

直接コロニー TLC 法による植物病原細菌の迅速同定 (1)

松山 宣明¹⁾・Ismail Hossain Mian²⁾・Abdul Mannan Akanda²⁾・古屋 成人¹⁾

(¹⁾九州大学農学部・²⁾IPSA バングラデシュ)

On a rapid identification of phytopathogenic bacteria by the direct colony thin-layer chromatography (1). Nobuaki MATSUYAMA¹⁾, Ismail Hossain Mian²⁾, Abdul Mannan Akanda²⁾ and Naruto FURUYA¹⁾ (¹⁾Fac. Agr., Kyushu Univ., Fukuoka 812, Japan, ²⁾IPSA, Salna, Gazipur 1702, Bangladesh)

The application of the direct colony thin-layer chromatography for the identification of phytopathogenic bacteria was conducted. One-loopful bacterial colony was pasted directly to the origin on silica gel TLC plate and dried completely. This plate was developed at 25°C for 10 min until the solvent front will reach 6 cm line from the origin spots with chloroform-methanol (CM, 2:1, v/v). After drying, bacterial cells were scraped out from the plate. Then, the plate was developed at the same direction with chloroform-methanol-1.25~5M ammonia (CMA, 60~80:25:4, v/v/v) or chloroform-methanol-water (CMW, 60:25:4, v/v/v) for ca. 1~1.5hr. After drying for more than 30 min, the spots were visualized by ninhydrin-spraying with successive heating at 100°C for 10 min. The chromatogram was recorded by a photograph or photocopy. Ideal chromatogram was obtained with chloroform-methanol-1.25M ammonia (60:25:4, v/v/v) or chloroform-methanol-water (60:25:4, v/v/v) as the second developing solvent-systems. Well reproducibility of chromatogram was observed when the conditions of TLC and culture age of the sample bacteria were kept steadfastly. Distinct differences among the chromatograms were observed at generic level. Especially, the difference between *Clavibacter* sp. (gram positive) and others (gram negative) was obvious. This method will be practically useful for a rapid identification of phytopathogenic bacteria.

緒 言

細菌は形態的特徴に乏しく、したがってその分類・同定は、生理・生化学的、血清学および病理学的諸性質に基づいてなされている。しかし、これらの性質に関する試験項目は多数に上り、多くの時間と手間がかかっているのが現状である。このため、種々の簡易同定法の開発が試みられて来た。Matsuyama *et al.* は *Serratia* 属菌菌体脂質の簡易同定を目的に直接コロニー薄層クロマトグラフィー法を開発し、また、この方法が同菌の種の同定にも利用出来ることを報告した。本法は、きわめて簡便で迅速性に富み、試料の変性を極力避けることが出来る点に特徴がある。そこで、本法の植物病原細菌同定への応用を目的に、まず最適実験条件の検討を行った。

材料および方法

1. 供試細菌

Table 1 に示す一般的な植物病原細菌16菌株を実験に

供試した。

2. 培地および培養条件

供試細菌の培養は、修正ジャガイモ半合成斜面培地 (PSA): 市販馬鈴薯煎汁寒天培地 (OXOID UNIPATH 社) 39 g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 2 g, Ca (NO₃)₂ · 4H₂O 0.5 g, ペプトン 5 g, 蒸留水 1 l, pH 7.0 または King B 斜面培地: 市販キング B 培地 (栄研) 38 g, 1%グリセリン溶液 1 l, pH 7.0 を用い、常法に従い 30°C, 2~12日間行った。

3. 直接コロニー薄層クロマトグラフィー

市販シリカゲル薄層プレート (Merck 社, Si60, 0.25mm, 10×20cmまたは20×20cm) の原点 (下端から 1 cm) に細菌湿菌体を 1 白金耳づつ載せ、ヘヤドライヤーで完全に乾燥させる。この薄層プレートを予め用意しておいた展開槽中で、クロロフォルム-メタノール (CM, 2:1, v/v) を用いて 25°C, 10分間、溶媒先端が原点から 6 cm の位置に来るまで展開後、プレートを取り出し 15分以上乾燥する。乾燥後、菌体を剥ぎ取りこのプレ-

