

沖縄に分布するサトウキビ白すじ病菌の遺伝子タイプ

農業環境技術研究所 對馬誠也

はじめに

沖縄県では、15世紀には中国南部から伝わったサトウキビを栽培し、生で食べ、煮て砂糖を作っていたとの記録が残されている。サトウキビの収穫面積は、1980年には21,800 haまで増加し(宮里, 1986)、その後やや減少したものの現在もサトウキビは沖縄県の基幹作物となっている。しかし、近年、農家圃場でサトウキビの葉身や葉鞘が白化する症状が発生して種苗管理上の問題となり、独立行政法人種苗管理センターからこれら葉身や葉鞘の白化原因の解明および診断法の開発等に関して協力依頼を受けた。

国内では、サトウキビの葉身や葉鞘の退緑あるいは白化を起す病害として、サトウキビモザイク病や白葉病、白すじ病、わい化病などが報告されているが(岸編, 1998)、上記の白化症状の原因については不明であった。そのため、沖縄から送られてきた白化症状を呈する葉身部や葉鞘部を顕微鏡観察した結果、白化葉の一部から菌泥の噴出が確認された。そこで、細菌の分離を試みたところ、サトウキビ白すじ病菌 [*Xanthomonas albineans* (ASHBY, 1929) Dowson] が分離された。このことから、少なくともサトウキビ白すじ病菌がこれら白化症状の原因の一つと考え、本病(口絵)を対象として、診断法や病原細菌の検出技術の開発に取り組むことにした。

これまでの研究から、本病の特徴としては、白化症状を呈する葉身、葉鞘からの病原細菌の分離が極めて難しい点があげられる。この原因としては、1) 白化症状が白すじ病菌以外の要因によって生じていることや、2) 白すじ病による白化症状は、病原細菌が生産する毒素によって生じていることから、白化した部位には病原細菌が存在していないこと、などが考えられる。しかし、圃場の発病調査の際には多数のサンプルを調査する必要があることから、白化症状は診断の重要な指標となることはいうまでもなく、これら白化症状等の病徴に基づく迅速で、簡便な診断、検出手法の開発も重要である。また、

種苗管理上、沖縄県で発生している白すじ病の病原細菌がどこから来たかを調べる必要もあった。そこで、筆者らは、白化症状と分子生物学的手法を用いた診断法と、沖縄県で発生する白すじ病菌の侵入経路等の推定法の開発を目的として、まず病原細菌の遺伝的多様性を調べることにした(TSUSHIMA et al., 2006)。

I サトウキビ白すじ病に関するこれまでの研究と課題

サトウキビ白すじ病は、1920年に細菌による導管病として報告され(RICAUD and RYAN, 1989)、その後、アメリカをはじめ各国で報告されている。本病の生態、防除、検出技術等に関する報告は海外では多いが、国内では極めて少ない。

本病の診断上の問題点としては、生産現場では本病原細菌以外が原因と思われる白すじ病類似症状が多いこと、接種試験による病気の再現が難しいことがあげられる(RICAUD and RYAN, 1989)。このため、特に圃場での発生調査のために迅速、簡便な診断法が必須となっており、これまでも抗原抗体反応や分子生物学的手法などによる様々な検出法が報告されている。分子生物学的手法を用いた検出技術としては、近年、DNAフィンガープリンティング法を用いた系統解析(ALVAREZ et al., 1996)やDNA多型解析(JAUFERRALLY-FAKIM et al., 2002)などの方法がある。

しかし、最近では、植物病原細菌においても、複数のハウスキーピング遺伝子(細菌の生存に不可欠な遺伝子)の塩基配列を直接比較することにより種間や種内の系統関係を解析する方法も報告されている。菌株間で特定のハウスキーピング遺伝子の塩基配列の違いが明らかになると、それらの違いで分けられたグループ(ここでは遺伝子タイプと称す)間の進化の過程をより詳細に検討することができるようになるだけでなく、それら遺伝子タイプの地理的分布や各遺伝子タイプの移動経路の解明などに役立つ可能性がある。また、地理的分布の特徴が明らかになると、各遺伝子タイプに適した栽培条件や、抵抗性品種の育成等に役立つ可能性もあろう。

