

ミニ特集：東北地方におけるキュウリホモプシス根腐病の防除対策

# 土壌からのホモプシス根腐病菌検出技術の開発と 秋田県におけるその利用

秋田県立大学 生物資源科学部 <sup>ふるや</sup>古屋 <sup>ひろみつ</sup>廣光・<sup>ふじ</sup>藤 <sup>しんいち</sup>晋一  
秋田県病害虫防除所 <sup>と</sup>戸 <sup>ざわ</sup>澤 <sup>せい</sup>清 <sup>とく</sup>徳

## はじめに

ウリ類のホモプシス根腐病は1980年代に我が国で初めて発生が報告されてから、各地で発生が認められるようになった。東北地方では1994年に初めて福島県（キュウリ（施設））で見つかった後、岩手県（2001年、キュウリ（露地））、宮城県（2005年、キュウリ（施設））、山形県（2006年、キュウリ（施設））で発生が認められた（門田，2008）。秋田県においても2008年に県中央部においてメロンで初めて発生が認められた後，2009年県南部においてキュウリ（露地）で発生が確認され危機感が募った。このときすでに我々は本病原菌（*Phomopsis sclerotioides*）の土壌からの高感度検出技術を開発していたことから，これを利用して2010～13年にかけて県内の病害発生ならびに病原菌分布の実態調査を行い，分布拡大阻止を含めた病害対策技術の構築が計られた。ここでは，この間の秋田県の取組みをとおして，土壌の遺伝子検査による本土壌病害の分布調査において注意した点あるいは調査結果の利用法について我々が経験したことを紹介したい。

## I 土壌からの病原菌検出

### 1 土壌の遺伝子検査方法

本菌の土壌からの検出は，土壌から抽出したDNAを鋳型として本病原菌に特異的なプライマー（CPs1/CPs2, SHISHIDO et al., 2010）を用いたPCR法によった。採取した土壌サンプル約20gをよく乾燥した後，鉄棒およびビーズショッカーで粉碎する。粉末状となった土壌0.5gから，Fast DNA SPIN Kit for soil（MP Biomedicals社，USA）を用いてDNAを抽出する。得られたDNAを鋳型としてnested PCRを行う。すなわちユニバーサルプライマーITS1/ITS4を用いてPCRを行い，次

にこれで得られる増幅産物を標的として特異的プライマーCPs1/CPs2を用いたPCRを行う。さらに，感度を向上させるため，特異的プライマーによるPCR反応において2種類のTaq DNAポリメラーゼ（recombinant Taq DNA polymerase：タカラバイオ株式会社，およびAmpliTaq Gold DNA polymerase：Applied Biosystem）を用い，このときのPCR反応のサイクル数を通常より多くした（time-release PCR法）。また，ここで用いる特異的プライマーCPs1の5'末端を蛍光色素FAMで標識したプライマー（Applied Biosystem）を用いることで，シーケンサー（ジェネティックアナライザー3130XL, Applied Biosystem）を使ってPCR増幅産物を検出することが可能となる。これによって増幅産物の検出を自動化できるだけでなく，増幅産物の有無をピークのサイズ値と蛍光シグナルの強度によって確認できるようになった（藤ら，2007；Iro et al., 2012）。なお本研究における土壌遺伝子検査のジェネティックアナライザー解析はすべて秋田県立大学バイオテクノロジーセンターを利用した。

### 2 遺伝子検査結果の判定

ジェネティックアナライザーによる解析結果は，増幅産物の塩基数に対応したピークの位置（サイズ値）および増幅産物の量に対応した蛍光シグナルの強度（以下，シグナル強度）として与えられる。陽性か陰性かの判定はこのサイズ値とシグナル強度によって行う。

