ファゼオロトキシン産生能を失ったキウイフルーツかいよう病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*) の愛媛県における出現と分布

三好 孝典^{1,2}・清水 伸一^{1,3}・澤田 宏之^{4*}

ABSTRACT

MIYOSHI, T.^{1,2}, SHIMIZU, S.^{1,3} and SAWADA, H.^{4*} (2012). Occurrence and distribution of a defective non-phaseolotoxin-producing mutant of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Ehime Prefecture, Japan. Jpn. J. Phytopathol. 78: 92–103.

In Ehime Prefecture, Japan, two types of symptoms of bacterial canker on kiwifruit have been found, subsequently termed types A and B. Type A symptoms, which formed on leaves in orchards located in Iyo City, are characterized by typical lesions (leaf spots with clear yellow halos). Type B symptoms, observed on leaves in orchards in Matsuyama City and Tobe Town, include only necrotic lesions without halos. Based on genotypic and phenotypic characterizations, the pathogens isolated from the two groups of orchards were both identified as *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa). In bioassay and inoculation experiments, the isolates derived from type B did not possess the ability to either produce phaseolotoxin (Ptx) or induce halos on kiwifruit leaves, although the constituent genes (*amtA*, *ptx*, ORF3 and *argK*) of the *argK-tox* cluster, which is responsible for Ptx production, were detected in these isolates by PCR. Although the coronatine-producing gene (*cfl*) and the effector gene (*hopA1*) have been reported in Psa isolated in Korea and Italy/France, respectively, we detected neither of these genes using PCR. These results suggest that a mutation(s) may have impaired Ptx production in Ptx-producing Psa, which is distributed widely in Japan, leading to the non-Ptx-producing mutant. We confirmed that such mutants are distributed exclusively in the Matsuyama-Tobe area in Ehime Prefecture, whereas Ptx-producers are prevalent in Iyo City. In addition, disease surveillance and inoculation experiments indicated that the virulence of the defective non-Ptx-producing mutant on kiwifruit branches was weaker than that of the Ptx-producers, suggesting that Ptx may function as a virulence determinant in branches.

(Received October 18, 2011; Accepted December 27, 2011)

Key words: kiwifruit, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, bacterial canker, phaseolotoxin, *argK-tox* cluster, mutation

緒 言

キウイフルーツ (*Actinidia deliciosa*) のかいよう病は、1984年に静岡県で初めて発生が確認された (Serizawa *et al.*, 1989). 本病が激発すると、成木がひと冬の間に枯死して経済栽培が壊滅することから、重要病害として恐れられている。本病の病原細菌は Takikawa *et al.* (1989) によって *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* として記載されている。これまでにわが国で分離されてきた病原細菌 (日本分離株) は、非特異的毒素である

「ファゼオロトキシン (Ptx)」を産生することが確認されている (第1表) (Sawada *et al.*, 1997; Tamura *et al.*, 2002). Ptx は標的酵素であるオルニチンカルバモイルトランスフェラーゼの活性を阻害し、その結果として葉に「黄色の明瞭なハロー」を伴う病斑が形成される (Tamura *et al.*, 2002). このような日本分離株の染色体上には、Ptx 産生に関わる多数の遺伝子群や、Ptx に対して耐性の標的酵素をコードする遺伝子 (*argK*) などが集積した領域 (*argK-tox* クラスター) が存在している (Genka *et al.*, 2006; Sawada *et al.*, 1997, 2002; 澤田ら, 2005).

¹ 愛媛県農林水産研究所果樹研究センター (〒791-0112 愛媛県松山市下伊台町 1618) Fruit Tree Research Center, Ehime Research Institute of Agriculture, Forestry and Fisheries, Matsuyama, Ehime 791-0112, Japan

² 現: 愛媛県東予地方局今治支局 (〒794-8502 愛媛県今治市旭町 1-4-9) Ehime Prefectural Toyo Regional Office Imabari Bureau, Imabari, Ehime 794-8502, Japan

³ 現: 愛媛県農林水産部 (〒790-8570 愛媛県松山市一番町 4-2) Ehime Prefectural Agriculture, Forestry and Fisheries Department, Matsuyama, Ehime 790-8570, Japan

⁴ 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, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

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

第1表 これまでに各国で報告されてきたキウイフルーツかいよう病菌^{a)}

系統名 ^{b)}	分離国	初発年	PCR 検出された病原性関連遺伝子 ^{c)}			cts haplotype ^{d)}	文献
			ファゼオロ トキシン	コロナチン	HopA1		
日本分離株 ^{e)}	日本	1984 年	+	—	—	A	Takikawa <i>et al.</i> (1989), Sawada <i>et al.</i> (1997), Ferrante and Scortichini (2010), Vanneste <i>et al.</i> (2011)
イタリア 1992 分離株	イタリア	1992 年	+	—	— / + ^{f)}	A	Scortichini (1994), Ferrante and Scortichini (2010), Vanneste <i>et al.</i> (2011)
韓国分離株	韓国	1980 年代 後半	—	+	—	A	Koh <i>et al.</i> (1994), Han <i>et al.</i> (2003), Lee <i>et al.</i> (2005), Vanneste <i>et al.</i> (2011)
イタリア 2008 分離株	イタリア	2008 年	—	—	+	I	Ferrante and Scortichini (2010), Vanneste <i>et al.</i> (2011)
フランス分離株	フランス	2010 年	NT	NT	+	I	Vanneste <i>et al.</i> (2011)

a) 各国で今までに報告されてきたキウイフルーツかいよう病菌を、分離国と PCR 検出された病原性関連遺伝子のパターンに基づいて整理した。

b) 本文中では、ここに示した系統名を用いて各国の分離株を表記した。

c) + : 当該病原性因子をコードする遺伝子が PCR によって検出された, — : 検出されなかった, NT : 調べられていない。

d) cts (クエン酸合成酵素遺伝子) の多型に基づく類別。A 型と I 型とでは 2 塩基の違いが認められている (Vanneste *et al.*, 2010, 2011)。

e) 愛媛県で分離された菌株は除く。

f) Ferrante and Scortichini (2010) と Vanneste *et al.* (2011) とで異なる結果が得られている。

本病は韓国、イタリアおよびフランスでも発生している(第1表)。韓国では1980年代後半に発生が確認され(Koh *et al.*, 1994), その病原細菌(韓国分離株)は非特異的毒素である「コロナチン」を産生することが認められたが, Ptx 産生能は検出されなかった(Han *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005)。一方, 1992年にはイタリアでも発生が確認され(Scortichini, 1994), その病原細菌(イタリア1992分離株)からは日本分離株と同様にPtx産生遺伝子が検出された(Ferrante and Scortichini, 2010)。しかし, 2008～2009年に中部イタリアで新たに分離された菌株(イタリア2008分離株)は, Ptx やコロナチンの産生遺伝子を有していないこと, エフェクター遺伝子の1つである「hopA1」を特異的に保持していることが明らかにされている(Ferrante and Scortichini, 2010)。さらに, 2010年にはフランスでも, イタリア2008分離株と同様なタイプの菌株が見出されている(Vanneste *et al.*, 2011)。以上のように, pv. *actinidiae* からは今までに3つの異なる病原性因子[Ptx(日本, イタリア1992), コロナチン(韓国), HopA1(イタリア2008, フランス)]が検出されている(第1表)。

