

報 文

ナス科植物青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) の
土壌中での動態解析を目的とした生態マーカーの導入

巖原美穂¹⁾・境 雅夫²⁾・高木滋樹³⁾・横山和平¹⁾・丸本卓哉¹⁾

¹⁾ 山口大学農学部

〒753-8515 山口県山口市吉田 1677-1

²⁾ 九州大学大学院農学研究院

〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1

³⁾ フマキラー株式会社

〒739-0494 広島県佐伯郡大野町梅原 1-11-13

Introduction of biomarker into *Ralstonia solanacearum* for dynamics analysis in soil

Miho Iduhara¹⁾, Masao Sakai²⁾, Shigeki Takaki²⁾, Kazuhira Yokoyama¹⁾ and Takuya Marumoto¹⁾

¹⁾ Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yoshida 1677-1, Yamaguchi, 753-8515 Japan

²⁾ Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki 6-10-1, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8581 Japan

³⁾ Fumakilla Ltd., Umehara 1-11-13, Ohno-cho, Saeki-gun, 739-0494 Japan

Abstract

A biomarker, *gfp* gene, was introduced into a strain of *Ralstonia solanacearum* isolated from tomato to investigate the fate of this strain in soil. Tn5-mutants of the strain SL8 were virulent against tomatoes. The behavior of these *gfp*-fused mutants was similar to that of the wild type strain both in the culture medium and in soil. In the case of the *gfp*-fused mutants in which the production of extracellular polysaccharides (EPS) was impaired or absent (EPS⁻), the fluorescence of GFP was useful to discriminate between the inoculated strains from other indigenous bacteria in soil.

In conclusion, the biomarker GFP allowed the count of both wild type strains, one which produced large amounts of EPS and the other PC-type mutants in terms of EPS. Subsequently, the *gfp*-fused mutants of *Ralstonia solanacearum* enabled to analyze the factors that induce phenotypic conversion from wild type strains under environmental conditions.

Key Words: *Ralstonia solanacearum*, biomarker, *gfp*, extracellular polysaccharide, phenotype conversion

はじめに

ナスやトマトなどのナス科植物では、施設栽培の普及に伴って *Ralstonia solanacearum* による青枯病の発生が増加している。

現在、国内でナス科植物の青枯病に登録のある農薬は、土壌くん蒸剤に限られ、クロルピクリンや臭化メチルなどが使用される。しかし、本菌は地表面から約1mの深層土壌にも存在し、土壌中における密度の変動は激しく^{22,23,29)}、しかも生活環や生態に不明な点が多いことから、これらの農薬による防除は現実的には非常に困難である。こ

のため、抵抗性品種の育成や生態的防除法の開発に高い関心が寄せられてきた。しかし、本菌の遺伝的多様性と宿主範囲の広さ¹⁸⁾および抵抗性台木を用いた場合にも本病害が発生することから推測されるように、開発された品種が抵抗性を継続し得るかどうか懸念される。また、生態的防除に関しては一般的に圃場レベルでの成功例が少なく、その効果を今のところ保証できない。抵抗性品種の利用や生態的防除法を含め、各種防除対策の効果の程度は、作物が栽培される環境条件によってしばしば大きく左右される。既存の防除法を有効に活用しその効果を最大限に引き出すには、病原菌の生態を明らかにし、その性質を利用することが重要である。

R. solanacearum には純粋培養系において、豊富な菌体外多糖 (extracellular polysaccharide, 以下、EPS と略す) を分泌することにより流動性集落を形成する菌株と EPS を殆ど分泌せず小さくて固い非流動性集落を形成する菌株の存在が知られている^{21,25)}。前者から後者への変化が本菌の EPS 生産に関する特徴のひとつ phenotype conversion (PC 化) である^{4,11)}。PC 化した株には、宿主を萎凋・枯死させる程の強い病原性はない⁴⁾。また、人為的に EPS 生産能を欠損させた本菌株の宿主に対する病原性は低下することが報告されている^{3,5,10,12,19,20)}。本菌による植物の発病機作のひとつとして、EPS が宿主導管を閉塞して水分移動を阻害し、植物体を萎凋させると考えられる⁶⁾。なお、PC 化した株が自然条件下で復帰変異する確率は非常に低いと考えられている^{4,26)}。純粋培養系でしばしば観察される PC 化の機構を利用することにより、本菌の病原性を制御したり土壤中における病原菌の活性を測定すること (発病予測) が可能ではないかと考えた。

