Microbiol. Cult. Coll. **30**(1): 13-27, 2014

植物病原性 *Rhizobium* 属細菌の分類の変遷とジーンバンクにおける対応

澤田宏之*，山﨑福容，竹谷　勝，青木孝之

独立行政法人農業生物資源研究所（NIAS）遺伝資源センター　〒305-8602　茨城県つくば市観音台 2-1-2

1. はじめに

根頭がんしゅ病と毛根病は，いずれも果樹をはじめとするさまざまな農作物に大きな被害をもたらす重要病害である（澤田，1994, 2006；澤田・畔上，2014；塩見ら, 1987）. これら両病害の病原細菌（根頭がんしゅ病菌と毛根病菌）は，70 年以上に渡って *Agrobacterium* 属の主要メンバーとして扱われてきた（Conn, 1942；Young *et al*., 2005）．ただし，*Agrobacterium* 属の分類体系には，いくつかの深刻な問題が属・種・変種レベルにまたがって複雑に絡み合いながら存在している（澤田，2007；澤田ら，2007；澤田・畔上，2014）．そこで，それらの問題を順次，解消していくことを目指して，さまざまな提案が段階的になされてきた．これらの提案のうち，現時点で有効なものを体系的に整理すると，表 1 に示した A, B, C の 3 つの分類体系（以後,「システム」と表記する）に集約することができる．

これら 3 つのシステムについては，以前，その概要を本誌でも紹介したところである（澤田，2007）．ただし，このうちのどれが主流になるのかについては，その時点では予想ができなかった. しかし, 最近になってその情勢に変化が生じつつあり，それに伴って農業生物資源ジーンバンク事業でも対応が求められるようになってきた.

本稿では，3 つのシステムについて改めて概説した上で, 分類をめぐる情勢の変化について解説を試みた. さらに，そのような情勢の変化を踏まえ，ジーンバンクでどのように対応してきたのかを紹介したい. なお, C システムの下では，根頭がんしゅ病菌や毛根病菌は以下の 7 つの菌種に含まれることになる（表 1C の 1 ～ 7）：*R. radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. vitis*, *R. rubi*, *R. larrymoorei*, *R. skierniewicense*, *R. nepotum*（澤田，2007；Pulawska *et al*., 2012a, 2012b）. そこで，以後，これら 7 菌種のことを「植物病原性 *Rhizobium* 属細菌」と便宜的に総称することにする.

*Corresponding author
E-mail: sawada@affrc.go.jp

2. 並立する 3 つの分類体系

1）病原性に基づいた人為分類（表 1A）

A のシステムは 1942 年に「*Agrobacterium* 属」が設けられた時点で成立した体制であり,「病原性」に基づいて属と種が定義されている（表 1A）（Conn, 1942; Allen & Holding, 1974）. すなわち, 根頭がんしゅ病菌は「*A. tumefaciens*」，毛根病菌は「*A. rhizogenes*」，*Rubus* 属植物由来の根頭がんしゅ病菌は「*A. rubi*」とされた．なお，これらの病原菌と生理・生化学的な性質では区別できないものの，病原性の認められない細菌が環境中から分離されることから，これを「*A. radiobacter*」とし，種のレベルで病原菌とは区別するという措置がとられている.〔*A. larrymoorei*（表 1A の 5）はさらに後になってから記載された.〕

一方，その後の研究によって，*A. rubi* 以外の 3 種の内部には，生理・生化学的性質の異なる複数の系統が存在していることが明らかになってきた（Holmes & Roberts, 1981）．そこで，それらの系統を整理して記載するために，それぞれの種内に変種レベルの分類階級である「生理型（biovar）」が設けられている（表 1A）（Kersters & De Ley, 1984）.

2）種レベルへの系統分類の導入（表 1B）

根頭がんしゅ病菌や毛根病菌の病原性に関する研究が進むにつれ，これらが保持している主要な病原性関連遺伝子が，腫瘍誘導〔tumor-inducing（Ti）〕プラスミド，あるいは，発根〔root-inducing（Ri）〕プラスミド（以後, これらをまとめて「病原性プラスミド」と表記する）に存在していることや，これら病原性プラスミドの多くが自己伝達性であることが明らかになってきた（Young *et al*., 2005；澤田 , 2006）．したがって，プラスミドの有無に左右されるような「病原性」を種レベルの分類基準として用いている限り（A システム），プラスミドの獲得や脱落が起こるたびにそ

表 1　植物病原性 *Rhizobium* 属細菌をめぐる 3 つの分類体系の対応関係 [a]

分類体系（システム）	A	B	C
特徴 [b]	病原性に基づいた人為分類	種レベルへの系統分類の導入	属レベルへの系統分類の導入
代表的な文献 [c]	BMSB 第 1 版 （Kersters & De Ley, 1984）	BMSB 第 2 版 （Young *et al*., 2005）	IJSEM 51: 89–103 （Young *et al*., 2001）
該当する分類群 [d]			
1	*A. tumefaciens* biovar 1 *A. rhizogenes* biovar 1 *A. radiobacter* biovar 1	*A. tumefaciens* (Ti) *A. tumefaciens* (Ri) *A. tumefaciens* (nonpathogenic)	*Rhizobium radiobacter* (Ti) *Rhizobium radiobacter* (Ri) *Rhizobium radiobacter* (nonpathogenic)
2	*A. tumefaciens* biovar 2 *A. rhizogenes* biovar 2 *A. radiobacter* biovar 2	*A. rhizogenes* (Ti) *A. rhizogenes* (Ri) *A. rhizogenes* (nonpathogenic)	*Rhizobium rhizogenes* (Ti) *Rhizobium rhizogenes* (Ri) *Rhizobium rhizogenes* (nonpathogenic)
3	*A. tumefaciens* biovar 3 *A. radiobacter* biovar 3	*A. vitis* (Ti) *A. vitis* (nonpathogenic)	*Rhizobium vitis* (Ti) *Rhizobium vitis* (nonpathogenic)
4	*A. rubi*	*A. rubi* (Ti)[e]	*Rhizobium rubi* (Ti)[e]
5	*A. larrymoorei*	*A. larrymoorei* (Ti)[e]	*Rhizobium larrymoorei* (Ti)[e]
6	未記載	未記載	*Rhizobium skierniewicense* (Ti)[e]
7	未記載	未記載	*Rhizobium nepotum* (Ti) *Rhizobium nepotum* (nonpathogenic)

[a] 同じ行にある学名同士は全く同じ実体を指し示している．したがって，ある菌株に付けられた学名は，同一行上の他の学名にそのまま読み替えることができる．
[b] それぞれの分類体系の特徴を示した．詳細については本文 2 章の各項目を参照．
[c] 各分類体系について説明している最も代表的な文献を挙げた．BMSB: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology，IJSEM: International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology
[d] 根頭がんしゅ病菌/毛根病菌をメンバーとして含む種（= 植物病原性 *Rhizobium* 属細菌）として，現時点で 7 種が記載されている（ここでは 1〜7 として表した）．
[e] 種内には今のところ根頭がんしゅ病菌 (Ti) のみが報告されているが，非病原菌（nonpathogenic）の存在も予想される．

の菌株の分類上の所属（種）が変わってしまう，という問題が生じることになる（Kersters & De Ley, 1984）．

一方，A システムにおいて種内変異を記載するために設けられた「biovar」を，コアゲノムに関連した表現型や遺伝型（= 近年の細菌分類学において分類指標として用いられている）に基づいて評価すると，種のレベルで扱うべき分類群であることが明らかとなってきた（Kersters & De Ley, 1984; Sawada & Ieki, 1992; Sawada *et al*., 1992a, 1992b；澤田，1994）．そこで，各 biovar を種レベルの分類群へと格上げすることが，筆者らなどによって 1990 年代に順次提案されていった（Ophel & Kerr, 1990; Sawada *et al*., 1993）．

3）属レベルへの系統分類の導入（表 1C）

Rhizobium 属は「根粒菌をメンバーとして含む種」を 1 つにまとめることによって設けられた属であり，*Agrobacterium* 属とは近縁な関係の分類群であると考えられていた（Conn, 1942）．ところが，さまざまな指標を用いて分子系統解析を行ってみると，これら 2 つの属は 1 つの単系統群（以後，この単系統群を「*Rhizobium* clade」と表記する）としてまとまってしまうこと，しかも，*Rhizobium* clade の内部で両属のメンバーは混在し，属単位でまとまるような傾向は認められないことが明らかとなってきた（図 1）（Sawada *et al*., 1993, 2003；一幡ら，2006；Young *et al*., 2001, 2005）．

