

# Phylotype 決定に基づいた 青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* 国内菌株の 系統再分類による青枯病菌インベントリーの作成

曳地 康史

高知大学農学部 植物工学研究室

[〒783-8502 南国市物部乙 200]

## Construction of Inventory of *Ralstonia solanacearum* Japanese strains by the reclassification based on their phylotype

Yasufumi HIKICHI

Laboratory of Plant Pathology & Biotechnology,

Faculty of Agriculture, Kochi University

### 1. 目的

これまでの青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* の分類では、宿主植物を基にした「race」と生化学的性質を基にした「biovar」が、種レベルより下の分類基準として国際的に用いられてきた (Hayward, 1991) . しかし、*R. solanacearum* の系統分類を行う上で、これらの分類基準は分子系統学の観点から曖昧であり、信頼性に欠けると考えられてきた。さらに、我が国では、ナス科植物に対する病原性を基にした「菌群」というグルーピングも独自に用いられており、分類基準が不統一なのが現状である。

分子遺伝学の進展と *R. solanacearum* のゲノム解析の結果、フランス、英国および米国を中心とした国際研究コンソシアムから、internal transcribed spacer 領域、endoglucanase 遺伝子 (*egl* 遺伝子) および *hrpB* 遺伝子の塩基配列を基にした「phylotype」を国際統一基準とすることが提唱されている。その結果、植物病理学のみならず、育種学や栽培学においても *R. solanacearum* の系統分類基準として国際的に phylotype を用いるようになってきている (Fegan and Prior, 2005) . 一方、国際研究コンソシアムに我が国からの参加はなく、日本産菌株の中で、現時点で phylotype が明らかにされたのは、国際研究コンソシアムで決定された菌株を含む約10株にすぎない。この現状は、我が国の青枯病研究を国際的に進展させる上での阻害要因であり、早急な対応が望まれている。

そこで、本研究では、研究教育に用いられている*R. solanacearum*日本産菌株のphylotypeを、*egl* 遺伝子と*gyrB* 遺伝子の部分塩基配列解析から決定するとともに、biovarについても決定し、それらの相互関係を明らかにする (Liu et al., 2009b) . さらに、タバコに対する病原性あるいは過敏反応誘導能についても明らかにし、これらの情報をもとに、青枯病研究者が利用できるようなインベントリーを作成するための基盤を整備することを目的とする。

## 2. 実験材料と方法

### 1) 供試菌株

実験に供試した*R. solanacearum* 菌株のリストを表1に示した。*R. solanacearum* 菌株の平板培養は、50 µg/ml ポリミキシンBを加用したBG 培地 (Boucher et al., 1985; 1% ポリペプトン, 0.1% 酵母抽出物, 0.1% カザミノ酸, 0.5% グルコース, 1.5% 寒天) を用い、28°C で行った。液体培養にはPS培地 (Wakimoto et al., 1968; ジャガイモ200gを賽の目に切り、約1Lの蒸留水を加えて30分~40分弱火で煮沸し、二重のガーゼでろ過する。ろ液に2%ショ糖を加えたのち蒸留水で1Lとする) を用い、30°C で行った。

### 2) ゲノムDNAの単離

AquaPure Genomic DNA Isolation Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)を用いて、*R. solanacearum*菌株のゲノムDNAの単離を説明書に準拠して行った。

### 3) *egl* の塩基配列の決定

*egl* の部分塩基配列の決定のために、まず、プライマーとして *eglA* (5'-GGAGACAUATGCATGCCGCTGGTCGCCGC -3') と *eglB* (5'-GGGAAAGUGCGTTGCCCGGCACGAACACC -3') を、鋳型に*R. solanacearum* 各菌株のゲノムDNAを、反応液としてPrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara Bio, Otsu, Japan)を用いてPCR反応を行った。反応条件は、95°C を 2 分間後、95°Cで30秒、65°C で1分間および72°C で1分間を30サイクル行った。得られたPCR産物を定法により、電気泳動とE.Z.N.A. Gel Extraction Kit (Omega Bio-tek, Doraville, GA, USA) を用いて分離・回収後、プライマーとして*eglA*か*eglB*、およびBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いてシーケンス反応を行い、Applied Biosystems 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems)を用いて塩基配列の決定を行った。

### 4) *gyrB* の塩基配列の決定

*gyrB* の部分塩基配列の決定のために、まず、プライマーとして、UP-IE (5'-CAGGAAACAGCTATGACCAYGSNNGGNGNAARTTYRA -3') と APrU (5'-TGTAACGACGGCCAGTGCNNGRRTCYYTTYTCYTGRCA -3') を、鋳型に*R. solanacearum* 各菌株のゲノムDNAを、反応液としてPrimeSTAR HS DNA Polymeraseを用いてPCR反応を行った。反応条件は、95°C を 2 分間後、98°Cで10秒、58°C で5秒および72°C で1分間を35サイクル行った。得られたPCR産物は前項と同様にして分離・回収した。さらに、プライマーとしてM13-47 (5'- TGTAACGACGGCCAGT -3')あるいはRV-M (5'-

