

岡山県におけるモモせん孔細菌病の優占種と 遺伝的多様性について

岡山県農林水産総合センター 農業研究所 かわ ぐち あきら
川 口 章

は じ め に

モモせん孔細菌病はモモの葉、枝、果実に病斑を形成して被害を起す細菌性病害であり(図-1, 図-2)、耐病性品種や卓効を示す防除薬剤も少ないことから、モモの難防除病害である。また、岡山県は全国5位の696 haの栽培面積(農林水産省大臣官房統計部, 2010)を有するモモ主産県であるが、本病の発生が高品質なモモ生産の障害の一つとなっている。一方、本病の病原細菌は、*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (= *X. campestris* pv. *pruni*), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Erwinia nigri-fluence* の3種が日本有用植物病名目録に記載されており、主には *X. arboricola* pv. *pruni*, 次いで *P. syringae* pv. *syringae* であり、*E. nigrifluence* はごくまれであるとされている(高梨, 1985)。高梨(1985)の報告によると、我が国で報告されている3種の本病原細菌の中では *X. arboricola* pv. *pruni* が優占種であるとしているが、*P. syringae* pv. *syringae* が分離頻度と病原性の強さでこれに次ぎ、広い地域に分布して発生にかかわっているとした。高梨(1985)は、福島、山梨、茨城、静岡の4県の現地モモ栽培圃場から、*P. syringae* pv. *syringae* を分離している。しかし、本県における優占的な病原細菌がどれであるかは明らかでなく、遺伝的多様性についても不明である。優占的な病原細菌を特定し、その遺伝的多様性を明らかにすることは、分子タイピングなどの手法を用いた疫学的解析のための基礎的知見として、本病の発生生態の解明に寄与するものと考えられる。

そこで、本県の主要モモ産地において発病葉を収集し、罹病組織からの細菌の検出頻度から優占的な病原細菌の特定を試みた。さらに、得られた病原細菌の遺伝的多様性について rep-PCR DNA フィンガープリント解析(以下、rep-PCR 解析)により検討した。

なお、本研究の一部は農林水産省の新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業「主要作物をキサントモ

ナス属病害から守る新規微生物農薬の開発(2011～13年度)」において実施した。また、本稿の一部は既に報告した(川口, 2012)ので、詳細はこれらを参照されたい。



図-1 モモせん孔細菌病の葉の症状

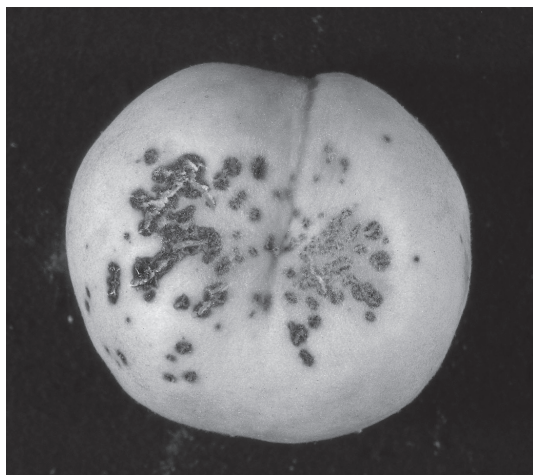


図-2 モモせん孔細菌病の果実の症状

Genetic Diversity and Dominant Species of Bacterial Pathogen Isolated from Peach Showed Diseased Symptoms of Bacterial Shot Hole in Okayama Prefecture, Japan. By Akira KAWAGUCHI

(キーワード: モモせん孔細菌病, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, rep-PCR DNA フィンガープリント)

I 岡山県における近年のモモせん孔細菌病の発生実態

岡山県病害虫防除所の定期巡回調査の定点である現地モモ露地栽培圃場における2002～12年の11年間の調査データを元に作図した本病の発生推移を図-3に示す。発病程度の調査基準：1圃場当たり3～5樹の新梢約20本を任意で選び、発病葉割合を算出、この発病葉割合に基づき発病程度を「A」～「F」の5段階で評価した。すなわち、発病程度A：発病なし、B：発病葉割合5%未満、C：同5%以上～10%未満、D：同10%以上～30%未満、E：同30%以上～50%未満、F：同50%以上とした。また、発病度＝ $100 \times (5F + 4E + 3D + 2C + B) / [5 \times (F + E + D + C + B + A)]$ を算出した。