一方，*Rhizobium* 属細菌の保持している共生（Sym）プラスミドを *Agrobacterium* 属細菌に導入すると，根粒を形成して共生窒素固定を行うようになることや，逆に Ti プラスミドが導入された *Rhizobium* 属細菌ががんしゅ形成能を獲得することが実験的に確認されるようになってきた（Kuykendall *et al*., 2005; Young *et al*., 2005 など）．さらに，このようなプラスミドの交換が，*Rhizobium* clade のメンバー間で自然環境中においても実際に行われていることを示すデータが，分子生態学の進歩とともに続々と報告されつつある（Velazquez *et al*., 2005；Weller *et al*., 2006 など）．その結果，病原性・共生プラスミドの獲得，交換や脱落といったイベントが，*Rhizobium* clade のメンバー

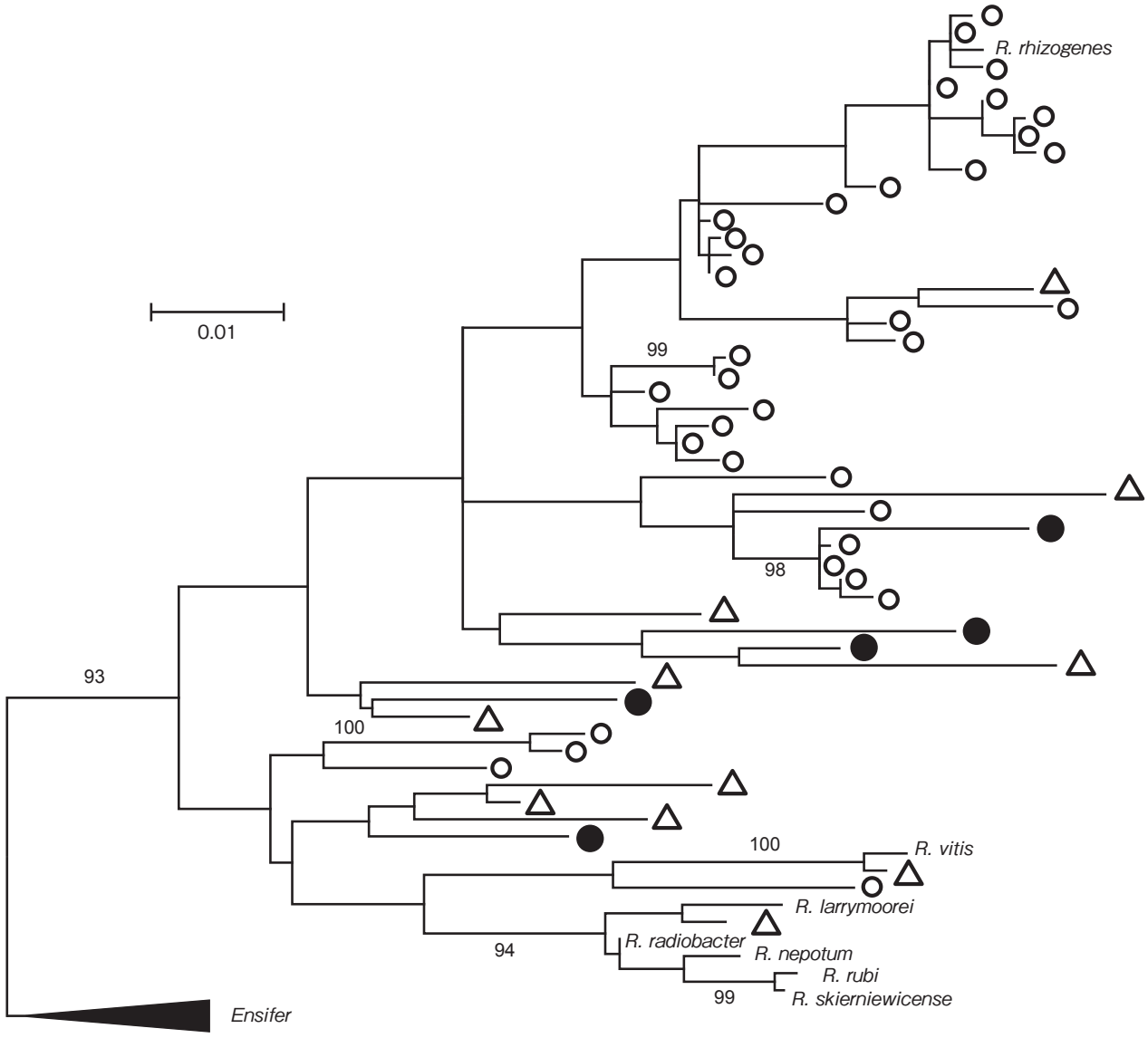

図 1　16S rDNA に基づく *Rhizobium* 属細菌（*Rhizobium* clade）の最尤系統樹

Rhizobium 属の 58 菌種を内群，*Ensifer* 属の 13 菌種を外群として用い，ガンマ補正した GTR モデル（Tavare, 1986）の下で最尤系統樹（Felsenstein, 1981）を構築した．本図には内群（*Rhizobium* clade）の部分のみを示してある．ブートストラップ値は 90％以上のみを表示した．なお，「植物病原性 *Rhizobium* 属細菌（7 菌種）」については学名を表記してあるが，「それ以外の菌種」は以下のように示した：○，根粒菌（35 菌種）；●，接種試験によって根粒形成能が確認されている環境微生物（5 菌種）；△，根粒形成能が確認できない環境微生物（11 菌種，表 2 参照）．

によって進化の過程で繰り返されてきたために，これらのプラスミドの保有菌が単系統群内で混在するような状況（図 1）がもたらされたのではないか，と考えられるようになってきた（Kuykendall *et al*., 2005）．このようなモザイク状の *Rhizobium* clade（図 1）の中から，特定のプラスミドを有している菌が人為的に拾い上げられ，属としてまとめられたのが「従来までの分類体系 =A や B のシステム」ということになる．

筆者らは，このような典型的な人為分類を，「系統分類に沿った合理的な体系」へと再構築することを目指してきた．そして，現行の「*Agrobacterium* 属と *Rhizobium* 属」（すなわち，*Rhizobium* clade の全体）を 1 つに統合し，新生「*Rhizobium* 属」とすることを提案した（表 1C）（Young *et al*., 2001）．したがって，この C システムにおける新生「*Rhizobium* 属」は，プラスミドの有無には左右されない「分子系統ベース

の分類群」ということになる．

なお，表1のC1に相当する分類群（種）には，かつての *A. radiobacter* と *A. tumefaciens* の基準株がいずれも含まれている．ただし，「*radiobacter*」の方に命名上の優先権があるため，C1には「*Rhizobium radiobacter*」という学名を当てるのが妥当であると判断した（Young *et al.*, 2001）．

3. Cシステムの利点

分類体系にとって，科学的なデータに基づいた「合理性」を備えていることはきわめて重要な前提であるが，分類のユーザーにとって「使いやすい道具」であることも大切な要件といえるのではないだろうか．Cシステムが合理的であることは前章でも述べたが，ここでは主に「道具としての利便性」の視点からも評価してみたい．

1）学名の拠り所が明示されている

AとBのシステムでは，まったく同じ学名（*A. tumefaciens* と *A. rhizogenes*）が用いられている箇所があるが（表1においてそれぞれ緑と黄色で示してある），システムによって同じ学名が異なる実体を指し示していることに注意が必要である．すなわち，「*A. tumefaciens*」という学名は，Aシステムでは「根頭がんしゅ病の病原菌である」ということを示している．一方，Bにおける「*A. tumefaciens*」は「遺伝的なまとまり」を示しており，その種内には「根頭がんしゅ病菌」「毛根病菌」「非病原菌」のいずれもが含まれている．そのため，どちらのシステムに依拠しているのかをはっきりと説明せずにこれらの学名を使うと，内容が誤って伝わる危険がある（澤田ら，2007）．一方，Cシステムでは属名（*Rhizobium*）によってその拠り所が明示されているため，そのような説明がなくても，学名の指し示す内容について誤解を与える心配はない．

2）分類が安定する

Cシステムにおける属や種の定義は，「病原性」や「共生窒素固定能」といったプラスミドに関連した性質には縛られていない．そのため，プラスミドの出入りに伴って「病原性」や「共生窒素固定能」に関わる特性に変化が生じても，当該菌株の学名が変わってしまうことはなく，分類が安定するという利点がある．

3）環境微生物が記載できる

Rhizobium clade（図1）の中には，「病原性」や「共生窒素固定能」の認められない菌株も多数含まれている（本稿では，以後，これらを便宜的に「環境微生物」と表記する．このうちの代表的なものは図1に△で示した）（Saidi *et al.*, 2011など）．しかし，AやBのシステムにおける *Agrobacterium* 属と *Rhizobium* 属は，それぞれ「病原性」と「共生窒素固定能」に基づいて定義されているので，どちらの属もこのような環境微生物をメンバーとして受け入れることはできない．そのため，多数の環境微生物が「所属不明菌」のまま長年放置されてきた（澤田ら，2007）．一方，Cシステムにおける新生 *Rhizobium* 属は「分子系統ベースの分類群」であるため，そのような環境微生物でも *Rhizobium* clade（図1）に入りさえすれば，属のメンバーとして正式に記載することが可能である．

