

# 根頭がんしゅ病菌のiプラスミドに関連した表現形質による 類別

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	澤田,宏之 家城,洋之 小林,省藏 生山,巖
発行元	日本植物病理學會
巻/号	58巻2号
掲載ページ	p. 244-252
発行年月	1992年4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



## 根頭がんしゅ病菌の Ti プラスミドに関連した 表現形質による類別\*

澤田 宏之\*\*・家城 洋之\*\*†・小林 省藏\*\*・生山 巖\*\*††

Hiroyuki SAWADA\*\*, Hiroyuki IEKI\*\*†, Shozo KOBAYASHI\*\* and  
Iwao OIYAMA\*\*†† : Grouping of Tumorigenic *Agrobacterium* spp.  
Based on Ti Plasmid-Related Phenotypes

### Abstract

Nineteen strains of *Agrobacterium tumefaciens* and 2 strains of *A. rubi* were tested for host range (stems of grapevine, peach, pear, tomato, sunflower, *Kalanchoe daigremontiana* and *Nicotiana tabacum*, and leaves of *K. daigremontiana*), tumor morphology on *K. daigremontiana* and grapevine, opine induction in tomato tumors, and agrocin 84 sensitivity. By principal component analysis using the mean diameter of 60 tumors formed by each strain on each of the test plants as a variable, the total of 21 strains were separated into the following seven groups named Groups 1-7. Group 1 (octopine and cucumopine-inducing strains), Group 2 (vitopine-inducing strains) and Group 3 (opine class was not determined) consisted of only biovar 3 strains, showed strong pathogenicity to grapevine, but differed in pathogenicity to other plants. Group 4 (octopine, agropine and mannopine-inducing strains) consisted of only biovar 1, whereas Group 5 (nopaline-inducing strains) comprised biovars 1 and 2, *A. rubi* and unclassified strains isolated from cherry, indicating its heterogeneity in chromosomal markers. Groups 4 and 5 showed weak pathogenicity to grapevine, but strong pathogenicity to the other plants. Both of Group 6 (opine class was not determined) and Group 7 (nopaline-inducing strains) contained unclassified strains (NCPPB 1650 and two kiwifruit isolates, respectively), and showed weak pathogenicity to all the inoculated plants. Strains belonging to each group gave uniform reactions within the group in tumor morphology, opine induction and agrocin 84 sensitivity, except for Group 5 which was divided into 2 subgroups (A and B) based on agrocin 84 sensitivity. Agrocin 84-sensitive Group 5-A consisted of biovars 1, 2 and unclassified cherry isolates, and resistant Group 5-B comprised only *A. rubi*. All the strains except for Group 5-A were agrocin-84 resistant. Six Japanese strains of biovar 3 belonging to Group 2 induced vitopine, indicating that the vitopine strains have a wide distribution in Japan.

(Received August 1, 1991)

**Key words:** *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rubi*, Ti plasmid, host range, opine induction, agrocin 84 sensitivity.

### 緒 言

近年になり日本各地で、各種農作物に *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend) Conn によって引き起こされる根頭がんしゅ病の多発が報告されている<sup>13,17,27</sup>。また、米国では *A. rubi* (Hildebrand) Starr and Weiss による *Rubus* 属植物の根頭がんしゅ

病が発生している<sup>12</sup>。保菌した苗木の流通、土壌伝染あるいは環境要因などが本病の分布拡大や多発の原因として疑われているが、本菌 (*A. tumefaciens* および *A. rubi*) に対する感度の高い検出方法がないことが、母樹や苗木の検定や生態学的な研究を行う上での障害となっている<sup>2</sup>。現在筆者らは、本菌に特異的な性質を明らかにし、それらを検出技術に利用することを目的に、

\* 果樹試験場業績番号 : E-147 Contribution No. E-147 of the Fruit Tree Research Station

\*\* 農林水産省果樹試験場安芸津支場 Akitsu Branch, Fruit Tree Research Station, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Akitsu, Hiroshima 729-24, Japan

† 現在 : 農林水産省果樹試験場興津支場 Present address : Okitsu Branch, Fruit Tree Research Station, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Okitsu, Shimizu, Shizuoka 424-02, Japan

†† 1991年12月28日死去 Deceased December 28, 1991.

細菌学的性質, 血清学的性質あるいは菌体脂肪酸組成などの染色体に支配されていると考えられる各種性質について調査を行っている<sup>28-31)</sup>。

一方, 本菌には寄生性の異なる多数の系統が存在し<sup>1,5,23,33,34)</sup>, *A. radiobacter* strain K84による生物防除も特定の系統にしか効果がないことが明らかになってきた<sup>6,11,14)</sup>。また, 系統によっては非常に宿主範囲が広い<sup>34)</sup>、発病跡地に他樹種を改植した場合でも本病が再発する危険がある。したがって, 防除を効率よく行うためには, このような系統を判別する技術確立し, 対象とする系統の性質にあわせた対策がとれるようにしなければならない。しかし, 宿主範囲や病原性, あるいは strain K84の産生するアグロシン 84に対する感受性などの系統分化に関連した表現形質は,

