

特集：花き病害研究の新展開と環境保全型防除技術

## 花き類養液栽培における病害の総合診断

岐阜大学流域圏科学研究センター かげやま こうじ

## はじめに

養液栽培では連作障害を回避し、栽培管理を効率化した工業生産的栽培形態をとっており、一見病原菌が入り込めないような環境にあるにもかかわらず実際には突如として発病することがある。そして、瞬く間に拡大して重大な被害をもたらす。これらの病害防除では、発病が見られたときに対処するというような従来型の防除法では後手に回ってしまうため、新しい視点からの防除対策が必要である。ここでは、的確な防除対策を確立するうえで重要となる診断の新しい視点について述べる。

## I 養液栽培に発生する病原菌の特徴

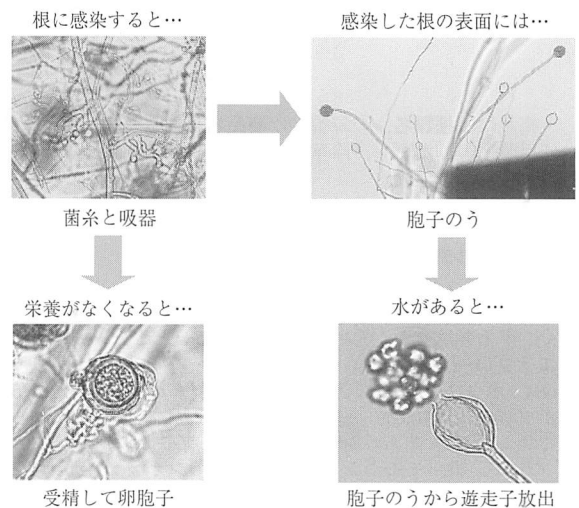
養液栽培における病原菌には、遊走子を形成して水媒伝染する *Phytophthora* 属菌や *Pythium* 属菌が多い。一口に病原菌といっても、一生の間にいろいろな姿をすることを忘れてはならない。*Pythium helicoides* を例にしてみると(図-1)、水があると胞子のうを形成して遊走子を放出し、遊走子は水中を遊泳して新しい植物へと移動する。植物に感染すると菌糸に姿を変え、根や茎に広がり、栄養をとって増殖しながら宿主の細胞を殺していく。このとき、周りに水があると胞子のうが植物体表面に形成されて遊走子が放出され、次から次へと植物に広がっていく。また、植物体内の栄養が枯渇すると有性器官を形成し、受精して厚い細胞壁をもった卵胞子を形成する。この卵胞子は、新しい宿主に遭遇するまで何年も耐久生存し、次の感染の機会を待っている。新しい宿主に出会うと発芽し、菌糸を伸ばして感染したり、胞子のうを形成して遊走子を放出したりするといった一生を送っている。すなわち、発病している部位の病原菌の姿は、その菌にとって一生の内の一時期の姿にしかすぎない。防除対策を考えるうえで重要なことは、この病原菌の一生を十分に理解したうえで対策を立てなくてはならないことである。

## II これからの診断

今までの防除は、病害の原因を診断して化学薬剤を一様に散布するといった「まず発病ありき」の方針であった。しかし、これからの防除には、病原菌がどのように侵入するのか(第一次伝染経路)、侵入した病原菌がどのように施設内で伝搬するのか、どのように越冬するのか(第二次伝染経路)といった生態学的視点が必要である。病原菌の生態に基づき、伝染経路を断つ確実な防除が望まれる。

例えば、最近問題となっている鳥インフルエンザでは、発病した鳥を処置するだけでは後手に回り病気の拡大は進むばかりである。伝染源は何か、発病した鳥からどのようにして伝搬するかを明らかにして伝染経路を断つことが重要であると認知されている。

このように、伝染経路は防除対策を確立するうえでなくてはならない情報である。本研究室で、長良川河川敷に生息する *Pythium* 属菌を調査したところ、下流に行くに従い水媒伝染性の植物病原菌が多くなることが明らかになった。長良川では、各種の作物の根腐病を引き起こす *Py. irregulare*、循環式のエプアンドフローやロックウールによる水耕栽培においてバラやカランコエに根腐病を起こす *Py. helicoides*、野菜の水耕栽培で問題になる

