

ウリ科作物の種子健全性検査で分離される 果実汚斑細菌病菌に類似した *Acidovorax* 属細菌について

株式会社サカタのタネ

まさづみ よしゆき い がらし みつる ごとう きよたか
 牧住 芳之・五十嵐 充・後藤 清孝
 むら お かずのり やまもと ももえ かく ひさとし
 村尾 和則・山本 桃枝・加来 久敏

はじめに

果実汚斑細菌病 (BFB) は、1980 年代後半から 90 年代にかけて米国においてスイカに大きな被害をもたらした病害である。本病は世界各地でスイカやメロンを中心としたウリ科作物に発生しており、日本国内においても 1998 年に山形県のスイカで初めて確認されて以来、複数の県で散発的な発生が認められている。

本病の第一次伝染源は病原細菌 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* に汚染された種子であり、種苗会社においては、汚染種子の混入・流通を未然に防止するための種子健全性検査が必須とされている。また、ウリ科作物種子の多くを海外から輸入する我が国では、スイカ、トウガン、メロンの種子に関して、植物防疫法施行規則によって *A. avenae* subsp. *citrulli* を輸出国での栽培地検査を要する検査有害動植物に指定し、国内への侵入を警戒している。

筆者らは種子健全性検査として、サンプリングした種子を播種し、本病の発生しやすい高温多湿条件下で育苗を行って発病の有無を確認する、グローアウト試験を実施している。近年、その検査の過程において、各ウリ科作物に形成された病斑から *A. avenae* subsp. *citrulli* と類似した細菌が分離されることがあり、問題となっている。ウリ科作物から分離される *Acidovorax* 属細菌としては、*A. avenae* subsp. *citrulli* のほかに *A. facilis* (HODGE et al., 1995) や *A. valerianellae* (瀧川ら, 2008) が報告されているものの、*A. avenae* subsp. *citrulli* との病原性比較や種子伝染性など、その詳細は明らかではない。筆者らは、分離した *Acidovorax* 属細菌に関して、*A. avenae* subsp. *citrulli* との異同も含め分類学的所属を検討し、さらにはウリ科作物に対する危険性を判断すべく病原性の調査を行った (MAKIZUMI et al., 2011) ので、ここに紹介する。

Acidovorax avenae subsp. *citrulli*-like Bacteria Detected by Seed Health Testing of Cucurbits. By Yoshiyuki MAKIZUMI, Mitsuru IGARASHI, Kiyotaka GOTOH, Kazunori MURAO, Momoe YAMAMOTO and Hisatoshi KAKU

(キーワード: *Acidovorax*, 果実汚斑細菌病 (BFB), 種子伝染, 種子健全性検査)

I ELISA による検出・同定

A. avenae subsp. *citrulli* の検出を目的とした ELISA 用抗体は数種類が市販されているが、その中からポリクローナル抗体 1 種 (日本植物防疫協会) およびモノクローナル抗体 1 種 (米国 Agdia 社) を用いて、DAS-ELISA により前記分離細菌の検出・同定を試みた。その結果、両抗体と反応する菌株、いずれか一方の抗体のみと反応する菌株、いずれの抗体とも反応しない菌株などが存在した (表-1)。また、ポリクローナル抗体の場合は、陽性と陰性の中間的な反応を示す菌株や、検定ごとに異なる結果を示す菌株があり、ELISA では正確な同定が行えない可能性が示唆された。

II 16S rRNA 遺伝子配列による同定

次に分離細菌の簡易同定を目的として、16S rRNA 遺伝子配列を解析し、さらに遺伝子系統樹を作成して分類学的所属を検討した。その結果、分離細菌は配列の違いによって 6 種類に分けられたが、いずれも *A. avenae* と近縁であった (表-1, 図-1)。しかし、*A. avenae* subsp. *citrulli* と一致する配列をもつ菌株はなく、イネ褐条病菌 *A. avenae* subsp. *avenae* と同一配列の菌株が多かった。ELISA によって *A. avenae* subsp. *citrulli* と同定されても、16S rRNA 遺伝子配列の解析では異なる結果となる菌株もあることが判明した。

III 病原性試験

分離細菌のウリ科作物に対する危険性を判断するため、今回の分離菌株のうち 10 菌株を噴霧接種してその病原性を検討した。その結果、キュウリやカボチャの若い本葉に黄斑や褐色の水浸状斑を形成するが多かった (口絵① A, B) が、*A. avenae* subsp. *citrulli* と比べると明らかに病原性が劣っていた。一つ一つの病斑については分離細菌と *A. avenae* subsp. *citrulli* とで外観上の大きな違いは認められなかったが、*A. avenae* subsp. *citrulli* が上位葉から下位葉まで全身の葉に多数の病斑を形成した (口絵① C, D) のに対して、分離細菌は主に展開して間もない若い本葉に病斑を形成した。また、分

