

# *Xanthomonas arboricola* による ブドウ斑点細菌病の発生

農業生物資源研究所 <sup>さわ</sup>澤 <sup>だ</sup>田 <sup>ひろ</sup>宏 <sup>ゆき</sup>之  
山梨県果樹試験場 <sup>くぬぎ</sup>功刀 <sup>ゆきひろ</sup>幸博・<sup>わとうち</sup>綿打 <sup>きょうこ</sup>享子

## はじめに

2008年6月、山梨県甲州市において、‘甲斐路’の葉や果房に原因不明の斑点症状（口絵A～G）が発生した。病原学的な検討の結果、本症状は *Xanthomonas* 属細菌が関与する細菌病であることを示唆する結果が得られた。これまで本属菌によるヨーロッパブドウ (*Vitis vinifera*) の病害としては、[*X. campestris*] pv. *viticola* による bacterial canker がインドとブラジルで報告されている (NAYUDU, 1972)。しかし、本病は病徴や病原細菌の性状がこれらの報告とは異なっていた。

そこで、本病の発生状況や病原細菌の特性についてさらに精査したところ、本病は *Xanthomonas arboricola* による新病害であることが判明した。また、日和見感染に起因する特異な発生生態の一端も明らかになってきたので、これまでに得られた結果の概要を紹介したい。なお、本稿における *Xanthomonas* 属細菌の学名表記は、PARKINSON ら (2009) の論文中の Table 1 の表記に従った。

## I 病 徴

病斑が形成されるのは葉身、小果梗、果粒の3箇所に限られており、今のところこれ以外の部位に症状は認められていない。葉には葉脈に囲まれた境界の明瞭な角斑が形成される（口絵A）。始めは黄白色～淡黄色～黄緑色の水浸状を呈するが（口絵B）、のちに褐色～黒褐色のえ死斑となる（口絵C）。時間の経過とともに病斑が互いに融合し、葉枯れ症状を呈する場合もある（口絵D）。

幼果期の小果梗には、長径3～10mmで不整形～楕円形のえ死斑が形成される場合がある（口絵E）。病斑部分の表皮は裂開・剥離し、中央部の組織は崩壊してやや陥没する。果粒の病斑の形状は小果梗のものに類似している。すなわち、長径3～5mmにわたって表皮が裂

開し、中央部の組織が崩壊・陥没することによって、黒褐色～黒色で楕円形のえ死斑となる（口絵F）。病斑が古くなると灰褐色で乾いた外観を呈するようになる（口絵G）。果粒の病斑直下の果肉には、深さ数mm程度の褐変・え死が認められる。

## II 発 生 状 況

山梨県では2008年に本病が最初に確認されて以来、4年連続して発生が認められている。県内のブドウ産地のうち、発生が確認されているのは甲州市と南アルプス市の2箇所である。なお、山梨県以外における発生の報告は今のところないようである。

初発は5月上旬ころ（展葉5～6枚時）であり、一部の樹で新梢の下位葉に症状が現れ、次第にそれが上位葉に進展するとともに、圃場全体へと拡大することもある。5～7月期には降雨とともに病気の拡大が認められるが、8月以降になると降雨があっても病勢の顕著な進展はほとんど観察されなくなる。葉に症状が発生した樹では、6月下旬ころから果房（小果梗や果粒）にもえ死斑が発生することがある。

品種別では‘甲斐路’での発生が最も多く、特にその早生系統（赤嶺）での被害が大きい。次いで‘ロザリオビアンコ’でも発生が認められる。‘甲斐路’と混植されている‘ピッテロビアンコ’、‘瀬戸ジャイアンツ’、‘リザマート’において発病が観察された事例もあるが、その数は極めて少ない。一方、山梨県における主要品種である‘巨峰’、‘ピオーネ’、‘甲州’、‘テラウエア’では、今のところ発生はまったく確認されていない。

## III 病原細菌の同定と病名の提案

病斑からわれわれが分離した菌株（以下、ブドウ菌と表記する）は、いずれもコッホの原則を満たすことから本病の病原であることが確認できた。また、予備解析の結果、これらは *Xanthomonas* 属細菌である可能性が示唆された。そこで、*Xanthomonas* 属細菌を同定する上で重要な表現型および遺伝型について調査を行い、ブドウ菌の種レベルの所属について検討した。