ホモプシス根腐病菌に特異的な増幅産物のサイズ値は，培養菌体から得たDNAを用いて19回行った実験の結果は最小値が381.60で最大値が385.38で，中央値は383.49であった（3.78の幅）であった。このようにサイズ値は，菌体抽出DNAを鋳型としたときでも実験によって変動するので，解析にあたっては常にポジティブコントロールを同時に解析する必要がある。なお，通常このピークは一峰性である。しかし，蛍光色素が著しく多い場合などに台形となることがあり，そのときには台形の肩部分の2箇所のサイズ値が与えられることがある。このようなときには，両方の肩部分のサイズ値の中央値をそのピークのサイズ値として扱った。

陽性か陰性を判断するもう一つの基準はシグナル強度

Detection of Black Root Rot Fungus, *Phomopsis sclerotioides*, in Soil of Commercial Cucurbit Fields. By Hiromitsu FURUYA Shin-ichi FUJI and Seitoku TOZAWA

（キーワード：ウリ類ホモプシス根腐病菌，土壌遺伝子検査，サンプリング法，広域圃場検査）

表-1 ジェネティックアナライザー解析出力値の評価基準

判定結果	サイズ値	シグナル強度
陽性	$PC - 2.50 \leq A \leq PC + 2.50$	$400 \leq T$
擬陽性	$PC - 3.50 \leq A < PC - 2.50$ および $PC + 2.50 < A \leq PC + 3.50$	$100 \leq T < 400$
判定困難	$PC - 5.50 \leq A < PC - 3.50$ および $PC + 3.50 < A \leq PC + 5.50$	$50 \leq T < 100$
陰性	$A < PC - 5.5$ および $PC + 5.5 < A$	$T < 50$

PC：ポジティブコントロールのサイズ値。

A：当該サンプルのサイズ値。

T：当該サンプルのシグナル強度。

である。バックグラウンドの強度は通常3～6である。そのため20前後であっても、解析チャートには明確なピークとして示される。しかし蛍光色素（がついた増幅産物）のごくわずかな混入でもこの程度のピークは現れる可能性はあることから、陽性と判断するには一定のシグナル強度が必要と考えた。陽性と陰性の境界がどのあたりかを判断する基準を厳密に定めることはできないので、作業仮説としてかなり慎重な基準を定めた（表-1）。その後3年間、実際に多数の土壌検査を行い、陽性あるいは擬陽性となった圃場の追跡調査をした結果、サイズ値については、他の微生物と混同したことを明確に示す結果はこれまで得られたことがないことからおおむね妥当と考えている。一方シグナル強度については、190で擬陽性と判定されたサンプルを採取した圃場でその後病原菌が分離されたことがあった。サイズ値が一致し、シグナル強度が100を超えるピークは警戒が必要と考えている。これらの点についてはさらに経験を積む必要があると考えている。

## II サンプリング法に基づく検査結果の解釈

1回の遺伝子検査で用いる土壌はわずか0.5gである。仮に、10a（作土層15cm）の圃場に10万個の病原菌が均一に分布しているとして、そこで採取した土壌0.5gに病原菌が含まれている確率はおおざっぱに言って300分の1程度である。10万個の病原体が存在してもなお検出するのは極めて難しい。しかもここでは遺伝子検査がほぼ完璧な感度すなわち1個/gの病原菌を確実に検出できると仮定している。わずかな土壌の検査によって圃場全体について病原菌の存否や分布に関して考察するときにはこのような限界を踏まえ、サンプリング法をもとにした確率論的な考察が必要である。以下、圃場における病原菌密度と検出確率の関係を考察した。

本研究では調査対象のウリ類圃場において5地点で土壌を採取し（1地点の採取量は約100g）、一つにまとめてよく混和し、その5gを検査に用いた。このときの結果の解釈について考察する。実際の採取は、露地栽培圃

表-2 ある割合（D）で病原菌が分布する圃場において5地点で採取した土壌を検査し、r個のサンプルが陽性となる確率（ $P < 0.05$ ）

病原菌分布 (D)	陽性サンプル数 (r)					
	5	4	3	2	1	0
1	1.000					
0.9	0.590	0.328	0.073	0.008	0.000	0.000
0.8	0.328	0.410	0.205	0.051	0.006	0.000
0.7	0.168	0.360	0.309	0.132	0.028	0.002
0.6	0.078	0.259	0.346	0.230	0.077	0.010
0.5	0.031	0.156	0.313	0.313	0.156	0.031
0.4	0.010	0.077	0.230	0.346	0.259	0.078
0.3	0.002	0.028	0.132	0.309	0.360	0.168
0.2	0.000	0.006	0.051	0.205	0.410	0.328
0.1	0.000	0.000	0.008	0.073	0.328	0.590
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000