核外遺伝子である Ti プラスミドに支配されている。したがって, 前述の染色体に関連した性質はこのような系統の判別には利用できない<sup>12,15,23,32)</sup>。

実用的な判別技術を確立するためには, Ti プラスミドに関連した表現形質について広範な調査を行い, 系統分化の実態を十分に明らかにした上で, 各系統に特異的な指標を探索していくことが必要である。系統分化の実態に関しては, 遺伝子工学分野の研究者を中心として研究が行われており, がんしゅ中に誘導されるオパインの種類を主な指標としていくつかの系統の存在が明らかにされてきた<sup>5,6,14,23,24,32-34)</sup>。しかし, 研究の対象が限られた菌株に偏っていたり, オパインに基づく類別と寄生性との関係が十分明らかにされていないように, 本病の被害が深刻な重要作物が接種試験の材

Table 1. Strains of *Agrobacterium* used in the present experiment

Taxon <sup>a)</sup>	Strain <sup>a)</sup>	Host	Sequence no. <sup>b)</sup>
Biovar 1			
<i>A. tumefaciens</i>	NCPPB 2437** <sup>c)</sup> (=ATCC 23308, B6) <sup>d)</sup>	Apple	1
	MAFF 03-01276	Chrysanthemum	2
	MAFF 03-01001	Cherry	3
	ATCC 33970 (=C58)	Cherry	4
Biovar 2			
<i>A. tumefaciens</i>	NCPPB 2303*	Almond	5
	Peach CG 8331	Peach	6
Biovar 3			
<i>A. tumefaciens</i>	NCPPB 2562* (=Ag63)	Grape	7
	YGAt 32-3	Grape	8
	G-Ag-19	Grape	9
	G-Ag-26	Grape	10
	G-Ag-27 (=MAFF 06-63001)	Grape	11
	K-Ag-1	Kiwifruit	12
	K-Ag-2	Kiwifruit	13
	NCPPB 1771	Grape	14
<i>A. rubi</i>			
	IFO 13261** (=ATCC 13335, NCPPB 1854)	<i>Rubus</i> sp.	15
	IFO 13260 (=ATCC 13334, NCPPB 1856)	<i>Rubus</i> sp.	16
Unclassified			
<i>A. tumefaciens</i>	NCPPB 1650	<i>Rosa</i> sp.	17
	K-Ag-3	Kiwifruit	18
	K-Ag-4	Kiwifruit	19
	Ch-Ag-4	Cherry	20
	Ch-Ag-5	Cherry	21

a) For the assignment of strains to taxa and their origin, see previous reports (Sawada, H. *et al.* (1990)<sup>27)</sup>, (1992)<sup>28)</sup>).

In this paper, the nomenclature presented in Bergey's Manual (1984)<sup>12)</sup> is adopted.

b) Sequence numbers of strains are used to represent them in Tables 2 and 3.

c) \*\*: type strain; \*: representative strain for the corresponding biovar (see Bergey's Manual (1984)<sup>12)</sup>).

d) The code number in the parenthesis is another designation of the strain. Abbreviations for culture collections: ATCC, American Type Culture Collection, U.S.A.; IFO, Institute for Fermentation, Osaka, Japan; MAFF, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan; NCPPB, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, U.K.

料に含まれていない、病原性の評価に客観性や定量性が欠けているなどの問題点があり、病害防除のための基礎データが十分整っているとは言い難い。

筆者らは、系統分化の状況を正しく把握し、判別技術確立の基礎とすることを目的に、Tiプラスミドに支配されている病原性と宿主範囲、がんしゅの形状、アグロシン84に対する感受性およびがんしゅ中に誘導されるオパインの種類に関する菌株間の差異を詳細に調査してきた。その結果、供試した21菌株がこれらの表現形質に基づいて大きく8つのグループ(サブグループを含む)に類別できることが明らかになったので報告する。

### 材料および方法

**供試細菌** 9種類の植物を分離源とする21菌株の根頭がんしゅ病菌を供試した(Table 1)。この中には外国産の8菌株が含まれている。これらの分類学的所属は、biovar 1が4菌株、biovar 2が2菌株、biovar 3が8菌株、*A. rubi*が2菌株、所属不明菌が5菌株である。なお、本属菌の分類・命名に関しては近年さまざまな提案がなされているが<sup>8,19,22)</sup>、混乱を避けるために本報ではBergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984)<sup>12)</sup>における方法にしたがった。

**病原性と宿主範囲** PPGA<sup>27)</sup>斜面培地を用いて28°Cで24時間培養した菌体から約 $10^8$  cfu/mlの濃度の細菌懸濁液を調整し、これを接種源として単針付傷接種<sup>27)</sup>を行った。接種の対象としたのはブドウ(品種:リザマート)、モモ(筑波6号)、ナシ(マンシュウマメナシ)、トマト(ポンテローザ)、ヒマワリ(大輪ひまわり)、ペンケイソウ(*Kalanchoe daigremontiana*)およびタバコ(サムソン)の茎、ならびにペンケイソウの葉の合計8種類である。各菌株とも、1種類の接種植物に対して20カ所に接種する試験を3反復行った。23°Cで30日後に形成されたがんしゅの長径を測定し、接種植物ごとに得られた60個の測定値の平均を求めた。このようにして各菌株ごとに得られた8個の平均値を変数として主成分分析を行い、宿主範囲と病原性に基づく供試菌株の類別を試みた。固有値は分散・共分散行列を用いて算出した。計算は農林水産研究計算センターの多変量解析プログラム(MAP)<sup>18)</sup>を利用して行った。

