ブドウ斑点細菌病菌 (*Xanthomonas arboricola*) と 核果類せん孔細菌病菌 (*X. arboricola* pv. *pruni*) の多相的な比較

澤田 宏之^{1*}・綿打 享子²・功刀 幸博²

ABSTRACT

SAWADA, H.^{1*}, WATAUCHI, K.² and KUNUGI, Y.² (2011). Polyphasic comparison of bacterial spot pathogen of grapevine (*Xanthomonas arboricola*) with that of stone fruits (*X. arboricola* pv. *pruni*). Jpn. J. Phytopathol. 77: 265–277.

Polyphasic comparisons were carried out to characterize the pathogen of bacterial spot disease of grapevine (*Xanthomonas arboricola*) (Sawada *et al.*, 2011) and that of bacterial spot diseases of stone fruits (*X. arboricola* pv. *pruni*) in detail. For that purpose, we isolated both pathogens in the area selected as a model, where the two diseases respectively occur annually in neighboring orchards, in Minami-Alps City, Yamanashi Prefecture in September 2010 to characterize them genotypically and phenotypically, to perform cross inoculation experiments, and to compare these results with those obtained from reference strains of *X. arboricola* pathovars. All strains of pv. *pruni* (1) are genetically highly uniform, (2) naturally infect peach, plum and apricot, (3) are highly virulent and stably pathogenic to peach, (4) do not naturally infect grapevine, and (5) are negative in the potato soft rot test. On the contrary, isolates causing bacterial spot disease of grapevine (1) are not genetically uniform and are scattered within the *X. arboricola* clade, interspersed with existing pathovars, in a *gyrB* phylogenetic analysis, (2) are weak, opportunistic pathogens, and only if the conditions are ideal, can they infect grapevine naturally, (3) do not naturally infect peach, plum or apricot, and (4) cause severe, rapid rot in the potato soft rot test. These results show that the latter pathogen should be regarded as a heterogeneous complex of genetically diverse, indigenous bacteria, although some phenotypes can be considered as common attributes. We concluded that it is inappropriate to propose a novel pathovar for the latter pathogen, until the pathovar of the genus *Xanthomonas* is further clarified and defined phenotypically and genotypically.

(Received June 7, 2011; Accepted August 8, 2011)

Key words: bacterial spot, *gyrB*, grapevine, peach, *Xanthomonas arboricola*, pv. *pruni*

緒 言

2008年6月、山梨県甲州市でブドウ（ブドウ科ブドウ属 ヨーロッパブドウ = *Vitis vinifera*）の葉および果房に斑点症状が発生し、2009年には同県南アルプス市にも発生が拡大した。葉では葉脈に囲まれた境界の明瞭な角斑が形成され、幼果期の果粒や小果梗には楕円形の壊死斑が認められた。われわれは本症状を病原学的に解析し、その病原細菌を *Xanthomonas arboricola* Vauterin, Hoste, Kersters and Swings 1995 と同定するとともに、新病害「ブドウ斑点細菌病」として提案

したところである（澤田ら、2011）。

2008～2009年に実施した調査・解析の結果（澤田ら、2011）は、「ブドウ斑点細菌病菌は遺伝的に固定されていない、弱病原性の日和見感染菌である」ことを示唆していた。また、ブドウ斑点細菌病菌の *gyrB* 配列は、*X. arboricola* のいずれの既知 pathovar の基準株とも一致しないことが確認できた。このことは、「ブドウ斑点細菌病菌はブドウ以外の植物の病害発生には関与していない」という可能性を示唆している。同様に、「他の既知 pathovar はブドウ斑点細菌病の発生に関与していない」との推測も成り立つであろう。また、

¹ 農業生物資源研究所（〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2） National Institute of Agrobiological Sciences, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

² 山梨県果樹試験場（〒405-0043 山梨市江曾原 1204） Yamanashi Fruit Tree Experiment Station, 1204 Ezohara, Yamanashi, Yamanashi 405-0043, Japan

* Corresponding author (E-mail: sawada@affrc.go.jp)

本研究で明らかになった DNA 塩基配列は、DDBJ/EMBL/GenBank DNA データベースに Accession Nos. AB615333–AB615351 として登録した。

「ブドウ斑点細菌病菌を pathovar として取り扱っても良いのだろうか」という重要な問題も残されている。以上のように、推測段階のものを含む未解決の問題が山積していることが、本病の防除対策を講じる上での障害となっている。それを解消するためには、ブドウ斑点細菌病菌と *X. arboricola* の既知 pathovar との比較を多相的に行い、本菌をさらに明確に特徴づけるとともに、既知 pathovar との相違点を整理する必要がある。

X. arboricola に含まれている 9 つの既知 pathovar (Parkinson *et al.*, 2009) のうち、わが国で記載があるのは *pv. pruni*, *pv. fragariae*, *pv. zantedeschiae* の 3 つである (日本植物病理学会, 2000, 2011)。このうち、山梨県では核果類の栽培が盛んであり、*pv. pruni* によるモモ (*Prunus persica*)・アンズ (*Prunus armeniaca*) のせん孔細菌病やスモモ (*Prunus salicina*) の黒斑病が恒常的に発生している。また、県内にはブドウとモモの栽培園が混在している産地も多く、ブドウ斑点細菌病とモモせん孔細菌病が近接した状態で発生する事例が実際に認められている。さらに、前報 (澤田ら, 2011) で実施したブドウへの人為接種において、既知 pathovar の中で最も強い病原力を示したのは *pv. pruni* であった。一方、山梨県におけるイチゴの生産規模は小さく、しかも *pv. fragariae* によるイチゴ斑細菌病の発生は県内では確認されていない。また、オランダカイウ (カラー) は県内にまとまった産地が存在しない上、*pv. zantedeschiae* によるオランダカイウ褐斑細菌病の発生の記録もない。

以上のことから、本研究ではブドウ斑点細菌病菌との比較対象として *pv. pruni* を選んだ。そして、ブドウ斑点細菌病とモモせん孔細菌病とが近接して発生している山梨県南アルプス市の園地をモデルとして選び、2010 年に両病原菌を分離した上で、対照菌とともにその遺伝型・表現型を解析し、交互接種試験を実施した。それらの結果に基づいて両病原菌を特徴づけながら、上記の問題について検証を試みるとともに、ブドウ斑点細菌病菌を pathovar として取り扱うことの是非についても考察した。

材料および方法

調査対象園における試験区の設定 山梨県南アルプス市西野には、ブドウ園とモモ園が隣接しており、しかも、ブドウ斑点細菌病とモモせん孔細菌病がそれぞれで発生している園地が存在する。そこで、その園地を調査対象として選び、それぞれの園内に 6 個の試験区を設けた (第 1 図)。ブドウ園には主に「甲斐路」の早生系統、モモ園には「暁星」が植栽されており、調査時点 (2010 年 9 月) で前者では 20 年、後者では 12 年の栽培歴がある。また、両園の境界付近にお

第 1 図 調査対象園における試験区の設定および分離された菌株の情報。

ブドウ園 (右) の A, B, D, E 区は東西が 3.6 m, 南北が 5.4 m の長方形であり, C, F 区は一边が 3.6 m の正方形である。モモ園 (左) についてはそれぞれの樹を調査単位として 6 区 (H ~ M 区) を設けた。

分離菌を *gyrB* 配列に基づいてグループに類別した後 (第 2 図, 第 1 表), 各グループの圃場内における分布域を視覚化するために, 各分離菌を以下の記号を用いて示した: ○, I 型; ●, II 型; △, II' 型; □, III 型。

