

(成果情報名) オクラうどんこ病に有効な有機 JAS 適合薬剤の選抜とその防除効果							
(要約) オクラうどんこ病の発病に対し、有機 JAS 適合薬剤では水和硫黄剤（イオウフロアブル）が最も有効である。露地栽培では本剤を主体とした有機 JAS 体系は化学合成殺菌剤の慣行防除と比べ、収量を下げずに高い防除効果を示し、散布回数も削減できる。							
(担当機関) 農業研究センター・病虫管理技術開発班					連絡先	098-840-8504	
部会	野菜・花き	専門	作物病害	対象	オクラ	分類	実用化研究

[背景・ねらい]

沖縄県のオクラ栽培では、生育期にうどんこ病による葉の黄化・落葉が問題となっている。近年、既報とは分生子の形態が異なる新たな病原菌 *Podosphaera xanthii* が本病の病原に追加され、露地と施設ともに本菌による被害が甚大である（澤岨ら、2022）。現在、複数回の化学合成殺菌剤の散布が行われているが、圃場によっては十分な防除効果は得られておらず、散布回数や資材費用も増加傾向にある。国内では化学合成以外の農薬として有機 JAS で使用可能な殺菌剤（以下、有機 JAS 殺菌剤）が認められており、本県ではエコファーマー認定や特別栽培農産物認証の基準を満たす際に、これらの剤の使用が有効である。そこで、本病に対する化学合成殺菌剤の使用量削減を目的に、有機 JAS 殺菌剤の中から有効薬剤を選抜し、圃場における防除効果を検討する。

[成果の内容・特徴]

1. 病原菌に対する供試 11 薬剤の予防および治療効果では、3 種化学合成殺菌剤の高い発病抑制と同等に、有機 JAS 殺菌剤では水和硫黄剤が最も高い発病抑制を示す。一方、バチルス・ズブチリス水和剤、調合油乳剤および還元澱粉糖化物液剤の抑制効果はない（図 1）。
2. 2022～23 年の露地栽培では、硫黄粉剤と水和硫黄剤を主体とした発病前からの有機 JAS 体系散布（以下、有機区）は、化学合成殺菌剤の慣行区よりも高い防除効果を示す（図 2）。
3. 2 年間の結果について、応答変数を発病葉率として、説明変数を試験区と処理後日数として検定した結果、発病葉率と処理後日数間に交互作用が認められ（Box-Cox 変換後の二元配置分散分析 2022 年：df=8、F=15.3、P<0.01、2023 年：df=6、F=139.5、P<0.01）、発病葉率の上昇の推移は各試験区間で異なる（図 2）。また、有機区の発病葉率は慣行区・無処理のどちらよりも有意に低くなる（Bonferroni 法による多重比較検定、P<0.01）。
4. 有機区では散布回数を慣行区よりも年あたり 1 回削減できる（図 2）。また、有機区の資材コストは約¥3,300～4,000/10a となり、慣行区より¥3,900～5,000/10a 程安くなる（2025 年 1 月時点）。
5. 有機区の果実収量は 2 年を通じて、慣行区のそれと同等であり、無処理のそれより有意に多い（図 3）。また、果実での汚れや薬害はみられない（データ省略）。

[成果の活用面・留意点]

1. オクラ生産現場における農家、普及員および営農指導員の防除対策資料として活用する。
2. 図 1 の「予防」（菌感染前の薬剤効果）では、草丈 25cm 程度のオクラ苗「ブルースカイ」全体に供試薬剤を 20ml/株を散布し、2 日後に *P. xanthii*（KFM-1 株；澤岨ら、2022）の分生子懸濁液（ $1.2 \times 10^5$  個/ml）3.3ml/株を噴霧接種した。一方、「治療」（菌感染後の薬剤効果）では先にオクラ苗に同菌を同量噴霧接種し、2 日後に供試薬剤を同量散布した。
3. 図 2、3 は冬春期の露地栽培における防除効果と収量を示した結果である。
4. 農薬の使用にあたっては最新の登録状況を確認すること。

[残された問題点] 夏～秋期における同試験による防除効果の検証

[具体的データ]

