

# トマトかいよう病菌 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* の Dot Immuno-Binding Assay (DIBA) 法および Tissue Printing Immunoassay (TPI) 法による検出

石井貴明・嶽本弘之  
(生産環境研究所)

高感度かつ簡易な血清学的検出法である DIBA 法及び TPI 法のトマトかいよう病の簡易診断への適用を試みた。トマトかいよう病菌 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* YM7709 株で作成した抗血清を用いて本県で分離された *C. m.* subsp. *michiganensis* 8 菌株及び N6601 株の計 9 菌株の血清学的性質を寒天ゲル内二重拡散法によって検討した。その結果、抗 YM7709 血清は供試したトマトかいよう病菌の 9 菌株と特異的に反応したが、他種細菌とは反応しなかった。また、これら 9 菌株間に血清学的差異は認められなかった。以上の結果から、本病原細菌の検出に抗 YM7709 血清による血清学的手法が利用できる可能性が高いことが示唆された。精製した抗 YM7709 IgG を用いた DIBA 法による本病原細菌の検出について検討したところ、培養細菌の懸濁液を用いた場合、検出限界は  $1.0 \times 10^6$  cfu/ml ( $1.0 \times 10^3$  cfu/dot) であった。さらに、接種したトマトの発病小葉及び自然感染トマトの発病小葉のいずれにおいても DIBA 法及び TPI 法による本病原細菌の検出が可能であった。以上の結果から、DIBA 法及び TPI 法はトマトかいよう病の簡易診断に適用可能と考えられる。

[キーワード：トマトかいよう病, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, 血清学的検出法, DIBA 法, TPI 法, 簡易診断]

Serological Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a Pathogen of Tomato Bacterial Canker, with Application of Using Dot Immuno-Binding Assay (DIBA) and Tissue Printing Immunoassay (TPI). ISHII Takaaki and HIROYUKI TAKEMOTO (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan.) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 20 : 42-47 (2001)

In this study, the serological characteristics of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a pathogen of bacterial canker, was investigated, prior to the application of serological methods, DIBA and TPI for the detection of this pathogen. In the Ouchterlony double immunodiffusion test, antisera raised against *C. m.* subsp. *michiganensis* strain YM7709 were specific to 8 strains from Fukuoka prefecture and a strain N6601 of *C. m.* subsp. *michiganensis*. However there was no reaction to other phytopathogenic bacteria. These strains of *C. m.* subsp. *michiganensis* also fell into the single serogroups, it was suggested from the result that the serological methods could be used in the detection of *C. m.* subsp. *michiganensis*. Nine strains of *C. m.* subsp. *michiganensis* were detected by the DIBA method to a limit of  $1.0 \times 10^6$  cfu/ml ( $1.0 \times 10^3$  cfu/dot). Furthermore, *C. m.* subsp. *michiganensis* in leaves derived from inoculated tomato plants and from wilting tomato plants collected in fields, was detected by using DIBA and TPI. Although DIBA and TPI could hardly detect *C. m.* subsp. *michiganensis* from latently infected tomato leaves, only the diseased leaves from inoculated plants and the wilting plants in the commercial green house showed strong reactivity in DIBA and TPI. These results suggest that DIBA and TPI can be useful for detection of *C. m.* subsp. *michiganensis* on diseased tomato leaves.

[Key words : tomato bacterial canker, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, serological method, DIBA, TPI]

## 緒言

トマトかいよう病は *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* によって引き起こされる細菌性の病害で、トマトの重要病害の 1 つである。本病は一度発病すると薬剤による防除効果が低く、また、発病株を中心に降雨や管理作業によって容易に二次伝染を引き起こし、圃場内に蔓延する。従って、罹病株の早期発見、除去は防除上極めて重要である。しかし、本病の初期病徴はトマト萎凋病、青枯病、斑点細菌病等と極めて類似している上に識別の指標とされる植物表面のコルク状病斑および果実の鳥眼状病斑は認められないこともあるため、病徴による識別は困難である。そのため、本病の簡易かつ