いて両樹種は近接して配置されており、境界付近の樹では互いの葉が擦れ合う状態であった。

なお、ブドウ園には「甲斐路」以外の品種も一部に植栽されていたが、それらの枝葉の分布ができるだけ少ない領域を試験区 (A ~ F 区) として設定した上で、「甲斐路」の葉のみを選んで調査・サンプリングを実施した。一方、モモ園の「暁星」はいずれも樹冠の長径が 6 m 前後に揃っていることから、それぞれの樹を調査単位として 6 区 (H ~ M 区) を設けた。

サンプリングと病原菌の分離・培養 ブドウ園およびモモ園の各区より罹病葉を無作為に採取し、区ごとに 12 枚を選んで分離に供した。各罹病葉から 1 個の病斑を選んで約 5 mm 角に切り出し、前報 (澤田ら, 2011) と同様にして画線法分離を行った。形成されたコロニーの中から 1 個を選び、単集落分離を 2 回繰り返すことによって純化を行った。このようにして区ごとに純粋培養を 12 株ずつ確立することによって、合計 72 株 (12 株 × 6 区) のブドウ分離菌と、72 株のモモ分離菌を得た (第 1 図, 第 1 表)。また、第 2 表に示した 46 株を、比較のための対照として以後の各試験に供した。これら供試菌株の培養および保存は前報 (澤田ら, 2011) と同様にして行った。

分離菌の類別 分離菌を遺伝的類縁関係に基づいて類別するために、*gyrB* を指標として選び、その部分配列を両鎖解

第1表 調査対象園から分離したブドウ斑点細菌病菌とモモせん孔細菌病菌

<i>gyrB</i> 配列に 基づく類別 (グループ) ^{a)}	各グループに類別された 分離菌株 ^{b)}	各グループから代表として選んだ菌株の来歴・性状 ^{c)}					
		代表として 選んだ菌株	分離源 (品種)	同定結果 ^{d)}	MAFF 番号 ^{e)}	DDBJ 登録番号 ^{f)}	ジャガイモ 塊茎腐敗 ^{g)}
I	10C03, 10C04, 10C05, 10C06, 10C07, 10C08, 10C09, 10C10, 10C11, 10C12, 10D04, 10D08, 10F01, 10F02, 10F03, 10F04, 10F05, 10F06, 10F07, 10F08, 10F09, 10F10, 10F11, 10F12	10F01	ブドウ (甲斐路)	ブドウ斑点細菌病菌 (<i>X. arboricola</i>)	211966	AB615333	+
		10F12	ブドウ (甲斐路)	ブドウ斑点細菌病菌 (<i>X. arboricola</i>)	211967	AB615334	+
II	10A01, 10A02, 10A03, 10A04, 10A05, 10A06, 10A07, 10A08, 10A09, 10A10, 10A11, 10A12, 10B01, 10B02, 10B03, 10B04, 10B05, 10B06, 10B07, 10B08, 10B09, 10B10, 10B11, 10B12, 10C01, 10C02, 10D01, 10D03, 10D05, 10D06, 10D07, 10D09, 10D10, 10D11, 10D12, 10E01, 10E02, 10E03, 10E04, 10E05, 10E06, 10E07, 10E08, 10E09, 10E10, 10E11, 10E12	10A01	ブドウ (甲斐路)	ブドウ斑点細菌病菌 (<i>X. arboricola</i>)	211968	AB615335	+
		10E01	ブドウ (甲斐路)	ブドウ斑点細菌病菌 (<i>X. arboricola</i>)	211969	AB615336	+
II'	10D02	10D02	ブドウ (甲斐路)	ブドウ斑点細菌病菌 (<i>X. arboricola</i>)	211970	AB615337	+
III	10H01, 10H02, 10H03, 10H04, 10H05, 10H06, 10H07, 10H08, 10H09, 10H10, 10H11, 10H12, 10I01, 10I02, 10I03, 10I04, 10I05, 10I06, 10I07, 10I08, 10I09, 10I10, 10I11, 10I12, 10J01, 10J02, 10J03, 10J04, 10J05, 10J06, 10J07, 10J08, 10J09, 10J10, 10J11, 10J12, 10K01, 10K02, 10K03, 10K04, 10K05, 10K06, 10K07, 10K08, 10K09, 10K10, 10K11, 10K12, 10L01, 10L02, 10L03, 10L04, 10L05, 10L06, 10L07, 10L08, 10L09, 10L10, 10L11, 10L12, 10M01, 10M02, 10M03, 10M04, 10M05, 10M06, 10M07, 10M08, 10M09, 10M10, 10M11, 10M12	10I01	モモ (暁星)	モモせん孔細菌病菌 (<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>)	211971	AB615338	—
		10L01	モモ (暁星)	モモせん孔細菌病菌 (<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>)	211972	AB615339	—

a) *gyrB* 配列に基づく分子系統解析の結果 (第2図) にしたがって, 分離菌株をグループに類別した.

b) 各菌株番号 (5文字) における中央のアルファベットは, その菌株が分離された試験区 (第1図) を示す.

c) 各グループから1あるいは2菌株を代表として選んで NIAS ジーンバンク (MAFF) 登録するとともに, 分子系統解析, ジャガイモ塊茎腐敗試験, 接種試験に供した.

d) 当該菌株の各種性状をもとに同定した結果を示す. 詳細は本文参照.

e) 当該菌株を NIAS ジーンバンク (MAFF) へ登録した.

f) 本研究で決定した *gyrB* 配列を DDBJ へ登録した.

g) +, 接種 24 時間以内にジャガイモ塊茎が腐敗した; —, 腐敗が認められない (第6図).

析によって決定した. そのために, XgyrB1F/XgyrB1R プライマーセット (Young *et al.*, 2008), および一部の菌株については XgyrPCR2F/X. gyrrsp1 あるいは XgyrconpcrF1/Xgyrconrprc1 プライマーセット (Parkinson *et al.*, 2007) を用い, コロニーダイレクト PCR によってこれらの *gyrB* の一部を増幅した. 得られた増幅産物の配列は前報 (澤田ら, 2011) と同様にダイレクトシーケンシングによって決定した.

得られた配列データを Genetyx-Mac ver. 16 (ゼネティックス) および MacClade ver. 4.08 (Maddison and Maddison, 2000) を用いてコンパイル・アラインメントした後, それらを前報 (澤田ら, 2011) における解析対象領域 (530 bp) と同じ配列長に揃えた. 調整した配列データと PAUP*4.0b10 (Swofford, 2002) を用いて分子系統解析を行い, 分離菌の類別を試みた. すなわち, Tajima-Nei モデル (Tajima and Nei, 1984) および