ところで, 4 遺伝子 (*gyrB*, *rpoD*, *hrpL*, *hrpS*) を用いた MLSA 解析や 16S-23S ITS 領域の配列比較によって, 日本分離株が遺伝的均一性のきわめて高い集団であることが明らかとなっている(Sawada *et al.*, 1997, 1999)。また, 日本分離株と韓国分離株が比較された結果, 16S rDNA や 16S-23S ITS 領域の配列が完全に一致していること(Han *et al.*,

2003), RAPD 解析においても両者は類似していることが報告されている(Lee *et al.*, 2005)。一方, 各国の分離株を cts (クエン酸合成酵素遺伝子) の配列に基づいて比較すると, 「日本分離株, 韓国分離株, イタリア1992分離株」と「イタリア2008分離株, フランス分離株」の2つのグループに分かれることから, 前者を cts haplotype A, 後者を haplotype I として区別することが提唱されている(第1表)(Vanneste *et al.*, 2010, 2011)。ただし, 両者の cts 配列の違いはわずかに2塩基のみであること, BOX-PCR や MLSA 解析に関しても両者間の差異は小さいことが認められている(Ferrante and Scortichini, 2010; Vanneste *et al.*, 2010, 2011)。すなわち, これまでに4か国で分離されてきた pv. *actinidiae* は, 保持している病原性因子に関しては多様性に富んでいるものの(第1表), その遺伝的背景は互いに類似していることが明らかとなってきた。

愛媛県では2000年に, キウイフルーツの「ヘイワード」において本病の発生が確認された(三好ら, 2003a)。このうち, 伊予市内の発生園では(第1図), 罹病葉に形成された壊死斑の周囲に黄色の明瞭なハローが誘導されるなど(第2図b), 本病の典型的な発生状況(Serizawa *et al.*, 1989; 牛山, 1993)が確認できた。一方, 松山市と砥部町における発生園では(第1図), 罹病葉に形成された壊死斑の周囲に, ハローが全く認められないことが明らかとなった(第2図a)(三好ら, 2003b)。さらに, このような「ハローのない園

第 1 図 愛媛県内におけるキウイフルーツかいよう病発生園の分布 (2003 年の全県調査に基づく)

- : 「ハローを伴わない病斑」のみが認められる発生園 (松山市と砥部町のみ分布),
- ▲ : 「黄色の明瞭なハローを伴う病斑」が認められる発生園 (伊予市のみ分布),
- ▲ : 障子山 (標高 885 m). スケールバーは 5 km を示す.

地」では、本病に特有な諸症状のうち、「ハロー」以外の病徴は一通り確認できるものの、その発生程度や被害状況が「ハローのある園地」に比べるとやや軽微であることも認められた (三好ら, 2003b)。

本研究では、これら両タイプの園地における本病の発生状況を詳細に調査するとともに、採取した病斑から病原細菌を分離し、それらの生理・生化学的性質、ハウスキープ

第 2 図 キウイフルーツかいよう病発生園における葉の病徴の違い

- a : 「ハローを伴わない病斑」のみが認められる発生園 (松山・砥部地区),
- b : 「黄色の明瞭なハローを伴う病斑」が認められる発生園 (伊予地区).

ング遺伝子の塩基配列, Ptx 産生能, 病原性因子 (Ptx, コロナチン, HopA1) をコードする遺伝子群の有無, 葉や枝に対する病原性・病原力等に関して比較を行った. そして, 「ハローのない園地」に分布している「通常とは異なる病徴をもたらす菌株」が, 今までに各国で報告されてきたいずれの系統 (第 1 表) に相当するのかについて検討した. さらに, *pv. actinidiae* が病原性を発揮する上で, Ptx がどのような役割を果たしているのかについても考察を試みた.

材料および方法

病原細菌の分離 「ハローのない園地」と「ハローのある園地」のそれぞれから, 3 園地ずつをモデルとして選んで詳細な調査を行った. すなわち, 2000 ~ 2002 年にかけて,

第 2 表 分離菌 (2000 ~ 2002 年) の病原性, Ptx 産生能および *argK-tox* クラスターの PCR 検出

発生園	ハローの有無 ^{a)}	所在地	病斑から分離した菌株数				葉に対する病原性		Ptx の産生 ^{e)}	<i>argK-tox</i> クラスターの PCR 検出 ^{f)}			
			2000 年	2001 年	2002 年	合計 ^{b)}	壊死斑形成 ^{c)}	ハロー形成 ^{d)}		<i>amtA</i>	<i>ptx</i>	ORF3	<i>argK</i>
A	—	砥部町	4	19	6	29	+	—	—	+	+	+	+
B	—	砥部町	0	0	26	26	+	—	—	+	+	+	+
C	—	松山市	4	22	10	36	+	—	—	+	+	+	+
D	+	伊予市	13	12	28	53	+	+	+	+	+	+	+
E	+	伊予市	9	13	35	57	+	+	+	+	+	+	+
F	+	伊予市	5	5	5	15	+	+	+	+	+	+	+
合計			35	71	110	216							

- a) 各園地において、罹病葉にハロー形成が認められるかどうかを調査した. + : 「黄色の明瞭なハローのある病斑 (第 2 図 b)」が認められる, — : 「ハローのない病斑 (第 2 図 a)」が認められる.
- b) 各園地ごとに分離した菌株を全て供試して、葉に対する接種, Ptx 産生能の生物検定, *argK-tox* クラスター構成遺伝子群の PCR 検出を行った.
- c) + : 壊死斑の形成が認められる.
- d) + : 壊死斑の周囲に黄色の明瞭なハローが形成される (第 3 図 c, d), — : 壊死斑の周囲にハローが形成されない (第 3 図 a, b).
- e) ファゼオロトシキン (Ptx) 産生能は後藤・瀧川 (1984c) の方法で検査した. + : 産生が認められる, — : 産生が認められない.
- f) + : PCR によって期待されるサイズの増幅が認められる.

毎年5月にこれらの園地から「葉の壊死斑・花蕾の褐変した萼片」を無作為に採取し、YP平板培地（後藤，1983）を用いて画線法分離を行うことにより、1病斑から1分離菌を得た。さらに、分離菌を純化するためにYP平板培地とキングB平板培地（King *et al.*, 1954）を用いて単集落分離を繰り返した。このようにして最終的に得られた216菌株（第2表）を凍結保存（西山，1977）し、以後の試験に供試した。

分離菌の葉に対する病原性の確認 分離した216株の葉に対する病原性を確認するために、「ヘイワード」を用いて付傷接種を行った。すなわち、24時間培養した被検菌を用いて約 10^8 cfu/mlの菌液を調整し、虫ピンを菌液に浸した後、ポット植えの「ヘイワード」の幼葉に対して5箇所を穿刺した。また、一部の菌株については、約 10^6 cfu/mlの菌液を用いて噴霧接種も行った。そして、接種後の植物にビニール袋を被せて湿室状態に1日間保った後、温室へ移して2週間にわたって経過を観察した。なお、蒸留水を用いて同様の処理を行ったものを陰性対照とした。

