

ナス半身萎凋病を抑制する輪作体系の実証

群馬県農業技術センター 環境部病害虫係

独立研究員 池田 健太郎

はじめに

ナスは国内でもっとも消費されている野菜のひとつである。群馬県は、平成 23 年度では全国第 3 位の生産量である(群馬県, 2013)。ナス栽培に大きな被害を及ぼす病害は多数あるが、中でも半身萎凋病は、全国的に問題となっている(橋本, 1989)。本病の病原菌である土壌伝染性植物病原糸状菌の半身萎凋病菌(*Verticillium dahliae*)は宿主範囲が広く、ナス科、アブラナ科をはじめ多くの種に感染する(Pegg and Brady, 2002)。なかでも、ナスは本病原菌に対する感受性が高く、被害は甚大である(萩原, 1990; Horiuchi, 1990)。それに加えて、病原菌の耐久体である微小菌核は土壌中に長期間、生存する(Schnathorst, 1981)。これらのことから、本病害の対策は困難なものになっている。くん蒸剤による土壌消毒は、本病に対しても有効である(McKeen and Mountain, 1967)。しかし、くん蒸剤の過剰な使用は環境に対して負のインパクトを与え、また作業者の健康上のリスクも高くなる(和田ら, 1982)。さらに、ビニルフィルムによる被覆が重労働な上、薬剤費、資材費など生産コストがさらに必要となる。それゆえ、本県のナス生産者からは土壌消毒に替わる対策が求められていた。

これまでに、ブロッコリーとの輪作を行うことでカリフラワーの *Verticillium wilt* などに対して発病抑制効果があることが報告されている(Subbarao et al., 1999)。これらの研究を元に、筆者らはナスとブロッコリーとの輪作によって本病の抑制が可能なることを明らかにした(Ikeda et al., 2015)。本稿では、ブロッコリーとの輪作によるナス半身萎凋病を抑制する体系の実証と、その作用機作について紹介したい。これらの結果を生産現場に普及するにあたり、防除効果のエビデンス(科学的根拠、田代, 2005)を得ることを心がけた。この点についても、エビデンスに基づく普及戦略として提案する。

1. ブロッコリー輪作によるナス半身萎凋病抑制効果

群馬県内の 5 か所の圃場で計 6 回の試験を実施した(表 1)。そのうち 4 回は微小菌核(Shiraishi et al., 2014)および土壌フスマ培地で培養した病原菌を土壌に接種して作成した汚染圃場で試験を実施した。その他の 2 回はナス生産者の自然発生圃場で効果の検討を行った。それらの汚染圃場でブロッコリーを栽培・収穫し、残渣を圃場にロータリーなどで鋤き込んだ。無処理区としてブロッコリーを作付けしない区(試験 5 を除く全試験)およびナスを連作した区(試験 5)を設けた。ブロッコリーを栽培・鋤き込み後、次年度に全面にナスを作付けし、半身萎凋病の発病株割合を調査した。個別の事例の無処理区とブロッコリー区の発病株割合の差を Fisher の正確確率検定で解析した。また、メタアナリシス(DerSimonian 法)によって無処理区とブロッコリー区の発病株割合のリスク比を算出した(DerSimonian and Kacker, 2007; DerSimonian and Laird, 1986; Kawaguchi, 2013; Kawaguchi et al., 2014; Madden and Paul, 2011; Rosenberg et al., 2004; 丹後, 2001)。試験 2~4 では 2 種の異なった台木品種で試験を行ったため、2 事例(例、試験 2-1 および試験 2-2 など)として解析を行った。試験 3-2 では発病がまったく確

表 1 試験の詳細および栽培履歴

試験	年次		圃場				ナス品種	
	ブロッコリー	ナス	場所	面積 (m ²)	反復	接種法	穂木	台木
1	2009	2010	伊勢崎 A	12	3	微小菌核	千両二号	自根
2-1	2010	2011	伊勢崎 B	32	3	土壌フスマ	千両二号	自根
2-2							なし	トナシム
3-1	2011	2012	伊勢崎 C	32	2	微小菌核	千両二号	自根
3-2							なし	トナシム
4-1	2012	2013	伊勢崎 B	32	2	土壌フスマ	千両二号	自根
4-2							千両二号	台太郎
5	2012	2013	榛東	無処理 ブロッコリー 288 1584	1	自然発生	艶姿	トナシム
6	2012	2013	富岡	ナス連作 ブロッコリー 38 67	1	自然発生	千両二号	トナシム

