

氏 名 (本籍)	きく 菊	もと 本	とし 敏	お 雄 (宮城県)
学位の種類	農	学	博	士
学位記番号	農	第	4 1	号
学位授与年月日	昭和 4 6 年 3 月 8 日			
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当			
最終学歴	昭和 3 6 年 3 月 名古屋大学大学院農学研究科 修士課程修了			
学位論文題目	そ菜類軟腐病細菌の生態的研究			

(主 査)
論文審査委員 教授 坂 本 正 幸 教授 三 沢 正 生
教授 古 坂 澄 石

論文内容要旨

軟腐病細菌は宿主範囲の広い土壌伝染性の細菌で、わが国はもとより世界に広く分布していて、とくにそ菜類にじんだいな被害を与えることでは、他にその類をみないといわれている。著者は本論文において、自然界における軟腐病細菌の個体群の変動に注目し、これに関与する諸要因とその役割ならびに、その相互関連性を明らかにすることを目的とした。

1. 軟腐病細菌の検出定量法の検討

まず本菌の個体群の変動を追究するには、単にその所在を明らかにするだけでなく、それらを定量的にとらえる必要がある。ところが検出定量法の現状はこうした要請にはほど遠いものがある。そこで、これまで利用されてきた感受性植物の生組織および選択培地による方法の精度とその改良の余地、またその問題点について検討した。人為的な接種試験では、軟腐病細菌の数コの細胞で腐敗がおこり、一般にハクサイ中肋はニンジンよりも感受性が高い。この方法の大きな欠陥は特異性の面にある。つまり土壌中には軟腐病細菌のほか、これらの植物組織の腐敗に関与する、*B. polymyxa* などのような腐敗性細菌が存在しており、この点のチェックがないと誤まった結論を下す危険性のあることを指摘した。選択培地の作製については、選択的抑制作用をもつ色素類あるいは抗生物質などの利用について、さらに探索する必要を認めた。

つぎに著者は、土壌病害の研究領域において、はじめて蛍光抗体法の導入をこころみた。現在、自然の場における検出定量に本法を全面的に応用できる段階には至っていない。しかし、これまでの方法では得られなかった高い特異性は、蛍光抗体法の大きな魅力である。以上のことから、1つの方法にたよるのではなく、実験の目的に応じて、いくつかの方法を組み合わせ、その長所を生かすことによって解決の方向を示した。また蛍光抗体法を直接的な観察に適用し、興味深い知見を与えることができた。このことから本法は、検出定量法だけでなく軟腐病細菌の生態の研究に、有用な手技として広く応用できることはま

ちがない。

2. 軟腐病細菌の生活と土壌中の微生物フローラ

土壌中には多種多様な微生物が存在し、相互に多面的な関係を保ちつつ、社会的な生活を営んでいるといわれている。ところが、軟腐病細菌の生活とそこにせい息する微生物との関係については、ほとんど知られていない。そこで軟腐病細菌の個体群の変動に対する微生物フローラの機能と役割を究明した。その方法論的立場は、系の複雑化に対応し軟腐病細菌の個体群の動きにどのような特徴が認められ、そこに働いている主動因子が何であるかに注目した。

まず単純な系として、殺菌土壌における純粋培養から出発した。軟腐病細菌はこの系で良好な生育を示した。その際、土壌の pH 値および栄養条件が個体群の生長とそのレベルを支配することを明らかにした。この系に、他の細菌を導入し、両細菌種の間で栄養に対する競争をおこさせた。その場合、混合培養の影響は、生育速度の遅い細菌種ほどひどく受けることを示した。つぎに風乾土壌中の微生物群との混合培養で、軟腐病細菌に作用する主動因子は孢子形成細菌群であることを明らかにした。またこの微生物群が軟腐病細菌の生育を阻害するには、一定時間その場で生活し、しかもマスとしての大きさを整える必要があった。さらに新鮮な土壌より分離した、糸状菌、放線菌、PEA 耐性細菌および色素耐性細菌の各グループとの混合培養では、色素耐性細菌の阻害作用がもつとも顕著であった。一方、軟腐病細菌の培養土壌を圃場に深さを変えて埋没した。本菌は野外で越冬し、4 月にその生存を確認できたが、深さの影響はなかった。このことは、深さが異なっても、埋没土壌中にすみついた微生物群の大きさに差がなかったためと考えた。