**形成されたがんしゅの形状** 上記の接種試験の結果、ペンケイソウの茎と葉、およびブドウの茎に形成されたがんしゅの形状に関して菌株間に差異が認められたので、がんしゅの色、表面の凹凸および不定根や

奇形腫(テラトーマ)形成の有無について調査し、菌株間の比較を行った。

**誘導されたオパインの種類** 上記の接種試験でトマトに形成されたがんしゅ組織を、クラフオラン(500 µg/ml)を添加したホルモンフリーのMurashige and Skoog (MS)<sup>33)</sup>培地で継代培養して除菌した後、ホルモンフリーMS培地で増殖させた。この培養組織約200 mgを0.1 Mアルギニン添加MS液体培地500 µl中で1晩培養後、蒸留水200 µl中で磨砕し、遠心後得られた上清を分析用の試料とした。ただし、ククモピンとミキモピンについては、蒸留水の代わりに0.1 N HClを用いて抽出し、ラクタム化させたものを分析試料とした<sup>9,10)</sup>。オパインの分離はろ紙電気泳動(20 V/cm, 1 hr)を用いて常法<sup>20)</sup>にしたがって行った。分析の対象としたのはTable 3に示した7種類のオパインである。オクトピンとノパリンはOtten and Schilperoort<sup>20)</sup>の方法によって検出し、標品(Sigma)との移動度および色調の比較によって同定した。アグロピンとマンノピンはCzako and Marton<sup>3)</sup>の方法で検出し、参考菌株であるNCPBP 2437<sup>24)</sup>(Table 1)から得られた試料と比較した。ミキモピンとククモピンはSavkaら<sup>29)</sup>の方法で検出した。前者はMAFF 03-01724<sup>9,10)</sup>、後者はNCPBP 2659<sup>4)</sup>から得られた試料(いずれも鎌田 博博士より分譲)と比較して同定した。ピトピンはSzegediら<sup>32)</sup>の方法で検出し、S-4およびSz-1<sup>32)</sup>(Szegedi, E. 博士より分譲、いずれも*A. tumefaciens* biovar 3)を参考菌株として用いた。

**アグロシン84感受性** Mooreら<sup>16)</sup>の方法にしたがって各菌株の感受性検定を行った。ただし、strain K84は、MG<sup>16)</sup>平板培地へスポット接種して48時間培養したのちに、クロロホルム蒸気処理を10分間行って殺菌し、被検菌との生育の競合による影響を除いた。また、MG培地へはbiotinの代わりに0.2 g/lのyeast extract (Difco)を濾過滅菌して加えた。

## 結 果

### 病原性と宿主範囲

接種試験から求めたがんしゅ長径の平均値を変数とし、分散・共分散行列を用いて固有値を計算して主成分分析を行った。第2主成分までの累積寄与率が89.7%であること、第1および第2主成分の各変数に対する寄与率がいずれも50%を越えていることから、第1および第2主成分を総合特性値として選んだ。

