

# 岡山県で発生した *Rhizobium radiobacter* (Ti) による ブドウ根頭がんしゅ病

岡山県農業総合センター農業試験場 かわ ぐち あきら  
川 口 章

## はじめに

ブドウ根頭がんしゅ病は土壌伝染性の細菌病であり、保菌苗木の流通によって病原細菌が広範囲に伝搬され、世界中のブドウ生産国で発生が問題となっている。病原細菌は海外では *Rhizobium vitis* (Ti) (= *Agrobacterium vitis* (Ti), *A. tumefaciens* biovar 3 ; 以下, 学名表記は C システム (澤田, 2007) に従う。Ti は植物にがんしゅを形成させる能力をもつという意味) と *R. radiobacter* (Ti) (= *A. tumefaciens* (Ti), *A. tumefaciens* biovar 1) が知られていたが、日本では *R. vitis* (Ti) のみが報告されていた (BURR and KATZ, 1984 ; THIES et al., 1991 ; 日本植物病理学会, 2000)。しかし、2005 年岡山県において、本病の病徴を呈するブドウの組織片から *R. vitis* (Ti) のコロニー形状とは明らかに異なる細菌が優占的に分離された。調査の結果、筆者らはそれらの細菌が *R. radiobacter* (Ti) であることをつきとめた (KAWAGUCHI and INOUE, 2009)。本稿では、発生状況や病原細菌の性質について紹介する。実験手法などの詳細は KAWAGUCHI and INOUE (2009) を参照されたい。

## I 発生状況

2005 年 10 月に岡山県赤磐市の無加温施設栽培ブドウ (品種: ‘瀬戸ジャイアンツ’, 9 年生) の結果枝の副梢の切り返し部に、直径 5 cm のがんしゅ様組織が形成されたものが農業試験場にもち込まれた。続いて同年 12 月、岡山県岡山市の加温施設栽培ブドウ (‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’, 6 年生) の地上部に直径 6 cm のがんしゅ様組織が形成されているのを確認した (図-1)。これらの症状はこれまで筆者が見てきた *R. vitis* (Ti) によるブドウ根頭がんしゅ病の症状とほぼ同じであった。これらのがんしゅ様組織から *R. vitis* 用選択培地である 3DG 培地 (BRISBANE and KERR, 1983) を用いて病原細菌の分離を行った。得られたコロニーから 10 菌株 (10 月のサンプルから ST05-1 株および ST05-2 株,

12 月のサンプルから AT06-1 ~ AT06-8 株) を選抜し、以下の試験に供試した。

## II 病原細菌の同定

### 1 病原性

根頭がんしゅ病菌の病原性を調べるためには、検定植物であるトマトを利用することが多い。分離細菌 10 菌株の菌液 (約  $10^8$  cells/ml) を滅菌した針に浸してトマト (品種: ‘ボンデローザ’) およびブドウ (品種: ‘ネオ・マスカット’) に有傷接種したところ、トマトでは接種 30 日後に、ブドウでは 90 日後にがんしゅ形成が確認され、接種部位から接種した菌が再分離された。

### 2 細菌学的性質

細菌学的性質の検査項目は非常に多いが、根頭がんしゅ病菌を特徴的に区別できる検査のみを選定することは可能である。澤田・土屋 (2003) および KAWAGUCHI et al. (2005 b) の報告を参考にし、13 項目の検査を行った。その結果を対象菌株と比較したところ、非病原性 *R. radiobacter* Ar-4 株とすべての項目で一致し、*R. radiobacter* (Ti) AtC1 株と 12 項目で一致した。非病原



図-1 *Rhizobium radiobacter* (Ti) によるブドウ根頭がんしゅ病の症状 (矢印は形成されたがんしゅを示す)

Grapevine Crown Gall Caused by *Rhizobium vitis* (Ti) in Okayama Prefecture, Japan. By Akira KAWAGUCHI

(キーワード: ブドウ根頭がんしゅ病, *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium vitis*)

表-1 ブドウ分離菌株の細菌学的性質

試験項目	ブドウ分離 菌株 <sup>a)</sup>	<i>R. radiobacter</i> (Ti) AtC1 株	非病原性 <i>R.</i> <i>radiobacter</i> (Ti) Ar-4 株	<i>R. rhizogenes</i> (Ti) Ch-Ag- 2 株	<i>R. vitis</i> (Ti) G-Ag-27 株
3-ケトラクトースの生成 (2) <sup>b)</sup>	+	+	+	-	-
リトマスミルク培養 (20)	K, R	K, R	K, R	A, C	K, R
オキシダーゼ活性	+	+	+	-	+
30℃での生育 (7)	+	+	+	-	+
1A 培地での生育 (7)	+	+	+	-	-
D-1 培地での生育 (10)	K, +	K, +	K, +	A, +	A, +
酸の産生: (7)					
エリトリトール	-	-	-	+	-
エタノール	+	+	+	-	-
アルカリの産生: (7)					
L-酒石酸塩の利用	+	-	+	+	+
マロン酸	-	-	-	+	+
クエン酸	-	-	-	+	+
アルブチン分解 (5)	+	+	+	+	-
アルギニン加水分解 (25)	+	+	+	-	+

