

沖縄県で分離されたサトウキビ白すじ病菌の 分子系統解析

對馬 誠也

農業環境技術研究所

[〒305-8604 つくば市観音台 3-1-3]

Phylogenetic diversity of *Xanthomonas albilineans* isolated in Okinaka, Japan

Seiya TSUSHIMA

National Institute for Agro-Environmental Sciences

1. 目的

サトウキビ白すじ病は、サトウキビの葉身や葉鞘の退緑あるいは白化を呈する病害であり (図 1)、アメリカをはじめ各国で報告されている (Comstock and Shine, 1992; Grisham et al., 1993; Hoy and Grisham, 1994; Ovalle et al., 1995; Diaz et al., 2000). 我が国では、本病は種苗管理上対策を要する重要病害の 1 つと位置付けられており、特に沖縄本島では近年の品種の変遷等に伴い発生が増加しているため (對馬, 2008)、早急な防除法の開発が求められている。

本病の病原菌は *Xanthomonas albilineans* であり、本病菌の生態、防除、検出技術に関する知見は海外では多いものの (Ricaud and Ryan, 1989)、国内では極めて少ない。その中で、病原細菌の移動経路や地理的分布等の生態的特徴を明らかにすることは、発病の拡大防止技術や発生予察等を開発する上で重要である。そのためには、国外を含め様々な場所から分離された各病原細菌株の複数の保存性の高い遺伝子の比較に基づく系統 (遺伝子タイプ) を明らかにした上で、系統ごとに解析することが有効である。

本研究は、国外の菌株とともに沖縄県で分離された白すじ病菌の分子系統解析を行い、沖縄に分布する遺伝子タイプを明らかにすることを目的として行った。すなわち、各菌株の 16S rRNA 遺伝子 (16S rDNA)、染色体の複製に関与する DNA ジャイレース遺伝子 (*gyrB*)、およびプロモーター特異的転写開始に関与するシグマ因子の一つである $\sigma 70$ ファクター遺伝子 (*rpoD*) の 3 つの遺伝子の DNA 塩基配列情報を解析し、その結果を基に各菌株の遺伝子タイプを明らかにした。なお、本成果の一部はすでに原著論文や解説などで発表している (Tsushima et al., 2006; 對馬, 2008)。

2. 材料および方法

1) 供試菌株

試験に供試した *X. albilineans* の菌株は、外国産の 10 菌株および沖縄県の東村の罹病サトウキビから分離された 21 菌株の計 31 菌株である (表 1)。なお、沖縄県から分離された 21 菌株は NIAS ジーンバンクに登録されており、それぞれ表 2 に示す MAAFF 番号が与えられている。



図 1. *Xanthomonas albilineans* によるサトウキビ白すじ病の病徴

赤の矢印は病原細菌の分離部位を示す。

2) DNA の抽出および PCR による増幅

各菌株のゲノム DNA は、Isoplant II kit (ニッポンジーン社製) によって抽出した。各菌株の 16S rDNA, *gyrB* および *rpoD* 領域を増幅するためのプライマーとして、16S rDNA では 63f (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') と 1387r (5'-

GGGCGGWGTGT

ACAAGGC-3'),

gyrB では UP-1 (5'-

GAAGTCATCATG

ACCGTTCTGCAY

GCNNGNGGNAA

RTTYGA-3')

と UP-2r (5'-

AGCAGGGTACG

GATGTGCGAGCC

RTCNACRTCNGC

RTCNGTCAT-3'),

rpoD では 70F (5'-

ACGACTGACCCG

GTACGCATGTAY

ATGMGNGARAT

GGGNACNGT-3')

