

Phytophthora 属菌の血清学的検出法

および同定法に関する研究

III. ELISA による植物組織中の *Phytophthora syringae* KLEB. の検出*

君 島 悦 夫・西 尾 健
高 山 睦 雄・長 尾 記 明

横浜植物防疫所

Studies on Serological Detection and Identification Methods for Species of *Phytophthora*. III. Detection of *Phytophthora syringae* in Plant Tissues by Means of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Etsuo KIMISHIMA, Takeshi NISHIO, Mutsuo TAKAYAMA and Noriaki NAGAO (Yokohama Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 20: 1-6. (1984)

Abstract: Two types of antisera, previously prepared for soluble (S) and crude cell-wall (CW) antigens from *Phytophthora syringae* (NISHIO *et al.*, 1983), were used in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to compare the serological specificity of them and to detect the fungus in plant tissues. 25 fungal isolates, including 10 isolates (7 species) of *Phytophthora*, 5 isolates (5 species) of *Pythium*, and 10 isolates (10 species) of other genera, were used. Of 25 fungi tested in the assay, all significant reaction was restricted to species of the genus *Phytophthora*, excluding *P. macrospora*. No or negligible reaction was obtained with representative isolates of 11 genera, including *Pythium*, *Aphanomyces*, *Botrytis*, *Rhizoctonia*, *Phomopsis* and *Verticillium*. S antiserum has a higher serological specificity than that of CW antiserum. The assay with S antiserum could be used to detect 0.1 $\mu\text{g/ml}$ (as a protein content) antigen, and to detect *P. syringae* in infected apple fruit and lilac leaf tissue.

ま え が き

Phytophthora 属菌の中には形態観察や培養上の性質だけではその分類・同定が難しいものがあり、最近、菌体から調整した可溶性タンパク質の電気泳動法 (MASAGO and YOSHIKAWA, 1983; 諸方ら, 1983) や、血清学的方法 (MALAJCZUK *et al.* 1975; MERZ *et al.* 1969) の試験結果を分類・同定の一助にしようとする試みがなされている。著者らは植物検疫場面での *Phytophthora* 属菌の検出および同定に、血清学的方法が利用できないか試験を続けている。

Phytophthora syringae (KLEBAHN) KLEBAHN は冷涼地でリンゴ・ナシなどの果樹類を侵し (WATERHOUSE, and WATERSTON, 1964), 我国未発生でその侵入を警戒している疫病菌の一つであるが、

この菌の抗血清を作製して行なったゲル内拡散法および蛍光抗体法による試験結果についてはすでに報告した (西尾ら, 1983 a, b)。

近年植物ウイルスや植物病原細菌の検出法としてよく利用され、また植物病原糸状菌の検出・同定にもその利用が検討されている (CASPER, and MENDGEN, 1979; NACHMIAS *et al.* 1979; JOHNSON *et al.* 1982) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) が、*Phytophthora* 属菌の検出・同定に利用できないかを検討した。本試験では作製した抗血清の ELISA における血清学的特異性の検討、および ELISA による罹病植物組織からの *P. syringae* の検出を試みたのでここに報告する。

なお、本試験を行なうにあたり有益な御助言を賜った京都府立大学正子教授、並びに貴重な菌株を譲下された大阪府立大学一谷多喜郎博士および宇都宮大学寺中理明教授、また終始御指導を賜った前当所病菌課長小林敏郎博士に心より御礼申し上げる。

* 本報告の概要は昭和 57 年度日本植物病理学会大会において発表した。

材料および方法

1. 供試菌株

本試験では前報(西尾ら, 1983b)で用いた, Table 1に示す *Phytophthora* spp. 8種10菌株, *Pythium* spp. 5種5菌株, その他の菌10種10菌株, 計23種25菌株を供試した。*P. syringae*, *P. erythrosetpica* および *Nectria haematococca* は Commonwealth Mycological Institute (CMI) および American Type Culture Collection (ATCC) より農林水産大臣の特別許可を得て導入した*。その他の菌は財団法人発酵研究所 (IFO), 大阪府立大学一谷博士および宇都宮大学寺中教授より分譲を受けたもの, 並びに当所病原菌にて保存中のものを使用した。

