

臺灣玫瑰及紫花宿苑癌腫病菌之特性

廖惠玲¹ 黃欒昌² 陳昭瑩^{1,3}

1. 臺北市 國立臺灣大學植物病理學系
 2. 臺東市 行政院農業委員會臺東區農業改良場
 3. 聯絡作者，電子郵件：cychen@ccms.ntu.edu.tw；傳真：02-23657735
- 接受日期：中華民國90年2月28日

摘要

廖惠玲、黃欒昌、陳昭瑩. 2001. 臺灣玫瑰及紫花宿苑癌腫病菌之特性. 植病會刊10:27-36.

本研究進行臺灣玫瑰及紫花宿苑癌腫病菌菌株特性之分析。依據生理生化之特性，玫瑰癌腫病菌菌株歸於同一群，紫花宿苑癌腫病菌菌株則可分為兩群（第一、二群）。紫花宿苑第二群菌株和 *Agrobacterium* 生物型 I 的生理生化特性相同；玫瑰菌株及紫花宿苑第一群菌株的生理生化特性相同，與 *A. rubi* 相似，但與 *Agrobacterium* 生物型 I 及生物型 II 的特性卻明顯不同。依 16S rDNA PCR-RFLP 分析結果，將玫瑰菌株歸為一群；紫花宿苑菌株分為二群，但與依生理生化特性之歸類並不完全吻合。綜合生理生化特性及 16S rDNA PCR-RFLP 圖譜分析結果，臺灣玫瑰癌腫病菌菌株特性僅有一種類型，紫花宿苑菌株則有三種類型。進一步利用聚合酵素連鎖反應以四個引子對偵測 Ti 質體上所攜帶的基因，與 nopaline 及 octopine 分泌有關的引子對 *6a*，僅能自紫花宿苑菌株擴增出預期的 PCR 產物；而另外三對引子 -*virA*，*virC1-D2* 及 *iaaH*，在所測試的癌腫病菌菌株均獲得偵測訊號，將可應用於癌腫病菌的快速鑑定及檢測上。

關鍵詞：農桿菌、生理生化特性、16S rDNA、聚合酵素連鎖反應、RFLP、Ti 質體、毒性基因、T-DNA、玫瑰、紫花宿苑、細菌性癌腫病

緒言

植物細菌性癌腫病 (crown gall disease) 是世界各地普遍發生的病害，*Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend) Conn 為一主要的病原細菌。受到癌腫病菌感染的植物，在一星期至幾個月間會產生肉眼可見的腫大瘤狀病徵，罹病幼苗生育受阻，呈現矮化等症狀，嚴重危害時，可能造成產量減少及經濟上的損失^(27,29,40,45)。大約 40 年前，臺灣地區就有甜菜發生癌腫病的報告⁽²⁾，之後於蘋果⁽³⁾、桉樹^(1,6) 等植株上也發現有腫瘤病徵。近幾年來，在臺灣中南部地區發現榕樹及紫花宿苑罹患癌腫病，其病原菌經鑑定為 *A. tumefaciens*^(4,17)；玫瑰癌腫病則分佈於臺灣各花卉栽培區⁽⁵⁾。據估計花蓮及彰化地區，罹病玫瑰園的平均罹病率超過 10%，在感病品種如愛斯基摩 (cv. Escimo) 栽培田，罹病率則可達 30-80% 以上。在彰化地區的玫瑰扦插苗圃也觀察到腫瘤病徵，罹病玫瑰幼苗有生長受阻、發育不良等情形⁽⁵⁾。

癌腫病菌的鑑定，傳統方法為測試其生理生化特性，並配合接種寄主或其他感病植物，觀察有無腫瘤病徵的形成⁽¹³⁾，不但耗時而且需要較大空間。近幾年來有許多應

用分子技術檢測植物癌腫病菌的報告^(18,19,21,23,38,39,44)，此等分子檢測技術是否適用於臺灣植物癌腫病菌的偵測，則有待進一步的驗證。於本研究中，一方面進行臺灣玫瑰及紫花宿苑癌腫病菌菌株生理生化特性及 16S rDNA PCR-RFLP 圖譜分析。另一方面檢視以聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)⁽⁴⁶⁾ 偵測病原菌 Ti 質體的效果，期供建立臺灣植物癌腫病菌快速鑑定及檢測流程之參考。

材料與方法

供試菌株

供試之 *Agrobacterium* 菌株列於表一，包括分離自玫瑰 (rose, *Rosa hybrida*) 病株的 17 個菌株、分離自紫花宿苑 (aster, *Aster ericoides* L.) 病株的 10 個菌株及 5 個對照菌株。其他有 10 個非 *Agrobacterium* 屬細菌的菌株，包括 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*、*Erwinia chrysanthemi*、*Pseudomonas fluorescens*、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*、*Ralstonia solanacearum*、*Rhizobium*

表一、本研究使用之 *Agrobacterium* 菌株Table 1. *Agrobacterium* isolates used in this study

<i>Agrobacterium</i> strain (s)	Source of diseased sample and location
AR3, AR14	Rose (cv. Escimo); Taichung
AR32, AR37, AR42, AR44	Rose (cv. Escimo); Hualian
AR48	Rose; Tianchung, Changhua
AR49, AR53, AR55, AR58	Rose (cv. Micle); Tianchung, Changhua
AR61	Rose (cv. Escimo); Tianchung, Changhua
AR66	Rose (cv. First red); Dacun, Changhua
AR15, RHT1	Rose; Shizhou, Changhua
RPL4	Rose; Puli, Nantou
RTP1	Rose; Taiping, Taichung
AASW2-1, AASW4, AT1, AT2, AT4, AT5, AT6, AT7, AT8	Aster; Pingtung
AASW3	Aster; Tianwei, Changhua
Reference ¹	
<i>A. tumefaciens</i> B6	CCRC 13210
<i>A. tumefaciens</i> C58	CCRC 13876
<i>A. rhizogenes</i>	CCRC 15722
<i>A. rubi</i>	CCRC 12820
<i>A. radiobacter</i>	CCRC 10372

¹ CCRC, Cultural Collection and Research Center, Food Industry Research and Development Institute, Hsinchu, Taiwan.

meliloti, *Rhizobium leguminosarum*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*。除了 *Rhizobium leguminosarum* 培養於 YEM 培養基 (0.05% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 0.02% NaCl, 0.04% yeast extract, 1% mannitol, pH 7.2) 外, 其他供試菌株均培養於 523 培養基 (1% sucrose, 0.8% casein enzymatic hydrolysate, 0.4% yeast extract, 0.2% K₂HPO₄-anhydrous, 0.03% MgSO₄·7H₂O, pH 7)。所有供試菌株均培養於 28 定溫箱中。除了 *Ralstonia solanacearum* 以無菌水懸浮液保存於室溫, 其他菌株均經隔夜培養後, 添加甘油至終濃度為 15%, 置於 -80 下保存。

