

数種 *Aphanomyces* 属菌株間の血清学的 類縁関係について*

小林 慶範・君島 悦夫
川合 昭・西尾 健

横浜植物防疫所

Serological Relationship of Some Fungi of the Genus *Aphanomyces*. Yoshinori KOBAYASHI, Etsuo KIMISHIMA, Akira KAWAI and Takeshi NISHIO (Yokohama Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 24: 15-20 (1988).

Abstract: Nine isolates (3 species) of *Aphanomyces*, 5 isolates (4 species) of *Phytophthora*, 8 isolates (6 species) of *Pythium* and 1 isolate of *Peronophythora* were studied serologically by means of gel diffusion test, indirect immunofluorescence method and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Antiserum was prepared for soluble antigen (S-antigen) from *Aphanomyces euteiches* (U-1), and adsorbed with S-antigen from *Phytophthora erythroseptica*.

In gel diffusion test, all tested S-antigens of isolates of *Aphanomyces* spp. formed sharp single precipitin line in 0.3% SDS agar plate, and others did not form.

In indirect immunofluorescence method, when the γ -globulin solution was diluted up to appropriate concentration, only hyphae of *Aphanomyces* spp. showed intense fluorescence.

In ELISA S-antigens of 4 isolates of *A. euteiches* and 2 isolates of *A. cochlioides* strongly and 3 isolates of *A. iridis* weakly reacted with adsorbed antiserum, but, others did not react.

These results show 3 species of *Aphanomyces* serologically related and that the genus *Aphanomyces* can be identified by serological means.

緒 言

形態的特徴や培養上の性質による分類・同定が困難な種が含まれる *Phytophthora* 属菌や *Pythium* 属菌を血清学的な手法あるいは電気泳動法などによって分類・同定を行おうとする試みは、近年多数報告されている (GILL and ZENTMYER, 1978; KRYWIENCYK and DORWORTH 1980; MALAJCZUK *et al.*, 1975; MASAGO and YOSHIKAWA, 1983; MERZ *et al.*, 1969; WHITE, 1976)。

筆者らは、植物検疫において糸状菌の検出・同定に抗血清を利用する試みを続けている。西尾らは *Phytophthora syringae* の抗血清を作製し、その寒天ゲル内拡散法における反応を検討し (1983a)、さらにまた蛍光抗体法による本菌の検出についても検討した (1983b)。君島ら (1984) は *P. syringae* 抗血清を用いて、ELISA によりその特異性を検討し、*Phytophthora* 属菌には属特異的抗原が存在し、血清学的な検出・同定が可能であると報告している。

今報告では、*Phytophthora* 属菌や *Pythium* 属菌に近縁な *Aphanomyces* 属菌について、その血清学的な性質を調べた。エンドウの根腐病、テンサイ黒根病、イリス黄化腐敗病などの病原菌である *Aphanomyces* 属菌は、その形態的特徴が *Pythium* 属菌と類似する点が多く、同定には経験と時間を要する。また、土壌中で両菌が混在しているとその分離はきわめて困難である (JONES and DRECHSLER, 1925)。本試験では、*Aphanomyces euteiches* DRECHSLER の抗血清を作製し、寒天ゲル内拡散法、蛍光抗体法および ELISA により数種の *Aphanomyces* 属菌の菌株間および *Phytophthora* 属菌や *Pythium* 属菌との血清学的類縁関係ならびに本菌の血清学的手法による分類・同定の可能性について検討したので報告する。

なお、試験を行うに当たり有益な御助言ならびに貴重な菌株を分譲賜った大阪府立大学一谷多喜郎先生、貴重な菌株を分譲賜った宇都宮大学寺中理明先生、東日本学園大学横澤菱三先生、北海道農業試験場築尾嘉章氏に深く感謝の意を表する。