Occurrence of Bacterial Spot of Grapevine Caused by *Xanthomonas arboricola*. By Hiroyuki SAWADA, Yukihiko KUNUGI and Kyoko WATAUCHI

(キーワード: ブドウ, 斑点細菌病, 常在菌, 日和見感染, *Xanthomonas arboricola*)

## 1 表現形質

ブドウ菌はグラム陰性、好気性で1本の極べん毛を有する桿菌であり、菌体の大きさは $1.8 \pm 0.2 \mu\text{m} \times 0.8 \pm 0.07 \mu\text{m}$ であった(図-1)。標準寒天培地上で黄色集落(口絵H)を形成し、カタラーゼ活性、サッカロース培地上における粘質集落の形成、硫化水素の産生が陽性であった。これら以外の表現形質についても、既報のXanthomonas属細菌の記載や対照としたXanthomonas属の参考菌株の結果とはほぼ一致していた(澤田ら, 2011 a)。

なお、ブドウ菌を標準寒天培地と普通寒天培地で培養し、それらの菌体を用いてKovacsのオキシダーゼテストを実施したところ、前者ではほとんど反応が認められなかったが、後者では強い陽性反応が迅速に現れることが明らかとなった。Xanthomonas属の参考菌株においてもこれと同様な傾向が認められた。したがって、Xanthomonas属細菌のオキシダーゼ活性が陰性と記載されることが多いのは、標準寒天培地のような糖(グルコース)を豊富に含む培地で得られた結果が採用されてきた可能性が考えられる。

## 2 分子系統解析

16S rDNAに基づいて分子系統解析を行ったところ、ブドウ菌はXanthomonas属内の単系統群(X. campestris core)に入ることが確認できた(図-2に○で示した)。ただし、Xanthomonas属細菌は16S rDNAに関して変異が少なく、このデータのみでブドウ菌の種レベルの所属について判定を下すことは不可能であった。

一般に細菌の分類における種レベルの枠組みは、

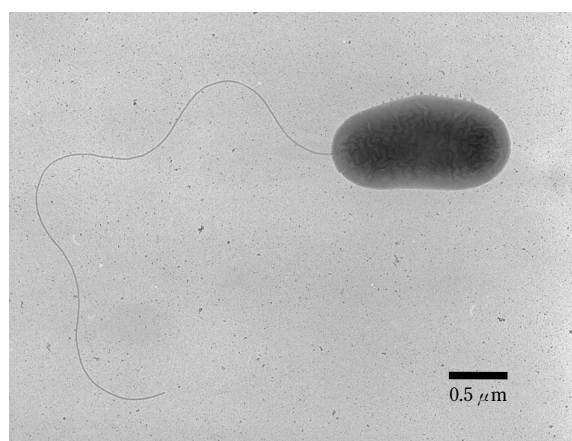


図-1 ブドウ斑点細菌病菌(Xanthomonas arboricola)の形態  
菌体をネガティブ染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。

DNA-DNA 相同性試験の結果を基準として構築されている。一方、Xanthomonas属においては、DNA-DNA 相同性試験の結果と、gyrBに基づく分子系統解析やrep-PCRに基づくクラスター分析の結果との間に高い相関が認められている(RADEMAKER et al., 2005; PARKINSON et al., 2009)。そこで、ブドウ菌の種レベルの位置づけを明らかにするために、gyrBとrep-PCRに基づく解析を実施した。

gyrB分子系統解析の結果、ブドウ菌はX. arboricolaに属する既知 pathovar とともに一つの明瞭な単系統群(X. arboricola クレード)を形成し、他の菌種から独立することが明らかとなった(図-3, 4)。同様な傾向はrep-PCR解析においても確認できた。すなわち、4組のrep-PCR用プライマーセット[BOX, ERIC, REPおよび(GTG)<sub>5</sub>]を用いて増幅を行い、得られたフラグメントパターンのデータをすべて連結したうえでクラスター分析を行った結果、ブドウ菌はX. arboricola クレードに含まれることが認められた。