認できなかったため、解析から除外した。5 圃場で 6 回、8 事例の検討を行った結果、試験 1、3-1、4-1、5、6 の 5 事例で無処理区と比較して有意な発病株割合の低下が確認された。8 事例の結果をメタアナリシスによって解析したところ、無処理区に対するブロッコリー輪作の相対的発病リスクは 0.53 (95%信頼区間 0.34-0.83) であった。このことから、ブロッコリー輪作を導入することで、なにも対処しない場合と比較してナス半身萎凋病は 53%にまで発病が少なくなることが明らかとなった。

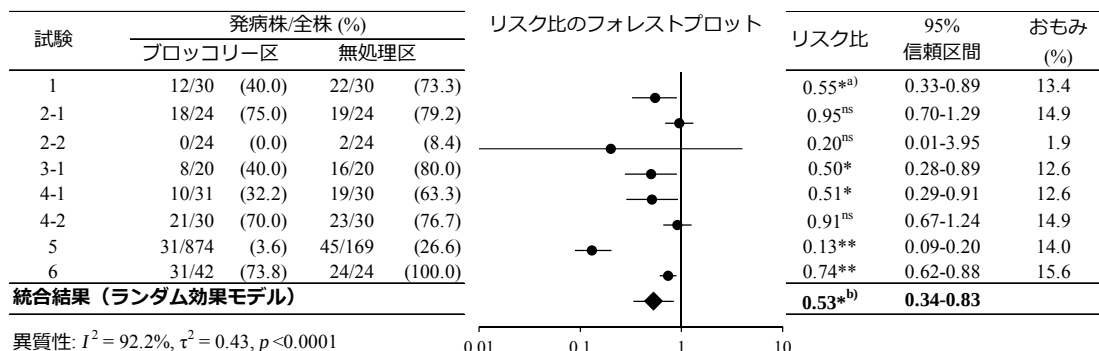


図1 ブロッコリーを前作した場合のナス半身萎凋病に対する抑制効果のメタアナリシスによる評価
 ●はそれぞれの相対的リスクを示す。◆は統合した相対的リスクを示す。エラーバーは95%信頼区間を示す。
 a) 個別の試験例の相対的リスクをFisherの正確確率検定によって解析した (ns: 有意差なし, $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$)
 b) メタアナリシスによる統合結果のアスタリスクは有意差があることを示す ($p < 0.05$)。

2. エビデンス(科学的根拠)に基づく普及戦略

近年、医療の分野にとどまらず、ビジネスや教育の分野においてエビデンスに基づき、経営方針や政策の決定を行うことが提案されている(西内, 2013; 中室, 2015)。農業の分野においても、エビデンスに基づいて技術の有効性を評価し、普及に役立てようとする動きが Evidence-based Control (通称 EBC) として、すでに始まっている(田代, 2005)。本研究においては、統計解析によってこの輪作体系の効果の科学的根拠を証明し、技術普及に活用することを試みた。

まず、8 事例の結果をメタアナリシスすることで、ブロッコリー輪作の無処理に対するナス半身萎凋病のリスク比は 0.53 になることが明らかとなった。さらに、メタアナリシスにおける感度分析、ロジスティック回帰分析によって、ナス半身萎凋病の抑制にどのような要因が関係しているのかを解析した(池田, 2015)。その結果、ナス半身萎凋病抑制を目的としてブロッコリー輪作を導入する場合、圃場の発病株割合の低い圃場(およそ 30%まで)や抵抗性台木を併用することでより高い発病抑制効果が得られることがわかった。このように、圃場データの統計解析によって得られたエビデンスに基づいて、技術普及を図った。その結果、生産現場での大きな失敗もなく、導入はすすんでいる。現在群馬県内で 33 件のナス生産者がブロッコリーとの輪作を取り入れており、今後も全県的な普及が見込まれる状況である。