図-1 病原菌の一生 (*Pythium helicoides*)

Integrated Diagnosis of Disease in Hydroponic Culture of Ornamental Plants. By Koji KAGEYAMA

(キーワード：診断, PCR, 総合防除)

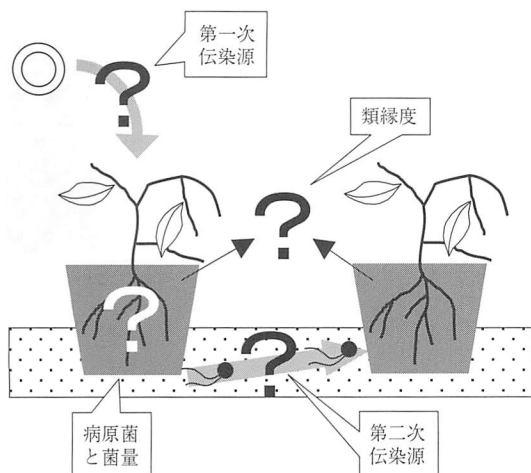


図-2 総合診断で調べること

*Py. dissotocum* 等が分離された。これは、発病している場所で病原菌を調べるだけでなく、視野を広げて、病原菌がどこからどのように持ち込まれるのかを調べる必要があることを示唆している。

特に、閉鎖系である養液栽培において有効な防除対策のためには、従来の発病個体の病害診断に加え伝染経路の診断が必須であり、これらを合わせた総合診断という新しい視点を提唱したい。具体的には、発病前の圃場・施設診断、発病後の病原菌の侵入経路診断、病原菌の二次伝染経路診断である(図-2)。近年、環境調和型の農業を目指して化学的防除だけでなく、物理的、耕種的、生物的防除や抵抗性品種の利用などの防除法を組み合わせた総合防除の必要性が叫ばれている。防除対策に総合診断が加われば、より効率で省資源な防除体系を確立することが可能となる。

### III 分子生物学的手法の利用

診断では、罹病植物から分離された菌株の同定は基本技術であるが、これには多くの労力と熟練が必要である。選択分離培地が利用できたとしても、出現するコロニーをすべて純粋培養として分離しなければならず、そのうえ各種繁殖器官を形成させる必要がある、それらを複雑な分類検索表の記載と比較する際には曖昧な形態に悩まされることになる。

また、植物病原菌の伝染経路を明らかにするには二つの技術的問題がある。一つは、土壌や水など環境サンプル中に無数に生息する微生物から特定の病原菌だけを迅速に定量する必要のあることである。従来は選択培地の開発により研究がなされてきたが、既に述べたように大

変時間がかかり、熟練が必要である。また、アブラナ科植物根こぶ病菌のような培養できない菌では不可能である。この問題を解決することが、診断を広範囲に多面的に行うために必須である。

二つ目は、詳細な伝染経路を解明するために、病原菌の系統分析や個体識別が必要なことである。分離菌株の類縁度を調べて、もし菌株同士が全く同じクローンであれば、それぞれの分離源にいる菌は同じ由来であることがわかる。もし、発病している植物から分離した菌株と、その植物を育てるときに使った培養土から分離した菌株がクローンなら培養土が伝染源と推定できる。また、もし岐阜県の罹病植物から分離した菌株と、宮崎県で分離した菌株の類縁度が高く、両県とも同じ苗生産地のものを使っていたとすると、苗による伝染であることがわかる。

これらの技術的問題は、分子生物学的手法の導入により解決できるようになってきている。基本となる技術は、1985年に初めて発表され、今日広く使われているポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術である。診断の分野にもPCRを応用した研究が飛躍的に増えてきている。菌の同定には塩基配列分析やRFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)解析、検出には特異プライマーを用いたPCR、菌量評価にはリアルタイムPCRによる定量、菌株の類縁度分析や個体識別にはRAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)-PCR、AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)、マイクロサテライトマーカー分析等が開発されてきている。以下にこれらの方法について原理や応用例を説明する。

