

平成 2 5 年 3 月 1 2 日

平成 2 4 年度レギュラトリーサイエンス新技術開発事業
研究実績報告書

課題番号：

「ハクサイ土壌病害虫の総合的病害虫管理（I P M）体系に向けた技術確立」

研 究 期 間：平成 2 2 年度～平成 2 4 年度（3 年間）

研究総括者名：對馬 誠也

試験研究機関名：独立行政法人農業環境技術研究所

長野県野菜花き試験場

群馬県農業技術センター

国立大学法人九州大学

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター

I. 試験研究の全体計画

1. 研究目的

ハクサイ生産地域で大きな問題となっているハクサイ黄化病と経験的にその助長要因として知られているキタネグサレセンチュウの総合的病害虫管理（IPM）に向け、発病・栽培環境の異なるほ場において、土壌eDNAを用いたPCR-DGGE解析等により、防除時期や要否を判断するための指標を選抜し、その利用可能性を調べる。さらに、DGGE解析結果を基に、発生抑制因子（不活性化菌など）を探索し、その特定と抑制効果の確認を行う。

本研究では、

1. 土壌eDNA解析による防除時期・要否を判断するための指標の探索

2. 黄化病菌、キタネグサレセンチュウ等の不活性化菌等の探索

を行うこととしており、特にこれまで経験的にハクサイ黄化病の助長要因として知られているキタネグサレセンチュウと黄化病関係性を科学的に明らかにし、それらを指標とした黄化病の診断技術を開発するとともに、土壌診断結果に応じた防除対策の適切な選択・組み合わせの提案を目的とする。また、併せて土壌eDNA解析により、黄化病の新たな微生物防除資材候補種の選抜も行う。

これにより、

1. ハクサイ黄化病の土壌診断技術の確立

2. 診断結果に応じた防除対策の提案

3. 黄化病を抑制する生物農薬の開発に向けた候補微生物種の提示

が期待される。

2. 研究内容

（1）中課題1：土壌 eDNA 解析による防除時期・要否を判断するための指標の探索

①小課題1：寒地におけるハクサイ黄化病と線虫害の発生実態調査と土壌情報収集

ア 発病程度の異なるほ場において、発病程度とキタネグサレセンチュウ密度の関係を調べる。

イ 病原菌とキタネグサレセンチュウの検出の有無を指標にした防除対策の選抜とその有効性を検証する。

ウ キタネグサレセンチュウが発病助長要因であるかどうかを科学的に明らかにする。

エ 得られた成果を基に、ハクサイ黄化病の診断と防除対策について、農業関係者への普及に努める。

②小課題2：寒冷地におけるハクサイ黄化病と線虫害の発生実態調査と土壌情報収集

ア ほ場においてキタネグサレセンチュウが発病助長要因であることを確認する。

イ ほ場においてキタネグサレセンチュウ密度を低減する緑肥植物を選抜する。

ウ 得られた成果を基に、ハクサイ黄化病の診断と防除対策について、農業関係者への普及に努める。

③小課題3：PCR-DGGEによる指標候補の選抜

ア PCR-DGGE で黄化病菌が検出できるかどうかを確認する。

イ PCR-DGGE でキタネグサレセンチュウが検出できるかどうかを確認する。

ウ PCR-DGGE 解析データが発病度、病原菌・キタネグサレセンチュウの有無などの指標になるかを検討する。

エ 全課題で得られた成果を基に「ハクサイ黄化病の次世代土壌病害診断マニュアル」を作成し、配布する。

④小課題4：マイクロアレイによる指標候補の選抜

ア 「既知細菌種、黄化病菌、キタネグサレセンチュウ」を合わせた検出用マイクロアレイを作成する。

イ 群馬県、長野県土壌サンプルからの検出を多ない、病原菌、キタネグサレセンチュウの検出の有無および発病と細菌相との関係を解析する。

(2) 中課題2：黄化病菌、キタネグサレセンチュウ等の不活化菌等の探索

- ①不活化菌のスクリーニング法を開発する。
- ②病害未発生ほ場から開発したスクリーニング法を使って不活性化菌を分離する。
- ③選抜した不活化菌の病害抑制効果を確認する。

3. 達成目標及び期待される成果

(1) 達成目標

- ①キタネグサレセンチュウがハクサイ黄化病の発病助長要因となっているか解明する。
- ②土壌 DNA 診断等をもとに、ハクサイ黄化病診断技術の開発を行う。

(2) 期待される成果

- ①本研究により、ほ場レベルで初めて、キタネグサレセンチュウがハクサイ黄化病の発生を助長しているかどうかが明らかになる。
- ②本研究により、「ハクサイ黄化病の次世代診断マニュアル（指導者向け）」が作成される。

1. 年次計画（下記例は22年度採択の3年間実施課題）

項目	平成 2 2 年度	平成 2 3 年度	平成 2 4 年度
1. 指標の探索			
(1) 寒地の発生実態、土壌調査	発生実態、土壌調査（長野県野菜花き試験場、農業環境技術研究所）		
(2) 寒冷地の発生実態、土壌調査	発生実態、土壌調査（群馬県農業技術センター、農業環境技術研究所）		
(3) PCR-DGGE による指標探索	指標探索（農業環境技術研究所、北海道農業技術センター、長野県野菜花き試験場、群馬県農業技術センター）		
(4) マイクロアレイによる指標探索	指標探索（九州大学、農業環境技術研究所、北海道農業技術センター、長野県野菜花き試験場、群馬県農業技術センター）		
2. 不活性化菌等の探索			
(1) 不活性化菌等の探索	不活性化菌探索（農業環境技術研究所、北海道農業技術センター、長野県野菜花き試験場、群馬県農業技術センター）		
所要経費（合計）	10,000 千円	8,000 千円	7,000 千円

II. 実施体制

項目	担当研究機関	研究担当者	エフオー ト (%)
研究総括者	農業環境技術研究所	對馬 誠也	15
1. 指標の探索	農業環境技術研究所、長野県野菜花き試験場、群馬県農業技術センター、九州大学、北海道農業研究センター	○ 對馬誠也 吉田重信 山岸菜穂 小木曾秀紀 藤永真史 横澤志織 池田健太郎 桑原克也 久原 哲 田代康介 串田篤彦	前出 20 25 15 5 15 25 20 5 5 20
(1) 寒地の発生実態、土壌調査	長野県野菜花き試験場、農業環境技術研究所	△ 山岸菜穂 小木曾秀紀 藤永真史 横澤志織 對馬誠也 吉田重信	前出 前出 前出 前出 前出 前出
(2) 寒冷地の発生実態、土壌調査	群馬県農業技術センター、農業環境技術研究所	△ 池田健太郎 桑原克也 對馬誠也 吉田重信	前出 前出 前出 前出
(3) PCR-DGGE による指標探索	農業環境技術研究所、長野県野菜花き試験場、群馬県農業技術センター、北海道農業研究センター	△ 對馬誠也 吉田重信 山岸菜穂 小木曾秀紀 藤永真史 横澤志織 池田健太郎 桑原克也 串田篤彦	前出 前出 前出 前出 前出 前出 前出 前出 前出
(4) マイクロアレイによる指標探索	九州大学、農業環境技術研究所、長野県野菜花き試験場、群馬県農業技術センター、北海道農業研究センター	△ 久原 哲 田代康介 對馬誠也 吉田重信 山岸菜穂 小木曾秀紀	前出 前出 前出 前出 前出 前出