以上のように、gyrB分子系統解析とrep-PCR解析という原理の異なる手法(澤田, 2008)によって同様な結果が得られること、16S rDNA分子系統解析や表現形質に関してもそれと矛盾する結果は認められないことから、ブドウ菌をXanthomonas arboricola Vauterin, Hoste, Kersters and Swings 1995と同定した(澤田ら, 2011 a)。

## 3 病名の提案

ブドウ科植物から今までにどのようなXanthomonas属関連細菌が分離されてきたのかについて、国内外の文献を対象として調査を行った。その結果、ブドウ科ブドウ属植物から分離されたXanthomonas属関連細菌としては、[X. campestris] pv. viticola, [X. campestris] pv. vitiscarnosae, [X. campestris] pv. vitistrifoliae, [X. campestris] pv. vitiswoodrowii, およびXylophilus ampelinus (basonym: "Xanthomonas ampelina")が記載されていた。また、ブドウ科ヤブカラシ属に属するヤブカラシ(=ピンボウカズラ)の斑点細菌病に関しては、"Xanthomonas cissicola"が病原として報告されている。ブドウ科ウドノキ属に属するLeea edgeworthiiについては、bacterial blightの病原として[X. campestris] pv. leeanaが記載されている。

以上のようなブドウ科植物由来のXanthomonas属関連細菌も含めたうえで分子系統解析を行ったところ、いずれの関連細菌もわれわれが分離したブドウ菌とは系統的位置づけが大きく離れており、種以上のレベルで異なる分類群であることが確認できた。なお、これら関連細菌の系統的位置づけについては、図-2および3に矢印

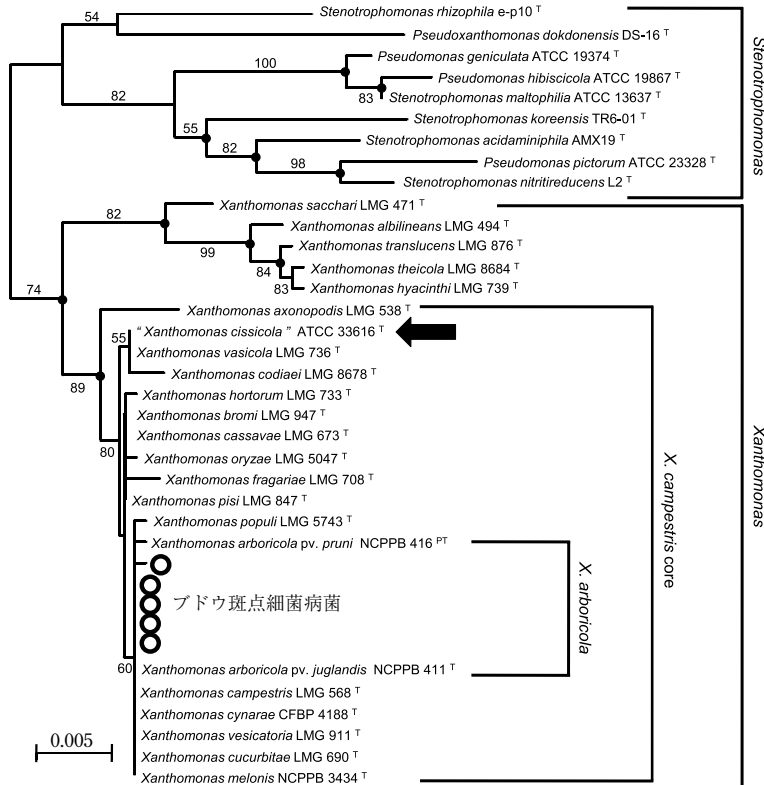


図-2 16S rDNA に基づいた *Xanthomonas* 属全体の近隣結合系統樹

*Stenotrophomonas* 属細菌をアウトグループとして系統樹を構築し、*Xanthomonas* 属における菌種間の系統関係を示した。○はブドウ斑点細菌病菌、矢印はヤブカラシ斑点細菌病菌 (“*Xanthomonas cissicola*”) の位置を示している。

