

2021年～2023年に採集した三浦半島内のダイコン黒芯症状から 分離された細菌種の判別

蓑島綾華・岡本昌広・島田涼子

The Species of *Pseudomonas* spp. Isolated from Black Heart of Japanese Radish in Miura Peninsula

Ayaka MINOSHIMA, Masahiro OKAMOTO and Ryoko SHIMADA

摘要

近年、三浦半島内の2～3月収穫のダイコンにおいて、黒芯症の発生が問題となっている。黒芯症はダイコン黒斑細菌病菌の感染により引き起こされるが、日本における本病原菌の細菌種としては、*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* および *P. cannabina* pv. *alisalensis* の2種が報告されている（日本植物病理学会 2025）。*P. cannabina* pv. *alisalensis* はエンバクにも病原性が報告されており、緑肥として前作にエンバクを栽培することにより感染を助長する可能性が示唆されている。そこで、2021～2023年に採集した黒芯症状を示すダイコン根部から51菌株を分離し、遺伝子解析および細菌学的性質の調査を行ったところ、黒斑細菌病菌である *P. syringae* pv. *maculicola* は3菌株であり、*P. cannabina* pv. *alisalensis* は分離されなかった。その他にも、多犯性の植物病原菌である *P. viridiflava* が13菌株分離された。本菌は、ダイコンへの病原性は確認されなかったが、エンバク野生種、トマトおよびキャベツには病原性が確認された。

キーワード：アブラナ科黒斑細菌病、黒芯症、細菌病害、マルチプレックスPCR、多様性

Summary

Recently, the symptoms of Black heart are observed on Japanese radish harvested from February to March in Miura Peninsula. The species of *Pseudomonas* spp. that caused Black heart of Japanese radish in Japan have been reported to be *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *P. cannabina* pv. *alisalensis*. *P. cannabina* pv. *alisalensis* caused to *Avena strigosa* Schreb. We isolated bacteria from Japanese radishes infected with Black heart disease in Miura Peninsula from 2021 to 2023 and analyzed their biological and molecular characteristics. Consequently, *P. syringae* pv. *maculicola* were isolated from the black heart samples. Moreover, *P. viridiflava* which caused many species of plants was isolated from the samples. Pathogenicity tests showed that *P. viridiflava* was not pathogenic to radish, but was pathogenic to tomato and cabbage.

Key words: Brassicaceae, Bacterial leaf spots, Bacterial Blight, *Raphanus sativus* L. var. *hortensis* Backer.

緒言

神奈川県三浦半島地域における秋冬ダイコンの作付面積は約600haであり、出荷量は県全体の約9割を占める。また当地域はダイコンの国指定産地となってい

る（三浦半島農業改良推進協議会 2025, 農林水産省 2021a, 2021b）。このように神奈川県内の重要な秋冬ダイコン産地である三浦半島地域において、ダイコン根部内の黒芯症状が現場で問題となっている。

ダイコンの黒芯症状は、根部内が黒変する症状であり、アブラナ科植物の黒斑細菌病菌である *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* および *P. cannabina* pv. *alisalensis* によって引き起こされる(竹内ら 1989, 堀之内 2010, 瀧川・高橋 2014)。どちらも根部内の症状であり、収穫時には見た目での判断が困難であるため、出荷後のクレームとなり大きな損害となる。

P. cannabina pv. *alisalensis* は、長野県においてアブラナ科作物の緑肥として栽培されるエンバク野生種(品種: ‘ヘイオーツ’)にも感染することが報告されている(石山ら 2012)。三浦半島地域では近年、緑肥としてエンバクを夏の休閑畑で栽培する事例が増えている(三浦半島農業改良推進協議会 2025)。三浦半島地域におけるダイコン黒斑細菌病菌が、エンバク野生種にも感染する *P. cannabina* pv. *alisalensis* であると、病原菌が畑の中で通年維持される可能性が考えられたため、本研究では三浦半島地域における黒芯症状に関わる菌の種類について調査した。

材料および方法

1. 菌株の採集

現地ダイコン根部内に黒芯症状を呈したサンプルを採集し、既報の希釈平板法または画線法により、単コロニーを分離した(堀江ら 2016)。単コロニーは、NA (Nutrient Agar) 培地上で 26°C 3 日間培養後、スキムミルク分散培地で -80°C に保存した。