CAGGAAACAGCTATGACC -3') を用いることによって塩基配列の決定を行った。

### 5) 系統解析

それぞれの遺伝子の塩基配列あるいはそれらの推定アミノ酸配列を基に、CLUSTAL W (Thompson et al. 1994; the DNA Data Bank of Japan, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/clustalw-j.html>)で系統解析を行った。系統樹の描画には、CLC Sequence ViewerとUPGMA algorithm (CLC bio, Aarhus, Denmark)を用いた。

### 6) biovarの決定

biovarの決定は、Hayward (1991)の方法に準拠したHorita and Tsuchiya (2001)の方法に従って行った。

### 7) タバコに対するHR誘導能検定

25 °C で 10,000 lux の人工日照 (16 時間/日) の培養室で 8 週間育苗した タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 187) の 4-5 葉に、 $1.0 \times 10^8$  cfu/ml に調製した *R. solanacearum* 懸濁液を針無ツベルクリン用シリンジで注入した。注入 24 時間後に、注入部での壊死斑の誘導の有無を観察するとともに、注入 14 日後まで萎凋症状の出現の有無について観察した。

## 3. 結果

Wicker et al. (2007) は、*egl* の部分塩基配列を用いれば、*R. solanacearum* 菌株の phylotype を決定できることを報告している。そこで、供試菌株の phylotype の決定を、*egl* の 688bp の部分塩基配列により行った。その結果、静岡県および長崎県のジャガイモからそれぞれ分離された MAFF 211271, および、MAFF 301558 と MAFF 301559 が phylotype IV に属し、それ以外の国内株は phylotype I に属することが明らかとなった (図1と表1)。

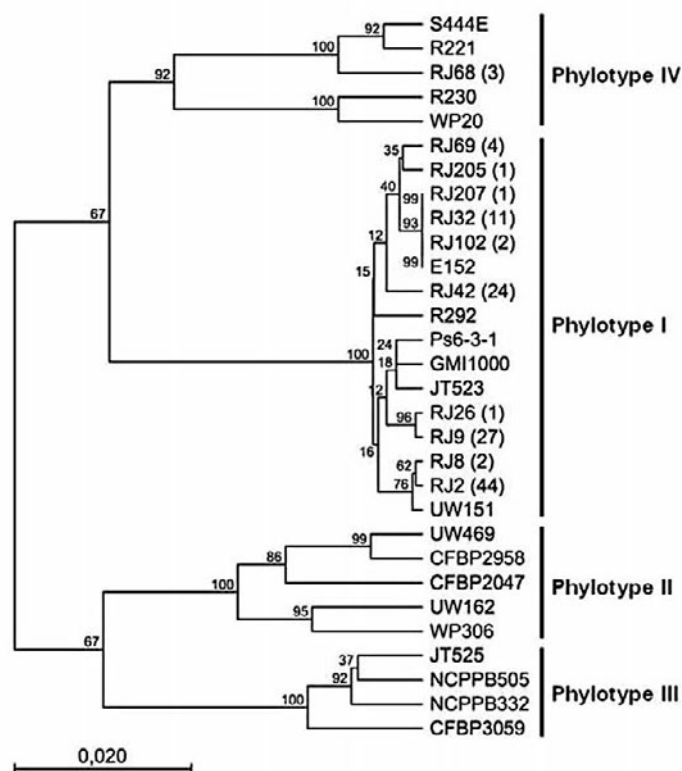


図1. *egl* 部分塩基配列による *R. solanacearum* 日本産菌株の系統樹

“RJ” 番号は表 1 の code に対応する。( )内の数字は同一の塩基配列を示した菌株数を示す。S444E, R221, R230, WP20, E152, R292, Ps6-3-1, GMI 1000, JT523, UW151, UW469, CFBP 2958, CFBP 2047, UW162, WP306, JT525, NCPPB 505, NCPPB 332 および CFBP 3059 の *egl* の塩基配列は Villa et al. (2005) より引用した。系統樹内の数値は bootstrap 確率を示す。

