HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ブドウつる割細菌病の発生生態と防除に関する研究
Author(s)	小松, 勉
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第12367号
Issue Date	2016-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12367
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62710
Type	doctoral thesis
File Information	Tsutomu_Komatsu.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

ブドウつる割細菌病の発生生態と防除に関する研究

北海道大学　大学院農学院
生物資源科学専攻　博士後期課程

小　松　　勉

目　　次

第１章　緒論　…… 1

第２章　研究史　…… 5
第１節　発生と同定　…… 5
第２節　病徴　…… 6
第３節　被害　…… 7
第４節　発生生態　…… 7
第５節　検出　…… 9
第６節　品種間差　…… 10
第７節　防除　…… 11

第３章　北海道で栽培される品種の感受性評価　…… 13
第１節　緒言　…… 13
第２節　現地一般園におけるつる割細菌病に対する品種間差異　…… 13
第１項　試験方法　…… 13
第２項　試験結果　…… 14
第３項　考察　…… 14
第３節　ポット苗への接種による品種間差異　…… 17
第１項　試験方法（2012 年）　…… 17
第２項　試験方法（2013 年）　…… 20
第３項　試験結果　…… 20
第４項　考察　…… 22
第３節　園地における品種間差異　…… 22
第１項　試験方法　…… 22
第２項　試験結果　…… 26
第３項　考察　…… 28

第４章　発生と環境条件　…… 31
第１節　緒言　…… 31
第２節　材料及び方法　…… 31
第１項　試験地概要　…… 31
第２項　接種方法　…… 32
第３項　降雨の状況等　…… 33
第４項　温湿度計測　…… 36
第５項　調査方法　…… 37
第３節　結果及び考察　…… 37

第 5 章　病原菌の越冬部位 …… 43
第 1 節　緒言 …… 43
第 2 節　試験方法 …… 43
第 1 項　噴霧接種後のポット苗における保菌 …… 43
第 2 項　越冬後のポット苗における保菌 …… 44
第 3 項　現地園地における越冬部位 …… 44
第 4 項　多発一般園における病原菌の越冬 …… 45
第 3 節　試験結果 …… 46
第 1 項　噴霧接種後のポット苗における保菌 …… 46
第 2 項　越冬後のポット苗における保菌 …… 47
第 3 項　現地園地における越冬部位 …… 48
第 4 項　多発一般園における病原菌の越冬 …… 49
第 4 節　考察 …… 50

第 6 章　北海道株と欧州株との分子系統解析及び病原性 …… 51
第 1 節　緒言 …… 51
第 2 節　試験方法 …… 52
第 1 項　供試菌株 …… 52
第 2 項　分子系統解析 …… 53
第 3 項　病原性試験 …… 55
第 3 節　試験結果 …… 57
第 4 節　考察 …… 61

第 7 章　薬剤防除 …… 65
第 1 節　緒言 …… 65
第 2 節　試験方法 …… 65
第 1 項　試験園地概要 …… 65
第 2 項　供試薬剤及び処理設計 …… 65
第 3 項　処理概要 …… 66
第 4 項　発病調査 …… 68
第 3 節　試験結果 …… 68
第 4 節　考察 …… 71

第 8 章　休眠期防除 …… 75
第 1 節　緒言 …… 75
第 2 節　試験方法 …… 75
第 3 節　試験結果 …… 75

第 4 節　考察 …… 76

第 9 章　薬剤防除による保菌への影響 …… 78
第 1 節　緒言 …… 78
第 2 節　試験方法 …… 78
第 3 節　試験結果 …… 79
第 4 節　考察 …… 81

第 10 節　総合考察 …… 82

第 11 章　要約 …… 90

英文要約 …… 93

引用文献 …… 95

謝辞 …… 107

図版説明 …… 109

図版 …… 111

第 1 章　緒論

平成 27 年現在，北海道はワインの原料として栽培される醸造用ブドウの作付面積が都道府県別で日本国内第 1 位（農林水産統計「平成 24 年産特殊果樹生産動態等調査」より）となっている．

北海道の夏は，本州以南に比較し梅雨や台風の影響が少なく，湿度が低く昼夜の寒暖差が大きい気象であり，このことがヨーロッパ系醸造用ブドウ（*Vitis vinifera*）の栽培に適しているとされている．また，北海道は北緯 42～45 度に位置しており，亜寒帯性気候に属していることからアメリン＆ウィンクラーによるワイン産地区分ではリージョン I に区分され，これはヨーロッパ北部，ドイツ，オーストリア，フランス北部（シャンパーニュ地方）と同様の栽培気候区分となり，ブドウ栽培としてはもっとも冷涼なエリアとなっており，シャルドネ，リースリングなど白ワイン用品種が適している産地となっている．このため北海道における主要品種は，栽培面積上位からケルナー(55.4ha)，セイベル 13053(49.8ha)，ツヴァイゲルトレーベ(41.9ha)，ミュラートルガウ(30.8ha)，バッカス(24.4ha)となっている（第 1-1 表）．

第1-1表 北海道における加工用向けブドウの栽培面積

品種名	栽培面積(ha)	品種名	栽培面積(ha)
ケルナー	55.4	ヴァイスブルグンダー	6.3
セイベル13053	49.8	マスカットオットネルソン	6.1
ツバイゲルトレーベ	41.9	レゲント	6.1
ミュラートゥルガウ	30.8	ドルンフェルダー	4.9
バッカス	24.4	ザラジュンジェ	4.4
ピノノアール	23.8	清舞	4.3
山幸	15.2	リースリング	4.1
セイベル5279	15.1	ソービニヨン・ブラン	4.0
清見	13.7	ヤマソービニヨン	3.7
シャルドネ	12.1	ロンド	3.6
メルロー	11.8	ふらの2号	3.2
セイベル9110	10.2	ゲヴュルツトラミネール	2.4
レンベルガー	8.1	モリオマスカット	1.6
ヤマブドウ	6.7	ｼｭﾍﾟｰﾄﾌﾞﾙｸﾞﾝﾀﾞｰ	1.2
トラミーナ	6.5	トロリンガー	1.1
ピノグリ	6.4	カベルネソービニヨン	1.0

農林水産統計 平成24年産特産果樹生産動態等調査
加工用専用品種の加工向け利用状況より

北海道における醸造用ブドウ栽培の歴史は，本道の開拓がはじまった明治期にさかのぼるが，ワイン醸造が本格化したのは1960年代以降であり，1963年に十勝ワイン（池田町），1972年に北海道ワイン（浦臼町）及びふらのワイン（富良野市），1974年に余市ワイン（余市町）が設立されている．また，2000年以降になると，道央地域および道南地域を中心に各地に個人あるいは法人経営のワイナリーがつくられ，道産ワインの生産振興が進むとともに広く親しまれるようになっている．

2009年秋，道内各地の醸造用ブドウ産地において，果実が黒変し腐敗する症状が発生し問題となった．また，本症状が発生したブドウ樹では葉にハローを伴う黄色の斑点症状が発生し，

病勢が進展すると病斑が拡大,融合し枯れ上がる症状を呈した.加えて,新梢には黒いかいよう症状を伴う亀裂が多数発生した.本症状がみられた果実を顕微鏡観察したところ，細菌による菌泥の流出が確認され，細菌病が疑われた．しかし，2009 年時点で日本国内ではブドウにおける細菌病は確認されていなかったため,本症状と観察された細菌との関係は不明であった.一方，醸造用ブドウ産地の多くでは,本症状は *Phomopsis viticola* によるつる割病と疑われ，ベノミル水和剤などつる割病に対する薬剤散布も行われたが，防除効果はみられなかった．その後，2011 年に新村ら(2012)により本症状は本邦ではじめて確認された，*Xylophilus ampelinus* による細菌性病害であることが明らかとなり，和名が「つる割細菌病」と提案された.

Xylophilus ampelinus によるつる割細菌病は，ギリシャ，イタリア，フランス，スペイン，北アフリカ沿岸諸国など，地中海沿岸諸国で古くから発生が報告されており，近年は南アフリカ共和国，南アメリカ諸国や東欧各国でも発生が確認されている．一方，同じヨーロッパ大陸においてもドイツやオーストリアなど北海道と同様のワイン産地区分リージョンⅠでは発生が報告されていない．そのため，栽培品種がこれら地域と同様の北海道でなぜ本病が発生したのかは不明である.

2009 年の被害発生，2011 年には本病が細菌病であることが明らかとなったが，醸造用ブドウを含むブドウにおいては，これまで灰色かび病，べと病，晩腐病など糸状菌病害に対する薬剤防除対策は行われてきたものの，細菌病の防除に関する知見はまったくなかった．このため，北海道立総合研究機構中央農

業試験場において，2011 年より 2013 年まで，本病に対する緊急的な防除対策試験が実施された．また，これに引き続き 2014 年から 2016 年までの予定で本病原細菌の生態解明とそれに基づく防除対策の確立試験が行われている．本論文は，これらの結果についてとりまとめたものである．

第 2 章　研究史

第 1 節　発生と同定

ブドウの細菌性えそ症状(bacterial necrosis of grapevine)については，19 世紀の終わりにはフランスで`Maladie d'Oléron'として発生が報告されており，病原細菌は *Bacillus viticola* が当てられていた (Ravaz 1986)．地中海沿岸諸国では，それぞれ同様の症状が報告されており，イタリアでは`Mal nero della vite' (Garovaglio and Cattaneo 1879)，ギリシャでは`Tsilik marasi' (Sarejani 1939) と呼ばれていた．南アフリカでは`Vlamsiekte'と呼ばれ，病原細菌は *Erwinia viticola* と記載されている (DuPlessis 1940)．その後，`Tsilik marasi'の病原細菌として，形態学的特徴，糖の代謝性および DNA 相同性から *Xanthomonas ampelina* と同定された (Panagopoulos 1969)．しかし，rRNA の相同性から *X. ampelina* が *Xanthomonas* 属菌に近似していないことが示され(De Vos and De Ley 1983)，*Psedomonas* 属菌及びその類縁種における芳香族アミノ酸代謝制御の研究によってもこれが支持された (Byng et al. 1980. Whitake 1981a, 1981b)．また，*X. ampelina* が *Xanthomonas* 属菌の特徴である xanthomonadins (brominated aryl-polyene) 色素を産生しないこと (Starr et al. 1977)，生育速度が極端に遅いこと，30℃までしか生育しないこと，ウレアーゼ活性が陽性であること，酒石酸を利用すること，グルコースからの酸産生が陰性であること (Bradbury 1984. Panagopoulos1969)が，*X. ampelina* が *Xanthomonas* 属菌と異なっていることを示した．Willems らにより，細胞タンパク質の電気泳動パターン及び API system による細

菌学的諸性質解析の結果，*X. ampelina* は単独かつ同一の分類群に属し，rRNA 相同性からも *Xanthomonas* 属と別種の新たな一属一種 *Xaylophilus ampelinus* と提案され (Willems et al. 1987a, 1987b)，現在に至っている．

日本国内においては 2009 年に北海道の醸造用ブドウではじめて発生が報告され，国内新発生の病害として病名「ブドウつる割細菌病」が提案された(新村ら 2012)．また，2012 年には秋田県の生食用ブドウにおいても本病の発生が確認されている(須崎・佐藤 2014a)．本病はつる割症状を呈することから，本病の病原が明らかにされる以前，つる割病(*Phomopsis viticola*)と混同される場合が多かった(Pearson and Austin 1998)．

第 2 節　病徴

X. ampelinus は，ヨーロッパブドウ(*Vitis vinifera*)およびその交雑種のみに病原性を示す．その病徴は，葉でははじめ葉脈に囲まれた淡黄色の小斑点が生じ，やがてハローを伴った褐色の病斑となり，融合すると葉は褐色に枯死する．また，葉縁部が黄化する場合も見られる．開花期に発生すると花穂が黒変し枯死する．巻きひげなどにも黒色のかいよう症状が生じる場合がある．葉での発生に続いて新梢に長さ数 mm のレンズ状の条斑が発生し，やがて拡大して数 cm から十数 cm 程度のつる割症状や黒褐色のかいよう症状となる．つる割症状は表皮のみが割れる軽微なものから，激しい発生の場合には維管束や髄まで達する場合がある．果実では黒褐色円形のかいよう症状が認められ，それに伴う裂果や腐敗症状もみられる．

第 3 節　被害

クレタ島では本病によるブドウ被害は深刻であると報告されている(Sarejani 1939). 同時に, 本病はアナトリア半島を発祥として, 古くからギリシャ国内で広まっていると推察されている.

1940 年には南アフリカで本病の甚発生によりブドウの収穫量が 70%以上減少した. フランスでは 1968 年にシャラント県のブーシェとユニ・ブラン, ランドックのグルナッシュとマカブーで深刻な被害が報告されている(EPPO 2009).

スペインでは 1978 年にはじめて確認されている(López et al. 1978)が, 発生地域ではその数年前から症状は出ていたものの発病が穏やかであったため見逃されていたと推察している. スペインでは 1975 年から 1980 年にかけて, 激しい降雨が続いたため本病の発生に好適な条件となり, 激しく発生した. 1981 年の実態調査では, カリニェナ地方のブドウ園 21,000ha のうち, 9,000ha で発生が認められており, うち 80%以上の樹が罹病し収穫の無かったブドウ園 500ha で樹が抜き取られた. しかし, 1981 年から 1985 年にかけては降水量が少なくなり, 本病の発生はみられなくなったことが報告されている(López et al. 1987b).

フランスでは 1993 年と 1997 年にも本病が甚発生した. 特にコニャック地方とアルマニャック地方ではユニ･ブラン, コロンバール, マカブー, ディー地方ではクレレットで収穫量の減少が著しいと報告されている(Ridé 2000).

第 4 節　発生生態

X. ampelinus はブドウの木質部や樹液中に存在し, 剪定器具によ

り伝播するとされている(Ridé et al. 1977). 実際に, 剪定鋏や収穫機の送風口から細菌が検出されている(Marcelin 1976). また, 剪定などにより生じる傷口から感染しやすく, これに風雨が伴うと伝染しやすい(EPPO 2009). 発病程度には年次間差が大きく, これは主に環境要因による. 気象の経過により病徴を示さない潜在的な時期を含めブドウの樹体内で数年間は生存している(Ridé and Marcelin 1983). 降雨が多く湿度が高い場合や, スプリンクラーによる灌水などが行われると発生しやすい. ブドウ園における作業体系が機械化により変化したことが本病が拡大した要因と考えられている(Ridé 1996).

ギリシャでは新梢が最も発病しやすい時期について, 接種試験により調査したところ, 10 月から 1 月が発病しやすい時期であった(Panagopoulos 1987). また, フランスで同様の調査を行ったところ, 10 月及び 2～3 月の感受性が高いものの 1 月が最も感受性が低くなっていた(Ridé and Marcelin 1983).

X. ampelinus のブドウ樹体内での動態について, Branas (1961)は汚染枝を組織学的に観察し, 病原細菌コロニーにより木質部導管の流れが阻害されていることを示した. また, Bernon (1963)は発病枝の病斑部付近の切片観察から, *X. ampelinus* により皮質細胞が破壊され, 靭皮繊維は崩壊していたこと, 病原細菌の集団により木質部導管の機能が阻害されていたことを報告している. Grall and Manceau (2003)は, *gfp* 遺伝子を導入した変異株を作成してブドウにおける *X. ampelinus* の動態を調査したところ, 有傷で接種した場合,接種菌は木質部導管でバイオフィルムを形成しながら増殖し, これにより水分の移動が妨げられるとともに導管組織が破壊され,

木質部細胞，放射組織細胞，髄部細胞の間で接種菌が増殖した．しかし，接種菌は師部から木質部を分ける形成層を超えることは無かった．噴霧接種した場合，接種菌は葉や茎で定着しており，更に接種後に伸長した新しい組織にも定着していることを示し，*X. ampelinus*は木質部導管において増殖，定着していると報告している．さらに，ブドウは休眠後，気温の上昇と共に萌芽するが，その前段階として前年剪定部分から樹液の漏出が起こる．Grall ら(2005)は，この漏出する樹液に含まれる *X. ampelinus* が当年の第 1 次伝染源であり，これにより感染した葉から風雨などによる空気中の分散により第 2 次伝染が起こると推察している．また，*X. ampelinus* は葉面では増殖できないと推察している．

北海道では，2010 年 7 月から前年発病園においてブドウ樹間にポットで生育した健全苗を置いたところ，9 月には葉に発病がみられ，周辺の発病樹から当年の内に感染が起きていることが確認された（新村，私信）．

第 5 節　検出

X. ampelinus は人工培地上での生育が非常に遅い細菌であり，発病したブドウの組織から通常の細菌病で行われる作業により分離しようと試みても，組織中に含まれる雑菌類の生育によりコロニーが覆われ，分離が阻害されてしまう場合が多い(EPPO 2009)．Serfontein ら(1997)は，感染したブドウ苗木を湿潤条件下，15℃3 日間保管することにより細菌密度が上昇し効率的に分離が可能であるとしている．また，これまで選択分離培地の検討はされてこなかったが，須崎・加藤(2014b)は *X. ampelinus* の強いウレアーゼ活性

を利用した準選択分離培地について報告している.

血清学的検出方法として, *X. ampelinus* のポリクローナル抗体を用いた ELISA 法により, 感染したブドウの樹液からは *X. ampelinus* を検出が可能としているが, 感染したブドウ組織から検出することは難しかったと報告している(López et al. 1987a). Gorris ら(1989)は *X. ampelinus* のモノクローナル抗体を作成し, 感染したブドウ組織からも検出は可能だったと報告しているが, 感度はやや低く, 腐生性の細菌に対してわずかな交叉反応が見られるなど問題もあった.

分子生物学的検出方法として, Botha ら(2001)は, 16S-23S rDNA 遺伝子のスペーサー領域の塩基配列から特異的プライマーを設計し, nested-PCR を行うことにより, ブドウ挿し穂における高感度の検出が可能であったことを報告している. Manceau ら(2005)は rDNA の ITS 領域の塩基配列から *X. ampelinus* の種特異的プライマーを設計し, PCR によりブドウ組織からの簡便な検出方法を報告するとともに, この特異的増幅産物に対する Dig 標識プローブを用いた PCR-ELISA 法によりマイクロプレートを利用した高感度検出法について報告している. Dreo ら(2007)は, 種特異的なマイナーグルーブバインダープローブを用いたリアルタイム PCR により, nested-PCR の 100 倍の感度でブドウ組織からの *X. ampelinus* 検出が可能であること, サイクル数と培地上での細菌計測数との相関を示し, 定量的な検出にも利用できることを示した.

第 6 節　品種間差

本病が古くから発生していた地中海沿岸諸国において, 本病に対

するブドウの感受性には品種間差異があることが知られている．ギリシャではサルタニーナ，ゴールドが感受性(López 1987)，フランスではアリカンテ・ブーシェ，グルナッシュ，ユニ・ブラン，マカブー，コロンバール，ガメ，グラモンなどが感受性(Ridé, M. 1984)，スペインではガルナッチャ・ネグラ，マカベオ，モスカテルが感受性(López 1980)，スロベニアではレブラが感受性(Dreo et al. 2005)とされている．一方，本病に対し実用的な抵抗性品種は見つかっていない(Ridé 1984)．

第 7 節　防除

ヨーロッパではブドウつる割細菌病の防除対策として，感染枝の除去，剪定はできるだけ乾燥しているときに行う，剪定道具は作業中感染しないようにするなどの耕種的防除がすすめられている（Panagopolos 1987）．汚染された種苗の移入により拡大することが懸念されるため，アメリカ合衆国ではカナダ以外からの苗の移入を禁止しており，オーストラリアも海外からの移入を禁止している．EU では発生地域から無発生地域へ苗を異動させる場合，2 年以上本病の発生が無いことを確認することが求められている(横浜植物防疫所調べ)．

殺菌剤散布による防除の試みとして，Panagopolos (1987)は本病に対して塩基性塩化銅，亜ヒ酸ナトリウム，DNOC，ストレプトマイシン，オキシテトラサイクリン，テトラサイクリン，カスガマイシン，バンコマイシン，シクロヘキシミド，ハイドロキシノール・ベンゾエート，フェンチアゾン，フェナジンなどの薬剤を剪定後，萌芽前などに 4 回撒布しても病害抑制効果は得られなかったとして

いる．また，Grasso and Refatti (1982)もイタリアでボルドー液やジクロロフェンを使った防除試験がうまくいかなかったことを報告している．López ら(1987)は様々な銅剤を用いた散布試験を実施したが干ばつのため処理区間で有意な差が得られなかったと報告している．本病に対し，細菌病に効果が期待される薬剤による防除は効果が確認されていないという報告がある一方，銅剤が本病の予防剤として利用され，銅剤の散布により二次伝染と病徴の出現を防ぐと報告している(Grall and Manceau 2003)が，具体的なデータは示されていない．Bugaret ら(2002)は有機硫黄剤と銅剤とを組み合わせることにより防除効果が得られるとしている．

また，Pasallidas and Argyropoulou (1992)は，本病に感染したブドウさし苗に対し，温湯消毒の効果を示し，オーストラリアではブドウ挿し苗の消毒として 50℃20 分間の温湯消毒が勧められている．

近年取り組まれている試験では，抗菌性合成ペプチドの効果(Visser et al. 2012)や全身抵抗性誘導の報告(Morales et al. 1998)もあるが，いずれも実用的な防除方法とはなっていない．

このように本病は古くから発生が認められているものの具体的な防除方法についての研究は少ない．一方で,「トルコでは絶滅が確認された」や「南アフリカでは銅剤の散布により問題とならなくなった」などの記述が総論に紹介されているものの，根拠となる試験記録や文献はなく，不明な点が多い．

第 3 章　北海道で栽培される品種の感受性評価

第 1 節　緒言

本病が古くから発生していた地中海沿岸諸国において，本病に対するブドウの感受性には品種間差異があることが知られている．ギリシャではサルタニーナ，ゴールドが感受性(López 1987)，フランスではアリカンテ・ブーシェ，グルナッシュ，ユニ・ブラン，マカブー，コロンバール，ガメ，グラモンなどが感受性(Ridé, M. 1984)，スペインではガルナッチャ・ネグラ，マカベオ，モスカテルが感受性(López 1980)，スロベニアではレブラが感受性(Dreo et al. 2005)とされている．しかし，北海道における醸造用ブドウの主要品種は，主にドイツ，オーストリアが中心であり，フランス原産の品種であってもフランス北部の品種が導入されており，温暖な地中海沿岸地域とは品種構成が異なっている．そのため北海道で栽培されている醸造用ブドウ品種における本病に対する感受性はまったく不明であった．このことから現地園，ポット苗，多品種栽植園地において本病に対する感受性の検定を行った．

第 2 節　現地一般園におけるつる割細菌病に対する品種間差異

第 1 項　試験方法

園内に多品種が栽植されており，2009 年につる割細菌病の発生が確認されている富良野市内の醸造用ブドウ園において，本病の発生程度に品種間差異がみられるのか調査を行った．調査は 1 品種につき 10 樹，1 樹あたり 50 葉を肉眼観察し，つる割細菌病と考えられる斑点

症状が観察された葉を発病葉として計数した．それぞれ 5 反復（計 2,500 葉／品種）で調査を行った．調査は，2012 年 9 月 12 日および 2013 年 9 月 17 日に行った．

第 2 項　試験結果

第 3-1 表に示した．

2 カ年の調査を通じて「イルサイ・オリヴァー」の発病葉割合が高かった．また，道内主要品種である「ケルナー」、「ツヴァイゲルトレーベ」は比較的本病が発生しやすい品種と考えられた．

第3-1表 ブドウつる割細菌病への感受性調査

品種	発病葉割合(%)		備考
	2012年	2013年	
イルサイ･オリヴァー	0.84	3.27	ハンガリー原産の極早生種
カベルネ･ソーヴィニヨン	0.52	0.56	
ツヴァイゲルトレーベ	0.48	1.30	
ケルナー	0.24	1.68	
ミュラー･トルガウ	0	0.76	
バッカス	0	0	(シルバーナ×リースリング)×ミュラー
参考(2013年のみの調査品種および多発事例のある品種の調査結果)			
ピノ･ノワール		0.08	
ニューヨークマスカット		9.80	2013年多発ほ場
セイベル10076		3.80	2009年発生ほ場

第 3 項　考察

調査地である富良野市において，2012 年は 6 月から 7 月下旬まで干ばつ傾向となったため本病の発生量は少なく，品種間差異は明らかではなかった．2013 年は，6 月中旬にまとまった降雨があり，7 月上旬には同市内の他園地「ニューヨークマスカット」において本病が多発していることが確認された．しかしその後，7～8 月中旬まで降雨が

なく，干ばつ傾向であったため病勢は停滞した．8 月中旬から降雨があったが，現地では開花期を中心に銅剤散布が実施されていたこともあり，調査園については多発生とはならなかった．

少発生条件下であったものの,「イルサイ・オリヴァー」が比較的本病に感受性であることが示唆された．この品種は 2011 年に実施された全道主要産地におけるつる割細菌病実態調査においても発生の多い品種であった（第 3-2 表).