4）分子同定が適用できる

指標遺伝子の配列データを用いて相同性検索や分子系統解析を行い，その結果に基づいて被検菌を同定するという手法（いわゆる分子同定）が，分子生態学分野を中心として広く利用されている．しかし，A，Bのシステムでは，分子系統に基づいて分類体系が構築されていないため，この同定手法を用いても適切な判定結果が得られないことがある（澤田ら，2007）．例えば，新たに分離された根粒菌に対して分子同定を試みた場合，たとえ *Agrobacterium* 属の既知種と高い相同性が認められたとしても，その分離菌を「*Agrobacterium* sp.」として扱うのは，A，Bのシステムの原則と矛盾してしまうために明らかに不適切であろう．一方，Cシステムは分子系統に基づいて構築されているため，相同性検索や分子系統解析に基づいた同定手法の適用が可能である．

5）明確かつ柔軟に菌株の位置づけ・特性が表現できる

Rhizobium clade（図1）が系統分類に基づいて整理されると，病原性に関する情報（病原性タイプ）はどのようにして表示すればいいのか，という問題が逆に生じることになる．この点については，以下のように表示することが既に提案されている（表1C）(Young *et al.*, 2001, 2005)：根頭がんしゅ病菌には tumorigenic という形容語を学名の前に付けるか，あるいは，学名の後に（Ti）あるいは（Ti strain）を付記する；毛根病菌では学名の前に rhizogenic，あるいは学名の後に（Ri）や（Ri strain）を付ける；非病原

菌の場合には nonpathogenic を学名に付記する．

Ｃシステムとこの表示方法とを組み合わせれば，「分類上の位置づけ」と「病原性タイプ」のいずれについても明確かつ柔軟に表現することが可能になる．すなわち，今後，新種に相当する植物病原性 *Rhizobium* 属細菌が見出されたとしても，あるいは，既知種の中に新たな病原性タイプが出現したとしても，この仕組みを利用すれば，いずれの場合でもその位置づけ・特性が容易に表現できる．

以上のように，Ｃシステムには「道具としての利便性」と「科学的な合理性」の両面において利点があり，ＡやＢが抱えていたさまざまな問題点が解消されている．

4. Ｃシステムが使われるようになってきた

ここまで紹介してきたＡ～Ｃのシステムは，命名規約上はいずれも有効であり，どれを用いても間違いではないとされている．そのため，「いずれのシステムも並行して使われつつある」というきわめて混乱した状態が，現在もなお進行中である（澤田，2007）．ただし，少なくとも細菌分類学の分野では，最近，その混乱した状況に変化の兆しが認められるようになってきた．本章ではそのうちの代表的な事例を２つ紹介したい．

2007 年以降，Ｃシステムの下で，さまざまな環境微生物が「*Rhizobium* 属の新種」として続々と記載されるようになってきた（表 2）．これらの環境微生物はいずれも根粒形成能を有していないことが実験的に検証されており，多くの場合，*nod*/*nif* 遺伝子群を保持していないことも確認されている．しかも，*Rhizobium taibaishanense* 以外の 10 種は，根粒とはまったく異なる分離源に由来している（表 2）．すなわち，これらは「非根粒菌」であることが明らかであるにもかかわらず，*Rhizobium* 属細菌としての正式な記載が認められたのである．このことは，３章の 3）で述べたようなＣシステムの利点が活用されることによって，今まで「所属不明菌」として放置されてきた環境微生物が整理され始めた，ということを示しているのではないだろうか．分子生態学の進歩に伴ってこのような環境微生物（非根粒菌）は今後もさらに見出されるであろうことから，*Rhizobium* 属における新種記載の勢いはこれからも止まることはなさそうである．

一方で 2012 年には，ポーランドやハンガリーで新たに見出された根頭がんしゅ病菌が，「*Rhizobium* 属の新種」（*R. skierniewicense* と *R. nepotum*）という形で正式に記載された（表 1C の 6, 7）（Pulawska *et al*., 2012a, 2012b）．つまり，これらの根頭がんしゅ病菌は，いきなり *Rhizobium* 属細菌として新種記載されたために，*Agrobacterium* 属のメンバーとしての名前を持っていないのである．ＡやＢのシステムに空白（表１に「未記載」として示した）が生じてしまったことになる．

以上の事例は，今後，細菌分類学分野において，Ｃシステムが主流となる可能性のあることを示している．特に，新種の根頭がんしゅ病菌が *Rhizobium* 属

表 2　*Rhizobium* 属細菌として正式に記載された「環境微生物」[a]

学名	分離源	文献
Rhizobium aggregatum	湖	Kaur *et al.* (2011)
Rhizobium borbori	活性汚泥	Zhang *et al.* (2011a)
Rhizobium endophyticum	インゲンの組織内部（内生菌）	Lopez-Lopez *et al.* (2010)
Rhizobium pseudoryzae	イネの根圏	Zhang *et al.* (2011b)
Rhizobium pusense	ヒヨコマメの根圏土壌	Panday *et al.* (2011)
Rhizobium rosettiformans	地下水	Kaur *et al.* (2011)
Rhizobium selenitireducens	バイオリアクター	Hunter *et al.*（2007）
Rhizobium soli	土壌	Yoon *et al.* (2010)
Rhizobium subbaraonis	海辺の砂	Ramana *et al.* (2013)
Rhizobium taibaishanense	ヤハズソウの根粒	Yao *et al.* (2012)
Rhizobium tarimense	森林土壌	Turdahon *et al.* (2013)

[a] 2013 年 9 月時点で正名として認められている環境微生物を示した．これらはマメ科植物に接種しても根粒を形成しないことが確認されている．これらの系統的な位置づけは図１に△で示した．なお，ここに示した 11 菌種以外にも，環境微生物が *Rhizobium* 属細菌として続々と報告されつつある（*R. paknamense*, *R. halotolerans*, *R. naphthalenivorans*, *R. phenanthrenilyticum* など）．

細菌として正式記載されたことの意義はきわめて大きいのではないだろうか.

5. 新たな問題― *R. radiobacter* における genomovar をいかに取り扱うか

DNA-DNA 交雑実験や分子系統解析などの結果に基づいて，*R. radiobacter* はゲノム塩基配列の変異が比較的大きな菌種であることが指摘されており，少なくとも 11 個程度の遺伝的性質の異なるまとまり（genomovar，genomospecies，genomic species などと表記されてきた．本稿では以後，「genomovar」と表記する）に類別できると考えられてきた（Portier *et al*., 2006; Costechareyre *et al*., 2010; Pulawska *et al*., 2012a など）．さらに最近になって，これら genomovar に相当する菌群を，種レベルの分類群（*R. nepotum*, *R. pusense*）として記載するという提案が相次いでいる（Pulawska *et al*., 2012a; Panday *et al*., 2011）．しかし，DNA-DNA 相同値を genomovar 間で調べてみると，組み合せによっては比較的高い値が得られるとの報告もある（Portier *et al*., 2006；鈴木，2014（私信））．したがって，すべての genomovar が種レベルに相当するまとまりであるかどうかについては，*R. radiobacter* 内で網羅的に DNA-DNA 交雑実験を行うことによって慎重に検討する必要があると思われる．

今後，*R. radiobacter* 関連の菌群に対してこのような検討が進められると，将来的には，種レベルだけではなく，亜種～変種レベルも含めて，分類を変更するような提案が活発に出されるようになる可能性がある．したがって，それに伴う混乱を最小限に止めるためには，*R. radiobacter* 関連の菌株に関しては，所属を genomovar レベルまで明らかにした上で，その情報を菌株とともに記録しておくことが重要である．そのような準備さえしておけば，将来，たとえ各 genomovar が正式に種として認められようとも，あるいは，亜種・変種レベルで取り扱うことになろうとも，記録しておいた genomovar の情報を基に，当該菌株の学名を新しい分類体系における適切な学名表記へと簡単に読み替えることができる（澤田・畔上，2014）．

6. ジーンバンクにおける対応

根頭がんしゅ病菌や毛根病菌は植物病原細菌として重要であるだけでなく，遺伝子組換えや物質生産・生物防除などの場面では有用菌としても利用されている（澤田，2006）．そのため，多くの菌株保存機関において収集・保存が行われてきたが，いずれの機関でもごく最近まで，A，B システムに基づいて学名の整理が行われていた．

