

イネに病原性を示す *Burkholderia* 属細菌の PCR-RFLP 分析による識別

浦 広幸・松元 賢・飯山 和弘・古屋 成人・松山 宣明
(九州大学農学部)

PCR-RFLP analysis for distinction of *Burkholderia* species, causal agents of various rice diseases. Hiroyuki URA, Masaru MATSUMOTO, Kazuhiro IYAMA, Naruto FURUYA and Nobuaki MATSUYAMA (Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kyushu University 812-8581)

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis for an internal transcribed spacer region (5S plus ITS 1 and ITS 2) of ribosomal DNA (rDNA) repetitive units amplified by the polymerase chain reaction (PCR) was used for rapid distinction of *Burkholderia glumae*, *B. gladioli*, *B. plantarii* and *B. vandii*, causal agents of various diseases. The RFLP profiles obtained after digestion of the ITS regions amplified by PCR with *Hha* I and *Sau* 3AI seemed useful for rapid distinction of these species. PCR-RFLP with *Hha* I and *Sau* 3AI for DNA samples from rice leaf-sheath tissues inoculated with *B. glumae* or *B. gladioli* and the corresponding bacterial cells cultured showed identical polymorphisms. The possibility of direct distinction of these pathogenic bacteria from naturally infected rice plant tissues by this method was demonstrated.

Key words: *Burkholderia* spp., internal transcribed spacer, PCR-RFLP, ribosomal DNA

Burkholderia glumae (イネもみ枯細菌病菌) は、イネにもみ枯症、幼苗腐敗症及び葉鞘褐変症を引き起こす植物病原細菌である^{3,9,11)}。*B. gladioli* (グラジオラス首腐病菌) もイネに同様の症状を引き起こし¹⁰⁾、両種細菌は宿主非特異的毒素 toxoflavin を産生する²⁾など類似した細菌学的性質を示すため、迅速な識別は困難である。

著者らは、迅速抽出-HPLC 分析⁷⁾及びクロロホルム-メタノール混液懸濁性試験⁸⁾等により、両種細菌の迅速な識別法の開発を試みている。本研究では、植物病原菌の類別及び検出等に広く用いられている分子生物学的手法^{4-5,8)}に着目し、5S rDNA を含む ITS (internal transcribed spacer) 領域をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法により増幅し、得られた増幅産物の制限酵素断片長多型性 (RFLP) 分析により、イネに病原性を示す4種の *Burkholderia* 属細菌 (*B. glumae*, *B. gladioli*, *B. plantarii*¹⁻²⁾ 及び *B. vandii*²⁾) の迅速な検出並びに識別を検討した。

材料及び方法

1. 供試菌株

Burkholderia glumae, *B. gladioli* pv. *gladioli*, *B. gladioli* pv. *alliiicola*, *B. gladioli* (pv. 未同定株), *B. plantarii* 及び *B. vandii* の計29菌株を供試した (Table 1)。この内、251-17株及び MAFF301728 株は、当初 *B. gladioli* pv. *gladioli* と同定・記載されていたが、本種細菌とは若干異なる細菌学的性質を示すことが指摘されている¹⁻²⁾。すなわち迅速抽出-HPLC 分析及びクロロホルム-メタノール混液懸濁性試験では251-17株は、*B. gladioli* の性質を示さず、生理・生化学的試験においても *B. glumae* と同様の性質を示した (データ未掲載)。また、MAFF301728 株は、tropolone を産生し、生理・生化学的試験でも典型的な *B. gladioli* とは異なる性質を示すため¹⁾、*B. vandii* に移すことが提案されている²⁾。

2. 菌体からの DNA 試料の調製

YPDA 平面培地 (ペプトン0.6g, デキストロース3g, 酵母抽出物3g, 寒天15g, 蒸留水1,000ml, pH

7.2) 上で培養した細菌の単一集落を523培地 {シヨ糖 10 g, カゼイン (酵素加水分解物) 8 g, 酵母抽出物 4 g, K_2HPO_4 2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g, 蒸留水 1,000 ml, pH 7.0} に接種し, 30°C で12時間振とう培養した。培養菌体を遠心分離 (15,000 rpm, 30 sec) により集菌し, その一部を TE 緩衝液 {10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)} 500 μ l に懸濁した後, 95°C で10分間熱処理した。遠心分離 (15,000 rpm, 30 sec) 後, 上清 5 μ l を PCR-RFLP 分析に供試した。