生理生化特性分析

首先測試各菌株在選擇性培養基上的生長情形, 將細菌培養於 D1M 培養基 (5% cellobiose, 0.1% NH₄Cl, 0.03% MgSO₄·7H₂O, 0.3% K₂HPO₄, 0.1% NaH₂PO₄, 1.5% agar, 高壓滅菌後加入 0.001% malachite green 以及過濾除菌的 0.025% cycloheximide, 0.01% bacitracin, 0.0001% tyrothricin 及 0.01% sodium selenite (Na₂SeO₃); Kado and Heskett, unpublished), 1A 培養基⁽¹²⁾、D-1 培養基⁽³⁶⁾、2E 培養基⁽¹²⁾、New-Kerr 培養基⁽³⁷⁾、Roy-Sasser 培養基^(7,14), 於 28 下培養三天後觀察菌落特性。其次進行 3-ketoglycoside 測試^(8,36), 將供試細菌點在平板培養基 (1% lactose, 0.1% yeast extract, 2% agar) 上, 一個培養皿點 4-6 個菌株, 將培養基置於 28 培養 1 至 2 天後, 於培養基表面覆蓋一層巴內弟反

應試劑 (Benedict's reagent), 置於室溫 1 小時, 屬於生物型 I 的菌系因會產生 3-ketolactose, 在菌體細胞周圍形成 Cu₂O 的黃色暈環。另外進行 Ferric ammonium citrate 利用試驗^(24,36)、L-tyrosine 利用試驗^(32,36)、oxidase 活性測試^(24,36)、citrate 利用試驗^(36,43)、Litmus milk 酸鹼測試⁽³⁶⁾、利用碳水化合物產酸產鹼試驗^(9,11,36)、對氯化鈉耐受性試驗⁽³⁶⁾ 及於 35 的生長情形。將測試結果與對照菌株比較, 以鑑別臺灣玫瑰及紫花宿苑癌腫病菌的生物型。

16S rDNA 之 PCR-RFLP 分析

以基因組 DNA 萃取套組 (genomic DNA extraction kit; Qiagen GmbH, Hilden, Germany) 抽取癌腫病菌的基因組 DNA, 稀釋後作為 PCR 模版 (DNA 終濃度約為 2 ng/μl)。以引子對 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 及 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCG-3')^(33,48) 擴增癌腫病菌的 16S rDNA, 於 PCR 溫度循環機進行聚合酵素連鎖反應 (95 2.24 分鐘, 一個循環; 95 1.12 分鐘, 63 2.24 分鐘, 72 2.24 分鐘, 四十個循環; 72 12 分鐘, 一個循環), 預期擴增的 DNA 片段大小約為 1,500 bp。將 PCR 產物以 DNA/RNA 膠體萃取套組 (DNA/RNA gel extraction kit; Viogene, Sunnyvale, CA) 進行回收。取適量 DNA, 以限制酵素 *Hae*III、*Mbo*I (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) 及 *Taq*I (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) 進行切割。於 2.5% 瓊脂精膠體 (Amresco, Solon, Ohio, USA) 上進行電泳分析, 檢查酵素切割後的 DNA 片段圖譜。

癌腫病菌 DNA 模版製備

參考 Kado 及 Liu⁽²⁸⁾ 所報告的方法, 自 *Agrobacterium* 細胞中抽取與致病性有關的 Ti 質體^(26,50)。挑取單一菌落於 523 液體培養基中, 於 28 振盪培養 14-16 小時後, 取 250μl 細菌懸浮液, 以 10,000 rpm 低溫離心 3 分鐘, 去除上澄液, 加入 100μl 無菌水混和均勻, 再加入 350μl 分解液 (lysis solution: 3% SDS, 50 mM Tris base, 加入約 0.128% NaOH 使 pH 值達 12.6), 混和均勻, 置於 55 水浴 60 分鐘, 之後加入等量的 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1), 以 10,000 rpm 低溫離心 10 分鐘, 吸取上層澄清液, 重複上述 phenol/chloroform/isoamyl alcohol 萃取步驟, 直到界面不再有白色物體為止, 最後將此上層澄清液保存於 -20。進行 PCR 時, 以無菌水稀釋 300 倍作為模版。

另外, 挑取單一菌落劃於 523 平板上, 於 28 培養 24 小時。挑取適量細菌, 以 100μl 無菌水懸浮, 使其濃度約 10⁸ cfu/ml。將懸浮液置於 95 10 分鐘後, 立即置於冰中冷卻, 直接作為 PCR 模版。

聚合酵素連鎖反應

共使用四對引子，分別針對T-DNA的*iaaH*⁽¹⁹⁾、*6a*⁽²¹⁾、毒性基因*virA* (5'-TGGTACGAGGACGTAAGTGCGG-3'; 5'-AGGCGGTGGCGAGTTCAAGAAG-3')^(34,42)及*virCI-D2* (5'-ATAACTTGAGCTCGATCG-3'; 5'-GGATCAGAAGCAGGTTTGAG-3')⁽⁴²⁾。其中*virCI-D2*引子對為Sawada等⁽⁴⁴⁾所報告VCF引子及Hass等⁽²³⁾所報告A引子的反意股 (antisense strand)。PCR反應液組成包括各0.8 μM引子對、0.8 mM MgCl₂、50 μM dNTP、10% 10 × Taq緩衝液 (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 0.5 M KCl, 0.1% gelatin, 15 mM MgCl₂)，混合3μl模版以及1 U Taq聚合酵素，加水至 30μl，以PCR溫度循環機 (RoboCycler Temperature Cycler; Stratagene, La Jolla, CA) 進行聚合酵素連鎖反應 (95 2分鐘，一個循環；95 1分鐘，55 2分鐘，72 2分鐘，四十個循環；72 10分鐘，一個循環)，最後保存於4 °C。取20μl PCR 產物進行電泳，檢查所擴增DNA片段的大小。

結果

生理生化特性

針對17個分離自玫瑰癌腫病組織及10個分離自紫花宿苑癌腫病組織的菌株，進行生理生化特性分析的結果列於表二。根據生理生化特性可將紫花宿苑分離菌株區分為二群，每群各包含5個菌株。第二群紫花宿苑菌株和生物型 I (biovar 1) 的生理生化特性相同，也可以在生物型 I 的選擇性培養基 (1A、D1M及D-1培養基) 上生長，而無法在生物型 II (biovar 2) 的選擇性培養基 (2E及New-Kerr培養基) 上生長。所有玫瑰菌株則均屬於同一群，其生理生化特性與紫花宿苑第一群的菌株相同，而且和*A. rubi*對照菌株相似，但卻與*Agrobacterium*生物型 I 及生物型 II 菌系的特性明顯不同，因此將具此類特性的菌株歸為一類 (以下稱為T類)。

