

化学分類学的指標に基づく *Burkholderia plantarii* と *B. vandii* の異同

平川 ゆみ・古屋 成人・飯山 和弘・浦 広幸*・
松元 賢・竹下 稔・松山 宣明**・高浪 洋一
(九州大学大学院生物資源環境科学府)

Comparative studies of *Burkholderia plantarii* and *B. vandii* based on chemotaxonomic markers. Yumi Hirakawa, Naruto Furuya, Kazuhiro Iiyama, Hiroyuki Ura, Masaru Matsumoto, Minoru Takeshita, Nobuaki Matsuyama and Yoichi Takanami (Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan)

Burkholderia plantarii, *B. vandii*, and strains of *B. gladioli* isolated from vanda plants were characterized by chemotaxonomic methods, and their relation to authentic strains of other plant pathogenic bacterial species is discussed. *B. plantarii* and *B. vandii* were indistinguishable in the chemotaxonomic analysis, and the degree of sequence identity between them was 96%. We conclude that *B. vandii* is a synonym of *B. plantarii*. Three strains MAFF301728, MAFF301729, and MAFF301730 isolated from the vanda plants and identified as *B. gladioli* pv. *gladioli*, should be transferred to *B. plantarii*. We also clarified that the causal bacterium of bacterial brown rot of vanda is the true *B. gladioli*.

Key words : *Burkholderia plantarii*, *Burkholderia vandii*, *Burkholderia gladioli*, chemotaxonomy

緒 言

イネ苗立枯細菌病の病原細菌である *Burkholderia plantarii* (旧名 *Pseudomonas plantarii*) は、1987年に畔上らにより命名、報告された (Azegami et al., 1987)。また *B. vandii* は洋ランの一種バンダから分離された細菌で、1994年に浦上らにより新種として記載されたものである (Urakami et al., 1994)。一方、我々は前報 (平川ら, 1999) において、生理・生化学的および病理学的諸性質に基づき、*B. plantarii* と *B. vandii* の類似性を示すと同時に、木嶋らによりバンダ罹病葉より分離・同定されたトロポロン産生性の *B. gladioli* (木嶋ら, 1986; 木嶋, 1987) を *B. plantarii* あるいは *B.*

vandii として取り扱うことを提案した。また、Coenye et al. (1999) も *B. vandii* は *B. plantarii* と同種 (junior synonym) ではないかと報告している。そこで本研究では、バンダ罹病葉から病原細菌の分離・同定を試みるとともに *B. plantarii* と *B. vandii* の分類学的位置づけを化学分類学的手法により再検討した。

材料および方法

1. 供試細菌

本実験に供試した植物病原細菌の来歴を Table 1 に示した。*B. plantarii* 2菌株、*B. vandii* の標準株、典型的な *B. gladioli* 3菌株、木嶋らによりバンダ罹病葉から分離・同定されたトロポロン産生性の *B. gladioli* 3菌株 (MAFF301728, MAFF301729, MAFF301730) および著者らがバンダ罹病葉から病原細菌を分離し、生理・生化学的試験並びに病原性試験に基づき *B. gladioli* と同定したトロポロン非産生性の3菌株 (9801, 9802および9803) を供試した。

*現在 福岡県八女地域農業改良普及センター

*Present address: Yame Regional Agriculture Extension Center, Fukuoka 834-0005, Japan)