しかし，4 章で紹介したような分類をめぐる情勢の変化に呼応するかのように，所蔵菌株の学名表記に C システムが使われる例が増えてきている．例えば，ATCC（米），DSM（独），LMG（ベルギー），CIP（仏）といった欧米の主要な機関や，わが国の NBRC（製品評価技術基盤機構），JCM（理化学研究所）などでは，既に C システムに基づく学名表記に切り替わっている．当ジーンバンクも根頭がんしゅ病菌や毛根病菌を多数所蔵していることから，このような情勢の変化に対応すべく，以下のように作業を進めてきた．

1）C システムへの学名更新作業の進め方

2013 年 9 月までに行った予備調査の結果，「植物病原性 *Rhizobium* 属細菌」の枠組みに入ると思われる菌株（非公開のものも含む）が，ジーンバンクには 244 菌株所蔵されていた．このうちの 2 菌株は C システムに基づいて学名表記されていたものの，A，B システムのどちらに依拠しているのかが不明な菌株が多数あり，分離源や特性情報等を総動員しながらそれを推測する以外に手がない，というきわめて混乱した状況にあった．

混乱を解消するためにまず必要なことは，表示学名の基準となる分類体系をジーンバンクとして 1 つに統一することである．そこで，3 章で述べたように利点の多い C システムを基準として採用し，それに基づいて表示学名を更新することにした．さらに，各菌株の病原性に関わる情報（Ti，Ri，あるいは nonpathogenic）も表示学名に付記し，ユーザーが菌株を選ぶ際の利便性を向上させることも同時に目指した．

ただし，表 1 における対応関係（同一行上の学名は同じ実体を指し示す）に基づいて，各菌株の学名を C システムへと機械的に読み替えることは，A と B の学名が識別不能なまま混在しているような状況下では不可能である．そのため，以下のような手順に従って各菌株を再同定し，それぞれの「種レベルの位置づけ」と「病原性タイプ」とを明らかにする必要がある．(1) 指標となる遺伝子に基づいて分子系統解析を行い，種レベルの位置づけを判定する．(2) 病原性プラスミドを検出するための PCR を実施するとともに，必要に応じて接種試験も行い，病原性タイプを判定する．(3) *R. radiobacter* に関しては genomovar 型別も実施す

る．そして，以上の作業によって得られたデータと関連資料を基に，所蔵菌株の表示学名を更新することにした．

2）種レベルの所属に関する判定

分子系統解析の指標としては，*Rhizobium* 属細菌において高い信頼性・解像度が確認されている 4 つの遺伝子〔16S rDNA，*atpD*，*glnA*（GSI），*recA*〕を用いた．これらの配列を決定した上で，澤田・畔上（2014）の方法にしたがって「個別の遺伝子ごとの分子系統解析」と「連結データを用いた分子系統解析（MLSA 解析）」を実施した．得られた系統樹の一部を図 2（16S rDNA 系統樹）と図 3（MLSA 系統樹）に示した．

実施したこれらすべての解析を通じて，所蔵菌株は大きく 5 つのグループにまとまることが安定して認められた．なお，5 つのグループのうち，含まれている菌株数が多い 3 グループについては，それぞれを圧縮表示した上で，グループ内に含まれている菌株数を図中に示した（図 2, 3 において赤, 青, 緑で示してある）．

構築された系統樹を基に，所蔵菌株の系統的位置づけや基準株・対照菌株との位置関係を確認し，各菌株の関連資料も参考にした上で，それぞれの種レベルの位置づけを判定した．その結果，図 2, 3 において赤で示した 67 菌株は *R. radiobacter*，緑で示した 113 菌株は *R. rhizogenes*，青で示した 59 菌株は *R. vitis* と

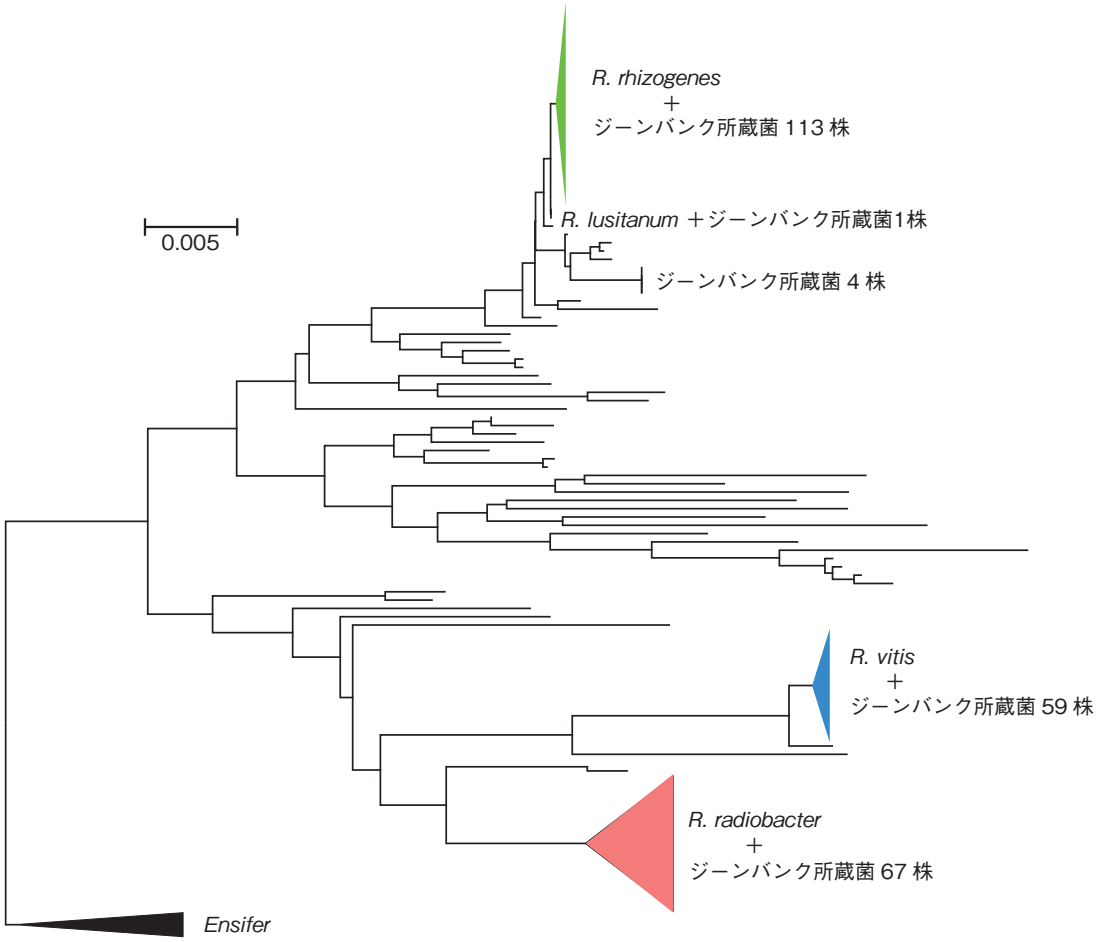

図 2　16S rDNA 分子系統解析に基づくジーンバンク所蔵菌の所属の確認

Rhizobium 属の 58 菌種と *Ensifer* 属の 13 菌種の基準株の配列データに，ジーンバンク所蔵の 244 菌株のデータを加えた上で，ガンマ補正した木村の 2 パラメーターモデル（Kimura，1980）の下で近隣結合系統樹（Saitou & Nei，1987）を構築した．なお，ジーンバンク所蔵菌を含む単系統群は圧縮表示するとともに，単系統群内に含まれているジーンバンク所蔵菌の株数を表示した．また，その単系統群内に既知菌種の基準株も含まれている場合は，その学名も併せて示した．それ以外の供試データについては，学名表記を省略した．