これまでのナス科植物青枯病に関する報告では、EPS を他の土着細菌との識別や病原性判別の指標としてきたため、EPS を生産しない *R. solanacearum* の関与は議論されてこなかった。このため、本菌の生活環の一部に関する知見が欠落しており、土壌菌密度や存在状態を正しく評価できていなかったことも推測される。

そこで、本報では EPS の生産能に変化を来した生産減少株や非生産株 (EPS-株) の検出を容易にするとともに、土壌における本菌の動態や本菌と宿主発病の関係を調査するために、*R. solanacearum* に生態マーカーを導入した。生態マ-

ーカーとしては、試料を破壊することなく連続観察が可能な green fluorescent protein (以下、GFP と表記) を選択した⁷⁾。GFP は発光クラゲ由来の緑色蛍光を発する蛋白質であり、その蛍光を確認するにあたって基質などを添加する必要がなく、手軽に観察できる利点がある。これまでに、*gfp* 遺伝子導入 *Pseudomonas aeruginosa* を土壌に接種し、土着細菌との識別に GFP が有効であったこと⁸⁾、また、本菌の *hrp* 遺伝子転写調節の研究にレポーター遺伝子として応用された例¹⁾などが報告されている。*gfp* 遺伝子導入株について数次スクリーニングによりトマトに対する病原性および土壌における生存性を野生株と比較した。その結果、野性株と諸性質が変わらず、EPS 生産能が低下した場合にも GFP を恒常的に発現する変異株が得られたのでここに報告する。

材料および方法

1. 供試菌

西山らによってトマトの青枯病罹病残渣より分離された *R. solanacearum* SL8 はトマトに対する病原性を有し、継代培養した場合にも安定した EPS 生産が確認された²⁴⁾。そこで、本菌株を *gfp* 遺伝子の受容菌として供試した。

R. solanacearum は LB 培地を用いて 28°C、2 日間振盪培養した。EPS 生産性の判別には、PCCG 培地¹⁵⁾を用いて 28°C、3 日間培養することにより流動性集落の形成に基づいて行った。トマト幼苗に対する病原性確認試験には、前述条件で PCCG 培地における集落を確認後、LB 培地で培養した菌液を供試した。

gfp 遺伝子のベクターとして *Pseudomonas* 属などのグラム陰性菌で恒常的に GFP を発現する Tn5*gfp*mut1 (未発表) を使用した。本ベクターは mini-Tn5 Transposon⁹⁾の転移領域内に *gfp* 遺伝子およびカナマイシン耐性遺伝子を持つ約 7.6 kb のプラスミドであり、Tn5*gfp*mut1 を保持した *Escherichia coli* S17-1(λpir) を供与菌として用い、37°C、カナマイシン (最終濃度 20 μg ml⁻¹) を加えた LB 培地で一晩培養した。

供試菌株は全て、25%グリセロール溶液に懸濁して、実験に使用するまで -80°C で凍結保存した。

2. 供試植物

病原性菌株の一次および二次選抜試験には、ト

マト（品種：桃太郎）を使用した。宇部粒状培土 2 号（1 セル当たり約 18 g）を詰めた育苗用パレットで、1 セル当たり 1 株を栽培した。三次選抜試験には、6 号黒ビニルポットにクレハ園芸培土を約 150 g 入れ、1 ポット当たり 3 株を栽培した。播種後ハウス内で約 2 週間栽培し、本葉が展開した幼苗を病原性試験に供試した。菌液接種後は、人工気象器内で 30°C、16 時間光照射下（照度：平均 20 W m⁻²）で栽培した。

3. 蛍光顕微鏡による GFP の観察条件

顕微鏡システムは OLYMPUS 社製 BX40、落射蛍光装置は同社の BX-FLA を使用した。GFP は IB 励起法で観察した。ダイクロックミラー：DM505、励起フィルタ：BP460-490、吸収フィルタ：BA515IF を使用した。シングルセルの GFP の発現については、適量の培養菌液をスライドガラスに滴下し、カバーガラスを乗せ、100 から 400 倍の倍率で観察した。集落の GFP 発現については、直径 9 cm のプレートを 1 cm 方眼紙上に置き、区画ごとに寒天培地上に形成された集落を倍率 40 倍で観察した。