3. 病原細菌の接種及び病斑部からの DNA 試料の調製

イネ種子 (品種「あそみのり」) を育苗後, 滅菌土壌を入れたワグネルポット (1/5,000 a) に移植し, ガラス温室内で生育させた。穂孕期の止葉葉鞘に, 0.7 ml の細菌懸濁液 (約 10^8 cfu/ml) を注入接種した。接種後2日間接種箱 (30°C, 相対湿度100%) 中に置き, その後再びガラス温室内で生育させた。接種10日後に病斑部を10 mm \times 5 mm の大きさに切り取り, 常法に従い表面殺菌した試料をマイクロ遠心管中で磨砕した。TE 緩衝液 500 μ l を加え懸濁した後, 95°C で10分間熱処理した。遠心分離 (15,000 rpm, 30 sec) により得た上清 5 μ l を PCR-RFLP 分析に供試した。

4. PCR-RFLP 分析

上記の方法で調製した DNA 試料に PCR を行った。使用したプライマーは, 竹内らによる塩基配列の解析結果⁸⁾を基に *Burkholderia* 属細菌の 5S rDNA を含む ITS 領域を増幅するよう設計した。反応液の組成は,

超純水 78.5 μ l, 10 \times 反応緩衝液 10.0 μ l, DNA 試料 5.0 μ l, dNTP 4.0 μ l, プライマー BUR-1 (5'-CTG GATCACCTCCTTT-3'), BUR-2 (5'-CGCTTGACCC TATAACG-3') 各 1.0 μ l, *Tth* DNA ポリメラーゼ 0.5 μ l の総量 100 μ l で, PCR の条件は 94°C 1 min, 50°C 2 min, 72°C 3 min, 30 cycle とした。PCR により 5S rDNA を含む ITS 領域を増幅した。得られた PCR 増幅産物を制限酵素 *Hha* I 及び *Sau* 3AI で切断した後, 3% アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。

結 果

1. 菌体から調製した DNA 試料の PCR-RFLP 分析

供試したすべての菌株から, 約 600 bp (s) の PCR 産物が検出された。しかし, *B. gladioli* MAFF302537 及び MAFF302409 の 2 菌株では, 約 600 bp (s) の PCR 産物に加え, さらに若干長い増幅産物が検出された (データ未掲載)。得られた PCR 産物を制限酵素 *Hha* I 及び *Sau* 3AI を用いて消化し RFLP 分析を行った結果を Fig. 1 及び Table 1 に示した。なお Table 1 では, 各種制限酵素で切断したときに同じ電気泳動像を示した菌株は同じアルファベットで表示した。PCR 産物を制限酵素 *Hha* I で切断すると, 種特異的な多型性が認められた。これに対し同一種内の菌株間では若干の多型が認められたものの高い相同性を示し, さらに *B. gladioli* の pathovar 間においても多型性は認められなかった。*B. gladioli* では, 菌株間で若干の多型性が認められたが, *B. glumae* 及び *B. plantarii* では全く認められなかった。

