

平成27年度(第12回)日本学術振興会賞・日本学士院学術奨励賞受賞

植物病害ブドウ根頭がんしゅ病の生物的防除法の開発 前編「新規拮抗細菌 ARK-1 株の発見から研究,そして 実用化に向けた展望」

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
西日本農業研究センター (前:岡山県農林水産部)

川口 章 (かわぐち あきら)

はじめに

ブドウ根頭がんしゅ病は、植物病原細菌 *Rhizobium vitis* (Ti) (= *Agrobacterium vitis* (Ti), *A. tumefaciens* biovar 3; 以下、学名表記はCシステム(澤田ら, 2007; 2015)に従う。Tiは植物にがんしゅを形成させる能力を有する“根頭がんしゅ病菌”であることを示す)によって植物の根や茎等にごんしゅ(癌腫)と呼ばれるこぶを形成する土壌病害(図-1)で、世界中で発生している。

本病の被害は樹勢の低下、果実品質の劣化、がんしゅ形成部位より上部の生育不良、枯死等があり、特に3年生までの苗木、若木では症状が見られた翌年に枯死することが多い(BURR et al., 1998)。病原細菌は土壌中のブドウ残渣内に少なくとも2年間は生存可能であることから(BURR et al., 1998)、発病樹を改植する際は、できるだけ残渣を取り除くことが求められるが、その完全な除去は不可能である。圃場の大きさや位置等の関係上、定植場所を大幅に変える訳にはいかないので、改植時に発病樹と同じ場所に定植する場合が多い。現在の技術では改植場所だけに限定して土壌消毒を行うことも極めて困難である。そのため、新しい苗木を改植しても再び発病してしまう、という悪循環を続けている。

本病は日本だけでなく世界のブドウ生産国で問題となっている。特に、海外ではワインの原料として、ワイン

用ブドウ品種の生産が活発である。我が国における本病による経済的被害の正確な統計はないが、カナダのオンタリオ州では本病の発生によりワイン用ブドウで毎年約200万ドルの経済損失を被っているという統計がある(University of Guelph, 1999)。また、米国のバージニア州では2014年に本病が大発生し、今も多くのワイナリーで甚大な被害が出ている(NITA, 2014)。さらに日本においても、近年、東日本を中心にブドウ根頭がんしゅ病の発生および被害が再び増加してきており、防除対策の確立が望まれている。

これまで、植物根頭がんしゅ病の病原細菌として複数種が報告されており、そのうち *R. radiobacter* (Ti) (= *A. tumefaciens* (Ti), *A. tumefaciens* biovar 1) と *R. rhizo-*



図-1 ブドウ根頭がんしゅ病の症状

Development for the Biological Control Method of Grapevine Crown Gall. The First Volume: Discovering the New Antagonistic *Rhizobium vitis* Strain Named ARK-1, Research and Prospects for the Future. By Akira KAWAGUCHI

(キーワード:ブドウ根頭がんしゅ病, 非病原性 *Rhizobium vitis*, 生物的防除)

genes (Ti) (= *A. rhizogenes* (Ti), *A. tumefaciens* biovar 2) の宿主範囲が非常に広く、93 科 643 種以上の双子葉植物に寄生性があるとされている (後藤, 1990)。世界中で発生しているが、卓効を示す化学農薬はない。生物防除技術の開発は古くから取り組まれており、非病原性 *R. rhizogenes* (= *A. radiobacter* biovar 2) K84 株によるバラ根頭がんしゅ病の生物防除は世界的に有名である (KERR, 1980)。日本でもその防除効果が実証されており (牧野, 1986)、微生物農薬アグロバクテリウム・ラジオバクター剤として市販されている。しかし、*R. vitis* (Ti) は K84 株が産生する抗菌物質であるアグロシン 84 に対して耐性があるため、K84 株はブドウ根頭がんしゅ病には防除効果がない (BURR et al., 1998; KAWAGUCHI et al., 2005; 2007; 2008 a)。これまで世界中の研究者がブドウ根頭がんしゅ病に対する拮抗細菌の探索を行ってきたが、実用化された菌株はいまだ存在しない (WEBSTER and THOMSON, 1986; BURR and REID, 1994; BURR et al., 1997; BURR and OTTEN, 1999; LI et al., 2009)。以上のことから、ブドウ生産現場では発病を防ぐ有効な手段がないのが現状である。

