

機関番号： 82111

研究種目： 若手研究（B）

研究期間： 2008～2010

課題番号： 20780026

研究課題名（和文） 量的遺伝をするブドウ黒とう病抵抗性の分子の実体の解明

研究課題名（英文） Analysis of the molecular mechanism of the quantitative resistance to grapevine anthracnose.

研究代表者

河野 淳 (Kono Atsushi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹研究所・ブドウ・カキ研究チーム・研究員

研究者番号： 90442772

研究成果の概要（和文）：安定して大量のブドウ黒とう病菌 (*Elsinoe ampelina*) 分生子（無性胞子）を得る手法を、培地濃度を検討することにより開発し、黒とう病菌の接種試験を継続的に行うことを可能にした。ブドウ94品種系統の黒とう病抵抗性を調査し、病斑径による評価が有効であることを示した。抵抗性ブドウ遺伝資源では、菌侵入後、速やかに過敏感細胞死やフェノール様物質の蓄積が観察され、菌糸の進展が阻害されることを明らかにした。こうした機構は、一定の抵抗性を有する欧州ブドウでも同様に備わっていることが予想された。

研究成果の概要（英文）：A reliable method to produce sufficient amount of conidia of *Elsinoe ampelina* was developed by modifying the concentration of the media. It enables us to evaluate the resistance of grapevines to anthracnose easily and stably. The resistance of 94 grapevines was evaluated, and the resistance of each vine was effectively shown by their lesion sizes. The hypersensitive response and the accumulation of brown compounds (phenolics) were observed soon after the invasion of the fungus in the resistant grapevine, and the further invasion into the plant cells was restricted. It was implied that the moderate resistant *Vitis vinifera* cultivars might have almost same mechanism against *E. ampelina*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学／園芸学・造園学

キーワード：植物、園芸学、植物病理学

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 総論

ブドウは欧州ブドウと米国ブドウに大別される。欧州ブドウは果実品質が優れるが耐病性が低く、ブドウに病害の多発する日本での露地栽培は困難である。一方の米国ブドウ

は、果実品質は欧州ブドウに及ばないが、日本で問題となる病害に対する抵抗性を有する。

一般に病害抵抗性は、病原微生物の感染前から備わっている静的抵抗性（物理的な進入障壁等）と、感染後に誘導される動的抵抗

性に分類される。動的抵抗性に含まれる現象としては、抗菌物質生成、防御関連遺伝子 (PR (Pathogenesis-related) 遺伝子等) の発現、過敏細胞死等が挙げられる。ブドウにおいても各種の PR 遺伝子が単離されており、抗菌物質としてレスベラトロール等の機能の解明がなされている。

一方、抵抗性を遺伝学的側面から捉えた場合、単一あるいはごく少数の遺伝子 (抵抗性遺伝子: R gene) からなる遺伝をする強力な抵抗性 (真性抵抗性、垂直抵抗性) と、作用力の弱い複数の遺伝子が関与する量的遺伝をする抵抗性 (水平抵抗性、圃場抵抗性) に分類される。前者に関しては近年飛躍的に研究が進展し、多くの場合その分子の実体が病原微生物の感染を察知するレセプター様タンパク質であることが示された。この抵抗性は病斑をほとんど形成させないほどに強力であるが、抵抗性を回避することが可能となった病原微生物が一定期間後に現れ、抵抗性が破られやすいという欠点を有する。一方、後者の抵抗性は前者に比べて弱く、病勢進展速度が遅いものの感染は成立するという特徴を有し、一般には病原微生物に回避されにくい抵抗性とされる (Agrios, 2004)。こうした量的抵抗性の実体となる遺伝子や抵抗性の発現機構の解明は進んでいない。

## (2) ブドウ黒とう病

日本で問題となるブドウ病害には黒とう病、べと病、晩腐病、うどんこ病、灰色かび病があり、慣行栽培では非常に多くの薬剤散布を行い各種病害の発生を抑えている。中でも、糸状菌である黒とう病菌 (*Elsinoe ampelina*) によって引き起こされる黒とう病は、欧州ブドウの多くが罹病性であるのに対し、米国ブドウは抵抗性を示すという品種間差異がある (Fennell, 1948; Mortensen, 1981)。Mortensen (1981) は圃場調査を基にした遺伝解析を行い、黒とう病抵抗性が3つの遺伝子座からなる量的遺伝をするという説を提唱した。しかし、この報告では抵抗性の実体までは踏み込んでおらず、抵抗性発揮に至るメカニズムの解明が残された課題である。

