

## ショウガ科植物青枯病菌の遺伝的多様性

堀田 光生<sup>a)</sup>

農業環境技術研究所

[〒305-8604 茨城県つくば市観音台 3-1-3]

### Genetic diversity of Zingiberaceae plant isolates of *Ralstonia solanacearum*

Mitsuo HORITA<sup>a)</sup>

National Institute for Agro-Environmental Sciences

#### 1. はじめに

*Ralstonia solanacearum* に起因する青枯病は、世界的に最も重要な細菌病の一つである。青枯病菌は病原性および細菌学的性質において多様な病原体で、宿主範囲の違いにより 5 つのレースに、生化学的な性質の違いにより 6 つの生理型 (biovar) にそれぞれ分けられており、特にショウガ (*Zingiber officinale* Rosc.) を含むショウガ科植物を犯す系統は、他植物を犯す系統と区別され、レース 4 に類別されている (Denny and Hayward, 2001)。青枯病は土壌伝染性の病害として知られているが、本菌に感染した種苗を介して長距離を伝播することが可能であり、それが青枯病の蔓延を促進させる原因の一つと考えられる (Hayward, 1991)。

ショウガ科植物青枯病は、これまで日本を含むアジア数か国、ハワイ、オーストラリア等で報告されており、現在も発生地域が拡大している (Hayward, 1994; Elphinstone, 2005; Tsuchiya et al., 2005; Waki et al., 2013; 堀田ら, 2014)。これ以上の蔓延を防ぐためには、その発生源をつきとめ、分離菌株の病原学的、疫学的特徴を明らかにし、植物検疫や種苗管理の段階で本菌を効率的に診断する方法の開発が必要である。近年、青枯病菌のゲノム情報が急速に蓄積し、同情報の解析が個々の系統の識別や同定の有効な手段となっている。特にエンドグルカナーゼ遺伝子 (*egl*) の塩基配列情報を基にした系統解析により、本菌は 50 以上のグループ (sequevar) に分けられることが報告されている (Fegan and Prior, 2005; Wicker et al., 2012)。今回、本報告では、アジア-太平洋地域でショウガ科植物から分離された青枯病菌の遺伝子情報を解析することで、その遺伝的多様性を明らかにすることを試みた。

---

a) (現所属) 農研機構 農業環境変動研究センター Institute for Agro-Environmental Sciences, NARO  
[〒305-8604 茨城県つくば市観音台 3-1-3]

## 2. 材料および方法

### 1) 供試菌株および培養方法

表 1 に供試した青枯病菌株を示した。ショウガ科植物分離株 (計 51 株) として、日本 (15 株)、タイ (11 株)、インドネシア (22 株)、中国 (2 株)、オーストラリア (1 株) 産株を、対照として日本産の他植物 (トマト, スターチス) 分離株 2 株をそれぞれ供試した。日本産 17 株は農業生物資源 (NIAS) ジーンバンクより得られた。日本産以外の大抵の株は Research Institute of Spices and Medical Crops (インドネシア, ボゴール) および Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives (タイ, バンコク) より分譲頂いた。供試菌株は 1% グルタミン酸ナトリウムと 10% スキムミルクを含む分散媒中に懸濁して  $-30^{\circ}\text{C}$  で保存し, TTC 平板培地 (Kelman, 1954) に塗抹して  $28^{\circ}\text{C}$  培養または CPG 液体培地 (Kelman, 1954) 中で  $30^{\circ}\text{C}$  一晩, 振とう培養後に用いた。

### 2) biovar の調査および病原性試験

Biovar の調査は Denny and Hayward (2001) の方法に基づき行った。病原性試験には、対象植物としてショウガ (品種 三州) を用い、園芸培土 (サカタ) を詰めたプラスチックポット (直径 9 cm) に種根茎を移植して温室内で 7~9 葉期まで栽培した。供試菌株を TTC 培地で培養し、滅菌蒸留水に約  $10^8\text{cfu/ml}$  となるように懸濁した後、注射針を用いてショウガの茎基部に懸濁液を有傷接種し、 $28^{\circ}\text{C}$  温室内で 3 週間病徴観察 (茎葉部の黄化, 萎凋の有無) を行った。

