

雨除け栽培で発生するトマトかいよう病の疫学的解析 による伝染源の解明

岡山県農林水産総合センター農業研究所 かわ川 ぐち口 あきら章

はじめに

トマトかいよう病は *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* によって起こる細菌病である。岡山県では、1972 年（昭和 47 年）に 6 月下旬定植の露地栽培トマトでかいよう病の初発生が確認され、一部産地では猛威を振るった。その後病害虫防除所などによる防除対策指導が行われ、雨除け（夏秋）栽培の普及後は大きな被害が見られなくなった。これは栽培様式が、風雨による病原細菌の伝搬を抑制したことによるものと考えられた。しかし 2004 年、県中部・北部の雨除け栽培トマト産地で本病の発生が問題になった。1998 年ごろから全国的にも本病の発生が顕在化しており（小松，2008）、ヨーロッパや中東諸国においてもやはり施設型栽培で本病が近年問題となっている（Ioannou et al., 2000 ; Kleitman et al., 2008）。本病は、一度発病すると病勢の進行を止めることは非常に困難である。

環境保全型農業の推進には発生病態の解明が極めて重要であり、伝染様式を明確にすることで初めて効率的な防除の実践が可能になる。そのため、病原細菌を DNA フィンガープリント法で個体識別し、現地での病原細菌の動態を追跡することによって一次伝染源の推定を試みた。さらに、発病した植物体の分布から圃場内での病原細菌の動態を推定するため、数学的手法による空間分布解析を行った。ここでは、伝染源の解明を中心に報告する。また、本稿の一部は既に報告した（谷名ら，2007；2008；川口ら，2008；2010 a；川口，2010；Kawaguchi et al., 2010）ので、詳細はこれらを参照されたい。

なお、本研究は農林水産省病害虫防除農業環境リスク低減技術確立事業（2006～08 年）で実施した。

I 岡山県での発生状況と仮説の設定

本県の雨除け栽培トマトにおける本病の発生は、主に中位葉に生じる葉脈間の脱水斑様の症状から始まる（図-1 A）。この症状は、5 月上～中旬定植の夏秋栽培の

作型では、早い場合は 6 月下旬から発生し、多くは梅雨明け後の 7 月中～下旬に認められる。しかしこの時期は、梅雨明けによる水分供給バランスの変化に伴って脱水斑様症状を形成する場合があるので、すべてがかいよう病によるものではない。脱水斑を生じた複葉はやがて黄化、萎凋し（図-1 B）、複葉基部の切断面には導管の褐変が認められる（図-1 C）。そして萎凋は複葉から全身へと移行し、最終的に株全体が萎凋、枯死する。こういった症状の圃場では、かいよう病の典型的な症状の一つである果実の鳥目症状は認められなかったが、これは施設型栽培であることから風雨の影響をほとんど受けないためと推察される。さらに聞き取り調査を行ったところ、毎年同じ生産者、同じ圃場で発生する例が多く、周辺生産者への拡大は問題となっていなかった。発生圃場の生産者は使用する苗の購入先や品種を変更し、資材の消毒、土壌表面を全面被覆する等の対策を講じたが、被害の低減にはつながらなかった。

以上の現地調査より、病原細菌は風雨による伝搬によって植物体表面に付着するのではなく、種子伝染や土壌伝染により植物体内に侵入後、増殖した病原細菌が導管の一部を詰まらせているという仮説を設定した。実際、病原細菌は萎凋した複葉の表面からは分離されないが複葉基部の褐変した導管（図-1 C）からは高率に分離されること、病原細菌が充満している導管が顕微鏡により観察されること（図-1 D）、病原細菌を塗布した単針を 8～9 葉期のトマトの複葉基部に有傷接種すると本症状が再現できることから、この仮説は真らしいと判断した。次に、特定の生産者にのみ毎年発生することから、「一次伝染源は圃場の外部から侵入するのではなく、各圃場に土着している」という仮説を設定した。

トマトかいよう病の一次伝染源として、植松ら（1977）は種子伝染が本病の伝播に果たす役割が大きいとし、Strider（1967）は土壌伝染の可能性を示唆している。脇本（1968）はトマトの栽培資材（支柱やハウス材料等）に付着越冬している乾燥形態の菌も見落としてはならないとしている。前述のとおり、現地の生産者は資材の消毒を行っているが防除効果につながっておらず、筆者らも資材からの病原細菌の分離を試みたが、いまだ成功していない（未発表）。そこで、病原細菌の資材における