一方、日本国内で現在広く栽培される生食用品種に関し、その黒とう病抵抗性品種間差異は不明な点が多く、断片的な調査結果が示されているのみである。また、黒とう病菌の分生子を人工培地上で得ることが難しかったことなども原因し、抵抗性評価の根拠となる抵抗性評価結果についても、国内での報告は多くなかった。

## 参考文献

- Agrios, G. (2004) Plant Pathology, 5th ed. Elsevier Acad. Press, 219-221.  
Fennell, J.L. (1948) J. Hered. 39, 54-64.  
Mortensen, J.A. (1981) J. Hered. 72, 423-426.

## 2. 研究の目的

本研究では、黒とう病的抵抗性の実体解明を目的とし解析を行う。まず、黒とう病抵抗性評価の基礎となる黒とう病菌分生子の形成法について検討する。次に、米国ブドウ、欧州ブドウおよび両者の雑種系統について、黒とう病感染成立以前と以後における抵抗性の評価を行い、その品種間差異を明らかにする。そして、その抵抗性の実体となる各種防御応答反応の有無、強弱について解析する。

本研究の特徴は、研究代表者の所属する農研機構果樹研究所に数多く保存されたブドウ遺伝資源並びに育種事業で育成されたブドウ母本系統を供試する点にある。特に抵抗性を示す個体では防御応答のどの過程に問題があるのか、あるいはどういった品種が黒とう病強度抵抗性を有するのかを明らかにする。こうした解析により、量的遺伝をする抵抗性の分子の実体、黒とう病耐病性の機構解明を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 黒とう病菌分生子形成法の改良

ジャガイモ煎汁寒天 (PDA) 培地等の人工培地で培養した黒とう病菌を用い、どのような条件で効率よく分生子を形成するのか検討した。

### (2) 切離葉への黒とう病菌分生子接種による形成病斑数、病斑径の評価

米国ブドウ、欧州ブドウおよび両者の雑種系統を含め、約 100 品種系統の挿し木苗を供試した。伸長途上の若い葉を採取し、0.5% 寒天培地を用いて切葉を作成し、 $1 \times 10^3$ /ml および  $5 \times 10^3$ /ml の黒とう病分生子を接種した。調査は接種後 14 日目に行った。黒とう病菌が植物体に侵入できるのかについて「形成病斑数」により評価し、侵入後の抵抗性を「病斑径」により評価した。本結果を各品種系統の総合的な黒とう病抵抗性とした。

### (3) 防御応答性遺伝子の発現解析

黒とう病菌接種後に、PR 遺伝子の発現パターンについて品種間差異があるか調査した。

(4) 感染成立過程の観察および感染により誘導される抗菌物質の調査

抵抗性の異なる品種を用い、感染成立過程がどのように異なるか解析した。また、感染後に合成、蓄積される物質について解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 黒とう病菌分生子形成法の改良

PDA 培地を用い、24 度暗黒条件下で 6 日程度培養した黒とう病菌コロニーを、滅菌水中で 6~8 時間程度振とう培養することにより、黒とう病菌分生子を安定的に得られることを見出した (Kono et al., 2009)。本研究を通じ、本手法により得られた黒とう病菌分生子を用いて接種を行った。

しかし、本手法により得られる分生子懸濁液の分生子密度は高かったものの、分生子総量は必ずしも多くなかったため、より多くの分生子を簡便に得る方法を検討した。その結果、PDA の濃度を 1/10 にした培地 (2.4g/L Potato Dextrose Broth, 20g/L Agar) において、より安定的に分生子が形成されると共に、高密度のコロニーが形成された培地上でも、各コロニーが分生子形成能を保持していることを見出した。具体的には、9 cm プレートあたり 1000 コロニー程度を形成させ、10 日程度培養したのち、滅菌水を 10ml 加え、30 度暗黒条件下で 4 時間程度培養することにより、 $5 \times 10^6$ /ml 程度の濃度の分生子懸濁液を 9 cm プレート一枚当たり 8ml 程度得ることができることを見出した。また、本培地により得られた分生子は、病原性を有していることも確認した。本培地により調整した分生子懸濁液活用することで、高濃度かつ多量の分生子接種が可能となり、圃場等での植物個体への接種試験がより容易になることが期待される。