次に、house-keeping遺伝子である*gyrB*の塩基配列を解析し、それらから推測される261残基のアミノ酸配列を基にして系統解析を行った。phyloptype IVに属する3菌株のGyrBの推定アミノ酸配列は同一であり、phyloptype Iに属する株とは異なるクラスターに位置した。一方、phyloptype Iに属する菌株は、大きく2つのクラスター（AおよびB）に分かれ、それぞれのクラスター内でさらに2つのタイプに分かれた（type 42とtype 66、および、type 2とtype 9）。分離された植物と、これらサブクラスターの類別との間には相関性は認められなかった（図2）。

phyloptype IVの3菌株はいずれもbiovar N2であった（表1）。一方、phyloptype Iの菌株は、4菌株がbiovar N2、49菌株がbiovar 3、64菌株がbiovar 4であった。興味深いことに、ほとんどのショウガ分離株はbiovar 4であった。しかし、ショウガ分離株以外の菌株では、分離植物とbiovarとの間に相関性は認められなかった。

タバコ葉に注入後、24時間以内に注入部にHR誘導能を示す*R. solanacearum*菌株は、タバコ植物に対して病原性を示さない。また、タバコ植物に病原性のある菌株をタバコ葉に注入接種した場合には、注入14日後までの間に、注入葉だけでなく植物体全身に萎凋症状が認められる。そこで、phyloptype Iに属する菌株のタバコ葉に対するHR誘導能力と、タバコ植物に対する病原性を解析するために、タバコ葉への注入接種を行った。phyloptype Iの117菌株

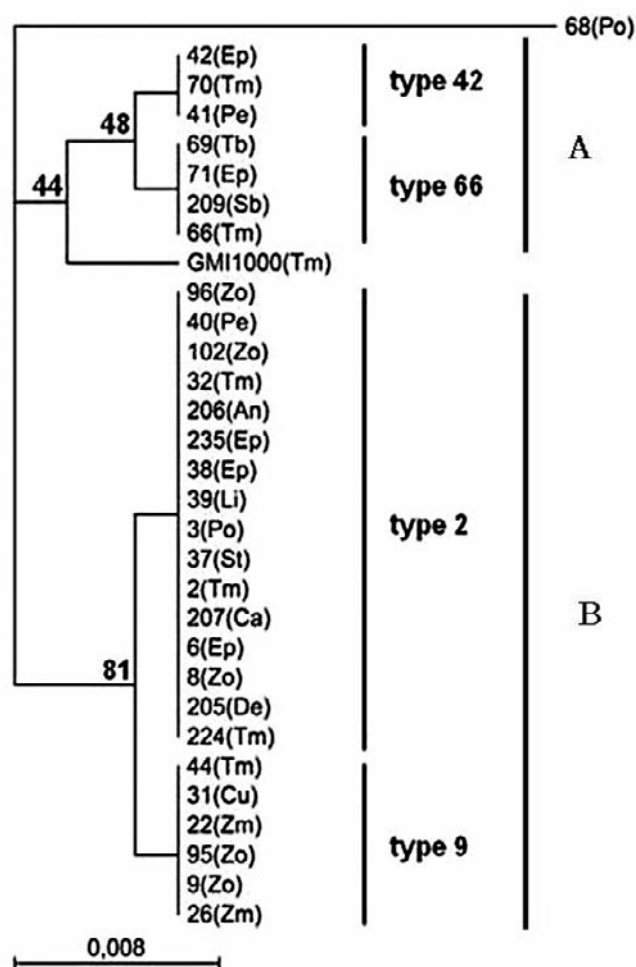


図2. GyrBの部分推定アミノ酸配列による phyloptype I の *R. solanacearum* 日本産菌株の系統樹

phyloptype IVの株 (code no. 68)を outgroupとして用いた。系統樹内の数値はbootstrap確率を示す。( )内のイニシャルはそれぞれの分離植物を示す: Tm, *Solanum lycopersicum*; Tb, *Nicotiana tabacum*; Ep, *Solanum melongena*; Po, *Solanum tuberosum*; Pe, *Capsicum annuum*; Li, *Limonium* sp.; An, *Angelia keiskei*; Ca, *Campanula lactiflora*; Sb, *Fragaria* sp.; Zo, *Zinger officinale*; Zm, *Zinger mioga*; Cu, *Curcuma alismatifolia*; St, *Strelitzia reginae*; De, *Delphinium* sp.