以上の理由から、筆者らは、沖縄県および外国で採取された菌株について、16Sリボゾーム遺伝子(以下16S rDNAと称す)、染色体の複製に関与するDNAジャイ

Phylogenetic Analysis of *Xanthomonas albilineans* Strains from Okinawa, Japan, through a Comparison of the *gyrB* and *rpoD* Genes in Geographically Distinct Strains. By Seiya TSUSHIMA

(キーワード: サトウキビ白すじ病菌, 遺伝子タイプ, *gyrB* 遺伝子, *rpoD* 遺伝子, 系統解析)

レース遺伝子 (同, *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 σ^{70} ファクター遺伝子 (同, *rpoD*) の三つの遺伝子の DNA 塩基配列情報をもとに系統関係を調べることにした。なお, *gyrB* と *rpoD* は 16S rDNA に比べ進化速度が速いといわれている。

II 沖縄県および各国におけるサトウキビ白すじ病菌の遺伝子タイプ

1 サトウキビ白すじ病菌の分離と供試菌株

意外に難航したのが, 病原細菌の分離, 収集であった。実際, 分離を開始した 1 年目は, 本病の典型的な症状の一つとされる, 白化葉身や葉鞘部位からはほとんど病原細菌が分離されなかった。また, まれに分離された場合でも分離培地上での病原細菌の増殖が極めて遅いことから, 分離に時間がかかるのと同時に, その分離培地で病原細菌を確実に分離しているのか不安を感じながら作業を行っていた。このため, 新鮮なサンプルから分離を行うことにより分離効率を上げられるかもしれないと考え, 2 年目には, サトウキビの葉身等を採取直後に現地 (種苗管理センター沖縄農場内) で分離作業を行った。その結果, 最終的に約 200 のサンプルから, Wilbrink 培地 (5 g polypeptone, 20 g sucrose, 0.5 g KH₂PO₄,

0.25 g MgSO₄ · 7H₂O, 15 g, 1 L) (RICAUD and RYAN, 1989) を用いて 21 菌株の病原細菌を分離することができた (表-1)。

これらの菌株に, LMG (Laboratorium voor Microbiologie Culture Collection. Ghent. Belgium) 株 10 菌株を加えた全 31 菌株を供試して系統解析を行った。

III 16S rDNA, *gyrB* および *rpoD* の塩基配列による遺伝子タイプの解析

1 PCR プライマーおよび PCR 条件

病原細菌から Isoplant II kit を用いて DNA 回収を行った。対象とする遺伝子ごとのプライマーセット (表-2) を用い PCR を行った。PCR 産物を BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit ver. 3.1 (Applied Biosystems) を用いて調整後, DNA シクエンサー (ABI PRISM 3100; Applied Biosystems) により塩基配列を決定した。

特に菌株間に塩基配列の差が認められた *gyrB* (1,060 bp), *rpoD* (702 bp) については, さらに系統解析を行った。アウトグループとして, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (KACC10331; GI : 58424217; *gyrB*, 1,057 bp; *rpoD*, 714 bp) を用いた。

表-1 供試したサトウキビ白すじ病菌

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

^{a)} LMG. Laboratorium voor Microbiologie Culture Collection. Ghent. Belgium.

2 サトウキビ白すじ病菌の遺伝子タイプと世界の分布

供試した 31 菌株は、16S rDNA の塩基配列の違いで二つのグループ (I, II) に分かれたただけであったが、*gyrB*, *rpoD* ではそれぞれ五つ (I~V), 四つ (I~IV) のグループに分かれた (表-3)。16S rDNA で唯一異なるグループに分かれた一菌株 (LMG479) は、唯一サトウキビ以外の宿主植物 (*Paspalum dilatatum*) から分離されたものであった。LMG479 は、*gyrB*, *rpoD* でも単独で他の菌株と異なるグループを形成していることから、LMG479 は他の菌株に比べ早い時期に分化したことが示唆された。さらに、*gyrB*, *rpoD* 間では、*gyrB* で分けられた二つのグループ (I と V) は *rpoD* でも同じグループ (それぞれグループ I と IV に該当) を形成したが、*gyrB* の二つのグループ (グループ III と IV) は

rpoD では一つのグループ (グループ III) となった。この結果、沖縄県で分離された 21 菌株は、*gyrB* と *rpoD* とともに、LMG481 (St. Lucia), LMG487 (Guyana), LMG488 (Sri Lanka), and LMG491 (Barbados) と同じグループを形成した。

