

ELISA によるチャ赤焼病細菌の検出

岩井 久・迫田 琢也・西 八束*・荒井 啓

(植物保護学講座)

平成8年8月10日受理

Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *theae* by ELISA

Hisashi IWAI, Takuya SAKODA, Yatsuka NISHI and Kei ARAI

(Laboratory of Plant Pathology and Entomology)

緒 言

チャ赤焼病は、細菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *theae*) によって起こるチャの重要病害である。1914年に静岡・京都・三重・奈良などの各府県で大発生した報告^{10, 11)}があるが、その後暫くは特に問題にはならなかった。しかし1955年に再び静岡で発生し¹⁵⁾、再度終息したかに見えたが、1975年3月には鹿児島県薩摩半島南部に発生し、激しい被害をもたらした²⁾。その後、鹿児島、静岡、長崎において発生が認められ、漸増の傾向にある病害である⁹⁾。

1914年の初発生以来、本病の発生生態については数多く研究され、発病に必要な環境条件やチャ樹側の条件について様々な知見が得られている⁹⁾。本病は秋から早春にかけて発生する。これは、台風、冬季の強風および整枝などによって生じた傷口より病原細菌が侵入し、適当な環境条件で増殖するためと考えられている。そのため、防風ネットを設けてチャ樹の傷害を防ぎ、秋整枝の後など推定される侵入時期には薬剤散布をするなどの防除対策が立てられている⁹⁾。しかし、本細菌に対して特に有効な薬剤はなく、本病の発生は今なお続き、今後も注意を要することから本病の防除のための新たな研究が求められている。

これまでに得られた発生生態についての知見の多くは、圃場における罹病葉数の推移に基づくものが中心であった。そのため、罹病葉の見られない時期における本細菌の所在については推定の域を出てい

なかった。実際のところ、本細菌が外部から侵入するものなのか、それとも宿主(チャ樹)で生存しているものなのかは不明である。仮に外部より侵入するもののだとしてもそれ以前の潜伏場所、すなわち第一次伝染源は特定されていない。また、予想される侵入時期から発病に至るまでの増殖の推移についても本細菌を直接分離することにより確認されたわけではない。落葉した罹病葉中の病原細菌の動向および周辺の非宿主植物の本細菌の生存に関する役割についても不明である。

このように病原細菌の生態は不明な点が多く、効果的な防除対策を立てる上での支障となっている。本病が今でも突発的に大発生する原因の一つがここにあると思われる。そこで、これまでの環境要因に偏りがちだった研究とは異なり、発病の主因となる病原細菌側からの生態研究が必要と思われる。そのためには、チャ樹体、落葉した罹病葉、チャ圃土壌などから年間を通じて本細菌の分離を試み、その推移を知る必要があるが、これらの試料には不特定多数の微生物が存在しているとみられるため目的の細菌を特異的に検出する手段が求められる。その一つの方法として、血清学的手法の一種である酵素結合抗体法(ELISA)による本細菌検出の可能性を検討し、同法が有用であることが示唆されたのでここに報告する。

材 料 と 方 法

1. 供試細菌

Pseudomonas syringae pv. *theae* 15菌株とその他の *Pseudomonas* 属細菌21種、25菌株 (Table 1, 2) を供試した。 *P. s.* pv. *theae* のうち、T632と

*鹿児島県茶業試験場, 鹿児島県川辺郡知覧町永里3964

*Kagoshima Tea Experiment Station, 3964 Nagasato, Chiran-cho, Kawanabe-gun, Kagoshima 897-03

