

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05652

研究課題名(和文) アスパラガス属固有種ハマタマボウキの罹病現象の究明と保護対策の確立

研究課題名(英文) Investigation of disease occurrence mechanism and establishment of their protection of *Asparagus kiusianus*

研究代表者

松元 賢 (Matsumoto, Masaru)

九州大学・熱帯農学研究センター・准教授

研究者番号：60304771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：食用アスパラガスと在来種のハマタマボウキとの交雑種が茎枯病に耐性があることを世界で初めて明らかにした。ハマタマボウキは、九州北部沿岸のみに自生する固有種で病害に強い植物であると認識されていたが、自生地での現地調査や病害調査を実施した結果、本植物の病原菌類として、*Phomopsis* 属、*Neopestalotiopsis* 属、*Fusarium* 属および*Botrytis* 属菌などによる本植物の病名記載を行った。

さらに、自生地の本植物根圏には高頻度で*Trichoderma*属菌が定着していることを明らかにし、本菌の根圏定着により、市販の園芸用培土でも生育可能であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究成果の学術的・社会的意義は、現在、自生地の現地調査と被害個体の調査から、本植物の生息域の減少の一要因として、複数種の植物病原菌類による複合感染の現状を明らかにしたことにより、絶滅危惧種IAに指定されている本植物の希少種としての保護の必要性を学術的に証明したことにある。また、根圏微生物の定着による微生物コンソーシアムの環境維持によって、市販の園芸用培土でも生育が可能であるという学術的な発見は、本植物の繁殖技術や確立や希少種の保護対策、生態系や生物多様性の保全などにつながることから社会的意義は高い。

研究成果の概要(英文)： For the first time in the world, a hybrid between edible asparagus and a native species of asparagus plant of Hamatamaboki has been shown to be resistant to stem blight disease. Although Hamatamaboki is an endemic species that grows only along the northern coast of Kyushu and has been recognized as a disease-resistant plant, field surveys in its native habitat have revealed that pathogenic fungi of the fungal genera were *Phomopsis*, *Neopestalotiopsis*, *Fusarium* and *Botrytis*. As a result, the pathogenic fungi of this plant described above were described.

In addition, we found that *Trichoderma* spp. were frequently established in the rhizosphere of this plant in the native habitat, and the rhizosphere establishment of this fungus made it possible to grow this plant in the commercial horticultural media.

研究分野：環境微生物学

キーワード：ハマタマボウキ 絶滅危惧種 アスパラガス茎枯病菌 根圏微生物 トリコデルマ属菌 ホモプシス属菌 繁殖法

# 研究テーマ：アスパラガス属固有種ハマタマボウキの罹病現象の究明と保護対策の確立

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の食用アスパラガス病害の 90%以上は植物病原菌による病害である。中でも、アスパラガス茎枯病は我が国をはじめ、世界最大の生産国である中国やタイなどのアジア地域での被害が大きく、欧米諸国でも発生が報告されている。本病害は一旦罹病するとその根絶は極めて困難であるにも関わらず、食用アスパラガス種内には病気に強い品種が見つかっていない。そのため、国内外の産地においては、薬剤防除を中心に総合的な防除対策を講じているが不十分である。さらに、近年主要薬剤に対する耐性菌も確認されており、病害防除対策が極めて難しくなりつつある。そこで、アスパラガスでは耐病性品種の育成が強く望まれているが、本植物は多年生で交雑しにくく、品種育成には多大な年数がかかり、かつ、アスパラガス品種内には耐病性形質が存在しないなど、耐病性品種育種のハードルは極めて高い。そのため、アスパラガスの耐病性品種の育種研究は、我が国を始め、欧米諸国やアジアとの間で世界的な競争を繰り広げている。