表-1 供試細菌のELISAおよび16S rRNA遺伝子配列解析の結果

種名, 菌株名	分離源	由来	ELISA ^{a)}		16S rRNA 遺伝子配列 ^{b)}
			ポリクローナル 抗体	モノクローナル 抗体	
分離菌株					
KBT003	スイカ	本研究	+	+	Seq1
KBT005	オモチャカボチャ	本研究	-	-	Seq4
KBT016	カボチャ	本研究	-	-	Seq4
KBT017	カボチャ	本研究	-	-	Seq5
KBT025	カボチャ	本研究	+	+	Seq1
KBT029	カボチャ	本研究	-	-	Seq1
KBT076	カボチャ	本研究	+	+	Seq1
KBT102	スイカ	本研究	-	+	Seq1
KBT109	スイカ	本研究	+	+	Seq1
KBT132	カボチャ	本研究	v	-	Seq1
KBT134	カボチャ	本研究	-	-	Seq1
KBT137	カボチャ	本研究	v	-	Seq1
KBT148	カボチャ	本研究	+	+	Seq1
KBT152	カボチャ	本研究	v	-	Seq1
KBT156	カボチャ	本研究	+	-	Seq2
KBT196	スイカ	本研究	-	-	Seq3
KBT209	カボチャ	本研究	-	-	Seq6
KBT213	カボチャ	本研究	v	-	Seq1
KBT229	スイカ	本研究	v	-	Seq1
対照菌株					
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>					
MAFF 301024	トウモロコシ	NIAS	-	-	ND
MAFF 301027	ホイトグラス	NIAS	-	-	ND
MAFF 301031	レスクグラス	NIAS	-	-	ND
MAFF 301036	テオシント	NIAS	-	-	ND
MAFF 301141	シコクビエ	NIAS	-	-	ND
MAFF 301502	イネ	NIAS	-	-	ND
MAFF 301506	イネ	NIAS	-	-	ND
MAFF 301508	イネ	NIAS	+	-	ND
MAFF 301510	イネ	NIAS	-	-	ND
MAFF 301609	ダリスグラス	NIAS	-	-	ND
MAFF 301752	イネ	NIAS	-	-	ND
MAFF 311160	イネ	NIAS	-	-	ND
<i>A. avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i>					
MAFF 301576	ファレノプシス	NIAS	-	-	ND
<i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>					
MAFF 720008	スイカ	NIAS	+	+	ND
MAFF 730196	メロン	NIAS	+	+	ND
<i>A. konjaci</i>					
MAFF 301465	コンニャク	NIAS	-	-	ND

NIAS, 農業生物資源ジーンバンク; ND, 未解析.

a) +, 405 nm の吸光度が0.1以上; v, 再現性に乏しく評価不能.

b) 分離菌株の配列名は任意に付けた.

MAKIZUMI et al. (2011) から一部改変して引用した.

