

ブドウ根頭がんしゅ病の診断と生物的防除 および病原細菌の系統解析に関する研究

川口 章

Studies on Diagnosis and Biological Control of Grapevine Crown Gall
and Phylogenetic Analysis of Tumorigenic *Rhizobium vitis*

Akira Kawaguchi

序

岡山県はブドウの栽培面積で全国第4位のブドウの主要産地であり、県内の農産物別産出額でも米、鶏卵、生乳に次ぐ第4位と、岡山県の果樹生産の重要な柱になっている。

ところが、平成14年ころから土壌病害である根頭がんしゅ病の症状が樹および苗木で散見されるようになり、一部の地域では本病の発生による樹の衰弱枯死が認められ、岡山県農業総合センター農業試験場に本病の診断依頼が寄せられた。しかし本病の正確な診断法は未確立であり、診断には多大な労力と時間を有した。また有効な防除対策がないため、生産者にとって大きな経済的被害をもたらす難防除病害として、全国的、また世界的にも大きな問題であった。

そこで、ブドウにおける本病の診断技術の開発と防除対策の確立に向けて研究が開始された。その結果、分子生物学的手法による遺伝子診断法を開発し、新規拮抗微生物を利用した環境負荷の低い生物的防除法を開発した。これにより正確且つ迅速な診断が可能となり、また生物的防除法は今後農薬登録に向けてさらに研究が進むものと期待される。

本論文は、病虫研究室川口研究員が平成14年の研究開始以来逐次発表してきた一連の研究成果を取りまとめたもので、実用価値は勿論のこと、学術的にも貴重な業績であるので、広く刊行し、一般の参考に供する次第である。

なお、本論文は同氏が平成19年3月23日に岡山大学から授与された博士（農学）の学位論文であることを付記しておく。

平成21年11月

岡山県農業総合センター農業試験場長
博士（農学） 伊 達 寛 敬

目 次

緒 言	68
第1章 非病原性 <i>Rhizobium vitis</i> の分離・同定および <i>Rhizobium vitis</i> の分子系統解析	70
第1節 岡山県におけるブドウ母樹および苗木の根頭がんしゅ病菌感染実態	70
1 母樹の検定	70
2 苗木の検定	71
3 考察	71
第2節 非病原性 <i>Rhizobium vitis</i> の分離および同定	71
1 細菌学的性質	71
2 病原性の調査	73
(1) 植物体への接種試験	73
(2) Polymerase chain reaction (PCR) による病原性関連遺伝子 <i>virC1-virC2</i> の検出	73
3 16S rDNA 塩基配列	74
4 考察	75
第3節 <i>Rhizobium vitis</i> の分子系統解析	75
1 抗血清を用いたスライド凝集反応	75
2 rep-PCR DNA フィンガープリント解析	77
3 MLSA (Multilocus sequence analysis)	78
4 考察	79
第2章 ブドウ根頭がんしゅ病の遺伝子診断	81
第1節 マルチプレックス PCR によるブドウ根頭がんしゅ病菌の簡易同定	81
1 <i>Rhizobium vitis</i> の16S rDNA を標的とした特異的プライマーの開発	81
(1) プライマーの設計	81
(2) Restriction fragment length polymorphism (RFLP) による PCR 産物の確認	85
2 マルチプレックス PCR の開発	86
3 考察	87
第2節 マルチプレックス PCR による罹病ブドウ樹組織からのブドウ根頭がんしゅ病菌の迅速検出	87
第3章 非病原性 <i>Rhizobium vitis</i> を利用したブドウ根頭がんしゅ病の生物的防除	89
第1節 有望菌株の選抜	89
1 トマトを用いた生物検定	89
2 ブドウを用いた生物検定	90
3 ヒマワリを用いた生物検定	91
4 平板培地上での抗菌活性	92
5 考察	93
第2節 非病原性 <i>Rhizobium vitis</i> VAR03-1株の地上部有傷接種によるがんしゅ形成抑制効果	94
1 混合接種比率ががんしゅ形成抑制効果に及ぼす影響	94
2 トマトにおけるがんしゅ形成性 <i>R. vitis</i> の複数の菌株に対するがんしゅ形成抑制効果	94
3 ブドウにおけるがんしゅ形成性 <i>R. vitis</i> の複数の菌株に対するがんしゅ形成抑制効果	95
4 VAR03-1株の平板培地上における阻止円の大きさとがんしゅ形成抑制効果との関係	96
5 考察	96

第3節 非病原性 <i>Rhizobium vitis</i> VAR03-1株のブドウ根部浸漬処理による防除効果	97
1 トマトおよびブドウ苗における根部浸漬処理のブドウ根頭がんしゅ病菌に対する防除効果 (施設内試験)	97
(1) トマトにおける防除効果	97
(2) ブドウにおける防除効果	98
2 根部浸漬の処理条件が防除効果に及ぼす影響 (施設内試験)	99
3 菌液の高濃度, 短時間の根部浸漬処理による防除効果 (施設内試験)	99
4 根部浸漬処理のブドウ根頭がんしゅ病に対する防除効果 (圃場試験)	100
5 考察	102
第4節 ブドウ根部における非病原性 <i>Rhizobium vitis</i> VAR03-1株の定着性と防除効果の持続性	104
1 根部浸漬処理による VAR03-1株のブドウ根部に対する定着性	104
2 希釈平板法によって得られた再分離菌と VAR03-1株の遺伝情報および抗菌活性の比較	105
3 根部浸漬処理による VAR03-1株と K84株のブドウ根部に対する定着性の比較	106
4 根部浸漬処理による非病原性 <i>R. vitis</i> VAR03-1株の防除効果の持続性 (施設内試験)	106
5 考察	107
第5節 他植物の根頭がんしゅ病に対する防除効果	108
1 トマトの根部浸漬処理によるキク科植物の根頭がんしゅ病菌に対する防除効果 (施設内試験)	108
2 バラの根部浸漬処理によるバラ科植物の根頭がんしゅ病菌に対する防除効果 (施設内試験)	108
3 平板培地上での抗菌活性	109
4 考察	109
第4章 総合考察	112
摘 要	118
引用文献	119
英文摘要	123

緒言

2007年現在、岡山県はブドウの栽培面積（結果樹面積）約1,070ha、収穫量約14,400tを誇り、山梨、長野、山形県に次いで全国第4位（中国四国農政局統計情報部2007年）のブドウの主要産地である。県内の農産物別産出額でも米、鶏卵、生乳に次ぐ第4位（果樹品目第1位）の102億円（粗生産額）であり、岡山県の果樹生産の重要な柱になっている。ところが、2002年に土壤病害である根頭がんしゅ病の症状が疑われる樹および苗木が散見され、岡山県農業総合センター農業試験場に同病害の診断依頼が寄せられた。ブドウ根頭がんしゅ病は植物病原性（がんしゅ形成性）細菌 *Rhizobium vitis* (Ophel and Kerr, 1990) Young et al., 2001 [= *Agrobacterium vitis*, *A. tumefaciens* biovar 3; 以下、学名表記はCシステム（澤田, 2007; Young et al., 2001）に従う] によって起こる土壤伝染性の病害であり、発病すると、乳白色から淡褐色で径数mmの柔らかいこぶが接木部付近を中心とする主幹の粗皮下や主枝などの地上部に形成され、時間の経過とともに暗褐色で不整形の大きながんしゅとなる（Fig. 1）。被害としては樹勢や果実品質を低下させ、激しい場合には主枝や樹全体が枯死に至るため、世界中のブドウ生産国で問題となっている。我が国における本病による経済的被害の正確な統計はないが、カナダのオンタリオ州では本病の発生により醸造用ブドウで毎年約200万ドルの経済損失を被っているという統計がある（University of Guelph, 1999）。本病原細菌を保菌した苗木の流通によって本病の広域的な伝染が起こることは一般的に知られており、病原細菌は土壤中に長く生存して伝染源となる（Burr and Katz, 1983; Burr et al., 1998）。典型的ながんしゅを形成している樹であれば本病の診断は容易であるが、接木部に生理的に形成されたカルスや、潜在感染している樹の診断には選択培地（Brisbane and Kerr, 1983; Roy and Sasser, 1993）を用いた病原細菌の分離が必須である。しかしながら、既報の選択培地は選択性に乏しく、複数の細菌が混在して増殖した培地上から目的の病原細菌を識別するのは困難な場合があり、診断には熟練を要した。さらに、本病は有効な防除技術がないため、診断が確定した次の防除指導は、罹病樹の伐採や罹病苗木の廃棄といった対策しかなく、生産者にとって大きな経済的被害をもたらしていた。

2003年1月に岡山県果樹苗木生産販売組合の要請によって、岡山県農業総合センター農業試験場が苗木生産に用いる現地母樹を中心とした本病原菌の感染調査に乗

り出した。県内の苗木生産者の保有する母樹およびがんしゅ様症状を有する苗木について病原細菌の分離を試みた結果、感染している母樹を確認できたが、その際に選択培地上にブドウ根頭がんしゅ病菌と同一のコロニー形態を示す非病原性の細菌が複数得られた。生理・生化学的性質、16S rDNA塩基配列、病原性の調査から、それらを非病原性 *R. vitis* であると同定した。これら非病原性菌はブドウ根頭がんしゅ病菌と病原性以外の諸性質において全く差異が無いため選択培地上に本病原細菌と同じコロニーを形成することから、分離後さらに生理・生化学的性質の調査や生物検定法による病原性の判定を必要とし、迅速な診断の支障となっていた。そこで、新たな診断手法の一つとして *R. vitis* の16S rDNAを標的とした特異的プライマーと、TiまたはRiプラスミドを有する病原性関連遺伝子である *virC* オペロンを標的とした特異的プライマーとを組み合わせたマルチプレックスPCRによるブドウ根頭がんしゅ病菌の簡易同定法を開発した。さらに、植物体より直接核酸を抽出し、それを鋳型としてマルチプレックスPCRを行うことにより病

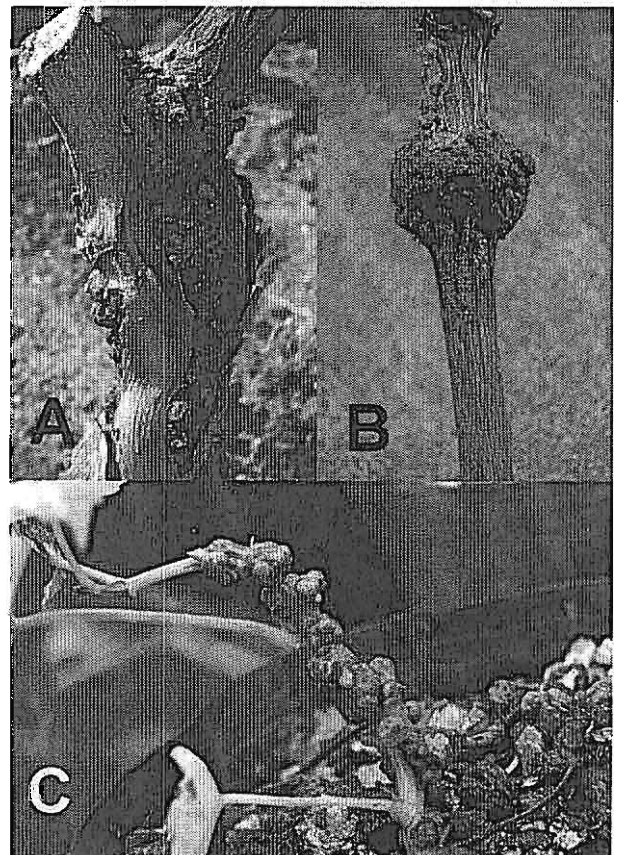


Fig. 1. A: Crown gall formed on the trunks of a grapevine. B: Crown gall developed on a graft of a grapevine nursery stock. C: Crown gall developed on 1-year-old seedling.

原細菌の分離、培養によらない迅速な遺伝子診断法を開発した。以上のことから、同病害の診断において正確性と迅速性を両立させることが可能となった。

主にバラ科植物に発生する根頭がんしゅ病には生物的防除の研究が進んでおり、我が国でもアグロバクテリウム・ラジオバクター剤（有効成分：非病原性 *R. rhizogenes* K84株）が微生物農薬として市販されているが、本剤はブドウ根頭がんしゅ病菌には全く防除効果がない（牧野，1986；Burr et al., 1998）。本論文では、岡山県で分離された非病原性 *R. vitis* の菌株の中に本病害のがんしゅ形成を抑制する菌株が存在することを突きとめ、最も高いがんしゅ形成抑制効果を有する VAR03-1株を拮抗微生物として選抜し、本菌株がブドウ根頭がんしゅ病菌に対して抗菌活性を持つことを明らかにした。さらに、ブドウ苗の根部に VAR03-1株を浸漬接種することにより、本病の発病を抑制できることを室内試験および圃場試験で確認した。また、VAR03-1株のブドウ根部への定着性や発病抑制効果を発揮できる濃度を検討し、安定的に防除効果を発揮する浸漬処理条件を明らかにし、今日まで防除が困難であった本病の生物的防除法を確立するための基礎が築けたものと考えられる。これらの成果の一部は既に公表した（川口ら，2004a；川口ら，2004b；川口ら，2005；Kawaguchi et al., 2005a, 2005b；川口ら，2006a, 2006b；川口・井上，2007a, 2007b；川口ら，2007；Kawaguchi et al., 2007；川口ら，2008a, 2008b；Kawaguchi et al., 2008a, 2008b, 川口，2009；Kawaguchi and Inoue, 2009；Kawaguchi, 2009）が、本論文は未発表の成果も含めて取りまとめたものである。

本論文を草するに当たり、懇切な御指導を賜りご校閲の労をとって頂いた岡山大学大学院自然科学研究科教授一瀬勇規博士、同教授白石友紀博士、同准教授豊田和弘博士に心から深謝の意を表す。また、共同研究者としてご協力頂くとともに終始懇切なご指導と供試菌株の分譲、抗血清による菌の系統解析のデータを賜った独立行政法人農業生物資源研究所澤田宏之博士、本研究の遂行にあたり終始暖かい激励、ご指導と供試菌株の分譲を

賜った静岡大学農学部教授瀧川雄一博士、元静岡県病害虫防除所所長（現光産業創成大学院大学教授）牧野孝宏博士、鹿児島大学農学部准教授境雅夫博士、供試菌株の分譲を賜った宮崎大学農学部准教授佐伯雄一博士、長野県果樹試験場近藤賢一氏、秋田県農林水産技術センター果樹試験場佐藤裕氏、鳥根県農業技術センター山本淳氏、静岡県農林技術研究所外側正之博士、北海道立道南農業試験場三澤知央氏、データの統計解析手法についてご教授賜った佐賀県上場営農センター副所長兼研究部長田代暢哉博士、ご助言と激励を賜った独立行政法人農業環境技術研究所石井英夫博士、兵庫県農林水産総合技術センター相野公孝博士、同センター神頭武嗣博士、佐賀県果樹試験場井手洋一氏、三重県農業研究所鈴木啓史氏、鳥取県農林総合研究所園芸試験場安田文俊博士、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所中野正明博士、同果樹病害研究チーム須崎浩一博士、九州大学大学院農学研究院教授土屋健一博士、本研究の端緒を与えられ研究当初から多大なご支援とご指導を賜った元岡山県農業総合センター農業試験場北部支場長（現全農おかやま）那須英夫博士、終始暖かい激励とご指導を頂いた同場長伊達寛敬博士、同副場長永井一哉博士、前病虫研究室長故近藤章博士、病虫研究室長土居典秀氏、病虫研究室専門研究員谷名光治氏、岡山県農業総合センター普及指導課副参事千脇健司氏、共同研究者として研究の遂行に多大なるご援助とご指導いただいた同病虫研究室専門研究員井上幸次博士、研究遂行上ご助力頂いた同病虫研究室関係各位、現地調査でご支援頂いた岡山県果樹苗木生産販売組合、岡山県農業総合センター普及指導課、農業普及指導センター、現地農家の各位に心から感謝の意を表す。

なお、本研究は岡山県から2003年から5か年間、本病の発生状況調査、診断および診断技術の開発には「病害虫・生育障害の診断と対策指導」、生物的防除技術の開発には「現地緊急対策試験」の研究費として助成を受けた。記して謝意を表す。

第1章 非病原性 *Rhizobium vitis* の分離・同定および *Rhizobium vitis* の分子系統解析

2002年に岡山県の一部の地域で根頭がんしゅ病の症状が疑われる樹および苗木が散見され、岡山県農業総合センター農業試験場に同病害の診断依頼があった。以下の結果が示すように、苗木生産に用いる現地母樹を中心とした本病原細菌の感染調査を行い、感染樹を特定した。

また、その際に選択培地上にブドウ根頭がんしゅ病菌と同一のコロニー形態を示す非病原性の細菌が複数得られ、診断の支障となった。今後の迅速な診断のためには、病原細菌に付随して分離されてくる細菌を特定しておく必要があると考えたことから、細菌学的性質、16S rDNA塩基配列、病原性の調査により、それらの菌株の同定を行った。

さらに、日本産の *Rhizobium vitis* 菌株間の遺伝的差異を分子系統学的手法により調査することにより、病原性 *R. vitis* と非病原性 *R. vitis* の進化的起源について検討した。

第1節 岡山県におけるブドウ母樹および苗木の根頭がんしゅ病菌の感染実態

岡山県におけるブドウ苗木生産用の母樹および苗木のブドウ根頭がんしゅ病菌の感染実態を把握するため、苗木生産者の保有する母樹およびがんしゅ様症状を有する苗木について病原細菌の分離を行った。

1 母樹の検定

材料および方法

2003年3~4月、県内の苗木生産農家7戸の保有する母樹計393本 (Table 1-1) について休眠枝の剪定痕を再度切断して噴出してくる樹液0.5~5mlをマイクロチューブ (栄研化学製) に採取し病原細菌の分離を行った。樹液0.1mlを Roy and Sasser が考案した *R. vitis* 選択寒天培地 (以下, RS 培地) (Roy and Sasser, 1983) 上に塗布し, 30°Cで5日間培養した。得られたコロニーのうち, *R. vitis* が示す特徴的な紫色を呈する目玉状のコロニーを釣菌し, 脇本処方によるショ糖加用ジャガイモ煎汁 (以下, 脇本) 寒天培地に画線して純化を行い, 供試菌株とした。

Table 1-1. Isolation of tumorigenic strain from mother plants of nursery stocks of grapevine

Sample	Cultivar	No. of sample	No. of sample isolated bacteria	No. of sample isolated tumorigenic strains ²
Mother plant	Pione	54	6	0
	Muscat of Alexandria	28	6	0
	Kyoho	1	1	0
	Seto Giants	2	0	0
	Muscat Baily A	6	1	0
	Aki Queen	1	0	0
	Neo Muscat	2	0	0
	Cabernet Franc	71	29	0
	SO4	4	3	0
	Teleki-Kober 5BB	185	68	1
	Teleki 8B	3	2	0
	101-14 Mgt	23	15	0
	Other varieties	13	6	0
	Total	393	137	1
Nursery stock	Pione / Teleki-Kober 5BB ³	4	1	0
	Seto Giants / Teleki-Kober 5BB	23	22	4
	Gross Colman / Teleki-Kober 5BB	4	2	0
	Other varieties	13	4	0
	Total	44	29	4

² Pathogenicity tests were conducted on tomato seedling

³ Scion cultivar / rootstock

病原性試験についてはトマト苗を用いた単針付傷接種による生物検定法 (Sawada et al., 1990) で行った。すなわち、2003年5月9日に本葉3葉期のトマト「ボンデローザ」の苗の茎(子葉の上下1cm)に、脇本寒天平板培地上に形成された供試菌株のコロニーを釣菌した爪楊枝を貫通する程度に突き刺して接種した。接種部位は5mm間隔とし、4か所に接種した。供試菌株あたりトマト苗3株を用い、接種後は温室で管理し約20日後に接種部のがんしゅ形成の有無を調査した。

結 果

393本の母樹より選択培地を用いて分離を試みた結果、137本からブドウ根頭がんしゅ病菌と類似したコロニーが得られた (Table 1-1)。これらの菌株について病原性検定を行った結果、1本の母樹「テレキ5BB」由来の菌株のみトマト苗にがんしゅを形成し、病原性が認められた (Table 1-1)。

2 苗木の検定

材料および方法

2003年1月、県内産のブドウ苗木44本について (Table 1-1) がんしゅ様の肥大が認められた接木部から組織片をおよそ1g採取し、70%エタノールで約1分間表面殺菌した。滅菌水で洗浄後に乳鉢で磨砕した磨砕液0.1ml、RS培地上に塗布して30℃で5日間培養した。得られたコロニーのうち、*R. vitis*が示す特徴的な目玉状のコロニーのものを釣菌し、脇本寒天培地に画線して純化を行い、供試菌株とした。各菌株の病原性検定は前述の母樹の検定と同様に行った。

結 果

44本の苗木から選択培地を用いて病原細菌の分離を試みた結果、29本からブドウ根頭がんしゅ病菌と類似したコロニーが得られた (Table 1-1)。これらの菌株について病原性検定を行った結果、4本の苗木(穂木品種：瀬戸ジャイアンツ、台木品種：テレキ5BB)由来の菌株のみトマト苗にがんしゅを形成し、病原性が認められたのに対し、残り25本由来の菌株では病原性は認められなかった (Table 1-1)。

3 考 察

本節では岡山県における苗木生産者の保有する母樹およびがんしゅ様症状を有する苗木についてブドウ根頭がんしゅ病菌の分離を行うことにより、感染実態を調査し

た。393本の母樹を調査した結果、1本から病原性を有する細菌が分離された。調査した全ての母樹の地上部にはがんしゅの形成は認められなかったことから、病原性細菌が分離された母樹の外観は健全であったため保菌樹としたが、根部ではがんしゅを形成していた可能性も考えられる。保菌樹の存在は調査母樹全体の0.3%程度となり、本県の母樹における感染率は非常に低いことが明らかとなった。また、がんしゅ様の肥大が認められた44本の苗木のうち、4本から病原性を有する細菌が分離されたことから、この4本の苗木の接木部の肥大はがんしゅである可能性が高いと考えられた。調査した苗木には全てがんしゅ様の肥大が認められていたにもかかわらず、病原細菌が分離された苗木は調査苗木全体の9%程度であった。従って、苗木に形成されたがんしゅ様肥大の全てが本病とは限らず、本病原細菌が関与する比率は比較的低いと考えられた。このように、接木部の肥大の症状から、本病であることを正確に診断することは困難と考えられた。特に苗木の流通においては接木部の肥大はがんしゅとして見られる場合が多いことから、苗木における本病の正確な診断が非常に重要である。

しかしながら、ブドウ苗木からの細菌の分離では、ブドウ根頭がんしゅ病菌と類似したコロニー形状の非病原性菌が選択培地上に多数検出され、個々のコロニーごとに病原性検定を行う必要がある。さらに従来の検定植物のトマトを用いた接種による病原性検定では判定までに30日程度が必要であり、迅速な診断が難しい。このため、このような問題点を解消できる新たな迅速且つ正確な診断法の開発が必要と考えられた。

第2節 非病原性 *Rhizobium vitis* の分離および同定

前節で述べたように、ブドウ根頭がんしゅ病菌の感染を判定するには、選択培地を用いた分離が必要であるが、現状では細菌のコロニー形状の目視による判別に頼らざるを得ない。しかし、この診断法においては、コロニー形状がブドウ根頭がんしゅ病菌と類似した非病原性菌が多数分離されるため、正確な診断の支障になっている。そこで本節では、ブドウ根頭がんしゅ病菌と非病原性菌の正確な識別方法の開発に資するため、病原性菌および非病原性菌の同定を行った。

1 細菌学的性質

材料および方法

前節において県内産のブドウ苗木より分離された非

病原性菌のうち9菌株(菌株名: VAR03-1, VAR03-3, VAR03-4, VAR03-21, VAR03-24, VAR03-28, VAR4-23, VAR7-1, Ar-4), および病原性菌1菌株(VAT03-9)を供試した(Table 1-2). 細菌学的性質はMooreら(2001), 後藤ら(1984a, b)の方法に準じ, 3-ケトラクトースの産生, アルギニンジヒドロラーゼ活性, アルブチン加水分解, リトマスミルク培養, オキシダーゼ活性, 生長素要求性, 2%NaCl耐性, 30°Cでの生育, 35°Cでの生育, RS培地での生育, D-1培地(Moore, et al., 1988)での生育, クエン酸の利用, 酸の産生(エリスリトール, メレジットース, エタノール), アルカリの産生(マロン酸, L-酒石酸)の17項目について調査した. また, 対照菌株として, がんしゅ形成性 *Rhizobium*

radiobacter (= *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1) AtC1株, 毛根形成性 *R. radiobacter* (= *A. rhizogenes* biovar 1) MAFF03-01724株, がんしゅ形成性 *R. rhizogenes* (= *A. tumefaciens* biovar 2) AtR1株およびCh-Ag-2株, がんしゅ形成性 *R. vitis* (= *A. tumefaciens* biovar 3) G-Ag-27株およびAt-90-23株を供試した(Table 1-2).

結 果

17項目の細菌学的性質を調査した結果, 8菌株(VAR03-1, VAR03-3, VAR03-4, VAR03-21, VAR03-28, VAR4-23, VAR7-1, VAT03-9)については *R. vitis* 2菌株と全ての性質について一致した(Table 1-2). Ar-4株については, *R. radiobacter* 2菌株と最もよく性質が¹

Table 1-2. Bacteriological characteristics and pathogenicity of grapevine isolates differing from those of the reference strains of genus *Rhizobium*

Test	Present strains				Reference strains			
	Group A ²	VAT03-9	Ar-4	VAR03-24	<i>Rhizobium radiobacter</i> (Ti) or (Ri) AtC1, MAFF301724	<i>R. rhizogenes</i> (Ti) AtR1, Ch-Ag-2	<i>R. vitis</i> (Ti) G-Ag-27, At-90-23	<i>R. larrymoorei</i> ³ (Ti)
Bacteriological characteristics								
Production of 3-ketolactose	- ^x	-	+	-	+	-	-	-
Arginine dihydrolase	+	+	+	-	+	-	+	NT
Arbutin hydrolysis	-	-	+	+	+	+	-	NT
Litmus milk reaction	ALK	ALK	ALK	ALK	ALK	AC	ALK	ALK
Oxidase reaction	+	+	+	+	+	-	+	+
Growth factor requirement	+	+	-	+	-	+	+	NT
Growth:								
in 2% NaCl	+	+	+	+	+	-	+	+
at 30°C	+	+	+	+	+	-	+	NT
at 35°C	-	-	+	-	+	-	-	-
on Roy and Sasser's medium	+	+	+	+	-	-	+	NT
on D-1 medium	+, AC	+, AC	+, ALK	+, AC	+, ALK	+, AC	+, AC	NT
Utilization of citrate	+	+	-	+	-	+	+	-
Acid from								
Erythritol	-	-	-	+	-	+	-	NT
Melezitose	-	-	+	+	+	-	-	-
Ethanol	+	+	+	-	+	-	+	NT
Alkali from								
Malonic acid	+	+	-	-	-	+	+	-
L-Tartaric acid	+	+	+	+	-	+	+	+
Pathogenicity (tumor formation)								
Tomato	-	+	-	-	+	+	+	+
Sunflower	-	+	-	-	NT	NT	+	NT
Grapevine	-	+	-	-	NT	NT	+	NT

² Group A includes seven isolates (VAR03-1, VAR03-3, VAR03-4, VAR03-21, VAR03-28, VAR7-1 and VAR4-23)

³ Data cited from Bouzar et al. (1995), Sawada and Tsuchiya (2003)

^x +, positive; -, negative; ALK, alkaline; AC, acid; NT, not tested

致した（17項目中15項目）が，RS 培地での生育および L- 酒石酸の利用能については結果が異なった（Table 1-2）．VAR03-24株については対照菌株の中で近い性質の菌が認められなかったことから，海外で発生が報告されたイチジク根頭がんしゅ病菌であるがんしゅ形成性 *R. larrymoorei* の細菌学的性質（Bouzar et al., 1995；澤田・土屋，2003）と比較したところ，9項目中7項目について一致した（Table 1-2）．

2 病原性の調査

(1) 植物体への接種試験

材料および方法

前項1と同様の10菌株を供試した．各菌株をそれぞれ脇本寒天平板培地で前培養し，一白金耳量を1mlの滅菌蒸留水に懸濁した菌液を接種源とした．ポットで栽培したトマト（‘ポンデローザ’，播種60日後），ヒマワリ（‘マンモス’，播種60日後），ブドウ（‘ネオ・マスカット’，1年生実生苗）に各菌株の菌液を針で単刺有傷接種（トマトおよびヒマワリ1株の主幹に4か所，ブドウ1株の主幹に7か所）した．接種は2003年7月25日に行い，ビニルハウスにて管理した．1菌株あたり植物は3株ずつ供試し，トマトおよびヒマワリは接種約30日後，ブドウは接種約90日後に接種か所のがんしゅ形成の有無を観察した．また，対照菌株として，がんしゅ形成性 *R. radiobacter* AtC1株，毛根形成性 *R. radiobacter* MAFF03-01724株，がんしゅ形成性 *R. rhizogenes* AtR1株および Ch-Ag-2株，がんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株および At-90-23株を供試した（Table 1-2）．

結 果

対照菌株として用いたがんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株および At-90-23株と，県内のブドウ苗木より分離された VAT03-9株については供試した全ての植物において接種か所のがんしゅの形成が認められた．しかし，9菌株（VAR03-1，VAR03-3，VAR03-4，VAR03-21，VAR03-24，VAR03-28，VAR4-23，VAR7-1，Ar-4）については供試した全ての植物においてがんしゅの形成は認められなかった（Fig. 1-1，Table 1-2）．がんしゅ形成性 *R. radiobacter* AtC1株，毛根形成性 *R. radiobacter* MAFF03-01724株，がんしゅ形成性 *R. rhizogenes* AtR1株および Ch-Ag-2株はトマトにのみ接種したが，接種か所のがんしゅの形成が認められた（Table 1-2）．

(2) Polymerase chain reaction (PCR) による病原性関連遺伝子 *virC1-virC2* の検出

材料および方法

前節において県内産のブドウ苗木より分離された非病原性菌のうち11菌株（VAR03-1，VAR03-3，VAR03-4，VAR03-21，VAR03-24，VAR03-28，VAR4-23，VAR7-1，Ar-4，PS-7，XC-6），および病原性菌1菌株（VAT03-9）を供試した．PCR プライマーとして，がんしゅ形成性 *Rhizobium* 属細菌が有する Ti プラスミド上に存在する病原性関連遺伝子群の一部である遺伝子 *virC1* と *virC2* を挟んだ414bpを増幅する特異的プライマー VCF3（5'-GGC GGG CGY GCY GAA AGR AAR ACY T-3'）および VCR3（5'-AAG AAC GYG GNA TGT TGC ATC TYA C-3'）（Kawaguchi et al. 2005a；Sawada and

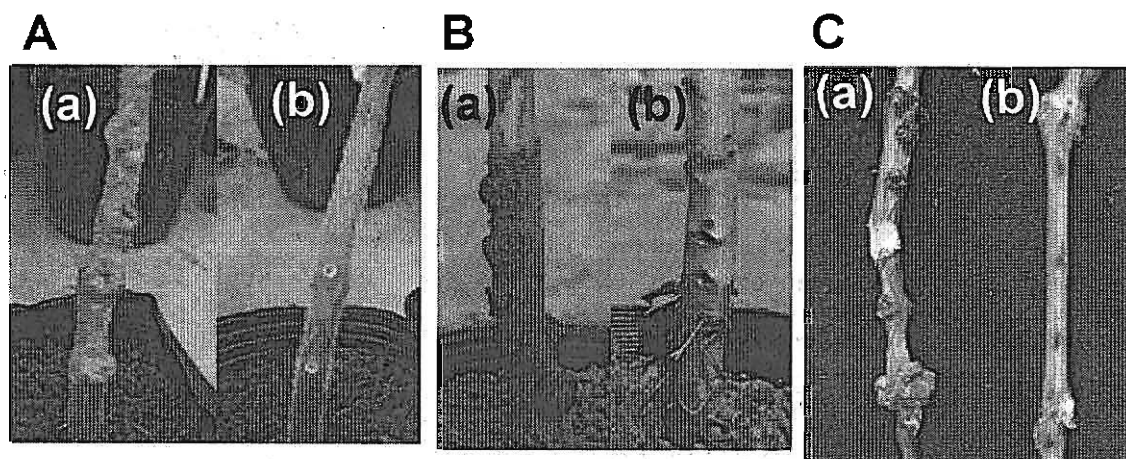


Fig. 1-1. Strains isolated from grapevine were tested for pathogenicity on young plants. A: A stem of tomato seedling. B: A stem of sunflower seedling. C: A stem of grapevine seedling. (a) Inoculated with strain VAT03-9 (= MAFF211676). (b) Inoculated with strain VAR03-1.

Tsuchiya 2003; Sawada 2004) を用いた。各供試菌株のコロニーを一白金耳量とり、0.1mlの滅菌蒸留水に懸濁して95℃ 10分間ヒートショックさせた後、水中で急冷し、15,000rpmで3分間遠心分離した上澄み液を鋳型としてPCRに供試した。サーマルサイクラーはTaKaRa PCR thermal cycler MP (タカラバイオ社製) を用い、PCRポリメラーゼはAmpliTaq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems社製) を用いた。PCRは、まず95℃で8分間加熱し、94℃で30秒間、60℃で1分間、72℃で2分間加熱する温度サイクルを40回繰り返す。その後72℃で7分間加熱する条件で行った。対照菌株としてがんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株を供試した。PCR後、3%アガロースゲルで電気泳動(100V)を約40分間行い、SYBR Green 染色液(タカラバイオ社製)で30分間染色して紫外線照射下でゲル上のバンドの有無を観察した。ゲルの撮影にはSYBR Green 専用フィルターを用いてデジタルカメラCOOLPIX885(Nikon社製)で撮影した。

結 果

対象菌株として用いたがんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株および県内のブドウ苗木より分離されたVAT03-9株では414bpの位置にバンドが確認され、*virC1-virC2*の遺伝子が検出されたが、病原性が認められなかった11菌株(VAR03-1, VAR03-3, VAR03-4, VAR03-21, VAR03-24, VAR03-28, VAR4-23, VAR7-1, Ar-4, PS-7, XC-6)についてはバンドが認められなかった(Fig. 1-2)。

3 16S rDNA 塩基配列

材料および方法

前項2-(2)と同様の12菌株を供試した。PCRプライ

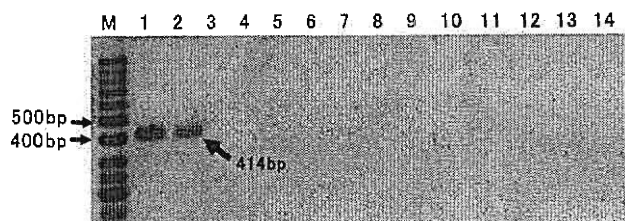


Fig. 1-2. Amplification products obtained by polymerase chain reaction (PCR) separated by agarose (3%) gel electrophoresis. Lanes: M, 50bp ladder marker; 1, tumorigenic *R. vitis* strain G-Ag-27; 2, VAT03-9; 3, VAR03-1; 4, VAR03-3; 5, VAR03-4; 6, VAR03-21; 7, VAR03-28; 8, VAR7-1; 9, VAR4-23; 10, Ar-4; 11, VAR03-24; 12, PS-7; 13, XC-6; 14, Distilled water as negative control. The expected size for *virC* operon is 414bp.

