ブドウの根頭がんしゅ病に対する抵抗性判定法と 品種抵抗性*

家城 洋之**,†・澤田 宏之**

Hiroyuki IEKI**,† and Hiroyuki SAWADA** : Method of Evaluation
on the Degree of Resistance of Grapevine and Resistance of
Grapevine Cultivars to Crown Gall Disease Caused by
Agrobacterium tumefaciens biovar 3

Abstract

Inoculation method for evaluating the degree of resistance to crown gall disease in grapevine, criteria for the evaluation of the degree of resistance, and classification of the degree of resistance in the major 60 cultivars of grapevine were examined. Second and third internodes of current shoots developed from nursery plants were inoculated at several sites by the needle prick inoculation method with a suspension (ca. 2×10^8 cfu/ml) of *A. tumefaciens* biovar 3, and were subsequently kept at 23°C for about 30 days. The diameter (2r) of the crown galls formed on the shoot was measured and the $r^2\pi$ value was calculated. Resistant “Delaware”, moderately resistant “Rose Ciotat”, and susceptible “Kyoho” cultivars should be inoculated at the same time when the degree of resistance in grapevine was evaluated. Then criteria for the evaluation of the degree of resistance were made as follows. When the index number against the $r^2\pi$ value of the crown galls formed on susceptible “Kyoho” cultivar was set at 100, the cultivars with an index number ranging from 0 to 20 were scored as resistant, those with index numbers from 21 to 60 were scored as moderately resistant, and those with an index number exceeding 60 were scored as susceptible. Based on the degree of resistance, the major 60 cultivars of grapevine inoculated with *A. tumefaciens* biovar 3 were classified into resistant (11 cultivars), moderately resistant (30 cultivars) and susceptible (19 cultivars) groups.

(Received May 16, 1991)

Key words: grapevine, crown gall, *Agrobacterium tumefaciens*, biovar 3, cultivar resistance.

緒 言

各地のブドウ産地において、巨峰などの優良品種に根頭がんしゅ病が多発して問題となっている⁷⁾。本病の特徴は、接ぎ木部、主幹、亜主枝、2年生枝などの地上部にがんしゅが形成されることである。

若木での集団発生が報告されているが、その原因として、苗木での持ち込みによるものが大部分であると推察される。本病原細菌は維管束部を移動することが明らかにされており^{4,5,8)}、細菌保菌樹から穂木を採取して苗木を増殖すると、汚染苗木となる危険性が高い。また、最近、本病原細菌 *Agrobacterium tumefaciens*

biovar 3 が土壌伝染することが報告された¹⁾。これらの理由によって、本病汚染苗木が育成され、ほ場に植え付けられたため集団発生につながっているものと推察される。

本病防除対策としては、本病原細菌を保菌していない健全苗木を育成して、未汚染地に植え付けることである。また、将来的には抵抗性遺伝子を巨峰などの抗病性の優良品種に導入、あるいは抵抗性品種を育成することが望まれる。

なお、本病原細菌については *Agrobacterium* 属の中で新しい種として独立させ *A. vitis* の新称をつけることが現在提案されている。

* 果樹試験番号 : E-146 Contribution No. E-146 of the Fruit Tree Research Station

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

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

Fig. 1. The needle prick inoculation method.

本研究では、ブドウの根頭がんしゅ病抵抗性を判定するための接種条件の検討、抵抗性判定基準の作成および代表的な品種に接種を行って抵抗性程度に基づく品種の類別化を行った。

材料および方法

接種試験 病原細菌は、ブドウ根頭がんしゅ病り病部位から筆者ら⁹⁾が分離し、同定した *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 (G-Ag-27) を供試した。PPGA 斜面培地で 28°C、24 時間培養後、白金耳で菌体を掻き取り、滅菌蒸留水に懸濁して細菌数を約 2×10^6 cfu/ml と約 2×10^8 cfu/ml に調製したものを接種源とした。

予備試験から、抵抗性が強いデラウェア、中のローズ・ショーター、弱い巨峰を選抜した。これらの2年生苗の生育しつつある新梢の先端部の2~3節間部の茎に、病原菌懸濁液を注射器(ディスポーザブルトッププラスチックシリンジ、1 ml)に入れ、注射針(直径 0.45 mm)で1新梢当たり5~6カ所に単針付傷接種を行った(Fig. 1)。接種菌量は1カ所当り注射器からの1滴とした。接種後は、そのまま18, 23, 28°Cに調節した人工気象器内に置き、約30日後にがんしゅの直径(2r)

Fig. 2. Crown galls formed on various cultivars of grapevine inoculated with *A. tumefaciens* biovar 3.