4. *R. solanacearum* への *gfp* 遺伝子の導入

トランスポゾン挿入変異法³⁰⁾を用い、二者接合法²⁸⁾によって *R. solanacearum* の染色体 DNA に *gfp* 遺伝子の導入を行った。SL8 株は、種々の抗生物質耐性を有していたが、カナマイシンには感受性、ポリミキシン B に対しては 100 μg ml⁻¹ まで耐性であった。これに対して *gfp* 遺伝子供与菌である *E. coli* S17-1(λpir) (Tn5*gfp*mut1) は、ポリミキシン B 50 μg ml⁻¹ で完全に生育を抑制された。以上より、供与菌との選別にはポリミキシン B を使用した。

Tn5*gfp*mut1 を保持した *E. coli* S17-1(λpir) と *R. solanacearum* SL8 の培養菌液を 4°C、10,000×g で 10 分間遠心し、SL8 については滅菌生理食塩水で 2 回遠心洗浄後、滅菌精製水にそれぞれ懸濁した。SL8 洗浄菌体懸濁液（約 1×10¹⁰ cells ml⁻¹）と *E. coli* S17-1(λpir) 菌体懸濁液（約 1×10⁹ cells ml⁻¹）を 1:1 の液量で混合したのち、LB 寒天培地に塗布した。28°C で一晚培養後、滅菌綿棒で集落をかき取って、滅菌生理食塩水に懸濁し、その懸濁液をカナマイシン（最終濃度 20 μg ml⁻¹）を添加した原・小野培地¹⁶⁾に塗布して 28°C で一週間培養した。トランスポゾンの転移によって、カナマイシン耐性を獲得し、培地上の EPS 生産が旺盛な集落を蛍光顕微鏡下で観察

して、その中から GFP の発現が認められた株を生態観察用の候補として選抜した。

5. 病原性による菌株の選抜

(1) 一次選抜 保存候補株に対して、病原性を指標とした一次選抜を行った。候補菌株の培養液 4 ml をそれぞれ土壌灌注接種した（約 2×10⁷ cells g⁻¹土壌）。なお、接種には対照菌として野性株 SL8 を用い同様に実験を行った。菌液接種 10 から 20 日後にかけて 2 日毎に萎凋症状出現の有無を調査して、病原性株を選抜した。

(2) 二次選抜 一次選抜した菌株をそれぞれカナマイシン（最終濃度 20 μg ml⁻¹）を添加した LB 培地で培養し、その菌液を蛍光顕微鏡下で観察してシングルセルの GFP 発現の有無を調べた。このとき、蛍光強度を目視により三段階に評価し、特に強い緑色蛍光が認められた菌株を候補菌株として選択した。これらの菌株は、EPS 生産性を確認後、再度カナマイシン存在下で培養した後、病原性試験に供試した。

供試菌の培養原液およびその 100 倍希釈液と 10,000 倍希釈液をそれぞれ 2 ml ずつトマト栽培土壌に灌注接種した（培養原液において、接種濃度は約 10⁷ cells g⁻¹土壌）。試験は 2 連で行い、菌液接種 11 日後に野性株と同程度の病原性を示す株を選抜した。

(3) 三次選抜 菌液 10 ml をそれぞれ土壌に灌注接種した（約 5×10⁶ cells g⁻¹土壌）。試験は 3 連で行い、野生株と同程度の病原性を示す菌株を選抜した。

なお、発病調査は植物体の発病程度を枯死、萎凋、健全の三段階で評価することによって行い、発病度を次式より算出した。

$$(\text{発病度}) = \{ (\text{枯死株数} \times 2) + (\text{萎凋株数} \times 1) + (\text{健全株数} \times 0) \} \div (\text{全調査株数} \times 2) \times 100$$

6. トランスポゾン挿入変異株の培地における増殖速度と土壌中における密度の変動

野性株 SL8 および本菌株と同等の病原性を有するトランスポゾン挿入変異株をそれぞれ LB 培地を用い 28°C、200 rpm で振盪培養し、定期的培養液の吸光度（波長：580 nm）を測定した。