第 2 表 本研究で供試した対照菌株

学名 ^{a)}	菌株番号 ^{b)}	分離源	産地	DDBJ 登録番号 ^{c)}	ジャガイモ 塊茎腐敗 ^{d)}
ブドウ斑点細菌病菌〔前報 (澤田ら, 2011) において分離した菌株〕					
<i>X. arboricola</i>	C1 (MAFF 211922)	<i>Vitis vinifera</i>	山梨県甲州市		+
<i>X. arboricola</i>	C8 (MAFF 211923)	<i>Vitis vinifera</i>	山梨県甲州市		+
<i>X. arboricola</i>	M1 (MAFF 211924)	<i>Vitis vinifera</i>	山梨県甲州市		+
<i>X. arboricola</i>	O1 (MAFF 211925)	<i>Vitis vinifera</i>	山梨県甲州市		+
<i>X. arboricola</i>	O2 (MAFF 211926)	<i>Vitis vinifera</i>	山梨県甲州市		+
<i>X. arboricola</i>	te1 (MAFF 211927)	<i>Vitis vinifera</i>	山梨県甲州市		+
<i>X. arboricola</i>	se2 (MAFF 211928)	<i>Vitis vinifera</i>	山梨県南アルプス市		+
<i>X. arboricola</i>	na4 (MAFF 211929)	<i>Vitis vinifera</i>	山梨県南アルプス市		+
<i>X. arboricola</i>	ni4 (MAFF 211930)	<i>Vitis vinifera</i>	山梨県南アルプス市		+
<i>X. arboricola</i>	E4 (MAFF 211931)	<i>Vitis vinifera</i>	山梨県甲州市		+
<i>X. arboricola</i>	F4 (MAFF 211932)	<i>Vitis vinifera</i>	山梨県甲州市		+
<i>X. arboricola</i>	H3 (MAFF 211933)	<i>Vitis vinifera</i>	山梨県甲州市		+
<i>X. arboricola</i>	I3 (MAFF 211934)	<i>Vitis vinifera</i>	山梨県甲州市		+
<i>X. arboricola</i>	J3 (MAFF 211935)	<i>Vitis vinifera</i>	山梨県甲州市		+
<i>X. arboricola</i>	K4 (MAFF 211936)	<i>Vitis vinifera</i>	山梨県甲州市		+
<i>X. arboricola</i>	U1 (MAFF 211937)	<i>Vitis vinifera</i>	山梨県甲州市		+
<i>X. arboricola</i>	oh1 (MAFF 211938)	<i>Vitis vinifera</i>	山梨県甲州市		+
<i>X. arboricola</i>	oh3 (MAFF 211939)	<i>Vitis vinifera</i>	山梨県甲州市		+
<i>X. arboricola</i>	ki1 (MAFF 211940)	<i>Vitis vinifera</i>	山梨県甲州市		+
<i>X. arboricola</i>	ko1 (MAFF 211941)	<i>Vitis vinifera</i>	山梨県甲州市		+
核果類せん孔細菌病菌 (黒斑病菌)					
<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	NCPPB 416 PT	<i>Prunus salicina</i>	ニュージーランド		—
<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	MAFF 301424	<i>Prunus salicina</i>	茨城県	AB615340	—
<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	MAFF 301425	<i>Prunus salicina</i>	茨城県	AB615341	—
<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	MAFF 301428	<i>Prunus armeniaca</i>	茨城県	AB615342	—
<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	MAFF 311562	<i>Prunus persica</i>	山梨県南アルプス市	AB615343	—
<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	MAFF 301420	<i>Prunus persica</i>	長野県	AB615344	—
<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	MAFF 311568	<i>Prunus persica</i>	長野県長野市	AB615345	—
<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	MAFF 311571	<i>Prunus persica</i>	長野県佐久市	AB615346	—
<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	MAFF 301421	<i>Prunus persica</i>	福島県	AB615347	—
<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	MAFF 311282	<i>Prunus persica</i>	福島県福島市	AB615348	—
<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	MAFF 311351	<i>Prunus persica</i>	福島県伊達町	AB615349	—
<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	MAFF 311572	<i>Prunus persica</i>	福島県国見町	AB615350	—
<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	MAFF 311579	<i>Prunus persica</i>	福島県桑折町	AB615351	—
<i>X. arboricola</i> clade のメンバー (ブドウ斑点細菌病菌と <i>p. pruni</i> を除く)					
<i>X. arboricola</i> pv. <i>fragariae</i>	LMG 19145 PT	<i>Fragaria ananassa</i>	イタリア		+
<i>X. arboricola</i> pv. <i>populi</i>	LMG 12141 PT	<i>Populus</i> sp.	オランダ		+
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	NCPPB 411 T	<i>Juglans regia</i>	ニュージーランド		—
<i>X. arboricola</i> pv. <i>celebensis</i>	NCPPB 1832 PT	<i>Musa</i> sp.	ニュージーランド		+
<i>X. arboricola</i> pv. <i>corylina</i>	NCPPB 935 PT	<i>Corylus maxima</i>	アメリカ合衆国		—
[<i>X. campestris</i>] pv. <i>arracaciae</i>	NCPPB 2436 PT	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>	ブラジル		+
[<i>X. campestris</i>] pv. <i>guizotiae</i>	NCPPB 1932 PT	<i>Guizotia abyssinica</i>	エチオピア		—
[<i>X. campestris</i>] pv. <i>zantedeschiae</i>	NCPPB 2978 PT	<i>Zantedeschia aethiopica</i>	南アフリカ		+
<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> clade のメンバー					
<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	MAFF 311127	<i>Citrus iyo</i>	愛媛県松山市		+
[<i>X. campestris</i>] pv. <i>vitistrifoliae</i>	NCPPB 1451 PT	<i>Vitis trifolia</i>	インド		—
[<i>X. campestris</i>] pv. <i>viticola</i>	NCPPB 2475 PT	<i>Vitis vinifera</i>	インド		—
[<i>X. campestris</i>] pv. <i>vitiscarnosae</i>	NCPPB 1149 PT	<i>Vitis carnosae</i>	インド		—
[<i>X. campestris</i>] pv. <i>vitewoodrowii</i>	NCPPB 1014 PT	<i>Vitis woodrowii</i>	インド		—

a) 学名は Parkinson *et al.* (2009) における Table 1 の表記にしたがった。

b) LMG, Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, ベルギー; NCPPB, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, 英国; MAFF, NIAS ジーンバンク, 農業生物資源研究所。

ブドウ斑点細菌病菌については, 分離番号と MAFF 番号 (括弧内) が併記してある。第 3 図にはこのうちの分離番号のみを示した。T, 当該種の基準株; PT, 当該 pathovar の基準株。

c) 本研究で決定した *gyrB* 配列を DDBJ へ登録した。

d) +, 接種 24 時間以内にジャガイモ塊茎が腐敗した; —, 腐敗が認められない (第 6 図)。

Jukes-Cantor モデル (Jukes and Cantor, 1969) のもとで、近隣結合法 (NJ 法) によって無根系統樹を構築した。系統樹の描画やブートストラップ解析は前報 (澤田ら, 2011) と同様にして行った。

各グループの系統的位置づけの確認と同定 前項において類別された各グループが, *gyrB* 系統樹においてどのように位置づけられるのかを確認した。すなわち, 各グループの配列と, *X. arboricola* クレードおよび *X. citri* subsp. *citri* クレードに属するメンバーの配列 (澤田ら, 2011) とを用いて, 最尤法 (ML 法), 最大節約法 (MP 法) および NJ 法に基づいて分子系統解析を行った。

そのためにまず, Modeltest ver. 3.7 (Posada and Crandall, 1998) を用いて, 解析対象である *gyrB* 配列データセット (49 OTU, 530 bp) に最適な塩基置換モデルの探索を行った。選択された最適モデルのもとで, ML 法に関しては Treefinder ver. October 2008 (Jobb et al., 2004), NJ 法に関しては PAUP*4.0 を用いて解析を実施した。MP 法に関しては, 前報 (澤田ら, 2011) と同様に Parsimony Ratchet 法 (Nixon, 1999) に基づいて解析を行った。

pv. *pruni* の遺伝的均一性の評価 pv. *pruni* における遺伝的均一性の程度を評価するために, DDBJ のキーワード検索 (ARSA) と相同性検索 (BLAST) を利用し, pv. *pruni* に由来する *gyrB* 配列を取得した。さらに, 国内産のさまざまな来歴の pv. *pruni* を比較のために選び, その *gyrB* 配列をダイレクトシーケンスによって決定した。このようにして新たに収集した配列を, 今までに集積してきた pv. *pruni* や他の *X. arboricola* 関連菌の配列とともにアラインメント・分子系統解析に供し, 配列の異同について比較・検討した。

