

メロン毛根病細菌Agrobacterium rhizogenesの血清学的性質

誌名	野菜・茶業試験場研究報告. A = Bulletin of the National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea. Series A
ISSN	09146644
著者名	白川,隆 塩見,敏樹 竹内,昭士郎
発行元	農林水産省野菜・茶業試験場
巻/号	3号
巻号補足	
掲載ページ	p. 35-43
発行年月	1989年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



メロン毛根病細菌 *Agrobacterium rhizogenes* の血清学的性質[†]

白川 隆*・塩見 敏樹**・竹内昭士郎**

(平成元年8月30日受理)

Serological Characteristics of *Agrobacterium rhizogenes*,
the Pathogen of Melon Hairy Root

Takashi SHIRAKAWA, Toshiki SHIOMI and Shoshiro TAKEUCHI

Synopsis

Antisera were produced against 2 isolates belonging to biovar 1 of *Agrobacterium rhizogenes*, the pathogen of melon hairy root, which were collected in different areas. These antisera were only specific to the isolates belonging to biovar 1 of *Agrobacterium* spp. The 31 isolates of *Agrobacterium* spp. used in this study were divided into 4 sero-groups based on the agar double-diffusion test. These sero-groups were correlated to the collection and the physiological characteristics, namely alkali production from citrate and mucic acid.

Key words: *Agrobacterium rhizogenes*, serology, melon, hairyroot.

I 緒 言

千葉県安房郡丸山町及び同郡千倉町の周年栽培型温室メロンに発生した、生育途中に異常に多数の根が地表面に露出する症状は、*Agrobacterium rhizogenes* (RIKER, BANFIELD, WRIGHT, KEITT & SAGEN, 1930) CONN, 1942 の biovar 1 に属する細菌による病害であることが明らかになり、メロン毛根病と命名された (塩見, 1987; 塩見ら, 1987)。本病の発生は、静岡県においても報告された (牧野ら, 1987)。

細菌の属及び種は、その細菌学的性質に基づいて同定されるが、そのためには形態的、生理的、生化学的など多数の項目にわたる検討が必要であり、多大の労力と時間を要する。更に植物病原細菌では、病原型を決定する

ため、宿主に対する接種試験も必要である。ところで、血清学的性質それ自体は細菌分類の基準ではないが、正規の分類結果と一致することが確認されている場合には、簡易同定の一手段として極めて有効である。植物病原細菌においても、*Pseudomonas* 属細菌をはじめ多くの細菌種で血清学的手法が簡易同定に利用されている (陶山ら, 1984; SCHAAD, 1979)。

筆者らは、メロン毛根病細菌の血清学的手法による簡易同定を目的とし、同細菌の血清学的性質について調査した。更に他の細菌学的性質と血清学的性質との関連について考察を加え、一定の成果が得られたので報告する。

本研究を行うに際し、貴重な植物病原細菌菌株を分譲いただいた農業環境技術研究所西山幸司博士 (現農業生物資源研究所)、並びに静岡県農業試験場牧野孝宏氏に厚くお礼申し上げる。

* 盛岡支場 (元野菜試験場環境部)

** 環境部

† 本報告の一部は、昭和61年度日本植物病理学会東北部会において報告した。

II 材料及び方法

1 供試細菌

供試した細菌菌株とその由来は Table 1 に示した。

このうち、*A. rhizogenes* の千葉分離株は、千葉県安房郡丸山町及び千倉町の2地点で採集した自然発病株から得たものであり、静岡県に由来する菌株は静岡県農業試験場環境部牧野孝宏氏より分譲された。その他の菌株は、農業環境技術研究所西山幸司博士及び発酵研究所より分

