植物に病害を起こすPseudomonas syringaeの2つの病原型に関する研究

SURE 静岡大学学術リポジトリ Shizuoka University REpository

メタデータ	言語: ja
	出版者:静岡大学
	公開日: 2017-06-07
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 逵, 瑞枝
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://doi.org/10.14945/00024343

## THESIS

# A study on two pathovars of Pseudomonas syringae

# causing diseases on plants

植物に病害を起こす Pseudomonas syringae の

2つの病原型に関する研究

## 逵 瑞枝

静岡大学創造科学技術大学院

自然科学系教育部バイオサイエンス専攻

## 2016年12月

### 【博士学位論文目次】

### 逵 瑞枝

4	(ナル) シニティン キャー・トー	D 1	•	6	0	- 01	느 도 표미	) - 日日. 3	- 7	7777	***
Λ	旭柳に 病害を起こう	Pseudomonas	SVrinoae	()	2 -	~)(/ ) /i	五月辺	11 BE 0	6	, 桁井 4	÷+-
1		1 Scauomonas	Synngae	· /	-	~ ~ / /r	いいエ		- a	・ウレン	/ LI

### 目次

第1章 序論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
第2章 共通する材料と方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・4
2.1 細菌の分離・培養・保存
(1) 罹病植物組織からの病原細菌の分離
<ul><li>(2) 分離菌の培養と保存</li></ul>
2.2 細菌学的性状試驗
2.3 ゲノム DNA 抽出
<ol> <li>(1) 全ゲノム DNA 抽出</li> </ol>
(2) RNase 処理
2.4 PCR
(1) PCR
(2) 全ゲノム DNA・プラスミド DNA・PCR 産物の電気泳動およびアガロースゲル
からの抽出
2.5 クローニング
(1) TA クローニング
(2) 大腸菌への形質転換
2.6 大腸菌からのプラスミド DNA 抽出
2.7 塩基配列解析
2.8 <i>iaaM</i> , Hおよび L 遺伝子, <i>ina</i> 遺伝子の検出
2.9 サザンハイブリダイゼーション
(1) サザンブロッティング
(2) ハイブリダイゼーション
<ol> <li>DIG 標識プローブの作成</li> </ol>
(4) プローブの検出
第3章 ネギ・タマネギ斑細菌病菌の同定および分類・・・・・・・・・・・18
3.1 緒言
3.2 供試菌株

3.3 材料および方法

- (1) 病原性および宿主範囲試験
- (2) 細菌学的性状試験
- (3) hrpZ遺伝子に基づく P. syringae のグループ判別 PCR
- (4) rep-PCR に基づく比較
- (5) 16S rDNA 塩基配列に基づく系統解析
- (6) gyrB, rpoD, gltA, gap1 遺伝子塩基配列に基づく系統解析
- (7) hrpS, A, Z, B遺伝子塩基配列に基づく系統解析
- (8) 毒素検定および efe 遺伝子, iaaM, Hおよび L遺伝子, ina 遺伝子検定
- (9) ネギ・タマネギ斑点細菌病菌特異的検出プライマーの設計及び PCR
- 3.4 結果
  - (1) 病原性および宿主範囲試験
  - (2) 細菌学的性状試験
  - (3) hrpZ遺伝子に基づく P. syringae のグループ判別 PCR
  - (4) rep-PCR に基づく比較
  - (5) 16S rDNA 塩基配列に基づく系統解析
  - (6) gyrB, rpoD, gltA, gap1 遺伝子塩基配列に基づく系統解析
  - (7) hrpS, A, Z, B遺伝子塩基配列に基づく系統解析
  - (8) 毒素検定および efe 遺伝子, iaaM, Hおよび L遺伝子, ina 遺伝子検定
  - (9) ネギ・タマネギ斑点細菌病菌特異的検出プライマーの設計及び PCR
- 3.5 考察
- 第4章 ネギ・タマネギ斑細菌病菌を含む P. syringae hrp-IV 群菌の系統関係・・・・85
  - 4.1 緒言
  - 4.2 供試菌株
  - 4.3 材料および方法
    - (1) 病原性試験と効率的な病斑形成方法の検討
    - (2) 細菌学的性状試験
    - (3) rep-PCR に基づく比較
    - (4) gyrB, rpoD, gltA, gap1 遺伝子塩基配列に基づく系統解析
    - (5) hrpS, A, Z, B遺伝子塩基配列に基づく系統解析
    - (6) 毒素検定および *iaaM*, *H*および *L*遺伝子, *ina* 遺伝子検定
    - (7) コロナチン生産関連プラスミドの抽出およびサザンハイブリダイゼーション
  - 4.4 結果
    - (1) 病原性試験と効率的な病斑形成方法の検討
    - (2) 細菌学的性状試験
    - (3) rep-PCR による比較

- (4) gyrB, rpoD, gltA, gap1 遺伝子塩基配列に基づく系統解析
- (5) hrpS, A, Z, B遺伝子塩基配列に基づく系統解析
- (6) 毒素検定および iaaM, Hおよび L遺伝子, ina 遺伝子検定
- (7) P. syringae hrp-IV 群菌の系統関係とコロナチン生合成
- 4.5 考察
- 第5章 本邦におけるオリーブがんしゅ病の発生と病原細菌の同定・・・・・・・134
  - 5.1 緒言
  - 5.2 供試菌株
  - 5.3 材料および方法
    - (1) 病原性および宿主範囲試験
    - (2) 細菌学的性状試験
    - (3) hrpZ遺伝子に基づく P. syringae のグループ判別 PCR
    - (4) rep-PCR による比較
    - (5) 16S rDNA 遺伝子塩基配列に基づく系統解析
    - (6) gyrB, rpoD, gltA, gap1 遺伝子塩基配列に基づく系統解析
    - (7) *iaaM*, *H*および *L*遺伝子, *ina* 遺伝子検定
  - 5.4 結果
    - (1) 病原性試験
    - (2) 細菌学的性状試験
    - (3) hrpZ遺伝子に基づく P. syringae のグループ判別 PCR
    - (4) rep-PCR による比較
    - (5) 16S rDNA 遺伝子塩基配列に基づく系統解析
    - (6) gyrB, rpoD, gltA, gap1 遺伝子塩基配列に基づく系統解析
    - (7) *iaaM*, *H*および *L*遺伝子, *ina* 遺伝子検定
  - 5.5 考察

第6章	総合	考察	•	••	•	•	••	•	•	•	•	••	•	•	• •	•	•	•	•	•	• •	••	•	•	•	•	•	• 1	172
摘要・・	•••	•••	•	••	•	•	•••	•	•	•	•	••	•	•	• •	•	•	•	•	•	• •		•	•	•	•	•	• 1	178
SUMMA	RY •	•••	•	•	•••	•	•	• •	• •	•	•	•	•••	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	• •	• •	•	1	181
引用・参	:考文	献・	•	•••	•	•	•••	•	•	•	•	••	•	•	• •	•	•	•	•	•	• •		•	•	•	•	•	• 1	84

#### 第1章 序論

Pseudomonas 属細菌の分類の歴史は古く, Migula (1894) により最初に提案 された際には、グラム陰性好気性、化学合成有機栄養代謝を行い、1 本以上の極 毛による運動性をもつ細菌がすべて含まれた. その後 Pseudomonas 属は、16S rDNA 塩基配列解析や、蛍光色素生産能およびポリ・β・ヒドロキシ酪酸粒の蓄積 能などにより、Acidovorax 属, Burkholderia 属, Ralstonia 属 (β・プロテオバ クテリア綱) と別れて、γ・プロテオバクテリア綱に属する一系統として改めて定 義されたが、それはごく最近のことである (Young et al. 2010).

Pseudomonas 属の中で最初に報告された植物病原細菌は, Pseudomonas mori (Boyer and Lambert, 1893) Stevens 1913 であり,本研究の対象である P. syringae Van Hall 1902 は,それに続いてライラック (Syringa vulgaris) から 最初に分離,報告された. Pseudomonas 属細菌は,初期には,限られた範囲の 不安定な形態学的特徴や細菌学的性状に基づいて提案されたため,続いて様々な 科・属の植物から分離された植物病原細菌も,宿主範囲の十分な証明がなされな いまま P. syringae と同定された (Young et al. 1992).

1966 年 Lelliott らにより、5 つの細菌学的性状に基づき蛍光色素生産 *Pseudomonas* 属細菌の5つの分類群を識別する LOPAT (レバン産生、オキシダ ーゼ活性、ジャガイモ腐敗能、アルギニンジヒドロラーゼ活性、タバコ過敏感反 応)試験が提案されると、*P. syringae* は、LOPAT 試験による分類で、オキシダ ーゼ活性陰性、ジャガイモ腐敗能陰性、アルギニンジヒドロラーゼ活性陰性、タ バコ過敏感反応陽性を示し、グループ I に属した、近年では、病原性や細菌学的 性状に加え、DNA-DNA ハイブリダイゼーションやハウスキーピング遺伝子塩基 配列など遺伝子に基づく *P. syringae* 菌株間の類縁関係の解析が盛んに行われて いる.

現在では、P. syringaeは、宿主範囲および病徴の違いに基づき50種以上の病

原型と呼ばれる分類単位に細分され、農業生産上重要な多様な植物種に損害を与 えることで知られている. 宿主範囲はイネやコムギ, アブラナ科植物を初めとす る草本植物だけでなく、バラ科やツバキ科、モクセイ科のような木本植物にも広 く分布する. P. syringae の中には, P. savastanoi や P. cannabina などのよう に DNAの近縁性や細菌学的性状などに基づき別種へ再分類されたものも含まれ、 広い意味で P. syringae complex と呼ばれる集団を構成している. P. syringae の病原型は、1999 年 Gardan らによるグルーピングでは、DNA-DNA ハイブリ ダイゼーションとリボタイピングに基づき 9 つの genomospecies に分けられた (Gardan et al. 1999). その後 2006 年, Inoue and Takikawa により, P. syringae 群細菌の特徴であるタバコ過敏感反応と宿主植物への病原性発現に関与する hrp (hypersensitive reaction and pathogenicity) 遺伝子を用いて P. syringae 群間 のグルーピングが可能であることが報告され,特に hrpZ遺伝子に基づき I-A, I-B, II, III, IV の5つのグループに分けられた.本研究の対象であるネギ・タマネギ 斑点細菌病菌は、このグルーピングにおいて、単子葉類を宿主とする P. syringae *hrp*-IV 群菌に分類され(Inoue and Takikawa 2006),また Gardan et al. (1999) の genomospecies では hrp-IV 群菌は genomospecies4 に相当している. 本研究 のもうひとつの対象であるオリーブがんしゅ病菌は、Gardan et al. (1999)の genomospecies2 に属し, Inoue and Takikawa の hrp グループでは I-A 群菌に相 当した.

ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は、Goto によって 1972 年に初めて報告され、P. syringae hrp-IV 群菌に分類されてはいるもの、1969 年、1986 年、1987 年の分 離以来発生が確認されず、病原型未決定のまま静岡大学農学部植物病理学研究室 に保存されていた. ところが 2012 年、静岡県のタマネギ圃場においてこの病害 が発生し、新たな細菌株が入手されたため、2012 年分離菌株の同定および P. syringae におけるネギ・タマネギ斑点細菌病菌の分類学的位置付けを解明するこ とを目的として研究を開始した.その後 2014 年,オリーブがんしゅ病と思しき 病害が同じく静岡県において発生し,予備試験から *P. syringae* と考えられる細 菌株を得ることができた.オリーブがんしゅ病の発生はこれまで日本国内では未 報告であるが,海外のオリーブ生産地域では重要な病害であるため,オリーブが んしゅ病菌の同定をもうひとつの研究テーマとして追加した.博士課程の研究と して,草本植物である単子葉類,木本植物であるオリーブを宿主とする異なる 2 つの *P. syringae グループ*に属する病原菌についての同定および分類を行った成 果を本論文にまとめた.尚,本研究の成果の一部は静岡大学農学部植物病理学研 究室の卒業生である久保田豊和氏,宮沢英恵氏(久保田 1988 卒業論文;宮沢 1994 卒業論文)によるものである.

本研究の遂行にあたり,静岡大学農学部植物病理学研究室瀧川雄一教授,平田 久笑准教授には,終始懇切丁寧なご指導およびご助言を頂き,心よりの感謝の意 をお伝えしたい.また,ネギ・タマネギ斑点細菌病菌のサンプルをご提供くださ った兵庫県立農林水産技術総合センターの西口真嗣氏,ネギ・タマネギ斑点細菌 病菌のサンプル採集にご協力を賜った静岡県病害虫防除所の芳賀一氏,セイヨウ チャヒキ分離菌株をご提供くださった長野県野菜花き試験場の石山佳幸氏,オリ ーブがんしゅ病菌および植物サンプルをご提供くださった日星コーポレーション 株式会社の太田光輝博士,静岡県病害虫防除所の田中弘太氏,名古屋植物防疫所 と横浜植物防疫所の諸氏,そしてネギ・タマネギ斑点細菌病菌の電子顕微鏡観察 にご協力くださった静岡大学グリーン科学研究所の方々に,この場をお借りして 御礼を申し上げる.そして,久保田豊和氏,宮沢英恵氏をはじめ,本研究の実験 を行うに当たり様々な便宜を図って頂いた植物病理学研究室の卒業生と学生の 方々,並びに本研究を遂行するに当たりご協力を賜ったすべての方々に,深く感 謝の意を表するものである.

### 第2章 共通する材料と方法

本研究において共通する材料および方法について記載した.

- 2.1 細菌の分離・培養・保存
- (1) 罹病植物組織からの病原細菌の分離

罹病部位の水浸状病斑と健全部分の境界から小片をメスで切り出し、スライド グラス上に載せて滅菌蒸留水1滴を垂らした後、カバーグラスを被せて顕微鏡で 観察し、病斑断面からの細菌の漏出を観察した.菌泥の噴出が確認された部位を 2mm 角程度の大きさに切り出し、70%エタノールに数秒間浸漬して表面殺菌後、 300µlの滅菌蒸留水中で磨砕した.30分静置後、上清をYP寒天平板培地 [酵母 エキス 5g、ペプトン 10g、蒸留水 1000ml、寒天 15g、pH6.8、121℃10分オー トクレーブ滅菌] に画線し、27℃で 2-3 日間培養した.

(2) 分離菌の培養と保存

分離プレート上に生育したシングルコロニーを PPGA 斜面培地 [ジャガイモ 200g, ペプトン 5g, グルコース 5g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>O 3g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g, NaCl 3g, 寒天 15g, 蒸留水 1000ml, pH6.8, 121℃ 10 分オートクレーブ滅菌] (Nishiyama 1978) に移植し, 27℃で培養後各種試験に用いた. 分離菌株は凍結 保存用培地 [スキムミルク (Difco) 10g, グルタミン酸 Na 1.5g, 蒸留水 100ml, 121℃1 分オートクレーブ滅菌] ヘ懸濁し, -20℃で凍結保存した.

#### 2.2 細菌学的性状試験

細菌学的性状試験は後藤・瀧川(1984a, 1984b, 1984c, 1984d) および Takikawa et al. (1989), Suzuki et al. (2003) の方法に従った. 各試験には, PPGA 斜面培

地上で 27°C 24-48 時間培養した細菌を, 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup>cfu/ml 濃度になるように滅菌蒸留 水に懸濁して得た菌液を用いた. 平板培地を用いた試験では, PPGA 斜面培地か ら掻き取った菌体を直接スポットもしくは画線した. 試験培地へ植菌後, 27°C で 培養した. 結果は試験培地への接種後 1-3 日, 5 日, 7 日, 14 日, 21 日後に観察 した.

### 2.3 全ゲノム DNA 抽出

### (1) 全ゲノム DNA 抽出

細菌からの全ゲノム DNA 抽出は, Ausubel et al. (1987)による CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) 法に従い以下のように行った. YP 液体培 地 [酵母エキス 5g, ペプトン 10g, 蒸留水 1000ml, pH6.8, 121°C 10 分オート クレーブ滅菌] 5mlに PPGA 斜面培地から掻き取った新鮮な菌体を懸濁し,27℃ で 24-48 時間振盪培養した. 1.5ml マイクロチューブに移して 14,000rpm で 30 秒間遠心して集菌し、上清を除去した後、ペレットを TE buffer [10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA pH8.0] 567ul にボルテックスミキサーで懸濁した. 10%SDS 30µl, proteaseK (20mg/ml) 3µl を加えよく混合し, 37℃で1時間培養した. 5M NaCl 100µl を加えよく混合し、CTAB/NaCl [CTAB 10%, NaCl 0.7M] 80µl を加 えよく混合した後、ブロックインキュベーター (ASTEC BI-515) を用いて 65℃ で 10 分間培養した. 等量のクロロホルム:イソアミルアルコール (24:1) を加え よく混合し,14,000rpmで5分間遠心した.上清を別のマイクロチューブに移し, 等量のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(25:24:1)を加えよく混 合し 14,000rpm で 5 分間遠心した. 上清を別のマイクロチューブに移し, イソプ ロパノールを全量の 60%になるように加えた. 室温で 10 分間静置後, 14,000rpm で15分間遠心した.上清を完全に取り除き70%エタノール400µl でペレットを 洗浄し、よく乾かした後 TE buffer 200µlに溶解した.以下の遺伝子解析では、

 $\mathbf{5}$ 

この方法で抽出した全ゲノム DNA を用いた.

### (2) RNase 処理

TE buffer に溶解した全ゲノム DNA に全量の 1/10 量の RNase (1mg/ml) を加 え 37℃で 60 分間培養した. 等量のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコ ール (25:24:1) を加えよく混合し, 14,000rpm で 10 分間遠心した. 上清を別の マイクロチューブに移し, 等量のクロロホルム:イソアミルアルコール (24:1) を 加えよく混合した後 14,000rpm で 10 分間遠心した. 上清を別のマイクロチュー ブに移し, 1/10 量の 3M 酢酸 Na 溶液と 2 倍量の 100%エタノールを加えよく混 合した後, ・20℃で 10 分間静置し, 14,000rpm で 15 分間遠心した. 上清を取り 除き, 70%エタノールで洗浄後ペレットを乾燥させ, 抽出された全ゲノム DNA の量に応じて TE buffer 20-50pl に溶解した. ペレットが完全に溶解したら約 1ng/pl 濃度に調整し, PCR (polymerase chain reaction) 用テンプレートとして 用いた.

### 2.4 PCR

### (1) PCR

PCR は Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) およ び TaKaRa PCR Thermal Cycler Dicer® Gradient (TaKaRa) を使用して行った. Taq polymerase は, Gene Taq (ニッポン・ジーン) または Ex Taq (TaKaRa) を 用いた.反応組成は,特別に記載しない場合は 10×Universal Buffer または 10×Ex Taq Buffer 1.0µl, 2.5mM dNTP Mixture 0.8µl, プライマー (5µm) 各 1.0µl, taq polymerase 0.2µl, テンプレート DNA 1.0µl, 滅菌蒸留水 5.0µl の全量 10µl で行った. PCR 増幅産物をベクターにクローニングする際には全量 50µl, サザ ンハイブリダイゼーション用プローブを作成する場合には全量 100µlを得るよう 反応を行った.

コロニーダイレクト PCR の場合は, YP 寒天平板培地上で 27℃24 時間培養し た新鮮なシングルコロニーを滅菌爪楊枝で釣菌し, マイクロチューブに入れた 20µl の TE buffer に懸濁した. 細菌懸濁液を 95℃で2分間ボイルし, PCR 反応液 10µl に対し 1µl をテンプレートとして用いた.

(2) 全ゲノム DNA・プラスミド DNA・PCR 産物の電気泳動およびアガロースゲ ルからの抽出

全ゲノム DNA・プラスミド DNA・PCR 産物は 0.7%濃度のアガロースゲルを 用い、1×Tris-acetic acid-EDTA (TAE) buffer [0.04M Tris, 0.02M 酢酸, 1mM EDTA pH8.0] (pH 8.0) 中で 100V の電圧で電気泳動した. rep-PCR 産物のみ 1.5%濃度のアガロースゲルを用い, 50Vの電圧で電気泳動した. サイズマーカー は Hi-Lo DNA Marker (Bionexus, Oakland, CA) を用いた. 泳動後ゲルを臭化エ チジウム溶液(1mg/ml)に30分間浸漬して染色し、ゲル撮影装置(ATTO)を用 いて下から紫外線を当て目的の遺伝子断片の有無を確認した. アガロースゲル からの DNA 抽出は NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (TaKaRa) を用い,製 品マニュアルに従って行った. 目的のバンドをゲルから切り出し, 1.5ml マイク ロチューブに移した. アガロースゲル 100mg 当たり Buffer NTI を 200µl 加え, 50℃で 5-10 分間インキュベートしてゲルを完全に溶かした. 融解液 700µl を NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column に移し、Collection Tube にセット して約 9127rpm で 30 秒間遠心した. Collection tube の廃液を捨て Wash Buffer NT3 700µlを加え約 9127rpm で 30 秒間遠心した. Collection tube の廃液を捨 て、さらに約 9127rpm で1分間遠心、Wash Buffer NT3 を完全に取り除いた. NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column を 1.5ml マイクロチューブにセット し, Buffer NE 10µl を加え室温で1分間静置した後約 9127rpm で1分間遠心して

DNA を回収した.

### 2.5 クローニング

### (1) TA クローニング

クローニングは, pGEM-T Easy Vector System (Promega) を用いて行った. 反応組成は製品マニュアルに従い, インサート DNA 3.0µl, 2×Rapid Ligation Buffer 5.0µl, pGEM-T Easy Vector (50ng) 1.0µl, T4 DNA Ligase (3 Weiss units /µl) 1.0µl を入れ, 全量 10µl になるように混合し, 16℃で1時間培養した. これ を大腸菌へ形質転換した.

(2) 大腸菌への形質転換

ポレーション用コンピテントセルの作成は以下のように行った. Escherichia coli DH5a 株を LB 液体培地 [酵母エキス 5g, ペプトン 10g, NaCl 10g, 蒸留水 1000ml, pH7.0, 121℃ 10 分オートクレーブ滅菌] 5ml で 37℃ で 24 時間振盪 培養し, この菌液を坂口フラスコの LB 液体培地 250ml に移し 37℃で 3-4 時間 培養した. これを遠心管に移し, 4℃で 15 分間遠心 (4000×g) した. 上清を捨て 10% Glycerol 250ml にペレットを縣濁し, 4℃で 15 分間遠心 (4000×g) した. 再度上清を捨て 10% Glycerol 250ml にペレットを縣濁し, 4℃で 15 分間遠心 (4000×g) した. 上清を捨てペレットを 10% Glycerol 1-2ml に縣濁し 50µl ずつ 1.5ml マイクロチューブに分注し、-80℃で保存した.

このコンピテントセルを用いてエレクトロポレーションを行った. コンピテン トセルを使用直前に氷中で融解し, コンピテントセル 50µl に対し形質転換する DNA を 2-3µl 混ぜ, 全量を 0.1cm gap の Gene PulserR Cuvette (Bio-Rad) に移 し, MicroPulser<sup>TM</sup> (BIO-RAD) にセットし 1.8kv 1pulse でエレクトロポレーシ ョンを行った. その後, キュベットの中身を 1.5ml マイクロチューブの LB 液体 培地 1ml に速やかに移し,37℃で1時間静置培養した.これを適切な抗生物質 と X-gal (20mg/ml) 30µl と IPTG (20mg/ml) 30µl を添加した LB 平板培地 10ml にスプレッダーで塗布し 37℃ 24時間培養した後,白色のシングルコロニーを滅 菌爪楊枝で釣菌し,抗生物質が添加された LB 寒天培地に植菌した.

### 2.6 大腸菌からのプラスミド DNA 抽出

大腸菌 *E. coli* DH5a 株からのプラスミド DNA 抽出は、Ausubel et al.(1987) のボイル法に従いミニスケールで以下のように行った. LB 液体培地に抗生物質 を添加し,大腸菌を懸濁後 37℃で 24 時間振盪培養した. 菌液を 1.5ml マイクロ チューブに移し, 軽く遠心して集菌し, STET buffer [スクロース 16g, TritonX-100 200µl, 0.5M EDTA pH8.0 20ml, 1M Tris-HCl pH8.0 10ml, 蒸留 水,全 200ml, 121℃ 10 分オートクレーブ滅菌] 400µl を加えボルテックスミキ サーを用いて懸濁した. Lysozyme (10mg/ml) 10µl を加え静かに混合し室温で 10 分間静置した.95℃で 1 分間ボイル後,14,000rpm で 3 分間遠心した. 菌体の ペレットを滅菌爪楊枝ですくい取って捨て,3M 酢酸 Na 20µl,イソプロパノー ル 200µlを加えて混合し,室温で 10 分間静置後 14,000rpm で 10 分間遠心した. 上清を捨てペレットを 70%エタノール 400µl で洗浄し,乾燥させた後 TE buffer 200µl に溶解させた. RNase 処理は全ゲノム DNA 抽出と同様に行った.

2.7 塩基配列解析

プラスミドにクローニングしたインサート DNA のシークエンス解析は,株式 会社ベックスに委託した.シークエンスデータは GENETYX Ver.10 (GENETYX CORPORARTION) を用いてアライメントを行った.シークエンスの相同性は National Center for Biotechnology Information (NCBI) の BLAST プログラム にて検索した.系統樹の作成は MEGA 7.0 (Kumar et al. 2016) を用い, Jukes-Cantor モデルに基づく近隣結合法および最尤法により作成した.

2.8 *iaaM*, *H*および *L* 遺伝子, *ina* 遺伝子の検出

インドール酢酸生産に関わる遺伝子  $iaaM, H, L \ge$ ,氷核活性タンパク生合成 遺伝子 ina の存在は、P. syringae 病原型を特徴づける重要な特性である.これ らの遺伝子に関して、本研究では PCR による検出を行った. iaaM、H遺伝子の 検出は Marchi et al. (2005) の方法に従った. iaaL 遺伝子は Penyalver et al. (2000) の方法に基づき,より多くの *P. syringae* 病原型の該当領域を増幅できる ようリバースプライマー (IAALR) に改変を加えた. 改変の内容は Table 2.1 に 示し, PCR サイクルは 94 °C 5 分, (94 °C 30 秒, 62 °C 30 秒, 72 °C 30 秒)×30 サイクル, 72 °C 7 分で行った. 反応組成は第 2 章 2.4 に従った. 氷核活性は, Tsuji et al. (accepted in Journal of General Plant Pathology) の方法に基づく *ina* 遺伝子の検出により調査した. *ina* 遺伝子検出プライマー(TSU31 / TSU32) は、公共データベースに登録される P. syringae 菌株の ina 遺伝子塩基配列の保 存性の高い部分に基づき,幅広い P. syringae病原型の同領域を増幅する目的で 設計した.プライマー設計に用いた塩基配列のアクセッションナンバー (acc. No.) は Table 2.3 に記載した. PCR サイクルは 94 °C 5 分, (94 °C 30 秒, 63 °C 30秒, 72°C 30秒)×30サイクル, 72°C 7分で行った. すべての PCR の反応 組成は第2章 2.4 に従った. プライマーに関する詳細は Table 2.1 に, PCR サイ クルは Table 2.2 に記載した.

2.9 サザンハイブリダイゼーション

(1) サザンブロッティング

全ゲノム DNA を用いてのサザンハイブリダイゼーションでは、全ゲノム DNA 8.0µl に対し、*Eco*RI 1.0µl, *Eco*RI buffer 2.0µl, 滅菌蒸留水 9µl の全量 20µl の組成 で、37°C 2 時間培養し制限酵素切断した. プラスミド DNA は制限酵素処理を行 わなかった. 全ゲノム DNA は 0.7%アガロースゲル 50mV で、プラスミド DNA は 0.5%アガロースゲル 25mV で電気泳動し、ゲルを HCl (0.25M) に 10 分間浸 漬した. 続いてゲルを変性液 [0.5M NaOH, 1.5M NaCl] に 15 分間 2 回浸した 後、中和液 [0.5M Tris, 1.5M NaCl, pH8.0] に 15 分間 2 回浸した. その後、 10×SSC buffer [1.5M NaCl, 0.15M Na-citrate, pH7.0] に 5 分間浸した. 同時 にろ紙 [No.3, WHATMAN] 6 枚も 10×SSC buffer に浸した.

食品用ラップフィルム上に 10×SSC buffer に浸したろ紙 3 枚を置き, その上に ウェルが下向きになるようにゲルをのせ, ゲルと同サイズに切断したセルロース メンブレン Magna Graph Nylon Transfer Membrane [0.45 Micron, OSMONICS INC.] 1 枚, 10×SSC buffer に浸したろ紙 3 枚, 乾燥したろ紙 3 枚, ペーパータ オルを高さ約 15cm に下から順に積み上げ,約 500g の重量をかけた. 3~24 時間 静置後, セルロースメンブレンを取り出し DNA が吸着した面に紫外線を 2 分間 照射し, DNA をセルロースメンブレンに固定した.

(2) ハイブリダイゼーション

セルロースメンブレンを, DNA を固定した面が内側になるようにハイブリ筒に 入れ, hybridization solution [20×SSC 125ml, Blocking reagent 2.5g, 0.1%N-Lauroylsarcosine Na-salt 0.5g, 10% SDS 1ml, 121°C 10 分オートクレ ーブ滅菌] 20ml を入れて, Hybridization Incubator HB-80 (TAITEC) を用いて 68°C 1 時間培養した. その後, hybridization solution を捨て, 95°C 10 分間熱 変性したプローブを加えて 68°C 6~24 時間ハイブリダイゼーションした.

(3) DIG 標識プローブの作成

プローブとする DNA は、第2章 2.4 の方法に基づき増幅およびアガロースゲ

ルからの抽出を行った. プローブは DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche)を用いて作成した. アガロースゲルから抽出した DNA を 98°C で 10 分 間熱変性させた後,氷上で急冷した. ジゴキシゲニンラベルするための反応液組 成は,DNA 1µg, 10×Hexanucleotide mixture 2µl, 10×dNTP labeling mixture 2µl, Klenow enzyme 1µl に全量が 20µl になるよう滅菌水を加え軽く混合した. 反応 液は 37°C で 1~20 時間インキュベートした後, 0.2M EDTA pH8.0 2µl を入れ反 応を停止させた. 3M 酢酸 Na 溶液 2µl, 100%エタノール 60µl を加えよく混合 し, -20°C で 2 時間静置した. 14,000 rpm 10 分間遠心した後上清を取り除き,70% エタノールでペレットを洗浄した. エタノールを取り除き,ペレットを完全に乾 燥させた後 TE buffer 50µl に溶解させた. このラベルされた DNA 50µl を 98°C で 10 分間熱変性させ氷上で急冷した後, hybridization solution20ml に全量を加 えプローブとした.

### (4) プローブの検出

プローブの検出は DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche) を用いて行 った. ハイブリダイゼーション後のセルロースメンブレンを Washing solution 1 [20×SSC 50ml, 10%SDS 5ml / 500ml] に 5分間 2回浸した後, Washing solution 2 [20×SSC 12.5ml, 10%SDS 5ml / 500ml] に 68°C で 15 分間浸した. 続いて buffer 1 [0.1M Tris-HCl, 0.15M NaCl pH7.5] に 1 分間浸漬した後, buffer 2 [0.5%Blocking regent, buffer 1, 121°C 10 分オートクレーブ滅菌] 30 分間浸し た. 再度 buffer 1 に 1 分間浸し, AP-conjugate 3µl を加えた buffer 1 20ml で 30 分間処理した. buffer 1 で 15 分間 2 回洗浄後, buffer 3 [0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, pH9.5] に 5 分間浸した. NBT 溶液 [NBT 75mg/ml, 70% N,N-dimethylformamide] 90µl, X-phosphate 溶液 [X-phosphate 50mg/ml, 100%N,N-dimethylformamide] 70µl を加えた buffer 3 20ml にセルロースメンブ レンを浸し,遮光下で 3~24 時間静置した.buffer 4 [10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0] に 5 分間つけ反応を停止させ, 観察した. セルロースメンブレンはドラ イヤーで水分を乾燥させ, アルミホイルに包んで保管した.

Designed for	Primer	Sequence (5'-3')	Size (bp)	Reference
hrpZ	PS IA-F	CAGCTTGCCCAGGAGCTGAC	000	
grouping	PS IA-R	ATGTTGACCAGCAGCAAGGC	000	
	PS IB-F	TTGGCTCAAGAGTTGACCCG	950	
	PS IB-R	GCGCGTTGACCAGCAAGTTG	850	
	PS II-F	GCTGTGATCGATCAGCTGGT	1000	Inoue and
	PS II-R	TCAGGCCACACAGCCTGGTTAG	1000	Takikawa(2006)
	PS III-F	AGCTGGCCGAGGAACTGATG		
	PS III-R	AACTGGTCAAGATCCTGAGC	750	
	PS IV-F	ATGCTCGCAAAATCGATGGC		
	PS IV-R	TGACTGGCCGTATTGCCATT	780	
BOX-PCR	BOXA1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG		
ERIC-PCR	ERIC1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAG		
	ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG		Rademaker
REP-PCR	REP1R	IIIICGICGICATCIGGC		et al. (1998)
	REP2L	ICGICTTATCIGGCCTAC		
16S rDNA	fD1-sat	AGAGTTTGATCCTGGTCAG		Kusumoto et al
100 10101	rP2-sat	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	1500	(2004)
gyrB	UP-1E	GAGGAAACAGCTATGACCAYGSNGGNGGNAARTTYRA		Yamamoto
8,12	AprI	TGTAAAACGACGGCCAGTGCNGGRTCYTTYTCYTGRCA	940	et al. (1999)
rnoD	72F	ACGACTGACCCGGTACGCATGTAYATGMGNGARATGGG		Maeda et al
1902	70R2	ATAGAAATAACCAGACGTAAGTTNGTRTAYTTYTTNGCDAT	843	(2006)
oltA	oltA-F	AGTTGATCATCGAGGGCGCWGCC		Sarkar and
8121	gltA_R	TGATCGGTTTGATCTCGCACGG	445	Guttman(2004)
aan1	gan-1F	CGTATCGCAATCAACGGTTT		Van et al
supi	ganA-R	CCCAYTCGTTGTCGTACCA	951	(2008)
hrnS-Z	TSU11	ATTTCGCCGCGATCTGTATT		()
hips E	TSU12	CGAAATTGTCAGCGAGCTT	1223	This study
hrpZ-B	TSU13	GGCAGCATTGATGACATCAC		
	TSU14	CTTGGTCGTCAACGCCATTT	1248	This study
cfl	primer1	GGCGCTCCCTCGCACTTI		Bereswill et al.
-J -	primer2	GGTATTGGCGGGGGTGC	650	(1994)
tblA	tbl-1	TCGATACAGGACCTCAAACA	(50	Berta et al.
	tbl-2	CAGTGGTCTGCGTAATCGAA	652	(1993)
argK	P5.1	AGCTTCTCCTCAAAACACCTGC	500	Schaad at al.
0	P3.1	TGTTCGCCAGAGGCAGTCATG	500	(1995)
mboA	TSU29	ACAAGCGTCATATYCTGG a)	222	Carrion et al.
	TSU30	GCTGTAYTTGTCKCCGTA <sup>a)</sup>	323	(2012)
syrB	primer B1	CTTTCCGTGGTCTTGATGAGG	750	Sorensen et al.
	primer B2	TCGATTTTGCCGTGATGAGTC	152	(1998)
efe	ETH-1	ATGACCAACCTACAGACT	1050	Sato et al.
	ETH-2	TCATGAGCCTGTCGCGCG	1050	(1997)
ina	TSU31	GGCAGTAAYCAGATTGCAAGT	250	Tsuji et al.
	TSU32	CVGCRGTSAGRTAACTGT	239	(2016)
BLSO	TSU15	CGGGGCGGAGATAATCACT	220	This study
detection	TSU16	GTTTCGACACCGTACACGGCCCTT	230	This study
cor	TSU5	ATGCCCAGCTCTTCGATCTT	2250	This study
	TSU6	ACGCCTTGTTCCGTTCCAG	2550	This study
ста	TSU7	ATCCTGGAAAGCGACACCT	2000	This study
	TSU8	GGCTCATGAGCTTGCTTTCT	2000	This study
cfa	TSU9	ATCCGCAGACGCTACCGAAGA	1000	This study
	TSU10	GTCTGCTCCGACCAATCGATCT	1900	This study

Table 2.1 PCR プライマーリスト

Designed for	Primer	Sequence (5'-3')	Size (bp)	Reference
iaaM	iaaMf	ATGCGCTTTCCTCCSAGY	207	Marchi et al.
	iaaMr	TGAGCCATMYCTGCCAT	307	(2005)
iaaH	iaaHf	TAAGAATACCCGGCGGCMT	604	Marchi et al.
	iaaHr	GCATTRCTKGCCAGRTC	094	(2005)
iaaL	IAALF	GGCACCAGCGGCAACATCAA	151	Penyalver et al.
	TSU22	CGCCCTCGGAACTGCCATA <b>Y</b> <sup>b)</sup>	454	(2000)

Table 2.1 PCR プライマーリスト (continued)

<sup>a)</sup> mboA 遺伝子検出プライマー (A-for and A-rev) は, P. syringae の他の病原型の増幅にも対

応できるよう改変した. 改変を加えた点は太字で示した.

<sup>b)</sup>*iaaL* 遺伝子検出プライマーのリバースプライマー (IAALR) は, *P. syringae* の他の病原型 の増幅にも対応できるよう改変した. 改変を加えた点は太字で示した.

## Table 2.2 PCR サイクルリスト

Amplify	Primer	PCR cycle	Size (bp)	Reference	
hrpZ (I-A)	PS IA-F/IA-R	94°C2m,(94°C 30s,62°C30s,72°C30s,)×30,72°C10m	880		
hrpZ(I-B)	PS IB-F/IB-R	94°C2m,(94°C30s,62°C30s,72°C30s,)×30,72°C10m	850		
hrpZ (II)	PS II-F/II-R	94°C2m,(94°C30s,62°C30s,72°C30s,)×30,72°C10m	1000	Inoue and Takikawa (2006)	
hrpZ (III)	PS III-F/III-R	94°C2m,(94°C30s,64°C30s,72°C30s,)×30,72°C10m	750		
hrpZ (IV)	PS IV-F/IV-R	94°C2m,(94°C30s,62°C30s,72°C30s,)×30,72°C10m	780		
BOX-PCR	BOXA1R	95°C2m,(94°C3s,92°C30s,50°C1m,65°C8m)×35,65°C8m			
ERIC-PCR	ERIC1R/ERIC2	95°C2m,(94°C3s,92°C30s,50°C1m,65°C8m)×35,65°C8m		Rademaker et al. (1998)	
REP-PCR	REP1R/REP2L	95°C2m,(94°C3s,92°C30s,43°C1m,65°C8m)×35,65°C8m			
16S rDNA	fD1-sat/ rP2-sat	94°C5m,(94°C1m,58°C1m,72°C1m)×30,72°C7m	1500	Kusumoto et al. (2004)	
gyrB	UP-1E/ AprU	94°C5m,(94°C1m,59°C1m,72°C1m)×30,72°C5m	940	Yamamoto et al. (1999)	
rpoD	72F/70R2	94°C5m,(94°C1m,59°C1m,72°C1m)×30,72°C5m	843	Maeda et al. (2006)	
gltA	gltA-F/ gltA-R	94°C5m,(94°C2m,56°C1m,72°C1m)×30,72°C5m	445	Sarkar and Guttman(2004)	
gap1	gap-1F/gapA-R	94°C5m,(94°C30s,58°C30s,72°C1m)×30,72°C5m	951	Yan et al. (2008)	
hrpS-Z	TSU11/TSU12	94°C5m,(94°C30s,59°C30s,72°C90s)×30,72°C5m	1223	This study	
hrpZ-B	TSU13/TSU14	94°C5m,(94°C30s,59°C30s,72°C90s)×30,72°C5m	1248	This study	
cfl	primer1/2	94°C5m,(94°C1m,70°C1m,72°C1m)×30,72°C7m	650	Bereswill et al. (1994)	
tblA	tbl-1/tbl-2	94°C5m,(94°C1m,58°C1m,72°C2m)×30,72°C5m	652	Berta et al. (1993)	
argK	P5.1/P3.1	94°C5m,(94°C1m,58°C1m,72°C2m)×30,72°C5m	500	Schaad at al. (1995)	
mboA	TSU29/TSU30	94°C5m,(94°C30s,65°C30s,72°C30s)×30,72°C5m	323	Carrio´n et al. (2012)	
syrB	primer B1/B2	94°C5m,(94°C90s,62°C90s,72°C3m)×35,72°C10m	752	Sorensen et al. (1998)	
efe	ETH-1/ETH-2	94°C3m,(94°C1m,55°C2m,72°C3m)×30,72°C5m	1050	Sato et al. (1997)	
ina	TSU31/TSU32	94°C5m,(94°C30s,63°C30s,72°C90s)×30,72°C10m	259	Tsuji et al. (2016)	
BLSOdetection	TSU15/TSU16	94°C5m,(94°C30s,63°C30s,72°C30s)×30,72°C5m	230	This study	
cor	TSU5/TSU6	94°C5m,(94°C30s,59°C30s,72°C3m)×30,72°C5m	2350	This study	
ста	TSU7/TSU8	94°C5m,(94°C30s,59°C30s,72°C3m)×30,72°C5m	2000	This study	
cfa	TSU9/TSU10	94°C5m,(94°C30s,59°C30s,72°C3m)×30,72°C5m	1900	This study	
iaaM	iaaMf/iaaMr	94°C3m,(94°C30s,54°C30s,72°C1m)×35,72°C10m	307	Marchi et al. (2005)	
iaaH	iaaHf/iaaHr	94°C3m,(94°C30s,54°C30s,72°C1m)×35,72°C10m	694	Marchi et al. (2005)	
iaaL	IAALF/TSU22	94°C5m,(94°C30s,62°C30s,72°C30s)×30,72°C5m	454	Penyalver et al. (2000)	

m;分,s;秒

## Table 2.3 ina 遺伝子増幅プライマー (TSU31/TSU32) の設計に用いた, P.

Strain	Accession number
<i>P. syringae</i> ina5	AJ001086
P. syringae S203	X03035
P. syringae INA4	FN650702
P. syringae CC1557	CP007014
P. syringae KCTC1832	AF013159
P. savastanoi pv. savastanoi NCPPB3335	KB644127
P. syringae pv. phaseolicola 1448A	CP000058
P. syringae pv. tabaci ICMP2835	NZ_LJRL01000072
P. syringae pv. glycinea race 4	NZ_AEGH01000073
P. syringae pv. glycinea B076	NZ_AEGG01000023
P. syringae pv. lachrymans ICMP3507	LJQP01000279
P. syringae pv. alisalensis ICMP15200	NZ_LJPP01000343
P. syringae pv. coriandricola ICMP12471	NZ_LJPZ01000292
P. cannabina pv. cannabina ICMP2823	NZ_LJPX01000682
P. syringae pv. mori ICMP4331	LJQU01000597
P. syringae pv. syringae MB03	EU360731
P. syringae pv. syringae B728a	CP000075
P. syringae pv. syringae B301D	CP005969
P. syringae pv. pisi PP1	NZ_AUZR02000128
P. syringae pv. lapsa ATCC10859	CP013183
<i>P. syringae</i> pv. <i>oryzae</i> 1_6	NZ_DS996979
P. syringae pv. porri ICMP8961	NZ_LJRA01000292
P. syringae pv. helianthi ICMP4531	NZ_LJQM01000035
P. syringae pv. tagetis ICMP4091	NZ_LJRM01000201

syringae 各病原型の塩基配列とそのアクセッションナンバー.

