

土壤病害ブドウ根頭がんしゅ病の生物的防除法の開発

川口 章（岡山県農林水産総合センター農業研究所）

akira_kawaguchi@pref.okayama.lg.jp

ブドウ根頭がんしゅ病は *Rhizobium vitis* (Ti) による土壤病害であり、難防除病害として世界中で問題になっているが、これまで有効な防除手段がなかった。そこで、本病の防除に有望な拮抗細菌の探索とその効果について検討した。その結果、非病原性の *R. vitis* の中に根頭がんしゅ病の発病を抑制する能力を持つ特定の菌株群を発見した。それらの菌株群の中から、本病の発病を最も強く抑制する菌株として ARK-1 株を選抜した。この菌株の懸濁液にブドウ苗木の根を浸漬することによって、定植後の発病を強く抑制することを圃場レベルでの防除試験で明らかにした。今後は、本生物的防除法を実用化するため、ARK-1 株を用いた世界初のブドウ根頭がんしゅ病防除剤の開発を進めていく予定である。

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, 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などにがんしゅ（癌腫）と呼ばれる腫瘍を形成する土壤病害（図 1）で、世界中で発生している。本病の被害は成木では樹勢の低下、果実品質の劣化、がんしゅ形成部位より上部の生育不良、枯死等があり、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。しかしながら、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。そこで、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に関する研究を行った。



図 1. ブドウ根頭がんしゅ病の症状

1. 有望菌株の選抜

2002 年から 2006 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癌腫形成能を欠く非病原性 *R. vitis* を分離、同定した^{1,2)}。癌腫形成能を検定する植物として、トマトの幼苗を用いることが多い。これらの菌株のうち、病原性菌と混合してトマト苗の茎に接種した時に癌腫形成が起こらない組み合わせがあった²⁾。このことから、非病原性 *R. vitis* の菌株の中には癌腫形成（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 か月後のトマト苗およびブドウ 1 年生実生苗の茎に単刺有傷接種して癌腫形成の有無および程度を調べた。その結果、最も発病抑制効果の高い ARK-1 株を選抜した（図 2）^{13,14)}。本来、拮抗微生物を用いた病害の生物的防除では、拮抗微生物を予防的に植物に接種、定着させるのは勿論のこと、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。

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^{5,11)}、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。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¹³⁾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。

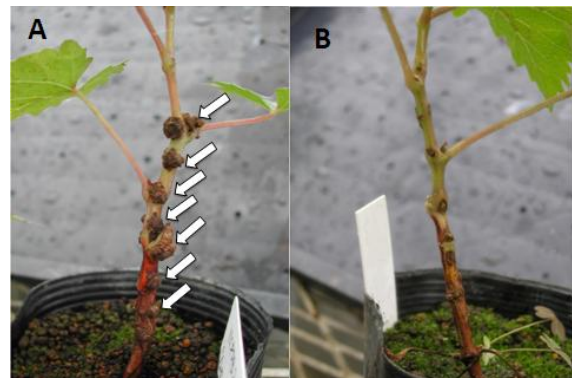


図2. ブドウ実生苗を用いたブドウ根頭がんしゅ病菌と非病原性菌の混合接種病原細菌のみを接種したブドウ苗(A)及び病原細菌とARK-1株を等量混合して接種したブドウ苗(B)。白い矢印は形成された癌腫を示す。

2. 根部浸漬処理による防除効果

土壌病害であるブドウ根頭がんしゅ病の防除に対して、定植前の健全な苗木の根部に菌液を予防的に処理する方法が考えられた。そこで、ARK-1株のブドウ根部への浸漬接種による効果を圃場で調べた。ARK-1株の菌液にブドウ苗の根を約1時間浸漬接種した後ただちに、*R. vitis* (Ti) 7菌株(前述の5菌株を含む)の菌液を混合して作成した汚染土を充填したポットに定植して温室で管理した。試験は4回行い、いずれも処理3ヶ月後に地上部および根の癌腫形成の有無を調査した。その結果、ARK-1株処理区で安定した発病抑制効果が認められた(平均発病抑制率85.2%)^{13,14)}。

