HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	テンサイそう根病および根腐病の生物的防除法に関する研究
Author(s)	佐山, 充
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	乙第5790号
Issue Date	2001-03-23
DOI	https://doi.org/10.11501/3182680
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51513
Type	doctoral thesis
File Information	000000400300.pdf



Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

テンサイそう根病および根腐病の生物的防除法に関する研究

佐山　充

①

テンサイそう根病および根腐病の生物的防除法に関する研究

佐山　充

目　次

Ⅰ. 緒言　1

Ⅱ. 研究史　4

Ⅲ. テンサイそう根病の生物的防除法

A. 土壌中のPolymyxa betae菌数を減少させる因子の探索

1. 各種植物のポット栽培におけるPolymyxa betae菌数の変動　15

2. 培養条件および土壌の種類を異にした場合のPolymyxa betae休眠胞子の空洞率の比較　31

B. 土壌中のPolymyxa betaeの直接観察法の改良　39

C. 根圏細菌によるそう根病の発病抑制

1. 室内試験および圃場での根圏細菌によるそう根病の抑制効果　51

2. 根圏細菌の施用法および利用法　77

Ⅳ. テンサイ根腐病の生物的防除

A. Rhizoctonia solani AG2-2-IV菌体の繰り返し接種によって誘導された発病抑止土壌の微生物的特性

1. 繰り返し接種による土壌の発病抑止性の誘導　83

2. 誘導された発病抑止性の要因解析　85

B. Verticillium biguttatumを用いたRhizoctonia solani AG2-2-IVによるテン

サイ苗立枯病および根腐病の生物的防除

1. テンサイ苗立枯病に対する抑制効果 107

2. テンサイ根腐病に対する抑制効果 109

3. テンサイ種子へのRhizoctonia solani菌糸の寄生に対する抑制効果 118

4. 培地上でのRhizoctonia solani菌糸に対する寄生性 118

5. Verticillium属菌の形態と生育温度 120

V. 総合考察 129

摘要 136

引用文献 141

Ⅰ．緒言

砂糖原料としてのテンサイは，1871年に道内で試作され，1920年から1921年にかけて帯広市および清水町にテンサイ製糖工場が設立されて以降に，産業としてのテンサイ糖業が成立するようになった（細川，1980)。その後，1970年代には作付面積約５～６万ヘクタール，10アール当たり平均収量約４～５トンとなり，現在（1999年）は，作付面積約7万ヘクタール，平均収量5.4トンとなり（北海道てん菜協会，2000），北海道の基幹的畑作物の一つとして重要な位置を占めている。

テンサイの病害には，ウイルス病が５種，細菌病が５種，糸状菌病が２２種報告されている（日本有用植物病名目録，2000）。その内被害が大きく問題となっている土壌病害としては，そう根病，根腐病，黒根病，苗立枯病がある。

我が国におけるテンサイそう根病の初発生は，1965年帯広市にある日本甜菜製糖株式会社で行われていたテンサイ連作試験区の中のものと考えられている（増田ら，1967）。しかし、初めはその原因が明らかでなかったため，連作障害の一つとして取り上げられていた（増田ら，1969）。その後，1969年および1970年に北海道の14支庁のうち渡島，胆振，日高，網走，宗谷，石狩，上川，後志および十勝の9支庁の一般農家圃場約595ヘクタールにおいて茎葉の黄化など生育異常症状が観察され，その被害

は極めて激しかったため，北海道内の植物病害とてん菜栽培の関係者により多くの研究と検討が続けられた（てん菜短期輪作対策協議会，1971；北海道てん菜技術推進協会，1972）。その結果，この生育異常症状には病原として媒介菌のPolymyxa betae Keskinおよび病原ウイルスが関与することが明らかとなり，また，防除法として育苗時の感染防止対策が講じられた。しかし，栽培圃場がすでに汚染されている場合には，媒介菌の生存期間が10年以上と長いことから耕種的防除は困難とされている。薬剤防除についても，実用的なものが無く，また抵抗性品種の抵抗性程度も不十分であり，現在も被害が問題となっている。新しい試みとしての生物的防除法の開発が求められている。本病はネコブカビ科のP. betaeによって伝搬されるウイルス（Beet necrotic yellow vein virus）に起因する土壌伝染性ウイルス病であることが明らかにされた（神沢・宇井，1972；Tamada and Baba, 1973）。その後，病原ウイルスについては，玉田らによりウイルスゲノムの機能の解析，遺伝子診断を含む検診法などが，媒介菌については，阿部らによって宿主範囲や分化型，土壌pHなど感染に影響する要因などの生態的な検討が行われた。

Rhizoctonia solani Kühnによって引き起こされるテンサイ根腐病は，1922年に北海道十勝地方で，1923年に札幌地方で初めて発生が確認された（桑山ら，1925）。以降，輪作など耕種的防除や薬剤防除などが行われているにもかかわらず，例年作付面積の約20％に発生があり，1997年

には18.2％で発生がみられている（北海道農政部，1998）。そのため，既存の防除技術を補強する意味から，また，殺菌剤の環境問題への配慮等から，予防的に施用できる生物的防除法の開発に対する要望が高まっている。

このようなことから筆者は，そう根病の防除法の一つとしての生物的防除法の開発を目的として，拮抗作用を持つ根圏細菌の探索，発病抑制効果試験，効果と定着性の関係，抵抗性品種や対抗植物の利用，媒介菌休眠胞子の検出法などの研究を行った。また，根腐病に関しては，発病衰退現象を防除に利用する可能性を検討するために，病原菌の繰り返し接種によって誘導された土壌の抑止性の解析を行い，さらに土壌から分離された菌寄生菌による防除法に関する研究を行った。

本稿を草するに当たり，北海道大学教授小林喜六博士，同教授内藤繁男博士，同教授上田一郎博士，同助教授近藤則夫博士には懇切丁寧なご指導とご校閲を賜った。衷心より感謝の意を表する。

本研究テーマは，前北海道農業試験場環境制御研究チーム長本間善久博士（現国際農林水産業研究センター）より与えられ，終始多大なご指導とご鞭撻を頂いた。北海道農業試験場環境制御研究チーム長竹中重仁博士には，有益なご指導をいただき，さらに本論文の取りまとめに当たっても綿密な御校閲を賜った。元北海道立中央農業試験場生物工学部長玉田哲男博士（現岡山大学資源生物科学研究所教授）には，終始有益なアドバイスをいただ

くとともに，BNYVVの純化ウイルス並びに抗血清の御分譲を賜った。北海道立上川農業試験場主任研究員阿部秀夫博士には，有益なご助言をいただくとともに，Polymyxa betaeの御分譲を賜った。元日本甜菜製糖株式会社総合研究所副所長神沢克一博士（現てん菜協会），日本甜菜製糖株式会社総合研究所主席研究員内野浩克博士（現日本甜菜製糖株式会社企画部）並びに日本甜菜製糖株式会社総合研究所渡辺英樹氏には，本研究の遂行に当たって多くの有益なご助言をいただくとともに，貴重な試料の御分譲を賜った。北海道糖業株式会社の各位には，貴重な試料の御分譲を賜った。北海道大学名誉教授生越明博士並びに財団法人日本きのこセンター菌蕈研究所小松光雄博士には，貴重な菌株の御分譲を賜った。以上の皆様に記して感謝の意を表する。

Ⅱ．研究史

1．テンサイそう根病

A．発生分布および被害

我が国では，1965年に北海道帯広市にある日本甜菜製糖株式会社のテンサイ連作試験区に原因不明な異常症状株が発生し（増田ら，1967），1968年に北海道の十勝地方および網走地方の一般農家圃場で発生が認められた（増田ら，1970）。1970年には多発生したが，その原因は，製

糖工場沈澱池土壌が混入した病土で育苗したテンサイを健全な畑に移植した結果と考えられた（てん菜短期輪作対策協議会，1971）。その後，育苗土に対する対策が徹底し無病土を用いるようになり，発生は減少した（宇井，1973）。しかし，一部には畑がすでに病土となっている地域もあり，土壌pHが5.5以下になるとほぼ発病が見られなくなる（神沢，1973）ことを利用して，土壌pHの低下などにより発生を抑えている状況である。しかし，近年は土壌pHの低下のためテンサイの生育阻害も生じているため，土壌pH以外の防除対策も必要とされている（伊槻ら，1998；梶山ら，1999）。

一方，世界的には，そう根病と考えられる病害が初めて報告されたのは1950年代初めにイタリアにおいてであり，ポー川の下流低地でテンサイの糖分含量が著しく低くなる現象が発生した。そのテンサイは，根部に細根の叢生，葉に黄化などの症状を示すことが知られ，リゾマニア（Rhizomania）と呼ばれた（宇井，1973）。現在までに，フランス（Putz and Vuittenez, 1974)，ドイツ(Hamdorfら，1977)，ユーゴスラビア(Ivanovicら，1978)，ギリシャ(Kouyeas, 1979)，ルーマニア(Codrescuら，1981)，スイス(Häni and Bovey, 1983)，オーストリア(Krexner, 1979)，ハンガリー(Kobzaら，1985)，スペイン(Cambraら，1988)，イギリス(Hill and Torrance, 1989)，アメリカ合衆国(Duffusら，1984)，中華人民共和国(Gaoら，1983）で本病の発生が報告されている。

そう根病による被害で最も重要なのは，根重，根中の

糖分の減少であり（増田ら，1970；神沢，1971a；宇井，1973），軽症であっても根中糖分の著しい低下が特徴である（増田ら，1970；神沢，1971a）。根部におけるウイルスおよび媒介菌の感染程度と被害の関係については，阿部により解析が行われ（阿部，1987），育苗時の感染は育苗土中の病土の割合が増加するに従い，媒介菌の感染程度や根部発病度が高くなり，その結果，根重および糖分が減少することが明らかにされた。また，本畑感染では，葉の黄化度，根の発病度および根のウイルス検出個体率と根重，根中糖分との間には高い負の相関関係が認められた。さらに，主根，側根，細根のうち，側根からのウイルス検出個体率において被害程度との高い正の相関関係が認められた。

発病は，湿潤，高い土壌pH（6.0以上），25℃以上の比較的高温のとき助長され，P. betaeの細根への寄生率も増加する（増田ら，1970；阿部ら，1971；神沢，1971a；Blunt, 1991）。土壌改良資材などの投入による高pH土壌での発病増加については，カルシウムの影響ではなく，pHの上昇のみが原因とされる（阿部，1987)。また，土性と発病との間には一定の関係はみられていない（宇井，1973)。

B．病原ウイルス

1950年代にリゾマニアの発生が確認されて以来，その原因についてはさまざまな推測がなされたが，実験的に証明されたのは1960年代になってからである（宇井，1973）。1966年にD`Ambraらはリゾマニアにかかったテンサ

イの根に見られる菌は，Polymyxa betae Keskinであることを初めて明らかにした。我が国では，神沢(1970)により細根中からP. betaeが観察され，その休眠胞子を含む罹病テンサイの細根磨砕液をテンサイ苗に接種することにより病徴が再現され，接種したテンサイの細根に本菌が見られることが報告された。一方，玉田ら(1970)は，葉脈黄化を示すテンサイから稈状ウイルスを検出し，血清学的性質，物理および化学的性質などから新しいウイルスであることを明らかにし（Tamada and Baba, 1973），BNYVV(Beet necrotic yellow vein virus)と命名した。さらに，本ウイルスはP. betaeによって媒介されることも明らかにされた（Tamada, 1974; Fujisawa and Sugimoto, 1977)。

ウイルスは5種の分節ゲノムから成り，ゲノムの総数は15,947塩基で，サイズの大きい順にRNA-1からRNA-5と名付けられている(Richards and Tamada, 1992; Saitoら，1996)。RNA-1とRNA-2は，ウイルスが感染し増殖するための基本的な機能を持ち，RNA-3はそう根症状やウイルスの増殖，RNA-4は菌伝搬効率を高める機能を有することが明らかとなった。

ウイルスの検出法については，免疫電顕法（萩田・玉田，1980），ELISA法（玉田・萩田，1982）が開発され，特にELISA法は基礎的研究から現場での検診まで幅広く利用されている。また，近年，ウイルスの系統を判別できる遺伝子診断技術も開発された(Saitoら，1997）。

C．媒介菌 Polymyxa betae

Polymyxa 属菌が所属するネコブカビ科 Plasmodiophoraceae は，かつては真菌（植物）門 Eumycota のべん毛菌亜門 Mastigomycotina に位置づけられていたが，その後，変形菌門 Myxomycota のネコブカビ綱 Plasmodiophoromycetes のネコブカビ目 Plasmodiophorales に所属変更となり（宇田川ら，1978），さらに近年は，原生動物界 (Protozoa) へ位置づけられるようになった（杉山，1997）。Polymyxa 属菌には，P. graminis と P. betae の2種があり，それぞれイネ科植物およびアカザ科植物が宿主とされ，この寄生性の差異が種の識別の重要な指標とされている (Karling, 1968)。その後，Polymyxa 属菌の宿主範囲についてはいくつかの報告があり，イネ科，アカザ科以外にヒユ科（神沢・宇井，1972），スベリヒユ科（藤沢・杉本，1978），ナデシコ科（Asher and Barr, 1990）にも寄生性が認められ，各植物から分離された菌株は，同じ科の植物にのみ寄生性を有することが明らかとされている（Abe and Ui, 1986）。

各種植物の栽培によるそう根病の発生に対する影響についてはいくつか報告されており，テンサイやフダンソウ跡地で本病の発生が増加し（神沢，1971b），コムギ，野生エンバクなどイネ科の植物には本病発生の低減効果が認められているが（阿部，1995），土壌中における P. betae の菌量変化の定量的測定はされていない。

土壌中からの P. betae の検出には，指標植物法が用いられており，内野ら（1990）や阿部ら（1991）により精度の高い土壌検診法が開発された。また，菌数の定量には

最確値法（Ciafardini and Marotta, 1989; Ciafardini, 1991）が利用されている。しかし，休眠胞子などの直接法による検出および定量は行われていない。

D．防除法

育苗時の感染防止には，薬剤による土壌の薫蒸処理（神沢，1971c；神沢，1972），加熱処理（神沢，1971c；菅原ら，1975），土壌水分およびpHの管理（神沢，1971a，1973）が有効と報告されている。本畑における防除に関しては，薬剤のD-D処理（菅原ら，1971，1974）のみでは効果が不十分であるが，硫黄粉による土壌pHの低下とD-D剤の併用（阿部・坪木，1978）により防除効果が認められている。また，不十分ながらも抵抗性品種が徐々に育成されており（Asher, 1989; 川勝ら，1998），少発生圃場で栽培されている。しかし，薬剤防除は経済性の面から実用性に乏しく，抵抗性品種もその発病軽減効果が不十分であり，本畑における的確な防除法がないのが現状である。

E．生物的防除法

そう根病に対する生物的防除に関する試験は，拮抗微生物によるものとしては，Trichoderma 属菌（D`Ambra and Mutto, 1986; Camporotaら，1988；Nowakowska, 1994)によるものが報告されている。対抗植物の利用については，野生エンバクなどの栽培により発病が軽減されること（阿部，1995），また，病原ウイルスの遺伝子を改変した弱毒ウイルスが作製され，野生株に対する干渉効果が認められ

ている（玉田ら，1992）。さらに病原ウイルスの外被タンパク質遺伝子を導入したテンサイも作出されており，本組み換え作物では，ウイルスの増殖が抑制されたと報告されている（Kallerhoffら，1990；Mannerlofら，1996）。しかし，拮抗微生物の利用については，圃場での効果は認められておらず，また，弱毒ウイルスについても病原ウイルスは全身感染しないため，接種には弱毒ウイルスを保毒させたP. betaeを利用しなければならず，圃場中のP. betae菌数の増加につながる危険性がある。さらに，P. betaeに対する抵抗性品種が育成された場合には，抵抗性品種との組み合わせによる防除が難しくなる可能性がある。

2．テンサイ根腐病

A．被害

テンサイ根腐病による被害は直接根部収量の減少に結びつき，25～30％の発病で約1tの減収となる（馬場，1981）。また，根重への影響以上に根中糖分と純糖率が低下し，重症なものでは糖分が健全個体の約60％になるとされる。8月中旬以降は新たな発病は認められないため，8月中旬以降の地上部観察で根腐病の被害程度はある程度の精度で推定できるとされている（馬場，1981）。

B．病原菌

Rhizoctonia solani Kühnは生理，生態，遺伝的に異なった菌株群を含み，現在菌糸融合群（AG: anastomosis group）により，

その系統類別が行われている（生越，1972）。北海道内のテンサイ根腐病の罹病部から主として分離されるR. solaniは，菌糸融合群2群2型の培養型Ⅳ（AG2-2-IV）であり，本菌群は強い病原性をもつ（内藤ら，1974）。一方，苗立枯病罹病苗から分離されるR. solaniは，AG1-IB，AG2-2-IV，AG4，AG5であり（生越，1972），その内AG5が最も多く検出されるが（内藤ら，1975），出芽前立枯に対してはAG4が強い病原性を示した（内藤ら，1974）。また，本菌の完全世代であるThanatephorus cucumeris (Frank) Donkは，テンサイなどの葉柄基部表面に形成されることもあるが，被害根部にはほとんど見られない（宇井，1960）。

C．耕種的および薬剤による防除法

根腐病の発病と前作の関係に関しては，前作がテンサイの場合にその発生量が最も多く，次いでバレイショ跡地，麦類やトウモロコシの跡地ではやや少ないと報告されている（Maxson, 1939；山口ら，1978）。生育中に培土することにより発病が増加するため，耕種的防除法として培土はさける必要がある（山口ら，1973）。逆に高畦栽培から発生時期に表層土壌を除去することにより，発病が低減されるが，テンサイの根部を露出させるために，収量，品質に対する悪影響や機械収穫が困難になることが予想される（神沢，1977）。有機物施用として，堆肥を混合することにより本病の発病が低減されたが，投入必要量が多いため実用性に乏しいとされる（神沢，1978）。直播栽培に比べて移植栽培では被害が軽減され

るが（内野・神沢，1986），その際育苗土には健全土壌を使用する必要がある（内藤ら，1980）。

薬剤防除に関しては，トルクロホスメチル剤，フルトラニル剤，ペンシクロン剤，メプロニル剤などの株元散布あるいは育苗土灌注処理が有効とされ，防除法として指導されている（北海道農政部，2000）。いずれも十分な防除効果を得るためには，適期に散布することが必要であるが，悪天候などにより遅延した場合には被害が増大するため，予防的に施用できる防除法が求められている。

D．抑止土壌

一般に土壌伝染性植物病害に対する発病抑止土壌は、長期間持続的に生じている自然発生的・土着的なものと、土壌改良資材の導入、単一栽培、基質や生物の添加などによって誘導されるものとがある（Hornby，1983）。そのうち、R. solaniに対する抑止土壌で自然発生的・土着的なものは、拮抗微生物の関与が考えられている。例えば、コロンビアのBogotaから得られたR. solaniに抑制的な土壌は、非抑制的なFort collinsの土壌に比べ糸状菌数が多く、特にTrichoderma属菌が8×10^5 cfu/gとFort collinsの1×10^2に比べて8,000倍も菌量が高かったと報告されている（Chet and Baker，1981）。また、オランダ北部の弱酸性砂質土壌にはジャガイモ黒あざ病に対する抑止土壌があり、そこでは黒あざ病菌の菌核の大部分が拮抗微生物、特にVerticillium属菌やGliocladium属菌に寄生されていたと報告されている

（Jager and Velvis, 1983）。しかし、ハワイ諸島のR. solaniによるカラシナ立枯病に対する抑止土壌は、その要因として微生物の関与は部分的で、水溶性アルミニウムなど非生物的要因の関与が大きいと報告されている（小林・Ko, 1983）。

R. solaniに関して抑止性が誘導されたものは、植物の単一栽培か菌体の繰り返し接種およびその組み合わせによるものが多い。例えば、R. solaniを接種した砂壌土にハツカダイコンを1週間毎に播種すると、4～5回目以降に苗立枯病の発生が減少した（Henisら,1978）。抑止性となったその土壌では、Trichoderma 属菌が、10^2 cfu/gから10^6に増加したと報告されている（Henisら，1979）。野田ら（1993）もR. solani AG1の繰り返し接種により誘導された抑止土壌でTrichoderma 属菌の著しい増加を認めている。しかし、AG2-2菌核のみの繰り返し接種によって誘導された抑止土壌中では、Trichoderma 属菌の顕著な増加は認められないとの報告もある（百町・宇井，　1982）。R. solani菌体の接種により誘導された抑止土壌では、抑止性は熱感受性の細菌や糸状菌などの菌糸圏微生物のような生物要因によって生じたものという報告もある（本間ら，1981）。また、テンサイの連作によって根腐病が衰退した土壌では、耐熱性細菌の関与の可能性も示されている（百町，1983）。オランダでは、ジャガイモ栽培後の砂質土壌にR. solani菌体を1回接種しただけで抑止性が確認されており、その場合ジャガイモの芽から重複寄生菌が多く分離され、

その多くはVerticillium biguttatumであったと報告されている（ven den Boogert and Jager, 1983）。以上のように、R. solaniに対する抑止土壌においては、Trichoderma 属菌やVerticillium 属菌などの菌寄生菌の関与を示す報告が多い。

E．生物的防除法

テンサイのR. solaniによる作物病害に対する生物的防除の主な研究例としては、Pseudomonas 属細菌などの拮抗細菌（Hommaら，1991；Mosaら，1997）、Trichoderma 属菌や2核性のRhizoctonia 属菌などの糸状菌（Abada, 1994；Herr, 1988；内野・神沢，1985；Walther and Gindrat, 1988）、食菌性昆虫のジャガイモクロバネキノコバエ（内藤・杉本，1988）などを用いたものがあり、発病抑制効果が認められている。しかし、根圏細菌およびジャガイモクロバネキノコバエを用いた試験では苗立枯病に対しての効果だけしか認められていない。また，Trichodermaの一部の菌はテンサイの苗枯病の病原として記載されているので（神沢，1973）利用するには問題があり，2核性のRhizoctonia の施用による防除効果は不十分であると報告されている（内野・神沢，1985）。

Ⅲ．テンサイそう根病の生物的防除法

A．土壌中の Polymyxa betae 菌数を減少させる因子の探索

テンサイそう根病の病原ウイルスの媒介菌である P. betae は，土壌中で休眠胞子の形態で生存している。そう根病の発病を軽減させるために，土壌中の P. betae の菌数を減少させる植物，資材，環境条件などを探索し，その効果を定量した。また，土壌中の P. betae の直接法による菌数測定のための，休眠胞子の染色法についての検討をした。

1．各種植物のポット栽培における Polymyxa betae 菌数の変動

(1)最確値法による各種土壌中のウイルス保毒 P. betae 菌数の測定

材料および方法

a)野生エンバクおよびテンサイ品種の栽培

札幌市にある北海道農業試験場（以下北農試（羊ヶ丘）とする）内のそう根病汚染圃場から採取した土壌（植壌土，pH5.8）に，肥料を土壌 1L 当たり N: 0.36g，P_2O_5: 0.36g，K: 0.25g の割合で混合した後，直径 12cm の素焼鉢に詰めた。次に，野生エンバク「ヘイオーツ」，テンサイの抵抗性品種として「リゾール」，および感受性品種として「モノエースS」をそれぞれ 1 鉢当たり 15 粒ずつ播種し，温室内で 3 ヶ月間栽培した後，植物体を抜き取り，2mm

のふるいを用いて根などの植物残渣をできる限り取り除いた。さらに，初めの半量の肥料を加えてから，上記植物を繰り返し栽培した。このようにして，のべ9カ月間これら植物を栽培した土壌を下記の試験に供試した。対照として，裸地区を設けた。

b)最確値法による各種土壌中の P. betae 菌数の測定

土壌中のウイルス保毒 P. betae 菌数を Ciafardini （1991）および Ciafardini and Marotta （1989）の方法に準じた最確値法により測定した。すなわち，上記供試土壌を前述と同量の肥料を加えた北農試（芽室）内の一般の輪作畑から採取した温室試験用育苗土を 2mm のふるいでふるったもの（以下耕地土壌と称する）（砂壌土，pH6.1）で希釈（4倍，5段階）し，育苗用トレイ（60ml 容）に詰め，テンサイ品種「モノエース S」を7粒ずつ播種した。50日間温室（最低温度を 23℃に設定）で栽培した後，各希釈段階におけるテンサイの病原ウイルスによる感染率を調査した。細根は水道水で水洗後，35℃で通風乾燥し，試験に供するまで4℃で保存した。ウイルス感染の調査は，玉田らの方法（玉田・荻田，1982）に準じた ELISA 法によって行い，供試材料の吸光値が健全細根の吸光値の平均値を1％水準で有意に越えた場合を感染と判定した。

結　果

あらかじめ部分純化した休眠胞子塊（図 1）を耕地土壌に混合することにより作製した人工汚染土壌を用いて，P. betae の検出効率を調査した。作成した汚染土壌を

石英砂入り試験管で栽培されたテンサイの細根
↓　　細根の10倍(w/v)の蒸留水を加え，
　　ホモジナイザーで10000rpm，10分間磨砕
磨砕液
↓　　100-150-400メッシュのふるいで濾過
濾過物
↓　　遠心で濃縮　3000rpm，5分間
沈殿
↓　　蒸留水に懸濁
　　1mlを5mlの1Mショ糖液に重層し，800rpm，5分間遠心
沈殿
↓　　蒸留水に懸濁
　　2000rpm，5分間遠心し，ショ糖を洗浄する
沈殿

図1　罹病テンサイ細根からのPolymyxa betae 休眠胞子の部分純化法

耕地土壌で4倍に希釈する操作を5段階行い，各希釈土壌に栽培されたテンサイのそう根病感染割合を調査した。感染割合から最確値法によって得られた1感染単位は，251個の休眠胞子塊の存在を示した。すなわち，感染に必要な最小の菌数（1感染単位）は休眠胞子塊251個に相当した。また，この時用いた人工汚染土壌中の休眠胞子塊は，平均22個の休眠胞子から形成されていた。栽培9ヶ月後の最確値法で測定された上記供試土壌中における感染単位で示されたウイルス保毒P. betae菌数は，野生エンバク区で0.18，抵抗性品種区で0.43，感受性品種区で5.22，裸地区で0.36となり，対数変換後に分散分析を行った結果，野生エンバク区においてP. betaeのウイルス保毒菌数が裸地区に比べて有意に減少した。抵抗性品種区は裸地区とは有意差は無かったが，感受性品種区は裸地区の約10倍に菌数が増加していた（図2）。

(2)直接法による P. betae 菌数の測定

材料と方法

最確値法による菌数測定の場合と同様な方法で，各種植物を14カ月栽培した土壌を用いた。供試土壌からのP. betae休眠胞子の検出は図3に示した方法により分画し，光学顕微鏡下で観察した。休眠胞子の空洞率調査のための染色には，コットンブルー，クリスタルバイオレット，メチレンブルー，ニュートラルレッド，トリパンブルーを0.1～0.01％濃度で溶解した水溶液およびラクトフェ

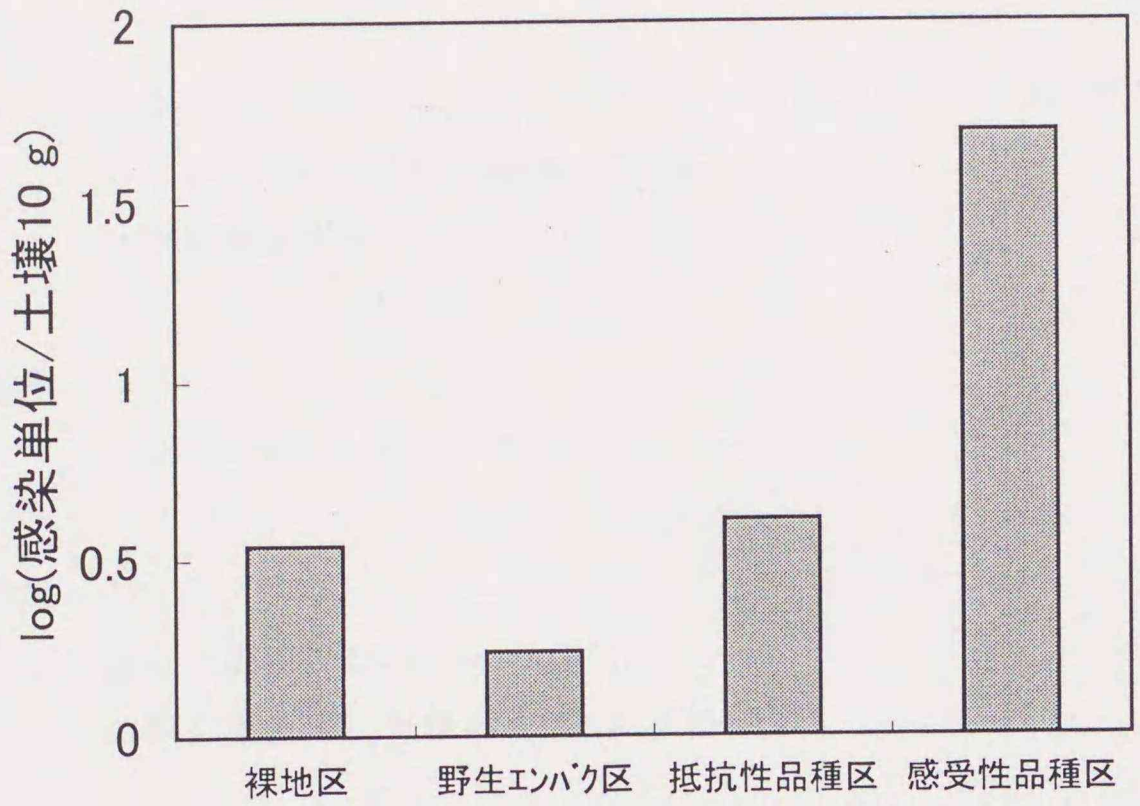


図2 野生エンバクおよびテンサイの9カ月間の栽培が及ぼす土壌中の媒介菌数への影響
最小有意差(5%)は, 0. 273

土壌20g

↓　蒸留水200mlを加え、ホモジナイザーで5,000rpm、10分間撹拌

ﾂｲｰﾝ80を0.2%加え140rpm、3時間振とう

30秒間静置する

上澄み

↓　100-150-400メッシュでろ過

ろ過物

↓　遠心で濃縮　2500rpm、5分間

沈澱を蒸留水に再懸濁して8回洗浄

沈澱

↓　100mlの蒸留水に懸濁する

1mlを5mlの2Mショ糖液に重層し、300rpm、1分間遠心

2回繰り返す

上澄み

↓　遠心でショ糖を洗う

1Mショ糖液に重層し、800rpm、5分遠心

2回繰り返す

沈澱

↓　2500rpmで遠心し、洗浄および濃縮する

沈澱

図２　土壌中からの休眠胞子塊の検出方法

ノール溶液を用いて染色程度を比較し，最も良く染色された溶液を染色液として用いた。空洞化程度は，休眠胞子塊を構成する休眠胞子が重なり合い，正確に測定できないため，空洞率を90％以上，89～75％，74～51％，50％以下の4階級に分けて調査した。

結　果

休眠胞子の染色には，コントラストが最も良好で細胞質の有無が容易に判別できた0.05％のトリパンブルーラクトフェノール溶液を用いた（図4）。各種植物を14カ月栽培した後の土壌中における休眠胞子塊を図3の方法により分画し検鏡した結果，大部分が植物体残渣などが付着していない裸の休眠胞子塊であった。検出された休眠胞子塊数は，テンサイの感受性品種区では土壌1g当たり8.6×10^2個であり，抵抗性品種区でもそれとほぼ同程度であった。一方，野生エンバク区と裸地区では感受性品種区の約1/3の休眠胞子塊数しか検出されなかった（図5）。検出された休眠胞子塊を構成する休眠胞子の空洞率を調査したところ，裸地区および野生エンバク区では大部分の休眠胞子塊が90％以上空洞化していたのに対し，テンサイの両品種区では，60％程度と少なく，空洞化割合50％以下が12～25％程度も存在していた（図6）。