Table 1 List of *Agrobacterium* spp. and other bacterial isolates used

Isolate	Host	Collected place	Year of isolation
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>			
1-1, 2-1, 3-1	<i>Cucumis melo</i>	Chikura, Chiba	1985
4-3, 5-2, 6-3	"	"	"
7-3, 8-1, 8-5	"	"	"
10-1, 11-3	"	"	"
U1-3, U1-4	<i>Cucumis melo</i>	Maruyama, Chiba	1985
MR-13, MR-15, S1-1	<i>Cucumis melo</i>	Kikukawa, Shizuoka	"
S1-2, S2-1, S2-2	"	"	"
<i>A. tumefaciens</i>			
NIAES 1001	<i>Prunus</i> sp.	Saitama	1956
1222	<i>Chrysanthemum frutescens</i> .	Shizuoka	1977
1223	"	"	"
1224	<i>Rosa</i> sp.	"	"
1277	<i>Chrysanthemum morifolium</i> .	"	"
1278	"	"	1975
1279	<i>Rosa</i> sp.	"	"
1280	"	"	"
1540	"	"	1983
1550	"	"	1983
IFO 13263			
<i>A. radiobacter</i>			
IFO 13532			
<i>Rhizobium japonicum</i>			
IFO 13338	<i>Medicago denticulata</i>	Osaka	1971
<i>R. leguminosarum</i>			
IFO 14168	<i>Phaseolus vulgaris</i>	U. S. A.	
<i>R. meliloti</i>			
IFO 13336	<i>Lotus corniculatus</i> var. <i>japonicus</i>	Osaka	1971
<i>R. trifolii</i>			
IFO 13337	<i>Trifolium repens</i>	"	"
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>			
NIAES 1037	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Nagano	1966
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>			
NIAES 1393	<i>Brassica pekinensis</i>	Kanagawa	1971
<i>P. marginalis</i> pv. <i>marginalis</i>			
NIAES 1173	<i>Solanum tuberosum</i>	Hokkaido	1969
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>			
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vitians</i>			
NL 7513	<i>Lactuca sativa</i>	Wakayama	1975

* IFO...Institute for Fermentation.

** NIAES...National Institute of Agro-Environmental Sciences.

譲されたものを用いた。

2 生理学的性質

供試した *Agrobacterium* 属細菌の一部については biovar が不明であるので生理学的性質を調査した。方法は、MOORE ら (1980) 及び富永 (1971) の採用した手法に準じて行った。ただし、グリセロリン酸カルシウム寒天 (GRAHAM ら, 1964), STARR の基礎培地 (STARR, 1946) 及びセレン酸ナトリウム寒天 (HENDRICKSON ら, 1934) の各試験は原著の方法に従った。

3 抗血清の作成

抗血清の作成に用いた菌株は、*A. rhizogenes* 2-1 及び MR-13 である。この両者を普通寒天培地で 28°C 下、24 時間培養し、生理食塩水に懸濁して遠心洗浄を 3 回繰り返した後、生理食塩水に 10^9 cfu/ml になるように再懸濁したものを免疫抗原とした。免疫抗原の注射は家兎に対して 4 日間隔で計 8 回行い、最初の 3 回は等量のアジュバント (Adjuvant, Complete, Freund, Bact) と混合して後脚大腿筋内に、後の 5 回はそのまま耳縁静脈内に順次量を増しながら注射を行った。最終免疫注射後 7 日目に全採血し、抗血清を得た。抗血清は非動化 (56°C, 30 分) 後、0.05% の NaN_3 を添加して -20°C で保存し、実験に供した。

4 血清学的試験

血清学的性質は凝集反応法と寒天ゲル内二重拡散法により調査した。凝集反応法はマイクロプレート法による。すなわち、U 字型 96 穴のマイクロプレートに、生理食塩水で 2 倍段階希釈した抗血清液と、生理食塩水に約 10^9 cfu/ml になるように懸濁した供試細菌液を 1:1 の割合で混合して 37°C に 2 時間保った。その後、4°C に一晩放置して限界反応希釈倍数を調査した。

寒天ゲル内二重拡散法は以下のようにして行った。寒天液 (Agar Noble 1%, NaCl 0.85%) を約 2 mm の厚さになるようにペトリ皿に流し込み、ゲル寒天液が固化した後、直径 5 mm の試料孔を 5 mm 間隔で配置した。試料孔に抗原と抗血清原液をそれぞれ入れ、湿室に保って 25°C 下に放置した。形成された沈降帯の観察は 4 日後に行った。生菌抗原液は次のようにして作成した。肉汁ブイヨン培地で 25°C, 24 時間振とう培養した供試細菌を生理食塩水に懸濁して遠心洗浄を 3 回反復し、 $10^9 \sim 10^{10}$ cfu/ml になるように生理食塩水に再懸濁した。加熱処理抗原は生菌抗原液を 100°C で 30 分間処理するこ