Epidemiological Study of Tomato Bacterial Canker in Greenhouse. By Akira KAWAGUCHI

（キーワード：トマトかいよう病，rep-PCR，I₀指数）

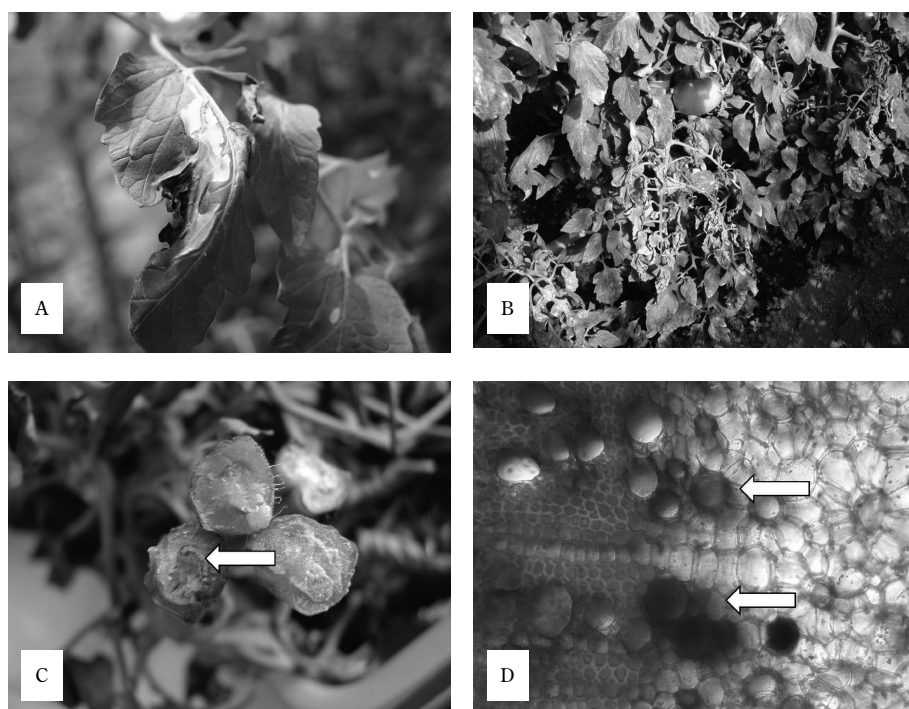


図-1 岡山県で発生している雨除け栽培におけるトマトかいよう病の症状

A: 小葉に形成された脱水斑 (壊死斑), B: 複葉の萎凋症状, C: 萎凋症状を呈した複葉の葉柄基部の切り口の褐変 (矢印), D: 複葉基部の導管に充満している病原細菌 (矢印).

越冬の可能性は低いとしていったん保留し、一次伝染源の候補を種子伝染と土壌伝染に絞った。

II 病原細菌の分子タイピングによる一次伝染源の解明

1 rep-PCR DNA フィンガープリント解析

ある病害が種子伝染するか土壌伝染するかについて、実験室レベルで介入試験を行うことは容易だが、生産者の圃場で実際にどちらが (または両方が) 起きていることを証明することは容易でない。筆者らは実験アプローチの一つとして、病原細菌本体を調査対象とした分子タイピングを行った。ここでの分子タイピングとは主に遺伝子の塩基配列の相同性に基づく個体または個体群の識別、グループ分けを指し、DNA フィンガープリント (指紋) 解析とも呼ばれる。いくつかの手法があるが、ここでは rep-PCR DNA フィンガープリント解析を選択した。多くの細菌染色体上には保存性の高い反復配列 (REP, ERIC, BOX 等。染色体上の位置は菌種、菌株によって異なる) が散在しており、反復配列から外向きのユニバーサルプライマーを用いて PCR を行うことで得られる複数のバンドパターンを菌株レベルで比較し、

識別を行うのが rep-PCR である。トマトかいよう病菌では、Louws et al. (1998) や Kleitman et al. (2008) が rep-PCR により系統解析を行った事例がある。