滅菌（121°C、20 分）した土壌（宇部粒状培土 2 号）30 g に微生物源としてトマト栽培圃場（福島県南会津郡、民間圃場）から採取した土壌を 1% (w/w) となるように添加して 25°C で 10 日間培養後、これを土壌微生物添加土壌として試験に用いた。また、対照区として同土壌を殺菌したのものも

同様に供試した。両土壤にトランスポゾン挿入変異株と野生株をそれぞれ接種（約 2×10^6 cells g^{-1} 乾土）し、接種後の菌密度の変動を0日から27日までPCCG培地を用い希釈平板法によって測定した。なお、菌液接種後の土壤水分は25%（宇部粒状培土2号の最大含水量：29.04%）とし、温度条件は25°Cに保った。

7. トランスポゾン挿入変異株からのEPS⁻集落の出現率

野性株SL8および本菌株と同等の病原力を有するトランスポゾン挿入変異株について、LB培地を用いた液体培養に引き続き、PCCG培地を用いて集落形態を観察し、交互に継代培養を行った。希釈平板法により、PCCG培地に形成されるEPS⁺集落とEPS⁻集落の出現率を調査した。操作を反復する場合には、PCCG培地に形成されたEPS⁺集落を継代培養した。

8. 土壤微生物添加土壤におけるEPS⁻株の検出

前述と同じ土壤微生物添加土壤にEPS⁻株を接種（約 2×10^6 cells g^{-1} 乾土）し、水分を25%に保ち、25°Cで27日間培養した後、土壤中の微生物数を希釈平板法により測定した。*R. solanacearum*の検出はPCCG培地、総細菌数は普通寒天培地（日水製薬）で、放線菌はデンプン培地（ K_2HPO_4 0.3 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0 g, NaCl 5.0 g, $NaNO_3$ 1.0 g, 可溶性デンプン 10.0 g, 寒天 20.0 g, イオン交換水 1,000 ml）を、そして糸状菌に対してはローズベンガル培地¹³⁾をそれぞれ用いた。また、*R. solanacearum*のEPS⁺集落とEPS⁻集落はEPS生産能の違いと顕微鏡下におけるGFPの緑

色蛍光に基づいてそれぞれ判別、確認し、計数した。

結果

1. 病原性による菌株の選抜

候補247株の中から、野性株と同程度の病原力

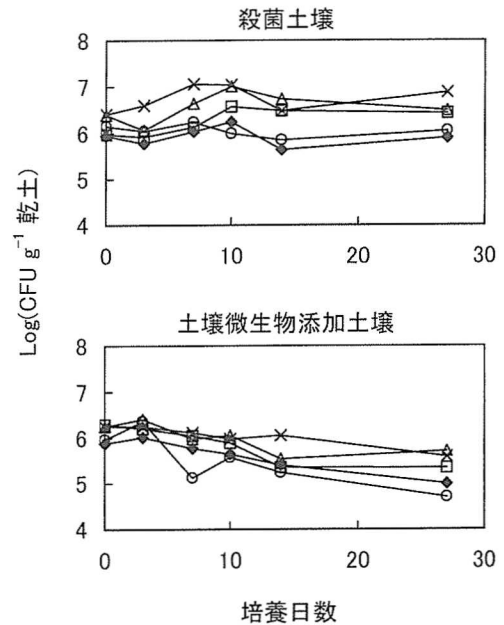


図1 *R. solanacearum*の野性株SL8とトランスポゾン挿入変異株の土壤中での菌密度の変動
 ◆：SL8, □：FR96, △：FR150,
 ○：FR157, ×：FR162