* 本報告の概要は昭和62年度日本植物病理学会大会において発表した。

材料と方法

供試菌株

本試験に供試した *Aphanomyces euteiches*, *A. cochlioides*, *A. iridis* の3種9菌株, *Phytophthora* 属菌4種5菌株, *Pythium* 属菌6種8菌株は, 宇都宮大学, 大阪府立大学, 東日本学園大学, 北海道農業試験場および財団法人大阪発酵研究所より分譲を受けたものを用いた。また, *Phytophthora erythroseptica* および *Phytophthora syringae* は Commonwealth Mycological Institute (CMI) より農林水産大臣の特別認可**を受けて導入し, *Peronophythora litchii* は当所病菌課で分離した菌株(小林ら, 1986)を用いた。

血清学的試験

Aphanomyces euteiches 抗血清は U-1 菌株を用い, 西尾ら(1983a)の方法に準じて作製した。ジャガイモ煎汁液体培地(PS)で7~14日間25°Cで振とう培養した菌糸をプフナーロートで集め, リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で3回洗浄後, 少量のPBSを加えワーリングブレンダーおよびヒスコトロン(日音医理器械製作所社製)で破碎した。破碎液を10,000×g, 10分間遠心分離し, その上清(可溶性分画:S分画)を抗原(S抗原)とし, ウサギに免疫した。得られた抗血清の力価測定はリングテスト法で行い, その力価は128倍であった。

予備試験の結果, 本抗血清は *P. erythroseptica* とわずかに反応することが判明したので, AVRAMEAS and TERNYNCK (1969)の方法により吸収抗血清を作製した。すなわち, *P. erythroseptica* のS分画をグルタルアルデヒドを用いて不溶性抗原とし, U-1抗血清と4°Cで一晩反応させ, その遠心上清を吸収抗血清とした。

寒天ゲル内拡散法

寒天ゲル内拡散法は, 西尾ら(1983a)の方法に準じ, 未吸収抗血清を用いた。供試した寒天ゲルは寒天0.8%, SDS 0.3%, NaN₃ 0.1%をPBSに溶解したものをを用いた。

蛍光抗体法

蛍光抗体法は, 西尾ら(1983b)の方法に準じた。培養菌糸片に未吸収の抗血清より純化したγ-グロブリン液を滴下し, 湿室条件下で37°C, 30分間静置し, PBSで洗浄後, 蛍光色素標識抗ウサギIgG-ヤギIgG

液(FITC抗ウサギIgG-ヤギIgG, 医学生物学研究所)を滴下し, 湿室条件下で37°C, 30分間静置した。PBSで洗浄後, 落射蛍光顕微鏡(NIKON XF-EF)B励起(励起フィルターIF: 410~485, 吸収フィルター: 515w)で観察した。

ELISA

ELISAは, CLARK and ADAMS (1977)の方法および君島ら(1984)が*Phytophthora*属菌の検出に用いた方法に準じた。抗血清は吸収抗血清を用い, 各菌株のELISA価は, 供試した各菌株のS分画を280nmの吸光度が0.6になるように調整したものをを用いた。

ELISA 価に及ぼす培地の影響

各菌株のELISA価に, 菌糸の培養に用いた培地が影響するかどうかを調べるため, 4種の培地で培養した同一菌株の菌糸より調整したS抗原を用い菌株のELISA価を比較した。供試菌株は, *A. euteiches* U-1, *A. cochlioides* AC-M4を用いた。供試した培地は, PS培地, V-8ジュース培地(V-8ジュース200g, CaCO₃ 2.5g, H₂O 1,000ml), トウモロコシ煎汁培地(CM)(コーンミール20g, H₂O 1,000ml), GILLら(1978)のグルコース・イーストペプトン培地(GYP)を用い, 各菌株を25°Cで14日間培養し, 常法によりS抗原を調整し, ELISA価を測定した。