## IV 同 定

PCRを同定に用いることにより、次のようなことが可能となった。一つは、形態の特徴が培地・培養条件や菌株の古さなどによって変化してしまうのに対し、再現性の高い結果が得られることである。もう一つは、塩基配列から系統進化学的關係も調べることができることである。

分類・同定では、核にコードされているリボゾームDNA遺伝子中のInternal Transcribed Spacer(rDNA-ITS)領域が、標的として多く使われている(MATSUMOTO et al., 1999)。rDNA-ITS領域には、どの菌のPCRにも利用できるユニバーサルプライマーが設計されている。また、rDNA-ITS領域の塩基配列はDNAデータベースに多く登録されており、これらは自由にダウンロードできて自分の菌株と比較可能である。このほかに注目されている遺伝子に、ミトコンドリアDNAにあるシトクロームオキシダーゼII(*cox II*)遺伝子があ

る (MARTIN, 2000)。rDNA-ITS 領域および *cox II* 遺伝子は進化とともに変異が蓄積しており、種特異的な塩基配列を同定に利用できるというだけでなく、塩基配列の類似度の比較から系統進化的関係も分析できるという利点がある。

## V 検 出

PCR による検出では、最初に環境サンプルから DNA を抽出する方法を確立することが重要である。土壌の例では、DNA を簡易に抽出するキットが市販されているが、土壌中に含まれる PCR 阻害物質 (特に腐植酸) の量によって結果の良否が左右される。本研究室では、PCR 阻害物質の除去法を多種組み合わせ合わせた方法により、様々な土壌から *Py. ultimum* だけでなく、*Verticillium dahliae* やアブラナ科植物根こぶ病菌も検出ができるようにした (KAGEYAMA et al., 2003)。これにより、植物体、水、土壌中の病原菌を PCR で検出できるようになってきている。PCR による検出は、わずか 2 日で結果が得られる迅速な方法である。

## VI リアルタイム PCR による定量

防除対策の取り組み程度を判断するために、病原菌量は重要な情報である。

検出の電気泳動像を見ると、バンドの太さが異なる (図-3-1)。鋳型の DNA が少ないと PCR 産物も少なくバンドは細くなり、DNA が多いと多く増幅するので太いバンドになるはずである。この原理に基づき、菌量を推定する。

しかし、PCR による定量には一つ問題がある。PCR のサイクル数が少ないと鋳型 DNA の濃度に依存して PCR 産物ができるので、バンドの太さによって鋳型 DNA の濃度を推定できる。ところが、サイクル数が多いと鋳型 DNA の濃度が高くて PCR 産物は無限に多くなるわけではなく、増幅は頭打ちになる。すると、PCR 産物の量が鋳型 DNA の濃度を反映しないので、バンドの太さが同じになってしまい、鋳型 DNA の濃度を推定できない。

では、鋳型 DNA の濃度が未知のとき、PCR 産物の量が十分で、かつ増幅が頭打ちでないような PCR サイクル数をどのようにして知ればよいのだろうか。この疑問を解決したのがリアルタイム PCR である。PCR の原理は全く同じで、特別な装置により PCR 産物の増幅量を常時 (リアルタイムに) モニタリングできるようになっている。図-3-2 に示すように、ある PCR 産物量 (Ct ライン) に達するのに必要な PCR サイクル数 (Ct 値) を