県内各地で発生しているトマトかいよう病が、共通の伝染源によるものかどうかについて検討するために、2005～08年に県中部・北部の8地域、20圃場の雨除け夏秋トマトから分離したトマトかいよう病菌180菌株の rep-PCR を行った。細菌を標的とした rep-PCR には REP-PCR, ERIC-PCR および BOX-PCR があるが、ここでは BOX-AIR プライマー (Martin et al., 1992) を用いた BOX-PCR と、ERIC1R/ERIC2 プライマー (Hulton et al., 1991) を用いた ERIC-PCR を行った。rep-PCR で得られた DNA パターンの結果を基に菌株間の類似度を計算し (UPGMA 法), データ置換を 2,000 回繰り返して分子系統樹を作成した。その結果, DNA フィンガープリントパターンは四つに分かれ, ハプロタイプ A～D として類別できた (図-2, 代表的な菌株のみ記載)。また, すべての供試菌株は, 年次が異なってもそれぞれの圃場および地域ごとにフィンガープリントパターンが一致した (図-3, ハプロタイプ A は 2 地域 8 圃場, B は 1 地域 2 圃場, C は 2 地域 2 圃場, D は 3

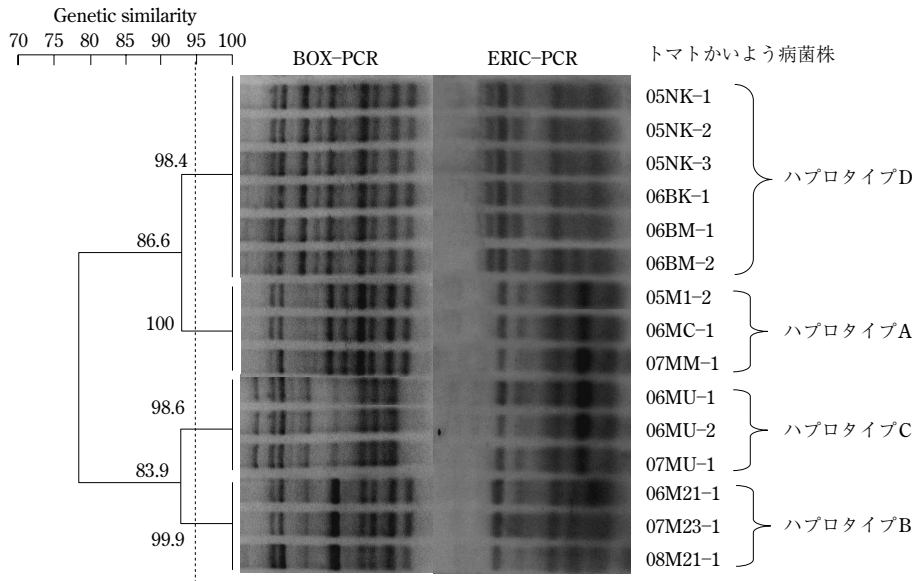


図-2 トマトかいよう病菌の rep-PCR DNA フィンガープリント解析に基づく分子系統樹 (UPGMA 法)

各枝の数字はブーストラップ確率 (2,000 回反復) を示す。

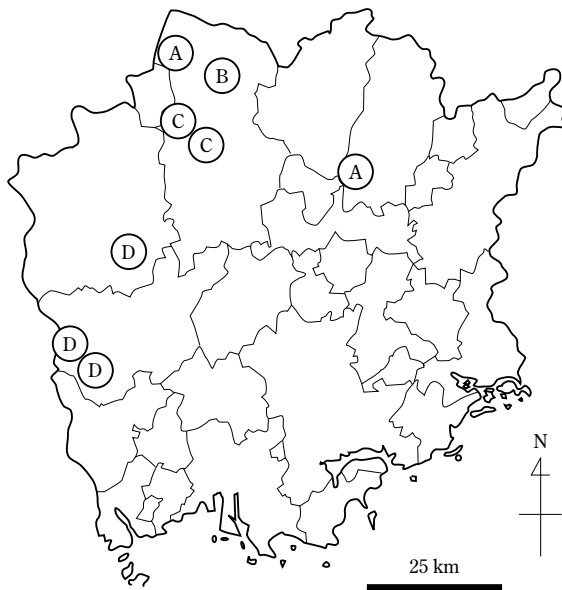


図-3 岡山県における病原細菌の分離地域とハプロタイプ (A ~ D) (2005 ~ 08 年調査)

