

[微探収報 8 : 17-24, 1996]

## オーストラリアにおける *Agrobacterium* 属細菌 の探索・収集

農業環境技術研究用 環境生物部 寄生菌動態研究室

澤田 宏之

静岡県農業試験場 病害虫部 病害研究室

牧野 孝宏\*

### Survey and Collection of *Agrobacterium* in Australia

Hiroyuki SAWADA

Laboratory of Pathology,

Department of Microbiology,

National Institute of Agro-Environmental Sciences

Kannondai 3-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

Takahiro MAKINO\*

Laboratory of Plant Pathology,

Shizuoka Agricultural Experiment Station

678-1, Toyoda-cho, Iwata-gun, Shizuoka 438, Japan

---

\* 現所属：静岡県 農政部 農業技術課

Present Address: Agricultural Technology Division, Agricultural Affairs Department, Organization of the Shizuoka Prefectural Government.

## 1. 目的

*Agrobacterium* 属細菌に関しては、保持しているプラスミドが遺伝子のベクターとして利用できることから、プラスミド関連の研究が大変注目され、その利用技術の開発が盛んに行われている(松本・町田, 1990)。しかし、病害を防除するという植物病理学の立場からみると、染色体DNA上にコードされた性質にも大きな関心を払わざるを得ない。すなわち、病気をおこす主因はプラスミドであるものの、発病に至るまでの過程で染色体DNAに関連した性質も重要な役割を果たしているからである。染色体DNA上にコードされた性質に注目するもう1つの理由として、検出・判別の指標として利用しやすいということがあげられる。すなわち、植物病原細菌では、染色体DNAに関連した生理・生化学的性質、血清学的性質や菌体脂肪酸組成などが検出や同定によく利用されており、病気の診断や病原細菌の生態学的な研究へと活用されている。しかし、*Agrobacterium* 属細菌はこれらの性質に関して変異に富んでおり、複数の系統に分化している。しかも、類別された各系統は生理型(biovar)として整理されているものの、その定義や境界には不明瞭な部分が多数残されている(Kersers and De Ley, 1984)。さらに、biovar間の相違点が十分に明らかにされていないこともあり、実用的な検出・判別技術を確立することが困難であるとされてきた(Kersers and De Ley, 1984; Bradbury, 1986)。

また、前述したように、植物の形質転換における遺伝子のベクターとして本菌の持つTiプラスミドが盛んに利用されてはいるが、Tiプラスミドに関しても系統間で変異があり、形質転換の効率や適用可能な植物種に差があることが明らかとなってきた(松本・町田, 1990)。従って、いろいろな植物に対して効率よく形質転換を行なうためには、異なる系統のプラスミドを収集し、目的に応じて選択できるような態勢をとる必要がある。

今回の探索・収集では、検出・判別技術開発に必要な特異的性状を運び出すための実験材料、および形質転換用のベクターの確保を目的として、遺伝的に多様な本属菌が存在すると考えられているオーストラリアにおいて根頭がんしゅ病組織を採集し、病原細菌を分離することを試みた。

## 2. 探索の概要

平成7年3月8日から3月22日まで、第1表および第1図に示した行程でオーストラリアのアデレード周辺を探査し、根頭がんしゅ病菌分離用サンプルを以下のように採集した(第2表)。採集中あたっては、アデレード大学、Peter J. Murphy 博士に助言と援助をいただき、車の貸与と大学の施設の利用についても便宜をはかっていただいた。

a) 3月10日 サウス・オーストラリア州 Willunga周辺はアーモンドの栽培が盛んであった。10~40年生の木の地際に直径数cmから30cmくらいの大きなかんしゅが、園によってはかなりの頻度で形成されていた(口絵写真参照)。乳白色~淡褐色で不整形のがんしゅ組織を各樹から1つずつ削り取り、合計10個採集することができた。