とにより、超音波処理抗原は同じく投入式超音波発生装置 (TOMY UR-200 P) で超音波処理 (出力約 110 W, 10 分間) することにより、それぞれ作成した。

III 結 果

1 生理学的性質

供試した 35 菌株の *Agrobacterium* 属細菌の生理学的性質について調査した。その主な結果を Table 2 に表示した。このうち、biovar の識別性質である Kovac のオキシダーゼ活性、クエン酸鉄の利用、リトマスミルク、2% NaCl 下での生育、3-ケトラクトースの利用、エリトリット、エタノール、メレジトースからの酸の産生、マロン酸、酒石酸、プロピオン酸からのアルカリ産生、35°C 下での生育などの各性質から、供試したメロン毛根病細菌は既往の報告 (塩見, 1987; 塩見ら, 1987; 牧野ら, 1987) のように biovar 1 に、他の *Agrobacterium* 属細菌 8 菌株は biovar 1 に、他の 4 菌株は biovar 2 に類別された。しかし、biovar 識別性質の一つであるクエン酸及び粘液酸からのアルカリ産生については、その反応によりメロン毛根病細菌は 2 グループに類別された。つまり、千葉分離株 13 菌株中 5 菌株はクエン酸からのアルカリ産生が陽性、粘液酸からのアルカリ産生が陰性であるのに対して、他の 8 菌株と静岡分離株 6 菌株はそれぞれ、陰性、陽性であった。一方、供試 *Agrobacterium* 属細菌のうち biovar 1 に属する 8 菌株は全菌株が陰性、陰性、biovar 2 に属する 8 菌株は陽性、陽性であった。

2 血清学的性質

a 凝集反応試験

作成した抗血清の力価は抗メロン毛根病細菌 2-1 血清 (以下抗 2-1 血清と略称する)、抗メロン毛根病細菌 MR-13 血清 (以下抗 MR-13 血清と略称する) とともに 1/2048 であった。これらの抗血清を用い、供試した各菌株の限界反応希釈倍数を調査した。結果は Table 3 に示した。抗 2-1 血清に対して、メロン毛根病細菌 19 菌株と *Agrobacterium* 属の biovar 1 に属する他種の各菌株は 1,024 ~ 2,048 倍の限界反応希釈倍数を示したが、biovar 2 に属する *Agrobacterium* 属細菌 4 菌株及び *Rhizobium* 属細菌 3 菌株は 2 ~ 8 倍の低い値を示した。また、その他の供試細菌菌株は全く反応が認められなかった。抗 MR-13 血清を用いた試験においても同様の結果であった。したがって、今回作成した 2 種類の

Table 2 Comparison of principal physiological characteristics of the 5 types of *Agrobacterium* spp.

Physiological Characteristics	<i>A. rhizogens</i>		other <i>Agrobacterium</i> spp.		biovars of <i>Agrobacterium</i> spp. ^a		
	14	5	7	4	I	II	III
No. of isolate							
Kovac's oxidase	+ ^b	+	+	-	+	d ⁻	d
Ferric ammonium citrate	+	+	+	-	+	-	-
Litmas milk	Alkali	Alkali	Alkali	Acid	Alkali	Acid	Alkali
2% NaCl tolerance	+	+	+	-	+	-	+
3-Ketolactose	+	+	+	+	+	-	d
Acide from Erythoritol	-	-	-	+	+	+	-
Ethanol	+	+	+	-	+	-	-
Melezitose	+	+	+	-	+	-	-
Alkali from Citrate	-	+	-	+	-	+	N
Malonate	-	-	-	+	-	+	+
Tartrate	-	-	-	+	-	+	+
Propionate	+	+	+	-	d	-	-
Mucic acid	+	-	-	+	-	+	-
Growth at 35°C	+	+	+	-	+	d ⁻	d

^a Cited from MOORE L. W. (1988), KERSTERS K. et al. (1984).