マーとしてグラム陰性細菌の16S rDNA増幅用ユニバーサルプライマーである8-27f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') および1510-1429r (5'-GGC TAC CTT TGT TAC GAC TT-3') (Lane 1991) を用いた。各供試菌株のコロニーを一白金耳量とり0.1mlの滅菌蒸留水に懸濁して95℃ 10分間ヒートショックさせた後、水中で急冷し、15,000rpmで3分間遠心分離した上澄み液を鋳型としてPCRに供試した。サーマルサイクラーはTaKaRa PCR thermal cycler MP (タカラバイオ社製) を用い、PCRポリメラーゼはAmpliTaq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems社製) を用いた。PCRは、まず95℃で8分間加熱し、94℃で1分間、55℃で30秒間、72℃で1分間加熱する温度サイクルを25回繰り返す。その後72℃で10分間加熱する条件で行った。得られたPCR産物(約1450bp)をDNAシークエンスに供試した。シークエンスプライマーには上記の8-27f, 1510-1492rに加え、343-357f (5'-TAC GGG AGG CAG CAG-3') および1115-1100r (5'-AGG GTT GCG CTC GTT G-3') も供試した。DNAシークエンス解析はABI PRISM 3100 (Applied Biosystems社製) を用いてダイナーミネーター法で行った。PCR産物の全長の塩基配列を決定し、得られた塩基配列情報を日本DNAデータベース(DDBJ)のデータベースより相同性検索を行い、最も近縁の細菌種を決定した。

結 果

16S rDNAの塩基配列を決定し、相同性検索を行った結果、8菌株(VAR03-1, VAR03-3, VAR03-4, VAR03-21, VAR03-28, VAR4-23, VAR7-1, VAT03-9)については *R. vitis* (= *Agrobacterium* biovar 3) の16S

Table 1-3. Species of bacteria with 16S rDNA sequences most similar to those of the strains

Strain	Bacterial species with most similar sequence (accession number)	Identity (%)
VAR03-1	<i>Rhizobium vitis</i> (U45329)	100
VAR03-3	<i>Rhizobium vitis</i> (U45329)	100
VAR03-4	<i>Rhizobium vitis</i> (U45329)	99.9
VAT03-9	<i>Rhizobium vitis</i> (U45329)	99.9
VAR03-21	<i>Rhizobium vitis</i> (U45329)	99.6
VAR03-24	<i>Rhizobium larrymoorei</i> (Z30542)	99.3
VAR03-28	<i>Rhizobium vitis</i> (U45329)	99.7
VAR4-23	<i>Rhizobium vitis</i> (U45329)	100
VAR7-1	<i>Rhizobium vitis</i> (U45329)	99.9
Ar-4	<i>Rhizobium radiobacter</i> (AJ389903)	99.9
PS-7	<i>Pseudomonas syringae</i> (AE016875)	96.0
XC-6	<i>Xanthomonas melonis</i> (Y10756)	98.2

rDNA 塩基配列と99.6~100%一致した (Table 1-3). Ar-4株については, *R. radiobacter* (= *Agrobacterium biovar 1*) と99.9%一致し, VAR03-24株については *A. larrymoorei* と99.3%一致した (Table 1-3). PS-7株は *Pseudomonas syringae* と96.0%, XC-6株は *Xanthomonas melonis* と98.2%一致した (Table 1-3).

4 考 察

本節では, ブドウ根頭がんしゅ病菌と非病原性菌を正確に区別する方法の開発に資することを目的として, 第1節でブドウ組織から分離された病原性を有する細菌および非病原性菌の同定を行った. 細菌学的性質17項目, 植物 (トマト, ヒマワリ, ブドウ) への接種による病原性検定, PCRによる病原性関連遺伝子の検出および16S rDNA 塩基配列のシーケンス解析による相同性検索の結果を総合的に判定した結果, VAT03-9株を病原性 (がんしゅ形成性) *R. vitis*, 8菌株 (VAR03-1, VAR03-3, VAR03-4, VAR03-21, VAR03-28, VAR4-23, VAR7-1, VAT03-9) を非病原性 *R. vitis*, Ar-4株を非病原性 *R. radiobacter* と同定した. VAR03-24株については接種試験およびPCRにおいて病原性は確認されず, *R. larrymoorei* の細菌学的性質 (Bouzar et al., 1995; 澤田・土屋, 2003) の9項目中7項目と一致し, *R. larrymoorei* の16S rDNA の塩基配列と99.3%の相同性を有していたことから, 非病原性 *R. larrymoorei* に非常に近縁であると考えられる. しかし, *R. larrymoorei* は近年発見された新種の細菌であり (Bouzar et al., 1995), 菌の性状に関する情報が比較的乏しいことから, 判断を保留した. PS-7株は *P. syringae* の16S rDNA の塩基配列と96.0%の相同性を有しており, XC-6株は *X. melonis* の16S rDNA の塩基配列と98.2%の相同性を有していたが, 細菌の種を決定するには相同性レベルが低く, また両菌株とも細菌学的性質の調査をしていないことから, それぞれを *Pseudomonas* sp. および *Xanthomonas* sp. と同定した. これらの菌は *virC1-virC2* 遺伝子を持たず, 第1節における病原性検定においても接種したトマト苗にがんしゅ形成以外の腐敗等の病原性は認められなかった (データ省略) ことから, ブドウ樹体内に存在する内生細菌であると考えられた.

以上の結果から, ブドウ組織から分離される非病原性の細菌には, 非病原性 *R. vitis* および非病原性 *R. radiobacter* が含まれることが明らかとなった. 非病原性 *R. vitis* の存在は世界的には既に知られており, ブドウ樹体内でブドウ根頭がんしゅ病菌に付随して分離される事例が報告されている (Burr and Katz, 1983). しかしな

が日本においては, *R. vitis* であるブドウ根頭がんしゅ病菌の存在は既に知られていたが, 同属同種の非病原性菌はこれまで未発見であった (田部井・西山, 1991) ことから, 本節での報告は非病原性 *R. vitis* の日本における最初の発見であると考えられる. また, ブドウ樹体内には, 非病原性 *R. vitis* および非病原性 *R. radiobacter* だけでなく, *Rhizobium* 属細菌以外の *Pseudomonas* 属細菌や *Xanthomonas* 属細菌なども存在し, それらの細菌は *R. vitis* と同じコロニー形状でRS培地上に分離されてくることが明らかとなった. このため, RS培地での分離後に病原性 *R. vitis* とそれ以外の細菌を迅速且つ正確に区別する手法の開発が必要であると考えられた.

第3節 *Rhizobium vitis* の分子系統解析

土壌伝染性のブドウ根頭がんしゅ病は日本各地で発生が認められているが, 病原細菌である *R. vitis* の遺伝的多様性については明らかでない. また, 岡山県のブドウ苗木から発見した, 病原性 (がんしゅ形成性) *R. vitis* と非病原性 *R. vitis* の遺伝的差異についても興味を持たれた. そこで, 抗血清を用いたスライド凝集反応, rep-PCR (the repetitive sequence-based polymerase chain reaction) DNAフィンガープリント法 (REP-PCR, BOX-PCR, ERIC-PCR) および複数の必須遺伝子の塩基配列を連結した上で分子系統解析を行うMLSA (Multilocus sequence analysis) により, 日本産を中心とする病原性および非病原性 *R. vitis* (以下, それぞれを「病原性菌」, 「非病原性菌」とする) の多様性解析を行った.

1 抗血清を用いたスライド凝集反応

植物病原細菌における血清学的な検定方法 (Schaad, 1979) は既に広く利用されている. ブドウ根頭がんしゅ病菌においてもポリクロナル抗血清が既に作成されており, スライド凝集反応および寒天ゲル内二重拡散法によって4つの血清型が存在することが知られている (Sawada et al., 1992a, 1992b) が, 非病原性 *R. vitis* がどの血清型に属するかについては未検討である. そこで, 日本産を中心とする病原性菌および非病原性菌の血清型について検討した.

材料および方法

日本産を中心とする *R. vitis* の36菌株 (病原性菌28菌株, 非病原性菌8菌株) を供試した (Table 1-4). 既報の4つの血清型 (A-D) を決定する4つのポリクロナル抗血清 (抗G-Ag-27, G-Ag-26, G-Ag-60, NCPPB2562

Table 1-4. List of *Rhizobium vitis* strains analyzed

Strains	Pathogenicity	Source	Location (supplier) ^y	Group		
				Serogroup	Genetic group	
					rep-PCR	MLSA
G-Ag-27	Tumorigenic	Grapevine	Nagano, Japan (H. Sawada)	A	A	A
YGAt32-3	Tumorigenic	Grapevine	Yamanashi, Japan (H. Sawada)	A	A	A
G-Ag-4	Tumorigenic	Grapevine	Shimane, Japan (H. Sawada)	A	A	A
G-Ag-9	Tumorigenic	Grapevine	Shimane, Japan (H. Sawada)	A	A	—
MAFF211676 (= VAT03-9) ^z	Tumorigenic	Grapevine	Okayama, Japan	A	A	A
MAFF211678 (= VAT3-2)	Tumorigenic	Grapevine	Okayama, Japan	A	A	—
VAT06-1	Tumorigenic	Grapevine	Okayama, Japan	— ^x	A	—
VAT06-30	Tumorigenic	Grapevine	Okayama, Japan	—	A	—
G-Ag-52	Tumorigenic	Grapevine	Iwate, Japan (H. Sawada)	A	A	A
G-Ag-62	Tumorigenic	Grapevine	Yamagata, Japan (H. Sawada)	A	A	A
K-Ag-1	Tumorigenic	Kiwifruit	Hiroshima, Japan (H. Sawada)	A	A	—
K-Ag-2	Tumorigenic	Kiwifruit	Hiroshima, Japan (H. Sawada)	A	A	—
At-90-23	Tumorigenic	Grapevine	Shimane, Japan (J. Yamamoto)	A	A	—
At-90-62	Tumorigenic	Grapevine	Shimane, Japan (J. Yamamoto)	A	A	—
At-5	Tumorigenic	Grapevine	Shimane, Japan (J. Yamamoto)	B	B	B
MAFF211674 (=A5-1)	Tumorigenic	Grapevine	Akita, Japan	B	B	B
MAFF211675 (=A5-2)	Tumorigenic	Grapevine	Akita, Japan	B	B	B
MAFF211677 (=A5-4)	Tumorigenic	Grapevine	Akita, Japan	B	B	B
A5-5	Tumorigenic	Grapevine	Akita, Japan	—	B	—
A5-6	Tumorigenic	Grapevine	Akita, Japan	—	B	—
A5-7	Tumorigenic	Grapevine	Akita, Japan	—	B	—
A5-8	Tumorigenic	Grapevine	Akita, Japan	B	B	—
A5-9	Tumorigenic	Grapevine	Akita, Japan	—	B	—
A5-11	Tumorigenic	Grapevine	Akita, Japan	—	B	—
A5-13	Tumorigenic	Grapevine	Akita, Japan	—	B	—
A5-15	Tumorigenic	Grapevine	Akita, Japan	—	B	—
VAT06-11	Tumorigenic	Grapevine	Okayama, Japan	—	B	—
G-Ag-19	Tumorigenic	Grapevine	Nagano, Japan (H. Sawada)	ng ^w	B	B
G-Ag-21	Tumorigenic	Grapevine	Nagano, Japan (H. Sawada)	B	B	B
G-Ag-23	Tumorigenic	Grapevine	Nagano, Japan (H. Sawada)	B	B	—
9-1-5	Tumorigenic	Grapevine	Nagano, Japan	B	B	B
9-3-1	Tumorigenic	Grapevine	Nagano, Japan	B	B	—
9-3-5	Tumorigenic	Grapevine	Nagano, Japan	B	B	—
G-Ag-61	Tumorigenic	Grapevine	Aomori, Japan (H. Sawada)	B	B	—
G-Ag-66	Tumorigenic	Grapevine	Akita, Japan (H. Sawada)	B	B	—
G-Ag-67	Tumorigenic	Grapevine	Akita, Japan (H. Sawada)	B	B	—
G-Ag-60	Tumorigenic	Grapevine	Aomori, Japan (H. Sawada)	C	C	C
NCPFB3554 ^t	Tumorigenic	Grapevine	Australia (H. Sawada)	C	C	C
VAT07-1	Tumorigenic	Grapevine	Okayama, Japan	—	D	D
VAT8-1	Tumorigenic	Grapevine	Okayama, Japan	—	D	D
NCPFB2562	Tumorigenic	Grapevine	Greece (H. Sawada)	D	D	D
VAR03-1	Nonpathogenic	Grapevine	Okayama, Japan	D	E	E
VAR03-3	Nonpathogenic	Grapevine	Okayama, Japan	D	E	E
VAR03-4	Nonpathogenic	Grapevine	Okayama, Japan	D	E	—
VAR03-21	Nonpathogenic	Grapevine	Okayama, Japan	D	E	—
VAR03-28	Nonpathogenic	Grapevine	Okayama, Japan	D	E	—
VAR4-23	Nonpathogenic	Grapevine	Okayama, Japan	D	E	—
VAR7-1	Nonpathogenic	Grapevine	Okayama, Japan	D	E	E
VAR7-4	Nonpathogenic	Grapevine	Okayama, Japan	D	E	—

^z MAFF, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Tsukuba Ibaraki, Japan

^y Unless a supplier is stated, we isolated the strain

^x —; Not tested

^w ng; Not grouped (Sawada et al., 1992a, 1992b)

^t Type strain

血清)を用いた (Sawada et al., 1992a, 1992b). 各抗血清を生理食塩水で20倍に希釈し, スライドガラス上に1滴採った. 供試菌株をPPGA斜面培地 (Sawada et al., 1990) で28°C, 24時間培養した後, 白金線でごく少量を釣菌して抗血清に徐々に混合し, スライドガラスを穏やかに前後に傾けながら凝集の有無を観察した. なお, G-Ag-19株については全ての抗血清で高い凝集価を示すため抗血清では類別不能の菌株とされており (Sawada et al., 1992a, 1992b), ここでは改めてスライド凝集反応は行わなかった.

結 果

病原性菌については既報 (Sawada and Ieki, 1992, Sawada et al., 1992a, 1992b) と同じグルーピングになった. 12菌株 (G-Ag-27, YGA32-3, G-Ag-4, G-Ag-9, MAFF211676, MAFF211678, G-Ag-52, G-Ag-62, K-Ag-1, K-Ag-2, At-90-23, At-90-62) は抗 G-Ag-27 血清 (血清型 A) に対してのみ凝集反応を示したことから, これらの菌株は血清型 A に属すると判断した (Table 1-4, 1-5). 13 菌株 (At-5, MAFF211674, MAFF211677, MAFF211678, A5-8, G-Ag-21, G-Ag-23, 9-1-5, 9-3-1, 9-3-5, G-Ag-61, G-Ag-66, G-Ag-67) は抗 G-Ag-26 血清 (血清型 B) に対してのみ凝集反応を示したことから, これらの菌株は血清型 B に属すると判断した (Table 1-4, 1-5). 2 菌株 (G-Ag-60, NCPPB3554^T) は抗 G-Ag-60 血清 (血清型 C) に対してのみ凝集反応を示したことから, これらの菌株は血清型 C に属すると判断した (Table 1-4, 1-5). 病原性菌 1 菌株 (NCPPB2562, ギリシャ産) と非病原性菌 8 菌株

Table 1-5. Reactions of *Rhizobium vitis* strains to antisera prepared against serogroups A-D in slide agglutination test

Serogroup ^z	Number of strains ^y	Antiserum ^x to heat-treated cells of			
		G-Ag-27 (A) ^w	G-Ag-26 (B)	G-Ag-60 (C)	NCPPB 2562 (D)
A	12	+	-	-	-
B	13	-	+	-	-
C	2	-	-	+	-
D	9	-	-	-	+

^z See previous reports (Sawada et al., 1992a, 1992b)

^y See Table 1-4

^x Diluted 20-fold with saline

^w Serogroup to which the strain belongs (Sawada et al., 1992a, 1992b)

^v +: massive agglutination within 30 sec; -: no agglutination within 2 min

(VAR03-1, VAR03-3, VAR03-4, VAR03-21, VAR03-28, VAR4-23, VAR7-1, VAR7-4) は抗 NCPPB2562 血清 (血清型 D) に対してのみ凝集反応を示したことから, これらの菌株は血清型 D に属すると判断した (Table 1-4, 1-5).

2 rep-PCR DNA フィンガープリント解析

近年, 細菌および糸状菌のゲノム DNA 上に存在する複数の繰り返し配列を同時に増幅し, アガロースゲル電気泳動で多型を検出して菌の個体識別を行う rep-PCR DNA フィンガープリント法が開発され, 生態研究に利用されている (Gilson et al., 1984; Horita and Tsuchiya, 2001; Hulton et al., 1991; Louws et al., 1998; Maeda et al., 2007; Martin et al., 1992, 澤田, 2008). しかし, *R. vitis* に関して本手法による遺伝的な個体識別は未だ検討されていない. そこで, 本手法を用いて *R. vitis* の遺伝的なグルーピングについて検討した.

材料および方法

前項にて血清型の調査に供試した *R. vitis* 36 菌株に新たに病原性菌 13 菌株を加えた 49 菌株 (病原性菌 41 菌株, 非病原性菌 8 菌株) に対して, rep-PCR DNA フィンガープリント解析を行った. rep-PCR には REP (repetitive extragenic palindromic) 領域を増幅する REP-PCR 法, ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) 領域を増幅する ERIC-PCR 法及び BOX 領域を増幅する BOX-PCR 法を用いた. プライマーは REP-PCR には REP1R (5'-III ICG ICG ICA TCI GGC-3') と REP2I (5'-ICG ICT TAT CIG GCC TAC-3'), ERIC-PCR には ERIC1R (5'-ATG TAA GCT CCT GGG TAT TCA C-3') と ERIC2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'), BOX-PCR には BOXA1R (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') を用いた (Louws et al., 1998). 各供試菌株のコロニーを一白金耳量とり 0.1ml の滅菌蒸留水に懸濁して 95°C 10 分間ヒートショックさせた後, 水中で急冷し, 15,000rpm で 3 分間遠心分離した上澄み液を鋳型 DNA 溶液として PCR に供試した. サーマルサイクラーは TaKaRa PCR thermal cycler MP (タカラバイオ社製) を用いた. 鋳型 DNA 溶液を 1μl, ERIC1R/ERIC2 プライマーセットまたは BOXA1R (各 20 pmol/μl) を 2μl, QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN 社製) を 12.5μl, 滅菌蒸留水を 9.5μl を混合して PCR 反応液 (総量 25μl) とした. PCR は, まず 95°C で 14 分間加熱し, 95°C で 30 秒間, 50°C で 1 分 30 秒間, 72°C で 1 分 30 秒間加熱

する温度サイクルを35回繰り返し、その後72°Cで10分間加熱する条件で行った。PCR後、3%アガロースゲルで電気泳動(50V)を約1時間30分行い、SYBR Green 染色液(タカラバイオ社製)で30分間染色して紫外線照射下でゲル上のバンドの有無を観察した。ERIC-PCRおよびBOX-PCRは菌株あたり3回行った。各菌株で得られたバンドのアガロースゲル上での位置に番号を付け、その位置にバンドが存在する場合には1点を、バンドが存在しない場合には0点を記録し、Diceの方法(Dice, 1945)で菌株間の類似度係数を算出した。系統樹は得られた類似度係数を用いてUPGMA法(the unweighted pair group method with arithmetic average)(Sneath and Sokal, 1973)で作成した。グルーピングの頑健性を評価するため、WinBootソフトウェアプログラム(Yap and Nelson, 1996)を用いてデータ置換を2,000回行い、ブートストラップ値を算出した。類似度80%以上のクラスターを同一グループとして区別した。

結果

REP-PCRでは安定的なバンドの多型が得られなかったが(データ省略)、ERIC-PCR及びBOX-PCRにおいて再現性のあるバンドの多型が得られたことから、データを連結し系統樹を作成した(Fig. 1-4, Table 1-4)。その結果、前項で分類した血清型Aは同じグループAとしてまとまった(Fig. 1-3, Table 1-4)。血清型B及びCについても同様に、それぞれが同じグループとしてまとまった(Fig. 1-3, Table 1-4)。血清型Dは病原性菌と非病原性菌に細分化され、病原性菌1菌株(NCPPB2562, ギリシャ産)はグループD、非病原性菌8菌株(VAR03-1, VAR03-3, VAR03-4, VAR03-21, VAR03-28, VAR4-23, VAR7-1, VAR7-4)はグループEとした(Fig. 1-3, Table 1-4)。また、新たに供試した病原性菌9菌株のうち、2菌株(VAT06-1, VAT06-30)はグループAに、9菌株(A5-5, A5-6, A5-7, A5-9, A5-11, A5-13, A5-15, VAT06-11, G-Ag-19)はグループBに、2菌株(VAT07-1, VAT8-1)はグループDに類別された(Fig. 1-4, Table 1-4)。

3 MLSA (Multilocus sequence analysis)

複数の必須遺伝子の塩基配列を連結した上で分子系統解析を行うMLSAは、分子系統解析の中でも信頼性の高い手法の一つとされており(澤田, 2008)、一幡ら(2006)は必須遺伝子である*dnaK*, *enb*, *pyrG*, *recA* および *rpoD* が指標したMLSAによって*Rhizobium*科を構成する菌種の遺伝的な類縁関係について報告している。しか

し、*R. vitis*に属する菌個体群について本手法による遺伝的な個体識別は未検討である。そこで、*R. vitis*がゲノム上に保持する必須遺伝子のうち*pyrG*, *recA* および *rpoD* を指標とした、MLSAによって*R. vitis*の遺伝的なグルーピングを行い、rep-PCR DNAフィンガープリント法に基づいた系統樹と比較した。

材料および方法

前項のrep-PCR DNAフィンガープリント法に供試した菌株から17菌株(病原性菌14菌株, 非病原性菌3菌株)を無作為に選び、試験に供試した。*pyrG*, *recA* および *rpoD* 遺伝子をPCRにて増幅し、ダイレクトシーケンスに用いた。*pyrG* 増幅用プライマーはApyrF1(5'-GCG CGA TAT GTA TTC ATC ACH GGC GG-3') およびApyrR4(5'-CCA AAG CCG CCC GGM ACS AGR ATG C-3')、*recA* 増幅用プライマーはrecAF1(5'

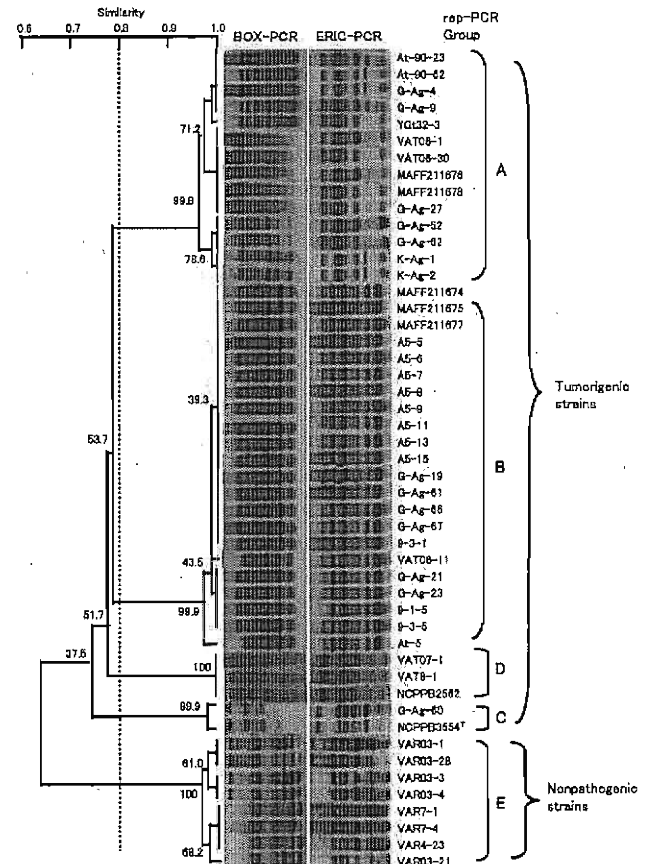


Fig. 1-3. Genetic diversity of 49 strains of *Rhizobium vitis* (41 tumorigenic strains and 8 nonpathogenic strains) revealed by rep-PCR analyses. A dendrogram was constructed using the unweighted pair group method with arithmetic average clustering. Values on branches represent the results of bootstrap analysis with 2,000 iterations.

-CGK CTS GTA GAG GAY AAA TCG GTG GA-3') および *recA*2 (5'-CGR ATC TGG TTG ATG AAG ATC ACC AT-3'), *rpoD* 増幅用プライマーは ArpoF1 (5'-TGA TCA AGG CCG CSA AGA AGC GCG G-3') および ArpoR2 (5'-ATG CGG TTC TGG TTS AGC GAM AGC G-3') を供試した (一幡ら, 2006). PCR 条件は一幡ら (2006) の報告に準じ, タッチダウン法で行った. それはつまり, まず95°Cで7分間加熱し, 変性反応を94°Cで1分間, アニールリングを65°Cで1分間, 伸長反応を72°Cで2分間加熱する温度サイクルを2回行い, 以後2サイクルごとにアニールリング温度を1°Cずつ下げた行き, 最終的にアニールリング温度を56°Cまで下げ, 続いて変性反応を94°Cで1分間, アニールリングを65°Cで1分間, 伸長反応を72°Cで2分間加熱する温度サイクルを15回繰り返す, その後72°Cで10分間加熱する条件で行った. ポリメラーゼは QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN 社製) を用いた. シークエンス解析には上記のプライマーに加え, *recA* には *recA*F2 (5'-ATC GAG CGG TCG TTC GGC AAG GG-3') を, *rpoD* には ArpoF3 (5'-GAT GTC GAT GCT KTC SGA YAT GGG-3') も供試した (一幡ら, 2006). シークエンス解析は ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems 社製) を用いてダイターミネーター法で行った. シークエンス解析で得られた塩基配列のデータは *pyrG*, *recA* および *rpoD* 遺伝の順に連結し, 国立遺伝学研究所 (DDBJ) の Clustal W (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/clustalw-j.html>) にて近隣結合法 (NJ法) にて系統樹を作成した. グルーピングの頑健性を評価するため Clustal W プログラムでデータ置換を1,000回行い, ブートストラップ値を算出した.

結 果

各菌株において, シークエンス解析により標的とした必須遺伝子の *pyrG* から984bp, *recA* から480bp, *rpoD* から748bp の塩基配列データ (PCR プライマー部分の塩基配列は削除) が得られ, 連結データを基に NJ法により系統樹を作成した (Fig. 1-4). その結果, 17菌株は A から E の5つのグループに類別された (Fig. 1-4). MLSA に基づく系統樹の位相は, rep-PCR DNA フィンガープリント法に基づく系統樹のそれと良く一致しており, MLSA の A, B, C, D および E グループは rep-PCR DNA フィンガープリント法の A, B, C, D および E グループとそれぞれ一致した (Table 1-4).

4 考 察

本節では抗血清を用いたスライド凝集反応, BOX-PCR および ERIC-PCR による rep-PCR DNA フィンガープリント解析および MLSA を行い, 日本産を中心とする病原性および非病原性 *R. vitis* の多様性解析を行った. 抗血清を用いた血清型の調査では, 病原性菌の多くは3つ (A~C) のグループに, 病原性菌1菌株と非病原性菌は1つ (D) のグループに類別された. rep-PCR DNA フィンガープリント解析では血清型 A~C に属する菌株はそれぞれ同じグループに属したが, 血清型 D に属する病原性菌と非病原性菌は別のグループに類別され, それぞれをグループ D および E としたことから, rep-PCR DNA フィンガープリント解析による類別は血清型をより細かく類別できることが示唆された. rep-PCR DNA フィンガープリント解析に供試した菌株の中から17菌株を選び, MLSA に供試した. その結果は rep-PCR DNA フィンガープリント解析の結果を支持するものであり, rep-PCR DNA フィンガープリント解析と MLSA の系統樹は位相がほぼ同じであった. このことから, rep-PCR DNA フィンガープリント解析で得られた系統樹の妥当性が強調された. 抗血清を用いた血清型の判定よりも rep-PCR DNA フィンガープリント解析および MLSA はさらに詳細に菌株を類別することが可能であり, 病原性菌は4つのグループに, 非病原性菌は病原性菌とは異なる1つのグループに類別されるこ

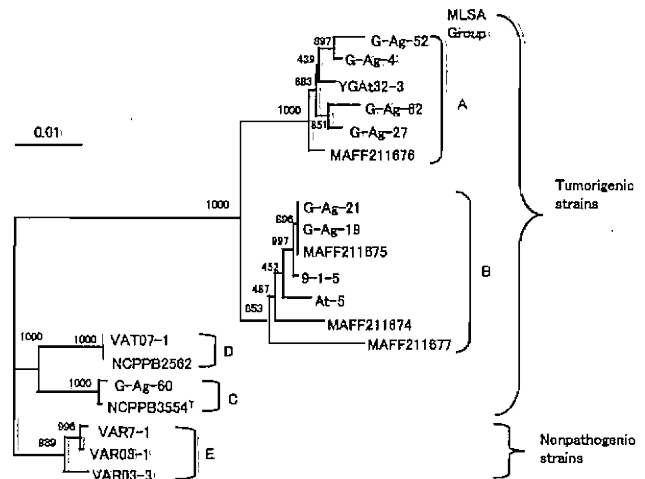


Fig. 1-4. Phylogenetic analysis of 17 strains of *Rhizobium vitis* (14 tumorigenic strains and 3 nonpathogenic strains) based on the neighbor-joining method using the concatenated sequence data of *pyrG*, *recA*, and *rpoD*. Numbers above branches are confidence values obtained for 1,000 bootstrap replicates. The bar represents a phylogenetic distance of 1%.

とが明らかとなった。rep-PCR DNA フィンガープリント解析およびMLSAは共に細菌が持つ遺伝情報を基にした系統解析であることから、これらの手法で類別されるグループは「遺伝子型 (Genetic group)」として定義することが妥当であると考えた。その遺伝子型はrep-PCR DNA フィンガープリント解析 (ERIC-PCR および BOX-PCR による) または MLSA によって判定でき

ることが明らかとなり、現在 *R. vitis* の遺伝子型は少なくとも5つ存在し、病原性菌は遺伝子型 A ~ D、非病原性菌は遺伝子型 E に類別されることが明らかとなった。以上のことから、岡山県で分離された非病原性 *R. vitis* は、病原性菌とは進化的起源が異なる菌群である可能性が示唆された。

第2章 ブドウ根頭がんしゅ病の遺伝子診断

前章において、岡山県内でブドウ苗木生産に用いる母樹および生産された苗木におけるブドウ根頭がんしゅ病の病原細菌の保菌調査を行った結果、ブドウ樹液や組織内に病原細菌だけでなく、非病原性 *Rhizobium vitis* が多く存在していることが明らかとなった。これら非病原性菌は病原性以外の諸性質においてブドウ根頭がんしゅ病菌と全く同一であり、選択培地上に本病原細菌と同じコロニーを形成するため、これらを同定するには、細菌の分離後に生理・生化学的性質の調査や検定植物への接種による病原性の判定を必要とし、迅速な診断の支障となっていた。そこで本章では、*R. vitis* の16S rDNA を標的とした特異的プライマーと、Ti または Ri プラスミド（以下、pTi または pRi）に存在する病原性関連遺伝子 *virC* 領域を標的とした特異的プライマー（澤田ら，2003）を組み合わせたマルチプレックス PCR によるブドウ根頭がんしゅ病菌の簡易同定法を開発した。

さらに、罹病したブドウ樹組織から DNA を直接抽出する方法（以下、DNA 直接抽出法）とマルチプレックス PCR を組み合わせ、病原細菌の分離作業が不要となる迅速な診断法を開発した。

第1節 マルチプレックス PCR によるブドウ根頭がんしゅ病菌の簡易同定

本病は地上部ががんしゅという特徴的な症状を呈するものの、接木部や傷口などに生理的に形成されたカルスとの違いが明瞭でない場合も多い。また、病徴が現れていない保菌樹と健全樹とを区別できないことから、本病の診断には選択培地を用いた病原細菌の分離培養が必須であった。しかしながら既報の選択培地は確実な選択性に欠けており、前章の結果が示すとおり RS 培地（Roy and Sasser, 1993）を用いてブドウ樹組織から細菌を分離したところ *R. vitis* だけでなく非病原性 *R. radiobacter*、*Pseudomonas* 属細菌および *Xanthomonas* 属細菌なども *R. vitis* と同じ形状のコロニーを形成した。そこで、ブドウ根頭がんしゅ病菌の16S rDNA を標的とした特異的プライマーを新規に設計し、pTi 上に存在する病原性関連遺伝子の一つである *virC* 領域を標的とした特異的プライマー VCF3 および VCR3（澤田ら，2003）を組み合わせたマルチプレックス PCR による本病原細菌の新たな簡易同定法を開発した。

1 *Rhizobium vitis* の16S rDNA を標的とした特異的プライマーの開発

(1) プライマーの設計

材料および方法

日本 DNA データバンクに登録されている *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. vitis* の基準菌株 (Type strain) および近縁の *Rhizobium* 属細菌の16S rDNA 塩基配列を照らし合わせ、フォワードプライマーには *R. radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. vitis* に共通の塩基配列を、リバースプライマーには *R. vitis* のみが保持する特異的な塩基配列を選定し、16S rDNA の一部 (570bp) を増幅させる2種類のプライマー Ab3-F3 (5'-ATG ACG GTA GTC GGA GAA GAA GCC-3') と Ab3-R4 (5'-CTG TCT CTG TGT CCC CGA AAG G-3') を設計した (Fig. 2-1, Table 2-2)。設計したプライマーを評価するため、*Rhizobium* 属細菌を中心とする103菌株 (Table 2-1) に対して PCR を行った。すなわち、脇本培地上に形成したコロニーを滅菌した爪楊枝で釣菌し、滅菌蒸留水20μl に懸濁し、94℃で10分間加熱した後、-70℃で急冷させた。鋳型 DNA 溶液1μl, Ab3-F3 と Ab3-R4 (各20pmol/μl) 各1μl, AmpliTaq Gold PCR Master Mix

```

351 CCATGCCGCG TGAGTGATGA AGGTGTTAGG ATTGTAAGC TCTTTCACCG
401 ATGAAGATAA TGACGGTAGT CGGAGAAGAA GCCCCGGGTA ACTTCGTGCC
451 AGCAGCGCGG Ab3-F3GTAATACGAA GGGGGCTAGC GTTGTTCGGA ATTACTGGGC
501 GTAAGCGCGA CGTAGGCGGA TAATTAAGTC AGGGGTGAAA TCCCGCAGCT
551 CAACTGCGGA ACTGCCTTTG ATACTGGTTA TCTTGAGTAT GGAAGAGBTA
601 AGTGAATTG CGAGTGATGA GGTGAAATTC GTAGATATTC GCAGGAACAC
651 CAGTGGCGAA GGC GGCTTAC TGGTCCATTA CTGACGCTGA GGTGCGAAAG
701 CGTGGGGAGC AAACAGGATT AGATACCTCG GTAGTCCACG CCGTAAACGA
751 TGAATGTTAG CCGTCGGCAA GTTGACTTGT CCGTGGCGCA CGTAACGCAT
801 TAAACATTCC GCCTGGGGAG TACGGTCGCA AGATTAAGAC TCAAAGGAAT
851 TGACGGGGGC CCGCACAAGC GGTGGAGCAT GTGGTTAAT TaqITCCAAGCAAC
901 GCGCAGAACC TTACCAGCTC TTGACATCCT GTGACCCGAC GGAGACGTGG
951 TTTTCCCTTT CCGGGACACA GAGACAGGTG CTGCATGGCT GTCGTCAGCT
1001 CGTGTGCTGA GATGTTGGGT Ab3-R4TAAGTCCCGC AAGGAGCGCA ACCCTCGCCC

```

Fig. 2-1. Partial sequence of 16S rDNA of *Rhizobium vitis* strain NCPPB3554^T (accession number D14502). The first nucleotide corresponds to position 351 of the 16S rDNA of strain NCPPB3554^T. A *TaqI* restriction site is indicated by the open triangle. Arrows indicate the relative priming positions of primers Ab3-F3 and Ab3-R4 used in PCR, multiplex PCR and the sequencing analysis of the amplified products.