本稿では、日本で発見された新規拮抗細菌を用いたブドウ根頭がんしゅ病の生物的防除法の開発を目的とした菌株の発見から圃場試験、開発の今後の展望について紹介する。なお、本稿の詳細なデータについては既に論文として発表している (KAWAGUCHI et al., 2005; 2007; 2008 a ;

2008 b ; 川口, 2009 ; KAWAGUCHI, 2011 ; KAWAGUCHI et al., 2012 ; KAWAGUCHI and INOUE, 2012 ; KAWAGUCHI, 2013 ; 2014 ; 2015 ; KAWAGUCHI et al., 2015) ので、併せて参照いただければ幸いである。

I 有望菌株の選抜

2002 ~ 06 年にかけて、筆者らは岡山県内のブドウ苗木を生産するための母樹および商品として流通しているブドウ苗木について本病の診断を行ったところ、それらサンプルからがんしゅ形成能を欠く非病原性 *R. vitis* を分離、同定した。これらの菌株のうち、病原性菌と混合して検定植物であるトマト苗の茎に接種した際、がんしゅ形成が起こらない組合せがあった。このことから、非病原性 *R. vitis* の菌株の中にはがんしゅ形成 (発病) 抑制効果を有する菌株が存在する可能性が示唆された。そこで分離された非病原性菌 306 菌株の一部について、生物防除に有望な菌株の選抜を行った。*R. vitis* (Ti) と非病原性 *R. vitis* の各菌株をそれぞれ等量で混合し (混合比率 1:1, 菌濃度 10^8 cells/ml), 播種 1 か月後のトマト苗 (品種: 'ポンデローザ') およびブドウ 1 年生実生苗 (ネオ・マスカット) の茎に単刺有傷接種してがんしゅ形成の有無および程度を調べた (以下、等量混合接種試験とする)。その結果、発病抑制効果の高い VAR03-1 株を選抜した。

その後、VAR03-1 株のブドウその他の植物に対する



図-2 ブドウ実生苗を用いたブドウ根頭がんしゅ病菌と非病原性菌の混合接種
病原細菌のみを接種したブドウ苗 (A) および病原細菌と ARK-1 株を等量混合して
接種したブドウ苗 (B)。白い矢印は形成されたがんしゅを示す。

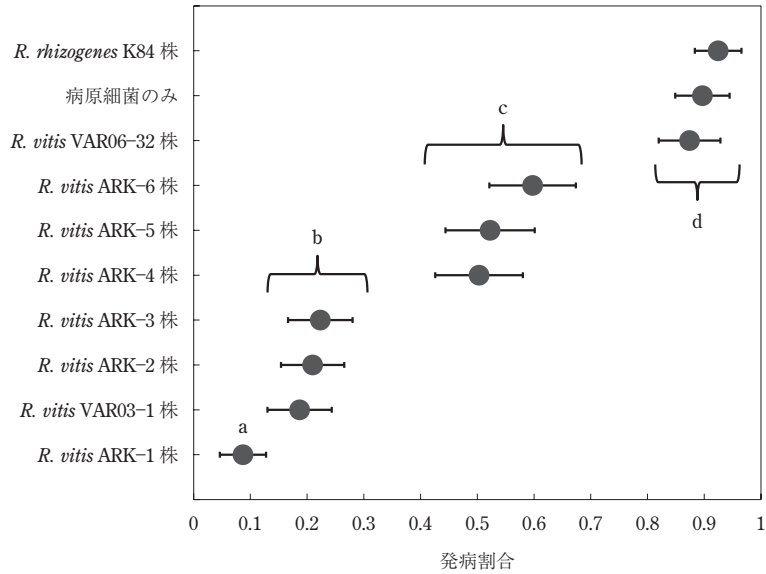


図-3 ブドウ実生苗を用いたブドウ根頭がんしゅ病菌と非病原性菌の混合接種による発病割合の比較
異英文字間はRyan検定により有意差あり ($p < 0.05$). バーは95%信頼区間を示す。

