

火傷病菌及び類縁細菌の系統解析と 検出方法に関する研究

松浦貴之*

目 次

緒言	7) 特異的プライマーによるPCR	20
I 火傷病菌, ナシ枝枯細菌病菌, <i>Erwinia</i>	2 結果及び考察	20
<i>pyrifoliae</i> の16S rRNA, <i>gyrB</i> , <i>rpoD</i> 遺伝	1) LB平板培地で分離された表生細菌	20
子の塩基配列に基づいた系統解析	2) M-MS平板培地で分離された表生細菌	22
1 材料と方法	3) <i>Pantoea</i> 属または <i>Erwinia</i> 属細菌と推定	
1) 供試菌株及び各菌株からのDNA抽出	された分離菌株の病原性及び簡易同定	
2) 16S rRNA, <i>gyrB</i> , <i>rpoD</i> 遺伝子のPCR	キット調査結果	25
及びシーケンス	4) LB及びM-MS平板培地で分離された菌	
3) 系統樹の作成	株の火傷病菌特異的プライマーによる	
2 結果及び考察	PCRの結果	25
1) 16S rRNA, <i>gyrB</i> , <i>rpoD</i> 遺伝子及び	IV 直接的PCRによる罹病植物からの火傷	
3種類の遺伝子を連結した配列の	病菌の検出法	28
系統樹	1 材料と方法	29
2) 火傷病菌, ナシ枝枯細菌病菌,	1) 発光遺伝子標識された火傷病菌を接種	
<i>E. pyrifoliae</i> の分子系統学的関係	した植物体における発病と発光の経時	
II グループ1, 2検出・識別用特異的プライ	的調査	29
マーの作製とその特異性の調査	2) 発光遺伝子標識された火傷病菌を接種	
1 材料と方法	した植物体からの火傷病菌の分離と直	
1) 供試菌株	接的PCRによる検出	29
2) プライマー特異性調査	3) 野生火傷病菌を接種した植物体からの	
3) 検出限界調査	火傷病菌の分離と直接的PCRによる	
2 結果及び考察	検出	30
1) EarpoD, EprpoDプライマーセットの	2 結果及び考察	
設計及びその特異性	1) 発光遺伝子標識された火傷病菌を接種	
2) EarpoD, EprpoDプライマーの検出	した植物体における発光と発病	30
限界	2) 発光遺伝子標識された火傷病菌を接種	
III ニホンナシ花器表生菌の調査	した植物体からの火傷病菌の分離と直	
1 材料と方法	接的PCRによる検出	31
1) 供試したニホンナシ花器	3) 野生火傷病菌を接種した植物体からの	
2) ニホンナシ花器からの表生菌の分離	火傷病菌の分離と直接的PCRによる	
3) PCR用の鋳型の調製	検出	33
4) 16S rRNA遺伝子の部分塩基配列に基	V 総合考察	34
づいた属の推定	摘要	37
5) 病原性試験	引用文献	38
6) API20NE及びAPI20E簡易同定キット	Summary	43
を用いたプロフィールインデックス		
調査		

緒 言

火傷病は火傷病菌(*Erwinia amylovora*)によって引き起こされるナシ、リンゴの最も重要な病害の1つである。火傷病の病徴は1793年に初めて報告された。その報告によると1780年代からアメリカのハドソン川流域で発生しているとされている。その原因については、害虫(キクイムシ)説、樹液が凍結することによる障害説、糸状菌説等様々な説が報告されていたが、どれも決定的なものではなかった。その後、1880年前後にBurrillにより、罹病樹から細菌が分離され、それを用いてセイヨウナシで病徴が再現されたことにより、火傷病は細菌病であることが明らかになった。分離された細菌は*Micrococcus*

*amylovorus*と名付けられたが(Van der Zwet and Keil⁽⁷⁰⁾), 1920年, Winslowら⁽⁷³⁾によって*Erwinia*属が確立され、*Erwinia amylovora*と命名された。

1780年代に、北米大陸の東側で確認された火傷病は、その後次第に発生地域を西部に拡大し、1900年代前半までにはアメリカ全土に広がった。さらに、カナダでも1840年以前からこの病気が確認され、1924年には、カナダのリンゴ・ナシ栽培地全域に分布することが確認されている。また、1919年にはニュージーランドで、1957年にはイギリスで、1964年にはエジプトで発生が報告されている。火傷病は現在もヨーロッパ地域、中東地域で分布を拡大しており、現在の発生地域は図1のとおりである(OEPP/EPPO 2007⁽⁵²⁾)。

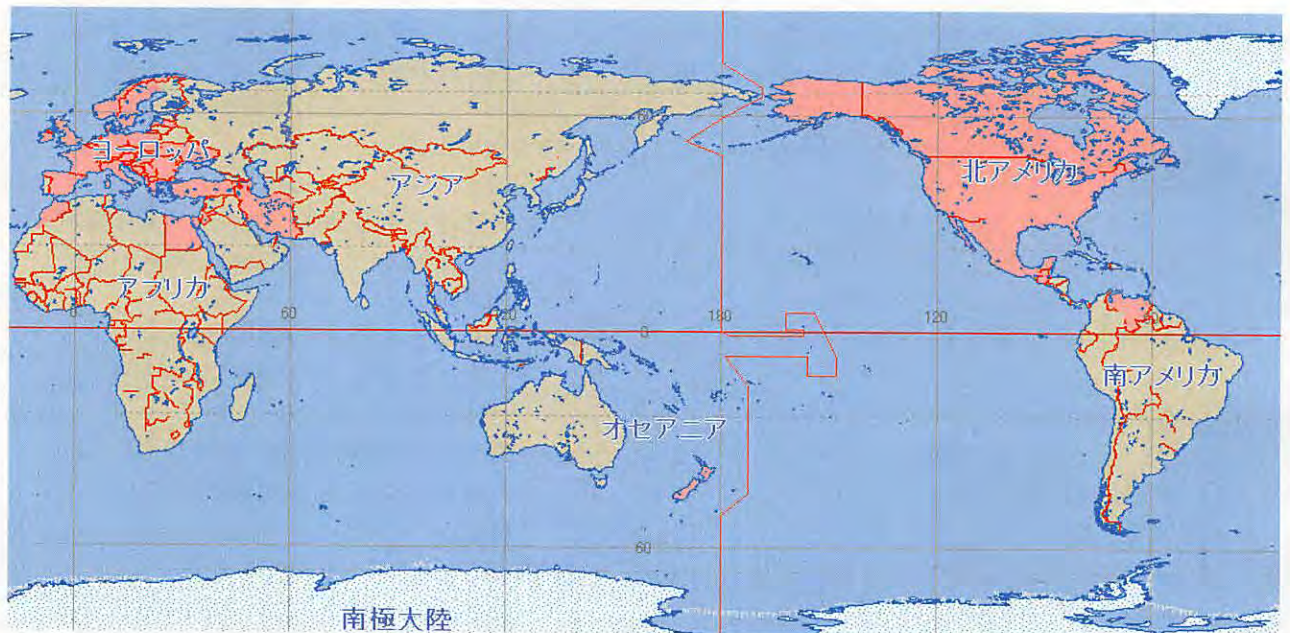


図1 火傷病菌発生国(*Erwinia amylovora* Distribution map Edition 8(2007)⁽⁵²⁾の情報をもとに作成) 薄桃色に塗られた国々で火傷病の発生が報告されている

日本国内においても1900年代前半に火傷病の発生報告がある(卜蔵⁽⁹⁾, 上田⁽⁶⁹⁾)が、現在はナシ、リンゴ生産地域において、火傷病は発生していない。これらの報告について水野ら⁽⁴³⁾は、日本における火傷病の発生報告及び海外における火傷病菌の侵入、定着、まん延の報告に関して詳細に検討し、「日本での火傷病菌によるナシ、リンゴの病害の発生報告は、リンゴ腐らん病やナシ胴枯病の誤同定である可能性が高い」と結論づけている。一方、北海道では、1980年代に火傷病に類似したナシ枝枯細菌病が報告され

ている(谷井ら⁽⁶⁵⁾)。この病原細菌は、チュウゴクナシから分離され、細菌学的性質が火傷病菌ときわめてよく似ていたが、その病原性が火傷病菌とは異なり、ナシのみに限定されたため、谷井らは*E. amylovora* pv. *pyri*を提案した(谷井⁽⁶⁶⁾)。しかし、この名前は認められなかった(Youngら⁽⁷⁹⁾)。その後、Mizunoら⁽⁴⁰⁾は火傷病菌、ナシ枝枯細菌病菌、また、*E. amylovora*に近縁の*E. mallotivora*等を用いて細菌学的性質の調査及びDNA-DNAハイブリダイゼーション試験を行い、ナシ枝枯細菌病菌は*E.*

amylovora の中の 1 つの biovar(*E. amylovora* biovar 4)であるとし、火傷病菌とは異なる細菌であるとした。なお、ナシ枝枯細菌病は1999年までに植物防疫法に基づく緊急防除が行われ、それ以降、現在に至るまで本病が再発したという報告はない。

さらに、韓国においてはニホンナシに壊死(えそ)を引き起こす *Erwinia* 属菌が分離され、火傷病菌との DNA-DNA ハイブリダイゼーション試験、16S-23S rDNA の塩基配列等の違いにより新しい病原菌として *E. pyrifoliae* と名付けられた (Kim ら⁽²²⁾, Rhim ら⁽⁵⁴⁾)。

かつて国内で発生したナシ枝枯細菌病菌と火傷病菌、*E. pyrifoliae* との関係については、菌体外多糖質合成酵素の遺伝子解析 (Kim ら⁽²³⁾) や *groEL* 遺伝子の解析 (Maxson-Stein ら⁽³⁷⁾) から「ナシ枝枯細菌病菌は、火傷病菌より *E. pyrifoliae* に近縁である」ことが示されている。

本研究では、火傷病菌、ナシ枝枯細菌病菌、*E. pyrifoliae* の系統関係を明らかにするために系統樹の作成を試みた。種間の系統解析によく用いられる *gyrB* 遺伝子及び *rpoD* 遺伝子の部分塩基配列を決定し系統樹を作成したところ、火傷病菌のグループとナシ枝枯細菌病菌・*E. pyrifoliae* グループの2つに分かれ、既存の報告を支持する結果となった。さらに、各グループの *rpoD* 遺伝子の特異的な塩基配列からプライマーを設計し、火傷病菌71菌株、ナシ枝枯細菌病菌14菌株、*E. pyrifoliae* 3菌株を用いてその特異性を調査したところ、それぞれのプライマーは目的とするグループの菌株のDNA断片を特異的に増幅した。

火傷病菌、ナシ枝枯細菌病菌、*E. pyrifoliae* によるナシ、リンゴ樹の病害は、現在のところ国内で発生が確認されていない。しかし、近年の物流及び人の活動は国際的に行われており、旅行者等による火傷病菌宿主植物の穂木、苗木等の不正持ち込み等に

よる火傷病菌、*E. pyrifoliae* の侵入リスクは常に存在する。また、現在発生が確認されていないナシ枝枯細菌病についても、再発する可能性は否定できない。

そこで本研究では、万が一火傷病が国内に発生した場合に利用できる検出法に関して検討を行った。まず、火傷病菌の伝搬に大きな役割を果たす花器における細菌相を明らかにし、338菌株の表生細菌について、各種同定手法において擬陽性となる細菌が存在するか否かの調査を行った。その結果、ニホンナシ花器表生菌において、擬陽性となる細菌は存在しなかった。さらに、上記で新たに開発したプライマーについて、これら表生細菌のPCRを行い、非特異反応が出ないPCR条件を確立した。

さらに、実際に火傷病罹病樹からの直接的なPCR法によって火傷病菌を検出する手法の検討及び供試する試料の採取部位を明らかにした。

本論文を取りまとめるにあたり、東京農業大学農学部教授陶山一雄博士、同学部准教授根岸寛光博士、農業環境研究所生物生体機能研究領域長對馬誠也博士、農業・食品技術総合研究機構 中央農業総合研究センター病害虫検出同定法研究チーム長畔上耕児博士の懇切なご指導とご校閲を賜った。本研究の遂行に際しては、横浜植物防疫所水野明文博士、農業生物資源研究所澤田宏之博士、中央農業総合研究センター井上康宏博士、東京農業大学農学部准教授篠原弘亮博士、農業環境技術研究所吉田重信博士、果樹研究所佐々木厚子博士から温かいご支援を賜った。また、横浜植物防疫所調査研究部病菌担当の方々からは貴重な試験材料を提供していただいた。また、中央農業総合研究センター研究管理監高橋賢司博士を始め旧病害防除部の方々、横浜植物防疫所佐藤成良氏を始め植物防疫所の方々から温かいご指導とご支援を賜った。ここに深く感謝の意を表する。

I 火傷病菌、ナシ枝枯細菌病菌、*Erwinia pyrifoliae* の16S rRNA, *gyrB*, *rpoD* 遺伝子の塩基配列に基づいた系統解析

火傷病菌、ナシ枝枯細菌病菌、*E. pyrifoliae* の3種類の細菌群は、その細菌学的性質が他の“*amylovora*”グループ(*E. mallotivora*, *E. tracheiphila*等)と極めて似通っており、16S rRNA

遺伝子の塩基配列においても99%以上の相同性を示すことが知られている。Mizuno ら⁽⁴⁰⁾ は火傷病菌とナシ枝枯細菌病菌のDNA-DNAハイブリダイゼーション試験を行い、その値が55-81%という結果を得た

ことと細菌学的性質が異なることから、ナシ枝枯細菌病菌は種としては *E. amylovora* とした上で、種以下の分類グループである biovar を採用し、biovar 4 とした。一方、Kim ら⁽²²⁾ は火傷病菌とニホンナシにえそを引き起こす細菌について同様の試験を行い、その値が 40-50% という結果を得たことから、ニホンナシえそ症状の病原細菌は火傷病菌とは異なる種とするのが妥当と考え、*E. pyrifoliae* と命名した。

DNA-DNA ハイブリダイゼーションは、細菌の種の分類に有効な手法であり、“Bergey's Manual of Systematic Bacteriology” でも種の決定において重要視されている。一方で、この手法は完全な手法ではなく、ある分離細菌を別種とするか同種とするかの境界線、すなわち相同値 70% 付近の結果が出た場合には、経験的に個々の研究者が、その他の試験結果と合わせて同種とするか、別種とするかを判断することになっている。

16S rRNA 遺伝子は原核生物に普遍的に存在する保存性の高い核酸分子であり、微生物の進化系統の研究に最も有効な分子マーカーとして使われている (Woese⁽⁷⁴⁾, Ludwig ら⁽³³⁾)。しかし、DNA-DNA ハイブリダイゼーション試験の相同値が 70% 以上の菌株間の 16S rDNA の相同性は 99% 以上になることから、種の識別評価に用いるのには限界がある (Fox ら⁽¹⁵⁾, Stackebrandt and Goebel⁽⁶²⁾)。近年、細菌の種間の類縁関係を解析するためにいくつかの特定遺伝子の配列が用いられている。それらの遺伝子に求められることは、1. プラスミド DNA のように水平移動しない遺伝子であること、2. 進化速度が 16S rRNA 遺伝子より速いこと、3. 細胞が普遍的にもっていること、があげられる。これらの条件を満たす遺伝子のうち、本研究では、*gyrB* 遺伝子と *rpoD* 遺伝子を選択した。

gyrB 遺伝子は DNA ジャイレース (II 型のトポイソメラーゼ) のサブユニット B タンパク質をコードしている遺伝子である。DNA ジャイレースは DNA の複製等において必要ならせん構造のねじれを解消するための酵素である (Watt and Hickson⁽⁷²⁾)。また、*rpoD* 遺伝子は RNA ポリメラーゼ酵素のシグマ因子の 1 つで、一般的に働く σ^{70} をコードしている遺伝子である。 σ^{70} は転写開始部位の選択を行う (Lonetto ら⁽³²⁾)。両タンパク質とも細菌細胞内の至る所に存在し、細胞の生存に必須である。これら

の遺伝子の水平移動は、rRNA 遺伝子と同じくらいまれであると考えられる。また、タンパク質をコードしている遺伝子は rRNA 遺伝子より進化スピードが速いという報告がある (Ochman and Wilson⁽⁵¹⁾)。また、現在までこの 2 種の遺伝子を用いた種間における様々な細菌の系統解析が行われている (Holmes ら⁽¹⁹⁾, Le Roux ら⁽²⁷⁾, Sawada ら⁽⁶¹⁾, Yamamoto ら⁽⁷⁷⁾, Yanez ら⁽⁷⁸⁾)。

そこで、火傷病菌、ナシ枝枯細菌病菌、*E. pyrifoliae* の 16S rRNA, *gyrB*, *rpoD* 遺伝子の部分塩基配列を決定し、分子系統解析を行った。

1 材料と方法

1) 供試菌株及び各菌株からの DNA 抽出

火傷病菌 28 菌株、ナシ枝枯細菌病菌 9 菌株、*E. pyrifoliae* 2 菌株の計 39 菌株のバラ科植物からの *Erwinia* 属病原細菌に加えて、軟腐病菌 (*E. carotovora* subsp. *carotovora*)、アカメガシワ斑点細菌病菌 (*E. mallotivora*)、大腸菌 (*Escherichia coli*) を供試した (表 1)。それぞれの菌株は Potato peptone glucose agar (PPGA) (西山・江塚⁽⁴⁹⁾) にて 27°C、3 日間培養し、DNA の抽出は ISOPLANT II (NIPPON GENE, Japan) にて行った。

2) 16S rRNA, *gyrB*, *rpoD* 遺伝子の PCR 及びシーケンス

16S rRNA 遺伝子の PCR は Marachesi ら⁽³⁵⁾ によって設計されたプライマー 63f (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') と 1387r (5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3') を用いた。PCR は、TaKaRa Ex Taq (TAKARA, Japan) と TaKaRa PCR Thermal Cycler MP (TAKARA, Japan) を用いて Marachesi ら⁽³⁵⁾ の方法に準じて行った。PCR 反応液 (TaKaRa Ex Taq 0.5U, dNTP 200 μ M, 1 $\times$ PCR buffer, 各プライマー 0.25 μ M) に抽出した DNA の 1 μ l を鋳型として添加し、総量を 20 μ l とした。反応条件は 95°C 1 分、55°C 1 分、72°C 1.5 分を 30 サイクル繰り返し、最後に 72°C 10 分とした。

gyrB 遺伝子の PCR は Yamamoto ら⁽⁷⁵⁾ によって設計されたプライマー UP-1 (5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYGA-3') と UP-2r (5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCNACRTCNCGRTCNCGTCAT-3') を用いた (ア

表 1 系統樹作成に用いた供試菌株

種名	供試菌株番号	菌株名	分離宿主	分離国	分離年
<i>Erwinia amylovora</i> biovar 1	Ea bv1-1	NCPPB 311	<i>Pyrus communis</i>	カナダ	1952
<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	Ea bv2-1	NCPPB 683 ^T	<i>Pyrus communis</i>	イギリス	1959
	Ea bv2-2	NCPPB 771	<i>Cotoneaster melanocarpus</i>	イギリス	1959
	Ea bv2-3	NCPPB 1734	<i>Pyrus communis</i>	エジプト	1965
	Ea bv2-4	NCPPB 1951	<i>Pyrus communis</i>	オランダ	1966
	Ea bv2-5	NCPPB 1952	<i>Crataegus</i> sp.	オランダ	1966
	Ea bv2-6	NCPPB 2135	<i>Pyrus communis</i>	ポーランド	1968
	Ea bv2-7	NCPPB 2213	<i>Malus sylvestris</i>	デンマーク	1968
	Ea bv2-8	LMG1933	<i>Cotoneaster buxifolius</i>	ベルギー	1980
	Ea bv2-9	LMG1917	<i>Crataegus monogyna</i>	ベルギー	1980
	Ea bv2-10	NCPPB 2083	<i>Malus sylvestris</i>	ニュージーランド	1963
	Ea bv2-11	NCPPB 831	<i>Malus sylvestris</i>	イギリス	1960
	Ea bv2-12	LMG1968	<i>Mespilus germanica</i>	フランス	1980
	Ea bv2-13	LMG1985	<i>Pyracantha</i> sp.	フランス	1980
	Ea bv2-14	ICMP 4245	<i>Pyrus communis</i>	アメリカ	1975
	Ea bv2-15	ICMP 4450	<i>Pyrus communis</i>	ニュージーランド	1975
	Ea bv2-16	NCPPB770	<i>Pyrus communis</i>	イギリス	1959
	Ea bv2-17	88-125 ^a	<i>Pyrus communis</i>	アメリカ	1988
	Ea bv2-18	LNPV-UB 0,49 ^b	<i>Photinia</i> sp.	フランス	1993
	Ea bv2-19	LNPV-UB 1,36 ^b	<i>Pyrus communis</i>	フランス	1992
	Ea bv2-20	LNPV-UB 1,39 ^b	<i>Malus sylvestris</i>	フランス	1992
	Ea bv2-21	LNPV-UB 2,18 ^b	<i>Cotoneaster lacteus</i>	フランス	1993
	Ea bv2-22	LNPV-UB 6,15 ^b	<i>Pyrus pyrifolia</i>	フランス	1992
	Ea bv2-23	LNPV-UB 6,67 ^b	<i>Crataegus monogyna</i>	フランス	1991
	Ea bv2-24	88-38 ^a	<i>Malus sylvestris</i>	アメリカ	1988
<i>Erwinia amylovora</i> biovar 3	Ea bv3-1	NCPPB 2291	<i>Rubus idaeus</i>	アメリカ	1949
	Ea bv3-2	NCPPB 1859	<i>Rubus idaeus</i>	アメリカ	1949
	Ea bv3-3	NCPPB 2293	<i>Rubus idaeus</i>	アメリカ	1949
<i>Erwinia amylovora</i> biovar 4	Ea bv4-1	Ea 9471 ^c	<i>Pyrus ussuriensis</i> (Mishirazu)	日本、北海道	1994
	Ea bv4-2	Ea 9577 ^c	<i>Pyrus communis</i> var. <i>sativa</i> (Brandywine)	日本、北海道	1995
	Ea bv4-3	YPPS 173	<i>Pyrus ussuriensis</i> (Mishirazu)	日本、北海道	1995
	Ea bv4-4	YPPS 175	<i>Pyrus ussuriensis</i> (Mishirazu)	日本、北海道	1995
	Ea bv4-5	YPPS 185	<i>Pyrus ussuriensis</i> (Mishirazu)	日本、北海道	1995
	Ea bv4-6	YPPS 200	<i>Pyrus ussuriensis</i> (Mishirazu)	日本、北海道	1996
	Ea bv4-7	YPPS 204	<i>Pyrus communis</i> var. <i>sativa</i> (Brandywine)	日本、北海道	1996
	Ea bv4-8	YPPS 206	<i>Pyrus communis</i> var. <i>sativa</i> (Brandywine)	日本、北海道	1996
	Ea bv4-9	YPPS 210	<i>Pyrus ussuriensis</i> (Mishirazu)	日本、北海道	1996
<i>Erwinia pyrifoliae</i>	Ep1	DSM12163 ^T	<i>Pyrus pyrifolia</i>	韓国	1996
	Ep2	DSM12394	<i>Pyrus pyrifolia</i>	韓国	1997
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	Ecar	ATCC 15713 ^T	<i>Solanum tuberosum</i>	デンマーク	1952
<i>Erwinia mallotivora</i>	Em	ATCC 29573 ^T	<i>Mallotus japonicus</i>	日本	1975
<i>Escherichia coli</i>	Ecoli	JCM 1649 ^T	Urine		

NCPPB: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, UK; LMG: Laboratory of Microbiology, Gent, Belgium; ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants, New Zealand; YPPS: Yokohama Plant Protection Station; DSM: DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; JCM: Japan Collection of Microorganisms; T: Type strain

a R. G. Robert 博士より横浜植物防疫所へ分譲

b C. Audusseau 博士より横浜植物防疫所へ分譲

c 谷井博士より横浜植物防疫所へ分譲

ンダーライン部分はシーケンスプライマーを示す). PCRは, TaKaRa Premix Taq (TAKARA, Japan), TaKaRa Ex Taq (TAKARA, Japan)とTaKaRa PCR Thermal Cycler MP (TAKARA, Japan), GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer, USA)を用いてYamamotoら⁽⁷⁵⁾の方法に準じて行った. PCR反応液(Premix Taq 25 μ l, TaKaRa Ex Taq 1.25U, 各プライマー1 μ M)に抽出したDNAの1 μ lを鋳型として添加し, 総量を50 μ lとした. 反応条件は94 $^{\circ}$ C1分, 55 $^{\circ}$ C1分, 72 $^{\circ}$ C2分を30サイクル繰り返し行った.