表1. *R. solanacearum* 供試菌株の性質

Code	Strain	Isolated from :	Prefecture	HR induction on tobacco	Phylotype	biovar	<i>egl</i>		<i>gyrB</i>	
							Accession no.	amino acid type	Accession no.	amino acid type
2	8107	<i>Solanum lycopersicum</i>	Nara	HR	I	4	AB508593	42	AB508473	2
3	MAFF 301524	<i>Solanum tuberosum</i>	Nara	HR	I	4	AB508594	42	AB508474	2
5	MAFF 730103	<i>Solanum lycopersicum</i>	Gunma	HR	I	4	AB508595	42	AB508475	2
6	MAFF 730126	<i>Solanum melongena</i>	Nara	HR	I	4	AB508596	42	AB508476	2
8	MAFF 211471	<i>Zingiber officinale</i>	Kochi	HR	I	4	AB508597	42	AB508477	2
9	MAFF 211479	<i>Zingiber officinale</i>	Kochi	HR	I	4	AB508598	9	AB508478	9
17	MAFF 241639	<i>Zingiber officinale</i>	Kochi	HR	I	4	AB508599	9	AB508479	9
20	MAFF 241641	<i>Zingiber officinale</i>	Kochi	HR	I	4	AB508600	9	AB508480	9
21	MAFF 241642	<i>Zingiber officinale</i>	Kochi	HR	I	4	AB508601	9	AB508481	9
22	MAFF 241644	<i>Zingiber mioga</i>	Kochi	HR	I	4	AB508602	9	AB508482	9
23	MAFF 241645	<i>Zingiber mioga</i>	Kochi	HR	I	3	AB508603	9	AB508483	9
24	MAFF 241646	<i>Zingiber mioga</i>	Kochi	HR	I	4	AB508604	9	AB508484	9
25	MAFF 211496	<i>Zingiber mioga</i>	Kochi	HR	I	4	AB508605	9	AB508485	9
26	MAFF 211491	<i>Zingiber mioga</i>	Kochi	HR	I	4	AB508606	26	AB508486	9
27	MAFF 211266	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hiroshima	HR	I	4	AB508607	42	AB508487	2
28	MAFF 211267	<i>Solanum lycopersicum</i>	Shimane	HR	I	4	AB508608	42	AB508488	2
29	MAFF 211268	<i>Solanum melongena</i>	Kochi	HR	I	4	AB508609	42	AB508489	2
30	MAFF 211269	<i>Solanum melongena</i>	Kochi	HR	I	4	AB508610	42	AB508490	2
31	MAFF 211272	<i>Curcuma alismatifolia</i>	Kochi	HR	I	4	AB508611	9	AB508491	9
32	MAFF 301070	<i>Solanum lycopersicum</i>	Kochi	HR	I	3	AB508612	32	AB508492	2
33	MAFF 301520	<i>Solanum melongena</i>	Saitama	HR	I	4	AB508613	42	AB508493	2
34	MAFF 301521	<i>Solanum melongena</i>	Nara	HR	I	4	AB508614	42	AB508494	2
35	MAFF 301523	<i>Solanum melongena</i>	Tokyo	HR	I	4	AB508615	42	AB508495	2
36	MAFF 301528	<i>Solanum lycopersicum</i>	Gunma	HR	I	4	AB508616	42	AB508496	2
37	MAFF 301560	<i>Strelitzia reginae</i>	Nagasaki	HR	I	3	AB508617	32	AB508497	2
38	MAFF 301841	<i>Solanum melongena</i>	Kanagawa	HR	I	3	AB508618	32	AB508498	2
39	MAFF 302549	<i>Limonium</i> sp.	Kochi	HR	I	3	AB508619	9	AB508499	2
40	MAFF 241654	<i>Capsicum annuum</i>	Kochi	HR	I	4	AB508620	42	AB508500	2
41	MAFF 211516	<i>Capsicum annuum</i>	Kochi	Vir	I	3	AB508621	42	AB508501	42
42	OE1-1	<i>Solanum melongena</i>	Okayama	Vir	I	4	AB508622	42	AB508502	42

表 1. (つづき)