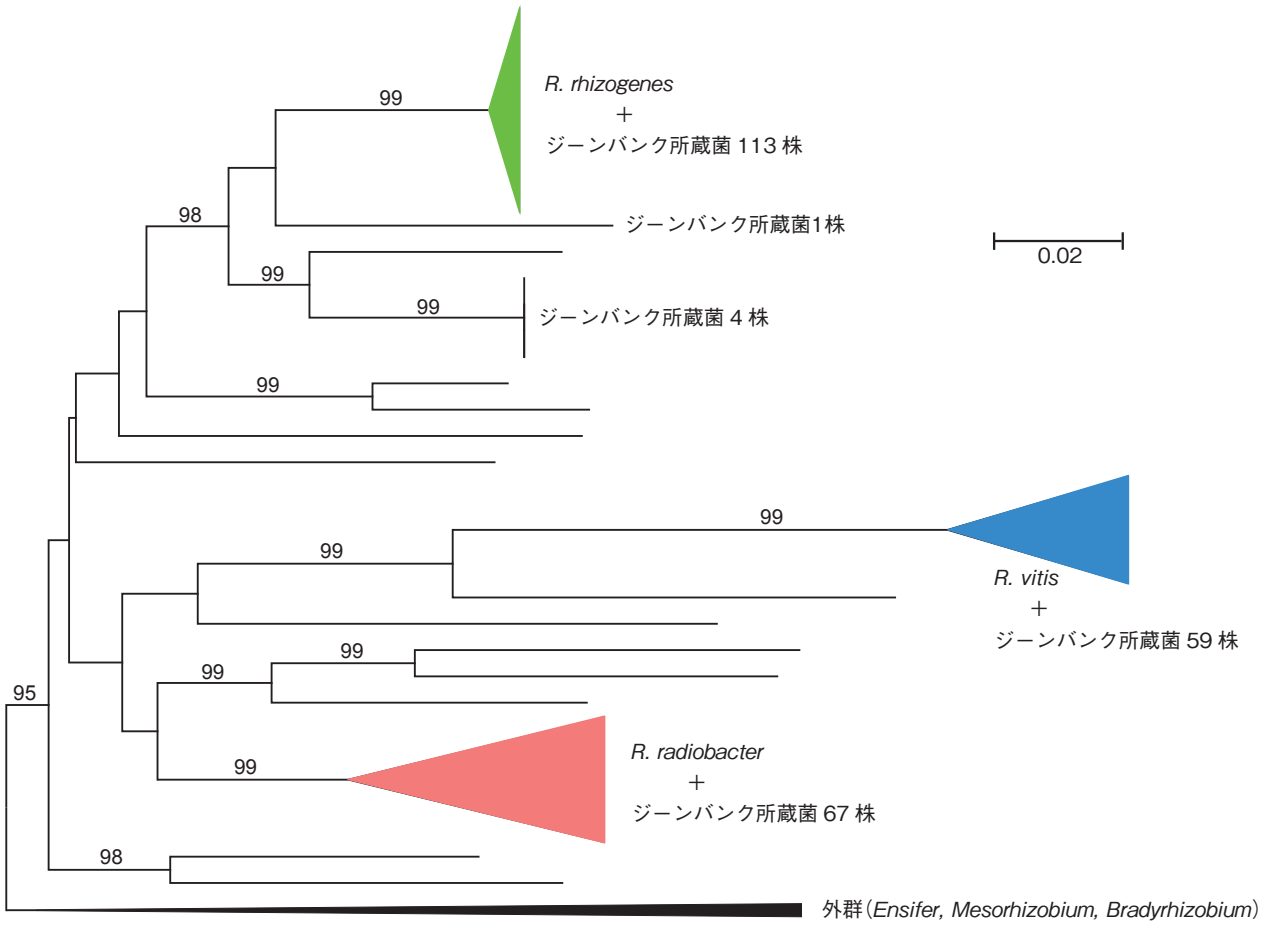

図 3　MLSA 解析に基づくジーンバンク所蔵菌の所属の確認

Rhizobium 属の主要な 18 菌種，*Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* 属の主要な 7 菌種の基準株の配列データ（*atpD*, *glnA*, *recA* の連結データ；1456 bp）に，ジーンバンク所蔵菌のデータを加えた上で，ガンマ補正した木村の 2 パラメーターモデルの下で近隣結合系統樹を構築した．なお，ジーンバンク所蔵菌を含む単系統群は圧縮表示するとともに，単系統群内に含まれているジーンバンク所蔵菌の株数を表示した．また，その単系統群内に既知菌種の基準株も含まれている場合は，その学名も併記した．それ以外の供試データについては，学名表記を省略した．

同定することができた（表 3）．ただし，残りの 5 菌株については，種レベルの所属を特定することができなかった．

3）病原性タイプに関する判定

ジーンバンクでは菌株を外部から受け入れる際に，その菌株の来歴・特性に関するデータや関連する論文情報なども提供頂いている．それらの関連資料から各菌株の病原性に関わる情報を抽出し，判定材料として利用した．また，その作業と並行して，VCF3/VCR3 プライマーセット（澤田・土屋，2003）を用いた PCR によって各菌株から病原性プラスミドの検出も試みた．ただし，これらの情報だけで全菌株の病原性タイプは判定できなかったので，必要に応じて接種試験も実施した．蓄積した情報を基に判定を試みたところ，所蔵する 244 菌株のうち，201 菌株は根頭がんしゅ病菌（Ti プラスミド保有菌），35 菌株は毛根病菌（Ri プラスミド保有菌），8 菌株は非病原菌と判定することができた（表 3）．

4）genomovar に関する判定

R. radiobacter に属する 67 菌株は，MLSA 解析において 6 つの単系統群に分かれることが確認できた（図 3 では赤色の圧縮表示としたので，具体的な結果は示していない）．そこで，これら 6 つの単系統群がいずれの genomovar に相当するのかを判定するために，*recA* 分子系統解析に基づく genomovar 型別（澤田・畔上，2014）を行った（図 4）．その結果，この

表 3　分類群別に選んだ推奨菌株一覧（分類・同定試験用の対照菌株）[a]

菌種（病原性タイプ）	genomovar[b]	各分類群に属する所蔵菌株数	推奨菌株の MAFF 番号
Rhizobium radiobacter (Ti)	G1	18	301276, 301224
	G4	4	301001, 211863
	G8	2	302378
Rhizobium radiobacter (Ri)	G7	17	212033, 301724
	G9	11	212029, 210265
	undetermined	7	—[c]
Rhizobium radiobacter (nonpathogenic)	G1	5	311303
	G9	3	520014
Rhizobium rhizogenes (Ti)	—	113	211729, 211728
Rhizobium vitis (Ti)	—	59	663001, 663007, 211942, 211908
Rhizobium sp. (Ti)	—	5	—[c]

[a] 分類学的な所属が確定できた所蔵菌株の中から，各分類群ごとに代表的なもの（推奨菌株）を選んだ．
[b] *R. radiobacter* を対象とした genomovar 型別（澤田・畔上，2014）については図 4 参照．
[c] 種・genomovar レベルの所属が確定できなかった菌群からは推奨菌株を選んでいない．

うちの 5 つの単系統群については，genomovar レベルの所属を明らかにすることができた．すなわち，23 菌株が genomovar G1（以後，G1 と表記する），4 菌株が G4，17 菌株が G7，2 菌株が G8，14 菌株が G9 に属することが確認できた（表 3）．さらに，Shams *et al.*（2013）の genomovar 型別用プライマーセットを用いた PCR 検定も行うことによって，表 3 の型別結果のダブルチェックを行った．なお，残りの 1 つの単系統群（7 菌株が含まれている．図 4 では「undetermined」として示した）については，genomovar レベルの所属が確定できなかった．

5）データベースの更新

以上のようにして判定した「種・genomovar レベルの所属」と「病原性タイプ」に基づいて，所蔵する 244 菌株の表示学名を C システムへと更新した．その内訳を，菌種/病原性タイプ/genomovar ごとに整理して表 3 に示した．なお，個々の菌株の具体的な情報は，ジーンバンクの遺伝資源データベースにおける「微生物遺伝資源の検索」ページ（http://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_search.php）を利用すれば，検索結果の詳細画面の中で確認することができる（図 5）．その詳細画面からは，各菌株の「種・genomovar レベルの所属」を判定する根拠（図 2–4）として利用した配列データ（16S rDNA，*atpD*，*glnA*，*recA*）がダウンロードできるようになっている（図 5 ①）．これらの配列は，ユーザーが研究目的に合致した菌株をジーンバンクの所蔵菌株の中から探す際に，目安として利用して頂けるものと考えている（Takeya *et al.*, 2012）．また，詳細画面の「文献」欄には，その菌株に関連した論文や紹介記事がリストアップされており，詳しい来歴や特性データなどが確認できるようになっている（図 5 ②）．

6）推奨菌株の選定

学名更新作業の仕上げとして，ユーザーが対照菌株として利用できるような典型的な菌株を選び，「推奨菌株」として提示することを試みた．そのためにまず，菌種/病原性タイプ/genomovar ごとに，来歴や特性なども考慮しながら，系統的位置づけや分類学的な試験性状が可能な限り典型的と思われる菌株を選び出し，「推奨菌株（分類・同定試験用の対照菌株）」としてまとめた（表 3）．また，同様にして，Ti あるいは Ri プラスミドを保持しており，病原性を有していることが確認できた所蔵菌株の中から，分離源植物ごとに代表的なものを選び出して「推奨菌株（接種試験用の対照菌株）」とした（表 4）．これらの推奨菌株は，ジーンバンクの遺伝資源データベースにおける「推奨菌株」ページ（http://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_approved.php）に一覧表示してある（図 6 にその一部を示した）．そこからは，各菌株の配列データ（①）や詳細な来歴情報（②）を確認することが可能であり，「申込」ボタン（③）をクリックすれば配布申込手続きの画面に移ることができる．