を測定して $r^2\pi$ 値を算出した。1 処理区当たり 2 本の苗木を供試した。

ブドウ各品種への接種 果樹試験場安芸津支場保存のブドウ属 60 品種から穂木を採取して、挿し木によって育成した2~3年生苗木の新梢に、接種試験の場合と同様に G-Ag-27 菌の約 2×10^8 cfu/ml を注射器で、単針付傷接種した。接種後は 23°C に置き、約 30 日後にがんしゅの直径(2r)を測定して $r^2\pi$ 値を算出した。接種試験は5回に分けて行い、1品種当たり2~3本の新梢を

Table 1. Effect of the combination of several factors on the formation of crown galls in grapevine

Cultivar	Inoculum density (cfu/ml)	Temperature (°C)		
		18	23	28
Kyoho	ca. 2×10^6	0.6 ^{a)}	1.5	1.1
	ca. 2×10^8	1.5	7.1	3.5
Rose Ciotat	ca. 2×10^6	0.5	0.8	1.1
	ca. 2×10^8	0.1	3.5	1.5
Delaware	ca. 2×10^6	0.0	0.1	0.0
	ca. 2×10^8	0.0	0.3	0.3

a) Average $r^2\pi$ value of 10 crown galls.

Table 2. Criteria of evaluation of the degree of resistance of grapevine to crown gall disease

Degree of resistance	Index number ^{a)}	Standard cultivar
Resistant	0-20	Delaware (9-16) ^{a)}
Moderately resistant	21-60	Rose Ciotat (41, 42)
Susceptible	>60	Kyoho (100)

a) Index against the $r^2\pi$ value of crown galls formed in "Kyoho" cultivar.

Table 3. Classification of grapevine cultivars based on the degree of resistance to crown gall disease

Degree of resistance	Cultivar name ^{a)}
Resistant	Delaware (lab., vin., aest.), St. George (rup.), SO4 (berl., rip.), Teleki 8B (berl., rip.), Alden (vin., lab., aest.), Monukka (vin.), Himrod (vin., lab., aest.), Thompson seedless (vin.), Rip. Rup. Coderc 3306 (rip., rup.), N.Y. 15305 (vin., lab., aest.) Nourvedre×Rup. 1202 (vin., rup.)
Moderately resistant	Katta Kurgan (vin.), Teleki 5BB (berl., rip.), Star Red (lab., vin., aest.), Wayne (vin., lab., aest.), N.Y. 15302 (vin., lab., aest.), <i>V. labrusca</i> (lab.), Naples (vin., lab., aest.), Suffolk Red (lab., vin.), Niagara Rosada (lab., vin.), Rip.×Berl. 420A (berl., rup.), Muscat Baily B (vin., lab., lin.), Hiro Hanburg (vin.), Muscat Hamburg (vin.), Jasmin (vin., lab.), Violet Uehara (vin., lab.), Rosaki (vin.), Perlette (vin.), Plavaj (vin.), Romulus (vin., lab., aest.), Beniizu (vin., lab.), Rose Ciotat (vin., lab., aest.), Cabernet Sauvignon (vin.), Izunishiki (vin., lab.), Monticola×Rip. 18808 (mon., rip.), Chasslas×Berl. 41-B (vin., berl.), Green Summer (vin.), Supper Hamburg (vin., lab.), Cabernet franc (vin.), Cardinal (vin.), Pione (vin., lab.)
Susceptible	LN-33 (rip., rup., cand., lab., vin.), Muscat of Alexandria (vin.), Ryuho (vin., lab.), Black Olympia (vin., lab.), Early Steuben (lab., vin.), Saperavi (vin.), Cabernet Suntory (vin., lab., linc.), Ruby Okuyama (vin.), Cambell Early (lab., vin.), Schuyler (vin., lab., aest.), Kyoho (lab., vin.), Rizamat (vin.), Hyuga (lab., vin.), Kaiji (vin.), Italia (vin.), Urbana (vin., lab.), Koushu Sanjaku (vin.), Pierce (lab., vin.), Aki Seedless (vin., lab., aest., linc.)

a) () indicates scientific name of grapevine cultivar; aest.: *Vitis aestivalis*, berl.: *V. berlandieri*, lab.: *V. labrusca*, linc.: *V. linsecumii*, mon.: *V. monticola*, rip.: *V. riparia*, rup.: *V. rupestris*, vin.: *V. vinifera*.