申請者らの研究チームは、日本産アスパラガス植物の一種であるハマタマボウキと食用アスパラガスとの交雑種が、茎枯病に耐性があることを世界で初めて明らかにしており、アスパラガス茎枯病の耐病性品種育種に対し、新たな可能性の提案を実現した。本病の耐病性品種の育種に展望が開かれた意味は非常に大きい。本植物は日本固有種の一種で九州北部沿岸のみに自生する希少種であるため、生息域は限定的で非常に狭く、本植物の病害記載が存在しないことから、病害に強い植物であると認識されていた。しかし、近年の申請者の現地調査では、罹病化したハマタマボウキを発見しており、これまでの病気に強いという認識を覆す結果を得ている。また、ハマタマボウキ自生地近隣は、九州の食用アスパラガスの大生産地であることから、アスパラガス属植物間の相互感染による新規病害の発生や病害の進展化、希少種の生息域の減少が懸念される。さらに、ハマタマボウキの持つ耐病性のポテンシャルから、育種研究を目的とした乱獲や国外への流出が耐病性品種の育種の障害となる可能性が示唆される。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、ハマタマボウキの自生環境特性を解明することにより、ハマタマボウキの人工栽培技術に資する知見を収集する。また、ハマタマボウキの自生環境下における病害発生実態を解明することにより、アスパラガス属新規病害発生および病害進展の予防策を提案する。さらに、これらの研究成果から、食用アスパラガスの罹病可能性を未然に防ぐとともに、耐病性品種の育種研究に貢献しうるハマタマボウキの種の保全について提案することができる質の高い研究を目指す。

## 3. 研究の方法

### 【課題 1】ハマタマボウキの発病実態の解明と病害抑止策の策定

#### 〔調査項目および内容〕

・病害調査：ハマタマボウキの分布調査と併せて、自生地の病害調査を実施する。病害調査で被害個体を発見した場合、被害個体のサンプリングを実施する。サンプリングは、罹病植物の患部組織、植物個体および種子を採集する。被害植物のサンプリングは必要最小限にとどめる。

・病害判定と病原菌同定：被害植物組織を PDA 培地上で 1 週間生育させ、被害組織から出てきたコロニー菌糸を PDA 培地上で生育させ、伸長した菌糸及び胞子を健全ハマタマボウキに接種し、分離菌の病原性を確認する。ハマタマボウキで確認された病原菌は、形態的特徴と DNA 遺伝子診断により分類同定を実施する。

・宿主範囲調査：ハマタマボウキ分離菌の病原性を確認するために、始めに、アスパラガス属植物の病原性試験を実施する。食用アスパラガス(品種：ウエルカム)や他の日本固有種であるタマボウキ、キジカクシおよびクサスギカズラ(申請者の収集個体)について病原性を確認する。また、アスパラガス属植物以外の植物種について病原性を調査するために、異なる宿主(ナス科、ウリ科、マメ科、アブラナ科植物など)に接種試験を実施し、宿主範囲を決定する。

・病原菌の伝染環：ハマタマボウキ分離菌の生活環(伝染環)を明らかにするために、ファイトトロン内で栽培したハマタマボウキに病原菌を感染させ、病斑形成と伝染・伝搬のモニタリングを行う。新たな病斑形成時に、罹病組織の病理観察を実施する。

・病害抑止法の検討：ハマタマボウキ自生地の根圏土壌に生息する微生物を選抜し、ハマタマボウキ分離菌と対峙培養させることにより、病原菌の生育を抑制・拮抗する微生物をスクリーニングする。これらの微生物を生物的防除資材として利用するための栽培試験を実施して、病害抑止技術を確立する。

## 【課題2】ハマトマボウキの繁殖環境の解明と栽培技術の確立

〔調査項目および方法〕

- ・ハマトマボウキ分布調査：九州北部沿岸域のうち、現在確認されている自生地を除く地域として、長崎県松浦市、長崎県壱岐市、佐賀県玄界灘町、福岡県福津市、山口県などの海岸線の内陸地および日本海(玄界灘)の諸島を調査対象地として、ハマトマボウキの分布を調査する。
- ・人工栽培化試験：繁殖環境の調査結果に基づき、ハマトマボウキの栽培に適した栽培繁殖環境を構築する。主に栽培土壌(砂質培土、園芸用培土、農業培土等)、肥料(リン酸、カリウム、窒素、微量元素)、灌水条件や日照条件などの条件について検討する。栽培試験は九州大学生物環境利用推進センター設置の環境制御装置(ファイトロン)で実施する。本研究で確立した栽培技術は、次の接種試験および繁殖地での保全保護活動に活用する。