7）期待されること

以上の一連の作業によって，ジーンバンクにおけるすべての植物病原性 *Rhizobium* 属細菌の表示学名を，

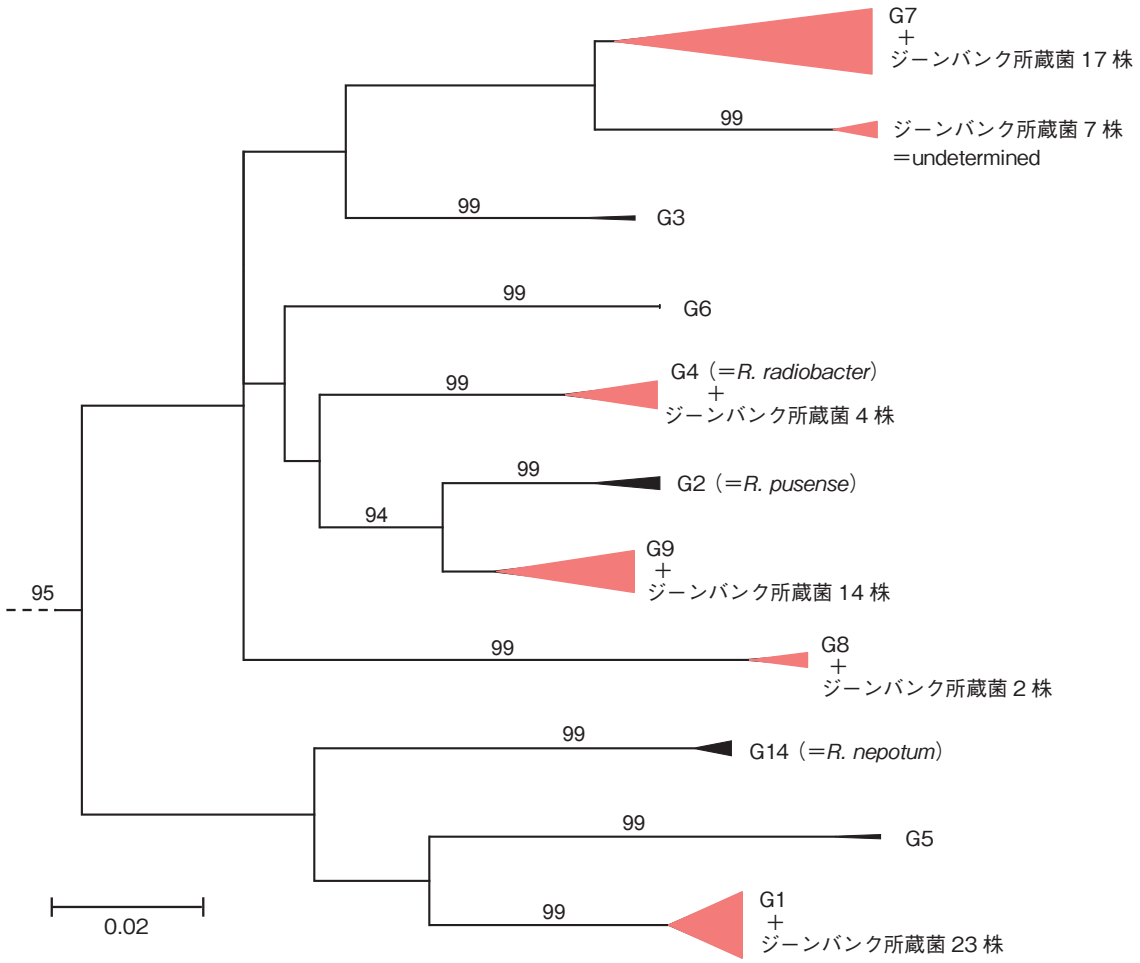

図 4　ジーンバンク所蔵の *R. radiobacter* を対象とした genomovar 型別

Pulawska *et al.*（2012b）の *recA* 配列データ（70 OTU, 429 bp）に，ジーンバンク所蔵の *R. radiobacter* 67 菌株のデータを加えた上で，ガンマ補正した GTR モデルの下で最尤系統樹を構築した．なお，本図には *R. radiobacter* に相当する領域のみを示し，それ以外の部分については省略してある．
R. radiobacter 内に形成された 11 個の単系統群をそれぞれ圧縮表示した上で，各単系統群に含まれている Pulawska *et al.*（2012b）のデータを基に，当該単系統群がいずれの genomovar に相当するのかを判定した．なお，ジーンバンク所蔵菌が含まれている 6 つの単系統群は赤で色づけした上で，各単系統群内に含まれているジーンバンク所蔵菌の株数を表示した．

C システムに基づいた形に統一することができた．しかも，今回の措置によって，表示学名に「病原性タイプ」が付記されたので，検索結果の一覧画面上で各菌株の病原性に関する情報を俯瞰することが可能となった．病原性に関する情報を求めてデータベース内や関連資料を探し回る必要がなくなったことから，ユーザーの利便性向上に大きく寄与できたのではないかと自負している．

ところで，ジーンバンクの検索システムは，C システムに書き換えられる以前の「A，B システムに基づいた学名」も検索語として利用できる仕様となっている．また，検索結果の詳細画面には，当該菌株の登録時学名も併記されるようになっている（図 5）．これらの機能は，ユーザーが自身の供試菌株の学名を C システムへと読み替えるための一助として利用頂けるのではないだろうか．

また，2 つの視点に基づいて選ばれた推奨菌株（表 3, 4）が利用できることも，ユーザーの利便性を高める上で効果があるものと考えている．今後，研究のさまざまな局面における対照菌株として，これらの推奨菌株が活用頂けるのではないかと期待している．

MAFF: 211729

MAFF番号	211729
微生物種類	細菌
学名	*Rhizobium rhizogenes* (Riker, Banfield, Wright, Keitt and Sagen 1930) Young, Kuykendall, Martinez-Romero, Kerr and Sawada 2001 (Ti)
登録時学名	*Agrobacterium rhizogenes* (Riker, Banfield, Wright, Keitt and Sagen 1930) Conn 1942
同定者	澤田宏之
再同定者	澤田宏之
分離源	にほんすもも
分離部位	根頭がんしゅ病罹病組織
採集地	岡山
採集日	1988/04
分離者	澤田宏之
提供者	澤田宏之
株名	Pl-Ag-1
培地	標準寒天培地 (Dextrose 1g, Peptone 5g, Yeast extract 2.5g, Agar 15g, Distilled water 1000ml) pH 7.0±
培養適温	28℃
培養期間	4日
環境有害性	植物病原性
① 塩基配列	16S atpD glnA recA
② 文献	Sawada, H. and Ieki, H., Phenotypic characteristics of the genus Agrobacterium, Annals of the Phytopathological Society of Japan, 58(1), 37-45, 1992 [DOI] Sawada, H., Takikawa, Y. and Ieki, H., Fatty acid methyl ester profiles of the genus Agrobacterium, Annals of the Phytopathological Society of Japan, 58(1), 46-51, 1992 [DOI] 澤田宏之, Agrobacterium 属細菌の系統および分類に関する研究, 果樹試験場報告, 5, 1-110, 1994 [URL]

図5　ジーンバンクの遺伝資源データベースにおける検索結果画面

検索結果の1例として，MAFF 211729の詳細画面の一部を示した．
矢印①で示したリンクをクリックすると，配列データをダウンロードできる．また，矢印②に示した文献欄には，当該菌株に関連した論文や紹介記事がリストアップされている．

7. おわりに

6章に示した一連の作業によって，所蔵するすべての植物病原性 *Rhizobium* 属細菌の表示学名を更新することができた．しかし，その過程で，この菌群の分類・同定に関わる新たな問題も浮かび上がってきた．ここではその中から2つを選んで紹介し，今後の対応について考えてみたい．

1）簡易同定法の開発

6章の3）における作業では，「VCF3/VCR3プライマーセット」を用いて病原性プラスミドのPCR検出を行い，得られた結果を病原性タイプの判定材料の1つとして利用した．しかし，その過程で，病原性を有しているにもかかわらず，想定される増幅産物の得られない菌株が複数見出された（データは示していない）．このことは，病原性プラスミドを安定して検出するためには，プライマーの改良や反応条件の至適化がさらに必要であることを示している．また，研究の現場では，病原性プラスミドの検出だけでなく，TiプラスミドとRiプラスミドの判別（プラスミド型別）が必要となる場面も多いと思われる．さらには，本属菌の分類上の所属が簡易に判定できるような「菌種同定用PCR」も是非実現したいところである．

