

アスパラガスの連作障害回避のための 改植マニュアル（第1版）



 **農研機構**  **野菜茶業研究所**

※農研機構は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構のコミュニケーションネームです。

農林水産省

農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業（実用技術開発ステージ 23025）

「根部エンドファイト活用によるアスパラガス連作障害回避技術体系の開発」

（2011年～2013年）

成果集

はじめに

アスパラガスは多年生作物で、栽培開始後一定の年次が経過すると、株の老化に伴って収量が減少し若茎品質が低下します。そこで株の更新が必要となる訳ですが、その際に、アスパラガスを栽培していた畑に新しい苗を定植する（「改植」と呼ばれる）と、アスパラガスが栽培されていなかった畑に定植した場合（「新植」と呼ばれる）に比べて、株の生育・収量が劣ることが多くなります。改植圃場では、最初は生育が良くても、新植圃場に比べ早い年次に収量や若茎品質の低下が始まると言われています。

この改植による収量低下を防ぐための技術はいくつか開発されてきましたが、効果にばらつきがあり、生産者の改植への不安は払しょくされていません。

新植できる適地があれば、新植するに越したことはありません。しかし、現在の圃場が土壌条件や水源などの条件や利便性の良いところに設置されている場合、ハウス等移設の経費を考えれば、栽培圃場を変えることはそう簡単なことではないため、現状では、連作障害の不安を抱えながら株の更新を引き延ばし、いよいよとなれば、やはりそれまでアスパラガスを栽培していた圃場に改植することも多いのが実情です。

これらの問題を解決するために、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業（実用技術開発ステージ）「根部エンドファイト活用によるアスパラガス連作障害回避技術体系の開発（平成23～25年度）」において研究開発を行ってきました。その結果、改植する圃場の状態を知るための診断技術や品種の耐病性診断法、アスパラガスの根に共生する菌（エンドファイト）の活用や湛水太陽熱処理技術を開発しました。本マニュアルにおいては、今回新たに開発されたこれらの技術について紹介します。

平成26年5月

研究総括

農研機構野菜茶業研究所

浦上敦子

目次

1. アスパラガスの連作障害概論と改植時フローチャート	3
2. 原因診断Ⅰ（DGGE法によるフザリウム属菌の判定）	5
3. 原因診断Ⅱ（ウイルスの判定）	9
4. フザリウム属菌に対するアスパラガス品種の反応	12
5. エンドファイト概論	15
6. エンドファイト定着苗の利用	18
7. エンドファイト定着苗の実証事例	22
8. 湛水太陽熱処理の利用	25

執筆者

1. アスパラガスの連作障害概論と改植時フローチャート
浦上敦子 農研機構野菜茶業研究所野菜生産技術研究領域
2. 原因診断Ⅰ（DGGE法によるフザリウム属菌の判定）
浦嶋泰文* 農研機構中央農業総合研究センター土壌肥料研究領域
（*現：農林水産省技術会議事務局）
3. 原因診断Ⅱ（ウイルスの判定）
志村華子 北海道大学大学院農学研究院園芸学研究室
4. フザリウム属菌に対するアスパラガス品種の反応
大竹祐一 福島県農業総合センター作物園芸部
大野正博 福島県農業総合センター作物園芸部
5. エンドファイト概論
成澤才彦 茨城大学農学部資源生物科学科
6. エンドファイト定着苗の利用
菊地聖永 パイオニアエコサイエンス株式会社
松永邦則 パイオニアエコサイエンス株式会社
7. エンドファイト定着苗の実証事例
鈴木美枝 福島県農業総合センター会津地域研究所
8. 湛水太陽熱処理の利用
田川 愛 佐賀県農業試験研究センター野菜花き部
中島寿亀 佐賀県農業試験研究センター野菜花き部
柳井洋介 農研機構野菜茶業研究所野菜生産技術研究領域

1.アスパラガスの連作障害概論と改植時フローチャート

(1) アスパラガスの連作障害について (概論)

1) 症状

典型的な症状は、株ごとの立茎数や茎径の減少です。茎径が小さくなるということは、草丈が低くなるということでもあります。また、欠株数も増加します。改植後、活着することなく枯死してしまう株があったり、春に萌芽がみられなくなったりします。茎葉の色が淡くなることもあります。これらの症状は、アスパラガスの草勢が弱った時に一般的に見られるものです。病害が起きている場合には、病害が進行すると特徴的な症状（地下茎や鱗芽の腐敗）が現れます。

2) 原因として考えられてきたこと

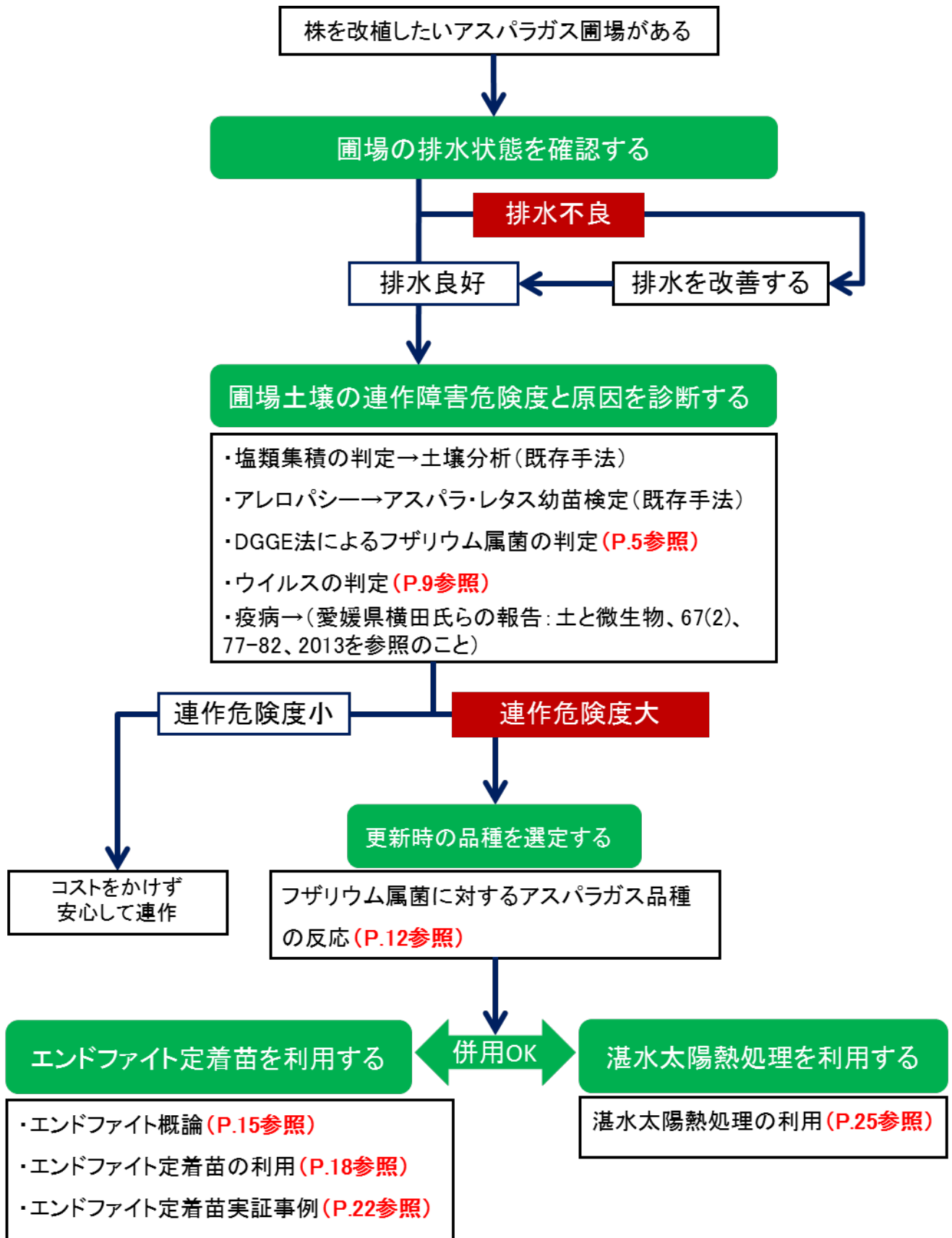
まず、原因として挙げられるのはフザリウム属の病原菌による病害（立枯病や株腐病）です。次にアスパラガスの植物体に含まれるアレロパシー物質による自家中毒作用および排水不良（土壌の物理性）などです。このほかに、塩類の集積やウイルスなども原因だと考えられています。また、近年は疫病も連作時に起きると報告されています。

