

有明海のり漁場から分離したあかぐされ病原菌Pythiumに関する研究IV

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	藤田, 雄二 銭谷, 武平
巻/号	43巻11号
掲載ページ	p. 1313-1318
発行年月	1977年10月

有明海のり漁場から分離したあかぐされ病原菌 *Pythium* に関する研究—IV

病原菌株の血清学的区別*1

藤田 雄二・銭谷 武平

(1977年5月18日受理)

Studies on Pathogenic *Pythium* of Laver Red Rot in Ariake Sea Farm—IV Serological Differentiation of Pathogenic *Pythium* Strains

Yuji FUJITA*2 and Buhei ZENITANI*2

A comparative study of *Pythium* strains causing laver red rot in Ariake Sea of Kyushu and in Tohoku was carried out serologically by preparing antisera against mycelia of *Pythium* sp. S1 from Ariake Sea and *P. porphyrae* M1 from Miyagi Prefecture of Tohoku. In agar-gel diffusion between the antisera and mycelial extract-antigens, 5 test strains from Ariake Sea were found to be related to 2 strains of *P. porphyrae* in general patterns. However, they could be distinguished from *P. porphyrae* by some differences in pattern and/or the number of precipitin lines, and closely resembled 2 strains from Fukushima Prefecture of Tohoku. Therefore, *Pythium* strains of laver red rot could be divided into two serological groups which corresponded with the groups based on morphology and physiology of the test strains. On the other hand, the two antisera did not cross-react with the antigens of terrestrial species, *P. monospermum*, *P. debaryanum*, *P. aphanidermatum* the *P. spinosum*. But one precipitin line was produced when the antigen of *P. monospermum* was tested with antiserum to *Pythium* sp. S1 indicating that *P. monospermum* morphologically resembles the strains from Ariake Sea rather than *P. porphyrae*.

The strains from Ariake Sea and Fukushima Prefecture were identified as *P. porphyrae* taxonomically, but the species was further subdivided into two groups, namely Ariake-Fukushima group and Miyagi group, based on serological and morphological characteristics.

先に、有明海産のりあかぐされ病原菌 *Pythium* の一般菌学的性状¹⁾ およびその他の二・三の培養上の性状^{2,3)}を東北産病原菌 *Pythium* と比較し、病原菌はこれら性状の相違によつて有明海・福島産菌株と宮城産 *P. porphyrae* の2群に区別されることを明らかにした。

免疫血清学的手法は種々の微生物の同定や類縁関係などの検討に適用されており、近年、腐敗菌科 (Pythiaceae) の *Phytophthora* 属菌などでも免疫拡散法が適用されている⁴⁻⁶⁾。このような方法によつてあかぐされ病原菌の2群の類縁関係を一層明確にすることが出来れば、有明海・福島産菌株の種類の同定に有力な根拠を与えるものと考えられる。さらにまた本法は菌株群の鑑別、病原菌の検出への応用も期待される。本報では、有明海産菌株と *P. porphyrae* の代表菌株の免疫血清を調製し、免疫拡散反応によつてあかぐされ病原菌の菌株間ならびにこれらと陸生 *Pythium* 菌4種類との類縁関係を比較検討した。

*1 本研究の概要は昭和50年10月日本水産学会秋季大会で発表。本研究の一部は昭和50年度文部省科学研究費によつた。

*2 長崎大学水産学部 (Fac. Fish., Nagasaki Univ., Nagasaki, Japan).

