メンブレンフィルターを利用した増菌 PCR 法による農業環境からの イネもみ枯細菌病菌の検出

小原 達二^{1*}・澤田 宏之²・畔上 耕児¹

ABSTRACT

OHARA, T.^{1*}, SAWADA, H.² and AZEGAMI, K.¹ (2004). Detection of the pathogen of bacterial grain rot of rice from agro-environment using membrane filtration and enrichment culture followed by PCR assay. Jpn. J. Phytopathol. 70: 115-122.

The detection of the pathogen of bacterial grain rot of rice, *Burkholderia glumae*, from agro-environmental water using selective media is difficult, because the water generally contains a very low concentration of the targeting pathogen. A new procedure was devised using membrane filtration and enrichment culture followed by PCR. A PCR primer set, PGF1 (5'-TGTCTGACACGGAACACCTGGGTAG-3') and PPR1 (5'-AGGTTGAGTTCTCGCATTTGTGCCG-3'), was designed for specific amplification of the 16S-23S rDNA spacer region in *B. glumae*. The procedure made possible the detection of *B. glumae* from 1000 ml of irrigation water inoculated with approximately 10⁰ cfu of the pathogen. We tested this procedure for various samples of agro-environmental water. *B. glumae* was detected from some samples of paddy water, irrigation water, river water and lake water from May through November. When the method was used on 30 species of volunteer plants in or around paddy fields with bacterial grain rot, *B. glumae* was detected from one plant of *Monochoria vaginalis*.

(Received November 20, 2003; Accepted January 23, 2004)

Key words: *Burkholderia glumae*, detection, membrane filtration, enrichment culture, PCR, agro-environmental water.

緒 言

イネもみ枯細菌病の病原である *Burkholderia glumae* は、イネの籾に対するもみ枯症の原因細菌であるとともに、育苗箱で育成されるイネ苗の腐敗症の原因細菌でもある。本細菌は種子伝染し、これが本病の主たる感染要因であると考えられているが、浸種、催芽時の汚染種子から健全種子への伝染、育苗箱内における罹病苗から周囲の健全苗への伝染、本田における感染株から周囲の健全株への伝染などの二次伝染についても報告されている（遠藤, 1990; 半沢・梶, 1992; 諏訪ほか, 1980）。また、イネ体における本細菌の分布様式や動態、病気の発生生態などに関する報告（畔上, 1996a, b; 畔上, 1997; Hikichi, 1993; Hikichi *et al.*, 1994; 乙藤, 1988; Tsushima *et al.*, 1991; Tsushima *et al.*, 1996）も多い。

しかし、*B. glumae* の農業環境における巨視的な分布・

挙動についてはなお不明な点が多く、生態学的研究に適した高精度で効率的な検出法が求められている。本細菌の検出法として、これまで、抗血清法（荒木・脇本, 1984; 曳地, 1993; 松田, 1985）、特異的産生物質を指標とした検出法（松田, 1985）、選択培地法（Kawaradani, 2000; 対馬ほか, 1986）、遺伝子診断法（Tsushima *et al.*, 1994; Takeuchi *et al.*, 1997）などが報告されているが、これらの方法はいずれも微量ないし少量の試料を対象としたもので、多種多様な微生物が混在する大容量試料の中から低密度に散在する標的細菌を検出するのに用いるのは難しい。宮川（2000）、Miyagawa and Inoue（2002）は、抗菌剤を添加した AFG 培地（畔上, 1994）を用いたメンブレンフィルター法により、水田周辺の水圏環境におけるイネ苗立枯細菌病菌 *Burkholderia plantarii* の分布および挙動を調査し、水田畦畔雑草が本細菌による病害の越冬伝染源となりうることおよびイネ種子が田面水を介して本細菌に感染し

¹ 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構中央農業総合研究センター病害防除部（〒305-8666 茨城県つくば市観音台3-1-1） National Agricultural Research Center, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8666, Japan

² 独立行政法人農業環境技術研究所生物環境安全部（〒305-8604 茨城県つくば市観音台3-1-3） National Institute for Agro-Environmental Sciences, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8604, Japan

* Corresponding author (E-mail: tatsuji@affrc.go.jp)

うることを見出した。筆者らはこれを *B. glumae* の検出に応用すべく、メンブレンフィルター法に適した選択培地について検討したが、大容量の環境試料中の多種で多数の細菌の中から本細菌を高精度に分離するのに適当な培地を得ることができず、同様の手法を用いた生態学的調査は困難であった。

そこで、本研究では農業環境における本細菌の分布および挙動を調査するための手法として、メンブレンフィルターを用いた濾過法による細菌の捕捉と、増菌後にPCRを行う enrichment PCR (Candrian, 1995) とを組み合わせた方法 (以下 MF 増菌 PCR 法という) について検討するとともに、本法を用いて水田地域における水圏環境および雑草からの *B. glumae* の高精度検出を試みたのでその結果を報告する。