これらの原因は、単独でというより、複数の原因が重なって連作時に障害を引き起こしていることが多いと考えられます。たとえば、「アレロパシー物質による自家中毒作用で弱った苗に、フザリウム病害が発生して悪化した」とか、「排水不良圃場で降雨後滞水したところに、疫病菌が蔓延した」などの例が挙げられます。原因の組み合わせは様々ですので、自分の畑では何が原因となりうるのか見極めることが必要です。

3) 対策技術としてこれまで行われてきたこと

フザリウム属菌や疫病菌に対しては、土壌消毒です。アレロパシー物質による自家中毒作用に対しては、アレロパシー物質の土壌中の濃度が低いと考えられる更新前の畝の間に新たな株を定植する方法、また、アレロパシー物質の存在する古い株の地下部の除去やいろいろな物質を吸着する性質を持つ活性炭剤への定植苗の浸漬処理や株もとへの灌注などがあります。さらに排水不良に対しては、心土破碎や明渠・暗渠の設置などが挙げられます。原因を踏まえた、対策技術の選択が重要です。

(2) 改植時フローチャート



2. 原因診断 I (DGGE によるフザリウム属菌の判定)

(1) 技術の概要 (対象病害)

アスパラガス連作障害の原因となる土壌病害としては、立枯病 (*Fusarium oxysporum* f. *sp.asparagi*) や株腐病 (*Fusarium proliferatum*) などが問題となっています。

1) 立枯病の症状

株に発生し、立枯れを引き起こすもので、地下茎や根の維管束が褐変し、さらに根冠部の維管束も褐変します。枯死株の株元にピンク色のカビを生ずることもあります。また、このほかに、収穫前の若莖に発病し、曲がりなどを生じることがあります。

2) 株腐病の症状

立枯病と症状がよく似ており、見ただけで両者を区別することは困難です。りん芽部に著しい褐変が認められます。ただし、発生初期には根部や茎部維管束の褐変は認められません。



写真 2-1 立枯病の症状

左：立ち枯れ症状
中：地際部のカビ
右：若莖の曲がり

写真 2-2 株腐病の症状

左：鱗芽群と貯蔵根の腐敗
右：鱗芽の褐変

土壌微生物性 (フザリウムの群集構造) を調べることで、土壌病害に起因する連作障害が起きる圃場かどうか 3 日程度で診断できます。

DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis : 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) 法とは、同じ長さの DNA 断片でも塩基配列の違いで分離することが可能となる電気泳動法です。DGGE 法による微生物性診断は農研機構中央農業総合研究センター土壌肥料研究領域 (連絡先 : 029-838-8828) までお問い合わせ下さい。

(2) DGGE 法による診断の準備

土壌の採取

- 1) 診断したい圃場の 5 力所以上から土壌を採取します。地表から 15cm 程度、土壌を取り除き、さらに、そこから深さ 10cm 程度の土壌を採取します (主にアスパラガスの根が存在するところから採取します)。
- 2) 採取した土壌は 2mm 目合いの篩を通し、速やかに秤量します (速やかにできない場合は冷暗所で数日保管します)。

3) DNA 抽出用の容器に計りとり、冷凍保存（家庭用の冷蔵庫の冷凍庫で可）します。

(3) 必要資材

1) DNA 抽出試薬

今回は、FastDNASpinKit for Soil (Q-BioGene 社) を利用しましたが、土壌から DNA が採取できるものであれば、その他の試薬でも利用可能です。ただし、日本に多く存在する黒ボク土は DNA を吸着するために、スキムミルク（組織培養用）を添加する必要があります。装置として、破碎装置 (Q-BioGene 社 FP シリーズ、和研薬 Bead Smash など) や微量高速遠心機が必要です。

2) PCR 装置と PCR 試薬

一般的な PCR 装置が使用可能です。

試薬として KOD -Plus- (東洋紡社) を使用しましたが、その他の PCR 試薬も利用可能です。

3) DGGE ゲル作成用試薬

40%アクリルアミドノビス 37.5:1 溶液（劇物ですので手袋着用）、ホルムアミド (deionized)、尿素、過硫酸アンモニウム、TEMED など。

4) DGGE 電気泳動装置

DCode システム (バイオラッド社)、パワーサプライなど。

5) ゲル撮影装置

16cm の大きさのゲルが撮影可能なものが必要です。

(4) 方法

DGGE 法の詳細な手法は農業環境技術研究所のホームページからダウンロード (<http://www.niaes.affrc.go.jp/techdoc/manual.html>) できる「PCR-DGGE による土壌細菌・糸状菌相解析法」または「土と微生物」62(1) P63-68、2008 年を参照してください。

1) 上記、資料を参考に土壌から DNA を抽出して下さい。前述のように黒ボク土には DNA が吸着しやすいために、スキムミルクの添加が必須です。

2) ペプチド鎖伸長因子 EF-1 α を標的としたプライマーセットを用いて、nested PCR を行います。

① 1st PCR では Forward primer として EF1 および Reverse primer として EF2 を用います。2nd PCR では Forward primer として Alfie1 および Reverse primer として Alfie2-GC を用います。

② PCR 条件は、1st PCR は、94°C-5 分→ [94°C-1 分、60°C-1 分、72°C-1 分] ×30 サイクル→72°C-10 分です。2nd PCR は、94°C-5 分→ [94°C-1 分、67°C-1 分、72°C-1 分] ×35 サイクル→72°C-10 分です。

3) DGGE ゲルの変性剤濃度は 40%→60%とし、泳動条件は 60℃、50V で 18 時間、電気泳動します。電気泳動終了後にゲルを SYBR® Green I（核酸と結合する性質上、変異原性の可能性があるものとして取り扱うこと。また、DMSO により組織中に色素が浸透する恐れもあるので、使用に際しては必ず手袋を着用すること）で染色します。

本手法を用いると、*Fusarium* のなかでアスパラガスに病原性を有するものとそうでないものに分けて解析することができます。

染色したゲルを撮影装置で撮影し、画像解析を行います。用いたマーカース間に検出されるバンド濃度の合計値で *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* のバンド濃度を割り、*Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* のバンド割合を算出することで、圃場の連作障害危険度を判定できます。

表 2-1 使用プライマーの配列図

プライマー	配列
EF-1	5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3'
EF-2	5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3'
Alfie1	5'-TCGTCATCGGCCACGTCGACTC-3'
Alfie2-GC	5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGGCGGGGGCAGCGGGGGCCTTACCGAGCTCRGCGGCTT-3'

(5) 解析例

長崎県のアスパラガス農家圃場を解析した結果、生育不良圃場で *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* のバンド割合が高い傾向にありました。さらに長崎県農林技術開発センター内の圃場解析により土壌が異なっても本方法は適用可能であることが明らかとなりました。

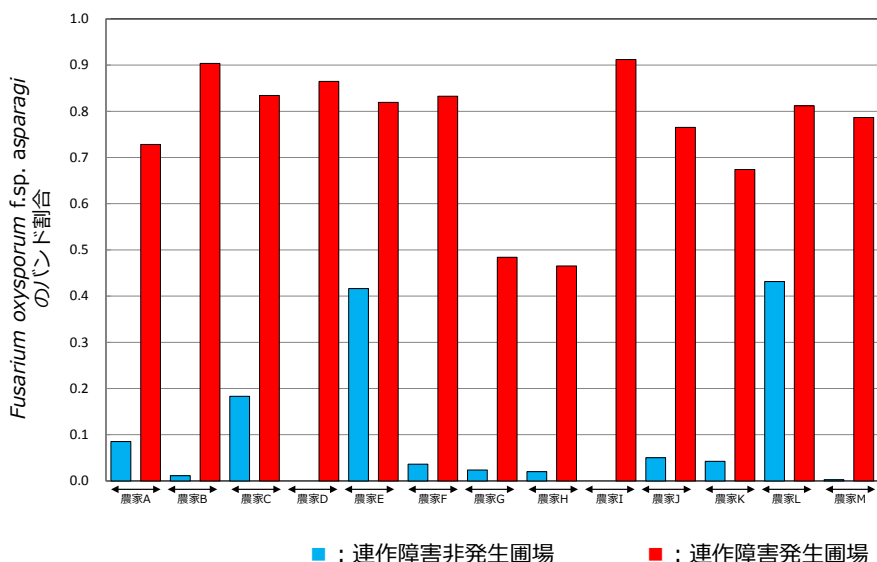


図 2-1 *Fusarium oxysporum* f.sp. *asparagi* のバンドの割合 (長崎県農家圃場)