T類菌株與生物型 I 的生理生化特性差異主要有：T類菌株無法在已知的生物型 I 的選擇性培養基 (1A、D1M及D-1培養基) 上生長，也無法分解3-ketoglycoside、還原三價鐵及利用citrate、propionic acid產鹼，且利用melezitose產酸的能力較生物型 I 菌系為弱。但T類菌株可於35 °C生長且具耐鹽性 (3% NaCl) 的特性與生物型 I 菌系類似。

T類菌株與生物型 II 菌系的生理生化特性差異主要有：T類菌株無法在2E培養基及New-Kerr培養基上生長，oxidase活性較生物型 II 為強，會利用litmus milk產鹼，利用L(+) tartaric acid產鹼的能力及在L-tyrosine上的生長情形不如生物型 II 菌系好，於35 °C下生長較生物型 II 菌系好。T類菌株具耐鹽性；但生物型 II 菌系不具耐鹽性。

T類菌株與*A. rubi*菌株的生理生化特性大致相同；但T類菌株無法在D-1培養基上生長，*A. rubi*菌株於D-1培養基上則生長緩慢。此外，T類菌株可於35 °C生長且具耐鹽性，而*A. rubi*菌株則於35 °C下生長較差且不具耐鹽性。

本研究中 17個玫瑰菌株、10個紫花宿苑菌株及*Agrobacterium*對照菌株均可以在Roy-Sasser生物型 III 選擇性培養基上生長，需在室溫中培養三至四日才可明顯地見到菌落，而10個非*Agrobacterium*屬細菌則均不能在1A、D1M、2E、New-Kerr及Roy-Sasser培養基上生長 (表二)。

16S rDNA PCR-RFLP 圖譜之比較

對4個玫瑰癌腫病菌菌株 (AR14、AR37、AR49及AR61)，3個屬於紫花宿苑癌腫病菌第一群 (T類) 菌株 (AASW2-1、AT1及AT2)，2個屬於紫花宿苑癌腫病菌第二群菌株 (AT5及AT8)，連同對照菌株*A. tumefaciens* C58進行16S rDNA的PCR擴增反應，都能得到大小約為1,500 bp的PCR產物。以*Hae*III、*Mbo*I或*Taq*I限制酵素進行切割的結果，*A. tumefaciens* C58菌株 (CCRC13876) 的限制酵素圖譜和Ponsonnet及Nesme⁽⁴¹⁾報告屬於生物型 I 的C58菌系相符，也與*A. rubi*的圖譜相同。所有供試玫瑰菌株 (T類) 與Ponsonnet及Nesme⁽⁴¹⁾報告中屬於生物型 I 的1904菌系相似。供試紫花宿苑菌株的16S rDNA PCR-RFLP圖譜中，有的與1904菌系相似，有的則與C58菌系及*A. rubi*相似。屬於T類的紫花宿苑菌株中，AASW2-1菌株的限制酵素圖譜與1904菌系相似；但AT1及AT2菌株的限制酵素圖譜則與Ponsonnet及Nesme⁽⁴¹⁾報告中屬於C58菌系及*A. rubi*相似。屬於第二群紫花宿苑 AT5及AT8菌株的限制酵素圖譜皆與1904菌系相似。(表三)

以*vir*基因序列為目標之PCR檢測

由標準菌株的試驗顯示，利用*virCI-D2*引子對時，以經過加熱 (95 °C, 10分鐘) 再急速冷卻的菌體細胞作為模版，獲得穩定的偵測結果。但利用*virA*引子對時，則需以Kado及Liu⁽²⁸⁾所報告的方法抽取Ti質體作為模版，才可獲得穩定的偵測結果。*virA*及*virCI-D2*引子對可自*A. tumefaciens*、*A. rhizogenes*及*A. rubi*對照菌株中擴增出預期大小的DNA片段。但自*A. rubi*對照菌株，*virA*引子對除了可擴增出預期的1,337 bp DNA片段外，還會得到一大約800 bp的片段。(表四)

在*A. radiobacter*對照菌株及其它10株非*Agrobacterium*屬細菌，這二對引子均無法擴增得到預期大小的PCR產物；但自*A. radiobacter*對照菌株，利用*virA*引子對可以擴增出一大小約為600 bp的DNA片段(表四)。以既定的模版製備方法進行分離菌株的試驗結果顯示，*virA*及*virCI-D2*引子對均可自測試的17個玫瑰菌株及10個紫花宿苑菌株擴增出預期大小 (1,337 bp及1,096 bp) 的DNA片段 (表四，圖一-1,2，圖二-1,2)。

以T-DNA序列為目標之PCR檢測

利用*6a*及*iaaH*二對引子進行T-DNA的偵測，可用經過

表二、臺灣玫瑰及紫花宿苑癌腫病菌之生理生化特性

Table 2. Biochemical and physiological characteristics of rose and aster strains of *Agrobacterium* in Taiwan

Test	Reaction ¹						
	Rose strains ² (17)	Aster strains ³		<i>Agrobacterium</i> ⁴			Nonagrobacteria ⁵ (10)
		Group I (5)	Group II (5)	Biovar 1 (3)	Biovar 2 (1)	<i>A. rubi</i> (1)	
Selective medium							
1A medium	-	-	++	++	-	-	-
D1M medium	-	-	++	++	+	-	- ⁶
D-1 agar	-	-	++	++	+	+	nt
2E medium	-	-	-	-	++	-	-
New and Kerr's medium	-	-	-	-	++	-	-
Roy and Sasser's medium	++	++	++	++	++	++	-
3-Ketolactose production	-	-	++	++	-	-	-
Ferric ammonium utilization	-	-	++	++	-	-	nt
Citrate utilization	-	-	+	+	-	-	nt
L-tyrosine utilization	+	+	+	+	++	+	
Oxidase activity	++	++	++	++	+	++	nt
Growth in litmus milk	Alkali	Alkali	Alkali	Alkali	Acid	Alkali	nt
Acid from							
erythritol	-	-	-	-	++	-	nt
ethanol	-	-	+	+	-	-	nt
melezitose	+	+	++	++ ⁷	+	+	nt
sucrose	++ ⁸	+	++	++	++	++	nt
Alkali from							
malonic acid	+	+	+	+	+	+	nt
L(+) tartaric acid	+	+	+	+	++	+	nt
propionic acid	-	-	+	+	-	-	nt
Growth at 35	++	++	++	++	+	+	nt
Growth in 2% NaCl	++	++	++	++	-	++	nt
Growth in 3% NaCl	++	++	++	++	-	-	nt

¹. Strength of reaction or bacterial growth was divided into four levels (+ +, +, ±, -; nt: not tested)

². Seventeen rose strains were tested.

³. Five aster strains of group I, AT1, AT2, AASW2-1, AASW3, and AASW4, and five aster strains of group II, AT4, AT5, AT6, AT7, and AT8, were tested.

⁴. *A. tumefaciens* strains C58 and B6 and a strain of *A. radiobacter* (CCRC10372) were used as references of biovar 1. A strain of *A. rhizogenes* (CCRC15722) was used as the reference of biovar 2. A strain of *A. rubi* (CCRC12820) was used as another reference.

