

ダイズ葉焼病の総合防除を目指して

福井県農業試験場 ^{わた}渡 ^{なべ}辺 ^{たか}貴 ^{ひろ}弘
 独立行政法人農業生物資源研究所 ^{さわ}澤 ^だ田 ^{ひろ}宏 ^{ゆき}之

はじめに

ダイズ葉焼病は、福井県をはじめとする多くのダイズ生産地で発生している重要病害である（西山ら，1986；西山，1991；矢ヶ崎・野田，2002）。本病は主に葉に発生し、ハローを伴った淡褐色～褐色の斑点が形成されるのが特徴である。激しく発病すると葉全体が焼けたような外観を呈し、落葉・枯死に至る場合もある（柚木，1986）。その結果、収量や品質が大きな影響を受けることから、産地では深刻な問題となっている。

本病を防除するうえで、早期発見による罹病株の抜き取りは効果が認められている。しかし、多大な労力がかかるため、全県的に徹底することは現実的な方策ではない。また、卓効のある登録農薬がないうえ、発生生態に関する知見が乏しく、要防除水準の策定が進んでいないなど、薬剤防除が効果的に実施できるような環境が整っているとは言い難い。さらに、本病は種子伝染が疑われている（西山，1999）にもかかわらず、種子の保菌検定を行うための検査体制も確立できていない。そのため、発病圃場由来の保菌種子が次作で用いられ、それが被害を倍加させるという負のスパイラルに陥っている可能性もある（渡辺・澤田，2013）。

福井県では、本病の防除を阻んでいるこれらの問題点を解消し、総合防除体系をさらに効率化することを目指している。そのために、より効果のある農薬を探索するとともに、本病の詳細な被害解析を行い、それに基づいて要防除水準を策定することを試みてきた。また、病原細菌を検出・定量するための実験系を構築し、さらに、被検種子から分析用試料を採取する方法を確立するなど、種子の検査体制を構築するための基盤整備についても取り組んでいる。

ここでは、これまで行ってきた個々の取り組みの概要を紹介するとともに、総合防除体系をさらに効率化するうえで残された問題点についても考えてみたい。

Efforts Toward Improvement of the Integrated Management of Soybean Bacterial Pustule. By Takahiro WATANABE and Hiroyuki SAWADA

（キーワード：ダイズ葉焼病，要防除水準，ジメトモルフ・銅水和剤，qPCR，絶対定量）

I より効果のある農薬の探索

1 培地上での薬剤スクリーニング

圃場での防除試験を行う前に、予備試験として、*in vitro* の条件下で候補薬剤のスクリーニングを試みた。そのために、2008年時点で、葉焼病以外のダイズ病害に登録のある以下の薬剤（括弧内は希釈倍率を示す）を候補として選んだ：シアゾファミド水和剤（1,000倍）、銅水和剤（500倍）、バリダマイシン液剤（500倍）、チウラム・ベノミル水和剤（500倍）、ジメトモルフ・銅水和剤（600倍）。そして、これらの薬剤の成分を所定の濃度で含む検定培地を作製したうえで、来歴の異なる22株の葉焼病菌を画線培養し、生育阻害が認められるかどうかを調べた。

その結果、シアゾファミド水和剤と銅水和剤では、22株すべてにおいて生育が認められた。また、バリダマイシン液剤では21株、チウラム・ベノミル水和剤では3株が生育した。一方、ジメトモルフ・銅水和剤では、供試菌株の生育は全く認められなかった。

