

ニンジンこぶ病菌 *Rhizobacter dauci*

河原崎 秀 志

公益財団法人 農業・環境・健康研究所

1. はじめに

ニンジンこぶ病は 1980 年代に青森県ではじめて確認され (桑田・後藤, 1986, 1987), その後 2004 年に静岡県でも発生が認められた (河原崎ら, 2006). 罹病したニンジンの根系にはカルス状のこぶが形成され, 可食部の肥大根に奇形を生じて外観品質を著しく低下させる. 被害が激しい場合は良品の生産がほとんどできないため, 経済的被害が極めて大きい. 本病は病徴の類似性から, 根こぶ線虫病や根頭がんしゅ病とみなされていた経緯がある (及川ら, 1990 ; 桑田・岩谷, 2007).

本病の病原細菌の学名ははじめ *Rhizobacter daucus* とされた (Goto and Kuwata, 1988) が, ラテン語文法上の理由から *R. dauci* に訂正された (Young *et al.*, 1991). 本菌はニンジン以外の作物や雑草からも分離され, 宿主範囲も広いことから, 環境中に広く分布しているものと考えられる (河原崎ら, 2013).

本マニュアルではニンジンこぶ病菌 *Rhizobacter dauci* Goto and Kuwata 1988 の分類, 同定, 病徴と標徴, 宿主範囲, 分離・培養・保存法, 接種法について紹介する.

2. 分類

当初, *R. dauci* は主に細菌学的な諸性質に基づき, *Pseudomonadaceae* 科に所属すると考えられた. しかし, *Pseudomonas* 属, *Xanthomonas* 属, *Frateria* 属とも多くの性質で異なることから, *Rhizobacter* 属が新たに創設され, 1 属 1 種の細菌として記載された (Goto and Kuwata, 1988). 本菌は *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 第 2 版 (Goto, 2005) では, *Pseudomonadaceae* 科が所属する *Gammaproteobacteria* 綱 *Pseudomonadales* 目に整理されたが, 分子系統学的検討は行われていなかった. その後, 16S rDNA 塩基配列に基づく分子系統解析の結果, *R. dauci* は *Betaproteobacteria* 綱 *Burkholderiales* 目に所属する細菌であることが示された (河原崎ら, 2008 ; Kawarazaki *et al.*, 2009).

一方, Stackebrandt *et al.* (2008) は硬水の小川から分離された *Methylibium subsaxonicum* と関連する細菌の分子系統解析を行ったところ, *R. dauci* が *Methylibium* 属の細菌と同じクレード内に配置され, 土壌細菌 *Methylibium fulvum* との相同性が 99.5% を示したことから, これらの細菌について分類学的検討が必要であると主張した. その後, 彼らは分子系統解析および化学分類学的な解析の結果から, *Methylibium fulvum* を *Rhizobacter* 属に転属することを提案している (Stackebrandt *et al.*, 2009).

3. 各種の性状と同定

1) 培養性状

R. dauci の集落は, DPPG 寒天培地 (後述) 上では乳白色, 蠟状で硬く, 中央が盛り上がり, 発達すると皺を生じる. 培地表面に強く張り付くため, 発達した集落は白金耳でかきとることが困難であり, 水には容易に懸濁しない. 本菌の wild type の集落は以上に記したような蠟状の rough 型 (図 1-a) であるが, 培地上で容易に集落変異を起こし, 粘質の smooth 型 (図 1-b), 流動性の fluid 型 (図 1-c), あるいはこれらの中間的

Hideshi Kawarazaki [Institute for Agriculture, Medicine, and the Environment]

Causal agent of carrot bacterial gall, *Rhizobacter dauci*. MAFF Microorganism Genetic Resources Manual No.35 (2014)

本稿で紹介された情報には, 平成 25 年度ジーンバンク事業外部委託課題「ジーンバンク所蔵のニンジンこぶ病菌 *Rhizobacter dauci* の培養特性の評価と取扱方法の確立」で得られた成果が含まれている.