**現在 東京農業大学

**Present address: Tokyo University of Agriculture, Kanagawa 243-0034, Japan)

Table 1. Bacterial strains used in this experiment

Bacterial species	Strain	Origin	Source # ¹⁾
<i>Burkholderia plantarii</i>	JCM5492 ^T	Rice seedling	JCM
	MAFF302484	Rice seedling	MAFF
<i>B. vandii</i>	JCM7957 ^T	Vanda root	JCM
(<i>B. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>)	MAFF301728	Vanda leaf	MAFF
	MAFF301729	Vanda leaf	MAFF
	MAFF301730	Vanda leaf	MAFF
<i>B. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>	ATCC10248 ^T	Gladiolus	ATCC
	MAFF302515	Tulip	MAFF
<i>B. gladioli</i> pv. <i>alluicola</i>	ATCC19302	Onion	ATCC
<i>B. gladioli</i> (pathovar unidentified)	T-1	Rice	KU
	9801	Vanda leaf	KU
	9802	Vanda leaf	KU
	9803	Vanda leaf	KU
<i>B. glumae</i>	MAFF301169 ^T	Rice grain	MAFF
	MAFF302423	Green gram	MAFF
	2	Rice grain	KNAES
<i>B. cepacia</i>	ATCC25416 ^T	Onion	ATCC
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	ATCC23308 ^T		ATCC
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	ATCC15713 ^T	Potato	ATCC
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	ATCC33913 ^T	Brussels sprouts	ATCC
<i>Ralstonia solanacearum</i>	ATCC11696 ^T	Tomato	ATCC
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i>	ATCC27794 ^T	Corn	ATCC
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	ATCC19860 ^T	Maize	ATCC

a) Abbreviations of culture collections: JCM, Japan Collection of Microorganisms; MAFF, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries; ATCC, American Type Culture Collection; KU, Kyushu University; KNAES, Kyushu National Agricultural Experiment Station.

2. 脂肪酸分析

①全菌体脂肪酸分析

全菌体からの脂肪酸の抽出, ガスクロマトグラフィー (GLC) による脂肪酸の検出およびデータの解析方法は塩崎ら (1995) および井上ら (1995) に従った。

②菌体膜脂肪酸分析

菌体膜脂肪酸分析は Kori et al. (1992) および井上ら (1995) の方法に準拠して行った。

3. 菌体膜蛋白質の分析

Frash et al. (1974) の方法により菌体膜を抽出し, 常法に従い SDS-ポリアクリルアミドゲル (12%) 電気泳動により分離した後, Coomassie brilliant blue R-250で染色し分析を行った。

4. 種特異的プライマーを用いた PCR 分析

523培地 (Kado and Heskett, 1970) に30℃で12時間振とう培養した菌体を, 滅菌蒸留水500 μ lに懸濁した後, 95℃で10分間熱処理した。遠心分離により得た上清5 μ lをPCRに供試した。プライマーは5S rDNAを含むITS (internal transcribed spacer) 領域を種特異的に増幅するように設計されたものを使用した。すなわち *B. plantarii* の特異的プライマー (Takeuchi et al., 1997) として PL-12f (5'-AGCCAGTCAGAGGATAAGTC-3'), PL-11r (5'-CAATTGAGCCGAACATTTAAG-3') を, *B. gladioli* 特異的プライマー (浦ら, 1999) として GLA-f (5'-CGAGCTAAATCCGCGAAA-3'), GLA-r (5'-AGACTCGAGTCAACTGA-3'), *B. glumae* 特異的

プライマー (Takeuchi et al., 1997) として GL-13f (5'-ACACGGAACACCTGGGTA-3'), GL-14r (5'-TCGCTCTCCCGAAGAGAT-3') をPCRに用いた。反応液の組成は, 超純水68.5 μ l, 10 \times 反応緩衝液 (100mM Tris-HCl, pH9.0, 500mM KCl, 1% TritonX-100) 10.0 μ l, 25mM MgCl₂, 10.0 μ l, DNA 試料5.0 μ l, 5mM dNTP 4.0 μ l, 20 μ M プライマー 対各 1.0 μ l, 2.5U/ μ l Taq DNA ポリメラーゼ0.5 μ lの総量100 μ lで, PCRの条件は94℃1分の変性, 60℃2分のプライマーのアニーリング, 72℃3分のDNA伸長反応を30サイクル行った。得られたPCR増幅産物を2.0%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。