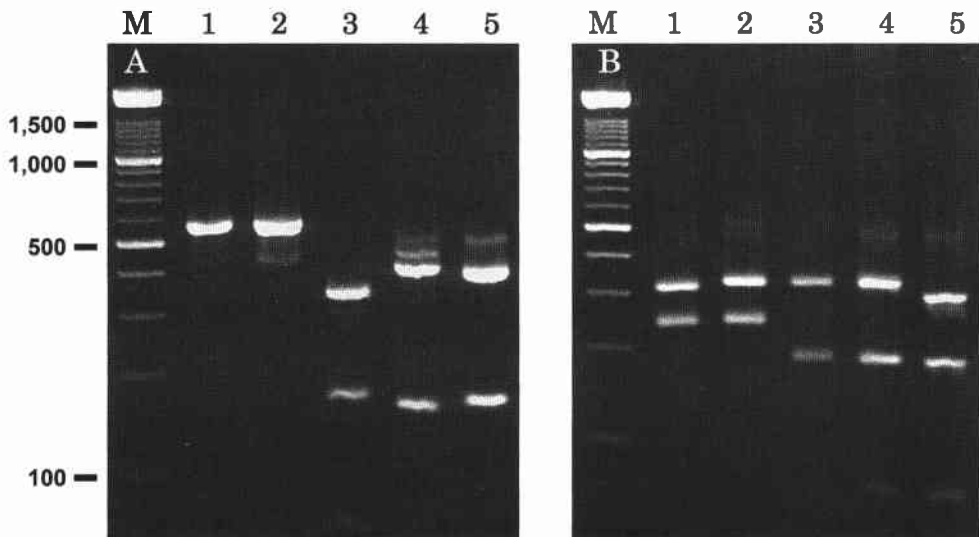


Fig. 1. RFLP profiles of PCR-amplified ribosomal DNA (rDNA) of *Burkholderia* spp., digested with *Hha* I (A) and *Sau* 3AI (B). Lane 1, *B. gladioli* pv. *gladioli* ATCC10248^T; Lane 2, *B. gladioli* pv. *allicola* ATCC19302; Lane 3, *B. glumae* MAFF301169^T; Lane 4, *B. plantarii* JCM5492^T; Lane 5, *B. vandii* JCM7957^T; M, Molecular marker. Sizes of DNA fragments (bp) were indicated on the left.

Table 1. PCR-RFLP profiles of *Burkholderia* spp.

Strain	Origin	Source	PCR-RFLP profiles	
			Hha I	Sau 3AI
<i>Burkholderia glumae</i>				
MAFF301169 ^T	Rice grain	MAFF ^{a)}	A ^{h)}	a
Kyu82-34-2	Rice grain	KNAES ^{b)}	A	a
2	Rice grain	KNAES	A	a
N7401	Rice seedling	NIAS ^{c)}	A	a
N7503	Rice seedling	NIAS	A	a
N7504	Rice seedling	NIAS	A	a
Ku8104	Rice grain	KU ^{d)}	A	a
Ku8112	Rice grain	KU	A	a
8020	Rice grain	KNAES	A	a
AZ8224	Rice	Dr. Azegami	A	a
T-2	Rice grain	KU	A	a
T-3	Rice grain	KU	A	a
<i>(B. gladioli pv. gladioli)</i>				
251-17	Dendrobium	TARC ^{e)}	A	a
<i>B. gladioli pv. gladioli</i>				
ATCC10248 ^T	Gladiolus	ATCC ^{f)}	B	b
MAFF302515	Tulip	MAFF	B	b
MAFF302537	Onion	MAFF	B-37	b-37
NIAS1065	Freesia	NIAS	B	b
E-14	Rice leaf	KU	B	b
<i>B. gladioli pv. alliiicola</i>				
ATCC19302	Onion	ATCC	B	b
<i>B. gladioli (pathovar unidentified)</i>				
MAFF302409	Adzuki bean	MAFF	B-37	b-37
MAFF302418	Green gram	MAFF	B	b
MAFF302424	Cymbidium	MAFF	B	b
T-1	Rice leaf-sheath	KU	B	b
H-1	Rice grain	KU	B	b
<i>B. plantarii</i>				
JCM5492 ^T	Rice seedling	JCM ^{g)}	C	a
MAFF302387	Rice seedling	MAFF	C	a-87
MAFF302484	Rice seedling	MAFF	C	a
<i>B. vandii</i>				
JCM7957 ^T	Vanda root	JCM	D	c
<i>(B. gladioli pv. gladioli)</i>				
MAFF301728	Vanda leaf	MAFF	D	c

a) Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries; b) Kyushu National Agricultural Experiment Station; c) National Institute of Agricultural Sciences; d) Kyushu University; e) Tropical Agricultural Research Center; f) American Type Culture Collection; g) Japan Collection of Microorganisms; h) Same letter indicates identical profiles in electrophoresis. B-37, b-37 and a-87 are different from B, b and a, respectively.

また、251-17株は *B. glumae* と、MAFF301728 株は *B. vandii* と同様の泳動像を示した。Sau 3AI で切断すると、Hha I とほぼ同様の分析結果が得られたが、*B. glumae* 及び *B. plantarii* は同様の泳動像を示した。さらに、*B. plantarii* では菌株間において多型が認められた。また、*B. plantarii* 及び *B. vandii* は Hha I で切断した場合にも

多型が認められるが、Sau 3AI で切断した場合にはより明瞭に両種細菌の識別が可能であった。

2. 接種病斑部から調製した DNA 試料の PCR-RFLP 分析

イネ葉鞘に *B. glumae* 及び *B. gladioli* を接種し、褐変症状を呈した病斑部分から調製した DNA 試料に PCR

行うと、約 600 bp (s) の長さの PCR 産物が検出された。得られた PCR 産物を各種制限酵素 (*Hha* I, *Sau* 3AI) により消化し RFLP 分析を行った結果、接種した 2 種細菌と同様の電気泳動像が確認された (データ未掲載)。また、無接種のイネ組織からは PCR 産物は検出されなかった。