参考として，2009 に本病の発生が初めて確認された「セイベル 10076」，2013 年 7 月に発生がみられた「ニューヨークマスカット」では 9 月調査時点においても発生が認められており，感受性の品種であると考えられた．

第3-2表　道内主要産地における品種毎のつる割細菌病発生状況(2011年)

品種名	調査園地数	調査面積(a)	発生樹割合(%)	発生程度
カベルネ・クービン	2	17	73	2.5
マスカット・オットネル	1	59	77	2.0
イルサイ・オリヴァー	1	100	74	2.0
メルロー	6	394	55	2.0
シャルドネ	6	330	66	1.7
ケルナー	34	3,155	51	1.6
ピノ・グリ	6	360	47	1.5
モリオ・マスカット	4	89	46	1.5
レンベルガー	2	294	26	1.5
ツヴァイゲルトレーベ	29	2,199	41	1.3
セイベル5279	4	302	19	1.3
カベルネ・ソービニヨン	1	10	49	1.0
ピノ・ノワール	5	273	48	1.0
セイベル10076	1	-	14	1.0
セイベル13053	6	480	11	1.0
ヴァイスブルグンダー	1	78	7	1.0
ドルンフェルダー	2	-	3	1.0
ミュラー・トルガウ	18	1,358	24	0.9
ザラジュンジェ	4	60	36	0.8
バッカス	12	680	17	0.8
山ぶどう	1	30	0	0.0

発生程度は無:0、微:1、少:2、中:3、多:4とした

第 3 節　ポット苗への接種による品種間差異

第 1 項　試験方法（2012 年）

本病に対する品種間差異を調査するためブドウポット苗への接種試験を行った．試験に供試した品種は第 3-3 表に示した．これらはすべて夕張郡長沼町にある北海道立総合研究機構中央農業試験場（以下，中央農試）のブドウ園から採取されたもので，採取した 2011 年時点において本病の発生が確認されていない健全樹由来のものである．2012 年 3 月 25 日に径 12cm ポリポットに園芸培土（ポットエース，片倉チッカリン，東京）と鹿沼土を 1：1(V/V)で十分混和したものを充填した.ポットにブドウ枝を挿し木して温室内で育成し,発根させ，新梢をのばしたものを供試した.

1 品種当たり 9 ポットを 3 反復で行ったが，ポット苗数の少ない品種については 1～2 反復とした.

第3-3表　ブドウつる割細菌病感受性試験供試品種一覧

品種名		原産国	学名・交配
ケルナー	Kerner	ドイツ	*V. vinifera (occidentalis)*
ローター・グーテデル	Roter Gutedel	ドイツ	*V. vinifera (caspica)*
ミュラー・トルガウ	Müller-Thurgau	ドイツ	*V. vinifera (occidentalis)*
ユヴェール	Jewel	ドイツ	*V. vinifera (occidentalis)*
ドルンフェルダー	Dornfelder	ドイツ	*V. vinifera (occidentalis)*
リースリング	Riesling	ドイツ	*V. vinifera (occidentalis)*
ツヴァイゲルトレーベ	Zweigeltrebe	オーストリア	*V. vinifera (occidentalis)*
MHアムレンシス	Amurensis Musham	ハンガリー	*V. amurensis × V. vinifera (pontica, antasiatica)*
セイベル5279	Seibel 5279 (= AURORE)	フランス	*V. vinifera x V.rupestris x V.linsecumii*
セイベル13053	Seibel 13053 (=CASCADE)	フランス	*V. vinifera x V.rupestris x V.labrusca x V.lincecumii x V.riparia x V.berlandieri*
カベルネ・ソーヴィニヨン	Cabernet Sauvignon	フランス	*V. vinifera (occidentalis)*
ピノ・ノワール	Pinot Noir	フランス	*V. vinifera (occidentalis)*
ナイアガラ	Niagara	アメリカ	*V. labrusca × V. vinifera* (and reciprocal cross)
デラウェア	Delaware	アメリカ	*V. vinifera x V.labrusca x V.aestivalis*
バッファロー	Buffalo	アメリカ	*V. vinifera x V.labrusca x V.aestivalis*
キャンベル・アーリー	Campbell Early	アメリカ	*V. labrusca × V. vinifera* (and reciprocal cross)
ポートランド	Portland	アメリカ	*V. labrusca × V. vinifera* (and reciprocal cross)
サニールージュ	Sunny Rouge	日本	*V. vinifera (pontica, antasiatica)× V. labrusca* (and reciprocal cross)
アルモノワール	Harmonoir	日本	*V. vinifera (occidentalis)*

本病は30℃以上ではほとんど発病しないとされているため，小型簡易パイプハウス（間口 5.4m，長さ 15m，高さ 3m）を雨水透過性の50%近赤外線遮光資材（メガクール，三菱樹脂アグリドリーム，東京）で覆い，内部が高温とならないようにした．なお，側面や棲面については被覆を行わず，通気性を確保した．ハウス内に防草シート（アグリシート，日本ワイドクロス，大阪）を敷き，その上に農業用トンネル資材（トンネル支柱・幅 180cm・高さ 87cm）を設置し，農業用ポリエチレンフィルムで覆ってトンネルを作った．トンネル下のシート部分にブドウポット苗を並べた．なお，通常はトンネル被覆を行わず開放し，接種後のみ被覆し高湿度が保たれるようにした．

接種菌株は，BB-7（2010 年余市町「ケルナー」分離菌）と BB-9（2010 年余市町「ツヴァイゲルトレーベ」分離菌）を用いた．普通液体培地において 110rpm，25℃，暗所で 7 日間振とう培養した供試菌 2 菌株の懸濁液それぞれ 100ml を混合し計 200ml とした後，蒸留水で 1000ml にメスアップした．調整後の菌体懸濁液については，普通寒天培地を用いた希釈平板法により菌密度を測定した．

調製した菌体懸濁液は加圧式ハンドスプレーを用いて 1 ポット当たり 3ml を茎葉に噴霧接種した．接種は午後 5 時以降に行い，接種前に散水シャワーによる頭上灌水を行った．接種後はフィルムでトンネル被覆し，翌朝被覆を開放することを繰り返した．接種はこの処理を 5 日間連続して行い，これを 1 回目接種とした．この処理を 3 回行ったので総接種回数は 15 回となる（第 3-4 表）．

10 月 3 日に全葉について発病の有無を確認し，発病葉割合を算出した．

第3-4表 接種月日および接種菌濃度(2012年)

接種回	接種月日	平均接種菌密度
1	6月8～12日	1.09×10^{7} cfu/ml
2	7月9～13日	6.74×10^{9} cfu/ml
3	8月24～28日	9.67×10^{9} cfu/ml

第 2 項　試験方法（2013 年）

2012 年供試したポット苗は，全葉落葉後 11 月 20 日に基部 2～3 芽を残して剪定を行った．剪定した枝の越冬芽について PCR による保菌検定(Komatsu and Kondo, 2015a)を行ったところ，保菌が確認されたため，2013 年は接種を行わず，自然発病による試験を行うこととした.そのまま積雪下で越冬させ,2013 年春に伸長した新梢を供試した.試験場所，遮光管理は 2012 年と同様とした．2013 年は，病原菌の接種やトンネル被覆は行わず，ほぼ毎日散水シャワーによる頭上灌水を行って湿潤状態を保つように管理し，自然状態での発病を調査した.

9 月 20 日に全葉について発病の有無を確認し,発病葉割合を算出した.

第 3 項　試験結果

試験の結果について第 3-5 表に示した.

第3-5表 ポット苗ブドウにおけるつる割細菌病発病程度

品種名	2012年			2013年		
	調査葉数	発病葉数	発病葉割合(%)	調査葉数	発病葉数	発病葉割合(%)
セイベル5279	567	135	23.8	435	216	49.7
ツヴァイゲルトレーベ	405	71	17.5	226	108	47.8
ケルナー	619	134	21.7	360	152	42.2
ローター・グーテデル	658	113	17.2	549	186	33.9
セイベル13053	401	63	15.8	388	119	30.7
ミュラー・トルガウ	462	53	11.5	314	108	34.4
ユヴェール	401	29	7.2	388	120	30.9
サニールージュ*	207	6	2.9	65	19	29.2
カベルネ・ソーヴィニヨン	528	20	3.8	439	114	26.0
ドルンフェルダー	190	6	3.2	266	68	25.6
ピノ・ノワール	301	2	0.7	307	65	21.2
リースリング	510	13	2.5	446	83	18.6
ナイアガラ	103	1	1.0	114	17	14.9
アルモノワール	318	4	1.3	424	42	9.9
キャンベル・アーリー	164	0	0.0	159	12	7.5
デラウェア*	18	0	0.0	17	1	5.9
バッファロー*	51	0	0.0	84	4	4.8
MHアムレンシス	251	0	0.0	250	6	2.4
ポートランド*	37	0	0.0	13	0	0.0

発病葉率：9株×3反復の平均値

*：試験株数が少ないため、参考値

北海道における主要品種（第 1-1 表参照）である「ケルナー」,「セイベル 13053」,「ツヴァイゲルトレーベ」は比較的感受性の品種と考えられた.

2012 年は 6～8 月中旬まで平年並の気温で推移した一方，降水量が少なく干ばつ傾向となった．試験に当たっては十分な灌水をほぼ毎日行ったものの，第 1 回，第 2 回接種後の葉における病徴は観察されなかった．9 月中旬以降，高温で経過したが降雨も平年並にあったことから葉に病徴が現れ，気温が低くなり，病徴が進展した 10 月 3 日に

調査を行った.

本病はぶどうの中でもヨーロッパ種(*V. vinifera*)で発生するとされており，本試験においても，供試したヨーロッパ種は「ピノ・ノワール」を除き，概ね発病程度が高い結果であった．しかし，つるのかいよう症状については確認できなかった.

2013 年は 6 月中旬に降雨があったものの，7～8 月は気温が平年より高く推移し，8 月中旬まで降雨の少ない状況であった．8 月下旬以降，気温は平年並，降水量は多めに推移し，9 月上旬から一部の品種で発病が認められ，9 月 20 日に発病調査を行った.

第 4 項　考察

2 カ年の平均発病葉割合から，道内主力品種である「ケルナー」,「ツヴァイゲルトレーベ」,「セイベル 5279」は比較的発病しやすい品種であると考えられた．また，アメリカブドウ(*Vitis　labrusca*)の交雑系統では比較的発病葉割合が少ない傾向がみられた．また，2012 年に比較し 2013 年の発生量が多いのは，7 月～9 月 3 半旬までの積算降水量が 2012 年は 364.0mm に対し 2013 年は 427.5mm となっており，多雨になったことによる(小松 2015)と考えられる.

第 3 節　園地における品種間差異

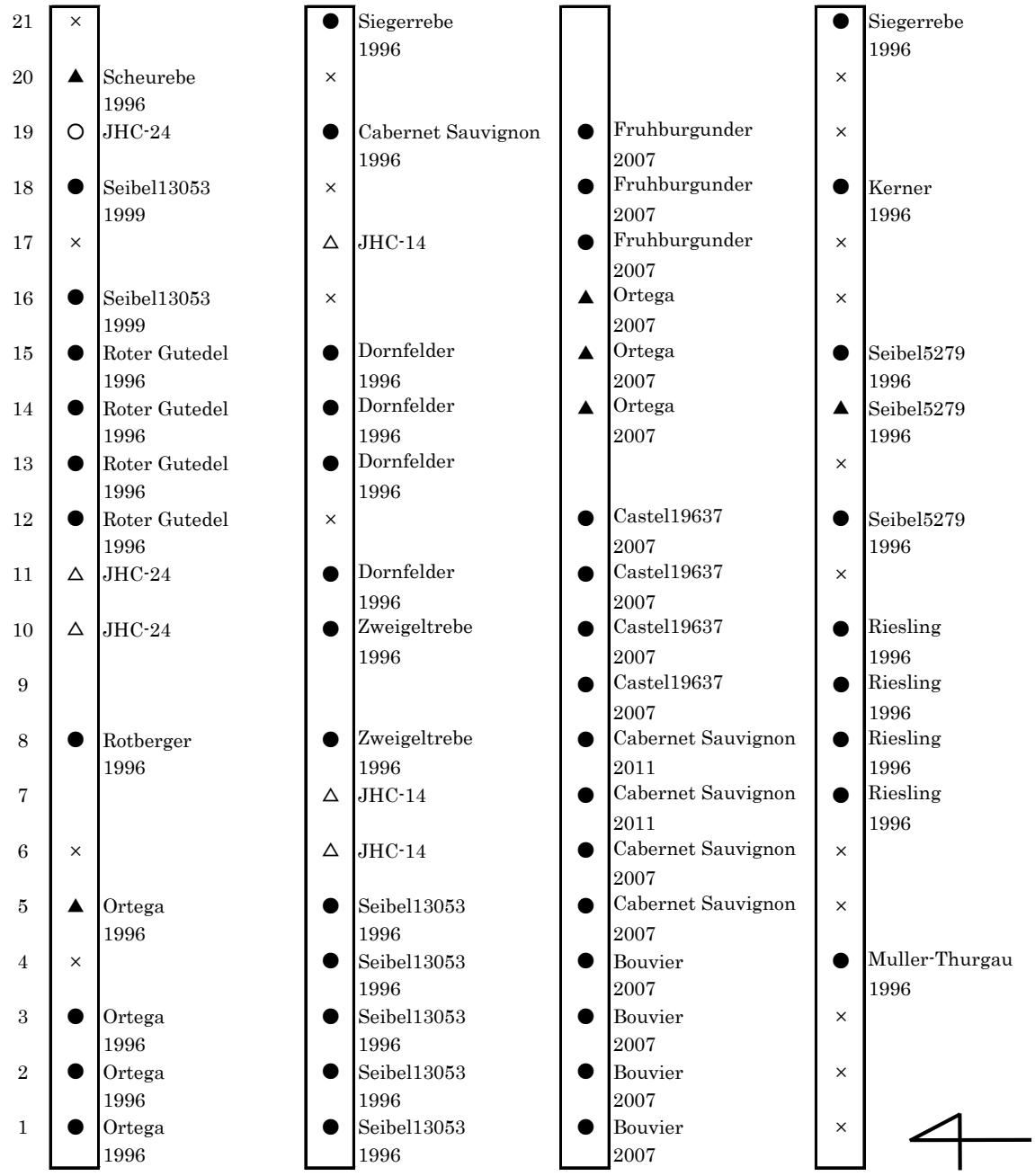
第 1 項　試験方法

2014～2015 年中央農試場内において，多品種が栽植されている遺伝資源保存園（第 3-1 図）において，接種により本病への感受性を比較検討した．なお，本病の発生を促すため，園内にスプリンクラーを

設置した.

栽植密度は株間 2m，畝間 2.5m，仕立て法は北海道慣行の片側水平コルドンで行った．試験地については，べと病や灰色かび病に対する防除は慣行どおり実施したが，本病の発生に影響があると推察される銅を含む薬剤は散布しないこととした.

2014 年は，開花直前を目安に，6 月 28 日から 8 月 21 日にかけて，計 6 回接種を行った．接種菌株は BB-7（2010 年余市町「ケルナー」分離菌）と F-3（2010 年富良野市「カベルネ・ソービニヨン」分離菌）を用い，普通液体培地 100ml に白金耳でかきとった菌体を懸濁し，25℃，70rpm で 7 日間振とう培養した．各菌株を 5 本ずつ培養し，それぞれを混合して作成した菌体懸濁液 1000ml 分を 20L の蒸留水で希釈した後，背負式動力噴霧器で十分量を散布した．散布した接種菌体懸濁液については，普通寒天培地を用いた希釈平板法により菌密度を測定し，その菌密度については第 3-6 表に示した.



第3-1図　つる割細菌病に対する品種間差試験園
×：欠株，▲：若干生育良くない，△：試験系統
品種名の下段は栽植年

第3-6表 2014年病原細菌の接種概要

接種日	接種菌密度 cfu/ml
6月26日	1.43×10^{7}
7月3日	7.33×10^{4}
7月15日	4.67×10^{6}
7月29日	5.63×10^{10}
8月8日	2.67×10^{6}
8月21日	2.71×10^{10}

2014 年は開花期となる 6 月下旬から 7 月まで降雨の少ない状況となり，接種前を中心に 8 回灌水を行った（第 3-7 表）．しかし，8 月から周期的な降雨があったため，以降スプリンクラーによる灌水は行わなかった．

第3-7表 2014年スプリンクラー稼働概要

処理月日	処理時間	備考
6月26日	15分	接種前
6月30日	15分	
7月3日	15分	接種間
7月15日	15分	接種前
7月16日	30分	
7月18日	30分	
7月25日	30分	
7月29日	30分	接種前

発病調査は，8 月 21，29 日，9 月 8，16 日に達観で調査可能な範囲の全葉数を計数し，同時に発病葉数を調査し，発病葉割合を算出した．

2015 年は 4 月 25 日に越冬芽を採取して保菌検定を行ったところ，

越冬芽における保菌が確認されたため接種は行わず，自然発病による試験を行うこととした．6 月上旬に大雨と低温があり，その後断続的な降雨があったものの夏季期間は降雨の少ない状況となり，8 月からスプリンクラーによる灌水を行った（第 3-8 表）．

第3-8表 2015年スプリンクラー稼働概要

処理月日	処理時間	備考
8月5日	45分	
8月12日	60分	
8月31日	60分	

発病調査は，9 月 9，18 日に達観で調査可能な範囲の全葉数を計数し，同時に発病葉数を調査し，発病葉割合を算出した．

第 2 項　試験結果

2014 年は，「セイベル 5279」において，初発を 8 月 14 日に確認した．2015 年は，「セイベル 5279」において，初発を 6 月 15 日に確認したが，その後病勢の進展はみられず，発病葉割合も低かった．2015 年は 2014 年に比較し発生量が少なかったが，これは 7 月 1 半旬から 9 月 3 半旬までの積算降水量が 2014 年は 356.5mm に対し 2015 年は 236.5mm と少雨になったためと(Komatsu 2015)考えられた．

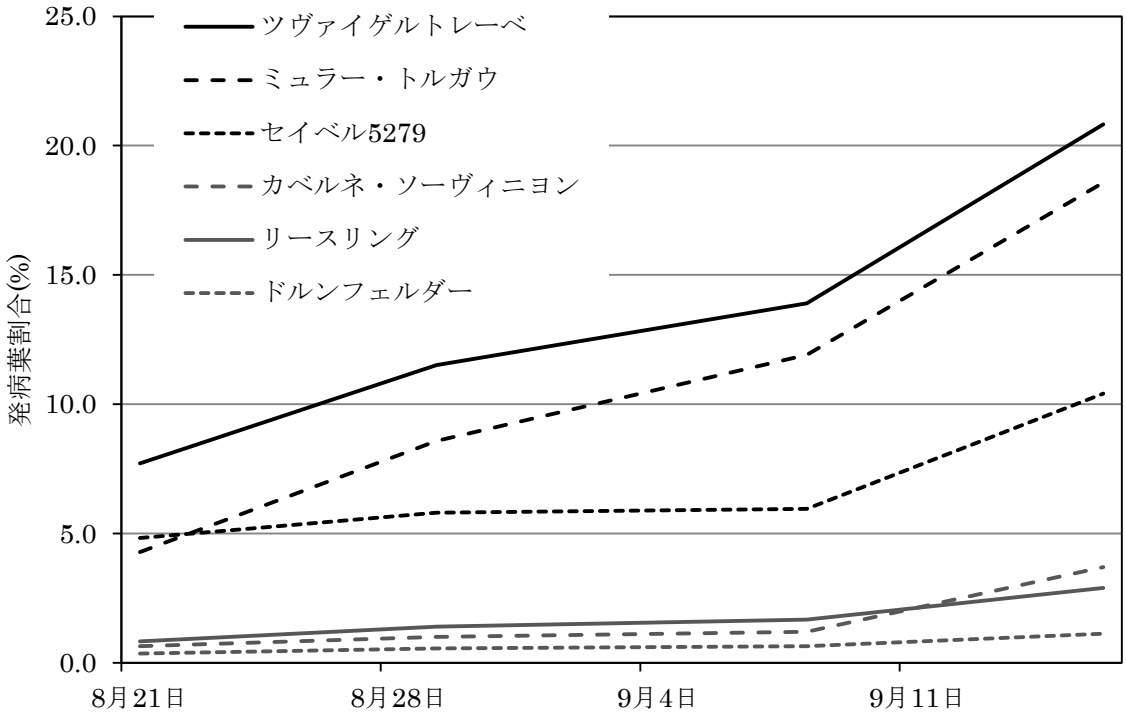
各調査日における発病葉割合の結果は第 3-8 表に示した．

第3-8表　遺伝資源園におけるつる割細菌病発生程度

品種名	本数	2014年			2015年		
		調査葉数	発病葉数	発病葉割合(%)	調査葉数	発病葉数	発病葉割合(%)
ツヴァイゲルトレーベ	2	347	71	20.5	243	27	11.1
ミュラー・トルガウ	1	210	39	18.6	123	11	8.9
セイベル5279	2	569	60	10.5	185	19	10.3
ケルナー	1	592	61	10.3	320	27	8.4
セイベル13053	7	1297	114	8.8	837	80	9.6
ショイレーベ	1	278	21	7.6	131	10	7.6
ローター・グーテーデル	4	780	36	4.6	453	14	3.1
ジーガレーベ	2	283	14	4.9	265	15	5.7
オルテガ	7	2020	95	4.7	1156	77	6.7
ロートベルガー	1	246	10	4.1	131	2	1.5
カベルネ・ソーヴィニヨン	5	1219	95	3.7	740	11	1.5
リースリング	4	957	27	2.8	503	19	3.8
フルーブルグンダー	3	591	16	2.7	378	3	0.8
ブービエ	4	729	19	2.6	506	8	1.6
キャステル19637	4	1053	20	1.9	550	9	1.6
ドルンフェルダー	4	799	9	1.1	516	7	1.4