### 3) DNA 抽出と PCR 検定

CPG 液体培地で培養した菌液を遠心分離 ( $12,000\times g$ ; 5 分) し、上清を除いた後、菌体を滅菌 Milli-Q 水に懸濁し、 $100^{\circ}\text{C}$  で 5 分加熱、氷冷して DNA 抽出を行った。供試菌株の *phylo*type は Fegan and Prior (2005) の報告に基づき、マルチプレックス PCR 法により調査した。日本産レース 4 は DNA フィンガープリント解析により 2 つの DNA type (I, II) に分けられ、それぞれを特異的に識別・検出する PCR 法が報告されている (Horita et al., 2004)。今回、供試菌株について同報に基づき PCR 検定を行った。各 PCR 産物は 1.5~2% アガロースゲルを用いて電気泳動し、目的の長さのバンドの有無について調査した。

### 4) *egl* および *mutS* 遺伝子のシーケンス解析

*egl* 遺伝子は Poussier et al. (2000) の、*mutS* 遺伝子は Prior and Fegan (2005) の報告に基づき、それぞれ PCR 増幅した後、1.5% アガロースゲル電気泳動を行い、DNA 抽出キット (QIAquick Gel Extraction Kit, キアゲン) を用いて目的の長さのバンドを回収した。その後、ファスマック (株) にシーケンス解析を依頼した。

### 5) データ解析

得られた DNA 配列は DDBJ/EMBL/Genbank データベースシステムに登録する (AB620014-

AB620018, AB621636–AB621695, AB678435–AB678437, AB678480–AB678491, AB678517–AB678528, AB732947–AB732956) とともに, DNA 解析ソフト (DNASIS pro, 日立) を用いてアライメントを行い, 木村 2-パラメーター法 (Kimura, 1980) を用いて遺伝距離を算出した. 系統樹は Clustal W ソフト (Thompson et al., 1994) 内の近隣結合法を用いて作成し, ブートストラップ解析を 1000 反復行うことで, 各分岐の確率を算出した.

表1. 供試菌株リスト

菌株名	分離植物	分離地域	sequevar <sup>a)</sup>	group ( <i>mutS</i> ) <sup>b)</sup>	DNA type <sup>c)</sup>	biovar
MAFF 107639, MAFF 107640, MAFF 107641 MAFF 107642, MAFF 107643, MAFF 211272 MAFF 211479, MAFF 211490, MAFF 211493 32, 1294, 1445, 1446, 1447, 1448, 1478 419B-1-I, 419-B-1-III, 412-C-1-I	ショウガ ミョウガ クルクマ属	日本, タイ	30	1	I	3, 4
MAFF 241651, MAFF 331053, MAFF 331054	ショウガ	日本	14	1	II	4
MAFF 211471, MAFF 211472, MAFF 211474 R277, Z8a, Z8b	ショウガ	日本, 中国 オーストラリア	16	2	II	4
T447, T454-B, T625, T625-98, T748, T749 T871, T874, T874-98, T917, T924-2, T948 T963, T968, Psg-8, Ps6-3-1	ショウガ属 クルクマ属	インドネシア	17	1	—	3
1052	ショウガ	タイ	47	1	—	4
T585-98, T736, T740, T741, T925-2, T952-B	ショウガ	インドネシア	未定	3	—	3, 4
MAFF 301070 MAFF 302549	トマト スターチス	日本	14	1	—	3

a) Fegan and Prior (2005), Wicker et al. (2012) の報告に基づく.

b) *mutS* 遺伝子配列を用いたクラスター解析に基づくグループ (図1).

c) Horita et al. (2004) の報告に基づく. —: いずれの DNA type にも属さない.

