

Pythium 属菌 4 種に対する抗血清の作製と その反応特異性*

小林 慶範・君島 悦夫・後藤 正昭

横浜植物防疫所

Preparation of Antisera for Four *Pythium* Species and Their Serological Specificity. Yoshinori KOBAYASHI, Etsuo KIMISHIMA and Masaaki GOTO (Yokohama Plant Protection Station 6-64, Kitanaka-dori, Naka-Ku, Yokohama 231, Japan). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 27; 1-6 (1991)

Abstract: Antisera were prepared for soluble antigens from four *Pythium* species; *P. aphanidermatum* (Pa), *P. iwayamai* (Pi), *P. paddyicum* (Pp) and *P. ultimum* (Pu). These antisera were tested with fungal antigens, including 15 isolates of *Pythium*, 2 isolates of *Aphanomyces*, 6 isolates of *Phytophthora* and 5 isolates of other genus fungi, by the agar gel immunodiffusion test and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Pa antiserum reacted with *P. butleri* and homologous antigen *P. aphanidermatum* but did not react with the other *Pythium* species. Pi, Pp and Pu antisera showed similar serological specificity and strongly reacted with *P. debaryanum*, *P. irregulare*, *P. iwayamai*, *P. paddyicum*, *P. sylvaticum*, *P. ultimum* and *P. vexans*, and slightly reacted with the other 8 *Pythium* species. And in ELISA these three kinds of antisera reacted with *Aphanomyces* as well as *Pythium*, but not reacted with other genus fungi. Then, it was impossible to distinguish the genus *Pythium* from *Aphanomyces* but possible from *Phytophthora* or other genus fungi by the serological reaction with these antisera. It was found that *P. aphanidermatum* and *P. butleri* appear to be serologically identical and different from the other *Pythium* species investigated. And it seemed that *P. debaryanum*, *P. irregulare*, *P. iwayamai*, *P. paddyicum*, *P. sylvaticum*, *P. ultimum* and *P. vexans* were related very closely.

Key word: *Pythium*, Serological specificity, ELISA

結 言

Pythium 属菌は、多くの植物の苗に立枯れを起こすほか、成植物にも葉枯れ、萎凋などを起こす、主に土壌伝染する重要な植物病原菌である。菌糸に隔膜がないなどの形態的特徴が *Phytophthora* 属菌や *Aphanomyces* 属菌と良く類似している。また、*Pythium* 属菌には、有性・無性器官を形成しにくい種もあり、形態的特徴や培養上の諸性質を基に分類・同定を行うには経験と多大な時間を要する (WATERHOUSE, 1968; PLAATS-NITERINK, 1981)。

このような理由からこれらの菌の分類・同定、検出および病気の診断を血清学的な手法あるいは電気泳動法などにより行おうとする試みが近年多数報告されており (MOHAN, 1988; ADASKAVEG *et al.*, 1988), すでに診断用のキットとして実用化されているものもある (MACDONALD *et al.*, 1990)。筆者らも、植物検疫において迅速かつ正確な植物病原糸状菌の同定、検出

を行なうために蛍光抗体法、ELISA 等の血清学的な手法の導入を検討している。

本報告では *Pythium* 属菌 4 種に対する抗血清を作製し、寒天ゲル内二重拡散法および ELISA によりその反応特異性を調査した。また、*Pythium* 属菌、*Phytophthora* 属菌および *Aphanomyces* 属菌の血清学的類縁関係について検討するとともに、血清学的手法による *Pythium* 属菌の分類・同定の可能性についても検討した。

なお、試験を行なうに当たり有益な助言並びに貴重な菌株を分譲賜った大阪府立大学一谷多喜郎博士、貴重な菌株を分譲賜った佐賀大学野中福次博士、東日本学園大学横澤菱三博士、終始ご指導を賜った農蚕園芸局植物防疫課西尾健博士に深く感謝の意を表す。