	一		藤永真史 横澤志織 池田健太郎 桑原克也 串田篤彦 對馬誠也 吉田重信 串田篤彦 山岸菜穂 小木曾秀紀 藤永真史 横澤志織 池田健太郎 桑原克也	前出 前出 前出 前出 前出 前出 前出 前出 前出 前出 前出 前出 前出 前出
2. 不活性化菌等の探索	農業環境技術研究所、北海道農業研究センター、長野県野菜花き試験場、群馬県農業技術センター	○	對馬誠也 吉田重信 串田篤彦 山岸菜穂 小木曾秀紀 藤永真史 横澤志織 池田健太郎 桑原克也	前出 前出 前出 前出 前出 前出 前出 前出 前出
(1) 黄化病の不活性化菌等の探索	農業環境技術研究所、北海道農業研究センター、長野県野菜花き試験場、群馬県農業技術センター	△	對馬誠也 串田篤彦 吉田重信 山岸菜穂 小木曾秀紀 藤永真史 横澤志織 池田健太郎 桑原克也	前出 前出 前出 前出 前出 前出 前出 前出 前出

Ⅲ. 主要な成果

1. 成果の内容

- (1) **【成果】キタネグサレセンチュウがハクサイ黄化病の発生助長要因であることを解明した。(p8～10)**

(解説) この結果から、黄化病の防除においては、病原菌だけでなく、キタネグサレセンチュウの両方を対象にした防除が重要であることを明らかにした。これにより、診断に基づく【防除対策の選択の幅】が広がった。「生産」現場、行政指導に役立つ情報と考える。

- (2) **【成果】発病ほ場からの土壌サンプルについて、PCR-DGGE 解析によりハクサイ黄化病菌とキタネグサレセンチュウを検出できる手法を開発した。(p10～11)**

(解説) PCR-DGGE による検出限界の関係で、病害によっては病原菌密度が低い場合は PCR-DGGE で検出できないことがあるが、ハクサイ黄化病については、長野県、群馬県の土壌とともに病原菌、キタネグサレセンチュウが検出できることが明らかになった。

- (3) **【成果】キタネグサレセンチュウとハクサイ黄化病菌の有無の組み合わせが発病程度と関係があることを明らかにした。(p11～13)**

(解説) 黄化病菌とキタネグサレセンチュウともに検出されたほ場では発病が多く、どちらかが検出された場合には発病が中程度であるなど、発病程度と両者の有無に関係があることがわかった。

- (4) **【成果】「ハクサイ黄化病の次世代土壌病害診断マニュアル(指導者向け)」を作成し、配布した。(p14)**

5 項目の診断項目 (1. 病原菌、キタネグサレセンチュウ検出、2. 前作発病度、3. 土壌生物性・理化学性、4. 土壌群名、5. DRC (発病しやすさ指標) を基に、比較的簡単に診断が可能な診断法を開発し、関係機関に配布した。

2. 成果の活用

- (1) 成果について、担当県においては、生産現場への普及を目的として、農業関係者への情報発信を進めている。

(例)

- ① 群馬県において、「平成24年度農業生産関連機関協議会」などで紹介して、普及につとめている。
- ② 長野県において、「JA 佐久間小沼支所野菜部会の作柄安定対策講習会」(長野県)等で紹介して、普及につとめている。

- (2) 本研究で開発した「診断」マニュアルの考え方を基に、「診断結果に応じた対策技術の支援システム」を加えることにより、どの土壌病害に対応可能な、これまでにない予防を重視した「土壌病害診断・対策支援システム」(ヘソディム)の開発(農林水産省委託プロジェクト気候変動プロジェクト【土壌病害虫診断技術等の開発:2011～2013】)に役立っている。なお、ヘソディムは、「健康診断に基づく土壌病害管理」(Health checkup based Soil-borne Disease Management: HeSoDiM)の略である。

Ⅳ. 研究実績報告

1. 中課題 1: 土壌 eDNA 解析による防除時期・要否を判断するための指標の探索

【結果】

- ・キタネグサレセンチュウが黄化病の発生助長要因であることを明らかにした。

- ・PCR-DGGE が汚染土壌からの病原菌とキタネグサレセンチュウの診断により可能であることを明らかにした。
- ・病原菌とキタネグサレセンチュウの有無の組み合わせで発病程度を大まかに推定できることが明らかになった。
- ・得られた成果を基に「ハクサイ黄化病の次世代土壌病害診断マニュアル（指導者向け）」を作成し、配布した。

(1) 小課題1：寒地におけるハクサイ黄化病と線虫害の発生実態調査と土壌情報収集

①平成23年度までの研究実績概要

- ア 22年度に設置した3ほ場（G1、G2及びG5ほ場）において、ハクサイの栽培を行い、発病実態調査と土壌情報の収集を行った。
- イ 設定した3ほ場では、ハクサイ黄化病の発生は甚発生、中発生、発生なしであり、指標候補の解析としては適したほ場選定であったと思われる。
- ウ G1、G2ほ場ではエンバク野生種の栽培すき込みによるキタネグサレセンチュウの抑制および発病抑制効果は確認されなかった。
- エ 現地土壌を用いたポット試験において、発病反応曲線を作成した。また、殺センチュウ粒剤処理による発病抑制が見られ、キタネグサレセンチュウによる本病の助長が確認された。

②平成24年度における研究実績概要

ア **【結果】様々な発病程度とキタネグサレセンチュウ密度を畑で検証した**

3年間で6箇所、のべ8ほ場にてハクサイ黄化病の発病、土壌情報の調査を行った（表1、2）。発病の程度は未発生～甚発生に及んだ。また、キタネグサレセンチュウ数も土壌20gあたり、0～284頭であった。指標の選抜を行うにあたって、バリエーションのある発病ほ場調査を行うことができた。

イ **【結果】病原菌とキタネグサレセンチュウを指標にした防除対策の選択とその有効性の検証**

ハクサイ黄化病菌とキタネグサレセンチュウのバンドを指標として用い、『畑の診断』から防除メニューの選定を行った。その結果、G1ほ場では土壌診断結果に基づき、土壌消毒を行うことで無処理区が54%にとどまった可販株率を70%に維持することができた。一方、G2ほ場では土壌診断結果に基づき、エンバク野生種を用いた輪作のみを実施したが、可販株率は97%と高く、無処理区の発病も少程度ではあったものの、不必要な土壌消毒を回避できた（表3）。