<sup>a)</sup> ST05-1, ST05-2, AT06-1, AT06-2, AT06-3, AT06-4, AT06-5, AT06-6, AT06-7, AT06-8 株を含む。 <sup>b)</sup> ( ): 培養期間 (日), +: 陽性, -: 陰性, K: アルカリ性, R: リトマスの還元, A: 酸性, C: 牛乳の凝固, NT: 試験せず。

性 *R. radiobacter* Ar-4 株は以前筆者が別のブドウから分離した菌株である (KAWAGUCHI et al., 2005 b)。*R. radiobacter* (Ti) AtC1 株はキクから分離された菌株であり、両者の違いは L-酒石酸の利用能だけである (表-1)。ブドウ組織には L-酒石酸が豊富に存在し、本来 *R. radiobacter* は L-酒石酸の利用能をもたないが、ブドウから分離された菌株はその能力を獲得している事例が報告されている (BURR and KATZ, 1983; SALOMONE et al., 1996; 1998)。今回のブドウ分離菌株も同様に L-酒石酸の利用能を有していたことわかった。

### 3 PCR 検定および 16S rDNA 解析

根頭がんしゅ病菌の主な病原因子である Ti プラスミド (以下, pTi) 上にある病原性関連遺伝子の一つ *virC*, 特に *virC1-virC2* オペロンを挟んだ領域を特異的に増幅するプライマーと, *R. vitis* に特異的な 16S rDNA の領域を増幅するプライマーを含むマルチプレックス PCR によるブドウ根頭がんしゅ病菌の簡易同定法 (KAWAGUCHI et al., 2005 a) を用いて調べた結果, 種特異的領域は増幅されず, *virC* のみ増幅が認められた (図-2)。この結果は, 分離菌株は pTi を有するが *R. vitis* ではないことを示している。また, 分離菌株のうち AT06-1 株および AT06-2 株について, 16S rDNA のほぼ全領域に当たる約 1.4 kbp の塩基配列を決定し, 日本 DNA データバンク (DDBJ) で同源性検索を行った結

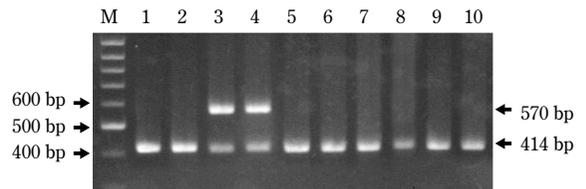


図-2 マルチプレックス PCR 法 (KAWAGUCHI et al., 2005 a) による *Rhizobium vitis* (Ti) の簡易同定

M: DNA マーカー, レーン 1~2: ブドウ以外の植物から分離された *R. radiobacter* (Ti) の菌株, レーン 3~4: *R. vitis* (Ti) の菌株, レーン 5~10: ブドウ分離菌株。570 bp のバンドが *R. vitis* の 16S rDNA 特異的バンドを示し, 414 bp のバンドは *virC* 遺伝子特異的バンドを示す。