D：病原菌の分布，r：陽性地点（サンプル）数。

場の場合、基本的に対角線法によった。

いまここに、病原菌の分布率がDである圃場があるとする。その圃場で採取したa個のサンプルのうちr個が陽性となる確率（検出確率）をP(r)とすると、これらの間には次の関係がある。

$$P(r) = aCr D^r (1 - D)^{a-r}$$

P(r)：検出確率，D：病原菌の分布率，a：全採取地点（サンプル）数，r：陽性地点（サンプル）数

この式をもとに採取地点数が5のとき病原菌の分布率Dに対応した検出確率P(r)を、陽性サンプル数(r)ごとに求めた（表-2）。陽性サンプル数ごとの検出確率であるから、ここでは採取した土壌サンプルをそれぞれ別々に遺伝子検査されている。これと同様の表をa=2～10についてそれぞれ作成し、検出確率P(r)が95%以上となる分布率(D)を、rごとに求めた（表-3）。そのうち、a=5（5地点でサンプリング）のときの病原

表-3 圃場の土壌サンプリング地点数と陽性サンプル（地点）数をもとにした病原菌分布率の推定 ( $P < 0.05$ )

陽性サンプル数 (r)	全サンプル数 (a)								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10									75 ~ 100
9								72 ~ 100	62 ~ 99
8							69 ~ 100	59 ~ 99	52 ~ 96
7						66 ~ 100	55 ~ 99	47 ~ 95	42 ~ 90
6					61 ~ 100	50 ~ 99	42 ~ 95	37 ~ 89	33 ~ 83
5				55 ~ 100	43 ~ 99	36 ~ 94	31 ~ 88	27 ~ 81	24 ~ 76
4			48 ~ 100	36 ~ 99	29 ~ 93	24 ~ 86	21 ~ 79	19 ~ 73	17 ~ 67
3		37 ~ 100	27 ~ 98	20 ~ 91	17 ~ 83	13 ~ 76	12 ~ 69	11 ~ 63	10 ~ 58
2	23 ~ 100	14 ~ 98	11 ~ 89	9 ~ 80	7 ~ 71	6 ~ 64	5 ~ 58	5 ~ 53	4 ~ 48
1	3 ~ 97	2 ~ 86	2 ~ 74	2 ~ 64	1 ~ 57	1 ~ 50	1 ~ 45	1 ~ 41	0 ~ 38
0	0 ~ 77	0 ~ 63	0 ~ 52	0 ~ 45	0 ~ 39	0 ~ 34	0 ~ 31	0 ~ 28	0 ~ 25

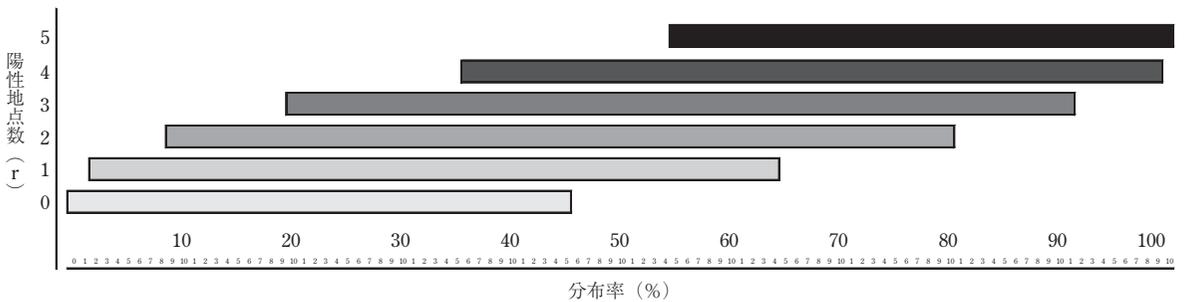


図-1 ある圃場において5地点で採取したサンプルのうちr個が陽性だったとき、推定される病原菌の分布率 ( $P < 0.05$ )

