

論文目録

主論文

1. 題目 有機物施用が土壤微生物相と植物生育に及ぼす影響に関する生態学的研究

2. 公表の方法・時期

第1章第1節 リグニン添加, キチン添加, *Fusarium oxysporum* 接種が土壤微生物相の変動に及ぼす影響

第1章第3節 リグニン添加, キチン添加, *Fusarium oxysporum* 接種が植物生育に及ぼす影響

昭和62年6月発行

Soil Science & Plant Nutrition第33巻第2号 245頁から 259頁に掲載

公表題目: Effect of the application of lignin and/or chitin to soil inoculated with *Fusarium oxysporum* on the variation of soil microflora and plant growth

(*Fusarium oxysporum* を接種した土壤へのリグニンそして/またはキチンの施用が土壤微生物相の変動と植物生育に及ぼす影響)

第1章第2節 リグニン添加, キチン添加, *Fusarium oxysporum* 接種が土壤中の糸状菌数および放線菌数に及ぼす効果の統計解析

平成2年12月発行予定

日本土壤肥科学雑誌第61巻第6号に掲載予定

公表題目: *Fusarium oxysporum* 接種, リグニン添加, キチン添加が土壤中の糸状菌数および放線菌数に及ぼす効果の統計解析について

第2章 *Fusarium oxysporum* の産生するフザリン酸の添加がキュウリ生育に及ぼす効果と, キュウリの intact および semi-intact plantを用いたフザリン酸起因の萎凋症状の発現

平成3年4月発行予定

日本土壤肥科学雑誌第62巻第2号に掲載予定

公表題目: キュウリの intact および semi-intact plantを用いたフザリン酸起因の萎凋症状の発現

第3章 嫌氣的条件下の水田土壤への稲わら添加が生物窒素固定に及ぼす影響
平成元年6月発行

Soil Science & Plant Nutrition第35巻第2号 235頁から 243頁に掲載

公表題目: Effect of the application of glucose, cellulose and rice straw on nitrogen fixation (acetylene reduction and soil-nitrogen components) in anaerobic soil

(嫌氣的土壤中におけるグルコース, セルロースおよび稲わら施用が窒素固定(アセチレン還元および土壤窒素構成成分)に及ぼす影響)

第4章 稲わらを添加した水田土壤還元層における孢子形成性嫌氣性窒素固定細菌数の変動

平成2年11月発行予定

土と微生物第36巻に掲載予定

3. 冊数 1冊

参考論文
なし

平成 2 年 11 月 22 日

学位授与申請者

安達克樹



有機物施用が土壤微生物相と植物生育に及ぼす影響
に関する生態学的研究

安達克樹

1 9 9 0

有機物施用が土壤微生物相と植物生育に及ぼす影響
に関する生態学的研究

安達克樹

1 9 9 0

目 次	頁
緒 言	1
第 1 章 畑土壌へのリグニン添加，キチン添加および <i>Fusarium oxysporum</i> 接種 が土壌微生物相と植物生育に及ぼす影響	2
第 1 節 リグニン添加，キチン添加， <i>Fusarium oxysporum</i> 接種が土壌微生物相の変動に及ぼす影響	2
第 2 節 リグニン添加，キチン添加， <i>Fusarium oxysporum</i> 接種が土壌中の糸状菌数および放線菌数に及ぼす効果の統計解析	13
第 3 節 リグニン添加，キチン添加， <i>Fusarium oxysporum</i> 接種が植物生育に及ぼす影響	20
第 2 章 <i>Fusarium oxysporum</i> の産生するフザリン酸の添加がキュウリ生育に及ぼす効果と，キュウリの intact および semi-intact plantを用いたフザリン酸起因の萎凋症状の発現	28
第 3 章 嫌氣的条件下の水田土壌への稲わら添加が生物窒素固定に及ぼす影響	39
第 4 章 稲わらを添加した水田土壌還元層における孢子形成性嫌氣性窒素固定細菌数の変動	48
総 合 考 察	58
謝 辞	63
引用文献	64

緒 言

安定した作物生産を維持するために、畑土壌・水田土壌への有機物施用は古くから行われてきた。化学肥料の施肥が始まると、土地生産性が上がり、作物栽培方法にも大きな変化がおきた。化学肥料偏重、単一作物栽培はこれからの農業の一つの典型とも言える。畑土壌での単一作物栽培は同一作物残渣による集積培養のような効果をもたらし、土壌微生物相悪化のおそれがある。また、土壌へ還元される有機物の絶対量が減少すれば、土壌の有機物含有率が漸減し、良好な団粒構造の維持等土壌の物理性・化学性の保全や良好かつ安定した土壌微生物相あるいは動物相の維持を困難にする危険性がある。こうしたことから、近年土壌への有機物施用を積極的に行おうという動きがみられ、その一つとして大量に排出される家畜糞尿や下水汚泥などの投入も考えられている。しかし、こうした土壌への有機物施用は、有機質肥料の名の下に、すべてが肯定されるべきではなく、無秩序に有機物が土壌へ施用されれば新たな問題を引き起こしかねない。

畑土壌における単一作物栽培では作物残渣の土壌へのすき込みにより微生物起因の土壌病害の発生という問題が生じるが、水田土壌における稲作では極めて長期間の単一作物栽培にもかかわらず土壌病害は起きず、逆に、稲わらのすき込みにより水田土壌中での生物窒素固定が励起されることが知られている。同じ作物残渣の土壌中へのすき込みであっても、畑土壌では土壌病害という作物生育に対してマイナスの作用が、水田土壌では生物窒素固定というプラスの作用が働いている。

このような背景の下で、本論文では畑土壌における微生物起因の土壌病害と、水田土壌における生物窒素固定を取り上げた。前者では畑土壌へのリグニン添加、キチン添加および植物病原性糸状菌 *Fusarium oxysporum* 接種が土壌微生物相の変動と植物生育に及ぼす影響を調べ、作物残渣の土壌へのすき込みと *Fusarium oxysporum* が産生する植物毒素フザリン酸による生育阻害との関連性を追及した。後者では水田土壌への稲わら添加が嫌氣的条件下の生物窒素固定に及ぼす影響について調べた。

第1章 畑土壌へのリグニン添加，キチン添加および *Fusarium oxysporum* 接種が土壌微生物相と植物生育に及ぼす影響

畑土壌へのリグニン添加，キチン添加およびキュウリつる割病を引き起こす植物病原性糸状菌 *Fusarium oxysporum* の人工接種により土壌微生物相がどのように変動するか，そして，その土壌で宿主キュウリを連作した場合の植物生育および土壌微生物相への影響を調べた。キチン添加は，*Fusarium*による土壌病害の生物的防除として今のところ最も有効な手段の一つと言えるが，リグニンの効果はなおあいまいであるため，この両者を組合せることにより，双方の土壌微生物相への影響をより鮮明にすることを試みた。実験は3年間継続し，長期にわたり微生物相の変動を追跡した。

第1節 リグニン添加，キチン添加，*Fusarium oxysporum* 接種が土壌微生物相の変動に及ぼす影響

1. はじめに

*Fusarium*属菌により引き起こされる土壌病害を有機物施用により防除しようとする多くの試みがなされてきた。Mitchell and Alexander (1962) は，*Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* により引き起こされるインゲン根腐病を土壌へのキチン添加により防除できたと報告した。彼らは，また，*Fusarium*属菌の細胞壁構成成分であるキチンの添加は，土壌中の放線菌数およびキチナーゼ活性を著しく増大させることを確認した。以後の研究によりキチン施用は *Fusarium oxysporum* による土壌病害の防除においても有効であることが示された (Buxton *et al.*, 1965, 駒田ら, 1965, Mitchell, 1963)。今のところキチンは，*Fusarium*病害の防除のために最も期待できる有機物の一つであると言える。しかしながら，細胞壁にキチン質を持たない藻菌類には効果がなく，むしろ発病を助長する欠点が指摘されている (下長根・尾崎, 1980)。

Lingappa and Lockwood (1962) は，土壌から抽出されたリグニン様物質は静菌作用 (fungistatic effect) を持つことを見いだした。Maurer and Baker (1964) は，リグニンとキチンを同時に施用することにより，*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* による土壌病害が軽減されたと報告した。Adams *et al.* (1968) は，土壌へのコーヒーかすの添加が *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* によるインゲン根腐病を防除し，土壌の静菌

作用を高めたと報告した。こうした結果は、リグニン施用が *Fusarium* 属菌による土壌病害を防除できるであろうことを示唆している。しかしながら、Adams *et al.* は、同じ報告の中で、コーヒークラス添加土壌中の *Fusarium* 菌密度が対照区よりも高かったことも観察していた。従って、*Fusarium* 属菌による土壌病害に及ぼすリグニン施用の影響については、なお十分には明らかにされていない。

ここでは、キュウリつる割病病原菌 *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* を供試菌とし、リグニン添加、キチン添加および *Fusarium oxysporum* 接種が土壌微生物相の変動に及ぼす影響と、宿主キュウリの連作が土壌微生物相の変動に及ぼす影響について明らかにするために実験を行った。

2. 実験方法

京大圃場水田転換畑から採取し、風乾した土壌 (pH 6.0, 炭素含有率: 0.90%, 窒素含有率: 0.116%, EC: 0.12mS/cm, P: 0.052%, K: 2.8%) および砂を 2mm のふるいに通した後、同量ずつ混合した。この混合土壌は壤質粗砂土 loamy coarse sand (pH 6.0) であり、その粒度組成は粗砂 77%, 細砂 13%, シルト 4%, 粘土 5% であった。栽培第 1 作目にこの土壌を 1ℓ のプラスチックポットに 1,200g ずつ詰め、宿主キュウリ (品種、四葉) を 3 年間にわたり 5 連作した。 *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* IFO 6384 (以下 *f.o.c.* と略す) を液体培地で振盪培養し (駒田, 1976), 小型分生胞子様の細胞 (bud cells) を遠心機で集菌した後、水道水により希釈して土壌へ人工接種した。添加有機物の炭素含有率はリグニンが 46.1%, キチンが 44.8% であり、窒素含有率については、リグニンは検出できず、キチンは 6.8% であった。リグニンとキチンは共に半井薬品 (京都) の製品を供試した。リグニンは黒色粉末であり、キチンは粒状であった。栽培第 1 作目の播種日の 9 日前にリグニンを 2,000 ppm, キチンを 1,000 ppm で土壌へ添加し、以後第 2 作目から第 5 作目までは添加しなかった。リグニンとキチンの添加により、四つの土壌処理区を設けた。すなわち、1) 対照区、2) リグニン添加区、3) キチン添加区、4) リグニンとキチンの両方を添加した区である。*f.o.c.* は、栽培第 1 作目播種日から 14 日後にポット当たり 10^9 菌数となるように人工接種した。上記 4 処理区は、それぞれ *f.o.c.* 接種区および無接種区の二つの処理区を持つので合計 8 処理区となった。この実験は Table 1-1 のように三つの土壌処理による三元配置の実験となっており、処理区は三つの因子の組合せとして表示される。3 年間にわたり宿主キュウリを 5 連作した。栽培期

Table 1-1. Treatments in the three-way factorial design.

Treatment number	Factor A: <i>F. o. c.</i> inoculation (10 ⁹ propagules/pot)	Factor B: Lignin addition (2,000 ppm)	Factor C: Chitin addition (1,000 ppm)
Un-inoculated			
1 Control	-	-	-
2 Lignin	-	+	-
3 Chitin	-	-	+
4 L+Ch	-	+	+
<i>F. o. c.</i> -inoculated			
5 Control	+	-	-
6 Lignin	+	+	-
7 Chitin	+	-	+
8 L+Ch	+	+	+

F. o. c.: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* IFO 6384

間は約1ヶ月間あるいはそれ以上であった。キュウリ栽培時には、化学肥料を各処理区同量ずつ与えた (Table 1-2)。施肥方法は、第1作目においてN 100 ppm, P 44ppm, K 83 ppmに相当する量の化学肥料を播種前に与え、第5作目にはその半分の割合で施肥した。第2作目、第3作目および第4作目においては、改変Hoagland・Snyder水耕液により適宜施肥した。栽培期間以外には土壌を風乾状態で保存した。各処理区のポット数は、第1作目が5、第2作目が4、第3作目が4、第4作目が3、第4作目が3であった。土壌微生物相の変動については、三つのタイプの土壌について調べた。すなわち、1) 5連作した土壌、2) 第1作目以後144週間風乾保存した土壌、そして3) 第3作目以後52週間風乾保存した土壌である。土壌微生物数の計数は、希釈平板法により行った。糸状菌数の計数は、ローズベンガル寒天培地 (リン酸一カリウム 1.0 g, 硫酸マグネシウム 0.5 g, ペプトン 5.0 g, グルコース10.0 g, ローズベンガル 0.066 g, 寒天15 g, 蒸留水 1,000ml, pH 6.8) を用いて、好気性細菌数と放線菌数の計数についてはアルブミン寒天培地 (エッグアルブミン0.25 g, グルコース 1.0 g, リン酸二カリウム 0.5 g, 硫酸マグネシウム 0.2 g, 硫酸第二鉄 痕跡, 寒天15 g, 蒸留水 1,000ml, pH 6.8~7.0) を用いて行った。接種菌 *F. o. c.* の計数についてもローズベンガル寒天培地により行い、コロニーの形態により同定し、計数した。菌数計数のための土壌採取の際に各処理区の土壌をトレーの中で攪拌できたため、希釈平板法に供試した土壌試料はその区を十分に代表するものであった。

Table 1-2. Addition of chemical fertilizer in each cultivation.

	No. of cultivations				
	1st	2nd	3rd	4th	5th
N addition (mg/pot)	120	27.3	103	28.4	56.4
P addition (mg/pot)	52.4	4.0	15.2	4.2	24.7
K addition (mg/pot)	100	30.5	115	31.7	47.0
Air-dry soil weight in a pot (g/pot)	1,200	1,300	1,240	1,200	1,130

他方、キュウリ栽培期間中の土壌採取・調製は、藁さじにより複数のポットより採取し、混合して一点とした。微生物菌数は1g乾土当りの菌数により表示したが、第1作目については、1g生土当りの菌数で表示した。

3. 結果

糸状菌の総数の変動を3年間にわたり追跡し、1g土壌中の菌数の対数値で示したのがFig. 1-1である。この図中5本の縦軸方向の帯は、キュウリ栽培時期を示している。*F. o. c.*接種区における第1作目途中の1g土壌当り約 10^6 菌数への急激な菌数増加は、*F. o. c.*の接種によるものである。糸状菌相の観察により以下の結果が得られた。

- 1) キチン添加区では、糸状菌数が増加した。とりわけPenicillium属のある種のものが優占的となった。しかし、リグニンとキチンを両方添加した土壌では、このPenicillium属菌の増殖は抑制され、目立たなかった。
- 2) リグニン添加は、糸状菌の増殖を抑制し、独特な糸状菌相を誘導した。すなわち、藻菌類様コロニーがあらわれた。リグニンとキチンの両方を添加した土壌における糸状菌相は、リグニン添加区の糸状菌相と類似していた。
- 3) リグニン添加の糸状菌相への影響は、3年間を通して認められたが、キチン添加区の糸状菌相と対照区のそれとの間の差異は、しだいに消失していった。これは、キチンの消耗・涸渇によるものであろう。
- 4) 糸状菌数の変動は、細菌数の変動と比べて風乾条件に対して比較的安定していた。しかし、風乾期間が約60週間を超えると糸状菌数は徐々に減少し、風乾144週後には1g乾土当り約 1×10^4 菌数となった。

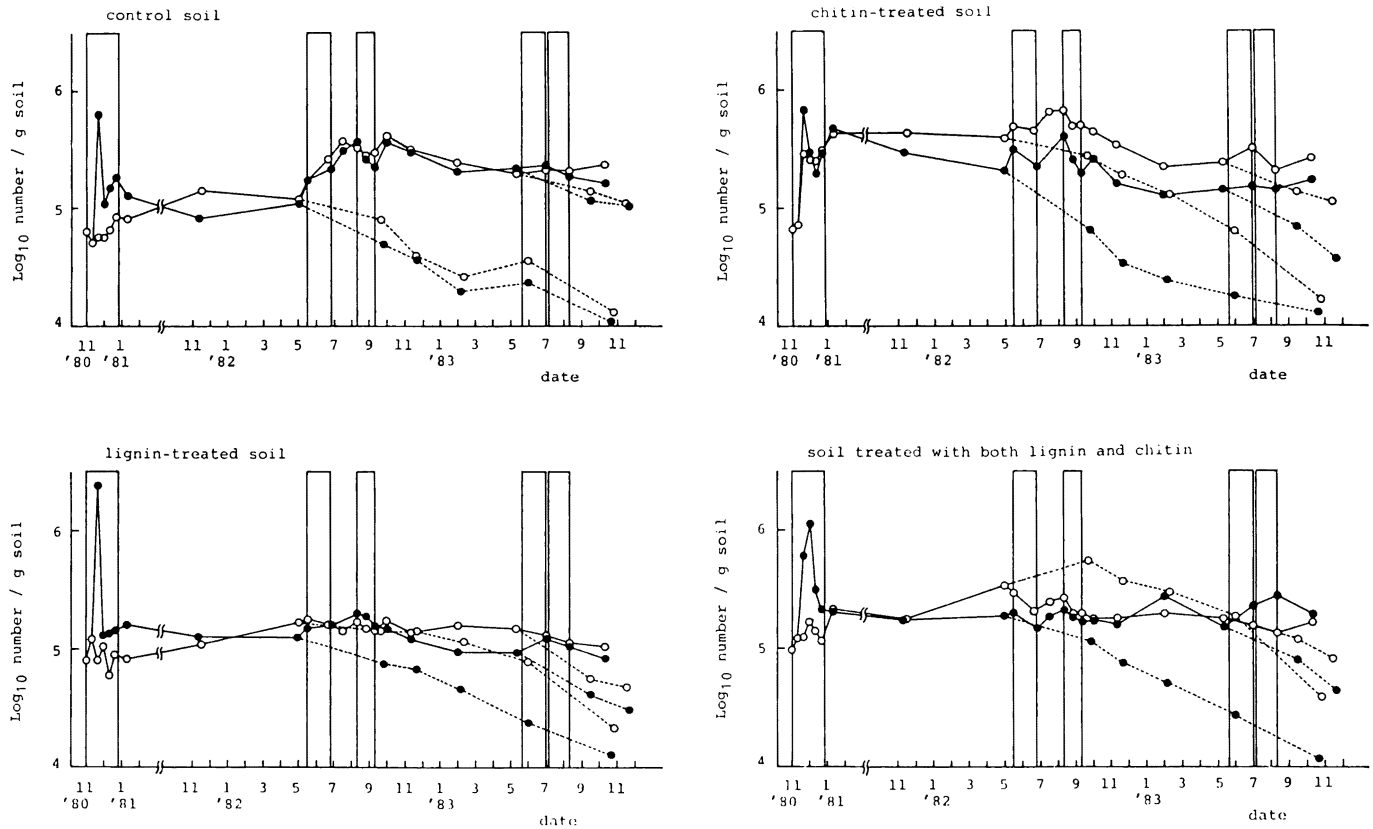


Fig. 1-1. Variations of total fungal populations. Open circles refer to un-inoculated soil, closed circles to *F.o.c.*-inoculated soil, solid lines to soil cultivated five times, and broken lines to soil kept air-dry.

