

野菜類軟腐病菌の増殖に及ぼすハクサイ組織からの抽出物の影響

北 山 淳¹⁾・富 樫 二 郎・生 井 恒 雄
山形大学農学部生物生産学科生物生産生態制御学講座
(平成13年10月1日受理)

Effect of the Extracts and Exudates from Chinese cabbages on the Growth
of Soft Rot Bacterium, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*.

Jun KITAYAMA¹⁾, Jiro TOGASHI and Tsuneo NAMAI
Department of Bioproduction, Faculty of Agriculture,
Yamagata University, Tsuruoka, 997-8555, Japan
(Received October 1, 2001)

Summary

Nutrient substances leaked from the roots of Chinese cabbages (*Brassica campestris*, Pekinensis group) have been commonly assumed to play an essential role in the preferential growth of soft rot bacterial pathogen, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in rhizosphere of the plant from its late wrapping stage and continuous maintenance of high population level as 10^5 - 10^7 cfu/g of soil in the site to harvest time. To make clear the mechanism of the growth and its maintenance, the present study was carried out to examine the effect of water-exudated and water-extracted solution of the roots and petioles of the plant on the growth of the organism. The high population level of about 10^5 - 10^7 cfu/g of soil in the rhizosphere declined rapidly by cutting the upper grand part of the plants. Thus, it was thought that the growth of the organism was closely concerned with some nutrient substances leaked from the root, which depended on photosynthesis of the plant. The organism hardly grew in water-exudated soil solution. Addition of water-exudated or water-extracted solution of roots or petioles of the plant to the water-exudated soil solution enhanced the growth of the organism and attained to a level of 10^7 cfu/ml at 25 for 24 hrs. However, the efficacy of the adding the water exudated or water extracted solutions to the soil solution extracted by autoclaveing (120 , 2 hrs.) was unclear. The results may indicate that some substances which can rise the preferential growth of the organism are contained in the tissues of roots and petioles of Chinese cabbage. Moreover, the growth of the organism was enhanced by addition of some nutritive substances contained in tissues of Chinese cabbages and in soil solution extracted by heating treatment as autoclaving. Sixteen kinds of amino acids and two sugars detected in the materials from tissues of the plant though they were variable according to growing stage of the plant and degree of cutting the upper ground part of the plant, seven kinds of polyphenol-like substances were also detected. There was a tendency that they were more abundant in the extracted solution than the exudate ion quantitatively and qualitatively. Some of amino acids such as aspartic acid and the two sugars, glucose and fructose were confirmed to induce the preferential growth to the organism by adding in synthetic medium and soil. A role of polyphenol-like substances in the growth of the organism was not examined. It may be concluded that the roots and the petiole of the plant contain amino acids and sugars inducing the preferential growth of the organism. Further study should be need to determine whether or not the substances leaked from the roots and petioles in a field and actually attribute to the preferential growth of the organism and maintenance of high population level in rhizosphere of the plant.

Key words : *E. carotovora* subsp. *carotovora*, preferential growth, nutrient substances

キーワード：野菜類軟腐病菌，増殖，ハクサイ抽出物

1) 現在：アグロカネショウ株式会社 (Agro-kanesho Co., LTD.)

緒 言

野菜類軟腐病菌 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* は多犯性の土壌伝染性植物病原細菌として広く知られている^{6, 23)}。本菌の腐生世代における土壌中での密度は極めて低く、通常の方法で検出・定量することは困難である^{10, 21, 23)}。しかしながらハクサイなどの宿主作物や、ある種の雑草が生育するとそれらの根圏では特異的に増殖し、生育終期まで $10^5 \sim 10^7$ colony forming unit/g, (以下cfuと略記する) の高い菌数が保持される^{2, 10, 22, 23)}。ハクサイ軟腐病は主として高い病原菌密度を保持している土壌と直接接している葉柄中肋基部から発生することから、このように増殖した病原菌が感染源の役割を担うものと理解されている。

ハクサイ根圏における軟腐病菌の増殖は種々の要因によって引き起こされるが、根から分泌されている化学成分がその主要な一因と考えられている^{10, 22, 23)}。しかしながら、技術的理由からその証明は未だになされていない。本研究では野菜類軟腐病菌の土壌中の増殖に及ぼすハクサイ根分泌物の役割を明らかにするために、ハクサイ根部組織中に含まれるアミノ酸、糖類およびポリフェノール

類等の抽出物を分析し、それらの物質の土壌中における軟腐病菌の増殖に及ぼす影響を検討した。

なお、本研究の概要は平成12年度日本植物病理学会東北部会（平成12年9月28日）で発表した。

材料及び方法

共通的な材料及び方法

圃場 ハクサイの栽培は鶴岡市高坂の山形大学農学部附属農場内のハクサイ連作圃場で行った。

ハクサイ品種 供試ハクサイ品種は松島交配W-1116, (渡辺採種場), CR-月華および黄駒(小林種苗)で4月(春播)と8月(夏播)に播種し、露地栽培とした。なお、供試品種はいずれも根こぶ病抵抗性品種である。