材 料 と 方 法

供試菌株

本試験に供試した菌株は Table 1 に示すとおり *Pythium* 属菌 15 種 15 菌株、*Aphanomyces* 属菌 2 種 2 菌株、*Phytophthora* 属菌 6 種 6 菌株およびその他の属

* 本報告の概要は 1990 年度日本植物病理学会大会において発表した。

Table 1. List of Isolates used in this study

Isolates	Designation	Source
<i>Pythium aphanidermatum</i>	344	UOP ^a
<i>P. butleri</i>	31214	I FO ^b
<i>P. debaryanum</i>	8002	N U ^c
<i>P. graminicola</i>	S-39	UOP
<i>P. irregulare</i>	30346	I FO
<i>P. iwayamai</i>	363	UOP
<i>P. paddicum</i>	364	UOP
<i>P. periplocum</i>	31933	I FO
<i>P. spinosum</i>	7031	I FO
<i>P. sylvaticum</i>	31942	I FO
<i>P. ultimum</i>	77	UOP
<i>P. vanterpoolii</i>	31923	I FO
<i>P. vexans</i>	7	UOP
<i>P. volutum</i>	31926	I FO
<i>P. zingiberum</i>	30817	I FO
<i>Aphanomyces euteiches</i>	F-2	HNU ^d
<i>A. iridis</i>	Ap-7	UOP
<i>Phytophthora capsici</i>	30696	I FO
<i>Ph. cryptogea</i>	S-16	HAE ^e
<i>Ph. erythroseptica</i>	181716	CM I ^f
<i>Ph. megasperma</i>	HS-57	HAE
<i>Ph. nicotianae</i> var. <i>parasitica</i>	30595	I FO
<i>Ph. syringae</i>	131191	CM I
<i>Peronophythora litchii</i>	TL-1	YPP ^g
<i>Botrytis cinerea</i>		YPP
<i>Fusarium oxysporum</i>		YPP
<i>Rhizoctonia solani</i>	390	S U ^h
<i>Verticillium dahliae</i>		YPP

- a: University of Osaka Prefecture
b: Institute for Fermentation, Osaka
c: Niigata University
d: Higashi Nippon Gakuen University
e: Hokkaido National Agricultural Experiment Station
f: Commonwealth Mycological Institute
g: Yokohama Plant Protection Station
h: Saga University

5 菌株である。これらの一部は、大阪府立大学、東日本学園大学、佐賀大学、財団法人大阪発酵研究所から分譲を受けたものを用いた。*Phytophthora erythroseptica* PETHYBRIDGE, *P. syringae* KLEBAHN は Commonwealth Mycological Institute より農林水産大臣の輸入許可**を得て導入し、*Peronophythora litchii* CHEN

** 許可番号 54 横植第 1430 号, 第 1431 号, 61 横植第 886 号

ex Ko *et al.* (小林ら 1986) 並びにその他の菌株は当所病菌課で分離し保存中の菌株を用いた。

抗原の調整および抗血清の作製

P. aphanidermatum (EDSON) FITZPATRICK (UOP 344) (Pa), *P. iwayamai* S. Ito (UOP 363) (Pi), *P. paddicum* HIRANE (UOP 364) (Pp) および *P. ultimum* TROW (UOP 77) (Pu) の各菌株の抗原の調整および抗血清の作製は西尾ら(1983a)の方法に準じた。得られた各抗血清の力価測定はリングテストで行い 32~64 倍であった。

Table 2. Reactions of fungal antigens with antisera prepared for four *Pythium* species in agar gel immunodiffusion