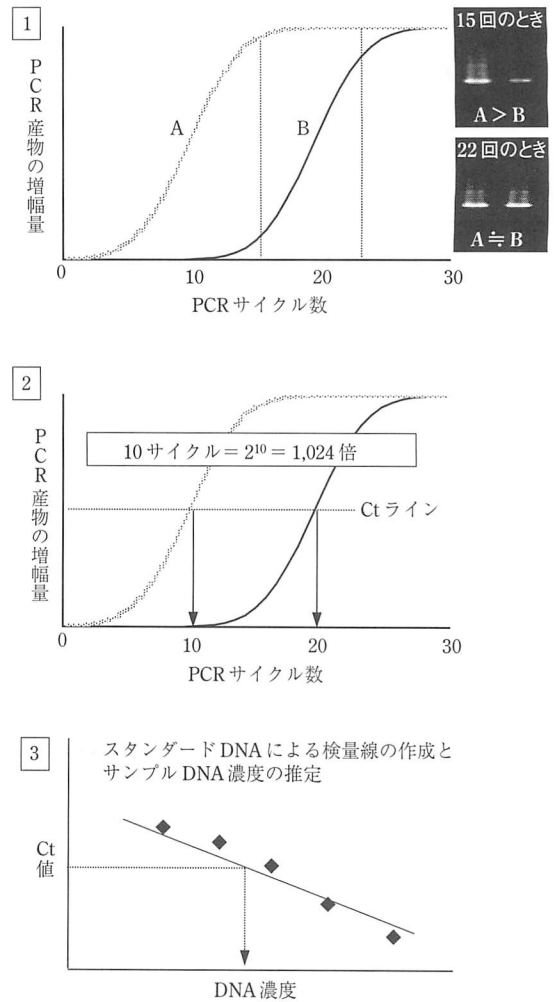


図-3 リアルタイム PCR による DNA 定量法 (浅野原図)

調べ、このとき既知濃度の DNA も同時に PCR して比較する。DNA 濃度とその濃度における Ct 値から、図-3-3 のような検量線を引き、未知サンプルの DNA 量を推定する。一細胞当たりの DNA 量をあらかじめ測定しておけば、リアルタイム PCR で得られた DNA 量を菌量に換算できる。

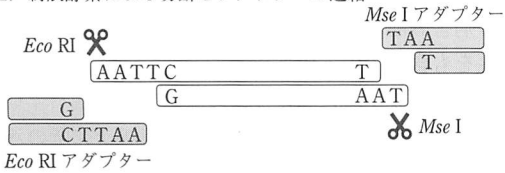
## VIII 個体群構造解析

個体群の分析では、RAPD-PCR や AFLP が使われている。ゲノム全体の塩基配列の違いを、PCR で検出して類似度を調べる方法である。

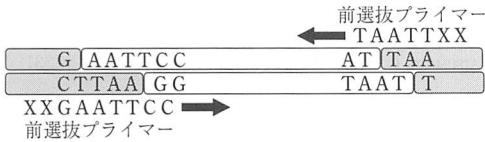
RAPD-PCR は、10 塩基対の短いプライマーを用いてゲノム DNA を任意に増幅し、増幅産物の長さを比較して類似度を調べる方法である。

AFLP では、ゲノム DNA を制限酵素で切断し、その

1. 制限酵素による切断とアダプターの連結



2. 前選抜 PCR



3. 選抜 PCR

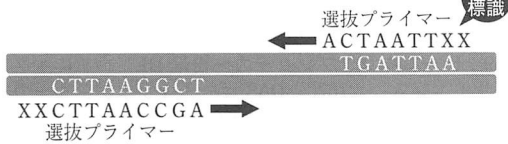


図-4 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) 法の原理

切り口にアダプター（塩基配列がわかっている短い DNA）を連結する（図-4-1）。アダプターが連結した DNA を前選抜プライマー（アダプターに任意の配列を 2～3 塩基付加したもの）にて PCR する（図-4-2）。次に、選抜プライマー（前選抜プライマーに任意の配列を 2～3 塩基付加したもの）にて二段階目の選択的 PCR を行う（図-4-3）。このようにしてゲノム中の任意の領域を増幅し、バンドパターンの分析から菌株間の類縁度を調べる。

本研究室では、RAPD-PCR と AFLP によって、バラおよびカランコエの根腐病菌 *Py. helicoides* の個体群構造を調べたところ、宿主植物、栽培様式、栽培地域にそれぞれ固有の個体群のあることが明らかになった。このことから、産地間や作物間を伝染するのではなく、それぞれ別の接種源が直接各地に導入されるか、あるいは土着の個体群が発病を引き起こしていると考えられた。

VII 個体識別

個体識別は、法医学の分野で既に実用されている技術である。例えば、殺人現場に残されていた頭髪が被疑者のものであるかどうかの鑑定に使われたり、中国残留孤児の親子判定に用いられたりしている（図-5）。

