

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	清水 佐知子
学位授与の日付	2025年2月28日	
論文名	水耕栽培におけるネギ根腐れの発生要因解明と防除法確立	
論文審査委員	主査	東條 元昭
	副査	青木 考
	副査	高野 順平

論文要旨

広島県では湛液式の水耕ネギ栽培が1988年から盛んに行われ、日本一の水耕ネギ産地となっている。しかし、夏期高温期に根腐症状が発生し、被害が大きい場合は全滅するため大きな問題となっている。また、産地では契約により無農薬で栽培が行われているため、農薬登録がある銀資材も使用できない。そのためこれらの原因解明と防除法確立が産地で急務となっている。そこで本研究では、水耕ネギ根腐れの原因を解明して発生生態を明らかにし、それらに対応した防除技術を開発することを目的とした。症状から糸状菌と細菌による病害が原因と疑われたため、これらの分離、ネギ病原性の評価、および同定を行って病原体の種類を明らかにした。次に、病原体の温度反応特性や発病菌密度の解明、生産圃場におけるモニタリング、培養液の微生物群集構成と発病との関係調査を行い、発生要因を明らかにした。最後に、農薬に依存しない防除法として培養液のpH管理による水耕ネギ根腐れの防除技術の開発を検討した。

第1章では水耕ネギ根腐れの病原体の同定を行った。まず、現地調査により根腐れの原因と考えられる糸状菌と細菌の調査を行った。2009年に糸状菌を、2016～2019年に糸状菌と細菌を、2020年に細菌と水耕栽培で発生する主要な糸状菌である *Pythium* 属菌を分離し、ネギ幼苗や種子に接種して病原性を調査した。病原性が認められたものについて、形態観察や遺伝子解析により菌種名を特定した。その結果、幼苗検定で病原性が認められた糸状菌として、有性器官を形成せず、なおかつ既報のネギ根腐病菌 *Globisporangium irregulare* (syn. *Pythium irregulare*) とは異なる *Pythium* 属菌3種を確認し、それぞれ *Pythium* cluster B2a sp.、*Pythium* cluster B1d sp.、*Pythium* clade A sp. と同定した。種子検定で病原性が認められた細

菌は、ネギ腐敗病菌 *Pseudomonas marginalis*、ネギ軟腐病菌 *Pectobacterium carotovorum*、*Dickeya* 属菌、ネギ葉枯細菌病菌 *Xanthomonas campestris*、ネギ褐色腐敗病菌 *Burkholderia gladioli* の他、*Acidovorax* 属菌、*Sphingobacterium* 属菌、*Empedobacter* 属菌、*Flavobacterium* 属菌、および *Chryseobacterium* 属菌であった。

次に、病原性が認められた *Pythium* 属菌 3 種と病原性が強かった細菌 6 種をネギ幼苗に混合接種し、根腐れに伴う立枯れの発病程度を調査した。その結果、*Pythium* 属菌 3 種とも、単独接種区は細菌単独接種区よりも発病度が高く、細菌を混合接種してもほとんどの組み合わせで発病度は高くならなかった。この結果から、根腐れや立枯れの主な病原体は *Pythium* cluster B2a sp.、*Pythium* cluster B1d sp.、*Pythium* clade A sp. であると考えられた。

さらに、*Pythium* 属菌 3 種の感染によるネギ生育への被害程度を明らかにするため、ネギの感染苗と健全苗を混植して水耕栽培し、感染菌数や生育に及ぼす影響を調査した。その結果、根への感染菌数は *Pythium* 属菌 3 種で有意な差は認められず、いずれも 45 cfu/株以上であった。ネギの草丈は *Pythium* 属菌 3 種いずれもが無接種区に対して 13~23% 抑制し、根の長さは *Pythium* cluster B1d sp. が 20% 抑制した。根の外観では *Pythium* cluster B2a sp. で褐変、腐敗が最も著しかった。収量(可食部重量)は *Pythium* cluster B1d sp. で 40% 減と有意な減少が見られた。*Pythium* cluster B2a sp. と *Pythium* clade A sp. でもそれぞれ 28% と 19% の収量減が見られた。以上のように、*Pythium* cluster B2a sp.、*Pythium* cluster B1d sp.、*Pythium* clade A sp. の 3 種のいずれもがネギの根を腐敗させ生育を抑制したことから、これら 3 つの菌種が水耕ネギに根腐れや立枯れの主原因であると判断し、これらをネギ根腐病菌として病原追加した。

