリウム液を100分の1容加えて冷蔵庫に保存し供試した。

蛍光抗体染色法

スライドグラスに細菌を含む検定液を塗布し, 風乾後, 2~3回軽く火災固定した。これに10倍に希釈した蛍光抗体液をマイクロピペットで滴下し, 湿室 (37℃) で30分間染色した。染色後, スライドグラフ上の余剰の蛍光抗体液を除去し, PBSで振をうとしながら30分間洗浄し, 遊離蛍光抗体を除去した。このスライドグラスを乾燥し, 60%グリセリンPBSで封入し, 水銀ランプを光源とした透過型蛍光顕微鏡 (ニコン FL) を用い, 暗視野コンデンサーを使用して, 404nmと434nmを主とす

る BV 励起光によって観察した。

血清試験方法

萎ちょう細菌病菌抗血清の血清学的な性質を明らかにするためにスライド凝集反応、ゲル内抗散法および蛍光抗体染色法により調べた。スライド凝集反応では本抗血清を10倍からの2倍ずつの段階希釈をして使用し、ゲル内沈降反応には原液をそのまま使用した。供試菌は第1表に示す54菌株を用い、それぞれPSA培地に斜面培養した後、1斜面につき10mlの生理食塩水に懸濁させたものを生菌抗原とし、同菌液を100°C・2時間加熱処理したものを加熱抗原とした。スライド凝集反応には、生菌抗原を用い、段階希釈した抗血清と反応させてその最終抗体価を求めた。ゲル内沈降反応には、窒化ナトリウムを加えて殺菌した生菌抗原と加熱抗原を用い、寒天ゲルは常法(富永, 1971)により作製し、中央のwellと周囲の6個のwellとの間隔は6mmとし、中央に抗血清を周囲に各供試菌の抗原を入れて室温下で7日間静置して観察した。蛍光抗体染色法では、生菌抗原をさらに生理食塩水で希釈し、 10^{4-5} cell/mlの濃度にして蛍光抗体染色を行った。

蛍光抗体染色法の検出精度

殺菌水、軟腐菌(*E. carovora*)懸濁液(10^{7-8} cells/ml)およびカーネーション茎磨砕汁液に既知濃度の斜面培養した萎ちょう病菌を加え、保菌液を作製し、これらの液をスライドグラスに塗布し、前述の蛍光抗体染色を行い、蛍光観察した。なお、カーネーション茎磨砕汁液は、茎1cm当り5mlの殺菌水を加え、乳鉢で磨砕し、No. 2濾紙で濾過して作製した。

萎ちょう細菌病菌の茎中での増殖

1979年1月、温室(15~20°C)内で栽培している鉢植えカーネーション苗の茎に萎ちょう細菌病菌をごく少数針接種し、接種後経時的に接種茎を採取し、上記と同様の茎磨砕汁液を得、この液を用いてPDA培地による希釈平板法で出現した本菌の特徴あるコロニーを計数して茎中(1cm)の細菌数を求めた。また、この茎磨砕汁液をスライドグラスに塗布して、蛍光抗体染色を行い、検出能力をみた。

結 果

抗血清併用切片テスト法による保菌検定

大量の挿穂、苗を効率よく保菌検定を行なうために、予備試験として多数の無病切片に針接種で 10^{3-4} cellsの菌数を保菌させた切片を加え、抗血清併用切片テスト法(第3図-3)によって検定を行なった結果(第2表)、無病切片20片に1本でも保菌切片が存在すれば、保菌切片の検出は可能であった。

以上の結果を診まえて、輸入カーネーションの検定は輸入検査時に採取し、冷蔵庫に保存していた挿穂、苗の節間部から1本につき1切片を採り、10切片を1検定単位として検定を行ない、結果は第3表に示した。202回の検定を行ない、細菌の生育による培地の懸濁の認められたものが108回あり、このうち抗血清に凝集反応が認められたものが8回あった。細菌の生育による培地の懸濁の認められなかったものでは、いずれも凝集反応を示さなかった。

