

4 種疫病菌抗血清の反応特異性*

君島 悦夫・小林 慶範・西尾 健

横浜植物防疫所

Serological Reactivities of Antisera Prepared for Four *Phytophthora* spp.. Etsuo KIMISHIMA, Yoshinori KOBAYASHI and Takeshi NISHIO (Yokohama Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 25: 1-6 (1989)

Abstract: Antisera were prepared for soluble (S) antigens from *P. syringae* CMI 131191, *P. erythroseptica* CMI 181716, *P. capsici* IFO 8386 and *P. phaseoli* 068, respectively. Serological reactivities of antisera were tested in ELISA. Using 20 isolates of *Phytophthora*, 6 isolates of *Pythium* and 4 isolates of other fungi. *Phytophthora syringae*, *P. erythroseptica* and *P. capsici* antisera were fairly genus-specific. And *P. phaseoli* was considered to be serologically related with *Pythium* spp. The effects of incubation period and culture media of hyphae on antigenic reactivity of S-antigens were also tested in ELISA. It was shown that the effects of those two factors were negligible, as far as using normally growing mycelia for S-antigen preparation.

Key words: *Phytophthora*, ELISA, serological specificity

ま え が き

抗血清を利用した病原糸状菌の検出・同定法の開発は、ELISA 等の新しい血清学的手法の開発にともない、近年特に盛んとなってきた（君島ら，1987）。

筆者らは植物検疫の現場に適用可能な迅速かつ簡便な糸状菌の検出法を開発する目的で、主にわが国未発生の疫病菌を用いて血清学的検出法について試験を行っている（西尾ら，1983a；西尾ら，1983b；君島ら，1984）。

今回は疫病菌の分類に広く用いられている WATERHOUSE (1963) の分類による 6 群 (I-VI) の中から、異なる群に属する 4 種を選び、それぞれの抗血清を作製して、その血清学的な反応特異性を ELISA によって検討したのでここに報告する。

なお、本試験を行うに当たり貴重な菌株を分譲していただいた元京都府立大学正子朔教授、大阪府立大学一谷多喜郎助教授、北海道農業試験場松本直幸氏に対し深甚な謝意を表する。

材料および方法

供試菌株

Phytophthora 属菌 14 種 20 菌株、*Pythium* 属菌 6 種 6 菌株、その他の属 4 種 4 菌株の計 30 菌株を供試した。その来歴は Table 1 のとおりで、Commonwealth

Mycological Institute (CMI), American Type Culture Collection (ATCC), 京都府立大学、大阪府立大学、北海道農業試験場、財団法人醸酵研究所 (IFO) および当所病菌課にて保存中のものを使用した。なお、海外からの菌株の導入に当たっては農林水産大臣の特別許可を得た**。

抗原の調整ならびに抗血清の作製

抗原の調整は西尾ら (1983a) が *P. syringae* の抗血清の作製に用いた調整法に従った。菌糸は、100 ml コルベンを用い、2% ショ糖加用ジャガイモせん汁液体 (PS) 培地 (50~60 ml) で各菌株を 5~10 日間 25℃ で静置培養して得た。

使用した抗血清のうち *P. syringae* (CMI 131191) 抗血清は西尾ら (1983a) の作製した可溶性分画抗血清 (S 抗血清) を用いた。*P. erythroseptica* (CMI 181716)、*P. capsici* (IFO 8386) および *P. phaseoli* (068) については各 S 抗原（総タンパク量 6.3~3.9 mg/ml）に等容量の Freund's complete adjuvant を加え、超音波処理 (180 W, 10 分間) で乳化し、家兎 1 羽当たり 2 ml ずつ 1 週間おきに計 4 回筋肉注射し、その後抗原 1 ml を静脈内に 1~2 回注射して、最後の注射後 4~6 日目に全採血し抗血清を得た。得られた抗血清の力価はリングテスト法で 128~256 倍であった。