*rpoD*遺伝子のPCRはYamamotoら⁽⁷⁶⁾によって設計されたプライマー70F (5'-ACGACTGACCCGGTACGCATGTAYATGMGNGARATGGGNACNGT-3')と 70R (5'-ATAGAAATAACCAGACGTAAGTTNGCYTCNACCATYTCYTTYTT-3')を用いた(アンダーライン部分はシーケンスプライマーを示す). PCRは, TaKaRa Premix Taq (TAKARA, Japan), TaKaRa Ex Taq (TAKARA, Japan)とTaKaRa PCR Thermal Cycler MP (TAKARA, Japan), GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer, USA)を用いてYamamotoら⁽⁷⁶⁾の方法に準じて行った. PCR反応液(Premix Taq 25 μ l, TaKaRa Ex Taq 1.25U, 各プライマー1 μ M)に抽出したDNAの1 μ lを鋳型として添加し, 総量を50 μ lとした. 反応条件は94 $^{\circ}$ C1分, 59 $^{\circ}$ C45秒, 72 $^{\circ}$ C2分を30サイクル繰り返し行った.

得られたPCR産物はQIA quick (Qiagen, Germany)を用いて精製し, ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit及びABI PRISM 3100 DNA sequencerを用いて直接シーケンスを行った. シーケンスプライマーは16S rRNA遺伝子ではPCRに用いたものと同じものを用い, *gyrB*, *rpoD*遺伝子については, 上述のPCRプライマーにおいてアンダーラインで示したものを用いた.

なお, Ea bv4-4とEa bv4-5の2菌株の*gyrB*遺伝子については, 直接シーケンスがうまくいかなかったため, PCR産物をTOPO TA cloning kit (Invitrogen, USA)を用いてクローニングをした後, シーケンスを行った.

3) 系統樹の作成

得られた16S rRNA, *gyrB*, *rpoD*遺伝子の部分塩

基配列はGENETYX-WIN/ATSQ (GENETYX, Japan)を用いてアッセンブルを行い, 供試した全ての菌株を遺伝子ごとにClustal X version 1.81 (Tompson ら⁽⁶⁸⁾)を用いて整列させた後, Se-Alv2.0(Sequence alignment editor. Andrew Rambaut Freeware)を用いて各遺伝子の大きさを統一した. また, *gyrB*, *rpoD*遺伝子の塩基配列は, アミノ酸になることを考慮してコドン単位で整列しているかどうかを確認し, 必要な修正を行った.

系統樹はPAUP* version 4.0 Beta (Sinauer, Sunderland, MA)を用いて近隣結合法 (neighbor-joining method: NJ法) (Saitou and Nei⁽⁶⁸⁾)にて作成した. 進化距離はHKY85 (Hasegawa ら⁽¹⁷⁾)で計算した. また, 得られた系統樹の信頼性は, ブートストラップ法 (Felsenstein⁽¹⁴⁾)を用いて行い, 1000回繰り返し行った.

2 結果及び考察

1) 16S rRNA, *gyrB*, *rpoD*遺伝子及び3種類の遺伝子を連結した配列の系統樹

供試した42菌株の16S rRNA, *gyrB*, *rpoD*遺伝子の部分塩基配列を決定した (Matsuura ら⁽³⁶⁾). 16S rRNA遺伝子は1,110bpの長さの塩基配列を決定し, *gyrB*遺伝子は大腸菌K-12菌株の403~1401番目の塩基に該当する長さの塩基配列を決定し, *rpoD*は大腸菌K-12菌株の366~1041番目の塩基に該当する長さの塩基配列を決定した. これらの配列データは日本DNAデータバンクに寄託した (表2).

各遺伝子の配列ごと及び3種の遺伝子を連結した配列で系統樹を作成した (図2). 16S rRNA遺伝子の系統樹 (図2-A) は3つのグループに分かれた. それぞれのグループはグループ1: 火傷病菌, グループ2: ナシ枝枯細菌病菌, グループ3: *E. pyrifoliae*となったが, グループ1とグループ2のブートストラップ値がそれぞれ71.0%, 61.0%と低く, 形成された樹においても各グループの分岐が3本にわたることから, この系統樹の信頼性は低いと判断された. *gyrB*及び*rpoD*遺伝子の系統樹 (図2-B, C) は, 2つのグループに分かれた. グループ1は火傷病菌, グループ2はナシ枝枯細菌病菌及び*E. pyrifoliae*を含んでいた. グループ1とグループ2のブートストラップ値は, 99.0~100.0%と非常に高く, 十分に信頼性が高い系統樹と判断された. また, 16S

rRNA, *gyrB*, *rpoD*遺伝子を連結し、系統樹を作成したところ、*gyrB*, *rpoD*遺伝子の系統樹と同じ形の系統樹が作成された。このことから火傷病菌、ナシ枝枯細菌病菌、*E. pyrifoliae*は、分子進化的には、3つのグループに分かれるのではなく、2つのグループに分かれることが強く示唆された。

表2 配列を決定した遺伝子のアクセッションナンバー

供試菌株番号	菌株名	DDBJ accession no. ^a		
		16S rRNA	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>
Ea bv1-1	NCPPB 311	AB242876	AB242881	AB242886
Ea bv2-1	NCPPB 683 ^T	AB242877	AB242881	AB242886
Ea bv2-2	NCPPB 771	AB242890	AB242881	AB242919
Ea bv2-3	NCPPB 1734	AB242891	AB242881	AB242886
Ea bv2-4	NCPPB 1951	AB242892	AB242881	AB242886
Ea bv2-5	NCPPB 1952	AB242877	AB242881	AB242886
Ea bv2-6	NCPPB 2135	AB242890	AB242882	AB242886
Ea bv2-7	NCPPB 2213	AB242893	AB242881	AB242886
Ea bv2-8	LMG1933	AB242894	AB242881	AB242886
Ea bv2-9	LMG1917	AB242895	AB242881	AB242886
Ea bv2-10	NCPPB 2083	AB242877	AB242881	AB242886
Ea bv2-11	NCPPB 831	AB242877	AB242881	AB242886
Ea bv2-12	LMG1968	AB242894	AB242881	AB242886
Ea bv2-13	LMG1985	AB242896	AB242881	AB242886
Ea bv2-14	ICMP 4245	AB242897	AB242881	AB242886
Ea bv2-15	ICMP 4450	AB242890	AB242881	AB242886
Ea bv2-16	NCPPB770	AB242877	AB242881	AB242886
Ea bv2-17	88-125	AB242898	AB242881	AB242919
Ea bv2-18	LNPV-UB 0.49	AB242899	AB242881	AB242886
Ea bv2-19	LNPV-UB 1.36	AB242900	AB242881	AB242886
Ea bv2-20	LNPV-UB 1.39	AB242890	AB242881	AB242886
Ea bv2-21	LNPV-UB 2.18	AB242901	AB242881	AB242886
Ea bv2-22	LNPV-UB 6.15	AB242902	AB242881	AB242886
Ea bv2-23	LNPV-UB 6.67	AB242890	AB242881	AB242886
Ea bv2-24	88-38	AB242897	AB242881	AB242920
Ea bv3-1	NCPPB 2291	AB242878	AB242883	AB242887
Ea bv3-2	NCPPB 1859	AB242878	AB242883	AB242887
Ea bv3-3	NCPPB 2293	AB242878	AB242883	AB242887
Ea bv4-1	Ea9471	AB242879	AB242884	AB242888
Ea bv4-2	Ea9577	AB242903	AB242911	AB242921
Ea bv4-3	YPPS173	AB242903	AB242884	AB242888
Ea bv4-4	YPPS175	AB242904	AB242912	AB242888
Ea bv4-5	YPPS185	AB242879	AB242884	AB242922
Ea bv4-6	YPPS200	AB242905	AB242913	AB242889
Ea bv4-7	YPPS204	AB242906	AB242914	AB242889
Ea bv4-8	YPPS206	AB242879	AB242884	AB242888
Ea bv4-9	YPPS210	AB242879	AB242915	AB242888
Ep1	DSM12163 ^T	AB242880	AB242885	AB242889
Ep2	DSM12394	AB242907	AB242885	AB242889
Ecar	MAFF 302159 ^T	AB242908	AB242916	AB242923
Em	MAFF 302175 ^T	AB242909	AB242917	AB242924
Ecoli	JCM 1649 ^T	AB242910	AB242918	AB242925

a 同じ配列は1つのアクセッションナンバーで示している

それぞれの供試菌株番号は、表1の供試菌株番号に対応する

グループ1を形成した火傷病菌は、3つのbiovarを含んでいた。bv. 1はカナダで分離された1菌株、bv. 2はtype strainを含む大部分の火傷病菌、bv. 3は、キイチゴにのみ病原性を示すいわゆるキイチゴ分離菌株と呼ばれている火傷病菌である。今回作成された系統樹において、bv. 1とbv. 2の違いは得られなかった。また、供試した25菌株のbv. 1, 2は、*gyrB*, *rpoD*遺伝子ともにほとんど同じ配列であった(表3, 4)。一方で、bv. 3は、分岐が確認され、その時のブートストラップ値も99.0~100.0%と高かった。このことは、*gyrB*, *rpoD*遺伝子では、宿主範囲が異なる菌株については、分子進化的に異なることを示した。しかし、今回供試した3菌株のbv. 3は、全て1949年にFolsonによって分離されたものであり、bv. 3の分子進化的な違いが信頼できるものであるか否かについては、由来が異なるbv. 3を用いて更なる調査を行い、同様の系統樹が作成されるかを調べる必要がある。

グループ2を形成したナシ枝枯細菌病菌と*E. pyrifoliae*は、ともに細菌学的性質や同じ宿主における病徴等が火傷病菌とよく似ている菌であるが、今回作成された系統樹において、火傷病菌と同じグループには入らず、独自のグループを形成した。特に*gyrB*遺伝子、*rpoD*遺伝子、3つの遺伝子配列を連結した系統樹(図2・B, C, D)において、100.0%と高いブートストラップ値を示したことから、分子進化において、これらが同じグループに属する1つの集団を形成することが示唆された。さらに、*gyrB*遺伝子、3つの遺伝子配列を連結した系統樹(図2・B, D)において、供試したナシ枝枯細菌病菌のうち、Ea bv4-2, Ea bv4-6, Ea bv4-7の3菌株は低いブートストラップ値(それぞれ65.0%, 57.0%)を示しながらも*E. pyrifoliae*と同じグループを作った。また、*rpoD*遺伝子の系統樹においても、グループは形成されなかったが、それ以外のナシ枝枯細菌病菌とは異なる位置に存在した。この3菌株の分離された年、分離された宿主に統一性はなく、Mizunoら⁽⁴⁰⁾が調査した詳細な細菌学的性質においても3菌株のみに共通した項目は見あたらなかった。これらのことは、今回作成された系統樹においてナシ枝枯細菌病菌と*E. pyrifoliae*が1つのグループを形成しながらも、そのグループ内の各菌株は、それぞれわずかに異なっていることが示唆された。

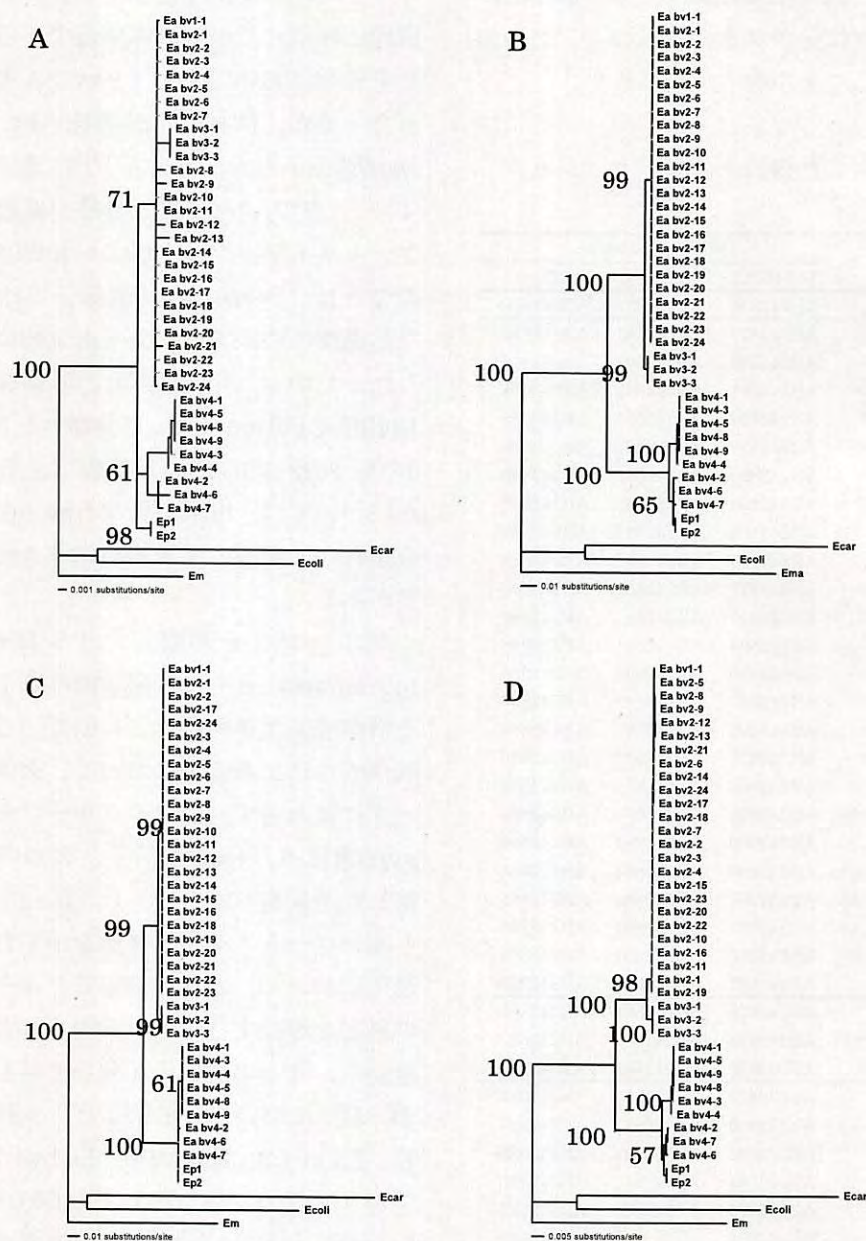


図2 近隣結合法で推定された 16S rRNA 遺伝子(A)、*gyrB* 遺伝子(B)、*rpoD* 遺伝子(C)、3種の遺伝子を連結した配列(D)の系統樹
進化距離は HKY85 (Hasegawa ら⁽¹⁷⁾) にて計算した。数字はブートストラップ値(1000 回反復)を示している Bar は進化距離尺度を示す

2) 火傷病菌, ナシ枝枯細菌病菌,

*E. pyrifoliae*の分子系統学的関係

火傷病菌, ナシ枝枯細菌病菌及び*E. pyrifoliae*は, *gyrB*, *rpoD*遺伝子, さらに16S rRNA遺伝子を含めた3種類の遺伝子を連結した配列の系統樹ではつきりと2つのグループに分かれ, それらは高いブートストラップ値を示したことから, 分子系統学的に違うグループであることは十分信頼できると考えられた. Mizunoら⁽⁴⁰⁾は火傷病菌とナシ枝枯細菌病菌の分類学的関係について細菌学的性質の調査とDNA-DNAハイブリダイゼーションを行い, 4つのbiovarに分類し, ナシ枝枯細菌病菌をbv. 4と分類した. その後, さらに血清学的な調査を行い, これら4つのbiovarは3つの血清型 (bv.1と2, bv. 3, bv. 4)に分かれることを明らかにした (Mizuno ら⁽⁴¹⁾). 一方で*E. pyrifoliae*は, DNA-DNAハイブリダイゼーションの結果や, 16-23S rRNA intergenic transcribed spacer (its)領域の遺伝子解析, Biotype 100 strips (bioMerieux France)を用いた細菌学的性質調査から火傷病菌と近縁であるが, 異なる種として提案されている (Kim ら⁽²²⁾). 今回の系統樹の結果からは, bv. 4と*E. pyrifoliae*が同じグループを形成したことから, 分子系統学的には, bv. 4は, 火

傷病菌より*E. pyrifoliae*により近縁であることが示唆された. これは, 今まで報告されている他の遺伝子の分子系統解析, exopolysaccharide synthesis gene (Kim ら⁽²³⁾), AFLP markers, *groEL* (Maxson-Stein ら⁽³⁷⁾), *hrpN* genes (Jock and Geider⁽²⁰⁾)の調査結果とも一致する. しかし, ナシ枝枯細菌病菌の分類学的位置づけは, 火傷病菌や*E. pyrifoliae*とのDNA-DNAハイブリダイゼーション試験, 細菌学的性質の比較, 脂肪酸解析などを広範に行い, 定める必要がある.

グループ1に含まれる火傷病菌のbv. 1, 2の*gyrB*, *rpoD*遺伝子の塩基配列はほとんど同一であったのと対照的に, グループ2に含まれるナシ枝枯細菌病菌は菌株間でわずかに配列が異なっていた (表3, 表4). 供試したbv. 1と2は, 世界各地の菌株を用いており, 分離年度も宿主も異なる. 一方でナシ枝枯細菌病菌は, チュウゴクナシとセイヨウナシから, 北海道でのみ分離されており, 分離された年もほんの数年間に収まる (表1). このことは, ナシ亜科の火傷病菌が分子系統学的には, ほぼ単一の系統が広く世界に伝播したのに対して, ナシ枝枯細菌病菌は, ごく限られた地域に多様な系統が存在していることを示唆している.

表3 供試菌株間における $gyrB$ 遺伝子の部分塩基配列の相同性

[illegible]

Ⅱ グループ1, 2 検出・識別用特異的プライマーの作製とその特異性の調査

Iにおいて、火傷病菌とその類縁細菌は、火傷病菌を含むグループ1と、ナシ枝枯細菌病菌及び*E. pyrifoliae*を含むグループ2に分けられることを明らかにした。そこで次に、それらを迅速・正確に検出・識別する方法の開発を試みた。

特異的プライマーを用いたPCRは、細菌を検出、同定する上で強力なツールの1つである。しかし、単一の特異的プライマーによるPCRは、ごく一部の遺伝子についての結果を示しているに過ぎず、それのみで対象病原菌を特異的に検出するのは信頼性に欠ける。そのため、いくつかの特異的プライマーを組合わせて用いることが望ましいと考えられる。火傷病菌についても、現在まで様々な特異的プライマーが報告されている。

火傷病菌の特徴的な性質の1つとして、29kbのプラスミド(pEA29)を共通して持っていることが報告されていたことから(Flankenstein ら⁽¹³⁾, Laurent ら⁽²⁶⁾)、このプラスミドをターゲットとしていくつかの特異的プライマーが報告されている(Bereswill ら⁽⁶⁾, McManus and Jones⁽³⁸⁾, Llop ら⁽²⁹⁾)。しかし、Llop ら⁽³⁰⁾ (31)は、pEA29を持たない火傷病菌を自然界より分離し、上記の特異的プライマーでは、検出できないことを報告した。

一方で、ゲノムDNAからの特異的プライマーとしては、火傷病菌の菌体外多糖質(exopolysaccharide)であるamylovoranの合成に関与するams領域遺伝子から作製されたプライマー(Bereswill ら⁽⁷⁾)、ゲノムDNAの特異的領域から作製されたプライマー(Guilford ら⁽¹⁶⁾)、23S rRNA遺伝子より作製されたプライマー(Maes ら⁽³⁴⁾)がある。

また、*E. pyrifoliae*についても16S rRNA遺伝子とinternal transcribed spacer (ITS)領域から作製された特異的プライマー及び火傷病菌のams領域遺伝子と対応するcps領域遺伝子から作製された特異的プライマーがある(Kim ら⁽²⁴⁾)。また、cps領域遺伝子のプライマーはナシ枝枯細菌病菌にも特異的なバンドを増幅した(Kim ら⁽²³⁾)。

本研究では、*rpoD*遺伝子の分子系統解析において、火傷病菌、ナシ枝枯細菌病菌、*E. pyrifoliae*が2つのグループに分かれたことから、同遺伝子のグループ1(火傷病菌)、グループ2(ナシ枝枯細菌病菌、

E. pyrifoliae)のそれぞれ特異的な領域から新たなプライマーを作製し、その特異性について調査を行った。

1 材料と方法

1) 供試菌株

71菌株の火傷病菌、14菌株のナシ枝枯細菌病菌、3菌株の*E. pyrifoliae*の計88菌株のバラ科植物由来の*Erwinia*属病原細菌(表5)と“amylovora”グループ(Dye⁽¹²⁾)に属する*E. mallotivora* 3菌株、*E. nigrifluens* 2菌株、*E. quercina* 2菌株、*E. rubrifaciens* 2菌株、*E. salicis* 2菌株を供試した(表6)。それぞれの菌株はLuria-Bertaini (LB) agarにて27℃、3日間培養した。その後、各培養菌を滅菌蒸留水に懸濁(濃度約 10^{7-8} cfu/ml)し、アルミブロック高温槽DTU-1B(タイテック)を用いて98℃、5分間処理を行ったものを鋳型とした。

2) プライマー特異性調査

グループ1特異的プライマー、EarpoD2f (5'-G GCGCGTGAAAAGTTCAA-3'), EarpoD1r (5'-AG GCCGCGGTTTCACATCT-3')及び、グループ2特異的プライマー、EprpoD2f (5'-GGCGCGTGAGAAG TTCGG-3'), EprpoD1r (5'-AGGCCACGGTTCAC ATCG-3')を*rpoD*遺伝子の部分塩基配列より設計した。PCRは、TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (TaKaRa)とGeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer)あるいはGeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems)を用いて行い、PCR反応液(TaKaRa Ex Taq HS 0.5U, dNTP 200μM, 1×PCR buffer, 各プライマー 20 pmol)に上述した細菌懸濁液2.0μlを鋳型として添加し、総量を20μlとした。反応条件は94℃1分、65℃45秒、72℃1分を30サイクル繰り返した。PCR産物を2%のアガロースゲルで電気泳動した後、臭化エチジウムで染色し、塩基配列から予想される375bpのDNA断片の増幅の有無を紫外線照射下で確認した。