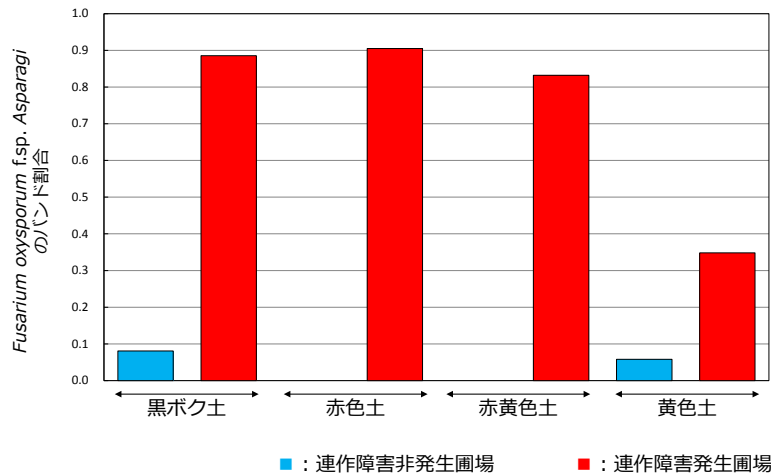


図 2-2 *Fusarium oxysporum* f.sp. *asparagi* のバンドの割合
(長崎県農林技術開発センター圃場)

(6) 連作危険度の判定

PCR-DGGE 法によるアスパラガスの連作危険度の判定基準（暫定版）を以下のように作成しました。データ数が少ないために暫定版となっております。

表 2-2 連作危険度の判定基準（暫定版）

FO割合	0	0~0.3	0.3~0.6	0.6以上
処置	改植可	有機物施用等による 土づくり	土壌消毒 を推奨	改植不可 もしくは 適切な土壌消毒

FO割合： *Fusarium oxysporum* f.sp. *asparagi* のバンド割合

(7) 留意点（注意する点・技術の限界）

- 1) DGGE 解析は PCR 操作を伴うので定性的な解析となります。圃場における菌株の定量的な解析は希釈平板法またはリアルタイム PCR 法を用いて下さい。
- 2) 土壌消毒後の生物診断を行うにあたって、処理後どの時期に土壌サンプルを採取するのが適切か検討中です。
- 3) 連作危険度の数値が低い場合でも、他の病害（株腐病、疫病など）や生理障害が発生する恐れがあります。
- 4) 排水不良による湿害など土壌病害に起因しない障害発生については本手法を用いては診断できません。
- 5) 連作危険度の判定値は暫定版です。改植 1 年目における欠株等の発生は抑止可能ですが、連作危険度の数値が低かった圃場で、数年後に病害が発生しない保証はありません。
- 6) 解析には専用の機器が必要です。診断実施前に相談をしていただくことをお勧めします。
連絡先：中央農業総合研究センター土壌肥料研究領域（029-838-8828）

3. 原因診断Ⅱ（ウイルスの判定）

アスパラガスに感染するウイルスはこれまでに5種類のウイルスが報告されています。その中でも特に問題視されている主要なウイルスは、アスパラガスウイルス1と2（AV-1、AV-2）です。海外の研究では、AV-2の単独感染またはAV-1とAV-2の重複感染がおこると若莖数の減少や草丈の低下といった生育への悪影響がでることが報告されています。しかし、日本国内のアスパラガスにおけるウイルス感染の影響は明らかにされておらず、国内のアスパラガスウイルスの研究は今回の研究課題により始まったばかりです。

(1) ウイルスの伝搬

AV-1とAV-2は、それぞれ虫媒伝染（AV-1）や種子伝染（AV-2）によって感染を拡大させます。またどちらも汁液感染が可能なため、収穫作業によって感染株から健全株へ汁液接触が起こることで感染が拡大します。また、AV-2が感染している雄株から健全な雌株への感染が確認されており、ウイルス感染花粉によってAV-2が伝搬する可能性も示唆されています。

(2) ウイルスの検出

アスパラガスにAV-1やAV-2が感染しても、一般的なウイルス病徴のようなモザイクや壞疽症状といった分かりやすい外観病徴を示しません。そのため、ウイルスの有無を調べるには、タバコやアカザ科植物などの検定植物に接種して病徴の出現を観察するか、あるいは実験的にウイルスを検出するしかありません。ウイルスを検出できる実験は数々ありますが、今回の研究課題により確立した、検出精度の高いRT-PCRによる検出法と重複感染を同時に検出することができるマクロアレイによる検出法の2つの方法を紹介します。

1) RT-PCRによる検出方法

RT-PCRによるウイルス検出ではまず、調べたいアスパラガスの一部を採取してそこから核酸（ウイルスRNA）を抽出します。採取部位は、地上部（主枝、側枝、若莖表皮）や地下部（貯蔵根）を用い、およそ1g（生重）もあれば十分です。黄化や腐敗が生じている部分、乾燥して水分がほとんどないような部分は避けます。若莖表皮は柔らかいので容易に磨砕できますが、主枝や側枝など固い組織の場合は液体窒素を使って十分に磨砕します。1回の核酸抽出実験に約0.1gの組織を使うので、サンプルが多いときには、0.1gずつに小分けして冷凍保存します。また、抽出した核酸は短期間なら冷凍保存できるので、RT-PCRで調べた後に、別の日に同じ核酸を使ってマクロアレイでも調べるということも可能です。

核酸抽出後、逆転写反応によりウイルスのcDNAを合成し、それを鋳型にしてPCRを行うことでウイルスcDNAを増幅します。PCRの反応系やプライマー配列については、北海道大学（志村：011-706-3875）までお問い合わせください。PCRを行った後、電気泳動により

増幅産物の有無を確認します。

1回目のPCRを行った後に、さらにPCRを行うこと（Nested PCR といいます）により検出精度を高めることができます。1回目のPCRではネガティブ判定とされるサンプルでも、Nested PCRを行うとポジティブ判定となる場合もあります（図1）。AV-1、AV-2はアスパラガス個体内での感染濃度が低いので、1回のPCRのみでは確実にネガティブ判定を下すことはできません。また、1回目のPCRで明瞭にバンドが確認できるようなサンプルはウイルスが高濃度で感染していると考えられます。

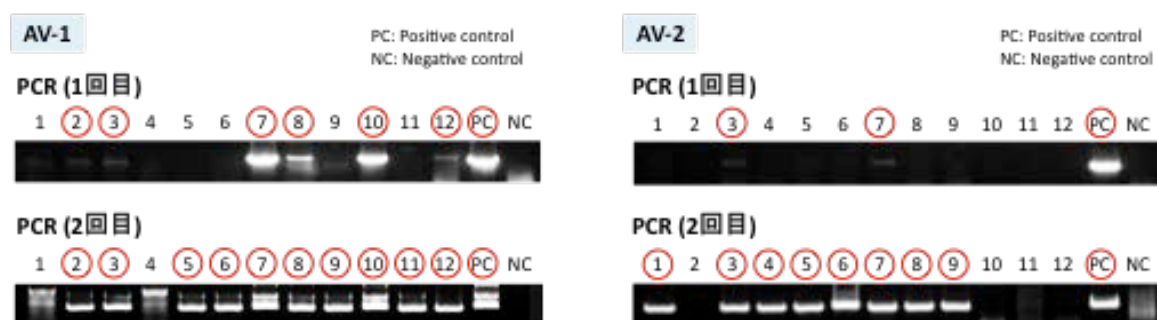


図1 RT-PCRによるAV-1とAV-2の検出

ポジティブ判定を○で示した。AV-1もAV-2も、PCR 1回目よりも2回目のほうがポジティブ判定となるサンプルが増えている。PCRを2回行うことで診断精度を高めることができる。