(3)根浸出液の処理による *P. betae* 休眠胞子の空洞化程度の比較

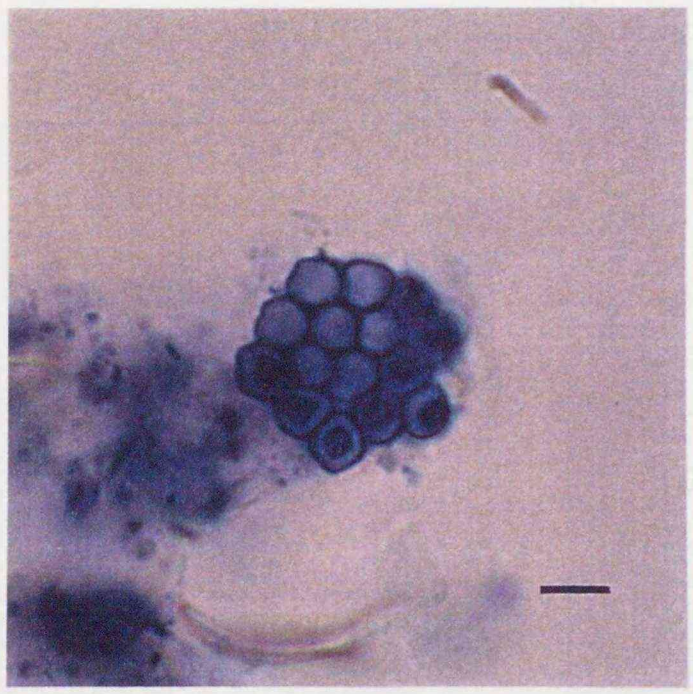


図4 トリパンブルーで染色されたPolymyxa betae 休眠胞子
スケールは，5μm

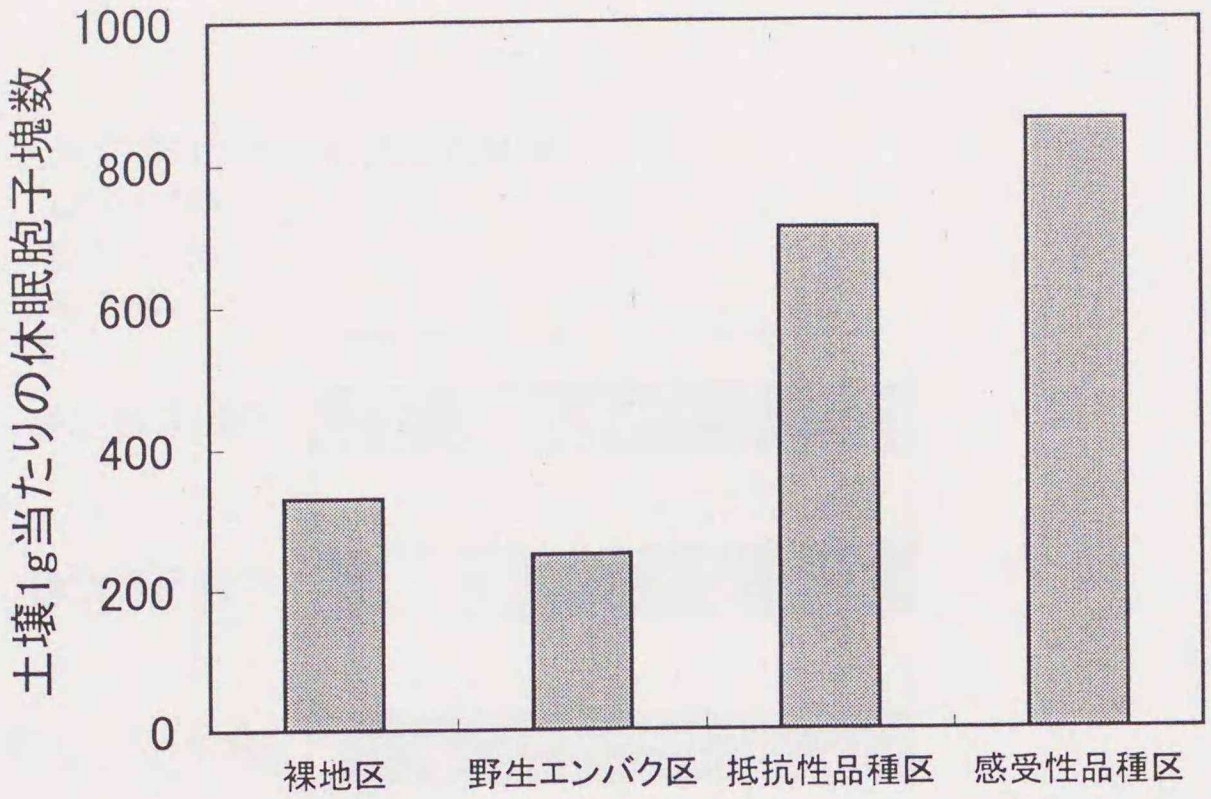


図5　野生エンバクおよびテンサイを14ヶ月栽培した跡地土壌中から直接法によって検出された休眠胞子塊数

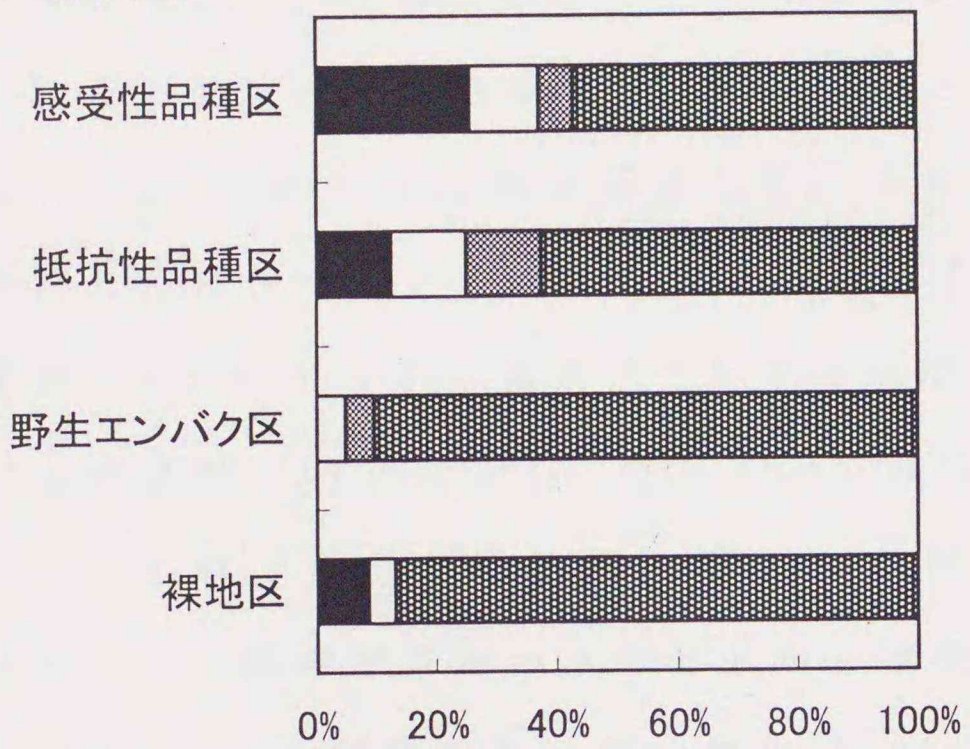


図6　野生エンバクおよびテンサイの14カ月栽培後の土壌中のPolymyxa betae
休眠胞子の空洞化休眠胞子割合

材料と方法

野生エンバクによる発病軽減効果の機作を明らかにするため，根浸出液による休眠胞子の空洞化促進効果の有無を調べた。20～30メッシュの滅菌した石英砂を入れた直径25mm長さ13cmで底に直径7mmの穴が開いている試験管にテンサイを栽培する，石英砂入り試験管法（阿部・玉田，1987）で植物を栽培した。本法で3～5週間栽培した野生エンバク「ヘイオーツ」，感受性テンサイ品種「モノエースS」，抵抗性テンサイ品種「リゾール」，コムギ品種「ホクシン」，バレイショ品種「さやか」，ダイズ品種「キタノオトメ」を約15時間蒸留水で湛水状態にし，試験管下部の水抜き穴から根浸出液を採取した。本液1mlを試験管内の部分純化P. betae休眠胞子塊と混合し，25℃で静置した。2日ごとに試験管内の休眠胞子塊を蒸留水で1回遠心洗浄し，根浸出液を新たに採取したものと交換した。この処理を60日間行ってから，各試験管から休眠胞子塊を回収し，胞子の細胞質の有無を調査し，空洞率を算出した。空洞率は，休眠胞子塊を構成する休眠胞子に重なりがあり，正確には測定できないため，10％区切りの単位で調査した。対照区として，蒸留水の湛水処理区を設け，各区とも休眠胞子塊200個ずつ調査し，3反復行った。

結　果

各休眠胞子塊の空洞率の平均値は処理前が17.3％であった。処理60日後には，テンサイ感受性品種区で58.9％，

野生エンバク区で 56.2 %，抵抗性品種区で 52.8 %，ダイズ区で 52.5 %，バレイショ区で 46.8 %，コムギ区で 44.7 %，蒸留水区で 26.0 %となった。すなわち野生エンバク区とテンサイ感受性品種区が同等で，テンサイ抵抗性品種区とダイズ区がやや低く，コムギ区とバレイショ区の空洞率が他の植物区に比べて低かった（表 1）。しかし，いずれの植物の根浸出液処理でも，空洞率は蒸留水処理に比べて有意に高かった。なお，根浸出液を採取した石英砂入り試験管で栽培した各植物の根の量は，多少の違いはあるもののいずれも試験管内に十分に張りめぐらされていた。

(4)そう根病汚染圃場における野生エンバクおよびテンサイの栽培が土壌中のウイルス保毒 P. betae 菌数に及ぼす影響

材料と方法

河西郡芽室町にある北海道農業試験場（以下北農試（芽室）とする）内のそう根病汚染圃場に 1998 年にそう根病感受性品種「モノエースＳ」を栽培し，1999 年に野生エンバク「ヘイオーツ」，そう根病感受性テンサイ品種「めぐみ」および抵抗性品種「リゾール」を栽培した。1 区 3.5m^2 で各処理 4 反復設けた。栽培前および栽培後に各区からランダムに土壌 100ml を 4 点採集し，これらを等量ずつ混合して試料とした。土壌試料は，ポット試験の場合と同様に，最確値法によってウイルス保毒媒介菌数を

表1　各種作物の根浸出液処理によるPolymyxa betae
休眠胞子の空洞率の変化

作　物　名	空洞率
感受性テンサイ品種「モノエースS」	58.9
野生エンバク「ヘイオーツ」	56.2
抵抗性テンサイ品種「リゾール」	52.8
ダイズ品種「キタノオトメ」	52.5
バレイショ品種「さやか」	46.8
コムギ品種「ホクシン」	44.7
蒸留水	26.0
処理前	17.3
最小有意差(5%)	3.8

測定した。

結　果

感染単位で表されたウイルス保毒媒介菌数は，対数変換した上で分散分析を行ったところ，各処理とも栽培前に比較して，栽培後は保毒菌数が有意に増加した。また，感受性品種の連作は，感受性品種の後に抵抗性品種や野生エンバクを栽培した場合に比べて有意に菌数を増加させた（表 2）。感受性テンサイ品種の栽培後の菌数は栽培当年より，１年経過後の方が増加した。

考　察

P. betae は，絶対寄生菌であることから一度発芽した後短期間で植物体に感染できなければ死滅する。そのため，耐久体の休眠胞子からの無効発芽を促進する対抗植物の利用により，土壌中の本菌の菌数を減少させる可能性があると考えられる。阿部（1995）は，ポット試験および枠圃場での試験により，野生エンバクを栽培することによりそう根病発病程度や P. betae の寄生程度が減少することを明らかにしたが，本試験では，土壌中のウイルス保毒 P. betae 菌数の減少量を定量的に評価した。その結果，ポットに野生エンバクを 9カ月間栽培した区では，裸地区と比較して菌数が有意に減少した。しかし，感受性品種を１年間栽培しただけで P. betae の菌数が裸地区の 10倍以上に増加してしまうことから，野生エンバクの利用法の一つとして，保毒菌数をわずかにしか増加させない「リ

表2 テンサイ品種および野生エンバクの栽培によるウイルス保毒Polymyxa betae 菌数の変動

処理		P. betae 感染単位[1)]			
1998年	1999年	栽培前	98年収穫後	99年収穫後	l.s.d.(5%)
感受性テンサイ品種	感受性テンサイ品種	0.12	0.75	2.05	0.86
感受性テンサイ品種	抵抗性テンサイ品種[3)]	0.00	0.12	0.93	0.39
感受性テンサイ品種	野生エンバク	0.29	0.83	1.37	0.40
感受性テンサイ品種	裸地	0.19	0.10	1.40	0.33
l.s.d.(5%)		n.s.	0.58	0.63	

1)土壌100g当たりの感染単位を対数変換した値。
2)感受性テンサイ品種は，1998年は「モノエースS」，1999年は「めぐみ」。
3)抵抗性テンサイ品種は，「リゾール」。

ゾール」などの抵抗性品種との組み合わせにより，土壌中の保毒 P. betae の増加量を低く抑える耕種的防除法が適していると考えられる。圃場でも同様にテンサイおよび野生エンバクの栽培によるウイルス保毒 P. betae 菌数の変動を調査しところ菌数低減効果は十分ではなかった。これは，圃場での野生エンバクの栽培可能期間は約 6ヶ月と，1シーズンの栽培であったことによると考えられる。感受性品種による菌数は，初年目収穫直後よりも連作翌年秋の調査時に増加したが，その理由として初年目に細根中に形成された P. betae の休眠胞子が細根組織の分解により土壌中に放出され，2年目の感染源として有効に働いたためと考えられる。

供試土壌から直接法により，ウイルス保毒の有無に関係なく全 P. betae 菌数を定量した結果，抵抗性品種区における菌数は感受性品種区と差が見られなかった。このことから，本抵抗性品種は主に植物体内におけるウイルスの増殖に対して抵抗性を持ち，その結果ウイルス保毒 P. betae 菌数の増加が抑えられたものと考えられる。

野生エンバクによる発病低減効果の機作について阿部(1995)は，休眠胞子を混合した石英砂入り試験管で野生エンバクを栽培し，灌水後に試験管下部の水抜き穴から採取した水耕液のテンサイへの接種により，休眠胞子の発芽促進効果を明らかにした。著者らは，休眠胞子の直接観察により，野生エンバクによる発芽促進効果を定量的に評価した。その結果，阿部(1995)の報告どおり発芽

促進効果は認められるものの，表 1に示したようにその効果は必ずしも高いとは言えないことから，他の要因による発病低減効果も関与している可能性がある。蒸留水処理区においても処理前に比べ空洞化胞子の割合が増加しているが，その原因として自然発芽，微生物混入等による影響が考えられる。そこで，これらの点について検討するため，以下の試験を行った。

2．培養条件および土壌の種類を異にした場合の P. betae 休眠胞子の空洞率の比較

先の試験において植物の栽培を行わずに培養した場合においても，植物組織から遊離した休眠胞子は，分離直後に比べて徐々に空洞化することが明らかとなった。この空洞化を促進する条件を探索し，防除への利用の可能性を調べるために以下の試験を行った。

(1)培養条件の異なる土壌中に埋没した P. betae 休眠胞子の空洞率

材料と方法

テンサイ罹病細根から集めた休眠胞子塊を孔径 10 mm のメンブランフィルターに挟み，北農試（芽室）内の汚染土壌に埋没した。本供試土壌は，温度条件（20 ～ 30 ℃，pH6.0，水分 40 %），水分条件（30 % ～湛水，温度 25 ℃，pH6.0），1 %ショ糖添加の有無（温度 25 ℃，pH6.0，水分 40 %），pH（5.4 ～ 6.9，温度 25 ℃，水分 40 %）を変えて室内で 64 日間培養し，各処理区における空洞化胞

子の割合を測定した。pHは，炭酸カルシウムおよび硫酸カルシウムを土壌1 L当たり20 gの割合で混合することにより，調整した。また，テンサイを20年以上連作している，日本甜菜製糖総合研究所清川農場の多発生および少発生土壌も比較のために用いた。さらに清川土壌については，培養期間を延長した場合の効果を調べるために P. betae を5ヶ月間土壌中で培養し，また，土壌中の微生物の影響を調べるために高圧蒸気滅菌処理（121 ℃，60分間）後の土壌中培養を行った。

結　果

休眠胞子塊の土壌中培養条件のうち，温度との関係では20 ℃および25 ℃に比べ30 ℃で有意に空洞率が高まり，高温で空洞化が促進された（表3）。土壌pHについては，pH 5.4に比べてpH 6.9で有意に空洞率が高く，高pHで空洞化が促進された。土壌への1％濃度のショ糖添加によっても空洞化が有意に促進された。一方，土壌水分に関しては湛水状態から，比較的水分の少ない水分30％までほぼ同様となり，空洞率への影響は認められなかった。清川土壌では，同じ条件で培養した北農試（芽室）内土壌に比べて高い空洞率を示し，培養期間の延長により，さらに空洞率が上昇した（図7）。一方，土壌の高圧蒸気滅菌処理により空洞率は，無処理に比べて低くなった（図8）。

(2)異なる培養条件での P. betae 休眠胞子の空洞率

表3 培養条件を変えた土壌中に
埋没したPolymyxa betae 休眠胞子の
空洞率の比較

処理	空洞率
温度	
20℃	32.6
25℃	32.4
30℃	37.8
l.s.d.(5%)	4.3
水分	
30%	30.8
40%	32.5
湛水	30.7
l.s.d.(5%)	n.s.
pH	
5.4	28.4
6.0	32.5
6.9	36.6
l.s.d.(5%)	3.0
1%ショ糖添加	
あり	37.3
なし	32.5
分散分析	P＜0.01
土壌[1)]	
清川1	43.9
清川2	47.9
清川3	48.4
農試	32.5
l.s.d.(5%)	13.9
処理前	13.9

1)清川1は，少発生連作圃場(pH5.6)，
清川2は，多発生連作圃場(pH6.3)，
清川3は，多発生連作圃場(pH6.3)。
清川土壌はすべて湿性黒色火山性土，
農試土壌は褐色火山性土(pH5.8)

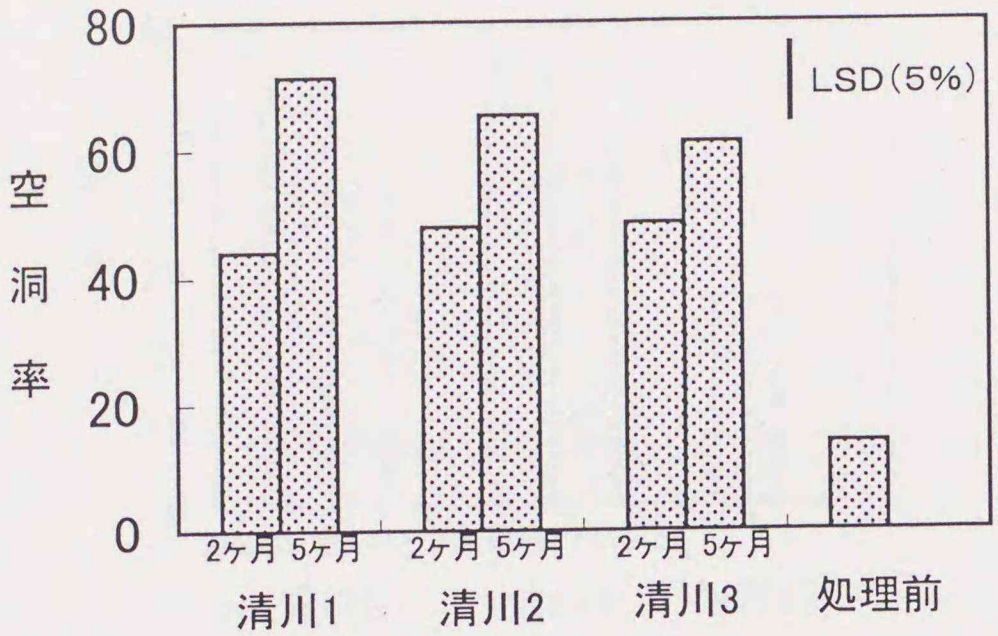


図7　異なる培養期間による空洞率の変化

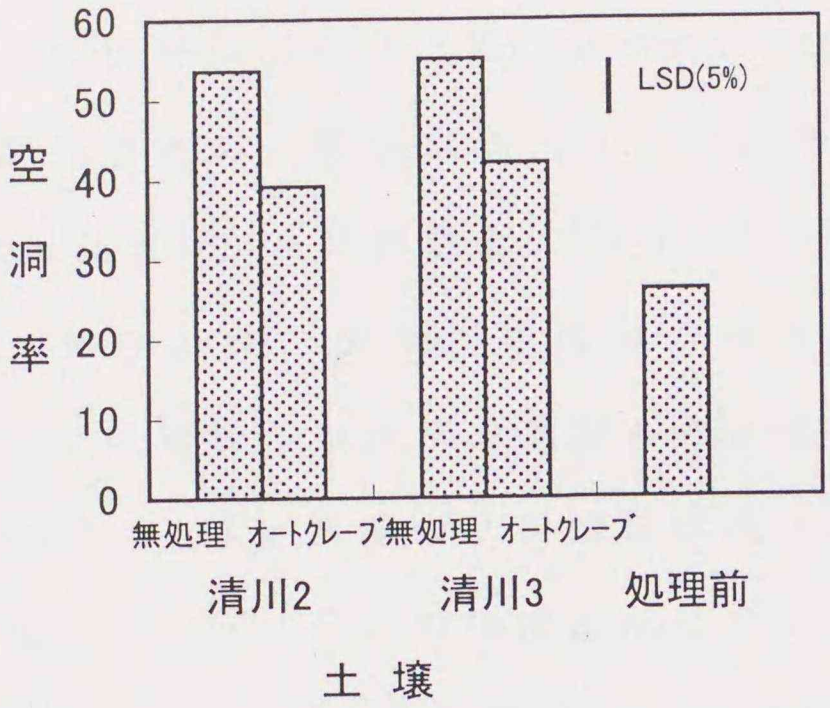


図8 オートクレーブ処理による空洞率の変化

材料と方法

休眠胞子の空洞化の促進に及ぼす温度，pHおよびテンサイの根浸出液成分（Rai and Strobel, 1966）の直接的な影響を調べるため，蒸留水またはリン酸緩衝液を入れた直径 15mm 長さ 10.5cm の試験管に部分純化した休眠胞子を懸濁し，温度，pH，根浸出液成分の有無を変えて室内暗黒条件で培養後の空洞率を調査した。温度は，20，25，30℃，pHは，1/15 M 濃度のリン酸緩衝液により 5.3，6.0，7.0 に調整した。テンサイの根浸出液に含まれる成分（Rai and Strobel, 1966）として，本試験では 1 ml 当たり糖はグルコース 70 mg，フルクトース 28 mg，マルトース 18mg を混合したもの，アミノ酸はアルギニン 0.168 mg，アスパラギン酸 0.154 mg，グルタミン酸 0.147 mg の混合液を用いた。休眠胞子は 1 日おきに蒸留水で遠心洗浄し，新しい溶液に懸濁した。処理開始 2 ヶ月後に休眠胞子を回収し，空洞率を調査した。

結　果

休眠胞子をテンサイの根浸出液成分の一部である糖，アミノ酸および両者を組み合わせた溶液中に懸濁することにより，空洞率は蒸留水 25.3 % に比べそれぞれ 32.3 %，31.6 %，33.6 % となり有意に増加したが，各溶液間では差は認められなかった（表 4）。pH 処理では，pH 5.4 が 32.6 %，pH 6.0 が 25.2 %，pH 7.0 が 26.0 % となり処理間差は認められなかった。温度を変えた場合には，30 ℃ で空洞率が高くなり土壌中での結果と同様の傾向を示したが，

表4　糖，アミノ酸，pHおよび温度が及ぼす
Polymyxa betae 休眠胞子の空洞率におよぼす影響

処理	空洞率
糖	32.3
アミノ酸	31.6
糖+アミノ酸	33.6
蒸留水	25.3
最小有意差(5%)	3.84
pH5.4	32.6
pH6.0	25.2
pH7.0	26.0
最小有意差(5%)	n.s.
20℃	25.3
25℃	25.3
30℃	32.3
最小有意差	n.s.

有意な差ではなかった。

考　察

野生エンバクによる休眠胞子の空洞化の促進効果の調査において，無処理でも空洞化が徐々に進んだことから，長期間土壌中生存するとされるP. betaeの休眠胞子においても圃場条件下で徐々に空洞化するものと考えられた。そのため，いくつかの条件下で休眠胞子を培養し，休眠胞子の空洞化の促進の可能性を調べた。その結果，休眠胞子を土壌中に埋没させた場合は，高温，高pH，ショ糖添加によって空洞化が促進された。清川土壌で空洞率が高かった原因は，土壌pHが北農試（芽室）内のものに比べて高かったことの影響が考えられる。しかし，本土壌を高圧蒸気滅菌することにより，空洞率が低下したことから土壌微生物による作用も影響したものと考えられる。これらのことから空洞化の促進について二つの可能性が考えられた。一つは，高温，高pH，ショ糖添加などの条件がP. betaeに直接作用することによって自然に発芽する可能性であり，もう一つは，土壌中の微生物の作用あるいは微生物が産生する物質により休眠胞子の空洞化が促進される可能性である。高圧蒸気滅菌処理した土壌中で培養した場合に空洞化の程度が低めであったことから，微生物の影響も示唆される。

同様の試験を土壌を用いず，水溶液だけを用いて行った結果，テンサイの根浸出液成分のうち糖やアミノ酸の

添加により空洞率が増加した。この場合は，溶液中の成分の直接的な影響により自然発芽が生じ空洞化が促進されたと考えられた。しかし，テンサイの根浸出液そのものの処理に比べると，空洞化の促進程度は低いため，他の成分も関与しているものと思われる。テンサイの苗立枯病や黒根病の病原である Aphanomyces cochlioides の遊走子に対する誘引効果についても，糖やアミノ酸だけではテンサイの根浸出液そのものに比較して，誘引効果が劣ることが報告されている（Rai and Strobel, 1966）。pH に関しては，リン酸緩衝液による pH の変化だけでは空洞化は促進されず，土壌中の他の要因との組み合わせによる作用も考えられる。

以上の結果から，休眠胞子の空洞化の促進には土壌中での高温，高 pH，糖やアミノ酸などの添加が有効であることが明らかとなった。野生エンバクの栽培は，根から浸出してくる糖やアミノ酸の促進作用があると考えられ，また，これらの作用を通して土壌中の微生物の活性も高めている可能性がある。

B．土壌中の Polymyxa betae の直接観察法の改良

土壌中の P. betae の菌数を調べるためには，指標植物法か直接法が用いられている（内野ら，1990；阿部ら，1991；佐山・本間，1993）。このうち，直接法では，ふるいと遠心分離を用いた分画と，ラクトフェノール・トリパ

ンブルー染色法との組み合わせにより検出しているが，さらに効率および精度を向上させるには，蛍光色素などによる選択的で視認しやすい染色法が必要である。そのために，休眠胞子の蛍光色素などによる染色法を検討した。

(1) P. betae 休眠胞子の染色性を向上させるための前処理法の検討

根こぶ病菌では土壌中の休眠胞子の検出に，蛍光色素による染色法が用いられている。しかし，P. betae の休眠胞子は根こぶ病菌と異なり，カルコフルオールによっては染色されず，他の蛍光色素による染色性も不十分である。そのため，染色される休眠胞子の割合を増加させる前処理法を検討した。

材料と方法

蛍光色素としては，カルコフルオール（100 µg/ml），アクリジンオレンジ（10 µg/ml），3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodide（$DiOC_6(3)$）（20 µg/ml），4',6-diamidino-2-phenylindole （DAPI）（1.0 µg/ml），臭化エチジウム（50 µg/ml），Fluorescein diacetate（FDA）（10 µg/ml）を用い，染色程度を比較した。これらの中から，前処理無しで最も良く染色される色素を用いて，前処理による染色性の向上の有無を調べた。前処理としてドデシル硫酸ナトリウム（SDS），塩化カルシウム，リゾチーム，水酸化ナトリウムの効果を調べた。処理条件は，SDS は 2%（w/v）濃度 SDS を含む電気泳動用緩衝液（0.0625 M トリス塩酸緩衝液，2 % w/v SDS，10 % w/v グリ

セリン，0.001 % w/v ブロムフェノールブルー，5 % v/v 2-メルカプトエタノール，pH 6.8）を用い，100 ℃で 5 分，10 分，20 分処理して染色程度を比較した。塩化カルシウムは 50mM トリス緩衝液（pH7.2）に 0.5 M 濃度で溶解し，一夜 4 ℃で約 70 rpm で振とうした。リゾチーム（和光純薬，卵白製）は，1.5 %（w/v）水溶液に 0.2N 水酸化ナトリウムを加え pH8.5 に調整した上で，37 ℃，3 時間約 70 rpm で振とうした。水酸化ナトリウムは 0.05 N 濃度の水溶液で室温，15 分間処理した。処理後は，蒸留水で洗浄後に選抜された蛍光色素による染色を行い，落射蛍光顕微鏡により観察し，染色程度を調べた。

結　果

上記の 5 種の蛍光色素による休眠胞子の染色を行った結果，$DiOC_6$(3)およびアクリジンオレンジによって一部の休眠胞子が染色された（表 5）。しかし，染色される休眠胞子の割合は，観察した休眠胞子塊ごとに異なり不均一であった。一方，カルコフルオールでは，ほとんど染色されなかった。前処理の効果を調べるための色素としては，染色されやすい $DiOC_6$(3)と，比較のために最も染色されなかったカルコフルオールを用いた。その結果，前処理として効果が認められたのは，SDS 処理のみであり，両色素を用いた染色法により大部分の休眠胞子が十分に染色されるようになった（図 9A, B）。

(2) FITC 標識レクチンによる P. betae 休眠胞子の染色

表5 Polymyxa betaeの休眠胞子の蛍光色素による染色性

色　素	染色性[1)]
カルコフルオール	−
アクリジンオレンジ	＋
$DiOC_6(3)$	＋
FDA	±
DAPI	±
臭化エチジウム	±

1)＋：染色される，±：弱く染色される，
−：ほとんど染色されない

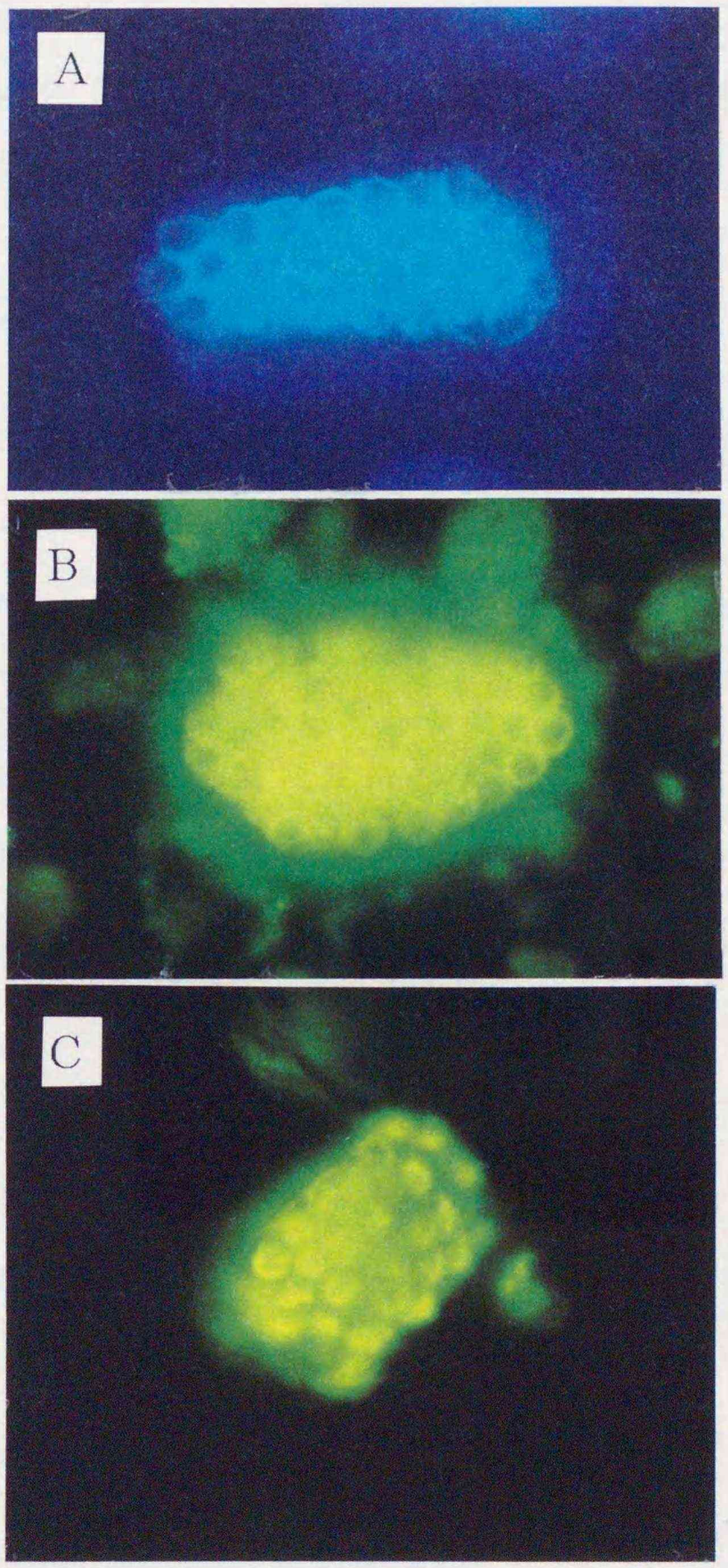


図9 SDSで前処理しカルコフルオール(A), $DiCO_6$(3)(B), FITC-WGA(C)で染色したPolymyxa betae 休眠胞子の蛍光顕微鏡写真

