

# ハクサイ軟腐病の研究の現状と課題

山形大学農学部生物生産学科生産生態制御学講座 富 裕 と が し 櫻 じ 二 ろ う 郎

近年食生活の多様化に伴って生食用野菜の周年需要が高まり、多くの野菜類が露地または施設内で周年栽培されるようになった。我が国ではハクサイは葉菜類の中で作付面積、生産量ともダイコン、キャベツ、タマネギについて第4位を占めている(斎藤, 1996)。栽培様式の変化に伴って病害も多発するようになり、現在ハクサイでは25種の病害が記録されている(日本植物病理学会, 1993)。この中の軟腐病の病原菌は、1901年 JONES によりニンジン軟腐病菌として最初に発表された(津山, 1962)。1917年 WINSLOW らが Erwin, F. SMITH 氏の業績を記念して周毛桿菌の植物病原細菌を *Erwinia* 属とした。現在本病原菌は腸内細菌科 *Erwinia* 属の soft rot 群のメンバーで *Erwinia caratovora* subsp. *corotovora* と呼ばれている。本病原菌は極めて多犯性で110余種の作物に寄生し(田部井ら, 1991)、人工栽培のキノコ類でも被害が発生している(伊阪ら, 1992)。ハクサイ軟腐病は最初中肋基部に小型の病斑として認められ、高温多湿の条件下では急速に進展してやがて株全体が軟化腐敗し、年次や地域によっては壊滅的な被害を受けることがある。このため、本病はウイルス病、根こぶ病とともに難防除病害の一つとされ(生越, 1992, 津山, 1979)効果的な防除法の確立が各方面から要請されている。本小文では、ハクサイ軟腐病の研究の現状と課題について若干概説することにする。

## I 土壌中でのハクサイ軟腐病の生存

軟腐病菌は殺菌土壌では急速に増殖し、約7日後に  $10^7 \sim 10^8$  cfu/g (以下、同じ)のレベルに達する。しかし、生土壌(非殺菌土壌)では増殖することなく減少し、7日前後で検出不能となる。一方圃場では菌数が少なく普通の希釈平板法では検出ができないが、ハクサイを栽培するとその根圏や中肋基部と接触している部位の土壌で特異的に増殖し、感染に必要な  $10^5 \sim 10^6$  のレベルに達する(KIKUMOTO, 1980; TOGASHI et al, 1998)。ハクサイ軟腐病は、普通結球後期以降中肋基部から発生することから、この部位で増殖した病原菌が感染源になる

ものと推察されている。この現象は過去に作物の栽培暦のない森林の土壌(TOGASHI, 1991)や砂丘地の砂などでも起こることから、軟腐病菌は耕地、未耕地を問わず広く  $10^3$  以下のレベルで分布、生存し、他の土壌微生物によって活動が抑制され、作物の栽培(主として根からの分泌物)によって活性化(増殖)されるものと理解されている。

## II 土壌中の軟腐病菌の検出・定量の必要性

土壌は微生物の宝庫であり、植物病原菌も土壌微生物群集の一員として生存している。このため1930年以降土壌病害の研究は Microbial ecology の時代といわれ、病原菌の生態を土壌微生物との相互関係の観点から調査、研究することが主流となっている。このため、土壌で他の微生物と共存している病原菌の菌数を的確に検出・定量することが要求され、これまで病原菌の性質によって様々な方法が研究、開発されている(菊本, 1989)。その中で選択培地を用いた希釈平板法が最も広く用いられている。