3) 検出限界調査

火傷病菌(NCPPB2083株)、ナシ枝枯細菌病菌(YPPS166株)、*E. pyrifoliae* (DSM12163株)を

表5-1 グループ特異的プライマーの特異性調査に用いた供試菌株1

No.	種名	菌株名	分離宿主	分離国	グループ
1	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 1	NCPB 311	<i>Pyrus communis</i>	カナダ	グループ1
2	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	NCPB 683 ^T	<i>Pyrus communis</i>	イギリス	グループ1
3	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	NCPB 771	<i>Cotoneaster melanocarpus</i>	イギリス	グループ1
4	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	NCPB 1734	<i>Pyrus communis</i>	エジプト	グループ1
5	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	NCPB 1951	<i>Pyrus communis</i>	オランダ	グループ1
6	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	NCPB 1952	<i>Crataegus</i> sp.	オランダ	グループ1
7	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	NCPB 2079	<i>Malus sylvestris</i>	ニュージーランド	グループ1
8	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	NCPB 2135	<i>Pyrus communis</i>	ポーランド	グループ1
9	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	NCPB 2213	<i>Malus sylvestris</i>	デンマーク	グループ1
10	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 3	NCPB 2291	<i>Rubus idaeus</i>	アメリカ	グループ1
11	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	LMG1933	<i>Cotoneaster buxifolius</i>	ベルギー	グループ1
12	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	LMG1917	<i>Crataegus monogyna</i>	ベルギー	グループ1
13	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	NCPB 2083	<i>Malus sylvestris</i>	ニュージーランド	グループ1
14	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	NCPB 831	<i>Malus sylvestris</i>	イギリス	グループ1
15	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	LMG1968	<i>Mespilus germanica</i>	フランス	グループ1
16	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	LMG1985	<i>Pyracantha</i> sp.	フランス	グループ1
17	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	ICMP 4450	<i>Pyrus communis</i>	ニュージーランド	グループ1
18	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 3	NCPB 1859	<i>Rubus idaeus</i>	アメリカ	グループ1
19	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	NCPB770	<i>Pyrus communis</i>	イギリス	グループ1
20	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	88-125 ^a	<i>Pyrus communis</i>	アメリカ	グループ1
21	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	LNPV-UB 0,49 ^b	<i>Photinia</i> sp.	フランス	グループ1
22	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	LNPV-UB 1,36 ^b	<i>Pyrus communis</i>	フランス	グループ1
23	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	LNPV-UB 1,39 ^b	<i>Malus sylvestris</i>	フランス	グループ1
24	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	LNPV-UB 2,18 ^b	<i>Cotoneaster lacteus</i>	フランス	グループ1
25	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	LNPV-UB 3,07 ^b	<i>Pyracantha</i> sp.	フランス	グループ1
26	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	LNPV-UB 3,08 ^b	<i>Cotoneaster lacteus</i>	フランス	グループ1
27	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	LNPV-UB 3,15 ^b	<i>Cotoneaster lacteus</i>	フランス	グループ1
28	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	LNPV-UB 6,15 ^b	<i>Pyrus pyrifolia</i>	フランス	グループ1
29	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	LNPV-UB 6,67 ^b	<i>Crataegus monogyna</i>	フランス	グループ1
30	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	LNPV-UB 9,44 ^b	<i>Mespilus germanica</i>	フランス	グループ1
31	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 3	NCPB 2293	<i>Rubus idaeus</i>	アメリカ	グループ1
32	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	88-38 ^a	<i>Malus sylvestris</i>	アメリカ	グループ1
33	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	YPPS 385	<i>Malus sylvestris</i>	アメリカ	グループ1
34	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 3	YPPS 396	<i>Rubus idaeus</i>	アメリカ	グループ1
35	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	YPPS 399	<i>Malus sylvestris</i>	アメリカ	グループ1
36	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	87/0066 ^a	<i>Pyrus communis</i>	アメリカ	グループ1
37	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	87/0067 ^a	<i>Malus sylvestris</i>	アメリカ	グループ1
38	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	87/0070 ^a	<i>Malus sylvestris</i>	アメリカ	グループ1
39	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	88/0037 ^a	<i>Malus sylvestris</i>	アメリカ	グループ1
40	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	88/0088 ^a	<i>Pyrus communis</i>	アメリカ	グループ1
41	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	97/0028 ^a	<i>Malus sylvestris</i>	イギリス	グループ1
42	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	97/0029 ^a	<i>Malus sylvestris</i>	ニュージーランド	グループ1
43	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 3	97/0032 ^a	<i>Rubus idaeus</i>	アメリカ	グループ1
44	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	98/0368 ^a	<i>Cotoneaster</i> sp.	オーストラリア	グループ1
45	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	99/0132 ^a	<i>Cotoneaster</i> sp.	ニュージーランド	グループ1
46	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	99/0134 ^a	<i>Sorubus aria</i>	ニュージーランド	グループ1
47	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	00/0004 ^a	<i>Malus sylvestris</i>	アメリカ	グループ1
48	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	ICMP 550	<i>Malus</i> × <i>domestica</i>	ニュージーランド	グループ1
49	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	ICMP 1392	<i>Malus</i> × <i>domestica</i>	アメリカ	グループ1
50	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	ICMP 1393	<i>Pyracantha</i> sp.	アメリカ	グループ1
51	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	ICMP 1441	<i>Pyrus communis</i>	ニュージーランド	グループ1
52	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	ICMP 1508	<i>Malus</i> × <i>domestica</i>	ニュージーランド	グループ1

表 5 - 2 グループ特異的プライマーの特異性調査に用いた供試菌株 1 (続き)

No.	種名	菌株名	分離宿主	分離国	グループ
53	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	ICMP 1530	<i>Cotoneaster salicifolius</i>	イギリス	グループ1
54	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	ICMP 4245	<i>Pyrus communis</i>	アメリカ	グループ1
55	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	ICMP 8861	<i>Pyrus communis</i>	ニュージーランド	グループ1
56	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	ICMP 8863	<i>Pyrus communis</i>	ニュージーランド	グループ1
57	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	ICMP 8865	<i>Malus</i> × <i>domestica</i>	ニュージーランド	グループ1
58	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	ICMP 9104	<i>Cotoneaster salicifolius</i>	ベルギー	グループ1
59	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	ICMP 11246	<i>Malus</i> × <i>domestica</i>	ニュージーランド	グループ1
60	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	ICMP 11249	<i>Pyrus communis</i>	ニュージーランド	グループ1
61	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	ICMP 11812	<i>Cydonia oblonga</i>	デンマーク	グループ1
62	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	ICMP 12133	<i>Cydonia</i> sp.	フランス	グループ1
63	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	ICMP 12365	<i>Stranvaesia</i> sp.	ニュージーランド	グループ1
64	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	ICMP 13293	<i>Cotoneaster</i> sp.	オーストラリア	グループ1
65	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	ICMP 13297	<i>Cotoneaster</i> sp.	オーストラリア	グループ1
66	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	ICMP 13413	<i>Pyrus communis</i>	ハンガリー	グループ1
67	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	ICMP 13415	<i>Malus</i> × <i>domestica</i>	ハンガリー	グループ1
68	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	ICMP 13549	<i>Cotoneaster</i> sp.	ニュージーランド	グループ1
69	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	YPPS 887	<i>Pyrus communis</i>	トルコ	グループ1
70	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	YPPS 888	<i>Pyrus communis</i>	トルコ	グループ1
71	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	YPPS 891	<i>Pyrus communis</i>	トルコ	グループ1
72	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 4	Ea 9471 ^c	<i>Pyrus ussuriensis</i> (Mishirazu)	日本、北海道	グループ2
73	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 4	Ea 9473 ^c	<i>Pyrus ussuriensis</i> (Mishirazu)	日本、北海道	グループ2
74	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 4	Ea 9577 ^c	<i>Pyrus communis</i> var. <i>sativa</i> (Brandywine)	日本、北海道	グループ2
75	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 4	YPPS 173	<i>Pyrus ussuriensis</i> (Mishirazu)	日本、北海道	グループ2
76	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 4	YPPS 175	<i>Pyrus ussuriensis</i> (Mishirazu)	日本、北海道	グループ2
77	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 4	YPPS 178	<i>Pyrus ussuriensis</i> (Mishirazu)	日本、北海道	グループ2
78	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 4	YPPS 181	<i>Pyrus ussuriensis</i> (Mishirazu)	日本、北海道	グループ2
79	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 4	YPPS 185	<i>Pyrus ussuriensis</i> (Mishirazu)	日本、北海道	グループ2
80	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 4	YPPS 187	<i>Pyrus ussuriensis</i> (Mishirazu)	日本、北海道	グループ2
81	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 4	YPPS 200	<i>Pyrus ussuriensis</i> (Mishirazu)	日本、北海道	グループ2
82	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 4	YPPS 204	<i>Pyrus communis</i> var. <i>sativa</i> (Brandywine)	日本、北海道	グループ2
83	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 4	YPPS 206	<i>Pyrus communis</i> var. <i>sativa</i> (Brandywine)	日本、北海道	グループ2
84	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 4	YPPS 208	<i>Pyrus ussuriensis</i> (Mishirazu)	日本、北海道	グループ2
85	<i>Erwinia amylovora</i> biovar 4	YPPS 210	<i>Pyrus ussuriensis</i> (Mishirazu)	日本、北海道	グループ2
86	<i>Erwinia pyrifoliae</i>	DSM12163 ^T	<i>Pyrus pyrifolia</i>	韓国	グループ2
87	<i>Erwinia pyrifoliae</i>	DSM12393	<i>Pyrus pyrifolia</i>	韓国	グループ2
88	<i>Erwinia pyrifoliae</i>	DSM12394	<i>Pyrus pyrifolia</i>	韓国	グループ2

NCPPB: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, UK; LMG: Laboratory of Microbiology, Gent, Belgium; ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants, New Zealand; YPPS: Yokohama Plant Protection Station; DSM: DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; T: Type strain

a R. G. Robert 博士より横浜植物防疫所へ分譲

b C. Audusseau 博士より横浜植物防疫所へ分譲

c 谷井博士より横浜植物防疫所へ分譲

表 6 グループ特異的プライマーの特異性調査に用いた供試菌株 2

No.	種名	菌株名	分離宿主	分離国
1	<i>Erwinia mallotivora</i>	ATCC 29573 ^T	<i>Mallotus japonicus</i>	日本
2	<i>Erwinia mallotivora</i>	SUPP 54 ^a	<i>Mallotus japonicus</i>	日本
3	<i>Erwinia mallotivora</i>	SUPP 743 ^a	<i>Mallotus japonicus</i>	日本
4	<i>Erwinia nigrifluens</i>	ATCC 13028 ^T	<i>Juglans regia</i>	アメリカ
5	<i>Erwinia nigrifluens</i>	ATCC 29275	<i>Juglans regia</i>	アメリカ
6	<i>Erwinia quercina</i>	ATCC 29281 ^T	<i>Quercus</i> sp.	アメリカ
7	<i>Erwinia quercina</i>	ATCC 29282	<i>Quercus</i> sp.	アメリカ
8	<i>Erwinia rubrifaciens</i>	ATCC 29291 ^T	<i>Juglans regia</i>	アメリカ
9	<i>Erwinia rubrifaciens</i>	ATCC 29293	<i>Juglans regia</i>	アメリカ
10	<i>Erwinia salicis</i>	ATCC 15712 ^T	<i>Salix alba</i>	イギリス
11	<i>Erwinia salicis</i>	ATCC 29294	<i>Salix alba</i>	イギリス

ATCC: American Type Culture Collection, USA; T: Type strain

a 瀧川博士より横浜植物防疫所へ分譲

それぞれ段階希釈し、上述したPCRによって、検出限界を調査した。各菌濃度はLB平板培地を用いて、希釈平板法（反復3回）で計測した。

2 結果及び考察

1) EarpoD, EprpoDプライマーセットの設計及びその特異性

シーケンスを行った39菌株の*rpoD*遺伝子の塩基配列のうち、分子系統解析でグループ1に属する火傷病菌から4菌株（アクセッションナンバーAB242886, AB242919, AB242920, AB242887）、グループ2に属するナシ枝枯細菌病菌から3菌株（AB242888, AB242921, AB242922）、*E. pyrifoliae*から1菌株（AB242889）の配列を比較し、グループ間で配列が異なる部分から数組のプライマーを設計した。予備試験の結果、グループ1においては、EarpoD2f, EarpoD1rが最も特異性が高かったため、グループ2においても同様の部分でEprpoD2f, EprpoD1rのプライマーを作製した。また、PCR反応条件については、後述するニホンナシ花器表生菌に対して、非特異反応が出ないようにアニーリング温度とサイクル数を定めた。グループ1特異的プライマー（EarpoD2f, EarpoD1r）は、供試した火傷病菌71菌株においてのみ特異的な375bpの遺伝子産物を増幅した。ナシ枝枯細菌病菌、*E. pyrifoliae*、その他の“*amylovora*”グループでは、遺伝子産物の増幅は全くなかった（図3, 5）。一方でグループ2特異的プライマー（EprpoD2f, EprpoD1r）は、供試したナシ枝枯細菌病菌14菌株、*E. pyrifoliae*3菌株に

おいて、特異的な375bpの遺伝子産物を増幅した。火傷病菌、*E. mallotivora*, *E. rubrifaciens*, *E. salicis*では、遺伝子産物の増幅は全くなかったが、*E. nigrifluens*, *E. quercina*において375bpとは異なる大きさの非特異産物を増幅した（図4, 5）。

図3, 4におけるレーン番号87の*E. pyrifoliae*は、EarpoD, EprpoDプライマーの両方で特異的なバンドが観察された。この菌株を高濃度ショ糖選択培地（末次ら⁽⁶⁴⁾）で希釈平板培養したところ、*E. pyrifoliae*と火傷病菌の両菌が検出され、この保存菌株は火傷病菌が混入していたことが判明した。

2) EarpoD, EprpoDプライマーの検出限界

EarpoDプライマーセットを用いて火傷病菌（NCPPB 2083株）の検出限界を調査したところ、 4×10^4 cfu/mlまで検出することができた（図6）。EprpoDプライマーセットを用いてナシ枝枯細菌病菌（YPPS 166株）、*E. pyrifoliae*（DSM 12163株）の検出限界を調査したところ、それぞれ、 1.4×10^5 cfu/ml, 5×10^4 cfu/mlまで検出することができた（図7）。

これらのことから、EarpoDプライマーセットは、火傷病菌の検出、同定に十分使用できると考えられた。また、EprpoDプライマーセットについても、EarpoDプライマーと比較するとやや特異性が落ちるが、ナシ枝枯細菌病菌及び*E. pyrifoliae*の検出、同定に十分活用できると考えられた。

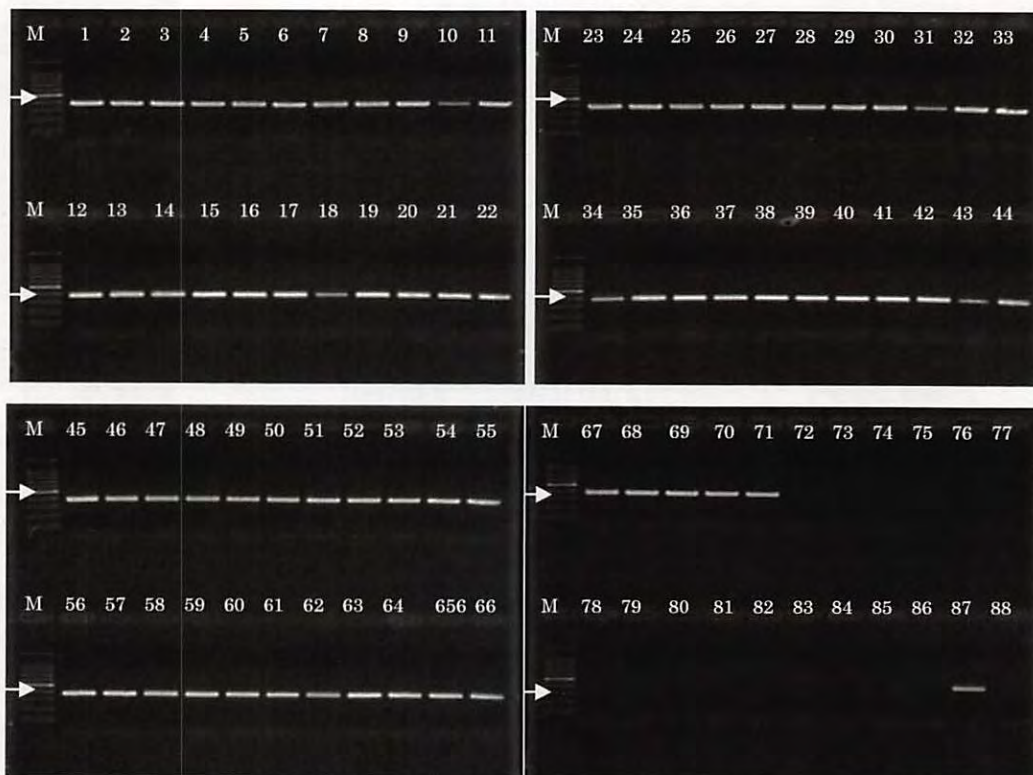


図3 EarpoD プライマーセットを用いた供試菌株 1 (火傷病菌、ナシ枝枯細菌病菌、*E. pyrifoliae*) の PCR
M: 100bp DNA marker, 各レーン番号は、表5の No.に対応している 矢印は 375bp を表す

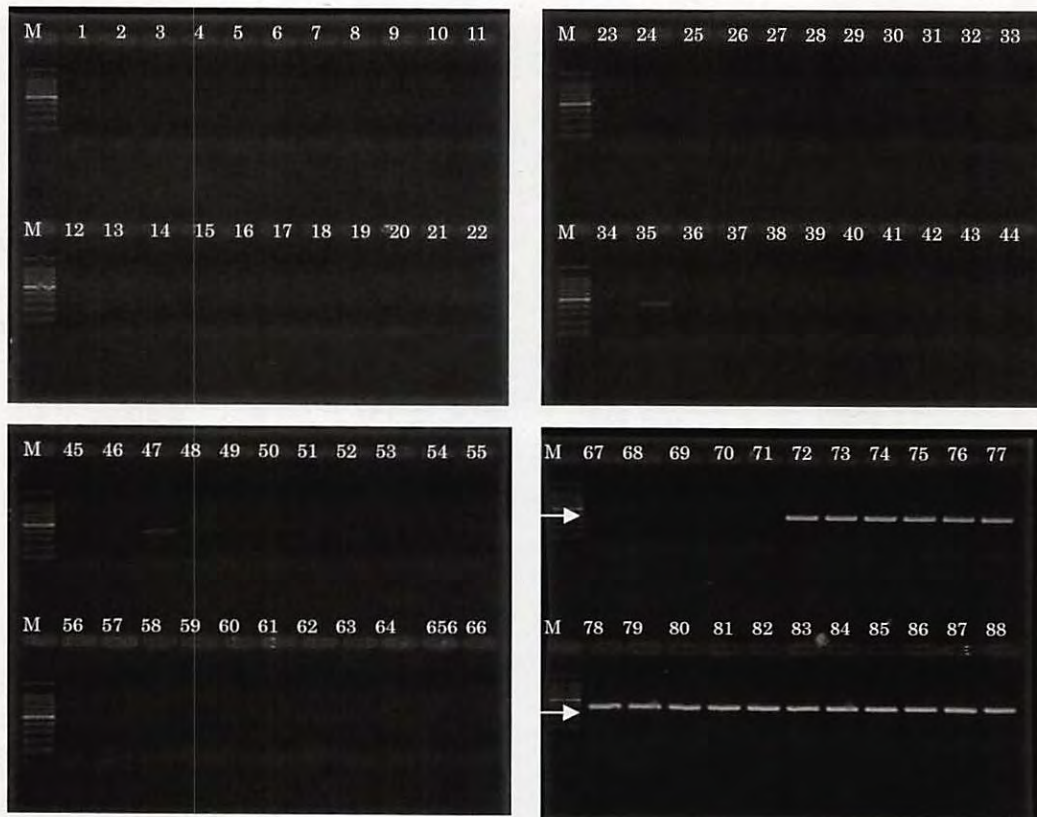


図4 EprpoD プライマーセットを用いた供試菌株 1 (火傷病菌、ナシ枝枯細菌病菌、*E. pyrifoliae*) の PCR
M: 100bp DNA marker, 各レーン番号は、表5の No.に対応している 矢印は 375bp を表す

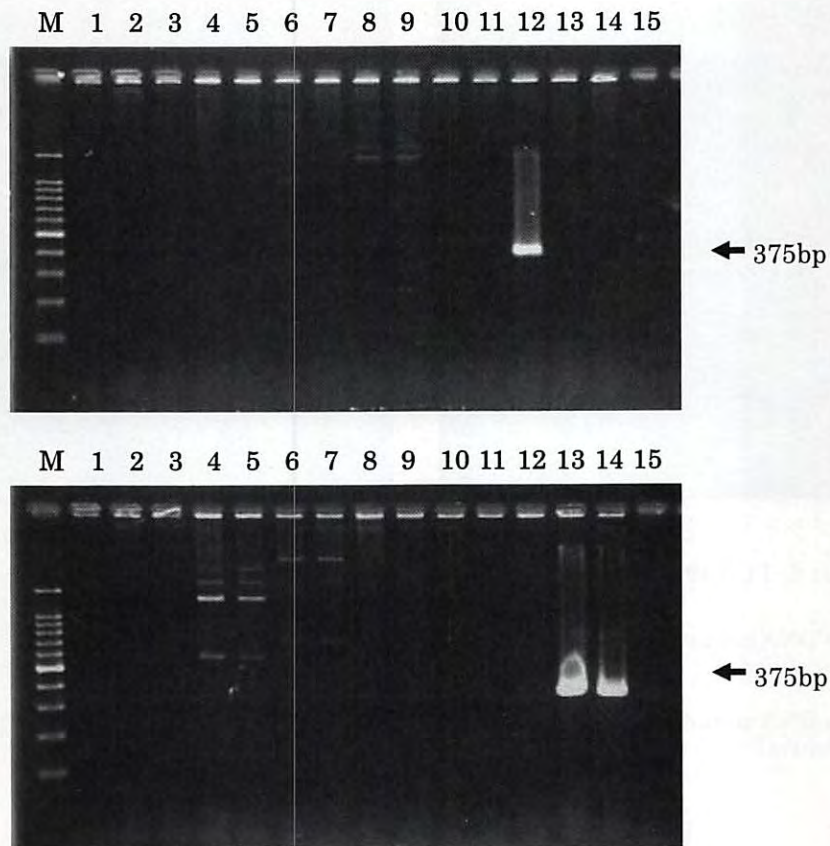


図5 EarpoD プライマーセット（上）及び EprpoD プライマーセット（下）を用いた供試菌株 2（“amylovora”グループ）の PCR
M： 100bp DNA marker、レーン No.1～11 は、表 6 の No.に対応している No.12：火傷病菌、No.13：ナシ枝枯細菌病菌、No.14： *E. pyrifoliae*、No.15： 蒸留水

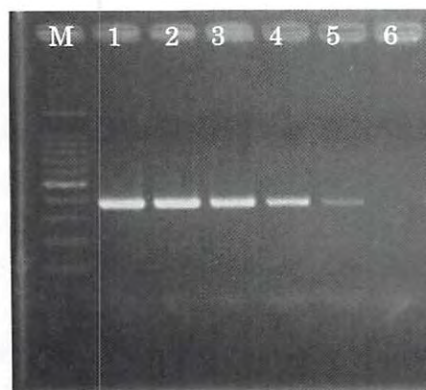


図6 EarpoD プライマーを用いた火傷病菌（NCPPB2083 株）の PCR 検出限界

M： 100bp DNA marker, 1： 4×10^8 cfu/ml,
2： 4×10^7 cfu/ml, 3： 4×10^6 cfu/ml,
4： 4×10^5 cfu/ml, 5： 4×10^4 cfu/ml,
6： 4×10^3 cfu/ml