第2表 抗血清併用切片テスト法の検出能力

健全切片	保菌切片	細菌生育	スライド凝集反応
25	1	—*1	—*2
20	1	+	+
15	1	+	+
10	1	+	+
5	1	+	+
1	1	+	+
0	1	+	+
0	10	+	+
2	8	+	+
4	6	+	+
6	4	+	+
8	2	+	+
10	0	—	—

※ 1. 細菌の生育の無いもの—, わずかに認められるもの+, 認められるもの+.

※ 2. 凝集の認められるもの—, わずかに認められるもの+, 認められるもの+.

第3表 抗血清併用切片テスト法による輸入カーネーションの保菌検定

検定単位* ¹	細菌の生育	スライド凝集反応
202	+* ² 108	+* ³ 8
		— 100
	— 94	+ 0
		— 88
		6* ⁴

※ 1. 茎10片を1検定単位とした

※ 2. 細菌の生育により白濁したもの+、しないもの—

※ 3. 凝集反応の認められたもの+、認められないもの—

※ 4. スライド凝集反応を実施しなかったもの

凝集反応の認められた試験管から細菌の分離を行なった結果、いずれからもグラム陰性、好気性、極毛桿菌で、PSA培地上に白色コロニーを作り、緑色蛍光色素を産生する *Pseudomonas* 属の細菌が分離されたが、これらの分離菌はいずれもカーネーションには病原性を示さず、萎ちょう細菌病菌とは異なる細菌であった。

本抗血清の萎ちょう細菌病菌に対する抗体価は、

1,280倍であるのに対し、これらの分離つれた *Pseudomonas* 属菌に対する抗体価は20倍であったため、分離菌のうちの1菌株を用いて本抗血清を吸収したところ、吸収抗血清はいずれの分離菌とも反応を示さず、また萎ちょう細菌病菌に対する抗体価は変らなかった。

血清試験

スライド凝集反応および蛍光抗体染色法の結果は第4表に示し、ゲル内沈降反応は反応の認められた *Pseudomonas* 属の細菌についての結果のみ第1図に示した。本抗血清は、*Corynebacterium*、*Erwinia* および *Xanthomonas* 属の各種病原細菌とはいずれの方法でも全く反応しなかったが、*Pseudomonas* 属の多くの種とスライド凝集反応およびゲル内沈降反応で反応した。

スライド凝集反応では、本抗血清は萎ちょう細菌病菌に対し明瞭な凝集塊を形成し、抗体価は1,280倍であったが、他の *Pseudomonas* 属菌に対しては絮状の凝集塊を形成し、これらに対する抗体価は20~80倍であり、一般的低かった。

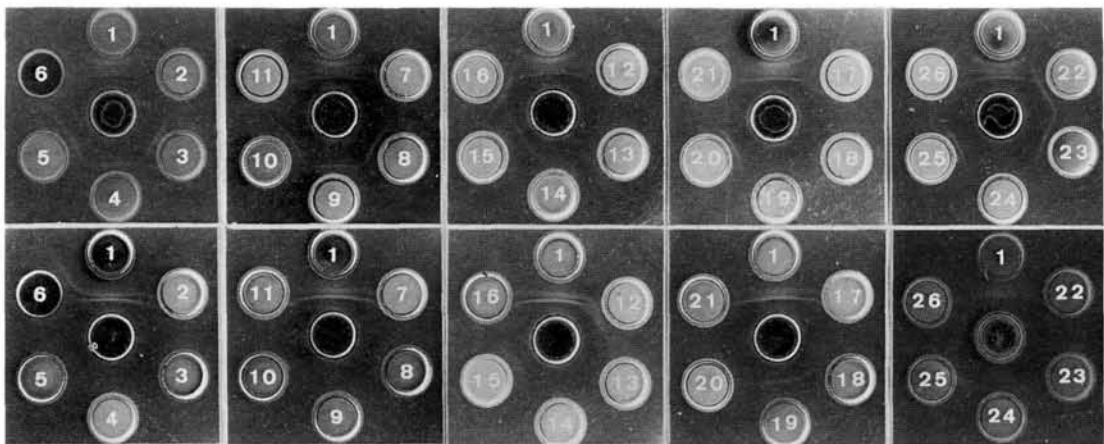
ゲル内沈降反応では、本抗血清は萎ちょう細菌病菌との間に生菌抗原および加熱抗原とも特異的沈降帯を含めて4本以上の沈降帯を形成した。*Pseudomonas* の他の