ウ **【結果】キタネグサレセンチュウが発病助長要因であることを解明（長野県も確認）**

キタネグサレセンチュウ無接種土壌（PP-）では、微小菌核の密度が0、10、100、1000個/g乾土と増えるにつれて、発病株率も11、22、33、44%と増加した。キタネグサレセンチュウの接種土壌（PP+）では、微小菌核密度が100個および1000個/g乾土で、黄化病菌単独接種と比較して顕著に発病が増加した。また、微小菌核密度が1000個/g乾土の場合、PP無接種土壌と比較して有意に発病が増加した（図1）。

エ **【結果】普及関係者への普及活動を実施**

これら成果を「平成24年度農業生産関連機関協議会」（群馬県）などで紹介して、普及活動に努めている。

表1 群馬県のハクサイ黄化病発生圃場における発病状況およびキタネグサレセンチュウ数の調査結果(2011年)

圃場	場所	試験区	品種	菌種	キタネグサレセンチュウ ¹⁾		可販株率	発病株率	発病指数 ²⁾
					定植時	終了時			
G1	長野原町	無処理	勝春	<i>Verticillium longisporum</i>	17.0	248.3	5	100	2.90
		エンバク野生種2	勝春	<i>V. longisporum</i>	12.0	125.0	0	100	3.00
		エンバク野生種3	勝春	<i>V. longisporum</i>	19.0	248.0	0	100	3.00
G2	長野原町	無処理	黄愛65	<i>V. longisporum</i>	0.3	5.0	79	26	0.63
		エンバク野生種1	黄愛65	<i>V. longisporum</i>	3.0	3.2	77	27	0.50
		エンバク野生種2	黄愛65	<i>V. longisporum</i>	5.7	8.2	71	53	0.82
G5	伊勢崎市	無処理	勝春	<i>V. dahliae</i>	1.7	0.8	0	0	0.00
		エンバク野生種	勝春	<i>V. dahliae</i>	0.0	1.2	0	0	0.00
		無処理	ムーンビーチ	<i>V. dahliae</i>	1.7	0.8	0	0	0.00
		エンバク野生種	ムーンビーチ	<i>V. dahliae</i>	0.0	1.2	0	0	0.00

1) 土壌20gあたりの数をベルマン法で計測した。

表2 群馬県のハクサイ黄化病発生圃場における発病状況およびキタネグサレセンチュウ数の調査結果(2012年)

圃場	場所	試験区	品種	菌種	キタネグサレセンチュウ ¹⁾		可販株率	発病株率	発病指数 ²⁾
					定植時	終了時			
G1	長野原町	無処理	みねぶき505	<i>V. longisporum</i>	11.8	9.4	54	66	1.49
		土壌消毒	みねぶき505	<i>V. longisporum</i>	0.5	0.6	70	38	0.92
		殺センチュウ粒剤	みねぶき505	<i>V. longisporum</i>	3.2	7.3	47	61	1.58
G2	長野原町	無処理	黄愛65	<i>V. longisporum</i>	1.7	3.8	100	17	0.17
		エンバク野生種	黄愛65	<i>V. longisporum</i>	2.0	14.7	97	14	0.17
G3	嬬恋村	無処理	無双	<i>V. dahliae</i>	0.0	0.0	40	100	2.32
		無処理	黄ごころ65	<i>V. dahliae</i>	0.0	0.0	80	40	0.94
		無処理	秋理想	<i>V. dahliae</i>	0.0	0.0	71	76	1.62
G4	嬬恋村	無処理	無双	<i>V. longisporum</i>	0.0	0.0	14	97	2.76
		無処理	黄ごころ65	<i>V. longisporum</i>	0.0	0.0	39	73	2.03
		無処理	秋理想	<i>V. longisporum</i>	0.0	0.0	60	74	1.66
G7	伊勢崎市	無処理	勝春	<i>V. dahliae</i>	0.2	0.0	89	52	0.65
		土壌消毒	勝春	<i>V. dahliae</i>	0.3	0.0	93	60	0.69
		無処理	ムーンビーチ	<i>V. dahliae</i>	0.2	0.0	100	29	0.29
		土壌消毒	ムーンビーチ	<i>V. dahliae</i>	0.3	0.0	100	39	0.39

1)、2) 表1参照

表3 次世代土壌病害管理における『畑の診断』から『発生リスクに応じた防除対策』のシミュレーション

圃場	畑の診断							防除対策と結果			
	2011				バンド出現率 ¹⁾		総合診断結果	2012			
	試験区	発生状況	可販株率	発病株率	病原菌	PP ³⁾		防除対策	発生状況	可販株率	発病株率
G1	無処理	甚発生	5	100	88.9	100	発病リスク高	無処理	中発生	54	66
								土壌消毒		70	38
								殺センチュウ粒剤		47	61
G2	無処理	多発生	79	26	27.8	100	発病リスク中	無処理	少発生	100	17
								エンバク野生種		97	14

1) 栽培期間を通じたPCR-DGGE解析によるバンドの出現率 2) 土壌20gあたり 3) PP: キタネグサレセンチュウ

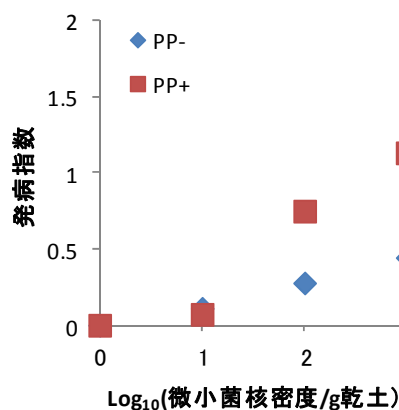


図1 キタネグサレセンチュウの有無がハクサイ黄化病発病に及ぼす影響

PP+: キタネグサレセンチュウ接種土壌

PP-: キタネグサレセンチュウ無接種土壌

アスタリスクはPP+区とPP-区との間に有意差があることを示す(発病株率: Fisherの正確確率検定、発病指数: Mann-WhitneyのU検定、 $p < 0.05$)。

(2) 小課題2：寒冷地におけるハクサイ黄化病と線虫害の発生実態調査と土壌情報収集

①平成23年度までの研究実績概要

ア センチュウ密度とハクサイ黄化病発生程度

野辺山ほ場では、エンバク＋クロルピクリン処理により、センチュウ密度が収穫時まで低く維持され、根部へのセンチュウ加害も認められず、黄化病の発病は認められなかった。御代田ほ場は、22年度センチュウ密度が高く、黄化病が多発生した。23年度はクロルピクリン処理により、PCR-DGGE解析でハクサイ黄化病菌のバンドが検出されるものの、センチュウ密度は激減し、ハクサイ黄化病は少発生となった。以上の事より、センチュウの加害を抑えることが、ハクサイ黄化病防除に重要であることが明らかとなった。

イ エンバク処理のセンチュウ密度抑制効果

エンバクを処理することによりセンチュウの密度が抑制されることが判明した。

ウ 多様性指数の変化

ハクサイ黄化病について、糸状菌の多様性指数に加えセンチュウの多様性指数の変化を解析することで、発病危険度予測の可能性が示唆された。エンバク野生種について、長野県のハクサイ産地において課題となる黒斑細菌病への感染が確認されたため、緑肥をエンバク野生種からライムギに変更して継続する。