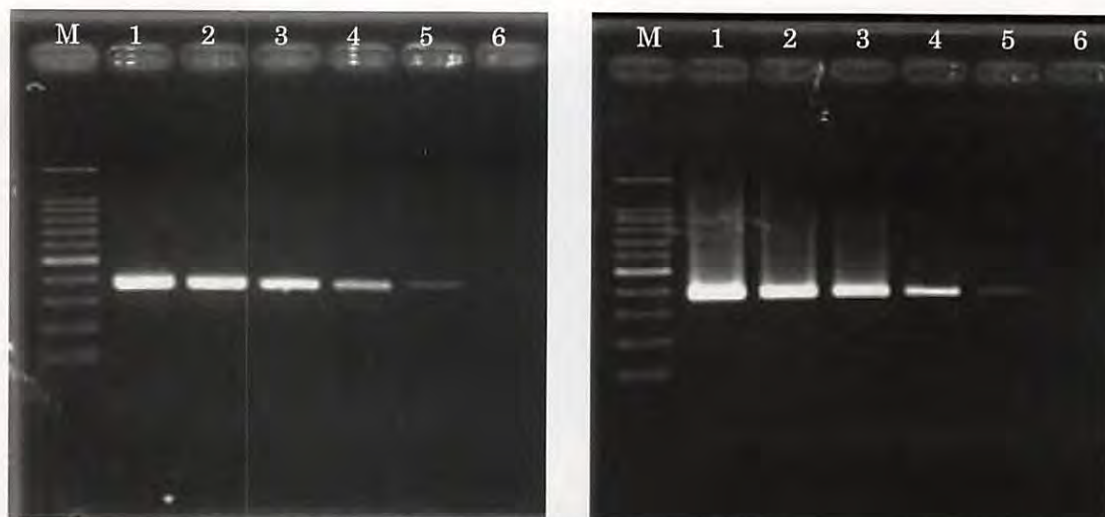


図7 EprpoD プライマーを用いたナシ枝枯細菌病菌 (YPPS166 株、左図)、*E. pyrifoliae* (DSM12163 株、右図) の PCR 検出限界

左図

M : 100bp DNA marker, 1 : 1.4×10^9 cfu/ml, 2 : 1.4×10^8 cfu/ml, 3 : 1.4×10^7 cfu/ml, 4 : 1.4×10^6 cfu/ml, 5 : 1.4×10^5 cfu/ml, 6 : 1.4×10^4 cfu/ml

右図

M : 100bp DNA marker, 1 : 5×10^8 cfu/ml, 2 : 5×10^7 cfu/ml, 3 : 5×10^6 cfu/ml, 4 : 5×10^5 cfu/ml, 5 : 5×10^4 cfu/ml, 6 : 5×10^3 cfu/ml

Ⅲ ニホンナシ花器表生菌の調査

現在、日本国内には火傷病菌、*E. pyrifoliae*は存在しない。しかし、国際的な物流や人の移動の増加に伴い侵入リスクは増加していると考えられる。また、1999年以降発生が確認されていないナシ枝枯細菌病についても再発する可能性は否定できない。

火傷病が発生しているヨーロッパの国々では、European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO)というヨーロッパ地域を包括した植物防疫組織内において、主要な病害虫に対する病害虫診断マニュアル(EPPO Standards)を作成しており、火傷病菌を検出、同定するための手法(Diagnostic protocols for regulated pest *Erwinia amylovora*)も存在する。その中では、直接分離の他、血清学的手法あるいは分子生物学的手法(PCR等)を用いたスクリーニングも同時に行っている。

国内において、火傷病類似症状が発見された場合、直接分離はもちろん必要であるが、上記のようなスクリーニングは、迅速な検出とそれに続く防除措置、あるいは発生樹からどれくらい広がっているかの調査に十分役に立つと考えられる。ここで、問題となるのは、これらのスクリーニングのツール(火傷病菌用抗体や特異的プライマー)の精度と信頼性であ

る。すなわち、これらのツールを用いた場合、火傷病菌でないにもかかわらず、特異的な抗体反応やPCRにおける特異的な遺伝子増幅を引き起こす表生菌が存在するか否かが問題となってくる。また、直接分離の際に用いられる選択培地も、これらの表生菌を抑制できるか否かは不明である。

そこで、これらの問題点を解決するために、火傷病菌及び*E. pyrifoliae*の宿主であるニホンナシの花器に存在する表生菌について調査を行うこととした。花器は火傷病菌の伝染環の中で重要な役割を果たしており、新たな宿主に伝搬するのに最も重要な部位と考えられている(Agrios⁽¹⁾)。また、ナシにおける表生菌の報告は少なく(Stockwell ら⁽⁶³⁾)、国内のニホンナシの花器における菌相は明らかにされていないことから、以下の調査を行った。

①LB培地を用いてニホンナシ花器に存在する表生菌を分離し、その種類及びおおよその数の調査。

②同じニホンナシ花器を用いて、火傷病菌用選択培地に分離されてくる表生菌の種類及びおおよその数の調査。

③分離された表生菌が火傷病菌を同定するための特異的プライマーにより陽性対照株と同じサイズの遺

伝子増幅が確認されるか否かの調査。

④火傷病菌用選択培地にて分離された表生菌について、選択培地上でのコロニーの形態の調査及び、その形態が火傷病菌と類似していた場合、ナシ幼果に対する病原性、API20NE簡易同定キットのプロフィールインデックス調査を行った。

1 材料と方法

1) 供試したニホンナシ花器

2006年4月に茨城県つくば市(4月7, 14日), 鳥取県東伯郡北栄町(4月17日), 長野県下伊那郡高森町(4月24日)の3ヵ所からニホンナシ花器を15~16樹から採取した。採取した花器の品種は、幸水, 新高, 新興, 豊水, 愛宕, 長十郎, ゴールド二十世紀(茨城), 豊水, ゴールド二十世紀(鳥取), ゴールド二十世紀, 二十世紀, 豊水, 南水, 越後錦(長野)である。

2) ニホンナシ花器からの表生菌の分離

開花中で外観上健全な花器の花梗を約1cm残して採取し, 10花器を1試料とし, ビニール袋(300mm×400mm)に入れ, 30mlの滅菌蒸留水を加えて50回ほどやさしく揉み, その液及び 10^{-1} , 10^{-2} 倍に段階希釈した液をLB平板培地及び改変 Miller and Schroth培地(M-MS培地)(水野ら⁽⁴²⁾)に100 μ lずつ塗布し, 暗黒下, 28°Cで培養した。各段階希釈液の平板培地への塗布は2反復行った。その後, 培養中に出現したコロニーに関して形態ごとにグループ化し, その中から2~3菌株を釣菌, 分離してスキムミルク分散媒にて凍結保存した。また, グループごとにコロニー数を計測した。

3) PCR用の鋳型の調製

保存していた分離細菌をLB斜面培地にて28°C, 3日間培養し, これを滅菌蒸留水に懸濁し(およそ 10^8 cfu/ml)アルミブロック高温槽DTU-1B(タイテック)を用いて98°C, 5分間処理を行ったものを鋳型とした。

4) 16S rRNA遺伝子の部分塩基配列に基づいた属の推定

16S rRNA遺伝子のPCRはMarachesiら⁽³⁵⁾によって設計されたプライマー63f (5'-CAGGCCTAAC

ACATGCAAGTC-3')と1387r (5'-GGGCGGWGTG TACAAGGC-3')を用いた。PCRは, TaKaRa Ex Taq (TAKARA, Japan)とTaKaRa PCR Thermal Cycler MP (TAKARA, Japan)を用いて, Marachesiら⁽³⁵⁾の方法に準じて行った。PCR反応液(TaKaRa Ex Taq 0.5U, dNTP 200 μ M, 1×PCR buffer, 各プライマー0.25 μ M)に上述した鋳型を1 μ l添加し, 総量を20 μ lとした。反応条件は95°C1分, 55°C1分, 72°C1.5分を30サイクル繰り返し, 最後に72°C10分とした。得られたPCR産物はshrimp alkaline phosphatase (GE-healthcare, Japan)とexonuclease (GE-healthcare, Japan)を用いて処理した後, ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit及びABI PRISM 3100 DNA sequencerを用いて直接シーケンスを行った。シーケンスプライマーはPCRに用いたものと同じものを用いた。得られた部分塩基配列はGENETYX-WIN/ATSQ (GENETYX, Japan)を用いて, 個々の分離細菌の遺伝子ごとにアッセンブルを行った。その後, DDBJ/EMBL/GenBankのデータベースからBLASTを用いて相同性検索を行い, 最も高い相同性を示したデータベース上の配列の属を分離細菌の属と推定した。形態ごとにグループ化され, コロニー数が計数された分離細菌のうち, 同じ属として推定されたものは同属として計数値を合計した。

5) 病原性試験

病原性はセイヨウナシとニホンナシの幼果を用いて調査した。幼果を5~8mmの厚さにスライスし, 20 μ lの分離細菌懸濁液(およそ 10^7 cfu/ml)を表面に滴下し, ガラスシャーレ内の湿らせたろ紙の上に置き, 28°Cで4日間保温した。

6) API20NE及びAPI20E簡易同定キットを用いたプロフィールインデックス調査

M-MS培地で分離された細菌の一部はAPI20NE及びAPI20E (bioMérieux France)を用いてプロフィールインデックス(PI)調査を行った。得られたPIはAPI20NEに関しては「作物の細菌病—診断と防除追補版2001」(西山ら⁽⁶⁰⁾)を用いて, API20Eに関しては, APIweb (bioMérieux France)を用いて相同性の検索を行うとともに, 火傷病菌のPIとも比較した。

7) 特異的プライマーによるPCR

火傷病菌の特異的プライマーとして、pEA29をターゲットとしたBereswillら⁽⁶⁾のプライマーセット、ゲノムDNAをターゲットとしたプライマーセット (Guilford ら⁽¹⁶⁾)、今回作製した*rpoD*遺伝子の特異的領域をターゲットとしたEarpoDプライマーセットを用いた。また、同時にナシ枝枯細菌病菌、*E. pyrifoliae*特異的プライマーであるEprpoDプライマーセットも用い、それらの特異性を調査した。

Bereswillら⁽⁶⁾によって設計されたプライマーA (5'-CGGTTTTTAAACGCTGGG-3')とプライマーB (5'-GGGCAAATACTCGGATT-3')を用いたPCRは、TaKaRa Ex Taq (TaKaRa, Japan)とGeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer, USA)あるいはiCyclerサーマルサイクラー (Bio-Rad Laboratories, USA)を用いて、Bereswillら⁽⁶⁾の方法に準じて行った。PCR反応液(TaKaRa Ex Taq 0.5U, dNTP 200μM, 1×PCR buffer, 各プライマー10μM)に上述した鋳型を2μl添加し、総量を20μlとした。反応条件は、最初に93℃で2分行った後、93℃1分、52℃2分、72℃2分を37サイクル繰り返し、最後に72℃10分とした。得られたPCR産物を2%のアガロースゲルで電気泳動した後、臭化エチジウムで染色した。紫外線照射下で特異的な900bpのDNA断片の増幅の有無を確認した。

Guilfordら⁽¹⁶⁾によって設計されたプライマーEA71(5'-CCTGCATAAATCACCGCTGACAGCTCAATG-3')とプライマーEA72 (5'-GCTACCACTGATCGCTCGAATCAAATCGCC-3')を用いたPCRは、TaKaRa Ex Taq (TaKaRa, Japan)とGeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer, USA)あるいはiCyclerサーマルサイクラー (Bio-Rad Laboratories, USA)を用いて行い、ほぼGuilfordら⁽¹⁶⁾の方法に準じて行ったが、アニーリング温度に関してのみ、特異性を高めるため55℃から65℃に変更した。この変更による火傷病菌のPCR反応には問題は生じなかった。PCR反応液(TaKaRa Ex Taq 0.5U, dNTP 200μM, 1×PCR buffer, 各プライマー12.5μM)に上述した鋳型を2μl添加し、総量を20μlとした。反応条件は、最初に95℃で1分の処理を行った後、95℃1分、65℃1分、72℃2分を40サイクル繰り返した。

得られたPCR産物を2%のアガロースゲルで電気泳動した後、臭化エチジウムで染色し、特異的な187bpのDNA断片の増幅の有無を紫外線照射下で確認した。

EarpoDプライマーセットEarpoD2f (5'-GGCGCGTGAAAAGTTCAA-3'), EarpoD1r (5'-AGGCCGCGGTTTCACATCT-3')及び、EprpoDプライマーセットEprpoD2f (5'-GGCGCGTGAGAAGTTCGG-3'), EprpoD1r (5'-AGGCCACGGTTTCACATCG-3')を用いたPCRは、TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (TaKaRa, Japan)とGeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer, USA)あるいはiCyclerサーマルサイクラー (Bio-Rad Laboratories, USA)を用いて行い、PCR反応液(TaKaRa Ex Taq HS 0.5 U, dNTP 200μM, 1×PCR buffer, 各プライマー20 pmol)に上述した細菌懸濁液2μlを鋳型として添加し、総量を20μlとした。反応条件は94℃1分、65℃45秒、72℃1分を30サイクル繰り返した。PCR産物を2%のアガロースゲルで電気泳動した後、臭化エチジウムで染色し、特異的な375bpのDNA断片の増幅の有無を紫外線照射下で確認した。

2 結果及び考察

1) LB平板培地で分離された表生細菌

茨城県、鳥取県、長野県の3カ所から4回の分離を行い、表生細菌278菌株を得た(畔上ら⁽³⁾)。この他に16菌株の酵母が得られた。平板培地上のコロニーの外観は、ほとんどが円形で色は黄色、白色ある



図8 ニホンナシ花器の表生細菌 (LB平板培地)
(4月14日茨城県において分離、28℃、
培養3日後)

表 7 LB平板培地にて分離された菌株の16S rRNA遺伝子の部分塩基配列解析による推定属名

推定された属名	菌株数	採取場所 (株数)
<i>Aerococcus</i>	2	鳥取 (2)
<i>Arthrobacter</i>	5	茨城 (4)、長野 (1)
<i>Bacillus</i>	76	茨城 (49)、鳥取 (9)、長野 (18)
<i>Brachybacterium</i>	1	茨城 (1)
<i>Brachybacterium or Sanguibacter</i>	7	茨城 (6)、長野 (1)
<i>Brevibacillus</i>	1	長野 (1)
<i>Brevibacterium</i>	4	茨城 (4)
<i>Brochothrix</i>	1	茨城 (1)
<i>Burkholderia</i>	3	茨城 (3)
<i>Curtobacterium</i>	10	茨城 (6)、鳥取 (3)、長野 (1)
<i>Curtobacterium or Arthrobacter</i>	7	茨城 (6)、鳥取 (1)
<i>Curtobacterium or Microbacterium or Frigoribacterium</i>	11	茨城 (1)、鳥取 (7)、長野 (3)
<i>Devosia</i>	1	茨城 (1)
<i>Enterococcus</i>	1	長野 (1)
<i>Frigoribacterium</i>	3	茨城 (2)、長野 (1)
<i>Kocuria</i>	1	茨城 (1)
<i>Microbacterium</i>	4	茨城 (3)、鳥取 (1)
<i>Paenibacillus</i>	13	茨城 (11)、鳥取 (2)
<i>Pedobacter</i>	2	茨城 (2)
<i>Pseudomonas</i>	79	茨城 (33)、鳥取 (24)、長野 (22)
<i>Rhanella or Erwinia or Pantonea</i>	7	茨城 (5)、鳥取 (2)
<i>Rhizobium</i>	1	茨城 (1)
<i>Rhodococcus</i>	3	茨城 (3)
<i>Roseomonas</i>	2	茨城 (1)、鳥取 (1)
<i>Sanguibacter</i>	1	鳥取 (1)
<i>Sphingomonas</i>	3	茨城 (3)
<i>Staphylococcus</i>	5	鳥取 (5)
<i>Stenotrophomonas</i>	1	茨城 (1)
<i>Streptomyces</i>	7	茨城 (4)、長野 (3)
<i>Streptomyces or Leifsonia or Arthrobacter</i>	8	茨城 (6)、長野 (2)
<i>Terrabacter</i>	6	茨城 (5)、長野 (1)
unknown	2	茨城 (2)

278

いはアイボリーを呈した (図 8)。表生細菌278菌株のうち、2菌株はPCRで目的とする増幅産物が得られずシーケンスができなかった。また、276菌株の16S rRNA遺伝子の部分塩基配列解析を行ったところ、半分以上の155菌株が *Bacillus* 属及び *Pseudomonas* 属と推定された (佐々木ら⁽⁵⁹⁾) (表 7)。

4月7日に茨城県で採取した花器の細菌相は *Bacillus* 属 (40.9% : 分離細菌の構成割合、以下同じ)、*Pseudomonas* 属 (16.6%)、*Curtobacterium* 属 (10.0%)、*Actinomycete* (4.0%)、その他 (13.6%) 及び不明 (15.0%) で構成されていた。分離された

平均コロニー数は 4.5×10^3 cfu/花器であった。また、4月14日に同じ場所で採取した花器の細菌相は、品種に関係なく一様に *Pseudomonas* 属 (88.2%) が大多数を占め、それに次いで *Enterobacteriaceae* (10.6%) が多かった。さらに、分離された平均コロニー数は 7.0×10^6 cfu/花器となり、分離細菌数がおおよそ1000倍となった。4月17日に鳥取県で採取した花器の細菌相は *Pseudomonas* 属 (74.2%)、*Enterobacteriaceae* (23.9%) で大部分を占め、それ以外の *Bacillus* 属、*Curtobacterium* 属等は0.1%以下であった。分離された平均コロニー数は $4.2 \times$

10⁴cfu/花器であった。4月24日に長野県で採取した花器の細菌相は、ほぼ全てが *Pseudomonas* 属 (99.9%) であり、その他の細菌の分離比率は0.01%

以下であった。分離された平均コロニー数は1.6×10⁸cfu/花器であり、最も多くの細菌が分離された (表8)。

表8 各園地におけるニホンナシ1花器あたりの表生細菌の種類と菌量及び比率

分離県(分離日)	推定された属名	推定菌量(cfu/花)	比率(%)
茨城県 (2006.4.7)	<i>Bacillus</i> spp.	1.9×10 ³	40.9
	<i>Pseudomonas</i> spp.	8.0×10 ²	16.6
	<i>Curtobacterium</i> spp.	4.5×10 ²	10.0
	<i>Streptomyces</i> spp.	1.8×10 ²	4.0
	その他	6.0×10 ²	13.6
	不明	6.5×10 ²	15.0
	小計	4.5×10 ³	100.0
茨城県 (2006.4.14)	<i>Pseudomonas</i> spp.	6.0×10 ⁶	88.2
	<i>Enterobacteriaceae</i>	7.0×10 ⁵	10.6
	<i>Curtobacterium</i> spp.	1.4×10 ⁴	0.2
	<i>Bacillus</i> spp.	4.1×10 ³	0.1
	その他	4.2×10 ⁴	0.6
	不明	2.6×10 ⁴	0.4
	小計	7.0×10 ⁶	100.0
鳥取県 (2006.4.17)	<i>Pseudomonas</i> spp.	3.1×10 ⁴	74.2
	<i>Enterobacteriaceae</i>	1.0×10 ⁴	23.9
	<i>Bacillus</i> spp.	2.6×10 ²	0.6
	<i>Curtobacterium</i> spp.	1.4×10 ²	0.3
	その他	2.0×10 ²	0.5
	不明	1.8×10 ²	0.4
	小計	4.2×10 ⁴	100.0
長野県 (2006.4.24)	<i>Pseudomonas</i> spp.	1.6×10 ⁸	99.9
	<i>Bacillus</i> spp.	2.9×10 ²	0.01%以下
	<i>Curtobacterium</i> spp.	1.2×10 ²	0.01%以下
	<i>Streptomyces</i> spp.	7.5×10	0.01%以下
	その他	1.8×10 ³	0.01%以下
	不明	3.0×10	0.01%以下
	小計	1.6×10 ⁸	100.0

この結果から、開花後のニホンナシ花器における表生細菌の大部分は*Pseudomonas*属であることが示された。また、表生細菌の構成は地域間差異は見られなかった。しかし、茨城県の園地における開花後間もない第1回目の分離結果は、同じ園地における第2回目の分離結果や他県の園地での分離結果と明らかに異なっており、開花後1週間で細菌相が著しく変化することが示された。これは、開花直後の花器の表面には様々な細菌が存在しているが、その中

で*Pseudomonas*属細菌がより多く増殖することを示唆している。このことは、他県でも同様のことが起きていると推察される。Sasakiら⁽⁶⁰⁾は、これらのデータを樹レベルで詳細に検討した結果、細菌相は品種間において差がないこと、各樹において、分離される細菌種の優先度が異なることを報告している。

2) M-MS平板培地で分離された表生細菌

茨城県、鳥取県、長野県の3ヵ所から4回の分離

を行い60菌株を得た。平板培地上のコロニーの外観は、ほとんどが円形で色は薄い黄色、白色あるいは

青色を呈した(図9)。分離菌60菌株の16S rRNA遺伝子の部分塩基配列解析を行ったところ、大部分

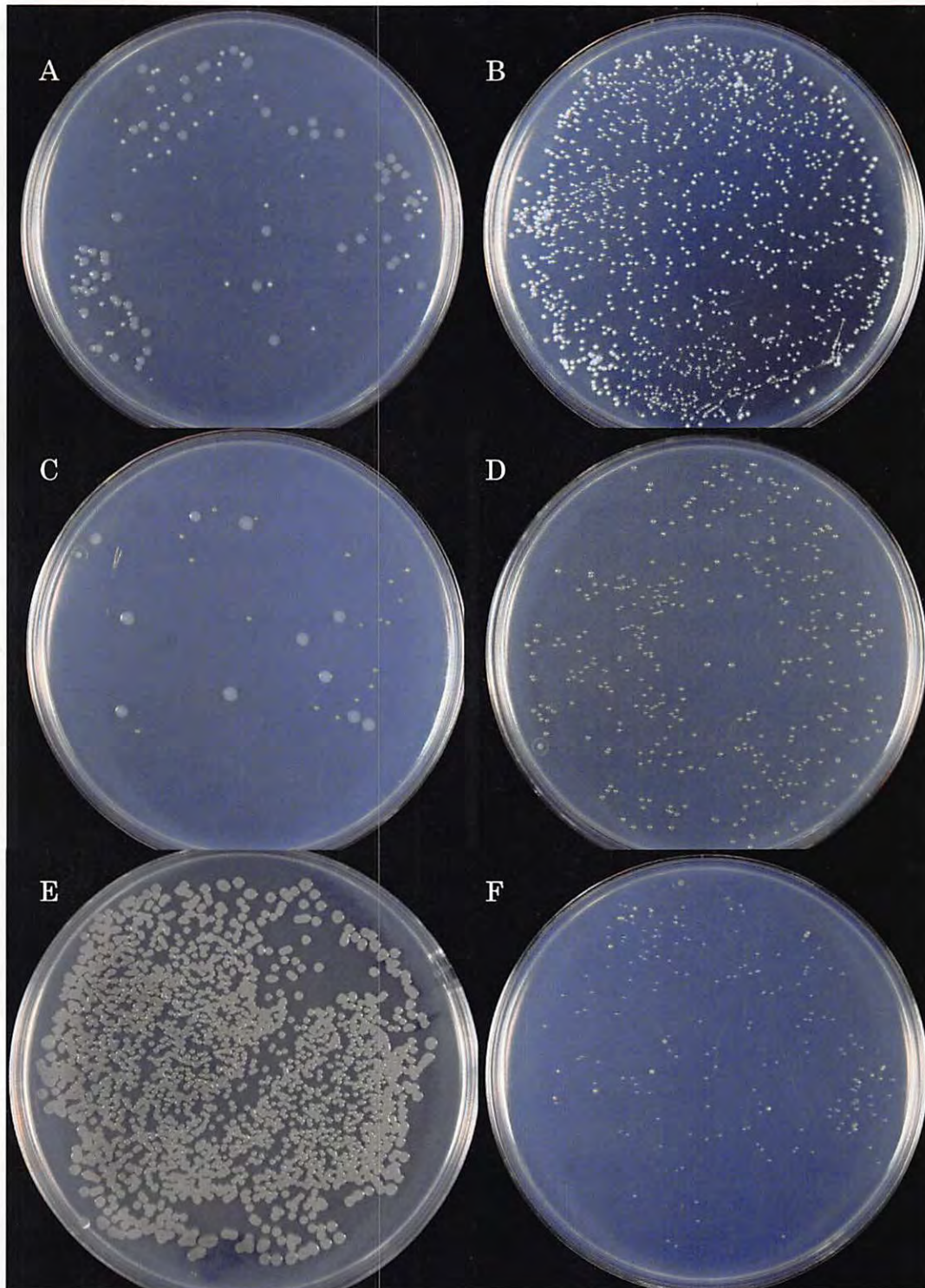


図9 M-MS平板培地上に分離されたニホンナシ花器の表生菌(A~E)及びM-MS平板培地上の火傷病菌(F)のコロニー (28℃ 培養4日目)

推定属名 A: *Pseudomonas*属 (大コロニー) 及び *Serratia*属 (小コロニー)、B: *Serratia*属、
C: *Pseudomonas*属 (大コロニー) 及び *Pantoea*属 (小コロニー)、D: *Pantoea*属、
E: *Pseudomonas*属、F: 火傷病菌(*E. amylovora*)

が*Pseudomonas*属と*Enterobacteriaceae* (*Enterobacter*属, *Pantoea*属, *Rhanella*属, *Serratia*属)と推定された (表 9).