2. 分離菌株の同定

分離菌株を NA 平板培地上で 26°C, 暗黒下で 3 日間培養後、単コロニーを滅菌したつまようじで突き、PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems) を用いて DNA を抽出した。これらを鋳型 DNA として、プライマー-63f/1387r を用いて 16S rRNA 遺伝子領域を、GoTaq Colorless Master Mix (プロメガ株式会社) を使用した PCR 法により増幅した(Marchesi et al. 1998)。PCR 産物は、電気泳動で確認後、ExoSAP-IT Express (ThermoFisher) でプライマーや dNTP を除去し、サンガー法によるダイレクトシーケンスにより、塩基配列を決定した。得られた配列は、NCBI の BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) で相同性検索を行った。

また、ダイコン種子の黒斑細菌病菌検査標準作業手順書(農研機構 2022)を参考として、マルチプレックス PCR によって *P. syringae* pv. *maculicola* および *P. cannabina* pv. *alisalensis* の判別を行った。ポジティブコントロールとして、KB211 菌株 (*P. cannabina* pv. *alisalensis*) および MAFF 302539 菌株 (*P. syringae* pv. *maculicola*) を用いた。なお、KB211 菌株は長野県野菜花き試験場より、MAFF 302539 菌株は農業生物資源ジーンバンクより分譲された菌株を使用した。

細菌学的性状の観察には、簡易同定キット API20NE (ジオメリュー) を使用した。

3. 分離菌株のダイコンに対する病原性

分離菌株の接種試験は、神奈川県農業技術センター内(神奈川県平塚市)露地圃場で行った。接種試験には、‘春宴’および‘YR 春の浦’を用い、播種は 2024 年 9 月 17 日に行った。分離菌株のうち、植物病原菌の可能性のある菌株 KPB23-30 および KPB23-31 (*P. syringae* pv. *maculicola*)、KPB23-27 および KPB23-48 (*P. viridiflava*) を供試した。PPGA (ジャガイモ・ペプトン・グルコース寒天) 斜面培地上で 26°C, 約 3 日間培養した菌株を 0.02% Tween20 を添加した滅菌水で懸濁して、約 1.0×10^8 cfu/mL の濃度に調整し、細菌懸濁液を作製した。水接種区には、滅菌したイオン交換水に 0.02% Tween20 を添加したものをを用いた。接種は、2024 年 11 月 18 日に行った。ダイコン地際部の外葉を 3 葉ずつ手で切り取り、新葉の 3 葉に 1 葉につき 3 か所ずつ針束で傷をつけた後、ダイコン 1 本につき約 10mL ずつ噴霧接種した。葉は接種後随時観察し、根部については 2025 年 2 月 25 日および 26 日に、各区 50 本中の区界を除いた 30 本ずつ収穫し、根部を縦に割って黒芯症状の有無を調査した。

4. 分離菌株の宿主範囲の検討

供試菌株には、3. と同様の菌株を使用した。供試植物には、エンバク野生種(品種: ‘ヘイオーツ’)、ブロッコリー(品種: ‘おはよう’)、トマト(品種: ‘桃太郎ピース’)、キャベツ(品種: ‘しずはま 1 号’) およびレタス(品種: ‘シスコ’)を使用した。PPGA 培地上で 26°C, 2 日間培養した菌叢を懸濁して、約 1.0×10^8 cfu/mL (エンバク野生種接種時のみ、約 7.0×10^9 cfu/mL) の細菌懸濁液を作製し、葉に針束で傷を

つけた各区3株に噴霧接種した。水接種区には、滅菌したイオン交換水に0.02%Tween20を添加したものを用了。接種後は滅菌水で濡らしたビニル袋に入れ、25℃湿潤条件に保ち、翌日に袋を取り除き、14日間病徴の有無を調査した。

結 果

1. 菌株の採集

三浦半島内の4地域7地点から、ダイコンの黒芯症状を示す20サンプルを採集した。これらのサンプルから合計で51菌株を分離した。

2. 分離菌株の同定

分離した菌株について、16S rRNA領域のシーケンス解析および細菌学的性状の観察を行った。16S rRNA領域におけるType菌株のみを指定した場合あるいは指定しない場合のBLAST検索結果から、植物病原細菌と考えられる菌株は19菌株であった(表1)。この中で、分離頻度の高かった菌種は、*P. viridiflava*であった。さらに、ダイコン黒斑細菌病菌を検出するマルチプレックスPCRを行ったところ、BLAST検索結果と同様に、3菌株(KPB23-30, KPB23-31, KPB23-32)から*P. syringae* pv. *maculicola*を示す約590bpのバンドが検出された(図1)。これらの結果から、黒芯症状を呈したダイコン根部内からは、黒斑細菌病として報告されている*P. syringae* pv. *maculicola*が分離されたが、本菌株の分離数は3菌株と全体に対する割合は低いことが明らかとなった。

