

Erwinia amylovora biovars 1-3 及び *E. pyrifoliae* からの 16S rDNA PCR-RFLP を用いた *E. amylovora* biovar 4 の特異的識別

松浦 貴之・塚本 貴敬・水野 明文・篠原 弘亮*・對馬 誠也*

横浜植物防疫所調査研究部・*農業環境技術研究所

Distinction of *Erwinia amylovora* biovar 4 from other *E. amylovora* biovars and *E. pyrifoliae* using 16S rDNA PCR-RFLP. Takayuki MATSUURA, Takanori TSUKAMOTO, Akifumi MIZUNO, Hirotsuke SHINOHARA* and Seiya TSUSHIMA* (Research Division, Yokohama Plant Protection Station, 1-16-10, Shin-yamashita, Yokohama 231-0801, Japan and *National Institute for Agro-Environmental Sciences). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 40: 107-111 (2004).

Abstract: The applicability of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for discrimination of *Erwinia amylovora* biovar 4, the pathogen of bacterial shoot blight of pear (BSBP), from other *Erwinia amylovora* biovars 1 to 3 and *Erwinia pyrifoliae* was examined. The 16S rDNA of *E. amylovora* biovar 4 were sequenced and compared with those of *E. amylovora* biovars 1 to 3 and *E. pyrifoliae*. Homologies among them showed more than 99%. Four restriction enzymes to distinct *E. amylovora* biovar 4 from the other *E. amylovora* biovars and *E. pyrifoliae* were theoretically found by analysis of GENETYX-WIN. Two (*Alw*26I and *Bbs*I) of them showed very clear 16S rDNA PCR-RFLP. They may be useful to rapidly distinguish *E. amylovora* biovar 4 from other *E. amylovora* biovar 1, 2 and *E. pyrifoliae* when bacterial diseases like fire blight occur in pome fruit.

Key words: 16S rDNA, PCR-RFLP, *Erwinia amylovora* biovars, *Erwinia pyrifoliae*

緒 言

Erwinia amylovora (BURRILL, 1882) WINSLOW *et al.* (1920) は、ナシ、リンゴなどのナシ亜科植物に火傷病を引き起こし、植物検疫上、侵入をもっとも警戒する植物病原細菌の一つである。一方、北海道で、1981 年に火傷病によく似たナシ枝枯細菌病の発生が報告された（谷井ら, 1981）。この細菌病は 1995 年から 1999 年まで国と北海道により緊急防除が行われ、現在では発生が認められていない（水野ら, 2003）。ナシ枝枯細菌病を引き起こす細菌について、MIZUNO らは、火傷病菌とは生理生化学的性質が異なるものとして *E. amylovora* biovar 4 と分類し、既報の火傷病菌も生理生化学的性質の違いから biovars 1~3 に分類することを提案している（MIZUNO, *et al.*, 2000）。また、近年、韓国のアジアナシに火傷病類似の病気を引き起こす病原細菌については、火傷病菌との 16S-23S rRNA intergenic transcribed spacer region の塩基配列及び DNA 相同性の違いから、KIM らにより *Erwinia pyrifoliae* の学名が提案されている（KIM *et al.*, 1999）。そこで本研究では、ナシで火傷病様病害が発生した際

に、その病原がナシ枝枯細菌病菌であるか否かを迅速に行うための手法を開発した。

材料及び方法

1. 供試菌株

供試した菌株を Table 1 に示した。各菌株は Tryptic Soy Agar : TSA (DIFCO) で 2~3 日間 26℃で培養した後、供試した。

2. ユニバーサルプライマーを用いた 16S rDNA の PCR

PCR 反応液は Takara Taq キット（タカラバイオ）で調製し、煮沸処理（約 10 分間）した細菌懸濁液（10⁸ cfu/ml）を用いて PCR を行った。プライマーは 27f（5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'）及び 1492r（5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'）（TSUKAMOTO *et al.*, 2001）を用いた。