②平成24年度における研究実績概要

ア **【結果】キタネグサレセンチュウが発病助長要因であることを確認（群馬県も確認）**

長野県において、ハクサイ黄化病助長要因として、ネグサレセンチュウ類が大きな影響を及ぼしていることを明らかにし、県内に対して殺センチュウ剤を用いた黄化病の発病抑制技術を普及技術として情報提供した（表1）。

イ **【結果】「ヘイオーツ」のキタネグサレセンチュウ密度低減効果を確認**

ネグサレセンチュウ類密度がエンバク「ヘイオーツ」およびライムギ「R-007」の栽培で抑制されることを明らかにした。長野県のハクサイ主産地でこれまで緑肥として輪作体系に組み込まれてきたエンバク「ヘイオーツ」がハクサイの黒斑細菌病の感染リスクを高める可能性があるとの知見が得られており、代替の緑肥が早急に必要であり、本成果についても県内に対して普及技術として情報提供した（表2）。

ウ **【結果】「診断指標」の有効性を現地試験で実証**

農業環境技術研究所で策定した発病予測指標の有効性を現地において実証した（表3）。

エ **【結果】農業関係者に対して普及活動を実施**

これら成果を「JA佐久間小沼支所野菜部会の作柄安定対策講習会」（長野県）等で紹介して、普及活動に努めている。

表1 殺センチュウ剤のハクサイ黄化病抑制効果（平成24年、野菜花き試験場）

試験土壌	殺センチュウ剤	ハクサイ黄化病 発病株率(%)	ネグサレセンチュウ類密度 (頭/25g土)
ハクサイ黄化病菌接種土壌	有	13.9	0.0
	無	45.5	152.3
ハクサイ黄化病多発現地A圃場	有	50.0	0.3
	無	100.0	60.7

表2 緑肥のすき込みがネグサレセンチュウ類に及ぼす影響

		場内圃場 ^{a)}				現地圃場 ^{b)}		現地圃場 ^{c)}	
		5月播種		9月播種		播種前		播種前	
		播種前	すき込み後	播種前	すき込み後	播種前	すき込み後	播種前	すき込み後
ライムギ「007」	1	19.7	3.0	29.7	5.3	0.3	1.0		
	2	10.3	5.3	9.3	7.0	0.0	2.7		
	3	9.3	7.0	1.0	1.0	0.7	0.3		
	平均	13.1	5.1	13.3	4.4	0.3	1.3		
エンバク「ヘイオーツ」	1	15.7	5.3	10.3	6.3			625.0	27.0
	2	6.7	1.3	6.0	1.7			585.0	29.0
	3	—	—	6.7	0.3			637.5	34.5
	平均	11.2	3.3	7.7	2.8			615.8	30.2
無処理	1	10.0	8.7	22.3	27.7	2.0	7.0	577.5	96.0
	2	9.3	9.3	2.3	3.0	0.0	17.0	762.0	200.5
	3	11.3	9.7	8.3	8.0	4.3	9.0	165.0	65.0
	平均	10.2	9.2	11.0	12.9	2.1	11.0	501.5	120.5

表3 発病予測「リスク中」における防除方法の検討(御代田圃場)

試験区	反復	発病株率(%)	H23収穫時土壌		発病予測	防除方法	発病株率(%)		発病度	
			PCR-DGGEバンドの検出有無				「黄愛」	「黄信」	「黄愛」	「黄信」
			圃場	センチュウ						
1	1	0.0	—	+	リスク中	ライムギ「007」	33.3	20.0	11.7	8.3
	2	5.3	—	—			33.3	20.0	13.3	6.7
	3	5.3	—	+			33.3	13.3	13.3	8.3
	平均	3.5					33.3	17.8	12.8	7.8
2	1	0.0	—	+	リスク中	ライムギ「ライ太郎」	66.7	31.3	36.7	21.9
	2	5.3	—	—			53.3	25.0	21.7	15.6
	3	0.0	—	+			66.7	46.7	26.7	26.7
	平均	1.8					62.2	34.3	28.3	21.4
3	1	5.3	—	+	リスク中	クロピク	20.0	6.7	5.0	1.7
	2	5.3	+	+			33.3	6.7	8.3	1.7
	3	5.3	—	+			13.3	13.3	5.0	3.3
	平均	5.3					22.2	8.9	6.1	2.2
4	1	30 ^{注2)}	+	—	リスク中	無処理	80.0	33.3	33.3	23.3
	2	40.0	+	—			73.3	50.0	28.3	23.4
	3	40.0	+	—			53.3	33.3	15.0	16.7
	平均	36.7					68.9	38.9	25.6	21.1

耕種概要: 平成24年7月25日定植、9月19日発病調査

(3) 小課題3: PCR-DGGEによる指標候補の選抜

①平成23年度までの研究実績概要

ア 群馬県および長野県のハクサイほ場から様々な時期に採取した土壌サンプルおよび線虫サンプルについて(群馬県83点、長野県99点)、PCR-DGGE解析を行い、黄化病菌バンドおよびキタネグサレセンチュウバンドの有無および強度と、各ほ場の発病程度との関係を調べた。その結果、黄化病菌およびキタネグサレセンチュウバンドの有無、強度および多様性指数を指標としたほ場の黄化病発病予測の可能性が示唆された。

イ 得られた結果の再現性を確認し、指標としての有効性の検証をするために、各種発病程度の異なるハクサイほ場の土壌について、PCR-DGGE解析を行い、黄化病菌、キタネグサレセンチュウバンドの有無及び多様性指数と発病度との関係を調べる必要が出てきた。

ウ 土壌理化学性および土性と発病度との関係を検討した。

②平成24年度における研究実績概要

ア【結果】病原菌検出がPCR-DGGEで可能になった

ハクサイ由来の黄化病菌5菌株、キャベツ由来2菌株の計7菌株についてPCR-DGGE解析を行い、バンドの出現およびその出現位置について確認を行った結果、いずれの菌株もゲル上に単一のバンドとして出現することが確認された(図1)。このバンド位置情報を基に、長野県および群馬県のハクサイほ場由来の黄化病汚染土壌のPCR-DGGE解析を行った結果、ほとんどの土壌で黄化病菌のバンドの存在が確認された(図2)。