2. ELISA の手順

ELISA に使用した器具・薬品および手順は, すべて CLARK and ADAMS (1977) に準じた。

ELISA には, 1試料当りマイクロプレートの2穴を用いた。反応終了時にはこの2穴分の反応液を1本の小試験管に取り, 2.5 ml の水を加え光路長 10 mm の石英セルを用いて, 波長 405 nm で測定した吸光度を ELISA 価とした。

γ-グロブリンと酵素の結合

西尾ら (1983a) が作製した *P. syringae* 131191 の可溶性分画 (S) 抗血清および粗細胞壁分画 (CW) 抗血清 (両抗血清とも力価はリングテスト法で 16-32 倍) より γ-グロブリンを純化した。純化 γ-グロブリンとアルカリ性リン酸分解酵素 (Alkaline phosphate. Type VII. Sigma 社製) の結合は次の手順によった。酵素の硫酸懸濁液を遠心し, その沈澱に純化 γ-グロブリン溶液を加え (混合比 2.5:1 W/W) 溶解し, 4℃ 30 分間放置後, 0.02 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に対し透析した。この溶液にグルタルアルデヒドを最終濃度が 0.2% となるように加えて, 20℃ 2 時間静置後, 0.02 M PBS に対し透析しさらに 0.05 M トリス緩衝液 (pH 8.0) に対して十分に透析した。この酵素結合 γ-グロブリン溶液は酵素タンパク質の濃度が 1 mg/ml になるように調整し, 小牛血清アルブミン (1%) および窒化ナトリウム (0.05-0.1%) を加え, それを調整原液として 4℃ で保存した。

菌体から調整した抗原の濃度測定

ELISA に供試する試料は, 前報 (1983a) の方法に準じて可溶性分画 (S 抗原) を調整した。試料中のタンパク質濃度の測定法を検討するため, *P. syringae* の S 抗原を用い LOWRY らの方法 (1951) と UV 法 (280 nm) (日本化学会編, 1978) とを比較した。その結果, UV 法で光路長 10 mm の石英セルを用い $OD_{280}=6$ の時, Lowry らの方法ではタンパク質濃度 1 mg/ml となった。この測定値の相関関係が他種菌の S 抗原にも適用できるかどうか調べるため, UV 法で $OD_{280}=0.6$ に調整した 8 種 (*Phytophthora capsici*, *P. parasitica* var. *nicotianae*, *Pythium irregulare*, *Py. vexans*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum graminicola*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahliae*) の S 抗原のタンパク質濃度を LOWRY らの方法で測定し比較した。その結果, 菌種により多少の振れはあったが $100 \pm 30 \mu\text{g/ml}$ となり大きなばらつきは認められなかったので, 以後のタンパク質の濃度測定は簡便な UV 法により行なった。

3. 罹病組織からの検出

P. syringae をライラック葉とリンゴ果実に接種し, それらを 18-20℃ で 5-7 日間湿室に静置した。これらの罹病組織および健全組織に, PVP-40 (Polyvinyl pyrrolidone, M.W. 40,000) が 0.2% になるように添加した PBS-Tween (PBS に Tween 20 を 0.05% となるように加えた液) の摩砕液を加えてすり鉢で摩砕し, 各摩砕液の上清液を検出試験に用いた。

結 果

1. コーティング γ-グロブリンおよび酵素結合 γ-グロブリン濃度の検討

P. syringae 131191 と *Colletotrichum graminicola* の S 抗原を $OD_{280}=0.6$ に調整し, コーティング γ-グロブリンおよび酵素結合 γ-グロブリンの最適濃度を検討した。コーティング γ-グロブリンは 10 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 2.5 $\mu\text{g/ml}$, および 1.25 $\mu\text{g/ml}$ の 4 区について, また酵素結合 γ-グロブリンは調整原液の 100 倍, 200 倍, 400 倍および 800 倍の 4 区について検討した。

S 抗血清を用いた試験結果は Fig. 1 のとおりである。コーティング γ-グロブリン濃度は 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 以下では ELISA 価が低くなり, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ においては大きな差が認められなかった。しかし, 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度では対照として用いた *C. graminicola* の ELISA 価が高くなり, 非特異発色と考えられたので, 5 $\mu\text{g/ml}$ が