^b +=Positive reaction for 100% of isolates, -=negative reaction for 100% of isolates, d=reaction differ with isolates, N=not tested.

Table 3 Agglutination reaction in test tube

Bacteria	Anti-2-1 serum	Anti-MR-13 serum
Pathogen of melon hairy root <i>Agrobacterium</i> spp.	1024~2048 ^a	1024~2048
biovar 1	1024~2048	1024
biovar 2	2~16	2~8
<i>Rhizobium</i> spp.	2~8	2~8
Other bacteria	0	0

^a Maximum dilution times.

抗血清は *Agrobacterium* 属の biovar 1 に属する細菌に対して特異性が高いことが判明した。また、biovar 1 と biovar 2 は、限界反応希釈倍率に大きな隔たりがあることから血清学的に異なることが判明した。

b 寒天ゲル内二重拡散試験

供試細菌菌株の血清型による類別を目的とし、寒天ゲル内二重拡散試験による沈降帯形成を調査した。抗原として、生菌、加熱処理菌、超音波処理菌の3種類を供試した。このうち、生菌を抗原とした場合には抗血清作成菌株に対してごく微弱な沈降帯を形成するのみで、定性的な判定は困難であった。

一方、抗原として加熱処理菌を用いた場合、抗2-1血清、抗MR-13血清ともにそれぞれの抗血清作成菌株に対して3本の沈降帯を形成した (Fig. 1)。沈降帯は、

Agrobacterium 属の biovar

1 に属する他の細菌菌株を抗原とした場合にも形成されたが、biovar 2 に属する細菌及び他属細菌を抗原とした場合には形成されなかった。この結果は、凝集反応試験での結果とよく一致した。メロン毛根病細菌を含む biovar 1 に属する27菌株は形成され

る沈降帯の数と種類によって四つの血清型に類別された。つまり、抗2-1血清に対する反応では抗血清孔に隣接する1本の沈降帯(c)はbiovar 1 に属する *Agrobacterium* 属細菌で共通に形成されるが、その他の2本の沈降帯(a, b)の有無によって三つのグループに類別された。一方、抗MR-13血清に対する反応では、biovar 1 に属する全菌株に共通する沈降帯はなく、3種類の沈降帯(a, b, c)の有無によって三つのグループに類別された。このように加熱処理菌を抗原とした場合、これら2種類の抗血清によって類別された各グループに含まれる菌株はほぼ一致し、*Agrobacterium* 属の供試細菌のうち biovar 1 に属する菌株は四つの血清型に類別された (Table 4)。

超音波処理菌を抗原とした場合、二つの抗血清はともに各抗血清作成菌株との間に4本の沈降帯を形成した

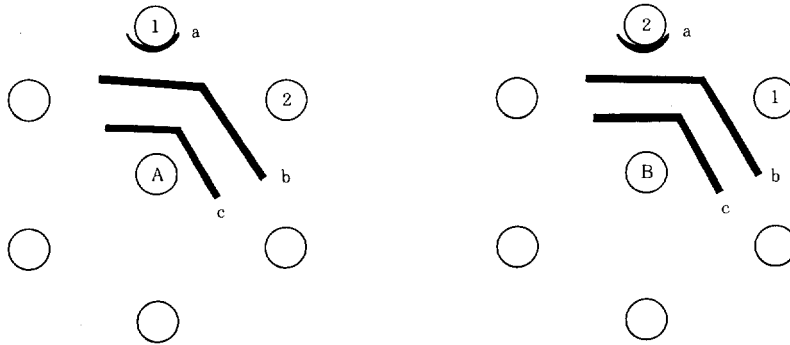


Fig. 1 Serological reactions in agar double diffusion tests to heat treated antigen. 1: *A. rhizogenes* strain 2-1, 2: *A. rhizogenes* strain MR-13, A: anti 2-1 serum, B: anti MR-13 serum.