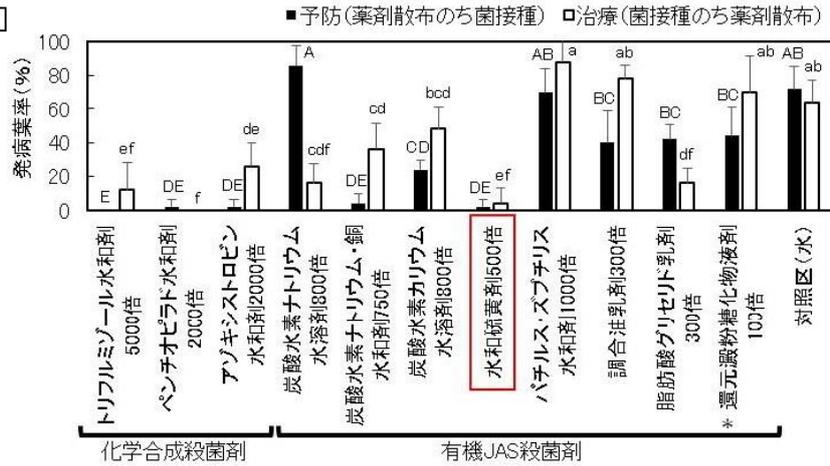


図1 オクラうどんこ病菌*P. xanthii*の発病に及ぼす各種薬剤の予防および治療効果

1薬剤につき5株を用い、散布14日後に任意に10葉/株を選び、発病葉率を調査した。アルファベット大(予防)と小(治療)は各薬剤間におけるSteel-Dwass法の多重比較検定による有意差を示す( $P < 0.01$ )。バーは標準偏差(SD)を示す。  
\* : 2022年に有機JAS規格から非適合となる。

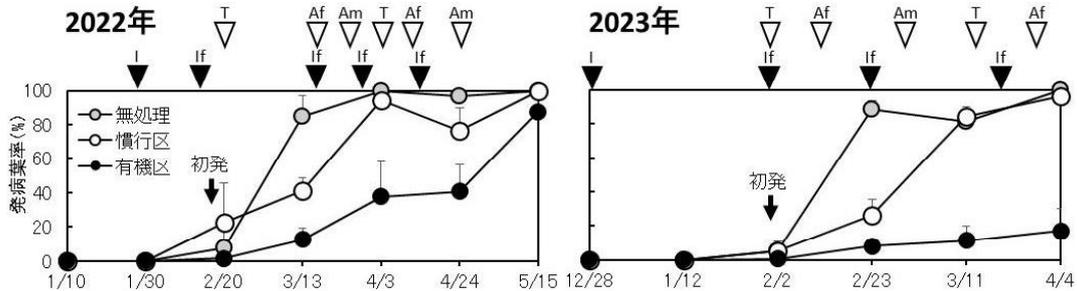


図2 各試験区におけるオクラうどんこ病の発病推移

試験区は4反復の乱塊法(30株/1.3m<sup>2</sup>/区)で設置した。2022年:「ブルースカイ」9月下旬定植、2023年:「フィンガー5」10月中旬定植、2か年とも12月下旬の収穫後の自然発生条件で実施した。15株/区の10葉について21日間隔で葉の発病率を調査した。▼:有機区の硫黄粉剤(1)3kg/10a(収穫後1回)と水和硫黄剤(1f)500倍の散布日、▽:慣行区の殺菌剤散布日(T:トリフルミゾール水和剤5000倍、Af:ベンチオピラド水和剤2000倍、Am:アゾキシストロビン水和剤2000倍)、⊥は初発日(発病が初めて確認された日、2022年:2/17、2023年:2/1)、バーは標準偏差(SD)を示す。

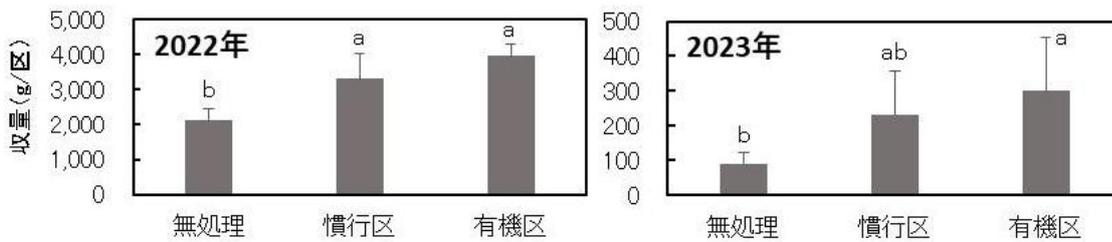


図3 各試験区における果実収量

収穫期間:2022年(4/3~5/11)、2023年(3/28~4/30)。収量は規格品(8~12cm程度のイボなしの若さや)の総重量を示す。アルファベットはTukey-Kramer法の多重比較検定による有意差を示す( $P < 0.05$ )。バーは標準偏差(SD)を示す。試験区の詳細については上記図2を参照してほしい。