迅速な診断法の開発が必要とされてきた。

ウイルスや細菌による植物病害の簡易診断における有力な手法に特異的抗体を利用した血清学的手法がある。中でも ELISA 法は検出感度が高く、定量的検出が可能であり、各種ウイルス病のほかトマトかいよう病を含むさまざまな細菌性植物病害の簡易診断に適用可能であることが示唆されている<sup>1,6,7,11,16</sup>。しかし、ELISA 法には酵素結合抗体の作製など予め準備が必要な点や反応操作に比較的長時間を要する点が短所として挙げられる。そこで、これらの短所を改良する方法として操作性に優れ、より迅速かつ多数の試料の同時処理が可能な DIBA (Dot Immuno-Binding Assay) 法の変法が日比<sup>5</sup>によって開発され、植物ウイルス検出に適用された。ま

た、DIBA法の長所を維持しながら、より簡易なTPI (Tissue Printing Immunoassay)法を植物ウイルスに応用した例も報告されている<sup>10,17,18)</sup>。しかし、これらの手法を植物病原性細菌の検出に利用した報告は少なく<sup>8,12)</sup>、トマトかいよう病についても検討されていない。そこで、本研究ではDIBA法およびTPI法がトマトかいよう病の簡易診断へ適用できるか否かについて検討したので報告する。

## 材料および方法

### 1 供試細菌

供試菌株はTable1に示した。トマトかいよう病菌 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* の分離菌8株は、本研究室及び福岡県病害虫防除所で1999年～2000年に県内で採集した罹病トマトから分離、同定されたものである。これらの菌株はSMCMM培地<sup>15)</sup>を用いた常法で単コロニー分離した後、トマト幼苗(‘ハウス桃太郎’)に対する病原性を確認し、西山<sup>13)</sup>によるAPI20NE(日本ビオメリユーパイオテック社、東京)を用いた簡易同定法に従って同定した。その他の菌株については他研究機関から過去に分譲を受けた後、本研究室で保存していたものである。供試菌株はPS液体培地もしくはPSA斜面培地を用いて培養した。ただし、SMCMM培地を用いたトマト小葉からの *C. m.* subsp. *michiganensis* の検出では30℃で7日間培養した。

### 2 本県産 *C. m.* subsp. *michiganensis* の血清学的性質

供試した *C. m.* subsp. *michiganensis* の抗血清は農林水産省野菜・茶業試験場環境部病害研究室の白川氏から

分譲を受けた(抗YM7709血清)。供試菌株の血清学的性質は寒天ゲル内二重拡散法を用いて検討した。PBS(最終濃度0.85%のNaCl及び0.02%のNaN<sub>3</sub>を含む20mMリン酸緩衝液、pH7.4)に寒天(Agar noble, 和光純薬, Tokyo)を1.0%(W/V)になるように融解し、スライドガラス上に重層した。寒天液が固化した後、スライドガラス中心の直径5mmの試料孔1個の周囲に同径の試料孔8個を中心から等距離かつ均等に配置した。中心の試料孔に抗血清原液20μlを、周囲の試料孔に約1.0×10<sup>9</sup>cfu/mlになるようにPBSで調製した供試細菌懸濁液20μlを注入し、湿室内で28℃に保持した。沈降帯の観察は7日目まで毎日行った。

### 3 トマト小葉からの試料液の調製

ELISA法及びDIBA法に供試するトマト小葉からの試料液の調製は、白川・佐々木の報告<sup>17)</sup>に準じた。ただし、供試したトマト小葉は常法で表面殺菌した後細断し、小葉1.0g:PBST10ml(最終濃度0.02%のTween20を含むPBS)の割合で混和した。次いで15ml容の滅菌試験管内で25℃、30分間、緩やかに振とう後、上精を試料液原液とした。

### 4 ELISA法による *C. m.* subsp. *michiganensis* の検出

酵素結合抗体法による検出にはDAS-ELISA法<sup>2)</sup>を用い、操作および酵素結合抗体の作成については白川・佐々木<sup>16)</sup>の方法に準じた。コーティングは炭酸緩衝液を用いてIgG濃度5μg/mlで4℃、24時間で行った。試料液(抗原液)は100μl/ウェルで37℃、3時間反応さ

Table 1 List of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and other bacterial strains used.

