凝集反応法によるスイカ果実汚斑細菌病の迅速診断法

小宮友紀子^{1,2}・白川 隆^{1,3*}・我孫子和雄⁴

ABSTRACT

KOMIYA, Y.^{1,2}, SHIRAKAWA, T.^{1,3*} and ABIKO, K.⁴ (2003). Rapid diagnosis of watermelon bacterial fruit blotch caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* with immunological agglutination methods. Jpn. J. Phytopathol. 69: 15-18.

The immunological agglutination method, using either latex particles or *Staphylococcus aureus* conjugated with anti-*Aac*-IgG, was tested for diagnosing bacterial fruit blotch of watermelon caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (*Aac*). In either case, when the suspensions of various plant pathogenic bacteria were tested, only *Aac* yielded a strong positive reaction. When sap prepared from sections including lesions was tested, both methods produced positive reactions with all sections from artificially inoculated watermelon plants. Moreover, positive reactions were observed with lesions older than 28 days. These methods are very simple, and only about 5 min/sample is needed to reach a diagnosis.

(Received May 23, 2002; Accepted September 27, 2002)

Key words: *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, watermelon, diagnosis, agglutination test, bacterial fruit blotch, latex.

スイカ果実汚斑細菌病は、*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (以下 *Aac*) によって発生する種子伝染性の病害である⁶⁾。本病は、1989～1994年にアメリカで発生して甚大な被害をもたらした⁶⁾。そのため、我が国では輸入相手国に対して栽培地検査を要求する重要病害として国内への侵入を警戒してきた³⁾。しかし、1998年に山形県ではじめて本病の発生が確認され¹¹⁾、1999年には鳥取県と長野県⁹⁾で、2001年には長野県、鳥取県、徳島県で発生した。今後、国内での蔓延防止と根絶、海外からの再侵入の防止が重要である。我が国では育苗期の苗腐敗を中心とした発病が多く、本圃では茎葉と果実での発病が少ない点がアメリカでの発病状況と異なっている。育苗期の苗腐敗症状は、他の細菌性あるいは糸状菌性の苗腐敗と識別することが困難である場合が多い。また、茎葉での病徴は、本病に特徴的で診断が容易である果実での病徴と異なり、萎凋細菌病、褐斑細菌病などの細菌性病害、糸状菌病であるつる枯病、炭疽病の病徴と似ているため、判別が困難である場合が多い。

本病の国内での蔓延を防止するには、迅速かつ正確に診断して、防除対策を早期に講じることが重要である。本病の診断法、*Aac*の検出法として、これまでにELISA法¹³⁾、選択培地法¹⁰⁾、PCR法¹³⁾、高比重ラテックス凝集反応法⁴⁾、イムノアフィニティー法が開発されている。また、著者ら⁵⁾は、より簡便な検出手法として、直接法によるDIBA法、あるいはこれの簡便法であるTPI法での検出・診断方法を報告した。しかし、上述した検出方法には特別な機材と多くの操作を必要としたり、判別までに30分～4日を必要とするため、生産現場での簡易診断には事実上、利用が困難であると考えられる。このため、より簡便かつ短時間で診断できる検出手法の開発が求められる。

これまで、植物病害において、ウイルス病と一部の細菌病でラテックス凝集反応法が簡便な検出方法として使用されている^{2,12)}。また、それと類似した検出方法として、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, 以下 *Saa*) の菌体を利用した凝集反応による検出法が報告されている^{1,7,8,14)}。これらの方法は、検出に要する操作が簡便

¹ 野菜茶業研究所果菜研究部 (〒514-2392 三重県安芸郡安濃町草生360) National Institute of Vegetable and Tea Science, Ano, Mie 514-2392, Japan

² 現: 肥飼料検査所 (〒460-0001 愛知県名古屋市中区三の丸1-2-2) Present address: Fertilizer and Feed Inspection Station, Sannomaru, Nakaku, Nagoya, Aichi 460-0001, Japan

³ 現: 野菜茶業研究所葉根菜研究部 (〒305-8666 茨城県つくば市観音台3-1-1) Present address: National Institute of Vegetable and Tea Science, Kannondai, Tsukuba, Ibaragi 305-8666, Japan

⁴ 元: 野菜茶業研究所 Formerly: National Institute of Vegetable and Tea Science

* Corresponding author (E-mail: cichorii@affrc.go.jp)