結 果

1. 寒天ゲル内拡散法

SDS寒天ゲルの中央wellに*A. euteiches* U-1抗血清を, 周囲6wellに各菌株のS抗原を入れ, 室温で24~48時間反応させた後観察した。その結果, 供試した*Aphanomyces*属菌はすべてよく反応し, 鮮明な1本の沈降帯を形成した(Fig. 1)。一方, *Phytophthora*属菌, *Pythium*属菌は全く反応しなかった。

2. 蛍光抗体法

純化したγ-グロブリン液(1mg/ml)を0.5mg/ml, 0.025mg/ml, 0.01mg/mlに希釈して蛍光抗体法を行い, 各菌株の培養菌糸の反応を観察した。その結果, 0.5mg/mlの濃度では, *Aphanomyces*属菌のすべての菌株は強く反応し鮮明な蛍光色に染色されたが, 対照区の*P. erythroseptica*, *P. megasperma*, *Py. aphanidermatum*も反応した。しかし, 0.025mg/mlでは, *Aphanomyces*属菌はすべて反応したが, *Phytophthora*属菌, *Pythium*属菌は全く反応しなかった。0.01mg/ml

** 許可番号54横植第1430号, 第1431号

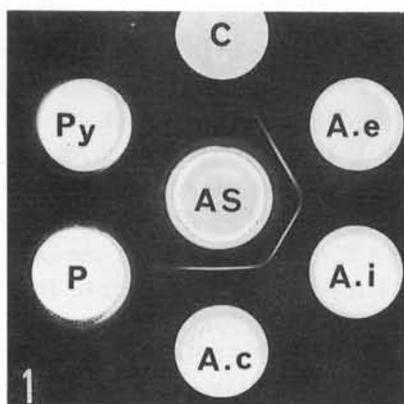


Fig. 1. Serological reaction in sodium dodecyl sulfate (SDS) immunodiffusion plate. Central well contained (AS) antiserum to *Aphanomyces euteiches* (U-1) and outer wells contained soluble antigens as follows: A.e=*A. euteiches* U-1, A. i=*A. iridis* Ap-1, A. c=*A. cochlioides* AC-M4, P=*Phytophthora erythroseptica* CMI 181716, Py=*Pythium aphanidermatum* UOP 344, and C=phosphate buffer saline (PBS).

では, *A. euteiches* U-1, AE-E-3-7, *A. cochlioides* AC-13, *A. iridis* Ap-7, Ap-43 は反応したが, その他の *Aphanomyces* 属菌および *Phytophthora* 属菌, *Pythium* 属菌は全く反応しなかった (Table 1)。

3. ELISA

(1) コーティング γ -グロブリンおよび酵素結合 γ -グロブリンの最適濃度の検討

A. euteiches U-1 と *P. erythroseptica* の S 抗原を用いて, 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, 5 $\mu\text{g/ml}$, 2.5 $\mu\text{g/ml}$, 1.25 $\mu\text{g/ml}$ の 3 区について, また酵素結合 γ -グロブリンは酵素濃度を 1 mg/ml に調整した原液を 200 倍, 400 倍, 800 倍に希釈した 3 区について試験を行った。その結果, コーティング γ -グロブリンの濃度が 5 $\mu\text{g/ml}$ の場合, いずれの酵素結合 γ -グロブリンの濃度でも *A. euteiches* はよく反応したが, *P. erythroseptica* も反応し非特異反応が認められた。2.5 $\mu\text{g/ml}$ では, 酵素結合 γ -グロブリン液の希釈が 200 倍のとき非特異反応が認められたが, 400 倍では認められず, *A. euteiches* はよく反応したので, この条件を最適と判断した。1.25 $\mu\text{g/ml}$ のときは非特異反応は認められなかったが, *A. euteiches*

Table 1. Reactions of fungi to stain with fluorescence antibody prepared against *Aphanomyces euteiches* (U-1).