##### (2) 切離葉への黒とう病菌分生子接種による形成病斑数、病斑径の評価

2 年間にわたり、主に生食用ブドウ品種系統を供試し、のべ 94 品種系統の黒とう病抵抗性調査を行った (表 1)。

その結果、病斑径には有意な品種間差があることが明らかになった。また、その調査結果は連続的であり、黒とう病侵入後抵抗性が量的な形質であることが再確認された。13 品種 2 年間の調査結果を基にした分散分析により、品種間差異の分散成分の約 60% が遺伝的なものであり、それ以外に統計的に有意な分散成分は品種と年次の交互作用のみであることが示された。品種と年次の交互作用は全分散の約 5% に過ぎないことから、本手法の

表 1 黒とう病病斑径調査結果

品種・系統名	2009病斑径		2010病斑径	
	平均	SE	平均	SE
173-2	-	-	3.26	0.25
406-1	-	-	2.50	0.42
608-8	-	-	1.81	0.17
619-11	-	-	2.33	0.26
620-2	-	-	1.93	0.32
632-15	-	-	1.75	0.11
634-81	-	-	3.49	0.29
639-22	-	-	1.42	0.23
640-47	-	-	2.91	0.18
640-65	-	-	2.46	0.21
645-73	-	-	3.10	0.16
651-6	-	-	2.89	0.24
658-9	-	-	2.79	0.24
659-25	-	-	3.22	0.17
660-35	-	-	3.72	0.17
662-58	-	-	2.86	0.22
662-6	-	-	3.30	0.20
663-3	-	-	1.39	0.27
667-6	-	-	3.26	0.23
668-124	-	-	1.19	0.09
668-2	-	-	2.36	0.21
668-4	-	-	2.02	0.22
669-1	-	-	3.74	0.15
675-125	-	-	3.09	0.20
719-11	-	-	2.76	0.17
<i>Vitis rupestris</i> 'Constantia'	-	-	2.96	0.07
<i>Vitis labrusca</i>	-	-	0.82	0.13
<i>Vitis riparia</i>	0.38	0.09	0.24	0.03
安芸津21号	2.86	0.21	-	-
アルフォンソラバレー	2.60	0.17	2.98	0.17
育71	-	-	2.06	0.17
イタリ	2.87	0.13	3.08	0.12
ウエイ	1.76	0.11	1.19	0.15
ウルバナ	1.76	0.13	0.89	0.14
エキゾチック	1.77	0.14	2.18	0.13
オリエンタルスター	3.15	0.22	-	-
オンタリオ	0.83	0.10	0.95	0.08
カージナル	2.82	0.17	2.65	0.12
カッタウルガン	3.43	0.17	2.82	0.16
カベルネソービニオン	2.65	0.13	1.73	0.25
カベルネフラン	-	-	2.62	0.13
カリグナン	3.79	0.14	3.31	0.19
巨峰	2.28	0.14	2.44	0.18
クイーンニーナ	2.27	-	2.70	0.19
グザルカラ	-	-	2.95	0.19
ケウカ	1.42	0.12	1.73	0.19
甲州	-	-	1.17	0.14
ゴールドデナムスカット	2.44	0.17	2.48	0.18
コンコード	1.69	0.14	1.52	0.15
サニールージュ	1.59	0.16	1.28	0.15
シャイラー	-	-	1.66	0.17
シャインマスカット	3.01	0.16	-	-
シャスラドール	-	-	0.73	0.11
シャスラローズ	-	-	0.69	0.07
シラー	-	-	1.27	0.13
スチューベン	1.58	0.32	1.72	0.14
ストーパー	2.29	0.17	1.82	0.26
赤嶺	3.51	0.14	3.30	0.15
瀬戸ジャイアンツ	2.24	0.18	2.32	0.14
セネカ	2.50	0.25	2.32	0.16
ダークリッジ	2.85	0.24	-	-
デラウェア	0.53	0.05	0.61	0.04
トムソンシードレス	3.58	0.15	3.26	0.14
ナイアガラ	1.95	0.37	1.65	0.29
ニューヨークマスカット	-	-	2.73	0.15
ノースブラック	2.10	0.25	1.37	0.33
パーレット	2.09	0.34	1.36	0.18
白南	3.50	0.16	3.31	0.12
バッファロー	1.33	0.34	2.03	0.20
ハニービーナス	2.60	0.24	-	-
パンビューレン	1.20	0.11	1.05	0.13
ピオーネ	1.92	0.25	1.79	0.16
ビットロビアンコ	-	-	3.14	0.13
ピノノワール	-	-	1.58	0.14
ピノブラン	-	-	1.74	0.17
ヒムロッド	3.21	0.26	2.24	0.26
藤稔	-	-	1.67	0.08
ブチシラー	-	-	1.14	0.22
ブラックビート	0.85	0.14	0.59	0.07
フレームトーカー	2.48	0.13	-	-
ポートルランド	1.86	0.22	1.43	0.22
マスカットオブアレキサンドリア	3.17	0.16	3.19	0.14
マスカットベリーA	1.94	0.35	1.27	0.12
マラガ	3.06	0.17	2.87	0.21
マルベック	-	-	2.28	0.18
陽峰	2.09	0.23	-	-
ラインリースリング	-	-	2.50	0.17
リザマート	-	-	3.28	0.19
リリアンス	2.38	0.10	-	-
レイクエメラルド	1.81	0.22	2.16	0.19
レーバークーン	-	-	2.29	0.22
レгент	-	-	1.50	0.09
レンベルガー	-	-	2.78	0.23
ロザリオビアンコ	3.49	0.23	3.15	0.12