Strain and isolate	Host	Source	Reference
<i>C. m.</i> subsp. <i>michiganensis</i>			
strain N6601	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	Nagano Pref.	NIAS <sup>1)</sup>
isolate FPCM 9901	"	Fukuoka Pref. Yanagawa city	FARC <sup>2)</sup>
FPCM 9902	"	Yamato town	"
FPCM 9903	"	Ukiha town	"
FPCM 9904	"	Kurume city	"
FPCM 9905	"	Yoshii town	"
FPCM 0001	"	Kaho town	"
FPCM 0002	"	Fukuoka city	"
FPCM 0003	"	Fukuma town	"
<i>C. m.</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	<i>Solanum tuberosum</i> L	Hokkaido	NIAS
starin 1			
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Rosa</i> sp.	Fukuoka Pref.	FARC
isolate FPAT 9701			
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	Unknown	Ehime Pref.	EAES <sup>3)</sup>
strain EH8514			
<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Solanum melongena</i>	Nara Pref.	CNAEN <sup>4)</sup>
strain 8103			

1) National Institute of Agricultural Sciences, Tokyo, Japan

2) Fukuoka Agricultural Research Center

3) Ehime Agricultural Experiment Station

4) Chugoku National Agricultural Experimental Station

せ、酵素結合抗体は1,000倍希釈で、37℃、3時間反応させた。判定は $Abs_{405} = 0.1$ 以上を陽性とした。なお、抗血清からのIgGの精製はImmunoPure IgG (Protein A) Purification Kit (PIERCE社, Rockford, IL)を用いて行い、精製したIgGは、1.0 mg/mlの濃度になるようにPBS(グリセロール及びアジ化ナトリウムをそれぞれ最終濃度20%及び0.02%で含む)で調製後、4℃で保存した。

## 5 DIBA法による*C. m. subsp. michiganensis*の検出

DIBA法による検出は試料液(抗原液)の調製法を除いて、日比<sup>5)</sup>の方法に準じた。支持体にはクリアプロット-P膜(ATTO社, 東京)を用い、以下に示した倍率で希釈した一次抗体及び3,000倍希釈した二次抗体は25℃、30分間反応させた。ブロッキング、一次抗体および二次抗体の希釈はTBST-スキムミルク(最終濃度で0.85% NaCl, 0.02% Tween20 および5%スキムミルクを含む50mM Tris-HCl緩衝液, pH7.6)で行い、二次抗体にはアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギIgG-ヤギIgG(EY laboratories社, San Mateo, CA)を供試した。また、酵素の基質および発色剤としてBCIP/NBT Color Substrate(Promega社, Madison, WI)を供試した。

### (1) 一次抗体の至適濃度の検討

抗原として30℃、48時間で斜面培養した*C. m. subsp. michiganensis*の細菌懸濁液を作成し、PBSTで $1.0 \times 10^8$  cfu/mlになるように調製し、10倍~1,000倍まで10段階希釈した。また、健全トマト小葉から調製した試料液の原液及びその10倍希釈液を対照とした。一次抗体の希釈倍率は100倍、500倍、1,000倍、2,000倍、4,000倍及び8,000倍に設定した。希釈した抗原と一次抗体との組み合わせにおけるスポットの発色の有無を肉眼で調査し、一次抗体の至適濃度を検討した。

### (2) 抗YM 7709血清を用いたDIBA法の検出限界及び反応特異性

*Clavibacter*属細菌は30℃、48時間、他属細菌は30℃、24時間培養した。培養した各植物病原細菌の供試菌株13株を抗原とし、 $1.0 \times 10^8$  cfu/mlになるようにPBSTで調製した。これを原液として $1.0 \times 10^8$  cfu/mlまで10段階希釈し、各細菌懸濁液1 $\mu$ lをDIBA法に供試した。

### (3) *C. m. subsp. michiganensis*を接種したトマト小葉からの検出

接種には3~4葉期のトマト苗(‘ハウス桃太郎’)を用いた。PS液体培地で30℃、24時間、100rpmで振とう培養した*C. m. subsp. michiganensis* FPCM9901株の菌体を遠沈後、滅菌水で約 $1.0 \times 10^8$  cfu/mlに調整し、トマト苗に浸根接種した。接種後はポットに移植し、ガラス温室で維持した。接種14日後の発病株から発病小葉及び未発病小葉を回収し、試料液を作成した。試料液原液は16倍まで2段階希釈し、各希釈液の2 $\mu$ lをスポットした。検出には異なる3株由来の3小葉を供試した。