### 4. 研究成果

- (1) アスパラガス属野生種から分離された *Phomopsis* 属菌の病斑形成と酵素活性との関連性  
本産のアスパラガス属野生種の一つであるハマトマボウキ (*Asparagus kiusianus*) に感染病斑が確認されたので、罹病植物個体の感染組織部を標本観察した。その結果、病斑形成に関与していると思われる糸状菌が観察された。そこで、罹病植物組織から原因菌を分離したところ、2種の *Phomopsis* 属菌 (*P. asparagi* および *Phomopsis* sp.) が分離され、その病原性が確認された。分離した *Phomopsis* 属菌は培地上での柄子殻および分生子の形成がきわめて遅いため、菌糸体を用いた改変 Vinyl Cotton (VC) による有傷接種を行い、接種72時間後におけるハマトマボウキ接種部位の罹病観察を行った。コットンブルーで染色した罹病組織からは、青色を呈した顆粒状の物体が観察された。*Phomopsis* 属菌の産生物質が顆粒物質の形成に関与している可能性が示唆されたため、菌株の酵素産生性を調査した。その結果、酵素産生の違いがハマトマボウキ分離菌株間で認められた。
- (2) アスパラガス属野生種の一つであるハマトマボウキから分離された *Neopestalotiopsis clavisporea* による新病害について  
2016年4月に、九州北部海岸部に自生している日本産のアスパラガス属野生種の一つであるハマトマボウキ (*Asparagus kiusianus*) の主茎および側枝に、褐色紡錘形の病斑が確認された。そこで、罹病植物組織から病斑形成に関与している糸状菌を分離した。分離菌はPDA培地上での分生子の形成がきわめて遅いため、菌糸体を用いた改変 Vinyl Cotton (VC) 法による有傷接種を行った。その結果、接種2週間後に接種部位に病斑形成が確認されたので、接種病斑から病原菌を再分離した。分離菌の形態的特徴は、分生子は4隔壁5細胞で、大きさ18–26×6.5–8.5 μm、中央3細胞は、長さ13–15 μm、淡褐色、頂部細胞には2本の付属糸を有し、*Pestalotiopsis* 属菌と形態的特徴が一致した。また、ITS, β-tubulin, および *tef1* の各遺伝子領域を指標にした塩基配列から、本病原菌を *Neopestalotiopsis* sp. と同定した。本植物における本菌による病害は未報告であり、国内初の報告となる。
- (3) アスパラガス属植物から分離した *Phomopsis asparagi* の遺伝的多様性に関する研究  
アスパラガス茎枯病(病原菌：*Phomopsis asparagi*)は食用アスパラガス (*Asparagus officinalis*) における最重要病害の一つであり、アスパラガス病害防除の重要課題となっている。平成29年度本大会において、在来種であるアスパラガス属野生種ハマトマボウキ (*A. kiusianus*) に自然感染した斑点性病斑から複数種の病原菌類が分離され、本菌が主たる病原菌であることを報告した。そこで、アスパラガス属間で分離源の異なる *P. asparagi* の遺伝的多様性を調査するために、ハマトマボウキの自生地である九州北部のアスパラガス産地から本菌を採集(AO菌)し、ハマトマボウキ分離菌(AK菌)を加えた代表的な15菌株を実験に供試した。食用アスパラガスへの接種試験とrDNA-ITS sequence およびRAPD-PCR法により、AO菌とAK菌は遺伝的に異なるクレードに位置していることが判明した。中でも、AK菌2菌株(SG16054株とSG16061株)他のAK菌とは明らかに異なる遺伝的特性を示した。
- (4) アスパラガス属野生種のハマトマボウキの斑点性病斑から分離された *Altanaria* 属菌について  
アスパラガス属野生種のハマトマボウキ (*Asparagus kiusianus*) の主茎部に、黒色～褐色の斑点性病斑を呈する病気の発生が、2017年6月に佐賀県虹の松原で認められた。そこで、常法に従い罹病部からポテトデキストロース寒天培地を用い病原菌の分離を試みた。その結果、黒色の菌そうが優占的に分離された。分離菌の菌そうをコルクボーラーで打ち抜き、菌糸体を含むディスクをカーボランダムによる主茎付傷部位に貼付した。接種2週間後に接種部位に原病徴が再現された。また、接種病斑部からは接種菌が再分離された。分離菌の分生

