

抗血清利用による細菌由来樹木こぶ病菌の類別

琉球大学農学部 樋口 浩・大宜見朝栄

1. はじめに

植物病原細菌の分類・同定を行う場合、一般に細菌学的性状として形態的、培養的、生理・生化学的性質等について多くの試験を必要とするため、長時間を要する。そこで、補助的手段として特異性が高い血清反応を利用することがよくみられる。著者らは、ヤマモモのこぶ病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *myricae*)⁰ を用いて抗血清を調製し、これと *Pseudomonas syringae* の各病原型 (Pathovar) との血清反応を分析し、Pathovar の類別手段として十分活用できると判断したので報告する。

なお、本報告は昭和55年7月～56年2月までに試験研究したものを取りまとめたものである。

2. 材料と方法

(1) 抗血清の作製^{1, 6, 9)}

家兔2匹 (1.9kg, 2.7kg) を準備し、血清中に抗体を産生させるために、抗原としてヤマモモこぶ病菌MR4を用いた。兎の耳縁静脈には細菌濃厚懸濁液 (10⁹/ml (希釈液は生理食塩水-食塩0.85g, 蒸留水100ml-)) を注射した。静注スケジュールは昭和55年7月29日から8月27日まで、ほぼ4日間隔で計8回実施した。因みに、最初は0.1mlを注射し、次回からは徐々に増量し、最終的に2ml注射した。抗原は調整後、4°Cの冷蔵庫に保ったものを用いた。第7回目注射後に試験的に採血し、試し凝集反応を行った。供試した兎のうち一匹は、抗体価が640倍以下であったが、もう一匹は2560倍まで上がったため、実験には高い方の個体を使うことにした (表-1)。

静注終了後一週間後に、頸動脈から全採血した。すなわち、滅菌した三角フラスコに採血した血液を、直ちにウォーターバス (37°C) 中に保ち、約30分後、分離した血清をピペットで別の容器にとり、遠沈法 (2500rpm, 5分間) によって赤血球を完全に除いたのち、凍結保存 (-20°C) した。

(2) 供試菌の選定

次の6菌種6菌株を供試した。

1) ヤマモモこぶ病菌MR4菌株⁰

Pseudomonas syringae pv. *myricae*

2) ナカハラクロキ癌腫 (こぶ) 細菌病菌SL3菌株⁹⁾ (未同定種)3) シャリンバイこぶ病菌RU2菌株⁷⁾

Pseudomonas syringae pv. *rhapiolepidis*

4) ウラジロエノキこぶ病菌TO1菌株⁸⁾

Pseudomonas syringae pv. *tremae*

5) カクレミノこぶ病菌DT1菌株⁸⁾

Pseudomonas syringae pv. *dendropanacis*

6) センダンこぶ病菌MA2菌株²⁾

Pseudomonas meliae

以上の6菌株をPDA (半合成バレイショ煎汁寒天培地) に斜面培養し、菌苔を生理食塩水で希釈して細菌懸濁液 (約10⁹/ml) とした。

(3) 試験管内凝集反応試験

細菌懸濁液を連続2倍希釈の抗血清入り試験管に等量づつ分注し、2時間後と24時間後、それぞれ観察し、凝集が起った最高希釈倍数を記録した。

3. 結果および考察

試験管内凝集反応試験の結果は、表-2に示す通りであった。すなわち、ヤマモモこぶ病菌MR4菌株、シャリンバイこぶ病菌RU2菌株、ウラジロエノキこぶ病菌TO1菌株およびカクレミノこぶ病菌DT1菌株では、それぞれ1280～2560倍、160～320倍、640倍および320～640倍まで凝集反応を確認できた。一方、ナカハラクロキ癌腫 (こぶ) 細菌病菌SL3菌株およびセンダンこぶ病菌MA2菌株では、いずれも全く反応を示さなかった。これにより凝集反応を示した4菌種は、互いに極めて近い類縁関係にあることおよび他の2菌種は、全く別の細菌であることが明らかになった。このことは後の研究成果によって、ウラジロエノキこぶ病菌、カクレ

Hiroshi HIGUCHI, Choei OGIMI (Col. of Agric., Univ. of the Ryukyus, Nishihara, Okinawa 903-01)
Classification of gall disease bacteria isolated from some trees, using an antiserum of Yamamomo's pathotype strain MR 4

ミノコブ病菌およびシャリンバイコブ病菌が、それぞれ *Pseudomonas syringae* 群の独立した病原型であると同定され、*pv. tremae*⁶⁾、*pv. dendropanacis*⁵⁾ および *pv. raphiolepidis*⁷⁾ と命名されたことにより証明された。

4. おわりに

ヤマモモコブ病菌の抗血清は、*Pseudomonas syringae* に属する樹木コブ病菌の Pathovar の類縁関係を研究するのに有効な手段と考えられる。今後は未発表のコブ病菌の同定においても、一手法として取り入れたいと考えている。

本研究を遂行するにあたり、静岡大学農学部教授後藤正夫博士には、多くの有益なご指導を賜った。ここに心から感謝の意を表する。

引用文献

- (1) 明日山秀文ほか：植物病理実験法，519～575，日本植物防疫協会 東京，1962
- (2) 大宜見朝栄：琉大農学報，24 497～556，1977
- (3) 大宜見朝栄・樋口 浩：92回日林論：136（講要），1981
- (4) —————：日植病報 47(4)，443～448，1981
- (5) 大宜見朝栄ほか：日植病報 54(3)，296～302，1988
- (6) —————：日林誌 70 (10)，441～446，1988
- (7) —————：100回日林論：154（講要），1988
- (8) 佐藤昭二ほか：植物病理学実験法，117～120，講談社 東京，1983
- (9) 瀧本清透：改編微生物学及植物病理学実験法，160～166，養賢堂 東京，1956

表-1 試し凝集反応判定結果

兎 個 体	希釈培数 反応時間	20	40	80	160	320	640	1280	2560	(倍) 対照区 (生理食塩水)
		No1	2 hr 後	+++	+++	++	++	+	+	—
	24 hr 後	+++	+++	++	++	++	—	—	—	—
No2	2 hr 後	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	—
	24 hr 後	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	—

注：+++ ~ — は、凝集程度を示す。

表-2 試験管内凝集反応試験結果

兎 個 体	希釈培数 反応時間	20	40	80	160	320	640	1280	2560
		ヤマモモ	2 hr 後	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MR 4	24 hr 後	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	—
ナカハラクロキ	2 hr 後	—	—	—	—	—	—	—	—
SL 3	24 hr 後	—	—	—	—	—	—	—	—
シャリンバイ	2 hr 後	+++	+++	+++	+++	+	—	—	—
RU 2	24 hr 後	+++	+++	+++	+++	—	—	—	—
ウラジロエノキ	2 hr 後	+++	+++	+++	+++	+++	++	—	—
TO 1	24 hr 後	+++	+++	+++	+++	+++	++	—	—
カクレミノ	2 hr 後	+++	+++	+++	+++	+++	+	—	—
DT 1	24 hr 後	+++	+++	+++	+++	+++	—	—	—
センダン	2 hr 後	—	—	—	—	—	—	—	—
MA 2	24 hr 後	—	—	—	—	—	—	—	—

注：対照区は生理食塩水を使用し、いずれも — であった。+++ ~ — は、反応程度を示す。