

灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) に対するモノクローナル抗体の作出

下村克己・草野成夫 (福岡県農業総合試験場果樹苗木分場)

Katsumi SHIMOMURA and Nario KUSANO : Production of Monoclonal Antibodies to Detect for *Botrytis cinerea*

灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) は、果樹や野菜を始め多くの作物を犯す栽培上最も重要な病原菌の一つである。福岡県のカキやブドウにおける本病の発生は、開花期前後に多く認められ、年によっては甚大な被害を及ぼす。カキでは、開花期前の新葉の先端部や花蕾の付け根が犯され、症状が激しい場合は落葉や落蕾まで進行する。またブドウでは、花穂の小枝梗単位で枯死するため、1房当たりの粒数が確保できず、多発生時には直接収量に影響する。本病の防除は、発生後に実施すると防除効果は非常に低いため、発生の直前および初期に行うことが重要である。しかし、胞子の飛散状況調査等に基づいた的確な防除は行われていないのが現状である。そこで、灰色かび病菌防除に係る発生予察に資するため、灰色かび病菌胞子を検出できるモノクローナル抗体 (以下 Mab) を作成し、その特異性について検討したので、その結果について報告する。

## 1. 材料および方法

## 1) 免疫源としての胞子懸濁液の調整

胞子は、当分場保存の灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) を、PDA 平板培地で3日間培養後、72hrBLB ランプを照射して形成させ、菌そう表面を滅菌蒸留水で洗浄して胞子を採集した。免疫源となる胞子の精製は、2層のガーゼで菌糸片を除去した後、さらに遠心分離 (1,500×g・5min) 操作で洗浄して行った。なお、免疫源の胞子濃度は、PBS で  $5.0 \times 10^6$  個/ml に調整した。

## 2) Mab の作出とアイソタイプ

Mab の作出は、前述の免疫源を用いマウスを用いて常法によって作出した。ハイブリドーマは、ELISA 法によりスクリーニングし、3回のクローニング後に確立した。作出した Mab のアイソタイプについては、アマシャム社製マウスモノクローアイソタイプングキットを用いて調査した。

## 3) 作出した Mab の特異性調査

作出した Mab の特異性は、各種病原糸状菌の胞子とともに、菌糸についても調査した。胞子に対する特異性は、BCIP / NBT 法により胞子を直接染色して調査した。また、菌糸に対する特異性は、菌糸を超音波処理により破碎し菌糸破砕液として供試し、ELISA 法によって調査した。

## 2. 結果および考察

## 1) Mab の作出とアイソタイプ

最終的には3株のハイブリドーマが得られた。その3株が産生する Mab のアイソタイプは、全て IgM であった。

## 2) 各種糸状菌の胞子に対する Mab の特異性

免疫源として供試した胞子および他属菌胞子に対する特異性を調査したところ、作出した Mab は *B. cinerea* の免疫源株および他の分離株とは反応したが、他属の菌株の胞子とは反応しなかった (第1表)。

## 3) 各種糸状菌の菌糸に対する Mab の特異性

菌糸破砕液に対する Mab の特異性を調査したところ、作成した Mab は免疫源を含む8属9種の糸状菌に対して、ほとんど反応しなかった (第2表)。したがって作出した Mab は、菌糸ではなく胞子に特異的に反応する可能性が高いと考えられた。

今後、*Botrytis* 属の異種菌株の胞子に対する特異性等を明らかにし実用化を図る必要がある。

第1表 各種糸状菌胞子に対するMabの反応

供試糸状菌	Mab		
	E12	C07	C72
<i>Gibberella zeae</i>	-	-	-
<i>G. fujikuroi</i>	-	-	-
<i>Alternaria mali</i>	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	-	-
<i>Verticillium sp.</i>	-	-	-
<i>Botrytis cinerea</i>	+	+	+

第2表 各種糸状菌菌糸に対するMabの反応

供試糸状菌	Mab		
	E12	C07	C72
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-
<i>Gibberella zeae</i>	-	-	-
<i>G. fujikuroi</i>	-	-	-
<i>Alternaria mali</i>	-	-	-
<i>Cladosporium fulvum</i>	-	-	-
<i>Sclerotium cepivorum</i>	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	-	-
<i>Verticillium sp.</i>	-	-	-
<i>Botrytis cinerea</i>	-	±	±