かつ短時間で診断可能であることが特徴である。そこで、スイカ果実汚斑細菌病の診断にこれら方法が適用できるか否かについて検討したので報告する。

ラテックス粒子を用いた凝集反応法による検出 *Aac* 菌株として *Aac9801* を使用し、このグルタルアルデヒド固定菌体を抗原としてウサギに免疫して抗血清を得た。この抗血清から *A. avenae* subsp. *avenae* MAFF301510 株の菌体を用いて非特異的抗体を吸収した後、硫酸塩析とセルロースカラムを用いたイオン交換クロマトグラフィーによって抗体を精製した。ラテックス粒子を用いた凝集反応法は、Slack ら¹²⁾ の方法を改変して行った。1/15 に希釈したラテックス粒子 (Sigma, 0.802 μm) 液と抗体液 (0.5 mg/ml) を 1 : 1 の割合で混合して 25°C で 4 時間、その後 4°C で一晩静置して、抗体をラテックス粒子に感作した。その後、トリス緩衝生理食塩水 (TBS, pH 7.4) で洗浄し、1 % 牛血清アルブミンと 0.02 % NaN_3 を含む 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4) に懸濁して 4°C で保存した。

検定は、10 倍に希釈した感作ラテックス粒子 10 μl と試料液 10 μl をスライドガラス上で混合し、3 分間緩く攪拌しながら凝集塊の形成を肉眼で観察した。肉眼による判定が困難な場合、実体顕微鏡を用いて観察した。

培養菌懸濁液を用いた場合、本法による *Aac* の検出限界濃度は、およそ 10^7 cfu/ml であり、 10^8 cfu/ml に調整した全ての供試 15 菌株の *Aac* は陽性反応を示した。*Aac* 以外の 5 属 15 種 16 菌株の植物病原細菌では、*Ralstonia solanacearum* で実体顕微鏡を用いた場合に観察される弱い陽性反応を示したが、その他の菌株で陽性反応を認めなかった (Table 1)。このことから、本法の *Aac* 特異性は高く、簡易同定法としての十分な感度と特異性を有するものと考えられた。

Staphylococcus aureus を用いた凝集反応法 *Saa* 菌体を用いた凝集反応法は、Lyons ら⁷⁾ の方法に準じて行った。*Saa* 菌株として ATCC12598 株を使用し、37°C で 24 時間培養した菌体を 2 % グルタルアルデヒドを含むリン

Table 1. Agglutination of plant pathogenic bacteria with using latex particles or *S. aureus* cells

Bacteria		Source	Latex agglutination	<i>S. aureus</i> agglutination
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>				
American isolate				
ATCC28625, 95-1		ATCC Georgia Univ.	+	+
Japanese isolate				
Aac 9803, Aac9901, Aac9926, Aac9922		NIVTS		
Aac9801, W9810, W9814, W9821, W9824, W9829, W9836		YPRSH	+	+
WA1122, WA1141		NVOES		
<i>A. avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	MAFF 301510	MAFF	-	-
<i>Burkholderia gladioli</i>	MAFF 301064	MAFF	-	-
<i>B. glumae</i>	MAFF 301169	MAFF	-	-
<i>B. andropogonis</i>	MAFF 301154	MAFF	-	-
<i>B. caryophylli</i>	MAFF 301192	MAFF	-	-
<i>Pseudomonas cichorii</i>	YM8705, YM7916	NIVOT	-	-
<i>P. corrugata</i>	Pco9004	NIVOT	-	-
<i>P. fluorescens</i>	Pfi9002	NIVOT	-	-
<i>P. marginalis</i> pv. <i>marginalis</i>	MAFF301417	MAFF	-	-
<i>P. putida</i>	MAFF301685	MAFF	-	-
<i>P. rubrisubalbicans</i>	MAFF301628	MAFF	-	-
<i>P. viridiflava</i>	MAFF301344	MAFF	-	-
<i>Ralstonia solanacearum</i>	MAFF730103	MAFF	±	-
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	MAFF301235	MAFF	-	-
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	MAFF301767	MAFF	-	-

+: positive reaction, -: negative reaction. ATCC: American Type Culture Collection, MAFF: Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries gene bank, NIVTS: National Institute of Vegetables and Tea Science, NVOES: Nagano Vegetable and Ornamental Crops Experiment Station, YPRSH: Yamagata Prefectural Research Station of Horticulture. Bacterial concentration of all strains was adjusted to about 10^8 cfu/ml by spectrophotometry. Bacterial suspensions were mixed with suspension of latex or cells of *S. aureus* that were conjugated with Anti-*Aac*-IgG and agitated slowly for 3 min.

酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いて 4°C で一晚固定し、グルタルアルデヒドを除去した後に 10^{10} cfu/ml となるように PBS に懸濁した。抗体 (0.5 mg/ml) と塩基性フクシン液 {PBSA (0.02% NaN_3 を含む PBS) 1000 ml に飽和塩基性フクシンエタノール溶液 1 μl を添加後、孔径 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過} と上述の固定 *Saa* 菌体液を 2 : 8 : 1 の割合で混合し、4°C で 24 時間静置した。感作した *Saa* 菌体液を PBSA で 3 回遠心洗浄し、PBSA に懸濁して 4°C で保存した。検定は、10 倍に希釈した感作 *Saa* 液 10 μl と試料液 10 μl をスライドガラス上で混合して、感作ラテックス粒子を使用した場合と同様にして行った。

培養菌液を供試した場合、本法による *Aac* の検出限界はおおよそ 10^7 cfu/ml であった。 10^8 cfu/ml の細菌懸濁液を供試した場合、15 菌株の全ての *Aac* は本法によって強い陽性反応を示した。また、上述した *Aac* 以外の植物病原細菌中で陽性反応を示す細菌種はなかった (Table 1)。以上のことから、本法は、簡易同定法としての十分な検出感度と特異性を有すると考えられた。

凝集反応法による病斑からの検出 接種によって形成した病斑からの凝集反応法による *Aac* の検出を検討した。本葉展開 2 ~ 3 葉期のスイカ実生苗に 10^8 cfu/ml の *Aac*9801 を単針付傷接種して 7 日間、28°C の飽和湿度条件に保って発病を促し、その後解放して育成した。この接種苗上に形成した病斑から 7 日間隔で凝集反応法によって *Aac* の検出を行った。葉、茎等に形成した病斑を含む 5 mm 角の試料を 1.5 ml のマイクロチューブ中で 0.5 ml の PBS と共に摩砕し、摩砕液を試料液として凝集反応法に供試した。病斑中の *Aac* 生菌数は、フェネチシリンとノボビオシンを添加しない選択培地・*Aac*SM¹⁰⁾ を用いた希釈平板法によって調査した。

その結果、感作ラテックス粒子を用いた凝集反応法、感作 *Saa* 菌体を用いた凝集反応法の両方において子葉、本葉、胚軸に形成した全ての病斑に対して強い陽性反応を認めた (Fig. 1)。この時、選択培地法による病斑 1 切片あたりの *Aac* 数は約 10^7 cfu であった。一方、*Aac* を接種していない健全植物から調整した試料液では陽性反応を認めなかった。この時、検定に必要とした時間は、試料の採取から磨砕までが 2 分、凝集反応法による検定は 3 分弱の合計 5 分弱であった。このことから両凝集反応法は、スイカ果実汚斑細菌病による病斑の診断に対して十分な陽性反応を示すことが明らかになった。また、これらの凝集反応法は、検定に特殊な機材を必要とせず、検定に数時間を必要とする ELISA 法¹³⁾、PCR 法¹³⁾、高比重ラテックス凝集反

Fig. 1. Detection of *A. avenae* subsp. *citrulli* from lesion of diseased watermelon plants with agglutination techniques. Diseased plants were sampled 7 days after inoculation. Sections, including lesions, were macerated with 0.5 ml PBS in microtest tubes, and the resulting supernatants were mixed with the suspensions of latex particles or cells of *S. aureus* that were conjugated with anti-*Aac*-IgG on slide glasses. The mixtures were agitated slowly and observed after 3 min.

応法⁴⁾と比較して 5 分とごく短時間で検定結果を得ることが可能なことから、スイカ生産圃場等での簡易検定に適していると考えられる。

本病では、わが国での初発生当初から、古い病斑から *Aac* を分離することが困難であることが経験的に知られていた。一方、筆者ら⁵⁾は、選択培地法で *Aac* の分離が困難な接種 28 日後の病斑において血清学的検出法の一つである DIBA 法、TPI 法で *Aac* を検出することが可能であることを示した。そこで、凝集反応法によるこれら古い病斑からの *Aac* 検出の可能性について調査した。その結果、感作ラテックス粒子、感作 *Saa* 菌体を用いたそれぞれの凝集反応法で、接種 28 日後の病斑においても強い陽性反応を認めた (Table 2)。一方、同一試料から選択培地で *Aac* を分離した結果、病斑中の *Aac* 生菌数は時間の経過と共に減少し、接種 2 週間以降には供試部位によっては、供試した 3 試料中の 1 ~ 2 試料から *Aac* が分離されない部位も認められた (Fig. 2, Table 2)。上述したようにこれら凝集反応法の検出限界は、 10^7 cfu/ml であると共に、検出に供試した 1 病斑あたりの *Aac* 数がおおよそ 10^7 cfu/ml である。これらのことから、選択培地法によって古い病斑から *Aac* が分離されなくても検出に必要な十分な *Aac* の抗原が古い病斑中で保存されていると推察される。このため、凝集反応法によって古い病斑から *Aac* を検出することが可能であると考えられた。病原細菌が培地法で分離されない古い病斑においても何らかの状態では *Aac* が生残していることも考えられ、第二次伝染源として無視できないと思