Table 1. Bacterial strains used in this study

Species	Strain	Source plant	Source site
<i>Erwinia amylovora</i> biovar 1	NCPBP 311	<i>Pyrus communis</i>	Canada
<i>Erwinia amylovora</i> biovar 2	NCPBP 683 ^T , NCPBP 595, NCPBP770, NCPBP 1114 NCPBP 771	<i>Pyrus communis</i>	UK
		<i>Cotoneaster melano-</i> <i>carpus</i>	do.
	NCPBP 831, NCPBP 1272, NCPBP 1951	<i>Malus sylvestris</i>	do.
	NCPBP 1952	<i>Pyrus communis</i>	Netherlands
	NCPBP 2213	<i>Crataegus</i> sp.	do.
	LNPV-UB 1,36 ^{a)}	<i>Malus sylvestris</i>	Denmark
	LNPV-UB 6,15 ^{a)}	<i>Pyrus communis</i>	France
	LNPV-UB 1,39 ^{a)}	<i>Pyrus pyrifolia</i>	do.
	LMG1985, LNPV-UB 3,07 ^{a)}	<i>Malus sylvestris</i>	do.
	LNPV-UB 2,18 ^{a)}	<i>Pyracantha</i> sp.	do.
	LNPV-UB 3,08 ^{a)}	<i>Cotoneaster lacteus</i>	do.
	LNPV-UB 3,15 ^{a)}	<i>Cotoneaster dammeri</i>	do.
	LMG1968, LNPV-UB 9,44 ^{a)}	<i>Cotoneaster salicifolius</i>	do.
	LNPV-UB 0,49 ^{a)}	<i>Mespilus germanica</i>	do.
	LNPV-UB 6,67 ^{a)}	<i>Photinia</i> sp.	do.
	LMG1933	<i>Crataegus monogyna</i>	do.
	LMG1943	<i>Cotoneaster repens</i>	Belgium
	LMG1917	<i>Cotoneaster</i> sp.	Belgium
	NCPBP 2135	<i>Crataegus monogyna</i>	Belgium
	ICMP 4245, ICMP 4248, 88-100 ^{b)} , 88-115 ^{b)} , 88-125 ^{b)} , 88-131 ^{b)} , 88-145 ^{b)} , 88-148 ^{b)} , 88-156 ^{b)} , 88-227 ^{b)} , 88-235 ^{b)} , 88-274 ^{b)}	<i>Pyrus communis</i>	Poland
	88-38 ^{b)} , YPPS385, YPPS386, YPPS387, YPPS388, YPPS389, YPPS390, YPPS391, YPPS392, YPPS393, YPPS399, YPPS400, YPPS401, YPPS402, [YPPS403, YPPS404, YPPS405, YPPS406, YPPS407, YPPS408, YPPS409, YPPS410, YPPS411	<i>Pyrus communis</i>	USA
	NCPBP 2080, ICMP 4450, ICMP 9144, ICMP 9148	<i>Malus sylvestris</i>	do.
	NCPBP 2079, NCPBP 2083, NCPBP 2084	<i>Malus sylvestris</i>	do.
	NCPBP 1734	<i>Pyrus communis</i>	Egypt

3. *E. amylovora* biovar 4 (ナシ枝枯細菌病菌) の 16S rDNA の塩基配列の決定と相同性の比較

36 菌株のナシ枝枯細菌病菌のうち 3 菌株 (YPPS 183, YPPS185, YPPS200) について 16S rDNA を増幅し、その配列を ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (アプライドバイオシステム社) で決定した。決定した塩基配列は DNA Data Bank of Japan (DDBJ) (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) に登録されている火傷病菌 15 菌株、*E. pyrifoliae* 1 菌株の 16S rDNA

(Table 2) と相同性を比較した。

4. 制限酵素の選抜と PCR-RFLP

前述のナシ枝枯細菌病菌 3 菌株の塩基配列と DDBJ に登録されている火傷病菌、*E. pyrifoliae* の 16S rDNA の配列を識別することのできる制限酵素を GENETYX-WIN (ソフトウェア開発株式会社) を用いて調べ、それらの酵素を用いて Table 1 で示すすべての菌株について 16S rDNA PCR-RFLP を行った。

Table 1. Continued

Species	Strain	Source plant	Source site
<i>Erwinia amylovora</i> biovar 3	NCPBP 2291, NCPBP 1859, NCPBP 2293, YPPS396	<i>Rubus idaeus</i>	USA
<i>Erwinia amylovora</i> biovar 4	Ea9471 ^{c)} , Ea9472 ^{c)} , Ea9473 ^{c)} , Ea9474 ^{c)} , Ea9475 ^{c)} , Ea9476 ^{c)} , YPPS173, YPPS174, YPPS175, YPPS176, YPPS177, YPPS178, YPPS186, YPPS187, YPPS188, YPPS189, YPPS179, YPPS180, YPPS181, YPPS182, YPPS183, YPPS184, YPPS185, YPPS200, YPPS201, YPPS202, YPPS203, YPPS210, YPPS211 Ea 9477 ^{c)} , YPPS 204, YPPS 205, YPPS 206, YPPS207, YPPS208, YPPS209	<i>Pyrus ussuriensis</i> (Mishirazu) <i>Pyrus communis</i> var. <i>sativa</i> (Brandywine)	Hokkaido, Japan Hokkaido, Japan
<i>Erwinia pyrifoliae</i>	DSM12162, DSM12163 ^T , DSM12393, DSM12394	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Korea

YPPS: Yokohama Plant Protection Station; NCPBP: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, UK; ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants, New Zealand; LMG: Laboratory of Microbiology, Gent, Belgium; DSM: DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; T: Type strain.

