



Title	トウモロコシ栽培によるアズキ落葉病菌菌量低下機構に関する研究
Author(s)	相馬, 潤
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第3664号
Issue Date	1995-03-24
DOI	10.11501/3082666
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/51270">http://hdl.handle.net/2115/51270</a>
Type	theses (doctoral)
File Information	000000285118.pdf



[Instructions for use](#)



トウモロコシ栽培によるアズキ落葉病菌

菌量低下機構に関する研究

農業生物学専攻 博士課程

相馬 潤







## 目次

第1章	緒言	1
第2章	研究史	
1	アズキ落葉病菌の同定と分類に関する研究	2
2	アズキ落葉病の発生および病原菌の生態に関する研究	5
第3章	各種作物栽培によるアズキ落葉病菌菌量の変化	
1	北海道大学農学部附属農場内小実験区での試験(1991年)	9
2	北海道立十勝農業試験場内実験区での試験(1992年)	16
3	北海道立十勝農業試験場内実験区での試験(1993年)	26
4	十勝土壌を用いた温室ポット試験	32
第4章	各種作物栽培によるダイズ落葉病菌菌量の変化	34
第5章	人工根圏土壌中におけるアズキ落葉病菌菌量の低下	
1	人工根圏土壌中のアズキ落葉病菌菌量の調査	37
2	人工根圏土壌中でのアズキ落葉病菌菌量低下における微生物の役割	42
3	4℃下における人工根圏土壌中のアズキ落葉病菌菌量	44
4	十勝土壌を用いた人工根圏土壌中のアズキ落葉病菌菌量	48
5	異なる組成の人工浸出液によるアズキ落葉病菌菌量の変化	51
6	人工浸出液によるダイズ落葉病菌の菌量低下	54
第6章	人工根圏土壌中における菌量低下に関与する要因	
1	人工根圏土壌中の糸状菌相	57
2	人工根圏土壌中の細菌相	60
3	人工浸出液が低栄養細菌に与える影響	78
4	人工根圏土壌中の微生物活性	79
5	人工根圏土壌中でのアズキ落葉病菌菌量低下の経時的調査	81



第7章	人工浸出液が土壌中の他の病原菌に与える影響	83
第8章	人工根圏土壌中のアズキ落葉病菌分生胞子の発芽	
1	人工根圏土壌中のアズキ落葉病菌分生胞子の発芽	88
2	アズキ根圏土壌中でのアズキ落葉病菌分生胞子の発芽	92
3	コムギ条斑病菌分生胞子の人工根圏土壌中での発芽	94
第9章	人工根圏土壌中におけるアズキ落葉病菌菌量低下の機構としての 栄養ストレスの評価	96
1	人工浸出液添加土壌の栄養ストレスの評価	97
2	人工根圏土壌の栄養ストレスの評価	102
第10章	総合考察	104
摘要		108
引用文献		111
培地成分表		120



## 第1章 緒言

アズキ落葉病は *Phialophora gregata* (Allington et Chamberlain) Gams f.sp. *adzukicola* Kobayashi, Yamamoto, Negishi, et Ogoshi による土壌伝染性病害である。本病は1938年に初めて我が国で報告され、1970年に十勝地方を中心として大発生し、その後も北海道のアズキ栽培に大きな障害となっている。本病の病原菌は土壌中で長期間生存するため、4年程度の短期輪作では激発することが多く、本病を回避する有効な方法としてはトウモロコシを中心とした長期輪作と田畑輪換および抵抗性品種の利用が挙げられる。

これまでに、トウモロコシ栽培により、土壌中のアズキ落葉病菌の菌量が著しく低下することが報告されている。この菌量低下現象の機構を明らかにし、本病の防除に役立てることが本研究の目的である。

本研究は1992年から1994年に北海道大学農学部、植物寄生病学講座で行った。研究を行うに当たり、御助言、御指導を頂いた生越 明教授、小林喜六助教授、近藤 則夫助手、秋野聖之助手に衷心より感謝する。

また、北海道立十勝農業試験場・病虫科田中文夫氏ならびに鳥倉英徳氏の御厚意により、1992、1993年の2年間にわたる同農業試験場での圃場試験を行うことができた。また、両氏には実験を行うに当たり、暖かい激励とご助言を賜った。ここに深く感謝の意を表す。

土壌細菌相の類似性に関する実験を行うに当たり、貴重な実験装置ならびに実験の機会を与えていただいた、農林水産省農業環境技術研究所・土壌微生物生態研究室、横山和成氏ならびに松本直幸氏に感謝する。

最後に本論文を取りまとめるに当たり、御助言・御指導を頂き、御校閲を賜った、北大農学部・植物寄生病学講座生越 明教授、小林喜六助教授、ならびに、同大学農学部・植物ウイルス学講座木村郁夫教授、同大学農学部・作物生理学講座喜久田 嘉郎教授に深く感謝の意を表す。



## 第2章 研究史

### 1. アズキ落葉病菌の同定と分類に関する研究

1938年頃より、それまで生育良好であったアズキ圃場で、8月下旬または成熟期に近いアズキの葉が黄化し、さらに落葉する症状が石狩、十勝を中心として観察された(田中・北沢、1956)。田中・北沢は、この病害は維管束病害であり、維管束の褐変部位と関連した分支根から*Fusarium* sp.が分離され、この菌が本病害と関連があると推測した。しかし、この病害を既に知られていたアズキ立枯病とは明らかに異なる病害と認め、アズキ落葉病という病名を与えた。

その後、1970年に本病は十勝地方を中心として大発生し、発生面積は十勝地方アズキ栽培面積の約66%に相当する14,000haに達した(赤井ら、1971; 成田ら、1971a)。田中・北沢の報告(1956)では落葉病の病原として*Fusarium*属菌の関与が示唆されていたが、病原性の確認は行われておらず、本病の病原菌は未同定であった。1970、1971年のアズキ落葉病罹病株からも*Fusarium*属菌が分離されたが、接種試験を行っても茎維管束の褐変、落葉症状など本病の病徴は再現されなかった。一方、落葉症状の認められる個体の褐変部位からブドウ糖加用ジャガイモ煎汁寒天培地上で灰褐色～灰白色、マット上に極めて緩慢に生育する菌が常に検出された。この菌をアズキに接種した結果、本病の病徴が現れたため、この菌が本病の病原菌であることが確認された(成田ら、1971a、b)。

この菌は、アメリカで既にAllington and Chamberlain (1948)により報告されていたダイズのbrown stem rot (BSR) 菌である、*Cephalosporium gregatum* Allington et Chamberlainと同種の菌であることが明らかとなった(成田ら、1971a、b)。しかし、ダイズのBSR菌(ダイズ落葉病菌)とアズキ落葉病菌が*Cephalosporium*属に属するか否かについては、その分生胞子の形成様式などの点で疑問が残されていた。その後、Gams (1971)は本菌を*Phialophora*属(Hypomycetes)に移し*Phialophora gregata* (Allington et Chamberlain) Gamsとすることを提案し、現在これが広く受け入れられている。

日本のアズキから分離されたアズキ落葉病菌はアズキとリョクトウに対し病原性を示し、ダイズには示さないが、アメリカで分離されたダイズ落葉病菌はダイズとリョクトウに病原性を示し、アズキには示さない(Allington and Chamberlain, 1948; 成田ら、1971a; Kobayashi et al., 1983)。これらの結果から、ダイズ落葉病



菌はアズキ落葉病菌と異なる分化型であることが示唆された。日本のアズキおよびダイズから分離された*P. gregata*を用いて、アズキ、ダイズ、リョクトウ、インゲンおよびササゲに対するそれらの病原性が検討された (Kobayashi *et al.*, 1991)。その結果、アズキ分離株はアズキとリョクトウに病原性を示し、ダイズ分離株はダイズとリョクトウに病原性を示した。以上よりKobayashi *et al.* (1991) は両者を分化型であるとし、アズキ落葉病菌に対して*P. gregata* f.sp. *adzukicola*、ダイズ落葉病菌に対しては*P. gregata* f.sp. *sojae*という分化型を提案した。近年、自然状態で*P. gregata*がリョクトウから分離され、導管病の病原菌として存在することが明らかとなった (Gray and Pataky, 1994)。また、ダイズ落葉病が激発する圃場に栽培した赤クローバーからダイズ落葉病菌が分離された報告もある (Dunleavy, 1967)。

ダイズ落葉病菌とアズキ落葉病菌について、形態、培養性質、生育速度および特異的萎ちよう毒素gregatin (Kobayashi and Ui, 1975, 1977)の生産について比較したところ、両者の間に違いは認められなかった (Kobayashi and Ui, 1980)。しかしその後、最適pH、生育適温およびジャガイモ煎汁寒天培地 (PDA) やV-8ジュース寒天培地上でのコロニーの色に違いがあることが報告された (Yamamoto *et al.*, 1991)。このことは両者が異なる分化型に属することを支持する結果であると考えられた。

アズキ落葉病菌、ダイズ落葉病菌の菌体内酵素の電気泳動パターン、ならびにDNA塩基組成・塩基配列について検討され、両菌は同一種であるが遺伝的分化が進んでいることが推測された (Yamamoto *et al.*, 1990, 1992)。

ダイズ落葉病菌ではその病原性の違いから二つの系統が存在することが報告された (Gray, 1971)。その中で、萎ちよう症状を起こす系統がType I、維管束の褐変は起こすが、萎ちよう症状にまでは発展しない系統がType IIとされた。また、これら二つの系統の病原性の強さと菌糸の生育速度の間には正の相関があるとした。しかし、Phillips (1973) は病原性の系統は少なくとも3系統以上存在するとし、病原性の強さと生育速度および培養形態に関連が認められないことを報告した。

一方、アズキ落葉病菌においても従来の系統と比較して、胞子の形態と形成様式および菌糸の太さにはほとんど差が認められないが、ダイズ茎煎汁培地上での生育速度およびPDA上での胞子形成量が大きく、gregatin生産量の小さい系統が発見された (Kobayashi *et al.*, 1979)。

従来の系統をType A、この新系統をType Bとしてそれらの病原性を比較した結果、Type Bは病原性が弱いことが明らかとなった (Kobayashi *et al.*, 1980)。



ダイズ落葉病に罹病したダイズから*P. gregata*のほかに、*Acremonium* sp.が低い頻度ではあるが常に分離された。両者を分生胞子の大きさで区別することは困難であるが、分生子柄の形態に若干の差が認められた。また、*Acremonium* sp.の生育速度は*P. gregata*のType I, IIよりも速かった。その病原性は、維管束の褐変を起こすにとどまり、落葉症状は起こさなかった (Mengistu and Grau, 1986)。一方、アズキ落葉病菌の弱病原性系統Type BはMengistu and Grau (1986) の記載によるダイズ落葉病罹病組織より分離された*Acremonium* sp.と類似点が多いため、*P. gregata*ではなく*Acremonium* sp.であることが推察された。さらに、菌体タンパク質と菌体内酵素の電気泳動パターンの比較、DNA塩基組成・塩基配列の相同性より、アズキ落葉病菌Type Bは*P. gregata*とは別種であることが明らかとされた (Yamamoto *et al.* 1990, 1992; 山本, 1994)。

Gray and Hepburn (1992) はアメリカで分離されたダイズ落葉病菌と日本で分離されたアズキ落葉病菌について、ミトコンドリアDNAの制限酵素断片長多型を調べた。その結果、ダイズ落葉病菌とアズキ落葉病菌の菌株間では多型が認められたが、アメリカ各地から分離されたダイズ落葉病菌の菌株間には多型は認められなかった。日本で分離されたアズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌についてミトコンドリアDNAの制限酵素断片長多型が調べられた (Yamamoto *et al.*, 1993)。その結果、アズキ落葉病菌は単一の起源を持つことが示唆され、北海道と秋田県で分離されたダイズ落葉病菌の間にはミトコンドリアDNAレベルで分化が認められた。

アメリカ各地から得られたダイズ落葉病菌の、4種類のダイズ品種に対する病原性の差が検討され、菌株間でかなりの病原性の差が認められた。このことからダイズ落葉病菌にはレースが存在する可能性が示唆された (Willmot *et al.*, 1989)。また、一つの圃場内から分離されたダイズ落葉病菌菌株間にも、抵抗性の異なるダイズ系統に対する病原性の差があることが報告されている (Sills *et al.*, 1991)。



## 2. アズキ落葉病の発生および病原菌の生態に関する研究

アズキ落葉病の病徴は、胚軸、茎、ならびに葉柄の維管束の褐変である。更に褐変が上部へ進み、その程度も激しくなると、莢が肥大する8月中下旬ころから下位葉の萎ちょうが現れ、しだいに上部の葉にも及び、最終的には落葉する（小林、1993； 成田ら、1971a； 土屋、1976）。病原菌の侵入によりアズキ根は紫褐色～暗褐色に変色する。病土に播種したアズキの根を根箱（root box）を用いて観察した結果、播種後20～21日目（発根始めから約2週間）に側根の一部で変色がみられた。このことから本病原菌の侵入は、播種後約2週間後に起こるものと推測された（土屋、1976）。ダイズ落葉病菌においても、圃場試験で播種後7週間までに根に侵入することが確認されている（Schneider *et al.*, 1972）。

胚軸部の維管束の褐変は播種後6～7週目に観察され、さらに進展して播種後8～9週目には主茎地際部に達する。12～13週目にはほぼ生長点にまで達する。褐変した維管束部の細胞には病原菌の菌糸が迷走または充満しているのがみられる（成田ら、1971a）。また、地下部に比べ地上部での褐変の進展が急速であったことから、Allington and Chamberlain(1948)が指摘するように、アズキ落葉病の場合にも導管内で形成された胞子が転流している可能性が示唆された（土屋・赤井、1971； 土屋、1976）。子実肥大期のダイズを用いてダイズ落葉病菌の浸根接種を行った結果、2日後に茎頂から菌が分離された。このことから、植物体での菌の移動は分生胞子によるものと考えられた（Schneider *et al.*, 1972）。

ダイズ落葉病では収穫前の低温が減収の要因となる（Allington and Chamberlain, 1948）。また、発生圃場率と気温の間に低い負の相関があることが報告されており、一方、降水量と発生圃場率の間には相関が認められていない（Dunleavy, 1966）。接種試験においては、ダイズ落葉病の発病は高温で抑制され（32℃）、接種時の植物が幼若であるほど病徴進展が遅れる（Chamberlain and McAlister, 1954）。このように、発病と気温ならびに生育段階の関係が報告された一方、Gray(1974)は強病原性の菌株を接種した場合には気温、生育段階のどちらも発病には影響しないと報告した。

アズキ落葉病の発病に関する気象要因としては、過去の激発年に共通した傾向として夏の高温があげられている（成田ら、1971a）。しかし、1971年の場合は冷害傾向の夏期低温湿潤気象であったが、アズキ落葉病が激発した。アズキは生育初期（6月上旬～7月下旬）の生育がきわめて遅い作物であり、この期間が根の発育を阻



害する気象条件であると、アズキの生育を抑制し、落葉病の感染・発病を激化させると考えられる。このことから生育初期の低温湿潤気象が本病の発生要因として重要であると考えられた(土屋、1976)。

ダイズ落葉病の激発要因として、ダイズの作付面積の拡大と4年に一度ダイズを栽培する輪作体系が崩れ、トウモロコシ・ダイズのための作付へ移行したことが挙げられた(Dunleavy, 1966)。また、過去3年間ダイズを栽培していない圃場ではダイズ落葉病の発生が認められないことから、ダイズ落葉病の防除には4年輪作体系が効果的であるとされた(Allington and Chamberlain, 1948)。アズキ落葉病においても、アズキ作付率の高い地方で発生が大きく、低作付率の地方では小発生であった。また、連作地、作付年次の近かった圃場に激発した事例が多かったことも報告されている(成田ら、1971a)。

アズキ落葉病の発病に関与する条件の一つとして、有害センチュウ生息土壌ではアズキ落葉病の発病が激しくなることが報告された(青田ら、1981)。根岸・小林(1984)はダイズシストセンチュウがアズキ落葉病の発病に及ぼす影響を検討し、センチュウ侵入による傷などが本菌の侵入、感染部位となり感染率、感染菌量が増大することにより発病が激化するものと考えた。

ダイズ落葉病菌は土壌中に埋められた罹病茎内で10カ月以上生存することから、罹病残さが感染源として重要であると考えられた(Lai, 1968)。ダイズ罹病茎は湿室中で多量の分生胞子を形成し、その最適温度は18°Cであった(Lai and Dunleavy, 1969a)。莢を除く全ての残さ上で胞子形成が認められたが、その形成率は植物体の部位によって異なり、最も胞子形成が多かったのは第2節の直上部であった(Lai and Dunleavy, 1969b)。また、実験室中で土壌に埋められた罹病茎上に分生胞子が形成されることが観察され(Lai and Dunleavy, 1969c)、さらに、圃場のダイズ罹病残さ上にもダイズ落葉病菌の分生胞子が形成されることが明らかとなった(Gray, 1972)。アズキ落葉病についても、圃場から採取したアズキ罹病茎上の胞子形成が希釈平板法によって調べられ、乾物重1g当たり $10^4$ 個程度の形成が認められた(土屋、1976)。

土壌中のダイズ落葉病菌分生胞子の発芽に与える土壌含水率の影響が検討され、23°Cにおいては含水率20%の土壌(Webster silt clay soil)が最も発芽率が高く、70%の胞子が発芽した(Lai and Dunleavy, 1969b)。

ダイズ落葉病菌の土壌中での生存形態に関しては、145 $\mu$ m以下の土壌分画中からは病原菌が検出されず、それ以上の分画でのみ検出されたことから、土壌中で分生



胞子は単独で存在せず、罹病茎の組織内で生存すると考えられた(Gray, 1972)。

アズキ落葉病においても感染源としての罹病残さの重要性が検討された。殺菌土壌に残さを混入した区では100%の個体が発病し、無処理区では全く発病が認められなかった。このことからアズキ罹病残さは感染源として大きな役割を持つことが示唆された(土屋、1976)。さらに、ふるいをかけて残さを除去した土壌と無処理の土壌にアズキを播種したところ、残さ除去区においても明らかに発病は認められたが、無処理区に比べて発病株数・発病程度はともに低かった。これらのことから、アズキ落葉病菌の感染源は主に罹病残さであると考えられた(土屋、1976)。

土壌中の病原菌の生態を研究する際、検出と定量のための優れた選択培地は必要不可欠である。土壌からの検出に優れたアズキ落葉病菌の選択分離培地が開発された(Kobayashi *et al.*, 1981)。この培地により、発病圃場の土壌中菌量が定量され、発病指数との間に正の相関が認められた(小林ら、1984)。また、硫酸銅を800ppm含む選択培地がダイズ落葉病菌の土壌あるいは罹病組織からの分離に有効であることが報告された(Mengistu *et al.*, 1991)。

発病圃場の土壌懸濁液中の菌量と、それを10 $\mu$ mのミリポアフィルターでろ過したろ液中の菌量とをアズキ落葉病菌選択分離培地を用いて比較したところ、無処理懸濁液中の菌量の約60%がろ液から検出された。この結果から、アズキ落葉病菌は土壌中で遊離胞子の形態でも生存していることが明らかとなった(Kobayashi *et al.*, 1981)。罹病残さを加えた土壌中のアズキ落葉病菌菌量は残さを加えない土壌よりも高くなった。これらのことから、土壌表面あるいは土壌中に残存する罹病残さ上に多量の分生胞子が形成され、これが雨露によって土壌中に混入し、菌量を増加させ感染源になると考えられた(近藤・小林、1983b)。

ポットにつめた殺菌土壌および無殺菌土壌にアズキ落葉病菌の分生胞子を接種し、これを野外に放置してその生存期間が検討された。殺菌土壌では270日以上、無殺菌土壌でも100日間生存することが明らかとなった(土屋、1976)。アズキ落葉病菌の分生胞子は風乾状態の土壌では15 $^{\circ}$ Cと25 $^{\circ}$ Cでほとんど生存できなかったが、湿潤状態では25 $^{\circ}$ Cでも200日以上生存する場合があり、また、湿潤状態において4 $^{\circ}$ Cと15 $^{\circ}$ Cでは1年半以上生存するなど温度・湿度ともに広い範囲で長期間生存することが明らかとなった。また、本分生胞子は土壌中での発芽率が低く、このことが長期生存と何らかの関わりがあるものと考えられた(近藤・小林、1983c)。

ダイズ落葉病の防除法としてダイズ作付の間に3年間他の作物を栽培することが有効であるとされた(Allington and Chamberlain, 1948)。また、ダイズ落葉病の発生



拡大の要因として4年輪作（トウモロコシ、ダイズ、オートムギ、牧草）からトウモロコシとダイズの2年輪作体系への移行が指摘された（Dunleavy, 1966）。この事実を受けて、トウモロコシ・ダイズの2作物のみの輪作でダイズ落葉病を防除する方法が検討され、トウモロコシの前作5年で発病を完全に抑制できることが明らかとなった（Dunleavy and Weber, 1967）。その後ダイズ落葉病に抵抗性の品種が開発され、現在では輪作による防除よりも実際的かつ効果的であることが報告されている（Tachibana, 1988; Tachibana *et al.*, 1989）。

アズキ落葉病に抵抗性の強い品種としてハツネショウズが1985年に農林水産省の新品種に認定され、北海道の奨励品種に決定した。しかし、ハツネショウズは普及の進んでいるエリモショウズに比べ、子実の品質や収量性の点でやや劣ることからより品質のよい系統の育成が試みられている（足立ら、1988）。

また、湛水処理により、アズキ落葉病菌菌量ならびにその発病が著しく低下することから、水田転作地帯では田畑輪換が本病の防除に効果的であることが明らかとなった（田中ら、1984）。

もう一つの防除法として輪作が挙げられ、アズキ落葉病はトウモロコシや牧草（主としてイネ科）を栽培した圃場では発生被害が軽微であることが報告されている（土屋、1976；青田ら、1984）。さらに、トウモロコシ、ダイズ、各種マメ科牧草栽培による土壌中のアズキ落葉病菌の菌量変化が調べられ、トウモロコシ、ダイズの栽培により菌量は著しく低下し、また各種マメ科牧草の栽培によっても菌量が減少することが報告された（近藤・小林、1983a）。しかし、この菌量低下の機構は明らかになっていない。

以上のように、アズキ落葉病に対する有効な防除法は、抵抗性品種の利用、田畑輪換による湛水処理およびトウモロコシを中心とした輪作などの耕種的防除法である。抵抗性品種の利用に関しては、品質との両立の問題があり、現在までにハツネショウズより優れた実用品種は知られていない。湛水処理は短期間（90～120日）であっても、病原菌菌量の低下とそれに伴う発病低減効果は大きい。これは経営面から現実的とはいえず、普及していない。輪作も同様に、経営的に栽培可能な作物に限られるため、有効とされる長期輪作を維持することは困難である。したがって、北海道のアズキ栽培の大きな障害である本病を効率的に防除する新しい方法が望まれる。そこで、本研究では、発病低減に有効なトウモロコシ栽培によるアズキ落葉病菌の菌量低下機構を解明し、本病の防除に利用可能な情報を提供することを試みた。



### 第3章 各種作物栽培によるアズキ落葉病菌菌量の変化

アメリカで発生したダイズ落葉病は、トウモロコシ5年ダイズ1年の輪作体系で完全に防除可能であることが報告された(Dunleavy and Weber, 1967)。このことからアズキ落葉病の防除法としてトウモロコシの利用が注目された。実際に、トウモロコシ前作により本病の被害は著しく軽減された(土屋、1976; 青田ら、1984)。次に、トウモロコシ栽培により土壌中の病原菌菌量が著しく低下することが明らかとなった(近藤・小林 1983a)。これらの事実より、トウモロコシ栽培が菌量低下に特異的な作用を持つことが示唆された。

筆者は菌量低下の場はトウモロコシ根圏であると考え、アズキを対照として根圏土壌中の本菌菌量を調査した。また、栽培土壌全体の菌量を評価するために、畝と畝の間の土壌(畝間土壌と呼ぶ)中の菌量も同時に調査した(相馬ら、1991a)。この予備的な試験の結果、トウモロコシ根圏と同様にアズキ根圏でもアズキ落葉病菌菌量の著しい低下が認められた。また、畝間土壌中の菌量はトウモロコシ栽培では減少したが、アズキ栽培では減少しなかった。

根圏土壌中では同様に菌量低下が認められるのに対し、畝間土壌中の菌量変化には差がある原因として、トウモロコシとアズキの根系の違いがある。すなわち、根系の分布範囲と密度の小さいアズキは、根圏での菌量低下の効果を土壌の広い範囲に広げることができなかつたと考えた。

この仮説を検討するため、トウモロコシ、アズキ根圏ならびに畝間土壌中の菌量を調査し、同時に畝間土壌中の根の量を比較した。また、トウモロコシとアズキに加えて、ダイズとコムギの効果を検討するため同様の実験を行った。

#### 1. 北海道大学農学部附属農場内小実験区での試験(1991年)

##### 材料および方法

##### a) 実験区

1991年4月に1m四方の実験区を北大農学部・植物寄生病学講座圃場内に4カ所設けた。これら実験区には同圃場内のアズキ落葉病自然汚染土をつめた。土壌は約1cm目のふるいをかけて用いた。実験区にはそれぞれトウモロコシ、アズキ、ダイズ、ならびにコムギを栽培し、品種はハニーバンタム、エリモシヨウズ、中生光黒、チホクコムギとした。播種は1991年5月22日に行い、同年9月まで栽培した。栽植密度は5列(15cm間隔)、6株(株間12cm)とし、一株当たり3粒播種した。本



実験ではこのときの列を畝とした。

#### b)アズキ落葉病菌菌量の定量

アズキ落葉病菌菌量の定量は選択分離培地 (Kobayashi *et al.*, 1981)を用いた希釈平板法によった。各希釈段階ごとに3反復の平板を用い、それらの平均をとって菌量とした。選択培地上に出現した本菌のコロニーを確認するために、それらをブドウ糖加用ジャガイモ煎汁寒天培地 (PDA) のスラントに移植した。25℃で約2週間培養後、その菌叢の特徴から本菌であると確認したものを計数した。

各作物の根圏土壌の採取には水中分画法を用いた。生育中の一株を丁寧に掘り取り、根に緩く付着した土壌を落とすため、空中で静かに振とうした。さらに、この根を既知量の殺菌蒸留水を含むフラスコに入れて静かに振とうし、根に強く付着していた土壌をできるだけ落とし、根圏土壌とした。

畝と畝の中央部から土壌を採取し、畝間土壌とした。畝間土壌中の菌量は、栽培土壌全体の菌量を反映するものと考えた。根圏土壌のサンプリングのために採取した株の近傍の畝と畝の中央部から採土管 (直径5 cm、深さ5 cm、容積100 cm<sup>3</sup>) で3カ所の土壌を採取した。これらをよく混合後、1 mm目のふるいに通したものを畝間土壌のサンプルとした。

根圏土壌ならびに畝間土壌は125rpmの水平振とう機で20~30分間振とう後、希釈平板法に用いた。

#### c)畝間土壌中の根量の比較

根量を比較するために、根長密度の測定を行った。根長密度とは単位土壌容積に含まれる根の長さである。本実験では、アズキ落葉病菌菌量の調査時に採取した畝間土壌中に含まれる根の長さを測定した。畝間から採取した300cm<sup>3</sup>の土壌は1 mm目のふるいにかけて希釈平板法に用いたが、このときふるいに残った根を集め、その長さを定規を用いて直接測定した。

以上の調査は6月中旬から8月にかけて約2週間おきに行った。



### 結果および考察

図3-1に各栽培区のアズキ落葉病菌菌量の変化を示した。トウモロコシ根圏土壌中では生育初期から著しい菌量の低下が認められた。また、アズキ、ダイズ、コムギの根圏土壌中でも、生育前半ではトウモロコシほどの低下は認められないが、後半ではほとんど検出されないほどに低下した。一方、畝間土壌中の菌量はアズキ栽培区を除いた3区で減少する傾向が認められた。

同時に調査した畝間土壌中の根長密度を比較すると、アズキ栽培区とそれ以外の区の違いが認められた(図3-2)。トウモロコシ、ダイズおよびコムギ栽培区では生育と共に根長密度が増加したのに対し、アズキ栽培区ではほとんど横ばいであった。

次に、以上の結果をもとに、畝間土壌中のアズキ落葉病菌菌量と根長密度の関係をグラフに表した(図3-3)。このグラフから、根長密度が大きい作物(トウモロコシ、ダイズ、コムギ)の栽培は畝間土壌中の菌量を低下させ、根長密度が小さいアズキ栽培では菌量が低下しなかったことが読み取れる。つまり、供試した4作物は、いずれもその根圏ではアズキ落葉病菌菌量を低下させるが、その根圏効果を土壌の広い範囲に広げることができる作物(根長密度の大きい作物)のみが畝間土壌中の菌量、すなわち栽培土壌全体の菌量を低下させることができたと考えられる(Souma *et al.*, 1995)。



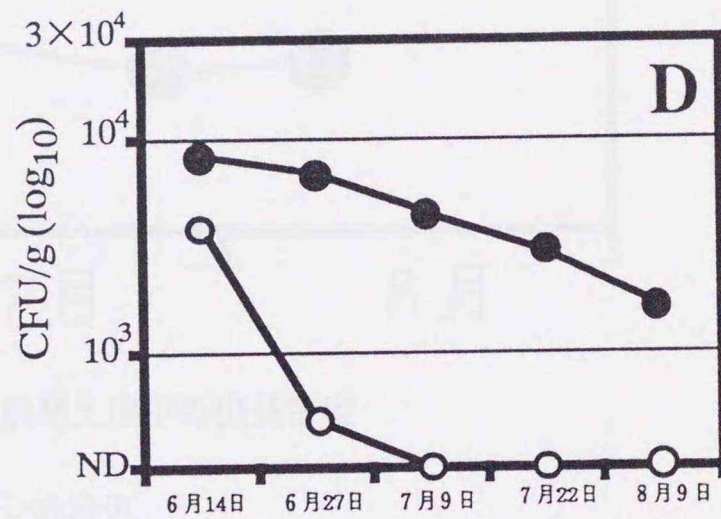
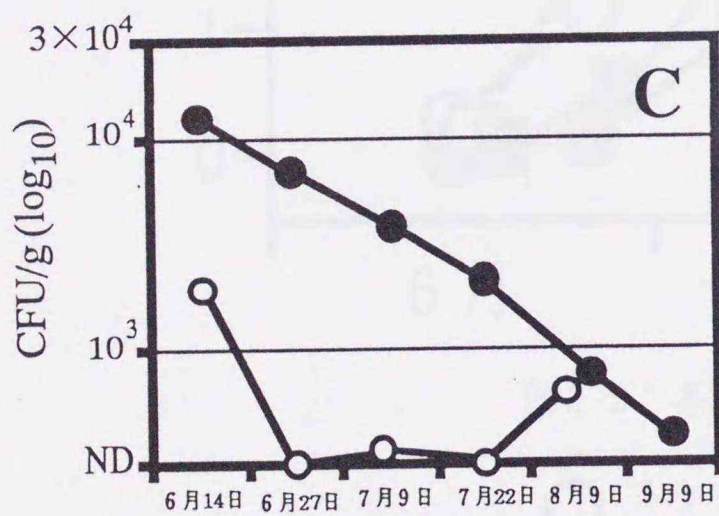
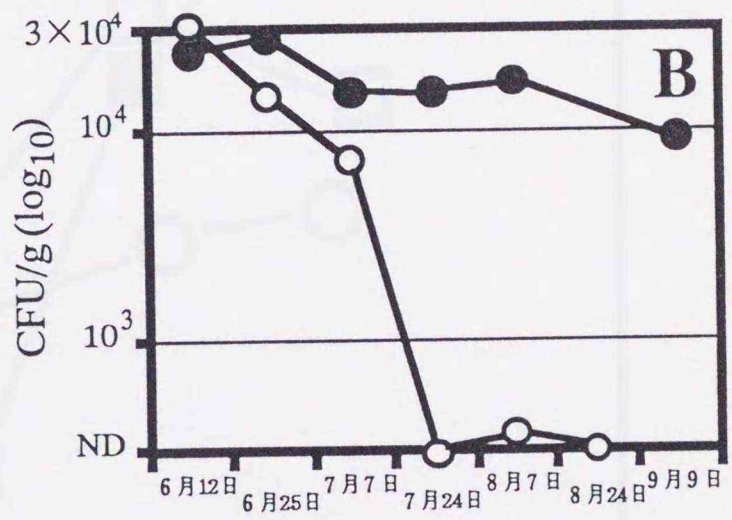
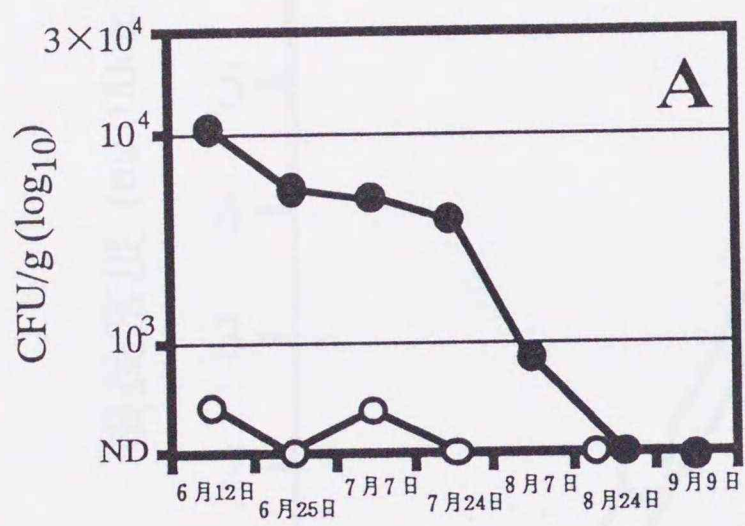


図3-1 各作物栽培区のアズキ落葉病菌菌量の変化  
 A;トウモロコシ栽培区 B;アズキ栽培区 C;ダイズ栽培区 D;コムギ栽培区  
 ○ 根圏土壌 ● 畝間土壌



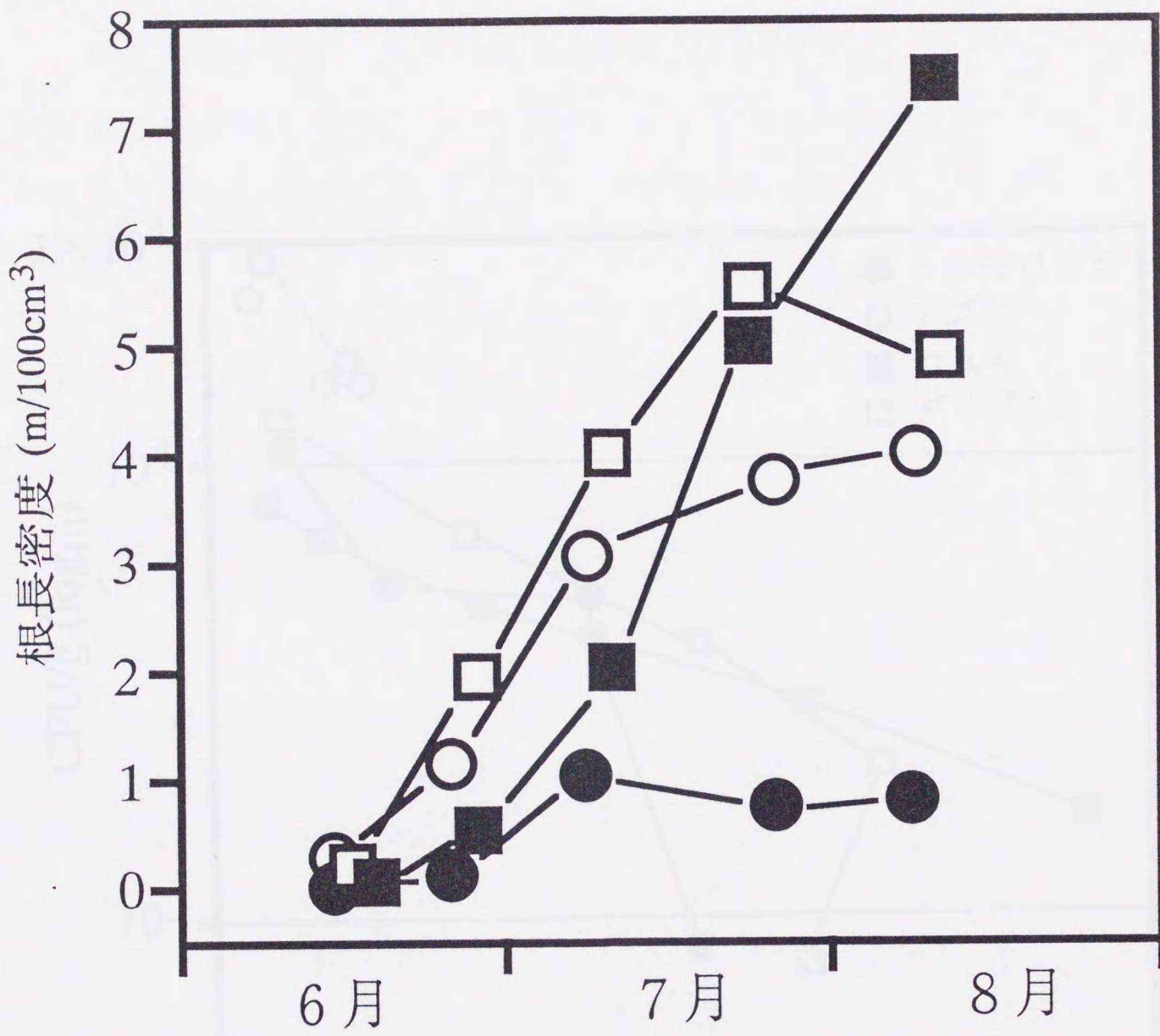


図3-2 各栽培区畝間土壌中の根長密度

- トウモロコシ栽培区
- アズキ栽培区
- ダイズ栽培区
- コムギ栽培区



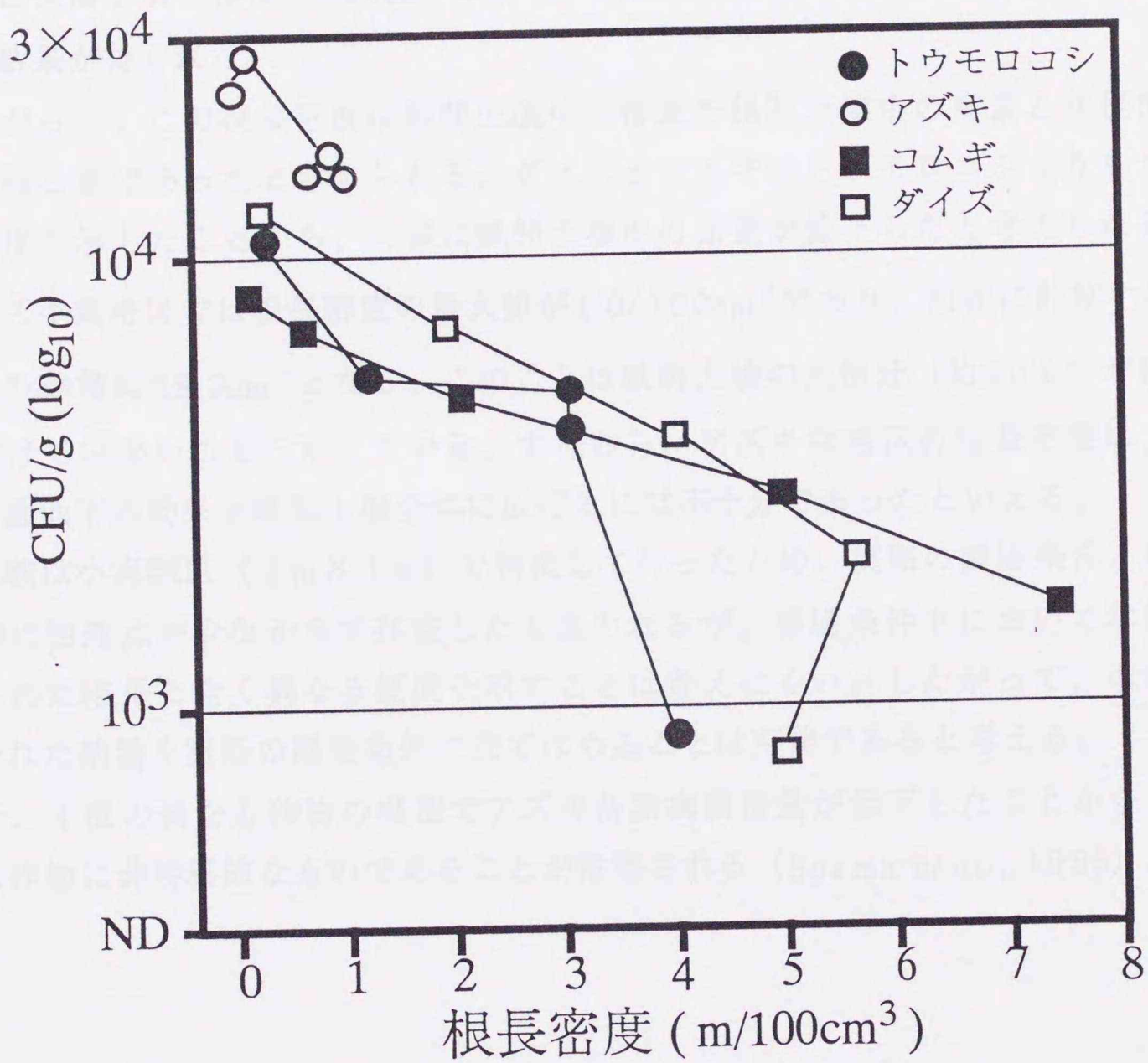


図3-3 畝間土壌中のアズキ落葉病菌菌量と根長密度の関係 ND: 検出されなかった。



アズキと他の3作物の間で根長密度に大きな違いがあることが明らかになったが、その根長密度が畝間土壌中の菌量を低下させるのに十分な量であったかどうか検討する必要がある。一般に、根圏効果の及ぶ範囲は根から数mmの範囲であるとされている (Curl and Truelove, 1986)。そこで、ここではこの範囲を根から半径3mmと考えて、畝間土壌中に占める根圏土壌の割合を試算する。トウモロコシは8月に根長密度が最大となり、 $4.0/100\text{cm}^3$ となった。根の周り半径3mmが根圏と考え計算すると根圏土壌の体積は $113\text{cm}^3$ となり、畝間土壌のほとんどが根圏土壌であったという結果が得られた。

したがって、この根長密度は畝間土壌中の菌量を根圏土壌中の菌量と同程度に低下させ得る量であったと考えられる。ダイズとコムギはトウモロコシよりも大きな根長密度を示したことから、同様に畝間土壌中の菌量が低下したと考えられる。一方、アズキ栽培区では根長密度の最大値が $1.0/100\text{cm}^3$ であり、同様に計算すると根圏土壌の体積は $28.3\text{cm}^3$ となる。このことは畝間土壌の大部分(約70%)が根の影響を受けていないことを示している。すなわち、アズキ栽培区の根長密度は、根圏での菌量低下の効果を畝間土壌全体に広げるには不十分であったといえる。

本実験は小実験区(1m×1m)で密植して行ったため、実際の圃場条件とは根系の発達に相違点が少なからず存在したと思われるが、圃場条件下において本実験から得られた結果と全く異なる傾向を示すことは考えにくい。したがって、本実験から導かれた結論を実際の圃場条件に当てはめることは可能であると考えられる。

