ククモピン型 Ri プラスミドを保持した *Rhizobium radiobacter* による トマト毛根病 (新称)

澤田 宏之^{1*}・畔上 耕児²

ABSTRACT

SAWADA, H.^{1*} and AZEGAMI, K.² (2014). First report of root mat (hairy root) of tomato (*Lycopersicon esculentum*) caused by *Rhizobium radiobacter* harboring cucumopine Ri plasmid in Japan. Jpn. J. Phytopathol. 80: 98–114.

In October 2011, hairy root symptoms were observed on commercially cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum*) grown on coco slabs (a plant cultivation medium made with finely flaked coconut fibers) in large hydroponic installations equipped with recirculating drip irrigation systems in Hiroshima Prefecture, Japan. Abundant proliferative adventitious hairy roots appeared and thickly covered the slab surfaces, leading to a “root mat” symptom. The dense growth of roots was also observed inside the slabs. The causal bacterium, which was demonstrated by inoculation and reisolation to be pathogenic on tomato, was a gram-negative, aerobic rod with 2 to 4 peritrichous flagella. It formed opaque, milky or pale yellowish-colored, circular colonies, and had biochemical and physiological characters similar to those of *Rhizobium* species. Phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequences also confirmed that it was a member of the genus *Rhizobium*. MLSA analyses based on the concatenated sequences of genes *atpD*, *glnA*, and *recA* revealed that the isolates are in the *R. radiobacter* clade. Thus, the pathogen was identified as *Rhizobium radiobacter* (Beijerinck and van Delden 1902) Young, Kuykendall, Martinez-Romero, Kerr and Sawada 2001. PCR analyses clarified that the pathogen harbored a cucumopine Ri plasmid. This is the first report on the occurrence of root mat (hairy root) of tomato caused by *R. radiobacter* (Ri) in Japan. Phylogenetic analyses revealed the existence of chromosomal polymorphisms among the present isolates, which proved to belong to genomovars G7 and G9 of *R. radiobacter* species complex. On the other hand, the cucumopine Ri plasmids harbored by the present isolates and the root mat pathogens isolated in Europe were highly homogeneous, which suggests that plasmids derived from the same origin might have been transferred to the indigenous bacteria in Europe and Japan, respectively.

(Received June 7, 2013; Accepted September 30, 2013)

Key words: root mat, hairy root, tomato, *Rhizobium radiobacter*, Ri plasmid, cucumopine

緒 言

2011年10月、広島県にあるトマト (*Lycopersicon esculentum* Mill.) の養液栽培施設において、養液栽培用の培地 (Fig. 1-A, B) の表面に、白色の毛状根が露出する症状が認められた (Fig. 1-C). その後、時間の経過とともに毛状根は培地表面の広い範囲にわたって広がり、培地全体が白っぽく見えるようになる、いわゆる「root mat」状を呈するようになった (Fig. 1-D, E). 本症状は、その発生状況や病徴から毛根病であることが疑われたが、我が国ではこれまでのところ、

トマトでの毛根病の発生記録はない (日本植物病理学会・農業生物資源研究所, 2012; 日本植物病理学会, 2013).

本症状が発生した栽培施設は、循環式養液栽培装置を備えたいわゆる「太陽光利用型植物工場」であり、栽培面積が8 haを越える大規模なものである。そこでは、養液栽培用の培地としてココスラブ (Fig. 1-A, B) (ココヤシの実の

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 農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所 (〒305-8666 茨城県つくば市観音台3-1-1) National Agriculture and Food Research Organization, NARO Institute of Vegetable and Tea Science, 3-1-1 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8666, 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 No. AB809364–AB809447 として登録した。

外皮繊維を圧縮して作製された養液栽培用培地。以後、「スラブ」と表記する。) が用いられており、1つのスラブに2本の苗が定植されている。また、養液管理は閉鎖系のもとで行われており、過剰な養液は排出されることなくすべて回収され、広大な施設内を循環しながら再利用されている。

ところで、イギリスをはじめとするヨーロッパでは、トマトやキュウリの養液栽培施設において root mat 症状が多発して問題となっており、その原因菌はクモピン型 Ri プラスミドを保持した *Rhizobium radiobacter* (= *Agrobacterium* biovar 1) であることが明らかにされている (Weller *et al.*, 2000a, 2000b, 2004, 2005, 2006)。ヨーロッパで問題となっているこの root mat 症状と、広島県で発生した本症状との間には、病徴や発生状況に関して類似点が認められた。

そこで、本症状の原因を明らかにするために、ヨーロッパで分離された root mat 症状の原因菌との比較を行いながら、病原学的な検討を試みた。その結果、本症状は *R. radiobacter* によって引き起こされた毛根病であることが判明した。さらに、本症状の原因菌の染色体型には多型が認められるのに対し、保持している Ri プラスミドはきわめて均一性が高いことが確認できたので、その詳細を報告する。

本論文における *Agrobacterium* 属および *Rhizobium* 属細菌に関わる学名表記は、Young ら (2001) が提案した分類体系 (澤田, 2007) に従った。なお、*R. radiobacter* は変異に富んだ菌種であり、複数の種へ分割すべきであるとの指摘もなされている (Pulawska *et al.*, 2012; Panday *et al.*, 2011)。そこで、特に *R. radiobacter* 内の多様性に関して議論する際は、本種を「*R. radiobacter* species complex」と表記することにした。また、ヨーロッパにおける root mat 症状の原因菌については、「ヨーロッパ産 RMA (Root Mat-Associated) 菌」と略記した。

材料および方法

病原細菌の分離と保存

罹病したトマト苗から毛状根、肥大根、あるいは、肥大根に形成されたこぶを採取し、病原細菌の分離に供した。毛状根の場合は 1 cm 程度の長さに、肥大根やこぶの場合は約 5 mm 角に切り出し、70%エタノールを用いて表面殺菌した後、滅菌水中で磨砕し、King B 平板培地に画線して培養した。形成された単集落の中から最も優占する形状のものを釣菌し、標準寒天培地 (Standard Methods Agar; SA) (日本製薬) を用いて単集落分離を 2 回繰り返すことによって純化を行った。得られた分離菌を次項の手順に従ってトマトに接種し、病原性の確認ができたものを「トマト分離菌」として以後の試験に供した (Table 1)。

対照菌株としては、Table 2 に示した毛根病菌 7 株を供試した。このうちの NCPPB 4062, 2659, 4042 および CSL 5012 は、トマト・キュウリにおける root mat 症状の原因菌としてイギリスやフランスの養液栽培施設で分離されたものであり (ヨーロッパ産 RMA 菌) (Weller *et al.*, 2000b, 2006), MAFF 301724 は千葉県産のメロン毛根病菌である (塩見ら, 1987)。

これらの供試菌株は、特に記載のない限り標準寒天培地を用いて 27°C で培養した。菌株の保存は凍結保存法によって行った。

接種試験

各菌株の病原性をトマト (品種: ポンテローザ) に対する刺針接種によって確認した。トマト種子を園芸用培土に播種し、23°C の恒温温室で液肥を定期的に施用しながら 1 か月間育苗し、良好な生育状態のものを選んで接種に供した。接種源として、供試菌株を平板培地で 3 日間培養した後、滅菌水に菌体を懸濁して約 10^9 cfu/ml の濃度に調整した菌液を用いた。そして、爪楊枝をこの菌液に浸した後、子葉から本葉第 2 葉にかけての節間にすぐに刺すという操作を、各節間当たり 2 ~ 3 箇所に対して行った。接種後、植物を 23°C の恒温温室に置き、90 日間にわたって経過を観察した。さらに、コッホの原則を確認するために、接種部に誘導された病変から細菌を分離した上で、VCF3/VCR3 プライマーセット (澤田・土屋, 2003) を用いたコロニーダイレクト PCR と、16S rDNA の部分塩基配列の解析を行い、接種菌との比較を試みた。なお、接種における陽性対照として Table 2 に示した対照菌株、陰性対照として滅菌水を用いた。

表現形質の調査

菌体の形態については、供試菌株を TY 液体培地 (トリプトン 5 g/l, 酵母エキス 3 g/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.87 g/l, pH 6.8) を用いて 27°C で 2 日間静置培養した後、ネガティブ染色して透過型電子顕微鏡で観察した。集落形態については、供試菌株を標準寒天培地の平板に画線し、27°C で培養しながら経時的に観察を行った。また、API 20NE (シスメックス・バイオメリュウ) を用いて 21 項目の表現形質を検査し、得られたプロファイル番号をもとに apiweb (シスメックス・バイオメリュウ) で検索を行った。Table 3 に示した表現形質については、後藤・瀧川 (1984a, b, c) あるいは Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria 第 3 版 (Schaad *et al.*, 2001) の手法に従って検査を行った。

16S rDNA に基づく分子系統解析

トマト分離菌・対照菌株の 16S rDNA の塩基配列を、澤田ら (2011) の方法に従って両鎖解析で決定した。決定した配列をもとに、Ribosomal Database Project (RDP) (Cole