S-2は静岡大学より分譲された株である。NO.1とK93001は県茶業試験場で1993年に鹿児島県知覧町のチャ葉より分離された株である。他の11株は鹿児島大学植物保護学(旧植物病理学)研究室で分離同定したもので、分離源としたチャ樹の来歴は以下の通りである。7715, 7718-1, 7718-2の3株は1977年3月に鹿児島県頰娃町で採取したものに由来し、このうちの7718-1と-2は元株7718を接種したチャ樹からの再分離菌である。9301~9307の7株は1993年2月に知覧町で採取したチャ樹に由来する。このうち9306株は抗血清作製の際の免疫抗原に用いた。9308株は1993年2月に頰娃町で採取したチャ樹に由来する。他の *Pseudomonas* 属細菌はすべて、農林水産省農業環境技術研究所の保存菌(NIAES株)で九州大学植物病理学研究室で経代培養された後、本研究室に分譲されたものである。分離あるいは分譲された株を一定期間継代培養した後、分散媒(スキムミルク:10g, L-グルタミン酸ナトリウム:1.5g, 蒸留水:100ml, pH:無調整)にて-30℃に凍結保存するとともに25℃でPDA培地(ジャガイモ200g煎汁:1,000ml, ブドウ糖:20g, 寒天:15g, pH6.8)あるいは, King's B培地(プロテオースペプトン:20g, グリセリン:10ml, リン酸水素二カリウム:1.5g, 硫酸マグネシウム:1.5g, 寒天:15g, 1,000ml, pH7.2)を用いて継代培養することによって維持した。すべての実験において、培養24時間以内のものを供した。

2. 抗血清の作製

PDA斜面培地で24時間培養した *P. s. pv. theae* 9306株を白金耳で取り、滅菌生理食塩水に懸濁した。これを2回遠心洗浄(8,000rpm, 15分, 4℃)し、再度滅菌生理食塩水に懸濁(濃度, 約 10^8 cfu/ml)したものを免疫源とした。これを初回0.3ml, 以後7日毎に0.5, 2, 3, 4, 4mlずつ家兎(ニュージランドホワイト種)の耳縁静脈に注射した。1回目の注射から5日後および6回目の注射の直後に部分採血し、抗体価の上昇程度をスライド凝集法によって調べた。その結果十分な抗体価が得られたので、6回目で注射を終え、その7日後に全採血した。

3. 抗血清の力価

P. s. pv. theae 15菌株に対する本抗血清の力価をスライド凝集法により調べた。即ち生理食塩水によって段階希釈した抗血清100 μ lのそれぞれに *P. s. pv.*

*theae*の懸濁液(濃度, 約 10^8 cfu/ml)を100 μ lずつ混合し、白色顆粒状沈殿の形成を観察し、この沈殿が認められる最大希釈倍数(反応終点)をもって、抗血清の力価とした。供試菌株は結果で示す。

4. 抗血清の特異性

本抗血清の特異性を *Pseudomonas* 属細菌22種、25菌株を用いてスライド凝集法により調べた。即ち、生理食塩水で25倍に希釈した抗血清100 μ lのそれぞれに各種細菌の懸濁液(濃度, 約 10^8 cfu/ml)を100 μ lずつ混合し、反応強度を記録した。供試菌株は結果で示す。

5. ELISA に用いた試薬の組成および用途

ELISAの各種実験で用いた試薬の組成は、Clark and Adamsの方法⁷⁾に準じた。試薬とその用途は次の通りである。PBS(Phosphate buffered saline)を γ -グロブリン(IgG)の精製に用いた。炭酸緩衝液をIgGの希釈に用い、PBS-T(Tween 20を含んだPBS)を細菌抗原液の調製、酵素結合抗体の希釈およびELISAにおけるタイタープレートの洗浄操作に用いた。また、ジエタノールアミン緩衝液に基質(パラ-ニトロフェニルりん酸, Sigma 104, 5mg/tablet)を1mg/mlの濃度に溶かし、基質液として使用した。

6. IgG の精製および酵素結合抗体の作製

Clark and Adamsの方法⁷⁾に準じた。精製したIgGは0.5mg/ml濃度で4℃に保存した。酵素結合抗体の作製には、3mlの精製IgG(1.5mg/3ml)と、0.3ml(3mg/0.3ml)のアルカリフォスファターゼ(cat. No.567744, > 2,500U/mg, Grade I, from calf intestine, Boehringer Mannheim)を供試し、作製した酵素結合抗体は4℃に遮光保存した。