5. 16S-23S rDNA スペーサー領域 (ITS) の塩基配列の比較

B. vandii のITS領域の塩基配列を決定するために, *Burkholderia* 属のrDNAのITS領域の塩基配列を基にして, プライマー-SQP-BFO (5'-TTTTGGATCCCTGGA TCACCTCCTTT-3'), SQP-BRE (5'-TTTTGAA TTC CGCTTGACCCTATAACG-3') を設計し, これを用いてPCR反応を行い, 本領域を増幅した。得られたDNA増幅産物をプラスミドベクター (pBluescript II KS+) にクローニングした後, プラスミドの精製を行い, Taq Cycle Sequencing Kit for Shimadzu DNA Sequencer Ver. 2 (Takara) とDSQ-1000 (島津製作所) を用いたジデオキシ法により塩基配列を決定し, 既に報告されている *B. plantarii*, *B. gladioli*, *B. glumae*

の ITS 遺伝子領域の塩基配列と比較した。

結 果

1. 脂肪酸分析

Table 2 に供試細菌の全菌体脂肪酸の構成成分および組成比を示した。*B. plantarii*, *B. vandii*, 典型的な *B. gladioli*, 木嶋らがバンダから分離・同定した *B. gladioli* および著者らが同植物より分離・同定した *B. gladioli* の全菌体脂肪酸の構成成分および組成比を比較すると, *B. vandii* は *B. plantarii* と極めて類似しており, 識別することはできなかった。木嶋らの分離株 (MAFF301728, MAFF301729 および MAFF301730) は, 18:1 *cis*11 および 19:0 *cyclo* の組成比が典型的な *B. gladioli* とは異なり, *B. plantarii* あるいは *B. vandii* と類似していた。著者らの分離株 (9801, 9802 および 9803) は典型的な *B. gladioli* と同様な組成比を示した。また Table 3 および Fig. 1 に示したように, 菌体膜脂肪酸の構成成分および組成比においても, *B. vandii* と *B. plantarii* とは識別できず, 木嶋らの分離株は *B. plantarii* および *B. vandii* とともにユークリッド距離 4.1 でクラスターを形成した。さらに著者らの分離株は典型的な *B. gladioli* と類似した組成比を示し, ユークリッド距離 3.3 でクラスターを形成した。

2. 菌体膜タンパク質のポリペプチドパターン比較

Fig. 2 に見られるように, *B. plantarii* と *B. vandii* の菌体膜蛋白質のポリペプチドパターンに相違は認められず, 両種細菌を識別することはできなかった。また木嶋らの分離株は, *B. plantarii* あるいは *B. vandii* と類似した泳動像を示し, 著者の分離株は典型的な *B. gladioli* のペプチドパターンと同様であった。

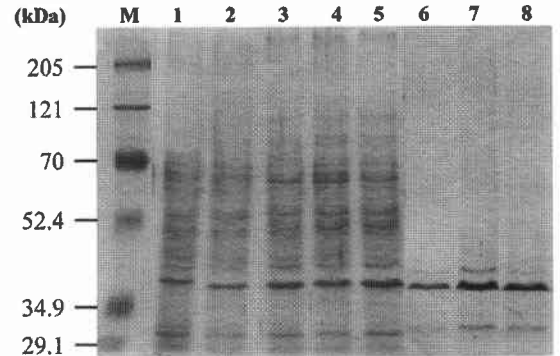


Fig. 2. SDS-PAGE profiles of membrane proteins of *Burkholderia* species.

lane M, Molecular weight markers

lane 1, *B. plantarii* JCM5492^T

lane 2, *B. plantarii* MAFF-302387

lane 3, *B. vandii* JCM7957^T

lane 4, (*B. gladioli* pv. *gladioli*) MAFF301728

lane 5, (*B. gladioli* pv. *gladioli*) MAFF301729

lane 6, *B. gladioli* (pathovar unidentified) T-1

lane 7, *B. gladioli* (pathovar unidentified) 9801

lane 8, *B. gladioli* (pathovar unidentified) 9802.