そこで、*in vitro* において最も効果の認められたジメトモルフ・銅水和剤を対象として圃場試験を行い、防除効果の確認を行うことにした。

2 圃場での効果の確認

ジメトモルフ・銅水和剤の防除効果を確認するために、2009～12年にかけて、実際の栽培条件下で散布試験を行った。そのために、前年に罹病ダイズ（品種‘エンレイ’）から採取した保菌種子を圃場に播種したうえで、福井県栽培基準に従って栽培管理を行いながら経過を観察した。そして、発病が確認できた時点から3回（初発時、および、その7日後と14日後）、ジメトモルフ・銅水和剤（600倍）を10a当たり150l散布した。調査は最終散布の14日後に行い、全葉を対象として発病程度を判定したうえで、発病葉率と発病度を算出した（表-1）。その結果、4回の試験を通じて、散布区は無処理区よりも発病葉率と発病度のいずれも低く、防除値は42.8～60.6となった。

次に、本剤を開花期に1回だけ散布することによって、十分な防除効果が得られるかどうかの確認を行った。そのために、2010年の開花期時点で同程度の発病が認め

表-1 ジメトモルフ・銅水和剤の圃場における防除効果の確認

試験区	2009年			2010年			2011年			2012年		
	発病葉率 (%)	発病度	防除価									
散布区	31.2	7.8	50.9	34.9	8.7	42.8	27.2	6.8	55.0	21.6	5.4	60.6
無処理区	58.7	15.9		60.8	15.2		60.3	15.1		54.4	13.7	

発病度：Σ(程度別発病葉数×指数)×100÷(調査葉数×4)。

指数；0：無発病，1：病斑面積率1～25%，2：同 26～50%，3：同 51～75%，4：同 76～100%。

表-2 開花期におけるジメトモルフ・銅水和剤散布の防除効果と収量品質に及ぼす影響

試験区	開花期の 発病葉率 (%)	9月下旬の 発病葉率 (%)	子実重 (g/株)	粒径分布 (%)		
				大粒	中粒	小粒
散布区	28.4	71.8	17.9	65.1	24.6	10.2
無処理区	26.3	84.8	15.6	51.1	31.8	17.1

られる圃場を試験区として選び、ジメトモルフ・銅水和剤散布区と無処理区を設けて試験を行った。その結果、散布区における9月下旬の発病葉率は低くなり、子実重は増加し、しかも大粒(7.9mm以上)の割合が高くなることが確認できた(表-2)。

以上の結果は、ジメトモルフ・銅水和剤が実際の栽培条件下における防除薬剤として有効であることを明確に示している。そこで、このことを根拠の一つとして、ジメトモルフ・銅水和剤を本病に対して登録拡大するための手続きを行い、防除に利用するための環境を整えた。

II 被害解析に基づく要防除水準の策定

1 ダイズ葉焼病の被害解析

薬剤防除を効率化するためには、対象病害の発生生態や被害の状況を把握したうえで、要防除水準を策定する必要がある。そこで、2009～10年にかけてのべ15箇所の試験区を設け、発病葉率と収量・品質との関係について調査し、それに基づいて被害解析を詳細に行った。

その結果、ダイズの開花期における発病葉率と小粒比率の間には、有意な相関($R^2 = 0.75$, 危険率1%)が認められた(図-1)。また、発病葉率と減収率の間にも、同様に有意な相関($R^2 = 0.74$, 危険率1%)のあることが明らかとなった(図-2)。さらに、開花期の発病葉率が10%を超えると、9月下旬には「多発生～甚発生」レベルの発病程度に達することも認められた(データ省略)。

以上の試験結果(図-1, 2), および、表-2に示した

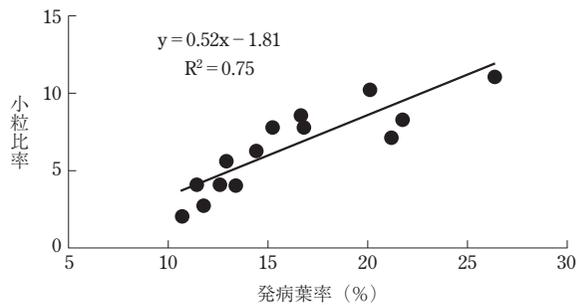


図-1 開花期における葉焼病発病葉率と小粒比率
圃場試験は2009～10年に合計15箇所で実施した。小粒比率は、発病区の小粒比率から健全区の小粒比率を引いた値である。なお、いずれの年次も得られた全子実を用いて粒径を分類した。