SDS処理により，大部分の休眠胞子は染色されるが，一般の蛍光色素では休眠胞子以外にも有機物や鉱物質の粒子も染色されることがある。そこで，糖鎖を特異的に認識する数種のレクチンを用いて選択的に染色する方法を検討した。

材料と方法

予め，SDS処理を行った部分純化 P. betae 休眠胞子を 0.24，1.2，2.4，12.0，60.0 µg/ml（w/v）濃度の8種類（Con A, DBA, LCA, PHA-E4, PNA, RCA120, UEA-I, WGA）のFITC標識レクチン溶液に懸濁し，室温で12時間染色した。ついで蒸留水で洗浄し，落射蛍光顕微鏡（B励起）で休眠胞子の染色程度を調査した。標識レクチンの濃度が 1.2 µg/ml 以下の調査では各処理ごとに20休眠胞子塊の染色程度を調査した。

結　果

12 µg および 60 µg/ml 濃度では，どのFITC標識レクチンでも休眠胞子は良く染色され，レクチンの種類による差異は見られなかった。染色による蛍光の強度に差異が見られたのは，1.2 µg/ml の濃度以下で，WGA および RCA120 は他の標識レクチンに比べて，染色性に優れた。本試験で用いられた両レクチンの赤血球凝集活性は WGA が RCA120 の約 1/70 であることから，WGA が最も P. betae の休眠胞子に対して特異性が高いと考えられた（表6, 図9C）。

(3) SDS処理した P. betae 休眠胞子の表面構造の走査電子顕微鏡観察

表6　FITCレクチンによるPolymyxa betae休眠胞子の染色

	1.2 μg			赤血球凝集活性
	(−)	(±)	(+)	
ConA	1	19	0	4.6
DBA	8	12	0	10.7
LCA	4	16	0	2.7
PHA-E4	4	15	1	1.4
PNA	6	14	0	21.4
RCA120	0	5	15	0.7
UEA-I	6	14	0	11.5
WGA	0	15	5	54.7

(−)染まらないか、非常に弱く染まる
(±)染まるが、他の残渣などと同程度で識別しにくい
(+)他の残渣より蛍光が強く、よく識別される

SDS処理によってP. betae休眠胞子は，蛍光色素やFITC標識レクチンによって染色されるが，この処理により休眠胞子の表面構造に変化が生じている可能性がある。特に，細胞壁に亀裂や小穴などが生じた場合には，休眠胞子の空洞率などの調査結果に大きな影響を及ぼすことが考えられる。そこで，走査電子顕微鏡（SEM）により，休眠胞子表面構造を詳細に観察した。

材料と方法

観察に用いる休眠胞子は，石英砂入り試験管育苗の播種3週間後のテンサイ苗にP. betaeの遊走子を接種し，その5週間目に罹病細根から部分純化して4℃で3週間保存したものを用いた。P. betaeの遊走子は，阿部・玉田（1987）らの方法に従い，石英砂入り試験管育苗テンサイ苗にP. betaeの遊走子を接種2週間後に4時間湛水状態にし，放出された遊走子を水抜き穴から採取して用いた。休眠胞子のSDS処理は60分間行い，対照として無処理を用いた。SDS処理後の休眠胞子は，蒸留水で5回洗浄後，1%オスミウム酸で4℃で12時間固定し，蒸留水で20分間4回洗浄した。エチルアルコールシリーズで脱水後，t-ブチルアルコールに置換し，凍結乾燥を行った。乾燥した試料は金蒸着した後，SEM（日本電子 JSM-5200LV）で検鏡・写真撮影した。

結　果

本法で観察したP. betaeの休眠胞子は片側がドーム状，反対側が5～6本程度の小さな突起のある円盤状をして

いた（図 10A, B, C）。各休眠胞子塊を構成する休眠胞子同士の接着状態は，休眠胞子塊ごとに異なり，隙間が無く密に接着しているものや，やや隙間があいているものが観察された。表面は平滑ではなく，細かい凹凸のある物質で覆われているようであった。SDS 処理と無処理休眠胞子の SEM による 1 万倍での観察では，表面構造および休眠胞子間の接着状態に差はなく，SDS 処理による休眠胞子表面構造の変化は，検出できなかった。

考　察

ネコブカビ科のネコブカビ（根こぶ病菌）の休眠胞子の細胞壁は，約 1/4 がキチンから構成され（Maxham and Buczacki, 1983），カルコフルオールで強く染色される（Takahashi and Yamaguchi, 1987）。従って，根こぶ病菌に近縁の種である P. betae の休眠胞子もカルコフルオールで染色されると期待されたが，実際はほとんど染色されなかった。そのため，P. betae の休眠胞子に適した染色法を開発した。休眠胞子がカルコフルオールなどで染色されなかった理由は，細胞壁成分そのものが異なるか，あるいは細胞壁の外部が何らかの物質により覆われているためと思われる。本試験において休眠胞子が SDS による前処理により染色されることから，後者の可能性が高いものと考えられる。

蛍光色素のうち $DiOC_6(3)$ は，細胞質を染めることができるため細胞質の有無（空洞率）も調べることができる

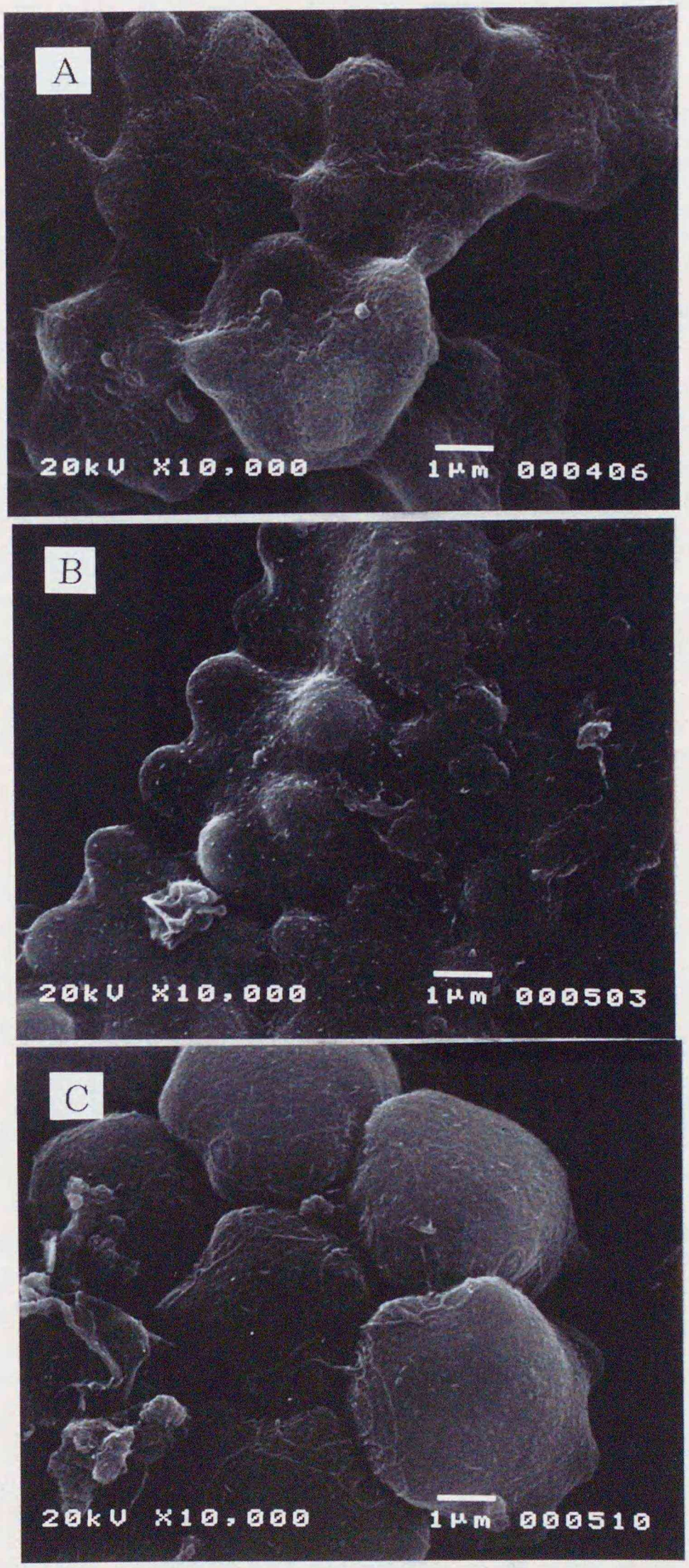


図10 SDS処理(A)および無処理(B,C)のPolymyxa betae
休眠胞子の走査電子顕微鏡写真
CとBは，反対方向から観察したもの

可能性がある。$DiOC_6$(3)などの蛍光色素は，ある程度の染色特異性があり，例えば $DiOC_6$(3)は濃度によって，小胞体，ミトコンドリアまたは細胞質全体を染色するとされている（Duckett and Read, 1991）。しかし，実際には土壌中の有機物や鉱物質粒子も本色素によりかなりの程度染色された。一方，レクチンは，ある特定の糖鎖とのみ結合する物質であることから，FITC 標識レクチンを用いることにより土壌中における休眠胞子をある程度選択的に染色することができると予想した。本試験の結果，FITC 標識レクチンを SDS 処理と組み合わせることにより，P. betae の休眠胞子をある程度特異的に染色できることが明らかとなった。このとき，レクチンとしては WGA がもっとも特異性が高く，低濃度でも休眠胞子を染色することができた。他の残渣に対する染色性は，蛍光色素そのものを使う場合に比べ低くなり，検出効率を高めることが可能になった。

また，SEM による観察の結果，休眠胞子の表面の構造には SDS 処理による変化は認められなかったことから，本処理により休眠胞子を損傷させることなく染色可能な状態にすることができることが明らかとなった。SDS 処理によって染色が可能となる機作については不明であるが，SEM では休眠胞子の表面構造に識別できない微少な変化が生じていることが考えられる。

以上のことから，土壌中の休眠胞子の効率的な検出には FITC-WGA を用い，空洞率の調査も併せて行う場合には，

$DiOC_6$(3)を用いた染色を行うのが有効と考えられる。

Ｃ．根圏細菌によるそう根病の発病抑制

根圏細菌を用いた生物的防除法の開発に資するため，根圏細菌の分離，選抜，室内および圃場での発病抑制試験，施用法の検討などを行った。

１．室内試験および圃場での根圏細菌によるそう根病の抑制効果

(1)根圏細菌の分離および選抜

材料と方法

帯広市清川町の日本甜菜製糖株式会社総合研究所付属農場のそう根病汚染圃場に栽培されたテンサイ（品種：モノエース）の細根を採取し，希釈平板法により根圏細菌を分離した。細根は，テンサイの地上部が健全および罹病している個体の各々から採取した。根圏細菌は，採取した細根を 30ml の滅菌蒸留水を入れた 100ml 容のコルベンに入れ，30 分間 120rpm で 3 回振とうすることにより洗浄したのち，滅菌した乳鉢で磨砕し，磨砕液から King' B 培地および m523 培地（表 7）を用いた希釈平板法により分離した。

分離菌株を King' s B 培地を分注したシャーレ内（径 6cm）で 28 ℃で 2 日間培養後に，滅菌水を 8 ml 加えて培地表面を筆でかき取り，細菌懸濁液（約 10^7 ～ 10^8cfu/ml）を作製した。予め，石英砂入り試験管育苗法（阿部・玉田，1987）（23 ℃，日長 18 時間）により育苗した播種 3 週間後の健全なテンサイ苗に細菌懸濁液を 5 ml 灌注し，3 日後に

表7　本論文中で使用した培地の組成

培地名	組成	
King' B 培地	プロテオース・ペプトンNo.3 (Difco)	20.0g
	K_2HPO_4	1.5g
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.5g
	グリセリン	10ml
	蒸留水	1000ml
	寒天	20.0g
	pH7.2	
m523培地	ショ糖	10.0g
	Casein dehydroysate	8.0g
	酵母エキス	4.0g
	K_2HPO_4	2.0g
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.3g
	寒天	15.0g
	蒸留水	1000ml
	pH6.9	
LB培地	バクトペプトン (Difco)	10.0g
	酵母エキス	5.0g
	NaCl	10.0g
	寒天	20.0g
	蒸留水	1000ml
素寒天(WA)	寒天	20.0g
	蒸留水	1000ml
麦芽エキス培地(MEA)	麦芽エキス	20.0g
	ブドウ糖	20.0g
	ペプトン	1.0g
	寒天	20.0g
	蒸留水	1000ml
麦芽エキス培地(MPA)	麦芽エキス	15.0g
	ペプトン	1.0g
	寒天	20.0g
	蒸留水	1000ml
ジャガイモ煎汁寒天培地	ジャガイモ	200g
	ブドウ糖	5.0g
	寒天	20.0g
	蒸留水	1000ml
エンバク粒培地	エンバク粒	100ml
	蒸留水	80ml
ローズベンガル寒天培地	KH_2PO_4	1.0g
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5g
	ペプトン	5.0g
	ブドウ糖	10.0g
	ローズベンガル	0.033g
	寒天	20.0g
	蒸留水	1000ml
	pH6.8	

アルブミン寒天培地	エッグアルブミン	0.25g
	ブドウ糖	1.0g
	K_2HPO_4	0.5g
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2g
	$Fe_2(SO_4)_3$	痕跡
	寒天	15.0g
	蒸留水	1000ml
	pH6.8～7.0	
Trichoderma選択培地	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2g
	K_2HPO_4	0.9g
	KCl	0.15g
	$(NH_4)_2SO_4$	1.0g
	ブドウ糖	3.0g
	クロラムフェニコール	0.25g
	デクソン	0.3g
	PCNB	0.2g
	ローズベンガル	0.15g
	寒天	20.0g
	蒸留水	1000ml
Czapek-Dox培地	$NaNO_3$	3.0g
	K_2HPO_4	1.0g
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5g
	KCl	0.5g
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01g
	酵母エキス	1.0g
	ショ糖	30.0g
	寒天	20.0g
	蒸留水	1000ml

betae 遊走子懸濁液（約 10^3 ～ 10^4 個/ml）を 5 ml 接種した。接種 18 日後に細根を回収し，以下の方法（佐山・本間，1993）によって P. betae の寄生率および寄生度を測定し，拮抗細菌を選抜した。

調査時に細根を 1 ～ 2mm に切断し，少量の場合は全量を，多い場合にはビーカーに入れた水中でよく撹拌したうえで一部をとり，0.1 % 酸性フクシン加用ラクトフェノールで固定し染色した。この細根片を 40 倍で検鏡し，休眠胞子塊が細根細胞内に存在する割合（寄生率）によって，指数 0：感染なし，1：10 % 以下，2：11 ～ 50 %，3：51 % 以上とした。各植物体ごとに 200 本の細根片を検鏡し，以下のように P. betae の寄生度を算出した。

寄生度 = (Σ (該当指数 × 細根片数) ／ (全細根片数 × 3)) × 100

結　果

希釈平板法により細根から合計 428 菌株の根圏細菌を分離した。分離菌株の発病抑制程度は図 11 のようになり，P. betae の寄生度が 10 ～ 19 のものが最も多く見られた。寄生度が 1 以下の菌株が 4 菌株あり，そのうち最も抑制効果が高く安定していたのは，m523 培地で分離された SB-K88 菌株であった（図 12）。以降，この菌株を用いて試験を行ったが，本菌株は King' s B 培地上で蛍光色素を産生せず，水酸化カリウム溶液による識別ではグラム陰性細菌であった。なお，分離源および分離に用いた培地の種類と，分離された細菌の抑制効果の強弱には関連

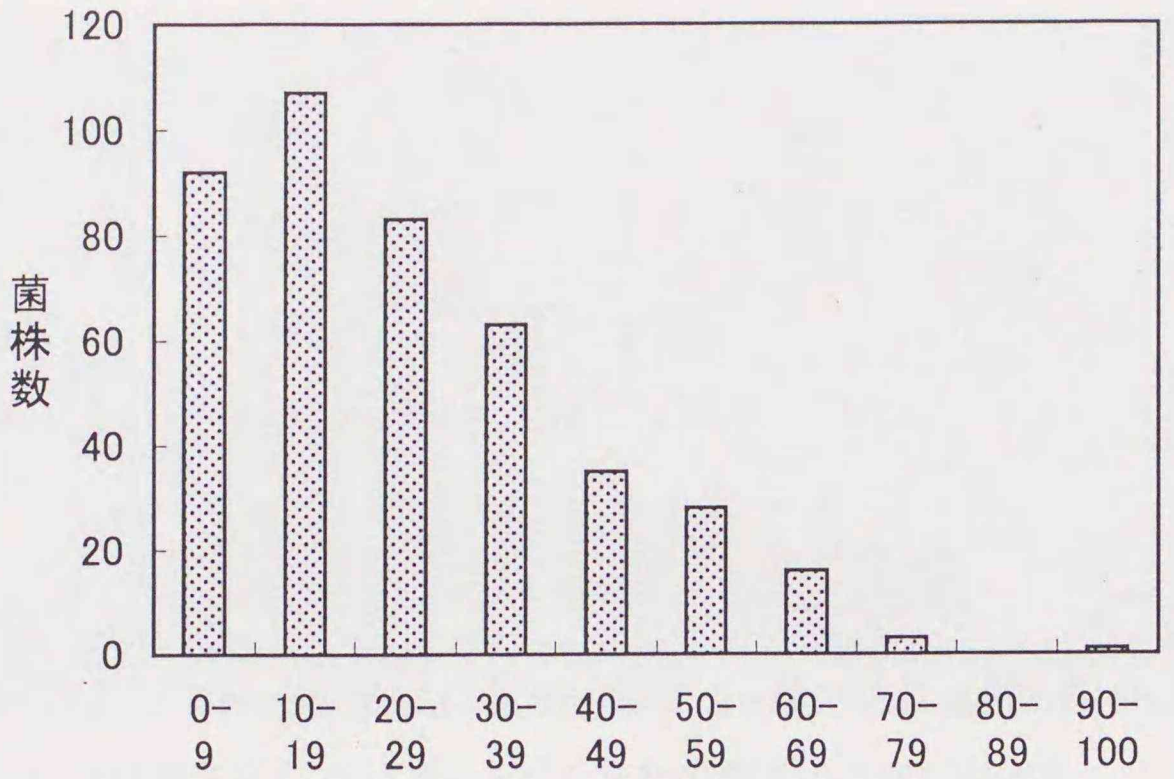


図11　テンサイの根圏から分離された細菌菌株のPolymyxa betae の抑制程度(寄生度)の頻度分布

寄生度は，長さ1～2mmの細根片について休眠胞子塊が細根細胞内に存在する割合によって，指数0:なし，1:10%以下，2:11～50%，3:50%以上として，200細根片を調査し，

寄生度＝(Σ(該当指数×細根片数)／(全細根片数×3))×100

で算出した数値。



図12　試験管育苗テンサイ苗におけるSB-K88菌株の発病抑制効果
左：播種後3週間目にSB-K88菌株を処理し，翌日P. betae遊走子を接種
右：P. betaeの遊走子接種のみ，
写真は，接種2週間後

は認められなかった。

(2)そう根病の発病抑制に及ぼす SB-K88 菌株細菌量と P. betae 菌量の関係

材料と方法

King's B 培地で 28℃ 2日間培養後に作製した SB-K88 菌株の細菌懸濁液を，遠心分離により蒸留水で3回洗浄した。洗浄した細菌懸濁液を約 10^8 cfu/ml になるように調整し，さらに 10，100 倍の希釈液を作製し，直径 25mm 長さ 13cm の石英砂入り試験管で育苗したテンサイ苗に 8 ml ずつ灌注した。3日後に約 10^4 個/ml および，その 10 および 100 倍に希釈した P. betae 遊走子を 8 ml ずつ接種した。接種3日後に細根を回収し，玉田らの方法（玉田・萩田，1982）に準じた ELISA 法により吸光値を測定し，病原ウイルスの感染程度を調査した。また，接種後 18 日目に細根を回収し，前項の細菌選抜法と同じ方法で P. betae の寄生率と寄生度を調査した。

結　果

P. betae の細根への寄生率および寄生度を調査したところ，細菌の濃度が高いほど，また，P. betae の遊走子濃度が低いほど発病（感染）抑制効果が高い傾向が認められた。ELISA 法による吸光値によって病原ウイルス濃度を測定した場合にも，同様な傾向が認められた（表 8）。この時，P. betae の寄生率および寄生度による調査では，接種した P. betae の遊走子濃度が原液のとき細菌濃度が

表8　そう根病の発病に及ぼすSB-K88およびPolymyxa betae遊走子濃度の影響

細菌濃度	P. betae遊走子濃度	寄生率[1)]	寄生度[2)]	吸光値
10^8cfu/ml	10^4個	0.0	0.0	0.042
10^7		38.1	18.4	1.265
10^6		66.1	38.3	1.926
なし		58.8	32.6	1.898
10^8cfu/ml	10^3	0.0	0.0	0.059
10^7		13.5	5.7	0.466
10^6		48.7	22.4	1.032
なし		52.0	23.7	1.486
10^8cfu/ml	10^2	0.0	0.0	0.029
10^7		2.2	0.7	0.184
10^6		41.6	20.3	0.301
なし		57.7	28.3	0.795
l.s.d.(5%)		17.6	9.2	1.034

1)寄生率は，図1の方法により調査した細根片について
寄生率＝寄生の認められた細根片数／全細根片数×100で算出した値
2)寄生度＝(Σ(当該指数×細根片数)／(全細根片数×3))×100

1ml 当たり 10^7cfu 以上で発病抑制効果が認められたが，ELISA 法による吸光値による調査では 1ml 当たり 10^8cfu でのみ効果が認められた。

(3)SB-K88 菌株の灌注処理による感染抑制効果の持続期間

材料と方法

直径 4cm，長さ 4cm の塩化ビニル製パイプに，1：1 に混合した耕地土壌と石英砂を詰め，テンサイ（品種「モノエース」）を播種した。播種後 21，23，25，27，29，31 および 34 日目に各々 SB-K88 菌株の懸濁液（約 10^9 cfu/ml）を 20 ml ずつ灌注した。全処理区とも播種後 38 日目に P. betae の遊走子（約 10^4 個/ml）を接種し，7 日後に細根を回収し，ELISA 法によりウイルスの感染程度を調べた。

結　果

SB-K88 菌株を灌注してから 10 日以内に P. betae 遊走子を接種した場合には，感染がほとんど見られず強い抑制効果が認められた。両者の接種間隔が 12 日目より長くなると，無処理区の吸光値と有意差が認められなくなった（図 13）。

(4)SB-K88 菌株培養濾液による感染抑制効果

SB-K88 菌株による発病抑制が，本菌株の産生する物質に起因するものであるか否かを調べるために，本菌株の培養濾液を用いて，その発病抑制効果を調べた。

材料と方法

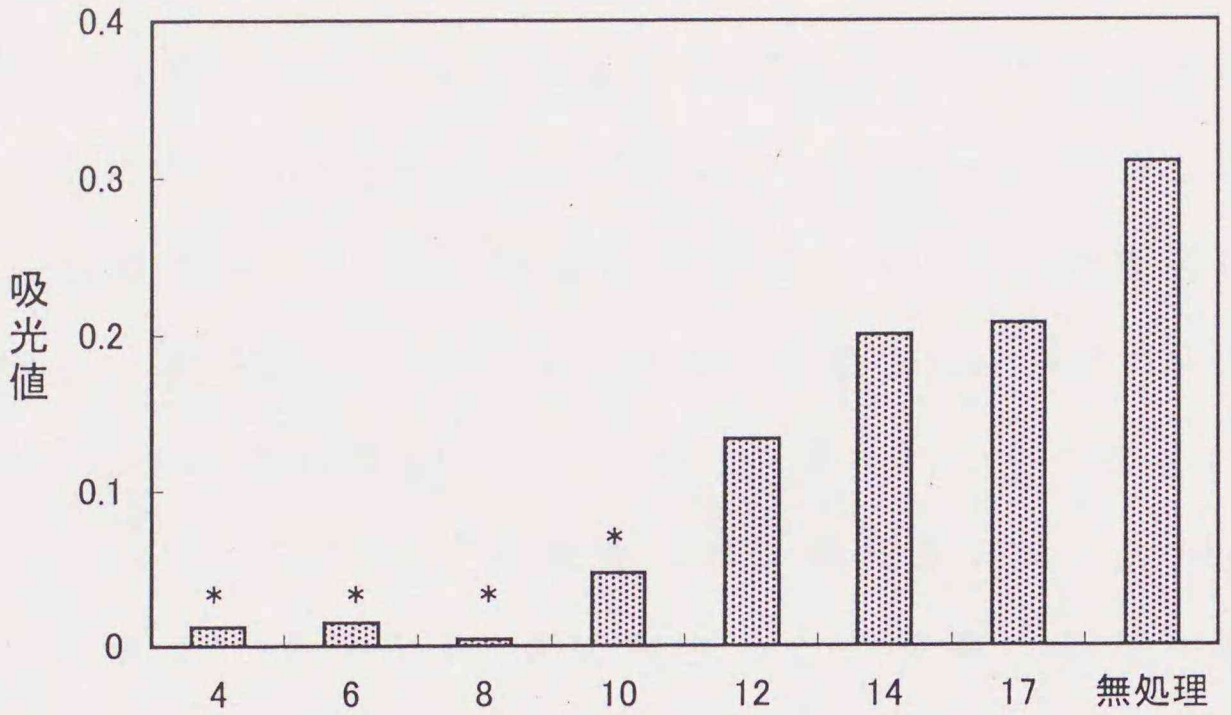


図13　SB-K88菌株の灌注後のそう根病発病抑制効果の持続期間
最小有意差(5%水準)は，0.231
*は，無処理との間に有意差があることを示す

SB-K88 菌株を King' s B 培地および LB 培地（表 7）で 28 ℃，3 日間振とう培養し，培養液を 20 分間 10000 rpm で遠心して菌体を沈殿させ，上澄みを採取した。この上澄みをさらに孔径 0.2 μm のメンブランフィルターで濾過し，細菌細胞を除去した。本濾液を原液，1/10，1/100 濃度に希釈して石英砂入り穴あき試験管（直径 25mm，長さ 13cm）で 23 ℃，3 週間栽培したテンサイ（品種「モノエース S」）に，1 本当たり 10 ml ずつ灌注した。灌注翌日に，P. betae 休眠胞子を 1 本当たり 10^4 個接種した。接種 7 日後に細根を回収し，ELISA 法により感染程度を調査した。さらに，濾液を加熱処理（100 ℃，30 分）した場合の影響を同様な方法で調べた。

結　果

King' s B 培地および LB 培地のいずれを用いても，ELISA 法による吸光値を対数変換して比較した結果，培養濾液の原液灌注処理は蒸留水処理区に比べて明らかに感染抑制効果が高かった（表 9）。培養濾液を希釈して処理した場合には有意な発病抑制効果が認められなかった。一方，培養濾液原液による発病抑制効果は，100 ℃ 30 分間処理しても失活しなかった。

(5)SB-K88 菌株の P. betae 休眠胞子の空洞化および感染力に及ぼす影響

材料と方法

SB-K88 株の発病抑制の機作を明らかにするため，同株

表9　SB-K88菌株培養濾液の発病抑制効果

処理	培地の種類 KB培地	LB培地
原液	1.20[1)]*	0.97*
1/10	2.81	3.15
1/100	2.71	2.98
原液100℃30分	1.03*	1.09*
培地のみ	2.45	2.44
蒸留水	2.83	
最小有意差(5%)	0.67	0.44

1)値は，log(吸光値×1000)

2)* は，蒸留水処理との間に有意さがあることを示す

の菌体および培養濾液が P. betae 休眠胞子の空洞化および感染能力に及ぼす影響を調査した。SB-K88 株を King' s B 液体培地で 2 日間 28 ℃で振とう培養し，培養液を 9000rpm で 30 分間遠心分離して，上澄み液と菌体に分離した。上澄み液はさらに孔径 0.2 μm のフィルターで濾過し，細菌細胞を除去して培養濾液とした。細菌細胞は培養液の影響を除くために，蒸留水に懸濁して 3 回遠心分離により洗浄した。罹病テンサイ細根から分離した休眠胞子を培養濾液または洗浄した細菌細胞懸濁液（約 2.4×10^9cfu/ml）に懸濁し，4 日間 25 ℃で静置した。処理後にラクトフェノール・トリパンブルーで固定染色し，休眠胞子塊 200 個について空洞率を調査した。感染能力の調査のためには，蒸留水で 5 回洗浄した処理休眠胞子塊約 10^4 個を石英砂入り試験管で栽培した播種後 3 週間目のテンサイ苗に接種し，14 日後に細根を回収し 30 ℃で通風乾燥したのち，ELISA 法によってウイルス感染程度を調査した。

結　果

SB-K88 菌株の洗浄した菌体および培養濾液を処理した休眠胞子と蒸留水処理の休眠胞子の空洞率には有意な差が認められなかった（表 10）。また，SB-K88 菌株の菌体および培養濾液を処理した休眠胞子を接種したテンサイは，蒸留水処理を行った休眠胞子を接種したテンサイと同等の ELISA 吸光値を示し，病原性に与える影響も認められなかった。

表10 Polymyxa betae休眠胞子の空洞率
および感染力に及ぼすSB-K88菌株の影響

処　理	空洞率	吸光値
SB-K88濾液	20.1	0.444
SB-K88菌体	23.5	0.421
蒸留水	17.3	0.395
l.s.d.(5%)	n.s.	n.s.