Ptx産生能の生物検定 大腸菌に対する生育阻害活性を指標とした生物検定法（後藤・瀧川，1984c）を用いて、被検菌のPtx産生能を調べた。指示菌として*Escherichia coli* B株（NBRC 13168）を供試し、陽性対照としてはpv. *actinidiae* Kw11（本 pathovar の基準株；Takikawa *et al.*, 1989）、陰性対照としては滅菌水を用いた。

argK-tox クラスターの構成遺伝子群のPCR検出 *argK-tox* クラスターを構成する遺伝子群（Genka *et al.*, 2006）の中から *amtA*, *ptx*, ORF3 および *argK* を対象として選び、コロニーPCRによってその検出を試みた。ORF3 と *argK* のプライマーは Sawada *et al.* (2002), *ptx* のプライマーは Prosen *et al.* (1993) が報告したものを、*amtA* については以下のプライマー（澤田，未発表）を用いた：*amtAF2*, 5'-CGTGTGTTCTCTACACTGAATGGGAC-3'/*amtAR*, 5'-GCTTTTCGAGTTTCTCTCGGCGGCGG-3'。被検菌をYP平板培地で24時間培養した後、滅菌爪楊枝をコロニーに接触させ、それを50 μ lの滅菌水中に入れて菌体を懸濁させた。この菌体懸濁液1 μ lと、プライマー（終濃度：0.2 μ M）およびTakara Ex Taq（Takara）を用いて反応液20 μ lを調製し、以下の条件でPCRを行った：95°Cで5分間熱変性後、(95°C 15秒, 58～60°C 15秒, 72°C 30秒)のサイクルを35回繰り返し、最後に72°C 7分で伸長反応を行った。増幅産物は2%アガロースゲル電気泳動によって分離し、エチジウムブロマイド染色後にトランスイルミネーターを用いて検出した。陽性対照としてpv. *actinidiae* Kw11、陰性対照として滅菌水を用いた。

コロナチン産生遺伝子 (*cfl*) およびエフェクター遺伝子 (*hopA1*) のPCR検出 YP平板培地で24時間培養した

被検菌から、InstaGene DNA purification matrix（Bio-Rad Laboratories）を用いてDNAを抽出した。得られたDNAを鋳型として用い、コロナチン産生に関わる *cfl* は Bereswill *et al.* (1994) の方法、エフェクター遺伝子の1種である *hopA1* は Ferrante and Scortichini (2010) の方法に従ってPCR検出を行った。いずれのPCRにおいても、*P. syringae* pv. *tomato* MAFF 302666 を陽性対照、滅菌水を陰性対照として用いた。

生理・生化学的性質の検査 後藤・瀧川（1984a, b, c）の方法に従って26項目の生理・生化学的性質を調べた。対照として、pv. *actinidiae* Kw11, pv. *phaseolicola* BQH-1 および pv. *syringae* LOB2-5 を用いた。

ハウスキープ遺伝子の塩基配列の比較 Sawada *et al.* (1999) の方法に従って2つのハウスキープ遺伝子 [*gyrB* (DNA ジャイレース β サブユニット 遺伝子), *rpoD* (RNA ポリメラーゼ $\sigma 70$ 因子 遺伝子)] の配列をダイレクトシーケンスによって決定した後、Genetyx-Mac ver. 16（ゼネティックス）を用いてコンパイル・アラインメントを行い、被検菌間で配列を比較した。さらに、これらの配列を用い、DDBJ のデータベースを対象として相同性検索を行った。

枝に対する病原性・病原力の検定 （試験①）2000年12月に、ポット植えの「ヘイワード」1年生苗木を地際から50 cmの位置で切り返し、その切断面に対して接種を行った。すなわち、約 10^8 cfu/mlに調整した被検菌の菌液を脱脂綿にしみ込ませ、枝の切断面に置床した上で、乾燥防止のために切断部全体をアルミホイルで1週間被覆した。アルミホイルを除去した後、これらの苗木を網室で4か月間生育させた上で、接種部における枯れ込みの状況を調査した。そして、枯れ込みの進行程度に基づいて－～++++の4段階の基準（第5表）を設け、発病程度の判定を行った。なお、1菌株当たり3本の苗木を供試して接種を行うとともに、陰性対照として滅菌水処理区を設けた。（試験②）2002年12月にも同様の試験を行ったが、接種用の菌液濃度は約 10^6 cfu/mlとし、1菌株当たり5本の苗木を接種に供した。調査は4か月後に行い、枯死長（接種部からの枯れ込みの長さ）、発芽障害数（枯死芽数と黄化新梢数）および健全新梢長（黄化した新梢を除いた健全新梢の、1樹当たりの延べ長さ）の3項目について苗木ごとに計測した。なお、発芽していない芽のうち、りん片が褐変しているものを枯死芽、りん片が健全なものを不発芽とした上で、発芽障害率を以下のようにして算出した：発芽障害率（%）＝〔（枯死芽数＋黄化新梢数）／（総芽数－不発芽数）〕×100。

発生園における枝の枯死率と分離菌のPtx産生能の調査 2004～2007年にかけて毎年5月下旬に、「ハローのない園地」（BおよびC）と「ハローのある園地」（DおよびE）に

において、1園地当たり5樹の成木を対象として結果母枝（1年生枝）の枯死率を調査した。さらに、毎年各園地において罹病葉を無作為に採取し、1罹病葉から1菌株の割合で病原細菌の分離を行った。そして、園地ごとに分離した20株前後の病原細菌を対象として、コロニーPCRによる *argK* の検出と Ptx 産生能の生物検定を実施した。

結 果

県内における発生状況

愛媛県では2003年に、キウイフルーツかいよう病を対象とした全県的な病害発生調査が実施された。その結果、伊予市、松山市および砥部町の計46園地で発生が確認された（第1図）（三好ら，2003b）。これらの発生園ではいずれも‘ヘイワード’が栽培されていた。このうち、伊予市内の39園地では（第1図）、罹病葉に形成された淡褐色～黒褐色の壊死斑の周囲に、黄色の明瞭なハローが認められた（第2図b）。これらの「ハローのある園地」の中から3園地（発生園D、E、Fと表記する；第2表）をモデルとして選び、発生状況の詳細な調査と罹病サンプルの採取を行った。

松山市と砥部町の7箇所の発生園では（第1図）、2003年の調査時点で、葉にハローが形成される事例は全く確認できなかった（第2図a）（三好ら，2003b，未発表）。一方、これらの7園地において、枝幹、新梢や花蕾に認められる病徴は、今まで報告されてきた本病の典型的な諸症状（Serizawa *et al.*, 1989; 牛山, 1993）と一致していた。ただし、結果母枝

の枯れ込みや発芽障害などの発生頻度や被害状況は、「ハローのある園地」に比べると軽微であった。この「ハローのない園地」からは、砥部町の2園地と松山市の1園地をモデル（発生園A、B、Cと表記する；第2表）として選び、以後の調査対象とした。

Ptx 非産生株

Ptx 産生株

第3図 Ptx 非産生株と産生株の葉に対する病原性
Ptx 非産生株としては00020と00026、Ptx 産生株としては00016と00022を供試した。
Ptx 非産生株を付傷（a）あるいは無傷（b）で葉に接種した場合、2週間後においても壊死斑の周囲にハローは形成されなかった。一方、Ptx 産生株を葉に接種した場合は、付傷（c）・無傷（d）のいずれにおいてもハローが形成された。