調査月日：2014年9月16日，2015年9月18日

調査した品種の内，「ツヴァイゲルトレーベ」，「ミュラー・トルガウ」の発病が多く，次いで「セイベル 5279」，「ケルナー」，「セイベル 13053」の発病が多かった．また，「カベルネ・ソーヴィニヨン」，「リースリング」の発病は少なかった．これはポット苗における接種試験の結果とほぼ同様の傾向であった．一方，ポット苗試験で発病の多かった「ローター・グーテデル」の発病葉割合は低く，ポット苗試験の結果と一致しなかった．また，感受性と考えられる品種については，初発後の発病の進展も大きかった（第 3-2 図）．



第3-2図　発病葉率上位3品種と下位3品種の発病葉割合の進展状況(2014年)

しかし，いずれの品種においてもつる割症状や果実の腐敗症状は確認されなかった．果実については，開花直後から顆粒肥大期までさまざまなステージでの接種を行ったが，腐敗に至るものは観察できず，果実のステージごとの感受性は明らかではなかった．

第 3 項　考察

ポット苗への噴霧接種による品種間差異の結果と，通常の園地における品種間差異にはほぼ同様の傾向がみられた．特に，ポット苗試験でも本病に感受性と考えられた道内主力品種「ケルナー」，「ツヴァイゲルトレーベ」，「セイベル 5279」，「ミュラー・トルガウ」は病に対する感受性が高いと考えられた．

アメリン＆ウィンクラーの気候区分は，ブドウの生育期である 4 月

1日から10月31日までの1日ごとの気温を測定し，華氏50℃を上回った日のその温度差の合計（=度日）により区分される．北海道が属するリージョンⅠは度日0～2500Fで，ドイツではモーゼル，ラインガウ地方，フランスではシャンパーニュ，ブルゴーニュ北部が属し，適合品種は「シャルドネ,」「リースリング」,「ピノ・ノワール」とされている．一方，ヨーロッパで本病が発生しているのはリージョンⅡ～Ⅴ，度日3000F以上となる地域で，Ⅲはフランス南部，イタリア北部，適合品種はシラー，サンジョヴェーゼ，Ⅳはイタリア南部，スペイン，ポルトガル，アルゼンチン，日本では山梨県，適合品種はバルベーラ，カリニャン，グルナッシュ，Ⅴはシチリア，南アフリカン，適合品種はカリニャン，グルナッシュとなっている．日本では山形県がリージョンⅢ，山梨県甲府がリージョンⅣに属しているがこれらの地域における本病の発生は確認されていない．このように既発生地域と北海道では適合品種がまったく異なっている．

ギリシャ，フランス，スペインにおける本病に対する品種毎の感受性評価を次に示す。

Response of some grapevine cultivars to *Xanthomonas ampelina*

	Very susceptible	Moderately susceptible	Moderately resistant
Greece	Sultanine, Gold	Perlette, Black Corinth, Rozaki	Cardinal, Ohanes, Tokay, Ribier, Cotsifali, Mandilari
France	Alicante Bouschet, Grenache, Ugni blanc, Macabeu, Colombard, Gamay, Gramon, Ribol, Muscat petits grains	Mourvedre, Cabernet Franc, Portan, Cinsault, Chenanson, Folle blanche, Alphonse Lavallee	Gris Meunier, Merlot, Syrah
Spain	Garnacha negra, Macabeo, Moscatel	Garnacha blanca, Juan Ibanez	Carinena, Quiebratinaja, Granegro

EPPO Bulletin 17 (1987)

しかしこれらについても,感受性の違う機作については記載が無く,熟期や交配由来などにより整理はされていない．同じ環境下にある状態で品種毎に発病程度に差異があることから何らかの遺伝的背景などがあると考えられるが品種間差異の理由については明確ではない．

第 4 章　発生と環境条件

第 1 節　緒言

本病が北海道においてはじめて確認されたのは，2009 年であった(新村ら 2012)．ブドウの開花期である 7 月上旬から 8 月の気象経過について，2009 年は特に多雨となり日射が少なく冷夏の年であった．

本病の発生には環境条件が大きく関与していることが報告されており(Panagopoulos 1987)，本病の発生に及ぼす環境要因について検討した．

第 2 節　材料及び方法

第 1 項　試験地概要

試験は 2014～2015 年に北海道余市郡余市町，夕張郡長沼町，富良野市で行った．試験地は余市町および富良野市の醸造用ブドウ園地 A～D，長沼町の道総研中央農業試験場（以下，中央農試）園地 E および簡易パイプハウス F，G である．試験地の概要は第 4-1 表に示した．

第4-1表 試験園地概要

試験地	地点名		品種	園地面積 (㎡)	処理条件など	
A	余市町	登町	ケルナー	5,000	自然発病	
B	余市町	美園町	ケルナー	3,600	自然発病	
C	富良野市	清水	ツヴァイゲルトレーベ	3,000	自然発病	
D	富良野市	山部	ニューヨークマスカット	4,000	自然発病	
E	長沼町	農試	ツヴァイゲルトレーベ	600	接種	+スプリンクラー灌水
F	長沼町	農試	ケルナー	114	雨よけ＋接種	ポット苗
G	長沼町	農試	ケルナー	70	遮光＋接種	ポット苗

試験地 A～E については，べと病や灰色かび病に対する防除は慣行どおり実施したが，本病の発生に影響があると推察される銅を含む薬剤は散布しないこととした.試験地 E は多品種が栽植されており，第 3 章で行った品種間差異の試験地でもある．試験地 F は，農業用ポリエチレンフィルムで天井を被覆後，遮光資材「らーくらくスーパーホワイト」(日本ワイドクロス，大阪）を展張し，降雨による影響を排除すると共に直射日光による温度上昇を防いだ（以下，雨よけ処理)．また，試験地 G では雨水透過性の遮光資材「メガクール」（三菱樹脂アグリドリーム，東京）を展張し，近赤外線を 50%カットした（以下，遮光処理)．両処理区内で 2014 年は 3 年生，2015 年は 4 年生のポット苗(品種「ケルナー」)各 60 株ずつを栽培した．ポット苗については，適宜散水シャワーによる頭上灌水を行って管理すると共に，ブドウべと病防除のためフルスファミド水和剤の 2,000 倍液を約 15 日間隔で散布した．ポット苗は完全落葉した後，11 月 5 日に基部 2～3 芽を残して剪定し，そのまま野外で積雪下に置き，翌春新たに伸長した枝を用いて試験を行った．

第 2 項　接種方法

2014 年試験地 E，F，G については，開花直前を目安に，6 月 28 日から 8 月 21 日にかけて計 6 回接種を行った（表 3-2)．接種菌株は BB-7（2010 年余市町「ケルナー」分離菌）と F-3（2010 年富良野市「カベルネ・ソービニヨン」分離菌）を用い，普通液体培地 100ml に白金耳でかきとった菌体を懸濁し，25℃，70rpm で 7 日間振とう培養した．各菌株を 5 本ずつ培養し，それぞれを混合して作成した菌体懸濁液 1000ml 分を 20L の蒸留水で希釈した後，背負式動力噴

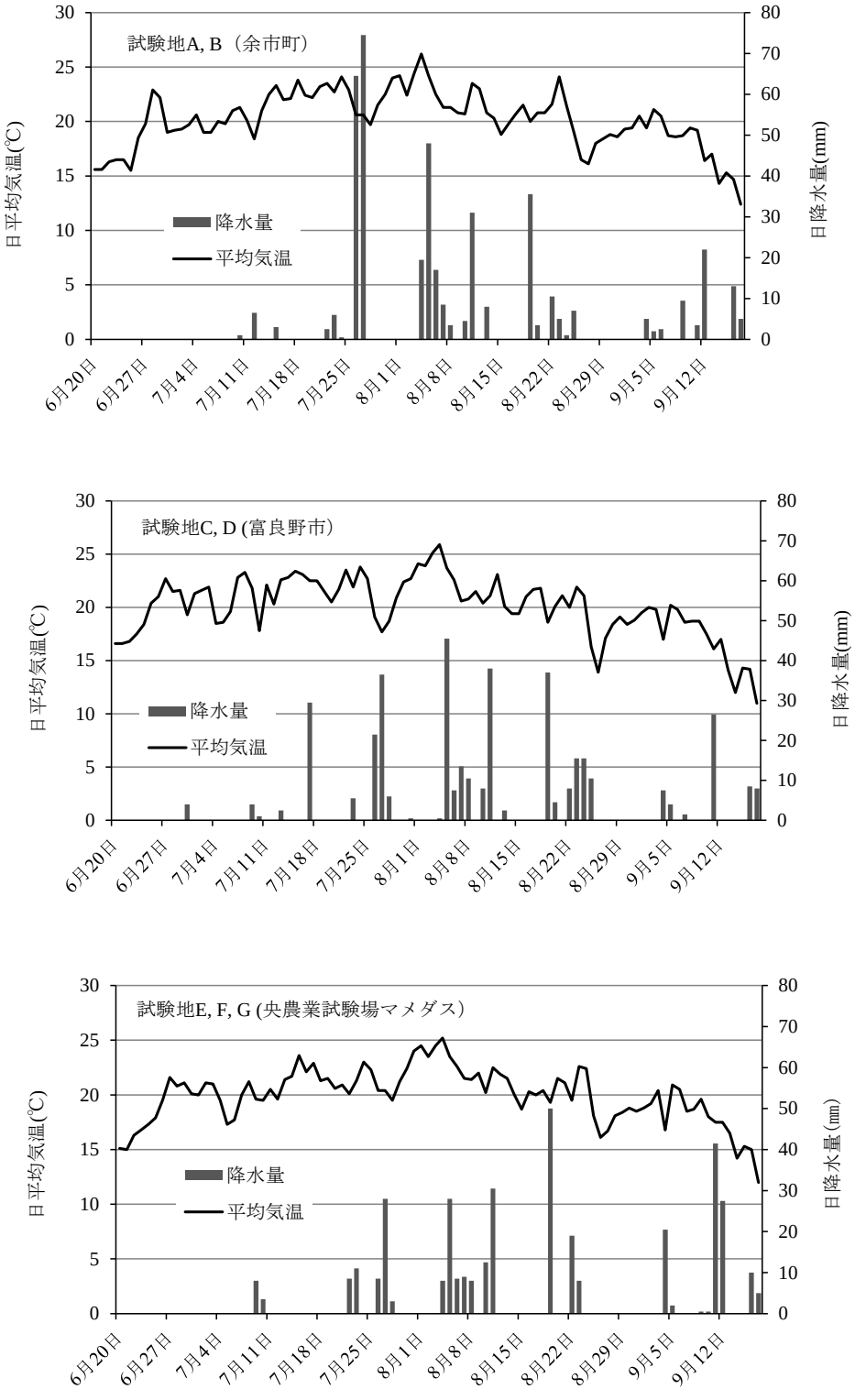
霧器で試験地 E は 53 株, F および G はポット苗 60 株ずつに十分量を散布した. 散布した接種菌体懸濁液については, その都度普通寒天培地を用いた希釈平板法により菌密度を測定した（第 4-2 表）.

第4-2表 試験地E, F, G接種概要(2014年)

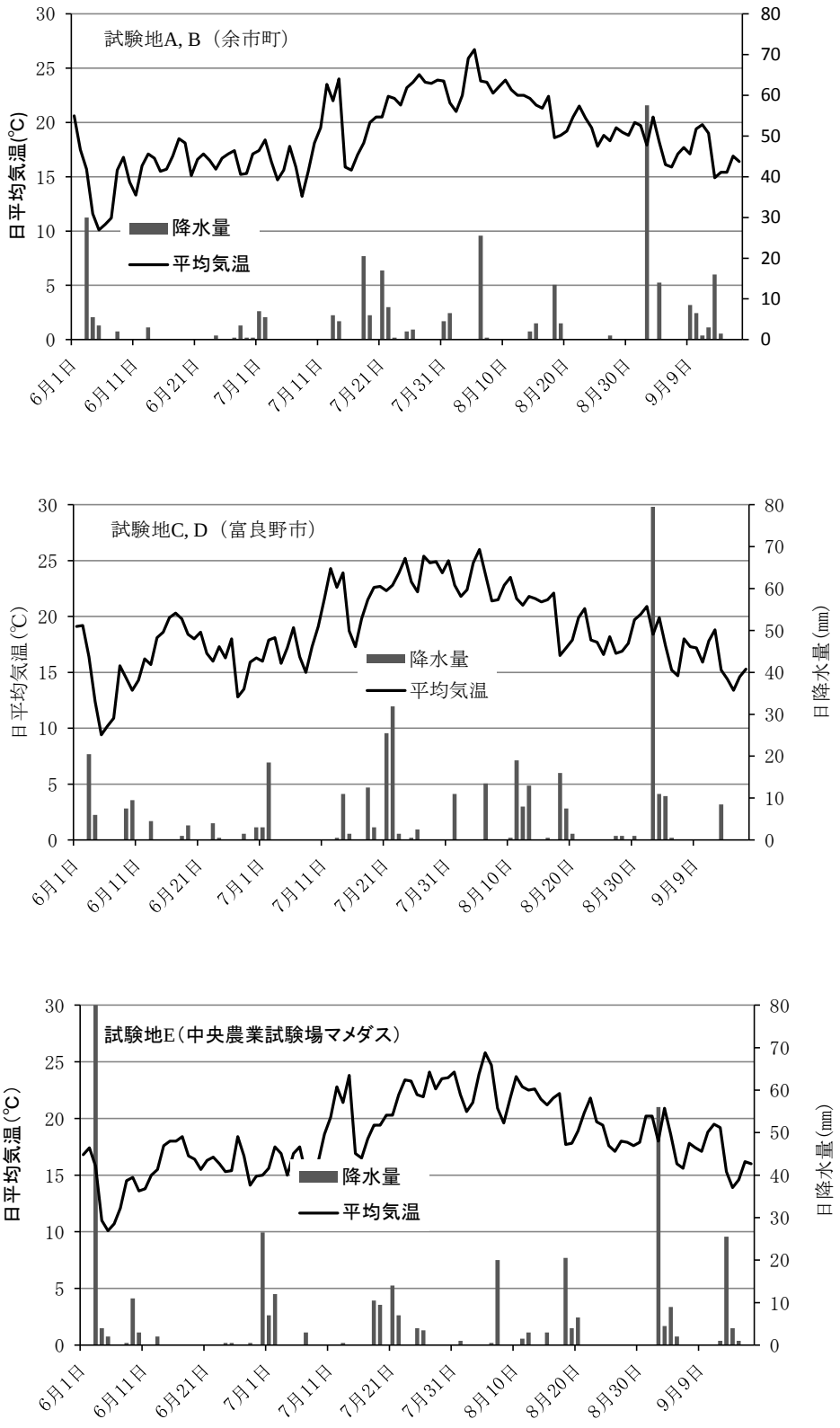
接種日	接種菌密度 cfu/ml
6月26日	1.43×10^{7}
7月3日	7.33×10^{4}
7月15日	4.67×10^{6}
7月29日	5.63×10^{10}
8月8日	2.67×10^{6}
8月21日	2.71×10^{10}

第 3 項　降雨の状況等

各試験地における 2014 年アメダスデータを第 4-1 図に, 2015 年データを第 4-2 図に示した.



第4-1図 2014年各試験地における日平均気温と降水量



第4-2図 2015年各試験地における日平均気温と降水量

2014年は，7月下旬まで高温少雨で経過したため，試験地Eではスプリンクラーによる頭上灌水を行った．灌水の概要については第4-3表に示した．8月以降は周期的な降雨があったことから，スプリンクラーは稼働させなかった．

第4-3表　試験地Eスプリンクラー稼働概要(2014年)

処理月日	処理時間	備考
6月26日	15分	接種前
6月30日	15分	
7月3日	15分	接種間
7月15日	15分	接種前
7月16日	30分	
7月18日	30分	
7月25日	30分	
7月29日	30分	接種前

2015年は前年の接種と発生により越冬芽での保菌が確認されたため，接種は行わず自然発病により実施した．スプリンクラーによる灌水の概要は第4-4表に示した．

第4-4表　試験地Eスプリンクラー稼働概要(2015年)

処理月日	処理時間	備考
8月5日	45分	
8月12日	60分	
8月31日	60分	

第4項　温湿度計測

各試験箇所中央部に温湿度データロガーHOBO ProV2（クリマテック，東京)をHOBO ProV2用自然通風シェルターに入れて設置し，

毎正時に温度と相対湿度を測定した．試験地 A～E においては，主枝を支える架線に温湿度計を吊して高さ約 400mm に設置した．試験地 F, G ではプラスティック製コンテナー（高さ 334mm）上に固定した．

2014 年は設置が最も遅かった試験地 C, D(5 月 26 日)に合わせ，5 月 27 日から 9 月 21 日までの 117 日分の計測データにより解析を行った．

2015 年は設置が最も遅かった試験地 A, B(5 月 20 日)に合わせ，5 月 21 日から 9 月 23 日までの 125 日分の計測データにより解析を行った．

第 5 項　調査方法

各処理区について，A～D は 10 樹 2 反復，E は 2 樹，F および G は 20 株について発病葉数を記録し発病葉割合を求めた．

第 3 節　結果および考察

処理地の発病葉割合と各環境要因との関係を第 4-5 表に示した．

第4-5表　発病葉割合と各条件における積算時間との関係

試験年	試験地	初発日	調査月日	調査葉数	発病葉割合(%)	各条件の積算時間(hr)[a)]			
						温度		相対湿度	
						15-20℃	25℃以上	95%以上	70%未満
2014	A	8月19日	9月18日	800	9.4	441	100	511	126
	B	8月19日	9月18日	950	21.9	425	139	513	124
	C	8月18日	9月22日	1,000	5.8	520	126	429	172
	D	8月18日	9月22日	1,000	18.3	545	110	667	120
	E	8月14日	9月16日	347	20.8	467	163	693	117
	F	8月20日	9月25日	457	2.2	423	203	445	237
	G	8月20日	9月25日	530	16.2	440	191	565	211
2015	A	6月19日	9月12日	1,100	9.5	488	118	603	57
	B	6月19日	9月12日	1,000	7.9	468	146	583	70
	C	8月24日	9月14日	1,000	6.5	567	138	440	181
	D	6月22日	9月14日	500	35.2	525	105	777	41
	E	6月15日	9月18日	243	11.1	520	167	711	77
(p=)						0.7801 ns	0.3247 ns	0.0079 *	0.1127 ns

a)2014年は8月1日から9月21日, 2015年は8月1日から9月23日までの毎時データの総和

*:誤差5%で有意, ns:有意差無し

2014年は，いずれの試験においても，本病の初発は8月中旬頃に認められ，その後9月にかけて病徴が進展したことから，自然発病と接種による発病との間に大きな発病助長の差異はなかったと考えられた．また,「ケルナー」および「ツヴァイゲルトレーベ」の本病に対する感受性は，これまでの品種比較試験によりほぼ差が無いと判断した．試験地Dの「ニューヨークマスカット」の本病に対する感受性の評価はできていないが，富良野市内における他の園地での発生状況から必ずしも発病しやすい品種ではないと考えており，試験地Dの環境条件が発生に影響していると推察している．初発期が8月中旬で共通していたことから，8月1日から9月21日までの温度と相対湿度データについて本病の発生と関連すると推察した各条件別の積算時間を算出した．

2015年は，6月が多雨寡照となったことから試験地Cを除いて6月中に初発を認めた．しかし7月中旬から高温少雨となり本病の進

展はみられなくなった．その後，8 月以降断続的な降雨があったが本病の進展は緩慢であった．また，試験地 F および G のポット苗では前年秋に剪定した新梢の越冬芽における保菌は確認したものの，2015 年の発病は確認できなかった．

本病の発生条件として，ブドウつる割細菌病が古くから発生している地中海沿岸地域では，冷涼で降雨の多い条件が必要とされており，スペインにおいても，本病が多発したのは年間 400～500mm の激しい降雨があった多雨条件の年であり，降水量が年間 200～300mm の年には発生が少なかったと報告されている(López et al. 1987)．また，ギリシャにおいて月ごとに接種を行ったところ，病徴が発現しやすかったのは 11～12 月であったと報告されている(Panagopoulos 1987)．ギリシャの首都アテネの気象データによると，この時期は雨期にあたり年間で最も降水量が多く，11 月の平均気温は 15.2℃，降水量は 63.0mm，12 月は 11.8℃，61.4mm となっている．本病が北海道においてはじめて確認され，開花直後の花穂の腐敗が発生した 2009 年，ブドウの開花期である 7 月上旬から 8 月の気象経過について主要な醸造用ブドウ産地の状況を確認すると，余市町では期間中の平均気温が平年差－1.3℃,降水量は平年比 126%，富良野市では平均気温の平年差－0.7℃，降水量の平年比 120%と，平年より気温が低く雨の多い状況であった．特に，開花直後からの 7 月 3 半旬～5 半旬は，期間中の日平均気温および降水量計が余市町では 17.9℃（平年差－2.1℃），119.5mm（平年比 267%），富良野市では 17.9℃（平年差－2.3℃），123.5mm（平年比 246%）と冷涼多雨であった．一方，本病が少発生であった 2012 年は，余市町における 7 月の平均気温は 19.5℃（平年差+0.6℃）であったが，降水

量は 7 月 5 日の 5.5mm，12 日の 47.5mm を除いてほぼ 0mm，富良野市においても月平均気温は 21.3℃（平年差+1.2℃）で 7 月 5 日の 36.5mm，12 日の 21.5mm，28 日の 19.5mm を除いてほぼ 0mm となっており，非常に降雨の少ない年であった．ギリシャでの接種試験および 2009 年の道内での発生状況から，本病の発生好適条件を相対湿度 95%以上の高湿度および 15～20℃の冷涼な気温であると想定した．これに対し，発生に不適な条件として，気温 25℃以上の高温条件および相対湿度 70%以下の低湿度を想定し，同様に積算時間を求めた．

得られたデータについて，発病葉割合との関係を分散分析により解析した．その結果，相対湿度 95％以上の積算時間のみが発病葉割合の増加との相関が認められ，好適条件と推定した 15～20℃の積算時間および不適条件と推定した 25℃以上の高温や相対湿度 70%以下との相関は認められなかった（第 4-4 表）．また，試験場所が近接している試験地 F と G の相対湿度を比較した結果，外気温や管理方法が同じ条件であっても，発病葉割合が高かった遮光処理（試験地 G）は雨よけ処理（試験地 F）に比較し，計測期間平均で相対湿度は 2.10 ポイント高く，期間中の湿度推移を比較しても高湿度に経過しており（第 4-2 図），このことからも湿度の高い条件が発病を促進することが支持された．

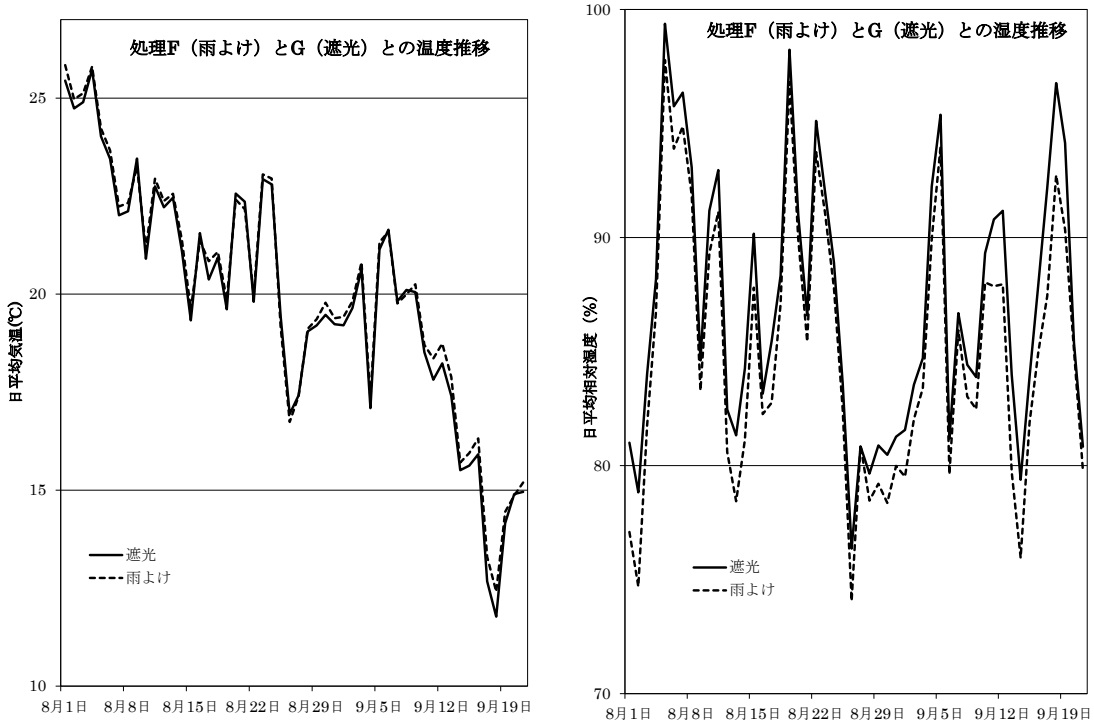


図4-2　処理FとGにおける温湿度推移

梅川・渡辺(1982)は，施設栽培におけるキュウリ斑点細菌病の発生に及ぼす温度および相対湿度の影響を調査し，発生に好適な温度条件を示すと共に，10℃あるいは 30℃では発病が極めて少ないこと，接種後の相対湿度が 90～95%以上の場合に大型病斑が形成されたことを示しており，細菌性病害における温湿度条件の重要性を明らかにしている．しかし，本試験では相対湿度 90～95%の積算時間と発病葉割合との間に有意な関係はみられず(データ省略)，やはり相対湿度 95%以上の積算時間との間にのみが有意な関係が認められた．

これらの結果より，本病の発生には高湿度条件の影響が大きいことが明らかとなり，露地で高湿度が維持される多雨条件となった場合には発生に注意する必要があることが示された．また，平年に近い気象条件であっても風通しが悪く湿気がこもりやすい園地や多灌

水を行うなど湿度が高まる園地では発生が助長されると考えられる.