防除効果を明らかにしてきたが (KAWAGUCHI et al., 2005 ; 2007 ; 2008 a ; 2012), さらに防除効果が高く, より安定した新たな菌株の探索も同時に進めていた。その結果, VAR03-1 株とは異なる 6 菌株 (ARK-1 ~ ARK-6) について発病抑制効果が認められた (図-2, 3, 代表的な菌株のデータのみ記載)。これら 6 菌株は, VAR03-1 株より効果の劣るグループ (ARK-4 ~ ARK-6), 効果が同程度のグループ (ARK-2, ARK-3) と, 効果が優れている ARK-1 株に分けることができた。以上より, ARK-1 株を新規拮抗細菌として選抜した。本来, 拮抗微生物を用いた病害の生物防除では, 拮抗微生物を予防的に植物に接種, 定着させるのはもちろんのこと, 自然界で想定される病原菌の密度よりも 10 ~ 100 倍以上高い濃度で処理することが多い。今回の選抜試験では, 病原菌と同濃度, 等量でかつ同時に植物に接種するという非常に厳しい条件で行ったにもかかわらず, 安定的な発病抑制効果を持つ菌株が選抜されたことは, その後の防除試験においても高い効果が期待できると考えられた。

また, *R. vitis* (Ti) は必須遺伝子の塩基配列の違いから, 少なくとも 5 つ (A ~ E) の遺伝子型 (Genotype) に類別され, 日本には主に A および B グループの菌が広く分布している (KAWAGUCHI et al., 2008 b ; KAWAGUCHI, 2011)。このため, それぞれの遺伝子型に属する代表的な *R. vitis* (Ti) 5 菌株を用いて混合菌液を作成し, 前述のブドウ実生苗による等量混合接種試験を行った。その

結果 ARK-1 株はやはり発病を強く抑制したことから, ARK-1 株は現在知られている *R. vitis* (Ti) の主要な系統の菌株に対して効果があることが示唆された。

II 圃場試験における防除効果

拮抗微生物の効果に関する実験室レベルでの報告は現在でも非常に多いが, 圃場レベルでの安定的な効果となると報告数は少ない。その中から生物農薬となって登録, 市販されるものはさらに少ないのが現状である。筆者は圃場での防除効果について, 岡山県農林水産総合センター農業研究所内の三つの異なる実験圃場で防除効果を検討した。処理方法は苗木の根を ARK-1 菌液 (約 10^8 cells/ml) に浸漬する方法で行った。浸漬処理の後, 4 月ごろに上記圃場に定植し, 約 10 ~ 12 か月後に掘り起こして発病の有無を調査した。試験は 2009 ~ 13 年に合計 9 回に分けて実施した。得られたデータはメタアナリシスによって評価した。その結果, ARK-1 株処理区で高い防除効果が認められた (図-4, 統合リスク比 0.18)。また, 本試験以外に他の研究機関で実施された ARK-1 株の圃場試験でも安定した防除効果を示したことから, *R. vitis* (Ti) が感染していない健全なブドウ苗木に対して ARK-1 株を定植前に処理することによって本病害を予防できることが明らかとなり, 今日まで防除が困難であった本病の生物防除技術を確立するための基礎が築けたものと考えられた。

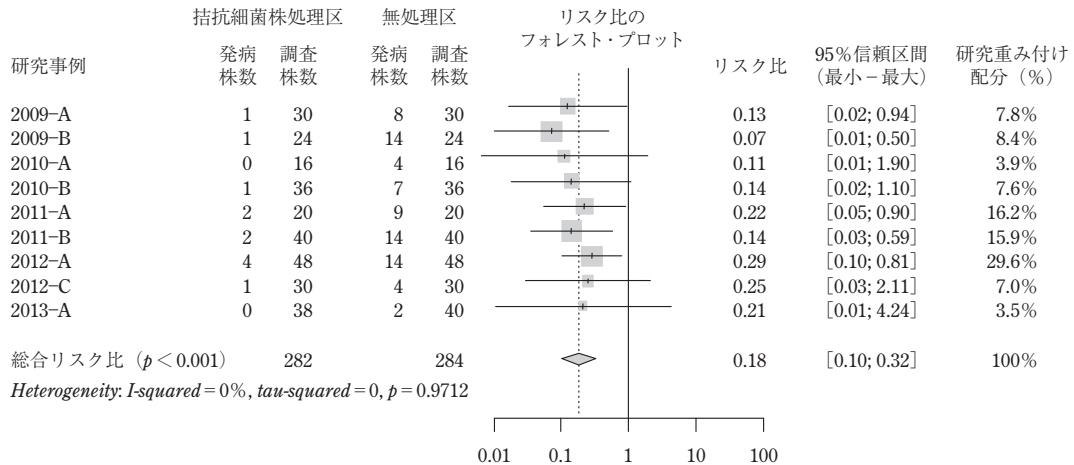


図-4 ブドウ根頭がんしゅ病に対する防除効果 (圃場試験)
それぞれ独立して実施した防除試験 9 事例を変量効果モデル統合方法である DerSimonian-Laird method で解析し、ARK-1 株処理区と無処理区の発病割合の比をリスク比とした。無処理区に対する統合リスク比は 0.18 ($p < 0.001$)。