第3表 Ptx 非産生株および産生株からの *cfl* および *hopA1* のPCR検出

菌株	MAFF 番号 ^{a)}	菌株の来歴 ^{b)}				PCR 検出 ^{c)}	
		分離年	園地	分離部位	Ptx の産生	<i>cfl</i>	<i>hopA1</i>
00020	211981	2000年	A	花蕾	—	—	—
01001	211982	2001年	A	花蕾	—	—	—
02160		2002年	A	葉	—	—	—
00026	211983	2000年	C	葉	—	—	—
01013	211984	2001年	C	花蕾	—	—	—
02030		2002年	C	葉	—	—	—
00016	211985	2000年	D	葉	+	—	—
01054	211986	2001年	D	花蕾	+	—	—
02073		2002年	D	葉	+	—	—
00022	211987	2000年	E	葉	+	—	—
01025	211988	2001年	E	花蕾	+	—	—
02012		2002年	E	葉	+	—	—
<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> Kw11					+	—	—
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> MAFF 302666					—	+	+

a) これら8株を農業生物資源ジーンバンク（MAFF）へ登録した。

b) 詳細は第2表を参照。

c) + : PCRによって期待されるサイズの増幅が認められる, — : 増幅が認められない。

分離菌の葉に対する病原性の確認

2000～2002年にかけて、調査対象園で無作為に採取した葉や萼片の病斑から216株を分離し、葉に対する付傷接種を行った。その結果、すべての分離菌において、調査対象園で認められていた原病徴が再現された（第2表）。すなわち、いずれの菌株でも付傷部の周囲が水浸状となり、やがて黄褐色～褐色～黒褐色の壊死斑が形成された。このうち、「ハローのある園地」（D～F）由来の125株では、壊死斑の周囲に明瞭なハローが形成された（第3図c）。一方、「ハローのない園地」（A～C）由来の91株では、ハロー形成が全く認められなかった（第3図a）。さらに、以上のような付傷接種によって認められた結果は、無傷（噴霧）接種においても同様に確認することができた（第3図b, d）。

Ptx 産生能の生物検定

2000～2002年にかけて分離した216株を対象としてPtx産生能の生物検定を行ったところ、「ハローのない園地」（A～C）由来の91株からはPtx産生が全く認められなかった。一方、「ハローのある園地」（D～F）由来の125株は、す

べてPtxを産生することが確認できた（第2表）。

argK-tox クラスターの構成遺伝子群のPCR検出

2000～2002年にかけて分離した216株を対象として*amtA*, *ptx*, ORF3 および *argK* のPCR検出を試みたところ、すべての分離菌から4遺伝子の明瞭なシグナルを得ることができた（第2表）。シグナルの強度やサイズに関して、菌株間に差異は認められなかった。

コロナチン産生遺伝子（*cfl*）およびエフェクター遺伝子（*hopA1*）のPCR検出

「ハローのない園地」由来のPtx非産生株、および「ハローのある園地」由来のPtx産生株の中から、第3表に示した6株ずつを代表として選び、コロナチン産生遺伝子（*cfl*）およびエフェクター遺伝子（*hopA1*）のPCR検出を試みた。その結果、いずれの菌株からも、両遺伝子のシグナルは全く認められなかった（第3表）。

生理・生化学的性質の検査

「ハローのない園地」由来のPtx非産生株、および「ハローのある園地」由来のPtx産生株をそれぞれ6株ずつ供試し、

第4表 Ptx 非産生株および産生株の生理・生化学的性質

検査項目	Ptx 非産生株 ^{a)} (n = 6)	Ptx 産生株 ^{a)} (n = 6)	<i>P. syringae</i> <i>pv. actinidiae</i> Kw11	<i>P. syringae</i> <i>pv. phaseolicola</i> BQH-1	<i>P. syringae</i> <i>pv. syringae</i> LOB2-5
グラム反応	— ^{b)}	—	—	—	—
OF 試験	O	O	O	O	O
非水溶性黄色色素産生	—	—	—	—	—
緑色蛍光色素産生	—	—	—	+	+
アルギニン加水分解	—	—	—	—	—
硝酸塩の還元	—	—	—	—	—
ゼラチンの液化	—	—	—	+	+
レバン産生	+	+	+	+	+
オキシダーゼ	—	—	—	—	—
レシチナーゼ	—	—	—	—	—
ウレアーゼ	—	—	—	—	—
チロシナーゼ	—	—	—	—	—
40°Cでの生育	—	—	—	—	—
ジャガイモ塊茎腐敗	—	—	—	—	—
タバコ過敏反応	+	+	+	+	+
加水分解：					
エスクリン	—	—	—	—	+
カゼイン	+	+	+	+	+
Tween80	+	+	+	+	+
炭素源の利用性：					
スクロース	+	+	+	+	+
ソルビトール	+	+	+	—	+
イノシトール	—	+	+	—	+
エリスリトール	—	—	—	—	+
乳酸	—	—	—	—	+
グルタル酸	+	+	+	—	+
グリセリン酸	+	+	+	—	+
トリゴネリン	—	—	—	+	+

a) Ptx 非産生株・産生株として供試した菌株は、いずれも第3表と同じである。

b) + : 陽性, — : 陰性, O : 酸化。

26項目の生理・生化学的性質を調査した結果を第4表に示した。Ptx非産生株に関しては、イノシール利用性が陰性となった以外は、*pv. actinidiae* Kw11と結果が一致していた。一方、Ptx産生株では、調査したすべての項目の結果がKw11と一致した。

ハウスキープング遺伝子の塩基配列の比較

「ハローのない園地」由来の2菌株(00020, 00026)と、「ハローのある園地」由来の2菌株(00016, 00022)について、*gyrB*と*rpoD*の部分配列(前者は612bp, 後者は516bp)を決定した。遺伝子ごとに比較したところ、これら4菌株の配列は互いに完全に一致していた。さらに、DDBJのデータベースを対象として相同性検索を行ったところ、われわれ(Sawada *et al.*, 1999)が以前決定した*pv. actinidiae* 日本分離株の*gyrB* (AB016303)および*rpoD* (AB016304)の配列とも完全一致していた。

枝に対する病原性・病原力の検定

接種後4か月目に調査したところ、陰性対照区(滅菌水処理区)では枝の切り口に癒傷組織が形成されており、枯れ込みの進行が阻止されていた。また、発芽障害(枯死芽, 黄化新梢)も全く認められず、健全な新梢が伸長していた(第5表, 第5図c)。

一方、「ハローのない園地」由来のPtx非産生株(00020, 00026),あるいは「ハローのある園地」由来のPtx産生株(00016, 00022)を接種した場合は、陰性対照区とは質的に異なる反応が認められた(第5表, 第4, 5図)。すなわち、いずれの接種区でも、接種した枝の切り口には癒傷組織の形

成は認められず、切り口から基部へ向かって枯れ込みが進行していた。その結果、枯死長に関して、これらの接種区と陰性対照区との間には有意差が認められた(第5表の試験②)。