b) 3月11日 サウス・オーストラリア州 Mount Compass付近のユーカリの巨木に、直径20~50cmくらいのこぶが形成されていたので、削り取って採集した。なお、この日探索した McLaren Vale周辺のブドウ園では、がんしゅ病に罹病したものはまったく見あたらなかった。

c) 3月12日 サウス・オーストラリア州アデレード市内のアデレード植物園周辺（ノーステラス地区）は緑が豊富であり、ユーカリをはじめとして樹種も変化に富んでいたが、根頭がんしゅ病の症状を示すものは認められなかった。

d) 3月14日 サウス・オーストラリア州 Barossa Valley 周辺はワイン生産が盛んであり、ブドウ園が多数点在していた。しかし、探索した園では根頭がんしゅ病に罹患したものはまったく認められなかった。2年前にかんしゅ病が発生した後、廃園にされた所があったので、ほ場の土を採取した。

e) 3月17日 サウス・オーストラリア州アデレード市、University of Adelaide の Waite Campus 内を探索したところ、バラの根元に黒褐色で不整形のがんしゅが形成されていたので、罹病組織を削って採取した。

### 3. 収集成果

#### (1) 分離

根頭がんしゅ病菌は、サンプルを採取後、時間が経過するにしたがって菌密度が低下するとともに、雑菌が増えるために、分離が困難になるといわれている。そこで、サンプルを採取した後、その日のうちにアデレード大学の Murphy 研究室に持ち帰ってただちに冷蔵し、当日かあるいは翌日には分離を行うようにした。具体的な分離方法は以下の通りである。

採取した根頭がんしゅ病材料から新鮮ながんしゅ組織を無菌的に切り出し、滅菌水で洗浄後、ペプトン水中でできるだけ磨碎して懸濁液を作った。これを King B 平板培地に画線培養し、28°C で 3 ~ 4 日間培養した。形成されたコロニーの中から、蛍光色素を産生せず、円形、全縁、平滑で湿光を帯びた半透明～白色のものを選び、滅菌したつまようじを用いてシングルコロニーを新しい King B 平板培地に穿刺して移植した。これを 28°C で培養した後、日本に持ち帰った。帰国後、各コロニーを新しい King B 平板培地に再度画線培養し、形成されたシングルコロニーを YEM 斜面培地に移植し、28°C で 2 日間培養した。このようにして、前項で述べた分離用サンプル(第 2 表)から 77 菌株を得ることができ、以下の試験に供した。

#### (2) 病原性

分離した 77 菌株の病原性は、23°C の温室で育成したトマト（品種：ポンテローザ）の茎、およびベンケイソウの茎と葉に接種することによって検定した。接種源として、被検菌株を YEM 斜面培地に 28°C で培養後、1 白金耳量の菌体をかき取って滅菌水 2 ml に懸濁したものを用いた。この懸濁液を、接種植物の茎に対しては各節間に注射器（針の直径：0.45mm）で 5 ~ 8 か所ずつ、葉に対しては葉肉部分に 5 ~ 8 か所ずつ単針付傷接種した。接種後、23°C に保たれた温室内で 30 日間にわたって、経過を観察した。ベンケイソウの茎と葉に形成されたがんしゅに関しては、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）形成の有無を指標として、形状に関する調査も行なった。

供試した分離菌 77 菌株のうち、Willunga で採取したアーモンドのがんしゅ由来の 5 菌株(1-2-6, 1-2-8, 1-2-27, 1-2-39 および 1-2-44；第 3 表)については、トマトの茎およびベンケイソウの茎と

葉にがんしゅを形成し、菌株間で病原性の強弱に差は認められなかった。いずれの植物でも接種後5～7日目頃から接種部位に病徵が現れた。はじめは乳白色の小さな隆起として認められたがんしゅは時間の経過とともに肥大した(口絵写真参照)。判定時におけるがんしゅの大きさはいずれの植物でも長径が3 mm以上となった。