さらに ARK-1 株は、ブドウに発生する根頭がんしゅ病だけでなく、リンゴ、モモ、ナシ等の根頭がんしゅ病に対しても高い防除効果を示すことを圃場試験で確認しており、ブドウだけに限らず、様々な植物への応用も期待される (KAWAGUCHI et al., 2015)。

III ブドウ根部での定着性

拮抗微生物が高い効果を発揮し、かつその効果を持続させるためには、処理した環境、植物に親和性を有し、効果を発揮するために必要な菌量を保持したまま定着することが求められる。特に、果樹などの永年性作物の場合は防除効果の持続性が重要となることから、ブドウの根における ARK-1 株の定着性について検討した。ブドウ 2 年生苗 (穂木: ピオーネ, 台木: テレキ 5BB) の根部を ARK-1 sc 株 (ストレプトマイシンと硫酸銅に対する耐性を獲得させた ARK-1 変異株) の菌液 (2×10^8 cells/ml) に 1 時間浸漬処理した後ポットに定植して温室で管理し、定期的に 8 株ずつ掘り取って根部に接種された ARK-1 sc 株の菌数を希釈平板法で検出した。その結果、根の表面から分離される菌は接種 24 か月後にはほぼ検出限界まで低下したのに対し、根の内部から分離される菌は接種 18 か月まで緩やかに菌数が低下し、24 か月後でも約 10^5 CFU/g 根の菌数が検出された (図-5)。ARK-1 は根の内部で長期間生存できると考えられ、一種の内生細菌である可能性が示唆された。

IV ユニークな拮抗作用機構の解明に向けて

ARK-1 株の拮抗作用機構についてはまだ不明な点が

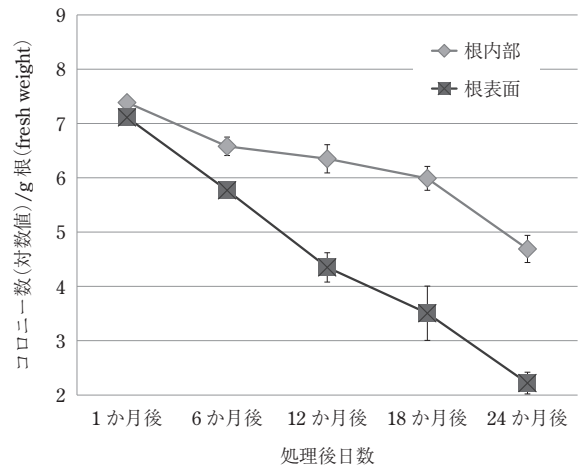


図-5 ARK-1 株のブドウ根部に対する定着性
バーは標準誤差を示す。

多いものの、一部興味深いメカニズムが明らかになってきている。

ARK-1 株をオートクレーブで滅菌した菌液 (菌体、培養物含む) や、液体培養後の上清 (フィルター滅菌して菌体を除去) では、ブドウへの等量混合接種において全く防除効果が認められないことから (KAWAGUCHI and INOUE, 2012)、防除には ARK-1 株の生きた菌体そのものが必要であると考えられた。また、ARK-1 株と *R. vitis* (Ti) をブドウに等量混合接種すると、接種部位において、接種 1~5 日後までは両菌株とも同じように増殖するが、その後 *R. vitis* (Ti) の菌数は ARK-1 株の 1/10 程度に減少していくことが明らかになった (KAWAGUCHI, 2014)。