栽培法施肥法等の栽培方法はTogashiの方法²²⁾に準じて行った。

根圏土壌の採取と病原菌の定量 結球後2週間間隔でハクサイの根圏土壌を空中振とう法⁴⁾で採取した。土壌10gを滅菌水90mlに加えて、10分間(200ストローク/分)振とうした後、変法ドリガルスキー培地(MD)²³⁾を用い希釈平板培養した。25℃, 48時間後平板上の軟腐病菌のコロニーを計数し、乾土1gあたりの生菌数(cfu)

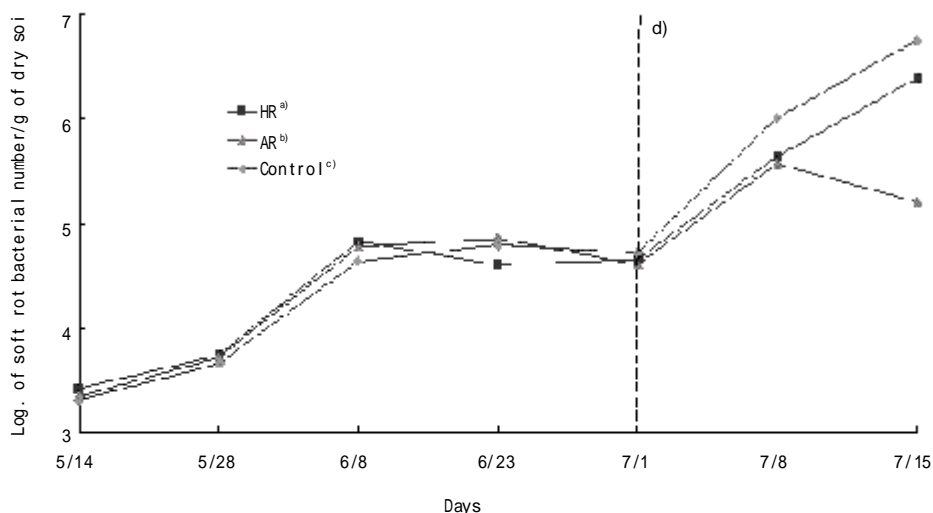


Fig. 1. Effect of cut of upperground of Chinese cabbage on the growth of *E. carotovora* subsp. *carotovora* in rhizosphere in spring crop. (1999, cv. CR-Gekka)

a) Half upperground part was cut.

b) All upperground part was cut.

c) Untreated.

d) Day treated.

で表示した．葉圏土壌⁹⁾については滅菌葉匙で採取した後同様に菌数を調査した．

ハクサイ地上部切断処理が根圏および葉圏土壌における軟腐病菌の菌数に及ぼす影響 ハクサイの地上部を除去することで根から分泌される物質の成分が変動し、根圏および葉圏土壌中の軟腐病菌の菌数も変動する可能性がある．そこでハクサイ地上部を播種60日後にそれぞれ全切除（AR区）および縦に2分の1切除（HR区）し、経時的に根圏および葉圏土壌の軟腐病菌数を希釈平板法で調べた．対照区は無切除のハクサイを用いた．培地は変法ドリガルスキー培地（MD）を使用した．

ハクサイ組織液の調製 供試圃場で栽培したハクサイ根部および中肋組織を十分水洗後その10gを乳鉢で磨砕した．その後脱イオン水20mlを加え、10分間（200ストローク/分）振とう後、遠心分離（12000×g、20分）した．この上澄液を孔径0.2μmのメンブランフィルターでろ過し、ろ液を抽出液とした．また、ハクサイ根全体および中肋組織10gをそれぞれ脱イオン水50mlに室温で1時間浸漬後、同様の方法で得たる液を浸出液とした．

土壌抽出液の調製 供試圃場の土壌を120g、2時間

高圧滅菌し、その10gに脱イオン水90mlを加えた後、前述と同様の条件で振とう後、遠心分離し、上澄液のろ液を殺菌土壌抽出液とした．非殺菌土壌についても同様に処理し、非殺菌土壌浸出液とした．

軟腐病菌の増殖実験

供試菌株 山形大学農学部植物病理学研究室保存の軟腐病菌 *E. carotovora* subsp. *carotovora* のY菌株および7154菌株を用いた．土壌細菌と混合培養下での軟腐病菌の増殖を調べる場合には前報⁵⁾と同じ方法で選抜したリファンピシン耐性菌株（RRS7154）を供試した．この耐性菌株の計数にはリファンピシン含有変法ドリガルスキー培地（RMD）を用いた．

土壌抽出液8mlにハクサイ組織抽出液1ml、RRS7154菌株および土壌細菌の懸濁液（各々 10^2 cfu/ml）を1mlずつ添加後、25℃で培養し経時的にそれらの菌数を希釈平板法で調べた．なおRRS7154菌株の菌数はRMD、グラム陰性細菌数と全細菌数の測定にはそれぞれMD、アルブミン培地²⁰⁾を用いた．

ハクサイ根部組織液中のアミノ酸、糖類およびポリフェノール類の定量、定性分析 ハクサイ組織液中のアミノ

Table 1. Effect of root extract or midrib extract of Chinese cabbage on the growth of *E. carotovora* subsp. *carotovora* 7154 isolate in sterilized soil extract.