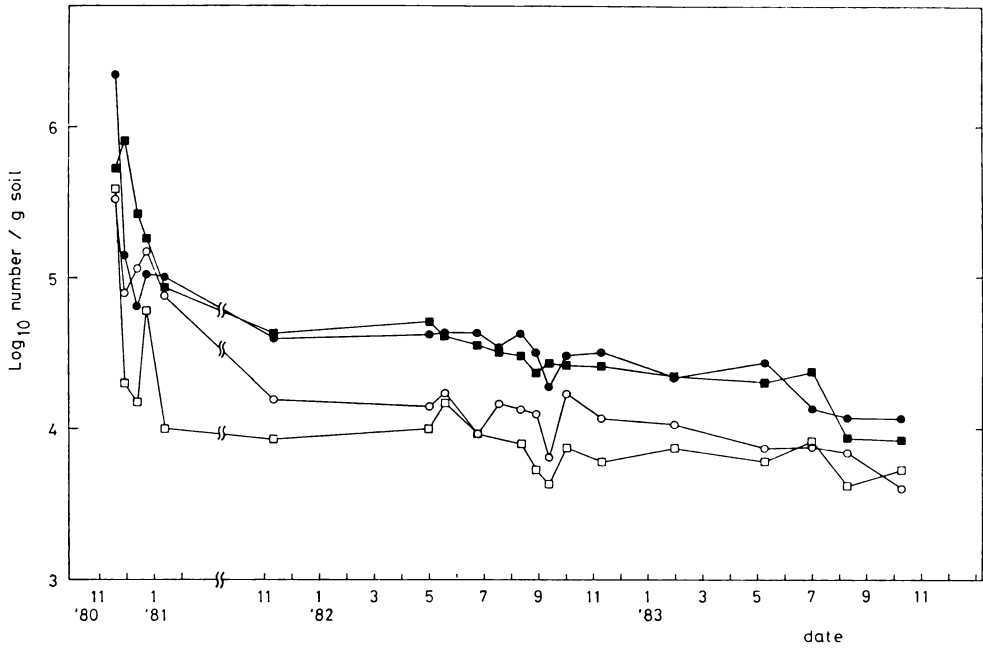


Fig. 1-2. Variations of populations of inoculated *F.o.c.* in soils cultivated five times. Open circles refer to control soil, closed circles to lignin-treated soil, open squares to chitin-treated soil, and closed squares to soil treated with both lignin and chitin.

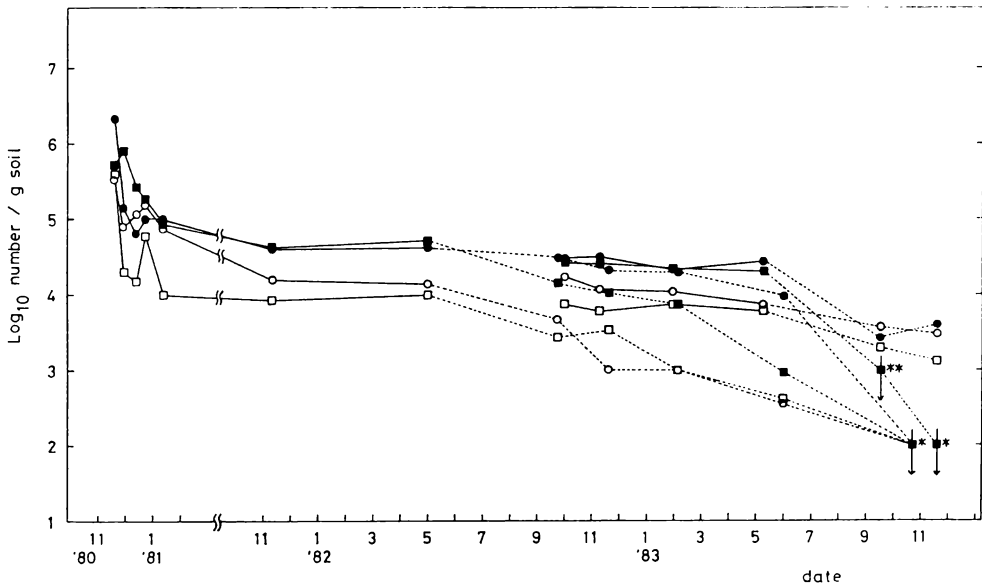


Fig. 1-3. Variations of populations of inoculated *F.o.c.* in soils kept air-dry after the first cultivation and soils kept air-dry after the third cultivation. Open circles refer to control soil, closed circles to lignin-treated soil, open squares to chitin-treated soil, and closed squares to soil treated with both lignin and chitin. Broken lines refer to soils kept air-dry. *Not detectable on plates with 1 ml of 10⁻² diluted soil suspension. **Not detectable on plates with 1 ml of 10⁻³ diluted soil suspension.

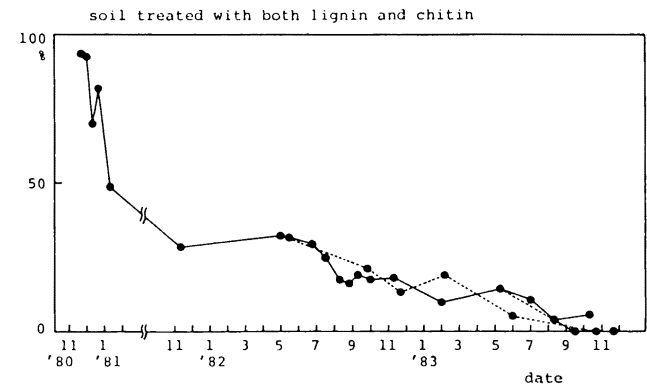
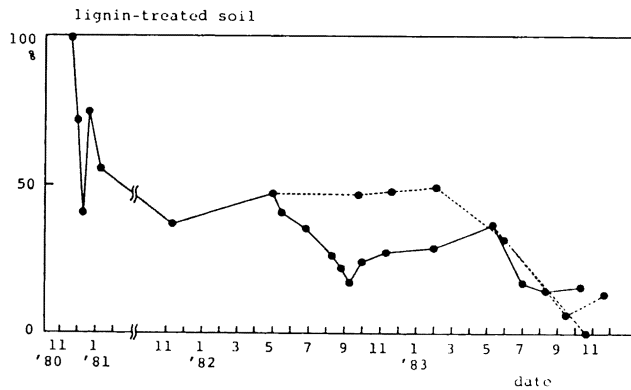
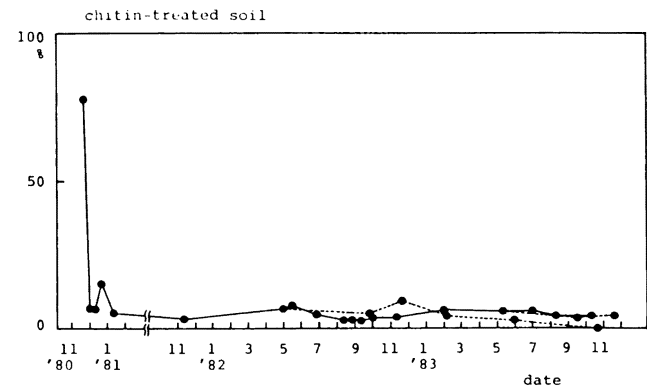
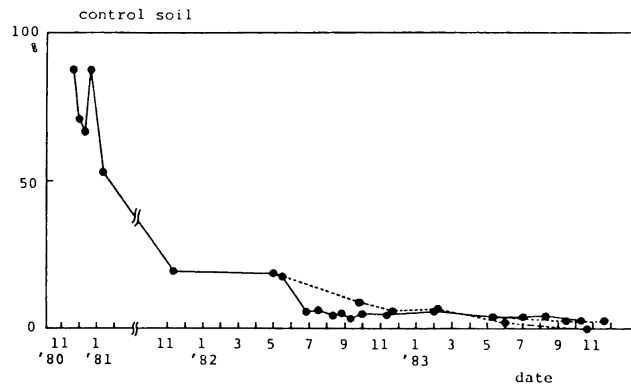


Fig. 1-4. Percentages of number of *F.o.c.* to that of total fungi. Solid lines refer to soil cultivated five times and broken lines to soil kept air-dry.

*F. o. c.*接種区では、接種菌 *F. o. c.*は全体の糸状菌群と共存していた。接種菌 *F. o. c.*の菌数の変動をFig. 1-2とFig. 1-3に示す。Fig. 1-2は、5連作した土壌中の *F. o. c.*菌数の変動を示している。Fig. 1-3は、第1作目以後風乾保存した土壌および第3作目以後風乾保存した土壌中の *F. o. c.*菌数の変動を示している。そして、糸状菌総数の内の接種菌 *F. o. c.*の占める割合を百分率(%)で示したのがFig. 1-4である。

- 1) 接種直後には、*F. o. c.*菌数は糸状菌総数の内77~99%を占めた。
- 2) キチン添加区では *F. o. c.*菌数は急激に減少した。これは、おそらくキチン添加による放線菌数および *F. o. c.*以外の糸状菌数の増加によると考えられた。
- 3) リグニン添加区およびリグニンとキチンの両方を添加した土壌では、*F. o. c.*菌数の百分率は、対照区およびキチン処理区よりもよりゆっくりと低下した。
- 4) 5連作した土壌では、*F. o. c.*菌数は減少したが、3年間を通して常に1g乾土当り 1×10^3 菌数を越えていた。他方、第1作目以後風乾保存した土壌では、第1作目終了後144週目に全処理区において *F. o. c.*は検出できなくなった。

放線菌数の変動をFig. 1-5に示す。1g土壌当りの菌数の対数値で示した。

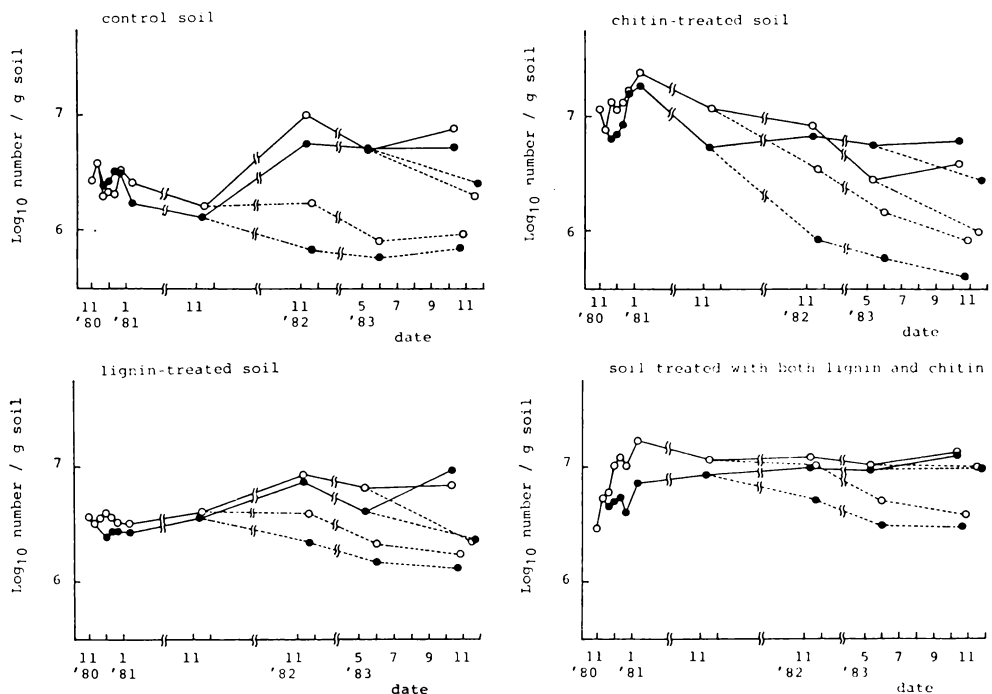


Fig. 1-5. Variations of actinomycetous populations. Open circles refer to un-inoculated soil, closed circles to *F. o. c.*-inoculated soil, solid lines to soil cultivated five times, and broken lines to soil kept air-dry.

- 1) キチン添加区では、放線菌数は第1作目において対照区とリグニン添加区に比べて5倍から8倍に増加した。
- 2) リグニンとキチンの両方を添加した土壌では放線菌数は増加した。
- 3) 第3作目から実験終了時までキチン添加区の放線菌数は、対照区およびリグニン添加区に比べてより少なくなった。このことは、土壌中のキチンが第2作目と第3作目の前あるいは後にすでに涸渇していたことを示唆した。

細菌数の変動をFig. 1-6に示す。1 g土壌当りの菌数の対数値で示した。

- 1) 第1作栽培時に、リグニン単独添加、キチン単独添加およびリグニンとキチンの両方の添加により細菌数は増加した。しかし、第1作目終了時において、リグニン添加区、キチン添加区およびリグニンとキチンの両方を添加した区の細菌数と対照区の細菌数の間の顕著な差は認められなかった。
- 2) 細菌は糸状菌および放線菌と比べて風乾により容易に影響を受け、細菌数は風乾によ

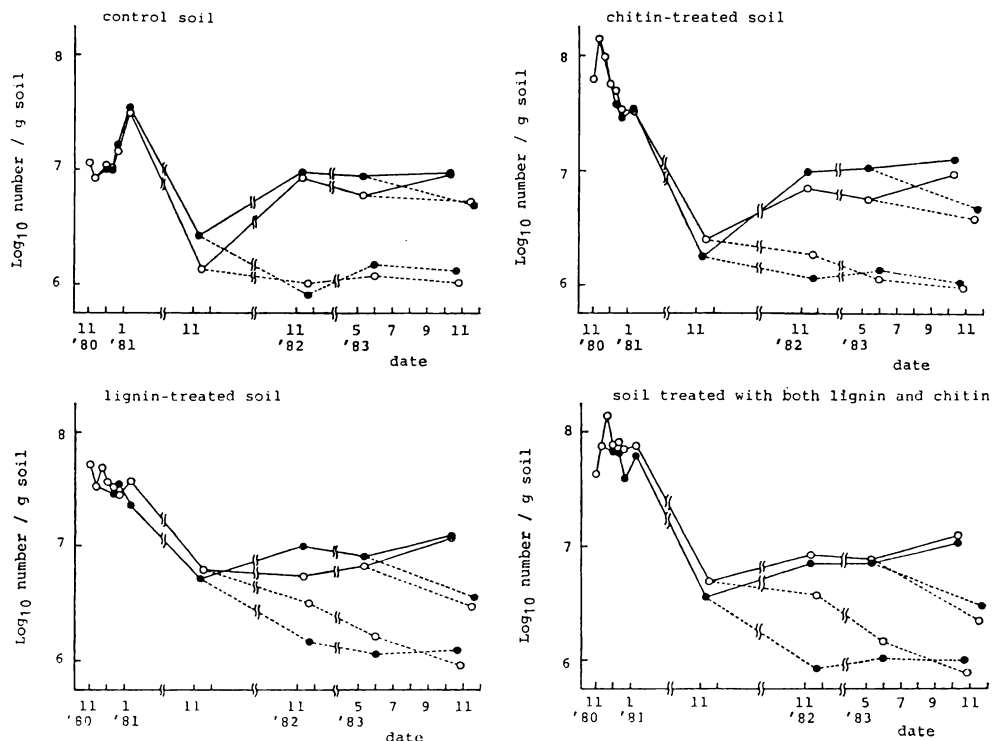


Fig. 1-6. Variations of bacterial populations. Open circles refer to un-inoculated soil, closed circles to *F.o.c.*-inoculated soil, solid lines to soil cultivated five times, and broken lines to soil kept air-dry.