* 本報告の概要は昭和 58 年度日本植物病理学会大会 (1983 年 3 月) において発表した (君島ら，1983)。

** 許可番号：54 横植第 1430 号，第 1431 号
49 神植第 1445 号，54 神植第 782 号

Table 1. Sources of isolates

No.	Isolate		Location	Source ^{A)}
	Species	Designation		
1	<i>Phytophthora cactorum</i>	PPCT-P 72	Taiwan	KPU
2	<i>P. cambivora</i>	050	United States	KPU
3	<i>P. capsici</i>	PPCT-P 66	Taiwan	KPU
4	<i>P. capsici</i>	002	Japan	KPU
5	<i>P. capsici</i>	8386	Japan	IFO
6	<i>P. castaneae</i>	9753	Ibaraki Pref.	IFO
7	<i>P. cryptogea</i>	S-16	Hokkaido Pref.	Matsumoto
8	<i>P. erythroseptica</i>	181716	United Kingdom	CMI
9	<i>P. infestance</i>	9173	Hokkaido Pref.	IFO
10	<i>P. megasperma</i> f. sp. <i>glycinea</i>	073	United States	KPU
11	<i>P. megasperma</i>	HS-57	Hokkaido Pref.	Matsumoto
12	<i>P. melonis</i>	132	Taiwan	KPU
13	<i>P. palmivora</i>	040	United States	KPU
14	<i>P. palmivora</i>	9755	Japan	IFO
15	<i>P. nicotianae</i> var. <i>parasitica</i>	4873	Japan	IFO
16	<i>P. phaseoli</i>	068	United States	KPU
17	<i>P. porri</i>	30416	Fukuoka Pref.	IFO
18	<i>P. syringae</i>	131191	Ireland	CMI
19	<i>P. syringae</i>	34002	United States	ATCC
20	<i>P. syringae</i>	62472	Netherlands	CMI
21	<i>Pythium aphanidermatum</i>	7030	Japan	IFO
22	<i>Py. cucurbitacearum</i>	23	Japan	UOP
23	<i>Py. irregulare</i>	30346	Japan	IFO
24	<i>Py. porphyrae</i>	30347	Miyagi Pref.	IFO
25	<i>Py. ultimum</i>	10034	Japan	UOP
26	<i>Py. vexans</i>	7	Japan	UOP
27	<i>Botrytis cinerea</i>		Japan	YPPS
28	<i>Colletotrichum graminicola</i>	C8-2-1	Japan	YPPS
29	<i>Fusarium oxysporum</i>	7157	Japan	IFO
30	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>		Japan	YPPS

A) Isolates were obtained from Kyoto Prefectural University (KPU); Institute for Fermentation, Osaka (IFO); N. Matsumoto, Hokkaido National Agricultural Experiment Station (Matsumoto); Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England (CMI); American Type Culture Collection, Rockville, MD (ATCC); University of Osaka Prefecture (UOP) and Yokohama Plant Protection Station (YPPS).

4 種抗血清の反応特異性の比較

30 菌株の菌糸から調整した S 抗原を用い、4 種疫病菌抗血清の反応特異性を ELISA により検討した。試験は 4~6 回反復し homologous な抗原の ELISA 値を 100% として各 S 抗原の値を相対的に表示した。

ELISA の手順は CLARK and ADAMS (1977) の方法

に準じた。菌糸磨砕および抗原の濃度調整にはリン酸緩衝生理食塩水に Tween 20 を 0.05%, polyvinyl pyrrolidone, M.W. 40,000 を 2% になるように加えた液 (PBST+2% PVP) を用い、OD₂₈₀=0.6 に調整した S 抗原を ELISA の試料とした。試験には 1 試料当たりマイクロプレートの 2 穴を用い、最終反応液 (基質反応液) を 1 本の小試験管に集めて 2.5 ml の蒸留水を

加え、光路長10 mm、波長405 nmの吸光度をELISA値とした。予備試験の結果から、コーティング γ -グロブリンおよび酵素結合 γ -グロブリンは次の濃度で利用した。コーティング γ -グロブリン濃度は*P. syringae* 抗血清：5 μ g/ml, *P. erythroseptica*, *P. capsici*, *P. phaseoli* の各抗血清：2.5 μ g/ml, 酵素結合 γ -グロブリンは4種ともに原液の200倍希釈とした。