子は、0～3 個の縦隔壁と 1～5 個の横隔壁を有し、淡褐色で、大きさ 51.8-111.0×28.0-50.7 $\mu\text{m}$  であり、*Alternaria* 属菌と形態的特徴が一致した。さらに、ITS 領域の塩基配列に基づく系統解析においても *Alternaria* 属菌であることが示された。そして、Alt a1 遺伝子の塩基配列に基づく解析から、分離菌は複数種あることが推定される。今後はこれらの分離菌の種レベルでの同定を試みる予定である。

#### (5) ハマタマボウキから分離された植物病原菌類の特異的 PCR 法による簡易診断

ハマタマボウキ (*Asparagus kiusianus* Makino) は、絶滅危惧 IB 種 (環境省カテゴリー) に指定されている九州北部沿岸に自生するアスパラガス属の在来種である。平成 29 年度本大会において *Phomopsis asparagi* と *Neopestalotiopsis* sp. の 2 菌種が本植物の主たる病原菌類であることを報告したが、偽葉の斑点性病徴の形成には複数の病原菌類が関与しているため、原因菌を標徴により特定することは非常に難しい。そこで、自然感染病徴からこれら 2 菌種を効率的に特定するための分子診断法の開発を実施した。はじめに、各菌の rDNA-ITS 領域に着目し、ハマタマボウキ由来 2 菌種を特異的に検出するプライマーを合計 32 組設計し、培養菌体由来の DNA を用いて本プライマーの有効性を評価した。その結果、*Phomopsis* 属菌判別プライマー (PhomF1/PhomR2) と *Neopestalotiopsis* 属菌判別プライマー (NeoF2/NeoR5) を見いだした。さらに本菌種の特異的検出プライマーの有効性を評価するためのマルチプレックス PCR や定量 PCR を実施した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Myo Zaw, Seint San Aye, Masaru Matsumoto	4. 巻 86
2. 論文標題 Colletotrichum and Diaporthe species associated with soybean stem diseases in Myanmar	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 114-123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10327-019-00902-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Myo Zaw, Seint San Aye, Le Dihn Thao, Masaru Matsumoto	4. 巻 42
2. 論文標題 Stem blight of asparagus caused by Phomopsis asparagi in Myanmar and their phylogenetic grouping	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bulletin of the Institute of Tropical Agriculture, Kyushu University	6. 最初と最後の頁 23-29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11189/bit.42.23	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Myo ZAW, Masaru MATSUMOTO	4. 巻 58
2. 論文標題 Plant Growth Promotion of Trichoderma virens, Tv911 on Some Vegetables and Its Antagonistic Effect on Fusarium Wilt of Tomato	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental Control in Biology	6. 最初と最後の頁 7-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2525/ecb.58.7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kenji Kikuhara, Kazuhiro Iiyama, Matsumoto Masaru, Naruto Furuya	4. 巻 85
2. 論文標題 First report on DMI fungicide resistance in Gymnosporangium asiaticum, the causal agent of Japanese pear rust, in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 49-56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10327-018-0820-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Minhaz Ahmed, Masaru Matsumoto, Akinori Ozaki, Nguyen Van Thinh, Kiyoshi Kurosawa	4. 巻 11
2. 論文標題 Heavy metal contamination of irrigation water, soil, and vegetables and the difference between dry and wet seasons near a multi-industry zone in Bangladeshy Zone in Bangladesh	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Water	6. 最初と最後の頁 583
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/w11030583	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Thinh Nguyen Van, Osanai Yasuhito, Adachi Tatsuro, Thai Phong K., Nakano Nobuhiko, Ozaki Akinori, Kuwahara Yoshihiro, Kato Ryosuke, Makio Masato, Kurosawa Kiyoshi	4. 巻 139