実験材料および方法

供試菌株 前報¹⁾で供試した有明海産 5 菌株, 福島産 2 菌株, 宮城産 *P. porphyrae* 2 菌株の 9 菌株以外に, 比較のために *P. debaryanum* IFO 5919, *P. aphanidermatum* IFO 7030, *P. spinosum* IFO 7031 および高橋⁷⁾が分離・同定した *P. monospermum* も供試した。菌株の保存法は前報¹⁾の通りであるが, 陸生菌の場合には海水の代りに淡水を用いて調製したコーンミール培地を用いた。

培地および培養方法 多量培養用の培地の調製はグルコース 0.5 g, L-グルタミン酸ナトリウム 0.2 g, リン酸水素二カリウム 8 mg, およびトリス 0.1 g を人工海水 (50%) 100 ml に溶解し, pH 7.5 に調整した。その他の培地の調製法ならびに人工海水組成は前報²⁾の通り。接種源は FULLER ら³⁾の平板培地で 20°C, 5~7 日間培養したコロニーの先端部を径 1 cm のディスクとして切り取り使用した。このディスクをのりあかぐされ病原菌および *P. monospermum* では 8 枚, また他の陸生菌では 5 枚を 500 ml 容三角フラスコ中の多量培養用培地 200 ml に接種し, 20°C で 14 日間静置培養した。なお, 陸生菌も海水を含む培地で培養したが, その生育は淡水培地に比較して劣るようなことはほとんど認められなかつた。

免疫血清の調製 有明海産 *Pythium* sp. S1 株と宮城産 *P. porphyrae* M1 株の 2 菌株を代表菌株として, 免疫血清を下記の方法で調製した。多量培養で得た菌糸体は 0.5% ホルマリン加生理食塩水で 3 回洗浄し, 菌糸体を分離してから同液に浸漬し冷蔵庫 (5°C) に 1 夜放置した。菌糸体は分離後, その乾燥重量が 4~5 mg/ml になるように生理食塩水に浮遊させ, ガラスホモジナイザーで磨砕して免疫抗原液とした。免疫血清の調製には家兔 (2.5~3.0 kg) を用い, 免疫抗原液とフロイントの完全アジュバンド (ヤトロソ社) を 1:1 に混合したものを 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 3.0 ml の順に四肢掌または趾掌の皮内に注射した。注射の間隔は第 1 回~3 回目までは 5 日間, それ以降は 7 日間とした。最後の注射から 1 週間毎に試験採血し, 凝集素価が 3,200 倍以上に上昇した後に頸動脈から全採血した。血清は常法によつて採取し, 56°C で 30 分間加温し非働化した後, 0.1% アジ化ナトリウムを添加して凍結保存 (-20°C) した。

凝集素価の測定 前同様にホルマリン加生理食塩水で処理した菌糸体は 0.15 M 塩化ナトリウムを含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.2, 以下 PBS と略す) で洗浄後, 再び同液に浮遊させガラスホモジナイザーで磨砕した。抗原液は, この菌糸体磨砕懸濁液をガーゼでろ過した後, 分光光度計 (日立, 101 型) を用いて 610 nm における吸光度を 0.130~0.140 に調整して使用した。凝集素価は, 生理食塩水で倍数希釈した免疫血清 0.5 ml に抗原液 0.5 ml 宛を加え, 37°C で 2 時間反応させ, 1 夜冷蔵庫 (5°C) に放置後, 凝集の有無を肉眼的に判定して測定した。

菌糸体から可溶性抗原液の調製 多量培養から分離し, 1.2% 食塩水で 3 回洗浄した菌糸体 0.5 g (湿重量) をペロナール緩衝液 (イオン強度 0.025, pH 8.6) 8.0 ml に浮遊させ, 最初ガラスホモジナイザーで磨砕し, 次に高圧窒素ガス細胞破碎装置 (Parr 社, 100~200 kg/cm²) によつて破碎した。この菌糸体破碎懸濁液を遠心分離 (3,000 rpm, 15 分) した後, その上澄液をメンブランフィルター (ミリポア社, 孔径 0.3 μ) でろ過し, そのろ液を可溶性抗原液とした。同液は蛋白質量が 6~7 mg/ml になるように限外ろ過器 (アミコン社, ミニコン B 15) を用いて濃縮した後, 凍結保存 (-20°C) した。蛋白質量は牛血清アルブミン (和光) を標準として, LOWRY ら⁸⁾の方法によつて測定した。