Table 1. Strains of *Rhizobium radiobacter* (Ri), causal agent of root rot of tomato, collected in this study and descriptive information

Isolate	MAFF no. ^{a)}	Location	Year	Species ^{b)}	Genomovar ^{c)}	Plasmid ^{d)}	Opine ^{e)}	PCR results ^{e)}					DDBJ accession ^{f)}				
								orf3+4 ^{g)}	orf8+10 ^{g)}	orf13 ^{g)}	cus ^{g)}	mis ^{h)}	16S rDNA	atpD	glnA	recA	cus
2-2	212029	Hiroshima, Japan	2012	<i>R. radiobacter</i>	G9	pRi	Cucumopine	+	+	+	+	–	AB809364	AB809381	AB809398	AB809415	AB809432
3-1	212030	Hiroshima, Japan	2012	<i>R. radiobacter</i>	G9	pRi	Cucumopine	+	+	+	+	–	AB809365	AB809382	AB809399	AB809416	AB809433
6-1	212031	Hiroshima, Japan	2012	<i>R. radiobacter</i>	G9	pRi	Cucumopine	+	+	+	+	–	AB809366	AB809383	AB809400	AB809417	AB809434
7-2	212032	Hiroshima, Japan	2012	<i>R. radiobacter</i>	G9	pRi	Cucumopine	+	+	+	+	–	AB809367	AB809384	AB809401	AB809418	AB809435
9-2	212034	Hiroshima, Japan	2012	<i>R. radiobacter</i>	G9	pRi	Cucumopine	+	+	+	+	–	AB809369	AB809386	AB809403	AB809420	AB809437
10-4	212035	Hiroshima, Japan	2012	<i>R. radiobacter</i>	G9	pRi	Cucumopine	+	+	+	+	–	AB809370	AB809387	AB809404	AB809421	AB809438
11-1	212036	Hiroshima, Japan	2012	<i>R. radiobacter</i>	G9	pRi	Cucumopine	+	+	+	+	–	AB809371	AB809388	AB809405	AB809422	AB809439
12-1	212037	Hiroshima, Japan	2012	<i>R. radiobacter</i>	G9	pRi	Cucumopine	+	+	+	+	–	AB809372	AB809389	AB809406	AB809423	AB809440
13-1	212038	Hiroshima, Japan	2012	<i>R. radiobacter</i>	G9	pRi	Cucumopine	+	+	+	+	–	AB809373	AB809390	AB809407	AB809424	AB809441
14-1	212039	Hiroshima, Japan	2012	<i>R. radiobacter</i>	G9	pRi	Cucumopine	+	+	+	+	–	AB809374	AB809391	AB809408	AB809425	AB809442
8-1	212033	Hiroshima, Japan	2012	<i>R. radiobacter</i>	G7	pRi	Cucumopine	+	+	+	+	–	AB809368	AB809385	AB809402	AB809419	AB809436
15-1	212040	Hiroshima, Japan	2012	<i>R. radiobacter</i>	G7	pRi	Cucumopine	+	+	+	+	–	AB809375	AB809392	AB809409	AB809426	AB809443

a) Strain accessions in NIAS Genebank, Japan.

b) Identification based on various phenotypes (Table 3) and phylogenetic analyses (Figs. 4–6). Nomenclature of Young *et al.* (2001) is used.c) Identification based on phylogenetic analysis using *recA* sequences (Fig. 6).

d) Identification based on PCR results.

e) +, positive; –, negative PCR result.

f) Primers designed by Weller *et al.* (2006).g) Primers: *cusF* (5'-TTGTTTCATAACACATGGCCTGCAGG-3')/*cusR* (5'-GGCGGGCCCTAACTGGTGGG-3'), newly designed by the authors based on *cus* gene sequence (AB039860).h) Primers: *misF* (5'-CCAGGTCTTCAAAATGTCCTCGCTCC-3')/*misR* (5'-GTTTGAGTACCGCTCAAAAGTCAGT-3'), newly designed by the authors based on *mis* gene sequence (NC002575).

i) Sequences were determined in this study and deposited in DDBJ.

Table 2. Reference strains used in this study

Species ^{a)} /Strain ^{b)}	Host	Location	Opine ^{c)}	PCR result ^{e)}					DDBJ accession ^{d)}				
				orf3+4 ^{f)}	orf8+10 ^{f)}	orf13 ^{f)}	cus ^{g)}	mis ^{h)}	16S rDNA	atpD	glnA	recA	cus
<i>Rhizobium radiobacter</i> (Ri)													
NCPBP 4062	Tomato	UK	Cucumopine	+	+	+	+	–	AB809379	AB809396	AB809413	AB809430	AB809447
NCPBP 2659	Cucumber	UK	Cucumopine	+	+	+	+	–	AB809376	AB809393	AB809410	AB809427	AB809444
NCPBP 4042	Cucumber	UK	Cucumopine	+	+	+	+	–	AB809377	AB809394	AB809411	AB809428	AB809445
CSL 5012	Cucumber	France	Cucumopine	+	+	+	+	–	AB809378	AB809395	AB809412	AB809429	AB809446
MAFF 301724	Melon	Chiba, Japan	Mikimopine	+	+	+	–	+	AB809380	AB809397	AB809414	AB809431	
<i>Rhizobium rhizogenes</i> (Ri)													
NBRC 13257 T	Apple	USA	Mannopine	–	–	–	–	–					
ATCC 15834	Unknown	Unknown	Agropine	–	–	–	–	–					

a) Nomenclature of Young *et al.* (2001) is used.

b) ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA; CSL, Central Science Laboratory Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Sand Hutton, York, UK; NBRC, Biological Resource Center (NBRC), National Institute of Technology and Evaluation, Chiba, Japan; NCPBP, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, UK; MAFF, see Table 1. T, Type strain of the species.

c) Data from Sawada *et al.* (1992), Sawada (1994), Weller *et al.* (2006), Hodges *et al.* (2004), and Isogai *et al.* (1988).

d) Sequences were determined in this study and deposited in DDBJ.

e–h) See Table 1.

et al., 2009) および EzTaxon-e Database (Kim *et al.*, 2012) で提供されている相同性検索を利用して近縁な菌種を明らかにした上で、それらの基準株の配列を取得した。これらの配列を MEGA 5.1 (Tamura *et al.*, 2011) に取り込み、MUSCLE でアラインメントを行った後、ギャップや不明確な塩基の含まれる座位を解析対象から除外した上で、以後の分子系統解析を行った。

解析手法としては最尤法 (ML 法)、近隣結合法 (NJ 法) および最大節約法 (MP 法) を用い、いずれも MEGA 5.1 を利用して解析を行った。ML 法に関しては、解析対象の配列データセットに最適な塩基置換モデルを探索した上で、選択された最適モデルのもとで解析を行った。NJ 法における

距離行列の推定は、ガンマ補正を行う最大複合尤度法を用いて行った。また、系統樹における枝の信頼性を評価するためにブートストラップ法を用いて検定を行い、1000 回反復における 90% 以上の値のみを分岐点上に示した。

MLSA (MultiLocus Sequence Analysis) 解析

トマト分離菌と対照菌株を対象として、*atpD*, *glnA* および *recA* の部分塩基配列を両鎖解析によって決定した。このうち、*atpD* に関しては、フォワードプライマーとして *atpD273F* (Merabet *et al.*, 2010) あるいは *atpD352F* (Martens *et al.*, 2008), リバースプライマーとして *atpD782R* (Vinuesa *et al.*, 2005) あるいは *atpD871R* (Martens *et al.*, 2008) を用い、コロニー PCR によってコーディング領域 (CDS) の一部を

増幅した。得られた増幅産物の配列は、増幅の際に用いたプライマーをそれぞれシークエンス用プライマーとして用い、ダイレクトシークエンスによって決定した。同様に、*glnA* については 144F/900R プライマーセット (Aujoulat *et al.*, 2011), *recA* については 41F/640R プライマーセット (Vinuesa *et al.*, 2005) を用いて増幅と配列決定を行った。

次に、トマト分離菌・対照菌株との比較に用いるために、Pulawska ら (2012) が MLSA 解析を行った際に使用した *Rhizobium* 属関連細菌の配列データを GenBank より取得した。得られた 3 遺伝子の配列データ [それぞれ 29 OTU (Operational Taxonomic Unit) から成る] に、トマト分離菌・対照菌株の配列 (17 OTU) を加えた上で、遺伝子ごとに NJ 法を用いて予備解析を行った。解析はガンマ補正を行う最大複合尤度法のもとで実行し、得られた 3 つの遺伝子系統樹を相互に比較した。