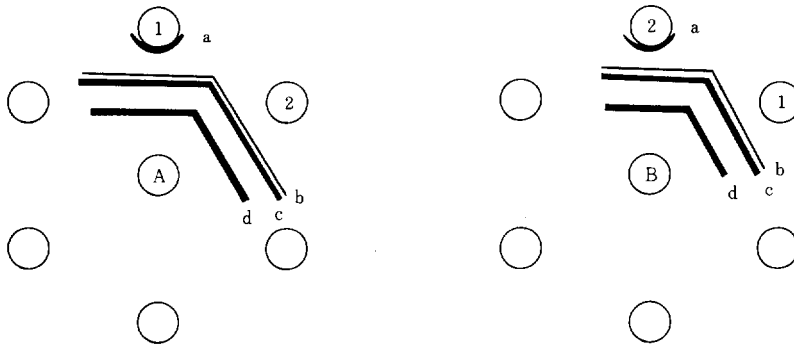


Fig. 2 Serological reactions in agar double diffusion tests to sonicated antigen. See Fig. 1.

Table 4 Precipitin band formation against heat treated antigen of *Agrobacterium* spp. in agar double diffusion test

Anti-serum / Sero-group	Anti 2-1 serum	Anti MR-13 serum
I	a b c ^a	b
II	c	a
III	b c	a b c
IV	* c	a
V	—	—

a a, b, c = Each precipitin band, * = differ with isolate, — = no reaction.

(Fig. 2). 他の菌株を抗原とした場合の沈降帯は、加熱処理菌を抗原とした時と同様に、*Agrobacterium* 属細菌の biovar 1 に属する菌株に対してのみ形成された。抗 2-1 血清に対する反応で、沈降帯 b と抗血清孔に隣接する沈降帯 d は、すべての biovar 1 に属する菌株で形成されるが、抗原孔に隣接する沈降帯 a の有無に

よって二つのグループに類別された。また、抗 MR-13 血清に対する反応では、2 本の沈降帯 b, c は各菌株に共通するが、抗原孔に接触する沈降線 a 及び d の有無によって二つのグループに類別された。超音波処理菌を抗原とした場合にも加熱処理菌を抗原とした場合と同様に、2 種類の抗血清に対する反応から、供試した biovar 1 に属する菌株は三つの血清型に類別された (Table 5).

以上の結果、*Agrobacterium* 属の biovar 1 に属する供試細菌の各菌株は、加熱処理菌あるいは超音波処理菌を抗原として用いると、2 種類の抗血清に対する沈降帯パターンから、それぞれ四つの血清型に類別された。ところが、加熱処理菌及び超音波処理菌に基づく各血清型に含まれる菌株は、すべて共通であった。すなわち、biovar 1 に属する供試細菌は、両処理菌のいずれを抗原として用いても、同様な四種類の血清型に分類することが可能である。それぞれの血清型に属する菌株は Table 6 に示した。このようにメロン毛根病細菌は、千

Table 5 Precipitin band formation against sonicated antigen of *Agrobacterium* spp. in agar double diffusion test

Anti-serum Sero-group	Anti 2-1 serum	Anti MR-13 serum
I	a b c d ^a	b c *
II	b * c	a b c *
III	b * d	a b c d
IV	b * d	b c *
V	—	—

a, b, c = Each precipitin band, * = differ with isolate, — = no reaction.

Table 6 Grouping of *Agrobacterium* spp. into 5 sero-groups

Sero-group	Isolate
I (biovar 1)	1-1, 2-1, 8-1, 8-5, 10-1, 11-3, U 1-3, U 1-4
II (biovar 1)	3-1, 4-3, 5-2, 6-3, 7-3
III (biovar 1)	MR-13, MR-15, S 1-1, S 1-2, S 2-1, S 2-2
IV (biovar 1)	NIAES 1001, 1222, 1223, 1224, 1277, 1278, IFO 13532, 13263
V (biovar 2)	NIAES 1279, 1280, 1540, 1550

葉県を採集地とする 2 血清型と、静岡県を採集地とする 1 血清型の計 3 血清型に分類された。*Agrobacterium* 属細菌のうち biovar 1 に分類される 8 菌株は別の 1 血清型に類別された。