第4表 *P. caryophylli* 生菌抗血清の性質

種名	スライド凝集反応	蛍光抗体染色法	種名	スライド凝集反応	蛍光抗体染色法
<i>Corynebacterium michiganens</i>	0 ^{1*}	— ^{2*}	<i>Pseudomonas mori</i>	×40	—
<i>C. oortii</i>	0	—	<i>P. phaseolicola</i>	×20	—
<i>C. sepeidonicum</i>	0	—	<i>P. setariae</i>	0	—
<i>Erwinia carotovora</i>	0	—	<i>P. solanacearum</i>	0	—
<i>E. carotovora</i>	0	—	<i>P. strifaciens</i>	×40	—
var. <i>atroseptica</i>			var. <i>japonica</i>		
<i>E. carotovora</i>	0	—	<i>P. syringae</i>	×40	—
var. <i>carotovora</i>			<i>P. tabaci</i>	×40	—
<i>E. milletiae</i>	0	—	<i>P. viridiflava</i>	0	—
<i>Pseudomonas alboprecipitans</i>	×20	—	<i>P. woodsii</i>	0	—
<i>P. angulata</i>	×40	—	<i>Xanthomonas campestris</i>	0	—
<i>P. caryophylli</i>	×1,280	卅	<i>X. citri</i>	0	—
<i>P. cichorii</i>	×40	—	<i>X. cucurbitae</i>	0	—
<i>P. coronafaciens</i>	×80	—	<i>X. hyacinthi</i>	0	—
<i>P. coronafaciens</i>	×40	—	<i>X. oryzae</i>	0	—
var. <i>atropurpurea</i>			<i>X. phaseoli</i>	0	—
<i>P. eriobotryae</i>	×40	—	var. <i>sojensis</i>		
<i>P. fluorescens</i>	0	—	<i>X. pruni</i>	0	—
<i>P. glumae</i>	0	—	<i>X. translucens</i>	0	—
<i>P. lachrymans</i>	×40	—	var. <i>hordei</i>		
<i>P. marginalis</i>	×40	—	<i>X. vesicatoria</i>	0	—
<i>P. marginata</i>	0	—			