(6)圃場における SB-K88 菌株の種子コーティングと根部浸漬処理による抑制効果

材料と方法

北農試（羊ヶ丘）内にあるそう根病汚染圃場（植壌土，pH6.1）で，1993 年に以下の試験を行った。テンサイ種子を SB-K88 菌株懸濁液に浸漬したのち，室温で 1 夜通風乾燥することによりコーティング種子を作成し（種子当たり約 10^7 cfu 付着），耕地土壌を詰めた育苗用紙筒「ペーパーポット」（規格 1 号）に播種した。さらに，圃場への移植前日に育苗用紙筒の約 1/3 が浸るように SB-K88 菌株の懸濁液（約 10^8 cfu/ml）に浸漬した。試験区は，1 区 1.1m^2 とし，反復を 30 区設けた。発病抑制効果を評価するため，生育期間中は，簡易葉緑素計で測定した，葉緑素の量と相関関係にある値の SPAD 値 (Uchino and Kanzawa, 1995) を用いた葉の黄化程度を，収穫直前には細根における P. betae の寄生程度を，さらに収穫時には根部の発病程度および根中糖分を調査した。

結　果

葉の黄化程度は，移植後 13 ～ 14 日ごとに調査した。その結果，発病株率が約 1 割の少発生圃場では移植後 3 カ月まで，また発病株率が約 5 割の中発生圃場では 1 カ月半までおのおの SB-K88 菌株処理区の SPAD 値が無処理区に比べて高く，発病抑制効果が認められた（図 14，15）。しかし，移植後約 6 カ月の収穫時における調査では，両

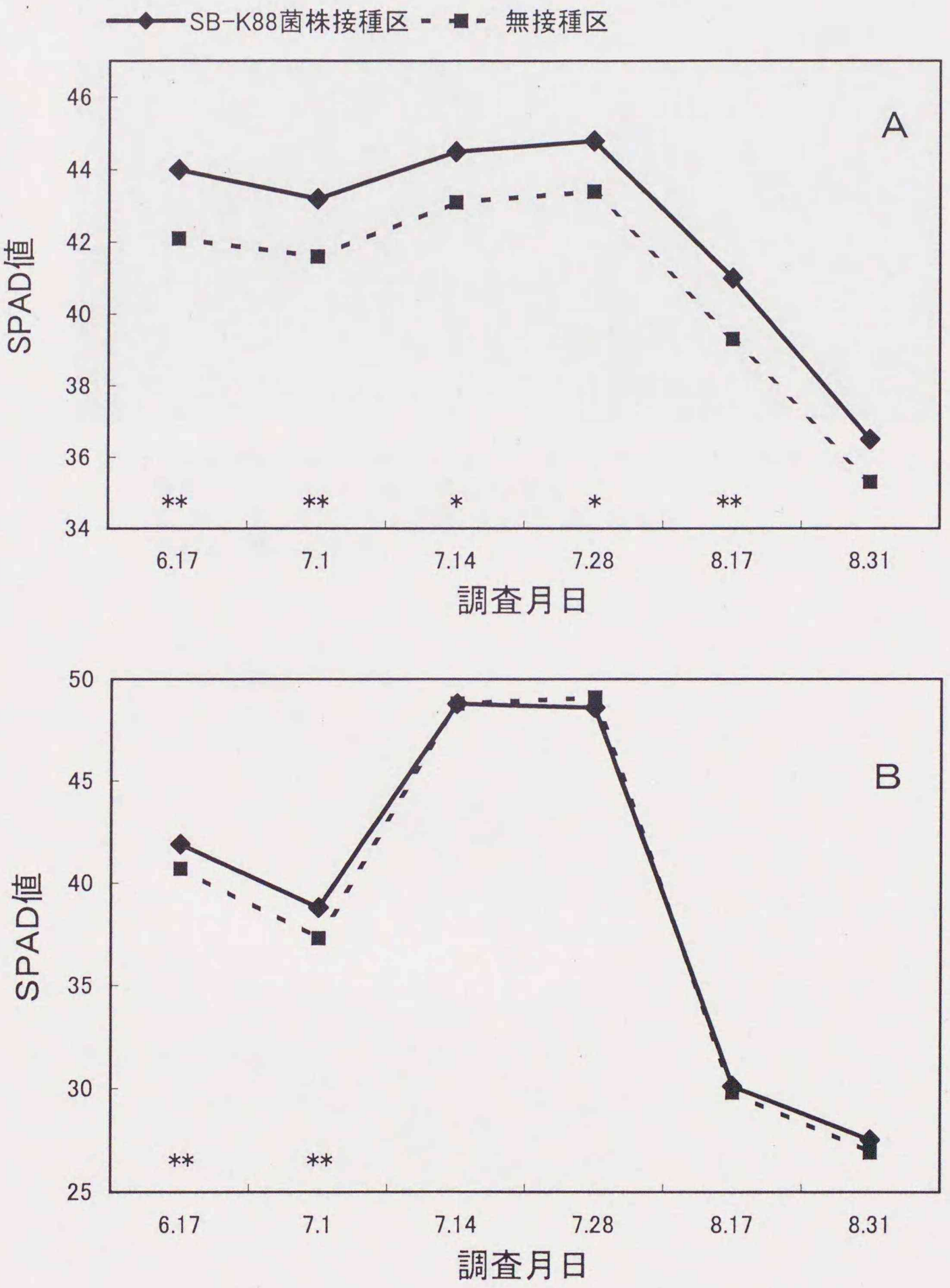


図14　圃場における葉の黄化程度(SPAD値)によるそう根病の発病抑制効果の検定
注）A:少発生圃場，　B:中発生圃場
　　*:5%水準で有意，**1%水準で有意を示す



図15　圃場試験と同じ処理を行ったテンサイ苗を汚染土壌を詰めたポットに
移植した場合の葉の黄化程度の差異
左：健全土，中央：SB-K88菌株処理，右：無処理
写真は，移植50日後

試験圃場とも地下部発病程度，P. betae 寄生程度，根中糖分などすべての測定値で無処理区との有意差が認められなくなった（表 11）。

(7)根圏細菌の圃場における定着性

(a)SB-K88 菌株の選択培地の作製

材料と方法

SB-K88 菌株の抗生物質に対する耐性を利用した選択培地を作製するために，12 種の抗生物質（ストレプトマイシン，ネオマイシン，スペクチノマイシン，カナマイシン，ペニシリン G，アンピシリン，ノボビオシン，セファロキシン，サイクロセリン，クロラムフェニコール，テトラサイクリン，シクロヘキシミド）を 50 ppm ずつ King' s B 寒天培地に添加した。SB-K88 菌株の白金耳でかき取った菌体を 5 ml の滅菌水に懸濁し，10^{-8} まで希釈したものを 0.5 ml 培地上に塗布し，25 ℃で 5 日間培養した後のコロニーの数と直径を調査した。さらに，コロニーの形成が認められた抗生物質を組み合わせた培地を作製し，コロニー数およびその直径を調査した。

結　果

供試した SB-K88 菌株は，カナマイシン，サイクロセリン，ストレプトマイシン，スペクチノマイシン，ネオマイシン，シクロヘキシミドに対する耐性を有していた（表 12）。King 's B 寒天培地にこれらの抗生物質を各々 50 ppm 加えた 6 種混合培地上では，SB-K88 菌株はコロニーの直

表11　収穫時におけるSB-K88菌株の発病抑制効果の調査結果

圃場		地下部発病株率	地下部発病度[1)]	P. betae寄生率[2)]	P. betae寄生度[3)]	根中糖分（%）
少発生	細菌接種	2.8	0.36	0.87	0.31	16.5
	無接種	1.9	0.28	0.84	0.30	16.7
	分散分析	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
中発生	細菌接種	79.8	19.46	0.92	0.39	7.7
	無接種	79.4	18.50	1.24	0.49	7.4
	分散分析	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

1)北海道立中央農試テンサイそう根病発病調査基準（阿部，1987）に準じて調査した。
発病度＝（Σ（該当指数×個体数））／（調査総個体数×4）
2)表8の寄生率に同じ。
3)表8の寄生度に同じ。

表12　SB-K88菌株のコロニー数および大きさに及ぼす培地に添加した抗生物質の影響

抗生物質[1]	コロニー数[2]	コロニーの直径[3]
サイクロセリン	239	△
カナマイシン	238	○
ネオマイシン	233	○
スペクチノマイシン	226	△
ストレプトマイシン	240	○
シクロヘキシミド	268	○
ペニシリンG	0	−
アンピシリン	0	−
ノボビオシン	0	−
セファロキシン	0	−
6種混合[4]	164	△
無添加	251	○

1)50ppm濃度でKing`B培地に添加
2)1白金耳の供試細菌を10^{-8}に希釈した平板上のコロニー数
3)○は，抗生物質無添加とほぼ同じ大きさ，△は無添加の約50%以下示す。
4)サイクロセリン，カナマイシン，ネオマイシン，スペクチノマイシンストレプトマイシン，シクロヘキシミドを各50ppm添加したもの。

径が 50 % 以下になり，出現するコロニー数もおよそ 2/3 に抑制された。しかし，本培地は他の根圏細菌の生育を顕著に抑制し，コロニーの形態からも他の細菌との識別が可能であったことから（図 16），本培地を選択培地として以下の試験に用いた。

(b)SB-K88 菌株の圃場における定着性

材料と方法

SB-K88 菌株のテンサイへの処理は，圃場における発病抑制試験と同様に，種子にコーティングし，さらに移植前日に紙筒苗を細菌懸濁液に浸漬した。処理翌日，移植 16 日，1 カ月，2 カ月および 3 カ月後に主根からの距離を変えて細根を採集し，30ml の滅菌蒸留水を入れた 100ml 容のコルベンに入れ 120rpm，30 分間振とうを 3 回繰り返して洗浄した。それらの細根をペーパータオルで吸水後秤量してから，滅菌乳鉢に 0.5ml の滅菌水を加えて磨砕した。順次希釈したその磨砕液を前述の SB-K88 菌株用の選択培地を分注したペトリ皿に 0.5ml ずつ塗布した。根圏に定着した菌量を，この希釈平板法により調査した。

結　果

テンサイの紙筒を約 10^8 cfu/ml の濃度の SB-K88 菌株の懸濁液に浸漬した。細根中の SB-K88 は，移植翌日には乾重 1g 当たり 6.4×10^7 cfu が検出され，その数は全細菌数の約 33 % であった（表 13）。移植 16 日後には 4.8×10^7 cfu となり，全細菌数の約 23 % に相当した。移植 1 ヶ月後には，紙

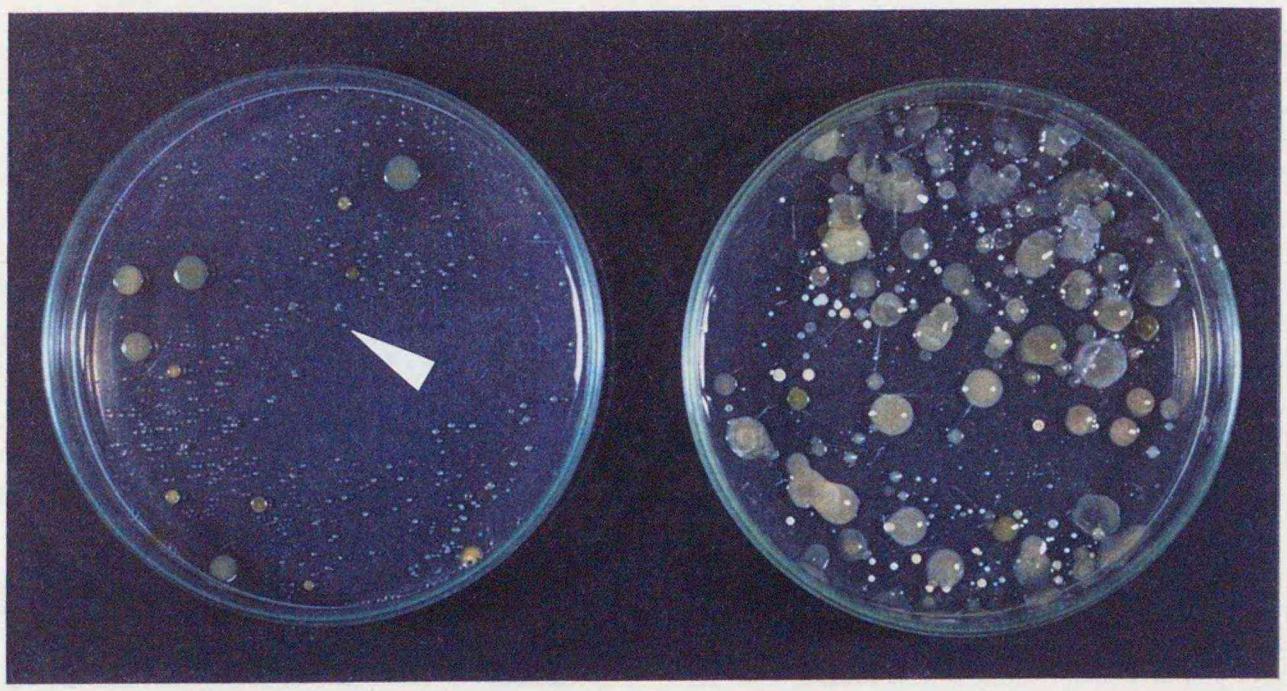


図16　SB-K88菌株の選択培地による検出。
左：6種混合培地（組成：サイクロセリン，カナマイシン，ネオマイシン，
スペクチノマイシン，ストレプトマイシン，シクロヘキシミドを各50ppm添加），
矢印がSB-K88のコロニー。
右：King' s B 培地。

表13　圃場で栽培されたテンサイ細根におけるSB-K88菌株の全細菌数に占める割合

	内部[1]	10cm[2]	20cm	30cm
処理直後	33.68(%)[3]			
移植後16日目	22.86			
1ヶ月	53.06	0.57	1.36	
2ヶ月		1.00	0.14	0.07
3ヶ月		0.56	0.05	0.90

1)育苗用紙筒内部の細根

2)主根からの距離

3)全細菌数に占める供試菌株の菌数の割合

筒内の細根ではSB-K88が53％と高い割合で検出できたが，主根から10cm離れた紙筒外の細根では0.57％という低頻度でしか検出されなかった。移植2カ月後，3カ月後には，さらに検出割合は低下し，主根から10～30cm離れた位置の細根では1％以下であった。

考　察

現在，テンサイそう根病の防除法に抵抗性品種の作付けが行われている。しかし，発病軽減効果や収量性が劣ることなど，防除対策としては必ずしも十分とはなっていない。そこで，生物的防除法による発病の軽減を目的として本試験を行った。

根圏細菌の分離は，帯広市清川のテンサイが長年連作され，そう根病が激発している圃場に植えられたテンサイの細根から行った。本圃場では土壌中の*P. betae*の休眠胞子の空洞率と菌密度が高かった。このような圃場では*P. betae*に対する拮抗微生物の密度も高まっていると予想された。本試験の結果，この激発圃場から，ポット試験レベルでそう根病の発病を抑制する菌株が得られた。選抜されたSB-K88菌株は，細菌濃度および*P. betae*の遊走子濃度の組み合わせにより，*P. betae*の寄生率および寄生度に差がみられ，ポット試験においてこの菌株の発病抑制効果が確認された。

SB-K88菌株の灌注処理による抑制効果の持続性について，細根のウイルス濃度を指標として調査した結果，約

10日間は効果が持続することが明らかとなった。この試験は，石英砂に耕地土壌を50％混合したものにテンサイを栽培して行ったが，石英砂だけではなく耕地土壌が混合された場合にも効果があることから，汚染土壌を使用した試験においても抑制効果が得られることが期待された。SB-K88菌株の発病抑制効果は，培養濾液のみの灌注処理によっても認められた。培養濾液による効果は，濾液中の抗菌物質の直接的な作用（Homma and Suzui,1989)のほかに，濾液の種子コーティングによって抵抗性の誘導が生じる場合（Press and Kloepper, 1997）が報告されており，本菌株の濾液による抑制の機作としては，どちらの可能性も考えられる。また，休眠胞子に対するSB-K88菌株の菌体および培養濾液の影響は，空洞率およびテンサイに対する感染性のいずれも認められなかったことから，本細菌は遊走子の感染性に対して影響を与えたものと思われた。

圃場試験の結果，SB-K88菌株を種子コーティングに加え浸漬処理することにより，移植後1～2ヶ月は葉の黄化程度で差が認められたが，約6ヶ月後の収穫時の調査では，根部発病程度，P. betae寄生程度や糖分を含め，SB-K88菌株処理の効果は認められなかった。この結果と，同時に調査したSB-K88菌株の定着性の結果から，根圏に定着している全細菌数に占めるSB-K88菌株の割合が高い場合にのみ，発病抑制効果が認められたものと考えられた。拮抗細菌は処理した場所付近に多く定着し，その場所か

ら遠ざかるに従い少なくなるという報告がある（Bahme and Schroth, 1987; Beauchamp ら, 1993）。本試験でも SB-K88 の菌数は処理した主根付近に多く定着し，主根から遠ざかるに従い，また，接種後の期間が長くなるに従って減少した。細根に感染する P. betae を抑制するためには，細根の伸長に従って細菌も同様に定着していく必要がある。

以上のように，SB-K88 菌株のテンサイ種子へのコーティングに加え苗の浸漬処理をすることによりそう根病の発病抑制効果が室内試験で明瞭に，また圃場試験でも移植後 2 ヶ月は持続した。本細菌は，これまで報告されている Trichoderma 属菌を利用した防除試験の結果（Camporota ら，1988；Nowakowska，1994）と比較して，室内試験における抑制効果に優れ，また圃場試験では微生物による防除として初めて抑制効果を示した。この効果は施用した細菌が高密度で根圏に定着することが前提になると考えられた。

なお，SB-K88 菌株は King' s B 培地上で蛍光物質を産生しないグラム陰性細菌であり，その後同定が行われた。Stenotrophomonas 属に属するが，植物に対する病原性が無いことから Xanthomonas campestris とは異なり，コロニーの形状が乳頭様でなく塩化ナトリウム 4 %およびトリフェニールテトラゾリウムクロライド 0.1 %を添加した培地上で生育できないことから S. maltophilia とも異なる新種であることが明らかとなり，Stenotrophomonas sp. とされた（Homma ら，1997）。本菌株は，R. solani および Pythium ultimum による

苗立枯病に対しても抑制効果を持つことが明らかとなっている。

2．根圏細菌の施用法および利用法

(1)異なる施用法による SB-K88 菌株のそう根病抑制効果と植物根への定着程度の比較

材料と方法

SB-K88 菌株をバーミキュライトに付着させ土壌に混合する方法，同菌株懸濁液を土壌に灌注する方法，および種子にコーティングする方法を用いて，そう根病の抑制効果およびテンサイ根への定着程度を比較した。King's B 培地で培養した菌体懸濁液（3.5 × 10^{10} cfu/ml）を容積比で1.6倍の粉砕したバーミキュライトと混合し，室温で一夜通風乾燥した結果，SB-K88 菌株はバーミキュライト 1 ml 当たり 7.7 × 10^{9} cfu 付着した。そこで，本バーミキュライトを容積比 10 % 濃度となるように土壌中に混合した（バーミキュライト処理）。灌注に用いた菌体懸濁液は 5.4 × 10^{9} cfu/ml の濃度のものを用い，1 鉢当たり 30 ml 灌注した（灌注処理）。種子コーティングでは，細菌懸濁液を種子と混合し，クリーンベンチ内で 1 夜通風乾燥し，種子 1 粒当たり 1.9 × 10^{8} cfu 付着させた（種子コーティング）。

テンサイの栽培は，北農試（羊ヶ丘）内のそう根病汚染圃場から採取した土壌にテンサイの育苗用の肥料（土壌 1L に対して硫酸アンモニウム 0.9 g，チリ硝石 1.3 g，過

燐酸石灰 2.1 g，硫酸カリ 0.5 g，炭酸カルシウム 2.1 g）を混合したものを直径 9 cm の素焼鉢に詰め，1鉢当たり 7 粒のテンサイ種子を播種して温室内で育苗した。発病抑制効果は，播種 3 および 4 週後に根部を回収し，ELISA 法の吸光値によって判定した。根圏定着性は，前述の 6 種混合の選択培地を用いた希釈平板法により調査した。

結　果

バーミキュライト処理では，播種 3 および 4 週後において無処理区と比べて顕著な抑制効果が認められた（表 14）。その効果は灌注処理および種子処理に比べて最も高かった。灌注処理では 4 週目のみに無処理区と比べて有意差が認められたが，種子処理では有意差は認められなかった。根圏での全細菌に占める SB-K88 菌株の割合は，3 処理区とも 3 週目で 5.2 ～ 10.3 %，4 週目で 1.5 ～ 7.1 % と，抑制効果の無かった種子処理を含め，各処理に大きな差は認められなかった。

(2)拮抗微生物と抵抗性品種の組み合わせによる効果

材料と方法

バーミキュライトを SB-K88 菌株懸濁液に浸漬後風乾し，バーミキュライト 1 g 当たり 2.8×10^{10} cfu 付着させた。これを北農試（羊ヶ丘）内のそう根病汚染圃場から採取した汚染土壌に前記のテンサイ育苗用肥料を混合したものに 10 %（v/v）の割合で混合した。この土壌を育苗用トレイ（1 穴 60 ml 容）に詰め，温室内で抵抗性品種「リ

表14　異なる施用法によるSB-K88菌株のそう根病抑制効果の比較

播種後3週間目

処理	ELISA吸光値	SB-K88菌数[1)]	全細菌数	割合(%)[2)]
SB-K88＋ﾊﾞｰﾐｷｭﾗｲﾄ	0.131*[3)]	5.0×10^{7}	9.6×10^{8}	5.2
SB-K88灌注	0.911	3.1×10^{7}	3.4×10^{8}	9.1
SB-K88種子処理	0.894	3.7×10^{7}	3.6×10^{8}	10.3
ﾊﾞｰﾐｷｭﾗｲﾄ	0.781			
無処理	0.965		5.9×10^{8}	
l.s.d.(5%)	0.294			

播種後4週間目

処理	ELISA吸光値	SB-K88菌数[1)]	全細菌数	割合[2)]
SB-K88＋ﾊﾞｰﾐｷｭﾗｲﾄ	0.601*	6.5×10^{7}	9.1×10^{8}	7.1
SB-K88灌注	0.870*	7.6×10^{6}	3.2×10^{8}	2.4
SB-K88種子処理	1.223	6.2×10^{6}	4.2×10^{8}	1.5
ﾊﾞｰﾐｷｭﾗｲﾄ	1.327			
無処理	1.241		7.3×10^{8}	
l.s.d.(5%)	0.234			

1)細根乾重1g当たり。
2)全細菌数に占めるSB-K88菌株の割合。
3)*は，無処理と比較して有意であることを示す。

ゾール」および感受性品種「モノエースＳ」を育苗した。対照として，無処理のバーミキュライトを混合した区を設けた。播種２カ月後に北農試（芽室）内の耕地土壌を詰めた直径 15 cm の素焼鉢に土壌とともに移植しさらに２カ月間栽培した。生育期間中に葉の黄化程度（SPAD 値）を，播種４カ月後に地下部発病程度，根重を調査した。

結　果

播種２カ月後の葉の調査では，抵抗性品種＋ SB-K88 区，抵抗性品種無処理区，感受性品種＋ SB-K88 区は感受性品種の無処理区と比べて SPAD 値が高く黄化程度も少なかった。抵抗性品種区内においても抵抗性品種＋ SB-K88 区は健全区とほぼ同程度の SPAD 値となり，抵抗性品種＋バーミキュライト区に比べて黄化程度に有意な差が認められた。根の調査では，抵抗性品種＋ SB-K88 区，抵抗性品種＋バーミキュライト区はいずれも感受性品種無処理区に対して根重が多く，根部発病指数も小さく処理間に有意な差が認められた。抵抗性品種＋ SB-K88 区は抵抗性品種＋バーミキュライト区に比べて有意差は無いものの，抵抗性品種＋ SB-K88 処理区において発病程度が低い傾向にあった。（表 15）。

考　察

拮抗細菌の施用法では，灌注処理と種子処理に比べてバーミキュライト処理のそう根病の発病抑制効果が高かった。バーミキュライト処理が灌注処理より効果が優っ

表15　SB-K88菌株と抵抗性程度の異なる品種の組み合わせによるそう根病発病抑制効果の比較

処理	根部発病指数[1)]	地上部黄化程度[2)]	根重[1)] (g/本)
抵抗性品種[3)]＋SB-K88[4)]	0.3a[5)]	40.2a	18.6a
抵抗性品種＋バーミキュライト	0.5a	35.5b	15.1ab
抵抗性品種健全	−	41.3a	19.9ac
感受性品種＋SB-K88	1.6b	37.7ab	10.8b
感受性品種＋バーミキュライト	1.7b	31.9	8.8b
感受性品種健全	−	40.7a	25.9c
l.s.d.(5%)	0.7	3.0	7.3

1)播種後131日目に調査した。
2)簡易葉緑素計で測定したSPAD値。播種後66日目に1個体につき2葉測定した。
3)抵抗性品種として「リゾール」，感受性品種として「モノエースS」を用いた。
4)SB-K88をバーミキュライトに付着させたものを用いた。
5)同一列の同一英文字間には，有意差(5%)がないことを示す。
6)各処理共に，10個体を用いた。

た理由として，媒介菌は細根に感染するため，土壌中へ処理細菌が均一に分布している方が発病抑制に有利である可能性が考えられる。灌注処理では導入した菌数が 1.7 倍であったが，土壌中で均一に分布していなかった可能性がある。今後，多孔質および多糖質資材などを含め，施用した細菌の定着性および活性の持続性に優れた担体の探索を行う必要がある。これらの担体を実際の栽培に用いる場合には，移植時に本畑土壌に混合することが考えられるが，この場合には大量の細菌が必要なため大量培養法の開発が必要となる。

SB-K88 菌株と抵抗性品種との組み合わせの効果については，抵抗性品種と組み合わせた場合でも黄化程度において SB-K88 菌株の処理効果が認められ，健全区に近い値となり抑制効果が高まった。全般的に抵抗性品種の効果が生育後期まで持続するため，4 カ月後の調査では抵抗性品種の効果のみに有意差が認められたが，SB-K88 菌株の施用区は両品種とも発病程度および根重を指標とした場合に有意差は無いものの，発病程度が低い傾向がみられた。これらのことから初期感染を拮抗細菌で抑制することによって品種の持つ抵抗性による被害軽減効果を増強することが可能であることが示され，両者の組み合わせが有効であると考えられた。

Ⅳ．テンサイ根腐病の生物的防除

A．*Rhizoctonia solani* AG2-2-IV 菌体の繰り返し接種によって誘導された発病抑止土壌の微生物的特性

R. solani AG2-2-IV 菌体の耕地土壌への繰り返し接種により誘導される，同菌による苗立枯病に対する抑止土壌について，微生物数，熱および薬剤感受性，増殖性などを調べることにより，その要因を探索した。

1．繰り返し接種による土壌の発病抑止性の誘導

材料と方法

北農試（羊ヶ丘）の耕地土壌（植壌土，pH5.6）をプラスチック製ポット（直径 20cm，6 L 容）に詰め，表 16 に示した *R. solani* の AG2-2-IV の 3 菌株，AG4 の 2 菌株の接種源を各々 2 週間ごとに 1 % (v/v)濃度で接種し，これにテンサイ種子（品種：モノエースＳ）を 40 粒播種した。各処理区とも 3 反復行った。ここで生育した植物体は繰り返し接種する時に，2mm のふるいを用いてできる限り除去した。接種源として，耕地土壌 400ml に 1cm 角に切ったテンサイ主根約 50g を混合し，121 ℃で 60 分間高圧蒸気滅菌したものに供試菌を接種し，25 ℃で約 2 週間培養したものを用いた。なお，培養に用いたテンサイ主根は接種時に取り除き，土壌と菌体のみを混和した。テンサイの栽培を行わない場合は，テンサイによる接種源の増殖が無いものと考えられたため，上記の接種源を 2 週間ごとに 2 % (v/v)濃度で接種した。対照に用いた死菌体

表16 供試菌株の分離源

種　　名	菌株名	分離源	分離地
Rhizoctonia solani AG2-2	Pf-28[1)]	テンサイ根	北海道
	Pf-62[2)]	土壌	同上
	Rh-509[1)]	テンサイ葉	同上
R. solani AG4	Pf-60[2)]	土壌	同上
	Rh-154[1)]	テンサイ根	同上
Trichoderma longibrachiatum	TMI60004[3)]	シイタケほだ木	鳥取県
T. polysporum	TMI60146[3)]	シイタケ種駒	同上
T. viride	TMI60231[3)]	シイタケほだ木	同上
T. harzianum	TMI60573[3)]	同上	大分県
T.pseudokoningii	TMI60824[3)]	同上	宮崎県
T. hamatum	TMI60886[3)]	土壌	鳥取県
Trichoderma sp.	HT87[1)]	土壌	北海道
Gliocladium virens	TMI60316[3)]	同上	千葉県
Verticillium bigutattum	HV8[1)]	同上	北海道

1) 北海道農業試験場保存菌株。

2) 北海道大学農学部生越明教授より分譲。

3) 財団法人日本きのこセンター菌じん研究所小松光雄博士より分譲。

は，上記の接種源を密封できるガラス容器(500ml 容)に入れ，プロピレンオキサイドを 5ml 加えた後 1 晩放置することにより作製した。調査は，苗立枯病の発生を播種後 2 週間にわたり調査して，苗立枯度(DOS=〔(2A+1B+0.5C)/2T × 100〕，A，B，C および T はそれぞれ，出芽前苗立枯数，出芽後苗立枯数，罹病苗数，播種した種子数を示す）を算出した。

結　果

耕地土壌への繰り返し接種により，R. solani の AG2-2-IV の 3 菌株と AG4 の 2 菌株のすべてにおいて苗立枯病に対する抑止性が生じ，菌群による差異は認められなかった(図 17)。5 回の繰り返し接種で苗立枯病の発生程度は，1 回目に比べ 34 % ～ 64 % に抑制された。微生物相が貧弱と見られる心土に繰り返し接種した場合には，作土に接種した場合に比べて抑止性は劣った（図 17）。また，菌体の繰り返し接種のみによってもテンサイの栽培を伴う場合と同程度に抑止性が生じたのに対して，プロピレンオキサイドで処理した死菌体を接種した場合は，抑止性が認められなかった(図 18)。

2．誘導された発病抑止性の要因解析

(1)繰り返し接種土壌の微生物数の変動と菌寄生菌の検出

材料と方法

aテンサイ苗立枯病の発生程度を指標とした土壌の抑止性の検定法

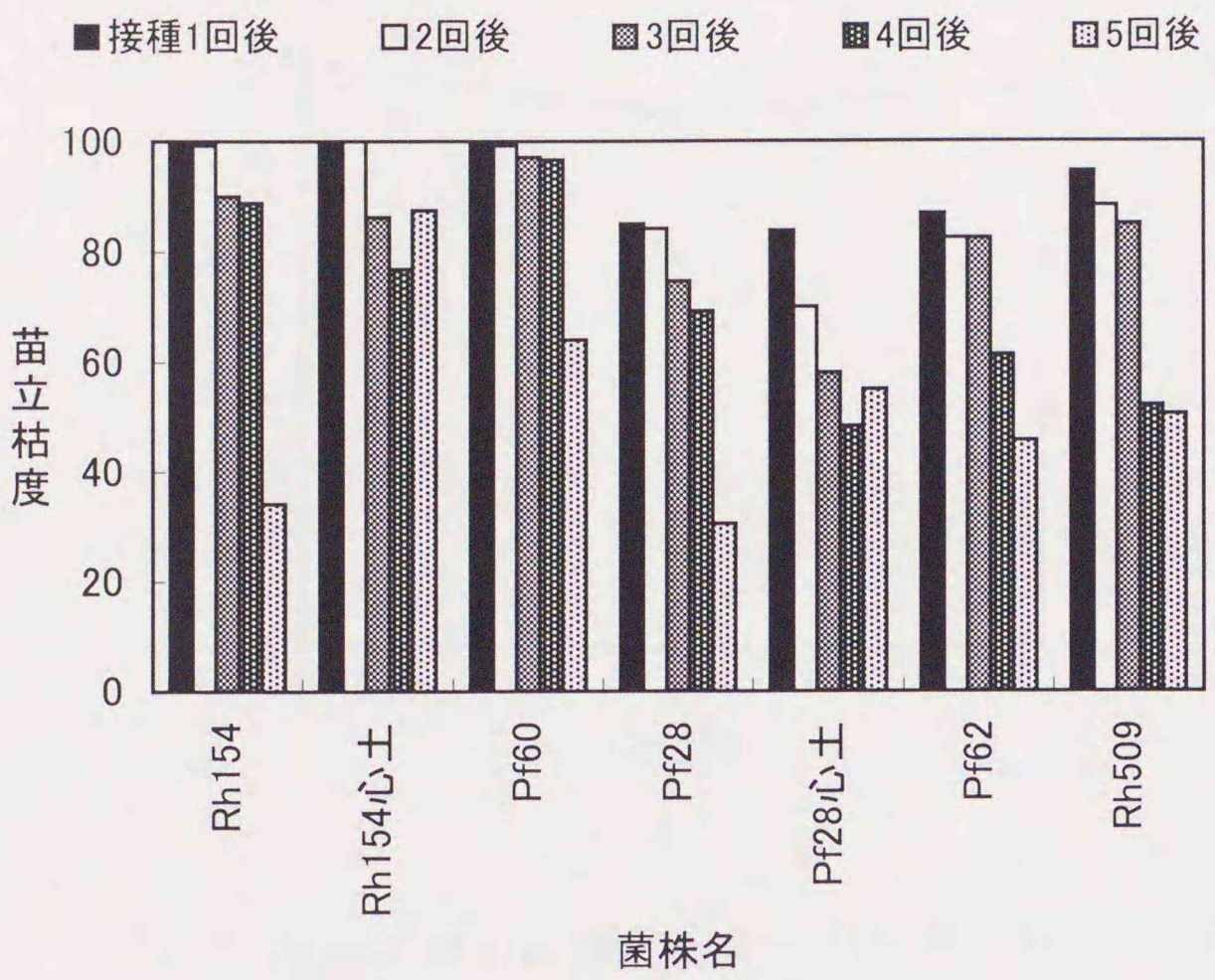


図17 Rhizoctonia solani AG2-2 および AG4 の繰り返し接種による苗立枯病発生程度
苗立枯度＝〔(2A＋1B＋0.5C)／2T×100〕, A, B, CおよびTはそれぞれ, 出芽前苗立枯数, 出芽後苗立枯数, 罹病苗数, 播種した種子数を示す。