4 月 7 日に茨城県で採取した花器からM-MS平板培地で分離された細菌は*Aurantimonas*属 (50.0%),

表 9 M-MS 平板培地にて分離された菌株の 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列解析による推定属名

推定された属名	菌株数	採取場所 (株数)
<i>Aurantimonas</i>	2	茨城 (2)
<i>Bacillus</i>	2	茨城 (2)
<i>Curtobacterium</i>	2	茨城 (2)
<i>Enterobacter</i>	4	茨城 (4)
<i>Pantoea</i>	11	茨城 (6)、鳥取 (3)、長野 (2)
<i>Pantoea</i> or <i>Erwinia</i>	4	茨城 (4)
<i>Pseudomonas</i>	27	茨城 (20)、鳥取 (5)、長野 (2)
<i>Rhanella</i>	3	鳥取 (3)
<i>Serratia</i>	5	茨城 (5)
	60	

*Bacillus*属 (25.0%), *Curtobacterium*属 (25.0%), であつた. 分離された平均コロニー数は60cfu/花器であつた. また, 4 月 14 日に同じ場所で採取した花器からM-MS平板培地で分離された細菌は, *Pseudomonas*属 (73.8%) が最も多く, それに次いで*Enterobacteriaceae*である*Serratia*属 (22.4%), *Pantoea*属 (3.3%), *Enterobacter*属 (0.5%) が多かった. 分離された平均コロニー数は 1.5×10^6 cfu/花器であつた. 4 月 17 日に鳥取県で採取した花器からM-MS平板培地で分離された細菌は*Pantoea*属 (80.8%), *Rahnella*属 (12.5%) で大部分を占め, その他に*Pseudomonas*属 (6.7%) が分離された. 分離された平均コロニー数は 1.3×10^4 cfu/花器であつた. 4 月 24 日に長野県で採取した花器からM-MS平板培地で分離された細菌は, ほぼ全てが*Pseudomonas*属 (99.9%) であり, その他に*Pantoea*属がわずかに分離された. 花器から分離された平均コロニー数は 6.9×10^5 cfu/花器であつた (表10).

表10 各園地におけるM-MS平板培地に分離されたニホンナシ 1 花器あたりの表生細菌の種類と菌量及び比率

分離県 (分離日)	推定された属名	推定菌量 (cfu/花)	比率 (%)
茨城県 (2006.4.7)	<i>Aurantimonas</i> sp.	3.0×10	50.0
	<i>Bacillus</i> sp.	1.5×10	25.0
	<i>Curtobacterium</i> sp.	1.5×10	25.0
	小計	6.0×10	100.0
茨城県 (2006.4.14)	<i>Pseudomonas</i> spp.	1.1×10^6	73.8
	<i>Serratia</i> sp.	3.2×10^5	22.4
	<i>Pantoea</i> spp.	4.8×10^4	3.3
	<i>Enterobacter</i> sp.	7.0×10^3	0.5
	<i>Pantoea</i> sp. or <i>Erwinia</i> sp.	6.0×10	0.01%以下
	小計	1.5×10^6	100.0
鳥取県 (2006.4.17)	<i>Pantoea</i> sp.	1.0×10^4	80.8
	<i>Rahnella</i> sp.	1.6×10^3	12.5
	<i>Pseudomonas</i> spp.	8.6×10^2	6.7
	小計	1.3×10^4	100.0
長野県 (2006.4.24)	<i>Pseudomonas</i> sp.	6.9×10^5	99.9
	<i>Pantoea</i> sp.	4.5×10	0.01%以下
	小計	6.9×10^5	100.0

M-MS平板培地におけるニホンナシ花器表生細菌の抑制効果は, グラム陽性菌である*Bacillus*属, *Curtobacterium*属, *Actinomycete*に対しては顕著であつたが, ある種の*Pseudomonas*属及び*Enterobacteriaceae*である*Pantoea*属, *Rahnella*属, *Serratia*属の細菌に対しては, 抑制効果が弱かつた. しかし,

これらのM-MS平板培地上でのコロニー形態は, 火傷病菌とは明らかに異なつた (図 9).
今回分離された菌株のうち, *Pantoea*属 または *Erwinia*属菌と推定された 4 菌株は, M-MS培地上で, 火傷病菌と似たコロニー形態を示した (図10). これについては, さらに詳細な調査を行ったので,

その結果を次項に示す。

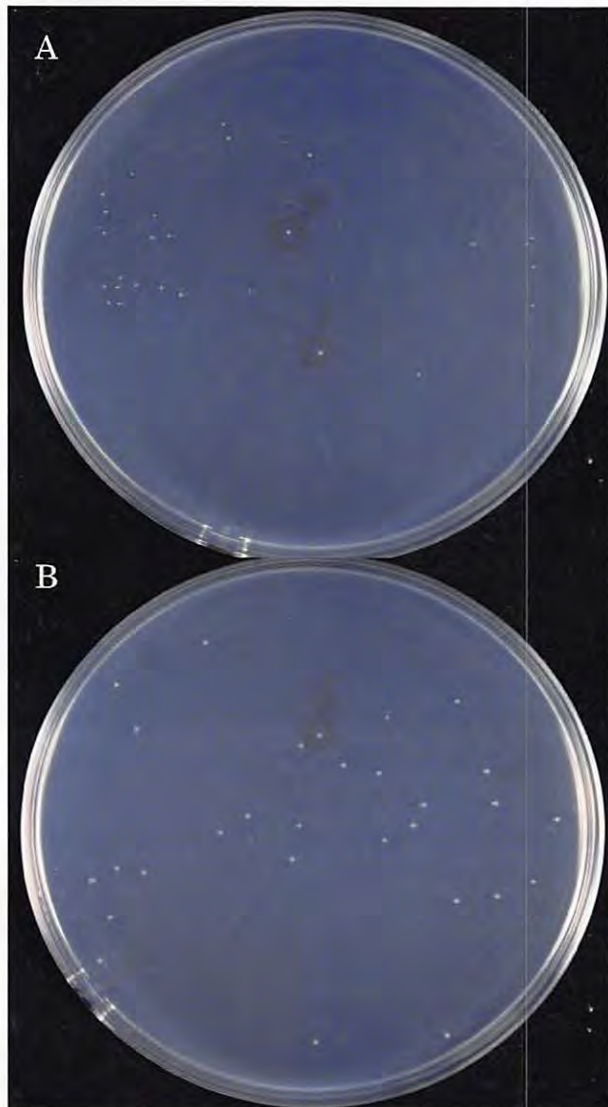


図10 M-MS平板培地上で火傷病菌コロニーとよく似た形態を示すニホンナシ花器表生細菌

- A: *Pantoea* 属または *Erwinia*属細菌と推定されたコロニー、
B: 火傷病菌(*E. amylovora*)

3) *Pantoea* 属または *Erwinia*属細菌と推定された分離菌株の病原性及び簡易同定キット調査結果

16S rRNA遺伝子の部分塩基配列の解析結果及びM-MS培地上でのコロニーの形態結果から、*Pantoea* 属または *Erwinia*属細菌と推定された分離菌株は、火傷病菌と分類学的に近縁である可能性が示された。そこで、この4菌株についてナシ幼果に対する病原性を調査したところ、4菌株はニホン

ナシ、セイヨウナシ幼果に対して病原性を示さなかった(図11)。API20NEのPIは4467740もしくは7067540となり、火傷病菌の4064540、0065450とは異なる結果となり、西山ら⁽⁵⁰⁾の「作物の細菌病—診断と防除追補版2001」のPI検索でも一致する菌種は存在しなかった。また、API20EのPIも、1005363及び1064372となり、火傷病菌の0005522とは異なり、APIweb検索でも、一致する菌株は得られなかった。これらの結果から、4菌株は、ナシ幼果に対して病原性を持たないことと、2種類のAPI簡易同定キットのPIが明らかに異なること、から火傷病菌とは異なる細菌であると結論づけた。

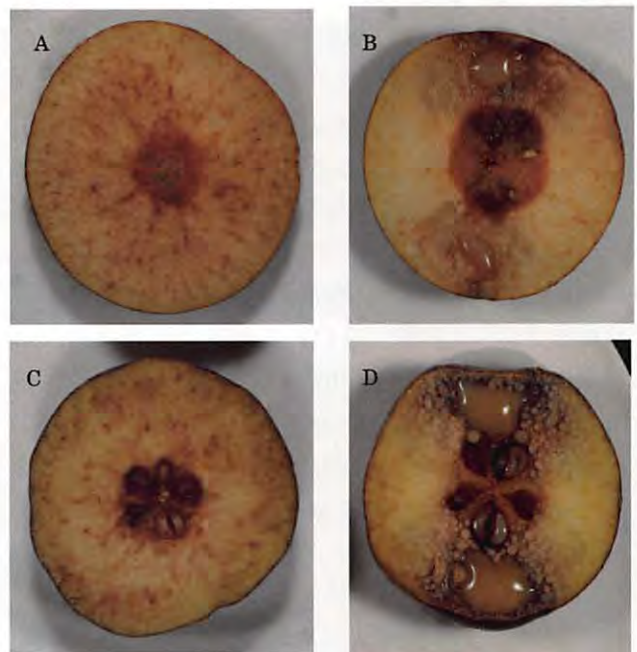


図11 *Pantoea*属または *Erwinia*属細菌と推定された分離菌及び火傷病菌のナシ幼果に対する病原性(接種4日後)

- A: 分離菌接種ニホンナシ幼果、
B: 火傷病菌接種ニホンナシ幼果、
C: 分離菌接種セイヨウナシ幼果、
D: 火傷病菌接種セイヨウナシ幼果

4) LB及びM-MS平板培地で分離された菌株の火傷病菌特異的プライマーによるPCRの結果

各特異的PCRにおいて、M-MS培地で分離された60菌株を用い、予備試験を行い、PCR条件を定めた。その結果BereswillのプライマーセットによるPCR

では、特異性を高めるためにアニーリング温度を上げたところ、火傷病菌の検出感度が著しく下がったため、PCR条件は原著論文どおりとした。また、GuilfordのプライマーセットによるPCRでは、特異性を高めるため、アニーリング温度を55℃から65℃に変更したところ、表生菌の非特異反応が抑制され、火傷病菌の検出限界は10⁴cfu/mlであり、検出に十分適用できると考えられたため、アニーリング温度を65℃とした。EarpoD、EprpoDプライマーセットに関しては、アニーリング温度を59℃から65℃に変更し、塩基配列から推定される増幅産物が375bpであることから、伸長時間を2分から1分に短縮した。また、使用するポリメラーゼをHot Start Ex Taqに変更した。この変更により、表生菌の非特異反応が抑制され、火傷病菌の検出限界はおよそ10⁴cfu/mlとなり、検出に十分適用できると考えた。

LB平板培地で分離された294菌株（酵母も含む）について、Bereswill, Guilford, EarpoD, EprpoDの各プライマーセットを用いてPCRを行ったところ、BereswillのプライマーセットによるPCRでは、約半数の菌株において非特異反応と見られるバンドが検出され、1菌株は陽性対照株と同じサイズのバンドが確認された。GuilfordのプライマーセットによるPCRでは、2菌株に非特異反応と見られるバンドが検出された。EarpoD及びEprpoDプライマーセットでは、非特異反応及び陽性対照株と同じサイズのバンドは確認されなかった（表11、図12）。

表11 既存の火傷病菌特異的プライマーセット及びグループ特異的プライマーセットを用いたニホンナシ花器表生菌株（294菌株）^aのPCRによる非特異的な遺伝子増幅

プライマー	増幅無し	非特異増幅有り	特異増幅有り ^b
Bereswill	163 ^c	130	1
Guilford	292	2	0
EarpoD(グループ1 特異的プライマー)	294	0	0
EprpoD(グループ2 特異的プライマー)	294	0	0

a : LB 平板培地で分離された菌株
b : 陽性対照株と同じサイズのバンドが検出された菌株
c : 数字は菌株数

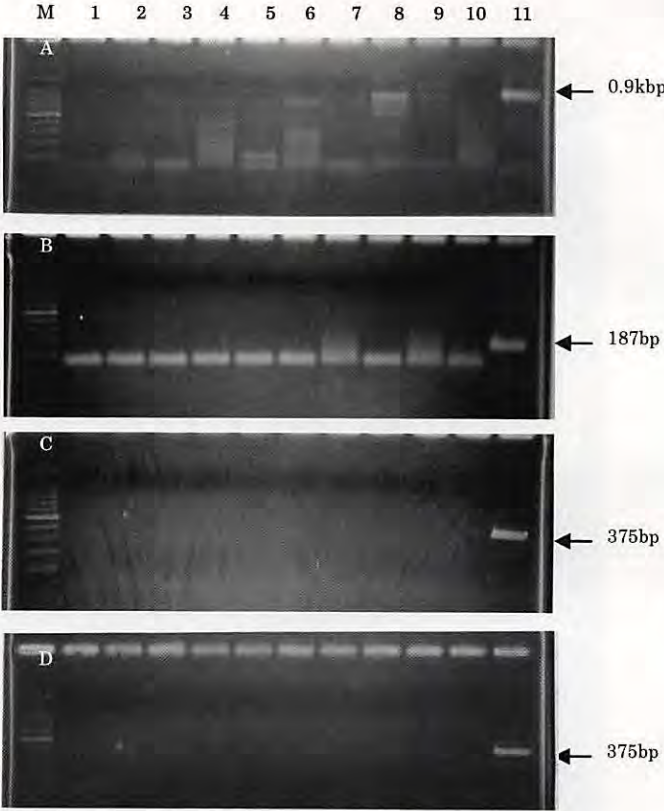


図12 ニホンナシ花器の表生菌株の特異的プライマーによるPCR（一部）

M: 100bp DNA marker、1: 酵母、2: *Bacillus* sp.、
3: *Pseudomonas* sp.、4: *Bacillus* sp.、
5: *Bacillus* sp.、6: *Bacillus* sp.、
7: *Streptomyces* sp.、8: *Pseudomonas* sp.、
9: *Pseudomonas* sp.、10: 不明、
11: *Erwinia amylovora*（ただし、Dの11はナシ枝枯細菌病菌）
A: Bereswillプライマーセット、
B: Guilfordプライマーセット、
C: EarpoDプライマーセット、
D: EprpoDプライマーセット、
1～9までの各菌株はLB平板培地にて分離された菌株

M-MS平板培地で分離された60菌株について、Bereswill, Guilford, EarpoD, EprpoDの各プライマーセットを用いてPCRを行ったところ、BereswillのプライマーセットによるPCRでは、53菌株において非特異反応と見られるバンドが検出されたが、陽性対照株と同じサイズのバンドは確認されなかった。また、Guilford, EarpoD及びEprpoDのプライマーセットでは、非特異反応及び陽性対照株と同じサイズのバンドは確認されなかった（表12、図13、14）。

表12 既存の火傷病菌特異的プライマーセット及びグループ特異的プライマーセットを用いたM-MS平板培地分離ニホンナシ花器表生細菌株(60菌株)のPCRによる非特異的な遺伝子増幅

プライマー	増幅無し	非特異増幅有り	特異増幅有り ^a
Bereswill	7 ^b	53	0
Guilford	60	0	0
EarpD(グループ1特異的プライマー)	60	0	0
EprpD(グループ2特異的プライマー)	60	0	0

a: 陽性対照株と同じサイズのコンドが検出された菌株
b: 数字は菌株数

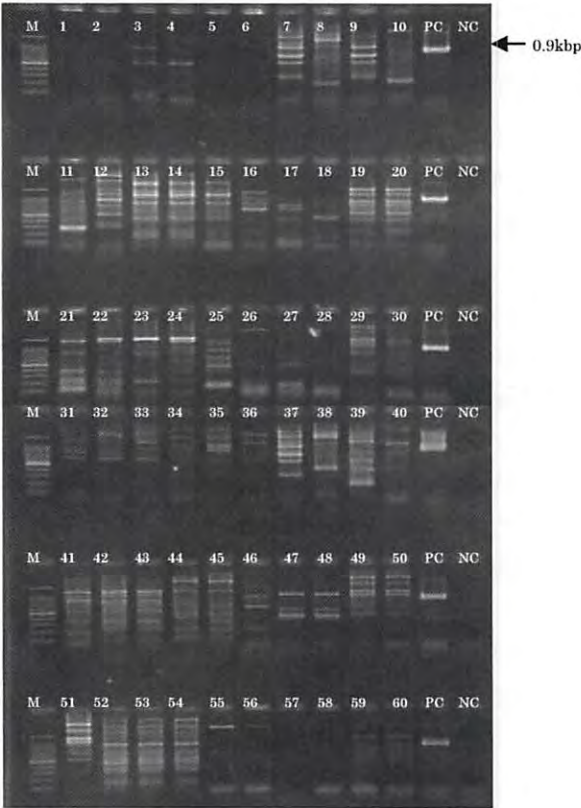


図13-1 M-MS平板培地で分離したニホンナシ花器表生細菌の火傷病菌特異的プライマーセット(Bereswill)によるPCR
M: 100bp DNA marker。1 ~60: 各分離菌株。
PC: 火傷病菌 NC: 蒸留水

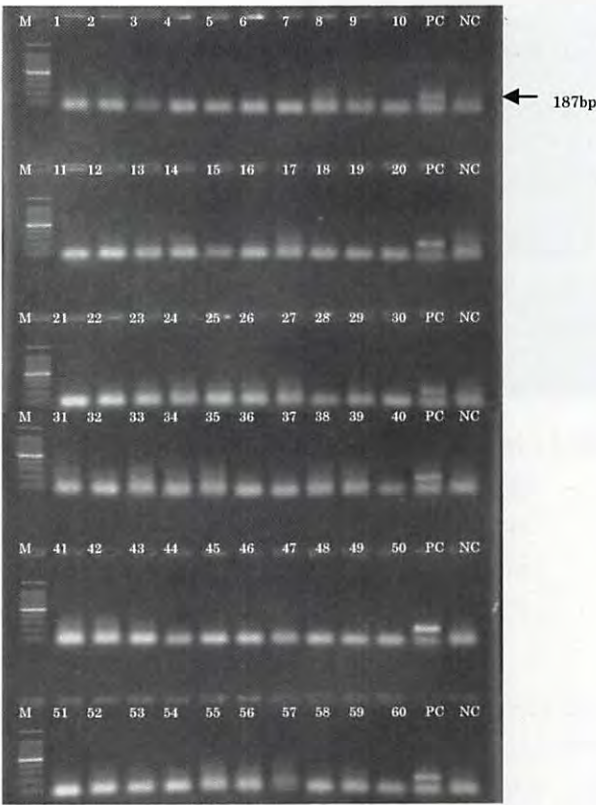


図13-2 M-MS平板培地で分離したニホンナシ花器表生細菌の火傷病菌特異的プライマーセット(Guilford)によるPCR
M: 100bp DNA marker 1 ~60: 各分離菌株
PC: 火傷病菌 NC: 蒸留水

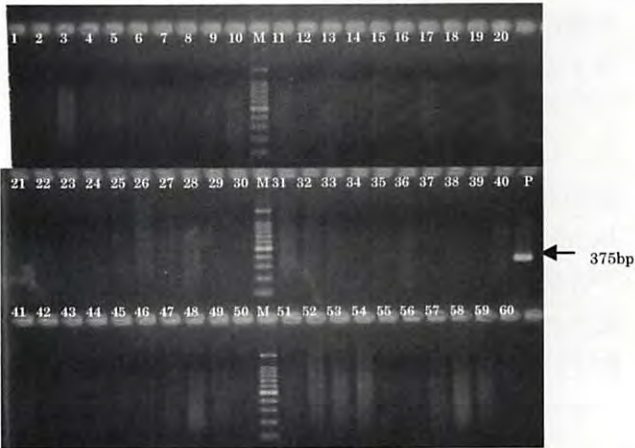


図13-3 M-MS平板培地で分離したニホンナシ花器表生細菌のグループ1特異的プライマー(EarpDプライマー)セットによるPCR
M: 100bp DNA marker 1 ~60: 各分離菌株
P: 火傷病菌

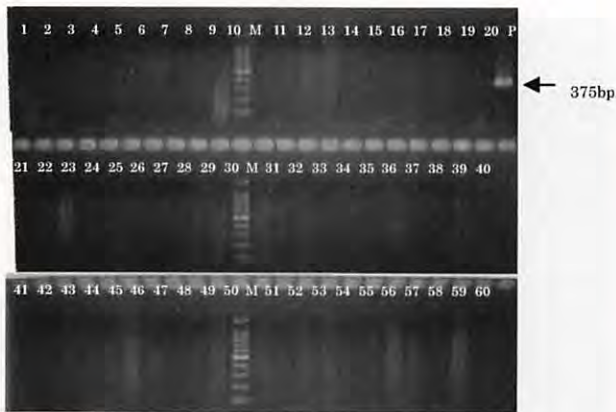


図14 M-MS平板培地で分離したニホンナシ花器表生細菌のグループ2特異的プライマー (EprpoDプライマー) セットによるPCR

M : 100bp DNA marker 1 ~ 60 : 各分離菌株
P : ナシ枝枯細菌病菌

これらの結果から、供試した3種の火傷病菌特異プライマーセットのうち、ニホンナシ花器表生菌に対して非特異反応が最も起きにくいのは、Earpodプライマーセットであり、それに次いでGuilfordのプライマーセットとなった。Bereswillのプライマーセットは、非特異反応を発現する菌株4割以上が存在した。このプライマーは以前より非特異反応が生じることが知られていたが (McManus and Jones⁽³⁸⁾, Llop ら⁽²⁹⁾)、今回の試験ほどに多数の表生菌についてプライマーの特異性を検討した報告は今までなかった。火傷病菌は、このプライマーセットでのPCRにおいて、0.9kbのバンドのみを増幅する。しかし、様々な菌が混在する自然界において火傷病罹病植物からの直接PCRを想定した場合、Bereswillのプライマーセットを用いたPCRは、多数の非特異バンドの中に0.9kbのバンドが隠されてしまう可能性もあることから、診断に用いることは実際上は難しいと考える。

また、Bereswillのプライマーセットを用いた場合、

陽性対照株と同じサイズのバンドが確認された菌株が存在した。この菌株の16S rRNA遺伝子からの推定属名は、*Pseudomonas*属であった。一方で、Guilfordのプライマーセット及びグループ1特異的プライマーセット (Earpodプライマーセット) では、この菌株に対して陽性対照株と同じサイズのバンドの増幅が認められないことから、特異性が十分にあると考えられた。

さらに、同様の試験を行った結果、グループ2特異的プライマーセット (EprpoDプライマーセット) についても非特異反応がなかったこと、及び陽性対照株と同じサイズのバンドが確認されなかったことから、このプライマーセットがナシ枝枯細菌病菌、*E. pyrifoliae*に対しても十分特異性が高いことが示された。

今回供試したニホンナシ花器の表生菌354菌株 (LB平板培地分離294菌株及びM-MS平板培地分離60菌株) についての結果から、Bereswillのプライマーセットは分離した細菌の同定には十分有用であるが、罹病植物体からの直接検出には向いていないと考えられた。

一方、pEA29をターゲットとしたPCRでは、Nested PCR (McManus and Jones⁽³⁸⁾, Llop ら⁽²⁹⁾) やPCR産物に対するDot-Blot-Hybridization (McManus and Jones⁽³⁸⁾) を行うことで特異性を高めている。これらの手法は十分な特異性があると考えられるが、pEA29を持たない火傷病菌の存在も確認されていることから (Llop ら⁽³⁰⁾, Llop ら⁽³¹⁾)、火傷病菌を普遍的に検出するためにはゲノムDNAを標的としたプライマーを用いた方がより検出特異性が高いと考えられる。

そこで、火傷病罹病植物体からPCRで火傷病菌を直接的に検出するには、Guilford, Earpodプライマーが適していると考えられ、両プライマーを用いて試験を行った。その結果を次で述べる。

IV 直接的PCRによる罹病植物からの火傷病菌の検出法

国内で火傷病または火傷病類似症状が発見された場合に、迅速な同定、検出法の一つとして罹病植物からの直接的PCRの利用が考えられる。これは、罹病植物組織からDNAを抽出し、それを鋳型として特異的プライマーを用いたPCRを行うことで、その症

状の原因菌の検出、同定を行う手法である。現在までに様々な植物病原菌で利用されており (Henson⁽¹⁸⁾, Rowhani ら⁽⁵⁷⁾, Minsavage ら⁽³⁹⁾, Ding ら⁽¹⁰⁾)、火傷病罹病植物からの火傷病菌の検出についても報告がある (McManus and Jones

1995⁽³⁸⁾, Maes ら⁽³⁴⁾, Llop ら⁽²⁹⁾, Taylor ら⁽⁶⁷⁾. これらの手法は、検出感度が十分に高いことから、利用価値も高いと考えられるが、特異的なDNA断片の増幅が確認された宿主植物試料から、火傷病菌が分離されていない事例があり (Llop ら⁽²⁹⁾, Maes ら⁽³⁴⁾), PCRでの判定に不安が残っている. そこで、本研究で設計した特異的プライマーが、火傷病罹病植物からの直接検出に利用できるか否かの調査を行うこととした. その際、以下の点について考慮した.