⁵. Ten kinds of bacteria in other genera were tested.

⁶. *Rhizobium meliloti* showed variable reaction.

⁷. *A. tumefaciens* strain C58 showed variable reaction.

⁸. Rose strain RHT1 showed negative reaction.

加熱 (95 °C, 10分鐘) 再急速冷卻的菌體細胞作為模版, 獲得穩定的偵測結果。這二對引子在 *A. radiobacter* 對照菌株及其它 10 株非 *Agrobacterium* 屬細菌, 均無可見的偵測訊號。在其他對照菌株, *6a* 引子對可自 *A. tumefaciens* B6 及 C58 菌株擴增出預期大小的 DNA 片段 (260 bp); 但無法自 *A. rhizogenes* 及 *A. rubi* 對照菌株獲得相同大小的 DNA 片段。在分離菌株中, *6a* 引子對可自所有紫花宿苑菌株擴增出預期大小的 DNA 片段 (260 bp); 但無法自所有玫瑰菌株擴增出預期大小的 DNA 片段。(表四, 圖一-3, 圖二-3)

在 *tumefaciens* B6、C58 及 *A. rubi* 對照菌株, *iaaH* 引子對均可擴增出預期大小的 DNA 片段 (180 bp); 但無法自 *A. rhizogenes* 菌株中獲得相同大小的 DNA 片段。對於所有玫瑰及紫花宿苑菌株, *iaaH* 引子對則均可擴增出預期大小的 DNA 片段 (180 bp)。(表四, 圖一-4, 圖二-4)

討論

A. tumefaciens 一般被用於指稱引起植物腫瘤的 Rhizobiaceae 科細菌^(25,30,31,36)。但也有些植物癌腫病菌的分

表三、臺灣玫瑰及紫花宿苑癌腫病菌 16S rDNA 之 PCR-RFLP 分析

Table 3. PCR-RFLP analysis of 16S rDNA of rose and aster strains of *Agrobacterium* in Taiwan

Enzyme and cut site ¹	Aster strains ²	Rose and aster strains ³	Reference ⁴					
			Biovar 1 (C58)	Biovar 1 (1904)	Biovar 2	Biovar 3	<i>A. rubi</i>	
<i>Nde</i> II (<i>Mbo</i> I)	248	+	+	+	+	+	+	+
	272	+	+	+	+	+	+	+
	355	+	+	+	+	+	+	+
	<i>N1</i>	-	-	-	-	+	-	-
	<i>N2</i>	-	-	-	-	+	-	-
	1300	+	+	+	+	+	+	+
<i>Taq</i> I	1474	+	+	+	+	+	+	+
	64	+	+	+	+	+	+	+
	<i>T</i>	-	-	-	-	+	-	-
	913	+	+	+	+	+	+	+
	1218	+	+	+	+	+	+	+
	1266	+	+	+	+	+	+	+
<i>Hae</i> III	<i>H1</i>	-	+	-	+	-	-	-
	234	+	+	+	+	+	+	+
	300	+	+	+	+	+	+	+
	<i>H2</i> (385)	+	+	+	+	+	-	+
	871	+	+	+	+	+	+	+
	<i>H3</i> (982)	+	+	+	+	-	-	+
	1153	+	+	+	+	+	+	+
	1332	+	+	+	+	+	+	+

¹ *N1* and *N2* indicate the cut sites within 16S₃₅₅ and 16S₁₃₀₀ region generating 65, 175 and 725-bp DNA fragments. *T* indicates the cut sites within 16S₆₄ and 16S₉₁₃ region generating 355 and 455-bp DNA fragments. *H1* indicates the cut sites within 16S₁₄ and 16S₂₃₄ region generating 20 and 200-bp DNA fragments. The presence or absence of the cut site(s) is denoted as + or -.

² Two aster strains of group I, AT1 and AT2, were tested.

³ Four rose strains, AR14, AR37, AR49, and AR61, and three aster strains, including AASW2-1 of group I and AT5 and AT8 of group II were tested

⁴ Data of PCR-RFLP analysis of 16S rDNA of *Agrobacterium* biovar 1, biovar 2, biovar 3 and *A. rubi* reported by Ponsonnet and Nesme⁽⁴¹⁾.

表四、四對引子針對 *Agrobacterium* 屬細菌之 PCR 分析

Table 4. PCR analysis of *Agrobacterium* strains with four primer pairs

Bacterium	Primer pair ¹			
	<i>virA</i>	<i>virC1-D2</i>	<i>iaaH</i>	<i>6a</i>
Rose strains ²	+	+	+	-
Aster strains ³	+	+	+	+
<i>A. tumefaciens</i> B6 (CCRC 13210)	+	+	+	+
<i>A. tumefaciens</i> C58 (CCRC 13876)	+	+	+	+
<i>A. rhizogenes</i> (CCRC 15722)	+	+	-	-
<i>A. rubi</i> (CCRC 12820)	+	+	+	-
<i>A. radiobacter</i> (CCRC 10372)	- ⁵	-	-	-
Bacteria in other genera ⁶	-	-	-	-

¹ +, Expected DNA fragment (1,337 bp from *virA* primers, 1,096 bp from *virC1-D2* primers, 180 bp from *iaaH* primers, 260 bp from *6a* primers) was amplified. -, Expected DNA fragment was not amplified.

² Seventeen rose strains were analyzed.

³ Ten aster strains were analyzed.

⁴ An extra band about 800 bp was visualized on the gel.