と 70R (5'-

ATAGAAATAACC

AGACGTAAGTTN

GCYTCNACCATY

表 1. 試験に供した *Xanthomonas albilineans* 菌株

菌株番号	宿主植物学名	採集場所	分離者名, 分離年
LMG479 ^{a)}	<i>Paspalum dilatatum</i>	Mauritius	G. Orian, 1947
LMG481	<i>Saccharum officinarum</i>	St Lucia	J. Spence, 1957
LMG482	<i>Saccharum officinarum</i>	Mauritius	A. Hayward, 1960
LMG483	<i>Saccharum officinarum</i>	Madagascar	P. Baudin, 1960
LMG487	<i>Saccharum officinarum</i>	Guyana	S. Bisessar, 1961
LMG488	<i>Saccharum officinarum</i>	Sri Lanka	A. Hayward, 1962
LMG489	<i>Saccharum officinarum</i>	Zimbabwe	R. Lelliott, 1965
LMG490	<i>Saccharum officinarum</i>	Malawi	J. Bradbury, 1967
LMG491	<i>Saccharum officinarum</i>	Barbados	J. Bradbury, 1968
LMG494 ^T	<i>Saccharum officinarum</i>	Fiji	D. Dye, 1961
T161-T164 ^{b)}	<i>Saccharum officinarum</i>	Okinawa, Japan	S. Tsushima, 2002
T166-T168	<i>Saccharum officinarum</i>	Okinawa, Japan	S. Tsushima, 2002
T169-T171	<i>Saccharum officinarum</i>	Okinawa, Japan	S. Tsushima, 2002
T174, T175	<i>Saccharum officinarum</i>	Okinawa, Japan	S. Tsushima, 2002
T179	<i>Saccharum officinarum</i>	Okinawa, Japan	S. Tsushima, 2002
T181, T182	<i>Saccharum officinarum</i>	Okinawa, Japan	S. Tsushima, 2002
T186	<i>Saccharum officinarum</i>	Okinawa, Japan	S. Tsushima, 2002
T187	<i>Saccharum officinarum</i>	Okinawa, Japan	S. Tsushima, 2002
T189, T190	<i>Saccharum officinarum</i>	Okinawa, Japan	S. Tsushima, 2002
T257	<i>Saccharum officinarum</i>	Okinawa, Japan	S. Tsushima, 2002
T258	<i>Saccharum officinarum</i>	Okinawa, Japan	S. Tsushima, 2002

a) LMG: ベルギーの Laboratorium voor Microbiologie Culture Collection の保存菌株。

b) 同一行にまとめられた菌株は、同一のサトウキビから分離されたことを表す。上付きの T は基準株を示す。

TCYTTYTT -3')を用い、PCR 反応を行った (Tsushima et al., 2006).

3) DNA シークエンスおよび系統解析

各 PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen 社) または ExoSAP-IT (USB 社) で精製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit ver. 3.1 (Applied Biosystems 社) でシークエンス反応後、DNA シークエンサーにより塩基配列を決定し、系統解析を行った。アウトグループとして、*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (KACC10331; GI: 58424217) を用いた。塩基配列のアライメントを Clustal W (ver. 1.8) で行った後、NJ 法により系統樹を作成した。

3. 結果

各遺伝子の系統解析に基づく供試菌株の遺伝子タイプの類別結果を表 3 に示す。16S rDNA の塩基配列に基づいた類別では 2 つのグループ (I, II) に分かれたただけであったが、*gyrB* および *rpoD* ではそれぞれ 5 (I~V)、4 (I~IV) グループに分けられた。*rpoD* と *gyrB* のグルーピングのパターンを比較すると、*rpoD* におけるグループ III が *gyrB* でさらに 2 グループに分けられる以外は同じであった。これら 3 つの遺伝子のグルーピング結果を総合的に判断して、供試した 31 菌株は 5 つの遺伝子タイプ (A~E) に分けられた。その中で、沖縄県由来の 21 菌株は、St. Lucia, Guyana,

表2. 供試菌株とジーンバンク登録番号との対応

菌株番号	MAFF番号
T166	311353
T169	311354
T174	311355
T181	311356
T187	311357
T161	311420
T162	311421
T167	311422
T168	311423
T170	311424
T171	311425
T175	311426
T179	311427
T182	311428
T189	311429
T163	311439
T164	311440
T186	311441
T190	311442
T257	311443
T258	311444