Table 1. List of phytopathogenic bacteria used in this experiment

Phytopathogenic bacteria	Isolates	Sources
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	1	NIAES ^{a)} (NIAS ^{b)})
" subsp. <i>michiganensis</i>	N6204	"
" "	N6206	"
<i>Erwinia chrysanthemi</i> pv. <i>chrysanthemi</i>	Ku8601 L1	AKU ^{c)}
<i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	489-4	LSPPM ^{d)}
" "	473-1	"
" "	EH8519	EAES ^{e)}
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i>	N6102-1	NIAES (NIAS)
" "	N6829-1-3	"
" "	N7501	"
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Q7463	KNAES
" "	T7174 SHR (12)	HNAES ^{f)} (TKNAES ^{g)})
" "	Q7781	KNAES ^{h)}
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1-3a	AKU
" "	1-SKRa	"
" "	Ku7411	"

a) National Institute of Agro-Environmental Sciences, Ibaraki, Japan

b) National Institute of Agricultural Sciences, Tokyo, Japan

c) Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka, Japan

d) Laboratory of Seed and Post-Harvest Disease, Plant Pathology and Microbiology Division, Department of Agriculture, Thailand

e) Ehime Agricultural Experiment Station, Ehime, Japan

f) Hokuriku National Agricultural Experiment Station, Niigata, Japan

g) Tokai-Kinki National Agricultural Experiment Station, Mie, Japan

h) Kyushu National Agricultural Experiment Station, Kumamoto, Japan

トをクロロフォルム-メタノール-1.25~5M アンモニア (CMA, 60:80:25:4, v/v/v) またはクロロフォルム-メタノール-水 (CMW, 60:25:4, v/v/v) で1時間前後展開した後、プレートを取り出して30分以上乾燥する。ニンヒドリン溶液 (Ninhydrin spray, 東京化成) を噴霧し15分以上乾燥後、100℃に10分程度保ち発色させる。プレートを透明なシートに載せ、直接コピーするか写真撮影して記録する¹⁻³⁾。

結果と考察

本実験に用いた直接コロニー薄層クロマトグラフィー法は、細菌菌体からの脂質の有機溶媒抽出をシリカゲル薄層上で直接行うところに特徴がある。したがって、菌体の破碎や抽出、濃縮過程における脂質の変性が避けられる他、菌体量が少なく済むため多数の検体を一度に供試することができるなどの利点がある。展開溶媒 CM による第一段階の展開では、脂質はほとんどスポットを形成しない。第二段階の溶媒 CMA または CMW によ

る展開で、CM により抽出された脂質の分離が行われる。

Fig. 1, 2 に見られるように、各種植物病原細菌はそれぞれ、属レベルで特徴のあるクロマトグラムを示した。供試した全グラム陰性菌では、Rf 0.62 付近に主スポットが顕れるのに対し、グラム陽性菌の *Clavibacter michiganensis* は、このスポットを欠いており、この点に明確な相違がみられた。

展開溶媒としては CMA, CMW 何れも良好であったがスポットのまとまりは、CMW の方が優れていた。また、*Serratia* 属菌の場合、CMA は 80:25:4, v/v/v の組成比のものが使われているが、植物病原細菌に限っては 60:25:4 の組成比のものが適しておりアンモニアの濃度も低いものの方が良好な結果を与えた。また、Fig. 2 に示すように、培養日数の違いによるクロマトグラムの変動はわずかであった。