7. ELISA により検出する際の諸条件の検討

(1) ELISA の手順

本実験は、直接二重抗体法によるELISA(Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay: DAS-ELISA)で行った。手技は、Clark and Adams⁷⁾に従った。即ち、まず、マイクロタイタープレート(Immuron 1 Form polystyrene plate, Dynatech Laboratories Inc.)のウェルに、IgG希釈液を200 μ lずつ分注し、37℃で5時間静置して吸着させた。PBS-Tで3回

洗浄することにより未吸着 IgG を除去後、検定試料 (抗原) を入れ 4℃ で 17 時間静置した。さらに 3 回洗浄後、酵素結合抗体希釈液を分注し 37℃ で 3 時間静置して抗原と結合させた。これをさらに 3 回洗浄して結合しなかった余分の酵素結合抗体を除去後、基質液を加え、27℃ で 1 時間静置し発色させた。発色後、水酸化ナトリウム溶液 (3 M 濃度) を 50 μ l ずつ加えて反応を停止し、波長 405nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (CLS-962, Cambridge Life Sciences) で測定した。

(2) IgG, 酵素結合抗体濃度の検討

IgG と酵素結合抗体の双方を、0.5, 1.0, 2.5 μ g/ml の 3 段階濃度に調製し、これらを組み合わせて、両者の最適濃度を検討した。チャ葉汁液で段階希釈した *P. s. pv. theae* 9306 株の懸濁液 (10¹ ~ 10⁸ cfu/ml) を検定試料とした。即ち、1994 年 8 月に学内チャ園より採取したチャ葉に生体重の 10 倍量の 2 倍濃度 PBS-T を加えて乳鉢と乳棒で磨砕した。磨砕液を 8,000rpm, 15 分, 4℃ で遠心分離し、その上澄みに *P. s. pv. theae* 9306 株の懸濁液 (2 \times 10¹ ~ 10⁸ cfu/ml) を等量ずつ混合し、最終的に 1 \times 10¹ ~ 10⁸ cfu/ml の細菌-チャ葉汁液懸濁液を作製した。

8. ELISA による各種試料の検定

(1) 供試試料

P. s. pv. theae 15 菌株, *Pseudomonas* 属菌 16 種類を用いて本 ELISA の特異性を調べた。また、本 ELISA を用いて数種チャ葉を検定し、赤焼病細菌の検出が可能かどうか検討した。数種チャ葉とは、知覧町後岳の成木園と幼木園で採取した、典型的な赤焼病の病徴を呈する葉 (それぞれ、試料 A, B とする)、知覧町塗木で採取した、褐変は見られるが赤焼病の病徴とは類似していない葉 (試料 C)、学内チャ園より採取した外見上健全な葉 (試料 D) の 4 種類である。

(2) 各種試料の調製方法

P. s. pv. theae 15 菌株, *Pseudomonas* 属菌 16 種類の場合、各菌株の懸濁液 (濃度: 2 \times 10¹ ~ 10⁸ cfu/ml) を等量の 2 倍濃度 PBS-T と混合した。

試料 A, B は、葉表面と組織内部に分けて調製した。チャ葉各 2 枚を 10ml 滅菌水入り試験管に入れ、試験管用ミキサーで傷が付かない程度の速さで 30 秒間攪拌し、上澄みを等量の 2 倍濃度 PBS-T と混合したものを「葉表面」の試料原液とした。次にこれらの試験管より葉を取り出し、常法 (70% エタノー

ルに 2 ~ 3 秒、ついで有効濃度 0.5% の次亜塩素酸ナトリウムに 2 分間浸漬し、滅菌水で 2 回洗浄する。) により表面殺菌した。次に、滅菌した鉢で葉を細切し、10ml の滅菌水入り試験管に入れ、試験管用ミキサーで 2 分間激しく攪拌し、上澄みを等量の 2 倍濃度 PBS-T と混合したものを「組織内部」の試料原液とした。試料 C, D は、葉表面と組織内部を区別せず、表面殺菌は行わず、そのまま細切して試験管に入れ、以下、同様の方法で調製した。