### 第3章 ネギ・タマネギ斑細菌病菌の同定および分類

### 3.1 緒言

ネギ (Allium fistulosum L.) およびタマネギ (A. cepa L.) は, APG 植物分類 体系で単子葉類・クサスギカズラ目・ヒガンバナ科・ネギ亜科・ネギ属に属する 一年生植物である. ネギ亜科の大半の種はネギ属に属し, ニンニク (A. sativum), ニラ (A. tuberosum Rottler ex Spreng. (1825)), リーキ (A. ampeloprasum var. porrum (L.) J.Gay (1847)), ワケギ (Allium × wakegi Araki (1950)), アサツキ (A. schoenoprasum var. foliosum), ラッキョウ (A. chinense), セイヨウアサツ キ (A. schoenoprasum) などが含まれる (Bremer et al. 2009, Angiosperm Phylogeny Website http://www.mobot. org/MOBOT/research/APweb/).

ネギは日本や中国では古くから野菜として用いられ,広く親しまれる植物であ る.日本には奈良時代には既に中国より渡来しており,現在では作付面積約 23,000ha・年間約48万tが生産されている.タマネギは中央アジアが原産と考 えられ,紀元前数千年前から食用として栽培された形跡がある.主要な野菜の中 ではトマト,スイカ,キャベツに次いで第4位の生産量で,現在世界では年間約 8600万tが生産される.日本では,戦後消費の拡大に伴って生産が増大し,現在 では北海道や佐賀県を中心に作付面積約25,700ha年間約127万tが生産されて いる(農林水産省平成27年産作況調査;FAOSTAT, http://faostat.fao.org/; 八鍬 1973).

現在,日本で報告されているネギの病害としては,*Pseudomonas syringae* van Hall 1902 (病原細菌の pathovar は未決定) による斑点細菌病 (Goto 1972;後藤 ら 1981), *P. marginalis* pv. *marginalis* (Brown 1918) Stevens 1925 による腐敗 病 (梅川ら 1983; 飯富ら 1983), *Pectobacterium carotovorum* (Jones 1901) Waldee 1945 emend. Gardan, Gouy, Chiristen & Samson 2003 (卜蔵 1915; 原

1925) および Dickeya sp. (病原細菌の pathovar は未決定) (瀧川ら 1983) によ る軟腐病, Xanthomonas axonopodis pv. allii (Kadota, Uehara, Shinohara & Nishiyama 2002) Roumangac, Gagnevin, Garden, Sutra, Manceau, Dickstein, Jones, Rott & Pruvost 2004 による葉枯細菌病 (Kadota et al. 2000), Burkholderia gladioli (Severini 1913) Yabuuchi, Kosako, Oyaizu, Yano, Hotta, Hashimoto, Ezaki & Arakawa 1993 による褐色腐敗病(酒井ら 2011)がある. また、タマネギの病害としては、P. syringae(病原細菌の pathovar は未決定) に よる斑点細菌病 (Goto 1972; 後藤ら 1981), B. cepacia (Palleroni & Holmes 1981) Yabuuchi, Kosako, Oyaizu, Yano, Hotta, Hashimoto, Ezaki & Arakawa 1993 (瀧川ら 2002; Sotokawa and Takikawa 2004) および Erwinia rhapontici (Millard 1924) Burkholder 1948 (大内ら 1982a; 1983) および P. marginalis pv. marginalis (富永・土屋 1958; 大内ら 1982b; 1983) による春腐病, Corynebacterium flaccumfaciens (Hedges 1922) Collins & Jones 1984 (病原細 菌の pathovar は未決定)によるかいよう病(谷井・小林 1984), *P. carotovorum* 2003 による軟腐病 (原 1930; 田部井・吉田 1952), B. gladioli (病原細菌の pathovar は未決定) によるりん片腐敗病(田中・青田 1990) がある(Table 3.1).

上記の病害の中で、ネギおよびタマネギの斑点細菌病(Bacterial leaf spot of onions; BLSO)は、冬~春季にかけて、ネギ・タマネギの葉身や花茎に発生する斑点性の細菌病である。病徴は、初め葉や花茎にアザミウマの食痕と類似した紡錘形の小さな灰白色壊死斑が現れる。壊死斑は周囲に黄色のハローを伴う暗緑色の水浸病斑を伴う。その後病斑は拡大して、特徴的な眼状斑点を形成する。病斑の表面には、天候条件により白い滲出物が見られることもある。重篤な感染では、病斑が癒合して大病斑を形成し、その部分から葉や花茎がねじれ折れ曲がって奇形となる(Goto 1972).

ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は、1972年 Goto により初めてタマネギより分離

され,病原性試験および細菌学的性状による同定の結果,ネギ・タマネギに寄生 性を持つ *P. syringae* の一系統であると報告された (Goto 1972). その後,当研 究室の瀧川により 1986年,久保田により 1987年,ネギより分離され Gotoの菌 と同様 *P. syringae* と同定された (久保田 1987,卒業論文).

ネギ・タマネギ斑点細菌病と病徴が類似した病害として、リーキ斑点細菌病が ある.リーキ斑点細菌病はリーキの花茎や葉に発生し、花茎では中心がくぼんで 壊死した楕円形の水浸状斑を多数形成する.病斑はグリース状で、緑がオリーブ グリーン色の黄褐色をし、病斑の周囲ではしばしば白い滲出物が見られる.葉で の病斑は,最初小さな卵型の水浸状斑で,やがて黄色から淡褐色の条斑に発展し, 突然葉の先端が萎凋する (Hale 1975).

リーキ斑点細菌病菌は、1975 年ニュージーランドにて Hale により分離・同定 され、病原性試験と細菌学的性状より Goto の菌と同様 *P. syringae* と同定された (Hale 1975).よって、リーキ斑点細菌病の病原菌はネギ・タマネギ斑点細菌病と 同一であると当初考えられていた.その後フランスでの発生に際し、1978 年 Samson らにより分離されたリーキ斑点細菌病菌は *P. syringae* の新病原型であ ることが報告され、pv. *porri* と命名された (Samson et al. 1981; 1998).

一方,ネギ・タマネギ斑点細菌病菌については、1987年当研究室の久保田により,病原性と細菌学的性状において pv. porriと異なる新病原型である可能性が示唆され,また1993年当研究室の宮沢により,病原性・細菌学的性状・DNA-DNA ハイブリダイゼーションより pv. porri と区別されることが明らかになった(久 保田 1988; 宮沢 1994,卒業論文).

2012 年 3 月静岡県浜松市西部のタマネギ圃場において,ネギ・タマネギ斑点細 菌病と考えられる斑点性の病害が発見された.病徴は,タマネギ葉上の水浸斑を 伴う楕円形,灰白,直径 5-15mm 程度の鳥眼状の壊死斑や,濃緑色の水浸部分を 伴う幅 10mm,長さ 10-50mm 程度の黄緑色のかすり紋様状の病斑で,ネギ・タ マネギ斑点細菌病に特徴的な症状だった.かすり紋様の病斑は灰白色の壊死斑へ 変化し,深刻な感染では複数の病斑が癒合し,葉にねじれや奇形が生じた (Fig. 3.1).サンプル収集時にはタマネギ花茎は発生しておらず,花茎での病徴は観察 できなかった.病斑表面には白い滲出物は見られなかったが,顕微鏡観察の結果, 病斑部からは大量の菌泥噴出が確認された.分離菌株は,蛍光色素を生産し,レ バン産生およびタバコ過敏感反応陽性,オキシダーゼ活性・ジャガイモ腐敗能・ アルギニンジヒドロラーゼ活性陰性などの予備試験結果より,LelliottのLOPAT グループ Ia に属し, *P. syringae* 群細菌と考えられた.また, Inoue and Takikawa (2006)の方法に基づく *P. syringae hrpZ*遺伝子に基づくグルーピング では,分離菌株はいずれも *P. syringae hrp-*IV 群菌に属した.

続いて,2013 年兵庫県淡路市において,2012 年静岡県浜松市での発生と類似 する病徴を示し,ネギ・タマネギ斑点細菌病と考えられる病害が報告された(西 ロ 2013).翌 2014 年,兵庫県淡路市のサンプルを得て分離および予備試験 (LOPAT 試験, *hrpZ* 遺伝子に基づくグルーピング)を行い,2012 年静岡県浜松 市分離菌株と同様の特徴を示す分離菌株を得た.

本研究では、2012年および2014年に分離された菌株が、過去に分離されたネ ギ・タマネギ斑点細菌病菌と同様のものであることを確認し、遺伝子レベルの解 析、ネギ類を中心とした各種植物に対する病原性の確認、細菌学的性状の調査を 通して、*P. syringae* pv. porriと比較しつつ、その分類学的位置付けを明確にす ることを第一の目的とした.遺伝子による解析としては、一般的に植物病原細菌 のグルーピングに用いられる rep-PCR (repetitive DNA sequence-based PCR)、 ハウスキーピング遺伝子 (gyrB, rpoD, gltA, gap1) および 16S rDNA 塩基配 列に基づく系統解析に加え、病原性に関与する III 型分泌機構をコードする hrpS, *A*, *Z*, *B*遺伝子領域塩基配列に基づく系統解析を行い、ネギ・タマネギ斑点細菌 病菌とその類縁細菌との系統関係を比較検討した.その結果、ネギ・タマネギ斑

点細菌病菌は,遺伝子・病原性・細菌学的性状のいずれの点においても,リーキ 斑点細菌病菌とは明確に区別され, *P. syringae hrp*-IV 群菌における独立した分 類群であることが明らかになった.

3.2 供試菌株

2012 年 3 月静岡県浜松市のタマネギ圃場の罹病タマネギ(Fig. 3.1) より分離 された 4 菌株 (SUPP2934-SUPP2937), 2014 年兵庫県淡路市の罹病タマネギよ り分離された1菌株(SUPP3062)を用いた.これらの菌株は異なる植物個体よ り分離され、rep-PCR により遺伝子的に均一であることが確認された後、代表菌 株として選抜された.また、当研究室には 1969 年静岡県でタマネギより分離さ れた 1 菌株 (ICMP3414), 1986 年静岡県でネギより分離された 1 菌株 (SUPP695), 1987 年静岡県でネギより分離された 3 菌株 (SUPP942-SUPP944) のネギ・タマネギ斑点細菌病菌が保存されており、それらも併せて使用した. ネギ・タマネギ斑点細菌病と宿主・病徴が類似した病害として、リーキ斑点細菌 病が挙げられる. その病原細菌である P. syringae pv. porri を比較対象として用 いた.使用した菌株はいずれもリーキより分離され、1987年フランスで分離され た 1 菌株 (ICMP8961PT), 1973 年ニュージーランドで分離された 1 菌株 (ICMP3644), 1949年イギリスで分離された1菌株 (ICMP3642), 1971年ニュ ージーランドで分離された 1 菌株 (ICMP3413), 1973 年ニュージーランドで分 離された1菌株(ICMP3643)の計5菌株を用いた.更に、P. svringae hrp-IV 群菌の参考菌株として、当研究室に保存される pv. oryzae 1 菌株 (SUPP541<sup>PT</sup>= 1-2<sup>PT</sup>), pv. coronafaciens 1 菌株 (SUPP196 = AVPCO8101), pv. atropurpurea 1 菌株 (SUPP1678 = NIAS1309) および pv. striafaciens 1 菌株 (SUPP110 = avena2) と, 毒素検定の参考菌株として pv. phaseplicola 1 菌株 (SUPP1139 = BQH-1)と pv. syringae 1 菌株 (SUPP458 = LOB2-1) を用いた (Table 3.2).

### 3.3 材料および方法

#### (1) 病原性および宿主範囲試験

Allium 属植物として, Allium cepa L. (タマネギ, cv. 'ベビーオニオン'). A. fistulosum L. (ネギ, cv. '岩槻ネギ', cv. '九条ネギ'), A. fistulosum L. var. caespitosum Makino (ワケギ, cv. '二十日ワケギ'), A. schoenoprasum L. (セイヨ ウアサツキ, cv. 'chive'), A. schoenoprasum var. foliosum Regel (アサツキ, 品種 不明), A. ampeloprasum var. porrum (L.) J.Gay (リーキ, cv. 'ポワロ'), A. tuberosum Rottler ex Spreng (ニラ, cv. '幅広ニラ'), A. sativum L. (ニンニク, 品種不明), A. ascalonicum L. (エシャロット, cv. 'ポワトウ'), A. chinense G. Don (ラッキョウ, cv. '福井ラッキョウ') に対する病原性を試験した. これらの植物は, 育苗トレイに1粒ずつ播種し発芽後直径 9cm のビニルポットに1株ずつ移植し, 本葉 2-3 枚を展開した時期に接種を行った. また近縁の P. syringae 病原型が宿 主とする植物である Avena sativa L. (エンバク, cv. 'スワン'), Bromus catharticus Vahl (イヌムギ, 品種不明), Coffea arabica L. (コーヒー, cv. 'アラビ カ'), Cucumis sativus L. (キュウリ, cv. '鈴成り四葉'), Hordeum vulgare L. (オオ ムギ, cv. 'ファイバースノウ'), Lolium multiflorum Lam. (イタリアンライグラス, cv. 'タチマサリ'), Oryza sativa L. (イネ, cv. 'コシヒカリ'), Phaseolus vulgaris L. (インゲンマメ, cv. 'アーロン'), Phleum pratense L. (チモシー, cv. 'ホクセイ'),Saccharum officinarum L. (サトウキビ,品種不明), Secale cereale L. (ライムギ, cv. '春一番'), Sorghum bicolor (L.) Moench, (ソルガム, 'ソルゴー'), Triticum aestivum L. (コムギ, cv. 'アヤヒカリ'), Vigna unguiculata (L.) Walp. (ササゲ, cv. '黒種三尺大長'), Zea mays L. (トウモロコシ cv. '甘いんです'), Zizania latifolia L. (マコモ,品種不明)に対しても接種を行った.サトウキビ,トウモロ コシ, ソルガム, マコモを除くイネ科植物は, 直径 9cm の塩化ビニルポットに

4-5 粒を播種し、植物が本葉 4-5 枚を展開した時期に接種した.トウモロコシ、 ソルガムは,直径 9cm の塩化ビニルポットに1粒ずつ播種し,植物が本葉4-5枚 を展開した時期に接種した.サトウキビ、マコモに対する接種は、ワグネルポッ ト(1/2000 a) で生育した植物体の新葉に対して行った. コーヒーは直径 5cm の 塩化ビニルポットで生育した、本葉 6-8 枚を展開した植物体に対して接種した. キュウリ、インゲンおよびササゲは、直径 9cm の塩化ビニルポットに1粒ずつ播 種し、本葉 3-4 枚を展開した植物体に対して接種した. サトウキビを含むすべて の植物は、室温 20-27°C のガラス温室で生育させた. 接種は滅菌注射針(28G)を 用い、すべての植物の本葉に対して、菌液約 10µl の液滴を貫通するようにおこ なった. 菌液は, PPGA 斜面培地上で 27°C 24 時間培養した新鮮な菌体を, 約 10<sup>8</sup> cfu/ml 濃度になるように滅菌水に懸濁したものを用いた. セイヨウアサツキを除 く Allium 属植物, エンバク, イタリアンライグラスおよびイネに対しては, Table 3.2 に挙げる供試菌株のうち pv. syringae SUPP458 を除く 20 菌株を接種した. セイヨウアサツキに対しては、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌 ICMP3414, SUPP2934 と pv. porri ICMP8961<sup>pT</sup>の3菌株を選抜して接種した. イネ科植物 を除く13植物種に対しては、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌4菌株(SUPP2934, SUPP695, SUPP942, ICMP3414) を選抜して接種を行った. 結果は接種後 1-14 日,21日,28日後に観察した.

(2) 細菌学的性状試験

菌体の電子顕微鏡観察は,静岡大学グリーン科学研究所のご協力により,走査 型電子顕微鏡 JEM-1400Plus (JEOL) を用い, EM Stainer (Nisshin EM Co., Ltd.) で染色後に観察した. 菌体サイズは 0.25%サフラニン溶液 (サフラニン 2.5g, 95%エタノール 100ml, 蒸留水 900 ml) で染色し,光学顕微鏡により観 察した. 鞭毛は Ryu (1938)の方法に改変を加えて染色し,光学顕微鏡で観察した.

Ryu (1938)の方法を改変した鞭毛染色には、PPGA 斜面培地上で 27℃ 24 時間培 養した新鮮な菌体を,10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup>cfu/ml 程度の濃度になるように 1/2 濃度の YP 液体培 地 [酵母エキス 2.5g, ペプトン 5g, 蒸留水 1000ml, pH6.8, 121℃10 分オート クレーブ滅菌] 5ml に懸濁し, 20℃ 24 時間静置培養した菌液を用いた. この菌液 10µl を,よく洗浄したカバーガラスに載せた 1/2 濃度 YP 液体培地 10µl の縁に静 かに載せ,風乾後軽く火炎固定した.染色液は,溶液 1 [5% フェノール水溶液 10ml,タンニン酸 2g,AIK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·12H<sub>2</sub>O 飽和水溶液 10ml] と溶液 2 [クリスタル バイオレット 12g, 100%エタノール 100ml] を溶液 1:溶液 2 = 20:1 (溶液 2 は Ryu (1937)の方法の 1/2 の濃度)になるように混合した後,14,000rpm で 30 秒間遠 心したものを用いた. 10·15 分静置して染色後,カバーガラスの菌液が載ってい ない面を上に向け,ごく弱い水流の水道水で 2 分間洗浄して染色液を洗い流した. 顕微鏡観察は常法に従って行った.以上の観察は ICMP3414 に対して行った.

細菌学的性状は、Table 3.2 に挙げる供試菌株のうち pv. syringae SUPP458 を 除く 20 菌株に対し、第 2 章 2.2 の方法に従って行った. 生理・生化学的試験は グラム反応 (KOH 法) (Ryu 1940)、糖の酸化・発酵 (OF)、レバン産生、オキシ ダーゼ活性、ジャガイモ腐敗、タバコ過敏感反応、King's B 培地上での蛍光色素 生産、カタラーゼ活性、スクロースからの還元物質の生成、グルコン酸酸化、カ ゼイン・ゼラチン・エスクリン・Tween80・デンプンの加水分解、硝酸塩の還元 性、硫化水素の産生、フェニルアラニンデアミナーゼ活性、インドールの生成、 チロシナーゼ活性、40°C での生育、レシチナーゼ活性、牛乳培養について試験し た.炭素源の利用性は 0.1%濃度の炭素源を添加した Ayers et al. (Society of American Bacteriologists 1957)の培地を用い、以下の糖・有機酸・アミノ酸に ついて試験した. 糖は、D・マンノース、D・キシロース、D・ラフィノース、D・マ ンニトール、サリシン、グリセロール、D・セロビオース、D・メレジトース、D・ ガラクトース、マルトース、ラクトース、D・ソルビトール、α・メチル・D(+)・グル コシド、D・リボース、スクロース、*myo*イノシトール、D・フルクトース、L・ラム ノース、D・アラビノース、L・アラビノース、D・トレハロース、D・グルコース、 ズルシトール、メリビオース、アドニトール、デンプン、*meso*-エリスリトール である. 有機酸・アミノ酸は、DL・乳酸、D・酒石酸、L・酒石酸、*meso*-酒石酸、 グルコン酸、DL・リンゴ酸、D・サッカリン酸、n・カプリン酸、メサコン酸、マロ ン酸、コハク酸、クエン酸、酢酸、プロピオン酸、n・酪酸、ギ酸、グルタール酸、 グリセリン酸、D・キナ酸、セバシン酸、トリゴネリン、ベタイン、L・ロイシン、 L・セリン、L・イソロイシン、DL・アスパラギン酸、L・ヒスチジン、L・アルギニン、 &・アラニン、L・チロシン、L・バリン、DL・ホモセリンである. 結果は試験培地へ の接種後 1-3 日、5 日、7 日、14 日、21 日後に観察した.

### (3) hrpZ遺伝子に基づく P. syringae のグループ判別 PCR

Inoue and Takikawa (2006) により, ネギ・タマネギ斑点細菌病菌 ICMP3414, pv. porri ICMP8961<sup>PT</sup>, pv. oryzae SUPP541<sup>PT</sup>, pv. coronafaciens SUPP196, pv. atropurpurea SUPP1678, pv. striafaciens SUPP110 は, hrpZ 遺伝子に基 づくグルーピングでは P. syringae hrp-IV 群菌に属することが確認されている. この研究では, 2012 年および 2014 年に分離されたネギ・タマネギ斑点細菌病菌 (SUPP2934-SUPP2937, SUPP3062), 1986 年および 1987 年に分離されたネギ・ タマネギ斑点細菌病菌 (SUPP695, SUPP942-SUPP944), ICMP8961<sup>PT</sup> 以外の pv. porri 菌株 (ICMP3644, ICMP3642, ICMP3413, ICMP3643) のグループ 判別を目的として, hrp-IV 群菌特異的検出プライマーを用いた PCR を行った. また上記の菌株が他の P. syringae hrp グループ特異的検出プライマーで検出さ れないことを確認するため, hrp-I-A, I-B, II, III 群菌特異的検出プライマーを 用いた PCR による検出も併せて行った. hrp-I-A 群菌特異的検出 PCR では pv. phaseolicola SUPP1139 (BQH-1), I-B 群菌特異的検出 PCR では pv. lachrymance SUPP105 (cucum-1), II 群菌特異的検出 PCR では pv. actinidiae SUPP320 (Kw11), III 群菌特異的検出 PCR では pv. syringae SUPP458 (LOB2-1) を, そ れぞれポジティブコントロールとして使用した. これらの菌株は Inoue and Takikawa (2006) により, それぞれのグループに属することが確認されている. プライマーに関する詳細は Table 2.1 に, PCR サイクルは Table 2.2 に記載した.

### (4) rep-PCR に基づく比較

rep-PCR は、多様な細菌種のクロモソームゲノム内に広く分布する繰り返しエ レメントを利用してプライマーを設定し(Versalovic et al. 1991)、PCR により繰 り返し配列間を増幅して得た産物を電気泳動してバンドパターンの多様性を比較 するフィンガープリンティングの一種であり、*Pseudomonas* 属や *Xanthomonas* 属の各病原型間での遺伝子多様性の比較に有効であることが示されている (Louws et al. 1994). 繰り返し配列の種類としては主に、ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus), REP (repetitive extragenic palindromic sequence), BOX (repetitive DNA sequences of the BOX A subunit of the BOX element of *Streptococcus pneumoniae*)がよく知られている.

Rep-PCR は Rademaker et al. (1998) の方法に従った. 抽出したゲノム DNA を適宜希釈してテンプレートとし,反応組成は,5×Gistchier buffer [83mM (NH4)2SO4, 335mM Tris-HCl pH8.0, 33.5µM EDTA pH8.0, 150mM 8-mercapto-ethanol 208µl, 100×BSA 800µg/ml] 4.0µl, 100×BSA (10mg/ml) 0.32µl, DMSO 2.0µl, 2.5mM dNTP Mixture 1.6µl, プライマー各 0.1µl (rep-PCR BOX では 0.1µl), taq polymerase 0.2µl, テンプレート DNA 1.0µl, 滅菌蒸留水 10.68µl の全量 20µl で増幅を行った. プライマーに関する詳細は Table 2.1 に, PCR サイクルは Table 2.2 に記載した. (5) 16S rDNA に基づく系統解析

16S rDNA 塩基配列解析は, Weisburg et al. (1991), Hiraishi (1995) のダイ レクトシークエンシング法に基づき,ネギ・タマネギ斑点細菌病菌 SUPP2934 および ICMP3414 について行った. PCR による 16S rDNA 領域の増幅は Kusumoto et al. (2004) の方法に基づき, 10×Ex Taq Buffer 10µl, 2.5mM dNTP Mixture 8.0µl, プライマー (5µm) 各 10µl, taq polymerase 2.0µl, テンプレー ト DNA 10µl, 滅菌蒸留水 50µl の全量 100µl の反応組成で行った. プライマーに 関する詳細は Table 2.1 に, PCR サイクルは Table 2.2 に記載した.

PCR 増幅産物は、ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法で精製した. PCR 増幅産物 100µl に対し、3M 酢酸 Na 2µl、40% PEG6000 (w/v) 60µl を加えてよ く攪拌し、DNA を析出させた. 室温で 10 分間静置後 14,000rpm で 10 分間遠心 した. 100%エタノールでペレットを洗浄後、100%エタノールを取り除き、続い て 70%エタノールで再度ペレットを洗浄した. 70%エタノールを除去後、よく乾 燥させてから TE buffer に溶解した. サンプルの塩基配列解析は株式会社ベック スに委託し、ベックスより受け取ったデータを基に塩基配列を決定した.

解析に用いた 16S rDNA 塩基配列データは, アクセッションナンバー LC164015 (SUPP2934) と LC164016 (ICMP3414) として DDBJ (DNA Data Bank of Japan) データベース (http://www.ddbj.nig.ac.jp) に登録した. 比較対 象とする近縁 *P. syringae* 病原型の 16S rDNA 塩基配列は公共データベースより, pv. *porri* (ICMP8961<sup>PT</sup> and P55), pv. *theae* (PT1<sup>PT</sup>), pv. *actinidiae* (Kw11<sup>PT</sup>), pv. *oryzae* (str. 1\_6), pv. *atropurpurea* (MAFF301017<sup>PT</sup>), pv. *pisi* (PP105), pv. *syringae* (B301D), pv. *myricae* (ICMP7118<sup>PT</sup>), pv. *phaseolicola* (ICMP2740<sup>PT</sup>), pv. *tabaci* (ICMP2835<sup>PT</sup>), pv. *glycinea* (ICMP2189<sup>PT</sup>), *P. viridiflava* (CFBP2107<sup>T</sup> = ICMP2848<sup>T</sup>) を入手した. *P. viridiflava* (CFBP2107<sup>T</sup>) は系統樹を作成する際にアウトグループ菌株に設定した. 系統樹の作成は第2章

2.7 の方法に従い,比較対象菌株 16S rDNA 塩基配列のアクセッションナンバーは Fig. 3.2 に掲載した系統樹において,菌株名に続く括弧内に示した.

(6) gyrB, rpoD, gltA, gap1 遺伝子塩基配列に基づく系統解析

ハウスキーピング遺伝子 gyrBは DNA ジャイレースサブユニット Bを, rpoD は RNA ポリメラーゼの主要シグマ因子を, gltA はクエン酸合成酵素を, gap1 は グリセルアルデヒド・3・リン酸脱水素酵素をそれぞれコードし, いずれも P. syringae の系統解析に頻繁に用いられる遺伝子領域である.

gyrB, rpoD, gltA, gap1遺伝子塩基配列に基づく MLSA は,ネギ・タマネギ 斑点細菌病菌 5 菌株 (SUPP2934, SUPP695, SUPP942, ICMP3414, SUPP3062), pv. porri 3 菌株 (ICMP8961PT, ICMP3642, ICMP 3413), 参考菌株 4 菌株 (pv. oryzae SUPP541PT, pv. coronafaciens SUPP196, pv. atropurpurea SUPP1678, pv. striafaciens SUPP110) について行った. PCR 条件は, gyrB 遺伝子領域は Yamamoto et al. (1999), rpoD遺伝子領域は Maeda et al. (2006), gltA遺伝子 は Sarkar and Guttman (2004)の方法にそれぞれ従った. gap1 遺伝子領域は, Yan et al. (2008)の方法に基づき,94°C5分,(94°C30秒,58°C30秒,72°C 1分) × 30 サイクル, 72°C7分の反応サイクルで増幅した.反応組成は第2章 2.4 に従った. プライマーに関する詳細は Table 2.1 に, PCR サイクルは Table 2.2 に記載した. 第2章 2.5-2.7 の方法に従い, 増幅産物の塩基配列を決定し, DDBJ に登録した (Table 3.3). 比較対象とする近縁 P. syringae 病原型の該当領域塩 基配列は,公共データベースより, pv. savastanoi (ICMP4352PT), pv. phaseolicola (1448A), pv. actinidiae (NCPPB3739PT), pv. syringae (B728a), P. cannabina pv. alisalensis (ICMP15200PT), P. viridiflava (ICMP2848T) について得た. P. viridiflava (ICMP2848<sup>T</sup>) は個別のハウスキーピング遺伝子およびそれらをコン カテネートした配列に基づく系統樹を作成する際のアウトグループ菌株に設定し

た (Fig. 3.3-3.7). 比較対象菌株の該当領域塩基配列アクセッションナンバーは, Table 3.4 に記載した.

(7) hrpS, A, Z, B遺伝子塩基配列に基づく系統解析

P. syringae hrp-IV 群菌の hrpS, A, Z, B遺伝子領域塩基配列に基づく系統 解析を行うため、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌 4 菌株 (SUPP2934, SUPP695, SUPP942, SUPP3062), pv. porri 3 菌株 (ICMP8961PT, ICMP3642, ICMP 3413), pv. atropurpurea SUPP1678 菌株の該当領域の塩基配列を決定した.該当領域を 増幅するプライマーセット TSU11 および TSU12, TSU13 および TSU14 はこの 研究で新規に設計した. TSU11 / 12 は hrpS-Z遺伝子領域の 1223bp を, TSU13 /14 は hrpZ-B 遺伝子領域の 1248bp をそれぞれ増幅し, いずれも DDBJ に過去 に登録された P. syringae hrp-IV 群菌の該当領域塩基配列 (P. syringae ICMP3414 AB112581, pv. oryzae SUPP541PT AB112580, pv. striafaciens SUPP110 AB112579, pv. coronafaciens SUPP196 AB112578) (Inoue and Takikawa 2006)の保存性の高い部分に基づき設計した. PCR 増幅サイクルはど ちらのプライマーセットでも、94°C5分、(94°C30秒、59°C30秒、72°C90 秒)×30 サイクル,72°C7 分で行い,反応組成は第2章 2.4 に従った.プライマ ーに関する詳細は Table 2.1 に, PCR サイクルは Table 2.2 に記載した. 第2章 2.5-2.7 の方法に従い、増幅産物の塩基配列を決定し、DDBJ に登録した(Table 3.3).

比較対象とする近縁 P. syringae 病原型の該当領域塩基配列は,公共データベ ースより, pv. savastanoi (ICMP4352<sup>PT</sup>), pv. phaseolicola (1448A), pv. actinidiae (NCPPB3739<sup>PT</sup>), pv. syringae (B728a), P. cannabina pv. alisalensis (ICMP15200<sup>PT</sup>), P. viridiflava (ICMP2848<sup>T</sup>) を得て,上述の過去に公開された P. syringae hrp-IV 群菌の塩基配列と併せて系統解析を行った. P. viridiflava

(ICMP2848<sup>T</sup>) は系統樹を作成する際のアウトグループ菌株に設定した. 比較対象菌株の該当領域塩基配列アクセッションナンバーは Fig. 3.8 に掲載した系統樹において、菌株名に続く括弧内に示した.

(8) 毒素検定および efe 遺伝子, iaaM, Hおよび L 遺伝子, ina 遺伝子検定

毒素検定はコロナチン,タブトキシン,ファゼオロトキシン,マンゴトキシン, シリンゴマイシンについて PCR と生物検定の両面から調査した.加えて,エチ レン生合成関連遺伝子 *efe*,インドール酢酸生合成関連遺伝子 *iaaM*, *H*, *L*, 氷 核活性タンパク生合成遺伝子 *ina* の存在を PCR により調査した.

コロナチン生産は、Bareswill et al. (1994) の方法に基づくコロナファシン酸 リガーゼをコードする cfl遺伝子を検出する PCR と, 西山・江塚(1978)の方法 に基づき, PPGA 斜面培地上で 27°C 48 時間培養した菌体をジャガイモ塊茎スラ イスに塗布する生物検定により検定した.またコロナチン生産は、コロナチン生 産誘導培地 HS-C 培地 [グルコース 20 g, NH<sub>4</sub>Cl 1g, MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.2 g, KH2PO4 4.1 g, K2HPO4·7H2O 3.6 g, KNO3 0.3 g, 20 µM FeCl3, 蒸留水 1000ml, pH6.8, 121℃10 分オートクレーブ滅菌] (Palmer and Bender 1993) を用いての 調査も行った. HS-C 培地に 1.5%の寒天を添加して平板とし, 細菌を画線して 18°Cで 5-6日培養した. 培養後, 直径 15mm のディスクを平板培地からコルク ボーラーを用いてくり抜き、ジャガイモ塊茎スライスにのせて 18 ℃ で 2-3 日培 養した. 植菌していない HS-C 平板培地をネガティブコントロールとして使用し た.またネギ・タマネギ斑点細菌病菌は宿主植物上では毒素によると思われる黄 化を引き起こすところから、の宿主のひとつであるネギの葉部分によるコロナチ ン生産誘導を調査した.西山・江塚(1978)の方法に従い, PPGA 斜面培地上で 27°C48時間培養した菌体をジャガイモ塊茎スライスに塗布した後,塗布面に約 15×40mm 大のネギ葉切片を緑色の面が上になるようにかぶせ、ネギとジャガイ
モ塊茎を貫くように解剖針で数回穿刺した.ネギ切片は予め、切断後流水で 30 分間洗浄した.これを 18°C で 2-5 日培養した.ネガティブコントロールとして は、菌体を塗布しないジャガイモ塊茎スライスにネギ葉切片をかぶせて解剖針で 数回穿刺したものを用いた.

タブトキシン,ファゼオロトキシン,マンゴトキシン生合成は,生物検定と PCR による生合成関連遺伝子の検出により調査した. 生物検定は, Fahy and Persley (1983) と Staskawicz and Panopoulos (1979) の方法に基づき大腸菌 B株への生 育阻害により評価した.LB 培地上で 37 ℃ 24 時間培養した大腸菌 B 株を,55℃ 程度まで冷ました試験培地に添加して平板としたものに,試験する菌株をスポッ トで植菌した.ポジティブコントロールは、タブトキシンでは pv. oryzae (SUPP541<sup>PT</sup>)を,ファゼオロトキシンでは pv. phaseolicola (SUPP1139),マンゴ トキシンでは pv. syringae (SUPP458) を用いた. PCR による毒素生合成関連遺 伝子の検出は、タブトキシン生合成酵素 TblA をコードする tblA 遺伝子 (Berta et al. 1993), tox-argK 遺伝子クラスター (Schaad et al. 1995), マンゴトキシ ン生合成タンパクをコードする mboA 遺伝子 (Carrio'n et al. 2012) より試験 した. mboA 遺伝子検出プライマー (A-for, A-rev) は、より多くの P. syringae 病原型の該当領域を増幅できるよう改変を加えた. 改変の内容は Table 2.1 に示 し, PCR サイクルは 94 °C 5 分, (94 °C 30 秒, 65 °C 30 秒, 72 °C 30 秒) × 30 サイクル, 72 °C 7 分で行った. 反応組成は第2章 2.4 に従った. その他のプラ イマーに関する詳細は Table 2.1 に、PCR サイクルは Table 2.2 に記載した.シ リンゴマイシン生産は, Gross and De Vay (1977) と Sinden et al. (1971) の方 法に基づく Geotrichum candidum IFO5767 菌株を用いた生物検定と, Sorensen et al. (1998) の方法に基づくシリンゴマイシン生合成酵素をコードする syrB遺 伝子の PCR による検出で調査した. シリンゴマイシンについてはさらに, pv. syringae (SUPP458) を DNA テンプレートとして増幅した PCR 産物を基に作成

したプローブを用いて, 第2章2.9の方法に基づくサザンハイブリダイゼーショ ンによる検出も行った. エチレンは, Sato et al. (1997)の方法に基づく efe 遺伝 子の PCR による検出によって調査した. iaaM, H, L遺伝子の検出, ina 遺伝子 の検出は第2章2.8の方法に従った. efe 遺伝子検出 PCR では pv. phaseolicola (KZ-2W), iaaM, H, L遺伝子検出 PCR では pv. savastanoi (ICMP4352<sup>PT</sup>)を ポジティブコントロールに用いた. ina 遺伝子検出 PCR では, pv. savastanoi (ICMP4352<sup>PT</sup>)をポジティブコントロールに, pv. actinidiae (ICMP9617<sup>PT</sup>)を ネガティブコントロールにそれぞれ用いた. プライマーに関する詳細は Table 2.1 に, PCR サイクルは Table 2.2 に記載した.

(9) ネギ・タマネギ斑点細菌病菌特異的検出プライマーの設計及び PCR

*Allium* 属植物を中心に類似する病徴を示すネギ・タマネギ斑点細菌病菌とリーキ斑点細菌病菌 pv. porriの宿主範囲は基本的には異なる.しかし,タマネギ・エシャロット・ラッキョウにおいては,病徴は異なるものの,人為的接種によって 双方の病原細菌が病原性を示す. 圃場での効果的な病害制御を目的とした迅速な病原の判別を目指し,ネギ・タマネギ斑点細菌病菌特異的検出プライマーの設計 を行った.

特異的検出プライマーは, P. syringae hrp-IV 群菌のハウスキーピング遺伝子 より, gap1 遺伝子塩基配列を利用して設計した. hrp-IV 群菌では, ネギ・タマ ネギ斑点細菌病菌4菌株 (SUPP2934, SUPP695, SUPP942, ICMP3414), pv. porri3菌株 (ICMP8961<sup>PT</sup>, ICMP3642, ICMP3643), pv. atropurpurea3菌株 (SUPP1678, SUPP2431, SUPP2433), pv. striafaciens 5 菌株 (SUPP988, SUPP990, SUPP110, SUPP2432, SUPP2436), pv. coronafaciens 3 菌株 (SUPP992, SUPP2433, SUPP196), クリーピングベントグラス分離菌株5菌株 (SUPP2408, SUPP2004, SUPP2411, SUPP2003, SUPP2358), pv. oryzae

(SUPP541<sup>PT</sup>)の *gap1*領域塩基配列を用いた.菌株の詳細は Table 4.1 に記載した. pv. *phaseolicola* (1448A, acc. No. CP000058), *P. cannabina* pv. *alisalensis* (ICMP15200<sup>PT</sup>, acc. No. AB794998), pv. *actinidiae* (NCPPB3739<sup>PT</sup>, acc. No. NZ\_AFTH01000356), pv. *syringae* (B728a, acc. No. CP000075), *P. viridiflava* (ICMP2848<sup>T</sup>, acc. No. LKEH01000019) の *gap1* 領域塩基配列は公共データベースより得た. これらを MEGA 7.0 (Kumar et al. 2016) を用いてアライメントし, ネギ・タマネギ斑点細菌病菌に特異的な塩基配列を持つ箇所を利用して, 230bp を 増 幅 す る フ ォ ワ ー ド プ ラ イ マ ー TSU15 (5 '-CGGGGGCGGAGATAATCACT-3'), リバース プライマー TSU16 (5'-GTTTCGACACCGTACACGGCCCTT-3') を作成した. PCR サイクルは 94 ° C 5 分, (94 ° C 30 秒, 63 ° C 30 秒, 72 ° C 30 秒) × 30 サイクル, 72 ° C 7分で行った.反応組成は第 2章 2.4 に従い, プライマーに関する詳細は Table 2.1 に, PCR サイクルは Table 2.2 に記載した.

3.4 結果

(1) 病原性および宿主範囲試験

Allium 属植物への接種では,ネギ・タマネギ斑点細菌病菌はタマネギ,ネギ(cv. '岩槻ネギ', cv. '九条ネギ'), ワケギ, セイヨウアサツキ, アサツキ, エシャロッ ト, ラッキョウに病原性を示した.一方, pv. porriは, タマネギ, エシャロット, ラッキョウ, ニラ, ニンニクに病原性を示し, 両者の宿主範囲は異なった. タマ ネギ, エシャロット, ラッキョウでは両方の病原細菌が病原性を示したが, 病徴 は明らかに異なっており識別可能なものであった. タマネギ, ネギ(cv. '岩槻ネ ギ'), アサツキ, リーキ, ラッキョウ, ワケギ上での人為的接種による病徴は Fig. 3.9 に示した.