3. 圃場レベルでの防除効果

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。圃場試験における処理方法は室内試験と同様に苗木の根を菌液に浸漬する方法で行った。浸漬処理の後、上記圃場に定植し、8か月~1年後に掘り起こして発病の有無を調査した。その結果、個々の試験にARK-1

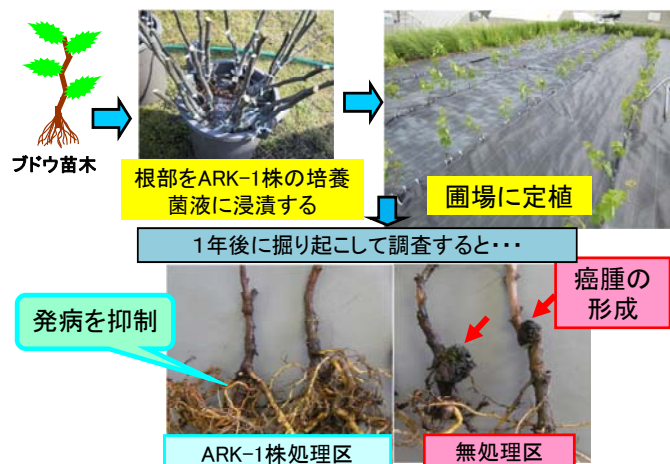


図3. ブドウ根頭がんしゅ病防除の圃場実証試験

株処理区で防除効果が認められた(図3)。しかしながら、土壌病害に対する防除や生物的防除の実証試験では、様々な環境要因によりデータがばらつくことが多いことから、同一の試験設計で実施された複数年における圃場試験5事例をメタアナリシス(Meta-Analysis)により統合評価し

た結果、ARK-1 株による浸漬処理をしたブドウは、無処理に比べて発病リスクが 0.12 倍（＝発病抑制率 88%）となることが明らかになった（図 4）。以上より、*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る。ブドウは生食用、醸造用として世界的に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と思われる。また、本菌株を含む本研究で得られた拮抗細菌の中にはブドウ以外の農作物に発生する根頭がんしゅ病にも効果が得られることから⁴⁾、幅広い農作物での応用についても今後検討して行く予定である。

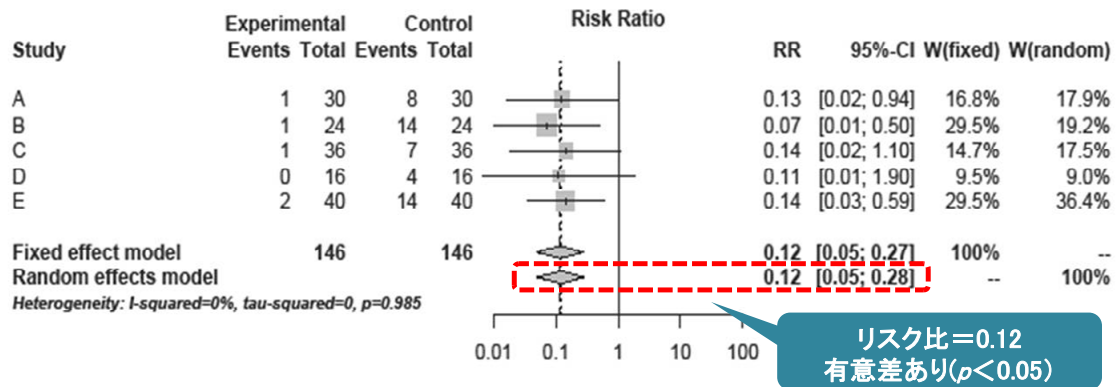


図 4. 圃場における実証試験のメタアナリシス (Meta-Analysis) による統合評価 (2009～2011, 圃場試験 5 事例, 統計ソフトウェア“EZR”による)

4. ブドウの根における定着性

拮抗微生物が高い効果を発揮し、且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。その結果、接種 12 か月後までは緩やかに菌数が約 10^6 CFU/g 根まで低下し、18 か月後には約 10^5 CFU/g 根の菌数が検出された^{13,14)}。現在、試験は継続しており、検出限界になるまで調査を続ける予定である。

5. おわりに

昨今の社会情勢における植物病害防除の研究では、生物防除に対する期待は非常に高いものがある。土壌病害には効果のある化学農薬が少なく、化学農薬と同等の効果を示す生物農薬も多いことから、生物防除は土壌病害に対する有効な手段であると言える。その中で土壌微生物が果たす役割は非常に大きい。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研究を行って参りたい。