考 察

イネに病原性を示す *Burkholderia* 属細菌 4 種 29 菌株の 5S rDNA を含む ITS 領域を PCR により増幅し、RFLP 分析を行った。その結果、供試した 4 種細菌 (*B. glumae*, *B. gladioli*, *B. plantarii* 及び *B. vandii*) は、種特異的な多型性を示すとともに、同一種内においては高い相同性を示し、本法によりこれら 4 種を迅速に識別できることが示された。*B. gladioli* で多型が見られた 2 菌株については PCR 増幅産物が 2 種得られ、それぞれの PCR 増幅産物については現在塩基配列を解析中である。さらに、251-17 株は *B. glumae* と、また MAFF301728 株は *B. vandii* と同じ電気泳動像を示し、本実験結果からも 251-17 株は *B. glumae*, MAFF301728 株は *B. vandii* であると考えられた。

次に、本法により病斑部から直接病原細菌を検出・識別できるか否かを調べるため、イネ葉鞘に *B. glumae* 及び *B. gladioli* を接種し、出現した病斑部から調製した DNA 試料を用いて、PCR-RFLP 分析を試みた。その結果、接種細菌由来の PCR 産物が得られ、RFLP 分析によりこれら 2 種の細菌の識別が可能であった。また、イネ幼苗及び籾さらにデンドロビウム葉片の接種病斑部についても PCR-RFLP 分析を行い同様の結果を得た (データ未掲載)。このように本法は、病斑部から直接病原細菌を検出・識別する手法として有効であることが示され、病原細菌の分離・培養を必要とする迅速抽出—HPLC 法及びクロロホルム—メタノール混液懸濁性試験よりもこの点で優れていると思われる。今後、DNA 試料の抽出方法及び PCR 反応条件等についてさらなる

改良を行い、自然感染した病斑部分からの病原細菌の検出・識別を試みる予定である。

摘 要

イネに病原性を示す 4 種細菌 (*Burkholderia glumae*, *B. gladioli*, *B. plantarii* 及び *B. vandii*) を迅速に識別することを目的として、供試菌株の DNA 試料の 5S rDNA を含む ITS 領域を PCR により増幅し、RFLP 分析を行った。得られた PCR 産物を制限酵素 *Hha* I 及び *Sau* 3AI で切断すると、供試した 4 種細菌を迅速に識別可能であった。さらに、*B. glumae* 及び *B. gladioli* をイネ葉鞘に接種し、病斑部から調製した DNA 試料を用いて PCR-RFLP 分析を試みた結果、接種細菌と同一の電気泳動像が認められた。以上の結果から、本法によりイネに病原性を示す 4 種の *Burkholderia* 属細菌を迅速に識別出来るほか、自然病斑部から病原細菌を直接検出・識別出来る可能性が示された。

引用文献

- 1) 畔上耕児 (1994) 農技研報 11: 1-80.
- 2) Iiyama, K., N. Furuya, H. Ura and N. Matsuyama (1998) J. Fac. Agr., Kyushu Univ. 42: 289-293.
- 3) 栗田年代・田部井英夫 (1967) 日植病報 41: 111. (講要)
- 4) Matsumoto, M., N. Furuya and N. Matsuyama (1996) J. Fac. Agr., Kyushu Univ. 41: 39-44.
- 5) Matsumoto, M., N. Furuya, Y. Takanami and N. Matsuyama (1997) Mycoscience 38: 451-454.
- 6) Matsuyama, N. (1998) J. Fac. Agr., Kyushu Univ. 42: 337-343.
- 7) Matsuyama, N., Y. Ueda, K. Iiyama, N. Furuya, H. Ura, A. Ashraf K. and M. Matsumoto (1998) J. Fac. Agr., Kyushu Univ. 42: 265-272.
- 8) Takeuchi, T., H. Sawada, F. Suzuki and I. Matsuda (1997) Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 63: 455-462.
- 9) 植松勉・吉村大三元・西山幸司・茨木忠夫・藤井 溥 (1976) 日植病報 42: 310-312.
- 10) 浦 広幸・飯山和弘・古屋成人・松山宣明 (1996) 日植病報 62: 640. (講要)
- 11) 安永忠道・青井俊雄・重松喜昭 (1986) 四国植防研究 21: 1-11.

(1998年5月1日 受領)