IV 考 察

塩見ら (1987) 及び牧野ら (1987) は、千葉県及び静岡県の温室メロンに発生した地表面に根が異常に露出する症状は、いずれも *A. rhizogenes* の biovar 1 による病害であることを明らかにした。植物病原細菌を分類する場合、通常数多くの細菌学的性質を調査しなければならず、多くの労力と時間を要し、植物病原細菌の分類同定を困難にしている。*Agrobacterium* 属細菌は病原性によって 4 種に分類されている。すなわち、各種植物にがんしゅを形成するものを *A. tumefaciens*、毛根を発生するものを *A. rhizogenes*、キイチゴ属植物のみにがんしゅを形成するものを *A. rubi*、病原性を持たないものを *A. radiobacter* に分類している。この 4 種は、各種植物に対する接種試験によってのみ分類される (KERSTERS ら, 1984)。 *Agrobacterium* 細菌の場合には、

更に同属細菌は病原性とは別に生理学的性質によって三つの生理型 (biovar) に類別され、*A. tumefaciens* には biovar 1, 2, 3 が、*A. rhizogenes* には biovar 1, 2 の存在が知られている。

他方、植物ウイルスをはじめとする多くの植物病原体の同定に、血清学的手法が用いられてきた。植物病原細菌においても多数の種で血清学的性質が明らかにされ、簡易同定の有効な手段として利用されている (SCHAAD, 1979; 後藤, 1981)。

Agrobacterium 属細菌の血清学的性質についてはこれまでも多くの報告がある。その中で、GRAHAM (1971) は *Agrobacterium* 属細菌菌株のがんしゅ形成の有無を血清学的に識別するのは困難であり、また、増殖の早い *Rhizobium* 属細菌と幾つかの *Agrobacterium* 属細菌との間で交差反応が存在することを報告している。一方、*Agrobacterium* 属の biovar 1 に属する細菌と biovar 2 に属する細菌は血清学的に識別可能であることが報告されている (KEANE ら, 1970; LOPEZ, 1971; MILLER ら, 1981; EL-KADY ら, 1982; ALARCON ら, 1987)。

今回、採集地の異なるメロン毛根病細菌 2 菌株を用いて抗血清を作成した。この両抗血清に対するメロン毛根病細菌 19 菌株を含む 31 菌株の *Agrobacterium* 属細菌の反応を比較した。その結果、凝集反応法による反応限界希釈倍数において、biovar 1 と biovar 2 は血清学的に識別が容易であった。したがって、今回作成した 2 種類の抗血清は *Agrobacterium* 属の biovar 1 に属する細菌に対して特異性が高く、biovar 1 と biovar 2 は、血清学的に異なることが判明した。この結果は、既往の報告と一致する。また、*Rhizobium* 属細菌では極微弱な反応が認められるが、他属菌株との間では反応が認められなかった。しかし、供試した菌株数も少なく、今後土壌細菌等も用いて更に詳細な検討が必要である。

HOCHSTER ら (1967) は、*A. tumefaciens* 菌株 B 6 とその非病原性突然変異株 B 6 TP を抗原とした抗血清による寒天ゲル内二重拡散試験で、病原性菌株と非病原性菌株は血清学的に異なることを報告している。同様な結果は、EL-KADY ら (1982) によっても報ぜられ、病原性菌株と非病原性菌株は血清学的に識別が可能であることを示唆している。更に SULE ら (1983) は、免疫電気泳動法を用い、アグロシン産性菌株 *A. radiobacter* K 84 株においてプラスミドに特異的な抗原が存在することを報告している。著者らの結果では、寒天ゲル内二重拡散法によってメロン毛根病細菌とその他の *Agrobacterium* 属細菌の biovar 1 に属する細菌は 2 種類の抗血清を用い

Table 7 Characteristics of *Agrobacterium* sp. belonging to biovar 1 tested in this study

Sero-group	No. of isolate	Collected place	Alkali production from	
			Citrate	Mucic acid
I	8	Chiba pref.	— ^b	+
II	5	Chiba pref.	+	—
III	6	Shizuoka pref.	—	+
IV	8	d ^a	—	—

a Differ with isolates.

b +=Positive reaction, -=negative reaction.