筆者らは現在，ジーンバンク所蔵菌株を供試しながら，これらの手法開発を目指して作業を進めているところである．信頼性の高い「菌種同定用PCR」や「プラスミド型別用PCR」が構築できれば，ジーンバンクにおける菌株の品質管理に利用できるだけでなく，関連分野における研究の効率化へも貢献できるものと考えている．

表 4　分離源植物別に選んだ推奨菌株一覧（接種試験用の対照菌株）[a]

分離源植物	分離源植物別の推奨菌株		
	菌種（病原性タイプ）	MAFF 番号	病名 [b]
エゾギク	*R. radiobacter* (Ti)	302338	—
オウトウ [c]	*R. radiobacter* (Ti)	211863	オウトウ根頭がんしゅ病
オウトウ [c]	*R. rhizogenes* (Ti)	211731, 211735	オウトウ根頭がんしゅ病
キウイフルーツ	*R. vitis* (Ti)	211950, 211951	キウイフルーツ根頭がんしゅ病
キク	*R. radiobacter* (Ti)	301276, 302378	キク根頭がんしゅ病
コスモス	*R. radiobacter* (Ti)	302558	—
サクラ類 [c]	*R. radiobacter* (Ti)	301001	サクラ類根頭がんしゅ病
サクラ類 [c]	*R. rhizogenes* (Ti)	211736	サクラ類根頭がんしゅ病
シオン属	*R. radiobacter* (Ti)	302556	—
シュッコンカスミソウ	*R. rhizogenes* (Ti)	302563	シュッコンカスミソウ根頭がんしゅ病
ソリダゴ	*R. radiobacter* (Ti)	211872	ソリダゴ根頭がんしゅ病
ニホンスモモ	*R. rhizogenes* (Ti)	211729, 211730	スモモ根頭がんしゅ病
ニホンナシ	*R. rhizogenes* (Ti)	211728, 663002	ナシ根頭がんしゅ病
バラ [c]	*R. radiobacter* (Ti)	301224	バラ根頭がんしゅ病
バラ [c]	*R. rhizogenes* (Ti)	663018, 211706	バラ根頭がんしゅ病
ブドウ	*R. vitis* (Ti)	663001, 663007	ブドウ根頭がんしゅ病
マーガレット	*R. radiobacter* (Ti)	301222	マーガレット根頭がんしゅ病
モモ	*R. rhizogenes* (Ti)	663003, 211710	モモ根頭がんしゅ病
リンゴ [c]	*R. radiobacter* (Ti)	211866	リンゴ根頭がんしゅ病
リンゴ [c]	*R. rhizogenes* (Ti)	211865	リンゴ根頭がんしゅ病
トマト	*R. radiobacter* (Ri)	212029, 212033	トマト毛根病
メロン	*R. radiobacter* (Ri)	301724, 210265	メロン毛根病

[a] Ti あるいは Ri プラスミドを保持しており，病原性を有していることが確認できた所蔵菌株の中から，分離源植物ごとに代表的なもの（推奨菌株）を選び，関連情報とともに示した．表中の点線より上に根頭がんしゅ病菌（Ti プラスミド保有菌），点線より下に毛根病菌（Ri プラスミド保有菌）を示してある．

[b] 該当する病害の記載が病名データベース（日本植物病理学会・農業生物資源研究所，2009）にある場合は，その病名を示した．

[c] これらの植物からは，*R. radiobacter* (Ti) と *R. rhizogenes* (Ti) のいずれもが分離されている．

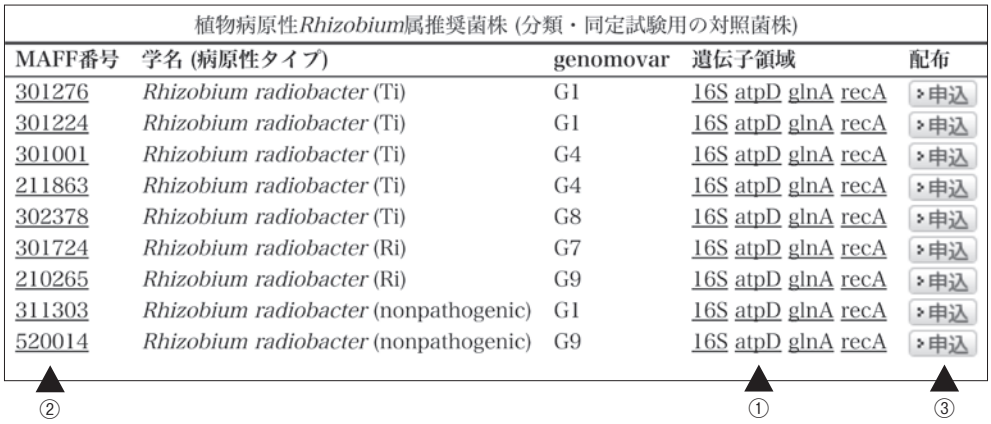

図 6　ジーンバンクの遺伝資源データベースにおける推奨菌株画面

植物病原性 *Rhizobium* 属細菌の推奨菌株ページの一部を示した．
矢印①で示したリンクをクリックすると配列データがダウンロードできる．矢印②からは各菌株の詳細画面（図 5）を見ることができる．③をクリックすると，当該菌株の配布申込画面へと移動する．

2）所属不明菌の扱い

6章の2）における作業では，既知菌種の枠組み（表1）に位置づけることができない菌株が複数見出されてきた（図2, 3，表3）．これらの所属不明菌は，今回採用した手法では同定しきれなかっただけなのか，あるいは，真の「新種」であるのか，現時点では判定不能である．今後，さまざまな視点に基づく解析を組み合わせることによって，これらの分類上の取り扱いについて検討したいと考えている．

分類と同定は表裏一体であることから，ジーンバンクにおける学名更新・品質管理等の作業も常にそれを意識しながら進めていく必要がある．今後もそのような作業を通じて，さまざまな研究分野に貢献できるような質の高い遺伝資源や情報を提供しつつ，ユーザーサービスに努めていきたいと考えている．

謝　辞

本稿で紹介したジーンバンク所蔵菌株は，多くの研究者の方々からジーンバンクへご提供頂いたものである．また，学名更新作業を進めるにあたり，青柳千佳氏，中島比呂美氏には多大なるご協力を頂いた．農業生物資源研究所遺伝資源センターの皆様からは有益なご助言とご支援を賜った．ここに記して深く感謝の意を表したい．

文　献

Allen, O.N. & Holding, A.J. 1974. Genus II. *Agrobacterium* Conn 1942, *In* Buchannan, R.E. & Gibbons, N.E. (eds.), Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, eighth edition. p. 264–267, Williams and Wilkins, Baltimore.

Conn, H.J. 1942. Validity of the genus *Alcaligenes*. J. Bacteriol. **44**: 353–360.

Costechareyre, D., Rhouma, A., Lavire, C., Portier, P., Chapulliot, D., Bertolla, F., Boubaker, A., Dessaux, Y. & Nesme, X. 2010. Rapid and efficient identification of *Agrobacterium* species by *recA* allele analysis. Microb. Ecol. **60**: 862–872.

Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. J. Mol. Evol. **17**: 368–376.

Holmes, B. & Roberts, P. 1981. The classification, identification and nomenclature of agrobacteria - Incorporating revised descriptions for each of *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend) Conn 1942, *Agrobacterium rhizogenes* (Riker et al.) Conn 1942, and *Agrobacterium rubi* (Hildebrand) Starr and Weiss 1943. J. Appl. Bacteriol. **50**: 443–467.

Hunter, W.J., Kuykendall, L.D. & Manter, D.K. 2007. *Rhizobium selenireducens* sp. nov.: a selenite-reducing *α-Proteobacteria* isolated from a bioreactor. Curr. Microbiol. **55**: 455–460.

一幡由香利，吉田隆延，野口雅子，染谷信孝，土屋健一，中島雅己，阿久津克己，澤田宏之 2006. *Agrobacterium* および *Rhizobium* 属細菌の多様性に関する分子進化学的研究．日植病報　**72**：305.

Kaur, J., Verma, M. & Lal, R. 2011. *Rhizobium rosettiformans* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site, and reclassification of *Blastobacter aggregatus* Hirsch and Müller 1986 as *Rhizobium aggregatum* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **61**: 1218–1225.

Kersters, K. & De Ley, J. 1984. Genus *Agrobacterium*, *In* Krieg, N.R. & Holt, J.G. (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol. 1, p. 244–254, Williams and Wilkins, Baltimore.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. **16**: 111–120.

Kuykendall, L.D., Young, J.M., Martinez-Romero, E., Kerr, A. & Sawada, H. 2005. Genus *Rhizobium*, *In* Garrity, G.M. (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition. vol. 2, part C, p. 325–340, Springer, New York.