Table 2-1. Bacterial strains used in this study and multiplex PCR results

Species and strain	Source and location (supplier) ^y	Result of PCR using Ab3-F3 and Ab3-R4 primers ^w	Multiplex PCR result ^x	
			16S rDNA ^w	<i>virC1-virC2</i> ^y
<i>Rhizobium radiobacter</i> (Ti)				
AtC1	Chrysanthemum; Shizuoka, Japan (Y. Takikawa)	—	—	+
CH3	Chrysanthemum; Shizuoka, Japan (Y. Takikawa)	—	—	+
CH5	Chrysanthemum; Shizuoka, Japan (Y. Takikawa)	—	—	+
C054	Cosmea; Shizuoka, Japan (Y. Takikawa)	—	—	+
<i>Rhizobium radiobacter</i> (Ri)				
MAFF301724 ^z	Melon; Shizuoka, Japan (MAFF)	—	—	+
AR-M-A	Melon; Shizuoka, Japan (M. Togawa)	—	—	+
AR-M-B	Melon; Shizuoka, Japan (M. Togawa)	—	—	+
AR-M-C	Melon; Shizuoka, Japan (M. Togawa)	—	—	+
ARM3	Melon; Shizuoka, Japan (M. Togawa)	—	—	+
ARP-30-1	Melon; Shizuoka, Japan (M. Togawa)	—	—	+
ARP-30-3	Melon; Shizuoka, Japan (M. Togawa)	—	—	+
ARP-30-4	Melon; Shizuoka, Japan (M. Togawa)	—	—	+
<i>Rhizobium radiobacter</i> (nonpathogenic)				
A1	Grapevine; Okayama, Japan	—	—	—
A2	Grapevine; Okayama, Japan	—	—	—
Ar-4	Grapevine; Okayama, Japan	—	—	—
Ar-9	Grapevine; Okayama, Japan	—	—	—
H5-10	Grapevine; Okayama, Japan	—	—	—
N1-3	Grapevine; Okayama, Japan	—	—	—
N2-2-5	Grapevine; Okayama, Japan	—	—	—
<i>Rhizobium rhizogenes</i> (Ti)				
Ch-Ag-2	Cherry; Yamagata, Japan (H. Sawada)	—	—	+
Ch-Ag-6	Cherry; Okayama, Japan (H. Sawada)	—	—	+
AtR1	Rose; Shizuoka, Japan (Y. Takikawa)	—	—	+
Ro-Ag-10	Rose; Yamagata, Japan (H. Sawada)	—	—	+
P-Ag-1	Pear; Mie, Japan (H. Sawada)	—	—	+
P-Ag-6	Pear; Nagasaki, Japan (H. Sawada)	—	—	+
Pch-Ag-2	Peach; Okayama, Japan (H. Sawada)	—	—	+
PI-Ag-1	Plum; Okayama, Japan (H. Sawada)	—	—	+
<i>Rhizobium vitis</i> (Ti)				
NCPPB3554 ^T	Grapevine; Australia (H. Sawada)	+	+	+
NCPPB2562	Grapevine; Greece (H. Sawada)	+	+	+
YGAt32-3	Grapevine; Yamanashi, Japan (H. Sawada)	+	+	+
G-Ag-27	Grapevine; Nagano, Japan (H. Sawada)	+	+	+
G-Ag-19	Grapevine; Nagano, Japan (H. Sawada)	+	+	+
G-Ag-21	Grapevine; Nagano, Japan (H. Sawada)	+	+	+
G-Ag-23	Grapevine; Nagano, Japan (H. Sawada)	+	+	+
9-1-5	Grapevine; Nagano, Japan	+	+	+
9-3-1	Grapevine; Nagano, Japan	+	+	+
9-3-5	Grapevine; Nagano, Japan	+	+	+
G-Ag-52	Grapevine; Iwate, Japan (H. Sawada)	+	+	+
G-Ag-62	Grapevine; Yamagata, Japan (H. Sawada)	+	+	+
G-Ag-4	Grapevine; Shimane, Japan (H. Sawada)	+	+	+
G-Ag-9	Grapevine; Shimane, Japan (H. Sawada)	+	+	+
At-90-23	Grapevine; Shimane, Japan (J. Yamamoto)	+	+	+
At-90-62	Grapevine; Shimane, Japan (J. Yamamoto)	+	+	+

Table 2-1. Bacterial strains used in this study and multiplex PCR results (continued 1)

Species and strain	Source and location (supplier) ^y	Result of PCR using Ab3-F3 and Ab3-R4 primers ^w	Multiplex PCR result ^x	
			16S rDNA ^w	<i>virC1-virC2</i> ^y
<i>Rhizobium vitis</i> (Ti)				
At-5	Grapevine; Shimane, Japan (J. Yamamoto)	+	+	+
MAFF211676 (= VAT03-9)	Grapevine; Okayama, Japan	+	+	+
MAFF211678 (= VAT3-2)	Grapevine; Okayama, Japan	+	+	+
VAT06-1	Grapevine; Okayama, Japan	+	+	+
VAT06-11	Grapevine; Okayama, Japan	+	+	+
VAT06-30	Grapevine; Okayama, Japan	+	+	+
VAT07-1	Grapevine; Okayama, Japan	+	+	+
VAT8-1	Grapevine; Okayama, Japan	+	+	+
K-Ag-1	Grapevine; Hiroshima, Japan (H. Sawada)	+	+	+
K-Ag-2	Grapevine; Hiroshima, Japan (H. Sawada)	+	+	+
G-Ag-60	Grapevine; Aomori, Japan (H. Sawada)	+	+	+
G-Ag-61	Grapevine; Aomori, Japan (H. Sawada)	+	+	+
G-Ag-66	Grapevine; Akita, Japan (H. Sawada)	+	+	+
G-Ag-67	Grapevine; Akita, Japan (H. Sawada)	+	+	+
MAFF211675 (=A5-2)	Grapevine; Akita, Japan	+	+	+
MAFF211677 (=A5-4)	Grapevine; Akita, Japan	+	+	+
A5-5	Grapevine; Akita, Japan	+	+	+
A5-6	Grapevine; Akita, Japan	+	+	+
A5-7	Grapevine; Akita, Japan	+	+	+
A5-8	Grapevine; Akita, Japan	+	+	+
A5-11	Grapevine; Akita, Japan	+	+	+
A5-13	Grapevine; Akita, Japan	+	+	+
A5-15	Grapevine; Akita, Japan	+	+	+
FZ-3-1	Grapevine; Hokkaido, Japan (T. Misawa)	+	+	+
FK-2-2	Grapevine; Hokkaido, Japan (T. Misawa)	+	+	+
FM-3-2	Grapevine; Hokkaido, Japan (T. Misawa)	+	+	+
ISP-2	Grapevine; Hokkaido, Japan (T. Misawa)	+	+	+
IK612-2	Grapevine; Hokkaido, Japan (T. Misawa)	+	+	+
IS552-1	Grapevine; Hokkaido, Japan (T. Misawa)	+	+	+
UM-1	Grapevine; Hokkaido, Japan (T. Misawa)	+	+	+
UK-2	Grapevine; Hokkaido, Japan (T. Misawa)	+	+	+
MM-2	Grapevine; Hokkaido, Japan (T. Misawa)	+	+	+
OSW-1	Grapevine; Hokkaido, Japan (T. Misawa)	+	+	+
YHtZ-2	Grapevine; Hokkaido, Japan (T. Misawa)	+	+	+
YHsM-2	Grapevine; Hokkaido, Japan (T. Misawa)	+	+	+
YMK-1	Grapevine; Hokkaido, Japan (T. Misawa)	+	+	+
NKZ-2	Grapevine; Hokkaido, Japan (T. Misawa)	+	+	+
HW	Grapevine; Hokkaido, Japan (T. Misawa)	+	+	+
<i>Rhizobium vitis</i> (nonpathogenic)				
VAR03-1	Grapevine; Okayama, Japan	+	+	-
VAR03-3	Grapevine; Okayama, Japan	+	+	-
VAR03-4	Grapevine; Okayama, Japan	+	+	-
VAR03-10	Grapevine; Okayama, Japan	+	+	-
VAR03-21	Grapevine; Okayama, Japan	+	+	-
VAR03-28	Grapevine; Okayama, Japan	+	+	-
VAR7-1	Grapevine; Okayama, Japan	+	+	-
VAR7-2	Grapevine; Okayama, Japan	+	+	-
VAR7-3	Grapevine; Okayama, Japan	+	+	-
VAR7-4	Grapevine; Okayama, Japan	+	+	-
VAR4-23	Grapevine; Okayama, Japan	+	+	-

Table 2-1. Bacterial strains used in this study and multiplex PCR results (continued 2)

Species and strain	Source and location (supplier) ^z	Result of PCR using Ab3-F3 and Ab3-R4 primers ^w	Multiplex PCR result ^x	
			16S rDNA ^v	<i>virC1-virC2</i> ^y
<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>viciae</i>				
USDA2370	<i>Pisum sativum</i> ; Unknown (Y. Saeki)	—	—	—
<i>Rhizobium tropici</i> IIB				
USDA9030	<i>Phaseolus vulgaris</i> ; Unknown (Y. Saeki)	—	—	—
<i>Rhizobium</i> sp.				
SE-1	<i>Sesbania</i> ; Okayama, Japan	—	—	—
SE-3	<i>Sesbania</i> ; Okayama, Japan	—	—	—
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>				
USDA6 ^T	<i>Glycine max</i> ; Japan (Y. Saeki)	—	—	—
USDA110	Soybean; Florida, United States (Y. Saeki)	—	—	—
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>				
USDA76 ^T	Soybean; California, United States (Y. Saeki)	—	—	—
<i>Sinorhizobium fredii</i>				
USDA205 ^T	Soybean; China (Y. Saeki)	—	—	—
<i>Mesorhizobium</i> sp.				
R3	Milk vetch; Fukuoka, Japan (M. Sakai)	—	—	—
<i>Pseudomonas</i> sp.				
PS-7	Grapevine; Okayama, Japan	—	—	—
<i>Xanthomonas</i> sp.				
XC-6	Grapevine; Okayama, Japan	—	—	—

^z MAFF, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Tsukuba Ibaraki, Japan.

^y Unless a supplier is stated, we isolated strain

^x +, target band present; —, no target band present

^w 570 bp DNA fragment was amplified by PCR using the specific primer set (Ab3-F3/Ab3-R4)

^v 414 bp DNA fragment was amplified using the universal primer set (VCF3/VCR3)

^t Type strain

Table 2-2. Oligonucleotides used as PCR or sequencing primers

Primer	Tm	5'-3' nucleotide sequence ^z	Targets	Fragment length
VCF3	66	GGCGGGCGYGCYGAAGRAARACYT	<i>virC1</i> and <i>virC2</i>	414 bp
VCR3	60	AAGAACGYGGNATGTTGCATCTYAC		
Ab3-F3	62	ATGACGGTAGTCGGAGAAGAAGCC	16S rDNA	570 bp
Ab3-R4	62	CTGTCTCTGTGTCGCCGAAAGG		

^z Y = C or T; R = A or G; N = A, C, G, or T

(Applied Biosystems 社製) 12.5µl, 滅菌蒸留水9.5 µl を混合して PCR 反応液 (総量25µl) とした。PCR は、まず95°C で8分間加熱し、95°C で30秒間、62°C で1分間、72°C で1分30秒間加熱する温度サイクルを30回繰り返し、その後72°C で7分間加熱するという条件で行った。サーマルサイクラーは TaKaRa PCR Thermal Cycler MP TP3000 (タカラバイオ社製) を用いた。PCR 後、各サンプル8µl に BPB 溶液2µl (TOYOBO 社製) を加え、全量を3% アガロースゲルで100V、40分程度電気泳動

し、エチジウムブロマイドで染色し、紫外線照射下でゲル上のバンドの有無を観察した。ゲルの撮影にはエチジウムブロマイド専用フィルターを用いてデジタルカメラ COOLPIX885 (Nikon 社製) で撮影した。

結 果

供試した菌株のうち *R. vitis* 65菌株 (がんしゅ形成性菌54菌株および非病原性菌11菌株) では570bp のバンドの増幅が確認されたが、*R. vitis* 以外の38菌株からは同様

のバンドは検出されなかった (Fig. 2-3A, Table 2-1).

(2) Restriction fragment length polymorphism (RFLP) による PCR 産物の確認

前項1-(1)において Ab3-F3と Ab3-R4のプライマーセットで *R. vitis* に特異的なバンドの検出が可能であったが、得られた PCR 産物が目的の遺伝子であることを確認する必要がある。Ab3-F3と Ab3-R4による 16S rDNA の増幅領域には *TaqI* 制限酵素切断部位が1か所存在し PCR 産物を *TaqI* で切断した場合、484bp と 68bp の2つのバンドが得られる (Fig. 2-1)。そこで、Ab3-F3と Ab3-R4によって増幅された PCR 産物を *TaqI* で切断する RFLP を行うことで、PCR 産物の確認を行った。

材料および方法

前項1-(1)において、Ab3-F3と Ab3-R4のプライマーセットを用いてがんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株および非病原性 *R. vitis* VAR03-1株より得られた570bp の PCR 産物8μl に対し、*TaqI* (TOYOBO 社製) 1μl および付属の H buffer (10倍濃度) を1μl 加えてピペットでよく混ぜ、60°C で1時間加熱した。その後反応溶液を8μl とり、BPB 溶液2μl (TOYOBO 社製) を加え、全量を3% アガロースゲルで100V、40分程度電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色し、紫外線照射下でゲル上のバンドの有無を観察した。ゲルの撮影にはエチジウムブロマイド

```

1282 GTAGCGACTT GGAAGGACTG TATTGCAGGA TCAGGTTGTC ATATATCTTC
1232 GATACTTCAG GCGCGGGCGG GCGCGCTGAA AGGAAGACCT GGATCTTTTC
1182 TGGCGGTGTC GTCGAAGCTA AAGCATCCAC GGTCCAGATC GATTGCTGAT
1132 CAGAGCTGTG ACAAGCGCTG GCGGTGGCTG GGGCAGGTGG TCGATCTTCC
1082 TCGTCGAGAT TTTGAGGCGG CTGCGGCAGG GTCGAGTTTT GGTGGCAAC
1032 AGGCAAAGAA GGATGGACGA TTTGGGTCG AGCGGCGGCA AGCCGCGCTG
982 CCTCCCGAC AGACAAGCGG GBTTCGGAA TTCCGATCTT CAGCCCTCCA
932 AGGCTTCGGT AACCAATTTG GAGATAGTGA CGAGTTCCTC CATGGCGATT
882 CTGAGATTCC GTTCGAGGAG GCGCATTGTC GGATCGGTTG TCATATTGAG
832 CAATGTGAGA TGCAACATGC CACGTTCCCT CATCGCGGCA AATGGGTGTC
782 TCTGGTGCAT GGGAGACTGT ACAACTGGAA GCGTTCGGAG CATGTCCGAC

```

Fig. 2-2. Partial sequence of the *virC1* and *virC2* genes of pTiC58 (accession number M16397).

The first nucleotide shown corresponds to position 1282 of the *virC* operon of pTiC58. The borders of *virC1* and *virC2* are indicated by closed triangles. Arrows indicate the priming positions of primers VCF3 and VCR3 (Sawada and Tsuchiya 2003) used in multiplex PCR and the sequencing analysis of the amplified products.

専用フィルターを用いてデジタルカメラ COOLPIX885 (Nikon 社製) で撮影した。

結 果

がんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株および非病原性 *R. vitis* VAR03-1株より得られた570bp の PCR 産物を *TaqI* で切断した結果、484bp と 68bp の2つのバンドが得られた (Fig. 2-3B, G-Ag-27株のデータのみ記載)。以上のことから、Ab3-F3と Ab3-R4のプライマーセットは標的である 16S rDNA の領域のみを増幅していることが明らかとなった。

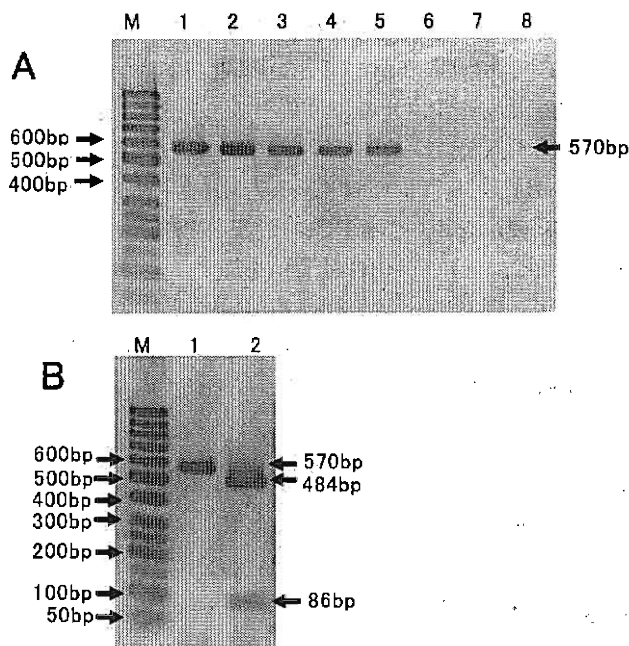


Fig. 2-3. A: Amplification products obtained by PCR using the Ab3-F3 and Ab3-R4 primers and separated by agarose (3%) gel electrophoresis. Lanes: M, 50bp DNA ladder marker; 1, tumorigenic *Rhizobium vitis* strain G-Ag-27; 2, tumorigenic *R. vitis* strain At-90-23; 3, tumorigenic *R. vitis* strain MAFF211676; 4, nonpathogenic *R. vitis* strain VAR03-1; 5, nonpathogenic *R. vitis* strain VAR7-1; 6, tumorigenic *R. radiobacter* strain AtC1; 7, tumorigenic *R. rhizogenes* strain Ch-Ag-2; 8, distilled water as negative control. The expected position of the 570bp fragment is shown. B: Restriction fragment length polymorphism (RFLP) of fragments amplified by the Ab3-F3/Ab3-R4 primer set. Lanes: M, 50bp DNA ladder marker; 1, tumorigenic *R. vitis* strain G-Ag-27 undigested; 2, tumorigenic *R. vitis* strain G-Ag-27 digested with *TaqI*.

2 マルチプレックス PCR の開発

材料および方法

Rhizobium 属細菌を中心とする103菌株を供試し (Table 2-1), 鋳型DNA溶液は前項1-(1)で調製したものをを用いた. *R. vitis* の検出用プライマーセットは Ab3-F3と Ab3-R4を, 病原性判定用のプライマーセットは pTi 上に存在する病原性関連遺伝子の一つである *virC* 領域を標的とした特異的プライマー VCF3と VCR3 (Fig. 2-2, 澤田ら, 2003) を供試した. 鋳型DNA溶液を1 μ l, Ab3-F3/Ab3-R4プライマーセット (各5 μ mol/ μ l) を1 μ l, VCF3/VCR3プライマーセット (各20 μ mol/ μ l) を1 μ l, QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN 社製) を10 μ l, 滅菌蒸留水を7 μ l を混合してPCR反応液 (総量20 μ l) とした. PCRは, まず95 $^{\circ}$ Cで14分間加熱し, 95 $^{\circ}$ Cで30秒間, 62 $^{\circ}$ Cで1分30秒間, 72 $^{\circ}$ Cで1分30秒間加熱する温度サイクルを33回繰り返す, その後72 $^{\circ}$ Cで7分間加熱するという条件で行った. サーマルサイクラーは TaKaRa PCR Thermal Cycler MP TP3000 (タカラバイオ社製) を用いた. PCR後, 反応溶液を8 μ l とり, BPB 溶液2 μ l (TOYOBO 社製) を加え, 全量を3%アガロースゲルで100V, 40分程度電気泳動し, エチジウムブロマイドで染色し, 紫外線照射下でゲル上のバンドの有無を観察した. ゲルの撮影にはエチジウムブロマイド

専用フィルターを用いてデジタルカメラ COOLPIX885 (Nikon 社製) で撮影した.

結 果

マルチプレックス PCRにより, 供試した菌株のうちがんしゅ形成性 *R. vitis* 54菌株については, *R. vitis* を決定する570bpのバンドと *virC1-virC2* 遺伝子群の存在を示す414bpのバンドの両方が得られた (Fig. 2-4, Table 2-1). 非病原性 *R. vitis* 11菌株については570bpのバンドのみが得られた (Fig. 2-4, Table 2-1). がんしゅ形成性 *R. radiobacter* 4菌株, 毛根形成性 *R. radiobacter* 8菌株およびがんしゅ形成性 *R. rhizogenes* 8菌株については *virC1-virC2* 遺伝子群の存在を示す414bpのみが得られた (Fig. 2-4, Table 2-1). それ以外の非病原性菌である, 非病原性 *R. radiobacter* 7菌株, *R. leguminosarum* 1菌株, *R. tropici* 1菌株, *Rhizobium* sp. 2菌株, *Bradyrhizobium japonicum* 2菌株, *B. elkanii* 1菌株, *Sinorhizobium fredii* 1菌株, *Mesorhizobium* sp. 1菌株, *Pseudomonas* sp. 1菌株および *Xanthomonas* sp. 1菌株はいずれのバンドも得られなかった (Fig. 2-4, Table 2-1). 以上のことから, Ab3-F3/Ab3-R4および VCF3/VCR3のプライマーセットを用いたマルチプレックス PCRでは, ブドウ根頭がんしゅ病菌であるがんしゅ形成性 *R. vitis* を特異的に検出することが可能であった.

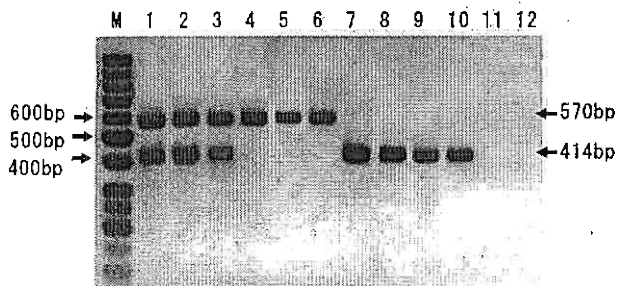


Fig. 2-4. Amplification products obtained by multiplex PCR separated by agarose (3%) gel electrophoresis. Lanes: M, 50bp DNA ladder; 1, *Rhizobium vitis* (Ti) strain G-Ag-27; 2, *R. vitis* (Ti) strain At-90-23; 3, *R. vitis* (Ti) strain VAT3-2; 4, *R. vitis* (nonpathogenic) strain VAR03-1; 5, *R. vitis* (nonpathogenic) strain VAR03-3; 6, *R. vitis* (nonpathogenic) strain VAR7-1; 7, *R. radiobacter* (Ti) strain AtC1; 8, *R. radiobacter* (Ri) strain MAFF301724; 9, *R. rhizogenes* (Ti) strain Ch-Ag-2; 10, *R. rhizogenes* (Ti) strain Atr1; 11, *R. radiobacter* (nonpathogenic) strain Ar-9; 12, Distilled water as negative control. The expected positions of the 570bp and 414bp fragments are shown.

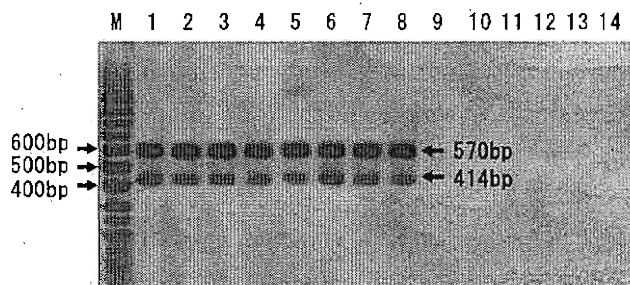


Fig. 2-5. Amplification products obtained by multiplex PCR separated by agarose (3%) gel electrophoresis. Lanes: M, 50bp DNA ladder; 1 to 5, tumors from grapevine seedling cv. Neo Muscat inoculated pathogen by needle pick method; 6, tumors from grapevine plant cv. Muscat of Alexandria inoculated pathogen by needle pick method; 7 to 8, graft unions from grapevine plant cv. Muscat of Alexandria inoculated pathogen by affusion of cell suspension; 9 to 12, stems from grapevine seedling cv. Neo Muscat no-inoculated as negative control; 13 to 14, graft unions from grapevine plant cv. Muscat of Alexandria no-inoculated as negative control. The expected positions of the 570bp and 414bp fragments are shown.

3 考 察

近年、PCRを基盤とする様々な植物病原菌の遺伝子診断法が開発されており、ブドウ根頭がんしゅ病菌であるがんしゅ形成性 *R. vitis* についても特異的プライマーを用いた病原性関連遺伝子を検出する方法が報告されている (Dong et al. 1992; Schulz et al. 1993; Sawada et al. 1995; Eastwell et al. 1995; Haas et al. 1995; Kaufmann et al. 1996). しかしながら、これまででがんしゅ形成性 *R. vitis* の同定と、それらの病原性関連遺伝子の検出を同時に行うPCR法は存在しなかった。そこで、*R. vitis* の16S rDNAを標的とした特異的プライマーセット Ab3-F3/Ab3-R4を新規に設計し、pTi上に存在する病原性関連遺伝子の一つである *virC* 領域を標的とした特異的プライマーセット VCF3/VCR3 (澤田ら, 2003) を組み合わせたマルチプレックスPCRによる簡易同定法を開発した。がんしゅ形成性 *R. vitis* では570bpと414bpの2本のバンドが出現することから、PCRで得られる情報量が増え、2本のバンドがそれぞれの内部標準としての機能も持つため、PCRの信頼性も向上すると考えられる。これまでのPCRによる検出法では主にpTiの病原性関連遺伝子のみを標的にしていたため、非病原性 *R. vitis* から全くバンドが検出されず、サンプル中に存在していても無視される場合が多かったと考えられる。

近年、環境中の様々な微生物の群集構造の解析が盛んに行われており、ブドウ樹体内の細菌の群集構造解析には非病原性菌の存在が注目される可能性があることから、本同定法を有効に活用できると考えられる。また、ブドウ以外の根頭がんしゅ病菌であるがんしゅ形成性 *R. radiobacter* やがんしゅ形成性 *R. rhizogenes* においては414bpのバンドが出現するため、本同定法はそういった菌株の病原性検定にも使用できるが、属および種は別の方法で決定する必要がある。特異的プライマー VCF3/VCR3はpTiだけでなくpRiの *virC* 領域も増幅することから、本同定法によって植物毛根病の病原細菌である毛

根形成性 *R. radiobacter* や毛根形成性 *R. rhizogenes* の病原性関連遺伝子も検出できるが、病原性の種類ががんしゅ形成性か毛根形成性かは接種試験やpTiまたはpRiの検出に特化した特異的プライマーを用いる必要がある。しかし、ブドウ毛根病の発生は世界中で報告がなく、pRiを有する毛根形成性 *R. vitis* も存在が報告されていない。このことから本同定法で570bpと414bpのバンドが得られる菌株は現時点ではブドウ根頭がんしゅ病菌として簡易同定しても差し支えないと考えられる。本同定法はブドウ根頭がんしゅ病菌であるがんしゅ形成性 *R. vitis* の簡易同定に特化したものであるが、選択培地から分離されたコロニーを迅速に同定できることから、本病の正確な診断に寄与できると考えられる。

第2節 マルチプレックスPCRによる罹病ブドウ樹組織からのブドウ根頭がんしゅ病菌の迅速検出

試験方法

がんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株を脇本寒天培地で前培養し、滅菌水で約 1×10^8 cells/mlに調整した懸濁液を接種源とした。ブドウは6年生の簡易被覆栽培‘マスカット・オブ・アレキサンドリア (以下、アレキ)’8樹と、ポット (直径15cm) に定植した1年生 (実生) の‘ネオ・マスカット (以下、ネオマス)’23樹を供試した。‘アレキ’2樹と‘ネオマス’15樹の主幹に病原細菌懸濁液を浸した注射針で1樹あたり5~10箇所単刺有傷接種 (Sawada et al., 1990) した。また、別の‘アレキ’2樹の株元に病原細菌懸濁液を1樹あたり3L、同様に‘ネオマス’2樹の株元に1樹あたり500mlを灌注した。‘アレキ’4樹と‘ネオマス’6樹を病原細菌無接種の陰性対照とした。接種3ヶ月後にがんしゅ形成を認めたものについてはがんしゅ組織、主幹組織または接木部組織を、形成を認めなかったものについては主幹組織または接木部組織

Table 2-3. Detection of tumorigenic *Rhizobium vitis* in plant tissues from grapevines using multiplex PCR

Cultivar	Sample	No. of sample	Inoculation of pathogen	Tumor formation	Re-isolated inoculum	Positive samples of PCR result
Muscat of Alexandria	Tumor	2	2 ^z	2	0	2
Neo Muscat (Seedling)	Tumor	15	15 ^z	15	14	15
Muscat of Alexandria	Graft union	2	2 ^y	0	0	2
Neo Muscat (Seedling)	Stem	2	2 ^y	0	0	2
Muscat of Alexandria	Graft union	4	0	0	0	0
Neo Muscat (Seedling)	Stem	6	0	0	0	0

^z Inoculated tumorigenic *R. vitis* strain G-Ag-27 by the needle prick method (Sawada et al., 1990)

^y Inoculated tumorigenic *R. vitis* strain G-Ag-27 by affusion of cell suspension (10^8 cells/ml)

を500~1,000mg 削り取り, 以下の試験に供試した。

削り取ったブドウ組織を液体窒素存在下で磨碎し, 約100mgの磨碎粉末を得た。DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN社製)を用いて磨碎粉末から全DNAを抽出, 精製し, DNA溶液50 μ lを得た。各DNA溶液1 μ lを鋳型とし, Ab3-F3/Ab3-R4プライマーセット(各5 μ mol/ μ l)を1 μ l, VCF3/VCR3プライマーセット(各20 μ mol/ μ l)を1 μ l, QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN社製)を10 μ l, 滅菌蒸留水を7 μ l混合してPCR反応液(総量20 μ l)とした。PCRは, まず95 $^{\circ}$ Cで14分間加熱し, 95 $^{\circ}$ Cで30秒間, 62 $^{\circ}$ Cで1分30秒間, 72 $^{\circ}$ Cで1分30秒間加熱する温度サイクルを33回繰り返す, その後72 $^{\circ}$ Cで7分間加熱するという条件で行った。サーマルサイクラーはTaKaRa PCR Thermal Cycler MP TP3000(タカラバイオ社製)を用いた。PCR後, 反応溶液8 μ lにBPB溶液2 μ l(TOYOBO社製)を加え, 全量を3%アガロースゲルで100V, 40分程度電気泳動し, エチジウムブロマイドで染色し, 紫外線照射下でゲル上のバンドの有無を観察した。ゲルの撮影にはエチジウムブロマイド専用フィルターを用いてデジタルカメラCOOLPIX885(Nikon社製)で撮影した。

また, 試験に供試した各ブドウ組織片の約300mgを70%エタノールで1分間表面殺菌した後, 滅菌水5mlを加えて磨碎し, 100 μ lをRS培地に塗布して30 $^{\circ}$ Cで5日間培養後に, 病原細菌に特有のコロニー形成の有無を観察した。