①火傷病菌は、日本に存在しない病原細菌であるため、植物への接種試験を行うためには、農林水産大臣の許可を受け、厳重に管理された実験室内の定温器もしくは隔離温室内で行う必要がある. 一方で、火傷病菌の宿主であるリンゴやナシのバラ科植物は木本植物であり、通常栽培された樹は、あまりにも大きくなりすぎてしまい、試験材料としては適していない. そこで、盆栽を用いることとした.

②PCR結果を担保するために同時に細菌の分離を行うこととした. その際に、各試料を相互汚染させないようにして供試する必要があることから、温州萎縮ウイルス (Satsuma dwarf virus : SDV) の迅速診断法に用いられている簡易磨砕容器を用いることとした. これは、ソフトラバー製のチューブで、そのうち側に溝がついており、容器内に試料と緩衝液を入れ、指で試料を磨砕することが可能なものであり、完全に密閉することができる (草野⁽²⁵⁾).

③植物体にはPCRを阻害する物質があることから、これらを除去するために様々な手法が取られている (Henson⁽¹⁸⁾, Llop ら⁽²⁸⁾, Maes ら⁽³⁴⁾) が、どの手法が優れているかは判然としない. 手法が煩雑化すると、それに伴い、試料間の相互汚染の危険性や熟練度による結果の違いが顕著になることから、手法としてはできるだけ簡便であることが望ましいと考えられる. 村元ら⁽⁴⁷⁾は、抗酸化物質を含ませたガラス繊維ろ紙を用いることで、迅速、簡便かつ低コストで植物からDNAを抽出する方法を考案し、この手法とPCRを用いてウイルス罹病葉から、ウイルスの検出を行っている. このことから、この手法を利用して火傷病罹病植物からDNAの抽出を試みることとした.

④これらの手法を用いるにあたり、発光遺伝子標識された火傷病菌を用いて、接种植物における火傷病

菌の存在の有無を、病徴の発現及び発光測定から視覚的に確認し、罹病部位、発光が観察された部位及び観察されなかった部位から試料の採取を行うこととした.

1 材料と方法

1) 発光遺伝子標識された火傷病菌を接種した植物体における発病と発光の経時的調査

発光遺伝子標識された火傷病菌 (Azegami ら⁽²⁾) を樹高約15cm、4~5年生の盆栽ヒメリンゴ (はなだて、福島県) の新梢4本に付傷接種し、2次元ルミノメーター (ARUGUS-50, 浜松ホトニクス (株), 静岡県) を用いて、新梢内における火傷病菌の発光を経時的に14日間観察した. また、同時に病徴発現も経時的に調査した.

ヒメリンゴは2次元ルミノメーターの暗箱に入れるため、及び観察しやすいように、適度に枝葉を剪定した. 付傷接種は火炎滅菌した白金線を用いて新梢を穿刺し、段階希釈した発光遺伝子標識された火傷病菌液を10ul置床することにより行った. 接種菌量は希釈平板培養法で算出した. その際の培地はLB平板培地にテトラサイクリンを20ppm添加したLBTe²⁰培地を用いた.

2) 発光遺伝子標識された火傷病菌を接種した植物体からの火傷病菌の分離と直接的PCRによる検出

発光遺伝子標識された火傷病菌を盆栽ヒメリンゴに接種した14日後に、接種して発病した部位、発病部と健全部の境界部位、発光が観察された外観上健全な部位、発光が観察されなかった外観上健全な部位から、火傷病菌の分離と直接的PCRによる検出を行った.

(1) 分離

試料とする新梢を5mmの長さで切り出し、滅菌水500ulを入れたSDV検定用簡易磨砕容器 (ミズホメディー (株), 佐賀県) を用いて磨砕した後、磨砕原液及び 10^{-2} , 10^{-4} に段階希釈した磨砕液をM-MS培地 (水野ら⁽⁴²⁾) に100ulずつ塗布し、火傷病菌の分離を行い、その濃度を調査した.

(2) DNA抽出とPCR

上記磨砕原液から、直接的PCRによって火傷病菌

を検出するために、ガラス繊維ろ紙を用いてDNAを抽出した。すなわち、「ガラス繊維濾紙を利用した植物からの迅速・簡便・低コストなDNA抽出法」(村元・沢野⁽⁴⁷⁾)に準じ、亜硫酸ナトリウム溶液に浸漬後、乾燥したガラス繊維濾紙(GA-55 ADVANTEC, Japan)をおよそ5mm角の大きさに切り出した後10ulの磨砕原液をしみこませ、プロトコールに従ってDNAを抽出した。PCRは、Guilfordら⁽¹⁶⁾及び本研究で設計したEarpoDプライマーセットを用い、反応条件は前章で定めた条件で行った。

3) 野生火傷病菌を接種した植物体からの火傷病菌の分離と直接的PCRによる検出

上記の試験を野生の火傷病菌(ICMP 1499株)を用いて同様に行った。盆栽ヒメリンゴ(樹高約15cm, 4~5年生)3樹の新梢12本に付傷接種し、14日後に新梢の発病部と健全部の境界部位及び前年枝に隣接する部分から、火傷病菌のM-MS培地による分離と直接的PCRによる検出を行った。接種、分離、PCRによる検出は上述した手法を用いた。接種菌量はLB平板培地を用いた希釈平板培養により算出した。

2 結果及び考察

1) 発光遺伝子標識された火傷病菌を接種した植物体における発光と発病

新梢の各付傷部位へ接種した発光遺伝子標識された火傷病菌量は、希釈平板法により算出したところ、それぞれ 1.5×10^5 cfu, 1.5×10^4 cfu, 1.5×10^3 cfu, 1.5×10^2 cfuであった。

火傷病菌を 1.5×10^5 cfu接種した新梢では、接種直後から接種部位で発光が観察され、その後、時間の経過とともに6日後まで接種部位から上位及び下位で発光が観察され、上位で約4.5cm, 下位で約5.5cmまで拡大した。その後発光は徐々に減衰し、接種14日後には、ごく一部でのみ発光が確認された。接種4日後に、接種部位より上位で褐変が観察され、時間の経過とともに拡大及び黒変し、14日後までには接種部位より上位は枯死した(図15)。

火傷病菌を 1.5×10^4 cfu接種した新梢では、接種1日後に接種部位及びその下位で発光が観察され、時間の経過とともに接種部位から上位及び下位で発光が観察されるようになり、5日後まで上位で約4cm, 下位で約5cmまで拡大した。その後発光は徐々に減

衰し、接種14日後には、ごく一部でのみ発光が観察された。接種5日後には接種部位の上位及び下位で褐変と黒変が観察され、上位の病徴は時間の経過とともに拡大し、14日後までに枯死した。下位の病徴は黒変したが、枯死しなかった(図16)。

火傷病菌を 1.5×10^3 cfu接種した新梢では、接種1日後に接種部位周辺でごく弱い発光が観察された後、時間の経過とともに発光の拡大が観察されたが、新梢が垂直に伸びていたため、発光が拡大した長さの計測はできず、接種14日後には、発光は観察されなかった。接種9日後に上位の一葉が萎れ、接種部から萎れた葉までの新梢の一部が黒変した。

火傷病菌を 1.5×10^2 cfu接種した新梢では、接種1日後に接種部位周辺でごく弱い発光が観察された後、時間の経過とともに5日後まで接種部位から上位及び下位で発光が観察され、上位で約7.5cm, 下位で約2cmまで拡大した。その後発光は徐々に減衰し、接種14日後には、ごく一部でのみ発光が観察された。接種8日後に上位の一葉の葉脈に褐変が観察され、その後黒変したが、葉が萎れることはなかった(図17)。



図15 発光遺伝子標識火傷病菌を接種したヒメリンゴ新梢における病徴と発光部位

(接種菌量 1.5×10^5 cfu)

- 1 : 接種6日後の病徴(左)及び発光部位(右)
- 2 : 接種13日後の病徴(左)及び発光部位(右)
発光部位写真上の色は発光強度を表している
(黄色>青緑>桃色>赤>青)
矢印は接種部位

2) 発光遺伝子標識された火傷病菌を接種した植物体からの火傷病菌の分離と直接的PCRによる検出

火傷病菌を 1.5×10^5 cfu, 1.5×10^4 cfu, 1.5×10^2 cfu

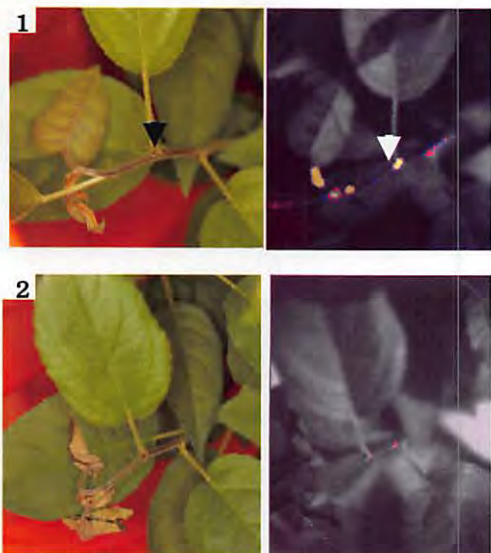


図16 発光遺伝子標識火傷病菌を接種したヒメリンゴ新梢における病徴と発光部位

(接種菌量 1.5×10^4 cfu)

- 1 : 接種5日後の病徴(左)及び発光部位(右)
 2 : 接種13日後の病徴(左)及び発光部位(右)
 発光部位写真上の色は発光強度を表している
 (黄色>青緑>桃色>赤>青)
 矢印は接種部位

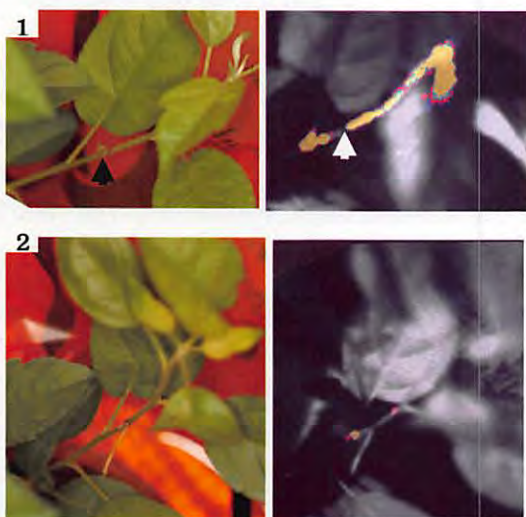


図17 発光遺伝子標識火傷病菌を接種したヒメリンゴ新梢における病徴と発光部位

(接種菌量 1.5×10^2 cfu)

- 1 : 接種5日後の病徴(左)及び発光部位(右)
 2 : 接種13日後の病徴(左)及び発光部位(右)
 発光部位写真上の色は発光強度を表している
 (黄色>青緑>桃色>赤>青)
 矢印は接種部位

接種した新梢の各部位(接種部位、枯死部位、健全部位等)(図18)から菌の分離を行ったところ、調査したほぼすべての部位から火傷病菌が分離された。また、同時に各部位からガラス繊維濾紙を用いた直接的PCRを行ったところ、火傷病菌が 10^5 cfu/部位以上分離された部位では、2種類の特異的プライマーを用いたPCRで特異的なバンドが検出された(図19, 表13)。

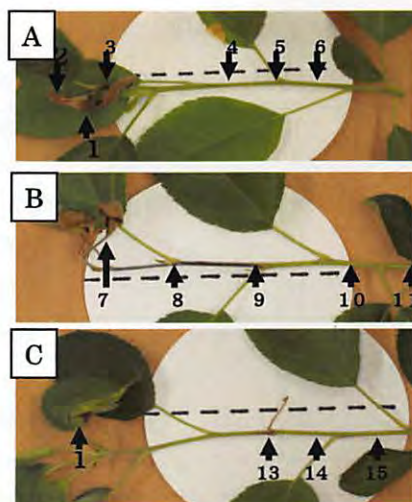


図18 発光遺伝子標識火傷病菌を接種したヒメリンゴ新梢における病徴の進展と検出に供した部位

A : 1.5×10^5 cfu接種新梢、B : 1.5×10^4 cfu接種新梢、C : 1.5×10^2 cfu接種新梢 1~15 : 分離に供した切り出し部位 3、8、13は接種部位 紙上の点線はサンプル切り出しの際に参考にするため5mm間隔に記してある 接種14日後

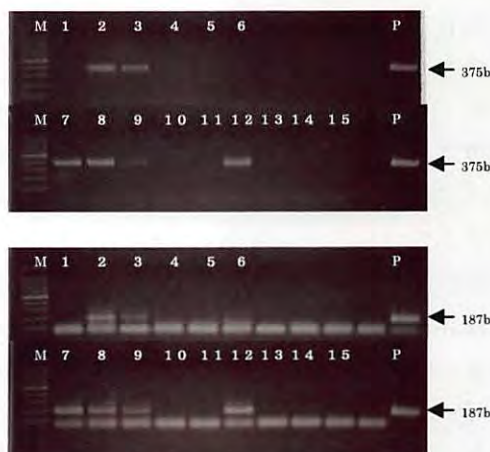


図19 発光標識火傷病菌接種新梢からの直接的PCRによる火傷病菌の検出

A : グループ1特異的プライマーセット(EarpoDプライマーセット)によるPCR B : GuilfordプライマーセットによるPCR 1~15は、図18の各切り出し部位に相当 M : 100bp DNA marker、PC : 発光遺伝子標識火傷病菌

表13 発光遺伝子標識火傷病菌を接種したヒメリンゴにおける各切り出し部位の発光状況、病徴、直接的PCR及び火傷病菌の分離

接種菌量 ^{a)}	分離部位 No.	発光状況	外観の症状	PCR による検出 ^{b)}		菌量 cfu/部位 ^{c)}	備考
				EarpolD	Guilford		
1.5×10 ⁵ cfu	1	発光後減衰	枯死	—	—	0	
	2	発光後減衰	枯死	+	+	1.1×10 ⁷	
	3	発光後減衰	黒変及び健全	+	+	4.0×10 ⁶	健全部との境界 (接種部位も含む)
	4	発光	健全	—	—	7.3×10 ³	
	5	発光後減衰	健全	—	—	1.8×10 ³	
	6	発光なし	健全	—	—	0	分離部位 No. 5 から 1cm 基部に近い部位
1.5×10 ⁴ cfu	7	発光後減衰	枯死	+	+	1.2×10 ⁶	
	8	発光後減衰	黒変	+	+	7×10 ⁷	接種部位
	9	発光後減衰	黒変及び健全	+	+	4×10 ⁵	健全部との境界
	10	発光	健全	—	—	1.2×10 ⁴	
	11	発光なし	健全	—	—	6.7×10 ²	分離部位 No. 10 から 2 cm 基部に近い部位
1.5×10 ² cfu	12	発光後減衰	葉脈褐変	+	+	1.9×10 ⁶	
	13	発光後減衰	褐変	—	—	1.3×10 ³	接種部位
	14	発光	健全	—	—	1.3×10 ³	
	15	発光なし	健全	—	—	2.0×10 ⁴	分離部位 No. 14 から 1cm 基部に近い部分

a) 接種：新梢の付傷部位に 1.5×10⁷, 1.5×10⁶, 1.5×10⁴cfu/ml の段階希釈菌液 10μl を置床

b) +：特異的 DNA 断片の増幅あり -：特異的 DNA 断片の増幅無し

c) 新梢 5mm あたりの菌量

これらのことから、発光遺伝子標識された火傷病菌は、1.5×10⁵, 1.5×10⁴, 1.5×10³, 1.5×10²cfu のいずれの菌量を接種した部位においても上下両方向へ移行していることが確認され、その移行距離は、いずれも上下方向を合わせて10cm程度であった。宿主植物内における火傷病菌の増殖については、Bogsら⁸⁾は、発光遺伝子または緑色蛍光タンパク質遺伝子で標識した火傷病菌が葉の葉毛より木部に侵入し、導管における水の流れに逆らって増殖し、導管壁を崩壊させていることを報告している。このことから、今回新梢に接種した発光遺伝子標識された火傷病菌も接種部位より導管を伝って上下方向へ移行し、増殖が著しい部分で病徴が発現したと考えられる。しかし、発光領域は6日目を境に徐々に減少していき、14日後にはほとんど観察されなくなった。一方で発病部において、火傷病菌は高濃度で分離された。分離された火傷病菌のコロニーを2次元ルミノメーターで観察したところ、そのコロニーの大部分が発光しなかったことから、接種時までにあるいはそれ以降に発光遺伝子を喪失した火傷病菌が発生し、植物

体内でその割合を徐々に増大させていったことにより、発光遺伝子標識された火傷病菌が減少したことが考えられた。

火傷病菌を1.5×10⁴~⁵cfu接種した新梢では顕著な黒変及び枯死が観察されたが、1.5×10²~³cfu接種した新梢では、ごく一部でのみ黒変が観察された。これら病徴が確認された部位からは、10⁶~⁷cfu/部位の火傷病菌が分離され、ガラス繊維濾紙を用いた直接的PCRでもDNAの特異増幅が確認された。ただし、一つの試料（表13 1.5×10⁵cfu接種新梢分離No.1）では、病徴が発現している部分でも火傷病菌の分離及びPCRによる検出ができなかった。しかし、発病部と健全部の境界部位からは、つねに火傷病菌の分離とPCRによる検出ができた。このことから、直接的PCRの試料として最適な部位は、必ずしも発病部とは限らず、発病部と健全部との境界部位がより適していると考えられた。一方で、外観上健全な部位からも、火傷病菌は、切り出し部位あたり10³~⁴cfu分離されたが、これらの部位からは、直接的PCRで検出できなかった。今回使用したGuilford及び

EarpoDのプライマーセットの検出限界は両方ともおよそ 10^4 cfu/mlであり、外観上健全な部位における火傷病菌の濃度が検出限界かそれ以下にあたるため、この二つのプライマーセットで検出するのは困難であると考えられた。

3) 野生火傷病菌を接種した植物体からの火傷病菌の分離と直接的PCRによる検出

新梢の各付傷部位へ接種した火傷病菌量は、希釈平板培養により算出すると、1新梢あたり 2.4×10^4 cfuであった。接種した12本の新梢は1本を除き、接種部位から上位が、4日目から黒変し始め、火傷病に特有の「羊飼いの杖」症状を示した(図20)。接種部位から下位は病徴を示さなかった。黒変しなかった1本の新梢は、外観上ほぼ健全であったが、一部でかいよう症状及び褐変が認められた(図21)。

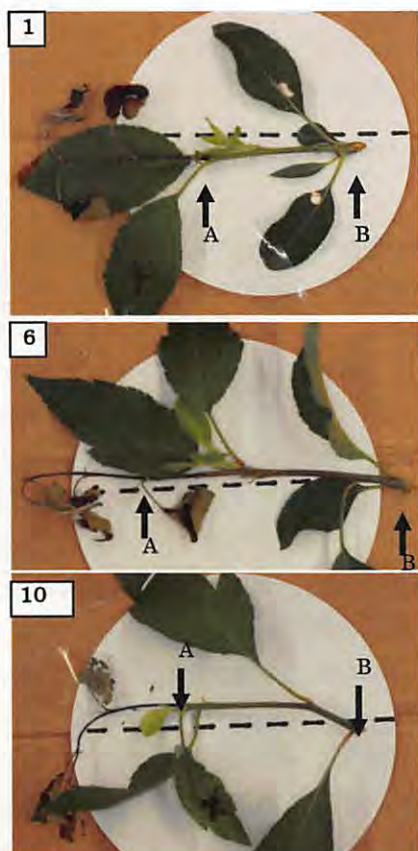


図20 野生火傷病菌を接種したヒメリンゴ新梢の典型的な病徴(一部)及び検出に供した部位
1, 6, 10: 表14中の接種新梢No.と対応している 黒矢印: 分離に供試した切り出し部位
A: 健全部との境界部位 B: 接種新梢基部
ろ紙上の点線はサンプル切り出しの際に参考にするため5mm間隔に記してある 接種14日後