10 菌株のネギ・タマネギ斑点細菌病菌はタマネギ,ネギ (cv. '岩槻ネギ', cv. '九

条ネギ), ワケギのいずれにも, ネギ・タマネギ斑点細菌病に特徴的な同様の病 斑を形成した. 接種後 4-5 日でネギ・タマネギ斑点細菌病菌は, 直径 1-2mm ほ どの、少しくぼんだ灰白色の紡錘形の壊死を接種孔周辺に形成した.7-10日経過 すると壊死部分は直径 4-5mm に成長し、周囲には水浸部分が現れた. 壊死部分 は淡褐色に変化することもあった.水浸部分の縁には 1-2mm 幅の黄化がところ どころ観察され、毒素による一般的なハローとは異なり黄化部分と健全部分との 境界は不明瞭だった.水浸部分は、現病徴で観察されたかすり紋様の病斑へ変化 することもあった. 壊死斑のいくつかは, 後藤により記述されたように典型的な, ネギ・タマネギ斑点細菌病に特徴的な鳥眼状斑となった(Goto 1972). この病徴 は、試験した菌株の中ではネギ・タマネギ斑点細菌病菌の接種によってのみ観察 された. 感染が重篤になると、複数の水浸部分、壊死斑が癒合して大病斑を形成 し,病徴の現れた葉全体が枯死することもあった.アサツキでは,ネギ・タマネ ギ斑点細菌病菌はいずれも接種後5-7日で、接種孔周辺の灰白色の壊死周囲に暗 緑色の水浸状病斑を形成した.水浸部分の周囲には、淡黄色の変色がところどこ ろ見られた.水浸病斑は接種後 7-10 日で葉の周囲を取り囲むように拡大し、最終 的には淡褐色の壊死へ変化した。セイヨウアサツキには、ネギ・タマネギ斑点細 菌病菌では ICMP3414 と SUPP2934 のみ接種試験を行い、どちらも接種孔周辺 に水浸部分に囲まれた灰白色の壊死を形成した.水浸部分の縁には 1mm ほどの 幅の黄化が観察された. エシャロットとラッキョウでは、ネギ・タマネギ斑点細 菌病菌はいずれも接種後5-7日で、接種孔周辺に水浸病斑に囲まれた楕円形・灰 白色の壊死を形成した.水浸病斑の縁は黄化した.接種 7-10 日後には,接種孔周 辺の壊死は褐色に変化し、水浸部分は葉を取り巻くように拡大した.しかし、ネ ギ・タマネギ斑点細菌病菌は、リーキ、ニラ、ニンニクには病原性を示さなかっ た.これらの植物上では、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は接種孔にごく小さな壊 死を残すのみで水浸病斑を形成せず、壊死が拡大することもなかった.また、ネ

ギ・タマネギ斑点細菌病菌は,近縁の *P. syringae* 病原型が宿主とする植物上では,接種孔痕のごく小さな壊死を除き病原性を示さなかった.ただしコーヒーとササゲ上でのみ,接種孔痕の壊死周辺に,明瞭な境界を持つ幅 1-3mm の淡黄色のハローが観察された.

一方, pv. porri 菌株はいずれも, タマネギ, エシャロット, ラッキョウ, ニラ, ニンニクに病原性を示したが、ネギ、ワケギ、アサツキ、セイヨウアサツキには 病気を起こさなかった.タマネギとエシャロット,ラッキョウでは, pv. porri菌 株は、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌とは異なる病徴を示した. タマネギでは、pv. porri 菌株はいずれも, 葉脈に沿って伸びる強い壊死症状を呈し, 壊死部分は深 くくぼんでいた、壊死部分は、縁に黄化を伴う水浸病斑に囲まれており、黄化部 分と健全部との境界は不明瞭だった. 葉脈沿いではあるが接種孔周辺の病斑から 離れた箇所に水浸病斑が生じ、そこから病斑が拡大することもあった.しかし pv. porri 菌株の接種では、タマネギ上に、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌に特徴的な 鳥眼状病斑、かすり紋様の病斑が形成されることはなく、水浸病斑および壊死の 形状もネギ・タマネギ斑点細菌病菌の紡錘状の病斑とは異なっていた。エシャロ ットとラッキョウでも同様で, pv. porri 菌株による壊死および水浸病斑は, ネギ・ タマネギ斑点細菌病菌によるものと異なり、葉脈に沿って長く伸びた、水浸病斑 は縁に境界が不明瞭な黄化を伴い、接種箇所から離れた場所に水浸症状が現れる こともあった. リーキ上では, pv. porri 菌株はいずれも, 接種後 7-10 日後で, 接種孔周辺に直径 4-5mm ほどのくぼんだ楕円形の壊死を形成した。壊死部分は 縁に黄化を伴う水浸部分に囲まれており、水浸部分と黄化部分は葉脈沿いに伸び た.水浸症状は,葉の向軸面より背軸面からの方が明瞭に観察された. 10-14 日 経過すると,壊死病斑はタマネギ上で観察されたのと同様に葉脈に沿って伸びた. ニラ・ニンニクでは、pv. porri 菌株は葉脈沿いに伸びる壊死と水浸病斑を形成し て,接種に用いた葉全体が枯死するほどの強い病原性を示した.しかし pv. porri

菌株は、ネギ(cv. '岩槻ネギ', cv. '九条ネギ')・ワケギ・アサツキ・セイヨウアサ ツキのいずれにも病原性を示さなかった. 接種孔周辺にはごく小さな壊死斑が形 成されたが、水浸症状や黄化は伴わず、拡大することもなかった. 以上より、ネ ギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. porriの宿主範囲は基本的に異なっており、一部 重複するものの病徴で識別可能なことが明らかになった.

P. syringae hrp·IV 群菌の参考菌株として用いた菌株では、pv. coronafaciens (SUPP196) と pv. oryzae (SUPP541<sup>PT</sup>) が、タマネギおよびネギ、ワケギ上に、 深くくぼんだ灰白色の壊死病斑を形成した. 壊死部分は黄色いハローに囲まれて おり、ハローの幅は 3-7mm ほどで、健全部分との境界はくっきりと明瞭だった. ハローにより接種した葉全体が枯死することもあった. しかし、これらの病斑は 水浸部分を伴わず、また形状もネギ・タマネギ斑点細菌病菌による鳥眼状病斑と は明らかに異なっていた. アサツキ、エシャロット、ラッキョウでは、pv. coronafaciens (SUPP196) および pv. oryzae (SUPP541<sup>PT</sup>) は、接種孔周辺に水 浸部分を伴わない黄色いハローを形成したのみで病原性を示さなかった (Fig. 3.10). 他の参考菌株である pv. atropurpurea (SUPP1678), pv. striafaciens (SUPP110), pv. phaseolicola (SUPP1139) は、タマネギにもネギ・ワケギにも 病原性を示さなかった.

以上の結果より、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は、タマネギ、ネギ、ワケギ、 アサツキ,セイヨウアサツキ,エシャロットおよびラッキョウへの病原性を持ち、 *P. syringae* pv. *porri* とは宿主範囲と病徴において区別された.病原性および宿 主範囲試験の結果は Table 3.5 に示した.

(2) 細菌学的性状試験

細菌学的性状においては、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. porri は、チロ シナーゼ活性と、meso-エリスリトール、グルタール酸、L-ロイシン、ベタイン、 DL-ホモセリンの利用性で区別された.また *P. syringae hrp*-IV 群菌の参考菌株で,ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と完全に一致する性状を示すものはなく,ネギ・ タマネギ斑点細菌病菌は他と明確に区別された.

ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は,YP 寒天培地上で 27 ℃ 48 時間培養すると, 表面が平滑で全縁状,凸状の直径 1-2mm のコロニーを形成した.顕微鏡観察の 結果,菌体は幅 0.3-0.7µm,長さ 1.2-4.1µmの桿状で 1-3本の極毛で運動した (Fig. 3.11).

生理・生化学的試験の結果では、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は、 グラム陰性、 好気性細菌で、レバン産生陽性、オキシダーゼ活性陰性、ジャガイモ切片の腐敗 能陰性,アルギニンジヒドロラーゼ活性陰性,タバコ過敏感反応陽性で Lelliott et al. (1966) の LOPAT グループ Ia に属した. King's B 培地上での蛍光色素生産 は陽性だった. その他の生理・生化学的性質では、カタラーゼ活性、スクロース からの還元物質生成, ゼラチン・カゼイン・ツイーン 80 の加水分解において陽 性を示し、グルコン酸酸化、エスクリン・デンプン加水分解、硝酸塩の還元性、 硫化水素の産生、フェニルアラニンデアミナーゼ活性、インドール生成、チロシ ナーゼ活性,40°C生育,レシチナーゼ活性は陰性だった.牛乳培養試験ではカゼ インの消化を起こした. pv. porri は、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌とほぼ同様の 結果を示したが、唯一チロシナーゼ活性の点で異なり陽性だった. また、YP ブ ロスで 27°C 24 時間振盪培養した際, pv. porri は夥しい褐色色素を生産した. これは、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と、その他の参考菌株 (pv. orvzae) SUPP541<sup>PT</sup>, pv. coronafaciens SUPP196, pv. atropurpurea SUPP1678, pv. striafaciens SUPP110, pv. phaseolicola SUPP1139) では観察されなかった (Fig. 3.12).

細菌が唯一の炭素源として利用できる糖・有機酸の調査では、ネギ・タマネギ 斑点細菌病菌はいずれも、D-マンノース、D-キシロース、D-ラフィノース、D-

マンニトール,グリセロール,D・ガラクトース,D・ソルビトール,D・リボース, スクロース,myo・イノシトール,D・フルクトース,L・アラビノース,D・グルコー ス,meso・エリスリトール,meso・酒石酸,グルコン酸,DL・リンゴ酸,D・サッカ リン酸,n・カプリン酸,マロン酸,コハク酸,クエン酸,グルタール酸,グリセ リン酸,D・キナ酸,L・ロイシン,L・セリン,DL・アスパラギン,L・アルギニン, ベタインで陽性を示した.サリシン,D・セロビオース,D・メレジトース,マルト ース,ラクトース,a・メチル・D(+)・グルコシド,L・ラムノース,D・アラビノース, D・トレハロース,ズルシトール,メリビオース,アドニトール,デンプン,DL・ 乳酸,D・酒石酸,L・酒石酸,メサコン酸,酢酸,プロピオン酸,n・酪酸,ギ酸, セバシン酸,トリゴネリン,L・イソロイシン,L・ヒスチジン,B・アラニン,L・チ ロシン,L・バリン,DL・ホモセリンでは陰性だった.

炭素源の利用性でも, pv. porri は, ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と近い結果を 示したが, ネギ・タマネギ斑点細菌病菌では meso-エリスリトール, グルタール 酸, L・ロイシン, ベタインが陽性を示したのに対し, pv. porri は陰性だった. ま た DL・ホモセリンでは, ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は陰性を示したが, pv. porri は陽性だった.

参考菌株でネギ・タマネギ斑点細菌病菌と完全に一致する細菌学的性状を示す ものはなかった.供試菌株間で結果に差があった項目は Table 3.6 に示した.以 上より,ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は細菌学的性状においても pv. porri やそ の他の試験した P. syringae hrp-IV 群菌の病原型と区別された.

(3) hrpZ遺伝子に基づく P. syringae のグループ判別 PCR

Inoue and Takikawa (2006) の方法に基づく *hrpZ* 遺伝子による *P. syringae* のグループ判別 PCR を行ったところ, すべてのネギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. *porri* 菌株は, pv. *oryzae* (SUPP541<sup>PT</sup>), pv. *coronafaciens* (SUPP196), pv.

atropurpurea (SUPP1678), pv. striafaciens (SUPP110)と同様に P. syringae *hrp*-IV 群菌に属した. pv. *phaseolicola* (SUPP1139)は *hrp*-I-A 群菌に属した. *hrp*-I-A 群菌特異的検出プライマー (PS IA-F / PS IA-R) を用いた PCR では, 既 知の I-A 群菌である pv. phaseolicola SUPP1139 (BQH-1) のみが約 880bp のバ ンドを形成した. I-B 群菌特異的検出プライマー (PS IB-F / PS IB-R) を用いた PCR では, 既知の I-B 群菌である. pv. lachrymance SUPP105 (cucum-1) のみが 約 850bp のバンドを形成した. II 群菌特異的検出プライマー (PS II-F / PS II-R) を用いた PCR では、既知の II 群菌である pv. actinidiae SUPP320 (Kw11)のみ が約 1000bp のバンドを, III 群菌特異的検出プライマー (PS III-F / PS III-R) を 用いた PCR では, 既知の III 群菌である pv. syringae SUPP458 (LOB2-1)のみが 約 750bp のバンドを形成した. IV 群菌特異的検出プライマー (PS IV-F / PS IV-R) を用いた PCR では、1986年、1987年、2012年、2014年にネギ・タマネ ギより分離されたネギ・タマネギ斑点細菌病菌と, ICMP8961<sup>PT</sup>以外の pv. porri 菌株(ICMP3644, ICMP3642, ICMP3413, ICMP3643)はいずれも, 既知の IV 群菌であるネギ・タマネギ斑点細菌病菌 ICMP3414, pv. porri ICMP8961PT, pv. oryzae SUPP541<sup>PT</sup>, pv. coronafaciens SUPP196, pv. atropurpurea SUPP1678, pv. striafaciens SUPP110 と同様,約 780bp のバンドを形成した (Fig. 3.13). これにより、1986年、1987年、2012年、2014年にネギ・タマネ ギより分離されたネギ・タマネギ斑点細菌病菌と, ICMP8961<sup>PT</sup>以外の pv. porri 菌株(ICMP3644, ICMP3642, ICMP3413, ICMP3643)は、*P. syringae hrp*-IV 群菌に属することが確認された.

(4) rep-PCR に基づく比較

ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は, rep-PCR によっても pv. *porri* や他の P. syringae hrp-IV 群菌と明確に識別された.

rep-PCR (ERIC) による比較では、ネギ・タマネギ細菌病菌は、pv. porri や他 の近縁細菌とは明確に区別される特徴的なバンドパターンを持つひとつのグルー プを形成した. 他の P. syringae hrp-IV 群菌の参考菌株の中には、ネギ・タマネ ギ細菌病菌と類似したバンドパターンを示すものはなかった. ネギ・タマネギ細 菌病菌はいずれも、基本的には同じバンドパターンを示したが、SUPP942、 SUPP943, SUPP944, ICMP3414 ではバンドパターンにごくわずかな多様性が 観察された.2012 年(静岡)と 2014 年(兵庫)にタマネギより分離された菌株 は、起源は異なるもののバンドパターンは均一で、1986年に静岡県で分離された SUPP695 と同様のバンドパターンを示した. pv. porri は, 分離場所や分離時期 は5菌株いずれも異なるが, rep-PCR (ERIC) では均一なバンドパターンを示し た (Fig. 3.14). 一方, rep-PCR (REP) では, ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は pv. porriとは異なる均一のバンドパターンを示したが、pv. porri 菌株間ではごくわ ずかな多様性が観察された. ICMP3644 と ICMP3643 は同様のバンドパターン を示したが, ICMP8961<sup>PT</sup>, ICMP3642 と ICMP3413 はそれぞれわずかずつ異な った(Fig. 3.15). rep-PCR (BOX) による比較では、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌 と pv. porriは, 一見同様のバンドパターンを示すように見えた. しかし, 仔細に 観察すると, pv. *porri*では 1,000bp 付近に観察されるバンドがネギ・タマネギ斑 点細菌病菌では見られず,また 500bp 付近のバンドパターンにも差異が確認され, 両者をはっきりと区別することができた.ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. porri は、それぞれの系統内部では均一だった. rep-PCR (BOX) においても、参考菌 株である P. syringae hrp-IV 群菌のバンドパターンはいずれも、ネギ・タマネギ 斑点細菌病菌, pv. porriと明らかに異なった (Fig. 3.16).

以上より, rep-PCR によって, ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は, pv. porri や 他の P. syringae hrp-IV 群菌と区別され, また系統内部ではわずかに遺伝的多様 性が観察された.

(5) 16S rDNA 塩基配列に基づく系統解析

2012年に分離された SUPP2934 と, 1969年に分離された ICMP3414の2菌 株のネギ・タマネギ斑点細菌病菌の16S rDNA 塩基配列1459bpを得て, そのう ち1377bpを用いて系統解析を行った.ネギ・タマネギ斑点細菌病菌 SUPP2934 と ICMP3414の16S rDNA 塩基配列は互いに完全に一致した.また,比較対象 として公共データベースより得た2菌株のpv. porri 菌株(ICMP8961<sup>PT</sup>, P55) も16S rDNA 塩基配列は互いに100%一致していた.ネギ・タマネギ斑点細菌病 菌 SUPP2934 および ICMP3414 と,2 菌株の pv. porri 菌株(ICMP8961<sup>PT</sup>, P55) 間の塩基配列の差異は1377bp中2bpで,99.99%の相同性を示した.しかし, Jukes-Cantor model に基づく近隣結合法で作成された系統樹(Fig. 3.2)では, ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. porri は, P. syringae hrp-IV 群菌内でそれぞ れ別々の独立した分枝を形成した.ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と, pv. porri 以 外の hrp-IV 群菌の16S rDNA 塩基配列の相同性は99.1-99.7% だった.以上の 16S rDNA 塩基配列に基づく系統解析の結果より,ネギ・タマネギ斑点細菌病菌 は P. syringae hrp-IV 群菌に属することが示された.

(6) gyrB, rpoD, gltA, gap1 遺伝子塩基配列に基づく系統解析

16SrDNA 塩基配列のみから詳細な系統関係を検討することは困難だったが, ハウスキーピング遺伝子 gyrB, rpoD, gltA, gap1 に基づく系統解析では, P. syringae hrp-IV 群菌におけるネギ・タマネギ斑点細菌病菌の詳細な位置付けが 明らかになり, hrp-IV 群菌では他の病原型から独立した一系統であることが示さ れた.

gyrB 遺伝子 910bp に基づく比較では、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と、pv. porri はそれぞれの系統内ではほぼ相同な塩基配列を示したが、ネギ・タマネギ

斑点細菌病菌株間では SUPP695 と SUPP942 がそれぞれ 1bp ずつ他と異なり, pv. porri 菌株間では ICMP3413 が他と 2bp 異なり,系統内部での遺伝的多様性 が見られた. gyrB 遺伝子塩基配列に基づく系統樹では,ネギ・タマネギ斑点細 菌病菌と, pv. porri は, hrp-IV 群菌クレード内でそれぞれ独立したクラスター を形成した. ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は pv. atropurpurea (SUPP1678)と, pv. porri は pv. oryzae (SUPP541<sup>PT</sup>) や pv. coronafaciens (SUPP196) と近い位 置を占めた (Fig. 3.4).

*rpoD* 遺伝子 804bp に基づく比較でも、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌間, pv. *porri* 菌株間での配列相同性は高く、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌間では ICMP3414が 1bp, pv. *porri* 菌株間では ICMP3413が 2bp 系統内の他の菌株と 異なった. この違いは *rpoD* 遺伝子塩基配列に基づく系統樹にも反映されたが、 ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と, pv. *porri* は, *gyrB* 遺伝子の場合と同様, それ ぞれ独立したクラスターを形成した.ただし, *rpoD* 遺伝子に基づく系統樹では, ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は pv. *oryzae* (SUPP541<sup>PT</sup>) に近く位置し, pv. *porri* は *gyrB* 遺伝子の場合と反対に, pv. *atropurpurea* (SUPP1678) と共にクラスタ リングされた (Fig. 3.5).

gltA 遺伝子は、hrp-IV 群菌間で配列類似性が高く、gltA 遺伝子 545bp に基 づく系統樹では pv. striafaciens (SUPP110) と pv. coronafaciens (SUPP196) がネギ・タマネギ斑点細菌病菌と同一のクラスターを形成した (Fig. 3.6). ネギ・ タマネギ斑点細菌病菌間では、SUPP2934 が他と 1bp 異なったが、一方で pv. coronafaciens (SUPP196) の gltA 遺伝子塩基配列は SUPP2934 以外のネギ・タ マネギ斑点細菌病菌のそれと完全に一致した. pv. striafaciens (SUPP110) と は 1bp の違いだった. pv. porri は、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌とは離れて独 立したクラスターを形成し、hrp-IV 群菌クレードにおいては pv. atropurpurea (SUPP1678) や pv. oryzae (SUPP541<sup>PT</sup>) に近い位置にあった (Fig. 3.6). 近隣

結合法による系統樹でも,最尤法による系統樹でも同様のトポロジーが確認された.

gap1遺伝子に基づく比較では、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌間では SUPP2934 のみが、969bp 中 1bp 異なり多様性を示した.pv. porri は、MLSA に用いた 3 菌株 (ICMP8961<sup>PT</sup>, ICMP3413, ICMP3462) 間で gap1遺伝子塩基配列は均一 だった.gap1遺伝子塩基配列に基づく系統樹では、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌 と pv. porri 菌株はそれぞれ独立したクラスターを形成した.pv. porriクラスタ ーは pv. coronafaciens (SUPP196) や pv. striafaciens (SUPP110) と近い位置 にあり、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は hrp-IV 群菌クレードにおいては独立し たクラスターを形成した (Fig. 3.7).

ハウスキーピング遺伝子 gyrB, rpoD, gltA, gap1遺伝子領域の塩基配列解析 の結果をまとめると、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は gyrB, rpoD, gap1遺伝子 塩基配列それぞれに基づく系統樹で独立したクラスターを形成した.解析に用い た遺伝子の種類により,hrp-IV 群菌クラスター内でのネギ・タマネギ斑点細菌病 菌ブランチの位置は不安定だったが、常に他と識別可能な一分類群であることが 明らかになった.gltA遺伝子塩基配列は hrp-IV 群菌間での相同性が高く、ネギ・ タマネギ斑点細菌病菌は他の hrp-IV 群菌と共にクラスタリングされたが、pv. porriとは別のクラスターに位置し、gltA遺伝子塩基配列においても両者は明確 に区別された.この結果は、gyrB, rpoD, gltA, gap1遺伝子領域をコンカテネ ートして得た 3128bp の塩基配列に基づく系統樹によっても支持された(Fig. 3.3).すべての系統樹は Jukes-Cantor model に基づく近隣結合法と最尤法によ り作成され、いずれの遺伝子に基づく系統樹でも、結合方法によるトポロジーの 変化は見られなかった.

(7) hrpS, A, Z, B遺伝子塩基配列に基づく系統解析

*P. syringae hrp*-IV 群菌 *hrpS*, *A*, *Z*, *B*遺伝子領域を増幅するために、本研究 で新規に設計したプライマーセット TSU11 / TSU 12と TSU13 / TSU14により, ネギ・タマネギ斑点細菌病菌 4 菌株 (SUPP2934, SUPP695, SUPP942, SUPP3062), pv. porri 3 菌株 (ICMP8961<sup>PT</sup>, ICMP3642, ICMP 3413), pv. atropurpurea SUPP1678 菌株の該当領域の塩基配列 2462bp を得て比較を行う と、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. porriは、それぞれの系統内部では均一な 塩基配列を示した. hrpS, A, Z, B遺伝子個々の塩基配列では, hrpS, A およ び B遺伝子の塩基配列は、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. porri間で完全に 一致していたが, harpin エフェクタータンパクをコードする hrpZ遺伝子領域に 大きな違いが見られ,1115bp 中 22bp,371 アミノ酸中 10 箇所で異なった. hrpS, A, Z, B遺伝子塩基配列 2462bp 中 2226bp に基づく系統樹では、ネギ・タマネ ギ斑点細菌病菌と pv. porriは、hrp-IV 群菌クレードの中でそれぞれ独立した分 枝を形成した (Fig. 3.8). ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は pv. oryzae (SUPP541PT) と, pv. porriは pv. coronafaciens (SUPP196), pv. striafaciens (SUPP110)や pv. atropurpurea (SUPP1678)と共に,大きく2つのグループに分かれた.以上より, ハウスキーピング遺伝子だけでなく,病原性に関与する hrpS, A, Z, B 遺伝子 においても、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. porri は明らかに異なることが示 された.

(8) 毒素検定および *efe* 遺伝子, *iaaM*, *H*および *L*遺伝子, *ina* 遺伝子検定

毒素検定およびその他病原性関連因子の検定結果一覧を Table 3.7 に示した. コロナチンについては、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. porri は共に、PCR では生産関連遺伝子が検出されるが、従来の生物検定方法であるジャガイモ塊茎 スライス上ではコロナチン活性を確認することができなかった.しかし、ネギ切 片やコロナチン生産誘導培地を介すると、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌や pv. porri は、ジャガイモ塊茎スライスにコロナチン様の活性を示すことが本研究で明らか になった.その他の植物毒素タブトキシン・ファゼオロトキシン・マンゴトキシ ン・シリンゴマイシンについては、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は PCR・生物検 定双方において陰性を示した.毒性関連因子に関わる遺伝子を検出する PCR で は、エチレン生産に関わる efe 遺伝子は検出されず、インドール酢酸生合成に関 わる iaaM, Hおよび L 遺伝子のうち iaaL 遺伝子のみが検出された.氷核活性タ ンパクをコードする ina 遺伝子は、すべての供試菌株から検出された.

コロナチンの前駆物質コロナミン酸とコロナファシン酸を結合させる役割を果 たすコロナファシン酸リガーゼをコードする cfl 遺伝子増幅 PCR では、供試菌株 のうちすべてのネギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. porri 菌株, pv. atropurpurea (SUPP1678), pv. striafaciens (SUPP110) から約 650bp の増幅産物が確認さ れ、これらの菌株がコロナチン生産関連遺伝子の一部を保有することが示された. pv. oryzae (SUPP541<sup>PT</sup>), pv. coronafaciens (SUPP196), pv. phaseolicola (SUPP1139) では, cfl 遺伝子の増幅は確認されなかった (Fig. 3.17). Nishiyama and Ezuka (1978) の方法に基づきジャガイモ塊茎スライスを用いた生物検定で は、pv. atropurpurea (SUPP1678)のみで接種部位に明らかなジャガイモ塊茎組 織の肥大が確認され、コロナチン生産が認められた.すべてのネギ・タマネギ斑 点細菌病菌と pv. porri 菌株, pv. striafaciens (SUPP110) は、コロナチン生産 に関わる cfl 遺伝子の一部を保有しながらも, 接種部位に褐変を生じるに留まり コロナチンの生産は確認できなかった (Fig. 3.17). しかし, これらの菌株につい て、ネギ葉切片や、コロナチン生産誘導培地である HS-C 培地 (Palmer and Bender 1993) を介すると、ジャガイモ塊茎スライス上でコロナチン様の活性が 見られた. 第3章 3.2 (8)で述べた方法より HS-C 培地で各菌株を培養後, 培地を コルクボーラーでくり抜いてジャガイモ塊茎スライスに乗せると、2-3日で培地 に覆われた部分とその周辺に明らかな組織の肥大が確認された、ネギ葉切片を用

いた場合も同様のコロナチン様活性が観察された (Fig. 3.17). HS-C 培地とネギ 葉切片どちらの場合も,細菌を接種しないネガティブコントロールでは,ジャガ イモ塊茎組織の肥大は観察されなかった.

タブトキシン,ファゼオロトキシン,マンゴトキシンについては、ネギ・タマ ネギ斑点細菌病菌と pv. porri のすべての菌株は、大腸菌 B 株への生育阻害を示 さず、また PCR によってもこれらの毒素の生産関連遺伝子は検出されなかった. 参考菌株では pv. atropurpurea (SUPP1678), pv. striafaciens (SUPP110) も 同様だった. pv. oryzae (SUPP541<sup>PT</sup>), pv. coronafaciens (SUPP196), pv. phaseolicola (SUPP1139), pv. syringae (SUPP458) はそれぞれ大腸菌 B 株の生 育を阻害し試験培地上で阻止円を形成した. これら参考菌株については、既に毒 素生産能が確認されているため、L-アルギニンと L-シトルリン、L-グルタミンに よる回復調査は割愛した. タブトキシン生合成酵素 TblA をコードする tblA 遺 伝子を検出する PCR では、pv. oryzae (SUPP541<sup>PT</sup>), pv. coronafaciens (SUPP196) で約 650bp の増幅産物が確認された. argK 遺伝子検出 PCR では pv. phaseolicola (SUPP1139) より約 500bp, mboA 遺伝子検出 PCR では pv. syringae (SUPP458) より約 320bp の増幅産物がそれぞれ確認された.

シリンゴマイシンについて、Sorensen et al. (1998) の方法に基づく *syrB*遺伝 子検出 PCR では、すべてのネギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. *porri* 菌株, pv. *oryzae* (SUPP541<sup>PT</sup>), pv. *coronafaciens* (SUPP196), pv. *atropurpurea* (SUPP1678), pv. *striafaciens* (SUPP110), pv. *phaseolicola* (SUPP1139) から *syrB* 遺伝子は検出されなかった. pv. *syringae* (SUPP458) では、ターゲットで ある約 750bp の増幅産物が確認された. *G. candidum* IFO5767 菌株を用いた生 物検定では、すべての pv. *porri* 菌株は、ポジティブコントロールとして用いた pv. *syringae* (SUPP458) よりは弱いが、指示菌の生育を阻害した (Fig. 3.18). pv. *syringae* (SUPP458) の *syrB*遺伝子の PCR 増幅産物をプローブとして用い

たサザンハイブリダイゼーションでは、すべての pv. *porri* 菌株からシリンゴマ イシン生合成遺伝子は検出されなかった.シリンゴマイシンは NRPs (non ribosomal peptides: 非リボソームペプチド)として知られるため、公開されてい る pv. *porri* ICMP8961<sup>PT</sup>ドラフトゲノムシークエンスより NRPs を検索したが、 シリンゴマイシン生合成関連遺伝子として該当するものは見つからなかった.

そのほかの毒性関連因子の生合成関連遺伝子を検出する PCR では、エチレン 合成酵素をコードする efe 遺伝子はすべての供試菌株で検出されず、ポジティブ コントロールとして用いた pv. phaseolicola (KZ2W)のみで約 1050bp の増幅産物 が検出された. iaaM, H, L 遺伝子検出 PCR では、すべてのネギ・タマネギ斑 点細菌病菌と pv. porri 菌株, pv. oryzae (SUPP541PT), pv. coronafaciens (SUPP196), pv. atropurpurea (SUPP1678), pv. striafaciens (SUPP110), pv. phaseolicola (SUPP1139) からは, iaaMおよび H遺伝子は検出されず, iaaL遺 伝子 (約 450bp) のみが検出された. ポジティブコントロールとして用いた pv. savastanoi (ICMP4352PT) からは iaaM, H, L遺伝子すべてが検出された. ina 遺伝子検出 PCR では、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. porri 菌株, pv. oryzae (SUPP541PT), pv. coronafaciens (SUPP196), pv. atropurpurea (SUPP1678), pv. striafaciens (SUPP110), pv. phaseolicola (SUPP1139) とポジティブコン トロール pv. savastanoi (ICMP4352PT) から,約 260bp の増幅産物が確認された. ネガティブコントロール pv. actinidiae (SUPP320) からは何も増幅されなかっ た.

以上の毒素検定および efe 遺伝子, iaaM, Hおよび L遺伝子, ina 遺伝子検定 より,以上より,ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. porri 菌株, pv. striafaciens (SUPP110) は,コロナチン生産に関わる cfl 遺伝子の一部を保有するが,ジャ ガイモ塊茎スライスに塗布する従来の生物検定方法ではコロナチン生産を検出す ることができないことが確認された.また,それらの菌株は,ネギ葉切片やコロ

ナチン生産誘導培地を介すると、ジャガイモ塊茎スライス上でコロナチンを生産 する可能性が示された.

(9) ネギ・タマネギ斑点細菌病菌特異的検出プライマーの設計及び PCR ネギ・タマネギ斑点細菌病菌特異的検出プライマーTSU15/TSU16を用いて供試 菌株に対する調査を行ったところ、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌のみで特異的に ターゲットサイズである 230bp の増幅産物が認められ,他の供試菌株では増幅産 物は確認されなかった (Fig. 3.19). また, ネギ・タマネギ斑点細菌病菌 4 菌株 (SUPP2934, SUPP695, SUPP942, ICMP3414), pv. porri 3 菌株 (ICMP8961<sup>PT</sup>, ICMP3642, ICMP3643), pv. oryzae (SUPP541PT), pv. coronafaciens (SUPP196), pv. atropurpurea (SUPP1678), pv. striafaciens (SUPP110), pv. phaseolicola (SUPP1139) を用いてのコロニーダイレクト PCR でも、ネギ・タマネギ斑点細 菌病菌のみに 230bp のバンドを形成した (Fig. 3.19A). 他種細菌では, pv. syringae (SUPP458), pv. tabaci (SUPP278 = Pt7364), P. cannabina pv. alisalensis (ICMP4326), P. marginalis (SUPP96 = Chr-3), P. viridiflava (SUPP2964), P. cichorii (SUPP178 = TPSAsh8101), Xanthomonas campestris pv. campestris (SUPP1885 = X.c.c.1), X. citri pv. citri (SUPP965 = citrus802), X. oryzae pv. oryzae (SUPP1990 = ORXH1), Burkholderia glumae (SUPP1741 = GM4), Acidovorax avenae (SUPP2012 = イネ 2B), Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum (SUPP8), Dickeya zeae (SUPP739 = MAFF301658), Pantoea ananatis (SUPP2219 = CTB1135), Erwinia rhapontici (ICMP1582PT), E. persicinus (IAM12843PT) について調査を行ったが増幅産物 は確認されなかった (Fig. 3.19B).

以上より,ネギ・タマネギ斑点細菌病菌を特異的に検出する目的で設計された プライマーセット TSU15 / TSU16 は,試験した細菌種ではネギ・タマネギ斑点

細菌病菌のみを特異的に検出し、コロニーダイレクト PCR でも正常に機能する ことが確認された (Fig. 3.19C).

#### 3.4 考察

本章では、2012年タマネギより分離された菌株および過去にネギ・タマネギ斑 点細菌病から分離された菌株について、ネギ類を中心とした各種植物への病原 性・宿主範囲試験,遺伝子レベルの解析,毒素検定,細菌学的性状調査を行い, かつ類似した病害を起こす植物病原細菌である pv. porri と比較することで、そ の分類学的位置付けを明らかにした.その結果、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は、 すべての項目において pv. porri と明確に区別され、P. syringae hrp-IV 群菌に おける独立した分類群であることが確認された.ネギ・タマネギ斑点細菌病菌が pv. porri と系統的に異なることは、Samson et al. (1998) (ネギ・タマネギ斑点 細菌病菌 CFBP1787 = NCPPB2737 = ICMP3414, CFPB2336, CFBP2337, CFBP2338 を使用)と Noble et al. (2006) (ネギ・タマネギ斑点細菌病菌 CFBP1787 = NCPPB2737 = ICMP3414 を使用)による先行研究において、血清型, 脂肪酸解析、病原性、DNA フィンガープリントに基づき既に示唆されていたが、 本研究ではハウスキーピング遺伝子と hrp遺伝子にそれぞれ基づくMLSAを含め、 多面的に両者間の多様性を確認した.

まず,ネギ類を中心とした各種植物への病原性調査では,ネギ・タマネギ斑点 細菌病菌は,タマネギとネギ,ワケギ上で,圃場で観察された原病徴を再現した. 病徴は最初,不整形の黄化を伴う水浸病斑に囲まれた灰白色の壊死を形成し,続 いて,ネギ・タマネギ斑点細菌病の典型的な症状である鳥眼状病斑へと変化した. この症状は,Goto (1972) により初めて報告され,また 2012 年に静岡県のタマ ネギ圃場で観察された症状と同様だった.ネギ・タマネギ斑点細菌病菌はGoto (1972) により報告されているようにエシャロット及びラッキョウにも病原性を 示し, さらにアサツキとセイヨウアサツキにも病原性を示した.一方, pv. porri 菌 株は, 過去に報告されているようにリーキ, タマネギ, エシャロット, ニンニク, ニラに病原性を示した (Lelliot 1952; Hale 1975; Samson et al. 1998; Koike et al. 1999; Noble et al. 2006; van Overbeek et al. 2010; Myung et al. 2011; Roach et al. 2015; Rombout et al. 2016). タマネギに対しては, ネギ・タマネギ斑点細 菌病菌と pv. porri の両方が病原性を示したが, 病徴は異なっており, タマネギ 植物上での病徴により両者を区別することは可能だった. pv. porri は, タマネギ 上で, 葉脈に沿って伸びる深くくぼんだ病斑を形成したが, これは Koike et al. (1999) と Noble et al. (2006) により報告されている病徴と同様だった. また pv. porri 菌株はいずれも, ネギ・タマネギ斑点細菌病に典型的な症状である鳥眼 状病斑を形成しなかった. エシャロットおよびラッキョウ上においても, 両者は 共に病原性を示したが, 病徴により識別は可能だった. 加えて, ネギ・タマネギ 斑点細菌病菌と pv. porri では, 宿主範囲が異なった. pv. porri は, ネギ・ワケ ギ, アサツキ・セイヨウアサツキ, すなわち A. fistulosum と A. schoenoprasum のグループには病原性を示さず, 宿主特異性が異なることが明らかになった.

ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は、近縁の P. syringae hrp-IV 群菌が宿主とする 植物に対して病原性を示さなかったが、hrp-IV 群菌の中では、pv. oryzae (SUPP541<sup>PT</sup>)と pv. coronafaciens (SUPP196) がタマネギ、ネギ、ワケギに対し て、接種された葉全体が枯死するような強い毒性を示した.病斑は楕円形に深く くぼんだ灰白色の壊死で、強い黄色のハローを伴った.しかしこの壊死斑は水浸 部分を伴わず、接種孔に形成された壊死斑が拡大することもなかった.これらふ たつの病原型は、植物毒素タブトキシンを生産することでよく知られており、本 研究の毒素検定においても pv. oryzae (SUPP541<sup>PT</sup>)と pv. coronafaciens (SUPP196) のタブトキシン生産能は確認されている.よって、これらふたつの 病原型による毒性はタブトキシンの影響によるものであり、タマネギ、ネギ、ワ

ケギを宿主植物とみなすことの妥当性については、今後検討の必要がある.

ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. porriは、細菌学的性状でも識別された.24 種の生理・生化学試験、59 種の糖・有機酸・アミノ酸の利用性を調査した結果、 両者はチロシナーゼ活性、meso-エリスリトール、グルタール酸、L・ロイシン、 DL・ホモセリン、ベタインの利用性において異なる性状を示した.これらの結果 は、meso-エリスリトールについては Hale (1975)、Samson et al. (1998)、Noble et al. (2006)の研究により、また DL・ホモセリンについては Samson et al. (1998) と Noble et al. (2006)の研究により確認されており、これらの炭素源が、ネギ・ タマネギ斑点細菌病菌と pv. porri を識別する上で有効であることが示された.

遺伝子に基づく解析では、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. porri はどちら も P. syringae hrpZ遺伝子に基づくグループ判別 PCR で hrp-IV 群菌に属し、ま た rep-PCR (ERIC, REP, BOX) によるフィンガープリンティング, 16S rDNA に基づく系統解析,それぞれ 4 種のハウスキーピング遺伝子 (gyrB, rpoD, gltA, gap1) および hrp 遺伝子 (hrpS, A, Z, B) を用いた MLSA の結果では、2 つ の異なるクレードに分かれた. rep-PCR, 特に rep-PCR (ERIC) および rep-PCR (REP) では、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は、pv. porriや他の hrp-IV 群菌と明 らかに識別可能なバンドパターンを示した. rep-PCR (ERIC) ではネギ・タマネ ギ斑点細菌病菌間に、rep-PCR (REP) では pv. porri 菌株間に、それぞれわずか な多様性が見られたが、それらは分離地や分離年に関係するものではなく、ネギ・ タマネギ斑点細菌病菌と pv. porri には、いくつかの遺伝的に多様なバリエーシ ョンが含まれることが示唆された. この結果は、IS50 プライマーを用いたフィン ガープリンティングにより、ICMP3414 のバンドパターンは、様々な国で分離さ れた pv. porri 菌株やリーキ分離菌株とそれと異なることを示した Noble et al. (2006) の結果によって支持された.

16S rDNA 遺伝子は P. syringae hrp-IV 群菌の中でよく保存性されており, 16S

rDNA 遺伝子に基づく系統樹のみで, hrp-IV 群菌における各病原型の位置関係を 整理するのは困難だった. ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. *porri*は, hrp-IV 群菌クラスターにおいて他と識別可能なサブクラスターを形成したが、比較対象 菌株 pv. oryzae str. 1\_6 と pv. atropurpurea MAFF301017PT を区別することはで きなかった. しかし, ハウスキーピング遺伝子 (gyrB, rpoD, gltA, gap1) に 基づく系統解析では、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. porri はそれぞれに、 他の hrp-IV 群菌から独立した分枝を形成し、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌が他 と遺伝的に異なる系統であることが示された. さらに, III 型分泌機構をコードす る hrp 遺伝子クラスターの一部である hrpS, A, Z, B 遺伝子に基づく系統樹で も、この結果は支持され、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は pv. porriや他の hrp-IV 群菌から独立した個別の分枝に属した. 個別の hrp 遺伝子としては、 hrpZ 遺伝 子でネギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. porri間で 1115bp 中 22bp, アミノ酸に して 371 アミノ酸中 10 箇所に違いが見られた (98%相同性). hrpZ 遺伝子は分泌 タンパクをコードしており, この 10 アミノ酸による harpin タンパクの違いが, ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. porriの宿主範囲に影響を及ぼしている可能性 が示唆された.個々のハウスキーピング遺伝子および hrp 遺伝子に基づく系統樹 では、解析に用いる遺伝子の種類によって、hrp-IV 群菌クラスターにおけるネ ギ・タマネギ斑点細菌病菌の分枝の位置は変動した. 今後, P. syringae hrp-IV 群菌の菌株数や,解析に用いる遺伝子の種類を増やして,更に掘り下げた系統解 析を行う必要がある.