近年,北海道においても夏季の異常な高温傾向が続いているため,2012～2015 年の一般園における本病の発生は少なく，本病の発生程度と温湿度との関係を解析することが難しい状況である．今後,2009 年のような多発生年に遭遇した場合,園地ごとの温湿度データを把握することにより，発病程度と温湿度との関係をより詳細に解析できると考えている．特に温度の条件については十分な検討ができていないため，地点や年次を重ね，病徴の進展に与える温度の影響についても検討する必要がある.

また，試験地 E では 8 月以降の相対湿度 95%以上の積算時間は 2014 年に比較し 2015 年の方が長かったものの,発病葉割合は 2014 年の方が高かった．6 月 20 日から 9 月 17 日までの積算降水量で比較すると 2014 年は 359.5mm だったのに対し,2015 年は 262mm で 100mm 近い差があった．2015 年は気温が低かったことから相対湿度は高くなったものの純粋な降水量では 2014 年の方が多く，発病葉割合も高かった．しかし降水量は同じ地域内の異なる園地における発病の際は説明できず解析は不可能であった．発病に与える影響として降水量が与える影響についても検討を要する要因の一つである.

第 5 章　病原菌の越冬部位

第 1 節　緒言

ブドウにおける本病原菌の保菌部位および翌年の感染源について，Grall ら（2005）は導管部内の保菌と萌芽前に起こる樹液流動により漏出する樹液の汚染が新しい組織での重要な感染源としている．しかし，古くからの本病の発生地である地中海沿岸と異なり，北海道のようにブドウが完全に積雪下に埋没し，融雪後に萌芽がはじまる地域での保菌部位については未解明であることから，道内のブドウにおける越冬部位について検討した．

第 2 節　試験方法

第 1 項　噴霧接種後のポット苗における保菌

2012 年 3 月にポリポット（計 12cm）に園芸培土（ポットエース）と鹿沼土を 1：1(V/V)で混和して充填し，ブドウを挿し木して温室内で育成し，発根，新梢をのばしたものを供試した．試験は 9 ポット，3 連制で行った．接種方法は第 3 章第 3 節第 1 項による．接種した新梢について，完全落葉後の 11 月 20 日に基部の越越冬芽 2～3 芽を残して剪定した．剪定枝を 4℃で約 60 日間冷蔵した後（2013 年 1 月 9 日～）の保菌について調査した．

まず保菌部位について検討するため，維管束部，表皮，越越冬芽の各部分について PCR 法により病原菌の検出を行い，そ

の後保菌の高い部位について品種間の差異を検討した.維管束部の核酸抽出はサンドベーパー法（Nakaune 2006）で行い，表皮と越冬芽についてはカッターナイフで切り出し後，越冬芽は3芽を1サンプルとし，表皮は長さ1cm，幅2mm程度の切片3枚を1サンプルとし，乳鉢で摩砕した後，DNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN, Hilden, Germany）により核酸を抽出した．PCRはManceauら(2005)による本菌特異プライマー(XaTS1; 5-TGC GTA GTT CAA CAC CAA AGT- 3′，XaTS2; 5-TAT GAC CCT CTT TCC ACC AGC-3′)を用い，94℃5分，94℃30秒・60℃45秒・72℃45秒を40サイクル，72℃8分，10℃保存で行い，増幅産物は0.01%ゲルレッド(和光純薬，東京)を混和した1.5%アガロースゲルで電気泳動後，UVトランスイルミネーターで確認した.

第2項　越冬後のポット苗における保菌

2012年新梢に接種し，発病させたポット苗については前述のとおり剪定し，そのまま野外で越冬させた．2013年8月7日に伸長した新梢の展開第1葉について，上記PCR法により保菌検定を行った.

第3項　現地園地における越冬部位

現地一般ブドウ園地において，融雪後（休眠期）萌芽前の越越冬芽および枝の切り口から染み出た樹液，展葉後の葉，花穂の保菌についてPCR法により検定を行った.供試材料の採取方法は，越冬芽，展葉後の葉，花穂はそのままカッターナイフで

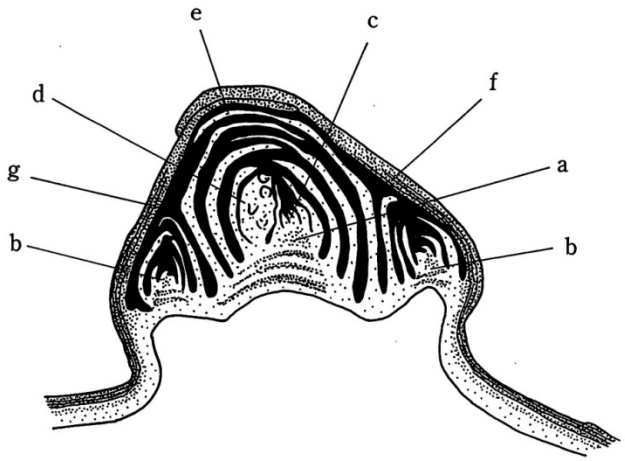
切り取りチャック付きビニール袋にいれ，樹液は剪定鋏で枝先端を切り落とし，染み出てきた樹液を 1.5ml マイクロチューブに回収した．カッターナイフおよび剪定鋏はその都度 70%エタノールで消毒した．

2013 年，余市町登町 A 園地「ケルナー」および美園町 B 園地「ケルナー」の採取は，萌芽前の越冬芽及び樹液について 4 月 23 日，展葉後の葉及び花穂について 6 月 14 に行った．富良野市清水 C 園地「ツヴァイゲルトレーベ」の採取は，萌芽前の芽及び樹液について 5 月 2 日，展葉後の葉につい 6 月 6 日，花穂について 6 月 17 日に行った．

2014 年，富良野市清水 C 園地「ツヴァイゲルトレーベ」及び富良野市山部 D 園地「ニューヨークマスカット」の採取は，萌芽前の芽，髄部組織及び樹液について 5 月 1 日，展葉後の第 1 葉及び花穂について 6 月 18 日に行った．

第 4 項　多発一般園における病原菌の越冬

2013 年に本病が発生した富良野市山部 D 園地「ニューヨークマスカット」について，2013 年 10 月 23 日に剪定した枝を持ち帰り，5℃で保管した．剪定翌日（保管期間 0 日），50 日後，100 日後に剪定枝の芽，髄部について PCR により保菌を調査した．また，保管 50 日後に芽を主芽と苞葉および綿毛部分にカッターナイフで分解して（第 5-1 図）保菌を調査した．



a：主芽（Main bud）e：葉の原基（Leaf primordium）
b：副芽（Sub bud） f：苞葉（Bract）
c：主芽の生長点 g：綿毛（Wool）
d：花房の原基（Flower primordium）

第 5-1 図　越冬芽の断面図（日本ブドウ学　中川昌一監修より）

第 3 節　試験結果

第 1 項　噴霧接種のポット苗における保菌

発病葉割合の高かった「ケルナー」の新梢の芽からは 9 サンプル中 6 サンプルで陽性が確認された（第 5-1 表）．一方，新梢の表皮および維管束部では確認されなかった．

接種当年のポット苗の剪定枝における芽において,「バッファロー」を除く全供試品種で保菌が確認された．また，発病程度と保菌に関連は認められなかった（第 5-2 表，第 5-1 図）．

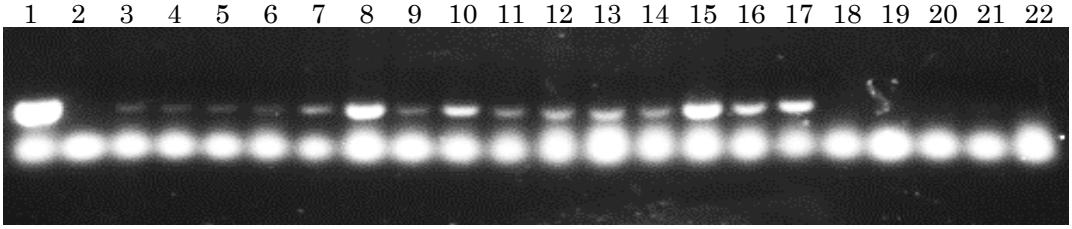
第5-1表　噴霧接種した「ケルナー」ポット苗
秋剪定枝各部位における保菌検定

部位	髄部	表皮	芽
陽性反応数	0/9	0/9	6/9

第5-2表　ぶどうポット苗接種試験におけるつる割細菌病
発病程度と秋剪定枝芽の保菌検定

品種名	発病葉割合 (%)	保菌検定
セイベル5279	23.8	12/15
ケルナー	21.7	151/5
ツヴァイゲルトレーベ	17.7	15/15
ローター・グーテデル	17.1	6/15
セイベル13053	15.8	15/15
ミュラー・トルガウ	11.4	12/15
ユヴェール	7.3	15/15
カベルネ・ソーヴィニヨン	3.9	9/15
ドルンフェルダー	3.2	12/15
サニールージュ	2.8	15/15
リースリング	2.6	12/15
アルモノワール	1.2	15/15
ナイアガラ	1.0	3/15
ピノ・ノワール	0.7	12/15
デラウェア	0.0	15/15
バッファロー	0.0	0/15
キャンベル・アーリー	0.0	151/5
ポートランド	0.0	15/15
MHアムレンシス	0.0	3/15

発病葉割合：2012年（接種当年）の調査結果
保菌検定：2012年秋剪定後、保存した新梢の芽の部分



lane1：つる割細菌病菌DNA，2：蒸留水，3～7：ポートランド，8～12：ケルナー，
13～17：セイベル13053，18～22：バッファロー
第5-2図　2012年接種苗の芽の保菌検定（抜粋）

第２項　越冬後のポット苗における保菌

2012年に接種し，新梢基部2～3芽を残して越冬させたポット苗では，越冬後に伸長した新梢の展開葉において，発病程度と関係なく保菌が確認された（第5-3表）.

第5-3表　接種ポット苗におけるつる割細菌病発病程度と越冬後の展開葉の保菌検定

品種名	発病葉割合 (%)	2012年秋 保菌検定 芽	2013年春 保菌検定 展開第1葉
セイベル5279	23.8	4/5	3/5
ケルナー	21.7	5/5	3/5
キャンベル・アーリ	0.0	5/5	2/5
MHアムレンシス	0.0	1/5	3/5

第 3 項　現地園における越冬部位

2012 年に防除試験を行った余市町 A および B 園地「ケルナー」における越冬後の芽において，A 園地では無処理区で高い保菌が確認された．一方，B 園地ではほとんど保菌が確認されなかった（第 5-4 表）．

第5-4表　越冬後の保菌部位および新組織における保菌割合

採取年	園地	場所	品種名	5月 芽	5月 髄部	5月 樹液	6月 葉	6月 花穂
2013	A	余市町	ケルナー	21.7	0	0	0	30.0
2013	C	富良野市	ツヴァイゲルトレーベ	40.0	0	0	45.0	85.0
2014	C	富良野市	ツヴァイゲルトレーベ	40.0	0	－	60.0	70.0
2014	D	富良野市	ニューヨークマスカット	63.3	0	0	70.0	70.0

－：樹液の採取ができなかった

2013年、2014年富良野市の「ツヴァイゲルトレーベ」は同一園（銅剤散布なし）

春に枝先端部を切断し，染み出た樹液や展開葉での保菌は確認できなかった．花穂については A 園地で保菌が確認された．

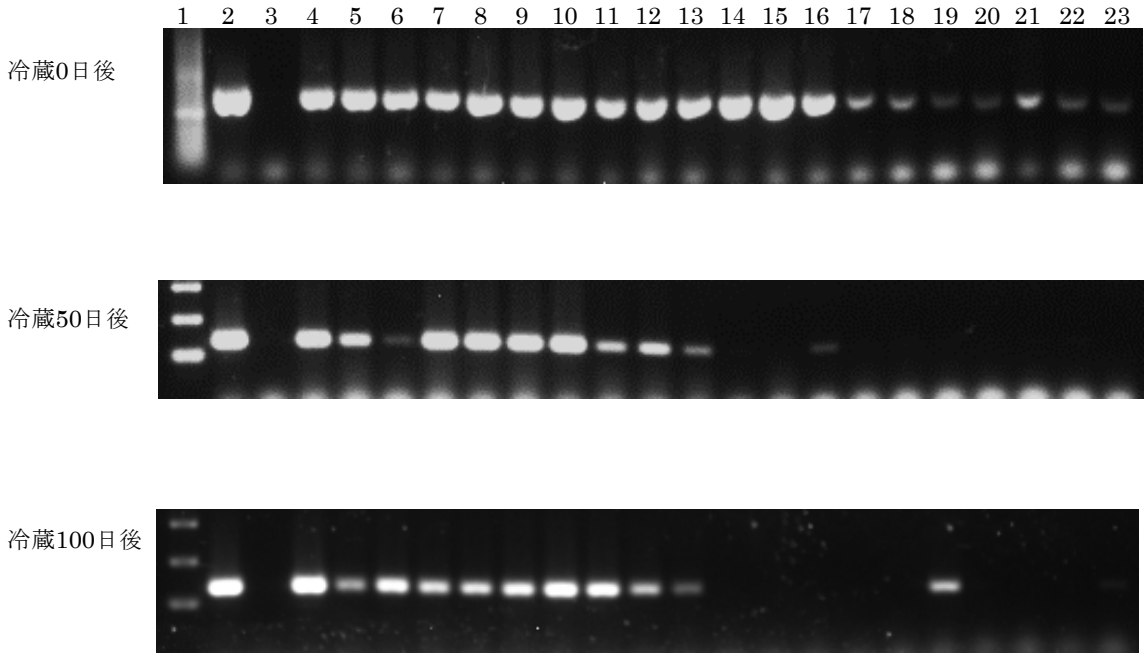
C 園地では春に枝先端部を切断し，染み出た樹液以外，越冬後の芽，展開葉，花穂のいずれでも保菌が確認された．

第４項　多発一般園における病原菌の越冬

2013年夏に本病が多発生した富良野市園地の「ニューヨークマスカット」について，秋の剪定枝の芽，髄部いずれにおいても保菌が確認された（第5-7表）．剪定直後は芽，髄部共に保菌が確認されたものの，冷蔵保存により髄部での検出割合は低下した．一方，芽での検出割合は100日後も低下しなかった（第5-3図）．

第5-5表　2013年「ニューヨークマスカット」における剪定枝の保菌

5℃保存期間	0日		50日		100日	
検定部位	芽	髄部	芽	髄部	芽	髄部
PCR検定による検出割合(%)	100	100	100	8.3	100	1.7



lane 1, 100bpladder; 2, つる割細菌病菌DNA; 3, 滅菌蒸留水; 4-13, 芽; 14-23, 髄部

第5-2図　2013年多発園[ニューヨークマスカット」剪定枝における保菌検定

芽の主芽部分と苞葉および綿毛部分では，主芽よりも苞葉および綿毛部分において高い保菌割合が認められた（第 5-8 表）.

第5-6表　冷蔵50日後の「ニューヨークマスカット」剪定枝芽の部位別保菌

PCR検定による検出割合(%)	
主芽	苞葉および綿毛
23.3	96.7

第 4 節　考察

噴霧接種により葉での発病は見られたものの，つるには潰瘍症状は見られなかったポット苗では，髄部から病原菌は検出されなかった.

しかし，芽では発病程度に関係なく病原菌が検出された．このことから,噴霧接種による菌体は,葉での発病に関与する他，芽の部分に保菌されていると考えられ，供試全品種の芽の保菌について検討した.

本病は風雨によって発病樹から健全樹に病原菌が伝播するが，葉で発病した後，落葉後はまず芽の部分に保菌されると考えられた.

2012 年少発生となった試験園地において 2013 年春に切断した枝先から染み出た樹液の検定では保菌は確認されず，北海道において少発生程度の翌年では髄部まで保菌がされないと推測された．一方，2013 年多発生のニューヨークマスカットでは秋に剪定された新梢の髄部まで保菌が確認され，多発生条件になると髄部まで保菌することが確認された．しかし，この保菌が翌年の発病にどの程度影響を与えるのかは不明である.

第 6 章　北海道株と欧州株との分子系統解析及び病原性

第 1 節　緒言

本病原菌は 1 属 1 種に分類されている (Willems ら 1987). 北海道において分離された菌株については，新村ら(2012)により細菌学的諸性質および 16S rDNA の塩基配列の解析結果から *X. ampelinus* と同定された．また，同定の際には Manceau ら(2005)による種特異プライマーを用いた PCR により目的とする位置に増幅産物が得られることが確認されている．したがって本病原菌は，ヨーロッパから北海道内へ伝播したと考えられる．本病が激発した 2009 年，北海道で栽培される主要 2 品種「ケルナー」,「ツヴァイゲルトレーベ」においても本病による果実の腐敗など収量被害が確認された．しかし，これらの品種はドイツやオーストリア原産であり，既発生地域の品種と異なっている．地中海沿岸地域の品種とこれらの品種の感受性の違いについては現在調査中である．本病は，本来地中海沿岸の温暖な地域で発生する病害であり，亜寒帯に属し冬期は平均気温が氷点下となる北海道で発生した理由は不明である。そこで，ヨーロッパで分離された菌株と北海道で分離された菌株について，分子系統解析と病原性の差異について検討した．細菌の遺伝的変異性を解析する手法として rep-PCR DNA フィンガープリント解析を用いた．

第 2 節　試験方法

第 1 項　供試菌株

供試菌株は第 6-1 表に示した．道内分離菌は，これまで分離された菌株からできるだけ地域数および品種数を多くするように選抜した．ヨーロッパ菌株は，French Collection of Plant associated Bacteria (CFBP)が保存している菌株の内，フランス，ギリシャ，スペインの菌株を地域や品種が重ならないように 10 菌株を選抜し，農林水産大臣許可制度を利用して植物防疫法の許可を得て輸入した．

第6-1表 供試菌株一覧

菌株名	分離品種	場所	分離年	DNA type
CFBP 1192	Sultana	Greece, Crete	1966	A
CFBP 1313	Ugni Blanc	France, Oléron	1971	A
CFBP 1796	Ugni Blanc	France, Charente Maritime	1975	A
CFBP 1800	Alicante	France, Aude Les Craboulets	1976	A
CFBP 1833	Grenache	France, Aude Les Craboulets	1976	A
CFBP 1841	Ugni Blanc	France, Ardéche Saint Reméze	1977	A
CFBP 1926	Grenache	Spain, Tosos	1978	A
CFBP 2059	Rupestris du Lot	France, Vaucluse Collet du Bray	1981	A
CFBP 4977	Clairette	France, Drôme Vercheny Le Haut	1999	B
CFBP 5787	Ugni Blanc	France, Charente Saint Preuil	2001	B
T-1	Müller-Thurgau	Hokkaido, Urausu	2011	C
T-2	Kerner	Hokkaido, Urausu	2011	C
T-3	Lemberger	Hokkaido, Urausu	2011	C
BB-2	Zweigeltrebe	Hokkaido, Urausu	2010	D
T-4	Pino Blanc	Hokkaido, Urausu	2011	C
T-5	Muskat Ottonel	Hokkaido, Urausu	2011	C
BB-5 (MAFF212143)	Kerner	Hokkaido, Yoichi	2010	C
BB-21	Zweigeltrebe	Hokkaido, Yoichi	2010	C
BB-13	Cabernet Cubin	Hokkaido, Yoichi	2010	C
Y-4	Müller-Thurgau	Hokkaido, Yoichi	2011	C
Y-8	Bacchus	Hokkaido, Yoichi	2011	C
N-1	Morino-Muskat	Hokkaido, Niki	2011	D
N-2	Zweigeltrebe	Hokkaido, Niki	2011	C
N-3	Kerner	Hokkaido, Niki	2011	C
N-6	Zalagyongye	Hokkaido, Niki	2011	C
TM-1	Zalagyongye	Hokkaido, Otobe	2011	C
TM-2	Merlot	Hokkaido, Otobe	2011	C
OK-1	Müller-Thurgau	Hokkaido, Okushiri	2011	D
OK-2	Merlot	Hokkaido, Okushiri	2011	C
OK-3	Chardonnay	Hokkaido, Okushiri	2011	D
OK-4	Pinot Gris	Hokkaido, Okushiri	2011	C
OK-5	Zweigeltrebe	Hokkaido, Okushiri	2011	C
OK-8	Seibel 13053	Hokkaido, Okushiri	2011	C
OK-10	Kerner	Hokkaido, Okushiri	2011	C
OK-11	Pinot Noir	Hokkaido, Okushiri	2011	C
F-1	Zweigeltrebe	Hokkaido, Furano	2011	C
F-2	Kerner	Hokkaido, Furano	2011	C
F-3	Cabernet Sauvignon	Hokkaido, Furano	2011	C
F-4	Zalagyongye	Hokkaido, Furano	2011	C
F-5	Irsai Oliver	Hokkaido, Furano	2011	C
F-6	Seibel 5279	Hokkaido, Furano	2011	C
F-7 (MAFF212144)	Seibel 13053	Hokkaido, Furano	2011	D
F-12	New York Muscat	Hokkaido, Furano	2013	C

第 2 項　分子系統解析

菌株は普通寒天培地平板で培養したコロニーから滅菌したつまようじの先端で菌体をとり，100µl の滅菌蒸留水に懸濁後，95℃10 分間熱処理し，氷中で急冷後，20,000g で 3 分間遠心分離した上清を鋳型サンプルとした．*X. ampelinus* は，かつて

Xanthomonas ampelina とされていたことから，*Xanthomonas* 属菌において遺伝的変異性の検定として用いられている repetitive sequence-based PCR 法を用いた（Sahin et al 2003, Rademaker et al 2005, Mondal and Mani 2009, Gama et al 2011, Adhikari et al 2012, Kawaguchi 2014). Rep-PCR は Versalovic et al. (1994), ERIC-PCR は Hulton et al. (1991), Box-PCR は Martin et al. (1992)のプライマーにより行った. REP-PCR 法は Louws et al. (1998)の方法により行った. PCR 反応液の組成は DNA テンプレート 1 µl, プライマー各 2 µl, 2 × QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN, Hilden, Germany) 12.5 µl，滅菌蒸留水 9.5 µl の計 25 µl とした. サーマルサイクラープログラムは次のとおりとした，初期変性は 95℃14 分，続いて変性 95℃30 秒，アニーリングは Rep-PCR は 40℃90 秒，Box-PCR および ERIC-PCR は 50℃90 秒，伸長反応は 72℃90℃，これを 40 サイクル，最終伸長反応 72℃10 分で行った. 増幅反応産物はゲルレッド（和光純薬）10,000 倍を加用した 2.0 % アガロースゲルを用いて 50v で 60 分の電気泳動を行い，UV トランスイルミネーターで画像を撮影した. バンドパターンは各 DNA テンプレートにつき，それぞれ 3 回の反復を行って確認した.