## 6 TPI法による*C. m. subsp. michiganensis*の検出

TPI法はLinら<sup>10)</sup>の方法に準拠し、検出には接種による発病トマト小葉及び自然発病トマト小葉を供試した。トマトへの*C. m. subsp. michiganensis* FPCM9901株の接種は5の(3)と同様に行った。圃場から採取した発病トマト株についてはSMCMM培地及びELISA法を併用して*C. m. subsp. michiganensis*を検出し、トマトかいよう病であることを確認した。TPI法の概要は以下のとおりである。小葉を葉巻状に固く巻き、中央部をカミソリで横断後、断面をクリアプロット-P膜に押しつけ、Tissue-printの試料シートとした。シートは最終濃度1.0%のTriton-X100及び最終濃度5.0%(W/V)のスキムミルクを含むPBSTで25℃、30分間ブロッキングした。以降の操作は、5のDIBA法に準じた。

## 結 果

### 1 本県産*C. m. subsp. michiganensis*の血清学的性質

本県で分離された8株を含む*C. m. subsp. michiganensis*の供試9菌株について血清学的差異の有無を調査した結果、供試した*C. m. subsp. michiganensis*の各菌株はいずれも、抗YM7709血清に対して明瞭な1本の沈降帯を形成し、その形成パターンに差異は認められなかった(Fig. 1)。以上のことから、供試した*C. m. subsp. michiganensis*菌株は同一の血清型に属すると考えられた。なお、YM7709血清は、対照として用いた他種の供試菌株との間に沈降帯を形成しなかった。

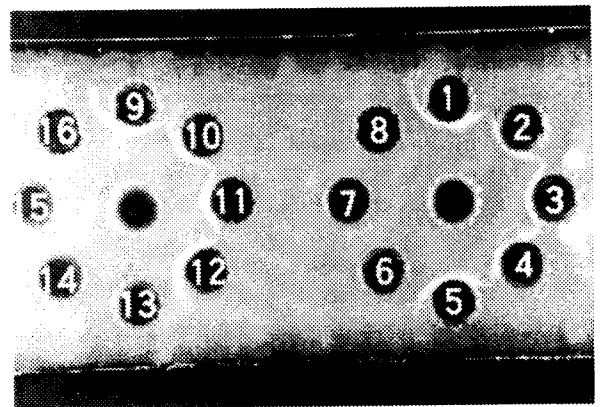


Fig.1 Ouchterlony double immunodiffusion tests of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolates and other phytopathogenic bacteria. The center wells contained 20  $\mu$ l of undiluted anti-YM7709 serum. The wells around antisera well contained 20  $\mu$ l of antigens (c. a.  $1.0 \times 10^8$  cfu/ml) of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* of (1) the strain N6601, (2) the isolate FPCM 9901, (3) the isolate FPCM9902, (4) the isolate FPCM 9903, (5) the isolate FPCM 9904, (9) the isolate FPCM 9905, (10) the isolate FPCM 0001, (11) the isolate FPCM 0002, (12) the isolate FPCM 0003, (6) and (13) the strain1 of *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, (7) the isolate FPAT 9701 of *Agrobacterium tumefaciens*, (14) the strain of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, (15) the strain 8103 of *Ralstonia solanacearum*, and (8) and (16) PBS control. The gels on glass slides were incubated at 25℃ for 72 hr.

### 2 DIBA法による*C. m. subsp. michiganensis*の検出

#### (1) 一次抗体の至適濃度の検討

一次抗体として使用するYM7709抗体の至適濃度を

決定するために希釈した細菌懸濁液と一次抗体液との組み合わせを変えて反応させ、スポットの発色を比較した。一次抗体の100倍 (IgG濃度:  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 及び500倍 ( $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) の希釈倍率では、健全トマト小葉から調製した試料液の原液及び10倍希釈液のスポットに非特異的発色が認められた。一方、一次抗体の希釈倍率が4,000倍及び8,000倍では、細菌濃度が  $1.0 \times 10^8 \text{cfu}/\text{ml}$  ( $1.0 \times 10^3 \text{cfu}/\text{dot}$ ) で発色がほとんど認められず、細菌濃度が  $1.0 \times 10^9 \text{cfu}/\text{ml}$  ( $1.0 \times 10^4 \text{cfu}/\text{dot}$ ) スポットでは全く発色が認められなかった。1,000~2,000倍希釈では健全トマト小葉からの試料液原液に非特異的発色が無く、 $1.0 \times 10^8 \text{cfu}/\text{ml}$  ( $1.0 \times 10^3 \text{cfu}/\text{dot}$ ) まで明瞭に発色が認められた。以上の結果からDIBA法では精製したYM7709抗体を1,000~2,000倍希釈で使用するのが適当と考えられた。従って、以降の試験ではYM7709抗体を2,000倍希釈で使用した。

