

# 微生物遺伝資源探索収集調査報告書

## 第25巻

2016（平成28年）



国立研究開発法人

農業・食品産業技術総合研究機構 遺伝資源センター

## 編 集

国立研究開発法人  
農業・食品産業技術総合研究機構  
遺伝資源センター  
微生物分類評価チーム

青木 孝之・澤田 宏之  
永井 利郎・一木 珠樹  
埋橋 志穂美

<http://www.gene.affrc.go.jp/>

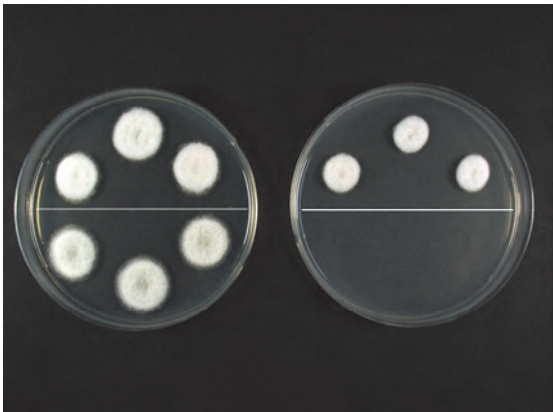
## 微生物遺伝資源の調査プロフィール



病原糸状菌類の光質に対する応答反応を調査中のインキュベーター（佐藤）



キク苗腐敗病菌の接種試験を実施中の接種箱（佐藤）



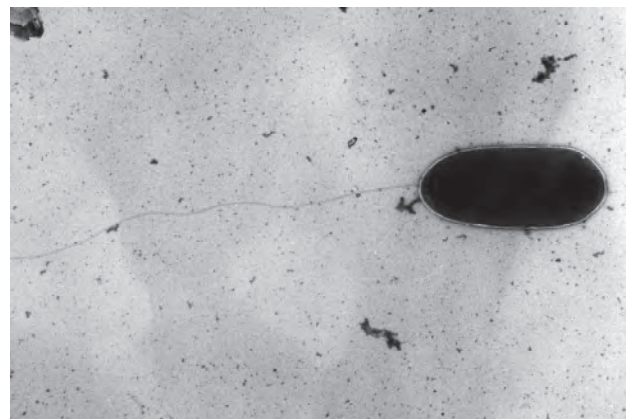
チャ輪斑病菌のQoI剤添加培地上での生育（右：QoI剤添加，左：対照，上：高度耐性菌株，下：感受性菌株）（山田）



モモ地際部の樹皮下に形成されたナラタケ菌糸膜（MAFF 625137の分離源）（中村）



圃場におけるショウガ青枯病の発生状況（堀田）



キウイフルーツかいよう病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3（澤田）

## ま え が き

わが国の農業・食品産業がさらなる発展を遂げるには、農作物の改良や、関連技術の高度化を目指した先端的な研究が必要不可欠である。それらの研究開発を推進するためには、研究の基盤となる生物遺伝資源を幅広く収集し、安定的に提供できるような体制を整備・拡充することが重要となる。

遺伝資源センターは、平成 27 年度までは農業生物資源研究所の 1 部門として、このような体制の整備・拡充を目指して農業生物資源ジーンバンク事業を実施してきた。すなわち、当事業は植物、微生物、動物、DNA の 4 部門からなり、部門ごとにそれぞれ対象とする遺伝資源の収集・受入、増殖・保存、特性評価、配布および情報の管理提供、ならびにそれらの高度化のための試験研究に取り組んできた。

その中で微生物遺伝資源部門は、農業生物資源研究所内にセンターバンクを置き、全国各地にあるサブバンクと連携しつつ、農作物の各種病原微生物や、食品微生物、動物病原微生物をはじめとする貴重な微生物遺伝資源を収集・保存し、配布してきた。これまでに収集してきた微生物の種類は、糸状菌（キノコ類を含む）、酵母、細菌（放線菌、マイコプラズマを含む）、ウイルス（ファージを含む）、ウイロイド、線虫、原虫、粘菌など、多岐にわたっており、保存総数は 32,525 株（平成 27 年度実績）に達している。また、これらの多様な微生物の特性を解析・評価し、得られた成果をデータベース化した上で広く公開することにより、ユーザーの検索・活用の便に供してきた。

なお、平成 28 年 4 月に農業生物資源研究所は、他の 2 法人とともに農業・食品産業技術総合研究機構に統合した。遺伝資源センターは新法人内で単独の研究所として位置づけられるとともに、多くのサブバンクを同じ農研機構内に持つことで、農業生物資源ジーンバンク事業がより効率的に運営できるようになり、さらに活動の幅を拡げつつある。

本報告書は、微生物遺伝資源を対象として、センターバンクと各サブバンクとが一体になって推進している上記の取り組みを紹介するために、平成 23～27 年度（2011 年 4 月～2016 年 3 月）の第 3 期中期計画期間中に得られた代表的な成果を選りすぐり、統合前のサブバンク体制ごとに整理して取りまとめたものである。本報告書が今後の微生物遺伝資源を利用した研究開発や技術指導等の一助になれば幸いである。

平成 28 年 12 月

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構  
遺伝資源センター長 根本 博

# 目 次

(平成 23～27 年度)

- まえがき 遺伝資源センター長 根本 博
1. 圃場抵抗性品種から分離したイネいもち病菌の遺伝子型とレースの調査……………1  
鈴木 文彦・安田 伸子・芦澤 武人・早野 由里子  
農業・食品産業技術総合研究機構  
中央農業総合研究センター
  2. 畑地土壌から分離した *Agrobacterium* (*Rhizobium*) 属細菌の特性……………5  
大脇 良成  
農業・食品産業技術総合研究機構  
中央農業総合研究センター
  3. 狭義のナラタケ *Armillaria mellea sensu stricto* の果樹類に対する病原性……………11  
中村 仁  
農業・食品産業技術総合研究機構  
果樹研究所
  4. *Plectosphaerella cucumerina* によるキク苗腐敗病の発生および病原菌の生態に  
ついて……………21  
佐藤 衛  
農業・食品産業技術総合研究機構  
花き研究所
  5. 花き病害病原糸状菌類の光質に対する応答反応……………31  
佐藤 衛  
農業・食品産業技術総合研究機構  
花き研究所
  6. チャ輪斑病菌の収集と QoI 剤感受性の評価……………39  
山田 憲吾  
農業・食品産業技術総合研究機構  
野菜茶業研究所
  7. *Pantoea* 属菌の雑草等からの分離とタマネギおよびネギに対する病原性……………45  
畔上 耕児  
農業・食品産業技術総合研究機構  
野菜茶業研究所

8. トウモロコシ根腐病菌の収集・同定と特性評価	57
	月星 隆雄・菅原 幸哉・増中 章 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所
9. 国産自給飼料として的大豆ソフトグレインサイレージからの乳酸菌の収集と系統的分類	63
	遠野 雅徳 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所
10. 根圏細菌 SB-K88 株がコムギ縮萎病媒介者 <i>Polymyxa graminis</i> のコムギへの感染に及ぼす影響	71
	佐山 充・大木 健広 農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター
11. レタスビッグベイン病を媒介する <i>Olpidium virulentus</i>	77
	野見山 孝司 農業・食品産業技術総合研究機構 近畿中国四国農業研究センター
12. ステラ (バコパ) とニチニチソウの炭疽病菌	83
	富岡 啓介 農業・食品産業技術総合研究機構 近畿中国四国農業研究センター
13. ショウガ科植物青枯病菌の遺伝的多様性	89
	堀田 光生 農業環境技術研究所
14. 納豆菌欠損ファージ生産変異株の作出	97
	永井 利郎 農業生物資源研究所
15. わが国で分離されたキウイフルーツかいよう病菌の特徴	103
	澤田 宏之 農業生物資源研究所
付録	
これまでの探索収集調査実績	111

# Annual Report on Exploration and Introduction of Microbial Genetic Resources

## Vol. 25

(April 2011 – March 2016)

### Contents

- Preface *Hiroshi NEMOTO*  
Director of Genetic Resources Center
1. Analysis of SSR genotyping and pathogenic races of *Pyricularia oryzae* isolates obtained from rice cultivars possessing different blast resistant genes .....1  
*Fumihiko SUZUKI, Nobuko YASUDA, Taketo ASHIZAWA and Yuriko HAYANO-SAITO*  
NARO Agricultural Research Center
  2. Isolation of *Agrobacterium (Rhizobium)* strains from soil using selective medium .....5  
*Yoshinari OHWAKI*  
NARO Agricultural Research Center
  3. Pathogenicity of *Armillaria mellea* sensu stricto on fruit trees .....11  
*Hitoshi NAKAMURA*  
NARO Institute of Fruit Tree Science
  4. Cutting rot of chrysanthemum caused by *Plectosphaerella cucumerina* and its ecology .....21  
*Mamoru SATOU*  
NARO Institute of Floricultural Sciences
  5. Reactions of causal fungus on flowers and ornamental plants against wavelength, light intensity and irradiation time .....31  
*Mamoru SATOU*  
NARO Institute of Floricultural Sciences
  6. Collection of *Pestalotiopsis* causing tea gray blight and their sensitivity to QoI fungicides .....39  
*Kengo YAMADA*  
NARO Institute of Vegetable and Tea Science
  7. Isolation of *Pantoea* spp. from weeds and their pathogenicity on onion and Welsh onion .....45  
*Koji AZEGAMI*  
NARO Institute of Vegetable and Tea Science

8. Collection and identification of isolates causing Pythium root rot of corn in Japan and their characteristics.....57  
*Takao TSUKIBOSHI, Koya SUGAWARA and Akira MASUNAKA*  
 NARO Institute of Livestock and Grassland Science
9. Collection and phylogenetic analysis of lactic acid bacteria isolated from soybean soft grain silages as self-sufficient feeds in Japan .....63  
*Masanori TOHNO*  
 NARO Institute of Livestock and Grassland Science
10. Effect of a strain of rhizobacteria SB-K88 for the infection of *Polymyxa graminis* as a vector of yellow mosaic on wheat .....71  
*Mitsuru SAYAMA and Takehiro OHKI*  
 Hokkaido Agricultural Research Center, NARO
11. *Oplidium virulentus*, the vector of lettuce big-vein disease .....77  
*Koji NOMIYAMA*  
 Western Region Agricultural Research Center, NARO
12. Pathogens of anthracnose of bacopa and Madagascar periwinkle .....83  
*Keisuke TOMIOKA*  
 Western Region Agricultural Research Center, NARO
13. Genetic diversity of Zingiberaceae plant isolates of *Ralstonia solanacearum* .....89  
*Mitsuo HORITA*  
 National Institute for Agro-Environmental Sciences
14. A *Bacillus subtilis* (*natto*) mutant on defective phage production .....97  
*Toshirou NAGAI*  
 National Institute of Agrobiological Sciences
15. Characteristics of pathogens causing bacterial canker of kiwifruit in Japan .....103  
*Hiroyuki SAWADA*  
 National Institute of Agrobiological Sciences

## Appendix

- Past Records..... 111



# 圃場抵抗性品種から分離したイネいもち病菌の 遺伝子型とレースの調査

鈴木 文彦<sup>a)</sup>・安田 伸子<sup>a)</sup>・芦澤 武人<sup>a)</sup>・早野由里子<sup>a)</sup>

農研機構 中央農業総合研究センター

[〒305-8666 茨城県つくば市観音台 3-1-1]

Analysis of SSR genotyping and pathogenic races of *Pyricularia oryzae* isolates  
obtained from rice cultivars possessing different blast resistant genes

Fumihiko SUZUKI<sup>a)</sup>, Nobuko YASUDA<sup>a)</sup>, Taketo ASHIZAWA<sup>a)</sup>

and Yuriko HAYANO-SAITO<sup>a)</sup>

NARO Agricultural Research Center

## 1. 目的

近年、水稻の品種育成においては、いもち病に対する圃場抵抗性遺伝子の利用が進められている。これまでに、陸稲品種等に由来する圃場抵抗性遺伝子として、*pi21* (Fukuoka et al., 2009), *Pi34* (Zenbayashi-Sawata et al., 2007), *Pi35* (Fukuoka et al., 2014) 等が同定されている。圃場抵抗性は、いもち病菌のレースに関係なく量的な抵抗性を示す特徴があり、真性抵抗性に比べて侵害菌による抵抗性崩壊が起りにくいと考えられてきた。しかし、同定された圃場抵抗性遺伝子の多くは、単独でも真性抵抗性に匹敵する強い抵抗性を発揮し、遺伝子によっては強侵害菌の存在を示す例も報告されている。このため、圃場抵抗性品種の普及にあたっては、いもち病菌集団に対する選択圧などの影響も考慮した上で、持続的な利用法を構築することが求められる。本試験では、いもち病の常発圃場において圃場抵抗性遺伝子を導入した3つの準同質遺伝子系統・品種 (NIL) を栽培し、各系統上でのいもち病菌集団の多様性やレースを調査した。なお、レース判別を実施した菌株の一部については、ジーンバンクに登録保存した。

## 2. 材料および方法

### 1) 発病調査とサンプリング

本調査は、愛知県豊田市稲武町において2012年に実施した。コシヒカリおよびコシヒカリにいもち病抵抗性遺伝子 (*pi21*, *Pi34*, *Pi35*) を導入した準同質遺伝子系統・品種 (NIL-*pi21*, NIL-*Pi34*,

---

a) (現所属) 農研機構 中央農業研究センター Central Region Agricultural Research Center, NARO  
[〒305-8666 茨城県つくば市観音台 2-1-18]

NIL-*Pi35*) を栽培し (各区 1.5 m<sup>2</sup>・75 株, 3 連制), 発病調査を行うとともに, 各系統・品種から葉いもちの病斑をサンプリングした. なお, 移植日は 6 月 7 日, 葉いもちの発病調査と病斑のサンプリングは 8 月 13 日に行った. 発病調査は, 浅賀の調査基準 (浅賀, 1981) を参考にして実施した.

## 2) 菌株の分離と遺伝子型の解析

サンプリングした病斑を供試し, 単孢子分離操作によって 1 病斑あたり 1 菌株を取得した. 分離菌株については, 8 種類の SSR マーカー (鈴木ら, 2012) を用いたジェノタイピングにより, 遺伝子型 (ハプロタイプ) に類別した. 使用した SSR マーカーは, Mgms01, Mgms02, Mgms04, Mgms06, Mgms08, Mgms09, Mgms14, および ms99-100 である. ハプロタイプ多様度は, 以下に記した Nei (1987) の計算式により行った. ハプロタイプ多様度  $h = n(1 - \sum xi^2) / (n-1)$ ; ただし,  $n$  はサンプル数,  $xi$  はハプロタイプ  $i$  の頻度.

## 3) レース検定

コシヒカリおよび各 NIL から取得した葉いもち分離集団から一部菌株を系統抽出し, レース検定を実施した. コシヒカリ分離集団からは 28 菌株 (うち 15 菌株をジーンバンクに登録: MAFF 101740, MAFF 101741, MAFF 101742, MAFF 101743, MAFF 101744, MAFF 101745, MAFF 101746, MAFF 101747, MAFF 101748, MAFF 101749, MAFF 101750, MAFF 101751, MAFF 101752, MAFF 101753, MAFF 101754), NIL-*pi21* 分離集団からは 29 菌株 (うち 17 菌株をジーンバンクに登録: MAFF 101770, MAFF 101771, MAFF 101772, MAFF 101773, MAFF 101774, MAFF 101775, MAFF 101776, MAFF 101777, MAFF 101778, MAFF 101779, MAFF 101780, MAFF 101781, MAFF 101782, MAFF 101783, MAFF 101784, MAFF 101785, MAFF 101786), NIL-*Pi34* 分離集団からは 29 菌株, NIL-*Pi35* 分離集団からは 10 菌株についてそれぞれ調査した. 各菌株は, オートミール寒天培地 (蒸留水 11 当たりオートミール 30 g, ショ糖 5 g, 粉末寒天 16 g) で 25 °C で培養後, 常法 (日本植物防疫協会, 1995) により分生孢子懸濁液を作成し, 判別品種に噴霧接種した. 判別品種には Yamada et al. (1976) の 9 品種に清沢 (1979) の 3 系統 (K60, BL1 および K59) を参考品種として加え, 接種葉身に生じた病斑の病斑型からレース判別を行った. なお, 清沢の 3 系統の K60 にはコード番号 000.1, BL1 には 000.2, K59 には 000.4 を与えた. また, 各判別イネ品種は, 粒状培土を充填したシードリングケース (縦 15 cm×横 5 cm×高さ 10 cm) に播種し, ガラス温室内で育苗し, 4~5 葉期にレース検定に供した.

## 3. 結果と考察

葉いもちの発病度の調査では, 原品種のコシヒカリに比較して各 NIL の発病程度が段階的に軽減され, 抵抗性遺伝子の強弱の程度を評価すると, *Pi34* < *pi21* < *Pi35* となった. サンプリングと単孢子分離作業の結果, コシヒカリ, NIL-*pi21* および NIL-*Pi34* からは, それぞれ 100 菌株前後が取得でき, 集団解析に必要な菌株数が確保できた. 一方, NIL-*Pi35* では病斑がほとんど形成されな

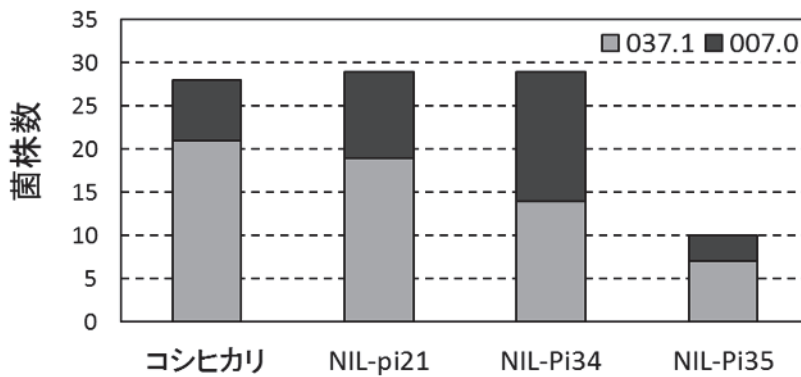


図 1. 葉いもち集団のレース構成

A および B) が 4 集団すべてで多数を占めた。

4 集団のハプロタイプ多様度については 0.483~0.605 となり、全体的に多様度は低く集団間差も小さかった。このことから、圃場抵抗性を導入した NIL 間で発病程度は異なるが、構成するハプロタイプや多様度への影響は小さいことが明らかになった。一方、全集団で 2 種類のハプロタイプが優占化したことや、全体的に低い多様度となった要因については特定できなかった。

4 集団から抽出した 96 菌株を対象にレース調査を実施した結果、レース 007.0 とレース 037.1 の 2 種類が検出された (図 1)。NIL-*Pi34* では、007.0 と 037.1 の分離割合が拮抗していたが、その他の 3 集団では、037.1 の割合が高かった。レースとハプロタイプの関係では、レース 037.1 はすべてハプロタイプ A と特定され、レース 007.0 は、ハプロタイプ B を中心に 6 種類のハプロタイプが含まれていた。前年の同圃場で行ったレース調査では、007.0 のみが検出されていたため、037.1 の菌系は調査年に急速に優占化したものと推察される。近年は、真性抵抗性遺伝子の *Pik* を

表 1. MAFF 登録菌株とレース検定結果

菌株 (MAFF番号)	レース 検定結果	菌株 (MAFF番号)	レース 検定結果
101740	037.1	101771	037.1
101741	037.1	101772	037.1
101742	037.1	101773	037.1
101743	037.1	101774	037.1
101744	037.1	101775	037.1
101745	007.0	101776	037.1
101746	037.1	101777	037.1
101747	037.1	101778	037.1
101748	037.1	101779	007.0
101749	037.1	101780	007.0
101750	007.0	101781	037.1
101751	007.0	101782	007.0
101752	007.0	101783	037.1
101753	037.1	101784	007.0
101754	037.1	101785	007.0
101770	037.1	101786	007.0

かったため、分離できた菌株が 10 菌株程度となった。次に、分離したすべてのいもち病菌株を対象として、8 種類の SSR マーカーを用いてジェノタイピングした結果、約 300 菌株の解析集団からは 17 のハプロタイプが検出された。このうち、分離頻度の高い 2 種類のハプロタイプ (ハプロタイプ

導入した品種を中心に 037.1 の菌系は全国的に観察されているが、本調査の供試系統・品種はすべて *Pik* を保有しない。本調査結果に関しては、多様な品種・系統が作付される試験地特有の環境が影響したとも考えられる。なお、調査対象菌株のうち、2015 年度までにジーンバンクに登録保存した 32 菌株について、レース検定結果を表 1 に

示した。今後も引き続き、いもち病菌集団のハプロタイプやレース構成の解析を通して、圃場抵抗性品種の持続的利用の可能性を明らかにしていく。

#### 4. 参考文献

- 浅賀宏一 (1981). イネ品種のいもち病に対する圃場抵抗性の検定方法に関する研究. 農事試研報 35: 51–138.
- Fukuoka, S., Saka, N., Koga, H., Ono, K., Shimizu, T., Ebana, K., Hayashi, N., Takahashi, A., Hirochika, H., Okuno, K. and Yano, M. (2009). Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice. *Science* 325: 998–1001.
- Fukuoka, S., Yamamoto, S., Mizobuchi, R., Yamanouchi, U., Ono, K., Kitazawa, N., Yasuda, N., Fujita, Y., Nguyen, T.T.T., Koizumi, S., Sugimoto, K., Matsumoto, T. and Yano, M. (2014). Multiple functional polymorphisms in a single disease resistance gene in rice enhance durable resistance to blast. *Scientific Reports* 4:45–50.
- 清沢茂久(1979). 作物の病害抵抗性育種とその基礎研究. 農及園 54: 1427–1432.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- 日本植物防疫協会 (1995). 作物病原菌研究技法の基礎—分離・培養・接種 (大畑貫一・荒木隆男・木曾皓・工藤晟・高橋廣治編). 日本植物防疫協会. 東京. pp. 342.
- 鈴木文彦・藤 晋一・古場文子・中島 隆・荒井治喜 (2012). SSR マーカーによる西日本から分離されたイネいもち病菌の多様性と集団解析. 日本植物病理学会報 78: 10–17.
- Yamada, M., Kiyosawa, S., Yamaguchi, T., Hirano, T., Kobayashi, T., Kushibuchi, K. and Watanabe, S. (1976). Proposal of a new method for differentiating races of *Pyricularia oryzae* Cavara in Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 42: 216–219.
- Zenbayashi-Sawata, K., Fukuoka, S., Katagiri, S., Fujisawa, M., Matsumoto, T., Ashizawa, T. and Koizumi, S. (2007). Genetic and physical mapping of the partial resistance gene, *Pi34*, to blast in rice. *Phytopathology* 97: 598–602.

# 畑地土壌から分離した *Agrobacterium* (*Rhizobium*) 属細菌の特性

大脇 良成<sup>a)</sup>

農研機構 中央農業総合研究センター  
[〒305-8666 茨城県つくば市観音台 3-1-1]

## Isolation of *Agrobacterium* (*Rhizobium*) strains from soil using selective medium

Yoshinari OHWAKI<sup>a)</sup>

NARO Agricultural Research Center

### 1. 目的

*Agrobacterium* 属細菌は、根頭がんしゅ病や毛根病の原因菌として植物病理学分野で古くから研究が進められてきた (澤田, 2006)。また、近年では植物に外来遺伝子を導入するための有用菌としても広く利用されている。一方、土壌や水圏などの環境中からも、*Agrobacterium* 属細菌が広く分離されているが、これらの環境中における生態や農業生産との関連は不明な点が多い。本研究では、土壌から選択培地を用いて分離した *Agrobacterium* 属細菌の特性について報告する。なお、*Agrobacterium* 属細菌の分類体系は統一されておらず、複数の分類・命名システムが混在している状況にある (澤田・土屋, 2003)。*Agrobacterium* 属と *Rhizobium* 属を統合する提案 (C システム; 澤田・土屋, 2003) もあるが、本報告では基本的に、「病原性に基づいた人為分類システム (A システム)」、あるいは「種レベルに自然分類を導入したシステム (B システム)」(澤田・土屋, 2003) に基づいて記載した。なお、引用文献、基準株、あるいは DNA データベースの登録データ (図 1, 2) の学名はそれぞれの原報に従ったので、A, B, C の 3 つのシステムの学名が混在していることに留意頂きたい。農業生物資源ジーンバンクにおける *Agrobacterium* 属細菌の学名の整理については、澤田ら (2014) により紹介されているので参照いただきたい。

### 2. 材料および方法

#### 1) 細菌の分離

中央農業研究センター内のダイズ栽培跡地および小麦栽培跡地の作土層より、土壌を採取した。

---

a) (現所属) 農研機構 中央農業研究センター Central Region Agricultural Research Center, NARO  
[〒305-8666 茨城県つくば市観音台 2-1-18]

土壌は、2地点ともに淡色クロボク土であった。採取した土壌は、2mm のふるいを通した後、直ちに10倍量の滅菌蒸留水に懸濁し、室温で10分間振とうした。土壌抽出液は、滅菌蒸留水で希釈した後、*Agrobacterium* biovar 1 の選択培地である1A培地 ( $K_2TeO_3$ を80ppm添加)に塗布し、28°Cで培養した (Mougel *et al.*, 2001)。プレートに出現したコロニーのうち、Mougel *et al.* (2001)により報告された *Agrobacterium* biovar 1 のコロニー形態 (黒色、円形、半レンズ状、全縁) と類似のものを釣菌し数回純化した。

## 2) 分子系統解析

分子系統解析には、分離した菌株のうち MAFF 107659 (ダイズ跡地土壌)、MAFF 107660 (ダイズ跡地土壌)、MAFF 107661 (ダイズ跡地土壌)、MAFF 107662 (ダイズ跡地土壌)、MAFF 107671 (小麦跡地土壌)、MAFF 107672 (小麦跡地土壌)、MAFF 107673 (小麦跡地土壌) および MAFF 107675 (小麦跡地土壌) を供試した。菌体から DNeasy Blood & Tissue kit (キアゲン) を用いて DNA を抽出し、プライマー 20F (5'-AGTTTGATCMTGGCTCA-3') と 1540R (5'-AAGGAGGTGATCCAGC-3') を用いて PCR 法により 16S rRNA 遺伝子を増幅し (Ishikawa *et al.*, 2003)、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。得られた塩基配列を基に近隣結合法により系統樹を作成した。また、MAFF 107659, MAFF 107660, MAFF 107661, MAFF 107672, MAFF 107673 については、プライマー SM (5'-AAGTCGTAACAAGGTAGCC-3') と BR3 (5'-GCTTTTCACCTTCCCTCAC-3') を用いて ITS 領域を増幅し (Willems *et al.*, 2001)、同様に塩基配列を決定し系統樹を作成した。

## 3. 結果

16S rRNA 遺伝子の塩基配列を基にした分子系統解析の結果、土壌から  $K_2TeO_3$  を80ppm添加した1A培地を用いて分離した菌株は、 $\alpha$ -プロテオバクテリアのうち、*Rhizobium/Agrobacterium* 属細菌とクラスターを形成した。特に *Agrobacterium radiobacter* ATCC 19358 や *Agrobacterium tumefaciens* NCPPB 2437 と近縁関係にあった (図1)。供試した菌株のうち、MAFF 107659, MAFF 107661, MAFF 107671, MAFF 107672, MAFF 107673 および MAFF 107675 株は高いブートストラップ値で支持される同一のクラスターを形成したが、MAFF 107660 と MAFF 107662 株はこれらの菌株とは異なる系統関係にあった。ITS 領域の塩基配列による系統解析結果も、これらの分離菌株が *Rhizobium/Agrobacterium* 属細菌と近縁であることを示した (図2)。16S rRNA 遺伝子の塩基配列による分子系統解析で同一のクラスターを形成した菌株は、ITS 領域の塩基配列による系統樹においても近縁関係を示した。一方、MAFF 107660 株は、ITS 領域の塩基配列を基にした系統樹においても、他の分離菌株とは異なる系統関係を示した。

これらの菌株について、*Agrobacterium* 属の病原性プラスミド (Ti および Ri プラスミド) 保有の有無を、プライマー VCF3 と VCR3 を用いた PCR 法により検討した (澤田・土屋, 2003)。その結果、供試したどの菌株からも、病原性遺伝子に相当する DNA 断片は増幅されなかった (データ省略)。

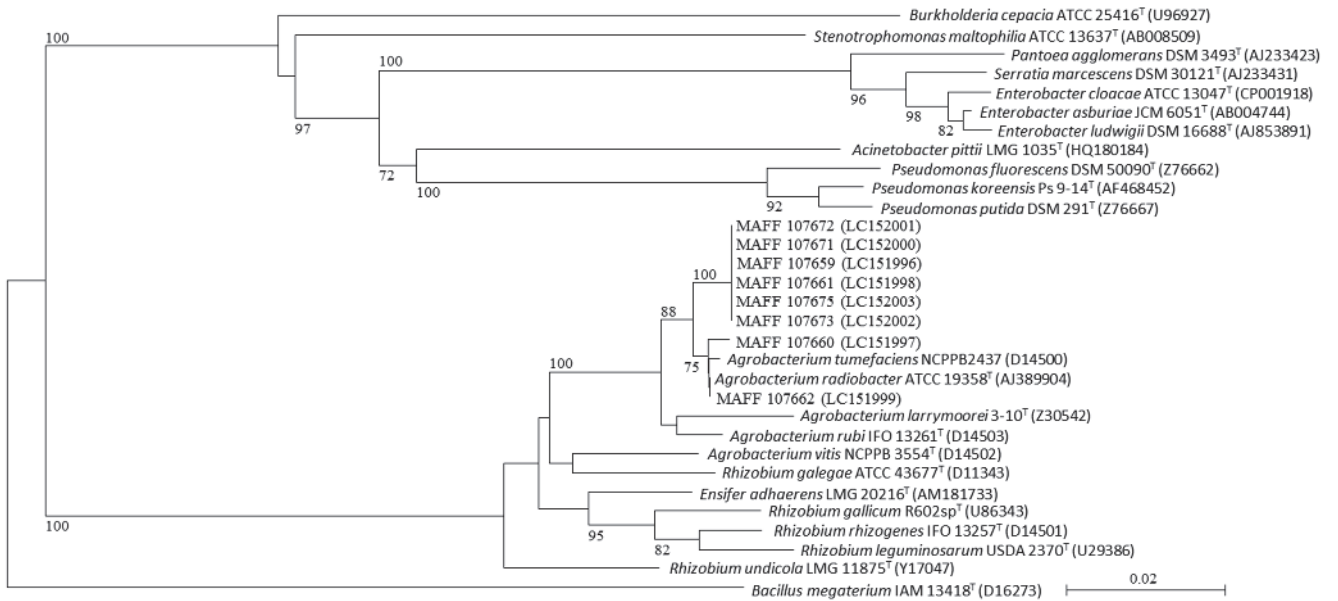


図 1. 16S rDNA 遺伝子の塩基配列を基にした分離菌株の系統樹

系統解析に供試した菌株は、プロテオバクテリアより選定し、アウトグループは *Bacillus megaterium* IAM 13418<sup>T</sup>とした。ブートストラップ値は70%以上を表示した。括弧内に DNA データベースの登録番号を示した。

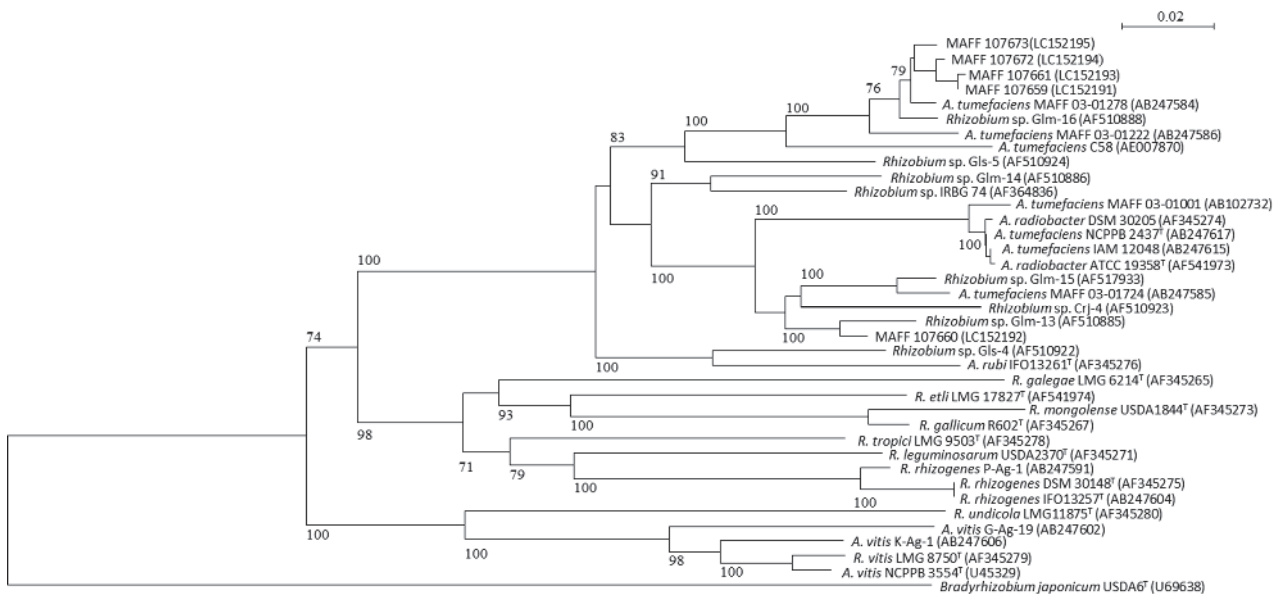


図 2. ITS 領域の塩基配列を基にした分離菌株の系統樹

系統解析に供試した菌株は、*Rhizobium/Agrobacterium* 属細菌より選定し、アウトグループは *Bradyrhizobium japonicum* USDA6<sup>T</sup>とした。ブートストラップ値は70%以上を表示した。カッコ内に DNA データベースの登録番号を示した。

#### 4. 考察

*Agrobacterium* biovar 1 の選択培地である 1A に  $K_2TeO_3$  を 80ppm 添加した平板培地を用いて、土壌から *Agrobacterium* を分離することが可能であった。土壌抽出液を接種した平板培地上には、数種類の異なる形態のコロニーが出現したが、Mougel *et al.* (2001) により記載された *Agrobacterium* biovar 1 のコロニー形態 (黒色, 円形, 半レンズ状, 全縁) により分離した菌株は、16S rRNA の塩基配列の相同性より *Agrobacterium* 属であると判断された (図 1)。また、*Agrobacterium* の近縁関係を推定するのに有効であると報告されている ITS 領域の塩基配列 (Bautista-Zapanta *et al.*, 2009) からも、これらの菌株は、*Agrobacterium tumefaciens* (*Agrobacterium radiobacter*) と近縁であると考えられた (図 2)。これらのことから、本培地が低密度で存在する環境サンプル中からの *Agrobacterium* の分離に有効であることが確認された。

今回分離された *Agrobacterium* からは、PCR 法により病原性プラスミドが検出されなかったことから、非病原性の株と推定された。小麦栽培跡地とダイズ栽培跡地のいずれからも非病原性 *Agrobacterium* が分離されたことから、これらの菌は栽培土壌中に広く分布する可能性が示唆された。これまで、*Agrobacterium* の研究は主に植物病原性の面から行われてきたが、土壌中の *Agrobacterium* の多くは非病原性の株であると報告されている (Mougel *et al.*, 2001)。今後、植物病原性の研究に加えて、環境中での *Agrobacterium* の生態や有用機能の開発に関する研究が進展することが期待される。

#### 5. 謝辞

本研究を行うにあたり、中央農業研究センターの佐々木由美子さんにご協力いただいた。ここに記して感謝の意を表す。

#### 6. 参考文献

- Bautista-Zapanta, J., Arafat, H. H., Tanaka, K., Sawada, H. and Suzuki, K. (2009). Variation of 16S-23S internally transcribed spacer sequence and intervening sequence in rDNA among the three major *Agrobacterium* species. *Microbiol. Res.* 164: 604–612.
- Ishikawa, M., Nakajima, K., Yanagi, M., Yamamoto, Y. and Yamasato, K. (2003). *Marinilactibacillus psychrotolerans* gen. nov., sp nov., a halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 711-720.
- Mougel, C., Cournoyer, B. and Nesme, X. (2001). Novel tellurite-amended media and specific chromosomal and Ti plasmid probes for direct analysis of soil populations of *Agrobacterium* biovars 1 and 2. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 65–74.
- 澤田宏之・土屋健一 (2003). *Agrobacterium* 属の分類. 日本植物病理学会報 69: 349–365.
- 澤田宏之 (2006). いわゆる「アグロバクテリウム」について— (1) プロフィール紹介—. 日本微生物資源学会誌 22: 117–121.



澤田宏之・山崎福容・竹谷 勝・青木孝之 (2014). 植物病原性 *Rhizobium* 属細菌の分類の変遷とジーンバンクにおける対応. 日本微生物資源学会誌 30: 13–27.

Willems, A., Coopman, R. and Gillis, M. (2001). Comparison of sequence analysis of 16S-23S rDNA spacer regions, AFLP analysis and DNA-DNA hybridizations in *Bradyrhizobium*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 623–632.

# 狭義のナラタケ *Armillaria mellea sensu stricto* の果樹類に対する病原性

中村 仁<sup>a)</sup>

農研機構 果樹研究所

[〒305-8605 茨城県つくば市藤本 2-1]

## Pathogenicity of *Armillaria mellea sensu stricto* on fruit trees

Hitoshi NAKAMURA<sup>a)</sup>

NARO Institute of Fruit Tree Science

### 1. 目的

ならたけ病は、多くの果樹や花木・林木などの木本植物をはじめとして草本植物にも発生する土壌病害で、果樹ではモモ、ブドウ、クリなどで被害が大きい。本病の病原菌はハラタケ目タマバリタケ科ナラタケ属に属するナラタケ (*Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm.) で、世界的に広く分布する。

本種の分類について、以前は形態的に類似したものが一括されて *A. mellea* として扱われていた。しかし、種内に生物学的種が存在することが示され、欧米では 1980 年代以降に、その後、日本においても生物学的種の整理が行われたことにより、*A. mellea* (狭義) を含めた複数の種に分けられた (Ota et al., 1998b; 車, 1999; Fox, 2000)。そのため、種を明確に示したい場合、種が整理される前の *A. mellea* は「広義のナラタケ (*A. mellea sensu lato*)」、種が整理された後の *A. mellea* は「狭義のナラタケ (*A. mellea sensu stricto*)」と区別される。また、日本に分布するナラタケは、ホモタリックな生活環を有することもあり (Ota et al., 1998a)、欧米に分布する種の亜種 *A. mellea* subsp. *nipponica* J.Y. Cha & Igarashi とされているが (車, 1999; 太田, 2006)、本亜種と同種あるいは近縁種と考えられる他地域に分布する菌との異同については整理されていない (Ota et al., 2000; Baumgartner et al., 2011)。したがって本研究では、現在日本に分布するナラタケの種名を *A. mellea* にとどめて「狭義のナラタケ (*A. mellea sensu stricto*)」として扱う。なお、これ以降、単に「ナラタケ」と表記した場合は「狭義のナラタケ」を指す。

ナラタケおよび広義のナラタケによって罹病した木本植物では、根や地際部の樹皮内および樹皮

---

a) (現所属) 農研機構 果樹茶業研究部門 Institute of Fruit Tree and Tea Science, NARO  
[〒305-8605 茨城県つくば市藤本 2-1]

下形成層部に膜状の白色菌糸体（菌糸膜）が伸展し、樹皮の腐敗と材質部の腐朽が起こる（Baumgartner et al., 2011）。罹病部が拡大すると通導阻害が進み、植物体全体が衰弱し、最終的には枯死に至る。感染は、ナラタケが形成する根状菌糸束が土壌中や罹病根を伝って、近接の健全根に達し、直接あるいは傷口から侵入することにより起こる。また、必ずしも根状菌糸束を形成しないこともあり、罹病根と健全根の接触によっても感染が広がる。

広義のナラタケにおいては、その宿主範囲は極めて広く、海外では 800 種以上と報告されている（Farr and Rossman, 2016）。日本においても 49 種（日本植物病理学会, 2015）あるいは 110 種（Kobayashi, 2007）との報告があり、その中には果樹類 9 種あるいは 11 種が含まれている。しかし、ナラタケについては、海外を含めて正確に同定された上で宿主範囲がまとめられた例は少なく、日本においては 1 種（日本植物病理学会, 2015）あるいは 16 種（Kobayashi, 2007）が宿主として挙げられているに過ぎず、果樹類ではナシとクリの 2 種のみが含まれる。

上記で挙げられたナラタケあるいは広義のナラタケの宿主とされている植物種については、必ずしも接種によって確認されたものではない。また、国内外を問わず、ある菌株を多くの植物種に接種し、その病原性を調査した事例は少ない。これは、ナラタケあるいは広義のナラタケにおいて、安定して病原性を評価できる接種方法が確立されていないことが理由の 1 つと考えられる。

そこで本研究では、ナラタケの病原性を安定して評価できる接種方法を開発するとともに、当該方法を用いてナラタケの果樹類に対する病原性を評価することを目的とした。なお、本稿では、2 年以上の栽培を要する木本植物で果実を食用とするものを「果樹類」とし、また、一部の果樹では台木に用いる樹種を当該果樹に相当するものとして扱った。

## 2. 材料および方法

### 1) 供試菌株

茨城県つくば市（農研機構果樹研究所圃場）の枯死モモ樹から採集され、罹病根内の菌体（菌糸膜）を分離源として得られたナラタケ MAFF 625137 を使用した（口絵参照）。本菌株は、菌糸および菌叢の形態と rDNA ITS 領域の塩基配列情報に基づいて同定されたものである。また、それ以外にも以下の 11 菌株 [MAFF 420656（分離菌株番号 94-7）、94-4、97-6、AS-1、NAM5、94-5、P-7、94-9、SB-1、P-5、96-12；Ota et al., 2000] も用いた。これら菌株は、Ota et al. (2000) によって SIG（Somatic incompatibility group；体細胞不和合性群）が決定されており、日本国内に分布する SIG A～SIG D のいずれかに属する。

### 2) SIG 判定

MAFF 625137 と既に SIG が判明している菌株との間で対峙培養を行い、MAFF 625137 の SIG を決定した。MAFF 625137 と MAFF 420656 を含む他菌株の含菌寒天をオートミール寒天培地に約 2 cm 離して置床し、その 3 週間後に両菌叢間で境界を形成していない場合を同一の SIG、着色した、もしくは両菌叢間で菌糸体が盛り上がった境界を形成した場合を異なる SIG に属すると判定した。

### 3) 接種試験

被接種樹として、リンゴ台木（マルバカイドウ、*Malus prunifolia* var. *ringo*；本稿ではリンゴとみなす）を含む果樹類8科15種の幼木を用いた（表1）。幼木の大きさは樹種によって異なるが、おおよそ樹高10~60 cmの個体を用いた。蒸留水を十分に含ませた滅菌ナシ枝片（長さ約3~4 cm×径約0.8~1 cm）40個あるいは滅菌ナシ枝チップ（4 mm 篩目以上、11 mm 篩目以下の大きさの

表1. 狭義のナラタケ *Armillaria mellea* sensu stricto MAFF 625137の果樹類に対する接種結果<sup>1)</sup>