表1 *R. solanacearum*の野性株SL8とトランスポゾン挿入変異株のトマト植物体に対する病原性

接種菌株	接種後日数		
	10	15	18
FR96	5.6 ± 9.6*	55.6 ± 25.5	77.8 ± 38.5
FR112	27.8 ± 9.6	55.6 ± 25.5	66.7 ± 33.3
FR150	5.6 ± 9.6	38.9 ± 41.9	72.2 ± 25.5
FR155	16.7 ± 16.7	55.6 ± 25.5	66.7 ± 33.3
FR157	27.8 ± 34.2	66.7 ± 0.0	77.8 ± 19.2
FR162	5.6 ± 9.6	55.6 ± 50.9	83.3 ± 28.9
FR176	0.0 ± 0.0	72.2 ± 9.6	88.9 ± 19.2
FR195	0.0 ± 9.6	36.1 ± 12.7	88.9 ± 9.6
FR227	11.1 ± 19.2	61.1 ± 25.5	100.0 ± 0.0
SL8	16.7 ± 16.7	72.2 ± 19.2	100.0 ± 0.0
無接種	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

*：発病度の平均値±標準偏差

を有する 62 株を一次選抜で得た。二次選抜では、先ず、GFP の蛍光強度と抗生物質耐性から 56 株に絞り込み、病原性試験に供試した。三次選抜で最終的に野性株と同程度の病原力を有する 9 株が選択された (表 1)。

2. トランスポゾン挿入変異株の培地における増殖速度と土壤中における菌密度の変動

野生株と同様に強い病原力を示した FR227 菌株は 9 株中でシングルセルの GFP の発現が最も弱かった。また、FR176 菌株は増殖曲線の立ち上がり方が他の菌株に比較して遅く、野生株との間で性質の違いが認められた。そこで、野性株と同様の増殖曲線を描いた 4 株 (FR96, FR150, FR157 および FR162) を選抜し、再度増殖速度を比較したが、野性株との違いは認められなかった。GFP の蛍光強度においても 4 株間に相違は無かった。

土壌における菌密度の変動を調査した。殺菌土壌および殺菌土壌に土壌微生物を添加した供試土壌においても、野性株と 4 株間の菌密度の変動に著しい違いは認められなかった (図 1)。

3. トランスポゾン挿入変異株からの EPS⁻ 集落の出現率

LB 培地と PCCG 培地を用い、交互に継代培養を行った。2 回目の PCCG 培地における集落形態観察時、FR96 菌株の EPS⁻ 集落出現率は 68.8%、FR150 菌株については 18.2% であり、EPS 生産能が変化した集落が高頻度で認められた。これに対して、FR157 菌株と FR162 菌株については 3 回目の形態観察時に 1% 未満の EPS⁻ 集落出現率を示した以外は、5 回の連続した継代培養において EPS⁻ 集落は認められなかった。ここで、FR157 菌株と FR162 菌株において、EPS を旺盛に生産する株としてそれぞれ 157E と 162E、一方 EPS を生産しなくなった株をそれぞれ 157PC と 162PC として保存した。なお、157PC および 162PC の両株も GFP を発現し、蛍光顕微鏡下で緑色蛍光を発することを確認した。

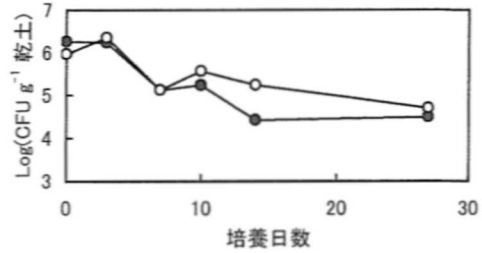


図 2 土壌微生物添加土壌中における *R. solanacearum* 157E 株と 157PC 株の菌密度の変動
○ : 157E, ● : 157PC

4. 土壌微生物添加土壌における EPS⁻ 株の検出

前培養によって種々の微生物が存在する土壌に 157PC 菌株を接種した。経時的に生菌数を測定し、PCCG 培地に形成された集落を観察した。本調査では、EPS⁺ 集落は検出されなかった。褐色の細菌集落を蛍光顕微鏡下で観察し、GFP を発する集落を計数した。EPS⁺ 株の土壌中での動態と比較するために、157E 菌株 (FR157 菌株) と 157PC 菌株の土壌菌密度の変動を図 2 に示した。また、157PC 菌株は接種 27 日後においても他の細菌と識別して計数できることが明らかとなった (表 2)。