ブドウへの人為接種 分離菌のブドウに対する病原性・病原力を評価するために, 対照菌とともに早生系「甲斐路」(赤嶺) の挿し木苗に対して人為的に接種を行った。すなわち, 前報 (澤田ら, 2011) と同じ方法・条件のもとで, 各菌株とも 6 回反復して噴霧接種を実施し, 菌株ごとに発病度を算出して比較した。

モモへの人為接種 ブドウへの接種と同じ菌株セットを供試し, 「嶺鳳」の接木苗に対して人為接種を実施した。そのために, 約 10^9 cfu/ml の菌液を接種源として用い, 高梨 (1995) のゴムプレス接種法を若干改変した強制気孔接種を行った。すなわち, 切断したゴム管を先端部に装着した洗濯ばさみを用意し, ゴム管部分を菌液に浸してゴム面に菌液を馴染ませてから葉身をはさみ, 少しおいてからはさみを外した。この処理を各新梢における展開した上位葉 3 枚に対して行った後, 23°C の恒温温室で経過を観察し, 21 日後に発病程度を記録した。以上の接種を菌株ごとに 3 回反復して実施

し, 得られた結果を比較した。

ジャガイモ塊茎腐敗能の検査 ジャガイモ塊茎を腐敗させる能力を分離菌が有しているかどうかを判定するために, 西山ら (2004) および後藤・瀧川 (1984) の方法に従って検査を行った。培養 3 日目の菌体を「男爵」の塊茎の切断面へ塗抹し, 塗抹部を爪楊枝で数回穿刺した後, 27°C の湿室のもとで 2 日間にわたって経過を観察した。判定は 1 日目の結果をもとに行い, その後の経過は参考データとして扱った。以上の検査を各菌株とも 2 回反復して行った。

結 果

試験区における発病状況と病原菌の分離

調査対象として選んだブドウ園とモモ園 (第 1 図) では, 調査時点 (2010 年 9 月 1 日) でブドウ斑点細菌病とモモせん孔細菌病がそれぞれの園の全域で発生していた。ブドウ斑点細菌病については, ブドウ園のいずれの試験区でも 7 割前後 (69 ~ 86%) の発病葉率が確認できた。達観評価では各区の発病程度に顕著な差は認められず, 罹病葉には葉脈に囲まれた境界の明瞭な角斑が多数形成されていた。前年 (2009 年) も同様に園全域で発病が観察されていたが, 2008 年以前の発生状況については不明である。

モモ園におけるせん孔細菌病については, スプリンクラーによる灌水が葉に直接当たる部位で高頻度に病斑が形成されていた。そのため, 区間で発病葉率に偏り (5 ~ 54%) が生じたが, いずれの調査対象樹にも発病は認められた。罹病葉には本病の特徴であるせん孔症状を伴った褐色不整形の病斑が形成されていた。なお, 本園はせん孔細菌病の常発地であり, 同様な発生状況が毎年観察されている。

ブドウ園の 6 区 (A ~ F 区) とモモ園の 6 区 (H ~ M 区) の各区より罹病葉を 12 枚ずつ採取し, 1 枚の葉から 1 個の病斑を分離用サンプルとして切り出して画線法分離に供した。その結果, いずれのサンプルからも *Xanthomonas* 属細菌に特徴的な黄色集落が優占的に形成され, サンプルによっては黄色集落がほぼ純粋に得られる場合もあった。これらの黄色集落からサンプルごとに 1 個を無作為に選んで釣菌・純化を行うことにより, 合計 72 株 (10A01 ~ 10F12) のブドウ分離菌と, 72 株 (10H01 ~ 10M12) のモモ分離菌を得ることができた (第 1 図, 第 1 表)。

分離菌の類別

分離菌 144 株の *gyrB* 配列データを用いて分子系統解析を実施し, 分離菌を遺伝的な類縁関係に基づいて類別することを試みた。その結果, Tajima-Nei モデル (第 2 図) と Jukes-Cantor モデル (データは示していない) のいずれにおいても, 得られる無根系統樹のトポロジーは一致した。すなわち,

第 2 図 *gyrB* 分子系統解析による分離菌の類別.

gyrB 配列データ (530 bp) に基づいて分離菌 144 株 (第 1 表) を類別するために、Tajima-Nei モデルのもとで近隣結合法 (NJ 法) を用いて無根系統樹を構築した。なお、個々の菌株番号は省略し、各グループ (I, II, II', III 型) に属する菌株数のみを示してある。各枝の数字は 1000 回反復によるブートストラップ値 (%), バーは 0.005 塩基置換/座位の長さを表す。

いずれのトポロジーにおいても、ブドウ分離菌 72 株は大きく 2 つのグループ (I 型と II 型) に類別された。I 型に含まれる 24 株の配列は互いに完全に一致していた。II 型に含まれる残りの 48 株に関しては、1 株 (10D02) を除いて配列が一致していた。10D02 は他の II 型菌と配列が 2 か所でのみ異なっていることから、II 型のサブグループ (II' 型) として扱うことにした (第 1 表)。なお、I 型および II 型のまとまりの中に、モモ分離菌由来の配列は混在していなかった。

ブドウ分離菌とは対照的に、モモ由来の分離菌 72 株はすべての配列が完全一致しており、III 型として 1 つにまとまった (第 2 図)。このまとまりの中にブドウ分離菌は混在しておらず、ブドウ分離菌とモモ分離菌は系統的に明確に区別できることが明らかとなった。

調査対象園における各グループ (I, II, II', III 型) の分布域を確認するために、試験区の見取り図上に各分離菌の属するグループの情報を表示した (第 1 図)。その結果、ブドウ園に関しては、異なるグループのメンバーが 1 つの園内で混在している実態が視覚化できた。一方、モモ園には III 型菌のみが分布しており、モモ園における病原菌集団の遺伝構造がきわめて均一であることが再確認できた。

各グループの系統的な位置づけの確認と同定

前項において類別された各グループの系統樹上における

位置づけを明らかにした上で、各グループの分類上の所属について検討した。なお、いずれのグループも *X. arboricola* クレードに含まれることが予備試験によって確認できたので、以下の 40 株の *X. arboricola* 関連菌の配列を対照として用いることにした：1) Parkinson ら (2009) によって *X. arboricola* クレードに属することが明らかにされた 16 株の対照菌；2) 来歴の異なる国内産の 4 株の *pv. pruni*；3) 前報 (澤田ら, 2011) で解析対象とした 20 株のブドウ斑点細菌病菌。さらに、*X. citri* subsp. *citri* クレードに属する 5 株をアウトグループとして供試した。対照として選んだこれら 45 株の *gyrB* 配列に対し、各グループ (第 1 表) から代表として選んだ以下の 4 株の配列データを加えた：I 型 (10F01)；II 型 (10A01)；II' 型 (10D02)；III 型 (10I01)。

以上の 49 OTU の配列データ (530 bp) をもとにモデル選択を行ったところ、「階層的尤度比検定 (hLRT)」と「修正赤池情報量基準 (AICc)」のいずれの基準においても、「ガンマ補正した Tamura-Nei モデル (TrN + G)」(Tamura and Nei, 1993) が最適な塩基置換モデルとして選ばれた。そこで、TrN + G のもとで ML 系統樹を構築し、90% 以上のブートストラップ値を系統樹上に示した (第 3 図)。なお、NJ および MP 法によって構築された系統樹においても、各グループの配置や対照菌との位置関係に関して、ML 系統樹と同様な傾向が確認できた (データは示していない)。