ベンケイソウにおけるがんしゅの形状に関しては、これら5菌株は均一なパターンを示した。すなわち、いずれの菌株も乳白色で平滑な形状のがんしゅを誘導した。また、ベンケイソウの葉では奇形種の形成が、茎については不定根の誘導と奇形腫の形成のいずれもが観察された(口絵写真参照)。

これら5菌株以外の72菌株については、残念ながらトマトとベンケイソウに対する病原性がまったく認められなかつたため、非病原菌と判定した。

### (3) Tiプラスミドの確認

前項で病原性が確認できた5菌株について、目的とするTiプラスミドを保持しているかどうかを、Tiプラスミドに特異的なプライマー(VCF/VCR:Sawada et al., 1995)を用いたPCRによって確認した。すなわち、これらの菌株からDNAを抽出し、VCF/VCRプライマーセットを用いてTiプラスミドのvir領域の一部を增幅後、2%アガロースゲルで泳動して産物を確認した。その結果、これら5菌株のいずれからも、予想されるサイズ(約700bp)と一致する単一の強いシグナルが得られ、菌株間で增幅パターンに差異は認められなかつた。前項でがんしゅ形成能が確認できたことと、このPCRの結果から、これらの菌株はいずれも目的とするTiプラスミドを保持しているものと判断した。

### (4) 同定

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol. 1 (1984)では、*Agrobacterium*属細菌は植物に対する病原性と病徵に基づいて4つの種(*A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. radiobacter*および*A. rubi*)に分類されている(Kersters and De Ley, 1984)。さらに、*A. rubi*以外の3種は、染色体DNA上にコードされた生理・生化学的性質などに基づいて3つのbiovar(biovar 1, 2および3)に細分されている(Kersters and De Ley, 1984)。したがって、*Agrobacterium*属細菌を同定するためには、接種試験によって病原性と病徵を確認して種の識別を行なつた後、さらに細かい性状を明らかにしてbiovarを特定するという2段階のステップが必要となる(Kersters and De Ley, 1984; Bradbury, 1986; Schaad, 1988)。

上記の5菌株はグラム陰性、好気性で運動性を有していた。グルコースを酸化的にのみ分解して酸を产生し、グルコース含有培地上で菌体外多糖質を旺盛に产生した。さらに、いずれの供試培地においてもガスおよび色素を产生せず、カタラーゼ活性を有し、トマトおよびベンケイソウにがんしゅを形成した。以上の性状から、これらは*Agrobacterium tumefaciens*であることが明らかである。

ここでは、さらにbiovarを特定するために脂肪酸組成の分析を行なつた。斜面培養菌の1白金耳量(湿菌体約50mg)を用い、Sasser(1990)の方法にしたがつて脂肪酸メチルエステルを調整した。分析にはFID付ガスクロマトグラフ(MIDI automated Microbial Identification System)を用

いた。分析の結果、供試した5菌株はいずれも同様なパターンを示すことが明らかとなった。直鎖のモノ不飽和酸としては18:1の含量の多いことが認められた。シクロプロパン酸については19:0 CYCLOの組成比が高かった。3-ヒドロキシ酸については、15:0 ISO 3OHのピークが特徴として認められた。一方、18:1 3OHに相当するピークは検出できなかった。以上の脂肪酸組成の特徴は biovar 2と一致していることから、これら5菌株は *Agrobacterium tumefaciens* biovar 2と同定した。

#### 4. 所感

今回の探索では、アーモンドのり病組織から目的とする *Agrobacterium tumefaciens* biovar 2を分離することができた。しかし、広範囲に探索を行なったにも関わらず、がんしゅ病のり病サンプルがなかなか見つからなかったり、サンプルから思うように目的とする菌が分離できなかつたと、必ずしも順風満帆とはいえない探索・収集行であった。目につきにくい地際や地下部に発生する病気であること、菌の生育が遅い上に雑菌が入り込みやすい土中由来のサンプルが多いことなどが原因であると思われる。しかし、順調に仕事が進まず、精神的に参ってしまいそうな時でも、二人で互いに励まし合いながら探索を続けることができた。二人分の予算を確保していただいた関係者の方々に深く感謝申し上げたい。