[研究情報]

課題 ID : 2021 農 008

研究課題名 : 総合的病害虫管理 (IPM) 利用技術の開発

予算区分 : その他 (総合的病害虫管理技術推進事業・営農支援課)

研究期間 (事業全体の期間) : 2021~2023 年度 (2021~2023 年度)

研究担当者 : 澤岬哲也、秋田愛子、安次富厚

発表論文等 : 1) 澤岬哲也ら (2024) 日本植物病理学会九州部会発表 2) 澤岬哲也ら (2022) 日植病報 88 : 27-30 3) 澤岬哲也 (2022) 植物防疫 76 : 36-40 4) 澤岬哲也ら (2022) 農林水産部普及に移す技術

(成果情報名) ニガウリ種子の簡易 DNA 抽出において遺伝子型判別の成功率を高める条件							
(要約) <u>ニガウリ種子の簡易 DNA 抽出</u> において、 <u>種子(胚組織)の供試量 3 mg、PVPP (重量比 0.5%) 添加、抽出 DNA の希釈無し</u> とすることで、PCR 増幅および制限酵素処理の成功率が共に向上する。							
(担当機関) 農業研究センター・研究企画班・野菜花き班					連絡先	098-840-8513	
部会	野菜・花き	専門	育種	対象	ニガウリ	分類	基礎研究

[背景・ねらい]

本県のニガウリ育種では、うどんこ病抵抗性などの有用形質を効率的に育成するため、種子(胚組織)を用いた遺伝子型判別法(令和4年度普及に移す技術)による播種前の DNA マーカー選抜を行っている。DNA マーカー選抜では、供試個体数が増えるほど多数の優良個体を得られるが、本判別法の DNA 抽出においては作業工程の多さや所要時間の長さにより、供試可能な個体数は制限される。一方、簡易 DNA 抽出キットは作業工程が少なく短時間で DNA を抽出できるため、種子を用いた遺伝子型判別法と組み合わせることで、より多くの個体を効率的に処理可能になると期待される。しかし、本キットは PCR 増幅や制限酵素処理を阻害する夾雑物の除去工程を含まないため、ニガウリ種子においては遺伝子型判別の成功率低下が課題となる。そこで本研究では、簡易 DNA 抽出キットを用いたニガウリ種子の DNA 抽出において、遺伝子型判別の成功率を高める条件を検討する。

[成果の内容・特徴]

1. 種子を用いた遺伝子型判別法と簡易 DNA 抽出キットを単純に組み合わせると、PCR 増幅および制限酵素処理による遺伝子型判別の成功率はともに低い(表1パターン1、図1a)。
2. 種子に含まれる夾雑物の影響を低減させるため、種子の供試量、PVPP(ポリビニルポリピロリドン)添加の有無、抽出 DNA 希釈の有無の条件を組み合わせると、複数のパターンで遺伝子型判別の成功率が高くなる(表1)。
3. PCR 増幅の成功率は、種子の供試量 3 mg および 6 mg のとき、12mg と比較して向上する。また、成功率は 3 mg でより向上する(表2)。
4. 上記を踏まえた供試量 3 mg における制限酵素処理の成功率は、PVPP 添加により向上し(表3、図1b)、抽出 DNA 希釈により低下する。
5. 以上より、簡易 DNA 抽出キットを用いたニガウリ種子の DNA 抽出において、遺伝子型判別の成功率を高めるプロトコルは、図2のとおりである。

[成果の活用面・留意点]

1. 本成果は、ニガウリ育種における DNA マーカー選抜の効率化に活用できる。
2. 供試した種子は OHB61-5(うどんこ病感受性)と 204-413(〃抵抗性)の F2 種子である。
3. 簡易 DNA 抽出には、カネカ簡易 DNA 抽出キット version 2(株式会社カネカ)を用いる。
4. 表2、3の統計解析では、Firth 法を用いたロジスティック回帰分析の係数推定値(説明変数が1単位増えたときの応答変数の変化量)から、種子の供試量と PVPP 添加、DNA 希釈が、PCR 増幅および制限酵素処理の成功率に及ぼす影響を定量的に評価している。
5. 図2のプロトコルは、DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)を用いた従来法と比べて、工程数を約3分の1の11工程、所要時間を約2分の1の52分(10検体あたり)に短縮する。