地域 6 圃場で一致)。

2 仮説の検証

この結果を受けて種子伝染の可能性について考察する。これらの圃場はほとんど同じ品種「桃太郎 8」を栽培

している。種子は毎年仕入れ業者が種苗会社から一括で仕入れ、それを各地域の支店に配布し、各支店は種子または苗の形で販売している。調査圃場の生産者は毎年各支店から購入していることから、基本的に毎年同じ販売元の種子を使っている。各地で発生している本病が種子伝染であるとした場合、その病原細菌のフィンガープリントパターンが分離された地域によって分かれるとは考えにくい。さらに、2005 ~ 08 年の間に種子および苗の購入先や、または品種を変更した生産者についても、発病株から分離された病原細菌のフィンガープリントパターンは 05 ~ 08 年の間変化しなかった。これらのことから、一次伝染源として、圃場の外部から侵入する経路をとる種子 (苗) 伝染の可能性は低く、伝染源が各圃場に土着する土壌伝染の可能性が高いと判断した (仮説は棄却されなかった)。

土壌伝染の可能性についてさらに検討した。前年度発生を認めた圃場において、翌年の定植直前の時期に土壌中にあったトマト残渣から、谷名ら (2007; 2008) が開発したイムノストリップを利用したトマトかいよう病菌分離法 (IS 分離法) により病原細菌の分離に成功している (谷名ら, 2007)。また、発病株を自然乾燥させたものを鋤き込んだ土壌に植えたトマトで本病徴が再現され、その後鋤き込んだ残渣とトマトから病原細菌が分離された (未発表)。トマトかいよう病菌は裸の状態

は土壤中で長く生存できない (GROGAN et al., 1953) との報告を考慮すると、これらのことから、土壤中に残存した前年の植物残渣が土壤伝染の要因の一つと結論付けた。

III 発病株の空間分布解析による二次伝染の解明

これまでの結果から、一次伝染は土壤中に残存した植物の被害残渣による土壤伝染であると判断した。次に、土壤伝染によって発生した発病株から、病原細菌が健全株に移動して新たな発病株を形成させる二次伝染の要因について検討した。本病における圃場での二次伝染には水媒伝染と接触伝染がある (GITAITIS, 1991) が、水媒伝染については II 章で述べたとおり、岡山県では病原細菌の伝搬を抑制できる雨除け栽培方式 (株元灌水) をとっており、可能性として除外した。接触伝染は主に生産者の管理作業 (誘引、腋芽除去 (芽かき)、収穫等) により、潜在感染株や発病株に接触したハサミまたは手で健全株に病原細菌を伝染させることを指す。現地の圃場ではトマトの列に沿って枯死した株が連続している光景を見るが (向, 1962), 列に沿って連続して存在する発病株が本当に接触伝染だけによるものだろうか。GITAITIS et al. (1978) は、土壤伝染性のトウモロコシ褐条病 (*Acidovorax avenae* subsp. *avenae*) がトラクターの耕耘の方向に伝染し、発病株がトウモロコシの列に沿って集中分布することを報告しており、トマトかいよう病でも同様の可能性が考えられる。しかし実際に、現地の自然発病圃場で土壤伝染と接触伝染のどちらがより本病の多発生に寄与しているのかを科学的に証明した事例はない。そこで、「本病の発生拡大には、土壤伝染よりも接触伝染の影響が強い」という仮説を設定し、空間分布解析による圃場での発病株の分布様式を解析した。

1 I_0 指数を用いた発病株の空間分布解析

生物個体群の空間分布様式の解析にはいくつかの方法があり、生態学の分野で広く用いられている。昆虫の分布様式の解析は応用動物昆虫学でも盛んである。しかし、植物病理学の分野ではあまり例がない。近年よく用いられる解析方法には、TAYLOR's power law (TAYLOR, 1961), I_0 指数 (MORISITA, 1959; 1962), m^*-m 回帰 (IWA0, 1968) があるが、ここでは I_0 指数を選択した。 I_0 指数は海外では主に考案者の森下正明博士の名前に由来した 'MORISITA-index' としてよく用いられている。最近では大崎ら (2009) が I_0 を用いたコムギ赤かび病の発病穂の分布解析を報告している。 I_0 は以下の数式で算出される。

$$I_0 = n \{ [(\sum x_i^2) - \sum x_i] / [(\sum x_i)^2 - \sum x_i] \}$$

n : コドラート (調査区) 数, $\sum x_i$: ある調査時の総発病個体数, x_i : i 番目の調査区の発病個体数を示す。

$I_0 < 1$ のときは一様分布, $I_0 = 1$ のときはランダム分布, $I_0 > 1$ のときは集中分布を示す。また, I_0 指数が 1 より有意に離れた値であることを以下の式により F 検定で判定した。

