

I-2. 果樹の根頭がんしゅ病菌およびブドウウイルス 病様症状の探索収集および特性解明

果樹試験場 安芸津支場 病害研究室

今 田 準
澤 田 宏 之

1. 目的

近年、各地のブドウ産地で根頭がんしゅ病が増加傾向にある。病原細菌である *Agrobacterium tumefaciens* には、細菌学的性質や DNA 相同性などの性状で区別できる3つの変種が存在し、それぞれ biovar として類別されているが、諸外国で行われた発生調査の結果、ブドウに病気を引き起こすのは biovar 3が多いことが認められている。しかし、biovar 3に関しては病原学的研究が遅れており、他の biovar との関係についても十分明らかにされていない。そのため、biovar 3に特異的な性状を利用した迅速な検出、識別技術が確立されておらず、本菌の生態学的研究や、母樹、苗木の保毒検定を行ううえでの障害となっている。

今回の探索、収集では、ブドウ根頭がんしゅ病の発生が認められているブドウ産地で病組織を採集し、病原細菌を分離する。また、それと並行してブドウ以外の植物由来の菌株も参考菌として収集する。そして、それらの間で各種性状に関する詳細な比較を行い、biovar 3の検出、識別技術確立に必要な特異的な性状を選び出すための基礎資料とする。

また、わが国のブドウでは、近年、味無果病、萎縮病、モザイク病などウイルス病による被害が問題化している。この他に巨峰の赤熟れ、発芽時のねむり症状、新葉のまだら模様、花振りなどのウイルス病と思われる症状が各地で多く発生している。当研究室では、現在まで主に西日本に発生するウイルス病様症状について、その原因究明に当たってきたが、今回は調査地域を広げて東日本に発生するウイルス病様症状を収集し、それらの伝染性の確認、既知ウイルスの保毒状況、病原の単離・同定を行い、ウイルス株の収集と保存を図ることを目的とする。

なお、根頭がんしゅ病菌の探索は澤田宏之が、ウイルス病様症状株は今田準が担当した。

2. 経過

- 1) ブドウ根頭がんしゅ病菌分離用サンプルを以下のように採取した(表1, 図1)。
 - a) 6月21日 岩手県園芸試験場大迫試験地(岩手県稗貫郡大迫町大迫9-63)場内で、ブドウ(高墨, 勝宝, 紅伊豆)の接ぎ木部付近に形成されていた乳白色~淡褐色で不整形のがんしゅ組織を、各樹から1つずつ削り取って採集した。
 - b) 6月22日 青森県三戸郡南部町大字小向字正寿寺のある一般栽培ほ場では、栽植されているブドウ(キャンベル・アーリー)のほぼ全樹が根頭がんしゅ病に罹り病していた。そのうちの1樹

から、接ぎ木部付近の大きく肥大した不整形、暗褐色のがんしゅ組織を削り取って採集した。

- c) 6月22日 青森県三戸郡三戸町大字同心町同心町でハウス栽培されていたブドウ（紅伊豆）の、棚上の2年生枝に形成されていた乳白色であわつぶ状のがんしゅ組織を採集した。
 - d) 6月23日 山形県立園芸試験場（寒河江市大字島字島南423）場内のブドウ（巨峰）の接ぎ木部付近に形成されていた乳白色～淡褐色であわつぶ状のがんしゅ組織を採集した。また、同場内でオウトウ（ナポレオン）の地際部付近に形成されていた黒褐色で不整形のがんしゅ組織を削り取った。
 - e) 6月23日 山形県寒河江市高屋のハウス栽培のバラの地際部付近に形成されていた乳白色で半球状のがんしゅを採集した。
- 2) ブドウウイルス病様症状の採集経過は以下のとおりである（表2，図1）。
- a) 6月21日 岩手県園芸試験場大迫試験地内の紅伊豆に、奇形を伴った新葉のモザイク症状及び節間短縮を示す樹から新葉及び穂木を採集した。
 - b) 6月22日 弘前大学内ほ場のスチューベン及び黒石市の一般栽培園のスチューベン、アーバナにモザイク症状を示す樹より新葉及び穂木を採集した。
 - c) 6月23日 秋田県若美町の一般栽培園のキャンベル・アーリーに奇形を伴った新葉のモザイク症状を、また、秋田県果樹試験場内ほ場のバッファローにモザイク症状、レッド・クイーンに奇形を伴った新葉のモザイク症状を示す樹から新葉及び穂木を採集した。