また、4種の異なる作物の根圏でアズキ落葉病菌菌量が低下したことから、この現象は作物に非特異的なものであることが推察される (Souma *et al.*, 1995)。



## 2. 北海道立十勝農業試験場内実験区での試験 (1992年)

北大内小実験区での試験により、トウモロコシ、アズキ、ダイズ、コムギの各根圏土壤中でアズキ落葉病菌菌量が低下し、また、その根圏効果を土壤中の広範囲に及ぼすことのできる作物（根長密度の大きい作物）を栽培することにより、土壤全体の菌量が低下することが明らかとなった。

本実験ではこれらのことが他の土壤を用いても同様であるかを検討するため、北海道立十勝農業試験場（芽室町）内に実験区を設けて試験を行った。また本実験では、密植栽培ではなく、実際の栽培と同様の栽植密度で栽培し、北大での実験と同じ結果が得られるか検討した。

### 材料および方法

#### a) 実験区

道立十勝農試圃場内のコンクリート枠（2 m×2 m）8カ所を実験区として用いた。実験区内の土壤は前年度の秋にアズキ落葉病が発病した土壤（同試験場圃場内）と入れ換え、さらにアズキ落葉病罹病残さを混入した。実験区は、無栽培区、トウモロコシ栽培区、アズキ栽培区、ダイズ栽培区、コムギ栽培区、ハイオーツ栽培区、ヒエ栽培区、ニンジン栽培区とした。ハイオーツはエンバクの野生種であり、ダイズシストセンチウの対抗植物として知られている。アズキ落葉病はダイズシストセンチウの存在で発病が助長されることから、ハイオーツ栽培によりセンチウ防除効果に加えて菌量低減効果も得ることができれば、クリーニングクロープとして有効であると考えられる。ヒエはイネ科の雑穀であり、その根系の発達が著しい。反対に、ニンジンは根系の発達が貧弱であると考え、比較のために用いた。表3-1に各作物の栽培方法を挙げた。



表3-1 各作物の栽培方法 (1992年度十勝農試実験区)

作物	品種	播種日	栽植密度
トウモロコシ	ハニーバンタム	5/20	畝間60cm、株間30cm、一本立て
アズキ	エリモショウズ	5/20	畝間60cm、株間20cm、三本立て
ダイズ	ユウズル	5/20	畝間60cm、株間20cm、三本立て
コムギ	ハルユタカ	5/20	畝間20cm、400粒/m <sup>2</sup>
ハイオーツ		5/20	畝間20cm、400粒/m <sup>2</sup>
ヒエ		7/10	畝間20cm、400粒/m <sup>2</sup>
ニンジン	鮮紅七寸人参	5/20	畝間40cm、株間10cm、一本立て

b) アズキ落葉病菌菌量の定量

各作物の根圏土壌中のアズキ落葉病菌菌量を調査した。この調査は6月22日から8月26日まで約2週間おきに5回行った。ただし、ヒエは播種時期が遅かったため7月29日から3回行った。根圏土壌のサンプリング方法ならびに病原菌の定量方法は第3章の1と同様である。

畝間土壌中の菌量は、各作物とも根圏土壌中菌量の調査と同時に行った。各栽培区で畝幅が異なるが、いずれも畝と畝の中央部から土壌を採取し畝間土壌とした。土壌採取は内径5cm、長さ40cmの採土管を用い、土壌深度2～7cmの部分を行った。また、採取は根圏土壌中菌量調査で採取した株の近傍の3カ所から行い、これら3サンプルをよく混和して畝間土壌とした。アズキ落葉病菌菌量の定量方法は第3章1に準じた。さらに、本実験では無栽培区の土壌中菌量も同時に調査した。

土壌中の根の分布と菌量低下の関係を明らかにするために、作物からの距離と土壌深度の異なる土壌を採取し、根長密度とアズキ落葉病菌菌量を調査比較した。この調査は根の成長がほぼ完了したと思われる生育後期の8月13、26日にトウモロコシ栽培区、コムギ栽培区で行った。トウモロコシ栽培区では株から5cm離れた位置と畝と畝の中央部(株からの距離30cm)から土壌を前述の採土管で採取し、前者を株元土壌、後者を畝間土壌とした。同時に、それぞれについて深度の異なる3土壌を採取し、深度は2～7、7～12、12～17cmの3種類とした。以上のように合計で6種類の土壌サンプル中のアズキ落葉病菌菌量と根長密度を調査した。調査方法は第3章1に準じた。コムギ栽培区では畝と畝の中央部でトウモロコシ栽培区と同様の深度から3種の土壌を採取し、それぞれについてアズキ落葉病菌菌量と根長密度を調査した。



### c) 根圏微生物相の予備調査

根圏土壌中のアズキ落葉病菌の変動と他の微生物の関係を検討するため根圏微生物相を予備的に調査した。

トウモロコシ根圏については6月22日、8月13日の2回行った。コムギ根圏は7月29日、8月13日の2回行った。アズキ、ヘイオーツはそれぞれ6月22日、7月29日に行った。根圏土壌のサンプルはアズキ落葉病菌菌量の定量に用いたものとした。また、対照として8月13日に無栽培区の微生物相の調査を行った。

調査は全細菌数、色素耐性細菌数、耐熱細菌数、蛍光性*Pseudomonas*数、糸状菌数、放線菌数について行った。全細菌数、糸状菌数、放線菌数はそれぞれ10% tryptic soy agar (DIFCO)、ローズベンガル寒天培地、素寒天培地を用い希釈平板法によって調査した。色素耐性細菌はクリスタルバイオレットとニュートラルレッドを含むviolet red bile agar上で検出した。蛍光性*Pseudomonas*はKing's B medium上に形成されたコロニーに365nmの紫外線を照射し、蛍光を発したものとした。また、土壌希釈液を60℃30分の温湯処理後、10% tryptic soy agar上で増殖した細菌を耐熱細菌として計数した。コロニーの計数は25℃で5～7日間培養後に行った。

### 結果および考察

各栽培区における根圏土壌中ならびに畝間土壌中のアズキ落葉病菌菌量の変化を図3-4に示した。無栽培土壌中での本菌菌量は4月では $10^5$  cfu/g以上であったが、8月の調査では約10分の1の $10^4$  cfu/gに減少した。したがって、何も栽培していない土壌中でも菌量は緩やかに低下することがわかる。しかし、 $10^4$  cfu/gという菌量は激しい発病を起こすのに十分な量である。一方、トウモロコシ栽培区畝間土壌中菌量は4月には $6 \times 10^5$  cfu/gと非常に高く、その後徐々に減少し、8月最後の調査では約 $4 \times 10^3$  cfu/gまで低下した。しかし、トウモロコシ栽培による菌量低下の程度は無栽培区の約2分の1程度にとどまったといえる。

トウモロコシ根圏では、1991年の北大圃場での実験においてほとんど検出されないほどの菌量低下が認められたが、本実験ではそのような顕著な菌量低下は認められず、 $10^4$  cfu/g以上の高い菌量で推移した。このように、根圏土壌中において十分な菌量低下が起きなかったことが畝間土壌中の菌量が低下しなかった原因であると考えられる。また、1991年の実験ではアズキ、ダイズ、コムギの各根圏土壌中で菌量低下が認められたが、本実験では同様の結果を得ることができなかった。アズキ



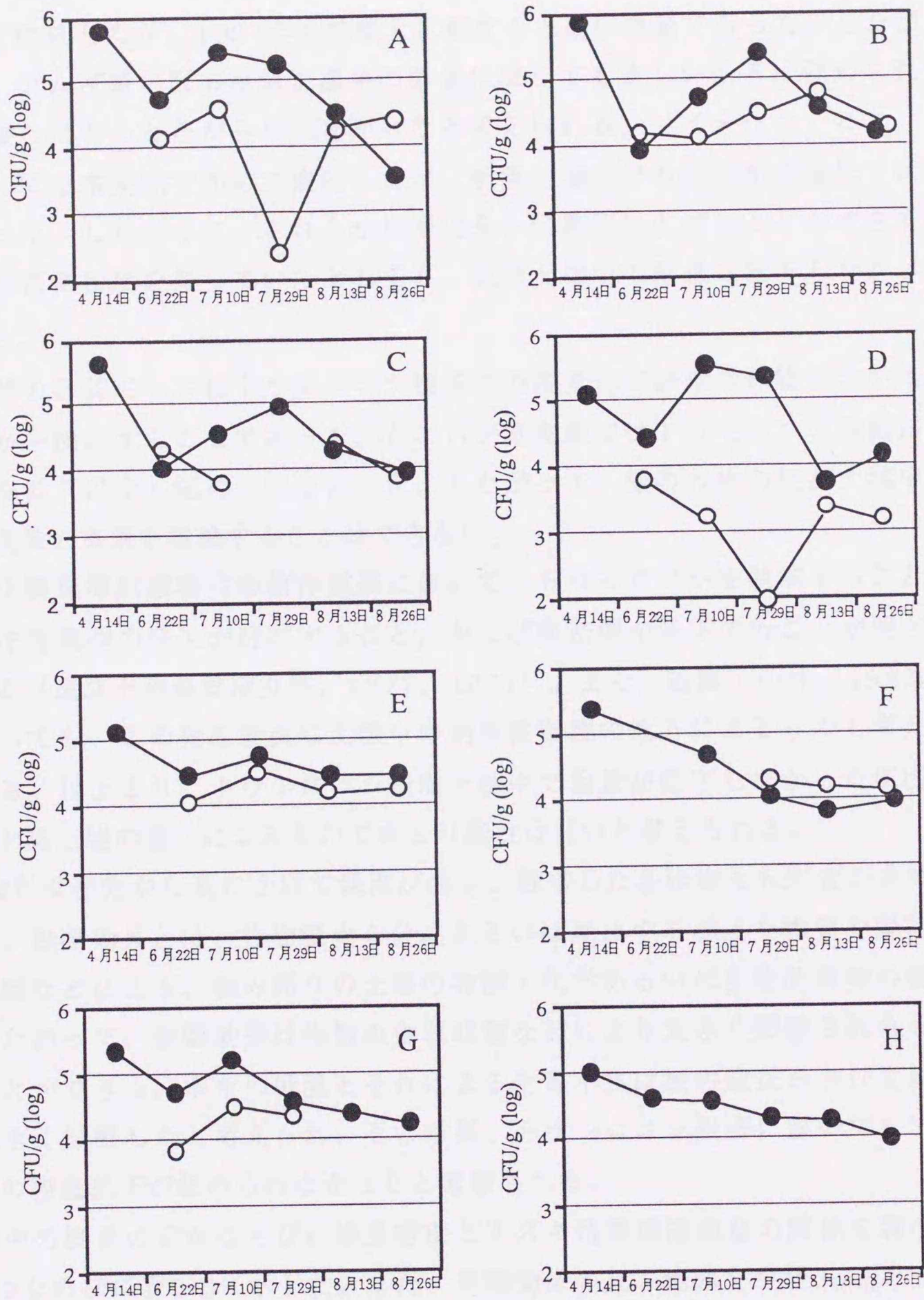


図3-4 各栽培区のアズキ落葉病菌菌量の変化

A: トウモロコシ栽培区 B: アズキ栽培区 C: ダイズ栽培区  
 D: コムギ栽培区 E: ヘイオーツ栽培区 F: ヒエ栽培区  
 G: ニンジン栽培区 H: 無栽培区

○ 根圏土 ● 畝間土



とダイズ根圏では $10^4$  cfu/g以上の高い菌量で推移し、コムギ根圏では $10^3$  cfu/gのオーダーで推移したが、1991年の結果と比較すると高い菌量であった。したがって、ダイズ、コムギ栽培区の畝間土壌中の菌量に関しても著しい低下は認められず、無栽培土壌とほとんど差がみられなかったと考えられる。ヘイオーツ、ヒエ、ニンジンに関しては本実験で初めて検討したが、根圏土壌中での顕著な菌量低下は認められなかった。したがって、これらが根圏効果を広範囲に広げることのできる根系の大きさと根長密度を持っていたとしても、畝間土壌中の菌量は低下しなかったと考えられる。

本実験の目的の一つはトウモロコシ根圏での菌量低下が他の作物においても認められるかを検討することであった。ところが本実験ではトウモロコシ根圏においても顕著な低下は全く認められなかった。したがって、他の作物の根圏土壌中での菌量低下現象の有無を議論することはできない。

道立十勝農業試験場内の輪作試験において、トウモロコシを栽培することによってアズキ落葉病の発生が軽減すること、および菌密度が低下することが明らかとなっている（道立十勝農試病虫科、1977、1981）。また、近藤・小林（1983a）の報告によっても、この発生軽減は土壌中の病原菌密度の低下によるものと考えられることができる。以上より、トウモロコシ根圏土壌中で菌量が低下しなかった原因は北大土壌と十勝土壌の違いによるものである可能性は低いと考えられる。

1992年は春先から夏にかけて低温が続き、栽培した各作物とも生育がきわめて悪かった。根圏効果とは、作物根から分泌あるいは浸出する様々な物質や脱落した根表皮組織などによる、根の周りの土壌の物理・化学あるいは生物的環境の変化である。したがって、根圏効果は作物の生理状態などにより大きく影響されるものと考えられることができる。本年の低温とそれによる生育不良は根の成長および生理的活性にも大きく影響したと考えられ、その結果、トウモロコシ根圏においてもアズキ落葉病菌の菌量低下が認められなかったと考察される。

土壌中の根系の分布ならびに根長密度とアズキ落葉病菌菌量の関係を調べた結果を表3-2ならびに表3-3に示した。また、根圏効果の及ぶ範囲を半径3mmとし、根長密度から試算した根圏効果の及ぶ土壌の割合もあわせて示した。この試算によると、トウモロコシ栽培区では株元土壌（8月26日調査）は全体的に根圏効果を受ける結果となった。また、より離れた畝間土壌中も同様の試算から60%以上が根圏効果を受けたであろう結果となった。したがって、根圏土壌中で著しい菌量の低下が認められた場合は株元土壌と畝間土壌中でも菌量が低下していたと考えられる。一方、



本実験結果では根圏土壌中菌量は $2 \times 10^4$  cfu/g以上と高かったにもかかわらず、株元土壌、畝間土壌の一部で $10^3$  cfu/gレベルまで低下した。この菌量低下の原因は不明であり、サンプルによる誤差である可能性が高い。コムギはトウモロコシよりも栽植密度が高いため根長密度も大きく、畝間土壌のほとんどが根圏効果を受けたと考えられる。コムギ根圏土壌中では他の作物よりも菌量低下が大きく、 $10^3$  cfu/gレベルであった。したがって、例外はあるものの（8月13日の7~12cmでは $1.1 \times 10^4$  cfu/g、8月26日の2~7cmでは $1.5 \times 10^4$  cfu/g）、畝間土壌中菌量もそれに近い菌量となったと考えられる。

トウモロコシ、コムギ栽培区共に一般的栽植密度で栽培したが、密植条件であった1991年の実験と同じかそれ以上の根長密度となることが明らかとなった。したがって、これらの作物は通常の栽培条件においても菌量を低下させるのに十分な根量に達すると考えられる。



表3-2 土壌中のアズキ落葉病菌菌量と根長密度 (8月13日調査)

土壌	深度 (cm)	アズキ落葉病菌 菌量 ( $\times 10^2$ cfu/g)	根長密度 (mm/100cm <sup>3</sup> )	試算による根圏土壌の割 合 (%) *1
トウモロ コシ栽培区				
株元土壌	2~7	40	1711	48.3
	7~12	27	1761	49.8
	12~17	8.5	3139	88.7
畝間土壌	2~7	330	676	19.1
	7~12	290	1572	44.4
	12~17	36	2358	66.6
根圏土壌		200		
コムギ 栽培区				
畝間土壌	2~7	57	2091	59.1
	7~12	110	7607	215.0
	12~17	12	9455	267.2
根圏土壌		24		

\*1 根圏効果の及ぶ範囲を根からの半径3mmとし、根の太さを考えずに試算した根圏土壌の体積が畝間土壌に占める割合



表3-3 土壌中のアズキ落葉病菌菌量と根長密度 (8月26日調査)

土壌	深度 (cm)	アズキ落葉病菌 菌量 ( $\times 10^2$ cfu/g)	根長密度 (mm/100cm <sup>3</sup> )	試算による根圏土壌の割 合 (%) *1
トウモロ コシ栽培区				
株元土壌	2~7	29	6338	179.1
	7~12	160	3543	100.1
	12~17	26	8204	231.8
畝間土壌	2~7	37	2108	59.6
	7~12	44	2748	77.7
	12~17	39	4113	116.2
根圏土壌		250		
コムギ 栽培区				
畝間土壌	2~7	150	4988	141.0
	7~12	24	5602	158.3
	12~17	21	6812	192.5
根圏土壌		15		
無栽培土壌				
	2~7	100		
	7~12	60		
	12~17	52		

\*1 根圏効果の及ぶ範囲を根からの半径3mmとし、根の太さを考えずに試算した根圏土壌の体積が畝間土壌に占める割合



各栽培区の根圏微生物相ならびに無栽培土壌の微生物相を調査した結果を表3-4~6に示した。表3-4には6月22日と8月13日に調査したトウモロコシ根圏微生物相を示し、表3-5には7月29日と8月13日調査のコムギ根圏微生物相を示した。さらに表3-6にはアズキとハイオーツの根圏微生物相ならびに無栽培土壌の微生物相を示した。

表3-4 トウモロコシの根圏微生物相 (cfu/g)

	6月22日	8月13日
全細菌	$1.9 \times 10^8$	$1.6 \times 10^8$
蛍光性 <i>Pseudomonas</i>	$1.1 \times 10^6$	$6.7 \times 10^5$
色素耐性細菌	$8.2 \times 10^6$	$4.7 \times 10^6$
耐熱細菌	$3.6 \times 10^6$	$5.0 \times 10^6$
糸状菌	$2.2 \times 10^5$	$6.8 \times 10^5$
放線菌	$4.1 \times 10^6$	$9.1 \times 10^6$

表3-5 コムギの根圏微生物相 (cfu/g)

	7月29日	8月13日
全細菌	$3.0 \times 10^7$	$1.6 \times 10^8$
蛍光性 <i>Pseudomonas</i>	$5.0 \times 10^5$	$2.8 \times 10^6$
色素耐性細菌	$3.5 \times 10^6$	$5.4 \times 10^7$
耐熱細菌	$3.5 \times 10^6$	$3.4 \times 10^6$
糸状菌	$8.0 \times 10^5$	$1.6 \times 10^6$
放線菌	$5.4 \times 10^6$	$6.1 \times 10^6$



表3-6 アズキ、ハイオーツ根圏土壌ならびに無栽培区の微生物相 (cfu/g)

	アズキ根圏 (6月22日調査)	ハイオーツ根圏 (7月29日調査)	無栽培区 (8月13日調査)
全細菌	$2.1 \times 10^8$	$4.7 \times 10^7$	$1.4 \times 10^8$
蛍光性 <i>Pseudomonas</i>	$1.1 \times 10^7$	$1.3 \times 10^6$	$4.9 \times 10^4$
色素耐性細菌	$1.5 \times 10^7$	$3.9 \times 10^6$	$8.2 \times 10^6$
耐熱細菌	$4.6 \times 10^6$	$3.3 \times 10^6$	$4.3 \times 10^6$
糸状菌	$5.7 \times 10^5$	$3.3 \times 10^5$	$4.5 \times 10^5$
放線菌	$5.4 \times 10^6$	$3.7 \times 10^6$	$7.3 \times 10^6$

無栽培土壌の微生物相は1989年から1991年に調査した北大圃場の微生物相とほぼ同じだった(相馬ら、1991b; 相馬、1992)。すなわち全細菌数は $1 \sim 3 \times 10^7$  cfu/gであり、それに占める耐熱細菌数の割合が大きかった。また、糸状菌数、放線菌数、蛍光性*Pseudomonas*数などにも大きな違いは認められなかった(表3-6)。トウモロコシ根圏の全細菌数は無栽培区と比較して約10倍に増加した。一方で耐熱細菌数は無栽培区と同じレベルにとどまり、色素耐性細菌が10倍以上増加した。また、蛍光性*Pseudomonas*も増加した。糸状菌数、放線菌数は無栽培区と比較してやや増加あるいは同レベルであった。これらの根圏微生物相の特徴は北大圃場にトウモロコシを栽培したときと同様の結果であった(相馬ら、1991b; 相馬、1992)。

これらの特徴は、8月13日調査のコムギ根圏でも認められ(表3-5)、またアズキ根圏でも同様の結果だった(表3-6)。しかし、ハイオーツ根圏では全細菌数が $4.7 \times 10^7$  cfu/gと低く、色素耐性細菌数も耐熱細菌数と同レベルであり、むしろ非根圏土壌(無栽培土壌)の微生物相に近かった。

トウモロコシなど作物根圏でのアズキ落葉病菌の菌量低下には微生物の働きが関与することが示唆されている(相馬、1992)。本実験では根圏土壌中での顕著な菌量低下が認められなかったが、ハイオーツを除き、各作物の根圏微生物相は北大圃場におけるものと大きく異ならなかった。根圏土壌中で菌量が低下しなかった原因として、低温による根の生理的活性の低下とそれに伴う根圏効果の低下を考察した



が、実際には根圏微生物相に差は無く、この考察とは矛盾するように思われる。しかし、この調査では微生物の数を調べているが、根圏効果には微生物の数だけでなくその活性の関与も大きいことが推察される。したがって、本実験で根圏土壌中のアズキ落葉病菌の菌量低下が認められなかった要因として根圏微生物の活性を挙げることができる。しかし、これは単なる推測であるため実験的に確かめる必要がある。

### 3. 北海道立十勝農業試験場内実験区での試験 (1993年)

1992年の実験ではトウモロコシ根圏においても菌量の低下は認められなかった。そこで、これが北大圃場土と十勝土との違いによるものであるのか否かを検討するため1993年も同様の実験を行った。

#### 材料および方法

##### a) 実験区

1992年度に使用した道立十勝農業試験場内のコンクリート枠 (2 m × 2 m) 6カ所を用いた。実験区内のアズキ落葉病菌菌量を増やすため、1991年の秋に、同圃場内に栽培されたアズキ落葉病罹病残さを入れた。本実験では実験区内の菌量を均一にする目的で、1993年5月に表面より20cmの土壌を1 cm目のふるいでふるった。6実験区はそれぞれトウモロコシ、アズキ、コムギ、ダイズ、ハイオーツ栽培区および無栽培区とした。播種は5月28日に行い、作物の品種と栽植密度は全て1992年の実験と同様とした (表3-1参照)。

##### b) アズキ落葉病菌菌量の調査

各栽培区の根圏土壌中菌量ならびに畝間土壌中菌量を調査した。根圏土壌の調査は6月30日から9月13日まで約2週間間隔で6回行った。播種前の4月22日と播種時に各区の菌量を調査し、その後、畝間土壌の調査は根圏土壌の調査と同時に行った。根圏土壌および畝間土壌の採取法、ならびに菌量の定量方法は1992年の実験と同様に行った (第3章2の材料および方法を参照)。さらに後半3回の調査 (8月16日、30日、9月13日) では、トウモロコシ、アズキ、ダイズ栽培区の株元土壌中の菌量を調査した。またこの時、コムギ、ハイオーツ栽培区については通常の畝間



土壌（深度2～7cm）よりも5cm深い土壌中（深度7～15cm）の菌量についても調査した。

c) 根圏微生物相の調査

アズキ落葉病菌菌量を調査するための根圏土壌サンプルの微生物相を調査した。調査時、回数はb)と同様である。調査項目は全細菌数、色素耐性細菌数、耐熱細菌数、糸状菌数および放線菌数の5項目とした。調査方法は第3章2の1992年度の実験方法に準じた。

結果および考察

各栽培区のアズキ落葉病菌菌量の変化を図3-5に示した。

トウモロコシ栽培区の土壌中菌量は播種時には $3.2 \times 10^4$  cfu/gであったが、根圏土壌中では7月半ばまで約10分の1の菌量であった。しかし、その後上昇していることから、トウモロコシ根圏ではアズキ落葉病菌菌量の低下は認められなかったと判断される。コムギ根圏の菌量は他の作物と比較するとやや低下したように思われるが、北大圃場での実験のような著しい菌量低下には至らなかった。一方、アズキ、ダイズおよびハイオーツ根圏ではほとんど低下は認められなかった。さらに、各栽培区ともに畝間土壌および株元土壌中の菌量はほぼ無栽培土壌の菌量と同様の高いレベルで推移し、ほとんど低下は認められなかった。

以上の結果をまとめると、1992年の結果と同じく、トウモロコシも含め、供試した各作物の栽培による菌量の低下は起こらなかったといえる。この結果は、同じ圃場内で行われたアズキ落葉病に対する輪作試験で、トウモロコシ、大麦、チモシー前作が発病程度と土壌中菌量を低下させたという報告と一致しない（道立十勝農試病虫科、1977）。本年度も1992年以上の著しい冷夏に見舞われ、作物の生育は著しく不良であった。第3章2で考察したように、本年も生育不良による根圏効果の低下により根圏土壌中で菌量低下が認められなかったと推察される。

図3-6にトウモロコシ根圏微生物相を示した。全細菌数は $10^8$  cfu/g以上を保ち、無栽培区の土壌（非根圏土壌、表3-7）の約10倍であった。また、色素耐性細菌も根圏での増加が著しく10倍以上の増加を示し、さらに糸状菌も3～4倍の増加を示した。一方、放線菌、耐熱細菌はほとんど根圏効果を受けていない。



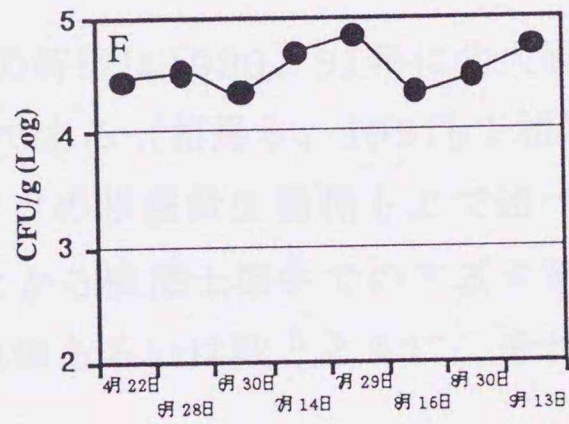
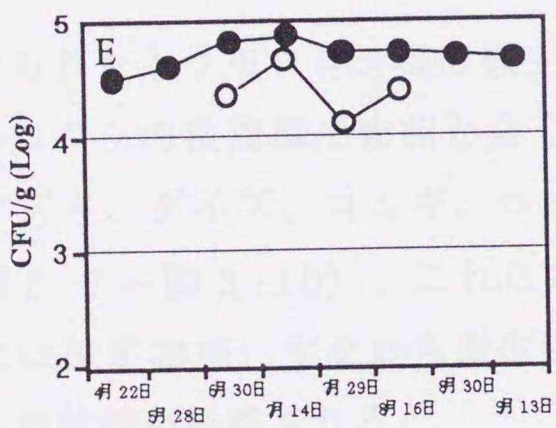
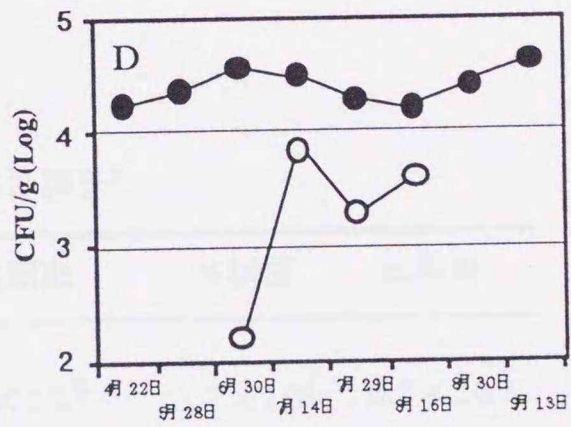
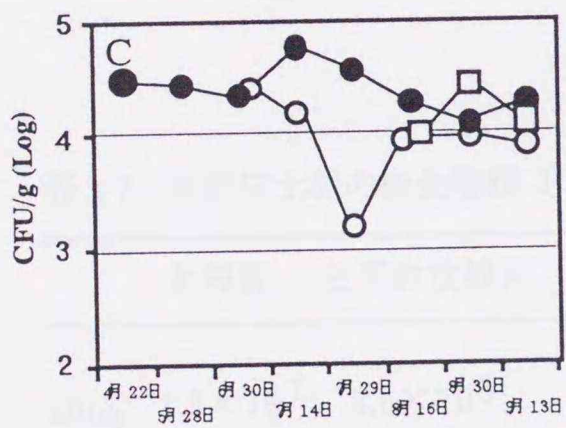
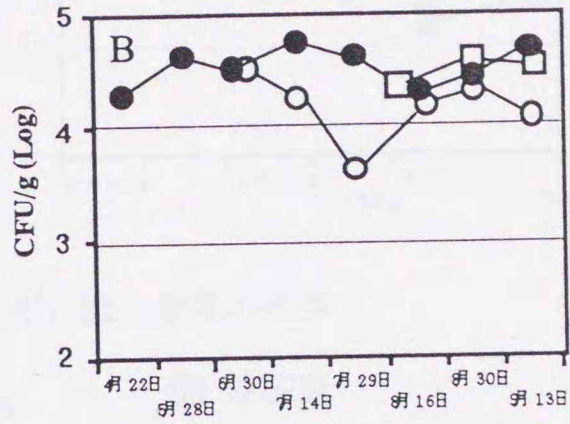
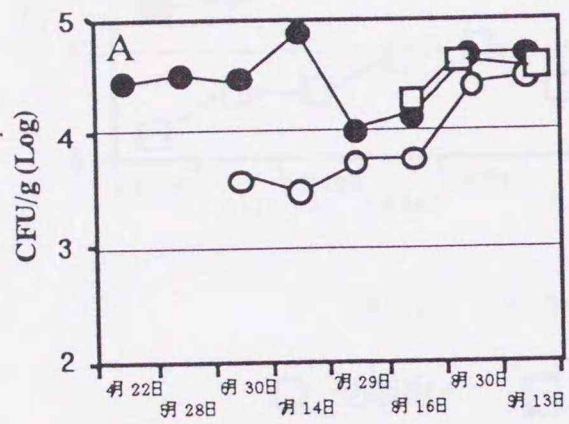


図3-5 各栽培区のアズキ落葉病菌菌量の変化  
 A トウモロコシ栽培区 B アズキ栽培区 C ダイズ栽培区  
 D コムギ栽培区 E ヘイオーツ栽培区 F 無栽培区  
 ○ 根圏土 ● 畝間土 □ 株元土

ただし、無栽培区は区内から無作為に選んだ場所から採取した土壌中の菌量



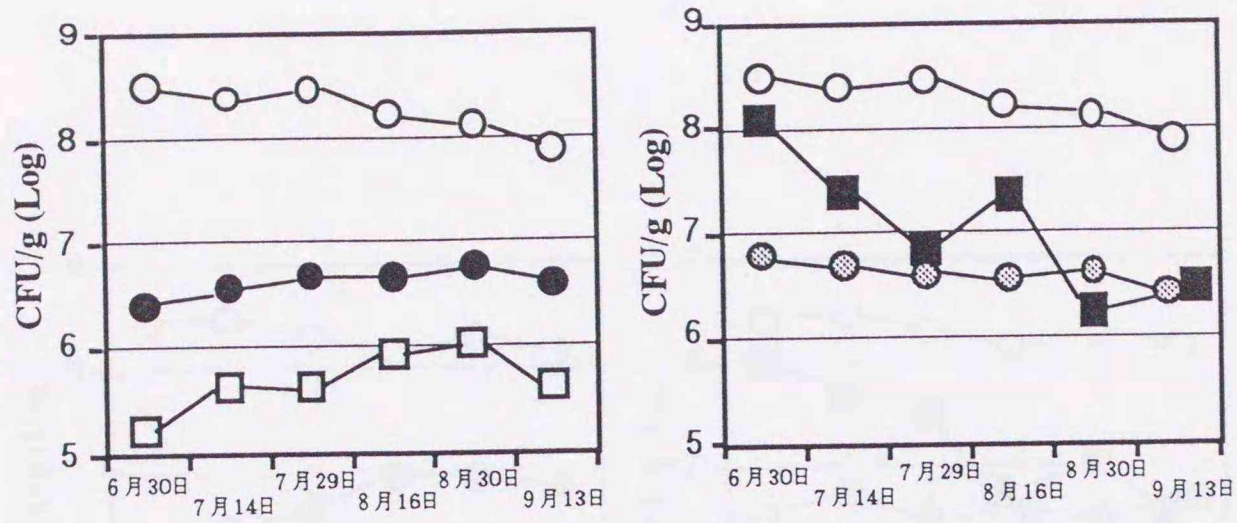


図3-6 トウモロコシ根圏微生物相の推移

○ 全細菌    □ 糸状菌    ● 放線菌  
 ■ 色素耐性細菌    ● 耐熱細菌

表3-7 無栽培土壌の微生物相 (9月16日調査)

	全細菌	色素耐性細菌	耐熱細菌	糸状菌	放線菌
cfu/g	$1.3 \times 10^7$	$2.5 \times 10^5$	$3.9 \times 10^6$	$1.7 \times 10^5$	$6.3 \times 10^6$

ここでみられたトウモロコシ根圏微生物相の特徴は1990、91年に北大圃場で栽培したトウモロコシの根圏微生物相と全く同様である(相馬ら、1991b; 相馬、1992)。同時に、アズキ、ダイズ、コムギ、ハイオーツの根圏微生物相も上で述べた特徴を示した(図3-7~図3-10)。これらのことから根圏土壌中でのアズキ落葉病菌菌量の低下には微生物相、すなわち微生物の種類あるいは数とともに、それらの活性が関与する可能性が推察される。

この可能性を検討するため、本実験と同じ十勝土壌を用いてトウモロコシやアズキなどを温室で栽培し、良好な生育下での根圏土壌中の菌量低下を検討する必要がある。



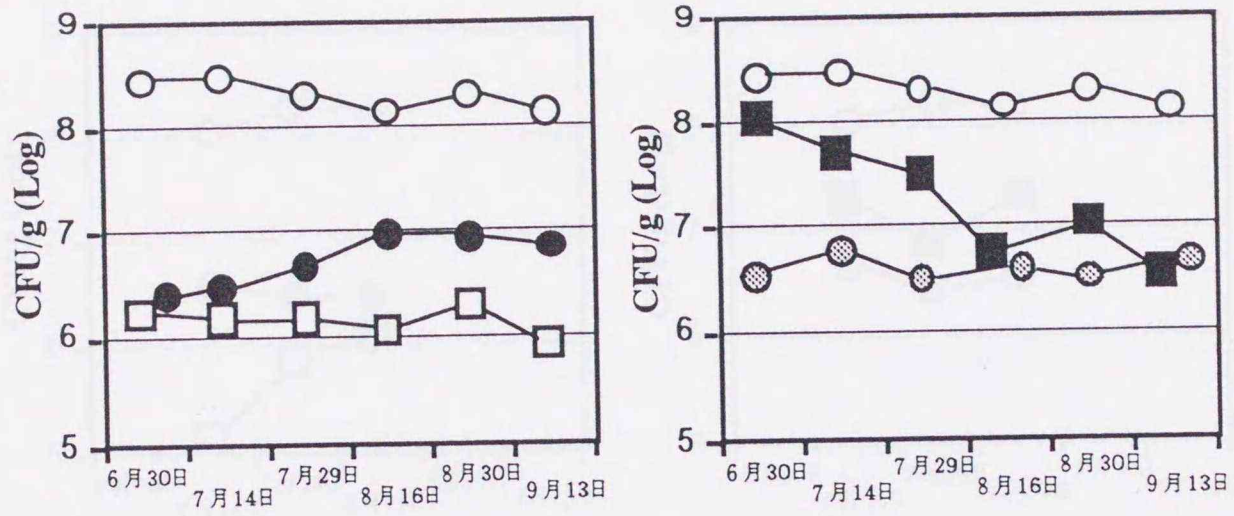


図3-7 アズキ根圏微生物相の推移

○ 全細菌    □ 糸状菌    ● 放線菌  
 ■ 色素耐性細菌    ● 耐熱細菌

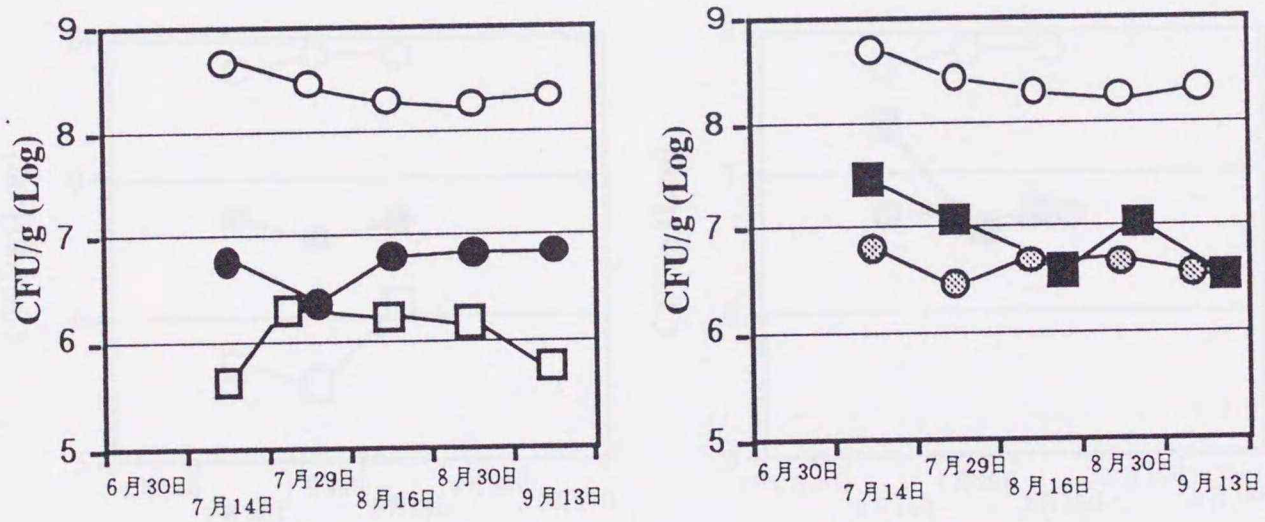


図3-8 ダイズ根圏微生物相の推移

○ 細菌    □ 糸状菌    ● 放線菌  
 ■ 色素耐性細菌    ● 耐熱細菌



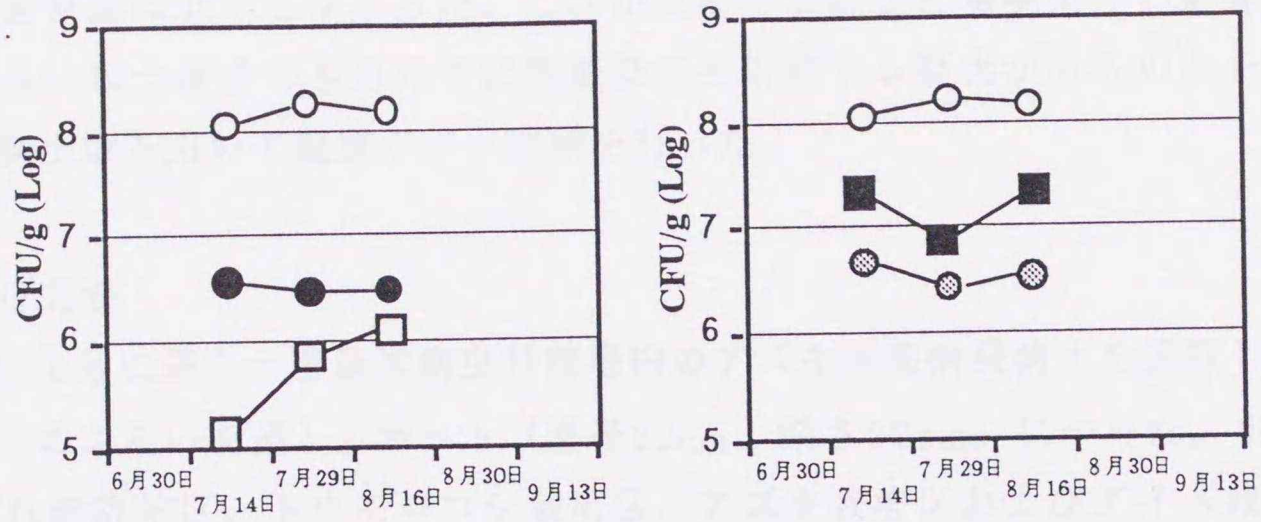


図3-9 コムギ根圏微生物相の推移

○ 全細菌    □ 糸状菌    ● 放線菌  
 ■ 色素耐性細菌    ● 耐熱細菌

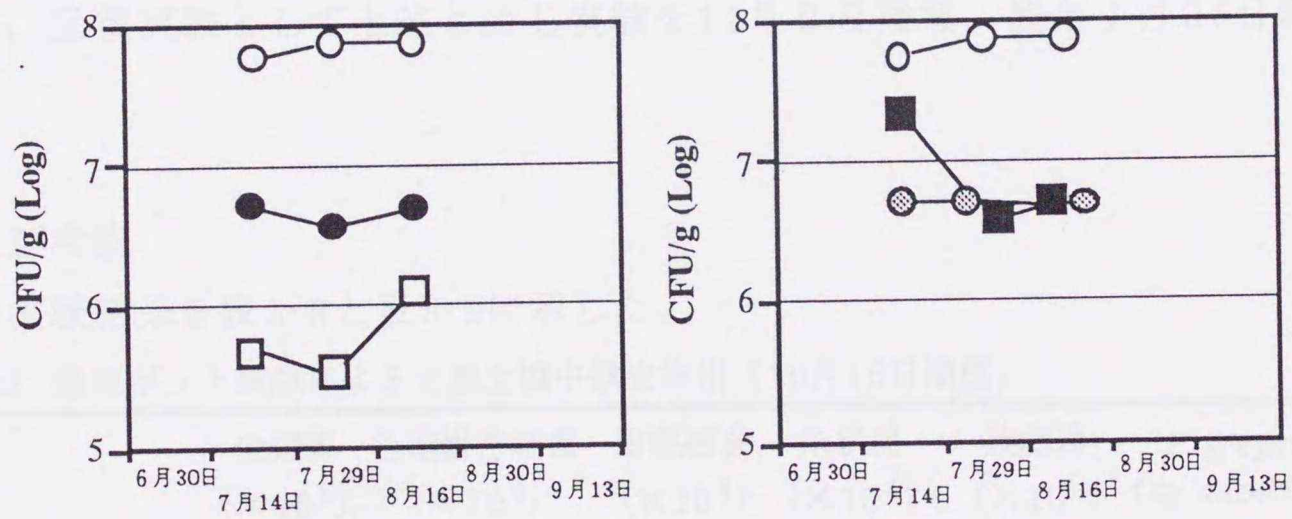


図3-10 ヘイオーツ根圏微生物相の推移

○ 全細菌    □ 糸状菌    ● 放線菌  
 ■ 色素耐性細菌    ● 耐熱細菌



#### 4. 十勝土壤を用いた温室ポット試験

2年間の十勝農試実験区を用いた圃場試験ではトウモロコシ根圏土壤中でもアズキ落葉病菌菌量は低下しなかった。これが夏期の低温など環境条件の影響によるものか、あるいは土壤そのものの中に菌量低下を阻害する要因があるのかを検討するため、十勝土壤を用いて温室ポット試験を行った。