謝辞

日本農学進歩賞の受賞にあたっては、日本土壌微生物学会から推薦を賜りました。日本土壌微生物学会の齋藤雅典会長、相野公孝副会長をはじめ、関係の先生方に心より感謝申し上げます。本研究を行うにあたり、共同研究者としてご指導、ご鞭撻を賜りました井上幸

次博士（岡山県農林水産総合センター農業研究所），那須英夫博士（元・岡山県農業総合センター農業試験場），澤田宏之博士（農業生物資源研究所），一瀬勇規博士（岡山大学教授）に心よりお礼申し上げます。岡山県農林水産総合センター農業研究所及び岡山大学の関係者の皆様，母校である九州大学の関係者の皆様，そしてご協力頂いた全ての方に深く感謝の意を表します。

主な研究業績（*：責任著者）

- 1) Kawaguchi A*, Sawada H, Inoue K, Nasu H (2005) Multiplex PCR for the identification of *Agrobacterium* biover 3 strains. *Journal of General Plant Pathology* 71:54-59.
- 2) Kawaguchi A*, Inoue K and Nasu H (2005) Inhibition of crown gall formation by *Agrobacterium radiobacter* biovar 3 strains isolated from grapevine. *Journal of General Plant Pathology* 71: 422-430.
- 3) Kawaguchi A*, Inoue K and Nasu H (2007) Biological control of grapevine crown gall by nonpathogenic *Agrobacterium vitis* strain VAR03-1. *Journal of General Plant Pathology* 73:133-138.
- 4) Kawaguchi A*, Inoue K and Ichinose Y (2008) Biological control of crown gall of grapevine, rose, and tomato by nonpathogenic *Agrobacterium vitis* strain VAR03-1. *Phytopathology* 98:1218-1225.
- 5) Kawaguchi A*, Sawada H and Ichinose Y (2008) Phylogenetic and serological analyses reveal genetic diversity of *Agrobacterium vitis* strains in Japan. *Plant Pathology* 57:747-753.
- 6) 川口 章* (2009) ブドウ根頭がんしゅ病の診断と生物的防除および病原細菌の系統解析に関する研究. *日本植物病理学会報* 75:155.
- 7) 川口 章* (2009) 非病原性 *Agrobacterium vitis* によるブドウ根頭がんしゅ病の生物的防除. *植物防疫* 63:135-139.
- 8) 川口 章* (2009) 岡山県で発生した *Rhizobium radiobacter* (Ti) によるブドウ根頭がんしゅ病. *植物防疫* 63:714-718.
- 9) Kawaguchi A*, (2009) Studies on the diagnosis and biological control of grapevine crown gall and phylogenetic analysis of tumorigenic *Rhizobium vitis*. *Journal of General Plant Pathology* 75:462-463.
- 10) Kawaguchi A*, Inoue K (2009) Grapevine crown gall caused by *Rhizobium radiobacter* (Ti) in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 75:205-212.
- 11) Kawaguchi A* (2011) Genetic diversity of *Rhizobium vitis* strains in Japan based on multilocus sequence analysis of *pyrG*, *recA* and *rpoD*. *Journal of General Plant Pathology* 77:299-303.
- 12) Kawaguchi A*, Kondo K and Inoue K (2012) Biological control of apple crown gall by nonpathogenic *Rhizobium vitis* strain VAR03-1. *Journal of General Plant Pathology* 78:287-293.
- 13) Kawaguchi A* and Inoue K (2012) New antagonistic strains of nonpathogenic *Agrobacterium vitis* to control grapevine crown gall. *Journal of Phytopathology* 160:508-518.
- 14) 川口 章*・井上幸次 (2012) 非病原性 *Rhizobium vitis* ARK-1 株によるブドウ根頭がんしゅ病の防除. *土と微生物* 66:51-54

Development of biological control for grapevine crown gall

Akira Kawaguchi (Research Institute for Agriculture, Okayama Prefectural Technology Center for
Agriculture, Forestry and Fisheries)
akira_kawaguchi@pref.okayama.lg.jp