それぞれの DNA 断片について，位置番号を付けるとともにテンプレートごとにそのバンドの有無を 1 か 0 でスコアした. それぞれの PCR によるスコアを統合して分析を行った. 系統樹は DendroUPGMA (http://genomes.urv.cat/UPGMA/)の平均二

乗偏差計数を適用し，非加重結合法(UPGMA)により作成した．

第 3 項　病原性試験

病原性の比較について、菌株は DNA type A から CFBP1926 株，　B は CFBP5787 株，C は BB-5，D は F-7 株を供試した。ブドウは北海道の主要品種でかつ本病に感受性の「ケルナー」3 年生ポット栽培苗を用いた．なお，接種試験はすべて道総研中央農業試験場内の隔離恒温室内において行った．接種は菌株を 100ml の普通液体培地で 7 間 25℃ 120rpm 培養し，滅菌蒸留水で約 10^8 cfu/ml に調製した菌体懸濁液をすべての葉面が濡れるよう噴霧接種した．接種後、半透明ポリプロピレン製コンテナ（443×325×163mm，クリスタルサンボックス，アズワン）にいれ蓋をし，菌株毎に隔離されるようにした．各コンテナは 20℃の恒温室内（明期 12 時間、暗期 12 時間）に置き，コンテナ内は高湿度を保つよう適宜ハンドスプレーにより水を噴霧した．1 試験において各菌株に対し 6 ポットずつを供試し，3 回試験を行った．接種月日および調査月日については第 6-2 表に示した．試験 2 ではぶどうの新梢にカッターナイフで髄部まで到達する傷を付けた後，噴霧を行った．試験 2 終了後，供試したポット栽培ぶどうをコンテナごと 4℃の冷蔵室内で保管し，落葉後，基部の 3～4 芽を残して伸長した枝を切り取り，再び 20℃の恒温室内に置き新たに伸長した枝を用いて試験 3 を行った．試験 3 で各菌株を接種したブドウ苗は試験 2 と同じものを用いた．また，試験 2 終了後，Komats and Kondo (2015a)の方

法により，枝から冬芽を切り取り，核酸抽出後 PCR により本病原菌の保菌検定を行った．

第6-2表 接種試験概要

試験番号	接種月日					調査月日
1	7月1日	7月22日	8月4日	8月26日		9月24日
2	10月10日	10月22日	11月12日	11月25日		12月16日
3	2月9日	2月18日	2月25日	3月3日	3月10日	3月25日

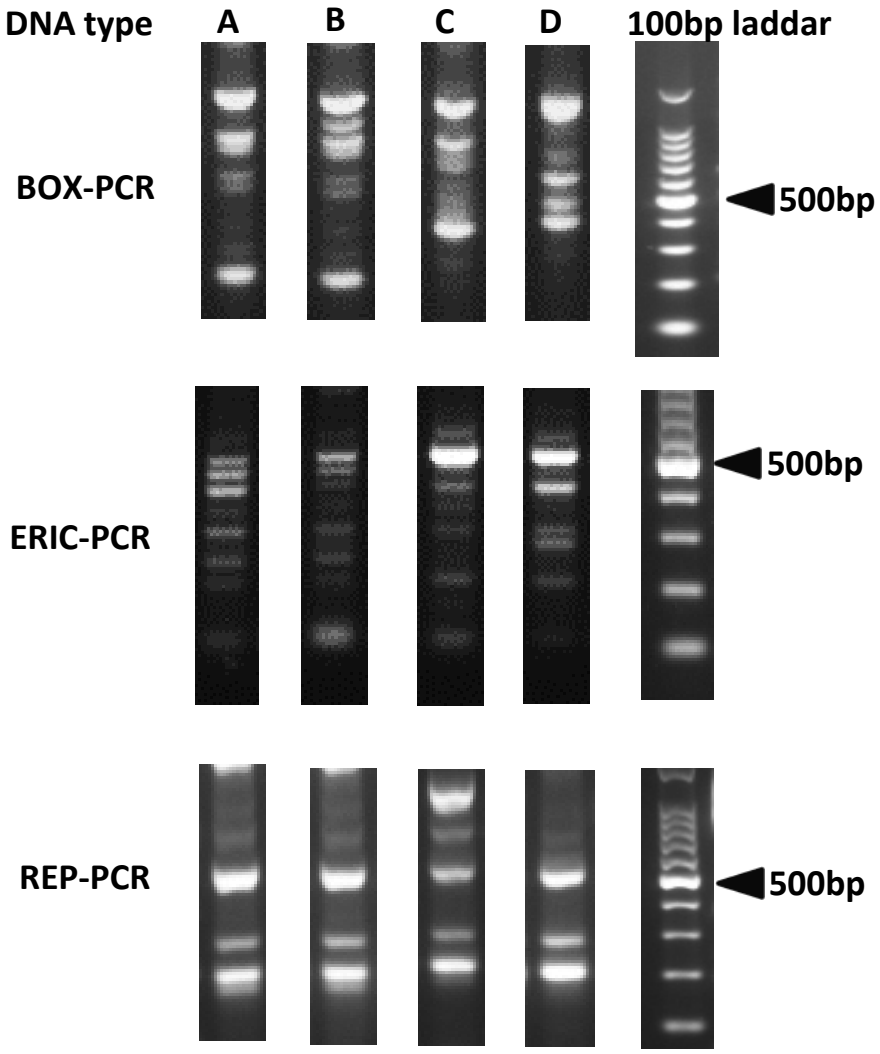
ポット株への接種試験の他， Sevillano ら(2014)の方法により病原力比較を行った．菌株は DNA type A から CFBP1926 株，B は CFBP5787 株，C は BB-5，D は F-7 株を供試した．100ml 普通液体培地を用い，25℃ 125rpm で OD_{600mm} が 1 に近づくまで振とう培養した．培養した菌体浮遊液 10ml を 15ml ポリプロピレンコニカルチューブにとり，2500g で遠心し菌体を回収した．菌体を滅菌 20%グリセリン水 1ml に懸濁し接種に用いた．ブドウは北海道の主要品種でかつ本病に感受性の「ケルナー」3 年生ポット栽培苗の葉を 1 処理に付き 5 枚用いた．ペトリ皿に 2%素寒天培地で平板を作成し，平板上にブドウの葉を（裏面を上にして）おいた．3 本の葉脈それぞれ中央部に注射針で傷を付け，菌体懸濁液を 10µl 接種した．滅菌 2%グリセリン水のみを対照とした．接種後ペトリ皿をパラフィルムで密閉し，室温で 7-8 日間静置し，壊死斑が生じるのを確認した．

病原力は電気伝導率測定により評価した．すなわち，各菌株を接種した葉について，接種した壊死斑部分を径 0.5cm のコル

クボーラーで抜き取り，1 枚の葉につき 3 枚，計 15 枚の葉片を作成し，50ml ポリプロピレンコニカルチューブにいれ，滅菌蒸留水 10ml を添加した．5 秒間ボルテックスした後，10 分間室温で静置し，水のみを新しいコニカルチューブに回収した．回収した液体について電気伝導率計 DS-14(HORIBA, Kyoto)により電気伝導率を計測した．

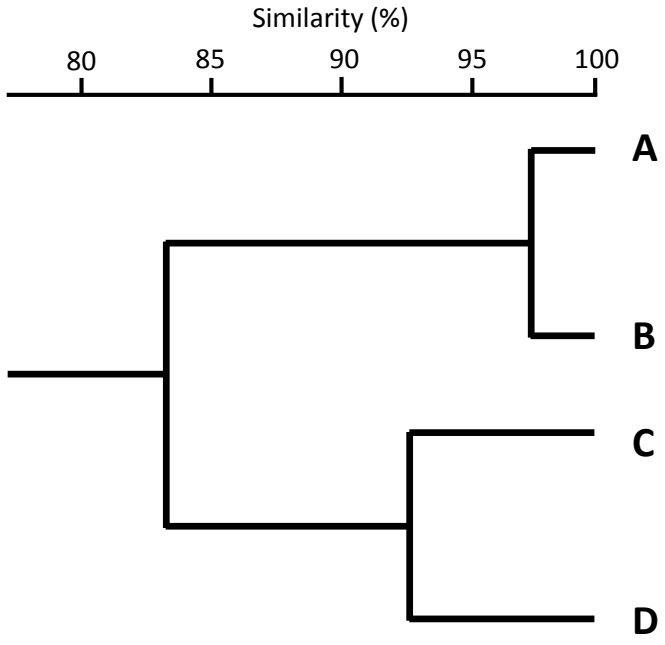
第 3 節　試験結果

反復配列による PCR 遺伝多型解析により，ヨーロッパ株と北海道株間に多型が認められた．また，北海道内，ヨーロッパ菌株内での多型も認められた(第 6-1 図)。



第 6-1 図　反復配列に基づく PCR 解析によるブドウつる割細菌病菌の遺伝的変異

このことから DNA type は 4 グループに別れた(第 6-2 図). まずヨーロッパ菌株と北海道株が明瞭に区分され，それぞれがさらに 2 グループに区分された．(第 6-1 表).



第 6-2 図　UPGMA による系統樹

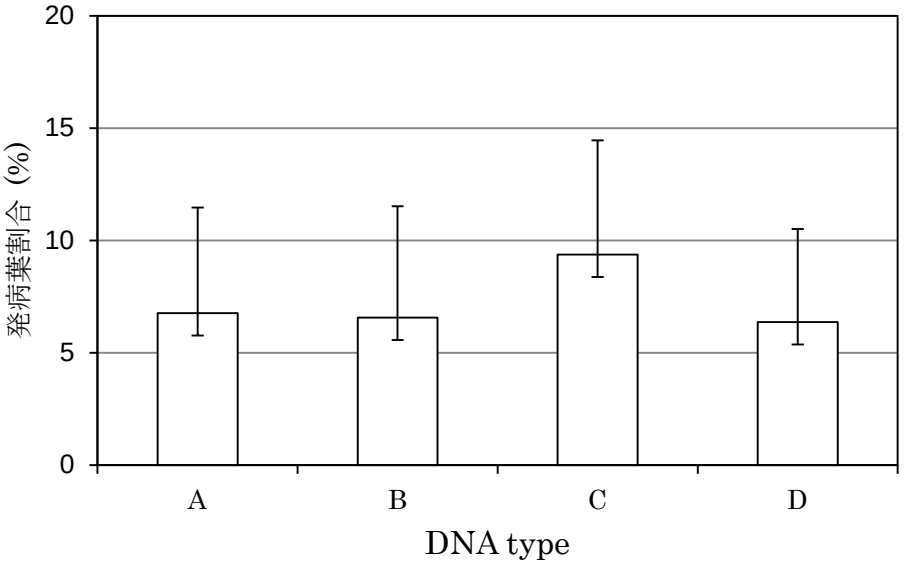
第6-3表 DNA type間の遺伝的距離

DNA type	A	B	C	D
A	0			
B	0.218	0		
C	0.617	0.655	0	
D	0.488	0.535	0.378	0

ポット苗に対する接種による病原性試験では，3 試験ともに発病が少なく，DNA type 間における発病葉割合について Tukey-Kramer の HSD 検定により解析したが，各グループ間に有意差は認められず，病原性の差は明確ではなかった(第 6-3 図).

試験 2 で使用したぶどうの新梢に形成された冬芽について，PCR による保菌検定を行ったところ，すべての DNA type において高い保菌割合が認められ，接種した場合の芽の保菌割合に DNA type 間で差異はみられなかった(第 6-4 表).

伝導率に基づく病原力試験では，接種区ではいずれも対照区に比較し接種部位にえそ症状が認められ（図版 3），接種部位の葉を懸濁させた蒸留水の電気伝導率は，対照のグリセリン水に比較し病原菌接種葉において有意な上昇が認められた．しかし，各 DNA type 間における導電率に有意な差は無く，ヨーロッパ株と北海道株との間に病原力の差異は認められなかった．（第 6-4 図）．

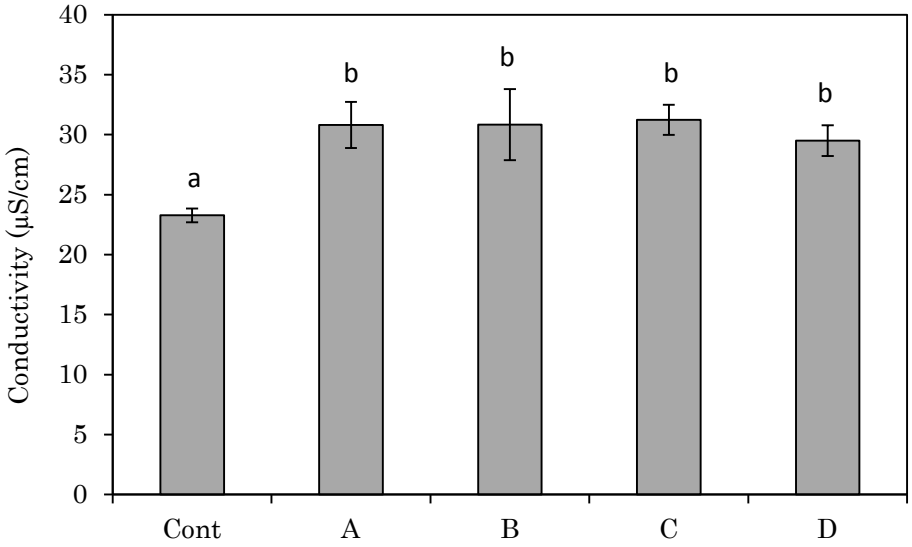


第6-3図　ポット苗への噴霧接種による各DNA type菌株の発病葉割合
A：CFBP1926，B：CFBP5787，C：BB-5，D：F-7
n=A：72，72，81；B：61，59，74，C：58，58，62，D：63，61，78
エラーバーは95%信頼区間を示す

第6-4表　接種後の芽における保菌割合

DNA type	A	B	C	D
PCR detection ratio	28/40	29/40	33/40	27/40

DNA type A, strain CFBP1926; DNA type B, strain CFBP5787;
DNA type C, strain BB-5; DNA type D, strain F-7



第6-3図　電気伝導率による病原力比較試験結果
Cont：20%グリセリン水，　DNA type A; strain CFBP1926，　B; strain CFBP5787,
C; strain BB-5，　D;strain　F-7
エラーバーは 95 %信頼区間を示す
エラーバー上の同じ文字間では誤差5%で差異の無いことを示す

第 4 節　考察

本菌は一属一種でヨーロッパブドウ(*Vitis vinifera*)およびその交雑種にのみ病原性を示す細菌とされている．そのため北海道における発生も原因菌はヨーロッパから北海道に移入したと考えられる．しかし、両者の間に遺伝的変異が認められたことから，北海道で発生した菌株はヨーロッパ由来としても，今回調査したフランス，ギリシャ，スペイン以外の国から移入した，

もしくは伝播の過程で相当の時間の経過もしくは品種の変化などがあったと考えられる.調査したヨーロッパ菌株は 1970～80 年代に分離されたものが主であり、現時点でヨーロッパにおいて発生している DNA　type について調査する必要がある．現在ヨーロッパで流行している DNA type が北海道で見つかった C および D であれば，ヨーロッパから北海道への伝播が近年になってからのものであると判断できる.逆にヨーロッパの DNA type が A および B のままであった場合，C および D の由来は他の地域からの伝播あるいは日本国内で変化した可能性が考えられる．北海道におけるブドウ栽培は，1870 年代後半からはじまったとされているが，醸造用ブドウの生産が盛んになったのは 1980 年代になってからであり，1981 年にツヴァイゲルトレーベ，セイベル 13503，ミュラートルガウ，セイベル 5279 の本格的な栽培がはじまり，1983 年にケルナーが大規模に導入された．このときヨーロッパで流行していた DNA type A および B が北海道に伝播したが寒冷地であるため潜伏し，遺伝的な変異を経て 2009 年に多発したという可能性も考えられる．そのため北海道での発生株の由来もしくは伝搬経路については，他の地域における現時点において発生している菌株との更なる比較検討が必要である.

各 DNA type 間における「ケルナー」に対する病原力に差異はみられなかった．また，試験葉数が少ないため示さなかったが，フランスで本病に感受性と評価されている「ガメ」についても葉への有傷接種によるえそ症状程度を伝電導率により評価

する試験を DNA type A と C で比較したが，両者に差異は見られなかった．

Sevillano ら(2014)は *X. ampalinus*の病原力に関与するタンパク質を特定するため，様々なトランスポゾン変異株を作製し有傷接種によるえそ症状の強さを評価する方法として導電率の測定を用いており，由来の異なる野生株間での比較は行っていない．Peros ら(1995)は in vitro で生育させた植物体に対する接種を行い，壊死した節間数の違いに基づき，本病に対する感受性の品種間差，培地中の硝酸態窒素含量による発病の違いとともに菌株間で発病の伸びに差異があったと報告している．しかし，供試した菌株は 2 菌株でいずれもシャラント・マリティーム県の「ユニ・ブラン」から分離された菌株であり，本研究で考察している異なる地域から分離された菌株間における病原性の違いを検証するには至っていない．したがって，異なる地域から分離された *X. ampalinus* 菌株間における病原性の違いを検討した試験はこれまでになく，本研究における試験が初めてである．しかし，これまで言われているような菌株間の病原力の違いは無いと考えられた．一方，本種にはこれまで特定の品種に対する病原の強い系統やレースは発見されていないとされている(EFSA 2014)ことも，この結果を支持していると考えられる．

本種は種内の菌株間における遺伝的相同性が高いとされ，菌株間で DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行うとほぼ 100%の相同性を示すとされている(Willems et al 1987)．本種内にお

ける遺伝的変異について，Manceau et al (2000)はギリシャの「スルタナ」分離株のみに遺伝的変異を示す DNA マーカーを報告しているが，この報告本種の種特異的塩基配列を解析することを目的としており，その後本種の種内変異についての報告はなく,本研究が本種の種内変異について初めての報告である.

第 7 章　薬剤防除

第 1 節　緒言

本病に対し，薬剤散布による防除効果はないとされている(Panagopoulos 1987)．しかし，銅剤の散布により本病の二次伝染および病徴の発現を抑制するという報告もある（Grall and Manceau 2003)．新村らは 2011 年に道内の本病発生園地において，慣行で行うべと病や灰色かび病に対する防除薬剤液に塩基性硫酸銅水和剤を加用し，展葉後約 10 日間隔で 7 回散布（6 月 5 日～8 月 1 日）を行ったところ，本病による発病葉割合の減少および収量の回復がみられたと報告している(私信)．そこで，塩基性硫酸銅水和剤の樹冠散布による本病の防除効果について検討した．

第 2 節　試験方法

第 1 項　試験園地概要

試験園地は，余市町登町 A 園地（品種「ケルナー」，1991 年栽植)，余市町美園町 B 園地（品種「ケルナー」1995 年栽植)，富良野市清水 C 園地（品種「ツヴァイゲルトレーベ」1999 年栽植)．株間：2m，畝間：2.5m，仕立て法：片側水平コルドン，1 区約 10 樹，2 反復で行った．

第 2 項　供試薬剤および処理設計

供試薬剤は塩基性硫酸銅水和剤（銅 32%)：800 倍（炭酸水

素カルシウム水和剤 100 倍加用）を用い，散布水量は 1 樹当たり 0.6～1.5L（120～300L/10a）とした．

処理区の設計は，予備的な試験で効果が確認されている 7 回散布に加え，より効率的に防除を行い，本病による果実被害を軽減することを目標とし，開花期前後における 3 回程度の散布，また 2010 年には 9 月以降に発病が進展した事例がみられていたことから，開花期よりも遅い時期に 3 回程度を散布する効果について検討した．

銅水和剤は 10 日間隔での処理を基本としたが，降雨の影響や慣行防除における散布間隔などの関係により正確に 10 日間隔ではない．試験園ではその他の病害に対する慣行防除は行っているが，本試験に影響があるため銅を含む薬剤については使用していない．

第 3 項　処理概要

試験は 2012～2014 年に行った．各処理月日の概要は第 7-1 表に示した．

第7-1表　銅剤散布によるつる割細菌病防除効果試験概要

試験年	園地	Plot[a]	供試本数	処理回数	処理月日							開花期	初発期
2012	A	1	19	7	5/28	6/18	7/3	7/17	7/24	8/2	8/15	7/3	8/15
		3	20	3			7/3	7/17	7/24				
		無処理	20	0	-	-	-	-	-	-	-		
	B	1	17	7	5/28	6/18	7/3	7/17	7/24	8/2	8/15	7/3	8/15
		3	18	3			7/3	7/17	7/24				
		無処理	16	0	-	-	-	-	-	-	-		
	C	1	20	7	5/31	6/11	6/19	6/29	7/10	7/20	7/30	7/6	8/12
		無処理	20	0	-	-	-	-	-	-	-		
2013	A	1	20	7	6/11	6/24	7/5	7/16	8/2	8/13	8/22	7/8	7/5
		2	20	4		6/24	7/5	7/16	8/2				
		3	20	3					8/2	8/13	8/22		
		無処理	20	0	-	-	-	-	-	-	-		
	B	1	18	7	6/11	6/24	7/5	7/16	7/29	8/13	8/22	7/8	7/5
		2	18	4		6/24	7/5	7/16	7/29				
		3	18	3					7/29	8/13	8/22		
		無処理	17	0	-	-	-	-	-	-	-		
	C	2	18	4	6/17	6/28	7/8	7/17	6/17			7/7	6/28
		無処理	20	0	-	-	-	-	-	-	-		
2014	A	3	19	3		6/25	7/4	7/14					8/19
		無処理	18	0									
	B	2	21	3					8/6	8/15	8/25	6/30	8/19
		3	20	3		6/25	7/4	7/14					
		無処理	15	0	-	-	-	-	-	-	-		
	C	2	20	3					8/8	8/18	8/29	6/30	8/18
		3	20	3		6/27	7/7	7/17					
		無処理	20	0	-	-	-	-	-	-	-		

[a] plot 1：展葉後から約10日間隔で7回散布（初発期を含む），plot 2：初発期を含む3～4回散布，plot 3：初発期を含まない3回散布

第 4 項　発病調査

2012 年,A および B 園地では 9 月 3 日に 1 樹当たり 300 葉，C 園地では 8 月 28 日に 1 樹当たり 60 葉を調査し，発病葉を計測し発病葉割合を求めた.