岡山県において7月下旬はモモの主力品種の収穫最盛期にあたるが、2003～06年にかけて発生が多く、2005年には本病に関する病害虫発生予察注意報が発表された。2005～09年まで発生圃場割合は減少し、2010年以降の発生圃場割合は低めに推移している。本県の露地栽培ではその多くが果実に袋をかける有袋栽培であることから、果実における本病の被害は無袋栽培に比べて少ないと考えられる。果実の袋掛けによる本病の物理的防除効果を期待するには、袋掛けの時期は早いほどよい。しかし、降雨や人手不足による農作業の遅れに伴い袋掛けの作業が遅れたり、果実肥大期の果実の生理的落下が多い品種を栽培している場合には、生理的落下を見極めてから袋掛けを行うために袋掛けが遅れたりしている圃場も見受けられる。

II 岡山県におけるモモせん孔細菌病の優占種と遺伝的多様性

1 現地発生圃場からの病原細菌の分離と同定

表-1に示す、岡山県の主要モモ産地の5地域においてそれぞれ隣接する数圃場から、本病の病徴を示す葉を1地域当たり約20枚採集した。1枚1箇所の病斑部を切り出して約1mlの滅菌蒸留水に浸し乳鉢で磨砕した磨砕液0.1mlをPSA（ポテト・スクロース・アガー）平板培地に塗布して27℃で5日間培養した。得られたコロニーを釣菌し、PSA平板培地に画線して純化を行い、各分離年において1地域当たり5～10菌株（計83菌株）を得た。これらの分離菌株について、BOUDON et al. (2005)の方法に従い、*X. arboricola* pv. *pruni*の必須遺伝子である*atpD*の756bpを特異的に増幅するPCRプライマーセット（P-X-ATPD-F/P-X-ATPD-R）を用いて特異的PCRを行った。さらに、各分離菌株をPSA平板培地で2日間培養後、滅菌水で約 10^7 cells/mlに調製し、2010～12年の7～8月に岡山県農林水産総合センター農業研究所敷地内の10～11年生モモ‘白鳳’の上位展開第3葉に噴霧接種（無傷）し、約1か月後に発病の有無を調査した。

モモの罹病葉から得られた83菌株は、すべて*Xanthomonas*属細菌に特徴的なコロニーの形状である、黄色、不透明、円形、全縁、中高～やや中高、平滑で湿光を帯びていた。*X. arboricola* pv. *pruni*の必須遺伝子の特異的に増幅するPCRの結果、すべての分離菌株で予想される756bpのバンドが得られた（データ省略）。また、分離菌株をモモの葉に接種した結果、供試した83菌株はすべて病原性を示し、病徴が再現された（表-1）。以