結 果

供試したブドウ組織片のうち, ブドウ根頭がんしゅ病菌を地上部に単刺有傷接種した‘アレキ’2樹と‘ネオマス’15樹, 株元に灌注接種した‘アレキ’及び‘ネオマス’各2樹ではマルチプレックスPCRにより570bpと414bpのバンドの増幅が確認されたが, 病原細菌無接種の‘アレキ’4樹と‘ネオマス’6樹からはバンドは検出されなかった(Fig. 2-5, Table 2-3)。一方, 病原細菌を接種した全21樹のうち, RS培地で再分離されたのががんしゅ組織を供試した‘ネオマス’の14樹であり, 残りの7樹からは再分離されなかったが(Table 2-3)。

考 察

ブドウ樹の組織片からのDNA直接抽出とマルチプレ

プレックスPCRを組み合わせた本同定法は病原細菌を接種した樹の組織片の全てから病原細菌を検出することができた。病原細菌を接種したががんしゅ形成がなかった‘アレキ’と‘ネオマス’各2樹の主幹または接木部組織においてもマルチプレックスPCRで陽性を示したことから, 本同定法によってブドウ根頭がんしゅ病菌を無病徴で保菌した樹からでも検出できる可能性が示唆された。また, 本同定法は本病原細菌の再分離ができなかったサンプルにおいても病原細菌の遺伝子断片を検出できたことから, 本同定法の検出感度は選択培地による分離培養法と比較してより高いと考えられる。

一般的に根頭がんしゅ病菌は自らのpTiに存在するT-DNAと呼ばれるDNA断片を植物細胞に注入して細胞を形質転換によりがんしゅ化させる。がんしゅ細胞からは*Rhizobium*属細菌の一部が資化できるオパインと総称される特殊なアミノ酸が分泌され, 根頭がんしゅ病菌はオパインを栄養源として増殖する(Zupan et al., 2000)。本報告ではがんしゅ組織からのみ病原細菌が再分離されたが, ‘アレキ’2樹と‘ネオマス’1樹ではがんしゅ組織を供試したにもかかわらず再分離されなかった。これは, これら3樹の生育が旺盛でなく, 形成されたがんしゅ自体も小さかったことから, がんしゅ組織に含まれるオパインの量が十分でなく, 病原細菌の増殖量が少なかった可能性が考えられた。

一般的にこれまでの診断法では, ブドウの組織片から細菌を分離・培養して選択培地上にコロニーを形成させるのに約5日間必要であり, その後にトマト苗を用いた病原性の生物検定および10項目程度の細菌学的性質を調査するとさらに約20~30日を有していた。しかし, 細菌分離後にマルチプレックスPCRを行う場合には約5日間の培養後, 1日あれば細菌の同定結果が得られるので, 約7日あれば診断結果が得られる。さらに, 組織片からのDNA直接抽出およびマルチプレックスPCRの組み合わせであれば, 両方併せても1日で結果が得られ, 高感度であることから, 本病の迅速な診断に有効であると考えられる。ただし, DNAの抽出およびマルチプレックスPCRは集中的な作業時間を必要とし, 1回に取り扱える検体数は20~30程度なので, 診断の必要な検体数や結果までに費やせる費用および時間に応じてそれぞれの診断法を使い分けることが必要と考えられる。

第3章 非病原性 *Rhizobium vitis* を利用したブドウ根頭がんしゅ病の生物的防除

本病の被害は成木では樹勢の低下、果実品質の劣化、がんしゅ形成部位より上部の生育不良等があり、3年生程度までの苗木、若木などでは枯死することが多い (Burr et al., 1998). 病原細菌は土壌中のブドウの残根に少なくとも2年間は生存可能であることから (Burr et al., 1998), 発病樹を改植する際は、できるだけ残根を取り除くことが望ましいが、その完全な除去は不可能である。また、改植時に既に定植・栽培されている他の樹との間隔が必要であるため、定植位置を大幅に変える訳にはいかず、改植場所だけに限定して土壌消毒を行うことも極めて困難である。

非病原性 *Rhizobium rhizogenes* (= *Agrobacterium radiobacter* biovar 2) K84株によるバラ根頭がんしゅ病の生物的防除は世界的に有名である。我が国でもその防除効果が実証されており (牧野, 1993), アグロバクテリウム・ラジオバクター剤として市販されている (2009年4月現在)。しかし、ブドウ根頭がんしゅ病菌はK84株が産生する抗菌物質であるアグロシン84に対して感受性を欠くため、K84株は本病には全く防除効果がなく (Burr et al. 1998), 他に有効な薬剤がないことから現在でも難防除病害となっている。本章では、第1章で報告した岡山県で分離および同定された非病原性 *R. vitis* からブドウ根頭がんしゅ病菌に対して拮抗性を有する菌株を選抜し、生物的防除法の開発を行った。

第1節 有望菌株の選抜

第1章でブドウ苗木から分離された細菌の病原性検定において、培地に形成された病原性 *R. vitis* のコロニーに非病原性 *R. vitis* が混在した状態でトマト苗に接種すると、がんしゅ形成が起こらなかった事例があった。よって、本県で分離された非病原性 *R. vitis* の中には、ブドウ根頭がんしゅ病菌のがんしゅ形成を抑制する菌株が存在するという仮説が考えられた。そこで、この仮説を検証するため、非病原性 *R. vitis* の各菌株とブドウ根頭がんしゅ病菌を等量混合したものをトマト、ブドウおよびヒマワリの苗の茎に有傷接種してがんしゅ形成の有無とその程度を調査し (以下、等量混合接種試験)、がんしゅ形成抑制効果の高い菌株を選抜した。また、平板寒天培地 (以下、平板培地) 上で非病原性 *R. vitis* の各菌株とブドウ根頭がんしゅ病菌を対峙培養することで抗菌活性の有無を調査した。

1 トマトを用いた生物検定

海外ではトマト根頭がんしゅ病は自然発生が確認されているが (Weller and O'Neill, 2006), 日本では未報告である。しかし、トマトは根頭がんしゅ病菌によるがんしゅの誘導を非常に受けやすいことから、様々な根頭がんしゅ病菌の病原性検定に用いられる (牧野, 1993)。また、トマトはバラ科やブドウ科の植物よりも生育が早く、種子から生育の揃った多数の苗を確保できるという利点があることから、まずトマトを用いた接種試験で拮抗細菌の選抜を行った。

材料および方法

供試菌株として、ブドウ根頭がんしゅ病菌であるがんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株、第1章にてブドウから分離された非病原性 *R. vitis* VAR03-1株, VAR03-3株, VAR03-4株, VAR03-21株, VAR03-28株, VAR07-1株, VAR4-23株, 非病原性 *Rhizobium* sp. VAR03-24株, 非病原性 *R. radiobacter* Ar-4株およびアグロバクテリウム・ラジオバクター剤の主成分である非病原性 *R. rhizogenes* K84株を用いた。各菌株を脳本寒天培地で27°C, 48時間培養した後、各菌液を約 1.0×10^8 cell/mlに調製し、がんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株の菌液と非病原性菌の各菌株の菌液をそれぞれ1:1の割合で混合し、接種源とした。トマト苗に対する接種の方法は、Sawadaら (1990) が報告した単針付傷接種による生物検定法で行った。2003年11月28日に本葉3葉期のトマト「ボンデローザ」苗の茎の子葉の上下に1cm間隔で4か所に、菌液を浸した爪楊枝を貫通する程度に突き刺して接種した。また、陽性対照として、がんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株の菌液のみを接種する区と、陰性対照として、滅菌蒸留水のみを接種する区を設けた。接種後は加温ガラス室 (20~25°C) で管理し、約25日後に接種部のがんしゅ形成の有無を調査した。がんしゅ組織の形成を認めたものについては、がんしゅの直径 (縦径と横径の平均) を測定した。トマト苗は各10株供試し、試験は3回行った。

結 果

ブドウ根頭がんしゅ病菌 G-Ag-27株に対するブドウから分離された非病原性菌株の混合接種によるがんしゅ形成抑制効果を調べた結果、非病原性 *R. vitis* の7菌株はいずれも G-Ag-27株によるトマトのがんしゅ形成を抑制した (Fig. 3-1A, Table 3-1)。その程度は菌株によって異なり、7菌株のうち VAR03-1株が最も高いがんしゅ形成抑制効果を示した (Fig. 3-1A, Table 3-1)。非病原性 *Rhizobium* sp. VAR03-24株は G-Ag-27株によるがんしゅ

形成を抑制したが、その程度は非常に低かった (Table 3-1)。非病原性 *R. radiobacter* Ar-4株および非病原性 *R. rhizogenes* K84株にはがんしゅ形成抑制効果は認められなかった (Table 3-1)。

2 ブドウを用いた生物検定

トマト苗を用いた選抜試験において、VAR03-1株が有望菌株として考えられた。ここではブドウ苗を用いて、VAR03-1株を中心とした非病原性菌株のがんしゅ形成抑制効果を調べた。

材料および方法

供試菌株としては、ブドウ根頭がんしゅ病菌であるがんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株、第1章にてブドウから分離された非病原性 *R. vitis* VAR03-1株、VAR07-1株、非病原性 *Rhizobium* sp. VAR03-24株、非病原性 *R. radiobacter* Ar-4株および非病原性 *R. rhizogenes* K84株を用いた。各菌株を脳本寒天培地で27°C、48時間培養した。培養後、各菌液を約 1.0×10^8 cell/mlに調製し、がんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株の菌液と非病原性の各菌株の菌液をそれぞれ1:1の割合で混合し、接種源とした。'ネオ・マスカット'を実生から育成した1年生苗を供試ブドウ苗とし、2004年3月17日に茎(主幹)の7か所に、菌液を

浸した注射針を貫通する程度に突き刺して接種した。また、陽性対照として、がんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株の菌液のみを接種する区と、陰性対照として滅菌蒸留水のみを接種する区を設けた。接種後は加温ガラス室(20~25°C)で管理し、約90日後に接種部のがんしゅ形成の有無を調査した。がんしゅの形成を認めたものについては、がんしゅの直径(縦径と横径の平均)を測定した。また、調査から約1年後に、供試したブドウの枯死株数を計測した。ブドウ苗は各10株供試し、試験は3回行った。

結 果

ブドウ根頭がんしゅ病菌 G-Ag-27株とブドウから分離された非病原性菌株の混合接種によるがんしゅ形成抑制効果を調べた結果、非病原性 *R. vitis* の VAR03-1株および VAR7-1株とともに G-Ag-27株によるブドウのがんしゅ形成を抑制し (Fig. 3-1B, Table 3-2)、特に1回目の試験において VAR03-1株は完全にごんしゅ形成を抑制した (Table 3-2)。また、1回目の試験の VAR7-1株、2および3回目の試験の VAR03-1株では、G-Ag-27株のみを接種した陽性対照よりも有意にごんしゅ形成を抑制し (Fig. 3-1B, Table 3-2)、ブドウ苗は枯死しなかった。非病原性 *Rhizobium* sp. VAR03-24株、非病原性

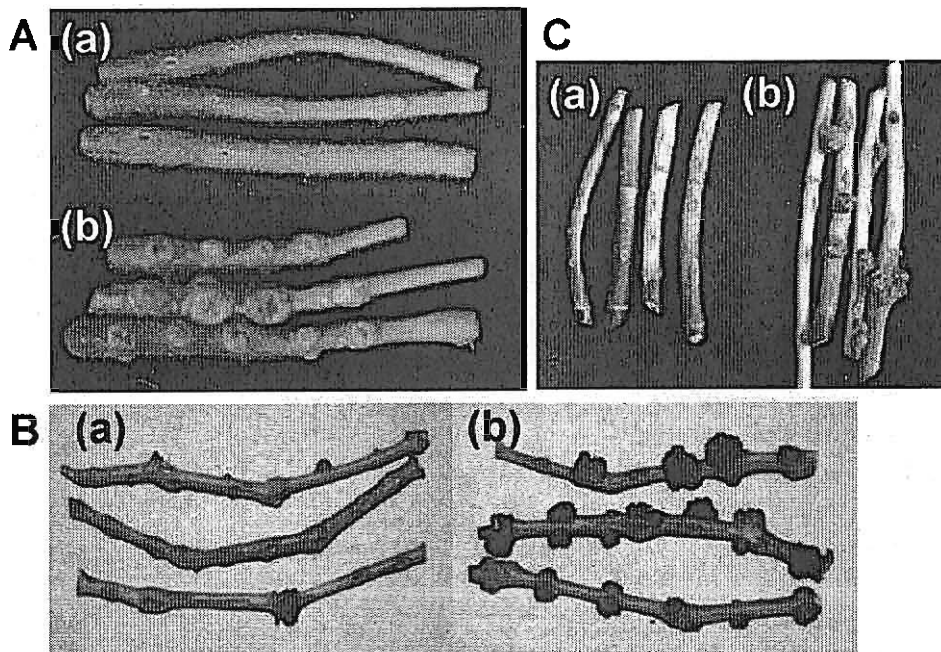


Fig. 3-1. Effect of VAR03-1 on tumor formation. A: Stems of tomato seedling, B: Stems of grapevine seedling. C: Stems of sunflower seedling, (a) Inoculated with mixtures of G-Ag-27 and VAR03-1 at the same time and at a cell ratio of 1:1. (b) Inoculated with only G-Ag-27. The photograph of tomato and sunflower seedlings were taken approximately one month after inoculation and that of grapevine seedlings approximately three months.

R. radiobacter Ar-4株および非病原性 *R. rhizogenes* K84株には G-Ag-27株によるブドウのがんしゅ形成を抑制する効果は認められず、枯死するブドウ苗が認められた (Table 3-2).

3 ヒマワリを用いた生物検定

ヒマワリについても日本での根頭がんしゅ病の自然発生は報告がないが、トマトと同様に根頭がんしゅ病菌の病原性確認の検定植物として用いられる (牧野, 1993).

ここで、VAR03-1株のがんしゅ形成抑制効果をヒマワリにおいて評価した。

材料および方法

供試菌株としてブドウ根頭がんしゅ病菌であるがんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株および非病原性 *R. vitis* VAR03-1株を用いた。両菌株を脇本寒天培地で27°C、48時間培養した。培養後、各菌液を約 1.0×10^8 cell/mlに調製し、1:1の割合で混合して接種源とした。播種後約

Table 3-1. Inhibition of tumor formation on tomato seedlings after inoculation with a mixture of *Rhizobium vitis* (Ti) strain G-Ag-27 and a strain of nonpathogenic *Rhizobium* in a 1:1 pathogen/nonpathogen cell ratio²

Species and strains	Experiment 1		Experiment 2		Experiment 3	
	Tumor formation (%)	Tumor size ^y (mm)	Tumor formation (%)	Tumor size (mm)	Tumor formation (%)	Tumor size (mm)
<i>R. vitis</i> (nonpathogenic) VAR03-1	0	0 a*	2.5	0.05 a	0	0 a
<i>R. vitis</i> (nonpathogenic) VAR03-3	10	0.24 a	7.5	0.18 a	0	0 a
<i>R. vitis</i> (nonpathogenic) VAR03-4	5	0.11 a	20	0.73 ab	12.5	0.52 ab
<i>R. vitis</i> (nonpathogenic) VAR03-21	17.5	0.55 ab	57.5	1.89 b	30	1.15 ab
<i>R. vitis</i> (nonpathogenic) VAR03-28	30	1.04 ab	30	0.93 ab	10	0.25 ab
<i>R. vitis</i> (nonpathogenic) VAR7-1	45	1.53 b	12.5	0.35 a	47.5	1.78 b
<i>R. vitis</i> (nonpathogenic) VAR4-23	10	0.37 ab	17.5	0.47 a	40	1.48 ab
<i>Rhizobium</i> sp. (nonpathogenic) VAR03-24	65	2.75 c	100	5.98 c	82.5	3.66 c
<i>R. radiobacter</i> (nonpathogenic) Ar-4	100	5.70 d	100	4.78 c	100	5.20 cd
<i>R. rhizogenes</i> (nonpathogenic) K84	100	5.31 d	95	5.40 c	90	5.46 d
Only G-Ag-27 ^x	100	4.98 d	100	5.59 c	100	6.69 d
Sterile distilled water	0	-	0	-	0	-

² Data are means of 10 replications of 4 inoculations per tomato seedling

^y Tumor diameter perpendicular to the long axis of the stem was measured. Means within a column followed by the different letter differ significantly (* $P < 0.05$), according to the Tukey's honestly significant difference (HSD) test

^x Only a tumorigenic strain G-Ag-27 (about 10^8 CFU/ml) was used as inoculum

Table 3-2. Inhibition of tumor formation on grapevine seedlings by inoculation of mixture of *Rhizobium vitis* (Ti) strain G-Ag-27 and a strain of nonpathogenic *Rhizobium* at a 1:1 pathogen/nonpathogen cell ratio²

Strain	Experiment 1			Experiment 2			Experiment 3		
	Tumor formation (%)	Tumor size ^y (mm)	Withered ^x	Tumor formation (%)	Tumor size (mm)	Withered	Tumor formation (%)	Tumor size (mm)	Withered
VAR03-1	0	0 a**	0/10	32.9	0.91 a	0/10	14.3	0.51 a	0/10
VAR7-1	10	0.22 a	0/10	NT ^y	NT	NT	NT	NT	NT
Ar-4	91.4	3.15 b	2/10	97.1	4.69 bc	6/10	NT	NT	NT
VAR03-24	72.9	3.37 b	1/10	NT	NT	NT	NT	NT	NT
K84	NT	NT	NT	92.8	3.83 b	4/10	92.9	5.37 b	1/10
Only G-Ag-27 ^w	94.3	3.83 b	1/10	100	5.67 c	3/10	97.1	6.20 b	5/10
Sterile distilled water	0	-	0/10	0	-	0/10	0	-	0/10

² Data are means of 10 replications of 7 inoculations per grapevine seedling

^y Tumor diameter perpendicular to the long axis of the stem was measured. Means within a column followed by the different letter differ significantly (** $P < 0.01$), according to Tukey's HSD test

^x Number of withered plants / number of plants tested

^w Only a tumorigenic strain G-Ag-27 (about 10^8 CFU/ml) was used as inoculum

^v NT, not tested

30日経過したヒマワリ‘マンモス’苗の茎の4か所に、2004年11月27日に菌液を浸した注射針を貫通する程度に突き刺して接種した。また、陽性対照として、がんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株の菌液のみを接種する区を設けた。接種後は加温ガラス室 (20~25°C) で管理し、約30日後に接種部のがんしゅ形成の有無を調査した。がんしゅ組織の形成を認めたものについては、がんしゅの直径 (縦径と横径の平均) を測定した。ヒマワリ苗は各10株供試し、試験は3回行った。

結 果

ブドウ根頭がんしゅ病菌 G-Ag-27株に対する非病原性 *R. vitis* VAR03-1株の混合接種によるがんしゅ形成抑制効果を調べた結果、がんしゅ形成は完全に抑制された (Fig. 3-1C, Table 3-3)。

4 平板培地上での抗菌活性

非病原性 *R. rhizogenes* K84株の拮抗作用は自身が産生する抗菌物質アグロシン84に基づくことされているが (Kerr, 1980; Smith and Hindley, 1978), 根頭がんしゅ病菌の菌株によってはアグロシン非感受性菌が存在し、このことがK84株の防除効果が発揮されない事例の原因とされている (Kerr and Htay, 1974; 牧野, 1993)。そこで、岡山県のブドウ苗木から分離された非病原性 *Rhizobium* 属菌について、複数のブドウ根頭がんしゅ病菌に対する抗菌活性を平板培地上での対峙培養で評価した。

材料および方法

抗菌活性調査の対象菌株 (Test strain) には非病原性 *R. vitis* VAR03-1株, VAR03-3株, VAR03-4株,

Table 3-3. Effect of coinoculation of *Rhizobium vitis* (nonpathogenic) strain VAR03-1 and *R. vitis* (Ti) strain G-Ag-27 at a 1:1 cell ratio on sunflower seedlings^z

Strain ^a	Tumor (%)	Tumor size ^y (mm)
VAR03-1	0	0**
Only G-Ag-27 ^x	47.5	2.36
Sterile distilled water	0	

^z Data are means of 10 replications of four inoculations per sunflower seedling

^y Tumor diameter perpendicular to the long axis of the stem was measured. Significantly different from inoculation of only G-Ag-27 (***P* < 0.01) according to Student's *t*-test.

^x Only a tumorigenic strain G-Ag-27 (about 10⁸ CFU/ml) was used as inoculum

VAR03-21株, VAR03-28株, VAR07-1株, VAR4-23株, 非病原性 *Rhizobium* sp. VAR03-24株, 非病原性 *R. radiobacter* Ar-4株および非病原性 *R. rhizogenes* K84株を用い、指示菌株 (Indicator strain) としてがんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株, At-90-23株, At-90-62株, MAFF211674株, MAFF211676株, MAFF211678株, At-5株, A5-5株, A5-7株, 9-3-5株, VAT8-1株を用いた。脇本寒天培地で27°C, 48時間培養し、培養後、各菌液を約1.0×10⁸ cell/mlに調製して接種源とした。平板培地を用いた抗菌活性調査法は既報の手法 (Kerr and Htay 1974; 松尾, 1993; Herlache and Triplett 2002) を参考にして、平板培地上での生育阻止帯 (以下、阻止円) を調査した。直径9cmの滅菌シャーレに滅菌済み Yeast-mannitol agar (YMA) 培地 (0.04% yeast extract, 1% mannitol, 1.7mM NaCl, 0.8mM MgSO₄, 2.2mM K₂HPO₄, pH7.0, 1.5% agar) を60°C程度にして約10ml注ぎ、固化させてYMA平板培地を作成した。直径8mmのペーパーディスク (アドバンテック東洋社製) をYMA平板培地の中央に置床した後、各非病原性 *Rhizobium* 属細菌の菌液を5μl滴下し27°C, 48時間培養した。シャーレのふたの内側にろ紙 (直径9cm) を敷き、クロロホルム1mlを滴下してふたを戻して30分間室温でくん蒸した後ろ紙を外して60分間静置しクロロホルムを完全に蒸発させた。その後、各指示菌株をスプレーで噴霧 (1~2ml) して培地に接種し、27°C, 48時間培養後、ペーパーディスク周辺の阻止円形成の有無およびその直径 (ペーパーディスクの直径8mmを含む) を調査した。試験は1回行い、対象菌株と指示菌株の一つの組み合わせあたり平板培地4

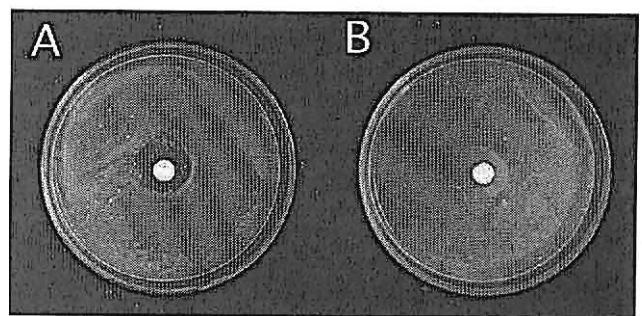


Fig. 3-2. *In vitro* antibiosis assay against *Rhizobium vitis* (Ti) strain G-Ag-27. A paper disk with a suspension of either *R. vitis* (nonpathogenic) strain VAR03-1 (A) or *R. rhizogenes* (nonpathogenic) strain K84 (B) was put onto YMA medium plates, which were then misted with a dilute suspension of G-Ag-27. At two days after misting, a zone of growth inhibition was seen around the paper disk with the suspension of VAR03-1 (A), but not around the one with K84 (B).

枚を用いた。4枚全ての阻止円の直径が10mm以下（ペーパーディスクの縁から阻止円直径までの距離が1mm以下）は抗菌活性なし（-）と判断した。1枚でも直径10mm以上の阻止円の形成が認められた場合は4枚の直径の平均値を算出し、直径10mm未満を土、直径10mm以上15mm未満を+、15mm以上20mm未満を++、20mm以上を+++として評価した。

結 果

指示菌株として用いたブドウ根頭がんしゅ病菌11菌株に対し対象菌株である非病原性 *R. vitis* の7菌株および非病原性 *Rhizobium* sp. の VAR03-24菌株は多くの組み合わせで阻止円を形成したが、形成の有無およびその大きさは対象菌株と指示菌株によって異なった (Table 3-4)。特に非病原性 *R. vitis* の VAR03-1株と VAR03-21株は全ての指示菌株に対して阻止円を形成した (Fig. 3-2, Table 3-4)。一方、非病原性 *R. radiobacter* Ar-4株および非病原性 *R. rhizogenes* K84株は全ての指示菌株に対して阻止円の形成が全く認められなかった (Fig. 3-2, Table 3-4)。

5 考 察

本節では、ブドウ根頭がんしゅ病の生物的防除技術の開発を目的とし、第1章で報告した岡山県で分離および同定された複数の非病原性 *Rhizobium* 属細菌から、ブドウ根頭がんしゅ病菌 G-Ag-27株に対して拮抗性を有する菌株を選抜した。すなわち、トマト苗の茎に対するがんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株との等量混合接種試験において、非病原性 *R. vitis* VAR03-1株は最も安定的に

がんしゅ形成を抑制した。VAR03-1株はブドウおよびヒマワリにおいてもがんしゅ形成抑制効果を示した。ブドウだけでなくトマト、ヒマワリを用いた場合でもがんしゅ形成抑制効果が認められることから、ブドウ以外の植物における防除効果も期待できると考えられた。また、平板培地上でのブドウ根頭がんしゅ病菌11菌株に対する阻止円形成による抗菌活性調査で、11菌株全てに対して阻止円形成が認められた。阻止円の直径は対象菌株と指示菌株の組合せによって異なっていたが、VAR03-1株は指示菌4菌株 (G-Ag-27, At-90-23, MAFF211674, At-5) に対して阻止円20mm以上の強い抗菌活性を有していた。また、指示菌株には遺伝子型 A, B を各5菌株ずつ、D を1菌株供試していたことから、VAR03-1株は日本に広く分布する本病原細菌の複数の異なる菌株に対して防除効果が期待できることが示唆された。非病原性 *R. rhizogenes* K84株はがんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株に対してがんしゅ形成抑制効果がなく、さらに、供試した全てのがんしゅ形成性 *R. vitis* に対して抗菌活性が認められなかった。この結果は、K84株がブドウ根頭がんしゅ病に効果がないという報告 (Burr et al., 1998) を支持するものであった。また、非病原性 *R. radiobacter* Ar-4株および非病原性 *Rhizobium* sp. VAR03-24株も G-Ag-27株に対してがんしゅ形成抑制効果がなく、阻止円の形成も認められなかったことから、病原性菌株に対する抗菌活性ががんしゅ形成抑制に関与している可能性が示唆された。この抗菌活性の強弱ががんしゅ形成抑制効果にどの程度関与しているかについては次節で検討する。

以上のことから、本節においてブドウ根頭がんしゅ病

Table 3-4. *in vitro* antibiosis assay of nonpathogenic *Rhizobium* strains against *R. vitis* (Ti) strains

Test strain	Formation of inhibition zone on YMA medium, by indicator strain ²										
	G-Ag-27 (A)	At-90-23 (A)	At-90-62 (A)	MAFF 211676 (A)	MAFF 211678 (A)	MAFF 211674 (B)	At-5 (B)	A5-5 (B)	A5-7 (B)	9-3-5 (B)	VAT8-1 (D)
VAR03-1	+++	+++	++	+	+	+++	+++	+	++	++	+
VAR03-3	+	+	+	++	+	++	+++	-	++	++	-
VAR03-4	+	+	-	++	+	+	+++	-	+	++	++
VAR03-21	+	+	++	++	+	++	++	+	+	++	++
VAR03-28	+	++	+	++	+	++	+	-	++	++	++
VAR7-1	+	+	++	+	+	++	++	-	++	+	-
VAR4-23	+	+	±	+	+	±	+	-	+	-	-
Ar-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VAR03-24	-	-	+	++	-	-	++	-	-	-	-
K84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

² Strains with an inhibition zone wider than 1 mm was evaluated as inhibition zone, +, developed inhibition zone of diameter of 10 to 15mm; ++, developed inhibition zone of diameter of 15 to 20mm; +++, developed inhibition zone of diameter of more than 20mm; ±, diameter of less than 10mm including 8mm diameter of paper disk; -, no inhibition zone (four replications of each treatment)

の生物的防除に利用できる有望な菌株として非病原性 *R. vitis* VAR03-1株を選抜した。今回、病原細菌と同濃度、等量でかつ同時に植物に接種するという非常に厳しい条件であったにもかかわらず、安定的な発病抑制効果を持つ菌株が選抜されたことから、以後の防除試験においても高い効果が期待できると考えられた。しかしながら、トマト、ヒマワリ、ブドウを用いた生物検定には指示菌株としてがんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株のみを供試したことから、今後は複数の菌株に対するがんしゅ形成抑制効果について検討する必要がある。

第2節 非病原性 *Rhizobium vitis* VAR03-1株の地上部有傷接種によるがんしゅ形成抑制効果

前節において、トマト、ブドウ、ヒマワリを用いた等量混合接種試験による生物検定で、ブドウ根頭がんしゅ病に対する拮抗細菌として非病原性 *R. vitis* VAR03-1株を選抜した。本節では、本菌株とがんしゅ形成性 *R. vitis* の混合接種における比率ががんしゅ形成抑制効果に及ぼす影響について検討した。また、本菌株のがんしゅ形成性 *R. vitis* の複数の菌株に対するがんしゅ形成抑制効果を検討し、さらに、VAR03-1株の抗菌活性とがんしゅ形成抑制効果の関係について評価した。

1. 混合接種比率ががんしゅ形成抑制効果に及ぼす影響

材料および方法

供試菌株としてブドウ根頭がんしゅ病菌であるがんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株、ブドウから分離された非病原性 *R. vitis* VAR03-1株を用いた。脇本寒天培地

で27℃、48時間培養した。培養後、両菌液を約 1.0×10^8 cell/mlに調製し、VAR03-1株とG-Ag-27株の菌液を99:1, 9:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:9の割合で混合し、接種源とした。2003年9月22日に本葉3葉期のトマト‘ポンデローザ’苗の茎の子葉の上下に1cm間隔で4か所に、菌液を浸した爪楊枝を貫通する程度に突き刺して接種した。また、陽性対照として、がんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株の菌液のみを接種する区を設けた。接種後は加温ガラス室(20~25℃)で管理し、約25日後に接種部のがんしゅ形成の有無を調査した。がんしゅの形成を認めたものについては、がんしゅ組織の直径(縦径と横径の平均)を測定した。トマト苗は各10株供試し、試験は3回行った。

結 果

トマト苗の茎に対する混合接種試験において、VAR03-1株とG-Ag-27株の各菌液の混合比率が99:1, 9:1, 3:1の場合にはがんしゅ形成を完全に抑制し、1:1の場合には陽性対照と比較してがんしゅ形成を強く抑制した(Table 3-5)。しかしながら、混合比率が1:3の場合にはがんしゅ形成抑制効果が著しく低下し、1:9の場合にはがんしゅ形成抑制効果はほとんど認められなかった(Table 3-5)。

2 トマトにおけるがんしゅ形成性 *R. vitis* の複数の菌株に対するがんしゅ形成抑制効果

材料および方法

供試菌株としてはブドウ根頭がんしゅ病菌であるがんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株, At-5株, At-90-23

Table 3-5. Effect of coinoculation of *Rhizobium vitis* (nonpathogenic) strain VAR03-1 and *R. vitis* (Ti) strain G-Ag-27 at different cell ratios on tomato seedlings²

Cell ratio (VAR03-1: G-Ag-27)	Experiment 1		Experiment 2		Experiment 3	
	Tumor formation (%)	Tumor size ³ (mm)	Tumor formation (%)	Tumor size (mm)	Tumor formation (%)	Tumor size (mm)
99:1	0	0 a**	0	0 a	0	0 a
9:1	0	0 a	0	0 a	0	0 a
3:1	0	0 a	0	0 a	0	0 a
1:1	5	0.14 a	2.5	0.08 a	0	0 a
1:3	67.5	1.91 b	90	3.81 b	82.5	3.42 b
1:9	100	4.95 c	100	5.33 c	85	4.73 b
Only G-Ag-27 ¹	100	6.38 c	95	5.75 c	100	5.22 b

² Data are means of 10 replications of four inoculations per tomato seedling

³ Tumor diameter perpendicular to the long axis of the stem was measured. Means within a column followed by the different letter differ significantly (** $P < 0.01$) according to Tukey's HSD test

¹ Only a tumorigenic strain (about 10^8 CFU/ml) was used as inoculum

株, At-90-62 株, MAFF211674 株, MAFF211675 株, MAFF211676 株, MAFF211677 株, MAFF211678 株, A5-5株, A5-6株, A5-7株, A5-9株, VAT8-1株 (14菌株) および非病原性 *R. vitis* VAR03-1株を用いた。各菌株を脇本寒天培地で27°C, 48時間培養した。培養後, 各菌液を約 1.0×10^8 cell/mlに調製し, がんしゅ形成性 *R. vitis* の各菌株と VAR03-1株の菌液をそれぞれ1:1の割合で混合し, 接種源とした。2004年10月25日に本葉3葉期のトマト 'ポンドローザ' の茎の子葉の上下に1cm間隔で4か所に, 菌液を浸した爪楊枝を貫通する程度に突き刺して接種した。陽性対照として, がんしゅ形成性 *R. vitis* の各菌株の単体の菌液のみを接種する区を設けた。接種後は加温ガラス室 (20~25°C) で管理し, 約25日後に接種部のがんしゅ形成の有無を調査した。がんしゅの形成を認めたものについては, がんしゅ組織の直径 (縦径と横径の平均) を測定した。トマト苗は各10株ずつ供試し, 試験は3回行った。

結 果

がんしゅ形成性 *R. vitis* の14菌株と VAR03-1株の等量混合接種試験の結果, 2回目の試験の MAFF211678株および At-90-62株との組み合わせではがんしゅ形成抑制

効果は認められなかったが, それ以外の試験および組み合わせでは, 高いがんしゅ形成抑制効果が認められた (Table 3-6)。

3 ブドウにおけるがんしゅ形成性 *R. vitis* の複数の菌株に対するがんしゅ形成抑制効果

材料および方法

供試菌株としてブドウ根頭がんしゅ病菌であるがんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株, At-90-23株, At-90-62株, MAFF211674 株, MAFF211676 株, MAFF211678 株, A5-6株, 9-1-5株 (8菌株) および非病原性 *R. vitis* VAR03-1株を用いた。脇本寒天培地で27°C, 48時間培養した。培養後, 各菌液を約 1.0×10^8 cell/mlに調製し, がんしゅ形成性 *R. vitis* の各菌株と VAR03-1株の菌液をそれぞれ1:1の割合で混合し, 接種源とした。'ネオ・マスカット' の実生から育成した1年生苗を供試ブドウ苗とし, 2004年5月24日に茎 (主幹) の6か所に, 菌液を浸した注射針を貫通する程度に突き刺して接種した。また, 陽性対照として, がんしゅ形成性 *R. vitis* の各菌株の菌液のみを接種する区を設けた。接種後は無加温ガラス室で管理し, 約90日後に接種部のがんしゅ形成の有無

