

岡山県農業総合センター農業試験場 かわ川 ぐち口 あきら章

— 9 —

余りにも時間がかかると思い、いくつかのプレートについて、複数のコロニーをプレート上で混ぜた後にトマト幼苗の茎に有傷接種した。その結果、コロニー形状は明らかに病原細菌である *A. vitis* に酷似した菌でもがんしゅ形成が認められない場合があった。接種部位から菌を再分離し、得られた個々のコロニーを一つ一つトマトに接種すると、病原性を示す菌と示さない菌とに類別された。このことから、病原性を示さない非病原性菌の中に、病原細菌のがんしゅ形成を抑制する効果をもつ菌が存在すると考えた。トマトに病原性を示さない菌を収集し、ブドウ（品種：ネオ・マスカット）、ヒマワリ（品種：マンモス）でも病原性を調べたが病原性は認められなかった（KAWAGUCHI et al., 2005 b）。根頭がんしゅ病菌の主な病原因子である Ti プラスミド上にある病原性関連遺伝子の一つ *virC* を特異的に増幅するプライマーと、*A. vitis* に特異的な 16S rDNA の領域を増幅するプライマーを含むマルチプレックス PCR によるブドウ根頭がんしゅ病菌の簡易同定法（KAWAGUCHI et al., 2005 a）を用いて調べた結果、*virC* は増幅されず、種特異的領域のみ増幅が認められた（KAWAGUCHI et al., 2005 b）。さらに、細菌学的性質および 16S rDNA の全塩基配列を調べた結果を合わせて総合的に判断した結果、これらの菌を非病原性 *A. vitis* と同定した（KAWAGUCHI et al., 2005 b）。

II 有望菌株の選抜と発病抑制効果

1 トマト、ブドウ苗を用いた有望菌株の選抜

がんしゅ形成抑制効果のより高い菌株を選抜するため、ブドウ根頭がんしゅ病菌と非病原性 *A. 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）、トマト苗（ポンデローザ）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）。菌株によってがんしゅ形成抑制効果に違いが認められ、その中から最も高いがんしゅ形成抑制効果を示した VAR03-1 株を新規拮抗細菌として選抜した（図-2、表-1）。非病原性 *A. vitis* と同時にブドウから分離された非病原性 *A. tumefaciens* Ar-4 株や *Agrobacterium* sp. VAR03-24 株、あるいは、K84 株については、がんしゅ形成抑制効果は認められなかった（表-1）。VAR03-1 株はブドウ苗（ネオ・マスカット）の主幹部を用いた等量混合接種試験においても、ブドウ根頭がんしゅ病菌 G-Ag-27 株のがんしゅ形成を抑制した（KAWAGUCHI et al., 2005 b）。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

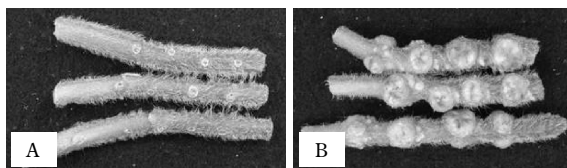


図-2 トマトにおける非病原性 *A. vitis* VAR03-1 株のがんしゅ形成抑制効果（接種 25 日後）

A : G-Ag-27 株と非病原性 *A. vitis* VAR03-1 株の混合菌液（混合比 1 : 1、菌濃度 10^8 cells/ml）を接種。
B : ブドウ根頭がんしゅ病菌 G-Ag-27 株（菌濃度 10^8 cells/ml）のみをトマト茎の 4 箇所単刺有傷接種。

表-1 トマト幼苗を用いたブドウ根頭がんしゅ病菌と非病原性菌株との混合接種によるがんしゅ形成抑制効果（KAWAGUCHI et al., 2005 b を一部改変）^{a)}

供試菌株	がんしゅ形成率 (%) ^{b)}
非病原性 <i>A. vitis</i> VAR03-1 株	0.8 a
非病原性 <i>A. vitis</i> VAR03-3 株	5.8 ab
非病原性 <i>A. vitis</i> VAR03-4 株	12.5 ab
非病原性 <i>A. vitis</i> VAR4-23 株	22.5 ab
非病原性 <i>A. vitis</i> VAR03-28 株	23.3 ab
非病原性 <i>A. vitis</i> VAR03-21 株	35.0 b
非病原性 <i>A. vitis</i> VAR7-1 株	35.0 b
非病原性 <i>Agrobacterium</i> sp. VAR03-24 株	82.5 c
非病原性 <i>A. rhizogenes</i> K84 株	95.0 c
非病原性 <i>A. tumefaciens</i> Ar-4 株	100.0 c
ブドウ根頭がんしゅ病菌 G-Ag-27 株のみを接種	100.0 c
滅菌水のみを接種	0.0