果, 多くの *R. radiobacter* の菌株と 100% の同源性を示した。

これら病原性, 細菌学的性質, 遺伝子解析の結果を総合的に判断し, 分離菌株を *R. radiobacter* (Ti) と同定した。

## III 他の *Rhizobium* 属細菌との比較

### 1 病原性

前章までに述べた分離菌株の病原性はブドウおよびトマトで確認したが, 植物によって形成されたがんしゅの

大きさに差異が認められた。そこで各種 *Rhizobium* 属細菌と病原性の程度について比較した。供試菌株の *R. vitis* (Ti) VAT07-1 株は、AT06-1 株～AT06-8 株が分離されたブドウから2006年に分離されたものであり、*R. vitis* (Ti) G-Ag-27 株は長野県のブドウから分離されたものである。実験の結果、ブドウから分離され、*R. radiobacter* (Ti) と同定した ST05-1 株および AT06-1 株、*R. vitis* (Ti) VAT07-1 株はブドウで病原性が強いがトマトでは弱く、*R. vitis* (Ti) G-Ag-27 株は両植物で病原性が強いが、ブドウ以外から分離された *R. radiobacter* (Ti) AtC1 株および *R. rhizogenes* (Ti) (= *A. rhizogenes* (Ti), *A. tumefaciens* biovar 2) Ch-Ag-2 株はブドウで病原性が弱くトマトで強いことがわかった(表-2)。このことから、ブドウから分離された *R. radiobacter* (Ti) または *R. vitis* (Ti) の供試菌株はどれもブドウには強い病原性を示すが、非宿主植物であるトマトには病原性の程度に差があることがわかった。分離された時期が異なるが同じブドウ個体から得られた菌株である AT06-1 株と VAT07-1 株は病原性も似ていることから、両者の pTi の形質に興味もたれた。そこで、病原性関連遺伝子の一つ *virC1-virC2* オペロンの塩基配列情報を基とした系統解析を行った。

表-2 ブドウ分離菌株と各 *Rhizobium* 属細菌の病原性の比較

菌株	がんしゅ直径 (mm) <sup>a)</sup>	
	ブドウ <sup>b)</sup>	トマト <sup>c)</sup>
ブドウ分離菌株		
ST05-1	7.1 ± 0.5 a	3.7 ± 0.9 a
AT06-1	7.5 ± 0.6 a	3.3 ± 0.8 a
<i>Rhizobium vitis</i> (Ti)		
VAT07-1 (ブドウ) <sup>d)</sup>	6.3 ± 0.5 a	2.2 ± 0.3 a
G-Ag-27 (ブドウ)	6.1 ± 0.6 a	6.5 ± 0.4 b
<i>R. radiobacter</i> (Ti)		
AtC1 (キク)	1.1 ± 0.2 b	6.6 ± 0.5 b
<i>R. rhizogenes</i> (Ti)		
Ch-Ag-2 (オウトウ)	1.3 ± 0.2 b	6.8 ± 0.5 b
非病原性 <i>R. radiobacter</i>		
Ar-4 (ブドウ)	0.0 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 c

<sup>a)</sup> 接種部位に形成されたがんしゅの直径の平均値。平方根変換後 Tukey の多重比較検定の結果、異なる英文字間には有意差 (1%) がある。 <sup>b)</sup> ブドウ苗 (ネオ・マスカット) 1 株当たり茎の5箇所に接種。データは3株の平均値。 <sup>c)</sup> トマト苗 (ボンデローザ) 1 株当たり茎の4箇所に接種。データは3株の平均値。 <sup>d)</sup> 分離された植物。

2 *virC1-virC2* 部分塩基配列を用いた分子系統解析  
 がんしゅ形成能をもつ (pTi を有する) 各種 *Rhizobium* 属細菌について *virC1-virC2* オペロンの部分塩基配列 (約 350 bp) を解析し (一部菌株は DDBJ に登録されている同部分の塩基配列情報を使用)、近隣結合法にて分子系統樹を作成した (図-3)。その結果、ブドウ由来の *R. vitis* (Ti) は二つのクラスターに分かれ、同じくブドウ由来の *R. radiobacter* (Ti) は一部の *R. vitis* (Ti) と同じクラスターに属した (図-3)。その他の *R. radiobacter* (Ti) と *R. rhizogenes* (Ti) はそれらとは別のクラスターに分かれた (図-3)。pTi はプラスミド DNA であることから種を超えて接合伝達する可能性が考えられ、*Rhizobium* 属細菌でも実例がある (VELAZQUEZ et al., 2005)。ブドウ由来の *R. radiobacter* (Ti) と *R. vitis* (Ti) が、種が異なるにもかかわらず今回解析した塩基配列情報が 100% 一致した事実は大変興味深い。これは部分塩基配列による系統解析のため、このデータが同じタイプの pTi を異なる種で共有していることの証拠にはならないが、特に AT06-1 ~ AT06-8 株と VAT07-1 株は分離された年代は違うが同じブドウから分離されており、クラスターも同じ (AT06-1 ~ AT06-5 株を供試)、病原性の程度も同じ (AT06-1 株を供試) であることから、両者間での pTi の受け渡しの可能性が考えられる。今後はさらなる pTi の塩基配列情報の解析が必要である。

また、*R. vitis* には染色体 DNA 情報を元にした分類である遺伝子型が五つ存在しており、*R. vitis* (Ti) にはこれまでに四つの遺伝子型 (A ~ D) が確認されている (KAWAGUCHI et al., 2008 a)。本系統樹により、遺伝子型 A と B, C と D が別々のクラスターに分かれたことから、A と B, C と D はそれぞれ似たタイプの pTi を保持していると考えられ、さらには異なる遺伝子型の菌株同士での pTi の伝達の可能性もある。このように、染色体とプラスミドの DNA から得られる情報を相互に比較し、菌株の分離された年代、場所、植物の種類などの情報も加味することで、植物病原性 *Rhizobium* 属細菌の病原性という性質も含めた分類・系統について、新たな知見が得られる可能性がある。