* 許可番号 54 横植第 1430 号, 第 1431 号および第 1397 号

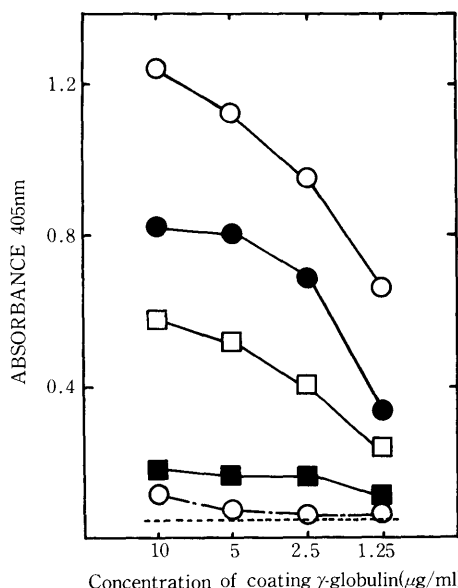


Fig. 1 Reaction in ELISA of S-antigen from *P. syringae* 131191 (—○—), and *Colletotrichum graminicola* (—□—) as control, at different concentrations of coating and enzyme-conjugate γ-globulin. Both γ-globulin solutions were prepared from soluble (S) antiserum. Protein concentration of S-antigen was adjusted to 100 μg/ml ($OD_{280}=0.6$). Dilution rate of enzyme-conjugate γ-globulin solution was indicated below, ○: 1/100, ●: 1/200, □: 1/400, ■: 1/800. The dashed line represents the level of background readings in the absence of antigens.

最適であると判断した。一方、酵素結合 γ-グロブリンは 800 倍希釈では ELISA 価が低く、高濃度になるにつれ ELISA 価は高くなった。しかし、100 倍希釈では *C. graminicola* で非特異発色の認められることがあり、200 倍希釈が最適であった。これらのことから以後の試験では、コーティング γ-グロブリン濃度は 5 μg/ml、酵素結合 γ-グロブリンは原液の 200 倍希釈液を用いた。なお、CW 抗血清の試験でもほぼ同じ結果であったので、S 抗血清と同じ条件で使用した。

2. *P. syringae* S 抗原の検出限界

P. syringae 131191 および *Botrytis cinerea* の S 抗原を用い、*P. syringae* の S 抗原の検出限界を調べた。 $OD_{280}=0.6$ に調整した原液を PBS-Tween で 10 倍に段階希釈し供試した。その結果、Fig. 2 に示すように *P. syringae* は抗原濃度 1 μg/ml まで 0.4 以上の

ELISA 価を示し、対照として用いた *B. cinerea* とは明瞭な差があった。0.1 μg/ml の濃度では 0.17 となり *B. cinerea* の 0.10 よりわずかに高い ELISA 価を示した。したがって *P. syringae* の S 抗原は 0.1 μg/ml まで検出が可能であった。

3. 供試抗血清の血清学的特異性

25 菌株の S 抗原を供試して、S および CW 両抗血清の血清学的特異性を比較した。菌糸の摩擦液および抗原濃度を調整するための希釈液は PBS-Tween+2% PVP 液を用いた。供試菌の S 抗原はすべて $OD_{280}=0.6$ に調整した。

その結果、Table 1 に示すように 2 種の抗血清は *Phytophthora* 属菌とのみ反応し、*Pythium* 属 5 菌株および他属の 10 菌株とは反応しなかった。*Phytophthora* 属菌の菌株間の ELISA 価を比較した場合、S 抗血清を用いたときはホモ抗原である *P. syringae* 131191 が 0.50 と最も高く、次いで他の *P. syringae* 2 菌株および *P. capsici* が 0.38~0.39 と比較的高かった。*P. castaneae*, *P. erythrocephala*, *P. palmivora*, *P. parasitica* var. *nicotianae*, *P. porri* の 5 種は 0.16~0.22 と低い