な集落型になる。なお、集落変異しても病原性に変化はない。

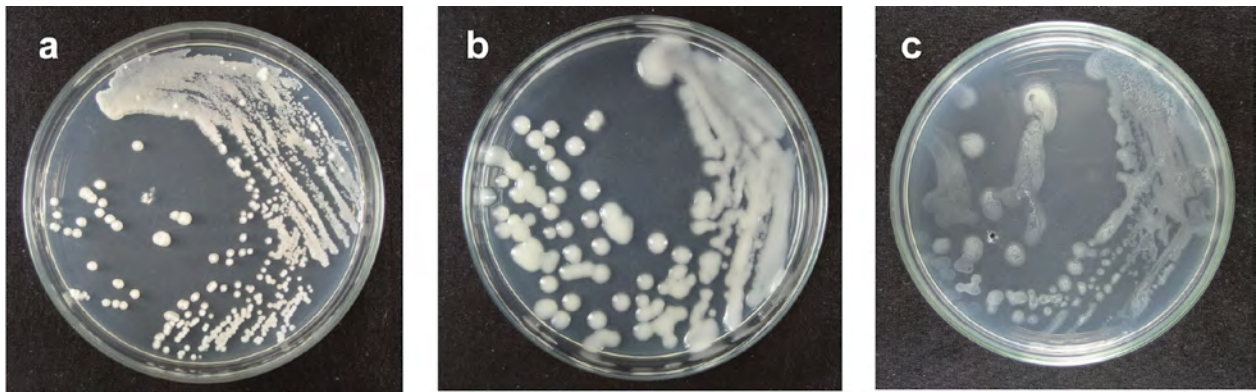


図 1. DPPG 寒天培地上における *R. dauci* strain O1 (MAFF 212041) の集落
a : rough 型, b : smooth 型, c : fluid 型. [河原崎ら (2013) を改変]

2) 細菌学的性質

R. dauci はグラム陰性、好気性で、莢膜を形成し、真直ぐかやや湾曲した桿菌で、大きさは $2.1 \sim 2.5 \times 0.9 \sim 1.3 \mu\text{m}$ である。運動性のある菌体は通常稀で、極鞭毛または側鞭毛あるいはその両者を持ち、ポリ 3- ヒドロキシ酪酸顆粒を集積し、キノンは Q8 である (Goto and Kuwata, 1988)。主な細菌学的性質を表 1 に示した。

表 1. *R. dauci* の主な細菌学的性質

陽性	ニンジンに対する病原性 (こぶ形成)、球状の菌膜形成、OF 試験 (O)、PHB の集積、オキシダーゼ、カタラーゼ、CMC の加水分解、ペクチンの溶解、テンブンの溶解、ツイーン80の加水分解、エスクリンの加水分解、レシチナーゼ、ウレアーゼ、利用性 (グルコース、フルクトース、ガラクトース、ラクトース、スクロース、デキストリン、マルトース、キシロース、マンノース、イノシトール、ソルビトール、グルコン酸)
陰性	グラム反応、チロシナーゼ、利用性 (トレハロース、クエン酸)

[河原崎ら (2012) を改変]

3) 分子系統解析

R. dauci の集落は蠟状で硬く溶液に懸濁しにくいいため、ゲノム DNA 抽出にあたっては前処理が必要である。供試菌を後述の DPPG または DYP 寒天の平板培地に画線して 25°C で 2 ~ 3 日間培養する。生育した集落をかきとって 1.5 ml マイクロチューブに入れ、少量の抽出用バッファーとともにホモジナイザーペッスルで磨砕する。その後は Zhu *et al.* (1993) のベンジルクロライドを用いた方法で抽出操作を行う。16S rDNA 増幅用プライマーは fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') と rD2 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') を用いる。PCR 増幅反応の条件は [94°C 5 分, (94°C 1 分, 58°C 1 分, 72°C 1 分) \times 30 サイクル, 72°C 7 分] で行う。PCR 産物を精製後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定して系統解析を行う (河原崎ら, 2012)。