## おわりに

我が国では、ブドウ以外の果樹および花き類に発生する根頭がんしゅ病菌として、*R. radiobacter* (Ti) または *R. rhizogenes* (Ti) が有名であったが、今回初めてブドウ根頭がんしゅ病菌として *R. radiobacter* (Ti) を同定した。今回診断した症状は一般的な *R. vitis* (Ti) が起

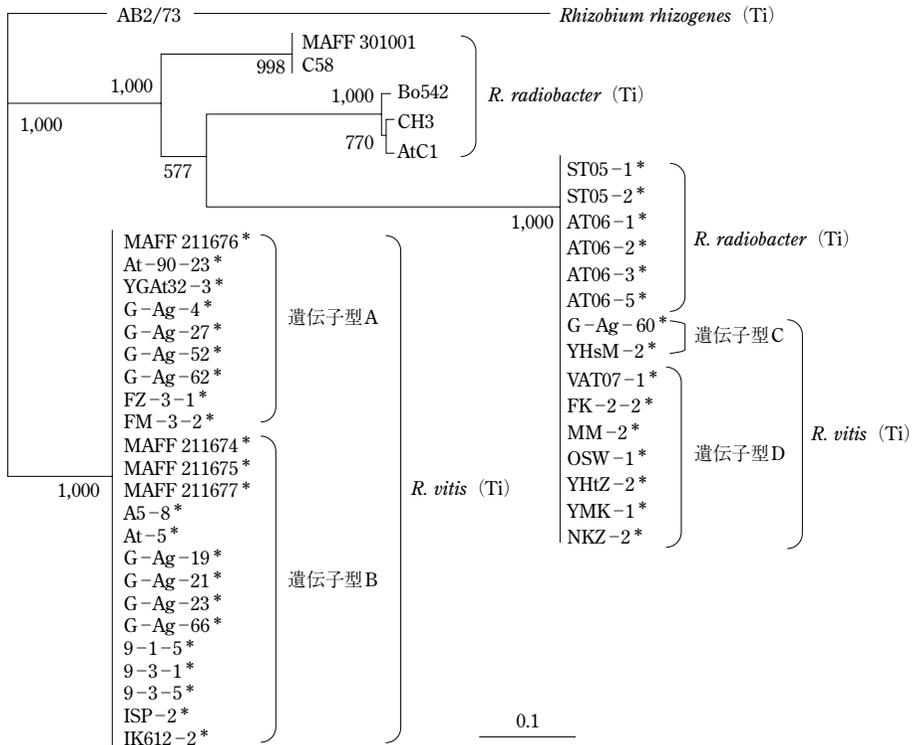


図-3 Tiプラスミド (pTi) 上に存在する病原性関連遺伝子 *virC1-virC2* オペロンの部分塩基配列 (約 350 bp) に基づいた近隣結合法によるがんしゅ形成性 *Rhizobium* 属細菌の分子系統樹。各枝の数字はブツストラップ確率 (1,000 回反復) を示す。\*: ブドウから分離された菌株を示す。

こすブドウ根頭がんしゅ病の症状と同じであり、植物の症状だけでは *R. vitis* (Ti) と *R. radiobacter* (Ti) のどちらによるものかを判断することは不可能だと思われる。幸いにも、岡山県では今回のサンプル以外での *R. radiobacter* (Ti) による本病害の発生は認めていない。ちなみに、*R. radiobacter* は脇本処方 PSA 培地のような糖類を含む培地で多糖質に富んだ盛り上がったコロニーを形成し、*R. vitis* とは容易に区別ができ、さらに細菌学的性質の一つである 3-ケトラクトース生成能を確認すれば、*R. radiobacter* であるか否かについておおよその見当がつく。また、筆者は、ブドウ樹体内から分離される菌株には非病原性の *R. radiobacter* が多いことを経験的に知っているが、ブドウ樹体内の具体的な細菌群集構造は不明である。果たしてブドウ樹体内での細菌の多様性はどうなっているのか、*Rhizobium* 属細菌同士の pTi の接合伝達は起こっているのか、ブドウに感染できる *R. radiobacter* (Ti) はもともと日本に存在していたのか、学術的な興味は尽きない。