Species	Antisera			
	Pa ^a	Pi ^b	Pp ^c	Pu ^d
<i>Pythium aphanidermatum</i>	+ ^e	- ^f	-	-
<i>P. butleri</i>	+	-	-	-
<i>P. debaryanum</i>	-	+	+	+
<i>P. graminicola</i>	-	-	-	-
<i>P. irregulare</i>	-	+	+	+
<i>P. iwayamai</i>	-	+	+	+
<i>P. paddicum</i>	-	+	+	+
<i>P. periplocum</i>	-	-	-	-
<i>P. spinosum</i>	-	-	-	-
<i>P. sylvaticum</i>	-	+	+	+
<i>P. ultimum</i>	-	+	+	+
<i>P. vanterpoolii</i>	-	-	-	-
<i>P. vexans</i>	-	+	+	+
<i>P. volutum</i>	-	-	-	-
<i>P. zingiberum</i>	-	-	-	-
<i>Aphanomyces euteiches</i>	-	-	-	-
<i>Phytophthora capsici</i>	-	-	-	NT ^g
<i>Ph. erythroseptica</i>	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	-	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	-	-	-	-
<i>Verticillium dahliae</i>	-	-	-	-

- a: *P. aphanidermatum* antiserum
b: *P. iwayamai* antiserum
c: *P. paddicum* antiserum
d: *P. ultimum* antiserum
e: Precipitin lines were observed
f: No precipitin lines were observed
g: Not Tested

血清学的試験

寒天ゲル内二重拡散法には0.9% 塩化ナトリウムを含む1% アガロースゲルを用いた。Pa, Pi, Pp および Pu の各抗血清を2-4倍に希釈し、供試菌株から調整した菌糸破碎液の上清(S抗原)を反応させ48時間後に観察した。ELISAは君島ら(1984)、小林ら(1988)の方法に準じ、精製した γ -グロブリンをプレートに結合させる二重抗体法で行い、アルカリフォスファターゼを標識酵素として用いた。ELISA値の測定はマイクロプレートリーダー(コロナ製)を用いて405nmの吸光度を測定し、各抗血清のホモロガスな抗原との反応を100%として相対値で表した。試験は3回反復し、その平均値を示した。

結 果

寒天ゲル内二重拡散法

寒天ゲル内二重拡散法の結果は、Table 2に示した。Pa抗血清は*Pythium aphanidermatum* および *P. butleri* SUBRAMANIAN と反応して明瞭な沈降帯を形成し、その他の*Pythium*属菌、*Aphanomyces*属菌、*Phytophthora*属菌、*Peronophythora*属菌、*Fusarium*属菌、*Rhizoctonia*属菌および*Verticillium*属菌とは反応しなかった(Fig. 1-A)。Pi, Pp および Pu 各抗血清は同様の反応を示し、*P. debaryanum* HESSE, *P. irregulare* BUISMAN, *P. iwayamai*, *P. paddicum*, *P. sylvaticum* CABBELL & HENDRIX, *P. ultimum* および *P. vexans* de BARY と反応して明瞭な沈降帯を形成