^{a)} 各供試菌株とブドウ根頭がんしゅ病菌 G-Ag-27 株を混合比 1 : 1 で混合した菌液をトマト幼苗の茎に 1 株当たり 4 箇所、10 株に単刺有傷接種。^{b)} データは 3 試験の平均値。アークサイン変換後 Tukey の多重比較検定の結果、同一英文字間には有意差 (5%) がないことを示す。

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も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た。

2 培地上での抗菌活性

非病原性 *A. rhizogenes* K84 株の拮抗作用は自身が産生する抗菌物質アグロシン 84 に基づくとされているが（SMITH and HINDLEY, 1978）、病原細菌の菌株によってはアグロシン非感受性菌が存在する（KERR and HTAY, 1974；牧野, 1993）。すなわち、根頭がんしゅ病菌は植

物体に感染してがんしゅ組織を形成させ、その組織から分泌されるオパインと総称される特殊なアミノ酸を資化することができるが、そのオパインのうちのノパリンとアグロシノピンを資化できる菌株しかアグロシン感受性をもたない (HAYMAN and FARRAND, 1988)。一方、ブドウ根頭がんしゅ病菌である病原性 *A. vitis* はオクトピン、クモピン、あるいはビトピン型 (G-Ag-27 株もビトピン型) である (澤田, 1994) ことも、K84 株が本病に効果がない理由の一つと考えられる。また、ブドウ根頭がんしゅ病菌は遺伝子型として少なくとも四つのグループ (A ~ D) 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 a)。そのため、抗菌活性を調べるためには少なくとも 2 グループに所属する複数の病原細菌を供試する必要があると考えた。

VAR03-1 株の平板培地上での抗菌活性を調べた結果、由来の異なる複数のブドウ根頭がんしゅ病菌 (長野県産 2 菌株 (A, B グループ各 1 菌株)、島根県産 3 菌株 (A グループ 2 菌株, B グループ 1 菌株)、岡山県産 3 菌株 (全て A グループ)、秋田県産 3 菌株 (全て B グループ)) に対して阻止円の形成が認められたのに対し、K84 株は阻止円を全く形成しなかった (図-3, KAWAGUCHI et al., 2005 b)。また、それら由来の異なる複数の菌株に対しても VAR03-1 株のがんしゅ形成抑制効果が安定的に発揮されることをトマト、ブドウ苗を用いた等量混合接種試験で確認した (KAWAGUCHI et al., 2007)。以上のことから、日本産のブドウ根頭がんしゅ病菌に対して本菌株が拮抗微生物として有望であると判断した。

III 浸漬処理による防除効果

1 室内試験

K84 株を主成分とするアグロバクテリウム・ラジオバ

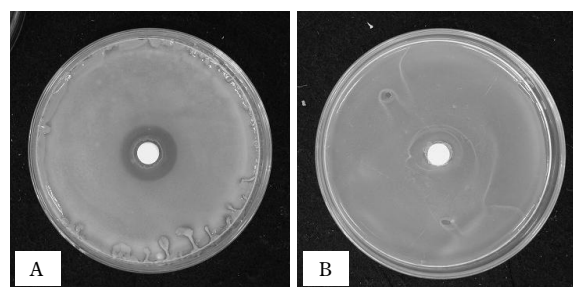


図-3 ブドウ根頭がんしゅ病菌 (G-Ag-27 株) に対する平板培地上での阻止円の形成

A: 中央のペーパーディスクに VAR03-1 株を接種。

B: 中央のペーパーディスクに K84 株を接種。

クター剤は、無病苗の根をその希釈液に浸漬し、あらかじめ K84 株を根に定着させた後に圃場に定植するという使用方法がとられる。ブドウ根頭がんしゅ病の防除に対しても同様に、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る。そこで、VAR03-1 株のブドウ根部への浸漬接種による効果をポット試験で調べた。VAR03-1 株の菌液 (約 10^9 cells/ml) にブドウ苗の根を約 1 時間浸漬接種した後、ただちにブドウ根頭がんしゅ病菌 4 菌株 (G-Ag-27, At-90-23, MAFF211674, MAFF211676 株) の菌液を混合して作成した汚染土 (約 5×10^7 cells/g 土) を充てんしたポットに定植して温室で管理し、3 か月後に地上部および根のがんしゅ形成の程度を調査した。その結果、VAR03-1 株の処理区で安定した抑制効果が認められた (表-2)。