核ゲノムの非コード領域（遺伝子として読み取られない領域：実は人間では 90% 以上がこの領域）には、2～5 塩基対の配列が数回から数十回繰り返している部分が

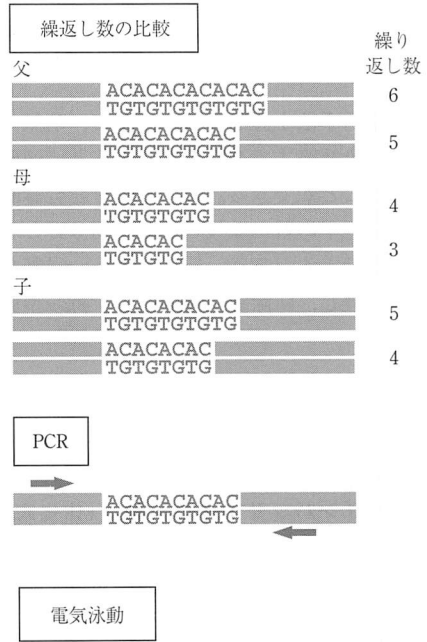


図-5 マイクロサテライトマーカーによる親子判別

存在し、繰返し数が個体により異なる例が知られている。この部分はマイクロサテライトマーカーと呼ばれており、個体による繰返し数の違いを利用して個体識別が行われている。実際には、マイクロサテライトマーカーの前後にプライマーを設計し、ゲノム DNA を PCR して、繰返し数の違いを電気泳動で検出する。

この技術では、マイクロサテライトマーカーを見つけることが困難で、植物病原菌ではまだ多くの研究はないが、ゲノム DNA の全塩基配列が明らかになっている *Fusarium gaminearum* で見出されている。ゲノムの全塩基配列を決定するプロジェクトがいくつかの植物病原菌で進められており、これに伴いマイクロサテライトマーカーによる個体識別技術は一般的になると思われる。また、動物の分野ではゲノム全体の塩基配列がわからない状態でもマイクロサテライトマーカーをみつける方法の論文が発表されているので、これらの植物病原菌への

応用が期待できる。

## おわりに

分子生物学的手法を診断学に応用して、病気の診断から病原菌の伝染経路までを明らかにすると、適確な防除法を提案することができる。この分野を総合診断学と名づけ、植物病理学の新たな核となる学問分野として位置付けることができるだろう。総合診断は、過剰な化学薬剤の投与を回避し、防除費用を節約し、持続型農業の推

進に大きな役割を果たすことができる。また、この新しい型の病害診断は、サービスを越えた新しいビジネスの可能性をも含んでいるであろう。

本原稿を作成するに当たり、岐阜大学流域圏科学研究センターの千田昌子氏と現(財)産業創造研究所の浅野貴博氏に協力をいただいた。記して、厚く御礼申し上げる。

## 引用文献

- 1) KAGEYAMA, K. et al. (2002): J. Gen. Plant Path. 69: 153 ~ 160.
- 2) MARTIN, F. N. (2000): Mycologia 92: 711 ~ 727.
- 3) MATSUMOTO, C. et al. (1999): Mycoscience 40: 321 ~ 331.

新しく登録された農薬 (5 ページから続き)

### ●カルタップ・BPMC 粒剤

21690: ST パダンバッサ 1 キロ粒剤: (住化武田農業) 2006/4/5

カルタップ: 14.0%, BPMC: 16.0%

稲: ニカメイチュウ, イネドロオイムシ, ツマグロヨコバイ, ウンカ類, コブノメイガ, イネミズゾウムシ, イネツトムシ: 収穫 30 日前まで

### ●アセタミプリド複合肥料

21693: レインボーフラー EX (ヤシマ産業) 2006/4/10  
アセタミプリド: 0.04%

ばら (ポット・プランター等の容器栽培), バンジー, (ポット・プランター等の容器栽培), ペチュニア (ポット・プランター等の容器栽培): アブラムシ類: 生育期