Lopez-Lopez, A., Rogel, M.A., Ormeno-Orrillo, E., Martinez-Romero, J. & Martinez-Romero, E. 2010. *Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. Syst. Appl. Microbiol. **33**: 322–327.

日本植物病理学会，農業生物資源研究所 2009．日本植物病名データベース（更新 2013 年 10 月 2 日）．入手先，農業生物資源ジーンバンク・遺伝資源データベース，http://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_pl_diseases.php．最終訪問日 2014 年 1 月 12 日．

Ophel, K. & Kerr, A. 1990. *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from

grapevines. Int. J. Syst. Bacteriol. **40**: 236–241.

Panday, D., Schumann, P. & Das, S.K. 2011. *Rhizobium pusense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **61**: 2632–2639.

Portier, P., Fischer-Le Saux, M., Mougel, C., Lerondelle, C., Chapulliot, D., Thioulouse, J. & Nesme, X. 2006. Identification of genomic species in *Agrobacterium* biovar 1 by AFLP genomic markers. Appl. Environ. Microbiol. **72**: 7123–7131.

Pulawska, J., Willems, A., De Meyer, S.E. & Sule, S. 2012a. *Rhizobium nepotum* sp. nov. isolated from tumors on different plant species. Syst. Appl. Microbiol. **35**: 215–220.

Pulawska, J., Willems, A. & Sobiczewski, P. 2012b. *Rhizobium skierniewicense* sp. nov., isolated from tumours on chrysanthemum and cherry plum. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **62**: 895–899.

Ramana, Ch.V., Parag, B., Girija, K.R., Ram, B.R., Ramana, V.V. & Sasikala, C. 2013. *Rhizobium subbaraonis* sp. nov., an endolithic bacterium isolated from beach sand. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **63**: 581–585.

Saidi, S., Mnasri, B. & Mhamdi, R. 2011. Diversity of nodule-endophytic agrobacteria-like strains associated with different grain legumes in Tunisia. Syst. Appl. Microbiol. **34**: 524–530.

Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. **4**: 406–425.

澤田宏之 1994. *Agrobacterium* 属細菌の系統および分類に関する研究. 果樹試報　**特 5**：1–110.

澤田宏之 2006. いわゆる「アグロバクテリウム」について―(1)プロフィールの紹介―. 日本微生物資源学会誌　**22**：117–121.

澤田宏之 2007. いわゆる「アグロバクテリウム」について―(2)分類の現状―. 日本微生物資源学会誌 **23**：29–34.

澤田宏之，畔上耕児 2014. ククモピン型 Ri プラスミドを保持した *Rhizobium radiobacter* によるトマト毛根病（新称）. 日植病報　**80**：22–38.

Sawada, H. & Ieki, H. 1992. Phenotypic characteristics of the genus *Agrobacterium*. Ann. Phytopathol. Soc. Japan **58**: 37–45.

澤田宏之，土屋健一 2003. *Agrobacterium* 属細菌の分類. 日植病報　**69**：349–365.

Sawada, H., Ieki, H., Oyaizu, H. & Matsumoto, S. 1993. Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. Int. J. Syst. Bacteriol. **43**: 694–702.

Sawada, H., Imada, J. & Ieki, H. 1992a. Serogroups of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 determined using somatic antigens. Ann. Phytopathol. Soc. Japan **58**: 52–57.

Sawada, H., Kuykendall, L.D. & Young, J.M. 2003. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. J. Gen. Appl. Microbiol. **49**: 155–179.

Sawada, H., Takikawa, Y. & Ieki, H. 1992b. Fatty acid methyl ester profiles of the genus *Agrobacterium*. Ann. Phytopathol. Soc. Japan **58**: 46–51.

澤田宏之，富岡啓介，永井利郎，青木孝之，遠藤眞智子，廣岡裕吏，佐藤豊三 2007. いわゆる「アグロバクテリウム」について―(3)今後の分類を考えるための視点―. 日本微生物資源学会誌　**23**：95–99.

Shams, M., Vial, L., Chapulliot, D., Nesme, X. & Lavire, C. 2013. Rapid and accurate species and genomic species identification and exhaustive population diversity assessment of *Agrobacterium* spp. using *recA*-based PCR. Syst. Appl. Microbiol. **36**: 351–358.

塩見敏樹，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.

Takeya, M., Yamasaki, F., Uzuhashi, S., Kumagai, M., Sawada, H., Nagai, T., Tomioka, K., Sato, T., Aoki, T. & Kawase, M. 2012. Development of a database of plant diseases in Japan and a system for making microorganism genetic resources and their DNA sequence data available to the research community. JARQ **46**: 193–198.

Tavare, L. 1986. Some probabilistic and statistical problems on the analysis of DNA sequences. Lect. Math. Life Sci. **17**: 57–86.

Turdahon, M., Osman, G., Hamdun, M., Yusuf, K., Abdurehim, Z., Abaydulla, G., Abdukerim, M., Fang, C. & Rahman, E. 2013. *Rhizobium tarimense*

sp. nov., isolated from soil in the ancient Khiyik River. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **63**: 2424–2429.

Velazquez, E., Peix, A., Zurdo-Pineiro, J.L., Palomo, J.L., Mateos, P.F., Rivas, R., Munoz-Adelantado, E., Toro, N., Garcia-Benavides, P. & Martinez-Molina, E. 2005. The coexistence of symbiosis and pathogenicity-determining genes in *Rhizobium rhizogenes* strains enables them to induce nodules and tumors or hairy roots in plants. Mol. Plant. Microbe Interact. **18**: 1325–1332.

Weller, S.A., Stead, D.E. & Young, J.P. 2006. Recurrent outbreaks of root mat in cucumber and tomato are associated with a monomorphic, cucumopine, Ri-plasmid harboured by various *Alphaproteobacteria*. FEMS Microbiol. Lett. **258**: 136–143.

Yao, L.J., Shen, Y.Y., Zhan, J.P., Xu, W., Cui, G.L. & Wei, G.H. 2012. *Rhizobium taibaishanense* sp. nov., isolated from a root nodule of *Kummerowia striata*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **62**: 335–341.

Yoon, J.H., Kang, S.J., Yi, H.S., Oh, T.K. & Ryu, C.M. 2010. *Rhizobium soli* sp. nov., isolated from soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **60**: 1387–1393.

Young, J.M., Kerr, A. & Sawada, H. 2005. Genus *Agrobacterium*, *In* Garrity, G.M. (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition. vol. 2, part C, p. 340–345, Springer, New York.

Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martinez-Romero, E., Kerr, A. & Sawada, H. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter, R. rhizogenes, R. rubi, R. undicola* and *R. vitis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**: 89–103.

Zhang, G.X., Ren, S.Z., Xu, M.Y., Zeng, G.Q., Luo, H.D., Chen, J.L., Tan, Z.Y. & Sun, G.P. 2011a. *Rhizobium borbori* sp. nov., aniline-degrading bacteria isolated from activated sludge. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **61**: 816–822.

Zhang, X., Sun, L., Ma, X., Sui, X.H. & Jiang, R. 2011b. *Rhizobium pseudoryzae* sp. nov., isolated from the rhizosphere of rice. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **61**: 2425–2429.

Changing situation relevant to the taxonomy of phytopathogenic *Rhizobium* species and their re-identification in NIAS Genebank

Hiroyuki Sawada, Fukuhiro Yamasaki, Masaru Takeya and Takayuki Aoki
Genetic Resources Center, National Institute of Agrobiological Sciences (NIAS)
2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

In the case of the genus *Agrobacterium*, which comprises crown gall bacteria and hairy root bacteria, the genus and species have been artificially defined based on pathogenic characters. For some species of the genus, several biovars, equivalent to the rank of variety level, have been established. Recently, based on the results of polyphasic taxonomic approaches, it was proposed that each biovar should be elevated to the species level (Sawada *et al.*, IJSB 43: 694-702, 1993; Ophel & Kerr, IJSB 40: 236-241, 1990), and that the genera *Agrobacterium* and *Rhizobium* should be amalgamated into one single genus *Rhizobium* (Young *et al.*, IJSEM 51: 89-103, 2001). Taking these changes in the taxonomic situation into consideration, strains belonging to the phytopathogenic *Rhizobium* species (formerly *Agrobacterium* species) preserved in the NIAS Genebank were re-identified based on phylogenetic analyses using 16S rDNA, *atpD*, *glnA* and *recA*, inoculation tests, PCR assays and so on, and some of them with typical characters for each species/pathogenic state/genomovar were selected as approved strains (reference strains for taxonomic studies). In addition, for every host plant, we chose pathogenic strains that were proved to harbor Ti or Ri plasmids, as approved strains (reference strains for inoculation tests). The DNA sequence data of the strains are provided by the NIAS Genebank database (http://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_search_en.php).