4. 病徴・標徴および宿主範囲

1) 病徴と標徴

R. dauci によるニンジンこぶ病はニンジンの生育初期から認められ、幼苗の主根先端部や皮目に直径 1 mm 前後の微小なこぶが形成される (図 2-a, b)。こぶはニンジンの生育に伴って発達し、数 mm から最大 2 cm 程度までになる (図 2-c, d)。肥大根の皮目に沿って帯状にこぶが形成される場合もある (図 2-e)。こぶの表面は淡褐色粗雑であり、表面円滑なネコブセンチュウのこぶ (図 2-f) とは外見上区別できる。こぶが形成さ

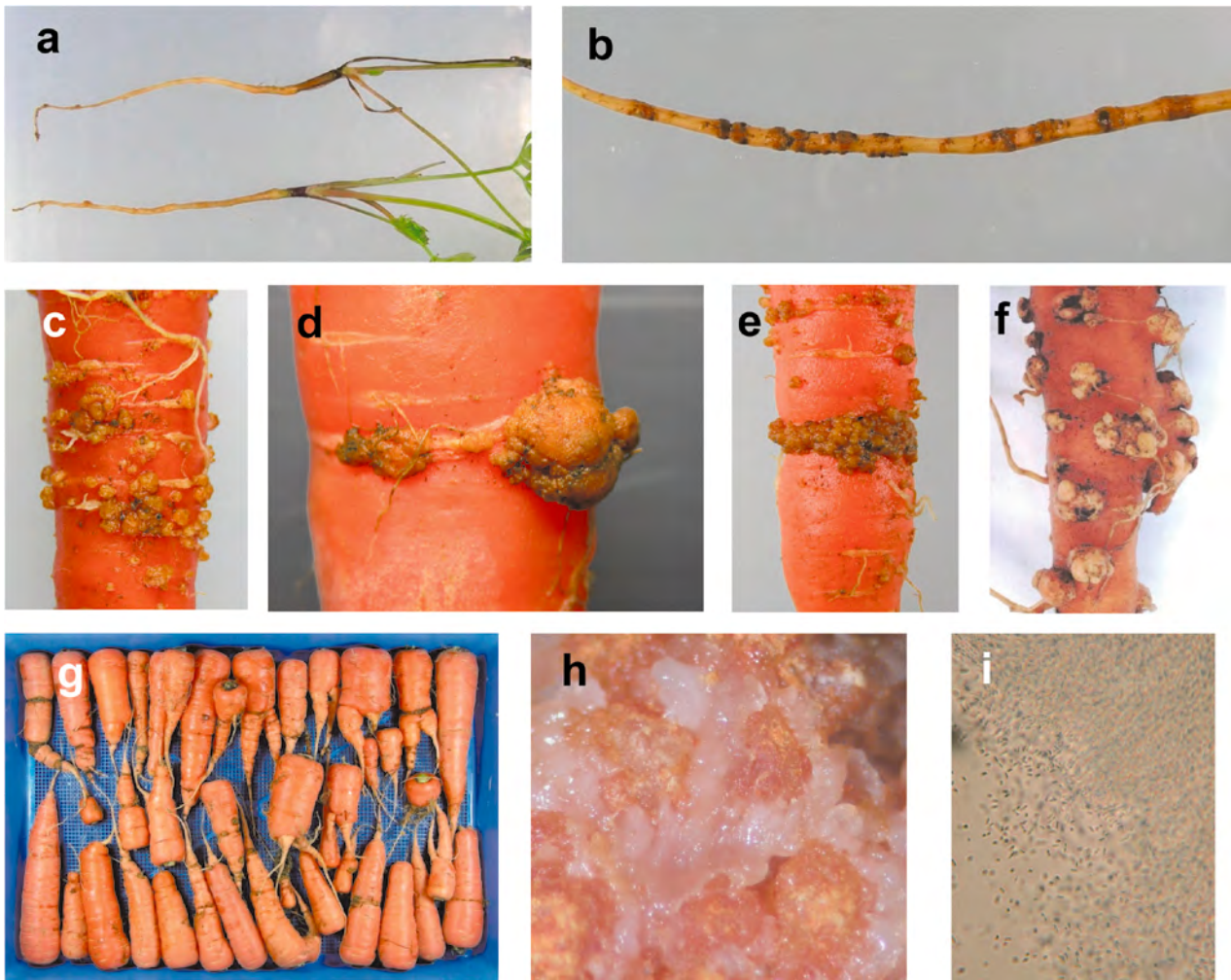


図 2. ニンジンこぶ病の病徴と標徴

a : 播種後 45 日目の幼苗の主根先端部に形成された微小こぶ, b : 播種後 45 日目の幼苗の主根皮目部に形成された微小こぶ, c : 収穫期の肥大根に形成された小型のこぶ, d : 収穫期の肥大根に形成された大型のこぶ, e : 収穫期の肥大根皮目部に帯状に形成されたこぶ, f : ニンジン根こぶ線虫病の病徴, g : 本病多発圃場で収穫されたニンジン, h : こぶ表面に認められる細菌集団 (乳白色の粘塊), i : 細菌集団の光学顕微鏡像.
 [河原崎ら (2013) を改変]

れた部分は正常な根の肥大が阻害され、くびれ、曲り、寸づまりなどの奇形を生じる (図 2-g)。こぶ表面にはしばしば乳白色蠟状または粘塊状の細菌集団が認められ、本病を診断する上で重要な標徴となる (図 2-h, i)。

2) 宿主範囲

ニンジン以外の植物ではトマト、キャベツ、ホトケノザ、オオイヌノフグリ、カラシナ、オオナズナ、スカシタゴボウ、ヒメオドリコソウ、タチイヌノフグリで自然発病が認められている (Kawarazaki *et al.*, 2009 ; 河原崎ら, 2012)。ニンジンこぶ病多発圃場で栽培した作物 7 科 20 種のうち、4 科 9 種が発病し、人工接種では 24 科 77 種のうち、20 科 46 種の植物で発病が確認されている (表 2)。