$$F_0 = [I_0 (\sum x_i - 1) + n - \sum x_i] / (n - 1)$$

2 小規模レベルの介入試験による検証

まず小規模レベルの介入試験により接触伝染のみを再現し、その分布様式を I_0 で解析した。2006 年、本病の発生履歴がない施設内圃場 (6 m × 42 m) でトマトを栽培し (1 畝 2 列定植, 2 畝栽培), ある株に病原細菌を接種して潜在感染株とし、芽かき作業 (ハサミまたは手) を行って発病株の拡がりを調査した。生産者は、芽かき、収穫、誘引等の管理作業を畝間の通路に沿った動線で行うため、トマトの列に沿って発病株が拡がるのが予想される。トマト 1 列を含む場合 (図-4 a) と、トマト 2 列 (1 畝) を含む場合 (図-4 b) でコドラートを分けて設定し、解析した。発病株からは病原細菌を再分離し、接種に用いた菌株と同じ菌株であることを, rep-PCR で確認しており、確かに潜在感染株から接触伝染したことを認めた。解析の結果, トマト 1 列にコドラートを設定した場合は $I_0 = 1.905$ を示し (5% 有意) 集中分布となった。トマト 2 列 (1 畝) にコドラートを設定した場合は $I_0 = 1.295$ で $I_0 > 1$ となったが有意差が認められず、ランダム分布の可能性を棄却できなかったため、ここではランダム分布と判定した。以上のモデル試験より、管理作業の方向 (トマト 1 列) に沿ってコドラートを設定することで、接触伝染による発病株の拡大を数値化することができると考えられた。

その翌年、同じ圃場で耕耘を行わずにトマトを定植し、管理作業を一切することなく栽培した場合、両コドラート設定 (図-4 a, b) ともランダム分布となった。以上より、管理作業による接触伝染がなく、かつトラクターなどの耕耘による土壌の影響がない場合は、本病の発病株は集中分布しない可能性が示唆された。

3 現地圃場で発生拡大に寄与する伝染様式の解明

次に、2005 ~ 08 年にかけて現地で自然発病している圃場で発病株の分布を解析した。現地では、1 畝 2 列定植のほかに、1 畝 1 列定植し、左右交互に誘引することで見かけ上 2 列として栽培する圃場があった (図-4 c, d)。管理作業による接触伝染が伝染要因として強い場合、交互に誘引した見かけ上の片側の列に集中分布すると考えられる。しかし、土壌伝染が要因として強い場合、耕耘の方向を考慮しても、見かけ上の片側の列単位に集中分布するとは合理的に考えにくい (列に関係なく畝単位で集中分布する可能性はある)。それはつまり、