3. ナス半身萎凋病菌のブロッコリーへの感染

全 6 回の試験すべてでナス半身萎凋病菌のブロッコリーへの感染を調査した。ブロッコリーの栽培時期が秋から冬にかかり、低温による外葉の老化などがみられたため、地上部の病徴による感染確認はできなかった。そこで、維管束組織の褐変によって発病を確認した(表 2)。その結果、すべての試験でブロッコリーの維管束は褐変しており、発病が確認された。発病株割合は試験毎に異なり、試験 3 では 37%であったのに対し、試験 2 では 94%であった。維管束褐変の進展を表した発病指数では、いずれの検討においても 1.0 を下回っていた。このことは、本病原菌によるブロッコリーの維管束褐変はほとんどの場合において根部のみに限定されることを表している。以上から、本病原菌はブロッコリーに感染し維管束を褐変させるものの、その褐変は花蕾部までには至らないと考えられる。

表2 ナス半身萎凋病汚染圃場におけるブロッコリーの発病株率および発病程度

試験	品種	発病指数				発病株率 (%)	発病程度
		0	1	2	3		
1	緑嶺	17	13	0	0	43	0.43
2	緑嶺	6	93	0	0	94	0.94
3	緑嶺	71	42	0	0	37	0.37
4	緑嶺	29	132	16	0	84	0.93
5	直緑93号	15	23	2	0	63	0.68
6	のぞみ424号	19	22	2	0	56	0.60

発病株率および発病程度はブロッコリーの茎および主根を垂直に切断し、維管束の褐変の進展を0～3の指数で分類した。

0: 褐変なし、1: 根のみに褐変、2: 収穫した花蕾の切り口以下の褐変、3: 収穫した花蕾に至る褐変

指数を平均した数値をブロッコリーの発病程度とした。

4. 土壌中におけるナス半身萎凋病菌の動態

土壌中の本病原菌の微小菌核の密度と発病には相関が認められる (Xiao and Subbarao, 1998)。しかし、*Verticillium* 属菌の土壌中の菌密度を正確に把握することは非常に困難である (Goud and Termorshuizen, 2003)。そこで、試験 1 での土壌中のナス半身萎凋病菌の動態を、quantitative nested real-time polymerase chain reaction (QNRT-PCR; Banno et al., 2011)。によって調査した。QNRT-PCR は土壌中の半身萎凋病菌の DNA のコピー数を Ct 値として定量する手法であり、Ct 値が高いほど本病原菌の密度が低く、Ct 値が低いほど菌密度が高いことを示している。本病原菌のブロッコリーとナスの輪作中における Ct 値の推移を図 2 に示す。ブロッコリー定植時はブロッコリー区と無処理区はほぼ同じ値であった。ブロッコリー栽培終了時では、ブロッコリー区の Ct 値は無処理区と比較して有意に上昇し、菌密度の低下が認められた。ブロッコリー栽培終了 2 週間後からナス栽培終了まで、ブロッコリー区では無処理区と比較して Ct 値は高い傾向を示した。これらのことから、ブロッコリーとの輪作体系においてナス半身萎凋病菌はブロッコリーの栽培中に減少することが示された。