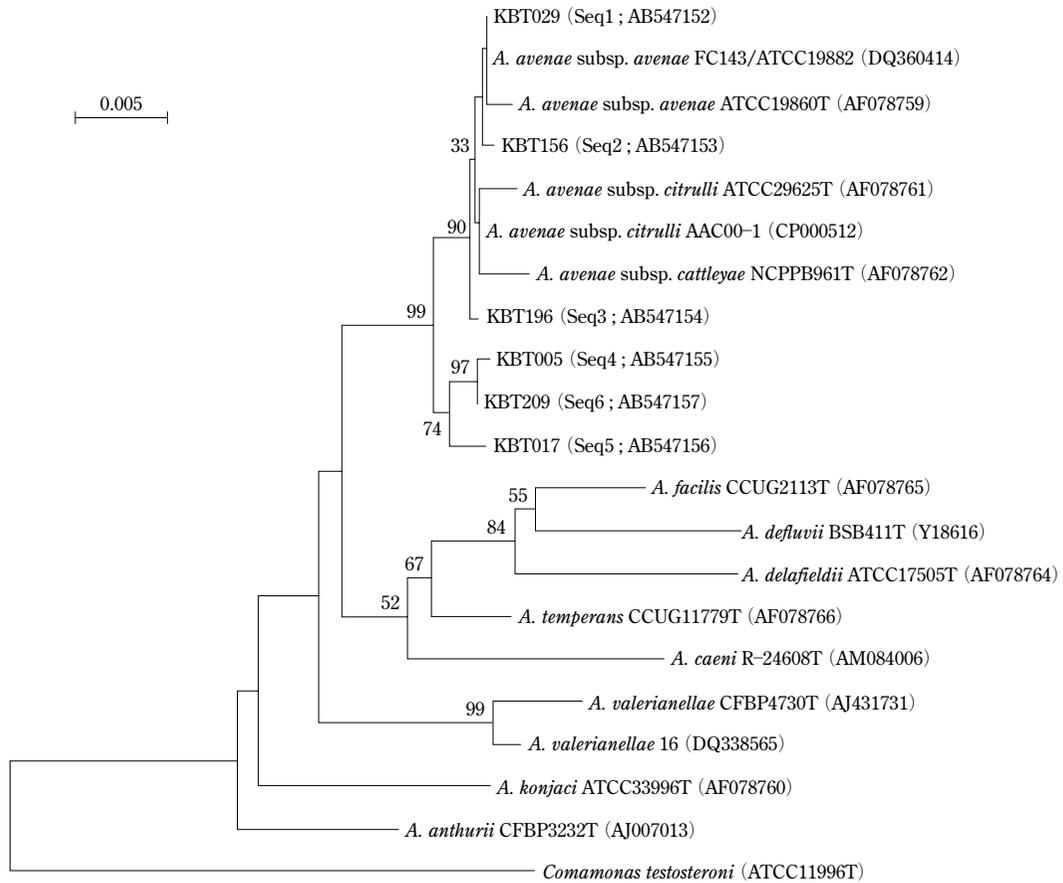


図-1 16S rDNA 遺伝子配列に基づく *Acidovorax* 属細菌の分子系統樹 (NJ 法) (MAKIZUMI et al. (2011) から一部改変して引用した。

離細菌はメロンやスイカにはほとんど病斑を形成しなかったが、*A. avenae* subsp. *citrulli* はこれらにも強い病原性を示し、病斑が拡大して株全体が腐敗する場合もあった。一方、*A. avenae* subsp. *avenae* はウリ科作物には病原性がないとされ (SCHAAD et al., 1978 ; 白川ら, 2000), ウリ科作物から分離された報告もないと思われるが, 本試験では弱い病原性が認められ, 分離細菌とほぼ同様の病徴を引き起こした (口絵① E, F)。これらの結果から, 今回分離された細菌のウリ科作物に対する危険性は, *A. avenae* subsp. *citrulli* と比較すると大幅に低く, *A. avenae* subsp. *avenae* と同程度であり, 作物栽培現場においては大きな問題にならないと考えられる。

IV 接種植物の組織学的観察

前記の病原性試験で形成された病斑において, 接種した細菌が植物組織に侵入し, 定着・増殖していることを確認するため, 植物組織を固定し, 切片を作成して光学

顕微鏡および走査型電子顕微鏡で観察した。その結果, 接種した細菌は葉の表面で増殖し, 気孔から侵入, その後柔組織の細胞間隙 (口絵② A) および維管束 (口絵② B) で増殖・拡散していた。しかし, その増殖・拡散程度は菌株によって違いがあり, 分離細菌は *A. avenae* subsp. *citrulli* に対して大幅に劣っていた (口絵③)。また分離細菌の場合には, その増殖部位の周辺に植物の反応物質が認められた。

おわりに

今回分離された細菌は, 16S rDNA 遺伝子配列から判断すると *A. avenae* subsp. *citrulli* とは異なる菌群であり, 病原性に関しても *A. avenae* subsp. *citrulli* と比べて著しく弱い。前述のとおり, これらの細菌のウリ科作物に対する危険性は低いと考えられるが, *A. avenae* subsp. *citrulli* との類似性から植物検疫や種子健全性検査の現場に混乱をもたらす可能性がある。現状では

ELISA など血清学的診断法では誤同定の恐れがあるため、PCR や遺伝子配列の解析等分子生物学的手法の適用が必要である。

植物病原性 *Acidovorax* 属細菌の分類に関しては近年、再編の動きがある (SCHAAD et al., 2008)。今回分離された細菌の分類学的所属に関してもさらなる検討を要し、特に 16S rRNA 遺伝子配列の一致するものが多かったイネ褐条病菌 *A. avenae* subsp. *avenae* との比較について、病原性や細菌学的性状も含めてより詳細な分析が求められる。それに加えて、16S rRNA 遺伝子配列よりも情報量の多い領域を用いた系統解析や、DNA-DNA 交雑試

験等も必要とされよう。今回分離された細菌は、ウリ科作物に対する病原性が弱く、種子の産地や年度に関係なく検出されることから、ウリ科作物の葉面などに生息する日和見感染菌であると推測されるが、それを結論するにはより広範な調査が必要である。

引用文献

- 1) HODGE, N. C. et al. (1995): *Phytopathology* **85**: 1187.
- 2) MAKUZUMI, Y. et al. (2011): *J. Gen. Plant Pathol.* **77**: 24 ~ 32.
- 3) SCHAAD, N. W. et al. (1978): *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**: 117 ~ 125.
- 4) ————— et al. (2008): *Syst. Appl. Microbiol.* **31**: 434 ~ 446.
- 5) 白川 隆ら (2000): *日植病報* **66**: 223 ~ 231.
- 6) 瀧川雄一ら (2008): *同上* **74**: 255.