評価結果は遺伝的な病斑径の違いをよくとらえていると言えた。既報 (Mortensen, 1981)

の評価結果との相関は  $r=0.75$  と高く、病斑径が黒とう病抵抗性の評価基準として有効であることが示唆された。

調査結果から、アメリカ原産のブドウ原種である *Vitis labrusca* や *V. riparia* などと並び、日本固有のブドウ品種である甲州も、非常に平均病斑径が小さく、強い侵入後抵抗性を有していることが示された。また、ブラックビートやデラウェアといった栽培品種も平均病斑径が非常に小さかった。欧州ブドウは平均病斑径の大きいものが大半を占めたが、シャスラやシラーといった一部の醸造用欧州ブドウは、黒点状の病斑を多く形成し、平均病斑径は非常に小さかった。パーレット、エキゾチック、瀬戸ジャイアンツ等の生食用欧州ブドウも比較的病斑は小さく、前述の甲州を含め、一部の欧州ブドウは一定の黒とう病侵入後抵抗性を有することを明らかにした点は、本研究の大きな成果である。黒とう病は欧州起源のブドウ病害であるとされており、黒とう病が発生する一部欧州ブドウ産地において、古来より黒とう病抵抗性の醸造用ブドウ品種が選抜されてきた可能性が考えられた。今後、黒とう病抵抗性品種を育成する上で、上記のような侵入後抵抗性を有する品種系統が、重要な母本となることが示唆された。

一方、病斑数の評価は品種内でのばらつきが大きく、抵抗性の品種間差異の効率的な検出は難しかった。しかし、オンタリオ、ポートランド、ナイアガラといった米国ブドウは一般に病斑数が少なく、欧州ブドウは一様に病斑数が多い傾向はみられたが、供試品種の黒とう病平均病斑径と平均病斑数の相関は  $r=0.53$  と弱いものであった(図1)。平均病斑径も小さく、形成病斑数も少ない米国ブドウを母本として用いると、後代個体の果実形質が著しく劣るため、優れた果実形質を有し、新品種となりうる個体を得るには、複数

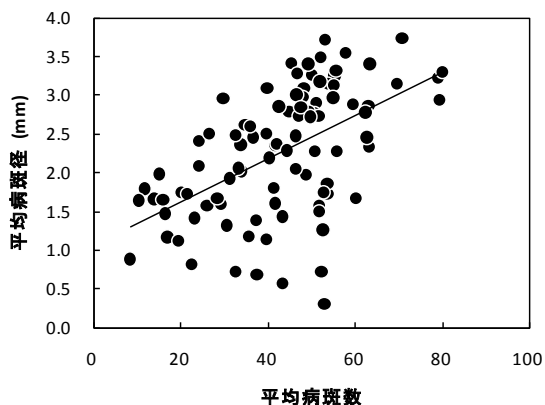


図1 平均病斑径と平均病斑数の相関

回の交配を重ねる必要がある。本研究でも明らかに became するように、黒とう病抵抗性は量的な形質であることから、交配を重ねて世代を進める上で、侵入前、侵入後のいずれの抵抗性についても、抵抗性を保持していることを確認することが不可欠である。