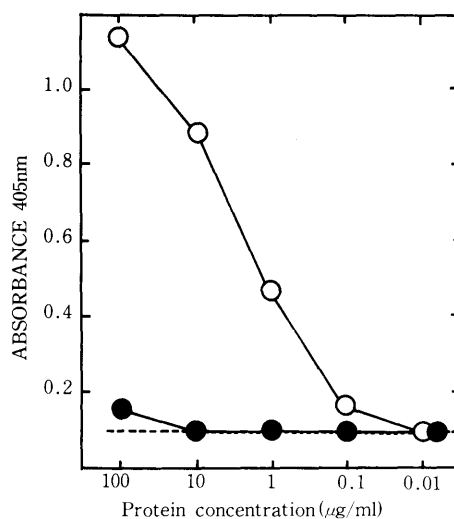


Fig. 2 ELISA values for extracted preparations of *P. syringae* 131191 diluted with PBS-Tween (○), and *Botrytis cinerea* (●) used as negative control. Protein concentrations in the extracted preparations were adjusted initially to 100 μg/ml ($OD_{280}=0.6$) and diluted. Soluble (S) antiserum was used. The dashed line represents the level of background readings in the absence of antigens.

Table 1 ELISA value for mycelial antigens prepared for various fungi^{a)}

Species and isolate number	Source ^{b)}	Type of antisera	
		Soluble antiserum	Cell wall antiserum
<i>Phytophthora syringae</i> 131191	CMI	0.50 ^{c)}	0.67
<i>P. syringae</i> 34002	ATCC	0.39	0.72
<i>P. syringae</i> 62472	CMI	0.38	0.60
<i>P. capsici</i> 8386	IFO	0.38	0.80
<i>P. castaneae</i> 9753	IFO	0.19	0.34
<i>P. erythroseptica</i> 181716	CMI	0.22	0.47
<i>P. macrospora</i> 9049	IFO	0.03	0.08
<i>P. palmivora</i> 9755	IFO	0.20	0.50
<i>P. parasitica</i> var. <i>nicotianae</i> 4873	IFO	0.16	0.35
<i>P. porri</i> 30416	IFO	0.20	0.66
<i>Pythium aphanidermatum</i> 7030	IFO	0.02	0.02
<i>Py. cucurbitacearum</i> 23	OPU	0.02	0.02
<i>Py. irregulare</i> 30346	IFO	0.02	0.02
<i>Py. ultimum</i> 10034	OPU	0.02	0.05
<i>Py. vexans</i> 7	OPU	0.02	0.01
<i>Aphanomyces euteiches</i>	UU	0.02	* ^{d)}
<i>Botrytis cinerea</i>	YPPS	0.02	0.03
<i>Colletotrichum graminicola</i> C8-2-1	YPPS	0.00 ^{e)}	0.01
<i>Fusarium oxysporum</i> 7157	IFO	0.00	0.01
<i>F. solani</i> f.sp. <i>mori</i> 7708	IFO	0.00	0.00
<i>Nectria haematococca</i> 18280	ATCC	0.00	0.00
<i>Phomopsis</i> sp.	YPPS	0.01	0.03
<i>Rhizoctonia solani</i>	YPPS	0.01	0.04
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	YPPS	0.00	0.02
<i>Verticillium dahliae</i>	YPPS	0.01	0.01
PBS-Tween control		0.00	0.00

^{a)} Soluble (S) antigens, prepared from homogenated mycelia of each species and isolate were used. Protein concentration of each antigen was adjusted to 100 $\mu\text{g/ml}$ ($\text{OD}_{280} = 0.6$).

^{b)} Stock culture of CMI: Commonwealth mycological institute, ATCC: American type culture collection, IFO: Institute for fermentation, Osaka, OPU: Osaka prefectural university (Plant pathological lab.), UU: Utsunomiya university (Plant pathological lab.), YPPS: Yokohama plant protection station (Research division).

^{c)} Absorbance value at 405 nm.

^{d)} Not tested.

^{e)} Zero indicates reading same or less than that of control.

ELISA 価を示した。 *P. macrospora* は全く反応しなかった。

一方、CW 抗血清ではホモ抗原である *P. syringae* 131191 は 0.67 であったのに対し、 *P. capsici*, *P. syringae* 2 菌株、 *P. porri* の 3 種 4 菌株は 0.60~0.80 と高い ELISA 価を示した。 *P. castaneae*, *P. erythroseptica*, *P. palmivora*, *P. parasitica* var. *nicotianae* の 4 種は

0.34-0.50 と *P. syringae* 131191 と比較してやや低い ELISA 価であった。 *P. macrospora* はほとんど反応しなかった。