Table 3-6. Effect of coinoculation of *Rhizobium vitis* (nonpathogenic) strain VAR03-1 and each pathogenic strain of *R. vitis* (Ti) isolated from different locations in Japan at a 1:1 cell ratio on tomato seedlings²

Tumorigenic strain (genetic group)	Experiment 1				Experiment 2				Experiment 3			
	Tumor formation (%)		Tumor size ³ (mm)		Tumor formation (%)		Tumor size (mm)		Tumor formation (%)		Tumor size (mm)	
	VAR03-1	Only pathogen	VAR03-1	Only pathogen	VAR03-1	Only pathogen	VAR03-1	Only pathogen	VAR03-1	Only pathogen	VAR03-1	Only pathogen
G-Ag-27 (A)	0	92.5	0**	4.94	12.5	100	0.44**	7.98	0	100	0**	5.13
MAFF211676 (A)	0	100	0**	5.78	12.5	95	0.34**	6.86	35	100	1.11**	6.45
MAFF211678 (A)	17.5	92.5	0.51**	4.55	75	97.5	3.11	4.74	10	87.5	0.27**	3.84
At-90-23 (A)	0	100	0**	5.98	10	95	0.37**	5.95	0	95	0**	4.84
At-90-62 (A)	27.5	100	0.99**	5.78	75	77.5	3.17	3.58	2.5	85	0.06**	3.13
MAFF211674 (B)	7.5	100	0.15**	6.15	20	100	0.58**	8.21	7.5	97.5	0.18**	6.13
MAFF211675 (B)	2.5	100	0.08**	4.60	2.5	80	0.07**	3.19	0	85	0**	3.15
MAFF211677 (B)	10	100	0.36**	6.97	2.5	97.5	0.05**	5.54	7.5	100	0.29**	5.99
A5-5 (B)	0	32.5	0**	1.27	0	32.5	0**	1.17	0	35	0**	1.02
A5-6 (B)	2.5	100	0.07**	4.20	0	95	0**	3.07	0	45	0**	1.49
A5-7 (B)	7.5	100	0.21**	6.91	5	85	0.15**	4.08	0	100	0**	5.76
A5-9 (B)	0	70	0**	2.47	2.5	90	0.07**	3.83	0	67.5	0**	2.07
At-5 (B)	2.5	97.5	0.08**	5.05	7.5	92.5	0.22**	4.29	7.5	95	0.25**	5.43
VAT8-1 (D)	0	40	0**	0.89	0	20	0**	0.75	5	20	0.23*	0.57

² Data are means of 10 replications of 4 inoculations per tomato seedling

³ Tumor diameter perpendicular to the long axis of the stem was measured. Significantly differ from inoculation of only each pathogenic strain (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$) according to Student's *t*-test

* Only a tumorigenic strain (about 10^8 CFU/ml) was used as inoculum

を調査した。がんしゅの形成を認めたものは、がんしゅ組織の直径（縦径と横径の平均）を測定した。ブドウ苗は各10株供試し、試験は1回行った。

結 果

がんしゅ形成性 *R. vitis* の8菌株と VAR03-1株の等量混合接種試験の結果、いずれの菌株に対してもがんしゅ形成抑制効果が認められた (Table 3-7)。

4 VAR03-1株の平板培地上における阻止円の大きさとがんしゅ形成抑制効果との関係

前節において VAR03-1株はがんしゅ形成性 *R. vitis* の複数の菌株に対して平板培地上での阻止円の形成が認められたが (Fig. 3-2, Table 3-4), その大きさを指標とした抗菌程度 (以下, 抗菌活性) ががんしゅ形成抑制効果の主因であるかについては分かっていない。本節2項においてトマト苗を用いた等量混合接種試験で、VAR03-1株はがんしゅ形成性 *R. vitis* の複数の菌株に対しがんしゅ形成抑制効果を示したことから (Table 3-6), VAR03-1株の抗菌活性とがんしゅ形成抑制効果の関係について検討した。

材料および方法

平板培地上での阻止円の直径の平均値 (4平板培地)

Table 3-7. Effect of coinoculation of *Rhizobium vitis* (nonpathogenic) strain VAR03-1 and each pathogenic strain of *R. vitis* (Ti) isolated from different locations in Japan at a 1:1 cell ratio on grapevine seedlings²

Tumorigenic strain	Tumor formation (%)		Tumor size ^y (mm)	
	VAR03-1	Only pathogen ^x	VAR03-1	Only pathogen
G-Ag-27 (A)	1.7	90	0.04**	4.09
At-90-23 (A)	28.3	98.3	0.56**	4.11
At-90-62 (A)	26.4	95	0.58**	2.83
MAFF211676 (A)	13.3	80	0.34**	2.44
MAFF211678 (A)	36.7	100	0.89**	3.46
MAFF211674 (B)	38.3	71.7	1.01**	2.72
A5-6 (B)	3.3	96.7	0.11**	3.29
9-1-5 (B)	18.3	96.7	0.45**	3.49

² Data are means of 10 replications of six inoculations per grapevine seedling

^y Tumor diameter perpendicular to the long axis of the stem was measured. Significantly different from inoculation of only each tumorigenic strain (***P* < 0.01) according to Mann-Whitney *U*-test

^x Only a tumorigenic strain (about 10⁸ CFU/ml) was used as inoculum

とがんしゅ形成抑制率の平均値 (トマト苗の茎に4か所接種, 10株供試, 3回試験) を用いて回帰分析を行った。Table 3-4における VAR03-1株のがんしゅ形成性 *R. vitis* 10菌株 (G-Ag-27株, At-90-23株, At-90-62株, MAFF211674株, MAFF211676株, MAFF211678株, At-5株, A5-5株, A5-7株, VAT8-1株) に対して形成した阻止円の直径の平均値を X 軸にとり, Table 3-6におけるがんしゅ形成性 *R. vitis* 10菌株 (全て上記と同じ菌株) に対するがんしゅ形成抑制率を Y 軸にとった。がんしゅ形成抑制率 (%) = 100 × (がんしゅ形成性菌のみを接種した場合のがんしゅ形成率 - VAR03-1株との混合接種した場合のがんしゅ形成率) / (がんしゅ形成性菌のみを接種した場合のがんしゅ形成率) とした。

結 果

平板培地上での阻止円の直径の平均値とがんしゅ形成抑制率の平均値の関係は、直線回帰の寄与率 (*R*²) が 0.138 (有意差なし) と低いことから、両者の間に有意な関係は認められなかった (Fig. 3-3)。

5 考 察

本節では、混合接種時における非病原性 *R. vitis* VAR03-1株とがんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株の比率の違いががんしゅ形成抑制効果に与える影響について検討した。その結果、混合菌液中の VAR03-1株の存在比率が G-Ag-27株と同等以上であれば、がんしゅ形成を強く抑制できたが、存在比率が G-Ag-27株よりも低い場合にはがんしゅ形成抑制効果はほとんど認められなかったことから、本菌株のがんしゅ形成抑制効果はその環境範

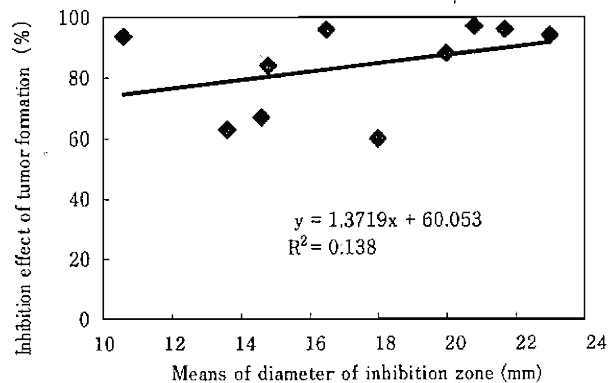


Fig. 3-3. Relationships between diameter of inhibition zone (mm) inhibition effect of tumor formation (%) by *Rhizobium vitis* (nonpathogenic) VAR03-1: $y = 1.3719x + 60.053$; $R^2 = 0.138$; $P > 0.05$ (no significant differences)

圃に存在するブドウ根頭がんしゅ病菌の菌数と同じかまたは多い場合に発揮されると考えられた。

一般的に拮抗微生物を用いた植物病害の生物的防除では、拮抗微生物を予防的に植物に接種、定着させ、自然界で想定される病原菌の密度よりも10~100倍以上高い濃度で処理することが多い。牧野(1993)は非病原性 *R. rhizogenes* K84株のバラ根頭がんしゅ病菌(がんしゅ形成性 *R. rhizogenes*) に対するがんしゅ形成抑制効果を簡易的に評価するため、本報告と同様の手法でトマト苗の茎に混合接種しているが、 10^9 cells/ml の K84株の菌液と 10^8 cells/ml のバラ根頭がんしゅ病菌の菌液を等量混合して試験を行っている。その場合でも、K84株によるバラ根頭がんしゅ病菌のがんしゅ形成抑制率は50%程度であったことから(牧野, 1993)、VAR03-1株のがんしゅ形成抑制効果が非常に高いことが裏付けられる。

また、がんしゅ形成性 *R. vitis* の複数の異なる菌株に対する VAR03-1株のがんしゅ形成抑制効果についてトマトおよびブドウを用いて検討した結果、遺伝子型 A、B および D を含む複数のがんしゅ形成性菌株に対して、本菌株は安定的にがんしゅ形成を抑制することが明らかとなった。この結果は、前節の平板培地上での阻止円形成試験の結果と一致しており、VAR03-1株は日本に広く分布する本病原細菌の複数の異なる菌株に対して防除効果が期待できることを強く示唆している。

VAR03-1株が本病原細菌に対して平板培地上で形成する阻止円の大きさと、トマト茎への本病原細菌との混合接種におけるがんしゅ形成抑制率の高さとの間には有意な関係は認められなかったことから、阻止円の直径が大きいほど実際の防除効果も高いという関係は成立しないと考えられた。非病原性 *R. rhizogenes* K84株のバラ根頭がんしゅ病に対する防除効果は、K84株の産生する抗菌物質アグロシン84だけに依存するのではなく、病原細菌と生存する環境、養分を奪い合う競合作用などの要因も関与しているとの指摘がある(牧野, 1993)。VAR03-1株が抗菌物質を産生していることは明らかであり、抗菌活性ががんしゅ形成抑制効果に関与している可能性は否定できないが、その産生能だけで実際の防除効果を推測することは困難であると考えられた。抗菌活性が防除効果にどの程度関与しているかについては、VAR03-1株の抗菌物質産生能力を担う遺伝子を探索し、トランスポゾン等の移動能力を発揮する塩基配列をその遺伝子内に挿入することによって抗菌力を欠如した変異株を作出した上で、がんしゅ形成抑制効果を評価する必要がある。

以上、本節では VAR03-1株がブドウ根頭がんしゅ病の生物的防除に有望であることが改めて確認された。し

かしながら、これまでは植物の茎に有傷接種することでがんしゅ形成抑制効果を判定していたが、本病が土壤伝染性の病害であることから、根頭がんしゅ病菌の土壤伝染抑制効果について検討する必要がある。そのためには、あらかじめ VAR03-1株をブドウ苗木の根部に接種したブドウ苗木の汚染土壌定植時における発病抑制効果について検討する必要がある。

第3節 非病原性 *Rhizobium vitis* VAR03-1株のブドウ根部浸漬処理による防除効果

第1, 2節において、非病原性 *R. vitis* VAR03-1株はブドウ根頭がんしゅ病に対する拮抗微生物として有望であると考えられた。非病原性 *R. rhizogenes* K84株を主成分とするアグロバクテリウム・ラジオバクター剤の使用方法は、無病苗の根をその希釈液に浸漬してあらかじめ K84株をバラの根に定着させた後に圃場に定植するというものであり、ブドウ根頭がんしゅ病の防除に VAR03-1株を用いる場合でも同様の処理方法が考えられる。そこで、本節では実際の防除での利用を想定して、VAR03-1株の菌液にブドウ苗木の根部を浸漬(以下、ブドウ根部浸漬処理)した場合の防除効果について、施設内試験および圃場試験で検討した。また、浸漬処理における VAR03-1株の菌液の濃度および処理時間についても検討した。

1 トマトおよびブドウ苗における根部浸漬処理のブドウ根頭がんしゅ病菌に対する防除効果(施設内試験)

(1) トマトにおける防除効果

材料および方法

供試菌株としてがんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株と非病原性 *R. vitis* VAR03-1株を用いた。供試菌株を脇本寒天培地に接種し、27°Cで48時間培養して、両菌液を約 1.0×10^8 cell/ml に調製した。圃芸培土(クレハ社製) 1kgあたり G-Ag-27株の菌液(約 1.0×10^8 cell/ml)を500ml注ぎ、良く混ぜ込んでブドウ根頭がんしゅ病菌汚染土(約 5×10^7 cells/g土)を作成してポリポット(黒、直径15cm×深さ12cm)に深さ約10cmまで充填した。トマト‘ポンデローザ’苗(3~4葉期)の根を束ねて全長の1/2の位置で切断し、VAR03-1株の菌液または滅菌蒸留水(無処理区として)に根部が液に完全に沈み込むように浸漬して約25°C、24時間静置した。次に同じ苗の根部をブドウ根頭がんしゅ病菌 G-Ag-27株の菌液に27°C、1時間浸漬した後、2006年6月12日に上記の汚染土を充填したポリポットにトマト苗を定植した。定植後は無加

温ガラス室で管理し、約8週後に根および地際部のがんしゅ形成の有無を調査し、発病株率と1株あたりのがんしゅ形成数および防除価を算出した。試験は4回行い、試験1ではトマト苗を10株/処理区、試験2では20株/処理区、試験3では15株/処理区、試験4では28株/処理区を供試した。防除価=100-[(VAR03-1株処理区の発病株率×100) / (無処理区の発病株率)]。

結 果

定植前のトマト苗を VAR03-1株の菌液 (約 1.0×10^8 cell/ml) に24時間浸漬処理した区の発病株率は無処理区と比較して有意に低く ($P < 0.001$)、防除価が62.1であり、1株あたりのがんしゅ形成数も少ないことから、防除効果が認められた (Fig. 3-4A, Table 3-8)。

(2) ブドウにおける防除効果

材料および方法

供試菌株とその調製及び汚染土の準備は前項(1)と同様

に行った。ブドウ‘ネオ・マスカット’を実生から育成した1年生苗の根を束ねて全長の1/2の位置で切断し、VAR03-1株の菌液または滅菌蒸留水 (無処理区として) に根部が完全に沈み込むように浸漬して約25℃、24時間静置した。次に同じ苗の根部をブドウ根頭がんしゅ病菌 G-Ag-27株の菌液に27℃、1時間浸漬した後、2005年2月23日に汚染土を充填したポリポット (黒、直径15cm×深さ12cm) にブドウ苗を定植した。接種後は加温ガラス室 (20~25℃) で管理し、約12週後に根および地際部のがんしゅ形成の有無を調査し、発病株率と1株あたりのがんしゅ形成数および防除価を算出した。ブドウ苗は各15株ずつ供試し、試験は3回行った。防除価=100-[(VAR03-1株処理区の発病株率×100) / (無処理区の発病株率)]。

結 果

定植前のブドウ実生苗を VAR03-1株の菌液 (約 1.0×10^8 cell/ml) に24時間浸漬処理した区の発病株率は無処理区と比較して有意に低く ($P < 0.01$)、防除価が71.4

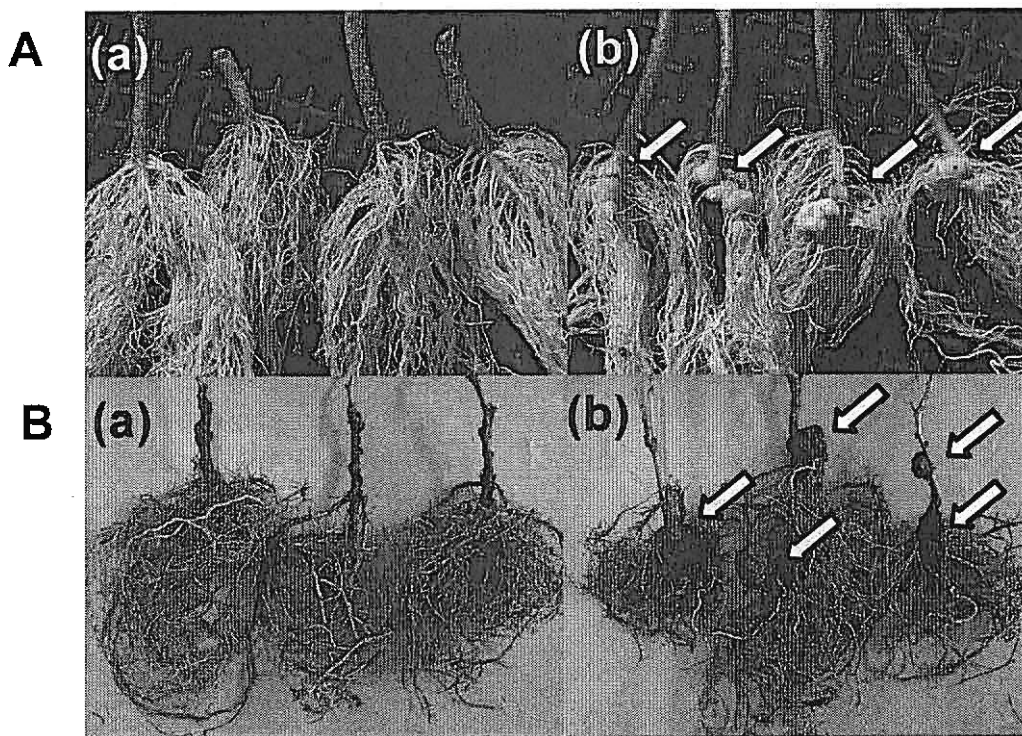


Fig. 3-4. Biological control activity of grapevine crown gall by nonpathogenic strain VAR03-1 of *Rhizobium vitis*. A: tomato seedlings, B: grapevine seedlings. (a) Seedlings were planted after a presoak with nonpathogenic strain VAR03-1 of *R. vitis* followed by inoculation with a cell suspension of tumorigenic strain G-Ag-27. (b) Seedlings were planted after inoculation only with a cell suspension of strain G-Ag-27 as a positive control. Tumors (arrows) developed on the roots or stems. The photograph of tomato and grapevine seedlings were taken approximately 2 and 6 months after inoculation, respectively.

であり、1株あたりのがんしゅ形成数も少ないことから、防除効果が認められた (Fig. 3-4B, Table 3-8).

2 根部浸漬の処理条件が防除効果に及ぼす影響 (施設内試験)

前項において、定植前のトマトまたはブドウ苗の根を VAR03-1株の約 1.0×10^8 cell/ml の菌液に24時間浸漬する予防的処理について防除効果を確認したが、ここでは、菌液の濃度、浸漬時間および病原細菌の接種後に VAR03-1株の菌液に浸漬する治療的処理が防除効果に及ぼす影響を検討し、最適な浸漬処理条件を探索した。

材料および方法

供試菌株としてがんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株, At-90-23株, MAFF211674株, MAFF211676株と非病原性 *R. vitis* VAR03-1株を用いた。供試菌株を臨本寒天培地に接種し、27°Cで48時間培養して、各菌液を約 1.0×10^8 cell/ml または約 1.0×10^9 cell/ml に調製した。園芸培土 (クレハ社製) 1kg あたり上記がんしゅ形成性菌4菌株の菌液 (約 1.0×10^8 cell/ml) を等量混合したもの500ml を良く混ぜ込んだブドウ根頭がんしゅ病菌汚染土 (約 5×10^7 cells/g) をポリポット (黒, 直径15cm × 深さ12cm) に深さ約10cm まで充填した。ブドウ 'ネオ・マスカット' を実生から育成した1年生苗の根を束ねて全長の1/2の位置で切断し、約 1.0×10^9 cell/ml の VAR03-1株の菌液に根部が完全に沈み込むように浸漬して約20°Cで1時間静置し、約 1.0×10^8 cell/ml の菌液では24時間または1時間浸漬した。次に同じ苗をブドウ根頭がんしゅ病菌 G-Ag-27株の菌液 (約 1.0×10^8 cell/ml) に27°Cで1時間浸漬した後、2007年5月17日に上記の汚染土を充填したポリポットに定植した。また、無処理区としてブドウ苗を滅菌蒸留水に約20°Cで24時間浸漬した後、

G-Ag-27株の菌液のみに27°C, 1時間浸漬し、汚染土に定植する区を設けた。さらに、VAR03-1株の菌液に浸漬する前に G-Ag-27株の菌液 (約 1.0×10^8 cell/ml) にブドウ苗を浸漬して、先に病原細菌に感染させ、その後 VAR03-1株の菌液に浸漬する (約 1.0×10^9 cell/ml の菌液に1時間, 約 1.0×10^8 cell/ml の菌液に24時間) 区も設けた。接種後は無加温ガラス室で管理し、約12週後に根および地際部のがんしゅ形成の有無を調査し、発病株率と1株あたりのがんしゅ形成数および防除価を算出した。ブドウ苗は各15株ずつ供試し、試験は1回行った。防除価 = $100 - [(\text{VAR03-1株処理区の発病株率} \times 100) / (\text{無処理区の発病株率})]$ 。

結 果

定植前のブドウ実生苗を約 1.0×10^8 cell/ml の VAR03-1株の菌液に24時間浸漬処理した区と、約 1.0×10^9 cell/ml の同菌液に1時間浸漬処理した区は共に防除価87.4となり、最も防除効果が高かった (Table 3-9)。約 1.0×10^8 cell/ml の VAR03-1株菌液に1時間浸漬処理した区は防除価24.9となり、防除効果は認められなかった (Table 3-9)。

また、VAR03-1株の菌液に浸漬する前に G-Ag-27株の菌液 (約 1.0×10^8 cell/ml) に苗を浸漬した区では、VAR03-1株菌液の濃度が 10^9 及び 10^8 cell/ml の区とも、先に VAR03-1株の菌液で浸漬処理した場合よりも防除効果が半減し、それぞれ防除価は43.7, 49.9であった (Table 3-9)。

3 菌液の高濃度、短時間の根部浸漬処理による防除効果 (施設内試験)

本節第2項の結果より、約 1.0×10^9 cell/ml の VAR03-1株の菌液に1時間浸漬処理した場合でも高い防除効果が

Table 3-8. Effect of strain VAR03-1 on crown gall of grapevine and tomato seedlings after dipping plant roots in bacterial cell suspensions in the greenhouse experiments²

Treatment	Tomato			Grapevine		
	Plants with tumors ^y (%)	No. of tumors/plant	Protective value ^x (%)	Plants with tumors (%)	No. of tumors/plant	Protective value (%)
VAR03-1	26.4***	0.10	62.1	8.9**	0.17	71.4
Sterile distilled water ⁿ	69.7	1.06		31.1	0.44	

² Data are means of four experiments of 10, 20, 15 and 28 tomato or three experiments of each 15 grapevine seedlings per treatment, and tumor formation was assessed 8 weeks later for tomato and 12 weeks later for grapevine

^y Significantly different from treatment of sterile distilled water (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) according to Cochran-Mantel-Haenszel test

^x Protective value (%) = $100 - [(\% \text{ of plants with tumors in treatment} \times 100) / (\% \text{ of plants with tumors in sterile distilled water treatment})]$

ⁿ Young plants were dipped in sterile distilled water 24 h before being dipped into cell suspension (10^8 cells/ml) of *Rhizobium vitis* (Ti) strain G-Ag-27

発揮されることが示唆された。ここでは、同処理条件での防除効果を詳細に検討した。

材料および方法

供試菌株としてがんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株, At-90-23株, MAFF211674株, MAFF211676株, 非病原性 *R. vitis* VAR03-1株および非病原性 *R. rhizogenes* K84株を用いた。供試菌株を脇本寒天培地に接種し, 27°Cで48時間培養して, がんしゅ形成性菌はそれぞれ約 1.0×10^8 cell/ml, VAR03-1株とK84株はそれぞれ約 1.0×10^9 cell/mlの菌液に調製した。園芸培土(クレハ社製)1kgあたり上記がんしゅ形成性菌4菌株の菌液(約 1.0×10^8 cell/ml)を等量混合したもの500mlを良く混ぜ込んだブドウ根頭がんしゅ病菌汚染土(約 5×10^7 cells/g)をポリポット(黒, 直径15cm×深さ12cm)に深さ10cmまで充填した。ブドウ「ネオ・マスカット」を実生から育成した1年生苗の根を束ねて全長の1/2の位置で切断し, VAR03-1株(約 1.0×10^9 cell/ml), K84株の菌液(約 1.0×10^9 cell/ml)または滅菌蒸留水に根が液に完全に沈み込むように浸漬して約20°C, 1時間静置した。次に苗を, ブドウ根頭がんしゅ病菌4菌株を等量混合した菌液(約 1.0×10^8 cell/ml)に27°Cで1時間浸漬した後, 2007年6月18日に汚染土を充填したポリポットに定植した。接種後は無加温ガラス室で管理し, 約12週後に根および地際部のがんしゅ形成の有無を調査し, 発病株率, 1株あたりのがんしゅ形成数および防除価を算出した。ブドウ苗は各15株ずつ供試し, 試験は4回行った。防除価=100 - [(拮抗菌株処理区の発病株率×100) / (無処理区の発病株率)]。

結 果

定植前のブドウ実生苗をVAR03-1株の菌液(約 1.0×10^9 cell/ml)に1時間浸漬処理した区の発病株率(4試験の平均値)は無処理区またはK84株を同条件で浸漬処理した区と比較して有意に低く($P < 0.05$), 防除価が91.8であり, 高い防除効果が認められた(Table 3-10)。K84株処理区の発病株率は対照区とほぼ同程度であり, 防除効果は認められなかった(Table 3-10)。

4 根部浸漬処理のブドウ根頭がんしゅ病に対する防除効果(圃場試験)

これまでの施設内試験の結果より, VAR03-1株を予防的に根部浸漬処理することでブドウ根頭がんしゅ病に対する防除効果が期待できることが明らかとなった。ここでは, ブドウ苗を用いた圃場試験でその効果を検討した。

材料および方法

供試菌株としてがんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株, At-90-23株, MAFF211674株, MAFF211676株, 非病原性 *R. vitis* VAR03-1株および非病原性 *R. rhizogenes* K84株を用いた。

試験1(定植2007年3月31日, 調査2007年9月28日): 試験は農業試験場内の傘型雨除けを設置した屋外コンクリートポット 1.1m^3 (縦 1.1m ×横 1m ×深さ 1m)を2つ用い, 2区制で行った。実生のブドウ「ネオ・マスカット」1年生苗の根を束ねて全長の1/2の位置で切断し, VAR03-1株の菌液(約 1.0×10^8 cell/ml)または滅菌蒸留

Table 3-9. Effect of strain VAR03-1 on crown gall of grapevine seedlings after dipping plant roots in bacterial cell suspensions in the greenhouse experiments²

Pre-treatment by pathogen			Treatment by VAR03-1			Plants with tumors (%)	No. of tumors/plant	Protective value* (%)
Strain	Cell suspension (cells/ml)	Treatment time (hr)	Strain	Cell suspension (cells/ml)	Treatment time (hr)			
-	-	-	VAR03-1	10^9	1	6.7	0.07	87.4
-	-	-	VAR03-1	10^8	24	6.7	0.07	87.4
-	-	-	VAR03-1	10^8	1	40.0	1.13	24.9
G-Ag-27 ^y	10^8	1	VAR03-1	10^9	1	30.0	0.60	43.7
G-Ag-27	10^8	1	VAR03-1	10^8	24	26.7	0.33	49.9
Sterile distilled water ^x	-	-	-	-	-	53.3	0.75	-

² Data are means of 15 grapevine seedlings per treatment

^y Only a tumorigenic strain was used as inoculum

^x Young plants were dipped in sterile distilled water 24 h before being dipped into the mixture of cell suspension (10^8 cells/ml) of *R. vitis* (Ti) strain G-Ag-27, At-90-23, MAFF211674 and MAFF211676

^w Protective value (%) = 100 - [(% of plants with tumors in treatment × 100) / (% of plants with tumors in sterile distilled water treatment)]

水（無処理区として）に根部が液に完全に沈み込むように浸漬して約20℃、24時間静置した。次に同じ苗を、がんしゅ形成性菌4菌株を等量混合した約 1.0×10^8 cell/mlの菌液に約20℃、1時間浸漬した。その後、1コンクリートポットあたりVAR03-1株処理と滅菌蒸留水処理の苗をそれぞれ15株ずつ定植し（株間15cm）、がんしゅ形成性菌4菌株を等量混合した約 5.0×10^7 cell/mlの菌液を1コンクリートポットあたり20L灌注した。定植後は2～3日おきに株元に灌水を行った。定植約6ヶ月後に全株を掘り起こして根および地際部のがんしゅ形成の有無を調査し、発病株率および防除価を算出した。

試験2（定植2008年4月9日、調査2008年10月12日）：試験は農業試験場内の傘型雨除けを設置した屋外コンクリートポット（縦1.1m×横1m×深さ1m）を3つ使い、3区制でおこなった。ブドウ‘ネオ・マスカット’実生1年生苗の根を束ねて全長の1/2の位置で切断し、根部をVAR03-1株の菌液（約 1.0×10^9 cell/ml）、K84株の菌液（約 1.0×10^9 cell/ml）または滅菌蒸留水（無処理区として）に浸漬して約20℃、1時間静置した。次に苗を、がんしゅ形成性菌4菌株を等量混合した約 1.0×10^8 cell/mlの菌液に約20℃、10秒間浸漬した。その後、1コンクリートポットあたりVAR03-1株、K84株または滅菌蒸留水処理の苗をそれぞれ14株ずつ定植し（株間15cm）、がんしゅ形成性菌4菌株を等量混合した約 5.0×10^7 cell/mlの菌液を1コンクリートポットあたり20L灌注

Table 3-10. Effect of nonpathogenic *Rhizobium* strains VAR03-1 and K84 on crown gall of grapevine seedlings after soaking plant roots in bacterial cell suspensions in the greenhouse experiments²

Treatment	Plants with tumors ^y (%)	No. of tumors/plant	Protective value ^x (%)
VAR03-1	3.4 a	0.07	91.8
K84	36.7 b	1.23	12.0
Sterile distilled water	41.7 b	0.88	

² Data are means of four experiments of 15 grapevine seedlings per treatment. Plants were soaked in cell suspension of antagonist (10^9 cells/ml) or sterile distilled water 1 h before being planted in a pot in soil infected with the mixture of cell suspension of *R. vitis* (Ti) strain At-90-23, G-Ag-27, MAFF 211674, and MAFF 211676 at a final concentration 5×10^7 cells/g soil

^y Means followed by the same letter are not significantly different according to Fisher's protected least significant difference (LSD) test on the arcsine transformation of the data at $P < 0.05$. NT; not tested

^x Protective value = $100\% - [(\% \text{ of plants with tumors in treatment} \times 100) / (\% \text{ of plants with tumors in sterile distilled water treatment})]$

した。定植後は2～3日おきに株元に灌水を行った。定植約6ヶ月後に全株を掘り起こして根および地際部のがんしゅ形成の有無を調査し、発病株率および防除価を算出した。

試験3（定植2008年4月19日、調査2008年11月27日）：農業試験場内の露地栽培圃場76.5m²（17×4.5m）を12.0m²（8×1.5m）の6区に分け、1処理あたり3区制で行った。2007年3月31日にかんしゅ形成性菌4菌株を等量混合した菌液（約 1.0×10^7 cells/ml）を動力噴霧機で400Lを圃場全体に表面散布して汚染圃場とした。ブドウ‘ピオーネ’の挿し木2年生苗（白根）の根を束ねて全長の1/2の位置で切断し、根部をVAR03-1株の菌液（約 1.0×10^9 cell/ml）または滅菌蒸留水（無処理区として）に浸漬して約20℃、1時間静置した。次に苗を、がんしゅ

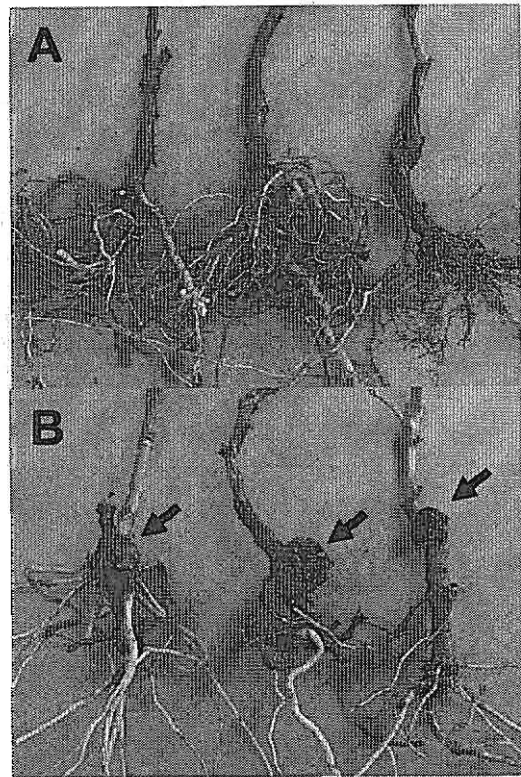


Fig. 3-5. Biological control activity of grapevine crown gall by nonpathogenic strain VAR03-1 of *Rhizobium vitis* in a field test. A: Grapevines seedlings were planted after a presoak with nonpathogenic strain VAR03-1 of *R. vitis* followed by inoculation with a cell suspension of tumorigenic strains. B: Grapevine seedlings were planted after inoculation only with a cell suspension of tumorigenic strains as a positive control. Tumors (arrows) developed on the roots or stems. The photographs of grapevines were taken approximately 6 months after planting in experiment 1.