ELISA値に及ぼす培養条件の影響

供試菌を培養する培地の種類および培養期間の違いがELISA値に影響するか検討した。

試験にはBURRELLら(1966)の合成培地(A), MERZら(1969)の合成培地(B), GILL and ZENTMYER (1978)のグルコース・イースト・ペプトン(GYP)培地およびPS培地を100 ml コルペンに50~60 ml 分注し、*P. erythroseptica* (CMI 181716), *P. capsici* (IFO 8386), *P. phaseoli* (068)の3菌株を25℃で10日間培養した後S抗原を調製し、各々homologousな抗体を用いてELISA値を測定した。

培養期間の検討時には100 ml コルペンにPS培地を50~60 ml 分注し、*P. erythroseptica* (CMI 181716), *P. phaseoli* (068)の2菌株を供試菌した。各菌株を25℃で培養し、培養2日目から30日目まで数日おきに各々100 ml コルペン4~5本から生育菌糸を集めS抗原を調製し、各々homologousな抗体を用いてELISA値を測定した。

結 果

1. 4種疫病菌抗血清の反応特異性

試験の結果はFig. 1のとおりであり、*P. syringae* 抗血清の場合*P. phaseoli*を除く*Phytophthora*属菌は45~98%の反応を示したが、*P. phaseoli*, *Pythium*属菌, *Botrytis cinerea*などの菌株は対照として用いたPBSの反応(14%)と同程度でいわゆるバックグラウンド値以下と考えられた。また、*P. erythroseptica* および*P. capsici* 抗血清の場合も同様に、*P. phaseoli*を除く*Phytophthora*属菌は各々36~96%, 51~100%の反応を示したが、*P. phaseoli*, *Pythium*属菌, *B. cinerea*などの菌株はバックグラウンド値以下であった。一方、*P. phaseoli* 抗血清の場合、*P. phaseoli*を除く*Phytophthora*属菌は33~63%の反応を示したのに対し、*Pythium cucurbitacearum* (UOP23)は98.5%, *Py. aphanidermatum* (IFO 7030)は90%, *Py. vexans* (UOP7)は70%と顕著な反応を示した。*B. cinerea*などの菌株はこの抗血清に対してもバックグラウンド値

と同程度であった。

2. ELISA値に及ぼす培養条件の影響

(1) 生育培地の影響

試験は2回反復し、得られたELISA値の平均値を比較した。その結果、*P. phaseoli*を合成培地(A), 合成培地(B), GYP培地およびPS培地で培養したときのELISA値は各々0.74, 0.64, 0.69, 0.84(平均0.73)であった。同様に*P. capsici*の場合は各々0.99, 0.87, 0.70, 0.82(平均0.85)であった。*P. erythroseptica*の場合、2種の合成培地(A), (B)では生育しなかったため供試することはできなかったが、GYP培地、PS培地で培養したときのELISA値は各々0.93, 0.92であった(Fig. 2)。以上、培地によるELISA値の変動は、多少認められるものの、それほど大きなものとは考えられなかった。

(2) 培養期間の影響

ELISA試験は2回反復し、得られたELISA値の平均値を比較した。その結果、*P. erythroseptica*を2, 7, 13, 30日間培養したときのELISA値は各々0.44, 0.64, 0.64, 0.58であった。また、*P. phaseoli*を2, 5, 11, 16, 20, 30日間培養したときのELISA値は各々0.38, 0.45, 0.42, 0.41, 0.35, 0.17であった(Fig. 3)。培養が長期間になるに従いELISA値が低下する傾向が認められたが、菌糸の生育が正常と思われたのは、20日程度までで30日では、菌糸の自己分解の兆候が認められた。菌糸生育の安定している5~16日では、ELISA値に大きな変動は認められなかった。

考 察

P. syringae, *P. erythroseptica* および*P. capsici*の各抗血清は本試験において*P. phaseoli*を除く*Phytophthora*属菌のみと反応を示した。この結果から、これら3種の抗血清は*Phytophthora*属菌に対し特異的反応を示すものと考えられた。この結果から、*Phytophthora*属菌には属特異的抗原の存在することが示唆された。