Species and isolate No.		Concentration of γ -globlin		
		0.5 mg/ml	0.025 mg/ml	0.01 mg/ml ^a
<i>Aphanomyces euteiches</i>	U-1	+	+	+
<i>Aphanomyces euteiches</i>	Ap-25	+	+	-
<i>Aphanomyces euteiches</i>	F-2	+	+	-
<i>Aphanomyces euteiches</i>	AE-E-3-7	+	+	+
<i>Aphanomyces cochlioides</i>	AC-M4	+	+	-
<i>Aphanomyces cochlioides</i>	AC-13	+	+	+
<i>Aphanomyces iridis</i>	Ap-1	+	+	-
<i>Aphanomyces iridis</i>	Ap-7	+	+	+
<i>Aphanomyces iridis</i>	Ap-43	+	+	+
<i>Phytophthora erythroseptica</i>	CMI 181716	+	-	-
<i>Phytophthora syringae</i>	CMI 131191	-	-	-
<i>Phytophthora capsici</i>	IFO 30696	-	-	-
<i>Phytophthora megasperma</i>	HS-57	+	-	-
<i>Phytophthora cryptogea</i>	S-16	-	-	-
<i>Pythium aphanidermatum</i>	UOP 344	+	-	-
<i>Pythium graminicola</i>	S-39	-	-	-
<i>Pythium vexans</i>	7	-	-	-
<i>Pythium irregulare</i>	IFO 30346	-	-	-

The degree of fluorescence was grade from - : no fluorescence to + : extreme brilliant yellow green fluorescence. a : The protein content of the γ -globlin solution.

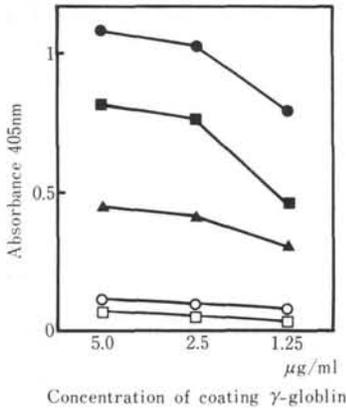


Fig. 2. Reactions of antigens prepared from mycelium of *Aphanomyces euteiches* (U-1) (●, ■, ▲) and *Phytophthora erythroseptica* (○, □), at different concentrations of coating and enzyme-conjugate γ -globulin in ELISA. Optical density at 280 nm of antigen solution were adjusted to 0.6. Dilution rate of enzyme-conjugate γ -globulin solution were indicated below. ●, ○, 1/200; ■, □, 1/400; ▲, 1/800