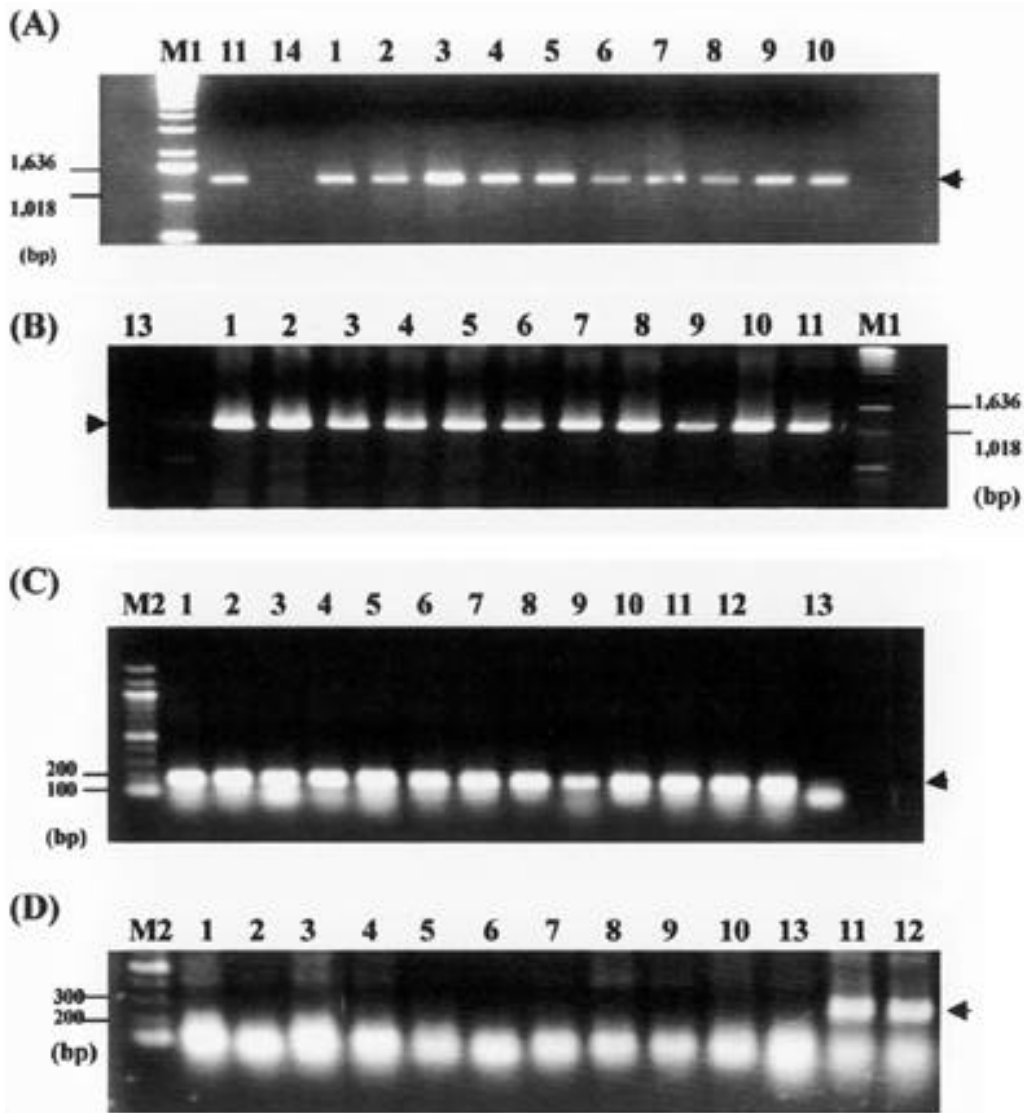
⁵ A band about 600 bp was visualized on the gel.

⁶ Bacteria of other genera were listed in Materials and Methods.

類地位並不明確⁽¹⁰⁾。根據廖氏之接種試驗結果⁽⁵⁾，本研究所使用的癌腫病菌分離菌株均可在胡蘿蔔切片及番茄幼莖造成組織增生，而玫瑰菌株可在玫瑰植株莖部、紫花宿苑菌株可在紫花宿苑花莖及葉片上造成腫瘤病徵。

Agrobacterium 屬細菌可由生理生化特性區分為生物型 I, II, 及 III^(30,31,36,43)。本研究之生理生化分析結果顯示，所分離的臺灣玫瑰癌腫病菌菌株屬於同一群，而紫花宿苑癌腫病菌菌株可分為兩群，其中第二群的菌株特性與生物型 I 菌系的特性相同，而玫瑰菌株及紫花宿苑第一群的菌株特性相同，歸為同一類，其特性與 *A. rubi* 菌株相似，但與生物型 I 及生物型 II 菌系的生理生化特性並不相同，這一類癌腫病菌在分類上應如何定位，仍有待進一步的研究。

16S rDNA 序列的比對也是鑑定 *Agrobacterium* 屬細菌的依據^(20,33,41,49,51)。本研究 16S rDNA 的 PCR-RFLP 圖譜分析結果顯示，臺灣玫瑰癌腫病菌及紫花宿苑癌腫病菌 AASW2-1 菌株 (屬於生理生化特性第一群) 及 AT5、AT8 菌株 (屬於生理生化特性第二群) 在 *Hae*III 限制酵素的切位與屬於生物型 I 的 1904 菌株相仿⁽⁴¹⁾；而紫花宿苑 AT1 及 AT2 菌株 (屬於生理生化特性第一群) 的 16S rDNA PCR-RFLP



圖一、臺灣玫瑰癌腫病菌之PCR分析

Fig. 1. PCR analysis of rose strains of *Agrobacterium* in Taiwan. DNA fragments were amplified from rose strains of *Agrobacterium* with primer pair of *virA* (A), *virCI-D2* (B), *iaaH* (C), or *6a* (D). The results from *Agrobacterium* strains, AR3 (lane1), AR14 (lane 2), AR15 (lane 3), RHT1 (lane 4), AR32 (lane 5), AR44 (lane 6), AR48 (lane 7), AR49 (lane 8), AR58 (lane 9), and AR66 (lane 10) were shown. *A. tumefaciens* C58 (lane 11), *A. tumefaciens* B6 (lane 12) and *A. radiobacter* (lane 13) were used as reference strains. Lane 14: negative control without DNA. One-kb DNA ladder (M1) and 100-bp DNA ladder (M2) are molecular size standards. Arrow indicates the expected PCR product.