新しく登録された農薬 (23.8.1 ~ 8.31)

掲載は、種類名、登録番号：商品名 (製造者又は輸入者) 登録年月日、有効成分：含有量、対象作物：対象病害虫：使用時期等。ただし、除草剤・植物成長調整剤については、適用作物、適用雑草等を記載。(登録番号：22948 ~ 22962) 種類名に下線付きは新規成分。※は新規登録の内容。

「殺虫剤」

- フロニカミドくん煙剤 ※新剤型
22949: ウララクくん煙剤 (石原産業) 11/08/03
22950: 新富士ウララクくん煙剤 (新富士化成業) 11/08/03
フロニカミド: 14.0%
- メロン (温室, ビニールハウス等密閉できる場所): アブラムシ類: 収穫前日まで
- オリフルア・トートリルア・ピーチフルア剤 ※既製剤 (中央値変更)
22959: コンフューザー N (信越化学工業) 11/08/24
(Z)-8-ドデセニル=アセタート: 36.2%, (Z)-11-テトラデセニル=アセタート: 23.9%, (Z)-9-テトラデセニル=アセタート: 4.8%, 10-メチルドデシル=アセタート: 0.64%, (Z)-9-ドデセニル=アセタート: 1.2%, 11-ドデセニル=アセタート: 0.65%, (Z)-11-テトラデセン-1-オール: 0.28%, (Z)-13-イコセン-10-オン: 21.3%
- 果樹類 (交尾阻害): ナシヒメシンクイ, モモシンクイガ, チャハマキ, チャノコカクモンハマキ, リンゴコカクモンハマキ, リンゴモンハマキ, スモモヒメシンクイ: 成虫発生初期から終期

「殺虫殺菌剤」

- アセタミプリド・フェンプロパトリン・チオファネートメチル水和剤 ※新混合剤
22951: モストップジン R スプレー (日本曹達) 11/08/03
22952: GF モストップジン R スプレー (住友化学園芸) 11/08/03
アセタミプリド: 0.0050%, フェンプロパトリン: 0.010%, チオファネートメチル: 0.040%
- きゅうり: アブラムシ類, ハダニ類, うどんこ病: 収穫前日まで
- なす: アブラムシ類, ハダニ類, うどんこ病: 収穫前日まで
トマト: アブラムシ類, うどんこ病, 葉かび病: 収穫前日まで

- 花き類・観葉植物 (きく, ばら, ペチュニアを除く): アブラムシ類, ハダニ類: 発生初期
ばら: アブラムシ類, ハダニ類, うどんこ病, 黒星病: 発生初期
ペチュニア: アブラムシ類, ハダニ類, うどんこ病: 発生初期
きく: アブラムシ類, ハダニ類, 褐斑病: 発生初期
- 脂肪酸グリセリド乳剤 ※既製剤 (新規参入)
22957: ガーデンアシストバームスプレー (サンケイ化学) 11/08/24
脂肪酸グリセリド: 0.15%
- 野菜類: ハダニ類, アブラムシ類, うどんこ病: 収穫前日まで
豆類 (種実): ハダニ類, アブラムシ類, うどんこ病: 収穫前日まで
- いも類: ハダニ類, アブラムシ類, うどんこ病: 収穫前日まで
- 花き類・観葉植物: ハダニ類, うどんこ病: —
ばら: アブラムシ類: —
パンジー: アブラムシ類: —
- クロルピクリンくん蒸剤 ※既製剤 (新規参入)
22960: ニッカクロールピクリン (ニッカファインテクノ) 11/08/24
クロルピクリン: 99.5%
- あぶらな科野菜 (キャベツを除く): 萎黄病, センチュウ類, ハリガネムシ, ネキリムシ, ケラ, 一年生雑草
だいこん: 亀裂褐変症
はくさい: 黄化病, 軟腐病, 根くびれ病
かぶ: 根こぶ病
キャベツ: 萎黄病, 根こぶ病, センチュウ類, ハリガネムシ, ネキリムシ, ケラ, 一年生雑草
レタス: ビッグベイン病, 根腐病, センチュウ類, ハリガネムシ, ネキリムシ, ケラ, 一年生雑草

(44 ページに続く)