ゲル内免疫拡散反応 ウフタロニー法および免疫電気泳動法によつた。ウフタロニー法ではガラス板上の厚さ 1 mm の寒天平板に免疫血清, 可溶性抗原液を入れる径 3 mm の穴をあけた。穴と穴の間隔はすべて 7 mm とした。寒天 (Special agar Noble, Difco) は 1.2 g を 0.1% アジ化ナトリウムを含む PBS 100 ml に溶解した。反応は 37°C の湿室で 28 時間行つた。

免疫電気泳動法ではガラス板上の厚さ 1.5 mm の寒天平板 (11×15.5 cm) に可溶性抗原液を入れる径 2 mm の穴を 1.6 cm 間隔にあけた。寒天は 1.2 g を 0.1% アジ化ナトリウムを含むペロナール緩衝液 (イオン強度 0.025, pH 8.6) 100 ml に溶解した。泳動には免疫電気泳動装置 (東洋科学, AE-2 型) を用い, 電極槽にペロナール緩衝液 (イオン強度 0.05, pH 8.6) を入れ, 寒天幅 1 cm 当り 10 V で約 3 時間通

電した。泳動は冷蔵庫 (5°C) 中で行った。泳動終了後、2 mm 幅の溝をつくり、これに免疫血清を入れた。拡散反応は、寒天表面に 5% フェノールを噴霧した後、10°C の湿室で 7~10 日間行つた。

実験結果

凝集素価による *Pythium* sp. S1 株と *P. porphyrae* M1 株の比較 最後の免疫注射から 3 週間後に全採血して得た免疫血清の同株抗原に対する凝集素価は、S1 株免疫血清では 3,200~12,800 倍、また M1 株免疫血清では 6,400~12,800 倍を示した。両免疫血清による異株抗原に対する凝集素価によつて S1 株と M1 株を比較した結果、いずれの免疫血清によつても同株抗原の場合と同じ凝集素価を示し、凝集素価では S1 株と M1 株とは一致した。

ゲル内拡散反応によるのりあかぐされ病原菌株間の比較 S1 株あるいは M1 株の免疫血清に対する有明海産 S1~3, N1・2 株、宮城産 M1・2 株および福島産 F1・2 株抗原のウフタローニ法による拡散反応の結果を Fig. 1 に示す。S1 株免疫血清と S2・3, N1・2, F1・2 株抗原との間には S1 株抗原と同様に 3 本の沈降線が認められ、しかもいずれの沈降線も S1 株抗原による沈降線と融合した (Fig. 1. a~c)。また M1・2 株抗原によつても同様に 3 本の沈降線が認められ、沈降型も S1 株抗原と近似したが、S1 株と M1・2 株抗原による 2 本の沈降線との間には弱いスパーが形成され (Fig. 1. a, b), S1 株と M1・2 株との間には相違が認められた。M1 株免疫血清と M1 株抗原との間には明瞭な 2 本の沈降線と弱い 1 本の沈降線が形成された。また M2 株抗原でも 3 本の沈降線が形成され、そのうち明瞭な 2 本の沈降線は M1 株抗原による沈降線と融合した (Fig. 1. e)。一方、M1 株免疫血清と S1~3, N1・2, F1・2 株抗原との間にはいずれの場合も明瞭な 2 本の沈降線が形成され、沈降型も相互によく類似した。またこれらの 2 本の沈降線のうち 1 本は M1 株抗原による沈降線と完全に融合したが、他の 1 本は M1 株抗原による沈降線とス