実験材料および方法

供試細菌 *B. glumae* 菌株として、スキムミルク分散媒 (10% スキムミルク, 1% グルタミン酸ナトリウム) に懸濁し -30°C で凍結保存した MAFF 301682 株を PPGA 培地上で培養したものを用いた。また、増菌培養条件の検討のため、対照菌として同様の方法で保存した *Burkholderia gladioli* (MAFF 302386), *B. cepacia* (AZ85173), *B. plantarii* (MAFF 301723^T), *B. andropogonis* (MAFF 302546), *Ralstonia pickettii* (JCM 5969), *R. solanacearum* (MAFF 302549), *Pseudomonas fuscovaginae* (AZ200143), *P. aeruginosa* (TF8913), *P. chlororaphis* (MAFF 302536), *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (KN122), *Erwinia ananas* (AZ8053) および *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (MAFF 301225) の各菌株を PPGA 培地上で培養して用いた。

PCR プライマー *B. glumae* を PCR で検出するための菌種特異的プライマーセットとして PGF1/PPR1 (Fig. 1) を用いることにした。本プライマーセットは、16S rRNA および 23S rRNA 遺伝子間のスペーサー領域 (16S-23S rDNA スペーサー領域) の配列を対象として、*B. glumae*, *B. plantarii* および *B. gladioli* の間で比較を行い、*B. glumae* に特異的な部分を選び出して設計したものである。このプライマーセットを用いて、*B. glumae* 25 菌株のほか、*B. plantarii* 73 菌株、*B. gladioli* 12 菌株、*B. cepacia* 7 菌株、*B. caryophylli* 1 菌株、*B. andropogonis* 2 菌株、*B. vietnamiensis* 1 菌株、*Ralstonia solanacearum* 3 菌株、*R. pickettii* 1 菌株、*Acidovorax avenae* subsp. *avenae* 1 菌株、*Pseudomonas corrugata* 1 菌株、*P. fuscovaginae* 1 菌株、*P. chlororaphis* 1 菌株、*P. aeruginosa* 1 菌株、*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 2 菌株および *Erwinia ananas* 1 菌株の計

Fig. 1. Sequence of the intergenic spacer region located between the 16S and 23S rRNA genes in the RNA operon of *Burkholderia glumae* MAFF 301169 (D87080; Takeuchi *et al.*, 1997). The specific primer sites (PGF1/PPR1) are enclosed in the boxes. By using these primers, amplified products of 371 bp (positions 179 to 549) can be obtained specifically from *B. glumae* strains. The 3' region of the 16S rRNA gene and the 5' region of the 23S rRNA gene are also shown.

6 属16種133株をコロニー PCR に供試したところ、供試したすべての *B. glumae* 菌株において明瞭な増幅が認められたが、その他の菌種では同様の増幅は見られなかった (データ省略)。この結果、きわめて特異性が高いことが確認できたことから、以後の試験における PCR は PGF1/PPR1 を用いて行うこととした。なお、本プライマーセットによって *B. glumae* から増幅される産物のサイズは 371 bp である。

増菌培養条件の検討 *B. glumae* を優先的に増菌するのに適した液体培地と増菌培養温度について検討した。まず、本細菌の選択培地として報告されている S-PG および CCNT の両固形培地の処方から寒天を除いて液体培地としたもの、およびそれらの5倍液ならびに10倍液について増菌の効果を比較した。対照として Luria-Bertani broth (LB) を供試した。それぞれの液体培地を 10 ml 入れた L 字型試験管に、終濃度 1.1×10^2 cfu/ml になるよう *B. glumae* MAFF 301682 株の懸濁液を加え、自記式温度勾配振とう培養装置 (ADVANTEC バイオフォトレコーダー TN-2612) にセットし、35.0°C 定温、30 rpm で振とう培養して、吸光度の経時的変化を培養48時間後まで10分間隔で計測した。

次に、上述の検討で *B. glumae* の培養に最適であった液体培地を用いて増菌培養温度について検討した。L 字形試験管に入った 10 ml の液体培地に、終濃度 1.1×10^2 cfu/ml になるよう *B. glumae* MAFF 301682 株を加え、バイオフォトレコーダーにセットし、 $30.0 \sim 42.0^\circ\text{C}$ 設定（実測値： $29.8 \sim 41.9^\circ\text{C}$ ）、30 rpm で振とう培養して、この温度域内の 12 温度点における吸光度の経時変化を培養 48 時間後まで 10 分間隔で測定した。