(2) 抗YM 7709血清を用いたDIBA法の検出限界及び反応特異性

培養した *C. m. subsp. michiganensis* および他の植物病原細菌の13菌株について  $1.0 \times 10^8$  から  $1.0 \times 10^9 \text{cfu}/\text{ml}$  まで10倍段階希釈した細菌懸濁液を作成し、菌株間での反応について調査すると共に、DIBA法による *C. m. subsp. michiganensis* の検出限界について検討した。その結果、DIBA法では *C. m. subsp. michiganensis* の各菌株は細菌濃度が  $1.0 \times 10^8 \text{cfu}/\text{ml}$  ( $1.0 \times 10^3 \text{cfu}/\text{dot}$ ) まで発色が確認できた。同属のジャガイモ輪腐病細菌 *C. m. subsp. sepedonicus* strain1は  $1.0 \times 10^8 \text{cfu}/\text{ml}$  ( $1.0 \times 10^3 \text{cfu}/\text{dot}$ ) の抗原量で弱く発色したが、他属細菌では  $1.0 \times 10^8 \text{cfu}/\text{ml}$  ( $1.0 \times 10^3 \text{cfu}/\text{dot}$ ) の細菌数でも発色は全く認められなかった。

(3) *C. m. subsp. michiganensis* を接種したトマト小葉からの検出

温室栽培の健全トマトの小葉及び *C. m. subsp. michiganensis* FPCM9901株を浸根接種したトマトの小葉からのDIBA法による検出結果をFig. 2に示した。健全トマト由来の小葉ではいずれの希釈倍率でも発色は認められなかったのに対して、接種トマトの発病小葉では8倍から16倍の希釈倍率でも明瞭に発色した。しか

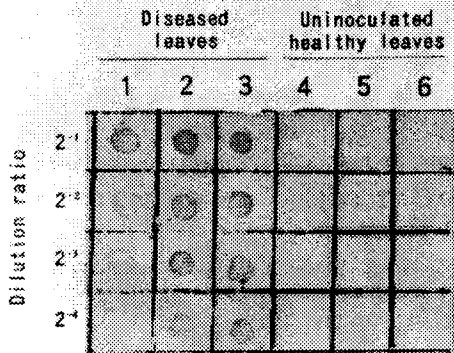


Fig.2 Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from leaves of inoculated and uninoculated tomato plants by Dot Immuno-Binding Assay. Lane 1 to 3: Samples from diseased leaves derived from inoculated tomato plants. Lane 4 to 6: samples from uninoculated healthy tomato plants.

し、接種トマト株の未発病葉を供試した場合、ほとんど検出できなかった (データ略)。

3 TPI法による *C. m. subsp. michiganensis* の検出

TPI法を利用した接種トマト小葉及び圃場由来の自然発病トマト小葉からの検出結果をFig. 3及びFig. 4に示した。接種トマトの発病小葉及び圃場由来の自然感染トマトの発病小葉では全てのTissue-print部に強い発色が認められたのに対して、健全トマトの小葉ではほとんど発色が認められなかった。接種トマトの未発病小葉を供試した場合、DIBA法の場合と同様にほとんど検出できなかった (データ略)。



Fig.3 Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from leaves of inoculated and uninoculated tomato plants using Tissue Printing Immunoassay. The 15 blots in the frame are from wilting tomato plants. The others are from uninoculated healthy tomato plants.

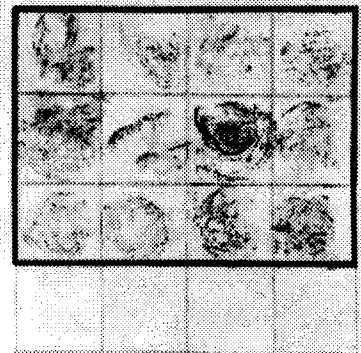


Fig.4 Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from leaves of naturally infected tomato plants in a commercial greenhouse by using Tissue Printing Immunoassay. The 12 blots in the frame are from wilting tomato plants. The others are from uninoculated healthy tomato plants used in DIBA.