2013 年，A および B 園地は 9 月 2 日，C 園地は 8 月 8 日に 1 樹あたり 50 枚ずつ（新梢の少ない樹では 30 葉）を調査し，発病葉を計測し発病葉割合を求めた.

2014 年，A および B 園地は 9 月 18 日，C 園地は 9 月 22 日に 1 樹あたり 50 枚ずつ(新梢の少ない樹では 30 葉)を調査し，発病葉を計測し発病葉割合を求めた.

第 3 節　試験結果

各試験年次における発病葉割合の結果を第 7-2 表に示した.

第7-2表　銅剤散布によるつる割細菌病防除効果試験結果

試験年	園地	Plot[a]	処理回数	発病葉割合 (%)
2012	A	1	7	0.25
		3	3	0.54
		無処理	0	1.28
	B	1	7	0.08
		3	3	1.73
		無処理	0	0.77
	C	1	7	0.60
		無処理	0	3.70
2013	A	1	7	1.20
		2	4	5.30
		3	3	7.30
		無処理	0	12.10
	B	1	7	1.11
		2	4	3.89
		3	3	8.75
		無処理	0	10.12
	C	2	4	6.44
		無処理	0	21.20
2014	A	3	3	5.89
		無処理	0	9.13
	B	2	3	4.86
		3	3	10.88
		無処理	0	8.27
	C	2	3	1.73
		3	3	3.98
		無処理	0	5.80

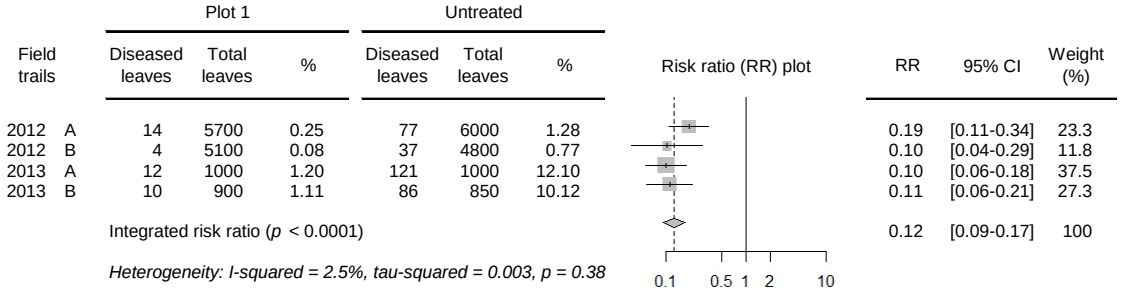
[a] plot 1:展葉後から約10日間隔で7回散布(初発期を含む), plot 2:初発期を含む3～4回散布, plot 3:初発期を含まない3回散布

当初，本病が果実被害をもたらすのは開花期頃からの発病によると推定していたが，防除効果の高い処理順序として，初発期を含む 7 回散布，初発期を含む 3～4 回散布，初発期を含まない 3 回散布に分けられた．そして初発期は必ずしも開花期とは限らないため，ブドウの生育ステージと薬剤散布適期との関

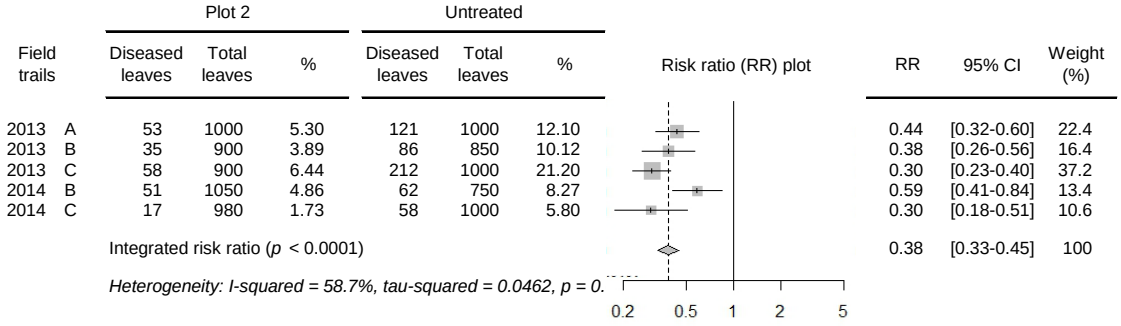
係は見いだせなかった.

この防除効果毎の 3 処理区をそれぞれ Plot 1, Plot 2, Plot 3 とし, メタアナリシスにより解析した. メタアナリシスは統計解析ソフトウェアーR のためのグラフィカル・ユーザー・インターフェース EZR (Kanda 2013)を用いて計算した. 各処理区と無処理区における発病葉割合をリスク比 (DerSimonian and Kacker 2007; DerSimonian and Laird 1986; Kawaguchi et al. 2014; Madden and Paul 2011; Rosenberg et al. 2004; Tango 2002) として算出し, 統合値により評価した.

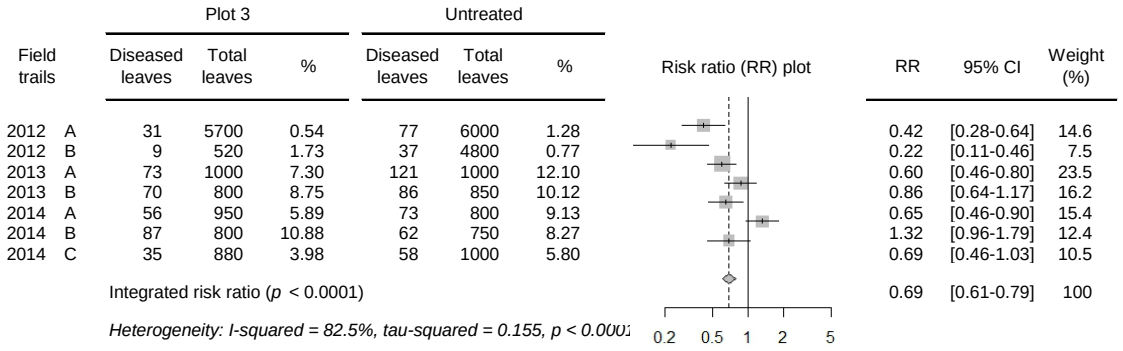
メタアナリシスによる統合リスク比を第 7-1 図から 7-3 図に示した.



第7-1図 初発期を含む7回散布による防除効果のメタアナリシスによる統合リスク



第7-2図 初発期を含む3～4回散布による防除効果のメタアナリシスによる統合リスク



第7-3図 初発期を含まない3～4回散布による防除効果のメタアナリシスによる統合リスク

Plot 1（初発期を含む 7 回散布）の統合リスク比は 0.12, 95%信頼区間 0.09-0.17, p<0.001 であり，無処理に比較し有意に発病を抑制し，その効果を防除価で現すと 88 となった．Plot 2（初発期を含む 3～4 回散布）の統合リスク比は 0.38, 95%信頼区間 0.33-0.45, p<0.001 であり，Plot 1 に比較するとやや劣るものの無処理に比較し有意に発病を抑制し，その効果を防除価で現すと 62 となった．Plot 3（初発期を含まない 3 回散布）の統合リスク比は 0.69, 95%信頼区間 0.61-0.79, p<0.001 であり，無処理に比較し有意に発病を抑制したものの，その効果は低く，防除価で現すと 31 となった．

第 4 節　考察

ブドウつる割細菌病の防除対策として，ヨーロッパでは感染枝の除去，剪定はできるだけ乾燥しているときに行う，剪定道具は作業中感染しないようにするなどの耕種的防除がすすめられている．Panagopoulos（1987）は，殺菌剤散布による本病防

除の試みとして，塩基性塩化銅，亜ヒ酸ナトリウム，DNOC，ストレプトマイシン,オキシテトラサイクリン,テラマイシン，カスガマイシン，バンコマイシン，シクロヘキシミド，安息香酸 8-キノリニル，フェンチアゾン，フェナジンオキシドを 4 回撒布しても病害抑制効果は得られなかったとしている．また，Grasso and Refatti (1982)もイタリアでボルドー液や ジクロロフェンの効果がなかったことを報告している．Lopez ら(1987)は，様々な種類の銅剤を用いた散布試験を実施したが干ばつのため処理区間で有意な差が得られなかったと報告している．これまでブドウつる割細菌病に対しては薬剤散布の効果はないとされてきたが，本試験において銅剤散布による防除効果が確認された．その効果は長期間散布し続けることで増加するが，一般的な防除回数としては初発期を含む 3 回程度で十分であると考えられた．日本植物防疫協会による殺菌剤の効果判定の目安として,防除価 81 以上で高い効果,60 以上で効果あり，40 以下で効果は低いとされており，初発期を含む 3～4 回散布は実用上十分な効果が認められた．

これまでの調査から 2009 年に多発生となった本病原菌は，北海道では越冬芽で保菌され，新梢や葉，花穂などの組織で生存していることが判っている．そのため銅剤の散布は，ぶどうの組織において低密度で保菌された状態からの増殖を抑制し，病徴の発現を抑制していると考えられる．これは Grall and Manceau (2003) が述べていることと一致している．また，銅剤散布区と無処理区とが隣接している処理区でも銅剤散布区において発病葉数が少なかったことから，二次感染も抑制してい

ると推察された.

本病の発生は,主に湿度により影響を受けていると考えられ,多発した2009年の気象経過から推測すると,平年では約20℃で経過する夏期期間が15～20℃と低温で,かつ降水量が多いことが発生好適条件である.2009年は葉の枯れ上がりだけではなく,花穂の黒変,腐敗,果実の腐敗が発生し,本病によりぶどうの収穫量が著しく低下した.このため,本病による経済的被害を回避するために花穂及び果実の腐敗を防ぐことが重要と考えられる.花穂および果実の腐敗を防ぐことを目標にした場合,本病の感染が懸念されるのは開花期であることから開花期を中心とした薬剤散布を計画した.しかし,試験を行った2012～2014年の夏季期間は北海道において平年より高温で経過したため,開花期あるいは果粒形成期には本病の発生がみられなかった.2012,2014年は気温が低下し,降水があった8月中旬以降に初発病斑を確認した.2013年は開花前に初発を認めたものの,その後高温少雨で推移したことから病勢が進展しなかった.このような条件であったが,初発期を含む3～4回の散布により発病葉は抑制された.しかし,発生が少なかったため無処理区においても花穂や果実の腐敗症状は発生がなく,経済的被害回避ということだけを考えると無散布でも問題は無かった.また,本病が多発する条件の場合,初発期からの約30日間の薬剤散布で後半の果実腐敗まで抑制できるのかは明らかではない.また,銅剤散布は初発期を外した期間に実施しても効果は得られないため,本病発生の懸念がある気温20℃以下で降雨があった場合は,すみやかに銅剤の散布を行い,その後の気象経

過や病徴の発生程度を観察して追加の散布を行うことが必要と考えられる.

第 8 章　休眠期防除

第 1 節　緒言

ブドウでは晩腐病（*Colletotrichum acutatum*, *Glomerella cingulate*），黒とう病（*Elsinoë ampelina*）の防除対策として，発芽前の休眠期防除による効果が確認されている（Fukaya 1996, Fukaya 1998）. いずれも前年に罹病した結果母枝や巻きひげなどの組織で病原菌が越冬し，第 1 次伝染源となるため，その予防として休眠期防除が効果を示すとされている．本病では病原菌の越冬は冬芽内部であるが,これに対する休眠期防除の効果について検討した.

第 2 節　試験方法

2012，2013 年，余市町の A 園地および B 園地（第 7 章参照）において，慣行で休眠期防除剤として用いられている多硫化カルシウム水溶剤 10 倍液をブドウの発芽前に散布し，その後塩基性硫酸銅水和剤の散布は行わず，本病の発生について調査した.

調査方法は，塩基性硫酸銅水和剤の散布試験と同様とし，2012 年 A および B 園地は 9 月 3 日に 1 樹当たり 300 葉を調査し， C 園地は 8 月 28 日に 1 樹当たり 60 葉を調査し，発病葉を計測し発病葉割合を求めた．2 カ年 2 試験園の合計 4 試験について，銅剤散布試験と同様にメタアナリシスによる統合リスク比を求めた.

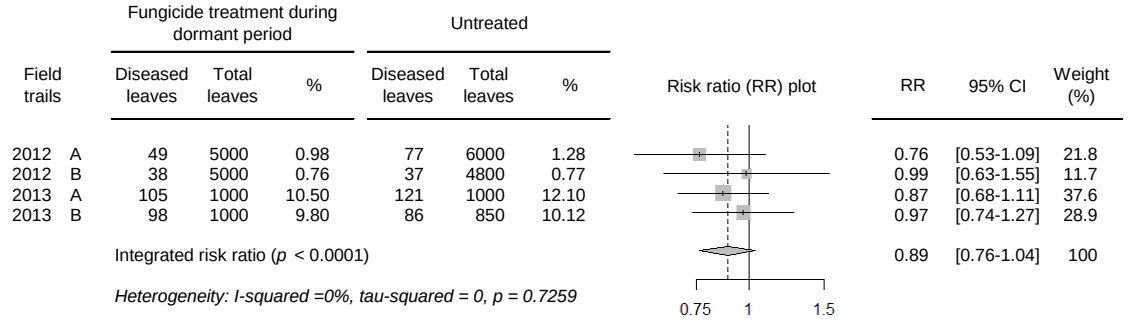
第 3 節　試験結果

多硫化カルシウム水溶剤による休眠期防除の本病に対する効果について第 8-1 表に示した.

第8-1表　多硫化カルシウム水溶剤による休眠期防除の効果

試験年	園地	処理	供試本数	散布月日	発病葉割合(%)
2012	A	処理	20	5/5	0.98
		無処理	20	-	1.28
	B	処理	20	5/2	0.76
		無処理	18	-	0.77
2013	A	処理	20	5/7	10.50
		無処理	20	-	12.10
	B	処理	20	5/7	9.80
		無処理	17	-	10.12

また，メタアナリシスによる統合リスク比は 0.89，95%信頼区間は 0.76-1.04，$p < 0.001$ であった．信頼区間が 1.0 を超えていることから，本処理による防除効果は認められないことが示された（第 8-1 図）．



第8-1図　メタアナリシスによる休眠期防除の統合リスク

第 4 節　考察

休眠期防除は，晩腐病のように植物体の表面に病原菌が残存しており，それが第 1 次伝染源となる場合には効果を示す．しかし，本病原菌は発芽前のブドウの表皮などには存在せず，越冬芽の内部である苞葉内側および綿毛部分に存在しているため，多硫化カルシウ

ム水溶剤の殺菌効果が及ばない．しかし，休眠期防除を浸透移行性の高い殺菌剤で行った場合には，苞葉内側の越冬菌株に対して効果が得られる可能性がある．

第 9 章　薬剤防除による保菌への影響

第 1 節　緒言

第 5 章において，北海道における本病原細菌の越冬場所は，越冬芽の部分が重要であること，第 7 章において，塩基性硫酸銅水和剤の散布により本病に対する防除効果が得られることを示した．本病に対する塩基性硫酸銅水和剤の散布が本病原菌の越冬芽における保菌に及ぼす影響について調査した．

第 2 節　試験方法

2012～14 年に薬剤散布試験を行った余市町 A, B 園地および富良野市 C 園地（第 7 章参照）において，翌年春の展葉前に処理区毎に越冬後の越冬芽を切り取り，PCR 法により保菌検定を行った．

2013 年春は，2012 年無処理，展葉後からの 7 回散布，開花期前後の 4 回散布,2014 年春は 2013 年無処理,展葉後からの 7 回散布，3 回散布，2015 年春は 2014 年無処理，発病前の開花期散布，初発前後を含む 3 回散布で比較を行った．

越冬芽をカッターナイフで切り取って採取し,乳鉢で摩砕した後，DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) により核酸を抽出した．PCR は Manceau ら(2005) による本菌特異プライマー(XaTS1; 5-TGC GTA GTT CAA CAC CAA AGT- 3′ , XaTS2; 5-TAT GAC CCT CTT TCC ACC AGC-3′)を用い，94℃5 分，94℃30 秒・60℃45 秒・72℃45 秒を 40 サイクル，72℃8 分，10℃保存で行い，増幅産物は 0.01%ゲルレッド(和光純薬，東京)を混和した 1.5%アガロースゲルで電気泳動後，UV トランスイルミネーターで確認した．

第 3 節　試験結果

保菌検定（第 5 章）で示したように，銅剤無散布区においては，各園地ともに越冬後の芽での保菌が確認された（第 9-1 表，第 9-1 図）.

一方，7 回散布区では越冬後の芽での保菌は確認されなかった.

初発期を含む 3～4 回散布区では，越冬後の保菌はほぼ確認されず，2014 年 B 園地でわずかな保菌が確認された.

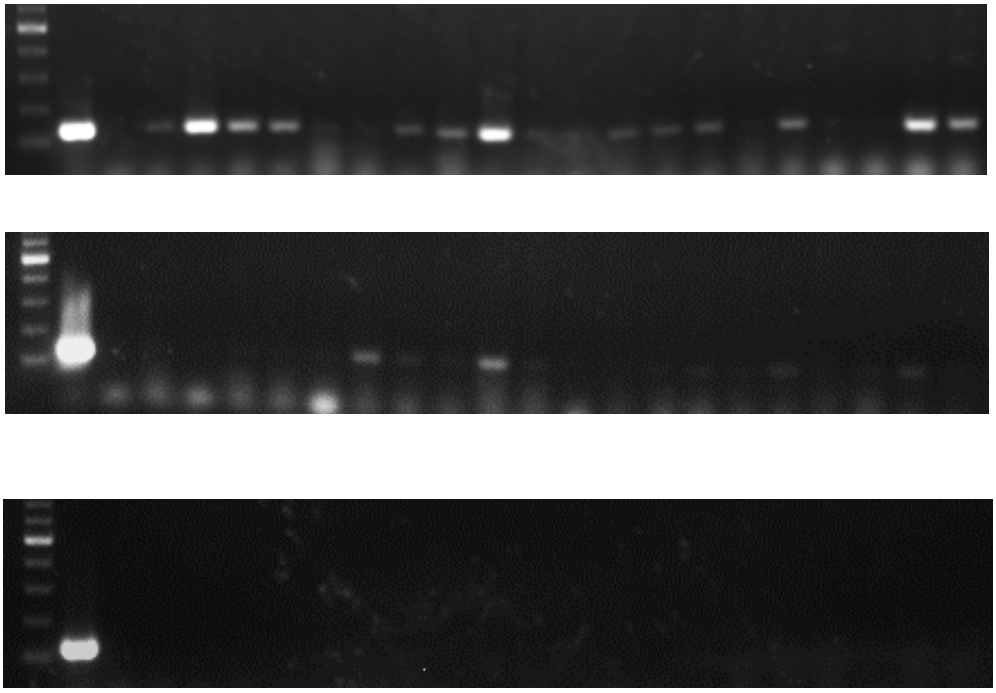
初発期を含まない 3 回散布区では，2012 年の A 園地，2014 年の A，B 園地で保菌が確認され，その保菌割合は無処理区に近似していた.

