ダイズ斑点細菌病菌における培地中とジャガイモ塊茎上での コロナチン産生の違い*

森脇 丈治**・水野 明文**†・佐藤 守***・門田 育生**・西山 幸司**

Jouji MORIWAKI**, Akifumi MIZUNO**†, Mamoru SATO***, Ikuo KADOTA** and Koushi NISHIYAMA** :
Difference in Production of Coronatine on Potato Tuber Tissue and in Liquid Culture
by *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*

Abstract

Twenty-five strains of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* were studied for their ability to produce coronatine and symptoms on soybean leaves. Seven strains induced lesions accompanied by halos on soybean leaves after natural and artificial infection, whereas the other strains induced lesions without halos. Five of the seven halo-inducers also produced coronatine on potato tuber tissues, whereas the 18 non-halo inducing strains did not. However, all 25 strains produced coronatine in Woolley's liquid medium. In addition, all twenty-five strains had a pCOR1-like plasmid in size. The *cfl* region in pCOR1, which is correlated with coronatine production in *P. syringae* pv. *atropurpurea*, was also detected in the pCOR1-like plasmids in all 25 strains. These results indicate that *P. syringae* pv. *glycinea* essentially has coronatine-producing ability, but its expression *in planta* may be regulated by a control system.

Key words : *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, bacterial blight, soybean, coronatine, potato hypertrophy assay, pCOR1.

ダイズ斑点細菌病 (病原: *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Coerper 1919) Young, Dye & Wilkie 1978) は、ダイズの重要病害のひとつであり、世界中に広く分布している¹³⁾。本菌にはダイズ葉にハローを形成するもの (ハロー形成菌) とハローを形成しないもの (ハロー非形成菌) とがある^{3,5,8)} (Fig. 1)。ハロー形成菌によって生じる病斑では、水浸状斑点の周囲に退緑した部分 (ハロー) が形成されるが、ハロー非形成菌によって生じる病斑では退緑部分がない。また、先の研究で、菌体をジャガイモ塊茎切片に直接接種し、ジャガイモ細胞の肥大の有無でコロナチン産生能を検定する方法⁷⁾ によって、ハロー形成菌にはコロナチン産生能があること⁸⁾、およびコロナチンの希薄溶液をダイズ葉に処理すると、病原細菌の接種で生じるハローと類似した葉斑を生じること⁷⁾ が明らかにされている。これらのことから、コロナチンを産生する菌がハロー病斑を形成すると推察された⁸⁾。しかし、ブラジル産のダイズ斑点細菌病菌を同定する過程で、ブラジル産菌の一部はハローのある病斑を形成するにもかかわらず、ジャガイモ法ではコロナチンは検出されなかった⁹⁾。この結果は、本菌のコロナチン産生能とハロー形成能との直接的関係を疑

わせるものである。そこで、ダイズ斑点細菌病菌のコロナチン産生能と病徴型との関係を明確にするため、培地中とジャガイモ塊茎上でのコロナチン産生について調査し、併せてコロナチン産生に関係するプラスミドの有無を調べた。

試験に供したダイズ斑点細菌病菌は、pathotype strain, ブラジル産のハロー形成菌 2 株, ハロー非形成菌 1 株, 日本産のハロー形成菌 4 株, ハロー非形成菌 17 株で、いずれも農林水産省微生物ジーンバンク (MAFF) 所蔵株である (Table 1)。対照には、コロナチン発見の元になったイタリアンライグラスかさ枯病細菌 *P. s.* pv. *atropurpurea* MAFF 301309 を用いた。病原性およびハロー形成の有無は以下の方法で調べた。ダイズ (品種: 鶴の子, 播種後 4 週間) に細菌懸濁液 (10⁸ cfu/ml) を噴霧接種し、25°C の温室に 24 時間置いたのち 25°C のガラス室に移して 5 日後に観察した。

コロナチンの抽出は西山⁷⁾ に準じ以下の方法で行った。Woolley らの培地¹⁵⁾ 150 ml に供試細菌を移植し、23°C で 5 日間振とう培養 (130 rpm) したのち、遠心分離 (12,000 × g, 10 分) によって上清を回収し、1 N 塩酸で pH 3 に調整

* 本研究の概要は平成 7 年度日本植物病理学会大会で発表した。

** 農業環境技術研究所 National Institute of Agro-Environmental Sciences, Tsukuba 305, Japan

*** 蚕糸・昆虫農業技術研究所 National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba 305, Japan

† 現在: 横浜植物防疫所 Present address: Yokohama Plant Protection Station, Yokohama 231, Japan

Fig. 1. Leaflet symptoms of soybean, inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. A: Inoculated with MAFF 302677 strain causing symptoms without halo. B: Inoculated with MAFF 301683, a halo-inducing strain.