MF 増菌 PCR 法を用いた検出法の検討 農業環境技術研究所（茨城県つくば市）の実験圃場敷地内にある農業用水貯水場（霞ヶ浦より引水）から採取した農業用水 1000 ml に *B. glumae* MAFF 301682 株の懸濁液を加え、終濃度 1.4×10^3 cfu/l, 1.4×10^2 cfu/l, 1.4×10^1 cfu/l, 1.4×10^0 cfu/l, 1.4×10^{-1} cfu/l および 1.4×10^{-2} cfu/l の人工汚染農業用水を作製した。対照として *B. glumae* MAFF 301682 株を添加しない農業用水を供試した。これらの汚染水を、まず 47 mm 径ガラス繊維フィルター（ADVANTEC GA-200）とポアサイズ $5.0 \mu\text{m}$ の 47 mm 径メンブレンフィルター（MILLIPORE JMWPO4700）を重ねてセットしたリユーザブルボルトトップフィルターシステム（Nalge Nunc International, 500 ml）を用いて吸引濾過し、次にその濾液をポアサイズ $0.45 \mu\text{m}$ の 47 mm 径メンブレンフィルター（PALL GN-6）をセットした同フィルターシステムを用いて再度吸引濾過し、フィルター上に集菌した。集菌後のフィルターは、上述の検討で *B. glumae* の培養に最適であった液体培地 30 ml とともに 50 ml 容ミニカルチューブに入れ、キャップで密封した後、振盪培養槽を用いて 39°C 、120 rpm で増菌培養を行った。培養 0, 20, 25, 30 時間後に培養液 1 ml をマイクロチューブに移し、15000 rpm で 15 分間遠心した沈殿物を滅菌蒸留水 $50 \mu\text{l}$ に懸濁した液の $2 \mu\text{l}$ を PCR 法による本細菌の検出に供した。PCR 反応液として、 2.0 pmol ($0.2 \mu\text{M}$) のプライマーセット（PGF1/PPR1）、 1.2 nmol ($120 \mu\text{M}$) の dNTP mixture（Wako）、 0.5 U の *Taq* DNA ポリメラーゼ（ABgene）および前述の増菌懸濁液 $2 \mu\text{l}$ を添加した $1 \times \text{Taq DNA 反応緩衝液}$ （ABgene Ready Mix PCR Buffer） $10 \mu\text{l}$ を調製した。これを Thermalcycler（PERKIN ELMER GeneAmp PCR system 2400）にセットし、 $95^\circ\text{C} : 30 \text{ 秒}$ （初回のみ $5 \text{ 分 } 30 \text{ 秒}$ ）、 $60^\circ\text{C} : 30 \text{ 秒}$ 、 $72^\circ\text{C} : 45 \text{ 秒}$ （最終回のみ $7 \text{ 分 } 45 \text{ 秒}$ ）の反応を 30 サイクル行った。PCR 産物は、2% アガロースゲルで泳動し *B. glumae* に特異的な 371 bp のバンドの有無を確認した。

水田地域における水圏環境からの検出 MF 増菌 PCR 法を用いて、2001 年 8 月 28 日から 2003 年 8 月 11 日にかけ

て、茨城県南部の花室川、小野川、稲荷川、谷田川、小貝川および利根川の各水系の水田地域ならびに埼玉県北東部の荒川水系の水田地帯における田面水、農業用水、農業排水、河川水、湖沼水等から採取した水 123 試料（2001 年：24 試料、2002 年：49 試料、2003 年：50 試料）各 1000 ml について、*B. glumae* の検出を試みた。

B. glumae が検出された試料のうちの一部については、確認のため、その MF 増菌 PCR 法における増菌液からの *B. glumae* 生菌の分離を試みた。分離には免疫磁気ビーズを用いた。すなわち、増菌液 $100 \mu\text{l}$ を供試し、免疫磁気ビーズへの細菌の捕捉には、一次抗体として抗 *B. glumae* ウサギ血清（畔上, 1994）から Affi-Gel Protein A MAPS II Kit（Bio-Rad）により精製した IgG を、二次抗体結合磁気ビーズとして Dynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG（DYNAL）を用い、M-280 に添付のプロトコールに従って間接法により行った。細菌を捕捉した M-280 の収集には Magnetic Particle Concentrator MPC（DYNAL）を用いた。収集した M-280 を $100 \mu\text{l}$ の滅菌蒸留水に懸濁し、その $50 \mu\text{l}$ を S-PG 平板培地および平板培地に塗抹接種し、S-PG では 28°C で 6 日間、CCNT では 41°C で 3 日間培養した。

