



香川県主要作物に発生する病害の発生生態の解明と 防除技術の開発

西村, 文宏

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2024-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第9034号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100492543>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文内容の要旨

氏 名 _____ 西村文宏 _____

専攻・講座 _____ 生命機能科学専攻 応用機能生物学講座 _____

論文題目（外国語の場合は，その和訳を併記すること。）

香川県主要作物に発生する病害の発生生態の解明と防除
技術の開発

指導教員 _____ 池田健一 _____

(氏名：西村文宏 NO.1)

香川県は耕作面積が少ないことから、大規模生産地と比較して少量ながらも多様な作物が栽培されている。年間を通して降雨が少なく、冬季は温暖な気候を利用して様々な園芸作物が作付けされており、露地栽培ではブロッコリーとタマネギが多くを占めている。このことから、当該2作物において最大の生産阻害要因となっている病害の発生生態の解明と防除方法について検討した。

第2章では、タマネギべと病における発病リスク評価と発病サイクルから導き出される総合防除戦略の確立について研究を行った。最初に、土壌サンプルの採種方法とその後のDNA抽出法の妥当性についてNGSによる細菌群集構造を指標として比較解析した。同一圃場内の異なった地点間において細菌群集構造に有意差を認めず、生土と2週間風乾燥した土壌、さらに14ヶ月間室温で保管した土壌の間でも細菌群集構造に有意差を認めなかったが、一部乾燥条件において影響を受けやすい細菌においてのみ存在量に変化した。土壌からのDNA抽出方法やDNA抽出実施者の違いでも細菌群集構造に影響を及ぼさなかった。続いて、香川県内のタマネギべと病菌 *Peronospora destructor* のCOXII領域から *P. destructor* を特異的に検出するプライマーペアおよびTaqManプローブを設計し、土壌から高感度に検出する方法を開発した。検出限界は5個卵孢子/g乾土であり、灰色低地土と同様に黒ボク土であっても高精度に検出された。この技術を用いてタマネギ栽培圃場における検出を行った。圃場内の地点間では *P. destructor* の卵孢子はバラツキが認められたが、それぞれの地点の土壌サンプルを混合することにより、圃場を代表する平均値を求めることができた。一次伝染株率と二次伝染株率の相関は比較的弱く、僅かな一次伝染株の発生であっても大規模な二次伝染株が発生しうることが示唆された。そこで、土壌中の卵孢子数と一次伝染株の関係に着目した。卵孢子数と一次伝染株のスピアマンの順位相関係数は一次伝染株を対象とした防除を行っていない圃場において高い相関 ($\rho=0.572$, $n=17$, 陽性適中率100、感度86.7) を認めた。土壌中の卵孢子数に対する前作の影響において、タマネギの連作は水稻やその他の畑作物と比較して卵孢子数の増加をもたらした。

土壌中の卵孢子数の季節変動とタマネギ生長との関係性を検討するために、土壌中のタマネギDNA濃度についても解析した。*P. destructor* 卵孢子数はタマネギ鱗茎生育期の3月頃に急増し、収穫末期の4月下旬から次作の定植を行った11月には減少した。土壌中のタマネギDNAについては、1月から2月にかけて増加し、「収穫後は速やかに減少した。タマネギDNAと *P. destructor* 卵孢子の相関は比較的弱かった。タマネギの根部重量を調査したところ、両品種ともにタマネギDNAのピークを迎えた翌月に葉鞘(鱗茎)重量が増加した。以上の結果より、土壌中から検出されるタマネギDNAの大部分はタマネギべと病の被害に伴って細胞が崩壊して遊離したものではなく、タマネギ根の生長に伴って老化した根が分解されて遊離されるものであり、*P. destructor* の卵孢子はタマネギの根の新陳代謝に伴って土壌中に放出されていることが考えられた。次に、*P. destructor* 卵孢子とタマネ

(氏名：西村文宏 NO.2)

ギ DNA に対する土壌深度の影響を調査した。土壌表層 5~10cm に多数の *P. destructor* 卵胞子を認めたが、20cm 以下では大きく減少した。