ただし、Ptx非産生株よりPtx産生株を接種した場合の方が、枝の枯れ込みが大きく進行するという傾向が観察された(第5表)。また、いずれの接種区においても枯死芽が認められたが、発芽障害率はPtx非産生株(第4図a, 第5図a)よりPtx産生株(第4図b, 第5図b)の方が高い傾向があった(第5表の試験②)。さらに、一旦伸長した新梢が黄化・萎凋する現象は、Ptx産生株を接種した場合にのみ認められた(第5図b)。健全新梢長に関しても、Ptx非産生株(第4図a, 第5図a)よりPtx産生株(第4図b, 第5図b)の接種区の方が短い傾向が認められた(第5表の試験②)。以上より、Ptx非産生株は枝に対する病原性を有していることが明らかとなったが、その病原力は産生株に比べて弱い傾向が認められた。

発生園における枝の枯死率と分離菌のPtx産生能の調査

「ハローのない園地」(BおよびC)と「ハローのある園地」(DおよびE)において、本病の発生状況を4年間にわたって詳細に調査した。その結果、いずれの年においても、結果母枝の枯死や発芽障害(枯死芽・黄化新梢)が全ての調査対象園で認められた。ただし、「ハローのない園地」にお

第4図 Ptx非産生株と産生株の枝に対する病原性・病原力(試験①)

Ptx非産生株(a)としては00020と00026, Ptx産生株(b)としては00016と00022を供試し、約 10^8 cfu/mlに調整した菌液を用いて接種を行った後、4か月後に調査した(第5表の試験①)。

第5図 Ptx非産生株と産生株の枝に対する病原性・病原力(試験②)

Ptx非産生株(a)としては00020と00026, Ptx産生株(b)としては00016と00022を供試し、約 10^8 cfu/mlに調整した菌液を用いて接種を行った後、4か月後に調査した(第5表の試験②)。c: 陰性対照区(滅菌水処理区)。

第5表 Ptx 非産生株および産生株の枝に対する病原性・病原力

菌株 ^{a)}	Ptx の産生 ^{a)}	試験① ^{b)}		試験② ^{c)}		
		枯死の進行程度 ^{d)}		枯死長 (cm) ^{e)}	発芽障害率 (%) ^{e,f)}	健全新梢長 (cm) ^{e,g)}
(滅菌水処理区)		—, —, —		0.1 a	0.0 a	77.0
00020	—	+, +, +		4.2 b	7.9 ab	38.9
00026	—	+, +, +++		3.5 b	16.0 bc	56.3
00016	+	++, ++, +++		6.7 b	86.0 bc	5.2
00022	+	+++, ++, +++		24.0 b	90.0 c	14.9

a) 第2, 3表を参照.

b) 2000年12月に実施した(第4図).

c) 2002年12月に実施した(第5図).

d) 枯死の進行程度は、以下の基準に基づいて判定した：—, 枯れ込みが認められない；+, 1/4 までの枯れ込みあり；++, 1/2 までの枯れ込みあり；+++, 1/2 以上の枯れ込みあり.

e) 同一カラムにおける異なる英字間には有意差がある (Steel-Dwass の多重比較, $p < 0.05$). ただし、健全新梢長では区間に有意差が認められなかった.

f) 発芽障害率 (%) = [(枯死芽数 + 黄化新梢数) / (総芽数 - 不発芽数)] × 100

g) 健全新梢長 = 健全新梢 (黄化した新梢を除く) の1樹当たりの延べ長さ

第6表 2004～2007年における結果母枝の枯死率と分離菌の Ptx 産生能

発生園 ^{a)}	ハローの有無 ^{a)}	結果母枝枯死率（％） ^{b)}				分離した菌株の Ptx 産生能 ^{c)}										<i>argK</i> ^{d)}
		2004 年	2005 年	2006 年	2007 年	2004 年		2005 年		2006 年		2007 年		合計		
						+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	
B	−	1.7 a	1.7 a	2.4 a	1.3 ab	0	19	0	21	0	17	0	20	0	77	+
C	−	1.9 a	5.1 a	2.2 a	0.5 a	0	17	0	20	0	17	0	19	0	73	+
D	+	17.6 c	29.1 c	11.9 b	3.2 bc	20	0	20	0	20	0	20	0	80	0	+
E	+	14.2 b	17.8 b	17.5 b	5.2 c	18	0	24	0	18	0	20	0	80	0	+

a) 第2表を参照.

b) 結果母枝枯死率 = (枯死していた結果母枝数 / 調査した結果母枝数) × 100. 同一カラムにおける異なる英字間には有意差がある (逆正弦変換後の Ryan 法による多重比較, $p < 0.05$).

c) 各園地で分離した菌株のファゼオロトキシシン (Ptx) 産生能は、後藤・瀧川 (1984c) の方法で検査した. + : 産生が認められる菌株の数, — : 産生が認められない菌株の数.

d) 各園地で分離した全菌株を供試して *argK* の PCR 検出を行った. + : 期待されるサイズの増幅が認められる.

ける枝の枯死率は「ハローのある園地」より低いという傾向が、調査の全期間を通じて認められた (第6表).

また、これらの各園地で4年間にわたって罹病葉を無作為に採取し、1菌株/1罹病葉の割合で病原細菌を分離した上で、その特性の調査を行った (第6表). その結果、「ハローのない園地」において分離された150株からは、*argK* は PCR 検出できたものの、Ptx の産生は全く認められないことが明らかとなった. 一方、「ハローのある園地」由来の160株は、いずれも Ptx 産生株であることが確認できた.

考 察

Ptx 非産生株の同定と県内における分布

本研究では、キウイフルーツかいよう病の罹病葉に「ハ

ローのない病斑 (第2図a)」のみが認められる園地 (A～C園; 第2表) と、「黄色の明瞭なハローのある病斑 (第2図b)」が形成される園地 (D～F園; 第2表) を調査対象として選び、それぞれの園地から病原細菌を多数分離してその性状を比較検討した. その結果、どちらのタイプの園地に由来する菌株も、キウイフルーツの葉に接種することによって、それぞれの園地で認められている「原病徴」を再現することができた (第2表, 第3図). また、26項目の生理・生化学的性質を調査したところ、イノシトールの利用に関しては「ハローのない園地」由来株のみが陰性となったが、それ以外の項目に関しては、いずれの園地由来株も対照として用いた *pv. actinidiae* 日本分離株と一致していた (第4表). さらに、これらの菌株のハウスキーピング

遺伝子 (*gyrB*, *rpoD*) の配列は, *pv. actinidiae* 日本分離株の配列 (AB016303, AB016304) と完全に一致していることが確認できた。以上のことから, いずれの園地由来の菌株についても *Pseudomonas syringae* *pv. actinidiae* であると同定した。

また, 2000～2002年にかけて分離した216株を供試して Ptx 産生能を生物検定したところ (第2表), 「ハローのある園地」由来株はすべて Ptx を産生することが確認できた。一方, 「ハローのない園地」由来株はいずれも Ptx 非産生であることが明らかとなった。さらに, 2004～2007年にかけて分離した310株からも, 全く同様な調査結果を得ることができた (第6表)。すなわち, 7年間にわたって実施してきた以上のような調査の結果, 「ハローのある園地」由来の285株はいずれも Ptx 産生株であるのに対し, 「ハローのない園地」由来の241株はすべて Ptx 非産生株であることが明らかとなった。