##### 材料および方法

1993年10月に道立十勝農試病虫科圃場内のアズキ落葉病発病土を採取した。土壤は5.66mmのふるいを通し、ポット（直径22cm、深さ22cm）につめた。ポット4個をそれぞれ無栽培区、トウモロコシ栽培区、アズキ栽培区およびダイズ栽培区とし、10月16日に播種した。播種は各作物とも3カ所3粒とし、北大植物寄生病学講座温室室内で栽培した。

約1カ月後、各作物の根圏土壤中の微生物相ならびにアズキ落葉病菌菌量を調査した。サンプルは3個体供試し、第3章2の方法に準じて調査した。また同時に、無栽培区の土壤についても同様に調査した。

さらに、反復実験として上述と同じ実験を12月9日播種、翌年1月26日調査で行った。

##### 結果および考察

2回の実験結果を表3-8と表3-9に示した。

表3-8 温室ポット試験による十勝土壤中微生物相（10月16日播種）

	全細菌 ( $\times 10^6$ )	色素耐性細菌 ( $\times 10^4$ )	耐熱細菌 ( $\times 10^4$ )	糸状菌 ( $\times 10^4$ )	放線菌 ( $\times 10^5$ )	<i>P. gregata</i> f.sp. <i>adzukicola</i>
無栽培土壤	16	28	390	13	61	5600
トウモロコシ 根圏土壤	77	1800	360	77	42	<200
アズキ根圏 土壤	120	3200	410	91	41	<250
ダイズ根圏 土壤	110	230	370	31	33	250

\*単位はcfu/g



表3-9 温室ポット試験による十勝土壤中微生物相 (12月9日播種)

	全細菌 ( $\times 10^6$ )	色素耐性細菌 ( $\times 10^4$ )	耐熱細菌 ( $\times 10^4$ )	糸状菌 ( $\times 10^4$ )	放線菌 ( $\times 10^5$ )	<i>P. gregata</i> f.sp. <i>adzukicola</i>
無栽培土壤	14	83	420	36	54	16000
トウモロコシ 根圏土壤	150	6100	350	32	73	2200
アズキ根圏 土壤	180	2500	530	160	95	9200
ダイズ根圏 土壤	220	8300	390	36	54	3500

\*単位はcfu/g

1回目の実験では無栽培土壤中のアズキ落葉病菌菌量が $5.6 \times 10^3$  cfu/gであったのに対し、トウモロコシ、アズキ、ダイズの各根圏では20分の1以下に減少した。2回目の実験のアズキ根圏では顕著な低下は認められなかったが、トウモロコシとダイズ根圏では1/5ないし1/7と程度は低いが菌量の低下が認められた。このように3作物の根圏で菌量低下が認められたことから、北大土壤と同様に十勝土壤でも根圏効果によるアズキ落葉病菌の菌量低下が起こると考えられる。

各作物の根圏微生物相は2回の実験に共通して、細菌数ならびに色素耐性細菌数の著しい増加など、これまで十勝圃場試験あるいは北大圃場試験で得られた結果と同様の特徴を示した。以上のように、同じ土壤に同じ作物を栽培し、その根圏微生物相にも大きな相違がなかったことから、1992、93年の圃場試験でアズキ落葉病菌の菌量が低下しなかった原因は根圏微生物の活性低下など未知の要因にあると推察される。



## 第4章 各種作物栽培によるダイズ落葉病菌菌量の変化

ダイズ落葉病はアズキ落葉病菌 (*Phialophora gregata* f.sp. *adzukicola*) と異なる分化型である *Phialophora gregata* f.sp. *sojae* による病害である。日本では1980年に北海道で発生し報告された (青田ら、1984)。一方、アメリカでダイズ落葉病は Allington and Chamberlain (1948) によって brown stem rot of soybean として報告された。それ以来これに関する研究は多いが、土壌中の菌量に関する研究は行われていない。

1991年秋に北海道長沼町の農家圃場において本病が激発し、土壌中の菌量も  $10^6$  cfu/g 以上と高くなった。ダイズ落葉病菌もアズキ落葉病菌と同様に各種作物を栽培することにより、その根圏土壌中で菌量が低下するか否かをこの農家圃場に実験区を設けて検討した。

### 材料および方法

本実験で用いた圃場は過去10年間ダイズとコムギの交互作を行ってきた圃場で、前年度 (1991年) のダイズ栽培ではダイズ落葉病が激発した。実験に用いた作物と栽培方法は表4-1に示した。

表4-1 各作物の栽培方法 (1992年度長沼圃場実験区)

作物	品種	播種日	栽植密度
トウモロコシ	ハニーバンタム	6/1	畝間60cm、株間30cm、一本立て
アズキ	エリモショウズ	7/2	畝間60cm、株間20cm、三本立て
ダイズ	ユウズル	6/1	畝間60cm、株間20cm、三本立て
コムギ	ハルユタカ	7/2	畝間20cm、400粒/m <sup>2</sup>
ハイオーツ		6/1	畝間20cm、400粒/m <sup>2</sup>
ニンジン	鮮紅七寸人参	6/1	畝間40cm、株間10cm、一本立て

これら6種の作物の栽培区の他に無栽培区を設け、各作物の根圏土壌中のダイズ落葉病菌菌量と無栽培土壌 (非根圏土壌) 中の菌量を調査比較した。ダイズ落葉病菌の検出と定量はアズキ落葉病菌選択分離培地を用い、第3章2と同様に行った。トウモロコシ栽培区に関しては畝間土壌、株元土壌中の菌量の調査を第3章2に準じて行った。さらに、アズキ、ハイオーツ栽培区についても畝間土壌中の菌量の調



査を行った。根圏土壌中ならびに無栽培土壌中のダイズ落葉病菌菌量の調査は7月25日から9月30日まで4回行った。

#### 結果および考察

図4-1に実験結果を示した。無栽培土壌と比較して、アズキ、コムギ根圏土壌中のダイズ落葉病菌菌量は約10分の1以下に低下し、 $1 \times 10^3$  cfu/g程度で推移した。トウモロコシ、ダイズ、ハイオーツおよびニンジンの根圏では低下の程度はやや低く、 $10^3$  cfu/gのオーダーで推移した。

菌量低下の程度はやや低かったが、ダイズ落葉病菌も各種作物の根圏効果によりその菌量は低下すると考えられる。本実験を行った1992年は夏期の異常な低温で供試した作物の成長は著しく悪かった。トウモロコシも含め、根圏土壌中の菌量低下の程度が低かった原因として、第3章で考察したような根圏微生物の活性の低下が関与したことが推察される。





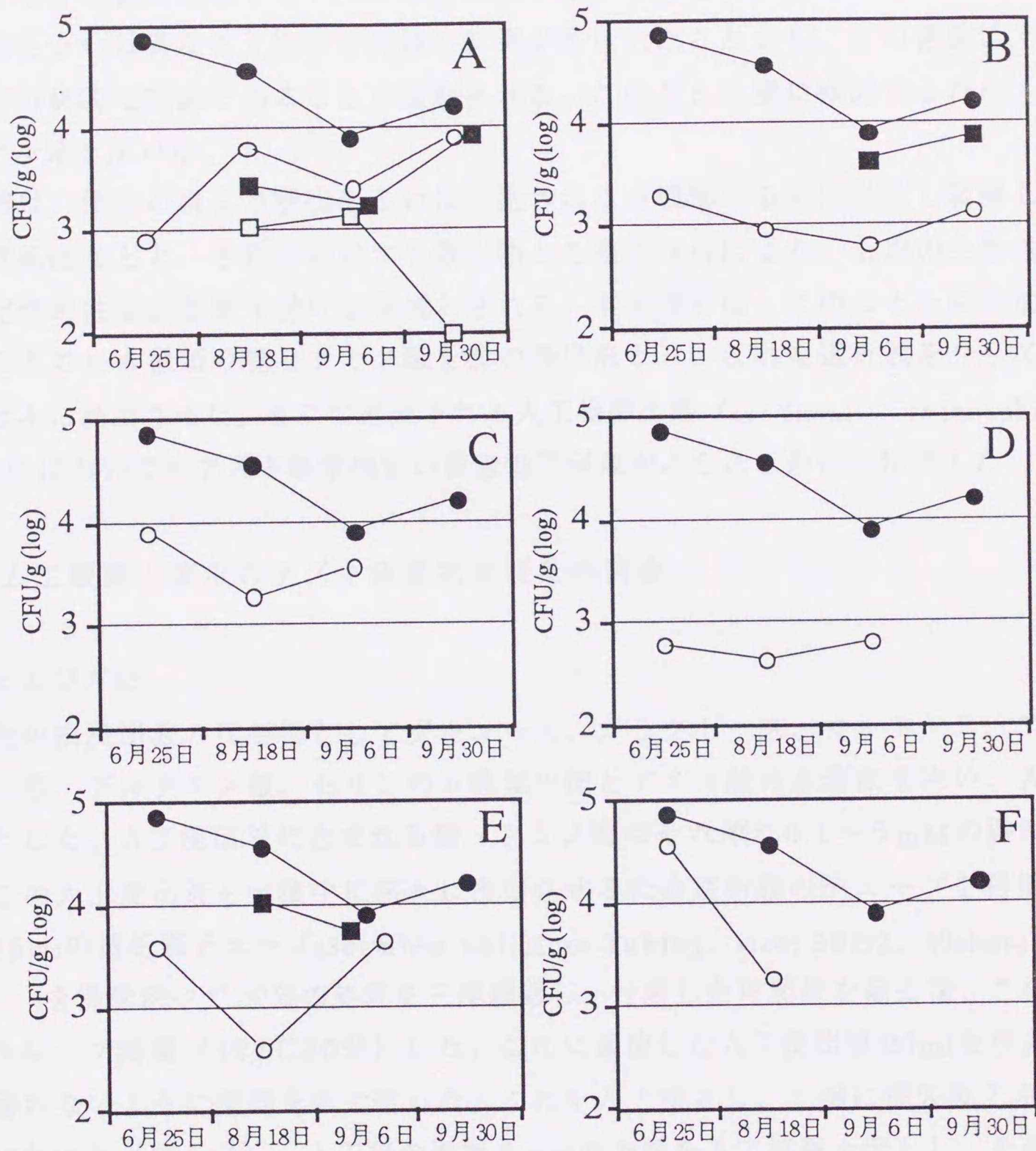


図4-1 無栽培土壤のダイズ落葉病菌菌量と各栽培区の根圏土壤中ならびに株元土壤、畝間土壤中菌量の比較

○ 根圏土壤    ■ 畝間土壤    □ 株元土壤    ● 無栽培土壤

A トウモロコシ栽培区    B アズキ栽培区    C ダイズ栽培区    D コムギ栽培区  
E ヘイオーツ栽培区    F ニンジン栽培区



## 第5章 人工根圏土壌中におけるアズキ落葉病菌菌量の低下

圃場試験ならびに温室でのポット試験の結果、トウモロコシ、アズキ、ダイズ、コムギなどの根圏土壌中でアズキ落葉病菌が低下することが明らかとなった。異なる作物あるいは異なる土壌中で同様の結果が得られたことから、この菌量低下は作物に非特異的な現象であることが推察される。このことを更に検討するため人工的なモデル系を用いた。

根圏は、作物の根より浸出あるいは分泌される有機物あるいは老化し剥離した根の表皮組織などと、それを利用する微生物との相互作用により、土壌の生物的、物理・化学的性質が影響を受ける領域とされる。本実験では、このことを疑似的に再現するために6種類の糖とアミノ酸を根の浸出液とし、これを透析膜を介して土壌中に徐々に浸出させた。そこで形成される人工根圏土壌 (artificial rhizosphere soil) 中においてもアズキ落葉病菌の菌量低下現象がみられるか否か検討した。

### 1. 人工根圏土壌中のアズキ落葉病菌菌量の調査

#### 材料および方法

作物の根浸出液の代替物としてグルコース、ガラクトース、マルトース、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリンの6種類の糖とアミノ酸の水溶液を用い、人工浸出液とした。人工浸出液に含まれる糖・アミノ酸はそれぞれ0.1~5 mMの濃度とした。この人工浸出液を土壌中に徐々に浸出させるため透析膜のチューブを利用した。長さ15 cmの透析膜チューブ (Seamless Cellulose Tubing, size; 30/32, Viskase Sales Corp.) を沸騰浴中で20分の処理を三度繰返し、付着した可塑性材を除去後、さらにオートクレーブ滅菌 (121°C 20分) した。これに滅菌した人工浸出液 20 ml を注入し、液が漏れないように両端を糸で縛った。これを人工根とし、土壌に挿入後7日間25°C下においた (図5-1)。人工根の周囲5 mmの土壌を人工根圏土壌とし、その中のアズキ落葉病菌菌量ならびに微生物相 (全細菌、色素耐性細菌、耐熱細菌、糸状菌、放線菌) を希釈平板法により調査した。人工根圏土壌は人工根を静かに抜き取ったあと、スパチュラで採取した。アズキ落葉病菌菌量と微生物相の調査方法は第3章に準じた。対照として、殺菌蒸留水の入った人工根を挿入し、その周り5 mm以内の土壌 (SDW区) を用いた。さらに何も挿入しない土壌 (無処理区) も同様に対照として用いた。人工根圏区、SDW区、無処理区ともに2反復とし、それらを混合して供試した。



実験は人工浸出液の濃度を変えて2回行った。実験1では0.1mMと1mMの濃度で、実験2では1mMと5mMの濃度で行った。土壌は北大農学部・植物寄生病学講座圃場のアズキ落葉病激発土を用い、使用前に5.66mmのふるいに通した。

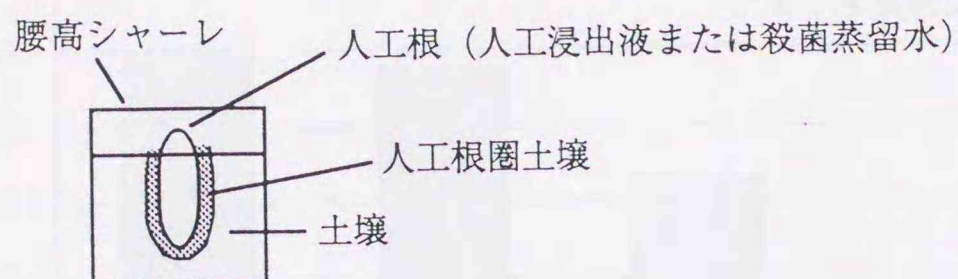


図5-1 人工根を用いたモデル実験の装置

### 結果および考察

無処理土壌（無処理区）と殺菌蒸留水を入れた人工根の周りの土壌（SDW区）に比較して、1mMの人工浸出液を入れた人工根の周りの土壌（1mM区）のアズキ落葉病菌菌量は著しく低下した（図5-2）。1mM区では全細菌数、色素耐性細菌数の増加が大きく、実際の作物根圏と同様の特徴を示した。一方、糖・アミノ酸濃度が10分の1である0.1mM区では全細菌数、色素耐性細菌数の増加が顕著でなく、アズキ落葉病菌の減少程度も小さかった。このことは根圏微生物が菌量低下に関与することを示唆するものと考えられる。

5mMの人工根圏土壌中においてもアズキ落葉病菌の菌量は著しい低下を示し、全細菌数、色素耐性細菌数、糸状菌数の増加も1mM区に比べさらに大きかった（図5-3）。

根圏土壌中でアズキ落葉病菌が減少することの説明として、植物の根から分泌される抗菌性物質の関与も考えられる。しかし、本実験の結果から、そのような物質の存在なしに菌量が低下することが明らかになった。



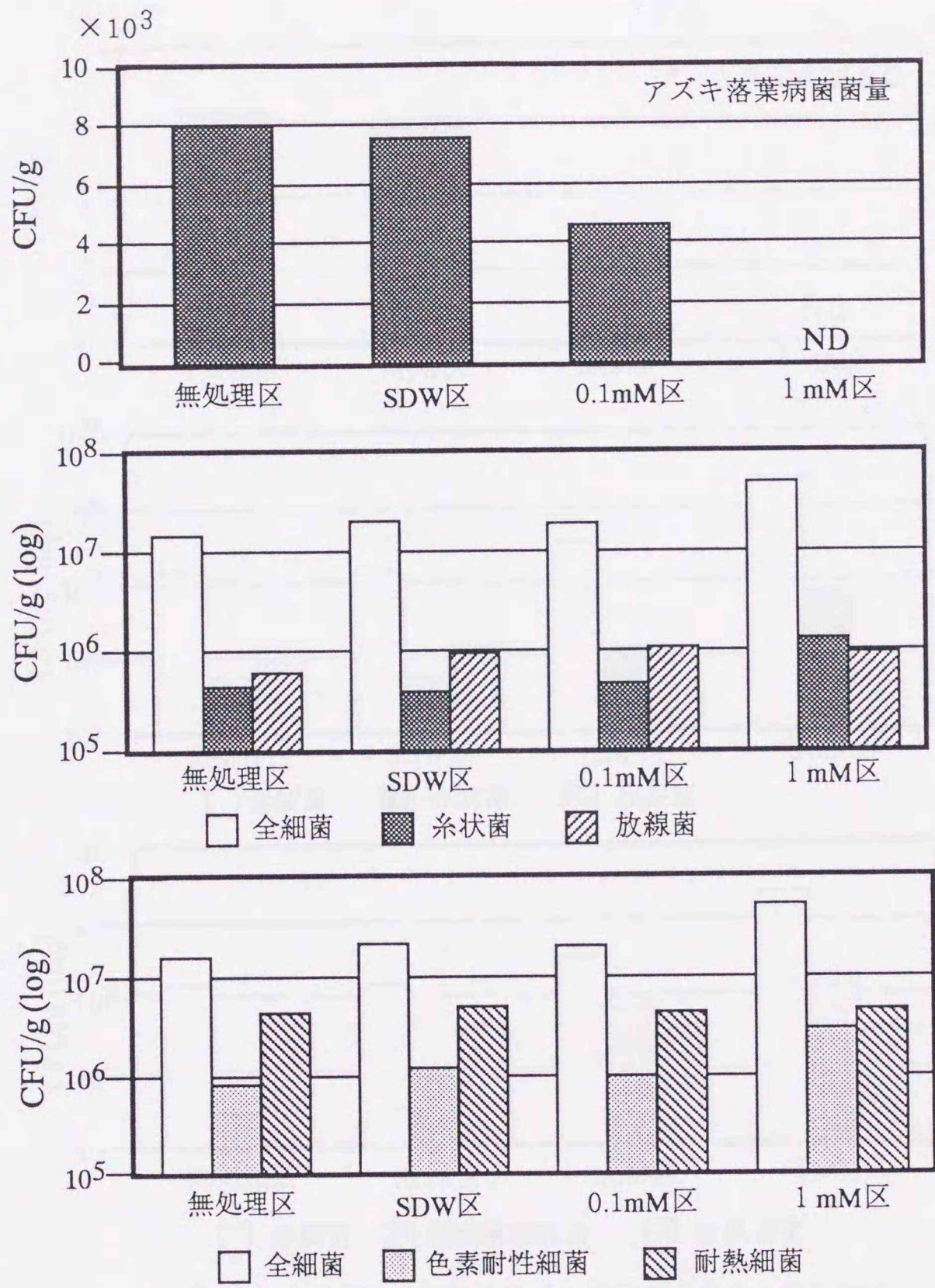


図5-2 人工根圏土壤中のアズキ落葉病菌菌量と微生物相  
 ND; 検出されなかった



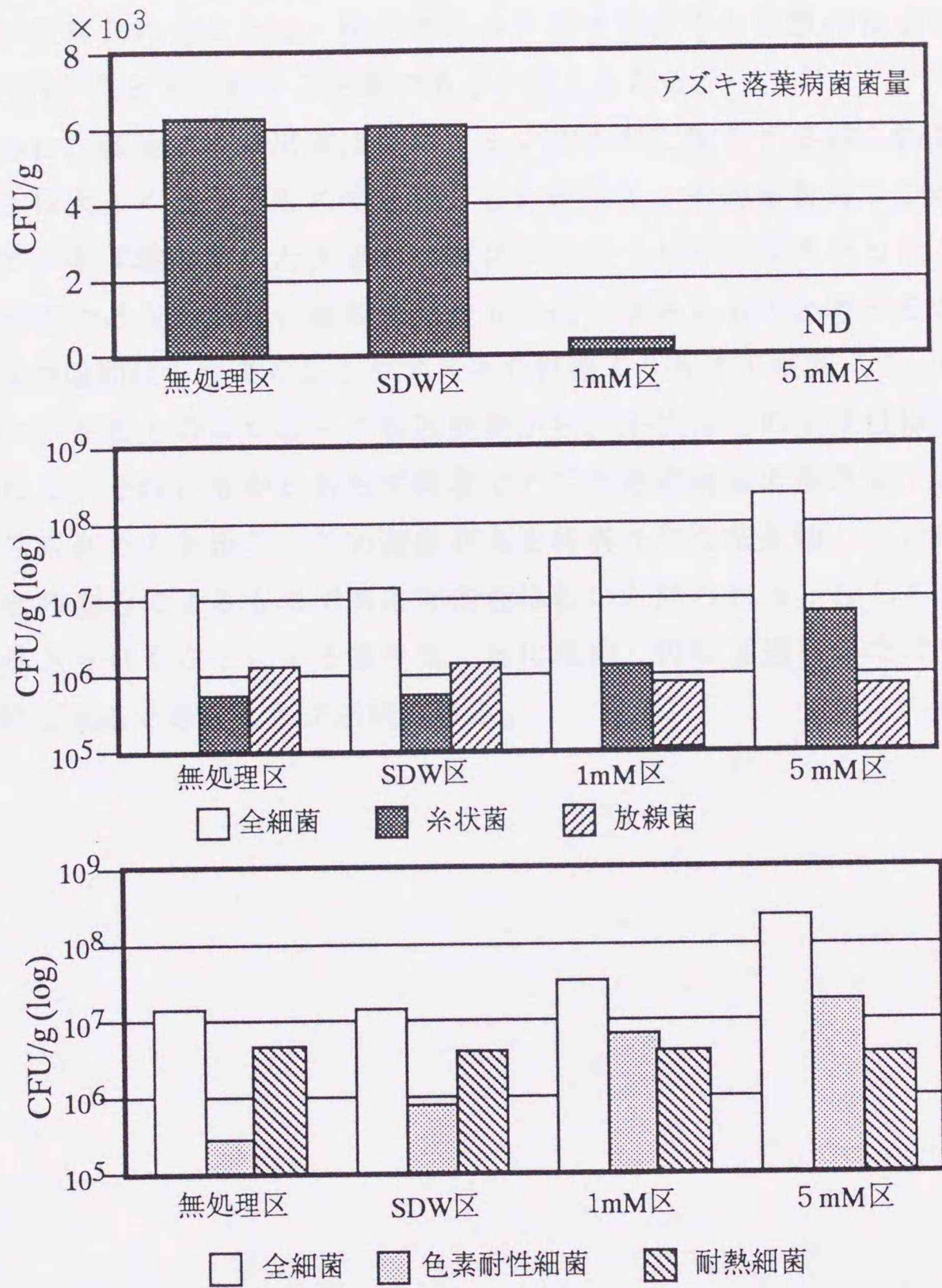


図5-3 人工根圏土壌中のアズキ落葉病菌菌量と微生物相  
 ND: 検出されなかった



人工浸出液の成分であるグルコース、ガラクトース、マルトース、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリンは実際の植物の根浸出液に一般的に含まれている成分とされている (Curl and Truelove, 1986)。そのような糖・アミノ酸の浸出により菌量低下現象が再現されたことは、宿主であるアズキも含めた複数の植物根圏で菌量低下が認められたことを支持する結果であると考えられる。

しかし同時に、植物の根浸出液は糖・アミノ酸のみに限らず多様な物質を含み、人工浸出液とは大きく異なるものである。したがって、全細菌数および色素耐性細菌の増加など、本実験で調べた大まかな項目ではほとんど差は無かったが、実際の根圏と人工根圏では微生物相の細部にかなりの違いがあるものと考えられる。実際に、糸状菌数の増加はトウモロコシやアズキの根圏よりも人工根圏 (5 mM区) で著しい。さらに、平板上のコロニーの形態観察から、糸状菌相の多様性は後者の方が低いと思われる。それにもかかわらず両者でアズキ落葉病菌の菌量低下という現象が一致してみられたことから、この現象がある特異な根圏微生物、または、ある植物根圏に固有の要因によるものである可能性は低いと思われる。むしろ、土壌に外から栄養が導入されることによる微生物 (特に細菌) の増殖過程またはその結果による非特異的な現象であることが示唆される。



## 2. 人工根圏土壤中でのアズキ落葉病菌菌量低下における微生物の役割

人工根圏土壤中でアズキ落葉病菌菌量が低下したことから、植物根が分泌する抗菌性物質などが菌量低下現象の必要条件ではないことが明らかとなった。このことは同時に、微生物の働きが重要であることを示唆するものである。本実験では人工根圏土壤中での菌量低下が微生物の作用によるものであるか否かを検討するため、アズキ落葉病菌を接種した殺菌土壤中に人工根を挿入し、その影響による本菌菌量の変化を調べた。

### 材料および方法

北大・植物寄生病学講座圃場のアズキ落葉病激発土を腰高シャーレにつめ、121℃で50分間オートクレーブ殺菌した。これに人工根を挿入し、さらに121℃で20分間オートクレーブした。この人工根の周囲1 cmの部分に約 $10^7$ /mlのアズキ落葉病菌分生胞子を2 ml灌注した。分生胞子はV-8ジュース寒天培地上で形成させ、殺菌蒸留水に懸濁後、遠心で2回洗浄した。人工浸出液の組成は本章1.と同様とし、濃度は2 mMと5 mMとした。対照として、オートクレーブ(121℃50分)した土壤に胞子を接種したもの(無処理区)と殺菌蒸留水を入れた人工根を挿入したもの(SDW区)を設けた。SDW区への胞子の接種方法は上述と同様とし、無処理区への接種は人工根周辺の接種部とほぼ同面積となる範囲に行った。

操作は全て無菌的に行い、無菌室内で1週間室温においた後、各区のアズキ落葉病菌菌量を調査した。調査はジャガイモ煎汁寒天培地を用いた希釈平板法(シャーレ3反復)で行い、同時に本菌以外の微生物の確認も行った。

### 結果および考察

表5-1 人工浸出液が殺菌土壤中のアズキ落葉病菌菌量に与える影響

	無処理区	SDW区	2mM区	5 mM区
アズキ落葉病菌菌量 (cfu/g)	$1.1 \times 10^6$	$1.3 \times 10^6$	$2.4 \times 10^6$	$2.7 \times 10^6$
その他の微生物*	ND	ND	ND	ND

\*その他の微生物(細菌、糸状菌、放線菌)は $10^2$ cfu/gレベルで検出されなかった。

表5-1に実験結果を示した。人工根圏土壤中(2 mM区、5 mM区)でアズキ落葉病菌菌量の低下は全く認められなかった。つまり、微生物の存在がなければ菌量は



低下しないことが明らかとなった。言い換えると、人工根圏土壌中での菌量低下は人工浸出液の影響により増殖した微生物の働きによるものといえる。さらに、このことから実際の植物根圏における菌量低下の主な原因は根圏微生物の働きであることが推測される。

人工根圏土壌中でアズキ落葉病菌菌量が対照と比較して約2倍に増加したが、これは人工浸出液に含まれる糖・アミノ酸を利用して胞子の再生産など増殖が起きたためと考えられる。



### 3. 4℃下における人工根圏土壌中のアズキ落葉病菌菌量

殺菌土壌を用いた実験より、人工根圏土壌中におけるアズキ落葉病菌の菌量低下は微生物のなんらかの働きによることが明らかとなった。そこで本実験では、菌量低下に対する微生物の作用をさらに明らかにすることを試みた。すなわち、無殺菌土壌に人工浸出液を浸出させ、かつ、その影響による微生物の増殖・活動を抑制したときのアズキ落葉病菌菌量の変化を検討した。微生物の増殖を抑制するために人工根圏の実験系を4℃下においた。

#### 材料および方法

人工根圏に関する実験法は本章1.に準じた。土壌は北大・植物寄生病学講座圃場のアズキ落葉病激発土を用い、人工浸出液の濃度は5mMとした。無処理区、SDW区、5mM区を設け、これらを4℃下に7日間おいた。対照として、同様のものを25℃下においた。これらの土壌中のアズキ落葉病菌菌量とその他の微生物相（全細菌数、色素耐性細菌数、耐熱細菌数、糸状菌数、放線菌数）を調査した。

さらに、人工浸出液（pH 2.6）による人工根圏土壌のpH変化の調査も行った。4℃下におくSDW区、5mM区と25℃下におくSDW区、5mM区をpH調査用に設け、実験開始7日後に各土壌の測定を行った。土壌にその体積の2.5倍のKCl溶液（1N）を加えて攪拌し、30分間静置後、pHメーターの電極を挿入して測定した。

#### 結果および考察

4℃下SDW区、5mM区および25℃下SDW区、5mM区の土壌pHはそれぞれ、4.0、4.0、4.1および4.2であり、4区ともほぼ同じ値を示した。したがって、人工浸出液による土壌pHへの影響はほとんどないことが明らかとなった。

4℃下および25℃下においた人工根圏土壌中の微生物相を調査した結果を図5-4に示す。4℃においた人工根圏土壌中の全細菌数は25℃のそれと同じく、対照と比較して約10倍に増加した。また、色素耐性細菌数も25℃においた場合と同様の増加を示した。耐熱細菌数ならびに放線菌数は25℃下の人工根圏土壌中で増加しないが、4℃でも増加しなかった。一方、糸状菌数に関しては、25℃では約10倍に増加するが、4℃では増加が認められなかった。

以上のように、糸状菌数を除いては4℃下と25℃下の人工根圏土壌中の微生物相に大きな違いは認められなかった。また、同様の実験を3回行ったが、結果は同じ



であった。

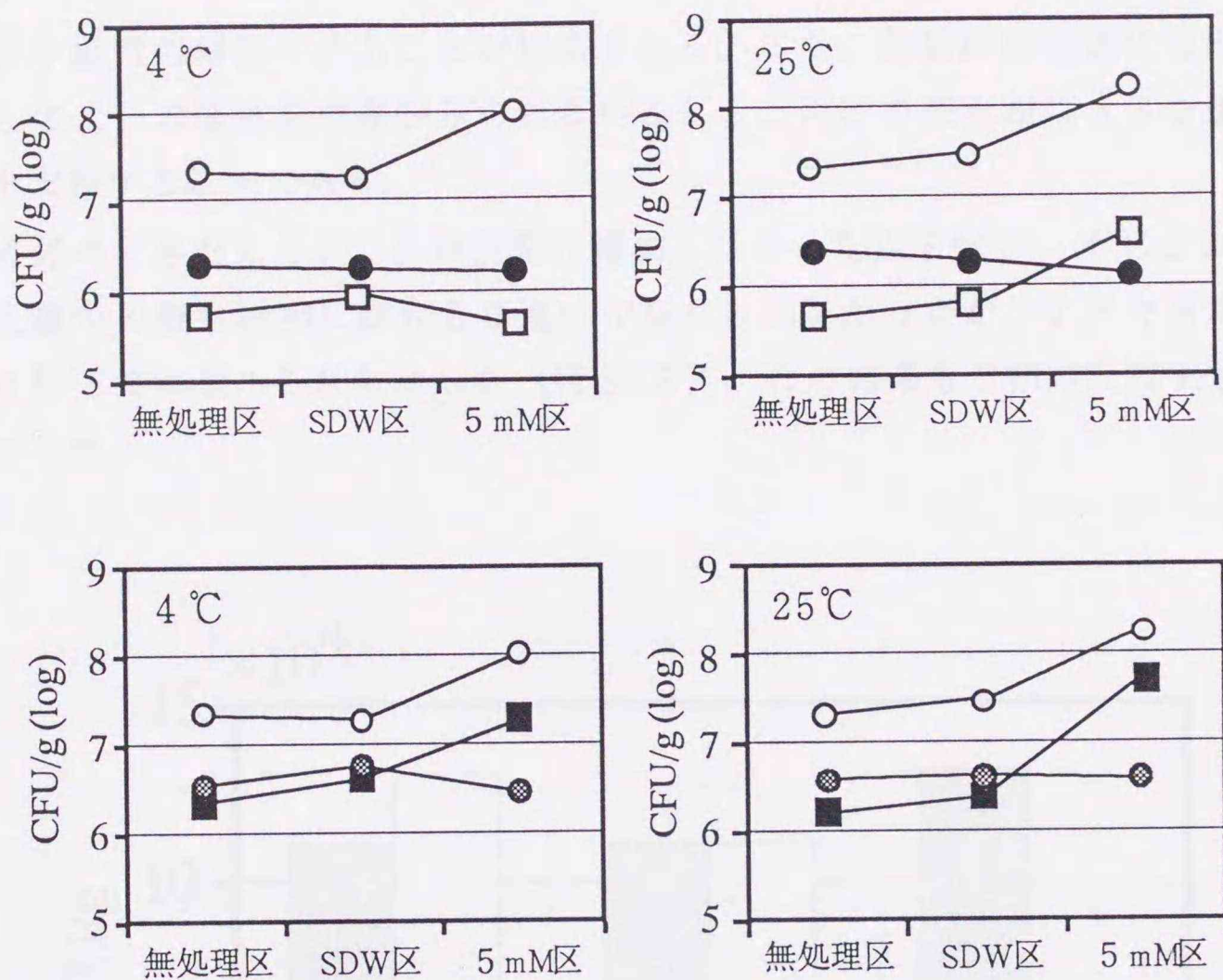


図5-4 4°C下における人工根圏土壤中の微生物相

4°C下と25°C下の人工根圏微生物相を比較した。

○全細菌 □糸状菌 ●放線菌 ■色素耐性細菌 ⊗耐熱細菌

一般に、細菌はその増殖温度域をもとに、高温菌 (thermophiles)、中温菌 (mesophiles)、低温菌 (psychrophiles) の3群に分けられる (Stanier *et al.*, 1986)。高温菌は55°C以上で増殖し、中温菌は20~45°Cで良好に増殖し、さらに低温菌は0°Cでよく増殖するものと分類される。しかし一方で、細菌の増殖可能温度域は細菌間で著しく異なる。0°C付近の低温環境下から分離された細菌でも、その多くが15°Cから20°Cに増殖最適温度を持ち、また、常温で分離した細菌も多くは0°C付近で増殖可能なものが多い (柳田, 1984)。さらに、土壌から頻繁に分離される *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Bacillus* 属菌の中には0°C付近で増殖可能なものがある (Stanier *et al.*, 1986; 柳田, 1984)。また、低温下でのみ増殖可能な好冷性のものは少ない (柳田, 1984)。



以上から土壌中の細菌の多くは増殖最適温度は20~45℃であるが、0℃付近の低温でも増殖可能な好中温性微生物（柳田、1984）であると考えられる。

したがって、4℃下の人工根圏土壌中で増加した細菌も、25℃下で増殖したものと同一好中温性の細菌であることが推測される。また、色素耐性細菌の増殖という点に関して二つの温度間で差がみられないことも、両者の細菌相に大きな違いがないことを支持する結果である。

以上に述べてきたように、糸状菌数が増加しなかった点を除き、4℃と25℃の人工根圏土壌中の微生物相には大きな違いが認められなかったが、アズキ落葉病菌の低下は4℃下では認められなかった（図5-5）。この結果も3回の反復実験を通じて同様だった。

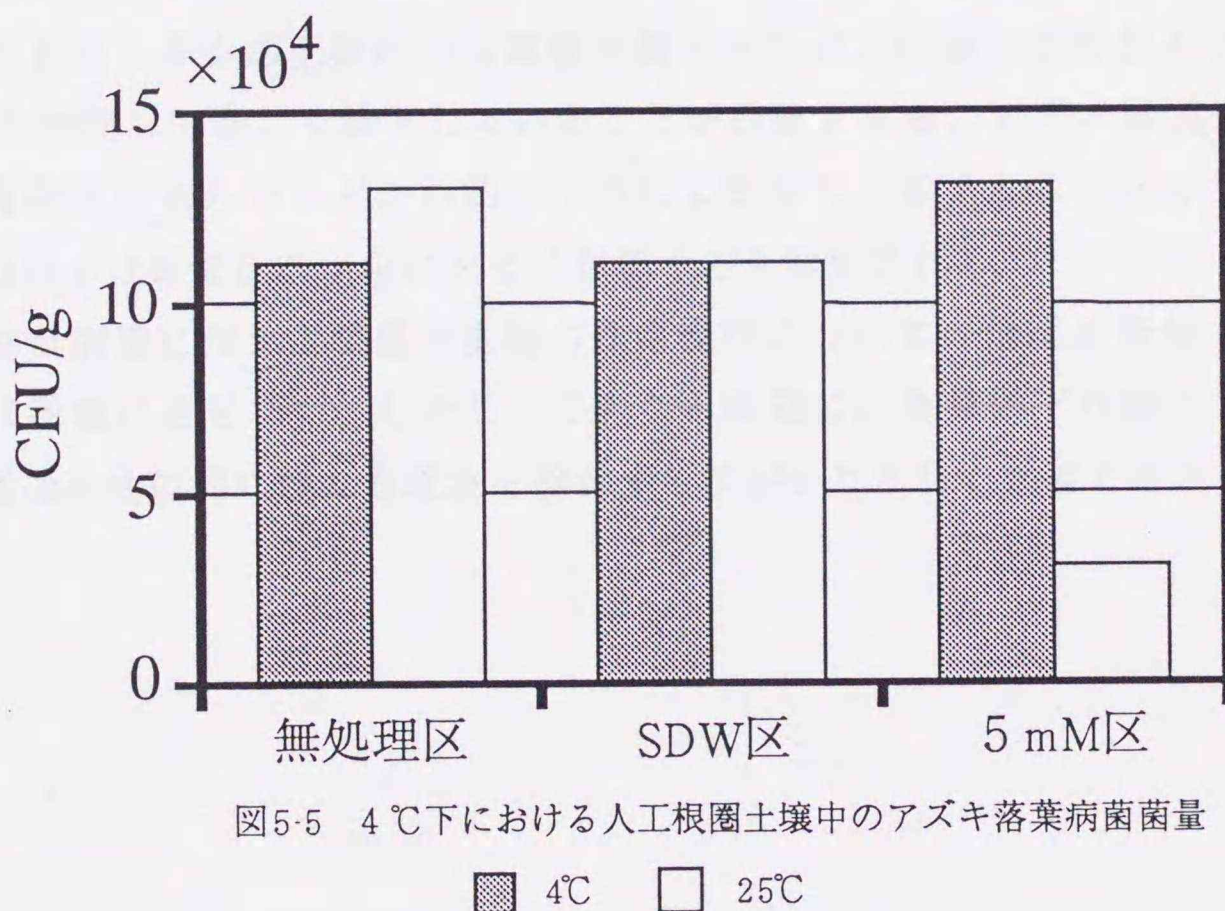


図5-5 4℃下における人工根圏土壌中のアズキ落葉病菌菌量

■ 4℃ □ 25℃

25℃下の人工根圏土壌中でのアズキ落葉病菌菌量低下は微生物の働きによるものである。ところが、4℃下の人工根圏土壌中では、糸状菌数以外の微生物相（微生物数）に違いがないにも関わらず、アズキ落葉病菌の菌量低下は起こらなかった。このことは、糸状菌の増加が菌量低下の原因であることを示唆する結果であるのだろうか。

25℃下の人工根圏で増殖する糸状菌は、その希釈平板上のコロニーの形態が同一



のものが多い。また、対照区（無処理区、SDW区）のコロニーは多様なものを含むことから、人工根圏土壌中ではある特定の種あるいは同一属内の数種のものを選択的に増加したと考えられる。すなわち、糸状菌数の増加は少数の菌種の増加によるものといえる。しかし、トウモロコシやアズキなど実際の植物根圏の微生物相の調査によれば（第3章）、糸状菌数の増加は人工根圏での増加ほど顕著ではなく、さらに、ある単一の菌種のみが選択的に増加するという傾向は認められない。したがって、少なくとも、特定の糸状菌の増加がアズキ落葉病菌の菌量低下の必要条件であると結論することは困難である。

上述の考察から、人工根圏（25℃下）での菌量低下の原因は細菌を中心とした微生物全体の増加に絞られる。しかし、4℃下の人工根圏土壌中でも全細菌の数については25℃下と同様の増加を示したが、アズキ落葉病菌の菌量低下は認められなかった。これに対する説明として、微生物全体の活性の低下が挙げられる。4℃という低温条件下でも多くの土壌細菌は増殖可能であるが、代謝などの様々な生理的活性は25℃と比較して著しく低下していることが推測される。アズキ落葉病菌の菌量低下は根圏微生物とのなんらかの相互作用によるものと考えられるので、その活性の低下は菌量低下現象に大きく影響すると推測される。

アズキ落葉病菌に対する根圏微生物の作用機作についての情報が皆無であるため、上の仮説は推測に過ぎない。しかし、このことは逆に、菌量低下の際にアズキ落葉病菌と根圏微生物の間に起こる現象を検討する手がかりとして重要であると考えられる。



#### 4. 十勝土壌を用いた人工根圏土壌中のアズキ落葉病菌菌量

第3章で述べた温室ポット試験によって、十勝土壌に栽培したトウモロコシ、アズキおよびダイズの根圏土壌でアズキ落葉病菌菌量が低下することが明らかとなった。そこで本実験では、人工浸出液の影響によっても十勝土壌中のアズキ落葉病菌の菌量が低下するか否かを検討した。

##### 材料および方法

1992年10月に道立十勝農試・病虫科圃場のアズキ落葉病激発土壌を採取し、供試した。土壌は1mm目のふるいを通して用いた。人工浸出液の組成は本章1.と同様とし、濃度は5mMとした。対照として人工根を挿入しない土壌（無処理区）と殺菌蒸留水を入れた人工根を挿入した土壌（SDW区）を設けた。これらをそれぞれ4℃と25℃下におき、7日後に各土壌のアズキ落葉病菌菌量と微生物相を調査した。これらの方法は本章1.に準じた。

人工浸出液が十勝土壌のpHに与える影響を検討するため、SDW区と5mM区を設け25℃下におき、7日後に各土壌のpHを測定した。測定法は本章3.と同様である。

##### 結果および考察

人工根圏土壌と対照土壌（SDW区）のpHには大きな差は認められず、両者とも4.5（pH KCl）であった。したがって、北大土壌と同じく、十勝土壌に対しても人工浸出液はpHに影響しないことが明らかとなった。

アズキ落葉病菌菌量の低下は、4℃下の人工根圏土壌中では認められなかったが、25℃下では著しく低下し、検出されないほどとなった（図5-6）。

また、このときの各区の微生物相を図5-7に示した。全細菌数は4℃、25℃ともに人工根圏土壌では $10^7$ レベルから $10^8$ レベルに増加した。糸状菌数は北大土壌を用いた実験と同様に25℃下では増加したが、4℃下での増加は認められなかった。また、放線菌数は25℃ではやや増加が認められたが、全細菌数や糸状菌数の増加と比較するとその程度は小さかった。さらに、25℃、4℃の人工根圏土壌中では色素耐性細菌数の著しい増加が認められたが、耐熱細菌数はほとんど増加しなかった。以上の点は北大土壌を用いた実験と同様の結果であった。