結果と考察

1. 抗血清の力価および特異性

P. s. pv. theae 15 菌株に対する本抗血清の力価は、抗血清の作製に用いた 9306 株と 7715 株で 2048 倍、9303 と 9304 株で 16384 倍、残りの 11 菌株では 4096、あるいは 8192 倍と高かった (Table 1)。

抗血清作製に用いたものと同じの抗原 (homologous antigen; ホモロガス抗原) に比較して、それ以外の抗原 (heterologous antigen; ヘテロロガス抗原) の力価が高い点について、原因を特定するのは難しい。しかし、抗体産生の際に作用したホモロガス抗原の無数の抗原決定基のうち、菌体表層に分布する抗原決定基と同一の分子が、たまたまヘテロロガス抗原の表層により多く存在し、抗体の抗原結合部位に強く作用したかも知れない。凝集法においては、表層抗原が重要であり、菌体内抗原はほとんど関与しないので、このような逆転現象も顕著

Table 1. Agglutination titers of antiserum to *Pseudomonas syringae* pv. *theae* 9306 against the whole cells of *P. s. pv. theae* isolates

Code	Isolate of <i>P. s. pv. theae</i>	Agglutination titer
1	9306	2048
2	9301	8192
3	9302	8192
4	9303	16384
5	9304	16384
6	9305	8192
7	9307	8192
8	9308	8192
9	7715	2048
10	7718-1	8192
11	7718-2	8192
12	NO.1	4096
13	K93001	8192
14	T632	8192
15	S-2	8192

Table 2. Agglutinate reactions of the whole cells of pseudomonads against the antiserum to *Pseudomonas syringae* pv. *theae* 9306

Code	Species	Reaction*
16	<i>P. syringae</i> pv. <i>theae</i> 9306	+++
17	<i>P. syringae</i> pv. <i>eriobotryae</i>	-
18	<i>P. syringae</i> pv. <i>mori</i>	++
19	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> Hatano	+++
20	" Ku7102	+
21	" Ku7103	-
22	<i>P. aeruginosa</i>	+++
23	<i>P. azotoformans</i>	-
24	<i>P. caryophylli</i> NIAES 1192	-
25	" NIAES 1406	-
26	<i>P. cruciariae</i>	++
27	<i>P. diminuta</i>	-
28	<i>P. fluorescens</i>	+
29	<i>P. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>	-
30	<i>P. iodinum</i>	-
31	<i>P. melanogenum</i>	-
32	<i>P. mildenbergii</i>	-
33	<i>P. ovalis</i>	-
34	<i>P. polycolor</i>	-
35	<i>P. pseudoalcaligenes</i> subsp. <i>konjaci</i>	-
36	<i>P. putida</i>	+++
37	<i>P. schuylkilliensis</i>	-
38	<i>P. sp.</i>	-
39	<i>P. vendrelli</i>	-
40	<i>P. xanthe</i>	-

* : Reaction against 50-fold diluted antiserum. Relative strength of each reaction (-~+++) was estimated compared with the reaction of *P. s. pv. theae* 9306(+++).

に現われるものと思われる。後述するように、この逆転現象はELISA反応においても認められたが、凝集法とは様相が異なった。

また、50倍希釈の抗血清の25菌株の *Pseudomonas* 属菌に対する反応を見たところ、赤焼病細菌と細菌学的性質の類似した *P. s. pv. mori*, *P. s. pv. tabaci* (菌株により反応の認められないものもある) や *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* のような土壌細菌群などにおいて凝集がみられた (Table 2)。