ハクサイ軟腐病菌の選択培地として1962年変法ドルガルスキー培地が報告され、今日でも広く用いられている。本培地で軟腐病菌は  $25^\circ\text{C}$  で2~3日培養すると黄色で周辺が銀白色に輝く亀裂状の集落を形成するので比較的容易に識別できる(津山, 1962)。欧米ではもっぱら Stewart 培地, CVP 培地 (crystal violet pectate) が用いられている。しかし、この方法の検出限界はおおむね土壌1g当たり  $10^3 \sim 10^4$  のレベルである。本菌はまた宿主柔組織の細胞中間膜を溶解し、水浸状の軟腐症状を引き起こすので、生柔組織(ニンジン円板)に被検土壌の希釈液を接種し、その腐敗の有無で軟腐病菌を半定量的に検出・定量できる(生柔組織法)(津山, 1962)。この検出限界は  $10^0 \sim 10^1$  cfu/ml である。これらの方法を開発した津山、坂本は土壌中で軟腐病菌は作物の栽培、季節などの要因に反応しながら動的に変動していることを明らかにした。しかしながら、ハクサイ軟腐病に関する研究を効率的に行うためにはさらに病原菌の検出・定量の精度を高めることが要請され、増菌法、蛍光抗体法、ファージ法、バクテリオシン法、遺伝子の一部を利用したPCR法などが開発されている。しかし、確実性、容易性、迅速性の点からいまだ解決すべき課題も

多く、その早急な検討、解決が求められている。

### III 土壤中の軟腐病菌の検出・定量への ファージ法の導入

バクテリオファージ（以下ファージと略す）は、宿主細胞に特異的に吸着、侵入後増殖して溶菌を引き起こすウイルスである。これまで多くの植物病原細菌でファージの存在が確認されているが、いずれも種または系統特異性を有するため分類、同定、検出・定量および発生予察などに用いられている。すでにインゲン種子内のかき枯病菌、葉枯病菌の検出やイネ白葉枯病菌の検出・定量にファージが用いられている。ここではファージ法を導入した土壤中の軟腐病菌の検出・定量の結果を述べることにする。

#### 1 検出・定量

ブイヨンに被検土壌と既知の数のファージを加え25°Cで培養する。もし被検土壌に軟腐病菌が存在していれば、溶菌感染サイクルが繰り返されファージ粒子は増加する。このため培養後ファージ粒子を溶菌斑計数法でカウントし、増加していれば被検土壌に軟腐病菌が存在していたと判定する。土壌微生物群存在下での開放系でも軟腐病菌はファージとの相互作用が起こる $10^4$ /mlのレベルに増殖する。被検土壌中の軟腐病菌の菌数を種々変えて検討したところ、 $10^1$  cfu/mlのような低いレベルまで放出することができた（富樫，1976）。1個の宿主細胞から放出されるファージ粒子数は一定条件下では一定の値となり、この数は平均放出量といわれている。被検土壌をブイヨンに加えて振とうし軟腐病菌を浮遊させる。この浮遊液にファージを加え軟腐病菌に吸着させる。その後抗ファージ血清を加え遊離ファージを不活化し、定常期に放出されたファージ粒子数と平均放出量から土壤中の軟腐病菌の菌数を定量できる。軟腐病菌の菌数を種々替えて土壌に添加して調査したところ、 $10^2$  cfu/gのレベルまで定量できることが確認された（SUZUKI and TOGASHI, 1978）。同様の方法でハクサイ葉上や組織内で他の微生物と共存している軟腐病菌を検出・定量できることが明らかにされた。

#### 2 ファージ法の圃場への応用

山形大学農学部附属農場で既知の軟腐病菌とファージの系を用い、ハクサイ根圏および葉面に添加した軟腐病菌の生存と感染源としての役割、維管束を通してのハクサイ体内での移動と分布など、一連の行動を明らかにすることができた。ところでファージ法を実際の圃場に適用する場合には、供試ファージの宿主範囲とその圃場に生存する軟腐病菌のファージ感受性がファージ法の有効

性を左右する。ファージの宿主範囲は病原菌の種によって異なり、他の種にまで及ぶ広いものから、同一種内の系統に限られる系統特異性のものまで実に多様である。

1984年6月から7月まで、鶴岡市周辺で軟腐病罹病野菜類から分離した15系統の軟腐病菌ファージはいずれも高い系統特異性を示し、分離に用いた系統以外にはほとんど反応しなかった。これらのファージと1984年から3年間同一の場所で17種類の野菜から分離した839菌株の軟腐病菌（同定試験の結果 *E. corotovora* subsp. *carotovora* と同定された）との反応を調べたところ、291菌株（34.4%）が感受性で、その反応パターンの差異によって11のファージ型に類別された（富樫，1989，1990）。このことは残りの70%台の軟腐病菌は実際に発病に関与しても供試のファージでは検出・定量できないことを示している。しかし、この障害はいくつかのファージを組み合わせることで供試することにより回避できることから、ファージ法は土壌や茎葉など他の微生物と共存している軟腐病菌を検出・定量できる有効な方法といえることができる。