ブートストラップ確率は 50% 以上の値のみを表示した。分岐点における●は、最尤法および最節約法においてもそのトポロジーが支持されたことを示している。

で示してある。ただし、*Xylophilus ampelinus* に関しては、これら二つの系統樹には収まらないほど、その系統的な位置づけがブドウ菌とは大きく離れていることから、データは示していない。

以上より、*X. arboricola* に相当する細菌がブドウ科植物から病原菌として分離されたという報告は、現在までのところ国内外とも存在しないことが明らかとなった。また、本病の病徴と一致するようなブドウの病害もこれまでに報告がない。したがって、本病を *X. arboricola* による新病害として「ブドウ斑点細菌病 (Bacterial spot of grapevine)」と呼称することを提案した (澤田ら, 2011 a)。

#### IV 病原細菌の特性と発生生態

##### 1 弱病原性の日和見感染菌

ブドウ菌の特性を調べるにしたがって、本菌が「弱病原性の日和見感染菌」であることを示唆するデータが得られつつある。すなわち、強い接種圧でブドウへ接種しても、供試菌株間で病原力にかなりばらつきが認められること (図-5)、その中の比較的病原力が強い菌株であっても発病程度は安定しておらず、接種条件・植物体の状態などによって結果が大きく影響を受けること、上位葉の葉身以外の部位には病変がまったく誘導されないことが明らかとなってきた (澤田ら, 2011 a ; 2011 b)。さらに、現地における発生調査でも、葉身と果房以外の部位には病変が認められないこと (口絵 A ~ G)、発病が認められるのはごく一部の感受性品種に限られるこ

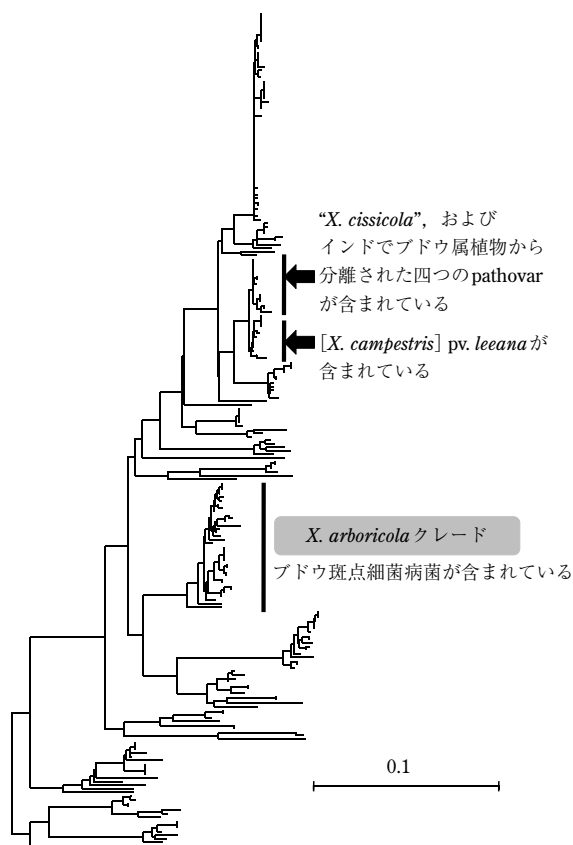


図-3 *gyrB* に基づいた *Xanthomonas* 属全体の近隣結合系統樹

PARKINSON et al. (2009) が本属を網羅的に解析した際に用いた 215 個の *gyrB* 配列に、ブドウ斑点細菌病菌のデータを加えたくて解析を行った。各データの学名は省略し、トポロジーのみを示してある。ブドウ斑点細菌病菌は *X. arboricola* クレードに含まれている。また、過去にブドウ科植物から分離されたことのある *Xanthomonas* 属細菌については、それぞれの位置づけを矢印で示してある。

と、栽培・気象条件や樹体の状態等が発病程度に大きく影響を与えることが繰り返し観察されている (切刀ら, 2010; 澤田ら, 2011 a; 2011 b)。以上のことは、「ブドウ菌は弱病原性であり、各種の条件が満たされた場合にのみ、日和見感染的に急性症状を引き起こす」という可能性を示している。