	Time (hr.)							
	0	3	6	12	27	51	72	96
Root extract	$1.7 \times 10^{2 \text{ a)}}$	$2.8 \times 10^2 \text{ a}$	$1.0 \times 10^2 \text{ c}$	$4.3 \times 10^4 \text{ a}$	$6.4 \times 10^7 \text{ a}$	$1.6 \times 10^7 \text{ b}$	$2.1 \times 10^8 \text{ a}$	$5.2 \times 10^8 \text{ a}$
Midrib extract	$1.0 \times 10^2 \text{ b}$	$2.2 \times 10^2 \text{ b}$	$4.7 \times 10^2 \text{ a}$	$1.4 \times 10^4 \text{ a}$	$2.7 \times 10^7 \text{ b}$	$1.4 \times 10^7 \text{ c}$	$6.0 \times 10^7 \text{ b}$	$8.0 \times 10^7 \text{ b}$
Control ^{b)}	$5.9 \times 10^1 \text{ c}$	$1.9 \times 10^2 \text{ b}$	$3.3 \times 10^2 \text{ b}$	$8.8 \times 10^3 \text{ a}$	$1.0 \times 10^6 \text{ c}$	$3.4 \times 10^7 \text{ a}$	$4.7 \times 10^7 \text{ c}$	$3.8 \times 10^7 \text{ c}$

a) Colony forming unit/ml (Average of five replications) .

Different letters indicate statistical significance at 5% level by Tukey's method.

b) No addition of root extract or midrib extract to soil extract.

Table 2. Effect of root extract of Chinese cabbage on the growth of *E. carotovora* subsp. *carotovora* 7154 isolate in non-sterilized soil solution.

Time (hr.)	RRS ^{a)}	RRS (control) ^{b)}	GN ^{c)}	GN (control)	Bacteria ^{d)}	Bacteria (control)
0	$3.6 \times 10^{1 \text{ e)}}$	$5.2 \times 10^1 \text{ c}$	$1.4 \times 10^2 \text{ e}$	$1.4 \times 10^2 \text{ g}$	$4.5 \times 10^2 \text{ h}$	$2.2 \times 10^2 \text{ j}$
24	$5.5 \times 10^6 \text{ b}$	$9.9 \times 10^0 \text{ d}$	$4.1 \times 10^7 \text{ f}$	$1.3 \times 10^2 \text{ g}$	$3.4 \times 10 \text{ b}$	$1.0 \times 10^2 \text{ k}$

a) Rifampicin resistant strain of *E. carotovora* subsp. *carotovora* 7154.

b) No addition of root extract to soil extract.

c) Gram-negative bacteria.

d) Total bacteria.

e) Colony forming unit/ml (Average of five replications).

Different letters indicate statistical significance at 5% level by Tukey's method.

酸、糖類およびポリフェノール類をそれぞれイオン交換樹脂（Dowex50W, Amberlite-IR45 及び IR120B, DIAION HP20）に吸着させ、各々の溶離液を調製した。定性、定量分析については、アミノ酸はニンヒドリン法による自動分析を行った。すなわち、アミノ酸自動分析機（ATTO社製 MLC703）を用い、カラム充填剤はDIAION CK10Sを使用し、サンプルは0.1ml注入して行った。糖類はTMSI-Hを用いてトリメチルシリル誘導体とした後、ガスクロマトグラフィーによって分析した。充填剤はSiliconc OV1/GschromQ, 60~80 meshを用いサンプルは0.5 μ l注入した。ポリフェノール類の定性分析は薄層クロマトグラフィー法を用いた。すなわち、TLCプレート（Merck社製 50DC Alufoien kieselgel 60F₂₅₄）を用い、展開溶媒にはベンゼン：酢酸エチル：蟻酸（88%）=15：8：1（第1展開液）、酢酸エチル：クロロホルム：蟻酸（88%）：蒸留水=19：1：1：1（第2展開液）を供試した。展開後、ジアゾ試薬噴霧後あるいは紫外線（254nmおよび365nm）照射下でスポットの観察を行った。また、ポリフェノール類の定量は高速液体クロマトグラフィーで行った。カラムはDevelosil C30-UG-5（4.5mm×250mm）、溶媒は5%アセトニトリル/1%酢酸（溶媒A）、50%アセトニトリル（溶媒B）を用いた。なお、溶出は溶媒B

が3時間で100%となる直線勾配で行い、検出は紫外部（285nm及び320nm）で行った。分析には、サンプル10mlを濃縮乾固後、メタノール0.1mlに溶解したものを、8 μ lを使用した。

軟腐病菌の増殖に対するハクサイ組織のアミノ酸、糖類の影響 アスパラギン加用培地²⁰⁾を基礎培地とし、アスパラギンの代わりにハクサイ組織から検出されたアミノ酸（2.5mg/ml）を、スクロースの代わりにグルコース、フルクトース（10mg/ml）をそれぞれ単独で添加した。その後、軟腐病菌を培地1mlあたり 10^5 cfu/mlの菌数で接種し、25℃で培養した。24時間後培地の濁度を分光光度計（Jasco社製、V530、波長254nm）で測定し、接種時と培養終了時の濁度の差から増殖の程度を判定した。さらに、土壤中における軟腐病菌の増殖に及ぼすハクサイ抽出液の影響を調べるために供試圃場から採取した殺菌土壌および非殺菌土壌10gを200ml容量のコルベンにとりハクサイ組織より検出されたものと同種類のアミノ酸、糖類をそれぞれ単独に添加後、軟腐病菌（ 2.2×10^3 cfu/ml）を添加した。25℃で24時間培養後、軟腐病菌数およびグラム陰性菌数をそれぞれMDを用いて希釈平板培養した。