### 3. 結果

#### 1) ショウガ科植物分離株の biovar および PCR 検定

供試したショウガ科植物分離株 51 株は biovar 3 (32 株) または biovar 4 (19 株) に類別された (表 1). Phylotype 識別・同定用 PCR 検定の結果, 全ての供試菌株から phylotype I に特異的なバンドが検出された (データ未掲載). 日本産レース 4 識別用 PCR 検定の結果, 日本およびタイ産 19 株で type I に, 日本, 中国, オーストラリア産 9 株で type II にそれぞれ特異的なバンドが検出された. インドネシア産の全株, タイ産 1 株および日本産他植物分離株では, いずれのバンドも検出されなかった (表 1).

#### 2) *egl* 遺伝子の解析

各供試菌株について *egl* 遺伝子の内部領域をコードする 666 塩基の配列情報が得られ, これらの情報を基にクラスター解析を行った. 対照として既報の日本, 中国, フィリピン, オーストラリア, インド産ショウガ科植物分離株を含む計 36 菌株の青枯病菌の塩基配列情報 (Poussier et al., 2000; Villa et al., 2005; Liu et al., 2009; Xu et al., 2009; Wicker et al., 2012; Kumar et al., 2014) を用い,

outgroup として MAFF 301558 株（日本産ジャガイモ分離株, phylotype IV に属する）の配列 (accession no. AY465002) を用いた. ショウガ科植物分離株は全て phylotype I に相当するクラ