り減少した。5連作土壌においても、第1作目と2作目の間の風乾保存期間に細菌数は全ての処理区で著しく減少した。こうした風乾の効果の陰に隠れて、リグニン単独添加、キチン単独添加およびリグニンとキチンの両方の添加が細菌数に及ぼす効果は明らかではなかった。

4. 考 察

リグニンとキチンという二つの物質の添加は、明らかに土壌微生物相の変動を引き起した。キチン添加は、これまでの多くの報告にあるように放線菌数を増加させた。キチン単独添加により接種した病原性糸状菌 *F. o. c.* の菌数は急激に減少した。従って、キチン添加は *Fusarium* 病害の発生した土壌を回復させるのに有効であろう。さらにキチン添加は、糸状菌数も増加させ、主に *Penicillium* 属の糸状菌が増殖した。この知見は、糸状菌のある種のものはキチンを利用し、*Fusarium* 属菌に対して競合的關係を持つてであろうことを示唆した。リグニンとキチンの両方を添加した場合には、放線菌数の増加は見られたが、総数としての糸状菌の増殖は抑えられ、*F. o. c.* 菌数の急激な減少はなく、キチンの効果は抑制された。従って、これまでキチンの効果は放線菌の働きによると言われてきたが、キチン添加により増殖する主に *Penicillium* 属の糸状菌にも *F. o. c.* 菌数を減少させる作用の一端があると推察された。

Lingappa and Lockwood (1962) は、土壌から抽出したリグニン様画分およびリグニン分解産物は静菌性があることを報告した。彼らは、また、リグニン分解産物のいくつかは、*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* の胞子発芽および発芽管の伸長を抑制すること、そして、*Penicillium frequentans* は、それらの物質に対して *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* よりもいくらか感受性が高いことも見いだした。彼らは、これらの結果からリグニン分解産物と広範に存在する土壌静菌作用 (soil fungistasis) との間に関連があるであろうことが示唆されたと報告した。このようにリグニン関連物質には静菌作用があり、この作用を利用して病原性糸状菌の土壌中での活動を抑えようとする試みもなされている。本実験でも、リグニン添加は明らかに糸状菌相の変化を引き起した。すなわち、総数としての糸状菌の増殖を抑制し、接種した *F. o. c.* 菌数の減少をゆるやかなものとし、そして土壌中での *F. o. c.* 菌数の生存を助長した。さらに、リグニン添加は、おそらく藻菌類 (Phycomycetes) の病原性糸状菌によると思われるキュウリ芽ばえの苗立枯れ病を誘引した。これらの結果から、土壌へのリグニン施用は、逆に、微生物起因の土壌病害を

助長するおそれがあることが示唆された。リグニンは難分解性であり土壤中に残存しやすいことから、その施用により土壤微生物相を悪化させ、植物生育に悪い影響を及ぼすおそれがあると推察された。*F. o. c.*を有機物施用により生物的に防除するには、放線菌と共に糸状菌の総数を増大させ、それらの拮抗作用および競合作用により*F. o. c.*菌数を減少させることが好ましいと推察された。

5. 要 約

土壤へリグニンとキチンをそれぞれ 2,000 ppmと 1,000 ppm添加し、*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (*F. o. c.*)を人工接種した。この土壤に宿主キュウリを3年間にわたり5連作し土壤微生物相の変動を追跡した。

これまでに、キチン添加は放線菌数を増加させ、この放線菌が*Fusarium*に対して拮抗的に働き*Fusarium*菌数を減少させると報告されてきた。一方、リグニンには静菌作用があり、胞子の発芽および発芽管の伸長を抑える作用があると報告されていた。本実験では、キチン単独添加により放線菌および主に*Penicillium*属の糸状菌が増殖し、*F. o. c.*菌数は急激に減少した。リグニン単独添加により総数としての糸状菌の増殖は抑制され、独特の糸状菌相が誘導され(藻菌類様のコロニーがあらわれた)、*F. o. c.*の生存が助長された。リグニンとキチンの両方を添加した場合には、放線菌数の増加は見られたが、総数としての糸状菌の増殖は抑えられ、*F. o. c.*菌数の急激な減少はなく、キチンの効果は抑制された。従って、これまでキチンの効果は放線菌の働きによると言われてきたが、キチン添加により増殖する主に*Penicillium*属の糸状菌にも*F. o. c.*菌数を減少させる作用の一端があると推察された。また、リグニンの静菌作用により*Fusarium*病害を抑制しようとする試みは、逆に*F. o. c.*の土壤中の生存を助長するおそれのあることが示唆された。*F. o. c.*を生物的に防除するには、放線菌と共に糸状菌の総数を増大させ、それらの拮抗作用および競合作用により*F. o. c.*菌数を減少させることが好ましいと推察された。

人工接種により大過剰となった土壤中の*F. o. c.*菌数は連作土壤では $10^3 \sim 2 \times 10^4$ のレベルへと収束した。他方、第1作後風乾保存した土壤の*F. o. c.*は第1作目終了後144週目に検出できなくなった。連作により*F. o. c.*の生存が維持されていたと考えられる。

第2節 リグニン添加，キチン添加，*Fusarium oxysporum* 接種が土壌中の糸状菌数 および放線菌数に及ぼす効果の統計解析

1. はじめに

畑土壌において微生物起因の土壌病害が多発するのに伴い，この土壌病害を有機物施用により防除しようとする多くの試みがなされてきた。*Fusarium*属菌による土壌病害においてキチンは病害防除における最も有効な有機物の一つであると考えられている（Mitchell, 1962, 下長根・尾崎, 1980）。他方，コーヒーかすやパークに含まれるリグニン関連物質により*Fusarium*病害を防除しようとする試みも行われている（下長根・尾崎, 1980, Adams *et al.*, 1968）。リグニンの分解産物は糸状菌毒性があり（Lingappa and Lockwood, 1962），*Fusarium*病害をリグニン添加により防除しようとする試みは静菌作用あるいは糸状菌毒性により*Fusarium*属菌の活動を抑えることを目的としていると考えられる。

前節において，次のような実験を行い，その結果を述べた。土壌へリグニンおよびキチンをそれぞれ 2,000 ppmおよび 1,000 ppm添加し，キュウリをポット栽培した。第1作目において*Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (*F.o.c.*)を人工接種した。3年間にわたりキュウリを5連作し，土壌微生物相の変動を追跡した。ここでは，この実験で得られた土壌中の糸状菌数および放線菌数の結果の内，第1作目終了後16日目の結果および第3作目終了後18日目あるいは58日目の結果を抽出し，3因子（因子A：*F.o.c.*接種，因子B：リグニン添加，因子C：キチン添加）の菌数の増減に及ぼす効果について，この実験が三元配置の実験となっていることを利用して統計解析した。

2. 実験方法

前節のとおり，この実験は三元配置の実験となっており，処理区はTable 1-1のように3因子（それぞれ2水準）の組合せのすべて（ $2^3 = 8$ ）となっている。

土壌微生物数の計数には希釈平板法を用いた。一般に土壌微生物数の計数において，各処理区からその区を十分に代表する土壌試料を採取・調製することに注意を払う必要があるが（例えば，処理区から複数のサンプルを取り十分に混合して1点とする等），結果的に各処理区1点の土壌試料を計数操作する機会が多い（香川尚徳, 1981）。本実験におけ

る計数操作では、各処理区1点の試料から各希釈段階の土壤希釈液を調製し、各希釈液に対して3連または4連で平板を作製し、計数値の平均をとった。このときには繰返しがあるが、各処理区から1点の土壤試料を採取・調製したという意味においてこの実験は統計的には繰返しのない実験と言える。そこで、得られた結果を三元配置法（繰返しなし）（石川ら、1967）に従って分散分析法により統計解析した。繰返しのない実験では、3因子交互作用 $A \times B \times C$ は誤差項と分離できないため誤差項とした。また、三つの2因子交互作用 $A \times B$ 、 $B \times C$ 、 $C \times A$ の内、不偏分散の比 F_0 が十分に小さい（ $F_0 < 1$ ）場合に限りその交互作用はないものとしてその作用の変動を誤差項にプールする手法を用いた。各因子の主効果については F_0 がどんなに小さくても誤差項にプールしなかった。

3. 結果および考察

1) 糸状菌数に及ぼす3因子の効果

第1作目の播種日を基準日（0日目）とする。土壤にリグニンとキチンを添加したのは基準日の9日前であり、基準日の14日後にポット上部より*f. o. c.*を人工接種した。ここでは第1作終了後16日目（基準日より10週目）および第3作目終了後18日目（100週目）の糸状菌数の結果（Table 1-3）を統計解析した。表中菌数の増減を示す比 y は、各処理区の糸状菌数 x を基準日における無接種対照区の糸状菌数（ 7.5×10^4 ）で割った値である。

Table 1-3における10週目の結果の比 y を分散分析法により解析するとTable 1-4のようになる。プーリング前では、因子Cの主効果が大きい傾向は認められるが、このままでは5%以下の危険率で有意な要因効果は認められない。しかし、交互作用 $A \times B$ および $C \times A$ の F_0 は十分に小さい（ $F_0 < 1$ ）ため、交互作用がないものとしてそれらの作用の変動を誤差項にプールして検定をしておすと、プーリング後の解析結果となる。主効果Cは1%危険率で、主効果Bおよび交互作用 $B \times C$ は5%危険率でそれぞれ有意な効果が認められた。従って、キチン添加により糸状菌数は増加し、リグニン添加により糸状菌数は減少した。また、交互作用 $B \times C$ （因子BとCの組合せの影響）が有意であることは、Table 1-5（BC二元表）のとおり、リグニン添加がキチンの糸状菌数を増加させる効果を抑制したことを示している。因子Aの糸状菌数に及ぼす効果は有意ではなかった。従って、*f. o. c.*接種直後には接種区の糸状菌数は急激に増加したが、基準日から10週目には無接種区の菌数と有意差のない菌数へと低下した。しかし、10週目において土壤中の*f. o. c.*

Table 1-3. Fungal populations 10 weeks and 100 weeks after the first seeding of cucumber.

Treatment	Fungal population ^a x	Population of inoculated <i>F. o. c.</i>	Ratio ^b y
<i>10 weeks after the first seeding</i>			
Un-inoculated			
1 Control	8.0×10^4	—	1.07
2 Lignin	8.5×10^4	—	1.13
3 Chitin	50.5×10^4	—	6.73
4 L+Ch	26.0×10^4	—	3.47
<i>F. o. c.</i> -inoculated			
5 Control	14.5×10^4	7.5×10^4	1.93
6 Lignin	17.5×10^4	10.0×10^4	2.33
7 Chitin	57.5×10^4	1.0×10^4	7.67
8 L+Ch	22.0×10^4	8.5×10^4	2.93
<i>100 weeks after the first seeding</i>			
Un-inoculated			
1 Control	49.7×10^4	—	6.63
2 Lignin	19.7×10^4	—	2.63
3 Chitin	55.0×10^4	—	7.33
4 L+Ch	19.7×10^4	—	2.63
<i>F. o. c.</i> -inoculated			
5 Control	40.7×10^4	16.7×10^3	5.43
6 Lignin	16.7×10^4	29.7×10^3	2.23
7 Chitin	30.3×10^4	7.3×10^3	4.04
8 L+Ch	19.3×10^4	24.7×10^3	2.57

^a Number/g soil

^b $x / 7.5 \times 10^4$

菌数はなお相当に高く、*F. o. c.*接種区の対照区およびリグニン添加区では糸状菌総数の内50%以上が接種菌であった。

Table 1-3における100週目の結果の比yを同様に分散分析すると、プーリング前には有意な効果が認められなかった。交互作用B×CおよびC×A ($F_0 < 1$)の変動を誤差項にプールして検定しなおすと、因子Bの主効果には5%の危険率で有意な効果が認められた。従って、リグニン添加により糸状菌数は減少した。ここで注意すべきことは、対照区の菌数が基準日の菌数の5倍から6倍に増加していたことである。これは第1作目終了後から2作目の栽培を開始するまでの69週間土壌を風乾保存したため、水田土壌における乾土効果と類似の作用により、微生物菌体由来の易分解性有機物が増したためと考えられ

Table 1-4. Analysis of variance of data of fungal populations 10 weeks after the first seeding.

Factorial effect	Variation (Sum of squares)	Number of degree of freedom	Unbiased variance ^a (Mean square)	Ratio ^b (Computed F)
	S	ϕ	V	F ₀
<i>Before pooling</i>				
A	0.756	1	0.756	1.83
B	7.106	1	7.106	17.16
C	25.704	1	25.704	62.08
A × B	0.162	1	0.162	0.39
B × C	8.946	1	8.946	21.61
C × A	0.344	1	0.344	0.83
E (A × B × C)	0.414	1	0.414	—
<i>After pooling</i>				
A	0.756	1	0.756	2.46
B	7.106	1	7.106	23.15*
C	25.704	1	25.704	83.73**
B × C	8.946	1	8.946	29.14*
E'	0.921	3	0.307	—
T	43.435	7		

^a S / ϕ
^b V / V_E

Table 1-5. Reconstruction of the data (*y* values) from Table 1-3 (10 weeks) into a two-factor experiment of factors B and C with two replications by the masking of factor A.

		Factor B	
		Without Lignin	With Lignin
Factor C	Without Chitin	1.50 ^a	1.73
	With Chitin	7.20	3.20

^a Average of two replications

る。リグニン添加はこの風乾後の糸状菌数の増加を抑制した形となっている。因子Cについては、主効果のF₀がきわめて小さく、キチン添加はすでに糸状菌数に影響を及ぼしていなかった。このことは、土壌中のキチンはすでにかなり分解・消失していたであろうことを示唆している。

Table 1-6. Actinomycetous populations 10 weeks and 106 weeks after the first seeding of cucumber.

Treatment	Actinomycetous population ^a x	Ratio ^b y
<i>10 weeks after the first seeding</i>		
Un-inoculated		
1 Control	2.6×10^6	0.96
2 Lignin	3.3×10^6	1.22
3 Chitin	24.0×10^6	8.89
4 L+Ch	16.9×10^6	6.26
<i>F. o. c.-inoculated</i>		
5 Control	1.7×10^6	0.63
6 Lignin	2.7×10^6	1.00
7 Chitin	18.6×10^6	6.89
8 L+Ch	7.6×10^6	2.81
<i>106 weeks after the first seeding</i>		
Un-inoculated		
1 Control	9.8×10^6	3.63
2 Lignin	8.4×10^6	3.11
3 Chitin	8.2×10^6	3.04
4 L+Ch	11.8×10^6	4.37
<i>F. o. c.-inoculated</i>		
5 Control	5.6×10^6	2.07
6 Lignin	7.3×10^6	2.70
7 Chitin	6.7×10^6	2.48
8 L+Ch	9.7×10^6	3.59

^a Number/g soil

^b $x / 2.7 \times 10^6$

2) 放線菌数に及ぼす3因子の効果

基準日より10週目および106週目の放線菌数の結果 (Table 1-6) を統計解析した。表中の比yは、基準日における無接種対照区の放線菌数 (2.7×10^6) で各処理区の菌数xを割った値である。

Table 1-6の10週目の結果の比yを糸状菌数の場合と同様に分散分析すると、プーリング前において因子Cの主効果には5%の危険率で有意な効果が認められた。プーリング後においては主効果Cは1%の危険率で有意であり、交互作用B×Cにも5%の危険率で有意な効果が認められた。従って、キチン添加は土壤中の放線菌数を著しく増加させた。また、キチンによるこの効果をリグニンは低下させていた。次に、Table 1-6の106週目の

結果を分散分析すると、ブーリング前・後共に5%以下の危険率で有意な要因効果は認められなかった。

以上のように、糸状菌数と放線菌数に及ぼす3因子の効果を三元配置法で解析することにより、キチン添加が放線菌数と糸状菌数を増加させたこと、リグニン添加がキチンによる糸状菌数を増加させる効果を抑制したこと、リグニンの糸状菌の増殖を抑える効果が長期にわたってみられたことが統計学的に示された。

土壌への有機物施用が土壌微生物相を変動させることができるため、微生物起因の土壌病害を回避し、あるいは、土壌病害のあらわれた土壌を回復させるための有効な手段と考えられる。しかしながら、施用する有機物のちがいによりその効果は様々で、成功例ばかりでなく、かえって土壌病害の発生が増す例もある（下長根・尾崎，1980，渡辺，1980）。同じ有機物を施用したとしても、対象とする土壌のちがいにより、その効果は変化して行くであろう。今回の実験結果は、キチン添加の場合について、このことを示す一つの簡単なモデルであると見ることができる。すなわち、同一土壌へのリグニン添加の有無により、キチン添加の微生物相に及ぼす効果は変化した。おそらく、リグニン含有率の高い土壌と低い土壌への同量のキチン施用を行った場合にも、得られる結果は異なるであろうことが示唆された。また、同一圃場であっても各区画の施用前歴のちがいにより、例えばリグニン含有率の高い有機資材が多量に施用されていた区画では、リグニンが難分解性であり土壌中に残存しやすいことから、キチン添加の効果は異なってあらわれてくることが推測できる。