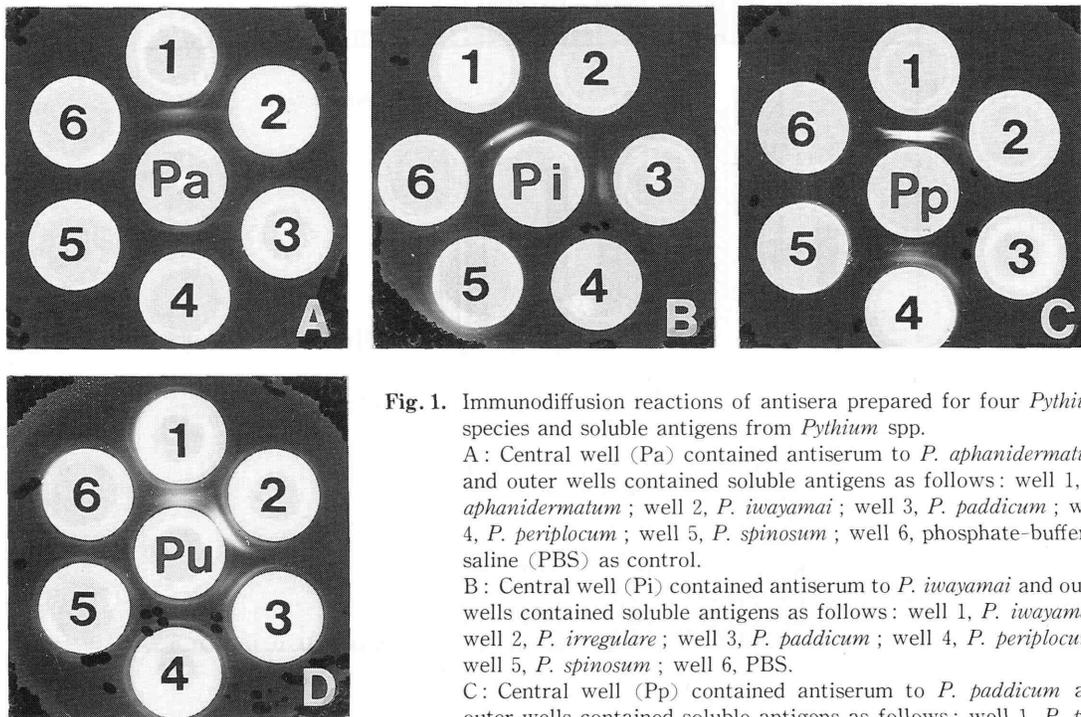


Fig. 1. Immunodiffusion reactions of antisera prepared for four *Pythium* species and soluble antigens from *Pythium* spp.

A: Central well (Pa) contained antiserum to *P. aphanidermatum* and outer wells contained soluble antigens as follows: well 1, *P. aphanidermatum*; well 2, *P. iwayamai*; well 3, *P. paddicum*; well 4, *P. periplocum*; well 5, *P. spinosum*; well 6, phosphate-buffered saline (PBS) as control.

B: Central well (Pi) contained antiserum to *P. iwayamai* and outer wells contained soluble antigens as follows: well 1, *P. iwayamai*; well 2, *P. irregulare*; well 3, *P. paddicum*; well 4, *P. periplocum*; well 5, *P. spinosum*; well 6, PBS.

C: Central well (Pp) contained antiserum to *P. paddicum* and outer wells contained soluble antigens as follows: well 1, *P. paddicum*; well 2, *P. aphanidermatum*; well 3, *P. butleri*; well 4, *P. debaryanum*; well 5, *P. graminicola*; well 6, PBS.

D: Central well (Pu) contained antiserum to *P. ultimum* and outer wells contained soluble antigens as follows: well 1, *P. ultimum*; well 2, *P. irregulare*; well 3, *P. iwayamai*; well 4, *P. paddicum*; well 5, *P. periplocum*; well 6, PBS.