水田雑草等からの検出および生菌の分離 MF 増菌 PCR 法により田面水から *B. glumae* が検出され、かつ傾穗期にもみ枯症の発生が認められた水田の畦畔周辺に自生する水田雑草等の植物を採取し、MF 増菌 PCR 法を応用してそれらからの *B. glumae* の検出を試みた。供試した植物は、2001 年 9 月に茨城県つくば市で採取した計 9 科 13 種 14 株、ならびに 2003 年 9 月に埼玉県行田市で採取した計 7 科 20 種 20 株の合計 34 株である（Table 1）。つくば市の試料については、地ぎわ部茎葉（花器、果実を持つものはこれを含める）を $0.1 \sim 0.2 \text{ g}$ 切り取り、流水で十分洗浄した後有効塩素量 0.5% の次亜塩素酸ナトリウム水溶液で表面殺菌し、滅菌蒸留水中で Vortex することによる洗浄を 2 回行った。行田市の試料については花器、果実を $0.1 \sim 0.2 \text{ g}$ 切り取り殺菌・洗浄せずそのまま用いた。試料は滅菌した鉢で数 mm に細断し、Table 1 に示した各群ごと一まとめにして 200 ml の滅菌蒸留水とともに 250 ml 容メディウムびんに入れ、超音波洗浄機を用いて 20 分間超音波処理した。この滲出液について MF 増菌 PCR 法によるスクリーニングを行った。スクリーニングの結果 *B. glumae* が検出された群については、さらに個々の試料について同様に検出を試みた。

B. glumae が検出された植物については、前述の免疫磁気ビーズを用いた方法と同様にして、増菌液からの *B.*

Table 1. Detection of *B. glumae* from paddy field weeds by the membrane filtration and enrichment culture followed by PCR assay

Sample No. ^{a)}	Scientific name	Japanese name	Division for Screening ^{b)}	Result of screening ^{c)}	Result of detection from each sample ^{d)}
1	<i>Echinochoa crus-galli</i> var. <i>oryzicola</i>	tainubie	I	—	
2	<i>Echinochoa crus-galli</i>	inubie			
3	<i>Aeschynomene indica</i>	kusanemu	II	+	—
4	<i>Eclipta prostrata</i>	takasaburou			—
5	<i>Monochoria vaginalis</i> var. <i>plantaginea</i>	konagi			+
6	<i>Eclipta prostrata</i>	takasaburou			—
7	<i>Cyperus globosus</i>	azegayatsuri			—
8	<i>Scirpus lineolatus</i>	himehotarui			—
9	<i>Digitaria ciliaris</i>	mehishiba	III	—	
10	<i>Persicaria hydropiper</i>	yanagitade			
11	<i>Ammannia multiflora</i>	himemisohagi			
12	<i>Cyperus difformis</i>	tamagayatsuri			
13	<i>Epilobium pyrricholophum</i>	akabana			
14	<i>Lindernia procumbens</i>	azena			
15	<i>Poa annua</i>	suzumenokatabira	IV	—	
16	<i>Beckmannia syzigachne</i>	kazunokogusa			
17	<i>Setaria viridis</i>	enokorogusa			
18	<i>Echinochloa crus-galli</i>	inubie			
19	<i>Panicum dichotomiflorum</i>	ookusakibi			
20	<i>Leptochloa chinensis</i>	azegayatsuri			
21	<i>Digitaria ciliaris</i>	mehishiba			
22	<i>Cyperus serotius</i>	mizugayatsuri	V	—	
23	<i>Fimbristylis miliacea</i>	hideriko			
24	<i>Aster subulatus</i> × var. <i>sandowicensis</i>	murasakihoukigiku			
25	<i>Conyza sumatrensis</i>	ooarechinogiku			
26	<i>Sonchus asper</i>	oninogeshi			
27	<i>Eclipta prostrata</i>	takasaburou			
28	<i>Cosmos bipinnatus</i>	kosumosu			
29	<i>Bidens frondosa</i>	amerikasenndangusa			
30	<i>Rorippa islandica</i>	sukashitagobou	VI	—	
31	<i>Rorippa indica</i>	inugarashi			
32	<i>Cassia obtusifolia</i>	ebisugusa			
33	<i>Chenopodium album</i> var. <i>centrorubrum</i>	akaza			
34	<i>Amaranthus patulus</i>	hosoageitou			

a) 1 to 14: collected in Tsukuba in September 2001, 15 to 34: collected in Gyoda in September 2003.

b) Budgets of samples within each division were assayed for screening.

c) +: detected, —: not detected.

d) +: detected, —: not detected.

glumae 生菌の分離を試みた。さらに、分離した細菌集落のうち *B. glumae* とみられる菌株について、本細菌であることを確認するため、イネ苗に対する病原性、グラジオラス葉に対する病原性およびタバコ過敏反応の病原性試験、グラム反応、40°C 下における発育、蛍光色素産生、糖・有機酸（ラフィノース、L-酒石酸、D-酒石酸、シトラコン酸、ニコチン酸、メサコン酸、安息香酸、レブリン酸）の分解、OF 試験およびレシチナーゼ産生の細菌学的性質、血清反応ならびに PCR による特異的増幅の有無の