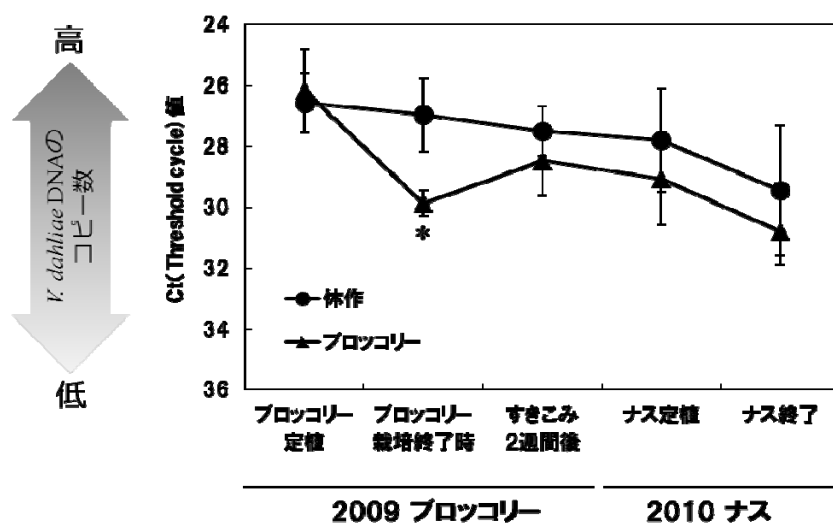


図2 ブロッコリーを前作した場合のナス半身萎凋病菌 *V. dahliae* の土壌中での動態 (試験1) *V. dahliae* の DNA コピー数は QNRT-PCR (Banno et al. 2011) によって Ct 値として検出された。土壌サンプルは完全無作為化された 3 反復の区画からそれぞれ採取した。エラーバーは 95% 信頼区間を示す。図中のアスタリスクはそれぞれの調査時期における Ct 値に有意差 (Student の t 検定、 $p < 0.05$) があることを示す。

5. 作用機作

ブロッコリーの残渣すきこみが半身萎凋病菌の微小菌核密度を減少させ、カリフラワーの *Verticillium wilt* を抑制する機構としては、以下の 3 つが示されている (Shetty et al., 2000)。

- 1) アリルイソチオシアネートなどのブロッコリー残渣から発生する揮発性の抗菌性物質
- 2) 拮抗微生物の増加
- 3) 土壌中の糸状菌が分泌するリグニナーゼによる微小菌核の分解

試験 1 では土壌中のナス半身萎凋病菌密度を示す QNRT-PCR の Ct 値は、ブロッコリーすきこみ 2 週間後には上昇はみられなかった。このことから、Shetty et al. (2000) が示唆したような、土壌微生物の影響による土壌中の本病原菌の減少は、本研究の試験 1 では起こらなかったと考えられる。一方で、Ct 値はブロッコリーの栽培中に大きく上昇した。

この結果は、本病原菌がブロッコリーに感染していることを示していると思われる。現に、ブロッコリーには維管束の褐変がすべての試験で確認されている。しかし、ブロッコリーの維管束の褐変は根部組織のみに止まっており、このことは過去の報告とも一致している (Bhat and Subbarao, 2001)。本病原菌の微小菌核は、植物体の根などの地下部の組織ではなく、葉などの地上部で主に形成されることが報告されている (Mol, 1995)。アブラナ科植物においては、半身萎凋病菌が感染した場合、全微小菌核のおよそ 81% が地上部で形成される。また、ナスでは罹病株を部位別 (葉、茎、根) に土壌に混和したところ、葉を混和した区のみで著しく発病することも報告されている (橋本, 1989)。これらのことから、発病葉などの地上部の罹病部位が、次作の発病につながる微小菌核の供給源となっていることが推察された。本研究で得られた結果から、ナス半身萎凋病菌はブロッコリーに感染したものの、地上部に進展できず、微小菌核の形成が著しく抑えられたことが考えられる (図 3)。このようにして次作に残存する微小菌核が減少し、ナス半身萎凋病の発病を抑制したのではないか。一方で、Shetty et al. (2000) が提唱しているブロッコリー残渣から発生する揮発性抗菌性物質や拮抗微生物、土壌微生物相の変化、糸状菌の産生するリグニナーゼの関与なども、今後の研究で明らかにしていく必要があるだろう。