3. 分離菌株のダイコンに対する病原性

KPB23-30およびKPB23-31菌株接種区では接種10日後(2024年11月28日、図2)に葉の斑点症状の初発を確認した。接種40日後(2025年1月14日)には株全体が萎凋し始め、調査時(2025年2月25日および26日、図3および4)には、ほぼすべての株が枯死した。また、どの区においても接種菌と同一の菌が葉および根部から再分離された。2品種および2菌株間での病原性の大きな差は見られなかった。KPB23-27およびKPB23-48菌株接種区、水接種区では、葉および根部に目立った病徴は見られなかった。

4. 分離菌株の宿主範囲の検討

接種した作物のうち、エンバク野生種では、KPB23-

48菌株を接種した区で傷をつけた部分からハローを伴う病斑が拡がり、葉全体が黄化した(図5C)。KPB23-27菌株では、少し病斑の拡がり観察できたが、KPB23-48菌株ほど病斑は拡がらなかった(図5B)。トマトおよびキャベツはKPB23-27およびKPB23-48菌株を接種した区で傷をつけた部分から病斑が拡がった(図5E, F, H, I)。どの区の病斑からも接種菌と同一の菌が再分離された。KPB23-30およびKPB23-31菌株を接種した4種作物は、どれも目立った病徴は見られなかった。水接種区についても病徴は見られなかった(図5A, D, G)。

考 察

2021~2023年に三浦半島地域で採集した黒芯症状を示すダイコンサンプルから分離された菌株は、ダイコン黒斑細菌病2種のうち、*P. syringae* pv. *maculicola*であった。今回の調査では、*P. cannabina* pv. *alisalensis*は分離されなかった。

また、ダイコンの黒芯症状からは、既知の黒斑細菌病菌以外にも、*P. viridiflava*が高率で分離された。*P. viridiflava*を健全なダイコンへ接種したが、病原性は確認されなかった。そのため、何らかの要因で潜伏感染をしていた可能性が考えられる。*P. viridiflava*は多犯性の病原菌であるため、宿主範囲の検討を行ったところ、エンバク野生種、トマトおよびキャベツについては病原性が認められた。そのため、*P. viridiflava*が潜伏感染したダイコンの残渣が伝染源となり、他の作物へ影響する可能性も考えられる。

今回の調査では、黒芯症状のサンプルから分離を試みたが、黒斑細菌病菌の分離率は少なかった。このことから、他の要因で同じような黒芯症状が引き起こされている可能性が示唆される。和歌山県においては、ダイコン黒斑細菌病の他に、斑点細菌病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *raphani*)や黒腐病菌(*X. campestris* pv. *campestris*)も黒芯症状を引き起こすと報告されている(和歌山県農業試験場2015)。今後は、黒斑細菌病菌以外の細菌やその他の考えられる要因にも注目して、黒芯症状の原因を調べていく必要があると考えられる。