今回の探索では、加来久敏氏（農業生物資源研究所）、Peter J. Murphy 氏（アデレード大学）、伊予住浩幸氏（静岡県農業試験場）をはじめ、農林水産技術会議事務局、農業生物資源研究所微生物遺伝資源担当部門、アデレード大学、静岡県農業試験場の多くの関係者の方々に大変お世話いただき、探索・収集を無事終えることができた。心からお礼申し上げます。

#### 参考文献

- 1) 松本省吾・町田泰則. 1990. Ti プラスミドベクターによる植物への遺伝子導入. 蛋白質・核酸・酵素. 35: 190-203.
- 2) Kersters, K. and J. De Ley. 1984. Genus III *Agrobacterium* Conn 1942. In N.R. Krieg and J. G. Holt (eds.) Bergey's manual of systematic bacteriology vol. 1. pp. 244-254. Williams & Wilkins, Baltimore.
- 3) Bradbury, J.F. 1986. *Agrobacterium* Conn 1942. In Guide to plant pathogenic bacteria. pp. 6-15. CAB International Mycological Institute, Kew.
- 4) Sawada, H., H. Ieki, and I. Matsuda. 1995. PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains. Appl. Environ. Microbiol. 61: 828-831.
- 5) Schaad, N.W. 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 2nd ed. Amer. Phytopath. Soc. Press, St. Paul.
- 6) Sasser, M. 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. In Z. Klement *et al.* (eds.) Methods in phytobacteriology. pp. 199-204. Akadimeai Kiado, Budapest.

## Summary

Galls were observed on the trunk of almond in Willunga, South Australia. The galls were rough and light-to dark-brown in color and covered with dead and flaky tissues. The inner part of the galls contained a white and fleshy callus from which the causal bacteria, *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend) Conn were isolated. These strains (1-2-6, 1-2-8, 1-2-27, 1-2-39 and 1-2-44) were highly aggressive in tomato and kalanchoe. Using the universal primer set (VCF/VCR) for PCR analysis to detect Ti plasmids, DNA fragments of 730-bp in length were amplified from them, indicating that they contain the plasmids. They were assigned to *A. tumefaciens* biovar 2 based on their phenotypic characteristics and fatty acid methyl ester (FAME) profiles.

第1表 探索・収集の行程（オーストラリア、1995.3.8～3.22）

月日	行 程	行 動 内 容
3. 8 成田——		移動（空路、機中泊）
9 シドニー——アデレード		移動（空路）、採集行程打ち合わせ
10 アデレード—Willunga—アデレード		アデレード大学挨拶および協力依頼、探索・収集（アーモンド）
11 アデレード—McLaren Vale—Mount Compass —Glenelg—アデレード		探索・収集（ブドウ、ユーカリ）、収集物整理
12 アデレード（ノーステラス地区周辺）		探索・収集（植物園周辺）、実験の打ち合わせおよび準備
13 アデレード		分離実験
14 アデレード—Barossa Valley—アデレード		探索・収集（ブドウ）
15 アデレード		分離実験、 <i>Agrobacterium</i> 研究者と情報交換
16 アデレード		分離および移植、保存、大学およびCSIROの研究施設見学
17 アデレード（University of Adelaide, Waite Campus およびその周辺）		探索・収集（バラ）、 <i>Agrobacterium</i> 研究者と情報交換
18 アデレード		分離実験、大学関係者と懇談会
19 アデレード		分離および移植、保存、収集物整理、結果の取りまとめ、大学関係者挨拶
20 アデレード—シドニー		移動（空路）
21 シドニー—成田		移動（空路）、輸入検疫受検
22 成田—東京		移動、農林水産省報告