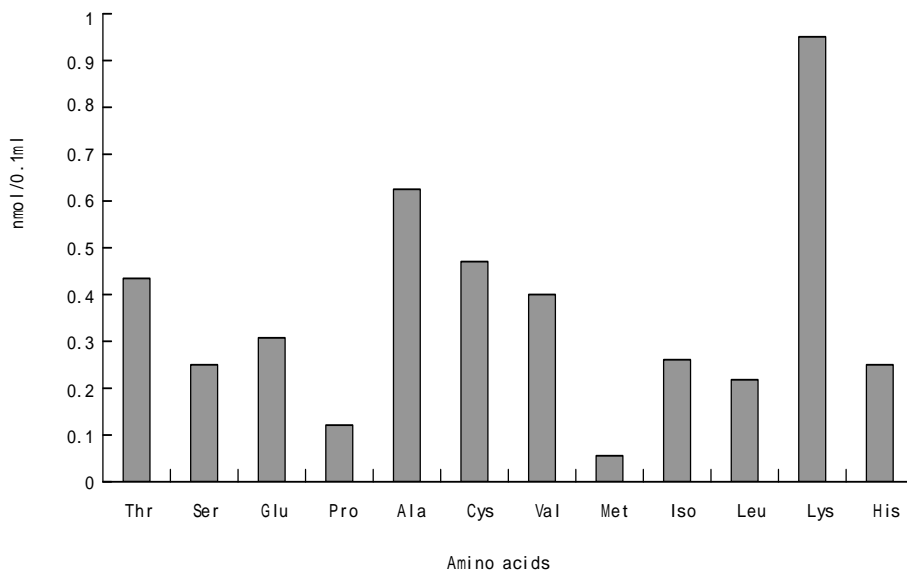


Fig. 2. Qualitative and quantitative analysis of amino acids in root exudates of Chinese cabbage at 40 days after seeding in spring crop, 1999. (cv. CR-Gekka)

結 果

1. ハクサイの根圏及び葉圏土壌における軟腐病菌の菌数に対する地上部切断処理の影響

1999年4月28日および2000年4月26日に播種したハクサイを供試し、地上部切断処理により根圏及び葉圏土壌における軟腐病菌の菌数の変動を調べた。CR-月華を用いた1999年春播の結果をFig. 1に示した。軟腐病菌は切断処理した7月1日には 10^4 cfu/gのレベルであった。しかし、処理7日以後には処理間で菌数に差異が見られた。すなわち、7月8日には無処理区では 10^6 cfu/gのレベルに達したが、HR区、AR区ではともに 10^5 cfu/gのレベルにとどまった。さらに7月15日には無処理区とHR区で 10^6 /gのレベルを保持したが、AR区では 10^5 /gのレベルであった。データには示さなかったが、葉圏土壌でも同じ傾向がみられ、無処理区では 10^6 cfu /gのレベルであっ

たが切断処理により 10^5 cfu /gのレベルに低下した。なお、松島交配W1116, CR-黄駒の品種でも同じ傾向が見られた。

2. 殺菌および非殺菌土壌浸出液における軟腐病菌の増殖に及ぼすハクサイ組織抽出液の影響

殺菌土壌浸出液中で軟腐病菌の増殖は緩慢で培養12時間で 10^3 cfu /ml, 27時間後では 10^6 cfu /ml, 51時間以降には 10^7 cfu /mlのレベルに達した。これに根部抽出液を添加した場合12時間後から増殖し、72時間後には 10^6 cfu /mlのレベルとなった。一方、中肋組織抽出液添加区では12時間で増殖が見られ、27時間後には 10^7 cfu /mlのレベルとなった。その後は対照区(殺菌土壌浸出液)と同様に 10^7 cfu /mlのレベルで推移した(Table 1)。非殺菌土壌浸出液で軟腐病菌と土壌細菌(土壌懸濁液)を混合培養したところ、いずれも増殖しなかった。しかし、根部抽出液の添加でいずれも増殖し、24時間後には培養開

Table 3. Qualitative and quantitative analysis of amino acids in root exudate of Chinese cabbage at 65 days after seeding in spring crop, 1999. (cv.CR-Gekka)

	Asp.	Thr.	Ser.	Glu.	Gly.	Ala.	Met.	Leu.	Lys.
HR ^{a)}	0.8 ^{b)}	0.3	0.5	2.3	0.4	0.3	- ^{e)}	-	-
AR ^{b)}	0.2	0.5	0.5	0.4	0.3	0.4	0.2	0.2	0.3
Control ^{c)}	0.2	0.6	0.5	0.2	0.2	0.1	0.1	-	0.1

a) Half of upperground part was cut.

b) All of upperground part was cut.

c) Untreated.

d) nmol / 0.1ml

e) Amino acids were not detected.