4. 罹病組織からの *P. syringae* の検出

S 抗血清を用いて罹病組織から *P. syringae* の検出を試みた。組織量 1 g に対し摩砕液 10 ml を加えて調

整した試料を10倍液として、50, 250, 1250, 6250倍の希釈液を作成した。結果はFig. 3のとおりで、リンゴおよびライラックの罹病部試料は10倍液で各々0.53, 0.40と高いELISA値を示し、健全部試料はほとんど反応しなかった。健全部試料の非特異発色はリンゴでは認められなかったが、ライラックでは10倍希釈液で0.13とわずかに認められた。

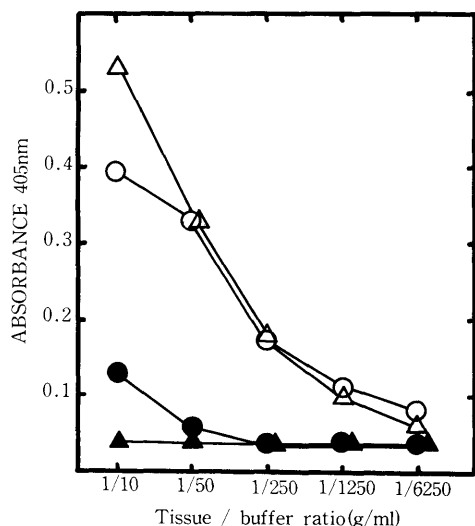


Fig. 3 ELISA value ($A_{405\text{ nm}}$) of *Phytophthora syringae* antigens in extracts of apple and lilac tissues prepared with different ratios of extracting buffer to tissue. The necrotic parts of apple fruit (△) and lilac leaf (○) infected with *P. syringae*. Healthy apple fruit (▲) and lilac leaf (●). Soluble (S) antiserum was used.

考 察

抗血清の血清学的な特異性を検討する場合は、抗原物質の濃度を一定にして試験する必要がある。本試験に用いたS抗原の抗原物質が何であるか明らかでないので、通常抗原物質として最も重要と思われるタンパク質の濃度をほぼ一定にした条件下で試験を行なった。本試験におけるELISAの反応条件(S抗原濃度: $OD_{280}=0.6$, コーディング γ -グロブリン $5\mu\text{g/ml}$, 酵素結合 γ -グロブリン200倍希釈液)では、予備試験の結果 *Phytophthora* 属以外の菌はほとんど反応が認められず、抗原濃度を変えてもやはり反応しなかった。*P. macrospora*を除く *Phytophthora* 属菌では、その濃度を10倍に希釈した場合($OD_{280}=0.06$)においても

ELISA値は20-40%低下する程度でよく反応した。また、S抗原のELISA値は培養日数や培養基を変えても大きな変動はなかった(君島ら, 未発表)。これらのことから、ELISA値はS抗原中の抗原の量的な差よりも質的な差に大きく依存するものと推察される。

P. syringae 131191のSおよびCWの両抗血清は *Phytophthora* 属菌以外のS抗原とは反応せず、属特異性が高かった。しかし、*P. macrospora*は両抗血清ともほとんど反応せず、供試した *Phytophthora* 属8種10菌株の中では大きく異なっていた。この結果は今までに報告したゲル内拡散法および蛍光抗体法での結果と一致した(西尾ら, 1983a, b)。 *Phytophthora* 属菌の反応程度により両抗血清の特異性を比較すると、S抗血清の場合はホモ抗原である *P. syringae* 131191が最も高く、次いで *P. syringae* 2菌株と *P. capsici*が比較的高いELISA値を示した。その他の *Phytophthora* 属菌は *P. syringae* 131191の反応程度と比較して30~44%であったことから、S抗血清にはある程度の種特異性が認められた。一方、CW抗血清では *P. syringae* 131191の場合と比較して、*P. capsici*, *P. porri*もホモ抗原と同程度の高いELISA値を示し、種特異性は認められなかった。

CW抗血清を用いた蛍光抗体法の場合では、*Pythium vexans*で吸収したときのみ初めて属特異的の反応が認められたが(西尾ら, 1983b), ELISAでは吸収しなくても属特異的の反応が認められた。したがって、ELISAでは抗血清の反応特異性がより高くなると思われる。