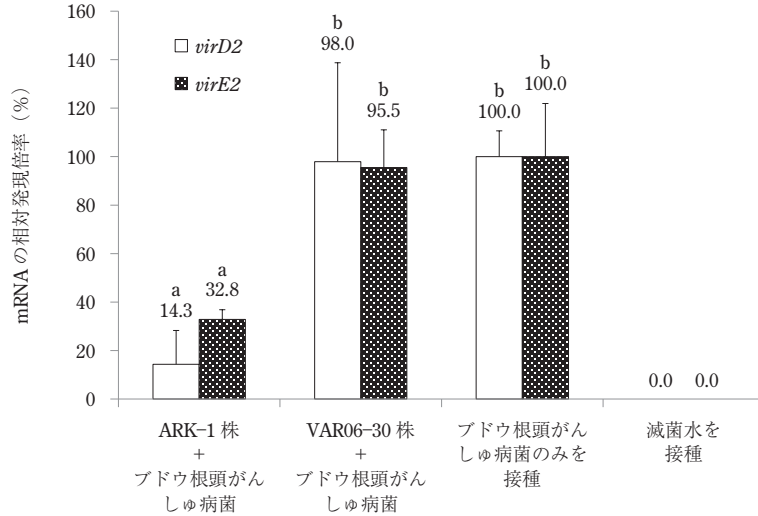


図-6 ブドウ体内における根頭がんしゅ病菌の病原関連遺伝子の発現 (接種1日後)
ブドウ根頭がんしゅ病菌 (*R. vitis* (Ti)) の単独接種時の発現量を100%とした相対比較。VAR06-30株は拮抗能力を有しない非病原性*R. vitis*。エラーバーは標準偏差。異なる英文字間には有意差 ($p < 0.05$) あり (Tukey HSD test)。

このように、ARK-1株はブドウ体内で*R. vitis* (Ti) を完全に駆逐しないにもかかわらず、非常に高い防除効果を発揮するという現象から、ARK-1株はこれまで知られているような抗菌物質による病原菌の抗菌/静菌作用とは異なる、新しい拮抗作用機構を有するのではないかと考えた。そこで、「ARK-1株は*R. vitis* (Ti) の病原性の発現を抑制する」という仮説を立てた。

ARK-1株と*R. vitis* (Ti) をブドウ実生苗の主幹部に等量混合接種した際の接種部位における*R. vitis* (Ti) の病原性関連遺伝子群 (*vir* 領域) の発現量を測定した。接種部位のブドウ主幹部の組織から抽出した全RNAを鋳型とし、RT-qPCRによって*vir* 領域内の*virD2*と*virE2*の発現量を定量した結果、ARK-1株を混合した接種部位の発現量は、*R. vitis* (Ti) 単独接種における発現量の1/3~1/7まで低下していた (図-6, KAWAGUCHI, 2015)。対照として、拮抗能力を有しない非病原性*R. vitis* VAR06-30株でも同じ試験を行ったが、こちらは*virD2*と*virE2*の発現量を低下させることはなかった (図-6, KAWAGUCHI, 2015)。以上より、ARK-1株の拮抗作用機構には、短期的には*R. vitis* (Ti) の*vir* 領域の発現抑制が、長期的には*R. vitis* (Ti) の増殖抑制が関与すると考えられた。

このように、ARK-1株の拮抗作用機構について一定の知見を得ることができたが、ARK-1株による植物の病害抵抗性誘導や、他の*vir* 領域の発現への影響、それらの性能に関係する新規遺伝子の存在等、まだまだ不明

な点が多い。今後も様々な観点から研究を進めていき、防除作用機構の解明を目指したい。

V 実用化に向けて

拮抗微生物を利用した生物的防除技術を一般に普及させるためには、我が国では農林水産省による農薬登録が必須になり、そのためには、農業生産者が使える「製剤」にする必要がある。ここで問題になるのが、拮抗微生物が製剤の形に加工されたときの「保存安定性」である。微生物を粉状または液体の状態にしたときに、その工程で生存菌数が大きく低下するような場合、工業的に製造することが困難になり、製剤の品質を担保することができない。また、製剤が完成してから農業生産者が使用するまでの間に、製剤中の生存菌数が品質保証を超えて著しく低下することもあってはならない。今後、生物的防除の研究を実用化まで持っていくためには、研究の段階において、防除効果だけでなく拮抗微生物の保存安定性について調べておくことが重要になる。

ARK-1株については今回紹介した内容以外にも、実用化に向けた必要なデータの蓄積を行っており、良好なデータが得られつつある。農薬登録が完了して農業生産者が実際に使えるようになるまでには、もうしばらくの月日を必要とするだろうが、それに向かって着実に前進していることをお伝えしておきたい。

おわりに

世界的にブドウは生食用、醸造用として非常に重要な品目であるため、本病に対する防除のニーズは世界中にある。世界的には特に醸造用のニーズが大きい。米国 (NITA, 2014) やカナダ (University of Guelph, 1999) を始めとして、世界中のワイン産業で本病の防除対策が切望されている。