以上の結果から、三つの遺伝子の塩基配列から総合的に判断して、供試した 31 菌株は五つの遺伝的に異なるタイプ (以下、それぞれ A, B, C, D, E タイプと呼ぶ) に分かれること、沖縄分離菌 21 株はすべて B タイプに属することが明らかになった。

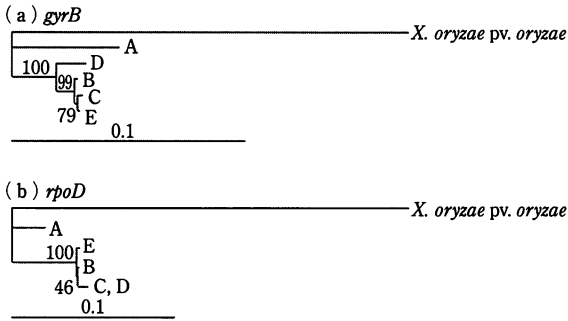
そこで、*gyrB*, *rpoD* について系統関係を調べた結果、A タイプは、両遺伝子とともに、他のグループとは明らかに異なるクラスターを形成した (図-1)。さらに、これらの遺伝子のアミノ酸レベルでの違いを比較したところ、*gyrB* では 4 箇所 (109, 127, 129, and 947), *rpoD* で

表-2 PCR に用いたプライマーセット

対象遺伝子	プライマー	塩基配列
16S rDNA	63f	5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3' (W = A or T)
	1387r	5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3' (W = A or T)
<i>gyrB</i>	UP-1	5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGNAARTTYGA-3' (Y = C or T; N = A, C, G, or T; R = A or G)
	UP-2r	5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCNCARTCNGTCAT-3'
<i>rpoD</i>	70F	5'-ACGACTGACCCGGTACGCATGTAYATGMNGARATGGGNACNGT-3' (M = A or C)
	70R	5'-ATAGAAATAACCAGACGTAAGTTNGCYTCNACCATYTCYTTYTT-3'

表-3 16S rDNA, *gyrB* および *rpoD* に基づくサトウキビ白すじ病菌の遺伝的多様性

菌株番号	16S rDNA	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>	遺伝子タイプ
LMG479	I (AB248365)	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
Okinawa strains				
T161-T164, T166-T168, T169-T171, T174, T175, T179, T181, T187, T189, T258	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



は 14 箇所 (135, 177, 183 ~ 185, 196, 197, 199, 200, 268, 300, 310, 565, and 661) にアミノ酸の置換が認められ、*gyrB* より *rpoD* でより多くの変異が生じていることが明らかになった (表-4)。

今回解析した結果を地図上に示した (図-2)。その結果、沖縄分離菌と同じ B タイプは、スリランカと中米に分布していたのに対して、A, C, D タイプはアフリカ、E タイプはフィジーと遺伝子タイプの分布が異なっていた (図-2)。