このように軟腐病菌はファージ感受性のパターンによっていくつかの系統（ファージ型）に類別されたが、ファージ型と分離源の野菜の種類との間に特別な対応関係はみられなかった。しかし、分離頻度はファージ型によって異なり、特定の型が優占的に分離されたが、病原力の強弱と間に一定の関係はなかった。カナダでは灌漑水や軟腐病罹病ジャガイモ塊茎などの分離源によって病原菌の血清型が異なり、また地上部と地下部のグループに大別される。普通、軟腐病は血清型IIIに属し土壌に生息している地下部のグループによって発病する。これに対して血清型XVIIIに代表される地上部のグループは主にエロゾルや昆虫によって伝搬され、高い湿度条件下で多汁質の作物に軟腐病を引き起こす（DeBoer, 1987）。ハクサイ軟腐病菌でもそのファージ型によって分離頻度が異なることから、土壌中での腐生的生存能力や感染、発病能力などがファージ型によって異なる可能性があり、今後病原菌の行動を系統レベルで追跡することも必要である。

### IV 土壌中でのハクサイ軟腐病菌の越冬

軟腐病菌の越冬に関して成書（後藤，1990；KIKUMOTO, 1980）に「主として土壌中であって越冬する」、「土壌中や罹病植物の遺体で越冬する」等と記載されている。しかしながらいまだ実験的に証明されていないので、リファンピシ耐性とファージ感受性で標識した軟腐病菌を供試して検討した。

1996年8月2日素焼鉢(18号)にハクサイ(松島交配W-1116)を播種した。9月18日にリファンピシン耐性でファージ感受性の異なる13系統の軟腐病菌を混合接種し、全身的に発病した株をそのまま土壤に埋没し越冬させた。越冬後の1997年4月30日ハクサイを播種し、土壤、根圏および発病した株の病斑から前年に埋没した病原菌の回収を試みた。この結果、土壤からは希釈平板法では検出されなかったが、0.1~0.2 cfu/gのレベルまで検出できる増菌法では0.5 cfu/gの菌数で検出された。また、根圏や病斑からは希釈平板法で容易に検出された。これらの発病株を除去後同じ鉢に1997年8月5日ハクサイを播種し、発病株の根圏や病斑から病原菌の再回収を試みたところ、リファンピシン耐性菌が再回収された。これらのことから、軟腐病菌は土壤や罹病植物で越冬し、次年度の感染源となることが明らかとなった。換言すれば、軟腐病菌は土壤中での腐生生活とハクサイでの寄生生活を繰り返しながら生存していることが実験的に証明された(富樫ら、未発表)。次に分離菌株のファージ感受性を濾紙法で調べたところ、分離菌株は供試の13系統のうちのわずか3系統にとどまり、系統(ファージ型)間で分離頻度に著しい差異が見られた。同一病原細菌の種内または系統間でのこのような優劣は他の微生物、宿主作物および環境条件が関与する選択圧によるといわれているが、今後その内容の具体的な解明が必要である。また、宿主依存性生存形態の腐生的エコタイプと腐生的生存形態の寄生的エコタイプに分化している可能性もあり、この検討も今後の課題である。

## V 伝染経路

ハクサイ軟腐病菌は殺菌土壤でも圃場(非殺菌土壤)と同様に発病する(TOGASHI et al., 1998)。この事実は、本病原菌が増殖した土壤とハクサイ中肋基部との接触以外の伝染経路が存在することを示している。これまでナノアオムシ、ヨトウムシなど体表面や腸管に病原菌が生存している昆虫による伝染、地表面から雨滴の跳ね上がりや風による土壤粒子の飛散に伴う伝染、罹病組織からの飛沫伝染などが指摘されている(後藤, 1990; KIKUMOTO, 1980)。ジャガイモ塊茎は雨水とジャガイモ黒脚病罹病組織との衝突によって生じるエロゾルによってジャガイモ黒脚病菌に再感染する。欧米では排水路、堀、小川、湖水、高原や未耕地土壤、雨水、雪、海水からも軟腐病菌が検出されている(DeBOER, 1987)。しかし、罹病植物が生育している場所の地下水からは全く検出されないことから、この病原菌は広範囲に飛散しているエロゾルに由来すると考えられる(QUINN et al.,