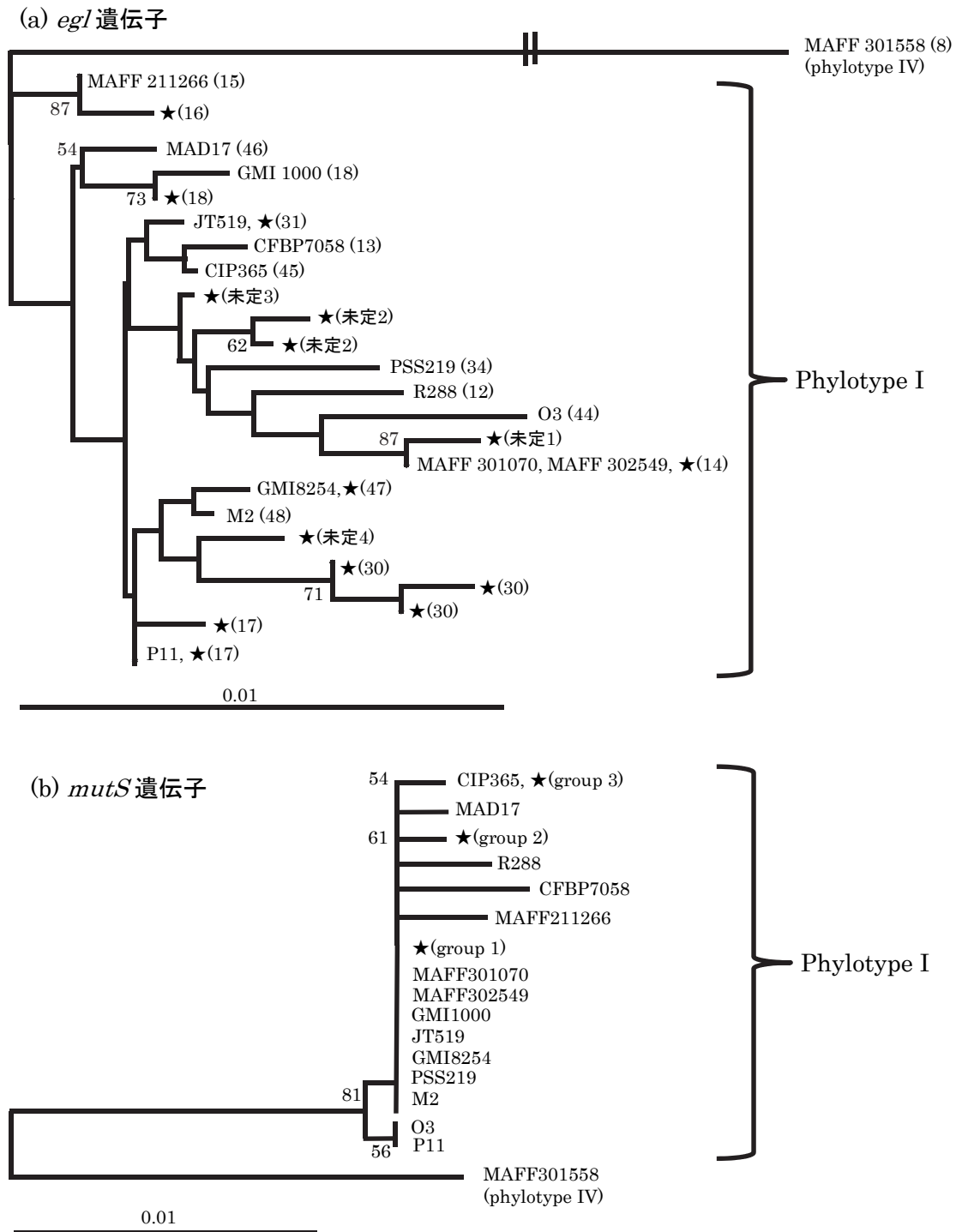


図1. *egl* 遺伝子および *mutS* 遺伝子領域の塩基配列に基づくショウガ科植物青枯病菌の遺伝的類縁関係

★ はショウガ科植物分離株を, 右横の ( ) 内はsequence (*egl* 遺伝子) またはgroup (*mutS* 遺伝子) をそれぞれ示す. 分岐点の数値はブートストラップ確率 (>50%) を, 最下線の長さは遺伝距離 (0.01) をそれぞれ示す.

スター内に属し (図 1), 11 の sequevar (14, 16, 17, 18, 30, 31, 47, 未定 1~4) に分けられ, それぞれ分離地域, 分離植物, biovar に違いがみられた (表 1, 表 2).

すなわち sequevar 14 には日本, 中国, フィリピンでショウガより分離された biovar 4 の株が, sequevar 16 には日本, 中国, オーストラリア産ショウガ分離株 (biovar 4) が, sequevar 17 にはインドネシア, インド産でショウガ属, クルクマ属植物およびカルダモン分離株 (biovar 3, 4) が, sequevar 30 には日本, タイ産ショウガ属およびクルクマ属植物分離株 (biovar 3, 4) が, sequevar 未定 1 には中国, インドネシア産ショウガ分離株 (biovar 3, 4) がそれぞれ含まれた. Sequevar 18 に中国産株が, sequevar 47 にタイ産株が, 他の 4 つの sequevar (31, 未定 2, 3, 4) にインド産株がそれぞれ含まれた. 供試した日本産他植物分離株 2 株は, ショウガ分離株 5 株とともに sequevar 14 に分けられた (表 1).

表 2. ショウガ科植物青枯病菌の sequevar と分離植物, 分離地域, biovar との関係

sequevar	分離植物	分離地域	biovar <sup>a)</sup>	調査菌株数 <sup>a)</sup>
14	ショウガ	日本, 中国, フィリピン	4	5
16	ショウガ	日本, 中国, オーストラリア	4	12
17	ショウガ属, クルクマ属 カルダモン	インドネシア, インド	3	25
18	ショウガ	中国	4	1
30	ショウガ属, クルクマ属	日本, タイ	3, 4	39
31	ショウガ	インド	3	1
47	ショウガ	タイ	4	1
未定 1	ショウガ	中国, インドネシア	3, 4	7
未定 2	ショウガ	インド	3, 4	2
未定 3	ショウガ	インド	3	2
未定 4	ショウガ	インド	3	1

a) 本試験および Villa et al. (2005), Liu et al. (2009), Xu et al. (2009), Waki et al. (2013), Kumar et al. (2014) の報告に基づく.