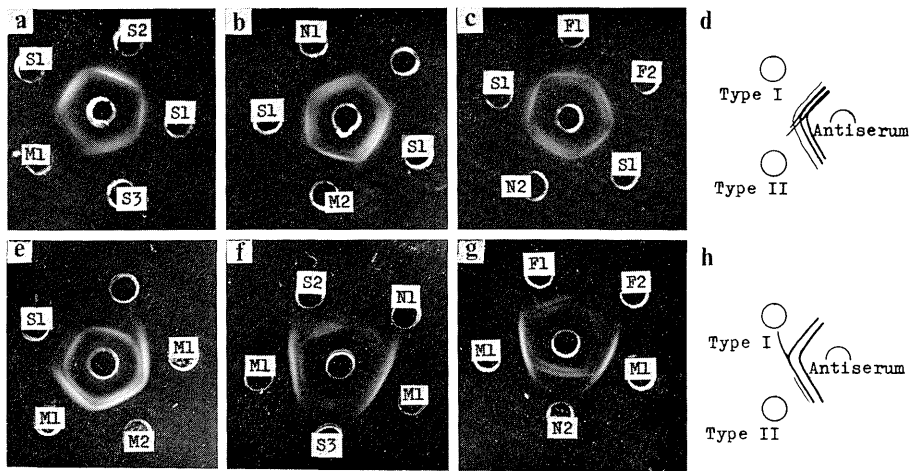


Fig. 1. Immunodiffusion patterns between mycelial extract-antigens of *Pythium* strains and two antisera by OUCHTERLONY method. Center wells; a) ~c), anti-*Pythium* sp. S1 serum. e) ~g), anti-*P. porphyrae* M1 serum. Surrounding wells; mycelial extract-antigens containing 6~7 mg protein per ml. d) and h); precipitin line drawings of two type patterns obtained with anti-*Pythium* sp. S1 serum (d) and anti-*P. porphyrae* M1 serum (h). Type I; strains S1~3, N1 and N2 from Ariake Sea of Kyushu and strains F1 and F2 from Fukushima Prefecture of Tohoku. Type II; strains M1 and M2, *P. porphyrae* from Miyagi Prefecture of Tohoku. Wells; 3 mm in diameter and 1.5 mm depth with spacing 7 mm. Reactions; 28 hrs. at 37°C in moist chamber.

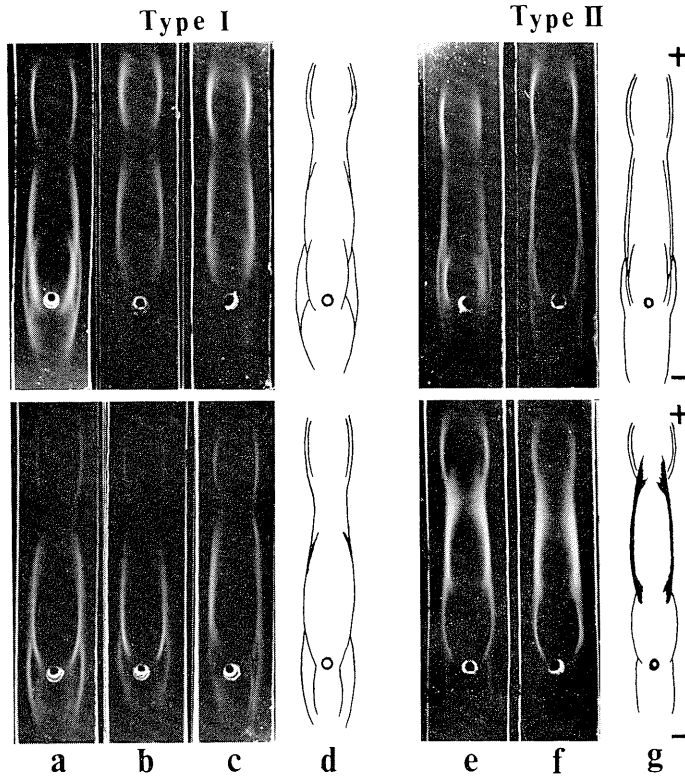


Fig. 2. Two types of immunoelectrophoresis pattern between mycelial extract-antigens of *Pythium* strains and two antisera. Antisera; upper; anti-*Pythium* sp. S1 serum, lower; anti-*P. porphyrae* M1 serum. Mycelial extract-antigens; a) strain S1, b) strain N1, c) strain F1, e) strain M1, f) strain M2. d) and g); precipitin line drawings of Type I (a~c) and Type II (e and f) respectively. The patterns of extract-antigens of strains S2, S3, N2 and F2 were similar to Type I.