第9-1表　前年の銅剤処理が翌年春の芽の保菌に与える影響

年次	処理区	園地					
		A		B		C	
		発病葉割合 (%)	検出割合 (%)	発病葉割合 (%)	検出割合 (%)	発病葉割合 (%)	検出割合 (%)
2012	7回散布	0.25	0.00	0.08	0.00	0.60	0.00
	初発期を含まない3回散布	0.54	15.00	1.73	0.00	nt	nt
	無処理	1.28	21.70	0.77	8.30	3.70	40.00
2013	7回散布	1.20	0.00	1.11	0.00	nt	nt
	初発期を含む4回散布	5.30	0.00	3.89	0.00	6.44	0.00
	初発期を含まない3回散布	7.30	0.00	8.75	0.00	nt	nt
	無処理	12.10	3.30	10.12	41.70	21.20	45.00
2014	初発期を含む3回散布	nt	nt	4.86	3.30	1.73	0.00
	初発期を含まない3回散布	5.89	40.00	10.88	70.00	3.98	0.00
	無処理	9.13	45.00	8.27	80.00	5.80	35.00

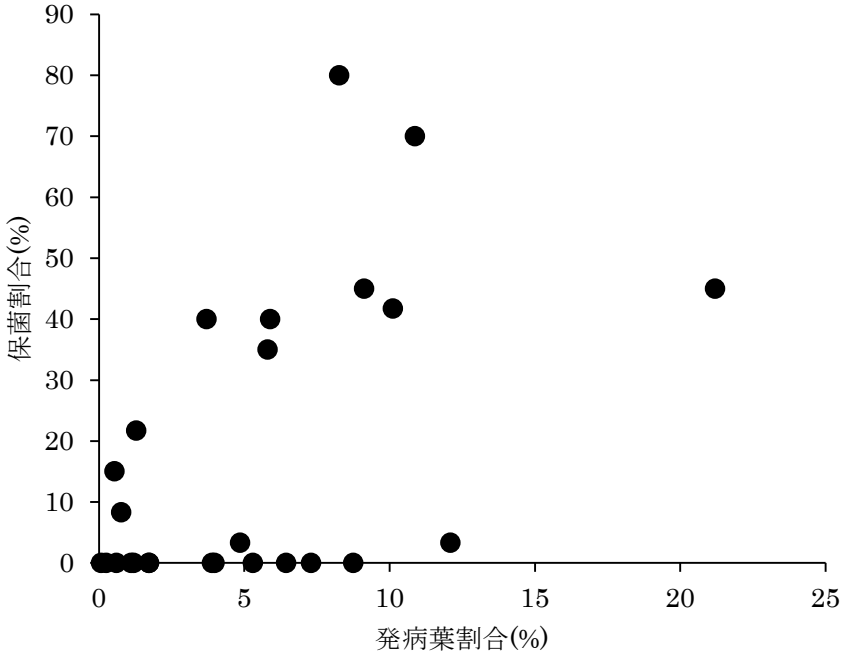
nt: not tested

発病葉率は各年次秋の調査結果，検出率は翌年初の越冬芽におけるPCRによる検出割合



第9-1図　各銅剤処理区における翌年春の冬芽における保菌検定（2014年B園地）
a：無処理，b：初発期を含まない3回散布，c：初発期を含む3回散布
lane 1: 100bp ladder, 2: DNA of Xylophilus ampelinus , 3: sterile distilled water, 4 to 23: samples

これらすべての前年秋の発病葉割合と翌年春の芽における保菌割合の関係を第 9-2 図に示した．両者の関係を分散分析で解析したところ，P=0.009 となり，1%以下で有意であった．したがって，前年秋の発病葉割合が高いと翌年春の芽における保菌が高まることが示唆された．



第9-2図　前年秋の発病葉割合と翌何春の冬芽における保菌割合

第 4 節　考察

銅剤の散布は，本病による病徴の拡大および 2 次伝染を防ぐとされている(Grall ら 2003)．本研究においても銅剤散布が防除効果を示すこと，その効果は初発期を含む 3～4 回散布で十分であることを示した．これに加え，銅剤散布により発病葉割合を低減することにより翌年春の芽における保菌割合も低減されることが示された．このことは，今後 2009 年のように本病が激発するような気象条件であったとしても，銅剤を散布することによる当年の発病抑制に加え，翌年の保菌割合を低下させ本病発生のリスクを低減することが可能であると推察される．今後の課題として，銅剤散布により保菌割合を低下させた樹と無処理の保菌割合の高い樹とで発生しやすい環境条件となった場合の初発期の早晩，病徴の進展などに差異が生じるのかを検討する必要がある．

第 10 章　総合考察

ブドウつる割細菌病は一属一種の病原菌 *Xylophilus ampelinus* (Willems et al. 1987)により引き起こされる病害で，主に地中海沿岸地域において発生しており，その地域からの伝播によると考えられる南アフリカなどでも問題となっている細菌病である．

本病原菌はヨーロッパブドウ(*Vitis vinifera*)およびその交配種にのみ病原性を示し，アメリカブドウ(*V. labrusca*)，アジア野生ブドウ(*V. amurensis*)には病原性を持たないとされている．

本邦においては，2009 年に北海道の醸造用ブドウで，2012 年には秋田県の生食用ブドウで発生が確認されている（Shinmura et al. 2012, Suzaki and Sato 2014）．

病徴は，はじめ葉に淡黄色の小斑点を生じ，やがてハローを伴った褐色の病斑となり，病斑が融合すると葉は褐色に枯れ上がる．新梢には数 mm のレンズ状の条斑が発生し，拡大すると数 cm から十数 cm のつる割症状や黒色のかいよう症状を呈する．つる割症状は表皮のみが割れる軽微なものから維管束や髄部に達する場合もみられる．開花期に発生すると花穂が黒変して枯死し，果実では黒褐色円形状のかいよう症状がみられ，裂果や腐敗症状を引き起こす．本病が果実被害に至るような甚発生となると,収量減少が著しくブドウ生産の大きな障害となる．

これまで本病による被害があったギリシャ，スペイン，フランスにおいて研究が進められており，本病に対する感受性に品種間差異があること，降雨の多い年に発生が多く，逆に降雨が

少ないと発生しない年もあるなど環境要因が発生に与える影響が大きいこと，樹体内で保菌され，特に展葉前の樹液漏出期に噴出する樹液中に含まれる病原細菌が一次伝染源として重要であること，薬剤散布による防除効果が得られにくいこと，などが報告されている．

ブドウにはアメリン＆ウィンクラーによる生育期間の積算温度（4月1日～10月31日までの日平均気温が華氏50℃を超える温度の積算値）に基づく気候区分が分けられており，既発生地域はリージョンⅡ～Ⅴに属し比較的温暖な地域である．一方北海道はリージョンⅠでブドウ栽培地域として最も冷涼な地域であり，おなじ区分にドイツが含まれている．このため北海道で栽培されている品種の多くがドイツやオーストリアなどから移入された品種である．しかし，ドイツやオーストリアでは本病の発生は報告されていない．なぜ気候区分も適応品種も異なる北海道で本病が発生したのか，その伝搬経路は不明である．本病は園地内では空気伝染することが確認されているが（Shinmura 私信），園地への侵入はほとんど汚染種苗の移動によるとされており，健全種苗の使用が防除対策の柱とされている(EPPO 2009)．北海道で現行の主力品種が栽培されはじめたのは1970年台以降であり，この時期に既発生地域ではたびたび本病の発生により被害を被ってきた．そのため本来本病の発生が無い地域の種苗にも本病の保菌がされ，伝播したことが想定される．本研究では1970～80年にヨーロッパで分離された菌株と現在北海道で発生している菌株との間に明瞭な遺伝的変異があることを示した．これはヨーロッパでの流行期に移入

した菌株が北海道内において無病徴で保菌される間に遺伝的変異を起こした可能性を示している．しかし，この仮説は現在ヨーロッパで発生している菌株の遺伝子型が不明のため未解明となっている．本病は 2009 年に突然多発したが，その発生状況はほぼ道内の醸造用ブドウ産地全域にわたっており，かなり以前から北海道内に移入し，広がっていたことが考えられる．また，2012 年の秋田県における発生も 2009 年の北海道での発生が伝播したのではなく，それ以前から保菌されていたことが推察されている（Suzaki, 2014）．通常の気象条件下では本病の汚染を確認することは難しいため，増殖される種苗が無病のものであるのか，単なる無病徴であるのかを葉や枝の状態で判断することは困難である．健全種苗の使用をはかるためには新植する種苗に対する高精度な汚染検定が必要である．

本病に対する感受性に品種間差異はあるが，同じ *V. vinifera* 間における違いが生じる理由は不明である．本研究ではアメリカブドウ(*V. labrusca*)の交配種では比較的感受性が低いことも示したが，*V.vinifera* における品種間差異がどのような遺伝的背景で起きているのかは判らなかった．

また，検定芽数が少ないため具体的なデータは示さなかったが，発病割合の高い品種（＝感受性の高い品種）と発病割合の低い品種では，翌年春の越冬芽保菌割合にも差があり，感受性の高い品種ほど越冬芽保菌割合も高かった．すなわち，感受性の品種ほど当年に発病しやすく，発病するほど保菌割合も高くなり翌年の発生リスクも高まると考えられる．したがって，本病の耕種的対策として本病に感受性の低い品種の選択があげら

れるが，醸造用ブドウにおいては，収穫後に生産されるワインの品質やブランドに合わせた品種の選択がなされており，本病による被害回避のみで低感受性品種が栽培される可能性は低い．

本病は多雨の条件で多発するとされている(Panagopoulos 1987)．実際同じ園地においても降水量の多い年は発生量が多く，降水量の少ない年では発生量も少なくなっていた．また，降水量が多いということは，曇雨天が続くということで気温も冷涼になりがちとなる．このことから様々な園地に精密な温湿度計を設置して温湿度を測定した．同じ年，同じ地域であっても地形や周辺環境により園地内の温湿度には違いが生じており，発病割合との関係を調査した結果，高湿度条件の積算時間が発病割合と正の相関関係をもっていた．これは，富良野市の多発園地 D が周辺園地よりも本病の初発が早く，発生量も多いことから推察し検証した結果である．また，長沼町中央農試内の遺伝資源園 E も比較的発生量の多い園地であった．両園地ともに防風林に囲まれており風通しが悪く，近隣に河川もしくは農業用ため池があるなど湿度が高まる要素が多い環境であった．一方，高台にある余市町 A 園地，富良野市 C 園地は試験年次を通じて高湿度の積算時間が短く，本病の発生に不適と考えられた．

本病の発生と降雨の関係について，道内最大産地である余市町における 2006～2015 年 5～9 月の 10 年間のデータをみると，多発生した 2009 年は 6 月の降水量が期間内最大 73.0mm（平年 44.1mm)，7 月の降水量が期間 2 位 187.5mm(平年 77.7mm)となっているものの，期間合計の降水量では 456.0mm（平年 463.0mm)と平年値と差が無い．期間最大は 2010 年の 794.5mm，

2位は2011年の752.5mmである．2010年は2009年の多発生に引き続き多くの園地で発生がみられており，感染源が増加していたとともに環境要因も発生に好適であったと考えられるが果実被害は2009年より少なかった．2011年は，9月に期間中の降水量の約半量である355.0mm（平年153.4mm）があり，9月になってから本病の蔓延が認められている．また，同様に2014年は8月に202.5mm（平年119.3mm）の降雨があり，8月中旬に本病の初発を認め，以後発病割合が増加した．一方，期間中の降水量が少なかった2012年（369.0mm），2015年（384.5mm）はいずれの年も少発生となっている．ブドウ栽培期間中の降水量と本病の発病割合とに関係はみられるが，本病による被害が最も大きかった2009年は展葉後の6月から7月上旬までの開花期まで降雨が多かったことが本病の初発を早めたと推察できる．

また，本研究では発病割合の上昇と関係のみられた環境要因として相対湿度95%以上の多湿状態の積算時間をあげたが，2009年の特徴として7月の平均気温が18.5℃（平年19.8℃）と低いことがあげられる．2011，2014年の7～8月は降水量が多かったものの気温が平年よりも高くなっていた．これらのことを総合すると，2009年の被害発生は，開花前（7月上旬）までの多雨で本病の発生が早く，引き続き7月が多雨，さらに低温となったことから,形成直後の花穂や果粒での発病がすすみ,果実減収につながったと推察する．本研究期間中にこのような果実被害におよぶ発病は認められなかったのは,2009年と同じような気象条件が得られなかったことが要因と考えられる．本

研究で温度と発病割合との関係は明確に出来なかったが，本病原菌が 33℃以上では生育しない(Panagopoulos 1987)ことから高温は発生に不適な条件とされ，降雨に加えて冷涼な気象が発病に好適とされている(Lopéz 1987)ことから，温度が発病割合にもたらす影響，特に被害発生につながる時期について，更なる検討が必要である．

ヨーロッパでは本病の第 1 次伝染源として展葉前の樹液量出による樹液中の保菌が重要であることが示されている(Grall et al. 2005)．また，樹液による感染拡大リスクとして剪定鋏などの器具による汚染が確認されている(Ridé 2000)．ブドウの芽における保菌は確認されているが(Héritier 1983)，ヨーロッパにおける越冬部位は維管束組織内とされ(Panagopoulos 1987)，無病徴でもブドウ樹内で保菌されている(Grall et al. 2005)．一方，本研究では剪定鋏による伝染や樹液中の保菌は確認できず，北海道において確実な越冬が確認されたのは越冬芽内部のみであった．本研究では PCR 法により検定を行っているが，ブドウは組織内に PCR 反応の阻害物質を多く含むため，検出精度をあげるために様々な工夫がなされてきた．しかし，本研究で使用した確認抽出キットでは，特に PCR 反応への影響は認められていない(Komatsu and Kondo 2015a)，そのため越冬後の樹液や組織内部で検出できないのはこれらにおける保菌が非常に低いレベルであることを示している．また，前年接種により発病させたブドウポット苗を翌年温室内で生育させ本病が発生しない状態で管理すると，形成された越冬芽における保菌割合が 0 となることを確認しており，無病徴での保菌は PCR 法でも検出す

ることが難しいことが推察される．2011 年以降，現地においては本病による被害は発生していないが，2009 年に発生を認めた園地において，2012 年に無病徴の葉を PCR 法により検定したところ，保菌が認められており，春の段階で PCR 法により検出できないレベルであっても無病徴感染が続いていることが考えられる．

北海道において樹液や維管束組織内での越冬が低いレベルである理由として，既発生地域にはない降雪と低温の影響をあげたが，逆に最も外気温の影響を受けやすい越冬芽において保菌されているのかの理由は明らかではない．主芽は保護毛に覆われ，何枚もの苞葉で包まれた状態なので，断熱など菌体の越冬に適していることも考えられる．ブドウの芽は挿し木をした場合，発根前に発芽，展葉することから芽自体に栄養を蓄えており，そのことが本病原菌の越冬に関与していることも想定される．

本研究ではこれまでヨーロッパで効果がないとされていた薬剤散布による本病の防除効果を確認し，その散布適期について初発期を含む 10 日間隔 3 回散布と提案した．しかし，前述のように本研究期間中は果実被害が発生するような気象条件が現れず，この散布体系が果実被害を回避できうるか否かについて検討できていない．また，初発期以降から散布を行っても十分な効果は得られにくいため，初発に至る恐れがある気象条件となった場合にはすみやかに塩基性硫酸銅水和剤を散布することをすすめている．この初発に至るおそれのある気象条件についても明確にはできていない．研究期間中の発生状況から推定す

ると，展葉後にかなりの降水量があり，その後の気温が上がらなかった場合に初発を認めている.降雨後が高温となった場合，降雨があったがその後干ばつとなった場合などは，初発があっても病勢の進展が止まるため，特に薬剤散布の必要は無いと考えられる．したがって，本病に対する薬剤散布は初発に至る恐れがある場合に散布をするが，その後の散布は気象の経過や発病の様子を観察し，本病の進展が見られる場合に追加で 2 回の散布を行うことにより，最も被害につながる果実での発病を抑えることを目標とすることが望ましい.

また，本病に対して薬剤散布を行うことは発病割合を低下させるとともに翌年への保菌割合も低下することが示されたことから，果実被害が回避された場合でも，9 月以降に葉や新梢で本病の発生が認められた場合には，薬剤散布を行い，発病割合を低下させることにより翌年の発病リスクが低下すると考えられ，薬剤散布の有用性が示された.

本病は平年並の気象経過を辿った場合，北海道における被害発生の懸念は低い病害と判断できる．しかし，全道的に本病の発生が少なかった 2015 年においても,6 月下旬の多雨とその後の低温により果実被害が発生した奥尻島の園地や園主の方針により銅剤無防除となっている富良野市の常発園地 D では果実収量の著しい低下が認められており，本病に対する初期防除が行われない場合，収量や品質への影響が懸念されることから，園地の状況や気象の経過，本病の発生状況を勘案し防除に当たることが望ましい.

第 11 章　要約

本研究では，2009 年に日本国内ではじめて発生したブドウつる割細菌病について，北海道における栽培品種の感受性の差異，発生好適条件や越冬場所などの発生生態，既発生地域であるヨーロッパ株との分子系統解析と病原性の比較，薬剤散布による防除効果，薬剤防除による保菌割合への影響について検討した．

１．北海道主要品種の感受性

本病は地中海沿岸地域で発生している病害で，既発生地域のギリシャ，スペイン，フランスでは本病に対する品種毎の感受性が評価されている．しかしこれらの品種は北海道内で栽培されている品種とは全く異なっており，道内栽培品種における本病に対する感受性は未調査であった．本研究ではポット苗に対する接種試験および実際の園地内における接種試験により道内主要品種における本病への感受性を明らかにし，道内主要品種「ツヴァイゲルトレーベ」，「セイベル 5279」，「ミュラー・トルガウ」，「ケルナー」は本病に感受性の品種，「ドルンフェルダー」，「カベルネ・ソーヴィニヨン」，「リースリング」は比較的感受性の低い品種と考えられた．

２．発生好適条件

本病は夏季が低温多雨となった 2009 年に多発した．このことから本病の発生に関与する環境要因について解析を行った．

様々な条件下のブドウ樹周辺の環境条件として，本病の発生に好適と考えられた相対湿度 95%以上の高湿度，15～20℃冷涼な気温，本病の発生に不適と考えられた相対湿度 70%以下の乾燥，25℃以上の高温の積算時間を比較した．その結果，発病葉割合の上昇と正の相関が認められたのは 95%以上の高湿度時間の積算値であった．その他の条件では相関が認められず，本病の発病を助長するのは高湿度時間の長さによることを明らかにした．

３．越冬部位

ヨーロッパにおいて，本病原菌はブドウの樹体内，樹液中で越冬し，翌春展葉前の樹液漏出が 1 次伝染源とされている．本研究では発病園地のブドウについて，展葉前の越冬芽，樹液，樹液が漏出している組織維管束部位について種特異プライマーを用いた PCR 法により保菌検定を行った．その結果，少なくとも北海道においては樹液や組織内部での保菌は確認できず，越冬芽で高い保菌割合が確認された．また越冬芽内の保菌部位について検討したところ主芽組織内部ではなく苞葉およびその内側の綿毛部分で保菌が確認され，この部分で病原菌が越冬していることを明らかにした．

４．分子系統解析

1970～80 年にヨーロッパで分離された菌株および 2011～13 年に北海道内で分離された菌株について，細菌の分子系統解析で用いられる反復配列を利用した PCR 法により解析を行った．

その結果，ヨーロッパ株と北海道株には明らかな遺伝的変異性がみられた．しかし，「ケルナー」に対する病原性については差異が認められなかった．

５．防除対策

ヨーロッパでは本病に対し薬剤散布による防除は効果が得られないとされている．しかし，本研究では塩基性硫酸銅水和剤の散布により本病が抑制されることを明らかにした．その防除効果は散布回数を 7 回にすると高かったが，初発期を含む前後の期間に 10 日間隔で 3 回の薬剤処理を行うことでも十分な効果が得られることを示した．

また，多硫化カルシウム剤による休眠期防除は本病に対する効果が無いことも明らかにした．

６．薬剤防除が与える保菌への影響

本病原菌は越冬芽内部で越冬し，翌年の伝染源となること，塩基性硫酸銅水和剤の散布により本病の防除効果が得られることを示した．この銅剤散布による発病葉割合の低下が越冬芽内での保菌割合に与える影響について調査した．その結果，銅剤散布により発病葉割合が低下すると翌春の越冬芽における保菌割合も低下することを明らかにした．また，品種間差異をみた場合，発病葉割合の低い品種は，発病葉割合の高い品種に比較し越冬芽の保菌割合が低いことを明らかにし，発病葉割合を低下させることにより越冬芽保菌割合も低下することが示された．

The Ecology of Bacterial Blight in Grapevines Caused by *Xylophilus ampelinus* (Panagopoulos) Willems et al. and the Development of Effective Disease Control Techniques

by

Tsutomu Komatsu

The first incidence of bacterial blight caused by *Xylophilus ampelinus* (Panagopoulos) Willems et al., in grapevines was identified in Hokkaido Prefecture, Japan, in 2009. The aim of the present study was to develop techniques to control bacterial blight by analyzing the habitat and pathogenicity of *X. ampelinus*, disease susceptibility of grapevine cultivars in Hokkaido, and the effect of germicides.

１．Disease susceptibility

Bacterial blight has been diagnosed in regions along the Mediterranean Sea, including Greece, Spain, and France. In these areas, the disease susceptibility of each cultivar has been evaluated; however, these varieties of cultivars are different from those in Hokkaido. Therefore, in the present study, the susceptibility of the cultivars in Hokkaido to bacterial blight was observed using potted grape plants and vines in the field. The results indicated that the following important cultivars were susceptible to the disease: Zweigeltrebe, Seibel 5279, Muller- Thurgau, and Kerner; and cultivars Dornfelder, Cabernet Sauvignon, and Riesling were relatively resistant to the disease.

２．Optimal environmental factors for disease development

When disease occurrence was first observed in Hokkaido in 2009, the summer season was predominantly cool and rainy, and it has been suggested that the environmental conditions stimulated disease development. Therefore, the effect of environmental factors on the disease was analyzed. The accumulated time to reach more than 95% relative humidity (RH) and the incidence of diseased leaves were positively correlated. Since other factors were not correlated with disease incidence, the duration of high humidity was considered the most important factor for disease occurrence.

３．Winter habitat

To determine the winter habitat of *X. ampelinus* in Hokkaido, bacterial DNA in the bud, sap, and xylem was examined using polymerase chain reaction (PCR) employing species-specific primer sets. Although *X. ampelinus* was not detected in the sap and xylem, reported to be the hibernacula in European cultivars, it was detected in the bract and wool of the bud. *X. ampelinus* in Hokkaido might overwinter in different plant organs than is seen in grapevines in Europe.

４． Genetic analysis

Genetic variation was determined in the strains collected from Hokkaido isolated from 2010 to 2013, and Europe isolated from the 1970-80s, using the combined results of Rep-, ERIC-, and Box-PCR. However, the pathogenicity to cultivar Kerner and the virulence were indistinguishable among these strains.

５． Development of a control method

The application of a copper agent effectively reduced disease occurrence in Hokkaido, although previous reports indicated that chemical agents did not aid in disease control in Europe. The protective effect of the copper agent increased with prolonged application, and sufficient protection was achieved with 3–4 applications every 10 d when applied concurrent to the initial stage of infection. The application of the copper agent during overwintering was not effective for disease control.

６． Effect of the application of a copper agent on bacterial survival

The effect of the copper agent to reduce bacterial overwintering was investigated. The application of the copper agent controlled the extent of infection in the year of treatment, and reduced the quantity of the bacteria surviving winter. Our findings indicate that the regular application of the copper agent would be an effective measure to prevent bacterial blight in grapevines.

引用文献

Adhikari, T.B., Gurung, S., Hansen, J.M., Bonman, J.M. (2012) Pathogenic and genetic diversity of *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* in North Dakota. PhytoPathol 102:390-402.

Albibi, R., Chen, J., Lamikanra, O., Banks, D. (1998) RAPD fingerprinting *Xylella fastidiosa* Pierce's disease strains isolated from a vineyard in North Florida. FEMS Microbiol Lett 165:347-352.

Bernon, G. (1963) Maladie bacterienne des Alicantes. Prog Agric Vitic 80:25-32.

Billones-Baaijens, R., Jones, E.E., Ridgway, H.J., Jaspers, M.V. (2013) Virulence affected by assay parameters during grapevine pathogenicity studies with *Botryosphaeriaceae* nursery isolates. Plant Pathol 62:1214-1225.

Botha, W.J., Serfontein, S., Greyling, M.M., Berger, D.K. (2001) Detection of *Xylophilus ampelinus* in grapevine cutting using a nested polymerase chain reaction. Plant Pathol 50:515-526.

Bradbury, J.F. (1984) Genus II. *Xanthomonas* Dowson 1939, p.199-210. In Krieg, N.R. and Holt, J. G. (ed.), Bergey's manual od systemic bacteriology, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Bradbury, J.F. (1991) *Xylophilus ampelinus*. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria No.1050. Mycopathologia 115: 63 - 64.

Branas, J. (1961) La maladie d'Oléron en Savoie. Prog Agric Vitic 78:86-90.

Bugaret Y, Tombu B and Vergnet C, 2002. Chemical control of grapevine bacterial necrosis [Xylophilus ampelinus]. New elements for optimising the use of copper. Phytoma-La Defense des Vegetaux 548: 34–40.

Byng, G.S., Whitaker, R.J., Gherna, R.L., Jensen, R.A. (1980) Variable

enzymological patterning in tryosine biosynthesis as a means of determining natural relatedness among the Pseudomonadaceae. J Bacterol 144:247-257.

Coletta - Filho, H.D., Takita, M.A., de Souza, A.A., Aguilar - Vildoso, C.I., Machado, M.A. (2001) Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* by a variable number of tandem repeat analysis. Appl Environ Microbiol 67:4091-4095.

De Leon, L. and Rodriguez, A. (2009) Comparative study of genetic diversity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolates from the Canary Islands by RAPD-PCR, BOX-PCR and AFLP. Plant Pathol 58:862-871.

De Vos, P. and De Ley, J. (1983) Intra- and intergeneric similarities of *Pseudomonas* and *Xanthomonas* ribosomal ribonucleic acid cistrons. Int J Syst Bacteriol 33:487-509.

Der Simonian, R. and Kacker, R. (2007) Random-effects model for meta-analysis of clinical trials: an update. Contemp Clin Trials 28:105-114.

Der Simonian, R. and Laird, N. (1986) Meta-analysis in clinical trials. Control Clin Trials 7:177-188.