考 察

病原性による選抜試験後、候補として残った 9 株は野性株と同様に強い病原力を有していた。それゆえ、これら 9 株において、土壌から植物体へ移行し植物体内で増殖したり感染植物の病徴を進展させる過程で機能する遺伝子の働きは、トランスポゾン挿入変異によって重大な影響を受けていないと推察された。しかし、FR227 菌株を除く 8 株の病原力は接種 18 日後において野性株よりも弱く、外来遺伝子の挿入による性状の変化は否めなかった。この中から、培地中における増殖速度

表 2 土壌微生物添加土壌からの *R. solanacearum* の EPS⁻ 株の検出 (CFU g⁻¹ 乾土)

区分	<i>R. solanacearum</i>		細菌	放線菌	糸状菌
	EPS ⁺ 株	EPS ⁻ 株			
無接種区	ND	ND	5.2×10 ⁶	3.0×10 ⁵	1.4×10 ⁵
157PC 株接種区	ND	3.1×10 ⁴	6.9×10 ⁶	2.0×10 ⁵	2.2×10 ⁵

ND : 検出限界以下

が野性株と同様に GFP の蛍光が強い 4 株 (FR96, FR150, FR157 および FR162) が選抜された。これら *gfp* 遺伝子導入株の殺菌土壌における菌密度の変動は、野性株と比較して著しい差異は認められなかったため、土壌への定着性や生残性に関わる機能に対する影響も少ないと考えられた。さらに、他の土壌生物との共存下で、土壌における菌密度の変動を野性株と比較した。本調査においても、いずれの供試菌株にも著しい菌密度の低下は認められず、4 株間に差違はなかった。さらに、これら 4 株を土壌灌注接種後、萎凋した植物体 (根部と子葉下茎部) および根圏土壌から回収し、PCCG 培地上で EPS を生産し *R. solanacearum* と判別した集落について GFP の発現を確認した (データ示さず)。即ち、選抜した 4 株は土壌への定着性や生残性に関して野性株と同等の性状を示し、他の土壌生物との競合がある場合においても野性株と同様に土壌に定着できることが明らかとなった。しかし、LB 培地と PCCG 培地を用いた継代培養を繰り返すことによって FR96 菌株と FR150 菌株は PC 化が高頻度で認められた。対照的に FR157 菌株と FR162 菌株では、PC 化はほとんど認められなかった。以上から、FR157 菌株と FR162 菌株は前培養期間における EPS 生産能の喪失の頻度は低く、この 2 株を用いて土壌を介した追跡調査を行った場合には、野性株に類似した生態を知ることが可能であると考えられた。一方、FR96 菌株と FR150 菌株については、PC 化の機構や PC 化を誘発する環境要因を調査する際に有用であると考えられた。これら 4 株のトマト幼苗に対する病原力の低下や PC 化が起こる頻度の相違は、*gfp* 遺伝子を導入したことによる影響と推察された。この要因として、トランスポゾンの宿主内での不安定さ、外来蛋白質である GFP の発現が宿主に与える影響、挿入変異による宿主遺伝子の破壊などが考えられた。

土壌微生物添加土壌を用いて、土壌水分および培養温度が同一の条件で、EPS⁺ 株と EPS⁻ 株の土壌菌密度の変動を調査した。GFP の緑色蛍光を確認することによって EPS⁺ 株である 157E 菌株と同様に EPS⁻ 株である 157PC 菌株を検出することが可能であった。157PC 菌株と 157E 菌株の密度の変動に違いは認められなかった。EPS⁻ 株も土壌中で野性株や EPS⁺ 株と同様に 27 日間生存したことから、自然界でも PC 化した本菌が生存していることが推察された。また、土壌微

生物添加土壌では、野性株 (SL8) とトランスポゾン挿入変異株の土壌菌密度の変動に有意差はなかったことから、157PC 菌株の菌密度の減少は *gfp* 遺伝子の脱落や不活性化によって計数されない集落があったためとは考えがたかった。しかし、一般的に本菌株の様な遺伝子組換え微生物を生態観察に用いる場合には、菌株の有効性は多面的に評価されるべきであり、潜在的要素も含めて野性株とは異なる性状を有していることを考慮すべきであると考えられた。