得られた主成分得点の散布図をFig. 1に示した。供試した21菌株は大きく7つのグループ(グループ

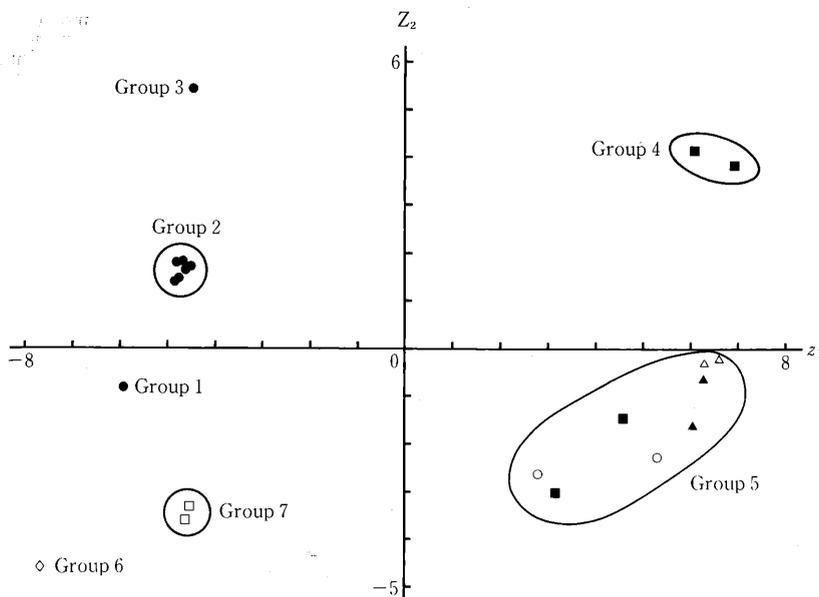


Fig. 1. Dispersion of 1st ( $z_1$ ) and 2nd ( $z_2$ ) component scores of 21 strains of *Agrobacterium* in the principal component analysis of host specificity patterns. Mean diameter of 60 tumors formed by each strain on each of 8 plants listed in Table 2 was used as variable. The analysis was made on a variance-covariance matrix, by using these 8 variables. The calculation was carried out with the "Multivariate Analysis Program (MAP)" of the Computing Center for Research in Agriculture, Forestry and Fisheries, MAFF, Japan. ■ : biovar 1 ; ▲ : biovar 2 ; ● : biovar 3 ; ○ : *A. rubi* ; ◇ : NCPPB 1650 ; △ : unclassified strains isolated from cherry ; □ : unclassified strains isolated from kiwifruit (see Table 1 and Sawada, H. *et al.* (1992)<sup>28)</sup>).

1~7)に明瞭に類別された。グループ1, 2および3はbiovar 3のみを含んでいるが、グループ1と3がそれぞれ外国産の菌株であるNCPPB 2562とNCPPB 1771から構成されているのに対し、日本で分離された6菌株(YGAt 32-3, G-Ag-19, 26および27, K-Ag-1および2)はグループ2として1つにまとまっていた。グループ4はbiovar 1に属する2菌株(NCPPB 2437およびMAFF 03-01276), グループ6は分類学的な所属が不明なNCPPB 1650<sup>28,29)</sup>, グループ7は同じく所属不明菌であるキウイフルーツから分離された2菌株(K-Ag-3および4)<sup>28,29)</sup>から構成されていた。一方、グループ5にはbiovar 1に属する2菌株(MAFF 03-01001, ATCC 33970), biovar 2に属する2菌株(NCPPB 2303, Peach CG 8331), *A. rubi*の2菌株(IFO 13261, 13260)および所属不明菌であるサクラ分離菌(Ch-Ag-4, 5)<sup>28,29)</sup>が混在しており、分類学的にはヘテロな集団であった。

類別されたグループごとに各接種植物におけるがんしゅの平均値を求めてTable 2に示した。グループ1, 2および3のbiovar 3はいずれもブドウに対して強い

病原性を示すものの、ベンケイソウの葉とモモに対してはまったく病原性を示さなかった。トマト, ヒマワリおよびタバコでは、これら3つのグループ間で病原性に差がみられた。グループ4と5はブドウには弱病原性であるものの、それ以外の植物に対しては病原性が強かった。一方、グループ6と7は全般的に病原性が弱く、特に前者はトマトに小さながんしゅを形成した以外は、まったく病原性を示さなかった。

#### 形成されたがんしゅの形状

ベンケイソウの茎と葉, およびブドウの茎に形成されたがんしゅには、色や表面の凹凸, 不定根や奇形腫(テラトーマ)の有無などの点で菌株間にさまざまな変異が観察された。しかし、前項で類別されたグループ単位で見ると、それぞれ均一かつ特異的なパターンを示していた(Table 2)。すなわち、グループ1, 2, 3および4は淡褐色で表面が粗造ながんしゅを形成するのに対し、グループ5と7は乳白色で平滑な形状のがんしゅを誘導した。また、不定根の誘導はグループ4と5, 奇形腫の形成はグループ5のみで認められた。

Table 2. Host specificity patterns and tumor morphology of the

Group <sup>a)</sup>	Strain <sup>b)</sup>	Biovar <sup>c)</sup>	Tumor diameter				
			Grape	Peach	Pear	Tomato	Sunflower
1	7	3	3.0	0.0	2.3	2.6	1.8
2	8,9,10,11,12,13	3	3.0±0.1	0.0	3.0±0.3	6.2±0.4	2.4±0.3
3	14	3	3.6	0.0	2.5	2.6	6.9
4	1,2	1	1.1±0.1	6.6±2.5	4.1±0.5	8.1±0.3	7.8±0.0
5	3,4,5,6,15,16, 20,21	1,2, <i>A. rubi</i> , unclassified	1.3±0.2	6.5±1.1	3.2±0.6	6.5±1.2	4.9±0.9
6	17	unclassified	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0
7	18,19	unclassified	0.0	0.0	2.3±0.1	4.8±0.1	2.2±0.1

a) Twenty one strains of *Agrobacterium* listed in Table 1 were divided into 7 groups based on the principal component analysis of host specificity patterns (see Fig. 1).

b) Strains are represented by their sequence numbers (see Table 1).

Table 3. Opine synthesis and agrocin 84 sensitivity of the 7 groups discerned by principal component analysis

Group <sup>a)</sup>	Strain <sup>b)</sup>	Biovar <sup>b)</sup>	Synthesis in tumors of							Agrocin 84 sensitivity
			Octopine	Nopaline	Agropine	Mannopine	Mikimopine	Cucumopine	Vitopine	
1	7	3	+	-	-	-	-	+	-	-
2	8,9,10,11, 12,13	3	-	-	-	-	-	-	+	-
3	14	3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	1,2	1	+	-	+	+	-	-	-	-
5-A <sup>c)</sup>	3,4,5,6, 20,21	1,2, unclassified	-	+	-	-	-	-	-	+
5-B <sup>c)</sup>	15,16	<i>A. rubi</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
6	17	unclassified	-	-	-	-	-	-	-	-
7	18,19	unclassified	-	+	-	-	-	-	-	-

a) See Fig. 1 and Table 2.

b) See Tables 1 and 2.

c) Eight strains of Group 5 (see Fig. 1 and Table 2) were divided into 2 subgroups (A and B) based on agrocin 84 sensitivity.