2 圃場試験

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非常に少ない。ましてその中から生物農薬となって登録、市販されるものは極々わずかである。筆者は圃場での防除効果について、一つはコンクリートポットで区切られた隔離圃場での傘型 (トンネル) 雨よけ栽培 (ネオ・マスカット)、もう一つは露地栽培 (ピオーネ) での防除効果を検討した。処理方法は室内試験と同様に苗木の根を菌液 (約 10^9 cells/ml) に約 1 時間浸漬する方法で行った。浸漬処理の後、病原細菌を土壤に灌注して人工汚染圃場とした上記各圃場に定植し、7 ~ 8 か月後に掘り起こして発病の有無を調査した。その結果、VAR03-1 株の処理区で高い防除効果が認められた (表-3, 図-4)。

表-2 根の浸漬処理による VAR03-1 株のブドウ根頭がんしゅ病に対する発病抑制効果 (室内試験, KAWAGUCHI et al., 2008 を一部改変)

処理区 ^{a)}	発病株率 (%) ^{b)}	防除価 ^{c)}
VAR03-1 株	3.4 a	91.8
K84 株	36.7 b	12.0
滅菌水 (無処理区)	41.7 b	

^{a)} VAR03-1, K84 株は 10^9 cells/ml に調整し、ブドウ苗 (ネオ・マスカット実生) の根を 1 時間浸漬した後に、ブドウ根頭がんしゅ病菌 4 菌株 (G-Ag-27, At-90-23, MAFF211674, MAFF211676 株) の菌液を混合して作成した汚染土 (5×10^7 cells/g) を充てんしたポットに 1 株ずつ定植して 3 か月後に調査した。1 試験当たり 1 区 15 株で、データは 4 試験の平均値。

^{b)} アークサイン変換後、Tukey の多重検定において異英字間には有意差 (5%) あり。 ^{c)} 防除価 = (1 - 処理区の発病株率 / 無処理区の発病株率) $\times$ 100。

表-3 ブドウ苗の根の浸漬接種による VAR03-1 株のブドウ根頭がんしゅ病に対する防除効果 (圃場試験, KAWAGUCHI et al., 2008 を一部改変)

処理区	雨よけ栽培圃場 ^{a)}		露地栽培圃場 ^{b)}	
	発病株率 (%)	防除価 ^{c)}	発病株率 (%)	防除価 ^{c)}
VAR03-1 株	0.0 a	100.0	2.2 **	92.4
K84 株	11.9 b	15.0	NT	
滅菌水 (無処理区)	14.0 b		28.9	

^{a)} 2007 年 2 月 13 日に浸漬処理後ただちに定植し, 同年 10 月 12 日に調査した. 1 処理当たり 1 区 14 株の 3 区制で, 発病株率の数値は 3 区の平均値. アークサイン変換後, Fisher の多重検定において異英字間には有意差 (5%) あり. ^{b)} 2007 年 4 月 19 日に浸漬処理後ただちに定植し, 同年 11 月 27 日に調査した. 1 処理当たり 1 区 15 株の 3 区制で, 発病株率の数値は 3 区の平均値. NT: 試験せず. **: Cochran-Mantel-Haenszel 検定において, 有意差 (1%) あり. ^{c)} 防除価 = (1 - 処理区の発病株率 / 無処理区の発病株率) × 100.

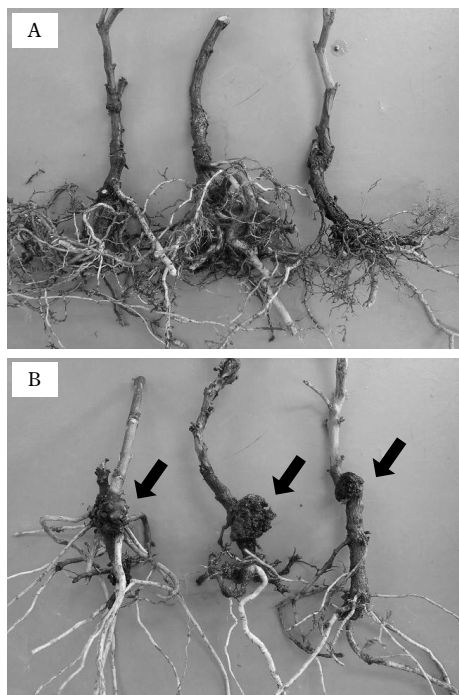


図-4 ブドウ根頭がんしゅ病に対する防除効果 (圃場試験, 定植 7 か月後)

A: VAR03-1 株をブドウ根部に浸漬処理した区.
B: 無処理区. 矢印が形成されたがんしゅ.