## 2 遺伝的に固定されていない

ブドウ菌が「遺伝的に固定されていない、多型を内包した菌群」であることも明らかとなってきた。すなわち、われわれが 2008 ~ 10 年にかけて分離してきたブドウ菌は、*gyrB* 分子系統解析 (図-4 に○で示した) や *rep*-PCR 解析において、既知 pathovar と混在しながら *X.*

*arboricola* クレード全域に散在することが認められた (澤田ら, 2011 a; 2011 b)。しかも、毎年新たにブドウ菌を分離するたびに、それまでに分離してきたいずれの菌株とも *gyrB* 配列やフラグメントパターンの異なる「まったく新しいタイプ」が、毎回必ず見いだされてくることも確認している (澤田ら, 2011 b)。このことは、今後も調査を続ければさらに新規のタイプが見つかり、ブドウ菌が *X. arboricola* クレード内により広く分散する可能性のあることを示している。

ブドウ菌が「遺伝的に固定されていない」と、前段に記したように「弱病原性の日和見感染菌である」ことから、以下のような推測が可能であろう。すなわち、本菌は通常、常在菌としてブドウ樹体上で腐生的な生活様式をとっているため、植物との強い相互作用や選択圧に曝されることが比較的少ないのではないだろうか。そのために、遺伝的に強く固定されることがなく、「多型を内包した状態」が保たれているのかもしれない。

なお、われわれは南アルプス市において、圃場全域で本病が発生しているブドウ園から本菌を多数分離し、*gyrB* 配列に基づいてそれらの類別を試みたことがある (図-6)。その結果、このブドウ園で分離された菌は三つの異なる系統に類別されること、それら三つの系統が一つのブドウ園内で複雑に混在しながら共存していることが確認できた。しかも、このうちの一つ (図-6における I 型菌) は、甲州市に分布している系統と配列が完全に一致していた (澤田ら, 2011 b)。もともと本菌は多様な系統に分化しているうえに、保菌した穂木・苗木などが流通することによって各系統の分布域が入り交じり、このような複雑な状況がもたらされたのではないかと考えている。

## 3 ジャガイモ塊茎腐敗能が強い

被検菌が腐敗病菌であるかどうかを予備的に確認するために、ジャガイモ塊茎腐敗能が調べられることがある (後藤・瀧川, 1984)。ブドウ菌に対してこの検査を実施したところ、すべての菌株が腐敗能を有していることが確認できた。しかも、その腐敗能力はきわめて強く、菌体を塗抹した部位だけでなくジャガイモ切片全体が激しく軟腐・黒変するという特徴が、すべてのブドウ菌に共通して認められた (澤田ら, 2011 b)。一方、同じくブドウ属植物の病原細菌としてインドで分離された [*X. campestris*] *pv. viticola*, [*X. campestris*] *pv. vitiscarnosae*, [*X. campestris*] *pv. vitistrifoliae*, [*X. campestris*] *pv. vitiswoodrowii* に関しては、いずれも陰性であることが確認できた。したがって、ブドウ属植物に対して親和性を確立するうえで、この能力は必須では