遺伝子的にネギ・タマネギ斑点細菌病菌と近い病原としては、近年アメリカで 報告され、タマネギ葉に強い黄化と葉枯れ症状を起こす「yellow bud」と呼ばれ る新病害の病原細菌である *Pseudomonas* sp. がある (Gitaitis et al. 2012). 公 共データベースに登録される「yellow bud」分離菌株の 16S rDNA 塩基配列 (ア クセッションナンバー: JF939841) は、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌の 16S rDNA

塩基配列と比較すると、1366bp 中 1bp が異なり 4bp が欠損しており、同配列に 基づく系統樹ではネギ・タマネギ斑点細菌病菌と同じクラスターに属した (デー タなし). しかし、Gitaitis らの分離菌株は、King's B 培地上で蛍光色素を生産し ない点でネギ・タマネギ斑点細菌病菌と異なる. また, Moloto et al. (2016) に より報告され,タマネギに葉枯れを起こす P. syringae の新病原型 pv. allii は, ハウスキーピング遺伝子である gap1 遺伝子塩基配列(618bp)に基づく P. syringae hrp-IV 群菌の系統樹では、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と近い位置を 占めた (Fig. 3.20). しかしネギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. allii は,系統樹上 でそれぞれ個別の分枝を形成することに加え,タマネギ上での病徴,宿主範囲, 細菌学的性状において異なった. すなわち, pv. alliiのタマネギ上での病徴は, pv. porriと同様の葉枯れおよび水浸状病斑のみであり、ネギ・タマネギ斑点細菌 病菌に特徴的な鳥眼状病斑やかすり文様の病斑の記述がないこと、pv. allii はネ ギ・タマネギ斑点細菌病菌の宿主植物であるネギやセイヨウアサツキに病原性を 示さないこと、細菌学的性状では、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は D-ソルビトー ルと D-ガラクトースを利用するが pv. allii は利用せず,反対に pv. allii は DL-乳酸利用性に陽性を示すが、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は陰性を示すことであ る. P. syringae 群細菌においては、上記のように病原型が異なるにも関わらず、 ハウスキーピング遺伝子に基づく MLSA で一致もしくは近い関係を示す場合が ある. 例えば P. savastanoi pv. savastanoi, pv. nerii, pv. fraxini は, 本研究で MLSA に用いたハウスキーピング遺伝子と同じ gyrB, rpoD, gltA および gap1 (計 2788bp)を用いて作成した系統樹では共に同一のクラスターに属し, pv. nerii は 2788bp 中 2bp, pv. fraxini は pv. savastanoi と一致するシークエンスを示し た (Moretti et al. 2016). しかしこれらは, 宿主範囲および植物ホルモン生産 (Iacobellis et al. 1998), rep-PCR (ERIC) (Tegli et al. 2010) により識別される 独立した病原型として認識されている.「yellow bud」分離菌株および pv. allii 菌

株も、16S rDNA やハウスキーピング遺伝子のような系統解析にしばしば用いら れる指標においてはネギ・タマネギ斑点細菌病菌と類似してはいるが、病原性や 細菌学的性状においては明確に区別される.

ネギ・タマネギ斑点細菌病の典型的な病徴は、壊死部分周辺の水浸病斑の縁に 黄化が現れるのが特徴であり、タマネギやネギの葉にクロロシスを起こす何らか の植物毒素生産の可能性が疑われた. 毒素生産に関わる遺伝子の PCR による検 出と、ジャガイモ塊茎によるコロナチン生物検定、大腸菌 B株を用いたタブトキ シンとファゼオロトキシン,マンゴトキシンの生物検定,G. candidum を用いた シリンゴマイシンの生物検定により、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. porri は、コロナチン生産のための cfl 遺伝子を保有していることが分かった. ネギ・ タマネギ斑点細菌病菌からは、試験した他の毒素生産関連遺伝子は検出されず、 また生物検定で明らかな陽性を示したものもなかった.ネギ・タマネギ斑点細菌 病菌と pv. porriのどちらも、ジャガイモ塊茎スライスに塗布する従来の検定方法 ではコロナチンを生産しなかったが,コロナチン生産誘導培地である HS•C 培地 を介するとジャガイモ塊茎組織にコロナチン様の活性を示した.この現象は参考 菌株のひとつ pv. striafaciens (SUPP110) でも同様だった. このことにより, ネ ギ・タマネギ斑点細菌病菌は、従来の生物検定方法では検出することができなか ったが、環境条件によりコロナチンを生産することが可能であり、このようなコ ロナチン生産方式をとる系統が P. syringae hrp IV 群菌には他にも存在すること が示唆された、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌のコロナチン生産は、何らかの要因 により阻害、もしくは促進される可能性があり、このコロナチン生産条件に関し ては今後更なる追及を要する.

本研究でネギ・タマネギ斑点細菌病を特異的に検出することを目的に作成した プライマーセット TSU15/16 は、コロニーダイレクト PCR でもネギ・タマネギ 斑点細菌病菌を特異的に検出した.しかし、より迅速な病原細菌の検出のために

は、ネギやタマネギなどの薬の病斑部から DNA を抽出・精製することなく直接 PCR を行う必要がある. プライマーセット TSU15 / 16 は、ネギ・タマネギ斑点 細菌病菌に特徴的な gap1 塩基配列に基づき設計されており、本研究で比較対象 のために用いた菌株間では、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌を特異的に検出可能で あることを確認した. しかし、双方のプライマーを BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) 検索すると、 TSU15 では植物病原細菌で同様の配列を持つものはなかったが、TSU16 につい ては pv. phaseolicola, pv. syringae, P. cannabina pv. alisalensis などが gap1 遺伝子に同様の配列を保有していた. 本研究で塩基配列解析を行った遺伝子のう ち, gyrBおよび rpoD遺伝子では特異的部分は 1 箇所のみでプライマー設計に適 さず、gltA 遺伝子には他の病原型から完全に独立した特異的部分がなかった. hrpZ遺伝子には 4 か所の塩基置換があったが、GC 含量がプライマー設計に適さ なかった. 分離菌株の純化を介さない植物サンプルダイレクト PCR において、 このプライマーセット TSU15 / 16 による検出が可能か、追って調査する.

以上より,2012年静岡および2014年兵庫で,ネギ・タマネギ斑点細菌病の症状を示すタマネギより分離された菌株は,過去の分離菌株と同様のネギ・タマネ ギ斑点細菌病菌であり,また,これらのネギ・タマネギ斑点細菌病菌は,病原性, 遺伝子,細菌学的性状において pv. porriと明確に区別されることが確認された. 日本で分離されたネギ・タマネギ斑点細菌病菌は, P. syringae 病原型における 独立した分類群であり,新病原型 Pseudomonas syringae pv. alliifistulosi pv. nov. として位置付けることを提案する.

宿主植物	病名	病原細菌	文献
ネギ	斑点細菌病	<i>Pseudomonas syringae</i> van Hall 1902 (pathovar 未決定)	Goto, 1972 後藤ら, 1981
ネギ	腐敗病	P. marginalis pv. marginalis (Brown 1918) Stevens 1925	梅川ら, 1983 飯富ら, 1983
ネギ	軟腐病	Pectobacterium carotovorum (Jones 1901) Waldee 1945 emend. Gardan, Gouy, Chiristen & Samson 2003	卜蔵, 1915 原, 1925
ネギ	軟腐病	Dickeya sp. (pathovar 未決定)	瀧川ら, 1983
ネギ	葉枯細菌病	Xanthomonas axonopodis pv. allii (Kadota, Uehara, Shinohara & Nishiyama 2002) Roumangac, Gagnevin, Garden, Sutra, Manceau, Dickstein, Jones, Rott & Pruvost 2004	Kadota et al, 2000
ネギ	褐色腐敗病	Burkholderia gladioli (Severini 1913) Yabuuchi, Kosako, Oyaizu, Yano, Hotta, Hashimoto, Ezaki & Arakawa 1993	酒井ら, 2011
タマネギ	斑点細菌病	<i>Pseudomonas syringae</i> van Hall 1902 (pathovar 未決定)	Goto, 1972 後藤ら, 1981
タマネギ	春腐病	<i>B. cepacia</i> (Palleroni & Holmes 1981) Yabuuchi, Kosako, Oyaizu, Yano, Hotta, Hashimoto, Ezaki & Arakawa 1993	瀧川ら, 2002 Sotokawa and Takikawa, 2004
タマネギ	春腐病	<i>Erwinia rhapontici</i> (Millard 1924) Burkholder 1948	大内ら, 1982; 1983
タマネギ	春腐病	P. marginalis pv. marginalis (Brown 1918) Stevens 1925	富永・土屋, 1958 大内ら, 1982;1983
タマネギ	かいよう病	Corynebacterium flaccumfaciens (Hedges 1922) Collins & Jones 1984 (pathovar 未決定)	谷井・小林, 1984
タマネギ	軟腐病	P. carotovorum (Jones 1901) Waldee 1945 emend. Gardan, Gouy, Chiristen & Samson 2003	原, 1930 田部井・吉田, 1952
タマネギ	りん片腐敗病	B. gladioli (Severini 1913) Yabuuchi, Kosako, Oyaizu, Yano, Hotta, Hashimoto, Ezaki & Arakawa 1993 (pathovar 未決定)	田中・青田, 1990

## Table 3.1 現在日本で確認されるネギ・タマネギの細菌性病害

Fig. 3.1



2012年静岡県のタマネギ圃場で観察されたネギ・タマネギ斑点細菌病の病徴. A. 鳥眼状・ 灰白色の壊死斑. B. かすり紋様状の病斑. 深刻な感染では複数の病斑が癒合して大病斑を 形成する.

菌株名	菌株別名	分離源	分離地	分離年	病原型
SUPP2934	1-a-1	Allium cepa	静岡	2012	BLSO agent
SUPP2935	2-a-1	A. cepa	静岡	2012	BLSO agent
SUPP2936	5-a-1	A. cepa	静岡	2012	BLSO agent
SUPP2937	8-a-1	A. cepa	静岡	2012	BLSO agent
SUPP3062	ネギ兵庫	A. cepa	兵庫	2014	BLSO agent
SUPP695	ALP8601	A. fistulosum	静岡	1986	BLSO agent
SUPP942	Ku74	A. fistulosum	静岡	1987	BLSO agent
SUPP943	Ku77	A. fistulosum	静岡	1987	BLSO agent
SUPP944	Ku95	A. fistulosum	静岡	1987	BLSO agent
<b>ICMP3414</b>	SUPP1440	A. cepa	静岡	1969	BLSO agent
ICMP8961PT		A. ampeloprasum var. porrum	France	1978	pv. <i>porri</i>
ICMP3644		A. ampeloprasum var. porrum	New Zealand	1973	pv. <i>porri</i>
ICMP3642		A. ampeloprasum var. porrum	U.K.	1949	pv. <i>porri</i>
ICMP3413		A. ampeloprasum var. porrum	New Zealand	1971	pv. <i>porri</i>
ICMP3643		A. ampeloprasum var. porrum	New Zealand	1973	pv. <i>porri</i>
<b>SUPP1678</b>	NIAS1309 <sup>a)</sup>	Lolium multiflorum	千葉	1971	pv. atropurpurea
SUPP541 <sup>PT</sup>	1-2 <sup>PT b)</sup>	Oryza sativa	青森	1983	pv. <i>oryzae</i>
SUPP196	AVPCO8101	Avena sativa	千葉	1981	pv. coronafaciens
SUPP110	avena2	A. sativa	千葉	1979	pv. striafaciens
<b>SUPP1139</b>	BQH-1	Phaseolus vulgaris	山梨	1989	pv. phaseolicola
SUPP458	LOB2-1	Syringa vulgaris	長野	1986	pv. syringae

Table 3.2 供試菌株

SUPP: Shizuoka University Plant Pathology, ICMP: International Collection of Microorganisms

from Plants

<sup>a)</sup> 西山 (1981)

<sup>b)</sup> 桑田 (1993)

### Fig. 3.2 16S rDNA 遺伝子塩基配列に基づく系統樹



0.0020

16S rDNA塩基配列(1377bp)を用いてJukes-Cantor modelに基づく近隣結合法により作成した系統樹.塩基配列のアクセッションナンバーは上図の括弧内に記載した.

Table 3.3 本研究で解析したハウスキーピング遺伝子および hrp遺伝子の DDBJ アクセッシ

Strain	pathovar	gyrB	rpoD	gltA	gap1	hrpS, A, Z, B
SUPP2934	BLSO agent	LC164027	LC164039	LC164051	LC164063	LC164076
SUPP695	BLSO agent	LC164028	LC164040	LC164052	LC164064	LC164077
SUPP942	BLSO agent	LC164029	LC164041	LC164053	LC164065	LC164078
SUPP3062	BLSO agent	LC164031	LC164042	LC164054	LC164066	LC164079
ICMP3414	BLSO agent	LC164030	LC164043	LC164055	LC164067	-
ICMP8961PT	pv. <i>porri</i>	LC164032	LC164044	LC164056	LC164068	LC164080
ICMP3642	pv. <i>porri</i>	LC164033	LC164045	LC164057	LC164069	LC164081
ICMP3413	pv. <i>porri</i>	LC164034	LC164046	LC164058	LC164070	LC164082
SUPP541 <sup>PT</sup>	pv. oryzae	LC164035	LC164047	LC164059	LC164071	-
SUPP196	pv. coronafaciens	LC164036	LC164048	LC164060	LC164072	-
SUPP1678	pv. atropurpurea	LC164037	LC164049	LC164061	LC164073	LC164075
SUPP110	pv. striafaciens	LC164038	LC164050	LC164062	LC164074	-

ョンナンバー



Fig. 3.3 gyrB, rpoD, gltA, gap1 遺伝子塩基配列に基づく系統樹

gyrB, rpoD, gltA, gap1 遺伝子をコンカテネートした塩基配列(3128bp)を用いて Jukes-Cantor model に基づく最尤法により作成した系統樹.本研究で解析した塩基配列の アクセッションナンバーは Table 3.3 に,比較対象として公共データベースより用いた菌株 のアクセッションナンバーは Table 3.4 に記載した.



gyrB遺伝子塩基配列(910bp)を用いてJukes-Cantor modelに基づく最尤法により作成した系統樹.本研究で解析した塩基配列のアクセッションナンバーはTable 3.3 に,比較対象として公共データベースより用いた菌株のアクセッションナンバーはTable 3.4 に記載した.

#### Fig. 3.5 rpoD 遺伝子塩基配列に基づく系統樹



0.0100

rpoD遺伝子塩基配列(744bp)を用いてJukes-Cantor modelに基づく最尤法により作成した系統樹.本研究で解析した塩基配列のアクセッションナンバーはTable 3.3 に,比較対象として公共データベースより用いた菌株のアクセッションナンバーはTable 3.4 に記載した.



gltA遺伝子塩基配列(573bp)を用いて Jukes-Cantor model に基づく最尤法により作成した系統樹.本研究で解析した塩基配列のアクセッションナンバーは Table 3.3 に,比較対象として公共データベースより用いた菌株のアクセッションナンバーは Table 3.4 に記載した.



# 0.0100

gap1遺伝子塩基配列(901bp)を用いてJukes-Cantor modelに基づく最尤法により作成した系統樹.本研究で解析した塩基配列のアクセッションナンバーはTable 3.3 に,比較対象として公共データベースより用いた菌株のアクセッションナンバーはTable 3.4 に記載した.

**Table 3.4** 本研究で系統樹を作成する際に使用した比較参考菌株の遺伝子とその公共データ ベースアクセッションナンバー

Strain	gyrB	rpoD	gltA	gap1		
pv. savastanoi ICMP4352 <sup>PT</sup>	NZ_LJRJ01000054	NZ_LJRJ01000196	NZ_LJRJ01000043	NZ_LJRJ01000148		
pv. <i>phaseolicola</i> 1448A	CP000058 <sup>a)</sup>					
pv. <i>actinidiae</i> NCPPB3739 <sup>PT</sup>	NZ_AFTH01000501	NZ_AFTH01000502	NZ_AFTH01000103	NZ_AFTH01000356		
pv. <i>syringae</i> B728a	CP000075 <sup>a)</sup>					
pv. <i>alisalensis</i> ICMP15200 <sup>PT</sup>	AB781098	AB795009	AB795004	AB794998		
P. viridiflava ICMP2848 <sup>T</sup>	LKEH01000023	LKEH01000048	LKEH01000015	LKEH01000019		

<sup>a)</sup> Whole genome sequence.
Fig. 3.8 hrpS, A, Z, B遺伝子塩基配列に基づく系統樹



hrpS, hrpA, hrpZ, hrpB 遺伝子をコンカテネートした塩基配列(2226bp)を用いて Jukes-Canter modelに基づく最尤法により作成した系統樹.本研究で解析した塩基配列の アクセッションナンバーは Table 3.3 および上図の括弧内に,比較対象として公共データベ ースより用いた菌株のアクセッションナンバーは上図の括弧内に記載した.



Fig. 3.9 人為的接種による病徴 (ネギ・タマネギ斑点細菌病菌, pv. porri)
タマネギ, ネギ, アサツキ, リーキ, エシャロット, ラッキョウへの病原性. A. タマネギ上での病原性, a) ネギ・タマネギ斑点細菌病菌 SUPP2934, b) pv. porri ICMP8961<sup>PT</sup>. B: ネギ(cv.
'iwatsukinegi')上での病原性, a) ネギ・タマネギ斑点細菌病菌 SUPP2935, b) pv. porri
ICMP3643. C: アサツキ上での病原性, a) ネギ・タマネギ斑点細菌病菌 SUPP2935, b) pv. porri
ICMP3643. D: リーキ上での病原性, a) ネギ・タマネギ斑点細菌病菌 SUPP2934, b) pv. porri
ICMP3644 (葉表), c) pv. porri ICMP3644 (葉裏). E: ラッキョウ上での病原性, a) ネギ・タマネギ斑点細菌病菌 SUPP2934, b) pv. porri
A ギ・タマネギ斑点細菌病菌 SUPP2934, b) pv. porri ICMP8961<sup>PT</sup>. F: ラッキョウ上での病原性, a) ネ



Fig. 3.10 人為的接種による病徴 (pv. oryzae, pv. coronafaciens)

ネギ,エシャロット,アサツキへの病原性. A:ネギ(cv. 'Iwatsuki-negi')上での病原性, a) pv. *coronafaciens* SUPP196, b) pv. *oryzae* SUPP541<sup>PT</sup>. B:アサツキ上での病原性, pv. *oryzae* SUPP541<sup>PT</sup>. C:エシャロット上での病原性, pv. *oryzae* SUPP541<sup>PT</sup>.

		BLSO agent	pv. porri	pv. oryzae	pv. corona- faciens	pv. atropu- rpurea	pv. stria- faciens	pv. phaseo- licola SUPP1139	
Plant species				SUPP541	SUPP196	SUPP1678	SUPP110		
A. cepa	タマネギ	++* <sup>a)</sup>	++ <sup>b)</sup>	$+h^{d}$	$+h^{d}$	-	-	-	
A. fistulosum (Iwatsuki-negi)	ネギ	++* <sup>a)</sup>	-	$+h^{d)}$	$+h^{d)}$	-	-	-	
A. <i>fistulosum</i> (Kujou-negi)	ネギ	++* <sup>a)</sup>	-	$+h^{d)}$	$+h^{d)}$	-	-	-	
A. fistulosum var. caespitosum	ワケギ	++* <sup>a)</sup>	-	$+h^{d)}$	$+h^{d)}$	-	-	-	
A. schoenoprasum	セイヨウ アサツキ	++ <sup>c)</sup>	_c)	nt	nt	nt	nt	nt	
A. schoenoprasum var. foliosum	アサツキ	++	-	-h	-h	-	-	-	
A. ampeloprasum var. porrum	リーキ	-	++	-	-	-	-	-	
A. sativum	ニラ	-	+	-	-	-	-	-	
A. tuberosum	ニンニク	-	++	++	++	-	-	-	
A. ascalonicum	エシャロット	++	++ <sup>b)</sup>	-h	-h	-	-	-	
A. chinense	ラッキョウ	++	++ <sup>b)</sup>	-h	-h	-	-	-	
Avena sativa	エンバク	-	-	+h	+h	_e)	+	-	
Coffea arabica	コーヒー	-h	nt	nt	nt	nt	nt	nt	
Lolium multiflorum	イタリアン ライグラス	-	-	-h	+h	+ <sup>e)</sup>	-	-	
Oryza sativa	イネ	-	-	+h	-h	_e)	-	-	
Phaseolus vulgaris	インゲンマメ	-	-	-	-	-	-	+	
Vigna unguiculata	ササゲ	-h	nt	nt	nt	nt	nt	nt	

### Table 3.5 病原性および宿主範囲試験の結果

++:陽性(縁に黄化を伴う水浸病斑を形成する),+:陽性(水浸病斑を形成するが縁に黄化

を伴わない), -: 陰性 (水浸病斑を形成しない), h: 黄色いハローを形成する, nt: not tested.

ネギ・タマネギ斑点細菌病菌および pv. porri 菌株間では均一な結果を示した.

a) A. cepa, A. fistulosum では、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は、縁に黄化を伴う水浸病斑 を形成し、本病害に特徴的な鳥眼状病斑を形成した.

<sup>b)</sup> A. cepa, A. ascalonicum, A. chinense では、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌および pv. porri 菌株の両方が病原性を示したが, pv. porri 菌株の病徴はネギ・タマネギ斑点細菌病とは異 なっており、葉脈に沿って伸びる、縁に黄化を伴う水浸病斑に囲まれた深くくぼんだ壊死斑 を形成した.

<sup>o</sup> A. schoenoprasum では、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌として選抜した ICMP3414 および SUPP2934 と、pv. porri 菌株として選抜した ICMP8961<sup>PT</sup> について試験した.

a) pv. oryzae SUPP541<sup>PT</sup>と pv. coronafaciens SUPP196 は病原性を示したが,病徴はネ ギ・タマネギ斑点細菌病の原病徴とは異なり,黄色いハローに囲まれた水浸部分を伴わない 深くくぼんだ壊死を形成した.

e) 接種部位周辺に赤紫色のハローを形成した.

 Pig. 3.11 與似現觀条による鞭毛の様子

 A

 9
 10

 20
 30

 40
 59

 68
 76

 50
 50

 10
 20

 30
 40

 59
 68

 76
 50

 10
 20

 30
 40

 50
 50

 10
 20

 10
 20

 10
 20

 10
 20

 10
 20

 10
 20

 10
 20

 10
 20

 10
 20

 10
 20

 10
 20

 10
 20

 10
 20

 10
 20

 10
 20

 10
 20

 10
 20

 10
 20

 10
 20

 10
 20

 10
 20

 10
 20

 10
 20

 10
 20

 10
 20

 10
 20

 10
 20

 10
 20

 10
 20

 10
 20</



A, B: 光学顕微鏡による観察 (ICMP3414). C: 走査型電子顕微鏡による観察 (ICMP3414, 画像提供:静岡大学グリーン科学研究所).

Fig. 3.11 顕微鏡観察による鞭毛の様子

# Fig. 3.12 YP ブロスでの色素生産





pv. porri 菌株は YP ブロスで 24 時間振盪培養すると褐色色素を生産するが, ネギ・タマネ ギ斑点細菌病菌と参考菌株では観察されなかった. 1-9; ネギ・タマネギ斑点細菌病菌, 1. SUPP2934; 2. SUPP2945; 3. SUPP2936; 4. SUPP2937; 5. SUPP695; 6. SUPP942; 7. SUPP943; 8. SUPP944; 9. ICMP3414, 10-14; pv. porri, 10. ICMP8961; 11. ICMP3644; 12. ICMP3642; 13. SUPP3413; 14. SUPP3643, 15-20; 参考菌株, 15. SUPP1678 (pv. atropurpruea); 16. SUPP541 (pv. oryzae); 17. SUPP196 (pv. coronafaciens); 18. SUPP110 (pv. striafaciens); 19. SUPP1139 (pv. phaseolicola); 20. SUPP458 (pv. syringae).

# Table 3.6 ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. porri 菌株, hrp-IV 群菌の他の病原型の菌株

Phenotypic characters	BLSO agent	pv. <i>porri</i>	pv. oryzae	pv. corona- faciens	pv. atropu- rpurea	pv. stria- faciens
Utilization of						
meso-erythritol	+	-	+	+	+	+
glutarate	+	-	+	+	+	+
betaine	+	-	+	+	+	+
L-leucine	+	-	+	+	+	+
DL-homoserine	-	+	-	-	-	-
Tyrosinase activity	-	+	+	+	-	-
Esculin hydrolysis	-	-	+	+	-	+
Fluorescent pigment production	+	+	+	+	-	+

間で異なる細菌学的性状

+: 陽性, -: 陰性. ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. porri 菌株間では結果は均一だった.

比較参考菌株は pv. oryzae (SUPP541PT), pv. coronafaciens (SUPP196), pv. atropurpurea

(SUPP1678), pv. striafaciens (SUPP110).



Fig. 3.13 hrpZ遺伝子に基づくの P. syringae hrp グループ判別 PCR

SUPP2934; 2. SUPP2935; 3. SUPP2936; 4. SUPP2937; 5. SUPP695; 6. SIPP942; 7.
 SUPP943; 8. SUPP944; 9. ICMP3414; 10. ICMP8961; 11. ICMP3644; 12. ICMP3642; 13.
 ICMP3413; 14. ICMP3643; 15. pv. *atropurpurea* SUPP1678; 16. pv. *oryzae* SUPP541; 17.
 pv. *coronafaciens* SUPP196; 18. pv. *striafaciens* SUPP110; 19. pv. *phaseolicola* SUPP1139; 20. DW; 21. pv. *lachrymance* SUPP105; 22. pv. *actinidiae* ICMP9617; 23. pv.
 syringae SUPP458; M. Hi-Lo DNA Marker (Bionexus, Oakland, CA).

# Fig. 3.14 rep-PCR (ERIC)



rep-PCR (ERIC)によるバンドパターンの比較. A. ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. porri 菌株との比較. B. ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と 参考菌株との比較. レーン 1-10; ネギ・ タマネギ斑点細菌病菌, レーン 11-15; pv. porri, レーン 16-20; 参考菌株. Lane 1, SUPP2934; 2, SUPP2935; 3, SUPP2936; 4, SUPP2937; 5, SUPP3062; 6, SUPP695; 7, SUPP942; 8, SUPP943; 9, SUPP944; 10, ICMP3414; 11, ICMP8961<sup>PT</sup>; 12, ICMP3644; 13, ICMP3642; 14, ICMP3413; 15, ICMP3643; 16, SUPP1678; 17, SUPP541<sup>PT</sup>; 18, SUPP196; 19, SUPP110; 20, SUPP1139; M, Hi-Lo DNA Marker (Bionexus, Oakland, CA). 各サンプル 10 µL を 1.5 % アガロースゲルにアプライして 50V で電気泳動した.

Fig. 3.15 rep-PCR (REP)



rep-PCR (REP)によるバンドパターンの比較. A. ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. porri 菌株との比較. B. ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と 参考菌株との比較. レーン 1-10; ネギ・ タマネギ斑点細菌病菌, レーン 11-15; pv. porri, レーン 16-20; 参考菌株. Lane 1, SUPP2934; 2, SUPP2935; 3, SUPP2936; 4, SUPP2937; 5, SUPP3062; 6, SUPP695; 7, SUPP942; 8, SUPP943; 9, SUPP944; 10, ICMP3414; 11, ICMP8961<sup>PT</sup>; 12, ICMP3644; 13, ICMP3642; 14, ICMP3413; 15, ICMP3643; 16, SUPP1678; 17, SUPP541<sup>PT</sup>; 18, SUPP196; 19, SUPP110; 20, SUPP1139; M, Hi-Lo DNA Marker (Bionexus, Oakland, CA). 各サンプル 10 µL を 1.5 % アガロースゲルにアプライして 50V で電気泳動した.

# Fig. 3.16 rep-PCR (BOX)



rep-PCR (BOX)によるバンドパターンの比較. A. ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. porri 菌株との比較. B. ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と 参考菌株との比較. レーン 1-10; ネギ・ タマネギ斑点細菌病菌, レーン 11-15; pv. porri, レーン 16-20; 参考菌株. Lane 1, SUPP2934; 2, SUPP2935; 3, SUPP2936; 4, SUPP2937; 5, SUPP3062; 6, SUPP695; 7, SUPP942; 8, SUPP943; 9, SUPP944; 10, ICMP3414; 11, ICMP8961<sup>PT</sup>; 12, ICMP3644; 13, ICMP3642; 14, ICMP3413; 15, ICMP3643; 16, SUPP1678; 17, SUPP541<sup>PT</sup>; 18, SUPP196; 19, SUPP110; 20, SUPP1139; M, Hi-Lo DNA Marker (Bionexus, Oakland, CA). 各サンプル 10 µL を 1.5 % アガロースゲルにアプライして 50V で電気泳動した. 黄 色い矢印はバンドパターンの違いを示す.

第3章

ネギ・タマネギ斑点細菌病菌の 同定および分類

	コロナチン		タブトキシン		マンゴーキシン		ファゼオロトキシン		シリンゴ マイシン		エチレン	iaaM	iaaH	iaaL	ina
菌株名	PCR	Bio	PCR	Bio	PCR	Bio	PCR	Bio	PCR	Bio	PCR	PCR	PCR	PCR	PCR
SUPP2934	+	+ <sup>a)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
SUPP2935	+	+ <sup>a)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
SUPP2936	+	+ <sup>a)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
SUPP2937	+	+ <sup>a)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
SUPP3062	+	+ <sup>a)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
SUPP695	+	+ <sup>a)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
SUPP942	+	+ <sup>a)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
SUPP943	+	+ <sup>a)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
SUPP944	+	+ <sup>a)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
ICMP3414	+	+ <sup>a)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
ICMP8961PT	+	+ <sup>a)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	+ <sup>b)</sup>	-	-	-	+	+
ICMP3644	+	+ <sup>a)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	+ <sup>b)</sup>	-	-	-	+	+
ICMP3642	+	+ <sup>a)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	+ <sup>b)</sup>	-	-	-	+	+
ICMP3413	+	+ <sup>a)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	+ <sup>b)</sup>	-	-	-	+	+
ICMP3643	+	+ <sup>a)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	+ <sup>b)</sup>	-	-	-	+	+
SUPP1678	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
SUPP541 <sup>PT</sup>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
SUPP196	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
SUPP110	+	+ <sup>a)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
SUPP1139	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
SUPP458	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+
KZ2W	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	+	nt	nt	nt	nt

Table 3.7 毒素検定および PCR による毒性関連遺伝子検出の結果

+: 陽性, -: 陰性, Bio: 生物検定.

a) ネギ葉・誘導培地を介するとコロナチン様の活性を示す.

<sup>b)</sup> *G. candidum* の生育を阻害するが, PCR およびサザンハイブリダイゼーションで *syrB* 遺伝子は検出されない.



Fig. 3.17 ネギ葉および誘導培地によるコロナチン様活性

A. ジャガイモ塊茎スライスに菌体を塗布する通常の生物検定における SUPP2934 のコロ ナチン活性(陰性). B. ジャガイモ塊茎スライスに菌体を塗布する通常の生物検定における SUPP1678 のコロナチン活性(陽性). C. ネギ葉切片を介した場合の ICMP3414 のコロナチ ン様活性の様子(誘導により陽性). D. a) HS-C コロナチン生産誘導培地を介した場合の SUPP110 のコロナチン様活性の様子(誘導により陽性). b) コロナチン生産誘導培地のみを ジャガイモ塊茎スライスにのせた場合(negative control).

Fig. 3.18 pv. porri 菌株による G. candidum の生育阻害



pv. *porri* 菌株による *G. candidum* の生育阻害. A-C; ネギ・タマネギ斑点細菌病菌, D; pv. *syringae* (positive control), E-G; pv. *porri*. A. ICMP3414, B. SUPP695, C. SUPP2934,
D. SUPP458, E, ICMP8961<sup>PT</sup>, F. ICMP3644, G. ICMP3642.





ネギ・タマネギ斑点細菌病菌特異的検出プライマーTSU15/TSU16 を用いたネギ・タマネギ 斑点細菌病菌の検出. A, B はゲノムテンプレート PCR, C はコロニーダイレクト PCR. レーン 1-9, ネギ・タマネギ斑点細菌病菌, 1, SUPP2934; 2, SUPP2935; 3, SUPP2936; 4, SUPP2937; 5, SUPP695; 6, SUPP942; 7, SUPP943; 8, SUPP944; 9, ICMP3414, レーン 10-14, pv. *porri*, 10, ICMP8961<sup>PT</sup>; 11, ICMP3644; 12, ICMP3642; 13, ICMP3413; 14, ICMP3643, 15, pv. *atropurpurea* SUPP1678; 16, pv. *oryzae* SUPP541<sup>PT</sup>; 17, pv. coronafaciens SUPP196; 18, pv. striafaciens SUPP110; 19, pv. phaseolicola SUPP1139; 20, pv. syringae SUPP458; 21, pv. tabaci SUPP278; 22, P. cannabina pv. alisalensis ICMP4326; 23, P. marginalis SUPP96; 24, P. viridiflava SUPP2964; 25, P. cichorii SUPP178; 26, Xanthomonas campestris pv. campestris SUPP1885; 27, X. citri pv. citri SUPP965; 28, X. oryzae pv. oryzae SUPP1990; 29, Burkholderia glumae SUPP1741; 30, Acidovorax avenae SUPP2012; 31, Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum SUPP8; 32, Dickeya zeae SUPP739; 33, Pantoea ananatis SUPP2219; 34, Erwinia rhapontici ICMP1582<sup>pT</sup>; 35, E. persicinus IAM12843<sup>pT</sup>; PC, コロニーダイレクト PCR の positive control (ICMP3414のゲノムをテンプレートとして用いた PCR 産物); M, Hi-Lo DNA Marker (Bionexus, Oakland, CA).

Fig. 3.20 ネギ・タマネギ斑点細菌病菌, pv. porri および他の hrp-IV 群菌と pv. alliiの位置

関係



0.01

gap1遺伝子塩基配列(618bp)を用いてJukes-Cantor modelに基づく近隣結合報により作成した系統樹.本研究で解析した塩基配列のアクセッションナンバーはTable 3.3 に記載した.

### 第4章 ネギ・タマネギ斑細菌病菌を含む P. syringae hrp-IV 群菌の系統関係

4.1 緒言

第3章で述べたように,病原性試験・遺伝子解析・毒素検定・細菌学的性状試 験の結果より、2012年ネギ・タマネギ斑点細菌病の症状を示すタマネギより分離 された菌株は、過去の分離菌株と同様のネギ・タマネギ斑点細菌病菌であり、な おかつそれらは, Allium 属に類似する病徴を起こすリーキ斑点細菌病菌 pv. porri と明確に区別される,独立した分類群であることが明らかになった.しかし,ハ ウスキーピング遺伝子および hrp 遺伝子に基づく系統解析の結果では, P. syringae hrp-IV 群菌内の系統関係は解析に用いた遺伝子により不安定で、ネギ・ タマネギ斑点細菌病菌の系統的位置は明確ではなかった、本章では、新たにイタ リアンライグラス, クリーピングベントグラス, エンバクより分離された P. syringae hrp-IV 群菌 18 菌株を追加して、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌を含む P. syringae hrp-IV 群菌の詳細な系統関係を追求した。新たに追加した供試菌株 であるイタリアンライグラスかさ枯病菌 pv. atropurpurea,エンバク条枯病菌 pv. striafaciens, エンバクかさ枯病菌 pv. coronafaciens, pv. atropurpurea および pv. striafaciens と同定されている(内海 2005, 卒業論文) クリーピングベント グラスかさ枯病菌の系統関係については、これまで詳細な報告がされていないた め、病原性試験、毒素検定、細菌学的性状試験、遺伝子解析を通して、新たに追 加した 18 菌株を含めて P. syringae hrp-IV 群菌の分類を試みた.

4.2 供試菌株

供試菌株は第3章で用いた20菌株 (Table 3.2) のうち,ネギ・タマネギ斑点細菌病菌4菌株 (SUPP2934, SUPP695, SUPP942, ICMP3414), pv. porri3菌株 (ICMP8961<sup>PT</sup>, ICMP3642, ICMP3643), pv. atropurpurea (SUPP1678),

pv. coronafaciens (SUPP196), pv. striafaciens (SUPP110), pv. oryzae (SUPP541<sup>PT</sup>), pv. phaseolicola (SUPP1139), pv. syringae (SUPP458) を選抜 し, それらに加えて, イタリアンライグラスより分離された pv. atropurpurea 2 菌株 (SUPP2431, SUPP2433), エンバクより分離された pv. striafaciens 4 菌株 (SUPP988, SUPP990, SUPP2432, SUPP2436), エンバクより分離された pv. coronafaciens 3 菌株 (SUPP992, SUPP2344, SUPP993), クリーピングベント グラスより分離された pv. atropurpurea 2 菌株 (SUPP2003, SUPP2358) およ び pv. striafaciens 3 菌株 (SUPP2408, SUPP2004, SUPP2411), セイヨウチャ ヒキより分離された 4 菌株 (SUPP3025, SUPP3159, SUPP3160, SUPP3162) の 計 18 菌株を追加した(Table 4.1). このうち SUPP2433 および SUPP300, SUPP2432 はコロナチン生産に関わる cfl 遺伝子を, SUPP993 はタブトキシン 生産に関わる tbl 遺伝子を欠損していることが, 当研究室の先行研究より明らか になっている (内海 2005, 卒業論文). 新たに追加された 18 菌株は, Inoue and Takikawa (2006) の方法に基づき P. syringae hrp-IV 群菌特異的検出プライマー で検出されることを事前に確認した.

4.3 材料および方法

(1) 病原性試験

病原性試験は、まず、Table 4.1 に記載した供試菌株のすべてに対して、Lolium multiflorum Lam. (イタリアンライグラス、cv. 'タチマサリ')、Avena sativa L. (エ ンバク、cv. 'スワン')、Agrostis palustris L. (クリーピングベントグラス、cv. 'ペ ンクロス')への単針付傷接種で行った. これらの植物は直径 9cm の塩化ビニルポ ットに 5-10 粒の種子を直播きし、室温 20-27°C のガラス温室で生育させた. 植 物は必要に応じて 4-5 本を残すように間引きし、本葉 2-3 枚を展開した時期に接 種を行った. 接種は滅菌注射針 (28G)を用い、すべての植物の上位 2 葉に対し て, 菌液約 10µlの液滴を貫通するように行った. 葉の先端から 2cm の地点より, 約 1-1.5cm おきに 2-3 カ所接種した. 菌液は, PPGA 斜面培地上で 27°C 24 時間 培養した新鮮な菌体を,約 10<sup>8</sup> cfu/ml 濃度になるように滅菌水に懸濁したものを 用いた. 接種後は高湿度(100%)下に一晩保管し,20-27°C のガラス温室に移動 して管理し,接種後 1-14 日,21 日,28 日後に結果を観察した.

また、イタリアンライグラス、クリーピングベントグラスのような葉身の幅が 狭い植物上では、病徴の観察に経験を要することがあり、また人為的接種により 接種葉が枯死する場合があることから、確実に病徴が識別可能な接種方法を検討 した. 直径 9cm の塩化ビニルポットに、イタリアンライグラス、クリーピングベ ントグラスの種子をばらまきし、室温 20・27°C のガラス温室で生育させた. 高さ 10cm ほどに生育した植物の葉の地際から 3cm の部分をエタノール消毒した鋏で 切り取り、切断面に滅菌綿棒で菌液をまんべんなく塗布した. 接種後、高湿度 (100%)下に一晩保管し、その後に 20・27°C のガラス温室に移動して管理した. 菌液は単針付傷接種の際と同様、PPGA 斜面培地上で 27°C 24 時間培養した新鮮 な菌体を、約 10<sup>8</sup> cfu/ml 濃度になるように滅菌水に懸濁したものを用いた (Fig. 4.1A). この葉身切り取り接種は、Table 4.1 に挙げた供試菌株すべてに対して試 験し、結果は接種後 1・14 日、21 日、28 日後に観察した.