[残された問題点]

特になし。

[具体的データ]

表1 パターンごとの PCR 増幅および制限酵素処理による遺伝子型判別の成功率

パターン	組み合わせ			成功率(%) <sup>4)</sup>	
	供試量 <sup>1)</sup>	PVPP <sup>2)</sup>	希釈 <sup>3)</sup>	PCR 増幅	制限酵素処理
1	12mg	なし	なし	50	30
2	12mg	なし	あり	70	50
3	12mg	あり	なし	20	10
4	12mg	あり	あり	50	10
5	6mg	なし	なし	100	90
6	6mg	なし	あり	90	50
7	6mg	あり	なし	90	70
8	6mg	あり	あり	90	80
9	3mg	なし	なし	100	80
10	3mg	なし	あり	100	40
11	3mg	あり	なし	100	100
12	3mg	あり	あり	100	90
従来法 <sup>5)</sup>	12mg	-	-	100	100

- 12mg：種子を用いた遺伝子型判別法（令和4年度普及に移す技術）における、種子 2mm 採取に相当する。
- なし：PVPPの添加無し、あり：カナカ簡易 DNA 抽出キット version 2 の試薬 A に重量比 0.5% の PVPP を添加。
- なし：抽出 DNA の希釈無し、あり：抽出 DNA を滅菌蒸留水で 2 倍希釈。
- PCR 増幅産物または制限酵素断片により遺伝子型を判別可能な検体数/10 検体×100。
- 種子を用いた遺伝子型判別法の結果を示す。DNA 抽出には DNeasy Plant Mini Kit を使用。

a: 表1パターンI

b: 表1パターンII

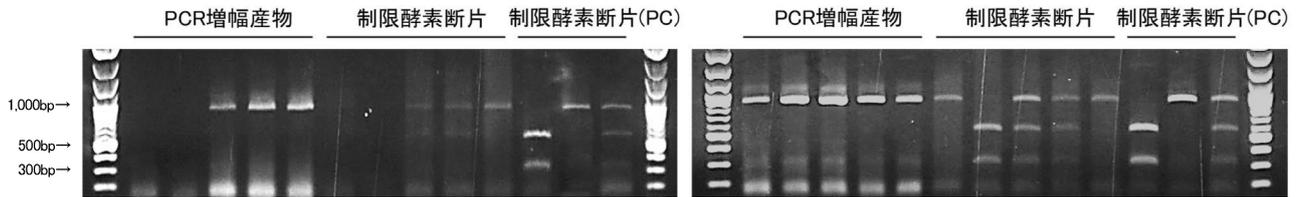


図1 PCR 増幅産物および制限酵素断片のアガロースゲル電気泳動図の例

- パターン 1 では、バンドの見られないサンプルや、バンドが不明瞭なため遺伝子型判別の困難なサンプルが生じる。
- PC はポジティブコントロール（従来法による DNA 抽出）を示す。
- PCR 反応液は 12.5μl 容量（鋳型 DNA 1μl）で、DNA ポリメラーゼに KOD FX（TOYOBO）、プライマーにニガウリうどんこ病抵抗性判定マーカー PMR80 を用いた。また、PCR 増幅産物のバンドサイズは 898bp である。
- 制限酵素処理の反応液は 25.0μl 容量（PCR 増幅産物 3μl）で、制限酵素に TspRI を用いた。また、制限酵素断片のバンドサイズは感受性ホモで 577bp と 321bp、抵抗性ホモで 898bp、ヘテロで 898bp と 577bp と 321bp である。

表2 PCR 増幅の統計解析結果<sup>1)</sup>

説明変数	係数推定値 <sup>2)</sup>	標準偏差	Wald $\chi^2$	p値
切片	0.15	0.50	0.09	n.s.
6mg	2.50	0.66	19.19	<0.001
3mg	4.55	1.43	32.06	<0.001
PVPP あり	-1.09	0.56	3.75	n.s.
希釈あり	0.79	0.56	1.95	n.s.