### 誘導されたオパインの種類

トマトのがんしゅ中に誘導されたオパインの種類についても、病原性と宿主範囲に基づいて類別されたグループごとに特徴的なパターンが認められた (Table 3)。グループ1はオクトピンとククモピン, グループ4はオクトピン, アグロピンおよびマンノピンを誘導しているのに対し, グループ2からはビトピン, グループ5と7からはノパリンのみが検出された。また, グループ3と6からは, 本試験で分析対象としたオパインは検出できなかった。なお, 今回供試した21菌株からは, ミキモピンを誘導するものは認められなかった。

### アグロシン84感受性

グループ5に属する8菌株は, 前項までの3つの表現形質については均一なパターンを示していたが, ア

グロシン84感受性に関しては陽性のものと陰性のものに分かれた。前者の6菌株をグループ5-A, 後者の2菌株をグループ5-Bとした (Table 3)。グループ5-Bの2菌株はともに *A. rubi* であった。また, グループ5-A以外の供試菌株はすべてアグロシン84に対して抵抗性であった。

### 考 察

根頭がんしゅ病菌 (*A. tumefaciens* および *A. rubi*) の保持するTiプラスミドは, 植物に対する病原性, 宿主範囲, がんしゅ中におけるオパインの誘導, オパインの利用性, Tiプラスミドの接合伝達, アグロシン84に対する感受性およびバクテリオファージAP-1に対する抵抗性などの機能を支配している<sup>12,25)</sup>。また, Ti

## 7 groups discerned by principal component analysis

[mean±SD(mm)]			Tumor morphology						
Kalanchoe leaves	Kalanchoe stems	<i>Nicotiana tabacum</i>	Kalanchoe stems			Kalanchoe leaves			Grape
			Morphology	Root	Teratoma	Morphology	Root	Teratoma	Morphology
0.0	1.6	2.4	A <sup>d)</sup>	—	—	—	—	—	A
0.0	1.6±0.1	4.1±0.2	A	—	—	—	—	—	A
0.0	0.0	7.3	—	—	—	—	—	—	A
3.9±0.2	6.6±1.3	7.7±0.4	A	+	—	A	—	—	A
5.3±0.5	7.2±1.2	3.3±1.2	B	+	—	B	—	+	B
0.0	0.0	0.0	—	—	—	—	—	—	—
0.0	3.7±0.1	0.0	B	—	—	—	—	—	—

c) Biovars to which the strains of the group belong (see Table 1).

d) A : light-brown in color with rough surface, B : white in color with smooth surface.

プラスミドの系統間で、形成されるがんしゅの形状に変異が認められるという報告もある<sup>5,7,23,32)</sup>。本試験ではこれらの表現形質の中から、病原性と宿主範囲、がんしゅの形状、アグロシン 84 感受性および誘導されるオパインの種類を指標として選び、Ti プラスミドに関連した系統分化の実態を調査した。このうち、病原性と宿主範囲に関しては、8 種類の接種データに基づく主成分分析によって、供試した 21 菌株が 7 つのグループ (グループ 1~7) に明瞭に類別できることが明らかになった (Fig. 1 および Table 2)。この接種試験には、根頭がんしゅ病の被害の大きいブドウ、モモおよびナシが含まれているため、各菌株やグループの農業環境における危険度の評価を行うことが可能である。また、がんしゅの形状、アグロシン 84 感受性および誘導されるオパインの種類に関して得られたデータを、これらのグループごとに比較したところ、グループ 5 以外ではグループごとに均一なパターンが得られた (Table 2 および 3)。したがって、これらのグループは、Ti プラスミドの分化を密接に反映したものであることがわかった。

グループ 1 として類別された NCPPB 2562 は、ギリシャでブドウから分離された biovar 3 に属する菌株である<sup>21,22)</sup>。ブドウに対して強い病原性を示すものの、それ以外の植物には全般的に病原性が弱いこと、ベンケイソウの茎に表面が粗造でごく小さながんしゅを形成すること (Table 2)、がんしゅ中にオクトピンを大量に誘導すること、Pauly 反応が陽性であるククモピンを誘導することから (Table 3)、グループ 1 は Depicker ら<sup>5)</sup> の “octopine-type 2”, Szegedi ら<sup>32)</sup> の “biotype 3 octopine isolate”, Paulus ら<sup>23)</sup> の “octopine-cucumopine strain” に相当することが確認でき

た。Paulus ら<sup>23)</sup> はこの系統がブドウに寄生する biovar 3 のの中では最も広く分布していると報告しているが、本試験では NCPPB 2562 と同じパターンを示す菌株を認めることができなかった。したがって、さらに広範な発生調査を行い、この系統の分布について再検討する必要があるだろう。