2) マクロアレイによる検出方法

マクロアレイによるウイルス検出でも、RT-PCR による方法と同様に核酸を抽出します。核酸は逆転写反応を行い cDNA にしてから、PCR を 1 回行うことにより各ウイルス由来の cDNA を増幅させます。RT-PCR 法ではこの増幅産物を電気泳動により確認しますが、マクロアレイでは塩基配列同士の特異的な複合体形成(ハイブリダイゼーション)を利用して PCR 後の増幅産物をマクロアレイ上に捕らえ、さらに可視化処理を行うことで増幅産物の有無を確認します。この検出法では、電気泳動では確認できないような微量の増幅産物も検出することができます。また、マクロアレイは AV-1 と AV-2 の PCR 産物を 1 種類のマクロアレイ（cDNA 搭載メンブレン）を用いて同時に検出するので、何度も電気泳動する必要はありません。ハイブリ作業は 1.5ml チューブを使って行うので作業も簡便です（図2）。

マクロアレイによる検出法は、RT-PCR による検出法よりも必要となる実験機器が少ないので、ある程度の実験設備があれば簡単に行うことができます。マクロアレイに取り組む場合は、アレイの分譲（あるいは購入）が必要です。北海道大学（志村：011-706-3875）までお問い合わせください。

(3) ウイルス感染調査および生育への影響

今回、北海道、佐賀と福島県のアスパラガスを用いて国内での報告例がある AV-1～3 につい

て感染調査を行いました。これまで AV-1 は北海道でのみ少発生していたという記録がありましたが、診断の結果、いずれの地域のアスパラガスからも AV-1 が検出され、AV-1 感染は予想外に広がっていることが分かりました。また、AV-2 もいずれの地域でも検出されました。一方、AV-3 はいずれの地域のアスパラガスからも検出されず、すでに国内の AV-3 感染は消滅している可能性が考えられます。

ウイルス感染がアスパラガスの生育に及ぼす影響を明らかにするため、圃場での生育状況が異なる株（健全、生育不良など）を区別してその株の AV-1 と AV-2 感染について調べました。その結果、いずれの地域でも、健全あるいは生育不良株のどちらでも AV-1 と AV-2 が検出されています。圃場で生じる生育不良の要因は多様であり、そのような状態で生育不良の要因とウイルス感染とを直接的に関連づけることは困難であると思われました。そのため、今後はウイルス感染を厳密に調べたウイルスフリー株を作成し、同一の栽培環境下においてフリー株と感染株を育成することでウイルス感染が及ぼす生育への影響をみる必要があります。

種子から発芽させたアスパラガス幼苗を用いて AV-2 の感染を調べると、感染率は約 10~30% です（AV-1 は種子伝染性でないためこの段階では検出されません）。しかし、AV-2 は種子や幼苗の時期には感染濃度が極端に低く、株齢が進むほど感染濃度が高まる性質があるようです。そのため、株齢が進むほど AV-2 は検出されやすくなります。実際に播種後約 2 ヶ月のときには感染率が 30% でも、数ヶ月後には 100% 近くの株に AV-2 感染が確認されることもあります。このため、幼苗の段階で AV-2 フリーであることを判定するのは困難です。また、同一品種株内での AV-2 感染濃度は異なっており、AV-2 感染濃度が高い種子が数% で存在することが確認されています。そのような AV-2 高濃度感染株を圃場に定植した場合、それが感染源となり汁液伝染により圃場全体へ感染が拡大していくのではないかと考えられます。最後に、フザリウム病菌の発生とウイルス感染との関連ですが、現在、ウイルス感染株ではフザリウム病害が発生しやすくなるという結果が得られています。まだ幼苗段階での結果ですので、今後は圃場レベルでの調査も必要です。

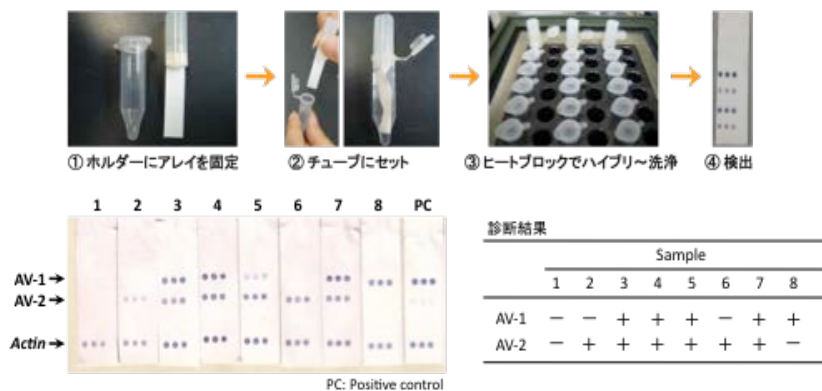


図2 マクロアレイの工程と診断結果の例

マクロアレイには、AV-1とAV-2だけでなく、実験のコントロールとしてアスパラガスのActin遺伝子のcDNAも搭載している。アレイ上のcDNAスポットの着色をみて感染の有無を判定する。

4. フザリウム属菌に対するアスパラガス品種の反応

アスパラガスにおける重大な病害の立枯病 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*)、株腐病 (*Fusarium proliferatum*) に対する抵抗性検定手法を開発し、それを活用して品種の抵抗性を評価しました。

(1) 立枯病抵抗性検定

1) 立枯病における抵抗性幼苗検定手法

接種方法は断根浸漬接種法を用いています。接種源として、立枯病菌株を PS 培地で 10 日間振とう培養後、 5.0×10^5 個/ml に調整した病原菌懸濁液に、128 (あるいは 200) 穴セルトレイで 4 週間程度育苗した幼苗の根を洗浄後、先端を切断し 30 分間浸漬します。その後、培土 (パーミキュライト : 市販培土 = 1 : 1) を用いて TO4 連×12 パック (東海化成) に植え付けます。植え付け後は照光型接種槽 (25℃、12 時間日長、照度 4000lx) で管理し、接種 8 週間後に調査を行います (図 4-1)。調査方法は、茎の褐変程度について、1 : 小さな病斑、2 : 茎数の 1/3 未満に大きな病斑、3 : 茎数の 1/3~2/3 に大きな病斑、4 : 茎数の 2/3 以上に大きな病斑、5 : 枯死、の 5 段階の発病指数で判定します (図 4-2)。



図 4-1 立枯病検定の状況



図 4-2 立枯病の発病状況
※左から発病指数 1~5

2) 立枯病に対する品種の抵抗性評価

上記の方法を用いて、各品種の抵抗性を評価した結果を表 4-1 に示します。抵抗性「やや強」の「ガインリム」並みの抵抗性を示す品種が認められました。

表4-1 立枯病に対する品種の抵抗性

品種名	抵抗性
(標)ガインリム	やや強
ポールトム	やや強
ハイキャッチ	やや強
ナイヤガラ	やや強
ゼンユウメーデル	やや強
ハイデル	やや強
(標)ウエルカム	中
ゼンユウガリバー	中

(2) 株腐病抵抗性検定

1) 株腐病における抵抗性幼苗検定手法

接種方法は土壌接種法を用いて行います。接種源は、PS 培地で 7 日間振とう培養後、殺菌土（パーミキュライト：市販培土＝1:1）に培養ろ液を混合し、2 週間程度室温で静置したものをフザリウム選択分離培地（西村培地）を用いた希釈平板法（方法については省略）により定量します。接種に用いる汚染土は、定量結果に基づき培土と接種源を混合し 5.0×10^5 cfu/g に調整します。その汚染土を用いて、128（あるいは 200）穴セルトレイで 4 週間程度育苗した幼苗を、TO4 連×12 パック（東海化成）に植え付けます。パックの内部底面には底面給水マットを置き、パックの下には、プラスチックバットに水耕栽培用ウレタン、底面給水マットを敷き、ウレタンが 7 割以上浸る程度の湛水状態（図 4-3）として、照光型接種槽（25℃、12 時間日長、照度 4000lx）で管理し（図 4-4）、接種 4 週間後に調査を行います。

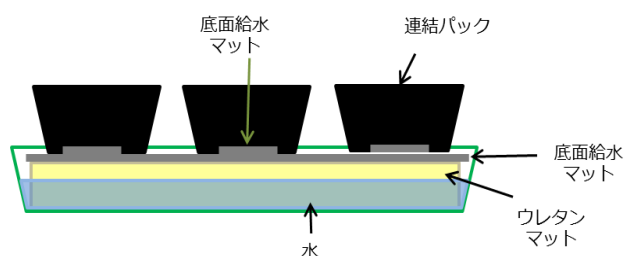


図 4-3 株腐病幼苗検定の管理方法

調査方法は、茎基部の褐変程度について、1：小さな線状、2：大きな線状、または小さなくぼみ、3：大きなくぼみ（茎径の 1/2 以下）、4：大きなくぼみ（茎径の 1/2 以上）、5：全体的に褐変またはくびれ、の 5 段階の発病指数で判定します（図 4-5）。