- 1) 応答変数：PCR 増幅成功率、説明変数：種子供試量、PVPP 添加有無、DNA 希釈有無、二項分布、リンク関数：logit。
- 2) 係数推定値の絶対値が大きいくほど、説明変数の応答変数に及ぼす効果は大きくなる。また、説明変数は係数推定値の符号が+のとき正の効果、-のとき負の効果を示す。

表3 制限酵素処理(供試量3mg)の統計解析結果<sup>1)</sup>

説明変数	係数推定値	標準偏差	Wald $\chi^2$	p値
切片	1.29	0.70	4.03	<0.05
PVPP あり	2.38	0.97	7.51	<0.01
希釈あり	-1.70	0.88	4.04	<0.05

- 1) 応答変数：種子供試量 3mg における制限酵素処理の成功率、説明変数：PVPP 添加有無、DNA 希釈有無、二項分布、リンク関数：logit。

1. ニガウリ種子から種皮を除去して胚を取り出し、胚の子葉側末端から組織を3mg採取する。
- ↓
2. バイオマッシャーで胚を破碎し、重量比0.5%のPVPPを加えた試薬Aを100μl添加してボルテックスで攪拌する。
- ↓
3. 遠心分離で胚を洗める(13,000rpm, 2分)。
- ↓
4. 上澄みをPCRチューブに回収し、98°C8分、以降25°Cに設定したサーマルサイクラーにて加熱する。
- ↓
5. PCRチューブをサーマルサイクラーから取り出し、試薬Bを14μl添加してボルテックスで攪拌する。
- ↓
6. PCRの鋳型DNAとして使用する。

図2 ニガウリ種子の簡易 DNA 抽出プロトコル

[研究情報]

課題 ID：2022 農 001

研究課題名：野菜類の簡易 DNA 抽出法の開発

予算区分：沖縄振興特別推進交付金（労働力不足と環境負荷軽減に対応する沖縄型園芸農業技術開発事業）

研究期間（事業全体の期間）：2022～2024 年度（2022～2026 年度）

研究担当者：友寄敬太、伊礼彩夏、儀間康造

発表論文等：なし

(成果情報名) 泡盛蒸留粕を用いた土壤消毒によるニガウリつる割病原菌の菌密度抑制効果							
(要約) 炭素含量 0.2wt%以上の泡盛蒸留粕を土壤混和後にビニール被覆を行うと、3週間後には圃場（島尻マージ）においてニガウリつる割病原菌密度を検出限界値未満にする。							
(担当機関) 農業研究センター宮古島支所					連絡先	098-840-8504	
部会	野菜・花き	専門	作物病害	対象	ニガウリ	分類	実用化研究

[背景・ねらい]

宮古島では冬春期の温暖な気候を活かしてニガウリなど野菜類の栽培が盛んである。しかし、自根栽培による連作が慣習的に行われており、つる割病などの土壤病害が問題となっている。防除策として、有機物を土壤中に投入する土壤還元消毒法が日本を含む世界各国で開発・普及している。地域資源である泡盛蒸留粕は、宮古地域の数酒造所から副産物として産出されるが、廃棄処理が必要なため有効利用が望まれている。本研究では、宮古地域の泡盛蒸留粕を用いた土壤還元消毒技術を開発する事を目的とした。国内で既に普及している低濃度エタノール土壤還元消毒を行う場合、エタノール濃度 0.25～1.0vol% (炭素含量 0.1～0.4wt%) の範囲で有効としている (門馬、2019)。そこで、島尻マージにおいて、各希釈した泡盛蒸留粕の土壤混和後密閉処理のニガウリつる割病原菌 (フザリウム菌) に対する抑制効果を室内試験で検証したのち、適する希釈濃度の泡盛蒸留粕を用いた土壤消毒を圃場で行いその効果を確認する。

[成果の内容・特徴]

1. 室内試験において、炭素含量 0.05wt% (90 倍希釈) 以上の泡盛蒸留粕を用いた土壤混和後の密閉処理は、既報のエタノールによる土壤還元消毒の場合と同様、ニガウリつる割病原菌密度を泡盛蒸留粕混和前の 4.82 Log CFU/g から検出限界値未満 (<1.05Log CFU/g) にする (表 1)。
2. 圃場において、炭素含量 0.2wt%の泡盛蒸留粕の土壤混和及びビニール被覆は、炭素含量 0.2wt%のエコロジアル® (市販のエタノール土壤還元消毒用資材) の場合と同様、ニガウリつる割病原菌密度を土壤混和前の 6.54 Log CFU/g から検出限界値未満 (<1.05Log CFU/g) にする (表 2)。

[成果の活用面・留意点]