グループ 2 には日本でブドウおよびキウイフルーツから分離された 6 菌株の biovar 3 (YGAt 32-3, G-Ag-19, 26 および 27, K-Ag-1 および 2) が含まれている。これらはオパインとしてビトピンのみを誘導すること (Table 3)、ベンケイソウの茎に弱い病原性を示すことから (Table 2)、Szegedi ら<sup>32)</sup> がハンガリーのブドウ分離株から発見した “vitopine strain” (ビトピン型)<sup>23)</sup> に相当することが判明した。現在までのところハンガリー以外ではビトピンを誘導するものが見いだされていないことから、ビトピン型は特殊な系統であると考えられている<sup>23)</sup>。しかし、本試験に供試した 6 菌株だけでなく、筆者らが日本各地でブドウから分離した 21 菌株の biovar 3<sup>27)</sup> もすべてビトピンを誘導することが確認できた (データ未発表)。このことは、ビトピン型の分布に関する従来の認識<sup>23)</sup> を改める必要のあることを示すと同時に、わが国に分布する biovar 3 の起源を考えるうえで大きな手がかりとなるであろう。前述した “octopine-cucumopine strain” と比較してビトピン型の biovar 3 は研究が遅れており、宿主範囲をはじめとする表現形質も不明な点が多いとされていた<sup>23)</sup>。この点については、接種試験によってブドウ以外のトマトやタバコにも強い病原性を示すのを認めることができた (Table 2)。さらに、ブドウ由来の菌株だけでなく、キウイフルーツのがんしゅから分離された 2 菌株 (K-Ag-1 および 2) もグループ 2 に含まれている

ことを考え合わせると、すべての biovar 3 がブドウにのみ病原性を示す狭宿主域のものであるという認識<sup>12,22)</sup>は改めるべきであろう。一方、筆者らは前報<sup>30)</sup>で biovar 3 に血清群分化のあることを明らかにしており、グループ 2 には血清群 A に属する 4 菌株 (YGAt 32-3, G-Ag-27, K-Ag-1 および 2), 血清群 B に属する 1 菌株 (G-Ag-26) および群別不能菌株 (G-Ag-19) が混在しているが、Ti プラスミドに関連した形質に関してはこれらの血清群間に差異は認められなかった。

グループ 3 にはイランでブドウから分離された NCPPB 1771 のみが含まれている。NCPPB 1771 は分類学的な所属が不明であるとされてきたが<sup>12)</sup>、筆者らが各種分類指標に基づいて検討した結果、biovar 3 であることが判明した菌株である<sup>28-30)</sup>。タバコとヒマワリに強い病原性を示すこと、ベンケイソウの茎にがんしゅをまったく形成しないこと (Table 2)、本試験で調査対象とした 7 種類のオパインがいずれも検出できないこと (Table 3) から、NCPPB 1771 はグループ 1 あるいは 2 の biovar 3 とは異なる系統である。いずれのオパインも検出できなかった点に関しては、今回調査した 7 種類以外のオパインを誘導しているためなのか、あるいはがんしゅ中における含量が少ないことに起因しているのかについて検討しなければならない。

グループ 4 に含まれている NCPPB 2437 (=B6) は、Depicker ら<sup>5)</sup>の“octopine-type 1”の代表的な菌株としてよく研究されており、誘導するオパインの種類やアグロシン 84 に対する抵抗性などの点もすでに明らかにされている<sup>24)</sup>。本試験では、日本産の MAFF 03-01276 も NCPPB 2437 と同じパターンを示すことがわかり (Table 2 および 3, Fig. 1)、わが国にもこのタイプの系統が分布していることが明らかになった。この系統はブドウに対しては病原性が弱いものの、他の接種植物に対してはいずれも強い病原性を示すこと (Table 2)、アグロシン 84 に対して抵抗性であることから (Table 3)、難防除の病原菌として注意する必要がある。

グループ 5 には biovar 1, 2, *A. rubi* および所属が不明なサクラからの分離菌 (Ch-Ag-4 および 5)<sup>28,29)</sup> が混在しており、分類学的にヘテロな集団であった。このことと、前述したように biovar 3 がグループ 1, 2 および 3 に分化しているということは、染色体 DNA に基づいた分類群 (biovar) と Ti プラスミドに関連した類別 (本報における“グループ”) との間には相関がないという報告<sup>12,32)</sup>を支持している。また、グループ 5 は

アグロシン 84 感受性に関してもヘテロであり、陽性のも (グループ 5-A) と陰性のも (グループ 5-B) に類別された (Table 3)。後者には、*A. rubi* の 2 菌株 (IFO 13261 および 13260) のみが含まれていることから、*A. rubi* は保持する Ti プラスミドに関しても特殊な菌群であることが明らかとなった。

グループ 6 と 7 にはそれぞれ所属不明菌である NCPPB 1650 とキウイフルーツ分離菌 (K-Ag-3 および 4) が含まれている。これらは今回供試した接種植物に対してごく小さながんしゅを形成するか、あるいはがんしゅの誘導をまったく示さないことから (Table 2)、弱病原性あるいは狭宿主域であることが考えられる。この点については更に接種植物の種類を増やし、宿主特異性に関して調査していく必要がある。