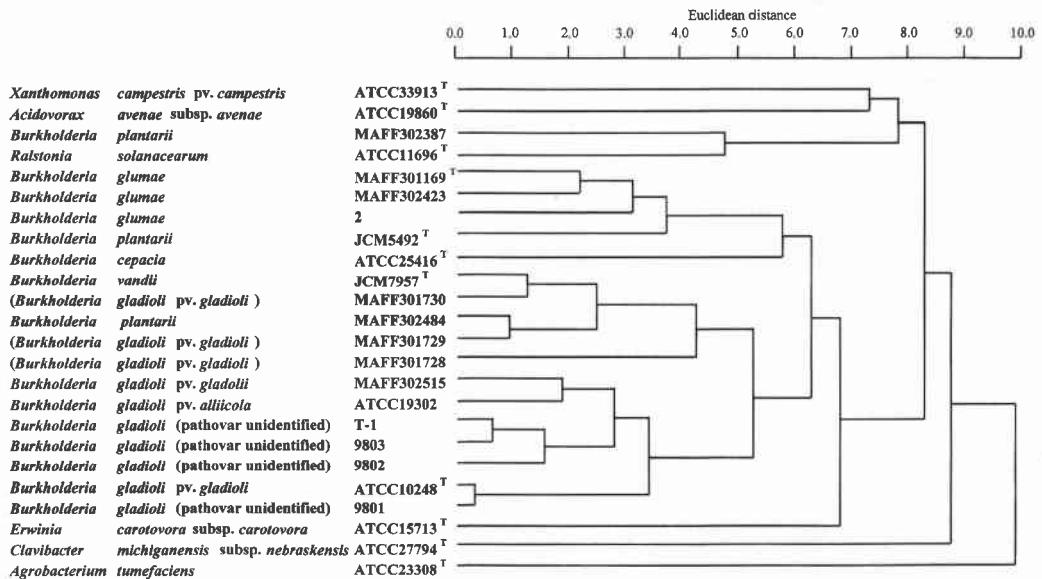


Fig. 1. Dendrogram of the cluster analysis of plant pathogenic bacteria based on the percentage composition of bacterial membrane fatty acids.

Table 2. Percentage composition of total cellular fatty acids in plant pathogenic bacteria

Bacterial species	Strain	Percentage composition of fatty acid ^{a)}												
		14:0	Rt 4.7 ^{b)}	Rt 4.9 ^{b)}	16:0	16:1 cis 9	Rt 9.0 ^{b)}	18:1 cis 11	18:0	19:0 cyclo	16:0 3-OH	16:1 2-OH	14:0 3-OH	20:1 cis 9
<i>Burkholderia plantarii</i>	JCM5492 ^T	7.07 ^{c)}	3.10	1.67	22.33	3.06	4.22	6.58	7.16	10.38	1.65	5.20	4.99	17.39
	MAFF302484	5.83	0.77	0.52	36.89	2.24	3.54	6.74	10.87	7.72	3.29	2.27	4.32	10.00
<i>B. vandii</i> (<i>B. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>)	JCM7957 ^T	4.99	1.04	0.56	39.94	1.70	3.58	7.43	9.45	9.27	2.34	2.35	4.12	8.36
	MAFF301728	6.47	0.77	0.42	37.52	1.82	2.93	7.09	9.43	13.12	2.23	2.14	3.16	8.73
<i>B. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>	MAFF301729	5.56	1.16	0.81	38.91	1.68	3.54	7.18	9.04	10.61	2.26	2.17	3.75	8.97
	MAFF301730	5.34	1.72	0.98	37.96	1.72	3.80	6.36	10.15	8.66	2.53	2.59	4.32	9.49
<i>B. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>	ATCC10248 ^T	5.55	0.87	0.54	32.85	12.00	2.67	19.13	5.93	5.13	1.15	1.97	2.84	5.46
	MAFF302515	5.50	0.68	0.35	36.04	5.66	3.64	11.64	9.68	6.20	2.43	1.56	4.29	7.35
<i>B. gladioli</i> pv. <i>alliiicola</i>	ATCC19302	5.22	0.79	0.45	38.80	6.87	3.55	8.84	9.71	5.20	2.44	2.05	4.37	7.41