*P. syringae*に罹病したリンゴ果実やライラック葉の植物組織からELISAにより十分に本菌を検出できたことから、疫病の診断にELISAは迅速で有効な方法と思われる。疫病菌の罹病組織からの分離に際しては、細菌や雑菌類との混合が多々見られ真の病因の診断に困難をきたす場合が多いが(桂, 1971), このような場合でもELISAでは疫病菌抗原があれば反応が認められると思われる。また、*Phytophthora* 属菌の同定を行なう場合、遊走子のうや藏卵器・藏精子などの無性・有性器官の形態観察が重要である。しかし、種によってはそれらの器官を形成しにくい菌もあり、同じPythiaceae科の *Pythium* 属菌と類似点も多く判別が困難なこともある。このような場合にELISAは *Phytophthora* 属菌と *Pythium* 属菌とを容易に判別できる方法と考える。

今後、ある程度の種特異的な反応の認められたS抗血清を用いて、*Phytophthora* 属菌の種の同定にELISAが利用できるかどうか検討したい。

摘 要

Phytophthora 属菌の検出・同定に抗血清が利用できるか、ELISA を用い検討した。抗血清は西尾ら (1983a) が *Phytophthora syringae* 131191 の可溶性分画 (S) および粗細胞壁分画 (CW) を抗原として作製したものを使用した。

Phytophthora 属 7 種 10 菌株, *Pythium* 属 5 種 5 菌株, その他の属 10 種 10 菌株, 計 25 菌株を供試した。試験の結果, *P. macrospora* を除く *Phytophthora* 属菌株にのみ反応が見られた。*Pythium*, *Aphanomyces*, *Verticillium* など供試 11 属 15 菌株は反応しなかった。

S および CW 両抗血清の血清学的特異性を比較したとき, S 抗血清の方がより高い特異性を示した。

ELISA によりタンパク濃度 $0.1 \mu\text{g/ml}$ までの抗原を検出できること, また罹病植物組織中から *P. syringae* を検出できることが判明した。

引 用 文 献

- CASPER, R. and K. MENDGEN (1979) Quantitative serological estimation of a hyperparasite: Detection of *Verticillium lecanii* in yellow rust infected wheat leaves by ELISA. *Phytopath. Z.*, 94, 89-91.
- CLARK, M.F. and A.N. ADAMS (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. gen. Virol.* 34: 475-483.
- JOHNSON, M.C., T.P. PIRONE, M.R. SIEGEL and D.R. VARNEY (1982) Detection of *Epichloë typhina* in tall fescue by means of enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathology*. 72: 647-650.
- 桂 琦一 (1971) 植物の疫病, 誠文堂新光社, 東京,

pp. 23-28

- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- MALAJCZUK, N., A.J. McCOMB and C.A. PARKER (1975) An immunofluorescence technique for detecting *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Aust. J. Bot.* 23: 289-309.
- MASAGO, H. and YOSHIKAWA, M. (1983) Fungal cytoplasmic proteins as a marker for classification and identification of *Phytophthora* species. The third international mycological congress. 176p (Abstracts)
- MERZ, W.G., R.G. BURRELL and M.E. GALLEGLY (1969) A serological comparison of six heterothallic species of *Phytophthora*. *Phytopathology* 59: 367-370.
- NACHMIAS, A., M. BAR-JOSEPH, Z. SOLEL and I. BARASH (1979) Diagnosis of mal secco disease in lemon by enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathology* 69: 559-561.
- 日本化学会編 (1978) 新実験化学講座, 生物化学 [1] 丸善, 東京: pp. 130-140.
- 西尾 健・川口嘉久・君島悦夫・高山睦雄・末次哲雄 (1983a) *Phytophthora* 属菌の血清学的検出法および同定法に関する研究 I. *Phytophthora syringae* 抗血清の作製とその寒天ゲル内拡散法における反応. 植防研報 19: 47-53.
- 西尾 健・君島悦夫・高山睦雄・末次哲雄 (1983b) *Phytophthora* 属菌の血清学的検出法および同定法に関する研究 II. *Phytophthora syringae* の蛍光抗体法による検出. 植防研報 19: 55-62.
- 緒方仁美・正子 朔・伊達寛敬 (1983) ナスに根腐萎ちょう症状を起こす疫病菌の同定. 日植病報 49: 391, (講要)
- WATERHOUSE, G.M. and J.M. WATERSTON (1964) *Phytophthora syringae*. C.M.I. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria No. 32.