の反応が弱かった (Fig. 2)。

(2) ELISA による供試菌株 S 抗原の反応

供試した各菌株の ELISA 価を Fig. 3 に示した。

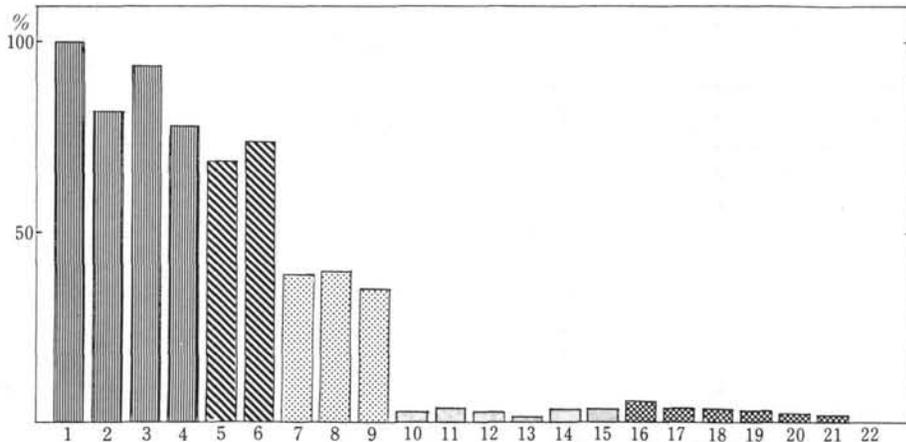


Fig. 3. Relative reactivity of soluble antigens from mycelium with *Aphanomyces euteiches* U-1 antiserum in ELISA. (1), (2), (3), (4) = *A. euteiches* U-1, Ap-25, AE-F2, AE-E-3-7, (5), (6) = *A. cochlioides* AC-13, AC-M4, (7), (8), (9) = *A. iridis* Ap-1, Ap-7, Ap-43, (10) = *Phytophthora erythroseptica*, (11) = *P. syringae*, (12) = *P. phaseoli*, (13) = *P. capsici*, (14) = *P. megasperma*, (15) = *P. cryptogea*, (16) = *Pythium irregulare*, (17) = *Py. vexans*, (18) = *Py. aphanidermatum*, (19) = *Py. debaryanum*, (20) = *Py. spinosum*, (21) = *Py. graminicola*, (22) = *Peronophythora litchii*. The ELISA value of homologous antigen of *A. euteiches* U-1 was indicated as 100 percent and others were relatively indicated. Each value was the mean of five replications.

homologous な抗原である *A. euteiches* U-1 菌株の ELISA 価を 100% とし、各供試菌株 S 抗原の ELISA 価を相対的に表した。なお試験は、5 回以上反復してその平均値を表示した。その結果、*A. euteiches* Ap-25, F-2, AE-E-3-7 はそれぞれ 82.5, 94.7, 78.6% とよく反応し、また、*A. cochlioides* AC-13, AC-M4 も 74.2, 69.2% とよく反応した。*A. iridis* 3 菌株はそれぞれ 39.8, 40.3, 35.8% と反応したが、*A. euteiches*, *A. cochlioides* に比べて反応が弱かった。なお、DUNCUN のマルチプルレンジテストの結果、*A. euteiches*, *A. cochlioides* と *A. iridis* の ELISA 価には統計的に有意差が認められた。*Phytophthora* 属菌 6 菌株、*Pythium* 属菌 8 菌株および *Peronophythora litchii* は全く反応しなかった。

(3) ELISA 価に及ぼす培地の影響

4 種の培地で供試菌をそれぞれ培養し、ELISA 価を比較した。その結果、*A. euteiches* U-1 を PS 培地、V-8 培地、CM 培地および GYP 培地で培養したときの ELISA 価は、それぞれ 0.52, 0.16, 0.55, 0.61 であった。同様に *A. cochlioides* の ELISA 価はそれぞれ、0.40, 0.20, 0.37, 0.30 であった。いずれの供試菌の場合でも、V-8 培地で培養した場合、他の培地と比較して ELISA 価が低かった (Fig. 4)。

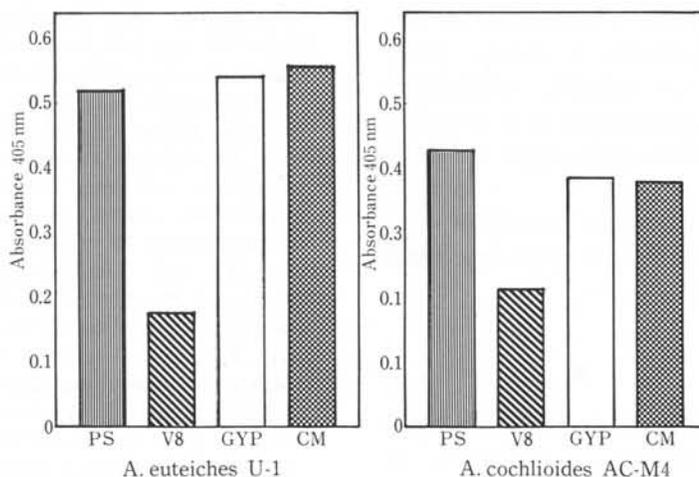


Fig. 4. Effect of the media on antigenicity of soluble fraction of mycelium. Two species of *Aphanomyces* were tested. Antigenicity of soluble fractions were measured by ELISA. Tested media were potato sucrose juice medium (PS), V-8 juice medium (V8), glucose yeast-peptone medium (GYP) and corn meal medium (CM).