HALSALL(1976)は吸収抗血清を用い、間接蛍光抗体法により*Phytophthora*属菌で種特異的反応が認められたと報告し、KRYWIENCYK & DORWORTH(1980)はゲル内拡散法により*Pythium*属菌をいくつかのグループに分けることができると報告している。しかし、本試験では*Phytophthora*属各菌株の反応程度から種を判定することやいくつかのグループに分類することは困難であった。

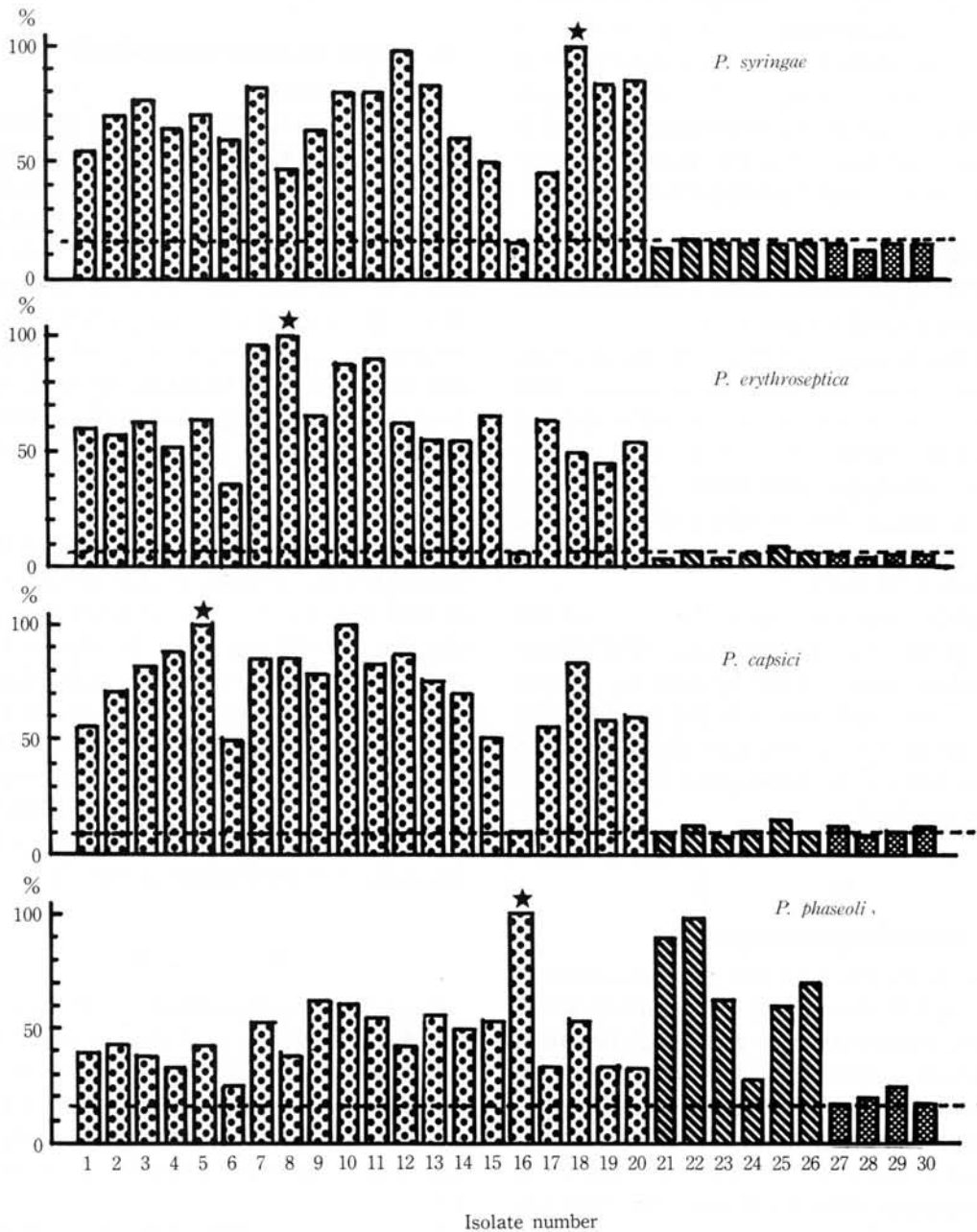


Fig. 1. Relative reactivity of soluble antigens from 20 isolates of *Phytophthora* (1-20), 6 isolates of *Pythium* (21-26) and 4 isolates of other genera (27-30) in ELISA using with soluble antisera against *Phytophthora syringae* (CMI 131191), *P. erythroseptica* (CMI 181716), *P. capsici* (IFO 8386) and *P. phaseoli* (068). The ELISA values of each homologous antigen were indicated as 100% with