形成性菌4菌株を等量混合した約 1.0×10^8 cell/mlの菌液に約20°C, 5秒間浸漬した。その後, 1区あたり VAR03-1株または滅菌蒸留水処理の苗をそれぞれ15株ずつ定植した後(条間150cm, 株間50cm), がんしゅ形成性菌4菌株を等量混合した菌液(約 1.0×10^7 cells/ml)を定植した株元に3Lずつ灌注した。定植後は圃場全体に防草シートを敷き, 灌水は特に行わなかった。定植約7ヶ月後に全株を掘り起こして根および地際部のがんしゅ形成の有無を調査し, 発病株率および防除価を算出した。

試験1~3における防除価は $100 - [(非病原性菌株処理区の発病株率 \times 100) / (無処理区の発病株率)]$ の計算式で算出した。

結 果

試験1におけるブドウ根頭がんしゅ病の発生は少〜中発生条件であった(無処理区の発病株率36.7%)。定植前のブドウ実生苗を VAR03-1株の菌液(約 1.0×10^8 cell/ml)に24時間浸漬処理した区で防除効果が認められた(防除価63.5, Fig. 3-5, Table 3-11)。

試験2における本病の発生は微〜少発生であった(無処理区の発病株率14.0%)。定植前のブドウ実生苗を

VAR03-1株の菌液(約 1.0×10^9 cell/ml)に1時間浸漬処理した区で発病株を全く認めず, K84処理区および無処理区と比較して発病株数は有意に少ないことから($P < 0.05$), 高い防除効果が認められた(防除価100, Table 3-11)。また, K84株の菌液で同様の処理を行った区では全く防除効果が認められなかった(防除価15.0, Table 3-11)。

試験3における本病の発生は少発生であった(無処理区の発病株率28.9%)。定植前のブドウ実生苗を VAR03-1株の菌液(約 1.0×10^9 cell/ml)に1時間浸漬処理した区で発病株は無処理区と比較して有意に少なく($P < 0.001$), 高い防除効果が認められた(防除価92.4, Table 3-11)。

5 考 察

本節では実際の防除への利用を想定して, ブドウ根部浸漬処理による VAR03-1株の防除効果について検討した。ポット苗を用いた施設内試験において, 定植前の苗を VAR03-1株の菌液(約 1.0×10^8 cell/ml)に24時間浸漬処理した場合, ブドウ根頭がんしゅ病菌による発病を抑制する効果が認められた。また, トマト苗を用いた根

Table 3-11. Effect of nonpathogenic *Rhizobium* strains VAR03-1 and K84 on crown gall of grapevine seedlings after soaking plant roots in bacterial cell suspensions in the field experiment²

Treatment	No. of replication	Experiment 1		Experiment 2		Experiment 3	
		Plants with tumors (%)	Protective value (%) ^y	Plants with tumors (%) ^x	Protective value (%) ^y	Plants with tumors (%) ^w	Protective value (%) ^y
VAR03-1	1	20.0		0.0		6.7	
	2	6.7		0.0		0.0	
	3	NT		0.0		0.0	
	Mean	13.4	63.5	0.0 a	100.0	2.2 ***	92.4
K84	1	NT		21.4		NT	
	2	NT		7.1		NT	
	3	NT		7.1		NT	
	Mean	-	-	11.9 b	15.0	-	-
Sterile distilled water	1	40.0		20.0		46.7	
	2	33.3		14.3		20.0	
	3	NT		7.7		20.0	
	Mean	36.7	-	14.0 b	-	28.9	-

² Data are means of two replications of 15 grapevine seedlings (cv. Neo Muscut) per treatment in experiment 1, three replications of 14 grapevine seedlings (cv. Neo Muscut) per treatment in experiment 2, and three replications of 15 grapevine nursery stocks (cv. Pione) per treatment in experiment 3. Plants were soaked in a cell suspension of strain VAR03-1 (10^8 cells/ml) or sterile distilled water 24 h before being planted in experiment 1, and plants were soaked in a cell suspension of antagonist (10^9 cells/ml) or sterile distilled water 1 h before being planted in experiment 2 and 3. NT; not tested

^y Protective value = $100\% - [(\% \text{ of plants with tumors in treatment} \times 100) / (\% \text{ of plants with tumors in sterile distilled water treatment})]$

^x Means followed by the same letter are not significantly different according to Fisher's protected least significant difference (LSD) test on the arcsine transformation of the data at $P < 0.05$

^w Significantly different from inoculation of treatment of sterile distilled water (** $P < 0.001$) according to Cochran-Mantel-Haenszel test

部浸漬処理試験でも防除効果が認められたことから、根部浸漬処理で、ブドウ以外の植物に対しても防除効果が期待できる可能性が示唆された。

根部浸漬処理で最も高い防除効果が得られる条件について検討した結果、約 1.0×10^8 cell/ml の VAR03-1 株の菌液に24時間浸漬処理する場合と、約 1.0×10^9 cell/ml の菌液に1時間浸漬処理した場合でほぼ同等の防除効果が得られたが、その後さらに試験事例を増やして検討した結果、約 1.0×10^8 cell/ml 菌液の24時間浸漬処理は防除価71.4 (3試験事例) に対し 1.0×10^9 cell/ml の菌液に1時間浸漬処理では防除価91.8 (4試験事例) となり、より高濃度の菌液であれば短時間の処理で高い防除効果が得られることが明らかとなった。実用場面では短時間で処理ができる方が農業生産者の利便性が高いと思われる反面、 1.0×10^9 cell/ml でさらに時間をかけて浸漬処理すると防除効果が向上または安定する可能性もある。どの程度まで処理時間を短縮しても効果の安定性が保持されるかについては今後の課題である。また、ブドウ苗に病原細菌を接種した後に VAR03-1 株の菌液に浸漬するという治療的処理を検討したが、予防的処理と比較して防除効果は半減したことから、潜在的に感染した苗木に対しては高い防除効果は見込めないと考えられた。以上のことから、VAR03-1 株の処理条件としては、定植前の苗木を 1.0×10^9 cell/ml の菌液に1時間浸漬処理する方法が有望と考えられた。

一般的な植物病害に対する拮抗微生物の防除効果については、小規模の室内または施設内での試験の報告は現在でも多いが、圃場試験での安定的な防除効果となると報告数は非常に少ない。本研究では農業試験場内に人工汚染圃場を作成し、雨除け栽培および露地栽培で圃場における防除試験を行った結果、高い防除効果が安定的に認められた。しかしながら、浸漬の処理条件によって効果に差があり、約 1.0×10^8 cell/ml で24時間浸漬処理した場合よりも約 1.0×10^9 cell/ml で1時間浸漬処理した場合の方が高い防除効果を示した。このことは施設内試験で

の結果と一致しており、約 1.0×10^9 cell/ml で1時間浸漬処理する条件が実際の圃場においても有効であると考えられた。

今回、汚染土壌の作成には施設内試験、圃場試験とものがんしゅ形成性 *R. vitis* の遺伝子型 A と B の両方の菌株を混合して用いた。A および B は共に日本に広く分布しているタイプであり、両方の菌株が存在する土壌において防除効果が得られたことから、VAR03-1 株を使用する際には病原性菌株の分布にかかわらず、日本の広い地域で使用できる可能性を示唆している。しかしながら、日本各地で土壌の特性は大きく異なるため、様々な種類の土壌での防除効果を検討する必要がある。

牧野 (1993) はバラ根頭がんしゅ病菌であるがんしゅ形成性 *R. rhizogenes* の土壌中での菌密度は一般に 10^5 cell/g 土程度、がんしゅ組織中では 10^7 cell/ml であり、がんしゅ自体が土壌中に残渣として存在する場合を考えたとしても、非病原性 *R. rhizogenes* K84 株を 10^9 cell/ml の濃度で処理すれば防除は可能であるとしている。ブドウ根頭がんしゅ病菌であるがんしゅ形成性 *R. vitis* は、一般的な農耕地の土壌から分離されることはほとんどなく (Bouzar et al., 1993)、土壌中のブドウの枯死根で2年程度生存するという報告があるが (Burr et al., 1995)、本病の発生圃場の土壌中での生存菌密度は明らかでない。よって牧野 (1993) の報告を参考にし、施設内試験では 5×10^7 cell/g 土の病原細菌密度の汚染土壌を作成し、圃場試験では $1 \sim 5 \times 10^7$ cell/ml 程度の菌液を灌注または土壌表面に散布して汚染土壌とした。その結果非病原性 *R. vitis* VAR03-1 株の 10^9 cell/ml 濃度の処理で実際に防除効果が確認されたことから、実際の発病圃場における病原細菌の密度でも本手法が有効である可能性が示唆された。

以上本節において、VAR03-1 株のブドウ根部浸漬処理がブドウ根頭がんしゅ病の防除に有効であることが明らかとなった。ブドウは永年性で、果実生産のための栽培期間は15~20年になり、その間常に本病原細菌に感染

Table 3-12. Population dynamics of *Rhizobium vitis* strain (nonpathogenic) VAR03-1 in the roots of grapevine cv. Néo Muscat after inoculation

Treatment	Log ₁₀ CFU per g (fresh weight) grapevine root ²					Average ³
	Months after inoculation					
	1	7	14	22	34	
VAR03-1	7.24 ± 0.15	6.91 ± 0.23	6.18 ± 0.39	4.67 ± 0.84	< 2	6.25 ± 0.40
Non-treatment	< 2 ^x	< 2	< 2	< 2	< 2	-

² Data are means of three grapevines. Mean log₁₀ ± standard error

³ Calculated an average the datas from 1 to 22 months

^x The approximate detection limit was 10² CFU

し、発病する危険性がある。従って、根部浸漬処理による防除効果の持続性について検討する必要があるが、その為にはまず VAR03-1株のブドウの根における定着性について明らかにする必要がある。これについては次節で検討する。

第4節 ブドウ根部における非病原性 *Rhizobium vitis* VAR03-1株の定着性と防除効果の持続性

これまでの結果から、非病原性 *R. vitis* VAR03-1株のブドウ根部浸漬処理が根頭がんしゅ病の防除に有効であることが明らかとなった。植物病害の生物的防除として拮抗性を有する細菌を用いる場合、その拮抗性は(1)病原菌への寄生、(2)病原菌に対する抗生作用、(3)病原菌との競合、(4)交差防除、(5)宿主植物の抵抗性誘導、(6)共生、などが単独または複合して作用することによって発揮される(百町, 2003)。土壤病害に対する拮抗細菌の利用には、拮抗細菌が長期にわたって生存しないか、または生存していても病原細菌を抑制するだけの活性を維持できない等の問題があり、対象植物に対する定着性が高い菌を選抜する必要があるとされている(百町, 2003)。そこで、非病原性 *R. vitis* VAR03-1株のブドウ根部に対する定着性を評価し、防除効果の持続性について検討した。

1. 根部浸漬処理による VAR03-1株のブドウ根部に対する定着性

材料および方法

供試菌株として非病原性 *R. vitis* VAR03-1株を脇本寒天培地に接種した後27℃で48時間培養して、約 1.0×10^8 cell/mlの菌液に調製した。ブドウ「ネオ・マスカット」を実生から育成した1年生苗5株の根を束ねて全長の1/2の位置で切断し、根部を VAR03-1株の菌液に浸漬して約20℃、24時間静置した。その後、園芸培土(クレハ社製)を深さ約10cmまで充填したポット(直径15cm×深さ12cm)にブドウ苗を定植した(2005年2月24日)。また、無処理区として、ブドウ苗を滅菌蒸留水に24時間浸漬した後にポットに定植する試験区も設けた。定植後は無加温ガラス室で管理した。菌の定着性の調査は希釈平板法にて行った。調査は2005年3月24日(浸漬処理後約1か月後)、2006年9月27日(約7か月後)、2006年4月20日(約14か月後)、2006年12月26日(約22か月後)、2007年12月20日(約34か月後)に、無作為に選んだ3株から根を採取(約1g/株)して行った。根を水洗後70%エタ

ノールに1分間浸漬して表面殺菌し、滅菌水1mlを加えて乳鉢中で良く磨碎し30分間静置した。上澄み液を 10^{-1} ~ 10^{-7} 倍まで段階希釈し、*R. vitis* 分離用選択寒天平板培地である3DG培地(Brisbane and Kerr, 1983)に各希釈液を0.1ml塗布して27℃で7日間培養した。その後培地に形成されたコロニーを計数した。

結 果

ブドウ根部浸漬処理として、VAR03-1株菌液の濃度約 1.0×10^8 cell/mlで、24時間の浸漬時間で行ったところ、VAR03-1株は処理後から徐々に菌数は減少する傾向を示した。すなわち、処理14か月後までは菌数が 10^6 CFU (colony forming units) /g 根程度まで緩やかに減少し、処理22か月後には 10^5 ~ 10^4 CFU/g 根の菌数が検出できたが、処理34か月後には検出限界以下となった(Table 3-12)。処理22か月後までの再分離された平均菌数は約 10^6 CFU/g 根であった(Table 3-12)。

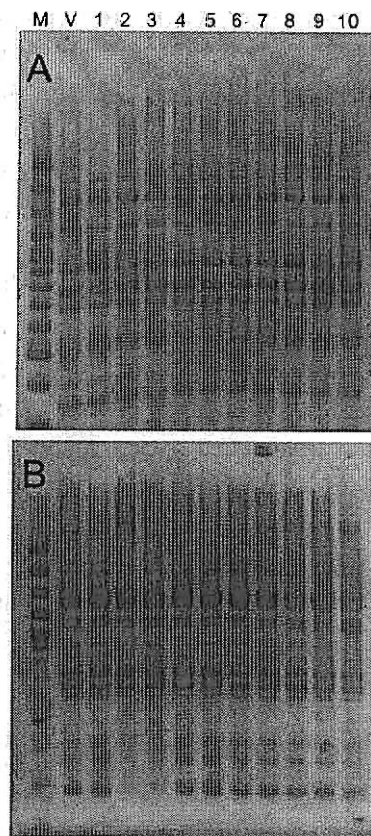


Fig. 3-6. DNA fingerprint patterns of 11 strains of *Rhizobium vitis* revealed by rep-PCR DNA fingerprint analysis with BOX (A) and ERIC (B) primer sets. Lanes: M, 100bp marker; V, VAR03-1; 1 to 10, each isolate obtained from grapevine roots of VAR03-1 in survival experiment.

2 希釈平板法によって得られた再分離菌と VAR03-1 株の遺伝情報および抗菌活性の比較

一般的に、植物の根部に接種した菌株の菌数を測定する場合、遺伝子組み換え技術によりマーカーとなる薬剤耐性などの性質を付与させた菌株を用いることで、検出率を向上するとともに再分離菌が接種菌と同一であることを示す方法がとられている。Burrら (1995) はブドウ根頭がんしゅ病菌のブドウ残渣での生存期間の調査の際に、菌株が元来持つ 16S rDNA と pTi の PCR-RFLP バンドパターンの比較により接種菌と残渣からの再分離菌が同一であると証明する手法を採用している。第1章第3節において、*R. vitis* は菌株によって rep-PCR のバンドパターンが異なることを明らかにしており、本節1項でのブドウ根部分からの再分離菌のマルチプレックス PCR, rep-PCR バンドパターンおよび抗菌活性を、接種菌である VAR03-1 株と比較することで、再分離菌が接種菌と同一であることを確認した。

材料および方法

本節1項での各調査時に 3DG 培地上に形成されたコロニーを無作為に抽出 (10~20 コロニー) し、各コロニーを滅菌した爪楊枝で釣菌し、滅菌蒸留水 20 μ l に懸濁し、94°C で 10 分間加熱した後、-70°C で急冷させて DNA 溶液とした。これを鋳型としてマルチプレックス PCR を行い、コロニーが非病原性 *R. vitis* であることを確認した。マルチプレックス PCR は第2章第1節2項と同様の方法で行った。また、本節1項での 2006 年 4 月 20 日および 2006 年 12 月 26 日の調査時に 3DG 培地上に形成されたコロニーを無作為に抽出 (10~20 コロニー) し、純化して得た再分離菌について BOX-PCR および ERIC-PCR を行い各コロニーのバンドパターンを VAR03-1 株と比較した。BOX-PCR および ERIC-PCR は第1章第3節2項と同様の

方法で行った。さらに rep-PCR に供試した再分離菌から 10 菌株を無作為に選び、指示菌としてがんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27 株を用いて平板培地上の阻止円形成を確認した。方法は第3章第1節4項と同様の方法で行った。

結果

マルチプレックス PCR によって再分離菌は 414bp のバンドのみが検出され、非病原性 *R. vitis* であることが示された (データ省略)。BOX-PCR および ERIC-PCR にて、再分離菌のバンドパターンは VAR03-1 株と一致した (Fig. 3-6)。また、再分離菌はがんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27 株に対して平板培地上で阻止円を形成した (Fig. 3-7)。以上のことから、再分離菌は接種菌である VAR03-1 株であると判断した。

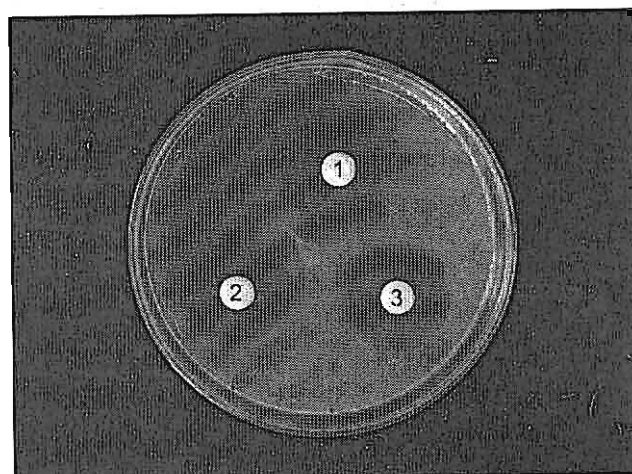


Fig. 3-7. In vitro antibiosis assay against *Rhizobium vitis* (Ti) strain G-Ag-27 as indicator strain. Paper disk No. 1 to 3 with a suspension of each isolate obtained from grapevine roots of VAR03-1 in survival experiment were placed on YMA medium plates, which were then misted with a dilute suspension of G-Ag-27.

Table 3-13. Root colonization of nonpathogenic *Rhizobium vitis* strain VAR03-1 and *R. rhizogenes* strain K84 in the roots of grapevine cv. Neo Muscat after inoculation

Strain	Treatment	Cell suspension (cells/ml)	Soaking time (h)	Log ₁₀ CFU per g (fresh weight) grapevine root ^a			
				Months after inoculation			
				1 ^y	3 ^y	9 ^y	18 ^x
VAR03-1		10 ⁹	1	7.87 ± 0.12 a	7.26 ± 0.13 a	5.96 ± 0.13 a	NT ^w
VAR03-1		10 ⁸	24	7.47 ± 0.10 ab	6.90 ± 0.14 a	5.63 ± 0.10 ab	6.19 ± 0.09
K84		10 ⁹	1	6.99 ± 0.04 b	5.71 ± 0.17 b	4.58 ± 0.12 b	NT
K84		10 ⁸	24	7.44 ± 0.20 ab	5.57 ± 0.20 b	4.20 ± 0.40 b	< 2 ^v

^a Data are means of 10 grapevines. Mean log₁₀ ± standard error

^y Treated grapevines were planted in pots with soil on 1 March 2008. Means followed by the same letter are not significantly different according to Scheffe's test at $P < 0.05$

^x Treated grapevines were planted in pots with soil on 6 June 2006

^w NT, not tested

^v The approximate detection limit was 10² CFU

3 根部浸漬処理による VAR03-1株と K84株のブドウ根部に対する定着性の比較

これまでのブドウ根部浸漬処理の試験において、VAR03-1株と K84株の防除効果を示してきたが、ブドウ根部での定着性については明らかでない。そこで、両菌株のブドウ根部での定着性を比較した。

材料および方法

供試菌株として非病原性 *R. vitis* VAR03-1株および非病原性 *R. rhizogenes* K84株を用いた。各菌株を前培養後、約 1.0×10^8 cell/ml または約 1.0×10^9 cell/ml の菌液に調製した。ブドウ「ネオ・マスカット」を実生から育成した1年生苗10株の根を束ねて全長の1/2の位置で切断し、根部を各菌液に浸漬して約20°Cで24時間または1時間静置した。その後、園芸培土（クレハ社製）を深さ約10cmまで充填したポット（直径15cm×深さ12cm）にブドウ苗を定植した。試験は2回に分けて行い、2006年6月6日には VAR03-1株と K84株の約 1.0×10^8 cell/ml 濃度で24時間処理した苗を定植し、2008年3月1日には VAR03-1株と K84株の約 1.0×10^8 cell/ml 濃度24時間処理および約 1.0×10^9 cell/ml 濃度1時間処理を定植した。定植後は無加温ガラス室で管理した。各処理ともブドウ10株を供試し、菌の定着性の評価は希釈平板法を本節1項と同様の方法で行った。調査は2006年6月6日定植の株は2007年12月10日（浸漬処理後約18か月後）、2008年3月1日定植の株は2008年3月24日（約1か月後）、2008年6月1日（約3か月後）、2008年11月25日（約9か月後）に行った。再分離菌が接種菌と同一であることの確認は、VAR03-1株は本節2項の方法と同様に行い、K84株については

R. rhizogenes の選択培地である2E培地（Brisbane and Kerr, 1983）を用いてブドウ根から分離した後、Stonierの方法（Lopez et al., 1998; Stonier, 1956, 1960）で再分離菌のアグロシン84産生能を評価した。

結果

VAR03-1株処理区からの再分離菌については、マルチプレックス PCR, BOX-PCR および ERIC-PCR によるバンドパターン及び平板培地上で阻止円の形成で接種菌と同一であることを確認した（データ省略）。また、K84株処理区については再分離菌が Stonier の培地で阻止円を形成したことから、K84株と判断した（データ省略）。

2008年の定植試験における浸漬処理1か月後の菌数は、処理濃度 1.0×10^9 cell/ml の1時間処理区において K84株処理区が VAR03-1株処理区の1/8程度の菌数となり、VAR03-1株処理区よりも有意（ $P < 0.05$ ）に少なかった（Table 3-13）。処理3か月後では処理条件にかかわらず K84株処理区の菌数が VAR03-1株処理区より有意（ $P < 0.05$ ）に少なく、VAR03-1株処理区が約 10^7 CFU/g 根に対し、K84株処理区は約 $10^5 \sim 10^6$ CFU/g 根で、1/40～1/50程度の菌数であった（Table 3-13）。処理9か月後でも同様の傾向を示し、K84株処理区（約 $10^4 \sim 10^5$ CFU/g 根）は VAR03-1株処理区（約 $10^5 \sim 10^6$ CFU/g 根）の1/20～1/60程度の菌数であった（Table 3-13）。また、2006年の定植試験における処理後18か月後では、VAR03-1株処理区は約 10^6 CFU/g 根の菌数が得られたが、K84株処理区では菌は分離されず、検出限界以下となった（Table 3-13）。処理条件の違いについては、VAR03-1株、K84株処理区でそれぞれ有意な差は認められなかった（Table 3-13）。

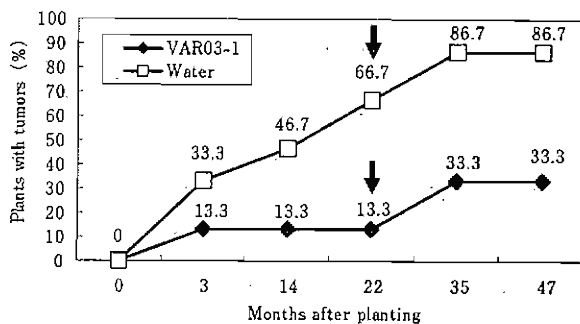


Fig. 3-8. Effect of *Rhizobium vitis* (nonpathogenic) strain VAR03-1 on crown gall of grapevine seedlings after dipping plant roots in bacterial cell suspensions in the greenhouse experiments. Arrows indicate the day when grapevine seedlings were re-planted in pots with new soil infected with a cell suspension of *R. vitis* (Ti) strain G-Ag-27.

4 根部浸漬処理による非病原性 *R. vitis* VAR03-1株の防除効果の持続性（施設内試験）

ここでは、約 1.0×10^8 cell/ml の VAR03-1株の菌液に24時間浸漬処理した場合の防除効果の持続性について検討するため、浸漬処理した後施設内で継続して栽培管理し、経時的に防除効果を調査した。

材料および方法

供試菌株とその調製および汚染土の準備は前節1項(2)と同様に行った。ブドウ「ネオ・マスカット」を実生から育成した1年生苗の根を束ねて全長の1/2の位置で切断し、VAR03-1株の菌液または滅菌蒸留水（無処理区として）に根部が液に完全に沈み込むように浸漬して約25°C、24時間静置した。次に苗の根部を新たにブドウ根

頭がんしゅ病菌 G-Ag-27株の菌液に27°Cで1時間浸漬した後、汚染土を充填したポリポット（黒、直径15cm×深さ12cm）にブドウ苗を定植した。接種後は無加温ガラス室で管理した。調査は2005年5月25日（処理約3か月後）、2006年6月17日（約14か月後）、2006年12月9日（約22か月後）、2008年1月15日（約35か月後）、2009年1月16日（約47か月後）に、ポリポットから株を掘り起こして根および地際部のがんしゅ形成の有無を調査した。調査後の株は培土を交換せず再び元のポットに定植したが、2006年12月9日調査後には、新たに作成した汚染土（約 0.5×10^7 cells/g 土）を充填したポットに取り替えて調査株を定植した。ブドウ苗は各15株ずつ供試し、試験は1回行った。防除価は次式で算出した。防除価 = $100 - [(VAR03-1株処理区の発病株率 \times 100) / (\text{無処理区の発病株率})]$ 。

結 果

処理3か月後の発病株率はVAR03-1株処理区が13.3%、無処理（滅菌水処理）区が33.3%となり（防除価60.1）、VAR03-1株の防除効果が認められた（Fig. 3-8）。その後処理22か月後まで、無処理区は新たに発病株が発生し続けたが、VAR03-1株処理区では新たな発病株の発生は認められなかった（Fig. 3-8）。処理35か月後の調査では、VAR03-1株処理区が33.3%、無処理区が86.7%となり（防除価61.9）、両区で発病株数が増加した。その後、接種47か月後には両区とも発病株数は増加しなかった（Fig. 3-8）。

5 考 察

本節では、非病原性 *R. vitis* VAR03-1株のブドウ根部に対する定着性について検討した。ブドウ根部浸漬処理をVAR03-1株の菌液濃度約 1.0×10^8 cell/ml、24時間浸漬で行った場合、処理22か月後（約2年後）には $10^4 \sim 10^5$ CFU/g 根の菌数が検出できたが、処理34か月後（約3年後）には検出限界以下となったことから、VAR03-1株は処理後約3年で検出限界以下の菌数まで低下するが、処理後約2年間はブドウ根部にある程度の菌数を保持して定着できるものと考えられた。Burrら（1995）はがんしゅ形成性 *R. vitis* を接種した後に土壌に埋没させたブドウの生根および枯死根における菌数の推移を調査し、接種23か月後に $10^4 \sim 10^5$ CFU/g 根の菌数で再分離されたことを報告しており、本研究の結果とほぼ一致している。さらにBurrら（1995）は枯死根内の病原細菌の菌数は接種1年後で $10^4 \sim 10^6$ CFU/g 根程度、接種2年後で $10^4 \sim 10^5$ CFU/g 根程度で存在することを実験的に

証明し、病原細菌が土壌中のブドウ枯死根に約2年間生存して伝染源と成り得るとしている。本病原細菌の土壌中での正確な生存菌数は明らかでないが、バラ根頭がんしゅ病では、一般的に土壌中の菌数は約 10^5 cells/g 土程度である（牧野、1995）。実験的には、がんしゅ形成性 *R. vitis* が 10^6 cells/g 土以上存在する汚染土壌ではブドウ根頭がんしゅ病の発病が起こるが、 10^4 cells/g 土以下では発病しないことが報告されている（Bishop et al., 1988）。本章第2節1項の結果よりVAR03-1株は同濃度以下の病原細菌に対して発病抑制効果を持つことから、VAR03-1株の防除効果の持続性の限界は $10^4 \sim 10^5$ CFU/g 根の菌数が検出された処理後2年程度と推察された。

VAR03-1株の処理条件を菌液濃度約 1.0×10^8 cell/ml、24時間浸漬と約 1.0×10^9 cell/ml、1時間浸漬で比較した結果、浸漬処理1、3、9か月後の菌数は両処理条件で有意な差はなく、ほぼ同じ程度の菌数であったことから、約 1.0×10^9 cell/ml、1時間浸漬でもVAR03-1株のブドウ根部での生存期間は2年程度と推察された。一方、K84株はVAR03-1株の調査結果と比較して明らかにブドウ根部での生存菌数が少なく、生存期間も短かったことから、K84株はブドウ根部における定着性が低いと考えられた。K84株がブドウ根頭がんしゅ病に対して全く防除効果を示さない原因は、がんしゅ形成性 *R. vitis* がK84株の産生する抗菌物質アグロシン84に非感受性であるだけでなく、K84株のブドウ根部における定着性の低さにもあると考えられた。

実際の防除効果の持続性については施設内試験で調査したところ、約 1.0×10^8 cell/mlのVAR03-1株の菌液に24時間浸漬処理した場合、処理後3か月～22か月に新たな発病株の発生は認められなかったが、処理35か月後の調査では発病株数が増加した。この原因として、VAR03-1株の菌数が浸漬処理22か月後には $10^4 \sim 10^5$ CFU/g 根程度まで減少したのに対し、22か月後の調査の後に新たな汚染土（約 0.5×10^7 cells/g 土）を充填したポットに定植したことで土壌中の病原細菌数がVAR03-1株の菌数を一時的に上回ったためと考えられた。この試験における防除効果の持続期間は、定着能力の調査から推定された防除効果の持続期間とほぼ一致することから、VAR03-1株は土壌中のブドウ罹病樹の枯死根が伝染源として機能する約2年間（Burr et al., 1995）の間、防除効果を持続してその期間の発病を抑制することが可能であると考えられた。しかしながら、環境によっては伝染源が2年間以上機能する可能性や、保菌苗木の定植などにより外部から病原細菌が圃場に供給される可能性も考えられる。このため、防除持続期間を延長

するためには、ブドウ樹の根域に VAR03-1株の菌液を追加して土壌灌注するなどの方法も考えていく必要がある。

第5節 他植物の根頭がんしゅ病に対する防除効果

これまでの結果から、非病原性 *Rhizobium vitis* VAR03-1株はブドウ根頭がんしゅ病の防除に有効な拮抗細菌であることが明らかとなった。根頭がんしゅ病はブドウ以外にもバラ科、キク科などを中心に様々な植物で発生する病害であり、我が国では主としてがんしゅ形成性 *R. radiobacter* および *R. rhizogenes* が病原細菌として存在する。本節では、トマトおよびバラを用いて、これらの根頭がんしゅ病菌に対する VAR03-1株の防除効果を検討した。

1 トマトの根部浸漬処理によるキク科植物の根頭がんしゅ病菌に対する防除効果 (施設内試験)

本章第1節1項では、拮抗菌を選抜するための検定植物としてトマトを用いているが、トマトは根頭がんしゅ病菌によるがんしゅの誘導を非常に受けやすいため、様々な根頭がんしゅ病菌の病原性検定に用いられる (牧野, 1993)。さらに、海外ではがんしゅ形成性 *R. radiobacter* によるトマト根頭がんしゅ病は自然発生の報告があり (Weller and O'Neill, 2006)、今後は日本でも発生する可能性がある。そこで、キク科植物由来のがんしゅ形成性 *R. radiobacter* に対する VAR03-1株の防除効果をトマトの根部浸漬処理で検討した。

材料および方法

供試菌株としてキク根頭がんしゅ病菌であるがんしゅ形成性 *R. radiobacter* CH3株および CH5株、コスモス根頭がんしゅ病菌である *R. radiobacter* C054株、非病原性 *R. rhizogenes* K84株、非病原性 *R. vitis* VAR03-1株を用いた。供試菌株を脇本寒天培地に接種し、27℃で48時間培養して、がんしゅ形成性菌株は約 1.0×10^8 cell/ml、非病原性菌株は約 1.0×10^9 cell/ml に調製した。園芸培土 (クレハ社製) 1kg あたり上記がんしゅ形成性菌3菌株の菌液を等量混合したもの500ml (約 1.0×10^8 cell/ml) を良く混ぜ込んだがんしゅ形成性 *R. radiobacter* の汚染土 (約 5×10^7 cells/g 土) をポリポット (黒、直径15cm × 高さ12cm) に高さ10cm まで充填した。トマト 'ポンデローザ' 苗 (3~4葉期) の根を束ねて全長の1/2の位置で切断し、根部を VAR03-1株、K84株の菌液または滅菌蒸留水 (無処理区として) に浸漬して約20℃で1時間浸漬し

た後、2006年8月27日に汚染土を充填したポリポットに定植した。接種後は無加温ガラス室で管理し、約8週後に根および地際部のがんしゅ形成の有無を調査し、発病株率と防除価を算出した。試験は3回行い、各試験においてトマト苗を各15株供試した。防除価は次式で算出した。防除価 = $100 - [(拮抗菌株処理区の発病株率 \times 100) / (\text{無処理区の発病株率})]$ 。

結果

VAR03-1株処理区の発病株率は無処理区と比較して有意に低く ($P < 0.05$)、無処理区よりも発病を平均して63.1%抑制した (防除価 = 63.1) ことから、防除効果が認められた (Table 3-14)。また、K84株処理区と比較して発病株率に有意な差はなく、発病株率および防除価はほぼ同等であった (Table 3-14)。

2 バラの根部浸漬処理によるバラ科植物の根頭がんしゅ病菌に対する防除効果 (施設内試験)

バラ根頭がんしゅ病菌にはがんしゅ形成性 *R. radiobacter* と *R. rhizogenes* が存在するが、静岡県をはじめとして、我が国で根頭がんしゅ病に罹病したバラから分離される病原細菌の多くはがんしゅ形成性 *R. rhizogenes* である (牧野, 1993)。そこで、バラ科植物由来のがんしゅ形成性 *R. rhizogenes* に対する VAR03-1株の防除効果をバラの根部浸漬処理で検討した。