Diagnostics *Xylophilua ampelinus*. (2009) EPPO Bull 39:403-412.

Dreo, T., Gruden, K., Manceau, C., Janse, J.D., Ravnikar, M. (2007) Development of real-time PCR-based method for detection of *Xylophilus ampelinus*. Plant Pathol 56:9-16.

Dreo, T., Seljak, G., Janse, J.D., Van Der Beld, I., Tjou-Tam-Sin, L., Gorkink-Smits, P., Ravnikar, M. (2005) First laboratory confirmation of *Xylophilus ampelinus* in Slovenia. EPPO Bull 35:149-155.

DuPlessis, S.J. (1940) Bacterial blight of vines (Vlamsietke) in South Africa

caused by *Erwinia vitivora* (Bacc) Du P Sci Bull Dep Agric Repub S Afr 214:1-105.

EFSA (2014) Scientific opinion on the categorization of *Xylophilus ampelinus* (Panagopoulos) Willems et al. EFSA J 12:3921.

Fatmi, M., Damsteegt, V.D., Schaad, N.W. (2005) A combined agar-absorption and BIO-PCR assay for rapid, sensitive detection of *Xylella dastidiosa* in grape and citrus. Plant Pathol 54: 1-7.

Fukaya M. (1996) Pest control of grape putrefaction in resting period. Ann Rept Plant Pro N Jpn 47:161 (abst. in Japanese)

Fukaya M. (1998) Effect of fungicide spray on anthracnose of grapevine during dormant period. Ann Rept Kansai Plant Prot 40:109-110 (in Japanese)

Gama, M.A.S., Mariano, R.L.R., Viana, F.M.P., Ferreira, M.A.S. V., Souza, E.B. (2011) Polyphasic characterization of pigmented strains of *Xanthomonas* pathogenic to cashew trees. Plant Dis 95:793-802.

Garovaglio, S. and Cattaneo, A. (1879) Del Mal Nero. Arch. Triennale Lab. Crittogamico Presso Univ Pavia 2:252-261.

Gorris, M.T., Cambra, M., López, M.M. (1989) Production of monoclonal antibodies specific to *Xylophilus ampelinus*. In: Klement, Z. (Ed.): Proceedings of the 7th International Conference of Plant Pathogenic Bacteria, Budapest, Hungary: Akademiai Kiado, 913-921.

Grall, S. and Manceau, C. (2003) Colonization of *Vitis vinifera* by a green fluorescence protein-labeled, *gfp-marked* strain of *Xylophilus ampelinus*, the causal agent of bacterial necrosis of grapevine. Appl Environ Microbiol 69:1904-1912.

Grall, S., Roulland, C., Guillaumès, J., Manceau, C. (2005) Bleeding sap and old

wood are the two main sources of contamination of merging organs of vine plants by *Xyophilus ampelinus*, the causal agent of bacterial necrosis. Appl Environ Microbial 71:8292-8300.

Grasso, S., Moller, W.J., Refatti, E., Magnano di San Lio, G., Granata, G. (1979) The bacterium *Xanthomonas ampelina* as causal agent of a grape decline in Sicily. Rivista di Pathologia Vegetale Series IV 15:91-106.

Héritier, J., (1983) Bacterial necrosis in Aude. Bull technique—Chambre d'agriculture des Pyrenees-Orientales, 106:50–56.

Hernandez - Martinez, R., Costa, H.S., Dumenyo, C.K., Cooksey, D.A. (2006) Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* infecting Grape, Almonds, and Oleander using a multiprimer PCR assay. Plant Dis 90:1382-1388.

Hulton, C.S. J., Higgins, C.F., Sharp, P.M. (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.

Jaspers, M.V., Seyb, A.M., Trought, M.C.T., Balasubramaniam, R. (2013) Overwintering grapevine debris as an important source of *Botytis cinerea* inoculum. Plant Pathol 62:130-138.

Jaunet, T.X. and Wang, J.F. (1999) Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan. PhytoPathol 89:320-327.

Kageyama, K., Komatsu, T., Suga, H. (2003) Refined PCR protocol for detection of plant pathogens in soil. J Gen Plant Pathol 69:153-160.

Kanda, Y. (2013) Investigation of the freely available easy-to –use software 'EZR' for medical statistics. Bone Marrow Transplant 48:452-458.

Kawaguchi, A. (2008) Phylogenetic and serological analyses reveal genetic

diversity of *Agrobacterium vitis* strains in Japan. Plant Pathol 57:747-753.

Kawaguchi, A. (2014) Genetic diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* strains in Japan revealed by DNA fingerprinting. J Gen Plant Pathol 80:366-369.

Kawaguchi, A., Inoue, K., Inoue, Y. (2014) Biological control of bacterial spot on peach by nonpathogenic *Xanthomonas campestris* strains AZ98101 and AZ98106. J Gen Plant Pathol 80:158-163.

Kawaguchi, A., Tanina, K., Inoue, K. (2010) Molecular typing and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouses in Japan. Plant Pathol 59:76-83.

Khoodoo, M.H.R., Jaufeerally - Fakim, Y. (2004) RAPD-PCR fingerprinting and southern analysis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachia* strains isolated from different Aroid hosts and locations. Plant Dis 88:980-988.

Komatsu, T. and Kondo, N. (2015a) Winter habitat of *Xylophilus ampelinus*, the causal of bacterial blight of grapevine, in Japan. J Gen Plant Pathol. 81:237-242.

Komatsu, T. and Kondo, N. (2015b) Efficacy of a copper-based bactericide in controlling bacterial blight of grapevines caused by *Xylophilus ampelinus*. J Gen Plant Pathol. 81:409-414.

Komatsu,T. (2015) Influence of the Environmental Factors to Disease Incidence of the Bacterial Blight of Grapevine, Caused by Xylophilus ampelinus. Ann Rept Plant Prot N Jpn. 66:

Komatsu, T., Shinmura, A., Kondo, N. (2016) DNA type analysis for differentiation of strains of *Xylophilus ampelinus* from Europe and Hokkaido, Japan. J Gen Plant Pathol. (in press).

Lopes, S.A., Damann, K.E., Grelen, L.B. (2001) *Xanthomonas albilineans* diversity and identification based on Rep-PCR fingerprints. Curr Microbiol 42:155-159.

López, M.M., Sampayo,M., Cambre, M., Salcedo, C.I. (1978) [Detection in Spain of *Xanthomonas ampelina*, causing bacterial blight of grapevine] (abstr.). *Sociedad Española de Microbiologia, Grupo Fitopatologia, Valencia*.

López, M.M., Gracia, M., Sampayo, M. (1980) Studues on *Xanthomonas ampelina* in Spain, p. 56-57. Procrrdings of the 5th Congrress of the Mediterranean PthotoPathol Union, Ptras, Greece.

López, M.M., Cambra, M., Aramburu, J.M., Bolinches, J. (1987) Problems of detecting phytopathogenic bacteria by ELISA. EPPO Bull 17:113-117.

López, M.M., Gracia, M., Sampayo, M. (1987) Current status of *Xanthomonas ampelina* in Spain and susceptibility of Spanish cultivars to bacterial necrosis. EPPO Bull 17:231-236.

Madden, L.V., Paul, P.A. (2011) Meta-analysis for evidence synthesis in plant Pathol: an overview. PhytoPathol 101:16-30.

Manceae, C., Coutaud, M.G.,Guyon, R. (2000) Assessment of subtractive hybridization to select species and subspecies specific DNA fragments for the identification of Xylophilus ampelinus by polymerase chain reaction (PCR). Eur J Plant Pathol 106:243-253.

Manceau, C., Grall, S., Brin, C., Guillaumes, J. (2005) Bacterial extraction from grapevine and detection of *Xylophilus ampekinus* by a pcr and microwell plate detection system. EPPO Bull 35:55-60.

Marcelin, H. (1976) La nécrose bactérienne de la vigne, Maladie d'Oléron, p. 1-29. In Compte-rendu d'assemblée plénière sur la nécrose bactérienne de

la vigne. Editions du Castillet, Perpignan, France.

Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Alloing, G., Hakenbeck, R. (1992) A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. Nuc Acids Res 20:3479-3483.

Martín-Sanz, A, Pérez de la Vega, M, Murillo, J, Caminero, C. (2013) Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from pea are phylogenetically and pathogenically diverse. PhytoPathol 103:673-681.

Matthee, F.N., Heyns, A.J., Erasmus, H.D. (1970) Present position of bacterial blight (Vlamsiekte) in South Africa. Deciduous Fruit Grower 20:81-84.

Minsavage, G.V., Thompson, C.M., Hopkins, D.L., Leite, R.M.V.B.C., Stall, R.E. 1994) Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. Phytopatology 84:456-461.

Mondal, K.K. and Mani, C. (2009) ERIC-PCR-generated genomic fingerprints and their relationship with pathogenic variability of *Xanthomonas campestris* pv. *punicae*, the incident of bacterial blight of Pomegranate. Curr Microbiol 59:610-620.

Morales, M., Bru, R., Gracia-Carmona, F., Ros Barceló, A., Pedreño, M.A. (1998) Effect of dimethyl-ß-cyclodextrins on resveratrol metabolism in Gamey grapevine cell cultures before and after inoculation with *Xylophilus ampelinus*. Plant Cell Tissue Organ Culture 53:179-187.

Nakaune, R., Nakano, M. (2006) Efficient methods for sample processing and cDNA synthesis by RT-PCR for the detection of grapevine viruses and viroids. J Virol Meth 134:244-249.

Panagopoulos, C.G. (1969) The disease "Tsilik marasi" of grapevine: its

description and identification of the casual agent (*Xanthomonas ampelina* sp. Nov.). Annales de l'Institut phytopathologique Benaki 9:59-81.

Panagopoulos, C.G. (1987) Recent research progress on *Xanthomonas ampelina*. EPPO Bull 17:225-230.

Parker, J.K., Havird, J.C., De La Fuente, L. (2012) Differentiation of *Xylella fastidiosa* Strains via Multilocus Sequence Analysis of Environmentally Mediated Genes (MLSA-E). Appl Environ Microbiol 78:1385-1396.

Pearson, R.C. and Austin C. (ed) (1998) Compendium of Grape Disease, pp17-18, 34-35. APS Press, St Paul (US).

Peros, J.P., Berger, G., Ridé, M. (1995) Effect of grapevine cultivar, strains of *Xylophilus ampelinus* and culture medium on in vitro development of bacterial necrosis. Vitis 34:189-190.

Prunier, J.P., Ridé, M., Lafon, R., Bulit, J. (1970) La nécrose bactérienne de la vigne. Comptes rendus de l'Academie d'Agriculture de France 56:975-982.

Psallidas, P.G. and Argyropoulou, A. (1992) Effect of hot water treatment on *Xylophilus ampelinus* in dormant grape cuttings. Proceeding of the 8th international conference on plant pathogenic bacteria.

Rademaker, J.L.W., Louws, F.J., de Bruijn, F.J. (2000) Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. Int J Syst Evol Microbiol 50:665-677.

Rademaker, J.L.W., Louws, F.J., Schultz, M.H., Rossbach, U., Vauterin, L., Swings, J., de Bruijn, F.J. (2005) A Comprehensive Species to Strain Taxonomic Framework for *Xanthomonas*. PhytoPathol 95:1098-1111.

Ravaz, L. (1986) La maladie d'Oléron. Annales de l' École Ntionale d'Agriculture, Montpellie 9:299-317 .

Ridé, M. (1984) La nécrose bactérienne. Phytoma 362:33-36.

Ridé, M. (1996) La nécrose bactérienne de la vigne: données biologiques et épidémiologiques, bases d'une strategie de lutte. C.R. Acad. Agric. France 82:31-50.

Ridé, M. (2000) Bactérioses de la vigne. In: Ridé M, Boudon-Padieu E, and Walter B (ed) Maladies à virus, bactéries et phytoplasmes de la vigne. Edition Féret, Bordeaux, France, pp 77-118.

Ridé, M. and Marcelin, H. (1983) Connaissances actuelles la necrose bacterienne de la vigne. Bull Tech.Pyrénées Orientales. 106:5-45.

Ridé, M., Ridé, S., Novoa, D. (1977) Donnes nouvelles sur la biologie de *Xanthomonas ampelina* Panagopoulos, agent de la necrose bacterenne de la vigne. Annales de Phytopathologie 9, 87.

Rosenberg, M.S., Garrett, K.A., Su, Z., Bowden, R.L. (2004) Meta-analysis in plant Pathol: synthesizing research results. PhytoPathol 94:1013-1017.

Rowhani, A., Chay, C., Golino, D.A., Falk, B.W. (1993) Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of grape fan leaf virus in grapevine tissue. PhytoPathol 83:749-753.

Sahin, F., Abbasi, P.A., Ivey, M.L.L., Zhang, J., Miller, S.A. (2003) Diversity among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* from lettuce. PhytoPathol 93:64-70.

Sarejani, J.A. (1939) Une maladie chronique de la vigne en Céter: le "Tsilik Marasi". Annales de l'Institut phytopathologique Benaki 3:31-39.

Sawada, H., Kunugi, Y., Watauch,i K., Kudo, A., Sato, T. (2011) Bacterial spot, a new disease of grapevine (Vitis vinifera) caused by *Xanthomonas arboricola* (in Japanese). Jpn J Phytopathol 77:7-22.

Sawada, H., Kunugi, Y., Watauch,i K., Kudo, A., Sato, T. (2011) Polyphasic comparison of bacterial spot pathogen of grapevine (*Xanthomonas arboricola*) with that of stone fruits (*X. arboricola* pv. *pruni*) (in Japanese). Jpn J Phytopathol 77:265-277.

Serfontein, S., Serfontein, J.J., Botha, W.J., Staphorst, J.L. (1997) The isolation and characterization of *Xylophilus ampelinus*. Vitis 36:209-210.

Sevillano, S., Cobos, R., Gacía-Angulo, P., Alonso-Monroy, A., Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez-Pérez, J.M., Olego, M.A., Acebes, K.L., Garzón, E., Coque, J.J.R. (2014) Maganese transportet protein MntH is required for virulence of *Xylophilus ampelinus*, the causai agent of bactrerial necrosis in grapevine. Australian J Grape and Wine Research 20:442-450

Shinmura, A., Horita, H., Inagawa, Y. (2012) Occurrence of Bacterial Blight of Grapevine caused by *Xylophilus ampelinus* in Japan (abst. in Japanese). Jpn J Phytopathol 78:60.

Smith, I.M., McNamara, D.G., Scott, P.R. (1996) Data Sheets on Quarantine Pests: *Xylophilus ampelinus*. European Plant Pest Organization: Prepared by CABI and EPPO for the EU under Contract 90/399003.

Starr, M.P., Jenkins, C.L., Busset, L.B., Andrewes, A.G. (1977) Chemotaxonomic significance of the xanthomonadins, novel brominated aryl-polyene pigments produced by bacteria of the genus *Xanthomonas.* Arch Microbiol 113:1-9.

Suzaki, K. and Sato, Y. (2014) Outbreak of bacterial blight on grapevine of table grapes in Akita prefecture (in Japanese). Ann Pept Plant Prot N Jpn 65:120-124.

Suzaki, K. and Sato, Y. (2014) Development of semiselective media for the

pathogen of bacterial blight of grapevine (abst. in Japanese). Jpn J Phytopathol 80:325.

Tango T (ed) (2002) Guide book of Meta-analysis (in Japanese). Asakura-Shoten, Tokyo.

Versalovic, J., Lupski, J.R., Schneider, M., De Bruijn, F.J. (1994) Genomic Fingerprinting of Bacteria Using Repetitive Sequence-Based Polymerase Chain Reaction. Methods Mol Cell Biol 5:25-40.

Visser M, Stephan D, Jaynes JM and Burger JT, 2012. A transient expression assay for the in planta efficacy screening of an antimicrobial peptide against grapevine bacterial pathogens. Letters in Appl Microbi 54: 543–551.

Whitaker, R.J., Byng, G.S., Gherna, R.L., Jensen, R.A. (1981) Comparative allostery of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthetase as an indicator of taxonomic relatedness in pseudomonad genera. J Bacterol 145:752-759.

Whitaker, R.J., Byng, G.S., Gherna, R.L., Jensen, R.A. (1981) Diverse Enzymological Patterns of Phenylalanine Biosynthesis in Pseudomonads Are Conserved in Parallel with Deoxyribonucleic Acid Homology. J Bacterol 147:526-534.

Willems, A., Gillis, M., Kersters, K., Van Den Broecke, L., De Ley, J. (1987) The taxonomic position of *Xanthomonas ampelina*. EPP Bull 17:237-240.

Willems, A., Gillis, M., Kersters, K., Van Den Broecke, L., De Ley, J. (1987) Transfer of *Xanthomonas ampelina* Panagopoulos 1969 to a new genus, *Xylophilus* gen. nov., as *Xylophilus ampelinus* (Panagoulos 1969) comb. nov. J Sys Bacteriol 37:422-430.

Zanzotto, A., Gardiman, M., Serra, S., Bellotto, D., Bruno, D., Greco, F.,

Trivisano, C. (2013) The spatiomporal spread of esca disease in a *Cabernet Sauvignon* vineyard: a statistical analysis of field data. Plant Pathol 62:1205-1213.

謝　辞

本研究の取りまとめにあたり，終始懇切なご指導とご鞭撻をいただいた北海道大学大学院農学院生物資源科学科教授近藤則夫博士に深く感謝いたします．また，ご校閲を賜った北海道大学大学院生物資源科学科教授増田清博士，講師秋野聖之博士に深く感謝いたします．

北海道立総合研究機構上川農業試験場新村昭憲主査，同中央農業試験場研究主幹堀田治邦博士には本病原菌の同定，菌株の分離など，北海道における本研究の礎を築いていただいたことに感謝します．

北海道立総合研究機構道南農業試験場長田中文夫博士，同中央農業試験場清水基滋病虫部長，五十嵐俊成博士からは本研究の遂行にあたりご協力いただくとともに多くのご助言をいただきました，中でも同中央農業試験場齊藤美樹博士には論文作成にあたって多大なご助力を賜り，ご助言とご指導をいただいたことに心より感謝します．

北海道立総合研究機構上川農業試験場稲川裕研究主幹，同中央農業試験場内田哲嗣主査，池永充伸研究主任，北海道庁技術普及課小坂善仁主任普及指導員には，各種調査にご協力いただくとともに果樹栽培を取り巻く情勢や醸造用ブドウに関するさまざまな知見を教えていただきました．

後志農業改良普及センター北後志支所黒川晃次支所長，吉岡美絵主査，渡邉智昭専門普及指導員，小島光利普及職員，後志

農業改良普及センター戸川浩主任普及指導員，上川農業改良普及センター富良野支所今井望専門普及指導員には現地試験の実施にあたり連絡調整や情報提供にご尽力いただきました，中でも現十勝農業改良普及センター十勝東北部支所清水理沙専門普及指導員には本病と最初に出会う機会を作っていただきました．

余市町弘津敏さん，弘津雄一さん，余市町廣瀬一也さん，富良野市ぶどう果樹研究所のみなさん，富良野市一藁英行さんには，貴重な園地を試験に使わせていただき，本研究の実施にご協力いただきました．みなさまに心より感謝の意を表します．

最後に，本研究に取り組むにあたり支えとなってくれた妻・美樹と娘・詩子に感謝します．

図版説明

図版 1

A. ブドウつる割細菌病が発生した葉の初期病斑「ケルナー」

B. ブドウつる割細菌病が発生した葉の後期病斑「ニューヨークマスカット」

C. ブドウつる割細菌病が発生した新梢のかいよう症状「ケルナー」

図版 2

A. ブドウつる割細菌病菌の培養形態（普通寒天培地，25℃，10 日間）

B. ブドウつる割細菌病菌の培養形態拡大図（スケールバー：1cm）

C. ポット苗に接種した際に現れた病斑「ケルナー」

D. ポット苗に接種した際に現れた病斑「ケルナー」

E. 園地において接種した際に現れた病斑「ツヴァイゲルトレーベ」

F. 園地において接種した際に現れた病斑「セイベル 5279」

図版 3

「ケルナー」葉への有傷接種による病原力試験の結果

A. Control（20%グリセリン水）

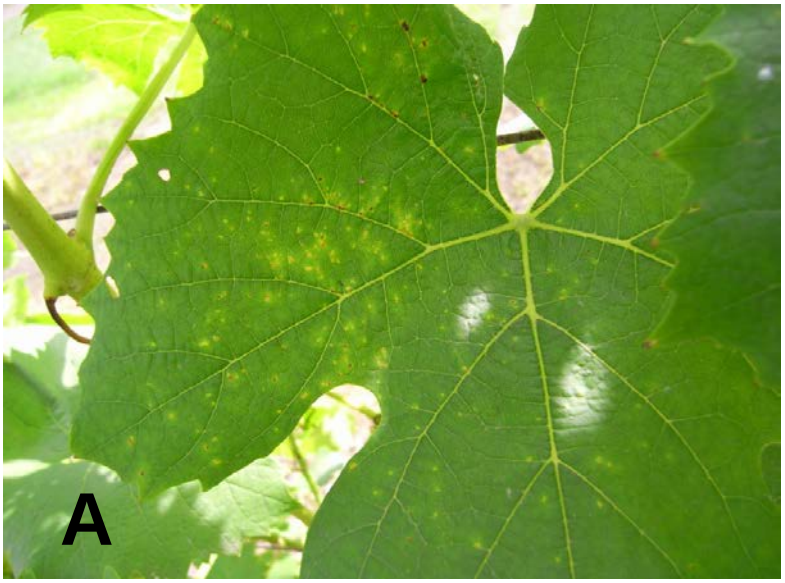
B. CFBP1926

C. CFBP5787

D. BB-5

E. F-7

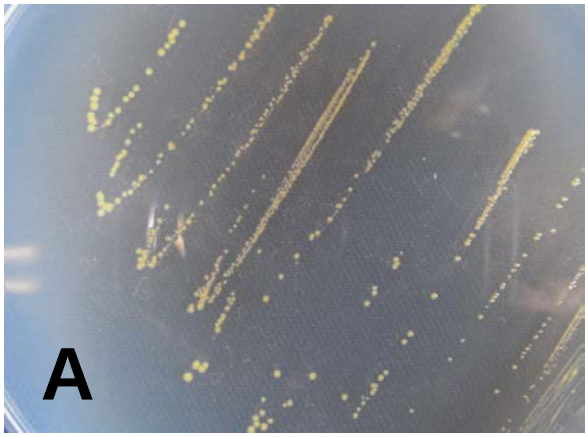
図版1

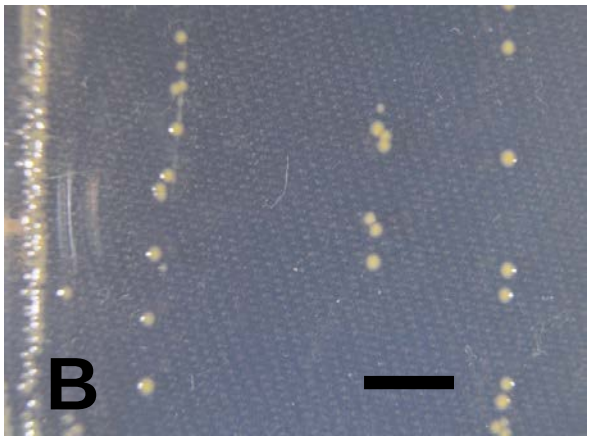






図版2













図版3