### ●BT 水和剤

21694: サブリナフロアブル (明治製菓), 21695: サンケイ サブリナフロアブル (サンケイ化学): 2006/4/19

バチルス チューリンゲンシス菌の生芽胞及び産生結晶毒素: 10.0%

野菜類: コナガ: 発生初期収穫前日まで, 茶: チャノコカクモンハマキ, チャハマキ: 発生初期摘採 7 日前まで

## 「殺菌剤」

### ●メトミノストロピン粒剤

21687: ホクコーイモチエース 1 キロ粒剤 10 (北興化学工業) 2006/4/5

メトミノストロピン: 10.0%

稲: いもち病: 収穫 35 日前まで (無人ヘリコプターによる散布)

### ●フラメトピル・メトミノストロピン粒剤

21688: ホクコーイモチエースリンバー 1 キロ粒剤 (北興化学工業) 2006/4/5

フラメトピル: 4.5%, メトミノストロピン: 10.0%

稲: いもち病, 紋枯病: 収穫 35 日前まで (無人ヘリコプターによる散布)

### ●トリシクラゾール水和剤

21691: ST ビームゾル (住化武田農業) 2006/4/5

トリシクラゾール: 20.0%

稲: いもち病: 収穫 7 日前まで (散布, 空中散布, 無人ヘリコプターによる散布)

### ●EDDP 粉剤

21701: 協友ヒノザン粉剤 25DL (協友アグリ) 2006/4/19  
EDDP: 2.5%

稲: いもち病, 穂枯れ (ごま葉枯病菌): 収穫 21 日前まで

## 「殺虫殺菌剤」

### ●エチプロール・シラフルオフェン・トリシクラゾール粉剤

21669: ビームクラップジョーカー粉剤 DL (バイエルクロップサイエンス), 21670: DAS ビームクラップジョーカー粉剤 DL (ダウケミカル日本) 2006/4/5

エチプロール: 0.25%, シラフルオフェン: 0.4%, トリシクラゾール: 0.5%

稲: いもち病, ウンカ類, ツマグロヨコバイ, カメムシ類, コブノメイガ: 収穫 14 日前まで

### ●クロチアニジン・ジクロシメット・チアジニル・フラメトピル粒剤

21671: プロパック箱粒剤 (住友化学) 2006/4/5

クロチアニジン: 1.5%, ジクロシメット: 1.5%, チアジニル: 6.0%, フラメトピル: 4.0%

稲 (箱育苗): いもち病, 紋枯病, イネミズゾウムシ, イネドロオイムシ, ウンカ類, ツマグロヨコバイ: 移植 3 日前 ~ 移植当日

### ●クロチアニジン・ジクロシメット・フェリムゾン粉剤

21699: 三共ブラストッパダントツ粉剤 DL (北海三共) 2006/4/19

クロチアニジン: 0.15%, ジクロシメット: 0.2%, フェリムゾン: 2.0%

稲: いもち病, ウンカ類, ツマグロヨコバイ, カメムシ類: 収穫 21 日前まで

## 「除草剤」

### ●イソウロン・DBN 粒剤

21666: ネコソギ A 粒剤 (レインボー薬品) 2006/4/5

イソウロン: 1.0%, DBN: 2.0%

樹木等 (公園, 庭園, 堤とう, 駐車場, 道路, 運動場, 宅地, 墓地, 鉄道等): 一年生雑草, 多年生広葉雑草, スギナ: 雑草発生前 ~ 生育期

### ●アニロホス・ダイムロン・ベンスルフロンメチル粒剤

21667: 三共ガスバ 1 キロ粒剤 51 (三共アグリ), 21668: ガスパ 1 キロ粒剤 51 (デュボン) 2006/4/5

アニロホス: 4.5%, ダイムロン: 4.5%, ベンスルフロンメチル: 0.51%

移植水稲: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ミズガヤツリ, ウリカワ, ヒルムシロ (九州), セリ, アオミドロ・藻類による表層はく離 (近畿・中国・四国): 移植後 3 ~ 15 日 (ノビエ 2.5 葉期まで)

(15 ページへ続く)