解析の結果 (第 3 図)、I 型菌はブドウ斑点細菌病菌である C1, C8, E4, F4, I3 と配列が完全一致していた。さらに、I 型菌からは以下のような特徴も確認できた：1) いずれもブドウ斑点細菌病に特徴的なブドウの葉の病斑から分離された；2) *Xanthomonas* 属細菌に特有の黄色集落を形成する；3) 後述するように (第 4 図)、このグループの代表菌 (10F01 と 10F12) をブドウへ接種すると、ブドウ斑点細菌病菌と同様な病斑を形成し、ほぼ同レベルの病原力を示した；4) これら代表菌をモモへ接種したところ、病変がまったく誘導されなかった。以上のことから、I 型菌はブドウ斑点細菌病菌 (*X. arboricola*) であると同定した (第 1 表)。

II および II' 型菌は、ブドウ斑点細菌病菌である oh1, oh3, ko1, se2 と配列が類似しており、これらとともに系統樹上で 1 つのクレードとしてまとまった (第 3 図)。さらに、I 型菌の場合と同様に、系統的な位置づけ以外の性状に関しても、これらはブドウ斑点細菌病菌と一致していた。したがって、II および II' 型菌についてもブドウ斑点細菌病菌であると同定した (第 1 表)。

III 型菌の配列は、対照として用いた 5 株の *pv. pruni* と完全一致していた (第 3 図)。さらに、III 型菌は：1) いずれもモモせん孔細菌病に特徴的なモモの葉の病斑から分離され

第3図 *gyrB* 分子系統解析による各グループ (I, II, II', III 型) の系統的位置づけの確認。

gyrB 配列に基づいて類別された各グループ (I, II, II', III 型) (第2図) の, *Xanthomonas arboricola* クレード内における位置づけを示した。そのために, *Xanthomonas 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, ガンマ補正した Tamura-Nei モデルのもとで最尤法 (ML 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% 以上のみを示した。バーは 0.05 塩基置換/座位の長さを表す。なお, 2008 ~ 2009 年にかけて分離した 20 株のブドウ斑点細菌病菌 (澤田ら, 2011) は, それぞれの分離番号 (第2表) を用いて示してある。

た; 2) *Xanthomonas* 属細菌に特有の黄色集落を形成する; 3) 後述するように, このグループの代表菌 (10I01 と 10L01) は, *pv. pruni* と同様な病斑をモモに形成した; 4) これら代表菌をブドウへ接種すると, *pv. pruni* と同様な病変を誘導し, 病原性の程度もほぼ同レベルであった (第 4 図). 以上のことから, III 型菌はモモせん孔細菌病菌 (*X. arboricola pv. pruni*) であると同定した (第 1 表).

pv. pruni の遺伝的均一性の評価

前項までの解析に供した *pv. pruni* は, その *gyrB* 配列が互いに一致していた. そこで, *pv. pruni* 由来の *gyrB* 配列データをさらに収集し, それらの遺伝的均一性に関して評価を試みた. そのためにまず, DDBJ での検索によって新たに 15 個の配列を取得した. さらに, 来歴の異なる国内産の 8 株の *pv. pruni* を供試し, その *gyrB* 配列を決定した. 最終的に集積できた *pv. pruni* の *gyrB* 配列は, 以下に示す 100 個である: 1) DDBJ より取得した外国 (4 か国) 由来のものが 16 個 (第 3 表); 2) われわれが決定した国内産の対照菌由来のものが 12 個 (第 2 表); 3) 今回分離した III 型菌のものが 72 個 (第 1 表).

これらの配列を比較したところ, 全サンプルに共通した領域 (506 bp) に関してサンプル間に多型は認められず, 互いに完全一致していた. すなわち, わが国を含めた 5 か国において分離されたモモ, スモモ, アンズ由来の 100 株の *pv. pruni* は, その *gyrB* 配列に同義置換えが存在しておらず, 遺伝的にきわめて均一であることが明らかとなった.

ブドウへの人為接種

gyrB に基づいて類別された各グループのメンバーが, 人為

第 3 表 DDBJ より取得した外国産の *pv. pruni* の *gyrB* 配列^{a)}

DDBJ 登録番号	分離源	分離国
EU285233	<i>Prunus salicina</i>	ニュージーランド
FN808380	<i>Prunus salicina</i>	イタリア
FN808381	<i>Prunus salicina</i>	イタリア
FN808375	<i>Prunus persica</i>	イタリア
FN808372	<i>Prunus persica</i>	イタリア
FN808374	<i>Prunus persica</i>	イタリア
FN808378	<i>Prunus persica</i>	イタリア
FN808379	<i>Prunus persica</i>	イタリア
FN808373	<i>Prunus persica</i>	イタリア
FN808376	<i>Prunus persica</i>	イタリア
FN808377	<i>Prunus persica</i>	イタリア
FN808383	<i>Prunus persica</i>	イタリア
FN808382	<i>Prunus armeniaca</i>	南アフリカ
FJ719773	<i>Prunus armeniaca</i>	スイス
FJ719771	<i>Prunus armeniaca</i>	スイス
FJ719772	<i>Prunus armeniaca</i>	スイス

a) DDBJ のキーワード検索および相同性検索を利用して取得した外国産 *pv. pruni* の *gyrB* 配列と, 当該菌株の来歴を示した. 詳細については本文参照.

的な接種によってブドウにどのような病変を誘導するのかを比較した. そのために, 以下の 7 株を各グループの代表として選んだ (第 1 表): I 型 (10F01, 10F12); II 型 (10A01, 10E01); II' 型 (10D02); III 型 (10I01, 10L01). また, 以下の 3 株を対照として供試した (第 2 表): ブドウ斑点細菌病菌 (C1, se2); *pv. pruni* (MAFF 301420).

ブドウ斑点細菌病菌の対照菌 (C1, se2) とブドウ由来の各グループ (I, II, II' 型) の結果を比較すると, 菌株間で病原性に強弱のあることが認められた (第 4 図). また, これらの中で発病度が最も高かった C1 においても, その結果は安定しておらず, 反復ごとに発病程度が大きく変動することが確認できた. さらに, 強い接種圧で接種しているにも関わらず, 病斑が形成されるのは展葉した第 1~4 葉の葉身に限られていた. 以上のことは, ブドウ斑点細菌病菌の病原性が限定的かつ不安定であることを示している.

III 型菌や *pv. pruni* の対照菌 (MAFF 301420) における病変の現れ方は, ブドウ斑点細菌病菌の場合と類似していた. すなわち, これら *pv. pruni* によって形成された病斑を, 大きさが同程度のブドウ斑点細菌病菌の病斑と比較すると, その形状は互いに類似しており, 肉眼的に識別することはできなかった. ただし, *pv. pruni* とブドウ斑点細菌病菌の発病度の分布はずれており (第 4 図), 両群間には 1% 水準で有意差が認められた. すなわち, 人為接種においてブドウに病変を誘導する能力は, *pv. pruni* よりブドウ斑点細菌病菌の方がやや強いことが明らかとなった.

モモへの人為接種

モモへの人為接種によって各グループのメンバーがどの

第 4 図 ブドウへの人為接種における各菌株の発病度.

ブドウ斑点細菌病菌 (7 株) とモモせん孔細菌病菌 (3 株) を, 前報 (澤田ら, 2011) と同じ方法・条件のもとで 6 回反復して早生系「甲斐路」(赤嶺) に噴霧接種した後, 菌株ごとに発病度を算出した.