調査を実施した。

実験結果

増菌に適した液体培地および培養温度

得られた各液体培地の増殖曲線の比較から、CCNT 液体培地を用いたとき、増殖速度、最大菌量とも LB 培地のそれらに近い優れた増菌効果が認められた (Fig. 2)。一方、合成培地である S-PG 液体培地を用いた場合は、増殖速度、最大菌量とも他に劣った。他細菌による生育阻害や

Fig. 2. Growth curve of *B. glumae* incubated in different liquid media. 1× CCNT, modified from CCNT (Kawaradani, 2000) solid complex medium; 1× S-PG, modified from S-PG (Tsushima *et al.*, 1986) solid synthetic medium; 1/5×, 5× dilution of 1× liquid medium with sterilized distilled water; 1/10×, 10× dilution of 1× liquid medium with sterilized distilled water.

拮抗作用の可能性を考慮すると、培養時間はできるだけ短い方が良く、培養開始後およそ25時間で最大菌量に達するCCNT液体培地5倍液が *B. glumae* の選択的増菌に適していると考えられる。

さらに、CCNT液体培地5倍液を用いて増菌培養温度について検討した結果、29.8～41.5℃の範囲では培養48時間後までの増殖曲線に大きな違いは認められず（データ省略）、この温度域における増殖速度および最大菌量の温度による差はほとんどないことが判明した。41.9℃では48時間以内での増殖は認められなかった。

以上の試験結果から、以下の試験では *B. glumae* の増菌培養にCCNT液体培地5倍液を用い、培養温度を本細菌の生育に影響が少なくかつ選択性をより発揮できると考えられる39℃とし、25～30時間を培養時間の基準とした。なお、これらの条件で、*B. gladioli*, *B. cepacia*, *B. plantarii*, *B. andropogonis*, *R. pickettii*, *R. solanacearum*, *P. fuscovaginae*, *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *A. avenae* subsp. *avenae*, *E. ananas* および *X. oryzae* pv. *oryzae* の各供試細菌をそれぞれ約 10^2 cfu添加した10 mlの液体培地

Fig. 3. Growth of bacterial species in 1/5× CCNT liquid enrichment medium after incubation for 30 hr. 1: *B. cepacia*, 2: *B. gladioli*, 3: *B. plantarii*, 4: *B. andropogonis*, 5: *R. pickettii*, 6: *R. solanacearum*, 7: *P. fuscovaginae*, 8: *P. aeruginosa*, 9: *P. chlororaphis*, 10: *A. avenae* subsp. *avenae*, 11: *E. ananas*, 12: *X. oryzae* pv. *oryzae*, C: *B. glumae*.

を試験管内で培養したところ、これら細菌は *B. glumae* と比較して増殖が大幅に抑えられ（Fig. 3）、本細菌以外のイネ病原性細菌や類縁細菌に対する高い増殖阻害効果が期待された。

MF 増菌 PCR 法の増菌時間と検出限界

MF 増菌 PCR 法を用いて人工汚染農業用水試料からの検出を試みた結果、増菌前にはすべての試料から特異的増幅バンドは検出されなかったが、増菌20時間後には初期濃度 $10^0 \sim 10^3$ cfu/lの試料から特異的増幅バンドが検出された（Fig. 4）。バンドの濃さは汚染水の初期濃度に相関しており、 10^0 cfu/lが検出限界であった。増菌25時間後には初期濃度 $10^0 \sim 10^3$ cfu/lの試料から特異的増幅バンドが検出され、バンドの濃さは汚染水の初期濃度によらずほぼ一様で検出に十分であった。この傾向は増菌後30時間の試料でも同様であった。このことから、本法の増菌時間として25～30時間が適当であると考えられ、この条件下での人工汚染農業用水からの検出限界濃度は 10^0 cfu/lレベルであった。

水田地域における水圏環境からの検出

MF 増菌 PCR 法を用いて水田地域の水圏環境試料から *B. glumae* の検出を試みた結果、123試料中39試料から本細菌に特異的な増幅産物が検出された（調査実施年：検出

Fig. 4. Limit of the membrane filtration and enrichment culture followed by PCR assay for detecting the rRNA gene of *B. glumae* in artificially infested irrigation water. Lanes 1 to 6, PCR-amplified products obtained from irrigation water samples infested with 10^3 to 10^{-2} cfu/l of *B. glumae*; lane 7, irrigation water without *B. glumae* (N); lane 8, sterilized distilled water suspended with *B. glumae* in 10^5 cfu/l (P); lane 9, molecular size marker (M).