菌分布率を示したものが図-1である。この図において横帯が示す病原菌分布率Dの範囲は、「ある圃場において、5地点(a)で採取したサンプルのうち陽性となったサンプル数がr個になる確率が95%以上である病原菌の分布率(D)」を表している。言い換えると、「5地点(a)で採取したサンプルのうち、r個(0~5)が陽性となった圃場には、その陽性サンプル数が示す帯の範囲の分布率で病原菌が分布する ( $P < 0.05$ )」となる。r/aがわかれば病原菌の分布率を推定することが可能である。この図では採取したサンプルをそれぞれ別々に遺伝子検査することが想定されている。1枚の圃場において5地点で土壌を採取し、一つにまとめて遺伝子検査をして「陽性」となったときには、1~5個のサンプルのいずれかあるいは複数が陽性であることと同義である。そこでこの方法でサンプリングした試料を検査して得られ

た結果は次のように解釈できる。

陽性：病原菌の分布は2~100%である。

陰性：病原菌の分布は0~45%である。

このとき、一つにまとめたサンプルに病原菌が存在するときには必ず検出できることが前提とされている。しかし、あらためて言うまでもなくこの技術にはそこまで(1 CFU/gを常に検出できる)の感度はない。モデル土壌を用いた調査では砂質土壌で最も高い感度が得られたが、それでも10 CFU/gであった。すなわち上記の陽性、陰性が示す分布率についても、実際にはそこまでの精度は得られてないことは承知しておく必要がある。しかし、後述のようにそれでもなお土壌の遺伝子検査には大きな利点がある。

以上の考察を踏まえ、現場における検査結果の活用にあたって結果の解釈は次のようにした。まず「陽性」は

「病原菌が存在する可能性が極めて高い」とした。存在を断定しなかったのは特異性が完全に担保される証拠はないと考えたからである。土壌のような多様な微生物が生息する環境 DNA を扱うときにはこのことも考慮する必要があると考えた。地域で初めて陽性圃場が見いだされたときには特に慎重であることが必要と思われたため、陽性となった圃場で発病を確認するか、病原菌を分離して初めて病原菌の存在を断定した。一方「陰性」は「病原菌が存在しない」ことを単純に意味しない。存在しないのと同じように「45%存在する」可能性もある。依然として警戒が必要である。

以上はサンプル土壌を一つにまとめて調査したときの分布確率を推定したものである。混和しないで別々に分析すればより正確(狭い範囲の分布率)な推定ができる。例えば、10地点で採取したサンプルをそれぞれ検査してそのうちの三つが陽性であれば、病原菌の分布は10～58%と推定される ( $P < 0.05$ ) (表-3)。採取地点数を増やせば、かなり正確な病原菌分布率を推定することも可能である。この分布率そのものの利用価値はともかく、圃場の病原菌汚染程度の指標としてその年の発病程度や被害リスクの推定に利用できる可能性がある。今後、この種の検討が行われることを期待したい。

### III 秋田県における分布調査

秋田県でキュウリホモブシス根腐病の発生が認められたのは2009年の夏の終わりころであった。この年、萎凋を伴って本病が発生したことが認められたのは二つの圃場のみであった。すでに土壌からの病原菌検出技術はほぼでき上がっていたことから、その年、本病の発生が見られた平鹿地域を中心に40圃場の緊急調査を行った結果、7圃場が陽性と判定された。その後の調査でこのうちのいくつかの圃場で生育したキュウリから本病原菌

が分離されたことから、遺伝子検査に一定の信頼性があることが示された。このことはまた、地上部に萎凋症状が見られなくても病原菌が土壌に侵入していることを意味している。地上部症状が発生していない圃場にも病原菌がすでに分布していることで関係者の間に危機感が募り、また本技術に一定の信頼性があることを経験したことから、翌年にはもう少し広い範囲で調査を行うこととなった。

