

野菜類軟腐病細菌の reservoir としての未耕砂土の役割

富 樫 二 郎

(山形大学農学部生物生産学科)

A Role of an Uncultivated Sand Soil as a Reservoir of the Soft Rot Bacteria

Jiro TOGASHI

Department of Bioproduction, Faculty of Agriculture,
Yamagata University, Tsuruoka, 997 Japan
(Received September 15, 1993)

Summary

To investigate a role of an uncultivated sand soil as a reservoir of the soft rot bacteria, Chinese cabbages (cv. Matsushima-kohai Shin No.6) were sown in the sand in which any crops have not been raised on May 12 (spring sowing) and Aug.6 (summer sowing), 1986, then susceptibility index to the soft rot and the multiplication of pathogenic organisms in the rhizosphere of the plants were periodically examined. After the sand was collected from Shonai sand dune, in Yamagata Prefecture, it was filled in clay pot (No.18) set in the field at our University Farm. As a control, the continuously Chinese cabbages-cropping soil at our University Farm was used. Growth of the plants in the sand was inferior to that in the continuously cropping soil. The severity to the disease was slight to mild in the sand while it was mild to severe in the continuously cropping soil. For example, the susceptibility index was 21.0 in the former and 70.0 in the latter on July 29 and 49.0 and 66.6 on Oct 30, respectively. However, the organisms multiplied in rhizosphere equally in both soils. The population level was 10^3 - 10^7 cfu/g of oven-dried soil in spring sowing and 10^4 - 10^5 cfu/g in summer sowing. On the basis of bacteriological characteristics and pathogenicity tests, the organisms from the rotted tissue and the rhizosphere were identified as *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. It may be concluded from the present study that the uncultivated sand plays a role as a reservoir of the soft rot bacteria.

Key words : Chinese cabbages, soft rot, inoculum.

緒 言

土壌病害の疫学的研究では土壌中における感染源の確認やその活性評価が基本的な課題の一つである。野菜類軟腐病の場合、病原菌 (*Erwinia* spp.) は畑土壌の他に未だ作物が栽培されたことのない道路際²¹⁾、原野^{8,9)}、森林¹⁹⁾の各土壌にも普通の方法では検出できない程の低密度で生存している。これらの事実から、土壌は耕地、未耕地に関係なく軟腐病の reservoir の役割を担っていると言えることができる。

ところで軟腐病菌は殺菌砂に接種した場合急速に増殖し、一週間後には 10^6 ~ 10^7 cfu/g のレベルに達する⁷⁾。しかし、実際の砂土に軟腐病菌が生存しているかどうかについての系統的な検討はなされていない。本研究では、未耕砂土の軟腐病菌の reservoir としての役割を確かめるために、未だ作物の栽培歴のない山形県庄内砂丘地で採取した砂土にハクサイを栽培し、軟腐病の発生、根圏土壌中における病原菌の増殖等を調査したので、その結果を報告する。

材 料 と 方 法

キーワード：ハクサイ、軟腐病、感染源
(1993年9月15日受理)

未耕砂土の採取とハクサイの栽培
1986年5月10日山形県酒田市浜中地区の庄内砂丘地

Table 1. Microbial populations in the soils^{a)}

	No. of sample	Bacteria ×10 ⁴		Dye-tolerant bacteria ×10 ⁵		Actinomycetes ×10 ⁴		Fungi ×10 ⁴		Soft rot bacteria	
		May 14	Aug. 9	May 14	Aug. 9	May 14	Aug. 9	May 14	Aug. 9	May 14	Aug. 9
Sand	1	0.9	1.1	0.7	0.8	0.5	<10 ⁵	3.2	1.1	<10 ⁴	<10 ⁴
	2	1.4	1.5	2.9	0.4	<10 ⁵	<10 ⁵	1.1	0.5	<10 ⁴	<10 ⁴
	3	0.8	0.9	0.3	1.0	<10 ⁵	<10 ⁵	3.7	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴
	Ave.	1.0	1.1	1.3	0.7	0.5		2.6	0.8		
Control ^{b)}	1	6.0	8.1	3.1	13.9	4.2	4.4	8.3	1.3	<10 ⁴	<10 ⁴
	2	7.5	8.8	2.3	12.7	2.9	3.8	10.0	3.8	<10 ⁴	<10 ⁴
	3	7.8	14.6	2.4	21.1	8.4	4.4	7.2	5.6	<10 ⁴	<10 ⁴
	Ave.	7.1	10.5	2.6	19.2	5.1	4.2	8.5	3.9		