試料数/調査試料数；2001年：15/24，2002年：12/49，2003年：12/50）。これらのうち任意の8試料（田面水2試料，農業用水3試料，河川水2試料，湖沼水1試料）については，免疫磁気ビーズを用いた増菌液からの *B. glumae* 生菌の分離を試み，それらのすべてについて *B. glumae* に特徴的な集落（Kawaradani, 2000; 対馬ほか, 1986）の生育を S-PG 平板培地および CCNT 平板培地上に確認した。

検出結果にもとづいて，本細菌が検出された試料数と検出されなかった試料数を月別にまとめると，本細菌が検出されるのは5月から11月までで夏から初秋にかけて検出率が高くなる傾向が認められた（Fig. 5）。また，本細菌の月別検出結果を試料の種類別に見ると，5月から10月にかけて本細菌は田面水から検出され，田面水が頻繁に排水される8，9月には，用水路，河川，湖沼からも検出された。一方，イネの栽培期間でない12月から4月までは検出

Fig. 5. Monthly incidence of *B. glumae* in water samples using the membrane filtration and enrichment culture followed by PCR assay.

されなかった（Table 2）。

水田雑草等からの検出および分離

B. glumae が検出されもみ枯症の発生を認めた水田の畦畔周辺に自生する植物34株について，MF 増菌 PCR 法を応用して *B. glumae* の検出を試みた結果，*Monochoria vaginalis* var. *plantaginea*（ミズアオイ科コナギ）のみから本細菌に特異的な増幅産物が検出された（Table 1）。

そこで，免疫磁気ビーズを用い，その MF 増菌 PCR 法における増菌液からの *B. glumae* 生菌の分離を試みた結果，S-PG 平板上に2タイプの細菌集落が分離された。第1のタイプは円形，全縁，中高で湿光を帯び淡紫色，第2のタイプは不完全な円形～不定形，中高で湿光を帯び暗紫色であった。前者のコロニーは S-PG 平板上における *B. glumae* の記載（対馬ほか, 1986）とよく一致しており，数の上でも圧倒的に優勢であった。その単一集落から得た分離株について，病原性試験，細菌学的性質，血清反応および PCR による特異的増幅の有無の調査を実施した結果，分離株は接種イネ苗に典型的な苗腐敗症状を表し，グラジオラス葉に対する病原性およびタバコ過敏反応を示し，グラム反応，40℃ 下における発育，糖・有機酸の分解，

Table 2. Detection of *B. glumae* in various water samples by month

Origin of sample	Month											
	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec
Paddy water		0/1 ^{a)}		0/1	2/2	2/5	7/9	1/3	4/10	1/1		
Drained paddy water				0/1		0/1	0/1	1/2	1/2			
Irrigation water				0/3		0/6	0/5	1/3	2/2	2/2		
River water		0/3	0/2	0/3		0/5	0/2	1/2	4/6	1/2	1/5	0/1
Lake water		0/2				0/1			1/2			
Bog water									0/1			

a) No. of sample(s) from which *B. glumae* was detected / No. of sample(s) examined.

OF 試験, レシチナーゼ産生等の細菌学的性質の調査結果が *B. glumae* の記載 (Azegami *et al.*, 1987; 後藤ほか, 1987; 栗田・田部井, 1967; 植松ほか, 1976) と概ね一致し, 抗 *B. glumae* IgG を用いた DIBA 法で陽性であり, さらに PCR 法によって *B. glumae* に特異的な DNA 断片を増幅した. 以上から本分離株は *B. glumae* と同定され, コナギからの本細菌の分離が確認された. なお, 供試したコナギには *B. glumae* によるとみられる病徴は観察されなかった.

考 察

種子などの試料中に含まれる植物病原細菌を培養後に PCR 法により検出する手法として, Scaad *et al.* (1995) は enrichment PCR の 1 種である BIO-PCR 法を報告した. 本法は試料中の細菌を液体中に抽出した後, その細菌抽出液の一部を固形培地上で培養または液体培地中で増菌することにより増殖させた標的細菌を, 直接, nested-PCR 法により検出するというものである. 通常, 試料の細菌抽出液を直接 PCR のテンプレートとして用いると, 液に含まれる PCR 阻害物質が検出感度の低下の原因になる. BIO-PCR 法では少量の抽出液を増菌培養してから PCR 法に供するため, PCR 阻害物質の影響が避けられ, 核酸抽出を行わなくても高い検出感度が維持できる. しかし, 標的細菌の密度が極めて低い環境試料からの検出の場合にあっては, たとえ高感度な BIO-PCR 法を用いても, 試料採取の段階で取り逃がしてしまい, 正しい結果が得られない危険性がある.