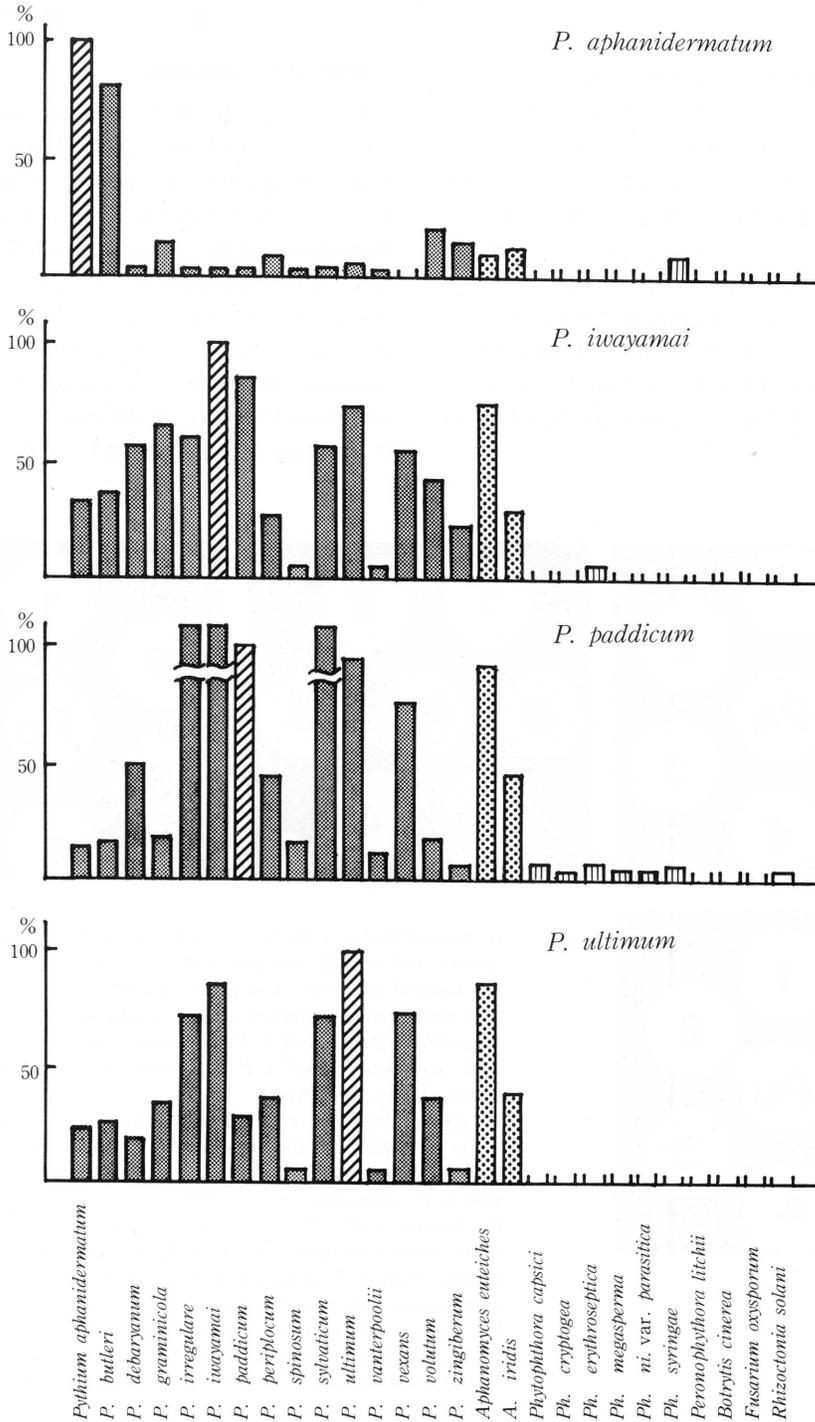


Fig. 2. Relative reactivity of soluble antigens from various mycelium with antisera prepared for four *Pythium* species; *P. aphanidermatum*, *P. iwayamai*, *P. paddicum* and *P. ultimum*, in ELISA. The ELISA value of homologous antigen (▨) was indicated as 100 percent and others were relatively indicated.

した。しかし、*P. aphanidermatum* などその他の *Pythium* 属菌 8 菌とは反応せず、また *Aphanomyces* 属菌、*Phytophthora* 属菌、*Fusarium* 属菌、*Rhizoctonia* 属菌および *Verticillium* 属菌とも反応しなかった (Fig. 1-B, C, D)。

ELISA

Pa 抗血清とホモログな抗原菌株 (*P. aphanidermatum*) との反応を 100% としたとき *P. butleri* は 81.7% とよく反応した。*P. volutum* VANTERPOOL & TRUSCOTT, *P. zingiberum* TAKAHASHI, *P. graminicola* SUBRAMANIAN は、それぞれ 21.3, 15.6, 14.1% とわずかに反応したが、その他の *Pythium* 属菌とは反応しなかった。