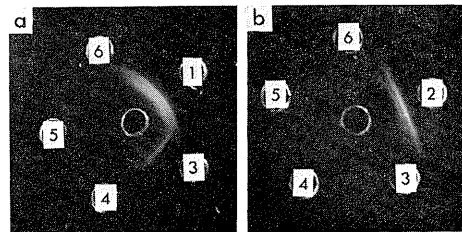


Fig. 3. Immunodiffusion patterns between mycelial extract-antigens of terrestrial *Pythium* spp. and two antisera by OUCHTERLONY method. Center wells; a) anti-*Pythium* sp. S1 serum, b) anti-*P. porphyrae* M1 serum. Surrounding wells; mycelial extract-antigens, 1) *Pythium* sp. S1, 2) *P. porphyrae* M1, 3) *P. momospermum*, 4) *P. debaryanum* IFO 5919, 5) *P. aphanidermatum* IFO 7030, 6) *P. spinosum* IFO 7031. Experimental conditions were the same as those in Fig. 1.

パーを形成し、S1~3, N1・2, F1・2 株と M1 株との間には相違が認められた (Fig. 1. e~g)。このようにウフトロニー法による反応では、すべてののりあかぐされ病原菌株は相互によく近似したが、おもに沈降型の部分的相違によつて Type I の有明海・福島産菌株と Type II の宮城産 *P. porphyrae* の 2 群に区別された (Fig. 1. d, h)。

次に免疫電気泳動法による結果を Fig. 2 に示す。S1 株免疫血清と各菌株抗原の間にはいずれの場合も 6 本の沈降線が形成された。一方、M1 株免疫血清は S1~3, N1・2, F1・2 株抗原と 6 本の沈降線を形成したが、M1・2 株抗原とは 6 本以上の沈降線を形成し、沈降線数による菌株間の相違が認められた。また両免疫血清と各菌株抗原との沈降型によつてもウフトロニー法による結果と同様に、S1~3, N1・2, F1・2 株と M1・2 株の 2 群に区別された (Fig. 2)。

のりあかぐされ病原菌と陸生 *Pythium* 菌との比較 両免疫血清に対する陸生 *Pythium* 菌 4 種類抗原のウフトロニー法による拡散反応の結果を Fig. 3 に示す。S1 および M1 株免疫血清と *P. debaryanum*, *P. aphanidermatum* および *P. spinosum* 抗原との間、また M1 株免疫血清と *P. monospermum* 抗原との間には沈降線は全く形成されなかつた (Fig. 3. a, b)。一方、S1 株免疫血清は *P. monospermum* 抗原と 1 本の沈降線を形成し、この沈降線は S1 株抗原による沈降線の 1 本と融合した (Fig. 3. a)。このようにのにりあかぐされ病原菌はいずれも陸生 *Pythium* 菌 4 種類とは血清学的に明らかに区別されたが、有明海産菌株は *P. monospermum* と血清学的類縁関係が認められた。

考 察

腐敗菌科に属する菌のうち *Phytophthora* 菌のいくつかの種類間では血清学的類縁関係が検討され⁴⁻⁶⁾、また *Pythium* 菌の鑑別に血清学的手法の適用性が検討されている^{10,11)}。しかし *Pythium* 菌の種類間の類縁関係を血清学的手法によつて研究した例はほとんどなかつたようである。