香川県農業試験場内においてべと病に自然感染したタマネギ「貴錦」の種子から *P. destructor* の検出を行ったところ、種子および種皮の各 1 反復において増幅を認めたことから、種子及び種皮への *P. destructor* の自然感染が起きている可能性が示唆された。タマネギべと病防除試験を行った際の処理区間について、一般化線形混合モデル解析を行った。その結果、定植時期を一日平均気温が 10℃以下となる 11 月 21~30 日へと遅らせた場合（オッズ比=0.16）とフロンサイド粉剤処理（オッズ比=0.65）において発病を抑制させる傾向が認められた。

第 3 章では、ブロッコリー黒すす病における発病リスク評価と発病サイクルから導き出される総合防除戦略の確立について研究を行った。発病過程を時空間分布解析した結果、黒すす病菌 *Alternaria brassicicola* は少量の汚染苗が本圃に持ち込まれていると考えられた。市販種子からも *A. brassicicola* が分離された。香川県圃場より分離された 36 菌株の *A. brassicicola* の個体群解析を行った。ITS-rDNA 領域には多型が認められなかったため、*nit* 変異株を用いた体細胞和合性 (Vegetative compatibility group: VCG) と Universally-primed (UP)-PCR による多型解析を行った。Rodrigues(2009)法を改変してローズベンガルを MM 培地に加え、次亜塩素酸カリウムを溶解限度の 40~60g まで増量したところ *nit* 変異株を得た。それぞれの *nit* 変異株を対峙培養することによって分離菌株は 18 種類の VCGs に分類された。育苗地点及び分離地点特異的な VCG が見出された一方で VCG12 は育苗地点および集荷場を横断的に分布していた。UP-PCR 解析により複数の多型バンドが得られた。UPGMA 法により作成された系統樹において、bootstrap probability (bp) 値が低いものの 5 つのクレードに分けられ、VCGs を UP-PCR の系統樹に当てはめると、VCG12 が多岐にわたるクレードに含まれていた。この結果は VCG12 という単一のクローンを起源とする集団がブロッコリー黒すす病を引き起こしており、それらは分化しつつある状態であることを示唆している。また、*nit* 変異株を用いて汚染種子を作出して、発病過程を評価した。*A. brassicicola* が成熟鞘以降の生育ステージで感染した場合は汚染率が高い種子が得られたにも関わらず発芽率が高いことが判明した。汚染種子は発芽すると子葉に菌の局在が確認されたが、ほとんどは潜伏感染した状態であった。潜伏感染状態の *A. brassicicola* は子葉とともに脱落し時間の経過とともに、腐生性の *A. alternata* に置き換わることが明らかとなった。子葉に局在した *A. brassicicola* の一部は葉軸へ伸展し、潜伏感染を維持していた。このような状態の苗が圃場に持ち込まれることが伝染源につながるものと考えられた。本研究においては、育苗期に葉枯れや立ち枯れ症状を認めなかった。栽培温度を 10℃や 35℃といった苗にとってストレス状態となる温度にすると葉枯れや立ち枯れ症状が再現された。このことから、キャベツ黒すす病などの先行研究において報告され

(氏名：西村文宏 NO.3)

ていた葉枯れや立ち枯れ症状は限定された条件における症状であり、ほとんどの苗は潜伏感染した状態で存在するものと考えられた。これは、発病の時空間分布解析の結果から得られた、伝染源が本圃に持ち込まれる可能性を示す結果と一致していた。

