

和歌山県において発生したウメ根頭がんしゅ病について

菱池政志¹

和歌山県農林水産総合技術センター 果樹試験場うめ研究所

Identification of Bacteria Caused Crown Gall of Japanese Apricot in Wakayama, Japan.

Masashi Hishiike

*Japanese Apricot Laboratory, Fruit Tree Experiment Station
Wakayama Research Center of Agriculture, Forestry and Fisheries*

緒言

根頭がんしゅ病は地際部を中心にごんしゅを形成する病害で、多くの有用植物に発生し、果樹類ではモモ、ナシ、ブドウ、オウトウ、キウイフルーツ、アーモンド、プラムなどで、花き類ではバラ、キク、マーガレット、ダリアなどで報告がある(石澤ら, 1992 ; Kerr, 1968 ; 太田ら, 1984 ; 寺井ら, 1987). 果樹類では苗木での発生が多く、樹勢の低下や幼木の枯死などが報告されている樹種もある(高木, 1933 ; 寺井ら, 1987 ; 山川ら, 1989 ; 山本・広沢, 1994). ウメにおける本病の発生は、白井・原(1927)や高木(1933)によって報告されているが、発生地域および病原菌の詳細については記載されていない。本県では2009年に田辺市のウメの苗木生産ほ場で、その疑い症例が確認された(第1図)。がんしゅを形成した苗木は、商品価値を失い、経済的損失を与えるため問題となっている。そこで、病原菌を分離し、検定植物への接種試験、細菌学的性質の調査および16S リボソームDNA(以下、rDNA)の塩基配列の決定を行い、病原細菌の同定および病害の診断を試みた。その結果、本県で初めてウメ根頭がんしゅ病の発生が確認されたため、その概要を報告する。

なお、根頭がんしゅ病菌が従来から所属する *Agrobacterium* 属は、その細菌学的性質により3つの生理型(biovar, biotype)に分けられるが、近年、新たな分類システムが提案されており、複数の分類システムが混在している状態にある(澤田・土屋, 2003)。そこで、本稿での学名表記は、Youngら(2001)が提案した分類システムCに従った。



第1図. ウメ1年生苗木に形成されたがんしゅ

¹現在：果樹園芸課

材料および方法

1 細菌の分離

ウメ1年生苗木3樹の根頭に形成されたがんしゅから、それぞれ常法により病原菌の分離を行った。すなわち、まず、罹病樹のがんしゅおよびその周辺を滅菌水で十分洗浄し、滅菌したメスでがんしゅを切り取って70%エタノールで表面殺菌した。さらに、内部の白く柔らかい組織を滅菌したメスで採取して、滅菌水中ですりつぶした後、普通寒天培地上で画線培養し、単一集落を釣菌することを2回繰り返して分離菌を得た。

2 病原性試験

検定植物として、ウメ（品種‘南高’）、トマト（品種‘ボンデローザ’）およびヒマワリ（品種‘大輪ひまわり’）を用いた。供試細菌を普通寒天培地上で25℃、2日間培養した集落を滅菌水に懸濁し、約 1×10^8 cfu/ml に調整したものを接種源とした。トマトおよびヒマワリは、注射器を用いてポットに育成した幼苗の茎に穿刺接種した。ウメは茎が硬いため、滅菌したカッターナイフを用いて茎に傷をつけた後、接種した。いずれも、接種後はガラス温室で管理した。病原性の判定は、直径5mm以上のがんしゅが形成されたものを陽性とした。

3 細菌学的性質

レチロシンの利用はKerstensら（1973）の方法を、New and Kerr培地はNew・Kerr（1971）の方法を、クエン酸鉄アンモニウム培地での薄膜の形成はMooreら（2001）の方法を用いた。その他の検査方法については、後藤・瀧川（1984a, 1984b, 1984c, 1984d）の方法を参照した。なお、糖の分解はAyersらの培地を、アルギニン加水分解はThornleyの培地を用いた。供試細菌は、普通寒天培地に画線し、25℃で2日間培養した後、検査培地に移植した。移植後は25℃のインキュベーターで培養した。