2) 株腐病に対する品種の抵抗性評価



図 4-4 株腐病幼苗検定の状況



図 4-5 株腐病の発病状況
※左から発病指数 1~5

表4-2 株腐病に対する品種の抵抗性

品種名	抵抗性
(標)ガインリム	やや強
ゼンユウガリバー	やや強
クリスマス特急	やや強~中
PA100	やや強~中
(標)ウエルカム	中
ポールトム	中
ハイキャッチ	中
バイトル	中
グリーンタワー	中
シャワー	中
ナイヤガラ	中
春まちグリーン	中
はるむらさきエフ	中
ハイデル	中

上記の方法を用いて、各品種の抵抗性を評価した結果を表 4-2 に示します。抵抗性「やや強」の「ガインリム」並みの抵抗性を示す品種が認められました。

(3) 留意事項

- ・ 菌株：検定に使用する病原菌の菌株を準備します。あらかじめ病原性の確認が必要です。
- ・ アスパラガス種子：農薬等がコーティングされている種子は、流水で洗浄し、コーティングを除去してから使用します。
- ・ 上記の結果は、幼苗における検定結果であり、成苗における圃場での抵抗性とは異なる可能性があります。

5. エンドファイト概論

(1) エンドファイトとは

エンドファイトとは、生きている植物体の組織や細胞内で生活する生物のことです。この生物には、細菌類や菌類などの微生物はもちろんのこと、ヤドリギに代表される寄生植物まで含まれます。コケ、シダ、地衣類や、草本植物、そして木本植物にわたる大部分の植物種にエンドファイトがすんでいることが報告されています。さらにその植物の根、葉、茎、および幹等、様々な部位をすみかとします。これらエンドファイトは、生活史の上で、そのすべてを植物体内で過ごすものもあれば、少しの間だけ植物内で生活するものも存在します。

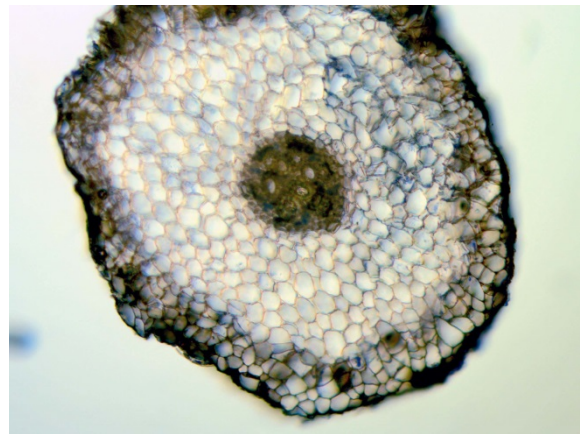
1) 特別なエンドファイト DSE

DSE とは、Darkseptate endophytic fungus (ダーク・セプテイト エンドファイティック ファンガス) のことで、森林土壌、およびそこに自生している植物根部に生息している菌類 (endophyte) の総称です。培地上で暗色の分生子や菌糸等 (Dark) から構成されるコロニー (右図) を形成し、比較的生育が遅いのが特徴です。



2) *Phialocephala fortinii* (フィアロセファラ フォルティニイ)

多くの分離報告があり、最も良く知られている DSE です。北方地域での報告が多いですが、その他の地域の森林等でも広く分布していると考えられています。培地上の生育が遅い特徴がある DSE ですが、その中では比較的生育が早い種類です。また、菌糸上にいぼ状構造物があることが大きな形態的な特徴です。また、根に微小菌核と呼ばれる菌糸の塊をつくり、そこで物質



交換を行うと報告されています。宿主植物がマツ等の木本植物である場合、マツタケと同じ外生菌根様の構造物をつくることも報告されています。アスパラガスの生育促進や病害抑制効果があることが報告されており、本事業でも使用されています。上図は *P. fortinii* が定着したアスパラガス根の断面図です。主に根の周りを取り囲むように定着しており、一部は皮層細胞内へ侵入しています。黒色の菌糸や微小菌核が認められます。

(2) エンドファイトと植物との共生関係

エンドファイトは、土壤中で耐久体として存在しています。植物の根が近づくと、これら土壤中の感染源が発芽し、菌糸を延ばし活動をはじめます。化学物質を介して、植物とコミュニケーションを行い、菌糸が植物根にたどりつくと、根の細胞内へ侵入をはじめます。その後、菌糸は、根内部まで到達しますが、植物には、ダメージは全く認められません。エンドファイトは、植物との間でバランスを保ち、ストレスを与えないで侵入、定着していることがわかっています。

一方、このバランス関係は、土壤中の環境条件の影響を受けます。例えば、植物単独では利用しにくい窒素源が土壤中にあると良い関係となり、エンドファイトが植物へ窒素を供給し、生育を助けていることがわかっていますが、植物が単独で利用できる化学肥料だけを施肥すると、良好な関係は成立しません。

また、菌類の生育にとって糖分はとても重要な栄養源ですが、たくさんあれば良いというわけではありません。植物とエンドファイトの関係では、低い糖濃度が良好であり、生育を促進することがわかっています。高い濃度では、生育を抑制します（右図：左から順に 0, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0,



および 3.0%糖濃度。エンドファイトを接種したアスパラガスの生育は糖濃度 0.1%が最も良く、1.0%を超えるとマイナスにはたらく）。

以上のような良好な条件下で、エンドファイトは、宿主から光合成産物由来の炭素源を獲得します。この炭素源によりエンドファイトはバイオマスを増加させ、ますます植物に窒素源を供給することができるようになり、しっかりとした共生関係がつけられます。このことは、土壤中の過剰な栄養分は、エンドファイトのはたらきにはマイナスに作用することを示しています。エンドファイトの有効利用には、土壤中の栄養条件を把握することが重要です。

(3) 作物病害防除へのエンドファイトの利用

慣行栽培で育てられた作物は、連作を繰り返すことで壊滅的なダメージを受けることが良く知られています。いわゆる連作障害です。日本全国の有名な産地では、多かれ少なかれ、この連作障害に悩んでいます。しかし、エンドファイトと良好な関係を築いた植物が病害などで全滅することはありません。本事業でもアスパラガスの土壌病害防除に有効なエンドフ

アイトを選抜することに成功しました（下図：左は対照区、右はエンドファイト処理区）。

では、どの様に病害を防いでいるのでしょうか？直接病原菌に対して拮抗するのではなく、植物にはたらきかけ、病原菌の侵入を防いでいることがわかってきました。一般に病原菌など、植物に好ましくない菌類が植物体内に侵入すると、細胞壁が厚くなったりしてバリアーをつくり植物は、これに抵抗します。もし、この抵抗反応が病原菌の侵入より遅く、十分な抵抗力を得る前に病原菌が植物内で増殖すると発病してしまうのです。エンドファイトが侵入しても、見かけ上は植物に何の変化もおきません。しかし、エンドファイト



トが住み着くことで、植物の病原菌への抵抗反応が準備を整えるのです。この準備が整った植物に、病原菌がアタックを試みると、抵抗反応が即座にはたらき、病原菌の侵入をブロックすることができるようになります。森林などに自生する植物でも同じような仕組みがはたらき、壊滅するほどのダメージは受けないのです。

6. エンドファイト定着苗の利用

(1) 技術の概要

改植圃場において *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* および *F. proliferatum* による立枯病、株腐病が原因と考えられる生育不良、収量の低下が問題となっています。これらの土壌病害に対処する技術として、根部エンドファイト *Phialocephala fortinii* LtPE2 株(以後エンドファイト)を定着させたアスパラガス苗の利用技術を開発しました。

エンドファイトがアスパラガス根部に定着することにより、下記 2 点の効果が期待されます。

- ・有機態窒素の吸収が促進され、慣行育苗に比べ苗のバイオマスが増加する。(図 6-2)
- ・エンドファイトの定着によりフザリウム病に対する抵抗性が向上する。(図 6-3、表 6-1)

エンドファイトの植物根部への定着は特定の環境で促進されます。そのため、培土条件や温度、培土水分量などを制御しやすい育苗時がエンドファイトの接種処理には最適です。本章では、育苗時にエンドファイトを接種する苗床処理法を中心にエンドファイトの利用法について説明します。