5. 分離・培養・保存法

1) 培地

R. dauci の分離・培養に用いる培地を以下に示す。

(1) 10 倍希釈したジャガイモ・ペプトン・グルコース (DPPG) 寒天培地 (Goto and Kuwata, 1988)

PDA (Potato Dextrose Agar, Difco Laboratories) 3.9 g, ペプトン 1 g, グルコース 8 g, 寒天 13.5 g, 蒸留水 1000 ml, pH 6.8.

表 2. *R. dauci* O1 (MAFF 212041) の人工接種による各種植物の発病

発病植物	トマト*, ピーマン, ジャガイモ, ナス, インゲンマメ, ササゲ, ダイズ, アズキ, クロタラリア*, クリムソンクローバ, アルファルファ, セスバニア, ルピナス, キュウリ*, メロン*, トウガン, ニガウリ* ^{a)} , コマツナ*, カブ*, ダイコン*, カリフラワー*, ルッコラ*, ブロッコリー*, スカシタゴボウ, シュンギク, アスター, コスモス, ヒマワリ*, コリウス*, ローザマリー, ヒメオドリコソウ, ヨウサイ, アサガオ, ホウレンソウ, オクラ*, ゴマ*, コリアンダー*, モロヘイヤ, ホウセンカ*, ナスタチューム, タチイヌノフグリ*, オシロイバナ, ルリトウワタ*, アマランサス*, デルフィニウム, サトイモ ^{b)}
非発病植物	タバコ, エンドウ, ラッカセイ, ソラマメ, スイカ, カボチャ, ズッキーニ, ユウガオ, ヘチマ, キャベツ, ゴボウ, シソ, メボウキ, ラベンダー, サルビア, サツマイモ, ルコウソウ, フダンソウ, テンサイ, キンギョソウ, ツルムラサキ, ケイトウ, ポーチュラカ, タマネギ, アスパラガス, トウモロコシ, コムギ, エンバク, ライムギ ^{a)} , オオムギ ^{a)} , ギニアグラス