4 16S rDNAの塩基配列の決定

供試細菌をPPGA培地で25℃、2日間培養したコロニーから、NucleoSpin Tissue（タカラバイオ株式会社製）を用いてDNAを抽出した後、Bacterial 16S rDNA PCR Kit（タカラバイオ株式会社製）を用いて16S rDNA領域を増幅した。増幅産物は、NucleoSpin Extract II（タカラバイオ株式会社製）を用いて精製した。サーマルサイクラーは、GeneAmp System 2700（Applied Biosystems社製）を用いた。増幅したDNAは、タカラバイオ株式会社のプレミックスシーケンス解析により16S rDNAの塩基配列を決定した。決定した塩基配列は、BLAST検索によりデータベース上の塩基配列と相同性検索を行った。

結 果

1 細菌の分離

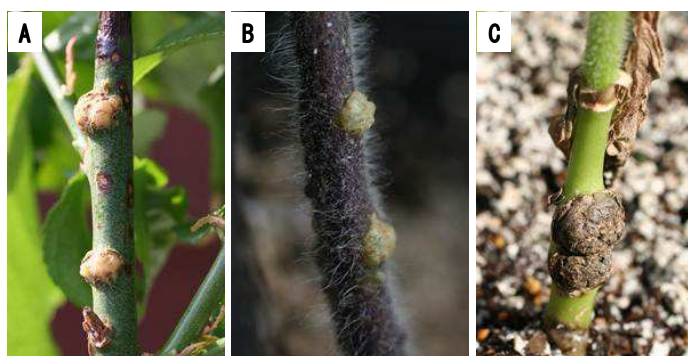
ウメの罹病樹3樹から白色集落を形成する細菌を1樹につき1菌株、計3菌株（UCG-1, UCG-2, UCG-3）分離した。

2 病原性試験

分離された3菌株（UCG-1, UCG-2, UCG-3）を供試した。3菌株とも、ウメ、トマト、ヒマワリのいずれにもがんしゅを形成し、病原性を示した（第2図）。それぞれのがんしゅからは、接種した菌と同様の集落を形成する菌が高頻度かつ純粋に分離された。

3 細菌学的性質

病原性が示された3菌株(UCG-1, UCG-2, UCG-3)を供試した。3菌株は、いずれも普通寒天培地上での集落が白色、円形、全縁、中高、半透明、平滑で湿光を帯びていた。また、調査した細菌学的性質23項目について同様の結果であった。結果を第1表に示す。供試細菌は、好気性で運動性を有しており、グルコースを酸化的にのみ分解して酸を産生し、グルコース含有培地上で菌体外多糖質を旺盛に産生した。いずれの供試培地においてもガスおよび色素を産生しなかった。エスクリンの分解、アルブチンの分解、カタラーゼ活性、生長素要求性、New and Kerr 培地での生育、クエン酸の利用、マロン酸の利用、L-チロシンの利用、ズルシットおよび α -メチル-D-グルコシドからの酸の産生、L-酒石酸からのアルカリの産生はいずれも陽性、グラム反応、2%NaCl 耐性、ホスファターゼ活性、硝酸塩の還元、レシチナーゼ活性、3-ケトラクトースの生成、クエン酸鉄アンモニウム培地での薄膜の形成、オキシダーゼ活性はいずれも陰性であった。リトマスミルク培養では、酸を産生した。



第2図. 検定植物へのウメ分離菌(UCG-1)の接種により形成したがんしゅ

A: ウメ(接種32日後) B: トマト(接種35日後)
C: ヒマワリ(接種45日後)

第1表. 供試菌の細菌学的性質

| 性 質 | ウメ由来3菌株 |
|------------------------------|---------|
| グラム反応 | - |
| 運動性 | + |
| OF試験 | 0 |
| 2%NaCl耐性 | - |
| ホスファターゼ活性 | - |
| 硝酸塩の還元性 | - |
| レシチナーゼ活性 | - |
| 3-ケトラクトースの生成 | - |
| エスクリンの分解 | + |
| アルブチンの分解 | + |
| カタラーゼ活性 | + |
| 生長素要求性 | + |
| New and Kerr 培地での生育 | + |
| クエン酸鉄アンモニウム培地における薄膜の形成 | - |
| リトマスミルク培養 | A, C |
| アルギニン加水分解(Thornleyの培地) | - |
| クエン酸の利用(Simmonsの培地) | + |
| マロン酸からのアルカリの産生 | + |
| L-チロシンの利用 | + |
| オキシダーゼ活性 | - |
| ズルシットからの酸の産生 | + |
| α -メチル-D-グルコシドからの酸の産生 | + |
| L-酒石酸からのアルカリの産生 | + |