Table 1. Tested strain

Strain	Locality	Host	Year and month isolated	Reference
<i>Pseudomonas syringae</i>				
pv. <i>glycinea</i>				
MAFF 302260 ^{PT}	New Zealand	Soybean	1968.3	—
MAFF 302676, 302677, 302678, 302680, 302682, 302683, 302685	Iwate, Japan	Soybean	1981.9	8)
MAFF 302688	Akita, Japan	Soybean	1981.9	8)
MAFF 301683, 302690, 302691, 302694, 302696	Ibaraki, Japan	Soybean	1981.9	8)
MAFF 302751, 302752, 302753, 302754	Ibaraki, Japan	Soybean	1982.7	8)
MAFF 302770, 302771, 302772	Ibaraki, Japan	Soybean	1982.9	8)
MAFF 301765	Ibaraki, Japan	Soybean	1982.9	—
MAFF 210373, 210381	Bahia, Brazil	Soybean	1989.2	9)
MAFF 210396	Brasilia DF, Brazil	Soybean	1989.3	9)
pv. <i>atropurpurea</i>				
MAFF 301309	Chiba, Japan	Italian ryegrass	1971.7	7)

PT: Pathotype strain. MAFF: Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan.

し、酢酸エチルで3回抽出した。酢酸エチル相を分取して40℃減圧下で濃縮・乾固し、残渣を1.5 mlのアセトンに溶解して100倍濃縮液とした。この抽出液中のコロナチンの有無はジャガイモ塊茎によって生物検定した。ジャガイモは塊茎(品種:男爵)を直径10 mm厚さ8 mmの円柱形に切り取り、流水で30分間洗浄したものをを用いた。直径6 mmの抗生物質検定用ろ紙(東洋ろ紙)に抽出液を10 µl吸収させて風乾したのち、ジャガイモ塊茎切片上に置き、その上に滅菌水を20 µl滴下した。このジャガイモ塊茎切片を湿らせたる紙を敷いたシャーレに入れ、25℃で5日間静置したのち、接触面の隆起を肉眼観察し、併せてジャガイモ細胞の肥大の有無を実体顕微鏡で拡大して調べた。その結果、供試細菌25株のすべてでジャガイモ細胞の肥大がみられ、コロナチン産生能が確認された。次に、これら菌株の細菌体を直接ジャガイモに接種し、20, 23, 26, 29℃の4段階で培養してコロナチン産生能を検定した。すべて

の培養温度において、5株のハロー形成菌からはコロナチンが検出されたが、残りの2株のハロー形成菌(ブラジル産菌)と18株のハロー非形成菌からはコロナチンは検出されなかった(Table 2)。

ライグラス類かき枯病細菌では88 kbのプラスミドがコロナチン産生に深く関係しており、このプラスミドはpCOR1と命名されている¹²⁾。供試細菌のプラスミドをアルカリ法¹¹⁾で抽出し、0.9%アガロースゲル電気泳動によりプラスミドの有無を調べた。ダイズ斑点細菌病菌は複数のプラスミドを保有しており、プラスミドパターンで11群に類別できた。各群のプラスミドパターンをFig. 2に示した。図中のダイズ斑点細菌病菌のすべての株において、pCOR1と同等の大きさ(88 kb前後)のプラスミドが認められた。また、図示していないその他の14株においてもpCOR1と同等の大きさのプラスミドが認められた。

Bereswillら²⁾はコロナチン産生に関与する遺伝子の一

Table 2. Several features of tested strains of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*