Pi, Pp および Pu 抗血清の反応は、それぞれホモログな抗原菌株 (*P. iwayamai*, *P. paddicum*, *P. ultimum*) との反応を 100% として比較した。その結果、Pu 抗血清と *P. paddicum* との反応が 24.0% と弱い反応であったほかは、3 抗血清とも *P. debaryanum*, *P. iwayamai*, *P. irregulare*, *P. paddicum*, *P. sylvaticum*, *P. ultimum*, *P. vexans* および *A. euteiches* DRECHSLER と 50% 以上と強く反応し、*A. iridis* ICHITANI & KODAMA と 24.6~48.4% と中程度反応した。しかし、*P. spinosum* SAWADA, *P. vanterpoolii* V. KOUYEAS & H. KOUYEAS, *P. zingiberum* とは全く反応しないかあるいは 20% 以下の弱い反応であった。

また、Pa, Pi, Pp および Pu の各抗血清とも *Phytophthora* 属菌、*Peronophythora* 属菌、*Botrytis* 属菌、*Fusarium* 属菌、*Rhizoctonia* 属菌および *Verticillium* 属菌とは反応しなかった (Fig. 2)。

考 察

Pa, Pi, Pp および Pu の各抗血清は、それぞれのホモログな抗原および *Pythium* 属菌の一部の菌株と反応し、*Phytophthora* 属菌、*Peronophythora* 属菌、*Botrytis* 属菌、*Fusarium* 属菌、*Rhizoctonia* 属菌および *Verticillium* 属菌とは全く反応しなかった。このことから、*Pythium* 属菌とその他の菌とは血清学的に類縁関係はないと考えられた。西尾ら(1983a, 1983b)、および君島ら(1984)は、*Phytophthora* 属菌には属特異抗原が存在し、*Phytophthora* 属菌と *Pythium* 属菌は血清学的に類別が可能であると報告している。今回の試験でも、*Pythium* 属菌の属特異抗原の存在については明らかにできなかったが、*Phytophthora* 属菌と

Pythium 属菌とは血清学的に異なることが判明した。しかし、*Aphanomyces* 属菌と *Pythium* 属菌は血清学的に類別が可能であると報告したが(小林ら, 1988)、今回の試験では、寒天ゲル内二重拡散法では両属の類別が可能であったが、ELISA では類別できなかった。

Pa 抗血清は、寒天ゲル内二重拡散法および ELISA のどちらの試験においても *P. butleri* と非常によく反応した。この結果は、KRYWIENCZYK and DORWORTH (1980) の報告と一致した。また、*P. butleri* は *P. aphanidermatum* の synonym と考えられており (FITZPATRICK, 1923)、*P. aphanidermatum* と *P. butleri* は血清学および形態学的にも近縁であると考えられた。Pi, Pp および Pu 各抗血清は、*Pythium* 属菌のなかで *P. debaryanum*, *P. irregulare*, *P. iwayamai*, *P. paddicum*, *P. sylvaticum*, *P. ultimum*, *P. vexans* などと強い反応を示し、*P. aphanidermatum*, *P. butleri*, *P. graminicola*, *P. periplocum*, *P. spinosum*, *P. vanterpoolii*, *P. volutum* および *P. zingiberum* などとは反応が弱いかあるいは全く反応しなかった。このことから、*Pythium* 属菌は血清学的類縁関係において、*P. aphanidermatum* および *P. butleri* のグループ、*P. debaryanum*, *P. irregulare*, *P. iwayamai*, *P. paddicum*, *P. sylvaticum*, *P. ultimum* および *P. vexans* のグループ、*P. graminicola*, *P. periplocum*, *P. spinosum*, *P. vanterpoolii*, *P. volutum* および *P. zingiberum* のグループの 3 つに分類することができると考えられた。KRYWIENCZYK and DORWORTH (1980) は、*Pythium* 属菌を血清学的に 4 グループに分類することができ、そのなかで *P. debaryanum*, *P. irregulare*, *P. sylvaticum* および *P. ultimum* は同じグループに属すると報告しているが、今回の試験結果からもこれらの菌は血清学的に同じグループに分類することができた。