^{a)} The 10 strains of LNPV-UB code from France were supplied by Dr. C. AUDUSSEAU.

^{b)} The 11 strains isolated from *Pyrus communis* and *Malus sylvestris* in USA were supplied by Dr. R. G. ROBERT.

^{c)} The 7 strains of Ea code were supplied by Dr. A. TANI.

Table 2. 16S rRNA data in this study

Species	Accession No.
<i>Erwinia amylovora</i>	AF140337
	AF140338
	AF140339
	AF140340
	AF140341
	AF141891
	AF141892
	AF141893
	AF141894
	AF141895
	AF141896
	AJ010485
	AJ233410
	U80195
	X83265
<i>Erwinia pyrifoliae</i>	AJ009930

結果及び考察

ナシ枝枯細菌病菌 3 菌株の塩基配列と既報の火傷病菌、*E. pyrifoliae* の 16S rDNA の配列を比較した結

果、ナシ枝枯細菌病菌 3 菌株は、比較したすべての火傷病菌および *E. pyrifoliae* に対して 99%以上の相同性を持つことが明らかとなった。

GENETYX-WIN を用いて調査したところ、ナシ枝枯細菌病菌を火傷病菌、*E. pyrifoliae* から識別することができる制限酵素 4 種 (*Alw*26I, *Eam*1104I, *Mbo*II, *Bbs*I) が見つかった。これら 4 種の制限酵素を用いて、Table 1 に示した 114 菌株の 16S rDNA PCR-RFLP を行ったところ、*Alw*26I と *Bbs*I を用いた RFLP でナシ枝枯細菌病菌を火傷病菌と *E. pyrifoliae* から識別することが可能となった (Fig. 1, Fig. 2, left)。

16S rDNA 上の *Alw*26I の認識部位は火傷病菌、*E. pyrifoliae* で 4 カ所、ナシ枝枯細菌病菌で 3 カ所あることが GENETYX-WIN による塩基配列の解析結果から明らかになり (Fig. 1, right)、実際の電気泳動バンドパターンにおいても火傷病菌とナシ枝枯細菌病菌ではそれを支持する結果が得られた。しかし、*E. pyrifoliae* に関しては塩基配列の解析結果とは異なるパターンを示し (Fig. 1, left)、5'末端から 2 番目の認識部位の切断が必ずしも起こっていない可能性が考えられた。

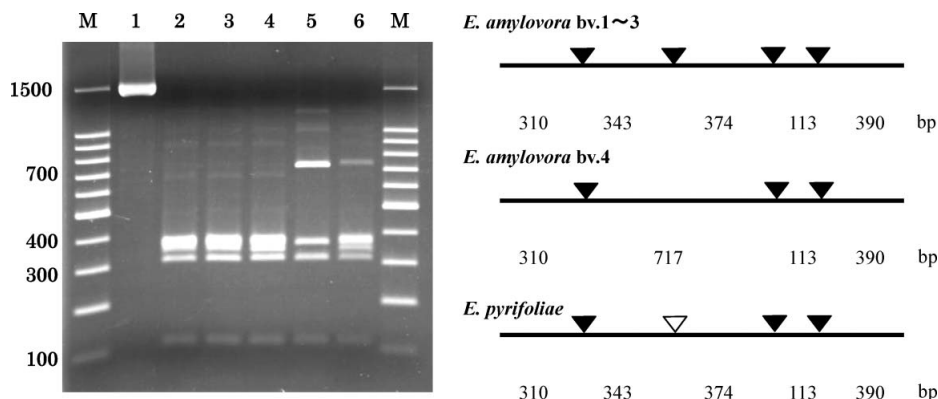


Fig. 1. (left). PCR-RFLP of 16S rDNA of *Erwinia amylovora* biovars and *Erwinia pyrifoliae* using *Alw26I*. lane 1: 16S rDNA PCR product of *E. amylovora* bv. 1; lane 2 to 6: PCR-RFLP; lane 2: *E. amylovora* bv. 1; lane 3: *E. amylovora* bv. 2; lane 4: *E. amylovora* bv. 3; lane 5: *E. amylovora* bv. 4; lane 6: *E. pyrifoliae*; M: 100 base DNA ladder.