ることによって類別が可能なが示唆された。既往の報告では *Agrobacterium* 属細菌の病原性はプラスミドの有無とその種類によることが知られている (KERSTERS ら, 1984)。今回の結果が、病原性及びプラスミドの種類の差異によるものか否かについては更に詳細な検討が必要である。また、メロン毛根病細菌は寒天ゲル内二重拡散法によって三つの血清型に類別された。同一の種内においても菌株により血清反応が異なることも報告されている (KEANE ら, 1970; BOUZAR ら, 1988)。また、血清学的性質が同一種内においても地域性や宿主等によって異なる事例も指摘されている (SCHAAD, 1979; 後藤, 1981)。今回の結果も同様な理由によるものと考えられる。

メロン毛根病細菌を含む *Agrobacterium* 属細菌 31 菌株の生理学的性質について調査した。その結果、biovar 判別性質 (KERSTERS ら, 1984; MOORE, 1988) の一つであるクエン酸及び粘液酸からのアルカリ産生の 2 性質の反応によってメロン毛根病細菌は二つのグループに類別された。この生理学的性質による類別と血清学的性質による類別は一致した。また、毛根形成能、菌株の由来による類別とも血清型はほぼ一致した。各血清型の主な性質を Table 7 に表示した。この一致が何に起因するのかは不明であり、更に詳細な検討を要する。

上述の結果より、今回作成した二種類の抗血清は *Agrobacterium* 属の biovar 1 に属する細菌と特異的に反応することが明らかになった。また、二種類の抗血清を用いた寒天ゲル内二重拡散法による沈降帯の形成様式から、メロン毛根病細菌は他の *Agrobacterium* 属の biovar 1 に属する細菌と識別が可能なが判明した。したがって、本抗血清はメロン毛根病細菌の簡易同定に利用することが可能であると考えられる。しかし、今回供試した菌株数が少なく、更に他の *A. rhizogenes* を含めた多数の *Agrobacterium* 属細菌を用いた、より詳細な検討が必要と考えられる。

V 摘 要

メロン毛根病細菌, *Agrobacterium rhizogenes* の血清学的性質を調査し、本病原細菌の血清学的手法による簡易同定について検討した。さらに、本病原細菌の血清学的性質と生理学的性質との関係についても考察した。その結果は以下のとおりである。

1) 異なった地域から採集した 2 菌株のメロン毛根病細菌に対して抗血清を作成した。これらの抗血清は凝集反応試験において *Agrobacterium* 属の biovar 1 に属する細菌と特異的に反応したが、biovar 2 に属する細菌および他属細菌とは全く反応しないか、極微弱な反応を示すのみであった。

2) 寒天ゲル内二重拡散試験において、沈降帯の形成様式から *Agrobacterium* 属の biovar 1 に属する 27 菌株の細菌は、四つの血清型に類別された。また、千葉県から採集した菌株と静岡県から採集した菌株は、血清学的に異なった。

3) メロン毛根病細菌 19 菌株を含む 31 菌株の *Agrobacterium* 属細菌の生理学的性質を調査した。その結果、メロン毛根病細菌は、クエン酸および粘液酸からのアルカリ産生の 2 性質により、二つのグループに類別された。

4) メロン毛根病細菌の血清型は、菌株の採集地、生理学的性質による類別とほぼ一致した。

5) 以上の結果から、メロン毛根病細菌の簡易同定に血清学的手法が使用できることが判明した。

引用文献

- 1) ALARCON, B., M. M. LOPEZ, M. CAMBRA & J. ORTIZ (1987): Comparative study of *Agrobacterium* biotypes 1, 2 and 3 by electrophoresis and