さらに、エンバクへの人為的接種で、エンバク条枯れ病に特徴的な葉脈に沿っ て伸びる条斑を再現することが困難であった.森ら (2001) によれば、P. syringae pv. syringae が病原細菌であるオオムギ黒節病では、オオムギ植物体の 低温遭遇が病徴発現に影響を与えることが示され、接種前の幼苗を一晩4°C で保 管した直後に接種する方法が試されている.また、鈴木ら (2010) では、同じく pv. syringae を病原細菌とするコムギ黒節病で、コムギ幼葉鞘とその内部の未展 開葉への穿刺接種が、効果的な病徴再現に有効であることが示されている.オオ ムギ、コムギ共にエンバク同様単子葉植物であり、またどちらの黒節病もエンバ

ク条枯れ病菌 pv. striafaciens と近縁な P. syringae の一病原型を病原としてい ることから、本研究においてもこの手法を応用した.それに加えて、エンバク条 枯れ病の自然発生病徴にしばしば観察される、葉の折れ目からの病原細菌の感染 を再現するため、エンバク幼苗の葉を折り曲げて傷をつけ、その部分から細菌を 感染させる方法を試みた、よって、試験区は、エンバク幼苗葉身への単針付傷接 種、幼葉鞘への穿刺接種、幼苗葉身折り曲げ接種のそれぞれについて、接種前の 一晩を常温で保管したものと 4°C で保管したもの,計 6 試験区とした. 試験方法 は、幼苗葉身への単針付傷接種は第3章3.4(1)の方法に従った。幼葉鞘への穿刺 接種は, 菌液約 10μlの液滴を葉鞘の地際から 1-1.5cm の高さにのせ, 滅菌注射 針(28G)で液滴を貫通して葉鞘とその内部の未展開葉を穿刺した(Fig. 4.1B). 葉身折り曲げ接種は、上位2葉の中ほどを指で折り曲げ葉の表面に傷をつけ、付 傷部分に菌液を滅菌綿棒で塗布した (Fig. 4.1C). エンバク植物はすべて, 直径 9cm の塩化ビニルポットに 4-5 粒の種子を直播きし, 20-27°C のガラス温室で 高さ 10cm ほどに生育したものを用いた. 接種後の植物は, 高湿度(100%)下に 一晩保管し、その後に 20-27°C のガラス温室に移動して管理した. 菌液は、PPGA 斜面培地上で 27°C 24 時間培養した新鮮な菌体を,約 10<sup>8</sup> cfu/ml 濃度になるよう に滅菌水に懸濁したものを用いた.エンバク上での条斑形成効率は,SUPP110, SUPP988, SUPP2436, SUPP2432, SUPP3025 についてそれぞれの試験区で約 100 反復を試験し算出した. 参考菌株としてイタリアンライグラス分離菌株 SUPP1678 (pv. atropurpurea), クリーピングベントグラス分離菌株 SUPP2003 および SUPP2408, エンバクから分離されタブトキシンを生産することが第3章 において確認されている SUPP196 (pv. coronafaciens) を用いた. 結果は接種後 1-14日,21日,28日後に観察した.

(2) 細菌学的性状試験

P. syringae hrp-IV 群菌のうち, pv. atropurpurea, pv. striafaciens, pv. coronafaciens の間で、細菌学的性状に差異が示されることが過去に報告されて いる. Kuwata (1993) によると, pv. atropurpurea (NIAS1309 = SUPP1678) と pv. coronafaciens (NIAS1314) は、黄色蛍光色素生産、エスクリンおよびアルブ チンの加水分解, L-ロイシンの利用性で異なる. また Schaad and Cunfer (1979) では, pv. atropurpurea, pv. striafaciens, pv. coronafaciens の間で, 蛍光色素 生産, L-ロイシン, マロン酸, L-アスコルビン酸の利用性が異なるとされている. 第3章3.3 (2)の細菌学的性状試験の結果でも, pv. atropurpurea (SUPP1678), pv. coronafaciens (SUPP196), pv. striafaciens (SUPP110)の間には, 蛍光色素 生産,エスクリン加水分解,チロシナーゼ活性,カタラーゼ活性,サルコシン, マロン酸の利用性で違いが観察された.よって、細菌学的性状より追加供試菌株 を類別することを目的とし、蛍光色素生産、エスクリン加水分解、チロシナーゼ 活性,カタラーゼ活性,サルコシン,マロン酸, L-アスコルビン酸, L-ロイシ ンの唯一の炭素源としての利用性を調査した. 試験方法は第2章2.2の方法に従 った.調査は Table 4.1 に挙げる 29 菌株のうち, セイヨウチャヒキ分離菌株を除 く 25 菌株に対して行った. 結果は試験培地への接種後 1-3 日, 5 日, 7 日, 14 日,21日後に観察した.

(3) rep-PCR に基づく比較

rep-PCR に基づく比較は, 第3章(4)の方法に従い, Table 4.1 に挙げる供試菌 株のすべてに対して行った. ネギ・タマネギ細菌病菌としては SUPP2934 および ICMP3414, pv. *porri* としては ICMP8961<sup>pT</sup>および ICMP3643 を選抜して用いた. プライマ ーに関する詳細は Table 2.1 に, PCR サイクルは Table 2.2 に記載した.

(4) gyrB, rpoD, gltA, gap1 遺伝子塩基配列に基づく系統解析

ハウスキーピング遺伝子 gyrB, rpoD, gltA, gap1遺伝子領域の塩基配列解析 は,第3章3.3(6)の方法に従い, Table 4.1 に挙げる供試菌株のうち,第4章で新 たに追加した 18 菌株 (SUPP2431, SUPP2433, SUPP2003, SUPP2358, SUPP2408, SUPP2004, SUPP2411, SUPP988, SUPP990, SUPP2432, SUPP2436, SUPP992, SUPP2344, SUPP993, SUPP3025, SUPP3159, SUPP3160, SUPP3162) に対して行った. PCR プライマーに関する詳細は Table 2.1 に, PCR サイクルは Table 2.2 に記載した. 比較対象とする近縁 *P. syringae* 病原型の該当領域塩基配列は, 公共データベースより, pv. savastanoi (ICMP4352<sup>PT</sup>), pv. phaseolicola (1448A), pv. actinidiae (NCPPB3739<sup>PT</sup>), pv. syringae (B728a), *P. cannabina* pv. alisalensis (ICMP15200<sup>PT</sup>), *P. viridiflava* (ICMP2848<sup>T</sup>) について得た. *P. viridiflava* (ICMP2848<sup>T</sup>) は系統樹を作成する 際のアウトグループ菌株に設定した. 比較対象菌株の該当領域塩基配列アクセッ ションナンバーは, Table 3.4 に記載した.

(5) hrpS, A, Z, B遺伝子塩基配列に基づく系統解析

第3章 3.3(7)の方法に従い, *P. syringae hrp*-IV 群菌の *hrpS*, *A*, *Z*, *B*遺伝 子領域塩基配列に基づく系統解析を行った. 対象菌株は Table 4.1 に挙げる供試 菌株のうち, 第4章で新たに追加した 18 菌株のうち, セイヨウチャヒキ分離菌 株を除く 13 菌株 (SUPP2431, SUPP2433, SUPP2003, SUPP2358, SUPP2408, SUPP2004, SUPP2411, SUPP988, SUPP990, SUPP2432, SUPP2436, SUPP992, SUPP2344, SUPP993, SUPP3025, SUPP3159, SUPP3160, SUPP3162) と した. PCR プライマーに関する詳細は Table 2.1 に, PCR サイクルは Table 2.2 に記載した. *P. syringae* (ICMP3414), pv. *oryzae* (SUPP541<sup>PT</sup>), pv. *striafaciens* (SUPP110), pv. *coronafaciens* (SUPP196) 該当領域塩基配列は, DDBJ より過 去に登録された配列を使用した (Inoue and Takikawa 2006). 比較対象とする近 縁 *P. syringae* 病原型の該当領域塩基配列は,公共データベースより pv. savastanoi (ICMP4352<sup>PT</sup>), pv. phaseolicola (1448A), pv. actinidiae (NCPPB3739<sup>PT</sup>), pv. syringae (B728a), *P. cannabina* pv. alisalensis (ICMP15200<sup>PT</sup>), *P. viridiflava* (ICMP2848<sup>T</sup>) を得て,上述の過去に公開された *P. syringae hrp*-IV 群菌の塩基配列と併せて系統解析を行った. *P. viridiflava* (ICMP2848<sup>T</sup>) は系統樹を作成する際のアウトグループ菌株に設定した.比較対 象菌株の該当領域塩基配列アクセッションナンバーは Fig. 4.2 に掲載した系統樹 において,菌株名に続く括弧内に示した.

(6) 毒素検定および iaaM, Hおよび L 遺伝子, ina 遺伝子検定

第3章 3.3(8)および 3.4(8)の毒素検定および毒性に関わる遺伝子の PCR による 検出において、供試菌株のうち陽性を示すものがあったのはコロナチン、タプト キシン、インドール酢酸(*iaaM*, *H*, *L*遺伝子の PCR による検出)、氷核活性タ ンパク(*ina* 遺伝子の PCR による検出)だった。第4章で追加した 18 供試菌株 は、それぞれ第3章で用いた供試菌株に含まれる pv. atropurpurea, pv. striafaciens, pv. coronafaciens のいずれかに同定されている.よって本章では、 コロナチン、タブトキシンの生物検定および生合成関連遺伝子の PCR による検 出と、インドール酢酸生合成関連遺伝子 *iaaM*, *H*, *L*, 氷核活性タンパク生合成 遺伝子 *ina* の存在を PCR により調査した. コロナチンの生物検定については、 ジャガイモ塊茎スライスに塗布する通常の試験方法に加えて、第3章 3.4(8)で述 べたネギ葉および誘導培地を介してのコロナチン活性についても試験した.以上 試験は、第3章 3.3(8)の方法に従い、Table 4.1 に挙げた全菌株に対して試験を行 った.なお、第3章 3.4(8)で pv. porri 菌株は *G. candidum*を用いた生物検定で、 指示菌の生育を阻害し何らかの毒素を生産する可能性が示されたが、シリンゴマ イシン生合成関連遺伝子 syrBは、PCR およびサザンハイブリダイゼーションで

検出されなかったので、シリンゴマイシンの検定は、マンゴトキシン、ファゼオ ロトキシン、エチレンと共に本章の毒素および毒性関連因子の検定から除外した.

また、ネギ葉および誘導培地を介するとコロナチン様活性を示す P. syringae hrp-IV 群菌の特殊なコロナチン生産制御方式と、コロナチン生産関連遺伝子との 関係を調査するため、コロナチン生産に関わる他の遺伝子領域にもプライマーを 設定して PCR による検出を行った. 第 3 章 3.3(8)で用いたコロナチン生産関連 遺伝子 PCR 検出プライマーCOR1 / COR2 (Bareswill et al. 1994) は, コロナフ ァシン酸リガーゼをコードする cfl遺伝子領域を増幅するものだったので, cfl遺 伝子よりも上流のコロナチン生産関連遺伝子領域を増幅するプライマーを設計し た.植物毒素コロナチンは、コロナファシン酸のカルボキシル基とコロナミン酸 のアミノ基がアミド結合により縮合した構造をとる (Parry et al. 1994). この生 合成を触媒するコロナファシン酸リガーゼをコードするのが cfl 遺伝子であり (Liyanage et al. 1995), cor 遺伝子はそのレギュレーターとして機能する (Bender et al. 1996). よって、レギュレーター領域 corR, S, P 遺伝子領域を増 幅する TSU5 / TSU6, コロナミン酸の一部をコードする cmaA, E 遺伝子を増幅 する TSU7 / TSU8, コロナファシン酸の一部をコードする cfa6-cfa7 遺伝子領域 を増幅する TSU9 / TSU10 を新規に設計し, hrp-IV 群菌におけるそれらの遺伝子 の存在を調査した. cor R, S, P 遺伝子領域増幅プライマーTSU5 / TSU6 は, 公共データベースに登録される pv. glycinea PG4180 (acc. No. U33326.3, cor R, S, P 遺伝子領域), (acc. No. U33327.2, corP 遺伝子領域), pv. tomato DC3000 (acc. No. NC\_004578.1, cor R, S, P 遺伝子領域), pv. actinidiae ICMP19071 (acc. No. AOJS01000156.1, cor R, S, P 遺伝子領域)の同領域シークエンスより, 保存性の高い部分を用いて設計した. cmaE-cmaA 遺伝子領域増幅プライマー TSU7 / TSU8 は、公共データベースより pv. glycinea PG4180 (acc. No. AY391839.1), pv. tomato DC3000 (acc. No. NC 004578.1) の同領域シークエン

スを用い,保存性の高い部分に設定した. *cfa6*-*cfa7* 領域増幅プライマーTSU9/ TSU10は,公共データベースより pv. *tomato* DC3000株 (acc. No. NC\_004578.1) の同領域シークエンスに基づいて設計した. PCR プライマーに関する詳細は Table 2.1 に, PCR サイクルは Table 2.2 に記載した.

(7) コロナチン生産関連プラスミドの抽出およびサザンハイブリダイゼーション

コロナチン生産関連遺伝子 cfl, cor, cma, cfa 領域は, pv. atropurpurea (NIAES1309 = SUPP1678) では約 58Mdalの巨大プラスミド pCOR1 上に存在 することが確認されている (Sato et al. 1983). また, pv. atropurpurea と同様 コロナチンを生産することが知られている pv. glycinea (PG4180) でも, コロナ チン生産関連遺伝子の一部が約 90Kb の巨大プラスミド p4180A 上に存在する (Bender et al. 1991). よって本研究においても, PCR にて cfl 遺伝子が検出され た菌株のプラスミド抽出を試みた。抽出したプラスミド上にコロナチン生産関連 遺伝子が存在するか調査するために, SUPP1678の cfl, cor, cma, cfa 遺伝子の 一部を PCR によって増幅して作成したプローブを用いて、全ゲノムおよびプラ スミド抽出物に対するサザンハイブリダイゼーションを行った. cfl 遺伝子を増 幅する PCR プライマーは Bareswill et al. (1994) の COR1 / COR2 を, cor, cma, cfa 遺伝子を増幅する PCR プライマーは、本章 4.3(6)で設計した TSU5 / TSU6, TSU7 / TSU8, TSU9 TSU10 をそれぞれ用いた. PCR プライマーに関する詳細 は Table 2.1 に、PCR サイクルは Table 2.2 に記載し、プローブの作成およびサ ザンハイブリダイゼーションの方法は第2章2.9(1)-(4)に従った. サザンハイブ リダイゼーションは、エンバクより分離された pv. striafaciens (SUPP110, SUPP988, SUPP990, SUPP2432, SUPP2436), イタリアンライグラスより分 離された pv. atropurpurea (SUPP1678, SUPP2431, SUPP2433), クリーピン グベントグラス分離菌株 (SUPP2003, SUPP2358, SUPP2408, SUPP2004,

SUPP2411), ネギ・タマネギ斑点細菌病菌 (SUPP2934, ICMP3414), pv. porri (ICMP8961<sup>PT</sup>, ICMP3413), セイヨウチャヒキ分離菌株 (SUPP3025) に加え, コントロールとして, コロナチン生産関連遺伝子がプラスミドゲノム上に存在す ることが確認されている *P. syringae* pv. glycinea ダイズ 801 およびダイズ 8101 (日渡 1999, 修士論文), pv. tomato PT23 (Bender et al. 1989) を, またコロナ チン生産関連遺伝子がクロモソームゲノム上に存在することが確認されている *P.* cannabina pv. alisalensis ICMP4326 を用いた.

アルカリ SDS 法によるプラスミド抽出は, Birnborn and Doly (1979) の方法 に基づき行った. YP 液体培地 5ml に細菌を懸濁し, 27°C で 24-48 時間振盪培養 した. 菌液を 1.5ml マイクロチューブに移して 14,000rpm で 1 分間遠心して集 菌し,ペレットを STET buffer 400ul にボルテックスミキサーで懸濁し洗浄した. 14,000rpm で1分間遠心して再度集菌した後、上清を完全に取り除き、氷冷した Solution I [50mM グルコース, 25mM Tris-HCl pH8.0, 10mM EDTA pH8.0, 121℃ 10 分オートクレーブ滅菌] 200µl を加えてボルテックスミキサーで完全に 懸濁した.当日調整した Solution II [0.2N NaOH, 1% SDS, セルロースメンブ レンフィルター滅菌]400µlを加えて、ごく穏やかに2-3回マイクロチューブを転 倒して混合し, 氷上で5分間静置した. これに氷冷した Solution III [5M 酢酸 K 60ml, 酢酸 11.5ml, 蒸留水 28.5ml, 121°C 10 分オートクレーブ滅菌] 300µl とクロロホルム 10µl を加えて穏やかに攪拌し、氷上で 5 分間静置した. 14,000rpm で5分間遠心した後、上清を別のマイクロチューブに移し、等量のイ ソプロパノールを加えた.マイクロチューブを上下に転倒して十分に混合し,10 分間静置後, 14,000rpm で 15 分間遠心した. 70%エタノール 400µl でペレット を洗浄し、よく乾かした後 TE buffer 30µl に溶解させた.

4.4 結果

(1) 病原性試験と効率的な病斑形成方法の検討

病原性試験では、新たに追加した 18 菌株はそれぞれ分離源植物に病原性を示 した.エンバク、イタリアンライグラスやクリーピングベントグラスへの単針付 傷接種では、タブトキシンやコロナチンが形成するハローに病徴が影響され、病 原性の判定が困難な場合もあった (Fig. 4.3A, B).しかし、鋏を用いた葉身切り 取り接種により、イタリアンライグラス、クリーピングベントグラス上でも、そ れぞれから分離された菌株のみが病原性を示すことが明らかになった (Fig. 4.4B, C).また、低温遭遇したエンバクへの幼葉鞘穿刺接種および葉身折り曲げ 接種では、エンバク分離菌株とセイヨウチャヒキ分離菌株のみが条斑を形成し (Fig. 4.4A)、常温に保管したエンバク植物を用いた場合や、単身付傷接種と比較 して効率よく病斑形成することが分かった (Table 4.2, Fig.4.5).病原性試験の 結果一覧は Table 4.3 に示した.

単針付傷接種によるエンバクへの接種では、pv. coronafaciens, pv. striafaciens を含むエンバク分離菌株と、セイヨウチャヒキ分離菌株はいずれも病原性を示し た.タブトキシン生産能を持つ pv. coronafaciens SUPP196, SUPP992, SUPP2433 では,接種孔の壊死を中心に直径 8・20mm ほどの黄色のハローを形成 し、エンバクかさ枯れ病に特徴的な病徴を現した.タブトキシン生産関連遺伝子 を持たない pv. coronafaciens SUPP993 では黄色いハローは観察されなかったが, 接種孔の周辺に幅 0.5mm ほどのごくわずかな水浸状病斑を形成し、再分離によ り同菌株が分離された.エンバクより分離された pv. striafaciens SUPP110, SUPP988, SUPP990, SUPP2432, SUPP2436 および、セイヨウチャヒキより 分離された SUPP3025, SUPP3159, SUPP3160, SUPP3162 では、コロナチン 生産関連遺伝子の有無に関わらず、ハローを伴わない褐色の小壊死斑、もしくは 葉脈に沿って伸びた長さ 10・15mm ほどの褐色の条斑が形成された.どちらの病 斑も、接種孔周辺に幅 1・2mm の明らかな水浸部位を伴った.イタリアンライグ

ラスより分離された pv. atropurpurea SUPP1678, SUPP2431 では, 接種孔の壊 死斑を中心とする直径 4-10mm ほどの赤紫色のハローが形成されたが、壊死反は 水浸部位を伴わず、ハローは接種孔にとどまった菌体に蓄積されていた毒素によ るものと推測された. コロナチン生産関連遺伝子を欠損しているイタリアンライ グラス分離菌株 SUPP2433 では, 接種部位に水浸部位を伴わない褐色の小壊死斑 を形成したのみだった. クリーピングベントグラス分離菌株では, SUPP2003 と SUPP2358 (ジャガイモ塊茎スライス上でコロナチンを生産し現在 pv. atropurpurea と同定されているもの)は、イタリアンライグラス分離菌株と同 様の赤紫色のハローが形成された. SUPP2408, SUPP2004, SUPP2411 (ジャガ イモ塊茎スライス上ではコロナチン非生産で、現在 pv. striafaciens と同定され ているもの)では、ハローを伴わない褐色の小壊死斑を形成した、もしくは葉脈 に沿って伸びた長さ 2-3mm ほどの淡褐色の条斑が形成された. 以上をまとめる と, エンバク上で明らかな病原性を示すのは, エンバクより分離された pv. coronafaciens および pv. striafaciens 菌株であり、イタリアンライグラス分離 菌株やクリーピングベントグラス分離菌株と病徴において識別は可能だった.し かし、それらのうち毒素生産関連遺伝子欠損株では、クリーピングベントグラス の一部 (ジャガイモ塊茎スライス上ではコロナチン非生産で, 現在 pv. striafaciens と同定されているもの) や コロナチン生産関連遺伝子欠損のイタ リアンライグラス分離菌株との識別は容易ではなく,顕微鏡レベルの観察を要し た.また、エンバク上では、イタリアンライグラス分離菌株と、クリーピングベ ントグラス分離菌株の一部(ジャガイモ塊茎スライス上でコロナチンを生産し現 在 pv. atropurpurea と同定されているもの)の識別は不可能だった. ネギ・タ マネギ斑点細菌病菌4菌株とpv. porri3菌株は,接種孔に高濃度菌液の接種によ ると思われるわずかな壊死を形成したのみで病原性を示さなかった(Fig. 4.3A). イタリアンライグラスに対する単針付傷接種では、イタリアンライグラス分離

菌株(SUPP1678, SUPP2431)は、イタリアンライグラスかさ枯病に特有の濃 い赤紫色のハローを伴う, 葉脈に沿って上下に伸びる長さ 3-4mm, 幅 2mm 程の 紡錘形の壊死斑を形成した.水浸状病斑は,赤紫ハローの影響により視認できな かった. コロナチン生産関連遺伝子を欠損したイタリアンライグラス分離菌株で ある SUPP2433 では、接種孔周辺にわずかな水浸を伴う壊死を形成したが、赤紫 色のハローは観察されなかった.エンバクより分離された pv. striafaciens (SUPP110, SUPP988, SUPP990, SUPP2436, SUPP2432) とセイヨウチャヒ キ分離菌株 (SUPP3025, SUPP3159, SUPP3160, SUPP3162) は、コロナチ ン生産関連遺伝子の有無に関わらず、接種孔に高濃度菌液の接種によると思われ るわずかな壊死を形成したのみで病原性を示さなかった.エンバクより分離され た pv. coronafaciens では、タブトキシン生産関連遺伝子を持つ菌株 (SUPP196, SUPP992, SUPP2344)は、接種孔周辺に水浸部位を伴う壊死を形成し、周囲に は黄色のハローが観察された. 壊死斑の形状は、イタリアンライグラス分離菌株 が形成するような紡錘形ではなく、葉脈に沿って上下に 2-3mm の長さに伸びる 条斑様だった.タブトキシン生産関連遺伝子欠損の pv. coronafaciens (SUPP993) では, 接種孔に幅 0.5-1mm のごくわずかな水浸部分を伴う壊死斑のみで, 黄色 ハローは形成されなかった. クリーピングベントグラス分離菌株では, ジャガイ モ塊茎スライス上でコロナチンを生産する SUPP2003 と SUPP2358 は、イタリ アンライグラス分離菌株と同様の赤紫色のハローを伴う紡錘形の壊死斑を形成し た. ジャガイモ塊茎スライス上でコロナチン活性を示さない SUPP2408. SUPP2004, SUPP2411では, 接種孔に水浸部分を伴わないわずかな褐色の壊死 斑が形成された.ネギ・タマネギ斑点細菌病菌4菌株とpv. porri3菌株は、接種 孔に高濃度菌液の接種によると思われるわずかな壊死を形成したのみで病原性を 示さなかった.以上をまとめると、イタリアンライグラスへの単針付傷接種で、 イタリアンライグラスより分離された pv. atropurpurea とクリーピングベント

グラスより分離された pv. atropurpurea を識別することは困難だった. エンバ クより分離された pv. coronafaciens は、タブトキシン生産関連遺伝子の有無に 関わらずイタリアンライグラス上で水浸状病斑を形成し、イタリアンライグラス に寄生性を持つ可能性が示された. エンバクより分離された pv. striafaciens, セ イヨウチャヒキ分離菌株、クリーピングベントグラスより分離された pv. striafaciens は、イタリアンライグラス上ではいずれも接種孔周辺に類似した褐 色の壊死斑を残すのみで、イタリアンライグラス上でこれらを識別することは不 可能だった (Fig. 4.3B).

以上より,分離源植物への単針付傷接種では,病原性からすべての供試菌株を 識別することはできなかった.なお,クリーピングベントグラスへの単針付傷接 種では,接種に用いた葉全体が枯死したり,接種孔に穴が開いて葉身の幅いっぱ いの壊死が生じたりして病徴の観察が不可能だった.

しかし、イタリアンライグラス、クリーピングベントグラスに対する、鋏を用 いた葉身切り取り接種では、供試菌株は分離源植物に対する病原性で明らかに識 別された.まず、イタリアンライグラス上では、イタリアンライグラスより分離 された pv. atropurpurea (SUPP1678, SUPP2431)が、切り口の赤紫色素の下部 に水浸状病斑を形成しつつ、葉脈に沿って拡大した.それに対してクリーピング ベントグラスより分離された pv. atropurpurea (SUPP2003, SUPP2358)は、切 り口にわずかに赤紫色素が観察されたのみで、水浸状病斑を形成せず、葉脈沿い に拡大することはなかった.エンバクより分離された pv. striafaciens (SUPP110, SUPP988, SUPP990, SUPP2432, SUPP2436)とクリーピングベントグラスよ り分離された pv. striafaciens (SUPP2408, SUPP2004, SUPP2411)は、切り 口に水浸部分を伴わない壊死を生じるに止まった.エンバクより分離されタブト キシンを生産する pv. coronafaciens (SUPP32, SUPP2344, SUPP196)は、切 り口の壊死部分と黄色ハローの中間に水浸状斑を形成し、再分離によりイタリア

ンライグラス中での拡散が確認された.タブトキシン欠損 pv. coronafaciens 菌株 である SUPP993 では,黄色ハローは形成されなかったが,壊死部分下部に水浸 状斑が形成された.ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. porri 菌株は,切り口に 水浸部分を伴わない壊死を形成したのみだった (Fig. 4.4B).

さらに、クリーピングベントグラスに対する葉身切り取り接種では、エンバク より分離された pv. striafaciens (SUPP110, SUPP988, SUPP990, SUPP2432, SUPP2436) とクリーピングベントグラスより分離された pv. striafaciens (SUPP2408, SUPP2004, SUPP2411), イタリアンライグラスより分離された pv. atropurpurea (SUPP1678, SUPP2431) とクリーピングベントグラスより分 離された pv. atropurpurea (SUPP2003, SUPP2358) が明確に識別された. すな わち, クリーピングベントグラスより分離された pv. striafaciens (SUPP2408, SUPP2004, SUPP2411) と pv. atropurpurea (SUPP2003, SUPP2358) では, 水浸状病斑が葉脈に沿って,接種葉全体に拡大するのが確認できた.SUPP2003, SUPP2358 では、切り口だけでなく葉身に広がった水浸状病斑の周辺にも赤紫色 素が観察された. SUPP2408, SUPP2004, SUPP2411 では、切り口に黒褐色の 色素が観察された.これらの病徴はクリーピングベントグラスかさ枯れ病の原病 徴と一致した(小林ら 2001; 2002). それに対して, イタリアンライグラス分離 菌株, エンバクより分離された pv. striafaciens 菌株は, 切り口にそれぞれ赤紫 と黒褐色の変色を伴う壊死を形成したのみだった. エンバクより分離された pv. coronafaciens 菌株では、切り口の灰白色の壊死の下部に明瞭な黄色い変色が観 察されたが,水浸部分は形成されなかった.ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. porri 菌株は、切り口に水浸部分を伴わない壊死を形成したのみだった.以上よ り、クリーピングベントグラスは、P. syringae hrp-IV 群菌の識別に有効である ことが明らかになった.また、クリーピングベントグラス分離菌株は、病原性に おいてイタリアンライグラスより分離された pv. atropurpurea (SUPP1678,

SUPP2431), エンバクより分離された pv. *striafaciens* (SUPP110, SUPP988, SUPP990, SUPP2432, SUPP2436) とは区別されることが示された (Fig. 4.4C).

エンバクの幼葉鞘穿刺接種および葉身折り曲げ接種では、エンバク分離菌株と セイヨウチャヒキ分離菌株のみが条斑を形成した。単針付傷接種では、エンバク より分離された pv. striafaciens (SUPP110, SUPP988, SUPP990, SUPP2432, SUPP2436)が明らかな条斑を形成しない場合、クリーピングベントグラスより 分離された pv. striafaciens (SUPP2408, SUPP2004, SUPP2411), コロナチン 欠損のイタリアンライグラス分離菌株 (SUPP2433), タブトキシン欠損の pv. coronafaciens (SUPP993) との識別は困難だった. しかし幼葉鞘穿刺接種および 葉身折り曲げ接種においては、長く伸びる条斑を形成するのは、エンバクより分 離された pv. striafaciens (SUPP110, SUPP988, SUPP2432, SUPP2436)と、 セイヨウチャヒキ分離菌株 (SUPP3025) のみであった. 温度条件としては, 接 種前の一晩を低温遭遇させた植物では、著しく高い確率で条斑が形成された、常 温に保管した植物体を用いた場合でも 4-46%の確率で条斑は形成されたが, 接種 前一晩を 4°C の低温に遭遇した植物体では 69-97%の高い確率で、5-22 cmの長く 伸びる条斑を形成した.単針付傷接種では、低温遭遇させた場合でも条斑形成効 率は11%以下だった.以上より、低温遭遇、幼葉鞘穿刺接種および葉身折り曲げ 接種がエンバク上での条斑形成には有効であることが確認された(Table 4.2, Fig.4.5). なお, コロナチン生産関連遺伝子の有無と条斑形成能の間に相関関係 はなかった.植物上での病徴と病原性の有無については Table 4.4 にまとめた.

(2) 細菌学的性状試験

追加菌株を含めた細菌学的性状試験の結果は Table 4.5 に示した. イタリアン ライグラス分離菌株は蛍光色素生産陰性により,またエンバクより分離された pv. *striafaciens* のうち SUPP110, SUPP990, SUPP2436 はマロン酸利用性陰性に より他と識別されたが、エンバクより分離された pv. *striafaciens*の SUPP988, SUPP2432 およびクリーピングベントグラス分離菌株の細菌学的性状は多様で、 細菌学的性状からすべての菌株を識別することはできなかった.

蛍光色素生産については、イタリアンライグラス分離菌株3菌株(SUPP1678, SUPP2431, SUPP2433)を除き、試験した菌株はいずれもKing'sB培地上で蛍光色素を生産した.エスクリン加水分解は、クリーピングベントグラス分離菌株であるSUPP2003とSUPP2358、イタリアンライグラス分離菌株3菌株、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌とpv. porri 菌株が陰性を示し、他の菌株は陽性だった.チロシナーゼ活性は、エンバクより分離されたpv. striafaciens のSUPP110, SUPP988、SUPP2436、SUPP2432と、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌のみが陰性を示した.

炭素源の利用において、サルコシンについては、エンバクより分離された pv. striafaciens の SUPP110, SUPP988, SUPP2436, SUPP2432 と、ネギ・タマ ネギ斑点細菌病菌, pv. porri 菌株が陰性を示した.マロン酸については、エンバ クより分離された pv. striafaciens のうち SUPP110, SUPP988, SUPP2436 の みが陰性を示した. L-ロイシンの利用性では、コロナチン生産関連遺伝子欠損株 である SUPP2433, SUPP988, SUPP2432 のみが陰性を示した.

細菌学的性状試験に関するこれらの結果を、分離源植物ごとに並べ直すと、イ タリアンライグラス分離菌株では蛍光色素生産陰性、エンバクより分離された pv. *striafaciens* ではチロシナーゼ活性陰性・サルコシンおよびマロン酸の利用性陰 性、クリーピングベントグラス分離菌株では蛍光色素生産およびチロシナーゼ活 性陽性・サルコシンおよびマロン酸の利用性陽性という傾向があることが示され た (Table 4.5). しかし、細菌学的性状のみで *P. syringae hrp*-IV 群菌すべてを 分類するのは不可能だった.

(3) rep-PCR による比較

*P. syringae hrp*-IV 群菌の rep-PCR では、菌株間のバンドパターンは互いに非常に類似しており、通常電気泳動に用いる 60×105 mm (40ml) のアガローズゲルでは識別が難しかった. そこで特に 120×125 mm (100ml) のアガローズゲルを用い、泳動距離を延長して比較を行った.

rep-PCR (ERIC) による比較では、菌株はそれぞれの宿主に基づくグループに 分けられた. クリーピングベントグラスから分離された 5 菌株 SUPP2003, SUPP2358, SUPP2408, SUPP2004, SUPP2411 のグループ, ネギ・タマネギ 斑点細菌病菌 SUPP2934 と ICMP3414 のグループ, pv. *porri* ICMP8961<sup>PT</sup> と ICMP3643 のグループ, エンバクより分離された pv. *striafaciens* の SUPP110, SUPP990, SUPP2436 のグループ, イタリアンライグラスより分離された SUPP1678, SUPP2431, SUPP2433 のグループ, そしてエンバクより分離された た pv. *coronafaciens* SUPP196, SUPP992, SUPP2344 のグループである. エン バクより分離された pv. *striafaciens* のうち, SUPP2432 はいずれの グループにも属さず, 独自のバンドパターンを示した (Fig. 4.6).

rep-PCR (BOX) による比較では, バンドパターンは非常に類似しており, 大型サイズのゲルを用いて泳動距離を延ばしても識別は困難だった. クリーピング ベントグラスから分離された 5 菌株 SUPP2003, SUPP2358, SUPP2408, SUPP2004, SUPP2411 とエンバクから分離された SUPP988, ネギ・タマネギ 斑点細菌病菌, pv. porri のグループがそれぞれ識別されたが, その他の菌株のバ ンドパターンはほぼ均一で区別することはできなかった (Fig. 4.7).

(4) gyrB, rpoD, gltA, gap1 遺伝子塩基配列に基づく系統解析

ハウスキーピング遺伝子塩基配列に基づく系統解析では,新たに追加した 18 菌株の gyrB, rpoD, gltA, gap1 遺伝子領域の塩基配列を得て,第3章 3.3(6), 3.4(6)で得た,ネギ・タマネギ斑点細菌病菌を含む P. syringae hrp-IV 群菌およ び近縁細菌の塩基配列と併せて系統解析を行った.ハウスキーピング遺伝子によ る系統解析では,供試菌株はそれぞれの分離源に基づくクラスター構造をとった.

gyrB, rpoD, gltA, gap1遺伝子をコンカテネートした塩基配列 3228bp に基 づく系統樹では、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌 4 菌株と pv. porri 3 菌株がそれぞ れ独立したクラスターを形成したのに加え、クリーピングベントグラスからの分 離菌株 5 菌株(SUPP2003, SUPP2358, SUPP2408, SUPP2004, SUPP2411), イタリアンライグラスからの分離菌株 3 菌株(SUPP1678, SUPP2431, SUPP2433)も、それぞれ分離源植物に基づくクラスターを形成した.エンバク から分離された pv. coronafaciens 4 菌株(SUPP196, SUPP992, SUPP2344, SUPP993),エンバクより分離された pv. striafaciensのうち SUPP110, SUPP990, SUPP2436 がそれぞれ同じクラスターに属した.エンバクより分離された pv. striafaciensのうち, SUPP988 と SUPP2432 は、どちらのエンバク分離菌株ク ラスターにも属さなかった.また、セイヨウチャヒキ分離菌株は、独自のクラス ターを形成した(Fig. 4.8)、これら分離源植物単位のクラスター構造は、環状の 無根系統樹ではより容易に識別された(Fig. 4.9).

(5) hrpS, A, Z, B遺伝子塩基配列に基づく系統解析

*hrpS, A, Z, B* 遺伝子領域塩基配列に基づく系統解析では,新たに追加した 18 菌株の同領域の塩基配列を得て,第3章3.3(7),3.4(7)で得た,ネギ・タマネ ギ斑点細菌病菌を含む *P. syringae hrp*-IV 群菌および近縁細菌の塩基配列と併せ て系統解析を行った.

hrpS, A, Z, B 遺伝子塩基配列に基づく系統樹でも、ハウスキーピング遺伝 子による系統樹同様、供試菌株は分離源植物毎にそれぞれのクラスターに分類さ れた.ネギ・タマネギ斑点細菌病菌, pv. porri 菌株、イタリアンライグラス分離
菌株, エンバクから分離された pv. coronafaciens 菌株, エンバクより分離され た pv. striafaciens 菌株, クリーピングベントグラス分離菌株の各クラスターで ある. さらに, クリーピングベントグラス分離菌株は, ジャガイモ塊茎スライス 上でコロナチン活性を示す SUPP2003, SUPP2358 と, コロナチン生産関連遺伝 子を持ちながらもジャガイモ塊茎スライス上でコロナチン活性を示さない SUPP2408, SUPP2004, SUPP2411 のふたつのクラスターに分かれた (Fig. 4.2).

(6) 毒素検定および *iaaM*, *H*および *L*遺伝子, *ina* 遺伝子検定

毒素検定結果一覧は、Table 4.7 に示した. ジャガイモ塊茎スライスに直接菌体 を塗布する従来の方法でコロナチン活性を示さない菌株の中には、コロナチン生 産関連遺伝子を持ち、コロナチン生産誘導培地を介するとコロナチンを生産する ものがあった.

コロナチンに関して、従来の検定方法である、ジャガイモ塊茎スライスに塗布 する方法でコロナチン活性を示したのは、イタリアンライグラスより分離された pv. atropurpurea SUPP1678 と SUPP2431、クリーピングベントグラス分離菌株 SUPP2003 と SUPP2358 のみであった.しかし、cfl, cor, cma, cfa 遺伝子領 域を増幅する PCR では、上記の 4 菌株に加え、エンバクより分離された pv. striafaciens SUPP110、SUPP988、SUPP2436、ジャガイモ塊茎スライス上でコ ロナチン活性を示さないクリーピングベントグラス分離菌株 SUPP2408、 SUPP2004、SUPP2411、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌、pv. porri 菌株でも一連 のコロナチン生産関連遺伝子の存在が確認された.これらの菌株は、ネギ葉やコ ロナチン生産誘導培地 HS-C 培地を介すると、ジャガイモ塊茎の組織を肥大させ た.また、エンバクより分離された pv. striafaciens SUPP110、SUPP2436の cor 遺伝子領域は、ターゲットサイズの約 2500bp ではなく約 4000bp のバンドを形 成し、同領域に約 1500bp の大きなインサート部分が存在する可能性が示された. ネギ葉や誘導培地を介さなくてもジャガイモ塊茎スライス上でコロナチン活性を 示す SUPP1678 と SUPP2431, SUPP2003 と SUPP2358 に,ネギ葉や誘導培地 によるコロナチン生産誘導を与えても,ジャガイモ塊茎組織の肥大の程度は,直 接菌体を塗布した場合と比べて増加しなかった.イタリアンライグラスより分離 された pv. atropurpurea SUPP2433,エンバクより分離された pv. striafaciens SUPP990, SUPP2432 と,エンバクより分離された pv. coronafaciens SUPP196, SUPP992, SUPP2344, SUPP993 は,誘導をかけてもジャガイモ塊茎スライス 上でコロナチン活性を示さず,また PCR では cfl, cor, cma, cfa 領域は検出さ れなかった.

タブトキシン生産関連遺伝子 *tbl* 領域増幅 PCR では,エンバクより分離された pv. *coronafaciens* SUPP196, SUPP992, SUPP2344 よりターゲットサイズの増幅産物が検出され,これらの菌株は大腸菌 B 株を用いた生物検定でも陽性を示した.SUPP993 では PCR,生物検定ともに陰性を示した.またこれらの菌株では,いずれのコロナチン生産関連遺伝子も PCR により検出されなかった.

(7) コロナチン生産関連プラスミドの抽出およびサザンハイブリダイゼーション

SUPP1678の cfl 遺伝子領域に基づき作製したプローブによる全ゲノムサザン ハイブリダイゼーションの結果,ジャガイモ塊茎スライス上でコロナチンを生産 する SUPP1678, SUPP2431, SUPP2003, SUPP2358 だけでなく,ジャガイモ 塊茎スライス上でコロナチン活性を示さない SUPP110, SUPP988, SUPP2436, SUPP2408, SUPP2004, SUPP2411 でも cfl 遺伝子の存在が確認された.ネギ・ タマネギ斑点細菌病菌 SUPP2934, ICMP3414, pv. porri ICMP8961<sup>PT</sup>, ICMP3413 でも同様だった. PCR で同遺伝子が検出されなかった SUPP2433, SUPP990, SUPP2432 では,サザンハイブリダイゼーションでも同領域の存在 は確認できなかった (Fig. 4.10).

プラスミド抽出は,全ゲノムサザンハイブリダイゼーションで cfl 遺伝子を保 有することが確認された以下の菌株に対して行った.エンバクより分離された pv. striafaciens から SUPP110, SUPP988, SUPP2436, イタリアンライグラスよ り分離された pv. atropurpurea から (SUPP1678, SUPP2431), クリーピング ベントグラス分離菌株 (SUPP2003, SUPP2358, SUPP2408, SUPP2004, SUPP2411), ネギ・タマネギ斑点細菌病菌 (SUPP2934, ICMP3414), pv. porri (ICMP8961<sup>PT</sup>, ICMP3413) である.以上の菌株に加えて、コントロールとして、 pv. glycinea ダイズ 801 およびダイズ 8101, pv. tomato PT23, P. cannabina pv. alisalensis ICMP4326 を用いた. PCR および全ゲノムサザンハイブリダイゼー ションで cfl 遺伝子が検出されず、ジャガイモ塊茎スライス上でコロナチン活性 を示さない菌株 (SUPP2433, SUPP990, SUPP2432) は除外した. プラスミド 抽出物に対して, cfl, cor, cma, cfa 遺伝子各領域の PCR 増幅産物基づくプロ ーブを使用したサザンハイブリダイゼーションを行った結果、これらの遺伝子が プラスミド上に存在したのは、供試菌株では、イタリアンライグラスより分離さ れた pv. atropurpurea SUPP1678 および SUPP2431 と, クリーピングベントグ ラス分離菌株の SUPP2003 および SUPP2358 のみであった.これらの菌株は, 通常の生物検定方法で、ジャガイモ塊茎スライス上でコロナチン活性を示す.他 の供試菌株からもプラスミドは抽出され、電気泳動によりその存在が確認された が、これらのプラスミドには cfl, cor, cma, cfa 遺伝子は存在しなかった. コ ントロールとして用いた pv. glycinea ダイズ 801 およびダイズ 8101, pv. tomato PT23からもプラスミドが抽出され, cfl, cor, cma, cfa 遺伝子はいずれもプラ スミド上に存在した (Fig. 4.11-14).