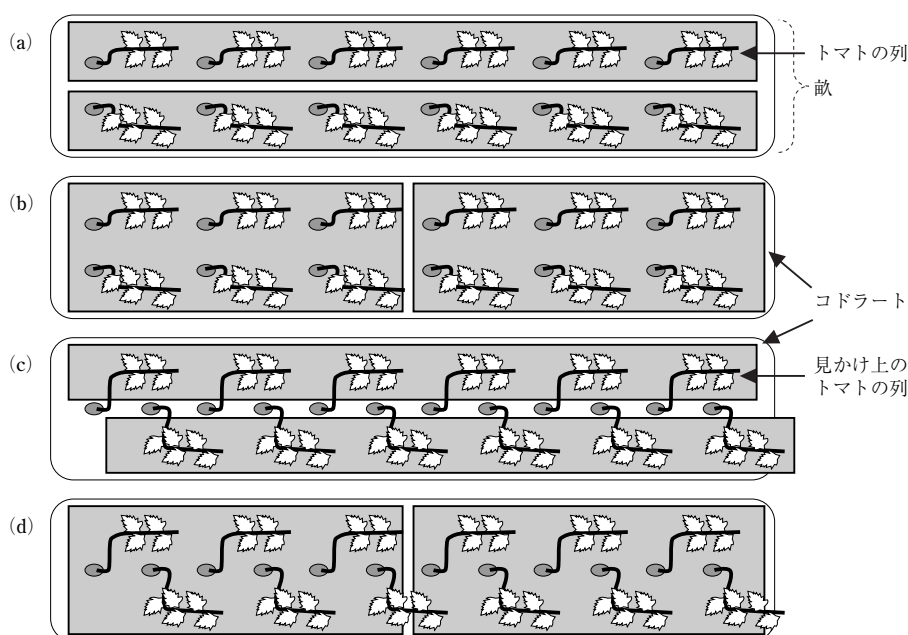


図-4 トマトの作付け様式とコードラート（調査区）設定

(c) と (d) は1畝に1列定植しているが、左右交互に誘引していることから、見かけ上2列である。

表-1 I_0 指数に基づく現地雨除け栽培圃場におけるトマトかいよう病発病株の分布様式

場所-栽培様式 ^{a)}	調査年	畝の数	列の数	総調査株数	発病株率 (%)	コードラートを列に設定				コードラートを畝に設定			
						コードラート内の株数	コードラート数	I_0 指数 ^{b)}	分布様式	コードラート内の株数	コードラート数	I_0 指数 ^{b)}	分布様式
真庭市-A	2005	3	6	360	13.1	6	60	1.554 *	集中分布	6	60	1.166 ^{ns}	ランダム分布
真庭市-B	2006	6	12	1,344	13.9	7	192	3.675 **	集中分布	6 or 8	191	3.142 **	集中分布
真庭市-B	2008	3	6	336	17.3	8	42	1.372 *	集中分布	8	42	1.169 ^{ns}	ランダム分布
真庭市-B	2008	3	6	360	8.1	6	60	1.943 **	集中分布	6	60	1.332 ^{ns}	ランダム分布
高梁市-A	2008	3	6	480	5.0	8	80	1.957 *	集中分布	8	80	1.739 ^{ns}	ランダム分布
高梁市-A	2008	3	6	480	7.1	8	80	3.957 **	集中分布	8	80	1.818 *	集中分布

^{a)} A:1畝2列定植 (図-4 a, bを参照), B:1畝1列定植 (左右交互に誘引し, 見かけ上2列. 図-4 c, dを参照). ^{b)} I_0 指数が1より有意に離れた値であるかについて F 検定で評価した (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ^{ns} 有意差なし). $I_0 > 1$ でかつ有意差ありの場合は集中分布, 有意差なしの場合はランダム分布として判定した。

見かけ上は列に沿って発病株が連続するものの, 同一線上に定植されている株が一つおきに発病するという考えにくい発病状態を意味するからである。1畝2列定植の圃場 (表-1, 真庭市-A, 高梁市-A), 1畝1列定植の交互誘引 (表-1, 真庭市-B) のそれぞれの圃場で, コドラートを列 (見かけ上の列を含む) 単位と畝単位に分けて設定し, 発病株数を調査した。その結果, すべての圃場で列単位では集中分布していたのに対し, 畝単位で

はランダム分布, または集中分布でも I_0 の値が列単位より小さかった (表-1)。なお, すべての調査圃場で, 生産者はハサミまたは手による管理作業を行っているが, ハサミを消毒するなどの対策はしていなかった。以上のことから, 調査した現地圃場では, 本病の発生拡大には土壌伝染よりも接触伝染の影響が強いと考えられた (仮説は棄却されなかった)。

Ⅳ 得られた科学的根拠に基づく、 伝染様式の推定

空間分布解析の結果、雨除け栽培のトマト圃場における発病株の増加には、土壤伝染（一次伝染）よりも管理作業による接触伝染（二次伝染）の影響のほうが強い（寄与度が高い）ことが裏付けられた。これまでの結果をまとめると、土壤伝染が一次伝染として、圃場で潜在感染株の形成や発病株の初発生に寄与すると考えられる。雨除け夏秋トマト産地では5月上旬に苗を定植し、本病の初発生が6月末である。土壤伝染を再現した接種試験において、本病は接種から病徴が現れるまで1か月以上かかることを確認している。つまり、現地の定植から初発生までの間、生産者が潜在感染株に気づかず管理作業で接触伝染を繰り返していると考えられる。その後は接触伝染が二次伝染としての機能をいかに発揮し、人間が病原細菌を健全株に接種していくことで発病株が増加し、被害が拡大する（多発生に寄与する）と推定される。