表3. 供試菌株の16S rDNA, *gyrB* および *rpoD* に基づくグルーピングおよび遺伝子タイプ

菌株番号	16S rDNA	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>	遺伝子タイプ
LMG479	I (AB248365) ^{a)}	I (AB248376)	I (AB248387)	A
LMG481	II (AB248366)	II (AB248377)	II (AB248388)	B
LMG487	II (AB248369)	II (AB248380)	II (AB248391)	B
LMG488	II (AB248370)	II (AB248381)	II (AB248392)	B
LMG491	II (AB248373)	II (AB248384)	II (AB248395)	B
沖縄分離21菌株	II (AB248364)	II (AB248375)	II (AB248386)	B
LMG482	II (AB248367)	III (AB248378)	III (AB248389)	C
LMG483	II (AB248368)	III (AB248379)	III (AB248390)	C
LMG489	II (AB248371)	IV (AB248382)	III (AB248393)	D
LMG490	II (AB248372)	IV (AB248383)	III (AB248394)	D
LMG494 ^T	II (AB248374)	V (AB248385)	IV (AB248396)	E

a) ローマ数字はNJ法による系統解析により分けられたグループを表す。DDBJ/EMBL/GenBankの accession numberを括弧内に示した。

Sri Lanka, Barbados から分離された菌株とともに、いずれも遺伝子タイプ B に該当した。これらの各遺伝子タイプ間の系統関係を *gyrB* および *rpoD* の配列に基づく系統樹により調べた結果、タイプ A は他のタイプと系統的な位置づけが明確に異なっていた (図 2)。また、これらのタイプの類別に関わる両遺伝子の塩基置換には、非同義置換が複数個含まれていることも明らかとなった (Tsushima et al., 2006)。

4. 考察

今回の研究により、上述した 3 つの遺伝子の塩基配列に基づく本病原細菌の遺伝子タイプは、世界で少なくとも 5 タイプ (A~E) 存在することが明らかとなった。各遺伝子タイプの分布を世界規模で見ると、A, C, D の菌株はアフリカ、B はアジア、カリブ諸島、E はフィジーに由来し、それぞれ地理的に離れた場所に分布していた。このことは、各タイプがそれぞれの地域で独自に分化した可能性が考えられる。その中で、沖縄県から分離された 21 菌株はいずれもタイプ B であることが明らかとなった。このことから、沖縄県では過去に 1 つの遺伝子タイプが浸入し、それが広がって現在に至っていることが示唆される。しかし、今回用いた菌株は国頭郡東村のサンプルのみで、菌株数もまだ少ないことから、今後は、沖縄本島の別な地域や他の島嶼の菌株についても収集し、さらに多くの菌株を供試して、上述の仮説を検証する必要がある。さらに、タイプ B はスリランカやカリブ海諸国由来の菌株も含まれていたことから、タイプ B は何らかの要因で伝搬され、世界の複数地域に分布している可能性がある。今後、沖縄に存在するタイプ B の伝搬経路や起源の解明を行うことにより、起源地域のサトウキビの中から、タイプ B に親和性/抵抗性を示すサトウキビ品