分離された年代は違うが同じブドウから *R. vitis* (Ti) と *R. radiobacter* (Ti) が分離されていることから、今後は両種による混合感染も事例として出てくる可能性がある。診断方法もそれに対応したものが求められると予想される。今回のように接種する植物を複数種用意し、病原性の程度の違いで判断することも可能ではあるが、既に主な植物病原性 *Rhizobium* 属細菌を同時にかつ迅速に同定できるマルチプレックス PCR 法が確立されつつある (澤田ら, 2009)。また、防除方法についても検討する必要があるが、筆者はこれまで *R. vitis* (Ti) による本病の発生に対して、拮抗細菌非病原性 *R. vitis* VAR03-1 株の適用について研究を行ってきた (KAWAGUCHI et al., 2005 b; 2007; 2008 b; 川口, 2009)。今後は、本拮抗細菌の有効性をブドウ由来の *R. radiobacter* (Ti) についても検討する予定である。

最後に、供試菌株を分譲いただいた静岡大学農学部 瀧川雄一博士、(独)農業生物資源研究所 澤田宏之博士、北海道立道南農業試験場 三澤知央氏、島根県農業

技術センター 山本 淳氏に厚くお礼申し上げます。

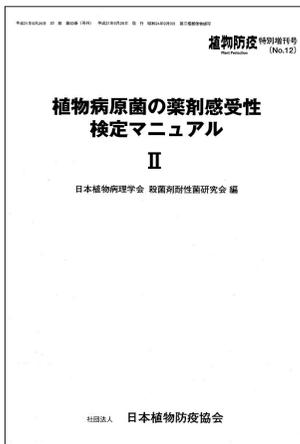
### 引用文献

- 1) BRISBANE, P. G. and A. KERR (1983): J. Appl. Bacteriol. 54: 425 ~ 431.
- 2) BURR, T. J. and B. H. KATZ (1984): Phytopathology 73: 163 ~ 165.
- 3) ——— (1984): Plant Dis. 68: 976 ~ 978.
- 4) ——— (1998): ibid. 82: 1288 ~ 1297.
- 5) KAWAGUCHI, A. et al. (2005 a): J. Gen. Plant Pathol. 71: 422 ~ 430.
- 6) ——— et al. (2005 b): ibid. 71: 422 ~ 430.
- 7) ——— et al. (2007): ibid. 73: 133 ~ 138.
- 8) ——— et al. (2008 a): Plant Pathol. 57: 747 ~ 753.
- 9) ——— et al. (2008 b): Phytopathology 98: 1218 ~ 1225.
- 10) ——— and K. INOUE (2009): J. Gen. Plant Pathol. 75: 205 ~ 212.
- 11) 川口 章 (2009): 植物防疫 63: 135 ~ 139.
- 12) 日本植物病理学会 (2000): 日本植物病名目録, 日本植物防疫協会, 東京, 428 pp.
- 13) 澤田宏之 (2007): 日本微生物資源学会誌 23: 29 ~ 34.
- 14) ———ら (2009): 日植病報 73: 209 (講要).
- 15) ———・土屋健一 (2003): 日植病報 69: 349 ~ 365.
- 16) THIES, K. L. et al. (1991): Plant Dis. 75: 634 ~ 637.
- 17) SALOMONE, J. Y. et al. (1996): Mol Plant-Microbe Interact. 9: 401 ~ 408.
- 18) ——— et al. (1998): ibid. 11: 836 ~ 838.
- 19) VELAZQUEZ, E. et al. (2005): Mol. Plant. Microbe. Interact. 18: 1325 ~ 1332.

！ 新刊 ！

植物防疫特別増刊号 No.12

## 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル II



日本植物病理学会 殺菌剤耐性菌研究会 編  
B5判 175ページ  
価格：3,150円(税込)

◆主な殺菌剤に対するイネ、ムギ、マメ類、野菜、果樹等の主要な病原菌の感受性検定方法を詳しく解説した第2弾。

内容：イネいもち病：MBI-D剤, QoI剤  
コムギ赤かび病菌：ベンゾイミダゾール剤  
マメ類灰色かび病：フルアジナム剤  
テンサイ褐斑病菌：DMI剤  
野菜類灰色かび病菌：メパニピリム剤  
その他31種類の病原菌と薬剤の組み合わせについて解説  
付録：殺菌剤耐性菌に関する国内文献集

お問い合わせとご注文は

社団法人 日本植物防疫協会 出版情報グループ 〒170-8484 東京都豊島区駒込1-43-11  
郵便振替口座 00110-7-177867 TEL 03-3944-1561 FAX 03-3944-2103  
ホームページ：http://www.jpfa.or.jp/ メール：order@jpfa.or.jp