考 察

植物病害の診断において病原体を簡易かつ迅速に検出、同定することは有効な防除対策を構築するために必要不可欠である。植物病原体の簡易かつ迅速な検出法として血清学的手法があり、植物ウイルスや細菌を中心に多くの植物病害の診断に応用されている。しかし、血清学的手法を病原細菌の検出や同定に利用する場合、対象とする病原細菌種において同種菌株間の血清学的性質に

大きな差異が存在しないという前提が必要となる<sup>4)</sup>。今回、白川・佐々木が作成した抗 *C. m. subsp. michiganensis* YM7709 血清に対して *C. m. subsp. michiganensis* の本県産 8 菌株及び N6601 株、同属の *C. m. subsp. sepedonicus* strain 1, *A. tumefaciens* FUPM9802 株, *E. carotovora* subsp. *carotovora* EH8514 株, 及び *R. solanacearum* 8103 株の生菌との反応を寒天ゲル内二重拡散法を用いて比較した結果, *C. m. subsp. michiganensis* の 9 菌株では同一パターンの明瞭な 1 本の沈降帯が形成され, その他の菌株では沈降帯は形成されなかった。白川・佐々木<sup>6)</sup> は抗 YM7709 血清を用いて分離地の異なる *C. m. subsp. michiganensis* 27 菌株について寒天ゲル内二重拡散法で調査したところ, 供試 27 菌株間に大きな差異が存在せず, 血清学的にはほぼ均一であることを報告した。白川・佐々木が供試した *C. m. subsp. michiganensis* の 27 菌株には, 本試験で供試した N6601 株が含まれている。従って, 白川・佐々木が供試した菌株と本試験の 8 菌株とは同一の沈降帯パターンを示すと推測され, これらの菌株は血清学的にはほぼ均一であることが示唆された。本試験の結果は, 抗 YM7709 血清が *C. m. subsp. michiganensis* の血清学的検出法に適用可能であるとした白川・佐々木の報告<sup>17)</sup> を支持するものである。

日比<sup>9)</sup> は ELISA 法の短所を改良した簡易検出法として DIBA 法の変法を植物ウイルスに応用し, 現在, 本法は ELISA 法と並んで植物ウイルス病の簡易同定法として用いられているが, 本法を植物病原細菌の検出へ応用した報告は少ない。そこで本試験では, 抗 YM7709 IgG を用いた DIBA 法による *C. m. subsp. michiganensis* の検出について検討した。その結果, 培養細菌の懸濁液を供試した場合, 細菌濃度が  $1.0 \times 10^6$  cfu/ml ( $1.0 \times 10^9$  cfu/dot) 以上で検出が可能であった。これに対して他種植物病原細菌では, ジャガイモ輪腐病細菌 (*C. m. subsp. sepedonicus* strain<sup>1)</sup>) が  $1.0 \times 10^6$  cfu/ml でわずかにスポットの発色が認められただけで, 他属の供試細菌は  $1.0 \times 10^6$  cfu/ml でも全く発色が認められなかった。これらの結果から DIBA 法を用いた *C. m. subsp. michiganensis* の特異的検出が可能であることが示唆された。

さらに筆者らは DIBA 法及び TPI 法による罹病トマト小葉からの *C. m. subsp. michiganensis* 検出についても検討した。その結果, 接種による発病小葉および自然発病小葉のいずれを供試した場合でも両法により *C. m. subsp. michiganensis* を検出することが可能であった。しかし, 接種トマトの未発病小葉を供試した場合, ほとんどの場合に病原細菌を検出することができなかった。これらの結果から DIBA 法及び TPI 法では萎凋, 黄化等の病徴が現れた小葉を試料としなければ本病の正確な診断ができないことが示唆された。しかし, 無病苗の検定等を除いて, 実際の病害診断においては対象作物に何らかの病徴様の障害が現れてから診断依頼がなされる場合がほとんどである。この点から両法は十分にトマトかいよう病の簡易診断に適用できるものと考えられる。特に TPI 法は DIBA 法及び ELISA 法と比較して罹病組織から