Fusarium病害を防除しようとする試みには、一方では、コーヒーかすやバーク堆肥等の施用による、リグニン関連物質の静菌作用（fungistatic effect）あるいは糸状菌毒性（fungitoxic effect）を利用しようとするアプローチがある。キチン施用によるFusarium以外の糸状菌および放線菌の菌数を増大させ、それらの競合作用および拮抗作用により病害を防除しようとする試みとは対照的なアプローチと言える。キチン施用によるFusarium病害防除の試みは、実際の圃場で行われた場合にも概ね有効であろうし、問題も少ないであろうと考える。しかし、リグニン関連物質の施用による病害防除については、リグニンの作用がFusarium属菌以外の糸状菌にも及ぶこと、施用されたリグニンが長期にわたり土壌中に残存することに十分に注意を払う必要があり、問題が多いのではなかろうか。土壌病害を防除するために有機物を実際の農地へ施用しようとする場合、その施用効果については、土壌微生物相に及ぼす影響とそれに引き続く植物生育に及ぼす

影響，病害軽減・回避を確認した評価方法の相違等多くの要因を十分に検討した上で，総合的に判断することが必要であろう。

4. 要 約

畑土壌へリグニン添加，キチン添加およびFusarium接種した実験が三元配置の実験となっていることを利用して，繰返しのない実験の統計解析を行った。糸状菌数と放線菌数に及ぼす各因子の主効果および2因子交互作用の内の有意な効果と，時間の経過に伴うそれらの効果の消長について統計学的に把握することができた。キチン添加により放線菌数が著しく増加し，糸状菌数も増加したこと，リグニン添加がキチンによる糸状菌数を増加させる効果を抑制したこと，リグニン添加の糸状菌の増殖を抑える効果が長期にわたって見られたことが統計学的に示された。

第3節 リグニン添加，キチン添加，*Fusarium oxysporum* 接種が植物生育に及ぼす影響

1. はじめに

*Fusarium*病害を有機物施用により防除しようとする多くの試みがなされてきた。それに伴って、さまざまな有機物の施用が病害防除に有効か否かを適切に評価・判定する必要がある。評価・判定方法としては、有機物施用が土壌微生物相に及ぼす影響を調べる方法と共に、病害の軽減・防除を確認するための植物生育に及ぼす影響を評価・判定する方法が重要である。従来の報告では、病原菌による感染土壌での作物の罹病率や枯死率、あるいは、感染率等への有機物施用効果を調べることにより、生物的防除における有効性が判定されている。しかし、実際の圃場では、*Fusarium*が感染していても、植物体の抵抗力が強いため、発病に至らずに収量が見込める場合など、さまざまな状況が生じるため、場合によっては生育量あるいは収量の比較による判定も必要となってくるであろう。従って、実際の圃場における*Fusarium*病害に及ぼす有機物施用の効果を判定するには、実験室レベルあるいは温室レベルの比較的短期間の試験の結果と圃場試験の結果とを連結させながら、複数の評価・判定方法の組合せによる総合的な判断によるべきであろう。

第1章第2節では、リグニン添加，キチン添加，*Fusarium oxysporum* 接種の3因子が土壌微生物相に及ぼす影響について述べたが、第3節では3因子が植物生育に及ぼす影響について5連作したキュウリの萎凋株数および生育量と、5作目の感染株数を調べることにより、リグニンとキチンの施用効果を判定しようと試みた。キュウリの生育量については、第2節と同様三元配置法により、3因子の生育量に及ぼす効果を統計解析した。

2. 実験方法

土壌処理，キュウリの栽培方法については第1節のとおり。キュウリ栽培時に化学肥料を各処理区同量ずつ与えた（Table 1-2）。第2節で述べたように、この実験は三元配置の実験とみなすことができ、Table 1-1のとおり8処理区は3因子（因子A：*F. o. c.*接種，因子B：リグニン添加，因子C：キチン添加）の組合せのすべてとなっている。キュウリの生育量については地上部乾物重の結果を統計解析した。第2節の土壌微生物計数値の結果は繰返しのないn = 1の結果であったが、地上部乾物重の結果にはポット数に相当する繰返し数がある。すなわち、第1作目がn = 5，第2作目と第3作目がn = 4，第4作目

と第5作目が $n = 3$ であった。各因子の主効果と、3因子交互作用および2因子交互作用について分散分析法により統計解析した。第3節では、繰返しがあるため、プーリングの手法は用いなかった。

萎凋株数と感染株数については、次のようにして計数した。萎凋株数については、*F.o.c.*の感染により萎凋症状のあらわれた株を、第1作目から第5作目について計数した。感染株数については、植物切片プレート法 (Lumsden *et al.*, 1976) により、接種菌 *F.o.c.*が植物体内へ侵入していることを確認し、計数した。第5作目の株について計数した。植物切片プレート法の操作は、1) 地際部の茎を20分間流水中で十分に水洗した、2) 茎を 0.5% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液中に30秒間浸漬し、滅菌水でリンスした、3) 茎1本につき薄い切片を4片ずつつくり、ローズベンガル寒天培地上へこの切片をのせた、という操作である。7日間培養後植物切片を中心にして接種菌 *F.o.c.*のコロニーがあらわれた株を感染株とした。

3. 結果

*F.o.c.*の感染による萎凋株数についてTable 1-7に示す。第1作目において比較的多い萎凋株が観察された。第2作目から第5作目においては、30日間から40日間の栽培期間で萎凋症状のあらわれた植物体数はわずかであった。しかしながら、第5作目の株について

Table 1-7. Number of plants wilted by *F.o.c.*

Treatment	No. of cultivations				
	1st	2nd	3rd	4th	5th
Un-inoculated					
1 Control	0	0	0	0	0
2 Lignin	0	0	0	0	0
3 Chitin	0	0	0	0	0
4 L+Ch	0	0	0	0	0
<i>F.o.c.</i> -inoculated					
5 Control	4	0	0	1	0
6 Lignin	1	0	0	0	0
7 Chitin	3	0	0	1	0
8 L+Ch	3	2	0	0	0
Number of plants in a treatment	10	8	8	3	3

植物切片プレート法による感染株数を調べた結果、第5作目において土壤中の接種菌 *F. o. c.* が植物体内へ感染侵入していたことが確認された (Table 1-8, Plate 1-1)。接種菌 *F. o. c.* が3年間にわたり病原性を保持していたことが示唆された。

Table 1-8. Number of plants infected with *F. o. c.* in the fifth cultivation.

Treatment	No. of cultivation: 5th
Un-inoculated	
1 Control	0
2 Lignin	0
3 Chitin	0
4 L+Ch	0 (<i>n</i> = 2)
<i>F. o. c.</i> -inoculated	
5 Control	0
6 Lignin	1
7 Chitin	1
8 L+Ch	2 (<i>n</i> = 2)
Number of plants in a treatment	3

Counted by using plant pieces plate technique.

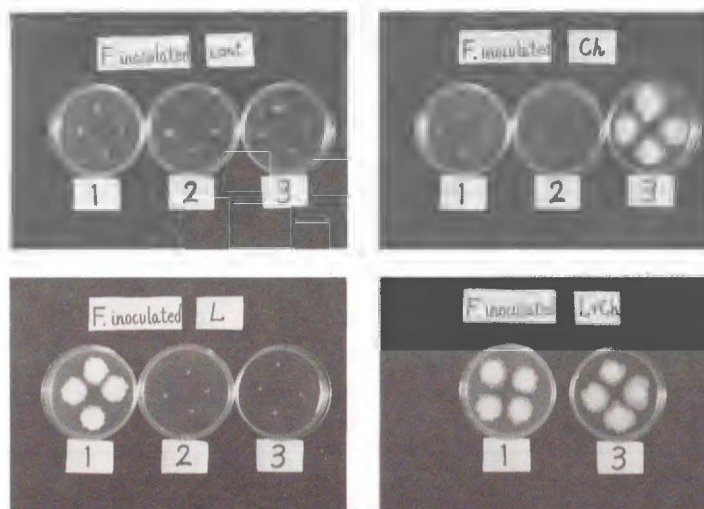


Plate 1-1. Plant pieces plates in *F. o. c.*-inoculated treatments in the fifth cultivation. Each treatment has three plates, and each plate has four pieces derived from one plant. Due to one missing plant, treatment of L+Ch has two plates.

Table 1-9. Shoot dry weight (g/plant).

Treatment	No. of cultivations						Total average
	1st a	1st b	2nd	3rd	4th	5th	
Un-inoculated							
1 Control	0.33	0.55	1.43	1.02	1.16	1.59 (<i>n</i> = 2)	1.00 (<i>n</i> = 31)
2 Lignin	0.30	0.46	1.33	0.75	1.29	1.32	0.89
3 Chitin	0.41	0.80	1.42	1.14	1.41	1.47	1.11
4 L + Ch	0.33	0.42	1.39	0.70	1.46	1.19 (<i>n</i> = 2)	0.88 (<i>n</i> = 31)
<i>F.o.c.</i> -inoculated							
5 Control	0.35	0.47	1.38	1.12	0.90 (<i>n</i> = 2)	1.53	0.99 (<i>n</i> = 31)
6 Lignin	0.28	0.32	1.35	1.01	0.97	1.32	0.90
7 Chitin	0.37	0.56	1.46	1.21	0.74	1.44	1.02
8 L + Ch	0.25	0.23	1.17	0.83	1.09	1.24 (<i>n</i> = 2)	0.78 (<i>n</i> = 31)
Number of plants in a treatment	4	6	8	8	3	3	32
Number of plants in a pot	2	2	2	2	1	1	—

第1作目から第5作目におけるキュウリ生育量（地上部乾物重）をTable 1-9に示す。各処理区の乾物重の平均をとる際、各栽培時期の初期に萎凋した株については欠測値として平均化から除外した。しかし、栽培時期の後半に萎凋した株については、それらの乾物重は統計解析に使用した。第1作目においては栽培株を播種後40日目（第1作目・a）と55日目（第1作目・b）の2回に分けて収穫した。Fig. 1-7, Fig. 1-8, Fig. 1-9は、三つの因子の主効果が各栽培時期のキュウリ生育量にどのように影響していたのかを示す。

- Fig. 1-7は因子A（*F.o.c.*接種）の主効果を示している。*F.o.c.*接種区の地上部乾物重と無接種区の乾物重を比較した図である。図中の縦の帯は各栽培時の無接種区の地上部乾物重に対する*F.o.c.*接種区の乾物重の割合を百分率で示している。100%を示す横線から上方または下方へ伸びる縦線はそれぞれの栽培時における因子Aの2水準の間の1%の危険率の最小有意差（LSD: Least significant difference）を示している。*F.o.c.*接種は、第4作目において地上部乾物重を有意に減少させたが、第3作目では乾物重を有意に増加させた。
- Fig. 1-8は因子B（リグニン添加）の主効果を示している。縦の帯はリグニンを添加しなかった区の乾物重に対するリグニン添加区の乾物重の割合を百分率で示している。

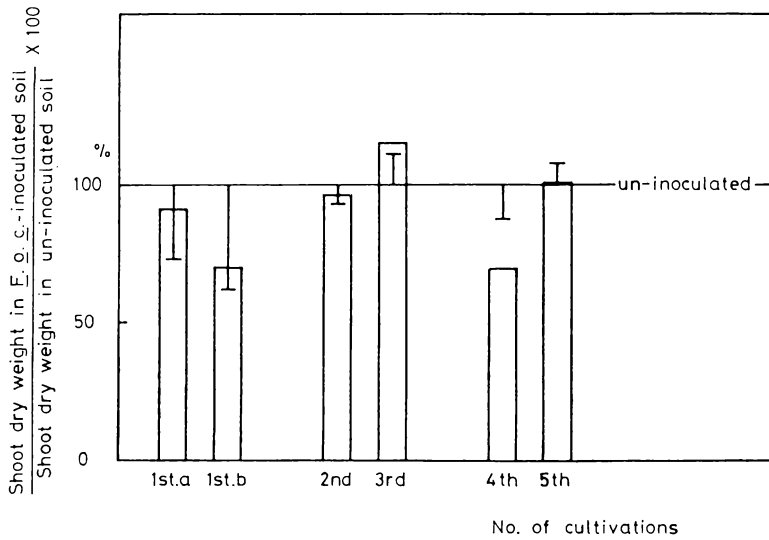


Fig. 1-7. Effect of factor A: *F.o.c.* inoculation on plant growth. Vertical bands refer to percentage of shoot dry weight in *F.o.c.*-inoculated soil to that in un-inoculated soil. Each vertical line refers to least significant difference between the two levels of this factor in each cultivation (at 1% level).

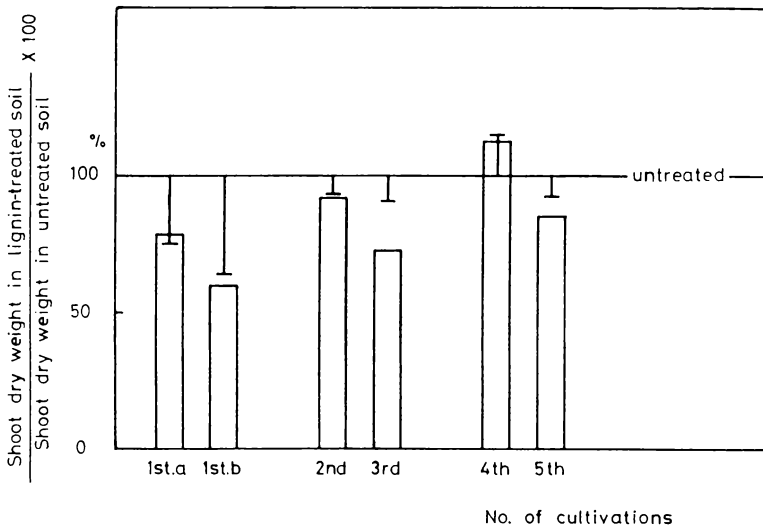


Fig. 1-8. Effect of factor B: lignin amendment on plant growth. Vertical bands refer to percentage of shoot dry weight in lignin-treated soil to that in untreated soil. Each vertical line refers to least significant difference between the two levels of this factor in each cultivation (at 1% level).

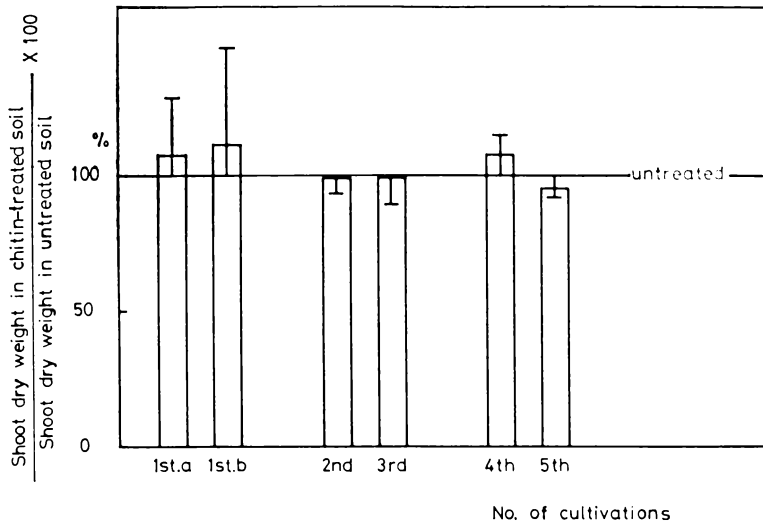


Fig. 1-9. Effect of factor C: chitin amendment on plant growth. Vertical bands refer to percentage of shoot dry weight in chitin-treated soil to that in untreated soil. Each vertical line refers to least significant difference between the two levels of this factor in each cultivation (at 1% level).

リグニン添加は、第1作目・b、第2作目、第3作目、第5作目において、地上部乾物重を有意に減少させた。

- 3) Table 1-9は因子C（キチン添加）の主効果を示している。縦の帯はキチンを添加しなかった区の地上部乾物重に対するキチン添加区の乾物重の割合を百分率で示している。5作を通してキチン添加の主効果に1%の危険率で有意な効果は認められなかった。
- 4) 三つの因子の交互作用については、第2作目における3因子交互作用A×B×C（5%危険率）、第3作目における2因子交互作用B×C（1%危険率）、第4作目における2因子交互作用C×A（5%危険率）に統計学的に有意な効果が認められた。しかし、これらの交互作用は5作を通して一貫した傾向を示すものではなかった。

4. 考察

この実験は土壌処理区に関して三つの因子を持ち、各因子がそれぞれ2水準を持つため、 2^3 要因分析 (factorial experiment) とみなされる。キュウリ生育に及ぼす各因子の効果を明らかにするため、地上部乾物重の効果を三元配置法により統計解析した。リグニン添加がキュウリ生育量を減少させる傾向があった。A. d. c. 接種とキチン添加の効果には5作を通して一貫した傾向は見いだせなかった。また、三つの因子の間の交互作用について

Table 1-10. Contents of 2 M KCl-extracted inorganic nitrogen, total carbon, and total nitrogen in the soils.