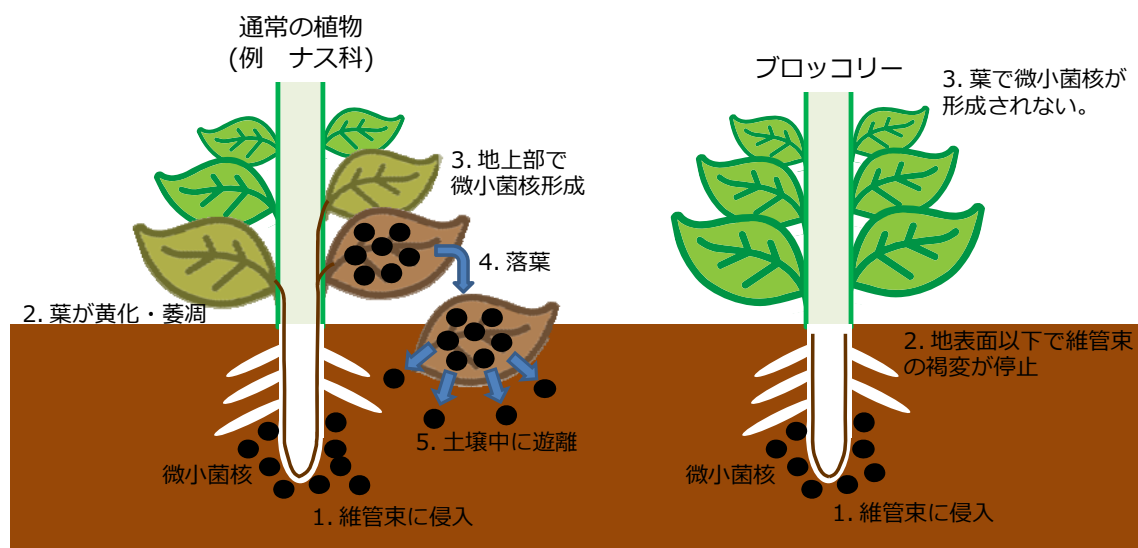


図3 ブロッコリーとの輪作における発病抑制・菌密度減少の作用機作

おわりに

本法を適用する際の主な注意点は以下のとおりである。

- 1) 本法では、圃場の汚染程度が高い場合、効果が劣ることが確認されている。発病株率がおよそ 30%までの圃場で適用する。
- 2) トナシムやトルバムビガーなどの半身萎凋病に抵抗性を持つ台木を併用する。
- 3) 半身萎凋病菌の微小菌核は黄化・萎凋した葉に形成される。そのため、微小菌核の密度を低く抑えるため、罹病株からの落葉は栽培期間を通して圃場外に持ち出して処理する。
- 4) 半身萎凋病が未発生な状態から予防的に導入してもよい。

これらの点に注意しながらナスとブロッコリーの輪作体系を導入することで、ナスの持続的な生産に役立てていただければ幸いである。

謝辞

多くのご助言をいただいた共同研究者である群馬県農業技術センター柴田聡氏、酒井宏氏、古澤安紀子氏、

東洋大学生命科学部坂野真平氏(現日本植物防疫協会)、藤村真氏、農研機構中央農業総合研究センター中保一浩氏には心より御礼申し上げます。また、本研究におけるデータ解析にあたり、多くの有益なアドバイスをいただいた日本植物病理学会 Evidence Based Control (EBC) 研究会(代表田代暢哉氏)の関係者に、厚く御礼申し上げます。本成果は、平成 20 年～24 年度文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業および平成 25～27 年度農林水産省農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業(25062C)によって得られたものである。