a) Cfu/g of oven-dried soil

b) Continuously Chinese cabbage-cropping soil

の松林周辺から砂土を採取した。5月12日鶴岡市高坂の山形大学農学部附属農場に埋設した18号素焼鉢に充填後¹⁹⁾直ちにハクサイ(松島交配新六号)を播種した(春播)。同様に8月6日にも素焼鉢を充分洗浄後未耕砂土をつめかえて播種した(夏播)。比較対照のため、同附属農場のハクサイ連作ほ場の土壌を供試し、素焼鉢は砂土および土壌とも各々10個使用した。施肥、肥培管理はすべて前報¹⁹⁾の通り行った。

供試土壌の微生物フローラの調査

砂土および土壌を充填した素焼鉢各々3個を選び、春播では5月14日、夏播では8月9日深さ5cmの部位の3ヶ所から採取した。各鉢ごとに充分混合し、前報¹⁸⁾と同様に微生物フローラを調査した。

軟腐病の発病調査

清水らの方法¹⁵⁾により春播では7月8日から、夏播では10月3日からいずれも一週間間隔で各々4回および5回発病調査を行った。

ハクサイ根圏土壌中での軟腐病菌の増殖

春播では7月29日、夏播では10月30日に地上部の生体重を測定後、根圏土壌中の軟腐病菌を前報^{17,18,19)}の方法で測定した。

分離菌株の同定試験

病斑および根圏土壌からの分離菌を単集落分離後、前報¹²⁾と同様に同定試験を行った。供試菌株は春播、夏播とも砂土の病斑および根圏土壌より各々5菌株、土壌では各々3菌株の合計26菌株とした。比較対照菌として農業技術研究所(現農業環境研究所)保存の軟腐病菌 *Erwinia carotovora* 7154を供試した。

結 果

砂土および畑土壌の微生物フローラ

全菌数は5月14日には砂土で10⁴~10⁵(乾土1gあたりcfuで以下同じ)、畑土壌で10⁵、8月9日には各々10⁴~10⁵、10⁵~10⁶のレベルであった。色素耐性(グラム陰性)菌数は両調査日とも砂土では10³~10⁴のレベルであったが、畑土壌では5月14日には10⁴、8月9日には10⁵のレベルであった。放線菌数は両調査日とも砂土では10⁴以下、畑土壌で10⁵のレベルであった。また、糸状菌数は両調査日とも砂土で10³~10⁴、畑土壌で10⁴~10⁵のレベルであった。このように全体として砂土では畑土壌に比べ、微生物数は少ない傾向が見られた。なお、軟腐病菌は本実験に用いた検出法のレベルでは全く検出されなかった(第1表)。

軟腐病の発病調査

発病調査の結果を第2表に示した。春播の砂土では7月22日まで軟腐病は発生しなかった。しかし、7月29日には5個体に発生し、その発病指数は個体で異なり10~80の値を示した。畑土壌では7月8日に2個体が発病した。その後病勢は進行し、7月15日以降には全個体が発病した。発病指数もたかく、腐敗のため倒伏する個体もみられた。夏播の場合、砂土では10月9日から軟腐病が発生した。しかし、10月23日までは発病指数が10で軽症であったが、10月30日には8個体が50の発病指数を示した。他方、畑土壌では10月3日からすでに発病し、その後おおむね50の発病指数で推移したが、10月30日には50~80で腐敗のため倒伏する個体もみられた。

Table 2. Susceptibility index of Chinese cabbage to soft rot.

	No. of pot	Spring sowing				Summer sowing				
		Jul. 8	15	22	29	Oct. 3	9	18	23	30
Sand	1	0	0	0	0	0	10	10	10	50
	2	0	0	0	50	0	10	10	10	50
	3	0	0	0	0	0	0	10	10	50
	4	0	0	0	10	0	0	10	10	50
	5	0	0	0	80	0	0	10	10	10
	6	0	0	0	0	0	0	10	10	50
	7	0	0	0	10	0	10	10	10	50
	8	0	0	0	50	0	0	10	10	80
	9	0	0	0	0	0	10	10	10	50
	10	0	0	0	10	0	0	10	10	50
Control ^{a)}	1	0	10	50	50	10	50	50	50	80
	2	0	50	50	50	10	50	50	50	80
	3	10	100	100	100	10	50	80	80	80
	4	0	50	50	50	—	—	—	—	—
	5	0	10	100	100	10	50	50	50	50
	6	0	50	50	50	10	50	50	50	80
	7	0	10	10	50	10	50	50	50	50
	8	0	10	50	100	10	10	50	50	50
	9	10	100	100	100	10	50	50	50	80
	10	0	10	10	50	10	50	50	50	50

a) Continuously Chinese cabbage-cropping soil

Table 3. Multiplication of soft rot bacteria in rhizosphere of Chinese cabbage.