3. 収集成果

1) 根頭がんしゅ病菌

(1)方法

採集した根頭がんしゅ病り病材料から新鮮ながんしゅ組織を切り出し、ペプトン水中でできるだけ磨碎して懸濁液を作った。これを King B 培地に画線培養し、1 病樹当たり 2～3 菌株の細菌を分離した。分離した菌株は、トマト（ポンテローザ）に単針付傷接種して 23℃ の温室で 21 日間にわたって経過を観察し、病原性が確認できたものから 1 菌株を選んで代表菌とした。

(2)結果

採集したり病材料から 15 菌株の病原細菌を分離することができた（表 3）。分離した 15 菌株は、トマトに接種後 5～7 日目頃から病徴をあらわした。はじめは乳白色の小さな隆起として認められたがんしゅは、時間の経過と共に肥大し、14 日目以降には表面が粗造となり淡褐色を帯びた。21 日目にはいずれの菌株でもがんしゅ長径が 3 mm 以上となり、菌株間で病原性の強弱や生じる病徴に差は認められなかった。

分離菌株の細菌学的性質を調査した結果、いずれの菌株もグラム陰性、好気性で周毛を有し、グルコース含有培地上で菌体外多糖質を旺盛に産生した。また、いずれの供試培地上でもガスや色素を産生しなかった。以上の性質と、トマトに対してがんしゅを形成することから、分離菌株は全て *Agrobacterium tumefaciens* であることが分かった。

ブドウから分離された 9 菌株（G-Ag-57～65）は、3-ケトーラクトースの生成、エスクリンの分

解 (Sneath), 35℃での生育, L-チロシンの利用, ズルシットからの酸の産生が陰性, 生長素要求性, L-酒石酸からのアルカリ産生が陽性, リトマスミルク培養では培地の青変とリトマスの還元が認められることから, いずれも biovar 3 であることが分かった。オウトウからの分離菌 (Ch-Ag-2, 3) とバラ分離菌 (Ro-Ag-10~13) は, 3-ケトーラクトースの生成, 35℃での生育が陰性, エスクリンの分解 (Sneath), 生長素要求性, L-チロシンの利用, ズルシットからの酸産生, L-酒石酸からのアルカリ産生が陽性, リトマスミルク培養では培地の赤変と凝固が認められることから, biovar 2 であることが明らかとなった (表4, 5)。

2) ブドウウイルス病様症状

(1)方法

ウイルス病様症状の発生状況を岩手, 青森, 秋田の各県下のブドウ園7か所において新葉, 枝幹について調査を行い, 新葉, 枝幹に症状がみられる樹から新葉及び穂木を採集し, 接ぎ木伝染性及びエライザ法で既知ウイルスの保毒状況を調べた。

- a) 接ぎ木伝染性を調べるため, 収集株の保存を兼ねてブドウ属検定植物 St. George 苗に緑枝接ぎ接種を行った。また, 新葉を用いて10種類の草本植物 (アカザ, キノア, センニチコウ, タバコ5種類, *N. glutinosa*, フィザリス) にカーボランダム法により汁液接種を行った。
- b) 収集株の全てについて, エライザ法によりブドウファシリーフウイルス (GFV), ブドウから分離・同定されている tobacco necrosis virus (TNV) 及びポティウイルスの保毒の有無を調べた。また, 各症状発現樹の新葉又は緑枝接ぎ接種した St. George の新葉を用いて常法により DN 試料を作製し, 電顕観察により病原の探索を行った。

(2)結果

St. George 苗に緑枝接ぎ接種した結果 (表6), 弘前大学と黒石市のスチューベン及び秋田県若美町のキャンベル・アーリー-2株の計4株は, St. George の新葉にモザイク症状を生じた。これらのモザイク症状はブドウフレックによる St. George の病徴とは明らかに異なり, また, エライザ検定によっても GFV, TNV, ポティウイルスとも無関係であったことから, 上記4株のウイルス病様症状は, ブドウフレック, GFV, TNV, ポティウイルスとは異なる接ぎ木伝染性の病因を保毒していることが明らかになった (表6)。その他のウイルス病様症状については, 秋田県試天王分場のパファローを除きブドウフレックに感染していた。

ウイルス病様症状発現樹又はそれを緑枝接ぎ接種した St. George 苗の新葉を用いて10種類の草本植物に汁液接種を5回行ったが, いずれのウイルス症状も供試した草本植物に反応しなかった。また, これらの DN 試料を電顕観察した結果, いずれにもウイルス様の粒子は認められなかった。