Strain	Halo-inducing on soybean (25°C) ^{a)}	Coronatine production on potato tuber tissue				Coronatine production in liquid medium (23°C)	pCOR1-like plasmid in size	PCR signal ^{b)}
		(20°C)	(23°C)	(26°C)	(29°C)			
MAFF 301683, 302260, 302690, 302691, 302772	+	+	+	+	+	+	+	+
MAFF 210373, 210381	+	—	—	—	—	+	+	+
MAFF 210396, 301765, 302676, 302677, 302678, 302680, 302682, 302683, 302685, 302688, 302694, 302696, 302751, 302752, 302753, 302754, 302770, 302771	—	—	—	—	—	+	+	+

a) Temperature cultured.

b) PCR was performed to amplify a portion of *cfl*²⁾, which encoded the enzyme responsible for amide bond formation between coronafacic acid and coronamic acid. Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA in two coronatine-producing pathovars of *Pseudomonas syringae*. Lane 1: *P. s.* pv. *atropurpurea* MAFF 301309 (pCOR 1). Lanes 2-12: *P. s.* pv. *glycinea*, 2: MAFF 302260, 3: MAFF 301683, 4: MAFF 302682, 5: MAFF 302677, 6: MAFF 302676, 7: MAFF 302694, 8: MAFF 302696, 9: MAFF 302751, 10: MAFF 210373, 11: MAFF 210381, 12: MAFF 210396.

部として、*cfl* 領域を報告している。それによると、コロナチンはコロナファシン酸とコロナミン酸との結合により合成され、*cfl* 領域はこの結合に関与しているとしている。そして、この *cfl* 領域は5つの病原型、*P. s.* pv. *atropurpurea*, *P. s.* pv. *glycinea*, *P. s.* pv. *maculicola*, *P. s.* pv. *morsprunorum*, *P. s.* pv. *tomato* のコロナチン産生能を持つ株のみが保有していることをPCR (Polymerase Chain Reaction)法を用いて明らかにした。また、Zhu ら¹⁶⁾ も *P. s.* pv. *maculicola* のコロナチン産生能を持つ株のみから同領域を検出している。供試細菌がこの領域を保有しているかどうかを調べるために、*cfl* 領域に特有な配列を増幅するプライマー (5'-GGCGCTCCCTCGCACTT-3', 5'-GGTATTGGCGGGGTGC-3')²⁾を用い、それぞれから抽出したプラスミドDNAをテンプレートとしてPCR法により調べた。反応は、ASTECH社のPROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM PC-700を使い、DNA変性94°C1分、アニーリング55°C2分、DNA伸長72°C3分を1サイクルとして、30サイクル行った。得られたPCR産物を1%アガロースゲル電気泳動により調査した。その

Fig. 3. PCR products amplified from *Pseudomonas syringae*. Lane 1: *P. s.* pv. *atropurpurea* MAFF 301309. Lanes 2-12: *P. s.* pv. *glycinea*, 2: MAFF 302260, 3: MAFF 301683, 4: MAFF 302682, 5: MAFF 302677, 6: MAFF 302676, 7: MAFF 302694, 8: MAFF 302696, 9: MAFF 302751, 10: MAFF 210373, 11: MAFF 210381, 12: MAFF 210396.

結果、対照の MAFF 301309 株で認められた *cfl* 領域に特異的な 0.65 kb の PCR 産物は、すべてのダイズ斑点細菌病菌において検出された (Fig. 3)。この PCR 産物を制限酵素 *Sma*I,あるいは *Cla*I で切断すると、共に Bereswill ら²⁾ の報告と同じ大きさの切断片が得られた。以上より、供試細菌のすべてがコロナチン産生遺伝子群の一部である *cfl* 領域を保有することは明らかである。

この *cfl* 領域の存在場所を調べる目的で、対照株 MAFF 301309 由来の 0.65 kb の PCR 産物をプローブとしてサザンハイブリダイゼーション¹¹⁾を行った。供試細菌のプラスミドを 0.9% アガロースゲル電気泳動により分画し、アルカリブロットング法¹⁰⁾により Hybond-N ナイロン膜 (アマシャム社) 上に転写した。プローブの標識とハイブリッドの検出は DNA ラベリング & デテクションキット DIG-ELISA (ベーリンガー・マンハイム社) を用いた。プローブの標識はランダムプライミング法⁴⁾により、ハイブリッドの検出は酵素免疫測定法で行った。その結果、標識した 0.65 kb の PCR 産物のプローブはダイズ斑点細菌病菌の全供試株の pCOR1 相当の大きさの最大プラスミドとだけ反応した。