2. ELISA の特性

(1) IgG, 酵素結合抗体の各濃度間での反応差異

IgG, 酵素結合抗体の各濃度の組合せにおける反応差異を比較したところ、IgGによる差は小さく、酵素結合抗体濃度による差が大きかった。即ち、酵

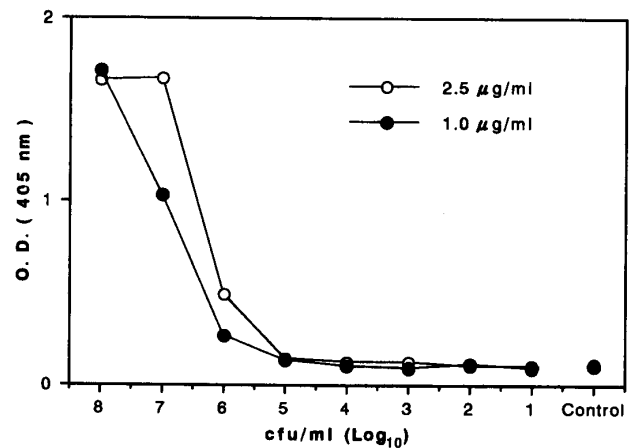


Fig. 1. Effect of IgG concentrations on ELISA for *P. s. pv. theae* 9306 assay. Concentration of conjugate is 1.0 µg/ml.

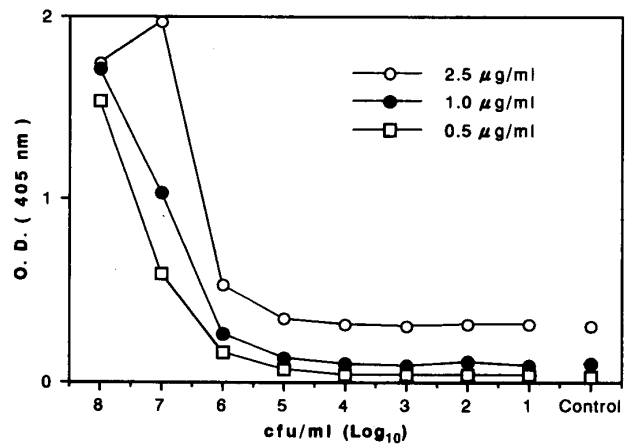


Fig. 2. Effect of conjugate concentrations on ELISA for *P. s. pv. theae* 9306 assay. Concentration of IgG is 1.0 µg/ml.

素結合抗体濃度を1.0 µg/mlにした場合、IgGの2濃度間での吸光度は $10^5 \sim 10^8$ cfu/mlの高濃度域においては差がみられたが、 10^6 cfu/ml以下ではほとんど差がみられなかった (Fig. 1)。しかし、IgG濃度を1.0 µg/mlにした場合、酵素結合抗体の3濃度間の吸光度は $10^1 \sim 10^8$ cfu/mlのすべての濃度域において差がみられ、酵素結合抗体濃度が高いほど高い吸光度を示した (Fig. 2)。なお、対照として用いた健全チャ葉汁液での非特異的反応は酵素結合抗体濃度が高いほど大きくなった (Fig. 2)。

(2) 検出限界

Table 3に示したように、酵素結合抗体濃度が0.5 µg/mlで、IgG濃度が2.5または1.0 µg/mlのとき、健全チャ葉汁液の吸光度 (非特異的反応) は最も小さく、その2倍以上を陽性とした場合の検出限界は、

Table 3. Effect of IgG and conjugate concentrations on the detection limit of ELISA for *P. s. pv. theae* assay

IgG ($\mu\text{g/ml}$)	Conjugate ($\mu\text{g/ml}$)	O.D. of healthy leaf sap (405nm)	Detection limit (cfu/ml)
2.5	2.5	0.33	$10^5 \sim 10^6$
	1.0	0.11	$10^5 \sim 10^6$
	0.5	0.03	$10^4 \sim 10^5$
1.0	2.5	0.31	$10^6 \sim 10^7$
	1.0	0.10	$10^5 \sim 10^6$
	0.5	0.03	$10^4 \sim 10^5$

$10^4 \sim 10^5$ cfu/mlであった。既報の ELISA による植物病原細菌の検出限界もまた $10^4 \sim 10^5$ cfu/ml にあり^{1, 6, 8, 13)}、それらと比較して今回の赤焼病細菌に対する ELISA の結果は遜色無いものと判断される。よって、以後の実験では、検出限界を考慮し、IgG 濃度 $1.0 \mu\text{g/ml}$ 、酵素結合抗体濃度 $0.5 \mu\text{g/ml}$ の条件で行った。