- serological methods. *J. Appl. Bacteriol.*, **62**, 295 ~ 308.
- 2) BOUZAR, H., L. W. MOORE & H. W. SCHAUP (1988): Lipopolysaccharide from *Agrobacterium tumefaciens* B 6 induces the production of strain-specific antibodies. *Phytopathology*, **78**, 1237 ~ 1241.
 - 3) EL-KADY, S. & S. SÜLE (1982): Serological comparisons between strains of *Agrobacterium radiobacter*. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.*, **17**, 1 ~ 6.
 - 4) 後藤正夫 (1981): 新植物細菌病学. pp.99 ~ 110, ソフトサイエンス社, 東京.
 - 5) GRAHAM, P. H. (1971): Serological studies with *Agrobacterium radiobacter*, *A. tumefaciens*, and *Rhizobium* strains. *Arch. Mikrobiol.*, **78**, 70 ~ 75.
 - 6) ——— & C. A. PARKER (1964): Diagnostic features in the characterisation of the root-nodule bacteria of legumes. *Plant and Soil*, **20**, 383 ~ 396.
 - 7) HENDRICKSON, A. A., I. L. BALDWIN & A. J. RIKER (1934): Studies on certain physiological characters of *Phytomonas tumefaciens*, *Phytomonas rhizogenes* and *Bacillus radiobacter*. Part II. *J. Bact.*, **28**, 597 ~ 618.
 - 8) HOCHSTER, R. M. & S. E. COLE (1967): Serological comparisons between strains of *Agrobacterium tumefaciens*. *Can. J. Microbiol.*, **13**, 569 ~ 572.
 - 9) KEANE, P. J., A. KERR & P. B. NEW (1970): Crown gall of stone fruit. II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. *Aust. J. Biol. Sci.*, **23**, 585 ~ 595.
 - 10) KERSTERS, K. & J. DE LEY (1984): Genus III. *Agrobacterium* Conn. 1942. In KRIEG, N. R. and J. G. HOLT, ed., 244 ~ 254, Williams & Wilkins Co., Baltimore/London.
 - 11) 牧野孝宏・大沢高志 (1987): メロン毛根病の発生と病原菌の同定. 静岡農試研報, **32**, 23 ~ 30.
 - 12) MOORE, L. W., A. ANDERSON & C. I. KADO (1980): Gram negative bacteria, A. *Agrobacterium*. In SCHAAD, N. W. ed. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2nd edition., 16 ~ 36, American Phytopathological Society, Minnesota.
 - 13) SCHAAD N. W. (1979): Serological identification of plant pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **17**, 123 ~ 147.
 - 14) 塩見敏樹 (1987): メロン毛根病の発生とその病原細菌. 植物防疫, **41**, 4 ~ 7.
 - 15) ———・白川 隆・竹内昭士郎・大泉利勝・植松清次 (1987): *Agrobacterium rhizogenes* biovar 1 によるメロン毛根病. 日植病報, **53**, 454 ~ 459.
 - 16) STARR, M. P. (1946): The nutrition of phytopathogenic bacteria. II. The genus *Agrobacterium*. *J. Bact.*, **52**, 187 ~ 194.
 - 17) SÜLE, S. & EL-S. EL-KADY (1983): Analysis of plasmid-coded antigens of *Agrobacterium radiobacter* strain K 84. *Phytopath. Z.*, **107**, 92 ~ 95.
 - 18) 富永時任 (1971): 日本における牧草および飼料作物の病害に関する研究 II 日本における牧草および飼料作物細菌病の病原学的研究. 農技研報, C 25, 205 ~ 306.

Serological Characteristics of *Agrobacterium rhizogenes*, the Pathogen of Melon Hairy Root

Takashi SHIRAKAWA, Toshiki SHIOMI and Shoshiro TAKEUCHI

Summary

The current experiment was carried out to investigate the serological characteristics of *Agrobacterium rhizogenes*, the pathogen of melon hairy root, and to apply serological methods for the diagnosis of this pathogen. Furthermore, the relationships between the serological characteristics and physiological properties were studied. The results obtained were as follows.

1. Antisera produced against 2 isolates (biovar 1) of *A. rhizogenes* isolated from different areas were specific to biovar 1 of *Agrobacterium* spp., but not react or react weakly to biovar 2 in the agglutination test.

2. In the agar double diffusion test, 27 isolates (biovar 1) of *Agrobacterium* spp. were classified into 4 sero-groups. The isolates of *A. rhizogenes* collected at Chiba prefecture could be distinguished serologically from the isolates collected at Shizuoka prefecture.

3. The physiological characteristics of 31 isolates of *Agrobacterium* spp. including the 19 isolates of *A. rhizogenes* were examined. *A. rhizogenes* was divided into 2 groups based on alkali production from citrate and mucic acid.

4. The sero-groups of biovar 1 of *A. rhizogenes* were correlated with the collection sites of the isolates and the physiological characteristics.

5. These results suggest that serological methods can be used for the diagnosis of *A. rhizogenes*.