表1 三浦半島地域で採集した菌株の同定結果

菌株番号	細菌名	Accession no. ^z	API20NE プロフィール インデックス	スクロース 利用能	マルチプレックスPCR バンドの有無
KPB23-06	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	NR_117825	0457451	—	—
KPB23-08	<i>P. viridiflava</i>	NR_117825	0457451	—	—
KPB23-09	<i>P. viridiflava</i>	NR_117825	0457451	—	—
KPB23-12	<i>P. viridiflava</i>	NR_117825	0457451	—	—
KPB23-13	<i>P. viridiflava</i>	NR_117825	0447451	—	—
KPB23-22	<i>P. viridiflava</i>	NR_117825	0457451	—	—
KPB23-25	<i>P. viridiflava</i>	NR_117825	0447451	—	—
KPB23-27	<i>P. viridiflava</i>	NR_117825	0447451	—	—
KPB23-28	<i>P. viridiflava</i>	NR_117825	0447451	—	—
KPB23-29	<i>P. viridiflava</i>	NR_117825	0447451	—	—
KPB23-30	<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	LC593620, AB023074, CP067024 ^y	0447451	+	+(約590bp)
KPB23-31	<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	LC593620, AB023074, CP067024 ^y	0447451	+	+(約590bp)
KPB23-32	<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	LC593620, AB023074, CP067024 ^y	0447451	+	+(約590bp)
KPB23-37	<i>P. allii</i> の近縁種	NR_179337, OP164746など	1457575	ND ^x	—
KPB23-40	<i>P. viridiflava</i>	NR_117825	0445551	—	—
KPB23-41	<i>P. allii</i> の近縁種	NR_179337, OP164746など	1557575	ND	—
KPB23-43	<i>P. viridiflava</i>	NR_117825	0457451	—	—
KPB23-48	<i>P. viridiflava</i>	NR_117825	0457451	—	—
KPB23-52	<i>P. allii</i> の近縁種	NR_179337, OP164746など	1557575	ND	—

^z 16S rRNA 領域における Type 菌株に指定した BLAST 検索で、相同性 98%以上であった配列

^y Type 菌株指定なし

^x データなし

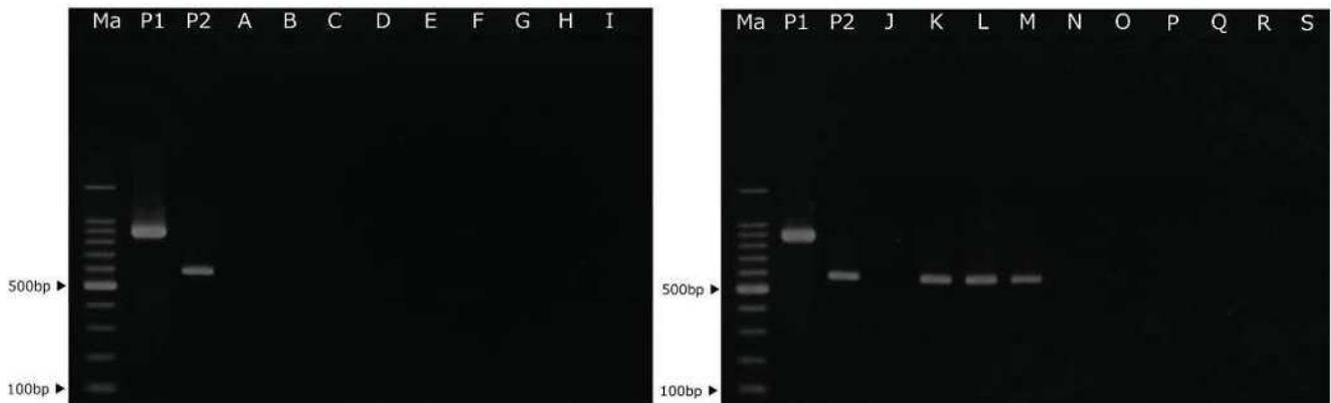


図1 マルチプレックス PCR 電気泳動結果

Ma : 100bp Ladder, P1 : KB211 菌株 (約 900bp), P2 : MAFF 302539 菌株 (約 590bp), A:KPB23-06 菌株, B : KPB23-08 菌株, C : KPB23-09 菌株, D : KPB23-12 菌株, E : KPB23-13 菌株, F : KPB23-22 菌株, G : KPB23-25 菌株, H : KPB23-27 菌株, I : KPB23-28 菌株, J : KPB23-29 菌株, K : KPB23-30 菌株, L : KPB23-31 菌株, M: KPB23-32 菌株, N : KPB23-37 菌株, O : KPB23-40 菌株, P: KPB23-41 菌株, Q : KPB23-43 菌株, R: KPB23-48 菌株, S: KPB23-52 菌株