Code	Strain	Isolated from :	Prefecture	HR induction on tobacco	Phylotype	biovar	<i>egl</i>		<i>gyrB</i>	
							Accession no.	amino acid type	Accession no.	amino acid type
44	MAFF 730138	<i>Solanum lycopersicum</i>	Kochi	Vir	I	3	AB508623	42	AB508503	9
49	MAFF 211282	<i>Solanum melongena</i>	Kochi	Vir	I	3	AB508624	42	AB508504	42
55	MAFF 241653	<i>Solanum melongena</i>	Kochi	Vir	I	4	AB508625	42	AB508505	42
56	MAFF 241658	<i>Solanum melongena</i>	Kochi	Vir	I	4	AB508626	42	AB508506	42
57	MAFF 241657	<i>Solanum melongena</i>	Kochi	Vir	I	4	AB508627	42	AB508507	42
58	MAFF 241638	<i>Solanum melongena</i>	Kochi	Vir	I	4	AB508628	42	AB508508	42
59	MAFF 241637	<i>Solanum melongena</i>	Kochi	Vir	I	4	AB508629	42	AB508509	42
60	MAFF 241636	<i>Solanum melongena</i>	Kochi	Vir	I	4	AB508630	42	AB508510	42
62	MAFF 241659	<i>Solanum melongena</i>	Kochi	Vir	I	4	AB508631	42	AB508511	42
63	MAFF 241656	<i>Solanum melongena</i>	Kochi	Vir	I	4	AB508632	42	AB508512	42
66	MAFF 301485	<i>Solanum lycopersicum</i>	Oita	Vir	I	N2	AB508633	42	AB508513	66
68	MAFF 211271	<i>Solanum tuberosum</i>	Shizuoka	NT	IV	N2	AB508634	68	AB508514	68
69	MAFF 301069	<i>Nicotiana tabacum</i>	Shizuoka	Vir	I	3	AB508635	42	AB508515	66
70	MAFF 301525	<i>Solanum lycopersicum</i>	Tottori	Vir	I	3	AB508636	42	AB508516	42
71	MAFF 301527	<i>Capsicum annuum</i>	Oita	Vir	I	N2	AB508637	42	AB508517	66
72	MAFF 301558	<i>Solanum tuberosum</i>	Nagasaki	NT	IV	N2	AB508638	68	AB508518	68
73	MAFF 301559	<i>Solanum tuberosum</i>	Nagasaki	NT	IV	N2	AB508639	68	AB508519	68
74	MAFF 211514	<i>Solanum lycopersicum</i>	Kochi	Vir	I	3	AB508640	42	AB508520	9
75	MAFF 241643	<i>Solanum lycopersicum</i>	Kochi	Vir	I	3	AB508641	42	AB508521	42
78	MAFF 211274	<i>Curcuma alismatifolia</i>	Kochi	HR	I	4	AB508642	9	AB508522	9
79	MAFF 211276	<i>Curcuma alismatifolia</i>	Kochi	HR	I	4	AB508643	9	AB508523	9
80	MAFF 211278	<i>Curcuma alismatifolia</i>	Kochi	HR	I	4	AB508644	9	AB508524	9
82	MAFF 241640	<i>Zingiber mioga</i>	Kochi	HR	I	4	AB508645	9	AB508525	9
85	MAFF 211492	<i>Zingiber mioga</i>	Kochi	HR	I	4	AB508646	9	AB508526	9
87	MAFF 211493	<i>Zingiber mioga</i>	Kochi	HR	I	4	AB508647	9	AB508527	9
88	MAFF 241660	<i>Zingiber mioga</i>	Kochi	HR	I	4	AB508648	9	AB508528	9
89	MAFF 211497	<i>Zingiber mioga</i>	Kochi	HR	I	4	AB508649	9	AB508529	9
92	MAFF 211484	<i>Zingiber officinale</i>	Kochi	HR	I	4	AB508650	9	AB508530	9
93	MAFF 211486	<i>Zingiber officinale</i>	Kochi	HR	I	4	AB508651	9	AB508531	9
95	MAFF 241647	<i>Zingiber officinale</i>	Kochi	HR	I	3	AB508652	32	AB508532	9
96	MAFF 241648	<i>Zingiber officinale</i>	Kochi	HR	I	4	AB508653	9	AB508533	2

表 1. (つづき)