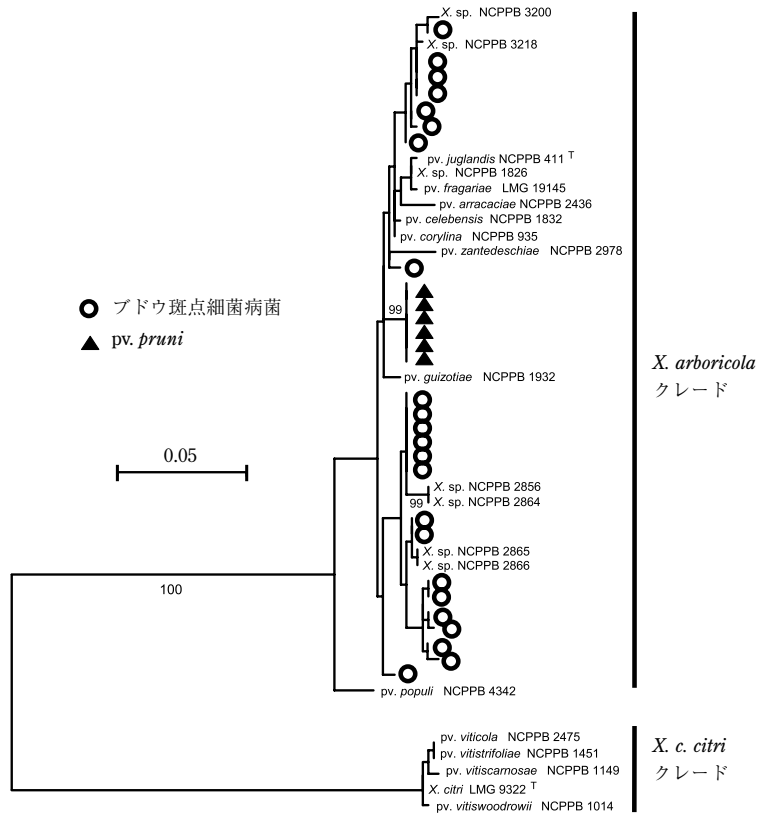


図-4 *gyrB*に基づいた *Xanthomonas arboricola* クレードの最尤系統樹

*X. citri* subsp. *citri* クレードのメンバーをアウトグループとして用い、最尤法によって分子系統樹を構築した。ブートストラップ値は90%以上のみを示してある。

*X. arboricola* クレード内におけるブドウ斑点細菌病菌の位置づけは○で示してある。なお、*X. arboricola* *pv. pruni* (▲) に関しては、100菌株を供試して比較解析してきたが、すべての *gyrB* 配列が完全一致していることが確認できた (ここには代表的な6菌株のみを示してある)。

ないのかもしれない。腐敗病菌の病原性因子と考えられているこの能力が、ブドウに斑点症状が誘導されるまでの過程で何らかの役割を果たしているのかどうかについては、現時点では全く不明である。

#### 4 常在菌による同時多発テロ

今までに得られた調査結果を総合すると、ブドウ菌は遺伝的に固定されてはいないが、「ブドウに自然感染する」・「極めて強いジャガイモ塊茎腐敗能を有している」という二つの表現型を共有していることが明らかとなった。すなわち、ブドウ菌は「このような二つの表現型によって特徴づけられるものの、遺伝的には多様に分化している常在菌の集合体」と位置づけることができよう。

このような常在菌によって本病が発生するまでの道筋は、以下のように推測することができる。すなわち、*X.*

*arboricola* クレード内にはブドウに対して親和性の系統が複数(多数?)存在しており、それらは普段はブドウ樹体上で常在菌として腐生的な生活をしている。しかし、それらの系統の中には、「好適な条件」に出会うとブドウに対して病原性を示すものが存在している。そのような潜在能力を備えた系統が、好適な条件の揃ったタイミングで、山梨県下の複数の産地でそれぞれが独立に日和見感染を起こした。その結果として、多数のブドウ園において本病の発生が認められるに至ったのではないだろうか。以上のような発生生態は「常在菌による同時多発テロ」と言い表すことができるのではないかと考えている。

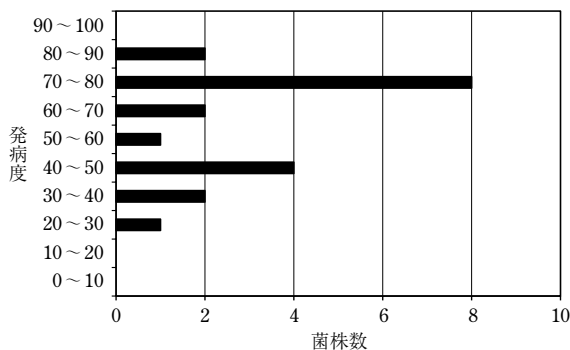


図-5 ブドウ斑点細菌病菌のブドウに対する病原力のばらつき

ブドウ斑点細菌病菌 20 株を用い、同一条件下でのブドウへの接種を各菌株とも 4 回反復して行った。そして、上位葉 3 枚における発病程度を 4 段階の調査基準(澤田ら, 2011 a)に基づいて判定したうえで、各菌株の発病度を算出した。さらに、発病度を 10 ごとの階級間隔で区切って Y 軸にとり、それぞれの階級に分布する菌株数を X 軸に示したのがこのヒストグラムである。