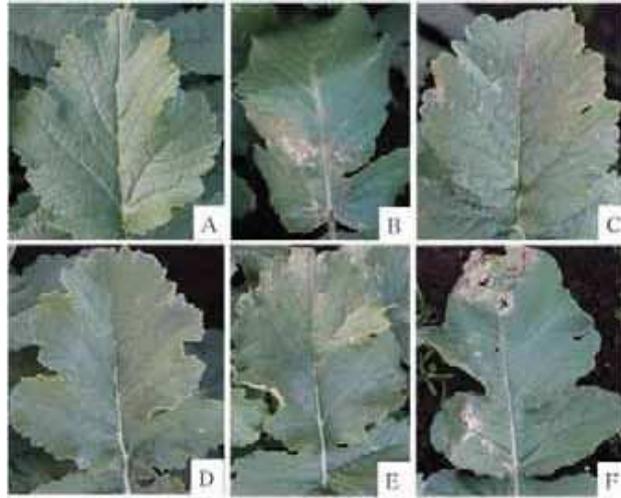


図2 ダイコン葉の病徴（接種10日後）

A : YR 春の浦（水接種区），B : YR 春の浦（KPB23-30 区），C : YR 春の浦（KPB23-31 区），D : 春宴（水接種区），E : 春宴（KPB23-30 区），F : 春宴（KPB23-31 区）

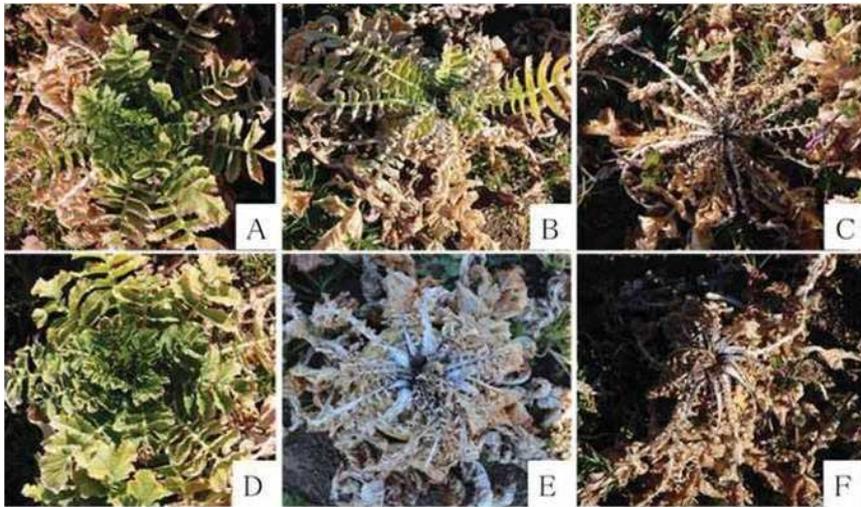


図3 ダイコン葉の病徴（接種99日後，調査時）

A : YR 春の浦（水接種区），B : YR 春の浦（KPB23-30 区），C : YR 春の浦（KPB23-31 区），D : 春宴（水接種区），E : 春宴（KPB23-30 区），F : 春宴（KPB23-31 区）

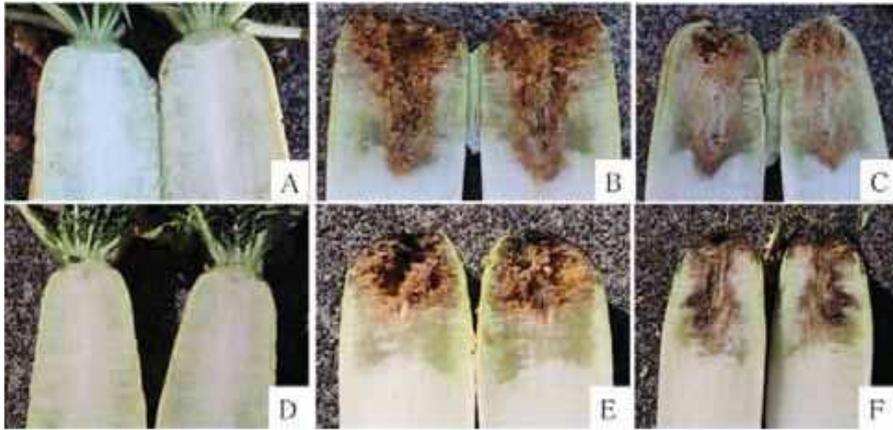


図4 ダイコン根部内の病徴（接種99日後，調査時）

A：YR 春の浦（水接種区），B：YR 春の浦（KPB23-30区），C：YR 春の浦（KPB23-31区），D：春宴（水接種区），E：春宴（KPB23-30区）、F：春宴（KPB23-31区）