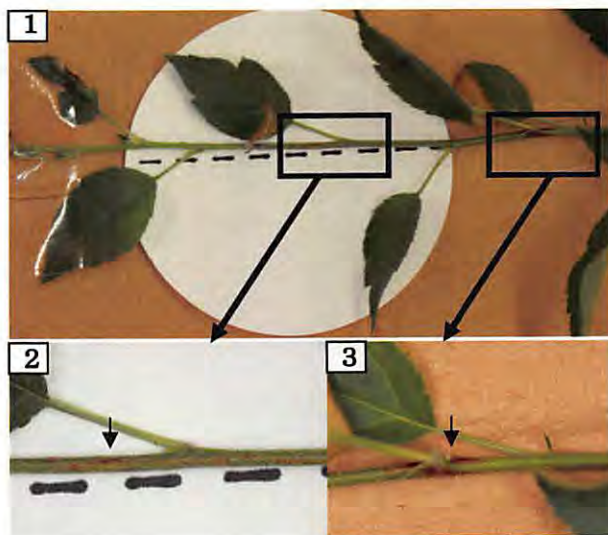


図21 野生火傷病菌を接種したヒメリンゴ新梢におけるかいよう症状及び褐変

1: 新梢全体写真
2: かいよう症状部位の拡大写真
3: 褐変変化症状の拡大写真
細矢印: 分離に供した部位

発病部と健全部の境界部位からは、新梢5mmあたり $10^5 \sim 10^6$ cfuの火傷病菌が分離され、2種の特異的プライマーセットを用いたPCRで特異的なバンドが検出された。また、前年枝に隣接する基部においては、6本の新梢から新梢5mmあたり $10^{1 \sim 3}$ cfuの火傷病菌が分離されたが、PCRでは検出できなかった。なお、残りの6本の基部からは火傷病菌は分離されなかった。黒変しなかった新梢のかいよう症状及び褐変した部位からは新梢5mmあたり $10^3 \sim 10^4$ cfuの火傷病菌が分離されたが、PCRでは検出できなかった(表14)。

野生火傷病菌を用いた再接種試験においても発病部と健全部の境からは、全ての試料からガラス繊維ろ紙を用いた本PCR検出手法で火傷病菌を検出することができたことから、本手法は、火傷病の侵入警戒調査において、火傷病類似症状が発見された場合に十分に活用できると考えられた。また、本手法はPCRに用いた試料から同時並行的に細菌を分離することが可能であり、PCRでDNAの特異増幅が確認された場合に、それが本当に火傷病菌であるか否かの確認、さらに生菌であるか否かの確認を行うことができる。

表14 野生火傷病菌を接種したヒメリンゴからの直接的PCRによる火傷病菌の検出と分離

接種新梢 No.	病徴	健全部との境界部位		接種新梢基部	
		PCR による 検出 ^{a)b)}	菌量 (cfu/部位) ^{c)}	PCR による 検出 ^{a)b)}	菌量 (cfu/部位) ^{c)}
1	黒変	+	3.9×10^6	—	0
2	黒変	+	7×10^4	—	1.3×10
3	黒変	+	2.4×10^5	—	0
4	黒変	+	6.4×10^6	—	1.7×10^2
5	褐変及び かいよう症状	—	$3.8 \times 10^{3 \sim 4}$	—	0
6	黒変	+	5.1×10^5	—	3.6×10
7	黒変	+	2.1×10^5	—	6.9×10^3
8	黒変	+	5.1×10^5	—	0
9	黒変	+	2.3×10^5	—	7.3
10	黒変	+	2.1×10^5	—	0
11	黒変	+	1.3×10^6	—	1.2×10
12	黒変	+	7.3×10^5	—	0

a) グループ 1 特異的プライマーセット (EarpoD プライマーセット) 及び Guilford プライマーセットの 2 種類を使用 いずれを用いても検出結果は同様であった

b) + : 特異的 DNA 断片の増幅あり - : 特異的 DNA 断片の増幅無し

c) 新梢 5mm あたりの菌量

V 総合考察

火傷病は、ナシ亜科に属するセイヨウナシ、リンゴの生産に破壊的な被害を及ぼす最も重要な細菌病である。また、近年はマルメロやビワにおいても大発生が確認されている (Momol and Yegen⁽⁴⁴⁾, Zilberstain ら⁽⁸¹⁾)。この病気を引き起こす火傷病菌は、キイチゴから分離された菌株を除いて、宿主範囲が広く、ナシ亜科に属する *Amelanchier*, *Cotoniaster*, *Crataegus*, *Photinia*, *Pyracantha*, *Sorbus*, *Stranvaesia* といったほとんどの属で自然発生の報告がある (Van der Zwet and Keil⁽⁷¹⁾)。これらの果樹、観賞用あるいは野生植物は、日本国内の至る所で栽培もしくは生育しており、万が一火傷病菌が国内に侵入した場合、このような宿主範囲の広い病原菌の根絶や、発生地域がそれ以上広がらないように封じ込めるための防除措置を効率的に行うためには、早期発見、早期防除が重要になる。

現在、国内に火傷病菌は存在していないが、ごく近縁の菌であるナシ枝枯細菌病菌が引き起こすナシ枝枯細菌病が発生していた時期 (1972年以前～1999年) がある。また、韓国で1995～1998年に発生した Asian pear blight も、火傷病菌にごく近縁で

ある *Erwinia pyrifoliae* によって引き起こされる。これら 3 種類の細菌は、それぞれがセイヨウナシやニホンナシによく似た病徴を示す病気を引き起こす一方で、ナシ枝枯細菌病菌や *E. pyrifoliae* は、宿主範囲が狭く、ごく一部のナシ亜科植物にしか病徴を現さない (谷井⁽⁶⁶⁾, Kim ら⁽²⁴⁾)。国内でこれらの細菌による病害が発生した場合、火傷病菌によるものと、それ以外によるものとは、宿主範囲の違いから、根絶や防除に関わる措置が当然異なってくる。そこで、極めて類似しているこれら 3 種類の細菌の系統関係を明らかにするために、16S rRNA 遺伝子、*gyrB* 遺伝子、*rpoD* 遺伝子の部分塩基配列を決定して系統樹を作成し、類別を試みた。その結果、*gyrB* 遺伝子、*rpoD* 遺伝子の部分塩基配列を用いて作成した系統樹では、3 種類の細菌が 2 つのグループに分かれ、グループ 1 は火傷病菌、グループ 2 はナシ枝枯細菌病菌ならびに *E. pyrifoliae* を含み、その信頼度は非常に高かった。さらに、16S rRNA、*gyrB*、*rpoD* 遺伝子の部分塩基配列を連結して系統樹を作成したところ、*gyrB*、*rpoD* 遺伝子で作成されたものと同様の系統樹が作成された。これらのことから、

3種類の細菌は分子系統学的に2つのグループに分かれることが強く示唆された。

火傷病菌とナシ枝枯細菌病菌の生理生化学的、遺伝的、血清学的な差異については、多くの報告があり (Beer ら⁽⁵⁾, Kim ら⁽²¹⁾, Momol ら⁽⁴⁵⁾, Mizuno ら⁽⁴⁰⁾, Mizuno ら⁽⁴¹⁾), ナシ枝枯細菌病菌は火傷病菌の中のひとつの系統と考えられていた。一方で, Asian pear blight の病原細菌である *E. pyrifoliae* は、火傷病菌とよく似ているが、DNA-DNAハイブリダイゼーションの値が40-50%を示したことから別種として提案され (Kim ら⁽²²⁾) 現在にいたっている。近年、これら3種類の菌の各種遺伝子、exopolysaccharide synthesis gene (Kim ら⁽²³⁾), AFLP markers, *groEL* (Maxson-Stein ら⁽³⁷⁾), *hrpN* genes (Jock and Geider⁽²⁰⁾) の分子系統解析の結果から、ナシ枝枯細菌病菌は火傷病菌よりも *E. pyrifoliae* に近縁であることが示された。本研究において、3種の遺伝子の分子系統解析でもこれらと同じ結果が得られ、火傷病菌の特異性が改めて示された。

ナシ亜科から分離された火傷病菌は、世界各地から集めた、分離年度、宿主が異なる菌株を用いたにも関わらず、*gyrB*, *rpoD* 遺伝子の部分塩基配列が分離菌株間でほとんど同一であった。これまでも、ナシ亜科の火傷病菌は、種レベルにおいて遺伝的に均一であるとされており (Momol and Aldwinckle⁽⁴⁶⁾, Rico ら⁽⁵⁸⁾), 今回の結果もこれを支持するものであった。しかし、近年のAFLP解析やPFGE解析 (Bazzi ら⁽⁴⁾, Zhang and Geider⁽⁸⁰⁾, Rico ら⁽⁵⁶⁾, Donat ら⁽¹¹⁾) は、火傷病菌のナシ亜科植物分離菌株について、詳細な遺伝子解析を行い、いくつかのパターンがあることを示しているが、AFLP解析の結果とPFGE解析の結果の相関については、はっきりしていない (Rico ら⁽⁵⁵⁾, Donat ら⁽¹¹⁾)。火傷病菌は遺伝的に均一でありながら、その中でいくつかの菌株群が存在していると考えられる。これに対して、ナシ枝枯細菌病菌はチュウゴクナシ及びセイヨウナシから、北海道でのみ、ほんの数年間で分離されているにも関わらず、*gyrB*, *rpoD* 遺伝子の部分塩基配列はわずかに異なっていた。これは、ナシ枝枯細菌病菌として分離同定された菌株が遺伝的にヘテロであることを示唆する。さらにこれらの遺伝子配列は、火傷病菌より *E. pyrifoliae* と相同性が高かった。

ナシ枝枯細菌病菌の学名は、日本植物病名目録上

は *Erwinia* sp. とされている (日本植物病名目録⁽⁴⁸⁾)。また、Mizuno ら⁽⁴⁰⁾ は、細菌学的性質の違い及びDNA-DNAハイブリダイゼーション試験の結果から *Erwinia amylovora* bv. 4としている。今回の結果から、ナシ枝枯細菌病菌は、*E. pyrifoliae* に近縁であることが示されたが、それぞれの細菌の火傷病菌に対するDNA-DNAハイブリダイゼーションの値は異なっており (Mizuno ら⁽⁴⁰⁾, Kim ら⁽²²⁾)、ナシ枝枯細菌病菌と *E. pyrifoliae* を同一の種として扱うことには疑問が残る。このことから、ナシ枝枯細菌病菌の分類学的位置については、火傷病菌や *E. pyrifoliae* とのDNA-DNAハイブリダイゼーション試験、細菌学的性質の比較、脂肪酸解析などを広範に行い、総合的に判断する必要がある。

以上の系統解析結果から火傷病菌とその類縁細菌は2グループに分かれた。そこで次に、グループ1 (火傷病菌)、グループ2 (ナシ枝枯細菌病菌, *E. pyrifoliae*) それぞれを検出・識別するため、*rpoD* 遺伝子の部分塩基配列より特異的プライマーを設計し、実際に各菌株を用いてその特異性を調査した。火傷病菌71菌株、ナシ枝枯細菌病菌14菌株、*E. pyrifoliae* 3菌株、火傷病菌に近縁な他の植物病原細菌11菌株及びニホンナシ花器の表生菌354菌株 (酵母16株を含む) を供試してPCRを行った。また、これらのPCRを行う際に予備試験を行い、非特異反応が生じないPCR条件を定めた。その結果、グループ1 特異的プライマーセット (EarpoDプライマーセット) では火傷病菌71菌株のみで375bpのDNA断片の増幅が確認されたが、それ以外の菌株では非特異反応も含めてDNA断片の増幅は確認されなかった。また、グループ2 特異的プライマーセット (EprpoDプライマーセット) ではナシ枝枯細菌病菌14菌株、*E. pyrifoliae* 3菌株で375bpのDNA断片の増幅が確認され、火傷病菌に近縁な他の植物病原細菌4菌株において375bpとは大きさの異なる非特異的なDNA断片の増幅がわずかに確認された。しかし、それ以外の菌株では非特異反応も含めてDNA断片の増幅は確認されなかった。また、グループ1 特異的プライマーセットの火傷病菌の検出限界は 4×10^4 cfu/ml, グループ2 特異的プライマーセットのナシ枝枯細菌病菌の検出限界は、 1.4×10^5 cfu/ml, *E. pyrifoliae* の検出限界は 5×10^4 cfu/ml であった。

これまでに火傷病菌の特異的プライマーセット

は、多数報告され (Bereswill ら⁽⁶⁾, Bereswill ら⁽⁷⁾, Guilford ら⁽¹⁶⁾, Maes ら⁽³⁴⁾), これらに応用した nested-PCR も報告されている (McManus and Jones⁽³⁸⁾, Llop ら⁽²⁹⁾). Llop ら⁽²⁹⁾ は、これらの PCR による火傷病菌の検出限界を調査し、およそ 7×10^{-1} cfu/ml と報告している。この検出感度は、今回設計したグループ 1, 2 特異的プライマーセットの検出感度と比較すると明らかに高いが、火傷病罹病植物からの火傷病菌の検出において、特異的な DNA 断片の増幅が確認された宿主植物試料から火傷病菌が分離されない事例も見られる (Llop ら⁽²⁹⁾, Maes ら⁽³⁴⁾)。この原因としては、火傷病菌の死菌もしくはコロニーを形成できないほどの微量の細菌を検出した可能性も考えられるが、全く異なる表生菌を検出した可能性も否定できない。また、Powney ら⁽⁵³⁾ はオーストラリアで分離されたバラ科植物から分離された表生菌に対して、これら特異的プライマーセット (Bereswill ら⁽⁶⁾, McManus and Jones⁽³⁸⁾, Llop ら⁽²⁹⁾) による PCR を行った際に、火傷病菌とは異なる表生菌において、火傷病菌と同じところに DNA 断片の増幅が確認されたことを報告している。今回作成したグループ特異的プライマーセットも PCR のサイクル数を増やせば 7×10^2 cfu/ml まで検出することが可能であった。その場合、ニホンナシ花器の表生菌において、火傷病菌とほぼ同じ大きさの DNA 断片の増幅が確認された菌株が存在した。このことから、これらの表生菌株で、DNA 断片の増幅がされない条件に定めており、そのため、グループ特異的プライマーセットの検出限界は低いものとなっている。PCR による植物病原体の検出は、プライマーセットの特異性により、その精度が決定されるが、宿主となる植物体の表生菌に対する特異性はあまり調査されていない。また、表生菌の菌相は、気候により異なることが考えられるため、その菌相を明らかにし、それらに対して非特異反応をおこさないプライマーセットの特異性の検討は、今後重要になると考える。

現在、国内に火傷病菌、ナシ枝枯細菌病菌ならびに *E. pyrifoliae* による病害の発生は確認されていないが、火傷病類似症状が確認された場合、その原因菌の迅速、正確な同定が必要となる。その際、上記 3 種の菌に近縁な表生菌が宿主植物上に存在していた場合、その同定は困難なものとなると予想され

る。そこで、火傷病菌及び *E. pyrifoliae* の宿主であるニホンナシの花器から網羅的に細菌を分離し、それらの火傷病菌ならびに *E. pyrifoliae* に対する類縁性、及び特異的プライマーセットを用いた PCR 診断法で擬陽性反応を起こす細菌の存在について検討した。茨城県、長野県、鳥取県から採取したニホンナシ花器より LB 培地及び火傷病菌用選択培地の一つである M-MS 培地 (水野ら⁽⁴²⁾) を用いて表生細菌の分離を行い、LB 培地で 278 菌株、M-MS 培地で 60 菌株の細菌株を得た。16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列から属を推定したところ、最も多く分離された細菌は *Pseudomonas* 属であり、コロニーの形態上の類別から推定した分離割合も茨城県で開花直後に採取した試料を除き、74.2~99.9% を占めた。それに次いで *Enterobacteriaceae* が 0.01~23.9% を占めた。また、分離された 338 菌株には火傷病菌、ナシ枝枯細菌病菌、*E. pyrifoliae* に近縁の細菌は存在しなかった。また、これら細菌株について、既存の火傷病菌特異的プライマーセット 2 種 (Bereswill ら⁽⁶⁾, Guilford ら⁽¹⁶⁾) 及び今回作製したグループ特異的プライマーセットを用いて PCR を行ったところ、グループ特異的プライマーセットが最も非特異反応が少なかった。それに次いで、PCR の条件を変更した Guilford のプライマーセットの非特異反応が少なく、Bereswill のプライマーは 40% 以上の菌株で非特異反応が観察された。

これらのことから、今回 *rpoD* 遺伝子の部分塩基配列から作製したグループ特異的プライマーは、火傷病菌、ナシ枝枯細菌病菌、及び *E. pyrifoliae* の検出、同定に十分利用できると考えられた。

火傷病類似症状が発見された場合には、通常の病原菌の分離培養及び各種性質 (分子生物学的、血清学的、生理生化学的) や病原性の調査に基づく同定が行われるが、これらの結果が出るまでには、およそ 2 週間かかる。より迅速に検出、同定を行うための一つの手法として、罹病植物体からの直接的な PCR が挙げられる。もちろんこの手法のみで同定はできないが、火傷病菌のように宿主範囲が広く、国内に侵入した際の危険性が高い病原細菌に対しては、暫定的な同定結果に基づく罹病枝の伐採等の防除措置を行うことが必要と考えられる。

盆栽ヒメリンゴと発光遺伝子標識された火傷病菌を用いた火傷病菌の動態及び直接的 PCR に供試

する試料部位の調査から、直接的PCRに供する最も適した部位は発病部と健全部の境界部位であることが明らかとなった。また、野生火傷病菌を用いた試験でも同様の結果が得られた。さらに、直接的PCRと同時に行った選択培地による火傷病菌の分離結果から、直接的PCRの検出限界は供試部位あたり 10^5 cfuであることが示された。Llopら⁽²⁹⁾は、火傷病菌が持つ特異的なプラスミドであるpEA29を標的として、nested-PCRにより 7×10^{-1} cfu/mlもの高感度な手法を開発し、植物体から火傷病菌を検出している。しかし、pEA29を持たない火傷病菌の存在が報告されていることから、火傷病菌の植物体からの検出においては総合的にいくつかの技術を組み合わせる必要があるとしている（Llopら⁽³⁰⁾、Llopら⁽³¹⁾）。EPPOの火傷病診断マニュアルにおいても、

病徴を示している植物体からの初期の迅速な同定は3種類の異なる試験（2種の血清学的試験、1種の特異的PCR）を行い、3種の試験とも陽性とならない場合は、同時に行う火傷病菌の分離結果に基づいて同定を行っている。今回、試料の磨砕に利用した温州萎縮ウイルス(SDV)検定用簡易磨砕容器は、試料磨砕時の試料間の相互汚染を起こしにくく、また、この磨砕液からガラス繊維ろ紙を利用したDNA抽出法を用いることにより、火傷病菌のPCRによる検出ができた。さらに磨砕液からの分離も可能であることが示された。このことから、今回行った手法は、火傷病類似症状が発見された場合、同じ試料から同時に火傷病菌の検出、分離を行うことで、初期の迅速な同定に十分利用できると考えられる。

摘 要

火傷病は、火傷病菌(*Erwinia amylovora*)によって引き起こされるナシ、リンゴの最も重要な細菌性病害の一つで、1780年代に、アメリカ合衆国の東部で初めて確認された。これまでに、北米大陸、ヨーロッパ地域、中東地域等40ヶ国以上で発生し、時に甚大な被害を及ぼしている。本研究では、バラ科植物（特にリンゴ・ナシ）に火傷病及び火傷病類似の病害を引き起こす3種類の細菌（火傷病菌、ナシ枝枯細菌病菌、*Erwinia pyrifoliae*）について、分子系統解析を試みた。さらに、それら細菌を検出・識別するための特異的なPCRプライマーセットを設計した。また、火傷病罹病植物からの直接的PCRによる診断時に、擬陽性反応を起こす可能性のあるニホンナシ花器に生息する常在細菌の調査を行うとともに、既存の簡便な手法を利用し、実際の利用場面において検出に適した試料の採取部位及びその検出感度について調査を行った。

火傷病菌、ナシ枝枯細菌病菌、*E. pyrifoliae*について、16S rRNA遺伝子、*gyrB*遺伝子、*rpoD*遺伝子の部分的塩基配列を決定し、分子系統解析を行った。その結果、3種類の細菌は2つのグループに分かれた。グループ1は火傷病菌、グループ2はナシ枝枯細菌病菌ならびに*E. pyrifoliae*を含んでいた。火傷病菌の*gyrB*、*rpoD*遺伝子の配列は、ほとんど同一であった。一方でナシ枝枯細菌病菌は互いにわずかに

に配列が異なっていた。このことは、火傷病菌が分子系統学的にはほぼ単一の系統が広く世界に伝播したのに対して、ナシ枝枯細菌病菌は限られた地域に多様な系統が存在していたことを示唆した。

*rpoD*遺伝子の塩基配列からグループ1、グループ2それぞれを検出・識別するための特異的プライマーセットを設計し、実際に各菌株を用いてその特異性を調査した。グループ1特異的プライマーセットは火傷病菌のみで、単一の375bpのDNA断片の増幅が確認された。また、グループ2特異的プライマーセットはナシ枝枯細菌病菌、*E. pyrifoliae*のみで、単一の375bpのDNA断片の増幅が確認され、その検出限界は 10^{4-5} cfu/mlであった。

国内のニホンナシの花器から網羅的に細菌を分離し、火傷病菌ならびにAsian pear blight pathogenに対する類縁性、及び特異的プライマーセットを用いたPCR診断法で擬陽性反応を起こす細菌の存在について検討した。茨城、長野、鳥取各県から採取した花器より表生細菌の分離を行い、338株の細菌株を得た。16S rRNA遺伝子の部分的塩基配列から属を推定したところ、大部分が*Pseudomonas*属または*Enterobacteriaceae*であった。得られた細菌株の中には、火傷病菌や*E. pyrifoliae*に類似している細菌は存在しなかった。また、これら細菌株について、既存の火傷病菌特異的プライマーセット2種及び今

回 *rpoD* 遺伝子の部分的塩基配列から作成したグループ特異的プライマーセットを用いてPCRを行ったところ、今回作成したグループ特異的プライマーセットが最も非特異反応がなかった。

PCRによって病原体を罹病植物体から直接検出するために、PCR反応を阻害する物質の除去及び、罹病植物体のどの部位がPCR用試料として適しているかを調査した。発光遺伝子標識された火傷病菌及び野生の火傷病菌を盆栽ヒメリンゴの新梢に付傷接種し、細菌の再分離と直接的PCRを試みた。簡易

磨砕容器で試料を磨砕し、ガラス繊維ろ紙を用いた簡便迅速なDNA抽出法により、PCR用の鋳型DNAを抽出して行った。PCR用試料として最適な部位は発病部と健全部の境界部位であり、その時の検出限界は切り出し部位あたり $10^5 \sim 10^6$ cfu であった。