Treatment	Soil kept air-dry after 1st cultivation			Soil kept air-dry after 3rd cultivation			Soil cultivated five times		
	Inorganic N (ppm)	C (%)	N (%)	Inorganic N (ppm)	C (%)	N (%)	Inorganic N (ppm)	C (%)	N (%)
Un-inoculated									
1 Control	84.8	0.57	0.045	6.5	0.52	0.036	5.3	0.53	0.038
2 Lignin	60.4	0.64	0.045	18.6	0.60	0.040	6.4	0.60	0.042
3 Chitin	46.0	0.58	0.044	21.1	0.55	0.036	3.8	0.55	0.041
4 L+Ch	52.4	0.64	0.048	23.1	0.60	0.037	29.5	0.61	0.046
<i>F.o.c.</i> -inoculated									
5 Control	83.0	0.57	0.049	6.2	0.53	0.035	4.0	0.49	0.034
6 Lignin	55.2	0.64	0.048	6.6	0.59	0.038	6.6	0.58	0.039
7 Chitin	53.8	0.57	0.045	5.0	0.55	0.038	4.6	0.53	0.039
8 L+Ch	49.5	0.64	0.049	22.3	0.62	0.039	11.3	0.64	0.048

も5作を通して一貫した傾向は見いだせなかった。このような結果を得た原因について考察してみたい。5連作土壌中の養分条件についてTable 1-2とTable 1-10に示す。Table 1-2は、各栽培時にポット当たり施用した化学肥料の量を示している。8処理区の土壌は、各栽培時に処理区間で同量の化学肥料を受容していた。一方、Table 1-10は土壌中の2 M 塩化カリウム抽出の無機態窒素量、全炭素含有率、全窒素含有率を示している。ある栽培時期における土壌の養分条件はそれ以前の植物生育の影響を受けていたため、養分条件は処理区間で変動していた。これらの結果は、仮に土壌中の養分条件が5連作の栽培期間を通して均一に維持できたならば、各因子の主効果は明確になり、また、因子間の交互作用についてもそのいくつかは5作を通して有意な効果が認められたかもしれないということを示唆している。この仮定条件を満たすためには供試土壌の綿密な養分管理が必要となってくる。

第3節では、5連作したキュウリの生育量を統計解析すると共に、萎凋株数と感染株数を調べ、Fusarium病害に対するリグニンとキチンの添加効果を判定しようと試みた。今回の萎凋株数の結果から添加効果を導くことは、2作目以後の萎凋株数が少ないことおよび萎凋株のあらわれた処理区に共通した傾向が見られないことから、困難であると言える。感染株数の結果から、30日間から40日間の栽培期間では接種菌*F. o. c.*がキュウリに感染してはいるが、なお発病し萎凋するには至らない株が多くあった可能性が示唆された。従って、Fusarium病害の生物的防除における有機物施用効果を判定するための栽培試験として

は、小規模短期間の試験と長期間の栽培試験とを組み合わせる必要性がある。

キュウリ生育量の結果からは、リグニン添加によりキュウリ生育量が減少する傾向が見られたが、これはリグニンを添加した区で接種菌 *F. o. c.* の感染により生育が抑制され生育量が減少したと考えるよりも、リグニンあるいはその分解産物が直接生育を抑制したようである。Fusarium病害に対するリグニン添加効果を判定するために重要な交互作用 A×B (*F. o. c.* 接種とリグニン添加の組合せの影響) については有意性を導くことはできなかった。また、因子 A (*F. o. c.* 接種) の効果が明瞭でなかった結果については、*F. o. c.* 接種区で *F. o. c.* により感染されているが萎凋していない株が存在したため、これらの株が発病に至ればその段階で生育は停滞することを考慮すれば、栽培期間を延ばせば効果が有意となる可能性がある。

今後、植物生育に及ぼす影響を解析することにより、Fusarium病害に対する有機物施用効果を評価・判定しようとする場合、萎凋株数については栽培期間の影響が大きいと考えられるため、感染株数と生育量を中心にして判定する方法が有効ではなかろうか。また、植物栽培に伴い土壌中の養分条件が処理区間で変動しやすい実験設計の場合には、土壌養分が処理区間で均一となるように養分管理しながら Fusarium 接種と有機物添加を行うことが求められる。この要求を満すことにより、植物生育に及ぼす各因子の主効果を明らかにするばかりでなく、Fusarium 接種と有機物添加の間の 2 因子交互作用 (今回の実験における A×B および C×A) の有意性を導くことが Fusarium 病害に対する有機物施用効果を判定する重要な鍵であると言える。

5. 要 約

3 年間にわたり 5 連作した宿主キュウリの生育に及ぼすリグニン添加、キチン添加、*F. o. c.* 接種の効果については、リグニン添加によりキュウリの地上部乾物重が減少する傾向があった。第 1 作目において *F. o. c.* 接種区における萎凋株数が 5 作中最も多かったが、第 2 作目から第 5 作目では萎凋株数はわずかであった。植物切片プレート法により、栽培期間中に萎凋症状があらわれなかった株において接種菌 *F. o. c.* による感染株が存在することが確認された。有機物施用による Fusarium 病害の軽減・防除を、植物生育に及ぼす効果を指標にして、評価・判定しようとする場合には、Fusarium により感染されているが萎凋症状はあらわれていない株が存在することに注意を払いつつ、生育量、萎凋株数および感染株数等から総合的に判断することが必要であると推察された。

第2章 *Fusarium oxysporum* の産生するフザリン酸の添加がキュウリ生育に及ぼす効果と、キュウリの intact および semi-intact plantを用いたフザリン酸起因の萎凋症状の発現

1. はじめに

Fusarium oxysporum は植物毒素フザリン酸 (fusaric acid: 5-*n*-butylpyridine-2-carboxylic acid, 分子量 179, 以下 F A と略す) を産生する。Fusarium 病害における萎凋症状は、導管閉塞、毒素産生等による総合的症状と言われるが、Fusarium 病害の発生における F A の役割については、なお不明な点がある。Fusarium 病害を土壌への有機物施用により生物的に防除しようとする試みの中で、ときには病害が助長されてしまう場合もある。例えば C/N 比の低い青刈作物のすき込みは施用時期により効果のあらわれ方が異なり、有機物が栄養基質となって病原菌を増加させ、発病の増加につながるおそれがある。また、作物残渣を栽培後土壌へすき込めば病原菌数増加のおそれはさらに大きいと共に、罹病作物残渣のすき込みにあつては植物体中の病原菌による代謝産物の土壌への混入ととらえることができる。本章で取り上げた F A の場合、実際に土壌からも検出されている (西村, 1957)。このように作物残渣という有機物の施用が病害を助長することから、このときの Fusarium 病害の発生あるいは病徴の発現を F A という産生物質との関係により説明できるかどうか検討した。

F A は 1934 年 藪田らにより命名された生理活性物質である。この物質は *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*) (藪田ら, 1934) などの Fusarium 属の一部 (西村, 1958) により産生され、植物の生育を阻害する (Gäumann, 1957, 玉利・加治, 1952-1953)。F A が病原性と直接関連している可能性はあるものの (Barna *et al.*, 1983, Chakrabarti and Chaudhary, 1980, Davis, 1969)、病徴または病原性の強弱とは関連がないとする報告も多い (Heitefuss *et al.*, 1960, Kuo and Scheffer, 1964, 西村, 1957, 西村ら, 1967, 西村, 1980)。このように発病過程の一連の事実 (pathogenesis) における F A の役割には諸説がある (Rudolph, 1976)。本研究では、キュウリの intact および semi-intact plant を用いることにより F A 起因の萎凋症状のあらわれる F A 濃度を明らかとすること、Fusarium 病害における F A の役割についてキュウリつる割病病徴との関連性を考察することを目的とした。semi-intact とは intact に近いが、人為的操作により intact ではなくなった状態を示しており、Beckers *et al.* (1987) が用いた用語に

なっている。本研究で調製したsemi-intact plantは、根部のごく一部を切除した植物体である。intactおよびsemi-intact plantを用いてFA溶液への浸漬試験を行うことにより、植物根部が直接FA溶液に触れ、植物体内へFAが容易に導入されるようにした。キュウリでは切枝を供試すると対照区の切枝にもしおれがでたため、semi-intact plantの使用によりFA浸漬試験における対照株を長時間安定化させ、FAによる植物体地上部のわずかな変化を判別すると共に、FAの低濃度側の影響をintactに近い植物体で観察した。ここでは、まず、キュウリつる割病病原菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* によるFAの産生を確認し、人工培地中での産生量を調べることで、根圏環境のFAの濃度レベルを推定する指標とすると共に、砂耕栽培した芽ばえおよび幼植物に対してFA添加試験を行い、植物根部の周囲に砂という媒体がある場合のFAの生育阻害効果を調べた。そして、それらの結果と、intactおよびsemi-intact plantを用いたFA浸漬試験の結果を比較しながら、FA添加試験の結果からFusarium病害と土壌中のFAとの関連性を、FA浸漬試験の結果から植物体内にFAが産生された場合のFAの植物体への影響を、推察しようとした。

2. 実験方法

1) *Fusarium oxysporum* の液体培養法

Fusarium oxysporum f. sp. *cucumerinum* IF0 6384 (以下 *F. o. c.* と略す) によるFA産生を確認するため、リチャーズ培地 (Sanwal, 1956) (グルコース50g, 硝酸アンモニウム10g, リン酸一カリウム5g, 硫酸マグネシウム 2.5g, 塩化第二鉄0.02g, 蒸留水 1,000ml, pH 4.0~4.2) を用いて *F. o. c.* の液体培養を行った。300ml 三角フラスコに培地 100ml を入れ、*F. o. c.* の小型分生胞子様の細胞 (bud cells) 懸濁液 7ml を接種し、28℃で静置培養した。

2) FA定量法

FAは紫外部の吸光度曲線における268nmのピークにより定量することができる。定量方法は、松尾ら(1976)の方法を参考にして、次のように行った。培養液をろ過し、菌体除去後、50℃で10倍に減圧濃縮した。4倍量のメタノールを加えタンパク質をろ別除去後再度50℃減圧濃縮によりメタノールを除き、蒸留水で正確に10倍濃縮液とした。この液1mlに蒸留水29mlを加え、6N塩酸によりpH 2.0としたあとエチルエーテル30mlで3回抽出した。エーテル抽出液を50℃で乾固し、エタノール1mlに溶解後、シリカゲル薄層に

塗布し、ブタノール：酢酸：水（4：1：1）で展開した。標品FA（半井化学薬品）と同じ位置のバンドをかき取り、95%エタノール10mlで溶出した。この液の紫外吸光度曲線を取りFAの存在を確認した後268nmの吸光度により定量した。

3) 播種日から15日目までの芽ばえに対するFA添加試験

直径12cm、深さ7cmの深型シャーレに砂（2mmのふるいを通した砂を十分に水洗し風乾したもの）300gを入れオートクレーブした。標品FAを用いて0、1、10、100ppmの濃度に調製したFA溶液を、無菌フィルターを通して70mlずつ添加した。キュウリ種子は十分に水洗した後70%エタノールにつけ、滅菌水中でよく洗い播種した。培養は20℃、明所12時間、暗所12時間の人工条件下で行った。

4) 砂耕栽培による播種後15日目から24日目までのキュウリ幼植物に対するFA添加試験

1ℓプラスチックポットに十分に水洗した砂1,600gを入れ、キュウリを2株/potで栽培し、添加試験に供試した。栽培には改変Hoagland・Snyder水耕液を使用し、100ml/pot・dayでポット上部より与えた。FAはこの培養液に0、10、100、300ppmの濃度で播種後15日目から添加した。FA添加前に水道水を100ml/potでかけ流し、砂中よ

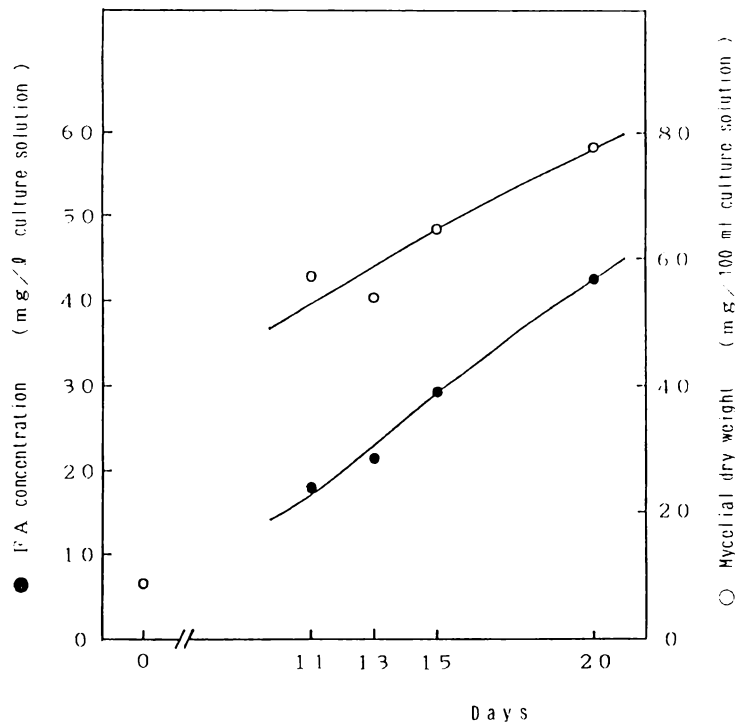


Fig.2-1. Mycelial dry weight and FA concentration produced by *F.a.c.* in liquid culture on static condition.

り既に添加したF Aと培養液成分が順次ポット外へ流れ出るようにした。F A添加液はpH 6.1に調製した。F A添加日数は9日間とした。

5) intactおよびsemi-intact plantを用いたF A浸漬試験

(a) intactおよびsemi-intact plantの調製

ロックウール水耕栽培用培地（新日鐵化学株式会社、商品名：エスプラン M-128、上面2.9 cm×2.9 cm、底面 3.5cm×3.6 cm、高さ 3.5cm、体積36cm³、保水量約34ml）にキュウリを播種し、改変Hoagland・Snyder水耕液により栽培した。播種後10日目より植物体を定期的にサンプリングした。intact plantとしてロックウール栽培株をそのまま供試した。semi-intact plantは栽培株の根端約5mmを切除し、ロックウールを丁寧に取り去り調製した。ただし、ロックウールに付着した細根の一部は脱落した。

(b) F A浸漬試験

pH 6.1に調整したF A標準液から、F A濃度0、5、10、20、40、60、80、100、120、150 ppmの溶液200mlを調製し300mlビーカーに入れた。intactおよびsemi-intact plant

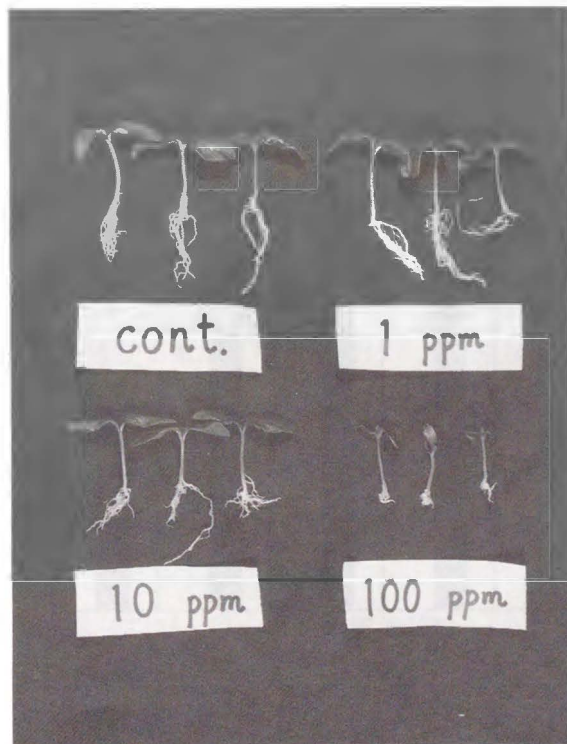


Plate 2-1. Cucumber seedlings (15 day-old) cultivated in deep petri dishes with sterile sand with the additions of 1, 10, and 100 ppm F A solutions.

の根部を溶液へ浸漬した。浸漬開始から48時間後に、植物体地上部の萎凋症状の有無を観察した。

3. 結果

[*A. d. c.* 液体培養における F A の産生]

A. d. c. をリチャーズ培地により11~20日間静置培養したときの菌体乾物重と培養液中に産生された F A 濃度を Fig. 2-1 に示す。静置培養20日間により40mg/ℓ の F A が産生された。また、大型坂口フラスコにリチャーズ培地 300ml を入れ、接種後2日間振盪培養した後8日間静置培養した場合には、10日間で60mg/ℓ の F A が産生された。

[播種日から15日目までの芽ばえに対する F A 添加試験]

F A 溶液を70ml/シャーレで添加しキュウリを播種したとき、播種後15日目の芽ばえを観察すると、F A 100 ppm 処理により形態的異常が見られた (Plate 2-1)。F A 10 ppm

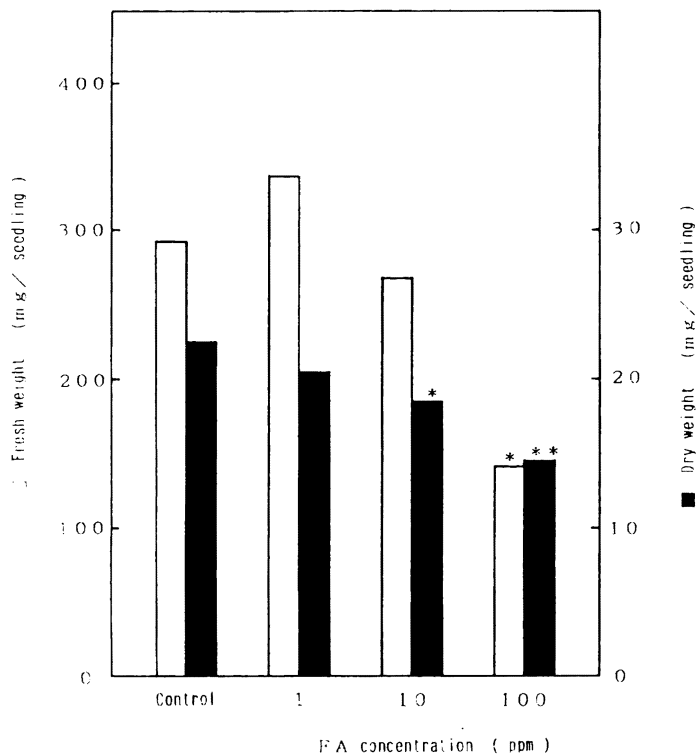


Fig.2-2. Growth inhibitory effect of F A on cucumber seedlings (fresh and dry weights of 15 day-old seedlings).