* は多数のこぶ形成が認められた植物を示す。a) は茎, b) は塊茎にこぶ形成 (いずれも根には非形成)。
〔河原崎ら (2012) を改変〕

(2) ペプトン・グリセリン (PG) 寒天培地

ペプトン 1 g, グリセリン 5 g, 1% ブロムクレゾールグリーン水溶液 2 ml, 寒天 15 g, 蒸留水 1000 ml, pH 6.8.

(3) 10 倍希釈した酵母エキス・ペプトン (DYP) 寒天培地

酵母エキス 5 g, ペプトン 1 g, 寒天 15 g, 蒸留水 1000 ml, pH 6.8.

2) 分離法

R. dauci は宿主植物根のこぶ表面に局在しているため、表面殺菌せずにこぶ組織を火炎滅菌したメスで切り取り、滅菌水中ですりつぶして懸濁液とする。こぶ表面に乳白色の細菌粘塊が認められる場合は、これを火炎滅菌した針先でかきとって滅菌水に懸濁させる。懸濁液 1 白金耳を DPPG 寒天培地の平板に画線し、25°C で培養する。3 ~ 4 日後には直径 1 mm 程度の乳白色で盛り上がった集落が生育する。

こぶ表面には *R. dauci* 以外の雑菌も混在しており、これらが培地上で優先すると培地が酸性化し、*R. dauci* の生育が抑制されて集落が全く発育してこない場合がある。このような時はこぶ組織を磨砕せず、以下に示す「徒手切片法」(桑田・岩谷, 2007) により懸濁液を調製すると雑菌が少なく分離効率がよい。すなわち、こぶ組織を火炎滅菌したカミソリまたはメスを用いて薄い切片にし、これを滅菌水中に浸漬し、目的細菌を漏出させて懸濁液を調製する。以後の操作は前段と同じである。

なお、PG 寒天培地を用いると雑菌の増殖に伴う培地の酸性化が起きにくい。培地の酸性化は添加したブロムクレゾールグリーンの黄変により確認できる。

3) 保存法

DPPG 寒天培地は *R. dauci* の特徴的な集落を発達させ、他菌との区別が容易になることから、分離用培地としては有用である。しかし、本培地上では *R. dauci* が早期に継代培養不能になる問題がある。本培地にリン酸緩衝液 (pH 6.8, 最終濃度 10 ~ 50 mM) または炭酸カルシウム (4%) を加えると継代培養不能にならずに長く保存できる (河原崎ら, 2009)。

薄い (0.01% 程度の) 酵母エキスの入った試験管に接種し、25°C で 1 ~ 2 日間培養後に 4°C で保存することも可能である。本菌は 4°C でもわずかずつ生育し、試験管壁面に微小な集落を形成する。培地の栄養濃度が高いと保存中に集落変異を起しやすいため、wild type の集落性状を維持したい場合はなるべく濃度の低い培地を用いる。

分散媒 (スキムミルク 10%, グルタミン酸ナトリウム 1%) に本菌を懸濁後、凍結保存することも可能である。長期間の保存のためには凍結乾燥保存法 (森地ら, 1977) を行う。

6. 接種法

供試菌を DYP 寒天培地の斜面で 25℃, 2 日間培養する. 滅菌水 10 ml を加え, 集落を白金耳で擦って懸濁させ, 接種用の菌液 (菌濃度: $\sim 10^8$ cfu/ml) とする. 発達した蠟状の集落は水にほとんど懸濁しないが, 培養 2 日目までの若い集落では比較的懸濁しやすい.