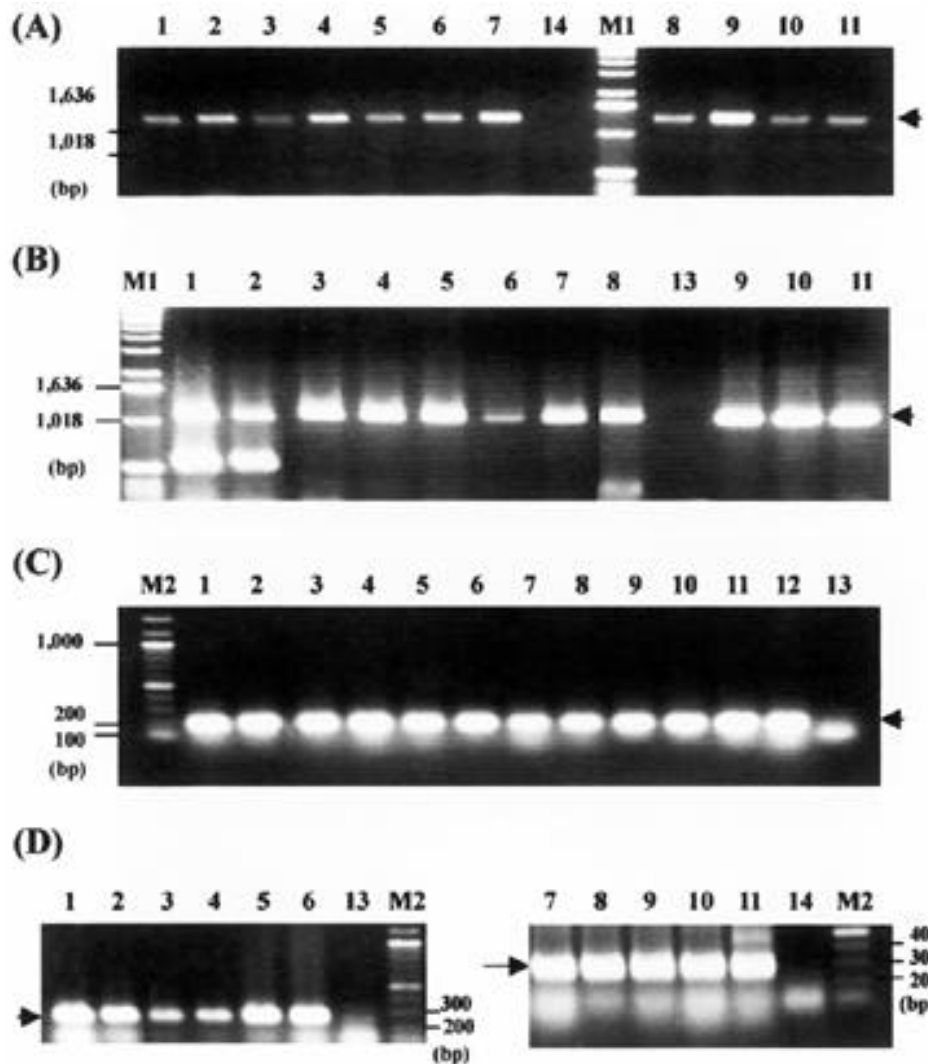
的圖譜則與 *A. tumefaciens* C58 (生物型I) 相同。根據 Ponsonnet及Nesme (1994) 的研究，屬於 *Agrobacterium* 生物型I的 *A. tumefaciens* C58與 *A. rubi* 16S rDNA的PCR-RFLP圖譜相同⁽⁴¹⁾。因此依據16S rDNA的序列特性，臺灣玫瑰及紫花宿苑癌腫病菌不僅和 *Agrobacterium* 生物型I相似，也和 *A. rubi* 十分相近。

綜合生理生化特性及 16S rDNA PCR-RFLP的分析結果，玫瑰癌腫病菌菌株自成一類，特性較為一致；而紫花宿苑癌腫病菌菌株至少可分為三種類型，故認為目前存在於臺灣的癌腫病菌族群可能具有不同類型的染色體遺傳特

性，但無論如何，病原菌株應保有其致病相關基因的序列特性，為較穩定存在的偵測目標。

以四對引子檢測來自臺灣不同地區的玫瑰及紫花宿苑癌腫病菌菌株，結果顯示，除 *6a* 引子對外，其他引子對均可自玫瑰及紫花宿苑菌株得到預期的 PCR 圖譜。*virA*，*virCI-D2*及*iaaH*引子對所偵測的目標基因與癌腫病菌的致病性有關，偵測的結果也指出，分離自不同植物的病原菌株，目標基因具有高的保守性，病原菌與致病相關基因較不易發生變異。

以PCR法檢測 *Agrobacterium* 病原細菌時，模式的製備



圖二、臺灣紫花宿苑癌腫病菌之PCR分析

Fig. 2. PCR analysis of aster strains of *Agrobacterium* in Taiwan. DNA fragments were amplified with primer pair of *virA* (A), *virC1-C2* (B), *iaaH* (C), or *6a* (D). The results from *Agrobacterium* strains, AT1 (lane 1), AT2 (lane 2), AT4 (lane 3), AT5 (lane 4), AT6 (lane 5), AT7 (lane 6), AT8 (lane 7), AASW3 (lane 8), AASW4 (lane 9) and AASW2-1 (lane 10) were shown. *A. tumefaciens* C58 (lane 11), *A. tumefaciens* B6 (lane 12), and *A. radiobacter* (lane 13) were used as reference strains. Lane 14, negative control without DNA. One-kb DNA ladder (M1) and 100-bp ladder (M2) are molecular size standards. Arrows indicate the expected PCR products.

一般為萃取Ti質體及基因組DNA^(19,23,39,44)，也有以細菌懸浮液直接進行PCR擴增反應^(18,39)。在本研究中，除了*virA*引子對外，其餘三對引子均可以用經過加熱(95℃, 10分鐘)再急速冷卻的菌體細胞作為模版，簡便且節省時間。*virA*引子對無法以直接加熱菌體作為模版，其原因可能是染色體DNA上含有和*virA*引子對相似的序列，干擾PCR檢測過程中引子對與Ti質體上目標DNA的黏結，而影響PCR擴增反應⁽⁵⁾。此一問題，已可由抽取Ti質體作為PCR模版，而獲得解決。

已知*virD1*引子對可由*A. tumefaciens* C58及紫花宿苑菌株擴增出444 bp的DNA片段，但無法自*A. tumefaciens*

B6及玫瑰菌株得到相同的產物⁽¹⁶⁾，顯示不同*Agrobacterium*病原菌株的*virD1*基因序列可能有較大的差異，至少存在有兩種不同的序列。因此，本研究進一步利用*Agrobacterium*病原菌株位於*virC1*的VCF引子⁽⁴⁴⁾及*virD2*的A引子⁽²³⁾，設計反意股引子，來擴增病原菌株*virC1*及*virD2*間的*virD1*基因，其中VCF及A引子已知可用來偵測*A. tumefaciens*、*A. rhizogenes*及*A. vitis*病原菌株^(23,44)，此二引子的反意股也可自供本研究之*A. tumefaciens*、*A. rhizogenes*、*A. rubi*對照菌株及玫瑰、紫花宿苑菌株中擴增預期的DNA片段；而無法自無病原性的*A. radiobacter*對照菌株及非*Agrobacterium*屬細菌擴增預期的DNA片段，顯

示*virC1-D2*引子對確實可以應用於*Agrobacterium*病原菌株的鑑定與檢測。此外，本研究也針對*A. tumefaciens* C58 *virA*基因5'端序列設計一對引子，該引子對也可自*A. tumefaciens*、*A. rhizogenes*及*A. rubi*對照菌株擴增出預期的DNA片段，也可應用於*Agrobacterium*病原菌株的鑑定。由於*virA*引子與*Agrobacterium*細菌染色體DNA可能有雜合的情形，無法對細菌細胞進行PCR擴增反應。及配合快速檢測病原之工作，尚需修改引子序列，以解決DNA黏合反應受到干擾的問題。