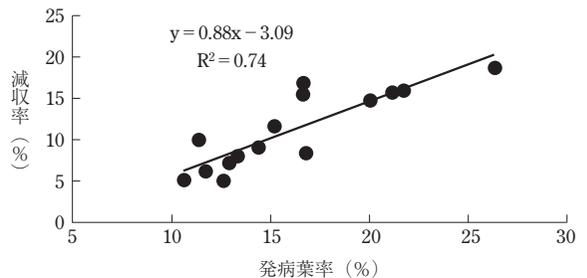


図-2 開花期における葉焼病発病葉率と減収率
圃場試験の設計は、図-1と同じである。

データは、本病に罹病すると種子が小粒化し、減収することを明確に示している。また、開花期における発病葉率と減収率の間に高い相関(図-2)が認められることから、これを基礎データとして要防除水準を策定することが可能となった。

2 要防除水準の策定

前述の被害解析結果とともに、以下のような情報も利用したうえで、齊藤ら(2000)を参考にしながら要防除水準の算出を試みた。すなわち、2008～10年における普通大豆の平均価格および平均単収をそれぞれ111円/kgと129kg/10a、ジメトモルフ・銅水和剤による本病の1回の防除費用を1,648円/10aとした。

その結果、被害許容水準は減収率11.5%〔 $(100 \times 1,648) / (111 \times 129)$ 〕として算出できた。一方、図-2の回帰式〔 $y = 0.88x - 3.09$ (y = 減収率, x = 発病葉率)〕より、開花期時点での発病葉率が16.5%の場合、そのまま防除することなく放置しておく、収穫期における最終的な減収率は11.5%に達することになる。以上のことから、要防除水準を「開花期の発病葉率16.5%」と設定し、防除要否の判断基準として提示することができた。

III リアルタイム定量PCR法(qPCR)の種子検査への導入の試み

1 プライマー・プローブの設計とその特異性の確認

葉焼病菌に汚染されていない種子が確保できれば、汚染種子に起因した発病をなくすことができ、長期的には本病を根絶することにもつながるのではないかと、この期待もある。ただし、それを実現するためには、種子中の葉焼病菌を高感度に検出・定量できるような検査手法を開発したうえで、種子の監視体制を確立しなければならない。そこで、そのための第1歩として、TaqManプローブ法に基づくqPCRを利用して、ダイズ種子中の葉焼病菌を絶対定量するための手法開発に着手した(渡辺・澤田, 2013)。

qPCRを行うために必要なプライマーとプローブは、*rpoD* (RNAポリメラーゼ主要シグマ因子遺伝子)の配列を標的として設計した。そして、それらの特異性を確認するために、供試菌株から抽出・精製したDNAを用いて予備的にqPCRを行った。その結果、供試した61株の葉焼病菌からは明瞭な増幅が認められたが、葉焼病菌以外の対照菌株からは全く増幅が見られなかった(データ省略)。すなわち、ここで設計したプライマー・プローブは極めて特異性が高いことが確認できたので、これらを利用して絶対定量のための実験系の構築を試みた。

2 検量線の作成と絶対定量可能な範囲の確認

設計したプライマー・プローブを利用して絶対定量するためには、適切な標準試料を用いて検量線を作成したうえで、その信頼性や定量可能範囲について評価しておく必要がある。

ここでは、「対象微生物の段階希釈系列を用いて添加回収試験を行う」という手順(澤田ら, 2008)に従って検量線を作成することにした。すなわち、葉焼病菌を蒸留水に懸濁して段階希釈系列を調製した後、それをダイズ種子に添加することによって「既知の密度で葉焼病菌を含むダイズ種子の系列」を作製し、それを「標準試料」とした。そして、その標準試料をもとに、「組換えDNA技術応用食品の検査方法」(厚生労働省編, 2001)に示された手順に従ってDNA抽出とqPCRを行い、検量線を作成した。