1980)。山形大学農学部附属農場で確かめられたように殺菌土壤に栽培したハクサイでも軟腐病が発生すること、ハクサイ圃場の土壤と病斑で軟腐病菌のファージ型が異なることがあること、雨水からも軟腐病菌が検出されること、ハクサイ軟腐病が土壤から離れた結球内部から発生することがあることなどから、ハクサイ圃場でもエロゾルと共に軟腐病菌が広く飛散しており、感染源となっている可能性が強く示唆された。

ハクサイ中肋組織には結球後期以降軟腐病菌が潜伏感染している(KIKUMOTO, 1980)。ジャガイモ、キュウリ、タマネギ、パイナップルの果実でも同様のことが観察されている。潜伏感染には宿主組織内の栄養成分のアンバランス、ポリフェノールオキシダーゼ活性が関与しているといわれている。ジャガイモ黒脚病の場合、潜伏感染している病原菌が感染源となるが、ハクサイでは潜伏感染している病原菌の役割や意義は不明であり、今後の課題である。これまでとかく土壤伝染が重視されがちで、それ以外の伝染経路に関する研究は少なく、実験的に証明されたものは極めて少ないように思われる。効果的な防除法を確立するためにも、今後早急に本病の伝染経路に関する総合的な研究が望まれる。

## VI ハクサイ軟腐病の防除

ハクサイ軟腐病の防除法として、無病地に栽培する、連作を避けて宿主以外の作物と輪作する、罹病植物の除去、除草など圃場衛生に努める、キスジノミハムシなどの害虫を駆除する、排水を良好にするため高畦にして密植を避ける、播種期を遅延する、抵抗性品種を栽培する、晴天日に収穫する、農薬を散布する、などと記載されている(後藤, 1990; 田部井ら, 1991)。しかしこれらの防除法については、他の病害の例から類推しての可能性を示唆したものもあり、今後実験的に証明する必要がある。たとえば、本病原菌は広く土壤に分布、生存しているため、無病地を選ぶのは実際には困難であろう。また、宿主以外のイネ科、マメ科作物との間作や輪作によって軟腐病が特に軽減される傾向はみられなかった(富樫, 1976)。

本病原菌のように、多犯性で長期間土壤に生存できる腐生的性格の強い病原菌に対しては、圃場衛生、播種期の変更、高畦栽培、マルチング、施肥法の改善などを適宜組み合わせた耕種的方法が効果的である。事実、敷ワラ、厩肥によるマルチング、高畦栽培、寒冷紗被覆等で高い防除効果が得られている(岡本, 1965)。

窒素肥料の過多は作物を過繁茂させ、病害抵抗性を低下させる(田部井ら, 1991)。ハクサイの栽培方法で多

肥を避けることと記されているのはこの辺の事情を反映しているであろう。一方、ハクサイ軟腐病はハクサイの生育期と密接に関係しており、通常十分に生育した結球後期から発生する。これらのことから、なんらかの方法でハクサイの生育を制御して過繁茂を避けるとともに、病害抵抗性を高めて軟腐病の被害を軽減できる可能性が考えられる。事実、大きさの異なる素焼鉢でハクサイを栽培したところ、発病指数(被害)は鉢の大きさ、換言すれば、生育状態に大きく依存していることが観察された。すなわち、鉢が大きくなるに従って生体重が増加して発病指数も高くなり、対照区(圃場)のハクサイと同様に激しく発病した。これとは反対に鉢が小さく生育が不十分なハクサイでは、根圏で病原菌は $10^5 \sim 10^6$  cfu/gのレベルに増殖したが軟腐病は発生しなかったことから、軟腐病の発生はハクサイの生育状態に強く依存していることが明らかとなった(TOGASHI, 1988)。また、堆肥と化学肥料(硫安、過磷酸石灰、塩化加里)を種々組み合わせてハクサイを栽培し、生育を制御することによって軟腐病の被害が軽減された(富樫ら, 1977)。施肥法の違いによって病勢の進展が左右されることは果樹類のせんこう細菌病、火傷病、キャベツ黒腐病などでも知られている。これまで記載されているハクサイ軟腐病の防除法の中で、最も効果的な方法は、ハクサイの播種適期を遅延することである。この機作は発病の適温を回避することにあるが、あまり遅く播きすぎると軟腐病が発生しないかわりに、生育が不良で結球も不完全となり商品価値が著しく低下する。したがって、地上部の生育を制御したり播種適期を調節する耕種的防除では、軟腐病の防除と商品価値の維持が両立できる栽培方法を地域ごとに吟味し確立することが必要である。