1. フザリウム菌などによる土壤病害発生圃場で泡盛蒸留粕を用いた土壤消毒を実施する際の参考資料として活用する。
2. 使用した泡盛蒸留粕は菊之露酒造株式会社工場 (宮古島市平良西里) で仕込んだ泡盛発酵もろみ蒸留後の残渣物であり、エタノール 1vol%未満、炭素含量 4.5±0.0wt%、窒素含量 0.6±0.0wt% (mean ±標準誤差; 2024 年 4 月から 7 月の半月ごと 9 回採取) である。
3. 泡盛蒸留粕を用いた土壤消毒は、還元効果が示唆される。
4. 地温 20℃では、泡盛蒸留粕に限らず有機物投入による還元効果がほぼないため (Momma *et al.*, 2010)、地温 30℃以上で維持することが望ましい。
5. 事前かん水し土壤をしっかりと湿らせた後、泡盛蒸留粕を投入しビニール被覆 (空気を遮断) する (ビニール被覆が先でも良い)。
6. 泡盛蒸留粕は基本、液体であるものの、不溶性の粒子を含む事に留意する。
7. 泡盛蒸留粕の圃場への散布方法などの詳細は今後検討する。

[残された問題点]

効率的かつ効果的な散布方法の開発

## [具体的データ]

表1 土壌消毒中におけるニガウリつる割病菌数 (Log CFU/g dry perlite) の変化

還元資材\経過日数	0	3	7	14
1.0vol%エタノール (炭素含量 0.4wt%)		1.85±0.33	<1.05	<1.05
0.5vol%エタノール (炭素含量 0.2wt%)		2.78±0.09	<1.05	<1.05
0.25vol%エタノール (炭素含量 0.1wt%)		3.01±0.31	1.40±0.28	<1.05
泡盛蒸留粕 (原液; 炭素含量 4.5wt%)		1.73±0.14	<1.05	<1.05
泡盛蒸留粕 (11倍希釈; 炭素含量 0.4wt%)		1.72±0.47	<1.05	<1.05
泡盛蒸留粕 (23倍希釈; 炭素含量 0.2wt%)	4.82±0.04	1.99±0.35	<1.05	<1.05
泡盛蒸留粕 (45倍希釈; 炭素含量 0.1wt%)		2.60±0.11	1.40±0.28	<1.05
泡盛蒸留粕 (90倍希釈; 炭素含量 0.05wt%)		3.25±0.09	1.56±0.41	<1.05
泡盛蒸留粕 (180倍希釈; 炭素含量 0.025wt%)		3.13±0.07	4.09±0.10	2.94±0.05
水		4.09±0.11	3.60±0.09	2.22±0.08
コントロール (資材無)		4.81±0.08	5.05±0.09	4.71±0.00

mean±標準誤差、n=3; プラスチックボックス (17×17×15 cm) 内の島尻マージ (支所内圃場より採取) 4kg にニガウリつる割病菌 (MAFF240804 (*Fusarium cugenangense*)) を粉砕パーライトと混合してナイロンバッグに詰めたのを埋設、溶液 1L 投入して土壌を浸漬させた。蓋で密閉し 30°C で 14 日間静置 (各 3 反復) した。病原菌は希釈平板法にて計測した。

表2 圃場における土壌消毒前後のニガウリつる割病菌数 (Log CFU/g dry perlite) の変化

処理区\経過日数	0	21
コントロール		6.24±0.02
水	6.54±0.06	3.95±0.42
エコロジアル (0.2wt%炭素含)		<1.05
泡盛蒸留粕 (0.2wt%炭素含)		<1.05

mean±標準誤差、n=3; 島尻マージが充足された 2m×2m×1.6m (D×W×H) =6.4m<sup>3</sup> の試験区に、水、エコロジアル、泡盛蒸留粕を約 1.5t 投入 (コントロールは投入無し)、農業用ビニールを被覆し密閉して 2024 年 8 月 27 日から 21 日間置いた (各 3 反復、本期間の地温日平均温度は 32.7°C)。深さ 30cm に埋設した上記病原菌は、土壌消毒前後で希釈平板法にて計測した。

## [研究情報]

課題 ID: 2023 農 001

研究課題名: 地域資源を活用した土壌還元消毒による持続的で環境にも優しい宮古島野菜づくり

予算区分: 県単 (沖縄県産業振興重点研究推進事業)

研究期間 (事業全体の期間): 2024~2025 年度 (2023~2025 年度)

研究担当者: 花ヶ崎敬資、下地浩之、小橋川隆一、谷合直樹、比嘉基晶

発表論文等: Australasian Plant Pathology に掲載予定