(3) 特異性

チャ赤焼病細菌 12 菌株の 10^5 および 10^6 cfu/ml における吸光度を Fig. 3 に示す。対照として用いた PBS-T の 2 倍以上を陽性とした場合、いずれの菌株も 10^7 cfu/ml 以上において陽性反応を示した（データは示していない）。吸光度の値は、菌株間で差異が認められた。即ち、 10^6 cfu/ml 濃度において、抗血清作製に用いた 9306 株と同様に高い値を示したグループ（9301, 9303, 9304, 9307, 9308, 7718-2, NO.1 株）、低い値を示したグループ（T632, S-2）

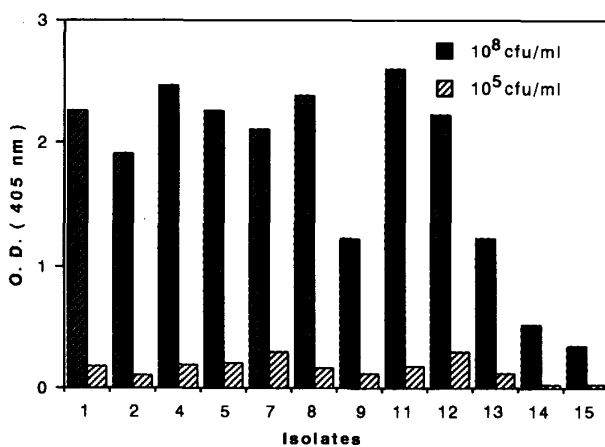


Fig. 3. ELISA for two concentrations of *P. s. pv. theae* isolates. Concentrations of IgG and conjugate are 1.0 and $0.5 \mu\text{g/ml}$ respectively. Code number of isolates followed Table 1.

とこれらの中間値を示したグループ（7715, K93001 株）に分かれた。

本 ELISA においても、先の凝集法の結果と同様に、ホモログス抗原とヘテログス抗原の反応の逆転が認められたが、その数は 4 菌株と少なく、値の較差も大きいものではなかった。これは、両法の抗原抗体反応の機作の違いによるものと推察できる。凝集法においては、主に生菌の表層抗原が作用するので、抗原抗体反応に関与する抗原決定基の種類は限られている。ところが ELISA において、PBS-T に懸濁した細菌は、一晩の静置中に一部が崩壊して細胞壁内構造が露出したり、菌体内成分が液層に溶出することが考えられ、関与する可溶性抗原の種類も多い。ちなみに生菌をウサギに免疫した場合、注射直後に菌体の崩壊が起こるので、産生された抗体は、菌体内外の膨大な構成分子に由来している。

門田ら¹²⁾ はイネ褐条病細菌には少なくとも 4 つの血清型が存在することを明らかにし、血清型の異なる菌株の抗血清 4 種を 1 次抗体とする間接 ELISA により、血清型の異なる菌株間での反応を比較した結果、そのうち 2 種類の抗血清を用いたとき、抗原の濃度が $10^5 \sim 10^7$ cfu/ml の範囲でホモログスな組合せはヘテログスな組合せより高い値を示したことから、血清型の違いにより ELISA 反応に差異が生ずる場合があると報告している。本 ELISA においても菌株間での反応に差がみられ、特に静岡分離株（S-2, T632）の反応は鹿児島分離株（10 菌株）と比べて弱かった。チャ赤焼病細菌の血清型についての報告はないが、西ら¹⁴⁾ は、静岡で分離した赤焼病細菌の抗血清がゲル内拡散法により鹿児島で分離した菌株とは沈降線を形成せず、静岡菌株とのみ形成したことを報告している。西らは赤焼病細菌の血清型について言及してはいるが、両地域に血清型の異なる赤焼病細菌が存在するものと考えて良いのでは

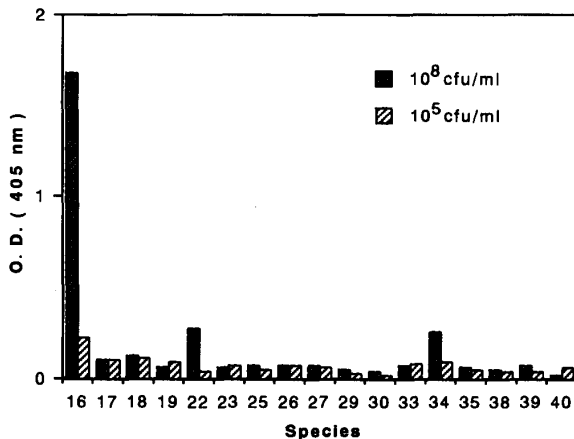


Fig. 4. ELISA for two concentrations of pseudomonads bacteria.