Table 2. Comparison of detection with agglutination technique and of isolation with dilution agar plate technique using AacSM from diseased watermelon materials

Test method	Plant part	Days after inoculation			
		7	14	21	28
Latex agglutination	Cotyledon	3/3 ^{a)}	3/3	3/3	3/3
	True leaf	3/3	3/3	3/3	3/3
	Hypocotyl	3/3	3/3	3/3	3/3
<i>S. aureus</i> agglutination	Cotyledon	3/3	3/3	3/3	3/3
	True leaf	3/3	3/3	3/3	3/3
	Hypocotyl	3/3	3/3	3/3	3/3
Selective medium AacSM	Cotyledon	3/3	3/3	2/3	1/3
	True leaf	3/3	2/3	2/3	3/3
	Hypocotyl	3/3	3/3	2/3	2/3

a) No. of positive reaction / No. of total samples tested.

The detection methods by agglutination tests were cited at Fig. 1.

Selective medium AacSM: *Aac* was isolated with selective agar medium (AacSM) for isolation of *Aac* from same supernatants that were used for agglutination tests.

Fig. 2. Population of *Aac* in diseased materials. Population of *Aac* was counted from the supernatants that were prepared from diseased lesion by dilution agar plate technique with selective agar medium for *Aac* (AacSM).
* the number indicated by log cfu/section (5 x 5 mm).

われる。このことから、これら凝集反応法は、防除を目的とした確実な診断方法として有益であると考えられる。

以上のことから、感作ラテックス粒子あるいは感作 *Saa* 菌体を用いた凝集反応法は、スイカ果実汚斑細菌病の生産現場における迅速な診断方法として優れていると考えられた。

引用文献

1. Chirkov, S.N., Olovnikov, A.M., Surguchyova, N.A. and Atabekov, J.G. (1984). Immunodiagnosis of plant viruses by a virobacterial agglutination test. *Ann. Appl. Biol.* 104: 477-483.
2. Fletcher, J. and Slach, S.A. (1986). Latex agglutination as a rapid detection assay for *Spiroplasma citri*. *Plant Dis.* 70: 754-756.
3. 平田賢司・小林慶範・水野明文・斉藤範彦 (1998). 日本が輸出国に栽培地検査を要求する我が国未発生有害動植物. *植物防疫* 52: 83-88.
4. 河野敏郎・高橋義行 (2001). 高比重ラテックス凝集反応法を用いたスイカ果実汚斑細菌病の簡易検出. *関東東山病虫研報* 48: 37-39.
5. 小宮友紀子・白川 隆・合澤雅夫・我孫子和雄 (1999). スイカ果実汚斑細菌病の血清学的診断法の開発. *日植病報* 65: 685 (講要).
6. Latin, R.X. and Hopkins, D.L. (1995). Bacterial fruit blotch of watermelon: The hypothetical exam question becomes reality. *Plant Dis.* 79: 761-765.
7. Lyons, N.F. and Taylor, J.D. (1990). Serological detection and identification of bacteria from plants by the conjugated *Staphylococcus aureus* slide agglutination test. *Plant Pathology* 39: 584-590.
8. Mraz, I., Pankova, I., Petrzik, K. and Sip, M. (1999). *Erwinia* and *Pseudomonas* bacteria can be reliably screened by an improved serological agglutination test. *J. Phytopathology* 147: 429-431.
9. 小木曾秀紀・藤永真史・清水時哉 (2001). 長野県におけるスイカ果実汚斑細菌病の発生. *関東病虫研報* 48: 33-36.
10. 白川 隆・合澤雅夫・小宮友紀子・我孫子和雄 (2000). 種子、植物体からの *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* の分離・検出を目的とした選択培地の開発. *日植病報* 66: 132 (講要).
11. 白川 隆・菊池繁美・加藤智宏・我孫子和雄・川合 昭 (2000). 日本におけるスイカ果実汚斑細菌病の発生. *日植病報* 66: 223-231.
12. Slack, S.A. and Ball, E.M. (1990). Latex agglutination for viruses and bacteria. In *Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens* (Hampton, R., Ball, E., DeBoer, S. eds.). pp. 307-312, APS Press, Minnesota.
13. Walcott, R.R. and Gitaitis, R.D. (2000). Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 84: 470-474.
14. Walkey, D.G.A., Lyons, N.F. and Taylor, J.D. (1992). An evaluation of a virobacterial agglutination test for the detection of plant viruses. *Plant Pathology* 41: 462-471.