IV ブドウ根部での定着性

拮抗微生物が高い防除効果を発揮し, 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

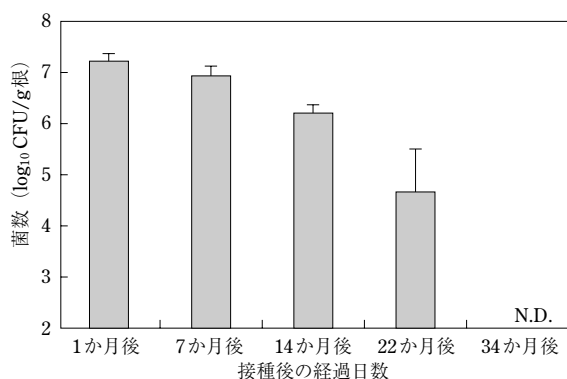


図-5 VAR03-1 株のブドウ根部に対する定着性 (KAWAGUCHI et al., 2008 b を一部改変)
バーは標準誤差. N.D.: 検出されず.

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。ブドウ 1 年生苗 (ネオ・マスカット実生) の根部を VAR03-1 株の菌液 (約 10^8 cells/ml あるいは 10^9 cells/ml) に 24 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 3 株ずつ掘り取って根部に接種された VAR03-1 株の菌数を希釈平板法で検出した。その結果, 接種約 1 年後までは緩やかに菌数が 10^6 CFU/g 根程度まで低下し, 約 2 年後には $10^5 \sim 10^4$ CFU/g 根の菌数が検出できたが, 約 3 年後には検出限界以下となった (図-5 には 10^8 cells/ml の菌液処理の結果を示した)。このことから, VAR03-1 株を根に 1 回浸漬処理した場合の防除効果の持続期間は 2 年程度ではないかと推察される。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ので, ブドウでは本病の被害が大きい苗木に対しては定植前の浸漬処理を行い, その後は根部の菌数を確保するため定期的に菌液を株元灌注するといった方法も考える必要がある。なお, K84 株のブドウ根部に対する定着性も評価したが, 根から分離される菌数は VAR03-1 株と比べて $1/10 \sim 1/100$ 程度であったことから, K84 株がブドウに効果がない原因の一つには本病原細菌に対する抗菌活性の欠如だけではなくブドウ根に対する定着性の弱さもあると考えられる (KAWAGUCHI et al., 2008 b)。

おわりに

根頭がんしゅ病は, 病原細菌が植物に感染し, 自身もつ T-DNA (transferred DNA の意) と呼ばれる DNA 断片が植物細胞の染色体 DNA に挿入されることで細胞が形質転換されて腫瘍化するという発病様式のため, 形質転換が完了した後ではその発病を抑える手段がなく,

現時点では病原細菌の侵入・感染および形質転換を阻止するための予防的戦略を選択せざるを得ない。基礎研究分野で進められているジーンサイレンシングのような遺伝子工学的手法が近い将来、形質転換後でも発病抑制に繋がる技術と成り得るかもしれないが、実用化にはまだ時間を要するだろう。

根頭がんしゅ病という植物病は歴史が古く、植物病理学の教科書には必ず記載されるほど有名であるが、その有効な防除法は極めて少ない。K84 株が本病に対し最も世界的に成功した事例であり、一つの病害の防除のために最初に選択すべき方法が化学的防除ではなく生物的防除であることも非常にまれな例と言えよう。その K84 株にしてもブドウには効果がなく、世界中でブドウ根頭がんしゅ病に対する拮抗微生物の探索が現在も進められているが、いまだ実用化された菌株はない。本稿で紹介した非病原性 *A. vitis* VAR03-1 菌株は、ブドウで高い防除（予防）効果を発揮する世界的にも珍しい菌株である。