引用文献

- Banno S, Saito H, Sakai H, Urushibara T, Ikeda K, Kabe T, Kemmochi I, Fujimura M (2011) Quantitative nested real-time PCR detection of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* in the soil of cabbage fields. J Gen Plant Pathol 77: 282-291
- Bhat RG, Subbarao KV (2001) Reaction of broccoli to isolates of *Verticillium dahliae* from various hosts. Plant Dis 85: 141-146
- DerSimonian R, Kacker R (2007) Random-effects model for meta-analysis of clinical trials: an update. Contemp Clin Trials 28:105-114
- DerSimonian R, Laird N (1986) Meta-analysis in clinical trials. Control Clin Trials 7: 177-188
- Goud, JC, Termorshuizen AJ (2003) Quality of Methods to Quantify Microsclerotia of *Verticillium dahliae* in Soil. Eur J Plant Pathol 109(6):523-534
- 群馬県 (2013) 平成 25 年度 群馬の農業. 群馬県農政部農政課.
- 萩原広 (1990) 日本産バーティシリウム病菌 *Verticillium dahliae* の病原性の分化 (病原菌の病原性の分化<特集>). 植物防疫 44:299-303.
- 橋本光司 (1989) ナス半身萎ちょう病に関する研究. 埼玉園試特報 2:1-110.
- Horiuchi S, Hagiwara H, Takeuchi S (1990) Host specificity of isolates of *Verticillium dahliae* towards cruciferous and solanaceous hosts. In: Hornby D (ed) Biological control of soil - borne plant pathogens. CAB International, Wallingford, pp 285-298
- 池田健太郎 (2015) メタアナリシスで、もっと現場で使えるエビデンス. EBC 研究会誌 11:7-11.
- Ikeda K, Banno S, Furusawa A, Shibata S, Nakaho K, Fujimura M. (2014) Crop rotation with broccoli suppresses *Verticillium* wilt of eggplant. J Gen Plant Pathol 81:77-82.
- Kawaguchi A (2013) Biological control of crown gall on grapevine and root colonization by nonpathogenic *Rhizobium vitis* strain ARK-1. Microbes Environ 28: 306-311.
- Kawaguchi A, Inoue K, Inoue Y (2014) Biological control of bacterial spot on peach by nonpathogenic *Xanthomonas campestris* strains AZ98101 and AZ98106. J Gen Plant Pathol 80:158-163.
- Madden LV, Paul PA (2011) Meta-analysis for evidence synthesis in plant pathology: an overview. Phytopathology 101: 16-30
- McKeen CD, Mountain WB (1967) Soil fumigation for control of *Verticillium* wilt of eggplant. Can J Plant Sci 47: 1-10
- Mol L (1995) Formation of microsclerotia of *Verticillium dahliae* on various crops. Neth J Agr Sci 43: 205-215
- 西内啓 (2013) 統計学は最強の学問である. ダイヤモンド社, 東京.
- 中室牧子 (2015) 「学力」の経済学, ディスカバー・トゥエンティワン, 東京.
- Pegg GL, Brady BL (2002) *Verticillium* wilts. CABI Publishing, Wallingford
- Rosenberg MS, Garrett KA, Su Z, Bowden RL (2004) Meta-analysis in plant pathology: synthesizing research results. Phytopathology 94: 1013-1017
- Schnathorst WC (1981) Life cycle and epidemiology of *Verticillium*. In: Mece ME, Bell AA, Beckman CH (eds) Fungal wilt disease of plants, Academic Press, New York, pp 81-111
- Shetty KG, Subbarao KV, Huisman OC, Hubbard JC (2000) Mechanism of broccoli-mediated *Verticillium* wilt reduction in cauliflower. Phytopathology 90: 305-310

- Shiraishi T, Sakai H, Ikeda K, Urushibara T (2014) A useful method for preparing *Verticillium dahliae* microsclerotia as an inoculum. J Gen Plant Pathol 80:475-478.
- Subbarao KV, Hubbard JC, Koike ST (1999) Evaluation of broccoli residue incorporation into field soil for *Verticillium* wilt control in cauliflower. Plant Dis 83:124-129
- 丹後俊郎 (2001) メタ・アナリシス：エビデンスの統合をめざす(<特集>「EBM」). 行動計量学 28:56-67.
- 田代暢哉 (2005) EBC (Evidence-based Control)の必要性：今、病害防除研究者に求められていること. EBC 研究会誌 1:1-10.
- Xiao, CL, Subbarao KV (1998) Relationships Between *Verticillium dahliae* Inoculum Density and Wilt Incidence, Severity, and Growth of Cauliflower. Phytopathology 88:1108-1115
- 和田健夫, 矢ノ口幸夫, 清井敏博 (1982) 土壌消毒地帯における大気中のクロルピクリン濃度. 関東東山病虫研報 29:181-182.