2010年度には秋田県のほぼ全域を対象として調査した。その結果、鹿角地域(約20km四方)で調査した50圃場のうち20圃場で陽性となったほか、北秋田地域(34圃場を調査)においても3圃場が陽性となった。鹿角地域では、かねてから萎凋を伴う生育不良が見られていたが、本病の関与は知られていなかった。土壌の遺伝子検査で陽性となった圃場が見つかったことを受けて、病原菌の分離を試みたところ、いくつかの圃場で病原菌が分離され、この地域に病原菌がかなり広く分布していることが明らかになった。しかし萎凋症状を伴う地上部の発病が見られる圃場は少なく、この時点で5圃場に満たなかった。

鹿角地域では、土壌の遺伝子検査によって初めて、本病が発生していることが明らかになった。これによって、それまで原因不明とされていた萎凋症状の一部が本病によるものと判断された。また地上部の萎凋症状が発生している圃場が五つに満たない時点で、20圃場に本病原菌が存在している可能性が高いことが示されたことで、本病に対する危機感が強く意識されるようになった。

そこでその後も継続して土壌遺伝子検査が実施された結果、ほぼ2年間の調査で67圃場が陽性あるいは擬陽性と判定された(表-4;図-2)。これらのほとんどは肉眼診断で発病が認められていなかった圃場である。土壌検査をする前に発病が知られたのは1圃場のみであっ

表-4 キュウリにおける土壌遺伝子検査結果と発病状況(2010～12年)

地域	調査圃場数	遺伝子検査			根部発病			萎れ被害
		陽性圃場数	擬陽性圃場数	計	偽子座	遺伝子検査	計	
鹿角	266	30	2	32	14	7	21	3
北秋田	87	5	0	5	1	1	2	1
山本	4	0	0	0	0	—	0	0
仙北	20	0	0	0	0	—	0	0
平鹿	116	10	0	10	6	0	6	4
雄勝	165	18	2	20	0	2	2	0
合計	658	63	4	67	21	10	31	8

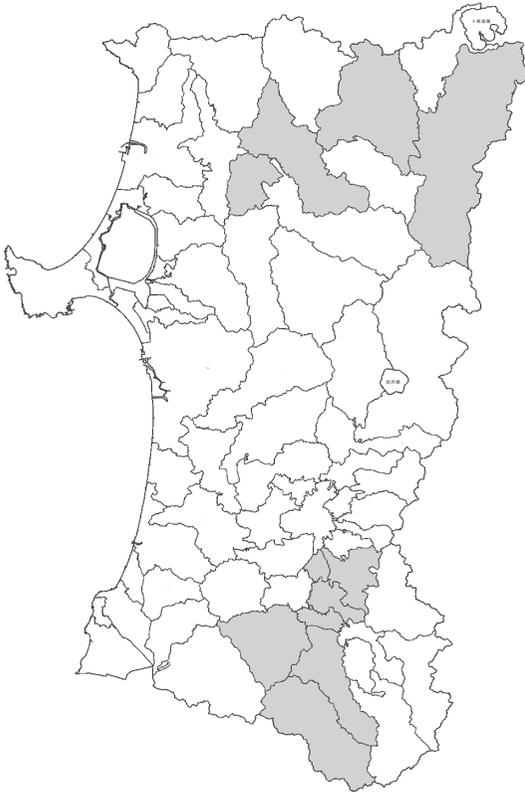


図-2 土壌遺伝子検査によって陽性となった圃場がある市町村 (2009～12年の調査)