一方, 筆者が行った方法は, 大容量の試料を採取し, メンブレンフィルターを用いて細菌を捕捉したのち増菌 PCR 法を行うことから, 低密度の標的細菌でもより確実に捕らえることができ, 環境試料からの精度の高い検出が可能となる. あわせて BIO-PCR 法と同様, 生細菌のみを検出できる, 拮抗微生物の影響を受けにくい, 検出感度が優れているといった利点を持つ. *B. glumae* を混入した農業用水 (人工汚染農業用水) を用いて行った試験では, 本法による検出限界は 10^0 cfu/l レベルであった. 本法を適用することにより, 水圏環境試料からの信頼性の高い検出が可能になると考えられる.

実際に, 本法を用いて農業環境における水圏から *B. glumae* の検出を試みたところ, 初夏から晩秋にかけて広範な水圏環境試料から検出された. 関東地区で一般的に稲作が開始される 5 月頃からイネの生育期間を通して, 本細菌は田面水で検出され, 田面水が頻繁に排水される 8, 9 月には, 用水路, 河川, 湖沼からも検出された. イネの栽培期間でない 12 月から 4 月までは検出されなかった. この

ように, 調査した水田地帯の水圏環境に *B. glumae* が存在する期間はイネの生育期間とよく符合していた. このことは, 調査範囲内で, 農業環境中に存在する *B. glumae* のほとんどは栽培イネに付着していたものに由来していることを示唆する. つまり, 本細菌は農業環境で越冬することはないか, あったとしても農業環境を汚染する原因としては無視できるレベルのものである可能性が高い. これは, 宮川 (2000), Miyagawa and Inoue (2002) が明らかにしたイネ苗立枯細菌病菌の生態とは大きく異なる.

しかしながら, 水田雑草等からの検出の試みでは, 唯一コナギから *B. glumae* が検出され自然宿主である可能性が考えられた. 本研究では *B. glumae* がコナギで越冬するかどうかについては明らかにできなかった. これについては今後検討する必要がある. Jeong *et al.* (2003) は韓国において 2000 年と 2001 年に採取された萎凋症状を示す畑作物を調査し, トマト, ゴマ, シソ, ナスおよびトウガラシから *B. glumae* を分離し, 萎凋の原因菌であるとした上で, これらの感染源はイネの開花穂であると推測した. 本研究ではこれら畑作物からの分離については行っていないが, 今後, わが国でも同様の事例がないかどうか, さらにそれらがイネもみ枯細菌病の越冬伝染源となりうるかどうかについて調査する必要がある.

本研究で *B. glumae* の農業環境における分布・挙動を調査する目的で用いた手法は, 定性的な検出法である. 検出の過程で増菌を行うことから定量性は期待できない. 今後, *B. glumae* の農業環境における分布・挙動をさらに詳細に調査するためには, 定量的検出法の開発が必要である.

摘 要

極めて低濃度でしか存在しない農業環境中からイネもみ枯細菌病菌 *Burkholderia glumae* を検出するのは, 選択培地を用いた塗抹法のような従来の方法では困難である. これを解決するために, メンブレンフィルターによる濾過法と増菌後に PCR を行う増菌 PCR 法とを組み合わせた新たな方法を考案した. PCR プライマーは, *B. glumae* の 16S-23S rDNA スペーサー領域を特異的に増幅するよう設計したもの (PGF1, 5'-TGTCTGACACGGAACACCTGGGTAG-3'; PPR1, 5'-AGGTTGAGTTCTCGCATTTGTGCCG-3') を用いた. 本法により, 10^0 cfu の *B. glumae* で人工的に汚染した 1000 ml の農業用水からの検出が可能であった. 本法を用いて, 水田地帯における水圏環境から採取した大容量試料について調査を行った結果, 5 月から 11 月にかけて田面水, 農業用水, 河川水および湖沼水から *B. glumae* が検

出されたが、12月から4月の間は全く検出されなかった。
また、もみ枯症が発生し *B. glumae* が検出された水田の外に自生する植物34株について検出を試みた結果、コナギから本細菌が検出された。