	No. of pot	Spring sowing	Summer sowing
		Jul. 29	Oct. 30
Sand	1	1282.1 ^{a)}	2.2
	2	2061.7	1.1
	3	250.0	<10 ⁴
	4	0.5	1.1
	5	3227.0	<10 ⁴
	6	5.0	<10 ⁴
	7	1.0	1.7
	8	3.6	<10 ⁴
	9	1.5	16.7
	10	2583.7	<10 ⁴
Control ^{b)}	1	8.8	4.6
	2	1.1	1.3
	3	25.8	9.9
	4	1573.6	1.3
	5	13.2	<10 ⁴

a) Cfu/g of oven-dried soil, ×10⁴

b) Continuously Chinese cabbage-cropping soil

根圏土壌における軟腐病菌の増殖

春播の場合、砂土では1個体あたり0.92kgの生体重で結球も不完全であった。しかし、10個体の根圏で軟腐病菌が増殖し、10³~10⁷cfu/gのレベルに達した。畑土壌では平均2.28kgの生体重で結球も良好であった。軟腐病菌は調査した5個体のすべての根圏で増殖し10⁴~10⁷cfu/gのレベルであった。夏播では、砂土で個体あたりの生体重は1.67kgであったが完全な結球はみられなかった。畑土壌の場合、ハクサイは完全に結球し、生体重も2.99kgに達した。軟腐病菌は砂土で10個体中5個体、畑土壌で5個体中4個体の根圏で増殖し、10⁴~10⁵cfu/gのレベルに達した(第3表)。

分離菌株の同定試験

分離菌株はブイヨン寒天培地では中高、円形、平滑で湿光を帯び、乳白色でバター質状の集落を形成した。変法ドリガルスキー培地²¹⁾では、中心部が黄色、周辺部が透明、円形の集落で、培地全面が黄変した。CVP培地¹⁶⁾では25℃、1日後に円筒状の穿孔(pit)を形成した。ハクサイ中肋やニンジン根部組織に軟腐症状をひきおこし、運動性でグラム陰性の通気嫌気性

Table 4. Some bacteriological characteristics of the present isolates.

Characteristics	Present isolates	<i>E. carotovora</i> 7154 ^{g)}
Flagellation	P ^{a)}	p
Gram staining	- ^{b)}	-
Anaerobic growth	+ ^{c)}	+
Motility	+	+
H ₂ S production	+	+
Indole production	V ^{d)}	-
Litmus milk	rac ^{e)}	rac
O/F test	F ^{f)}	F
Nitrate reduction	+	+
Gelatin liquefaction	+	+
Levan formation	V	-
Acetoin production	+	+
Methyl red test	V	+
Phenylalanine deaminase	-	-
Catalase	+	+
Oxidase	-	-
Lecitinase	-	-
Phosphatase	-	-
Potato soft rot	+	+
Growth in 5% NaCl	+	+
Growth at 37°C	+	+
Sensitivity to erythromycin	-	-
Acid from glucose	+	+
lactose	+	+
sucrose	+	+
maltose	-	-
raffinose	+	+
palatinose	+	+
dextrin	-	-
mannitol	+	+
glycerol	+	+
α -methyl glucoside	-	-

a) Peritrichous

b) Negative

c) Positive

d) Variable among isolates

e) Reduced, acidified and curdled

f) Fermentative

g) Reference strain

菌であった。また、分離菌株はいずれもフラクトース、ガラクトースなどの糖類から酸を生成し、ゼラチン液化、カタラーゼ活性は陽性、インドール産生、フォスファターゼ活性は陰性、グルコースを発酵的に分解した。これらの諸性質から分離菌はいずれも Facultatively anaerobic Gram-negative, *Erwinia* 属の *caroto-*

vora 群¹⁰⁾に属するものと判定された。さらにパラテノースの利用、抗生物質に対する感受性など *carotovora* 群内の種のカテゴリ基準的諸性質^{3,10)}に関する試験結果と対照菌のそれらの諸性質より、分離菌はいずれも *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* と同定された (第4表)。