star on the top of column in each test. The dashed line represents the level of background readings of the absence of antigens.

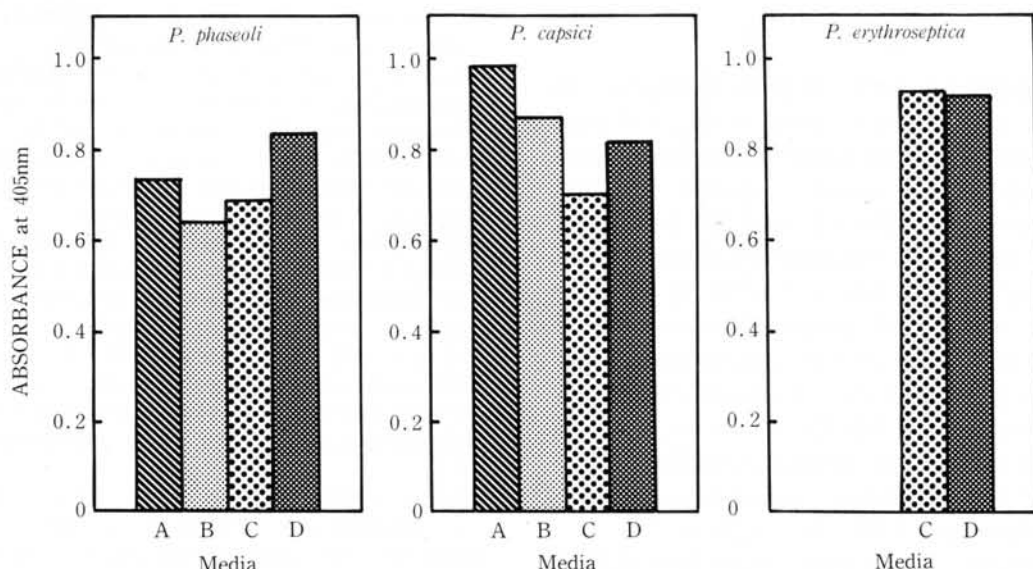


Fig. 2. Effect of culture media on antigenic reactivity of soluble antigens from three *Phytophthora* spp. in ELISA. Medium A is synthetic medium (BURELL, R.G. *et al.*, 1966), B is synthetic medium (MERZ, W.G. *et al.*, 1969), C is glucose yeast peptone medium (GILL and ZENTMYER, 1978) and D is potato sucrose medium.

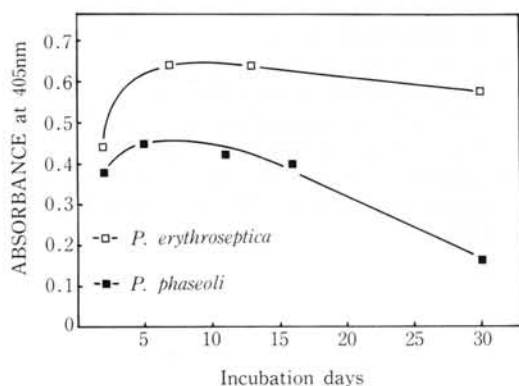


Fig. 3. Effect of incubation period on antigenic reactivity of soluble antigens from two *Phytophthora* spp. in ELISA.