ところで, キウイフルーツかいよう病菌は強い感染力・伝染力を有しており, 一旦感染すると導管を通じて樹体内に病原細菌が拡散すること, そのような樹体の各部からは菌泥が溢出し, それが風雨で飛散することによって周囲の樹の葉・蕾・花・新梢へと新たに本病が伝染することが明らかにされている (Serizawa *et al.*, 1989; 牛山, 1993)。このような本菌の生態特性を考慮すると, 2000～2007年にかけて各園地で葉や花蕾の病斑を無作為に採取し, 1菌株/1病斑の割合で526株の病原細菌を分離して蓄積してきた結果 (第2, 6表) は, 「当該園地に分布している病原菌集団の特性」を把握する上で必要十分な情報量を満たしていると思われる。以上のことから, 今回調査対象とした「ハローのある園地」には Ptx 産生株のみが, 「ハローのない園地」には Ptx 非産生株のみが分布していると判断した。

2003年に実施された全県調査によって, 「ハローのある園地」は県内に39箇所認められたが, これらはいずれも伊予地区に集中していた (第1図)。一方, 「ハローのない園地」として確認できたのは7箇所であり, これらは松山・砥部地区にのみ局在していた。これら2つのタイプの園地は, 最も近いもの同士でも直線距離で約8km離れている上に, その間には標高885mの障子山があって両地区を隔てている。すなわち, 両タイプの園地は, 地理的・地形的に隔てられて存在していることが明らかとなった。以上のことを考え合わせると, 少なくとも今回の調査時点では, 愛媛県において Ptx 産生株は伊予地区の一部に, Ptx 非産生株は松山・砥部地区の一部にのみ排他的に分布しているものと思われる。

Ptx 非産生株と産生株との比較

Ptx 非産生株がなぜ松山・砥部地区に局在しているのか

を解明する端緒を開くために, Ptx 非産生株と Ptx 産生株とを多相的に比較することを試みた。そのためにまず, Ptx 産生遺伝子群の集積する「*argK-tox* クラスター」を, Ptx 非産生株が保持しているかどうかについて調査を行った。すなわち, クラスターを構成する遺伝子群 (Genka *et al.*, 2006) の中から *amtA*, *ptx*, ORF3 および *argK* を指標として選び, それらの PCR 検出を行った。

その結果, Ptx 産生株/非産生株のいずれからもシグナルを得ることができた (第2表)。指標として利用した4つの遺伝子のうち, *amtA* と *argK* はそれぞれクラスターの左右両末端付近に, *ptx* と ORF3 はクラスターの比較的中央付近に位置している (Genka *et al.*, 2006)。このような配置の遺伝子のいずれもが Ptx 非産生株から検出されることから, これらの Ptx 非産生株は, *argK-tox* クラスターの構造の少なくとも一部は保持しているはずである。したがって, 今回見出された Ptx 非産生株は, 「クラスターを保持している Ptx 産生株において, Ptx 産生に直接/間接的に関わるメカニズムのいずれかに欠損が生じ, 産生能が失われた変異株」であろう。

われわれはこれまでに, Ptx を産生することが知られている *P. s. pv. phaseolicola* (インゲンかさ枯病菌) と *pv. actinidiae* を対象として, さまざまな視点から比較解析を行ってきた。その結果, *argK-tox* クラスターは可動性遺伝因子であり, *Pseudomonas* 属細菌とは異なる菌群を起源としていること, そこから水平移動によって *pv. phaseolicola* や *pv. actinidiae* の「祖先型の染色体」へと侵入し, 挿入された可能性があることを明らかにしてきた (Genka *et al.*, 2006; Sawada *et al.*, 1997, 1999, 2002; 澤田ら, 2005)。

一方, スペインには, Ptx を産生しない *pv. phaseolicola* が分布していることが明らかとなり, その染色体上には *argK-tox* クラスターが存在していないことが確認された (Rico *et al.*, 2003)。そのため, この Ptx 非産生株は, *argK-tox* クラスターの侵入を受ける前の「*pv. phaseolicola* の祖先型」か, あるいは, Ptx を産生する *pv. phaseolicola* からクラスターが「後天的に脱落した株」のどちらかであろうと推測されている (González *et al.*, 2003; Oguiza *et al.*, 2004)。また, スペインでは, このような Ptx 産生株と非産生株とが, それぞれ異なるインゲン産地において排他的に分布していることが確認されている (José *et al.*, 2010)。これら両産地では気候が異なり, 栽培されているインゲンの品種も違うことなどが, 産生株と非産生株の排他的分布をもたらした要因の1つではないかと考えられている (José *et al.*, 2010)。

今回, 愛媛県の松山・砥部地区 (第1図) に排他的に分布していることが明らかとなった Ptx 非産生株は, スペインに分布している「*argK-tox* クラスターを保持していない Ptx 非

産生株」とは異なり、「クラスターの少なくとも一部は保持しているにもかかわらず、産生能を喪失した変異株」である。後者のようなタイプの Ptx 非産生株が、1つの地区の複数の園地にまたがって排他的に分布しているという現象は、*pv. phaseolicola* と *pv. actinidiae* のいずれを通じてもこれまでに報告がなく、今回の発見が初めてである。

2003 年の全県調査によって、「ハローのない園地」は松山・砥部地区にのみ認められたが、逆に同地区内からは「ハローのある園地」は全く見出せなかった（第 1 図）。また、2000～2007 年の調査期間を通じて、松山・砥部地区の調査対象園からは、Ptx 産生株が全く検出できなかった（第 2, 6 表）。したがって、「松山・砥部地区内において Ptx 産生株に変異が生じ、その結果として同所的に非産生株が出現した」という可能性は考え難いであろう。一方、前述したように、松山・砥部地区と伊予地区の発生園は 8 km 以上離れている上に、間を山で隔てられている（第 1 図）。また、本病に関しては、保菌した穂木・苗木が流通することによって病原細菌が伝搬され、病気の発生地が拡大することが懸念されている（牛山, 1995）。以上のことから、次のような推測をしているところである。すなわち、「汚染した農業資材などによって、Ptx 非産生株が外部から松山・砥部地区へと持ち込まれ、本病が発生・定着した。一方、別ルートを通じて、伊予地区へは Ptx 産生株が持ち込まれた。しかし、両地区を隔てている地理的・地形的な条件のために 2 つの系統の分布域が交わることはなく、各々の排他的な分布が今も維持されている。」という仮説が成り立つのではないだろうか。今後は、苗木をはじめとする農業資材などの流通経路や、Ptx 非産生株・産生株の分布・生態特性などをさまざまな観点からさらに詳細に調査することによって、この仮説を検証していきたいと考えている。

諸外国で報告されている *pv. actinidiae* との異同

ここでは、Ptx 非産生株の起源について考察するために、諸外国で報告されてきた *pv. actinidiae*（第 1 表）との異同について検討してみたい。*pv. actinidiae* に関してはこれまでに日本、韓国、イタリア、フランスにおいて、異なる時期に多数の菌株が分離されてきた。そして、これらの菌株はさまざまな遺伝学的手法によって解析され、比較されている（第 1 表）。その結果、これらの遺伝的背景は互いに類似しており、*pv. actinidiae* は全体として均一性の高い集団であることが明らかとなっている（Ferrante and Scortichini, 2010; Han *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Sawada *et al.*, 1997, 1999; Vanneste *et al.*, 2010, 2011）。一方で、*pv. actinidiae* からは今までに 3 つの異なる病原性因子 [Ptx（日本、イタリア 1992）、コロナチン（韓国）、HopA1（イタリア 2008, フランス）] が