4. 所感

根頭がんしゅ病菌の3つの biovar のうち, 今回の探索, 収集ではブドウ, バラ, オウトウから biovar 2と3を分離することができたが, biovar 1に相当するものは認められなかった。わが国では, 花卉類根頭がんしゅ病から biovar 1の検出例があるものの, 果樹類では今のところ報告がない。また, わが国ではブドウから biovar 3以外の菌が分離されたとの報告もないことから, 今後とも更に発生

調査を続けて病原学的研究を行う必要がある。

今回の探索で収集したウイルス病様症状のうち、4種の症状の接ぎ木伝染性が確認された。しかし、これらの症状発現株からの病原の確認や単離にはまだ成功しておらず、さらに供試草本植物を増やして病原の単離を試みる必要がある。

根頭がんしゅ病菌及びウイルス病様症状株の収集には、現地関係者と密接な連絡を取り、異常症状が発見された場合、すみやかに連絡してもらい体制を確立しておく必要がある。そのためにも、探索・収集に必要な旅費をセンターで保留しておき、必要に応じて配分するようにしてほしい。

5. 資料

表1. ブドウ等の根頭がんしゅ病り病サンプル採集行動日程表

月 日	旅 程	行 動 内 容
6月20日	安芸津町～盛岡市	移動
21日	盛岡市～大迫町	岩手県園芸試験場大迫試験地場内でブドウ根頭がんしゅ病り病組織を採集。
	～八戸町	移動
22日	八戸町～五戸町	青森県三戸郡南部町でブドウ根頭がんしゅ病り病組織を採集。
		青森県三戸郡三戸町でブドウ根頭がんしゅ病り病組織を採集。
	～山形市	移動
23日	山形市～寒河江市	山形県立園芸試験場場内でブドウおよびオウトウのがんしゅ組織を採集。
		山形県寒河江市でバラ根頭がんしゅ病り病組織を採集。
	～安芸津町	移動

表2. ブドウウイルス病様症状サンプル採集行動日程表

月 日	旅 程	行 動 内 容
6月20日	安芸津町～盛岡市	移動
21日	盛岡市～大迫町	岩手園試大迫試験地内のブドウ園で調査・収集
	～弘前市	移動
22日	弘前市～黒石市	弘前大学及び黒石市内のブドウ園で調査・収集
	～秋田市	移動
23日	秋田市～若美町～天王町	若美町及び秋田果試天王分場のブドウ園で調査・収集
	～安芸津町	移動



図1 探索収集地域と主な収集地点

表3. 収集したブドウ等根頭がんしゅ病菌

収集番号	G-Ag-57 58 59	60	61	62 63 64 65	Ch-Ag-2 3	Ro-Ag-10 11 12 13
原材料	ブドウがんしゅ	ブドウ がんしゅ	ブドウ がんしゅ	ブドウ がんしゅ	オウトウ がんしゅ	バラがんしゅ
採集月日	6.21	6.22	6.22	6.23	6.23	6.23
採集地	岩手県稗貫郡 大迫町	青森県 南部町	青森県 三戸町	山形県 寒河江市	山形県 寒河江市	山形県寒河江市
採集した微生物 の属、種名	<i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i>	<i>A. tume-</i> <i>faciens</i>	<i>A. tume-</i> <i>faciens</i>	<i>A. tume-</i> <i>faciens</i>	<i>A. tume-</i> <i>faciens</i>	<i>A. tumefaciens</i>

表4. 根頭がんしゅ病菌の特性評価

性 質	収集番号	G-A-57 58	Ch-Ag-2	Ro-Ag-10
		59 60 61 62 63 64 65	3	11 12 13
トマトに対するがんしゅ形成		+	+	+
3-ケトーラクトースの生成		-	-	-
エスクリンの分解 (Dye)		+	+	+
エスクリンの分解 (Sneath)		-	+	+
アルブチンの分解		-	d	+
β -ガラクトシダーゼ活性		+	+	+
硝酸塩の還元性		-	-	-
硝酸呼吸		-	-	-
アルギニン加水分解 (Thornley)		+	-	-
アルギニン加水分解 (Moeller)		-	-	-
硫化水素の産生		-	-	-
尿素試験		+	+	+
オキシダーゼ活性 (PPGA)		+	-	-
生長素要求性		+	+	+
2% NaCl 下での生育		d	-	-
リトマスミルク培養		KR	AC	AC
ホスファターゼ活性		-	+	+
Nile Blue 試験		-	-	-
クエン酸鉄アンモニウム での薄膜の形成		-	-	-
30C での生育		d	-	-
35C での生育		-	-	-
クエン酸の利用		+	+	+
L-チロシンの利用		-	+	+
Schroth et al. 培地での生育		-	+	-
New & Kerr 培地での生育		-	+	+
酸の産生:				
ズルシット		-	+	+
メレジトース		-	-	d
meso- エリスリット		-	+	+
α -メチル-D-グルコシド		-	+	+
ラフィノース		+	+	+
エタノール		+	-	d
アルカリの産生:				
マロン酸		+	+	+
プロピオン酸		d	-	-
L-酒石酸		+	+	+
粘液酸		-	+	+