* significant at 5% level compared with control.
** significant at 1% level compared with control.



Plate 2-2. Cucumber young plants (24 day-old) cultivated in pots in sand culture with the daily additions of 10, 100, and 300 ppm FA solutions for 9 days.
 0, Control ; 1, Addition of 10 ppm FA ; 2, Addition of 100 ppm FA ; 3, Addition of 300 ppm FA.

処理では、対照区と比べ地上部には差は見られないが、根部の生育がいく分抑制された。この試験における芽ばえの新鮮重と乾物重をFig. 2-2に示す。FA 10 ppm処理による芽ばえの乾物重の減少は5%の危険率で、100 ppm処理による乾物重の減少は1%の危険率で、それぞれ有意に認められた。

〔播種後15日目から24日目までのキュウリ幼植物に対するFA添加試験〕

播種後15日目から9日間連続してキュウリ幼植物にFAを添加したとき、FA 300 ppm処理区では、添加開始後2日目より変化があらわれ、以後激しい生育阻害が認められた(Plate 2-2)。地上部乾物重をFig. 2-3に示す。繰返し数は1処理区3ポットの3連である。FA 100 ppm処理区では対照区に比べ14%の生育量の減少が1%の危険率で有意に認められた。

〔intactおよびsemi-intact plantを用いたFA浸漬試験〕

intact plantをFA溶液に48時間浸漬したところTable 2-1の結果が得られた。この場合にはロックウールと共に約34mlの水がFA溶液 200mlへ持ち込まれていた。播種後10日目から28日目の株に対してFA 20 ppmあるいは40 ppm処理により茎または葉柄のくびれや葉のしおれあるいは葉柄の下方へのしなりの症状があらわれた。FA濃度が高くなるにしたがい症状はしだいに激しくなった。FA 120, 150 ppm処理により激しい全身萎凋症状

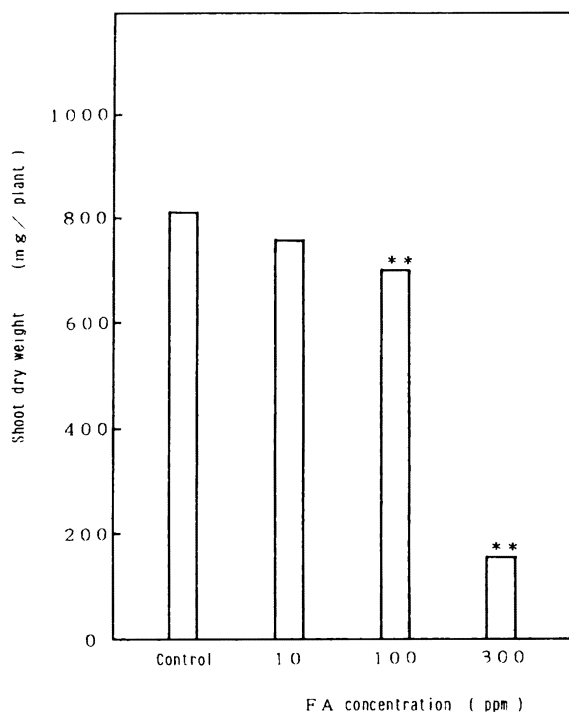


Fig.2-3. Growth inhibitory effect of F A on cucumber young plants (shoot dry weights of 24 day-old young plants).

** significant at 1% level compared with control.

があらわれた。semi-intact plantの場合は、播種後16日目から28日目の株に対して浸漬試験を行い、Table 2-2の結果を得た。播種後21, 24, 28日目の供試株に対してF A 10 ppm処理により下方の数枚の葉のしおれあるいは全身のゆるい萎凋症状が見られた(Plate 2-3)。より高濃度側ではintact plantの場合と類似の症状があらわれた。

4. 考 察

キュウリつる割病病徴の一つに萎凋症状がある。発病初期には全体が生気を失い日中だけしおれ、朝夕は正常に回復する(米山, 1980)。これを繰り返したのち萎凋枯死する。従って、つる割病病徴としての萎凋症状は、発病初期のゆるいしおれに特徴があると言える。Fusarium病害の病徴とF Aの関連性を論じた報告では、F Aによる植物体への効果が茎や葉柄のくびれ、収縮などの回復不能な激しい障害としてあらわれたため、その関連性が否定的に扱われているのではなかろうか。以下ではこの点をふまえて、今回得られた結

Table 2-1. Wilt symptoms on intact plants after the 48h-bathing in FA solutions.

FA concentration (ppm)	Plant age (day-old)							
	10	12	14	16	18	21	24	28
0	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-
20	±	-	-	-	-	+	-	-
40	+	+	+	+	+	++	+	+
60	+	+	+	+	++	++	++	+
80	+	+	+	++	++	+++	++	+
100	++	+	++	++	++	++	++	+
120	+++	++	++	++	+++	+++	+++	++
150	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++

Symptoms - : no reaction.
 ± : slight change of wilt or stem constriction.
 + : wilt of some leaves or constriction of stem or petiole.
 ++ : severe wilt.
 +++ : dry down of whole plant.

Table 2-2. Wilt symptoms on semi-intact plants after the 48h-bathing in FA solutions.

FA concentration (ppm)	Plant age (day-old)				
	16	18	21	24	28
0	-	-	-	-	-
5			-	-	-
10	-	-	+	+	+
20	-	-	+	+	-
40	++	+	-	+	+
60	++	++	++	++	+
80	+++	++	++	+++	+
100	+++	+++	+++	++	++
150	+++	+++	+++	+++	+++

Symptoms - : no reaction.
 + : wilt of some leaves or constriction of stem or petiole.
 ++ : severe wilt.
 +++ : dry down of whole plant.



Plate 2-3. Semi-intact plants (24 day-old) after the 48h-bathing in FA solutions.

果について考察を進める。

F Aは植物毒素として、F Aによる障害あるいは生育阻害効果が認められていたが、これまでの実験対象は発芽時の芽ばえあるいは切り枝中心であり、時にはごく若い齢の幼植物が用いられていた。また、根細胞、根毛、小葉片あるいはカルスを実験対象としてF Aの効果を調べた報告がある (Arias, 1985, Barna *et al.*, 1985, D'alton and Etherton, 1984, Magnegneau and Branchard, 1988)。本研究では、まず、根部周囲に砂という媒体があり、そこにF Aが存在する場合のF Aの生育阻害効果を調べた。砂耕栽培により播種日から15日目までの芽ばえおよび播種後15日目以降の幼植物の両方についてF A添加試験を行った。芽ばえではF A 100 ppm 70ml/シャーレ処理により、幼植物ではF A 300 ppm 100 ml/pot・day処理により激しい生育阻害があらわれた。しかし、その症状はキュウリつる割病病徴とは類似していなかった。砂耕栽培株へのF A添加試験では砂によるF Aの吸着があるため、低濃度でのF Aの効果は植物体にあらわれにくかったと推察した。一方、*F. o. c.*をリチャーズ培地で液体培養したときのF A産生量は40~60mg/lであった。キュウリ連作土壌において作物残渣が大量に土壌へすき込まれた場合においても、土壌中のF Aの濃度レベルは高々この濃度であろうし、土壌中での分解を考慮すれば、その濃度レベルはおそらくはるかに低いと推定される。このように、Fusarium病害によるしおれ症

状を砂中の、あるいは、土壌中のF Aの蓄積によると考えることは困難である。

F Aはこれまでにいくつかの作物において実際の感染宿主体内から検出された生体内毒素(vivotoxin)であり(Gäumann, 1957, 西村, 1957, 西村, 1962, 西村ら, 1967), キュウリと*F. o. c.*の関係においてもF Aは植物体内に産生されているであろう。ここではintactおよびsemi-intact plantを用いることにより根部が直接F A溶液に触れ、F Aが植物体内へ吸入されやすくなる手法を採った。semi-intact plantではF A 10 ppm処理において下方の葉のしおれあるいは全身のゆるい萎凋症状が観察できた。この症状がF A浸漬試験における地上部の最も低濃度側の反応であり、症状はキュウリつる割病病徴と類似していた。他方、F A 40 ppm以上の処理によりintactおよびsemi-intact plantに引き起こされた症状は茎または葉柄のくびれや葉のしおれ症状であり、茎または葉柄のくびれが葉のしおれに先行する場合が見られた。F A 40 ppm以上で処理した場合のこの症状は、キュウリつる割病病徴とは類似していなかった。F A 10 ppm処理では、semi-intact plantにおいてのみF Aの地上部への移行が起き、より高濃度処理では、intactとsemi-intact共にF Aの侵入を受けたが、F A濃度が高いため症状はゆるい萎凋から茎や葉柄の部位でのくびれへと変化したと推定すれば、intactとsemi-intact双方の結果の相違点と共通点を説明できると考える。この推定に関して根に着目してみると、intactな根の場合、低濃度のF Aの体内への侵入は防御されたが、F A濃度が高まるにつれてF Aによる根のダメージは大きくなり、植物体内へのF Aの侵入を許した、という推定も可能と考えられる。semi-intact plantの根の場合には、低濃度のF Aもまた植物体内へ誘導されたであろう。semi-intact plantにおいて、F A 10 ppm処理という低濃度でゆるい萎凋症状が見られたことから、キュウリ植物体に感染した*F. o. c.*により植物体内で産生されたF Aが蒸散流に乗り上方の茎葉部へ到達し、部分的な葉のしおれあるいは全身的なゆるい萎凋を引き起こしている可能性があるかと推察した。言い換えれば、キュウリつる割病病徴の一つである萎凋症状の発現においてF Aが役割を持つ可能性が示唆された。しかしながら、この可能性を裏付けるためには、より直接的な例えば実際の罹病植物体中のF A含有率等のデータが必要である。

Fusarium病害におけるF Aの役割について、ここではキュウリの場合について考察したが、これまでの報告から植物種とFusarium属菌の組合せによりF Aの役割に軽重がある可能性がある。また実験における植物へのF Aの添加手法の相違も考慮しながら、この問題に関してなお一層の検討が必要であろう。

5. 要 約

キュウリつる割病病原菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* をリチャーズ培地で液体培養したときのフザリン酸 (FA) 産生量は40~60mg/l であった。

深型シャーレに殺菌した砂を入れて栽培した播種日から15日目までの芽ばえと、ポットで砂耕栽培した播種後15日目から24日目までのキュウリ幼植物に対するFA添加試験を行った。芽ばえについてはFA 100 ppm 70ml/シャーレ処理により、幼植物についてはFA 300 ppm 100 ml/pot・day処理により激しい生育阻害があらわれた。

ロックウール培地に生育させたキュウリ (intact) および根端約5mmを切除しロックウールを丁寧に取り去ったキュウリ (semi-intact) を用いて、FA起因の萎凋症状のあらわれるFA濃度を調べた。intact plantでは、播種後10日目から28日目の株に対してFA 20 ppmあるいは40 ppm処理により茎または葉柄のくびれや葉のしおれ症状が見られた。FA 120 ppm, 150 ppm処理では激しい全身萎凋症状があらわれた。semi-intact plantでは、播種後21, 24, 28日目の株に対してFA 10 ppm処理により下方の数枚の葉のしおれあるいは全身のゆるい萎凋症状があらわれた。semi-intact plantにおけるこの症状はつる割病病徴と類似していた。キュウリつる割病病徴の一つである萎凋症状の発現においてFAが役割を持つ可能性が示唆された。

第3章 嫌氣的条件下の水田土壤への稲わら添加が生物窒素固定に及ぼす影響

1. はじめに

水田土壤は1年の内水稻作付期間の約4ヶ月間湛水条件下におかれ、この期間中は酸素の乏しい嫌氣的な条件となっている。水田土壤はこの酸素の乏しい湛水期と酸素のある程度存在する落水期が交互に繰り返される生態系であるため、水田土壤の微生物相は次のような特徴を持っている。1) 畑土壤と比べて好氣性微生物である糸状菌が少なく、放線菌数も少ない。2) 細菌数（ほとんどが条件的嫌氣性細菌）は多く、下層においても、畑土壤に見られるような細菌数の減少が見られない。従って、水田土壤は細菌群の働きが極めて大きい、細菌型の土壤である。このような水田土壤へ稲わらを施用すると生物窒素固定（biological nitrogen fixation, 以下BNFと略す）が高まることが知られている。また、湛水条件下の水田土壤生態系は大きく別けて、田面水、酸化層、還元層、そして根圏土壤から成っているが、各部位におけるBNFについて、例えば、田面水におけるラン藻によるBNF、酸化層を含む作土層表層における光合成細菌によるBNF、あるいは、根圏細菌によるBNFについて、多くの研究がなされている。そして、各部位におけるBNFを明らかにしなければ、水田土壤におけるBNFの全体像をとらえることはできない。ここでは水田土壤還元層に着目し、実験室レベルで酸素の影響を完全に排除した嫌氣的条件下の水田土壤系を調製した。この土壤へ稲わらおよびその成分のモデルとしてセルロースあるいはグルコースをそれぞれ1%添加し、アセチレン還元活性（acetylene reduction activity, 以下ARAと略す）の変動を詳細に調べ、同時に土壤中の窒素固定量の指標として塩酸分解性総窒素量および α -アミノ酸態窒素量の変動を調べることにより、BNFへの稲わら添加の影響を明らかにすることを目的とした。

前述したように、一般に水田土壤への稲わら添加はBNFを高める。Matsuguchi (1979) は、1 ha当り10tの稲わら施用が作土層のARAを70%高めたと報告した。Matsuguchiは、稲わら、部分的に分解した稲わら、セルロース、グルコースを5%添加した湛水土壤の従属栄養性ARAの経時変化について調べた。Yoneyama *et al.* (1977) は、稲わらの乾土当り0.5%、1.0%、1.5%、2.0%添加がARAや無機態窒素濃度等に及ぼす効果を調べ、湛水土壤のARAは、わら混入により、稲わら分解の比較的初期の段階で励起されたと報告した。Yoneyama *et al.* の実験ではBNFはARAにより測定されたが、土壤窒素量の変化は確認されていない。Santiago-Ventura *et al.* (1986) は、ガラス室内のポツ

ト試験による N-balance の研究により、稲わら施用（乾土当り 0.3% 添加）が 2 ~ 4 mgN / g 稲わらの割合で N-gain を高めたと報告した。Ladha *et al.* (1987) は、水田土壌への稲わら施用が ARA, 細菌数そして稲生育に及ぼす影響を研究し、稲わら施用は分解初期において土壌中の ARA と細菌増殖を励起したことを報告した。Rice and Paul (1972) は、麦わらを 20% 添加した土壌あるいは砂と粘土の混合系における BNF について研究した。彼らは、この土壌系と砂-粘土系における窒素固定効率はそれぞれ 2.2 および 2.1 mgN / g 麦わらであり、湛水系における唯一の活発な窒素固定微生物は *Clostridium* 属菌であったと報告した。しかし、わらの 20% 添加が圃場における実際の条件よりもはるかに高い割合であり、砂-粘土-わらの系は人工的であると言える。一方、Harper and Lynch (1984) は、分解中の麦わらの好気-嫌気の接触部位に着目し、培養した麦わらから嫌氣的条件下の無窒素培地を用いて単離された細菌は全て *Clostridium butyricum* であったと同定した。彼らは、嫌氣性窒素固定細菌は好氣性糸状菌が産生したセルロース分解酵素による分解産物により扶養されていると考えた。Ito and Watanabe (1981) は、土壌中の様々な窒素形態について、生物的に固定された窒素と土壌由来の窒素の分布パターンを分析し、酸不溶性のヒューミン態窒素画分には生物的に固定された窒素の内わずか 6% しか存在しないことを見いだした。この結果から、BNF による窒素富化 (N-enrichment) を土壌の加水分解性窒素量を分析することにより検知することが可能と考えられる。水田土壌還元層における稲わら分解の条件は必ずしも絶対嫌氣的条件と限定できるものではないが、本章における実験では特に絶対嫌氣的条件下における土壌へのグルコース、セルロース、稲わら添加が、ARA, 窒素固定細菌数そして土壌中の塩酸分解性総窒素量と α -アミノ酸態窒素量に及ぼす効果について調べた。まず、ガラス室内のポット試験により水田土壌還元層における稲わらの分解速度を分析した。次に、嫌氣的土壌中における稲わら添加の BNF (ARA と土壌窒素量の変化) に及ぼす効果を、グルコースあるいはセルロース添加の効果と比較する実験、そして、グルコースとセルロースの添加が嫌氣性窒素固定細菌に及ぼす効果に関する実験を行った。