Code	Strain	Isolated from :	Prefecture	HR induction on tobacco	Phylotype	biovar	<i>egl</i>		<i>gyrB</i>	
							Accession no.	amino acid type	Accession no.	amino acid type
99	MAFF 241649	<i>Zingiber officinale</i>	Kochi	HR	I	3	AB508654	9	AB508534	9
101	MAFF 241650	<i>Zingiber officinale</i>	Kochi	HR	I	4	AB508655	9	AB508535	9
102	MAFF 241651	<i>Zingiber officinale</i>	Kochi	HR	I	4	AB508656	32	AB508536	2
103	MAFF 241652	<i>Zingiber officinale</i>	Kochi	HR	I	4	AB508657	42	AB508537	2
106	MAFF 211499	<i>Capsicum annuum</i>	Kochi	HR	I	4	AB508658	42	AB508538	2
112	MAFF 241655	<i>Solanum melongena</i>	Kochi	Vir	I	3	AB508659	42	AB508539	42
201	SUPP100	<i>Solanum melongena</i>	Chiba	HR	I	4	AB508660	42	AB508540	2
202	SUPP117	<i>Solanum lycopersicum</i>	Saitama	HR	I	4	AB508661	42	AB508541	2
203	SUPP203	<i>Strelitzia reginae</i>	Shizuoka	HR	I	3	AB508662	32	AB508542	2
205	SUPP1510	<i>Delphinium</i> sp.	Shizuoka	HR	I	3	AB508663	205	AB508543	2
206	SUPP1541	<i>Angelica keiskei</i>	Tokyo	HR	I	3	AB508664	32	AB508544	2
207	SUPP1725	<i>Campanula lactiflora</i>	Shizuoka	HR	I	3	AB508665	32	AB508545	2
208	SUPP1875	<i>Nicotiana tabacum</i>	Shizuoka	Vir	I	3	AB508666	42	AB508546	66
209	SUPP1876	<i>Fragaria</i> sp.	Shizuoka	Vir	I	3	AB508667	42	AB508547	66
210	SUPP2164	<i>Solanum lycopersicum</i>	Shizuoka	Vir	I	3	AB508668	42	AB508548	66
211	SUPP2531	<i>Solanum lycopersicum</i>	Shizuoka	Vir	I	N2	AB508669	42	AB508549	66
213	Rst018	<i>Solanum lycopersicum</i>	Kumamoto	Vir	I	3	AB508670	42	AB508550	42
215	Rst016	<i>Solanum lycopersicum</i>	Fukushima	HR	I	4	AB508671	42	AB508551	2
216	Rst017	<i>Solanum lycopersicum</i>	Shizuoka	HR	I	3	AB508672	42	AB508552	2
217	Rst023	<i>Solanum lycopersicum</i>	Nagano	HR	I	3	AB508673	42	AB508553	2
218	Rst026	<i>Solanum melongena</i>	Yamanashi	Vir	I	3	AB508674	42	AB508554	42
219	Rst033	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hokkaido	HR	I	3	AB508675	42	AB508555	2
220	Rst043	<i>Solanum lycopersicum</i>	Saitama	HR	I	3	AB508676	42	AB508556	2
221	Rst065	<i>Solanum lycopersicum</i>	Saitama	HR	I	4	AB508677	42	AB508557	2
222	Rst067	<i>Solanum lycopersicum</i>	Kumamoto	Vir	I	N2	AB508678	42	AB508558	66
223	Rst069	<i>Solanum lycopersicum</i>	Ehime	HR	I	4	AB508679	42	AB508559	2
224	Rst071	<i>Solanum lycopersicum</i>	Kanagawa	HR	I	3	AB508680	9	AB508560	2
225	Rst087	<i>Solanum lycopersicum</i>	Yamagata	HR	I	4	AB508681	42	AB508561	2
226	Rst095	<i>Solanum lycopersicum</i>	Gunma	HR	I	3	AB508682	42	AB508562	2
227	HAIP001	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hyogo	HR	I	4	AB508683	42	AB508563	2
228	HAIP004	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hyogo	HR	I	4	AB508684	9	AB508564	2

表 1. (つづき)

Code	Strain	Isolated from :	Prefecture	HR induction on tobacco	Phylotype	biovar	<i>egl</i>		<i>gyrB</i>	
							Accession no.	amino acid type	Accession no.	amino acid type
229	HAIP010	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hyogo	HR	I	3	AB508685	9	AB508565	2
230	HAIP016	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hyogo	HR	I	3	AB508686	32	AB508566	2
231	HAIP026	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hyogo	HR	I	3	AB508687	32	AB508567	2
232	HAIP067	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hyogo	HR	I	3	AB508688	32	AB508568	2
233	HAIP070	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hyogo	HR	I	3	AB508689	32	AB508569	2
234	HAIP101	<i>Solanum melongena</i>	Hyogo	HR	I	4	AB508690	42	AB508570	2
235	HAIP104	<i>Solanum melongena</i>	Hyogo	HR	I	3	AB508691	9	AB508571	2
236	HAIP107	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hyogo	HR	I	3	AB508692	32	AB508572	2
237	HAIP110	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hyogo	HR	I	3	AB508693	32	AB508573	2
238	HAIP119	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hyogo	HR	I	3	AB508694	42	AB508574	2
239	HAIP122	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hyogo	HR	I	4	AB508695	42	AB508575	2
240	HAIP140	<i>Solanum tuberosum</i>	Nagasaki	HR	I	4	AB508696	42	AB508576	2
241	HAIP141	<i>Solanum tuberosum</i>	Nagasaki	HR	I	3	AB508697	42	AB508577	2
242	HAIP142	<i>Capsicum annuum</i>	Hyogo	Hr	I	3	AB508698	42	AB508578	2
243	TBW A-1-1-1-1	<i>Solanum lycopersicum</i>	Mie	Vir	I	3	AB508699	42	AB508579	42
244	06SM212A-2	<i>Solanum melongena</i>	Mie	HR	I	4	AB508700	42	AB508580	2
245	PBW A-3-1-1	<i>Capsicum annuum</i>	Mie	HR	I	3	AB508701	42	AB508581	2
246	PBW C-1	<i>Capsicum annuum</i>	Mie	HR	I	4	AB508702	42	AB508582	2
247	8242	<i>Solanum lycopersicum</i>	Tottori	HR	I	4	AB508703	42	AB508583	2
248	Nasu19	<i>Solanum melongena</i>	Okayama	Vir	I	3	AB508704	42	AB508584	42
249	Nasu30-2	<i>Solanum melongena</i>	Okayama	Vir	I	3	AB508705	42	AB508585	42
250	06-E-1	<i>Solanum melongena</i>	Okayama	Vir	I	3	AB508706	42	AB508586	42
251	DTR07-1	<i>Solanum melongena</i>	Okayama	Vir	I	3	AB508707	42	AB508587	42
252	Y17-4	<i>Solanum lycopersicum</i>	Shiga	Vir	I	4	AB508708	42	AB508588	42
253	S293-1	<i>Solanum lycopersicum</i>	Wakayama	HR	I	4	AB508709	42	AB508589	2
254	S507-1	<i>Solanum lycopersicum</i>	Tochigi	HR	I	4	AB508710	42	AB508590	2
255	S434-3	<i>Solanum melongena</i>	Okayama	Vir	I	3	AB508711	42	AB508591	42
256	S543-4	<i>Solanum melongena</i>	Tochigi	Vir	I	3	AB508712	42	AB508592	42