硬質赤玉土 (小粒) をポットに充填し, 被検植物を播種してハイポネックス 1000 倍液を灌水して育成する (図 3-a). 株もとの土を除去して根を露出させ, 割り箸の先端に固定した紙やすりで軽く擦って傷を付け (図 3-b), 菌液をパスツールピペットで流しかけてから除去した土を戻す (図 3-c,d). 4 週間生育させた後にポットから根を取り出してこぶ形成の有無を観察する.



図 3. *R. dauci* の接種方法

a: ポットに被検植物の種子を播種して育成する, b: 株もとの土を除去して根を露出させ, 紙やすりで擦って傷を付ける, c: 菌液をパスツールピペットで流しかける, d: 除去した土をもとに戻す.

7. 引用文献

- Goto, M. and Kuwata, H. (1988). *Rhizobacter daucus* gen. nov., sp. nov., the causal agent of carrot bacterial gall. Int. J. Syst. Bacteriol. 38: 233-239.
- Goto, M. (2005). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd ed, vol. 2, part B. pp. 404-406. Springer, USA.
- 河原崎秀志・奈良吉主・勝倉光徳・横田克長・名倉かおり・川田宏史・木嶋利男・瀧川雄一・後藤正夫 (2006). ニンジンおよび数種の雑草に認められたこぶ病について. 日植病報 72: 314 (講要).
- 河原崎秀志・後藤正夫・加藤孝太郎・木嶋利男・川田宏史・山本圭祐・瀧川雄一 (2008). ニンジンおよび自生植物から分離されたニンジンこぶ病菌の同定および分類学的位置について. 日植病報 74: 255 (講要).
- 河原崎秀志・後藤正夫・田渕浩康・加藤孝太郎・木嶋利男・瀧川雄一 (2009). ニンジンこぶ病菌 *Rhizobacter dauci* が培養不能になる要因. 日植病報 75: 210 (講要).
- Kawarazaki, H., Goto, M., Kato, K., Kijima, T., Kawada, H., Yamamoto, K. and Takikawa, Y. (2009). Identification of a bacterium isolated from galls on carrot and weeds. J. Gen. Plant Pathol. 75: 235-240.
- 河原崎秀志・後藤正夫・加藤孝太郎・木嶋利男・瀧川雄一 (2012). ニンジンこぶ病菌 *Rhizobacter dauci* の各種植物からの分離と宿主範囲. 日植病報 78: 293-300.
- 河原崎秀志・後藤正夫・加藤孝太郎・木嶋利男・瀧川雄一 (2013). *Rhizobacter dauci* によるニンジンこぶ病. 植物防疫 67: 401-405.
- 桑田博隆・後藤正夫 (1986). ニンジンの新しい細菌病こぶ病 (新称) について 1. 日植病報 52: 505 (講要).
- 桑田博隆・後藤正夫 (1987). ニンジンこぶ病菌の分類, 生態及び防除. 日本植物病理学会第 14 回植物細菌病談話会講演要旨集: 14-22.
- 桑田博隆・岩谷香緒里 (2007). ニンジンこぶ病菌 *Rhizobacter dauci* の効率的な分離培養法. 北日本病虫研報 58: 34-37.
- 森地敏樹・山里一英・鈴木正敏・高野光男・根井外喜男 (1977). 凍結乾燥保存法. 微生物の保存法, 根井外喜男 編, pp. 20-57. 東京大学出版会.
- 及川 健・今井照規・桑田博隆・島田慶世・千葉順逸 (1990). ニンジンこぶ病の発生要因及び薬剤