ブロッコリーの黒すす病に対する感受性は下位葉ほど高かった。ハウス内の発病は接種株を中心として隣接した株の間で病原菌の移動が確認されたことから、実際の圃場では隣接個体も巻き込んだ垂直伝染が起きていると考えられた。薬剤防除試験を行ったところ、ロブラール水和剤およびポリオキシシン AL 水溶剤は高い消毒効果を認めた。本圃において、カンタス DF を散布することで、いずれの時期であっても防除効果を認めたが、花蕾形成期直前の散布では効果が劣った。この研究により、黒すす病菌の伝染環として種子由来の病原菌は苗に局在的かつ潜在的に感染しており、僅かな感染苗として本圃に持ち込まれ、周辺の健全株に伝染していることが示された。これらを踏まえると、種子生産現場においては鞘の収穫から脱穀まで黒すす病菌の蔓延を抑止して感染を極力抑えるとともに、ロブラール水和剤またはポリオキシシン AL 水溶剤による種子消毒を実施することが重要である。育苗圃では過剰な灌水や極端な温度変化といった植物の生育阻害要因を排除して、べと病対策も兼ねてフォリオゴールドやアミスターの薬剤散布を行って健全苗への伝染を防ぐことが重要である。本圃へ定植後は、早めにカンタス DF を散布して感受性の高い下位葉を保護することで、圃場全体の菌密度を低減させて花蕾への伝染を防ぐことが重要である。

第4章では、これまでに得られた研究結果を踏まえた効果的な防除体系を総合考察した。現在は、みどりの食料システム戦略が農林水産省より提唱され、薬剤防除だけではなく、耕種的防除も含めた総合防除 (Integrated pest management: IPM) の実現が求められている。タマネギべと病に関しては、本研究により得られた結果から、いくつかの耕種的防除法のヒントが得られた。一つ目はタマネギの連作による問題である。タマネギを連作した圃場と、水田利用やその他作物を栽培した圃場の間では、卵胞子数に大きな差が認められた。また、卵胞子は土壌表層より 5~10cm に集中する傾向が認められた。この層はタマネギ苗を定植する際に根が接触しやすく、感染を助長していることが考えられた。このため、天地返しを十分に行うことにより、感染しにくくなる可能性が考えられた。さらに、タマネギ苗の定植時期に関して、一日平均気温が 10℃を下回る頃であれば発病が大きく低下していた。この時期に薬剤防除を組み合わせることにより、防除効果は高まる事が明らかとされた。このように、卵胞子数を減少させ、タマネギ根との接触を避け、*P. destructor* の活動温度を避けることにより、一次伝染株の出現を最小限に抑え込むことが可能となるであろう。ブロッコリー黒すす病においては、感染株から隣接株への水平方向の伝搬が確認された。ブロッコリーの葉は横方向へ大きく展開することより、隣接株における予防対策も重要であることが考えられる。そのため、作付けの際になるべく展開葉が重ならないように1条植えて株間を広く取るといった工夫や、薬剤散布は発病株を中心としてその周

(氏名：西村文宏 NO.4)

圃まで念入りに行う必要がある。本研究により、香川県の主要作物において被害の大きい、タマネギべと病およびブロッコリー黒すす病の感染サイクルを明らかとし、病原菌の特性に応じた防除対策を提案することができた。このようなアプローチは他の病害にも応用できるものとする。病原菌の動態を明らかとして、それに応じた防除対策を講じることにより、減農薬につながり、環境負荷にやさしく、高い生産効率が実現できる農業経営が普及することを期待する。