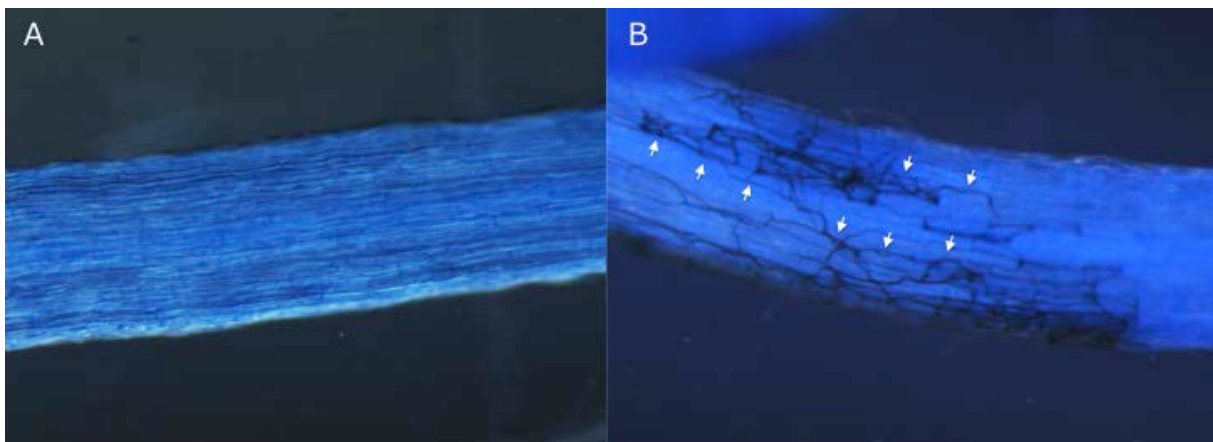


図 6-1. アスパラガス根部に定着したエンドファイトの様子
A：慣行育苗したアスパラガス苗の根部、B：エンドファイト接種処理したアスパラガス苗の根部
矢印で示したエンドファイトの暗色の菌糸がアスパラガス根部を覆っている。

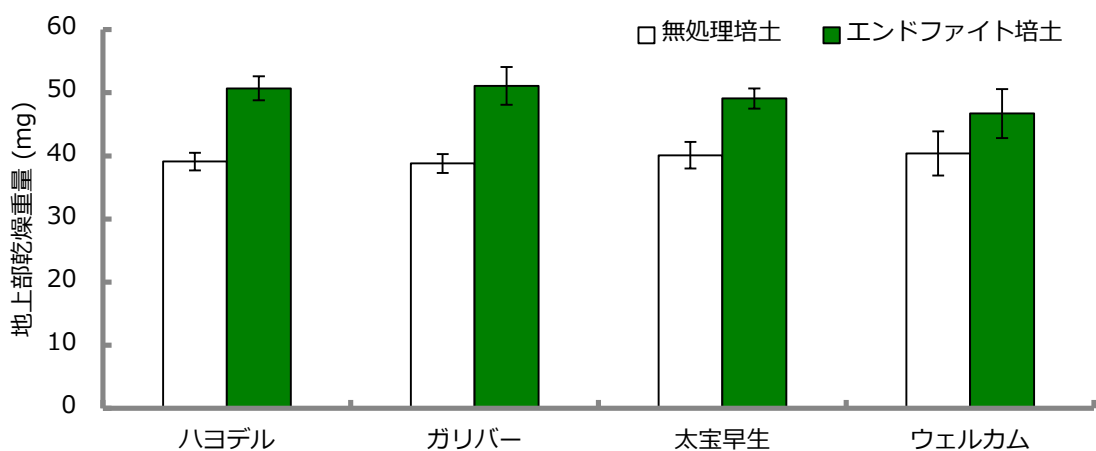


図 6-2. エンドファイト接種処理したアスパラガス各品種苗の播種 1 か月後の地上部乾燥重量
供試 4 品種全てにおいてエンドファイト接種処理によりバイオマスが増加した。

表 6-1. エンドファイト接種処理したアスパラガス苗のアスパラガス立枯病抑制効果

処理区	地上部乾燥重量 (mg) (±SE)	根部乾燥重量 (mg) (±SE)	発病度 ²⁾
慣行苗／慣行培土	143 (11.4)	287 (9.35)	16
慣行苗／病原菌培土 ¹⁾	99.8 (10.9)	312 (28.5)	50
エンドファイト苗／慣行培土	210 (20.9)	458 (36.3)	16
エンドファイト苗／病原菌培土	227 (26.2)	474 (40.6)	15

慣行苗、エンドファイト苗ともに 200 穴トレイで 4 週間育苗し、慣行培土、病原菌培土をそれぞれ入れた 9 cm ポットに鉢上げし、さらに 4 週間育苗した。

1) 病原菌培土：滅菌した慣行培土にアスパラガス立枯病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* の分生子を 10^5 個/g 培土になるように混合した。

2) 発病度は以下の式で算出した。

発病度 = $\{ \sum (\text{程度別発病苗数} \times \text{指数}) / (\text{調査苗数}) \times 5 \} \times 100$

根部全体の萎凋程度を 5 段階に分け指数を与えた。0:萎凋無し、1:20 %以下、2:20–40 %、3:40–60 %、4:60–80 %、5:80 %

(2) 準備

・エンドファイト接種用培土

エンドファイト菌体が混合された培土です。エンドファイトの定着が促進されるよう培土組成、肥料成分が調整されています。パイオニアエコサイエンス株式会社で販売を予定しています。

・アスパラガス種子

農薬等のコーティング処理がされている種子については、流水で洗浄しコーティングを除去してから使用して下さい。種子を容器に入れガーゼ等で蓋をした状態で水を流し入れると簡単にコーティングを除去することができます。

(3) 苗床処理法

- 1) エンドファイト接種用培土をセルトレイに詰める。
- 2) 灌水する(培土全体が湿る程度)。
- 3) 鎮圧ローラ等を用いて培土に窪みを作り、中央に播種する。
- 4) 播種後、種子が見えなくなる程度に覆土し、再度灌水する。
- 5) 播種後は発芽まで地温が約 25℃になるように管理する。
- 6) 発芽後育苗期間中は日中最高温度 25℃、夜間最低温度 12℃、苗床温度約 20℃を保つよう管理する。※苗床温度が 30℃を超えないように注意して下さい。
- 7) 鉢上げを行う場合はエンドファイト苗専用の鉢上培土を使用して下さい。

※育苗途中で追肥を行う場合は、有機質のものを使用して下さい。有機態の窒素成分によってエンドファイトの根部定着が促進され、植物体の生育促進が期待されます。

パイオニアエコサイエンス株式会社では、上記手法でエンドファイトを定着させたアスパラガス苗の販売を予定しています。出荷前にエンドファイトの定着状態の確認を行い、十分な定着が確認された苗をご提供します。また、エンドファイト接種用培土の販売も予定しております。エンドファイト苗および培土の詳細については下記までお問合せ下さい。

問合せ先：パイオニアエコサイエンス株式会社 東日本事業所 園芸種子部

TEL：028-638-8990

FAX：028-638-8991

(4) 定植時のエンドファイト資材の植穴処理

定植時にエンドファイト苗用鉢上培土を植穴処理することでエンドファイトの定着を維持することが可能です。

- 1) ポットの大きさよりも若干大きめの植穴を掘る。
- 2) エンドファイト資材 100～500 mL を植穴に入れ、土壌とよく混合する。
- 3) ポットから苗を取り出し、植穴に植える。

(5) 留意点（注意する点・技術の限界）

エンドファイトは高温に弱いため、苗床温度が 30℃を超えないよう注意して下さい。高温が続くと苗床中のエンドファイトが死滅することがあります。

圃場環境によってはエンドファイトの効果が表れない場合があります。特に、排水不良の圃場では湿害により根部の生育が妨げられ、エンドファイトの定着が阻害されることがあります。そのような圃場では、客土や明渠、暗渠の設置を行い排水性の改善を優先して行って下さい。