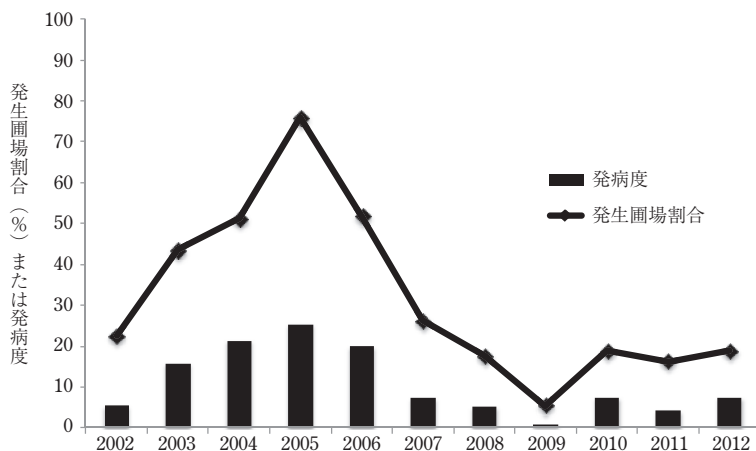


図-3 岡山県におけるモモせん孔細菌病の7月下旬の発生圃場割合および発病度（2002～12年）

表-1 岡山県で分離されたモモせん孔細菌病菌株の来歴

採集年月日	場所	宿主	品種	分離部位	菌株数	病原性
2010年5月24日	岡山市北区上芳賀	モモ	清水白桃	葉	10	+
2010年7月2日	井原市美星町大倉	モモ	白鳳	葉	10	+
2010年7月26日	新見市土橋	モモ	白鳳	葉	10	+
2010年7月26日	勝央町下石生	モモ	清水白桃	葉	10	+
2011年6月7日	奈義町柿	モモ	白鳳	葉	7	+
2011年6月7日	勝央町下石生	モモ	清水白桃	葉	5	+
2011年6月17日	岡山市北区上芳賀	モモ	白鳳	葉	6	+
2012年6月4日	勝央町下石生	モモ	清水白桃	葉	10	+
2012年6月4日	岡山市北区上芳賀	モモ	白鳳	葉	10	+
2012年7月17日	倉敷市玉島北	モモ	白鳳	葉	5	+

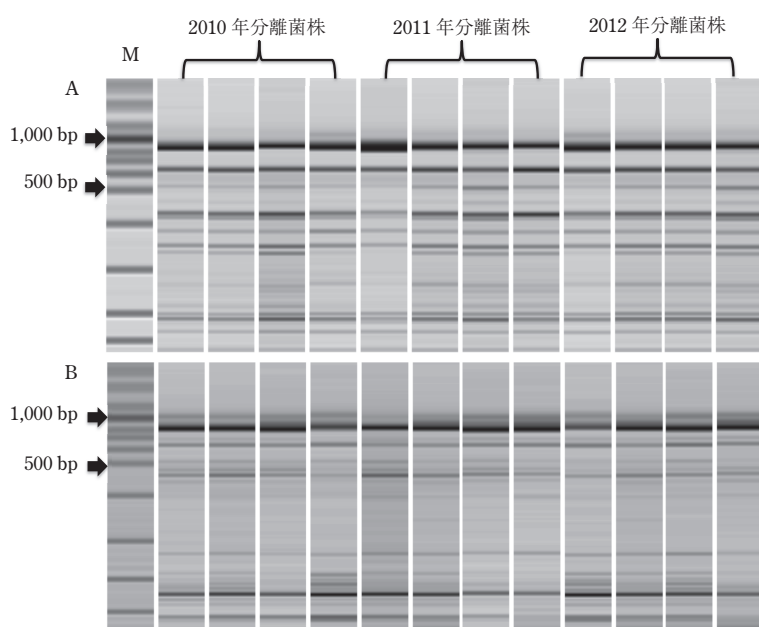


図-4 岡山県で分離されたモモせん孔細菌病菌に対する rep-PCR DNA フィンガープリント解析

A : ERIC-PCR, B : REP-PCR, M : 100 bp ラダーマーカー

上のことから、分離菌株はすべて *X. arboricola* pv. *pruni* であると判断した。また、83 菌株以外にも、葉の病斑から分離した際に培地上に形成されたコロニーはほとんどが *Xanthomonas* 属細菌の特徴を有するものであり、まれに *Pseudomonas* 属細菌の特徴を示すコロニーが認められたものの、接種試験による病原性は認められなかった（データ省略）。これらのことから、本県の主要モモ産地における本病原細菌の優占種は *X. arboricola* pv. *pruni* であると考えられた。

2 rep-PCR 解析

次に、遺伝的多様性を評価するため、分離菌 83 菌株

の rep-PCR 解析を行った。rep-PCR 解析は ERIC-PCR 法 (HULTON et al., 1991) および REP-PCR 法 (VERSALOVIC et al., 1994) で行った。rep-PCR は一度の PCR で複数の DNA 領域を同時に増幅するため、PCR の回数によっては電気泳動後のバンドの位置や数が異なることがある。そこで、バンドの再現性を確認するため、PCR を各菌株当たり 3 回行い、安定的に検出されるバンドを解析の対象とした。その結果、ERIC-PCR 法および REP-PCR 法ではバンドパターンの再現性が高く、各菌株は採集地域に関係なくバンドパターンにはほとんど差が認められなかった (図-4)