### 4.5 考察

第3章より、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は、P. syringae hrp-IV群菌に属す

106

る他の病原型と明確に区別される独立した分類群であることが明らかになった. しかし,ハウスキーピング遺伝子および hrp 遺伝子塩基配列に基づく系統解析の 結果, hrp-IV群菌の系統関係は複雑で,系統解析に用いる遺伝子によってネギ・ タマネギ斑点細菌病菌クラスターの位置は不安定であった.本章では,新たに追 加した 18 菌株の hrp-IV群菌と併せ,ネギ・タマネギ斑点細菌病菌を含む hrp-IV 群菌の系統関係を更に追求した.

追加菌株を用いてのハウスキーピング遺伝子および hrp 遺伝子塩基配列に基 づく系統解析では,供試菌株はほぼ分離源に基づくクラスター構造を示した.す なわち,ネギ・タマネギから分離されたネギ・タマネギ斑点細菌病菌,リーキか ら分離された pv. porri,イタリアンライグラスより分離された pv. atropurpurea, クリーピングベントグラス分離菌株,エンバクより分離された pv. coronafaciens, エンバクより分離された pv. striafaciens (SUPP110, SUPP990, SUPP2436) の 各クラスターである.この遺伝子塩基配列に基づく系統解析の結果は,rep-PCR (ERIC) の結果により支持され,各分離源植物に基づくクラスターに属する菌株 同士は類似したバンドパターンを示した.しかし,エンバクより分離された pv. striafaciens のうち,SUPP988とSUPP2432はいずれのクラスターにも属さず, rep-PCR (ERIC) でも独自のバンドパターンを示し, pv. striafaciens 菌株の遺 伝的多様性が示された.

植物毒素コロナチンについては、ジャガイモ塊茎スライスに直接塗布する従来 の検定方法によりコロナチン活性が確認されるのは、イタリアンライグラスより 分離された pv. atropurpurea の SUPP1678 および SUPP2431 と、クリーピング ベントグラス分離菌株のうち SUPP2003 および SUPP2358 の4菌株のみであっ た.また、この4菌株のみが病原性試験においてイタリアンライグラスとエンバ クに濃い赤紫色のハローを形成した.しかし、コロナチン生産に関わる cfl, cor, cma, cfa 遺伝子は、上述の4菌株だけでなく、エンバクより分離された pv. striafaciens SUPP110, SUPP988, SUPP2436 と,クリーピングベントグラス 分離菌株のうち SUPP2408, SUPP2004, SUPP2411 でも検出され,またこれら の菌株は,ネギ葉やコロナチン生産誘導培地を介してジャガイモ塊茎スライスに コロナチン様活性を示した.全ゲノムを用いたサザンハイブリダイゼーションの 結果では,ジャガイモ塊茎スライス上でコロナチンを生産する菌株も,誘導培地 を必要とする菌株も,どちらも cfl 遺伝子を持つことが確認された.また,プラ スミド抽出物によるサザンハイブリダイゼーションより,SUPP1678, SUPP2431, SUPP2003 では, cfl, cor, cma, cfa 遺伝子はプラスミド上に存在することが明 らかになった.ジャガイモ塊茎組織の肥大能や,イタリアンライグラス・エンバ ク上で見られる赤紫色のハローは,菌株の分離源植物や遺伝子的な系統よりも, このプラスミドの存在に大きく影響される可能性が示された.

タブトキシンに関しては、タブトキシン生産に関わる *tbl* 遺伝子は、SUPP196、 SUPP992、SUPP2344 に存在した. この 3 菌株は、病原性試験においてイタリ アンライグラスとエンバクに pv. *coronafaciens* に特徴的な黄色いハローを形成 した. またこれら3菌株はいずれのコロナチン生産関連遺伝子も持たず、反対に コロナチン生産関連遺伝子を持つ細菌の中に *tbl* 遺伝子を持つものはなかった.

イタリアンライグラスより分離された SUPP2433 と, エンバクより分離された SUPP990, SUPP2432 は, 調査したコロナチン・タブトキシンどちらの生産関 連遺伝子も持たなかったが, rep-PCR とハウスキーピング遺伝子および hrp 遺伝 子塩基配列による系統解析の結果では, コロナチンを生産する菌株に近い位置を 示した.

病原性に関しては、イタリアンライグラス、エンバク、クリーピングベントグ ラスからの分離菌株は、単針付傷接種では病徴から明確に区別するのは困難だっ た.病斑はコロナチンやタブトキシンによるハローと、それらに伴う壊死に阻害 され、接種に用いた各種植物上での寄生性を見極めることは難しかった.しかし、 本研究で工夫したイタリアンライグラス、クリーピングベントグラスの鋏を用い た切り取り接種、低温遭遇させたエンバクを用いた幼葉鞘穿刺接種および折り曲 げ接種により,各分離源植物上で分離菌株を効果的に識別することが可能だった. 単針付傷接種では, イタリアンライグラスより分離された pv. atropurpurea SUPP1678, SUPP2431と、クリーピングベントグラス分離菌株のうちのコロナ チン生産関連プラスミドを持つタイプ SUPP2003, SUPP2358 が, エンバクお よびイタリアンライグラス上で同じような病徴を示し判別は困難だったが、切り 取り接種においては、それぞれ分離源植物のみで、葉脈に沿って葉身に侵入し、 水浸状病斑を伴う病斑を形成し病原性を示した. 同様に, エンバクやイタリアン ライグラス上での判別が困難だった、エンバクより分離された pv. striafaciens SUPP110, SUPP990, SUPP2436, SUPP988, SUPP2432, クリーピングベン トグラス分離菌株のうちのコロナチン生産関連プラスミドを持たないタイプ SUPP2408, SUPP2004, SUPP2411 についても、クリーピングベントグラスの 切り取り接種による水浸状病斑形成、低温遭遇エンバクを用いての幼葉鞘穿刺接 種および折り曲げ接種により、分離源植物に特異的な病原性を明確に確認するこ とができた.これらの接種方法による宿主特異性の確認は、hrp-IV 群菌の病原性 を判断する上で重要な情報である植物毒素コロナチンもしくはタブトキシン生産 能を欠損した菌株の判別に効果的であり, SUPP2433, SUPP990, SUPP2432, SUPP993 のような毒素生産能欠損株は分離源植物上でのみ,水浸状病斑を形成 した.

細菌学的性状試験では、イタリアンライグラス分離菌株が蛍光色素生産(陰性) から、タブトキシン遺伝子を持たないエンバク分離菌株 (pv. striafaciens) はマ ロン酸利用性(陰性)から識別された.調査した項目では、クリーピングベント グラス分離菌株とタブトキシン遺伝子を持つエンバク分離菌株 (pv. coronafaciens) は似た傾向を示し区別することはできなかったが、両者は毒素生

109

産の違いで識別することができる.これまでの研究では, P. syringae hrp-IV 群 菌の細菌学的性状には菌株間差があり,細菌学的性状から分類することは難しい とされていたが,この研究で用いた菌株では分離源毎にある程度の傾向が示され た.更に項目を増やして調査する.

これまで, *P. syringae hrp*-IV 群菌 pv. atropurpurea, pv. striafaciens, pv. coronafaciens は,主に毒素生産により分類されていたが,本研究を通じ,必ず しもその限りではないことが判明した.供試菌株は分離源植物ごとに遺伝的に隔 たり,また毒素生産は菌株の系統ではなくプラスミドの有無に左右される可能性 が示された.また,これまで赤紫色ハローを作るものは pv. atropurpurea (瀧川 2004),黒褐色の病斑を形成するものは pv. striafaciens であると同定されていた クリーピングベントグラスかさ枯病菌は,それらの病原型とは遺伝子的に異なる ひとつの系統であることが明らかになった. *P. syringae hrp*-IV 群菌の系統関係 は密接で,エンバク分離菌株の中にはいずれの分類群にも属さないものもあった が,その中でも,ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は常にひとつの独立した分類群と して位置付けられ,新病原型に相当するものと考えられた.

第4章

ネギ・タマネギ斑点細菌病菌を含む *P. syringae hrp*-IV 群菌の系統関係

菌株名	菌株別名	分離源	分離地	分離年	病原型
SUPP1678	NIAS1309	Lolium multiflorum	千葉	1971	pv. <i>atropurpurea</i>
SUPP2431	MAFF301017	L. multiflorum	山口	1967	pv. <i>atropurpurea</i>
SUPP2433	MAFF301308	L. multiflorum	山口	1971	pv. <i>atropurpurea</i>
SUPP2003	小林 701	Agrostis palustris	千葉	2000	pv. <i>atropurpurea</i>
SUPP2358	-	A. palustris	熊本	2003	pv. <i>atropurpurea</i>
SUPP2408	小林 662	A. palustris	三重	2000	pv. <i>striafaciens</i>
SUPP2004	小林 804	A. palustris	静岡	2000	pv. <i>striafaciens</i>
SUPP2411	小林 1161	A. palustris	佐賀	2001	pv. <i>striafaciens</i>
SUPP988	avena8404	Avena sativa	静岡	1984	pv. <i>striafaciens</i>
SUPP990	avena8501	A. sativa	静岡	1985	pv. <i>striafaciens</i>
SUPP110	avena2	A. sativa	千葉	1979	pv. <i>striafaciens</i>
SUPP2432	MAFF301032	A. sativa	広島	1967	pv. <i>striafaciens</i>
SUPP2436	MAFF302791	A. sativa	千葉	1984	pv. <i>striafaciens</i>
SUPP992	avena8503	A. sativa	静岡	1985	pv. <i>coronafaciens</i>
SUPP2344	ASBS1	A. sativa	栃木	2004	pv. <i>coronafaciens</i>
SUPP196	AVPCO8101	A. sativa	千葉	1981	pv. <i>coronafaciens</i>
SUPP993	avena8504	A. sativa	静岡	1985	pv. <i>coronafaciens</i>
SUPP3025	エンバク 4	A. strigosa	長野	2011	not decided
SUPP3159	NE1105	A. strigosa	長野	2011	not decided
SUPP3160	NE1106	A. strigosa	長野	2012	not decided
SUPP3162	NE1201	A. strigosa	長野	2012	not decided
SUPP2934	1-a-1	Allium cepa	静岡	2012	BLSO agent
SUPP695	ALP8601	A. fistulosum	静岡	1986	BLSO agent
SUPP942	Ku74	A. fistulosum	静岡	1987	BLSO agent
ICMP3414	SUPP1440	A. cepa	静岡	1969	BLSO agent
ICMP8961 <sup>pt</sup>		A. ampeloprasum var. porrum	France	1978	pv. <i>porri</i>
ICMP3642		A. ampeloprasum var. porrum	U.K.	1949	pv. <i>porri</i>
ICMP3413		<i>A. ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i>	New Zealand	1971	pv. <i>porri</i>
SUPP541 <sup>PT</sup>	1-2	Oryza sativa	青森	1983	pv. <i>oryzae</i>

Table 4.1 第4章で使用した供試菌株

SUPP: Shizuoka University Plant Pathology, ICMP: International Collection

of Microorganisms from Plants

Fig. 4.1 切り取り接種,幼葉鞘穿刺接種,折り曲げ接種方法の模式図 A. 切り取り接種



B. 幼葉鞘穿刺接種



C. 葉身折り曲げ接種





Fig. 4.2 hrpS, A, Z, B 遺伝子に基づく系統樹

*hrpS, A, Z, B* 遺伝子領域 2214bp を用いて作成した Jukes-Canter model に基づく近隣結合法の系統樹.

Fig. 4.3 イタリアンライグラス,エンバクへの単針付傷接種

A. イタリアンライグラス

B. エンバク



A. イタリアンライグラスへの単針付傷接種. A: SUPP196, B: SUPP2433, C:
SUPP1678, D: SUPP2358, E: SUPP2433, F: SUPP2408, G: SUPP988, H:
SUPP110, I: DW.

B. エンバクへの単針付傷接種. A: SUPP196, B: SUPP2433, C: SUPP110, D: SUPP2432, E: SUPP1678, F: SUPP2408, G: SUPP2411, H: DW.

Fig. 4.4 イタリアンライグラス, クリーピングベントグラスへの切り取 り接種, エンバクへの幼葉鞘穿刺接種およびに葉身折り曲げ接種 A. イタリアンライグラス



イタリアンライグラスへの切り取り接種. A: SUPP1678, B: SUPP2431, C: SUPP2003, D: SUPP2358, E: SUPP110, F: SUPP2408, G: SUPP196, H: DW.

Fig. 4.4 イタリアンライグラス, クリーピングベントグラスへの切り取り接種, エンバクへの幼葉鞘穿刺接種およびに葉身折り曲げ接種



B. クリーピングベントグラス

クリーピングベントグラスへの切り取り接種. A: SUPP2004, B: SUPP2411, C: SUPP110, D: SUPP988, E: SUPP2003, F: SUPP2358, G: SUPP1678, H: SUPP196, I: DW.

Fig. 4.4 イタリアンライグラス, クリーピングベントグラスへの切り取り接種, エンバクへの幼葉鞘穿刺接種およびに葉身折り曲げ接種



低温遭遇させたエンバクへの幼葉鞘穿刺接種およびに葉身折り曲げ接種.A:幼 葉鞘穿刺接種 (SUPP2436),B:幼葉鞘穿刺接種 (SUPP2432),C:折り曲げ接 種 (SUPP110),D:単針付傷接種 (SUPP110),E:単針付傷接種 (SUPP2436). Table 4.2 接種直前の低温(4°C)遭遇がエンバク植物上での条斑形成効率におよぼす影響と,接種方法による条斑形成効率の違い

	接種	重前一晚4	ŀ°C	接		
	単針 葉鞘 葉身		葉身	単針	葉鞘	葉身
	付傷	穿刺	折曲	付傷	穿刺	折曲
SUPP110	4/97	<b>99</b> /102	78/108	6/145	17/96	11/96
SUPP2436	5/94	<b>91</b> /96	<b>89</b> /96	0/95	20/96	0/96
SUPP2432	0/96	<b>80</b> /96	66/95	0/90	4/94	0/92
SUPP988	0/89	<b>82</b> /93	<b>75</b> /92	0/76	12/80	1/79
SUPP3025	0/78	63/80	56/78	0/57	28/60	1/60

分母は試験した個体数,分子は1cm以上の条斑を形成した個体数.単針付傷は単 身付傷接種,葉鞘穿刺は幼葉鞘穿刺接種,葉身折曲は葉身折り曲げ接種を示す. 太字は条斑形成率80%以上の試験区を示す. Fig. 4.5 接種直前の低温(4°C)遭遇がエンバク植物上での条斑形成効率 におよぼす影響と,接種方法による条斑形成効率



第4章

ネギ・タマネギ斑点細菌病菌を含む *P. syringae hrp*-IV 群菌の系統関係

		L. multiflorum	A. palustris	A. sativa
菌株名	分離源	イタリアン ライグラス	クリーピング ベントグラス	エンバク
SUPP1678	Lolium multiflorum	+rph	$-rph^{a)}$	$-rph^{a)}$
SUPP2431	L. multiflorum	+rph	$-rph^{a)}$	$-rph^{a)}$
SUPP2433	L. multiflorum	+	_	-
SUPP2003	Agrostis palustris	$-rph^{a)}$	+rph	$-rph^{a)}$
SUPP2358	A. palustris	$-rph^{a)}$	+rph	$-rph^{a)}$
SUPP2408	A. palustris	_	+c)	—
SUPP2004	A. palustris	_	+c)	-
SUPP2411	A. palustris	_	+c)	—
SUPP988	Avena sativa	_	_	+d)
SUPP990	A. sativa	_	_	+d)
SUPP110	A. sativa	—	—	+d)
SUPP2432	A. sativa	_	_	+d)
SUPP2436	A. sativa	_	_	+d)
SUPP992	A. sativa	+yh	-yh	+yh
SUPP2344	A. sativa	+yh	-yh	+yh
SUPP196	A. sativa	+yh	-yh	+yh
SUPP993	A. sativa	+b)	_	+b)
SUPP3025	A. strigosa	—	—	+d)
SUPP3159	A. strigosa	_	_	+d)
<b>SUPP3160</b>	A. strigosa	—	—	+d)
SUPP3162	A. strigosa	—	—	+d)
SUPP2934	Allium cepa	—	—	—
SUPP695	A. fistulosum	—	—	—
SUPP942	A. fistulosum	—	—	—
ICMP3414	A. cepa	—	—	—
ICMP8961 <sup>PT</sup>	A. ampeloprasum var. porrum	-	_	_
ICMP3642	A. ampeloprasum var. porrum	-	-	_
ICMP3413	A. ampeloprasum var. porrum	-	-	-
SUPP541 <sup>PT</sup>	Oryza sativa	—	—	+yh

# Table 4.3 病原性試験結果一覧

+:水浸状病斑を形成する、-:水浸状病斑を形成せず、接種部位の壊死に留ま

- る, rph: 赤紫色ハロー, yh: 黄色ハロー.
- a) 接種部位に赤紫色もしくは赤褐色のハローが現れるが,水浸状病斑を形成せず拡大しない.
- b) 黄色のハローを形成しないが接種部位に水浸状病斑を形成する.
- e) 接種部位と水浸状病斑の周囲に黒褐色の色素が観察される.
- d) 葉脈に沿って長さ 1cm 以上の条斑を形成する.

第4	1章
ネギ・タマネギ斑点細菌病菌を含	きむ
P. syringae hrp-IV 群菌の系統関	剧係

			L. multiflorum イタリアン	<b>A. palustris</b> クリーピング	A. sativa	
菌株名	分離源	現分類	ライグラス	ベントグラス	エンバク	
SUPP1678	Lolium multiflorum	pv. <i>atropurpurea</i>	水浸状病斑が 葉脈沿いに拡大	切断面壊死	接種孔壊死	
SUPP2431 SUPP2433	L. multiflorum L. multiflorum	pv. <i>atropurpurea</i>	赤紫色ハロー	が 赤 赤 赤 た 遺 株 は ハローなし	が 示 三 / 1 ※毒素欠損株は ハローなし	
SUPP2003	Agrostis palustris	pv. atropurpurea	切断面壊死 赤紫色ハロー	水浸状病斑が 葉脈沿いに拡大	接種孔壊死 赤紫色ハロー	
SUPP2358 SUPP2408	A. palustris A. palustris	pv. <i>atropurpurea</i> pv. <i>striafaciens</i>	切断面壊死	水浸状病斑が	接種孔壊死	
SUPP2004 SUPP2411	A. palustris A. palustris	pv. <i>striafaciens</i> pv. <i>striafaciens</i>	色素なし	黒褐色色素	色素なし	
SUPP992 SUPP2344	Avena sativa A sativa	pv. coronafaciens	水浸状病斑が	切断面壊死 黄色ハローのみ	接種孔に	
SUPP196	A. sativa	pv. coronafaciens		拡大しない ※毒素欠損株は	黄色ハロー	
SUPP993 SUPP988	A. sativa A. sativa	pv. <i>coronafaciens</i> pv. <i>striafaciens</i>				
SUPP990 SUPP110	A. sativa A. sativa	pv. <i>striafaciens</i> pv. <i>striafaciens</i>				
SUPP2432 SUPP2436	A. sativa A. sativa	pv. striafaciens	切断面壊死のみ	切断面壊死のみ	接種孔より	
SUPP3025	A. strigosa	unknown			条斑形成	
SUPP3159 SUPP3160	A. strigosa A. strigosa	unknown unknown				
SUPP3162	A strigosa	unknown				

Table 4.4 植物上での病徴と病原性の一覧

ピンク色に着色されたセルは病原性陽性を示す.

第4章

٦

ネギ・タマネギ斑点細菌病菌を含む *P. syringae hrp*-IV 群菌の系統関係

Г

					炭素源の利用性			
菌株名	分離源植物	蛍光色素生産	エスクリン ン	チ ロシナーゼ ビ	サルコシン	マロン酸	アスコルビン酸	L- ロイシン
SUPP1678	L. multiflorum	_	_	_	+	+	+	+
SUPP2431	L. multiflorum	_	_	_	+	+	+	+
SUPP2433	L. multiflorum	_	_	_	+	+	+	_
SUPP2003	A. palustris	+	_	+	+	+	+	+
SUPP2358	A. palustris	+	_	+	+	+	+	+
SUPP2408	A. palustris	+	+	+	+	+	+	+
SUPP2004	A. palustris	+	+	+	+	+	+	+
SUPP2411	A. palustris	+	+	+	+	+	+	+
SUPP988	A. sativa	+	+	+	—	+	+	+
SUPP990	A. sativa	+	+	—	—	—	+	—
SUPP110	A. sativa	+	+	_	—	—	+	+
SUPP2432	A. sativa	+	+	_	+	+	+	—
SUPP2436	A. sativa	+	+	_	—	—	+	+
SUPP992	A. sativa	+	+	+	+	+	+	+
SUPP2344	A. sativa	+	+	+	+	+	+	+
SUPP196	A. sativa	+	+	+	+	+	+	+
SUPP993	A. sativa	+	+	+	+	+	+	+
SUPP3025	A. strigosa	+	+	_	_	_	+	_
SUPP3159	A. strigosa	+	+	_	_	_	+	_
SUPP3160	A. strigosa	+	+	_	_	_	+	_
SUPP3162	A. strigosa	+	+	_	_	_	+	_
SUPP2934	A. cepa	+	-	_	_	+	+	+
SUPP695	A. fistulosum	+	-	_	_	+	+	+
SUPP942	A. fistulosum	+	-	-	-	+	+	+
ICMP3414	A. cepa	+	-	_	_	+	+	+
ICMP8961 <sup>PT</sup>	A. ampeloprasum var. porrum	+	_	+	_	+	+	_
ICMP3642	A. ampeloprasum var. porrum A. ampeloprasum	+	_	+	_	+	+	_
ICMP3413	var. porrum	+	_	+	_	+	+	—
SUPP541 <sup>PT</sup>	Oryza sativa	+	+	+	+	+	+	+

# Table 4.5 細菌学的性状試験結果一覧

# M 1 2 3 4 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 17 19 20

# Fig. 4.6 rep-PCR (ERIC)

1: SUPP2408, 2: SUPP2004, 3: SUPP2411, 4: SUPP2003, 5: SUPP2358, 6: SUPP988, 7: SUPP2432, 8: SUPP2934, 9: ICMP2314, 10: ICMP8961, 11: ICMP3413, 12: SUPP110, 13: SUPP990, 14: SUPP2436, 15: SUPP1678, 16: SUPP2433, 17: SUPP2431, 18: SUPP196, 19: SUPP992, 20: SUPP2433, M: Hi-Lo DNA Marker (Bionexus, Oakland, CA).

Fig. 4.7 rep-PCR (BOX)



1: SUPP2408, 2: SUPP2004, 3: SUPP2411, 4: SUPP2003, 5: SUPP2358, 6: SUPP988, 7: SUPP2432, 8: SUPP2934, 9: ICMP2314, 10: ICMP8961, 11: ICMP3413, 12: SUPP110, 13: SUPP990, 14: SUPP2436, 15: SUPP1678, 16: SUPP2433, 17: SUPP2431, 18: SUPP196, 19: SUPP992, 20: SUPP2433, M: Hi-Lo DNA Marker (Bionexus, Oakland, CA).

124



Fig. 4.8 ハウスキーピング遺伝子に基づく系統樹

*gyrB, rpoD, gltA, gap1* 遺伝子領域 3132bp を用いて作成した Jukes-Canter model に基づく近隣結合法の系統樹.



Fig. 4.9 ハウスキーピング遺伝子に基づく系統樹

*gyrB, rpoD, gltA, gap1* 遺伝子領域 3132bp を用いて作成した Jukes-Canter model に基づく近隣結合法の無根系統樹.

第4章

ネギ・タマネギ斑点細菌病菌を含む P. syringae hrp-IV 群菌の系統関係

		コロナチン				タブト キシン		インドール 酢酸		氷核 活性
菌株名	分離源植物	P C R	生物検定	生物 特 勝 漢	プラスミド	P C R	生物検定	iaa M   H	issL	ina
SUPP1678	L. multiflorum	+	+	+	+	_	_	—	+	+
SUPP2431	L. multiflorum	+	+	+	+	_	—	_	+	+
SUPP2433	L. multiflorum	—	_	_	_	_	_	_	+	+
SUPP2003	A. palustris	+	+	+	+	_	_	_	+	+
SUPP2358	A. palustris	+	+	+	+	_	_	_	+	+
SUPP2408	A. palustris	+	_	+	_	_	_	_	+	+
SUPP2004	A. palustris	+	_	+	_	_	_	_	+	+
SUPP2411	A. palustris	+	_	+	_	_	_	_	+	+
SUPP988	A. sativa	+	_	+	_	_	_	_	+	+
SUPP990	A. sativa	—	-	—	_	_	_	—	+	+
SUPP110	A. sativa	+	—	+	_	_	_	—	+	+
SUPP2432	A. sativa	—	-	—	_	_	_	—	+	+
SUPP2436	A. sativa	+	—	+	_	—	_	—	+	+
SUPP992	A. sativa	—	—	—	—	+	+	—	+	+
SUPP2344	A. sativa	—	—	—	_	+	+	—	+	+
SUPP196	A. sativa	—	—	—	—	+	+	—	+	+
SUPP993	A. sativa	—	—	—	_	—	_	—	+	+
SUPP3025	A. strigosa	+	—	+	—	—	_	—	+	+
SUPP3159	A. strigosa	+	—	+	—	—	_	—	+	+
SUPP3160	A. strigosa	+	—	+	—	—	_	—	+	+
SUPP3162	A. strigosa	+	_	+	_	_	_	—	+	+
SUPP2934	A. cepa	+	-	+	_	_	_	—	+	+
SUPP695	A. fistulosum	+	_	+	_	_	_	—	+	+
SUPP942	A. fistulosum	+	—	+	—	—	_	—	+	+
ICMP3414	A. cepa	+	_	+	_	_	_	—	+	+
ICMP8961 <sup>PT</sup>	A. ampeloprasum var. porrum	+	-	+	-	-	-	_	+	+
ICMP3642	A. ampeloprasum var. porrum	+	_	+	_	_	_	_	+	+
ICMP3413	A. ampeloprasum var. porrum	+	_	+	_	_	_	_	+	+
SUPP541 <sup>PT</sup>	Oryza sativa	—	—	—	—	+	+	—	+	+

Table 4.7 毒素および毒性に関連する因子の検定結果一覧

コロナチンの PCR は cfl, cor, cma, cfa 遺伝子が検出されたものを陽性とした. コロナチン生物検定はジャガイモ塊茎スライスに菌体を塗布した. コロナチン生 産誘導は,ネギ葉もしくは HS・C 培地を介して行った. プラスミドは, プラスミ ド上に cfl, cor, cma, cfa 遺伝子が存在するものを陽性とし,サザンハイブリダ イゼーションにより調査した. タブトキシンの PCR は tbl 遺伝子が検出されたも

のを陽性とした.タブトキシン生物検定は大腸菌 B 株への生育阻害により調査し

た. 氷核活性は ina 遺伝子が PCR により増幅されたものを陽性とした.

Fig. 4.10 *cfl* 遺伝子をプローブとした全ゲノムサザンハイブリダイゼ ーション



1: SUPP2003, 2: SUPP2358, 3: SUPP2408, 4: SUPP2004, 5: SUPP2411, 6: SUPP988, 7: SUPP990, 8: SUPP2431, 9: SUPP2432, 10: SUPP2433, 11: SUPP2436, 12: SUPP1678, 13: SUPP110, 14: SUPP2934, 15: ICMP3414, 16:ICMP3413, M: Hi-Lo DNA Marker (Bionexus, Oakland, CA).

Fig. 4.11 *cfl* 遺伝子をプローブとしたプラスミドサザンハイブリダイ ゼーション



Fig. 4.12 cor遺伝子をプローブとしたプラスミドサザンハイブリダイゼ ーション



Fig. 4.13 *cma* 遺伝子をプローブとしたプラスミドサザンハイブリダイ ゼーション



Fig. 4.14 *cfa* 遺伝子をプローブとしたプラスミドサザンハイブリダイゼ ーション



### 第5章 本邦におけるオリーブがんしゅ病の発生と病原細菌の同定

5.1 緒言

オリーブ (Olea europaea) は 6,000 年以上昔から人類によって栽培されてき た馴染み深い作物のひとつであり,その起源は地中海東部沿岸と言われる (Liphschitz et al. 1991; Vossen, 2007).現在では,スペイン,イタリア,ギリシ ャなど地中海沿岸部を中心に年間約 2000 万トンが生産されている (国際連合食 糧農業機関統計,2010).国内でも,油脂の自給を目指した当時の政府の計画に 基づき,1908 (明治 41) 年香川県で試験栽培が開始され (Ichikawa et al. 1987),現在では小豆島を中心に国産オリーブの主要な生産地となっている.近 年では,オリーブ栽培は静岡県や九州地方など国内数箇所に広まり,またオリー ブ樹は庭園木や街路樹としても利用されている.

日本植物病名日録 (日本植物病名データベース, http://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro\_pl\_diseases.php)によると、オリ ーブの病害の中で細菌が病原であるものは、Agrobacterium tumefaciens による 根頭がんしゅ病と、P. savastanoi pv. savastanoi (ex Smith 1908) Gardan et al. 1992によるがんしゅ病のふたつである.オリーブがんしゅ病は、地中海沿岸や北 米などオリーブ生産地域では広く認知されている病害だが、近年、オーストラリ ア (Hall et al. 2004)やネパール (Balestra et al. 2009)のような今まで本病害 発生の報告がなかった地域からも病害の発生および病原細菌の分離が続いて報告 されている. P. savastanoi pv. savastanoi の分類は、最初 Smith (1908)により Bacterium savastanoi とされ、その後 P. savastanoi (Stevens 1913), P. syringae pv. savastanoi (Young et al. 1978), P. syringae subsp. savastanoi pv. oleae (Janse 1982)を経て、Gardan et al. (1992)のDNA-DNA ハイブリダイゼーシ ョンおよび細菌学的性状試験より、別種の P. savastanoi pv. savastanoi に分類 された. P. syringae complex に含まれる病原型である.

日本では、上田(1914)により海外の病害として初めて報告、がんしゅ病と命 名された. その後, 石山・向 (1941), 岡部 (1949) によっても海外での発生が 紹介されているが,国内における pv. savastanoiの発生はこれまで報告されてい なかった.ところが、2014年静岡県の家庭庭園に植栽されるオリーブにがんしゅ 病と思われる病徴が発生した.病徴を示した植物は、樹齢200年程度、樹高3.2m、 胸高直径 1.8m, 基部幹周 2.2m で, 鑑賞目的で海外より輸入され, 庭園内で唯一 のオリーブ樹として単独で植えられていた.周辺の街路樹にはオリーブの若木が 使用されていたが,発病は観察されなかった.病徴は直径5-25mmのがんしゅで、 枝や幹, 葉やひこ生え根元にも見られた (Fig. 5.1). がんしゅは, 樹上では細枝 に多く見られ,重篤なものでは病変より先端部分にかけて枯死するものもあった. 若いがんしゅは淡褐色がかった薄緑色をしており表面は滑らかだが、古くなると 表面は粗く褐色~暗褐色に変化した.若いがんしゅを切断してみると、薄緑色の 組織に混ざり合うように水浸状部位および褐変が見られた.がんしゅ表面には菌 泥は観察されなかったが、褐変部分内部の空洞には菌泥と思われる乳白色の粘質 物が詰まっていることもあった.水浸状部位からは,Lelliott らの方法による蛍 光色素産生群 Pseudomonas 属植物病原細菌の類別方法である LOPAT 試験 (Lelliott et al. 1966) で Ib 群に属する細菌がほぼ純粋に分離され、またこの細菌 は Inoue and Takikawa (2006) の P. syringae hrp I-A 群に属し, pv. savastanoi の可能性が考えられた.

静岡県でオリーブより分離された 13 菌株 (Table 5.1) に対して,病原性試験・ 細菌学的性状試験・遺伝子解析を通し,分離菌株の同定と系統解析を行ったとこ ろ,静岡分離菌株は調査したいずれの項目においても *P. savastanoi* pv. *savastanoi* の pathotype 菌株 (ICMP4352<sup>PT</sup>) と同様の性質を示し, pv. *savastanoi* と考えられ,本邦における同菌分離の初めての報告となった.これ らの結果はTsuji et al. (2015) として発表し, さらに平成 27 年植物病理学会大 会で,病名は病名目録に記載されている「がんしゅ病」を用いることを提案した. なお,その後の詳細な遺伝子フィンガープリンティング (rep-PCR) 調査により, 当初ほぼ均一に見えたバンドパターンには,ごくわずかに異なる2種類が含まれ ており,静岡分離菌株は遺伝的に異なる2系統を含むことを確認した.

静岡県での発生に続き,2015年愛知県と神奈川県でオリーブがんしゅ病と思わ れる症状が観察され,名古屋植物防疫所および横浜植物防疫所により,愛知県で はオリーブの3植物個体より4菌株,神奈川県でも同様に3植物個体より3菌株 が分離された.愛知県,神奈川県共に,海外より輸入され造園会社の種苗場に植 栽されていたオリーブ成木に病徴が発見された.愛知・神奈川での分離菌株は, 名古屋植物防疫所より静岡大学植物病理学研究室に送られ、静岡分離菌株と同様 に LOPAT 試験, P. syringae hrp I-A 群菌特異的検出 PCR による予備試験を行う と、愛知県の1菌株を除き、愛知・神奈川分離菌株は静岡分離菌株と同様、LOPAT (---+) で Lelliott らの Ib 群に属し, Inoue and Takikawa (2006) の類別 では hrp I-A 群に属した.よって、予備試験において明らかに既知の pv. savastanoi と異なる性状を示した愛知県の1菌株を除く6菌株の愛知・神奈川 分離菌株を、病原性、細菌学的性状、遺伝子に基づき同定し、静岡分離菌株と併 せて日本国内の3県より分離された pv. savastanoi 菌株の比較を行った. その結 果,愛知・神奈川分離菌株は,オリーブへの病原性試験,細菌学的性状試験,ハ ウスキーピング遺伝子に基づく MLSA のいずれにおいても基本的には静岡分離 菌株および pathotype 菌株 (ICMP4352<sup>PT</sup>) と同様の性質を示した. しかし, rep-PCR によるフィンガープリンティングでは、愛知・神奈川分離菌株うち2菌 株は静岡分離菌株と一致するバンドパターンを示したものの,残る4菌株は独自 のバンドパターンを示し、国内で分離された pv. savastanoi 菌株の遺伝子的多様 性が示された. これらの結果は Tsuji et al. (in press) として報告した.

136

本論文第5章は、以上に述べた結果を含め、日本で分離されたオリーブがんし ゆ病菌 *P. savastanoi* pv. *savastanoi*の病原性、細菌学的性状、遺伝子の特性に ついてまとめたものである.

5.2 供試菌株

オリーブがんしゅからの細菌の分離は、第2章 2.1(1)に従って行った. がんし ゆ内の水浸状部位と健全部分との境界を 1.5mm 角程度の大きさに切り出し、70% エタノールに数秒間浸漬して表面殺菌後 300µlの滅菌蒸留水中で磨砕した. 上清 を YP 寒天平板培地に画線したものを 27°C で 2·3 日間培養し、13 菌株 (SUPP3085-SUPP3088 および SUPP3127-SUPP3135) を得た.静岡分離菌株 13 菌株に加えて、愛知県で分離された 3 菌株 (SUPP3145-SUPP3147) と 神奈川 県で分離された 3 菌株 (SUPP3148-SUPP3150) を名古屋植物防疫所より得た (Table 5.1). 愛知県分離菌株は当初4菌株あったが、うち1菌株は LOPAT 試験 で(++-+-) を示し、過去に報告されている *P. savastanoi* pv. savastanoi と は明らかに異なったので (Lelliott et al. 1966)、今後の試験から除外した. 分離 菌株の保存と、各種試験のための培養は第2章 2.1(2)に従った.

5.2 材料および方法

(1) 病原性および宿主範囲試験

病原性および宿主範囲は, P. savastanoi pv. savastanoi や, その近縁細菌であ り類似する病害を引き起こす pv. nerii, pv. fraxini が宿主とする Olea europaea (オリーブ), Fraxinus griffithii (シマトネリコ), Jasminum polyanthum (ハゴロ モジャスミン), Nerium oleander (セイヨウキョウチクトウ), Ligustrum obtusifolium (イボタノキ), Osmanthus fragrans var. aurantiacus (キンモクセ イ) に対して行った. オリーブとイボタノキは 1/2000 a サイズのワグネルポット で、シマトネリコとハゴロモジャスミンは 1/5000 a サイズのワグネルポットにそ れぞれ植栽し、20・25°Cのガラス温室で管理した. セイヨウキョウチクトウとキンモ クセイは、15・35°Cの屋外で生育する植物を用いた. 接種は滅菌注射針(28G)を用 い、すべての植物の新梢の枝部分に対して、菌液約 10µl の液滴を貫通するよう におこなった. 菌液は、PPGA 斜面培地上で 27°C 24 時間培養した新鮮な菌体を、 約 10<sup>8</sup> cfu/ml 濃度になるように滅菌水に懸濁したものを用いた. オリーブに対す る病原性試験は、静岡分離菌株 3 株 (SUPP3085, SUPP3086, SUPP3129)、愛 知 分 離 菌 株 3 菌 株 (SUPP3145-SUPP3147), 神 奈 川 分 離 菌 株 2 菌 株 (SUPP3148-SUPP3150) について調査した. その他の植物種に対する宿主範囲試 験では SUPP3085 と SUPP3129 を選抜して用いた. 結果は毎週、6 か月後まで 観察した.

## (2) 細菌学的性状試験

分離菌株の細菌学的性状試験は、第2章2.2に述べた方法に従って行った.グ ラム反応(KOH法)(Ryu 1940),糖の酸化・発酵(OF: oxidative or fermentative metabolism),レバン産生、オキシダーゼ活性、ジャガイモ腐敗、アルギニンジ ヒドロラーゼ活性、タバコ過敏感反応、King's B 培地上での蛍光色素生産、カタ ラーゼ活性、カゼイン・ゼラチン・エスクリンの加水分解、唯一の炭素源として の D・ソルビトールの利用性はすべての供試菌株に対して試験した.さらに静岡分 離菌株に対しては、生理・生化学的試験として、スクロースからの還元物質の生 成、硝酸塩の還元性、レシチナーゼ活性、ポリ・B・ヒドロキシ酪酸粒の蓄積と、唯 ーの炭素源として、D・マンニトール、D・グルコース、D・フルクトース、スクロー ス、D・アラビノース、L・アラビノース、*myo*イノシトール、D・セロビオース、 D・トレハロース、ラクトース、マルトース、*meso*エリスリトール、アドニトー ル、2・ケト・D・グルコン酸、安息香酸、D・酒石酸、L・酒石酸、*meso*酒石酸、D・ キナ酸, アントラニル酸, ベタイン, トリゴネリン, L-チロシン, DL-ホモセリンの利用性を調査した.

(3) hrpZ遺伝子に基づく P. syringae のグループ判別 PCR

Inoue and Takikawa (2006) の hrpZ 遺伝子に基づくグルーピングでは、P. savastanoi pv. savastanoi の位置付けについて言及されていないが, Gardan et al. (1992) で pv. savastanoi と近縁であることが示された P. syringae pv. phaseolicola と pv. glycinea は hrp-I-A 群菌に含まれる. よって, pv. savastanoi が pv. *phaseolicola* や pv. *glycinea* と同様 *hrp*-I-A 群菌に含まれることを確認 するため、hrp-I-A 群菌特異的検出プライマーを用いた PCR を行った. また pv. *savastanoi* が他の *P. syringae hrp* グループ特異的検出プライマーで検出されな いことを確認するため、hrp-I-B, II, III, IV 群菌特異的検出プライマーを用い た PCR による検出も併せて行った. hrp-I-A 群菌特異的検出 PCR では pv. phaseolicola SUPP1139 (BQH-1), I-B 群菌特異的検出 PCR では pv. lachrymance SUPP105 (cucum-1), II 群菌特異的検出 PCR では pv. actinidiae ICMP9617PT (Kw11), III 群菌特異的検出 PCR では pv. syringae SUPP458 (LOB2-1), IV 群 菌特異的検出 PCR では pv. oryzae SUPP541PT (1-2)を, それぞれポジティブコン トロールとして使用した. これらの菌株は Inoue and Takikawa (2006) により, それぞれのグループに属することが確認されている.プライマーに関する詳細は Table 2.1 に, PCR サイクルは Table 2.2 に記載した.

# (4) rep-PCR による比較

rep-PCR は第3章 3.2(4)に述べた方法に従い, Table 5.1 に挙げた供試菌株全 菌株に対して rep-PCR (BOX, ERIC, REP) を行った. プライマーに関する詳細 は Table 2.1 に, PCR サイクルは Table 2.2 に記載した. 電気泳動は第2章 2.4(2)
の方法に従い、1.5%濃度のアガロースゲルを用い、50V の電圧で電気泳動した. ゲルのサイズは通常泳動距離 60mm (40ml) を用い、バンドパターンを詳細に比 較する際には泳動距離 120mm (100ml) を用いた.