Table 4. Qualitative and quantitative analysis of amino acids in root extract of chinese cabbage at 70 days after seeding in spring crop, 1999. (cv.CR-Gekka)

Treatment	Detected amino acids										
	Asp.	Thr.	Ser.	Glu.	Pro.	Gly.	Ala.	Val.	Met.	Ile.	Leu.
HR ^{a)}	5.10 ^{d)}	3.40	1.80	4.00	0.30	1.50	5.70	1.10	-	0.40	0.60
AR ^{b)}	22.40	20.00	10.50	- ^{e)}	1.90	3.40	29.60	13.00	0.30	9.60	4.40
Control ^{c)}	6.20	4.70	1.70	6.10	-	2.30	6.50	1.50	0.30	0.40	1.00

Treatment	Detected amino acids				
	Tyr.	Phe.	Lys.	His.	Arg.
HR	-	-	0.50	0.30	-
AR	2.20	2.40	3.40	4.10	4.20
Control	-	-	-	-	-

a, b, c, d, e) refer to Table 3.

始時の $10^1 \sim 10^2$ cfu/ml のレベルから軟腐病菌数は 10^6 cfu/ml, グラム陰性菌数は 10^7 cfu/ml, 全細菌数は 10^8 cfu/mlの各レベルに増殖した (Table 2).

3. ハクサイ根部浸出液および抽出液中のアミノ酸と糖類の定性および定量分析

1999年春播で播種後65日のCR-月華を用いたが地上部切断処理前のハクサイ根部抽出液からスレオニン, セリン, グルタミン酸など12種のアミノ酸が検出された. そのなかでリジンが最も多く $1.0 \text{ nmol} / 0.1 \text{ ml}$ であり, 次いでアラニン, シスチンの順であった (Fig. 2). 処理5日後にはHR区でアスパラギン酸など6種, AR区でアスパラギン酸など9種, 無処理区でアスパラギン酸など8種のアミノ酸が検出された (Fig. 3). 一方, 抽出液ではHR区でアスパラギン酸, グルタミン酸など12種, AR区で15種, 無処理区で10種のアミノ酸が検出され, 全部で16種類に達した (Table 4). 浸出液からはいずれの処理区でも糖類は検出されなかった. 抽出液では無処理区とAR区でフルクトースとグルコースの2種類の糖類が検出され, 前者ではフルクトース, 後者ではグルコースが多い

傾向が見られた. しかし, HR区では糖類は検出されなかった (Table 5). なお, データには示さなかったが, 抽出液からUV照射下 (245nmおよび365nm) で検出可能なポリフェノール類と考えられる7個のスポットが検出された. 4. ハクサイ組織から検出されたアミノ酸および糖類の軟腐病菌の増殖に対する影響

合成培地を用い, ハクサイ組織から検出されたアミノ酸および糖類の軟腐病菌の増殖に対する影響を調べた.

データには示さなかったが, *E. carotovora* subsp. *carotovora* Y菌株ではアスパラギン酸, セリン, グルタミン酸, アラニン, シスチン, ロイシン, フェニルアラニン, ヒスチジンで増殖し, アスパラギン酸, グルタミン酸で高い効果が見られた. また, 7154菌株の結果をTable 6に掲げたが, アスパラギン酸, セリン, グルタミン酸, アラニン, シスチン, ロイシンで増殖した. しかし, 両菌株ともスレオニン, プロリン, バリンなどでは増殖しなかった. 糖類のフルクトース, グルコースではY菌株, 7154菌株ともに増殖した (Table 7). 非殺菌土壌中における軟腐病菌の増殖では両菌株ともアスパラギ

Table 5. Qualitative and quantitative analysis of sugars in root extract of Chinese cabbage at 65 days after seeding in spring crop, 1999. (cv.CR-Gekka)

Treatment	Fructose	Glucose
HR ^{a)}	- ^{d)}	-
AR ^{b)}	4.13 ^{e)}	34.99
Control ^{c)}	131.49	22.23

a, b, c) refer to Table 3.

d) Sugars were not detected.

e) nmol/0.5ml.

Table 6. Effect of amino acids on the growth *E. carotovora* subsp. *carotovora* 7154 isolate in the synthetic medium.

Times(hr.)	Asp.	Thr.	Ser.	Glu.	Pro.	Gly.	Ala.	Cys.	Met.
0	0.346 ^{a)}	0.305	0.305	0.338	0.367	0.336	0.219	0.742	0.321
24	1.699	0.381	0.772	1.566	0.447	0.485	0.561	1.369	0.480
	1.353 ^{b)a}	0.076 l	0.467 d	1.228 b	0.080 kl	0.149 hi	0.342 f	0.627 c	0.159 hi
Times(hr.)	Val.	Iso.	Leu.	Tyr.	Phe.	Lys.	His.	Arg.	Control
0	0.33	0.303	0.342	0.504	0.526	0.364	0.313	0.372	0.304
24	0.415	0.473	0.709	0.825	0.874	0.499	0.532	0.611	0.380
	0.085 kl	0.170 h	0.367 e	0.321 f	0.348 ef	0.135 ji	0.219 g	0.239 g	0.076 jk

a) Absorption at 245 nm.

b) Difference in initial (0 hr.) and final (24 hr.) absorption.