最後に、トマト分離菌の系統学・分類学的な位置づけを明確にするために MLSA 解析を行った。すなわち、*atpD*, *glnA*, *recA* の配列データをすべて連結した上で、MEGA 5.1 を用いて ML 法, NJ 法および MP 法によって解析を行った。なお、各手法における解析の進め方は、前項に示した 16S rDNA に基づく解析の場合と同様である。

recA に基づく genomovar の判別

R. radiobacter は遺伝的な変異に富んでいることが確認されており、それに基づいて変種レベルの分類階級である genomovar に類別されている (Portier *et al.*, 2006; Costechareyre *et al.*, 2010; Pulawska *et al.*, 2012 など)。そこで、*R. radiobacter* に属する供試菌株が、いずれの genomovar に属するのかについて判別を試みた。そのために、これらの *recA* 配列データを、Pulawska ら (2012) の *recA* 配列データ (70 OTU, 429 bp: Pulawska らが genomovar の判別を行う際に使用したデータセット) に加えた上で、MEGA 5.1 を用い、ML 法, NJ 法および MP 法に基づいて解析を行った。なお、各手法における解析の進め方は、16S rDNA に基づく解析や MLSA 解析の場合と同様である。

Ri プラスミドのオパイン型の判別

Weller ら (2006) は、Ri プラスミドにのみ存在している以下の 3 つの遺伝子領域から、ククモピン/ミキモピン型 Ri プラスミドに特異的な配列を抽出し、それを標的としてプライマーを設計している (プライマーの名称を括弧内に示した): orf3+4 (T-DNA 2564F/T-DNA 4014R), orf8+10 (T-DNA 6478F/T-DNA 7950R), orf13 (T-DNA 11696F/T-DNA 13150R)。そして、これらのプライマーセットを用いて PCR を行くと、ククモピン/ミキモピン型 Ri プラスミドからのみシグナルが得られることを確認している (Weller

et al., 2006)。そこで、この実験系を利用して PCR を行い、トマト分離菌が Ri プラスミドを保持しているかどうか、そのオパイン型はククモピン/ミキモピン型であるかどうかについて判別を試みた。

さらに、ククモピン型とミキモピン型の Ri プラスミドを識別するために、ククモピン合成酵素遺伝子 (*cus*) とミキモピン合成酵素遺伝子 (*mis*) をそれぞれ標的とする 2 組のプライマーセットを設計した。すなわち、前者に関しては *cusF* (5'-TTGTTTCATAACACATGGCCTGCAGG-3') / *cusR* (5'-GGCGGGCCCTAACTGGTGGG-3'), 後者に関しては *misF* (5'-CCAGGTTCTTCAAATGTCTCGCTCC-3') / *misR* (5'-GTTTGAGTACCGCTCAAAAGTCAGT-3') を設計し、これらを用いて PCR を行った。

ククモピン型 Ri プラスミドの比較

供試菌株が保持しているククモピン型 Ri プラスミドを対象として、菌株間で多型が認められるかどうかを調べた。そのために、ククモピン型 Ri プラスミド上のみ特異的に存在しているククモピン合成酵素遺伝子 (*cus*) を指標として選び、その配列を決定した。すなわち、*cusF/cusR* プライマーセットを用いて *cus* のほぼ全長を増幅した上で、ダイレクトシークエンスによる両鎖解析によって配列を決定し、菌株間で比較を行った。

結 果

発生状況と病徴

広島県にあるトマトの大規模養液栽培施設で、2011 年 10 月、定植後 3 か月ほど経過した一部の苗の株元付近に白色の毛状根が発生し、スラブ (Fig. 1-A, B) の表面に露出しているのが認められた (Fig. 1-C)。その後、同様な症状を呈する苗の数が増加するとともに、症状が激化する事例が目立つようになった。その結果、2012 年 5 月の段階で、多発した区画における発病株率は、達観評価で 50%程度にまで達した。

発生初期には株元付近に毛状根がわずかに認められる程度であるが、時間の経過とともに株元だけでなく、スラブの上面や側面の広い範囲にわたって多数の毛状根が露出するようになる (Fig. 1-C)。最終的には、無数に形成された根が密に絡み合いながらスラブ表面を覆い尽くし、スラブ全体が白っぽく見えるようになる、いわゆる「root mat」状を呈するようになる (Fig. 1-D, E)。root mat 部分には、無秩序に絡み合った毛状根が厚さ数 mm ~ 1 cm 程にわたって集積している (Fig. 1-E)。また、root mat が形成されたスラブでは、スラブ内部にも多数の毛状根が発生し、密に充満している様子が認められる。ただし、スラブ内部の根の密

Fig. 1. Hydroponic tomato (*Lycopersicon esculentum*) with natural symptoms of root mat caused by *Rhizobium radiobacter* (Ri). A, B. Coco slab on which healthy tomato plants are grown. C. Coco slab on which infected tomato plants are propagated, showing extensive root proliferation across the slab surface. D, E. Heavily increased root production across the slab surface, leading to a root mat symptom (root proliferation sufficient to cover the slab surface densely). F. Thickened roots occasionally occur. G, H. Sporadic (G) or continuous (H) galls formed on thickened roots (scale bar, 1 cm).

度は、表面の root mat 部分よりはやや低い (Fig. 1-E).

毛状根の色は、スラブ内部では白色～乳白色～ベージュ色であるが (Fig. 1-E), 表面に露出した部分では淡褐色～褐色を帯びることがある (Fig. 1-F). 毛状根の太さ (直径) は 2 mm 以下のものが多いが、一部には 3 mm ～ 1 cm にまで肥大した部分も混在している (Fig. 1-F). このような肥大部には、直径が 2 mm ～ 2 cm のこぶが散在 (Fig. 1-G), あるいは鎖状に連生する場合 (Fig. 1-H) がある. さらに、このようなこぶから多数の毛状根が密生するような事例もまれに認められる.

罹病株では栄養成長と生殖成長のバランスが前者に偏って樹勢過多となり、その結果として過繁茂や果実肥大の抑制などの被害が認められるようになる. そのため、罹病株の果実品質を健全株と同レベルに保つには、生殖成長を促進するような栽培管理を株単位で個別に行う必要が生じる. その結果、本症状は生産の効率化を進める上での阻害要因として、特に大規模栽培施設において深刻な問題となっている.

以上のような症状は ‘ミディ’, ‘ラウンド’, ‘プラム’, ‘チェリー’ などの中玉～ミニトマトにおいて発生が認められた. なお、形成された毛状根からは、位相差検鏡下で細菌の漏出が確認できた.

病原細菌の分離と病原性の確認

2012 年 5 月に、root mat 症状が発生している養液栽培施設において、12 箇所の調査地点をランダムに設け、各地点から罹病サンプルを 1 つずつ採取した. サンプルごとに複数の菌株を分離した上で接種を行い、病原性の確認ができたものから 1 株を代表として選んだ. このようにして得られた 12

株の「トマト分離菌」を以後の試験に供試した (Table 1).

これらの分離菌をトマト苗に刺針接種すると、7 ～ 10 日後には接種部位がわずかに隆起した. その後、時間の経過に従って隆起が徐々に大きくなり、こぶとして明瞭に認められるようになるとともに、こぶの表面や周辺から多数の細根が発生した (Fig. 2). 接種 90 日後には、こぶの長径は 2 ～ 8 mm, 高さは 1 ～ 3 mm となり、表面の色調は乳白色～淡褐色～褐色となった. また、こぶ周辺に発生した細根の長さは 2 ～ 5 mm に達した (Fig. 2).

形成されたこぶや細根から再分離を試みたところ、接種菌と集落形状が類似した細菌がほぼ純粋に分離できた. さらに、それらの集落を対象として VCF3/VCR3 プライマーセット (澤田・土屋, 2003) を用いたコロニーダイレクト PCR を行ったところ、いずれの集落からも病原性プラスミド特異的なシグナルが認められた (結果は示していない). また、それらの 16S rDNA の部分配列 (前半の約 500 bp 前後) は、接種菌と同一であることが確認できた. 以上のようにコッホの原則が満たされたことから、これら 12 株のトマト分離菌はいずれも本病の病原であると判断した.

表現形質の調査

トマト分離菌はいずれも 2 ～ 4 本の周鞭毛を有する桿菌であり、菌体 (2-2 株) の大きさは $1.5 \pm 0.3 \mu\text{m} \times 0.8 \pm 0.1 \mu\text{m}$ ($n = 18$) であった (Fig. 3-A). 標準寒天培地の平板培養では 2 日目に孤立集落が肉眼で認められるようになり、3 日目にはその直径が 1 mm に達した. 6 ～ 8 日目には極大 (～ 4.5 mm) に達し、以後は集落の大きさに殆ど変化は認められなかった. 集落の形状は、乳白色～淡黄色～うすいベージュ色、不透明、円形、全縁、丘状～やや中高、平滑で湿光を帯びていた (Fig. 3-B). 水溶性色素の産生は認められなかった.