(5) 16S rDNA 遺伝子塩基配列に基づく系統解析

16S rDNA 塩基配列解析は, 第3章 3.2(5) に述べた方法に従い, 静岡分離菌株 3菌株 (SUPP3085, SUPP3086, SUPP3129), 愛知分離菌株 2菌株 (SUPP3145, SUPP3147), 神奈川分離菌株 (SUPP3148, SUPP3150)について行った. PCR プライマーに関する詳細は Table 2.1 に, PCR サイクルは Table 2.2 に記載した. 解析に用いた 16S rDNA 塩基配列データは、アクセッションナンバーLC012764 (SUPP3085), LC012765 (SUPP3085) と LC189177 (SUPP3129) として DDBJ データベース (http://www.ddbj.nig.ac.jp) に登録した. SUPP3145, SUPP3147, SUPP3148, SUPP3150 については、SUPP3085 および SUPP3086 と 100%-致する配列を示したため、データベースに登録しなかった. 比較対象とする近縁 P. syringae 病原型の 16S rDNA 塩基配列は公共データベースより, P. savastanoi pv. savastanoi (NCPPB639<sup>PT</sup> = ICMP4352<sup>PT</sup>, NCPPB3335), pv. fraxini (PVFiF1), pv. nerii (ITM313), pv. myricae (ICMP7118<sup>PT</sup>), pv. phaseolicola (ICMP2740<sup>PT</sup>, 1448A), pv. glycinea (ICMP2189<sup>PT</sup>, B076), pv. actinidiae (Kw11<sup>PT</sup>), pv. pisi (PP105), pv. syringae (B301D), pv. oryzae (str. 1 6), P. cannabina py. alisalensis (NMH10111), P. viridiflava (CFBP2107<sup>T</sup> = ICMP2848<sup>T</sup>) を入手した. *P. viridiflava* (CFBP2107<sup>T</sup>) は系統樹を作成する際に アウトグループ菌株に設定した.系統樹の作成は第2章2.7の方法に従い、比較 対象菌株 16S rDNA 塩基配列のアクセッションナンバーは Fig. 5.2 に掲載した系 統樹において, 菌株名に続く括弧内に示した.

(6) gyrB, rpoD, gltA, gap1 遺伝子塩基配列に基づく系統解析

ハウスキーピング遺伝子塩基配列に基づく MLSA は, 第3章 3.2(6) に述べた 方法に従い, gyrB, rpoD, gltA, gap1遺伝子を用いて行った. 菌株は rep-PCR の結果を考慮し,静岡分離菌株 3株 (SUPP3085, SUPP3086, SUPP3129),愛 知分離菌株2菌株 (SUPP3146, SUPP3147), 神奈川分離菌株1菌株 (SUPP3149) を選抜して解析した. PCR プライマーに関する詳細は Table 2.1 に, PCR サイク ルは Table 2.2 に記載した. 第2章 2.5-2.7 の方法に従い, 増幅産物の塩基配列を 決定し, DDBJ (http://www.ddbj.nig.ac.jp) に登録した (Table 5.2). 比較対象 とする近縁 P. syringae 病原型の該当領域塩基配列は、公共データベースより P. savastanoi pv. savastanoi (ICMP4352<sup>PT</sup>, NCPPB3335), P. syringae pv. phaseolicola (1448A), pv. glycinea (B076, race4), pv. actinidiae (NCPPB3739<sup>PT</sup>), pv. syringae (B728a), P. cannabina pv. alisalensis (ICMP15200PT), pv. oryzae (SUPP541PT), pv. coronafaciens (SUPP196), P. viridiflava (ICMP2848<sup>T</sup>) に ついて得た. P. viridiflava (ICMP2848<sup>T</sup>) は系統樹を作成する際のアウトグルー プ菌株に設定し,系統樹はコンカテネート配列に基づく系統樹 (Fig. 5.3)と gyrB, rpoD, gltA, gap1 遺伝子塩基配列それぞれに基づく系統樹(Fig. 5.4-5.7)を作 成した.比較対象菌株の該当領域塩基配列アクセッションナンバーは,Table 5.3 に記載した.

(7) *iaaM*, *H*および *L*遺伝子, *ina* 遺伝子検定

*iaaM*, *H*および *L*遺伝子, *ina*遺伝子の PCR による検出は, 第2章2.8 に述 べた方法に従い, Table 5.1 に挙げた供試菌株すべてに対して行った. 新規に設計 したプライマーセット TSU31/32 が正しく機能するか調査するため, *ina*遺伝子 検出 PCR は, *P. syringae* の各病原型に対しても行った. *hrp*-I-A 群菌として *P. syringae* pv. *phaseolicola* (SUPP1139), pv. *glycinea* (SUPP211), pv. *tabaci*  (SUPP7364), hrp-I-B 群菌として P. cannabina pv. alisalensis ICMP15200<sup>PT</sup>, pv. lachrymans (SUPP105), pv. mori (kuwa1-2), hrp-II 群菌として pv. actinidiae (ICMP9617<sup>PT</sup>), pv. tomato (DC3000), pv. theae (2-1), hrp-III 群菌 として pv. syringae (SUPP458), pv. pisi (SUPP1662), pv. oryzae (SUPP541<sup>PT</sup>), pv. coronafaciens (SUPP196), その他の hrp-グループに属する菌株として pv. tagetis (ICMP4091<sup>PT</sup>), pv. helianthi (ICMP4531<sup>PT</sup>) を用いた. プライマーに関 する詳細は Table 2.1 に, PCR サイクルは Table 2.2 に記載した.

5.3 結果

(1) 病原性試験

オリーブ新梢に対する接種では、試験した菌株はいずれも病原性を示した.接 種後 2・4 週間で、接種孔周辺に明らかに認識できるふくらみが形成された.その 後接種孔を中心に樹皮に割れ目が生じ、1・3 ヵ月で直径 5・20mm のがんしゅへと 成長した(Fig. 5.8A).原病徴で観察されたように、接種個所に形成されたがんし ゅより先端にかけて枯死した枝もあった(Fig. 5.8B).愛知分離菌株のうち SUPP3145 と SUPP3146 は、他の分離菌株に比べて病原性が弱く、ふくらみが 形成されるまでに 4 週間以上かかり、その後形成されたがんしゅは直径 1・2 mmと 他の分離菌株によるものと比べて明らかに小さかった(Fig. 5.8C).がんしゅ形成 までにかかる期間は枝の生育ステージによって左右され、若い枝ではより短期間 でがんしゅが形成された.

宿主範囲は SUPP3085 と SUPP3129 の 2 菌株を選抜して行ったが, これらの 菌株はいずれも, ハゴロモジャスミンに対し, 短期間で著しいがんしゅを形成し た. 接種 2 週間後には, 直径 3-5mm の明らかながんしゅが接種部位に形成され, 最終的には直径 10-25mm の巨大ながんしゅへと成長した (Fig. 5.9A). しかし, シマトネリコ, セイヨウキョウチクトウ, イボタノキ, キンモクセイに対しては, 試験した菌株はどちらも、接種孔周辺にわずかなふくらみを残しただけで明らか な病原性を示さず、これらのふくらみはその後発達することはなかった(Fig. 5.9B-D).病原性および宿主範囲試験の結果は Table 5.4 に示した.

(2) 細菌学的性状試験

静岡,愛知,神奈川県でオリーブがんしゅより分離された菌株は、グラム陰性、 好気性で、タバコ過敏感反応、King's B 培地上での蛍光色素生産、カタラーゼ活 性は陽性、レバン産生、オキシダーゼ活性、ジャガイモ腐敗、アルギニンジヒド ロラーゼ活性、カゼイン・ゼラチン・エスクリンの加水分解は陰性、唯一の炭素 源として D-ソルビトールを利用した.これらの結果より、分離菌株は Lelliott et al. (1966) の LOPAT 試験による蛍光色素産生群 *Pseudomonas* 属植物病原細菌 の類別で Ib 群に相当し、過去に報告される *P. savastanoi* pv. *savastanoi* の性状 (Gardan et al. 1992) と一致した.ただし、pathotype 菌株 ICMP4352<sup>PT</sup> は唯一 の炭素源として D-ソルビトールを利用しなかった.また、愛知分離菌株のうちの 2 菌株 SUPP3145 と SUPP3146 は、タバコ過敏感反応で陽性ではあったが反応 が弱く、タバコ葉組織に壊死を起こすまでに他の菌株より時間がかかった.また この 2 菌株は蛍光色素生産陰性だった (Table 5.5).

さらに静岡分離菌株は、以下の項目において 13 菌株すべてが均一な結果を示 した. 生理・生化学的試験では、スクロースからの還元物質の生成が陽性、硝酸 塩の還元性、レシチナーゼ活性、ポリ・8-ヒドロキシ酪酸粒の蓄積は陰性だった. 唯一の炭素源としては、D-マンニトール、D-グルコース、D-フルクトース、スク ロース、L-アラビノース、myo-イノシトール、L-酒石酸、ベタインを利用し、D-セロビオース、D-トレハロース、ラクトース、マルトース、D-アラビノース、 meso-エリスリトール、アドニトール、トリゴネリン、2-ケト-D-グルコン酸、安 息香酸、D-酒石酸、meso-酒石酸、D-キナ酸、アントラニル酸、L-チロシン、D

L-ホモセリンを利用しなかった. これらの性状は過去に報告されている pv. *savastanoi*の性状 (Gardan et al. 1992) と一致した (Table 5.6).

(3) hrpZ遺伝子に基づく P. syringae のグループ判別 PCR

静岡,愛知,神奈川分離菌株および P. savastanoi pv. savastanoiの基準菌株 ICMP4352<sup>PT</sup>はいずれも, hrpZ 遺伝子に基づく P. syringae hrp-I-A 群菌特異的 検出 PCR (Inoue and Takikawa 2006) で,およそ 880bpの増幅産物を形成した. 一方でその他の hrp グループ (I-B, II, III, IV) に属する病原型を特異的に増 幅するプライマーを用いた PCR では,オリーブ分離菌株からの増幅産物は確認 されなかった. さらに, Inoue and Takikawa (2006) により塩基配列解析がなさ れ DDBJ に登録される hrpS, A, Z, B遺伝子領域塩基配列と,公共データベー スに登録される ICMP4352<sup>PT</sup>の同領域塩基配列を用いて系統樹を作成したところ, pv. savastanoi は hrp-I-A 群菌と同じクラスターに属した (Fig. 5.10). 系統樹作 成に使用した塩基配列のアクセッションナンバーは系統樹内の括弧内に記した.

(4) rep-PCR による比較

まず, rep-PCR (ERIC および BOX) により,静岡分離菌株 13 菌株および *P. savastanoi* pv. *savastanoi* の基準菌株 ICMP4352<sup>PT</sup>を比較した. rep-PCR での比較に通常用いられる泳動距離 60mm (40ml) のゲルを用いた観察では,バンドパターンはすべての菌株でほぼ均一だった.しかし,泳動距離 120mm (100ml) のゲルに通常の 2 倍の 20plの PCR 産物をアプライして詳細に比較すると, rep-PCR (ERIC) において,静岡分離菌株 13 菌株のバンドパターンは 2 つのタイプに分かれた. SUPP3085-3088, SUPP3127-3128, SUPP3130 と SUPP3132-3135 から成る ERIC パターン 1 と, SUPP3129 および SUPP3131 から成る ERIC パター ン 2 である (Fig. 5.11A). rep-PCR (REP) では, 2 つのグループ間でバンドパタ ーンの違いがより顕著に現れ, ERIC パターン1に相当する菌株は REP パターン 1に, ERIC パターン2に相当する菌株は REP パターン2に属した (Fig. 5.11B). rep-PCR (ERIC) と rep-PCR (REP) において, 2つのグループのバンドパター ンは, それぞれのグループ内では完全に均一で, またどちらも ICMP4352<sup>PT</sup>のそ れとはわずかに異なり完全には一致しなかった.

続いて愛知,神奈川分離菌株を追加して,静岡分離菌株および基準菌株 ICMP4352<sup>PT</sup>と比較した.rep-PCR (ERIC)による比較では,愛知分離菌株の SUPP3145とSUPP3146のバンドパターンは,静岡分離菌株のERICパターン1 と一致した.一方で神奈川分離菌株のSUPP3148とSUPP3149(ERICパターン 3),愛知分離菌株のSUPP3147(ERICパターン4),神奈川分離菌株のSUPP3150 (ERICパターン5)はそれぞれ,他とは一致しない特有のバンドパターンを示した (Fig. 5.12A).愛知,神奈川分離菌株の中にも,rep-PCR(ERIC)でICMP4352<sup>PT</sup> と一致するバンドパターンを示すものはなかった.rep-PCR(REP)では,ERIC パターン1,3,4,5に属する菌株が均一なバンドパターンを示し(REPパター ン1),一方ERICパターン2に属する静岡分離菌株SUPP3129およびSUPP3131 のみが独自のバンドパターンを示した(REPパターン2)(Fig. 5.12B).rep-PCR (REP)では,ICMP4352<sup>PT</sup>はREPパターン1,2のどちらとも異なるバンドパタ ーンを示した.rep-PCR(BOX)による比較では,静岡,愛知,神奈川分離菌株 のバンドパターンはいずれもICMP4352<sup>PT</sup>のそれと一致した(写真は付さず).

#### (5) 16S rDNA 遺伝子塩基配列に基づく系統解析

静岡,愛知,神奈川分離菌株の 16S rDNA 遺伝子塩基配列を得て,公共データ ベースより得た *P. savastanoi* pv. *savastanoi*の基準菌株 ICMP4352<sup>PT</sup>の該当領 域塩基配列と比較したところ,静岡菌株の SUPP3085 および SUPP3086,愛知 菌株の SUPP3145 および SUPP3147,神奈川分離菌株の SUPP3148 および SUPP3150 の配列は ICMP4352<sup>PT</sup>と 100%一致した.静岡分離菌株の SUPP3129 は 1426bp 中 1bp 異なった (99.99%相同). 公共データベースより得た近縁の *P. syringae* 病原型の該当領域塩基配列との比較により系統解析を行うと,静岡, 愛知,神奈川分離菌株は, pv. *savastanoi* ICMP4352<sup>PT</sup>や NCPPB3335, pv. *fraxini* PVFiF1, pv. *nerii* ITM313, pv. *myricae* MAFF301464 と同一のクラスターに属 した (Fig. 5.2).

(6) gyrB, rpoD, gltA, gap1遺伝子塩基配列に基づく系統解析

静岡分離菌株 3 株(SUPP3085,SUPP3086,SUPP3129),愛知分離菌株 2 菌 株 (SUPP3146, SUPP3147), 神奈川分離菌株 1 菌株 (SUPP3149)のハウスキー ピング遺伝子 gyrB (910bp), rpoD (853bp), gltA (573bp), gap1 (901bp)の塩基 配列を得て系統解析を行った. gyrB および gltA 遺伝子塩基配列に基づく比較 では,解析に用いた菌株の該当領域塩基配列は, P. savastanoi pv. savastanoiの 基準菌株 ICMP4352<sup>PT</sup> のそれらと完全に一致した. rpoD 遺伝子塩基配列では, SUPP3129 (静岡), SUPP3147 (愛知), SUPP3149 (神奈川)が, それぞれ別々の 場所において1塩基ずつICMP4352PTと異なった.一方, gap1遺伝子塩基配列 に基づく比較では、SUPP3085 および SUPP3086 (静岡) が、それぞれ別々の場 所において1塩基ずつICMP4352<sup>PT</sup>と異なった.SUPP3129(静岡)およびすべて の愛知・神奈川分離菌株の gap1 遺伝子塩基配列は ICMP4352<sup>PT</sup> と完全に一致し た. gyrB, rpoD, gltA, gap1 遺伝子塩基配列それぞれに基づく系統樹 (Fig. 5.4-5.7)において、静岡、愛知、神奈川でオリーブから分離された菌株はいずれ も, 既知の pv. savastanoi 菌株 ICMP4352PT, NCPPB3335 と同じクラスターに 位置した.これら 4 種類のハウスキーピング遺伝子をコンカテネートして得た 3171bp の塩基配列に基づく系統樹では, ICMP4352<sup>PT</sup>, NCPPB3335 を含むオ リーブ分離菌株のクラスターは、ブートストラップ値100の高い値で支持された

(Fig. 5.3). すべての系統樹は Jukes-Cantor モデルに基づく近隣結合法と最尤法 によって作成し,双方の系統樹においてトポロジーに変化はなかった.

(7) *iaaM*, *H*および *L*遺伝子, *ina* 遺伝子検定

静岡,愛知,神奈川県でオリーブから分離された 19 菌株と,*P. savastanoi* pv. *savastanoi* の基準菌株 ICMP4352<sup>PT</sup>のすべてから,*iaaM*,*H*,*L*遺伝子が PCR により検出された.*ina* 遺伝子は,*hrp*-II 群菌に属する 3 病原型 (pv. *actinidiae* ICMP9617<sup>PT</sup>, pv. *tomato* DC3000, pv. *theae* 2-1)を除き,静岡,愛知,神奈川 分離菌株および ICMP4352<sup>PT</sup> とその他すべての病原型の菌株から,ターゲットサ イズの 259bp の PCR 産物が検出された (Fig. 5.13). PCR による *ina* 遺伝子の 検出は,テンプレートとしてゲノムを用いた場合でもコロニーダイレクト PCR でも可能だった.

5.4 考察

16S rDNA 塩基配列解析, 4 種のハウスキーピング遺伝子塩基配列に基づく MLSA, *hrpZ* 遺伝子に基づく *P. syringae* のグルーピング, *iaaM*, *H*, *L* およ び *ina* 遺伝子の PCR による検出のすべてにおいて, 日本国内の 3 県でオリーブ より分離された菌株は, *P. savastanoi* pv. *savastanoi*の基準菌株 ICMP4352<sup>PT</sup> と同様の結果を示し, *P. savastanoi* pv. *savastanoi* であると考えられた.

病原性試験では,試験に用いられた日本国内の分離菌株はいずれもオリーブに がんしゅを形成した.愛知県分離菌株のうち2株,SUPP3145とSUPP3146は, 他の分離菌株に比べてがんしゅの形成に時間がかかり,形成されたがんしゅも小 さかった.これらの菌株では,蛍光色素生産が陰性だっただけでなく,タバコ過 敏感反応が弱かったことから,植物への毒性が抑制されている可能性が考えられ た.pv. savastanoi にはタバコ過敏感反応陰性を示す菌株が含まれることは, Lelliott et al. (1966) や Marchi et al. (2011) などの先行研究でも示されている. 本研究では、これらの菌株の病原性が弱まった正確な理由を調査しなかったが、 III 型分泌機構やそのエフェクターに欠陥が生じている可能性が考えられる.これ ら弱毒性菌株の病原性と宿主特異性については、更なる研究による解明が求めら れる.

加えて, SUPP3085 および SUPP3129 を選抜して行ったハゴロモジャスミン への接種試験では、これらの菌株はオリーブ上よりも著しく短い2週間で深刻な 感染を起こし、明らかながんしゅを形成した.我々の知るかぎり、ハゴロモジャ スミンへの接種試験とその結果はこれまでに報告されていない.ハゴロモジャス ミンは観賞用植物として日本でも一般的に親しまれており、ハゴロモジャスミン への pv. savastanoi への自然感染や,ハゴロモジャスミンを介しての pv. savastanoi の感染拡大には注意が必要である.近年では, J. nudiflorum (オウ バイ, Taghavi and Hasani 2012), Osmanthus fragrans (ギンモクセイ, Cinelli et al. 2013), Myrtus communis (ギンバイカ, Cinelli et al. 2014), Punica granatum (ザクロ, Bozkurt et al. 2014)への P. savastanoi 種細菌の感染が報告 されている.これらのすべてが pv. savastanoiによるものかどうかは不明である が, pv. savastanoiを含む P. savastanoi 種細菌の宿主範囲については, 日本在 来の植物種を含め、幅広い植物へのさらなる調査が必要である。特に、pv. *savastanoi* が主に宿主とするモクセイ科植物は 25 属約 600 種から成り (Wallander and Albert 2000), モクセイ属 (ヒイラギなど), ヒトツバタゴ属 (ヒ トツバタゴ), レンギョウ属 (ヤマトレンギョウ, ショウドシマレンギョウなど), イボタノキ属 (ミヤマイボタ, ネズミモチなど), トネリコ属 (トネリコ, アオダ モなど)など、絶滅危惧種を含む日本原産の植物種が多く含まれるため注意が必 要である.

また, 接種試験において, SUPP3085 と SUPP3129 は, シマトネリコ, セイ

ヨウキョウチクトウ、イボタノキ、キンモクセイ上で、接種孔周辺にわずかなふ くらみを残したが、このふくらみはその後6ヶ月間に渡る観察期間中明らかなが んしゅに発達することはなかった(Fig. 5.9b-d)ため、これらの植物種に対する 病原性を陰性と判定した(Table 5.4).しかし、接種孔周辺に形成されるふくら みは、pv. savastanoiの代表的な宿主植物であるオリーブ上においても同様で、 試験した菌株はいずれも、接種後1・3ヵ月を経てがんしゅ形成に至る以前に接種 孔周辺にふくらみを形成した.このことより、モクセイ科やキョウチクトウ科の 植物を用いた pv. savastanoiの病原性試験では、少なくとも3ヵ月以上の長期の 観察が不可欠であることが示された.また、シマトネリコ、セイヨウキョウチク トウ、イボタノキ、キンモクセイのような pv. savastanoi が寄生性を示さない植 物種の接種孔周辺に形成されたふくらみは、接種に用いた菌液にわずかに含まれ た細菌由来のインドール酢酸の影響か、もしくは接種時に針で付傷されたことに 対する植物側の応答によるものと考えられる.

細菌学的性状試験では,試験した菌株はいずれもこれまでに報告されている pv. savastanoi の性状と一致する結果を示した (Garden et al. 1992; Marchi et al. 2005; Schaad 1980). 唯一の炭素源としての D-ソルビトールの利用性については, すべての日本分離菌株は,これらの先行研究における結果と同様陽性を示したが, pv. savastanoi の基準菌株である ICMP4352<sup>PT</sup> は陰性を示した. 基準菌株が炭素 源としてソルビトールを利用しないことは, Gardan et al. (1992) により述べら れており,本研究で得られた結果は, pv. savastanoi の典型的な性質に矛盾する ものではない.

rep-PCRより,日本国内で分離された P. savastanoi pv. savastanoi 群には, わずかな遺伝的多様性があることが示された.静岡,愛知,神奈川の3県から分 離された19菌株は,rep-PCR(ERIC)では5パターン,rep-PCR(REP)では2 パターンのバンドパターンに分かれた. P. savastanoi 菌株のグルーピングにお

ける DNA フィンガープリンティングの有効性は, rep-PCR や RAPD (Random amplification of polymorphic DNA) を用いた先行研究の結果によって支持され る (Scotichini et al. 2004; Young 2004; Moretti et al. 2016; Krid et al. 2009). 日本国内で分離された pv. savastanoi 菌株は,ハウスキーピング遺伝子に基づく MLSA ではほぼ均一で,系統樹内ではまとまった位置関係を示したが,rep-PCR の結果では菌株間に多様性が見られた.この多様性には,分離地や分離年との関 連性はなかった.これらより,日本分離菌株が単一菌株のクローンではないこと が示唆される.日本分離菌株はいずれも,静岡県に植栽される推定樹齢 200 年以 上の植物体を含め,ヨーロッパより輸入されたオリーブの古木から分離されてい る.静岡県のオリーブ植物体は家庭庭園に唯一のオリーブ樹として植栽されていたが,愛知および神奈川県の植物体は造園会社の種苗場に植えられていた.これ らの状況を考え合わせると,日本国内で分離された pv. savastanoi 菌株群の遺伝 的多様性は輸出国由来の疑いがある.

しかし、苗木とは異なり、成木を輸入する場合には、オリーブがんしゅ病の病 徴が確認しやすい細枝は切り落とされた状態で輸送されるので、植物検疫時に病 徴を視認することは困難と思われる.実際に、静岡県のオリーブ植物体では、定 植後、樹勢が回復すると同時にがんしゅが形成された.近年では、P. savastanoi pv. savastanoi によるオリーブがんしゅ病以外にも、新型 P. cannabina pv. alisalensis によるアブラナ科植物黒斑細菌病の輸入種子による持ち込み、P. syringae pv. actinidiae (Psa3) によるキウイフルーツかいよう病の輸入花粉に よる感染拡大が示唆されるなど、種苗や農業資材の世界規模での流通に伴い、従 来とは異なる形態で病原菌が持ち込まれる可能性が高まっている. 植物体上に直 接病徴が観察されない場合にも対応可能な病原細菌検出技術の確立が必要である.

興味深いことに,先述の弱毒性菌株 (SUPP3145, SUPP3146) は, rep-PCR および MLSA の結果では,その他通常の病原性を持つ分離菌株と同じグループに

第5章 本邦におけるオリーブがんしゅ病の発生と 病原細菌の同定

属し,他と同様に *iaaM*, *H*, *L* 遺伝子や *ina* 遺伝子を持ち,調査した範囲では 遺伝子的な違いは見つからなかった.これら2菌株の弱毒性のメカニズムに対し ては,更なる遺伝子的な調査を要する.

現在までのところ, *P. savastanoi* pv. *savastanoi* は国内の3地域のみで分離 されている.病害の重要性に鑑み,日本国内における本菌の拡大・分布には継続 的な調査が必要である.

静岡県のオリーブで観察された原病徴. A. 樹上でのがんしゅ, B. 小枝上のがんしゅ, C. ひ こ生え地際部にできたがんしゅ, D. 葉にできたがんしゅ, E. 若いがんしゅ内部の水浸部 分.

Fig. 5.1 オリーブでの原病徴

菌株	菌株別名	分離地	分離年
SUPP3085		静岡	2014
SUPP3086		静岡	2014
SUPP3087	OK-A1	静岡	2014
SUPP3038	OK-A2	静岡	2014
SUPP3127		静岡	2014
<b>SUPP3128</b>		静岡	2014
SUPP3129		静岡	2014
SUPP3130		静岡	2014
SUPP3131		静岡	2014
SUPP3132		静岡	2014
SUPP3133		静岡	2014
SUPP3134		静岡	2014
SUPP3135		静岡	2014
<b>SUPP3145</b>	1-1	愛知	2015
<b>SUPP3146</b>	1-2	愛知	2015
SUPP3147	2-9	愛知	2015
<b>SUPP3148</b>	K1-6	神奈川	2015
<b>SUPP3149</b>	K3-6	神奈川	2015
SUPP3150	K4-1	神奈川	2015
ICMP4352 <sup>PT</sup>		Yugoslavia	1959

Table 5.1 供試菌株

すべての菌株はオリーブ (Olea europaea) より分離した. SUPP: Shizuoka University

Plant Pathology, ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants.

第5章 本邦におけるオリーブがんしゅ病の発生と 病原細菌の同定



0.001

16S rDNA 塩基配列 (1343bp) を用いて作成した Jukes-Cantor model に基づく近隣結合 法の系統樹. 公共データベースより入手した配列のアクセッションナンバーは括弧内に記 載した. Table 5.2 本研究で解析したハウスキーピング遺伝子および *hrp* 遺伝子塩基配 列のアクセッションナンバー (DDBJ)

Strain	Isolation	16S rDNA	gyrB	rpoD	gltA	gap1
SUPP3085	Shizuoka, 2014	LC012764	LC012766	LC012768	LC189186	LC189192
SUPP3086	Shizuoka, 2014	LC012765	LC012767	LC012769	LC189187	LC189193
SUPP3129	Shizuoka, 2014	LC189177	LC189178	LC189182	LC189188	LC189194
SUPP3146	Aichi, 2015	-	LC189179	LC189183	LC189189	LC189195
SUPP3147	Aichi, 2015	-	LC189180	LC189184	LC189190	LC189196
SUPP3149	Kanagawa, 2015	-	LC189181	LC189185	LC189191	LC189197



Fig. 5.3 gyrB, rpoD, gltA, gap1 遺伝子塩基配列に基づく系統樹

gyrB, rpoD, gltA, gap1 遺伝子をコンカテネートして得た塩基配列 (3171bp)を用いて 作成した Jukes-Cantor model に基づく近隣結合法の系統樹.本研究で解析した塩基配列 のアクセッションナンバーは Table 5.2,公共データベースより入手した配列のアクセッシ ョンナンバーは Table 5.3 に記載した.





gyrB 遺伝子塩基配列 (890bp) を用いて作成した Jukes-Cantor model に基づく近隣結合 法の系統樹.本研究で解析した塩基配列のアクセッションナンバーは Table 5.2,公共デー タベースより入手した配列のアクセッションナンバーは Table 5.3 に記載した.





0.005

rpoD 遺伝子塩基配列(807bp)を用いて作成した Jukes-Cantor model に基づく近隣結合 法の系統樹.本研究で解析した塩基配列のアクセッションナンバーは Table 5.2,公共デー タベースより入手した配列のアクセッションナンバーは Table 5.3 に記載した.





0.005

gltA 遺伝子塩基配列(573bp)を用いて作成した Jukes-Cantor model に基づく近隣結合 法の系統樹.本研究で解析した塩基配列のアクセッションナンバーは Table 5.2,公共デー タベースより入手した配列のアクセッションナンバーは Table 5.3 に記載した.





0.01

gap1 遺伝子塩基配列(870bp)を用いて作成した Jukes-Cantor model に基づく近隣結合 法の系統樹.本研究で解析した塩基配列のアクセッションナンバーは Table 5.2,公共デー タベースより入手した配列のアクセッションナンバーは Table 5.3 に記載した.

第5章 本邦におけるオリーブがんしゅ病の発生と 病原細菌の同定

Strain	gyrB	rpoD	gltA	gap1
pv. savastanoi ICMP4352 <sup>PT</sup>	NZ_LJRJ01000054	NZ_LJRJ01000196	NZ_LJRJ01000043	NZ_LJRJ01000148
pv. savastanoi NCPPB3335	KB644093	KB644104	KB644130	KB644115
pv. <i>glycinea</i> race4	NZ_AEGH01000036	NZ_AEGH01000001	NZ_AEGH01000062	NZ_AEGH01000003
pv. glycinea B076	NZ_AEGG01000055	NZ_AEGG01000014	NZ_AEGG01000028	NZ_AEGG01000009
pv. <i>phaseolicola</i> 1448A		CP00	00058 <sup>a)</sup>	
pv. actinidiae NCPPB3739 <sup>PT</sup>	NZ_AFTH01000501	NZ_AFTH01000502	NZ_AFTH01000103	NZ_AFTH01000356
pv. <i>syringae</i> B728a		CP00	00075 <sup>a)</sup>	
pv. <i>oryzae</i> SUPP541 <sup>PT</sup>	LC164035	LC164047	LC164059	LC164071
pv. <i>coronafaciens</i> SUPP196	LC164036	LC164048	LC164060	LC164072
pv. <i>alisalensis</i> ICMP15200 <sup>PT</sup>	AB781098	AB795009	AB795004	AB794998
P. viridiflava ICMP2848 <sup>T</sup>	LKEH01000023	LKEH01000048	LKEH01000015	LKEH01000019

Table 5.3 公共データベースより使用した塩基配列のアクセッションナンバー

<sup>a)</sup> Whole genome sequence.

# Fig. 5.8 人為的接種による病徴(オリーブ)

A: オリーブ上のがんしゅ, 接種後 3 か月 (SUPP3085), B: オリーブ上のがんしゅと接種 した枝の枝枯れ症状, 接種後 6 か月 (SUPP3129), C: 弱毒性菌株 (SUPP3145) による小型 のがんしゅ, 接種後 16 か月.



Fig. 5.9 人為的接種による病徴 (オリーブ以外の植物)

A: ハゴロモジャスミン上のがんしゅ, 接種後 6 か月 (SUPP3129), B: セイヨウキョウチ クトウ接種痕のわずかなふくらみ, 接種後 6 か月 (SUPP3085), C: シマトネリコ接種痕の わずかなふくらみ, 接種後 6 か月 (SUPP3085), D: イボタノキ接種痕のわずかなふくらみ, 接種後 6 か月 (SUPP3129).

Plant species	SUPP 3085	SUPP 3086	SUPP 3129	SUPP 3145	SUPP 3146	SUPP 3147	SUPP 3148	SUPP 3149	SUPP 3150
Olea europaea (オリープ)	+	+	+	w+	w+	+	+	+	+
Fraxinus griffithii (シマトネリコ)	-	nt	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Jasminum polyanthum (ハゴロモジャスミン)	+	nt	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Nerium oleander (セイヨウキョウチクトウ)	-	nt	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Ligustrum obtusifolium (イボタノキ)	-	nt	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Osmanthus fragrans var. aurantiacus (キンモクセイ)	-	nt	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt

# Table 5.4 病原性試験結果

+: 陽性, w+: 他の菌株に比べてがんしゅの形成に時間がかかる, がんしゅが小さい, -: 陰

性, nt: not tested.

## Table 5.5 日本国内分離菌株の細菌学的性状

Strain	Shizuoka isolates	Aichi isolates	Kanagawa isolates	ICMP 4352 <sup>PT</sup>
levan production	-	-	-	-
oxidase activity	-	-	-	-
potato soft rot	-	-	-	-
arginine dihydrolase activity	-	-	-	-
tobacco hypersensitive reaction	+	+ <sup>a)</sup>	+	+
fluorescent pigment production	+	+ <sup>a)</sup>	+	+
catalase activity	+	+	+	+
hydrolysis of casein	-	-	-	-
gelatin	-	-	-	-
esculin	-	-	-	-
utilization of D-sorbitol	+	+	+	-

+: 陽性, -: 陰性. a)に示す2菌株を除き,静岡,愛知,神奈川分離菌株の性状は均一だっ

た. ICMP4352<sup>PT</sup>の性状は過去に調査した(未発表).

a) 愛知分離菌株のうち, SUPP3145 と SUPP3146 はタバコ過敏感反応が弱く, King's B 培

地上で蛍光色素を生産しなかった.

Strain	Shizuoka isolates	ICMP 4352 <sup>PT</sup>
levan production	-	-
oxidase activity	-	-
potato soft rot	-	-
arginine dihydrolase activity	-	-
tobacco hypersensitive reaction	+	+
fluorescent pigment production	+	+
catalase activity	+	+
sucrose reduction	+	+
hydrolysis of casein	-	-
gelatin	-	-
esculin	-	-
nitrate reduction	-	-
lecithinase activity	-	-
poly-β-hydroxybutyrate granules accumulation	-	-
utilization of D-mannitol	+	+
D-cellobiose	-	-
maltose	-	-
lactose	-	-
<b>D</b> -sorbitol	+	-
sucrose	+	+
<i>myo</i> -inositol	+	+
<b>D</b> -fructose	+	+
D-arabinose	-	-
L-arabinose	+	+
<b>D-trehalose</b>	-	-
<b>D</b> -glucose	+	+
adonitol	-	-
<i>meso</i> -erythritol	-	-
<b>D-tartrate</b>	-	-
L-tartrate	+	+
meso-tartrate	-	-
2-Keto-D-gluconate	-	-
D-quinate	-	-
anthranilate	-	-
benzoate	-	-
trigonelline	-	-
betaine	+	+
L-tyrosine	-	-
<b>DL-homoserine</b>	-	-

# Table 5.6 静岡分離菌株の細菌学的性状

+: 陽性, -: 陰性. ICMP4352<sup>PT</sup>の性状は過去に調査した(未発表).

第5章 本邦におけるオリーブがんしゅ病の発生と 病原細菌の同定

Fig. 5.10 hrp 遺伝子に基づく系統樹



0.1



Fig. 5.11 静岡分離菌株の rep-PCR によるバンドパターンの比較

B.

A: rep-PCR ERIC による比較. B: rep-PCR REP による比較. Lane 1, SUPP3127; 2, SUPP3128; 3, SUPP3130; 4, SUPP3132; 5, SUPP3133; 6, SUPP3134; 7, SUPP3135; 8, SUPP3085; 9, SUPP3086; 10, SUPP3087; 11, SUPP3088; 12, ICMP4352PT; 13, SUPP3129; 14, SUPP3131; M, Hi-Lo DNA Marker (Bionexus, Oakland, CA). 各サンプ ル 10 µL を 1.5 % 濃度のアガロースゲルを用いて 50 V で電気泳動した. 黄色い矢印はバ ンドパターンの違いを示す.

Fig. 5.12 愛知・神奈川分離菌株と静岡分離菌株間の rep-PCR によるバンドパ ターンの比較とグルーピング

A.



B.



С.

Band patterns in rep-PCR



A: rep-PCR ERIC による比較. B: rep-PCR REP による比較. C: rep-PCR ERIC および REP のバンドパターンに基づくグルーピング模式図. Lane 1, SUPP3145; 2, SUPP3146; 3, SUPP3085; 4, SUPP3147; 5, SUPP3129; 6, ICMP4352<sup>PT</sup>; 7, SUPP3148; 8, SUPP3149; 9, SUPP3150; M, Hi-Lo DNA Marker (Bionexus, Oakland, CA). 各サンプル 20 µL を 1.5 % 濃度のアガロースゲルを用いて 50 V で電気泳動した. 黄色い矢印はバンドパターンの違い を示す.

Fig. 5.13 P. syringae 各病原型からの ina 遺伝子の PCR による検出



*P. syringae* 各種病原型の *ina* 遺伝子検出 PCR の結果 (genome DNA テンプレート). Lane 1, SUPP3085; 2, SUPP3086; 3, SUPP3087; 4, SUPP3088; 5, SUPP3127; 6, SUPP3128; 7, SUPP3129; 8, SUPP3130; 9, SUPP3131; 10, SUPP3132; 11, SUPP3133; 12, SUPP3134; 13, SUPP3135; 14, SUPP3145; 15, SUPP3146; 16, SUPP3147; 17, SUPP3148; 18, SUPP3149; 19, SUPP3150; 20, pv. *savastanoi* ICMP4352<sup>PT</sup>; 21, pv. *phaseolicola* SUPP1139; 22, pv. *savastanoi* ICMP4352<sup>PT</sup>; 23, pv. *glycinea* SUPP211; 24, pv. *tabaci* SUPP7364; 25, pv. *alisalensis* ICMP15200<sup>PT</sup>; 26, pv. *lachrymans* SUPP105; 27, pv. *mori* kuwa1-2; 28, pv. *actinidiae* ICMP9617<sup>PT</sup>; 29, pv. *tomato* DC3000; 30, pv. *theae* 2-1; 31, pv. *syringae* SUPP458; 32, pv. *pisi* SUPP1662; 33, pv. *oryzae* SUPP541<sup>PT</sup>; 34, pv. *coronafaciens* SUPP196; 35, pv. *tagetis* ICMP4091<sup>PT</sup>; 36, pv. *helianthi* ICMP4531<sup>PT</sup>; N, negative control (sterile distilled water); M, Hi-Lo DNA Marker (Bionexus, Oakland, CA).

### 第6章 総合考察

本研究では、草本植物であるネギ属植物、木本植物であるオリーブに病害を起こす Pseudomonas syringae のふたつの病原型について、植物への病原性試験、細菌学的性状 試験、遺伝子的系統解析、毒素生産能調査を通して同定および分類の研究を行った.その 結果、まず、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は、P. syringae の新たな病原型として位置づけ られることが明らかになり、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌を含む P. syringae hrp·IV 群菌 は、既存の病原性と毒素生産に基づく分類とは異なり、分離源植物に基づき遺伝子的に分 類されることが分かった.また、日本国内で初めての P. savastanoi pv. savastanoi による オリーブがんしゅ病の発生が確認された. P. syringae 群細菌の分類および同定に関しては、 既に枚挙の暇がないほどの夥しい先行研究が世界中で行われているが、近年の遺伝子解析 技術の発達に伴い、病原性試験や細菌学的性状試験のような従来基本的に行われてきた試 験方法が慎重に行われていない場合も見かける.本研究では、全ゲノム解析のような遺伝 子情報を重点的に頼る方法ではなく、植物への病原性、細菌の生理生化学的性状、毒素生 産能は生物検定に重きを置いた上で、遺伝子解析として rep-PCR やハウスキーピング遺伝 子、hrp 遺伝子に基づく MLSA を加え、多面的かつ詳細な P. syringae 病原型の分類およ び同定を行った.

まず病原性試験について、本研究では日本在来の植物種を中心とした幅広い植物種への 人為的接種を行い、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌についても、オリーブがんしゅ病菌 *P. savastanoi* pv. *savastanoi* についても、これまで確認されていなかった宿主植物を明らか にした.本研究で行われた接種試験において、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は、Goto (1972) により報告されたネギ、タマネギ、ラッキョウ、エシャロットの他に、日本在来種のワケ ギやアサツキ上でも明らかな水浸状病斑を形成し、寄生性を持つことが明らかになった. ワケギやアサツキは、ネギ、タマネギと栽培方法が似ていることから近接した条件で栽培 されることも多く、発生時には感染拡大への注意が必要である.またこれらの野菜は日本

の食卓に欠かすことができない食材であることから、ネギなどでは水耕栽培による周年生 産化も進んでいるが、病原の性質上施設栽培下での制御は困難であり被害の深刻化が懸念 される.また、pv. savastanoi は、日本原産ではないが、園芸植物として広く普及してい るハゴロモジャスミンに対して極めて強い病原性を示した.本研究で行われた病原性試験 において、pv. savastanoi はイボタノキ、キンモクセイ、シマトネリコ、キョウチクトウ のような街路樹によく用いられる植物種に対して病原性を示さなかったが、ハゴロモジャ スミンは持ち運びの容易な小型のつる性植物であり、感染拡大の一因となる可能性はある. 現在国内で pv. savastanoi によるオリーブがんしゅ病の発生が確認されているのは静岡・ 愛知・神奈川の 3 地域だが、いずれの植物体も家庭庭園や造園業者の種苗園に定植されて いる私有の個体であり、pv. savastanoi の拡大については今後長期的なモニタリングが必 要である. P. syringae の病原型は、通常 1 種もしくは複数種の限られた植物種を宿主とす るため、明確な宿主範囲調査により的確な防除が可能である.