おわりに

これらの結果を受けて、一次伝染のリスクを減らすための方法として、土壤消毒を行うことが考えられる。小松（2008）は太陽熱や還元土壌消毒の効果を検討しており、筆者らも化学農薬による土壌消毒の効果を確認している（川口ら，2010 b）。また、本病の多発を防ぐ方法として、管理作業でのハサミ、作業手袋の消毒を行うことが考えられる。漆原（2009）はハサミの消毒による効果を報告しており、筆者らも作業手袋を消毒することによる二次伝染防止効果をj確認している（川口ら，2010 b）。

本報告では、分子タイピングにより特有の遺伝子情報を利用して病原微生物を個体識別し、伝染経路を追跡する手法を取り入れた分子疫学的手法と、伝統的な個体群動態解析法である I_0 指数を組合せることにより、岡山県での本病の伝染様式に科学的根拠を裏付けすることができた。ただし、本病の一次伝染には土壤伝染だけでな

く種子伝染もあり、本病が発生する圃場が毎年変わったr、DNAフィンガープリント解析による個体識別が本報告と異なる結果になったりする場合には、種子伝染を疑うべきである。

清沢（1985）は「植物疫学」を「種々の植物流行病の流行あるいは激発の実態を研究し、その原因を探り、それを防ぐための方策を研究する科学」であると定義した。植物疫学の研究を行うために最初にすべきことは、現地での観察や聞き取りのデータに基づいて適切な仮説を設定することである。そして、データ解析時にノイズとなる偶然、バイアス、交絡要因の影響を相当の信頼性をもって否定できるような試験を設計することが極めて重要である。筆者は、伝染源を特定し、その伝染環を遮断するように防除対策を行うことで、効率的な防除が初めて可能となると考えており、植物疫学はその中心に位置する学問だと考える。

引用文献

- 1) GITHAITIS, R. D. et al. (1978): *Phytopathology* **68**: 227 ~ 231.
- 2) ——— (1991): *Compendium of Tomato Diseases*, APS Press, Minnesota, USA, p. 25 ~ 26.
- 3) GROGAN, R. G. et al. (1953): *Phytopathology* **43**: 473 (abstract).
- 4) HULTON, C. S. et al. (1991): *Mol. Microbiol.* **5**: 825 ~ 834.
- 5) IWAO, S. (1968): *Res. Population Ecol.* **10**: 1 ~ 20.
- 6) IOANNOU, N. et al. (2000): *J. Phytopathol.* **148**: 383 ~ 386.
- 7) KAWAGUCHI, A. et al. (2010): *Plant Pathol.* **59**: 76 ~ 83.
- 8) 川口 章ら (2008): *日植病報* **74**: 76 (講要).
- 9) ———ら (2010 a): 同上 **76**: 68 (講要).
- 10) ———ら (2010 b): *岡山農研研報* **1**: (印刷中).
- 11) ——— (2010): *EBC 研究会誌* **7**: 1 ~ 10.
- 12) 清沢茂久編 (1985): *植物疫学*, 博友社, 東京.
- 13) KLEITMAN, F. et al. (2008): *Euro. J. Plant Pathol.* **121**: 463 ~ 475.
- 14) 小松 勉 (2008): *植物防疫* **62**: 209 ~ 212.
- 15) LOUWS, F. J. et al. (1998): *Phytopathology* **88**: 862 ~ 868.
- 16) MARTIN, B. et al. (1992): *Nucleic Acids Res.* **20**: 3479 ~ 3483.
- 17) MORISITA, M. (1959): *Memoirs of the Faculty of Sciences, Kyushu Univ. Series E (Biology)* **2**: 215 ~ 234.
- 18) ——— (1962): *Res. Population Ecol.* **4**: 1 ~ 7.
- 19) 向 秀夫 (1962): *植物防疫* **16**: 453 ~ 456.
- 20) 大崎美由紀ら (2009): *日植病報* **75**: 307 ~ 313.
- 21) STRIDER, D. L. (1967): *Phytopathology* **57**: 1067 ~ 1071.
- 22) TAYLOR, L. R. (1961): *Nature* **189**: 732 ~ 735.
- 23) 谷名光治ら (2007): *日植病報* **73**: 268 (講要).
- 24) ———ら (2008): 同上 **74**: 76 ~ 77 (講要).
- 25) 植松 勉ら (1977): *日植病報* **43**: 412 ~ 418.
- 26) 漆原寿彦 (2009): *植物防疫* **63**: 315 ~ 319.
- 27) 脇本 哲 (1968): 同上 **22**: 155 ~ 158.