API 20NE を用いてトマト分離菌の表現形質を検査したところ、硝酸塩の還元とクエン酸の利用において菌株間で差異が認められ、プロファイル番号は 1667744 (クエン酸利用が陰性の場合; 15-1 株のみ), 0667745 (硝酸還元が陰性の場合; 9-2 株のみ), および 1667745 (硝酸還元とクエン酸利用のいずれも陽性の場合; その他の 10 株) となった. これらのプロファイル番号をもとに apiweb で検索を行うと、いずれの場合も「*Rhizobium radiobacter*」が同定候補の 1 つとして提示された. ただし、プロファイル番号が 0667745 と 1667745 の場合は、同定確率が低いことが示された. なお、対照の *R. radiobacter* MAFF 301724 (メロン毛根病菌) のプロファイル番号は 1667744 となった.

後藤・瀧川 (1984a, b, c) あるいは Laboratory Guide (Schaad *et al.*, 2001) の手法を用いて 31 項目の表現形質 (Table 3)

Fig. 2. Rooting from tomato stems inoculated with the root mat pathogen 90 days postinoculation (needle prick inoculation). Right. Hairy roots and galls formed on tomato stems inoculated with the root mat pathogen (Table 1). Left. Negative control (sterile distilled water) exhibited no symptoms.

Fig. 3. Morphology of the root mat pathogen, *Rhizobium radiobacter* (Ri).

A. Electron micrograph of strain 2-2 showing rod-shaped cell and 3 peritrichous flagella. B. Colony color and morphology of strain 10-4 on standard methods agar medium incubated at 27°C for 4 days.

を検査し、トマト分離菌同士で結果を比較したところ、3項目で差異が認められた。すなわち、3-ケトラクトースの生成では8-1株と15-1株のみが陽性を示し、硝酸塩の還元とプロピオン酸の利用では9-2株のみが陰性となった。

これらの3項目を除き、それ以外の項目に関して比較を行ったところ、トマト分離菌12株と*R. radiobacter* MAFF 301724の結果はすべて一致していた (Table 3)。同様に、トマト分離菌の結果は、*R. radiobacter* の文献データ (Sawada *et al.*, 1990; Sawada and Ieki, 1992; 澤田, 1994; 澤田・土屋, 2003; 澤田, 未発表) と一致していた (Table 3)。一方、*R. rhizogenes*, *R. vitis*, *R. rubi*, *R. larrymoorei* の文献データ (Sawada *et al.*, 1990; Sawada and Ieki, 1992; 澤田, 1994; 澤田・土屋, 2003; 澤田, 未発表; Bouzar and Jones, 2001) に関しては、いずれも複数の項目において、トマト分離菌の結果との間に相違が認められた (Table 3)。

16S rDNA に基づく分子系統解析

トマト分離菌・対照菌株の配列を決定し、アラインメントした上で両端を切りそろえ、1289 bp の長さに統一したも

のを以後の解析に用いた。これらの配列をもとに相同性検索を行ったところ、トマト分離菌は*Rhizobium* 属の既知菌種ときわめて高い一致率を示した。すなわち、2-2株の配列をもとに検索を行った場合、以下の7菌種からは97%以上の一致率が得られた：*R. pusense* (一致率 100%)、*R. radiobacter* (99.07%)、*R. nepotum* (98.60%)、*R. larrymoorei* (98.37%)、*R. skierniewicense* (97.83%)、*R. rubi* (97.75%)、*R. rosettiformans* (97.36%)。

そこで、*Rhizobium* 属、およびその近縁属である*Ensifer* 属の既知菌種を比較対象として選び、これらの基準株の配列データを RDP あるいは EzTaxon-e Database より取得した。そして、*Rhizobium* 属細菌を ingroup [計 69 OTU (トマト分離菌・対照菌株も含む)]、*Ensifer* 属細菌を outgroup (計 13 OTU) として解析を行った。ただし、ギャップや不明確な塩基の含まれる座位は解析対象から除外し、残った 1236 bp を解析に用いた。

モデル選択を行ったところ、「GTR+G+I」が最適な塩基置換モデルとして選ばれたので、その条件下で ML 解析を行った。さらに、比較のために NJ および MP 解析も行い、得られた3つの系統樹を比較した。その結果、全体的なトポロジーがほぼ一致していたので、ここでは 16S rDNA 解析の代表として最尤系統樹を示すことにした (Fig. 4)。なお、outgroup として用いた*Ensifer* 属細菌は省略してある。

この系統樹において、トマト分離菌12株 (緑で示した) は、ヨーロッパ産 RMA 菌 (ピンクで示した) やメロン毛根病菌 (MAFF 301724) とともに*Rhizobium* 属の単系統群に含まれている。さらに、この単系統群の中で、トマト分離菌は以下の6つの既知菌種とともに1つのクラスター (Fig. 4の黄緑で示した領域) としてまとまることが認められた：*R. pusense*, *R. radiobacter*, *R. nepotum*, *R. larrymoorei*, *R. skierniewicense* および *R. rubi*。また、このクラスターは95%という高いブートストラップ値で支持されていた。

MLSA 解析

本研究で決定した *atpD*, *glnA*, *recA* の配列データ (Table 1, 2) を、Pulawska ら (2012) の各配列データセットに加え、アラインメントを行った上でそれぞれの両端を切りそろえた。その結果、それぞれ 46 OTU から成る 418 bp, 647 bp, 429 bp のサイズの配列データセットが得られた。予備試験として、これらのデータセットを用いて遺伝子ごとに解析を行い、得られた系統樹を比較した。その結果、全体的なトポロジーは系統樹間ではほぼ一致していることが確認できた (データは示していない)。このことから、3遺伝子の配列データを連結して MLSA 解析を行っても問題はないものと判断した。

Table 3. Comparison of phenotypes between *Rhizobium radiobacter* (Ri), causal agent of root rot of tomato (isolates listed in Table 1) and other phytopathogenic *Rhizobium* species

Characteristic	Present isolates (n=12) ^{a)}	<i>R. radiobacter</i> MAFF 301724 ^{b)}	<i>R. radiobacter</i> ^{c)}	<i>R. rhizogenes</i> ^{c)}	<i>R. vitis</i> ^{c)}	<i>R. rubi</i> ^{c)}	<i>R. larrymoorei</i> ^{c)}
Peritrichous flagella	2–4	2–4	+	+	+	+	+
Cell shape	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Motility	+	+	+	+	+	+	+
Gram reaction	–	–	–	–	–	–	–
O-F test	O	O	O	O	O	O	O
Oxidase	+	+	+	–	+	+	–
3-Ketolactose production	– ^{d)}	+	+	–	–	–	–
Arginine dihydrolase	+ ^{e)}	+ ^{e)}	+	–	d	–	–
Mucoid growth on nutrient agar + 5% sucrose	+	+	+	+	+	–	–
Nitrate reduction	+ ^{f)}	+	d	–	–	–	–
Growth at 35°C	+	+	+	–	–	–	–
Growth in 1% NaCl	+	+	+	–	–	–	–
Growth in 2% NaCl	+	+	+	–	+	d	+
Utilization of:							
Acetate	+	+					
Aconitate	+	+					
L-Arabinol	+	+					
L-Arginine	+	+					
Citrate	+ ^{g)}	+	d	+	+	–	W
Erythritol	–	–	–	+	–	d	
Ethanolamine	+	+					
Gluconate	+	+	+	+	+		
Malonate	–	–	–	+	+	+	–
Mannitol	+	+	+	+	+		+
D-Melezitose	+	+	+	–	–	W	–
α-Methyl-D-glucoside	+	+	+	+	–	W	W
Propionate	+ ^{f)}	+	+	–	+	–	
D-Raffinose	+	+	+	+	+	+	–
Salicin	+	+	+	+	+		
Sarcosine	+	+					
D-Tartrate	–	–					
L-Tartrate	–	–	d	+	+	–	+

Symbols : +, 80–100% of strains were positive; d, 21–79% positive; –, 0–20% positive; W, weak reaction; O, oxidative reaction.

a) See Table 1.

b) See Table 2.

c) Data are from Sawada *et al.* (1990), Sawada and Ieki (1992), Sawada (1994), Sawada and Tsuchiya (2003), Sawada (unpublished), and Bouzar and Jones (2001).

d) Only strains 8–1 and 15–1 gave positive reactions.

e) All strains tested positive in this conventional test using Thornley's medium, but negative for using API 20NE.

f) Only strain 9–2 was negative.

g) All strains tested gave positive reactions in this conventional test using Ayers, Rupp, and Johnson's medium, but only strain 15–1 was negative for API 20NE.