のうち、83 菌株がタバコ葉注入部に HR を誘導し、接種タバコ葉と植物に萎凋症状は認められなかった (表 1) . 一方、34 菌株は、タバコ葉での HR 誘導能は示さず、接種後 14 日までの間に接種タバコ葉と植物に萎凋症状が認められた. 興味深いことに、GyrB のアミノ酸配列による系統解析の結果でクラスターAに属した菌株はいずれもタバコ葉に HR を誘導せず、タバコ植物に病原性を示した. 一方、クラスターBに属した菌株は、type 9 の 2 菌株を除き、タバコ葉に HR を誘導し、タバコ植物に病原性を示さなかった.

#### 4. 所感

Fegan and Prior (2005)は、*R. solanacearum* のアジア分離菌株の多くは phylotype I, 東南アジアとオーストラリア分離菌株の多くは phylotype IV, アフリカ分離菌株の多くは phylotype III, および中南米分離株の多くは phylotype II であることを報告している. 本研究の結果から、我が国の分離株の多くが phylotype I であり、一部のジャガイモ分離株が phylotype IV であることが明らかとなった. さらに、GyrB の部分アミノ酸配列を用いた分子系統解析から、我が国の phylotype I の菌株は 2 種類の祖先に由来する 2 つのグループに類別できる可能性が示唆された. さらに、これらの祖先はそれぞれタバコ葉に対する HR 誘導能とタバコ植物に対する病原性を有していると考えられた. 分離植物と biovar については、*egl* の部分塩基配列による phylotype や GyrB の部分アミノ酸配列による分子系統との間に相関性が認められず、多様化していたことから、寄生性と biovar の多様化の速度は *egl* の塩基置換や GyrB のアミノ酸置換の速度よりも早いと推察された. タイプ III 分泌系が欠損すると *R. solanacearum* の病原性は喪失する. さらに、*R. solanacearum* GMI1000 株のタバコ葉に対する HR の誘導において、タイプ III エフェクターである *avrA* と *popP1* がその主因であると報告されている (Poueymiro et al., 2009). 一方、我々は、我が国の phylotype I に属する菌株の AvrA のアミノ酸配列の保存性はきわめて高く、タバコ葉に HR 誘導能を有する菌株でも *popP1* を有しない菌株があることを明らかにしている (Liu et al., 2009a) . すなわち、*R. solanacearum* 菌株の寄生性の進化・多様化について理解するためには、タイプ III エフェクターの分子進化を詳細に解析する必要があると考える.

#### 5. 謝辞

本研究では、多くの方々にご支援とご協力をいただいた. 相野公孝博士、川口章博士、溝口仙太郎氏、中保一浩博士、塩見寛氏、矢野和孝氏および瀧川雄一博士には *R. solanacearum* 菌株を分譲いただいた. Yingqin Liu 博士、神田絢美博士、木場章範博士および大西浩平博士には共同研究をしていただいた. さらに、青枯病コンソシアム「aogare」の参加者の皆様には適切なご助言をいただいた. ここに記して、深く感謝の意を表する.