供試樹種の科・種名 <sup>2)</sup>		試験 番号	品種 <sup>3)</sup>	病斑・菌糸膜 形成頻度 <sup>4)</sup>	宿主植物 (既報) <sup>5)</sup>
バラ科 Rosaceae					
モモ	<i>Amygdalus persica</i>	1	あかつき	1/1	+ <sup>*,**</sup>
		2	あかつき	1/1	
ウメ	<i>Armeniaca mume</i>		不明	1/1	+ <sup>**</sup>
アンズ	<i>Armeniaca vulgaris</i>		平和	1/2	+ <sup>**</sup>
ビワ	<i>Eriobotrya japonica</i>		不明	2/2	+ <sup>**</sup>
ナシ	<i>Pyrus pyrifolia</i> var. <i>cultra</i>	1	幸水	1/1	+ <sup>*,**</sup>
		2	幸水	1/1	
ナワシロイチゴ	<i>Rubus parvifolius</i>		- <sup>*</sup>	1/2	
アケビ科 Lardizabalaceae					
ミツバアケビ	<i>Akebia trifoliata</i>		不明	3/4 <sup>*</sup>	
ブナ科 Fagaceae					
クリ	<i>Castanea crenata</i>	1	ぼろたん	1/1	+ <sup>*,**</sup>
		2	ぼろたん	1/1	
ミカン科 Rutaceae					
ラフレモン	<i>Citrus jambhiri</i>		- <sup>**</sup>	2/2	
カキノキ科 Ebenaceae					
カキ	<i>Diospyros kaki</i>	1	富有	3/3 <sup>**</sup>	
		2	次郎	2/2 <sup>**</sup>	
		3	- <sup>**</sup>	0/3	
		4	- <sup>**</sup>	0/4	
クワ科 Moraceae					
イチジク	<i>Ficus carica</i>		蓬菜柿	2/4	+ <sup>*</sup>
ヤマグワ	<i>Morus australis</i>		- <sup>*</sup>	1/2 <sup>*</sup>	+ <sup>*,**</sup>
ツツジ科 Ericaceae					
ラビットアイ・ブルーベリー	<i>Vaccinium ashei</i>		ホームベル	2/2	
ブドウ科 Vitaceae					
アメリカブドウ	<i>Vitis labrusca</i>	1	キャンベル・アーリー	1/2	+ <sup>*,**</sup>
		2	キャンベル・アーリー	2/2	

1) ポット植えの被接種樹の大きさに応じた接種源（培養ナシ枝片・チップ；2~4ヶ月培養）数量を使用し、接種2~3ヶ月後に調査。ウメとアンズに対する試験では培養期間5ヶ月の枝片を接種源として使用。土壌中での根状菌糸束形成が観察された試験のみを結果として示した。

2) 米倉・梶田（2003）に準拠。一部は一般名を使用。

3) \*：野外採取，\*\*：実生。

4) 病斑および樹皮下での菌糸膜形成が観察された被接種樹数/供試樹数，\*：病斑組織からの接種菌株の再分離を確認，\*\*：富有では2個体で，次郎では1個体で樹皮にのみ菌糸膜形成。

5) +：報告あり，\*：日本植物病理学会（2015），\*\*：Kobayashi (2007)。いずれもナラタケあるいは広義のナラタケの宿主植物を指す。

もの) 100 ml 分 (乾燥重約 15 g) を入れたプラントボックス内に、あらかじめ各菌株を培養していたナシ枝片 4 個を接種源として加えて培養した。培養は、暗黒下 23°C で 2~5 か月間行い、培養期間 2 か月を超えた場合は乾燥を防ぐために滅菌蒸留水を適宜加えた。

室内において、接種源として 2~4 か月間培養した枝片を 6 個あるいは 8 個、培養チップ 50 ml 分を使用し、剪定鋏で根の先端を切除するとともに太い根に切れ込みを入れた 2 年生リンゴ台木を接種源に接するように作土 (黒土 (刀川平和農園, 栃木) : バーミキュライト = 10 : 1) を用いてビニールポットに植え付けた。各試験にはリンゴ台木 3~5 個体を用い、各 1 回行った。一部試験では、対照として無接種の台木を用いた。

リンゴ台木以外の被接種樹については、幼木の大きさに応じて、2~5 か月間培養した培養枝片を 8 個あるいは 20 個、培養チップを 50 ml あるいは 100 ml 分を接種源として用い、リンゴ台木と同様に根部に付傷させた後、ビニールポットあるいは素焼き鉢に植え付けた。試験には樹種ごとに 1~4 個体を用い、試験は状況に応じて 1~4 回行った。いずれの試験においても対照としての無接種樹は用いなかった。一部試験では、形成された病斑から菌を再分離した後、SIG 判定と同様の手順で接種菌株と再分離菌株との対峙培養を行い、その際、両菌叢間で境界を生じなかった場合に接種菌株が再分離されたと判断した。

リンゴ台木の場合は 25°C で 2 か月育成後、その他の被接種樹の場合は 25°C で 2~3 か月育成後、接種源上あるいは土壤中における根状菌糸束の形成の有無、および地下部 (根冠部および根部) における病斑形成 (樹皮組織の腐敗) および樹皮下における菌糸膜形成の有無を調査した。リンゴ台木以外の被接種樹の場合は接種後に根状菌糸束の形成が認められない場合は接種不成功とみなして、試験結果から除外した。ある樹種に対する接種において、基本的には複数個体あるいは複数回にわたって病斑形成が認められた場合、当該植物種に対して病原性ありと判定した。

### 3. 結果

#### 1) SIG 判定

MAFF 625137 は、対峙培養後に SIG A に属する 4 菌株とは境界を生じず、MAFF 420656 を含む SIG B~D に属する 7 菌株とは境界を生じた (図 1) s. したがって、MAFF 625137 は、Ota et al. (2000) で報告された 4 SIG のうち、SIG A に属すると判定した。

#### 2) 接種試験

##### (1) ナラタケ MAFF 625137 のリンゴ台木に対する接種結果

リンゴ台木に対して、接種源の培養期間を 2、3 あるいは 4 か月、および接種源個数を 6 個あ

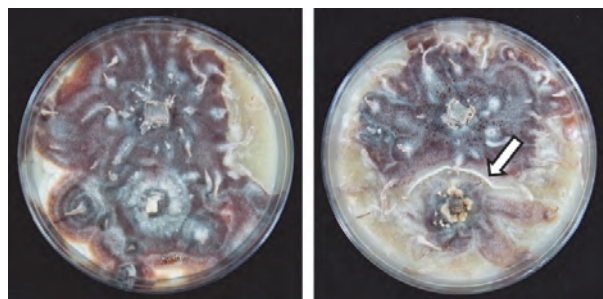


図1. 狭義のナラタケ *Armillaria mellea sensu stricto*におけるSIG反応

左 : MAFF 625137 (上側) と AS-1 (下側 ; SIG A に属する) との反応 (同じ SIG に属する)。右 : MAFF 625137 (上側) と MAFF 420656 (下側 ; SIG C に属する) との反応 (異なる SIG に属する。矢印は菌叢間に形成された境界を示す)。

るいは8個にしてリンゴ台木に接種した結果、培養期間・使用個数に関わらず、根状菌糸束の形成が認められた場合には供試した全ての個体の根部に病斑（樹皮組織の腐敗）および樹皮下における菌糸膜形成が認められた（図2）。根状菌糸束形成が認められなかった場合には、土壌中から回収した接種源が黒変しており、接種源が不良であったものと判断された。したがって、以降の接種試験には、上記の培養期間・使用個数のうち、短期間で接種源が作製でき、かつ、より安定的に

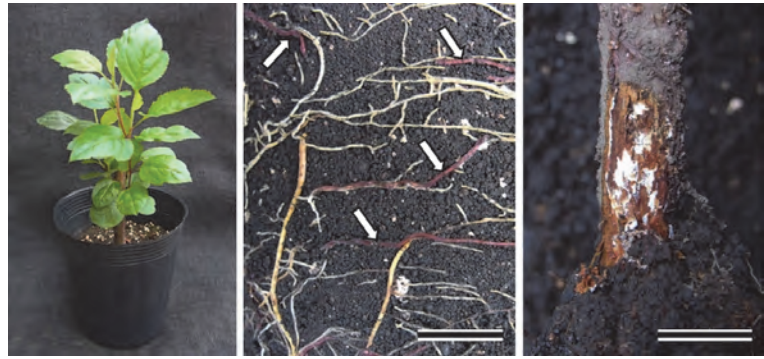


図2. 狭義のナラタケ *Armillaria mellea sensu stricto* MAFF 625137によるリンゴ台木への接種結果

左：接種されたリンゴ台木（マルバカイドウ）の2年生幼木。中：接種2か月後に土壌中で伸長していた濃赤紫色の根状菌糸束（矢印）（バー：1 cm）。淡黄褐色に見えるのはリンゴ台木の根。右：接種されたリンゴ台木幼木の地際部に認められた病徴・標徴（樹皮組織の腐敗および樹皮下に形成された白色の菌糸膜）（バー：1 cm）。

病斑形成が期待できる接種条件として、培養期間2か月の培養ナシ枝片を8個使用（培養チップの場合は50 ml分使用）することを基本とした。併せて、接種後、根状菌糸束が形成されていることが確認できた場合に限り、試験が成功したものとみなした。

## (2) ナラタケの異なるSIGに属する菌株の接種結果

接種条件として培養期間2か月の接種源を8個使用してリンゴ台木に接種したところ、MAFF 625137以外のSIG Aに属する4菌株の病原性が確認されたが、MAFF 420656を含むSIG Cに属する3菌株では病斑・菌糸膜形成は観察されず、病原性が認められなかった（表2）。対照とした無接種台木では病斑・菌糸膜形成は観察されなかった。SIG Aに属する菌株は根状菌糸束の形成頻度が高かったが、MAFF

表2. 狭義のナラタケ *Armillaria mellea sensu stricto* 各菌株のリンゴ台木への接種試験結果<sup>1)</sup>

供試菌株 <sup>2)</sup>	SIG <sup>2)</sup>	根状菌糸束形成頻度 <sup>3)</sup>	病斑・菌糸膜形成頻度 <sup>4)</sup>
MAFF 625137	A	4/4	3/4
94-4	A	4/4	3/4
97-6	A	4/4	4/4
AS-1	A	4/4	2/4
NAM5	A	4/4	4/4
MAFF 420656 (94-7)	C	2/4	0/4
94-5	C	2/4	0/4
P-7	C	0/4	0/4
対照（無接種）		0/4	0/4

1) ポット植え2年生リンゴ台木（マルバカイドウ）に接種源として培養ナシ枝片8個を用いて接種した2か月後に調査。

2) 分離菌株番号およびSIG（Somatic incompatibility group）はOta et al.（2000）による。

3) 土壌中での根状菌糸束形成が観察されたポット数/リンゴ台木植えポット数。

4) 病斑および樹皮下での菌糸膜形成が観察されたリンゴ台木数/供試リンゴ台木数。

420656 を始めとして SIG C に属する菌株は根状菌糸束の形成頻度が低く、菌株によっては全く形成しなかった。

### (3) ナラタケ MAFF 625137 の果樹類に対する接種結果

リンゴ（リンゴ台木）以外の果樹類 14 種に対して MAFF 625137 を接種したところ、カキを除いた 13 樹種では明瞭に病斑・菌糸膜が形成され、MAFF 625137 は当該 13 樹種に対して病原性を有すると判断された（図 3, 表 1）。一部の試験では接種菌株が腐敗組織から再分離されることを確認した。カキに対して接種試験を 4 回行ったところ、うち 2 回では病斑・菌糸膜形成が認められなかったが、他の 2 回では一部の個体において病斑・菌糸膜が形成された（図 4, 表 1）。しかし、それら病斑・菌糸膜は、根の切断部のみで見られるものや、樹皮のみで見られるものがあり、それらの伸展は局所にとどまった。また、感染部位ではタンニンによるものと思われる強い黒変が観察された（図 4）。被接種樹のうちウメおよびアンズに対しては、リンゴ台木を用いた接種試験では使用しなかった培養期間 5 か月の培養枝片を接種源として用いた結果、一部個体に対する病斑・菌糸膜形成が認められた（表 1）。

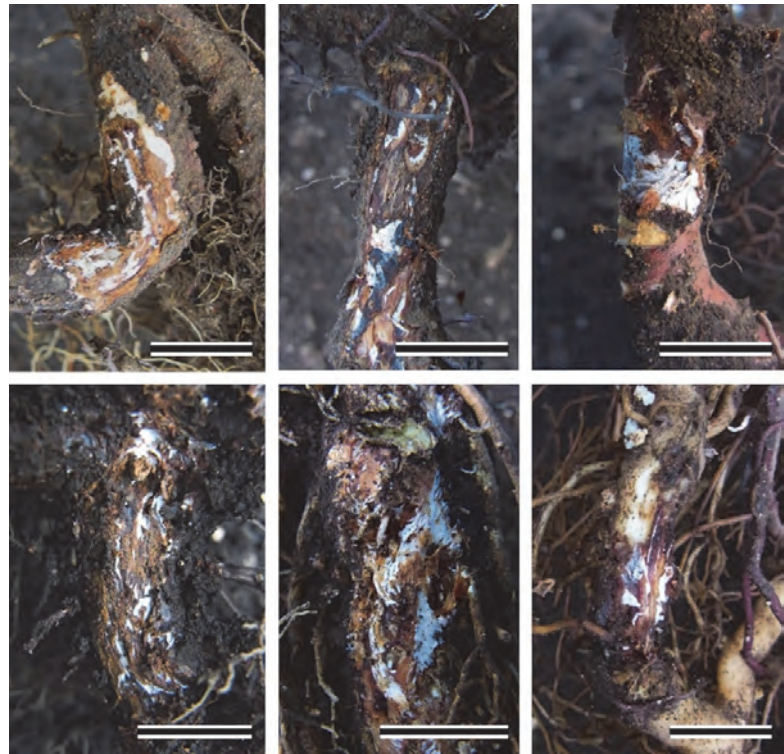


図3. 狭義のナラタケ *Armillaria mellea sensu stricto* MAFF 625137による果樹類への接種結果

左上：ナシ，中上：クリ，右上：モモ，左下：ビワ，中下：ラフレモン，右下：ミツバアケビ。いずれも被接種樹に認められた病斑（根部樹皮下に形成された白色の菌糸膜およびその周辺組織の腐敗）を示す。バー：1 cm.

## 4. 考察

### 1) 接種方法と病原性の評価

これまでのナラタケあるいは広義のナラタケの接種に関する報告では、接種源として、滅菌枝片で3~6か月培養したものを使用し、接種1か月~1年後に調査していることが多い(Mansilla et al., 2001; Sicoli et al., 2002; Baumgartner and Rizzo, 2006; Metaliaj et al., 2006)。本研究では、リンゴ台木に対する接種試験の結果から、効率的な接種条件として、枝片を2か月培養して作製した接種源を8個使用し、接種2か月後に調査を行うことで病原性を評価できることを明らかにした。接種の目的や被接種植物体の大きさにもよるが、これは過去の報告と比べると、若干効率が良いとい

える。また、本研究で行ったように、供試する植物体の大きさに合わせて接種源の大きさや数量を変えることによって、本法による接種の効率性を維持できるものと考えられる。

本研究では、病原性の有無を病斑（樹皮組織の腐敗）および樹皮下における菌糸膜の形成の有無によって判定した。リンゴ台木に対する MAFF 625137 の接種試験では、根状菌糸束形成が認められなかった場合には病斑・菌糸膜は形成されず、根状菌糸束形成が認められた場合には根の傷口への菌糸束による侵入が観察された。このことは、従来指摘されているように (Gregory et al., 1991; Fox, 2000; Baumgartner et al., 2011), ナラタケの宿主への感染・侵入に果たす根状菌糸束の重要性を示すと同時に、根状菌糸束形成の有無によって接種の成否もしくは接種源の良否が判定できることを意味する。根状菌糸束形成を確認しながら接種試験を実施することは、より安定した病原性評価を可能にするという点で重要と考えられる。

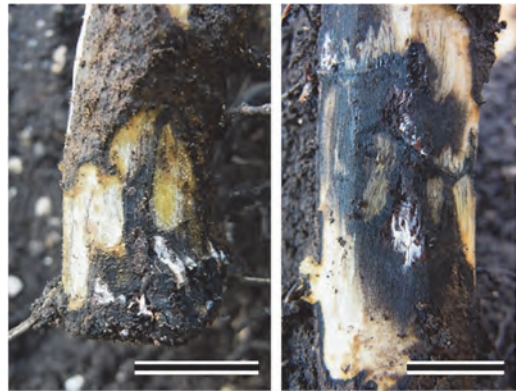


図4. 狭義のナラタケ *Armillaria mellea* sensu stricto MAFF 625137によるカキ樹への接種結果

左：品種「次郎」の切断した根先端部の樹皮下にわずかに形成された白色の菌糸膜（バー：5 mm）、右：品種「富有」の樹皮部にのみ形成された白色の菌糸膜（バー：1 cm）。

## 2) ナラタケの異なる SIG に属する菌株間での病原性の比較

本研究において、ナラタケの異なる SIG に属する複数菌株を用いてリンゴ台木に接種したところ、MAFF 420656 を含む SIG C に属する 3 菌株では病斑・菌糸膜形成に至らなかったが、MAFF 625137 を含む SIG A に属する 5 菌株では高頻度に病斑・菌糸膜形成が認められた。これまで日本のナラタケにおいて SIG 間における病原性・病原力の差異に関する知見は得られていないが、今回の試験結果からは SIG A は SIG C よりもリンゴ台木に対する病原力が強い可能性が示唆される。Ota et al. (2000) は SIG A が他 SIG よりも国内に広く分布することを報告しており、各 SIG の分布の違いは各々の病原力と関連していることも考えられる。

同時に、SIG C の菌株では菌糸束形成頻度が低く、SIG 間における病原性の差異は根状菌糸束の形成程度による可能性もあると考えられた。一方で、今回供試した SIG C に属する菌株においては、長期の維持・管理の過程で根状菌糸束の形成能が不良となった可能性もある。今後、野外から採集して間もない SIG C に属する菌株の菌糸束形成程度を調査する必要があるだろう。

## 3) ナラタケ MAFF 625137 の果樹類に対する病原性

これまで、日本のナラタケに関しては、宿主植物として 16 種が挙げられ、果樹ではナシとクリの 2 種のみしか挙げられていない (Kobayashi, 2007)。広義のナラタケでは、宿主として 49 種 (日本植物病理学会, 2015) あるいは 110 種 (Kobayashi, 2007) が挙げられているが、それぞれ果樹



としては9種あるいは11種が含まれているに過ぎない。本研究で、ナラタケ MAFF 625137 がリンゴ（リンゴ台木）を含む果樹類 8 科 15 種に病原性を有することが明らかになった。これら樹種の中には日本におけるナラタケの宿主として報告されていない5樹種（ナワシロイチゴ、ミツバアケビ、ラフレモン、カキ、ラビットアイ・ブルーベリー）も含まれており、広義のナラタケと同様にナラタケも宿主範囲が広いものと考えられる。ただし、カキに対しては他樹種と異なり、病斑・菌糸膜形成頻度が低く、それらの伸展程度も小さかった。このことから MAFF 625137 はカキに対しては病原力が弱いことが示唆される。

広義のナラタケを含めて、ある特定の菌株を多くの樹種に接種し、その病原性を調査した報告は少ない。加えて、当該報告例では1属内の複数樹種への接種結果に限られるようであり (Guillaumin et al., 1991; Sicoli et al., 2002; Metaliaj et al., 2006), 科レベルで異なる多数の樹種に接種を行った事例は見当たらない。本研究でナラタケ MAFF 625137 の多数の樹種に対する病原性を明らかにできたのは、病原性を安定して評価しうる接種方法が開発されたことが大きな理由と考えられる。今後、本接種方法を用いることによってナラタケ種内における宿主範囲の比較や宿主の抵抗性の評価などを効率的に行うことができるものと思われる。

## 5. 謝辞

本研究を行うにあたり、ナラタケ菌株を分譲いただくとともにナラタケ属菌の分類・同定および生理・生態的特性に関する貴重なご意見をいただいた森林総合研究所（現所属 日本大学）の太田祐子氏に厚く御礼申し上げます。

## 6. 参考文献

- Baumgartner, K. and Rizzo, D.M. (2006). Relative resistance of grapevine rootstocks to *Armillaria* root disease. *Am. J. Enol. Vitic.* 57: 408–414.
- Baumgartner, K., Coetzee, M.P. and Hoffmeister, D. (2011). Secrets of the subterranean pathosystem of *Armillaria*. *Mol. Plant Pathol.* 12: 515–534.
- 車 柱榮 (1999). 北海道産ナラタケの分類と生態. *日菌報* 40: 155–164.
- Farr, D.F. and Rossman, A.Y. (2016). Fungal databases, Systematic mycology and microbiology laboratory, <http://nt.ars-grin.gov/fungaldbases/>. ARS, USDA (参照 2016年8月1日) .
- Fox, R.T.V. (2000). *Armillaria* root rot: Biology and control of honey fungus. Intercept Ltd., Andover.
- Gregory, S.T., Rishbeth, J. and Shaw, C.G., III (1991). Pathogenicity and virulence. *In: Armillaria* root disease. Agriculture Handbook No. 691 (Shaw, C.G., III and Kile, G.A., eds). pp. 76–87, United States Department of Agriculture Forest Service, Washington, DC.
- Guillaumin, J.J., Pierson, J. and Grassely, C. (1991). The susceptibility to *Armillaria mellea* of different *Prunus* species used as stone fruit rootstocks. *Scientia Horticulturae* 46: 43–54.
- Kobayashi, T. (2007). Index of fungi inhabiting woody plants in Japan –host, distribution and

- literature—. Zenkoku-Noson-Kyoiku Kyokai Publishing, Tokyo.
- Mansillal, J.P., Aguin, O. and Sainz, M.J. (2001). A fast method for production of *Armillaria* inoculum. *Mycologia* 93: 612–615.
- Metaliaj, R., Sicoli, G. and Luisi, N. (2006). Pathogenicity of *Armillaria* isolates inoculated on five *Quercus* species at different watering regimes. *Phytopathol. Mediterr.* 45: 3–9.
- 日本植物病理学会 (2015). 日本植物病名目録, 2015 年版. 日本植物病理学会, 東京.
- Ota, Y., Fukuda, K. and Suzuki, K. (1998a). The nonheterothallic life cycle of Japanese *Armillaria mellea*. *Mycologia* 90: 396–405.
- Ota, Y., Matsushita, N., Nagasawa, E., Terashita, T., Fukuda, K. and Suzuki, K. (1998b). Biological species of *Armillaria* in Japan. *Plant Dis.* 82: 537–543.
- Ota, Y., Intini, M. and Hattori, T. (2000). Genetic characterization of heterothallic and non-heterothallic *Armillaria mellea* sensu stricto. *Mycol. Res.* 104: 1046–1054.
- 太田祐子 (2006). ナラタケ属菌の分類・系統・生態およびならたけ病の防除. *樹木医学研究* 10: 3–10.
- Sicoli, G., Annese, V., de Gioia, T. and Luisi, N. (2002). *Armillaria* pathogenicity tests on oaks in Southern Italy. *J. Plant Pathol.* 84: 107–111.
- 米倉浩司・梶田忠 (2003). BG Plants 和名-学名インデックス (YList), <http://ylist.info>. (参照 2016 年 4 月 30 日).

# *Plectosphaerella cucumerina* によるキク苗腐敗病の発生 および病原菌の生態について

佐藤 衛<sup>a)</sup>

農研機構 花き研究所

[〒305-8519 茨城県つくば市藤本 2-1]

## Cutting rot of chrysanthemum caused by *Plectosphaerella cucumerina* and its ecology

Mamoru SATOU<sup>a)</sup>

NARO Institute of Floricultural Sciences

### 1. 目的

キク属 (*Chrysanthemum*) はキク科 (*Compositae*) に属しており、30 以上の種を持つ大きなグループである。原産種はアジアから北西ヨーロッパまで分布している (Horst and Nelson, 1997)。中でもキク (*C. morifolium* Ramat.) は最も重要な栽培種であり、1 年生花きとして世界中で栽培されている。日本では主に観賞用として栽培され、花き類の中では生産出荷量は最も多い。キクには疫病、半身萎凋病、萎凋病、立枯病などの様々な糸状菌による立枯れ性病害が発生して生産阻害要因となっている。

近年、日本ではキク栽培の方法として、未発根のキクの挿し穂苗を直接土壤に挿す「直挿し法」が広く行われており (本田ら, 1996 ; 佐々木ら, 1996), これら直挿し用のキク苗の海外からの輸入が多くなっている。2008 年 9 月中旬、愛知県内でセルトレイで育苗中のキク (品種: '神馬 2 号') で生育障害が発生した。この苗はインドネシア産購入苗であり、挿し穂 10 日後も全く発根せず、穂の先端が黒変・腐敗していた。キク挿し穂において、本症状の記録は無く、新病害の可能性があると考え、病原菌の分離、培養、接種を試みた。また、合わせて、分離菌の分類・同定を行った。さらには、分離菌を既知の日本産の病原菌と比較検討を行うとともに、分離菌のキクにおける動態についても試験を行った。その結果、新病害であることが判明し (Satou et al., 2010), さらに農業生物資源ジーンバンクに登録した供試菌株について諸特性を明らかにするとともに、本病の防除薬剤についても検討した (Satou et al., 2013)。本報告では主にそれらの成果をまとめて報告する。

---

a) (現所属) 農研機構 野菜花き研究部門 Institute of Vegetable and Floriculture Science, NARO  
[〒305-0852 茨城県つくば市藤本 2-1]

## 2. 材料および方法

### 1) キクからの分離・培養・接種

2008年9月、愛知県において生育障害が発生した海外産キク挿し穂（品種‘神馬2号’）は、挿し穂10日後も全く発根せず、穂の先端が黒変・腐敗していた（図1a）。この苗から常法により病原菌の分離を試みた。また、分離菌は単孢子分離菌株とし、1L当たり200gのジャガイモ煎汁に、20gのショ糖および寒天を加えて作成したジャガイモ煎汁ショ糖寒天培地（PSA）、同培地のショ糖の代わりに20gブドウ糖を加用したジャガイモ煎汁ブドウ糖寒天培地（PDA）あるいはジャガイモ煎汁ブドウ糖液体培地（PD）を用いて培養を行い、以下の試験に供試した。

生育温度：PSA培地に直径6mmの菌そうを置床し、5、10、15、20、25、30、35、40℃の暗黒下の恒温器内で培養し、1日当たりの菌糸生育を測定した。

接種試験：PSA培地で培養し分生子粘塊を滅菌水に懸濁し、 $10^7$  conidia/mlに調整し、接種源とした。これに、キク挿し穂‘神馬’を30分浸漬後、育苗用土を詰めたトレイに挿し、7～14日間25℃設定のガラス温室にて育苗した。

### 2) 分離菌の分類・同定

顕微鏡下で分離菌の形態等について観察、計測を行った。また、分離菌のゲノムDNAをWizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA)により抽出し、Kageyama et al. (2003) に従い rDNA-ITS 領域を ITS1, ITS4 プライマー(White et al., 1990)を用いて PCR 増幅した。その後、増副産物について BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて、塩基配列の解読を行った。配列データは、DDBJ/EMBL/GenBank databases に登録されている菌株との類似度を調べた。

### 3) 分離菌および同属菌の病原性

分離菌を PD 培地で 25℃、5～7 日間培養し、培養後は 5000×g で遠心分離し、集め、滅菌水に再懸濁し、 $1\sim 5\times 10^7$  conidia/ml に調整し、接種源とした。これに、キク挿し穂‘神馬’‘神馬 2 号’‘沖の白波’を 30 分間浸漬後、育苗用土を詰めたトレイに挿した。各品種とも無接種区を設けた。25℃、12 時間照明、湿度 100%の温室で3週間育成した。病原性は次の通り評価した。4：挿し穂末端部が腐敗；3：挿し穂末端部全体が黒変；2：挿し穂末端部半分以上が黒変；1：挿し穂末端部半分未満の黒変；0：変色無し。試験は5反復行った。統計解析は JMP 10 (<http://www.jmp.com/japan/>) で行った。

本分離菌の他、ジーンバンクに登録されていた *Plectosphaerella* 属菌（ダイコン円形褐斑病菌：MAFF 238964、カボチャ白斑病菌：MAFF 238627）を接種に用いた。各菌とも、前述同様の方法で培養して接種源とし、‘神馬’に接種を行った。試験は2反復行った。病原性の評価、統計解析についても前述同様とした。

128 穴セルトレイに MAFF 712335 の分生子を滅菌土壌 1g あたり  $1\times 10^6$  conidia となるように混合した土を 128 穴トレイに詰め、健全‘神馬’の挿し穂を挿した。分生子を混合しない土のみを対

照区とした。MAFF 712335 の分生子懸濁液に漬けた後、挿し穂した区も設けた。各区 24 本挿し穂を使用し、温室条件下で管理した。試験は 2 反復で行った。発病の評価は前述に従った。

#### 4) キク苗腐敗病菌のキク体内での動態

発根したキク挿し穂の根の先端部を切り、MAFF 712335  $1\sim 5\times 10^7$  conidia/ml の分生子懸濁液に 30 分間漬けた後、滅菌土壌を詰めたプランター(L650×W220×H190 mm)に植え付けた。対照区では、根の先端を切っただけのキク挿し穂を植えた。1 週間後、脇芽が出やすいよう頂芽を折り取った。2~3 週間毎に発生してきた脇芽を摘み取り、試験材料とした。試験は 2009 年、2010 年の 2 回行った。

2009 年 7 月 9 日、27 日、8 月 20 日、9 月 17 日、感染区‘神馬’の採穂は 24、22、24、21 本、感染区‘沖の白波’は 28、24、29、26 本、それぞれ採穂した。2010 年 6 月 21 日、7 月 2 日、8 月 23 日、感染区‘神馬’は 18、28、17 本、感染区‘沖の白波’は 30、30、16 本、それぞれ採穂した。2009 年対照区‘神馬’は 26、-, 17、16 本、対照区‘沖の白波’は 21、-, 21、14 本、それぞれ採穂した。2010 年対照区‘神馬’は 22、26、17 本、対照区‘沖の白波’は 30、23、17 本それぞれ採穂した。

常法に従って各挿し穂における *P. cucumerina* の有無を確認するため、pH4 に調整した PDA に置床した。

#### 5) キク苗腐敗病菌の薬剤防除の可能性

Brantner and Windels (1998)、木曾(1994)、Matheron and Porchas (2000)に従って、キク腐敗苗分離菌株 MAFF 712335、MAFF 712336、MAFF 712337、MAFF 712338 の薬剤感受性を調査した。チオファネートメチル (トップジン M 70%WP、日本曹達、東京)、メタラキシル (リドミル 2%GR、シンジェンタジャパン、東京)、トルクロホスメチル (リゾレックス 5%WP、住友化学、東京)、キャプタン (オーソサイド 80%WP、アリストライフサイエンス、東京)、2,4,5,6-テトラクロイソフタロニトリル (TPN) (ダコニール 40%WP、住友化学、東京)、ベノミル (ベンレート 50%WP、住友化学、東京)、マンコゼブ (ジマンダイセン 75%WP、ダウケミカル、東京) (表 1)。予め作製・溶解し 50°C としたものに最終濃度がそれぞれ 5~500 ppm となるように各薬剤を加え、プラスチックシャーレに流し込み、試験用平板とした。3 週間培養した菌そう寒天片 (直径 6mm) を薬剤添加平板に置床した (1 菌片/シャーレ、1 薬剤 1 菌株あたり 3 枚シャーレ)。薬剤無添加の PDA を対照区とした。25°C 暗黒下で 5 日間培養後菌そう直径を計測し、対照区と比較した阻止率を計算した。50%効果濃度 (EC<sub>50</sub>) を JMP 10 で算出した。

農薬の効果確認試験は次の通りに行った。挿し穂末端部を 70%チオファネートメチル、2%メタラキシル、50%トルクロホスメチル、80%キャプタン、40%TPN、50%ベノミルをそれぞれ粉衣し、MAFF 712335  $1\times 10^6$  conidia/土 1 g となるように調整した土を詰めたセルトレイに挿した。前述のとおり管理し、発病調査を行った。試験は 2 回行った。発病指数から防除価を算出した。

### 3. 結果

#### 1) キクからの分離・培養・接種

病斑部 (図 1a) からはクリーム色の菌叢で表面が粘質を呈する生育の比較的遅い菌が高率に分離された (図 1b). このうちの 1 菌株 (菌株名: 1-M) について詳細な試験を行った. 本菌の分生子懸濁液にキク健全挿し穂(神馬)を浸漬接種後, トレイで育苗したところ, しおれが目立ち, 挿し穂の切断面が黒~褐変したほか, 多くは発根するものの, 一部の挿し穂は発根しないなど, 原病徴とほぼ同様の症状を示した (図 1c). 挿し穂の黒変部からは接種菌が再分離され, 本菌が病原菌であることが確認された. 本菌は PSA 上で 5~ 35°C で生育し, 適温は 25°C であった. 25°C での菌糸生育速度は 3mm/日であった. 供試菌株 1-M を MAFF 712335 として, また, 他にも分離菌株 1-2, 1-3, 1-7 をそれぞれ MAFF 712336, MAFF 712337, MAFF 712338 として農業生物資源遺伝子バンクに登録した.

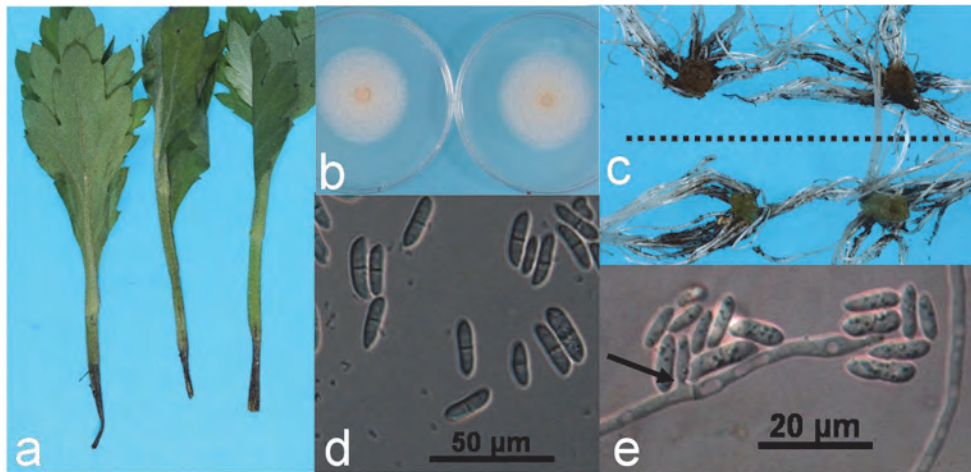


図 1. キクの病徴および分離菌株

a: キク挿し穂の病徴 (末端部が黒変), b: PDA 上での分離菌の菌叢 (左: 表面, 右: 裏面), c: 接種 14 日後の「神馬」の挿し穂先端部の黒変 (上段: 接種, 下段: 無接種), d: PDA 上での分生子, e: アデロフィアライド (矢印). (Satou et al., 2010 の Fig.1 を改変)

#### 2) 分離菌の分類・同定

分離菌株 1-M はアデロファイアライドを含むモノファイアライド (Gams, 1971) 先端に分生子を擬頭状に形成した (図 1d,e). 分生子は無色, 平滑, 紡錘形で中央 1 隔壁の 2 細胞が多く, 時に単細胞, 大きさは 2 細胞のものが平均  $13.5 \times 4.4 \mu\text{m}$ , 1 細胞のものが平均  $8.1 \times 2.4 \mu\text{m}$  であるなど, Sato et al. (2005), Palm et al. (1995), Seifert (1996) などの報告した *Plectosphaerella* 属菌と一致した (表 1). また, Carlucci et al. (2012), Usami et al. (2012, 2015), 廣岡ら (2016) は, ITS および 28S rRNA 遺伝子の D1/D2 領域による *Plectosphaerella* 属菌の同定の検証を行っており, 既報の菌株が新種や未記載種に再同定されている. しかしながら, 本分離菌の rDNA-ITS 領域の塩基配列は *P. cucumerina* (KC756835 他) と 99.8% (466/467bp) 一致し, *Plectosphaerella cucumerina*

(Lindf.) W. Gams と同定された。塩基配列データは AB537556 として DDBJ に登録した。

キク挿し穂での腐敗症状は記録が無く新病害と考えられたため、*Plectosporium tabacinum* (*P. cucumerina*) による「キク苗腐敗病」(cutting rot of chrysanthemum) とした (Satou et al., 2010)。

表 1. 既知 *Plectosphaerella* 属菌とキク分離菌株との比較

菌株	分離源	分離地	PDA上での菌そう	菌糸生育 (mm/日 20°C)	フィアライド	分生子の大きさ (μm) および形態	
						1 細胞	2 細胞
FLS63 (Sato et al., 2005)	カボチャ	鹿児島	平滑で気中菌糸はまれ、 クリーム～鮭肉～淡褐色	2.6-4.0	Monophialide, adelophialide <sup>a)</sup>	4.0-9.0 × 1.6-2.4 楕円～長楕円	5.0-11.0 × 2.0-3.2 楕円～長楕円
RA1 (Sato et al., 2005)	ランキュラス	香川	平滑で気中菌糸はまれ、 クリーム～鮭肉～淡褐色	4.0-4.4	Monophialide, adelophialide	4.0-6.0 × 1.0-2.2 楕円～長楕円	5.5-11.0 × 1.2-2.5 楕円～長楕円
<i>P. cucumerina</i> (Palm et al., 1995)	-	-	灰～褐、ややオレンジ、 半透明で湿った感じ、気 中菌糸わずか	1.9-5.3	Monophialide, adelophialide	4.6-10.9(-13.6) × (1.8-)2.3-3.1 楕円	7.3-13.6 × (2.3-)2.7 -3.6 楕円
<i>P. cucumerina</i> (Seifert, 1996)	-	-	凸～平滑で気中菌糸はま れ、白～クリーム～鮭肉 色	2.1-5.6	Monophialide, adelophialideま れに polyphialide	6.0-12.0 × 2.0-3.0 楕円～長楕円	7.5-14.0 × 2.5-3.5 楕円～長楕円
1-M	キク	愛知 <sup>b)</sup>	湿った感じ、平滑で気中 菌糸はまれ、クリーム～ 鮭肉色	2.5	Monophialide, adelophialide	6-11.8 × 1.4-3.4 (平均 8.1 × 2.4) 紡錘～楕円	10.9-16.2 × 3.4-7.0 (平均 13.5 × 4.4) 紡錘～楕円

a) 図1参照。

b) インドネシアからの輸入。

(Satou et al., 2010のTable 1を改変)

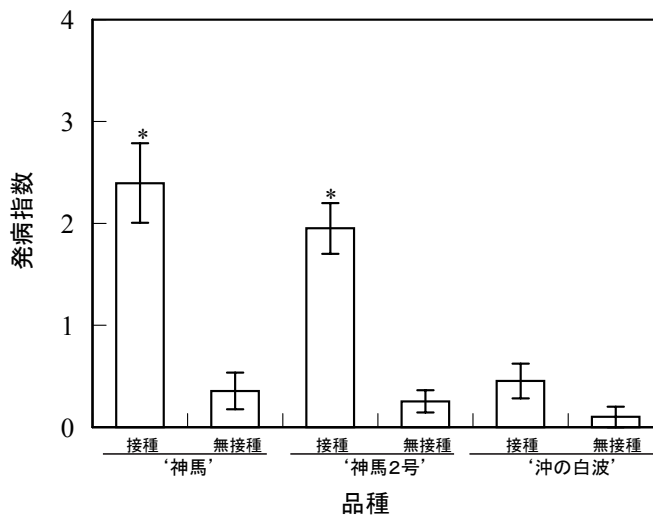
### 3) 分離菌および同属菌の病原性

キク苗腐敗病菌 *P. cucumerina* (1-M) は、「神馬」、「神馬 2 号」に感染・発病させた (図 2)。穂を菌体懸濁液に浸してから挿し穂した場合と菌体懸濁液を混和した土壤に挿し穂をした場合、いずれにおいても発病が認められた (図 3)。ダイコンおよびカボチャ由来の *Plectosphaerella* 属菌により、キクは発病した (図 4)。

図 2. *Plectosphaerella cucumerina* (1-M) のキク品種に対する病原性

図中の「\*」は、Wilcoxon rank sum test にて有意差あり ( $P < 0.05$ )。

(Satou et al., 2013 の Fig.1 を改変)



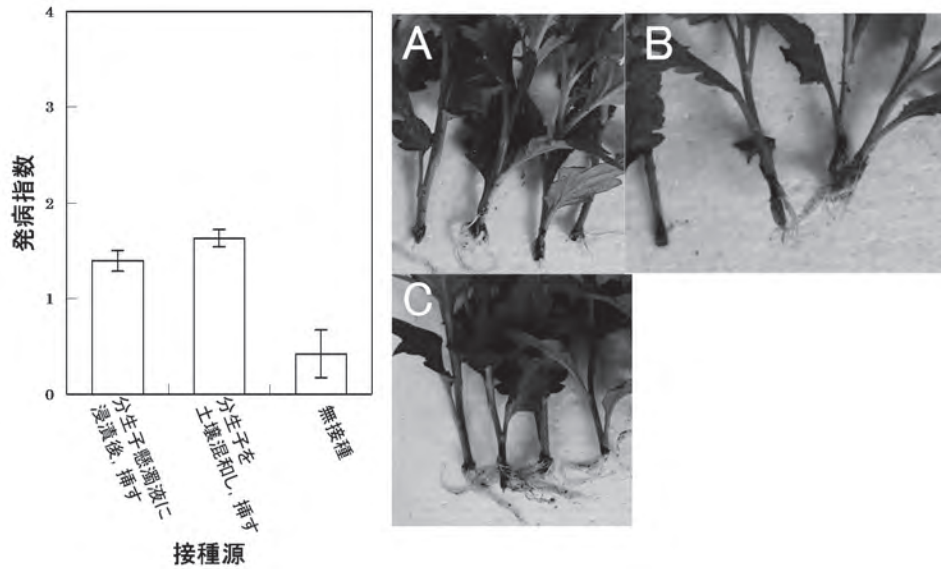


図3. *Plectosphaerella cucumerina* の接種方法の違いによるキク‘神馬’に対する病原性  
 A : 分生子懸濁液に浸漬後に挿す, B : 分生子を土壌混和した後に挿す, C : 無接種.  
 (Satou et al., 2013 の Fig.2 を改変)

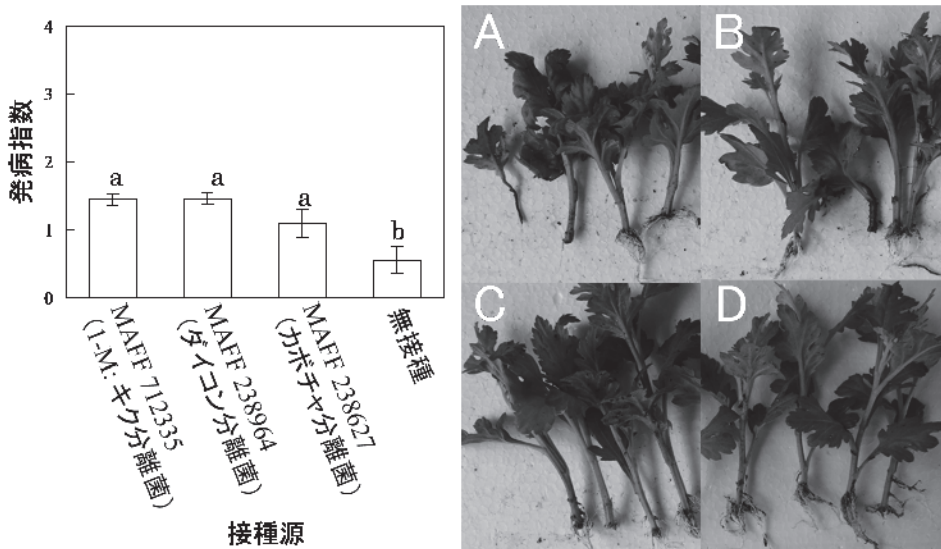


図4. *Plectosphaerella* 属菌のキク‘神馬’に対する病原性  
 A : MAFF 712335, B : MAFF 238964, C : MAFF 238627, D : 無接種, 図中のアルファベットが異なるものはSteel-Dwass 検定において有意差あり ( $P=0.05$ ).  
 (Satou et al., 2013 の Fig.3 を改変)

#### 4) キク苗腐敗病菌のキク体内での動態

あらかじめ本菌を接種した株より発生した脇芽から *P. cucumerina* が分離されることから, *P. cucumerina* は, 導管を通じてキク体内を移動すると考えられた (図5).