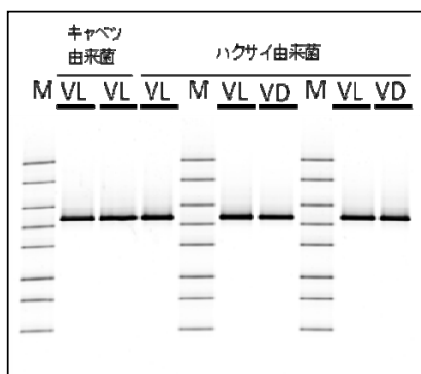


図 1. 黄化病菌の DGGE ゲル上におけるバンドの位置

菌種 : VD, *V. dahliae*
VL, *V. longisporum*

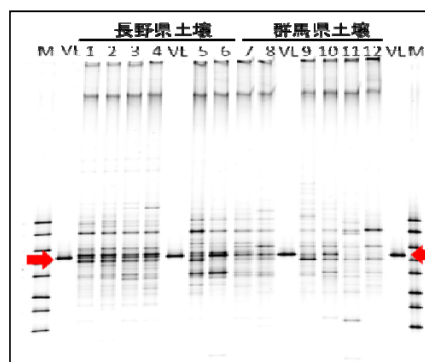


図 2. 黄化病菌汚染土壌から抽出した糸状菌 DNA の DGGE プロファイル。

矢印 (→) は黄化病菌の位置を示す。

イ 【結果】 キタネグサレセンチュウの検出が PCR-DGGE で可能になった

キタネグサレセンチュウについても、植物寄生性線虫特異的プライマーを用いた PCR-DGGE 解析により、ゲル上に単一のバンドとして出現することが確認された。このバンド位置情報を基に、長野県および群馬県のハクサイほ場由来の黄化病汚染土壌の PCR-DGGE 解析を行った結果、ほとんどの土壌でキタネグサレセンチュウのバンドの存在が確認された (図 3)。なお、本成果の実際の診断への応用試験についてはそれぞれの課題で報告している。

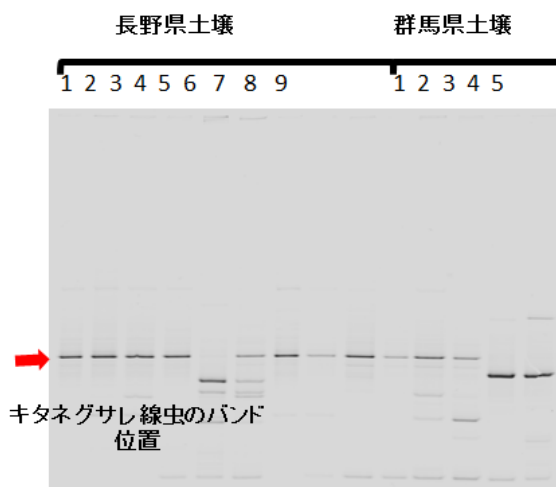


図 3. 黄化病菌汚染土壌の植物寄生性線虫の DGGE 解析

→ : キタネグサレセンチュウのバンドの位置を示す

ウ 【結果】 発病度と病原菌・キタネグサレセンチュウのバンド強度に高い相間を確認

平成 23 年度に、様々な時期の各ほ場由来の土壌サンプルおよび線虫サンプルについて PCR-DGGE 解析を行い、発生程度毎に特徴的な形質を調べた結果、黄化病菌バンドおよびキタネグサレセンチュウバンドの有無と強度 (濃さ) が、各ほ場の発病程度と関係することを明らかにした。特に、前作ハクサイ収穫後またはエンバクすき込み時期の黄化病菌バンドとキタネグサレセンチュウバンドの強度と発病度との間に高い相関が認められた。また、前作ハクサイ収穫後またはエンバクすき込み前後には、線虫の多様性指数と発病度にも相関が認められた (表 1)。

表 1. 群馬県ほ場における黄化病菌、キタネグサレセンチュウ
バンド強度および線虫の多様性指数と発病度との相関関係

サンプリング時期	キタネグサレ センチュウ	黄化病菌	線虫多様性 (Shannon index)
すき込み前	0.72	0.77	-0.91
すき込み直後	0.90	0.93	-0.68
すき込み2-3週間後	0.06	0.96	-0.30
ハクサイ定植前	0.90	0.27	0.31
ハクサイ定植時	0.50	0.80	0.16
ハクサイ収穫時	0.94	0.85	0.61

* 太字: $P < 0.05$

エ【結果】病原菌とキタネグサレセンチュウ、線虫多様性に高い相関を確認

平成24年度に同様に PCR-DGGE 解析を行い発生程度毎に特徴的な形質を調べた結果、前作の収穫後、鋤込み前後の時期（9月～12月頃）の黄化病菌およびキタネグサレセンチュウのバンドの有無、線虫相の多様性が、本病の発生程度と関連する再現性のある形質として選抜でき（表2）、これらにより本病の発生予測が可能となることが示唆された。

表 2. 群馬県圃場における黄化病菌バンドとキタネグサレセンチュウバンドの有無および黄化病発病程度との関係

時期	圃場	反復区	バンド		最終発病度	診断予想	合致
			ネグサレセンチュウ	黄化病菌			
エンバク 播種時 (H23, 10月)	G1	1	●		53.3 (中発生)	中	OK
		2	●		46.7 (中発生)	中	OK
	G2	1	●	●	0 (少発生)	多	
		2	●	●	15.2 (少発生)	多	
エンバク 鋤込み時 (H23, 12月)	G2	3	●	●	4.8 (少発生)	多	
		4	●		0 (少発生)	多	
	G1	1	●		53.3 (中発生)	中	OK
		2	●		46.7 (中発生)	中	OK
	G2	1	●	●	0 (少発生)	多	
		2	●	●	15.2 (少発生)	多	
	G3	1		●	16.7 (少発生)	中	
		2		●	33.3 (中発生)	中	OK
	G4	1		●	100 (多発生)	中	
		2		●	52.8 (中発生)	中	OK
	G7	1	●		13.3 (少発生)	中	
		2			8.6 (少発生)	少	OK
		3			6.9 (少発生)	少	OK