Fig. 1 (right). *Alw26I* Restriction map of 16S rDNA PCR products of *Erwinia amylovora* biovars and *Erwinia pyrifoliae*. Each number shows fragment size. Closed triangles show restriction sites. An open triangle indicates an unstable restriction site.

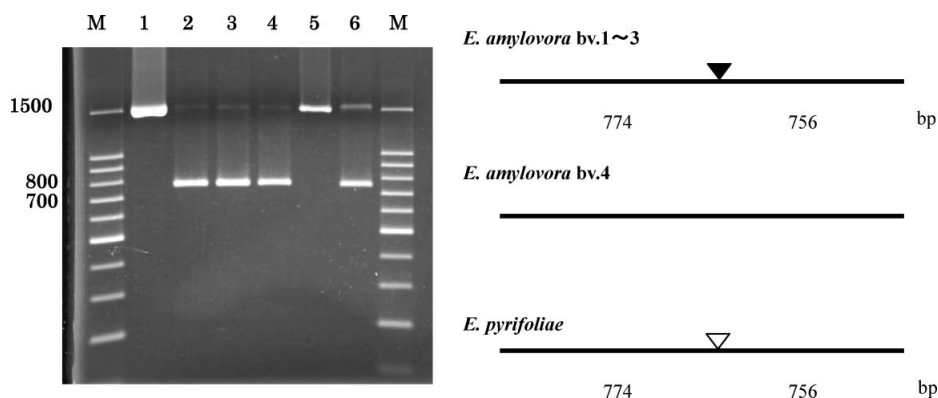


Fig. 2. (left). PCR-RFLP of 16S rDNA of *Erwinia amylovora* biovars and *Erwinia pyrifoliae* using *BbsI*. lane 1: 16S rDNA PCR products of *E. amylovora* bv. 1; lane 2 to 6: PCR-RFLP; lane 2: *E. amylovora* bv. 1; lane 3: *E. amylovora* bv. 2; lane 4: *E. amylovora* bv. 3; lane 5: *E. amylovora* bv. 4; lane 6: *E. pyrifoliae*; M: 100base DNA ladder.

Fig. 2. (right). *BbsI* Restriction map of 16 S rDNA PCR products of *Erwinia amylovora* biovars and *Erwinia pyrifoliae*. Each number shows fragment size. Closed triangles show restriction sites. An open triangle indicates an unstable restriction site.

BbsI については、火傷病菌、*E. pyrifoliae* で1カ所、ナシ枝枯細菌病菌では認識部位がないことが、同様の解析結果から得られた (Fig. 2, right)。こちらの電気泳動バンドパターンに関しても、*E. pyrifoliae* の場合、その認識部位の切断が必ずしも起こっていない結果が得られた (Fig. 2, left)。このことから、*E. pyrifoliae* が持つ 16S rDNA 上の *Alw26I*, *BbsI* 認識部位にコピー間で変異があることが示唆された。

これに対し、*MboII* では、各制限酵素断片長間の差

異が小さいため、電気泳動バンドパターンで識別することが困難であった。同様に *Eam1104I* については、塩基配列上に理論的には切断部位が存在したが、実際の制限酵素処理では多型が得られなかった。

以上のことから、制限酵素 *Alw26I* と *BbsI* を用いた 16S rDNA の PCR-RFLP により、ナシ枝枯細菌病菌を火傷病菌と *E. pyrifoliae* から迅速に識別することが可能と考えられる。

引用文献

- KIM, W., L. GARDAN, S. RHIM and K. GEIDER (1999) *Erwinia pyrifoliae* sp. nov., a noval pathogen that affects Asian pear trees (*Pyrus pyrifolia*, NAKAI). *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 899–906.
- MIZUNO, A., S. SATO, A. KAWAI and K. NISHIYAMA (2000) Taxonomic position of the causal pathogen of bacterial shoot blight of pear. *Journal of General Plant Pathology* **66**: 48–58.
- 水野明文・佐藤成良・川合 昭・高橋賢司・西山幸司・畔上耕児・家城洋之・駒村研三 (2003) 日本における火傷病発生の疑義. 植防研報 **39**: 109–116
- TSUKAMOTO, T., M. TAKEUCHI, O. SHIDA, H. MURATA and A. SHIRATA (2001) Proposal of *Mycetocola* gen. nov. in the family Microbacteriaceae and three new species, *Mycetocola saprophilus* sp. nov., *Mycetocola tolaasinivorans* sp. nov. and *Mycetocola lacteus* sp. nov., isolated from cultivated mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 937–944.
- 谷井昭夫・田村 修・尾崎政春 (1981) ナシ樹火傷病類似症を起因する病原細菌. 日植病報 **47**: 102.