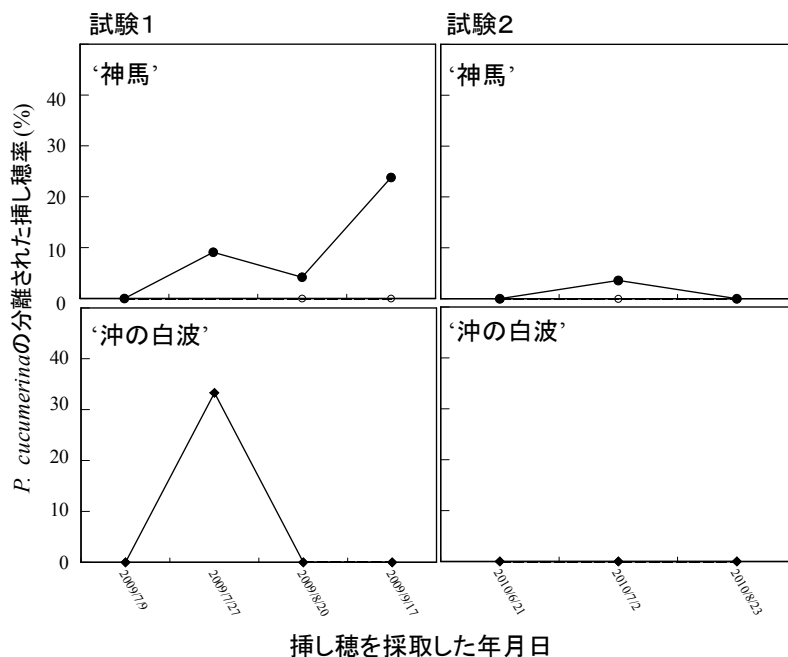


図 5. *Plectosphaerella cucumerina* を接種したキク 2 品種より発生した脇芽からの本菌の分離  
 左：2009 年，右：2010 年，●： *P. cucumerina* 接種区（神馬），○：対照無接種区（神馬），◆： *P. cucumerina* 接種区（沖の白波）◇：対照無接種区（沖の白波）.  
 (Satou et al., 2013 の Fig.4 を改変)

### 5) キク苗腐敗病菌の薬剤防除の可能性

キク挿し穂を用いた本病の防除効果試験においては，キャプタン，TPN，チオファネートメチルの効果が高かった（図 6）．50%効果濃度（EC<sub>50</sub>）はキャプタンおよび TPN の防除効果において，適用可能と考えられる薬剤の濃度が示された（表 2）．

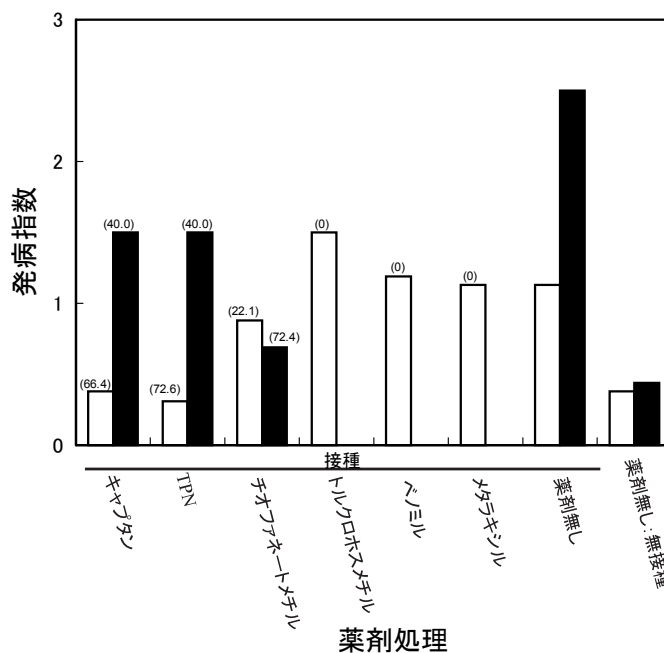


図 6. 各薬剤のキク苗腐敗病に対する防除効果  
 □ 試験 1, ■ 試験 2. ( ) 内の数値は各試験における，薬剤無処理に対する防除価.  
 (Satou et al., 2013 の Fig.5 を改変)

表 2. キク分離 *Plectosphaerella cucumerina* 各菌株の殺菌剤成分に対する 50%効果濃度 (EC<sub>50</sub>)

MAFF 番号	菌糸生育抑制の50%効果濃度 (EC <sub>50</sub> , ppm)						
	キャプタン	TPN	チオファネート メチル	メタラキシル	トルクロホス メチル	ベノミル	マンコゼブ
712335	118.4 <sup>a</sup>	505.6	- <sup>b</sup>	-	-	>1000	>1000
712336	52.6	5.2	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
712337	26.5	8.8	-	>1000	>1000	>1000	>1000
712338	45.3	34.1	-	-	>1000	>1000	>1000

<sup>a</sup> JMP 10 (<http://www.jmp.com/japan/>) により計算.

<sup>b</sup> 計算不能.

(Satou et al., 2013のTable 2を改変)

#### 4. 考察

感染穂が海外から日本に入ってきたのか, 日本国内で感染発病したのかは明らかではないが, *P. cucumerina* によって発病することが明らかとなり, 本病をキク苗腐敗病と命名した (Satou et al., 2010). 本病は, ‘神馬 2 号’で発生し, 品種比較では‘沖の白波’よりも‘神馬’, ‘神馬 2 号’での発生率が高かった. 日本では‘神馬’‘神馬 2 号’の栽培が多いため, 本病に対する注意が必要である.

予め病原菌を混ぜた土に挿し穂した場合と, 挿し穂を菌体懸濁液に浸漬した後に挿した場合のいずれでも発病したことから, 挿し穂による伝染, 土壌での伝染いずれも可能性があると考えられた. また, 土壌伝染の可能性を示す結果として, *Plectosphaerella* 属菌と同定されているダイコン円形褐斑病菌 (MAFF 238964) (佐藤, 2008), カボチャ白斑病菌 (MAFF 238627) (Sato et al., 2005) ともキク苗腐敗病菌と同様にキクに対して病原性を示すことが明らかとなった. また, あらかじめ *P. cucumerina* を接種した植物体から得られた挿し穂より本菌が分離されたことから, 挿し穂による伝染が示唆された. 海外からの侵入, 在来菌のいずれもキク苗腐敗病の原因となることが考えられることから, 十分な注意が必要である (Satou et al., 2013).

本報告の結論をまとめると次の通りとなる. (1) *P. cucumerina* はキクの重要品種に感染, 発病させる (2) 挿し穂, 土壌いずれでも伝染する (3) 他植物から分離した *Plectosphaerella* 属菌はキクを発病させる可能性がある (4) *P. cucumerina* はキク体内を移行する (5) キャプタン, TPN, チオファネートメチルは本病の抑制に効果がある.

本病の発生を抑制するためには, 変色等罹病の疑われる挿し穂は使用しない, 発病の疑われる親株から挿し穂は採取しない等の他, 圃場衛生をはじめ, 土壌消毒にも気を配る必要がある.

#### 5. 謝辞

本研究は, 元農研機構花き研究所の築尾嘉章氏, 農研機構野菜花き研究部門の松下陽介氏および住友克彦氏との共同研究として実施した. ここに記して深謝の意を表す.

## 6. 参考文献

- Brantner, J. R. and Windels, C. E. (1998). Variability in sensitivity to metalaxyl *in vitro*, pathogenicity, and control of *Pythium* spp. on sugar beet. *Plant Dis.* 82: 896–899.
- Carlucci, A., Raimondo, M. L., Santos, J. and Phillips, A. J. (2012). *Plectosphaerella* species associated with root and collar rots of horticultural crops in southern Italy. *Persoonia* 28: 34–48.
- Gams, W. (1971). *Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes)*. Gustav Fisher Verlag. Stuttgart.
- 廣岡裕吏・竹内 純・柴田 葵・堀江博道・佐藤豊三 (2016). 我が国における植物寄生性 *Plectosphaerella* 様菌類の分子系統解析. *日植病報* 82: 26. (講要)
- 本田孝志・藤田政良・上島良純 (1996). スプレーギクにおける直挿し栽培と砂上げ苗栽培の生育, 開花. *園学雑* 65 別 1: 448–449. (講要)
- Horst, R. K. and Nelson, P. E. (1997). *Compendium of chrysanthemum disease*. 62p., APS Press. St. Paul MN, USA.
- Kageyama, K., Komatsu, T. and Suga, H. (2003). Refined PCR protocol for detection of plant pathogens in soil. *J. Gen. Plant Pathol.* 69: 153–160.
- 木曾 皓 (1994). 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル (6) 野菜類灰色かび病菌. *植物防疫* 48: 42–46.
- Matheron, M. E. and Porchas, M. (2000). Impact of azoxystrobin, dimethomorph, fluazinam, fosetyl-Al, and metalaxyl on growth, sporulation, and zoospore cyst germination of three *Phytophthora* spp. *Plant Dis.* 84: 454–458.
- Palm, M. E., Gams, W. and Nirenberg, H. I. (1995). *Plectosporium*, a new genus for *Fusarium tabacinum*, the anamorph of *Plectosphaerella cucumerina*. *Mycologia* 87: 397–406.
- 佐々木厚・山田有子・小野寺英一・佐藤泰征 (1996). キクの直挿し栽培法. *東北農業研究* 49: 229–230.
- Sato, T., Inaba, T., Mori, M., Watanabe, K., Tomioka, K. and Hamaya, E. (2005). *Plectosporium* blight of pumpkin and ranunculus caused by *Plectosporium tabacinum*. *J. Gen. Plant Pathol.* 71: 127–132.
- 佐藤豊三 (2008). 近年国内で各種病害を起こすことが明らかとなった不完全糸状菌 *Plectosporium tabacinum*. *植物防疫* 62: 490–495.
- Satou, M., Chikuo, Y., Matsushita, Y. and Sumitomo, K. (2010). Cutting rot of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) caused by *Plectosporium tabacinum*. *J. Gen. Plant Pathol.* 76: 225–228.
- Satou, M., Sumitomo, K. and Chikuo, Y. (2013). Cultivar resistance, infection sources, and effective fungicides identified to control Chrysanthemum cutting rot caused by *Plectosporium tabacinum*. *J. Gen. Plant Pathol.* 79: 168–174.

- Seifert, K. A. (1996). *Plectosporium tabacinum*. Fungi Can No. 333. Can. J. Plant Pathol. 18: 309–311.
- Usami, T., Morii, S., Matsubara, C. and Amemiya, Y. (2012). Plectosphaerella rot of lettuce, coriander, and chervil caused by *Plectosphaerella pauciseptata*. J. Gen. Plant Pathol. 78: 368–371.
- Usami, T., Matsubara, C., Kashiwazaki, Y., Shito, T., Kanegae, Y. and Ebihara, Y. (2015). Leaf and spathe spot of calla lily caused by an undescribed species of *Plectosphaerella*. J. Gen. Plant Pathol. 81: 291–296.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Shinsky, J.J. and White, T.J. (eds) PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, pp. 315–322.

# 花き病害病原糸状菌類の光質に対する応答反応

佐藤 衛 <sup>a)</sup>

農研機構 花き研究所

[〒305-8519 茨城県つくば市藤本 2-1]

## Reactions of causal fungus on flowers and ornamental plants against wavelength, light intensity and irradiation time

Mamoru SATOU <sup>a)</sup>

NARO Institute of Floricultural Sciences

### 1. 目的

これまで、植物病原糸状菌の光に対する様々な反応について研究が行われている（本田, 1979, 1999 ; 倉田, 1986）. 紫外線 B 波（UV-B）は直接的な孢子発芽や発芽管の伸長を阻害するとした報告（Willoquet et al., 1996; Paul, 2000; Austin and Wilcox, 2012）や、Suthaparan et al. (2012) は、暗期の途中で UV-B を照射することによってバラうどんこ病が抑制されることを報告している. この報告では、UV-B 照射がうどんこ病菌に直接作用し、うどんこ病の発生を抑制するとしている. また、太陽光から UV-B を除去することによってうどんこ病の発生が増加することも示されている（Keller et al., 2003; Austin and Wilcox, 2012）. また、分生子発芽と菌糸成長に及ぼす直接的な影響としては、既にブドウうどんこ病でも報告（Willoquet et al., 1996; Austin and Wilcox, 2012）されている.

本報告では、農業生物資源ジーンバンクの所蔵菌株を用いて、品目・品種が多様な花きに発生する病原糸状菌類について、過去の研究事例を参考に、様々な波長に対して、菌糸伸長を主とした光質応答反応を明らかにする.

なお、本報告の一部は既に発表している（Kobayashi et al., 2013; 佐藤ら, 2013; 佐藤・小林, 2015）.

### 2. 材料および方法

#### 1) 菌株および照射器具

花き類の病原糸状菌はそれぞれ各表に示す農業生物資源ジーンバンクに登録されている菌株を使用した.

---

a) (現所属) 農研機構 野菜花き研究部門 Institute of Vegetable and Floriculture Science, NARO  
[〒305-0852 茨城県つくば市藤本 2-1]

UV-Bにはタフナレイ (YGRKX21799:パナソニックエコソリューションズ社, 大阪) を使用し, 各設定照射条件となるよう, 紫外線放射照度計 (表示部 X1, 受光部 UV-3702-4, Gigahertz-Optik 社, ドイツ) で計測しながら調光器, 距離または金属網等で調節した. UV-A (315~380 nm) には FL20S・BL-B (同上) を使用し, 同じく紫外線放射照度計で計測し, 調整した. 青色光 (400~500 nm) には FL20S・B およびフィルターNK92050D (同上), 緑色光 (500~550 nm) には FL20S・G およびフィルターNK92050G (同上), 黄色光 (550~600 nm) には FL20S・Y-F (同上), 赤色光 (600~700 nm) には FL20S・R およびフィルターNK92050R (同上), 遠赤色光 (700~800 nm) には特注品 (同上), 白色光には FL20SS EX-N/18 (同上) を使用し, 各設定照射条件となるよう, Light Meter (表示部 X1, 受光部 LI190SA, LI-COR 社, アメリカ) で計測しながら調光器および距離または金属網等で調節した.

## 2) 光質が花き類の病原糸状菌の菌糸生育等へ及ぼす影響

### (1) 光質が植物病原糸状菌の菌糸生育に及ぼす影響

UV-B, UV-A, 青色光, 緑色光, 黄色光, 赤色光, 遠赤色光の各波長の光源を設置したインキュベーター内で, 菌糸生育に供試するプラスチックシャーレ内においてそれぞれのエネルギー量が  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (UV においては約  $720 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) となるよう光量を調節した. インキュベーター内の温度は, 菌糸生育に供試するプラスチックシャーレ内が  $25^{\circ}\text{C}$  となるよう調整した.

ジャガイモ煎汁ブドウ糖寒天 (PDA) 培地で各菌株を前培養し, 菌叢をコルクボーラーで打ち抜き, 菌糸生育調査用の PDA 培地に置床した. 置床後は, 直ちに各インキュベーター内に移し, 24 時間連続照射で 4 日間培養した. 対照区として, 同光量の白色光下  $25^{\circ}\text{C}$  および暗黒下  $25^{\circ}\text{C}$  において培養した. 培養終了後は, 菌叢の直径を計測した. 計測値を基に次の通り計算し, 1 日当たり菌糸伸長量とした.

$$\text{1 日当たり菌糸伸長量} = \frac{(\text{菌叢直径} - \text{コルクボーラーで打ち抜いて置床した培養片の直径})}{(2 \times \text{培養日数})}$$

1 菌株当たり各光照射条件下で 3 反復行い, 平均値を算出した. 菌株毎に, 暗黒下での 1 日当たり菌糸伸長量を 100 として, 各光条件下での 1 日当たり菌糸伸長に換算した.

### (2) UV-B が植物病原糸状菌へ及ぼす影響

#### i) UV-B 照射強度が菌糸生育菌糸伸長及び孢子形成に及ぼす影響

PDA 培地で前培養した灰色かび病菌 4 菌株を試験に供試した. 菌叢を菌糸生育菌糸伸長調査用の PDA 培地に置床した. 置床後は, UV-B 2.9, 5.8,  $11.5 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  で照射し, 対照区は暗黒下  $25^{\circ}\text{C}$  とした. 培養 3 日後, 前述同様, 菌叢直径を調査し, さらに 11 日後にシャーレ当たりの分生子数を顕微鏡下で計数した.

#### ii) UV-B 照射強度がバラうどんこ病菌に及ぼす影響

バラ品種‘サムライ 08’上で形成されたうどんこ病菌の分生子を 1.5%の素寒天培地に載せたタマ

ネギ表皮に、筆で払うことによって落下させた。この培地を 24°C 下に置き、UV-B をそれぞれ 0, 5, 10, 15, 20  $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  で照射した。24 時間後、顕微鏡下で発芽率を調査した。発芽率は UV 無照射の発芽率を 1 として補正した。

### iii) 自然光下における UV-B 照射がトルコギキョウ炭疽病菌に及ぼす影響

トルコギキョウ炭疽病菌 (*Colletotrichum fioriniae*: MAFF 238652) の培養菌叢片を PDA 培地上に置床し、紫外線透過量に影響を及ぼさない透明の袋 (No.9 規格袋, 株式会社ジャパックス, 東京) で覆った。その後、自然光条件のガラス温室内で UV-B (18 または 36  $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 8:30-14:30 の 6 時間) を照射し、3 日後、菌糸伸長を計測した。各区において 5 反復行った。対照は UV-B 無照射及びアルミ箔で覆い暗黒下とした。

## 3. 結果

### 1) 花き類の病原糸状菌の菌糸伸長等への光質の影響

#### (1) 光質が植物病原糸状菌の菌糸生育に及ぼす影響

*Botrytis cinerea* 20 菌株, その他地上部病害病原糸状菌 23 菌株及び土壌病害病原糸状菌 17 菌株の光質応答反応を調査した結果, UV-B 照射下では菌糸伸長は顕著に抑制された。一部の菌株では UV-A 照射下においても顕著な菌糸伸長抑制が認められた。青色光でも菌糸伸長抑制される菌株が認められた。緑色, 黄色, 赤色, 遠赤色では生育抑制される菌株はいくつかあったものの抑制効果は低いと考えられた (表 1~3)。

表 1. 各波長域下で培養した *Botrytis cinerea* の菌糸伸長 <sup>a)</sup>

MAFF No. <sup>b)</sup>	分離源 <sup>b)</sup>	波長域								
		暗黒	白色	UV-B	UV-A	青色	緑色	黄色	赤色	遠赤色
712085	ホウセンカ	100	92	0	96	107	109	103	92	99
712113	マリーゴールド	100	117	0	95	114	114	111	102	100
712114	スパシフィラム	100	90	0	99	107	104	93	102	97
712186	ムギワラギク	100	110	0	113	128	96	94	117	114
712187	ハナウリクサ	100	78	0	73	76	90	84	88	90
712188	トルコギキョウ	100	90	0	75	79	91	79	83	69
712189	キンギョソウ	100	89	0	65	93	91	92	89	92
712190	ニチニチソウ	100	84	0	43	79	93	84	88	89
712191	バラ	100	97	0	59	79	89	52	79	101
712192	カーネーション	100	99	0	69	92	90	85	94	94
712193	スターチス属植物	100	104	0	86	110	110	110	101	111
712199	ニオイミゾホオズキ	100	107	0	87	101	96	102	100	98
712200	キンギョソウ	100	144	0	86	141	121	118	124	109
712201	クササンダンカ	100	52	0	88	67	78	80	73	97
712202	デージー	100	91	0	59	62	98	94	72	50
712203	リンドウ属	100	97	0	86	102	96	94	96	94
712219	オステオスペルマム	100	77	0	72	80	77	81	90	98
712221	ノース・ポール	100	97	0	81	96	107	102	87	93
712222	キバナコスモス	100	109	0	133	129	173	87	109	74
712295	ユリ属植物	100	75	0	130	70	97	101	69	78

a) 各菌株の暗黒下における菌糸伸長を 100 として, 各波長域下での菌糸伸長を補正。

b) 農業生物資源ジーンバンク事業における菌株番号および菌株の分離源。

表 2. 各波長域下で培養したその他地上部病害病原糸状菌の菌糸伸長<sup>a)</sup>

MAFF No. <sup>b)</sup>	分離源 <sup>b)</sup>	学名	波長域								
			暗黒	白色	UV-B	UV-A	青色	緑色	黄色	赤色	遠赤色
712084	デンドロビウム類	<i>Selenophoma dendrobbii</i>	100	117	63	117	105	90	95	71	93
712086	ツタ	<i>Phyllosticta ampellicida</i>	100	107	27	80	107	93	107	96	110
712087	タチシャリンバイ	<i>Cercospora violamaculans</i>	100	91	0	84	83	104	63	61	67
712088	ツワブキ	<i>Phyllosticta petasitidis</i>	100	100	0	75	98	93	95	99	99
712089	ジニア	<i>Alternaria zinniae</i>	100	101	0	103	98	89	94	107	101
712115	セントポーリア	<i>Corynespora cassiicola</i>	100	80	7	141	106	110	100	108	106
712210	ハマナス	<i>Colletotrichum fioriniae</i>	100	107	0	92	106	98	101	105	102
712211	ハマナス	<i>Colletotrichum fioriniae</i>	100	101	0	97	99	101	108	100	100
712212	ハマナス	<i>Alternaria alternata</i>	100	117	16	105	94	92	98	105	98
712213	ハマナス	<i>Alternaria alternata</i>	100	123	26	132	89	107	100	120	119
712218	シャクナゲ	<i>Corynespora</i> sp.	100	84	0	102	68	90	70	115	105
712285	キク	<i>Stemphylium lycopersici</i>	100	156	37	大 <sup>c)</sup>	168	142	120	136	134
712286	キク	<i>Stemphylium lycopersici</i>	100	104	59	166	153	112	129	153	94
712289	リンドウ	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	100	101	0	106	104	96	108	101	102
712291	ボケ	<i>Diprocarpon mali</i>	100	109	38	104	91	94	107	97	102
712292	ボケ	<i>Diprocarpon mali</i>	100	93	40	89	96	97	100	96	99
712293	アメリカナデシコ	<i>Alternaria alternata</i>	100	104	14	99	105	105	114	118	111
712296	アセビ	<i>Phyllosticta</i> sp.	100	106	0	53	110	107	115	114	111
712297	カナメモチ	<i>Entomosporium mespili</i>	100	75	7	50	71	96	80	104	93
712311	ストック	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	100	104	5	93	96	103	106	107	105
712312	ハダマノキ	<i>Colletotrichum fioriniae</i>	100	110	0	74	116	106	113	117	105
712313	クリスマスローズ	<i>Colletotrichum lineola</i>	100	111	0	105	103	102	111	109	107
712314	クリスマスローズ	<i>Colletotrichum lineola</i>	100	105	0	98	105	102	105	104	104

a) 各菌株の暗黒下における菌糸伸長を100として、各波長域下での菌糸伸長を補正.

b) 農業生物資源ジーンバンク事業における菌株番号および菌株の分離源.

c) 菌糸伸長が速く、測定不能.

表 3. 各波長域下で培養した土壌病害病原糸状菌の菌糸伸長<sup>a)</sup>

MAFF No. <sup>b)</sup>	分離源 <sup>b)</sup>	学名	波長域								
			暗黒	白色	UV-B	UV-A	青色	緑色	黄色	赤色	遠赤色
712100	シクラメン	<i>Fusarium</i> sp.	100	95	0	82	88	91	95	101	95
712101	シクラメン	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	98	0	87	93	93	105	103	101
712195	ニチニチソウ	<i>Sclerotium</i> sp.	100	134	0	54	103	103	147	104	91
712198	マツムシソウ	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	100	124	0	66	109	105	101	100	90
712220	オステオスペルマム	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	100	80	0	27	113	137	107	105	108
712235	オオヒエンソウ属	<i>Verticillium tricorpus</i>	100	98	0	77	95	99	104	103	99
712240	オオヒエンソウ属	<i>Verticillium tricorpus</i>	100	111	0	81	100	103	97	106	106
712242	カーネーション	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	100	93	0	68	105	108	93	93	98
712246	カーネーション	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	100	99	0	80	93	92	100	101	97
712247	カーネーション	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	100	101	0	91	93	95	101	102	104
712249	カーネーション	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	100	99	0	84	95	101	108	106	104
712298	トルコギキョウ	<i>Penicillium pinophilum</i>	100	104	0	77	92	89	110	100	106
712300	トルコギキョウ	<i>Penicillium pinophilum</i>	100	87	0	41	100	92	97	103	97
712304	キク	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	96	0	85	95	92	104	102	102
712315	エラティオール・ベゴニア	<i>Fusarium foetens</i>	100	101	0	75	96	98	106	105	104
712316	エラティオール・ベゴニア	<i>Fusarium foetens</i>	100	99	0	86	94	97	106	106	102
712322	ニューギニア・インパチエンス	<i>Rhizoctonia solani</i> AG2-2 III B	100	96	0	95	94	93	102	98	101

a) 各菌株の暗黒下における菌糸伸長を100として、各波長域下での菌糸伸長を補正.

b) 農業生物資源ジーンバンク事業における菌株番号および菌株の分離源.



## (2) UV-B が植物病原糸状菌へ及ぼす影響

### i) UV-B 照射強度が菌糸伸長及び孢子形成に及ぼす影響

キンギョソウ灰色かび病菌は暗黒下においても分生子を形成し、UV-B 照射の分生子形成への影響は認められなかったが、他の菌株では  $2.9 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  の UV-B 照射で分生子形成が促進された。また、菌糸伸長は、 $5.8 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  の UV-B 照射で約半分に抑制された (表 4)。

表 4. UV-B の照射強度を変えて培養した灰色かび病菌の菌糸伸長及び分生子形成

MAFF No. <sup>a)</sup>	分離源 <sup>a)</sup>	UV-B の照射強度 ( $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ )									
		暗黒		2.9		5.8		11.5		720	
		菌糸伸長	分生子数 <sup>b)</sup>	菌糸伸長	分生子数	菌糸伸長	分生子数	菌糸伸長	分生子数	菌糸伸長	分生子数
712113	マリーゴールド	100	—	36	3.2	25	2.0	0	2.7	0	2.8
712189	キンギョソウ	100	3.1	59	2.9	46	2.5	15	1.6	0	2.6
712193	スターチス属植物	100	0.9	79	3.3	66	2.9	18	2.6	0	3.1
712203	リンドウ属	100	—	58	0.9	57	—	36	—	0	2.7

a) 農業生物資源ジーンバンク事業における菌株番号および菌株の分離源。

b) 常用対数表示 [数値 =  $\log_{10}$ (平均分生子数)] , — は分生子形成無し。

### ii) UV-B 照射強度がバラうどんこ病菌に及ぼす影響

バラうどんこ病菌の分生子の発芽は、UV-B 照射量が高くなるにつれて低くなった。バラに傷害を引き起こさない程度の UV-B 照射区 ( $5, 10 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) では非照射区と比較して、うどんこ病菌の孢子発芽が若干抑制された (図 1)。

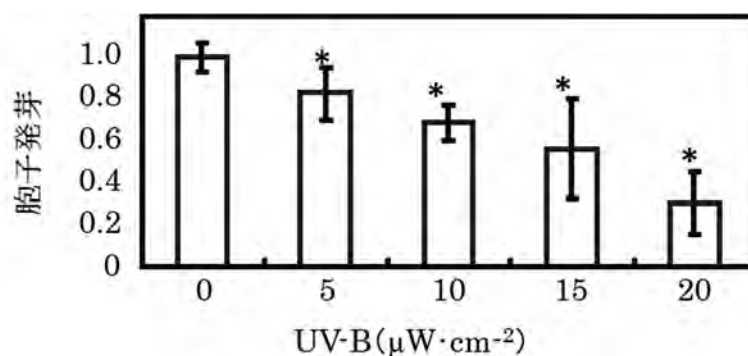


図 1. UV-B 照射強度におけるバラうどんこ病菌の発芽

発芽率は UV-B 無照射の発芽率 (対照 UV-B : 0) を 1 として補正。

\*は Williams 法により 5% で対照区との有意差あり。

(Kobayashi et al., 2013 の Fig.3 を改変)

### iii) 自然光下における UV 照射がトルコギキョウ炭疽病菌に及ぼす影響

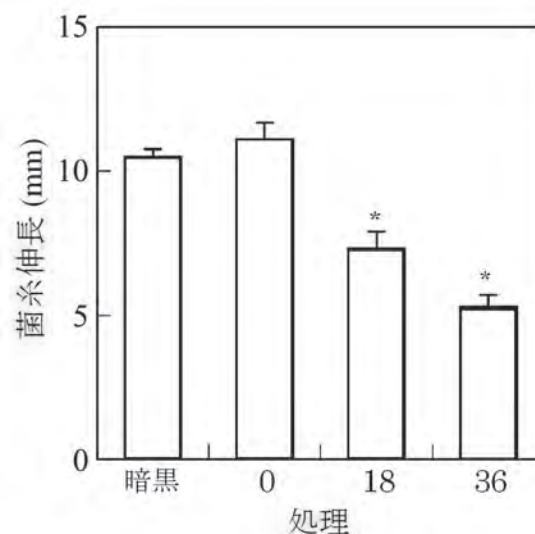
UV-B 照射区でのトルコギキョウ炭疽病菌の菌糸伸長は、暗黒下及び自然光下よりも有意に抑制された (図 2)。したがって、UV-B はトルコギキョウ炭疽病菌の菌糸伸長を直接抑制すると考えられた。

図 2. UV-B 照射によるトルコギキョウ炭疽病菌の菌糸伸長

0 : 自然光条件下, 18 : 自然光条件下で UV-B  $18 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  を 8:30–14:30 の 6 時間照射, 36 : 自然光条件下で UV-B  $36 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  を 8:30–14:30 の 6 時間照射. 平均 $\pm$ 誤差.

\*は Wilcoxon rank sum test により 5% で有意差あり.

(佐藤ら, 2013 の Fig.4 を改変)



#### 4. 考察

照射強度および照射時間にも関係するが, UV-B 照射により灰色かび病菌の菌糸伸長は抑制され, 分生子形成は促進されることが明らかとなった. 照射強度  $5.8 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  の照射で菌糸伸長は半分以下に抑制された. また,  $2.9 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  11 日間の照射で分生子形成数は促進された. 灰色かび病菌においては, 照射強度や時間によって, 菌糸伸長や分生子形成への影響が異なるものの, 一定の傾向はあるものと考えられる.

バラうどんこ病菌の分生子発芽においては, UV-B 照射強度に比例して発芽率が低下したことから, UV-B 照射はバラうどんこ病菌の生育に抑制的に働くと考えられた. しかし, 実用化段階で使用されている UV-B の照射強度 ( $5\sim 15 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) のみでは, バラうどんこ病に対して防除価 80 以上の効果を上げるとは考えにくいことから, 従来から考えられている抵抗性誘導との合わせ技により, 防除効果を示していると考えられる.

自然光下におけるトルコギキョウ炭疽病菌の菌糸伸長は UV-B 照射により有意に抑制されたことから, UV-B 照射はトルコギキョウ炭疽病菌の生育に抑制的に働くと考えられた. こちらについても, UV-B 照射の直接的な菌糸伸長抑制のみで防除価を高くすることは考えにくいため, 抵抗性誘導との合わせ技により, 防除効果を示すのではないかと考えられる.

#### 5. 謝辞

本研究は, 現在岩手生物工学研究センターの小林光智衣氏との共同研究として実施した. ここに記して深謝の意を表す.

#### 6. 参考文献

Austin, C. N. and Wilcox, W. F. (2012). Effects of sunlight exposure on grapevine powdery mildew development. *Phytopathology* 102: 857–866.

本田雄一 (1979). 糸状菌の孢子形成と光条件. *植物防疫* 33: 430–438.

- 本田雄一 (1999). 光環境と糸状菌および糸状菌病. 島根病虫研報 24: 5–28.
- Keller, M. et al. (2003). Nitrogen and ultraviolet radiation modify grapevines' susceptibility to powdery mildew. *Vitis* 42: 87–94.
- Kobayashi, M., Kanto, T., Fujikawa, T., Yamada, M., Ishiwata, M., Satou, M. and Hisamatsu, T. (2013). Supplemental UV radiation controls rose powdery mildew disease under the greenhouse conditions. *Environ. Control Biol.* 51: 157–163.
- 倉田宗良 (1986). 灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) の分生胞子の形成誘起及び形成阻害におよぼす光質の影響. 高知農林研報 18: 1–7.
- Paul, N. D. (2000). Stratospheric ozone depletion, UV-B radiation and crop disease. *Environ. Pollut.* 108: 343–355.
- 佐藤 衛・小林光智衣・神頭武嗣・菅原 敬・山田 真・石渡正紀 (2013). 紫外線 B 波 (UV-B) 照射によるトルコギキョウ炭疽病の発病軽減. 関東病虫研報 60: 78–81.
- 佐藤 衛・小林光智衣 (2015). 第 1 編 花き類及び糸状菌類の光応答メカニズムの解明. 第 2 章 花き病害病原糸状菌ならびに花き類の病害虫抵抗性誘導における光質応答メカニズムの解明. 1 花き病害病原糸状菌類の光質応答反応. 農林水産技術会議事務局編. 花きの光応答メカニズムの解明及び高度利用技術の開発 (プロジェクト研究成果シリーズ 533). pp. 27–32.
- Suthaparan, A. et al. (2012). Suppression of powdery mildew (*Podosphaera pannosa*) in greenhouse roses by brief exposure to supplemental UV-B radiation. *Plant Dis.* 96: 1653–1660.
- Willcoquet, L. et al. (1996). Effects of radiation, especially ultraviolet B, on conidial germination and mycelial growth of grape powdery mildew. *Eur. J. Plant Pathol.* 102: 441–449.

## チャ輪斑病菌の収集と QoI 剤感受性の評価

山田 憲吾<sup>a)</sup>

農研機構 野菜茶業研究所

[〒428-8501 静岡県島田市金谷猪土居 2769]

### Collection of *Pestalotiopsis* causing tea gray blight and their sensitivity to QoI fungicides

Kengo YAMADA<sup>a)</sup>

NARO Institute of Vegetable and Tea Science

#### 1. 目的

輪斑病は我が国におけるチャ (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) の重要病害の一つである (西島, 2008). その病原菌は *Pestalotiopsis theae* (Sawada) Steyaert と *P. longiseta* (Speg.) K. Dai & Tak. Kobay. の 2 種である. 主にチャ葉の機械収穫によって葉に形成された傷口から発病し, 同心円状の輪紋を有する円形~V 字型の大型壊死病斑を生じる. 茎では壊死が傷口から下方に進展し, 葉の着生部に到達すると腋芽を枯死させる. また, 新梢の基部で自然に生じた傷口から発病すると, 上部への水分供給が絶たれて新梢全体が枯死する新梢枯死症状を呈する. 輪斑病の防除には, 治療効果を有し卓効を示すアゾキシストロビン水和剤が基幹薬剤として広く使用されている. しかし, アゾキシストロビンを含む QoI 剤は耐性菌の発生リスクが高いことが明らかとなっており, チャ輪斑病菌でも 2008 年に鹿児島県で QoI 剤耐性菌の出現と, それによる栽培現場における QoI 剤の効力低下が確認された. そこで, 他の地域における QoI 剤耐性チャ輪斑病菌の発生状況を明らかにするため, 国内各地で輪斑病菌を採集して QoI 剤感受性を調査した. なお, 本成果の一部はすでに原著論文などで発表している (園田・山田, 2012 ; Yamada and Sonoda, 2012).

#### 2. 材料および方法

##### 1) 菌株の採集, 分離および QoI 剤感受性予備検定

2009~2012 年に静岡県, 埼玉県, 香川県, 高知県, 滋賀県および三重県の茶園において輪斑病罹病葉を採集した (表 1). アゾキシストロビン 100 mg/L および没食子酸 *n*-プロピル 2 mM を添加した PDA 培地 (栄研化学) を用いて, 菌の分離および QoI 剤感受性の予備検定を行った. すべ

---

a) (現所属) 農研機構 果樹茶業研究部門 Institute of Fruit Tree and Tea Science, NARO  
[〒428-8501 静岡県島田市金谷猪土居 2769]

ての試験において、アゾキシストロピンは市販の水和剤（アミスター20フロアブル、シンジェンタジャパン）を用いた。罹病葉を25℃の湿室で2～4日間静置して病斑上に形成された分生子を培地に接種し、25℃で4日間培養後に菌叢直径が10 mm以上となったものを高度耐性、4日後の生育がないかごくわずかで7日後に明確な生育が認められたものを中度耐性、7日後まで生育が認められなかったものを感受性と判定した。予備検定終了後、ブラックライト（BLB）蛍光ランプ照射下で培養を継続して分生子を形成させ、単孢子分離菌株を得た。

## 2) 特性調査

### (1) 同定

オートクレーブ滅菌したチャ葉に供試菌株を接種し、25℃、BLB照射下で2～3週間培養後に形成された分生子の形態から菌種を同定した。また、マイクロウェーブ法 (Ferreira and Glass, 1996) で抽出したDNAを鋳型として、ITS4およびITS5プライマー (White et al., 1990) を用いてリボソームRNA遺伝子のinternal transcribe spacers (ITS) 領域を増幅し、ダイレクトシーケンスによって塩基配列を決定した。

### (2) 病原性

圃場の茶樹（品種「やぶきた」）から切り離したチャ成葉に十字形（約3×3mm）に付傷し、分生子を塗抹して25℃、12時間照明の湿室に静置した。接種10日後に病斑形成の有無を判定した。

### (3) QoI 剤感受性

供試菌株をPDA培地、25℃で4～5日間培養し、6 mm径の菌叢ディスクを切り取って、所定濃度のアゾキシストロピンおよび没食子酸 *n*-プロピル 2 mMを含むPDA培地に置床した。25℃、暗黒下で4日間培養後に菌叢直径を測定して、生育阻害率（1 - アゾキシストロピン添加区の菌叢伸長量 / アゾキシストロピン無添加区の菌叢伸長量 × 100）を薬剤濃度の対数に対してプロットし、50%生育阻害濃度（EC<sub>50</sub>）を算出した。一部の菌株のQoI剤感受性は、各薬剤濃度における菌叢生育の有無から決定した最小生育阻止濃度（MIC）またはアゾキシストロピン濃度100 mg/Lにおける生育阻害率で示した。

### (4) チトクローム *b* 遺伝子型

QoI剤の作用点であるチトクローム *b* の遺伝子型をシーケンス解析またはマルチプレックスPCR-RFLP法により決定した。シーケンス解析では、マイクロウェーブ法 (Ferreira and Glass, 1996) またはDNeasy Plant Mini Kit (キアゲン) で抽出したDNAを鋳型とし、RSCBF1およびRSCBR2プライマー (Ishii et al., 2001) を用いたPCRによってチトクローム *b* 遺伝子の部分配列を増幅してダイレクトシーケンス、もしくはクローニング後にシーケンス解析を行った。マルチプレックスPCR-RFLP法はYamada and Sonoda (2012)の方法によって行った。

## 3. 結果および考察

### 1) 菌種および病原性

チャ輪斑病病斑から分離した *Pestalotiopsis* 属菌 50 菌株はすべて、チャに対して強い病原性を示

表 1. 供試菌株の来歴と特性

MAFF番号	採集地	採集年	ITS領域 菌種 <sup>a)</sup> 塩基配列 <sup>b)</sup>	QoI剤		チトクローム <i>b</i>	
				耐性 <sup>c)</sup>	EC <sub>50</sub> <sup>d)</sup>	遺伝子型 <sup>e)</sup>	塩基配列 <sup>b)</sup>
752021	静岡県島田市	2009	PI AB758106	S	(0.39)	WT(-)	AB713421
752022	静岡県島田市	2009	PI AB758107	HR	(>800)	G143A(-)	AB713422
752023	静岡県牧之原市	2009	PI	S	(0.2)	WT(-)	未登録
752024	静岡県牧之原市	2009	PI 未登録	HR	(>800)	G143A(-)	未登録
752025	静岡県牧之原市	2009	PI	S	(0.2)	WT(-)	未登録
752026	静岡県牧之原市	2009	PI	HR	(>800)	G143A(-)	未登録
752027	静岡県島田市	2009	PI	S	(0.2)	WT(-)	未登録
752028	静岡県島田市	2009	PI	HR	(>800)	G143A(-)	未登録
752029	静岡県御前崎市	2009	PI	HR	(>800)	G143A(-)	
752030	静岡県御前崎市	2009	PI	S	(0.2)		
752031	静岡県御前崎市	2009	PI AB758111	MR	1.2	F129L(+)	AB713426
752032	静岡県御前崎市	2009	PI 未登録	MR	2.9	F129L(+)	未登録
752033	静岡県御前崎市	2009	PI AB758108	MR	1.3	F129L(-)	AB713423
752034	静岡県御前崎市	2010	PI AB758110	HR	(54%)	G143A(+)	AB713425
752035	静岡県御前崎市	2010	PI 未登録	MR	1.6	F129L(-)	
752036	静岡県御前崎市	2010	PI 未登録	S	0.03	WT(-)	
752037	静岡県御前崎市	2010	PI	S	0.03	WT(-)	
752038	静岡県御前崎市	2010	PI 未登録	HR	(32%)	G143A(-)	未登録
752039	静岡県御前崎市	2010	PI	MR	1.9		
752040	静岡県御前崎市	2010	PI 未登録	MR	1.3	F129L(-)	未登録
752041	静岡県御前崎市	2010	PI AB758109	S	0.03	WT(+)	AB713424
752042	静岡県牧之原市	2010	PI	S	0.02		
752043	静岡県島田市	2010	PI	S	0.01		
752044	静岡県御前崎市	2010	PI	S	0.02		
752045	静岡県御前崎市	2010	PI	MR	2.1	F129L(-)	
752046	静岡県島田市	2010	PI	HR	(41%)		
752047	静岡県島田市	2010	PI	HR	(29%)		
752048	静岡県島田市	2010	PI 未登録	HR	(16%)	G143A(+)	未登録
752049	静岡県牧之原市	2010	PI	MR	2.0	F129L(-)	
752050	静岡県牧之原市	2010	PI	MR	1.4	F129L(-)	
752051	静岡県島田市	2010	PI 未登録	S	0.06	WT(+)	未登録
752052	埼玉県入間市	2009	PI	S	0.02		
752053	埼玉県入間市	2009	Pt	S	0.01		
752054	埼玉県所沢市	2009	PI	S	0.03		
752055	埼玉県所沢市	2009	PI	S	0.03		
752056	香川県まんのう町	2009	PI	S	0.03		
752057	香川県三豊市	2009	PI	S	0.04		
752058	高知県大豊町	2009	Pt	S	0.01		
752059	滋賀県甲賀市	2011	PI	S	0.02		
752060	滋賀県甲賀市	2011	PI	HR	(24%)		
752061	静岡県牧之原市	2010	PI	HR	(30%)		
752062	香川県三豊市	2009	PI	S	0.01		
752063	香川県高松市	2009	PI	S	0.07		
752064	三重県松坂市	2012	PI	S	0.01		
752065	三重県松坂市	2012	PI	S	0.02		
752066	三重県鈴鹿市	2012	PI	S	0.02		

表 1. (つづき)

MAFF番号	採集地	採集年	菌種 <sup>a)</sup>	ITS領域 塩基配列 <sup>b)</sup>	QoI剤		チトクローム <i>b</i>	
					耐性 <sup>c)</sup>	EC <sub>50</sub> <sup>d)</sup>	遺伝子型 <sup>e)</sup>	塩基配列 <sup>b)</sup>
752067	三重県鈴鹿市	2012	PI		S	0.02		
752068	三重県四日市市	2012	PI		S	0.03		
752069	三重県四日市市	2012	PI		S	0.02		
752070	三重県四日市市	2012	PI		S	0.05		

a) PI: *P. longiseta*, Pt: *P. theae*.

b) DDBJアクセション番号, 空欄は未調査.

c) HR: 高度耐性, MR: 中度耐性, S: 感受性.

d) カッコ内の数値はMICまたはアゾキシストロビン濃度100mg/Lにおける生育阻害率.

e) カッコ内の記号 (+/-) はイントロンの有無, 空欄は未調査.

した. 菌種は 48 菌株が *P. longiseta*, 2 菌株が *P. theae* であった (表 1). 過去の調査では, 全国的には *P. longiseta* が大部分を占めたものの, *P. theae* も多くの府県で分離され, 埼玉県, 徳島県および熊本県では *P. theae* が過半数を占めた (鬼木ら, 1986). これに対し現在の種構成は著しく単純化していたが, 埼玉県および高知県でそれぞれ 1 菌株のみではあるが *P. theae* が検出されたことから, 輪斑病菌の種構成は現在も地域によって異なる可能性が示唆された. *P. longiseta* 14 菌株の ITS 領域の塩基配列を解析した結果, すべての菌株で既報の配列 (AB482206 [MAFF752008]) と 100% 一致した. このうち 6 菌株の配列を DDBJ に登録した (表 1).