<i>B. gladioli</i> (pathovar unidentified)	T - 1	7.42	0.94	0.60	28.88	5.08	4.25	11.44	8.31	7.23	2.08	3.33	4.45	11.94
	9801	5.51	1.58	0.75	37.83	6.19	3.44	9.86	9.03	5.59	2.14	1.78	4.13	7.33
	9802	7.10	0.65	0.21	39.89	6.49	3.10	8.82	9.24	5.02	2.05	2.02	4.12	7.74
	9803	6.25	0.82	0.44	36.10	7.66	3.12	11.95	8.30	5.18	1.97	2.11	4.19	7.50
<i>B. glumae</i>	MAFF301169 ^T	5.21	0.94	0.30	25.67	9.30	2.99	21.97	4.77	12.01	1.15	2.34	2.87	7.36
	MAFF302423	4.71	2.22	0.81	25.94	4.65	3.92	21.97	6.92	13.48	1.79	3.21	4.19	7.43
	2	4.86	0.66	0.19	33.27	3.44	4.88	16.28	9.32	8.16	2.24	2.87	6.10	8.30
<i>B. cepacia</i>	ATCC25416 ^T	4.50	1.91	0.08	30.21	11.14	2.85	25.73	3.99	3.67	3.81	0.39	3.81	3.46
<i>A. tumefaciens</i>	ATCC23308 ^T	1.23	1.80	1.09	11.14	3.20	1.83	64.60	0.21	7.00	0.03	1.92	2.23	3.13
<i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	ATCC15713 ^T	2.59	1.90	0.92	35.02	33.36	0.72	13.98	0.32	9.16	0.01	1.23	0.08	0.04
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	ATCC33913 ^T	3.31	25.35	19.66	10.78	27.49	0.04	0.63	0.15	0.00	0.00	2.59	0.00	0.00
<i>R. solanacearum</i>	ATCC11696 ^T	6.31	1.16	0.92	26.37	21.56	0.66	11.30	5.29	7.45	0.92	11.62	0.46	0.88
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i>	ATCC27794 ^T	0.69	10.03	78.02	1.53	0.83	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	7.01	0.00	0.00
<i>A. avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	ATCC19860 ^T	4.32	0.51	0.18	26.89	53.36	0.33	12.43	0.87	0.54	0.12	0.00	0.19	0.08