氏名	西村 文宏		
論文 題目	香川県主要作物に発生する病害の発生生態の解明と防除技術の開発		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	准教授	池田 健一
	副 査	教授	土佐 幸雄
	副 査	教授	中屋敷 均
	副 査		
	副 査		
要 旨			
病原菌は固有の感染戦略や生存戦略があり、宿主植物は固有の生育特性を有しており、それらが複雑に絡み合うことにより、防除を難しくしている。本学位論文草稿は香川県における主要作物であるタマネギとブロッコリーにおける重要病害の発生生態の解明と防除方法について検討したものである。第1章ではタマネギべと病とブロッコリー黒すす病の発病に関するこれまでの知見と取り組むべき問題点を提起した。第2章ではタマネギべと病、第3章ではブロッコリー黒すす病、それぞれの病害の発生生態と防除方法に関する研究成果が記載され、第4章においては、病害防除対策を講じる際の考え方について総合考察を行っている。 第2章では、タマネギべと病における発病リスク評価と発病サイクルから導き出される総合防除戦略の確立について検証を行った。最初に、土壌サンプルの採種方法とその後のDNA抽出法の妥当性について次世代シーケンス解析による細菌群集構造を指標として比較解析した。同一圃場内の異なった地点間において細菌群集構造に有意差を認めず、生土と2週間風乾した土壌、さらに風乾後14ヶ月間室温で保管した土壌の間でも細菌群集構造に有意差を認めなかったが、一部乾燥条件で影響を受けやすい細菌においてのみ存在量に変化した。土壌からのDNA抽出方法やDNA抽出実施者の違いでも細菌群集構造に影響を及ぼさなかった。続いて、香川県内のタマネギべと病菌 <i>Peronospora destructor</i> の COX II 領域から <i>P. destructor</i> を特異的に検出するプライマーペアおよび TaqMan プローブを設計し、土壌試料から高感度に検出する方法を開発した。検出限界は 0.5 個/ g 乾土であり、核酸抽出が困難な黒ボク土であっても高精度に検出された。この技術を用いてタマネギ栽培圃場における検出を行った。圃場内の地点間では <i>P. destructor</i> の卵胞子はバラツキが認められたが、それぞれの地点の土壌サンプルを混合することにより、圃場を代表する平均値を求めることができた。一次伝染株率と二次伝染株率の相関は弱く、僅かな一次伝染株の発生であっても大規模な二次伝染株が発生しうることが示唆された。そこで、土壌中の卵胞子数と一次伝染株の関係に着目した。卵胞子数と一次伝染株のスピアマンの順位相関係数は一次伝染株を対象とした薬剤防除を行っていない圃場において高い相関 ($\rho=0.572$, $n=17$, 陽性適中率 100、感度 86.7) を認めた。土壌中の卵胞子数に対する前作の影響において、タマネギの連作は水稻やその他の畑作物と比較して卵胞子数の増加をもたらした。土壌中の卵胞子数の季節変動とタマネギ生長との関係性を検討するために、土壌中のタマネギ DNA 濃度についても解析した。<i>P. destructor</i> 卵胞子数はタマネギ鱗茎生育期の3月頃に急増し、収穫末期の4月下旬から次作の定植を行った11月には減少した。土壌中のタマネギ DNA については、1月から2月にかけて増加し、収穫後は速やかに減少した。タマネギ DNA と <i>P. destructor</i> 卵胞子の相関は弱かった。タマネギの根部重量を調査したところ、両品種ともにタマネギ DNA のピークを迎えた翌月に葉鞘(鱗茎)重量が増加した。以上の結果より、土壌中から検出されるタマネギ DNA はタマネギべと病の被害に伴って細胞が崩壊して遊離したものではなく、タマネギ根の生長に伴って老化した根が分解されて遊離されるものであり、<i>P. destructor</i> の卵胞子はその新陳代謝に伴って土壌中に放出されていることが考えられた。次に、<i>P. destructor</i> 卵胞子とタマネギ DNA に対する土壌深度の影響を調査した。土壌表層 5~10cm に多数の <i>P. destructor</i> 卵胞子を認めたが、20cm 以下では大きく減少した。また、種子伝搬の可能性を検証するために、香川県農業試験場内においてべと病に自然感染したタマネギ			