グループ 5 がアグロシン 84 感受性に基づいて 2 つに細分されたことから、今回供試した 21 菌株は大きく 8 つのグループ (サブグループを含む) に類別できることが明らかとなった。苗木や土壌などの被検材料から分離された菌株がこれらのどのグループに属するかがわかれば、防除対策上有効な情報となる。類別の際に用いた各種表現形質についてその都度調べてもグループの判別は可能であるが、接種試験では結果が得られるまでに大変時間がかかるうえ、接種植物を常備しておくのに多大な労力を要するという欠点がある。またオパイン分析も、各オパインごとに検出方法が異なるために、簡便な判別方法とはなりえない。したがって、8 つのグループのそれぞれに対して特異性が高く、しかも迅速に検出できるような指標を新たに探索しなければならない。この条件を満たすものとして、Ti プラスミドの構造の違いを直接検出するような遺伝子診断法などが考えられる。今後は、このような視点からグループ間の比較を行っていくことが必要である。

本研究を行うに当たり、ミキモピンとククモピンの標品を分譲いただき、検出についてご指導していただいた筑波大学生物学系、鎌田 博博士に厚くお礼申し上げる。

## 摘 要

根頭がんしゅ病菌 (*Agrobacterium tumefaciens* および *A. rubi*) の Ti プラスミドに基づく系統分化を明らかにするために、来歴の異なる 21 菌株をブドウ、モモ、ナシ、トマト、ヒマワリ、ベンケイソウ、タバコの茎、ならびにベンケイソウの葉に接種した。形成されたがんしゅの長径を変数として主成分分析を行ったとこ

ろ、これらは7つのグループ(グループ1~7)に大きく類別できた。グループ1(オパインとしてオクトピンとククモピンを誘導)、2(ビトピン誘導)および3(オパイン未検出)には biovar 3 のみが含まれており、いずれもブドウに対して強い病原性を示したが、その他の植物ではがんしゅの大きさに差異が認められた。グループ4(オクトピン、アグロピンおよびマンノピン誘導)は biovar 1 のみを含んでいるが、グループ5(ノパリン誘導)には biovar 1, 2, *A. rubi* および所属不明菌が混在しており、分類学的にはヘテロな集団であった。これら2つのグループはブドウには弱病原性であるものの、それ以外の植物には強い病原性を示した。分類学的な所属が不明な菌株から構成されているグル

ープ6(オパイン未検出)およびグループ7(ノパリン誘導)は全般的に病原性が弱かった。形成されたがんしゅの形状、がんしゅ中に誘導されるオパインの種類およびアグロシン 84 感受性についても、グループ5以外ではグループごとに均一なパターンが得られた。グループ5はアグロシン 84 感受性が陽性のグループ5-A (biovar 1, 2 および所属不明菌)と陰性の5-B (*A. rubi*)に細分された。グループ5-A以外の供試菌株はすべてアグロシン 84 に対して抵抗性であった。グループ2に属する日本産の6菌株の biovar 3 は、いずれもオパインとしてビトピンを誘導することから、わが国にもビトピン型が分布していることが明らかとなった。