考 察

P. erythrosetptica で吸収した *Aphanomyces euteiches* U-1 抗血清は、寒天ゲル内拡散法、蛍光抗体法および ELISA のいずれの方法によっても最適条件下では *Aphanomyces* 属菌にのみ反応し、*Phytophthora* 属菌、*Pythium* 属菌とは全く反応しなかった。これは西尾ら (1983a, b)、君島ら (1984) が *Phytophthora* 属菌について検討した結果と一致し、*Aphanomyces* 属菌にも *Phytophthora* 属菌と同様に属特異的な抗原が存在することが示唆された。

西尾ら (1983a) は、通常の寒天ゲルを用いた場合、1本の鮮明な沈降帯と3~4本の不鮮明な沈降帯を形成し、SDSゲルを用いた場合、通常1本の鮮明な沈降帯が1~2日後に形成されたと報告している。本試験では、SDSゲルのみで試験を行った。その結果、Fig. 1に示すように *Aphanomyces* 属菌はすべて1本の鮮明な沈降帯を形成し、西尾ら (1983a) の報告と一致した。このことから、*Aphanomyces* 属特異的な抗原の存在が示唆され、*A. euteiches*、*A. cochlioides*、*A. iridis* は血清学的に類縁関係があると考えられた。CRYWIENCYK and DORWORTH (1980) は、吸収抗血清を用いた寒天ゲル内拡散法で *Pythium* 属菌をいくつかのグループに分類できると報告し、BURRELL ら (1966) は、特異性の高い抗血清を用い、*Phytophthora* 属菌の種の同定が可能であると報告したが、本試験では、*Aphanomyces* 属の判別はできたが、種の判別はで

きなかった。

蛍光抗体法による試験では、Table 1に示すように最適条件下では *Aphanomyces* 属菌と他の菌との判別は可能であると思われた。このことは、西尾ら (1983b) が *Phytophthora* 属菌の検出を検討した報告と一致した。MALAJCZUK ら (1975)、BURRELL (1966) は蛍光の強弱により種の判別が可能であると報告したが、本試験では、これによる種の判別は困難であった。

ELISA では、君島ら (1984) が *Phytophthora* 属菌で得た結果と同様に *Aphanomyces* 属特異的に反応することが判明した (Fig. 4)。GERIK ら (1987) は、*Verticillium dahliae* の抗血清を作製して *Verticillium* 属菌の血清学的類縁関係について検討し、ELISA による種の判別は可能であると報告している。本試験では、*A. euteiches* と *A. iridis* の ELISA 価に有意な差が認められ、ELISA による両種の判別の可能性があるものと思われたが、今後の検討が必要である。

ELISA 価に及ぼす培地の影響を調べた結果、V-8培地で培養した菌糸の ELISA 価は、いずれの供試菌でも他の培地で培養したものより低い値となった。V-8培地で培養した菌糸は、他の培地で培養したもの比べて生育が悪く、しかも褐色を帯びていた。このことが ELISA 価に影響したかどうかについては、さらに検討する必要があるが、ELISA による *Aphanomyces* 属菌の分類・同定に関する試験を行う場合には、少なくとも供試菌の培養に用いる培地を同一とする必要があると考えられた。

以上、*Aphanomyces* 属菌には属特異的な抗原が存在し、*A. euteiches*, *A. cochlioides*, *A. iridis* は、血清学的類縁関係があり、寒天ゲル内拡散法、蛍光抗体法および ELISA により *Aphanomyces* 属菌を近縁の *Phytophthora* 属菌、*Pythium* 属菌と判別することが可能であることが明らかとなった。