### おわりに

ブドウ菌を相手に研究を始めてから 3 年が経過し、おぼろげながらも見えてきたその輪郭を紹介してきた。しかし、本菌に関しては未解明の問題が山積しており、それが診断・防除技術を開発するうえでの障害にもなっている。ここでは、それら残された問題のうち、特に重要なものを挙げておきたい。

#### 1 ブドウ菌は新 pathovar なのか？

pathovar (病原型)とは、主に病徴や宿主範囲に基づいて定義された、変種レベルの分類階級である。したがって、pathovar の分類・同定を行うためには、接種試験を行って病徴や宿主範囲に関する情報を得ることが必要とされている。一方、近年になり、Xanthomonas 属における pathovar の枠組みと、遺伝学的手法に基づく類別パターンとが一致する場合のあることが報告されつつある (Bui Thi Ngoc et al., 2010)。その成果をもとに、本属における pathovar は「遺伝的な実体」であると考えてもよいのではないかと、との意見も出されているようである。われわれも、*X. arboricola* pv. *pruni* (核果類せん孔細菌病菌)が遺伝的に極めて均一であり(図-4 に▲で示した)、「遺伝的な実体」そのものであることを確認している(澤田ら, 2011 a ; 2011 b)。

対照的に、ブドウ菌は「遺伝的に固定されていない常在菌の集合体」であることが、まさに本研究によって判

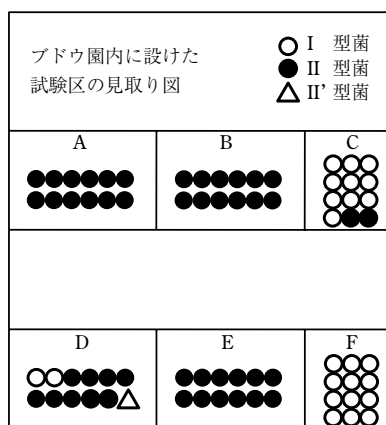


図-6 一つのブドウ園内に三つの系統が混在しながら分布している状況

本病が発生しているブドウ園内に六つの試験区 (A ~ F 区) を設けた。各試験区から分離したブドウ斑点細菌病菌を *gyrB* 配列に基づいて類別したところ、I 型菌 (○)、II 型菌 (●)、II' 型菌 (△) の 3 系統に類別できること、それらが一つの園内で混在していることが明らかとなった。

明したところである。さらに、本属の既知 pathovar の中でも、遺伝的な実体とは言えないものが存在している可能性も示されている (RADEMAKER et al., 2005)。したがって、pathovar の枠組みと遺伝的なまとまりとの関係については、来歴の異なる菌株をさらに多数供試しながら、今後も慎重に検討していく必要がある。

その結果として既知 pathovar が遺伝的に特徴付けられ、それをもとに pathovar の定義がより明確化されることを期待したい。それが実現した段階で初めて、ブドウ菌を pathovar レベルでいかに扱うべきかについて、結論が下せるのではないだろうか。それまでは、ブドウ菌を一つに括って新 pathovar として提案することは差し控えたいと考えているところである。

#### 2 ブドウ菌にとっての「好適な条件」とは？

本稿では、「好適な条件」が揃ったときにブドウ菌が日和見感染を起こす、ということを繰り返し述べてきた。それでは、その好適な条件とは具体的に何であろうか？本病に対する防除対策を考えるうえでも重要なことなので、最後に改めて問題を整理してみたい。

発生調査と接種試験の結果、「甲斐路」が本病に対して極めて感受性であることが明らかとなっている(切刀ら, 2010)。一方、ボルドー液散布が行われている圃場では本病の発生が少ないという傾向が、発生調査によって認められている。ところが、近年は山梨県全体としてボルドー液使用量は減少傾向にあり、年間を通じて全く