本菌株の拮抗作用機構としては、抗菌物質の産生と植物体根部への定着による競合作用が考えられる。今後は、抗菌物質の同定や抗菌活性が実際の防除効果にどの程度寄与しているかも調査する必要がある、植物体に対する抵抗性誘導などの可能性も検討してみたい。また、ブドウ以外の根頭がんしゅ病にも浸漬処理による防除効果を検討しており、一部認められる植物もあることから (KAWAGUCHI et al., 2008 b), 今後も対象植物の範囲に関する調査を継続する予定である。本菌株は本病のバイオコントロールエージェントとして有望であるが、実用化に

向けた課題はまだ多い。

世界的に見て、寒冷な地域でブドウ根頭がんしゅ病の発生が多いが、それには凍害との関連が指摘されている。つまり、病原細菌が樹体内の導管などを通過して全身に分布した後、凍害で植物組織にクラック（亀裂）が入り、発病が助長されると考えられている (BURR et al., 1998)。今後はこういった寒冷な栽培条件での本菌株の防除効果も調べる必要がある。しかし、この凍害による発病助長の現象を実験的に証明した研究事例はなく、樹体内の菌の分布や密度、品種や時期によるその変化なども未知の部分が多い。今後も集中的な研究を行い、本菌株を核とした生物的防除法の確立を目指したい。

引用文献

- 1) BURR, T. J. and B. H. KATZ (1984): Plant Dis. **68**: 976 ~ 978.
- 2) ——— et al. (1998): ibid. **82**: 1288 ~ 1297.
- 3) HAYMAN, G. T. and S. K. FARRAND (1988): J. Bacteriol. **170**: 1759 ~ 1767.
- 4) KAWAGUCHI, A. et al. (2005 a): J. Gen. Plant Pathol. **71**: 422 ~ 430.
- 5) ——— et al. (2005 b): ibid. **71**: 422 ~ 430.
- 6) ——— et al. (2007): ibid. **73**: 133 ~ 138.
- 7) ——— et al. (2008 a): Plant Pathol. **57**: 747 ~ 753.
- 8) ——— et al. (2008 b): Phytopathology **98**: 1218 ~ 1225.
- 9) KERR, A. and K. HTAY (1974): Physiol. Plant Pathol. **4**: 37 ~ 44.
- 10) 牧野孝宏 (1993): 静岡農試特報 **17**: 1 ~ 100.
- 11) ROY, M. A. and M. SASSER (1983): Phytopathology **73**: 810 (Abstract).
- 12) 澤田宏之 (1994): 果樹試特報 **17**: 1 ~ 110.
- 13) ——— (2007): 日本微生物資源学会誌 **23**: 29 ~ 34.
- 14) SMITH, V. A. and J. HINDLEY (1978): Nature **276**: 498 ~ 500.
- 15) University of Guelph (1999): ScienceDaily, <http://www.sciencedaily.com/releases/1999/05/990506153806.htm>

新しく登録された農薬 (21.1.1 ~ 1.31)

掲載は、**種類名**、登録番号：**商品名**（製造者又は輸入者）登録年月日、有効成分：含有量、**対象作物**：対象病害虫：使用時期等。ただし、除草剤・植物成長調整剤については、**適用作物**、適用雑草等を記載。（登録番号：22312 ~ 22328）下線付きは新規成分。

「殺虫剤」

●アクリナトリン水和剤

22321：アザミバスター水和剤（エスディーエス バイオテック）09/01/21

アクリナトリン：3.0%

りんご：モモシンクイガ、キンモンホソガ、アブラムシ類、リンゴハダニ、ナミハダニ：収穫7日前まで

なし：シンクイムシ類、アブラムシ類、ハダニ類、カメムシ類：収穫7日前まで

かき：カメムシ類、カキグダアザミウマ、ハダニ類、チャノキイロアザミウマ、カキノヘタムシガ、ミカンキイロアザミウマ：収穫7日前まで

もも：モモハモグリガ、シンクイムシ類、アブラムシ類、ハ

ダニ類、カメムシ類、ミカンキイロアザミウマ、ドウガネブイブイ：収穫前日まで

ネクタリン：モモハモグリガ、シンクイムシ類、アブラムシ類、ハダニ類、カメムシ類、ミカンキイロアザミウマ：収穫前日まで

ぶどう：チャノキイロアザミウマ、ハダニ類、フタテンヒメヨコバイ、ミカンキイロアザミウマ：収穫7日前まで

いちじく：カンザワハダニ、アブラムシ類、ショウジョウバエ類、ハスモンヨトウ、ヨトウムシ：収穫前日まで

きゅうり：アブラムシ類、オンシツコナジラミ、ハダニ類、ミカンキイロアザミウマ：収穫前日まで

（18 ページに続く）