そこで、3 遺伝子の連結データ (46 OTU, 1494 bp) を作成した上で、ギャップや不明確な塩基の含まれる座位を除外し、残った 1477 bp を MLSA 解析に供した。このデータを用いてモデル選択を行ったところ、GTR+G+I が最適モ

デルとして選ばれた。そこで、この条件下で ML 解析を行うとともに、比較のために NJ および MP 解析も実施した。その結果、3 つの解析法によって得られた系統樹はほぼ同じトポロジーであり、しかも、前段の予備解析で作成した 3

Fig. 4. Maximum-likelihood (ML) phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the relationships among strains of the root mat pathogen isolated in Japan (Table 1; indicated by green marker) and in Europe (Table 2; indicated by pink marker), and members of the genus *Rhizobium*. All existing *Ensifer* species were used as outgroups to root the tree (indicated by the triangle). Phylogenetic trees constructed using the neighbor-joining (NJ) and maximum-parsimony (MP) methods, had topologies similar to that of the ML tree. Numbers at nodes are bootstrap values (>90%) based on ML analysis of 1000 resampled data sets. GenBank accession numbers are given in parentheses. T, type strain of the species. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

Fig. 5. Maximum likelihood (ML) tree based on concatenated sequences of genes *atpD*, *glnA* and *recA* showing the relationships among strains of the root mat pathogen isolated in Japan (indicated by green marker) and in Europe (indicated by pink marker), and members of the genus *Rhizobium*. *Ensifer*, *Mesorhizobium* and *Bradyrhizobium* species were used as outgroups (indicated by the triangle). The data sets used here were the same as used by Pulawska *et al.* (2012), obtained from GenBank, except for 51 sequences of strains of the root mat pathogen determined in this study (Tables 1 and 2). Filled circles indicate that the corresponding nodes were also recovered in both the neighbor joining (NJ) and maximum parsimony trees. Open circles indicate that the corresponding nodes were also recovered in the NJ tree. Numbers at nodes are bootstrap values (>90%) based on the ML analysis of 1000 resampled data sets. Bar, 0.05 substitutions per nucleotide position.

つの遺伝子系統樹とも一致していた。そこで、ここでは MLSA 解析の代表として最尤系統樹を示した (Fig. 5)。なお、outgroup として用いた *Ensifer* 属、*Mesorhizobium* 属、*Bradyrhizobium* 属細菌は省略してある。

トマト分離菌 12 株は、ヨーロッパ産 RMA 菌やメロン毛根病菌とともに、明瞭な単系統群 (黄色で示した領域) の中に含まれた (Fig. 5)。また、この単系統群の構成メンバーは、いずれも *R. radiobacter* species complex に関連した菌株であった。

ヨーロッパ産 RMA 菌 4 株は、*R. radiobacter* species complex の単系統群内において、大きく 2 つのグループ (CSL

5012 とそれ以外の 3 菌株) に分かれた。また、トマト分離菌 12 株に関しても、2 つのグループに分かれることが明らかとなった。すなわち、8-1 株と 15-1 株は近縁であり、それ以外の 10 株とは系統的な位置づけが離れていた。

recA に基づく genomovar の判別

トマト分離菌・対照菌株の *recA* 配列データ (17 OTU, 429 bp) を、Pulawska ら (2012) の *recA* 配列データ (70 OTU, 429 bp) に加えた上で、ギャップや不明確な塩基の含まれる座位を除去し、残ったデータ (87 OTU, 427 bp) を解析に供した。モデル選択の結果、GTR+G+I が最適モデルとして選ばれたので、この条件下で ML 解析を行うとともに、

Fig. 6. Maximum likelihood (ML) tree based on *recA* gene sequences showing the relationships among strains of the root mat pathogen isolated in Japan (indicated by green marker) and in Europe (indicated by pink marker), and members of the 10 genomovars (G1–G9, G14) of so called *R. radiobacter* species complex. *Ensifer*, *Mesorhizobium* and *Bradyrhizobium* species, and members of the genus *Rhizobium* other than *R. radiobacter* species complex were omitted, and only a detailed illustration of the *R. radiobacter* species complex is shown. The data sets of Pulawska *et al.* (2012), obtained from GenBank, were used here in addition to 17 sequences of strains of the root mat pathogen determined in this study (Tables 1 and 2). Numbers at nodes are bootstrap values (>90%) based on the ML analysis of 1000 resampled data sets. Bar, 0.02 substitutions per nucleotide position.

比較のために NJ および MP 解析も実施した。

得られた 3 つの系統樹を比較したところ、genomovar 単位のまとまりは系統樹間で一致していた。また、これらの系統樹における基本的なトポロジーは、Pulawska ら (2012) や Costechareyre ら (2010) における解析結果とも一致していた。

解析結果の代表として Fig. 6 に最尤系統樹を示した。ただし、系統樹のサイズが大きいのので、Fig. 6 には *R. radiobacter* species complex に相当する領域のみを示し、それ以外の部分 (*R. radiobacter* species complex 以外の *Rhizobium* 属細菌, outgroup として *Ensifer* 属, *Mesorhizobium* 属, *Bradyrhizobium* 属細菌) については省略した。なお、各菌株の genomovar レベルの所属については、Pulawska ら (2012) や Costechareyre

ら (2010) の結果を基に判定を行った。また、トマト分離菌が含まれている genomovar をオレンジで、それ以外の genomovar を青で色づけして区別した。

ヨーロッパ産 RMA 菌 4 株は *R. radiobacter* species complex の中で 2 つのグループに分かれており、CSL 5012 は genomovar G4、それ以外の 3 菌株は genomovar G7 のクラスターに含まれていた。また、トマト分離菌 12 株も 2 つのグループに分かれることが明らかとなった。すなわち、8-1 株と 15-1 株は genomovar G7、それ以外の 10 株は genomovar G9 のクラスターに含まれていた。

Ri プラスミドのオパイン型の判別

Weller ら (2006) の設計した 3 組のプライマーセット (T-DNA 2564F/T-DNA 4014R, T-DNA 6478F/T-DNA 7950R,

T-DNA 11696F/T-DNA 13150R) を用い、トマト分離菌を対象として PCR を行った。その結果、いずれのプライマーセットを用いた場合も、ククモピン/ミキモピン型 Ri プラスミドに特異的な増幅産物が、トマト分離菌 12 株のすべてにおいて認められた (Table 1 における orf3+4, orf8+10, orf13)。

ククモピン合成酵素遺伝子 (*cus*) を標的として設計した *cusF/cusR* プライマーセットを用いて PCR を行ったところ、トマト分離菌 12 株のすべてから、陽性対照であるククモピン型の菌株 (Table 2) と同じサイズの増幅産物が得られた (Table 1)。一方、ククモピン型以外の対照菌株からは増幅は認められなかった (Table 2)。

ミキモピン合成酵素遺伝子 (*mis*) を標的とした *misF/misR* プライマーセットを用いた場合は、陽性対照としたミキモピン型の菌株 (Table 2) からは 1013 bp のサイズの産物が認められた。しかし、トマト分離菌やミキモピン型以外の対照菌株からは全くシグナルが得られなかった (Table 1, 2)。

ククモピン型 Ri プラスミドの比較

ククモピン型 Ri プラスミドの基準とされている pRi2659 (Davioud *et al.*, 1988) において、ククモピン合成酵素遺伝子 (*cus*: AB039860) の CDS のサイズは 963 bp である。トマト分離菌 12 株とヨーロッパ産 RMA 菌 4 株のすべてについて、この CDS の 13 ~ 915 座位に相当する 903 bp の配列を決定することができた (Table 1, 2)。それらを MEGA に読み込み、アラインメントを行った上で比較したところ、16 個の配列は互いに完全一致しており、同義置換さえ存在しないことが明らかとなった。

考 察

病原細菌の種レベルの所属

供試した 12 株のトマト分離菌 (Table 1) は、いずれもコッホの原則を満たすことから本病の病原であることが確認できた。また、本病の発生状況や病徴 (Fig. 1)、接種試験の際に認められた発病過程や再現された病徴 (Fig. 2)、分離菌の集落形態 (Fig. 3) や 16S rDNA の予備解析等の結果から、これらは *Rhizobium* 属に属する毛根病菌である可能性が示唆された。そこで、*Rhizobium* 属細菌を同定する上で重要な表現型や遺伝型を中心として検査を行い、トマト分離菌の分類上の所属について検討した。

表現型に関しては、植物病原性の *Rhizobium* 属細菌を同定する上で有効とされている生理・生化学的性質 (Sawada *et al.*, 1990; Sawada and Ieki, 1992; 澤田, 1994; 澤田・土屋, 2003; Schaad *et al.*, 2001) を中心として検査を行った (Table 3)。その結果、本菌はグラム陰性、好気性で運動性を有す

る周毛桿菌であり、乳白色～淡黄色～うすいベージュ色の集落を形成すること (Fig. 3)、オキシダーゼ活性、アルギニンジヒドロラーゼ活性、35°C での生育、2% NaCl での生育、D-メレイトースの利用が陽性、エリトリールやマロン酸の利用が陰性であった (Table 3)。一方、3-ケトラクトースの生成、硝酸塩の還元、プロピオン酸の利用に関しては、トマト分離菌の間で差異が認められた。