a) Percentage of peak area relative to total fatty acid methyl esters.

b) Rt 4.7, Rt 4.9 and Rt 9.0 are unidentified fatty acids (Rt = retention time, min).

c) Fatty acids in each strain are expressed as a percentage of total cellular fatty acid composition. Fatty acids were identified by their retention times on a gas chromatograph capillary column.

Table 3. Percentage composition of bacterial membrane fatty acids in plant pathogenic bacteria

Bacterial species	Strain	Percentage composition of fatty acid ^{a)}												
		14:0	Rt 4.7 ^{b)}	Rt 4.9 ^{b)}	16:0	16:1 cis 9	Rt 9.9 ^{b)}	18:0	19:0 cyclo	16:0 3-OH	16:1 2-OH	14:0 3-OH	20:1 cis 9	
<i>Burkholderia plantarii</i>	JCM5492 ^T	14.96	3.03	3.18	22.61	0.87	2.82	1.35	4.32	15.83	1.00	7.55	2.67	17.51
	MAFF302484	15.92	0.97	0.82	30.97	0.37	1.41	0.24	8.87	12.97	0.84	5.64	4.60	14.65
<i>B. vandii</i> (<i>B. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>)	JCM7957 ^T	18.17	1.74	1.01	30.66	1.05	3.24	0.95	8.13	11.37	1.89	2.23	3.65	12.63
	MAFF301728	18.54	1.24	0.00	36.93	1.21	4.03	1.60	9.90	7.77	2.71	1.17	5.39	6.41
<i>B. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>	MAFF301729	15.76	0.00	0.00	30.92	0.00	3.60	0.00	7.34	15.09	1.68	2.30	4.56	17.06
	MAFF301730	21.66	2.40	0.00	33.07	0.00	3.86	0.00	8.70	11.43	0.00	3.22	3.77	11.90
<i>B. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>	ATCC10248 ^T	8.25	0.81	0.00	42.95	1.79	4.18	2.85	9.72	8.02	1.32	1.67	5.89	9.17
	MAFF302515	8.72	2.05	2.81	38.50	3.07	4.55	0.00	9.67	6.70	2.10	3.73	4.15	8.65
<i>B. gladioli</i> pv. <i>alliiicola</i>	ATCC19302	11.25	4.56	1.80	37.65	0.29	2.82	0.30	8.59	9.24	1.43	5.49	3.60	9.77
<i>B. gladioli</i> (pathovar unidentified)	T - 1	9.32	2.49	1.32	34.45	0.16	3.34	0.00	8.20	11.62	2.43	4.91	4.04	13.80
	9801	7.24	0.78	0.35	44.43	0.37	3.94	0.57	10.20	8.98	2.57	1.11	5.76	10.54
	9802	9.15	1.17	0.16	38.40	1.38	3.29	0.16	10.06	10.51	2.77	1.75	4.85	12.93
	9803	11.38	1.24	0.75	37.02	0.15	3.13	0.06	8.05	13.89	1.90	2.13	4.45	13.33
<i>B. glumae</i>	MAFF301169	10.91	1.52	0.57	22.74	1.96	4.88	2.71	7.38	22.07	1.92	1.82	5.94	12.15
	MAFF302423	13.11	3.73	1.52	23.81	0.43	3.87	0.00	5.41	22.33	0.70	4.66	5.26	13.55
<i>B. cepacia</i>	ATCC25416 ^T	12.48	0.84	0.40	27.04	5.99	3.52	13.19	5.47	11.11	1.31	2.24	3.89	10.49
<i>A. tumefaciens</i>	ATCC23308 ^T	2.00	1.75	1.23	10.05	0.72	2.71	3.81	0.66	47.53	0.00	2.60	2.83	24.10
<i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	ATCC15713 ^T	3.61	1.89	0.75	41.95	16.25	0.95	9.51	0.15	22.48	0.00	1.60	0.07	0.59
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	ATCC33913 ^T	3.35	22.64	18.16	13.36	13.16	2.52	0.55	0.48	0.11	0.00	0.35	0.19	0.21
<i>R. solanacearum</i>	ATCC11696 ^T	11.80	16.85	6.58	12.72	5.69	0.34	0.38	1.48	8.24	0.00	21.92	0.00	0.00
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i>	ATCC27794 ^T	4.07	12.27	45.06	22.62	9.44	1.52	0.00	0.00	0.00	1.53	3.50	0.00	0.00
<i>A. avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	ATCC19860 ^T	18.46	0.65	0.47	35.54	26.77	0.37	6.81	2.27	4.91	0.70	0.33	0.13	0.76

a) Percentage of peak area relative to total fatty acid methyl esters.

b) Rt 4.7, Rt 4.9 and Rt 9.9 are unidentified fatty acids (Rt = retention time, min).

c) Fatty acids in each strain are expressed as a percentage of bacterial membrane fatty acid composition. Fatty acids were identified by their retention times on a gas chromatograph capillary column.

3. 特異的プライマーを用いた PCR

B. plantarii, *B. gladioli* および *B. glumae* をそれぞれ特異的に検出可能なプライマーを用いて PCR 分析を行った結果を Fig. 3 に示した。*B. vandii* および木嶋らの分離株から、*B. plantarii* に特異的なプライマーにより約180bp の PCR 産物が検出された。*B. gladioli* 特異的プライマーにより、典型的な *B. gladioli* からのみ約300bp の DNA 増幅産物が検出された。また、*B. glumae* 特異的プライマーを用いた PCR では *B. glumae* からのみ約400bp の増幅産物が検出された。

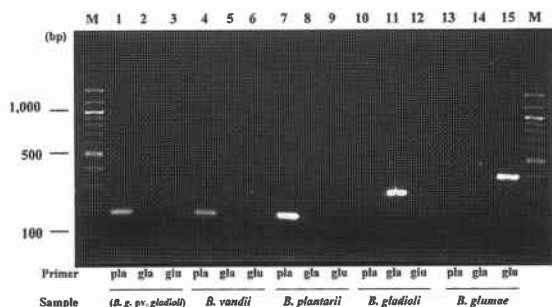


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of the PCR-amplified 16S-23S ribosomal DNA ITS region of *Burkholderia* species using primers PL-12f and PL-11r (pla), GLA-f and GLA-r (gla), and GL-13f and GL-14r (glu).