(6) 実証事例

いずれの実証圃場でも排水が良好で、抜根し前作の通路に定植するなど従来の技術を継承しながら、品種を変更するとともにエンドファイトが定着した苗を定植しました。

各圃場において、定植年での土壌病害の発生は確認できませんでした。対照区、エンドファイト接種処理区共に順調に生育しました。

実証事例 1) ハウス栽培

前作品種：ウェルカム

改植品種：ゼンユウガリバー

排水条件：良好（客土を実施）

改植理由：収量の低下

改植へのステップ：前作の夏芽収穫後、株を鋤き込み、前作の通路だった箇所に畝立て・定植した

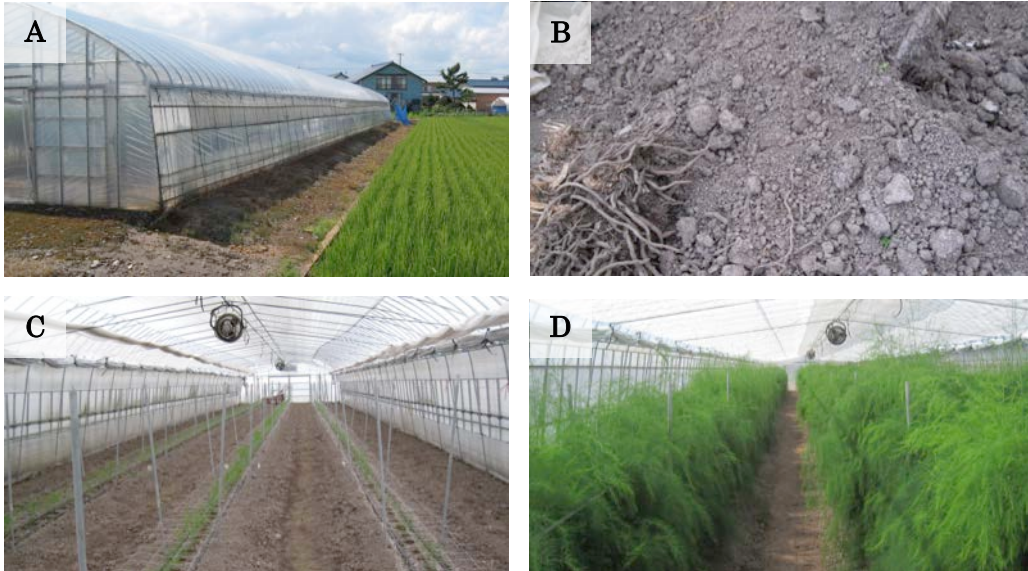


図 6-3. ハウス栽培の圃場の様子

A：客土を行いハウスを建設 B：改植後の土壌(残根が見られる)

C：前作の通路だった箇所に畝立てし定植 D：定植年の生育は順調

実証事例 2) 露地栽培

前作品種：ウェルカム

改植品種：ゼンユウガリバー

排水条件：良好

改植理由：ねずみ、もぐらの発生および茎枯病による欠株

改植へのステップ：前作の地下部を抜根し、圃場外へ持ちだした

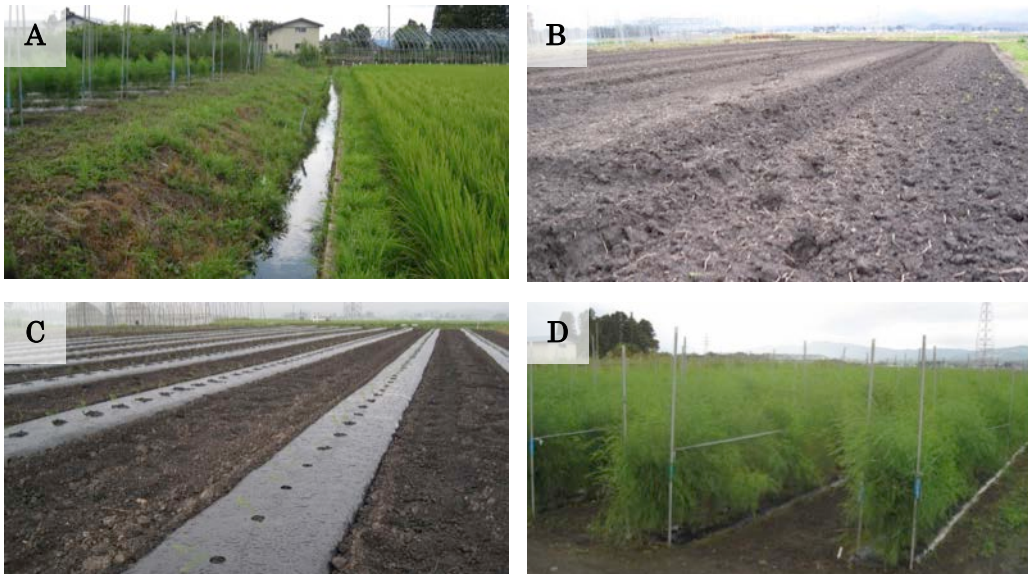


図 6-4. 露地栽培 圃場の様子

A：右手水田より高い位置に圃場があり排水良好 B 抜根後の耕起状況(残根あり)

C：前作の通路だった箇所に畝立てし定植 D：定植年の生育は順調

7. エンドファイト定着苗の実証事例

福島県会津地方の現地圃場において、根部エンドファイトを処理した定植 2 年株および 1 年株の生育に及ぼす影響や病害の抑制効果について、実証試験した内容の一部を紹介します。

(1) 2 年株

1) 圃場条件

表 1. 2 年株の圃場条件

実証圃場	ハウス1	ハウス2
排水性	やや不良	良好
前作	6年間アスパラ栽培後 還元土壌消毒	10年間アスパラ栽培後 1年間ソルゴー栽培
定植前FO割合 ¹⁾	0.877	0.736

実証ほ場	露地1	露地2	露地3
排水性	不良	不良	やや良好
前作	ねぎ・大根等栽培後 1年間アスパラ栽培	水稲栽培後 15年以上アスパラ連作	5年間アスパラ栽培後 2年間休耕後 5年間アスパラ栽培
定植前FO割合	0.184	0.161	0.488

※定植月日：平成24年7月31日～8月1日
1) FO割合：検出されたフザリウム全体に対するアスパラガス病原菌であるFusarium oxysporumの割合

2) 生育状況

定植時の生育レベルに差があったため、生育状況の直接比較はできませんでした。

表 2. 2 年株の生育状況

品種名	エンド ファイト の有無	ハウス1			ハウス2			露地1			露地2			露地3		
		草丈 (cm)	茎数 (本)	茎径 (mm)	草丈 (cm)	茎数 (本)	茎径 (mm)	草丈 (cm)	茎数 (本)	茎径 (mm)	草丈 (cm)	茎数 (本)	茎径 (mm)	草丈 (cm)	茎数 (本)	茎径 (mm)
ウェルカム	有	162.9	3.9	10.3	140.0	4.4	9.2	-	-	-	132.9	7.5	9.0	160.0	5.5	8.6
"	無	175.1	4.5	12.9	140.0	4.8	11.6	-	-	-	155.6	10.3	12.0	160.0	5.3	11.8
福島交10号	有	200.0	3.8	12.1	140.0	4.1	9.2	-	-	-	164.7	9.8	9.9	160.0	5.3	10.0
"	無	205.4	4.3	14.5	140.0	5.3	12.9	-	-	-	154.4	12.1	10.2	160.0	5.0	13.5
ハルキタル	有	184.1	4.0	9.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
"	無	191.2	4.7	11.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

※調査月日：10月2日。露地1については、病害による欠株が多く判断不能。

※草丈：最大・摘心草丈、茎数：立基本数（5mm以上）、茎径：最大茎径

3) 立枯症状の発生状況

夏期の多雨等により、排水不良の露地圃場においては、エンドファイト処理の有無に関わらず立枯症状の発生が著しく、DGGE 解析法による FO 割合が低めであっても、根部エンドファイトを活用してもアスパラガス連作障害は回避しにくいと考えられます。また、土壌消毒等を行ったハウス栽培や比較的排水の良い露地圃場においても、エンドファイト苗の立枯症状発生抑制効果に有意な差は認められませんでした。

表3. 立枯症状の発生状況（2年株）

品種名	エンド ファイト の有無	立枯症状発生株率(%) ¹⁾				
		ハウス 1	ハウス 2	露地 1	露地 2	露地 3
ウエルカム	有	6.7	0.0	100.0	61.1	5.0
〃	無	0.0	20.8	87.5	75.0	17.9
福島交10号	有	0.0	0.0	100.0	81.5	4.2
〃	無	3.3	0.0	93.8	100.0	25.0
ハルキタル	有	3.3	-	-	-	-
〃	無	6.7	-	-	-	-