オ【結果】成果を基に「次世代ハクサイ黄化病診断マニュアル」を作成・配布

全課題の成果をとりまとめ、農業環境技術研究所が代表となって「ハクサイ黄化病の次世代土壌病害診断マニュアル」を作成し、配布した（図4）。

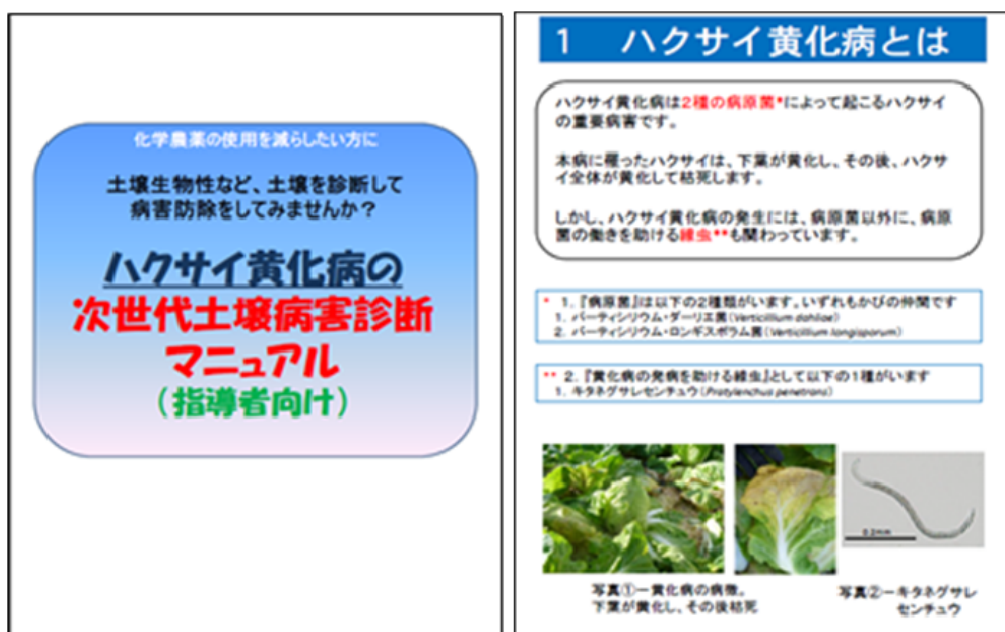


図4. ハクサイ黄化病の次世代土壌病害診断マニュアル（抜粋：表紙と1ページ目）

（4）小課題4：マイクロアレイによる指標候補の選抜

①平成23年度までの研究実績概要

ほ場において採取されたから土壌から抽出されたDNAを用いて、DNAマイクロアレイを用いた解析が可能であることが判明した。また、各土壌サンプルから100種類以上の細菌が検出され、多様性指数などの微生物相情報が獲得できることが判明した。一方、ハクサイ黄化病病原菌及びキタネグサレセンチュウは解析したすべての土壌サンプルにおいて未検出であった。

②平成24年度における研究実績概要

ア【結果】既知細菌、黄化病菌、キタネグサレセンチュウ検出用マイクロアレイを作成

土壌微生物叢解析用DNAマイクロアレイとして、データベースから入手した微生物DNA配列及び土壌微生物サンプルのシーケンス配列データから設計した3,387プローブとハクサイ黄化病病原菌及びキタネグサレセンチュウの推定特異配列から設計したプローブを固定したものを作成した。

イ【結果】群馬、長野土壌サンプル計188で検出実施

平成23年度土壌サンプルとして群馬県ほ場55サンプルと長野県ほ場87サンプル、及び平成24年度土壌サンプルとして群馬県ほ場28サンプルと長野県ほ場18サンプルの合計188土壌サンプルのDNAマイクロアレイデータを収集し、蓄積した。

ウ【結果】黄化病菌、キタネグサレセンチュウは検出されなかった

取得したDNAマイクロアレイデータを解析した結果、ハクサイ黄化病病原菌及びキタネグサレセンチュウは解析したすべての土壌サンプルにおいて検出されず、DNAマイクロアレイの検出限界以下と考えられた。

エ【結果】細菌多様性指数と発病度、ネグサレセンチュウ密度との相関は見られず

取得した DNA マイクロアレイデータから、検出されたプローブとそのシグナル強度を利用した多様性指数を解析した結果、発病度や計測されたネグサレセンチュウ密度と明確な相関を示す指数は検出されなかった

オ【結果】しかし、発病度、ネグサレセンチュウ密度と高い相関を示す微生物があった

取得した DNA マイクロアレイデータ中の各シグナルの解析し、発病度やセンチュウ密度と相関を示す微生物シグナルが存在しており、これらを発病や防除の実施を判断する指標として活用できる可能性が示唆された（図 1）。

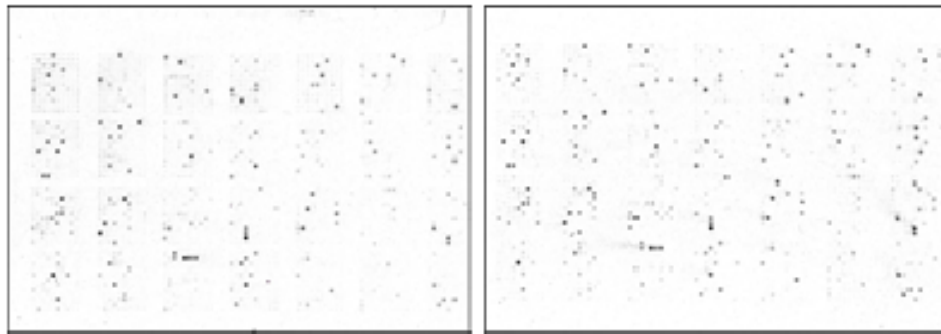


図1. 圃場土壌サンプルのマイクロアレイ解析
マイクロアレイ上の点が濃いほどその細菌種がい
ることを示す

2. 中課

題

2：黄化病菌、キタネグサレセンチュウ等の不活化菌等の探索

本病の発生が見られない栽培ほ場（群馬県は国府地区、長野県は朝日地区）から採取した土壌から、黄化病菌（*V. longisporum* KT1-1 株）に強い生育抑制効果を示した 3 つの細菌株および 2 つの糸状菌株を得た。

細菌株では 国府地区から得られた 1-32 株、5-7 株、朝日地区からは 1-7-2 株で抑制活性強い生育抑制活性が見られた。これらはいずれも放線菌であり、16SrRNA 遺伝子の塩基配列情報から、*Streptomyces thermocoprophilus* 等と近縁であることが示唆された。同様に、糸状菌株では、rRNA 遺伝子の ITS 領域の塩基配列情報から、*Paecilomyces*、*Penicillium*、*Fusarium* 等であることが示唆され、特に強い抑制活性を示した国府地区由来の 3-8 株は、*Fusarium equiseti* と同定された。しかし、これらの各菌株が示す PCR-DGGE ゲル上のバンドの有無および強度について、群馬・長野の現地ほ場での各土壌由来の DNA サンプルを用いて調べた結果、各土壌で見られた発病度と関連するバンドは確認されなかった。

微生物の発病抑止活性を評価するためのハクサイポット苗の試験系を構築し、現在分離した放線菌、糸状菌の抑制活性の評価を継続している。分離した放線菌数種について、ネグサレセンチュウ密度に対する抑制効果およびセンチュウ害に対する抑制効果を評価した結果では、顕著な抑制効果は確認できなかった。

（1）平成 23 年度までの研究実績概要

本病の発生が見られない栽培ほ場（群馬県は国府地区、長野県は朝日地区）から採取した土壌から、常法に基づき糸状菌および細菌を分離し、黄化病菌（*V. longisporum* KT1-1 株）との対峙培養を行い、特に強い生育抑制効果を示した菌株として、計 3 つの細菌株および計 2 つの糸状菌株を得た。

細菌株では 国府地区から得られた 1-32 株、5-7 株、朝日地区からは 1-7・2 株で抑制活性強い生育抑制活性が見られた。これらの菌株はその培養性状からいずれも放線菌であり、16SrRNA 遺伝子の塩基配列情報から、いずれも *Streptomyces thermocoprophilus* 等と近縁であることが示唆された。これら菌株の中でもっとも強い生育抑制活性を示した 5-7 株のキチン培地上での反応を調べた結果、これら菌株はキチナーゼ活性を持つことが示唆された。また、PCR-DGGE ゲル上におけるこれら菌株のバンドの位置は、それぞれ異なっており、群馬・長野の現地ほ場での各土壌由来の DNA サンプルについて解析した結果、1-34 菌株の位置に相当するバンドの強度が発病度と関連している傾向が認められた。