これらのことから、土壌中の微生物フローラは、それを構成する個々の種の段階までおりれば、軟腐病細菌の生育と生存に対してマイナスからプラスまで幅広い様々な関係を見いだすことができるものと考えられた。しかし、微生物

フローラの機能を全体としてみた場合、それは軟腐病細菌の個体群の大きさを制御し、その個体群密度を低下の方向に導く、主要な要因として位置づけられることを指摘した。

3. 軟腐病細菌の生活と植物

軟腐病細菌と植物との間には、腐生的関係と寄生的関係が存在する。これらの関係が、本菌の個体群の変動にどのようなかわりを持つかを明らかにしようとした。

はじめに、人為的に軟腐病細菌を風乾土壌に接種して、一時的に本菌を優占させ、そこに22種の植物をは種した。根圏に定着し、高い密度でせい息していることの認められた植物は、ハクサイ、キュウリおよびアサガオの3種しかなく、蛍光抗体法の応用によってはじめて、コムギ、エンバク、アズキ、トマト、ヘチマの根圏にも低い密度で生存していることがわかった。そこで、ハクサイ栽培畑に自生していた雑草15種を調査し、ノグシ、アカザ、ツユクサの根圏で軟腐病細菌が高い密度でせい息していることを知った。つぎに、10科30種の作物を圃場に栽培した。軟腐病細菌に対する選択的増菌作用は、十字花科の作物がもっとも顕著であり、マメ科の作物にはその作用が全く認められなかった。そこで再び、11科26種の植物の無菌栽培をおこない、そこに軟腐病細菌を導入した。その結果、すべての植物について本菌の増殖がおこった。このことから、植物の選択的増菌作用における微生物フローラの生態的意義を指摘した。今度は、ハクサイを圃場に栽培し、生育にともなう根圏微生物フローラの変動を分析した。その結果は第1表に示すようであった。

また、ハクサイの中肋は微生物フローラに対して、根圏と同様な作用を示すことを認め、その作用をPhyllosphere-effect(葉圏効果)と名づけた。以上の結果が示すように、植物は土壌中における軟腐病細菌の個体群を増大させる上で、最も有力な要因であると結論した。

第1表 ハクサイの生育にともなう根圏効果の変動

Seedtime	Date of sampling	Sep. 5	Sep. 18	Sep. 26	Oct. 3	Oct. 11	Oct. 20	Oct. 27
Aug. 9, 1967.	Days after sowing	27	40	48	55	63	72	79
	Bacteria	11.1	8.7	9.5	10.1	7.7	22.5	22.2
	Actinomycetes	1.4	1.0	1.8	1.2	1.9	1.8	2.1
	Dye-tolerant bacteria	33.1	56.1	26.5	20.4	30.3	109.5	54.4
	Soft-rot bacteria	? ^a	?	>90.6	>3,769.0	>324.7	5,803.3	>4,051.4
	Fungi	1.2	1.2	0.4	0.2	0.5	0.4	0.9
Sep. 5, 1967.	Days after sowing	0	13	21	28	36	45	52
	Bacteria	-	12.6	10.0	6.9	8.3	17.4	17.2
	Actinomycetes	-	1.0	1.5	1.0	1.3	0.9	0.6
	Dye-tolerant bacteria	-	60.3	58.4	36.0	72.6	84.8	69.2
	Soft-rot bacteria	-	?	?	?	?	1,248.0	>86.8
	Fungi	-	2.2	1.5	0.3	0.6	0.4	0.8

a : Undetected in the rhizosphere soil.