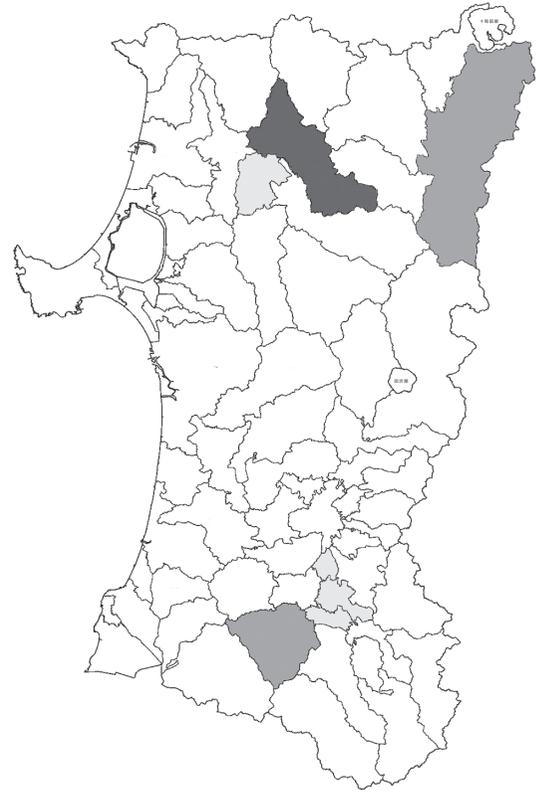


図-3 キュウリの根における発病が確認された市町村 (2009～13年)

淡色：偽子座が疑似微小菌核を確認。

暗色：根の遺伝子検査により陽性。

た。なお、2010～12年度の3年間において、秋田県全県でホモブシス根腐病によると見られる萎凋症状が発生したのは7圃場のみであった。遺伝子検査前から発病が見られた圃場を除く6圃場では、遺伝子検査によって病原菌の存在が強く疑われた後、詳細な調査によって本病の発生が認められたものである。すなわち、最初に発見された圃場を除き、すべてが土壌の遺伝子検査によって見つかったと言ってよい。

次にこの67圃場について病原菌の存在を確認した。その結果、21圃場においてキュウリの根に偽子座が疑似微小菌核のいずれかあるいは両方が観察された。特徴的な症状が確認できなかった圃場から根を採取して遺伝子検査したところ10圃場で採取した試料が陽性となった。これら31圃場のうち7圃場では、実際に本病原菌が純粋分離された。これらの結果から、秋田県では地上部に萎凋症状が見られないが圃場に病原菌が侵入していると見られる潜在的汚染圃場は、調査を実施した658圃場で60圃場で全体の9.1%に及ぶと推察された(戸澤ら, 2014; 図-3, 4)。

これらの調査結果をもとに秋田県では本病への警戒を

呼びかけ、対策を記した二つのパンフレット(「ホモブシス根腐病の防除対策について」, 秋田県病害虫防除所・秋田県立大学編集, 秋田県農林水産部園芸振興課発行, 2013年3月。「きゅうりホモブシス根腐病の対策について」, 秋田県病害虫防除所作成, 2014年3月)を作成してすべてのキュウリ生産農家に配布した。この資料を活用しながら講習会や対面指導を行って本病に対する警戒を喚起するとともに、地元農業協同組合や県農業振興局普及課の協力のもと地域ぐるみで圃場衛生の取組みを強化した。

## おわりに

秋田県において実施された今回の調査は六つの行政的な区分ごとに行われた。現在、そのうちの4地域で本病が発生している。このうち最初に発生が認められた地域を除くすべてで、病気の発生が認められる前に病原菌が検出された。同様のことは岩手県においても経験されている(永坂, 2013)。すなわち本技術によって病気の発