## 2) QoI 剤感受性およびチトクローム *b* 遺伝子型

菌株の分離時に行った予備検定において感受性と判定された *P. longiseta* 菌株の EC<sub>50</sub> は 0.01~0.07 mg/L (平均 0.027 mg/L) であったのに対し, 中度耐性菌株は 1.2~2.9mg/L (平均 1.74mg/L) で resistance factor (RF; 耐性菌と感受性菌の EC<sub>50</sub> の比) は 64.4 であった (表 1). 高度耐性菌株は最高濃度の 100 mg/L における生育阻害率が 16~54 % で, EC<sub>50</sub> および RF は算出できなかった (表 1). チトクローム *b* 遺伝子を解析した結果, 増幅産物中にイントロンと推測される配列を含む菌株と含まない菌株があり, いずれのタイプの菌株においても中度耐性菌株はすべて F129L 変異, 高度耐性菌株はすべて G143A 変異を有していた (表 1). これらの変異を除くと, エキソンおよびイントロンの塩基配列はすべての菌株で完全に一致した. 以上の結果から, 静岡県ではすでに耐性菌が広く分布しており, チトクローム *b* 遺伝子の F129L 変異による中度耐性菌と G143A 変異による高度耐性菌の 2 種類の耐性菌が存在することが明らかとなった. また, 薬剤耐性の問題が顕在化していない滋賀県において 1 菌株のみではあるが高度耐性菌が検出されたことから, 他の未検出地域においても耐性菌が低頻度で存在する可能性が示唆された.

## 4. 謝辞

本研究は現・農研機構九州沖縄農業研究センターの園田亮一氏との共同研究として実施した. また, 埼玉県茶業研究所の小俣良介氏には菌株を提供して頂いた. ここに記して深謝の意を表する.

## 5. 参考文献

- Ferreira, A.V.B. and Glass, N.L. (1996). PCR from fungal spores after microwave treatment. *Fungal Genet. Newsl.* 43: 25–26.
- Ishii, H., Fraaije, B.A., Sugiyama, T., Noguchi, K., Nishimura, K., Takeda, T., Amano, T. and Hollomon, D.W. (2001). Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology* 91: 1166–1171.
- 西島卓也 (2008). 茶大百科 第2巻 (農山漁村文化協会編). pp. 537–538, 農山漁村文化協会, 東京.
- 鬼木正臣・成澤信吉・安藤康雄 (1986). 我が国の主要チャ産地におけるベンズイミダゾール系殺菌剤耐性輪斑病菌の発生実態. *茶研報* 64: 29–33.
- 園田亮一・山田憲吾 (2012). 2009–2011年の静岡県牧ノ原台地における QoI 剤耐性チャ輪斑病菌の分布. *日植病報* 78: 200. (講要)
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* PCR protocols: a guide to methods and applications (Innis, A., Gelfand, D.H., Shinsky, J.J. and White, T.J., eds.). pp. 315–322, Academic Press, San Diego.
- Yamada, K. and Sonoda, R. (2012). Characterization of moderate resistance to QoI fungicides in *Pestalotiopsis longiseta* and polymorphism in exon-intron structure of cytochrome *b* gene. *J. Gen. Plant Pathol.* 78: 398–403.



# *Pantoea* 属菌の雑草等からの分離とタマネギ

## およびネギに対する病原性

畔上 耕児<sup>a)</sup>

元 農研機構 野菜茶業研究所

[〒305-8666 茨城県つくば市観音台 3-1-1]

### Isolation of *Pantoea* spp. from weeds and their pathogenicity on onion and Welsh onion

Koji AZEGAMI<sup>a)</sup>

NARO Institute of Vegetable and Tea Science

#### 1. はじめに

タマネギの鱗茎等腐敗症<sup>b)</sup> (center rot, bulb decay, leaf blight, seed stalk rot) は、アメリカ合衆国、日本、大韓民国をはじめ世界各地で大きな被害を与えている (Gitaitis and Gray, 1997 ; 白川ら, 2010 ; Kim et al., 2012). 本病は 1997 年 5 月にアメリカ合衆国ジョージア州で発見されたが、その病原細菌 *Pantoea ananatis* corrig. (Serrano 1928) Mergaert et al. 1993 は、最初は 1928 年にフィリピンでパイナップル幼果褐色腐敗の病原 *Erwinia ananas* として報告され (Serrano, 1928), 我が国では 1941 年からパイナップル花樟病の病原として知られていた (日本植物病理学会, 2015). その後、イネ内穎褐変病 (吉田ら, 1982), スパシフィルム葉腐細菌病 (木嶋ら, 1985), メロン果実内腐敗病 (Bruton et al., 1986; Wells et al., 1987; 厚地ら, 2004; 木戸ら, 2008; Kido et al., 2008), アリウム類腐敗病 (多賀ら, 1999), フリージア首腐病 (阿部ら, 2000) の病原としても報告された. 海外では、これらの他にスーダングラス (Azad et al., 2000), トウモロコシ (Paccola-Meirelles et al., 2001), ユーカリ (Coutinho et al., 2002), ソルガム (Cota et al., 2010) に対する病原としても報告されている. 同菌は、近年になって大被害をもたらさうる植物病原体の一つであることが認識されるようになってきた.

*Pantoea* 属は、1989 年に腸内細菌科の中に提案され、かつての *Enterobacter agglomerans*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae* が *P. agglomerans* として括られた (Gavini et al., 1989). そ

---

a) (現所属) 退職

b) 病名は、日本植物病名目録 (2015 年版) によると「りん片腐敗病」(*B. gladioli* による病害と同じ) であるが、その備考に「当該病名は… (中略) … *B. gladioli* による病害との異同と合わせ再検討を要す」とある. 白川ら(2010)は、「りん片腐敗病等との異同を検討して提案したい」として「鱗茎腐敗症」と仮称するにとどめており、本稿では鱗茎等腐敗症と表記した.

の後、*E. ananas* (シノニムとされた *E. uredovora* を含む) と *E. stewartii* もそれぞれ *Pantoea* 属へ移され(Mergaert et al., 1993 ; Trüper and De'Clari, 1997), *Pantoea* 属菌は現在までに表 1 に挙げた 22 種 (亜種レベルで 23) が提案されている (他属へ移された種を除く). *Pantoea* 属菌は植物からだけでなく、水、土、食品、動物、さらに院内感染菌としてヒト (De Baere et al., 2004) から分離されている.

*Pantoea ananatis* は、グラム陰性、通性嫌気性で運動性があり、黄色のコロニーを形成する (Grimont and Grimont, 2005). かつて *E. ananas* は、細菌学的性質の原記載が非病原性の、あるいは腐敗部で二次的に増殖する *E. herbicola* と識別し難かったために、後者の変種 "*E. herbicola* var. *ananas*" と位置付けられたこともあった. *Pantoea* 属菌は、表現形質や遺伝形質において多様であり、それぞれの種の分類・分布・生態の詳細は不明瞭であった. 近年、分類に関して、*P. ananatis* に分類される菌株がタバコ、ネギの反応と遺伝学的性質により 3 グループに分けられることが報告された (Kido et al., 2010).

生態に関して、タマネギ鱗茎等腐敗症初発見地のジョージア州では、*P. ananatis* がタマネギ種子から分離され、そのような汚染種子を播種すると発病したことから、種子伝染すること、従って病原細菌が汚染種子によってジョージア州へ持ち込まれた可能性もあることが示された (Walcott et al., 2002). しかし、その一方で土着していた可能性もあったので野外における感染源を探るための

表 1. 既報の *Pantoea* 属菌種 <sup>a)</sup>

種 名	備考 (分離源, 分離地)
<i>P. agglomerans</i> (Beijerinck 1888) Gavini et al. 1989	植物体表面, 種子, 人体, 環境
<i>P. allii</i> Brady et al. 2011	タマネギ種子, 南アフリカ共和国, アメリカ合衆国
<i>P. ananatis</i> corrig. (Serrano 1928) Mergaert et al. 1993	植物体, 院内
<i>P. anthophila</i> Brady et al. 2009	ハウセンカ, インド
<i>P. brenneri</i> Brady et al. 2010	
<i>P. calida</i> Popp et al. 2010	
<i>P. coffeiphila</i> Gueule et al. 2015	コーヒー種子, ブルンジ共和国
<i>P. conspicua</i> Brady et al. 2010	
<i>P. cyripedii</i> (Hori 1911) Brady et al. 2010	
<i>P. deleyi</i> Brady et al. 2009	ユーカリ属葉, ウガンダ共和国
<i>P. dispersa</i> Gavini et al. 1989	植物体表面, 種子, 人体, 環境
<i>P. eucalypti</i> Brady et al. 2009	ユーカリ属, ウルグアイ共和国
<i>P. eucrina</i> Brady et al. 2010	
<i>P. gaviniae</i> Popp et al. 2010	
<i>P. intestinalis</i> Prakash et al. 2015	
<i>P. rodasii</i> Brady et al. 2012	
<i>P. rwandensis</i> Brady et al. 2012	
<i>P. septica</i> Brady et al. 2010	
<i>P. stewartii</i> (Smith 1898) Mergaert et al. 1993	
<i>P. stewartii</i> subsp. <i>indologenes</i> Mergaert et al. 1993	アワ等
<i>P. stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> (Smith 1898) Mergaert et al. 1993	トウモロコシ, corn flea beetle
<i>P. theicola</i> Kato et al. 2015	紅茶
<i>P. vagans</i> Brady et al. 2009	ユーカリ属, ウガンダ共和国
<i>P. wallisii</i> Brady et al. 2012	ユーカリ属, 南アフリカ共和国

a) Euzéby (1997)のwebサイトを参照した (参照2016年8月8日) .

調査が行われた (Gitaitis et al., 2002a). 既報の宿主は少なかったが, 調査の結果, *P. ananatis* は病徴を呈していない多くの単子葉・双子葉の雑草, 作物から分離され, 次の植物からの分離菌株はタマネギに病原性を示し, それらが感染源となる可能性が示された. Florida pusley (*Richardia scabra*, アカネ科), crabgrass (*Digitaria sanguinalis*, メヒシバ属マナグラス), tall verbena (*Verbena bonariensis*, クマツヅラ属ヤナギハナガサ), bristly starbur (*Acanthospermum hispidum*, キク科), hyssop spurge (*Chamaesyce hyssopifolia* または *Euphorbia hyssopifolia*, トウダイグサ科ニシキソウ属), yellow nutsedge (*Cyperus esculentus*, ショクヨウガヤツリ, キハマスケ), slender amaranth (*Amaranthus viridis*, ホナガイヌビユ), pink purslane (*Claytonia sibirica*, スベリヒユ科), Texas millet (*Panicum texanum*, キビ属), cowpea (*Vigna unguiculata*, ササゲ). また, 初報告の 1997 年以前に分離・保存されていた菌株にも鱗茎等腐敗症を起こすものが検出された. *P. ananatis* は, さらに *Frankliniella fusca* (ウスグロアザミウマ) から分離され, それが媒介虫となっている可能性がある (Gitaitis et al., 2002b, Gitaitis et al., 2003). 実験により, *Thrips tabaci* (ネギアザミウマ) も *P. ananatis* を吸汁獲得し, 伝搬したとの報告もある (Dutta et al., 2014). コットンボール内部の褐色腐敗の原因は *P. agglomerans* であるが, そこからは *P. ananatis* も高頻度で分離され, それが *Pseudatomoscelis seriatus* (ワタノミハムシ) によって伝搬される可能性も指摘されている (Bell et al., 2007).

わが国でも *P. ananatis* が単子葉・双子葉の作物から分離されており, 農業生物資源ジーンバンク (農研機構 遺伝資源センター, 2016) にはイネ, キュウリ, タマネギ, クワ属, クワノメイガ虫体から分離された株が保存されている. *P. ananatis* は, イネ刈り株 (長谷川ら, 2002) から分離されている. 同ジーンバンクには, サツマイモ, カモガヤ, ネズミノオ属, ギニアグラス, タチスズメノヒエ, オヒシバ, キンエノコロ, ススキから分離された *Pantoea* 属菌も保存されている. しかし, タマネギに対して病原性を有する *Pantoea* 属菌の宿主域の広がりに関する調査例は見あたらなかった. そこで, 雑草等から *Pantoea* 属菌を分離して, それらのタマネギおよびネギに対する病原性を調査した. 以下にその結果を報告する. なお, 本報告の一部は 2014 年日本植物病理学会関東部会で発表している (畔上, 2015).

## 2. 材料および方法

### 1) 分離源と分離方法

2014 年 4~7 月に, 主として茨城県つくば市と土浦市で採集した雑草・作物の花・果実など 151 試料から黄色の *Pantoea* 属菌の分離を試みた. 試料は, 倒伏細菌病の症状を呈していたトウモロコシ以外は, 病気らしい症状は呈していなかった. 各部位から約 1~2 mm 四方の切片を切り出し, あるいは 5~6 個の種子を取り出して滅菌水中で洗浄した後にメスとピンセットを用いて破碎し, 白金耳を用いて KB 平板培地および LB 平板培地上に画線塗抹した. 培養は 28°C で 1~3 日間行い, 黄色コロニーを釣菌・再画線・再釣菌して純粋にし, 斜面培養菌苔をスキムミルク分散媒に懸濁して凍結保存し, 後の実験に供した. すべての平板培地上の黄色コロニーを釣菌したわけではないが, 常

に *Pantoea* 属菌のコロニーの存否は、黄色の *Xanthomonas* 属菌と混同しないよう注意しながら記録した。

## 2) 接種方法と同定方法

分離細菌のタマネギとネギに対する病原性は、白金線を用いて培養菌苔を針接種することによって調査した。供試タマネギは市販品（品種は不明）で、茶色の薄皮をむいてそのままあるいは鱗片にばらして針接種し、ビーカーまたはシャーレに入れて蓋をして 25~28°C のインキュベータに保存した。供試ネギ（品種：小春および小夏）は、ポット（直径約 13cm）の育苗土に播種して雨よけ栽培したもので、葉に針接種した。タバコ過敏反応検査に供試した品種は、ホワイトバーレー、キサランチ、およびサムスンで、細菌懸濁液（約 10<sup>8</sup>CFU/ml）をそれらの葉肉内に注射した。いずれの調査も 3 反復以上行った。分離菌株の同定は、後藤・瀧川（1984a, b, c, d）などに掲載されている常法に準じた。

## 3. 結果

### 1) *Pantoea* 属菌の検出・分離と接種試験

*Pantoea* 属菌は、4 月には検出・分離頻度が低かったが 5 月以降高くなり（図 1）、表 2 に挙げた種々の試料から分離された。

*Pantoea* 属菌はセイヨウタンポポ果实とアメリカオニアザミ果实からは優占種として検出されることが多く（図 2）、検出・分離頻度はそれぞれ 77%（22 試料中 17 試料）、75%（8 試料中 6 試料）であった。

次の植物から分離した *Pantoea* 属菌株は、タマネギ鱗茎およびネギ葉に対して病原性を示した（図 3, 4）：スズメノテッポウ、シマスズメノヒエ、

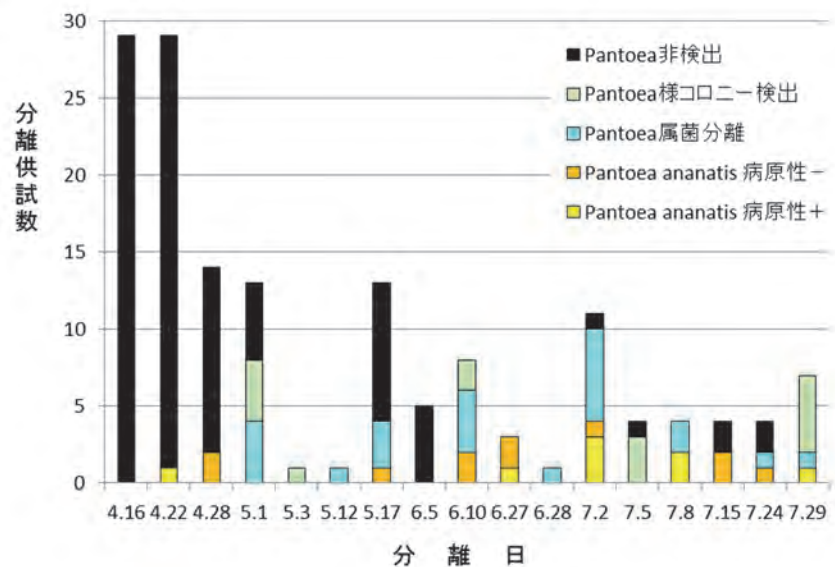


図1. 雑草等からの *Pantoea* 属菌の検出・分離結果

6月5日の試料は札幌市で採集した雑草。7月29日の試料は銚子市から送付された腐敗したトウモロコシ。それ以外の試料はつくば市または土浦市で採集した雑草または作物。「検出」とは、釣菌しなかったが平板培地上に *Pantoea* 属菌様コロニーが存在したことを表す。

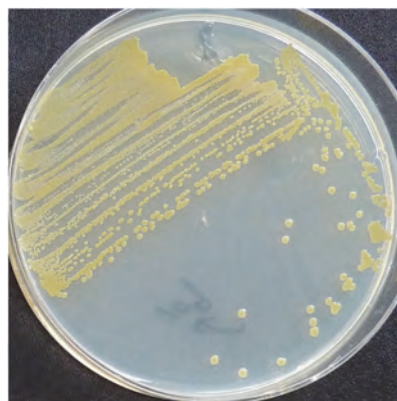


図2. アメリカオニアザミ果实から分離された *Pantoea* 属菌  
*Pantoea* 属菌が優占種として分離された。培地はLB.

表2. *Pantoea*属菌株の分離源とタマネギおよびネギに対する病原性

菌株番号 <sup>a)</sup>	分離源	分離部位	採集地	分離日	病原性
K1 (AZ201414) 【730291】	スズメノテッポウ	花穂	つくば市南中妻	4.22	+
K3	セイヨウタンポポ	果実	つくば市観音台	4.28	-
K4	セイヨウタンポポ	果実	つくば市観音台	4.28	-
K5	セイヨウタンポポ	果実	つくば市観音台	5.1	-
K6	セイヨウタンポポ	果実	つくば市観音台	5.1	-
K7	セイヨウタンポポ	果実	つくば市観音台	5.1	-
K8 (AZ201436) 【730309】	セイヨウタンポポ	種子	つくば市南中妻	5.1	-
K9, K10	セイヨウタンポポ	果実	土浦市おおつ野	5.12	-
K11	セイヨウタンポポ	果実	土浦市おおつ野	5.17	-
K12 (AZ201446) 【730292】	ノアザミ	花	土浦市おおつ野	5.17	-
K13	セイヨウタンポポ	果実	土浦市おおつ野	5.17	-
K14	ノゲシ	果実	土浦市おおつ野	5.17	-
K15	ニガナ	果実	土浦市おおつ野	6.1	-
K16	ブタナ	果実	土浦市おおつ野	6.1	-
K17	ノアザミ	花	土浦市おおつ野	6.1	-
K18	ハルジオン	果実	土浦市おおつ野	6.1	-
K19 (AZ201473) 【739293】	ライムギ	種子 (葯付き)	つくば市観音台	6.1	-
K20 (AZ201475) 【730294】	セイヨウタンポポ	種子	つくば市観音台	6.1	-
K21 (AZ201483) 【730295】	シマスズメノヒエ	花穂 (葯付き)	つくば市観音台	6.27	+
K22 (AZ201485) 【730296】	エノコログサ	花穂 (葯付き)	つくば市観音台	6.27	-
K23 (AZ201486) 【730297】	イヌビエ	花穂 (葯付き)	つくば市観音台	6.27	-
K24, K25	ニガナ	果実	つくば市観音台	6.28	-
K26	セイヨウタンポポ	果実	つくば市観音台	7.2	-
K27	ブタナ	果実	つくば市観音台	7.2	-
K28 (AZ201491) 【730298】	ノボロギク	種子	つくば市観音台	7.2	+
K29 (AZ201492) 【730299】	カラスムギ	種子	つくば市観音台	7.2	+
K30 (AZ201493) 【730300】 , K31	ノゲシ	種子	つくば市観音台	7.2	-
K32 (AZ201497) 【730301】	ハマヒエガエリ	種子	つくば市観音台	7.2	+
K33	ネジバナ	花穂	つくば市観音台	7.2	-
K34	チガヤ	果実	つくば市観音台	7.2	-
K35	ノビル	珠芽	つくば市観音台	7.2	-
K36, K37	ワルナスビ	花	つくば市観音台	7.2	-
K38, K39	アメリカオニアザミ	果実	つくば市北中妻	7.8	-
K40 (AZ2014108) 【730302】	アメリカオニアザミ	種子	つくば市南・北 中妻境界	7.8	+
K41 (AZ2014109) 【730303】	アメリカオニアザミ	種子	つくば市南中妻	7.8	+
K42	ネギ	葉先 (葉先のみ壊死)	つくば市北中妻	7.8	-
K43 (AZ2014113) 【730304】	ネギ	葉 (葉先は枯れていたが ほぼ健全)	つくば市南中妻	7.15	-
K44 (AZ2014115) 【730305】 , K45	ニラ	葉先の縁が少し白化	つくば市赤塚	7.15	-
K46	ヤブカンゾウ	葯	つくば市新牧田	7.24	-
K47 (AZ2014123) 【730306】	ニラ	花	つくば市新牧田	7.24	-
K49 (AZ2014126) 【730307】	トウモロコシ <sup>b)</sup>	果実 (腐敗し割れて湿っ ていた)	銚子市	7.29	-
K50 (AZ2014127) 【730308】	トウモロコシ <sup>b)</sup>	包葉, 水浸状淡褐変	銚子市	7.29	+

a) Kで始まるものは今回実験時の番号, ( )内は分離時とMAFF登録時の株名, 【 】内はMAFF番号. 同一行にある菌株は同一試料からの分離.

b) 倒伏細菌病の症状を呈しており, 果実 (穀粒)・包葉からは*Dickeya zeae*様のコロニー (1株を釣菌し病原性と細菌学的性質を確認した) が約90%以上の高率で分離された. 割けた果実内に溜まっていた液を直接画線塗抹した場合には, 分離されたコロニーの100%が*Pantoea*属菌様コロニーであった. 葉および花糸からも*Pantoea*属菌様コロニーが分離された.

ノボロギク、カラスムギ、ハマヒエガエリ、アメリカオニアザミ、トウモロコシ。これらから分離した菌株を接種したタマネギ鱗茎では、接種2日後に接種部位が水浸状または白色となり、腐敗の進行が始まった。ネギ葉では、接種2日後に接種部位の緑色が濃くなりまたは白色となり、腐敗の進行が始まった。タマネギ鱗茎およびネギ葉に対して病原性を示した菌株は、タバコ葉肉内注射接種により翌日には菌液浸潤部位を壊死させた。すなわち、タバコ過敏感反応も陽性であった。なお、トウモロコシ分離菌株には、壊死が菌液浸潤部位に留まらず、接種葉全体、茎、さらには上位葉にまで広がる株(K49)もあった(図5)。



図3. タマネギへの針接種による病徴



図4. ネギ葉への針接種による病徴



図5. K49株をタバコ葉肉内に注射接種した場合の壊死部位の拡大

品種はホワイトバーレー。接種3日後に撮影。

## 2) 細菌学的性質

分離した *Pantoea* 属菌株の細菌学的性質を表3に示した。セイヨウタンポポから分離した *Pantoea* 属菌には、KB斜面培地中に淡いが深い青色色素を生産する株(K8)があった(図6)。この色素は培養後1日目に現れ、2日目には見られなくなった。

## 4. 考察

分離した *Pantoea* 属菌株のうち、グラム反応-, OF試験はF, 黄色色素産生+, 運動性+, インドール産生, *myo*イノシトール利用, ラクトース利用, D-メリビオース利用, D-ラフィノース利用が陽性で, D-酒石酸利用, アドニトール利用が陰性の株(K1, K12, K19~K23, K28~K30, K32,



図6. K8株が生産する青色色素

K40~K41, K43, K44, K47, K50) を, *P. ananatis* と同定した. ただし, 瀧川雄一博士が ina (氷核) 活性遺伝子の有無を調査したところ, K20, K30 については「陰性であり, *Pantoea* sp. と属名までにとどめた方がよい」との助言を受けたので, それに従いたい. 一方, K49 はアドニール利用能が陽性であったが, 瀧川博士のその後の調査によって *P. ananatis* と同定された (瀧川博士, 私信). すなわち, *P. ananatis* はスズメノテッポウ, シマスズメノヒエ, ノボロギク, カラスムギ, ハマヒエガエリ, アメリカオニアザミ, トウモロコシ, ノアザミ, ライムギ, エノコログサ, イヌビエ, ネギ, ニラから分離された. その他の試料から分離された *Pantoea* 属菌の種レベルの同定は保留した.

次の植物から分離された *P. ananatis* 菌株はタマネギ鱗茎およびネギ葉に病原性を示したので, 本病の感染源となる可能性があると考えられる. すなわち, スズメノテッポウ, シマスズメノヒエ, ノボロギク, カラスムギ, ハマヒエガエリ, アメリカオニアザミ, トウモロコシから分離された菌株である. ただし, 今回これらから分離された菌株が実際に本病を起こしている病原菌そのものであるかどうかについては, 検証する必要がある.

ジョージア州でも, 多くのありふれた雑草・作物が感染源となる可能性が示されている (Gitaitis et al., 2002a). また, 今回同一試料から分離された *Pantoea* 属菌株の細菌学的性質は必ずしも均一ではなく (K24 と K25, K30 と K31, K36 と K37, K38 と K39, K44 と K45), 同一試料部位に多様な *Pantoea* 属菌が混在している場合があった. これらのことから, 今回病原性を有する *Pantoea* 属菌が検出・分離されなかった植物も含め, さらに多くの植物種にも感染源となる可能性があると考えられる.

ジョージア州で本病が突然に問題化した原因については, 感受性新品種の導入, より強病原性株が種子で持ち込まれた可能性, あるいはアザミウマの増加との関連性が考えられている (Gitaitis et al., 2002a, 2002b, 2003). 同州ではアザミウマ増加によって食害増加と収量低下が見られている. 本病は, 我が国ではまだ一部の地域からしか報告されていないが, 今回雑草等から分離された *P. ananatis* が病原菌そのものであるならば, 実際には広範囲に発生していると考えられる. そうでなくとも, 拡散・侵入に警戒し, 防除対策を練っておく必要がある. 腸内細菌科の細菌によるタマネギ病害には, *Pectobacterium carotovorum* による軟腐病と *Erwinia rhapontici* による腐敗病が古くから知られているが (日本植物病理学会, 2015), この他にも南アフリカ共和国, ペルー共和国, アメリカ合衆国, 宮城県では *P. agglomerans* (Hattingh and Walters, 1981 ; Gitaitis et al., 2004 ; Edens et al., 2006 ; 農研機構 遺伝資源センター, 2016), 南アフリカ共和国およびアメリカ合衆国では *P. allii* (Brady et al., 2011), さらにオーストラリアとカリフォルニア州では *Enterobacter cloacae* (Cothier and Dowling, 1986 ; Bishop and Davis, 1990) による病害も報告されている. 発生地で防除対策を考えるには, これらによる病害である可能性も視野に入れながら, タマネギの品種, 栽培法, 気象, 病原体の生理, 宿主・媒介虫, さらに種子伝染等の要素を考慮した生態研究が必要である.

セイヨウタンポポから分離された *Pantoea* 属菌 K8 株は, 水溶性青色色素を生産した. 既に, 環境中から分離した *P. agglomerans* が培地中に深い青色色素を生産したとの報告があり (Fujikawa

表3. 雑草等から分離された *Pantoea* 属菌の細菌学的・病理学的性質

性 質	<i>P. agglomerans</i> <sup>a)</sup>	<i>P. ananatis</i> <sup>a)</sup>	菌 株 番 号 <sup>b)</sup>															
			1, 21, 28, 29, 32, 40, 41, 50	12, 19, 20, 22, 23, 30, 43, 44, 47	49	3, 13, 27, 33, 39	4, 5, 9, 10	6, 7, 11, 14, 16-18	8, 15	24, 31	25	26, 38, 45	34, 35	36	37	42	46	48
グラム反応	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
OF試験	F <sup>c)</sup>	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
黄色色素産生	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
インドール産生	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
糖・有機酸の利用																		
<i>myo</i> -イノシトール	(d)/d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—	+
D-ソルビトール	—	+	+(41は—)	+(30は—)	—	—	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—	—	+
ラクトース	—	+	+	+	+	—	+	—	—	+	+	+	—	—	—	+	—	+
D-メリビオース	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ラフィノース	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	+
D-酒石酸	(+)	—	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	+	—	—	+	—	+
アドニトール	—	—	—	—	+													
タバコ過敏反応 (WB,Xa,Sm) <sup>d)</sup>			+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
タマネギ鱗茎腐敗			+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ネギ葉壊死			+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

a) Bergey's Manual (Grimont and Grimont, 2005) から引用. + : 90 ~ 100% の株が 1 ~ 2 日で+. (+) : 90 ~ 100% の株が 1 ~ 4 日で+. — : 90 ~ 100% の株が 4 日目でも—. d : 11 ~ 89% の株が 1 ~ 4 日で+. (d) : 11 ~ 89% の株が 3 ~ 4 日で+. なお, 今回分離された菌株の+, — に関しては各カラムの全菌株について+または— (D-ソルビトール利用能, タバコ過敏反応は例外).

b) 菌株番号は, 表 2 の K1 ~ 50 に対応. K1 と同一カラム, K12 と同一カラムの菌株は当初 *P. ananatis* と同定したが, ina (氷核) 活性遺伝子が検出されなかった K20, K30 は *Pantoea* sp. にとどめた.

c) F : 通性嫌気性.

d) WB : 品種ホワイトパーレー, Xa : キサンチ, Sm : サムスン.



and Akimoto, 2011), 今回見られた色素もそれと同一か類縁の物質である可能性が高いと考えられる。

## 5. おわりに

最近, *P. ananatis* あるいは *P. agglomerans* のイネ, ネギあるいはタマネギに対する病原性の有無と特定の遺伝子領域 (*Pantoea ananatis* specific virulence locus, 仮称 PASVIL) の有無は一致していると報告された (久保田ら, 2014; 瀧川ら, 2015). この領域の有無を指標とすることで, タマネギ鱗茎等腐敗症に関わる *P. ananatis*, *P. agglomerans* などの病原細菌の宿主域の調査あるいは生態研究が容易となり, さらに広範な宿主あるいは媒介虫が発病に関与している可能性が明らかになると期待される。

## 6. 謝辞

細菌同定に際して助言を賜った瀧川雄一博士には, この場をお借りして深く御礼申し上げます。

## 7. 参考文献

- 阿部雄幸・佐藤智浩・後藤新一・佐藤 純・篠原宏亮 (2000). 山形県庄内地方で発生したフリーズア首腐病について. 北日本病虫研報 51: 115–118.
- 厚地多恵・瀧川雄一・木戸一孝・長谷川優 (2004). メロン果実腐敗症から分離された *Erwinia ananas* (= *Pantoea ananatis*) について. 日植病報 70: 283 (講要).
- Azad, H.R., Holmes, G.J. and Cooksey, D.A. (2000). A new leaf blotch disease of sudangrass caused by *Pantoea ananas* and *Pantoea stewartii*. Plant Dis. 84: 973–979.
- 畔上耕児 (2015). *Pantoea* 属菌の雑草等からの分離とタマネギ鱗茎, ネギ葉, タバコ葉への接種. 日植病報. 日植病報 81: 55 (講要) .
- Bell, A.A., Medrano, E.G., Lopez, J.D. and Luff, R.K. (2007). Transmission and importance of *Pantoea ananatis* during feeding on cotton buds (*Gossypium hirsutum* L.) by cotton fleahoppers (*Pseudatomoscelis serratus* Reuter). Proceedings of the World Cotton Research Conference-4 (WCRC-4), 1835. Lubbock, Texas.
- Bishop, A.L. and Davis, R.M. (1990). Internal decay of onions caused by *Enterobacter cloacae*. Plant Dis. 74: 692–694.
- Brady, C.L., Goszczynska, T., Venter, S.N., Cleenwerck, I., De Vos, P., Gitaitis, R.D. and Coutinho, T.A. (2011). *Pantoea allii* sp. nov., isolated from onion plants and seed. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61: 932–937.
- Bruton, B.D., Wells, J.M. and Lester, G.E. (1986). Pathogenicity of *Erwinia ananas* to muskmelons in Texas. Phytopathology 76: 1136 (Abstr).

- Cota, L.V., Costa, R.V., Silva, D.D., Parreira, D.F., Lana, U.G.P. and Casela, C.R. (2010). First report of pathogenicity of *Pantoea ananatis* in sorghum (*Sorghum bicolor*) in Brazil. Australasian Plant Dis. Notes 5: 12–122.
- Cother, E.J. and Dowling, V. (1986). Bacteria associated with internal breakdown of onion bulbs and their possible role in disease expression. Plant Pathology 35: 329–336.
- Coutinho, T.A., Preisig, O., Mergaert, J., Cnockaert, M.C., Riedel, K.-K., Swings, J. and Wingfield, M.J. (2002). Bacterial blight and dieback of *Eucalyptus* species, hybrids, and clones in South Africa. Plant Dis. 86: 20–25.
- De Baere, T., Verhelst, R., Labit, C., Verschraegen, G., Wauters, G., Claeys, G. and Vanechoutte, M. (2004). Bacteremic infection with *Pantoea ananatis*. J. Clin. Microbiol. 42: 4393–4395.
- Dutta, B., Barman, A.K., Srinivasan, R., Avci, U., Ullman, D.E., Langston, D.B. and Gitaitis, R.D. (2014). Transmission of *Pantoea ananatis* and *P. agglomerans*, causal agents of center rot of onion (*Allium cepa*), by onion thrips (*Thrips tabaci*) through feces. Phytopathology 104: 812–819.
- Edens, D.G., Gitaitis, R.D., Sanders, F.H. and Nischwitz, C. (2006). First report of *Pantoea agglomerans* causing a leaf blight and bulb rot of onions in Georgia. Plant Dis. 65:615, (Disease notes).
- Euzéby, J.P. (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 590–592. [List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.net>. (参照 2016年8月8日)] .
- Fujikawa, H. and Akimoto, R. (2011). New blue pigment produced by *Pantoea agglomerans* and its production characteristics at various temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 77:172–178.
- Gavini, F., Mergaert, J., Beji, A., Mielcarek, C., Izard, D., Kersters, K. and De Ley, J. (1989). Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 337–345.
- Gitaitis, R.D. and Gay, J.D. (1997). First report of a leaf blight, seed stalk rot, and bulb decay of onion by *Pantoea ananas* in Georgia. Plant Dis. 81: 1096 (Disease notes).
- Gitaitis, R., Walcott, R., Culpepper, S., Sanders, H., Zolobowska, L. and Langston, D. (2002a). Recovery of *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot of onion, from weeds and crops in Georgia, USA. Crop Prot. 21: 983–989.
- Gitaitis, R., Wells, L., Sanders, H., Riley, D. and Walcott, R. (2002b). Association of *Pantoea ananatis* with tobacco thrips, *Frankliniella fusca*. Phytopathology 92: S149 (Abstr.).

- Gitaitis, R.D., Walcott, R.R., Wells, M.L., Diaz Perez, J.C. and Sanders, F.H. (2003). Transmission of *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot of onion, by tobacco thrips, *Frankliniella fusca*. Plant Dis. 87: 675–678.
- Gitaitis, R.D., Sanders, F.H., Walcott, R.R. and Burrell, D. (2004). Bacterial leaf blight and bulb rot of onion in Peru caused by *Pantoea agglomerans* and *P. ananatis*. Phytopathology 94: S145 (Abstr.).
- 後藤正夫・瀧川雄一 (1984a). 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べかた (1). 植物防疫 38: 339–344.
- 後藤正夫・瀧川雄一 (1984b). 同上 (2). 植物防疫 38: 385–389.
- 後藤正夫・瀧川雄一 (1984c). 同上 (3). 植物防疫 38: 432–437.
- 後藤正夫・瀧川雄一 (1984d). 同上 (4). 植物防疫 38: 479–484.
- Grimont, P.A.D. and Grimont, F. (2005). Genus XXIII. *Pantoea* Gavini, Mergaert, Beji, Mielcarek, Izard, Kersters and De Ley 1989b, 343<sup>vp</sup> emend. Mergaert, Verdonck and Kersters 1993, 171. In Bergey's manual of systematic bacteriology 2nd ed. Vol. 2, The Proteobacteria Part B. The Gammaproteobacteria. (Brenner, D.J., Krieg, N.R. and Staley, J.T., eds.). pp. 713–720, Springer, USA.
- 長谷川優・畔上耕児・吉田浩之 (2002). イネ内穎褐変病菌のイネの刈り株における越冬. 日植病報 68: 259 (講要).
- Hattingh, M.J. and Walters, D.F. (1981). Stalk and leaf necrosis of onion caused by *Erwinia herbicola*. Plant Dis. 65: 615–618.
- 木戸一孝・小林真樹・松本大雪・長谷川優・瀧川雄一 (2008). メロン果実腐敗病 (仮称) の病原菌である *Pantoea ananatis* (= *Erwinia ananas*) の宿主範囲と遺伝的特異性. 日植病報 74: 262 (講要).
- Kido, K., Adachi R., Hasegawa M., Yano K., Hikichi Y., Takeuchi S., Atsuchi T. and Takikawa Y. (2008). Internal fruit rot of netted melon caused by *Pantoea ananatis* (= *Erwinia ananas*) in Japan. J. Gen. Plant Pathol. 74: 302–312.
- Kido, K., Hasegawa, M., Matsumoto, H., Kobayashi, M. and Takikawa, Y. (2010). *Pantoea ananatis* strains are differentiated into three groups based on reactions of tobacco and welsh onion and genetic characteristics. J. Gen. Plant Pathol. 76: 208–218.
- 木嶋利男・山下修一・土居養二 (1985). *Erwinia* 属細菌によるアワ株腐細菌病 (新称), 宿根カスミソウこぶ病 (新称), スパテヒラム葉腐細菌病 (新称). 日植病報 51: 344 (講要).
- Kim, J., Choi, O. and Kim, T.-S. (2012). An outbreak of onion center rot caused by *Pantoea ananatis* in Korea. Plant Dis. 96: 1576 (Disease notes).
- 久保田雄貴・木戸一孝・瀧川雄一 (2014). *Pantoea ananatis* Group I の病原性に関する特異的遺伝子領域について. 日植病報 80: 328 (講要).

- Mergaert, J., Verdonck, L. and Kersteras, K. (1993). Transfer of *Erwinia ananas* (synonym, *Erwinia uredovora*) and *Erwinia stewartii* to the genus *Pantoea* emend. as *Pantoea ananas* (Serrano 1928) comb. nov. and *Pantoea stewartii* (Smith 1898) comb. nov., respectively, and description of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* subsp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 43: 162–173.
- 日本植物病理学会 (2015). 日本植物病名目録 (2015 年版). p. 284, pp. 906–907, 日本植物病理学会, 東京.
- 農研機構 遺伝資源センター (2016). 農業生物資源ジーンバンク・遺伝資源データベース, [http://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro\\_search.php](http://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_search.php). (参照 2016 年 8 月 8 日)
- Paccola-Meirelles, L.D., Ferreira, A.S., Meirelles, W.F., Marriel, I.E. and Casela, C.R. (2001). Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. J. Phytopathology 149: 275–279.
- Serrano, F.B. (1928). Bacterial fruitlet brown rot on pineapple in the Philippines. Philipp. J. Sci. 36: 271–305.
- 白川 隆・西口真嗣・山内智史 (2010). *Pantoea ananatis* によるタマネギ鱗茎腐敗症の発生. 日植病報 76: 176 (講要).
- 多賀由美子・築尾嘉章・守川俊幸 (1999). *Erwinia ananas* による観賞用アリウム (*Allium giganteum*) の鱗茎腐敗. 北陸病虫研報 47: 55.
- 瀧川雄一・富田俊介・久保田雄貴・畔上耕児・木戸一孝(2015). 雑草から分離された *Pantoea ananatis* およびタマネギから分離された *P. agglomerans* における PASVIL の検出. 日植病報 81: 301 (講要).
- Trüper, T. and De'Clari, L. (1997). Taxonomic note: Necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) “in apposition”. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 908–909.
- Walcott, R.R., Gitaitis, R.D., Castro, A.C., Sanders, F.H., Jr. and Diaz-Perez, J.C. (2002). Natural infestation of onion seed by *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot. Plant Dis. 86: 106–111.
- Wells, J.M., Sheng, W-S., Ceponis, M.J. and Chen, T.A. (1987). Isolation and characterization of strains of *Erwinia ananas* from honeydew melons. Phytopathology 77: 511–514.
- 吉田浩之・尾崎克己・畔上耕児 (1982). イネの内えい褐変症. 植物防疫 36: 122–126.

## トウモロコシ根腐病菌の収集・同定と特性評価

月星 隆雄<sup>a)</sup>・菅原 幸哉<sup>b)</sup>・増中 章<sup>a)</sup>

農研機構 畜産草地研究所

[〒329-2793 栃木県那須塩原市千本松 768]

### Collection and identification of isolates causing Pythium root rot of corn in Japan and their characteristics

Takao TSUKIBOSHI<sup>a)</sup>, Koya SUGAWARA<sup>b)</sup>, Akira MASUNAKA<sup>a)</sup>

NARO Institute of Livestock and Grassland Science

#### 1. 目的

飼料用トウモロコシは長大型飼料作物としてはわが国で最も生産量の多い作目で、2015年度の作付けは北海道を中心に全国で約92,000 haに及ぶ(農林水産省, 2015)。生産物の多くは黄熟期に青刈りされ、細断して主にロールバールとしてサイレージ発酵後、家畜に給与される。しかし、刈取適期の黄熟期頃に植物体全体が枯れ上がる「根腐病」が発生し、大きな問題となっている。

根腐病はピシウム(*Pythium*)属菌により引き起こされ、1980年代に神奈川県など関東地方を中心に飼料用トウモロコシで発生し、初め根が黒変ないし褐変し、黄熟期頃に一気に枯れ上がり、植物体全体が黄化する。また、植物体の水分吸収が困難になるため雌穂が垂れ下がるのが特徴の一つで(図1)、茎内部は病原菌が伸展、まん延することで空洞化し(図2)、軟化するため機械刈りがうまくできず、大きな減収につながる。この



図1. トウモロコシ根腐病  
(垂れ下がった雌穂)



図2. 空洞化した茎内と病原菌による組織の褐変(下部)

a) (現所属) 農研機構 西日本農業研究センター Western Region Agricultural Research Center, NARO  
[〒721-8514 広島県福山市西深津町 6-12-1]

b) (現所属) 農研機構 畜産研究部門 Institute of Livestock and Grassland Science, NARO  
[〒329-2793 栃木県那須塩原市千本松 768]

病害は飼料用トウモロコシの「萎凋症」として報告されたが（佐藤ら，1984；井上ら，1984），後にスイートコーンで報告された「根腐病」が正式名となった（橋本ら，1985）。

1990年代は大規模な発生は見られなかったが，2010年代に入ってから各地で再び根腐病が多発するようになり，特に2011年にはこれまで大きな発生の報告がなかった北海道（十勝地方など）で大発生し，大きな問題となった（十勝毎日新聞，2011）．病原菌は *Pythium graminicola* Subramanian とされていたが，これまで報告のない地域での発生もあり，病原菌種を再確認する必要があったため，各地で採集を行い，分離菌の形態および分子系統から菌種を同定するとともに，菌糸伸長，病原性等の特性解明を行った．

## 2. 材料および方法

### 1) 菌株の収集

2009年から2012年にかけて，北海道十勝清水町，札幌市，山形県酒田市，栃木県那須塩原市，群馬県前橋市，長野県塩尻市，宮崎県都城市の6道県7市町で，7月下旬から9月にかけて飼料用トウモロコシ根腐病発病株，または部分的な根腐れなどが見られた個体の根および地際部の茎をサンプリングし，根は一晩流水中で洗浄後，茎は内部組織を長さ5mm程度の小片に細断した．これを70%エタノールに約30秒間，1%次亜塩素酸水溶液に約1分間浸漬後，蒸留滅菌水中で2度洗浄し，水分をふき取った上で，1.5%素寒天平板培地上に置き，1-2日間暗黒下25°Cで培養した．伸長した *Pythium* 属菌を単菌糸分離し，V8ジュース培地（Campbell V8ジュース200ml，CaCO<sub>3</sub> 3g，寒天15g，以下V8）上で3-4日培養後，V8斜面培地に移植して分離菌株とし，これを20-25°Cの恒温器内で保存した．

### 2) 菌種の同定および菌糸生育試験

遠心（3000rpm，3分）により固形分を除いたV8ジュースで作成した平板培地（以下V8平板）上で，分離菌

MAFF No. (菌株)	菌種	分離部位	採集地	採集年月	DDBJ Accession No.*
511547	<i>Pythium arrhenomanes</i>	茎内部	栃木県那須塩原市	2009/9	AB903904
511548	"	根	長野県塩尻市	2010/9	AB979109
511552	"	根	群馬県前橋市	2011/9	AB979113
511553	"	根	北海道札幌市	2011/9	AB979114
511554	"	根	北海道十勝清水町	2012/8	AB979115
511559	"	茎内部	宮崎県都城市	2011/7	AB979122
Arr1**	"	茎内部	栃木県那須塩原市	2009/9	-
511550	<i>P. graminicola</i>	根	長野県塩尻市	2010/9	AB979111
511551	"	根	群馬県前橋市	2011/9	AB979112
511557	"	根	宮崎県都城市	2012/7	AB979118
511558	"	茎内部	宮崎県都城市	2011/7	AB979119
511560	"	根	宮崎県都城市	2011/7	AB979120
511562	"	根	山形県酒田市	2012/8	AB979121
Gra1**	"	根	栃木県那須塩原市	2011/7	-
511561	<i>P. heterothallicum</i>	根	宮崎県都城市	2011/7	AB979123
511555	<i>P. inflatum</i>	根	北海道十勝清水町	2012/8	AB979116
511549	<i>P. ultimum var. ultimum</i>	根	長野県塩尻市	2010/9	AB979110

\* rDNA-ITS配列，\*\* MAFF非登録菌株．

の ribosomal RNA 遺伝子 (以下 rDNA) -ITS 領域の相同性解析を行うために, 分離菌株を V8 平板上, 25°C, 暗黒下で約 7 日間培養し, 形成された菌叢をかき取り, 既報の方法により DNA の抽出を行った (Tsukiboshi et al., 2005). これをテンプレートとして, ITS1 および ITS4 プライマー (White et al., 1990) を用いて PCR 増幅装置 (PCR Thermal Cycler Dice, タカラバイオ(株)) により 5.8S rDNA を含む rDNA-ITS 領域を増幅し, ダイレクトシーク

エンスにより塩基配列を決定した. 得られた塩基配列は BLAST (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>, DDBJ) により相同性検索を行った. 形態観察および rDNA-ITS 領域の相同性検索結果に基づき, 種を同定した.