4. 軟腐病細菌の生活と土壌

軟腐病細菌の個体群の変動に対して、微生物フローラと植物とは相反する方向に作用することを認められた。では、この反応の起こる舞台となる土壌は、一体どのような役割を演ずるだろうか。土壌の物理化学的な諸性質が相互に複雑にからみあって、この反応に関与しているものと推察される。ここでは、これらの諸要因を個別的にとり挙げないで、とくに土壌のもつ構造化を中心に検討した。

殺菌土壌に *E. aroideae* と *S. lutea* を混合培養し、洗浄一音波法によって粒団中における分布を調べた。両細菌は土壌粒団中にすみわけている様子はなく、粒団の比較的外部にランダムに分布し、せい息していることがわかった。また培養90日を経過した150コの土壌粒団をそれぞれ調べた結果、2コの粒団に *E. aroideae* がなお非常に高い密度で生存していることを認めた。軟腐病細菌を殺菌土壌に培養し、蛍光抗体法で土壌を直接観察した。本菌の細胞は土壌粒子にランダムに分布していて、明りょうな集落はほとんど観察されなかった。つぎに、ハクサイの根圏土壌における各微生物群の分画をおこない、

第2表に示す結果をえた。

第2表 ハクサイ根圏土壌における微生物群の分布と根圏効果

Organisms	Bacteria	PEA-tolerant bacteria ^{a)}	Dye-tolerant bacteria	Soft-rot bacteria	Actinomy-cetes	Fungi	
Control soil (CS)	$\times 10^6$ 28.0 ^{b)}	$\times 10^5$ 88.7	$\times 10^5$ 6.7	$\times 10^4$ —	$\times 10^5$ 40.7	$\times 10^3$ 158.6	
Rhizosphere soil (RS)	163.3	327.5	306.8	42.7	93.0	195.2	
Outer (%) ^{c)}	CS	36.7	41.0	45.1	—	47.7	66.3
	RS	53.1	59.4	56.3	90.1	39.7	54.3
R/S ratios	Outer ^{d)}	8.4	5.4	57.0	>969.7	1.9	1.0
	Inner	4.3	2.5	36.2	>158.4	2.6	1.7
	As a whole ^{e)}	5.8	3.7	45.6	>645.0	2.3	1.2

^{a)} PEA (phenethyl alcohol). ^{b)} No. /g oven-dried soil.

^{c)} Percent of microbial populations inhabiting outer part of soil aggregates.

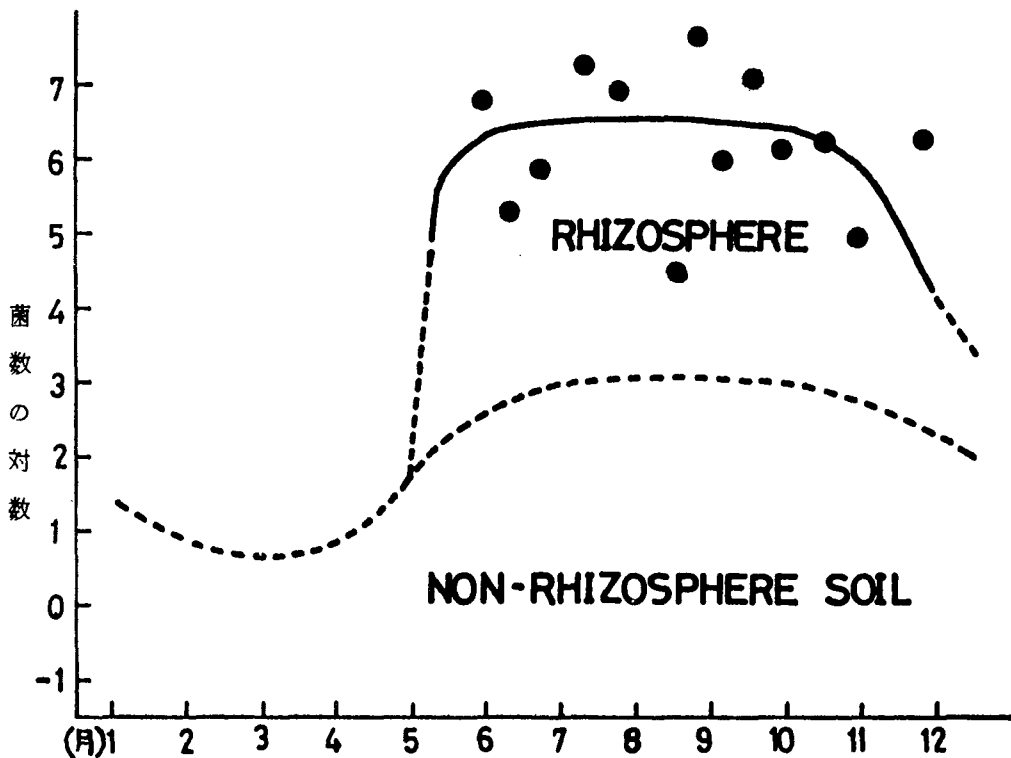
^{d)} Separation of rhizosphere effect into the two parts of soil aggregates.