トマト分離菌間で差異の認められた上記の 3 項目を除き、残りの項目について比較を行ったところ、トマト分離菌の結果は、対照とした *R. radiobacter* MAFF 301724 (メロン毛根病菌) の結果や、*R. radiobacter* の文献データ (Sawada *et al.*, 1990; Sawada and Ieki, 1992; 澤田, 1994; 澤田・土屋, 2003; 澤田, 未発表) と一致していた (Table 3)。一方、*R. rhizogenes*, *R. vitis*, *R. rubi*, *R. larrymoorei* の文献データ (Sawada *et al.*, 1990; Sawada and Ieki, 1992; 澤田, 1994; 澤田・土屋, 2003; 澤田, 未発表; Bouzar and Jones, 2001) とは、複数の項目において相違が認められた (Table 3)。また、API 20NE を用いて表現形質の検査を行った場合も、トマト分離菌からは *R. radiobacter* と類似したパターンが得られた。

遺伝型の検査としては、最初に 16S rDNA に基づく分子系統解析を実施した。得られた系統樹 (Fig. 4) の基本的なトポロジーは、これまでに報告されてきた分子系統解析の結果 (Sawada *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2001; Kuykendall *et al.*, 2005; Pulawska *et al.*, 2012) と一致しており、信頼性の高い系統樹であることが確認できた。トマト分離菌は、この系統樹における *Rhizobium* 属の単系統群に含まれること、その内の 6 つの既知菌種 (*R. pusense*, *R. radiobacter*, *R. nepotum*, *R. larrymoorei*, *R. skienewicence*, *R. rubi*) の基準株とは特に近縁な関係であることが認められた。ただし、これら 6 つの既知菌種とトマト分離菌との関係を示す分岐は、一部を除いてブートストラップ確率が非常に低い (38 ~ 63%) ことから、この解析結果のみでトマト分離菌の種レベルの所属について判定することは不可能であった。

そこで、トマト分離菌の位置づけをより明確にするために、*atpD*, *glnA*, *recA* の連結データを用いて MLSA 解析を行った。その結果、トマト分離菌 12 株のいずれもが、ブートストラップ確率 100% で支持された明瞭な単系統群 (Fig. 5 において黄色で示した領域) の中に含まれることが明らかとなった。また、この単系統群には、*R. radiobacter* の基準株 (LMG 140^T; Fig. 5 では「*R. radiobacter*」と表記してある) も含まれている。さらに、同じくこの単系統群に含まれている C58 株、ヨーロッパ産 RMA 菌 (NCPB 4062, 2659, 4042 および CSL 5012)、メロン毛根病菌 MAFF 301724 も、*R. radiobacter* に属する菌株である (Weller *et al.*, 2000a, 2000b,

2004, 2005, 2006; 塩見ら, 1987). また, この単系統群には *R. pusense* と *R. nepotum* も含まれているが, これらはいずれも *R. radiobacter* species complex のメンバーであり, *R. radiobacter* 内に設けられている genomovar と同列のまとまりであることが確認されている (Pulawska *et al.*, 2012; Panday *et al.*, 2011).

以上のことから, 「黄色で示した単系統群は *R. radiobacter* species complex に相当する」と判断した. すなわち, MLSA 解析によって, すべてのトマト分離菌が *R. radiobacter* species complex の枠組みに入ることが明らかとなった. また, トマト分離菌からは, 表現型 (Table 3, Fig. 3) に関しても *R. radiobacter* と一致する結果が得られている. 以上より, トマト分離菌 12 株を, *Rhizobium radiobacter* (Beijerinck and van Delden 1902) Young, Kuykendall, Martinez-Romero, Kerr and Sawada 2001 と同定した.

病原細菌の保持しているプラスミド

本病の発生状況は, ヨーロッパの養液栽培施設でトマト・キュウリに発生している root mat 症状 (Weller *et al.*, 2000a, 2000b, 2004, 2005, 2006) の場合と酷似している. また, トマト分離菌の種レベルの所属が *R. radiobacter* であり, ヨーロッパ産 RMA 菌と同じであることも明らかとなった. 以上のことから, トマト分離菌は病原因子として Ri プラスミドを保持している可能性が高いと思われる (澤田, 2006). そこで, この点について確認するとともに, その Ri プラスミドがいずれのオパイン型に属するのかについても検討を試みた.

Ri プラスミドは複数のオパイン型 (アグロピン, マンノピン, ククモピン, ミキモピン型など) に分化していることが知られている (Dessaix *et al.*, 1998). このうち, ククモピン型とミキモピン型は構造が似ており, 配列の相同性も高いことが明らかとなっている (Moriguchi *et al.*, 2001; Mankin *et al.*, 2007). Weller ら (2006) はこのことを利用して, ククモピン/ミキモピン型 Ri プラスミドに特異的な 3 組のプライマーセットを作成している. そこで, これらのプライマーセットを用いて PCR 検定を行ったところ, すべてのトマト分離菌から陽性の結果を得ることができた (Table 1 における orf3+4, orf8+10, orf13). このことは, トマト分離菌がククモピン/ミキモピン型の Ri プラスミドを保持していることを示している.

ククモピン型 Ri プラスミドの T-DNA では, right border に隣接した位置にククモピン合成酵素遺伝子 (*cus*) が存在している (Mankin *et al.*, 2007). 一方, ミキモピン型の相同な位置には, *cus* の代わりにミキモピン合成酵素遺伝子 (*mis*) が存在している (Moriguchi *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001). また, *cus* と *mis* の間には, 塩基配列レベルの相同性がほと

んど認められていない (Suzuki *et al.*, 2001). これらの情報を利用して *mis* と *cus* に特異的なプライマーセットを設計し, PCR による判別を試みた. その結果, トマト分離菌からは *mis* 特異的なシグナルは全く得られなかった (Table 1). 一方, *cus* 特異プライマーによる PCR では, すべてのトマト分離菌において増幅が認められた. 以上のことは, トマト分離菌が「ククモピン型の Ri プラスミド」を保持していることを示している. したがって, 前段に示した種レベルの同定結果も考え合わせると, 本菌は *Rhizobium radiobacter* (Ri) と表記されるべき毛根病菌 (Young *et al.*, 2001; 澤田, 2007) であることが明らかとなった.

なお, わが国ではこれまでにリンゴ, バラ, メロンにおいて毛根病の発生が報告されている (日本植物病理学会・農業生物資源研究所, 2012; 日本植物病理学会, 2013). このうち, メロン毛根病菌 MAFF 301724 はミキモピン型 Ri プラスミドを保持していることが判明しているが (Suzuki *et al.*, 2001), それ以外の毛根病菌ではオパイン型が明らかになっていない. したがって, ククモピン型 Ri プラスミドが国内で検出されたのは本研究が初の事例となる. また, 世界的には, イギリス, フランスにおける RMA 菌 (Weller *et al.*, 2006) に次いで 3 例目となる.

病原細菌の genomovar の判別

トマト分離菌が属している *R. radiobacter* species complex は, 少なくとも 10 あるいは 11 個の genomovar (genomospecies, genomic species と表記されることもある) に類別できると考えられている (Portier *et al.*, 2006; Costechareyre *et al.*, 2010; Pulawska *et al.*, 2012 など). また, 最近になり, genomovar に相当する菌群があいついで新種 (*R. nepotum*, *R. pusense*) として提案されるようになってきた (Pulawska *et al.*, 2012; Panday *et al.*, 2011). 後述するように, これらの新種が種レベルの分類群として妥当かどうかという問題はあつもの, 今後もこの傾向は続く可能性がある. そこで, 将来の分類の変更 (genomovar の種への格上げ) に備えるためにも, *R. radiobacter* species complex に属する菌株を記載する際は, genomovar レベルの所属を明らかにした上で, その情報を学名とともに記載しておくべきであろう.