1* 抗体価。

2* 反応の認められなかったもの—、強く反応の認められたもの×。

第1図 各種 *Pseudomonas* 属菌のゲル内沈降反応

中央: *P. caryophylli* の生菌抗血清, 周囲: 上段は下記の *Pseudomonas* 属菌の生菌抗原, 下段は加熱抗原。

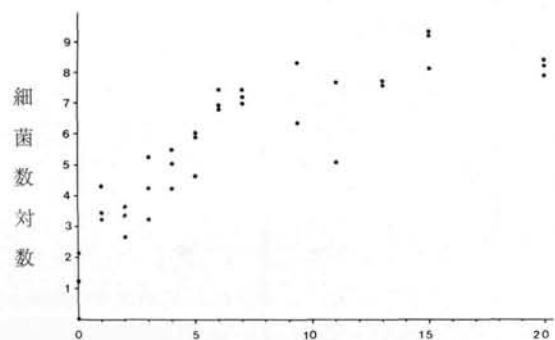
1: *P. caryophylli*, 2: *P. albobacillans*, 3: *P. angulata* (井原), 4: *P. angulata* (山口), 5: *P. aptata*, 6: 生理食塩水, 7: *P. cichorii*, 8: *P. coronafaciens*, 9: *P. coronafaciens* var. *atropurpurea*, 10: *P. eriobotryae*, 11: *P. fluorescens*, 12: *P. glumae*, 13: *P. lachrymans*, 14: *P. marginalis*, 15: *P. marginata*, 16: *P. mori*, 17: *P. phaseolicola*, 18: *P. setariae*, 19: *P. solanacearum*, 20: *P. strifaciens* var. *japonica*, 21: *P. syringae*, 22: *P. tabaci* (6602), 23: *P. tabaci* (6604), 24: *P. tabaci* (7246), 25: *P. viridiflava*, 26: *P. woodsii*

種の細菌は、生菌抗原の場合には多くの種が不明瞭な数種の非特異的沈降帯を形成したが、加熱抗原の場合にはこれらの非特異的沈降帯を消失したものが多かった。一方 *P. setariae* および *P. solanacearum* のように新たに非特異的な沈降帯を生じたものがあった。またスライド凝集反応とゲル内沈降反応との間の関係は明らかではなかった。

蛍光抗体染色法では、萎ちょう細菌病菌のみが特異的に黄緑色に染色された (第3図-4)。

蛍光抗体染色法の検出精度

第5表に示すように、いずれの場合も 1ml 中に 2.3×10^3 cells の細菌数があれば、検定液中の細菌の検出は可能であった。生理食塩水の細菌の検出は、他の細菌や夾雑物の混在した茎磨砕汁液中の細菌より蛍光顕微鏡下



第2図 接種茎1cm中の病原細胞の増殖速度 (1979年, 1月; 15~20°C)

第5表 各種液中に懸濁した萎ちょう細菌の蛍光抗体染色法による検出精度

試料	細菌数/ml	希 釈 倍 数					
		$\times 10^{-0}$	$\times 10^{-1}$	$\times 10^{-2}$	$\times 10^{-3}$	$\times 10^{-4}$	$\times 10^{-5}$
生理食塩水	1	4.0×10^6	+	+	+	+	—
	2	3.0×10^6	+	+	+	+	—
	3	2.3×10^6	+	+	+	+	—
細菌懸濁液	2.3×10^6	+	+	+	+	—	—
茎磨砕汁液	2.3×10^6	+	+	+	+	—	—