P. phaseoli は前述した3種の疫病菌抗血清に対していずれとも反応しなかった。また、*P. phaseoli* 抗血清に対して *Phytophthora* 属菌は33~63%の反応しか示さなかったのに比べ、*Py. vexans*, *Py. aphanidermatum*, *Py. cucurbitacearum*, は70~98%の反応を示した。本試験と同様の方法で作製した *Py. aphanidermatum* (UOP 344) 抗血清に対し *P. phaseoli* は高い反応値を示した(小林ら, 未発表)。これらの結果から、*P. phaseoli* (068) は血清学的に *Pythium* 属に近縁であ

ると思われた。WATERHOUSE の検索表(1963)によれば、*P. phaseoli* はジャガイモ疫病菌(*P. infestans* f. sp. *infestans*) などと同様にIV群に分類されている。また、BRASIER (1983)は *Phytophthora* 属のI~VIの各群(WATERHOUSE: 1963)を系統発生的に分類しているが、それによればIV群に属す菌は *Pythium* 属菌と近縁とは考えられていないし、また、形態的にも類似していない。

ELISA値に及ぼす培養条件の影響と調べた結果、供試した4種類の培地間および5~16日間までの培養日数間に大きな差は認められなかった。これらの結果から栄養生長を盛んに行っている正常な菌糸を用いた抗原を調整すれば、ELISA値に及ぼす培養条件の影響は少ないと考えられ、本法により測定した各菌株のELISA値は供試抗血清に対する相対的な血清学的類縁関係を示しているものと考えられた。

本試験で属特異的の反応を示した *P. erythroseptica* および *P. capsici* 抗血清を用いれば *P. syringae* 抗血清(君島ら, 1984)と同様に疫病の早期診断が可能と考えられる。種の同定に抗血清を利用しようとする場合、種特異的の反応を示す抗体を得る必要があるが、このような抗体を得るため今後モノクローナル抗体の作製などさらに検討したい。

摘 要

4種疫病菌抗血清の反応特異性をELISAにより検討した。抗血清は西尾ら(1983a)が作製した *P. syringae* (CMI 131191) のS抗血清の他, *P. erythroseptica* (CMI 181716), *P. capsici* (IFO 8386) および *P. phaseoli* (068) の可溶性分画(S)を抗原として作製したものを使用した。*Phytophthora* 属菌14種20菌株, *Pythium* 属菌6種6菌株, その他の属4種4菌株を試した。その結果, *P. syringae*, *P. erythroseptica*, *P. capsici* の各抗血清に対し *P. phaseoli* を除く *Phytophthora* 属菌のみが反応し, *P. phaseoli*, *Pythium* spp. *B. cinerea* など11菌株は反応しなかった。一方, *P. phaseoli* 抗血清に対し *Phytophthora* 属菌は中程度の反応を示し, *Pythium cucurbitacearum*, *Py. aphanidermatum* は著しく高い反応を示した。

ELISA 値に及ぼす培養条件の影響を調べた結果, 正常に生育している菌糸を用いれば, 培地および培養期間の影響は少ないことが判明した。

引 用 文 献

- BRASIER, C.M. (1983) *Phytophthora*. The American Phytopathological Society. Minnesota, pp. 351-364.
- 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.
- GILL, H.S. and G.A. ZENTMYER (1978) Identification of *Phytophthora* species by disc electrophoresis. *Phytopathology* **68**: 163-167.
- HALSALL, D.M. (1976) Specificity of cytoplasmic and cell-wall antigens from four species of *Phytophthora*. *J. Gen. Microbiol.* **94**: 149-158.
- 君島悦夫・西尾 健・高山睦雄・木村 茂 (1983) 我が国未発生の重要糸状菌病の診断技法に関する研究 IV. *Phytophthora* spp. 菌株間の血清学的類縁関係について, 日植病報 **49**: 391-392 (講要).
- 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.
- 君島悦夫・小林慶範・西尾 健 (1987) 抗血清を利用した糸状菌病の診断, 植物防疫 **41**: 442-448.
- 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・高山睦雄・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・高山睦雄・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.
- WATERHOUSE, G.M. (1963) Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycol. papers C.M.I.* **92**: 1-22.