トマト分離菌・対照菌株の genomovar レベルの所属を明らかにするために, これらの *recA* 配列データを, Pulawska ら (2012) が genomovar の判別を行う際に使用したデータセットに加えて分子系統解析を行った. その結果, 対照としたヨーロッパ産 RMA 菌のうち, フランス由来の CSL 5012 は genomovar G4 (以後, genomovar の名称を「G4」のように略記する) であり, それ以外のイギリス産の 3 株 (NCPPB 2659, 4042, 4062) は G7 に属することが確認でき

た (Fig. 6). また、日本産のメロン毛根病菌 MAFF 301724 も G7 のメンバーであることが認められた。

トマト分離菌のうち、8-1 株と 15-1 株は G7 に属することが明らかとなった。ただし、これら 2 株の *recA* 配列や *atpD*・*glnA* の配列 (Table 1) は、同じ G7 に属するイギリス産 RMA 菌 (NCPPB 2659, 4042, 4062) やメロン毛根病菌 MAFF 301724 (Table 2) とは異なっていた (Fig. 5, 6)。

一方、それ以外の 10 株のトマト分離菌については、いずれも G9 のメンバーであることが明らかとなった (Fig. 6)。なお、G9 に属する *R. radiobacter* は、これまでのところ、オーストラリアで園芸培土から分離された 2 株 (Hayward 0362, 0363) が知られているのみであり (Pulawska *et al.*, 2012; Costechareyre *et al.*, 2010; Portier *et al.*, 2006)、きわめて希少である。また、G9 のメンバーはいずれも 3- ケトラクトースの生成が陰性であり、*R. radiobacter* の一般的な特徴とは異なることが明らかとなった (Table 3)。

genomovar の分類上の扱いについて

前段に記したように、*R. radiobacter* species complex では、genomovar に相当する菌群を種へと格上げするような提案がなされている (Pulawska *et al.*, 2012; Panday *et al.*, 2011)。この動きに従うのであれば、トマト分離菌が属する G7 と G9 についても、それぞれの genomovar を新種として新たに提案する手続きが必要となる。

ただし、種レベルの境界の判定基準である DNA-DNA 相同値を genomovar 間で調べてみると、genomovar の組合せによっては、その値が比較的高くなる場合があるとされている。すなわち、先行して種へと格上げされた *R. nepotum* (G14) や *R. pusense* (G2) と、*R. radiobacter* の基準株 (G4) との間では、前者の場合は 45% (Pulawska *et al.*, 2012)、後者の場合は 51% (Panday *et al.*, 2011) という値が観察されている。また、G1, G4 および G8 の間でも 37 ~ 58% という値が得られており、特に G4 と G8 の間では 52 ~ 58% とかなり高い値が認められている (Portier *et al.*, 2006)。

以上のことから、来歴の異なる十分な数の菌株を供試し、網羅的に DNA-DNA 交雑実験を行うと、種レベルの境界とされている「60 ~ 70%」を越えるような値を含んだ、連続的な数字が genomovar 間で得られる可能性は十分に考えられる。また、今後さらに菌株の探索が進めば、既知の genomovar 間の遺伝的な距離を埋めるような「新たな genomovar」が見出される、という事態も起こりうるのではないだろうか。したがって、*R. radiobacter* species complex の全体像が十分に把握しきれておらず、genomovar 間の関係が明確になっていない現段階で、*R. radiobacter* の基準株との DNA 相同値のみを根拠にして個別に種の提案を行うのは避けるべ

きではないだろうか。

まず必要なのは、各 genomovar の識別性状として利用できるような表現型を探索するとともに、genomovar 間のすべての組合せにおいて DNA-DNA 交雑実験を網羅的に行うことであろう。それらの情報が揃えば、各 genomovar を分類学的にいかに取り扱うべきかについて判断を下せるのではないだろうか。そのような段階に達するまでは、混乱を避けるために、安易な新種提案 (genomovar の種への格上げ) は控えるべきであると判断した。

Ri プラスミドの施設内における伝達

トマト分離菌 12 株は、16S rDNA 系統樹 (Fig. 4)、MLSA 系統樹 (Fig. 5)、genomovar の判別 (Fig. 6) のいずれにおいても、大きく 2 つのグループ (G7 と G9) に分かれることが明らかとなった。また、それぞれのグループの中には、さらに小さな変異が存在していた。一方、トマト分離菌の保持しているククモピン型 Ri プラスミドの *cus* 配列 (Table 1) は互いに完全一致しており、同義置換え認められなかった。すなわち、トマト分離菌の染色体型には多型があるのに対し、保持している Ri プラスミドは均一であることが明らかとなった。

トマト分離菌で認められた以上のような傾向は、イギリスにおける RMA 菌の分析結果と一致している (Weller *et al.*, 2004, 2005, 2006)。Weller らは、イギリスでのこのような分析結果をもとに、以下のような推測を行っている。すなわち、植物工場内を循環している養液中には、Ri プラスミドを受容する能力を有したさまざまな細菌が生息しており、もとの Ri プラスミド保有株からそのような受容能力のある株へと接合伝達が行なわれた結果、多様な病原性菌株が養液中で新たに生じたのであろう、と考えられている (Weller *et al.*, 2004, 2005, 2006)。

本研究で調査を行ってきた広島県の発生施設でも、イギリスにおける root mat の発生施設と同様に、過剰な養液は排出されることなくすべて回収され、広大な施設内を循環しながら再利用されている。したがって、この施設においても、Weller らが想定しているのと同様な現象が起きている可能性がある。すなわち、循環している養液中において、ククモピン型 Ri プラスミドが元株から他の菌株へと伝達された結果、多様な病原性菌株が新たに生まれ、それらがさらに養液の循環によって拡散・混合され、施設内で複雑に入り交じるという状況がもたらされたのではないだろうか。今後はこの点を確認するために、疫学調査をさらに継続するとともに、Ri プラスミドの構造を菌株間でより詳細に比較することを予定している。

ククモピン型 Ri プラスミドの起源

トマト分離菌とヨーロッパ産 RMA 菌の *cus* 配列が完全に一致しているということは、これらの保持しているククモピン型 Ri プラスミドが、同一の起源に由来するきわめて近縁な関係にあることを示唆している。したがって、同一起源のプラスミドを保持した病原性菌株がヨーロッパと日本に分布を広げ、それぞれの養液栽培環境において土着の菌へとプラスミドを伝達した結果、均一性の高いプラスミドを共有した「変異に富んだ RMA 集団」がそれぞれの地域に生まれたのではないだろうか。

ただし、このククモピン型 Ri プラスミドの元々の起源はどこなのか、それがどのような経路・メカニズムによって分布を広げたのかについては、現時点では全く不明である。なお、ククモピン型 Ri プラスミドを保持した病原性菌株が初めて分離されたのは 1973 年のイギリスであり、その後もイギリスではトマトやキュウリにおいて多くの分離例がある (Davioud *et al.*, 1988; Weller *et al.*, 2000a, 2000b, 2006)。また、これらのククモピン型 Ri プラスミドがきわめて均一性の高いことも確認されている (Weller and Stead, 2002; Weller *et al.*, 2004, 2006)。しかも、過去 40 年間にわたって、ククモピン型 Ri プラスミドはヨーロッパ産 RMA 菌からのみ検出されてきており、本研究がその唯一の例外ということになる。以上のことは、ククモピン型 Ri プラスミドがイギリス (ヨーロッパ) 起源である可能性を示唆しているのかもしれない。

一方、MLSA 解析や genomovar の判別を通じて、トマト分離菌 (Table 1) の染色体型と、ヨーロッパ産 RMA 菌の染色体型とが一致するような事例はまったく認められなかった (Fig. 5, 6)。したがって、RMA 菌がヨーロッパから日本へと直接侵入し、それに伴ってククモピン型 Ri プラスミドが持ち込まれたという可能性については、今回の解析では確認することができなかった。

ただし、供試菌株数が少ないので、この可能性が完全に否定されたわけではない。今後は、来歴の異なる RMA 菌をさらに供試した上で、染色体型とプラスミドの比較を網羅的に行い、ククモピン型 Ri プラスミドの起源と日本への伝播経路について検証を試みたいと考えている。

病名の提案

本研究によって、*Rhizobium radiobacter* (Ri) が本病の原因菌であることが証明された。一方、わが国にはこれまでのところ、*Rhizobium* 属に属する植物病原細菌 (旧 *Agrobacterium* 属細菌) によるトマトの病害は報告がない (日本植物病理学会・農業生物資源研究所, 2012; 日本植物病理学会, 2013)。以上より、本病を *Rhizobium radiobacter* (Ri) による新病害

として「トマト毛根病 [英名: Root mat (hairy root) of tomato]」とすることを提案する。

摘 要

2011 年 10 月、広島県におけるトマト (*Lycopersicon esculentum*) の大規模養液栽培施設で、養液栽培用培地の表面に多数の毛状根が発生し、培地表面が密に覆い尽くされる症状 (root mat) が発生した。root mat が形成された培地の内部にも、毛状根が密に充満していた。これらの罹病組織からは、乳白色～淡黄色～うすいパーヴェル色で不透明の円形集落を形成する細菌が分離された。分離菌株をトマトに刺針接種すると多数の細根が発生し、そこからは接種菌が再分離できた。本菌はグラム陰性、好気性で 2～4 本の周鞭毛を有する桿菌であり、その主要な生理・生化学的性質や 16S rDNA の分子系統解析における位置づけは *Rhizobium* 属細菌に一致した。また、*atpD*, *glnA* および *recA* に基づく MLSA 解析において、本菌は *R. radiobacter* の単系統群に含まれた。以上より、本菌を *Rhizobium radiobacter* (Beijerinck and van Delden 1902) Young, Kuykendall, Martinez-Romero, Kerr and Sawada 2001 と同定した。また、本菌はククモピン型の Ri プラスミドを有していることが確認できた。*R. radiobacter* (Ri) によるトマトの病害はわが国では報告がないため、本病を新病害としてトマト毛根病 [Root mat (hairy root) of tomato] と呼称したい。分子系統解析の結果、本菌の染色体型には多型があり、本菌の genomovar レベルの所属は genomovar G7 と G9 に分散することが明らかとなった。一方、本菌やヨーロッパにおける root mat 症状の原因菌が保持しているククモピン型 Ri プラスミドは、きわめて均一性が高いことが認められた。以上のことは、同一起源のプラスミドがヨーロッパと日本において、それぞれの土着の菌へと伝達された可能性を示唆している。

謝 辞

本研究を行うにあたり、ご助言を賜った静岡大学 瀧川雄一教授、静岡県農林技術研究所 伊代住浩幸氏に篤くお礼申し上げます。

引用文献

- Aujoulat, F., Jumas-Bilak, E., Masnou, A., Salle, F., Faure, D., Segonds, C., Marchandin, H. and Teyssier, C. (2011). Multilocus sequence-based analysis delineates a clonal population of *Agrobacterium* (*Rhizobium*) *radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) of human origin. *J. Bacteriol.* 193: 2608–2618.
- Bouzar, H. and Jones, J.B. (2001). *Agrobacterium larrymoorei* sp. nov., a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1023–1026.

- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M. and Tiedje, J.M. (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 37: D141–D145.
- Costechareyre, D., Rhouma, A., Lavire, C., Portier, P., Chapulliot, D., Bertolla, F., Boubaker, A., Dessaux, Y. and Nesme, X. (2010). Rapid and efficient identification of *Agrobacterium* species by *recA* allele analysis: *Agrobacterium recA* diversity. *Microb. Ecol.* 60: 862–872.
- Davioud, E., Petit, A., Tate, M.E., Ryder, M.H. and Tempé, J. (1988). Cucumopine—a new T-DNA encoded opine in hairy root and crown gall. *Phytochemistry* 27: 2429–2433.
- Dessaux, Y., Petit, A., Farrand, S.K. and Murphy, P.J. (1998). Opines and opine-like molecules involved in plant-*Rhizobiaceae* interactions. In *The Rhizobiaceae* (Spaink, H.P., Kondorosi, A. and Hooykaas, P.J.J., eds.). pp. 173–197, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- 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方 (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方 (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方 (4). 植物防疫 38: 479–484.
- Hodges, L.D., Cuperus, J. and Ream, W. (2004). *Agrobacterium rhizogenes* GALLS protein substitutes for *Agrobacterium tumefaciens* single-stranded DNA-binding protein VirE2. *J. Bacteriol.* 186: 3065–3077.
- Isogai, A., Fukuchi, N., Hayashi, M., Kamada, H., Harada, H. and Suzuki, A. (1988). Structure of a new opine, mikimopine, in hairy root induced by *Agrobacterium rhizogenes*. *Agric. Biol. Chem.* 52: 3235–3237.
- Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., Park, S.C., Jeon, Y.S., Lee, J.H., Yi, H., Won, S. and Chun, J. (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 716–721.
- Kuykendall, L.D., Young, J.M., Martínez-Romero, E., Kerr, A. and Sawada, H. (2005). Genus *Rhizobium*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition, Vol. 2, part C (Garrity, G.M., ed.). pp. 325–340, Springer, New York.
- Mankin, S.L., Hill, D.S., Olhoft, P.M., Toren, E., Wenck, A.R., Nea, L., Xing, L.Q., Brown, J.A., Fu, H.H., Ireland, L., Jia, H.M., Hillebrand, H., Jones, T. and Song, H.S. (2007). Disarming and sequencing of *Agrobacterium rhizogenes* strain K599 (NCPPB2659) plasmid pRi2659. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 43: 521–535.
- Martens, M., Dawyndt, P., Coopman, R., Gillis, M., De Vos, P. and Willems, A. (2008). Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 200–214.
- Merabet, C., Martens, M., Mahdhi, M., Zakhia, F., Sy, A., Le Roux, C., Domergue, O., Coopman, R., Bekki, A., Mars, M., Willems, A. and de Lajudie, P. (2010). Multilocus sequence analysis of root nodule isolates from *Lotus arabicus* (Senegal), *Lotus creticus*, *Argyrolobium uniflorum* and *Medicago sativa* (Tunisia) and description of *Ensifer numidicus* sp. nov. and *Ensifer garamanicus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 664–674.
- Moriguchi, K., Maeda, Y., Satou, M., Hardayani, N.S.N., Kataoka, M., Tanaka, N. and Yoshida, K. (2001). The complete nucleotide sequence of a plant root-inducing (Ri) plasmid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in *Rhizobiaceae*. *J. Mol. Biol.* 307: 771–784.
- 日本植物病理学会・農業生物資源研究所 (2012). 日本植物病名目録 (第2版). 日本植物病理学会, 東京.
- 日本植物病理学会 (2013). 日本植物病名目録追録. (<http://www.ppsj.org/pdf/mokuroku-tsuiroku130901.pdf>).
- Panday, D., Schumann, P. and Das, S.K. (2011). *Rhizobium pusense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 2632–2639.
- Portier, P., Fischer-Le Saux, M., Mougél, C., Lerondelle, C., Chapulliot, D., Thioulouse, J. and Nesme, X. (2006). Identification of genomic species in *Agrobacterium* biovar 1 by AFLP genomic markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7123–7131.
- Pulawska, J., Willems, A., De Meyer, S.E. and Süle, S. (2012). *Rhizobium nepotum* sp. nov. isolated from tumors on different plant species. *Syst. Appl. Microbiol.* 35: 215–220.
- Sawada, H., Ieki, H. and Takikawa, Y. (1990). Identification of grapevine crown gall bacteria isolated in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 56: 199–206.
- Sawada, H. and Ieki, H. (1992). Phenotypic characteristics of the genus *Agrobacterium*. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 58: 37–45.
- 澤田宏之・家城洋之・小林省蔵・生山 巖 (1992). 根頭がんしゅ病菌の Ti プラスミドに関連した表現形質による類別. 日植病報 58: 244–252.
- 澤田宏之 (1994). *Agrobacterium* 属細菌の系統および分類に関する研究. 果樹試験場報告 特別報告 5: 1–110.
- Sawada, H., Kuykendall, L.D. and Young, J.M. (2003). Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 49: 155–179.
- 澤田宏之・土屋健一 (2003). *Agrobacterium* 属細菌の分類. 日植病報 69: 349–365.
- 澤田宏之 (2006). いわゆる「アグロバクテリウム」について (1) プロフィールの紹介. 日本微生物資源学会誌 22: 117–121.
- 澤田宏之 (2007). いわゆる「アグロバクテリウム」について (2) 分類の現状. 日本微生物資源学会誌 23: 29–34.
- 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.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W. (2001). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd edition, APS Press, St. Paul, Minnesota.
- 塩見敏樹・白川 隆・竹内昭士郎・大泉利勝・植松清次 (1987). *Agrobacterium rhizogenes* biovar 1 によるメロン毛根病. 日植病報 53: 454–459.
- Suzuki, K., Tanaka, N., Kamada, H. and Yamashita, I. (2001). Mikimopine synthase (*mis*) gene on pRi1724. *Gene* 263: 49–58.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and

- maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731–2739.
- Vinuesa, P., Silva, C., Werner, D. and Martínez-Romero, E. (2005). Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Mol. Phylogenet. Evol.* 34: 29–54.
- Weller, S.A., Stead, D.E., O'Neill, T.M. and Morley, P.S. (2000a). Root mat of tomato caused by rhizogenic strains of *Agrobacterium* biovar 1 in the UK. *Plant Pathol.* 49: 799.
- Weller, S.A., Stead, D.E., O'Neill, T.M., Hargreaves, D. and McPherson, G.M. (2000b). Rhizogenic *Agrobacterium* biovar 1 and cucumber root mat in the UK. *Plant Pathol.* 49: 43–50.
- Weller, S.A. and Stead, D.E. (2002). Detection of root mat associated *Agrobacterium* strains from plant material and other sample types by post-enrichment TaqMan PCR. *J. Appl. Microbiol.* 92: 118–126.
- Weller, S.A., Stead, D.E. and Young, J.P.W. (2004). Acquisition of an *Agrobacterium* Ri plasmid and pathogenicity by other α -*Proteobacteria* in cucumber and tomato crops affected by root mat. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2779–2785.
- Weller, S.A., Stead, D.E. and Young, J.P.W. (2005). Induction of root-mat symptoms on cucumber plants by *Rhizobium*, but not by *Ochrobactrum* or *Sinorhizobium*, harbouring a cucumopine Ri plasmid. *Plant Pathol.* 54: 799–805.
- Weller, S.A., Stead, D.E. and Young, J.P.W. (2006). Recurrent outbreaks of root mat in cucumber and tomato are associated with a monomorphic, cucumopine, Ri-plasmid harboured by various *Alphaproteobacteria*. *FEMS Microbiol. Lett.* 258: 136–143.
- Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martínez-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.