図-1 *gyrB*, *rpoD* 遺伝子の塩基配列に基づくサトウキビ白すじ病菌 31 菌株の系統関係

表-4 サトウキビ白すじ病菌の各遺伝子タイプ間における *gyrB*, *rpoD* 遺伝子のアミノ酸配列の違い

遺伝子	置換位置	遺伝子タイプ				
		A	B	C	D	E
<i>gyrB</i>	109	<u>A</u> CC (T)	<u>G</u> CC (A)	<u>G</u> CC (A)	<u>G</u> CC (A)	<u>G</u> CC (A)
	127, 129	<u>C</u> TC (L)	<u>T</u> TA (L)	<u>T</u> TA (L)	<u>G</u> TA (V)	<u>T</u> TA (L)
	947	<u>A</u> AG (K)	<u>A</u> GG (R)	<u>A</u> GG (R)	<u>A</u> AG (K)	<u>A</u> GG (R)
<i>rpoD</i>	135	<u>G</u> TC (V)	<u>A</u> TC (I)	<u>A</u> TC (I)	<u>A</u> TC (I)	<u>A</u> TC (I)
	177	<u>G</u> GC (G)	<u>A</u> GC (S)	<u>A</u> GC (S)	<u>A</u> GC (S)	<u>A</u> GC (S)
	183 ~ 185	— (-)	<u>G</u> CT (A)	<u>G</u> CC (A)	<u>G</u> CC (A)	<u>G</u> CC (A)
	196, 197	<u>G</u> AT (D)	<u>G</u> CC (A)	<u>G</u> CC (A)	<u>G</u> CC (A)	<u>G</u> CC (A)
	199, 200	<u>G</u> CC (A)	<u>G</u> GG (G)	<u>G</u> GG (G)	<u>G</u> GG (G)	<u>G</u> GG (G)
	268	<u>G</u> TC (V)	<u>G</u> CC (A)	<u>G</u> CC (A)	<u>G</u> CC (A)	<u>G</u> CC (A)
	300	<u>A</u> CC (T)	<u>G</u> CC (A)	<u>G</u> CC (A)	<u>G</u> CC (A)	<u>G</u> CC (A)
	310	<u>G</u> TC (V)	<u>G</u> CC (A)	<u>G</u> CC (A)	<u>G</u> CC (A)	<u>G</u> CC (A)
	565	<u>G</u> CC (A)	<u>G</u> TC (V)	<u>G</u> TC (V)	<u>G</u> TC (V)	<u>G</u> TC (V)
	661	<u>G</u> AG (E)	<u>G</u> GG (G)	<u>G</u> GG (G)	<u>G</u> GG (G)	<u>G</u> GG (G)

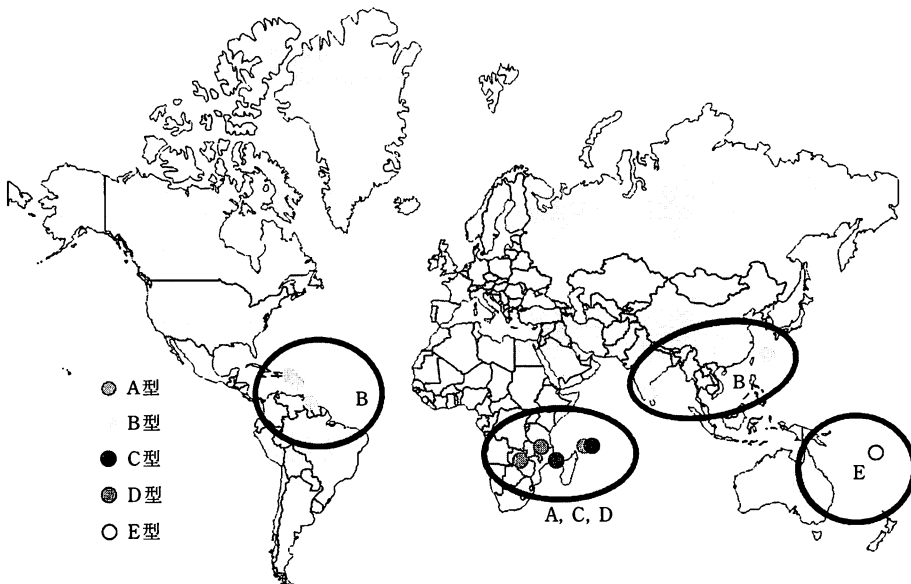


図-2 世界におけるサトウキビ白すじ病菌の遺伝子タイプ (A ~ E) の分布

おわりに

サトウキビ白すじ病菌の三つのハウスキーピング遺伝子の塩基配列の組合せから、本病原細菌は少なくとも世界に五つの遺伝子タイプ (A, B, C, D, E タイプ) があることを初めて明らかにした。各遺伝子タイプの分布を見ると、B タイプ、E タイプおよびその他のタイプ (A, C, D) が、それぞれ地理的にも大きく離れた場所に分布していた。このことは、それぞれの遺伝子タイプがそれぞれの地域で独自に進化したことが考えられる。また、興味深いことに、沖縄県の菌株 (21 菌株) は、すべて同一の遺伝子タイプ (B タイプ) に属していたことから、沖縄には、過去に一つの遺伝子タイプが侵入し、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、今回用いた菌株数はまだ少ないことから、上記の仮説を検証するためには、さらに多くの菌株を用いて解析する必要がある。