注) +: すべて陽性 -: すべて陰性

A: 酸の産生 K: アルカリの産生

R: リトマスの還元 C: 牛乳の凝固

得られた結果を、澤田・土屋(2003)の根頭がんしゅ病菌の鑑別性状(分類システムC)13項目と照

らし合わせたところ、*Rhizobium rhizogenes* とすべての項目で一致した (第2表)。

第2表. 病原細菌の鑑別性状の比較

| 性 質 | <i>Rhizobium</i> | | | ウメ由来3菌株 |
|------------------------------|--------------------|-------------------|--------------|---------|
| | <i>radiobacter</i> | <i>rhizogenes</i> | <i>vitis</i> | |
| 3-ケトラクトースの生成 | + | - | - | - |
| ミルク培養 | K | A | K | A |
| マロン酸からのアルカリの産生 | - | + | + | + |
| L-酒石酸からのアルカリの産生 | d | + | + | + |
| クエン酸の利用 (Simmons の培地) | d | + | + | + |
| クエン酸鉄アンモニウム培地における薄膜の形成 | + | - | - | - |
| 生長素要求性 | - | + | + | + |
| New and Kerr 培地での生育 | - | + | - | + |
| 2%NaCl耐性 | + | - | + | - |
| アルギニン加水分解 (Thornley の培地) | + | - | d | - |
| ズルシットからの酸の産生 | + | + | - | + |
| α -メチル-D-グルコシドからの酸の産生 | + | + | - | + |
| L-チロシンの利用 | - | + | - | + |

注) 澤田・土屋 (2003) の鑑別性状 (分類システムC) から13項目を抜粋。

澤田・土屋 (2003) の記載はパープルミルクとなっているが、本研究ではリトマスミルクを使用した。

+: 80%以上が陽性 - : 80%以上が陰性 d : 菌株間で反応が異なる

K : 酸の産生 A : アルカリの産生

4 16S rDNA の塩基配列

病原性試験、細菌学的性質ともに、供試した3菌株で同様の結果であったため、分離菌株を代表して UCG-1 株を供試し、16S rDNA のほぼ全領域にあたる 1402bp の塩基配列を決定した。結果を第3表に示す。UCG-1 菌株の塩基配列を日本 DNA データバンク (DDBJ) で相同性検索を行ったところ、*Rhizobium rhizogenes* と 100% の相同性であった。

第3表. ウメ分離菌 (UCG-1株) の16S rDNAの塩基配列 (1402bp)