氏名	西村 文宏
「貴錦」の種子から <i>P. destructor</i> の検出を行ったところ、種子および種皮から増幅を認めたことから、種子伝搬する可能性が示唆された。タマネギべと病防除試験を行った際の処理区間について、GLMM 解析を行ったところ、定植時期を一日平均気温が 10℃以下となる 11 月 21～30 日へと遅らせた場合（オッズ比=0.16）とフロンサイド粉剤処理（オッズ比=0.65）において発病を抑制させる傾向が認められた。本章の内容の一部は科学雑誌 Plant Pathology (2022) 71: 1784-1792 に掲載されており、特許（7248329 号）も取得した。 第 3 章では、ブロッコリー黒すす病における発病リスク評価と発病サイクルから導き出される総合防除戦略の確立について検証を行った。発病過程を時空間解析した結果、黒すす病菌 <i>Alternaria brassicicola</i> は少量の汚染苗が本圃に持ち込まれていると考えられた。市販種子からも <i>A. brassicicola</i> が分離された。香川県圃場より分離された 36 菌株の <i>A. brassicicola</i> の個体群解析を行った。ITS-rDNA 領域には多型が認められなかった。さらに、<i>nit</i> 変異株を用いた体細胞和合性 (Vegetative compatibility group: VCG) と Universally-primed (UP)-PCR による多型解析を行った。常法を改変して次亜塩素酸カリウムを溶解限度の 40～60g まで増量したところ <i>nit</i> 変異株を得た。それぞれの <i>nit</i> 変異株を対峙培養することによって分離菌株は 18 種類の VCGs に分類された。この VCG と UP-PCR 解析で得られた多型バンドパターンより作成された系統樹とを対比したところ、育苗地点及び分離地点特異的な VCGs が見出された一方で、VCG12 は多岐にわたるクレードに含まれ、育苗地点および集荷場を横断的に分布していた。この結果は VCG12 という単一のクローンを起源とする集団がブロッコリー黒すす病を引き起こしており、それらは分化しつつある状態であることを示唆している。また、<i>nit</i> 変異株を用いて、汚染種子を作出して、発病過程を評価した。鞘が成熟した後に接種を行うと発芽率の高い汚染種子が得られた。汚染種子は発芽すると子葉に菌の局在が確認されたが、ほとんどは潜伏感染した状態であった。潜伏感染状態の <i>A. brassicicola</i> は子葉とともに脱落し時間の経過とともに、腐生性の <i>A. alternata</i> に置き変わっていた。子葉に局在した <i>A. brassicicola</i> の一部は葉軸にも伸展し、潜伏感染を維持していた。このような状態の苗が圃場に持ち込まれることより発病しているものと考えられた。この観察結果は、発病の時空間分布解析の結果と一致していた。ブロッコリーの黒すす病に対する感受性は下位葉ほど高かった。ハウス内の発病は接種株を中心として隣接した株の間で病原菌の移動が確認されたことから、実際の圃場では隣接個体も巻き込んだ垂直伝染が起きていると考えられた。薬剤防除試験を行ったところ、ロブラル水和剤およびポリオキシシン AL 水溶剤は高い消毒効果を認めた。本圃において、カンタス DF を散布することで、いずれの時期であっても防除効果を認めたが、花蕾形成期直前の散布では効果が劣った。本研究において明らかとなった、潜伏感染した苗が伝染源であることを踏まえると、種子生産現場においては鞘の収穫から脱穀まで黒すす病菌の蔓延を抑止して感染を極力抑えるとともに、ロブラル水和剤またはポリオキシシン AL 水溶剤による種子消毒を実施する。育苗圃では過剰な灌水や極端な温度変化といった植物の生育阻害要因を排除して、べと病対策も兼ねてフォリオゴールドやアミスターの薬剤散布を行って健全苗への伝染を防ぐ。本圃へ定植後は、早めにカンタス DF を散布して感受性の高い下位葉を保護することで、圃場全体の菌密度を低減させて花蕾への伝染を防ぐことが重要であることを提案した。 第 4 章では、これまでに得られた研究結果を踏まえた効果的な防除体系を総合考察した。現在は、みどりの食料システム戦略が農林水産省より提唱され、薬剤防除だけではなく、耕種的防除法も含めた総合防除 (Integrated pest management: IPM) の実現が求められていることより、それぞれの病害における耕種的防除法の実現の可能性について考察した。 本研究により、香川県の主要作物において被害の大きい、タマネギべと病およびブロッコリー黒すす病の感染サイクルを明らかとし、病原菌の特性に応じた防除対策を提案することができた。このようなアプローチは他の病害にも応用できるものとする。病原菌の動態を明らかとして、それに応じた防除対策を講じることにより、減農薬につながり、環境負荷にやさしく、高い生産効率が実現できる農業経営が普及することが期待される。よって、学位申請者の西村文宏は博士（農学）の学位を得る資格があると認める。	