### (3) 防御応答性遺伝子の発現解析

(2) の調査において罹病性であると判断されたトムソンシードレス、抵抗性であるとされたコンコードを用い、防御応答遺伝子として *PR-2*、*PR-4* 遺伝子の発現を黒とう病感染4日後について半定量PCR法により測定した。しかし、明らかに抵抗性の異なるこれら2品種間で、両遺伝子の発現量に明確な差は見いだされなかった。本研究では切葉を用いて黒とう病菌の接種を行っており、この切葉にしたストレス、あるいはシャーレ内で高湿度に保っているというストレスにより、これらPR遺伝子の発現が上がってしまうことが原因として考えられた。抵抗性品種間差異は、これらPR遺伝子の関与しない機構により支配されていることが考えられた。

### (4) 感染成立過程の観察および感染により誘導される抗菌物質の調査

抵抗性の非常に強い *V. riparia* では、黒とう病菌感染2日後から、菌侵入部位に褐色の物質の蓄積が観察された。そこで、トリパンブルー染色により、黒とう病菌の菌糸と植物体の過敏感細胞死について観察したところ、*V. riparia* では感染2日後には既に、侵入部位の活発な過敏感細胞死が観察されると共に、褐色の物質の蓄積が観察された。これは、黒とう病菌の侵入後すぐに植物体の自発的な細胞死が生じると共に、フェノール化合物の蓄積が始まっていることを示唆した。黒とう病菌菌糸の進展も非常に遅く、多くの場合フェノール化合物の蓄積した細胞内に閉じ込められていた。こうした抵抗反応の結果、*V. riparia* では黒点状の非常に小さな病斑が形成されると考えられた。

一方、罹病性欧州ブドウであるトムソンシードレスやイタリアでは、黒とう病菌接種2日後には、表皮細胞の陥没が観察されたものの、褐色の物質の蓄積は全く観察されなかった。トリパンブルー染色を行ったところ、感染2日後には菌糸は観察されるものの、植物体細胞の染色は非常に弱く、*V. riparia* のような活発な過敏感細胞死は生じていなかった。感染7日後には、病斑の中央部にトリパ

ンブルーで濃く染色される死細胞が多く観察されたが、これは感染により死んだ細胞が染まっていると考えられた。また、この時期に至っても、褐色の物質の蓄積は見られなかった。トリパンプルーで染色される細胞の外側には、旺盛に進展する菌糸が観察された。これは、感染7日後以降も病斑が拡大することを示唆するが、実際、感染14日後に至るまで病斑は拡大を続けた。

以上より、黒とう病抵抗性の一端は、感染後非常に速い時期に抵抗反応を惹起しうることであることが示され、その際には過敏感細胞死やフェノール化合物の蓄積が生じることが示唆された。一方、罹病性品種では、こうした抵抗反応を速やかに引き起こすことができないことが明らかになった。また、欧州ブドウの中にも、甲州、パーレットや一部の醸造用ブドウ等の一定の抵抗性を有するものがあり、*V. riparia*のような黒点状の極小病斑を生じやすいことが観察されており、*V. riparia*と同様に、感染後の早い時期から抵抗反応を引き起こすことができることが、こうした欧州ブドウの抵抗性の一端を担っていることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ①Atsushi Kono, Ryoji Nakaune, Masahiko Yamada, Masaaki Nakano, Nobuhito Mitani, and Toshihito Ueno (2009) Effect of Culture Conditions on Conidia Formation by *Elsinoë ampelina*, the Causal Organism of Grapevine Anthracnose. Plant Disease. 93:481-484. (査読あり)

[学会発表] (計3件)

- ①河野 淳ら (2008) 病斑径測定によるブドウ黒とう病抵抗性の検定. 園芸学会  
 ②河野 淳ら (2009) ブドウ遺伝資源における黒とう病抵抗性の病斑径測定による評価. 園芸学会  
 ③Kono et al. (2010) The Interaction of *Elsinoë ampelina* with *Vitis vinifera*. 10th International Conference on Grape Genetics and Breeding.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河野 淳 (KONO ATSUSHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹研究所・ブドウ・カキ研究チーム・研究員