R. solanacearum の病原性株は EPS を菌体外に豊富に分泌する EPS⁺ 株である。このため、ナス科植物青枯病の発生病態に関するこれまでの研究は、EPS⁺ 株の動態のみに注目して行われてきた。すなわち、*R. solanacearum* の土壌からの検出は選択培地^{14,15,16,21})を用い、EPS 生産集落を指標として行われ、本菌の EPS⁻ 株の動態に対しては余り注意が払われてこなかった。しかし、本菌の弱病原性株がトマト青枯病の防除に有効であったとする報告²⁾や EPS 生産能が低下した弱病原性バクテリオシン産生株の浸漬処理がタバコ立枯病の発病抑制に有効であったとする報告¹⁷⁾もあることから、EPS⁻ 株が発病抑制に何らかの影響を与えていることが考えられる。純粋培養系で頻繁に認められる PC 化が、いかなる土壌条件下でどの程度の頻度で起こるのか、詳細な報告はなく、自然界で普遍的に認められる現象であるかは明らかにされていない。しかし、土壌に接種した *R. solanacearum* が環境条件によっては PC 化するとの報告²⁷⁾や培地の種類によって弱病原性株が高頻度で検出されるとの報告²⁹⁾もあり、*R. solanacearum* の EPS 生産を環境条件や栄養面から制御できることが示唆されている。

土壌を介した *R. solanacearum* の生態を解明するために、遺伝子組換え技術によって生態マーカー (*gfp* 遺伝子) を導入した *R. solanacearum* を作出した。得られた菌株は、*gfp* 遺伝子の導入によって、野性株とは異なる性質が発現し、病原性や自然環境下での動態に影響があると考えられた。そこで、トマト幼苗に対する病原性、培地中での増殖速度および土壌菌密度の変動について、野性株と同様の性質を有する 2 株 (157E 株および 162E 株) を選抜した。両菌株は全ての性状において野性株と同一ではないにしても、EPS 生産能に関わらず本菌の集落を平易に検出でき、PC 化をもたらず土壌の条件を検索できる利点を有してい

る。したがって、本菌株を使用して *R. solanacearum* の EPS 生産能が欠失した系統の動態を新たに評価することにより、病害抑制に有益な情報を得ることが可能になると考えられる。

要 旨

土壌中における *Ralstonia solanacearum* の生態研究への利用を目的とし、本菌の野性株に生態マーカーとして *gfp* 遺伝子を導入し、導入株の特性について検討した。導入株はトマトに対する病原性を保持しており、培地中や土壌中での動態も野性株と差がなかった。菌体外多糖生産能に変異が生じた場合でも GFP の蛍光によって他の土壌細菌と容易に識別することができた。これらの結果から、本菌株は土壌中における *R. solanacearum* の生態および菌体外多糖生産能の変異が誘導される条件を探索するための手段として有効であった。

謝 辞

本研究を行うにあたり、菌株を提供いただいた、東京大学 西山雅也、山口大学 伊藤真一の両先生に謝意を表す。また、貴重なご助言を賜った阿部光子、山口大学 中澤晶子、広島大学 杉山正則、新川英典、立命館大学 久保幹の諸先生方に心より感謝の意を表す。