### 引用文献

- Anderson, A.R. and Moore, L.W. (1979). Host specificity in the genus *Agrobacterium*. *Phytopathology* 69 : 320-323.
- Burr, T.J. (1988). Crown Gall. In *Compendium of Grape Diseases* (Pearson, R.C. and Goheen, A.C. eds.). APS Press, St. Paul. pp. 41-42.
- Czako, M. and Marton, L. (1986). Independent integration and seed-transmission of the T<sub>R</sub>-DNA of the octopine Ti plasmid pTi Ach5 in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Mol. Biol.* 6 : 101-109.
- Davioud, E., Petit, A., Tate, M.E., Ryder, M.H. and Tempe, J. (1988). Cucumopine—A new T-DNA-encoded opine in hairy root and crown gall. *Phytochemistry* 27 : 2429-2433.
- Depicker, A., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983). Plant cell transformation by *Agrobacterium* plasmids. In *Genetic Engineering of Plants* (Kosuge, T. and Meredith, C.P. eds.). Plenum Press, New York. pp. 143-176.
- Ellis, J.G. and Murphy, P.J. (1981). Four new opines from crown gall tumours—their detection and properties. *Mol. Gen. Genet.* 181 : 36-43.
- Gresshoff, P.M., Skotnicki, M.L. and Rolfe, B.G. (1979). Crown gall teratoma formation is plasmid and plant controlled. *J. Bacteriol.* 137 : 1020-1021.
- Holmes, B. (1988). Taxonomy of *Agrobacterium*. *Acta Hort.* 225 : 47-52.
- Isogai, A., Fukuchi, N., Hayashi, M., Kamada, H., Harada, H. and Suzuki, A. (1988). Structure of a new opine, mikimopine, in hairy root induced by *Agrobacterium rhizogenes*. *Agric. Biol. Chem.* 52 : 3235-3237.
- Isogai, A., Fukuchi, N., Hayashi, M., Kamada, H., Harada, H. and Suzuki, A. (1990). Mikimopine, an opine in hairy roots of tobacco induced by *Agrobacterium rhizogenes*. *Phytochemistry* 29 : 3131-3134.
- Kerr, A. and Tate, M.E. (1984). Agrocins and the biological control of crown gall. *Microbiol. Sci.* 1 : 1-4.
- Kerstens, K. and De Ley, J. (1984). Genus III. *Agrobacterium* Conn 1942. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg, N.R. and Holt, J.G. eds.). Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore. pp. 244-254.
- 牧野孝弘・森田 儔 (1985). 静岡県内バラ園から分離されたバラ根頭がんしゅ病菌の生理型と Agrocin 84 感受性. *静岡農試研報* 30 : 45-52.
- Messens, E., Lenaerts, A., Hedges, R.W. and Van Montagu, M. (1985). Agrocipopine A, a phosphorylated opine is secreted from crown gall cells. *EMBO J.* 4 : 571-577.
- Michel, M-F., Brasileiro, A.C.M., Depierreux, C., Otten, L., Delmotte, F. and Jouanin, L. (1990). Identification of different *Agrobacterium* strains isolated from the same forest nursery. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 : 3537-3545.
- Moore, L.W., Kado, C.I. and Bouzar, H. (1988). *Agrobacterium*. In *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria* (Schaad, N.W. ed.). 2nd ed. APS Press, St. Paul. pp. 16-36.
- 太田光輝・西山幸司 (1984). 花き類の根頭がんしゅ病に関する研究 I. 病害の発生ならびに病原細菌の細菌学的性質. *日植病報* 50 : 197-204.
- 奥野千恵子 (1976). 統多変量解析法 (奥野忠一ほか編). 日科技連出版社, 東京. pp. 115-146.
- Ophel, K. and Kerr, A. (1990). *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40 : 236-241.
- Otten, L. and Schilperoort, R. (1978). A rapid micro scale method for the detection of lysopine and nopaline dehydrogenase activities. *Biochim. Biophys. Acta* 527 : 497-500.
- Panagopoulos, C.G. and Psallidas, P.G. (1973). Characteristics of Greek isolates of *Agrobacterium tumefaciens* (E.F. Smith & Townsend) Conn. *J. Appl. Bacteriol.* 36 : 233-240.

22. Panagopoulos, C.G., Psallidas, P.G. and Alivizatos, A.S. (1978). Studies on biotype 3 of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens*. In Proc. 4th Int. Conf. Plant Pathol. Bacteriol., Angers. pp. 221-228.
23. Paulus, F., Huss, B., Bonnard, G., Ride, M., Szegedi, E., Tempe, J., Petit, A. and Otten, L. (1989). Molecular systematics of biotype III Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. Mol. Plant-Microbe Interact. 2 : 64-74.
24. Petit, A. and Tempe, J. (1985). The function of T-DNA in nature. In Molecular Form and Function of the Plant Genome (Van Vloten-Doting, L. et al. eds.). Plenum Press, New York and London. pp. 625-636.
25. Ream, W. (1989). *Agrobacterium tumefaciens* and interkingdom genetic exchange. Annu. Rev. Phytopathol. 27 : 583-618.
26. Savka, M.A., Ravillion, B., Noel, G.R. and Farrand, S.K. (1990). Induction of hairy roots on cultivated soybean genotypes and their use to propagate the soybean cyst nematode. Phytopathology 80 : 503-508.
27. Sawada, H., Ieki, H. and Takikawa, Y. (1990). Identification of grapevine crown gall bacteria isolated in Japan. Ann. Phytopath. Soc. Japan 56 : 199-206.
28. Sawada, H. and Ieki, H. (1992). Phenotypic characteristics of the genus *Agrobacterium*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 58 : 37-45.
29. Sawada, H., Takikawa, Y. and Ieki, H. (1992). Fatty acid methyl ester profiles of the genus *Agrobacterium*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 58 : 46-51.
30. Sawada, H., Imada, J. and Ieki, H. (1992). Serogroups of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 determined using somatic antigens. Ann. Phytopath. Soc. Japan 58 : 52-57.
31. Sawada, H., Imada, J. and Ieki, H. (1992). Evaluation of serodiagnosis for differentiating serogroups of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. Ann. Phytopath. Soc. Japan 58 : 91-94.
32. Szegedi, E., Czako, M., Otten, L. and Koncz, C.S. (1988). Opines in crown gall tumours induced by biotype 3 isolates of *Agrobacterium tumefaciens*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 32 : 237-247.
33. Wabiko, H., Kagaya, M., Kodama, I., Masuda, K., Kodama, Y., Yamamoto, H., Shibano, Y. and Sano, H. (1989). Isolation and characterization of diverse nopaline type Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens* from Japan. Arch. Microbiol. 152 : 119-124.
34. Yanofsky, M., Lowe, B., Montoya, A., Rubin, R., Krul, W., Gordon, M. and Nester, E. (1985). Molecular and genetic analysis of factors controlling host range in *Agrobacterium tumefaciens*. Mol. Gen. Genet. 201 : 237-246.