2. 実験方法

1) 水田土壌中の稲わら分解速度

Watanabe (1984) が発展させた plastic net bag (以下 PNB と略す) 法により、土壌中の稲わら分解量を測定した。

国際稲研究所 (I R R I , los Baños, Laguna, Philippines) の水田圃場から採取した Maahas clay soil (pH 6.8 , 窒素含有率 : 0.16% , 有機態炭素含有率 : 1.28% , C E C : 35 meq / 100 g soil , P : 427 ppm , K : 962 ppm (Ventura and Watanabe, 1984)) をガラス室内の実験に供試した。 I R R I 圃場において採取された稲わら (含水率 : 9.1% , 有機物含有率 : 乾物当り 75.8%) を約 3 cm の長さに切断し、わら桿と葉鞘の部分を選別した。この 30 片を正確に秤量し、 P N B に封入した。 1 / 2,000 a ワーグネルポット (直径 25 cm × 高さ 30 cm) に Maahas 土壌を入れて湛水状態を維持し、深さ約 10 cm の位置にわらを封入した P N B を埋めた。埋没後 5 , 9 , 20 , 30 , 40 , 62 , 72 日目に土壌から P N B を 3 連でサンプリングした。 P N B を水中でゆるく上下させた後、稲わら残渣を注意深く P N B から取り出し、 110 ° C で乾燥して乾物重を、 490 ° C で 4 時間灰化して灰分率を、それぞれ求めた。有機物含有率はこれらの値から算出した。

2) 嫌氣的土壌へのグルコース、セルロース、稲わら添加が A R A および土壌中の塩酸分解性総窒素量と α -アミノ酸態窒素量に及ぼす効果

石川県立農業短期大学圃場の水稲連作土壌 (灰色低地土、野市統) を湿った状態で 1 mm のふるいを通し、実験に供試した (砂質埴壌土 sandy clay loam : 粗砂 13% , 細砂 50% , シルト 19% , 粘土 18% , pH 6.8) 。セルロースは Microkristallin Art 2331, Merck を使用した。稲わらは同圃場で栽培されたもの (品種 : 加賀ひかり , 塩酸分解性窒素含有率 : 0.47%) を細かく粉碎し、 0.149 mm のふるいを通して供試した。

(a) 培養

容積 68 ml の大型試験管に湿潤土壌 10.0 g を入れ、リン酸二カリウム 2 mg と蒸留水 5 ml を入れ、気層を酸素フリーの窒素ガス (加熱還元銅カラムに通して純化した窒素ガス) で置換した。先端をブチルゴム栓で封じ、 2 日間室温で静置した。この土壌へ窒素ガス下で乾土に対して 1% の割合のグルコース、セルロース、稲わらを添加し、再度ブチルゴム栓で封じた。土壌と添加物を十分に混合し、 30 ° C 暗所で培養した。

(b) A R A 測定

大型試験管内の土壌をゆっくり攪拌し、窒素ガス下で先端を欠いたピペットを用いて、スラリー状の土壌懸濁液 3 ml を容積 34 ml の試験管へ分注し、 W 型ブチルゴム栓で封じた。各処理区 3 連とした。各試験管へ 2 ml のアセチレンガスを注入した後、 30 ° C 暗所で 24 時間培養し、気層をガスクロマトグラフィーにより分析した。

(c) 土壌窒素分析

ここでの窒素分析の方法は *Methods of Soil Analysis* (Stevenson, 1982) に従い、部分的に改変することにより行った。

濃塩酸30mlを土壌10.0gの入った大型試験管に添加し、計算量の蒸留水を加えることにより6 N 塩酸・土壌混合液とした。この混合液を冷却管を付けて95℃24時間加熱分解し、ろ過した。得られた加水分解液を、氷水中で冷やし、スターラーで攪拌しながら、慎重にpH 6.5±0.1へ中和した。

中和した加水分解液の一部を2連で完全にケルダール分解し、アンモニア態窒素量を蒸留滴定により定量した。本実験で用いた装置における塩酸分解性総窒素 (Total HCl-hydrolyzable-N, 以下THNと略す) の回収率は87.92% (標準誤差は4連で±0.58%) であった。

中和した加水分解液10ml (土壌10.0gから得られた加水分解液の1/25) と0.5 N 水酸化ナトリウム1mlをフラスコに入れ、沸騰水中で体積が4~6mlとなるまで加熱した。クエン酸500mgとニンヒドリン200mgをフラスコに添加して沸騰水中に10分間置き、冷却した。リン酸-ホウ酸buffer 10 mlと5 N 水酸化ナトリウム1mlを注入後、フラスコを水蒸気蒸留した。 α -アミノ酸態窒素 (α -Amino acid-N, 以下AANと略す) の回収率は73.16%であり、標準誤差は4連で±0.83%であった。

3) 嫌氣的土壌へのグルコース、セルロース添加が嫌気性窒素固定細菌数に及ぼす効果

実験材料と土壌の培養方法は2)の実験と同じである。嫌気性窒素固定細菌数の計数にロールチューブ法 (Hungate, 1969) を用いた。土壌試料を、加熱した還元銅カラムを通して純化した酸素フリーの窒素ガス下で、適切な希釈段階まで嫌氣的に希釈した。このとき用いた嫌気性希釈液の組成は、塩化ナトリウム2.25g, 塩化カリウム0.105g, 塩化カルシウム0.06g, 重炭酸ナトリウム0.05g, チオグリコール酸ナトリウム1.0g, 0.1%レサズリン1.0ml, 蒸留水1,000mlである。土壌希釈液1mlを窒素ガス下で無窒素 *Clostridium* 培地 (リン酸二カリウム1.0g, 硫酸マグネシウム0.2g, 塩化ナトリウム0.01g, 硫酸マンガン0.002g, モリブデン酸ナトリウム0.002g, 塩化カルシウム0.01g, 硫酸第一鉄0.05g, ショ糖20g, チオグリコール酸ナトリウム0.5g, 0.1%レサズリン1.0ml, 寒天20g, 蒸留水1,000ml, pH 7.2) に接種し、30℃暗所で2週間培養後、コロニー数を計数した。各希釈段階について4連のロールチューブにより計数した。

3. 結果および考察

1) 水田土壌中の稲わら分解速度

稲わら 1 g 当りの有機物含有量 (g) の値を Fig. 3-1 に示す。約 32% の有機物が培養期間のはじめの 10 日間で分解した。稲わらの有機物含有量の減少曲線は、稲わら中の有機物が少なくとも二つの画分、すなわち、一つは急速に分解する画分 (半減期 17 日) であり、他方はゆっくりと分解する画分 (半減期 58 日)、から成っていることを示唆した。Yoneyama *et al.* (1977) や Ladha *et al.* (1987) により報告されているように、稲わら分解に伴う BNF はこの急速に分解する画分と関連しているようである。次の実験では、グルコースとセルロースを稲わらに含まれる代表的な物質のモデルとして土壌へ添加した。

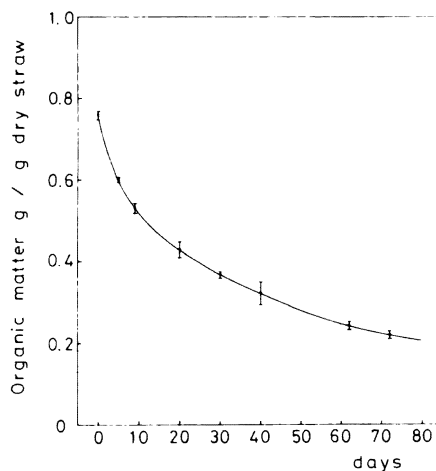


Fig. 3-1. Decomposition rate of rice straw in paddy soil. Vertical lines indicate standard errors.

2) 嫌氣的土壌へのグルコース、セルロース、稲わら添加が A R A および土壌中の T H N 量と A A N 量に及ぼす効果

3 種類の有機物添加後 0 日目から 14 日目までの培養土壌の A R A の測定結果を Fig. 3-2 に示す。グルコース添加土壌では、A R A は添加直後より上昇し、そのピークは培養 1 日目にあらわれた。セルロース添加土壌における A R A は 2 日目から上昇し、ピークは 3 日目から 4 日目にあらわれた。稲わらを添加した土壌において、A R A は添加直後よりわずかに上昇したが、これはおそらく稲わら中の水溶性糖類の存在によるものと考えられる。A R A のピークは 3 日目にあらわれ、そのピークの高さはセルロース添加区のピークの高さの約 1 / 3 であった。1 週間毎の A R A の測定結果を Fig. 3-3 に示す。培養 14 日目を過ぎると A R A は 4 処理区すべてにおいて非常に低く、あるいは、無視できるほどとなった。

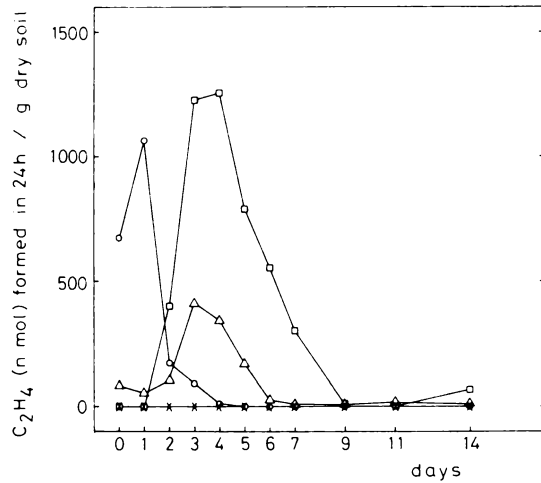


Fig. 3-2. ARA of the incubated soils. ×, control soil; ○, soil with glucose addition; □, with cellulose addition; and △, with rice straw application.

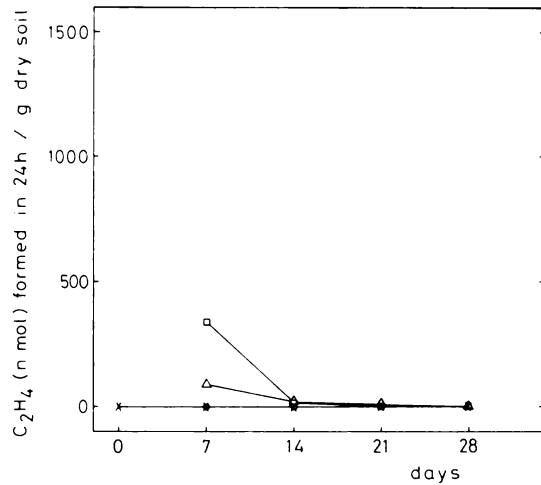


Fig. 3-3. ARA of the incubated soils (weekly ARA assay). ×, control soil; ○, soil with glucose addition; □, with cellulose addition; and △, with rice straw application.

グルコース、セルロースを添加した土壌のARAと稲わらを添加した土壌のARAを比較することにより、稲わら分解に伴うARAの主要なピークは、稲わら中のセルロースあるいはヘミセルロースの分解と関連していると考えられる。一方、稲わら処理区の培養0日目から2日目のARAのわずかな上昇は、稲わら中に少量含まれる水溶性糖類と関連しているであろう。培養土壌中のTHN量をFig. 3-4に示す。THN量はグルコースあるいはセルロース添加により培養7日目に増加していた。培養14日目において対照区と比較したときのTHNの増加量は、グルコース添加区では $0.095 \text{ mg N / g 乾土}$ 、セルロース添加区

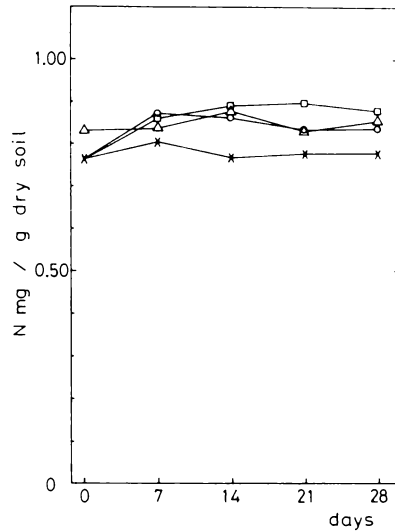


Fig. 3-4. Total hydrolyzable-N content of the incubated soils. ×, control soil; ○, with glucose; □, with cellulose; and △, with rice straw.

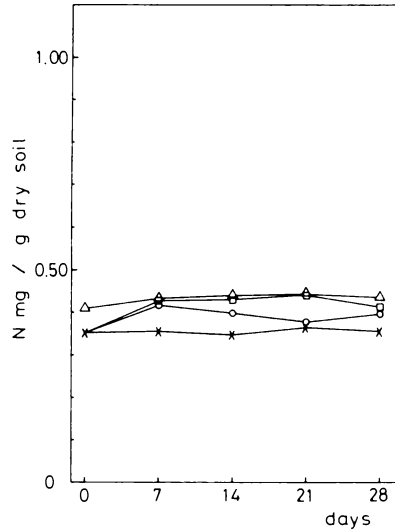


Fig. 3-5. α-Amino acid-N content of the incubated soils. ×, control soil; ○, with glucose; □, with cellulose; and △, with rice straw.

では 0.124mgN/g 乾土 (回収率による補正後の値) であった。また、14日目の稲わら添加区の THN 量と 0 日目の同一区の THN 量の差は 0.047mgN/g 乾土 であった。土壌中の AAN 量を Fig. 3-5 に示す。AAN 量もまたグルコースあるいはセルロース添加により培養 7 日目に増加していた。THN 量の増加量の一部は AAN 量の増加によることが示唆された。培養 14 日目における対照区に対する AAN の増加量は、グルコース添加区において 0.051mg/g 乾土 、セルロース添加区において 0.084mg/g 乾土 であった。稲わら添加区においては 14 日目の AAN 量と 0 日目の AAN 量の差は 0.031mg/g 乾土 であった。こ

のように、グルコース、セルロース、稲わらを添加した土壌中のTHN量とAAN量の増大の結果により、ARAの結果が裏付けられた。本実験における窒素固定によるN-gainのオーダーはグルコースまたはセルロース処理により、およそ0.1mgTHN/g乾土であった。培養14日目におけるTHNの増加量を添加した有機物当りに換算すると、9.5 mgN/gグルコース、12.4 mg N/gセルロース、4.7 mgN/g稲わらであった。これらのN-gainの値はTHN量の測定により評価したものであり、THNは土壌窒素の一部であるため、土壌の全窒素分析を行い、今回の実験結果を強化することが必要であろう。

3) 嫌氣的土壌へのグルコース、セルロース添加が嫌氣性窒素固定細菌数に及ぼす効果

ロールチューブ培養上に生育したコロニーを次の二つの方法により計数した。すなわち、a) 無窒素培地上に生育する全てのコロニー数の計数（極小コロニーを含む）、b) 無窒素培地上に生育する大型および中型のコロニー数の計数。培養土壌中の嫌氣性窒素固定細菌数の変動をFig.3-6に示す。この培地上に大型のコロニーを形成する細菌は窒素固定性Clostridiumと判断される（安達，1990）。グルコース添加により増殖する嫌氣性細菌については、単離菌の孢子形成とカタラーゼ活性を確認し、顕微鏡観察により桿菌であったため、窒素固定性Clostridiumと同定された。他方、セルロース添加処理により増殖する極小コロニーについては同定できなかった。Fig.3-6の結果および無窒素培地上のコロニーの形態の比較により、グルコースあるいはセルロースの1%添加により嫌氣性窒素

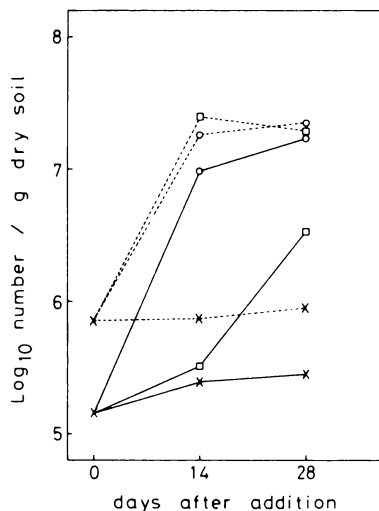


Fig.3-6. Variations of the number of anaerobic bacteria grown on nitrogen-free medium. ×, control soil; ○, with glucose; and □, with cellulose. —, number of large and medium-size colonies; ----, number of total colonies grown on the medium.