第2章では、水耕ネギ根腐れの発生要因の解明を行った。前章でネギ根腐れを引き起こす主要な原因が *Pythium* 属菌 3 種であることを明らかにしたが、それらの発生生態は不明である。そこで、これらの遊走子形成の温度反応特性、各温度における菌密度と発病との関係などを調査した。現地の水耕ネギ栽培圃場の培養液水温は、冬期は 8~19℃で平均 14℃、春期と秋期は 10~28℃で平均 19℃、夏期は 19~33℃で平均 26℃であった。このような環境から分離される *Pythium* 属菌 3 種の菌糸の伸長温度範囲は、*Pythium* cluster B2a sp.、*Pythium* cluster B1d sp. および *Pythium* clade A sp. で、それぞれ 4~37℃、4~34℃および 7~40℃と互いに異なった(第1章で調査)。一方で菌糸伸長の至適温度はいずれの菌種も 31~34℃であったことから、培養液の温度が最高で 33℃まで上昇する夏期高温期の水耕ネギ栽培施設では、これら *Pythium* 属菌 3 種の菌糸伸長の活性が最も高くなると考えられた。一方、感染源として重要な役割をはたす遊走子については、その形成の至適温度は 3 菌種いずれも 25℃であったが、形成可能な温度の範囲は *Pythium* cluster B2a sp. が 10~30℃(水耕ネギの培養液の周年の温度に相当)、*Pythium* cluster B1d sp. が 20~25℃(同、春期)、*Pythium* clade A sp. は 20~30℃(同、春期から秋期)であった。これらの結果から、培養液水温が 25℃前後になる 5~7 月と 9 月が 3 菌種のいずれもが増殖する時期と考えられた。以上の結果に基づいて、温度と菌密度を変動させた遊走子接種実験を行った結果、3 種とも発病は 20℃以上で確認され、感染株

率が最も高くなる温度は、*Pythium cluster B2a sp.* で 24°C、*Pythium cluster B1d sp.* と *Pythium clade A sp.* で 32°Cであった。3種の菌糸生育の至適温度である32°Cでは、いずれの菌種も2~20 cfu/L以上の低菌密度で感染および発病が認められ、菌密度が高くなるほど感染株率が高くなった。32°Cは低~中温生育性の作物であるネギ自体にも生育に不適な温度である。多くの *Pythium* 属菌種は、植物が温度等のストレスで活性化した時に植物を加害しやすい。そのため、水耕ネギ根腐れの場合にも、高温で *Pythium* 属菌の加害を受けるリスクが高くなると考えられた。

次に、栽培方法や発病履歴が明らかな水耕ネギ栽培施設の4つの圃場で、ネギ根腐病の発生と、培養液およびネギ根に生息している *Pythium* 属菌の種類との関係を3年間調査した。*Pythium* 属菌の種類は、分離とリボソーム遺伝子に基づく同定で調べた。その結果、培養液中の優占菌種は周年にわたって *Pythium cluster B1d sp.* であった。一方、ネギ根では、根腐れの少発生圃場では *Pythium cluster B1d sp.* が多く、多発生圃場では *Pythium cluster B1d sp.* に加えて *Pythium cluster B2a sp.* と *Pythium clade A sp.* も発病前期や発病盛期に見られた。このことから、培養液中の優占菌が必ずしもネギ根に優占的に感染しているわけではないことがわかった。以上のことから、培養液中の密度よりも根への感染に着目して、これら3種の *Pythium* 属菌の防除対策を講じる必要があると考えられた。また、室内実験と圃場調査から、ネギ根腐病である *Pythium* 属菌3種は、水耕栽培施設において年間を通じて生育および増殖し、2~20 cfu/Lの低菌密度でも感染し、20°Cを超えると発病することが確認された。

さらに次世代シーケンサーで検出される培養液の微生物群集構造とネギ根腐病の発生に関係があるかどうかを、上記の4圃場から栽培液を採取して調べた。その結果、細菌と真菌の群集構造は、圃場や時期が同じ場合には類似していたが、これらの微生物の多様性指数と発病との間には相関は認められなかった。細菌群では、4圃場の無発病期の3月と11月に *Pseudomonas* 属菌が確認された。この内、1つの圃場で8~10月にネギ根腐病の発病が認められ、8、9月には *Dickeya* 属菌が確認された。このように、ネギ根腐病の無発病期と発病圃場で細菌の種類が異なる結果が得られた。また、根腐病の発病と負の相関関係にある真菌の分類群を確認した。今後、データを蓄積することで、発病期や発病前に特異的に見られる微生物群や発病抑制に関係する微生物群を把握できれば、その微生物に着目したネギ根腐病の予察技術や栽培管理技術への応用にも繋がる可能性がある。