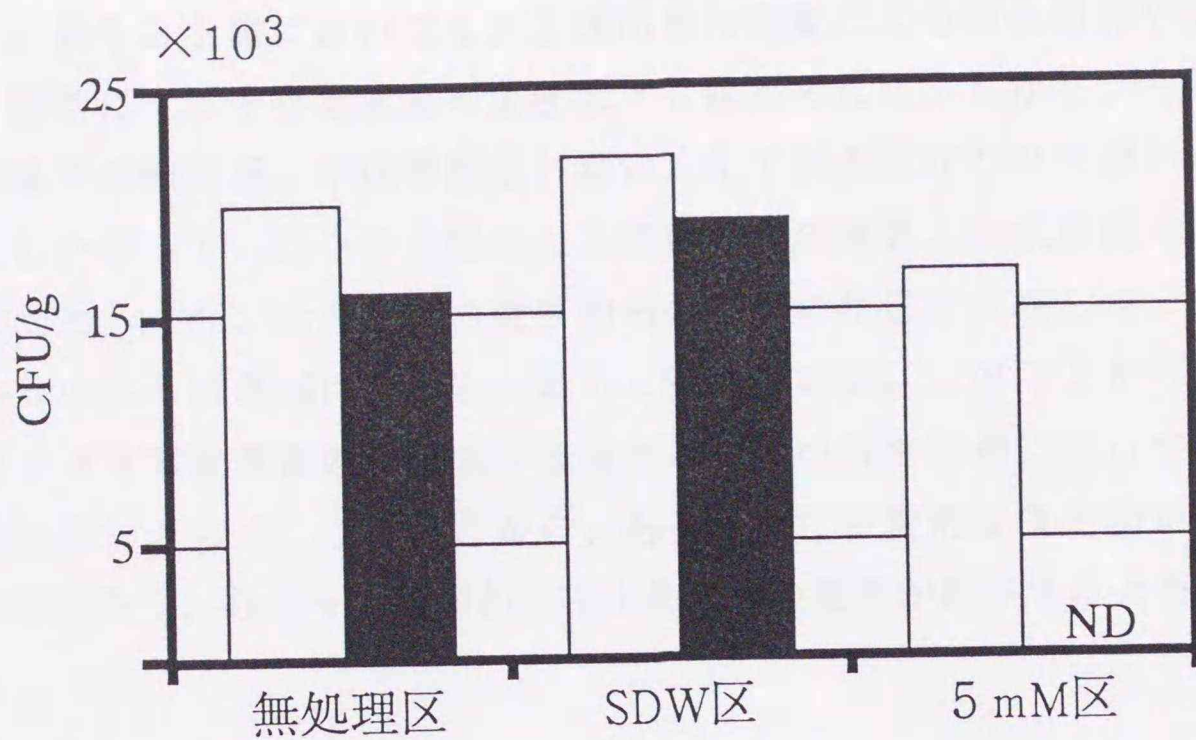


図5-6 人工浸出液が十勝土壤中のアズキ落葉病菌に与える影響

□ 4°C    ■ 25°C    ND; 検出されなかった。

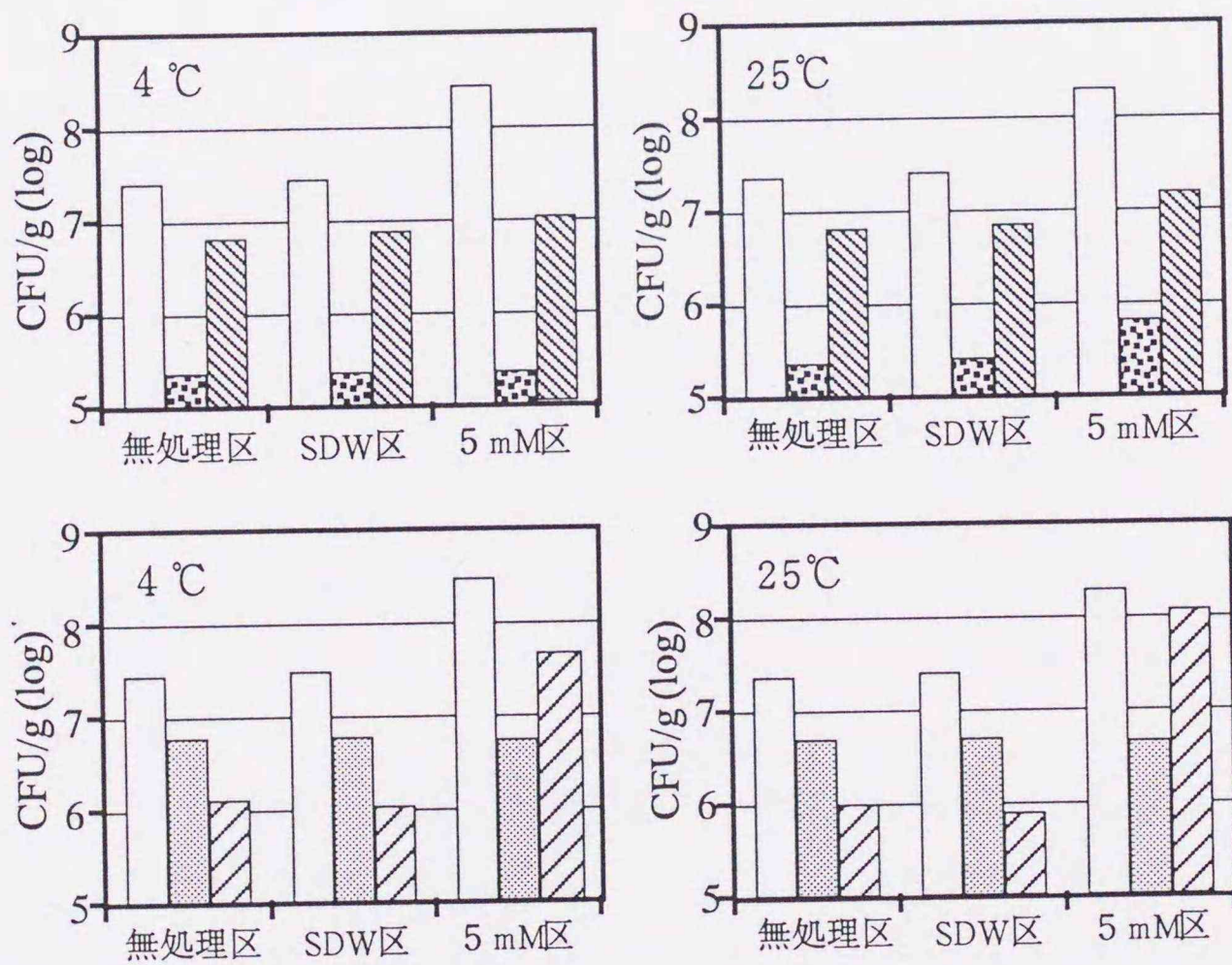


図5-7 人工浸出液が十勝土壤の微生物相に与える影響

□ 全細菌    ■ 糸状菌    ▨ 放線菌    ▩ 耐熱細菌    ▪ 色素耐性細菌



すなわち、異なる土壌においても人工浸出液の影響による微生物相の変化は大きく異ならず、同時にアズキ落葉病菌の菌量低下も認められた。しかし、一般に、異なる土壌間ではその細菌相、糸状菌相など細かくみていくとかなりの違いがあると考えられる。したがって、二つの土壌の人工根圏で全細菌数、糸状菌数の増加が同様に認められたとしても、元の土壌の微生物相の構成の相違を反映して、人工根圏中の細菌相あるいは糸状菌相にも違いがあると考えられる。このことから、人工根圏土壌中でのアズキ落葉病菌の菌量低下は異なる種類の微生物相によっても起こるものと考えられる。さらに、このことから、ある土壌に特異的な微生物が菌量低下に関与するのではなく、むしろ非特異的な微生物一般の働きが関与すると思われる。



## 5. 異なる組成の人工浸出液によるアズキ落葉病菌菌量の変化

十勝土壌を用いた実験により、複数の土壌で人工根圏でのアズキ落葉病菌菌量の低下が起こることが明らかとなった。このことから、異なる微生物環境下でも人工根圏土壌中では菌量低下が起こることが考察された。本実験ではこのことを別の方法で検討するため、これまでの実験で用いたグルコース、ガラクトース、マルトース、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリンという人工浸出液の組成をフルクトース、キシロース、アラビノース、グリシン、アラニン、アルギニンに変更した。人工浸出液の組成を変更することにより、それによって異なる種類の微生物が増殖することが予想され、そのような条件下においてもアズキ落葉病菌菌量が低下するかどうかを検討した。

### 材料および方法

土壌は北大・植物寄生病学講座圃場のアズキ落葉病激発土を5.66mmのふるいに通したものをを用いた。人工浸出液の組成はフルクトース、キシロース、アラビノースの3種の糖とグリシン、アラニン、アルギニンの3種のアミノ酸とした。人工浸出液の濃度はそれぞれを1mM含むものと5mM含むものの2種類用意し、1mM区、5mM区とした。対照としてなにも挿入しない無処理区、殺菌蒸留水の入った人工根を挿入したSDW区を用意した。その他の方法は本章1.に準じた。各土壌は7日間25℃におき、アズキ落葉病菌菌量ならびに微生物相を調査した。

### 結果および考察

本実験で用いた組成の人工浸出液の影響によってもアズキ落葉病菌の菌量は著しく低下した(図5-8)。また、1mMの浸出液よりも5mMの浸出液の効果が高かった。

この時、人工根圏土壌(1mM区と5mM区)中では全細菌数は増加し、 $10^8$ cfu/g以上となった(図5-9)。従来の人工浸出液を用いた実験では、糸状菌数は約10倍程度に増加することが多かった。しかし、本実験ではSDW区の $3.5 \times 10^5$ cfu/gと比べ、1mM、5mM区それぞれ $4.5$ 、 $7.2 \times 10^5$ cfu/gと増加の程度は小さかった。一方、放線菌、耐熱細菌はほとんど人工浸出液の影響を受けなかった。SDW区と比較した色素耐性細菌数の増加は、1mM区でやや小さかったが(約6倍)、5mM区では約30倍と大きかった。



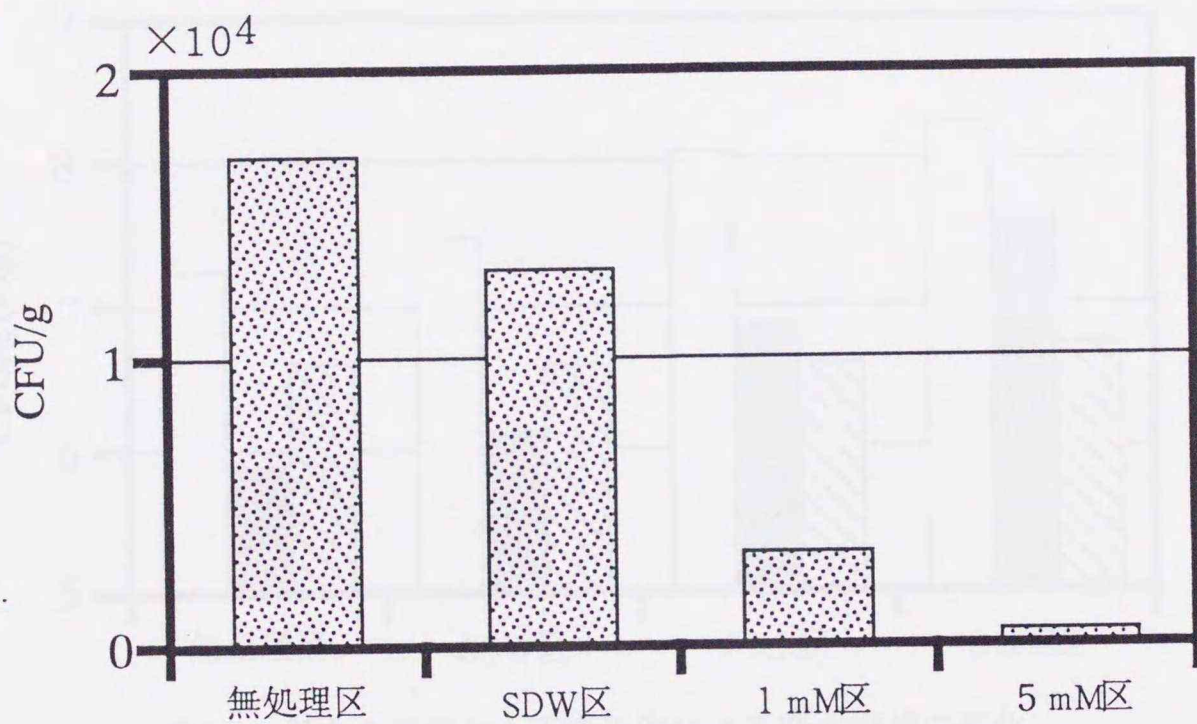


図5-8 組成の異なる人工浸出液の影響によるアズキ落葉病菌菌量の変化

人工浸出液の組成はフルクトース、キシロース、アラビノース、グリシン、アラニン、アルギニンとした。



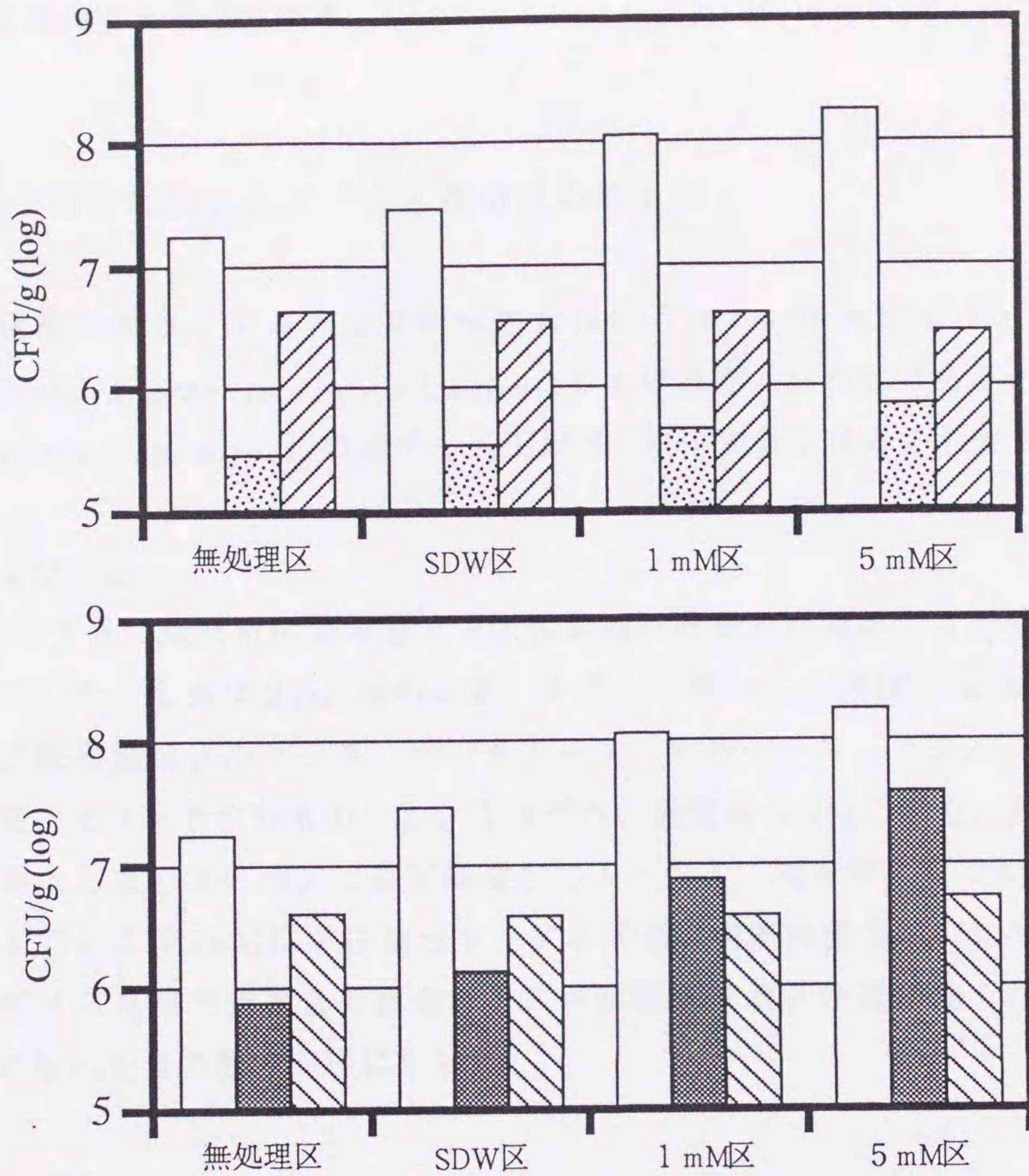


図5-9 異なる組成の人工浸出液による微生物相の変化

人工浸出液の組成はフルクトース、キシロース、アラビノース、グリシン、アラニン、アルギニンとした。

□全細菌    ●糸状菌    ▨放線菌    ■色素耐性細菌    ▤耐熱細菌

組成の異なる人工浸出液を用いた本実験においても、人工根圏土壤中でアズキ落葉病菌の菌量低下が認められた。このときの人工根圏の微生物相は、糸状菌数の増加程度が小さかった点で、従来の浸出液での結果と若干異なったが、全体的には大きな違いは認められなかった。しかし、人工浸出液の組成が異なるため、その影響により増加する微生物の種類がこれまでの実験と全く同じである可能性は低い。それにも関わらず、このような条件下においても菌量低下が認められた。このことは、この菌量低下現象が、与えられた糖・アミノ酸の違いによって異なる反応を示すような特異的な微生物の関与ではなく、微生物全体の非特異的な作用によるものである。



ることを支持する結果である。

## 6. 人工浸出液によるダイズ落葉病菌の菌量低下

人工根圏土壌中でアズキ落葉病菌菌量は低下する。本実験ではアズキ落葉病菌 (*Phialophora gregata* f.sp. *adzukicola*) とは異なる分化型であるダイズ落葉病菌 (*P. gregata* f.sp. *sojae*) の菌量も人工根圏土壌中で低下するか否か検討した。

### 材料および方法

1992年1月に長沼町の前年度ダイズ落葉病が激発した圃場より土壌を採取し、実験に供試した。土壌は2mm目のふるいを通して用いた。実験方法は本章1.に準じた。人工浸出液はグルコース、ガラクトース、マルトース、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリンを含むものとし、それぞれの濃度は5mMとした。対照として、人工根を挿入しない無処理区と殺菌蒸留水の入った人工根を挿入したSDW区を設けた。各区を4℃および25℃に7日間おき、ダイズ落葉病菌菌量ならびに微生物相を調査した。ダイズ落葉病菌菌量の調査はアズキ落葉病菌選択分離培地を用い、アズキ落葉病菌の検出定量の際と同様に行った。

### 結果および考察

各区のダイズ落葉病菌菌量を図5-10に示した。これまで本章の実験に用いた土壌のアズキ落葉病菌菌量は $10^4$ cfu/gのオーダー以下であったが、本実験で用いた土壌中のダイズ落葉病菌菌量は高く、 $10^5$ cfu/g以上であった。4℃下においた人工根圏土壌中ではほとんど菌量の低下は認められなかった。一方、25℃下の人工根圏土壌中では $1.3 \times 10^4$ cfu/gとなった。この菌量はこれまでのアズキ落葉病菌に関する実験結果と比較すると非常に高い値であるが、対照の10分の1以下に低下している。したがって、ダイズ落葉病菌も人工根圏土壌中で菌量が低下するといえる。



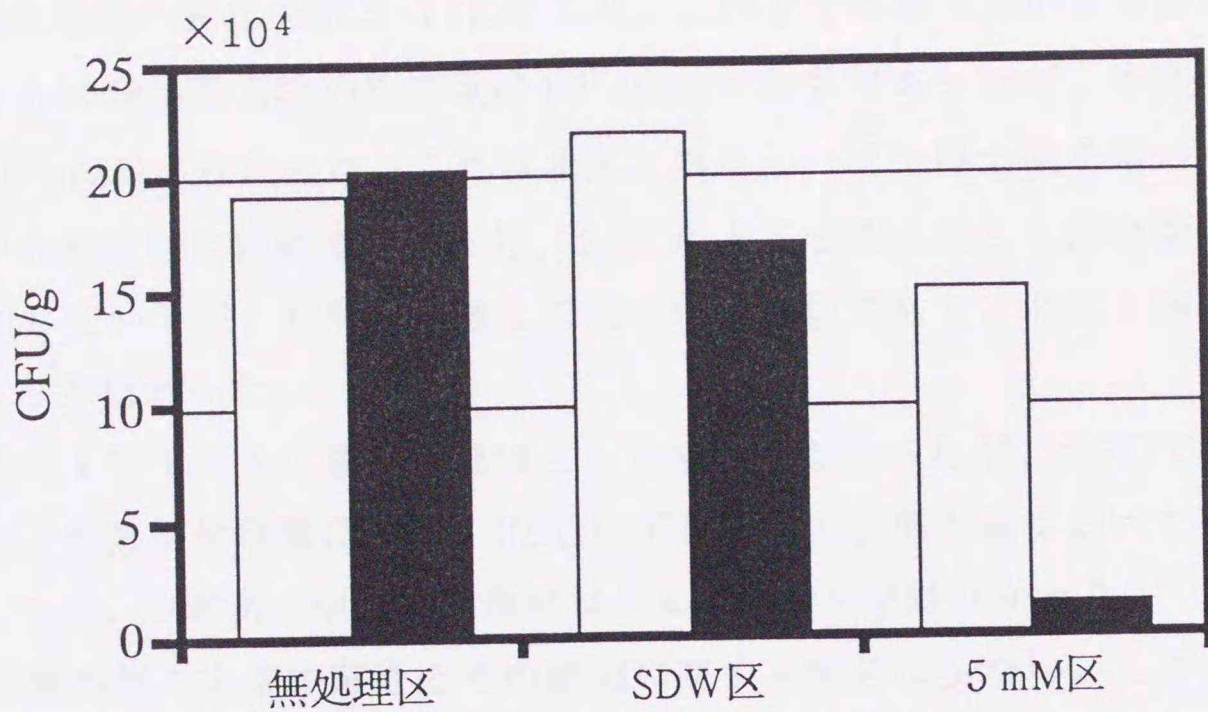


図5-10 人工根圏土壤中のダイズ落葉病菌菌量

□ 4°C    ■ 25°C

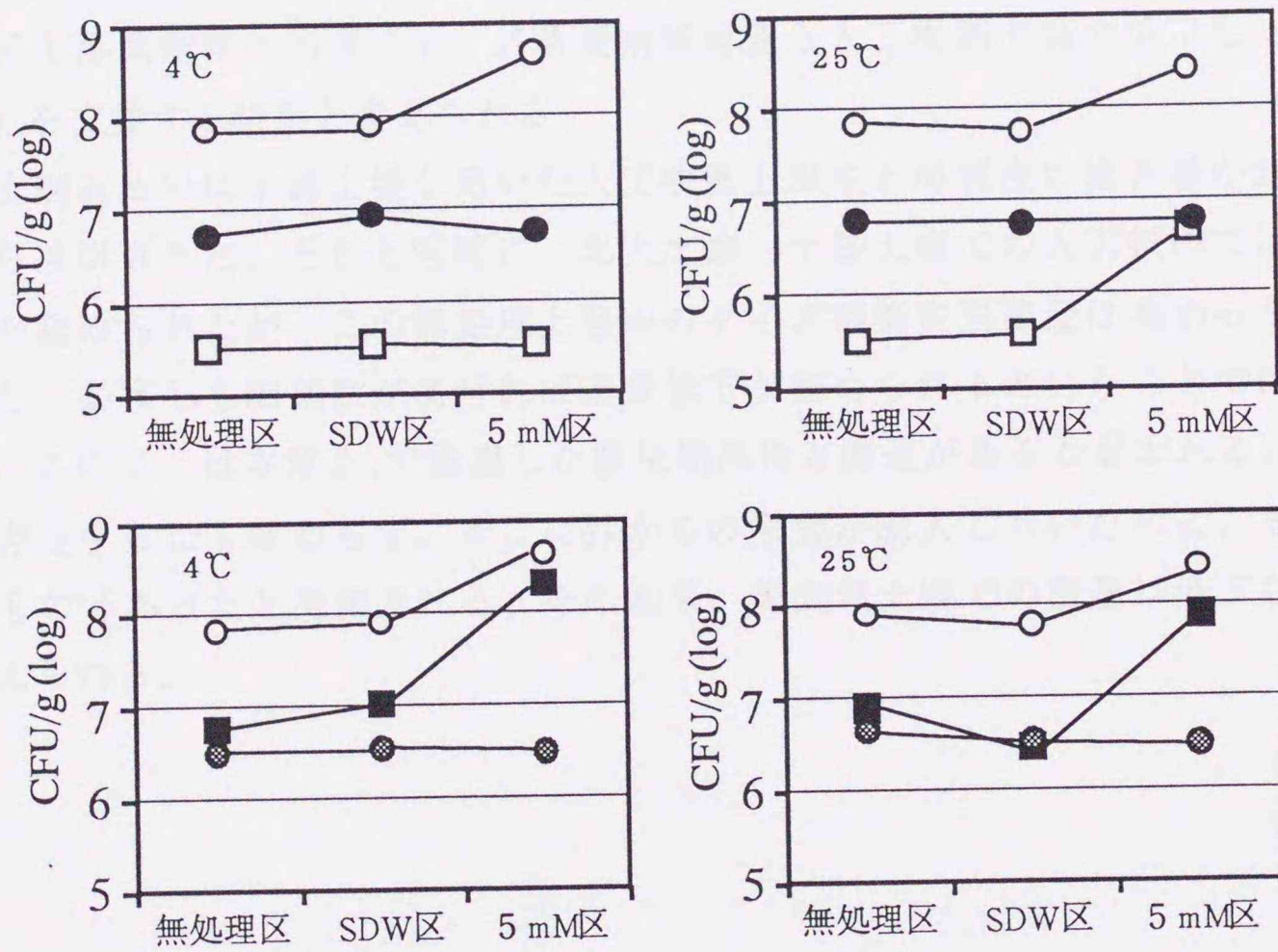


図5-11 人工浸出液がダイズ落葉病激発圃場土（長沼町）の微生物相に与える影響

○ 全細菌   □ 糸状菌   ● 放線菌   ■ 色素耐性細菌   ◐ 耐熱細菌



各区の微生物相の変化を図5-11に示した。これまで本章で用いてきた北大土壌、十勝土壌ともに無処理土壌の細菌数は $10^7$ cfu/gの前半であったが、本実験で用いた土壌では $10^8$ cfu/gに近かった。これは北大土壌あるいは十勝土壌を用いた際の人工根圏土壌中の細菌数に匹敵する。4℃、25℃の人工根圏土壌とも細菌数は $10^8$ cfu/g以上に増加しているが、対照と比較して約5倍の増加であり、北大土壌や十勝土壌の増加率よりも低かった。

糸状菌数は4℃下の人工根圏ではほとんど増加しなかったが、25℃では著しい増加を示した。色素耐性細菌は4℃、25℃いずれの人工根圏土壌においても10倍以上増加した。一方、放線菌、耐熱細菌数はほとんど影響を受けなかった。

ダイズ落葉病菌の土壌中菌量とその動態に関する報告は少ない。しかし、ダイズ落葉病菌とアズキ落葉病菌は同一種に属し、形態、あるいは生理的特徴から両者を判別することは困難である。また、ダイズ落葉病菌とアズキ落葉病菌の生活環は非常によく似ている。これらのことから、ダイズ落葉病菌とアズキ落葉病菌の土壌中での生存には大きな違いはないと推察される。また、本実験で明らかとなったように、アズキ落葉病菌と同様にダイズ落葉病菌菌量も人工根圏土壌で低下したことはこのことを支持する結果と考えられる。

北大土壌あるいは十勝土壌を用いた人工根圏土壌中と同程度の細菌数が無処理土壌中から検出された。それと同時に、北大土壌・十勝土壌での人工根圏では菌量低下現象が認められたが、この無処理土壌中のダイズ落葉病菌菌量は高かった。このことから、必ずしも細菌数が高ければ菌量低下が認められるということではないと言える。このことは本章3.で論議した微生物活性と関連があると思われる。高い細菌数が存在するにも関わらず、そこに外からの栄養が流入しないために、その活性は低いものであったと推測される。その結果、無処理土壌での菌量は低下しなかったと考えられる。



## 第6章 人工根圏土壌中における菌量低下に關与する要因

前章の実験結果より、根浸出液に一般的に含まれる糖・アミノ酸からなる人工浸出液の影響を受けた人工根圏土壌中でアズキ落葉病菌菌量が低下することが明らかとなった。また、この現象には微生物の増加が關与し、さらに、それはある特異的な微生物によるものではなく、むしろ微生物一般の非特異的な働きによることが示唆された。

本章では以上のことを更に検討するため、人工根圏土壌中の糸状菌相、細菌相についてより詳細に調査した。また、微生物の活性と菌量低下の問題を検討するため、人工根圏土壌の呼吸量を測定した。

### 1. 人工根圏土壌中の糸状菌相

一般に、アズキ落葉病菌菌量が低下する25℃下の人工根圏土壌中では糸状菌が著しく増加する。これまでの実験で、人工根圏土壌の希釈平板（ローズベンガル寒天培地）を観察すると、同一と思われるコロニーが大多数を占める傾向があった。すなわち、人工根圏では糸状菌数は増加するが、その多様性は著しく低下する傾向が認められた。本実験ではこの傾向を明らかとするため、対照と人工根圏土壌の糸状菌相ならびに糸状菌数を調査した。

#### 材料および方法

土壌は北大・植物寄生病学講座圃場のアズキ落葉病激発土を5.66mmのふるいに通したものをを用いた。土壌を腰高シャーレにつめ、殺菌蒸留水を入れた人工根を挿入したもの（SDW区）と5mMの人工浸出液を入れた人工根を挿入したもの（5mM区）を用意し、それぞれを4℃と25℃下においた。ここでは、4℃下においたSDW区と5mM区をそれぞれLS区、LE区とし、25℃下においたSDW区と5mM区をHS区、HE区とした。これらをそれぞれの温度下に7日間おき、ローズベンガル寒天培地を用いた希釈平板法により各根圏土壌中の糸状菌相の調査を行った。人工根圏土壌の採取法などは第5章1.に準じた。

希釈平板後5日目に平板上のコロニー形態を観察し、異なるコロニーは全てPDAスラントに移植した。また、その形態が酷似するコロニーは同一種に属するものと考え、一つのグループとしそのコロニー数を計数後、代表する一つのコロニーを



PDAスラントに移植した。各菌株はスラント上で雑菌の混入のないことを確かめた。その後、各菌株を素寒天培地あるいはPDAの平板に移植し、10~30日間25℃で培養した。これを顕微鏡で観察し、その分生孢子、分生子柄またはその他の器官の形態によって各菌株の属を決定した。属の同定に当たっては、渡邊恒雄著、"土壤糸状菌 -培養株の検索と形態-" を参照した。

#### 結果および考察

糸状菌数の計数ならびに糸状菌相の検討には1シャーレ当たり20コロニー以上ある希釈段階を用いた。しかし、LE区は糸状菌数が少なかったため、最も低い希釈段階でも1シャーレ当たりコロニー数が15程度しかなかった。一方、HE区は他の3区に比べて約10倍の糸状菌数であったので、希釈段階が10倍高いシャーレのコロニーについて調査した。

HS, HE, LS, LE区の糸状菌数はそれぞれ $2.4 \times 10^5$ 、 $3.1 \times 10^6$ 、 $2.4 \times 10^5$ 、 $1.7 \times 10^5$  cfu/gであり、HE区でのみ著しく増加した。

表6-1に各区の糸状菌相を示した。同一の属に属すると思われる菌株の内、PDA上での菌相が異なるものが存在したため、その菌相のタイプ数を示した。これにより同一属内における多様性をある程度示すことができると考えた。

HS区とLS区を比較すると、同定できた属数は13と10でほぼ同数であり、さらに *Cladosporium*, *Coniothyrium*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Myrothecium*, *Penicillium*, *Trichoderma* など共通のものも多かった。両者に共通しない属はその菌量が比較的 low 検出限界に近いことから、これらの有無が糸状菌相の大きな違いであるとは考えにくい。また、両区に共通して *Gliocladium*, *Penicillium*, *Trichoderma* がやや多かったが、その他の属の菌量はほぼ同じであった。LE区に関してこれと同様の結果が得られた。すなわち、これら3区の糸状菌相は、その構成あるいは多様性に関してほぼ同様であるといえる。一方、HS区では糸状菌相の多様性は著しく低かった。*Penicillium*, *Gliocladium* の菌量が突出して高く、これらの増加が全糸状菌数の増加を担っている。

以上より、4℃下の条件では糸状菌相は人工浸出液の影響をほとんど受けないが、25℃下では *Penicillium* を中心とした限られた集団のみが著しい増加を示し、糸状菌数全体の増加となって表れることが明らかとなった。一方、トウモロコシ・アズキなど実際の植物の根圏土壌中の糸状菌数は人工根圏土壌でのような著しい増加は示さず、さらに、その多様性の極端な低下も認められない。したがって、25℃下の人



工根圏で増加する *Penicillium*, *Gliocladium* など一部の糸状菌がアズキ落葉病菌菌量低下の必要条件である可能性は低いと考えられる。

表6-1 人工根圏土壌中の糸状菌相

HS区			HE区		
属名	タイプ数	菌量 ( $\times 10^3$ cfu/g)	属名	タイプ数	菌量 ( $\times 10^3$ cfu/g)
<i>Acremonium</i>	3	13	<i>Fusarium</i>	1	45
<i>Aspergillus</i>	1	8.9	<i>Gliocladium</i>	5	910
<i>Cladosporium</i>	3	18	<i>Penicillium</i>	3	2000
<i>Coniothyrium</i>	1	8.9	<i>Ramichloridium</i>	1	45
<i>Fusarium</i>	1	8.9			
<i>Gliocladium</i>	2	8.9			
<i>Metarhizium</i>	1	8.9			
<i>Myrothecium</i>	1	4.4			
<i>Paecilomyces</i>	4	27			
<i>Papulaspora</i>	1	4.4			
<i>Penicillium</i>	4	27			
<i>Phialophora</i>	1	4.4			
<i>Trichoderma</i>	3	22			
not-identified	1	31			
LS区			LE区		
属名	タイプ数	菌量 ( $\times 10^3$ cfu/g)	属名	タイプ数	菌量 ( $\times 10^3$ cfu/g)
<i>Cladosporium</i>	2	8.5	<i>Acremonium</i>	1	4.2
<i>Coniothyrium</i>	1	4.3	<i>Aspergillus</i>	2	8.5
<i>Fusarium</i>	1	8.5	<i>Basipetospora</i>	1	4.2
<i>Gliocladium</i>	1	13	<i>Cladosporium</i>	1	4.2
<i>Humicola</i>	1	4.3	<i>Gliocladium</i>	1	8.5
<i>Myrothecium</i>	1	4.3	<i>Humicola</i>	1	13
<i>Penicillium</i>	9	85	<i>Mucor</i>	2	13
<i>Rhizoctonia</i>	1	4.3	<i>Paecilomyces</i>	1	4.2
<i>Torula</i>	1	4.3	<i>Penicillium</i>	6	59
<i>Trichoderma</i>	3	27	<i>Trichoderma</i>	3	13
not-identified	4	30	not-identified	6	38

タイプ数； 同属内の菌株をPDA上の菌叢で分類したグループ数  
not-identified； 属を同定できなかったもの



## 2. 人工根圏土壌中の細菌相

前章3.の実験から、4℃と25℃下の人工根圏土壌中の全細菌数、色素耐性細菌数、耐熱細菌数にほとんど違いは認められないが、アズキ落葉病菌の菌量低下は25℃下でのみ起こることが明らかとなった。土壌から分離される多くの細菌は好中温性であると考えられることから、二つの温度下で増殖した細菌相はほぼ同様と推測した。本実験ではこのことを実験的に裏付けるため、両者の細菌相を簡易細菌同定システムBIOLOGを利用して調査比較した。

### 材料および方法

#### a) 供試菌株の準備

北大・植物寄生病学講座圃場内のアズキ落葉病激発土を5.66mmのふるいに通し、腰高シャーレにつめた。これに前章1.と同様の人工浸出液(5mM)の入った人工根を挿入し、4℃と25℃下においた。対照として、殺菌蒸留水の入った人工根を挿入したものを用意した。4℃下の対照をLS区、人工浸出液を浸出させたものをLE区とした。同様に、25℃下の対照と人工根圏をHS区、HE区とした。7日後に供試細菌の分離とその他の微生物相の調査を希釈平板法により行った。人工根圏土壌の採取などは前章1.と同様とした。

供試細菌分離用培地としてPTYG培地(Bone and Balkwill, 1986)を用いた。また、本実験では土壌の希釈に15mMリン酸緩衝液を用いた。一つの希釈段階につきシャーレを3枚使い、各シャーレにはあらかじめ十字を引いておき、この上に出現したコロニーを無作為につり上げた。この時、一枚のシャーレから、重なっていない約20コロニーをつり上げることのできる最小希釈倍率のものを選んで用いた。コロニーのつり上げは25℃で7日間培養後に行った。つり上げたコロニー中には2種以上の細菌が混在している可能性が高いので、菌体をリン酸緩衝液に懸濁しPTYG培地に広げ、単コロニー分離を3回繰り返した。さらに、簡易細菌同定システムBIOLOGではグラム陰性・陽性細菌を異なる手順で分析するため、分離した各菌株のグラムテストを3% KOHを用いた簡便法で行った。実験に供試した各菌株のリストを表6-2に挙げた。LS区, LE区, HS区, HE区それぞれ37, 58, 51, 53菌株分離し、以下の実験に供試した。

全細菌数の調査は前述のPTYG培地上に表れたコロニーを計数した。アズキ落葉病菌菌量、糸状菌数、放線菌数、色素耐性細菌数、耐熱細菌数に関しても同じ土壌希



积液を用いて調査した。方法は第3章に準じた。

表6-2 供試菌株のグラム染色性 (P;陽性、N;陰性)

LS 101	N	203	N	213	N	309	N
102	P	204	N	214	N	310	N
103	N	205	N	301	P	311	N
104	P	206	N	302	N	312	P
105	P	207	N	303	N	313	N
106	N	208	N	304	N	314	P
107	N	209	P	305	N	315	N
108	P	210	N	306	N		
201	N	211	N	307	P		
202	P	212	P	308	N		
LE 101	N	111	N	201	N	211	N
102	N	112	N	202	N	212	N
103	N	113	N	203	N	213	N
104	N	114	P	204	N	214	N
105	P	115	N	205	N	215	P
106	N	116	N	206	N	216	N
107	N	117	N	207	N	217	P
108	N	118	N	208	N	218	N
109	N	119	N	209	P	219	N
110	N	120	N	210	N	220	N
HS 101	N	202	N	305	N	5103	N
102	P	203	N	306	P	5104	N
103	P	204	P	307	N	5105	N
104	N	205	N	308	N	5106	N
105	N	206	N	309	N	5201	P
106	N	207	P	310	N	5202	N
107	N	301	P	311	N	5203	N
108	P	302	N	312	N	5204	N
109	N	303	N	5101	N	5205	P
201	N	304	N	5102	P	5301	P
						5302	N
						5303	P
						5304	N
						5305	N
						5306	N
						5307	N
						5308	P
						5309	P
						5310	P
						5311	N
HE101	P	111	P	121	N	207	N
102	P	112	N	122	N	208	P
103	N	113	N	123	N	209	N
104	N	114	N	124	P	210	N
105	N	115	P	201	N	211	N
106	N	116	N	202	N	212	N
107	N	117	N	203	N	213	P
108	P	118	N	204	P	214	N
109	N	119	N	205	N	215	P
110	N	120	N	206	P	216	N
						217	N
						310	P
						311	N
						312	P



#### b) 簡易細菌同定システム” BIOLOG” による細菌の同定

BIOLOGは95種類の炭素源利用性を基に細菌の同定を行うシステムである。95種類の炭素源利用性を調べることにより原理的には $2^{95}$  (約 $4 \times 10^{28}$ )通りのパターンが得られる。コンピュータによって、このパターンをデータベースに登録されている既知の細菌のパターンと比較し、細菌の同定を行う。データベースには現在、グラム陽性細菌は225のSpeciesまたはGroupsが、グラム陰性細菌は569のSpeciesまたはGroupsが登録されている。

炭素源の利用性は、発色試薬と目的の炭素源が入っている96穴マイクロプレートのウェルに供試細菌の懸濁液を入れて培養後、酸化還元反応による発色をマイクロプレートリーダーで検出することによって調べる。グラム陽性と陰性細菌では調べる炭素源の約3分の1が異なるため、異なるマイクロプレートを用いる。グラム陽性細菌にはGP Microplateを、陰性細菌にはGN Microplateを用いた。

供試する菌株は実験開始2日前に移植し、新鮮な菌体を用いた。菌体は滅菌した綿棒で掻きとり、0.85%生理食塩水に懸濁した。細菌懸濁液は $3 \times 10^8$ /mlとなるように濁度計を用いて調整した。この細菌懸濁液を8連マイクロピペットを用いてマイクロプレートの各ウェルに150 $\mu$ l入れ、これを28 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。

培養後、発色をBIOLOG専用のマイクロプレートリーダーで読みとり、そのデータを専用のコンピュータソフトウェアによって解析し、細菌の同定を行った。

#### c) 細菌集団間の類似性の評価

異なる土壌から得られた細菌相の類似性を比較するために、クラスター分析を応用してその集団の多様性を検討し、さらに、集団間の類似性を検討した。これらの検討には、グラム陽性細菌と陰性細菌に共通の61炭素源の利用性のデータを用い、両者を同時に分析した。

クラスター分析を利用した細菌集団の多様性の評価に関する報告があり(横山ら、1992)、ここではそれに準じて検討した。まず最初に、4集団の多様性を評価するために多様性指数を求めた。ここで多様性指数とは、集団のクラスター間距離の総和に、各菌株当たりの平均クラスター間距離をかけた値と定義する。クラスター分析はユークリッド距離を用いたUPGMA法(unweighted pair-group method using arithmetic averages; 群平均法)によった。

次に、4集団間相互の類似性の検討を行った。ここでは、異なる2集団を混合してクラスター分析を行ない、デンドログラムを描き、集団の重複程度を検討した。



さらに、類似性を数学的に表現するため、類似度という指数を用いた。ここで類似度とは、分子に、2集団をそれぞれ別々にクラスター分析したときのクラスター間距離の和をとり、分母は、2集団を一つに混合して分析したときのクラスター間距離を2倍したものとし、これを100倍してパーセントで表したものである。したがって、この類似度は二つの集団に含まれる菌株のうち、何パーセントが同じものであるかということの意味するものではない。むしろ、二つの集団の相対的な類似性を表す指標である。集団間の類似度を算出するためのクラスター分析には、ユークリッド距離をもとにしたUPGMA法を用いた。一方、デンドログラムを描く際にはユークリッド距離ではなく、マンハッタン距離を用いた。これらは本質的には同じことを示すものであるため、このことによる結果への影響はほとんど無い。

### 結果および考察

細菌菌株の分離と同時に調査した各区の微生物相を図6-1に示した。これまでの結果と同様にアズキ落葉病菌はHE区で著しく減少した。また、全細菌数、色素耐性細菌数の増加はLE区、HE区ともに著しかった。一方、糸状菌数はHE区でのみ著しく増加した。また、放線菌数、耐熱細菌数は人工浸出液の影響をほとんど受けなかった。以上のように、これまでの実験で観察された微生物相の特徴が再現された。