考 察

野菜類軟腐病菌 *Erwinia* spp. は土壤や植物残渣から頻繁に分離される²⁾。また、宿主作物を栽培したことのない畑^{11,18)}や未耕土壤^{8,9,19)}でも軽症ながら軟腐病が発生することから、本菌は耕地、未耕地に関係なく広く土壤に分布・生存しているものと考えられている。

植物病原細菌の土壤における生存様式は多種多様であり¹⁾、軟腐病菌の場合、*Ps. solanacearum* や *A. tumefaciens* などと同様に作物の有無に関係なく土壤中での増殖や生存が可能であり、病気は一時的な (ephemeral) もので、土壤腐性菌 (true soil saprophyte) に類別できると指摘されている^{1,14)}。しかしながら、これとは反対に本菌の土壤中での生存は作物の根に依存しており (root epiphyte)、宿主植物が存在する場合には増殖できるものの、それを欠く場合には徐々に密度が低下すること、植物残渣土でも分解するまで生存可能であることなどが報告されている¹⁴⁾。このように土壤中での本菌の分布・生存に関しては未だに多くの疑問が残されている。いずれにしても、土壤中で腐生的に生存している本菌が作物の生育にともなって増殖し、感染源となって軟腐病をひきおこすことから、土壤は本菌の reservoir の役割をもつと理解されている²¹⁾。このような観点から、本研究では山形県庄内砂丘の未耕砂土を用い、砂土にも本菌が生存しているか否かを検討した。

供試の砂土の微生物数は、畑土壤のそれらに比べ少ない傾向がみられた。また、ハクサイの播種前にはいずれの土壤からも軟腐病菌は本実験で用いた検出方法では検出されなかった。ハクサイを素焼鉢に栽培した場合、軟腐病の発病程度は鉢の大きさに左右される¹⁷⁾。今回は畑に栽培したものと同程度に発病する18号鉢を用いたが、個体当りのハクサイ生体重は春播で0.92kg、夏播で1.67kgであり、畑土壤でのそれらの各々約40%および50%にとどまり、結球も不良であった。また、軟腐病の発病程度は畑土壤に比べ軽症であった。本病の被害はハクサイの生育期や生育状態等に左右されることから²¹⁾、有機物含量が少なく、本菌によって汚染されていることがある推肥⁵⁾を施用しなかったことによると推察される生育不良が砂土での軽症な発病程度と関係しているものと考えられる。

一方、根圏における本菌の増殖は砂土の春播で10個体(100%)、夏播で5個体(50%)、畑土壤の春播で5個

体(100%)、夏播で4個体(80%)で起こり、 $10^3 \sim 10^7$ cfu/g のレベルに達した。これらの増殖した病原菌は細菌学的性質および接種試験の結果より *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* と同定された。

ハクサイ栽培ほ場では、細菌や糸状菌の胞子が150cmの高さのところでも浮遊しており、軟腐病の発生時期にはその病原菌が露滴や雨水から検出され、また、罹病株周辺では病原菌が地表面に落下していた²⁰⁾。これらの事実は、タバコ野火病菌¹²⁾やコンニャク葉枯病菌⁶⁾のように罹病個体からの風による飛散、ジャガイモ黒脚病菌^{4,13)}のようにエロゾルによる飛散がほ場の軟腐病菌でもおこっている可能性がある。室内実験では土壤と同様に砂土に導入した軟腐病菌は短時間で死滅する⁷⁾。しかしながら、ほ場では本実験のように軟腐病菌が検出されない砂土でも外部から何らかの原因で軟腐病菌が侵入、定着し、感染源となる可能性が考えられるので、今後詳細な研究が必要である。

今回の実験結果より、作物の栽培歴のない砂土にも軟腐病菌が生存しており、reservoir の役割を担っていることが示された。このため、未耕の砂土でも宿主作物が栽培された場合には激しく軟腐病が発生することが明らかとなった。

摘 要

まだ作物を栽培したことのない砂土の軟腐病菌の reservoir としての役割を確かめるための実験を行った。1986年5月10日山形県庄内砂丘地の酒田市浜中地区の松林の周辺から砂土を採取後、本学部附属農場に埋設した18号素焼鉢に充填し、5月12日ハクサイ (松島交配新六号) を播種した (春播)。同様に8月6日にも播種した (夏播)。比較対照として同附属農場のハクサイ連作ほ場の土壤を用いた。砂土の場合、ハクサイの生育は不良であり、軟腐病の発病程度も軽症であった。しかし、根圏での病原菌の増殖は畑土壤と同程度におこり、春播では $5.0 \times 10^3 \sim 3.2 \times 10^7$ cfu/g、夏播では $1.1 \times 10^4 \sim 1.6 \times 10^5$ cfu/g の菌数に達した。これら病原菌は、その細菌学的性質および接種試験の結果より *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* と同定された。以上のことから、未耕砂土にも低密度ながら軟腐病菌は生存しており、畑土壤と同様に未耕砂土も軟腐病菌の reservoir としての役割を持つことが示された。