糸状菌株では、生育抑制効果を示した菌株は rRNA 遺伝子の ITS 領域の塩基配列情報から、*Paecilomyces*、*Penicillium*、*Fusarium* 等であることが示唆され、それらの中で特に強い抑制活性を示した国府地区由来の 3-8 株は、*Fusarium equiseti* と同定された。しかし、これらの各菌株が示す PCR-DGGE ゲル上のバンドの有無および強度について、群馬・長野の現地ほ場での各土壌由来の DNA サンプルを用いて調べた結果、各土壌で見られた発病度と関連するバンドは確認されなかった。

微生物の発病抑止活性を評価するためのハクサイポット苗の試験系を構築し、現在分離した放線菌、糸状菌の抑制活性を評価している。分離した放線菌数種について、ネグサレセンチュウ密度に対する抑制効果およびセンチュウ害に対する抑制効果を評価した結果では、顕著な抑制効果は確認できなかった。

(2) 平成 24 年度における研究実績概

ア 【結果】不活化菌のスクリーニング法を開発

黄化病菌に対する不活化菌のスクリーニング方法について検討し、triple-agar-layer technique(3 重培地法)を用い、菌株を直接植物体に接種してスクリーニングする方法が有効であることを明らかにした。

イ 【結果】病害未発生ほ場から開発したスクリーニング法を使って不活性化菌を分離

開発したスクリーニング法により、本病の発生が見られないほ場（群馬県は国府地区、G5 ほ場、長野県は朝日地区）の土壌から、常法に基づき糸状菌および細菌を分離し、黄化病菌に対し強い生育抑制効果を示した菌株として、3 つの *Streptomyces* 属放線菌株および *Fusarium* 属 2 種の糸状菌株を得た（図 1、表 1）。

ウ 【結果】発生がみられない土壌に発病抑止菌の存在を確認・同定

本病の発生が見られない栽培ほ場（群馬県は国府地区、G5 ほ場、長野県は朝日地区）の土壌 DNA の PCR-DGGE 解析を行い、発病抑止関連 DNA バンドをシーケンス解析の結果、*Chaetomium* 属、*Trichoderma* 属菌等であることを明らかにした（表 2）。

エ 【結果】選抜菌の病害抑制効果を確認。PCR-DGGE で迅速選抜が可能になった。

上記（イ）および（ウ）の結果から選抜した候補菌（*Streptomyces phaeopurpureus* 5-7 株および *S. griseoruber* 1-34 株、*Fusarium equiseti* 3-8 株、*Trichoderma atroviride* MAFF328301 株、*Chaetomium* sp. KR-2 株および GTO-1 株）の発病抑制活性をポット苗で調べた結果、*Chaetomium* sp. 2 菌株および *Streptomyces* 属細菌 2 菌株等で発病抑制活性が認められた（表 3、図 2）。また、強い抗菌活性を示す *Fusarium equiseti* 3-8 株の抗菌成分は、equisetin およびその epi-equisetin であることを明らかにした（図 3）。

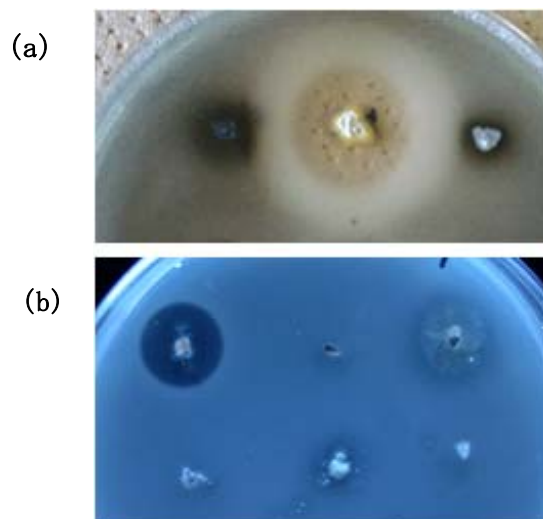


図 1. 黄化病未発生土壌から分離された放線菌・糸状菌の黄化病菌に対する抗菌活性。
(a) 放線菌 5-7 株が形成する生育阻止帯、(b) 糸状菌 3-8 株が形成する生育阻止帯

表 1. 未発病土壌から分離された *Verticillium longisporum* の生育抑制活性を有する微生物

土壌採取地	分離微生物 (菌株数)	生育抑制活性を 示した菌株数	強い抑制活性を 示した菌株名	rRNA遺伝子に基づく推定菌種
群馬(国府)	細菌(43菌株)	6	5-7 1-34	<i>Streptomyces phaeopurpureus</i> <i>Streptomyces griseoruber</i>
	糸状菌(37菌株)	10	3-8	<i>Fusarium equiseti</i>
長野(朝日)	細菌(41菌株)	1	1-1-7-2	<i>Streptomyces thermocaprophilus</i>
	糸状菌(69菌株)	9	2-3-14	<i>Fusarium sp.</i>

表 2. 未発病土壌由来の PCR-DGGE 解析により特徴的に出現したバンドおよびその推定糸状菌種

Metrix (バンドの場所)	推定される種名
糸状菌	
23.98	<i>Trichoderma</i> spp. (<i>atroviride</i> , <i>viride</i> , sp.)
28.98	<i>Chaetomium</i> spp.
31.54	<i>Pythium</i> spp. (<i>ultimum</i> 等)
84.46	<i>Coniochaeta</i> spp.

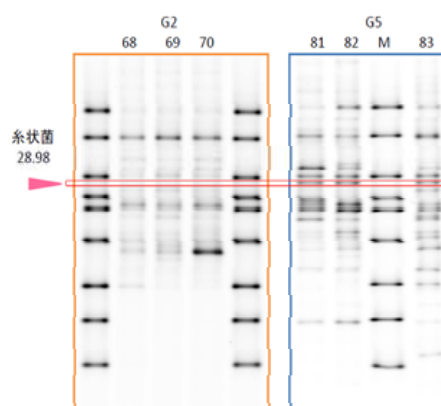


表 3. ハクサイ黄化病未発生土壌から示唆された拮抗微生物の発病抑制効果 (群馬県)

菌株	菌種	調査株数	健全株数	発病株数	発病指数
無処理		10	6	4	0.80
3-6	<i>Fusarium equiseti</i>	10	6	4	0.70
5-7	<i>Streptomyces phaeopurpureus</i>	10	7	3	0.60
320301	<i>Trichoderma aranzobii</i>	10	7	3	0.50
1-34	<i>Streptomyces griseoruber</i>	10	8	2	0.40
KR-2	<i>Chaetomium</i> sp.	9	7	2	0.22
39L400	<i>Streptomyces</i> sp.	10	9	1	0.20
GTC-1	<i>Chaetomium</i> sp.	10	8	2	0.20