Concentrations of IgG and conjugate are 1.0 and 0.5 µg/ml respectively. Code number of species followed Table 2.

ないかと思われる。よって、本 ELISA において菌株間で反応に差が見られたのも血清型の違いに原因があるものと思われる。

P. s. pv. theae と *Pseudomonas* 属菌 16 菌株の 10⁸ および 10⁵ cfu/ml 濃度における吸光度を Fig. 4 に示した。対照として用いた PBS-T の 2 倍以上を陽性とした結果、10⁵ cfu/ml ではいずれの菌株でもほとんど反応が認められず、10⁸ cfu/ml では *P. aeruginosa* および *P. polycolor* に弱い陽性反応が認められた。しかし、*P. s. pv. theae* と細菌学的性質の類似した *P. s. pv. eriobotryae*, *mori*, *tabaci* および他の *Pseudomonas* 属細菌 11 菌株は陰性であった。以上のことから本 ELISA の特異性は高く、赤焼病細菌の簡易同定に利用できることが

示唆された。なお、*P. polycolor* はタバコの leaf spot から分離される細菌であるが、生理学性質が *P. aeruginosa* と同一か類似しており、Bergey's Manual (第 8 版) では、*P. polycolor* が *P. aeruginosa* の変種 (variety) であるか、両者が synonym である可能性を示唆している⁴⁾。また同書において、*P. iodinum* は *Chromobacterium iodinum* に改名されている⁵⁾。

(4) 数種チャ葉に対する検定

成木園と幼木園より採取した典型的な赤焼病の病徴を呈するチャ葉を試料に用いた実験で、表面および組織内部の両方から高い吸光度が得られた (Table 4)。病徴形成に伴い、組織が崩壊し、組織内部から流出したり、周囲の罹病葉より伝播した細菌が、供試試料の表面に付着していたものと考えられた。赤焼病罹病葉の電顕観察において、初期病徴では細菌は柔組織の細胞間隙に存在するが、病徴の進展とともに柔組織は崩壊し、褐変部分の広範囲に細菌が散在することが観察されている³⁾。

塗木より採取したチャ葉は陰性であったことから、その褐変症状は赤焼病細菌によって生じたものではないものと考えられた。

以上のことから、本 ELISA による罹病葉中の赤焼病細菌の検出が可能であることが示唆された。

要 約

チャ赤焼病の病原細菌である *Pseudomonas syringae* pv. *theae* 9306 株をウサギに免疫して得た抗血清は、凝集法により力価 2048 倍を示した。常法により本抗血清から IgG (γ-グロブリン) を精製し、アルカリフォスファターゼを標識して酵素結合

Table 4. Detection of *P. s. pv. theae* from the tea-leaf set on the natural growing tea plant

Code* ¹	State of tea field	Sample* ² obtained from	Dilution series of sample solution					
			10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
A	Mature	LS	1.942* ³	1.153	0.333	0.062		
		LT		1.093	0.556	0.079	0.036	0.019
B	Young	LS	1.679	1.311	0.516	0.101		
		LT		1.153	0.733	0.274	0.054	0.017
C	Mature	LS+LT	0.036	0.015				
D	Mature	LS+LT	0.019					

*¹: See the text.

*²: LS; Leaf surface, LT; Leaf tissue.

*³: All numbers are optical densities at 405 nm.