表 5. 収集した根頭がんしゅ病菌の biovar

収集物の種類	収集点数
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> biovar 2	6
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> biovar 3	9

表 6. ブドウウイルス病様症状の伝染性とエライザ検定

採集地	採集 年月日	品 種	症 状	St. George への反応	草本植物 への反応 ^a	エライザ 検 定 ^b
岩手園試大迫	63.6.21	紅伊豆	M, Mf, SI	F1	—	—
青森弘前大	63.6.22	スチューベン	M	M	—	—
〃 黒石市	〃	〃	M	M	—	—
〃 〃	〃	アーバナ	M	F1	—	—
秋田若美町	63.6.23	キャンベル・アーリー	M, Mf	M, Mf	—	—
〃 〃	〃	〃	M, Mf	M, Mf	—	—
〃 果試天王	〃	バッファロー	M	—	—	—
〃 〃	〃	レッド・クイーン	M, Mf	F1	—	—

^a供試草本植物：アカギ，キノア，センニチコウ，タバコ 5 種類，*N. glutinosa*，フィザリス

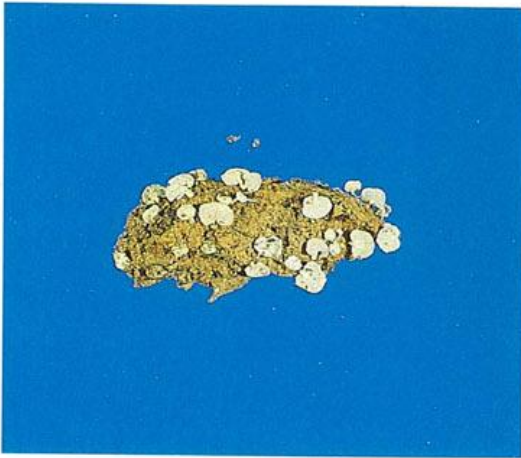
^b対象ウイルス：GFV, TNV, ブドウから分離されたポティウイルス

F1 : fleck, M : mosaic, Mf : malformation, SI : short internodes

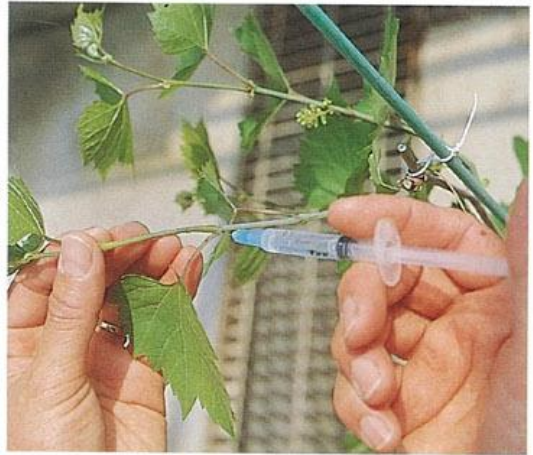
表 7. 収集したブドウウイルス病様症状株

	収集番号			
	V-1	V-2	V-3	V-4
原材料	ブドウ	ブドウ	ブドウ	ブドウ
採集月日	6.22	6.22	6.23	6.23
採集地	青森県 弘前市	青森県 黒石市	秋田県 若美町	秋田県 若美町
採集した微生物 の属，種名	未同定	未同定	未同定	未同定

微生物の探索収集プロフィール



小笠原諸島・母島の桑木山にて収集した
ヒナノウチワ



病原性確認のためのブドウ新梢（巨峰）
への単針付傷接種



ネパールの餅麴「マーチャ」の製造風景。
練った米粉を整形し、発酵させる。



ネパール国中央食品研究所の協力を得て、
収集した「マーチャ」より発酵米を調整
し、菌を分離する。