### 3) *mutS* 遺伝子の解析

各供試菌株について *mutS* 遺伝子の内部領域をコードする 651 塩基の配列情報が得られ, これらの情報を基にクラスター解析を行った. 対照として既報の 13 菌株の塩基配列情報 (Prior and Fegan, 2005; Wicker et al., 2012) を用いた. outgroup として MAFF 301558 株 (accession no. AY756812) を用いた. *egl* 遺伝子の解析結果と同様に, ショウガ科植物分離株は全て phylotype I に相当するクラスターに属し (図 1), 3 つの group に分けられた. 各 group は sequevar と関連が

みられ、group 2 に sequevar 16 の株が、group 3 に sequevar 未定 1 の株が、group 1 にそれ以外の sequevar の株がそれぞれ含まれた (表 1)。供試した日本産他植物分離株 2 株は、ショウガ科植物分離株の group 1 と相同であった。

#### 4) 供試菌株のショウガに対する病原性

分離植物、分離地域、sequevar、DNA group または biovar (表 1) の異なるショウガ科植物分離株 9 菌株 (MAFF 107639, MAFF 211272, MAFF 211474, MAFF 211490, MAFF 241651, MAFF 331053, 1445, T447, T585-98) および他植物分離株 2 株 (MAFF 301070, MAFF 302549) について、ショウガに対する病原性を調査した。その結果、ショウガ科植物分離株は全てショウガに強い病原性 (茎葉部の萎凋、枯死) を示したのに対し、他植物分離株はいずれもショウガに病徴を示さなかった。

#### 4. 考察

ショウガ科植物青枯病は様々な気象条件のアジア-太平洋地域の国で発生している。今回の解析結果では、これら分離菌株は *egl* 遺伝子解析で 11 の sequevar に、*mutS* 遺伝子解析で 3 つの group にそれぞれ分けられ、また sequevar の異なる菌株間では、分離地域、分離植物等に違いがみられるなど、遺伝的にも病原学的にも多様な系統が存在し、これらが各地域で同青枯病を発生・蔓延させているものと考えられた。また、これら系統のいくつかは国・地域をまたがって分離されており、青枯病菌汚染種苗等を介して国際的にも国内的にも伝播した可能性が推測された。日本国内において、ショウガ科植物青枯病は 1995 年にタイから輸入したクルクマ種苗を栽培した高知県内で初発生し、1997 年以降、同県内の初発地域近隣のショウガ、ミョウガ栽培地域において青枯病の発生が相次いで報告された (Tsuchiya et al., 2005)。2009 年以降は高知県以外の地域にその発生が拡大している (堀田ら, 2014)。今回の DNA 情報を基にした解析では、日本産株は 3 つの sequevar (14, 16, 30) に分かれ、sequevar 14 の株は中国、フィリピン産株と、sequevar 16 の株は中国、オーストラリア産株と、sequevar 30 の株はタイ産株とそれぞれ相同であり、これら複数の海外地域から日本国内に伝播した可能性が推測された。Sequevar の異なる菌株間では、宿主範囲や病原力においても違いがみられることが報告されている。例えば sequevar 16 の株はショウガのみから分離され、それ以外のショウガ科植物に接種してもほとんど病徴を示さないのに対し、sequevar 30 の株はショウガ以外のショウガ科植物にも強い病原性を示す (矢野ら, 2011)。これらの結果から、同青枯病の防除には、分離菌株の系統に応じてそれぞれ異なる対策を取る必要があると考えられた。

#### 5. 謝辞

本研究は栃木県農業試験場の和氣貴光氏、CABI-UK の黒瀬大介氏、Indonesian Center for Agricultural Biotechnology の Karden Mulya 氏、九州大学の土屋健一氏との共同研究として実施した。ここに記して深謝の意を表す。