今後、ニンヒドリン以外の検出試薬を用いて情報量を増やすことにより、*Serratia* 属菌におけるような種レベルでの同定も可能になることが予測される。

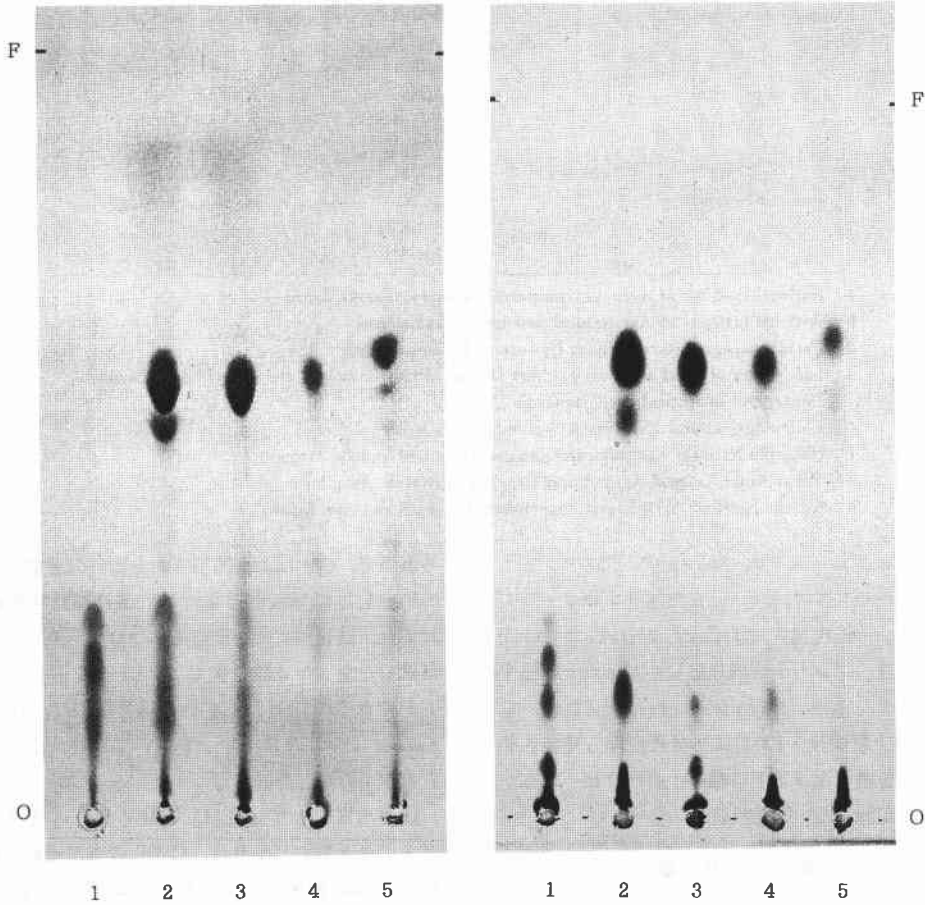


Fig. 1. Chromatograms of phytopathogenic bacteria obtained by the direct colony thin-layer chromatography.

First developing solvent: chloroform-methanol (2: 1, v/v)

Second developing solvent:

Left; chloroform-methanol-1,25 M ammonia (60: 25: 4, v/v/v)

Right; chloroform-methanol-water (60:25: 4, v/v/v)

Bacteria used:

1: *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*

2: *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*

3: *Erwinia chrysanthemi* pv. *chrysanthemi*

4: *Xanthomonas campestris* pv. *citri*

5: *Agrobacterium tumefaciens*

F: Solvent front, O: Origin

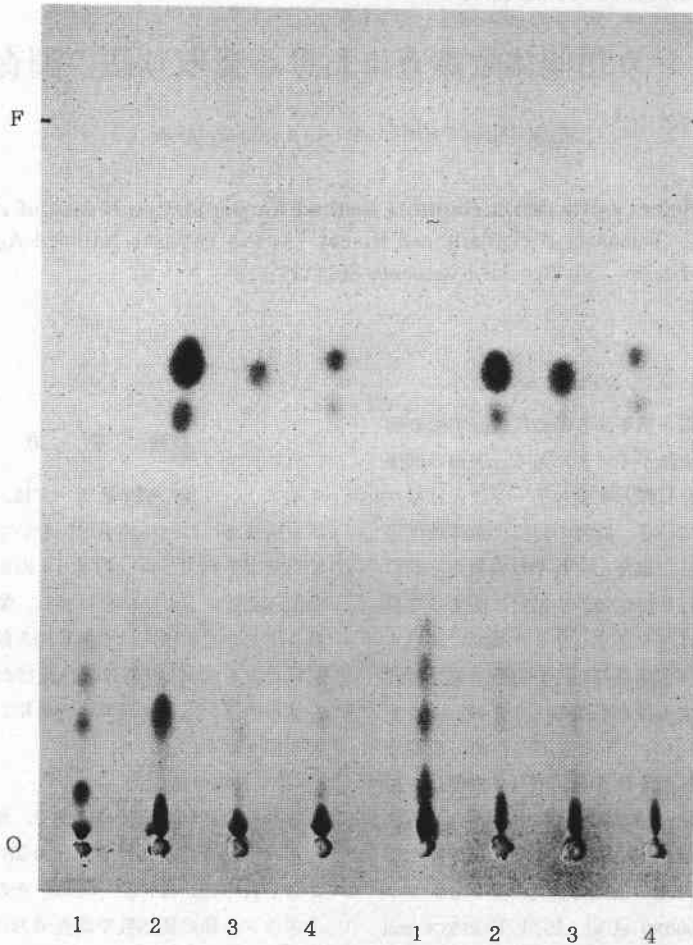


Fig. 2. Effect of culture age of bacteria on the chromatogram.

Left 1~4: 2 days old bacteria

Right 1~4: 12 days old bacteria

Bacteria used:

1: *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*

2: *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*

3: *Xanthomonas campestris* pv. *citri*

4: *Agrobacterium tumefaciens*

F: Solvent front, O: Origin

Second developing solvent:

chloroform-methanol-water (60:25:4, v/v/v)

引用文献

1) Matsuyama N., Ismail Hossain Mian, Abdul Mannan Akanda and Furuya N. (1993) J. Fac. Agr. Kyushu Univ 37 (3, 4): 283-287. 2) Matsuyama T., Sogawa M. and Yano I. (1987)

Appl. Envir. Microbiol. 53: 1186-1188. 3) 松山東平 (1987) クロマトグラフィーによる細菌の迅速同定 菜根出版 東京: pp. 40-50.

(1993年4月13日 受領)