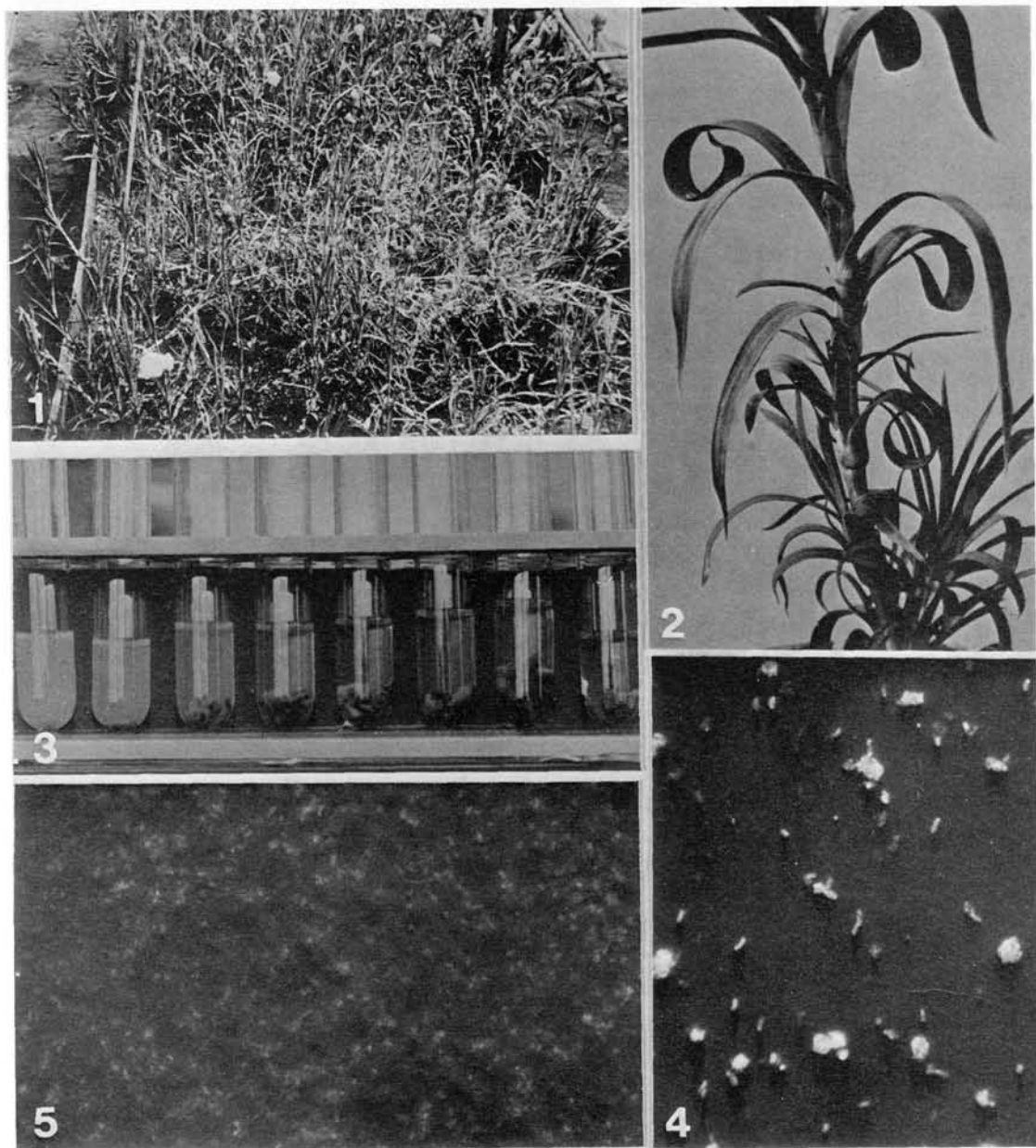
※ 検出されたもの+, されないもの—。

では難しかった。茎磨碎汁液中には、赤色の自家蛍光を発する葉緑素や植物組織が多数含まれていたが、萎ちょう細菌病菌は黄緑色の特異蛍光とその形状から検出は比較的容易であった(第3図-5)。なお、茎磨碎汁液1ml中に 2.3×10^8 cellsの細菌は、茎1cmに5mlの殺菌水を加えて作製したものであるので、茎1cmに 1.2×10^4

cellsの細菌が存在するものから得られたものと同様である。

萎ちょう細菌病菌の茎中での増殖

第2図に示したように、茎中に少数(10^0 - 3 cells)の細菌が接種されると、茎内で急速に増殖し、約10日後には 10^8 レベルまで達するが、それ以降は接種部の細菌数



第3図 1. 温室での発生状況, 2. 低温時の本病の特徴 (stem cracking), 3. 抗血清併用切片テスト法による保菌検定 (白濁したものは細菌の生育), 4. 蛍光抗体染色された *P. caryophylli*, 5. 茎磨碎汁液中の *P. caryophylli*

には顕微増減は認められなかったが、接種部の上部または下部に移動していた。接種後15日頃から接種部に細菌粘塊の溢出が認められ、20～30日後には亀裂が生じた（第3図-2）。これは本病の低温時における特徴的な病徴の1つであった。