また、供試した各細菌菌株をBIOLOGにより分析した結果を表6-3～6-6に示した。BIOLOGでは各細菌菌株はデータベースに登録されている標準菌株のデータとの比較で分類されるが、データベースも完全ではなく、また、未知の細菌も多数あることから、同定結果は一番近いと考えられる標準菌株で示される。このとき、データベースに登録されている菌株と対象菌株の一致度を示す判断基準として“Similarity”が採用されている。この値は0～1までの間であり、数値が大きい方がよく一致していることを示し、0.5より大きい値のときに同定されたと判断される。ただし、この数値は同定された菌株である確率を示すものではなく、ある種の判断基準である。同じ種であることが示されていても、菌株間でSimilarityに違いがあることが多いが、このことはそれらの菌株が全く同じではないことを示している。

次に、61の炭素源利用性により各区の細菌群をクラスター分析した結果をデンドログラムに示す(図6-2～図6-5)。



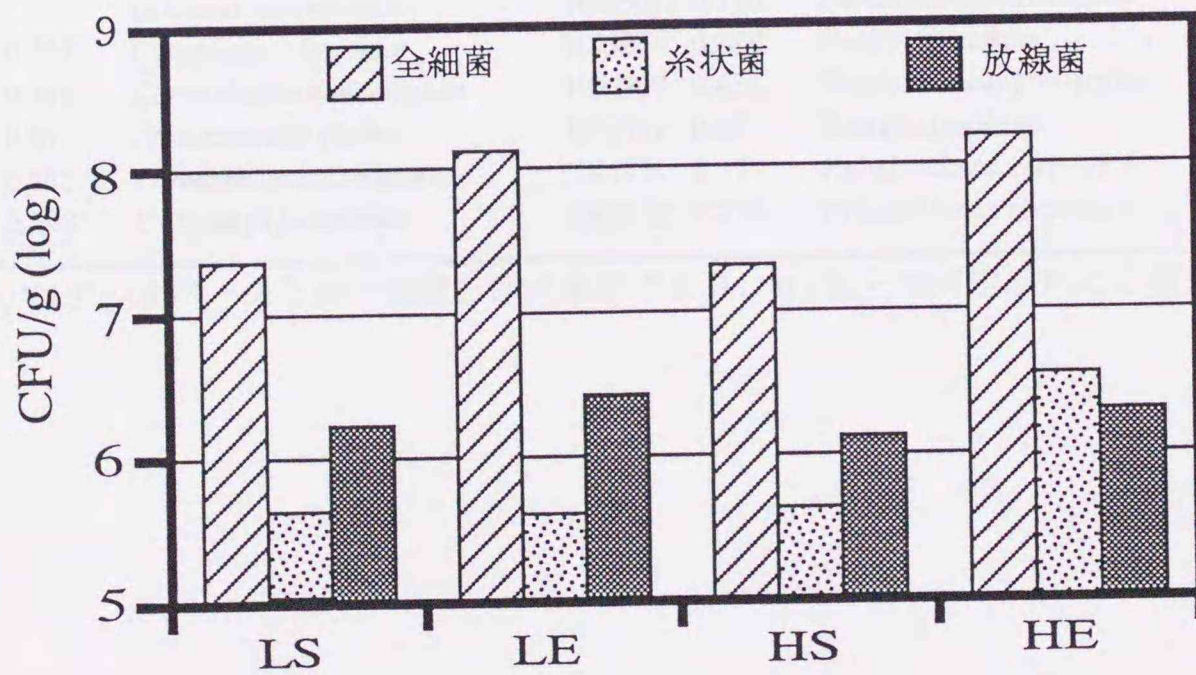
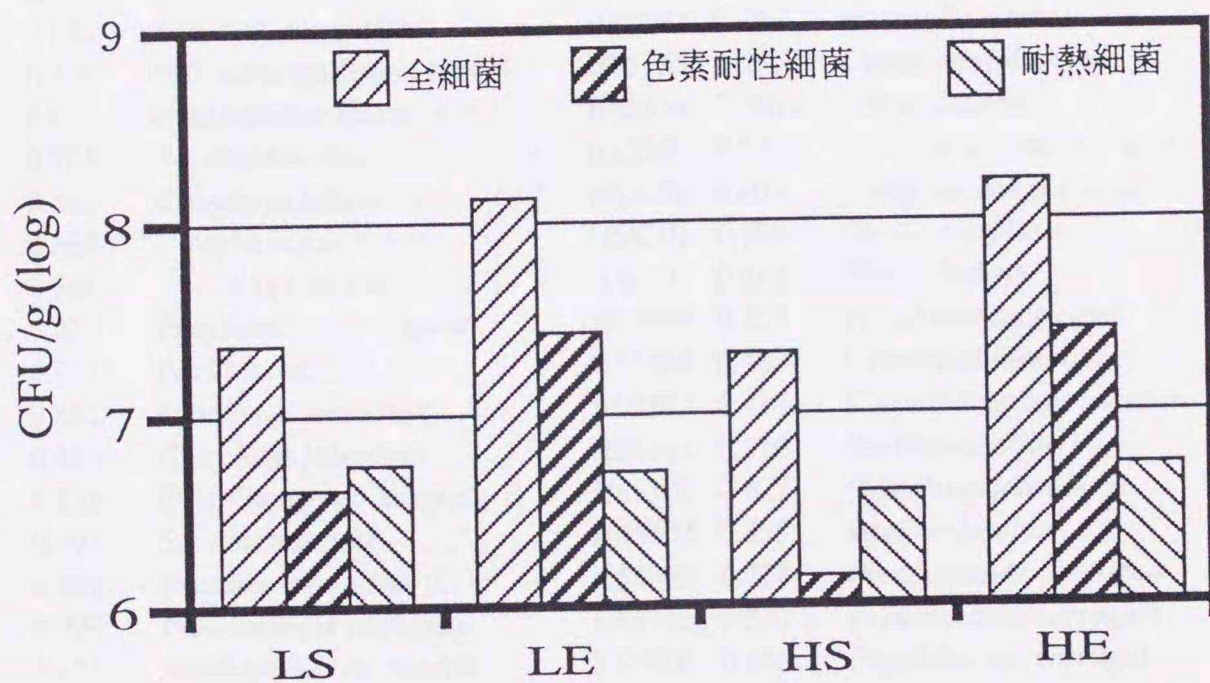
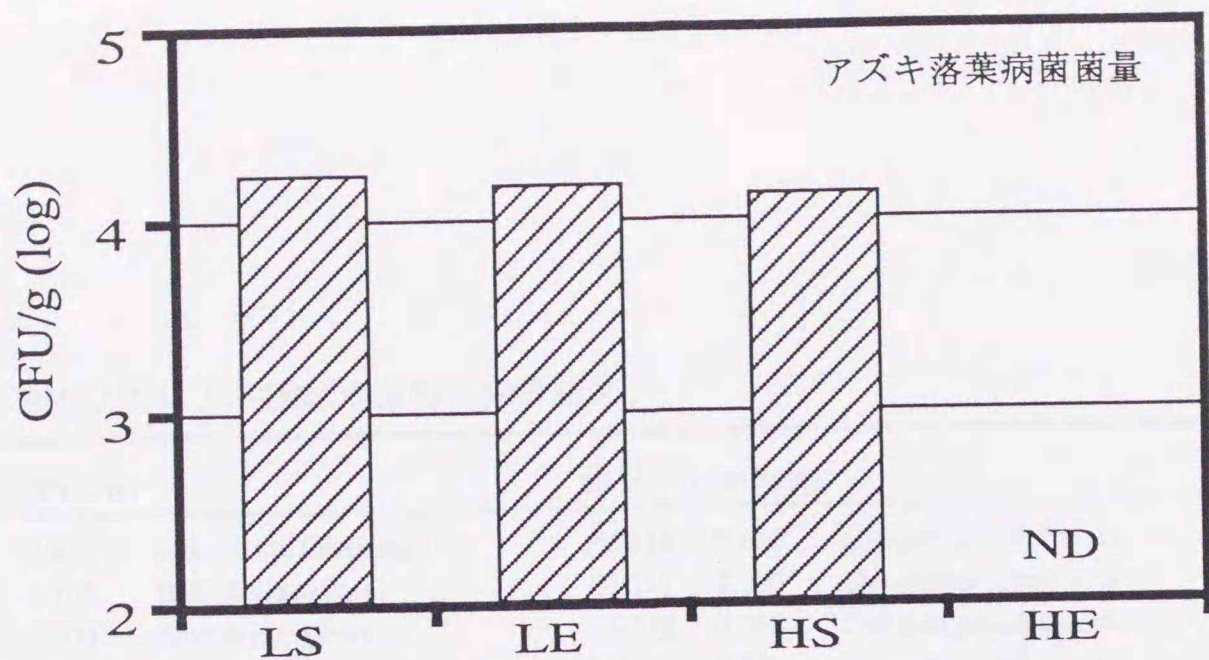


図6-1 人工根圏土壤中の微生物相  
ND; 検出されなかった。



表6-3 BIOLOGによるHS区の菌株の分析結果

菌株 "Similarity"			菌株 "Similarity"		
HS101	0.478	<i>Cytophaga johnsonae</i>	HS310	0.466	<i>Cytophaga johnsonae</i>
HS102	0.703	<i>Bacillus insolitus</i>	HS311	0.500	<i>Cytophaga johnsonae</i>
HS103	0.703	<i>Bacillus insolitus</i>	HS312	0.368	<i>Cytophaga johnsonae</i>
HS104	0.356	<i>Comamonas acidovorans</i>	HS5101	0.281	<i>Cytophaga johnsonae</i>
HS105	0.173	<i>Pseudomonas cichorii</i>	HS5102	0.784	<i>Moraxella atlantae</i>
HS106	0.326	<i>Pseudomonas fluorescens</i> E	HS5103	0.563	<i>Cytophaga johnsonae</i>
HS107	0.622	<i>Pseudomonas fluorescens</i> E	HS5104	0.366	<i>Vibrio fischeri</i>
HS108	0.703	<i>Bacillus insolitus</i>	HS5105	0.791	<i>Brucella abortus</i> biovar 2
HS109	0.563	<i>Cytophaga johnsonae</i>	HS5106	0.601	<i>Pseudomonas corrugata</i>
HS201	0.368	<i>Cytophaga johnsonae</i>	HS5201	0.706	<i>Bacillus insolitus</i>
HS202	0.389	<i>Cytophaga johnsonae</i>	HS5202	0.268	<i>Vibrio fischeri</i>
HS203	0.220	<i>Pseudomonas corrugata</i>	HS5203	0.353	<i>Pseudomonas glathei</i>
HS204	0.713	<i>Bacillus insolitus</i>	HS5204	0.485	<i>Cytophaga johnsonae</i>
HS205	0.485	<i>Cytophaga johnsonae</i>	HS5205	0.416	<i>Corynebacterium jeikeium</i>
HS206	0.486	<i>Cytophaga johnsonae</i>	HS5301	0.519	<i>Bacillus insolitus</i>
HS207	0.527	CDC Group A-5 subgroup B	HS5302	0.427	<i>Cytophaga johnsonae</i>
HS301	0.791	<i>Bacillus insolitus</i>	HS5303	0.855	<i>Bacillus insolitus</i>
HS302	0.399	<i>Pseudomonas cichorii</i>	HS5304	0.730	<i>Pseudomonas corrugata</i>
HS303	0.279	<i>Pseudomonas corrugata</i>	HS5305	0.351	<i>Pseudomonas corrugata</i>
HS304	0.421	<i>Xanthomonas campestris</i> pathovar <i>xanthosoma</i>	HS5306	0.356	<i>Pseudomonas corrugata</i>
HS305	0.597	<i>Cytophaga johnsonae</i>	HS5307	0.730	<i>Pseudomonas corrugata</i>
HS306	0.416	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	HS5308	0.658	<i>Bacillus insolitus</i>
HS307	0.312	<i>Pseudomonas glathei</i>	HS5309	0.434	<i>Rhodochoccus globerulus</i>
HS308	0.515	<i>Pseudomonas corrugata</i>	HS5310	0.435	<i>Bacillus insolitus</i>
HS309	0.599	<i>Cytophaga johnsonae</i>	HS5311	0.378	<i>Pseudomonas corrugata</i>
			HS5312	0.078	<i>Pseudomonas mephitica</i>

"Similarity"はデータベースとの一致度を示す基準であり、0.5以上で同定されたと考える。



表6-4 BIOLOGによるHE区の菌株の分析結果

菌株 "Similarity"			菌株 "Similarity"		
HE101	0.555	<i>Micrococcus luteus</i>	HE204	0.155	<i>Staphylococcus sciuri</i>
HE102	0.112	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	HE205	0.351	<i>Pseudomonas fluorescens</i> B
		pathovar <i>flac</i>	HE206	0.419	<i>Bacillus insolitus</i>
HE103	0.285	<i>Moraxella atlantae</i>	HE207	0.466	<i>Xanthomonas campestris</i>
HE104	0.167	<i>Pseudomonas cichorii</i>			pathovar <i>strelitzia</i>
HE105	0.612	<i>Pseudomonas cepacia</i>	HE208	0.696	<i>Bacillus insolitus</i>
HE106	0.563	<i>Cytophaga johnsonae</i>	HE209	0.728	<i>Moraxella atlantae</i>
HE107	0.301	<i>Moraxella atlantae</i>	HE210	0.563	<i>Cytophaga johnsonae</i>
HE108	0.642	<i>Bacillus insolitus</i>	HE211	0.826	<i>Pseudomonas cepacia</i>
HE109	0.401	<i>Pseudomonas paucimobilis</i> A	HE212	0.826	<i>Pseudomonas cepacia</i>
HE110	0.268	<i>Pseudomonas pikettii</i>	HE213	0.438	CDC Group A-5 subgroup B
HE111	0.008	<i>Staphylococcus lentus</i>	HE214	0.656	<i>Pseudomonas azelaica</i>
HE112	0.636	<i>Moraxella atlantae</i>	HE215	0.009	<i>Staphylococcus sciuri</i>
HE113	0.475	<i>Pseudomonas cepacia</i>	HE216	0.308	<i>Pseudomonas fluorescens</i> E
HE114	0.454	<i>Pseudomonas cepacia</i>	HE217	0.196	<i>Pseudomonas glathe</i>
HE115	0.337	<i>Bacillus insolitus</i>	HE301	0.391	<i>Pseudomonas corrugata</i>
HE116	0.537	<i>Alkaligenes faecalis</i> type II	HE302	0.664	<i>Pseudomonas corrugata</i>
HE117	0.291	<i>Pseudomonas fluorescens</i> B	HE303	0.198	<i>Pseudomonas cichorii</i>
HE118	0.284	<i>Moraxella bovis</i>	HE304	0.220	<i>Rhodococcus luteus</i>
HE119	0.242	<i>Pseudomonas cichorii</i>	HE305	0.121	<i>Staphylococcus lentus</i>
HE120	0.689	<i>Pseudomonas corrugata</i>	HE306	0.160	<i>Pseudomonas azelaica</i>
HE121	0.377	<i>Pseudomonas corrugata</i>	HE307	0.294	<i>Shewanella putrefaciens</i> A
HE122	0.448	<i>Pseudomonas corrugata</i>	HE308	0.177	<i>Pseudomonas glathe</i>
HE123	0.338	<i>Pseudomonas cichorii</i>	HE309	0.005	<i>Staphylococcus lentus</i>
HE124	0.642	<i>Bacillus insolitus</i>	HE310	0.216	CDC Group A-5 subgroup B
HE201	0.802	<i>Pseudomonas cepacia</i>	HE311	0.276	<i>Pseudomonas paucimobilis</i> A
HE202	0.585	<i>Alkaligenes faecalis</i> type II	HE312	0.144	<i>Arthrobacter histidinolovorans</i>
HE203	0.826	<i>Pseudomonas cepacia</i>			

"Similarity"はデータベースとの一致度を示す基準であり、0.5以上で同定されたと考える。



表6-5 BIOLOGによるLS区の菌株の分析結果

菌株 "Similarity"			菌株 "Similarity"		
LS101	0.197	<i>Pseudomonas paucimobilis</i> B	LS212	0.348	<i>Curtobacterium citerum</i>
LS102	0.666	CDC Group A-5 subgroup B	LS213	0.563	<i>Cytophaga johnsonae</i>
LS103	0.478	<i>Cytophaga johnsonae</i>	LS214	0.198	<i>Pseudomonas cichorii</i>
LS104	0.607	<i>Bacillus insolitus</i>	LS301	0.759	<i>Bacillus insolitus</i>
LS105	0.006	<i>Staphylococcus lentus</i>	LS302	0.497	<i>Moraxella atlantae</i>
LS106	0.563	<i>Cytophaga johnsonae</i>	LS303	0.589	<i>Pseudomonas corrugata</i>
LS107	0.563	<i>Cytophaga johnsonae</i>	LS304	0.488	<i>Cytophaga johnsonae</i>
LS108	0.612	<i>Bacillus megaterium</i>	LS305	0.222	<i>Pseudomonas fluorescens</i> E
LS201	0.144	<i>Comamonas testosteroni</i>	LS306	0.379	<i>Cytophaga johnsonae</i>
LS202	0.501	<i>Bacillus insolitus</i>	LS307	0.713	<i>Bacillus insolitus</i>
LS203	0.454	<i>Cytophaga johnsonae</i>	LS308	0.488	<i>Cytophaga johnsonae</i>
LS204	0.511	<i>Pseudomonas corrugata</i>	LS309	0.379	<i>Cytophaga johnsonae</i>
LS205	0.210	<i>Xanthomonas campestris</i> pathovar <i>vesicatoria</i> B	LS310	0.523	<i>Cytophaga johnsonae</i>
LS206	0.308	<i>Cytophaga johnsonae</i>	LS311	0.582	<i>Pseudomonas corrugata</i>
LS207	0.421	<i>Cytophaga johnsonae</i>	LS312	0.352	<i>Curtobacterium luteum</i>
LS208	0.749	<i>Pseudomonas corrugata</i>	LS313	0.524	<i>Cytophaga johnsonae</i>
LS209	0.181	<i>Staphylococcus lentus</i>	LS314	0.691	<i>Bacillus insolitus</i>
LS210	0.488	<i>Cytophaga johnsonae</i>	LS315	0.259	<i>Pseudomonas cichorii</i>
LS211	0.302	<i>Cytophaga johnsonae</i>			

"Similarity"はデータベースとの一致度を示す基準であり、0.5以上で同定されたと考える。



表6-6 BIOLOGによるLE区の菌株の分析結果

菌株 "Similarity"			菌株 "Similarity"		
LE101	0.128	<i>Weeksella zoohelcum</i>	LE210	0.680	<i>Pseudomonas corrugata</i>
LE102	0.562	<i>Pseudomonas corrugata</i>	LE211	0.468	<i>Moraxella atlantae</i>
LE103	0.098	<i>Pseudomonas paucimobilis</i> B	LE212	0.452	<i>Pseudomonas corrugata</i>
LE104	0.521	<i>Pseudomonas corrugata</i>	LE213	0.611	<i>Janthinobacterium lividum</i> B (26C)
LE105	0.148	<i>Staphylococcus lentus</i>	LE214	0.693	<i>Janthinobacterium lividum</i> B (26C)
LE106	0.219	<i>Alkaligenes faecalis</i> type II	LE215	0.458	<i>Bacillus subtilis</i>
LE107	0.871	<i>Moraxella atlantae</i>	LE216	0.799	<i>Pseudomonas corrugata</i>
LE108	0.405	<i>Pseudomonas corrugata</i>	LE217	0.759	<i>Bacillus insolitus</i>
LE109	0.169	<i>Pseudomonas viridilivida</i> B	LE218	0.702	<i>Pseudomonas corrugata</i>
LE110	0.704	<i>Pseudomonas corrugata</i>	LE219	0.437	<i>Pseudomonas corrugata</i>
LE111	0.697	<i>Pseudomonas corrugata</i>	LE220	0.530	<i>Pseudomonas corrugata</i>
LE112	0.542	<i>Pseudomonas corrugata</i>	LE221	0.589	<i>Bacillus insolitus</i>
LE113	0.472	<i>Brucella abortus</i> biovar 2	LE301	0.415	<i>Capnocytophaga canimorsus</i>
LE114	0.296	CDC Group A-5 subgroup B	LE302	0.475	<i>Cytophaga johnsonae</i>
LE115	0.735	<i>Pseudomonas corrugata</i>	LE303	0.006	<i>Staphylococcus lentus</i>
LE116	0.219	<i>Alkaligenes faecalis</i> type II	LE304	0.542	<i>Pseudomonas fluorescens</i> E
LE117	0.244	<i>Pseudomonas cichorii</i>	LE305	0.465	<i>Pseudomonas corrugata</i>
LE118	0.401	<i>Pseudomonas corrugata</i>	LE306	0.596	<i>Pseudomonas corrugata</i>
LE119	0.100	<i>Pseudomonas fluorescens</i> B	LE307	0.724	<i>Pseudomonas corrugata</i>
LE120	0.546	<i>Pseudomonas corrugata</i>	LE308	0.598	<i>Pseudomonas corrugata</i>
LE201	0.749	<i>Pseudomonas corrugata</i>	LE309	0.522	<i>Pseudomonas corrugata</i>
LE202	0.741	<i>Pseudomonas corrugata</i>	LE310	0.410	<i>Cytophaga johnsonae</i>
LE203	0.634	<i>Pseudomonas corrugata</i>	LE311	0.339	<i>Cytophaga johnsonae</i>
LE204	0.742	<i>Moraxella atlantae</i>	LE312	0.390	<i>Pseudomonas fluorescens</i> F
LE205	0.831	<i>Pseudomonas corrugata</i>	LE313	0.683	<i>Cytophaga johnsonae</i>
LE206	0.579	<i>Pseudomonas corrugata</i>	LE314	0.163	<i>Pseudomonas cichorii</i>
LE207	0.799	<i>Pseudomonas corrugata</i>	LE315	0.220	<i>Pseudomonas cichorii</i>
LE208	0.237	<i>Pseudomonas corrugata</i>	LE316	0.379	<i>Cytophaga johnsonae</i>
LE209	0.177	<i>Enterococcus gallinarum</i>	LE317	0.485	<i>Cytophaga johnsonae</i>

"Similarity"はデータベースとの一致度を示す基準であり、0.5以上で同定されたと考える。



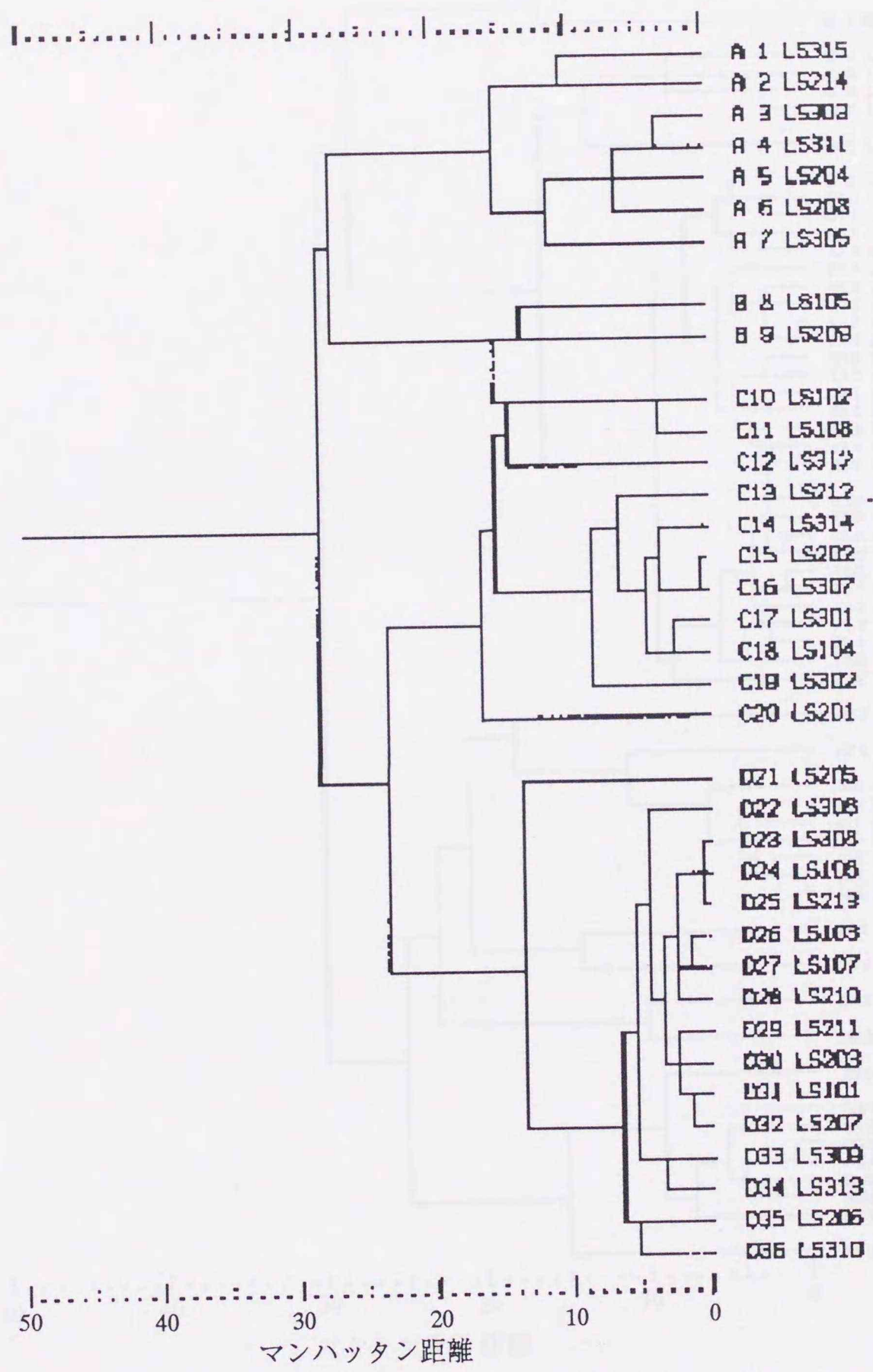


図6-2 LS区の細菌集団を61の炭素源利用性に基づき分類したデンドログラム  
各菌株名の前に書かれたアルファベットは一つのクラスターを示す。



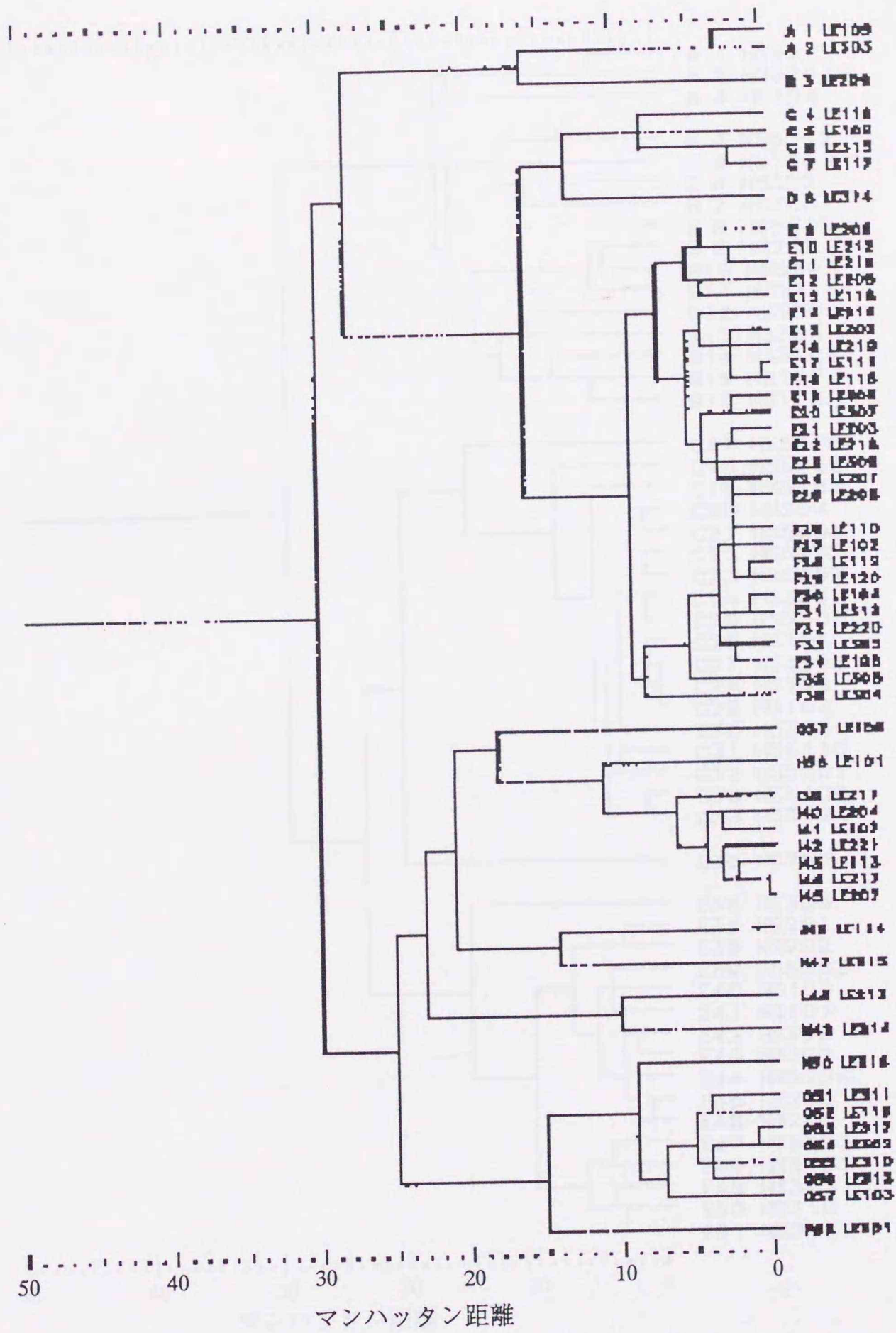


図6-3 LE区の細菌集団を61の炭素源利用性に基づき分類したデンドログラム  
 各菌株名の前に書かれたアルファベットは一つのクラスターを示す。



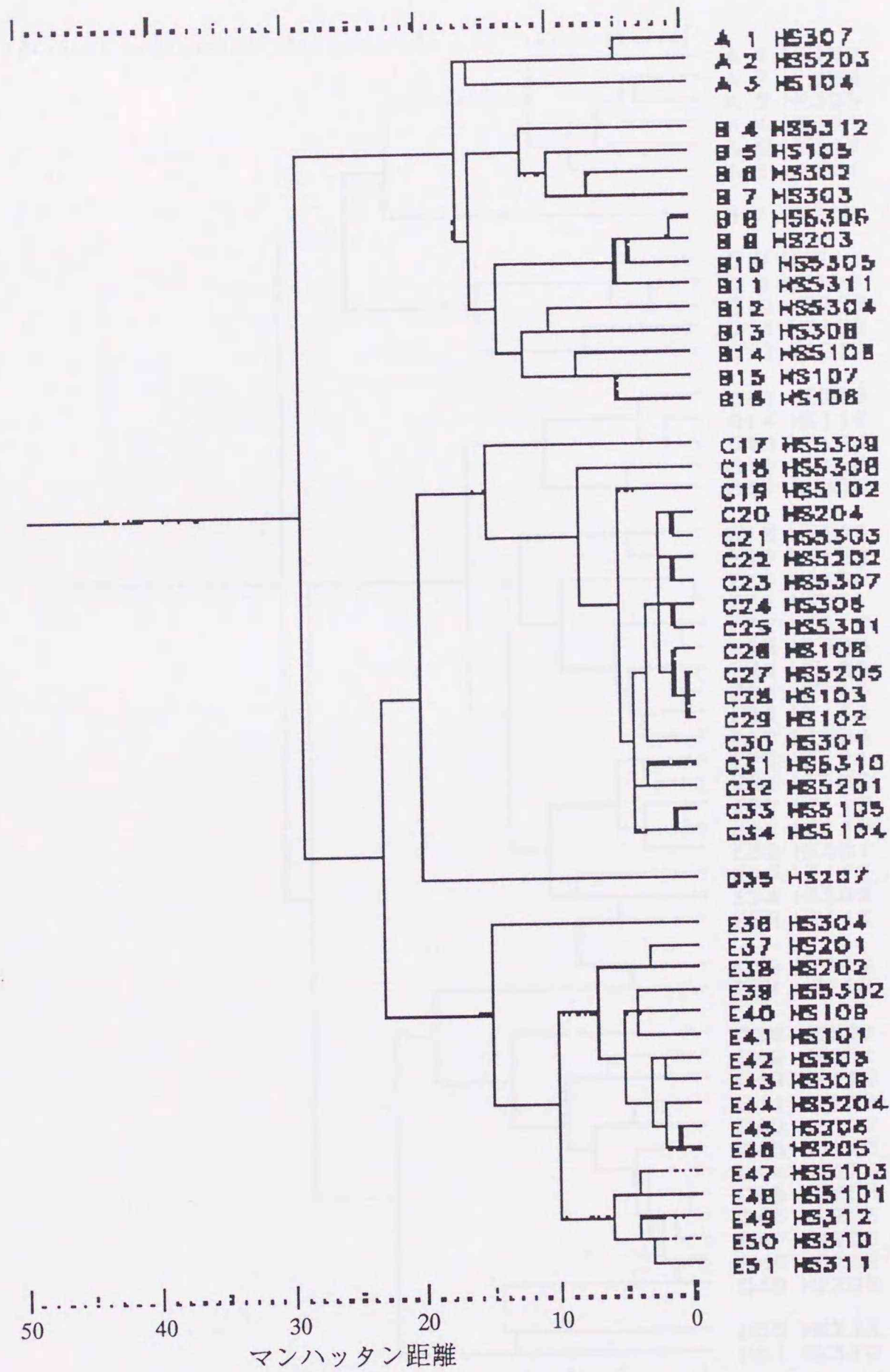


図6-4 HS区の細菌集団を61の炭素源利用性に基づき分類したデンドログラム  
 各菌株名の前に書かれたアルファベットは一つのクラスターを示す。



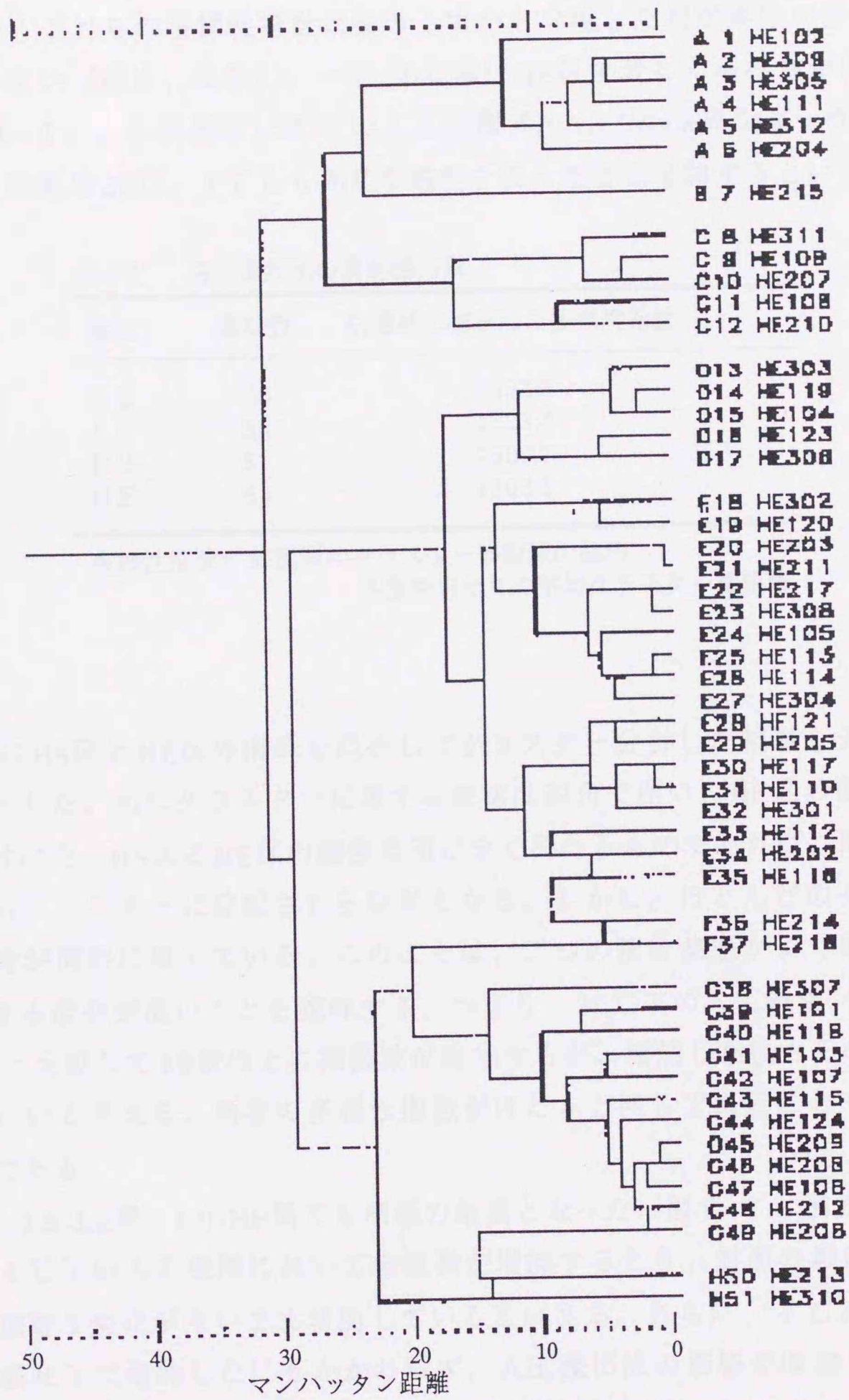


図6-5 HE区の細菌集団を61の炭素源利用性に基づき分類したデンドログラム  
 各菌株名の前に書かれたアルファベットは一つのクラスターを示す。



また、これらの結果をもとに各区の細菌集団の多様性指数を算出した（表6-7）。LS区が多様性指数が他の3区よりやや高いが、ほとんど差がないといつてよいと思われる。したがって、人工浸出液によって細菌集団の多様性は影響を受けないといえる。また、これらの多様性指数は他の土壌から分離した細菌集団の多様性と比較するとやや高い（横山、私信）。一方、糸状菌はHE区で著しく多様性が低下した（本章1.、表6-1）。糸状菌は25℃下の人工根圏で*Penicillium*属など一部が著しく増加するが、細菌は25℃、4℃とも同じ多様性を保ったまま増加するといえる。

表6-7 各細菌集団の多様性指数

集団	菌株数	50菌株に補正した多様性指数
LS	36	1697.5
LE	58	1523.4
HS	51	1500.7
HE	53	1503.2

$$\text{多様性指数} = \frac{\text{集団間のクラスター間距離の総和}}{\times \text{各菌株当たりの平均クラスター間距離}}$$

図6-6にHS区とHE区の菌株を混合してクラスター分析した結果をデンドログラムにして示した。同じクラスターに属する菌株は四角で囲い、HE区の菌株の後ろにはバーを付けた。HS区とHE区の細菌集団が全く異なるものであれば、両者の菌株は全く別々のクラスターに分配される結果となる。しかし、ほとんどのクラスターに両者の菌株が同時に属している。このことは、二つの細菌集団がよく似たものであり、共通する度合が高いことを意味する。つまり、25℃下の人工根圏（HE）では対照（HS）と比較して10倍以上に細菌数が増加するが、増加した後もその構成に顕著な変化はないといえる。両者の多様性指数がほとんど同じであることもこれを支持する結果である。

さらに、LS-LE間、LE-HE間でも同様の結果となった（図6-7、図6-8）。したがって、4℃下の人工根圏において細菌数が増加するとき、対照の細菌相と比較して構成に顕著な変化がないまま増加しているといえる。さらに、4℃と25℃という異なった温度下で増加したにもかかわらず、人工浸出液の影響で増加した細菌相には大きな違いは認められないといえる。

以上のことは類似度という指標を用いても同様の結果となった（図6-9）。



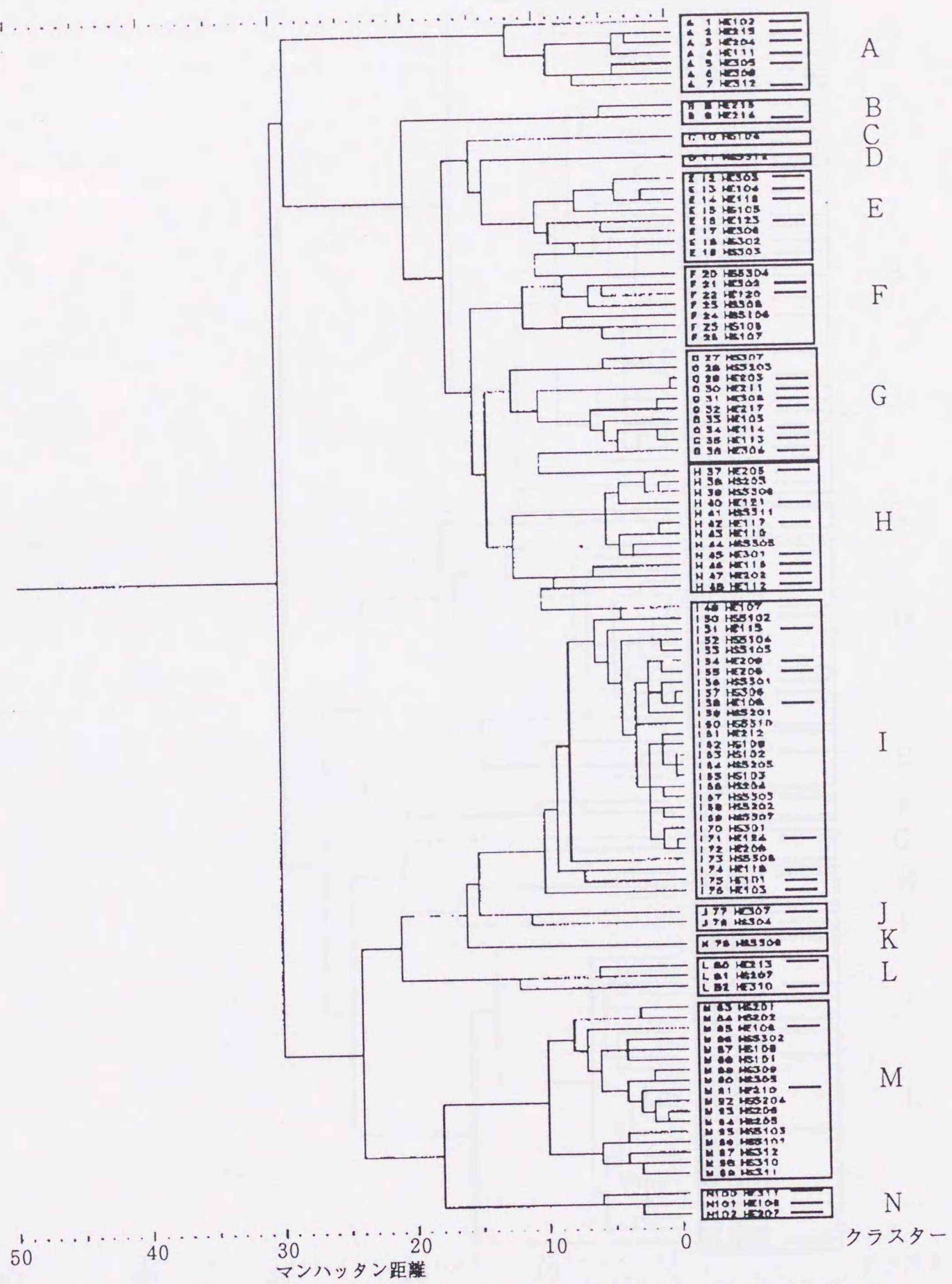


図6-6 HS区とHE区の細菌集団を混合してクラスター分析して描いたデンドログラム  
 菌株名の後ろにバーのあるものがHE区の菌株。同じクラスターに属する菌株は  
 四角で囲った。