最後に、論文作成にあたりご指導を賜った山口大学 田中秀平先生に深謝致します。

引用文献

- 1) Aldon, D., Brito, B., Boucher, C. and Genin, S. (2000) A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *EMBO J.*, **19**, 2304-2314
- 2) Arwiyanto, T., Sakata, K., Goto, M., Tsuyumu, S. and Takikawa, Y. (1994) Induction of tomatine in tomato plant by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **60**, 288-294
- 3) Boucher, C. A., Barberis, P. A., Trigalaet, A. P. and Demery, D. A. (1985) Transposon mutagenesis of *Pseudomonas solanacearum*: Isolation of Tn 5- induced avirulent mutants. *J. Gen. Microbiol.*, **131**, 2449-2457
- 4) Brumbley, S. M. and Denny, T. P. (1990) Cloning of the wild-type *Pseudomonas solanacearum phcA*, a gene that when mutated alters expression of multiple traits that contribute to virulence. *J. Bacteriol.*, **172**, 5677-5685
- 5) Cook, D. and Sequeira, L. (1991) Genetic and biochemical characterization of a *Pseudomonas solanacearum* gene cluster required for extracellular polysaccharide production and for virulence. *J. Bacteriol.*, **173**, 1654-1662
- 6) Coplin, D. L. and Cook, D. (1990) Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **3**, 271-279
- 7) Cormack, B. P., Valdivia, R. H. and Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, **173**, 33-38
- 8) Dandie, C. E., Thomas, S. M. and McClure, N. C. (2001) Comparison of a range of green fluorescent protein-tagging vectors for monitoring a microbial inoculant in soil. *Lett. Appl. Microbiol.*, **32**, 26-30
- 9) de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. and Timmis, K. (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.*, **172**, 6568-6572
- 10) Denny, T. P. and Beak, S. R. (1991) Genetic evidence that extracellular polysaccharide is a virulence factor of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **4**, 198-206
- 11) Denny, T. P., Carney, B. F. and Shell, M. A. (1990) Inactivation of multiple virulence genes reduces the ability of *Pseudomonas solanacearum* to cause wilt symptoms. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **3**, 293-300
- 12) Denny, T. P., Makini, F. W. and Brumbley, S. (1988) Characteristics of *Pseudomonas solanacearum* Tn5 mutants defective in extracellular polysaccharide. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **1**, 215-223
- 13) 土壌微生物研究会編 (1992) 新編土壌微生物研究法, p.381, 養賢堂, 東京
- 14) Granada, G. A. and Sequeira, L. (1983) A new selective medium for *Pseudomonas solanacearum*. *Pl. Dis.*, **67**, 1084-1088
- 15) 原 秀紀・古賀一浩・田中 博 (1995) タバコ立枯病菌分離定量用培地の改良, *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, **61**, 255
- 16) 原 秀紀・小野邦明 (1984) タバコ立枯病菌の新

- しい選択培地による検出定量法, 植物防疫, **38**, 26-29
- 17) Hara, H. and Ono, K. (1991) Effect of weakly-virulent bacteriocin-producing strain of *Pseudomonas solanacearum* on the protection of tobacco plant from bacterial wilt. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **57**, 24-31
- 18) Hayward, A. C. (1995) volume 1 Prokaryotes: *Pseudomonas solanacearum* In Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases, Ed. U. S. Singh, R. P. Singh and K. Kohmoto, p. 139-148, Elsevier Science Ltd, Oxford
- 19) Kao, C. C., Barlow, E. and Sequeira L. (1992) Extracellular polysaccharide is required for wild-type virulence of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Bacteriol.*, **174**, 1068-1071
- 20) Kao, C. C. and Sequeira, L. (1991) A gene cluster required for coordinated biosynthesis of lipopolysaccharide also affects virulence of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Bacteriol.*, **173**, 7841-7848
- 21) Kelman, A. (1954) The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrazolium medium. *Phytopathology*, **44**, 693-695
- 22) Kelman, A. and Sequeira, L. (1965) Root-to-root spread of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, **55**, 304-307
- 23) McCarter, S. M., Dukes, P. D. and Jaworski, C. A. (1969) Vertical distribution of *Pseudomonas solanacearum* in several soils. *Phytopathology*, **59**, 1675-1677
- 24) Nishiyama, M., Shiomi, Y., Suzuki, S. and Marumoto, T. (1999) Suppression of growth of *Ralstonia solanacearum*, tomato bacterial wilt agent, on/in tomato seedlings cultivated in suppressive soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **45**, 79-87
- 25) 岡部徳夫・後藤正夫 (1954) *Pseudomonas solanacearum* の研究. IV, F 型菌および OP 型菌の性状比較について, 静大農研究報告, **4**, 41-60
- 26) Shekhawat, G. S., Gadewar, A. V. and Chakrabarti, S. K. (1992) Spontaneous phenotypic reversion from afluidal to fluidal state in strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Bacterial Wilt Newsl.*, **8**, 5-6
- 27) Shekhawat, G. S. and Perombelon, M. C. M. (1991) Factors affecting survival in soil and virulence of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Plant Dis. Prot.*, **98**, 258-267
- 28) Simon, R., Priefer, U. and Puhler, A. (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology*, **1**, 784-789
- 29) 田中行久 (1979) タバコ立枯病菌の生態学的研究, 鹿児島たばこ試報, **22**, 1-82
- 30) 脇本 哲 (1993) 植物病原性微生物研究法, p. 386~394, ソフトサイエンス社, 東京