ような病変を誘導するのかを比較するために、前項のブドウへの接種の場合と同じ菌株セット（10株；第4図）を供試して接種を行った。その結果、III型菌や *pv. pruni* の対照菌を接種した場合は、7～10日目頃にはわずかな黄変が認められるようになり、14日以降には接種部位が灰褐色～黒褐色の不整形壊死斑となった（第5図）。菌株間で発病程度に顕著な差は認められず、いずれの場合もほぼ同程度の明瞭な病変が誘導された。一方、ブドウ由来の各グループ（I, II, II'型）やブドウ斑点細菌病菌の対照菌を接種した場合は、いずれの接種葉にも病変が全く誘導されなかった。

ジャガイモ塊茎腐敗能の検査

前報（澤田ら，2011）では、供試したブドウ斑点細菌病菌から強いジャガイモ塊茎腐敗能が認められた。そこで、この性質がすべてのブドウ斑点細菌病菌に共有されているのか、他の *X. arboricola* 関連菌ではどうなのかについて調査を行った。ブドウ斑点細菌病菌としては以下の25株を供試した：前報（澤田ら，2011）で解析対象とした20株（第2表）；I型（10F01, 10F12）；II型（10A01, 10E01）；II'型（10D02）。*pv. pruni* については以下の15株を供試した：pathotype strain（NCPPB 416）；さまざまな来歴の国内産対照菌12株（第2表）；III型（10I01, 10L01）。また、*X. arboricola* クレードや *X. citri* subsp. *citri* クレードに属する既知 pathovar も比較のために供した（第2表）。

その結果、すべてのブドウ斑点細菌病菌において腐敗が観察された（第1, 2表）。いずれの菌株においても腐敗の進行は早く、24時間後には菌体を塗抹した部位だけでなく、ジャガイモ切片全体が軟腐し、黒褐色を呈した（第6図）。一方、供試した15株の *pv. pruni* では、2日目まで経過観察を続けたものの、腐敗は全く認められなかった（第1, 2表, 第6図）。

pv. pruni 以外の *X. arboricola* 関連菌のうち、*pv. fragariae*, *pv. populi*, *pv. celebensis*, *pv. arracaciae*, *pv. zantedeschiae* では、塗抹

第5図 モモへの人為接種の結果（21日後）。ブドウへの接種（第4図）と同じ菌株セット（10株）を供試し、高梨（1995）のゴムプレス接種法を若干改変した強制気孔接種によって、‘嶺鳳’に対して人為的に接種を行った。左、モモせん孔細菌病菌（MAFF 301420）；右、ブドウ斑点細菌病菌（C1）。

部分の軟腐が認められた。一方、*pv. juglandis*, *pv. corylina*, *pv. guizotiae* では、2日目においても腐敗は観察されなかった。また、*X. citri* subsp. *citri* クレードのメンバーに関しては、*pv. citri* では塗抹部分が軟腐したが、ブドウ属植物由来の4つの pathovar では腐敗は認められなかった（第2表）。

考 察

本研究ではブドウ斑点細菌病菌と *pv. pruni* を多相的に比較し、それぞれを詳細に特徴づけながら、1) ブドウ斑点細菌病菌は「遺伝的に固定されていない、弱病原性の日和見感染菌である」と結論づけても良いのか、2) ブドウ斑点細菌病菌はモモ・スモモ・アンズ病害発生には関与しないのか、

第6図 ジャガイモ塊茎腐敗試験の結果（24時間後）。ジャガイモ塊茎腐敗能を西山ら（2004）および後藤・瀧川（1984）の方法に準拠して検査した。供試した各菌株の検査結果は、第1, 2表に示した。左、ブドウ斑点細菌病菌（C1）；右、モモせん孔細菌病菌（NCPPB 416）。

3) *pv. pruni* はブドウ斑点細菌病の発生には関与しないのか、などの問題について検証を試みた。

pv. pruni の特徴

モモ、スモモ、アンズ由来のさまざまな来歴の *pv. pruni* を比較したところ、以下に記載する性状がこれらの分離菌に共通していることが確認できた。また、*pv. pruni* の自然感染宿主として明確にされているのは、少なくともわが国ではモモ、スモモ、アンズの 3 種類に限られている（日本植物病理学会, 2000, 2011; 高梨, 1978）。したがって、ここでは以下の記載を *pv. pruni* に共通した性状として扱うことにした。

pv. pruni をモモへ人為接種したところ、各菌株の発病程度に顕著な差は認められず、明瞭な病変が安定して誘導されることが確認できた（第 5 図）。このことは、後述するブドウ斑点細菌病菌とは対照的に、*pv. pruni* が安定した病原性を有している「強毒菌」であることを示している。

一方、調査対象園においてブドウとモモは 12 年にわたって隣接した状態であったにも関わらず、ブドウ斑点細菌病の病斑から *pv. pruni* は検出できなかった（第 1, 2 図, 第 1 表）。また、2008 ~ 2009 年に山梨県下の各地のブドウ園から多数のブドウ斑点細菌病菌を分離したが、それらの *gyrB* 配列からも *pv. pruni* と一致するものは見出せなかった（澤田ら, 2011; 澤田ら, 未発表）。以上の結果は、「*pv. pruni* がブドウに自然感染して斑点細菌病を引き起こす」という可能性を否定している。

ただし、強い接種圧のもとで *pv. pruni* をブドウへ人為接種すると、病原力は弱いものの、斑点細菌病に類似した病変が誘導されることが認められた（第 4 図）（澤田ら, 2011）。人為接種では病変が誘導されるにも関わらず、ブドウでの自然感染が認められない原因については、今後もさらに検討する必要がある。その場合、直接的な病原力だけでなく、ブドウ樹体上における生残能力をはじめとする *pv. pruni* の生態特性にも、目を向ける必要があるのかもしれない。

ところで、*pv. pruni* からはジャガイモ塊茎腐敗能が全く認められないことが明らかとなった（第 6 図, 第 1, 2 表）。すなわち、後藤・瀧川（1984）の方法に準拠し、接種前にジャガイモ切片を水洗する、培養 3 日目の菌体を切片に多量に塗抹した後、塗抹部を爪楊枝で穿刺する、などの処置を行ったにも関わらず、供試したいずれの *pv. pruni* においても腐敗は観察できなかった。この結果は、後述するブドウ斑点細菌病菌の場合とは対照的である。したがって、ブドウにおいて *pv. pruni* の自然感染が認められない原因については、この結果にも留意しながら検討すべきであろう。

pv. pruni の特徴として特筆すべきなのは、その遺伝的均一性の高さであろう。すなわち、5 か国で分離されたモモ、ス

モモ、アンズ由来の計 100 株の *pv. pruni*（第 1 ~ 3 表）からは、*gyrB* 配列（506 bp）に関して同義置換すら検出できなかった。また、rep-PCR 解析に関しても、さまざまな来歴の *pv. pruni* から均一性の高いフラグメントパターンが得られている（Louws *et al.*, 2001; Rademaker *et al.*, 2005; 澤田ら, 2011）。さらに、モモに対する病原力（第 5 図）や自然感染能、ジャガイモ塊茎腐敗能（第 1, 2 表, 第 6 図）といった表現型に関しても、*pv. pruni* からは斉一な結果が認められている。以上のことは、「*pv. pruni* の遺伝的均一性の高さは普遍的であり、それが世界的にも広範囲にわたって分布している」という可能性を示している。

pv. pruni に均一性をもたらした要因に関しては、以下のような推測が可能であろう。すなわち、植物との共進化の過程で、*pv. pruni* が核果類に対する強毒菌として遺伝的に固定された後、保菌した穂木・苗木の流通などによって短期間に急速かつ広範囲に拡散したことが考えられる。あるいは、核果類に対して強い病原性を発現しながらその樹体上に常在する、という生活様式では、強い安定化選択を *pv. pruni* が恒常的に受けている可能性もある。いずれにせよ、この問題を解明するためには、さまざまな視点からさらに慎重に検討する必要がある。