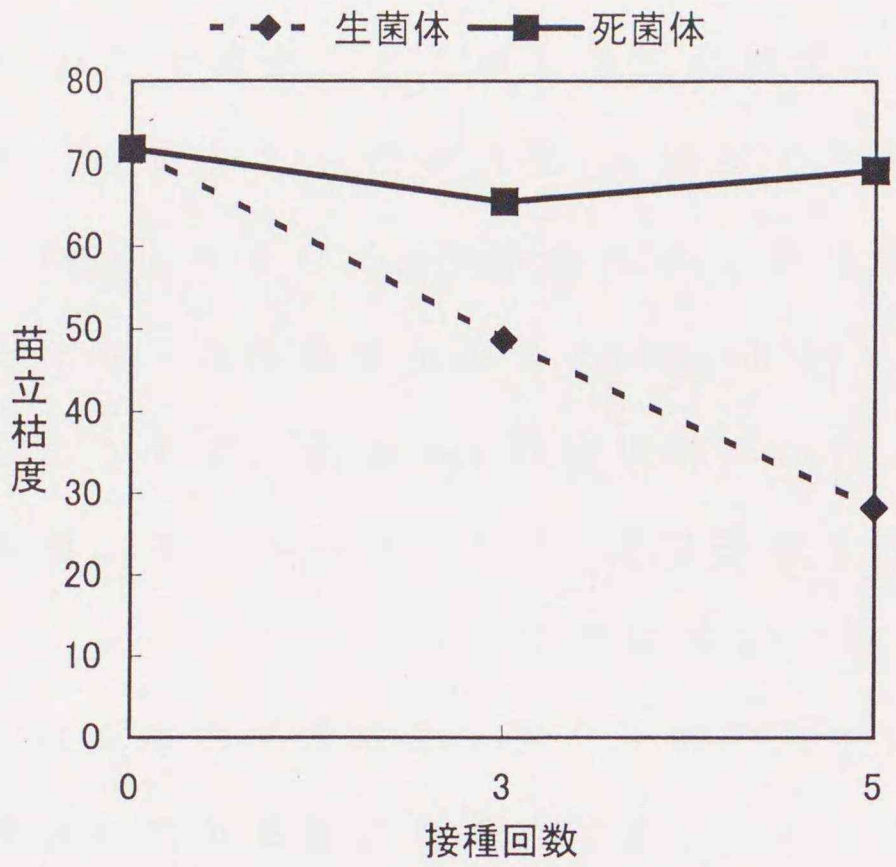


図18 Rhizoctonia solani AG2-2 の生菌体および死菌体の接種による苗立枯病の発生程度

R. solani AG2-2-IV の Pf-28 菌株をエンバク粒培地（表 7）で 2 週間 25 ℃で培養したものを通風乾燥後に粉砕し，2mm のふるいを通したものを 1 % (v/v)濃度で供試土壌に接種した。Pythium および Aphanomyces による苗立枯病の発生を抑えるため，この混合土壌に fenaminosulf を 1 L 当たり 0.7g 施用したうえで，直径 9cm の素焼鉢に詰め，テンサイ種子（品種：モノエースS）を 13 粒播種した。これを自然光型ファイトトロン（人工照明無し，昼 25 ℃夜 22 ℃）または温室内で栽培し，苗立枯病の発生を 2 週間にわたり調査して苗立枯度を算出した。1 区につき 3 ポットを用いた。

b 土壌中の微生物数の測定

土壌中の糸状菌数，細菌数，放線菌数，Trichoderma 属菌数は希釈平板法で測定した。培地は各々ローズベンガル寒天培地，Kings'B 寒天培地，アルブミン寒天培地，Trichoderma 選択培地（表 7）を用いた。R. solani を含む Rhizoctonia 属菌密度は，Ko and Hora（1971）の方法に準じソイルペレットからの菌糸の出現率によって調査した。

結　果

繰り返し接種を行った土壌中の糸状菌数は乾土 1g 当たり 10^4 から 10^5 cfu の間で推移し，接種期間中に大きな変動は無かった(図 19)。また、Trichoderma 属菌数は 10^3 cfu，細菌数は 10^7 cfu，放線菌数は 10^6 cfu 程度で推移した。細菌の中で Kings' B 培地上で蛍光性色素を産生する細菌数は 10^4 cfu 以下であった。

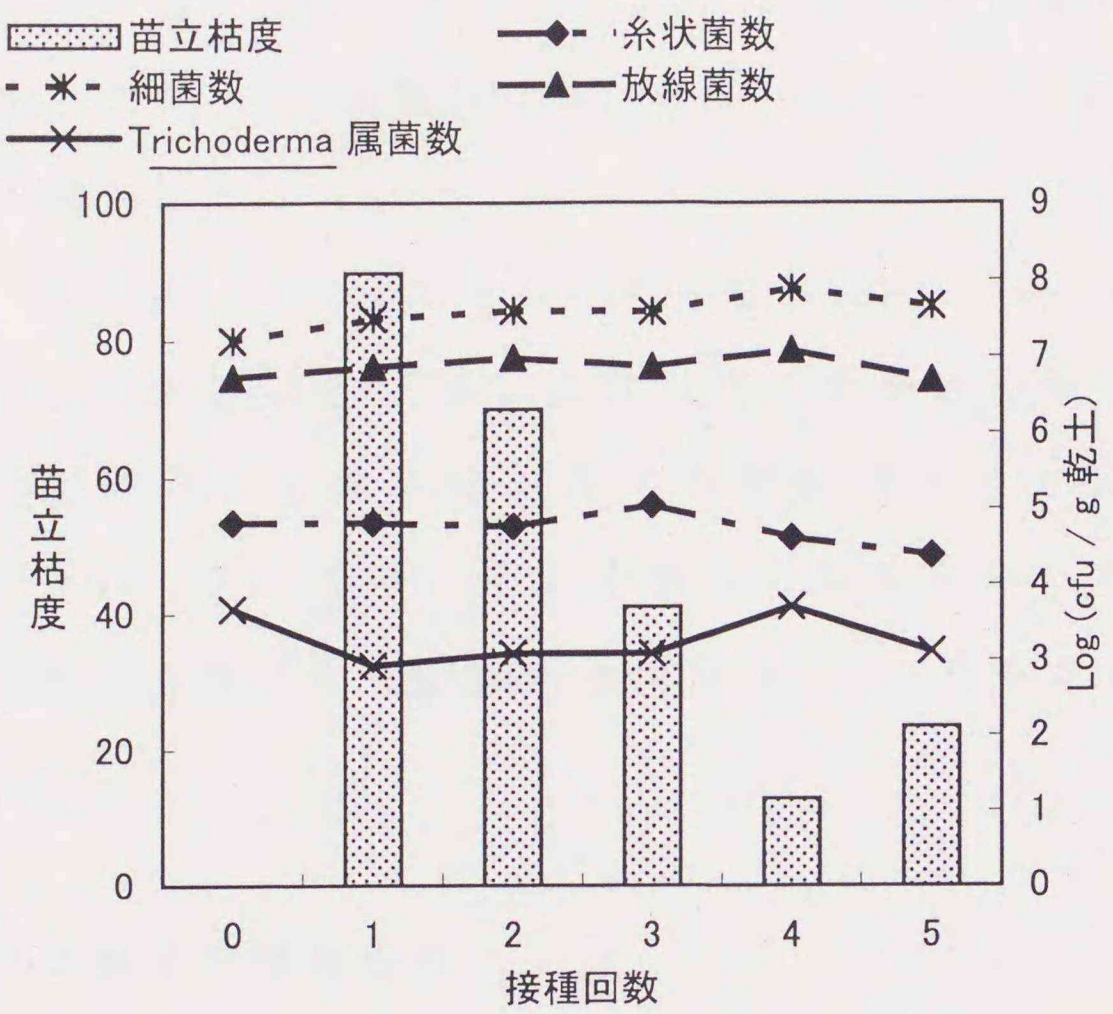


図19 Rhizoctonia solani AG2-2 の繰り返し接種による微生物数と苗立枯病発生程度の変動

一方，ソイルペレットからの Rhizoctonia 属菌菌糸の出現率は，Pf-28 菌株 (AG2-2-IV) で最初 66.7 % であったものが 5 回繰り返し接種することにより 2.8 % にまで減少した (図 20)。また，Rh-154 菌株 (AG4) では 97.2 % の出現率が 8.3 % に減少した。

同時に，ジャガイモ煎汁寒天培地（PDA，表 7）上の R. solani の菌叢に繰り返し接種土壌の希釈液を塗布し，R. solani に対する寄生菌の集落を形成させる方法により（Morris ら，1994），菌寄生菌の分離を試みたところ，Trichoderma 属菌と Verticillium 属菌が R. solani 菌糸から検出された。

(2) 土壌中の菌糸生育

材料と方法

直径 25mm，長さ 13cm のガラス管に繰り返し接種土壌を詰め，その上に Pf-28 菌株が生育している厚さ 1cm の PDA ディスクを置床し，乾燥を防ぐため上部の穴をミリラップ（ミリポア社）で被った。下部の穴は脱脂綿で栓をし，23 ℃ で 5 日間培養後に菌糸の生育程度を調査した。対照として無接種土壌を用いた。

結　果

5 回繰り返し接種後の土壌中での Pf-28 菌株の菌糸は，培養開始 3 日目以降は生育が有意 (P=0.05) に遅くなり，5 日目では無接種土壌に比べて約 1/2 の生育量となった (図 21)。

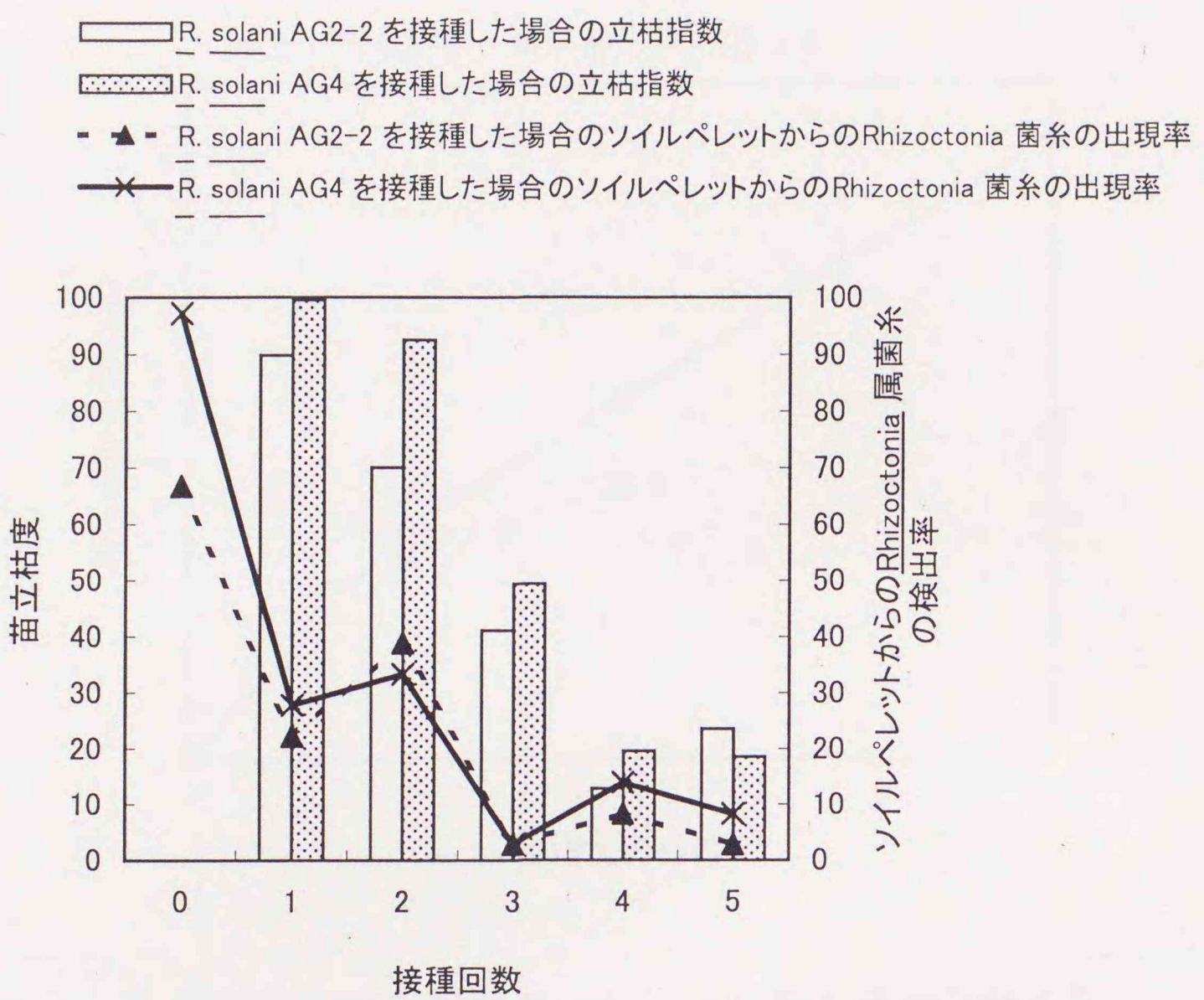


図20 Rhizoctonia solani AG2-2 の繰り返し接種土壌からのRhizoctonia 属菌の検出率，および苗立枯病発生程度

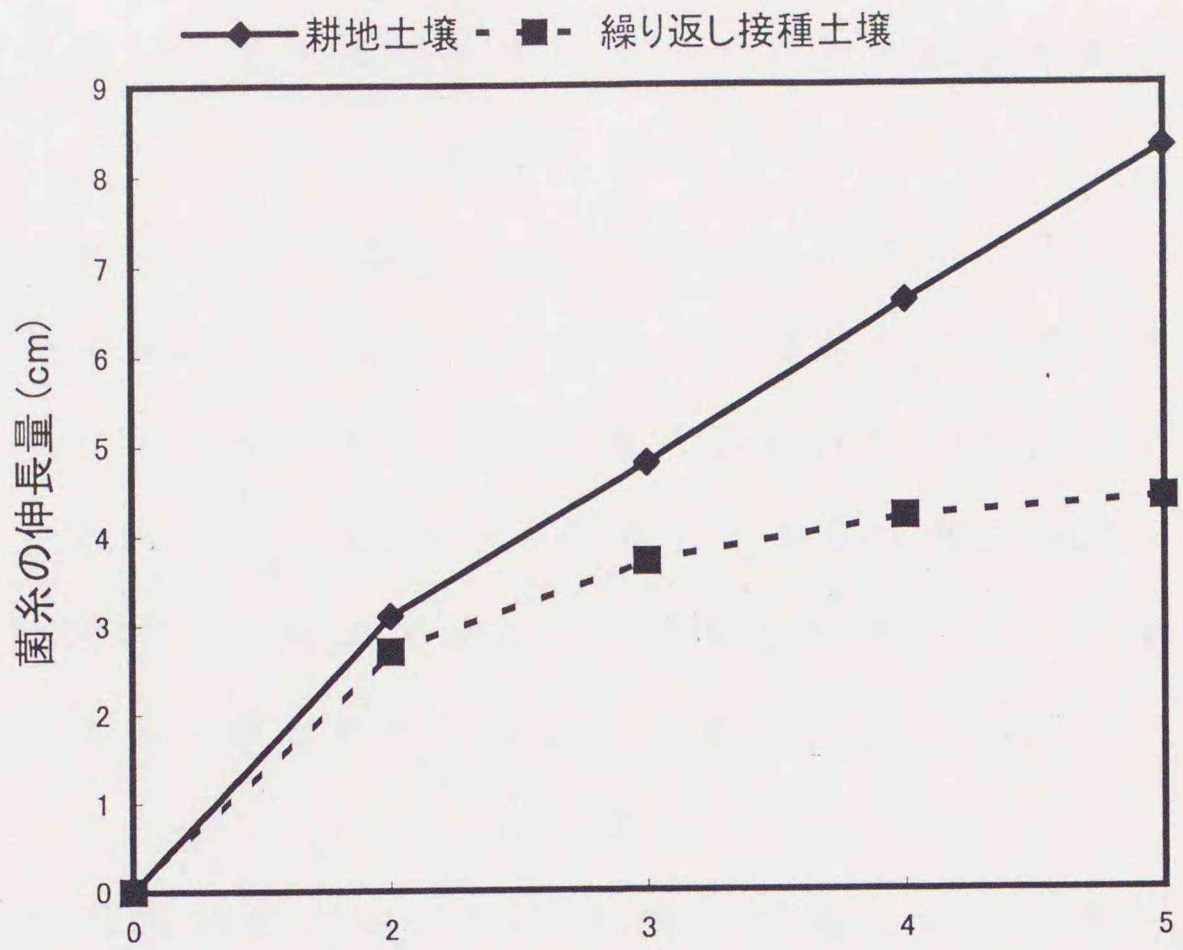


図21　耕地土壌および繰り返し接種土壌中における
Rhizoctonia solani 菌糸の生育量
最小有意差＝0.50。

(3) 繰り返し接種土壌の発病抑制効果の菌糸融合群特異性

材料と方法

R. solani AG2-2-IV の Rh509 と AG4 の Pf60 を北農試（羊ヶ丘）の耕地土壌に 5 回繰り返し接種し，発病抑止土壌を作成した。この土壌に対する菌糸融合群特異性の有無を明らかにするために，AG2-2-IV で作成した抑止土壌に AG4 を，AG4 で作成した抑止土壌に AG2-2-IV を接種し，テンサイを播種し苗立枯病の発生程度を調査した。

結　果

異なる菌糸融合群（AG）の菌株を繰り返し接種して作成した抑止土壌に対しても，抑止性は菌糸融合群による差はみられなかった（表 17）。

(4) 土壌中の抑止因子の増殖性の検討

材料と方法

Pf-28 培養菌体を 5 回繰り返し接種した土壌を北農試（芽室）の耕地土壌で 1 % (v/v)に希釈し，25 ℃で 3 週間前培養した。その時、希釈した土壌に繰り返し接種土壌に用いたものと同じ Pf-28 培養菌体を 10 % 濃度 (v/v)で添加した区および無添加区を設けた。さらに対照の一つとして，無処理の耕地土壌に Pf-28 培養菌体のみを 10 % 濃度（v/v)で添加した区を設けた。培養後にテンサイを播種し苗立枯病の発生程度により抑止性の有無を調査した。

結　果

表17　繰り返し接種土壌の菌糸融合群特異性の有無

	発病抑制試験に用いた菌株	
繰り返し接種に用いた菌株	Rh509	Pf60
Rh509 (AG2-2)	34.8	34.1
Pf60 (AG4)	39.9	69.6
耕地土壌	95.6	97.1

注)数値は，苗立枯度。

予備試験では，苗立枯病の発生程度は，繰り返し接種土壌を5％以下に希釈すると，無接種の耕地土壌との有意差が無く，抑止性も認められなくなった（図 22）。本試験においても1％に希釈したときには抑止性がみられなかった（図 23）。しかし，これに R. solani の菌体を加え 25℃で3週間前培養した後には，苗立枯度が 25.0 となり，前培養しない土壌の 75.0 に比べ抑止性が高まった。一方，耕地土壌に生菌体のみを混合した場合にも苗立枯度が 47.4 と低く，抑止性が認められたが，その抑制程度は繰り返し接種土壌と生菌体を加えた場合に比べて明らかに低かった。

(5) 土壌中の抑止因子の熱感受性の検討

材料と方法

繰り返し接種土壌の抑止性が消失する温度を明らかにするために，土壌を 40℃～ 60℃で 30 分間の通気蒸気処理あるいは，121℃ 30 分間の高圧蒸気滅菌を行ったのち，苗立枯病の発生程度を調査した。処理土壌は 4℃で保存し，処理 5 日目にテンサイ播種し，2 週間後まで苗立枯病の発生を調査した。

結　果

苗立枯病に対する抑止性は 43～ 52℃の通気蒸気処理によって弱まり，55℃でほぼ消失した(表 18)。発病試験前の糸状菌数は 52℃以上で減少したが，細菌数は 60℃まで無処理と差がなかった。

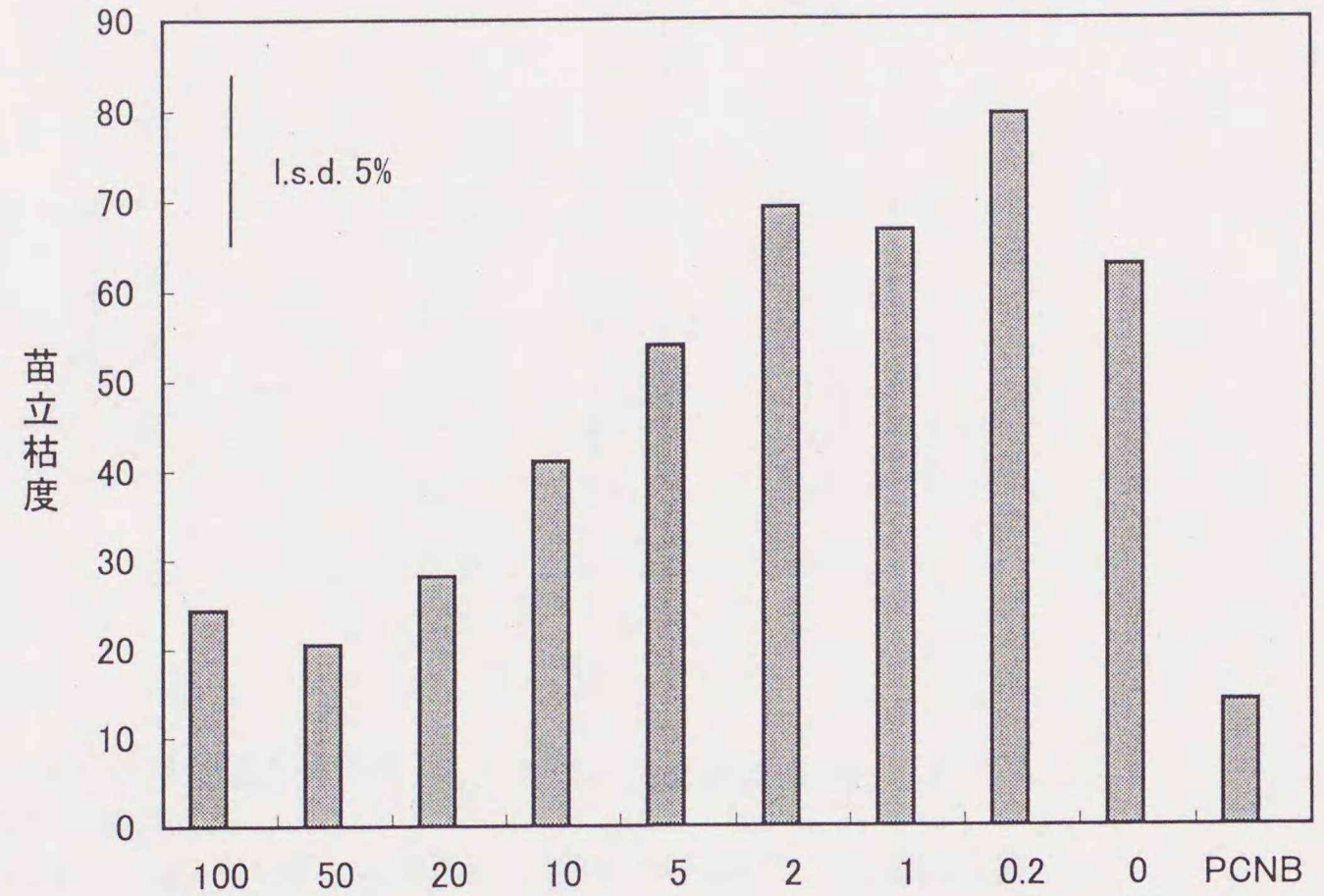


図22　繰り返し接種土壌を耕地土壌で希釈したときの苗立枯病抑制効果の変化
Rhizoctonia solaniは，1%濃度(v／v)で接種した

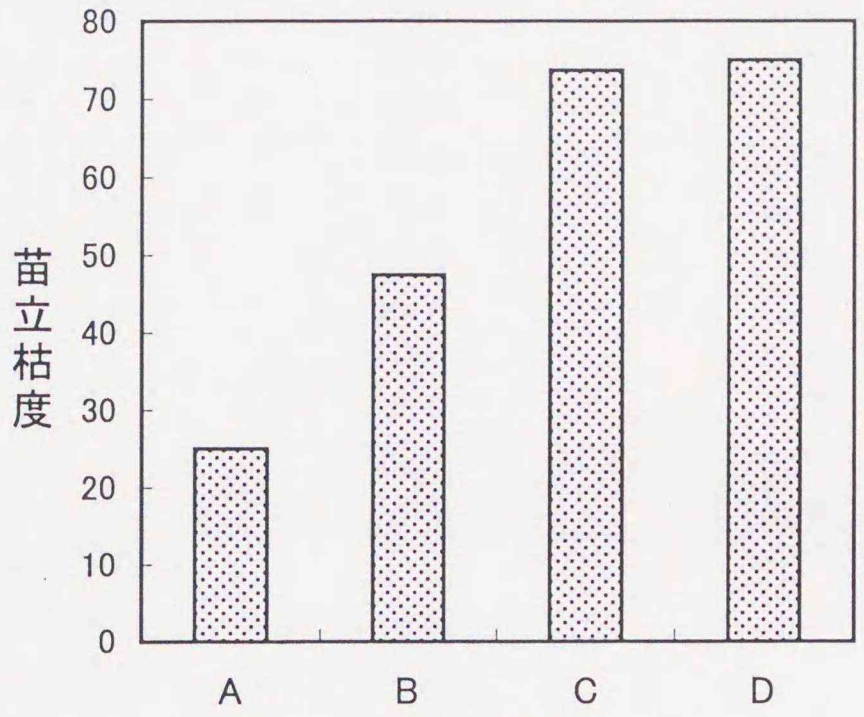


図23　繰り返し接種土壌を少量混合した土壌のRhizoctonia solani AG2-2 による
苗立枯病発生程度
A:繰り返し接種土壌1%とR. solani 培養生菌体10%を混合し3週間前培養,
B:繰り返し接種土壌1%とR. solani 死菌体10%を混合を混合, C:繰り返し接種土壌1%を混合,
D:無処理耕地土壌
最小有意差(5%)＝13.6

表18 Rhizoctonia solani AG2-2 による繰り返し接種土壌の熱処理による苗立枯病発生程度および微生物数の変動

処　理	苗立枯度[1)]	糸状菌数(log cfu g^{-1})[2)]	細菌数(log cfu g^{-1})[3)]
無処理繰り返し接種土壌	60.3	3.95	7.26
40°C	60.3	3.92	7.15
43°C	68.6	4.15	7.34
46°C	68.6	3.82	7.26
49°C	78.9	3.48	6.88
52°C	80.8	2.86	6.80
55°C	90.4	2.20	7.20
60°C	91.7	0.00	7.00
121°C	85.3	0.00	0.00
耕地土壌	82.7	4.08	6.88
l.s.d.(5%)	16.3	0.78	0.25

1)数値は6反復の平均値

2)数値は3反復の平均値。 0は，10^2未満を示す。

3)数値は3反復の平均値。 0は，10^3未満を示す。

(6)ベノミル処理が抑止性に及ぼす影響

a 培地上での菌寄生菌のベノミル感受性の調査

材料と方法

担子菌に対する菌寄生菌で抑止土壌の抑止要因とされる Trichoderma 属（Chet and Baker, 1981）の菌株（表 16），Gliocladium 属（Jagar and Velvis, 1983）の菌株，Verticillium 属の菌株についてベノミル感受性を調査した。PDA にベノミル水和剤を所定濃度(w/v)になるように加え，直径 9cm のペトリ皿に分注した。これに，あらかじめ 7 日間前培養した供試菌の径 7 mm の含菌寒天を置床して，25 ℃で培養した。5 日後，菌糸の生育量を測定した。

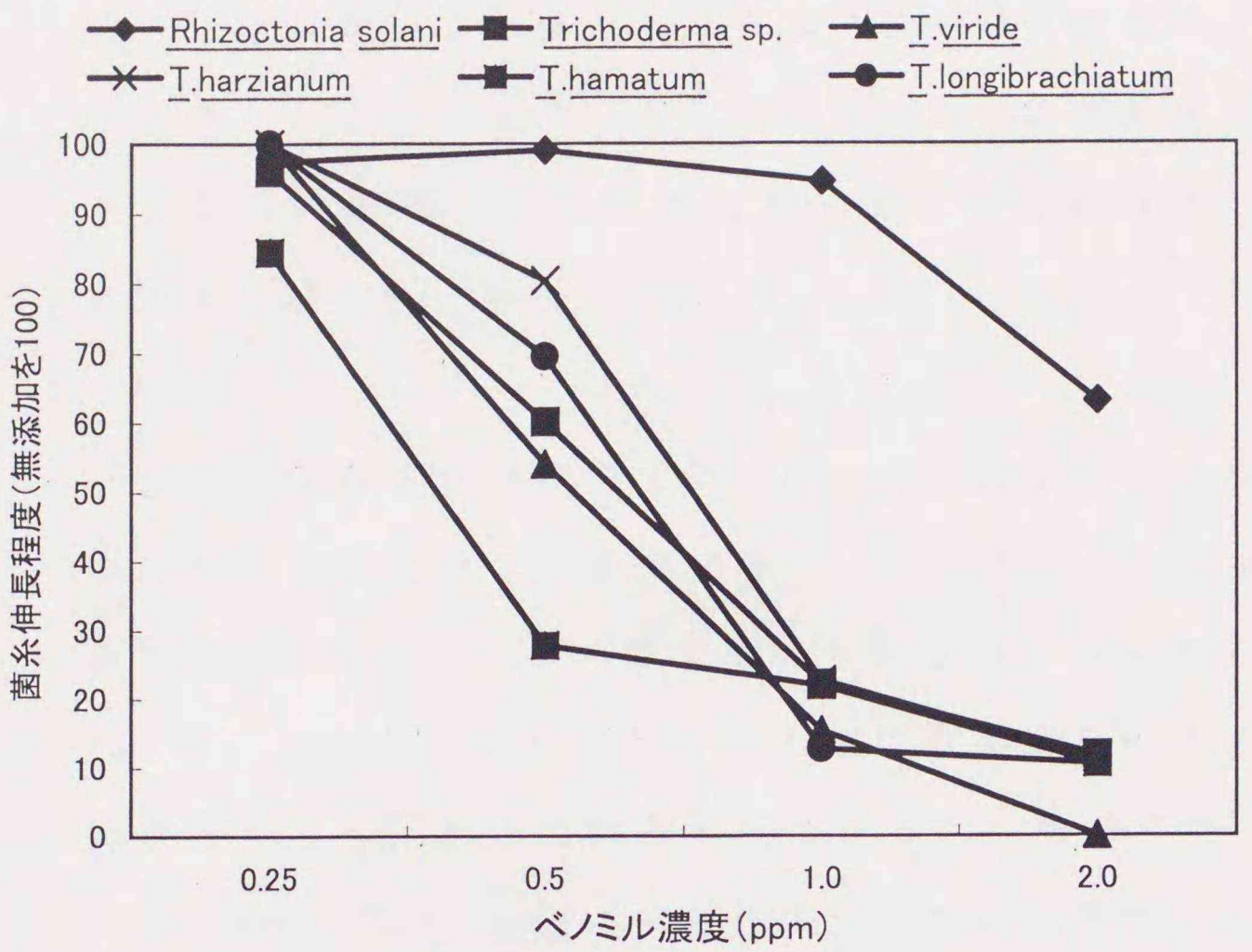
結　果

Trichoderma 属菌，Gliocladium 属菌，Verticillium 属菌の生育量は，ベノミル剤 2 ppm を添加した PDA 平板上において無添加の 20 % 以下となり，生育が強く抑制された（図 24）。一方，R. solani に対する抑制程度は 70 % 程度であった。

b 苗立枯の発生程度による測定

材料と方法

繰り返し接種した土壌にベノミル水和剤を 50 ～ 200 ppm 濃度で混合し，苗立枯病の発生程度を指標として抑止性への影響を調べた。同時に，R. solani によるテンサイ苗立枯病に抑制効果のある Trichoderma sp. HT87 株（表 16)をふすま，バーミキュライトおよび Czapek-Dox 液体培地を容積