最近、化学合成薬剤の環境への影響などの理由から作物病害の生物防除法に大きな期待が寄せられ、いろいろの病害で研究されている。ハクサイ軟腐病については、最近東北大学遺伝生態研究センターの菊本らにより変異誘発剤エチルメタンスルホニル処理で作出された軟腐病菌の非病原性菌株は病原性菌株の病斑形成を強く抑制し

た(高原, 1993)。この抑制作用はバクテリオシンによると推察されているが、圃場でも卓越した防除効果が認められた。種々の試験を経てこの菌株は、今回軟腐病に対する世界最初の微生物農薬(商品名:バイオキパー)として市販されて実用化の段階に入っており(KIKUMOTO et al., 1997)、今後各地での防除効果が期待されている。

#### 引用文献

- 1) DEBOER, S. H. (1987): Plant pathogenic bacteria. Dordrecht, pp. 121~128.
- 2) 後藤正夫 (1990): 植物細菌病学概論, 養賢堂, 東京, pp. 232~233.
- 3) 伊阪ら (1992): 日植病報 58: 596 (講要).
- 4) KIKUMOTO, T. (1980): Bull. Inst. Agr. Res., Tohoku Univ. 31: 19-41.
- 5) 菊本敏雄 (1989): IGEシリーズ7, 東北大学遺伝生態研究センター, pp. 27~39.
- 6) KIKUMOTO, T. et al. (1997): Pro. Plant Growth-Promoting rhizobacteria, Sapporo, pp. 118~119.
- 7) 日本植物病理学会 (1993): 日本有用植物名目録2 (野菜, 草花), 黒船印刷, 静岡, pp. 3~5.
- 8) 生越 明 (1992): 土壤伝染病談話会レポート1. 日本植物病理学会土壤伝染病談話会.
- 9) 岡本康博 (1965): 日植病報 30: 103~104.
- 10) QUINN, C. E. et al. (1980): J. Appl. Bacteriol. 49: 175~181.
- 11) 斎藤 隆 (1996): 新版蔬菜園芸, 文永堂出版, 東京, pp. 32~39.
- 12) 高原吉幸 (1993): 日植病報 59: 581~586.
- 13) SUZUKI, Y. and J. TOGASHI (1978): Phytopathol. Z. 93: 137~147.
- 14) 田部井英夫ら (1991): 作物の細菌-診断と防除-日本植物病疫協会, 東京, pp. 211~213.
- 15) 富樫二郎 (1976): 山形大学紀要(農学) 7: 347~366.
- 16) TOGASHI, J. (1988). J. Yamagata Agr. For. Soc. 45: 25~28.
- 17) 富樫二郎 (1989): 山形大学紀要(農学) 10: 771~781.
- 18) ——— (1989): IGEシリーズ7, 東北大学遺伝生態センター, pp. 40~50.
- 19) ——— (1990): 日植病報 56: 309~314.
- 20) TOGASHI, J. (1991): Bull. Yamagata Univ. Agr. Sci. 11: 265~271.
- 21) ——— (1997): 山形大学農学部農場報告 9: 17~22.
- 22) TOGASHI, J. et al. (1998): Bull. Yamagata Univ. Agr. Sci. 13: 29~37.
- 23) 津山博之 (1962): 東北大農研彙報 13: 221~345.
- 24) ——— (1979): 化学と生物 17: 190~194.
- 25) ——— (1980): 植物防疫 34: 294~298.