2. 論文標題 Chemical speciation and bioavailability concentration of arsenic and heavy metals in sediment and soil cores in estuarine ecosystem, Vietnam	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microchemical Journal	6. 最初と最後の頁 268 ~ 277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.microc.2018.03.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 菊原 賢次・橋本 文武・松元 賢・飯山 和弘・古屋 成人	4. 巻 84
2. 論文標題 ナシ赤星病の多発生とDMI 剤の効果減退との関連 福岡県八女地域での後ろ向きコホート研究	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本植物病理学会報	6. 最初と最後の頁 98-104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3186/jjphytopath.84.98	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 菊原 賢次、足立 龍弥、齊藤 紀子、飯山 和弘、松元 賢、古屋 成人	4. 巻 64
2. 論文標題 福岡県におけるDMI剤低感受性ナシ黒星病菌の発生状況	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 九州病害虫研究会報	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4241/kyubyochu.64.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 1. Myo Zaw, Michito Oishi, Sadao Yamashita, Katsumi Shimomura, Yuki Mori, Masaru Matsumoto.
2. 発表標題 Evaluation of <i>Trichoderma virens</i> Tv911 as a biocontrol agent for fusarium wilt disease of lettuce and tomato
3. 学会等名 Annual meeting of the Phytopathological Society of Japan
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 1. Nguyen Van Thinh, Masaru Matsumoto, Myo Zaw, Dinh Xuan Thanh, Nguyen Dinh Nguyen, Shamim Uddin, Hoang Van Hiep, Kiyoshi Kurosawa
2. 発表標題 Arsenic, Trace Toxic Metals and Microbial Community Structure in Ancient Sediment Layers in Bangladesh and Vietnam.
3. 学会等名 The 24th International Forum on Arsenic Contamination of Groundwater in Asia (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 児玉佐和、飯山和弘、酒井順子、矢野和孝、松元 賢、土屋健一、堀田光生、古屋成人
2. 発表標題 ゲノム比較解析によるショウガ科作物青枯病菌に特異的な遺伝子群の同定
3. 学会等名 令和元年度日本植物病理学会九州部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊原賢次、飯山和弘、松元 賢、古屋成人
2. 発表標題 福岡県におけるナシ黒星病菌のDMI剤感受性と耐性菌に対する有効薬剤
3. 学会等名 平成30年度日本植物病理学会九州部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Myo, Z., Seint San, A., and Matsumoto, M
2. 発表標題 Current occurrence of Diaporthe diseases on soybean stem in Myanmar
3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小埜 晶・大迫佳奈・飯山和弘・古屋成人・松元 賢
2. 発表標題 ハマタマボウキから分離された植物病原菌類の特異的PCR 法による簡易診断
3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅野 明・アブデルラーマン モスタファ・三苫 舞・池内隆夫・森 充隆・村上恭子・尾崎行生・松元 賢・浦上敦子.
2. 発表標題 食用アスパラガスとハマタマボウキを用いた茎枯病菌感染初期におけるトランスクリプトームの動態と遺伝的変異
3. 学会等名 平成30年度園芸学会秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Thao Le Dinh・大迫佳奈・Zaw Myo・飯山和弘・古屋成人・松元 賢
2. 発表標題 アスパラガス属植物から分離したPhomopsis asparagi の遺伝的多様性に関する研究
3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大迫佳奈、Myo Zaw, 飯山和弘、古屋成人、松元 賢
2. 発表標題 アスバラガス属野生種のハマタマボウキの斑点性病斑から分離されたAltanaria属菌について
3. 学会等名 平成30年度日本植物病理学会九州部会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------