謝 辞

本研究を行うにあたり、砂土の採取を快諾下さった酒田市浜中早坂剛氏、実験に協力下さった前植物病理学研究室技官斉藤澄子氏、専攻生斉藤渉氏に謝意を表す。また、軟腐病菌の菌株を分譲下さった前農林省農業技術研究所（現農林水産省農業環境技術研究所）土屋行夫技官に謝意を表す。

引用文献

- Buddenhagen, I. W. (1965). The relation of plant-pathogenic bacteria to the soil. Ecology of soil-borne plant pathogens. Univ. Calif. Press. Berkely. pp. 269-284.
- Burr, T. J. and Schroth, M. S. (1977). Occurrence of soft-rot *Erwinia* spp. in soil and plant material. Phytopathology 67:1382-1387.
- Dickey, R. S. and Kelman, A. (1988). *Erwinia. Carotovora* or soft rot group. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS Press. St. Paul. Minesota. pp. 44-59.
- GRAHAM, D. C. and QUINN. C. E. (1977): Quantitative studies on the generation of aerosols of *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* by simulated raindrop impaction on blackleg-infected potato stems. J. Appl. Bact. 43 : 413-424.
- 浜田正美・佐藤正躬(1961). *Erwinia carotovora* (Johns)Holland に関する研究 宮城農短大学術報告 8 : 20-23.
- 林 宣夫(1991):コンニャク葉枯病の二次伝染 日植報 57 : 345-350.
- 菊本敏夫・坂本正幸(1965).そ菜類軟腐病菌の生態的研究 (1) 殺菌土壌および砂における *Erwinia aroideae* (Townsend)Holland の増殖. 東北大農研報 17 : 43-56.
- 小林研三(1986). 原野開墾畑におけるダイコン軟腐病の発生推移. 九病虫研会報 32 : 49-52.
- 小林研三・吉田政博(1989). 原野開墾ダイコン畑におけるダイコン軟腐病の伝染源の探索. 日植病報 55 : 519. (講要)
- Lelliott, R. A. and Dickey, R. S. (1984). Genus *Erwinia*. Bergey's manual of systematic bacteriology. The Williams and Wilkins Co., Baltimore. PP.469-476.
- Mew, T. W., Ho, W. C. and Chu, L. (1976), Infectivity and survival of soft rot bacteria. Phytopathology 66 : 1325-1327.
- 小野那明・赤沢順子(1986). 人工気象下におけるタバコ野火病菌の罹病植物からの飛散 日植病報 52 : 126 (講要) .
- PEROMBELON, M. C. M. (1978). Contamination of potato crops by air-borne *Erwinia carotovora* Proc. 4th. Int. Conf. Plant Path. Bact. 563-565.
- Schuster, M. L. and Coyne, D. P. (1974). Survival mechanism of phytopathogenic bacteria. Ann.Rev.Phytopathol. 11 : 199-211.
- 清水茂・金沢幸三・小林高博(1958). はくさい白腐病抵抗性育種に関する研究 第1報. 自然発病による抵抗性の品種間差異農技研報告 E6 : 71-108.
- 富樫二郎(1986). ラッキョウ軟腐病の病原細菌について. 日植病報 52 : 725-727.
- Togashi, J. (1988). The effect of volume of the soil raising Chinese cabbages on the severity of the soft rot disease. J. Yamagata Agr. For. Soc. 45 : 25-28.
- 富樫二郎(1989). 宿主および非宿主作物の連作がハクサイ軟腐病の発生と土壤微生物フローラの変動に及ぼす影響. 山形大学紀要 (農学). 10 : 771-781.
- Togashi, J. (1991). The incidence of bacterial soft rot of Chinese cabbages grown in uncultivated soil. Bull. Yamagata Univ., Agr. Sci., 11 : 265-271.
- 富樫二郎(1991). ハクサイほ場の露滴や雨水からの軟腐病菌の検出. 山形農林学会報 48 : 55-59.
- 津山博之(1962). 白菜軟腐病に関する研究. 東北大農研彙報 13 : 221-345.