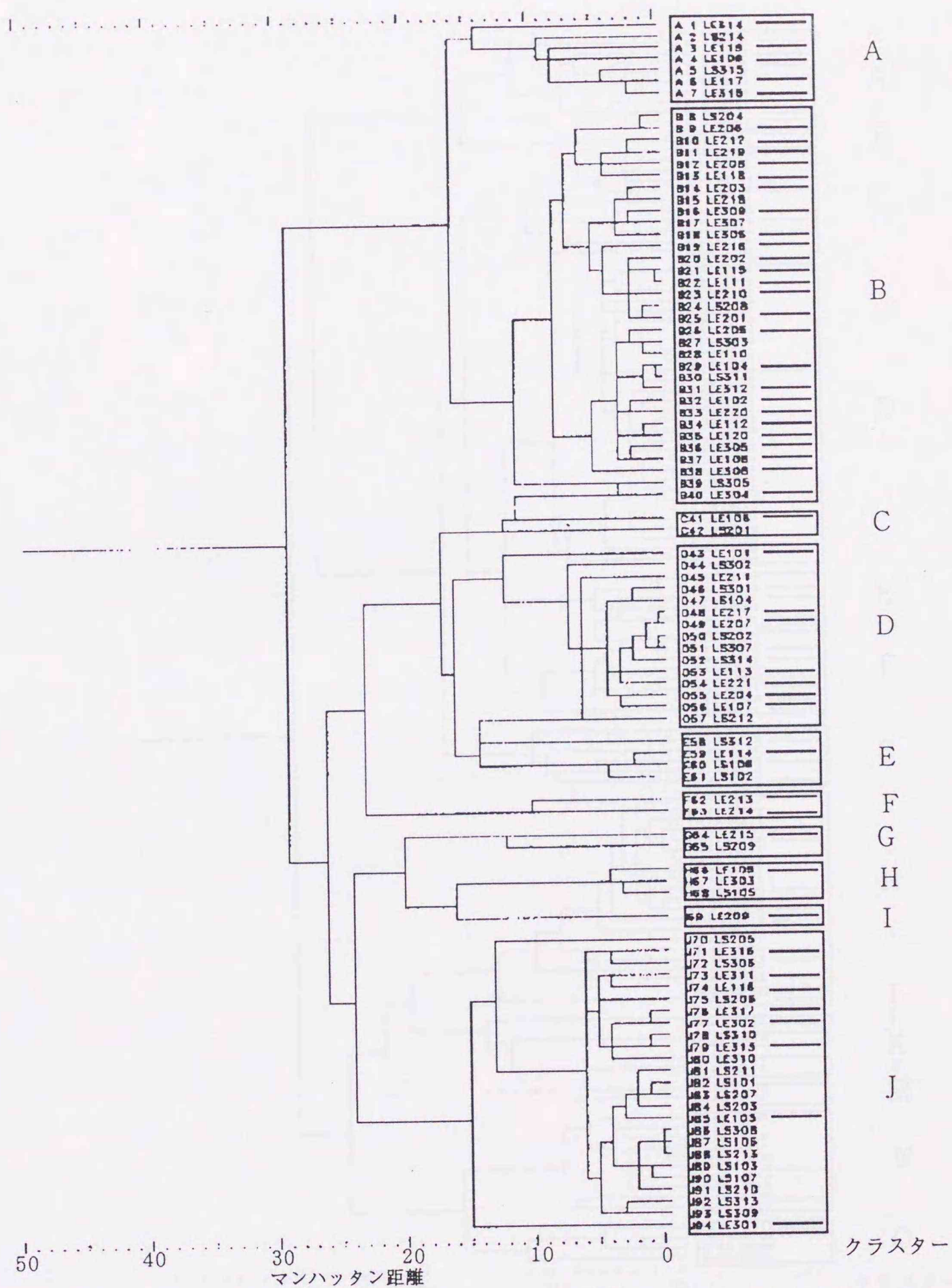


図6-7 LS区とLE区の細菌集団を混合してクラスター分析して描いたデンドログラム  
 菌株名の後ろにバーのあるものがLE区の菌株。同じクラスターに属する菌株は  
 四角で囲った。



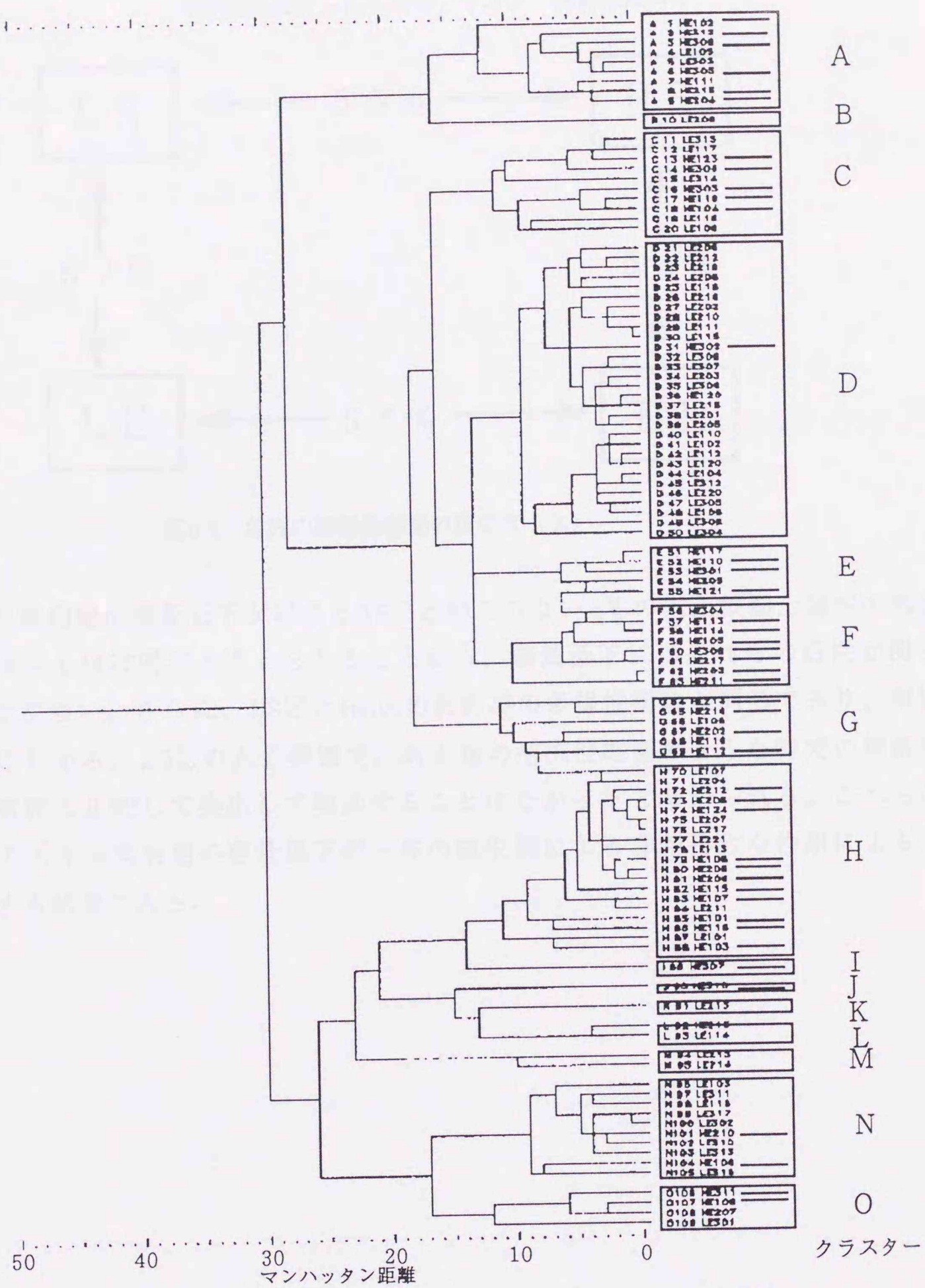


図6-8 LE区とHE区の細菌集団を混合してクラスター分析して描いたデンドログラム  
 菌株名の後ろにバーのあるものがHE区の菌株。同じクラスターに属する菌株は  
 四角で囲った。



$$\text{類似度 (\%)} = \frac{\text{2集団のクラスター間総距離の和}}{\text{2集団を混合したときのクラスター間総距離} \times 2} \times 100$$

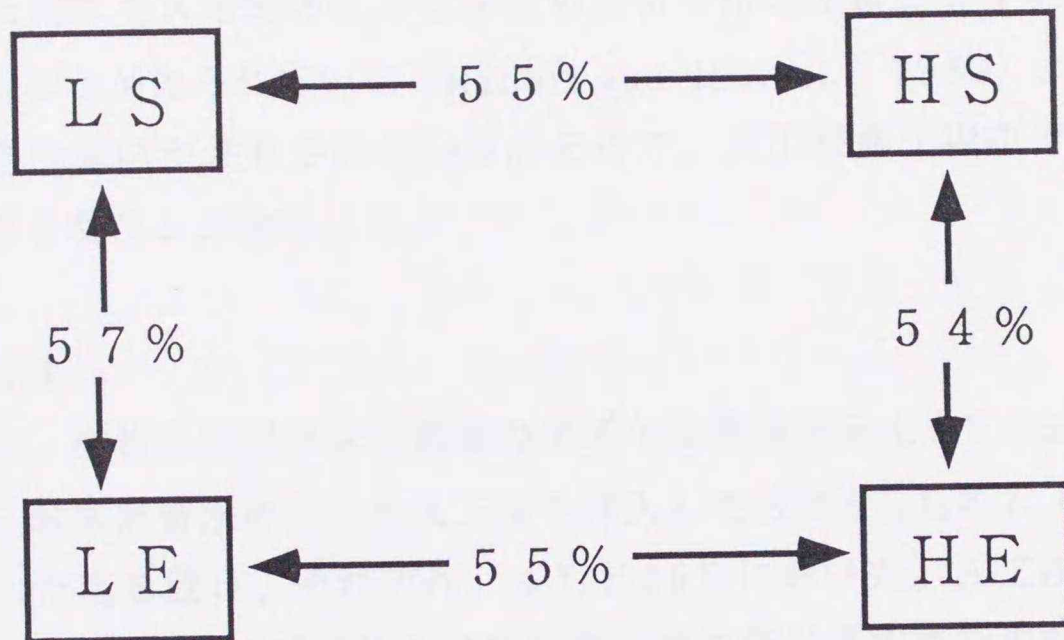


図6-9 各区の細菌集団間の類似度 (%)

アズキ落葉病菌の菌量低下が起こる25℃と起こらない4℃の人工根圏土壤中の細菌は、数も種類もほぼ同様と考えられることから、菌量低下にはこれらの活性が関与する可能性が強い。さらに、HS区とHE区の細菌群の多様性指数が同じであり、類似度が高いことから、25℃の人工根圏で、ある種の拮抗性細菌のような特定の細菌群が他の細菌群と比較して突出して増加することはなかったと考えられる。これらのことは、アズキ落葉病菌の菌量低下が一般の微生物による非特異的な作用によることを支持する結果である。



### 3. 人工浸出液が低栄養細菌に与える影響

土壌中には肉エキス培地のような栄養の豊富な培地では生育不能な低栄養細菌が多数存在することが知られている (Hattori and Hattori, 1980)。近年、この低栄養細菌の生態的意味が注目されている。そこで、人工根圏土壌中で低栄養細菌がどのような影響を受けるか検討した。

#### 材料および方法

土壌は北大・植物寄生病学講座圃場のアズキ落葉病激発土を5.66mmのふるいを通して用いた。殺菌蒸留水の入った人工根を挿入した区と5mMの人工浸出液の入ったものを挿入した区を設け、それぞれ、4℃と25℃においた。人工浸出液の組成は第5章1.と同様とした。実験開始7日目に各土壌の低栄養細菌数の調査を行った。人工根圏土壌の採取などその他の条件は第5章1.に準じた。

低栄養細菌数は100倍希釈肉エキス培地 (DNB培地) を用いた希釈平板法によった。これを25℃で培養し、6日目以降に表れたコロニーを計数して低栄養細菌数とした。コロニーの計数は希釈平板後20日目に行った。

#### 結果および考察

25℃下のSDW区、5mM区および4℃下のSDW区、5mM区の低栄養細菌数 (cfu/g) はそれぞれ、 $6.5 \times 10^7$ 、 $3.1 \times 10^7$ 、 $4.6 \times 10^7$ 、 $2.7 \times 10^7$ であり、ほとんど違いは認められなかった。低栄養細菌は富栄養条件下では増殖できないため人工根圏土壌中では増殖しなかったと考えられる。また、低栄養細菌はセリン、アスパラギンなどのアミノ酸存在下では強い増殖阻害を受けることが報告されている (Hattori and Hattori, 1980)。人工浸出液にはグルタミン酸、アスパラギン酸およびセリンの3種のアミノ酸が含まれており、この作用によって低栄養細菌は増殖阻害を受けたものと考えられる。

アズキ落葉病菌菌量の低下現象が起こる25℃下の人工根圏で変化がみられないことから、低栄養細菌が菌量低下に関与する可能性は低いと思われる。むしろ、人工浸出液に反応して増殖する高栄養細菌が大きな役割を果たすことが推察される。



#### 4. 人工根圏土壤中の微生物活性

4℃下においた人工根圏土壤と25℃下においたそれを比較すると、糸状菌数では異なるが、細菌数および細菌相はほぼ同様であることが明らかとなった。25℃下における糸状菌数の増加は特定の数種の増加によるものであり、この特異的な増加が直接アズキ落葉病菌の菌量低下を起こすとは考えにくい(本章1.)。したがって、これを除くと、二つの人工根圏土壤中では微生物相に質的、量的な違いはないと考えられる。ところが、アズキ落葉病菌の菌量低下が認められるのは25℃下の人工根圏のみである。この原因として微生物の活性の違いが考えられた。そこで、本実験では人工根圏土壤の呼吸量を測定し、その微生物活性を調査した。

#### 材料および方法

人工浸出液の組成は第5章1.と同様とし、濃度は5mMとした。土壤は北大・植物寄生病学講座圃場土のアズキ落葉病激発土を5.66mmのふるいを通して用いた。これを腰高シャーレにつめ、人工根を挿入した(5mM区)。対照として人工根を挿入しない土壤(無処理区)、殺菌蒸留水の入った人工根を挿入したもの(SDW区)を用意した。これらをそれぞれ密閉容器に入れ、土壤より発生する二酸化炭素量を測定した。また、温度による微生物活性の違いを検討するため、これら3区はそれぞれ4℃と25℃においた。二酸化炭素量の測定方法は田辺の簡易法を改変して用いた(田辺、1975)。密閉容器内に0.2N NaOH 4mlの入ったバイアル瓶をいれ、二酸化炭素を吸収させた。これを一定時間おきに取りだし、0.2N HClで滴定し、二酸化炭素の発生量を計算した(図6-10)。

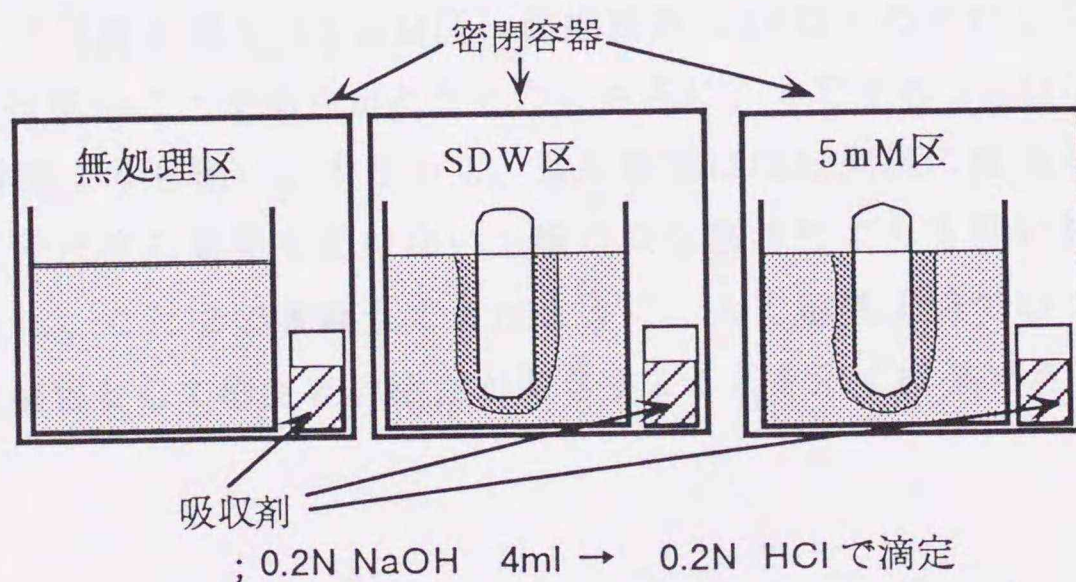


図6-10 人工根圏土壤より発生する二酸化炭素量の測定



## 結果および考察

二酸化炭素発生量の測定結果を図6-11に示した。

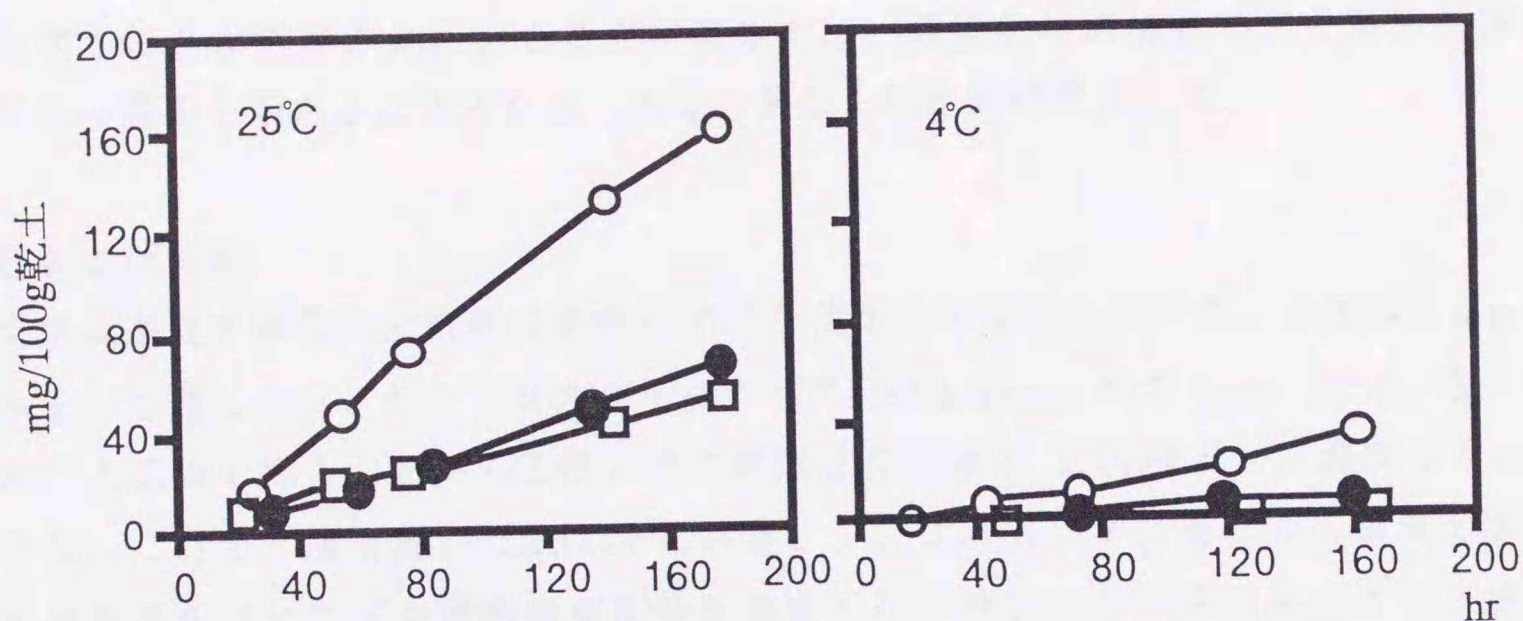


図6-11 人工根圏土壌からの二酸化炭素発生量

□ 無処理区 ● SDW区 ○ 5 mM区

25°C下の対照と比較して、人工根圏土壌（5 mM区）の二酸化炭素発生量すなわち微生物活性は高い。本実験では腰高シャーレ内の土壌全体からの二酸化炭素を測定したが、実際に人工浸出液の影響を受ける土壌はその一部であると考えられることから、その人工根圏土壌のみを取り出せば、乾土100g当たりの二酸化炭素発生量はさらに多くなると考えられる。つまり、人工根圏と対照の微生物活性の差は図6-11に示したよりもさらに大きくなることが推測される。

4°C下の人工根圏土壌中（5 mM区）の細菌数は25°C下のそれと同様に増加するが、その活性は低いことが明らかとなった。さらに、4°C下の5 mM区の微生物活性は25°C下の対照よりも低い。すなわち、微生物数はほぼ同様に増加していても、その活性は人工浸出液の影響を受けない土壌の微生物活性よりも低い結果となった。これらのことは、これまで議論してきたように、人工根圏土壌でのアズキ落葉病菌の菌量低下の要因として微生物の活性が関与することを示す結果である。



## 5. 人工根圏土壌中でのアズキ落葉病菌菌量低下の経時的变化

これまでの実験から、人工根圏土壌中でのアズキ落葉病菌菌量の低下には、人工浸出液の影響による微生物（特に細菌）数の増加とそれに伴う微生物活性の増大が関与することが推察された。そこで本実験では、細菌数の増加とアズキ落葉病菌の低下との関係を明らかにするため、両者の菌量を経時的に調査した。

### 材料および方法

土壌は道立十勝農試病虫科圃場内のアズキ落葉病激発土を用いた。土壌は1mm目のふるいを通した。これをプラスチックカップ（径4.5cm、高さ9cm、220ml容）につめ、人工根を挿入した。人工浸出液の組成は第5章1.と同様とし、濃度は5mMとした。これを4個用意して25℃下におき、1、3、5、7日後に人工根圏土壌中の細菌数ならびにアズキ落葉病菌菌量を調査した。調査は希釈平板法により、細菌用に10%TSAを用い、アズキ落葉病菌用には選択分離培地を用いた。人工根圏土壌の採取方法などは第5章1.と同様とした。

また、対照として実験開始時の土壌中細菌数ならびにアズキ落葉病菌菌量も調査した。

### 結果および考察

図6-12に結果を示した。人工浸出液の土壌中への浸出量の目安として人工根圏土壌の含水率もあわせて示した。

細菌数の増加は実験開始1日後にすでに起こり、その後はほぼ一定だった。一方、アズキ落葉病菌菌量は5日目までは減少率が低く、その後大きく減少し、7日後の調査では検出されなかった。

また、同様の実験を、北大・植物寄生病学講座圃場内のアズキ落葉病激発土を用い、反復数を2として行ったところ、アズキ落葉病菌菌量は5日目の調査で著しく減少した。

これらの結果から、菌量低下は後半に起こると結論できる。したがって、菌量の低下は細菌数の著しい増加の過程で起きるのではなく、その結果として、増加した細菌が数日間何らかの活動することによって起きると考えられる。



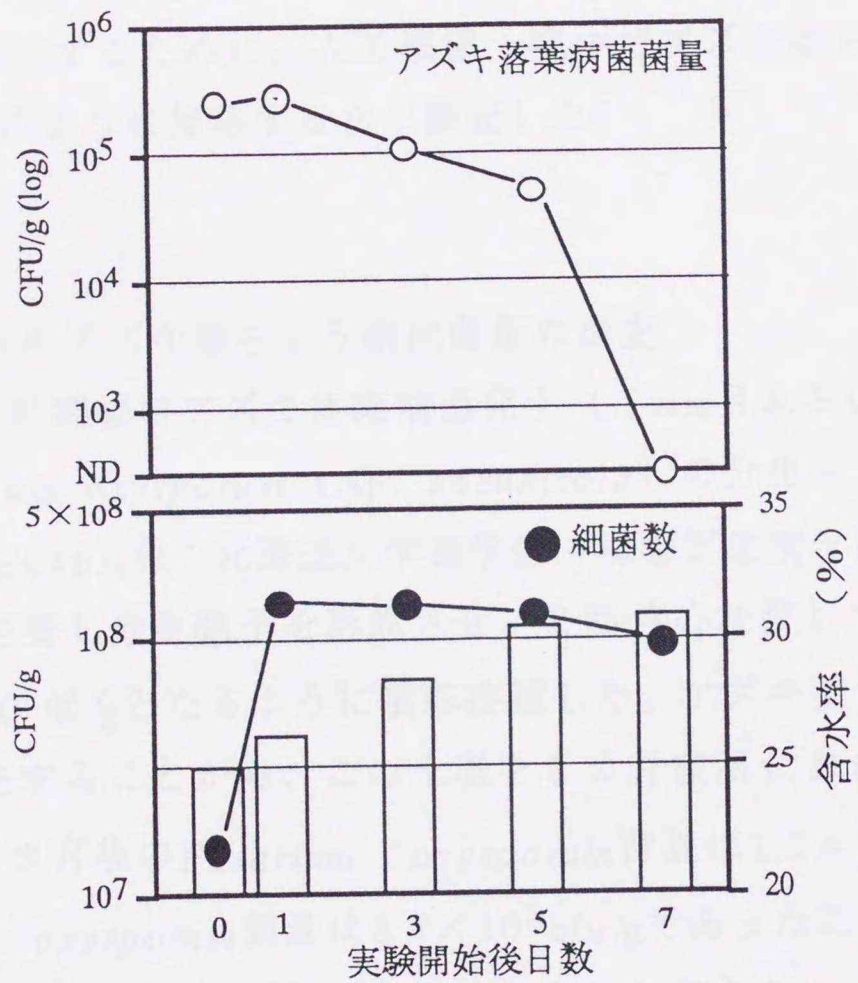


図6-12 人工根圏土壤中のアズキ落葉病菌と細菌数の経時的変化



## 第7章 人工浸出液が土壌中の他の病原菌に与える影響

アズキ落葉病菌菌量は人工根圏土壌中で著しく低下する。このことはトウモロコシ、アズキなどの根圏で、非特異的に低下することを支持する結果であると考えられる。一方で、他の病原菌については、複数種の植物根圏で菌量低下現象が起こることはあまり報告されていない。したがって、これがアズキ落葉病菌に特異的な現象であるか否かが問題となる。

そこで、本章では人工根圏土壌中における菌量低下がアズキ落葉病菌に特異的なものであるのかを検討するために、人工根圏土壌中でアズキ萎ちょう病菌とコムギ条斑病菌の菌量がどのように推移するかを調査した。

### 材料および方法

#### a) 人工根圏土壌中のアズキ萎ちょう病菌菌量の調査

道立十勝農試病虫科圃場のアズキ落葉病激発土（1 mm目ふるい通し）にアズキ萎ちょう病菌（*Fusarium oxysporum* f.sp. *adzukicola*）の分生胞子を接種した。アズキ萎ちょう病菌（KF646A株；北海道大学農学部・植物寄生病学講座、近藤則夫氏より分譲）をPDAで培養し分生胞子を形成させ、2回遠心洗浄して用いた。この分生胞子を土壌に $5 \times 10^5$ 個/gとなるように噴霧接種した。アズキ萎ちょう病菌は土壌中では厚膜胞子で存在することから、この土壌を1カ月室温におき、土壌中で厚膜胞子を形成させた。1カ月後の*Fusarium oxysporum*菌量は $1.1 \times 10^5$ cfu/gであった。接種前の土壌中の*F. oxysporum*菌量は $8.7 \times 10^3$ cfu/gであったことから、接種土壌中の*F. oxysporum*の大半はアズキ萎ちょう病菌であると考えた。*F. oxysporum*菌量の測定は駒田培地を用いた希釈平板法によった。

上述の土壌をプラスチックカップにつめ、人工根を挿入した。人工根圏に関する実験方法は第5章1.に準じた。人工浸出液の濃度は5 mMとし、対照としてSDW区を用意した。これらを4℃と25℃の二つの温度下においた。7日後にアズキ萎ちょう病菌菌量と微生物相の調査を行った。アズキ萎ちょう病菌菌量の調査には駒田培地を用い、シャーレの反復数は3とした。微生物相の調査は第5章1.に準じた。



#### b) 人工根圏土壌中のコムギ条斑病菌菌量の調査

道立十勝農試病虫科圃場のアズキ落葉病激発土（1 mm目ふるい通し）にコムギ条斑病菌（*Cephalosporium gramineum*）の分生胞子を接種した。コムギ条斑病菌（北大・植物寄生病学講座保存菌株 SO-2）をPDAで培養し分生胞子を形成させ、2回遠心洗浄して供試した。分生胞子は土壌に $10^6$ 個/gとなるように噴霧接種し、1日おいてから以下の実験に供試した。このとき土壌中の本菌菌量を希釈平板法により調査したところ、 $6.5 \times 10^5$  cfu/gであった。

この土壌をプラスチックカップにつめ、人工根を挿入した。人工根圏に関する実験方法は第5章1.に準じた。人工浸出液の濃度は5 mMとし、対照としてSDW区を用意し、これらを4℃と25℃の二つの温度下においた。7日後、細菌数とコムギ条斑病菌菌量を希釈平板法により調査した。細菌数用には10% TSA、コムギ条斑病菌用にはコムギ条斑病菌選択分離培地（Wiese and Ravenscroft, 1973）を用い、3枚のシャーレの計数を平均して菌量を算出した。

#### 結果および考察

図7-1にアズキ萎ちょう病菌に関する調査結果を示した。

本実験においても、アズキ落葉病菌に関しての実験と同様の微生物相の変化が認められた。すなわち、全細菌数、色素耐性細菌数が4℃と25℃の人工根圏土壌で増加し、耐熱細菌と放線菌はほとんど増加しなかった。また、糸状菌は25℃の人工根圏で著しい増加を示した。

このように微生物相は同様であったにもかかわらず、アズキ萎ちょう病菌菌量は25℃下の人工根圏土壌中で全く減少しなかった。

さらに、本実験で用いたKF646A菌株から誘導した*nit*-mutantであるKF646/13の厚膜胞子を接種した土壌を用いて同様の実験を行った。*nit*-mutantとは硝酸塩を利用できない突然変異株であり、硝酸塩を唯一の窒素源とするMM培地上では野性株と異なる生育を示し(Puhalla, 1985)、この性質は*Fusarium oxysporum*の分化型を区別するマーカーとして用いられる。このことに関して、*nit*-mutantと親株の土壌中の生存が3つの分化型を用いて検討され、両者に差がないことが明らかとなっている（Hadar *et al.*, 1989）。

*nit*-mutantであるKF646/13を用いた結果、親株と全く同様に人工根圏土壌中での菌量低下は認められなかった。



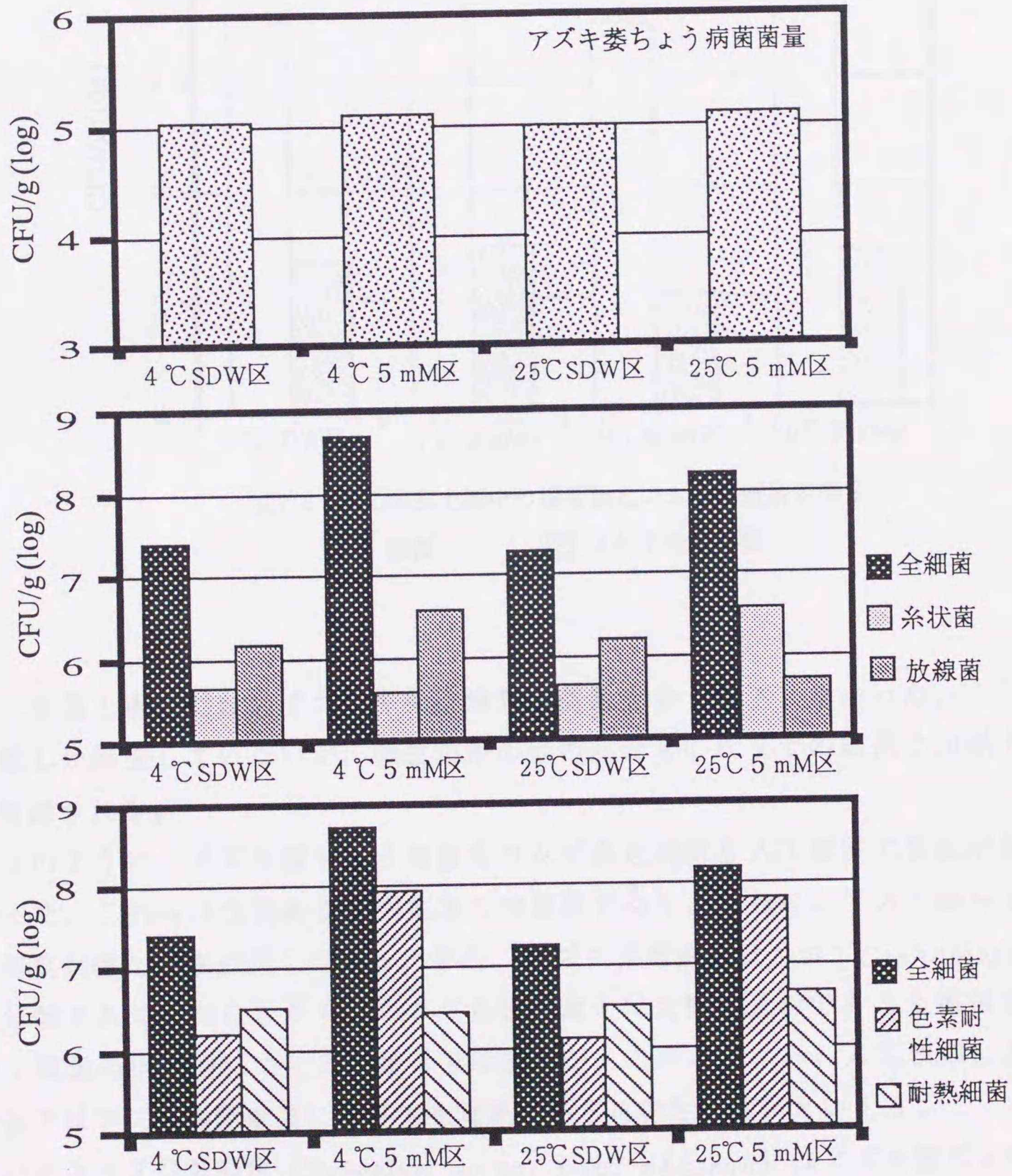


図7-1 人工根圏土壤中のアズキ萎ちょう病菌菌量と微生物相



次に、コムギ条斑病菌についての結果を示す（図7-2）。

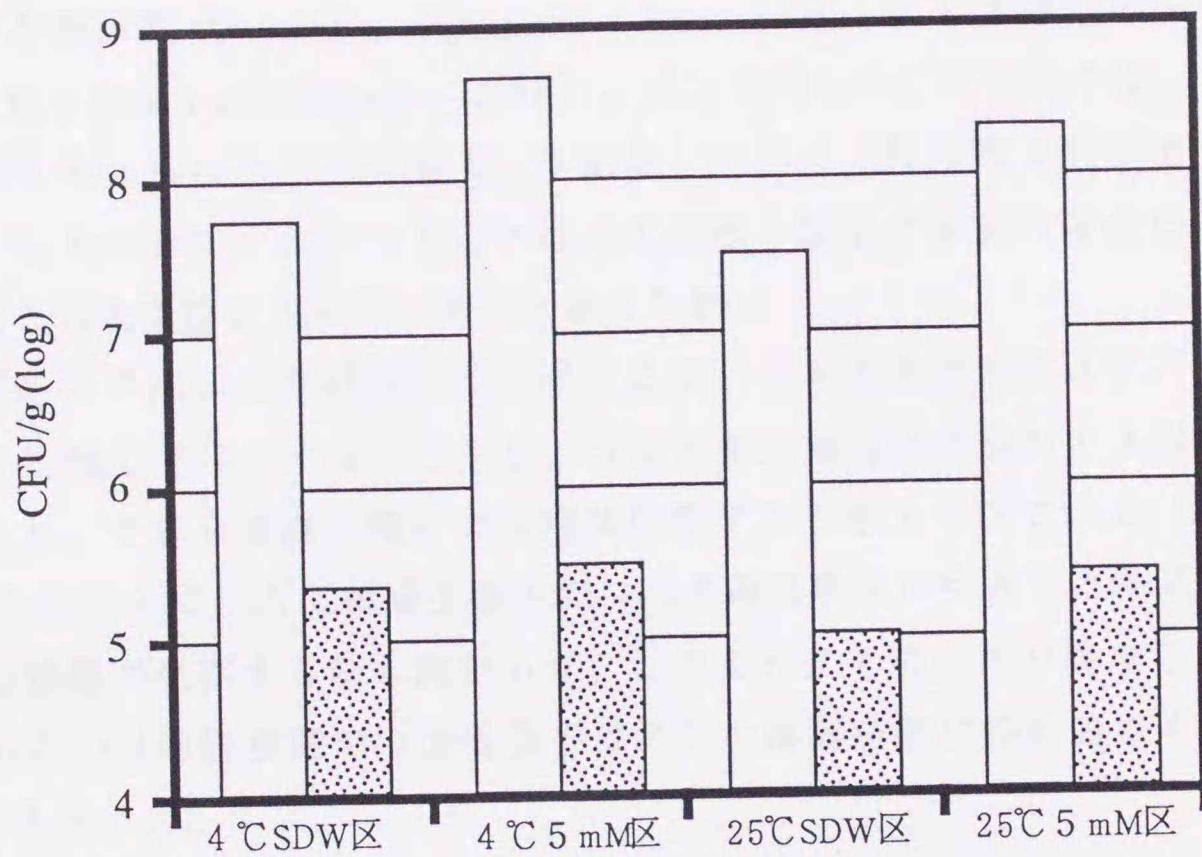


図7-2 人工根圏土壤中の細菌数とコムギ条斑病菌菌量

□ 細菌      ■ コムギ条斑病菌

人工根圏土壤中においてコムギ条斑病菌の菌量も全く低下しなかった。ここでは細菌数しか調査していないが、微生物相の他の部分もこれまでの結果と同様であったと推測される。

以上のように、アズキ萎ちょう病菌もコムギ条斑病菌も人工根圏で菌量が低下しなかった。これらは代表的な土壌病害の病原菌であり、さらに、アズキ萎ちょう病菌は落葉病菌と宿主が同じである。また、アズキ落葉病菌はかつて *Cephalosporium* 属に分類されていたことから、コムギ条斑病菌とは比較的近縁であると推測される。僅か2種類の病原菌についての結果ではあるが、このことから、人工根圏における菌量低下はアズキ落葉病菌に特異的な現象である可能性が強いといえる。

インゲンマメ根腐病菌 (*Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*) はアズキ萎ちょう病菌と同様に土壌中では厚膜胞子として存在し (Nash *et al.*, 1961)、植物の根あるいは発芽中の種子の周りで発芽するが、その根あるいは種子が宿主ではない場合は発芽管の先端に新しい厚膜胞子を形成する (Schroth and Hendrix, 1962)。また、



インゲンマメ根腐病菌は非根圏土壌よりも、宿主、非宿主に関係無く、根圏により多く存在する (F. F. Hendrix, 未発表)。以上よりこの病原菌は植物に関係無く、根圏で生息する菌であるといえる。また、アズキ萎ちょう病菌とは分化型の異なるサツマイモつる割病菌 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *batatas*) は非宿主の根に侵入して生存する (Hendrix and Nielsen, 1958)。以上の例にみられるように、これらの病原菌と近縁と考えられるアズキ萎ちょう病菌も根圏で生息可能な病原菌であると考えられる。したがって、これらのことは人工根圏土壌中で本菌の菌量低下が認められなかったことを支持する結果であると考えられる。

アズキ萎ちょう病菌は厚膜胞子で生存するが、コムギ条斑病菌はアズキ落葉病菌と同じく分生胞子で存在する。しかし、コムギ条斑病菌は多数のイネ科植物の根圏から分離され、それら根圏土壌中で長期間生存すると考えられている (宮島・斉藤、1985)。このことは、人工根圏土壌中でコムギ条斑病菌が生存した結果と一致する。分生胞子の形態で生存するにも関わらず、このようにその生存が異なることから、人工根圏あるいは植物根圏での菌量低下はアズキ落葉病菌に特異的なものであることが推察される。



## 第8章 人工根圏土壌中のアズキ落葉病菌分生胞子の発芽

アズキ落葉病菌の土壌中での生存形態は分生胞子であることから (Kobayashi *et al.*, 1981)、人工根圏土壌中で菌量が著しく低下するという事は、そこで分生胞子が死滅しているということを示す。このとき、分生胞子が発芽しているのか、あるいは発芽しないまま死滅するのかは、菌量低下の機構を解明する上で重要な手がかりとなる。そこで、本章では蛍光色素で染色した胞子を土壌に接種し、人工根圏土壌中での発芽を検討した。それと同時に、アズキ根圏における分生胞子の発芽も検討した。また、人工根圏土壌中で菌量の低下しないコムギ条斑病菌の分生胞子の発芽も同様に観察し、アズキ落葉病菌と比較した。

### 1. 人工根圏土壌中のアズキ落葉病菌分生胞子の発芽

#### 材料および方法

V-8ジュース寒天培地上で形成させたアズキ落葉病菌分生胞子を集め、蛍光色素 Fluorescent Brightener 28 (以下FBとする。) で染色し、土壌に接種した。アズキ落葉病菌の菌株は孢子形成量の多いFRS91を用いた。FRS91は、北大・植物寄生病学講座圃場で栽培したアズキ (エリモショウズ) の罹病残さより1991年に分離した菌株である。これをV-8ジュース寒天培地上に移植し、1カ月間25℃で培養して分生胞子を形成させた。培地上に形成された分生胞子は殺菌蒸留水に懸濁して集め、遠心により3回洗浄した。

この孢子懸濁液 (約 $10^7$ 個/ml) にFBを300ppmとなるように加え、室温・暗黒下で5時間染色した (Tsao, 1970)。FBはあらかじめ水溶液を用意し、 $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過滅菌して加えた。染色後、遠心によって余分な色素を除去し、殺菌蒸留水に再懸濁した。この分生胞子懸濁液を土壌に約 $10^6$ 個/gとなるように噴霧接種した。土壌は、道立十勝農試病虫科圃場内より採取したアズキ落葉病激発土を1mm目のふるいに通したものを用いた。

この土壌をプラスチックカップにつめ、人工根を挿入した。人工根に関する方法は第5章1.に準じた。5mMの人工浸出液の区 (5mM区) と殺菌蒸留水の入った人工根を挿入した区 (SDW区) をそれぞれ4反復用意し、これらを25℃におき、1、3、6、8日後に観察した。同時に、FBで染色した分生胞子懸濁液を殺菌土壌 (121℃60分オートクレーブ) に灌注し、そこでの発芽も検討した。