| | | | | | | |
|------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | CTGGCGGCAG | GCTTAACACA | TGCAAGTCGA | GCGCCCGCA | AGGGGAGCGG | CAGACGGGTG |
| 61 | AGTAACGCGT | GGGAATCTAC | CCTTTTCTAC | GGAATAACGC | AGGGAAACTT | GTGCTAATAC |
| 121 | CGTATGTGTC | CTTCGGGAGA | AAGATTTATC | GGGAAAGGAT | GAGCCCGCGT | TGGATTAGCT |
| 181 | AGTTGGTGGG | GTAAAGGCCT | ACCAAGGCGA | CGATCCATAG | CTGGTCTGAG | AGGATGATCA |
| 241 | GCCACATTGG | GACTGAGACA | CGGCCAAAC | TCCTACGGGA | GGCAGCAGTG | GGGAATATTG |
| 301 | GACAATGGGC | GCAAGCCTGA | TCCAGCCATG | CCGCGTGAGT | GATGAAGGCC | CTAGGGTTGT |
| 361 | AAAGCTCTTT | CACCGGAGAA | GATAATGACG | GTATCCGGAG | AAGAAGCCCC | GGCTAACTTC |
| 421 | GTGCCAGCAG | CCGCGGTAAT | ACGAAGGGGG | CTAGCGTTGT | TCGGAATTAC | TGGGCGTAAA |
| 481 | GCGCACGTAG | GCGGATCGAT | CAGTCAGGGG | TGAAATCCCA | GGGCTCAACC | CTGGAAGTGC |
| 541 | CTTTGATACT | GTCGATCTGG | AGTATGGAAG | AGGTGAGTGG | AATTCGGAGT | GTAGAGGTGA |
| 601 | AATTCGTAAG | TATTCGGAGG | AACACCAAGT | GCGAAGGCGG | CTCACTGGTC | CATTACTGAC |
| 661 | GCTGAGGTGC | GAAAGCGTGG | GGAGCAAACA | GGATTAGATA | CCCTGGTAGT | CCACGCCGTA |
| 721 | AACGATGAAT | GTTAGCCGTC | GGGAGTATA | CTGTTCCGGT | GCGCAGCTAA | CGCATTAAC |
| 781 | ATTCGCCTG | GGGAGTACGG | TCGCAAGATT | AAAAC TCAA | GGAATTGACG | GGGGCCGCA |
| 841 | CAAGCGGTGG | AGCATGTGGT | TTAATTCGAA | GCAACGCGCA | GAACCTTACC | AGCCCTTGAC |
| 901 | ATCCTGTGTT | ACCGTAGAG | ATATGGGGTC | CACTTCGGTG | GCGCAGAGAC | AGGTGCTGCA |
| 961 | TGGCTGTGCT | CAGCTCGTGT | CGTGAGATGT | TGGGTTAAGT | CCCGCAACGA | GCGCAACCTT |
| 1021 | CGCCCTTAGT | TGCCAGCATT | CAGTTGGGCA | CTCTAAGGGG | ACTGCCGGTG | ATAAGCCGAG |
| 1081 | AGGAAGGTGG | GGATGACGTC | AAGTCCTCAT | GGCCCTTACG | GGCTGGGCTA | CACACGTGCT |
| 1141 | ACAATGGTGG | TGACAGTGGG | CAGCGAGCAC | GCGAGTGTGA | GCTAATCTCC | AAAAGCCATC |
| 1201 | TCAGTTCGGA | TTGCACTCTG | CAACTCGAGT | GCATGAAGTT | GGAATCGCTA | GTAATCGCGG |
| 1261 | ATCAGCATGC | CGCGGTGAAT | ACGTTCCCGG | GCCTTGTACA | CACCGCCCGT | CACACCATGG |
| 1321 | GAGTTGGTTT | TACCCGAAGG | TAGTGCCTA | ACCGCAAGGA | GGCAGCTAAC | CACGGTAGGG |
| 1381 | TCAGCGACTG | GGGTGAAGTC | GT | | | |

考 察

ウメのがんしゅから分離された細菌は、ウメ、トマト、ヒマワリにがんしゅを形成した。また、調査した細菌学的性状 23 項目の内、澤田 (2003) の鑑別性状 (分類システム C) と比較した 12 項目すべてが *R. rhizogenes* と一致した。さらに、16S rDNA の塩基配列が *R. rhizogenes* と 100% の相同性を示した。以上のことから、分離菌をがんしゅ形成性の *R. rhizogenes* と同定し、本県で 2009 年に発生したウメの病害を根頭がんしゅ病と診断した。ウメ根頭がんしゅ病については、白井・原 (1927) および高木 (1933) が、*Bacterium tumefaciens* (後に *Agrobacterium tumefaciens* に変更) の感染により発生すると報告しているが、発生地域および病原細菌の細菌学的性質の記載はない。病原菌の詳細については、本研究により初めて明らかとなった。

今回、ウメ「南高」の 1 年生苗で根頭がんしゅ病の発生を確認したが、同じ苗木業者から購入した外見は健全な 1 年生苗を 1 年間育成した後のがんしゅの形成が認められた事例があった。この事例では本菌が苗木ほ場で感染したのか、購入後に定植ほ場で感染したのかは不明である。とはいえ、ブドウ根頭がんしゅ病では、苗木の移動により病原菌が伝染し、土壌伝染で発生地内での被害が拡大するとされている (Bishop ら, 1988 ; Burr・Katz, 1983)。したがって、県内のある程度の面積のウメ園地に、本菌が存在していることが想定される。