Different letters indicate statistical significance at 5% level by Tukey's method.

ン酸とセリンで効果が見られたが、その他のアミノ酸ではみられなかった。糖類ではフルクトース、グルコースともに軟腐病菌の増殖に効果を示した。また、軟腐病菌を調査した同じMD培地の平板上に形成されたグラム陰性細菌のコロニー数についても調査したところ、供試のアミノ酸、糖類の影響は見られなかった。

考 察

植物では光合成した炭素の約20%が根から放出されるといわれている¹²⁾。事実、植物根から糖類が分泌され、その他、アミノ酸、生理活性物質、核酸、酵素、蛍光性物質、植物ホルモン、アルカロイド、抗菌物質なども分泌されている^{3, 13, 14, 18, 19, 23, 24)}。また、植物の根の周囲にはこれらの物質などとともに根の先端にできるムシゲル、脱落した根毛、表皮なども蓄積して微生物の増殖のための栄養源となったり、走化性をひきおこすなど微生物の活動が活発となり根圏といわれている^{16, 17)}。植物病原系状菌においても根の周りで休眠体の発芽、菌体の増殖、化学的走化性などがおこり、根圏は病原性発現に大きな役割を持っている^{14, 15, 16, 24, 25)}。軟腐病菌の場合、通常土

壌中では 10^3 cfu/g以下の低い密度で生存しているがハクサイが栽培されると、その根圏で急激に増殖することが広く認められ^{10, 22)}、根からの分泌物が大きく関与しているものと推察されている。これらのことを証明するためにはまずハクサイを無菌条件下で栽培することが必要であるが、本実験ではまずハクサイの根や中肋組織に含まれる軟腐病菌の栄養源としてのアミノ酸、糖類の種類を調べ、それらの増殖に及ぼす影響を検討した。

根からの分泌物に含まれる物質の種類や量は作物の種類、生育時期、栄養状態、栽培条件、ストレスなどで変わる^{14, 16)}。まず、ハクサイの地上部を切断し、その後の根圏における軟腐病菌数の変動を調査したところ、切除により菌数は減少し、これまでの報告¹⁾と一致した。根からの分泌物は地上部の光合成と密接に関係しており¹²⁾、地上部切断処理によって光合成能が低下し根からの分泌物にも影響を与え、結果的に根圏における軟腐病菌数の低下を引き起こしたものと考えられる。葉圏土壌の場合、ハクサイ中肋組織との接触を断つことにより3～5日間で軟腐病菌は急激に減少し検出不能になった²²⁾。しかし、今回のように地上部を切断した場合には、土壌と根や中

Table 7. Effect of sugars on the growth of *E. carotovora* subsp. *carotovora* 7154 isolate in the synthetic medium.

Times (hr.)	Fructose	Glucose	Control
0	1.423 ^{a)}	1.136	1.010
24	2.325	2.146	1.27
	0.902 ^{b)} a	1.010 b	0.260 c

a, b) refer to Table 6.

Table 8. Effect of amino acids and sugars on the growth of *E. carotovora* subsp. *carotovora* 7154 isolate and Gram-negative bacteria in soil.

	Amino acids									
	Asp.	Thr.	Ser.	Glu.	Pro.	Gly.	Ala.	Cys.	Met.	Val.
RRS7154	$1.4 \times 10^{5b)}$	6.3×10^4bcd	3.4×10^5a	9.7×10^4bcd	6.8×10^4bcd	8.7×10^4bcd	9.0×10^4bcd	5.7×10^4bcd	3.7×10^4	6.3×10^4bcd
GN ^{a)}	5.6×10^6abc	2.1×10^5abc	7.9×10^6abc	3.4×10^5abc	3.9×10^6abc	2.4×10^6abc	4.3×10^5abc	3.2×10^6abc	1.2×10^6	9.2×10^6a

	Amino acids							Sugar		Control
	Iso.	Leu.	Tyr.	Phe.	Lys.	His.	Arg.	Fru.	Glu.	
RRS7154	8.0×10^4bcd	6.0×10^4bcd	1.0×10^4d	4.3×10^4bcd	5.3×10^4bcd	4.3×10^4bcd	2.0×10^4d	3.6×10^5a	1.4×10^5bc	3.0×10^4d
GN ^{a)}	9.9×10^6ab	4.4×10^6ab	2.1×10^6abc	6.4×10^6abc	8.2×10^6abc	6.4×10^6abc	4.2×10^6abc	1.3×10^6bc	1.6×10^6bc	2.9×10^6abc

a) Gram-negative bacteria.

b) Colony forming units / g of soil.

Different letters indicate statistical significance at the 5% level by Tukey's method.