ゲル免疫拡散反応の結果、有明海産菌株は福島産菌株とよく類似したが、宮城産 *P. porphyrae* とは沈降型や沈降線による部分的相違が認められた。形態的性状においても有明海産菌株は福島産菌株とほぼ一致し、*P. porphyrae* とは逸出管の径・長さ、孢子囊の分枝などによる相違が認められている¹⁾。またあかぐされ病原菌は比較供試した陸生 *Pythium* 菌とは血清学的類縁関係がほとんど認められなかつたが、有明海産菌株は *P. monospermum* と 1 本の共通沈降線による類縁関係が認められた。のりあかぐされ病原菌は形態的性状において *P. monospermum* との類似点が多く^{1,12)}、とくに有明海・福島産菌株は分枝孢子囊によつても類似し、*P. monospermum* との形態的類似点が *P. porphyrae* より多い。*P. porphyrae* は孢子囊が分枝することがなく、このことは *P. monospermum* との形態的性状における相違の一つとされている¹²⁾。以上のようにあかぐされ病原菌株間、あかぐされ病原菌と陸生 *Pythium* 菌の血清学的類縁関係はそれぞれの形態的性状による類縁関係とよく相応する。他の多くの *Pythium* 菌の類縁関係の検討に血清学的方法の有用性が期待される。なお、のり寄生種 *P. marinum*¹³⁻¹⁵⁾ は菌株の入手が困難であつたので比較のために供試できなかった。有明海産菌株および *P. porphyrae* は *P. marinum* とは形態的に明らかに相違する^{1,12)}。

あかぐされ病原菌株はその形態的性状¹⁾、生育環境要因²⁾および有性生殖器官形成³⁾における相違から 2 群に区別されたが、その存在は血清学的にも確かめることができた。しかし両群間の血清学的特異性はあまり顕著でなく、両群は他の *Pythium* 菌と比較してむしろ密接な類縁関係にあると理解される。したがつて両群の血清学的相違は、形態的相違¹⁾と同じように species を異にするほど重要であるとは認め難い。なお、また HENDRIX & PAPA¹⁶⁾ は *Pythium* 菌の既知 species を species complex として整理統合することを提案している。このようなことも考慮して、有明海・福島産菌株は *P. porphyrae* に同定し、*P. porphyrae* は有明海・福島産群と宮城産群の 2 群に区別するのが妥当と考えられる。

あかぐされ病原菌の免疫血清は特異性が高いようで、漁場での本菌の分布状況の調査などに蛍光抗体法の適用は十分に可能であると思われる。

終りに、御懇切な教示を賜わつた九州大学農学部豊水正道教授、北御門学助教授に深謝の意を表します。また文献の教示、菌株の分与を賜わつた大阪府立大学農学部一谷多喜郎先生に感謝致します。

文 献

- 1) 藤田雄二・銭谷武平: 本誌, **42**, 1183-1188 (1976).
- 2) 藤田雄二・銭谷武平: 同誌, **43**, 89-95 (1977).
- 3) 藤田雄二・銭谷武平: 同誌, **43**, 921-927 (1977).
- 4) R. G. BURRELL, C. W. CLAYTON, M. E. GALLEGLY, and V. G. LILLY: *Phytopathology*, **56**, 422-426 (1966).
- 5) W. G. MERZ, R. G. BURRELL, and M. E. GALLEGLY: *ibid.*, **59**, 367-370 (1969).
- 6) D. M. HALSALL: *J. Gen. Microbiol.*, **94**, 149-158 (1976).
- 7) 高橋 実: 日植病報, **16**, 19-22 (1952).
- 8) M. S. FULLER, B. E. FOWLES, and D. J. McLAUGHLIN: *Mycologia*, **56**, 745-756 (1964).
- 9) O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 10) D. J. MORTON and P. D. DUKES: *Nature*, **587**, 923 (1967).
- 11) D. G. WHITE: *Phytopathology*, **66**, 523-525 (1976).
- 12) M. TAKAHASHI, T. ICHITANI, and M. SASAKI: *Trans. Mycol. Soc. Japan*, in the press.
- 13) F. Y. KAZAMA and M. S. FULLER: *Can. J. Bot.*, **48**, 2103-2107 (1970).
- 14) F. Y. KAZAMA and M. S. FULLER: *ibid.*, **51**, 693-699 (1973).
- 15) F. Y. KAZAMA and M. S. FULLER: *Mycologia*, **69**, 246-254 (1977).
- 16) F. F. HENDRIX and K. E. PAPA: *Proc. Amer. Phytopathol. Soc.*, **1**, 200-207 (1974).