なお、モモ、ブドウでは根頭がんしゅ病に対する抵抗性の品種間差異が報告されている (家城・澤田, 1992 ; 石澤ら, 1992)。ウメの品種間差異についても今後明らかにして、効率的防除につなげる必要がある。

摘 要

- 1) 和歌山県のウメにおいて、2009 年に根頭がんしゅ病の疑い症例が初めて発生して問題になった。
- 2) ウメ樹のがんしゅから分離した細菌を、ウメ、トマト、ヒマワリに接種した結果、いずれにもがんしゅを形成し、病原菌と特定した。
- 3) 病原菌の細菌学的性質を、根頭がんしゅ病菌の鑑別性状と照らし合わせたところ、*R. rhizogenes* とすべての項目で一致した。
- 4) 分離菌の 16S rDNA の塩基配列を決定し、相同性検索した結果、*R. rhizogenes* と 100% の相同性を示した。
- 5) 以上の結果から、病原菌をがんしゅ形成性の *R. rhizogenes* と同定し、本県で 2009 年に発生したウメの病害を根頭がんしゅ病と診断した。

謝 辞

本研究を行うにあたり終始懇切な御指導をいただき、また本稿を御校閲いただいた株式会社理研グリーン・グリーン研究所の小林真樹氏に深く感謝の意を表す。

引用文献

- Bishop, A. L., Katz, B. H. and Burr, T. J. 1988. Infection of grapevine by soilborne *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 and population dynamics in host and nonhost rhizospheres. *Phytopathology*. 78 : 945-948.
- Burr, T. J. and Katz, B. H. 1983. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 from grapevine galls and sap, and from vineyard soil. *Phytopathology*. 73 : 163-165.
- 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. 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べかた (2). *植物防疫*. 38 : 385-389.
- 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 (3). *植物防疫*. 38 : 432-437.
- 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 (4). *植物防疫*. 38 : 479-489.
- 家城洋之・澤田宏之. 1992. ブドウの根頭がんしゅ病に対する抵抗性判定法と品種抵抗性. *日植病報*. 58 : 195-199.
- 石澤ゆり・京谷英壽・西村幸一・山口正己. 1992. モモ根頭がんしゅ病抵抗性の検定法と品種間差異. *果樹試報*. 23 : 37-46.
- Kerr, A. 1969. Crown gall of stone fruit I. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* and related species. *Aust. J. boil. Sci.* 22. 111-116.
- Kerstens, K., De Ley, J., Sneath, P. H. A. and Sackin, M. 1973. Numerical taxonomic analysis of *Agrobacterium*. *J. Gen. Microbiol.* 78 : 227-239.
- Moore, L. W., Bouzar, H. and Burr, T. 2001. *Agrobacterium*. In *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, third edition. (Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W., eds.). pp. 17-35, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- New, P. B. and Kerr, A. 1971. A selective medium for *Agrobacterium radiobacter* biotype 2. *J. Appl. Bacteriol.* 34 : 233-236.
- 太田光輝・西山幸司. 1984. 花き類の根頭がんしゅ病に関する研究. I. 病害の発生ならびに病原細菌の細菌学的性質. *日植病報*. 50 : 197-204.
- 澤田宏之・土屋健一. 2003. *Agrobacterium* 属細菌の分類. *日植病報*. 69 : 349-365.
- 白井光太郎・原攝祐. 1927. 訂正増補日本菌類図鑑. pp. 51.
- 高木三郎. 1933. 根頭癌腫病と其の防除法. *日園雑*. 45(12) : 37-40.
- 寺井康夫・浅利覚・小野光明・市川和規. 1987. ブドウ根頭がんしゅ病の発生状況と病原細菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) の選択培地による分離と病原性. *日植病報*. 53 : 405.
- 山川隆平・東海林久雄・田中孝. 1989. 山形県におけるブドウ根頭がんしゅ病の発生について. *日植病報*. 55 : 88.
- 山本淳・広沢敬之. 1994. 島根県におけるブドウ根頭がんしゅ病の発生と伝染経路. *島根農試研報*. 28 : 9-19.
- Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martinez-Romero, E., Kerr, A. and Sawada, H. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations : *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 : 89-103.