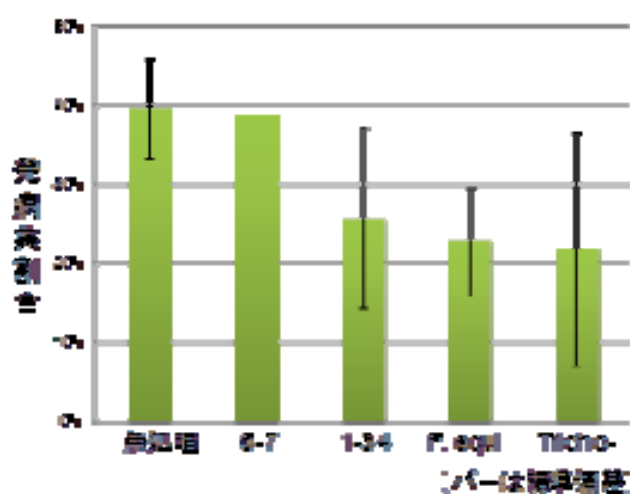


図 2. ハクサイ黄化病未発生土壌から示唆された拮抗微生物のポット苗における発病抑制効果

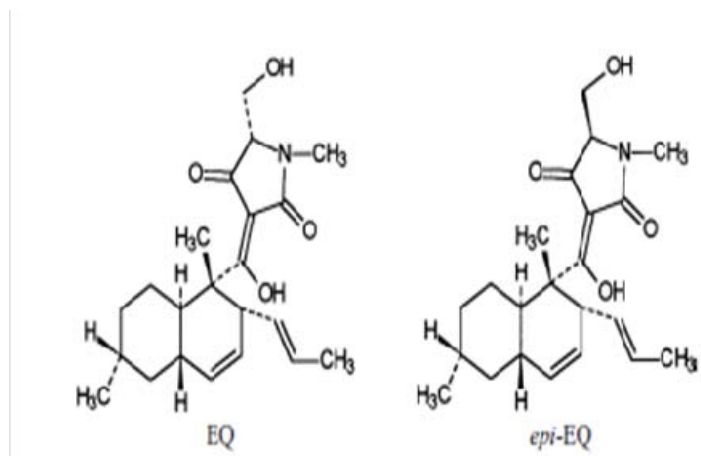


図 3. 拮抗成分として同定された equisetin(EQ)および epi-equisetin(epi-EQ)の化学構造

V. 論文、特許等の実績等 別添のとおり

これまでの論文、特許等の実績等

学術論文

タイトル、著者名、学会誌名、巻、ページ、発行年月	機関名
1. Association of Verticillium dahliae and Verticillium longisporum with Chinese cabbage yellows and their distribution in the main production areas of Japan. Kentaro Ikeda, Shinpei Banno, Ken Watanabe, Masashi Fujinaga, Hideki Ogiso, Hiroshi Sakai, Hitoshi Tanaka, Shizue Miki, et al. Journal of General Plant Pathology 78. 331-337. 2013.	群馬県農業技術センター・他.
2. Design and evaluation of PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of plant parasitic and fungivorous nematode communities. Atsuhiko Kushida. Microbes and Environments 28:269-274.2013.	北海道農業研究センター
3. ハクサイ黄化病発生圃場におけるPCR-DGGE法に基づく土壌微生物相の多様性と発病程度との関係の解析. 長瀬陽香・丹羽理恵子・松下裕子・池田健太郎・山岸菜穂・串田篤彦・岡田浩明・吉田重信・對馬誠也. 日本植物病理学会報 81(印刷中)	農業環境技術研究所・群馬県農業技術センター・長野県野菜花き試験場・農研機構北海道農業研究センター
4. A useful method for preparing microsclerotial inoculum of Verticillium dahliae. Toshimasa Shiraishi・Hiroshi Sakai・Kentaro Ikeda・Toshihiko Urushibara. Journal of General Plant Pathology. Online (2014.8)	群馬県農業技術センター
5. Integrated control and integrated pest management in Japan: the need for various strategies in response to agricultural diversity. Seiya Tsushima. Journal of General Plant Pathology. Online (2014.8)	農業環境技術研究所

口頭発表

タイトル、発表者名、学会等名、発表年月	機関名
1. 土壌微生物を用いて作物の病害が防げるか？その可能性. 對馬誠也. 日本土壌微生物学会2012年度大会市民公開講演会(要旨). 2012	農業環境技術研究所
2. 群馬県のハクサイ黄化病発生圃場におけるキタネグサレセンチュウの確認と発病助長. 池田健太郎、桑原克也、串田篤彦、吉田重信、對馬誠也. 関東病害虫研究会報 60: 150.. 2013	群馬県農業技術センター・農研機構北海道農業研究センター・農業環境技術研究所
3. 長野県におけるハクサイ黄化病助長要因とその耕種対策の検討. 山岸菜穂・横澤志織・串田篤彦・對馬誠也・石山佳幸・藤永真史. 関東東山病害虫研究会報60: 153. 2012	長野県野菜花き試験場・北海道農業研究センター・農業環境技術研究所

4. PCR-DGGEによる土壌微生物の分析. 第63回日本電気泳動学会シンポジウム ～電気泳動と質量分析による微生物の分析～. 對馬誠也. 講演要旨集, 2013.(ページなし)(2013.6.20)	農業環境技術研究所
5. Current and future perspectives of DNA analyses in Andosols in Japan. Seiya Tsushima. ‘ Andosols Revisiting – Genesis and classification of volcanic ash soil (Andosols), and its utilization in Monsoon Asia–’ MARCO international workshop 2014. Abstract 13–14. 2014(6).	農業環境技術研究所
6. PCR-DGGE法に基づく土壌微生物相とハクサイ黄化病発病程度との関係の解析. 長瀬陽香・丹羽理恵子・松下裕子・池田健太郎・山岸菜穂・串田篤彦・吉田重信・對馬誠也. 平成26年日本植物病害学会大会(札幌)プログラム・講演要旨予稿集 95. 2014.	農業環境技術研究所・群馬県農業技術センター・長野県野菜花き試験場・農研機構北海道農業研究センター

出版図書

区分: ①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

区分	著書名、(タイトル)、著者名、出版社名、発行年月	機関名
⑤	ハクサイ黄化病の次世代土壌病害診断マニュアル(指導者向け)、農業環境技術研究所、佐藤印刷、2013.2	農業環境技術研究所
⑤	レギュラトリーサイエンス事業の成果報告、Agricultural Local Progressive Support System Network、長野県農業試験場(Webサイト) 2013.	長野県野菜花き試験場
②	ハクサイ黄化病菌 <i>Verticillium dahliae</i> と <i>V. longisporum</i> の分布と圃場診断に基づいた防除. 池田健太郎・酒井宏・田中一史・柴田 聡・坂野真平・藤村真・渡邊 健・山岸菜穂・藤永真史・小木曾秀紀・串田篤彦・吉田重信・對馬誠也. 植物防疫 68(1):30–33.2013.	群馬県農業技術センター・茨城県農業総合センター農業研究所・長野県野菜花き試験場・農研機構北海道農業研究センター・農業環境技術研究所
②	土壌生物性評価による土壌病害診断の可能性. 對馬誠也. 土づくりとエコ農業46:8–15. 2014.	農業環境技術研究所

国内特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

国際特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名