検出されている（第 1 表）（Ferrante and Scortichini, 2010; Han *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Sawada *et al.*, 1997, 2002; Vanneste *et al.*, 2011）。

今回、愛媛県で見出された Ptx 非産生株からは、コロナチン産生に関わる *cfl* やエフェクター遺伝子の 1 つである *hopA1* は PCR 検出できなかった（第 3 表）。一方、この Ptx 非産生株に関しては、*gyrB* と *rpoD* の配列が *pv. actinidiae* 日本分離株と完全一致していることが確認できている（第 2 表）。したがって、この Ptx 非産生株は外国起源のものではなく、わが国に広く分布している Ptx 産生株（日本分離株；第 1 表）を直系の祖先とする「欠損変異株」であろう。

pv. actinidiae に関して今までに得られてきた成果（第 1 表）（Genka *et al.*, 2006; Sawada *et al.*, 1997, 1999, 2002）をもとに、われわれは以下のような推測をしているところである（澤田ら, 2005）。すなわち、世界各地の *Actinidia* 属植物には遺伝的に近縁な常在菌が広く分布しており、これら「祖先型の常在菌」に対して、各地でそれぞれ異なる病原性関連遺伝子が水平移動などによって侵入した。その結果、いずれの受容菌も顕著な病徴をキウイフルーツに誘導することができるようになり、各国で順次、病原細菌として認識されていったのではないだろうか。

この仮説のもとでは、今回見出された Ptx 非産生株の示す表現型、すなわち、「葉にハローを誘導しない」・「枝に対する病原力が弱い」などの特徴は、病原性関連遺伝子を受容する以前の「祖先型の常在菌」の表現型を示している、という可能性が考えられる。この点については、*Actinidia* 属植物の常在菌の探索や、来歴の異なる *pv. actinidiae* の比較解析などを行うことによって検証を試みたいと考えている。

なお、1992 年にイタリアで分離された *pv. actinidiae*（イタリア 1992 分離株）は、遺伝的類縁性が日本分離株に特に近く、同じ haplotype A に属すること、*argK-tox* クラスターを有していることから（第 1 表）（Ferrante and Scortichini, 2010; Vanneste *et al.*, 2011）、汚染した農業資材などによって日本分離株がイタリアへ持ち込まれたという可能性も考えられるのではないだろうか。キウイフルーツの苗木や受粉用の花粉の流通は世界的に非常に活発になっていることから、今後は逆にコロナチン産生株や *hopA1* 保有株がわが国へと侵入しないように警戒する必要も出てくるのかも知れない。

Ptx の病原性因子としての役割

今回分離した Ptx 産生株と非産生株を葉に接種したところ、Ptx 非産生株ではハロー形成が認められなかった（第 3

図 a, b, 第2表). Ptx 非産生株のみが分布する園地 (A ~ C) でも, 調査期間 (2000 ~ 2007 年) を通じてハロー形成は全く確認できなかった (第2図 a, 第2表). 以上のことは, 葉のハローは Ptx の作用によって誘導されるという報告 (Tamura *et al.*, 2002) を支持している.

一方, Ptx 産生株と非産生株を枝に接種すると, いずれにおいても病原性は認められるものの, 病原力は Ptx 産生株の方が強いことが明らかとなった (第4, 5図, 第5表). さらに, 発生園における結果母枝の枯死状況を調査したところ, Ptx 産生株が分布する発生園 (D および E) の方が, 枝の枯死率が高いことが認められた (第6表). これらのことから, キウイフルーツかいよう病において, Ptx は「枝に対する病原力を決定する因子」の1つとしても機能している可能性が考えられる.

pv. phaseolicola に関しては, 人為的に作出された Ptx 非産生株をインゲンに接種し, Ptx の作用を解析することが試みられている (Patil *et al.*, 1974). その結果, Ptx 非産生株を葉へ接種した場合は, ハローが形成されないだけでなく, 接種部位から他の部位へと接種菌の拡散する様子が認められないことも指摘されている. 同様に, Ptx に耐性の標的酵素 (オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ) を発現する形質転換インゲンでは, Ptx を産生する *pv. phaseolicola* を接種しても, 接種部位からの接種菌の拡散が抑えられることが報告されている (Herrera-Estrella and Simpson, 1995). また, われわれも, Ptx に耐性の標的酵素を発現させた形質転換キウイフルーツを作出した上で, Ptx を産生する *pv. actinidiae* を葉に接種したところ, 接種部位における *pv. actinidiae* の増殖が抑えられることを確認している (星ら, 2000; 大里ら, 未発表). 以上のことから, キウイフルーツやインゲンでの病気の発生における Ptx の役割は, 葉におけるハローの形成だけでなく, 枝に対する病原力も含んだ, 広範囲に及ぶものである可能性が考えられる. 病害抵抗性の植物を作出する上でも重要な問題であることから, 今後もさらに検討を続ける必要があろう.

摘 要

愛媛県では伊予市と松山市／砥部町においてキウイフルーツかいよう病が発生している. このうち, 伊予市の発生園では, 「黄色の明瞭なハローを伴う病斑」が葉に形成されていた. 一方, 松山市／砥部町における罹病葉には「ハローを伴わない病斑」のみが認められた. 両タイプの発生園から分離した病原細菌の各種表現型と遺伝型を解析した結果, いずれの菌株も *Pseudomonas syringae* *pv. actinidiae* と同定することができた. しかし, 生物検定と接種試験を

行ったところ, ハローのない園地に由来する菌株はファゼオロトキシシン (Ptx) 産生能を有しておらず, 葉にハローを誘導できないことが明らかとなった. 一方, これらの菌株からは, Ptx の産生に関与する *argK-tox* クラスターの構成遺伝子群 (*amtA*, *ptx*, ORF3 および *argK*) が PCR 検出できた. なお, 諸外国ではコロナチン産生遺伝子 (*cfl*) やエフェクター遺伝子 (*hopAI*) を保持しているキウイフルーツかいよう病菌が報告されているが, これらの遺伝子は今回の分離菌株からは PCR 検出できなかった. 以上のことは, ハローのない園地由来の Ptx 非産生株は, わが国に広く分布している Ptx 産生株において, Ptx 産生に関わるメカニズムになんらかの欠損が生じ, その産生能が失われた変異株であることを示している. 現地調査と接種試験の結果, Ptx 非産生株は産生株に比べて枝に対する病原力が弱いことが明らかとなった. したがって, Ptx は枝に対する病原力決定因子の1つとしても機能している可能性が考えられる. また, 愛媛県内では Ptx 産生株は伊予市に, 非産生株は松山・砥部地区において, それぞれ排他的に分布していることも確認できた.

謝 辞

本研究を行うにあたり, 貴重な菌株を分譲していただき, 種々ご教示いただいた静岡大学 瀧川雄一教授に篤くお礼申し上げます.