材料および方法

供試菌株としてバラ根頭がんしゅ病菌であるがんしゅ形成性 *R. rhizogenes* AtR1株、オウトウ根頭がんしゅ病菌がんしゅ形成性 *R. rhizogenes* Ch-Ag-2株、ナシ根頭がんしゅ病菌であるがんしゅ形成性 *R. rhizogenes* P-Ag-1株、非病原性 *R. rhizogenes* K84株、非病原性 *R. vitis* VAR03-1株を用いた。供試菌株を脇本寒天培地に接種し、27℃48時間培養して、がんしゅ形成性菌株は約 1.0×10^8 cell/ml、非病原性菌株は約 1.0×10^9 cell/ml に調製した。園芸培土 (クレハ社製) 1kg あたり上記がんしゅ形成性菌3菌株の菌液を等量混合したもの500ml (約 1.0×10^8 cell/ml) を良く混ぜ込んだがんしゅ形成性 *R. rhizogenes* の汚染土 (約 5×10^7 cells/g) をポリポット (黒、直径15cm × 高さ12cm) に高さ10cm まで充填した。バラ 'ローテローゼ' 1年生接木苗 (台木; ノイバラ) の根を束ねて全長の1/2の位置で切断し、根部を VAR03-1株、K84株の菌液または滅菌蒸留水 (無処理区として) に浸漬して約20℃で1時間浸漬した後、2007年4月9日に汚染土を充填したポリポットに定植した。接種後は無加温ガラス室で管理し、

約5ヶ月後に根および地際部のがんしゅ形成の有無を調査し、発病株率と防除価を算出した。試験は3回行い、各試験においてバラ苗を各20株供試した。防除価は次式で算出した。防除価=100-[(拮抗菌株処理区の発病株率×100)/(無処理区の発病株率)]。

結 果

VAR03-1株処理区の発病株率はK84株処理区および無処理区と比較して有意な差は認められなかったが、無処理区よりも発病を平均して73%抑制した(防除価=73.0)(Table 3-14)。K84株処理区は無処理区の発病株率より有意に低く($P < 0.05$)防除価は82.2であり、防除効果が認められた(Table 3-14)。

3 平板培地上での抗菌活性

ここでは、前項1, 2で用いた根頭がんしゅ病菌の菌株に対するK84株またはVAR03-1株の抗菌活性を平板培地上での対峙培養で評価した。

材料および方法

抗菌活性調査の対象菌株(Test strain)には非病原性*R. vitis* VAR03-1株および病原性*R. rhizogenes* K84株を用

い、指示菌株(Indicator strain)としてがんしゅ形成性*R. radiobacter* CH3株, CH5株, C054株, がんしゅ形成性*R. rhizogenes* AtR1株, Ch-Ag-2株, P-Ag-1株, がんしゅ形成性*R. vitis* At-90-23株, G-Ag-23株, MAFF211674株, MAFF211676株を用いた。抗菌活性調査法は本章第1節4項の方法に従った。試験は1回行い、対象菌株と指示菌株の一つの組み合わせあたり平板培地4枚を用い、直径の平均値を算出した。

結 果

指示菌株として用いた根頭がんしゅ病菌10菌株に対し、VAR03-1株は阻止円を形成したが、K84株はがんしゅ形成性*R. radiobacter* C054株と全てのがんしゅ形成性*R. vitis*に対して阻止円を形成しなかった(Fig. 3-9, Table 3-15)。また、同じ指示菌株(10菌株中8菌株)に対して、VAR03-1株の方がK84株よりもする阻止円の直径が有意に大きかった(Fig. 3-9, Table 3-15)。

4 考 察

これまでの試験では、ブドウ根頭がんしゅ病菌であるがんしゅ形成性*R. vitis*に対する非病原性*R. vitis* VAR03-1株の防除効果を、トマト、ヒマワリおよびブド

Table 3-14. Effect of nonpathogenic *Rhizobium* strains VAR03-1 and K84 on crown gall of tomato and rose after soaking plant roots in bacterial cell suspensions in the greenhouse experiments

Treatment	No. of experiment	Tomato ^a		Rose ^b	
		Plants with tumors (%) ^x	Protective value (%) ^w	Plants with tumors (%)	Protective value (%)
VAR03-1	1	20.0		10.0	
	2	26.7		0.0	
	3	33.3		5.0	
	Mean	26.7 a	63.6	5.0 ab	73.0
K84	1	46.7		5.0	
	2	13.3		5.0	
	3	6.7		0.0	
	Mean	22.2 a	69.7	3.3 a	82.2
Sterile distilled water	1	40.0		20.0	
	2	80.0		25.0	
	3	100.0		10.0	
	Mean	73.3 b		18.3 b	

^a Data are means of three experiments of 15 tomato seedlings per treatment. Plants were soaked in cell suspension of antagonist (10^9 cells/ml) or sterile distilled water 1 h before being planted in a pot in soil infected with the mixture of cell suspension of *R. radiobacter* (Ti) strain CH3, CH5, and C054 at a final concentration 5×10^7 cells/g soil

^b Data are means of three experiments of 20 rose nursery stocks per treatment. Plants were soaked in cell suspension of antagonist (10^9 cells/ml) or sterile distilled water 1 h before being planted in a pot in soil infected with the mixture of cell suspension of *R. rhizogenes* (Ti) strain x AtR1, Ch-Ag-2, and P-Ag-1 at a final concentration 5×10^7 cells/g soil

^x Means followed by the same letter are not significantly different according to Ryan's multiple comparison test at $P < 0.05$

^w Protective value = $100 - [(\% \text{ of plants with tumors in treatment} \times 100) / (\% \text{ of plants with tumors in sterile distilled water treatment})]$

ウの地上部への等量混合接種や根部浸漬処理によって検討してきた。本節では、がんしゅ形成性 *R. vitis* 以外の根頭がんしゅ病菌であるがんしゅ形成性 *R. radiobacter* および *R. rhizogenes* に対する VAR03-1 株の防除効果を検討した。トマトを用いたキク科植物根頭がんしゅ病菌に対する防除試験では、VAR03-1 株処理区の発病株率は無処理区と比較して有意に低かった。また、K84 株処理区と比較して発病株率に有意な差はなく、発病株率および

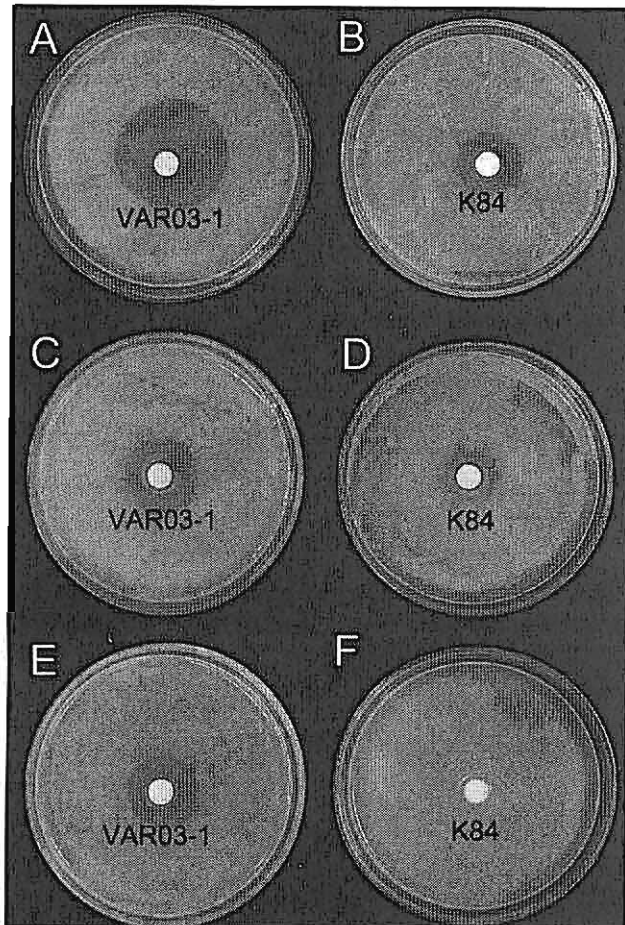


Fig. 3-9. In vitro antibiosis assay against tumorigenic *Rhizobium* spp. Paper disks with a suspension of either *R. vitis* (nonpathogenic) strain VAR03-1 (A, C, E) or *R. rhizogenes* (nonpathogenic) strain K84 (B, D, F) were placed on YMA medium plates, which were then misted with a dilute suspension of *R. radiobacter* (Ti) strain CH3 (A, B), *R. rhizogenes* (Ti) strain Ch-Ag-2 (C, D), or *R. vitis* (Ti) strain G-Ag-27 (E, F). Two days after misting, a halo of growth inhibition was seen around the paper disk with the suspension of VAR03-1 (A, C, E) against each tumorigenic *Rhizobium* spp. and of K84 (B, D) against both *R. radiobacter* (Ti) and *R. rhizogenes* (Ti), but not around the one with K84 (F) against *R. radiobacter* (Ti).

防除価はほぼ同等であったことから、VAR03-1 株のキク科植物根頭がんしゅ病菌に対する防除効果が認められ、その程度は K84 株とほぼ同等と判断した。実際のキク科植物においてもがんしゅ形成性 *R. radiobacter* による根頭がんしゅ病の発病を抑制できる可能性が示唆された。

バラを用いたバラ科植物根頭がんしゅ病菌に対する防除試験では、K84 株処理区の発病株率は無処理区より有意に低かったのに対し、VAR03-1 株処理区の発病株率は K84 株処理区および無処理区と比較して有意な差は認められなかったが防除価は 73.0 と高かったことから、K84 株の防除効果にはやや劣るものの、バラ根頭がんしゅ病に対する防除効果はあると判断した。ただし試験データにばらつきがあるため、今後さらに複数種の植物を用いてがんしゅ形成性 *R. rhizogenes* に対する防除効果を詳細に検討する必要がある。

K84 株は自身が産生する抗菌物質アグロシン 84 により、根頭がんしゅ病菌を選択的に抗生する (Smith and Hindley, 1978) が、ブドウ根頭がんしゅ病菌であるがんしゅ形成性 *R. vitis* はこの物質に対して非感受性であることが知られている (Burr et al., 1998; Burr and Reid, 1993; Kerr, 1980)。本節においても K84 株は平板培地上での対峙培養においてがんしゅ形成性 *R. vitis* に対して全く抗菌活性を示さなかったことから、本章第 1

Table 3-15. *in vitro* antibiosis assay of nonpathogenic *Rhizobium* strains against tumorigenic *Rhizobium* strains

Indicator strain	Formation of inhibition zone ² on YMA medium (mm)	
	K84	VAR03-1
<i>R. radiobacter</i> (Ti)		
CH3	11.8 ± 4.3	19.6 ± 0.7
CH5	6.1 ± 3.5	17.2 ± 1.6*
C054	0.0 ± 0.0	16.4 ± 0.8*
<i>R. rhizogenes</i> (Ti)		
AtR1	18.9 ± 2.5	18.9 ± 0.3
Ch-Ag-2	12.2 ± 1.2	20.0 ± 1.9*
P-Ag-1	11.0 ± 0.3	18.3 ± 1.4*
<i>R. vitis</i> (Ti)		
At-90-23	0.0 ± 0.0	20.8 ± 0.7*
G-Ag-27	0.0 ± 0.0	21.7 ± 2.8*
MAFF 211674	0.0 ± 0.0	20.0 ± 1.3*
MAFF 211676	0.0 ± 0.0	14.8 ± 0.3*

² Data are mean (± standard error) radiuses of the inhibition zone of four replications per treatment. Strains with an inhibition zone distance from paper disk wider than 1 mm were evaluated as sensitive. Means followed by an asterisk differ significantly ($P < 0.05$) between VAR03-1 and K84 according to the Mann-Whitney *U*-test on the square root transformation ($X + 0.5$) data

節4項の結果とも一致し、過去の報告を支持する結果となった。K84株はがんしゅ形成性 *R. radiobacter* C054株には抗菌活性を示さなかったが、CH3株、CH5株およびC054株を含む汚染土によって起こったトマトでのキク科植物根頭がんしゅ病菌の発病を抑制した。牧野 (1993) は、アグロシン84非感受性菌であるがんしゅ形成性 *R. rhizogenes* R73株が起すバラ根頭がんしゅ病の発病をK84株によって抑制した事実から、K84株による根頭がんしゅ病の防除効果にはアグロシン84による抗生だけでなく、根圏での生存場所や栄養分を他者から奪う競合作用も要因として考えられるとしている。本項でのK84株のトマトでの防除効果は、牧野 (1993) の報告を支持すると考えられる。また、本防除試験はCH3株、CH5株およびC054株を含む混合菌液を用いており、混合菌液中にはアグロシン84感受性である菌株の菌数の方が多いことも、防除効果に影響している可能性がある。

VAR03-1株は供試した全てのがんしゅ形成性 *Rhizobium* 属細菌、すなわち、ブドウ根頭がんしゅ病菌だけでなくキク、バラ、コスモス、オウトウおよびナシ根頭がんしゅ病菌にも抗菌活性を示したことから、これ

らブドウ以外の根頭がんしゅ病にも防除効果がある可能性が示唆された。また、その阻止円の直径はK84株と比較しても有意に大きい場合が多かった。本章第1~4節においても明らかであるように、ブドウ根頭がんしゅ病に対する防除効果はVAR03-1株がK84株に大きく優るものの、本節の試験結果におけるキク科およびバラ科根頭がんしゅ病菌に対する防除効果では、阻止円の大きさにかかわらず両菌は同等かあるいはK84株が若干上回る結果となった。これは、本章第2節4項におけるVAR03-1株が形成する阻止円の大きさとトマト茎でのがんしゅ形成抑制率の高さとの間には有意な関係は認められなかった結果とも一致しており、阻止円の直径が大きいほど実際の防除効果も高いという関係は成立しないことを強く示唆している。それには抗菌活性以外の防除メカニズムが交絡要因として関与していることが考えられ、その一つとしてVAR03-1株はK84株と比較してトマトやバラの根部に対する定着性が低いのではないかという仮説を導くことになる。今後はVAR03-1株の防除メカニズムの解明のため、より詳細な研究が期待される。

第4章 総合考察

本論文は、岡山県におけるブドウ母樹および苗木の根頭がんしゅ病菌の感染実態、その際に分離・同定された非病原性 *Rhizobium vitis* の分離および同定、*R. vitis* の分子系統解析、マルチプレックス PCR を用いた本病の遺伝子診断、非病原性 *R. vitis* を用いた本病の生物的防除法に関して2003～2008年に行った一連の研究結果を取りまとめたものである。本論文の個別の実験結果についての考察は各節でその都度行ってきたが、ここでは更に幾つかの項目について総括的な議論を行うことにする。

岡山県におけるブドウ母樹および苗木の根頭がんしゅ病菌の感染実態

岡山県における苗木生産者の保有するブドウ母樹およびがんしゅ様症状を有する苗木についてブドウ根頭がんしゅ病菌の感染実態を調査した結果、保菌母樹の割合は調査樹全体の0.3%程度となり、本県の母樹における感染率は非常に低いことが明らかとなった。また、接木部のがんしゅ様の肥大が認められた苗木のうち、病原性を有する細菌が分離された苗木は9%程度であったことから、接木部のがんしゅ様肥大は全てが本病とは限らず、その率は比較的低いと考えられる。しかしながら、数年に一度は岡山県内の現地圃場で本病の発生が問題となり、2006年には高梁市を中心に発生して一部のブドウは枯死が確認された。本病は土壤伝染性であり、三澤 (2004) は茎頂培養して無病化したブドウ苗木を、発病樹を掘り起こした跡に定植して苗木が発病することを確認している。このことから、保菌苗木の発病だけでなく、現地圃場に苗木を定植した後の土壤伝染による感染、発病や、苗木自体の接木後の育成圃場での感染も考えられる。さらに、現地圃場の定植苗には他県で生産された保菌率の不明な苗木も流通しており、国内で広域に保菌苗木による伝染が起っている可能性もあることから、今後、他県産の苗木についても保菌状況を調査する必要がある。現地圃場で発病しているブドウが保菌苗木からのものか、または土壤伝染によるものか、またはその両方であるかについては現在のところ不明であり、防除対策としては母樹の保菌調査を定期的に行い保菌苗木の流通を防ぐ方法と、育苗圃および現地生産圃場での土壤伝染を防ぐ方法の両方が必要である。

非病原性 *Rhizobium vitis* の分離および同定

前述の母樹および苗木での感染実態調査の際に分離された細菌の一部を同定した結果、病原性菌はブドウ根頭

がんしゅ病菌であるがんしゅ形成性 *R. vitis*、非病原性菌は非病原性 *R. vitis*、非病原性 *R. radiobacter*、非病原性 *Rhizobium* sp.、非病原性 *Pseudomonas* sp. および非病原性 *Xanthomonas* sp. であることが明らかとなった。これらの細菌は全て Roy and Sasser (RS) 培地上で *R. vitis* と同じ形状のコロニーを形成することから、コロニー形状だけでブドウ根頭がんしゅ病菌を識別することは困難であり、本病原細菌とそれ以外の細菌のコロニーを迅速且つ正確に識別する手法の開発が必要である。

非病原性 *R. vitis* の存在は世界的には既に知られているが (Burr and Katz, 1983)、日本においてはこれまで未発見であった (田部井・西山, 1991)。したがって、本研究での報告は非病原性 *R. vitis* の日本における最初の発見であると考えられる。ところで、非病原性 *R. vitis* はブドウ樹体内でがんしゅ形成性 *R. vitis* に付随して生存していると考えられているが (Burr and Katz, 1983)、2003年の長野県および秋田県のブドウの発病樹の樹液からはがんしゅ形成性 *R. vitis* は分離されたが非病原性 *R. vitis* は分離されなかったこと (データ省略)、2003～2008年の岡山県内で診断依頼のあったブドウの組織片および樹液からは非病原性 *R. vitis* が分離されていなかったこと (データ省略) 等から、非病原性 *R. vitis* が常に本病原細菌に随伴しているとは考えにくく、ブドウ樹体内の細菌群集構造の中で優占種ではないものと推察される。このように非病原性 *R. vitis* のブドウ樹体内での生態については不明な点が多いことから、今後、微生物生態学の観点からの生態解明が期待される。

Rhizobium vitis の分子系統解析

本研究により、現在 *R. vitis* の遺伝子型は少なくとも5つ存在し、がんしゅ形成性 *R. vitis* は遺伝子型 A～D、非病原性 *R. vitis* は遺伝子型 E に類別されることを明らかにした。rep-PCR は、増幅された DNA をアガロースゲル電気泳動でバンドとして可視化させてバンドの数と位置を比較して判定する方法であるのに対し、MLSA は選抜した対象遺伝子の塩基配列自体を比較して判定する方法であり、一般的に rep-PCR の方が簡便に実施できるのに対して MLSA は塩基配列の決定に時間を必要とする反面、塩基配列を直接比較するため結果の信頼性は高い。しかし本研究での rep-PCR と MLSA の系統樹は位相がほぼ同じであったことから、rep-PCR で得られた系統樹の妥当性は高いと考えられ、*R. vitis* の遺伝子型は ERIC および BOX プライマーを用いた rep-PCR で簡易に判定することが可能であると考えられる。なお、REP プライマーについては多型が安定的に出現しない場合が

あった（データ省略）ことから、本種の分子系統解析には有効でないと考えられる。

一般的に根頭がんしゅ病菌の病原性は T-DNA が存在する Ti プラスミド (pTi) に起因するものであり、pTi が菌体内に存在するか否かによって病原性、非病原性の表現型が決定する。もちろん、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が (Burr et al., 1987), pTi が存在しない限り発病には至らない。プラスミド DNA は移動性の環状 DNA で、細菌同士がべん毛を接合させて伝達することから、自然界では病原性および非病原性菌株間でも pTi などのプラスミド DNA の受け渡しが行われている可能性がある。実際、植物の毛根病の病原細菌である毛根形成性 *R. rhizogenes* は病原因子として Ri プラスミド (pRi) を有するが、*R. rhizogenes* の基準菌株である ATCC 11325^T 株は pRi だけでなく、根粒形成性 *Rhizobium* 属細菌が有する根粒形成因子の Sym プラスミドを同時に保持していたという報告があり (Velazquez et al., 2005), これは自然界における近縁の細菌同士が頻繁にプラスミド DNA を交換している可能性を強く示している。*R. vitis* においても同様の可能性が考えられることから、がんしゅ形成性 *R. vitis* および非病原性 *R. vitis* の染色体 DNA に遺伝的な差異はないという帰無仮説を設定した。しかしながら、本研究の結果より、両者には遺伝的差異が存在し、別の遺伝子型として定義することが適切であると判断した。これにより、岡山県で分離された非病原性 *R. vitis* はブドウ根頭がんしゅ病菌とは進化的起源が異なる菌群である可能性が示唆された。本研究では日本産を中心に *R. vitis* の菌株を供試したことから、絶対的な菌株数に限りがあった。世界各地で分離された多数の *R. vitis* を供試して遺伝子型を調べることで、がんしゅ形成性 *R. vitis* と同じ遺伝子型の非病原性 *R. vitis* や、新たな遺伝子型のグループに属する菌株が発見される可能性も十分にあり、今後はより多くの菌株を供試して遺伝子型の調査を行い、*R. vitis* の遺伝的多様性について基礎的知見を蓄積していく必要がある。

抗血清を用いたスライド凝集反応、BOX-PCR および ERIC-PCR による rep-PCR さらには MLSA (*pyrG*, *recA*, *rpoD*) による *R. vitis* の総合的な遺伝的多様性の解析は本研究が世界初の報告である。MLSA に用いた *pyrG*, *recA*, *rpoD* の各遺伝子は、細胞が生存するために必須の遺伝子で、全ての *R. vitis* が染色体 DNA に保持し、変異に富むことから遺伝的多様性を解析する標的として適する (一幅ら, 2006)。このため、MLSA によって明らかにされた *pyrG*, *recA*, *rpoD* の塩基配列を用いて、各

遺伝子型に特異的な PCR プライマーやプローブを設計することが可能である。そういったプライマー/プローブを個体群識別マーカーとして *R. vitis* のブドウ樹体内や圃場での動態を追跡する技術の開発が期待される。それによって、現地圃場での発病の原因が土壤伝染由来かまたは保菌苗木による持ち込みによるものかを判断できるようになれば、本病の防除方法を選択する上での有益な情報と成り得る。

ブドウ根頭がんしゅ病の遺伝子診断

本研究では、ブドウ根頭がんしゅ病菌の 16S rDNA を標的とした新規の特異的プライマーセットと、pTi 上に存在する病原性関連遺伝子の一つである *virC* 領域を標的とした特異的プライマーセット (澤田ら, 2003) を組み合わせたマルチプレックス PCR による簡易同定法を開発した。本手法は選択培地で分離されたコロニーを迅速に同定できることから、本病の正確な診断に寄与できると考えられる。また、本研究ではコロニーを滅菌水に懸濁して煮沸した粗抽出液を鑄型として供試したが、培地上のコロニーを針で極少量掻き取って PCR 反応液に直接入れるコロニーダイレクト PCR も可能であり、この場合はより迅速に同定を行うことができる。植物病原細菌は顕微鏡観察で認められる形態の情報が乏しく、同定にあたっては様々な試薬や培地を用いて細菌学的性質を調査する必要があるが、PCR のような客観性が高く簡便な手法は、スピードを要求される病害診断の場面では非常に有効である。ただし、PCR には非特異的反応の可能性が僅かではあるが常に存在することから、一次診断として PCR を用い、その後ある程度検査項目を選抜した細菌学的性質の追試による二次診断を行い、診断を確定するといった方法が望ましいと思われる。

本研究におけるブドウ組織からの直接検出ではがんしゅ組織を主に供試したが、実際の病害診断では、地上部または根のがんしゅ様組織を用いた本手法による診断が可能と考えられる。一方、症状が現れていない苗木生産用の母樹などの保菌検査では、いつの時期にどの部位で菌が局在しているかを明らかにした上で、検査試料の採集方法について検討する必要がある。例えばブドウ根頭がんしゅ病菌は植物細胞に侵入する際、外傷や凍害による細胞の損傷が侵入経路になるとされていることや (Burr et al., 1998)、接木部付近にがんしゅの形成が見られることが比較的多いことから、症状がない樹ではまず接木部の組織を供試することが考えられる。さらに発病樹では、春先に剪定痕から滲出してくる樹液から本病原細菌が検出されることが報告されており (Burr and

Katz, 1983; Lehoczy, 1971; 山本ら, 1994), これは冬期間に密度が下がった病原細菌が春になって発病部で増殖し、樹液の移動とともに樹全体へ移動したためと考えられている (Burr and Katz, 1983; Lehoczy, 1971; 山本ら, 1994). したがって、発病樹や保菌樹の樹液からの本手法による検出についても検討する必要がある。

ブドウ根頭がんしゅ病に対しては現在のところ治療的な対策がないため、生育不良や枯死に至った場合には改植する必要がある。しかし、本病は土壤伝染性であることから新しい苗木を発病樹があった場所に定植することは避けなければならない。そこで、土壤中の病原細菌の有無を調べるために、土壤から直接抽出した土壤微生物由来のDNAを鋳型として、本研究で開発したマルチプレックスPCRを行う方法を今後検討する必要がある。ただし、土壤中には未知の微生物が非常に多く含まれることから、より検出精度の高いプライマーやプローブの設計、PCRの反応条件の再検討等が必要になると予想される。第1章第3節で報告した必須遺伝子の塩基配列情報がこのようなプライマーやプローブの設計に有効と思われるが、これらについては今後の課題である。

これまで日本においてブドウ根頭がんしゅ病の病原菌としてはがんしゅ形成性 *R. vitis* のみが報告されていた (日本植物病理学会, 2000)。ところが、著者らは岡山県内のブドウのがんしゅ組織からがんしゅ形成性 *R. radiobacter* を分離し、ブドウ根頭がんしゅ病の新たな病原として追加することを提案している (川口ら, 2008; Kawaguchi et al., 2009)。開発したマルチプレックスPCR法は、ブドウ根頭がんしゅ病菌であるがんしゅ形成性 *R. vitis* の簡易同定に特化したものであるため、がんしゅ形成性 *R. radiobacter* の pTi は検出可能であるが、*R. radiobacter* を同定することはできない。しかし、澤田ら (2009) は必須遺伝子である *recA* および *pyrG* の塩基配列情報に基づいて新規のプライマーを設計し、*R. radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. vitis*, *R. rubi* を一度に同定できるマルチプレックスPCR法を開発したことを報告しており、今後さらに、*Rhizobium* 属細菌の簡易同定だけでなく、pTi または pRi も同時に検出できるマルチプレックスPCR法の開発が期待される。

非病原性 *Rhizobium vitis* VAR03-1株のブドウ根頭がんしゅ病に対する防除効果

これまで多くの研究者がブドウ根頭がんしゅ病に対する拮抗細菌の選抜を行ってきたが、世界的に実用化された菌株はまだ存在しない (Burr and Reid, 1993; Burr and Otten, 1999; Burr et al., 1997; Chen and

Xiang, 1986; Staphorst et al., 1985; Wang et al., 2003; Webster and Thomson, 1986)。本研究ではブドウ根頭がんしゅ病の生物的防除技術の開発を目的とし、岡山県で分離および同定された非病原性 *Rhizobium* 属細菌から、ブドウ根頭がんしゅ病菌に対して拮抗性を有する菌株として非病原性 *R. vitis* VAR03-1株を選抜した。トマト、ブドウ、ヒマワリの茎を用いたブドウ根頭がんしゅ病菌との等量混合接種試験において、VAR03-1株は安定的にがんしゅ形成を抑制した。一方、本研究のようにブドウ茎に対する病原細菌との等量混合接種試験でがんしゅ形成抑制効果が認められた拮抗細菌の一つに非病原性 *Rhizobium* (= *Agrobacterium*) *vitis* F2/5株が報告されている (Burr and Reid, 1993; Burr et al., 1997)。しかしF2/5株はブドウでのみがんしゅ形成抑制効果を示し、トマト、ヒマワリでは抑制効果を認めない (Burr et al., 1997) ことから、VAR03-1株の方が応用できる植物の種類が多い点で優位性がある。実際、VAR03-1株は根部浸漬処理においてもブドウだけでなくトマト、バラに防除効果を発揮した。また、F2/5株には全く防除効果を示さないブドウ根頭がんしゅ病菌の菌株が存在するが (Burr and Reid, 1993; Burr et al., 1997)、VAR03-1株は供試した全ての菌株に対してがんしゅ形成抑制効果が認められた。このことから、VAR03-1株が本病の拮抗細菌として有望であることがわかる。

一般的な拮抗微生物の防除効果に関して、小規模の室内実験の報告は現在でも多いが、圃場試験での安定的な防除効果の報告は非常に少ない。そこで、本研究では実際の利用を想定して、ブドウ根部浸漬処理によるVAR03-1株の防除効果について検討した。本試験では施設内試験および圃場試験によって、定植前の苗をVAR03-1株の約 1.0×10^8 cell/ml 菌液に24時間浸漬処理または 1.0×10^9 cell/ml の菌液に1時間浸漬処理することにより、本病を防除できることが明らかとなった。ブドウ根頭がんしゅ病の圃場試験で拮抗細菌の根部浸漬処理による防除効果を示したのは、本研究が世界初の報告である。今後は実際の露地栽培、雨除け栽培、加温施設栽培など様々な栽培条件においても本菌の防除効果を検討するとともに、効果的・効率的な処理条件や、高濃度の菌を安定的に保存する製剤技術についても検討する必要がある。

前述の根部浸漬処理が予防的な処理であるのに対し、ブドウ苗を先に病原細菌に接種した後にVAR03-1株の菌液に浸漬するという治療的な処理条件では防除効果は半減したことから、潜在的に感染した苗木に対しては高い防除効果は見込めないと考えられる。すなわち、本処

理法を用いる場合には健全な苗木を定植に用いることが前提となる。その際、苗木の保菌の検査については、本研究で開発したマルチプレックス PCR も有効な手段となると考えられる。

今回、日本に広く分布している遺伝子型 A と B の両方のがんしゅ形成性菌株を混合した汚染土壌において防除効果を示したことは、VAR03-1株が日本の広い地域で使用できる可能性を示唆している。しかしながら、他の遺伝子型の菌株についても防除効果を検討する必要がある。さらには日本各地で土壌の特性は大きく異なり、それが本処理法の効果に影響しているとも考えられることから、様々な種類の土壌での防除効果もあわせて検討する必要がある。

非病原性 *R. vitis* VAR03-1株はブドウ根部浸漬処理によって約2年間ブドウ根部に定着できることが明らかとなった。がんしゅ形成性 *R. vitis* は土壌中のブドウ枯死根内で $10^4 \sim 10^5$ CFU/g 根の菌数が存在して伝染源として機能し (Burr et al., 1995); 10^4 cells/g 土以下の菌密度では発病しない (Bishop et al., 1988) とされており、処理2年後にブドウ根部に定着していた VAR03-1株の菌数は $10^4 \sim 10^5$ CFU/g 根と *R. vitis* の発病を抑制可能なレベルであったことから防除効果は維持されると考えられた。実際の施設内試験での防除効果でも、処理後3か月～22か月の間に VAR03-1株処理区で新たな発病株の発生は認められなかったことから、VAR03-1株の防除効果の持続性は根部浸漬処理後約2年間と考えられた。ブドウは永年性作物であるため、処理後2年以降での防除効果の維持については、根部の菌密度を確保するため定期的に菌液を株元灌注するといった方法を検討する必要がある。

以上の結果から、今日まで有効な防除法がなかったブドウ根頭がんしゅ病の生物的防除の基礎を確立した。ブドウのようにハウス型施設、棚、トンネル型雨除け設備を用いる果樹の場合、発病後の補植時には既に定植・栽培されている他の樹との間隔を考慮すると、定植場所を大幅に変更できないため、発病か所と同じかまたは近い場所に定植せざるを得ないことが多い。そういった場合でも、本菌株を定植前の苗木の根に処理して定植することで発病のリスクを低減させることが可能である。また、本病は定植5年未満の苗木や若木で発病すると生育不良や枯死などが多く見られるが、それ以降の成木では発病はするものの果実生産に与える被害は少ないことが多く、VAR03-1株は苗木の生産現場や本圃での苗木の定植・改植を中心に利用されることが予想される。今後はブドウ根頭がんしゅ病に対する防除対策の最も有効な手

段として、VAR03-1株を有効成分とする微生物製剤の開発が強く望まれる。

VAR03-1株の他植物の根頭がんしゅ病に対する防除効果

これまでに根頭がんしゅ病の病原細菌として、*R. radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. vitis*, *R. rubi*, *R. larrymoorei* (全てがんしゅ形成性) の5種が報告されている (澤田・土屋, 2003)。がんしゅ形成性 *R. larrymoorei* はイチジク根頭がんしゅ病菌として海外でのみ報告されており (Bouzar et al., 1995), がんしゅ形成性 *R. rubi* はキイチゴ類根頭がんしゅ病菌として我が国での発生が1927年に記載されているが (日本植物病名目録, 2000) その後の発生の報告はない。このため、がんしゅ形成性 *R. radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. vitis* の3種が我が国の農業生産上重要な病原細菌と言え、バラ科、キク科など93科の植物に病原性を示すとされる (田部井・西山, 1991)。特にがんしゅ形成性 *R. radiobacter* と *R. rhizogenes* はバラ科、キク科を中心に根頭がんしゅ病を起こす極めて多犯性の病原細菌であり、これまでは我が国でも非病原性 *R. rhizogenes* K84株を主成分とするアグロバクテリウム・ラジオバクター剤によって生物的防除が行われてきた。しかし K84株は病原細菌の菌株によって効果が不安定な場合があり (Hayman and Farrand, 1988); K84株だけに依存する根頭がんしゅ病防除には限界がある。岡山県で分離された非病原性 *R. vitis* VAR03-1株はブドウだけでなく、トマトおよびヒマワリの茎に対する等量混合接種やトマト、バラの根部浸漬処理においても防除効果が認められたことから、K84株同様にバラ科やキク科の根頭がんしゅ病に対しても防除効果が期待できる。しかし VAR03-1株の防除効果の程度はトマト、バラの根部浸漬処理では K84株と比較してほぼ同等かやや劣る結果であったため、さらに防除試験例を重ねるとともに、他の植物に対する防除効果も慎重に検討する必要がある。また、ブドウ根頭がんしゅ病の病原としてがんしゅ形成性 *R. radiobacter* も機能していると考えられること (川口ら, 2008; Kawaguchi et al., 2009) から、ブドウを用いたがんしゅ形成性 *R. radiobacter* に対する防除効果も検討しなければならない。しかしながら、がんしゅ形成性 *R. vitis* に全く防除効果を示さない K84株と比較して、VAR03-1株は *R. radiobacter*, *R. rhizogenes* および *R. vitis* に対して防除効果を示すことから、植物と病原細菌の適応範囲において、K84株を凌ぐ性能を有する拮抗細菌であると判断される。K84株のみに依存してきた根頭がんしゅ病防除に別の拮抗細菌による新たな防除手段を提示することは、農業生産者にとって防除手段の選択肢が増