謝 辞

本研究を行うにあたり、供試細菌を分譲いただいた独立行政法人農業環境技術研究所西山幸司博士および元農業研究センター故福田徳治博士に感謝申し上げます。

引用文献

- 荒木 亮・脇本 哲 (1984). *Pseudomonas glumae* に特異的な抗血清について. 日植病報 50: 102 (講要).
- Azegami, K., Nishiyama, K., Watanabe, Y., Kadota, I., Ohuchi, A. and Fukuzawa, C. (1987). *Pseudomonas plantarii* sp. nov., the causal agent of rice seedling blight. Int. J. Syst. Bacteriol. 37: 144-152.
- 畔上耕児 (1994). イネ苗立枯細菌病に関する研究. 農環研報 11: 1-80.
- 畔上耕児 (1996a). *Vibrio fischeri* の発光遺伝子を導入した *Burkholderia glumae* と *B. plantarii* のイネ体における発光. 日植病報 62: 306 (講要).
- 畔上耕児 (1996b). *Burkholderia glumae* および *B. plantarii* のイネ体における増殖. 日植病報 62: 640-641 (講要).
- 畔上耕児 (1997). *Burkholderia glumae* および *B. plantarii* のイネもみ感染に至るまでの挙動. 日植病報 63: 254 (講要).
- Candrian, U. (1995). Polymerase chain reaction in food microbiology. J. Microbiol. Methods 23: 89-103.
- 遠藤頼嗣 (1990). イネもみ枯細菌病 (加藤 肇監修). pp. 82-98, 全国農村教育協会, 東京.
- 後藤孝雄・西山幸司・大畑貫一 (1987). イネもみ枯症状を起こす細菌. 日植病報 53: 141-149.
- 半沢伸治・梶 和彦 (1992). もみ枯細菌病 (苗腐敗症) の育苗箱における二次感染と発病苗の本田での動態. 今月の農業 36: 32-35.
- 曳地康史 (1993). 免疫蛍光抗体法による *Pseudomonas glumae* の検出. 日植病報 59: 477-480.
- Hikichi, Y. (1993). Relationship between population dynamics of *Pseudomonas glumae* on rice plants and disease severity of bacterial grain rot of rice. J. Pesticide Sci. 18: 319-324.
- Hikichi, Y., Okuno, T. and Furusawa, I. (1994). Susceptibility of rice spikelets to infection with *Pseudomonas glumae* and its population dynamics. J. Pesticide Sci. 19: 11-17.
- Jeong, Y., Kim, J., Kim, S., Kang, Y., Nagamatsu, T. and Hwang, I. (2003). Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops. Plant Dis. 87: 890-895.
- Kawaradani, M., Okada, K. and Kusakari, S. (2000). New selective medium for isolation of *Burkholderia glumae* from rice seeds. J. Gen. Plant Pathol. 66: 234-237.
- 栗田年代・田部井英夫 (1967). イネもみ枯細菌病菌について. 日植病報 41: 111 (講要).
- 松田 泉 (1985). イネもみ枯細菌病 (*Pseudomonas glumae*) の迅速検出法. 植物防疫 44: 461-464.
- 宮川久義 (2000). イネ苗立枯細菌病菌のため池からの検出と水際雑草での越冬. 日植病報 66: 214-222.
- Miyagawa, H. and Inoue, H. (2002). Alternative route of infection for bacterial seedling blight of rice caused by *Burkholderia plantarii*. J. Gen. Plant Pathol. 68: 356-362.
- 乙藤まり・角重和浩・吉田桂輔 (1988). イネもみ枯細菌病菌のイネ体における生存部位. 九病虫研報 34: 1-4.
- Schaad, N. W., Cheong, S. S., Tamaki, S., Hatziloukas, E. and Panopoulos, N. J. (1995). A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. Phytopathology 85: 243-248.
- 諏訪正義・小川勝美・渡部 茂 (1980). イネもみ枯細菌病に関する研究 第3報 苗腐敗症の浸種, 育苗中の2次感染. 北日本病害虫研報 31: 52-53.
- 対馬誠也・脇本 哲・茂木静夫 (1986). イネもみ枯細菌病菌検出のための選択培地. 日植病報 52: 253-259.
- Tsushima, S., Mogi, S., Naito, H. and Saito, H. (1991). Populations of *Pseudomonas glumae* on rice plants. Ann. Phytopath. Soc. Japan 57: 145-152.
- Tsushima, S., Narimatsu, C., Mizuno, A. and Kimura, R. (1994). Cloned DNA probe for detection of *Pseudomonas glumae* causing bacterial grain rot of rice. Ann. Phytopath. Soc. Japan 60: 576-584.
- Tsushima, S., Naito, H. and Koitabashi M. (1996). Population dynamics of *Pseudomonas glumae*, the causal agent of bacterial grain rot of rice, on leaf sheaths of rice plants in relation to disease development in the field. Ann. Phytopath. Soc. Japan 62: 108-113.
- Takeuchi, T., Sawada, H., Suzuki, F. and Matsuda, I. (1997). Specific detection of *Burkholderia plantarii* and *B. glumae* by PCR using primers selected from the 16S-23S rDNA spacer regions. Ann. Phytopath. Soc. Japan 63: 455-462.
- 植松 勉・吉村大三朗・西山幸司・茨木忠雄・藤井 溥 (1976). 育苗箱のイネ幼苗に腐敗症をおこす病原細菌について. 日植病報 42: 464-471.