の試料液の調整が不要な点で最も簡易な血清学的検出法であり, 大量試料からの迅速検出に有効な方法である。また, 本法は特殊な機器が不要でかつ手法の習得が容易であるため, 栽培現場への普及も可能と考えられる。近年, ELISA 法と同等以上の検出感度を有する手法として PCR 法などの分子遺伝学的手法の応用が多くの植物病原体を対象に試みられており, 植物病原細菌ではジャガイモ輪腐病細菌の *C. m. subsp. sepedonicus* を罹病塊茎から検出した例などが報告されている<sup>3,9,14)</sup>。今回の試験結果から, 未発病の植物体における血清学的手法による *C. m. subsp. michiganensis* の検出が不可能であることが示唆されている事や今後大型共同育苗施設において無病苗育成を目的としたトマトかいよう病検定が必要となる可能性を考えるならば, 分子遺伝学的手法による *C. m. subsp. michiganensis* の高感度検出について検討する必要があると思われる。

## 謝 辞

本研究を遂行するに際して, 貴重なトマトかいよう病菌の抗血清及び御指導を賜った農林水産省野菜・茶業試験場の白川 隆博士に厚く御礼申し上げる。

## 引用文献

- 1) Cambra, M. and M. M. Lopez (1978) Titration of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* antibodies by using enzyme-labelled anti-rabbit  $\gamma$  globulins (E.L.I.S.A. indirect method) Proc. 4th Int. Conf. Plant Path. Bact. Angers. 323 - 331
- 2) 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.
- 3) Giuseppe, F., and L. Romano (1994) Identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* using the polymerase chain reaction. Can. J. Microbiol. **40** : 148 - 151.
- 4) 後藤正夫 (1981) 植物病原細菌学. ソフトサイエンス社. 東京. 12 - 15.
- 5) 日比忠明 (1984) DIBA 法による植物ウイルスの検出法. 植物防疫. **38** (8) : 36 - 40.
- 6) 河原林主一・陶山一雄・小林明男・根岸浩光・藤井溥 (1987) *Pseudomonas* 属菌数種の酵素結合抗体法 (ELISA) による検出. 日植病報 **53** : 403 (講演要旨).
- 7) 河野雅一・原沢良栄・小島 誠 (1988) ELISA によるイネ褐条病細菌の検出. 日植病報 **54** : 120 (講演要旨).
- 8) Lazarovits, G., D. Zutra, and M. Bar - Joseph (1986) Enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose membranes (dot-ELISA) in the serodiagnosis of plant pathogenic bacteria. Can. J. Microbiol. **33** : 98 - 103.

- 9) Lee, I.-M., M. Bartoszyk, D. E. Gundersen, B. Mogen, and R. E. Davis (1997) Nested PCR for ultrasensitive detection of the potato ring rot bacterium, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Appl. Env. Microbiol. **63** : 2625 – 2630.
- 10) Lin, N. S., Y. H. Hsu, H. T. Hsu (1990) Immunological detection of plant viruses and a myco-plasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. Phytopathology **80** : 824 – 828.
- 11) 松田 泉・佐藤善司 (1987) 酵素標識抗体法によるイネもみ枯細菌病菌の検出. 日植病報 **53** : 403 (講演要旨).
- 12) Nakazawa.-Nasu, Y., S. Kitanosono, H. Hasegawa, K. Okunoya, F. Yaegaki, K. Suzuki, Y. Hikichi, and T. Okuno (1999) Detection of *Ralstonia solanacearum* using tissue printing immunoassay. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. **65** : 549 – 552
- 13) 西山幸司 (1996) パソコンを用いた植物病原細菌同定システム「簡易同定96」の使い方. 農業環境技術研究所資料 **19** : 1 – 24.
- 14) Schneider, B. J., J.-L. Zhao, and C. S. Orser (1993) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by DNA amplification. FEMS Microbiol. Lett. **109** : 207 – 212.
- 15) 白川 隆・佐々木次雄 (1987) トマトかいよう病細菌の検出用選択培地. 日植病報 **54** : 540 – 543.
- 16) 白川 隆・佐々木次雄 (1990) トマトかいよう病細菌 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* の酵素結合抗体法による検出. 野菜・茶業試験場研究報告 **C.1** : 75 – 83.
- 17) Suzuki, K., A. Saito, C. Piyasak, A. Okumura, and Y. Hikichi (1995) Infection route of cucumber mosaic virus in *Gentian*. 3) Detection of CMV from stems at cutting after harvest. Annu. Rept. Plant Prot. North Japan **46** : 91 – 94
- 18) Takeshita, M., M. Suzuki, S. Kuwata, and Y. Takanami (1998) Involvement of cucumber mosaic cucumovirus RNA2 and RNA3 in viral systemic spread in radish plant. Archiv. Virol. **143** : 1109 – 1117.