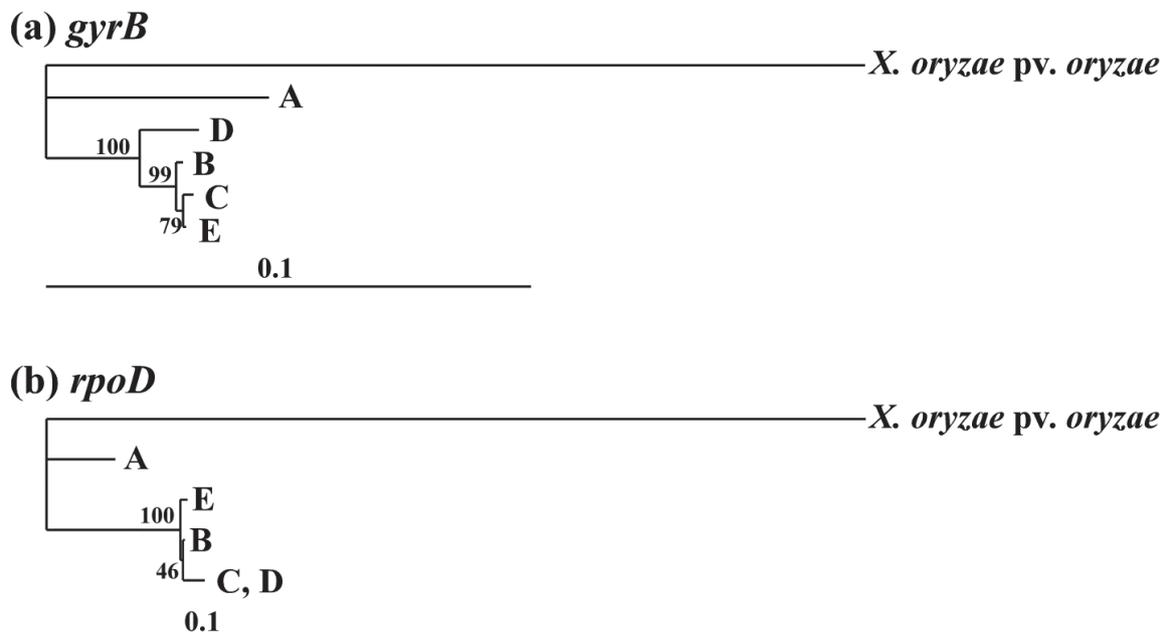


図 2. 供試菌株の *gyrB* および *rpoD* 遺伝子の塩基配列に基づく遺伝子タイプ間の系統関係
(a) *gyrB* 遺伝子の塩基配列に基づく系統樹, (b) *rpoD* 遺伝子の塩基配列に基づく系統樹.

種（系統）および抵抗性遺伝子の特定が可能となり、抵抗性品種の育成等に役立つことが期待できる。

5. 謝辞

本研究を行うに当たり多大なご協力ご支援を賜った東北大学・安藤杉尋氏，種苗管理センター沖縄農場・中里 工氏および杉沢 武氏，沖縄県農業試験場・小禄博明氏および澤岬哲也氏，さらに菌株の採集にご協力いただいた沖縄県関係者およびサトウキビ生産者の方々に厚くお礼申し上げます。

6. 参考文献

- Comstock, J.C. and Shine, J.M. Jr. (1992). Outbreak of leaf scald of sugarcane, caused by *Xanthomonas albilineans*, in Florida. *Plant Dis.* 76: 426.
- Diaz, M., Peralta, E.L. and Iglesia, A. (2000). *Xanthomonas albilineans*, haplotype B responsible for a recent sugarcane leaf scald disease outbreak in Cuba. *Plant Dis.* 85: 334.
- Grisham, M.P., Legendre, B.L. and Comstock, J.C. (1993). First report of leaf scald, caused by *Xanthomonas albilineans*, of sugarcane in Louisiana. *Plant Dis.* 77: 537.
- Hoy, J.W. and Grisham, M.P. (1994). Sugarcane leaf scald distribution, symptomatology, and effect on yield in Louisiana. *Plant Dis.* 78: 1083–1087.
- Ovalle, W., Comstock, J.C., Juarez, J. and Soto, G. (1995). First report of leaf scald of sugarcane (*Xanthomonas albilineans*) in Guatemala. *Plant Dis.* 79: 212.
- Ricaud, C. and Ryan, C.C. (1989). Leaf scald. *In* Diseases of sugarcane (Ricaud, C., Egan, B.T., Gillispie, A.G. Jr. and Hughes, C.G., eds.). pp. 39-58, Elsevier, Amsterdam.
- 對馬誠也 (2008). 沖縄に分布するサトウキビ白すじ病菌の遺伝子タイプ. *植物防疫* 62: 6-10.
- Tsushima, S., Shinohara, H., Nakazato, T., Ando, S., Sugisawa, T. and Tabei, Y. (2006). Phylogenetic analysis of *Xanthomonas albilineans* strains from Okinawa, Japan, through a comparison of the *gyrB* and *rpoD* genes in geographically distinct strains. *J. Phytopathol.* 154: 683-687.

Summary

The phylogenetic analyses of *Xanthomonas albilineans*, the causal bacterial pathogen of sugarcane leaf scald disease, were carried out using 31 geographically distinct strains, including 21 strains obtained in Okinawa, Japan. Partial nucleotide sequences of their *gyrB* and *rpoD* genes were determined, and neighbor-joining trees based on the sequences were constructed to clarify their phylogenetic relationships. The level of sequence diversity in each *gyrB* and *rpoD* genes depended on the geographic origin of the strains. All the strains obtained in Okinawa formed a homogenous group (genetic group B) with strains derived from the Caribbean islands (St Lucia and Barbados), Guyana and Sri Lanka. Thus, the sequence analyses of these genes can be useful for differentiating genetic variants within the *X. albilineans* species. The genetic group B including Okinawa strains might be once broadly transferred and localized in several regions in the world.