肋組織との接触は保持されており根や中肋組織から分泌物の供給が持続し、軟腐病の極端な低下がおこらなかったものと考えられるが、今後検討する必要がある。

一般に土壌は微生物にとって栄養不足であり²⁶⁾、飢餓状態で生存しているといわれている⁴⁾。非殺菌土壌の水浸出液では軟腐病は増殖できなかったが、ハクサイ根や中肋組織の水抽出液を添加することにより急速に増殖した。しかしながら、殺菌土壌抽出液ではこのような組織液添加の有無にかかわらず様に増殖した。これは殺菌処理により土壌中の可給態の養分が遊離し、軟腐病菌はこれを利用して増殖した⁸⁾ためと考えられる。これらの事実は土壌中で栄養不足のため低密度でしかも休止状態 (suspended animate hypobiosis) で生存している軟腐病菌⁶⁾が根圏で根からの分泌物を利用して急速に増殖し、高い菌数を保持できることを指摘しているものであり、軟腐病菌が根圏生息菌 (rhizosphere habitant)⁷⁾と呼ばれるゆえんでもあろう。しかし、この増殖は軟腐病菌以外の土壌細菌でもおこり、圃場のハクサイ根圏で軟腐病菌が優占する理由についてはさらに検討する必要がある。いずれにしてもこれまでの実験からハクサイ根や中肋組織には軟腐病菌の栄養源になるアミノ酸、糖類が含まれていることが明らかとなった。

植物病原細菌の栄養要求は種によって異なり、単純なものから複雑なものまで多岐にわたる。軟腐病菌の場合は単純でグルコース、アンモニア、無機塩を含む培地で炭素量として10ppm、窒素量は1ppmあれば増殖できる²¹⁾。しかしながらサイアミンやビオチンなどの増殖因子を添加すると増殖が著しく促進される²¹⁾。ハクサイの採取時期や切断処理の種類によって異なるが、その根や中肋組織から17種のアミノ酸と2種類の糖類が検出された。しかし、地上部を切除するとこれらの物質の種類や量が変わる傾向が見られた。また、糖類は根部からの分泌が多い物質とされており⁷⁾、今回の実験では根からは検出されたが中肋組織の水抽出液からは検出されなかった。しかし、これは濃度が検出限界以下であること及び浸出時間が1時間で短かったことなども考えられ、さらに検討する必要がある。根からの抽出物中のアミノ酸にはアスパラギン酸やアラニンのように合成培地や土壌中での軟腐病菌の増殖を活発にするものが含まれている。また、検出された糖類は2種類とも増殖効果が示された。しかし、これらの糖類は普通広く細菌の炭素源として利用されておりハクサイ根圏で優占的に増殖する場合の役割については今後いろいろの観点から調査する必要がある。

今回検出された糖類やアミノ酸が実際に圃場で栽培中のハクサイの根から分泌されるか否かは現在のところ不明である。今後これらの物質や軟腐病菌の増殖に促進的に作用する増殖因子などが、根から分泌されているかどうかについても検討する必要がある。一方、今回の実験でハクサイの組織から7種のポリフェノールと考えられる物質が検出された。そのうちの1種は軟腐病菌の増殖を促進し、地上部切断処理により減少する傾向がみられた。しかしながら物質の特定までには至らなかった。この物質の同定も今後の検討課題である。

ところで軟腐病菌は根からのある種の分泌物に走化性を示し、その速度は蛍光性細菌の約4倍とされている。一方、根の分泌物には有毒なシアン化合物が含まれること¹⁶⁾、根からの分泌物は拮抗菌の活動を抑制または活性化作用があること^{3, 16)}、広く土壌に分布している微生物の静菌作用を打破すること¹¹⁾などの報告がある。さらに根圏ではpHやCO₂濃度などの非生物的環境も微妙に変化している¹⁶⁾。したがって、根の分泌物の作用については栄養的な面に加えて総合的に多面にわたって検討することが必要である。それにより根圏における軟腐病菌の増殖の機作は解明されるのではなかろうか。

摘 要

ハクサイ根圏における軟腐病菌 (*E. carotovora* subsp. *carotovora*) の増殖の機作を明らかにするために、ハクサイ組織の水抽出液および浸出液の軟腐病菌の増殖に対する影響を調べ、それらに含まれるアミノ酸、糖類およびポリフェノール類についてそれぞれ定性・定量分析を行った。軟腐病菌は結球期以降のハクサイ根圏で増殖し、 $10^5 \sim 10^6$ cfu/g の高いレベルを保持していたが、地上部の切除処理により菌数は減少した。これは根からの分泌物の種類や量が地上部の光合成の有無と関係し、根圏での軟腐病菌の増殖に影響していることが示唆された。土壌の水浸出液にハクサイの根部や中肋組織の抽出液を添加し、軟腐病菌と土壌細菌を培養したところ、両者とも増殖したが、軟腐病菌で高い増殖がみられた。殺菌土壌浸出液ではハクサイの抽出液や浸出液を添加しなくても増殖が起こったことから加熱処理により土壌中の有機物が可給態となり、軟腐病菌が増殖できるようになるものと考えられた。ハクサイの根部や中肋組織の抽出液や浸出液からはアスパラギン酸、スレオニンなど16種のアミノ酸とグルコース、フラクトースの2種の糖類および7種のポリフェノールと考えられる物質が検出された。浸