rep-PCR 解析は微生物の種以下のレベルの遺伝的多様性の評価のためによく用いられる手法であり、筆者らもこの手法を用いて植物病原細菌であるブドウ根頭がんしゅ病菌 *Rhizobium* (= *Agrobacterium*) *vitis* やトマトかいう病菌 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* の遺伝的多様性を明らかにしている (川口, 2010; 2012; KAWAGUCHI et al., 2008; 2010; 2012)。また, rep-PCR 解析は *Xanthomonas* 属細菌の種レベルのみならず, pathover レベル, 菌株レベルの遺伝的差異を検討する場合にも利用できる可能性が報告されている (LOUWS, et al., 2001; RADEMAKER, et al., 2005)。本研究において, ERIC-PCR および REP-PCR はデータの再現性が高く, 信頼できる結果であることから, 岡山県内に分布している *X. arboricola* pv. *pruni* は遺伝的類似性が高く, 一つにまとまった遺伝系統である可能性が示唆された。

これまでに, 日本における *Xanthomonas* 属細菌の rep-PCR 解析は澤田ら (2010) の報告があり, *X. arboricola* の菌株については高い遺伝的類似性が認められたとしているが, その中で *X. arboricola* pv. *pruni* については供試菌株が少なく, 全国的な *X. arboricola* pv. *pruni* の遺伝的類似性については明らかでなかった。本研究の結果, 岡山県内の菌株において高い遺伝的類似性が認められ, 今後主要なモモ生産県を中心に rep-PCR 解析を進めることによって, 日本における *X. arboricola* pv. *pruni* の遺伝的多様性がつかめるものと考えられる。

おわりに

我が国におけるモモせん孔細菌病の研究は, これまで

国公立試験研究機関を中心に, 病原細菌の同定, 実際の現地圃場での発生生態の解明, 物理的防除および化学的防除法の開発を中心として行われており, 現在では本病に対してかなり具体的な防除対策を講じることができる。しかし, それでもなお, 本病が多発生する年が存在し, 生産者らは本病の恐ろしさを忘れることができないでいる。また, モモの品種, 殺菌剤の種類の変遷や既存の殺菌剤における使用基準の変更により, 過去に確立された防除対策が現在においてそのまま適用できなくなっているのも確かである。筆者らの研究グループは, 本病に対する新たな防除技術, 最適な殺菌剤散布時期に関する情報を提供するため, 産官学連携で研究開発に取り組んでいる。一日も早く, この成果をモモ生産現場に普及できるように, 現在も全力をあげて取り組んでいるところである。

引用文献

- 1) BOUDON, S. et al. (2005): *Phytopathology* **95**: 1081 ~ 1088.
- 2) HULTON, C. S. et al. (1991): *Mol. Microbiol.* **5**: 825 ~ 834.
- 3) KAWAGUCHI, A. et al. (2008): *Plant Pathol.* **57**: 747 ~ 753.
- 4) ——— et al. (2010): *Plant Pathol.* **59**: 76 ~ 83.
- 5) ——— et al. (2012): The 2nd Korea-Japan Joint Symposium: 25 (Abstract).
- 6) 川口 章 (2010): *植物防疫* **64**: 647 ~ 652.
- 7) ——— (2012): *関西病虫研報* **54**: 105 ~ 107.
- 8) LOUWS, F. et al. (2001): *Plant pathogenic bacteria*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, p. 124 ~ 127.
- 9) 農林水産省大臣官房統計部 (2010): *農林水産統計, 平成 22 年果樹及び茶栽培面積*, 農林水産省, p. 4 ~ 5.
- 10) RADEMAKER, J. L. W. et al. (2005): *Phytopathology* **95**: 1098 ~ 1111.
- 11) 澤田宏之ら (2010): *日植病報* **77**: 7 ~ 22.
- 12) 高梨和雄 (1985): *同上* **39**: 57 ~ 60.
- 13) VERSALOVIC, J. et al. (1994): *Methods Mol. Cell Biol.* **5**: 25 ~ 40.