- 防除. 青森農試研報 31: 29-41.
- Stackebrandt, E., Frühling, A., Cousin, S., Brambilla, E., Lünsdorf, H., and Verborg, S. (2008). *Methylibium subsaxonicum* spec. nov., a *Betaproteobacterium* isolated from a hardwater rivulet. *Curr. Microbiol.* 56: 298-305.
- Stackebrandt, E., Verborg, S., Frühling, A., Busse, H. J., and Tindall, B. J. (2009). Dissection of the genus *Methylibium*: reclassification of *Methylibium fulvum* as *Rhizobacter fulvus* comb. nov., *Methylibium aquaticum* as *Piscinibacter aquaticus* gen. nov., comb. nov. and *Methylibium subsaxonicum* as *Rivibacter subsaxonicus* gen. nov., comb. nov. and emended descriptions of the genera *Rhizobacter* and *Methylibium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 2552-2560.
- Young, J. M., Bradbury, J. F., Davis, R. E., Dickey, R. S., Ercolani, G. L., Hayward, A. C., and Vidaver, A. K. (1991). Nomenclatural revisions of plant pathogenic bacteria and list of names 1980-1988. *Rev. Pl. Pathol.* 70: 211-221.
- Zhu, H., Qu, E., and Zhu, L. H. (1993). Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Res.* 21: 5279-5280.

別表 1. 農業生物資源ジェンバンクが保存しているニンジンこぶ病菌

MAFF 番号	株名	集落型 ^{a)}	分離源	採集地	文献 (注を参照)
211679	H2	S	ニンジン	青森 (南津軽郡平賀町)	b, c
211680	H3	R	ニンジン	青森 (南津軽郡平賀町)	b, c
211681	H4	R	ニンジン	青森 (南津軽郡平賀町)	b, c
211682 (基準株)	H6	R	ニンジン	青森 (南津軽郡平賀町)	b, c, d
211683	H8	R	ニンジン	青森 (南津軽郡平賀町)	b, c
211684	H9	R	ニンジン	青森 (南津軽郡平賀町)	b, c
211685	N1	S	ニンジン	青森 (黒石市)	b, c
211686	N2	R	ニンジン	青森 (黒石市)	b, c, d
211687	N3	R	ニンジン	青森 (黒石市)	b, c
211688	N4	R	ニンジン	青森 (黒石市)	b, c
211689	H21	R	ニンジン	青森 (平川市)	c
211690	H25	R	ニンジン	青森 (平川市)	c
211691	A16	R	ニンジン	青森 (黒石市)	c
211692	A17	R	ニンジン	青森 (黒石市)	c
211693	R11	S	ニンジン	青森 (六戸町犬落瀬市)	c
211694	R12	R	ニンジン	青森 (六戸町犬落瀬市)	c
212041	O1	R	ニンジン	静岡 (伊豆の国市)	c, d

a) R: rough 型, S: smooth 型.

b) Goto and Kuwata (1988).

c) 桑田・岩谷 (2007).

d) Kawarazaki *et al.* (2009).

生 物 研 資 料

平成 26 年 12 月

December, 2014

微生物遺伝資源利用マニュアル (35)

2014 年 12 月 24 日 印刷

2014 年 12 月 25 日 発行

編集兼
発行者 独立行政法人 農業生物資源研究所

National Institute of Agrobiological Sciences

〒 305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2

ニンジンこぶ病菌 *Rhizobacter dauci*

河原崎 秀 志

公益財団法人 農業・環境・健康研究所

目 次

1. はじめに	1
2. 分類	1
3. 各種の性状と同定	1
4. 病徴・標徴および宿主範囲	2
5. 分離・培養・保存法	3
6. 接種法	5
7. 引用文献	5
別表 1. 農業生物資源ジェンバンクが保存しているニンジンこぶ病菌	7

本稿で紹介された情報には、平成 25 年度ジェンバンク事業外部委託課題「ジェンバンク所蔵のニンジンこぶ病菌 *Rhizobacter dauci* の培養特性の評価と取扱方法の確立」で得られた成果が含まれている。

2014 年 12 月

編集兼発行者 独立行政法人 農業生物資源研究所



National Institute of Agrobiological Sciences