また、第4章で述べた pv. atropurpurea, pv. striafaciens, クリーピングベントグラス かさ枯病菌では、接種方法を工夫することにより宿主植物と病原細菌の関係を明らかに観 察できた. その結果、これまで pv. atropurpurea と pv. striafaciens からなると考えられ てきたクリーピングベントグラスかさ枯病の病原細菌は、両者とは宿主植物を異にする P. syringae 病原型の新系統である可能性が示唆された. それに加え, pv. coronafaciens がイ タリアンライグラスに寄生性を持つことが確認された. 単子葉類を宿主とする病原細菌の 中でも、pv. atropurpurea, pv. striafaciens, pv. coronafaciens は、細菌学的性状に基づ く識別が困難であり、1960年代~1980年代に報告されて以来、分離源植物に対する病原性 と毒素生産により分類されてきた. 例えば、イタリアンライグラスから分離され, コロナ チンによる赤紫色もしくは赤褐色のハローを形成するものは pv. atropurpurea, エンバク から分離され黄色いハローを形成するものは pv. coronafaciens などのように判断され、毒 素生産能欠損株では識別が困難だった. しかし、本研究で行った葉身を切り取り切断面に 菌液を塗布する葉身切り取り接種により、pv. atropurpurea はイタリアンライグラスのみ

で、クリーピングベントグラス分離菌株はクリーピングベントグラスのみで、葉脈に沿っ て葉身に侵入し、水浸状病斑を伴う壊死斑を形成し、病原性を示した.寄生性を示さない 植物に対しても、切り口には細菌の生産するコロナチンやタブトキシンによるハロー(変 色)は観察されたが、葉身への侵入および病斑の形成は観察されなかった.この接種方法に より、クリーピングベントグラスかさ枯病菌の病原細菌は、従来考えられてきた pv. *atropurpurea* およびに pv. *striafaciens* ではなく、それらから独立した一系統であること が明らかになった.この結果は rep-PCR、ハウスキーピング遺伝子や *hrp* 遺伝子に基づく MLSA などの遺伝子的解析でも支持された.同様にして、pv. *coronafaciens* はイタリアン ライグラス切断面の接種部分より葉身に侵入して水浸状病斑を形成し、水浸部分からは接 種菌株が再分離され、イタリアンライグラスへの寄生性が確認された.

本研究を通して、細菌学的性状調査は、近年頻繁に用いられるキットを用いた簡易的細 菌学的性状調査ではなく、原法に則り調整した調査培地を用いて行った. 同様に毒素検定 は、毒素生産関連遺伝子の PCR による検出だけでなく、ジャガイモ塊茎スライス、大腸菌 や *G. candidum* への生物検定によっても調査された. 特筆すべき結果としては、詳細な細 菌学的性状試験により、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と、リーキ斑点細菌病菌 *P. syringae* pv. porri およびに近縁の hrp<sup>-</sup>IV 群菌を識別することができた. また毒素検定においては、 pv. porri が *G. candidum* の生育を阻害することが明らかになった. 通常 *G. candidum* ~ の生育阻害により検定される毒素はシリンゴマイシンであるが、シリンゴマイシン生産関 連遺伝子の PCR による検出で一般的に用いられる syrB 遺伝子は pv. porri からは検出さ れず、公共データベースに公開される pv. porri 基準菌株 ICMP8961<sup>PT</sup>株のドラフトゲノム シークエンスからも、シリンゴマイシンを生産することで知られる pv. syringae B301D 株 の syrB 遺伝子といくらかでも相同性を示す領域は検索できなかった. pv. porri による *G. candidum* に対する生育阻害の原因については、今後更なる調査を要する. また、ジャガ イモ塊茎スライスを用いた生物検定により、これまでコロナチン生産関連遺伝子のセット を保有しながらもコロナチンを生産しないと考えられてきたネギ・タマネギ斑点細菌病菌、 pv. porri, pv. striafaciens, クリーピングベントグラスかさ枯病菌の一部において,ネギ葉 や誘導培地を介するとジャガイモ塊茎組織に肥大が観察され,コロナチン様の活性が認め られることが明らかになった.これらの結果は,個別の培地を用いた詳細な細菌学的性状 試験と,生物検定に基づく毒素生産能調査に得られたものであり,P. syringae 群細菌の分 類および同定では従来行われてきた丁寧な細菌学的性状試験,生物検定による毒素検定が 必須であることが示された.更にプラスミド抽出物に対するサザンハイブリダイゼーショ ンにより,ジャガイモ塊茎組織に常に肥大を起こす菌株ではコロナチン生産関連遺伝子が プラスミド上に,ネギ葉や誘導培地による誘導を要する菌株ではクロモソームゲノム上に 存在することが本研究で明らかになった.コロナチン生産関連遺伝子をプラスミドグノム 上もしくはクロモソームゲノム上に持つケースとしては,P. syringae pv. tomato の例が挙 げられるが, pv. tomato 菌株は基本的にジャガイモ塊茎スライス上でコロナチン活性を示 し,クロモソームタイプの菌株でも,本研究でネギ・タマネギ斑点細菌病菌, pv. porri, pv. striafaciens,一部のクリーピングベントグラスかさ枯病菌が示したような誘導は必要とし ない.本研究で対象とした hrp IV 群菌で観察された特殊なコロナチン生産制御メカニズム と,これらの菌株のコロナチン生産を助長する物質については,今後更に追及する.

本研究で行われた遺伝子に基づく系統解析において, rep-PCR, ハウスキーピング遺伝子 および hrp 遺伝子に基づく系統解析は, P. syringae 各病原型を効果的に識別した. 特に Inoue and Takikawa (2006) の hrp 遺伝子に基づき作成した系統樹では,供試菌株はハウ スキーピング遺伝子に基づく系統樹の場合と同様にクラスタリングされ,菌株間の系統関 係が強く支持された. ハウスキーピング遺伝子は, P. syringae 病原型の同定および分類の 先行研究でしばしば用いられる gyrB, rpoD, gltA, gap1 を用いたが,ネギ・タマネギ斑 点細菌病菌を含む hrp-IV 群菌,オリーブがんしゅ病菌 P. savastanoi pv. savastanoi を含 む hrp-I-A 群菌のどちらの場合でも gltA 遺伝子のみは系統解析に用いた菌株内で保存性が 高く,ネギ・タマネギ斑点細菌病菌や pv. savastanoi と近縁細菌が同一のクラスターに属 する場合もあった. その他のハウスキーピング遺伝子では,供試菌株はそれぞれの病原型
や分離源植物に基づきクラスターを構成した. hrp-IV 群菌, hrp-I-A 群菌どちらの場合で も、系統樹内における個々のクラスターの位置関係は、解析に用いたハウスキーピング遺 伝子, hrp 遺伝子の種類によって少しずつ異なり, P. syringae 群細菌が分化の過程におけ る遺伝子の水平伝搬などにより複雑な進化を遂げたことが示唆された. rep-PCR はこれら の遺伝子に基づく系統解析によるクラスタリングの結果を支持しただけでなく, MLSA で は捉えきれなかった菌株間の遺伝的多様性を明らかにする場合もあった. ネギ・タマネギ 斑点細菌病菌株間の遺伝的多様性は rep-PCR (ERIC) に,比較対象菌株である P. syringae pv. porri の多様性は rep-PCR (REP) に反映された. 日本国内で分離された pv. savastanoi の系統解析においても、供試菌株は rep-PCR (ERIC)により 5 パターン, rep-PCR (REP) に より 2 パターンのフィンガープリンティングバンドパターンを示した. rep-PCR が Pseudomonas 属や Xanthomonas 属の各病原型間での遺伝子多様性の比較に有効である (Louws et al. 1994) ことは第3章 3.3(4)でも述べた. また第5章 5.5 に述べたように, pv. savastanoi の遺伝的多様性を調査する上での DNA フィンガープリンティングの有効性は, rep-PCR や RAPD (Random amplification of polymorphic DNA) を用いた先行研究の結果 によって支持される (Scotichini et al. 2004; Young 2004; Moretti et al. 2016; Krid et al. 2009). rep-PCR は、その性質上結果をデータベースとして蓄積することは困難ではあるが、 P. syringae 群細菌の遺伝子に基づくグルーピング,遺伝的多様性調査ツールとしては最も 迅速かつ有用な方法のひとつであることが再確認された.一方,興味深いことに、日本国 内で分離された pv. savastanoi では,2菌株の弱病原性菌株 (SUPP3145 および SUPP3146, 愛知県分離菌株)が、通常の病原性を示す菌株(SUPP3085 および SUPP3086、静岡県分 離菌株)と完全に一致するバンドパターンを示した.これらの菌株では, iaaM, H, L 遺 伝子や ina 遺伝子のような病原性に関わる遺伝子の保有については同様だったが、弱毒性 菌株 SUPP3145 および SUPP3146 では他と異なり、タバコへの過敏感反応が弱く蛍光色 素生産が陰性だった. このような MLSA にも rep-PCR によるフィンガープリンティングに も反映されない性質と、その遺伝子的背景については今後更なる研究を要する.

以上, *P. syringae* のふたつの病原型に属する細菌の同定および分類を通し, *P. syringae* 群細菌の同定および分類においては,病原性,細菌学的性状,遺伝子解析および毒素検定 を網羅した多面的かつ綿密な調査が不可欠であることが再確認された. 摘要

Pseudomonas syringae は、世界各地で農作物に損害を与える重要な植物病原細菌のひとつである. その宿主植物や病原性は病原型と呼ばれる分類単位によってさまざま異なり、 的確な防除のためには病原型の正確な同定および分類が不可欠である. P. syringae の病原 型は現在 50 種類以上存在するが、未分類の病原型も数多く存在する. 本研究では、 P. syringae 病原型のうち、病原型未決定であったネギ・タマネギ斑点細菌病菌の同定および 分類と、世界的に認知される重要病害だが日本の発生は未報告であった P. savastanoi pv. savastanoi の同定を行った.

2012 年静岡県浜松市のタマネギ圃場にて、続いて 2014 年兵庫県淡路島にて、ネギ・タ マネギ斑点細菌病と思われる葉枯れ症状が発生した.ネギ・タマネギ斑点細菌病は 1972 年 Goto により初めて記載され、病原はネギ・タマネギに寄生性を持つ P. svringae の一系統で あると同定されたが、その分類学的位置付けは未決定である。本研究では、病原性、細菌 学的性状,毒素,遺伝子に基づき,2012 年および 2014 年分離菌株が当研究室保存の過去 に分離されたネギ・タマネギ斑点細菌病菌株と同一であるかを確認し、類似する病害であ るリーキ斑点細菌病の病原細菌 P. syringae pv. porri やその他の P. syringae hrp-IV 群菌と の比較を通して分類を行った、ネギ類を中心とした各種作物に対する病原性試験では、ネ ギ・タマネギ斑点細菌病菌と pv. porriは、ネギ、リーキ他への病原性で異なった. タマネ ギでは両者が病原性を示したが,病徴は異なり,植物への病原性の差異が明らかになった. 細菌学的性状では,チロシナーゼ活性と,5 種の炭素源の利用性に違いが見られ,ネギ・タ マネギ斑点細菌病菌と pv. porri は明らかに区別された.遺伝子解析について, rep-PCRの 結果,2012 年および 2014 年分離菌株は、過去のネギ・タマネギ斑点細菌病菌株と同様の バンドパターンを示し、また pv. porriとは明確に区別された. ハウスキーピング遺伝子 (gyrB, rpoD, gltA, gap1) に基づく系統樹, およびに III 型分泌機構をコードする hrpS, A, Z, B遺伝子塩基配列に基づく系統樹では、2012年、2014年および過去に分離された ネギ・タマネギ斑点細菌病菌は, pv. porri や他の hrp-IV 群菌とは異なるひとつの独立した

178

クラスターを形成した.よって、2012 年および 2014 年分離菌株は、過去に分離された菌 株と同様のネギ・タマネギ斑点細菌病菌であり、またそれらは pv. porri とは遺伝的な系統 が異なることが示された.毒素検定では、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌、pv. porri、pv. striafaciens は、コロナチン生産に関わる cfl、cfa、cma、cor 遺伝子の一部を保有してい たが、従来の生物検定方法であるジャガイモ塊茎スライスに塗布する方法では、コロナチ ン活性を確認することができなかった.しかし、ネギ葉やコロナチン生産誘導培地を介す ると、これらの菌株はいずれもコロナチン様の活性を示すことが本研究で初めて明らかに なった.以上より、ネギ・タマネギ斑点細菌病菌と外国で発生する pv. porri は明確に区別 され、主に単子葉植物に病原性を示す hrp-IV 群菌の中で独立した分類群であるため、新病 原型として提案した.

続いて P. syringae hrp IV 群菌内でのネギ・タマネギ斑点細菌病菌の位置を明確にするた め、新たに hrp IV 群菌 18 菌株を追加して詳細な系統関係を追求した. gyrB, rpoD, gltA, gap1 および hrpS, A, Z, B遺伝子塩基配列に基づく系統解析では、追加菌株を含む供試 菌株は、概ね分離源植物によって分かれるクラスターを形成した. この結果は rep-PCR に よっても支持され、これまで病原性と毒素生産により分類されてきた hrp-IV 群菌が遺伝子 的に隔たることが確認された. コロナチンに関する毒素検定では、常にコロナチン活性を 示す菌株では、主要なコロナチン生産関連遺伝子をプラスミド上に、誘導を必要とする菌 株ではクロモソーム上に持つ可能性が示された. 病原性試験では、単針付傷接種で hrp-IV 群菌の各病原型を識別が可能になった. 細菌学的性状のみですべての菌株を識別する ことはできなかったが、毒素生産を併せると、分離源に基づくグループ間には識別を可能 にする一定の傾向があり、これまで困難とされていた細菌学的性状による分類の可能性が 示唆された.

2014 年静岡県においてオリーブ (*Olea europaea*) にがんしゅ病と思われる病徴が発生し、予備試験から *P. syringae* 群と考えられる細菌を分離した. 続いて 2015 年愛知県およ

179

び神奈川県において同様の病徴が観察され、分離菌株を入手した.病原性試験・細菌学的 性状試験・遺伝子解析を通し、分離菌株の同定と系統解析を行った.病原性調査では、分 離菌株はオリーブとハゴロモジャスミンに特徴的ながんしゅを形成した.分離菌株はいず れも LOPAT 試験(----+)で Lelliott らの Ib 群に属し、ソルビトールの利用性を除き、 細菌学的性状は基準菌株と完全に一致した.16S rDNA および gyrB, rpoD, gltA, gap1 塩 基配列に基づく系統解析では、分離菌株は基準菌株と共にクラスターを形成した.rep-PCR では、分離菌株は基本的には基準菌株と同様のバンドパターンを示したが、わずかな違い が観察され、国内分離菌株の遺伝的多様性が示された.iaaM, iaaH, iaaL, ina 遺伝子 PCR による検出では、分離菌株はすべて陽性を示した.以上より、分離菌株は P. savastanoi pv. savastanoi と考えられ、本邦における同菌の分離はこれが初めての報告となる.

本研究を通して, *P. syringae* 病原型の分類および同定には MLSA およびに rep-PCR が 有効だった.また,詳細な病原性試験によって,宿主植物への病原性で *P. syringae* の新た な一系統 (クリーピングベントグラスかさ枯病菌)の存在が明らかになり, pv. savastanoi の新たな宿主植物 (ハゴロモジャスミン)が判明した.よって,遺伝子解析だけでなく病原 性や細菌学的性状を含めた多面的な解析が, *P. syringae* 病原型の分類および同定には不可 欠であることが示された.

## SUMMARY

*Pseudomonas syringae* is one of the most important plant pathogens causing various diseases all over the world, and they are divided into more than fifty pathovars by their host plants. In this study, we worked on two pathovars of *P. syringae*, the causal agent of bacterial leaf spot of onions (BLSO), and *P. savastanoi* pv. *savastanoi* causing knots on olive.

In 2012 and 2014, a disease suspected as bacterial leaf spot of onions (BLSO) re-emerged in Shizuoka and Hyogo, Japan, respectively. A pathogenic bacterium was isolated from the infected onions and suggested to be BLSO agent through preliminary examinations. BLSO was first recorded in Japan by Goto in1972 and the pathogen was considered as a pathovar of *Pseudomonas syringae*, but it has not been taxonomically investigated in detail. The strains isolated in 1969, 1986, 1987, 2012 and 2014 were compared with the causal agent of bacteriosis of leeks (P. syringae pv. porri) which shows similar symptoms with BLSO. rep-PCR distinguished the BLSO agent and pv. porri. 2012 and 2014 isolates showed basically same band patterns as BLSO strains isolated previously. The sequence analysis of housekeeping genes and *hrp* genes which encode the type-III secretion system revealed that the BLSO agent and pv. porri formed independent clusters. 2012 and 2014 isolates belonged to BLSO cluster in both of those analyses. From the results of rep-PCR and sequence analysis, 2012 and 2014 isolates were identical with BLSO strains isolated in the past and BLSO agent is independent from pv. porri genetically. In bacteriological characteristics, difference was observed in utilization of erythritol, DL-homoserine, glutaric acid and others between the BLSO agent and pv. porri. In pathogenicity tests, two organisms showed different reactions on onion, Welsh onion, leek, garlic and chives. In phytotoxin examinations, although all of cfl, cor, cma, cfa genes were detected in BLSO agent and pv. porri, both of them did not produce coronatine on potato tuber slices. But they showed coronatine-like activity on potato tuber slices, when they were applied with Welsh onion leaves or coronatine production inducing medium (HS-C medium). A similar phenomenon was observed for pv. *striafaciens*, too. According to these findings, BLSO agent is clearly distinguished from pv. *porri* and considered to be a new pathovar of *P. syringae*.

To clarify the position of BLSO strains among the *P. syringae hrp*-group IV strains, minute phylogenic relationship was pursued adding 18 strains of *hrp*-group IV. The sequence analysis of housekeeping genes and *hrp* genes showed that strains formed independent clusters based on plants they were isolated. This result was supported by the result of rep-PCR. In the past study, *hrp*-group IV strains were classified by their virulence and pathogenicity for the host plants. This research confirmed that *hrp*-group IV strains are genetically distinguished among pathovars. In phytotoxin examinations about coronatine, the existence of the plasmid encoding *cfl, cor, cma, cfa* genes was suggested in strains producing coronatine on potato tuber slices. In strains requiring onion leaves or HS-C medium to produce coronatine, it was considered that these genes existed on chromosome. By artificial inoculations to Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*), creeping bentgrass (*Agrostis palustris*) and oats (*Avena sativa*) with modified methods, *hrp*-group IV strains could be distinguished in pathogenicity on their host plants.

Olive knot disease was first found in Shizuoka prefecture, Japan, in 2014. From water soaked tissues inside young knots, a bacterium forming cream white-colored colonies was easily isolated, and the isolates from knots were also suspected to be *P. savastanoi* pv. *savastanoi* through preliminary examinations. Subsequently, olive trees having knots were also found in Aichi and Kanagawa prefectures in 2015, and three isolates from olive knots of each prefecture were sent to our laboratory. Therefore, the

## **SUMMARY**

identification of isolates from three prefectures was conducted through pathogenicity test, bacteriological characterizations and genetic analysis. In phylogenic analysis based on 16S rDNA and housekeeping genes (gyrB, rpoD, gltA and gap1), the isolates belonged to a same cluster with the pathotype strain, ICMP4352<sup>PT</sup>. *iaaM*, H and Lgenes and *ina* gene were detected from all of the isolates by PCR. In rep-PCR (ERIC and REP) analysis, the isolates showed nearly identical band patterns to that of ICMP4352<sup>PT</sup>, but the slight variations of band patterns were observed among them. On the pathogenicity test, the isolates formed distinct knots on olive and pink jasmine. Among phenotypic properties, the isolates showed almost identical results with those of ICMP4352<sup>PT</sup> with the single exception of D-sorbitol utilization. Consequently, Aichi and Kanagawa isolates from olive were identified as *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, and several genetic diversities in terms of rep-PCR were observed in Japanese population of *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, indicating their heterogeneity.

Throughout these identifications and classifications of strains of *P. syringae* pathovars, MLSA or rep-PCR functioned effectively for grouping *P. syringae* strains. On the other hand, multiple investigations, including detailed pathogenicity test and bacteriological characterizations, were also needed for accurate identifications and classifications of *P. syringae*.

## 【引用・参考文献】

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1987) Current protocols in molecular biology, vol 1. Wiley, New York
- Balestra GM, Lamichhane JR, Kshetri MB, Mazzaglia A, Varvaro L (2009) First report of olive knot caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in Nepal. Plant Pathol 58:393
- Barta TM, Kinscherf TG, Uchytil TF, Willis DK (1993) DNA sequence and transcriptional analysis of the *tblA* gene required for tabtoxin biosynthesis by *Pseudomonas syringae*. Appl Environ Microbiol 59:458-466
- Bender CL, Malvick DK, Mitchell RE (1989) Plasmid-Mediated Production of the Phytotoxin Coronatine in *Pseudomonas syringae* pv. *tomatot*. J Bacteriol 171: 807–812
- Bender CL, Young SA, Mitchell RE (1991) Conservation of plasmid DNA sequences in coronatine-producing pathovars of *Pseudomonas syringae*. Appl Environ Microbiol 57: 993–999
- Bender CL, Palmer D, Penaloza-Vazquez A, Rangaswamy V, Ullrich M (1996) Biosynthesis of coronatine, a thermoregulated phytotoxin produced by the phytopathogen *Pseudomonas syringae*. Arch Microbiol 166: 71–75
- Bereswill S, Bugert P, Völksch B, Ullrich M, Bender CL, 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
- Birnborn HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl Acids Res 7: 1513–1523

卜蔵 梅之丞 (1915) 病害虫雑誌 2: 付録 31

Bozkurt IA, Soylu S, Mirik M, Ulubas Serce C, Baysal Ö (2014) Characterization of bacterial knot disease caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* on pomegranate (*Punica granatum* L.) trees: a new host of the pathogen. Appl Microbiol 59: 520–527

- Bremer B, Bremer K, Chase M, Fay M, Reveal J, Soltis D, Soltis P, Stevens P (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Bot J Linn Soc 161: s105–121
- Carrion VJ, Arrebola E, Cazorla FM, Murillo J, Vicente A (2012) The *mbo* operon is specific and essential for biosynthesis of mangotoxin in *Pseudomonas syringae*. PLoS ONE 7:e36709. doi:10.1371/journal.pone.0036709
- Cinelli T, Rizzo D, Marchi G, Surico G (2013) First report of knot disease caused by *Pseudomonas savastanoi* on sweet olive in central Italy. Plant Dis 97: 419
- Cinelli T, Marchi G, Cimmino A, Marongiu R, Evidente A, Fiori M (2014) Heterogeneity of *Pseudomonas savastanoi* populations infecting *Myrtus communis* in Sardinia (Italy). Plant Pathol 63: 277–289
- Fahy PC, Persley GC (1983) Plant bacterial diseases: a diagnostic guide. Academic Press, Sidney, p 363-365
- FAOSTAT (2012) Food and agricultural organization of the United Nations. http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx
- Gardan L, Bollet C, Ghorrah MA, Grimont F, Grimont PAD (1992) DNA relatedness among the pathovar strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janse (1982) and proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp. nov. International Int J Syst Bact 42: 606–612
- Gardan L, Shafik H, Belouin S, Broch R, Grimont F, Grimont PAD (1999) DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (*ex* Sutic and Dowson1959). Int J Syst Bact 49: 469–478
- Gitaitis R, Mullis S, Lewis K, Langston D, Watson AK, Sanders H, Torrance R, Jones JB, Nischwitz C (2012) First report of a new disease of onion in Georgia caused by a nonfluorescent *Pseudomonas* species. Plant Dis 96:285
- Goto M (1972) Bacterial leaf spot of onions in Japan. Plant Dis Rep 56: 90-493

- 後藤 正夫・市川 一行・牧野 孝宏 (1981) 我が国で最近発見された細菌病. 植物防疫 35: 270-274
- 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 (1). 植物防疫 38: 339-344
- 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 (2). 植物防疫 38: 385-389
- 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 (3). 植物防疫 38:432-437
- 後藤 正夫・瀧川 雄一 (1984d) 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
- Gross DC and DeVay JE (1977) Population dynamics and pathogenesis of Pseudomonas syringae in maize and cowpea in relation to the in vitro production of syringomycin. Phytopathology 67: 475-483
- Hale CN (1975) Bacteriosis of leek in New Zealand. J Agric Res 18: 251-254
- Hall BH, Cother EJ, Whattam M, Noble D, Luck J, Cartwright D (2004) First report of olive knot caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* on olives (*Olea europaea*) in Australia. Aust Plant Pathol 33: 433–436
- 原 攝祐 (1925) 實驗作物病理學, 養賢堂, 東京, pp 469
- 原 攝祐 (1930) 實驗作物病理學, 養賢堂, 東京, pp 769
- 平石 明 (1995) PCR を利用した 16S r RNA 遺伝子の解析と系統研究-1 16S rDNA の増幅と制 限酵素断片解析 Bull J Soc Microbial Ecol 10: 31-42
- 日渡 寿巳 (1999) ダイズ斑点細菌病菌のコロナチン生産に関与する遺伝子の解析. (修士論 文)
- Iacobellis NS, Caponero A, Evidente A (1998) Characterization of *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi* strains isolated from ash. Plant Pathol 47: 73-83

- Ichikawa T, Okamoto H, Fujimoto Y, Kawanishi R, Tuboi Y (1987) Diurnal and seasonal changes of Location and Behavior in Adult Olive Weevil, *Dyscerus perforatus* (ROELOFS) (Coleoptera: Curculionidae). Jpn J Appl Ent Zool 31: 6–16
- 飯富 暁康・梅川 学・田口 多喜子・佐々木 次雄 (1983) Pseudomonas 属細菌によるネギの 腐敗症について:(1) 発生実態および病徴. 日植病報 49:415 (講要)
- Inoue Y, Takikawa Y (2006) The *hrpZ* and *hrpA* genes are variable, and useful for grouping *Pseudomonas syringae* bacteria. J Gen Plant Pathol 72: 26–33

石山 信一・向 秀夫 (1941) 植物病原細菌誌,明文堂, 東京, pp 398

- Jones LR (1901) A soft rot of carrot and other vegetables caused by *Bacillus carotovorus*. Vermont Agr Exp Stn Ann Rep 13: 299–332
- Kadota I, Uehara K, Shinohara H, Nishiyama K (2000) Bacterial Blight of Welsh Onion: A New Disease Caused by *Xanthomonas campestris* pv. *allii* pv. nov. J Gen Plant Pathol 66: 310–315
- 小林 真樹・早川 敏広,・矢口 重治 (2001) クリーピングベントグラスに発生した Pseudomonas syringae 群細菌による葉枯症状. 芝草研究 30(別 1): 104
- 小林 真樹・早川 敏広・矢口 重治・瀧川 雄一・林田 美由貴 (2002) クリーピングベント グラスに発生した3種の細菌性病害について. 芝草研究 31(別 1):35
- Koike ST, Barak JD, Henderson DM, Gilbertson RL (1999) Bacterial blight of leek: a new disease in California caused by *Pseudomonas syringae*. Plant Disease 83: 165–170
- Krid S, Rhouma A, Quesada JM, Penyalver R, Gargouri A (2009) Delineation of *Pseudomonas* savastanoi pv. savastanoi strains isolated in Tunisia by random - amplified polymorphic DNA analysis. J Appl Microbiol 106: 886–894
- 久保田 豊和 (1988) ネギ斑点細菌病に関する研究. (卒業論文)
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol 33: 1870–1874

Kusumoto S, Aeny TN, Mujimu S, Ginting C, Tsuge T, Tsuyumu S, Takikawa Y (2004) Occurrence

of blood disease of banana in Sumatora, Indonesia. J Gen Plant Pathol 70: 45-49

桑田 博隆 (1993) イネかさ枯病に関する研究. 青森県農業試験場研究報告 33: 1-67

Lelliott RA (1952) A new bacterial disease of leeks. Plant Pathol 1: 84-85

- Lelliott RA, Billing E, Hayward AC (1966) A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic Pseudomonads. J Appl Bacteriol 29: 470–489
- Liphschitz N, Gophna R, Hartman M, Biger G (1991) The beginning of olive (*Olea europaea*) cultivation in the old world: a reassessment. J Arch Sci 18: 441–453
- Liyanage H, Penfold C, Turner J, Bender CL (1995) Sequence, expression and transcriptional analysis of the coronafacate ligase-encoding gene required for coronatine biosynthesis by *Pseudomonas syringae*. Gene 153: 17–23
- Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, De Bruijn FJ (1994) Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Appl Environ Microbiol 60: 2286–2295
- Maeda Y, Shinohara H, Kiba A, Ohnishi K, Furuya N, Kawamura Y, Ezaki T, Vandamme P, Tsushima S, Hikichi Y (2006) Phylogenetic study and multiplex PCR-based detection of *Burkholderia plantarii, Burkholderia glumae* and *Burkholderia gladioli* using gyrB and rpoD sequences. Int J Syst Evol Microbiol 56: 1031–1038
- Marchi G, Viti C, Giovannetti L, Surico G (2005) Spread of levan-positive populations of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, the causal agent of olive knot, in central Italy. Eur J Plant Pathol 112: 101–112
- Marchi G, Cinelli T, Surico G (2011) A review on *Pseudomonas savastanoi* genetic traits involved in disease development and in symptom induction. In: Schena L, Agosteo GE, Cacciola SO (eds)
  Olive Diseases and Disorders, chap 6. Transworld Research Network, Kerala, India, pp 117–141
- Migula W., 1894. Über ein neues System der Bakterien. Arbeiten aus dem Bakteriologischen Institut

der Technischen Hochschule zu Karlsruhe 1: 235-238

宮沢 英恵 (1994) ネギ斑点細菌病に関する研究. (卒業論文)

- Moloto VM, Goszczynska T, du Toit LJ, Coutinho TA (2016) A new pathovar of *Pseudomonas syringae*, pathovar *allii*, isolated from onion plants exhibiting symptoms of blight. Eur J Plant Pathol: 1–13
- Moretti C, Vinatzer BA, Onofri A, Valentini F, Buonaurio R (2016) Genetic and phenotypic diversity of mediterranean populations of the olive knot pathogen, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Plant Pathol DOI: 10.1111/ppa.12614
- 森 充隆・十河 和博・瀧川 雄一 (2001) オオムギ黒節病の病徴発現に関する温度と植物体 の生育ステージ. 日植病報 67:207 (講要)
- Myung IS, Joa JH, Shim HS (2011) Bacterial leaf spot of onion caused by *Pseudomonas syringae* pv. *porri*, a new disease in Korea. Plant Dis 95: 1311
- 西口 真嗣 (2013) 淡路島におけるタマネギ病害防除への取り組み. 農薬春秋 90:9-14
- 西山 幸司 (1978) 植物病原細菌簡易同定法の試案. 植物防疫 32:283-288
- 西山 幸司・江塚 昭典 (1978) 新しい生理活性物質コロナチンを生産する細菌の種類. 日植病報 44:179-183
- 西山 幸司 (1981) ライグラス類かさ枯病細菌における病原性関連物質に関連する研究. 農 技研報. C35: 1-55
- Noble DH, Cother EJ, Hailstones DL, Flack M, Oxspring L, Hall B (2006) Characterisation of *Pseudomonas syringae* strains associated with a leaf disease of leek in Australia. Eur J Plant Pathol 115: 419-430

農林水産省平成27年産作況調查,

http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou\_yasai/index.html

岡部 徳夫 (1949) 植物細菌病学,朝倉書店,東京, pp 172

大内 昭・大沢 高志・西村 十郎 (1982a) タマネギ春腐病を起因する 2 種の病原細菌:1.

Erwinia rhapontici (Millard 1924) Burkholder 1948. 日植病報 48: 76-77 (講要)

- 大内 昭・西村 十郎・大沢 高志 (1982b) タマネギ春腐病を起因する 2 種の病原細菌: 2. *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* (Brown 1918) Stevens 1925. 日植病報 48: 137 (講 要)
- 大内 昭・大沢 高志・西村 十郎 (1983) タマネギ腐敗病を起こす 2 種の病原細菌, Erwinia rhapontici (Millard 1924) Burkholder 1948 および Pseudomonas marginalis pv. marginalis (Brown 1918) Stevens 1925. 日植病報 49: 619-626
- Palmer DA, Bender CL (1993) Effects of environmental and nutritional factors on production of the polyketide phytotoxin coronatine by *Pseudomonas synrngae* pv. glycinea. Appl Environ Microbiol 59: 1619–1626
- Parry RJ, Mhaskar SV, Lin MT, Walker AE, Mafoti R (1994) Investigation of the biosynthesis of the phytotoxin coronatine. Can J Chem 72: 86–99
- Penyalver R, García A, Ferrer A, Bertolini E, López MM (2000) Detection of *Pseudomonas* savastanoi pv. savastanoi in olive plants by enrichment and PCR. Appl Environ Microbiol 66: 2673–267
- Rademaker JLW, Louws FJ, de Bruijn FJ (1998) Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In: Akkermans ADL, van Elsas JD, de Bruijin FL (eds) Molecular microbial ecology manual, chap 3.4.3. Kluwer, Dordrecht, suppl (3), pp 1–27
- Roach R, McTaggart A, Gambley C, Harper S, Carey D, Duff JD (2015) *Pseudomonas syringae* pv. *porri*: a new pathogen of Australian onions. Acta Hortic 1105: 149–154
- Rombouts S, Van Vaerenbergh J, Volckaert A, Baeyen S, De Langhe T, Declercq B, Lavigne R, Maes M (2016) Isolation and characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *porri* from Leek in Flanders. Eur J Plant Pathol 144: 185–198

Ryu E (1937) A simple method of staining bacterial flagella. Kitasato Arch Exp Med 14:218-219

- Ryu E (1940) A simple method of differentiation between gram-positive and gram-negative organism without staining. Kitasato Arch Exp Med 17: 58–63
- 酒井 和彦・宇賀 博之・平野 泰志・井上 康宏 (2011) Burkholderia gladioli によるネギ褐色 腐敗病(新称)の発生. 日植病報 77:183 (講要)
- Samson R, Poutier F, Rat B (1981) Une nouvelle maladie du poireau: la graisse bactérienne à *Pseudomonas syringae*. PHM Rev Hortic 219: 20–23
- Samson R, Shafik H, Benjama A, Gardan L (1998) Description of the bacterium causing blight of leek as *Pseudomonas syringae* pv. *porri* (pv. nov.). Phytopathology 88:844–850
- Sarkar SF, Guttman DS (2004) Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. Appl Environ Microbiol 70: 1999–2012
- Sato M, Nishiyama K, Shirata A (1983) Involvement of plasmid DNA in the productivity of coronatine by *Pseudomonas syringae* pv. *atropurpurea*. 日植病報 49: 522-528
- Sato M, Watanabe K, Yazawa M, Takikawa Y, Nishiyama K (1997) Detection of new ethylene-producing bacteria, *Pseudomonas syringae* pvs. *cannabina* and *sesami*, by PCR amplification of genes for the ethylene-forming enzyme. Phytopathology 87: 1192–1196
- Schaad NW, Cunfer BM (1979) Synonymy of Pseudomonas coronafaciens, Pseudomonas coronafaciens pathovar zeae, Pseudomonas coronafaciens subsp. atropurpurea, and Pseudomonas striafaciens. Int J Syst Bacteriol 29: 213–221
- Schaad NW (1980) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS press, St. Paul, p39
- Schaad NW, Cheong SS, Tamaki S, Hatziloukas E, Panopoulos NJ (1995) A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. Phytopathology 85: 243–248
- Scortichini M, Rossi MP, Salerno M (2004) Relationship of genetic structure of *Pseudomonas* savastanoi pv. savastanoi populations from Italian olive trees and patterns of host genetic

diversity. Plant pathol 53: 491-497

- Sinden SL, DeVay JE, Backman PA (1971) Properties of syringomycin, a wide spectrum antibiotic and phytotoxin produced by *Pseudomonas syringae*, and its role in the bacterial canker disease of peach trees. Physiol Plant Pathol 1: 199–213
- Society of American Bacteriologists (1957) Manual of microbiological methods. McGraw-Hill, New York, p 54
- Sotokawa N, Takikawa Y (2004) Occurrence of bacterial rot of onion bulbs caused by *Burkholderia cepacia* in Japan. J Gen Plant Pathol 70: 348–352
- Sorensen KN, Kim KH, Takemoto JY (1998) PCR detection of cyclic lipodepsinonapeptide-producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity of strains. Appl Environ Microbiol 64: 226–230
- 鈴木 啓史・橋爪 不二夫・黒田 克利 (2009) コムギ黒節病菌病原性検定のための接種試験 法の検討. 日植病報 76:62 (講要)
- Staskawicz BJ, Panopoulos NJ (1979) A rapid and sensitive microbiological assay for phaseolotoxin. Phytopathology 69: 663–666
- Stevens PF (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July 2012 [and more or less continuously updated since]. <u>http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/</u>.
- Šutić D, Dowson WJ (1963) The reactions of olive, oleander and ash, cross inoculated with some strains and forms of *Pseudomonas savastanoi* (Smith) Stevens. J Phytopathol 46: 305–314
- Suzuki A, Togawa M, Ohta K, Takikawa Y (2003) Occurrence of white top of pea caused by a new strain of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. Plant dis 87: 1404–1410
- Taghavi M, Hasani S (2012) Occurrence of *Pseudomonas savastanoi* the causal agent of winter Jasmine gall in Iran. Iran Agr Res 31: 39-48
- Takikawa Y, Serizawa S, Ichikawa T, Tsuyumu S, Goto M (1989) *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* nov.: the causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan. Ann Phytopath Soc Jpn

55: 437-444

瀧川 雄一・吉野 正義・山下 修一・土居 養二 (1983) ネギ軟腐病より分離された Erwinia
 chrysanthemi について. 日植病報 49:415 (講要)

- 瀧川 雄一・外川 直子・楠元 智子 (2002) Burkholderia cepacia によるタマネギの腐敗症の発生. 日植病報 68:64 (講要)
- 瀧川 雄一・内海 恵美・小林 真樹・早川 敏広 (2004) クリーピングベントグラスかさ枯病 の病原細菌の同定. 日植病報 70: 282 (講要)
- 田中 民夫・青田 盾彦 (1990) Pseudomonas gladioli によるタマネギのりん茎腐敗. 日植病報 56: 393-394 (講要)
- 谷井 昭夫・小林 敏郎 (1984) Corynebacterium 属細菌によるタマネギかいよう病 (新称) に ついて. 日植病報 50:95 (講要)
- 田部井 英夫・吉田 孝二 (1952) 玉葱の細菌性腐敗病(心腐病)菌に就いて. 日植病報 16: 180-181 (講要)
- Tegli S, Cerboneschi M, Libelli IM, Santilli E (2010) Development of a versatile tool for the simultaneous differential detection of *Pseudomonas savastanoi* pathovars by end point and real-time PCR. BMC microbiol 10: 156
- 富永 時任・土屋 行夫 (1958) Psendomonas 属細菌によるタマネギ及びラツキョウの腐敗病 について、日植病報 23:36 (講要)
- Tsuji M, Ohta K, Tanaka K, Takikawa Y (2015) First Report of Knot Disease on Olive (*Olea europaea*) in Japan Caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Plant Dis 99: 1445
- Tsuji M, Ohta K, Tanaka K, Takikawa Y (accepted) Comparison among Japanese isolates of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, the causal agent of olive knot disease. J Gen Plant Pathol
- 内海 恵美 (2005) クリーピングベントグラスかさ枯病病原細菌に関する研究. (卒業論文)
   上田 榮次郎 (1914) 植物の細菌病に就て(一). 病虫雑 1:20-23

- 梅川 学・飯富 暁康・佐々木 次雄 (1983) Pseudomonas 属細菌によるネギの腐敗症について: (2) 病原細菌の同定. 日植病報 49:415 (講要)
- Van Overbeek LS, Nijhuis EH, Koenraadt H, Visser J, Van Kruistum G (2010) The role of crop waste and soil in *Pseudomonas syringae* pathovar *porri* infection of leek (*Allium porrum*). Appl soil ecol 46: 457–463
- Versalovic J, Koeuth T, Lupski R (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerpriting of bacterial genomes. Nucl Acids Res 19: 6823–6831
- Vossen P (2007) Olive oil: history, production, and characteristics of the world's classic oils. Hort Science 42: 1093-1100
- Wallander E, Albert VA (2000) Phylogeny and classification of *Oleaceae* based on *rps16* and *trnL-F* sequence data. Am J Bot 87: 1827–1841
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol 173: 697–703
- 八鍬 利郎 (1973) ネギ=植物としての特性. 農業技術大系野菜編 8, 農山漁村文化協会, 東京, pp 3-72
- Yamamoto S, Bouvet PJM, Harayama S (1999) Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA–DNA hybridization. Int J Syst Bacteriol 49: 87–95
- Yan S, Liu H, Mohr TJ, Jenrette J, Chiodini R, Zaccardelli M, Setubal JC, Vinatzer BA (2008) Role of recombination in the evolution of the model plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, a very atypical tomato strain. Appl Environ Microbiol 74: 3171–3181
- Young JM, Takikawa Y, Gardan L, Stead DE (1992) Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. Ann Rev Phytopath 30: 67–105.
- Young JM (2004) Olive knot and its pathogens. Aust Plant Pathol 33: 33-39
- Young JM (2010) Taxonomy of Pseudomonas syringae. J Plant Pathol 92 (1, Supplement):

S1.5-S1.14