世界における本病の生物防除研究について見てみると、本研究のようにブドウ主幹部を用いた接種試験でがんしゅ形成抑制効果が認められた拮抗細菌として非病原性 *R. vitis* F2/5 株 (BURR and REID, 1994; BURR et al., 1997) と非病原性 *R. vitis* E26 株 (LI et al., 2009) がある。しかし、いずれも圃場試験で安定した効果を示したという事例はなく、本病の防除においては我々の ARK-1 株が世界で最も実用化に近い位置に立っており、本研究分野で先駆的な役割を果たしている。今後も新規拮抗微生物の選抜が世界中で行われるであろう。

本菌株は健全な苗木に予防的に処理し、発生圃場において発病を抑制することを目的とすべきである。つまり、*R. vitis* (Ti) は植物細胞を形質転換させて腫瘍化させるという発病機構であるため、形質転換が完了した細胞に対しては拮抗微生物を投与しても治療効果は期待できない。そのため、根頭がんしゅ病を発生させないように管理することが必要であり、発病樹が発見されたとしても、他の健全樹に感染が拡大しないように、未発病の樹に灌注処理などで ARK-1 株を導入していくような方法も今後検討していく必要がある。

土壌病害には効果のある化学農薬が少なく、土壌消毒

には高い導入コストを必要とする場合が多い。その点からも、生物防除は土壌病害に対する有効な手段として期待され続ける存在だと言える。筆者らが取り組んでいる本研究が、ブドウ根頭がんしゅ病に対する世界初の有効な防除技術として、農業生産者が実施可能な形にするために、今後も実用化に向けた活動を継続していきたい。

引用文献

- 1) BURR, T. J. and C. L. REID (1994): *Amer. J. Enol. Vitic.* **45**: 213 ~ 219.
- 2) ——— et al. (1997): *Phytopathology* **87**: 706 ~ 711.
- 3) ——— et al. (1998): *Plant Dis.* **82**: 1288 ~ 1297.
- 4) ——— and L. OTTEN (1999): *Annu. Rev. Phytopathol.* **37**: 53 ~ 80.
- 5) 後藤正夫 (1990): 植物細菌病学概論, 養賢堂, 東京, p.128 ~ 134.
- 6) KERR, A. (1980): *Plant Dis.* **64**: 25 ~ 30.
- 7) KAWAGUCHI, A. et al. (2005): *J. Gen. Plant Pathol.* **71**: 422 ~ 430.
- 8) ——— et al. (2007): *ibid.* **73**: 133 ~ 138.
- 9) ——— et al. (2008 a): *Phytopathology* **98**: 1218 ~ 1225.
- 10) ——— et al. (2008 b): *Plant Pathol.* **57**: 747 ~ 753.
- 11) 川口 章 (2009): 植物防疫 **63**: 135 ~ 139.
- 12) KAWAGUCHI, A. (2011): *J. Gen. Plant Pathol.* **77**: 299 ~ 303.
- 13) ——— et al. (2012): *ibid.* **78**: 287 ~ 293.
- 14) ——— and K. INOUE (2012): *J. Phytopathol.* **160**: 509 ~ 518.
- 15) ——— (2013): *Microbe. Environ.* **28**: 306 ~ 311.
- 16) ——— (2014): *ibid.* **29**: 296 ~ 302.
- 17) ——— et al. (2015): *Plant Dis.* **99**: 409 ~ 414.
- 18) ——— (2015): *Euro. J. Plant Pathol.* **142**: 789 ~ 799.
- 19) LI, J. Y. et al. (2009): *J. Phytopathol.* **157**: 159 ~ 165.
- 20) 牧野孝宏 (1986): 植物防疫 **40**: 540 ~ 546.
- 21) NITA, M. (2014): *Grape Press, Virginia Vineyards Association, Waterford, VA*, p.11 ~ 12.
- 22) 澤田宏ら (2007): 日本微生物資源学会誌 **23**: 95 ~ 99.
- 23) ———ら (2015): 植物防疫 **69**: 106 ~ 112.
- 24) University of Guelph (1999): *ScienceDaily*. <<http://www.science-daily.com/releases/1999/05/990506153806.htm>>
- 25) WEBSTER, J. and J. A. THOMSON (1986): *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 217 ~ 219.