菌糸生育試験は各菌株について, 上記のように V8 平板上, 5~40°C (5°C 毎) の温度範囲で行い, 菌糸伸長速度を測定した (図 3).

### 3) 接種試験

各菌種から 1 菌株ずつ (表 3) を, 麦粒培地 (大麦粒に同量の蒸留水を加え高圧滅菌) 上, 7-10 日間暗黒下 25°C で培養し, 接種源とした. 1 万分の 1 ワグネルポットに重量比 5% で上記接種源を混和した園芸培土 (クレハ(株)) を充填した. 飼料用トウモロコシは KD720 (カネコ種苗(株)) を供試し, 湿らせたろ紙を敷いたシャーレ内, 暗黒下 25°C で種子を発芽させ, 芽が 5mm 程度伸びたものを芽出し苗として, 上記ポットに移植した. これを 25°C 光周期 12 時間の陽光定温室で育て, 10-14 日後に調査した. 調査は, 根腐れ程度 (0: 発病無し, 1: 根の先端部分が黒変, 2: 根の半分程度が黒変, 3: 根全体が黒変), 草丈 (地際から最上位葉身先端までの長さ) および出芽率 (出芽し植物体となった植物個体の割合) について行った. 無接種区として麦粒のみを混和した土壌を用い, 同様に試験を行った. 試験は 1 回につき 6-8 個体を用い, 3 反復した.

## 3. 結果

### 1) 菌株の収集および同定

飼料用トウモロコシの根腐れ症状から菌を分離した結果, 計 79 菌株を得た (表 2). 北海道, 栃

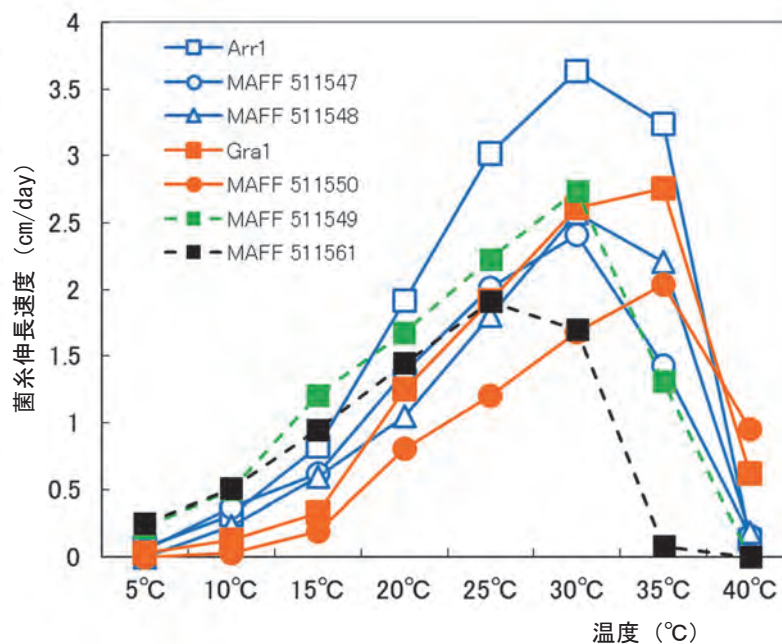


図 3. トウモロコシ根腐れ症状から分離される *Pythium* 属菌の生育温度

木, 群馬, 長野, 宮崎の各道県から採集した 42 菌株は, 造卵器は球形, 表面平滑, 大きさ 23.9 – 30.5 $\mu\text{m}$ , 造精器 1–8 個が側着し, 内部に充満型卵胞子を 1 個形成. 卵胞子は淡黄褐色, 壁の厚さ 1.3–2.7 $\mu\text{m}$  であった. 相同性解析の結果, MAFF

表2. 根腐症状を示したトウモロコシから分離した *Pythium* 属菌の各道県での分離菌株数\*

菌種	<i>P. arrhenomanes</i>	<i>P. graminicola</i>	<i>P. ultimum</i>	<i>P. heterothallicum</i>	<i>P. inflatum</i>
北海道	11 (92)	0	0	0	1 (8)
山形	0	6 (100)	0	0	0
栃木	4 (67)	2 (33)	0	0	0
群馬	2 (40)	3 (60)	0	0	0
長野	19 (63)	3 (10)	8 (27)	0	0
宮崎	6 (30)	13 (65)	0	1 (5)	0
計	42 (54)	27 (34)	8 (10)	1 (1)	1 (1)

\* 分離菌株数 (各道県での分離頻度%)

登録株はすべて *Pythium arrhenomanes* (AY598628) と 99.1–99.9% の相同性を示した. 形態的にも記載 (Plaats-Niterink, 1981) と一致することから, これらの菌株を *P. arrhenomanes* Drechsler と同定した (Tsukiboshi et al., 2014). 表 1 に示した菌株以外については形態による同定を行った.

山形, 栃木, 群馬, 長野, 宮崎の各県から採集した 27 菌株は, 造卵器は球形, 表面平滑, 大きさ 21.5–29.6 $\mu\text{m}$ , 造精器 1–8 個が側着し, 内部に充満型卵胞子を 1 個形成. 卵胞子は壁の厚さ 1.1–2.2 $\mu\text{m}$  であった. 造卵器の大きさが *P. arrhenomanes* に比べやや小さいことが特徴であり, 形態的に *Pythium graminicola* の記載と一致した (Plaats-Niterink, 1981). 相同性解析の結果, MAFF 登録株はすべて *P. graminicola* (AY598625) と 99.7–100% の相同性を示した. 以上から, これらの菌株を *P. graminicola* Subramanian と同定した. 表 1 に示した菌株以外については形態による同定を行った.

長野県で採集した 8 菌株は, 造卵器は球形, 表面平滑, 大きさ約 26 $\mu\text{m}$ , 造精器の形成は観察できず, 内部に非充満型卵胞子を 1 個形成した. 相同性解析の結果, MAFF 登録株は *Pythium ultimum* var. *ultimum* (AY598657) と 100% の相同性を示した. 以上から, この菌株を *P. ultimum* Trow var. *ultimum* と同定した. 表 1 に示した菌株以外については形態による同定を行った.

宮崎県で採集した 1 菌株は, 造卵器は球形, 表面平滑, 大きさ約 23 $\mu\text{m}$ , 造精器 1 個が側着し, 内部に充満型卵胞子を 1 個形成したが, 成熟した卵胞子は少なかった. 相同性解析の結果, *Pythium heterothallicum* W.A. Campbell et F.F. Hendrix (AY598654) と 99.6% の相同性を示したことから, 同菌と同定した. また, 北海道で採集した 1 菌株は, 造卵器および造精器は観察できなかったが, rDNA-ITS 配列は *Pythium inflatum* V.D. Matthews (AY598626) と 100% の相同性を示し, 同菌と同定した. なお, MAFF 登録株の rDNA-ITS 配列は DDBJ に登録した (表 1).

## 2) 菌糸生育

菌糸生育試験の結果, *P. arrhenomanes* 3 菌株はいずれも生育適温が 30 $^{\circ}\text{C}$  となり, 菌糸伸長速度は 2.4–3.6 cm/日であった (図 3). これに対し, *P. graminicola* 2 菌株はいずれも生育適温が 35 $^{\circ}\text{C}$  であり, 伸長速度は 2.0–2.7 cm/日であった. *P. ultimum* var. *ultimum* および *P. heterothallicum* は, 生育適温がそれぞれ 30 $^{\circ}\text{C}$  および 25 $^{\circ}\text{C}$  であった.



### 3) 病原性

接種試験の結果、*P. arrhenomanes* はトウモロコシに激しい根腐れを引き起こし、草丈も無接種区に比べ大幅に抑制された（表 3）。*P. graminicola* 菌株も *P. arrhenomanes* に比べ草丈抑制はやや劣ったが、同程度の根腐れを引き起こし、明瞭な病原性を示した。接種土壌での出芽率は両者に大きな差はなく、70–80%程度であった。これに対し、*P. ultimum* var. *ultimum* は、ほとんど根腐れを引き起こさず、草丈も大きく抑制されることはなかったが、出芽率は平均 57.1%と *P. arrhenomanes* および *P. graminicola* よりも低くなった。*P. heterothallicum* は病原性を全く示さず、草丈も無接種区と同等であった。*P. inflatum* は接種を行っていない。

表3. トウモロコシ根腐れ症状から分離される *Pythium* 属菌の病原性

菌種	<i>P. arrhenomanes</i>	<i>P. graminicola</i>	<i>P. ultimum</i>	<i>P. heterothallicum</i>	無接種
MAFF No.	511548	511550	511549	511561	
根腐れ程度*	3	3	1	0	0
草丈(cm)	16.3	20.9	26.9	33.4	31.8
出芽率(%)	71.4	85.7	57.1	85.7	92.9

\*: 中央値, 0: 発病無し, 1: 根の先端部分が黒変, 2: 根の半分程度が黒変, 3: 根全体が黒変.

### 4. 考察

トウモロコシ根腐病については 1980 年代に神奈川、栃木、千葉県など関東を中心に発生し、*P. graminicola* が原因菌とされた。しかし、当時は東北以北での発生はなく、本調査で初めて北海道でも本病の発生を認めた。病原菌としても飼料用トウモロコシでは初めて *P. arrhenomanes* が分離され、明瞭な病原性を示した。この菌はすでにスイートコーンで根腐病菌として報告されており（舟久保, 2010）、水稻でも東北・北陸地方を中心に苗立枯病菌として問題になっている（戸田ら, 2011）。トウモロコシに明瞭な病原性を示した *P. arrhenomanes* と *P. graminicola* の地域ごとの分布を見ると、北海道、栃木、長野など比較的冷涼な地域では *P. arrhenomanes* が過半数～多数を占めたのに対し、群馬、宮崎などの比較的温暖な地域では *P. graminicola* が過半数を占めていた。菌糸生育試験の結果では、*P. graminicola* は生育適温が 35°C であったのに対し、*P. arrhenomanes* は 30°C であり、このことも両菌種の分布に関わるものと推定した。また、両菌とも高温性ピシウムであり、近年の気候温暖化に伴い分布を拡大したものと推測した。*P. ultimum* var. *ultimum* はトウモロコシのピシウム苗立枯病菌であり、出芽率を低下させたことから、幼苗での病原菌が生育後期でも残存して分離された可能性がある。*P. heterothallicum* は一般的に病原菌ではなく、森林土壌等から腐生的に分離されるが、本調査でもトウモロコシに全く病原性を示さず、腐生菌として付随して分離された可能性が高い。*P. inflatum* も同様に土壌から分離されることが多く、本調査では接種試験は行っていないが、腐生菌である可能性が高い。

本調査を通して、トウモロコシ根腐病菌は現在特に北日本で病原性の強い *P. arrhenomanes* の発生が多いことが明らかになった。著者らは、本調査で収集した菌株（主に MAFF 511548）を爪楊

枝穿刺法によるトウモロコシ根腐病抵抗性検定に用いており (Mitsuhashi et al., 2015), 本調査で採集した菌株の抵抗性育種での活用が今後も期待される。

## 5. 謝辞

長野県畜産試験場の三木一嘉氏には現地でのサンプル採集の際にご協力頂いた。ここに記して深謝の意を表する。

## 6. 参考文献

- 舟久保太一 (2010). *Pythium arrhenomanes* によるトウモロコシ根腐病 (病原追加). 関東東山病害虫研究会報 57: 15–17.
- 橋本光司・吉野正義・渡辺恒雄 (1985). スィートコーン根腐病 (新称) の発生生態と防除. 関東東山病虫研報 32: 56–58.
- 井上 登・島貫忠幸・佐藤 徹 (1984). トウモロコシ萎凋症 (立枯れ様症状) の発生経過について. 関東草飼研誌 8: 56–59.
- Mitsuhashi, S., Masunaka, A., Kikawada, T., Sugawara, K., Tsukiboshi, T., Tamaki, H. and Sato, H. (2015). Evaluation of resistance to *Pythium* root rot by *Pythium arrhenomanes* in corn by using a toothpick inoculation method. Grassl. Scie. 61: 181–184.
- 農林水産省 (2015). 農林水産作況調査. 飼料作物平成 27 年度, [http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou\\_kome/index.html](http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_kome/index.html). 農林水産省, 東京.
- 佐藤 徹・島貫忠幸・月星隆雄 (1984). トウモロコシ茎腐症状から分離された *Pythium* 菌について. 日植病報 50: 137. (講要)
- 戸田 武・岩佐昭紀・藤 晋一・古屋廣光 (2011). 東北および北陸地域 5 県におけるイネ苗立枯病を引き起こす *Pythium* 属菌の種について. 日植病報 77: 202. (講要)
- 十勝毎日新聞 (2011). 「根腐病」大発生. 十勝毎日新聞 9 月 30 日号
- Tsukiboshi, T., Chung, W. H. and Yoshida, S. (2005). *Cochliobolus heveicola* sp. nov. (*Bipolaris heveae*) causes brown stripe of bermuda grass and Zoysia grass. Mycoscience 46: 17-21.
- Tsukiboshi, T., Sugawara, K., Masunaka, A. and Mitsuhashi, S. (2014). First report of *Pythium* root and stalk rot of forage corn caused by *Pythium arrhenomanes* in Japan. Plant Disease 98: 1155.
- Van der Plaats-Niterink, A. J. (1981). Monograph of the genus *Pythium*. Stud. Mycol. 21: 1–242.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. B. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Gelfand, M., Sninsky, D., White, T. (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, California, pp.315–322.

# 国産自給飼料として的大豆ソフトグレインサイレージ からの乳酸菌の収集と系統学的分類

遠野 雅徳 <sup>a)</sup>

農研機構 畜産草地研究所

[〒329-2743 栃木県那須塩原市千本松 768]

Collection and phylogenetic analysis of lactic acid bacteria isolated from  
soybean soft grain silages as self-sufficient feeds in Japan

Masanori TOHNO <sup>a)</sup>

NARO Institute of Livestock and Grassland Science

## 1. 目的

我が国の畜産業では、トウモロコシ子実、アルファルファ乾草、大豆粕等の高タンパク質飼料の大部分を輸入に頼っている。これらの飼料の世界的な供給不足により、輸入飼料価格の高騰が畜産農家経営に深刻な悪影響を与えており、急務に解決すべき問題となっている。近年、国産自給飼料として有望な大豆ソフトグレインサイレージ(大豆 SGS)の研究・技術開発が展開されているが(河本ら, 2011)、更なる安定的な調製・貯蔵・流通技術の創成が期待されている。大豆 SGS とは、収穫後の大豆穀実をサイロ等で発酵処理することにより、長期保存可能なサイレージとして貯蔵したものである。本技術創成に向けて、大豆 SGS に認められる微生物の中でも、発酵過程において極めて重要な働きをする *Lactobacillus* 属等の乳酸菌に関する基礎的知見の蓄積に加えて、良質な大豆 SGS と関連付けられる分離乳酸菌のサイレージ添加剤への応用を目指した取り組みが必要不可欠となる。

そこで本研究では、東北農業研究センターにおいて栽培・貯蔵された大豆 SGS のうち、カビ等の発生が制御され、開封後の好氣的保管中も良好な品質を維持し続けたサンプルにターゲットを絞り、本大豆 SGS からの乳酸菌の分離を試みた。特長的な大豆 SGS には、サイレージ調製において有用な機能を有する土着の乳酸菌が存在しているという発想の下、将来的なサイレージ添加剤への応用を見据えた菌株収集・系統学的分類を行うことを目的とした。

---

a) (現所属) 農研機構 畜産研究部門 Institute of Livestock and Grassland Science, NARO

[〒329-2743 栃木県那須塩原市千本松 768]

## 2. 材料および方法

### 1) 大豆 SGS の調製と発酵品質

#### (1) 大豆 SGS の調製

平成 25 年に東北農業研究センターで栽培した大豆タチナガハの穀実を水分含量が 40%となるように、添付取扱説明書に従って調製した市販飼料添加用乳酸菌製剤であるサイマスターLP 乳酸菌液（雪印種苗株式会社）で加水後、ドラム缶サイロ（200L 容）に貯蔵し、10 ヶ月屋外に保管して大豆 SGS を調製した。開封後、ドラム缶下部の大豆 SGS を採材し、1 ヶ月間室温（約 20℃）で放置した。

#### (2) 発酵品質分析

主に既報に従い（Tohno et al., 2012）、一部変法を用いて、開封後に好氣的放置した大豆 SGS の発酵品質を分析した。すなわち、10g の大豆 SGS サンプルを 100mL の滅菌蒸留水に懸濁し、Promedia SH-II M ホモジナイザー（株式会社エルメックス）を用いて、5 分間十分に攪拌した。大豆 SGS 懸濁液の pH を MP230 pH メーター（メトラー・トレド株式会社）により分析した。LC-2000Plus（日本分光株式会社）を用いた高速液体クロマトグラフィー分析により、有機酸含量を測定した。新鮮物 1g 当たりの各種微生物コロニー形成単位（乳酸菌、酵母、カビ、大腸菌群、一般好気性細菌、バチルス及びビクロストリジア）を常法（Tohno et al., 2012）に従って分析した。

### 2) 乳酸菌の分離・同定及び分子系統解析

#### (1) 乳酸菌の分離

上述の大豆 SGS 懸濁液を滅菌蒸留水で段階希釈後、de Man Rogosa Sharpe (MRS) 寒天培地 (Difco) に同抽出液を塗布し、アネロパック・ケンキ（三菱ガス化学株式会社）を用いて、30℃で 3 日間嫌気培養した。ランダムに選択したコロニーを MRS 寒天培地上で 3 回純粋培養を繰り返し、グリセロールストックにより -80℃で保存した。

#### (2) 乳酸菌の生理・生化学的性状解析

グラム染色は、ファイバーG「ニッスイ」（日水製薬株式会社）により、純粋培養後の各乳酸菌分離株を用いて実施した。カタラーゼ産生試験及び API 50（シスメックス・ビオメリュー株式会社）による糖資化性試験は、既報に従って実施した（Tohno et al., 2015）。

#### (3) 分子系統解析

MRS 寒天培地に生じた分離株のコロニーをかき取った後、既報のダイレクト PCR 法により、27F（5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'）および 1492R（5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'）のユニバーサルプライマー（Suzuki et al., 1996）を用いて 16S ribosomal RNA(以下 rRNA)遺伝子領域を増幅し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した（Tohno et al., 2013）。得られた塩基配列を基に近隣結合法により系統樹を作成した（Tohno et al., 2014）。

### 3. 結果

#### 1) 大豆 SGS の発酵品質

供試大豆 SGS の pH 値は 5.20 であり、乳酸と酢酸含量はそれぞれ 0.73, 0.16 (新鮮物%) であった。吉草酸, プロピオン酸及び酪酸の産生は認められなかった。同 SGS に含まれる微生物数の検討により、乳酸菌及び酵母がそれぞれ  $1.7 \times 10^8$ ,  $2.0 \times 10^6$  (コロニー形成単位/新鮮物 g) 認められたが、カビ, 大腸菌群, 一般好気性細菌, バチルス及びクロストリジアは検出されなかった。また、外観上に微生物的な汚染や腐敗は認められず、官能的にも異臭は感知されなかった。

#### 2) 分離乳酸菌の同定

供試大豆 SGS より合計 24 株の乳酸菌を分離した。本分離株のうち、市販飼料添加用乳酸菌製剤由来と考えられる乳酸菌株を除き、以下の合計 11 菌株を 16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹解析に供試した [MAFF 516307 (= DG1) 株, MAFF 516308 (= DG3) 株, DG4 株, MAFF 516309 (= DG9) 株, MAFF 516310 (= DG10) 株, DG12 株, DG13 株, DG14 株, DG17 株, DG18 株及び DG23 株]。

これらの乳酸菌株は、いずれもグラム陽性、カタラーゼ陰性、桿菌様の細胞形態を示した。16S rRNA 遺伝子配列による系統樹解析により、MAFF 516307 株, MAFF 516308 株, DG4 株, DG12 株, DG13 株, DG14 株, DG17 株及び DG18 株は、*Lactobacillus buchneri* JCM 1115<sup>T</sup> 株と同一のクラスターを形成した (図 1)。これらの分離株と JCM 1115<sup>T</sup> 株との 16S rRNA 遺伝子配列類似性は 99.9% 以上を示した。

一方、MAFF 516309 株及び MAFF 516310 株の最近縁種は *Lactobacillus brevis* JCM 1059<sup>T</sup> 株

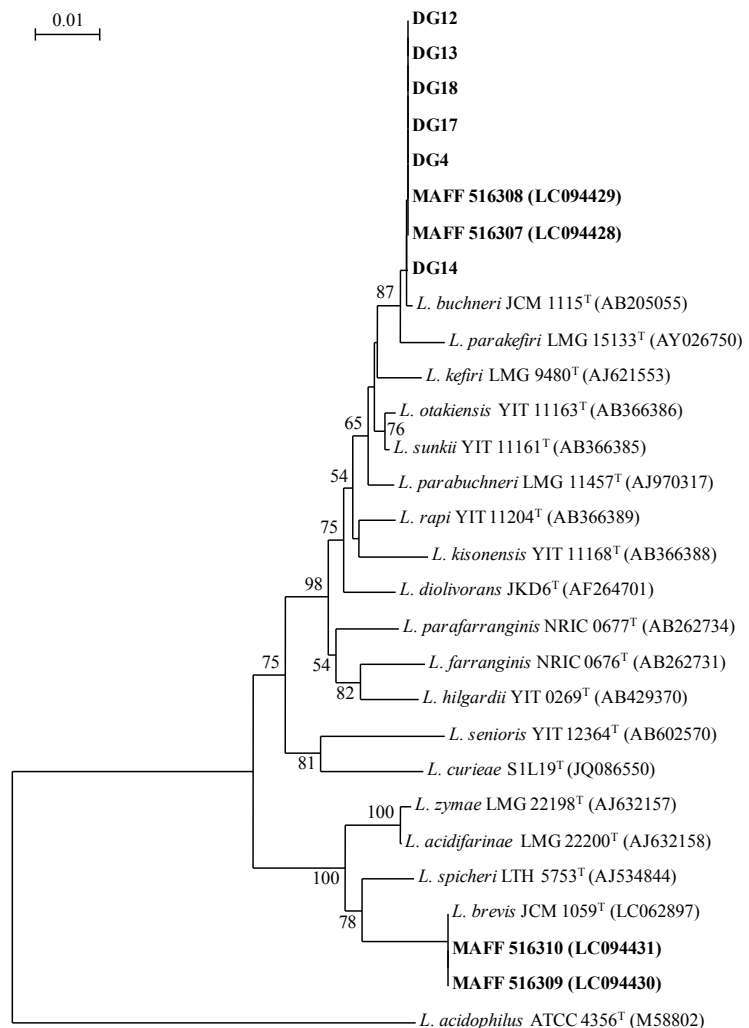


図1. 大豆SGSから分離した乳酸菌の16S rDNA 遺伝子配列に基づく系統樹解析

Kimura two-parameterモデルと近隣結合法による16S rDNA遺伝子配列を指標とした大豆SGS由来分離株 (太字) と既知の*Lactobacillus*属近縁種により系統樹を作成した。括弧内にGenBank/EMBL/DDBJアクセスナンバーを示す。数値はそれぞれ、近隣結合法で算出された1,000反復のブートストラップ値を示す。

であり、16S rRNA 遺伝子配列類似性は 100%一致した (図 1)。

### 3) 分離乳酸菌の糖資化性

表 1 に供試 11 菌株の糖資化性試験結果を示した。 *L. buchneri* と同定された 9 菌株において、D-xylose, methyl- $\beta$ -D-xylopyranoside 及び D-turanose の資化性に菌株間の違いが認められた。 *L. buchneri* 分離株と *L. brevis* 分離株との比較により、 *L. buchneri* 分離株においてのみ N-acetyl-glucosamine, salicin 及び 2-keto-gluconate が陰性であった一方、 methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, D-lactose, D-sucrose, D-melezitose 及び D-raffinose が陽性であった。

### 4. 考察

開封後に 1 ヶ月以上好氣的放置したにも拘わらず、顕著なカビ汚染や二次発酵が認められなかった大豆 SGS より乳酸菌を分離することにより、本大豆 SGS における乳酸菌叢への理解と有用分離乳酸菌株の今後の活用の可能性を検討した。供試大豆 SGS は、有害微生物の活性阻害を伴う良質牧草サイレージの基準となる pH 値 4.2 (McDonald, 1991) よりやや高値であったものの、一定量の乳酸及び酢酸が認められたことから、発酵過程により生産された有機酸が十分に残存していることが示唆された。しかしながら、乳酸や酢酸含量が 1.0%未満の比較的低量であったことから、有機酸による有害微生物阻害効果のみならず、発酵過程に生成された他の抗菌性化合物の関与も十分に考えられた。微生物解析により、 $10^8$  (コロニー形成単位/新鮮物 g) オーダーの多数の乳酸菌が認め

表1. 大豆SGSからの乳酸菌分離株の糖資化性

	<i>Lactobacillus buchneri</i>									<i>Lactobacillus brevis</i>	
	MAFF 516307	MAFF 516308	DG4	DG12	DG13	DG14	DG17	DG18	DG23	MAFF 516309	MAFF 5163010
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Methyl- $\beta$ -D-xylopyranoside	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
N-Acetyl-glucosamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Esculin ferric citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
D-Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
D-Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
D-Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
D-Turanose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Gluconate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-Keto-gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
5-Keto-gluconate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+, 陽性; -, 陰性. すべての供試菌株において, glycerol, erythritol, D-arabinose, L-xylose, D-adonitol, D-mannose, L-sorbose, L-rhamnose, dulcitol, inositol, D-mannitol, D-sorbitol, methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside, amygdalin, arbutin, D-cellobiose, D-trehalose, inulin, starch, glycogen, xylitol, gentiobiose, D-tagatose, D-fucose, L-fucose, D-arabitol, L-arabitolの資化性は認められなかった。

られた一方で、好気的変敗の一原因微生物と考えられる酵母は、 $10^6$  オーダーの低値を示した。また、カビ、大腸菌群及びクロストリジア等の有害微生物は認められず、外観上の微生物学的腐敗や異臭も感知されなかった。以上のことから、本大豆 SGS が開封後も良質な品質を維持していたと考えられる。

分離された乳酸菌の同定と系統学的分類の結果、分離株は *L. buchneri* と *L. brevis* であることが明らかとなった。これらの *Lactobacillus* 属乳酸菌は、使用した市販飼料添加用乳酸菌製剤には含まれない菌種であり、供試した大豆穀実に寄生した「大豆由来」の乳酸菌であると考えられる。

イタリアンライグラスサイレージへの *L. brevis* 供試株の単独添加により、発酵促進効果と好気的変敗抑制効果が認められたが、コーンサイレージへの添加には同有益効果は認められなかったと報告されている (Li et al., 2016)。サトウキビサイレージへの *L. brevis* DSM 23231 株の添加により、無添加区と比べて開封後の変敗が悪化する傾向が認められている (Daniel et al., 2016)。一方、*L. buchneri* の複数の菌株は、コーンサイレージの発酵品質を促進するのみならず、開封後の好気的変敗を抑制することが知られている (Danner et al., 2003 ; Tabacco et al., 2011)。*L. buchneri* はサイレージ発酵スターターとして活用例も多く、カビ発生制御や好気的変敗防止を含むサイレージ品質維持における有益効果が総説として取り纏められている (Holzer et al., 2003)。大豆 SGS に対する *L. buchneri* の添加効果に関する検証例はなく、上述した他のサイレージ素材における知見を一概に引用することは難しいものの、本大豆 SGS に認められた発酵品質維持効果は、*L. buchneri* によるものである可能性が強く示唆される。さらに、市販飼料添加用乳酸菌製剤を添加しても、本供試サンプルにおける開封後の優れた品質維持効果が認められない例もあることから (データ未掲載)、良質な発酵品質の維持効果は、供試大豆に本来付着する *L. buchneri* 等の優れた有益機能を有する乳酸菌の初発菌数や微生物活性といった不安定要素に影響を受けることが想定される。

大豆穀実には約 12% の可溶性炭水化物が含まれており、主に sucrose, raffinose 及び stachyose が含まれていると報告されている (Hagely et al., 2013)。本研究で得られた供試株のうち、*L. buchneri* においてのみ sucrose と raffinose の資化能が認められたことから、大豆 SGS 発酵過程において本菌種分離株が有利に発酵に関与したことが示唆される。*L. buchneri* における sucrose と raffinose 資化性は同種異株で異なることが知られており、11–89% の *L. buchneri* の菌株が陽性であるとされ (Hammes et al., 2009)、極めて多様性に富んでいる。すなわち、本研究における *L. buchneri* 分離株の両糖質の資化性は 100% 認められたが、本特徴は *L. buchneri* において必ずしも認められるものではないことから、分離株が大豆 SGS の発酵に関与できる特徴的な *L. buchneri* であると考えられる。これらの分離株の糖資化性プロファイルと大豆由来可溶性炭水化物の関連を基礎として、より最適な大豆 SGS 発酵に貢献するサイレージ用乳酸菌添加剤の選択・提案に繋がるものと考えられる。

本研究により、優れた発酵品質を維持した大豆 SGS より、今後添加剤として有効活用が期待できる複数の乳酸菌株を分離することに成功した。これらの分離乳酸菌株や同効果を期待できる乳酸菌株を大豆 SGS に添加し、予め高活性かつ高濃度の菌数によって発酵を促進させることにより、国産自給飼料としての大豆 SGS の安定的な調製・貯蔵・流通が可能となると期待できる。

## 5. 謝辞

大豆栽培及び大豆 SGS 調製・貯蔵試験は、東北農業研究センターの河本英憲氏・嶺野英子氏らの研究グループにより実施され、同 SGS に含まれる有用乳酸菌の分離を共同研究として実施した。ここに記して深謝の意を表する。

## 6. 参考文献

- Daniel, J.L.P., Checchi, M., Zwieler, J., Junges, D., Fernandes, J. and Nussio, L.G. (2015). The effects of *Lactobacillus kefir* and *L. brevis* on the fermentation and aerobic stability of sugarcane silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 205:69–74.
- Danner, H., Holzer, M., Mayrhuber, E. and Braun, R. (2003). Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:562–567.
- Hagely, K.B., Palmquist, D. and Bilyeu, K.D. (2013). Classification of distinct seed carbohydrate profiles in soybean. *J. Agric. Food Chem.* 61:1105–1111.
- Hammes, W.P. and Hertel, C. (2009). Genus I. *Lactobacillus*, In W. Ludwig, K. H. Schleifer and W.B. Whitman (ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed., vol. 3. pp.465–511. Springer, New York, NY.
- Holzer, M., Mayrhuber, E., Danner, H. and Braun, R. (2003). The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends Biotechnol.* 21:282–287.
- 河本英憲・増田隆晴 (2011). くず大豆のサイレージ発酵品質と発酵に伴うタンパク画分の変化. *日草誌* 57 (別) :177.
- Li, Y., Wang, F. and Nishino, N. (2016). Lactic acid bacteria in total mixed ration silage containing soybean curd residue: their isolation, identification and ability to inhibit aerobic deterioration. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 29:516–522.
- McDonald, P., Henderson, N. and Heron, S. (1991). *The biochemistry of silage*, Second edition, Chalcombe Publications, Bucks, pp.12, 84-85, 108–111, 167.
- Suzuki, K., Sasaki, J., Uramoto, M., Nakase, T. and Komagata, K. (1996). *Agromyces mediolanus* sp. nov., nom. rev., comb. nov., a species for "*Corynebacterium mediolanum*" Mamoli 1939 and for some aniline-assimilating bacteria which contain 2,4-diaminobutyric acid in the cell wall peptidoglycan. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:88–93.
- Tabacco, E., Piano, S., Revello-Chion, A. and Borreani, G. (2011). Effect of *Lactobacillus buchneri* LN4637 and *Lactobacillus buchneri* LN40177 on the aerobic stability, fermentation products, and microbial populations of corn silage under farm conditions. *J. Dairy Sci.* 94:5589–5598.
- Tohno, M., Kobayashi, H., Tajima, K. and Uegaki, R. (2012). Strain-dependent effects of inoculation of *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* on fermentation quality of paddy rice (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*) silage. *FEMS Microbiol. Lett.* 337:112–119.



- Tohno, M., Kitahara, M., Inoue, H., Uegaki, R., Irisawa, T., Ohkuma, M. and Tajima, K. (2013). *Weissella oryzae* sp. nov., isolated from fermented rice grains. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63:1417–1420.
- Tohno, M., Kitahara, M., Matsuyama, S., Kimura, K., Ohkuma, M. and Tajima, K. (2014). *Aerococcus vaginalis* sp. nov., isolated from the vaginal mucosa of a beef cow, and emended descriptions of *Aerococcus suis*, *Aerococcus viridans*, *Aerococcus urinaeequi*, *Aerococcus urinaehominis*, *Aerococcus urinae*, *Aerococcus christensenii* and *Aerococcus sanguinicola*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64:1229–1236.
- Tohno, M., Kitahara, M., Irisawa, T., Ohmori, H., Masuda, T., Ohkuma, M. and Tajima, K. (2015). *Lactobacillus mixtipabuli* sp. nov. isolated from total mixed ration silage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65:1981–1985.

# 根圏細菌 SB-K88 株がコムギ縞萎縮病媒介者 *Polymyxa graminis* のコムギへの感染に及ぼす影響

佐山 充<sup>a)</sup>・大木 健広

農研機構 北海道農業研究センター

[〒062-8555 北海道札幌市豊平区羊ヶ丘 1]

## Effect of a strain of rhizobacteria SB-K88 for the infection of *Polymyxa graminis* as a vector of yellow mosaic on wheat

Mitsuru SAYAMA<sup>a)</sup> and Takehiro OHKI

Hokkaido agricultural research center, NARO

### 1. 目的

コムギ縞萎縮病は *Wheat yellow mosaic virus* (WYMV) によって生じるウイルス病で、ネコブカビ科に属する絶対寄生性の *Polymyxa graminis* が媒介する土壤伝染性病害である (Usugi et al., 1989). 本病は全国的に発生しておりコムギの収量が減少するが (御子柴ら, 1988), 北海道内でも感受性品種の栽培面積増加により発生が増加している (堀田ら, 2011). 現在の主力品種には抵抗性品種はなく, 防除薬剤はクロルピクリンや D-D 剤など土壌処理剤の効果が認められているが (斉藤ら, 1964), 環境にかかる負荷や経済性により一般圃場での利用は困難とされている (西尾ら, 2014). そのため著者らは, コムギ縞萎縮病の生物防除法の開発を目的として, 媒介微生物である *P. graminis* の感染を抑制する可能性がある根圏細菌の施用法と培養法の検討を室内試験で行ったので報告する. なお, 本成果の一部はすでに原著論文で発表している (佐山・大木, 2014).

### 2. 材料および方法

#### 1) 供試菌株

テンサイの細根から分離された農研機構北海道農業研究センターの保存菌株である SB-K88 株 (MAFF 140101) (佐山ら, 1994) を用いた. 本菌株は, *Lysobacter* 属細菌であり (Islam, 2010), テンサイそう根病の病原ウイルスを媒介する *Polymyxa betae* の感染や *Pythium* 属菌と *Rhizoctonia solani* によるテンサイ苗立枯病の発病を抑制することがすでに明らかになっている

---

a) (現所属) 農研機構 北海道農業研究センター Hokkaido Agricultural Research Center, NARO

[〒082-0081 北海道河西郡芽室町新生南 9 線 4]

(本間ら, 1993; 佐山ら, 1994).

## 2) コムギの栽培方法

試験管育苗法(阿部・玉田, 1987)を一部改変した砂耕または土耕栽培を行った。砂耕栽培の場合は、底部に穴の開いた直径25mmのガラス管に20~30メッシュの石英砂を詰め、1本にコムギ種子1粒を約1cmの深さに播種し、一部改変したHoagland and Arnon液(浅川, 1985)を毎日5ml灌水した。土耕栽培の場合は、2mmのふるいを通した圃場土と育苗用培土を3:7に混合したものを詰め1cmの深さに播種した。播種後、出芽までは16°Cの暗黒の定温室に置き、出芽後は11°Cに設定された陽光定温器内で合計2ヶ月間栽培した。コムギは、品種「ホクシン」、または「きたほなみ」を使用した。

## 3) *Polymyxa graminis* の接種方法

接種源は、北海道伊達市または夕張郡長沼町の本病発生圃場から採取した土壌で栽培したコムギ根から分離し、コムギ根により継代している菌株を用いた。感染コムギ根をFujisawa and Sugimoto (1976)の方法に準じて、磨砕、ふるいによる濾過、遠心分離による洗浄濃縮を行い、休眠孢子塊懸濁液を作成した。試験管育苗法のコムギ苗1本に対して、土耕の場合は $7 \times 10^3$ 個の休眠孢子塊を含む懸濁液を、砂耕の場合は $3.5 \sim 7.0 \times 10^2$ 個を含む懸濁液を播種時に種子の下に灌注接種した。

## 4) 評価方法

播種2ヶ月後に根を回収し、*P. graminis*の感染根率によって評価した。感染根率は、佐山・本間(1993)に準じた以下の方法によって調査した。1個体ごとに水洗したコムギの根を2mm程度に切り、ビーカー内の水中で良く攪拌した。この根の一部を取り、ラクトグリセロールで固定したのち100片を検鏡し、*P. graminis*の感染の有無を調べ、感染した根の断片の割合を感染根率とした。

## 5) 異なる処理方法によるSB-K88株の*P. graminis*感染抑制効果の比較

### (1) 灌注処理(土耕栽培)

凍結保存されたSB-K88株をミクロスパーテルで1さじかき取り、これを100ml容のフラスコに入れたブドウ糖加用ジャガイモ煎汁液体培地(PDB培地, Difco社)に接種し、25°C, 120rpmで9日間振とう培養した。培養液または培養液を遠心分離して得た上澄み液又は処理液の蒸留水による1/10希釈液を、播種時に覆土した土壌の上から6mlずつ灌注処理した。検定は、1処理につき5個体を供試した。以下のすべての処理を含め、細菌懸濁液の細菌密度は、King's B寒天培地を用いた希釈平板法によって測定した。

### (2) 担体覆土処理(土耕栽培)

SB-K88株をKing's B液体培地(KB液体培地)で灌注処理と同様の条件で3および5日、PDB培地で7または12日間振とう培養後、担体として用いたバーミキュライトと混合し、通風乾燥機で乾燥させることによって吸着させた。SB-K88株が吸着したバーミキュライトを栽培用の混合土

壤に 20%または 40%の割合で混合し、種子の上に 1cm の厚さに覆土した。処理は、培地と培養日数、土壌へのバーミキュライトの混合割合を組み合わせ、培地・日数・混合割合で本文と表中に示した。無処理は 4 個体、その他の処理は 3 個体を用いた。対照区には無処理のほかに、無処理のバーミキュライトを 40%混合した「バーミキュライト 40%のみ」区を設けた。バーミキュライトに付着した細菌数は、バーミキュライト 1ml を 20ml の滅菌蒸留水を入れた 100ml 容のフラスコに入れ、120rpm で 30 分間振とう後 10 秒間静置し、上澄み液を用いて測定した。

### (3) 種子コーティング処理

#### a) 砂耕栽培

KB 液体培地で 3 日間、又は PDB 培地で 7 日間培養した SB-K88 株の培養液を用いた。各培養液に 2 時間浸漬処理した種子を砂耕栽培した。各処理とも 5 個体を用いた。

#### b) 土耕栽培

SB-K88 株を PDB 培地で 3, 5, 7, 9 日間培養し、それぞれの培養液で 2 時間浸漬処理した種子を播種し土耕栽培した。処理ごとに 3 個体用いた。種子に付着した細菌数は、処理した種子を滅菌水入り試験管中で 30 秒間攪拌し、得られた細菌懸濁液を用いて測定した。

## 3. 結果

### 1) 灌注処理（土耕栽培）による感染抑制効果

培養後の細菌密度は、 $4.1 \times 10^9$  cfu/ml であった。*P. graminis* の感染根率は、無処理が 12.4%に対して PDB 培養液、PDB 培養上澄み液処理ともに 0.0%となり、灌注処理した根部では *P. graminis* は観察されなかった（表 1）。一方、1/10 濃度の培養液処理の感染根率は 7.2%、1/10 濃度の培養上澄み液処理は 5.0%で、無処理と有意な差はなかった。

表 1. 根圏細菌 SB-K88 株 PDB 培養液の灌注処理による *P. graminis* 感染抑制効果（土耕栽培）

処理区	感染根率	標準誤差
蒸留水	12.4	3.25
PDB	20.4	2.80
PDB 培養液	0.0	0.00 * <sup>1)</sup>
PDB 培養液 1/10 濃度	7.2	1.83
PDB 培養液上澄み液	0.0	0.00 *
PDB 培養液上澄み液 1/10 濃度	5.0	2.43

1) \* は、Tukey の多重比較により、5% 水準で無処理との間に有意な差があることを示す。

### 2) 担体覆土処理（土耕栽培）による感染抑制効果

担体 1ml に付着した細菌数は、KB 培地 3 日間培養が  $8.5 \times 10^9$  cfu、5 日間培養は  $10^6$  cfu 以下、PDB 培地 7 日間培養が  $3.5 \times 10^9$  cfu、12 日間培養が  $4.5 \times 10^9$  cfu であった。*P. graminis* の感染根率は、無処理が 11.0%、バーミキュライト 40%のみの覆土が 16.0%であった。無処理に対して有意に感染根率が低かったのは、PDB・7 日・40%で 2.0%だった。バーミキュライト 40%のみに対して有意に感染根率が低くなったのは、PDB・7 日・20% (3.3%)、KB・5 日・20% (5.7%)、PDB・

7日・40% (2.0%), PDB・12日・40% (4.0%) であった (表2).

表2. 根圏細菌SB-K88の担体覆土処理による*P. graminis* 感染抑制効果 (土耕栽培)

### 3) 種子処理による感染抑制効果

#### (1) 砂耕栽培

処理に使用した KB 液体培地の細菌密度は 1ml 当たり  $5.1 \times 10^9$ cfu, PDB 培地の細菌密度は  $3.4 \times 10^8$ cfu であった. 蒸留水処理の感染根率が 32.4% に対して, KB 液体培養液処理では 25.2% で効果が無かったが, PDB 培養液処理では 0.0% で有意に感染根率が低くなり, 効果が認められた (表3).

#### (2) 土耕栽培

種子 1 粒に付着した細菌数は,  $1.7 \times 10^6 \sim 9.3 \times 10^6$ cfu であった. 蒸留水処理の感染根率が 25.3% に対して PDB 培養液処理区は 16.7~34.3% となり, 培養液処理による感染抑制効果は, どの培養日数でも認められなかった (表4).