Agarose gel was stained with ethidium bromide. Lane M, Molecular weight marker (100 bp ladder); Lane 1-3, (*B. gladioli*, pv. *gladioli*) MAFF301728; Lane 4-6, *B. vandii* JCM7957T; Lane 7-9, *B. plantarii* JCM5492T; Lane 10-12, *B. gladioli* pv. *gladioli* ATCC10248T; Lane 13-15, *B. glumae* MAFF302423.

4. ITS の塩基配列の比較

Fig. 4 に *B. vandii* の ITS 塩基配列を示した。また、この塩基配列を既報の *B. plantarii*, *B. gladioli* および *B. glumae* の配列と比較した結果を Table 4 に示した。*B. vandii* の ITS 塩基配列は *B. plantarii* のそれと比較すると約96%の相同性を示したのに対して、*B. gladioli* との相同性は約88%であった。

考 察

脂肪酸分析、菌体膜タンパク質の比較および種特異的 PCR 等の化学分類学的手法に基づき、*B. vandii* と *B. plantarii* の分類学的位置づけを再検討した結果、両種細菌を明確に識別するような指標を見出すことはできなかった。また *B. vandii* と *B. plantarii* の ITS の塩基配列は約96%の高い相同性を示し、さらに両細菌種の生理・生化学的並びに病理学的性質も極めて類似していることから、*B. vandii* は *B. plantarii* と同種異名であると考えられる。また、木嶋らによりバンダから分離された *B. gladioli* と同定されたトロポロン産生性の MAFF301728, MAFF301729, MAFF301730株は、本研究においても典型的な *B. gladioli* とは明らかに異なり、*B. plantarii* あるいは *B. vandii* と同様の性質を示すことから、これら3菌株を *B. vandii* とともに *B.*

```

1 TCGGGCTGGA CTCACCTCCT TTCTCGAGCT AGTACCGCAA ACATTGAGCG TTCACGCTTA 60
61 TCGGCTGTTG ATCAAGACAG ACTCAGGGGT CTGTAGCTCA GTCGGTTAGA GCACCGTCTT 120
121 GATAAGGCGG GGGTCGTTGG TTCGAATCCA ACCAGACCCA CCAATTGTCT GGCACGGTAG 180
181 TCCTGAGTAG TCTCTGTACA TGGGGGCATA GCTCAGCTGG GAGAGCACCT GCTTTGCAAG 240
241 CAGGGGTCGT CGGTTTCGATC CGCTCTGCTC CCACCAATCT TCAATAAAGA AGGCTTGGAC 300
301 CAAGGTTACT TGGTACCGAG GTTCTCTTAT TGGCGATTGA GCCAAGTACA GGATAAGTCA 360
361 GAAGTAGCAC TTATCGGCTG TGCTTCTTTA ACAATCTAGA AGAAGTAGTA ATTTGGATAG 420
421 CGGAACGGTT ATTTGAGATG GGCCTGGAAA CTATCCGGGT TGTGATTGTA TCGATGTATC 480
481 TCAAGATGAT TCGAACTTAA ACCTTGGCTT CAATTGGAAT ACGGCACAAA TGGGAGAACT 540
541 CAACCTGTAA CGACTGTC..... 558

```

Fig. 4. Nucleotide sequence of the 16S-23S ribosomal DNA ITS region of *Burkholderia vandii* JCM7957^T.

Table 4. Nucleotide sequence identity matrix of 16S-23S ribosomal DNA ITS region of plant pathogenic *Burkholderia* species.