有する苗木数本を供試した。

抵抗性判定基準の作成 ブドウ各品種への接種試験の結果およびほ場での発病状況から、抵抗性の判定のための基準品種を選抜するとともに、接種によって形成されたがんしゅの大きさから抵抗性判定基準を作成した。

結 果

接種試験

抵抗性が強いデラウェア、中のローズ・ショーター、弱の巨峰の3品種と2段階の接種菌濃度(約 2×10^6 と 2×10^8 cfu/ml)とを組み合わせる各品種の新梢に接種した。18, 23, 28°Cに保ち、約30日後に調査した結果、Table 1に示すように形成されたがんしゅが最も大きくなったのは23°C、ついで28°C、最も小さいのは18°Cであった。

また、接種菌濃度の違いでは、3品種(デラウェア、ローズ・ショーター、巨峰)のいずれの場合でも3種類

の接種温度(18, 23, 28°C)にかかわらず、接種菌濃度では約 2×10^8 cfu/mlのほうが約 2×10^6 cfu/mlよりもがんしゅが大きくなった。

各品種ともがんしゅが最大となったのは、接種菌濃度が約 2×10^8 cfu/ml、温度23°Cの場合であり、そのときのがんしゅの $r^2\pi$ 値は抵抗性が弱い巨峰で7.1(巨峰に形成されたがんしゅの表面積に対する指数を100とする、以下同)、中のローズ・ショーターは3.5(49)、強のデラウェアは0.3(4)であった。

抵抗性判定基準および各品種の抵抗性

1988~1990年の間、5回に分けて接種試験を行った結果、抵抗性が強いものから弱いものへと連続的に分布していた。これらの接種試験の結果から、抵抗性が強、中、弱のグループに属する代表的な品種を選ぶとともに、抵抗性を判定する場合の基準品種として、強のデラウェア、中のローズ・ショーター、弱の巨峰を選んだ。巨峰に形成されたがんしゅの $r^2\pi$ 値に対する各品種の指数より、抵抗性が強と判定されるものは指

数0~20, 中は21~60, 弱は61以上のものとする抵抗性判定基準をTable 2のように作成した。この基準にもとづいて, 各品種の抵抗性を判定すると以下のとおりである(Table 3, Fig. 2)。

抵抗性が強に属する品種: デラウェア, セント・ジョージ, SO 4, テレキ 8 B, オールデン, モヌッカ, ヒムロッド, トムソン・シードレス, リパリア・ルベストリス・クーデル 3306, N.Y.15305, ムールベードル×ルベストリス 1202。

中に属する品種 (強いものの順): カッタ・クルガン, テレキ 5 BB, スター・レッド, ウェイン, N.Y. 15302, *Vitis labrusca*, ネイプルス, サフォーク・レッド, ナイアガラ・ロザータ, リパリア×ベルランディエリ 420 A, マスカット・ベリー B, ヒロ・ハンブルグ, マスカット・ハンブルグ, ジャスミン, パイオレット・ウエハラ, ロザキ, パーレット, プラベイ, ロムルス, 紅伊豆, ローズ・ショーター, カベルネ・ソービニオン, 伊豆錦, モンティコラ×リパリア 18808, シャスラー×ベルランディエリ 41-B, グリーン・サマー, スーパー・ハンブルグ, カベルネ・フラン, カージナル, ピオーネ。

弱に属する品種: LN-33, マスカット・オブ・アレキサンドリア, 竜宝, ブラック・オリンピア, アーリー・スチューベン, サペラビー, カベルネ・サントリー, ルビー・オクヤマ, キャンベル・アーリー, シャイラー, 巨峰, リザマート, 日向, 甲斐路, イタリア, アーバナ, 甲州三尺, ピアス, 安芸シードレスで, その中で最も病性であったのは甲州三尺であった。

考 察

植物の病気を防除する最も有効な手段の一つとして, 抵抗性品種を栽培することである。そのため各種作物で, 各種病害に対して抵抗性を付与するために, 抵抗性遺伝子を保持する品種や野生種を交配することによって, 抵抗性品種育成を行っている。抵抗性品種を育成するためには, まず野生種や各品種の抵抗性程度を把握する必要がある。そのためには, 抵抗性程度を正確に判定する方法が確立されなければならない。

ブドウ根頭がんしゅ病は優良品種の巨峰で多発しているが, もう一方の主要品種であるデラウェアでは本病の発生病がなく, 両品種間で発病に差が認められる。このことは品種間において, 根頭がんしゅ病に対する抵抗性に差異があることを示唆している。

本病原細菌に対するブドウの抵抗性を判定するため, 組織培養細胞への病原細菌の吸着量の差異と抵抗

性の違いとの間に関係あることが報告されている²⁾。また, 林ら(未報告)は茎頂培養系の葉片および葉柄に本病原細菌を接種して形成されるがんしゅの多少による判定を試みている。

筆者らは³⁾, 苗木を用いて抵抗性を検定するための方法を確立するため, まず接種条件の検討を行い, さらに抵抗性を判定するための基準品種の選抜と判定基準を作成した。