抗体を作製した。プレートに吸着させる IgG ならびに酵素結合抗体の最適濃度を、9306株に対して検討した後、細菌検出のため、酵素結合抗体法 (ELISA) に用いた。P. s. pv. *theae* 15分離株のうち、鹿児島で分離された13株は強く反応したが、静岡で分離された2株の反応は弱かった。他の *Pseudomonas* 属細菌16種のうち14種は反応しなかったが、*P. aeruginosa* と *P. polycolor* が若干反応した。ELISA は、圃場から採取したチャ葉から P. s. pv. *theae* を検出する目的に、十分適用できると判断された。

謝辞 本実験を行うに当たり、*Pseudomonas syringae* pv. *theae* の T632と S-2株を分譲して頂いた静岡大学植物遺伝資源学講座、ならびに各種 *Pseudomonas* 属細菌を分譲して頂いた九州大学植物病理学講座に深謝致します。

文 献

- 1) Alvarez, A.M. and Lou, K.: Rapid identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by ELISA. *Plant Dis.*, **69**, 1082-1086 (1985)
- 2) 荒井啓・野中寿之・三木洋二・植原一雄：薩摩半島南部に発生した茶の細菌性病害について。鹿大農学術報告, **29**, 55-61 (1979)
- 3) 荒井啓・植原一雄・野中寿之：チャかいよう病ならびに赤焼病罹病組織の走査電顕観察。日植病報, **49**, 386 (1983) (講要)
- 4) Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (8th Ed.). p.221-222, William and Wilkins Co., Baltimore (1974)
- 5) Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (8th Ed.). p.357, William and Wilkins Co., Baltimore (1974)
- 6) Civerolo, E.L. and Fan, F.: *Xanthomonas campestris* pv. *citri* detection and identification by Enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Dis.*, **66**, 231-236 (1982)
- 7) Clark, M.F. and Adams, A.N.: Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. gen. Virol.*, **34**, 475-483 (1977)
- 8) Comstock, J.C. and Irely, M.S.: Detection of the sugarcane leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*, using tissue blot immunoassay, ELISA, and isolation techniques. *Plant Dis.*, **76**, 1033-1035 (1992)
- 9) 江塚昭典・安藤安雄：チャの病害。p.70-83, 日本植物防疫協会, 東京 (1994)
- 10) 堀正太郎：細菌の寄生に基く茶樹の一大病害 (赤焼病)。病虫雑, **1**, 247-252 (1914)
- 11) 堀正太郎：細菌の寄生に基く茶樹の一大病害 (3月号のつづき)。病虫雑, **2**, 1-7 (1914)
- 12) 門田育生・竹中重仁：イネ褐条病細菌の血清型における ELISA 反応の差異。日植病報, **55**, 513 (1989) (講要)
- 13) Lamka, G.L., Hill, J.H., McGee, D.C. and Braun, E. J.: Development of an immunosorbent assay for seedborne *Erwinia stewartii* in corn seeds. *Phytopathology*, **81**, 839-846 (1991)
- 14) 西 八東・長友 繁・松田 泉：チャ赤焼病細菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *theae*) の血清学的検出。日植病報, **60**, 366-367 (1994) (講要)
- 15) 岡部徳雄・後藤正夫：日本における植物細菌病害 IV. 茶樹の赤焼病について。静岡農研報, **5**, 96-99 (1955)

Summary

An antiserum supplied with the agglutination-titer of 2048 was prepared in a rabbit against an isolate 9306 of *Pseudomonas syringae* pv. *theae*, a pathogen of the tea bacterial shoot blight. Using the standard procedures, the IgG (γ -globulin) of the antiserum was purified and then conjugated with alkaline phosphatase. The concentrations of the precoating IgG and the conjugated IgG were standardized against an isolate 9306, and for the purpose of detecting bacteria, the fixed appropriate concentrations were used in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). High reactivities were observed in case of the thirteen Kagoshima isolates out of the fifteen *P. s. pv. theae* isolates, but the remaining two Shizuoka isolates gave only weak reactions. No possible occurrence of the reactions was detected in the fourteen species out of the sixteen pseudomonads bacteria other than these, however, *P. aeruginosa* and *P. polycolor* gave moderately positive reactions. Therefore, ELISA was fixed to be adequate for detecting *P. s. pv. theae* from the leaves sampled out of the tea plants in the field.