今後は、抗血清による種の判別、同定が可能かどうか、また、植物組織や土壌中からの *Aphanomyces* 属菌の検出についてさらに検討したい。

摘 要

Aphanomyces euteiches DRECHSLER 菌糸の可溶性分画を用いて抗血清を作製し、その特異性を、*A. euteiches*, *A. cochlioides*, *A. iridis* の3種9菌株、*Phytophthora* 属菌4種5菌株、*Pythium* 属菌6種8菌株、*Peronophythora* 属菌1菌株を用い、寒天ゲル内拡散法、蛍光抗体法および ELISA により検討した。

1. 寒天ゲル内拡散法では、供試した *Aphanomyces* 属菌すべてが反応し鮮明な1本の沈降帯を形成したが、*Phytophthora* 属菌および *Pythium* 属菌は形成しなかった。

2. 蛍光抗体法では、 γ -グロブリン液を最適濃度に希釈した場合 *Aphanomyces* 属菌のみが反応した。

3. ELISA では、*A. euteiches* 4菌株、*A. cochlioides* 2菌株はよく反応し、*A. iridis* 3菌株の反応は弱かった。一方、*Phytophthora* 属菌、*Pythium* 属菌および *Peronophythora* 属菌は全く反応しなかった。なお、ELISA 価を測定し、各菌株の血清関係を調べる場合、同一培地で培養した菌糸を用いる必要があると思われた。

4. 以上から、*Aphanomyces* 属菌には属特異的な抗原が存在し、*A. euteiches*, *A. cochlioides*, *A. iridis* は血清学的類縁関係があり、*Phytophthora* 属菌および *Pythium* 属菌とは血清学的に判別することが可能であることが明らかとなった。

引用文献

- AVRAMÉAS, S. and T. TERNYNCK (1969) The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents. *Immunochemistry* **6**: 53-66.
- BURRELL, R.G., C.W. CLAYTON, M.E. GALLEGLY and V.G. LILLY (1966) Factors affecting the antigenicity of the mycelium of three species of

Phytophthora. *Phytopathology* **56**: 422-426.

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.

GERIK, J.S., S.A. LOMMEL and O.C. HUISMAN (1987) A specific serological staining procedure for *Verticillium dahliae* in cotton root tissue. *Phytopathology* **77**: 261-265.

GILL, H.S. and G.A. ZENTMYER (1978) Identification of *Phytophthora* species by disc electrophoresis. *Phytopathology* **68**: 163-167.

JONES, F.R. and C. DRECHSLER (1925) Root rot of peas in the United States caused by *Aphanomyces euteiches* (n. sp.) *J. Agr. Res.* **30**: 293-325.

君島悦夫・西尾 健・高山睦雄・長尾記明 (1984) *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. *植防研報* **20**: 1-6.

小林慶範・君島悦夫・西尾 健・長尾記明 (1986) 輸入検疫で台湾産レイシ (*Litchi chinensis* SONN.) から分離された *Peronophythora litchii* CHEN ex KO *et al.* について. *植防研報* **22**: 55-60.

KRYWIENCZUK, J. and C.E. DORWORTH (1980) Serological relationships of some fungi of the genus *Pythium*. *Can. J. Bot.* **58**: 1412-1417.

MASAGO, H. and M. YOSHIKAWA (1983) Fungal cytoplasmic proteins as a marker for classification and identification of *Phytophthora* species. The third international mycological congress 176p (Abstract).

MALAJCZUK, N., A.J. MCCOMB and C.A. PARKER (1975) An immunofluorescence technique for detecting *Phytophthora cinnamomi* RANDS. *Aust. J. Bot.* **23**: 289-309.

MERZ, W.G., R.G. BURRELL and M.E. GALLEGLY (1969) A serological comparison of six heterothallic species of *Phytophthora*. *Phytopathology* **59**: 367-370.

西尾 健・川口嘉久・君島悦夫・高山睦夫・末次哲男 (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* の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・高山睦夫・末次哲男 (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.

WHITE, D.G. (1976) The preparation and use of a fluorescent antibody reagent for the detection of *Pythium graminicola*. *Phytopathology* **66**: 523-525.