その一方で、今回五つの遺伝子タイプの存在が明らかになったことで、遺伝子タイプごとの特異検出や、新たな遺伝子タイプの沖縄県への侵入の警戒にも役立つと考える。今後、さらに世界各国でサトウキビ白すじ病菌の遺伝子タイプの分布が解析されれば、遺伝子タイプごと

の世界的分布や地理的特性などが明らかになり、遺伝子タイプごとの防除対策にも役立つ可能性もあろう。今後は、国際的ネットワークによる遺伝子タイプの推定も重要と思われる。

今回は、サトウキビ白すじ病菌の遺伝的多様性について報告したが、前述したように、本病に関する研究は1920年代から始められているにもかかわらず、病原細菌の分離法や診断法はいまだに不十分と言わざるを得ない。加えて、病原細菌の接種による再現試験も容易ではない。以上のことから、簡易な診断法や分離培地の作成 (投稿中)、接種方法等についてもさらなる研究が必要である。

参考文献

- 1) ALVAREZ, A. M. et al. (1996): *Plant Pathol.* 45: 358 ~ 366.
- 2) JAUFFERALLY - FAKIM, Y. et al. (2002): *Euro. J. Plant Pathol.* 108: 121 ~ 130.
- 3) 宮里清松 (1986): サトウキビとその栽培, 日本分蜜糖工業会, p. 358.
- 4) 日本植物病害大辞典 (1998): 岸国平編, 全国農村教育協会, 東京, p. 170 ~ 176.
- 5) RICAUD, C. and C. C. RYAN (1989): *Leaf scald*, p. 39 ~ 58 in *Diseases of Sugarcane*, C. RICAUD et al. eds., Elsevier, Amsterdam.
- 6) TSUSHIMA, S. et al. (2006): *J. Phytopathol.* 154: 683 ~ 687.

(新しく登録された農薬5ページからの続き)

芝: シバツトガ, タマナヤガ, スジキリヨトウ: 発生初期
 ●チアメトキサム・ピロキロン粒剤
 22279: デジタルメガフレア箱粒剤 (シンジェンタ ジャパン)
 08/10/22
 チアメトキサム: 8.0%, ピロキロン: 12.0%
 稲 (箱育苗): カメムシ類 (移植当日)
 稲 (箱育苗): ウンカ類, イネミズゾウムシ, イネドロオイムシ, いもち病: (移植前3日~移植当日)

「殺虫殺菌剤」

●ジノテフラン・トリシクラゾール・フルトラニル粉剤
 22268: ビームモンカットスタークル F 粉剤 5DL (日本農薬)
 08/10/08
 ジノテフラン: 0.35%, トリシクラゾール: 0.50%, フルトラニル: 2.0%
 稲: いもち病, 紋枯病, ウンカ類, ツマグロヨコバイ, カメムシ類: 収穫14日前まで
 ●ピメトロジン・フィプロニル・プロベナゾール粒剤
 22272: ビルダープリンスチェス粒剤 (明治製薬) 08/10/08
 22273: シンジェンタ ビルダープリンスチェス粒剤 (シンジェンタ ジャパン) 08/10/08
 22274: ホクコービルダープリンスチェス粒剤 (北興化学)

08/10/08

22275: BASF ビルダープリンスチェス粒剤 (BASF アグロ)

08/10/08

ピメトロジン: 3.0%, フィプロニル: 1.0%, プロベナゾール: 10.0%

稲 (箱育苗): いもち病, ウンカ類, コブノメイガ: 移植3日前~移植当日

「殺菌剤」

●銅水和剤

22264: フジドーフロアブル (日本農薬) 08/10/08

塩基性硫酸銅: 36.0%

かんぎつ: かいよう病: —

ばれいしょ: 疫病: —

茶: 炭疽病, 網もち病: 摘採14日前まで

●イミノクタジン酢酸塩・フルトラニル水和剤

22265: 日農モンカットベフランフロアブル (日本農薬)
 08/10/0822266: 日曹モンカットベフランフロアブル (日本曹達)
 08/10/08

イミノクタジン酢酸塩: 10.0%, フルトラニル: 20.0%

小麦: 紅色雪腐病, 雪腐小粒菌核病: 根雪前

(14ページに続く)