培地・培養日数・混合割合	感染根率	標準誤差	対無処理	対パーミキュライト
無処理	11.0	1.47		
パーミキュライト40%のみ	16.0	2.08		
PDB <sup>1)</sup> ・7日・20% <sup>2), 3)</sup>	3.3	1.86		* <sup>4)</sup>
PDB・12日・20%	7.0	1.73		
KB液体・3日・20%	10.0	2.89		
KB液体・5日・20%	5.7	2.19		*
PDB・7日・40%	2.0	1.53	*	*
PDB・12日・40%	4.0	1.00		*
KB液体・3日・40%	8.7	1.86		
KB液体・5日・40%	7.7	1.86		

1) PDB: ブドウ糖加用ジャガイモ煎汁液体培地, KB液体: King's B液体培地.

2) 表中でPDB・7日・20%は, PDB培地で7日間培養した細菌液を吸着させたパーミキュライトを覆土に20%の割合で混合した処理を示す.

3) PDB・7日・20%の付着細菌数は $3.5 \times 10^9$ cfu/ml, PDB・12日・20%は $4.5 \times 10^9$ cfu/ml, KB液体・3日・20%は $8.5 \times 10^9$ cfu/ml, KB液体・5日・20%は $10^6$ cfu/ml以下.

4) \*は, Tukeyの多重比較により, 5%水準で無処理あるいはパーミキュライトのみ処理との間に有意な差があることを示す.

## 4. 考察

本試験で供試したSB-K88株はテンサイ根圏から分離された細菌で, *P. betae* の感染を抑制することが明らかになっているが, 本試験からコムギに感染する *P. graminis* の感染も抑制することが示された. 土壌を用いた栽培では, 培養液の灌注処理とパーミキュライトを担体に用いた覆土処理で感染抑制効果が認められた. 灌注処理では, 培養液の上澄み液のみでも効果が認められた

表3. 異なる培地で培養した根圏細菌SB-K88株の種子処理による*P. graminis* 感染抑制効果 (砂耕栽培)

処理区	感染根率	標準誤差
蒸留水	32.4	2.31
King's B液体培養液	25.2	1.66
PDB培養液 <sup>1)</sup>	0.0	0.00 * <sup>2)</sup>

1) PDB培地: ブドウ糖加用ジャガイモ煎汁液体培地.

2) \*は, Tukeyの多重比較により, 5%水準で無処理との間に有意な差があることを示す.

ことから、抑制効果には本細菌の生産物が関与している可能性が考えられる。SB-K88 株は、テンサイ苗立枯病の発病抑制に関与していると考えられている抗生物質 xanthobaccin を産生することが知られている (Nakayama et al., 1999)。本物質の水溶液の種子処理によって砂耕栽培のコムギへの *P. graminis* の感染が抑制されたことから (データ未掲載)、*P. graminis* の感染に対しても影響を与えている可能性

がある。KB 培養液に比べて PDB 培養液の効果が高いが、これは PDB による培養が本物質の生産に適しているとされていることが関係している可能性がある。施用法の簡便さから最も実用性が高いと考えられる種子処理では、砂耕栽培では効果が認められたものの土耕栽培では認められなかった。これは拮抗作用に関与する物質が土壌中で吸着や分解されることにより、種子処理では施用量が不足した可能性がある。今後は、処理細菌の十分な施用量を確保するために、コーティング方法の改良などを試験する必要があると思われる。

## 5. 謝辞

北海道農業研究センターの中山尊登博士には、有益なご助言を賜った。ここに記して深謝の意を表す。

## 6. 参考文献

- 阿部秀夫・玉田哲男 (1987). *Polymyxa betae* Keskin (テンサイそう根病のウイルス媒介者) の簡易接種・増殖法. てん菜研究会報 29 : 34-38.
- 浅川征男 (1985). 最新作物生理実験法 (北條良夫・石塚潤爾編). pp.388-389, 農業技術協会, 東京.
- Fujisawa, I. and Sugimoto, T. (1976). Transmission of beet necrotic yellow vein virus by *Polymyxa betae*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 43: 583-586.
- 本間善久・内野浩克・神沢克一・中山尊登・佐山 充 (1993). 根圏細菌によるテンサイ苗立枯病の抑制と拮抗物質生産. 日植病報 59 : 282 (講要).
- 堀田治邦・竹内 徹・佐々木純・鈴木孝子・木口忠彦 (2011). 北海道におけるコムギ縮萎病の発生分布. 北日本病虫研報 62 : 47-49.
- Islam, T. (2010). Mode of antagonism of a biocontrol bacterium *Lysobacter* sp. SB-K88 toward a damping-off pathogen *Aphanomyces cochlioides*. World J. Microbiol. Biotechnol. 26:629-637.

表4. 異なる期間培養した根圏細菌SB-K88株の種子処理による *P. graminis* 感染抑制効果 (土耕栽培)

培養日数	感染根率	標準誤差	付着細菌数
蒸留水	25.3 <sup>1)</sup>	4.70	—
0	17.3	4.06	—
3	34.3	4.33	3.9×10 <sup>6</sup>
5	17.3	5.24	9.3×10 <sup>6</sup>
7	23.3	3.48	1.7×10 <sup>6</sup>
9	16.7	5.36	6.2×10 <sup>6</sup>

1) 処理間に有意差なし。

- 御子柴義郎・藤澤一郎・赤坂安盛・田野崎真吾 (1988). 岩手県内におけるコムギ萎縮病及びコムギ縞萎縮病の発生. 東北農業研究 41 : 143-144.
- Nakayama, T., Homma, Y., Hashidoko, Y., Mizutani, J. and Tahara, S. (1999). Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp. Strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease. Appl. Environ. Microbiol. 65: 4334-4339.
- 西尾善太 (2014). コムギ縞萎縮病抵抗性品種‘ゆめちから’の育成と抵抗性品種の由来. 植物防疫 68 : 134-137.
- 齊藤康夫・高梨和雄・岩田吉人・岡本 弘 (1964). 土壌伝染性ムギウイルス病に関する研究. I 薬剤処理が病土およびウイルスに及ぼす影響. 農技研報告 C17 : 41-60.
- 佐山 充・本間善久 (1993). テンサイ罹病細根および土壌からの *Polymyxa betae* の休眠胞子塊の検出評価および部分純化法. 北日本病虫研報 44 : 24-27.
- 佐山 充・内野浩克・神沢克一・本間善久 (1994). 根圏細菌のバクテリゼーションによるテンサイそう根病の抑制. てん菜研究会報 36 : 202-209.
- 佐山 充・大木健広 (2014). コムギ縞萎縮ウイルス媒介者 *Polymyxa graminis* の感染を抑制する根圏細菌の選抜. 北日本病虫研報 65 : 19-23.
- Usugi, T., Kashiwazaki, S., Omura, T. and Tsuchizaki, T. (1989). Some properties of nucleic acids and coat proteins of soil-borne filamentous viruses. Ann. Phytopath. Soc. Japan 55:26-31.

# レタスビッグベイン病を媒介する *Olpidium virulentus*

野見山 孝司<sup>a)</sup>

農研機構 近畿中国四国農業研究センター  
[〒721-8514 広島県福山市西深津町 6-12-1]

## *Olpidium virulentus*, the vector of lettuce big-vein disease

Koji NOMIYAMA<sup>a)</sup>

Western Region Agricultural Research Center, NARO

### 1. 背景・目的

レタスビッグベイン病は土壌伝染性の難防除ウイルス病害である。本病に罹病したレタス (*Lactuca sativa* L.) は、葉脈周辺が白く退色して葉脈が太くなったように見えるために商品価値が減少するばかりでなく、被害程度がひどい場合には生育不良を引き起こす (図 1)。本病はアメリカで 1934 年に発生が報告され、日本では 1970 年代初頭に和歌山県で初めて確認された (Jagger & Chandler, 1934; 岩木ら, 1978)。冬春レタスの主産地である瀬戸内地域においては



図 1. ビッグベイン病が発病したレタス。

野見山 (2013) より転載。

90 年代以降被害が拡大しており、現在も留意しなければならない重要な土壌病害である (岩本・相野, 2010)。

レタスビッグベイン病の病原ウイルスは土壌に生息する *Olpidium virulentus* (Sahtiy.) Karling によってのみ媒介される。本菌はツボカビ門—ツボカビ綱—フクロカビ目—フクロカビ科に属する絶対寄生菌で、遊走子のう、休眠孢子および遊走子を形成する (図 2a-c)。病原ウイルスを保毒する *O. virulentus* 汚染圃場にレタスが定植されると、土壌中の休眠孢子内に遊走子が分化して放出され、これが最初の伝染源として根に感染する。感染した遊走子は根内で遊走子のうや休眠孢子となり、これらからさらに大量の遊走子が分化し増殖を繰り返す生活環を有する。一つの遊走子が感染・分化した場合には遊走子のうが、二つの遊走子が接合して感染・分化した場合には休眠孢子が形成

a) (現所属) 農研機構 西日本農業研究センター Western Region Agricultural Research Center, NARO  
[〒721-8514 広島県福山市西深津町 6-12-1]



されると考えられている。菌の感染・増殖は根でしか起きず、葉や茎など地上部へは移行しない。耐久器官の休眠孢子は宿主植物体が枯死しても土壤中に存在し、次の感染源となる。以前は、*O. virulentus* は *Olpidium brassicae* (Woronin) P.A. Dang. のレタス系統であるとみなされていたが (Tomlinson and Garrett, 1964), 宿主範囲, 形態的特徴, 性の分化ならびに rDNA-ITS 領域の塩基配列の比較に基づき *O. brassicae* とは別種として分けられた (小金澤ら, 2004; Koganezawa et al., 2005; Sahtiyanci, 1962; Sasaya and Koganezawa, 2006). 血清学的特性も両種では異なる (野見山, 2013).

レタスビッグベイン病の関連ウイルスとして、当該症状を引き起こすレタスビッグベインミラフィオリウイルス (*Mirafiori lettuce big-vein virus*, MiLBVV) および罹病株から高頻度に検出されるものの機能未知なレタスビッグベイン随伴ウイルス (*Lettuce big-vein associated virus*, LBVaV) の 2 種が知られている (Kuwata et al., 1983; Roggero et al., 2000; Lot et al., 2002). いずれのウイルスも *O. virulentus* の菌体内に存在しており、遊走子が植物根に侵入する際に感染すると考えられる (Campbell, 1962). これらのウイルスは休眠孢子内で 20 年近く活性が保持されることから、一度発生すると根絶することは困難である (Campbell, 1985). *Olpidium virulentus* 自体は植物に対する病原性はないものの、多種類の植物に寄生する菌であり、MiLBVV や LBVaV 以外にも、チューリップ微斑モザイクウイルス、チューリップ条斑ウイルス、タバコえそ D ウイルスなどの複数種の病原ウイルスを媒介する (小金澤, 2005).

このように *O. virulentus* はウイルス媒介菌としてかねてより広く知られている重要な菌であるが、絶対寄生性で人工培養できないことが研究推進上の難点であり、ジーンバンクにおいてもこれまでに登録はなかった。今回、日本各地のレタスビッグベイン病発生圃場から、MiLBVV と LBVaV の媒介能を有する *O. virulentus* を探索・収集し、ジーンバンク登録したので、ここに報告する。

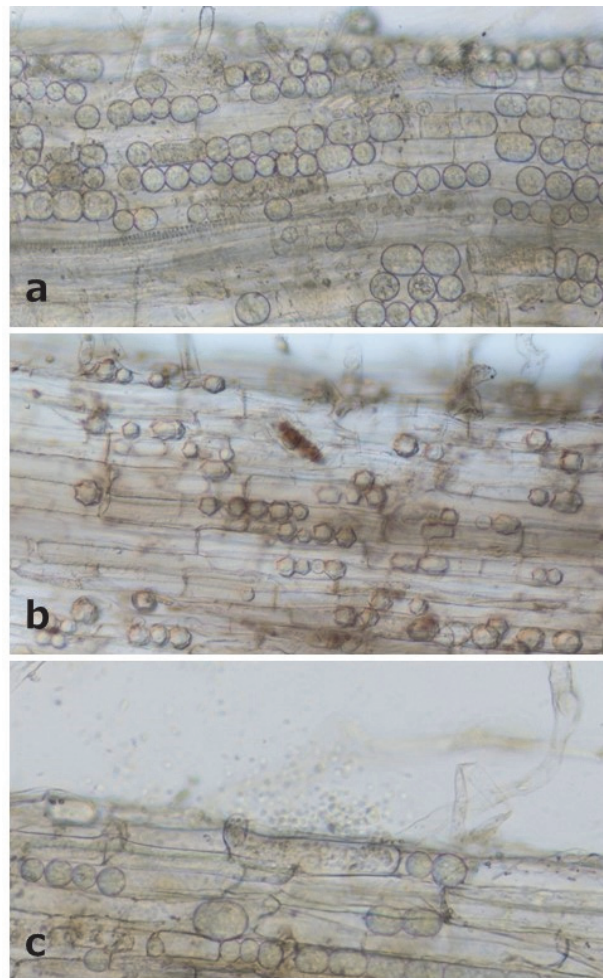


図 2. *Olpidium virulentus* の形態.

a. 遊走子のう (球形または楕円形: 20–200  $\mu\text{m}$ , 内部に遊走子を多数形成); b. 休眠孢子 (球形または楕円形: 20–30  $\mu\text{m}$ , 星形の中膜を有する三膜構造); c. 遊走子のうから放出される遊走子 (球形: 2–4  $\mu\text{m}$ , 1本の尾形べん毛で遊泳). 野見山 (2013) より転載.

## 2. 材料および方法

### 1) 分離源の土壌

2003年から2004年にかけてレタスビッグベイン病の発病が確認された5地域（香川県観音寺市、兵庫県南あわじ市、徳島県阿波市、岡山県岡山市および千葉県館山市）のレタス圃場より土壌を採取した。また、2006年には、本病の発病が認められていない当センター内のハダカムギ圃場（香川県善通寺市）からも土壌を採取した。

### 2) 単遊走子の分離

300 g用イチゴパックに滅菌海砂（水洗により脱塩済み）を詰め、レタス（品種；シスコ（タキイ種苗）、以下同じ）を約3週間育苗（5株/パック）し、採取した土壌（生土）15–20 gを株元に接種した。接種約3週間後に細根2–3 cmを掘り上げて、水洗して砂や土壌を洗い落とし、顕微鏡下（倍率200倍）で*O. virulentus*の寄生を確認した。遊走子のうがまばらに形成された部位を探し出し、実体顕微鏡下で両刃カミソリを用いて、遊走子が詰まった遊走子のうが1個だけの領域約0.5 mmを切り出した。さらに位置を変えて顕微鏡下で他の遊走子のうが存在しないことを確認した後、ピンセットでつまみとり、滅菌海砂を詰めた50 mLコニカルチューブで栽培した播種1–2週後のレタス苗の地際部に滅菌水で洗い落としとして接種した。遊走子のうから放出された遊走子が根に遊泳して感染しやすいように接種時には砂表面まで灌水した。接種約2週間後に細根を掘り上げて、*O. virulentus*の感染を確認し、単遊走子のう分離株とした。一連の栽培は人工気象器内（20°C、明期10時間、暗期14時間）で行い、灌水には水道水を用いた。砂で栽培することにより根から簡単に砂粒子を洗い落とすことができ、顕微鏡観察での確認が容易になる。単遊走子のう分離に関してはLin et al. (1970)の文献も参考になる。

### 3) ウイルス媒介能の評価

MiLBVVおよびLBVaVを保毒していない単遊走子のう分離株を、根に*O. virulentus*は寄生しておらず、ウイルスのみ感染した挿し芽レタスに接種することにより、ウイルス媒介能を評価した（夏秋ら、2002）。両ウイルス汚染土壌で40–50日間栽培して発病が確認されたレタスの地際部を片刃カミソリで切断し、若葉3枚程度残して外葉をはぎ取り、切り口からの白濁液を流水中で洗い落とす。この挿し穂を水道水を満たした15 mLコニカルチューブに挿して約2週間発根させることにより、根に*O. virulentus*がないウイルス感染レタスを調製した。挿し芽レタスを滅菌海砂に定植し、さらに約2週間栽培して十分発根させた後、単遊走子のう分離株を接種して約1か月間栽培した。根を掘り上げて水道水に約15分間浸漬して遊走子を放出させ、滅菌海砂（滅菌土も可）で育苗した検定用のレタスに接種した。接種後40–50日間栽培したレタスの若葉からRNAを抽出し、RT-PCRによりウイルス感染の有無を確認した。

## 3. 結果

単遊走子のう分離に当たっては、土壌を接種してから2週目では遊走子のうの形成が不十分で見

つけにくく、4週目では多く感染しすぎて単分離しにくかったため、好適な3週目に行った。単遊走子のう分離株の獲得効率は20–40%であった。得られた単遊走子のう分離株から、レタスに接種してもMiLBVVおよびLBVaVのどちらも検出されない(感染しない)ウイルスフリーの10株を選抜した。ウイルス媒介能を評価した結果、これらはいず

表1. ジーンバンク登録した *Olpidium virulentus* とそのウイルス媒介能

MAFF 番号	株名	採取地	ウイルス媒介能	
			MiLBVV	LBVaV
150501	AW-1	兵庫県南あわじ市	+(有)	+
150502	CH-1	千葉県館山市	+	+
150503	OK-1	岡山県岡山市	+	+
150504	TK-1	徳島県阿波市	+	+
150505	TY-1	香川県観音寺市	+	+
150506	AW-2	兵庫県南あわじ市	+	+
150507	CH-2	千葉県館山市	+	+
150508	TK-3	徳島県阿波市	+	+
150509	TY-2	香川県観音寺市	+	+
150510	ZN-1	香川県善通寺市	+	+

れもMiLBVVとLBVaVを媒介することを確認し、ジーンバンクに登録した(表1)。なお、各株は、休眠孢子が多数形成された植物根を掘り上げて風乾し、紙に包んでポリ袋に入れた状態で4℃下に保管することにより数年間は保存可能で、この乾燥根少量(約2cm)を株元に覆土接種することで復元できる。*Olpidium*属菌の基本的取り扱いについては守川(2005)の文献を参照されたい。

#### 4. 考察

MiLBVV および LBVaV のどちらも保毒していない今回のジーンバンク登録株はいずれも両ウイルスの媒介能を有していることが確認された。レタス圃場土からレタスを用いて取得した9株(ZN-1以外)は、そもそも両ウイルスとの親和性ならびに両ウイルスの媒介性が高いものとして選抜されたと考えられる。*Olpidium virulentus*は多種類の植物に寄生することから(Koganezawa et al., 2005)、栽培植物が異なる土壌を分離源としたり、分離に供試する植物を変えたりすることによって、ウイルス媒介能の異なる菌株を分離できる可能性がある。今後の探索ではこの点も考慮して進めていきたい。

#### 5. 謝辞

兵庫県立農林水産技術総合センターの西口真嗣氏、小林尚司博士、徳島県立農林水産総合技術支援センターの米本謙悟氏、岡山県農林水産総合センターの桐野菜美子氏、松岡静江氏、千葉県農林総合研究センターの海老原克介氏には現地の調査・土壌採取にご協力頂いた。ここに記して深謝の意を表す。

#### 6. 参考文献

- Campbell, R.N. (1962). Relationship between the Lettuce big-vein virus and its vector, *Olpidium brassicae*. *Nature* 195: 675–677.
- Campbell, R.N. (1985). Longevity of *Olpidium brassicae* in air-dry soil and persistence of the

- lettuce big-vein agent. Can. J. Bot. 63: 2288–2289.
- 岩木満朗・中野昭信・家村浩海・栃原比呂志 (1978). わが国におけるレタスビッグベイン病の発生とその土壌伝染. 日本植物病理学会報 44: 578–584.
- 岩本豊・相野公孝 (2010). レタスビッグベイン病の総合防除. 植物防疫 64: 229–234.
- Jagger, I.C. and Chandler, N. (1934). Big vein, a disease of lettuce. Phytopathology 24: 1253–1256.
- 小金澤碩城・高山智光・笹谷孝英 (2004). *Olpidium brassicae* sensu lato アブラナ科系統と非アブラナ科系統の休眠孢子形成の差異. 日本植物病理学会報 70: 307–313.
- 小金澤碩城 (2005). ウイルス媒介者としての *Olpidium* と *Polymyxa*. 植物防疫 59: 251–255.
- Koganezawa, H., Inoue, H. and Sasaya, T. (2005). Host specificity and multiplication of eight isolates of *Olpidium brassicae* sensu lato and its related *Olpidium* sp. Bull. Natl. Agric. Res. Cent. West. Reg. 4: 39–59.
- Kuwata, S., Kubo, S., Yamashita, S. and Doi, Y. (1983). Rod-shaped particles, a probable entity of lettuce big vein virus. Ann. Phytopath. Soc. Japan 49: 246–251.
- Lin, M.T., Campbell, R.N., Smith, P.R. and Temmink, J.H.M. (1970). Lettuce big-vein virus transmission by single-sporangium isolates of *Olpidium brassicae*. Phytopathology 60: 1630–1634.
- Lot, H., Campbell, R.N., Souche, S., Milne, R.G. and Roggero, P. (2002). Transmission by *Olpidium brassicae* of *Mirafiori lettuce virus* and *Lettuce big-vein virus*, and their roles in lettuce big-vein etiology. Phytopathology 92: 288–293.
- 守川俊幸 (2005). *Olpidium* 属菌の実験取り扱い方法. 植物防疫 59: 78–81.
- 夏秋啓子・守川俊幸・夏秋知英・奥田誠一 (2002). わが国のビッグベイン症状を示すレタスから検出された *Mirafiori lettuce virus*. 日本植物病理学会報 68: 309–312.
- 野見山孝司 (2013). レタスビッグベイン病の媒介菌オルピディウム菌の休眠孢子を認識するポリクローナル抗体の作製. 植物防疫 67: 379–382.
- Roggero, P., Ciuffo, M., Vaira, A.M., Accotto, G.P., Masenga, V. and Milne, R.G. (2000). An *Ophiovirus* isolated from lettuce with big-vein symptoms. Arch. Virol. 145: 2629–2642.
- Sahtiyanci, S. (1962). Studien über einige wurzelparasitäre Olpidiaceen. Arch. Mikrobiol. 41: 178–228.
- Sasaya, T. and Koganezawa, H. (2006). Molecular analysis and virus transmission tests place *Olpidium virulentus*, a vector of *Mirafiori lettuce big-vein virus* and tobacco stunt virus, as a distinct species rather than a strain of *Olpidium brassicae*. J. Gen. Plant Pathol. 72: 20–25.

## ステラ (バコパ) とニチニチソウの炭疽病菌

富岡 啓介<sup>a)</sup>

農研機構 近畿中国四国農業研究センター

[〒721-8514 広島県福山市西深津町 6-12-1]

### Pathogens of anthracnose of bacopa and Madagascar periwinkle

Keisuke TOMIOKA<sup>a)</sup>

Western Region Agricultural Research Center, NARO

#### 1. はじめに

農業生物資源ジーンバンク事業における微生物遺伝資源の充実と高度化を図る一環として、我が国における花卉類の生産・試験栽培現場で原因不明とされていた病害を調査し、病原の収集と特性評価を行った。本稿では、菌類病であることが判明した *Colletotrichum destructivum* 種複合体構成種によるステラ (バコパ) 炭疽病ならびに *Colletotrichum gloeosporioides* 種複合体構成種によるニチニチソウ炭疽病とそれら病原菌の調査結果を報告する。なお、本報告は、著者が第3期中期計画の前半に実施した農業生物資源研究所サブバンクの取組内容に基づく。

#### 2. 各病害の詳細

##### 1) ステラ (バコパ) 炭疽病菌 [病原菌株: MAFF 240195 文献: Tomioka et al. (2012)]

2007年1~2月、群馬県の温室で鉢植栽培中のステラ (バコパ) [*Sutera cordata* (Thunb.) Kuntze, ゴマノハグサ科] に斑点・葉枯性病害を認めた (Fig.1a–c)。葉に現れた暗褐色の斑点が徐々に拡大・融合し、周縁が暗褐色で中央部が淡褐色の病斑になる。病斑の多い葉は早期に乾燥して枯れ上がる。多湿条件で病斑には暗褐色の剛毛を有する分生子層が現れた (Fig.1d)。分離菌株 (代表株: MAFF 240195) は、PDA, 25°C, BLB 下で灰色の菌叢を形成し (Fig.1e)、病斑上と同様の分生子層と長径 200 μm 以下の黒色菌核を形成した (Fig.1f, g)。分生子は分生子柄先端のモノフィアライドから生じ、無色単細胞、表面平滑、円筒形ないし紡錘形で両端がやや尖り、大きさ 11.6~22.4×3.4~5.4 μm (Fig.1h)。PCA, 25°C, BLB 下で生じた付着器は灰褐色、棍棒形~不整形、大きさ 6.4~14.4×4.0~10.4 μm (Fig.1i)。分離菌株の rDNA-ITS (ITS1+5.8S+ITS2) 塩基配列 (AB458662) は、

---

a) (現所属) 農研機構 西日本農業研究センター Western Region Agricultural Research Center, NARO  
[〒721-8514 広島県福山市西深津町 6-12-1]

*Colletotrichum destructivum* O'Gara と同定されている既知の菌株と高い類似性があった [AB042302 (MAFF 305635: 99.3%), AB042303 (MAFF 238563: 99.3%), AB046609 (CBS 172.51: 98.6%), AB057435 (IFO 7384: 97.8%), AB057437 (IMI 103844: 97.8%), AB334521 (MAFF 239947: 99.3%), AB334522 (MAFF 239948: 98.9%), AB105958 (PC1: 99.6%), AB105959 (MAFF 238453: 99.6%), AB105960 (MAFF 238560: 99.4%), AB105961 (MAFF 410037: 99.2%), AB354932 (MAFF 240106: 97.6%), AF320562 (ATCC10921: 99.4%), AF320564 (N150: 99.0%)]. 以上より、今回の分離菌株を同菌種と同定した. 分離菌株の分生子懸濁液を健全なステラの葉の表面に噴霧接種した結果、原病徴が再現され、罹病部から接種菌が再分離されたことから、分離菌株のステラに対する病原性が立証された (Fig.1j-l). 本病を新病害としてステラ炭疽病 (anthracnose) と名付けた. 最近、6 遺伝子座 [rDNA-ITS, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH),  $\beta$ -tubulin-2 (TUB2), actin (ACT), histone H3 および chitin synthase 1] に基づく系統解析によって、*C. destructivum* は少なくとも 16 種から成る種複合体であることが示された (Damm et al., 2014). ステラ炭疽病菌 MAFF240195 は、rDNA-ITS, GAPDH, TUB2 および ACT の 4 遺伝子座に基づく系統解析によって、*C. destructivum* 種複合体構成種の *Colletotrichum tabacum* Böning の基準菌株と単系統となることが判明した (森脇ら, 2016). 今後、6 遺伝子座で再確認することとし、本報告では同菌株を *C. destructivum* 種複合体に属する菌種、と同定するに留めた.

## 2) ニチニチソウ炭疽病菌 [病原菌株: MAFF 240311, MAFF 240312 文献: Tomioka et al. (2013)]

2003年7月に静岡県で、また、2004年9月に沖縄県で露地栽培中のニチニチソウ [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don, キョウチクトウ科] に茎枯性病害を認めた (Fig.2a). 茎に現れた直径 5~10 mm の褐色斑の拡大・融合により罹病部が早期に乾枯し、上位葉が萎凋・脱落する. 多湿条件で病斑には分生子層が現れた (Fig.2b). 分離菌株 (代表株: 静岡県産 MAFF 240311, 沖縄県産 MAFF 240312) は、PDA, 25°C, BLB 下で灰白色の菌叢を形成し (Fig.2c), 病斑上と同様の分生子層を形成した. 分生子は分生子柄先端のモノフィアライドから生じ、無色単細胞、表面平滑、やや円筒形、大きさ 11.3~17.5 × 3.0~5.0  $\mu\text{m}$  (Fig.2d). PCA, 25°C, BLB 下で生じた付着器は褐色~暗灰褐色、類球~不整形、大きさ 7.0~13.0 × 5.5~9.5  $\mu\text{m}$  (Fig.2e). 両分離菌株の形態は、*Colletotrichum gloeosporioides* 種複合体に属する *Colletotrichum theobromicola* Delacroix とよく似ているが、rDNA-ITS と TUB2 の部分塩基配列 [rDNA-ITS: AB334524 (MAFF 240311) / AB334760 (MAFF 240312); TUB2: AB774150 (MAFF 240311) / AB774151 (MAFF 240312)] は、同じ種複合体に属する *Colletotrichum siamense* Prihastuti, L. Cai & K.D. Hyde あるいは *Colletotrichum tropicale* Rojas, Rehner & Samuels と高い類似性があった [*C. siamense* rDNA-ITS: JX010159 (C1254.6: 99.5% / 100%), JX010258 (C1316.6: 100% / 99.5%); *C. siamense* TUB2: JX010404 (C1315.2: 99.1% / 98.1%); *C. tropicale* rDNA-ITS: JX010275 (C1272.16: 99.8% / 99.3%); *C. tropicale* TUB2: JX010407 (5101: 98.4% / 100%)]. よって、分離菌株を、*C. gloeosporioides* 種複合体に属する菌種、と同定するに留めた. 分離菌株の分生子を含む PDA 菌叢を健全なニチニチソウの有傷茎に接種し

た結果、原病徴が再現され、罹病部から接種菌が再分離されたことから、分離菌株のニチニチソウに対する病原性が立証された (Fig.2f, g). 本病を新病害としてニチニチソウ炭疽病 (anthracnose) と名付けた.

### 3. おわりに

近年, *Colletotrichum* 属菌の分子系統解析による分類学的な再検討が進められている. 今回のニチニチソウ炭疽病菌株については, *C. gloeosporioides* 種複合体に属する菌種として, 今後, 分子系統解析を通じて改めて菌種を確認する必要がある. また, ステラ炭疽病菌株についても, 上記の通り *C. destructivum* 種複合体に属する菌種として, 今後, 同様に確認する必要がある.

### 4. 謝辞

本研究にあたっては, 小金澤碩城博士 (カネコ種苗株式会社), 佐藤豊三博士 (農研機構 遺伝資源センター), 寺沢祐一博士 (カネコ種苗株式会社), 西川盾士博士 (株式会社 サカタのタネ) ならびに森脇丈治博士 (農研機構 九州沖縄農業研究センター) に多大なご協力を賜った. ここに記して深謝の意を表する.

### 5. 文献

Damm, U., O'Connell, R.J., Groenewald, J.Z. and Crous, P.W. (2014). The *Colletotrichum destructivum* species complex – hemibiotrophic pathogens of forage and field crops. *Stud. Mycol.* 79: 49–84.

森脇丈治・下元祥史・富岡啓介・佐藤豊三 (2016). 複数遺伝子の塩基配列を結合した系統解析に基づくダイコン, ネメシア, ミツバ炭疽病菌等の分類学的再検討. *日本植物病理学会報* 82(3): 236.

Tomioka, K., Sato, T., Moriwaki, J., Terasawa, Y. and Koganezawa, H. (2012). Anthracnose of bacopa caused by *Colletotrichum destructivum*. *J. Gen. Plant Pathol.* 78: 133–135.

Tomioka, K., Nishikawa, J., Moriwaki, J. and Sato, T. (2013). Anthracnose of Madagascar periwinkle caused by species belonging to the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *J. Gen. Plant Pathol.* 79: 374–377.

※ 本稿の Tomioka et al. (2012, 2013) に係る写真等は, 日本植物病理学会と Springer Verlag 社の許可を得て転載した (<http://www.ppsj.org/journal-reprint.html>).

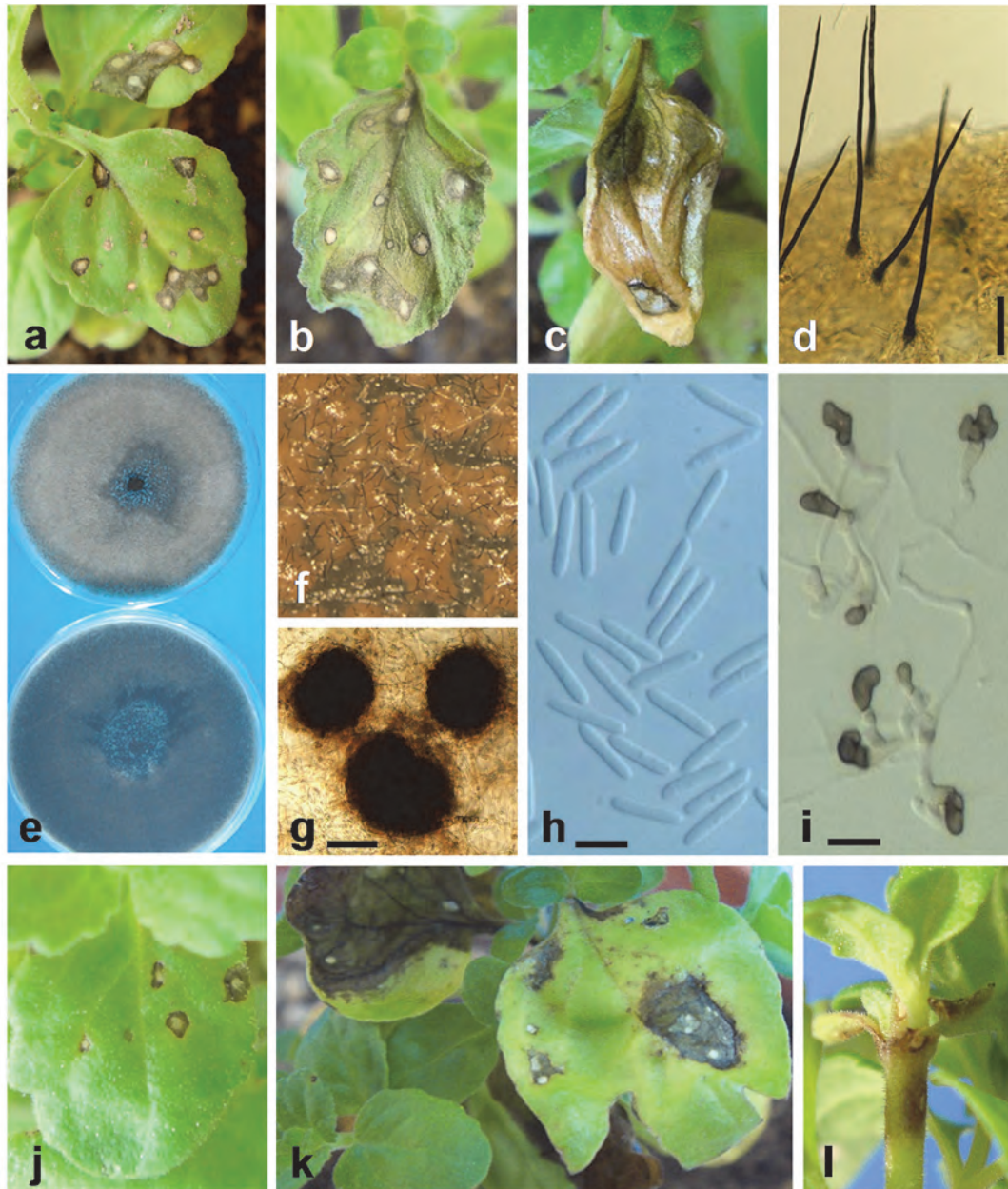


Fig. 1 Symptoms of anthracnose on bacopa and morphology of causal fungus, *Colletotrichum destructivum*.

a–c Natural symptoms, spotting and blight of leaves. d Acervuli with setae on a foliar lesion after natural infection (*bar* 40  $\mu\text{m}$ ). e–i Morphology of MAFF 240195. e Colonies grown on PDA at 25°C in the dark for 12 days (*upper* surface side, *lower* reverse side). f Conidial masses on colony grown on PDA at 25°C under black light for 12 days. g Sclerotia on colony grown on PDA at 25°C under black light for 12 days (*bar* 100  $\mu\text{m}$ ). h Conidia (*f*) (*bar* 10  $\mu\text{m}$ ). i Appressoria formed in slide culture on PCA at 25°C under black light for 7 days (*bar* 20  $\mu\text{m}$ ). j–l Reproduction of symptoms after inoculation with MAFF 240195. j Necrotic spots with dark brown margins on a leaf 7 days after inoculation. k Blighted leaves 10 days after inoculation. l Necrotic lesions on a stem 15 days after inoculation.



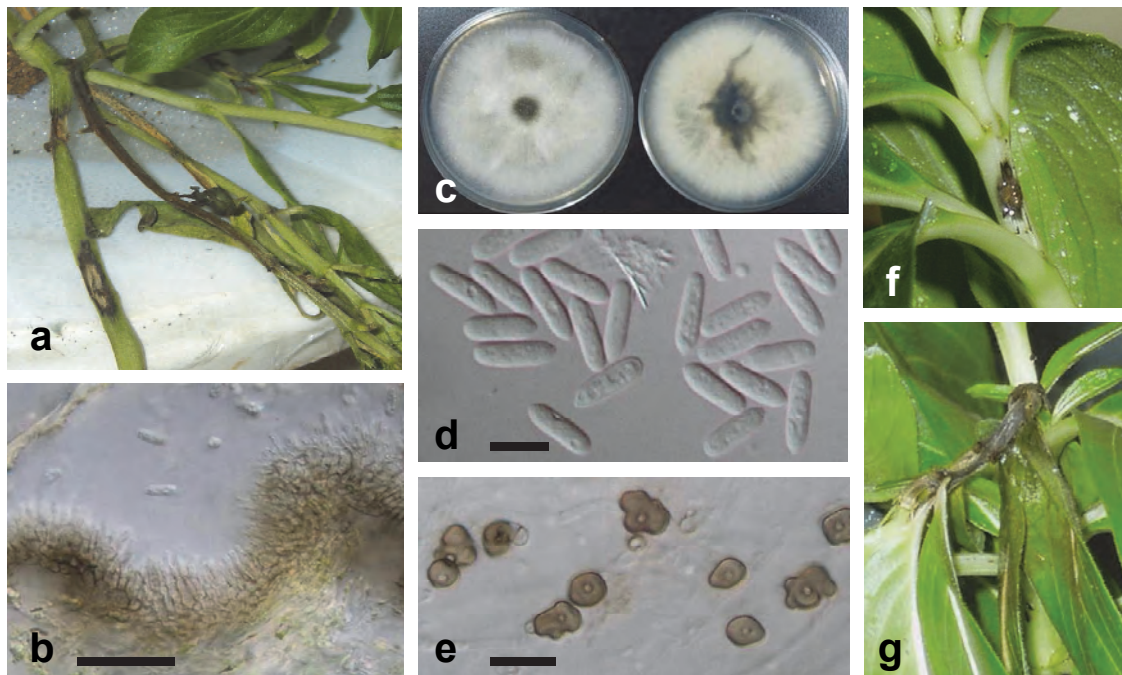


Fig. 2 Anthracnose symptoms on Madagascar periwinkle and morphology of causal fungi.  
 a Natural symptoms, stem blight, found in Okinawa Prefecture. b–e Morphology of pathogen. b Acervulus without setae on stem lesion from natural infection (a) (*bar* 50  $\mu\text{m}$ ). c–e MAFF240312 grown at 25°C. c Colonies grown on PDA in the dark for 1 week (*left* surface side, *right* reverse side). d Conidia on PDA under a black light for 1 week (*bar* 10  $\mu\text{m}$ ). e Appressoria in slide culture on PCA under a black light for 5 days (*bar* 20  $\mu\text{m}$ ). f Stem lesion at 2 days after inoculation with MAFF 240311. g Stem and leaf blight at 4 days after inoculation with MAFF 240312.

## ショウガ科植物青枯病菌の遺伝的多様性

堀田 光生<sup>a)</sup>

農業環境技術研究所

[〒305-8604 茨城県つくば市観音台 3-1-3]

### Genetic diversity of Zingiberaceae plant isolates of *Ralstonia solanacearum*

Mitsuo HORITA<sup>a)</sup>

National Institute for Agro-Environmental Sciences

#### 1. はじめに

*Ralstonia solanacearum* に起因する青枯病は、世界的に最も重要な細菌病の一つである。青枯病菌は病原性および細菌学的性質において多様な病原体で、宿主範囲の違いにより 5 つのレースに、生化学的な性質の違いにより 6 つの生理型 (biovar) にそれぞれ分けられており、特にショウガ (*Zingiber officinale* Rosc.) を含むショウガ科植物を犯す系統は、他植物を犯す系統と区別され、レース 4 に類別されている (Denny and Hayward, 2001)。青枯病は土壌伝染性の病害として知られているが、本菌に感染した種苗を介して長距離を伝播することが可能であり、それが青枯病の蔓延を促進させる原因の一つと考えられる (Hayward, 1991)。

ショウガ科植物青枯病は、これまで日本を含むアジア数か国、ハワイ、オーストラリア等で報告されており、現在も発生地域が拡大している (Hayward, 1994; Elphinstone, 2005; Tsuchiya et al., 2005; Waki et al., 2013; 堀田ら, 2014)。これ以上の蔓延を防ぐためには、その発生源をつきとめ、分離菌株の病原学的、疫学的特徴を明らかにし、植物検疫や種苗管理の段階で本菌を効率的に診断する方法の開発が必要である。近年、青枯病菌のゲノム情報が急速に蓄積し、同情報の解析が個々の系統の識別や同定の有効な手段となっている。特にエンドグルカナーゼ遺伝子 (*egl*) の塩基配列情報を基にした系統解析により、本菌は 50 以上のグループ (sequevar) に分けられることが報告されている (Fegan and Prior, 2005; Wicker et al., 2012)。今回、本報告では、アジア-太平洋地域でショウガ科植物から分離された青枯病菌の遺伝子情報を解析することで、その遺伝的多様性を明らかにすることを試みた。

---

a) (現所属) 農研機構 農業環境変動研究センター Institute for Agro-Environmental Sciences, NARO  
[〒305-8604 茨城県つくば市観音台 3-1-3]

## 2. 材料および方法

### 1) 供試菌株および培養方法

表 1 に供試した青枯病菌株を示した。ショウガ科植物分離株 (計 51 株) として、日本 (15 株)、タイ (11 株)、インドネシア (22 株)、中国 (2 株)、オーストラリア (1 株) 産株を、対照として日本産の他植物 (トマト, スターチス) 分離株 2 株をそれぞれ供試した。日本産 17 株は農業生物資源 (NIAS) ジーンバンクより得られた。日本産以外の大半の株は Research Institute of Spices and Medical Crops (インドネシア, ボゴール) および Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives (タイ, バンコク) より分譲頂いた。供試菌株は 1% グルタミン酸ナトリウムと 10% スキムミルクを含む分散媒中に懸濁して  $-30^{\circ}\text{C}$  で保存し, TTC 平板培地 (Kelman, 1954) に塗抹して  $28^{\circ}\text{C}$  培養または CPG 液体培地 (Kelman, 1954) 中で  $30^{\circ}\text{C}$  一晩, 振とう培養後に用いた。

### 2) biovar の調査および病原性試験

Biovar の調査は Denny and Hayward (2001) の方法に基づき行った。病原性試験には、対象植物としてショウガ (品種 三州) を用い、園芸培土 (サカタ) を詰めたプラスチックポット (直径 9 cm) に種根茎を移植して温室内で 7~9 葉期まで栽培した。供試菌株を TTC 培地で培養し、滅菌蒸留水に約  $10^8\text{cfu/ml}$  となるように懸濁した後、注射針を用いてショウガの茎基部に懸濁液を有傷接種し、 $28^{\circ}\text{C}$  温室内で 3 週間病徴観察 (茎葉部の黄化, 萎凋の有無) を行った。

### 3) DNA 抽出と PCR 検定

CPG 液体培地で培養した菌液を遠心分離 ( $12,000\times g$ ; 5 分) し、上清を除いた後、菌体を滅菌 Milli-Q 水に懸濁し、 $100^{\circ}\text{C}$  で 5 分加熱、氷冷して DNA 抽出を行った。供試菌株の *phylo*type は Fegan and Prior (2005) の報告に基づき、マルチプレックス PCR 法により調査した。日本産レース 4 は DNA フィンガープリント解析により 2 つの DNA type (I, II) に分けられ、それぞれを特異的に識別・検出する PCR 法が報告されている (Horita et al., 2004)。今回、供試菌株について同報に基づき PCR 検定を行った。各 PCR 産物は 1.5~2% アガロースゲルを用いて電気泳動し、目的の長さのバンドの有無について調査した。

### 4) *egl* および *mutS* 遺伝子のシーケンス解析

*egl* 遺伝子は Poussier et al. (2000) の、*mutS* 遺伝子は Prior and Fegan (2005) の報告に基づき、それぞれ PCR 増幅した後、1.5% アガロースゲル電気泳動を行い、DNA 抽出キット (QIAquick Gel Extraction Kit, キアゲン) を用いて目的の長さのバンドを回収した。その後、ファスマック (株) にシーケンス解析を依頼した。

### 5) データ解析

得られた DNA 配列は DDBJ/EMBL/Genbank データベースシステムに登録する (AB620014-

AB620018, AB621636–AB621695, AB678435–AB678437, AB678480–AB678491, AB678517–AB678528, AB732947–AB732956) とともに, DNA 解析ソフト (DNASIS pro, 日立) を用いてアライメントを行い, 木村 2-パラメーター法 (Kimura, 1980) を用いて遺伝距離を算出した. 系統樹は Clustal W ソフト (Thompson et al., 1994) 内の近隣結合法を用いて作成し, ブートストラップ解析を 1000 反復行うことで, 各分岐の確率を算出した.