これらの研究結果は、万が一火傷病菌が日本に侵入した際の同定作業の迅速性、正確性を高めることに寄与するとともに、他の植物病原細菌に対しても応用可能と考えられた。

引用文献

1. Agrios, G. N. (2004) Plant Pathology fifth edition 12. Plant diseases caused by prokaryotes Fire blight of pear and apple. P641-647
2. Azegami, K., T. Tsukamoto, T. Matsuura, T. Ohara, Y. Inoue, A. Mizuno, K. Yoshida, H. Bessho, S. Kimura, M. Goto (2004) Invasion and colonization of mature apple fruit by *Erwinia amylovora* tagged with bioluminescence genes. J. Gen. Plant Pathol. 70, 336-341
3. 畔上耕児・松浦貴之・井上康宏・佐々木厚子 (2007) リンゴ成熟果実、ニホンナシ花器から分離された細菌がリンゴ成熟果実又はナシ幼果に起こす症状. 日植病報, 73, 40(講要)
4. Bazzi, C., M. Merighi, M. M. Lopez, Y. Zhang, S. Jock, K. Geider (1999) Differentiation of *Erwinia amylovora* strains isolated in southern Europe by PFGE analysis. Acta. Hor. , 489, 197-200
5. Beer, S. V., J. H. Kim, C. H. Zumoff, A. J. Bogdanove, R. J. Laby, H. L. Gustafson, M. T. Momol, H. S. Aldwinckle, A. Tani, O. Tamura (1996) Characterization of bacteria that cause "bacterial shoot blight of pear" in Japan. Acta. Hor. , 411, 179-181
6. Bereswill, S., A. Pahl, P. Bellemann, W. Zeller, K. Geider (1992) Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. Appl. Environ. Microbiol., 58, 3522-3526
7. Bereswill, S., P. Bugert, I. Bruchmuller, K. Geider (1995) Identification of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. Appl. Environ. Microbiol. , 61, 2636-2642
8. Bogs, J., I. Bruhmuller, C. Erbar, K. Geider (1998) Colonization of host plants by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* marked with genes bioluminescence and fluorescence. Phytopathology, 88, 416-421
9. 卜蔵梅之丞 (1915) 大正3年の疫学会と将来の展望—苹果花焼病の惨害. 病虫雑, 2, 10-18
10. Ding, F., G. Wang, G. Yi, Y. Zhong, J. Zeng, B. Zhou (2005) Infection of wampee and lemon by the citrus huanglongbing pathogen (*Candidatus liberibacter asiaticus*) in China. J. Plant Pathol., 87, 207-212
11. Donat, V., E. G. Biosca, J. Penalver, M. M. Lopez (2007) Exploring diversity among Spanish strains of *Erwinia amylovora* and possible infection sources. J. Appl. Microbiol. , 103, 1639-1649
12. Dye, D. W. (1968) A taxonomic study of the genus *Erwinia* I. The "amylovora" group. N. Z. Jl. Sci., 11, 590-607
13. Falkenstein, H., W. Zeller, K. Geider (1989) The 29 kb plasmid, common in strains of *Erwinia amylovora*, modulates development

- of fireblight symptoms. J. Gen. Microbiol., 135, 2643-2650
14. Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies, an approach using the bootstrap. Evolution, 39, 783-791
 15. Fox, G. E., J. D. Wisotzkey, P. Jurtshuk Jr. (1992) How close is close, 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. Int. J. Syst. Bacteriol., 42, 166-170
 16. Guilford, P. J., R. K. Taylor, R. G. Clark, C. N. Hale, R. L. S. Forster (1996) PCR-based techniques for the detection of *Erwinia amylovora*. Acta. Hor., 411, 53-56
 17. Hasegawa, M., H. Kishino, T. Yano (1985) Dating of the Human-Ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. J. Mol. Evol., 22, 160-174
 18. Henson, J. M. (1993) The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. Annu. Rev. Phytopathol., 31, 81-109
 19. Holmes, D. E., K. P. Nevin, D. R. Lovley (2004) Comparison of 16S rRNA, *nifD*, *recA*, *gyrB*, *rpoB* and *fusA* genes within the family Geobacteraceae fam. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54, 1591-1599
 20. Jock, S., K. Geider (2004) Molecular differentiation of *Erwinia amylovora* strains from North America and of two Asian pear pathogens by analyses of PFGE patterns and *hrpN* genes. Environ. Microbiol., 6, 480-490
 21. Kim, J. H., S. V. Beer, C. H. Zumoff, R. J. Laby, H. L. Gustafson, H. S. Aldwinckle, A. Tani (1996) Characterization of *Erwinia amylovora* strains from different hosts and geographical areas. Acta. Hor., 411, 183-185
 22. Kim, W. S., L. Garden, S. L. Rhim, K. Geider (1999) *Erwinia pyrifoliae* sp. nov., a novel pathogen that affects Asian pear trees (*Pyrus pyrifolia* Nakai). Int. J. Syst. Bacteriol., 49, 899-906
 23. Kim, W. S., M. Hildebrand, S. Jock, K. Geider (2001a) Molecular comparison of pathogenic bacteria from pear trees in Japan and the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. Microbiology, 147, 2951-2959
 24. Kim, W. S., S. Jock, J. P. Pulin, S. L. Rhim, K. Geider (2001b) Molecular detection and differentiation of *Erwinia pyrifoliae* and host range analysis of the asian pear pathogen. Plant Dis., 85, 1183-1188
 25. 草野成夫 (2006) モノクローナル抗体を用いた温州萎縮ウイルスの迅速診断法. 植物防疫, 60, 491-495
 26. Laurent, J., M. A. Barny, A. Kotoujansky, P. Dufriche, J. L. Vanneste (1989) Characterization of a ubiquitous plasmid in *Erwinia amylovora*. Mol. Plant-Microbe Interact., 2, 160-164
 27. Le Roux, F., M. Gay, C. Lambert, J. L. Nicolas, M. Gouy, F. Berthe (2004) Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences. Dis. Aquat. Org., 58, 143-150
 28. Llop, P., P. Caruso, J. Cubero, C. Morente, M. M. Lopez (1999) A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. J. Microbiol. Methods, 37, 23-31
 29. Llop, P., A. Bonaterra, J. Penalver, M. M. Lopez (2000) Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. Appl. Environ. Microbiol., 66, 2071-2078
 30. Llop, P., V. Donat, M. M. Lopez, J. Cabrefiga, L. Ruz, E. Montesinos, J. L. Palomo, M. Rodriguez (2006a) An *Erwinia amylovora* strain without plasmid pEA29 isolated in a nursery from hawthorn. Acta. Hor., 704, 431-435
 31. Llop, P., V. Donat, M. Rodriguez, J. Cabrefiga, L. Ruz, J. L. Palomo, E. Montesinos, M. M. Lopez (2006b) An indigenous virulent strain of *Erwinia amylovora* lacking the ubiquitous

- plasmid pEA29. *Phytopathology*, 96, 900-907
32. Lonetto, M., M. Gribskov, C. A. Gross (1992) The $\sigma 70$ family, sequence conservation and evolutionary relationships. *J. Bacteriol.*, 174, 3843-3849
 33. Ludwig, W., O. Strunk, S. Klugbauer, N. Klugbauer, M. Weizenegger, J. Neumaier, M. Bachleitner, K. H. Schleifer (1998) Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis*, 19, 554-568
 34. Maes, M., P. Garbeva, C. Crepel (1996) Identification and sensitive endophytic detection of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* with 23S ribosomal DNA sequences and the polymerase chain reaction. *Plant Pathol.*, 45, 1139-1149
 35. Marchesi, J. R., T. Sato, A. J. Weightman, T. A. Martin, J. C. Fry, S. J. Hiom, W. G. Wade (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 795-799
 36. Matsuura, T., H. Shinohara, Y. Inoue, K. Azegami, S. Tsushima, T. Tsukamoto, A. Mizuno (2007) *Erwinia* isolates from the bacterial shoot blight of pear in Japan are closely related to *Erwinia pyrifoliae* based on phylogenetic analyses of *gyrB* and *rpoD* genes. *J. Gen. Plant. Pathol.*, 73, 53-58
 37. Maxson-Stein, K., G. C. McGhee, J. J. Smith, A. L. Jones, G. W. Sundin (2003) Genetic analysis of a pathogenic *Erwinia* sp. isolated from pear in Japan. *Phytopathology*, 93, 1393-1399
 38. McManus, P. S., A. L. Jones (1995) Detection of *Erwinia amylovora* by Nested PCR and PCR-dot-blot and reverse-blot hybridizations. *Phytopathology*, 85, 618-623
 39. Minsavage, G. V., C. M. Thompson, D. L. Hopkins, R. M. V. B. C. Leite, R. E. Stall (1994) Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology*, 84, 456-461
 40. Mizuno, A., S. Sato, A. Kawai, K. Nishiyama (2000) Taxonomic position of the causal pathogen of bacterial shoot blight of pear. *J. Gen. Plant Pathol.*, 66, 48-58
 41. Mizuno, A., S. Sato, A. Kawai (2002) Serological differences among *Erwinia amylovora* biovars. *J. Gen. Plant Pathol.*, 68, 350-355
 42. 水野明文・塚本貴敬・川合昭 (2002) リンゴ生果実内部からの火傷病菌(*Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow ら., 1920)の検出方法. 植防研報, 38補冊, 9-12
 43. 水野明文・佐藤成良・川合昭・高橋賢司・西山幸司・畔上耕児・家城洋之・駒村研三(2003) 日本における火傷病発生の疑義. 植防研報, 39, 109-116
 44. Momol, M. T., O. Yegen (1993) Fire blight in Turkey, 1985-1992. *Acta. Hor.*, 338, 37-39
 45. Momol, M. T., E. A. Momol, W. F. Lamboy, J. L. Norelli, S. V. Beer, H. S. Akdwinckle (1997) Characterization of *Erwinia amylovora* strains using random amplified polymorphic DNA fragments (RAPDs). *J. Appl. Microbiol.*, 82, 389-398
 46. Momol, M. T., H. S. Akdwinckle (2000) Genetic diversity and host range of *Erwinia amylovora*. Pages 55-72 in, *Fire Blight. The Disease and its Causative Agent, Erwinia amylovora*. Vanneste, J. L. ed. CAB International, Wallingford, UK
 47. 村元靖典・沢野定憲 (2004) ガラス繊維濾紙を利用した植物からの迅速・簡便・低コストなDNA抽出法. 平成16年度「関東東海北陸農業」研究成果情報 生物工学部会
 48. 日本植物病理学会編 (2000) 日本植物病名目録. 日本植物防疫協会 867pp.
 49. 西山幸司・江塚昭典 (1977) ラフ型集落を生じるライグラス類かさ枯病細菌の分離例 日植病報, 43, 426-431
 50. 西山幸司・高橋幸吉・高梨和雄 編 (2001) 作物の細菌病 2001年追補版. CD-ROM版 日本植物防疫協会

51. Ochman, H., A. C. Wilson (1987) Evolution in bacteria, Evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *J. Mol. Evol.*, 26, 74-86
52. OEPP/EPPO (2007) *Erwinia amylovora* Distribution map. CABI Pub Wallingford. Map2 (Edition 8)
53. Powney, R., K. Plummer, S. V. Beer, J. Luck, B. Rodoni (2008) Evaluation of PCR-based protocols for the detection of *Erwinia amylovora*. *Acta. Hor.*, 793, 505-511
54. Rhim, S. L., B. Volksch, L. Garden, J. P. Paulin, C. Langlotz, W. S. Kim, K. Geider (1999) *Erwinia pyrifoliae*, an *Erwinia* species different from *Erwinia amylovora*, causes a necrotic disease of Asian pear trees. *Plant Pathol.*, 48, 514-520
55. Rico, A., A. Ortiz-Barredo, J. Murillo (2004) Genetic characterization of *Erwinia amylovora* strains by amplified fragment length polymorphism. *J. Appl. Microbiol.*, 96, 302-310
56. Rico, A., M. E. Fuhrer, A. Ortix-Barredo, J. Murillo (2008) Polymerase chain reaction fingerprinting of *Erwinia amylovora* has a limited phylogenetic value but allows the design of highly specific molecular markers. *Phytopathology*, 98, 260-269
57. Rowhani, A., C. Chay, A. Golino, B. W. Falk (1993) Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf virus in grapevine tissue. *Phytopathology*, 83, 749-753
58. Saitou, N., M. Nei (1987) The Neighbor-joining method, a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4, 406-425
59. 佐々木厚子・松浦貴之・井上康宏・島根孝典・畔上耕児(2007) ニホンナシ花より火傷病菌用選択培地及びLB培地に分離された細菌集団の解析. *日植病報*, 73, 40 (講要)
60. Sasaki, A., T. Shimane, K. Azegami, T. Matsuura, Y. Inoue (2008) Bacterial isolates inhabiting Japanese pear flowers and their potential pathology. *Acta. Hor.*, 793, 89-94
61. Sawada, H., F. Suzuki, I. Matsuda, N. Saitou (1999) Phylogenetic analysis of *Pseudomonas syringae* pathovars suggests the horizontal gene transfer of *argK* and the evolutionary stability of *hrp* gene cluster. *J. Mol. Evol.*, 49, 627-644
62. Stackebrandt, E., B. M. Goebel (1994) Taxonomic note, a place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44, 846-849
63. Stockwell, V. O., R. J. McLaughlin, M. D. Henkels, J. E. Loper, D. Sugar, R. G. Roberts (1999) Epiphytic colonization of pear stigmas and hypanthia by bacteria during primary bloom. *Phytopathology*, 89, 1162-1168
64. 末次哲雄・佐藤成良・高山睦雄・山内淳司 (1981) 植物検疫重要細菌病の診断技法に関する研究 第Ⅱ報 *Erwinia amylovora* の検出について. *植防研報*, 17, 77-85
65. 谷井昭夫・田村修・尾崎政春 (1981) ナシ樹火傷病類似症を起因する病原細菌. *日植病報*, 47, 102 (講要)
66. 谷井昭夫 (1983) ナシ火傷病類似症とその病原細菌. *日植病学会第12回植物細菌病談話会講演要旨*, p.18-23
67. Taylor, R. K., P. J. Guilford, R. G. Clark, C. N. Hale (2001) Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers. *N. Z. J. Crop Hor. Sci.*, 29, 35-43
68. Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D. G. Higgins (1997) The CLUSTAL_X windows interface, flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25, 4876-4882
69. 上田栄次郎 (1903) 苹果樹腐爛病病原細菌. *大日本農会報*, 260, 1-3
70. Van der Zwet, T., H. L. Keil (1979a) Fire Blight, A Bacterial Disease of Rosaceous Plants

- Chapter 1 Historical Review. Agriculture Handbook 510, U S Dept of Agriculture, Science and Education Administration, Washington, DC, p2-9
71. Van der Zwet, T., H. L. Keil (1979b) Fire Blight, A Bacterial Disease of Rosaceous Plants Chapter 6 Host Range. Agriculture Handbook 510, U S Dept of Agriculture, Science and Education Administration, Washington, DC, p29-36
 72. Watt, P. M., I. D. Hickson (1994) Structure and function of type II DNA topoisomerases. *Biochem. J.*, 303, 681-695
 73. Winslow, C. E. A., J. Broadhurt, R. E. Buchanan, C. Krumwied Jr, L. A. Rogers, G. H. Smith (1920) The Families and Genera of the Bacteria. *Jour. Bact.*, 5, 209
 74. Woese, C. R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, 51, 221-271
 75. Yamamoto, S., S. Harayama (1995) PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1104-1109
 76. Yamamoto, S., S. Harayama (1998) Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48, 813-819
 77. Yamamoto, S., H. Kasai, D. L. Arnold, R. W. Jackson, A. Vivian, S. Harayama (2000) Phylogeny of the genus *Pseudomonas*, intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology*, 146, 2385-2394
 78. Yanez, M. A., V. Catalan, D. Apraiz, M. J. Figueras, A. J. Martinez-Murcia (2003) Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *Int. J. Syst. Evo. Microbiol.*, 53, 875-883
 79. Young, J. M., G. S. Saddler, Y. Takikawa, S. H. De Boer, L. Vauterin, L. Gardan, R. I. Gvozdyzk, D. E. Stead (1996) Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. *Rev. Plant Pathol.*, 75, 721-763
 80. Zhang, Y., K. Geider (1997) Differentiation of *Erwinia amylovora* strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4421-4426
 81. Zilberstaine, M., Z. Herzog, S. Manulis, D. Zutra (1996) Outbreak of fire blight threatening the loquat industry in Israel. *Acta. Hor.*, 411, 177-178

Studies on Phylogenetic Analyses and Detection Method of Fire Blight Pathogen and its Closely Related Bacteria

Takayuki Matsuura*

Summary

1. Introduction

Fire blight, caused by *Erwinia amylovora*, is the world's most important bacterial disease of pear and apple. It was first reported in the eastern area of the United States of America (Hudson Valley, New York State) in the 1780s. Thereafter the disease spread south and westward in the USA. In early 1900s, the disease was confirmed all over the USA. Furthermore, the first occurrence of fire blight was mentioned as early as the 1840s in Canada. Since 1924, the disease has spread to all pear and apple growing areas of Canada. On the other hand, the reports of fire blight came from New Zealand in 1919, from England in 1958, and from Egypt in 1964. Fire blight has been spreading in European and Middle Eastern countries and occasionally causes severe damage. There are about 40 countries known with fire blight worldwide at present.

Erwinia amylovora has not been isolated in Japan. However, bacterial shoot blight of pear with symptoms resembling fire blight was reported and the causal pathogen closely related to *E. amylovora* was assigned to *Erwinia* sp. This disease was eradicated by Japanese governmental emergency control measures and has not been reported since eradication. *Erwinia amylovora* also has not been isolated in South Korea. In 1999, a new disease with symptoms resembling fire blight was reported on Asian pears in South Korea. The causal agent was named *E. pyrifoliae*.

In this study, the phylogenetic relationships among *E. amylovora*, *Erwinia* sp. (the pathogen of bacterial shoot blight of pear), and *E. pyrifoliae* were revealed on the basis of their common nucleotide sequences. For the detection and identification of each bacterium, PCR primers were designed using the nucleotide sequences. Epiphytic bacteria on Japanese pear flowers, which may cause misidentification in the diagnosis of fire blight using direct PCR, were investigated. The sensitivity and suitable sites for direct PCR were also investigated.

2. Phylogenetic relationships among *E. amylovora*, *Erwinia* sp. (the pathogen of bacterial shoot blight of pear), and *E. pyrifoliae*

Phylogenetic trees were made based on the sequences of 16S rRNA, *gyrB*, and *rpoD* genes of *E. amylovora* (28 isolates), *Erwinia* sp. (the pathogen of bacterial shoot blight of pear 9 isolates), and *E. pyrifoliae* (2 isolates). The *gyrB* genes encode the subunit B protein of DNA gyrase which is the enzyme responsible for introducing negative supercoils into bacterial chromosomes and plays a crucial role in the replication of chromosomes. The *rpoD* genes encode the σ^{70} factor which is one of the sigma factors that confers promoter-specific transcription initiation on RNA polymerase. The tree based on 16S rRNA

gene sequences demonstrated low reliability. On the other hand, the trees based on *gyrB* and *rpoD* demonstrated very high reliability. In each tree, the 39 isolates formed two groups: “group 1” containing fire blight pathogen isolates and “group 2” containing bacterial shoot blight pathogen and Asian pear pathogen isolates. Furthermore, the tree based on combined 16S rRNA, *gyrB*, and *rpoD* sequences was similar to the *gyrB*-based and *rpoD*-based trees. Thus, phylogenetic analyses suggested that isolates from the three diseases could be divided into two groups.

The *gyrB* and *rpoD* sequences of the 25 *E. amylovora* isolates, except for isolates from *Rubus* sp., were almost identical. Meanwhile, the *gyrB* and *rpoD* sequences of the 9 isolates of bacterial shoot blight of pear pathogen were slightly different from one another. The 25 *E. amylovora* isolates had been isolated from different geographical areas, different host plants, and at different times. The 9 isolates of bacterial shoot blight of pear had been isolated only from the Hokkaido region in Japan, only from pear plants, and only during a period of several years. These results suggested that *E. amylovora*, except for *Rubus* strains, was a homogeneous group which had been spread worldwide, and that the pathogen of bacterial shoot blight of pear which was a heterogeneous group, existed in a limited region.

3. Design of primers for the detection and identification of bacteria belonging to group 1 and 2

The primers which can distinguish bacteria belonging to group 1 and 2 based on the *rpoD* gene sequences were designed. The specificity of these primers was investigated using 71 isolates of *E. amylovora*, 14 isolates of bacterial shoot blight of pear pathogen, 3 isolates of *E. pyrifoliae*, and 11 isolates of closely related bacteria. The group 1-specific primer set amplified 375 bp of DNA from all of the 71 *E. amylovora* isolates, but not from other isolates. The group 2-specific primer set amplified 375 bp of DNA from all of the 14 isolates of bacterial shoot blight of pear pathogen and *E. pyrifoliae*, but not from any of the 71 *E. amylovora* isolates, the only other size of amplification was recognized in 4 isolates of closely related bacteria. The detection limits of these primers were 10^{4-5} cfu/ml.

4. Epiphytic bacteria inhabiting Japanese pear flowers

Epiphytic bacteria were isolated from Japanese pear flowers in Japan, and were investigated for the relationship to *E. amylovora*, the pathogen of bacterial shoot blight of pear, or *E. pyrifoliae*. A total of 278 bacteria were isolated from Japanese pear flowers in three areas (Ibaraki, Nagano, and Tottori prefectures) using LB medium. A total of 60 bacteria were also isolated using a semi-selective medium for *E. amylovora*. Partial 16S rRNA gene sequence similarity and colony count revealed that *Pseudomonas* spp. and *Enterobacteriaceae* dominated on Japanese pear flowers. These bacteria were not closely related to *E. amylovora*, the pathogen of bacterial shoot blight of pear, or *E. pyrifoliae*. All of the 338 bacterial isolates were checked for the false positive reaction using the present and newly designed primers. Thus, the newly designed primers were considered to be practical for the detection and identification of *E. amylovora* even from Japanese pear flowers.

5. PCR detection of *E. amylovora* in infected plant material

It was necessary to identify suitable sites on diseased plants for PCR and to remove inhibitors from them for PCR. Therefore, an *E. amylovora* isolate tagged with bioluminescence genes was used to examine the behavior and movement of the pathogen in inoculated apple shoots. The sections of shoots with or without symptoms and luminescence were used for isolation and PCR detection. DNA was extracted from the sections using a simple grinding tube and glass fiber filter paper. From symptomatic

sections, 10^{5-7} cfu of *E. amylovora* tagged with bioluminescence genes were isolated, and the 375bp DNA fragment was mostly detected by PCR. However, from one symptomatic section, neither *E. amylovora* nor the fragment was detected. On the other hand, from asymptomatic sections, 10^{2-4} cfu of the pathogen were isolated, but the fragment was not detected by PCR. The border of healthy and diseased tissue was a suitable site for detecting the pathogen and the fragment by PCR. Apple shoots inoculated with a wild *E. amylovora* isolate were also investigated. Eleven out of all 12 inoculated shoots showed the typical symptoms. From the symptomatic shoots, 10^{5-6} cfu of wild *E. amylovora* were isolated, and the fragment was detected by PCR. On the other hand, from the one symptomless shoot, *E. amylovora* was isolated, but the fragment was not detected.

6. Conclusion

In this study, the phylogenetic relationships among *E. amylovora* (the pathogen of fire blight), *Erwinia* sp. (the pathogen of bacterial shoot blight of pear), and *E. pyrifoliae* (the pathogen of Asian pear blight) were investigated using the sequences of 16S rRNA, *gyrB*, and *rpoD* genes. Thirty-nine isolates belonging to the species formed two distinct monophyletic groups in the phylogenetic trees constructed based on the *gyrB* gene, *rpoD* gene, or a combination of the three genes, "group 1" containing the pathogen of fire blight and "group 2" containing the pathogen of bacterial shoot blight of pear and the pathogen of Asian pear blight. The pathogen of fire blight, except for isolates from *Rubus* sp., was homogeneous for sequences of *gyrB* and *rpoD*. The primers which could amplify the *rpoD* gene sequences specific to group 1 and 2 were designed. These primers were demonstrated only for each group containing isolates amplifying a unique DNA fragment. The suitable site for direct PCR detection of fire blight pathogen from the infected plant was revealed. The border of healthy and diseased tissue was very suitable for PCR.

These results will contribute to the detection and identification of the pathogen of fire blight from infected plants if the pathogen enters into Japan. Furthermore, these methods should also be applicable to other plant pathogenic bacteria.