Species ^{a)}	Length (bp)	%Homology with :				
		<i>B. plantarii</i>	<i>B. vandii</i>	<i>B. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>	<i>B. gladioli</i> pv. <i>alliicola</i>	<i>B. glumae</i>
<i>B. plantarii</i>	558	—	—	—	—	—
<i>B. vandii</i>	558	96	—	—	—	—
<i>B. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>	558	88	87	—	—	—
<i>B. gladioli</i> pv. <i>alliicola</i>	558	89	89	94	—	—
<i>B. glumae</i>	558	90	88	88	89	—

a) *B. plantarii*, strain MAFF301723 (accession No. D87079); *B. vandii*, strain JCM7975^T (this study); *B. gladioli* pv. *gladioli*, strain ICMD3950 (accession No. D87081); *B. gladioli* pv. *alliicola* strain ICMP2804 (accession No. D87082); *B. glumae*, strain MAFF301169^T (accession No. D87080).

plantarii として取り扱うことが望まれる。また、これら3菌株を含む *B. plantarii* および *B. vandii* はバンダ葉に病原性を示さない(平川ら, 1999)。一方、我々がバンダ罹病葉から分離した細菌は、細菌学的・病理学的並びに化学分類学的にも典型的な *B. gladioli* と同様の性質を示し、さらに全ての *B. gladioli* はバンダ葉に病原性を有する(平川ら, 1999) ことから、真の *B. gladioli* がバンダの病原細菌であると結論した。

引用文献

- Azegami, K., K. Nishiyama, Y. Watanabe, I. Kadota, A. Ohuchi and C. Fukazawa. (1987) *Pseudomonas plantarii* sp. nov., the causal agent of rice seedling blight. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 144-152.
- Coenye, T., B. Holmes, K. Kersters, J. R. W. Govan and P. Vandamme (1999) *Burkholderia cocovenenans* (van Damme *et al.* 1960) Gillis *et al.* 1995 and *Burkholderia vandii* Urakami *et al.* 1994 are junior synonyms of *Burkholderia gladioli* (Severini 1913) Yabuuchi *et al.* 1993 and *Burkholderia plantarii* (Azegami *et al.* 1987) Urakami *et al.* 1994, respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 37-42.
- Frash, C. E. and E. C. Gotschlich. (1974) An outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* group B responsible for serotype specificity. *J. Exp. Med.* 140: 87-104.
- 平川ゆみ・浦 広幸・古屋成人・松山宣明 (1999) *Burkholderia plantarii* と *B. vandii* の分類学的再検討. 九病虫研会報 45: 1-4.
- Kado, C. I. and G. M. Heskett. (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969-976.
- 木嶋利男・手塚徳弥・山下修一・土居養二 (1986) *Pseudomonas gladioli* pv. *gladioli* によるバンダ褐色腐敗病 (新称) *Pseudomonas* によるイチゴ褐色腐敗病 (新称). 日植病報 52: 151 (講要).
- 木嶋利男 (1987) 鉢物類の細菌病に関する研究. 栃木農試研報 34: 50-90.
- 井上美由紀・松元 賢・古屋成人・松山宣明 (1995) *Pseudomonas syringae* における全菌体及び菌体膜脂脂肪酸組成の比較. 九病虫研会報 41: 55-57.
- Kori, Y., N. Furuya, K. Tsuno and N. Matsuyama. (1992) Differentiation of *Erwinia chrysanthemi* and *E. carotovora* subsp. *carotovora* by the cellular fatty acid analysis. *J. Fac., Kyushu Univ.*, 37 (2): 173-178.
- 塩崎尚美・井上美由紀・松元 賢・飯山和弘・古屋成人・松山宣明 (1995) イネ褐条病細菌 (*Pseudomonas avenae*) の分類学的検討. 九病虫研会報 41: 1-6.
- Takeuchi, T., H. Sawada, F. Suzuki and I. Matsuda. (1997) Specific detection of *Burkholderia plantarii* and *B. glumae* by PCR using primers selected from the 16S-23S rDNA spacer regions. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 63: 455-462.
- 浦 広幸・松元 賢・平川ゆみ・飯山和弘・古屋成人・松山宣明 (1999) 16S-23S リボソーム DNA スペース領域の配列を利用した PCR による *Burkholderia gladioli* の特異的検出. 日植病報 65: 374 (講要).
- Urakami, T., C. Ito-Yoshida, H. Araki, T. Kijima, K. I. Suzuki and K. Komagata. (1994) Transfer of *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* spp. and description of *Burkholderia vandii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44 (2): 235-245.

(2001年4月26日 受領)