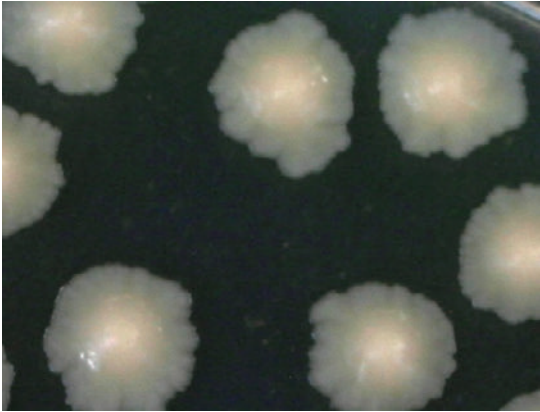
## 6. 参考文献

- 1) Boucher, C.A., Barberis, P.A., Trigalet, A.P. and Demery, D.A. (1985) Transposon mutagenesis of *Pseudomonas solanacearum*: Isolation of Tn5-induced avirulent mutants. *J. Gen. Microbiol* 131: 2449-2457.
- 2) Fegan, M. and Prior, P. (2005) How complex is the "*Ralstonia solanacearum* species complex"? In: Allen C, Prior P, Hayward AC (eds) *Bacterial wilt: the disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. APS Press, St. Paul, MN, pp 449-462.
- 3) Hayward, A.C. (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29:65-87.
- 4) Horita, M. and Tsuchiya, K. (2001) Genetic diversity of Japanese 421 strains of *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* 91:399-407.
- 5) Liu, Y., Kanda, A., Kiba, A., Hikichi, Y. and Ohnishi, K. (2009a) Distribution of avirulence genes *avrA* and *popP1* in phylotype I Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. *J. Gen. Plant Pathol.* 75:362-368.
- 6) Liu, Y., Kanda, A., Kiba, A., Hikichi, Y., Aino, M., Kawaguchi, A., Mizoguchi, S., Nakaho, K., Shiomi, H., Takikawa, Y. and Ohnishi, K. (2009b) Molecular typing of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum* and the relationship with the ability to induce a hypersensitive reaction in tobacco. *J. Gen. Plant Pathol.* 75:369-380.
- 7) Poueymiro, M., Cunnac, S., Barberis, P., Deslandes, L., Peeters, N., Cazale-Noel, A.C., Boucher, C. and Genin, S. (2009) Two type III secretion system effectors from *Ralstonia solanacearum* GMI1000 determine host-range specificity on tobacco. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22: 538-550.
- 8) 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
- 9) Wakimoto, S., Uematsu, T. and Mukoo, H. (1968) Bacterial canker disease of tomato in Japan. 1. Isolation and identification of the causal bacteria, and resistance of tomato varieties against the disease. *Bull. Natl. Inst. Agric. Sci. Ser. C.* 22: 269-279.
- 10) Wicker, E., Grassart, L., Coranson-Beaudu, R., Mian, D., Guilbaud, C., Fegan, M. and Prior, P. (2007) *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:6790-6801.

## Summary

The genetic diversity of a total of 120 *Ralstonia solanacearum* strains isolated from a variety of host plants across Japan was assessed on the basis of phylogenetic analyses of endoglucanase gene *egl* and *gyrB*, and biovar, pathogenicity on tobacco. The phylogenetic analysis of *egl* revealed that only three strains belonged to phylotype IV and the rest strains belonged to phylotype I. Most of the strains isolated from the family *Zingiberaceae* were biovar 4. The phylogenetic analyses on the basis of partial amino acid sequences of GyrB revealed that the phylotype I strains were grouped into four of GyrB types. We observed that the strains belonging to specific GyrB types (type 42 and type 66) wilted tobacco and the strains belonging to the rest of GyrB types (type 2 and type 9) elicited HR, demonstrating that pathogenicity on tobacco is genetically differentiated in the Japanese strains of *R. solanacearum*.

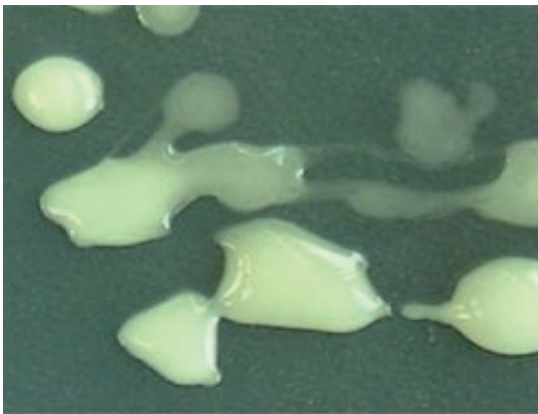
## 微生物遺伝資源の調査プロフィール



タイモ立枯細菌病菌 (*Erwinia chrysanthemi*) のコロニー (土屋)



落葉漂白菌類を採集した沖縄本島の亜熱帯常緑広葉樹林 (大園)



左: *Ralstonia solanacearum* OE1-1 株の PS 培地上でのコロニー  
右: 植物育成室における接種試験 (曳地)



*Pestalotiopsis adusta* が分離されたユリの斑点症状 (渡辺)