また、細菌数計数に用いた茎磨碎汁液をスライドグラスに塗布し、前記の蛍光抗体染色を行なった結果、接種後4～5日後から本菌を検出した。この頃は接種部茎に 10^{4-5} cellsの細菌を保菌しており、蛍光抗体染色法の検出精度の結果に一致した。

考 察

肉眼検査を主体とする輸入検査においては、無病徴の植物体に潜在している病原細菌の検出は極めて困難である。従来、植物検疫においては植物病原細菌の診断にスライド凝集反応などの簡易な血清学的方法が利用され、効果をあげているが、無病徴の植物体に潜在する病原細菌のように数が少ない場合は、スライド凝集反応のような簡易な方法では診断は不可能であった（松濤ら、1962；小畑、1968）。

抗血清併用切片テスト法は、低密度の保菌切片でも培養することにより細菌を増殖させ、スライド凝集反応により増殖した細菌を簡易的に同定し、検定を行なうものである。萎ちょう細菌病菌はPD培地中での生育はよく、少数の細菌でも培地中に存在すれば、2～3日間の培養により培地が白濁し、スライド凝集反応でも判定出来る菌数（ 10^{7-8} cells/ml）に達し、検出が可能となる。しかし、本法による輸入カーネーションの検定では、本抗血清に凝集性のある非病原性の *Pseudomonas* 属細菌が発見されたが、一応吸収試験によりこのようなカーネーションに付着する雑菌の類属凝集反応の検定への影響は除去され、吸収抗血清の有効性が確認されたが、類属凝集性を有する細菌を含めて多数の細菌が培養により認められた。これらの細菌の萎ちょう細菌病菌の増殖への影響が考えられるため、今後表面殺菌法の改良、選別培地の利用などを検討しなければならない。

一般に細菌の抗原は複雑であり、鞭毛性、菌体性、病原性など種々の抗原決定基を有しているため、無処理の生菌抗原を家兎に注射して作製した本抗血清は、Friedman (1953) の結果と同様に *Pseudomonas* 属の植物病原細菌にかなり広い類属凝集反応を示し、生菌抗原を用いたゲル内沈降反応では数種の共通沈降帯を形成した。また萎ちょう細菌病菌は、ゲル内沈降反応で数本の沈降帯を形成し、数種の抗原決定基を有していることが確認された。加熱抗原を用いたゲル内沈降反応では、生菌抗原の場合に表われた共通沈降帯が消失したものがあり、こ

れらは易熱性の抗原によるものと考えられる。このように本抗血清は萎ちょう細菌病菌の種々の抗原決定基に対する抗体を有しているため、簡易的な同定に利用するためには、その性質について、充分検討しなければならない。また、抗血清を作製するときには生菌抗原より特異性の高い加熱抗原、リボゾーム（Schaad, 1976）などの抗原を利用する必要がある。

本実験で作製した蛍光抗体は、スライド凝集反応およびゲル内沈降反応で認められた非特異的な抗体を含んでいると考えられるが、萎ちょう細菌病菌のみを反応し、特異性が極めて高かった。これは蛍光抗体作製過程や、蛍光抗体染色時に希釈されたためにその能力を表わさなかったものと考えられる。

カーネーション茎の磨碎汁液の蛍光抗体染色を行い、この中に含まれる1個の細菌（図3-5）の存在が確認できるが、スライドグラス上に固定された少数の細菌を蛍光顕微鏡下で検出することは難しく、実際には1ml中に 2.3×10^8 cellsの細菌を含んだ試料から細菌の検出が出来た。これは長時間の蛍光観察で蛍光が弱まったり、夾雑物の影響のためと考えられる。また茎1cmに殺菌水5mlを加えて得た磨碎汁液による検定では、茎1cmに 1.2×10^4 cells以上の細菌が存在せねばならず、茎磨碎汁液による保菌挿穂・菌の検定は充分であるとは言えない。しかし、蛍光抗体染色法は、無病徴の保菌茎からわずか2～3時間内に保菌検定が可能であり、優れた方法である。