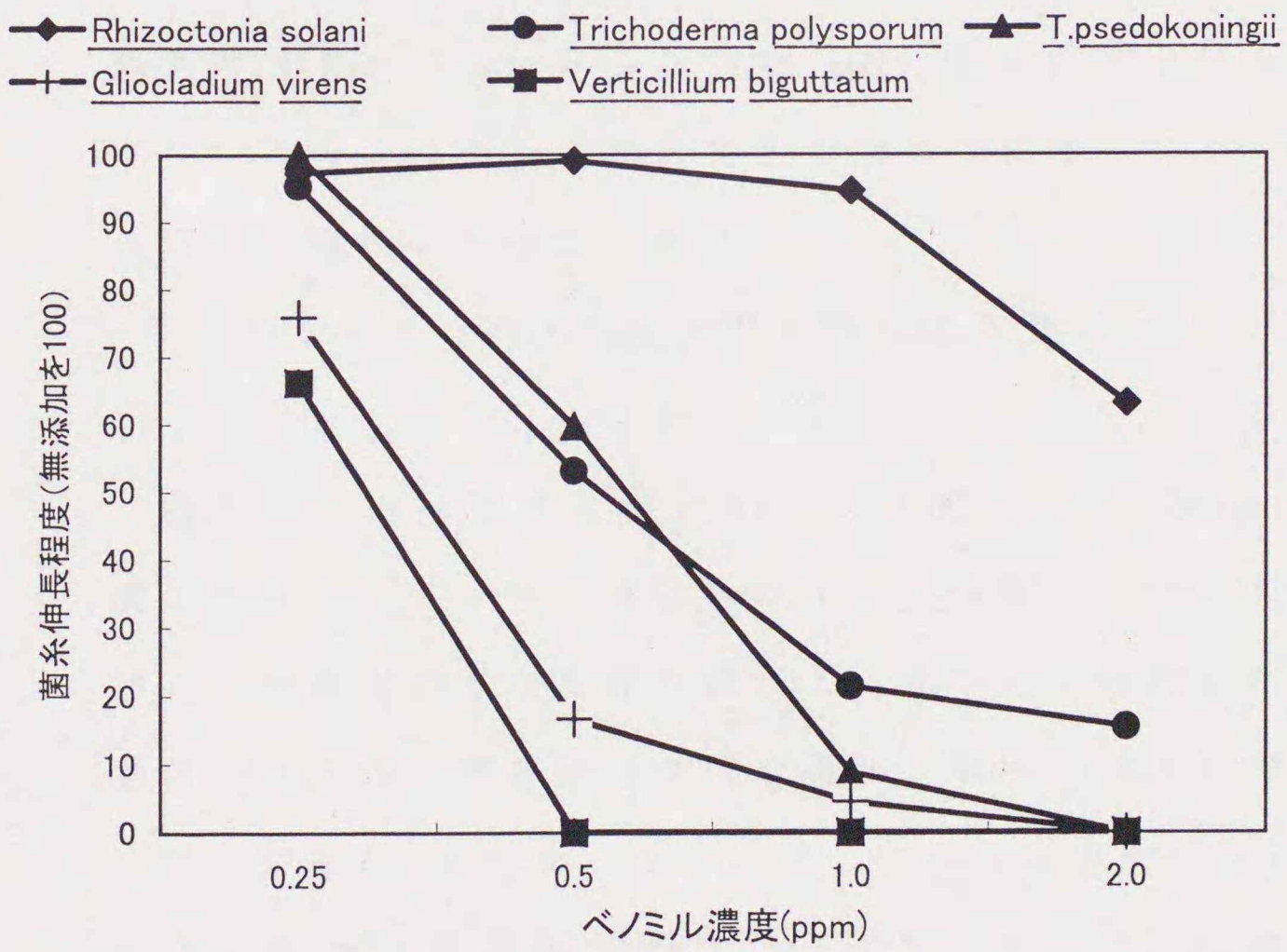


図24 Trichoderma 属菌株, Gliocladium 属菌株, Verticillium 属菌株のベノミルを添加した培地上での菌糸の生育量の比較

比で 3:3:1 に混合した培地（以下ふすま・バーミキュライト培地とする）に 25 ℃，3 日間培養した。培養菌体を 5 % 濃度（v/v)で耕地土壌に混合し，土壌中でのベノミルに対する感受性を調査した。

結　果

Trichoderma sp. HT87 株のふすま・バーミキュライト培地での培養菌体を混合した耕地土壌に，ベノミルを 150 ppm 濃度(w/v)で添加すると，苗立枯病の抑制効果が減少した(図 25)。しかし，繰り返し接種土壌に同濃度のベノミルを混合しても，抑止性は変化しなかった。処理濃度 200 ～ 250 ppm では R. solani の病原性にも影響が見られ，それ以上の濃度での試験は不可能であった。細菌に抑制効果のあるストレプトマイシン 4000 ppm，オキシテトラサイクリン 1000 ppm や他の糸状菌用殺菌剤は添加しても，抑止性に影響がなかった（表 19）。

c テンサイ種子への R. solani 着生程度による測定

材料と方法

繰り返し接種土壌にベノミル水和剤を 50 ～ 200ppm 濃度で混合し，テンサイ種子への Rhizoctonia 菌糸の着生を指標として抑止性への影響を調べた。繰り返し接種した土壌にベノミルを所定濃度で混合後，これを径 9cm のペトリ皿に詰めた。テンサイ種子を埋めてから蒸留水を加え，水分を約 35 % に調節し 25 ℃で 2 日間培養した。処理後に種子を水道水で十分に洗浄してから Rhizoctonia 菌の選択培地（Ko and Hora, 1971）に置床し，25 ℃で 2 日間静置後に

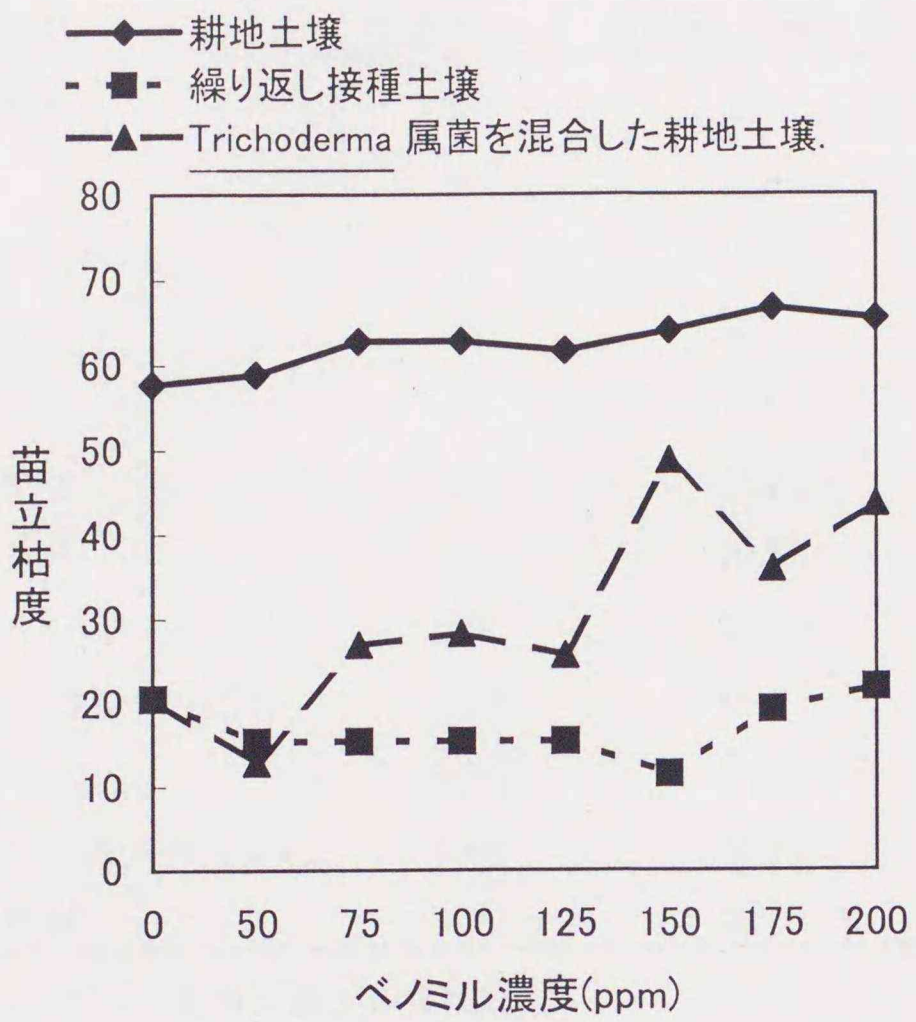


図25　耕地土壌，繰り返し接種土壌，Trichoderma 属菌を混合した耕地土壌にRhizoctonia solani AG2-2 を接種した場合の苗立枯度に及ぼすベノミルの影響
最小有意差(5%)＝18.9

表19　薬剤の混合による土壌の抑止性への影響

薬剤名	土壌中への処理濃度(ppm)	苗立枯度 繰り返し接種土壌	苗立枯度 耕地土壌
ホセチル	200	5.1	83.3
	300	12.8	39.8
ポリオキシン	10	15.4	29.5
トリアジン	25	5.1	61.6
	50	7.7	29.5
TPN	25	17.9	34.6
	50	10.3	21.8
ビテルタノール	100[1)]	25.7	80.8
ストレプトマイシン	4000	15.4	70.5
	5000	9.0	52.6
オキシテトラサイクリン	1000	10.3	57.7
無処理		16.7	75.7

1)テンサイに生育阻害がみられた。

Rhizoctonia 属菌糸の出現した種子の割合を調査した。苗立枯病を指標とした場合と同様に，Trichoderma sp. HT87 株の培養菌体の混合土壌についても調査した。

結　果

テンサイ種子への R. solani 菌糸の着生を指標として行ったところ，繰り返し接種土壌ではベノミル 150ppm まで無添加と差が認められなかった（図 26）。一方，Trichoderma sp. HT87 株の培養菌体を混合した土壌では，100ppm でベノミル無添加より着生率が増加し，R. solani に対する抑止性が減少した。150ppm 以上では，耕地土壌でも R. solani の着生率が減少したことから，本菌の生育に影響したものと考えられた。

考　察

R. solani 生菌体の繰り返し接種によって誘導されたテンサイ苗立枯病抑止性の因子は，活発に生育している R. solani 菌糸に対して有効で，生きた同菌を基質として増殖する生物性のものであると考えられた。また，抑止性は 46 ～ 49 ℃の通気蒸気処理によって弱まり，55 ℃ 30 分処理でほぼ消失した。60 ℃ 30 分処理で抑止性が失活する場合は，耐熱性の芽胞を形成する細菌や放線菌の可能性は低いものとされている（Cook and Baker, 1983）。また，多くの土壌糸状菌は 54 ～ 60 ℃で死滅し（Baker, 1962），Pseudomonas 属細菌は 60 ℃ 30 分処理で死滅する（Cook and Baker, 1983）。本試験においては，糸状菌数は 49 ℃以上で

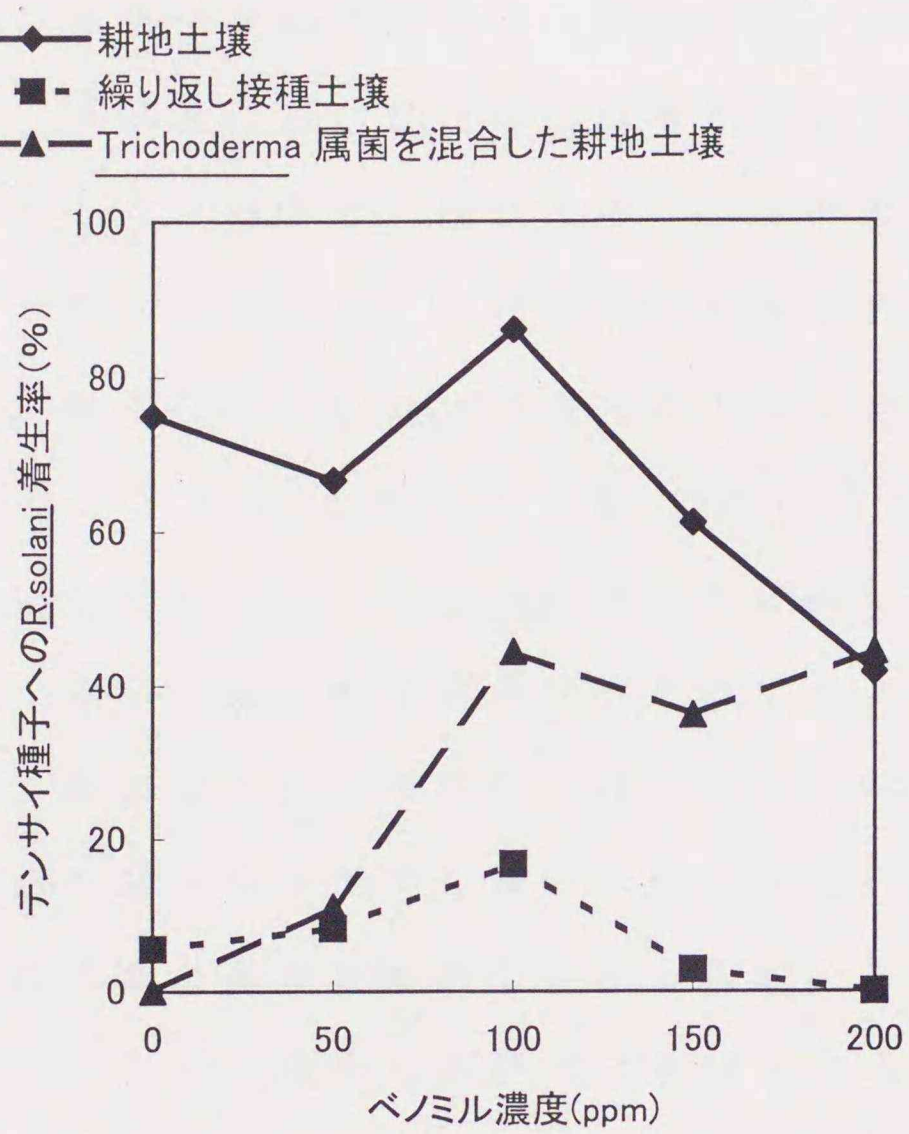


図26　耕地土壌，繰り返し接種土壌，およびTrichoderma 属菌を混合した耕地土培養したテンサイ種子へのRhizoctonia solani の着生率に及ぼすベノミルの影響
すべての処理土壌にR. solani AG2-2-IV培養菌体を1%(w/w)濃度で接種した
最小有意差(5%)＝16.7

減少し，細菌数は 60 ℃まで無処理と差が見られなかった。これらのことから，本試験における抑止因子が，耐熱性の細菌や放線菌である可能性は低いと考えられた。また、本試験に用いた土壌には蛍光物質を産生する細菌数が少なく，繰り返し接種土壌は抗生物質に対しても感受性が低いことから，その関与の可能性も低いと考えられた。筆者らは，R. solani 菌体の繰り返し接種によって誘導された本抑止土壌から，R. solani に寄生能力のある Trichoderma 属菌および Verticillium 属菌を分離した。繰り返し接種土壌にこれらの菌が感受性を示すベノミルを混合しても，抑止性の低下が認められなかったことから，これらの菌の関与の可能性も低いものと考えられた。また，抑止性に菌糸融合群特異性がみられなかたことから，菌糸融合によって移行し病原性に影響を与える dsRNA のような因子（Castanho ら，1978）による可能性も低いと思われた。

以上のことから、本試験に用いられた繰り返し接種土壌の主な抑止要因は，ベノミルに非感受性でかつ熱感受性であり，これまで R. solani に対する抑止土壌の抑止要因としては知られていない微生物である可能性が示唆された。

B．*Verticillium biguttatum* を用いた *Rhizoctonia solani* AG2-2-IV によるテンサイ苗立枯病および根腐病の生物的防除

前項の試験で *R. solani* AG2-2-IV を繰り返し接種した耕地土壌から，菌寄生性の *Verticillium* 属菌を分離した。本菌を用いたテンサイ苗立枯病および根腐病の生物的防除法の開発に資するため，抑制効果の高い菌株の選抜，室内および圃場での発病抑制試験，培地上での *R. solani* との交互作用の観察などを行った。

1．テンサイ苗立枯病に対する抑制効果

材料と方法

(1)供試菌株

R. solani AG2-2-IV として，北海道恵庭市のテンサイ根から分離された Pf-28 株（表 16）を用いた。また，*Verticillium* 属菌は，北農試（羊ヶ丘）および北農試（芽室）耕地土壌（いずれも植壌土，pH 5.5 および pH 5.8）に Pf-28 株菌体を 5 回繰り返し接種することによって誘導された苗立枯病抑止土壌（Ⅳ．A.で作製されたもの）から，*R. solani* の菌叢を用いた希釈平板法（Morris ら,1994）によって分離した 23 菌株を用いた。なお，これら 23 菌株の内訳は，北農試（羊ヶ丘）分離株が 19 株（HV1 ～ HV13, HV15 ～ HV20），北農試（芽室）分離株が 4 株（MV1 ～ MV4）である。

(2)接種源の培養法

Verticillium 属菌は，ふすま・バーミキュライト培地に 25℃，2週間培養し，接種源として用いた。なお，接種源の菌濃度は、0.1％素寒天（WA）30 ml に培養菌体 1 g を懸濁し，約 130 rpm，30 分間振とう後，PDA を用いた希釈平板法により測定した。また，R. solani は，エンバク粒培地で 25℃，約 2 週間培養した菌体を 20℃で 1 晩通風乾燥後，粉砕器で粉砕し，さらに 1 mm のふるいを通したものを接種に用いた。

(3)発病抑制効果の検定法

北農試（羊ヶ丘）の耕地土壌に，R. solani の培養菌体を 1％（v/v）の濃度で接種し，さらに Pythium および Aphanomyces による病害の発生を予防するために fenaminosulf を 0.7 g/l 混和処理した後，Verticillium 属菌の培養菌体を 1％（v/v）濃度で接種した。これらの土壌を径 9cm の素焼鉢にそれぞれ詰め，テンサイ種子（品種：モノエースＳ）を 1 鉢当たり 13 粒播種した。1 区 3 鉢を用いて温室内で栽培し，播種 2 週間後に苗立枯病の発生程度を調査して苗立枯度を算出した。

Verticillium 属菌の接種菌量と苗立枯病抑制効果の比較には，R. solani の培養菌体を 0.5％（v/v）の濃度で接種した。また，Verticillium 属菌としては HV8 と HV10 の 2 菌株を用い，それぞれ 1，2 および 5％（v/v）の濃度で培養菌体を接種した。

Verticillium 属菌の HV10 株を用い，分生子の種子コーティングと上記の培養菌体の土壌施用の効果の比較をし

た。分生子は，9cmペトリ皿に分注した麦芽エキス寒天培地（MPA，表7）で25℃で19日間培養後，ペトリ皿に蒸留水を10ml入れ，筆でかき取ったものを100メッシュのふるいで濾過し，遠心で濃縮したものを種子に粉衣し室温で風乾して用いた。

結　果

Verticillium 属菌の供試23菌株の間で発病抑制程度に差異が認められ，HV3，4，5，7，8，9，10，11，12，13，16，17，18，20，MV1～4の計18菌株は無処理区に比べて苗立枯病の発生が有意に少なかった（図27）。

また，Verticillium 属菌の接種菌量と苗立枯病抑制効果の比較をするために Verticillium 属菌 HV8株と HV10株の培養菌体（HV8は 1.7×10^{6} cfu/生重g，HV10は 9.7×10^{5} cfu/生重g）を R. solani 接種土壌に1，2および5％の濃度で接種したところ，いずれの濃度においても無処理区に比べ苗立枯病が少なく，Verticillium 属菌の接種菌量が増加するにつれて，発病抑制効果が高まる傾向が認められた（図28）。とくに，両菌株とも5％濃度区では対照薬剤の PCNB（40 ppm）区と同等の抑制効果が認められた。

一方，Verticillium 属菌の種子コーティングでは，種子1粒あたり 3.8×10^{6}cfu の量の付着があったが，抑制効果は認められなかった（図29）。

2．テンサイ根腐病に対する抑制効果

(1)室内試験

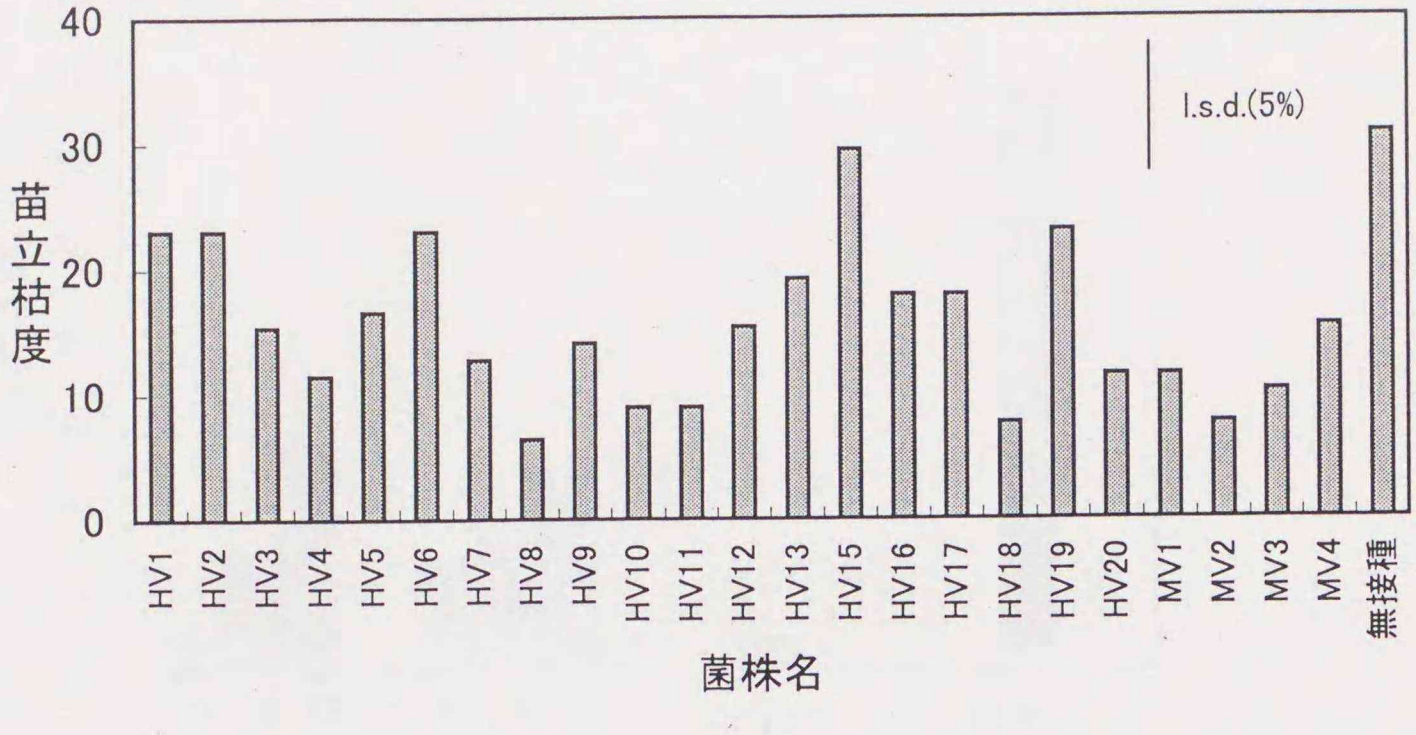


図27　菌寄生性Verticillium 属菌のRhizoctonia solani AG2-2による苗立枯病の抑制効果

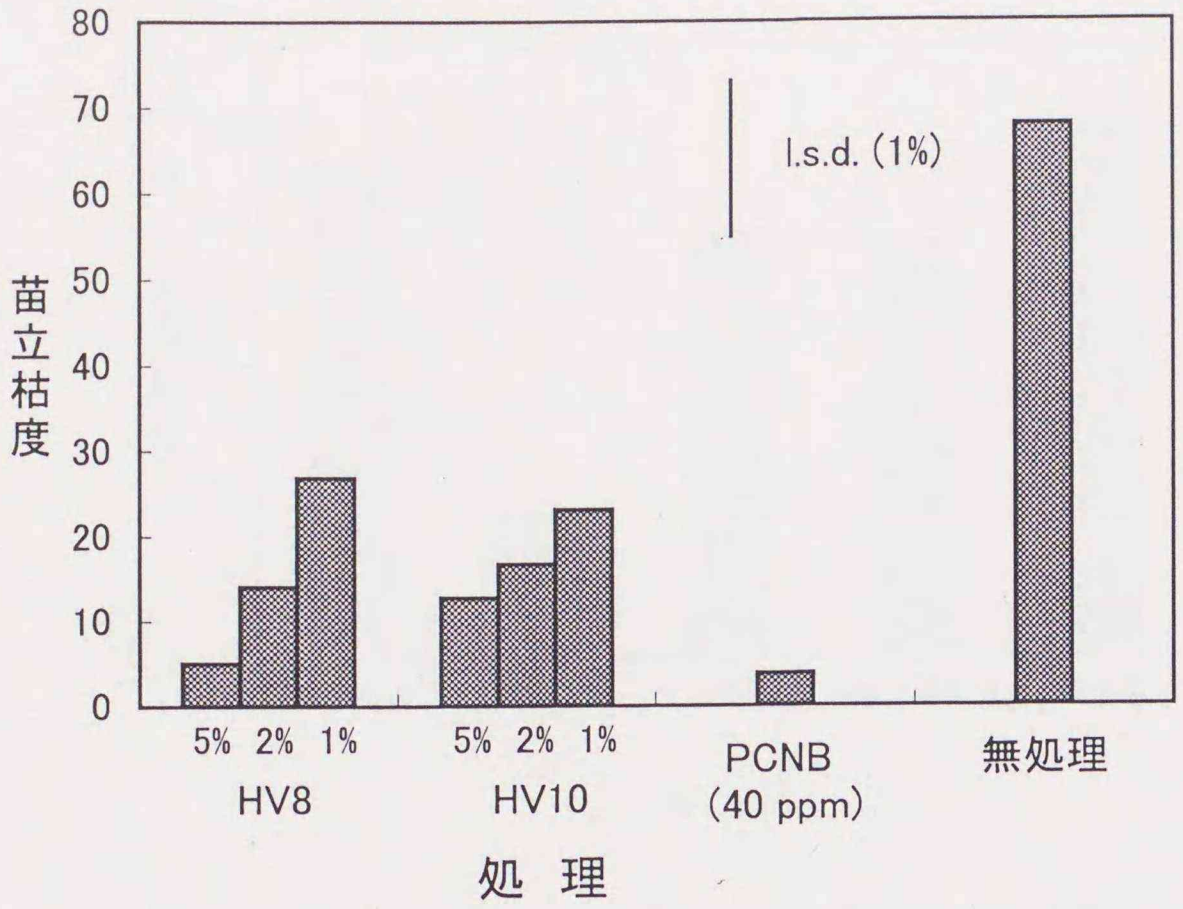


図28 Verticillium属菌の接種菌量と苗立枯病抑制効果の比較

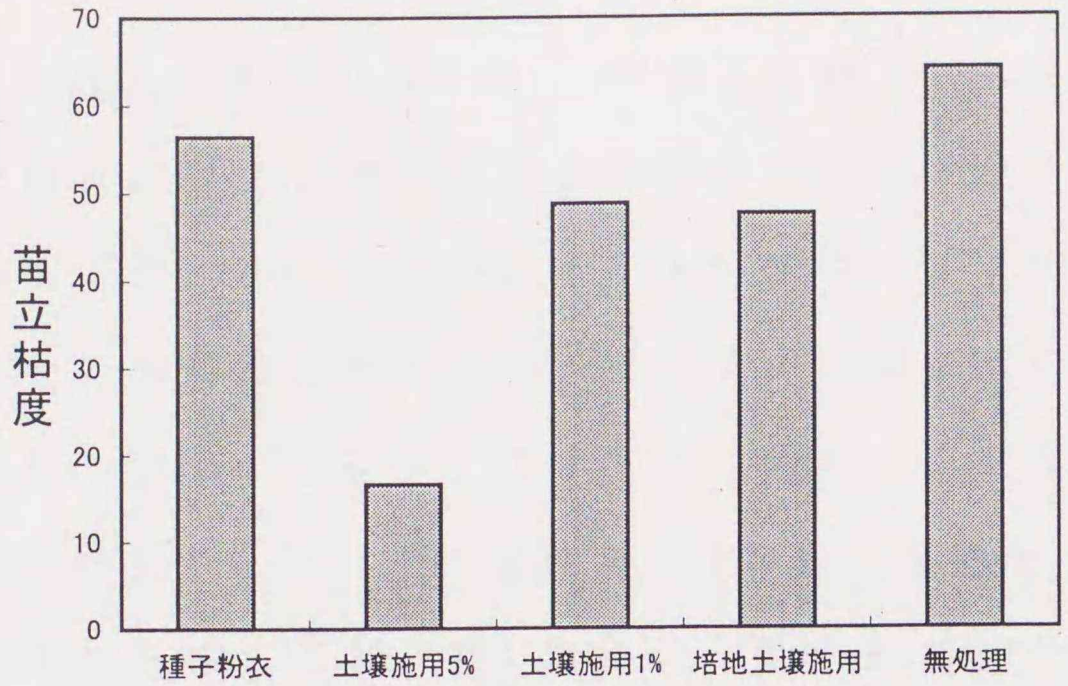


図29　Verticillium属菌の種子粉衣と土壌混合による抑制効果の比較
培地土壌施用は，Verticillium属菌の培養に用いる培地を5%(v/v)濃度で混合した
最小有意差(5%)は，15.6

材料と方法

Verticillium 属菌の HV8 株，HV9 株，10 株，17 株を用いて，根腐病に対する抑制効果を温室内でポット栽培によって調査した。6 L 容のプラスチック製ポットに北農試（羊ヶ丘）の耕地土壌を詰め，テンサイの育苗用の肥料を混合後，1 ポットあたり 2 個体ずつテンサイを栽培し，合計 5 ポットを用いた。播種 3 カ月後に Verticillium 属菌の培養菌体を株元に 10ml ずつ施用し，翌日 R. solani Pf-28 のエンバク粒培養菌体を 10 粒ずつ株元に接種した。接種後 28 日目に北海道農試てん菜部根腐病調査基準（北海道てん菜技術推進協会，1981）に準じて根部の発病調査を行い，発病指数の平均値を算出した。

結　果

供試した 4 菌株のうち 3 菌株で抑制効果が認められ（表 20，図 30），苗立枯病に効果のあった 4 菌株の内 HV8，HV10 および HV17 は，根腐病も抑制することができることが明らかとなった。これら 3 菌株の内，HV8 株および HV10 株を以下の圃場試験に用いることにした。

(2) 圃場試験

材料と方法

1996 年に北農試（羊ヶ丘）圃場で Verticillium 属菌の HV8 株と HV10 株の根腐病に対する抑制効果を調査した。テンサイ品種「モノエース S」を 4 月 15 日に播種，5 月 27 日に定植した。試験区は 1 区 8.25 m^2，3 反復で行い，肥料

表20　温室内ポット試験におけるVerticillium 属菌株元接種による根腐病の抑制効果の比較

処　理	発病指数[1)]
HV8	0.7
HV9	1.6
HV10	1.2
HV17	0.5
培地[2)]	2.7
無処理	3.0
薬剤[3)]	0.0
l.s.d.(5%)	1.5

1)北海道農試てん菜部根腐病発病調査基準による発病指数。健全:0～枯死:5までの6段階で調査した。
2)Verticillium属菌を培養するのに用いた培地を施用した。
3)トクルロホスメチル水和剤500倍液を1株当たり10ml灌注。



図30　Verticillium属菌によるポット試験での根腐病抑制効果
（株元接種）
上段から，HV8菌株，HV10菌株の接種区，培地施用区，
無処理区の発病程度

は 10a あたり N: 15kg, P_2O_5: 25kg, K_2O: 15kg を作畦時に施用した。病害虫の防除薬剤は，殺虫剤のみ散布した。Verticillium 属菌による土壌処理の方法としては，1)培養菌体を播種前の育苗土に 3 %(v/v)混合（育苗土処理），2)移植時に培養菌体 20 ml を植穴土壌に施用（植穴処理），3)R. solani Pf-28 の接種前日に培養菌体をテンサイの株元土壌に施用（株元処理），4)以上の 3 処理をすべて行う（3 回処理）の 4 方法を用いた。R. solani の接種は，7 月 9 日にエンバク粒で培養したもの 10 粒をテンサイの各株元土壌に処理することによって行った。発病調査は 9 月 19 日に行い，室内試験と同様に北海道農試てん菜部根腐病調査基準（北海道てん菜技術推進協会,1981）に準じて発病度（発病度=〔Σ（当該指数×当該個体数）／（調査個体数×最大指数）〕×100）を算出した。

結　果

無処理対照区では植物体のほぼ全株が発病し，その内の約 1/3 の株が枯死するかまたは病斑が地下部の 67 %以上に拡がる激しい症状を示し，発病度は 70 となった。このような激発条件下においても，Verticillium 属菌の HV10 株による育苗土処理区，HV8 株による植穴処理区と株元処理区，および両菌株による 3 回処理区では，根腐病の発生程度が無処理対照区と比べて有意に低く，明らかな抑制効果が認められた(図 31)。特に，両菌株による 3 回処理区は，慣行防除のトルクロホスメチル(1000ppm)の株元灌注処理と同等の抑制効果が認められた。