出液では検出されたアミノ酸の種類や量は少なく、糖類、ポリフェノールと考えられる物質は検出されなかった。これは濃度が低いこと及び浸出時間が短かったことにもよると考えられた。また、ハクサイ地上部切除処理によってこれらの物質の種類や量が変動する傾向が見られた。合成培地を用いて軟腐病菌の栄養要求性を調べた結果、ハクサイの根や組織から検出されたアミノ酸のうちアスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、シスチンや、グルコース、フラクトースを利用することが確かめられた。またこれらの物質を土壌に添加した場合アスパラギン酸とセリンのアミノ酸とグルコースおよびフラクトースでそれぞれ軟腐病菌の増殖がみられた。以上の結果より根圏土壌における軟腐病菌の増殖にはこれらのアミノ酸と糖類が関係しているものと推察された。

謝 辞

本研究を進めるにあたり終始懇切なご指導をいただきました山形大学農学部生物資源利用化学講座、五十嵐喜治教授にお礼申し上げる。

引 用 文 献

1. Alam, S. M. Khorshed (1999). Ecological studies on the soft rot disease of Chinese cabbage.
2. Burr, T. J. and Schroth, M. N. (1977). Occurrence of soft rot *Erwinia* spp. in soil and plant material. *Phytopathology* 62: 1382-1387.
3. Buxton, F. W. (1962). Root exudates of banana and their relationship to strains of the *Fusarium* causing Panama wilt. *Ann. Appl. Biol.* 50: 269-282.
4. 土壌微生物研究会編 (1981). 土の微生物, 博友社. 東京. 111-112.
5. Glandorf, D. C. M., Brand, I., Bakker, P. A. H. M. and Schippers, B. (1992). Stability of rifampicin resistance as a marker for root colonization studies of *Pseudomonas putida* in the field. *Plant and Soil* 147: 135-142.
6. 後藤正夫 (1981). 植物細菌病学. ソフトサイエンス社, 東京.
7. 平井篤造, 鈴木直治 (1963). 植物病理の生化学 前編. 農業技術協会, 東京.
8. 菊本敏雄・坂本正幸 (1965). そ菜類軟腐病細菌の生態的研究 第1報 殺菌土壌および砂における *Erwinia aroideae* (Twons.) Holl. の増殖. 東北大農研報. 17: 43-56.
9. 菊本敏雄・坂本正幸 (1969). そ菜類軟腐病細菌の生態的研究 第7報 作物および雑草根圏における軟腐病細菌の増殖. 日植病報. 25: 36-40.
10. Kikumoto, T. (1980). Ecological aspects of the soft rot bacteria. *Rep. Inst. Agr. Res. Tohoku Univ.* 31: 19-41.
11. Lockwood, J. L. (1964). Soil fungistasis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2: 341-362.
12. 西尾道徳 (1989). 土壌微生物の基礎知識. 農文協. 東京.
13. Rovira, A. D. (1961). Plant root excretions in relation to the rhizosphere effects. The exudation of - group vitamins. *Plant and Soil*. 14: 199-214.
14. Rovira, A. D. (1964). Plant root exudates and their influence upon soil microorganisms. In *Ecology of soil-borne plant pathogens*. Baker, K. F. and Snyder, W. C. Eds. Univ. of California Press, Berkeley. 180-186.
15. Schroth, M. N. and Snyder, W. C. (1961). Effect of host exudates in chlamydospore germination of the bean root rot fungus, *Fusarium solani* f. *phasesii*. *Phytopathology*. 51: 389-393.
16. Schroth, M. N. and Hildebrand, D. C. (1964). Influence of plant exudates on root infecting fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2: 101-132.
17. Stanghellini, M. E. (1982). Survival of *E. carotovora* in soil. *Phytopathogenic Prokaryotes*. Vol. 1: 249-261.
18. Sulochana, C. B. (1962). Amino acids in root exudates of cotton. *Plant and Soil*. 16: 312-316.
19. Sulochana, C. B. (1962). Cotton roots and vitamins requiring and amino acids requiring bacteria. *Plant and Soil*. 16: 335-347.
20. 滝元清透 (1958). 微生物学および植物病理学実験法. 養賢堂, 東京.
21. Togashi, J. and Sakamoto, M. (1965). Studies on the growth and nutrient requirements of *Erwinia aroideae* (Towns.) Holl., the caused bacterium of

- the soft rot of vegetables. Sci. Rep. RITU. D. 16 : 47-53.
22. Togashi, J. (1972). Studies on the outbreak of the soft rot disease of Chinese cabbage by *Erwinia aroideae* (Townsend.) Holl. Rep. Inst. Agr. Res. Tohoku Univ. 23 : 17-52.
23. 津山博之 (1962). 白菜軟腐病に関する研究. 東北大農研彙. 13 : 221-345.
24. Vancura, V. (1964). Root exudates of plants 1. Analysis of root exudates of barley and wheat in their initial phases of growth. Plant and Soil. 21 : 231-249.
25. Vancura, V. and Hovadik, A. (1965). Composition of root exudates in the course of plant development. Plant Microbes Relationship. 21-27.
26. 渡辺恒雄 (1998). 植物土壌病害の事典. 朝倉書店, 東京.