第2表 試料採取月日、宿主名および採取場所

サンプル番号	採取月日	宿主名	採 集 場 所	発 病 状 況 そ の 他
1-1~7	3. 10	アーモンド	Willunga, South Australia	10~40年生の木の地際に形成された直径数cm~30cmのこぶ
1-8~10	3. 10	アーモンド	Willunga, South Australia	10~40年生の木の地上50~100cm付近の幹に形成されたこぶ
2-1~3	3. 11	ユーカリ	Mount Compass, South Australia	地上部に形成された直径20~50cmくらいのこぶ
3	3. 14	ブドウ	Barossa Valley, South Australia	根頭がんしゅ病発生跡地の土
4	3. 14	ブドウ	Barossa Valley, South Australia	根頭がんしゅ病発生跡地の土
5	3. 14	ブドウ	Barossa Valley, South Australia	根頭がんしゅ病発生跡地の土
6-1~3	3. 17	バラ	Adelaide, South Australia	根元に形成されていた黒褐色で不整形のこぶ

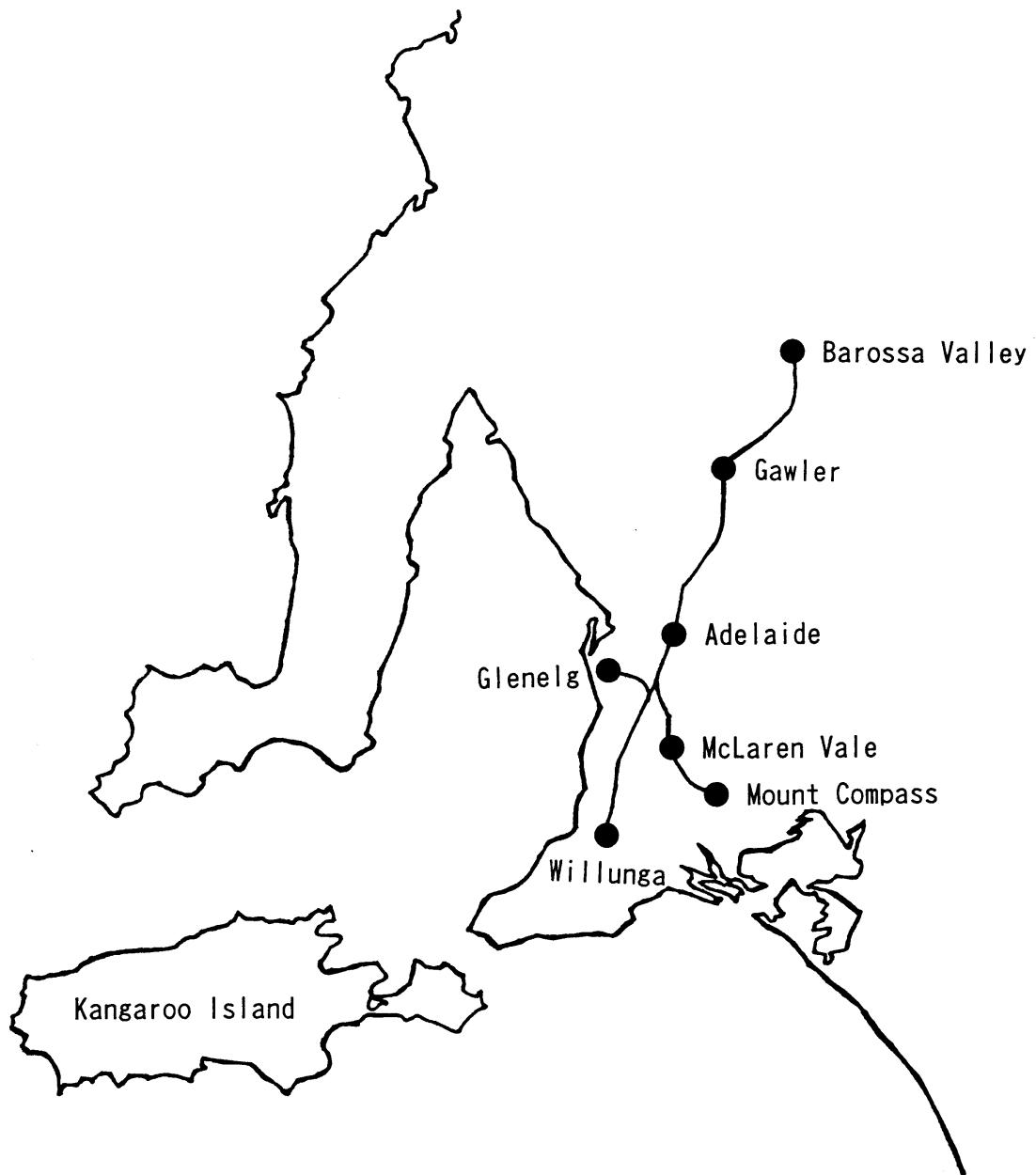
第3表 Willunga 産アーモンド根頭がんしゅ病菌<sup>a)</sup>の特性