引用文献

- Bereswill, S., Bugert, P., Völksch, B., Ullrich, M., Bender, C.L. and Geider, K. (1994). Identification and relatedness of coronatine-producing *Pseudomonas syringae* pathovars by PCR analysis and sequence determination of the amplification products. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2924–2930.
- Ferrante, P. and Scortichini, M. (2010). Molecular and phenotypic features of *Pseudomonas syringae* *pv. actinidiae* isolated during recent epidemics of bacterial canker on yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in central Italy. *Plant Pathol.* 59: 954–962.
- Genka, H., Baba, T., Tsuda, M., Kanaya, S., Mori, H., Yoshida, T., Noguchi, M.T., Tsuchiya, K. and Sawada, H. (2006). Comparative analysis of *argK-tox* clusters and their flanking regions in phaseolotoxin-producing *Pseudomonas syringae* pathovars. *J. Mol. Evol.* 63: 401–414.
- González, A.I., Pérez de la Vega, M., Ruiz, M.L. and Polanco, C. (2003). Analysis of the *argK-tox* gene cluster in nontoxigenic strains of *Pseudomonas syringae* *pv. phaseolicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4979–4982.
- 後藤正夫 (1983). 植物病理学実験法 (佐藤照二ほか編). p. 84, 講談社サイエンティフィック, 東京.
- 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 (2). 植物防疫 38: 385–389.
- 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 (3). 植物防疫 38: 432–437.
- 後藤正夫・瀧川雄一 (1984c). 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: 479–484.
- Han, H.S., Koh, Y.J., Hur, J.S. and Jung, J.-S. (2003). Identification and characterization of coronatine-producing *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. J. Microbiol. Biotechnol. 13: 110–118.
- Herrera-Estrella, L. and Simpson, J. (1995). Genetically engineered resistance to bacterial and fungal pathogens. World J. Microbiol. Biotechnol. 11: 383–392.
- 星 裕孝・中村ゆり・布目 司・澤田宏之・米山勝美 (2000). ファゼオロトキシン耐性遺伝子の導入によるキウイフルーツかいよう病抵抗性植物の作出. 日植病報 66: 139 (講要).
- José, M.S., Rodicio, M.R., Argudín, M.A., Mendoza, M.C. and González, A.J. (2010). Regional variations in the population structure of *Pseudomonas syringae* pathovar phaseolicola from Spain are revealed by typing with *PmeI* pulsed-field gel electrophoresis, plasmid profiling and virulence gene complement. Microbiology 156: 1795–1804.
- King, E.O., Ward, M.K. and Raney, D.E. (1954). Two simple media for demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Lab. Clin. Med. 44: 301–307.
- Koh, Y.J., Cha, B.J., Chung, H.J. and Lee, D.H. (1994). Outbreak and spread of bacterial canker in kiwifruit. Korean J. Plant Pathol. 10: 68–72.
- Lee, J.H., Kim, J.H., Kim, G.H., Jung, J.S., Hur, J.-S. and Koh, Y.J. (2005). Comparative analysis of Korean and Japanese strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing bacterial canker of kiwifruit. Plant Pathol. J. 21: 119–126.
- 三好孝典・楠元智子・清水伸一 (2003a). 愛媛県におけるキウイフルーツかいよう病の発生. 愛媛果樹試験報 16: 47–56.
- 三好孝典・澤田宏之・楠元智子・清水伸一 (2003b). キウイフルーツかいよう病菌のファゼオロトキシン非生産株の出現. 日植病報 69: 307 (講要).
- 西山幸司 (1977). 凍結法による植物病原細菌の保存. 植物防疫 31: 465–467.
- Oguiza, J.A., Rico, A., Rivas, L.A., Sutra, L., Vivian, A. and Murillo, J. (2004). *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* can be separated into two genetic lineages distinguished by the possession of the phaseolotoxin biosynthetic cluster. Microbiology 150: 473–482.
- Patil, S.S., Hayward, A.C. and Emmons, R. (1974). An ultraviolet-induced nontoxigenic mutant of *Pseudomonas phaseolicola* of altered pathogenicity. Phytopathology 64: 590–595.
- Prosen, D., Hatziloukas, E., Schaad, N.W. and Panopoulos, N.J. (1993). Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed by polymerase chain reaction-based amplification of a phaseolotoxin gene region. Phytopathology 83: 965–970.
- Rico, A., López, R., Asensio, C., Aizpún, M.T., Asensio-S-Manzanera, M.C. and Murillo, J. (2003). Nontoxigenic strains of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* are a main cause of halo blight of beans in Spain and escape current detection methods. Phytopathology 93: 1553–1559.
- Sawada, H., Takeuchi, T. and Matsuda, I. (1997). Comparative analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and pv. *phaseolicola* based on phaseolotoxin-resistant ornithine carbamoyltransferase gene (*argK*) and 16S–23S rRNA intergenic spacer sequences. Appl. Environ. Microbiol. 63: 282–288.
- Sawada, H., Suzuki, F., Matsuda, I. and Saitou, N. (1999). Phylogenetic analysis of *Pseudomonas syringae* pathovars suggests the horizontal gene transfer of *argK* and the evolutionary stability of *hrp* gene cluster. J. Mol. Evol. 49: 627–644.
- Sawada, H., Kanaya, S., Tsuda, M., Suzuki, F., Azegami, K. and Saitou, N. (2002). A phylogenomic study of the OCTase genes in *Pseudomonas syringae* pathovars: the horizontal transfer of the *argK-tox* cluster and the evolutionary history of OCTase genes on their genomes. J. Mol. Evol. 54: 437–457.
- 澤田宏之・吉田隆延・野口雅子・染谷信孝・土屋健一 (2005). *Pseudomonas syringae* 群細菌によるファゼオロトキシン産生能の獲得. 植物細菌病談話会論文集 (第 23 号). pp. 98–110, 日本植物病理学会, 東京.
- Scortichini, M. (1994). Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit in Italy. Plant Pathol. 43: 1035–1038.
- Serizawa, S., Ichikawa, T., Takikawa, Y., Tsuyumu, S. and Goto, M. (1989). Occurrence of bacterial canker of kiwifruit in Japan: Description of symptoms, isolation of the pathogen and screening of bactericides. Ann. Phytopath. Soc. Japan 55: 427–436.
- Takikawa, Y., Serizawa, S., Ichikawa, T., Tsuyumu, S. and Goto, M. (1989). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.: The causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan. Ann. Phytopath. Soc. Japan 55: 437–444.
- Tamura, K., Imamura, M., Yoneyama, K., Kohno, Y., Takikawa, Y., Yamaguchi, I. and Takahashi, H. (2002). Role of phaseolotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in the formation of halo lesions of kiwifruit canker disease. Physiol. Mol. Plant Pathol. 60: 207–214.
- 牛山欽司 (1993). キウイフルーツかいよう病の生態と防除に関する研究. 神奈川県園芸試験場研究報告 43: 1–76.
- 牛山欽司 (1995). キウイフルーツかいよう病の発生生態. 植物防疫 49: 107–110.
- Vanneste, J.L., Yu, J. and Cornish, D.A. (2010). Molecular characterisations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains isolated from the recent outbreak of bacterial canker on kiwifruit in Italy. New Zealand Plant Protection 63: 7–14.
- Vanneste, J.L., Cornish, D.A., Yu, J., Audusseau, C., Paillard, S., Rivoal, C. and Poliakoff, F. (2011). Presence of the effector gene *hopA1* in strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated from France and Italy. New Zealand Plant Protection 64: 252–258.