第3章では、培養液の pH 管理によるネギ根腐病の防除法を確立した。水耕栽培で発生する *Pythium* 属菌は、遊走子を介して根に感染し二次伝染を繰り返して被害を拡大させるが、遊走子形成には培養液の pH、特に低 pH が大きく影響していると考えられている。そこで水耕ネギ根腐病の病原体に対する低 pH 培養液の抑制効果を、生産圃場条件と実験条件で調べた。生産圃場で異なる培養液 pH 条件を作り、発病状況を調べた結果、低 pH 区 (pH 4.3~4.9) では慣行区 (pH 5.4~6.4) と比較してネギ根腐病の発生が有意に低かった。実験条件で *Pythium cluster B2a sp.* を接種して同様の試験を行ったところ、低 pH 区 (pH 4.0 および 4.5) は慣行区 (pH 5.5) と比較して、遊走子の産生を有意に抑制し、根への感染率を低下させることが確認さ

れた。また、上述の3種の *Pythium* 属菌についても、低 pH 区 (pH4.0) は慣行区 (pH5.5) に比べ、遊走子密度と根への感染率を大幅に低下させることが確認された。低 pH 区でネギの収量への負の影響は認められなかった。これらの結果から、培養液の pH を 4.0 に下げることによって、収量を損なうことなく水耕栽培ネギの根腐病を抑制できることを明らかにした。

以上の本研究で、まず水耕栽培ネギで甚大な被害をもたらす根腐れの主要な原因体が *Pythium* 属菌 3 種であることを明らかにした。次にこれら *Pythium* 属菌 3 種の温度反応特性や発病菌密度等の発生生態実験や生産圃場での調査から、培養液の低い菌密度や高い水温が発生要因であることを明らかにした。また、発病と培養液の微生物群集との関係調査により、多発圃場や発病期に特徴的な微生物群が存在している可能性が示された。さらに培養液の pH 管理による本病の新たな防除手段を開発した。今後、これらの新知見や技術の水耕ネギ生産現場への普及が期待される。

審査結果の要旨

広島県では湛液式の水耕ネギ栽培が1988年から盛んに行われ、日本一の水耕ネギ産地となっている。しかし、夏期高温期に根腐症状が発生し、被害が大きい場合は全滅するため大きな問題となっている。また、産地では契約により無農薬で栽培が行われているため、農薬登録がある銀資材も使用できない。そのためこれらの原因解明と防除法確立が産地で急務となっている。そこで本研究では、水耕ネギ根腐れの原因を解明して発生生態を明らかにし、それらに対応した防除技術を開発することを目的とした。症状から糸状菌と細菌による病害が原因と疑われたため、これらの分離、ネギ病原性の評価、および同定を行って病原体の種類を明らかにした。次に、病原体の温度反応特性や発病菌密度の解明、生産圃場におけるモニタリング、培養液の微生物群集構成と発病との関係調査を行い、発生要因を明らかにした。最後に、農薬に依存しない防除法として培養液の pH 管理による水耕ネギ根腐れの防除技術の開発を検討した。

第1章では水耕ネギ根腐れの病原微生物の同定を行った。予備調査でネギへの病原性が認められたものについて、形態観察や遺伝子解析により種名を特定した。その結果、幼苗検定は3種の卵菌 (*Pythium* cluster B2a sp., *Pythium* cluster B1d sp. および *Pythium* clade A sp.) が、種子検定で9種の細菌がネギに病原性を示した。次に、上記の *Pythium* 属菌3種とネギへの病原性が強かった細菌6種をネギ幼苗に共接種し、根腐れに伴う立枯れの発病程度を調査した。その結果、*Pythium* 属菌3種のいずれでも、それぞれの単独接種区で細菌単独接種区よりも発病度が高く、細菌を共接種してもほとんどの組み合わせで発病度が高くならなかった。この結果から、根腐れや立枯れの主な病原は上記の *Pythium* 属菌3種と考えられた。さらに、これらの *Pythium* 属菌3種に感染したネギを混植した水耕条件で収穫までネギを栽培してネギ根への菌の感染と収量への影響を調べたところ、収穫に至るまで各菌種の感染が一定レベル (45 cfu/株以上) で収量減をもたらし、根の腐敗も見られることがわかった。*Pythium* 属菌3種はこれまでネギの病原として知られていなかったため、ネギ根腐病菌として病原追加した。