ブドウ斑点細菌病菌の特徴

ブドウ斑点細菌病は 2008 年にわれわれがその発生を確認して以来、4 年連続（2008 ~ 2011 年）して山梨県下のブドウ園で発生している。これまでに行ってきた研究（功刀ら, 2010; 澤田ら, 2011; 澤田ら, 未発表）によって、「ブドウ斑点細菌病菌」として記載した「*X. arboricola* に属する菌群」は、ブドウの葉や果房に自然感染し、急性症状としての斑点病を誘導する能力を有していること、少なくとも山梨県下の複数の産地に分布していることが明らかになってきた。

ブドウ斑点細菌病菌が「弱病原性の日和見感染菌の集合体」であることも、本研究によって再確認することができた。すなわち、ブドウへの人為接種をきわめて強い接種圧のもとで実施しているにも関わらず、菌株間で病原力にばらつきが認められること、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、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、本研究（第 4 図）および前報（澤田ら, 2011）において一貫して認められてきた。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、ごく一部の感受性品種でのみ発病が確認されること、栽培・気象条件や樹体の状態などが発病程度に大きく影響を与えることが明らかになってきた（功刀ら, 2010; 澤田ら, 2011; 澤田ら, 未発表）。以上のことは、「本菌

は通常、常在菌としてブドウ樹体上で生息しており、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している」という可能性を示唆している。

ブドウ斑点細菌病菌が「遺伝的に固定されていない、多型を内包した菌群」であることも改めて確認できた。すなわち、われわれが2008～2009年に分離したブドウ斑点細菌病菌は、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、*gyrB* 分子系統解析と rep-PCR 解析によって確認できている（第3図）（澤田ら, 2011）。さらに、本研究において2010年に新たに分離した72株（第1表）も、*gyrB* 分子系統解析によって3つに類別されることが明らかとなった（第2図）。しかも、その内の2つ（IIおよびII'型菌）は、2008～2009年に分離したいずれのブドウ斑点細菌病菌とも *gyrB* 配列の異なる、新しいタイプであることが判明した（第3図）。このことは、今後調査を続ければさらに新しいタイプが見つかり、ブドウ斑点細菌病菌が *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。

ブドウ斑点細菌病菌が変異に富んでいる理由については、以下のように推測することができる。すなわち、本菌は通常、常在菌として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」が保たれている可能性が考えられる。

また、今回の調査によって3タイプの菌が1つのブドウ園内で共存している実態が明らかとなった（第1図）。すなわち、遺伝的に多様な系統が、山梨県内の産地・地区レベルのみならず、圃場というより小さな単位においても混在していることが確認できた。もともと本菌は多様な系統に分化している上に、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かもしれない。

ところで、モモ・スモモ・アンズの病変から「*pv. pruni*」として分離されてきた菌株の中には、ブドウ斑点細菌病菌に相当するものは存在しないことが確認できた。すなわち、前述したように、5か国において分離されたモモ、スモモ、アンズ由来の100株の *pv. pruni*（第1～3表）は、その *gyrB* 配列が互いに完全一致しており、ブドウ斑点細菌病菌の配列と一致するものはまったく見出されなかった。さらに、ブドウ斑点細菌病菌をモモに人為的に接種しても、病変が全く誘導されないことも明らかとなった（第5図）。以上のことは、「ブドウ斑点細菌病菌がモモ・スモモ・アンズに自然感染し、せん孔細菌病や黒斑病の発生に直接関与する」という可能性を明確に否定している。

また、ブドウ斑点細菌病菌の *gyrB* 配列は、*X. arboricola* の既知 pathovar のいずれの基準株とも一致しないことから（第3図）（澤田ら, 2011）、「ブドウ斑点細菌病菌がブドウ以外の植物の病害発生に直接関与することはない」、あるいは、「既知 pathovar がブドウ斑点細菌病の発生に直接関与することはない」という形で仮説をより一般化することも可能であろう。ただし、*pv. pruni* 以外の既知 pathovar については、遺伝学的な知見の蓄積が不十分であり、各 pathovar における変異幅が明らかにされていないため、現時点でこれらの仮説について何らかの判断を下すことはできない。今後もさらに生態学・遺伝学的な調査を進めるとともに、交互接種試験を行い、各 pathovar を多相的に特徴づけした上で比較検討する必要がある。

本研究によってすべてのブドウ斑点細菌病菌がジャガイモ塊茎腐敗能を有していることが確認できた（第1, 2表）。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（第6図）が、すべての菌株に共通して認められた。一方、ブドウ属植物由来の4つの既知 pathovar（*pv. viticola*, *pv. vitiscarnosae*, *pv. vitistrifoliae*, および *pv. vitiswoodrowii*）は、いずれもジャガイモ塊茎腐敗試験が陰性であった（第2表）。したがって、ブドウ属植物に対して親和性を確立する上で、この能力は必須ではないのかもしれない。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どのような役割を果たしているのかについては、今後の検討課題であろう。

今までに実施してきた調査・解析を総合すると、ブドウ斑点細菌病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」「強いジャガイモ塊茎腐敗能を有する」という2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、ブドウ斑点細菌病菌は、「このような2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る。このような菌群を pathovar レベルでいかに取り扱うべきかについて、次項で考えてみたい。

ブドウ斑点細菌病菌を pathovar としてまとめることの是非について

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須とされている。一方、近年になり、*Xanthomonas* 属細菌を対象として、さまざまな遺伝学的手法（澤田, 2008）を利用した多様性解析が実施されるようになってきた。その結果、pathovar の枠組みと、遺伝学的手法〔AFLP (Ah-You *et al.*, 2009; Bui Thi Ngoc *et*

al., 2010; Rademaker et al., 2000), rep-PCR (Rademaker et al., 2000, 2005), MLSA (Ah-You et al., 2009; Bui Thi Ngoc et al., 2010) に基づく類別とが一致する場合のあることが明らかになってきた。

これらの結果をもとに、本属の pathovar は「遺伝的な実体」を伴った存在と考えても良いのではないかと、との指摘がなされている (Bui Thi Ngoc et al., 2010)。われわれの研究においても、*gyrB* の分子系統解析 (第 3 図) (澤田ら, 2011) や rep-PCR 解析 (澤田ら, 2011) を通じて、*pv. pruni* の遺伝的均一性がきわめて高いことが確認できた。このことは、*pv. pruni* がまさに「遺伝的な実体」そのものであることを示唆しているのではないだろうか。

対照的に、ブドウ斑点細菌病菌は遺伝的に固定されていないことが、前回 (澤田ら, 2011) および今回の解析 (第 2, 3 図) によって明確になった。すなわち、本菌は Bui Thi Ngoc ら (2010) が指摘するようなタイプの「遺伝的な実体」ではなく、共通する表現型でのみ認識できるような「遺伝的には多様な菌群」であることが確認できた。