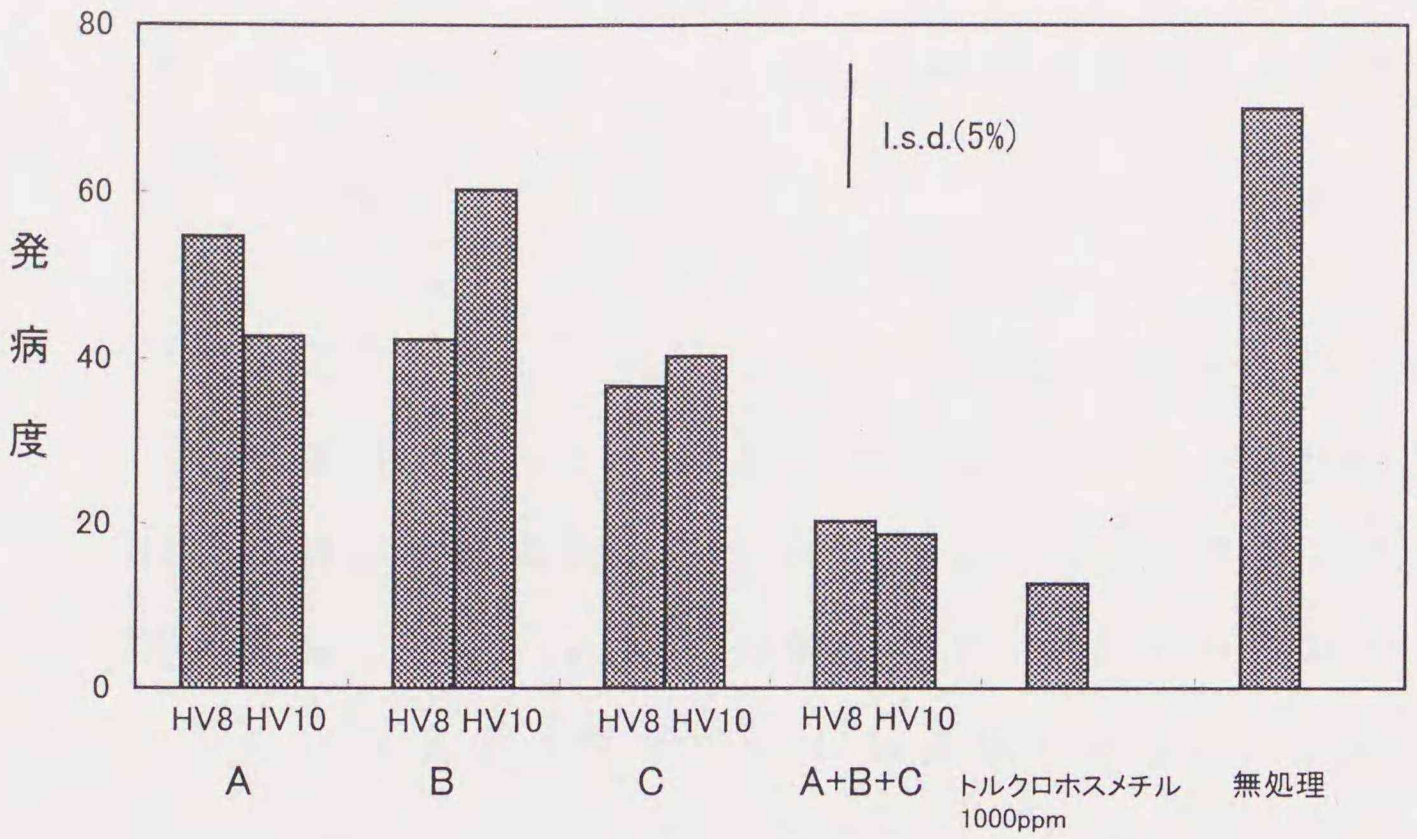


図31　Verticillium属菌によるテンサイ根腐病の発病抑制効果
（A：育苗土処理，B：植穴処理，C：株元処理）
HV8およびHV10は，Verticillium属菌の菌株名
トルクロホスメチル1000ppmは，薬剤対照区として，10a当たり200Lの割合で株元散布した

3．テンサイ種子への R. solani 菌糸の寄生に対する抑制効果

材料と方法

北農試（芽室）の耕地土壌に，R. solani AG2-2-IV の Pf-28 の培養菌体を 1％（v/v）の濃度で接種した後，Verticillium 属菌 HV8 株の培養菌体を 5％および 1％（v/v）の濃度でそれぞれ接種した。これらの土壌を径 9cm の素焼鉢に詰め，テンサイ種子を 1 鉢当たり 12 粒播種した後，ガラス温室に置いた。3 日後に種子を回収し，水道水で十分に洗浄後，R. solani の選択培地（Ko and Hora, 1971）に置床した。25℃で 2 日間培養後，光学顕微鏡下で種子からの Rhizoctonia 菌糸の出現率を調査した。

結果

テンサイ種子への R. solani の寄生は，Verticillium 属菌の接種濃度が高いほど抑制された（図 32）。特に Verticillium 属菌の接種濃度が 5％のときは，PCNB の土壌混合処理（40 ppm）と同等の抑制効果が認められた。

4．培地上での R. solani 菌糸に対する寄生性

材料と方法

WA で 25℃，3 日間培養した R. solani AG2-2-IV の菌叢上に，Verticillium 属菌 23 菌株の分生子懸濁液（約 10^3 cfu/ml）をそれぞれ 0.5 ml 塗布した。塗布 2～4 日後に，R. solani 菌糸への Verticillium 属菌の寄生の過程をラクトフェノール・コッ

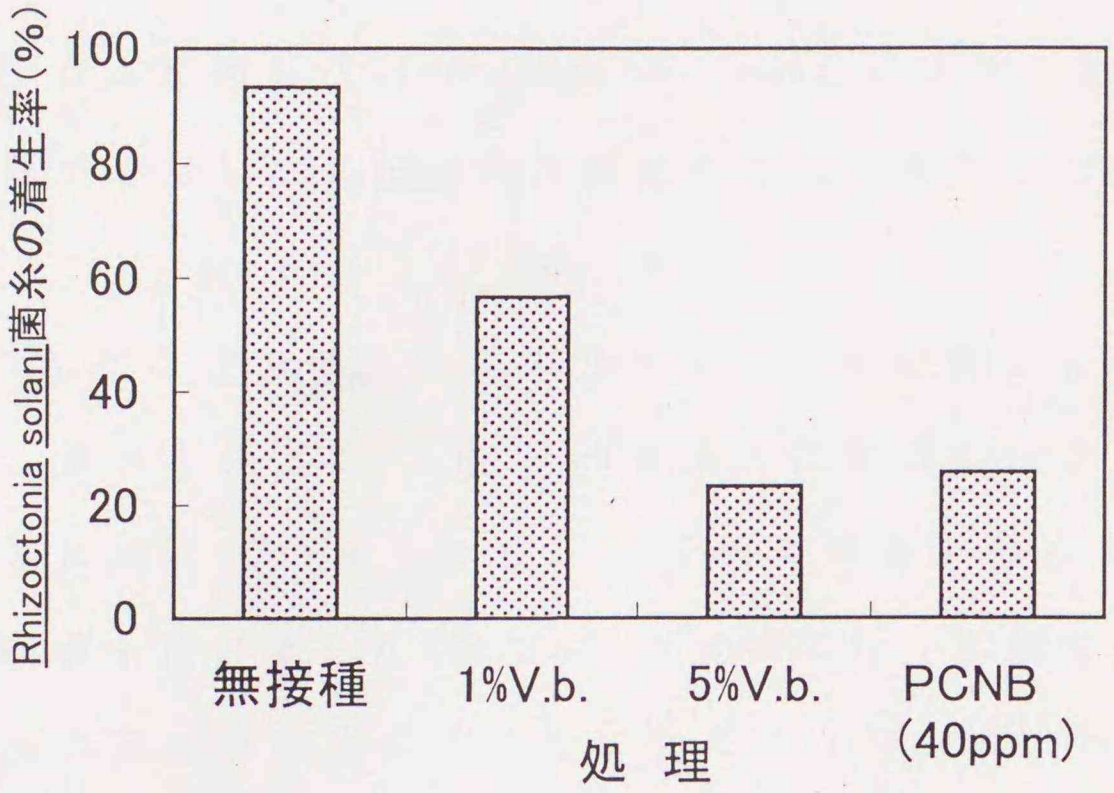


図32 Verticillium属菌HV8株によるRhizoctonia solani AG2-2 のテンサイ種子への着生に対する抑制効果

トンブルーで染色し，光学顕微鏡観察により調査した。また，2-(p-ヨードフェニル)-3-(p-ニトロフェニル)-5-フェニルテトラゾリウムクロライド(INT)を用いたテトラゾリウム塩還元法（Zimmerman ら，1978）により，Verticillium 属菌が着生した R. solani 菌糸細胞の生死も調査した。

結　果

WA 上の Verticillium 属菌の分生子は，接種翌日には発芽し，菌糸を伸ばして R. solani の菌糸に接近し，さらに同菌糸に沿って生育した後，かぎ状の菌糸を形成して R. solani 菌糸に付着した(図 33A)。3 日後には，本菌菌糸が R. solani の菌糸細胞内に侵入している様子が観察された(図 33B)。R. solani 菌糸へのこのような着生の過程は，Verticillium 属菌の全ての供試株で確認され，また各菌株による着生程度にも差異は認められなかった。また，Verticillium 属菌が着生している R. solani の菌糸細胞内に INT 染色による赤色色素の沈着が高い頻度で観察されたことから，本菌は生きた細胞に寄生したことが示された（図 33A)。しかし，すでに侵入を受けていた R. solani の菌糸細胞は色素の沈着がほとんど見られず，細胞質を失って空洞化して，すでに死滅していた(図 33B)。

5．Verticillium 属菌の形態と生育温度

材料と方法

Verticillium 属菌 23 菌株の内，苗立枯病に対する抑制効果が高かった HV8 株と HV10 株について，PDA 上で 25 ℃，7

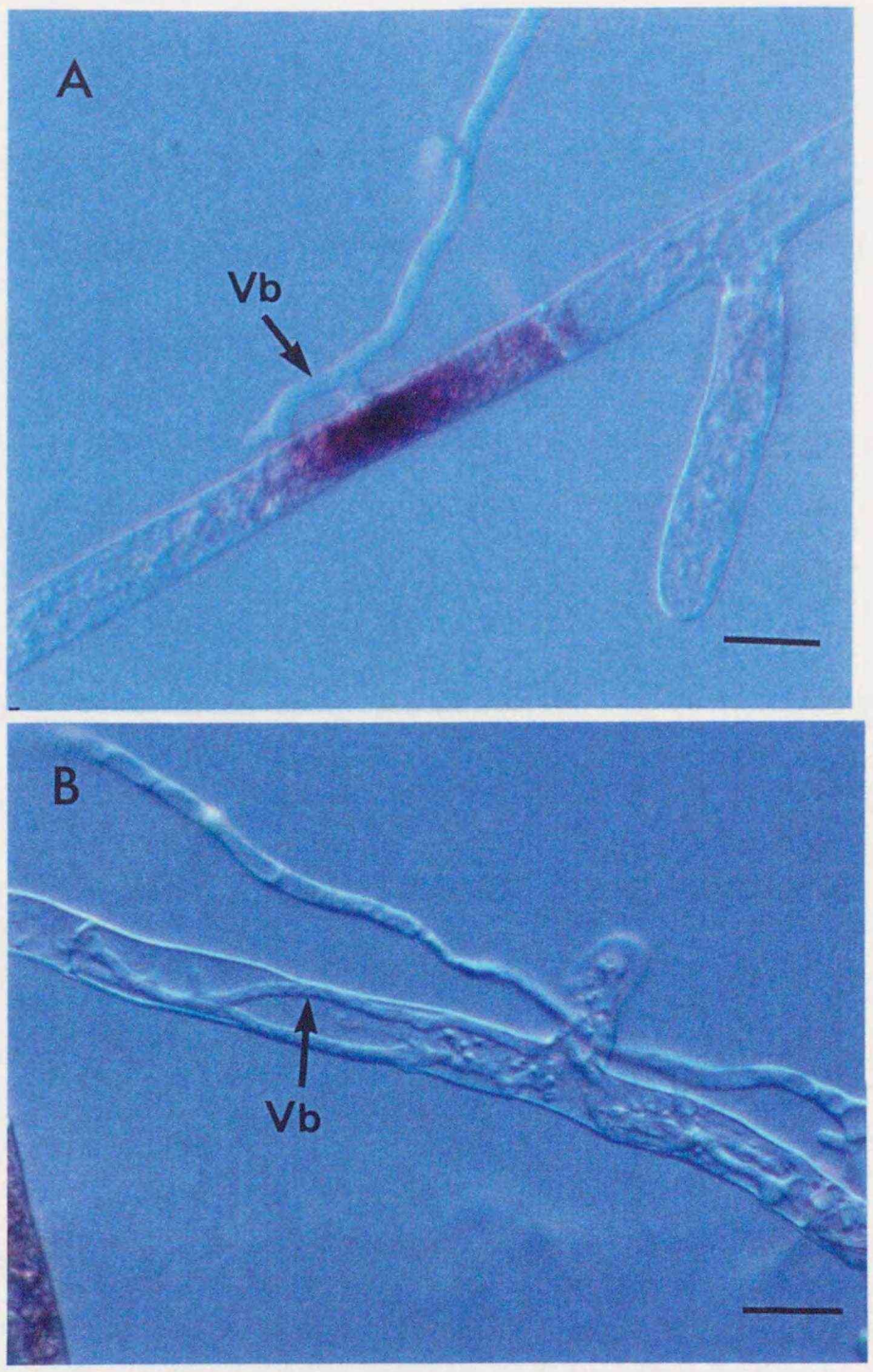


図33 Verticillium 属菌HV8株(Vb) のRhizoctonia solani AG2-2 に対する寄生。
(A: 菌糸の着生, INT染色, スケールは10μm。
B: R. solani菌糸内のVerticillium 属菌糸(Vb), スケールは10μm。

日間培養後の分生子の大きさ，分生子内油胞数，フィアライドの長さと輪生数を観察した。生育温度は，麦芽エキス寒天培地（MEA，表 7）平板に両菌株の PDA 培養菌叢ディスク（直径 5 mm）を置床し，12 ℃から 37 ℃までの各温度下で 4 日間培養し菌叢直径を測定した。得られた各測定値は，Gams and Zaayen（1982）による V. biguttatum の原記載と比較した。

結　果

発病抑制効果の高かった Verticillium 属菌の HV8 株と HV10 株について，形態的特性と生育温度を調査した。両菌株ともに分生子柄は直立し，先端に分生子塊を形成し，フィアライドは輪生した（図 34B）。分生子は無色，単胞，円筒状で内容に比較的大形の油胞を有し，両端部にやや膨らみを生じた（図 34A），HV8 株で分生子の大きさは平均 6.7（4.0-9.8） μm × 2.8（2.3-3.3） μm，分生子内油胞数は平均 2.2（2-4）個，フィアライドの長さは平均 30.4（20.0-40.8） μm，MEA 上の菌叢は白色ビロード状であった。HV10 株でも形態的にはほぼ同じであった（表 21）。また，両菌株とも生育可能な最低温度は 12-16 ℃，最適温度は 25-28 ℃，最高温度は 30-37 ℃の間であった（図 35）。

考察

分離された Verticillium 属菌の種を同定するために形態的特性および生育温度を Gams and Zaayen（1982）による V. biguttatum の原記載と比較した結果，供試 Verticillium 属菌菌

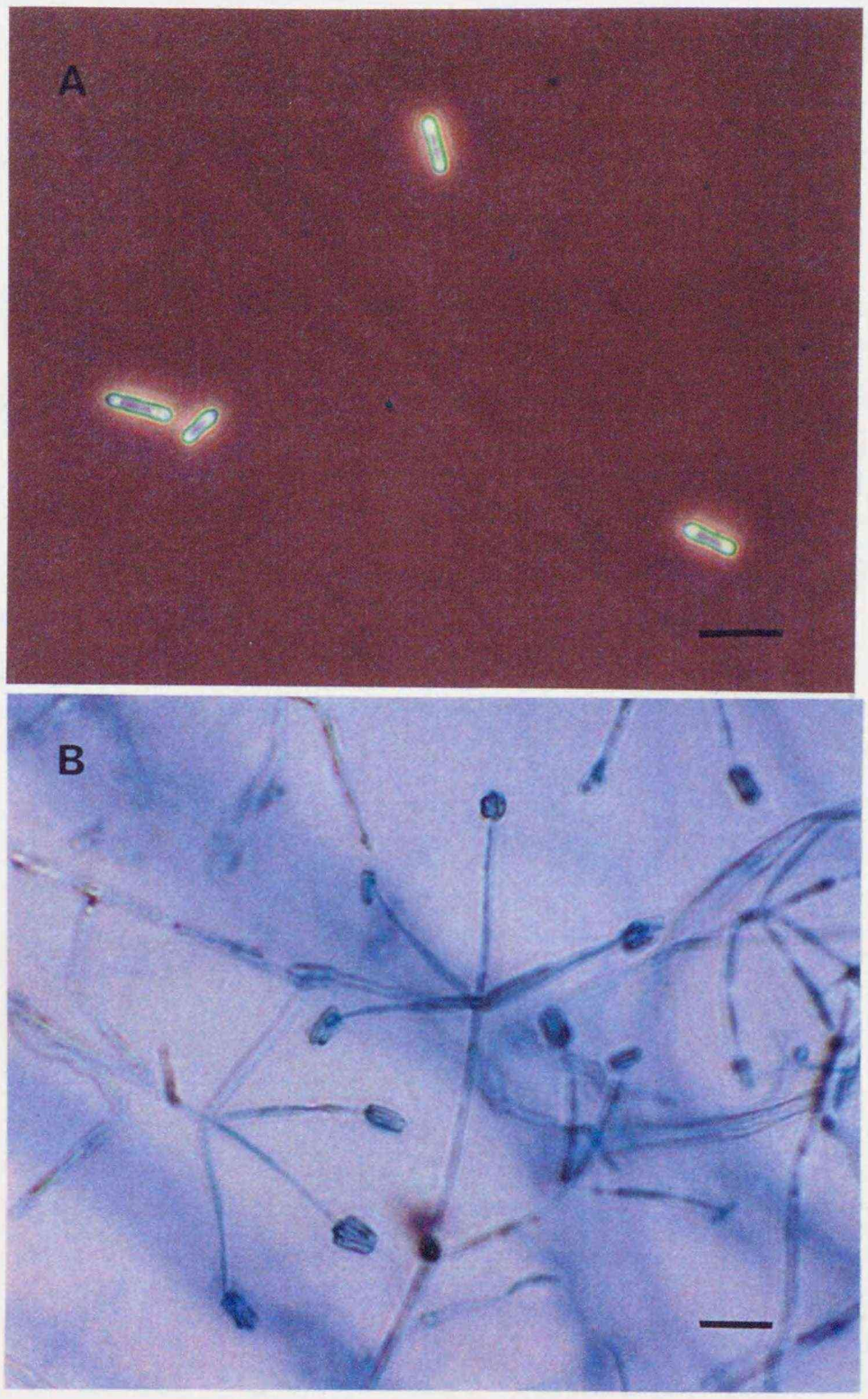


図34 Verticillium 属菌の形態。
(A:位相差顕微鏡で観察した分生子, スケールは10μm。
B:ラクトフェノールコットンブルーで染色した分生子柄および
フィアライド, スケールは10μm。)

表21 分離されたVerticillium属菌株とVerticillium biguttatumの記載との分生子とフィアライドの形態の比較

形 質	Gams and Zaayen[1)] による記載	分離菌株の測定値 HV8 範囲	HV8 平均値[2)]	HV10 範囲	HV10 平均値
分生子					
長さ(μm)	5.5-9.5	4.0-9.8	6.7	4.2-8.8	6.2
幅(μm)	1.5-2.2	2.3-3.3	2.8	2.4-3.3	2.7
比率	2.7-4.5	1.4-3.3	2.3	1.5-3.4	2.3
油胞数	2(まれに3)	2-4	2.2	2-3	2.1
フィアライド					
長さ(μm)	18-30	20.0-40.3	30.4	23.8-36.9	30.3
輪生数	3-5	3-5	4.2	3-5	4.0

1) Gams and Zaayen (1982)。

2) 数値は，分生子またはフィアライド50個の平均値。

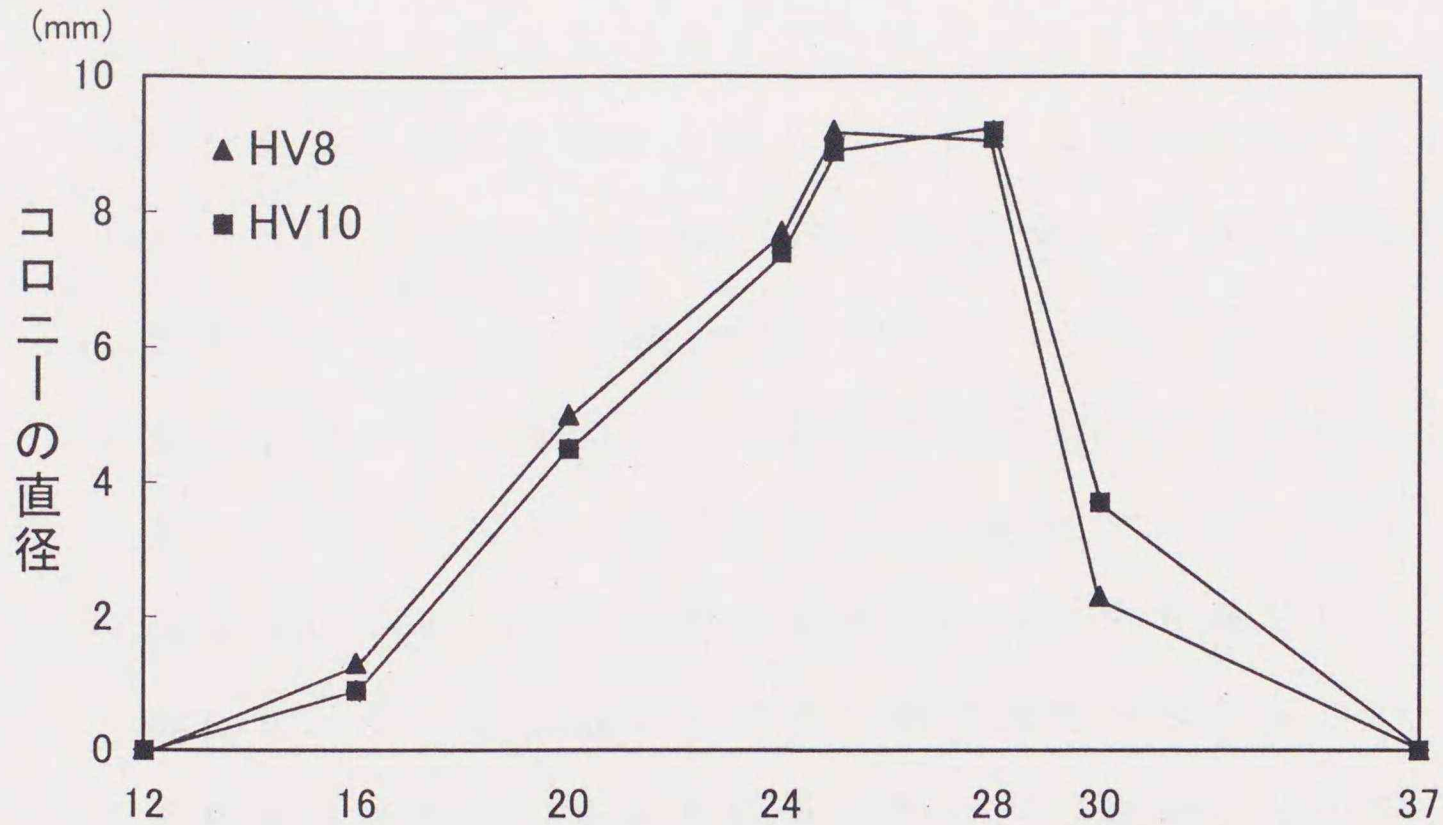


図35 分離 Verticillium 属菌の接種4日目の各温度での生育量

株は，分生子の幅およびフィアライドの長さがやや長かったものの，ほぼ記載と一致した。各温度での菌糸生育については，Gams and Zaayen（1982）の記載では30℃で全く生育しないが，ven den Boogert ら（1984）は1日当たり1.5 mm生育しており，菌株により多少の差異はあるものと思われる。また，形態的に似ている V. fungicola などの近縁種（Gams and Zaayen, 1982）とは各温度における生育量が大きく異なり，また R. solani に対する寄生様式の特徴からも，供試菌株はいずれも日本では未記載の V. biguttatum と同定された。

V. biguttatum は，現在まで報告されている Pseudomonas 属菌などの拮抗細菌（Homma ら,1991; Mosa ら,1997）やジャガイモクロバネキノコバエ（内藤・杉本, 1988）などと異なり，苗立枯病ばかりでなく根腐病に対しても抑制効果があった。Trichoderma 属菌のうち T. viride は，育苗時におけるテンサイ苗枯病の病原菌として記載されているので（神沢, 1973），本種をテンサイに適用するには問題がある。一方，V. biguttatum は植物に対しては病原性を示さなかった。本菌は活物的（biotrophic）菌寄生菌とされ，生育に基質を必要としない。寄生した R. solani の菌叢全体の生育に影響を及ぼすことも生物的防除に利用する場合に有利な点とされている（ven den Boogert and Deacon, 1994）。

V. biguttatum はオランダおよびイギリスで R. solani AG3 によるジャガイモ黒あざ病罹病塊茎上の R. solani の菌核から分離され（Jagar ら，1979; Morris ら，1992），ジャガイモ黒

あざ病に対する抑制効果が認められている（Velvis and Jagar, 1983）。一方，我が国では，これまで本菌を用いた生物的防除の研究例はなく，本研究によって，V. biguttatum によるテンサイの根腐病と苗立枯病の生物的防除の可能性が明らかとなった。

V. biguttatum の供試 23 菌株間で苗立枯病に対する抑制効果に差が認められた。しかし，培地上の試験では R. solani 菌糸に対する寄生の程度は，どの菌株でもほぼ同じであったことから，発病抑制効果の菌株間差は一つには，土壌中における R. solani 菌糸への寄生能力の差異によることも推察される。また，HV8 株施用区では，テンサイ種子への R. solani の寄生が抑制されたことから，V. biguttatum は土壌中の R. solani の菌糸に寄生してその活性を低下させ，菌糸伸長を抑制することによって，苗立枯病の発生を抑制するものと考えられる。

HV8 株と HV10 株は圃場試験においてテンサイ根腐病に対しても抑制効果を示した。これらの菌株の施用時期と R. solani の接種時期の間隔が近いほど，概して高い抑制効果がみられたことから，V. biguttatum 施用後の土壌中における本菌の定着性が効果に影響している可能性がある。3 回接種で最も高い効果が認められたが，これは V. biguttatum の反復施用により土壌中の本菌密度が高まったためと考えられる。

発病抑止土壌に関する試験では，V. biguttatum が主因という結果を得ることは出来なかったが，V. biguttatum の抑

制効果が圃場試験でも認められたことから，将来微生物農薬としての利用が期待される。

培地上での V. biguttatum と R. solani との相互作用について，ven den Boogert ら（1984）は R. solani の近傍を生育する V. biguttatum の菌糸は，主軸菌糸から側枝菌糸を伸ばし，R. solani 菌糸の細胞壁を貫穿して細胞内に侵入し生育することを報告している。本研究の供試菌株における観察結果も，同様であった。また、INT 染色により，V. biguttatum の菌糸は R. solani 菌糸の死細胞ではなく生細胞に着生すること，および本菌侵入後に，R. solani の菌糸細胞が死に至ることが観察され，ven den Boogert ら（1994）によって示されたとおり V. biguttatum は活物的（biotrophic）菌寄生菌であることが確認された。

本研究で示した V. biguttatum の利用は，慣行の薬剤処理法に比べて施用方法が煩雑であり，また病害抑制効果もやや劣るため、現段階での実用化は難しい。しかし，通常の根腐病発生条件では，育苗土処理と抵抗性品種を組み合わせることにより防除効果が期待され，また，テンサイの生産においても薬剤使用量の削減が求められることから，近い将来テンサイ苗立枯病や根腐病の総合防除における有用な技術の一つとなる可能性がある。

Ｖ．総合考察

１．そう根病の生物的防除

そう根病の感染は，土壌中の病原ウイルス媒介菌の P. betae 休眠胞子から発芽した遊走子が細根に到達し細根表面に付着後，その細胞質が細根内に貫入しウイルスを植物細胞内に放出し増殖を開始することにより成立するとされている（阿部，1987）。本病の生物的防除を考えるとき，この休眠胞子からウイルスの植物体内での増殖に至るまでのどの場面での阻止を試みようとするのかが問題となる。

本研究においてはまず，土壌中の感染源である P. betae の休眠胞子を減らすための手法や条件の検討を行った。その結果，野生エンバクの栽培によって土壌中のウイルス保毒休眠胞子の菌数の減少効果がある程度認められたが，この効果も感受性テンサイ品種の発病を抑えるほど菌数は低下せず，感受性テンサイ品種の栽培によるウイルス保毒媒介菌の増加量が多いため，抵抗性品種の栽培との組み合わせによる利用が必要である。休眠胞子は，分解過程の罹病植物組織から遊離し，感染源として有効になると考えられ，また，生物的防除が効果を及ぼすことが可能になるのも遊離後と思われる。本研究により，P. betae の休眠胞子は長期間生存するものの空洞化が徐々におこり，ショ糖の添加などによりこれが促進されることが明らかとなった。土壌中での休眠胞子の空洞化は主に

遊離の休眠胞子が対象になると思われる。従って，土壌中での罹病根組織の分解を促進する微生物を増やすことによって，休眠胞子を根から遊離させ，空洞化を助長できる可能性がある。

遊走子は細胞壁を持たず寿命が最も短く，また，外的環境要因を受けやすいと考えられる。そこで遊走子の感染を根圏で防ぐことを目的とする試験を行った。そのためテンサイの根圏細菌のなかからそう根病に対して抑制効果のあるものを探索することとした。そう根病の場合は発病抑止土壌や衰退土壌が知られていないため，これら土壌からの探索は期待できない。このため帯広市清川地区のテンサイが長期間連作されそう根病が発生している圃場を選んだ。その理由として，本圃場から採取した土壌中に埋没した休眠胞子が高い空洞率を示したこと，およびそう根病に対する拮抗微生物が集積していることが期待された。圃場に栽培されたテンサイの細根から根圏細菌を分離し選抜試験を行った結果，分離菌株の中から顕著な発病抑制効果のあるSB-K88株が得られた。本菌株の抑制効果は室内試験では高かったが，圃場では劣り，その原因のひとつとして根への定着性の不足が考えられた。媒介菌の P. betae は新しい細根があればテンサイの全生育期間にわたり感染できるため，感染可能期間が非常に長く，また感染可能な根域も広い。しかし，圃場試験では根に処理した拮抗細菌はある程度新しい細根にも生育とともに移動し増殖していたが，すべての細根表面で

感染を阻止できるまでには至らなかったと考えられた。化学薬剤と異なり生物的防除として実用性のある微生物は，その自己増殖性や移動性が高いのに特徴がある。そう根病の防除でも，これらの特徴が有利に働くことが期待されるような拮抗細菌の施用法の改良や，導入菌にとって有利な根圏環境などの解明と管理によってより高い効果が得られる可能性がある。微生物の定着性については，品種間差があるものと言われており（Cook, R. J. and Baker, K. F., 1983），より効果的な品種との組み合わせを探索することによりSB-K88による発病抑制効果の向上が期待される。また，定着性とともに施用した細菌の根圏での活性の高さも抑制効果の発現に重要な要素であると思われる。培地上で生育した細菌細胞は十分な栄養状態にあり，放出される代謝物も豊富であると考えられるが，土壌中や根圏では培地上に比べて貧栄養状態にあり，抗菌性物質の生産量も限られるものと思われる。抑制効果のみられる期間が限られている原因の一つとして，施用後しばらくは培地上で生育中に蓄えた栄養を利用して盛んに抗菌性物質を体外に放出しているが，その後は根圏などから得た養分のみにより生育するため徐々に抗菌性物質の生産量が減少していくことが考えられる。

一方，耐久体である休眠胞子に対する拮抗微生物として Trichoderma 属菌が報告されており（D'Ambra and Mutto, 1986; Comporota ら，1988; Nowakowska, 1994），その主な機作は寄生と考えられている。著者らも休眠胞子に付着している糸状菌

の分離を試みたが，発病抑制効果のある糸状菌は得られなかった。P. betae の休眠胞子は土壌中の生存期間が長期間にわたることから，休眠中の活性は低いものと思われ，糸状菌などによる寄生も高頻度で起こるとは考えにくい。土壌中の休眠胞子を菌寄生菌の施用により発病抑制効果が得られるほどに高い割合で死滅させるのは困難と考えられる。

今後は病害防除の方向として総合防除の考え方が重要になると思われるが，そう根病については経済的に利用可能な薬剤が無いこともあり，総合防除による防除体系の構築が必要と考えられる。その場合，本研究で明らかとなったように，抵抗性品種の利用によるウイルス保毒 P. betae の増殖の抑制，根圏細菌による遊走子の感染の阻止，遊離の休眠胞子を不活化する野生エンバクなどの対抗植物の導入と空洞化を促進する物質の土壌への添加による土壌中の感染源ポテンシャルの低減をねらった防除法などを組み合わせる必要がある。

2．テンサイ根腐病の生物的防除

根腐病の生物的防除については，テンサイ苗立枯病や根腐病に対する発病抑止土壌や拮抗微生物が知られているため，これらの利用による防除法の開発を行うことにした。発病抑止土壌は R. solani 菌体の繰り返し接種により誘導され，再現性があり発病抑制程度も高かったため，その抑止要因を解明し利用しようとした。その結果，本