1) 立枯症状発生株率：
 症状発生株/1年目秋の試験区株数×100
 ※調査月日：9月27日～10月2日。達観調査。
 ※一元配置分散分析の結果、エンドファイトの
 有、無間では5%水準で有意差なし



エンドファイトウエルカム（露地3）



無処理ウエルカム（ハウス2）



無処理ウエルカム（露地3）

(2) 1年株

1) 圃場条件

表4 1年株の圃場条件

実証ほ場	露地
排水性	やや良好
前作	5年間アスパラ栽培後 2年間休耕後 5年間アスパラ栽培後 1年間休耕
定植前F0割合 ¹⁾	0.245

1) F0割合：検出されたフザリウム全体に対する
 アスパラガス病原菌である
 Fusarium oxysporumの割合

2) 生育状況

生育については、エンドファイト処理区で無処理区よりやや劣る傾向にありました。

表5 1年株の生育状況

品種名	エンド ファイト の有無	5月23日		9月27日		※定植月日：5月22日 ※草丈：最大草丈 茎数：5mm以上茎数 茎径：最大茎径
		草丈 (cm)	草丈 (cm)	茎数 (本)	茎径 (mm)	
ウエルカム	有	25.5	160.7	9.2	8.0	
〃	無	30.4	156.5	12.1	9.2	

3) 立枯症状の発生状況

立枯症状は無処理区で発生しましたが、処理区では発生が認められませんでした。

表6 立枯症状の発生状況（1年株）

品種名	エンド ファイト の有無	立枯れ症状発生株率 (%) ¹⁾	※調査月日：9月27日。達観調査。
ウエルカム	有	0	1) 立枯症状発生株率：症状発生株/試験区株数×100
〃	無	10	



エンドファイトウエルカム



無処理ウエルカム

(3) 今後の課題

アスパラガスは多年性作物であり、根部エンドファイトが永続的に定着可能な条件を明らかにするとともに、現地圃場における数年間のデータの蓄積等が必要であると考えられます。

8. 湛水太陽熱処理の利用

(1) 技術の概要（対象となる障害・作用機作）

湛水太陽熱処理は、水をかけ流す湛水処理と熱を利用する太陽熱処理を組み合わせたもので、アスパラガスの連作障害を回避する目的で開発されました。湛水太陽熱処理は、太陽熱処理により病原性微生物の菌密度を低下させると同時にアスパラガス残さの分解を促し、土壌中にアレロパシー物質を放出させ、湛水灌漑によりアレロパシー物質や土壌中に過剰に蓄積した肥料成分を除去する技術です。これまでに連作障害の回避技術として提案されてきた農薬による土壌消毒や活性炭のすき込みおよび抜根処理と比べ、費用も労力も少なく効果が得られることが特徴です。

(2) 準備

- 1) 雨除けハウスによりアスパラガスを栽培している圃場で、近隣に水路があるなど取水源があることが本処理の前提条件です。
- 2) 圃場を耕起、均平化しておきます。この時、地上部は持ち出しを推奨しますが地下部はすき込みで構いません。

(3) 必要器材

- 1) 幅 20～30cm の畦畔板：ハウスの内側を囲むために使用
- 2) 直径 150mm 程度の塩ビパイプ：湛水灌漑用の水を引き込むために使用
- 3) 透明ビニルシート：太陽熱処理のため地面全体を覆うことが出来る大きさ、中古品で十分

(4) 手順（図 8-1）

- 1) 雨除けハウスの内周を畦畔板で囲みます（写真 8-1）。
- 2) 土壌の熱伝導性を高めるため湛水灌漑を行います（写真 8-2）。
- 3) 水が引いたら地面をビニルシートで全面被覆し、ハウスを閉め込んで 7～9 月の間に約 2 か月間太陽熱処理を行います（写真 8-3）。
- 4) ビニルシートで覆われた状態で湛水灌漑（留意点 4 を参照）を行い、アレロパシー物質を除去します（写真 8-4）。
- 5) 圃場に入れる程度に土が乾いたら、通常の定植作業を行います（写真 8-5）。

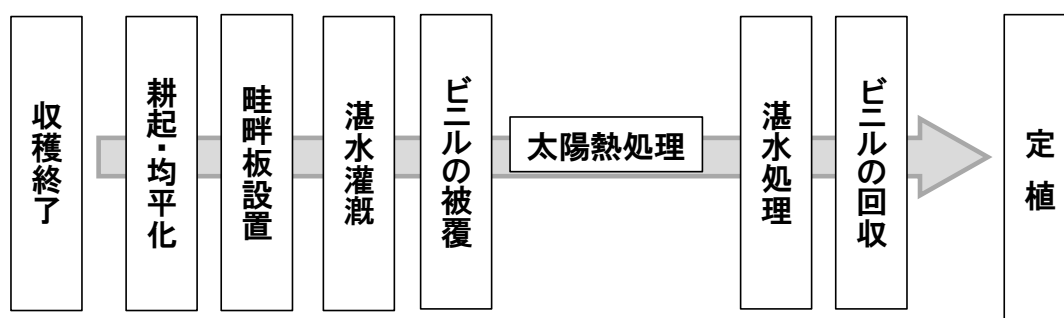


図8-1 湛水太陽熱処理の流れ

(5) 留意点（注意する点・技術の限界）

- 1) 処理終了後の畦畔板を撤去する際に、未処理部分である畦畔板の外側の土を内側に混入しないように注意して下さい。改植後のアスパラガスへの病害発生の原因となります。
- 2) 圃場の近くに利用できる水路がない場合は灌水チューブによるかけ流しも可能です。その場合、均一な洗浄効果を得るために、圃場内全体に水が行き渡るよう水圧を調整してください。
- 3) 立枯病菌は、40℃以上の積算時間が 336 時間で、殺菌効果が得られるとの報告があることから、太陽熱処理は、30cm 深の地温を測定してこの条件を満たすことを目標にしてください。地温の測定方法については、お近くの農業改良普及センターや農業研究機関にお尋ねください。
- 4) 灌漑水量は土によって変える必要があります。例えば、佐賀県の実証例では、1 日当たり 150mm を 3 回としました。これは、0~30cm 深の土を 3 回洗うことに相当します。空隙（水や空気が入る土壌中の隙間）が少ない沖積土等では上記水量が目安となりますが、空隙が多い黒ボク土等では 1 日当たり 200mm を 3 回が目安となります。
- 5) 湛水太陽熱処理でアレロパシー作用が軽減されているかどうかは、レタス種子の発芽で簡単に確認することができます。湛水太陽熱処理前と後の土を小さなポット（9.5cm 黒ポットで十分）に取り、レタス種子（例えば品種「グレートレークス」）を 10~20 粒播いてざっと灌水します。室温（18~25℃）で 5 日ほど経過したところで発芽勢が湛水太陽熱処理後の土で良くなっていれば、処理は成功です。もし湛水太陽熱処理の前後で発芽勢が変わらない場合は、湛水灌漑を追加実施してください。



写真 8-1 雨除けハウスの内周を畦畔板で囲む



写真 8-2 湛水→自然落水を3回繰り返す



写真 8-3 約2か月間太陽熱処理する



写真 8-4 太陽熱処理後、再度湛水灌漑を3回する



写真 8-5 定植時の様子

(6) 実証事例

2011年7～9月に佐賀県内の現地圃場3か所で湛水太陽熱処理を実施しました。その後、2011年秋に1か所、2012年春に2か所で改植しました。改植後、2013年までの生育および収量は新植と遜色なく推移しました（写真8-6, 8-7, 8-8）。



写真 8-6 収穫開始時の様子



写真 8-7 改植 1 年目株元の様子



写真 8-8 収穫 1 年目春芽収穫時の様子

平成 26 年 1 月 24 日 初版（冊子体）発行

平成 26 年 5 月 野菜茶業研究所 web サイト用第 1 版発行

http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/laboratory/vegetea/pamph/index.html

（現在、エンドファイト定着苗に関して、調査を続けていますので、調査結果がまとまりましたら、そのデータを追加し、「第 2 版」を発行する予定です。）

「アスパラガスの連作障害回避のための 改植マニュアル（第 1 版）」

本マニュアルの記載内容を転載・複製する場合は、
野菜茶業研究所の許可を得てください。

編集・発行所 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
野菜茶業研究所

〒514-2392 三重県津市安濃町草生 360

電話 050-3533-3861

FAX 059-268-3124

URL <http://www.naro.affrc.go.jp/vegetea/index.html>