以上のことは、存在基盤が対照的な 2 つのタイプ (*pv. pruni* とブドウ斑点細菌病菌) が、*X. arboricola* という 1 つの種の枠組みの中で共存していることを示している。この事実は、ブドウ斑点細菌病菌の pathovar レベルにおける取扱を考える上で、問題をより複雑にしているといえよう。仮に、表現型によって定義・識別できることを根拠にしてブドウ斑点細菌病菌を pathovar としてまとめるとなると、1 つの種内に存在基盤のまったく異なる pathovar が並立することになる。このことは、pathovar レベルの同定を行う、あるいは、将来的に pathovar の定義を明確化・統一化するような場合に、混乱を招く可能性がある。

ただし、*X. arboricola* の既知 pathovar は、遺伝的な実体として明確なものばかりとは限らないことも示唆されている。すなわち、Rademaker ら (2005) は rep-PCR 解析に基づいて各 pathovar の変異幅を評価しているが、*pv. corylina* や *pv. juglandis* に関しては、pathovar 内で必ずしも均一な結果が得られないことを報告している。ただし、検討されている菌株数が少ないため、*X. arboricola* における pathovar のまとまりについて、現時点で結論づけることは避けるべきであろう。いずれの pathovar についても、来歴の異なる菌株をさらに供試し、多相的に検討する必要がある。

その結果として、既知 pathovar の存在基盤が明らかになり、それをもとに pathovar の定義を明確化・統一化するような議論が進むことを期待したい。それが実現した段階で初めて、ブドウ斑点細菌病菌のような「共通した表現型は認められるものの、遺伝的には多様に分化している常在菌の集合体」を

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、ブドウ斑点細菌病菌を 1 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。

摘 要

ブドウ斑点細菌病菌 (*Xanthomonas arboricola*) (澤田ら, 2011) と核果類せん孔細菌病菌 (黒斑病菌) (*X. arboricola* pv. *pruni*) を多相的に比較し、両病原菌を詳細に特徴づけることを試みた。そのために、ブドウ斑点細菌病とモモせん孔細菌病とが近接して発生している山梨県南アルプス市の園地をモデルとして選び、2010 年 9 月に両病原菌を分離した上で、対照菌とともにその遺伝型・表現型を解析し、交互接種試験を実施した。その結果、*pv. pruni* からは以下の性質が共通して認められた：1) 遺伝的均一性がきわめて高い、2) モモ、スモモ、アンズに自然感染し、せん孔細菌病 (スモモの場合は黒斑病) を引き起こす能力を有している、3) モモに対して安定した病原性を示す「強毒菌」である、4) ブドウに自然感染して斑点細菌病を引き起こすことはない、5) ジャガイモ塊茎腐敗試験は陰性である。一方、ブドウ斑点細菌病菌からは以下のような性質が認められた：1) 遺伝的に固定されていない、多型を内包した菌群である、2) 弱病原性の日和見感染菌であり、条件さえ揃えばブドウに自然感染し、急性症状としての斑点病を引き起こすことがある、3) モモ・スモモ・アンズには自然感染しない、4) きわめて強いジャガイモ塊茎腐敗能を有している。すなわち、ブドウ斑点細菌病菌とは、「ブドウに自然感染する」・「強いジャガイモ塊茎腐敗能を有する」という 2 つの表現型を共有しており、そのことによって特徴づけることが可能ではあるものの、遺伝的には多様に分化している常在菌の集合体である、と位置づけることができる。今後、*Xanthomonas* 属において既知 pathovar の存在基盤が明らかにされ、それをもとに pathovar の定義が遺伝的に明確化・統一化されるまでは、このようなブドウ斑点細菌病菌を 1 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。

謝 辞

本研究を行うにあたり、ご協力・ご助言を賜った山梨県果樹試験場富田晃氏、萩原栄揮氏、農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所中村仁氏、岡山県農林水産総合センター川口章氏に篤くお礼申し上げます。

引 用 文 献

Ah-You, N., Gagnevin, L., Grimont, P. A. D., Brisse, S., Nesme, X.,

- Chiroleu, F., Bui Thi Ngoc, L., Jouen, E., Lefeuvre, P., Vernière, C. and Pruvost, O. (2009). Polyphasic characterization of xanthomonads pathogenic to members of the Anacardiaceae and their relatedness to species of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 306–318.
- Bui Thi Ngoc, L., Vernière, C., Jouen, E., Ah-You, N., Lefeuvre, P., Chiroleu, F., Gagnevin, L. and Pruvost, O. (2010). Amplified fragment length polymorphism and multilocus sequence analysis-based genotypic relatedness among pathogenic variants of *Xanthomonas citri* pv. *citri* and *Xanthomonas campestris* pv. *bilvae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 515–525.
- 後藤正夫・瀧川雄一 (1984). 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.
- Jobb, G., Von Haeseler, A. and Strimmer, K. (2004). TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evol. Biol.* 4: 18. doi: 10.1186/1471-2148-1184-1118.
- Jukes, T. and Cantor, C. (1969). Evolution of protein molecules. *In* Mammalian protein metabolism (Munro, H. N., ed.). pp. 21–132, Academic Press, New York.
- 功刀幸博・綿打享子・澤田宏之・武井森彦・村上芳照・佐藤豊三・工藤 晟 (2010). 山梨県のブドウに発生した葉および果房の細菌性斑点症状. 日植病報 76: 212. (講要)
- Louws, F. J., Ritchie, D. F. and Shoemaker, P. B. (2001). Genetic diversity of selected bacterial populations in North Carolina. *In* Plant pathogenic bacteria (De Boer, S. H., ed.). pp. 124–127, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Maddison, D. and Maddison, W. (2000). MacClade 4: analysis of phylogeny and character evolution, Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- 日本植物病理学会編 (2000). 日本植物病名目録. 日本植物防疫協会, 東京.
- 日本植物病理学会編 (2011). 日本植物病名目録追録. (<http://www.ppsj.org/pdf/mokuroku-tsuiroku110601.pdf>).
- 西山幸司・高橋幸吉・高梨和雄 (2004). 作物の細菌病一病徴診断と病原の同定一. 日本植物防疫協会, 東京.
- Nixon, K. C. (1999). The Parsimony Ratchet, a new method for rapid parsimony analysis. *Cladistics* 15: 407–414.
- Parkinson, N., Aritua, V., Heeney, J., Cowie, C., Bew, J. and Stead, D. (2007). Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2881–2887.
- Parkinson, N., Cowie, C., Heeney, J. and Stead, D. (2009). Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 264–274.
- Posada, D. and Crandall, K. A. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.
- Rademaker, J. L. W., Hoste, B., Louws, F. J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L., Vauterin, P. and De Bruijn, F. J. (2000). Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 665–677.
- Rademaker, J. L. W., Louws, F. J., Schultz, M. H., Rossbach, U., Vauterin, L., Swings, J. and De Bruijn, F. J. (2005). A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology* 95: 1098–1111.
- 澤田宏之 (2008). 植物病原細菌の同定・判別手法. 植物防疫 62: 217–222.
- 澤田宏之・功刀幸博・綿打享子・工藤 晟・佐藤豊三 (2011). *Xanthomonas arboricola* によるブドウ斑点細菌病 (新称). 日植病報 77: 7–22.
- Swofford, D. L. (2002). PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), version 4.0b10, Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tajima, F. and Nei, M. (1984). Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol. Biol. Evol.* 1: 269–285.
- 高梨和雄 (1978). モモせん孔細菌病の発生生態に関する研究. 果樹試報 A 5: 1–71.
- 高梨和雄 (1995). 作物病原菌研究技法の基礎 (大畑貫一ほか編). pp. 242–243, 日本植物防疫協会, 東京.
- Tamura, K. and Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10: 512–526.
- Young, J. M., Park, D. C., Shearman, H. M. and Fargier, E. (2008). A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* 31: 366–377.