大量のものを迅速かつ正確に検査する必要のある輸入検疫には有効な手段であると考えられる。

なお、萎ちょう細菌病菌の血清型については、今まで報告もなく、また本実験に供試した抗血清は神奈川県産の萎ちょう細菌病菌12菌株と強く反応し、血清型の存在は明瞭に確認されなかったが、今後さらに検討する必要がある。

摘 要

カーネーション萎ちょう細菌病菌の生菌抗血清を作製し、無病徴の保菌挿穂・苗から本菌を検出した。本生菌抗血清を用いた抗血清併用切片テスト法により、輸入カーネーション挿穂・苗の保菌検定を行なったところ、本法は優れた方法ではあるが、類属凝集性のある *Pseudomonas* 属が発見されたが、この菌を用いた吸収試験は有効であった。

つぎに、本抗血清の血清学的性質を各種植物病原細菌を用い、スライド凝集反応、ゲル内沈降反応および蛍光抗体染色法によって検討したところ、スライド凝集反応およびゲル沈降反応では、hetelogenousな抗原が *Pseudo-*

monas 属に存在していることが明らかになったが、蛍光抗体染色法は高い特異性を有していた。スライド凝集反応では、homologous な抗原は 1,280 倍であるのに比し、hetelogenous な抗原は 20~80 倍であった。ゲル内沈降反応では、加熱抗原の方が生菌抗原より特異的であった。

蛍光抗体染色された萎ちょう細菌病菌は茎磨碎汁液 1 ml にわずか 2.3×10^3 cells 含まれている細菌でも短時間に検出が可能であり、本法は迅速かつ正確な検出法である。

引用文献

- 鍵渡徳次, 土屋行夫 (1968) カーネーション萎ちょう細菌病の発生とその防除, 植物防疫 **22**: 21-24.
- FRIEDMAN, B.A. (1953) Serological tests with some phytopathogenic species of *Pseudomonas*, Phytopathology **43**: 412-414.
- 菊本敏雄 (1870) 蛍光抗体法による土壌病害検診, 植物防疫 **24**: 18-20.
- 国立予防衛生研究所学友会編 (1964) ウイルス実験学総論, 丸善, 東京.
- 松濤美文, 佐々木邦雄 (1962) 圃場検査にうけるジャガイモ輪腐病の血清による診断方法, 植防研報 **2**: 33-40.
- NELSON, P.E., J. TAMMEN, and R. BAKER (1960) Control of vascular wilt disease of carnation by culture-indexing, Phytopathology **50**: 356-360.
- 西村十郎 (1971) 切片テスト法によるカーネーション無病菌判定, 農業及び園芸 **46**: 73-78.
- 西村十郎 (1973) カーネーション萎ちょう細菌病の発生生態と防除, 農業及び園芸 **48**: 68-72.
- 西村十郎・脇本 哲 (1971) カーネーション萎ちょう細菌病の発生生態に関する研究 1. カーネーション萎ちょう細菌病ファージの特性および増殖について, 日植病報 **37**: 301-306.
- 小畑琢志 (1968) ヒヤンシス黄腐病とその抗血清による診断, 植防研報 **5**: 7-17.
- 大田光輝 (1978) カーネーション萎ちょう細菌病防除に関する研究 (第1報), 静岡県における発生状況および分離病原細菌の性質, 静農試報 **23**: 66-72.
- 劉 和元 (1970) 植物ウイルス研究分野における蛍光抗体法の応用, 植物防疫 **24**: 40-43.
- SCHAAD, N.W. (1976) Immunological comparison and characterization of ribosomes of *Xanthomonas vesicatoria*, Phytopathology **66**: 770-776.
- 富永時任 (1971) 日本における牧草および飼料作物の病害に関する研究 II 日本における牧草および飼料作物細菌病の病原学的研究, 農技研報 C **25**: 205-315.