^{e)} An ordinary meaning of rhizosphere effect.

第2表で特徴的なことは、軟腐病細菌の90パーセント以上の細胞が粒団の外部で増殖している点にある。また他の細菌群も粒団の内部より、外部の方で増殖がより促進されていることがわかった。葉圏土壌についても同様の現象を認めたと。今度は、構造的に注目して、風乾した砂と土壌粒団に軟腐病細菌を接種し、混合培養をおこなった。それらにグルコースを添加した場合、砂では軟腐病細菌の死滅が促進され、マイナスに作用したのに対し、土壌粒団ではプラスの結果を与えた。この現象を構造と栄養との2つの側面から考察した。土壌は不均一な系であり、養分や水分条件も不連続である。このことは、そこにせい息する微生物に対して、複雑で変化に富んだすみ場所を提供するものでありまた土壌は環境の変化に対する抵抗力も大きい。こうした土壌のもつ特徴とこれまで得られた微生物的諸現象から判断して、土壌は微生物フローラと植物の相反する方向での作用を包括的に制御するものとして、位置づけられるという見解を示した。

5. まとめ

自然界における軟腐病細菌の個体群の動きについて、著者はこれまでに得られた知見をもとに、その見解を第1図にまとめた。



第1図 土壤中における軟腐病細菌の個体群の季節的変動

第1図でみるように、土壤中における軟腐病細菌の個体群の動きを、2つの流れに分けた。1つの流れは根圏土壤中でおこり、他の流れは非根圏土壤にみられるものを想定した。いうまでもなく、前者の流れを形成する個体群が実際の発病に直接関与する。また、この流れが後者の流れにどう寄与しているかが

連作の問題点となるものである。一方，自然界において本菌の個体群を基本的に支えるものとして，重要な役割をになうのは後者の流れであると考えている。ここに，軟腐病細菌が土壌微生物としての性格をとどめていることを示した。

審査結果の要旨

軟腐病細菌の土壤中における生活を明らかにすることは、この菌の生活環の大きな部分を占める腐生相での生態と生活環の連続性について明らかにする重要な問題であり、かつ本病防除法を確立するうえに多くの基礎的知見を与えるものであるが、現在のところ、きわめて研究に乏しい。

本研究において注目すべき成果は次のような点である。

- (1) 研究をすゝめるにあたって土壤中の軟腐病細菌の選択培地による検出定量法を改良し、かつ新しく特異性の高い蛍光抗体法を導入して本病菌の生態の研究に有効であることを示した。
- (2) 土壌を用いた *in vitro* の実験および圃場土壌における実験的観察を行なって、本病菌群とこれと共存する土壌微生物群との相互関係を明らかにし、幾多の知見をえ、考察を加えた。
- (3) 軟腐病細菌群の植物根圏土壌中における動向を調査し、作物では十字花科野菜、キュウリ、アサガオの根圏に高い密度でせい息していること、ならびに畑に自生する植物のうちで、アカザなど数種の雑草の根圏にとくに選択的にせい息していることを明らかにした。しかしマメ科作物の根圏には全く認められなかった。一方、多くの植物を無菌的に栽培して、その根圏に本病菌を導入すると増殖がおこることを確かめ、他の微生物群のもつ生態的意義を指摘した。またハクサイ葉表面に多くの軟腐病細菌が生存していること、ハクサイの生育時期によって、その根圏微生物フローラの変動がおこることを示した。
- (4) 本病菌が土壌団粒にせい息している部位は、それらの表面に近い部分であることを洗浄法及び超音波法によって示した。

以上の研究は、軟腐病細菌の土壤中における腐生相の生態に多くの知見をもたらしたものであり、同時に今後の研究に幾つかの問題を具体的に提起したものであって示唆するところが大きいので、農学博士の学位を授与するに値するものとする。