えることに繋がり、ブドウだけでなくその他多くの植物に発生する根頭がんしゅ病の防除に貢献できると期待される。

VAR03-1株の根頭がんしゅ病発病抑制機構

非病原性 *R. vitis* VAR03-1株は平板培地上でがんしゅ形成性 *R. radiobacter*, *R. rhizogenes* および *R. vitis* に対して阻止円を形成することから、根頭がんしゅ病菌に対する抗菌物質を産生することが明らかとなった。ある細菌によって産生され、同一種以外の系統あるいは近縁の細菌に対して抗菌活性を示す物質のうち、その構成成分がタンパク質からなる物質はバクテリオシンと呼ばれ、大腸菌の産生するコリシンを中心に膨大な研究がなされている (松尾, 1993)。非病原性 *R. rhizogenes* K84株の産生する抗菌物質アグロシン84は構成成分がタンパク質ではないが、がんしゅ形成性 *R. radiobacter* と *R. rhizogenes* に対してのみ抗菌活性を有する (Burr et al., 1998; Burr and Reid, 1993; Kerr, 1980; Smith and Hindley, 1978) ことから、バクテリオシンの範疇で定義されている (松尾, 1993)。VAR03-1株は3種のがんしゅ形成性 *Rhizobium* 属細菌に対して抗菌活性を有するが、*Rhizobium* 属細菌以外のナス青枯病の病原細菌 *Ralstonia solanacearum* やトマトかいよう病の病原細菌 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* に対しては抗菌活性を示さなかった (データ省略) ことから、産生する抗菌物質はバクテリオシンの一種と推察される。本抗菌物質の構成成分の解明については今後の課題である。

根頭がんしゅ病菌の菌株によってはアグロシン84非感受性菌が存在する (Kerr and Htay, 1974; 牧野, 1993)。根頭がんしゅ病菌は植物体に感染してがんしゅ組織を形成させ、その組織から分泌されるオパインと総称される特殊なアミノ酸を資化することができるが、そのオパインの内のノパリンとアグロシノピンを資化できる菌株だけがアグロシン84感受性を持つ (Hayman and Farrand, 1988)。一方、がんしゅ形成性 *R. vitis* はオパインの内のオクトピン、ククモピンあるいはビトピン型であり (澤田, 1994)、K84株に対する非感受性菌と考えられる。特にがんしゅ形成性 *R. vitis* G-Ag-27株はビトピン型であることが知られており、日本に広く分布するがんしゅ形成性 *R. vitis* の多くがビトピン型である (澤田, 1994)。VAR03-1株はビトピン型の *R. vitis* G-Ag-27株に対して抗菌活性を認めたことから、VAR03-1株はビトピン型の病原細菌には防除効果を持つことが明らかになった。また、K84株が抗菌活性を示す菌株はノパリン型またはアグロシノピン型と考えられ、VAR03-1株は供試した全て

のがんしゅ形成性 *Rhizobium* 属細菌に対して抗菌活性を認めたことから、VAR03-1株はノパリン型またはアグロシノピン型にも抗菌活性を持つと考えられる。このことから、VAR03-1株はK84株よりも広範囲のオパイン資化型の病原細菌に対して防除効果を発揮できる可能性がある。今後、今回示したオパイン以外の病原細菌に対するVAR03-1株の防除効果も調べる必要がある。

K84株の根頭がんしゅ病発病抑制機構には、抗菌物質アグロシン84による抗菌作用と、生存する環境や養分を病原細菌と奪い合う競合作用が関与していると考えられている (牧野, 1993)。しかし、K84株はがんしゅ形成性 *R. vitis* に対する抗菌活性を持たないことや、ブドウ根部に対する定着性がVAR03-1株より劣ることが明らかとなったことから、K84株がブドウ根頭がんしゅ病に効果が無い理由は抗菌作用と競合作用の両方に乏しいためと推察される。一方、VAR03-1株はすでに述べたように平板培地上で抗菌活性を有しており、さらにブドウ根部に対する定着性も高いことが明らかとなっている。以上のことから現時点では、VAR03-1株による根頭がんしゅ病発病抑制機構は抗菌活性と競合作用の両方が関与していると考えるのが妥当である。

VAR03-1株の平板培地上で形成する阻止円の直径と実際の防除効果の程度には相関が低かったことから、阻止円の直径は防除効果の程度を推測する指標としては不適であると考えられた。原因として、平板培地上での阻止円の直径は供試菌株の培養条件や培地の種類によって影響を受け実際の抗菌活性を反映しないことが考えられる。このため抗菌活性がどの程度防除効果に貢献しているかについては、遺伝子破壊によりVAR03-1株の抗菌物質産生能力を欠如した株を作出してがんしゅ形成抑制効果を評価し、また、VAR03-1株の植物根圏や植物体内での実際の抗菌物質産生量を測定する必要がある。K84株のアグロシン84についても植物体内での産出量はまだ明らかにされておらず、*in vivo* で抗菌物質の産出量を測定することは拮抗細菌の生態研究に寄与すると思われる。

一部の真正細菌は自己の菌密度を感知して、それに応じて様々な物質の産生を制御するクオラム・センシング (quorum sensing) と呼ばれる機構を有しており (Whitehead et al., 2001)、菌密度が十分に高くなると菌同士が互いにクオルモンと総称されるシグナル分子を細胞外に分泌して集団的な行動を起こす (Zhang, 2003)。それは植物病原性 *Rhizobium* 属細菌にも認められており、がんしゅ形成性 *R. radiobacter* はクオルモンとして 3-oxo-octanoyl-L-homoserin lactone を分泌し、細胞間

における pTi の伝達を促進しているという報告がある (Swiderska et al., 2001 ; Zhu and Winans, 2002). 混合接種における VAR03-1 株の存在比率が病原細菌よりも低くなると発病抑制効果が著しく低下する事実から, VAR03-1 株とがんしゅ形成性 *R. vitis* の混合比率が 1 : 1 の状態が VAR03-1 株にとってのクオラム・センシングを行える最低レベルの菌密度であり, VAR03-1 株の存在比率が病原細菌よりも低い場合には, 抗菌物質の産生を誘導するための十分な菌密度を確保できずにクオルモ

ン分泌が抑制されて抗菌物質産生が起こらなかった可能性が考えられる. VAR03-1 株と病原細菌は同属同種の *R. vitis* であるが, 抗菌物質産生能の有無や rep-PCR や MLSA による遺伝子型の点で異なる「個体」であることは明らかである. 同種内の個体 (菌株) レベルでもクオラム・センシングが機能するかについては非常に興味深く, VAR03-1 株の発病抑制機構の解明にも繋がるかと期待される.

摘 要

本論文は、岡山県におけるブドウ母樹および苗木の根頭がんしゅ病菌感染実態、非病原性 *Rhizobium vitis* の同定、*R. vitis* の分子系統解析、マルチプレックス PCR を用いた本病の遺伝子診断、非病原性 *R. vitis* を用いた本病の生物的防除法に関して2003～2008年に行った一連の研究成果を取りまとめたものである。

1 岡山県におけるブドウ母樹および苗木の根頭がんしゅ病菌の感染実態

岡山県における苗木生産者の保有するブドウ母樹およびがんしゅ様症状を有する苗木についてブドウ根頭がんしゅ病菌の感染実態を調査した結果、保菌樹の割合は調査母樹全体の0.3%程度となり、本県の母樹における感染率は非常に低いことが明らかとなった。また、接木部にがんしゅ様の肥大が認められた苗木のうち、病原性を有する細菌が分離された苗木は9%程度であったことから、接木部のがんしゅ様肥大は全てが本病とは限らず、本病原細菌が関与する比率は比較的低いと考えられた。

2 非病原性 *Rhizobium vitis* の分離・同定および *Rhizobium vitis* の分子系統解析

岡山県内のブドウ苗木生産に用いられる母樹および苗木について本病原細菌の分離を試みた結果、感染している母樹を確認できたが、その際に選択培地上にブドウ根頭がんしゅ病菌と同一のコロニー形態を示す非病原性菌株が複数得られた。生理・生化学的性質、16S rDNA塩基配列、病原性の調査などから、それらを非病原性 *R. vitis* であると同定した。また、これらの非病原性菌とブドウ根頭がんしゅ病菌との間の遺伝的な差異を分子系統学的手法に基づいて調査した結果、病原性菌は4つのグループに、非病原性菌は病原性菌とは異なる1つのグループに類別されることが明らかとなった。このことから、非病原性菌株はブドウ根頭がんしゅ病菌と進化的起源の異なる系統であることが示唆された。

3 ブドウ根頭がんしゅ病の遺伝子診断

ブドウ根頭がんしゅ病菌の検出には選択培地が利用されるが、確実な選択性に欠ける面があるため、分離菌の同定には複数の生理・生化学的性質の調査や生物検定による病原性の判定を強いられることとなり、本病の迅速な診断の支障となっていた。本病の新たな診断手法の一つとして *R. vitis* の16S rDNA を標的とした特異的プライマーと、TiまたはRiプラスミドに存在する病原性関連

遺伝子 *virC* 領域を標的とした特異的プライマーとを組み合わせたマルチプレックス PCR によるブドウ根頭がんしゅ病菌の簡易同定法を開発した。さらに、植物体より直接核酸を抽出し、それを鋳型としてマルチプレックス PCR を行うことにより病原菌の分離、培養によらない迅速な遺伝子診断法を開発した。以上のことから、同病害の診断において正確性と迅速性を両立させることが可能となった。

4 非病原性 *Rhizobium vitis* を利用したブドウ根頭がんしゅ病の生物的防除

ブドウ根頭がんしゅ病には現在のところ有効な防除技術がないため、世界中でその対策が強く求められている。岡山県でブドウ苗木生産用の母樹より分離された非病原性 *R. vitis* の菌株の中にはがんしゅ形成抑制効果を有する菌株が存在した。がんしゅ形成抑制効果のより高い菌株を選抜するため、ブドウ根頭がんしゅ病菌と非病原性 *R. vitis* の各菌株を1:1で混合した菌液をトマト苗の茎に単針付傷接種してがんしゅ形成の有無および程度を調べた結果、VAR03-1株が最も高いがんしゅ形成抑制効果を示した。また、VAR03-1株はヒマワリやブドウにおいて同様にごんしゅ形成を抑制した。供試した非病原性 *R. vitis* 菌株の平板培地上での抗菌活性を調べた結果、VAR03-1株は供試した全てのブドウ根頭がんしゅ病菌に対して阻止円を形成し、それらのブドウ根頭がんしゅ病菌に対してVAR03-1株のがんしゅ形成抑制効果が安定的に発揮されることを確認した。また、VAR03-1株の接種菌数が病原細菌の接種菌数以上であればがんしゅ形成を抑制することが明らかとなった。

さらに、実際の防除の場面を想定して、ブドウ苗の根部にVAR03-1株を浸漬接種することにより、ブドウ根頭がんしゅ病菌に対する防除効果を室内試験および圃場試験で確認した。VAR03-1株はブドウの根に対して少なくとも2年間は安定して定着し且つ防除効果を発揮することが確認された。しかし、すでにブドウ根頭がんしゅ病菌が感染したブドウに対しては防除効果が劣った。また、VAR03-1株が産生する抗菌物質はブドウ以外のキク、バラ、コスモス、オウトウ、ナシの根頭がんしゅ病菌に対しても抗菌活性を有し、VAR03-1株菌液の根部浸漬処理によりトマトを用いたキク科根頭がんしゅ病菌およびバラ根頭がんしゅ病の発病も抑制したことから、広範囲の植物の根頭がんしゅ病防除に応用が期待される。以上の研究結果から、VAR03-1株を基幹とするブドウ根頭がんしゅ病の生物的防除の基礎が確立された。

引用文献

- Bishop, A. L., B. H. Katz and T. J. Burr (1988) Infection of grapevine by soilborne *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 and population dynamics in host and nonhost rhizospheres. *Phytopathology*, 78: 945-948.
- Bouzar H., W. S. Chilton, X. Nesme, Y. Dessaux, V. Vaudequin, A. Petit, J. B. Jones and N. C. Hodge (1995) A new *Agrobacterium* strain isolated from aerial tumors on *Ficus benjamina* L. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 65-73.
- Bouzar H., D. Quadah, Z. Kirimi, J. Jones, M. Trovaoto, A. Petit and Dessaux (1993) Correlative association between resident plasmids and the host chromosome in a diverse *Agrobacterium* soil population. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 1310-1317.
- Brisbane, P. G. and A. Kerr (1983) Selective media for three biovars of *Agrobacterium*. *J. Appl. Bacteriol.*, 54: 425-431.
- Burr, T. J. and B. H. Katz (1983) Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 from grapevine galls and sap, and from vineyard soil. *Phytopathology*, 73: 163-165.
- Burr, T. J., A. L. Bishop, B. H. Katz, L. M. Blanchard and C. Bazzi (1987) A root-specific decay of grapevine caused by *Agrobacterium tumefaciens* and *A. radiobacter* biovar 3. *Phytopathology*, 77: 1424-1427.
- Burr, T. J. and C. L. Reid (1993) Biological control of grape crown gall with nontumorigenic *Agrobacterium vitis* F2/5. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 45: 213-219.
- Burr, T. J., C. L. Reid, M. Yoshimura, E. A. Momol and C. Bazzi (1995) Survival and tumorigenicity of *Agrobacterium vitis* in living and decaying grape roots and canes in soil. *Plant Dis.*, 79: 677-682.
- Burr, T. J., C. L. Reid, E. Taglietti, C. Bazzi and S. Süle (1997) Biological control of grape crown gall by strain F2/5 is not associated with agrocin production or competition for attachment site on grape cells. *Phytopathology*, 87: 706-711.
- Burr, T. J., C. Bazzi, S. Süle and L. Otten (1998) Crown gall of grape: Biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. *Plant Dis.*, 82: 1288-1297.
- Burr, T. J. and L. Otten (1999) Crown gall of grape: Biology and disease management. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 37: 53-80.
- Chen, X.Y. and W. N. Xiang (1986) A strain of *Agrobacterium radiobacter* inhibits growth and gall formation by biotype III strains of *Agrobacterium tumefaciens* from grapevine. *Acta. Microbiol. Sin.*, 26: 193-199.
- Dong, L. C., C. W. Sun, K. L. Thies, D. S. Luthe and C. H. Grave (1992) Use of the polymerase chain reaction to detect pathogenic strains of *Agrobacterium*. *Phytopathology*, 82: 434-439.
- Eastwell, K. C., L. G. Willis and T. D. Cavaleer (1995) A rapid and sensitive method to detect *Agrobacterium vitis* in grapevine cuttings using the polymerase chain reaction. *Plant Dis.*, 79: 822-827.
- Gilson E, J., M. Clement, D. Brutlag, M. Hofnung (1984) A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *E. coli*. *The EMBO J.*, 3: 1417-1421.
- Haas, J. H., L. W. Moore, W. Ream and S. Manulis (1995) Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2879-2884.
- Hayman, G. T. and S. K. Farrand (1988) Characterization and mapping of the agrocinopine-agrocin 84 locus on the nopaline Ti plasmid pTiC58. *J. Bacteriol.*, 170: 1759-1767.
- Herlache, T. C. and E. W. Triplett (2002) Expression of a crown gall biological control phenotype in an avirulent strain of *Agrobacterium vitis* by addition of the trifolitoxin production and resistance genes. *BMC Biotechnol.*, 2: 2.
- Horita M. and K. Tsuchiya (2001) Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology*, 91: 399-407.
- Hulton C. S., C. F. Higgins and P. M. Sharp (1991) ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.*, 5: 825-834.
- 百町満朗 (1993) 拮抗微生物による病害防除のメカニズム. 拮抗微生物による作物病害の生物防除 (百町満朗ら編). クミアイ化学工業株式会社, 東京, pp.19-27.
- 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 (講要).
- Kaufmann, M., H. H. Kassemeyer and L. Otten (1996) Isolation of *Agrobacterium vitis* from grapevine propagating material by means of PCR after immunocapture cultivation. *Vitis*, 35: 151-153.
- 川口 章・井上幸次・那須英夫 (2004a) ブドウ苗木から分離された *Agrobacterium radiobacter* biovar 3 がブドウ根頭がんしゅ病のがん腫形成に及ぼす影響. 日植病報, 70: 76-77 (講要).
- 川口 章・澤田宏之・井上幸次・那須英夫 (2004b) マルチプレックス PCR によるブドウ根頭がんしゅ病菌の簡易同定. 日植病報, 70: 284 (講要).
- 川口 章・井上幸次・那須英夫 (2005) *Agrobacterium radiobacter* biovar 3 VAR03-1 株によるブドウ根頭がんしゅ病の抑制効果. 日植病報, 71: 302-303 (講要).
- Kawaguchi, A., H. Sawada, K. Inoue and H. Nasu (2005a) Multiplex PCR for the identification of *Agrobacterium* biovar 3 strains. *J. Gen. Plant Pathol.*, 71: 54-59.
- Kawaguchi, A., K. Inoue and H. Nasu (2005b) Inhibition of crown gall formation by *Agrobacterium radiobacter* biovar 3 strains isolated from grapevine. *J. Gen. Plant Pathol.*, 71: 422-430.
- 川口 章・井上幸次・那須英夫 (2006a) マルチプレックス PCR によるブドウ根頭がんしゅ病菌の罹病ブドウ樹組織からの迅速検出. 日植病報, 72: 77 (講要).
- 川口 章・井上幸次・那須英夫 (2006b) ブドウ根頭がんしゅ病に対する非病原性 *Agrobacterium vitis* VAR03-1 株の根部浸漬接種による抑制効果. 日植病報, 72: 308 (講要).
- 川口 章・井上幸次 (2007a) 非病原性 *Agrobacterium vitis* VAR03-1 株のブドウ根頭がんしゅ病に対する圃場での防除効果と処理条件. 日植病報, 73: 277-278 (講要).
- 川口 章・井上幸次 (2007b) 拮抗微生物非病原性 *Agrobacterium vitis* VAR03-1 株のブドウ根部に対する定着性. 土と微生物, 61: 161 (講要).
- 川口 章・澤田宏之・一瀬勇規 (2007) rep-PCR および必須遺伝子の配列を用いた *Agrobacterium vitis* の分子系統解析. 日植病報, 73: 71-72 (講要).
- Kawaguchi, A., K. Inoue and H. Nasu (2007) Biological control of grapevine crown gall by nonpathogenic *Agrobacterium vitis* strain VAR03-1. *J. Gen. Plant Pathol.*, 73: 133-138.
- 川口 章・澤田宏之・一瀬勇規 (2008a) 我が国におけるブドウ根頭がんしゅ病菌の遺伝型とその分布. 土と微生物, 62: 143 (講要).
- 川口 章・井上幸次・一瀬勇規 (2008b) 拮抗微生物非病原性 *Agrobacterium vitis* VAR03-1 株の拮抗作用機構に関する一考察. 日植病報, 74: 81 (講要).
- 川口 章・井上幸次 (2008) *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1 によるブドウ根頭がんしゅ病の発生 (病原追加). 日植病報, 74: 253 (講要).
- Kawaguchi, A., H. Sawada and Y. Ichinose (2008a) Phylogenetic and serological analyses reveal genetic diversity of *Agrobacterium vitis* strains in Japan. *Plant Pathol.*, 57: 747-753.
- Kawaguchi, A., K. Inoue and Y. Ichinose (2008b) Biological control of crown gall of grapevine, rose, and tomato by nonpathogenic *Agrobacterium vitis* strain VAR03-1. *Phytopathology*, 98: 1218-1225.
- 川口 章 (2009) ブドウ根頭がんしゅ病の診断と生物的防除および病原細菌の系統解析に関する研究. 日植病報, 75: 155 (講要).
- Kawaguchi, A. and K. Inoue (2009) Grapevine crown gall caused by *Rhizobium radiobacter* (Ti) in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.*, 75: 205-212.
- Kawaguchi, A. (2009) Studies on Diagnosis and Biological Control of Grapevine Crown Gall and Phylogenetic Analysis of Tumorigenic *Rhizobium vitis*. *J. Gen. Plant Pathol.*, 75: 462-463.
- Kerr, A. (1980) Biological control of crown gall through production of agrocin 84. *Plant Dis.*, 64: 25-30.
- Kerr, A., and K. Htay (1974) Biological control of crown gall through bacteriocin production. *Physiol. Plant Pathol.*, 4: 37-44.
- Lehoczy, J. (1971) Further evidences concerning the systematic spreading of *Agrobacterium tumefaciens* in the vascular system of grapevines. *Vitis*, 10: 215-221.
- López- López, M. J., B. Vicedo, N. Orellana, J. Piquer and M. M. López (1998) Behavior of a virulent strain derived from *Agrobacterium radiobacter* strain K84 after spontaneous Ti plasmid acquisition. *Phytopathology*, 89: 286-292.
- Louws, F. J., J. Bell, C. M. Medina-More, C. D. Smart, D. Opgenorth, C. A. Ishimura, M. K. Hausbeck, F. J. de Bruijn, D. W. Fulbright (1998) rep-PCR-mediated genomic fingerprinting: a rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology*,

- 88: 862-868.
- Maeda, Y., M. Horita, H. Shinohara, A. Kiba, K. Ohnishi, S. Tsushima, Y. Hikichi (2007) Analysis of sources of oxolinic acid-resistant field strains of *Burkholderia glumae* based on rep-PCR analysis and nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD*. *J. Gen. Plant Pathol.*, 73: 46-52.
- 三澤知央 (2004) ブドウ根頭がんしゅ病の発病跡地に栽植した無病の苗木の感染・発病. 北日本病虫研報, 55: 84-86.
- 牧野孝宏 (1993) 花き類の根頭がんしゅ病およびメロン毛根病・つる枯病の生物的防除に関する研究. 静岡農試特報, 17: 1-100.
- 松尾憲総 (1993) バクテリオシン, 植物病原性微生物研究法 (脇本 哲ら編), ソフトサイエンス社, 東京, pp.459-466.
- Martin, B., O. Humbert, M. Camara, E. Guenzi, J. Walker, T. Mitchell, P. Andrew, M. Prudhomme, G. Alloing, R. Hakenbeck, D. A. Morrison, G. J. Boulnois, J. P. Claverys (1992) A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nuc. Acids Res.*, 20: 3479-3483.
- Moore, L. W., C. I. Kado, H. Bouzar (1988) Gram-negative bacteria. A. *Agrobacterium*. In: Schaad, NW (ed) A Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2nd edition, APS Press, Minnesota, pp.16-36.
- 日本植物病理学会編 (2000) 日本植物病名目録. 日本植物防疫協会, 東京, pp.1-857.
- Roy, M. A. and M. Sasser (1983) A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3. *Phytopathology*, 73: 810.
- Sawada, H., H. Ieki and Y. Takikawa (1990) Identification of grapevine crown gall bacteria isolated in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 56: 199-206.
- Sawada, H., H. Ieki (1992) Phenotypic characteristics of the genus *Agrobacterium*. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 58: 37-45.
- Sawada, H., J. Imada and H. Ieki (1992a) Serogroups of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 determined using somatic antigens. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 58: 52-57.
- Sawada, H., J. Imada and H. Ieki (1992b) Evaluation of serodiagnosis for differentiating serogroups of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 58: 91-94.
- 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.
- 澤田宏之・土屋健一 (2003) *Agrobacterium* 属細菌の分類. 日植病報, 69: 349-365.
- 澤田宏之 (2007) いわゆる「アグロバクテリム」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 (2008) 植物防疫基礎講座: 植物病原細菌の同定・判別法. 植物防疫, 62: 217-222.
- 澤田宏之・永井利郎・富岡啓介・青木孝之・佐藤豊三 (2009) コロニーダイレクトのマルチプレックスPCRによる4種の植物病原性 *Rhizobium* (= *Agrobacterium*) 属細菌の迅速同定. 日植病報, 75: 209. (講要).
- Schaad, N. W. (1979) Serological identification of plant pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 17: 123-147.
- Schulz, T., D. Lorenz, K. W. Eichhorn and L. Otten (1993) Amplification of different marker sequences for identification of *Agrobacterium vitis* strains. *Vitis*, 32: 179-182.
- Smith, V. A., and J. Hindley (1978) Effect of agrocin 84 on attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to cultured tobacco cells. *Nature*, 276: 498-500.
- Sneath, P. H. A., R. R. Sokal (1973) Numerical Taxonomy. Freeman WH and Co., San Francisco, USA.
- Staphorst, J. L., F. G. H. van Zyl, B. W. Strijdom and Z. E. Groenewold (1985) Agrocin-producing pathogenic and nonpathogenic biotype-3 strains of *Agrobacterium tumefaciens* active against biotype-3 pathogens. *Curr. Microbiol.*, 12: 45-52.
- Stonier, T. (1956) Labeling crown gall bacteria with P^{32} for radioautography. *J. Bacteriol.*, 72: 259-268.
- Stonier, T. (1960) *Agrobacterium tumefaciens* Conn. II. Production of an antibiotic substance. *J. Bacteriol.*, 79: 889-898.
- Swiderska, A., A. K. Berndtson, M. R. Cha, L. Li, G. M. J. Beaudoin, J. Zhu and F. Clay (2001) Inhibition of the *Agrobacterium tumefaciens* TraR quorum-sensing regulator.: Interactions with the TraM anti-activator. *J. Biol. Chem.*, 276: 49449-49458.

- 田部井英夫・西山幸司 (1991) 細菌学的性質, 作物の細菌病 (田部井英夫ら編), 日本植物防疫協会, 東京, pp:87-113.
- University of Guelph (1999) ScienceDaily. <<http://www.sciencedaily.com/releases/1999/05/990506153806.htm>>
- Velazquez, E., A. Peix, J. L. Zurdo-Piñeiro, J. L. Palomo, P. F. Mateos, R. Rivas, E. Muñoz-Adelantado, N. Toro, P. García-Benavides and E. Martínez-Molina (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.
- Wang, H. M., H. X. Wang, T. B. Ng and J. Y. Li (2003) Purification and characterization of an antibacterial compound produced by *Agrobacterium vitis* strain E26 with activity against *A. tumefaciens*. *Plant Pathol.*, 52: 134-139.
- Webster, J. and J. A. Thomson (1986) Agrocin-producing *Agrobacterium tumefaciens* strain active against grapevine isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52: 217-219.
- Weller, S. A. and T. M. O'Neill (2006) Crown gall in organically grown UK tomato caused by tumorigenic strains of *Agrobacterium*. *Plant Pathol.*, 55: 571.
- Whitehead, N. A., A. M. Barnard, H. Slater, N. J. Simpson and G. P. Salmond (2001) Quorum-sensing in gram negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25: 365-404.
- 山本 淳・広沢敬之 (1994) 島根県におけるブドウ根頭がんしゅ病の発生と伝染経路. 島根農試研報, 28: 9-19.
- Yap, I. and R. J. Nelson (1996) Winboot: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. IRRI Discussion Paper Series. 14: International Rice Research Institute, Manila, Philippines.
- Young, J. M., L. D. Kuykendall, E. Martínez-Romero, A. Kerr and H. Sawada (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, L. H. (2003) Quorum-quenching and proactive host defense. *Trends in Plant Sci.*, 8: 238-244.
- Zhu, J. and S. C. Winans (2002) Activity of the quorum-sensing regulator TraR of *Agrobacterium tumefaciens* is inhibited by a truncated, dominant defective TraR-like protein. *Mol. Microbe.*, 27: 289-297.
- Zupan, J., T. R Muth, O. Draper and P. Zambryski (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant J.*, 23: 11-28.

Studies on Diagnosis, Biological Control of Grapevine Crown Gall and Phylogenetic Analysis of Tumorigenic *Rhizobium vitis*

Akira Kawaguchi

summary

Crown gall of grapevine, caused by *Rhizobium vitis* (= *Agrobacterium vitis*) (Ti), is the most important bacterial disease of grapevine (*Vitis vinifera* L.) throughout the world, but there is neither an effective control method nor rapid and simultaneous diagnosis. We describe phylogenetic analysis of *R. vitis* strains, development of diagnosis method based on multiplex polymerase chain reaction (PCR), and biological control of grapevine crown gall using *R. vitis* (nonpathogenic) strain VAR03-1.

1. Isolation and identification of nonpathogenic strains of *R. vitis* and phylogenetic analysis of *R. vitis* strains

At a result of a field survey of potential *R. vitis* (Ti) infections of mother plants and nursery stocks in Okayama Prefecture, it was indicated that nursery stocks with Teleki-Kober 5BB as rootstock yield from the infected mother plant are widely distributed in Okayama Prefecture. Moreover, because there were too many nonpathogenic strains isolated by the Roy and Sasser medium as *R. vitis* selective medium, it was thought the possibility that these strains become obstacles of a prompt diagnosis in the future. In next section, the author had tried to identify these nonpathogenic strains. Some nonpathogenic strains were identified using pathogenicity tests, physiological and biochemical characteristics, and DNA sequencing analysis. Consequently, these strains were identified as *R. vitis* (nonpathogenic). The phylogenetic analysis of tumorigenic and nonpathogenic *R. vitis* strains based on a slide agglutination test using antisera prepared against somatic antigens, the results of repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) analysis using BOX and ERIC as primers and multilocus sequence analysis (MLSA) using the partial nucleotide sequences of *pyrG*, *recA*, and *rpoD* was carried out. The *R. vitis* strains separated into four serogroups (A to D) based on the SAT reactivity. The phylogenetic analyses showed *R. vitis* strains separated into four tumorigenic groups (A to D) and one nonpathogenic group (E). Serogroups A to C corresponded exactly to genetic groups A to C, respectively, whereas serogroup D further divided into two distinct genetic groups, D and E. These results suggest that *R. vitis* strains are genetically heterogeneous and can be separated into several genetic groups. The differences between the nucleotide sequences of *pyrG*, *recA*, and *rpoD* of the genetic groups will enable the development of a simple and convenient monitoring method, which will increase understanding of the dynamics of each genetic group of *R. vitis* in the natural environment.

2. Development of genetic diagnosis by multiplex PCR

To build up a foundation of practical method to identify *R. vitis* (Ti) and *R. vitis* (nonpathogenic) rapidly and simultaneously, multiplex PCR using the pTi- and pRi-specific primer set VCF3/VCR3 and the species-specific primer set Ab3-F3/Ab3-R4 was developed. This multiplex PCR system can be used to identify isolates collected from tumors or immature tumors of grapevine, after a rough screening on selective medium of *R. vitis*. Moreover, a rapid detection method of *R. vitis* (Ti) using the multiplex PCR and DNA extracted from a tissue of grapevine was developed. It was possible to yield positive results of multiplex PCR from several grapevines whether or symptom of crown gall, suggesting that this method has high sensitivity.

3. Biological control of grapevine crown gall by *R. vitis* (nonpathogenic) strain VAR03-1

The screening tests of biological control agent in *R. vitis* (nonpathogenic) were carried out, and *R. vitis* (nonpathogenic) strain VAR03-1 was selected as biological control agent against grapevine crown gall. In a test with a 1:1 cell ratio of pathogen/nonpathogen on stems of tomato (*Solanum lycopersicum*), sunflower (*Helianthus annuus* L.), and grapevine, strain VAR03-1 was effective in reducing the incidence of tumor formation on grapevine and reduced tumor size. Many tested *R. vitis* (nonpathogenic) strains were bacteriocinogenic, causing an inhibition zone against *R. vitis* (Ti) strains on YMA medium. Strain

VAR03-1 was most effective against *R. vitis* (Ti) strains and appears to be a promising agent to control crown gall of grapevine.

A mixture of strain VAR03-1 and tumorigenic strain G-Ag-27 of *A. vitis* at respective cell ratios of 1:1, 3:1, 9:1 and 99:1 significantly inhibited gall formation and size on stems of tomato. Also strain VAR03-1 inhibited tumor formation on stems of both tomato and grapevine at a 1:1 cell ratio with several *R. vitis* (Ti) strains isolated from different fields of grapevine in Japan. In biological control tests, when roots of grapevine and tomato seedlings were soaked in a cell suspension of strain VAR03-1 for 24 h before a 1 h soak in a cell suspension of the pathogen and subsequent planting in pots of infested soil, strain VAR03-1 significantly reduced the incidence of tumor formation on both plants. In a field test, furthermore, pre-inoculation of grapevine roots with strain VAR03-1 reduced percentage of diseased plants and controlled crown gall of grapevine seedlings.

To develop more effective condition of application of VAR03-1, effective concentration and timing of application was investigated toward the practical use. As a result, using the method of planting grapevine seedlings in the soil infested with some tumorigenic strains, pre-treatment of grapevine roots with strain VAR03-1 (adjusted to 10^9 cells/ml and soaked for 1 h) reduced percentage of diseased plants and controlled crown gall of grapevine seedlings. On the other hand, the effect of VAR03-1 is reduced by half to grapevine roots that is already infected by tumorigenic strains. VAR03-1, adjusted to 10^9 cells/ml and soaked for 1 h, was effective in reducing both the percentage of diseased plants, but *R. rhizogenes* (nonpathogenic) strain K84 adjusted to 10^9 cells/ml gave no ability to control tumor formation of grapevine seedlings. Thus, the ability of VAR03-1 to control grapevine crown gall is greater than that of K84 in the test using grapevine seedlings. Moreover, VAR03-1 greatly controlled crown gall of grapevine due to *R. vitis* (Ti) in the field. The sufficient results that VAR03-1 was an effective bacterial agent to control grapevine crown gall using this method were obtained. VAR03-1 established populations averaging 10^6 CFU/g root in the rhizosphere of grapevine and persisted on roots for two years.

When roots of rose (*Rose multiflora* Thunb.) and tomato were soaked in a cell suspension of antagonists before planting in soil infested with *R. rhizogenes* (Ti) and *R. radiobacter* (Ti), respectively, treatment with VAR03-1 reduced the number of plants with tumors and disease severity in the two plant species besides grapevine. The inhibitory effects of treatment with VAR03-1 and the nonpathogenic *R. rhizogenes* strain K84 on crown gall of rose and tomato were almost identical. VAR03-1 was bacteriocinogenic, producing a halo of inhibition against those three species of *Rhizobium*. This is the first report that a nonpathogenic strain, VAR03-1, can effectively control crown gall caused by *R. vitis* (Ti), *R. rhizogenes* (Ti), and *R. radiobacter* (Ti).