接種条件としては, 生育しつつある新梢の先端部2~3節間部の茎に *Agrobacterium tumefaciens* bio-var 3 の菌濃度約 2×10^8 cfu/ml を注射器に入れ, 数カ所単針付傷接種を行った後, 23°C に置き, 約30日後にがんしゅの直径を測定して $r^2\pi$ 値を算出した。同時に接種したり病性の基準品種である巨峰に形成されたがんしゅの $r^2\pi$ 値に対する指数によって, Table 2 の判定基準で抵抗性を分類した。しかし, 抵抗性を強, 中, 弱に分類したが, 必ずしも明瞭に区別できず連続的であった。この方法は, 基準品種を決めたことによって, 接種条件が異なることによってがんしゅ形成に影響しても, 相対的に抵抗性が評価できる利点がある。

各品種の根頭がんしゅ病に対する抵抗性は, 強いものから弱いものへと連続的に分布しているのが特徴であった。現在わが国で台木として利用されている SO 4, テレキ 8 B は強に, また, テレキ 5 BB は中でも強い部類に属しており, そのため台木部や根にがんしゅの発生が認められない理由であると考えられる。このように台木が抵抗性であっても, 穂木がり病性であれば主幹や2年生枝などの地上部にがんしゅが形成されるので, 穂木品種も抵抗性でなければならない。また, なぜ地上部にがんしゅが形成されるのかは, 病原細菌が通導組織を移動するため^{4,5,8)}, 棚上の生育伸長している枝に病原細菌が達し, なんらかの原因で傷ができると, そこにがんしゅ形成が誘導されると考えられる。

抵抗性の違いを分類学的にみると, *Vitis vinifera* に属する品種は抵抗性が強いものから弱いものへと分布していたが, *V. vinifera* と *V. labrusca* を交配してできた品種は弱いものが多い傾向がみられた。また, *V. rupestris* を交配親としたものは強いものが多かった。

このように本方法で抵抗性の検定を行った結果, 品種間で抵抗性に差があることが明らかとなったので, さらに多くの品種について検定を実施して, 抵抗性品種育成のための基礎資料を集める必要がある。

摘 要

ブドウの根頭がんしゅ病に対する抵抗性を判定するための接種方法、抵抗性程度を分類するための判定基準および主要 60 品種の抵抗性程度の類別を行った。根頭がんしゅ病抵抗性程度を判定するための接種条件は、苗木の生育しつつある新梢先端部 2~3 節間部の茎に *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 の菌濃度約 2×10^8 cfu/ml を注射器（ディスプレイザブルトッププラスチックシリンジ、針の直径 0.45 mm）で数カ所単針付傷接種を行う。これを 23°C に約 30 日間置いた後、が

んしゅの直径 (2r) を測定して、 $r^2\pi$ 値を算出する。その際、基準品種として選抜した抵抗性が強いデラウェア、中のローズ・ショーター、弱の巨峰にも同時に接種を行う。抵抗性判定基準は、基準品種の巨峰に形成されたがんしゅの $r^2\pi$ 値の指数を 100 とした場合、各品種の指数が 0~20 のものは抵抗性が強い、21~60 は中、61 以上は弱と判定する。この判定基準によって、ブドウ 60 品種の抵抗性を分類すると、強に属する 11 品種、中の 30 品種および弱の 19 品種の 3 グループに分けられた。その中で最も病性であったのは甲州三尺であった。

引用文献

1. Bishop, A.L., Katz, B.H. and Burr, T.J. (1988). Infection of grapevine by soil-borne *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 and population dynamics in host and nonhost rhizospheres. *Phytopathology* 78 : 945-948.
2. Cleveland, G.L. and Goodman, R.N. (1984). Differential adsorption of *Agrobacterium tumefaciens* to grape tissue culture cells. *Phytopathology* 74 : 798 (Abstr.).
3. 家城洋之・澤田宏之・今田 準 (1989). ブドウ根頭がんしゅ病菌の接種法とブドウ品種の抵抗性について. 日植病報 55 : 516 (講要).
4. Lehoczky, J. (1968). Spread of *Agrobacterium tumefaciens* in the vessels of grapevine, after natural infection. *Phytopath. Z.* 63 : 239-246.
5. Lehoczky, J. (1971). Further evidences concerning the systemic spreading of *Agrobacterium tumefaciens* in the vascular system of grapevines. *Vitis* 10 : 215-221.
6. Sawada, H., Ieki, H. and Takikawa, Y. (1990). Identification of grapevine crown gall bacteria isolated in Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 56 : 199-206.
7. 寺井泰夫・浅利 寛・小野光明・市川和規 (1987). ブドウ根頭がんしゅ病の発生状況と病原細菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) の選択培地による分離と病原性. 日植病報 53 : 405 (講要).
8. 山本 淳・広沢敬之・三上哲壮・多久田達雄 (1989). 島根県におけるブドウ根頭がんしゅ病の発生と病原細菌の存在場所. 日植病報 55 : 515 (講要).