抑止土壌の特性として，①細菌数，糸状菌数，菌寄生菌の一つである Trichoderma 属菌数の増加が無い，② R. solani 菌糸の伸長を抑制する，③菌糸融合群特異性が無い，④死菌体では誘導されない，⑤微生物相の貧弱な心土では抑止性が劣る，⑥熱感受性である，⑦増殖性がある，⑧ベノミルや細菌に対する抗生物質への感受性が低いなどの性質が明らかとなり，R. solani に対する土壌の抑止要因として，これまで報告されている微生物の関与には否定的な結果となった。残る可能性のうち R. solani の外的要因としては，ストレプトマイシンなどの抗生物質に耐性な細菌，ベノミルなどの薬剤に耐性な糸状菌などが考えられ，R. solani の内的要因としては病原性低下因子などが考えられる。しかし，病原性低下因子については，本試験においては R. solani AG2-2-IV の繰り返し接種により誘導された土壌の抑止性は，菌糸融合が起こらない異なる融合群にも同様に発病抑止性を示したことから，融合によって移行する因子によるものではないと考えられる。また，生物的防除において R. solani による病害のように抑止土壌が知られているものについては，拮抗微生物を利用するだけでなく，抑止性そのものの利用も必要と思われる。その際，R. solani 菌体の繰り返し接種により高度の土壌の抑止性を誘導できるが，圃場に病原菌である R. solani を散布することはできないため，食用キノコ菌体などの代替資材（佐山・本間，1999）や抑止性の誘導に好適な条件の探索が必要である。

繰り返し接種土壌からは，その発病抑止性に直接関与する微生物は明らかにできなかったが，Trichoderma 属菌や Verticillium 属菌が分離された。このうち，Trichoderma 属菌の一部の種ではテンサイ苗に対して病原性が報告（神沢，1973）されていることもあり，わが国では未報告の Verticillium biguttatum による苗立枯病と根腐病の生物的防除法の検討した。その結果，R. solani AG2-2-IV による苗立枯病については，土壌に対して 5 % 量の V. biguttatum の培養菌体を施用することにより対照薬剤と同等の発病抑止効果が得られたことから，本拮抗微生物は紙筒移植栽培における苗立枯病防除資材としての実用化の可能性が高いものと思われる。根腐病の圃場試験に関しては，R. solani の接種前日に V. biguttatum を株元に施用した場合，高い抑制効果が見られたが，育苗土施用や移植時施用では不十分であった。実際の利用場面では，圃場での株元施用も可能であるが，実用面からは予防的な防除ともなる育苗土施用で抑制効果が得られることが望まれる。本菌は菌核や厚膜胞子は観察されていない（Gams and Zaayen, 1982）。土壌中での耐久器官としては分生子が主なものと考えられる（Jager and Velvis, 1996）ので，分生子の土壌中での発芽条件や生存条件などを解明する必要がある。育苗土施用で効果が不十分である原因として施用後の V. biguttatum の土壌中や根圏での定着性や活性が十分でない可能性がある。V. biguttatum の発病抑制の機作については，病原菌への寄生が主な要因と思われるが，本菌が抗菌物質を生産

するとの報告もあり（Morris ら，1995），両者の作用が複合的に働いている可能性がある。今後，V. biguttatum の効果の認められた施用法の利用場面や機械化を検討することにより，実用化に近づくものと思われる。

摘　要

本研究は，北海道における基幹作物の一つであるテンサイの重要な土壌病害であるそう根病と根腐病の生物的防除法の開発に資するための根圏細菌，菌寄生菌，対抗植物，土壌の抑止性などに関する研究を行った。

1．テンサイそう根病の生物的防除

1)汚染土壌に栽培した野生エンバクやテンサイが土壌中の Polymyxa betae の休眠胞子数に与える影響について調査した。野生エンバクの9カ月間の栽培により最確値法で測定した土壌中のウイルス保毒 P. betae 菌数は裸地区に比較して有意に減少した。抵抗性テンサイ品種の栽培は有意な増加を示さなかったが，後作の感受性テンサイ品種の栽培により 10 倍の増加がみられた。汚染土壌中の休眠胞子を直接法により調査したところ，野生エンバク区と裸地区が同程度で両テンサイ品種の約 1/3 の菌数であり，抵抗性テンサイ品種の P. betae の感染に対する抵抗性は感受性品種と同程度と考えられた。テンサイ2品種，野生エンバク，コムギ，バレイショ，ダイズの根浸出液の P. betae 休眠胞子の空洞化に及ぼす影響を調べたところ，空洞率はすべての根浸出液の処理で蒸留水処理よりも高く，特に感受性テンサイ品種，野生エンバクで高買った。野生エンバクの栽培による P. betae 菌数の減少効果は，根浸出物の作用による休眠胞子の空洞化が一部関与していると考えられた。

2)蒸留水処理でもわずかにみられたP. betae休眠胞子の空洞化を促進する条件を探索した。P. betaeの休眠胞子を埋没させた土壌にショ糖を添加した場合，pHが高くかつ温度も高い場合に，空洞化の促進が認められた。一方，空洞化は土壌水分に影響されず，またオートクレーブ処理した土壌では，促進されなかった。蒸留水に懸濁したP. betae休眠胞子も糖またはアミノ酸の添加によって空洞化が促進された。これらのことから，植物が無い場合でも，土壌中の休眠胞子には空洞化が生じ，条件によっては促進することが明らかとなった。

3)生物的防除法に関する試験を行ううえで必要な土壌中のP. betaeの直接法による菌数の測定や，休眠胞子の観察のために蛍光色素による染色法を検討した。その結果，休眠胞子はSDSによる前処理により十分に染色されるようになった。さらに，FITC結合レクチンによってもより染色に対する選択性が高まった。走査電顕による観察の結果，SDS処理を行っても休眠胞子の表面構造には損傷が認められず，本方法は休眠胞子の観察，検出に適した方法と言える。

4)拮抗細菌によるテンサイそう根病の発病抑制法を検討した。そう根病激発圃場に栽培したテンサイの細根から428菌株の根圏細菌を分離した。それらの中から最も効果の高い1菌株（SB-K88）を選抜し，以下の実験に用いた。石英砂入り試験管で栽培されたテンサイに本菌株に灌注処理したところ，細菌の濃度が高いほど，また接種

した P. betae 遊走子濃度が低いほど発病抑制効果が強くあらわれた。培養濾液の灌注によっても同様な効果が認められた。土壌と石英砂の混合土壌を用いて SB-K88 株の灌注処理による効果の持続期間を調べたところ，約 10 日間は高い抑制効果があることが確認された。葉の黄化程度を指標とした場合，育苗時に接種することにより発病抑制効果が，中発生圃場では移植後 1.5 カ月，少発生圃場では 3 カ月間持続した。しかし，栽培後期あるいは収穫期における調査では効果は認められなかった。SB-K88 株の抗生物質に対する自然耐性を利用した選択培地を使用して定着性を調査した結果，育苗中および移植直後には全細菌数に占める SB-K88 株の割合が高かったが，その後は減少した。

5) 拮抗細菌の施用法と利用法の検討をした。SB-K88 菌株を種子コーティングし，あるいはバーミキュライトの担体に付着させ，これを土壌混合および灌注処理と比較したところ，担体の土壌混合で最も効果が高かった。抵抗性品種の栽培時における SB-K88 株の利用法として，SB-K88 株は初期感染を抑制し，抵抗性品種の効果は栽培後期まで継続したことから，両者の組み合わせにより効果が増強できる可能性が示された。

2．テンサイ根腐病の生物的防除

1) Rhizoctonia solani の 2 群 2 型の培養型 IV および 4 群菌株の菌体の繰り返し接種により、苗立枯病に対する土壌の抑

止性を誘導した。抑止性は、テンサイ栽培の有無に関わらず、菌体接種のみによっても生じ、死菌体によっては生じなかった。繰り返し接種による土壌中の糸状菌、細菌、放線菌、Trichoderma 属菌数の変動はわずかであった。しかし、同時に測定したソイルペレット法による土壌塊からの Rhizoctonia 菌糸の出現率は減少した。繰り返し接種土壌中における R. solani の菌糸生育は耕地土壌中に比べて劣り、接種 5 日目で約 1/2 となり、明らかに、菌糸生育が抑制された。繰り返し接種土壌の抑止性は、培養することにより高まることから、生物的因子であることが示唆された。抑止性は、55 ℃の通気蒸気処理によってほぼ消失したことから、耐熱性の細菌の関与の可能性は低いものと考えられた。また、抑止性のベノミルに対する感受性は低く、Trichoderma 属菌、Gliocladium 属菌、Verticillium 属菌などは同剤に感受性が高かった。これらのことから、本実験に用いられた繰り返し接種土壌の主な抑止要因は、ベノミルに非感受性で熱感受性であり、R. solani に対する抑止土壌の抑止要因としてはこれまでに知られていない微生物である可能性が示唆された。

2）R. solani AG2-2 を繰り返し接種した北海道札幌市および河西郡芽室町の耕地土壌から菌寄生性 Verticillium 属菌 23 菌株を分離した。分離菌株の多くは R. solani AG2-2 によるテンサイ苗立枯病を抑制したがその程度は菌株により異なった。分離菌株の中から最も抑制効果

の高かった2菌株（HV8株，HV10株）を選抜した。これら2菌株は施用量が多いほどテンサイ苗立枯病に対する抑制効果が高く，またテンサイ種子へのR. solaniの寄生を強く抑制し，特に5％の濃度で処理した場合にはPCNB（40 ppm）処理と同等の抑制効果を示した。また両菌株はテンサイ根腐病に対しても，株元への1回処理および苗床，植穴，株元への計3回処理で明瞭な抑制効果を示した。光学顕微鏡観察の結果，分離Verticillium属菌はR. solani菌糸の生細胞に寄生し，本菌侵入後にR. solaniの菌糸が死に至ることが明らかとなった。分離Verticillium属菌は，形態と生育温度からいずれもVerticillium biguttatumと同定された。

引用文献

Abada, K. A.: Fungi causing damping-off and root-rot on sugar-beet and their biological control with Trichoderma harzianum, Agriculture, Ecosystems and Environment 51: 333-337, 1994

阿部秀夫：テンサイそう根病のウイルス媒介者，Polymyxa betae Keskin の生態と防除に関する研究，北海道立農業試験場報告 60：1-99，1987

阿部秀夫：テンサイそう根病に対するクリーニングクロップの探索，日植病報 61：270-271，1995（講演要旨）

阿部秀夫・真野　豊：サトウダイコンの異常生育（仮称）と土壌反応，日植病報 37：409，1971（講演要旨）

阿部秀夫・坪木和男：てん菜そう根病の多発畑に対する土壌 Ph 低下と D-D 剤処理の併用効果，てん菜研究会報 20：57-65，1978

Abe, H. and Ui, T.: Host renge of Polymyxa betae Keskin strains in rhizomania-infested soils of suger beet in Japan, Ann. Phytopath. Soc. Japan 52: 394-403, 1986

阿部秀夫・玉田哲男：Polymyxa betae Keskin（テンサイそう根病のウイルス媒介者）の簡易接種・増殖法，てん菜研究会報 29：34-38，1987

阿部秀夫・斎藤美奈子・玉田哲男：テンサイそう根病の簡易土壌検診法，てん菜研究会報 33：68-75，1991

Asher, M. J. C.: Rhizomania: Progress with resistant varieties, British sugar beet review 57(4): 16-19, 1989

Asher, M. J. C. and Barr, K. J.: The host range of Polymyxa betae and resistance in

Beta species, Proceedings of the first symposium of the international working group of plant viruses with fungal vectors, 65-68, 1990

馬場徹代：テンサイ根腐病およびジャガイモ黒あざ病の防除に関する研究，北海道立農業試験場報告 35：1-74，1981

Baker, K. F. : Principles of heat treatment of soil and planting material, The Jorunal of the Australian Institute of Agricultural Science, 28, 118-126, 1962

Bahme, J. B. and Schroth, M. N.: Spatial-temporal colonization patterns of a rhizobacterium on underground organs of potato, Phytopathology 77: 1093-1100, 1987

Beauchamp, C. J., Kloepper, J. W. and Lemke, P. A.: Luminometric analyses of plant root colonization by bioluminescent pseudomonads, Can. J. Microbiol.39: 434-441, 1993

Blunt, S. J., Asher, M. J. C. and Gilligan, C. A.: Infection of sugar beet by Polymyxa betae in relation to soil temperature, Plant Pathology 40: 257-267, 1991

Cambra Mora, J. and Garcia Benavides, P.: Detection of Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV) - induced beet rhizomania inCastilla and Leon (Spain), Invest. Agr.: Prod. Prot. veg. 3: 355-367, 1988

Camporota, P., Bordei, V. and Richard-Molard, M.: Biological control of Polymyxa betae (Keskin) by means of Trichoderma sp. Preliminary results in vivo, Agronomie 8: 223-225, 1988

Castanho, B., Butler, E. E. and Shepherd, R. J.: The association of double-stranded RNA with Rhizoctonia decline, Phytopathology 68: 1515-1519, 1978

Chet, I. and Baker, R.: Isolation and biocontrol potential of Trichoderma hamatum

from soil naturally suppressive of Rhizoctonia solani, Phytopathology 71, 286-290, 1981

Ciafardini, G.: Evaluation of Polymyxa betae Keskin contaminated by Beet necrotic yellow vein virus in soil, Appl. Environ. Microbiol. 57: 1817-1821, 1991

Ciafardini, G. and Marrotta, B.: Use of the most-probable-number technique to detect Polymyxa betae (Plasmodiophoromycetes) in soil, Appl. Environ. Microbiol. 55: 1273-1278, 1989

Codrescu, A., Ciochia, V. and Vilau, N.: Symptoms of rhizomania on sugar beet crops in Romania, Productia Vegetala, Cereale si Plante Tehnice 33: 38-40, 1981

Cook, R. J. and Baker, K. F. : The nature and practice of biological control of plant pathogens, APS, p.45, 207 and 265, 1983

D`Ambra V. and Keskin, B.: Zur Verbreitung von Polymyxa betae keskin, Arch. f. Mikrobiol. 55: 309-310, 1966

D`Ambra, V. and Mutto, S.: The ultrastructure of Polymyxa betae zoospore exit-tube differentiation, Can. J. Bot. 55: 831-839, 1977

D`Ambra, V. and Muttto, S.: Parasitism of Trichoderma harzianum on cystosori of Polymyxa betae, J. Phytopathology 115: 61-72 ,1986

Duckett, J. G. and Read, D. J.: The use of the fluorescent dye, 3,3'-dihexyloxacarbocyanineiodide, for selective staining of ascomycete fungi associated with liverwort rhizoids and ericoid mycorrhizal roots, New Phytol. 118: 259-272, 1991

Duffus, J. E., Whitney, E. D., Larsen, R. C., Liu, H. V. and Lewellen, R. T.: First report in western himisphere of rhizomania of sugar beet caused by beet necrotic yellow vein virus, plant Disease 68: 251, 1984

Fugisawa, I. and Sugimoto, T.: Transmission of beet necrotic yellwo vein virus by Polymyxa betae, Ann. Phytopath. Soc. Japan 43: 583-586, 1977

藤沢一郎・杉本利哉：スベリヒユ科植物の根にみられた Polymyxa について，日植病報 44：70，1978（講演要旨）

Gams, W. and Zaayen, A. Van : Contribution to the taxonomy and pathogenicity of fungicolous Verticillium species. I. Taxonomy, Neth. J. Pl. Path. 88: 57-78, 1982

Gao, J. L., Deng, F., Zhai, H. Q., Ling, X. S. and Liu, Y.: The occurrence of sugar beet rhizomania caused by beet necrotic yellow vein virus in China, Acta Phytopath. Sinica 13: 1-4, 1983

萩田孝志・玉田哲男：免疫電顕法によるてん菜そう根病の病原ウイルス（BNYVV）の検出，てん菜研究会報 22：39-47，1980

Hamdorf, G., Lesemann, D. E. and Weidemann, H. L.: Untersuchungen über die Rhizomania-Krankheit an Zucker-rüben in der Bundesrepublik Deutschland, Phytopathologische Zeitschrift 90: 97-103,1977

Häni, A. and Bovey, R.: La rhizomanie, une virose de la betterave, nouvelle pour la Suisse, Revue Suisse Agiric. 15: 305-308, 1983

Henis, Y., Ghaffar, A. and Baker, R.: Integrated Control of Rhizoctonia solani Damping-off of Radish: Effect of Successive Plantings, PCNB, and Trichoderma harzianum on Pathogen and Disease, Phytopathology 68, 900-907, 1978

Henis, Y., Ghaffar, A. and Baker, R.: Factors Affecting Suppressiveness to Rhizoctonia solani in soil, Phytopathology 69, 1164-1169, 1979

Herr, L. J.: Biocontrol of Rhizoctonia crown and root rot or sugar beet by binucleate Rhizoctonia spp. and Laetisaria arvalis, Ann. appl. Biol. 113: 107-118, 1988

Hill. S. A. and Torrance, L.: Rhizomania disease of sugar beet in England, Plant

Pathology 38: 114-122, 1989

北海道農政部・北海道病害虫防除所：平成10年度農作物有害動植物発生予察事業年報：89，1998.

北海道農政部：農作物病害虫防除基準，pp. 86-90，2000

北海道てん菜協会：平成11年度てん菜の生産実績，83p，2000

北海道てん菜技術推進協会：てん菜土壌病害に関する試験成績書　Iてん菜そう根病　IIてん菜根腐病　昭和46年度，102pp，1972

北海道てん菜技術推進協会：てん菜の病害に関する試験成績書　昭和55年度，pp. 90-96, 1981

本間善久・山下洋子・久保千冬・石井正義：Rhizoctonia solaniの菌体を繰り返し接種した土壌中のダイコン立枯病の抑制要因,日植病報　47, 388, 1981

Homma, Y. and Suzui, T.: Role of antibiotic production in suppression of radish damping-off by seed bacterization with Pseudomonas cepacia, Ann. Phytopath. Soc. Japan 55: 643-652, 1989

Homma, Y., Chikuo, Y. and Ogoshi, A.: Mode of suppression of sugar beet damping-off caused by Rhizoctonia solani by seed bacterization with Pseudomonas cepacia, Bulletin SROP 14: 115-118, 1991

Homma, U, Katoh. K, Uchino, H. and Kanzawa, K. : Suppression of sugar beet damping-off by seed bacterization with Stenotrophomonas sp. SB-K88 in a paper-pot system, p. 205-208, In A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, and S. Akino (ed.), Plant growth-promoting rhizobacteria-present status and future prospects. The 4th PGPR Internationl Workshop

Organizing Committee, Sapporo, Japan, 1997

Hornby, D.: Suppressive soils, Ann. Rev. Phytopathol. 21, 65-85, 1983

細川定治：甜菜，pp.9-12 (p188)，養賢堂，1980

百町満朗：テンサイ根腐病の発病衰退現象，植物防疫 37, 532-537, 1983

百町満朗・宇井格生：テンサイ根腐病菌（Rhizoctonia solani AG2-2）によるテンサイ子苗立枯病の衰退，日植病報 48, 600-606, 1982

伊槻康成・中里秀昭・田中淳裕：テンサイの圃場における初期生育障害について，てん菜研究会報 40：69-73，1998

Ivanovic, M. , Panic, M. and Dordevic, M.: Presence of fungus Polymyxa betae Keskin in cases of sugar beet root stunting, Agrohemija 9/10: 383-392, 1978

Jager, G., Hoopen, A. Ten and Velvis, H. : Hyperparasites of Rhizoctonia solani in Dutch potato fields, Neth. J. Pl. Path. 85: 253-268, 1979

Jager,G. and Velvis,H.: Suppression of Rhizoctonia solani in potato fields. 1. Occurence, Neth. J. Pl. Path. 89, 21-29, 1983

Jager, G. and Velvis, H.: Biological destruction of conidia of Verticillium biguttatum, Eur. J. Plant Pathol. 102: 623-633, 1996

梶山　努・中津智史・山神正弘：テンサイ直播栽培における初期生育障害について，てん菜研究会報 41：53-59，1999

神沢克一：てん菜の異常生育について，日植病報 36：365，1970（講演要旨）

神沢克一：てん菜の異常生育（仮称）について　第1報

発病条件と被害について，てん菜研究報告　補巻 13：35-47，1971

神沢克一：サトウダイコンの異常生育（仮称）に対する前作の影響について，日植病報 37：409，1971

神沢克一：てん菜の異常生育（仮称）について　第 2 報育苗土の消毒法について，てん菜研究報告　補巻 13：48-55，1971

神沢克一：てん菜のそう根病について　第 3 報各種薬剤による育苗土の消毒について，てん菜研究報告　補巻 14：35-42，1972

神沢克一：てん菜のそう根病について　第 5 報　育苗土の PH と発病について，てん菜研究報告　補巻 15：27-35，1973

神沢克一：紙筒育苗てん菜苗の苗枯病，　第 13 回てん菜技術連絡研究会発表論文集，pp. 37-43，1973

神沢克一：てん菜の根腐病の防除に関する研究．第 3 報生育期中の表層除去の効果について，てん菜研究会報 18：123-129，1977

神沢克一：てん菜の根腐病の防除に関する研究．第 4 報粗大有機物の利用について，てん菜研究会報 19：9-15，1978

神沢克一・宇井格生：サトウダイコンのそう根病，日植病報 38：434-435，1972

Kallerhoff, J., Perez, P., Bouzoubaa, S., Tahar, S. B. and Perrer, J.: Beet necrotic yellow vein virus coat protein-mediated protection in sugar beet (Beta-vulgaris L.)

protoplasts, Plant cell rep. 9: 224-228, 1990

Karling, J. S.: The plasmodiophorales 2nd Ed, pp.95-98, Hafner Publishing Company, New York and London,1968

川勝正夫・中野睦子・蔵之内利和・大潟直樹・Mechelke, W.・田中征勝：テンサイそう根病抵抗性新品種「シュベルト」の育成とその特性，てん菜研究会報 40：21-29，1998

Ko, W. H.and Hora, F. K. :A selective medium for the quantitative determination of Rhizoctonia solani in soil, Phytopathology 61: 707-710, 1971

小林紀彦・Ko, W. H.: ハワイ諸島における Rhizoctonia solani に対する発病抑止土壌の探索とその抑止機構の解明，土と微生物 25, 1-8, 1983

Kobza, S., Dezsery, M., Pocsai, E. and Szendrei, L.: Occurrence of beet yellow vein virus, causative agent of "sugar beet rhizomania" disease in Hungary, Novenyvedelem 21: 14-18, 1985

Kouyeas, H.: The "rhizomania" of sugar beet, Annales de I'Institut Phytopathologique Benaki 12: 151-153, 1979 (summarized in R. P. P. 60)

Krexner, R.: Beet yellowing disease in Austria, Pflanzenarzt 32: 59-64, 1979 (summarized in R. P. P. 64)

桑山　覚・栗林数衛・大島喜四郎：甜菜の病害虫とその防除，北農試彙報，36：p. 80-81，1925

Mannerlof, M. Lennerfors, B. and Tenning, P.: Reduced titer of BNYVV in transfenic sugar beets expressing the BNYVV coat protein, Euphytica 90: 293-299, 1996

増田昭芳・加川勝久・神沢克一：てん菜の連作に関する

研究（予報），てん菜研究報告　補巻 7：72-79，1967

増田昭芳・加川勝久・神沢克一：てん菜の連作に関する研究　第 1 報　連作障害様異常てん菜の発生，てん菜研究報告　補巻 11：77-84，1969

増田昭芳・加川勝久・神沢克一：てん菜の連作に関する研究　第 2 報　連作障害様異常てん菜発生原因の探索，てん菜研究報告　補巻 11：85-92，1970

Maxham, S. and Buczacki, S. T.: Chemical composition of the resting spore wall of Plasmodiophora brassicae, Trans.Br.mycol.Soc. 80, 297-304, 1983

Maxson, A. C.: Beet root rot caused by Rhizoctonia solani, Proc. Amer. Soc. Sugar Beet Tech. 1939: 38-45, 1939

Morris, R. A. C., Coley-Smith, J. R. and Whipps, J. M. : Isolation of mycoparasite Vericillium biguttatum from sclerotia of Rhizoctonia solani in the United Kingdom, Plant Pathol. 41: 513-516, 1992

Morris, R. A. C., Coley-Smith, J. R. and Whipps, J. M. : Quantitative isolation of the mycoparasite Verticillium biguttatum from soil, Soil Biol. Biochem. 27: 793-799, 1995

Morris, R. A. C., Ewing, D. F., Whipps, J. M. and Coley-Smith, J. R.: Antifungal hydroxymethyl-phenols from the mycoparasite Verticillium biguttatum, Phytochemistry 39: 1043-1048, 1995

Mosa, A. A., Bbd-El-Sayed, Wafaa, M. and El-Kholi, M. M. A.: Biological control of Rhizoctonia damping-off of sugar beet by Pseudomonas fluorescens. Arab Univ. J. Agri. Sci., Ain Shams Univ., Cairo 5, 433-447, 1997

内藤繁男・山口武夫・杉本利哉：てん菜の根腐病から分離した Rhizoctonia solani KUHN の類別について，北海道農

試研報 108 : 45-53, 1974

内藤繁男・杉本利哉・山口武夫・藤沢一郎：てん菜の苗立枯病から分離した Rhizoctonia solani KUHN の類別について，北海道農試研報 111 : 25-35, 1975

内藤繁男・神沢克一・杉本利哉：テンサイの紙筒育苗と根腐病の発生との関係，てん菜研究会報 22 : 18-24, 1980）

内藤繁男・杉本利哉：ジャガイモクロバネキノコバエによるテンサイ苗立枯病の抑止，日植病報 54 : 317-318, 1988

日本植物病理学会：日本有用植物病名目録，pp. 63-66, 2000

野田智昭・本田博子・景山幸二・百町満朗：Rhizoctonia solani および Sclerotium rolfsii を土壌に繰り返し接種して生じた発病抑止要因の解析，日植病報，59, 748-749, 1993

Nowakowska, H.: Polymyxa betae Keskin- Vector of rhizomania beet virus and its role in disease process. Part II . Influence of some agrotechnical, chemical and biological methods on restriction of beet root infection by P. betae, Hodowla Roslin Aklimatyzacja, 1994

生越　明：Rhizoctonia solani Kühn の菌糸融合による類別，日植病報 38 : 117-122, 1972

Press, C. M. and Kloepper, W.: Role of bacterial cell constituents in PGPR-mediated induced systemic resistance of cucumber, p. 260-264, In A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, and S. Akino (ed.), Plant growth-promoting rhizobacteria- present status and future prospects. The 4th

PGPR Internationl Workshop Organizing Committee, Sapporo, Japan, 1997

Puz, C. and Vuittenez, A.: Observation de particules virales chez des detteraves presentant, en Alsace, des symptomes de ˋ rhizomanie ˋ , Ann. Phytopathol. 6: 129-138, 1974

Rai, P.V. and Strobel, G. A.: Chemotaxis of zoospores of Aphanomyces cochlioides to sugar beet seedlings, Phytopathology 56: 1365-1369, 1966

Rhichards, K. E. and Tamada, T.: Mapping functions on the multipartite genome of beet necrotic yellow vein virus, Annual Review of Phytopathology 30: 291-313, 1992

Saito, M., Kiguchi, T. Kusume, T. and Tamada, T.: Complete nucleotide sequence of of the Japanese isolate S of beet necrotic yellow vein virus RNA and comparison with European isolates, Arch. Virol. 141: 2163-2175, 1996

Saito, M. Kiguchi, T. and Tamada, T.: Nonradioactive, digoxigenin-labeled DNA probes for the detection of five RNA species present in beet necrotic yellow vein virus, Bull. Res. Inst. Bioresour. Okayama Univ. 5: 79-96, 1997

佐山　充・本間善久：テンサイ罹病細根および土壌からの Polymyxa betae の休眠胞子塊の検出評価および部分純化法，北日本病害虫研究会報 44：24-27，1993

佐山　充・本間善久：発病抑止土壌の拮抗作用を利用したテンサイ根腐病抑止技術の開発，研究成果シリーズ 333，農林水産技術会議事務局，p.135-137，1999

菅原寿一・臼井　寛・杉本利哉：伊達地方におけるてん菜異常生育症状の発生ならびに薬剤処理の効果について，てん菜研究報告　補巻 13：166-171，1971

菅原寿一・臼井　寛・堤　平・杉本利哉：伊達地方のそ

う根病に対するＤ－Ｄ処理の効果について，てん菜研究報告 15：195-200，1974

菅原寿一・藤井勝敏・本多文彦・阿部秀夫・真野　豊：てん菜そう根病に対する育苗土壌の加熱消毒効果，てん菜研究報告 16：135-143，1975

杉山純多：生物学辞典（八杉龍一ほか編），pp. 1560-1561，岩波書店，1997

Takahashi, K. and Yamaguchi, T.: An improved method for estimating the number of resting spores of Plasmodiophora brassicae in soil, Ann. Phytopath. Soc. Japan 53: 507-515, 1987

玉田哲男・神沢克一・宇井格生：テンサイの異常生育症状株から検出されたウイルスについて，日植病報 36：365，1970（講演要旨）

玉田哲男・萩田孝志：ELISA 法によるテンサイそう根病ウイルス（BNYVV）の検出，日植病報 48：399-400，1982（講演要旨）

Tamada, T. and Baba, T.: Beet necrotic yellow vein virus from rizomania affected sugar beet in Japan, Ann. Phytopath. Soc. Japan 39: 325-332, 1973

Tamada, T., Abe, H. and Baba, T.: Beet necrotic yellow vein virus and its relation to the fungus Polymyxa betae. Infection and Antimicrobial Agents, Vol. 3. T. hasegawa, ed. Proc. First Intersect. Congr. IAMS. pp.313-320, 1974

玉田哲男・楠目俊三・齋藤美奈子・木口忠彦・内野浩克・神沢克一：欠失 RNA 遺伝子を用いた弱毒ウイルスによるテンサイそう根病の防除効果，日植病報 58：638，1992

てん菜短期輪作対策協議会：てん菜の生育異常症状に関する試験成績書　昭和45年度，109pp，1971

内野浩克・神沢克一：テンサイ根腐病に関する研究　第8報生物的防除法における Rhizoctonia 属菌利用の可能性について，てん菜研究会報 27: 65-70，1985

内野浩克・神沢克一：テンサイ根腐病の防除に関する研究　第9報紙筒移植栽培による被害の軽減について，てん菜研究会報 28：148-153，1986

内野浩克・阿部秀夫・玉田哲男・神沢克一：テンサイを捕捉植物とするそう根病の土壌診断法について，てん菜研究会報 32：86-93，1990

Uchino, H. and Kanzawa, K.: Evaluation of yellowing intensity of sugar beet leaves infected with rhizomania by using a handheld chlorophyll meter, Ann. Phytopath. Soc. Japan 61: 123-126, 1995

宇井格生：テンサイの主要病害とその研究，甜菜研究会報告 2：26-90，1960

宇井格生：てん菜そう根病をめぐる諸問題，てん菜研究会報 15：233-267，1973

宇田川俊一ら：菌類図鑑（上），pp.209-210, 講談社，1978

Velvis, H. and Jager, G. : Biological control of Rhizoctonia solani on potatoes by antagonists. 1. Preliminary experiments with Verticillium biguttatum, a sclerotium-inhabiting fungus, Neth. J. Pl. Path. 89: 113-123, 1983

ven den Boogert, P. H. J. E. and Jager, G.: Accumulation of hyperparasites of Rhizoctonia solani by addition of live mycelium of R. solani to soil. Neth. J. Pl. Path. 89, 223-228, 1983

ven den Boogert, P. H. J. F. and Jagar, G. : Biological control of Rhizoctonia solani on potatoes by antagonisits. 3. Inoculation of seed potatoes with different fungi, Neth. J. Pl. Path. 90: 117- 126, 1984

ven den Boogert, P. H. J. F. and Deacon, J. W. : Biotrophic mycoparasitism by Verticillium biguttatum on Rhizoctonia solani, Eur. J. Plant Pathol. 100 : 137-156, 1994

Walther, D. and Gindrat, D.: Biological control of damping-off of sugar-beet and cotton with Chaetomium globosum or a fluorescent Pseudomonas sp., Can. J. Microbiol. 34: 631-637, 1988

山口武夫・杉本利哉・宇井格生：最近5カ年間におけるてん菜根腐病の発生実態について，てん菜研究会報 20 : 111-122， 1978

山口武夫・内藤繁男・杉本利哉：てん菜の根腐病に関する研究．第4報　中耕・培土処理と発病との関係，てん菜研究会報 15 : 223-226， 1973

Zimmerman, R., Iturriaga, R. and Becker-Birck, J.: Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration, Appl. Environ. Microbiol. 36: 926-935, 1978

N/-10

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

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

C Y M

© Kodak, 2007 TM: Kodak

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