第2章では水耕ネギ根腐れの発生要因の解明を行い、感染源として重要な役割をはたす遊走子の形成の至適温度が *Pythium* 属菌3菌のいずれもが25°C前後であったことから、養液温度がこの温度になる5~7月と9月が3菌種のいずれもが増殖する時期と考えられた。一方で3菌種の菌

糸伸長は高温で最も速くなることから、培養液温度が最高で33°Cまで上昇する夏期高温期に感染後の発病リスクが高まると考えられた。さらに、温度と菌密度を変動させた遊走子接種実験を行った結果、3菌種とも発病が20°C以上で確認されたが、感染株率が最も高くなる温度は菌種により24~32°Cと異なった。32°Cでは高温を好まないネギもストレスを受けるため、このような高温では*Pythium*属菌の加害を受けるリスクが高くなると考えられた。

次に、栽培方法や発病履歴が明らかな水耕ネギ栽培施設の4つの圃場で、ネギ根腐病の発生と、培養液およびネギ根に生息している*Pythium*属菌の種類との関係を3年間に渡って分離トリボソーム遺伝子に基づく同定で調べた。その結果、培養液中の優占菌種は周年にわたって*Pythium cluster B1d sp.*であった。一方、ネギ根では、根腐れの少発生圃場では*Pythium cluster B1d sp.*が多く、多発生圃場では*Pythium cluster B1d sp.*に加えて*Pythium cluster B2a sp.*と*Pythium clade A sp.*も発病前期や発病盛期に見られた。このことから、培養液中の優占菌が必ずしもネギ根に優占的に感染しているわけではないことがわかった。

さらに培養液の微生物群集構造とネギ根腐病の発生に関係があるかどうかを、上記の4圃場から栽培液を採取し次世代シーケンサーで調べた。その結果、細菌と真菌の群集構造は、圃場や時期が同じ場合には類似していたが、これらの微生物の多様性指数と発病との間には一部の指数で相関が認められたが、単年度の結果であった。細菌群では、4圃場の無発病期の3月と11月に*Pseudomonas*属菌が確認された。この内、1つの圃場で8~10月にネギ根腐病の発病が認められ、8、9月には*Dickeya*属菌が確認された。このように、ネギ根腐病の無発病期と発病圃場で細菌の種類が異なる結果が得られた。また、根腐病の発病と負の相関関係にある真菌の分類群を確認した。今後、データを蓄積することで、発病期や発病前に特異的に見られる微生物群や発病抑制に関係する微生物群を把握できれば、その微生物に着目したネギ根腐病の予察技術や栽培管理技術への応用にも繋がる可能性がある。

第3章では、培養液のpH管理によるネギ根腐病の防除法を確立した。水耕栽培で発生する*Pythium*属菌は、遊走子を介して根に感染し二次感染を繰り返して被害を拡大させるが、遊走子形成には培養液のpH、特に低pHが大きく影響すると考えられている。そこで水耕ネギ根腐病の病原体に対する低pH培養液の抑制効果を、生産圃場条件と実験条件で調べた。生産圃場で異なる培養液pH条件を作り、発病状況を調べた結果、低pH区(pH 4.3~4.9)では慣行区(pH5.4~6.4)と比較してネギ根腐病の発生が有意に低かった。実験条件で、上述の3種の*Pythium*属菌のいずれもが、低pH区(pH4.0)が慣行区(pH5.5)に比べて遊走子密度と根への感染率を大幅に低下させることが確認された。低pH区でネギの収量への負の影響は認められなかった。これらの結果から、培養液のpHを4.0に下げること、収量を損なうことなく水耕栽培ネギの根腐病を抑制できることを明らかにした。

以上の本研究で、まず水耕栽培ネギで甚大な被害をもたらす根腐れの主要な原因体が*Pythium*属菌3種であることを明らかにした。次にこれら*Pythium*属菌3種の温度反応特性や発病菌密度等の発生生態実験や生産圃場での調査から、培養液の低い菌密度や高い水温が発生病因であることを明らかにした。また、発病と培養液の微生物群集との関係調査により、多発圃場や発病期に特徴的な微生物群が存在している可能性が示された。さらに培養液のpH管理による本病の新たな防除手段を開発した。今後、これらの新知見や技術の水耕ネギ生産現場への普及が期待される。これらの新知見は応用生命科学分野、とくに農学、植物病理学および園芸科学の発展に大きく寄与する。よって、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士(応用生命科学)の学位を授与することを適当と認める。