以上の結果を要約すると Table 2 に示す通りとなる。ダイズ斑点細菌病菌においては、1) 供試細菌の全株が液体培地中でコロナチンを産生する能力を有する。2) 供試細菌の全株が pCOR1 相当の大きさのプラスミドを保有している。3) 供試細菌のもつプラスミド中に pCOR1 に存在する *cfl* 領域と同等の配列がある。4) 供試細菌は細菌体を直接ジャガイモに接種する方法では、コロナチンを産生してジャガイモに細胞肥大を起こす株と、コロナチンを産生せず細胞肥大を起こさない株とに分けられる。5) ジャガイモ塊茎上でのコロナチン産生の有無は、20~29°C の間では培養温度に影響されない。6) ダイズ (品種: 鶴の子) への噴霧接種で、供試細菌はハローを伴う病斑を形成する株とハローを伴わない病斑を形成する株とに分けられる。病斑におけるハローの有無と、4) で述べたジャガイモ細胞の肥大との関係を見ると、ハロー病斑を作りジャガイモ細胞を肥大させる 5 株、ハロー病斑を作りジャガイモ細胞を肥大させない 2 株、ハローのない病斑を作りジャガイモ細胞を肥大させない 18 株に分かれた。これとは別に、コロナチンを産生しない株^{2,5,14)}、コロナチン産生遺伝子を持たない株^{2,14)}が報告されているが、供試細菌にはそのような株はなかった。

この結果から、ダイズ斑点細菌病菌は、コロナチン産生遺伝子を有し、その一部は少なくともプラスミド上に存在する。そして、コロナチン産生遺伝子は、Woolley らの液体培地中ではいつでも発現するが、ジャガイモ塊茎上やダイズ葉中ではその発現を制御している系があるのではないかと推察される。

引用文献

1. Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
2. Bereswill, S., Bugert, P., Völksch, B., Ullrich, M., Bender, C.L. and 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.
3. Chamberlain, D.W. (1952). A halo-producing strain of *Pseudomonas glycinea*. *Phytopathology* 42: 299-300.
4. Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13.
5. Mitchell, R.E. (1982). Coronatine production by some phytopathogenic pseudomonads. *Physiol. Plant Pathol.* 20: 83-89.
6. Moffett, M.L. (1976). A halo-producing strain of *Pseudomonas glycinea* in Australia. *Rev. Plant Pathol.* 55: 968.
7. 西山幸司 (1981). ライグラス類かき枯病細菌における病原性関連物質に関する研究. *農技研報 C* 35: 1-55.
8. 西山幸司・畔上耕児・長田 茂・中曽根渡・江塚昭典・渡辺康正 (1986). ダイズ細菌病の種類と病原細菌の同定. *農環研報* 1: 83-94.
9. 西山幸司・Charchar, M.J.・飯塚典男 (1990). ブラジルのダイズ細菌病について. *日植病報* 56: 151 (講要).
10. Reed, K.C. and Mann, D.A. (1985). Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucleic Acids Res.* 13: 7201-7221.
11. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
12. Sato, M., Nishiyama, K. and Shirata, A. (1983). Involvement of plasmid DNA in the productivity of coronatine by *Pseudomonas syringae* pv. *atropurpurea*. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 49: 522-528.
13. Sinclair, J.B. and Backman, P.A. (1983). *Compendium of Soybean Disease*, 3rd ed., APS Press, Minnesota.
14. Ullrich, M., Bereswill, S., Völksch, B., Fritsche, W. and Geider, K. (1994). Molecular characterization of field isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* differing in coronatine production. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1927-1937.
15. Woolley, D.W., Pringle, R.B. and Braun, A.C. (1952). Isolation of the phytopathogenic toxin of *Pseudomonas tabaci*, an antagonist of methionine. *J. Biol. Chem.* 197: 409-417.
16. Zhu, Y., Tamura, K., Watanabe, M., Matsuda, I. and Sato, M. (1995). Plasmid-mediated coronatine production in *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 61: 569-574.

(平成 8 年 4 月 11 日受付; 平成 8 年 7 月 23 日受理)