Eastwell等報告⁽²¹⁾針對T-DNA上*6a*基因設計的引子可自其大部份的*A. tumefaciens*菌株擴增260 bp的DNA片段，但卻無法由C58菌株的DNA得到PCR產物。本研究以此引子對自紫花宿菀菌株及*A. tumefaciens* C58、B6對照菌株均可擴增出如預期大小的PCR產物。已知*6a*基因與octopine及nopaline的分泌有關⁽³⁵⁾，*nos*及*ocs*分別為nopaline及octopine的合成酵素基因⁽⁵⁰⁾。Chen等⁽¹⁶⁾以*nos*引子對自*A. tumefaciens* C58擴增*nos*基因，以*ocs*引子對自紫花宿菀菌株及*A. tumefaciens* B6擴增*ocs*基因；本研究也則以*6a*引子對自這些菌株擴增預期的DNA片段。另一方面，廖氏⁽⁵⁾無法以*nos*及*ocs*引子對自供試的*A. rhizogenes*及*A. rubi*對照菌株擴增預期的DNA片段；本研究結果進一步指出*6a*引子對無法自*A. rhizogenes*及*A. rubi*對照菌株擴增預期的DNA片段，顯示凡具有*nos*及*ocs*基因的菌株，可能即不含有*6a*基因。Chen等⁽¹⁶⁾已指出*nos*及*ocs*引子對不能自玫瑰菌株擴增出預期的DNA片段與本研究中不能以*6a*引子對擴增出預期的DNA片段結果，均說明玫瑰菌株極可能不帶有*nos*及*ocs*基因，實際情形仍有待進一步的試驗才能確知。

已知*iaaH*為生長激素 (auxin) 生合成酵素基因^(47,50)，本研究所使用的*iaaH*引子對可以自*A. tumefaciens* C58、B6及*A. rubi*對照菌株擴增得到180 bp的PCR產物；但無法自*A. rhizogenes*菌株擴增出*iaaH*基因片段。有學者指出*A. rhizogenes* A4的*iaaH*序列和*A. tumefaciens* Ach5並不完全相同^(15,22)，Dong等⁽¹⁹⁾也指出不同生物型的*iaaH*基因序列也有差異，故推測雖然*A. rhizogenes*的Ri質體雖具有*iaaH*基因，但卻不一定可以利用源自於*A. tumefaciens* Ti質體*iaaH*序列的引子對擴增得到PCR產物。但如Dong等⁽¹⁹⁾之報告，本研究結果驗證其*iaaH*引子對可以偵測引起腫瘤的*Agrobacterium*病原菌株。

本研究嘗試以四對引子對針對10株非*Agrobacterium*屬細菌菌株進行PCR擴增反應，結果均無法獲得預期大小的PCR產物，即使在與*Agrobacterium*屬細菌親緣關係相當接近的*Rhizobium*屬細菌菌株也無偵測訊號產生。因此認為這四對引子的偵測對象為*Agrobacterium*屬細菌，就實際需要，可選擇一或多個合適引子對，用於*Agrobacterium*病原菌株的快速鑑定與檢測。

誌謝

本研究承農委會科技計畫 [88科技-1.3-檢04] 經費補助研究期間承蔡東纂、劉興隆、陳明昭、陳俊位先生等協助病株之採集，特誌謝忱。

引用文獻

1. 王維洋. 1992. 臺灣桉樹病害調查報告. 林業試驗研究報告季刊7:179-194.
2. 朱學曾、胡學和. 1959. 甜菜病害之調查研究 - 臺灣甜菜病害. 臺灣糖業試驗所研究彙報 19:21-34.
3. 孫守恭. 1967. 臺灣溫帶果樹之病害. 植保會刊9:96-97.
4. 許秀惠、林俊義、陳福旗. 1997. 榕樹細菌性癌腫病菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 在臺灣之發生. 植保會刊 39:195-205.
5. 廖惠玲. 2000. 臺灣植物癌腫病菌之PCR鑑定及檢測. 臺灣大學碩士論文. 106 pp.
6. 謝煥儒. 1980. 臺灣木本植物病害調查報告(三). 中華林學季刊 13:129-139.
7. Balows, A., Traper, H. G., Dwukin, M., Hausler, W., and Schlefer, K. H. (eds.) 1992. The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, and Applications. Springer-Verlag, New York, 4126 pp.
8. Bernaerts, M. J., and De Ley, J. 1963. A biochemical test for crown gall bacteria. Nature 197:406-407.
9. Bouzar, H., and Jones, J. B. 1992. Distinction of biovar 2 strains of *Agrobacterium* from other chromosomal groups by differential acid production. Lett. Appl. Microbiol. 15:83-85.
10. Bouzar, H., Chilton, W. S., Nesme, X., Dessaux, Y., Vaudequin, V., Petit, A., Jones, J. B., and Hodge, N. C. 1995. A new *Agrobacterium* strain isolated from aerial tumors on *Ficus benjamina* L. Appl. Environ. Microbiol. 61:65-73.
11. Bouzar, H., Jones, J. B., and Hodge, N. C. 1993. Differential characterization of *Agrobacterium* species using carbon-source utilization patterns and fatty acid profiles. Phytopathology 83:733-739.
12. Brisbane, P. G., and Kerr, A. 1983. Selective media for three biovars of *Agrobacterium*. J. Appl. Bacteriol. 54:425-431.
13. Buchanan, R. E., and Gibbons, N. E. 1974. Description of the species of genus *Agrobacterium*. Pages 265-267 in: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland, 1246 pp.
14. Burr, T. J., Katz, B. H., and Bishop, A. L. 1987. Populations of *Agrobacterium* in vineyard and nonvineyard soils and grape roots in vineyards and nurseries. Plant Dis. 71:617-620.