表1. 供試菌株リスト

菌株名	分離植物	分離地域	sequevar <sup>a)</sup>	group ( <i>mutS</i> ) <sup>b)</sup>	DNA type <sup>c)</sup>	biovar
MAFF 107639, MAFF 107640, MAFF 107641 MAFF 107642, MAFF 107643, MAFF 211272 MAFF 211479, MAFF 211490, MAFF 211493 32, 1294, 1445, 1446, 1447, 1448, 1478 419B-1-I, 419-B-1-III, 412-C-1-I	ショウガ ミョウガ クルクマ属	日本, タイ	30	1	I	3, 4
MAFF 241651, MAFF 331053, MAFF 331054	ショウガ	日本	14	1	II	4
MAFF 211471, MAFF 211472, MAFF 211474 R277, Z8a, Z8b	ショウガ	日本, 中国 オーストラリア	16	2	II	4
T447, T454-B, T625, T625-98, T748, T749 T871, T874, T874-98, T917, T924-2, T948 T963, T968, Psg-8, Ps6-3-1	ショウガ属 クルクマ属	インドネシア	17	1	—	3
1052	ショウガ	タイ	47	1	—	4
T585-98, T736, T740, T741, T925-2, T952-B	ショウガ	インドネシア	未定	3	—	3, 4
MAFF 301070 MAFF 302549	トマト スターチス	日本	14	1	—	3

a) Fegan and Prior (2005), Wicker et al. (2012) の報告に基づく.

b) *mutS* 遺伝子配列を用いたクラスター解析に基づくグループ (図1).

c) Horita et al. (2004) の報告に基づく. —: いずれの DNA type にも属さない.

### 3. 結果

#### 1) ショウガ科植物分離株の biovar および PCR 検定

供試したショウガ科植物分離株 51 株は biovar 3 (32 株) または biovar 4 (19 株) に類別された (表 1). Phylotype 識別・同定用 PCR 検定の結果, 全ての供試菌株から phylotype I に特異的なバンドが検出された (データ未掲載). 日本産レース 4 識別用 PCR 検定の結果, 日本およびタイ産 19 株で type I に, 日本, 中国, オーストラリア産 9 株で type II にそれぞれ特異的なバンドが検出された. インドネシア産の全株, タイ産 1 株および日本産他植物分離株では, いずれのバンドも検出されなかった (表 1).

#### 2) *egl* 遺伝子の解析

各供試菌株について *egl* 遺伝子の内部領域をコードする 666 塩基の配列情報が得られ, これらの情報を基にクラスター解析を行った. 対照として既報の日本, 中国, フィリピン, オーストラリア, インド産ショウガ科植物分離株を含む計 36 菌株の青枯病菌の塩基配列情報 (Poussier et al., 2000; Villa et al., 2005; Liu et al., 2009; Xu et al., 2009; Wicker et al., 2012; Kumar et al., 2014) を用い,

outgroup として MAFF 301558 株（日本産ジャガイモ分離株, phylotype IV に属する）の配列 (accession no. AY465002) を用いた. ショウガ科植物分離株は全て phylotype I に相当するクラ

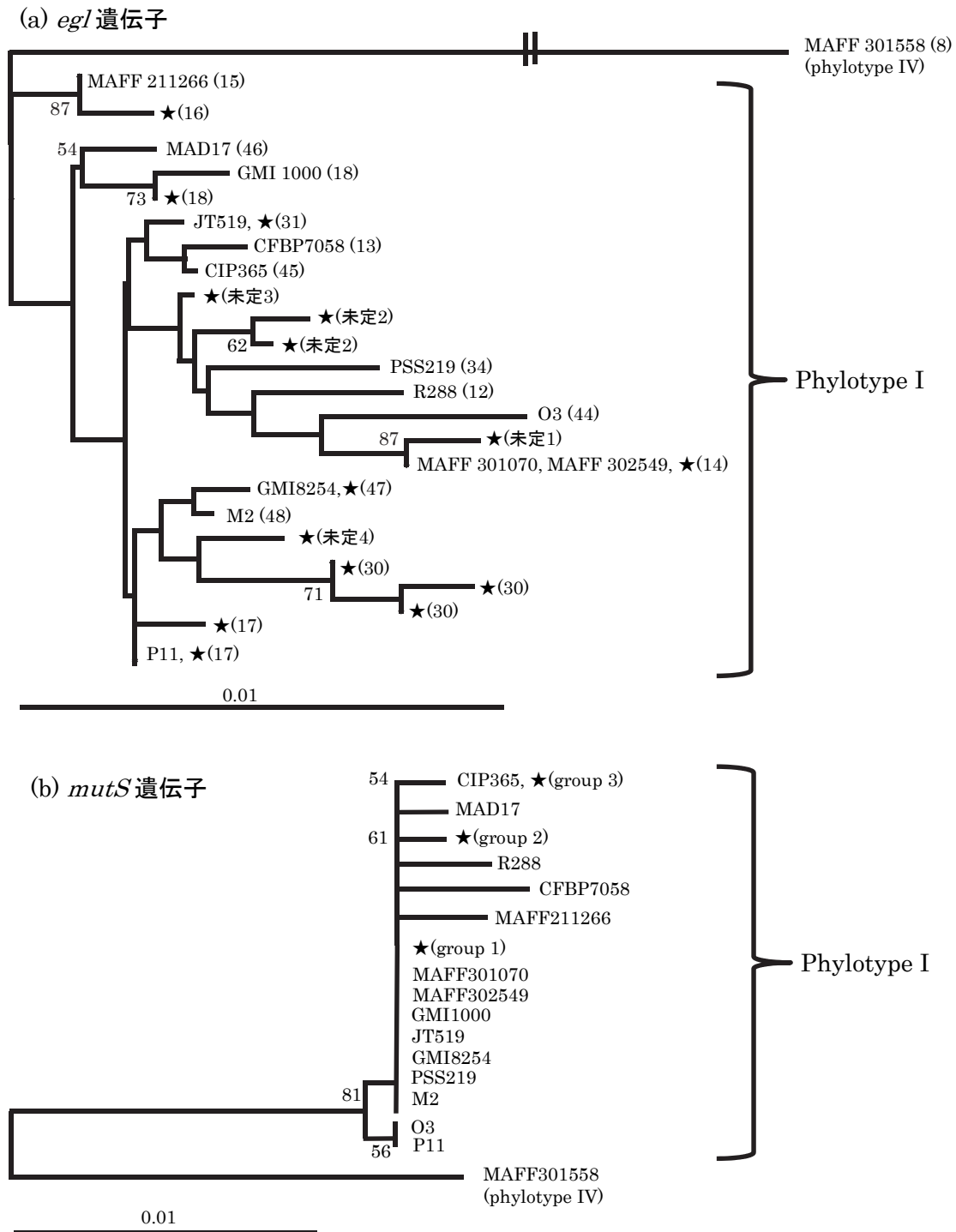


図1. *egl* 遺伝子および *mutS* 遺伝子領域の塩基配列に基づくショウガ科植物青枯病菌の遺伝的類縁関係

★ はショウガ科植物分離株を, 右横の ( ) 内はsequence (*egl* 遺伝子) またはgroup (*mutS* 遺伝子) をそれぞれ示す. 分岐点の数値はブートストラップ確率 (>50%) を, 最下線の長さは遺伝距離 (0.01) をそれぞれ示す.

スター内に属し (図 1), 11 の sequevar (14, 16, 17, 18, 30, 31, 47, 未定 1~4) に分けられ, それぞれ分離地域, 分離植物, biovar に違いがみられた (表 1, 表 2).

すなわち sequevar 14 には日本, 中国, フィリピンでショウガより分離された biovar 4 の株が, sequevar 16 には日本, 中国, オーストラリア産ショウガ分離株 (biovar 4) が, sequevar 17 にはインドネシア, インド産でショウガ属, クルクマ属植物およびカルダモン分離株 (biovar 3, 4) が, sequevar 30 には日本, タイ産ショウガ属およびクルクマ属植物分離株 (biovar 3, 4) が, sequevar 未定 1 には中国, インドネシア産ショウガ分離株 (biovar 3, 4) がそれぞれ含まれた. Sequevar 18 に中国産株が, sequevar 47 にタイ産株が, 他の 4 つの sequevar (31, 未定 2, 3, 4) にインド産株がそれぞれ含まれた. 供試した日本産他植物分離株 2 株は, ショウガ分離株 5 株とともに sequevar 14 に分けられた (表 1).

表 2. ショウガ科植物青枯病菌の sequevar と分離植物, 分離地域, biovar との関係

sequevar	分離植物	分離地域	biovar <sup>a)</sup>	調査菌株数 <sup>a)</sup>
14	ショウガ	日本, 中国, フィリピン	4	5
16	ショウガ	日本, 中国, オーストラリア	4	12
17	ショウガ属, クルクマ属 カルダモン	インドネシア, インド	3	25
18	ショウガ	中国	4	1
30	ショウガ属, クルクマ属	日本, タイ	3, 4	39
31	ショウガ	インド	3	1
47	ショウガ	タイ	4	1
未定 1	ショウガ	中国, インドネシア	3, 4	7
未定 2	ショウガ	インド	3, 4	2
未定 3	ショウガ	インド	3	2
未定 4	ショウガ	インド	3	1

a) 本試験および Villa et al. (2005), Liu et al. (2009), Xu et al. (2009), Waki et al. (2013), Kumar et al. (2014) の報告に基づく.

### 3) *mutS* 遺伝子の解析

各供試菌株について *mutS* 遺伝子の内部領域をコードする 651 塩基の配列情報が得られ, これらの情報を基にクラスター解析を行った. 対照として既報の 13 菌株の塩基配列情報 (Prior and Fegan, 2005; Wicker et al., 2012) を用いた. outgroup として MAFF 301558 株 (accession no. AY756812) を用いた. *egl* 遺伝子の解析結果と同様に, ショウガ科植物分離株は全て phylotype I に相当するクラスターに属し (図 1), 3 つの group に分けられた. 各 group は sequevar と関連が

みられ、group 2 に sequevar 16 の株が、group 3 に sequevar 未定 1 の株が、group 1 にそれ以外の sequevar の株がそれぞれ含まれた (表 1)。供試した日本産他植物分離株 2 株は、ショウガ科植物分離株の group 1 と相同であった。

#### 4) 供試菌株のショウガに対する病原性

分離植物、分離地域、sequevar、DNA group または biovar (表 1) の異なるショウガ科植物分離株 9 菌株 (MAFF 107639, MAFF 211272, MAFF 211474, MAFF 211490, MAFF 241651, MAFF 331053, 1445, T447, T585-98) および他植物分離株 2 株 (MAFF 301070, MAFF 302549) について、ショウガに対する病原性を調査した。その結果、ショウガ科植物分離株は全てショウガに強い病原性 (茎葉部の萎凋、枯死) を示したのに対し、他植物分離株はいずれもショウガに病徴を示さなかった。

#### 4. 考察

ショウガ科植物青枯病は様々な気象条件のアジア-太平洋地域の国で発生している。今回の解析結果では、これら分離菌株は *egl* 遺伝子解析で 11 の sequevar に、*mutS* 遺伝子解析で 3 つの group にそれぞれ分けられ、また sequevar の異なる菌株間では、分離地域、分離植物等に違いがみられるなど、遺伝的にも病原学的にも多様な系統が存在し、これらが各地域で同青枯病を発生・蔓延させているものと考えられた。また、これら系統のいくつかは国・地域をまたがって分離されており、青枯病菌汚染種苗等を介して国際的にも国内的にも伝播した可能性が推測された。日本国内において、ショウガ科植物青枯病は 1995 年にタイから輸入したクルクマ種苗を栽培した高知県内で初発生し、1997 年以降、同県内の初発地域近隣のショウガ、ミョウガ栽培地域において青枯病の発生が相次いで報告された (Tsuchiya et al., 2005)。2009 年以降は高知県以外の地域にその発生が拡大している (堀田ら, 2014)。今回の DNA 情報を基にした解析では、日本産株は 3 つの sequevar (14, 16, 30) に分かれ、sequevar 14 の株は中国、フィリピン産株と、sequevar 16 の株は中国、オーストラリア産株と、sequevar 30 の株はタイ産株とそれぞれ相同であり、これら複数の海外地域から日本国内に伝播した可能性が推測された。Sequevar の異なる菌株間では、宿主範囲や病原力においても違いがみられることが報告されている。例えば sequevar 16 の株はショウガのみから分離され、それ以外のショウガ科植物に接種してもほとんど病徴を示さないのに対し、sequevar 30 の株はショウガ以外のショウガ科植物にも強い病原性を示す (矢野ら, 2011)。これらの結果から、同青枯病の防除には、分離菌株の系統に応じてそれぞれ異なる対策を取る必要があると考えられた。

#### 5. 謝辞

本研究は栃木県農業試験場の和氣貴光氏、CABI-UK の黒瀬大介氏、Indonesian Center for Agricultural Biotechnology の Karden Mulya 氏、九州大学の土屋健一氏との共同研究として実施した。ここに記して深謝の意を表す。

## 6. 参考文献

- Denny, T.P. and Hayward, A.C. (2001). Gram-negative bacteria *Ralstonia*. In Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (3rd ed.) (Schaad N.W., Jones, J.B. and Chun, W., eds.). pp. 151–174, American Phytopathological Society, St. Paul.
- Elphinstone, J.G. (2005). The current bacterial wilt situation: A global overview. In Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex (Allen, C., Prior, P. and Hayward, A.C., eds.). pp. 9–28, American Phytopathological Society, St. Paul.
- Fegan, M. and Prior, P. (2005). How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex?” In Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex (Allen, C., Prior, P. and Hayward, A.C., eds.). pp. 449–461, American Phytopathological Society, St. Paul.
- Hayward, A.C. (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annu. Rev. Phytopathol. 29: 65–87.
- Hayward, A.C. (1994). The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In Bacterial Wilt: the Disease and its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum* (Hayward, A.C. and Hartman, G.L., eds.). pp. 9–24, CAB International, Wallingford.
- Horita, M., Yano, K. and Tsuchiya, K. (2004). PCR-based specific detection of *Ralstonia solanacearum* race 4 strains. J. Gen. Plant Pathol. 70: 278–283.
- 堀田光生・土屋健一・菅康弘・矢野和孝・和氣貴光・黒瀬大介・古屋成人 (2014). 青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* の分類の現状と日本産株の遺伝的多様性. 日植病報 80: 1–10.
- Kelman, A. (1954). The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance of a tetrazolium medium. Phytopathology 44: 693–695.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16: 111–120.
- Kumar, A., Prameela, T.P., Suseelabhai, R., Siljo, A., Anandaraj, M. and Vinatzer, B.A. (2014). Host specificity and genetic diversity of race 4 strains of *Ralstonia solanacearum*. Plant Pathol. 63:1138–1148.
- Liu, Y., Kanda, A., Yano, K., Kiba, A., Hikichi, Y., Aino, M., Kawaguchi, A., Mizoguchi, S., Nakaho, K., Shiomi, H., Takikawa, Y. and Ohnishi, K. (2009). Molecular typing of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum* in relation to the ability to induce a hypersensitive reaction in tobacco. J. Gen. Plant Pathol. 75: 369–380.
- Poussier, S., Prior, P., Luisetti, J., Hayward, C. and Fegan, M. (2000). Partial sequencing of the *hrpB* and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex. Syst. Appl. Microbiol. 23: 479–486.
- Prior, P. and Fegan, M. (2005). Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. Acta Hort. 695: 127–136.



- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–4680.
- Tsuchiya, K., Yano, K., Horita, M., Morita, Y., Kawada, Y. and d'Ursel C.M. (2005). Occurrence and epidemic adaptation of new strains of *Ralstonia solanacearum* associated with *Zingiberaceae* plants under agro-ecosystem in Japan. *In* Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex (Allen, C., Prior, P. and Hayward, A.C., eds.). pp. 463–469, American Phytopathological Society, St. Paul.
- Villa, J.E., Tsuchiya, K., Horita, M., Natural, M., Opina, N. and Hyakumachi, M. (2005). Phylogenetic relationships of *Ralstonia solanacearum* species complex strains from Asia and other continents based on 16S rDNA, endoglucanase, and *hrpB* gene sequences. *J. Gen. Plant Pathol.* 71: 39–46.
- Waki, T., Horita, M., Kurose, D., Mulya, K. and Tsuchiya, K. (2013). Genetic diversity of *Zingiberaceae* plant isolates of *Ralstonia solanacearum* in the Asia-Pacific region. *JARQ* 47:283–294.
- Wicker, E., Lefeuvre, P., de Cambiaire, J-C., Lemaire, C., Poussier, S. and Prior, P. (2012). Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. *ISME J.* 6: 961–974.
- Xu, J., Pan, Z.C., Prior, P., Xu, J.S., Zhang, Z., Zhang, H., Zhang, L.Q., He, L.Y. and Feng, J. (2009). Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China. *Eur. J. Plant Pathol.* 125: 641–653.
- 矢野和孝・川田洋一・堀田光生・曳地康史・土屋健一 (2011). ショウガ科植物から分離された青枯病菌の系統とそれらの宿主範囲. *日植病報* 77:88–95.

## 納豆菌欠損ファージ生産変異株の作出

永井 利郎 a)

農業生物資源研究所

[〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2]

### A *Bacillus subtilis* (*natto*) mutant on defective phage production

Toshirou NAGAI a)

National Institute of Agrobiological Sciences

#### 1. 目的

納豆菌[*Bacillus subtilis* (*natto*)]は、日本の伝統的醗酵食品である納豆を生産する細菌である(Nagai and Tamang, 2010). 納豆菌や枯草菌(*B. subtilis*)は菌体外に欠損ファージを生産することが知られている(Seaman et al., 1964, Tsutsumi et al., 1990). これら欠損ファージの構造蛋白質

は納豆菌のゲノム上にコードされており、納豆菌体内でファージ粒子が作られる。しかしながら、ファージ頭部にはそのファージゲノムではなく、納豆菌自身のゲノムをある大きさにランダムに切りそろえられた断片がパッケージングされる。したがって、この欠損ファージは、増殖することができない(図 1)。しかしながら、欠損ファージは、この欠損ファージに感受性のある納豆菌株を溶菌する、または生育を阻害することができる。通常の場合、そのファージ懸濁液を希釈し、感受性の菌株にスポットすると、低希釈倍率ではスポットしたところ全体が溶菌し、大きな溶菌斑を形成するが、希釈倍率を高めるにつれ、個々のプラークが観察されるようになる。しかし、欠損ファージでは、低希釈倍率では溶菌斑を形成するが、希釈率を高め

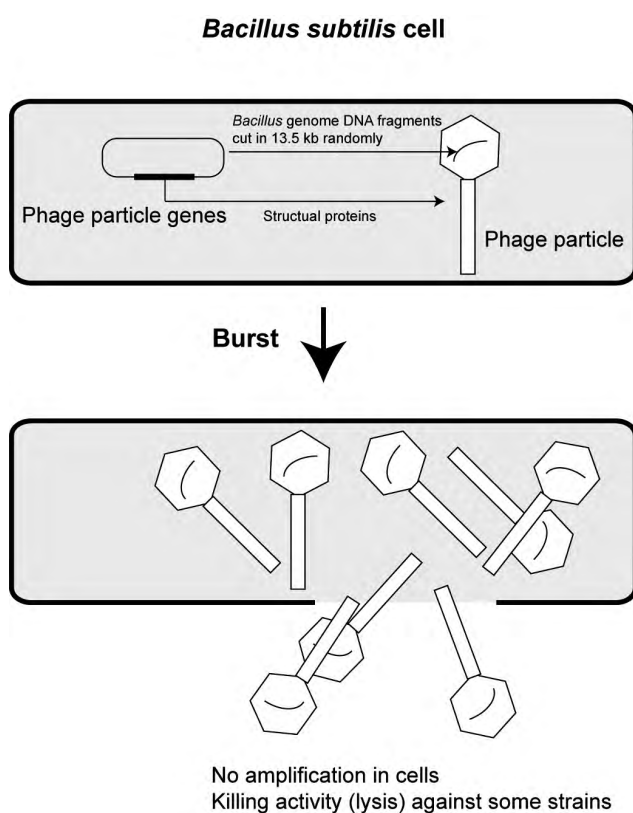


図 1. 欠損ファージ粒子の生成

a) (現所属) 農研機構 遺伝資源センター Genetic Resources Center, NARO

[〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2]

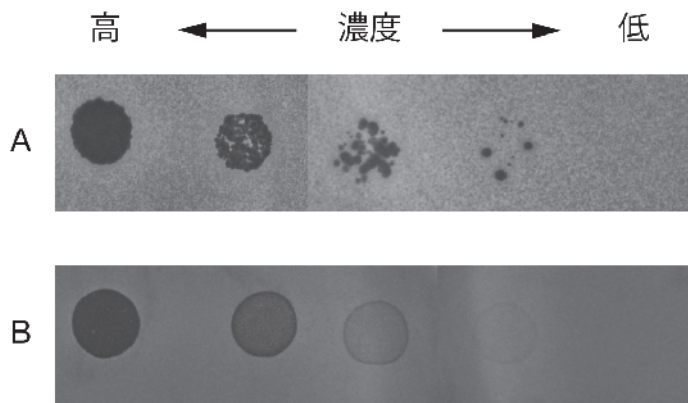


図 2. 通常のファージ(上)と欠損ファージ(下)の各希釈段階での溶菌斑形成の違い

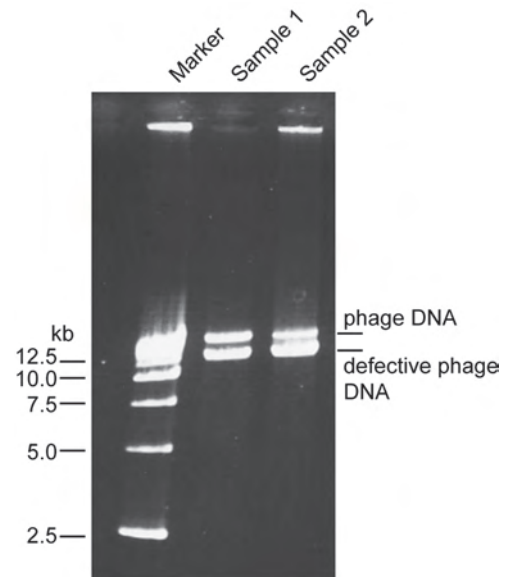


図 3. 欠損ファージのサンプルへの混入の例

るとその溶菌斑全体が薄れていくだけであり、個々のプラークを形成することはない (図 2)。

多くの納豆菌を調べると、それぞれの欠損ファージに感受性・非感受性の菌株が存在しており、感受性の違いを利用することにより、ある程度は納豆菌の菌株レベルでの識別が可能になる。その一方で、通常の納豆菌ファージを、欠損ファージを生成する納豆菌を用いて増殖すると、欠損ファージが混入し、目的とする納豆菌ファージのみからなるサンプルを調製することができないという不都合が生じる。図 3 は、ある納豆菌ファージサンプルから抽出した DNA の電気泳動像であるが、目的のファージの DNA (高分子側) 以外に欠損ファージ由来の DNA が確認できる。このような場合、実験によっては障害となるので欠損ファージを取り除くことが必要であり、それには困難が伴う。

そこで、そのような障害を取り除く目的で、欠損ファージ生産性変異株の作出を行った。ここでは、著者の行った研究 (Nagai, 2014) 中心に解説する。

## 2. 材料および方法

### 1) 使用した微生物と培養条件

本研究に使用した主要な菌株及び作出した変異株は表 1 にまとめた。本研究により作出した変異

表 1. 実験に使用した菌株

株名	特性	分離源・由来	MAFF登録番号
MAFF 118147	PGA <sup>+</sup> , DP118147 <sup>+</sup>	宮城県, 発酵食品	
MAFF 302078	Rif <sup>S</sup>	埼玉県, 土壌	
NA1	PGA <sup>-</sup> , DP118147 <sup>+</sup>	MAFF 118147 の自然突然変異体	MAFF 211989
NA2	PGA <sup>-</sup> , DP118147 <sup>-</sup>	NA1 をアクリジンオレンジにより変異処理	MAFF 211990
NA3	Rif <sup>R</sup>	MAFF 302078 の自然突然変異体	MAFF 211991

PGA<sup>+</sup>:ポリグルタミン酸生産能あり, PGA<sup>-</sup>:ポリグルタミン酸生産能なし,

DP118147<sup>+</sup>:欠損ファージ産生, DP118147<sup>-</sup>:欠損ファージ非産生,

Rif<sup>S</sup>:リファンピシン感受性, Rif<sup>R</sup>:リファンピシン耐性 (日本食品科学工学会より許可を得て転載)

株はすべてジーンバンクに登録した。培養は LB 培地に 10 mM 硫酸マグネシウムを添加した培地または、ニュートリエントブロス(日水製薬)を使用し、37°Cで 16–24 時間、または 30°Cで 1–2 日間の条件で行った。以下に書かれてある以外の方法については、常法を用いた。

## 2) アクリジンオレンジによる変異処理

アクリジンオレンジ存在下で *B. subtilis* を液体培養し、段階希釈後プレートに展開し、コロニーを得た(Hara et al., 1982)。マイクロタイタープレートを用いて一晩、液体培養した後、遠心分離を行い、上清を回収し、指示菌入り軟寒天(リファンピシン含有)上にスポットした。一晩培養後、溶菌斑形成を観察した。

## 3) 電子顕微鏡観察

酢酸ウラニウムによるネガティブステイン法によった。観察は株式会社花市電子顕微鏡技術研究所(愛知、岡崎市)で行った。

## 3. 結果と考察

### 1) 納豆菌 MAFF 118147 の欠損ファージ

納豆菌 MAFF 118147 の培養上清から欠損ファージを検出し、そのファージを DP118147 (欠損ファージ Defective Phage にちなむ)と命名した。DP118147 はこれまでの欠損ファージ(Seaman et al., 1964 ; Tsutsumi et al., 1990)と同様に非常に小さな頭部(直径 40 nm)と収縮性の尾部(17 × 264 nm)より構成される(図 4)。欠損ファージ粒子からは 13.5 kb の DNA が検出された(図 5 A)。

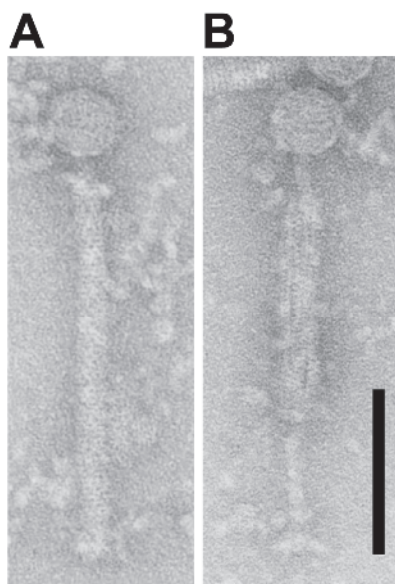


図4. 欠損ファージDP118147 (A)と尾部が収縮した形態(B)の電顕写真

バー=100 nm. (日本食品科学工学会より許可を得て転載)

### 2) 指示菌

140 株の *B. subtilis* について、納豆菌 MAFF 118147 の培養上清により、生育阻害される菌株を検索したところ、73 株(52%)が生育阻害を受けた。その中から、軟寒天中できめの細かい菌叢を形成する *B. subtilis* MAFF 302078 を以降の実験に使用することとした。なお、納豆菌 MAFF 118147 は低分子の抗生物質を生産する可能性もあったが、生育阻害活性は 200 kDa 以上の画分に存在しており、低分子の生育阻害活性物質はほとんど作られていなかった。

*B. subtilis* MAFF 302078 は、欠損ファージ生産変異株のスクリーニングに便利のように抗生物質(リファンピシ

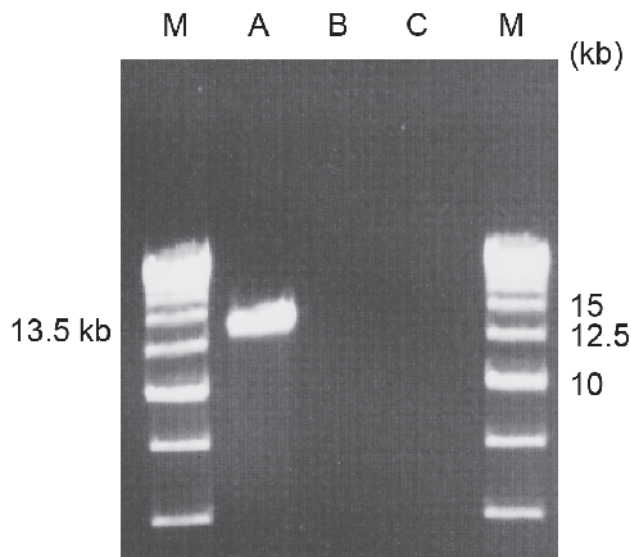


図5. 欠損ファージ DNA の電気泳動像

M, マーカー; A, DP118147 DNA(MAFF 118147 培養液由来); B, NA2 培養液由来; C, NA2 溶菌液由来 (日本食品科学工学会より許可を得て転載)

ン)耐性を自然突然変異により付与し(詳細は次節で詳述), NA3 と命名した.

### 3) 欠損ファージ生産変異株の取得

納豆菌が生産するポリグルタミン酸(納豆の糸の主成分であり, 曳糸性のあるグルタミン酸ポリマー. 以下 PGA)は非常に粘性が高く, また DNA と非常に似通った物理化学的性質を有しているために, DNA 調製の際に混入する. 納豆菌 MAFF 118147 も PGA を生産するが, 以上の理由のため以下の操作がしにくくなるので, まずは PGA 非生産株を取得した. 納豆菌の PGA 生産能はゲノム上の挿入配列により高頻度に欠落しやすい性質をもつので, PGA 生産培地に普通に培養したコロニーを展開すると, 曳糸性を示さない PGA 非生産株が容易に生じてくる(Nagai et al., 2000). そのような株を純粋

分離し, NA1 と命名した.

NA1 を変異剤アクリジンオレンジで処理し, 平板に展開後, 生じた 96 個のコロニーを, マイクロタイタープレートにて液体培養した. 培養液を遠心分離した後, 得られた上清を, NA3(リファンピシン耐性)を含む二重平板にスポットした. なお, 二重平板の下層培地にはリファンピシンを加えておき, 上清に含まれる, 遠心分離で除去しえなかった細菌の増殖を抑えた. 以上の結果, 96 個中 1 個の溶菌斑を形成しないコロニーを見出し, これを NA2 と命名した.

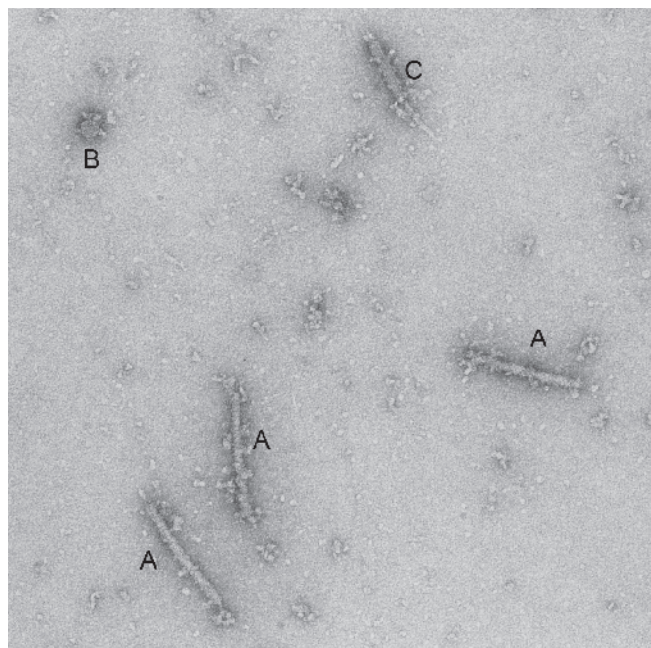


図6. NA2 の電顕写真

A, 尾部; B, 頭部; C, 収縮した尾部. バー=200 nm (日本食品科学工学会より許可を得て転載)

### 4) 欠損ファージ生産変異株の性質

NA2 の培養液から DNA を抽出し, アガロース電気泳動により分析したところ, 欠損ファージ由来の 13.5 kb の DNA は検出できなかった(図 5 B). また, NA2 の溶菌液から DNA は検出できなかった(図 5 C)NA2 とその親株である MAFF 118147 の増殖曲線を調べたところ, 変化はなかった(データ省略). アクリジンオレンジ処理により, 生育に影響のある変

異は受けていないと考えられた。

NA2 の培養液について電顕観察したところ、頭部と尾部が結合した完成形の欠損ファージ(図 4)を見出すことはできず、分離した頭部と尾部が観察された(図 6)。すなわち、生じた変異はファージ粒子のアセンブリの過程において、頭部と尾部を結合する段階で生じていることが示唆された。すなわち、NA2 では完全には欠損ファージの発現が阻害されてはいなかった。NA2 の欠損ファージの尾部は、頭部と結合していなくても収縮する能力は保持しており(図 6 C, 図 4 B)、尾部の機能は完全には損なわれてはいなかった。NA2 菌体内で欠損ファージ粒子の検出を試みたが、菌体内内容物が妨害し電顕観察を行うことはできなかった。頭部に含まれるはずの DNA は培養液中からも菌体内からも検出されなかったが(図 5 B,C)、頭部に最初からパッケージングされていなかったのか、パッケージングはされたが頭部から漏れ出て DNase により分解されたか、またはゲノムからの DNA の切り出し自体が行われなかったのかは不明である。表現型として正常な欠損ファージ粒子を形成しない変異株の取得に成功したが、遺伝子のどこにどのような変異が生じたのか、その変異によりなぜ頭部と尾部は結合されないのかについては、今後詳細な検討が必要である。

#### 4. 参考文献

- Hara, T., Aumayr, A., Fujio, Y. and Ueda, S. (1982). Elimination of plasmid-linked polyglutamate production by *Bacillus subtilis* (*natto*) with acridine orange. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 1456–1458.
- Nagai, T., Tran, L.S.P., Inatsu, Y. and Itoh, Y. (2000). A new IS4 family insertion sequence, IS4*Bsu1*, responsible for genetic instability of poly- $\gamma$ -glutamic acid production in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 182: 2387–2392.
- Nagai, T. and Tamang, J. (2010). Fermented legumes: Soybean and non-soybean products. *In* Fermented Foods and Beverages of the World (Tamang, J.P. and Kailasapathy, K., eds.). pp 191–224, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Nagai, T. (2014). A defective bacteriophage produced by *Bacillus subtilis* MAFF 118147 and a mutant producing no normal particles of the defective bacteriophage. *Food Science and Technology Research* 20:1229–1234.
- Seaman, E., Tarmy, E. and Marmur, J. (1964). Inducible phages of *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 3: 607–613.
- Tsutsumi, T., Hirokawa, H. and Shishido, K. (1990). A new defective phage containing a randomly selected 8 kilobase-pairs fragment of host chromosomal DNA inducible in a strain of *Bacillus natto*. *FEMS Microbiol. Lett.* 72:41–46.

# わが国で分離されたキウイフルーツかいよう病菌の特徴

澤田 宏之<sup>a)</sup>

農業生物資源研究所

[〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2]

## Characteristics of pathogens causing bacterial canker of kiwifruit in Japan

Hiroyuki SAWADA<sup>a)</sup>

National Institute of Agrobiological Sciences

### 1. はじめに

キウイフルーツかいよう病は近年、世界各地で分布を拡大しており、わが国を含む少なくとも 16 か国で深刻な被害が報告されている (農林水産省, 2016; 澤田, 2016). その病原細菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*) は多様性に富んでおり (McCann et al., 2013; Butler et al., 2013), 現在, 表現型・遺伝型の違いに基づいて「biovar 1, 2, 3, 5, 6」という 5 つの biovar (生理型; 変種レベルの分類階級) に整理されている (澤田ら, 2016). また, これらの biovar 間では, 病原性関連遺伝子の構成や病原力が異なることも明らかになりつつある (McCann et al., 2013; Fujikawa and Sawada, 2016). なお, わが国には, このうちの 4 つ (biovar 1, 3, 5, 6) が分布しており, キウイフルーツ (*Actinidia chinensis*, *A. deliciosa*) やサルナシ (*A. arguta*) などのマタタビ属植物で被害が認められている (Takikawa et al., 1989; 澤田ら, 2016; 澤田, 2016).

農業生物資源ジーンバンク事業では, サブバンクをはじめとする多くの関係者にご協力頂きながら, キウイフルーツの最重要病害とされている本病を対象として探索・収集を重点的に実施してきた. その結果, わが国で分布が確認されている biovar 1, 3, 5, 6 のいずれに関しても, 来歴の異なる菌株を多数収集することができた (表 1). 本稿では, これらの所蔵菌株を対象として筆者らが行ってきた特性評価の結果を簡単に紹介しながら, 各 biovar の特徴を整理してみたい.