## 6. 参考文献

- Denny, T.P. and Hayward, A.C. (2001). Gram-negative bacteria *Ralstonia*. In Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (3rd ed.) (Schaad N.W., Jones, J.B. and Chun, W., eds.). pp. 151–174, American Phytopathological Society, St. Paul.
- Elphinstone, J.G. (2005). The current bacterial wilt situation: A global overview. In Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex (Allen, C., Prior, P. and Hayward, A.C., eds.). pp. 9–28, American Phytopathological Society, St. Paul.
- Fegan, M. and Prior, P. (2005). How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex?” In Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex (Allen, C., Prior, P. and Hayward, A.C., eds.). pp. 449–461, American Phytopathological Society, St. Paul.
- Hayward, A.C. (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annu. Rev. Phytopathol. 29: 65–87.
- Hayward, A.C. (1994). The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In Bacterial Wilt: the Disease and its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum* (Hayward, A.C. and Hartman, G.L., eds.). pp. 9–24, CAB International, Wallingford.
- Horita, M., Yano, K. and Tsuchiya, K. (2004). PCR-based specific detection of *Ralstonia solanacearum* race 4 strains. J. Gen. Plant Pathol. 70: 278–283.
- 堀田光生・土屋健一・菅康弘・矢野和孝・和氣貴光・黒瀬大介・古屋成人 (2014). 青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* の分類の現状と日本産株の遺伝的多様性. 日植病報 80: 1–10.
- Kelman, A. (1954). The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance of a tetrazolium medium. Phytopathology 44: 693–695.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16: 111–120.
- Kumar, A., Prameela, T.P., Suseelabhai, R., Siljo, A., Anandaraj, M. and Vinatzer, B.A. (2014). Host specificity and genetic diversity of race 4 strains of *Ralstonia solanacearum*. Plant Pathol. 63:1138–1148.
- Liu, Y., Kanda, A., Yano, K., Kiba, A., Hikichi, Y., Aino, M., Kawaguchi, A., Mizoguchi, S., Nakaho, K., Shiomi, H., Takikawa, Y. and Ohnishi, K. (2009). Molecular typing of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum* in relation to the ability to induce a hypersensitive reaction in tobacco. J. Gen. Plant Pathol. 75: 369–380.
- Poussier, S., Prior, P., Luisetti, J., Hayward, C. and Fegan, M. (2000). Partial sequencing of the *hrpB* and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex. Syst. Appl. Microbiol. 23: 479–486.
- Prior, P. and Fegan, M. (2005). Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. Acta Hort. 695: 127–136.

- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–4680.
- Tsuchiya, K., Yano, K., Horita, M., Morita, Y., Kawada, Y. and d'Ursel C.M. (2005). Occurrence and epidemic adaptation of new strains of *Ralstonia solanacearum* associated with *Zingiberaceae* plants under agro-ecosystem in Japan. *In* *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum* Species Complex (Allen, C., Prior, P. and Hayward, A.C., eds.). pp. 463–469, American Phytopathological Society, St. Paul.
- Villa, J.E., Tsuchiya, K., Horita, M., Natural, M., Opina, N. and Hyakumachi, M. (2005). Phylogenetic relationships of *Ralstonia solanacearum* species complex strains from Asia and other continents based on 16S rDNA, endoglucanase, and *hrpB* gene sequences. *J. Gen. Plant Pathol.* 71: 39–46.
- Waki, T., Horita, M., Kurose, D., Mulya, K. and Tsuchiya, K. (2013). Genetic diversity of *Zingiberaceae* plant isolates of *Ralstonia solanacearum* in the Asia-Pacific region. *JARQ* 47:283–294.
- Wicker, E., Lefeuvre, P., de Cambiaire, J-C., Lemaire, C., Poussier, S. and Prior, P. (2012). Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. *ISME J.* 6: 961–974.
- Xu, J., Pan, Z.C., Prior, P., Xu, J.S., Zhang, Z., Zhang, H., Zhang, L.Q., He, L.Y. and Feng, J. (2009). Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China. *Eur. J. Plant Pathol.* 125: 641–653.
- 矢野和孝・川田洋一・堀田光生・曳地康史・土屋健一 (2011). ショウガ科植物から分離された青枯病菌の系統とそれらの宿主範囲. *日植病報* 77:88–95.