使用しないブドウ農家もある。また、新梢が旺盛に伸長している5～6月ごろに本病は発生するが、8月以降になると病勢の進展がほぼ止まることや、接種試験を成功させるためには、ブドウ苗を軟弱に育てるのが必須であることも明らかとなってきた。さらに、本病の発生が最初に確認された2008年の梅雨期は、例年になく降雨量が多くて日照時間が少なかったことや、接種試験においても、菌液を噴霧後のブドウ苗を暗黒下の温室に置かないと発病しないということも、関連する情報として挙げておきたい。

以上のことから、「葉や果房の組織が軟弱な時期に、過度の多雨・日照不足が重なると、ボルドー液散布が十分ではない「甲斐路」において日和見感染が起こりうる」という可能性が浮かび上がってくる。このような好適な条件が出揃った2008年の梅雨期に、ブドウ菌による日和見感染が多発して被害が顕在化した結果、本病が病害として初めて認識されるに至ったのであろうか？

ここで展開した推論、あるいは、本文中に示した様々な疑問や推論を解明・検証するためには、ブドウ菌の生

態特性を明らかにすることが重要であると考えている。すなわち、ブドウ菌の検出・定量技術を開発したうえで、各種植物体上におけるブドウ菌の分布・動態を明らかにすること、ブドウ樹体上における本菌の生残能力を確認すること、越冬場所・第一次伝染源を解明すること等が今後の課題であろう。また、ボルドー液以外の各種薬剤による防除効果についても早急に確認する必要がある。それらの知見を総合し、本病に対する効果的な診断・防除技術を確認したいと考えている。

#### 引用文献

- 1) Bui Thi Ngoc, L. et al. (2010): Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60: 515 ~ 525.
- 2) 後藤正夫・瀧川雄一 (1984): 植物防疫 38: 339 ~ 344.
- 3) 切刀幸博ら (2010): 日植病報 76: 212 (講要).
- 4) NAYUDU, M. V. (1972): Phytopath. Z. 73: 183 ~ 186.
- 5) PARKINSON, N. et al. (2009): Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 264 ~ 274.
- 6) RADEMAKER, J. L. W. et al. (2005): Phytopathology 95: 1098 ~ 1111.
- 7) 澤田宏之 (2008): 植物防疫 62: 217 ~ 222.
- 8) ———ら (2011 a): 日植病報 77: 7 ~ 22.
- 9) ———ら (2011 b): 同上 77: 265 ~ 277.

## 植物防疫特別増刊号 No.10

# 植物ダニ類の見分け方

B5判 120頁 口絵カラー  
価格 2,520円税込 (本体 2,400円)

### ◆ 農作物に寄生するダニ類および天敵のカブリダニ類の見分け方を詳しく解説。

#### 掲載内容

- I. ハダニ科の見分け方 (江原昭三・後藤哲雄 著)
  - 1) ハダニ科の概説と日本産の種のリスト
  - 2) ビラハダニ亜科のハダニ
  - 3) ナミハダニ亜科のハダニ
- II. ヒメハダニ科およびケナガハダニ科の見分け方 (江原昭三 著)
- III. フシダニ類の見分け方 (上遠野 富士夫 著)
  - 1) フシダニ類の概説とナガクダフシダニ科およびヨツゲフシダニ科
  - 2) フシダニ科群の概説と属への検索
  - 3) ハリナガフシダニ科の概説と属への検索
- IV. コナダニ類の見分け方 (岡部 貴美子 著)
  - 1) コナダニによる作物被害とダニの見分け方
  - 2) コナダニ類の同定 I 標本の作製から科の同定まで
  - 3) コナダニ類の同定 II 成虫と第2若虫から属への同定
- V. カブリダニ科の見分け方 (江原 昭三 著)
  - 1) カブリダニ科の概説と日本産の種のリスト
  - 2) ムチカブリダニ亜科
  - 3) ホンカブリダニ亜科
  - 4) カタカブリダニ亜科