君島ら(1990)は、今回作製した抗血清を利用し、根腐れ症状を呈したカーネーションから分離した病原菌が *Pythium* 属菌の一種であると同定した。このように *Pythium* 属菌の同定に今回作製した抗血清は有効な手段となることが判明した。今後は、さらに特異性の高い抗血清を作製し、種の同定の可能性について検討し、さらに土壌検診への応用についても検討したい。

摘 要

1. *Pythium aphanidermatum* (Pa), *P. iwayamai* (Pi), *P. paddicum* (Pp) および *P. ultimum* (Pu) 各菌糸の可溶性分画を用いて抗血清を作製し、その反応

特異性を *Pythium* 属菌 15 菌株, *Aphanomyces* 属菌 2 菌株, *Phytophthora* 属菌 6 菌株, その他の菌株 5 菌株, 計 28 菌株を供試して, 寒天ゲル内二重拡散法および ELISA により調べた。

2. Pa 抗血清は, *P. aphanidermatum* および *P. butleri* とのみ反応し, 他の *Pythium* 属菌, *Phytophthora* 属菌, *Aphanomyces* 属菌, *Botrytis* 属菌, *Fusarium* 属菌, *Rhizoctonia* 属菌および *Verticillium* 属菌とは反応しなかった。

3. Pi, Pp および Pu 抗血清は, *P. debaryanum*, *P. irregulare*, *P. iwiyamai*, *P. paddicum*, *P. sylvaticum*, *P. ultimum*, *P. vexans* などと良く反応し, *P. aphanidermatum*, *P. graminicola*, *P. spinosum*, *P. zingiberum* などとは反応しなかった。さらに *Phytophthora* 属菌, *Peronophythora* 属菌, *Botrytis* 属菌, *Fusarium* 属菌, *Rhizoctonia* 属菌および *Verticillium* 属菌とも反応しなかった。しかし, *Aphanomyces* 属菌とは寒天ゲル内二重拡散法では反応しなかったが, ELISA では反応した。

4. この血清反応の特異性から, *P. aphanidermatum* と *P. butleri* は血清学的に近縁であり, 供試した *Pythium* 属菌は 3 つのグループに分けられると考えられた。

引用文献

- ADASKAVEG, J.E. (1988) Comparative protein studies of several *Pythium* species using isoelectric focusing. *Mycologia* 80: 665-672.
- FITZPATRICK, H.M. (1923) Generic concepts in the Pythiaceae and Blastocladiaceae. *Mycologia*. 15: 166-173.
- 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 (1990) カーネーションから分離された 2 種の *Pythium* 菌について. 日植病報 56: 148 (講要)
- 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.
- 小林慶範・君島悦夫・川合 昭・西尾 健 (1988) 数種 *Aphanomyces* 属菌株間の血清学的類縁関係について. 植防研報 24: 15-20.
- KRYWIENCZYK, A.J. and C.E. DORWORTH (1980) Serological relationships of some fungi of the genus *Pythium*. *Can. J. Bot.* 58: 1412-1417.
- MACDONALD, J.D., J. STITES and J. KABASHIMA (1990) Comparison of serological and culture plate methods for detecting species of *Phytophthora*, *Pythium* and *Rhizoctonia* in ornamental plants. *Plant Dis.* 74: 655-659.
- MOHAN, S.B. (1989) Cross-reactivity of antiserum raised against *Phytophthora fragariae* with other *Phytophthora* species and its evaluation as a genus-detecting antiserum. *Plant Pathology* 38: 352-363.
- 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* 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.
- PLAATS-NITERINK, A.J. VAN DER (1981) Monograph of the genus *Pythium*. *Studies in mycology*, No. 21. Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn, The Netherlands.
- WATERHOUSE G.M. (1968) The genus *Pythium* PRINGSHEIM. *Commonwealth Mycological Institute, Mycological Papers* No. 110.