トマトに 対する病原性	ベンケイソウにおけるがんしゅの形状						PCR(VCF/VCR) による増幅 <sup>b)</sup>	脂肪酸組成				
	茎			葉				18:1 19CYC 15:0 ISO 3OH 18:1 3OH				
	形状	不定根	奇形腫	形状	不定根	奇形腫		+	+	+	-	
+	乳白色、平滑	+	+	乳白色、平滑	-	+	+	+	+	+	-	

a) Willunga のアーモンド（10~40年生）の地際に形成されていたがんしゅからの分離菌

(菌株番号: 1-2-6, 1-2-8, 1-2-27, 1-2-39および1-2-44)。

b) Ti プラスミドに特異的な約700bp のDNA 断片の増幅の有無。



第1図 アデレード周辺における探索・収集径路

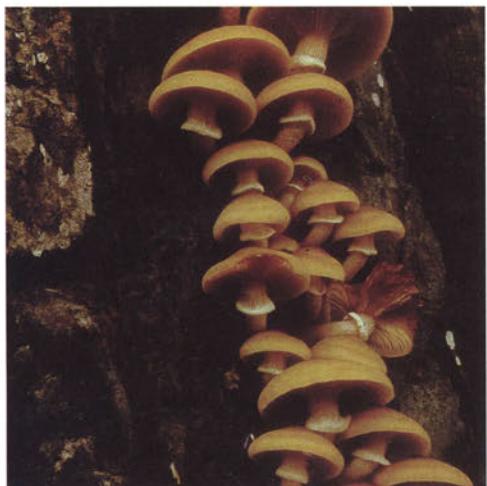
# 微生物の探索収集プロフィール



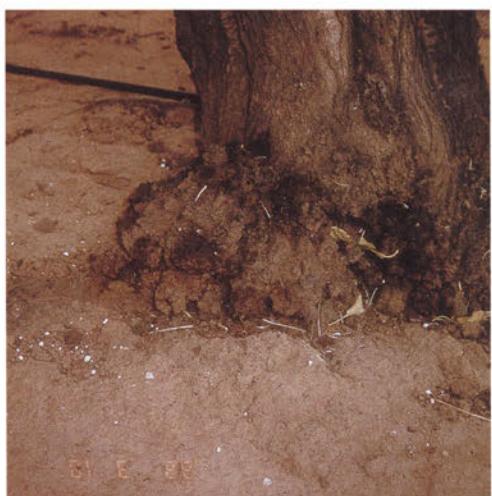
北海道で収集した萎黄症状株  
(アカクローバてんぐ巣病)



罹病した植物内に観察される MLO 粒子  
(アカクローバてんぐ巣病内)



福島県柳津町で採集した子実体  
(ナラタケ属)



根頭がんしゅ病の病徵  
(アーモンドの地際に形成されたがんしゅ,  
サウスオーストラリア州, Willunga)



根頭かんしゅ病菌の病原性検定  
(ベンケイソウの茎に形成されたがんしゅ)



イネ病原微生物の探索収集  
(スリランカ, ヌワラエリヤ周辺)