人工根の周り 5 mm 程度の土壌をとり、その適当量を 9 ml の蒸留水に懸濁してよく攪拌した。次に、土壌粒子に吸着した胞子を分離させるために、これを 5 分間超音波処理した。この土壌懸濁液を約 30 秒間静置し、大きな土壌粒子の含まれない上層を適当量スライドガラスの上にとり、カバーガラスをかけて観察に用いた。これを蛍光顕微鏡（UG1 励起フィルター使用）で検鏡した。このとき、アズキ落葉病菌は青い蛍光を発する。視野を変えながら、200 個ほどの胞子を観察し、その内、土壌粒子に吸着しておらず、発芽しているかいないかを通常光で観察できるものについてデータをとった。

### 結果および考察

FB 染色により、アズキ落葉病菌分生胞子の発芽に影響がないかについて、染色後の分生胞子を素寒天培地上に広げてその発芽を検討した結果、ほぼ 100% の胞子が発芽した。したがって、染色による発芽への影響はないものと判断される。

25℃ 下の各土壌中のアズキ落葉病菌分生胞子の発芽率を図 8-1 に示した。

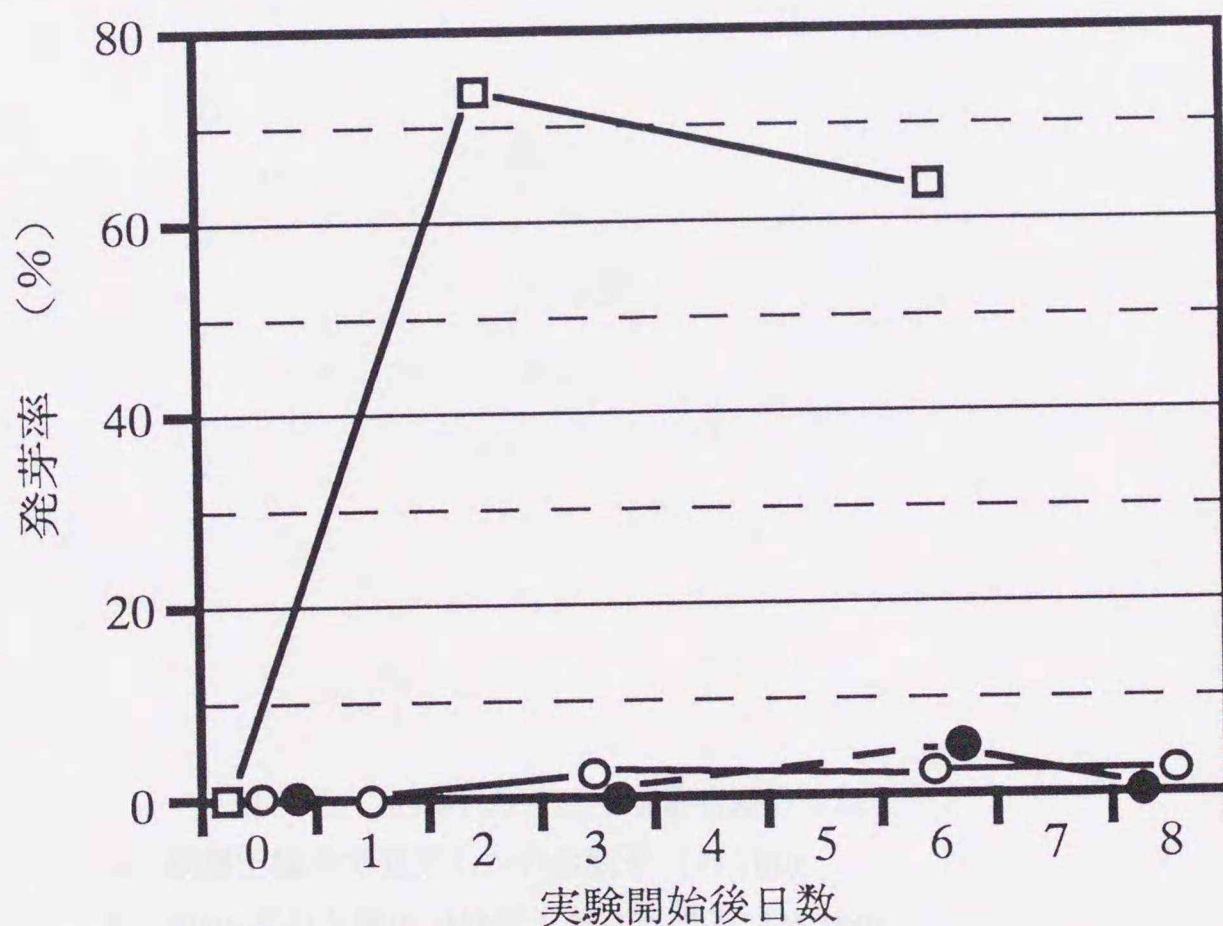


図8-1 人工根圏土壌中のアズキ落葉病菌分生胞子の発芽 (25℃)

- 殺菌土壌
- 対照土壌 (SDW区)
- 人工根圏土壌 (5 mM区)



殺菌土壌中では実験開始3日後には70%以上の胞子が発芽した。アズキ落葉病菌分生胞子は蒸留水中では発芽せず、その発芽には外部からの栄養が必要である。殺菌土壌中では、そこに含まれる栄養を他の微生物との競合なしに利用できたため、発芽率が上昇したと考えられる。SDW区ではほとんど発芽が認められなかったが、これは土壌静菌作用によるものと考えられる。糖とアミノ酸の人工浸出液が栄養として供給される人工根圏土壌中でも、ほとんど発芽は認められなかった。

また、土壌中でのアズキ落葉病菌の発芽した分生胞子と未発芽の分生胞子を図8-2に示した。

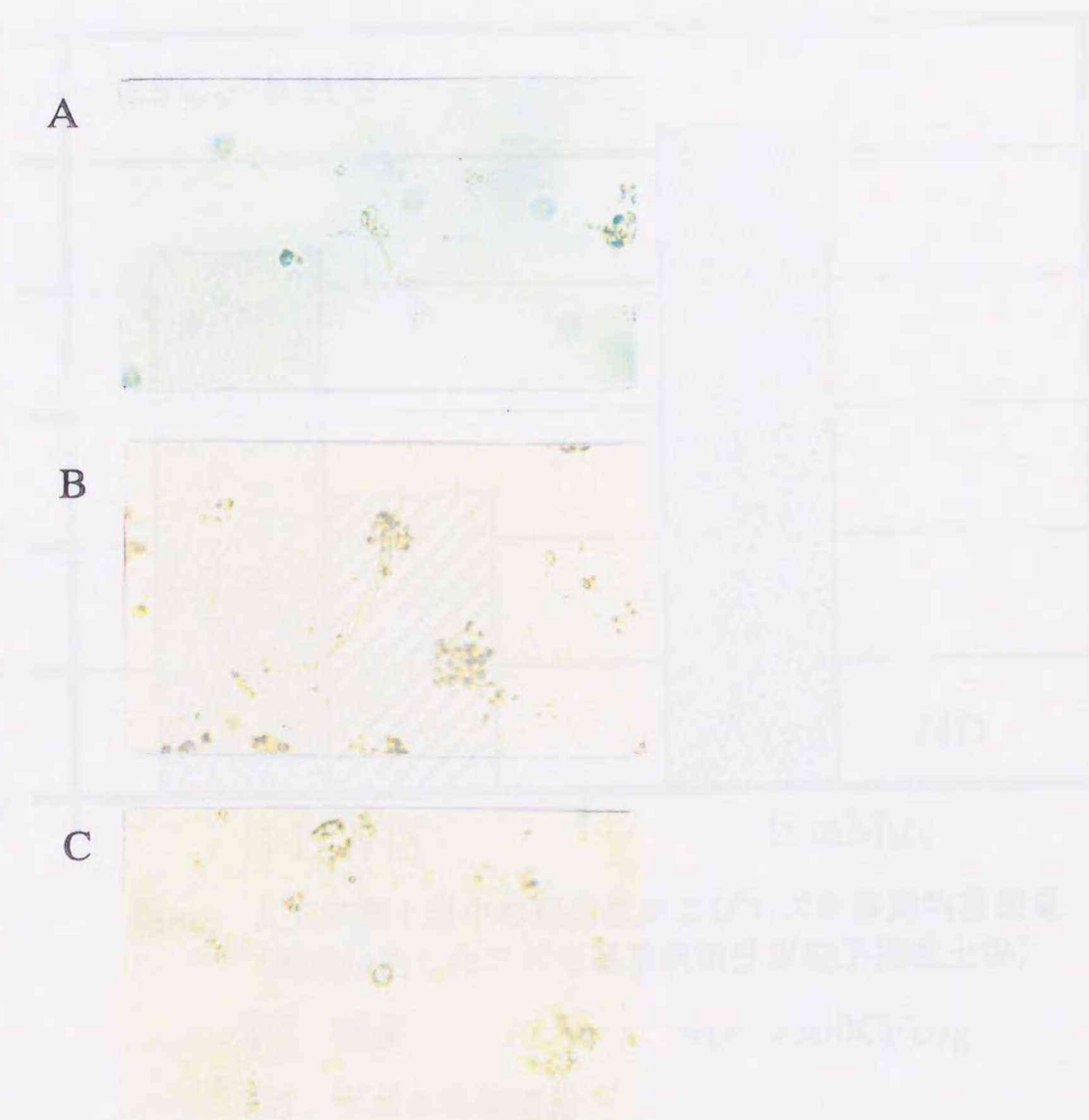


図8-2 土壌中のアズキ落葉病菌分生胞子

- A 殺菌土壌中で発芽した分生胞子 (×260)
- B SDW区の土壌中で発芽した分生胞子 (×260)
- C 人工根圏土壌中 (5 mM区) の未発芽分生胞子 (×520)



図8-3に8日目の観察時の土壤中のアズキ落葉病菌菌量と細菌数を調査した結果を示した。この時、人工根圏土壤中からはアズキ落葉病菌は検出されなかった。このことから、分生胞子は発芽しないままの状態に死滅していることが明らかとなった。

一般に、土壤病原菌の胞子の死滅過程として、非宿主作物の根などから供給される栄養に反応して発芽し、その発芽管が新しい胞子を形成する前に溶菌されることが挙げられる。ところが、アズキ落葉病菌の場合は全く発芽せずに死滅することから、これとは異なる作用機作によるものと考えられる。

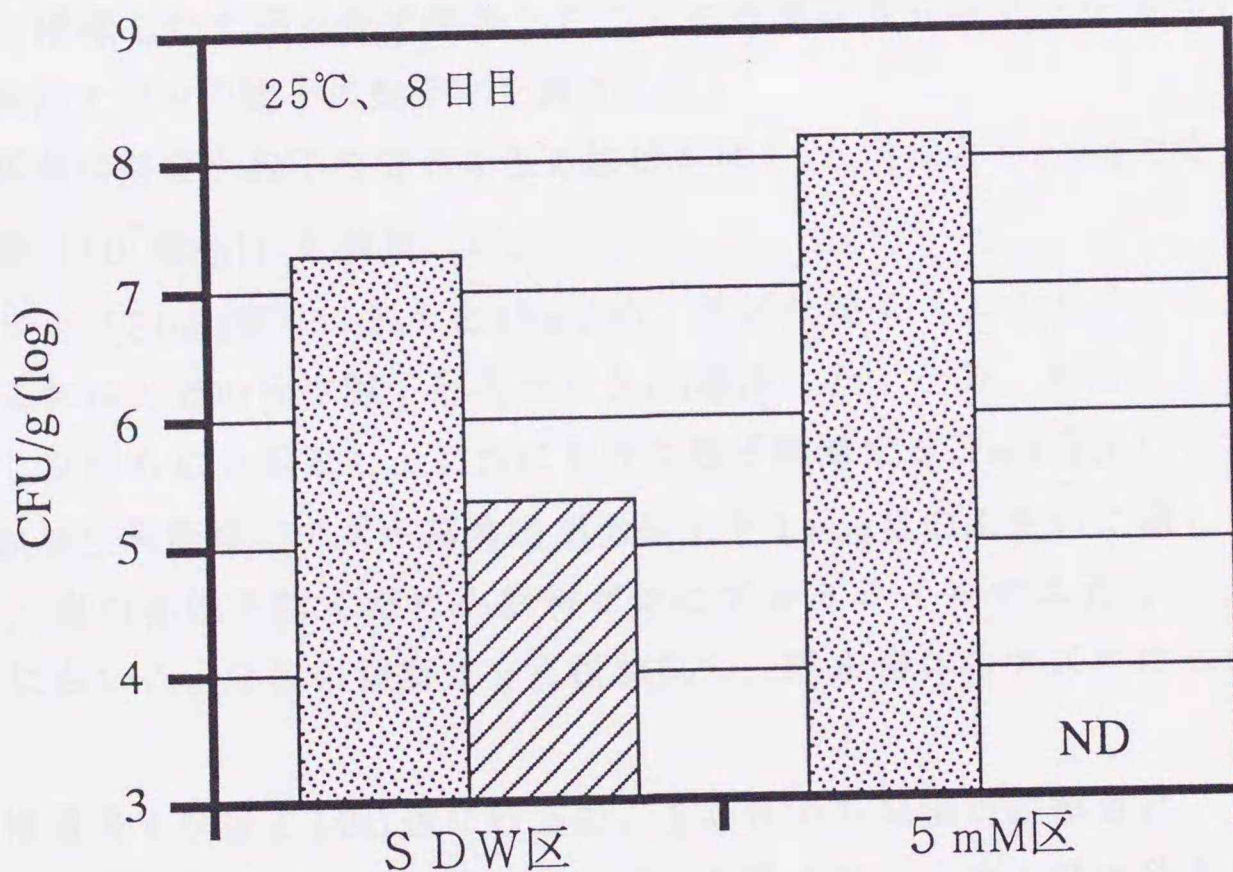


図8-3 人工根圏土壤中の細菌数およびアズキ落葉病菌菌量 (蛍光染色したアズキ落葉病菌分生胞子接種土壤)

■ 細菌                      ND; <500CFU/g  
 ▨ アズキ落葉病菌



## 2. アズキ根圏土壌中でのアズキ落葉病菌分生胞子の発芽

人工根圏土壌中で、アズキ落葉病菌分生胞子は発芽せずに死滅することが明らかとなった。一方、本菌は実際のアズキの根圏土壌中でも著しい菌量低下を示す。人工根圏土壌中とアズキ根圏土壌中での菌量低下現象の機作が同じであるならば、アズキ根圏においても発芽せずに死滅することとなる。この実験では、宿主であるアズキの根圏土壌中でも、本菌の分生胞子は発芽しないかを検討した。

### 材料および方法

アズキを播種した土壌に蛍光染色したアズキ落葉病菌分生胞子を灌注し、その後のアズキ根圏土壌中の胞子の発芽率を調査した。

アズキ落葉病菌分生胞子の蛍光染色方法は本章1.と同様とし、FBで染色した分生胞子懸濁液 ( $10^7$ 個/ml) を調整した。

小試料ビン (30ml容) に生土を15gつめ、アズキ種子 (エリモショウズ) を3粒播種し、これに上述の分生胞子懸濁液を3 ml灌注した。一方、対照として同様の土壌に播種しないものを用意し、これにも分生胞子懸濁液を3 ml灌注した。土壌は道立十勝農試病虫科圃場のアズキ落葉病菌激発土を1 mm目のふるいに通して用いた。灌注後、土壌の乾燥を防ぐため小試料ビンにアルミホイルでふたをし、実験室内 (25℃) においた。1回の観察に2反復供試し、計6個体のアズキについて観察した。

調査は播種後4日目と10日目に行った。2日目から発根が観察され、4日目に発芽が始まった。アズキ植物体を静かに土壌から取りだし、地上部は除去して、土壌の付着した種子 (胚乳) と根を試験管に入れた。これに2~3 mlの蒸留水を加え、ボルテックスで激しく攪拌し、付着した土壌を落とした。この土壌懸濁液をスライドガラスに適量とり、蛍光顕微鏡で観察した。観察方法も本章1.に準じた。対照土壌については、根圏土壌とほぼ同量の土壌を試験管にとり、以下同様の方法で観察した。



## 結果および考察

表8-1 アズキ根圏土壌中でのアズキ落葉病菌分生胞子の発芽

	発芽率 (%)	
	4日目	10日目
非根圏土壌	4.1	2.7
根圏土壌	3.6	3.8

根圏土壌中の発芽率の測定には6個体のアズキを供試し、その平均をとった。

実験結果を表8-1に示した。人工根圏土壌中の結果と同様に、アズキ根圏においても発芽率は低かった。この実験の他にも、分生胞子の土壌への接種方法や接種密度を変えて数回実験を行ったが、全く同様の結果であった。さらに、アズキのみではなく、トウモロコシの根圏土壌中においても発芽率は低かった。本実験も含めて、これらの実験では発芽直後の実生の根圏土壌についての観察ではあるが、実際の植物根圏においても発芽せずに死滅するものと推測される。

宿主であるアズキ根圏において本菌の発芽率が高くないことは、感染の成立という点からみると矛盾する結果と思われる。しかし、発芽率が低いとはいえ、皆無ではないのでこの発芽した胞子が感染に関与している可能性がある。また、さらに根面に近いところを観察することができれば、より高い発芽率が得られるのかもしれない。あるいは、極端に考えると、ただ一つの胞子が発芽して侵入すれば感染が成立し、発病するのであるから、その他の大多数の胞子が根圏で死滅しても問題は無いともいえる。いずれにしても、アズキ落葉病菌の感染の詳細を明らかにし、本実験の結果と比較する必要がある。



### 3. コムギ条斑病菌分生胞子の人工根圏土壤中での発芽

人工根圏土壤中でコムギ条斑病菌分生胞子は死滅しないが、そのときの分生胞子の発芽率を調査した。

#### 材料および方法

供試菌株はSO-2とし、PDA上で1カ月培養して分生胞子を形成させた。以下、FB染色、土壌接種などの方法は全て本章1.と同様に行った。観察は実験開始後3日目および7日目に行った。

#### 結果および考察

図8-4に実験結果を示した。

殺菌土壤中では50%以上の胞子が発芽した。アズキ落葉病菌と同じく、コムギ条斑病菌の分生胞子も栄養のない殺菌蒸留水中では発芽しないことから、その発芽には外部からの栄養を必要とする。殺菌土壤中ではその栄養を他の微生物との競合なしに利用して発芽したと考えられる。一方、SDW区では発芽率は低かったが、これは土壌静菌作用によると思われる。ところが、人工根圏ではSDW区と比較して発芽率が高くなった。これは人工浸出液に含まれる糖・アミノ酸を利用したためと考えられる。7日目の観察では3日目の観察時よりも発芽率が低下しているが、蛍光染色した胞子は発芽後2~3日するとその蛍光が薄くなることから、3日目以前に発芽した胞子は7日目には観察できなかつたためと考えられる。

同じ分生胞子という形態であるにも関わらず、アズキ落葉病菌とコムギ条斑病菌は人工根圏土壤中での動態が大きく異なることが明らかとなった。今後、人工根圏土壤中における菌量の低下というアズキ落葉病菌に特異的な現象を解明するために、両菌を比較検討することは有効な手段となり得る。



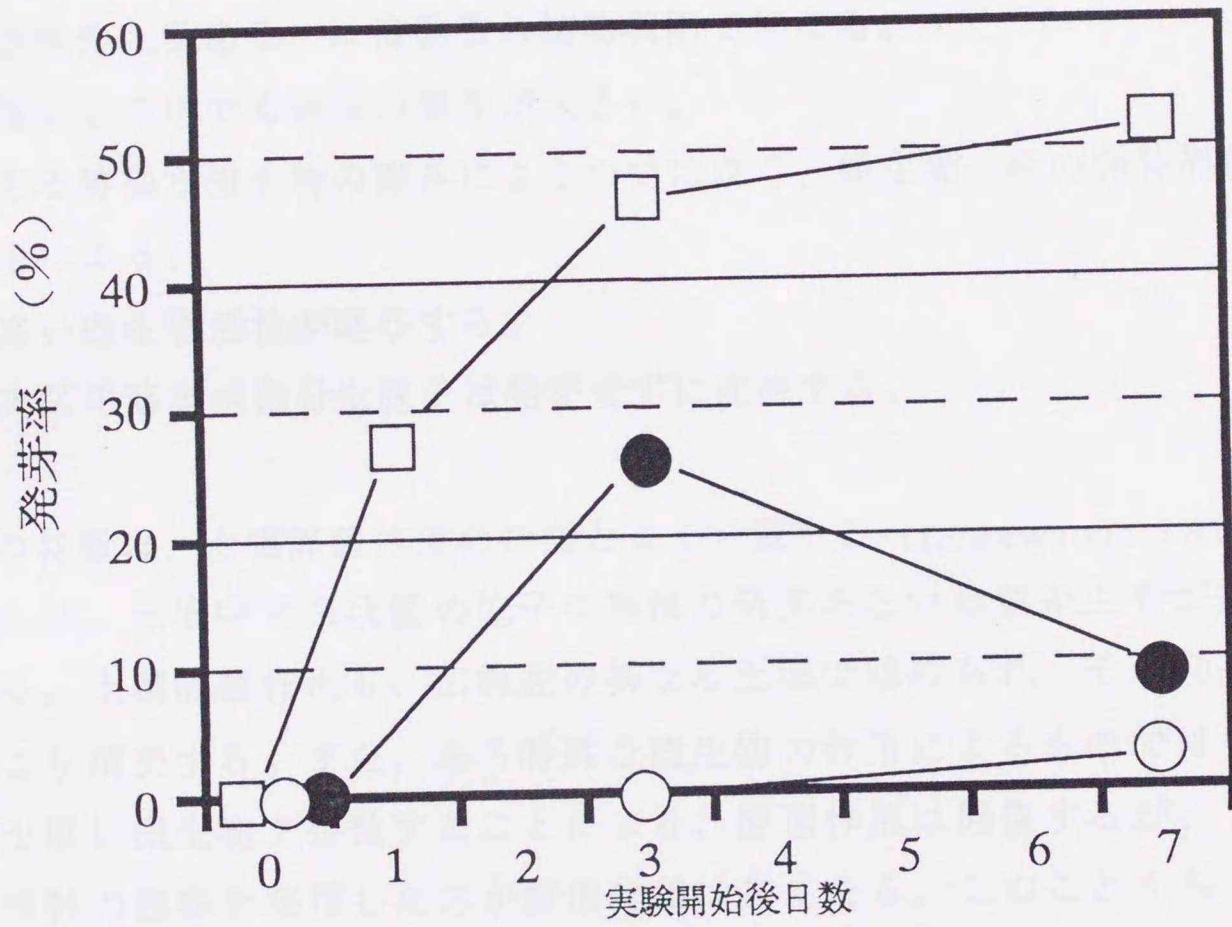


図8-4 人工根圏土壌中でのコムギ条斑病菌分生胞子の発芽

□ 殺菌土壌      ○ SDW区      ● 5 mM区



## 第9章 人工根圏土壌中におけるアズキ落葉病菌菌量低下の機構としての 栄養ストレスの評価

植物根圏あるいは人工根圏土壌中でのアズキ落葉病菌の菌量低下に関するこれまでの結果を以下にまとめる。

- 1 微生物の作用が関与する。
- 2 複数の土壌あるいは複数種の植物根圏で起こる。
- 3 微生物の中でも細菌の関与が大きい。
- 4 ある特異な微生物の働きによるのではなく、微生物一般の非特異的作用による。
- 5 高い微生物活性が関与する。
- 6 アズキ落葉病菌分生胞子は発芽せずに死滅する。

これらの特徴は、土壌静菌作用の特徴とよく一致する (Lockwood, 1964)。土壌静菌作用とは、土壌中で糸状菌の胞子や菌核の発芽あるいは菌糸生育が抑制される現象である。土壌静菌作用も、広範囲の異なる土壌で認められ、その効果は殺菌することにより消失する。また、ある特殊な微生物の作用によるものではない。さらに、殺菌土壌に微生物を接種することにより、静菌作用は回復するが、1菌株の接種よりも複数の菌株を接種した方が静菌作用は高くなる。このことから、微生物の高い多様性の関与が示唆される。また、微生物活性の低い深部の土壌では静菌作用は小さい。このように共通点が多く、さらに、人工根圏あるいは植物根圏で分生胞子の発芽が認められないことから、人工根圏での菌量低下に土壌静菌作用が関与するのではないかと考えた。

Lingappa and Lockwood (1963) は土壌静菌作用の原因として養分欠乏説を唱えた。これは、胞子内の貯蔵養分が流出し、発芽に必要な栄養分が欠乏することにより土壌静菌作用が起こるとするものである。土壌には胞子からの栄養流出を促進する働き (栄養ストレス) があり、さらに、その作用は、胞子から浸出する栄養物を土壌微生物が奪うことによることが証明された (Bristow and Lockwood, 1975)。さらにこの栄養ストレスを人工的に再現する Leaching model system を用いて、胞子内に貯蔵している養分により発芽可能な胞子 (nutrient-independent spore) から養分を奪うことにより、その発芽を抑制することに成功し、養分欠乏説を証明した



(Arora *et al.*, 1983; Hsu and Lockwood, 1973; Ko and Lockwood, 1967; Lockwood, 1975; Sneh and Lockwood, 1976)。発芽に外部からの栄養を必要としない孢子 (nutrient-independent) を土壤中に置くと、土壤微生物に養分を奪われることにより、次第に外部からの栄養を必要とする状態になり (nutrient-dependent)、さらに発芽能力を失い、最終的に死滅するとされる (Bristow and Lockwood, 1975; Filonow and Lockwood, 1983; Lockwood, 1986)。この説に従えば、アズキ落葉病菌の分生孢子 (発芽に外部からの栄養を必要とする) も、土壤中では栄養ストレス下におかれることにより、徐々に死滅すると考えられる。

一方、これまでの実験から、人工根圏土壤中では微生物数あるいはその活性が普通の土壤と比較して著しく高いことが明らかとなった。そこで、アズキ落葉病の分生孢子は、この人工根圏土壤中の微生物の活動により急速に孢子内の栄養を奪われ、速やかに死滅するのではないかと考えた。

コムギ条斑病菌の分生孢子は、アズキ落葉病菌と同様に外部からの栄養に依存する孢子であるが、人工根圏土壤中でも死滅しない。また、外部からの栄養である人工浸出液に反応して発芽する能力も保っている。したがって、アズキ落葉病菌の分生孢子は、特に栄養の流出が速いものであることが推測される。

本章では、以上の仮説を検討するため、予備的な実験を行った。

## 1. 人工浸出液添加土壤の栄養ストレスの評価

Ko and Lockwood (1967)は図9-1に示した装置により栄養欠乏説を検討した。その結果、メンブランフィルター上の非栄養依存性 (nutrient-independent) の孢子は殺菌土壤上では発芽するが、無処理土壤上では発芽が認められなかった。さらに、グルコースを添加した寒天ディスクを無処理土壤上に置くと、寒天ディスク中のグルコースが減少した。これらのことから、土壤微生物はメンブランフィルターを通して孢子中の栄養を奪い、発芽を抑制していることが明らかとなった。本実験ではこの実験系を利用して、人工浸出液を添加した土壤のアズキ落葉病菌に対する栄養ストレスを検討した。



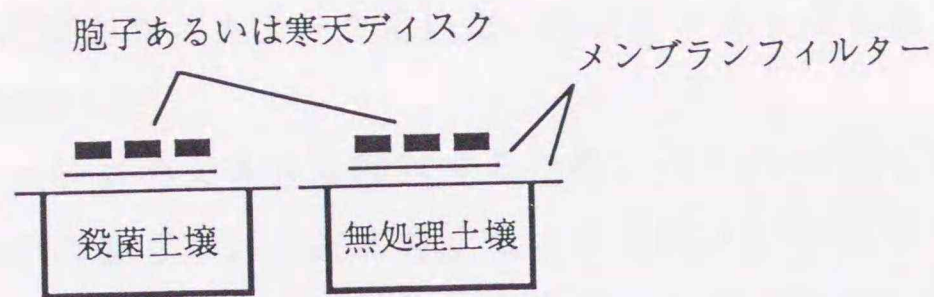
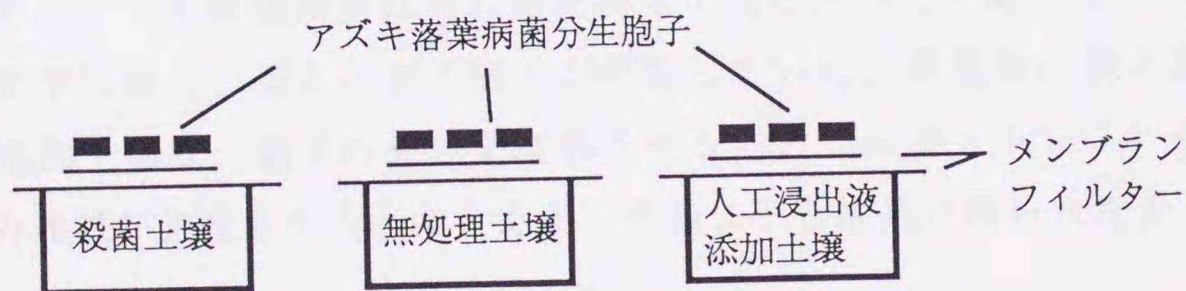


図9-1 Ko and Lockwood (1967) が用いた実験系

#### 材料および方法

アズキ落葉病菌 (FRS91) をV-8ジュース寒天培地で培養し、分生胞子を形成させた。これを殺菌蒸留水に懸濁して集め、3回遠心で洗浄した。次に、 $10^5$ 個の胞子を、直径25mmのメンブランフィルター (ポリカーボネート製、孔径 $1\mu\text{m}$ ) 上に吸引ろ過してのせた。メンブランフィルターはオートクレーブで滅菌して用いた。

径35mm、深さ12mmの小シャーレに、最大容水量の60~70%に調節した土壤をつめた。土壤は道立十勝農試病虫科圃場のアズキ落葉病激発土を、1mm目のふるいを通して用いた。この土壤の上に滅菌したメンブランフィルター (ポリカーボネート製、直径47mm、孔径 $0.2\mu\text{m}$ ) をのせ、更にその上に前述の胞子をのせたメンブランフィルターをのせた。フィルター上の無菌状態を保つため、これを滅菌したシャーレに入れた。また同様に、土壤湿度を人工浸出液 (5mM、組成は第5章1.と同様) で調節したものと、殺菌土壤を用いたものを用意した。殺菌土壤を入れる小シャーレは滅菌済みのものを使用した (図9-2)。



各土壤は最大容推量の60~70%に調節した。  
フィルター上の無菌状態を保つために滅菌シャーレ (径9cm) に入れた。

図9-2 実験方法

これらを一定時間 $25^\circ\text{C}$ 下に静置した後、各土壤上の分生胞子の発芽率と、その時の生存率を調査した。調査方法は、胞子をのせたフィルターを無菌的に半分に切り分け、半分はローズベンガルで染色して発芽率を調査した。残りの半分は殺菌土 (最大容水量の60~70%に調節) へのせ、そこでの発芽率を調査し、生存率とした。



一回の観察で2反復のフィルターを用いた。各フィルターごとに、5視野から100～200個の胞子を観察した。

各土壌の栄養ストレスの大きさを検討するため、ペーパーディスクに添加したグルコースの損失量を調査した。上述の各土壌に同様にメンブランフィルターを2枚のせ、一定時間25℃下で静置後、グルコースを添加したペーパーディスクをのせた。これをさらに3時間25℃下で静置し、ペーパーディスクに残存するグルコース量を調べ、実験開始前と比較し、グルコース損失量を求めた。ペーパーディスク（東洋濾紙、直径8mm、厚さ2mm）は乾熱滅菌し、これに滅菌ずみのグルコース水溶液を80mg/ペーパーディスクとなるように一定量滴下した。このペーパーディスク4枚を一つの土壌の上にのせた。グルコース量の調査には、各土壌2反復用い、それらを平均した。1反復内の4ディスクを5mlの蒸留水に入れ、1時間静かに攪拌し、ディスク内に残ったグルコースを溶出させ、グルコース量を測定した。溶出したグルコース量の測定はNelson-Somogyi法によった（実験化学講座編集委員会、1957）。

#### 結果および考察

アズキ落葉病菌の発芽率と、その時の生存率を図9-3に示した。

殺菌土壌上でほとんどのアズキ落葉病菌分生胞子は発芽した。これは、メンブランフィルターを介して殺菌土壌中の栄養を利用したためと考えられる。それとは対照的に、無処理土壌、人工浸出液添加土壌ではほとんど発芽しなかった。人工浸出液を接種した土壌では、糖・アミノ酸が外部から供給されているが、他の微生物との競合の結果、アズキ落葉病菌はそれらを利用できなかったと考えられる。しかし、その時の生存率は高く、ほとんどの胞子が生存していた。微生物の数と活性の高い人工浸出液添加土壌は、胞子の養分を流出させる能力（栄養ストレス）が高く、そのため胞子の死滅が加速されると考えたが、そのような結果は得られなかった。



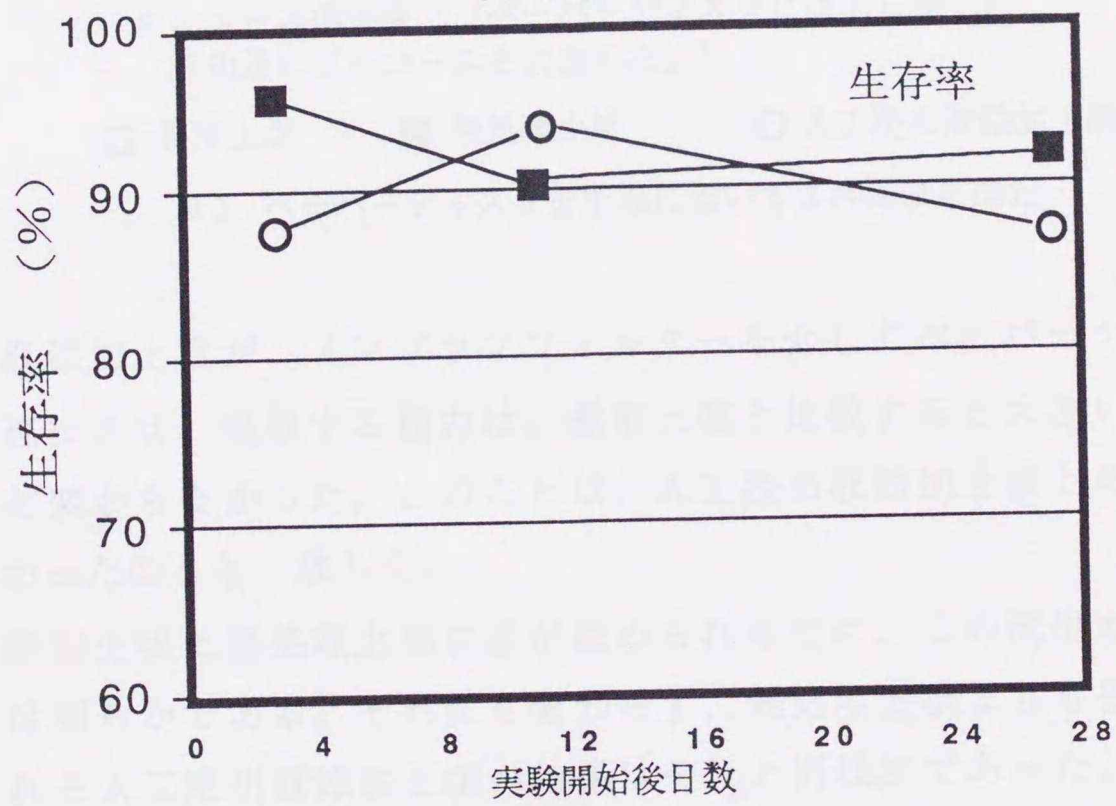
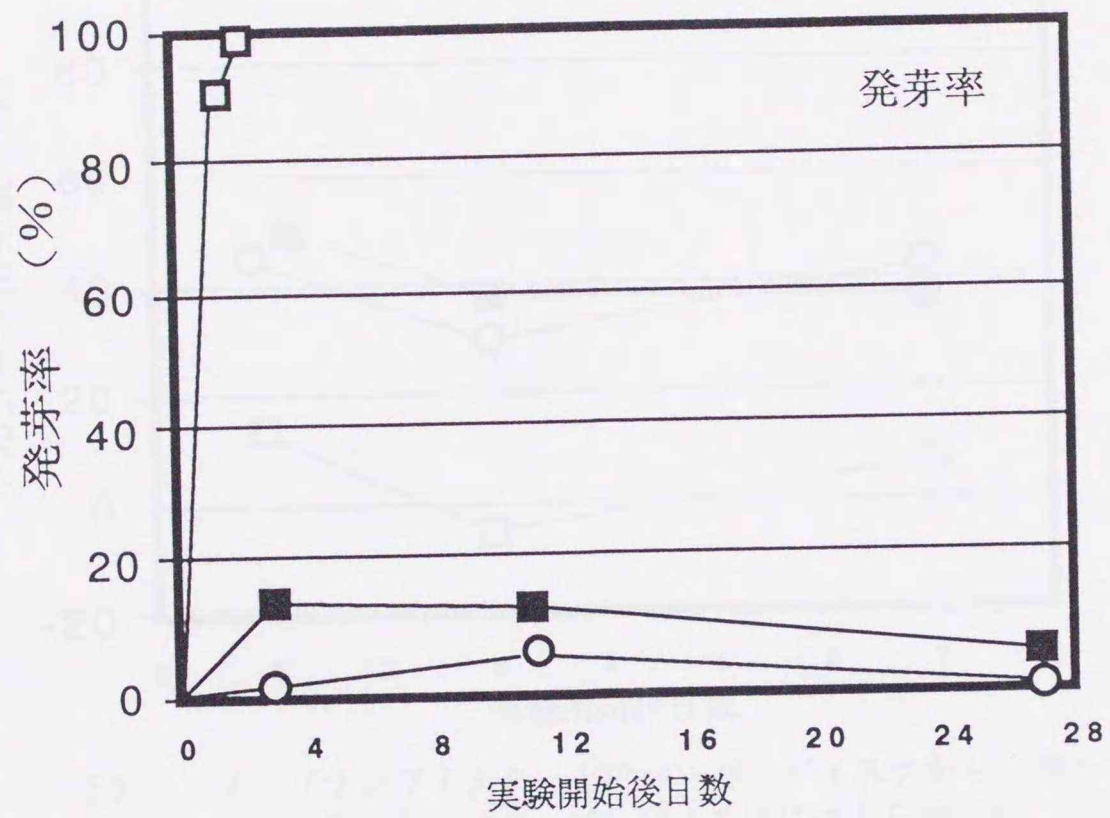


図9-3 メンブランフィルター上のアズキ落葉病菌分生胞子の発芽率と生存率

□ 殺菌土壌上    ■ 無処理土壌上    ○ 人工浸出液接種土壌上



次に、グルコース損失量を調査した結果を示す（図9-4）。

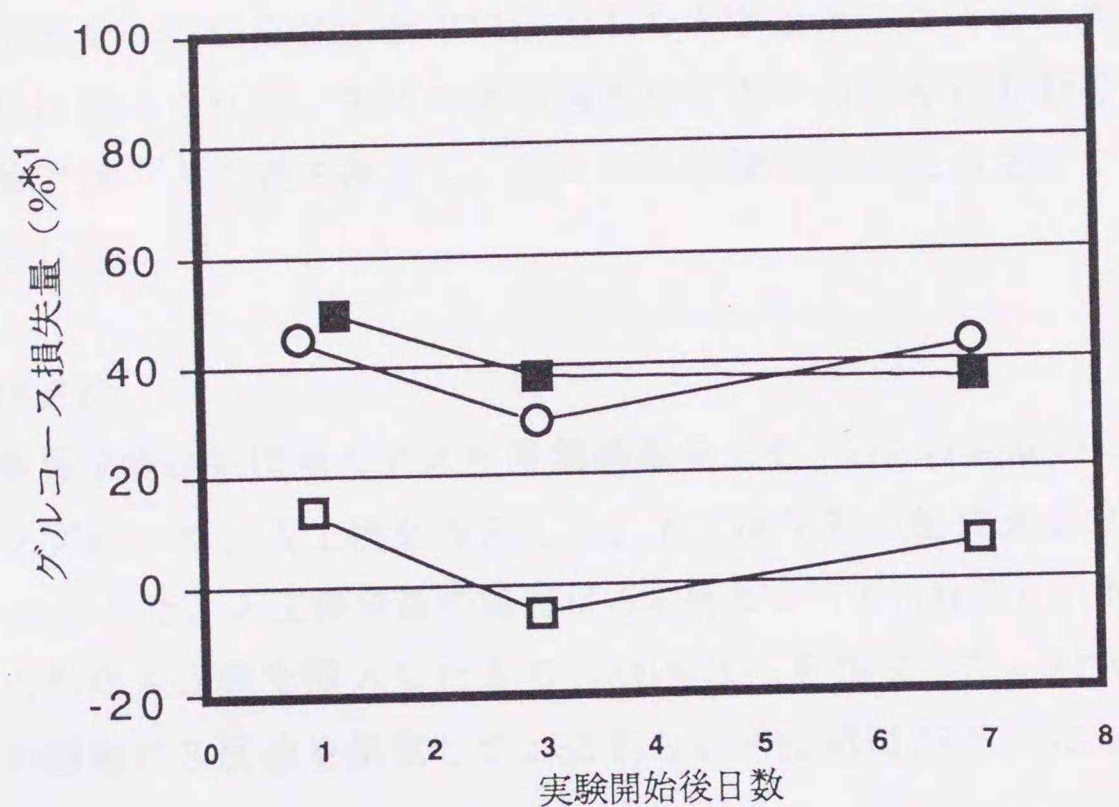


図9-4 メンブランフィルター上のペーパーディスクから土壌へのグルコース損失量（ペーパーディスクにはあらかじめ既知量のグルコースを添加した。）

□ 殺菌土壌      ■ 無処理土壌      ○ 人工浸出液添加土壌

\*1 ペーパーディスクを土壌に置いて3時間後に測定

人工浸出液添加土壌が、メンブランフィルターを介してペーパーディスク内のグルコースを流出させ、吸収する能力は、殺菌土壌と比較すると大きいですが、無処理土壌とほとんど変わらなかった。このことは、人工浸出液添加土壌上の胞子の生存率が低下しなかったことと一致した。

一方で、殺菌土壌と無処理土壌に差が認められるため、この流出が微生物の作用によることは明らかである。それにも関わらず、無処理土壌よりも微生物活性の高いと考えられる人工浸出液添加土壌の効果はそれと同程度であった。この原因についてはさらに検討を要する。



## 2. 人工根圏土壌の栄養ストレスの評価

人工浸出液を一時に直接土壌中に添加した土壌を用いたモデル実験では栄養ストレスの増加は認められず、アズキ落葉病菌分生孢子の生存にも影響しなかった。そこで本実験では、人工根を挿入し、徐々に人工浸出液を浸出させた土壌の栄養ストレスを検討した。

### 材料および方法

道立十勝農試病虫科圃場のアズキ落葉病激発土を1mmのふるいに通して、プラスチックカップにつめ、人工根を挿入した。人工浸出液の組成およびその他の方法は第5章1.に準じた。人工浸出液の濃度は5mMとし(5mM区)、対照として、殺菌蒸留水を入れた人工根を挿入したもの(SDW区)を用意した。SDW区、5mM区ともに一回の調査に3反復を供試した。これらを一定期間25℃下におき、以下の実験に供試した。