その結果、 $6 \times 10^8 \sim 6 \times 10^2$ cfu/種子1gの範囲において、極めて強い直線性を得ることができた(図-3)。したがって、ここで構築したqPCR実験系と標準試料を用いれば、少なくともこの細菌密度の範囲において、精度の高い定量実験が実施できることが明らかとなった。

3 検体1kgからの分析用試料の採取方法

qPCR実験系を種子検査の現場で活用するには、qPCR実験に供する「分析用試料」を「収穫物」の中から採取するための方法が必要となる。厚生労働省編(2001)の「組換えDNA技術応用食品の検査方法」には、一つの圃場由来の収穫物が15袋以下の場合には、以下のようにして「収穫物」から「検体」を準備するように示されている。すなわち、全収穫物の中から無作為に2袋を選んだうえで、各袋から500gを量り取って混合し、

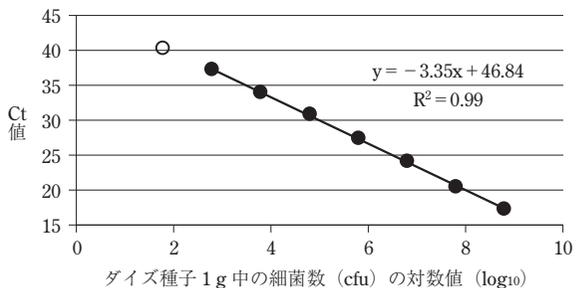


図-3 ダイズ種子中の葉焼病菌に対するqPCRの定量性と定量可能範囲の確認

「 $6 \times 10^8 \sim 6 \times 10^0$ cfu/種子1gの密度でダイズ葉焼病菌を含む種子サンプルの系列」を作製したうえで、各サンプルからDNAを抽出してqPCRを行った。なお、 6×10^4 cfu/種子1gの密度のサンプル(○)では、3反復のすべてから常にシグナルが得られるわけではないことが判明した。

全量を 1 kg としたものを「検体」として以後の定量実験に供するように指導がなされている (図-4 上)。

しかし、その 1 kg の「検体」の中から実際の「分析用試料」を採取するための具体的な手順は、「組換え DNA 技術応用食品の検査方法」には全く示されていない。そこで、厚生労働省 編 (2001) が示した枠組みに従いながら予備実験を繰り返すことによって、暫定的な採取方法 (図-4 下) を考案することができた。

さらに、この採取方法の有効性を検証するために、以下のような試験を実施した。まず、汚染種子と健全種子とを様々な割合で混合し、人為的な「検体」を作製した。そして、そこから図-4 下の手順に従って「分析用試料」を採取して qPCR を行い、混合割合に比例した定量値が安定して得られるかどうかを調べた。

その結果、混合割合と定量値との間に極めて強い直線性が認められ (図-5)、本法によって精度の高い結果が得られることが確認できた。しかも、2 回の反復試験の

結果がほぼ一致することも明らかとなった。これらの結果は、1 kg の検体を検査するに際し、図-4 下の手順に従って分析用試料の採取を行えば、精度の高い定量値が安定して得られることを示している。

以上のことから、ここで確立した分析用試料の採取方法 (図-4 下) と qPCR 実験系 (図-3) は、特異性・感度・精度・再現性・安定性が高いことから、実用性の高い手法であると判断した (渡辺・澤田, 2013)。

おわりに

本研究の開始時点では、ダイズ葉焼病に対してジメトモルフ・銅水和剤は農薬登録されていなかった。しかし、表-1, 2 に示した試験結果や関係機関の尽力によって、2013年3月27日付けで登録拡大が実現した。今後は、本剤と要防除水準とを組合せて活用することによって、適期に効率よく薬剤防除が実施できるものと期待している。種子の監視体制に関しては、未解決の課題が山積して