### 2. 各 biovar の特徴

#### 1) biovar 1

1980年頃に静岡県で*A. deliciosa*に症状が認められたのが, キウイフルーツかいよう病の最初の発生事例とされている. その際に原因菌として見出されたのが biovar 1 である (Takikawa et al., 1989). ジーンバンクには, 6 県で分離された, キウイフルーツあるいはサルナシに由来する 50 株

---

a) (現所属) 農研機構 遺伝資源センター Genetic Resources Center, NARO

[〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2]

表1. ジーンバンク所蔵のかいよう病菌<sup>a)</sup>

biovar	別名 <sup>b)</sup>	分離源 <sup>c)</sup>	採集地	MAFF 番号 <sup>d)</sup>	株数
1	Psa 1, Psa J	キウイフルーツ	愛媛, 香川, 和歌山, 静岡, 神奈川, 新潟	211981, 211982, 211983, 211984, 211985, 211986, 211987, 211988, 212162, 302091, 302092, 302093, 302143, 302144, 302145, 302146, 302966, 302967, 302968, 302969, 302970, 302971, 302972, 613001, 613002, 613003, 613004, 613005, 613006, 613007, 613008, 613009, 613010, 613011, 613012, 613013, 613014, 613015, 613016, 613017, 613018, 613020, 613021, 613022, 613023, 613024	46
				サルナシ	神奈川
3	Psa 3, Psa V	キウイフルーツ	佐賀, 福岡, 愛媛, 和歌山	212101, 212102, 212103, 212104, 212105, 212106, 212107, 212108, 212109, 212110, 212111, 212112, 212113, 212114, 212115, 212116, 212117, 212118, 212119, 212120, 212121, 212122, 212145	23
5	Psa 5	キウイフルーツ	佐賀	212054, 212055, 212056, 212057, 212058, 212059, 212060, 212061, 212062, 212063	10
6	-	キウイフルーツ	長野	212130, 212131, 212132, 212133, 212134, 212135, 212136, 212137, 212138, 212139, 212140, 212141, 212142	13

a) 2016年5月末日時点での所蔵菌株を示した。

各菌株の詳しい来歴は遺伝資源データベース ([http://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro\\_search.php](http://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_search.php)) を参照。

b) 各biovarには様々な別名がある (Butler et al., 2013 ; McCann et al., 2013 ; 澤田ら, 2014b, など)。本欄にはそのうちの代表的なもののみを示した。

c) キウイフルーツには*Actinidia chinensis*と*A. deliciosa*が含まれる。

d) MAFF番号を赤字で示した21株のbiovar 1からは、ファゼオロトキシンの産生が確認できなかった (表2)。また、赤字で示した8株のbiovar 3からは、Pac\_ICE1, 2, 3 (表4) がPCR検出できなかった (表3)。

のbiovar 1が所蔵されている (表1)。

biovar 1は非特異的毒素の1

種であるファゼオロトキシ  
を産生することが特徴とされ  
ている (Sawada et al., 1997)。

そこで、所蔵する50株の産生能  
を生物検定法によって確認し  
たところ、表1でMAFF番号を  
赤字で示した21株のbiovar 1か  
らは、ファゼオロトキシンの産  
生が認められなかった (表2)。

また、これらがファゼオロトキ  
シンの生合成遺伝子群  
(*argK-tox*クラスター ; 図1)  
を保持しているか否かをPCR  
検定によって調べたところ、  
MAFF 613017と613018から  
はシグナルが得られなかった  
が、それ以外のbiovar 1からは

表2. ジーンバンク所蔵のかいよう病菌で認められた主な表現型

biovar	蛍光色素 の産生	API 20NE の プロファイル番号 <sup>a)</sup>	ファゼオロトキシンの 産生 <sup>b)</sup>	コロナチン の産生 <sup>c)</sup>
1	-	0047451 <sup>d)</sup>	d <sup>e)</sup>	-
3	-	0047451 <sup>d)</sup>	-	-
5	+	0443451	-	-
6	-	0447451	+	+

+, 陽性 ; -, 陰性 ; d, 菌株によって異なる。

a) API 20NEを用いて生理・生化学的性質を検査し、培養3日目の判定結果をもとにプロファイル番号を算出した。

b) 感受性の*E. coli*に対する生育阻害活性を指標とした生物検定法 (澤田ら, 2016) を用いて調査した。

c) ジャガイモ塊茎を用いた生物検定法 (澤田ら, 2016) による。

d) biovar 1では培養後4~5日経過するとゼラチンが遅れて分解され始めたが、プロファイル番号の算出に当たっては陰性として取り扱った。一方、biovar 3では培養期間を延長しても、ゼラチンの分解は認められなかった (澤田ら, 2015)。

e) 50株のbiovar 1のうち、表1でMAFF番号を赤字で示した21株からは、ファゼオロトキシン産生が認められなかった。



増幅が認められた（表3の *argK*~*amtA*の4つの項目）（澤田ら，2014a）．以上のことから，産生能の認められなかった21株の biovar 1（表1で赤字で示した）のうち，生合成遺伝子群がPCR検出できた19株については，産生能を失うような変異がこれらの遺伝子群に蓄積している可能性が考えられる（三好ら，2012）．

ところで，ファゼオロトキシンの生合成遺伝子群はゲノミックアイランド [*tox island*と命名した（図1）（Genka et al., 2006）] の内部に存在していること，*tox island*は元々，他の細菌が保持していたが，水平移動を通じて biovar 1が獲得したものであることが，我々の解析によって明らかになっている（Sawada et al., 1997；Genka et al., 2006，など）．したがって，生合成遺伝子群がPCR検出できなかったMAFF 613017と613018については，*tox island*を獲得する以前の「biovar 1の祖先型に由来する株」，あるいは，*tox island*が後天的に脱落した「欠損変異株」のいずれかに相当する可能性が考えられる（澤田ら，2014a）．この点については，今後，これらの菌株の比較ゲノム解析を進めることによって確認したいと考えている．

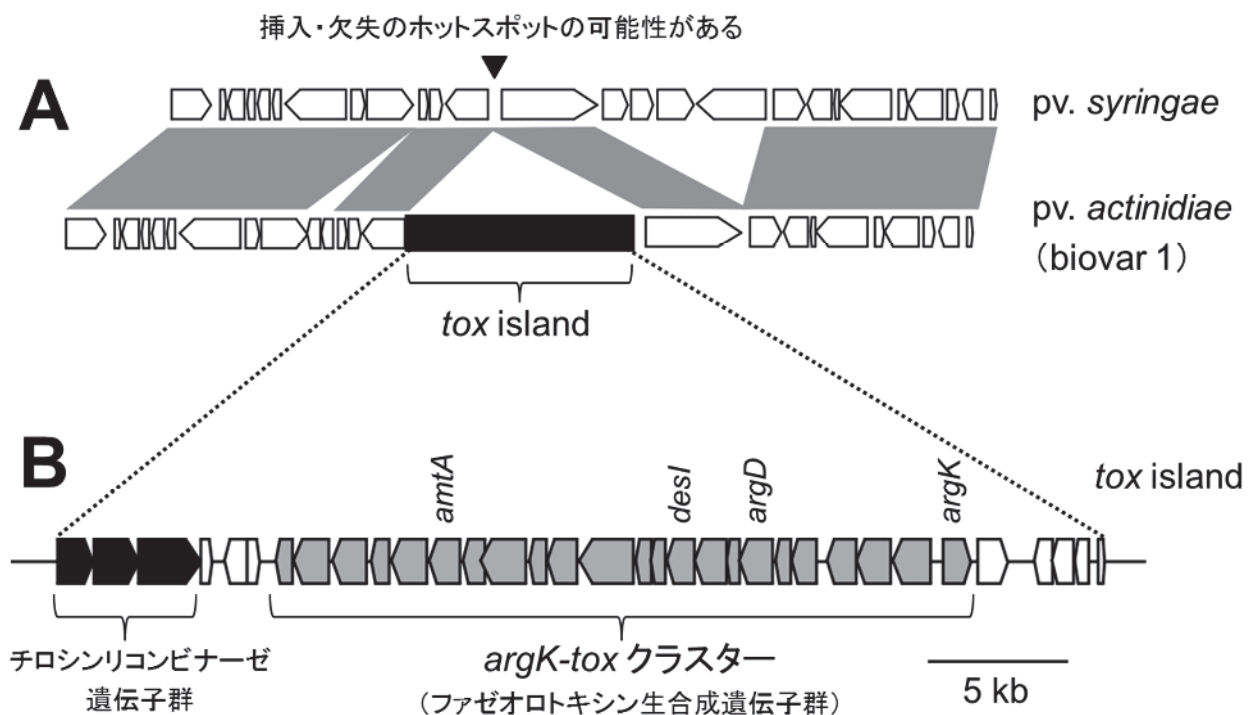


図1. biovar 1 の染色体における *tox island* の挿入部位付近の構造

- A: biovar 1（下側），および，近縁の *P. syringae* pv. *syringae*（上側）における，当該領域の遺伝子構成を模式的に示した．ホモログの関係にある遺伝子同士は，グレーボックスで結んである．biovar 1における黒塗りの四角で示した部分が，染色体に挿入された *tox island*（約 38kb）である．一方，*P. syringae* pv. *syringae*における相同な部位（黒塗りの矢尻で示した）には，*tox island* のようなゲノミックアイランドは挿入されていない（Genka et al., 2006；澤田ら，2014b）．
- B: *tox island* の構造を詳細に示した．グレーで示した部分が，ファゼオロトキシン生合成遺伝子群 [*argK-tox* クラスタ（約 23kb）] に相当する．*tox island* の左側境界付近には，チロシンリコンビナーゼ（部位特異的組換え酵素の1種であり，ゲノミックアイランドやファージの切り出し・挿入に関与する）をコードする遺伝子が3つタンデムに存在しており，これらが *tox island* の水平移動に関与した可能性が考えられる（Genka et al., 2006；澤田ら，2014b）．

biovar 1所蔵菌株の表現型のうち、API 20NEのプロファイル番号に関しては、biovar 3と同じ結果(0047451)が得られた(表2)。ただし、biovar 1では、培養開始後4~5日経過するとゼラチンが遅れて分解され始めるのに対し、biovar 3では陰性のまま変化が認められなかった。また、比較ゲノム解析の結果、エフェクター遺伝子の1つである*hopH3*は、かいよう病菌の中ではbiovar 1にのみ特異的に存在していることが明らかになっている(Fujikawa and Sawada, 2016; McCann et al., 2013)。そこで、*hopH3*を標的としてPCR検定を行ったところ、biovar 1所蔵菌株のすべてから増幅が確認できたのに対し、それ以外のかいよう病菌からは検出できなかった(表3)。したがって、これらの指標は、biovar 1の判別に利用できると考えている(澤田ら, 2016)。

## 2) biovar 3

biovar 3がわが国で初めて確認されたのは2014年であるが(澤田ら, 2015)、その後も分布の拡大は続いており、現時点で15都県から特殊報が出されるに至っている(農林水産省, 2016, など)。biovar 1に比べて被害程度がより大きいとの指摘もあり、地域によっては深刻な問題となっている。ジーンバンクには、4県に由来する23株のbiovar 3が所蔵されている(表1)。

biovar 3は、近年、世界中で猛威を振るっており、わが国を含む少なくとも12か国でその分布が確認されている(農林水産省, 2016, など)。なお、わが国では2014年までbiovar 3の検出事例が全く存在しないこと、biovar 3は中国が起源と推測されていること(Butler et al., 2013; Cuntly et al., 2015)などから、2014年に初検出されたbiovar 3は、いずれかの分布国よりごく最近になって

表3. ジーンバンク所蔵のかいよう病菌を対象としたPCR検定の結果

PCR検定の目的	pathovarの同定			biovarの判別					毒素関連遺伝子の検出						Pac_ICEの検出								
	ITS	<i>hopZ3</i>	<i>hopO1-2</i>	<i>hopH3</i>	<i>acnB</i>	<i>hopH1</i>	<i>hopZ5</i>	Con002	ファゼオロトキシン		コロナチン				ICE共通	ICE1	ICE2	ICE3					
PCRの標的 <sup>a)</sup>									<i>argK</i>	<i>argD</i>	<i>desI</i>	<i>amtA</i>	<i>cfl</i>	<i>corR</i>	<i>cmaU</i>	MCP	eno	China	met	Europe	<i>arsH</i>	<i>araC</i>	<i>gst</i>
biovar 1	+	+	-	+	-	-	-	-	d <sup>b)</sup>	d <sup>b)</sup>	d <sup>b)</sup>	d <sup>b)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
biovar 3	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	d <sup>c)</sup>	d <sup>c)</sup>	d <sup>c)</sup>	d <sup>c)</sup>	-	-	-	-
biovar 5	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
biovar 6	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

+, 陽性; -, 陰性; d, 菌株によって異なる。

a) PCRの標的とした各遺伝子領域、プライマー配列、反応条件等の詳細な情報は、澤田ら(2016)に示した。

b) 表1に示した50株のbiovar 1のうち、MAFF 613017と613018からは、ファゼオロトキシン生合成遺伝子群(*argK-tox*クラスター)の指標とした4つの遺伝子(*argK*~*amtA*; 図1)が検出できなかった(澤田ら, 2014a)。

c) 表1でMAFF番号を赤字で示した8株のbiovar 3からは、Pac\_ICE 1(表4)に関連した4つの遺伝子領域(MCP~met)が検出できなかった(澤田ら, 2015)。

から侵入したものではないか、と考えられている。また、中国を起源とするbiovar 3は、その後、少なくとも3つの伝搬経路（①中国からニュージーランドへ、②中国からヨーロッパ諸国へ、③中国からチリへ）を通じて、世界各地へと拡散した可能性が指摘されている（Butler et al., 2013 ; Balestra et al., 2013 ; Cuntly et al., 2015, など）。そこで、以上のような情報を踏まえた上で、わが国への侵入経路を解明するための糸口を探るべく、所蔵菌株と外国産の対照菌株の比較解析を試みた。

その際の指標として利用したのが、biovar 3が保持しているintegrative conjugative element (ICE : 宿主の染色体から切り出された後、接合によって他の細菌へと伝達されるタイプのゲノミックアイランド) である。ICEはきわめて変異に富んでおり、これまでにbiovar 3からは、構造や染色体における挿入部位などが異なる7種類のICE (Pac\_ICE1, 2, 3, 5, 6, 7, 8) が見出されている (Butler et al., 2015)。このうち、biovar 3における主要なICEとされている「Pac\_ICE1, 2, 3」の特徴を表4に示した。なお、前段に記した3つの伝搬経路には、それぞれ、これら主要な3つのICEを保持したbiovar 3が対応しているのではないかと、この推測がなされている (Butler et al., 2013, 2015 ; McCann et al., 2013 ; Balestra et al., 2013)。すなわち、①、②、③の各経路を通じて、Pac\_ICE1, 2, 3を保持したbiovar 3が伝搬された可能性が指摘されている。

biovar 3所蔵菌株のICE保有状況をPCR検定によって調査したところ、表1でMAFF番号を黒字で示した15株のbiovar 3からは、Pac\_ICE1に由来するシグナル (表3におけるMCP~metの4つの項目) を得ることができた (澤田ら, 2015)。この結果は、わが国へのbiovar 3の伝搬に、①の経路が関与している可能性を示唆するものといえる。しかし、これらの菌株のゲノム解析を行ったところ、ICE領域からさまざまな多型が検出され、これらが保持しているPac\_ICE1は多様性に富んでいることが分かってきた (藤

川・澤田, 未発表)。また、表1の赤字で示した8株のbiovar 3からは、Pac\_ICE1, 2, 3に由来する増幅産物 (表3におけるMCP~gstの8つの項目) が全く得られなかった (澤田ら, 2015)。以上のことは、わが国に分布するbiovar 3には、予想以上に多様な変異が存在することを示している。

したがって、biovar 3の侵入源・侵入経路に関して考察するためには、視点の異なるデータをさらに蓄積した上で、慎重に解析を進める必要がある。

表4. biovar 3が保持しているPac\_ICE1, 2, 3の比較 <sup>a)</sup>

	各ICEを保持したbiovar 3が 検出されている国 <sup>b)</sup>	染色体における 挿入部位 <sup>c)</sup>
Pac_ICE1	中国, ニュージーランド, 日本	<i>att-1</i>
Pac_ICE2	中国, ヨーロッパ諸国	<i>att-2</i>
Pac_ICE3	中国, チリ	<i>att-2</i>

a) biovar3からはこれまでに7種類のICE (Pac\_ICE1, 2, 3, 5, 6, 7, 8) が検出されている (Butler et al., 2015)。本表には、そのうちの主要な3種類のICEを示した。

b) Butler et al. (2013, 2015), McCann et al. (2013), Balestra et al. (2013), 澤田ら (2015) に基づく。

c) ICEが染色体に挿入される際、リジン tRNA 遺伝子が標的として利用される。なお、biovar 3にはリジン tRNA 遺伝子が2コピーあり、それぞれ、*clpB* 近傍と *exsB* 近傍に存在している。また、各コピーにおけるICEの挿入部位は、「*att-1*」と「*att-2*」と命名されている (Butler et al., 2013, 2015 ; McCann et al., 2013)。

ると考えている。

なお、biovar 3所蔵菌株の表現型を調べたところ、前述したように、API 20NEのプロファイル番号に関してbiovar 1と同じ結果が得られた（表2）。しかし、培養期間を延長してもbiovar 3ではゼラチンの分解が全く認められないことから、両者の判別は可能である。また、エフェクター遺伝子である *hopH1* と *hopZ5* は、かいよう病菌の中ではbiovar 3のみが保持していることが判明した（Fujikawa and Sawada, 2016 ; McCann et al., 2013）。そこで、これらを標的としたPCR検定を実施したところ、biovar 3所蔵菌株のすべてから明瞭なシグナルが確認できた（表3）（澤田ら, 2015）。したがって、これらの表現型・遺伝型は、biovar 3を判別する上で有効であろう。

### 3) biovar 5

biovar 5 は 2012 年に佐賀県北部地域で初めて分離された新規系統であり（澤田ら, 2014a），今のところ同地域以外では分布が確認されていない。ジーンバンクには 10 株が所蔵されている（表 1）。なお、biovar 5 の病原力は他の biovar より弱いと考えられているが、比較ゲノム解析の結果、病原性関連遺伝子の構成がかなり異なっていることが明らかになった（Fujikawa and Sawada, 2016）。その成果をもとに設計した特異的プライマーは、biovar 5 の判別に有効なことが確認できている（表 3 の Con002）。また、biovar 5 はかいよう病菌の中では唯一、蛍光色素を産生すること、API 20NE による検査でも特異的な結果（0443451）が得られることから（表 2）（澤田ら, 2014a），これらの表現型も判別指標として有効である。

### 4) biovar 6

biovar 6 は、2015 年に長野県中部地域で見つかった罹病樹から分離された新規系統であり（澤田ら, 2016），ジーンバンクには 13 株が所蔵されている（表 1）。これまでのところ、他の地域では分布が確認されていないことから、エンデミックな系統の可能性はある。なお、当該罹病樹は既に伐採されており、その後、biovar 6 が新たに検出されるという事例は発生していない。biovar 6 の特徴として特筆すべきなのは、ファゼオロトキシンとコロナチンという 2 つの植物毒素をいずれも産生するという点である（表 2, 3）（澤田ら, 2016）。このような特異な性質は、植物病理学におけるこれまでの研究の歴史の中でも報告例がなく、判別指標としても有効性が高いと思われる。この性質をどのようにして獲得したのか、これらの毒素は病原性の発現に対して如何に寄与しているのかなど、biovar 6 をめぐる未解明の問題は多く、今後、ゲノム解析等によって明らかにしたいと考えている。

## 3. おわりに

キウイフルーツかいよう病菌は東アジア起源であると推測されている（Genka et al., 2006 ; Butler et al., 2013 ; McCann et al., 2013 ; Cuntly et al., 2015 ; 澤田ら, 2014b ; 澤田, 2016, など）。すなわち、この地域に自生しているマタタビ属植物（サルナシ、マタタビなど）の表生菌の中から、遺伝子の水平移動やゲノム再編成等を通じて病原性を獲得するものが出現し、山中で野生植物の病

原菌として生息していた。その後、これら野生植物の病原菌が、近年になって商業栽培され始めたキウイフルーツと出会うことによって、「キウイフルーツかいよう病」という病気が我々の前に姿を現すに至ったのではないかと考えられている。

したがって、山中に潜んでいる未知の系統がキウイフルーツと新たに出会い、さらには、それが潜在感染・混入した苗、穂木、花粉等が流通することによって他の地域へも分布を拡大する、という事態が今後も発生する可能性は完全には否定できないであろう。重要なのは、新たに出現した系統を対象として病原学的な研究を遅滞なく実施した上で、得られた情報を利用してかいよう病菌の判別・検出技術を改良し、その有効性の維持・向上を図ることであろう。判別・検出技術は、病原菌の系統に適した防除対策を選択したり、病原菌の新たな分布拡大を阻止する上で、必要不可欠な基幹技術である（澤田ら、2016）。その技術開発を支援するためにも、また、病原菌の生態や分布の実態をより正確に把握するためにも、本病を対象とした探索・収集や特性評価に今後も取り組んでいきたいと考えている。

#### 4. 謝辞

本研究は以下の方々との共同研究として実施した（五十音順）：井手洋一氏（佐賀県庁）、間佐古将則氏（和歌山県果樹試験場）、菊原賢次氏（福岡県農林業総合試験場）、楠元智子氏（愛媛県農林水産研究所）、近藤賢一氏（長野県庁）、篠崎毅氏（愛媛県農林水産研究所）、清水伸一氏（愛媛県農林水産研究所）、中畝良二氏（農研機構）、成富毅誌氏（佐賀県庁）、野口真弓氏（佐賀県果樹試験場）、藤川貴史氏（農研機構）、三好孝典氏（愛媛県農林水産研究所）。また、農研機構の青柳千佳氏と中島比呂美氏には、ご支援・ご協力を賜った。ここに記して深く感謝の意を表したい。

#### 5. 参考文献

- Balestra, G.M., Taratufolo, M.C., Vinatzer, B.A. and Mazzaglia, A. (2013). A multiplex PCR assay for detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and differentiation of populations with different geographic origin. *Plant Dis.* 97: 472–478.
- Butler, M.I., Stockwell, P.A., Black, M.A., Day, R.C., Lamont, I.L. and Poulter, R.T.M. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* from recent outbreaks of kiwifruit bacterial canker belong to different clones that originated in China. *PLoS ONE* 8: e57464.
- Butler, M.I. and Poulter, R.T.M. (2015). The accessory genome of PSA strains from China, New Zealand, Chile, Italy, Japan and Korea. *In* 2nd International PSA Symposium Abstract and Programme Book. p. 94, Italy.
- Cunty, A., Cesbron, S., Poliakoff, F., Jacques, M.A. and Manceau, C. (2015). Origin of the outbreak in France of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3, the causal agent of bacterial canker of kiwifruit, revealed by a multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 81: 6773–6789.
- Fujikawa, T. and Sawada, H. (2016). Genome analysis of the kiwifruit canker pathogen

- Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 5. Sci. Rep. 6: 21399; doi: 21310.21038/srep21399.
- Genka, H., Baba, T., Tsuda, M., Kanaya, S., Mori, H., Yoshida, T., Noguchi, M.T., Tsuchiya, K. and Sawada, H. (2006). Comparative analysis of *argK-tox* clusters and their flanking regions in phaseolotoxin-producing *Pseudomonas syringae* pathovars. J. Mol. Evol. 63: 401–414.
- McCann, H.C., Rikkerink, E.H., Bertels, F., Fiers, M., Lu, A., Rees-George, J., Andersen, M.T., Gleave, A.P., Haubold, B., Wohlers, M.W., Guttman, D.S., Wang, P.W., Straub, C., Vanneste, J., Rainey, P.B. and Templeton, M.D. (2013). Genomic analysis of the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* provides insight into the origins of an emergent plant disease. PLoS Pathog 9: e1003503.
- 三好孝典・清水伸一・澤田宏之 (2012). ファゼオロトキシン産生能を失ったキウイフルーツかいよう病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*) の愛媛県における出現と分布. 日植病報 78: 92–103.
- 農林水産省 (2016). キウイフルーツかいよう病の新系統 (Psa3 系統) (更新 2016 年 6 月 20 日). 技術情報等, <http://www.maff.go.jp/j/syouan/syokubo/gaicyu/siryoku2/index.html>. 農林水産省, 東京 (参照 2016 年 6 月 20 日) .
- Sawada, H., Takeuchi, T. and Matsuda, I. (1997). Comparative analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and pv. *phaseolicola* based on phaseolotoxin-resistant ornithine carbamoyltransferase gene (*argK*) and 16S–23S rRNA intergenic spacer sequences. Appl. Environ. Microbiol. 63: 282–288.
- 澤田宏之・三好孝典・井手洋一 (2014a). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* の新規 MLSA グループ (Psa5 系統) によって *Actinidia chinensis* に発生したかいよう病. 日植病報 80: 171–184.
- 澤田宏之・三好孝典・清水伸一・中畝良二・藤川貴史 (2014b). キウイフルーツかいよう病菌の多様性. 植物防疫 68: 660–667.
- 澤田宏之・清水伸一・三好孝典・篠崎毅・楠元智子・野口真弓・成富毅誌・菊原賢次・間佐古将則・藤川貴史・中畝良二 (2015). わが国で分離された *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3 の特徴. 日植病報 81: 111–126.
- 澤田宏之・近藤賢一・中畝良二 (2016). キウイフルーツかいよう病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*) の新規 biovar (biovar 6) の特徴. 日植病報 82: 101–115.
- 澤田宏之 (2016). わが国に分布するキウイフルーツかいよう病菌の多様性 – 外来系統の侵入による混乱 –. 学術の動向 21(8): 28–33.
- Takikawa, Y., Serizawa, S., Ichikawa, T., Tsuyumu, S. and Goto, M. (1989). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.: the causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan. Ann. Phytopath. Soc. Japan 55: 437–444.

付録

これまでの探索収集調査実績

Appendix

Past Records

外部委託による探索収集調査実績（昭和62年度～平成21年度）（ジーンバンクのウェブサイトにおいて、報告書各巻のPDFを公開している）

掲載巻 (発行年月)	実施年度	調査課題	対象微生物	担当機関	担当者	派遣先	期間
第1巻 (1989.3)	昭62 (1987)	害虫防除に利用する微生物の探索および特性解明	昆虫寄生菌	果樹試験場	柳 沼 勝 彦	長野県 岩手県・青森県 静岡県	S62.07.27～S62.07.29 S62.10.22～S62.10.24 S62.12.07～S62.12.08
		香川県および愛媛県における魚類病原菌およびウイルスの探索収集	魚類病原細菌 魚類病原ウイルス	養殖研究所	反 町 稔 佐 古 浩 前 野 幸 男	香川県・愛媛県	S62.11.07～S62.10.13
		多糖類分解酵素の生産菌の探索および特性解明	多糖類分解菌	食品総合研究所	原 口 和 朋	千葉県	S62.10.13～S62.10.24
		北海道の各種飼料に着生する有用微生物の収集	飼料微生物	畜産試験場	原 慎 一 郎	北海道	S62.09.24～S62.09.29
		窒素固定菌の探索収集とその有効利用	窒素固定菌	農業生物資源研究所	蒲 生 卓 磨	タイ	S62.09.01～S62.09.22
		反芻家畜寄生性住血吸虫の探索および収集	家畜寄生性原虫	家畜衛生試験場	南 哲 郎	インドネシア	S62.11.29～S62.12.19
第2巻 (1990.3)	昭63 (1988)	小笠原諸島の亜熱帯農業環境における菌類遺伝資源の収集および特性解明	植物病原菌 木材腐朽菌	農業環境技術研究所	佐 藤 豊 三	小笠原諸島 (父島 母島)	S63.07.01～S63.07.06
		果樹の根頭がんしゅ病菌およびブドウウイルス病様症状の探索収集および特性解明	植物病原ウイルス 植物病原細菌	果樹試験場	今 田 準 澤 田 宏 之	岩手県・青森県 山形県・秋田県	S63.06.20～S63.06.23
		亜熱帯地域に生息する食品関連の特殊糸状菌の収集	カビ毒生産菌	食品総合研究所	鶴 田 理	沖縄県	S63.11.05～S63.11.10
		北海道における大型褐藻分解細菌の探索収集	大型褐藻分解細菌	中央水産研究所	中 山 昭 彦 内 田 基 晴	北海道	S63.07.04～S63.07.06
		ネパール国における伝統的な発酵食品の調査および食品微生物の調査	発酵微生物	食品総合研究所	新 国 佐 幸	ネパール	S63.10.11～S63.11.01
第3巻 (1991.3)	平元 (1989)	沖縄における食用きのこ遺伝資源の探索収集および特性解明	食用きのこ	森林総合研究所	根 田 仁	沖縄県	H01.10.13～H01.11.19
		都城市周辺圃場におけるアフラトキシン生産菌の探索収集	糸状菌	食品総合研究所	岡 崎 博	宮崎県	H01.08.23～H01.08.25
		タイにおけるさび病菌の重複寄生菌の調査・収集	拮抗微生物	農業環境技術研究所	佐 藤 豊 三	タイ	H01.10.02～H01.10.21
第4巻 (1992.3)	平2 (1990)	キオピエダシヤクの病原糸状菌の探索収集	糸状菌	森林総合研究所	島 津 光 明	沖縄県	H02.12.18～H02.12.21
		ソルガム紫斑点病菌の交配用菌株等の探索	糸状菌	草地試験場	月 星 隆 雄	九州	H02.09.09～H02.09.12
		特殊環境微生物の探索と利用	特殊環境微生物	食品総合研究所	川 澄 俊 之	九州	H02.10.15～H02.10.18
		ニュージーランドにおけるきのこ類の探索収集	食用きのこ	森林総合研究所 沖縄県林業試験場	根 田 仁 宮 城 健	ニュージーランド	H03.03.13～H03.03.27
第5巻 (1993.3)	平3 (1991)	高知県における木材腐朽菌遺伝資源の探索収集	木材腐朽菌	森林総合研究所	服 部 力	高知県	H03.11.12～H03.11.15
		セルロース合成および分解真菌の探索収集および特性解明	鞭毛菌類・子囊菌類	農業環境技術研究所	大久保 博 人	北海道	H03.09.24～H03.09.28
		北海道におけるコムギ植物体上微小菌類の収集	微小菌類	農業生物資源研究所	青 木 孝 之	北海道	H03.07.08～H03.07.12
		米粒の品質劣化に影響する病原菌類相と侵害機作の解明	糸状菌	農業研究センター	内 藤 秀 樹	山口県	H03.09.23～H03.09.25
		タイにおける特殊環境微生物（好塩菌）の探索収集	特殊微生物	食品総合研究所	川 澄 俊 之	タイ	H03.07.25～H03.08.20
第6巻 (1994.3)	平4 (1992)	ナン黒星病菌のDMI剤感受性のモニタリング	糸状菌	果樹試験場	石 井 英 夫	佐賀県	H04.07.18～H04.07.20
		九州における樹木寄生糸状菌類の調査と収集	糸状菌	森林総合研究所	金 子 繁	大分県・熊本県	H04.09.22～H04.09.27
		中華人民共和国雲南省におけるイネいもち病菌の探索収集	糸状菌	農業研究センター	内 藤 秀 樹	中国	H04.09.19～H04.09.29



掲載巻 (発行年月)	実施年度	調査課題	対象微生物	担当機関	担当者	派遣先	期間
第7巻 (1995.3)	平5 (1993)	小笠原諸島におけるさび病菌の重複寄生菌の調査・収集	糸状菌	四国農業試験場	佐藤豊三	小笠原諸島	H05.12.08～H05.12.15
		九州地域におけるイネ白葉枯病菌各種レースの探索・収集	植物病原細菌	農業生物資源研究所	加来久敏	長崎県・熊本県 宮崎県	H05.09.25～H05.09.28
		タイ国におけるサイレージ用高温性乳酸菌の探索・収集	乳酸菌	草地試験場 静岡県畜産試験場	大桃定洋 片山信也	タイ	H05.08.25～H05.09.13
第8巻 (1996.3)	平6 (1994)	北海道に発生する植物病原MLOの探索と収集	植物病原微生物	農業研究センター	塩見敏樹	北海道	H06.08.30～H06.09.03
		東北地方におけるナラタケ属菌の生態と分類学的検討	担子菌類	森林総合研究所	長谷川絵里	青森県・岩手県 山形県・宮城県 福島県	H06.09.12～H06.09.13 H06.10.06～H06.10.07 H06.10.11～H06.10.12 H06.10.20～H06.10.21 H06.10.24～H06.10.25
		オーストラリアにおける <i>Agrobacterium</i> 属細菌の探索・収集	植物病原細菌	農業環境技術研究所 静岡県農業試験場	澤田宏之 牧野孝宏	オーストラリア	H07.03.08～H07.03.22
		スリランカ国におけるイネ病原微生物の探索収集	植物病原細菌	農業生物資源研究所 京都府立大学 北海道十勝農業試験場	落合弘和 堀野修之 宮島邦之	スリランカ	H07.02.25～H07.03.08
第9巻 (1997.3)	平7 (1995)	沖縄における放線菌根菌(フランキア菌)の探査と収集	窒素固定微生物	森林総合研究所	山中高史	沖縄県	H07.09.18～H07.09.21
		南西諸島における拮抗性シュードモナス属細菌の探索と収集	拮抗細菌	農業生物資源研究所	土屋健一	沖縄県	H07.11.25～H07.12.04
		中国におけるダイズ根粒菌等有用微生物の探索・収集に関する共同調査	共生微生物	農業生物資源研究所 長野県中信農業試験場	横山正文 村上敏文	中国	H07.07.15～H07.08.01
第10巻 (1998.3)	平8 (1996)	北海道における発酵食品微生物の収集	食品微生物	食品総合研究所	森勝美 山田(伊豫)知枝 中島博文 島純	北海道	H08.11.26～H08.11.30
		九州地方におけるカメムシ類共生微生物の探索と収集	共生微生物	果樹試験場	三代浩二	福岡県・熊本県 大分県	H08.10.14～H08.10.19
		ネパールにおける新規拮抗微生物の探索収集	拮抗微生物	農業生物資源研究所 兵庫県中央農業技術センター	堀田光生 相野公孝	ネパール	H08.09.24～H08.10.08
第11巻 (1999.3)	平9 (1997)	長崎県福江島、壱岐及び対馬におけるカンキツかいよう病菌の収集	細菌	果樹試験場	塩谷浩 尾崎克己	対馬・壱岐 福江島	H09.08.21～H09.08.22 H09.09.25～H09.09.26 H09.10.23～H09.10.24
		タイ国でのカンキツトリステザウイルス弱毒、強毒系統の探索・収集	ウイルス	果樹試験場	家城洋之	タイ	H09.08.27～H09.09.11
		沖縄県での暖地型イネ科植物ミイラ穂病菌の探索・収集	糸状菌	草地試験場	月星隆雄	沖縄本島 石垣島	H10.02.26～H10.03.02
第12巻 (2000.3)	平10 (1998)	離島及び西日本地域のブナ帯における主要栽培きのこの野生菌株の収集と特性評価	担子菌	森林総合研究所	馬場崎勝彦 宮崎安将	南九州・佐渡島 紀伊半島	H10.10.26～H10.11.20
		奄美大島におけるサトウキビ上生息糸状菌類の収集と特性評価	糸状菌	農業生物資源研究所	青木孝之	奄美大島	H10.11.30～H10.12.06
		台湾におけるVA菌根菌の探索と収集	共生微生物	草地試験場	斉藤雅典	台湾	H11.01.16～H11.01.24

掲載巻 (発行年月)	実施年度	調査課題	対象微生物	担当機関	担当者	派遣先	期間
第13巻 (2001.3)	平11 (1999)	沖縄における乳酸菌の収集と特性評価	乳酸菌	畜産試験場	木元 広 実	沖縄県	H11.08.25 ~ H11.09.01
		東北地域におけるイチゴうどんこ病に対する拮抗微生物の収集と特性評価	拮抗微生物	野菜・茶業試験場	小坂橋 基 夫	栃木県・福島県 青森県・岩手県 宮城県	H12.01.18 ~ H12.01.21
		ロシア極東地域における <i>Steinernema</i> 属・ <i>Heterorhabditis</i> 属 昆虫病原性線虫およびそれらの共生細菌の収集と特性評価	線虫 共生細菌	農業環境技術研究所	吉田 睦 浩	ロシア	H11.09.05 ~ H11.10.07
第14巻 (2002.3)	平12 (2000)	沖縄におけるいもち病菌の収集と特性評価	糸状菌	中央農業総合研究センター	宮坂 篤 一 園田 亮 一	沖縄県	H12.10.17 ~ H12.10.20
		東北地方北部地域及び長野県におけるナメコ等食用きのこの収集と特性評価	担子菌	森林総合研究所 岩手県林業技術センター 青森県林業試験場	馬場崎 勝 彦 宮崎 安 将 上 部 明 広 坂 本 尚 美	長野県・青森県 秋田県	H12.10.17 ~ H12.10.19 H12.10.30 ~ H12.11.02
		インドネシアにおける植物病原および共生シュードモナスの収集と特性評価	細菌	農業環境技術研究所	土屋 健 一	インドネシア	H12.11.19 ~ H12.12.03
第15巻 (2003.3)	平13 (2001)	沖縄県における園芸作物病原菌等の収集と特性評価	糸状菌	農業生物資源研究所	佐藤 豊 三	沖縄県	H13.11.01 ~ H13.11.07
		沖縄県でのイネ科植物寄生性 <i>Bipolaris</i> , <i>Curvularia</i> , <i>Exserohilum</i> 属菌の収集	糸状菌	農業環境技術研究所	月星 隆 雄	沖縄県	H14.02.18 ~ H14.02.22
		沖縄県におけるサトウキビから分離される細菌の収集と特性 解明	細菌	農業環境技術研究所	篠原 弘 亮	沖縄県	H13.11.25 ~ H13.12.01
		南西諸島における植物病原細菌の探索収集	細菌	農業生物資源研究所	堀田 光 生	南西諸島	H14.01.23 ~ H14.01.30
第16巻 (2004.3)	平14 (2002)	南九州におけるイネ科植物内生性窒素固定細菌の収集と評価	窒素固定細菌	国際農林水産業研究センター	安藤 康 雄	宮崎県 鹿児島県	H14.09.01 ~ H14.09.05
		長野・群馬・新潟県におけるダイズシストセンチュウ並びに ネコブセンチュウの収集	線虫	中央農業総合研究センター	相場 聡 水久保 隆 之 伊藤 賢 治	長野県・群馬県 新潟県	H14.10.21 ~ H14.10.25 H14.11.12 ~ H14.11.13
		富山県におけるキク立枯れ性病害の収集と特性評価	糸状菌	花き研究所	築尾 嘉 章	富山県	H14.11.25 ~ H14.11.26
		サトウキビ白すじ病菌の探索・収集	細菌	農業環境技術研究所	対馬 誠 也	沖縄県	H14.12.09 ~ H14.12.13
		北東北地域における発酵関連糸状菌の探索収集	発酵関連糸状菌	食品総合研究所	柏木 豊	青森県	H14.12.18 ~ H14.12.20
		冬期ベトナム北部における野菜発酵食品由来微生物の収集 と特性評価	発酵関連微生物	食品総合研究所	稲津 康 弘	ベトナム	H14.03.03 ~ H14.03.16
		北海道でのイネ科植物寄生性 <i>Bipolaris</i> , <i>Drechslera</i> , <i>Exserohilum</i> 属菌の収集	糸状菌	農業環境技術研究所	月星 隆 雄	北海道	H15.08.25 ~ H15.08.29
第17巻 (2005.1)	平15 (2003)	キク立枯れ性病害の病原菌の探索・収集	糸状菌	花き研究所	伊藤 陽 子 築尾 嘉 章	香川県	H15.09.04 ~ H15.09.05
		富山県および新潟県におけるダイズシストセンチュウの収集	線虫	中央農業総合研究センター	相場 聡	富山県 新潟県	H15.11.04 ~ H15.11.05 H15.11.06 ~ H15.11.07
		アメリカ合衆国の微生物遺伝資源保存機関の視察	卵菌類等	農業生物資源研究所	竹内 香 純 飯田 元 子	アメリカ合衆国	H15.10.07 ~ H15.10.09

掲載巻 (発行年月)	実施年度	調査課題	対象微生物	担当機関	担当者	派遣先	期間
第18巻 (2005.11)	平16 (2004)	特異な分布をとる新規アフラトキシン産生菌の探索 (信越地方)	糸状菌	信州大学	後藤 哲久	長野県	H16.07.16 ~ H16.08.06
		屋久島、奄美大島における昆虫病原糸状菌の探索・収集	糸状菌	果樹研究所	柳 沼 勝彦	鹿児島県	H16.10.18 ~ H16.10.23
		中国における飼料作物・家畜腸内由来乳酸菌の収集と評価	乳酸菌	畜産草地研究所	蔡 義民	中国	H16.09.17 ~ H16.10.24
第19巻 (2006.12)	平17 (2005)	植物内生酵母の探索と特性解析	酵母	北海道農業研究センター	斎藤 勝一	北海道	H17.06 ~ H17.09
		実用栽培品種ダイズ根粒菌の探索収集	根粒菌	青森県農林総合研究センター	桑田 博隆 近藤 伸子 岩谷 香緒里	青森県	H17.03.15
		台湾・マレーシアにおけるチャもち病菌の探索収集	糸状菌	農業生物資源研究所	長尾 英幸	台湾 マレーシア	H17.04.25 ~ H17.05.10 H18.01.24 ~ H18.02.09
第20巻 (2007.12)	平18 (2006)	キャベツ黒腐病菌及びファージの探索収集	植物病原細菌 ファージ	中央農業総合研究センター	井上 康宏 松浦 貴之 畔上 耕児	長野県・茨城県 群馬県・東京都 三重県・静岡県 岐阜県	H18.07.26 ~ H18.12.05
		ニンジンこぶ病菌の探索収集	植物病原細菌	青森県農林総合研究センター	桑田 博隆 岩谷 香緒里	青森県	H18.09.16 ~ H18.10.10
		島根大田と熊本阿蘇の草地における アーバスキュラー菌根菌の探索収集	菌根菌	畜産草地研究所	小島 知子	島根県・熊本県	H18.05.21 ~ H18.05.24 H18.11.05 ~ H18.11.08
		東京都の園芸作物に発生した本邦初産属種を含む 植物病原菌類の特性評価	植物病原糸状菌	東京都農林総合研究センター 東京農業大学	竹内 純道 堀江 博吏 岡裕 啓子 廣夏 秋啓 成澤 才彦	(特性調査)	
第21巻 (2008.12)	平19 (2007)	西南暖地における Dark-septate endophytic fungi (DSE) の採集とその生態解明	糸状菌	茨城大学	成澤 才彦	茨城県・沖縄県 鹿児島県	H19.08.23 ~ H19.08.25
		西南暖地の未知の植物病原性分生子果不完全菌の収集	植物病原糸状菌	三重大学	中島 千晴	鹿児島県 沖縄県	H19.05.28 ~ H19.05.31 H19.11.17 ~ H19.11.20
		キクわい化ウイルスの探索収集	ウイルス	花き研究所	松下 陽介	鹿児島県	H19.07.23 ~ H19.07.26
		中国チベットにおける伝統発酵飼料・食品由来乳酸菌の 収集と分類	乳酸菌	畜産草地研究所	蔡 義民	中国	H19.09.06 ~ H19.09.28
		ミャンマー連邦におけるいもち病菌の探索収集	植物病原糸状菌	農業生物資源研究所 東京農業大学	林 長生 入江 憲治	ミャンマー	H19.09.22 ~ H19.10.03
		トマト青枯病菌 <i>Ralstonia solanacearum</i> に感染する ファージの特性評価	ファージ	名古屋大学	浅川 晋	(特性調査)	
第22巻 (2009.12)	平20 (2008)	南西諸島の主要作物に発生する細菌性病害の 探索と病原細菌の収集	植物病原細菌	九州大学	土屋 健一	沖縄県	H20.12.20 ~ H20.12.24
		国内産 <i>Pestalotiopsis</i> 属菌の系統分類と 拮抗性微生物としての可能性	植物病原糸状菌	玉川大学	渡辺 京子	宮城県 茨城県 神奈川県 静岡県	H20.09.19 H20.09.20 H20.10.11 H20.10.26
		各種園芸作物の病原菌の収集と それらの孢子形成能を維持した簡易保存法の検討	植物病原糸状菌	首都大学東京	古川 聡子	東京都・埼玉県 茨城県など	H20.05以降、複数回
		Phylotype 決定に基づいた青枯病菌 <i>Ralstonia solanacearum</i> 国内菌株の系統再分類による青枯病菌インベントリーの作成	植物病原細菌	高知大学	曳地 康史	(特性調査)	
		西南暖地において収集した落葉漂白菌類の リグニン分解特性の評価	糸状菌	京都大学	大園 享司	(特性調査)	

掲載巻 (発行年月)	実施年度	調査課題	対象微生物	担当機関	担当者	派遣先	期間
第23巻 (2010.12)	平21 (2009)	トマト葉かび病菌の新たな病原性系統の収集	糸状菌	野菜茶業研究所	飯田 祐一郎	北海道など	H21.04.01以降、複数回
		きのこ栽培の害菌, <i>Trichoderma</i> 属菌の探索, 分子系統解析と代謝産物パターン解析	糸状菌	玉川大学 富山県立大学	奥田 徹 五十嵐 康弘	沖縄県 岩手県	H21.06.17 ~ H21.06.22 H21.10.09 ~ H21.10.12
		細胞性粘菌の作物病害微生物に対する抑制作用	粘菌	筑波大学	川上 新一	鹿児島県 北海道 新潟県	H21.07.24 ~ H21.07.27 H21.09.10 ~ H21.09.13 H21.11.02 ~ H21.11.03
		国内産 <i>Corynespora cassicola</i> 菌株の寄生性と系統進化の解析	糸状菌	高知県農業技術センター	下元 祥史	(特性調査)	

各中期計画期間におけるサブバンクの代表的課題の紹介（平成18年度～平成27年度）（ジーンバンクのウェブサイトにおいて、報告書各巻のPDFを公開している）

掲載巻 (発行年月)	実施年度	調査課題	対象微生物	担当サブバンク	担当者	
第24巻 (2011.12)	平18～22 (2006～2010)	第2期中期計画	クリンギゾウムシ幼虫に強い病原力を有する昆虫病原系状菌の探索	昆虫病原系状菌	果樹研究所	井原史雄 柳沼勝彦
			材質腐朽菌3種の果樹類における発生調査およびナン枝に対する病原性の評価	植物病原系状菌	果樹研究所	中村仁
			キクのビシウム立枯病菌の同定と病原性	植物病原系状菌	花き研究所	月星隆雄
			数種アブラナ科植物に病原性を有する <i>Alternaria brassicicola</i> の収集	植物病原系状菌	野菜茶業研究所	窪田昌春
			ライグラスなどグラス類もち病菌の分子系統と病原性	植物病原系状菌	畜産草地研究所	月星隆雄
			乳児糞便からの乳酸菌の分離・同定と特性解析	乳酸菌	畜産草地研究所	鈴木チセ
			優れた発酵特性を有する酵母の探索	酵母	食品総合研究所	安藤聡 中村敏英
			伝統的黒酢製造時に生成される膜状堆積物中の細菌	細菌	食品総合研究所	木村啓太郎
			北日本地域におけるダイズシストセンチュウの探索・収集	線虫	中央農業総合研究センター	相場聡
			<i>Penicillium oxalicum</i> による日本新発生のトマト青かび病	植物病原系状菌	農業環境技術研究所	小坂橋基夫
			沖縄県で分離されたサトウキビ白すじ病菌の分子系統解析	植物病原細菌	農業環境技術研究所	對馬誠也
			ヒアシンス腐敗病、ナルコユリ炭疽病およびマダラハウチワマメ灰色かび病	植物病原系状菌	農業生物資源研究所	富岡啓介
			アサガオ類白さび病菌の分子系統と宿主特異性	植物病原系状菌	農業生物資源研究所	佐藤豊三
			納豆菌バクテリオファージのタイピングと特性調査	バクテリオファージ	農業生物資源研究所	永井利郎
第25巻 (2016.12)	平23～27 (2011～2015)	第3期中期計画	圃場抵抗性品種から分離したイネいもち病菌の遺伝子型とレースの調査	植物病原系状菌	中央農業総合研究センター	鈴木文彦 安田伸子 芦澤武由里子
			畑地土壌から分離した <i>Agrobacterium (Rhizobium)</i> 属細菌の特性	細菌	中央農業総合研究センター	大脇良成
			狭義のナラタケ <i>Armillaria mellea sensu stricto</i> の果樹類に対する病原性	植物病原系状菌	果樹研究所	中村仁
			<i>Plectosphaerella cucumerina</i> によるキク苗腐敗病の発生および病原菌の生態について	植物病原系状菌	花き研究所	佐藤衛
			花き病害病原系状菌類の光質に対する応答反応	植物病原系状菌	花き研究所	佐藤衛
			チャ輪斑病菌の収集と QoI 剤感受性の評価	植物病原系状菌	野菜茶業研究所	山田憲吾
			<i>Pantoea</i> 属菌の雑草等からの分離とタマネギおよびネギに対する病原性	植物病原細菌	野菜茶業研究所	畔上耕児
			トウモロコシ根腐病菌の収集・同定と特性評価	植物病原系状菌	畜産草地研究所	月星隆雄 菅原幸哉 増中章
			国産自給飼料としての大豆ソフトグレインサイレージからの乳酸菌の収集と系統学的分類	細菌	畜産草地研究所	遠野雅徳
			根圏細菌 SB-K88 株がコムギ縮萎病媒介者 <i>Polymyxa graminis</i> のコムギへの感染に及ぼす影響	細菌	北海道農業研究センター	佐山充 大木健広
			レタスビッグベイン病を媒介する <i>Olpidium virulentus</i>	糸状菌	近畿中国四国農業研究センター	野見山孝司
			ステラ（バコパ）とニチニチソウの炭疽病菌	植物病原系状菌	近畿中国四国農業研究センター	富岡啓介
			ショウガ科植物青枯病菌の遺伝的多様性	植物病原細菌	農業環境技術研究所	堀田光生
			納豆菌欠損ファージ生産変異株の作出	バクテリオファージ	農業生物資源研究所	永井利郎
			わが国で分離されたキウイフルーツかいよう病菌の特徴	植物病原細菌	農業生物資源研究所	澤田宏之

遺伝資源センター資料

平成 28 年 12 月

微生物遺伝資源探索収集調査報告書 第 25 巻

2016 年 12 月 24 日 印刷

2016 年 12 月 25 日 発行

編集兼  
発行者

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構  
遺伝資源センター

Genetic Resources Center  
National Agriculture and Food Research Organization  
〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2  
<http://www.gene.affrc.go.jp/>

**Annual Report on Exploration and Introduction of  
Microbial Genetic Resources**

**Vol. 25**

**2016**



**Genetic Resources Center  
National Agriculture and Food Research Organization**