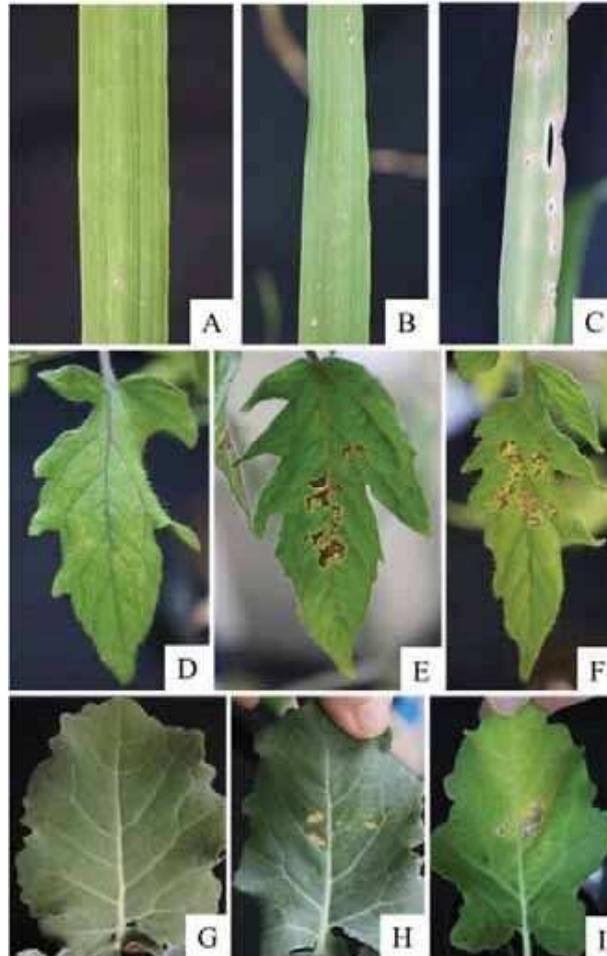


図5 エンバク野生種，トマトおよびキャベツ葉の病徴（接種14日後）

A：エンバク野生種（水接種区），B：エンバク野生種（KPB23-27区）、C：エンバク野生種（KPB23-48区），D：トマト（水接種区）、E：トマト（KPB23-27区）、F：トマト（KPB23-48区），G：キャベツ（水接種区），H：キャベツ（KPB23-27区）、I：キャベツ（KPB23-48区）

引用文献

- 堀江博道・橋本光司・西尾健. 植物医科学実験マニュアル -植物障害の基礎知識と臨床実践を学ぶ-. 2016.p.364-365. 大誠社. 東京.
- 堀之内勇人. ダイコン黒芯症の発生要因と防除対策.2010. 植物防疫 64: 220-223.
- 石山佳幸・山岸菜穂・小木曾秀紀・藤永真史・瀧川雄一.2012.緑肥用エンバク (セイヨウチャヒキ, *Avena storigosa* Schreb.) の褐色壊死斑から分離された *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* について. 日植病報 78: 239. (講要)
- Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J., and Wade, W. G. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 64:2 795-799.
- 三浦半島農業改良推進協議会.2025.三浦半島農業のあゆみ (第5巻) .p.7-8.
- 日本植物病理学会. 2025.日本植物病名目録 (2025年2月版) .p.284-285.
- 農研機構.2022. ダイコン種子黒斑細菌病菌検査標準作業手順書.p.27-28.
- 農林水産省. 2021a. 令和3年野菜生産出荷統計. <https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00500215&tstat=000001013427&cycle=7&year=20210&month=0&tclass1=000001032286&tclass2=000001032933&tclass3=000001172686>
- 農林水産省. 2021b. 令和3年市町村別データ. <https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00500215&tstat=000001013427&cycle=7&year=20210&month=0&tclass1=000001033085&tclass2=000001163026>
- 竹内妙子・土屋健一・香川晴彦・加瀬正敏.1989.ダイコン黒斑細菌病菌による根部褐変症状の発生について.関東東山病虫研報 36:60-62.
- 瀧川雄一・高橋冬実. 2014. アブラナ科植物黒斑細菌病 歴史と現状. 日植病報 80:104-110.
- 和歌山県農業試験場. 2015. ダイコン黒芯症の防除対

策

p.2.https://www.pref.wakayama.lg.jp/prefg/070100/070109/gaiyou/001/nougyoushikenjyou/shikenkenkyuus-eika/shikenkenkyuuseika_d/fil/kokusinn.pdf