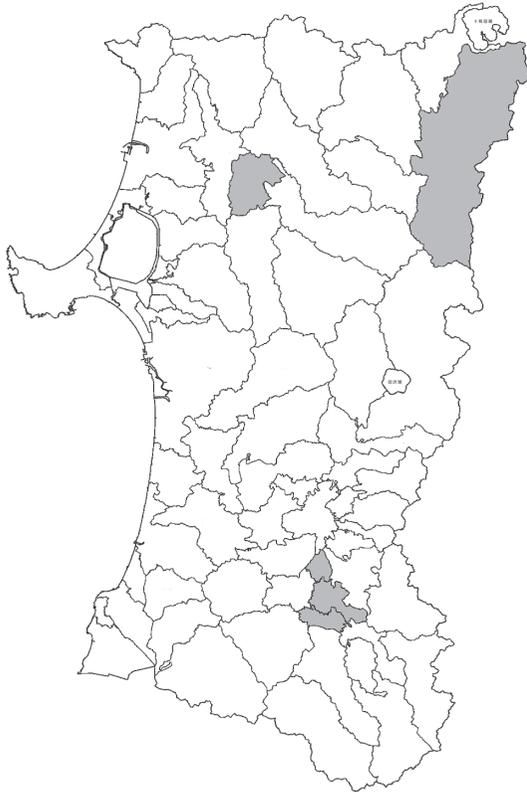


図-4 キュウリホモブシス根腐病によって被害(萎凋、枯死)が確認された市町村 (2009～13年)

生が認識されていない地域あるいは段階で病原菌を検出できることが実証された。それによって甚大な被害を被る前に防除対策の構築と啓発活動が迅速に行われた。もとより根系生息性病原菌は基本的に人の活動によって非汚染圃場に侵入する。これを阻止することが、最初のそして最も効果的な対策技術であることは言うまでもない。今回の経験は、土壌や植物からの病原菌検出技術が革新的に発達した今日、この対策の基本を再度見直すことに意味があることを想起させた。また土壌の健康診断に基づく土壌病管理の重要性も改めて指摘されるようになっている(對馬, 2014)。各種のメタDNA解析技術が大きく進展した今日、土壌や植物根の微生物や微生物相をモニタリングすることによって、土壌の微生物や微生物相を制御する技術開発が、いよいよ我々の視野に入ってきたことを示しているものと考えている。最後に、本研究を遂行するにあたって協力をいただいた秋田県の各地域振興局、農業共同組合の関係各位に厚くお礼を申し上げます。

引用文献

- 1) 藤 晋一ら (2007):日植病報 73:49～50.
- 2) Iro, T. et al. (2012): Plant Disease 96:515～521.
- 3) 門田育男(編)(2008):キュウリホモブシス根腐病防除マニュアル, 農研機構東北農研センター, 39pp.
- 4) 永坂 厚(編)(2013):ウリ科野菜ホモブシス根腐病被害回避マニュアル, 農研機構東北農研センター, 52 pp.
- 5) Shushno, M. et al. (2010): J. Gen. Plant Pathol. 76:21～30.
- 6) 戸澤清徳ら (2014):北日本病害虫研究会報(印刷中).
- 7) 對馬誠也 (2014):健康診断に基づく土壌病害管理ヘソディム, 気候変動に対応した循環型食料生産等の確率のためのプロジェクト, (独)農業環境技術研究所, 122 pp.

農林水産省プレスリリース (26.7.16～8.15)

農林水産省プレスリリースから、病害虫関連の情報を紹介します。  
<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan> の後にそれぞれ該当のアドレスを追加してご覧下さい。

- ◆「平成 26 年度 病害虫発生予報第 5 号 (水稲特集)」の発表について (7/24) /syokubo/140724.html
- ◆「平成 26 年度 病害虫発生予報第 6 号」の発表について (8/14) /syokubo/140814.html

発生予察情報・特殊報 (26.7.1～7.31)

各都道府県から発表された病害虫発生予察情報のうち、特殊報のみ紹介。発生作物：発生病害虫(発表都道府県)発表月日。都道府県名の後の「初」は当該都道府県で初発生の病害虫。  
 ※詳しくは各県病害虫防除所のホームページまたはJPP-NET (<http://www.jpnp.net/>) でご確認下さい。

- ネギ：えそ条斑病(京都府：初) 7/2
- ウメ：輪紋病(愛知県：初) 7/11
- トマト：葉かび病 [レース 2.9, 4.9, 2.5.9 および 4.5.9 の初確認] (栃木県：初) 7/24
- ピーマン：えそ輪点病, トマト：茎えそ病(仮称) (栃木県：初) 7/24
- ナス：トビイロシワアリ(群馬県：初) 7/30