SDW区、5mM区ともに人工根の周り5mmの範囲より土壌を採取し、蒸留水で最大容水量の60~70%に調節した。この土壌を小シャーレにつめ、滅菌したメンブランフィルター(直径47mm)をのせた。この上にさらにグルコースを添加したペーパーフィルターをのせた。以下、グルコース損失量の測定方法は本章1.に準じた。

### 結果および考察

実験結果を図9-5に示した。人工根圏土壌へのグルコース損失量は対照とほとんど同様だった。すなわち、この結果は、アズキ落葉病菌に対する人工根圏土壌の栄養ストレスの強さが対照土壌と同じであることを示す。しかし、これまでの実験から、人工根圏土壌では通常の約10倍の微生物が存在し、その活性も著しく高いことが明らかとなっている。そのような人工根圏土壌中で、微生物の作用による孢子の内在栄養物の損失が対照と同じ程度であるだろうか。

実際の土壌中での栄養ストレスは、孢子の周りで微生物が直接作用する状態での現象である。したがって、本実験のようにメンブランフィルターを介して微生物の接触を妨げた系では、その程度が緩められてしまった可能性がある。言い換えると、この系では孢子の発芽を阻害する程度の栄養ストレスは再現できるが、孢子の死滅が必要とするさらに激しい栄養ストレスは再現できなかったかもしれない。この問題を明らかにするために、Lockwoodが用いたLeachig systemの様な装置により、ア



ズキ落葉病菌分生胞子を強力な栄養ストレス下においたときに、それらが死滅に至るかを検討する必要がある。

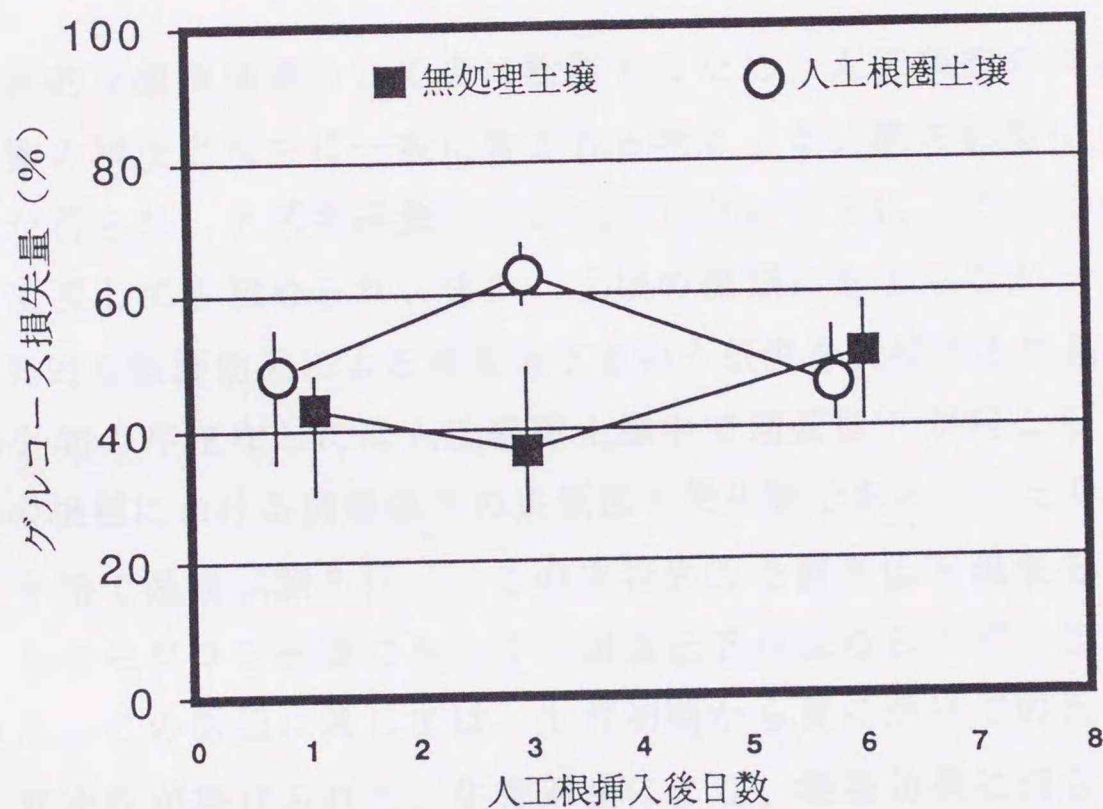


図9-5 ペーパーディスクから人工根圏土壌へのグルコース損失量  
土壌の上にメンブランフィルターを置き、その上に既知量のグルコース溶液を添加したペーパーディスクをのせた。測定は3時間後に行った。



## 第10章 総合考察

北大圃場の小実験区における試験の結果、トウモロコシ、アズキ、ダイズ、コムギの根圏土壌中において、アズキ落葉病菌菌量の著しい低下が認められた。また、温室試験によって、十勝土壌でも同様の現象が確認された。異なる土壌と、複数の植物根圏で同様にみられたことから、この現象は非特異的な根圏効果によるものと推察された。

この非特異的な根圏効果について更に検討するため、人工根圏の実験を行った。その結果、植物の根浸出液中に一般に含まれる糖とアミノ酸の影響によって、疑似的な根圏効果が得られ、アズキ落葉病菌が低下した。さらに、この現象は糖・アミノ酸の種類を変更しても認められ、また、土壌の種類にもよらなかった。これらのことは、非特異的な根圏効果による菌量低下という仮説を支持する結果であった。

また、微生物の存在なしには人工根圏土壌中で菌量低下が起こらないことから、実際の植物の根圏における菌量低下の主原因も微生物であると考えられる。

2年間、十勝で圃場試験を行い、この非特異的な菌量低下現象を再現することを試みたが、トウモロコシ根圏においても菌量低下は認められず、他の作物も同様の結果であった。この原因に関しては、生育初期から夏にかけての低温とそれに伴う植物体の生育不良が挙げられた。生育不良により、根圏効果に何らかの影響がでたものと考えられる。しかし、根圏微生物相（数）は北大圃場での調査結果と同様であった。

一方、4℃下においた人工根圏では、微生物数（細菌数）が25℃下の人工根圏と同程度に増加しているにも関わらず、その活性が低く、アズキ落葉病菌の菌量低下が認められなかった。このことから微生物の活性が菌量低下に重要であると思われ、十勝の圃場試験での各作物根圏で菌量低下が認められなかったことも、この理由によると考えられた。

アズキ根圏においても、トウモロコシ根圏と同様にアズキ落葉病菌菌量が低下するが、それにも関わらず、その栽培によって土壌中菌量の低下は認められない。これはアズキと他の3種の作物との根系の違いによって説明することができる。トウモロコシなどは根系の分布範囲が大きく、さらに、その広い範囲に高密度で根が存在する。このような植物は、根圏という限られた空間内で起こる菌量低下現象を土壌中に一様に広げることができる。一方、アズキは根系が小さく、また、その形態も疎であるため、大部分の土壌がその影響を受けないままであると考えられる。これは、北大圃場の小実験区で密植栽培して得られた結果であるが、十勝の実験区で



トウモロコシとコムギを通常の栽植密度で栽培した結果、両者とも根圏効果を土壤全体に及ぼすことのできる根の量に達することが明らかとなった。このことから、仮に、この実験時に根圏土壤で著しい菌量の低下が認められていたとすると、土壤中の菌量も著しく低下したと推測できる。

したがって、圃場で観察されたトウモロコシ栽培によるアズキ落葉病菌菌量の低下は、根圏での微生物一般の非特異的な作用による菌量低下を、トウモロコシの発達した根系が土壤全体に一様に広めたためであると結論できる。

本研究では、圃場全体あるいは栽培土壤全体としての菌量を検討する際に、畝間土壤あるいは株元土壤という用語を用いて、植物に対する土壤採取位置を明確にした。一般の病原菌に関して、ある作物の栽培土壤中の菌量を調査した報告をみると、土壤採取位置が明記されていないものが多い。しかし、栽培土壤は播種時と生育後期では土壤中の根の分布に大きな違いがあり、また、生育段階によって根が高密度に分布する位置と全く根の認められない位置が存在する。土壤病原菌の生態研究では、根あるいは根圏は非常に重要な意味を持つことから、植物の根系の分布を考慮に入れることが必要であると思われる。

本研究のテーマは、トウモロコシ栽培によるアズキ落葉病菌菌量低下機構の解明であるが、これはトウモロコシ栽培により土壤中菌量が著しく低下するという報告（近藤・小林、1983a）がもとになっている。しかし、同時にこの中で、ダイズ栽培あるいはマメ科牧草栽培による菌量低下も報告されている。また、イネ科植物の栽培により、本病の発病と菌量が低下することも報告されている（北海道立十勝農業試験場病虫科、1977、1981）。

一方、Dunleavy and Weber (1967)は、ダイズ栽培の間に5年間のトウモロコシ栽培を挟むことにより、ほぼ100%ダイズ落葉病を防除することができることを報告した。しかし、この研究で、輪作作物としてトウモロコシが選ばれたのは、その効果を他の作物と比較した結果からではない。米国アイオワ州でダイズ落葉病の発生が拡大した原因の一つに、トウモロコシ-ダイズ-エンバク-牧草という輪作体系からトウモロコシ-ダイズという輪作体系へ移行したことが挙げられている（Dunleavy, 1966）。このトウモロコシとダイズのみという制約を受けた輪作体系でダイズ落葉病を防除することが可能か否かを検討したのが、この論文の趣旨である。

以上に挙げたことは、本研究の結論である非特異的な根圏効果による菌量低下ということを支持するものであると考えられる。したがって、トウモロコシの効果は大きいですが、これ以外にもクリーニングクロープとして有用なものも存在する可能性



がある。そのような作物を探し、トウモロコシ栽培も含めて現在までに利用可能な防除法と組み合わせ、アズキ落葉病の発生と被害を最小限とする栽培体系を工夫することが必要であろう。

アズキ落葉病菌汚染土壌をポットなどにつめ、温室に置くと速やかに菌量が低下する場合が多いことから、実際の植物を用いて、その根圏土壌中での菌量低下現象を反復して検討することは難しい。一方、人工根圏の実験では植物を育てる必要がないため、短期間で結果が得られ、非常に有効な方法である。実際の植物根圏とは様々な点で異なると思われるが、アズキ落葉病菌の菌量低下が再現され、微生物相にも共通点が認められることから、根圏での菌量低下を検討するモデルとすることが可能であると考えられる。

人工根圏土壌中で増加する糸状菌はある一部の属に限られるが、それが単独で菌量低下の原因となることは考えにくい。その理由として、植物根圏での糸状菌相はそのような傾向は示さないことが挙げられる。糸状菌以外に、人工根圏で著しく増加する微生物は、耐熱性のものを除く細菌である。したがって、菌量低下に関与する微生物は主にこれらの細菌であることが推測される。

人工根圏土壌中でアズキ落葉病菌の分生胞子は未発芽の状態に死滅すること、あるいは、この現象が微生物一般の非特異的な作用によることなどの特徴は、土壌静菌作用の性質とよく一致する。そこで、人工根圏土壌中における菌量低下現象の機構について、Lockwoodの提唱した養分欠乏説による説明を試みた。以下にその仮説を述べる。

アズキ落葉病菌分生胞子は、その発芽に関して外部栄養依存性であるため、通常の土壌中でも発芽せずに土壌微生物による内在養分の流出（栄養ストレス）にさらされている。人工浸出液中の糖・アミノ酸の利用により、他の土壌微生物（特に細菌）の活性が著しく高くなると、さらに栄養ストレスが強くなり、養分の損失が急激になる。強くなった栄養ストレス下でアズキ落葉病菌分生胞子は、急激に内在養分を奪われ、培地上のような富栄養条件におかれても発芽することができなくなり、さらにそれが進行すると死滅する。

一方、コムギ条斑病菌の分生胞子は、人工根圏土壌中でも人工浸出液を利用して発芽することができた。このことは、アズキ落葉病菌の分生胞子は、他の糸状菌の分生胞子と比較して特に栄養ストレスに敏感であることを示しており、人工根圏土壌中での菌量低下が本菌に特異的であることと一致する。

本研究で行った実験では、上に述べた仮説を証明するようなデータは得られなか



った。しかし、人工根圏土壌中での菌量低下が、実験開始後5～7日目に起こることも、徐々に内在養分が流出していくという上述の仮説に一致する。このように、仮説を支持する状況証拠が多数あることから、実験方法を改善するなどしてさらに検討する必要がある。

栄養ストレスによる内在養分の喪失と病原菌の発芽能力の低下、あるいは病原性の低下に関するこれまでの研究は、主にモデルシステムや通常の土壌を用いてなされており、根圏土壌のような、さらに微生物活性の高まった土壌での検討はなされていない。しかしこのことは、アズキ落葉病菌に限らず、土壌生息性糸状菌一般の生態研究の上でも重要であろう。

本研究ならびにこれまでに蓄積された研究から、アズキ落葉病菌は生態面で、他の病原菌とは異なる性格を持つ菌であるといえる。今後は、根圏土壌中での分生胞子の死滅というミクロな現象の機構を解明し、それを、根系の分布と土壌全体の菌量低下というマクロな現象と結び付ける研究が必要であろう。



## 摘 要

1. トウモロコシを栽培することにより、土壌中のアズキ落葉病菌 (*Phialophora gregata* f. sp. *adzukicola*) 菌量が著しく低下することが報告されている(近藤・小林、1983a)。そこで本研究では、このトウモロコシ栽培による土壌中のアズキ落葉病菌菌量の低下機構を解明することを試みた。
2. 北海道大学農学部附属農場内に設けた実験区において、トウモロコシ、アズキ、ダイズおよびコムギを栽培し、アズキ落葉病菌菌量の変動を調査した。その結果、トウモロコシ、アズキ、ダイズおよびコムギの根圏土壌中でアズキ落葉病菌菌量は著しく (1/10~1/20) 低下した。トウモロコシのみならず、宿主であるアズキも含めた複数の作物の根圏土壌中で同様に菌量低下が認められたことから、根圏での菌量低下現象は作物に非特異的な現象であると考えられた。
3. 北海道立十勝農業試験場圃場のアズキ落葉病激発土を用いた温室ポット試験においても、トウモロコシ、アズキおよびダイズの根圏土壌中でアズキ落葉病菌菌量の低下が認められた。したがって、根圏での菌量低下現象は異なる土壌中でも再現された。以上のように、根圏土壌中での菌量低下現象は作物あるいは土壌の種類によらないことから、根圏というものの持つ一般的な作用 (非特異的な根圏効果) によることが推察された。
4. 北大農学部附属農場内実験区における試験で、畝間土壌 (畝と畝の中央部から採取した土壌、この土壌中の菌量が栽培土壌全体の菌量を反映すると考えた。) 中のアズキ落葉病菌菌量と根長密度を調査した。その結果、4作物共に根圏で菌量低下が認められるにも関わらず、畝間土壌中の菌量はトウモロコシ、ダイズ、コムギ栽培区で低下したが、アズキ栽培区では低下しなかった。この時、根長密度はアズキ栽培区以外では著しく増加したが、アズキ栽培区ではほぼ横ばいであった。このことはアズキ根系の分布範囲が他の作物と比較して小さいことを示す。以上の結果より、根圏で菌量低下が認められる作物のうち、根系が土壌の広範囲に及び、また、根長密度の大きいものを栽培することにより、栽培土壌全体の菌量が低下することが明らかとなった。したがって、トウモロコシ栽培によるアズキ落葉病菌菌量の低下は、その根圏での菌量低下を土壌中の広い範囲に一律に広げたためであると考えられた。



5. 多数の作物の根浸出液に一般的に含まれるとされる3種類の糖（グルコース、ガラクトース、マルトース）と3種類のアミノ酸（アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン）をそれぞれ5 mM含む水溶液（人工浸出液）を、透析膜を介して土壤中に徐々に浸出させることにより微生物が増加し、疑似的な根圏土壤（人工根圏土壤）が形成された。その人工根圏土壤においてもアズキ落葉病菌菌量の著しい低下（1/10～1/100）が認められた。この現象は異なる土壤（北大土壤と十勝土壤）でも同様に認められ、さらに、人工浸出液の組成を変えても同様であった。このことも、根圏での菌量低下が作物（根浸出液）あるいは土壤に非特異的な現象であることを示す結果と考えた。
6. 人工根圏土壤中でのアズキ落葉病菌菌量の低下に関与する微生物の役割を検討するため、殺菌土壤を用いて実験を行った。その結果、微生物の存在なしには人工根圏土壤中での菌量低下は認められなかった。したがって、人工根圏土壤中におけるアズキ落葉病菌の菌量低下は微生物の何らかの作用によることが明らかとなった。
7. 人工浸出液が細菌相に与える影響を簡易細菌同定システム"BIOLOG"を利用して検討した。その結果、人工浸出液の影響により、細菌数は約10倍に増加するが、その多様性および細菌相はもとの土壤と大きく異ならなかった。
8. 糸状菌も人工根圏土壤中で約10倍に増加するが、*Penicillium*属など一部の増加が大きく、その多様性は著しく低下した。これら一部の菌種の増加とその作用により、アズキ落葉病菌菌量の低下が起こる可能性は低いことが考察された。このことから、人工根圏土壤中の菌量低下には主に細菌の作用が関与することが推測された。
9. 人工根圏土壤中でのアズキ落葉病菌菌量低下に関与する微生物の作用をさらに検討するため、低温（4℃）下における人工根圏土壤中の微生物相ならびにアズキ落葉病菌菌量を調査した。その結果、4℃下においた人工根圏土壤でも微生物（細菌）は増加したが、アズキ落葉病菌の菌量低下は起こらなかった。また、このときの細菌相は25℃下においた人工根圏土壤中の細菌相と大きく異ならなかった。



10. 4℃下においた人工根圏土壌中の微生物活性（土壌からの二酸化炭素発生量）は、25℃下においたものと比較して著しく低かった。このことから、菌量低下には高い微生物活性が必要であることが示唆された。
11. 以上に述べた人工根圏土壌中におけるアズキ落葉病菌菌量低下現象を総合すると、この現象は、人工浸出液の影響により増加した微生物（主に細菌）の作用による。またこの時、細菌相は対照土壌とその多様性に大きな違いがなく、類似性も高いことから、菌量低下現象がある特異的な細菌群の作用による可能性は低く、むしろ、人工根圏土壌中で増加した細菌一般の非特異的な作用によることが推察された。これと同時に、増加した細菌の高い活性が必要条件であることが推測された。
12. アズキ萎ちょう病菌（*Fusarium oxysporum* f. sp. *adzukicola*）とコムギ条斑病菌（*Cephalosporium gramineum*）に関しては人工根圏土壌中で菌量の低下が認められなかった。このことから、人工根圏土壌中での菌量低下はアズキ落葉病菌に特異的な現象であることが推察された。
13. 蛍光染色したアズキ落葉病菌分生胞子を接種した土壌を用いて、人工根圏土壌中の胞子の発芽と菌量を調査した。その結果、アズキ落葉病菌の分生胞子は人工根圏土壌中で、発芽しないまま死滅することが明らかとなった。また、実際のアズキ根圏土壌中においても胞子の発芽率は低かった。このことから、実際の根圏においても発芽しないまま死滅することが推察された。
14. 以上に述べた作物根圏あるいは人工根圏土壌中でのアズキ落葉病菌菌量低下現象の特徴は、土壌静菌作用の特徴と共通点が多く認められた。したがって、作物根圏あるいは人工根圏土壌中でのアズキ落葉病菌菌量低下の機構として、分生胞子の内在栄養物質が土壌微生物の作用により喪失し、その結果、分生胞子が死滅することが示唆された。



## 引用文献

- 足立大山、成河智明、千葉一美、村田吉平、原 正紀、島田尚典 (1988) あずき新品種「ハツネショウズ」の育成について 北海道立農試集報 57:13-24
- 赤井 純、坪木和夫、後木利三 (1971) 十勝地方に多発したアズキ落葉病の発生と被害について 日植病報 37:168 (講要)
- Allington, W. B. and D. W. Chamberlain (1948) Brown stem rot of soybean. *Phytopathology* 38:793-802
- 青田盾彦、小池正徳、坪木和男、酒井真次 (1984) *Cephalosporium gregatum* ALLINGTON et CHAMBERLAINによるダイズ落葉病 (新称) について 日植病報 50:98 (講要)
- 青田盾彦、谷井昭夫、赤井 純 (1981) アズキ落葉病と線虫の関連について 日植病報 47:99-100 (講要)
- 青田盾彦、坪木和男、赤井 純 (1984) トウモロコシ栽培年数とアズキ落葉病の発生 日植病報 50:99 (講要)
- Arora, D. K., A. B. Filonow and J. L. Lockwood (1983) Exudation from  $^{14}\text{C}$ -labeled fungal propagules in the presence of specific microorganisms. *Can. J. Microbiol.* 29:1487-1492
- Bone, T. L. and D. L. Balkwill (1986) Improved flotation technique for microscopy of in situ soil and sediment microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:462-468
- Bristow, P. R. and J. L. Lockwood (1975) Soil fungistasis: role of spore exudates in the inhibition of nutrient-independent propagules. *J. Gen. Microbiol.* 90:140-146



- Chamberlain, D. W. and D. F. McAlister (1954) Factors affecting the development of brown stem rot of soybean. *Phytopathology* 44:4-6
- Curl, E. A. and B. Truelove (1986) *The Rhizosphere*. Springer-Verlag, Berlin 288pp.
- Dunleavy, J. (1966) Factors influencing spread of brown stem rot of soybeans. *Phytopathology* 56:298-300
- Dunleavy, J. (1967) Red clover infected by *Cephalosporium gregatum*. *Phytopathology* 57:810 (abst.)
- Dunleavy, J. M. and C. R. Weber (1967) Control of brown stem rot of soybean with corn-soybean rotations. *Phytopathology* 57:114-117
- Filonow, A. B. and J. L. Lockwood (1983) Loss of nutrient-independence for germination by fungal propagules incubated on soils or on a model system imposing diffusive stress. *Soil Biol. Biochem.* 15:567-573
- Gams, W. (1971) *Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes)*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 262pp.
- Gray, L. E. (1971) Variation in pathogenicity of *Cephalosporium gregatum* isolates. *Phytopathology* 62:1362-1364
- Gray, L. E. (1972) Recovery of *Cephalosporium gregatum* from soybean straw. *Phytopathology* 62:1362-1364
- Gray, L. E. (1974) Role of temperature, plant age, and fungus isolate in the development of brown stem rot of soybeans. *Phytopathology* 64:94-96
- Gray, L. E. and A. G. Hepburn (1992) Mitochondrial DNA restriction patterns of *Phialophora gregata* isolates from soybean and adzuki bean. *Phytopathology* 82:211-215
- Gray, L. E. and J. K. Pataky (1994) Reaction of mung bean plants to infection by isolates of *Phialophora gregata*. *Plant Dis.* 78:782-785



Hadar, E., J. Katan and T. Katan (1989) The use of nitrate-nonutilizing mutants and a selective medium for studies of pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. Plant Dis. 73:800-803

Hattori, R. and T. Hattori (1980) Sensitivity to salts and organic compounds of soil bacteria isolated on diluted media. J. Gen. Appl. Microbiol. 26:1-14

Hendrix, F. F. and L. W. Nielsen (1958) Invasion and infection of crops other than the forma suscept by *Fusarium oxysporum* f.sp. *batatas* and other formae. Phytopathology 48:224-228

北海道立十勝農業試験場病虫科 (1977) 畑作物の連作病害の究明と対策に関する試験 昭和51年度北海道立十勝農業試験場集報 北海道立十勝農業試験場 pp. 87-91

北海道立十勝農業試験場病虫科 (1981) アズキ落葉病の防除法確立試験 昭和55年度北海道立十勝農業試験場集報 北海道立十勝農業試験場 pp. 82-86

Hsu, S. H. and J. L. Lockwood (1973) Soil fungistasis: behavior of nutrient-independent spores and sclerotia in a model system. Phytopathology 63:334-337

実験化学講座編集委員会 (1957) 実験化学講座23 生物化学I 日本化学会編 pp. 417-418

Ko, W. H. and J. L. Lockwood (1967) Soil fungistasis: relation to fungal spore nutrition. Phytopathology 57:894-901

小林喜六 (1993) アズキ落葉病の生態と防除 植物防疫 47:169-172

小林喜六、近藤則夫、根岸秀明、宇井格生 (1984) 北海道に発生するアズキ落葉病の発生分布ならびに実態に関する調査、研究 北大農学部邦文紀要 14:91-97



Kobayashi, K., N. Kondo, F. Tanaka, and T. Ui (1980) Differences in the virulence of Type A and Type B isolates of *Cephalosporium gregatum*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 46:253-255

Kobayashi, K., N. Kondo, T. Ui, H. Tachibana, and T. Aota (1983) Difference in pathogenicity of *Phialophora gregata* isolates from adzuki bean in Japan and from soybean in the United States. Plant Dis. 67:387-388

Kobayashi, K., F. Tanaka, N. Kondo, and T. Ui (1981) A selective medium for isolation of *Cephalosporium gregatum* from soil and population in adzuki bean field soils estimated with the medium. Ann. Phytopath. Soc. Japan 47:29-34

Kobayashi, K., F. Tanaka, T. Ui and J. Akai (1979) A new strain of *Cephalosporium gregatum*, causal fungus of brown stem rot of adzuki beans. Ann. Phytopath. Soc. Japan 45:409-411

Kobayashi, K. and T. Ui (1975) Isolation of phytotoxic substances produced by *Cephalosporium gregatum* Allington and Chamberlain. Tetrahedron Letters 47:4119-4122

Kobayashi, K. and T. Ui (1977) Wilt-inducing antibiotic compounds produced by *Cephalosporium gregatum*. Physiol. Pl. Path. 11:55-60

Kobayashi, K. and T. Ui (1980) Comparison of *Cephalosporium gregatum* isolates from adzuki bean in Japan and soybean in U. S. A. Ann. Phytopath. Soc. Japan 46:241-246

Kobayashi, K., H. Yamamoto, H. Negishi and A. Ogoshi (1991) Formae speciales differentiation of *Phialophora gregata* isolates from adzuki bean and soybean in Japan Ann. Phytopath. Soc. Japan 57:225-231

近藤則夫、小林喜六 (1983a) アズキ落葉病菌の生態に関する研究 I.寄主、非寄主作物栽培によるアズキ落葉病菌菌量の季節変動 北大農学部邦文紀要 14:39-47



- 近藤則夫、小林喜六 (1983b) アズキ落葉病菌の生態に関する研究 II. 土壌中菌量に及ぼすアズキ罹病残さの影響 北大農学部邦文紀要 14:48-49
- 近藤則夫、小林喜六 (1983c) アズキ落葉病菌の生態に関する研究 III. アズキ落葉病菌分生胞子の土壌中での生存と発芽 北大農学部邦文紀要 14:50-55
- Lai, P. V. (1968) Isolation of *Cephalosporium gregatum* from soybean straw. *Phytopathology* 58:1194-1195
- Lai, P. V. and J. M. Dunleavy (1969a) Sporulation of *Cephalosporium gregatum* on naturally infested soybean straw. *Phytopathology* 59:343-345
- Lai, P. V. and J. M. Dunleavy (1969b) Sporulation and spore germination of *Cephalosporium gregatum* as influenced by host substrate and soil moisture. *Phytopathology* 59:1646-1649
- Lai, P. V. and J. M. Dunleavy (1969c) Growth and sporulation of *Cephalosporium gregatum* on various media and buried soybean straw. *Phytopathology* 59:1950-1953
- Lockwood, J. L. (1964) Soil fungistasis. *Ann. Rev. Phytopathol.* 2:341-362
- Lockwood, J. L. (1975) Quantitative evaluation of a leaching model system for soil fungistasis. *Phytopathology* 65:460-464
- Lockwood, J. L. (1986) Soilborne plant pathogens: concepts and connections. *Phytopathology* 76:20-27
- Mengistu, A. and C. R. Grau (1986) Variation in morphological, cultural, and pathological characteristics of *Phialophora gregata* and *Acremonium* sp. recovered from soybean in Wisconsin. *Plant Dis.* 70:1005-1009
- Mengistu, A., H. Tachibana and C. R. Grau (1991) Selective medium for isolation and enumeration of *Phialophora gregata* from soybean straw and soil. *Plant Dis.* 75:196-199



- 宮島邦之、齊藤 泉 (1985) コムギ条斑病のイネ科植物における生存 日植病報 51:108 (講要)
- 成田武四、赤井 純、坪木和男 (1971a) アズキ落葉病とその病原菌 植物防疫 25:353-358
- 成田武四、赤井 純、坪木和男 (1971b) アズキ落葉病菌 *Cephalosporium* 菌について 日植病報 37:168-169 (講要)
- Nash, S. M., T. Christou and W. C. Snyder (1961) Existence of *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* as chlamydospores in soil. *Phytopathology* 51:308-312
- 根岸秀明、小林喜六 (1984) アズキ落葉病の発病に及ぼすダイズシストセンチュウの影響 日植病報 50:500-506
- Phillips, D.V. (1971) Influence of air temperature on brown stem rot of soybean. *Phytopathology* 61:1205-1208
- Phillips, D.V. (1973) Variation in *Phialophora gregata* *Pl. Dis. Rep.* 57:1063-1065
- Puhalla, J. E. (1985) Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Can. J. Bot.* 63:179-183
- Schroth, M. N. and F. F. Hendrix, Jr. (1962) Influence of nonsusceptible plants on the survival of *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* in soil. *Phytopathology* 52:906-909
- Schneider, R. W., J. B. Sinclair and L. E. Gray (1972) Etiology of *Cephalosporium gregatum* in soybean. *Phytopathology* 62:345-349
- Sills, G. R., E. T. Gritton, and C. R. Grau (1991) Differential reactions of soybean genotypes to isolates of *Phialophora gregata*. *Plant Dis.* 75:687-690



Sneh, B. and J. L. Lockwood (1976) Quantitative evaluation of the microbial nutrient sink in soil in relation to a model system for soil fungistasis. *Soil Biol. Biochem.* 8:65-69

相馬 潤 (1992) トウモロコシ栽培によるアズキ落葉病菌菌量低下機構に関する研究 北海道大学大学院農学研究科農業生物学専攻修士論文 151 pp.

相馬 潤、小林喜六、生越 明 (1991a) トウモロコシ栽培によるアズキ落葉病菌の菌量低下機構 I. トウモロコシおよびアズキの根圏土壌中のアズキ落葉病菌菌量 北大農学部邦文紀要 17:473-477

相馬 潤、小林喜六、生越 明 (1991b) トウモロコシ栽培によるアズキ落葉病菌の菌量低下機構 II. トウモロコシおよびアズキの根面微生物相、根圏微生物相の比較 北大農学部邦文紀要 17:479-488

Souma, J., K. Kobayashi and A. Ogoshi (1995) Relationship between root length density and decrease in population of *Phialophora gregata* f. sp. *adzukicola*. *Soil Microorganisms* 45 (in press)

Stanier, R. Y., J. L. Ingraham, M. L. Wheelis and P. R. Painter (1986) 微生物学 (上) 原書第5版 高橋 甫、斎藤日向、手塚泰彦、水島昭二、山口英世訳、倍風館 pp. 190-191

Tachibana, H. (1988) Use and management of resistance for control of brown stem rot of soybeans. in *Soybean Diseases of the North Central Region*. T. W. Wyllie and D. H. Scott Ed. APS Press St. Paul, Minnesota pp.102-105

Tachibana, H., A. H. Epstein and B. J. Havlovic (1989) Effect of four years of continuous cropping of maturity group II soybean resistant to brown stem rot on brown stem rot and yield. *Plant Dis.* 73:846-849

田辺市郎 (1975) 土壤呼吸 土壤微生物実験法 土壤微生物研究会編 養賢堂 pp. 270-276



- 田中文夫、土屋貞夫、近藤則夫、小林喜六 (1984) 転作地帯のアズキ落葉病に対する田畑輪換の効果 日植病報 50:98-99 (講要)
- 田中一郎、北沢健治 (1956) 小豆落葉病について 日植病報 21:123 (講要)
- Tsao, P. H. (1970) Applications of the vital fluorescent labeling technique with brighteners to studies of saprophytic behavior of *Phytophthora* in soil. Soil Biol. Biochem. 2:247-256
- 土屋貞夫 (1976) アズキ落葉病について 第8回土壤伝染病談話会資料 pp.14-18
- 土屋貞夫、赤井 純 (1971) アズキ落葉病に罹病したアズキの維管束褐変の推移 日植病報 37:409 (講要)
- 渡邊恒雄 (1993) 土壤糸状菌 -培養株の検索と形態- ソフトサイエンス社 392p.
- Wiese, M. V. and A. V. Ravenscroft (1973) Quantitative detection of propagules of *Cephalosporium gramineum* in soil. Phytopathology 63:1198-1201
- Willmot, D. B., C. D. Nickell and L. E. Gray (1989) Physiologic specialization of *Phialophora gregata* on soybean. Plant Dis. 73:290-294
- 山本英樹 (1994) アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌の分類に関する研究 北大農学部邦文紀要 19:57-98
- Yamamoto, H., K. Kobayashi and A. Ogosi (1990) Isozyme polymorphism in *Phialophora gregata* isolates from adzuki bean and soybean in Japan. Ann. Phytopath. Soc. Japan 56:584-590
- Yamamoto, H., K. Kobayashi and A. Ogosi (1991) Comparison of culture characteristics of *Phialophora gregata* ff. sp. *adzukicola* and *sojae* in Japan. Trans. Mycol. Soc. Japan 32:529-533



Yamamoto, H., K. Kobayashi and A. Ogoshi (1992) Genetic relatedness between *Phialophora gregata* ff. sp. *adzukicola* and *sojae* Trans. Mycol. Soc. Japan 33:461-465

Yamamoto, H., K. Kobayashi and A. Ogoshi (1993) Restriction fragment length polymorphisms in mitochondrial DNA of *Phialophora gregata* in Japan. Trans. Mycol. Soc. Japan 34:465-471

柳田友道 (1984) 微生物科学 4.生態 学会出版センター p160

横山和成、香口哲行、井之本晃、森下敏和、赤坂安盛、市川和規、三上哲壮、西山幸司、対馬誠也、河本征臣 (1992) クラスタ分析法を用いた土壤生息性拮抗細菌群の多様性評価 日植病報 58:585 (講要)



培地成分表 本研究で用いた培地の組成を以下に示した。

アズキ落葉病菌選択分離培地

蒸留水1000ml、寒天 20g、ガラクトース 5g、ペプトン 5g、リン酸一カリウム 1g、硫酸マグネシウム 0.5g、ホウ酸ナトリウム 0.5g、PCNB 0.5g、コール酸ナトリウム 0.5g、塩酸テトラサイクリン 50mg、硫酸ストレプトマイシン 0.2g

ブドウ糖加用ジャガイモ煎汁培地 (PDA)

ジャガイモ 200g、グルコース 20g、寒天 15g、蒸留水 1000ml

10% Tryptic soy agar (10%TSA)

Tryptic soy agar (DIFCO)を10倍希釈し、寒天濃度を1.5%に調整。

TSA: Bacto Tryptone 15g, Bacto Soytone 5g, sodium chloride 5g,

Bacto Agar 15g

ローズベンガル寒天培地

リン酸一カリウム 1g、硫酸マグネシウム 0.5g、ペプトン 5g、グルコース 10g、寒天 20g、ローズベンガル 30mg、ストレプトマイシン 30mg、蒸留水1000ml

素寒天培地 (WA)

寒天 15g、蒸留水1000ml

Violet red bile agar (DIFCO)

Bacto Yeast Extract 3g, Bacto Peptone 7g, Bacto Bile Salt No.3 1.5g, Bacto Lactose 10g, sodium chloride 5g, Bacto Agar 15g, neutral red 30mg, Bacto Crystal Violet 2mg

King's B 培地 (KB培地)

Proteose Peptone No.3 20g、リン酸二カリウム 1.5g、硫酸マグネシウム 1.5g、寒天 15g、グリセロール 15ml、蒸留水1000ml



#### PTYG培地

Bacto Peptone 0.25g、 Bacto Tryptone 0.25g、 Bacto Yeast Extract 0.5g、  
グルコース 0.5g、 硫酸マグネシウム 30mg、 塩化カルシウム 3.5mg、  
Bacto Agar 15g、 蒸留水1000ml

#### 100倍希釈肉エキス培地 (DNB培地)

肉エキス 0.1g、 ペプトン 0.1g、 塩化ナトリウム 50mg、 Agar Noble  
(DIFCO) 15g、 蒸留水1000ml

#### 駒田培地 (*Fusarium*菌用合成選択分離培地)

リン酸二カリウム 1g、 塩化カリウム 0.5g、 硫酸マグネシウム 0.5g、  
Fe-EDTA 10mg、 アスパラギン 2g、 ガラクトース 20g、 PCNB 1g、  
コール酸ナトリウム 0.5g、 ホウ酸ナトリウム 1g、 硫酸ストレプトマイシン  
0.3g、 寒天 15g、 蒸留水1000ml

#### MM培地 (最小培地)

スクロース 30g、 リン酸一カリウム 1g、 硫酸マグネシウム 0.5g、 塩化カ  
リウム 0.5g、 硫酸第一鉄 10mg、 硝酸ナトリウム 2g、 寒天 20g、 蒸留水  
1000ml、 trace element solution 0.2ml

##### \* trace element solution

クエン酸 5g、 硫酸亜鉛七水和物 5g、 硫酸第一鉄 4.75g、 硫酸第一鉄  
アンモニウム 1g、 硫酸銅五水和物 250mg、 硫酸マンガン 50mg、  
ホウ酸 50mg、 モリブデン酸ナトリウム 50mg、 蒸留水1000ml

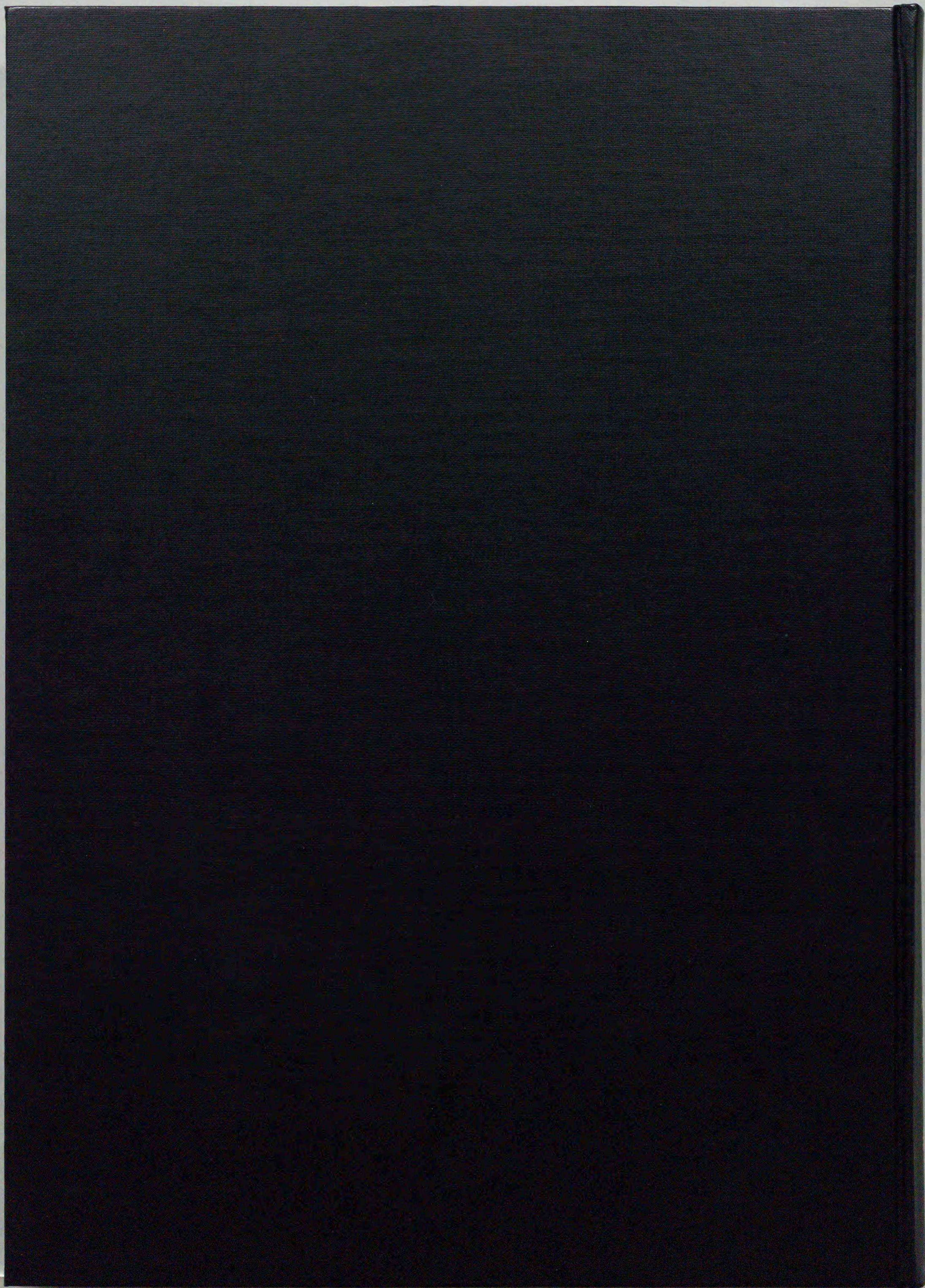
#### コムギ条斑病菌選択分離培地

100gのコムギ葉身 (播種後10~30日) を1000mlの蒸留水で10分間煮たものを  
ガーゼで濾過し、20gの寒天を加え、オートクレーブ (121℃、10分) する。  
この培地1000mlに対し、0.8~1.2gの硫酸銅を加える。

#### V-8ジュース寒天培地

V-8ジュース200mlに炭酸カルシウム3gを加え、よく攪拌後、遠心して上清を  
とり、これを蒸留水で5倍に希釈する。これに寒天を2%となるように加える。



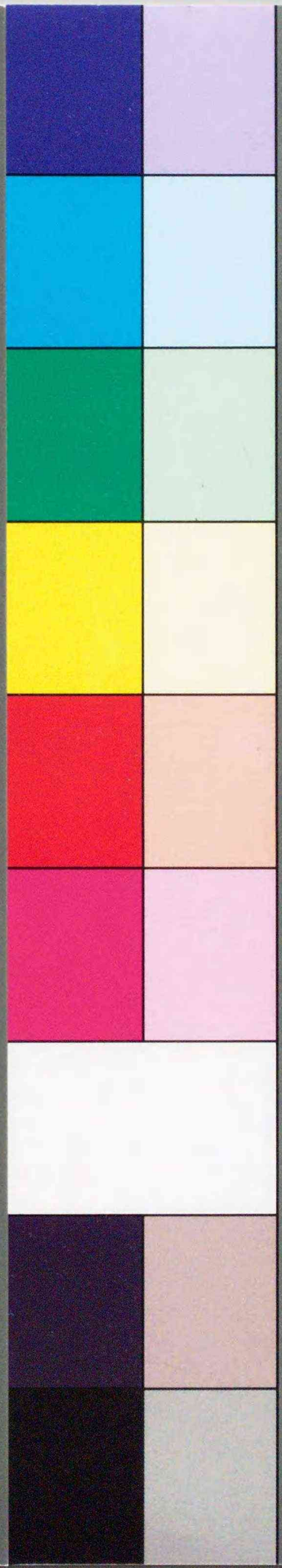




Inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



# Kodak Gray Scale

**A** 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19



© Kodak, 2007 TM: Kodak