15. Camilleri, C., and Jouanin, L. 1991. The TR-DNA region carrying the auxin synthesis genes of the *Agrobacterium rhizogenes* agropine-type plasmid pRiA4: Nucleotide sequence analysis and introduction into tobacco plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4:155-162.
16. Chen, C. Y., Liao, H. L., and Chung, J. C. 1999. Amplification of *virD1* and opine synthase genes from tumorigenic rose and aster strains of *Agrobacterium* in Taiwan by polymerase chain reaction. *Plant Pathol. Bull.* 8:143-148.
17. Chen, F. C., Hseu, S. H., Hung, S. T., Chen, M. C., and Lin, C. Y. 1999. Leaf, stem and crown galls on perennial asters caused by *Agrobacterium tumefaciens* in Taiwan. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40:237-242.
18. Cubero, J., Martinez, M. C., Llop, P., and López, M. M. 1999. A simple and efficient PCR method for the detection of *Agrobacterium tumefaciens* in plant tumors. *J. Appl. Microbiol.* 86:591-602.
19. Dong, L. C., Sun, C. W., Thies, K. L., Luthe, D. S., and Graves, C. H., Jr. 1992. Use of polymerase chain reaction to detect pathogenic strains of *Agrobacterium*. *Phytopathology* 82:434-439.
20. Eardly, B. D., Wang, F. S., and van Berkum, P. 1996. Corresponding 16S rRNA gene segment in Rhizobiaceae and *Aeromonas* yield discordant phylogenies. *Plant and Soil* 186:69-74.
21. Eastwell, K. C., Willis, L. G., and Cavileer, T. D. 1995. A rapid and sensitive method to detect *Agrobacterium vitis* in grapevine cuttings using the polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 79:822-827.
22. Gielen, J., De Beuckeleer, M., Seurinck, J., Deboeck, F., De Greve, H., Lemmers, M., Van Montagu, M., and Schell, J. 1984. The complete nucleotide sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. *EMBO J.* 3:835-846.
23. Haas, J. H., Moore, L. W., Ream, W., and Manulis, S. 1995. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2879-2884.
24. Hendrickson, A. A., Baldwin, I. L., and Riker, A. J. 1934. Studies on certain physiological characters of *Phytomonas tumefaciens*, *Phytomonas rhizogenes* and *Bacillus radiobacter*. *J. Bacteriol.* 28:597-618.
25. Holmes, B., and Roberts, P. 1981. The classification identification and nomenclature of agrobacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 50:443-467.
26. Hooykaas, P. J. J., and Beijersbergen, A. G. M. 1994. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:157-179.
27. Horst, R. K. 1989. *Compendium of Rose Diseases*. APS Press, St. Paul, Minnesota. 50 pp.
28. Kado, C. I., and Liu, S. T. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145:1365-1373.
29. Keane, P. J., Kerr, A., and New, P. B. 1970. Crown gall of stone fruit. II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. *Aust. J. Biol. Sci.* 23: 585-595.
30. Kerr, A., and Brisbane, P. G. 1983. *Agrobacterium*. Pages 27-43 in: *Plant Bacterial Diseases: A Diagnostic Guide*. P. C. Fahy, and G. J. Persley eds. Academic Press, Australia, 393 pp.
31. Kersters, K., and De Ley, J. 1984. Genus III. *Agrobacterium* Conn. Pages 244-254 in: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. N. R. Keng and J. G. Holt (eds.), The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland, 964 pp.
32. Kersters, K., and De Ley, J., Sneath, P. H. A., and Sackin, M. 1973. Numerical taxonomic analysis of *Agrobacterium*. *J. Gen. Microbiol.* 78: 227-239.
33. Laguerre, G., Allard, M. R., Revoy, F., and Amarger, N. 1994. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:56-63.
34. Leroux, B. L., Yanofsky, M. F., Winans, S. C., Ward, J. E., Ziegler, S. F., and Nester, E. W. 1987. Characterization of the *virA* locus of *Agrobacterium tumefaciens*: a transcriptional regulator and host range determinant. *EMBO J.* 6:849-856.
35. Messens, E., Lenaerts, A., Van Mongtagu, M., and Hedges, R. W. 1985. Genetic basis for opine secretion from crown gall tumor cells. *Mol. Gen. Genet.* 199:344-348.
36. Moore, L. W., Anderson, A., and Kado, C. I. 1988. *Agrobacterium*. Pages 16-36 in: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 2nd edn. N. W. Schaad (ed.) APS Press, St. Paul, Minnesota.
37. New, P. B., and Kerr, A. 1971. A selective medium for *Agrobacterium radiobacter* biotype 2. *J. Appl. Bacteriol.* 34:233-236.
38. Picard, C., Ponsonnet, C., Paget, E., Nesme, X., and Simonet, P. 1992. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2717-2722.
39. Pionnat, S., Nesme, X., Dessaux, Y., and Poncet, C. 1996. Detection and determination of pathogenic *Agrobacterium* of roses with PCR. *Acta Hort.* 424:228-232.
40. Poncet, C., Antonini, C., Bettachini, A., Hericher, D., Pionnat, S., Simonini, L., Dessaux, Y., and Nesme, X. 1996. Impact of the crown gall disease on vigour and yield of rose trees. *Acta Hort.* 424:221-227.
41. Ponsonnet, C., and Nesme, X. 1994. Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. *Arch. Microbiol.* 161:300-309.
42. Rogowsky, P. M., Powell, B. S., Shirasu, K., Lin, T.-S., Morel, P., Zyprian, E. M., Steck, T. R., and Kado, C. I. 1990. Molecular characterization of the *vir* region of *Agrobacterium tumefaciens*: complete nucleotide sequence and gene organization of the 28.63-kbp regulon

- cloned as a single unit. Plasmid 23:85-106.
43. Sawada, H., and Ieki, H. 1992. Phenotypic characteristics of genus *Agrobacterium*. Ann. Phytopath. Soc. Jpn. 58: 37-45.
 44. Sawada, H., Ieki, H., and Matsuda, I. 1995. PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains. Appl. Environ. Microbiol. 61:828-831.
 45. Serfontein, S., and Staphorst, J. L. 1994. Crown gall of hop caused by *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1 in South Africa. Plant Pathol. 43:1028-1030.
 46. Steffan, R. J., and Atlas, R. M. 1991. Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology. Annu. Rev. Microbiol. 45:137-161.
 47. Thomashow, L. S., Reeves, S., and Thomashow, L. S. 1985. Crown gall oncogenesis: evidence that a T-DNA gene from the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6 encodes an enzyme that catalyzes synthesis of indoleacetic acid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5071-5075.
 48. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173:697-703.
 49. Willems, A., and Collins, D. 1993. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 43:305-313.
 50. Winans, S. C. 1992. Two-way-chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. Microbiol. Rev. 56:12-31.
 51. Yanagi, M., and Yamasato, K. 1993. Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. FEMS Microbiol. Lett. 107:115-120.

ABSTRACT

Liao, H. L.¹, Huang, T. C.,² and Chen, C. Y.^{1,3} 2001. Characteristics of rose and aster strains of *Agrobacterium* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 10:27-36. (¹ Department of Plant Pathology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan., ² Taitung Agricultural Improvement Station, Taitung, Taiwan., ³ Corresponding author, E-mail: cychen@ccms.ntu.edu.tw; Fax no. 02-23657735)

The characteristics of *Agrobacterium* strains isolated from rose and aster in Taiwan were investigated. Based on physiological and biochemical traits, the rose strains were characterized as single group whereas aster strains were divided into two groups (group I and group II). Aster strains of group II were physiologically and biochemically identical to *Agrobacterium* strains of biovar 1. Aster strains of group I, and rose strains were closely related to *A. rubi*, but considerably different from *Agrobacterium* strains of biovar 1 and biovar 2. According to PCR-RFLP analysis of 16S rDNA, the rose strains were categorized into one group; aster strains were still divided into two groups that did not coincide with the category based on physiological and biochemical traits. According to the physiological, biochemical, and 16S rDNA PCR-RFLP analysis, the rose strains were grouped into one type while the aster strains were distinguished as three types. Furthermore, four primer pairs were used to detect the genes on Ti plasmid. Primer pair of *ba*, related to the secretion of nopaline and octopine, amplified expected DNA fragment from aster strains but not from rose strains. Primer pairs of *virA*, *virC1-D2*, and *iaaH*, could amplify target DNA from all of the tested rose and aster strains and would be applicable in quick identification and detection of tumorigenic strains of *Agrobacterium*.

Key words : *Agrobacterium*, physiological and biochemical characteristics, 16S rDNA, polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism, Ti plasmid, virulence gene, T-DNA, rose, aster, crown gall