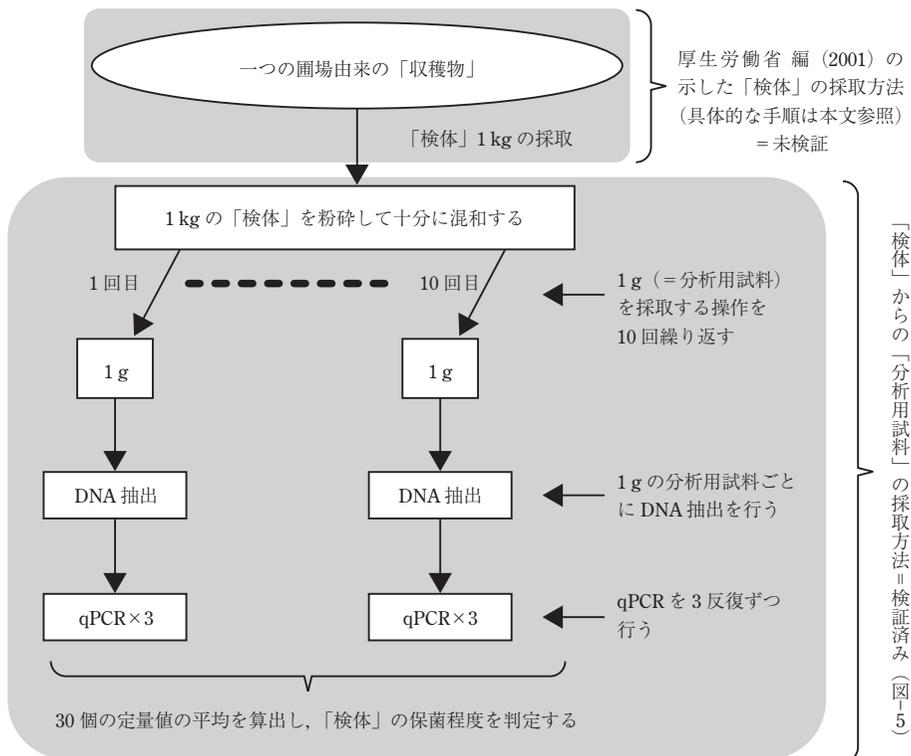


図-4 検体 1 kg からの分析用試料採取方法の概要

厚生労働省 編 (2001) の示した「収穫物からの検体の採取方法」にしたがって 1 kg の検体を準備したうえで、以下のようにして「分析用試料」を採取し、定量値を算出する。

- 1) 1 kg のダイズ種子 (= 検体) を粉碎して十分に混和する。
- 2) 「1 kg の粉碎種子から 1 g (= 分析用試料) を採取する」という操作を 10 回繰り返す。
- 3) 採取した 1 g の粉碎種子ごとに DNA を抽出した後、qPCR を 3 反復行って定量値を求める。
- 4) 得られた 30 個の定量値を平均し、その値をもとに「検体」の保菌程度を判定する。

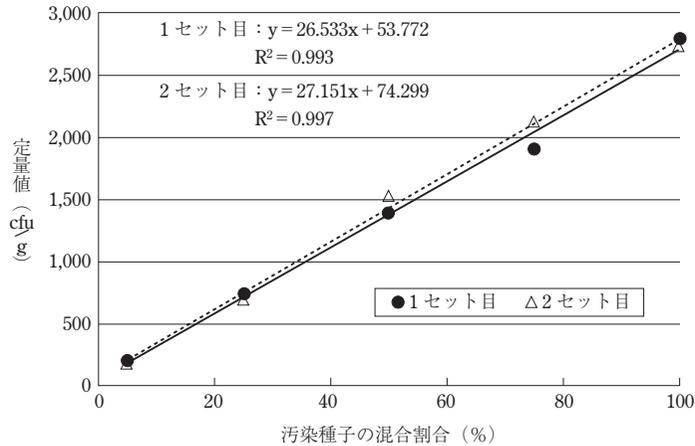


図-5 検体からの分析用試料採取方法の評価実験

図-4 に示した分析用試料採取方法の有効性を確認するために、以下のような評価実験を行った。すなわち、汚染種子と健全種子とを様々な割合で混合し、人為的に「検体」を作製した。そして、そこから図-4 の方法に従って分析用試料の採取と qPCR を行い、混合割合に比例した定量値が安定して得られるかどうかを調べた。

いる状態である。そのうちの 하나가、「収穫物からの検体の採取方法」が十分に信頼できるものかどうかという問題である。厚生労働省 編 (2001) の「組換え DNA 技術応用食品の検査方法」には、一つの圃場由来の「収穫物」の中から、1 kg の「検体」を採取するための手順が示されている (図-4 上)。また、本研究によって、1 kg の「検体」の中から実際の「分析用試料」を採取し、qPCR を行うまでの一連の実験系を確立することができた (図-4 下)。したがって、両者を組合せれば、検査対象圃場における葉焼病菌の汚染程度が把握できることになる。ただし、ダイズ葉焼病を対象とした保菌検定に対して、厚生労働省 編 (2001) が示した「収穫物からの検体の採取方法」(図-4 上) が単純に適用できるかどうかについては、今後、様々な条件の圃場で実証試験を行うことによって改めて確認する必要がある。

二つ目として、ここで確立した qPCR 実験系 (図-3) は DNA を標的としているため、定量値には死菌や VNC 菌 (培養不能菌) に由来するシグナルも含まれている可能性がある、という問題がある。したがって、検査によって得られた定量値のすべてが、実際に発病に結びつくかどうかについては検討の余地がある。

以上のような問題があるため、今後は、算出された定量値と次作における発病程度 (発病率) との関係について、様々な条件下で検証を繰り返し、データを蓄積する必要がある。このようなデータが十分に蓄積できれば、それと図-1, 2 のデータとを組合せて総合判断する

ことによって、「経営上の問題を生じさせないレベルの定量値の目安」を明らかにすることができるかもしれない。そして、それをもとに種子検査における現実的な判定基準」を策定したうえで、「分析用試料の採取方法、qPCR 実験系、判定基準」の 3 者を統合することによって、ダイズ種子の検査体制を確立していきたいと考えている。

なお、今回は誌面の都合で、罹病株の抜き取り、輪作、抵抗性品種の利用をはじめとするその他の防除法については、全く触れることができなかった。今後はこれらの技術についても必要に応じて見直しを行ったうえで、薬剤防除や種子検査と組合せることによって、より効果的な総合防除体系を確立することに少しでも寄与したいと考えている。

引用文献

- 1) 厚生労働省 編 (2001): 組換え DNA 技術応用食品の検査方法, 厚生労働省, 東京.
<http://www.mhlw.go.jp/topics/idenshi/kensa/kensa.html> (参照 2012 年 11 月 15 日)
- 2) 西山幸司ら (1986): 農環研報 1: 83 ~ 94.
- 3) ——— (1991): 作物の細菌病, 田部井英夫ほか 編, 日本植物防疫協会, 東京, p. 151 ~ 152.
- 4) ——— (1999): 種子伝染病の生態と防除, 大畑貫一ほか 編, 日本植物防疫協会, 東京, p. 202.
- 5) 齊藤美奈子ら (2000): 北日本病虫研報 51: 33 ~ 36.
- 6) 澤田宏之ら (2008): 植物防疫 62: 611 ~ 617.
- 7) 渡辺貴弘・澤田宏之 (2013): 日植病報 79: 83 ~ 91.
- 8) 矢ヶ崎健治・野田 聡 (2002): 今月の農業 46(3): 22 ~ 25.
- 9) 柚木利文 (1986): 作物病虫害ハンドブック, 梶尾敏宏ほか 編, 養賢堂, 東京, p. 130 ~ 131.