固定性細菌数が増加し、セルロースが分解・消費される際に生育する窒素固定細菌とグルコースが分解・消費される際に生育する窒素固定細菌とは異なることが示唆された。

水田土壌におけるBNFに関する研究は、様々な土壌条件の下で多様な規模の実験により行われてきた。水田土壌還元層に施用された稲わら分解に伴うBNFは、主に嫌気的条件下で起きるであろう。ここでは、実験室レベルで完全嫌気的条件下の実験を行い、1日毎にARAを測定することにより、分解初期段階におけるグルコース、セルロースあるいは稲わらの施用に伴うARA変動の詳細を明らかにした。今回得られた結果から、セルロースまたは稲わらの分解において、嫌気性セルロース分解細菌と嫌気性窒素固定細菌が共同してBNFを行っていることが示唆された。

4. 要 約

Plastic net bag 法を利用して水田土壌還元層における稲わら分解速度の測定を行い、稲わら中の有機物は少なくとも二つの画分、一つは急速に分解する画分（半減期17日）、他方はゆっくりと分解する画分（半減期58日）、から成ることが示された。

嫌気的条件下（窒素ガス下）の水田土壌への稲わら1%添加が生物窒素固定に及ぼす効果を、グルコースまたはセルロースの1%添加の効果と比較した。培養土壌のアセチレン還元活性（ARA）を1日毎に測定したところ、グルコース添加によるARAは添加直後より上昇し、培養1日目にピークがあらわれた。セルロースまたは稲わら添加によるARAのピークは3日目から4日目にあらわれた。セルロース添加によるARAのピークの高さは稲わら添加による高さの約3倍であった。培養2週間を過ぎるとARAは無視できるほどとなった。土壌中の塩酸分解性窒素量および α -アミノ酸態窒素量はグルコースまたはセルロース添加により増大し、ARAの結果を裏付けた。培養14日目における塩酸分解性窒素の増加量は、添加した有機物当りに換算すると、9.5 mgN/gグルコース、12.4 mg N/gセルロース、4.7 mgN/g稲わらであった。グルコースおよびセルロース添加により無窒素培地に生育する嫌気性細菌数は増加した。グルコース添加により増殖した嫌気性窒素固定細菌は窒素固定性Clostridiumと同定された。無窒素培地上のコロニー形態の比較により、セルロースが分解・消費される際に生育する窒素固定細菌とグルコースが分解・消費される際に生育する窒素固定細菌とは異なることが示唆された。以上の結果より、セルロースまたは稲わらの分解において、嫌気性セルロース分解細菌と嫌気性窒素固定細菌が共同して生物窒素固定を行っていることが示唆された。

第4章 稲わらを添加した水田土壌還元層における孢子形成性嫌気性窒素固定細菌数の変動

1. はじめに

土壌への稲わら施用により窒素固定活性が上昇するという事実は実験室レベルにおいても、温室、圃場レベルの実験においても報告されている (Harper and Lynch, 1984, Ladha *et al.*, 1987, Matsuguchi, 1979, Rice and Paul, 1972, Santiago-Ventura *et al.*, 1986)。この窒素固定活性の上昇と、窒素固定する微生物の増殖とを結び付けることは自然なことであり、土壌中のある種の微生物はわら施用により刺激され、活発な窒素固定と共に増殖したであろう。湛水土壌系あるいは好気性と嫌気性の接触部位において、わら添加により窒素固定する嫌気性微生物はClostridiumであったと報告されている (Rice and Paul, 1972, Harper and Lynch, 1984)。窒素固定性Clostridium以外の嫌気性窒素固定細菌には、硫酸還元菌の一部、光合成細菌等がいる。湛水土壌中の窒素固定全体に対する硫酸還元菌の寄与は小さいという報告がある (Durbin and Watanabe, 1979)。また、光合成細菌については、稲わらの表層施用による菌数の増大が確認されている (Ladha *et al.*, 1987)。嫌氣的土壌へのグルコース、セルロース、稲わら添加が窒素固定に及ぼす影響を調べると、グルコースあるいはセルロース添加により嫌気性窒素固定細菌数が増加し (Adachi *et al.*, 1989)、グルコース添加により増殖するのは窒素固定性Clostridiumであった。しかし、完全嫌氣的条件下の水田土壌において、セルロース添加により窒素固定を行う微生物については明らかではない。

本研究では、ガラス室内ポット試験により粉碎した稲わらを水田土壌還元層へ均一に混入し、稲わらの分解・資化における耐熱性嫌気性窒素固定細菌 (heat-resistant anaerobic nitrogen-fixing bacteria, 以下HANBと略す) の寄与について評価しようと試みた。このHANBの中心となるものは孢子形成する窒素固定性Clostridiumである。従来、嫌氣的条件下の稲わら分解に伴う生物窒素固定 (BNF) を担う微生物として、主に窒素固定性Clostridiumが注目されてきた。しかし、第3章において、完全嫌氣的条件下のセルロースまたは稲わら分解において嫌気性セルロース分解細菌と嫌気性窒素固定細菌が共同して生物窒素固定を行っていること、この共同を担う窒素固定細菌は糖類を資化する窒素固定性Clostridiumと異なるであろうことが示唆された。おそらく稲わら中の水溶性糖類は窒素固定性Clostridiumの増殖を促すであろうが、嫌氣的条件下の稲わらの

分解・資化における窒素固定性Clostridiumの寄与は、稲わら中の水溶性糖類の存在割合がセルロース、ヘミセルロースに比べ低いことから、その存在割合程度のごくわずかの寄与である可能性がある。ここでは、稲わら、部分分解稲わら（34日間好気分解した後、乾燥させた稲わら）、セルロースを添加した土壤中のHANB数の変動を調べた。部分分解稲わらは、水溶性糖類を含む易分解性画分が分解・消失したであろう稲わらとして、セルロースは、稲わら中に多量に含まれる成分、セルロース・ヘミセルロース、のモデル物質として実験に供試した。

2. 実験方法

1) 稲わら添加した水田土壤中のHANB数の変動

国際稲研究所 (Los Baños, Laguna, Philippines) 圃場の水田土壌 (Maahas clay soil, pH 6.8, 窒素含有率: 0.16%, 有機態炭素含有率: 1.28%, CEC: 35 meq/100 g soil, P: 427 ppm, K: 962 ppm (Ventura and Watanabe, 1984)) を湿った状態で2mmのふるいを通し、ガラス室内の実験に供試した (含水率: 52.1%, 密度: 1.41 g/cc)。稲わら (品種 IR60, *Oryza sativa*) を乾燥し、粉砕した (含水率: 8.1%, 有機物含有率: 乾物当り 76.7%)。湿潤土壌100gを1/2,000aワグネルポットに入れ、粉砕稲わらを乾土に対して0.1%, 1%の割合で混入し、土壌中で均一となるように十分攪拌した。1処理区3連とした。培養期間中は湛水状態を維持した。3処理区 (対照区, 稲わら0.1%および1%添加区) の還元層の土壌をガラス管を用いて定期的に採取した。

嫌気性窒素固定細菌の計数は第3章と同様に嫌氣的ロールチューブ法により行ったが、ここでは土壌希釈液を加熱処理した点が異なる。各処理区3連のポットより採取した土壌をプラスチック袋に入れ十分混合した。この土壌10gを嫌氣的希釈液 (塩化ナトリウム2.25g, 塩化カリウム0.105g, 塩化カルシウム0.06g, 重炭酸ナトリウム0.05g, チオグリコール酸ナトリウム1.0g, 0.1%レサズリン1ml, 蒸留水1,000ml) 90mlの入ったボトルに入れて攪拌し、酸素フリーの窒素ガス下で土壌懸濁液を希釈した。耐熱性 (孢子形成性) 細菌を計数するため、土壌希釈液を80℃10分間加熱した。加熱後直ちに冷却した希釈液1mlを改変した無窒素Clostridium培地 (リン酸二カリウム1.0g, 硫酸マグネシウム0.2g, 塩化ナトリウム0.01g, 硫酸マンガン0.002g, モリブデン酸ナトリウム0.002g, 硫酸第一鉄0.05g, グルコース20g, チオグリコール酸ナトリウム0.5g, 0.1%レサズリン1ml, 寒天15g, 蒸留水1,000ml) 7mlへ窒素ガス下で接種し、ロール

チューブを作成した。30℃暗所で2週間培養後，形成されたコロニーを計数した。

2) 部分分解稲わらあるいはセルロースを添加した水田土壤中でのHANB数および従属栄養細菌数の変動

粉碎した稲わら（含水率：9.3%，有機物含有率：乾物当り84.2%）750 gに1,500mlの水を加えプラスチックトレー中で34日間培養した。培養期間中定期的に水を与えて水分を維持した。こうして得られた分解途中の稲わら（含水率：65.4%，有機物含有率：乾物当り70.0%）を70℃で乾燥させ，再度粉碎して，部分分解稲わらとして実験に供試した。稲わら中の約20%の有機物がこの培養期間中に分解した。

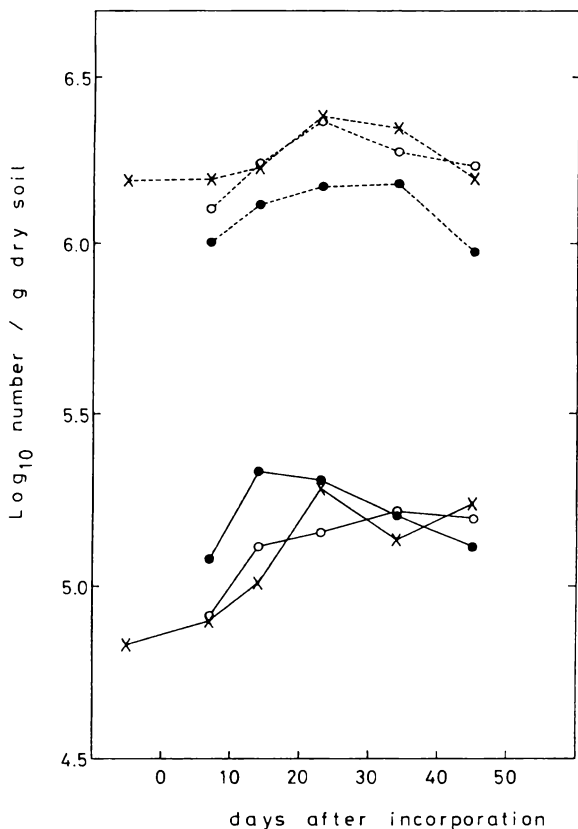


Fig.4-1. Fluctuations in the number of anaerobic bacteria grown on nitrogen-free medium. ×, control soil; ○, soil with straw addition at 0.1%; ●, soil with straw addition at 1%. —, number of large and medium-size colonies; ·····, number of total colonies grown on the medium. Diluted soil suspension was heated at 80℃ for 10min before inoculation to the medium.

Maahas土壌（含水率：57.4%，密度：1.37 g/cc）10g をポットに入れ，部分分解稲わらと粉末セルロース（Microgranular CC31 cellulose powder, Whatman Chemicals Separation Ltd.）を乾土当り 0.1%および1%添加し，均一となるように十分攪拌し，湛水状態で培養した。土壌採取，土壌希釈，並びに，ロールチューブ作成の手順は 1) の稲わら添加実験と同様であるが，本実験では土壌希釈液の加熱処理は60℃30分間とした。また，嫌気性従属栄養細菌を計数するため，嫌氣的ロールチューブ法により，加熱処理をしていない希釈液を改変V L培地（ペプトン5 g，酵母エキス5 g，肉エキス2 g，塩化ナトリウム5 g，L-システイン塩酸塩0.30 g，0.1%レサズリン1 ml，寒天15 g，蒸留水1,000 ml）に接種し，生育するコロニーを計数した。

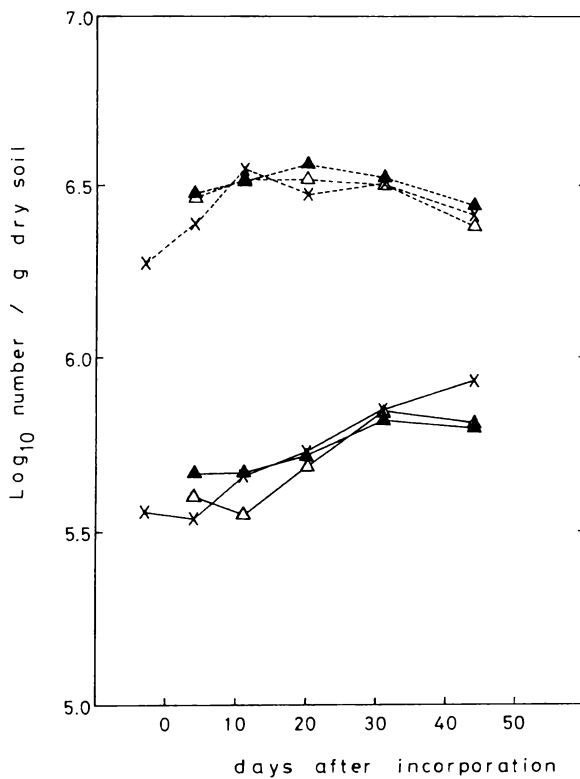


Fig.4-2. Fluctuations in the number of anaerobic bacteria grown on nitrogen-free medium. ×, control soil; △, soil with partially decomposed straw at 0.1%; ▲, soil with partially decomposed straw at 1%. —, number of large and medium-size colonies; ·····, number of total colonies grown on the medium. Diluted soil suspension was heated at 60°C for 30min before inoculation.

3) ロールチューブ培養からの単離菌のアセチレン還元活性測定および顕微鏡観察

無窒素培地上に生育したコロニーを斜面培地へ単離し、Pankhurst tube法 (Campbell and Evans, 1969) により単離菌のアセチレン還元活性 (ARA) 測定を行った。液体培地 (前述した無窒素Clostridium培地から寒天を抜いた培地) 6 ml に単離菌懸濁液 0.5 ml を接種し、30℃暗所で培養した。4日または5日間培養後ARAを測定した。液体培養した単離菌を顕微鏡観察した。

3. 結果

1) 稲わら添加した水田土壤中でのHANB数の変動

無窒素培地上に生育したコロニーを以下の二つの方法により計数した。a) 全てのコロ

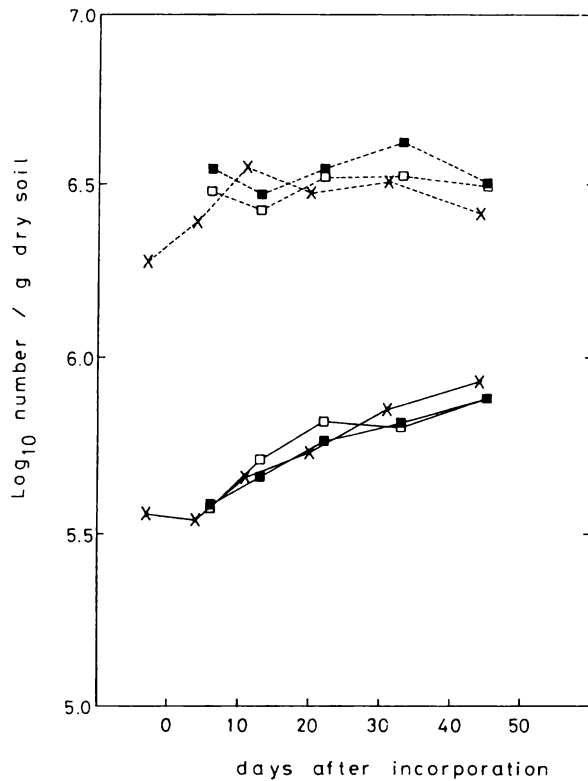


Fig.4-3. Fluctuations in the number of anaerobic bacteria grown on nitrogen-free medium. ×, control soil; □, soil with cellulose at 0.1%; ■, soil with cellulose at 1%. —, number of large and medium-size colonies; ·····, number of total colonies grown on the medium. Diluted soil suspension was heated at 60°C for 30min before inoculation.

ニーの計数（極小コロニーを含む）， b) 大型および中型のコロニーの計数。Fig. 4-1に無窒素培地上に生育した嫌気性細菌数の変動を示す。稲わら1%添加区において，混入後20日間にわたり大型および中型のコロニー（large and medium-size colonies, 以下LMCと略す）数は対照区に比べて増加した。両処理区間の差は，混入後14日目において，約2倍であった。培養30日を過ぎるとこの傾向は消失した。他方，無窒素培地上の全コロニー数（極小コロニーを含む）は稲わら1%添加により対照区に比べてわずかに減少した。この傾向は混入後40日間にわたり見られた。

2) 部分分解稲わらあるいはセルロースを添加した水田土壌中でのHANB数および従属栄養細菌数の変動

無窒素培地上に生育した嫌気性細菌数の変動をFig. 4-2およびFig. 4-3に示す。部分分解稲わらとセルロースの1%添加区におけるLMC数は対照区とほぼ同様の変動を示した。

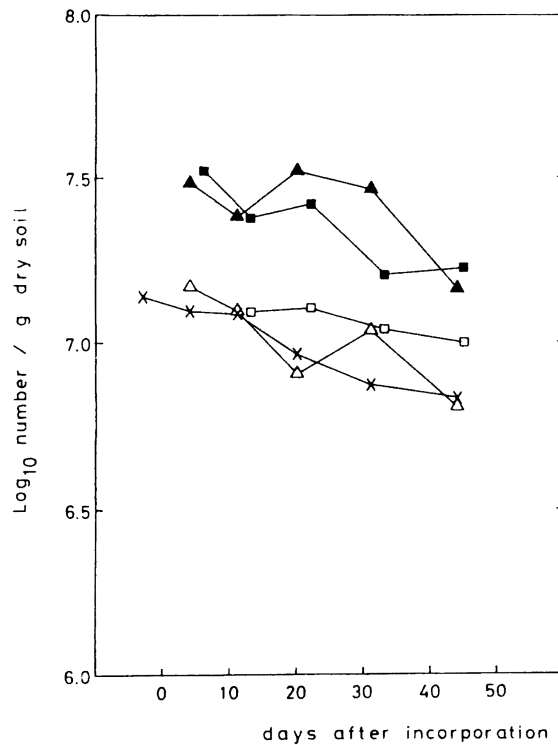


Fig. 4-4. Fluctuations in populations of heterotrophic anaerobic bacteria. ×, control soil; Δ and ▲, soil with partially decomposed straw at 0.1% and 1%, respectively; □ and ■, soil with cellulose at 0.1% and 1%, respectively. Diluted soil suspension was not heated.

また、全コロニー数についても、有機物添加した4処理区と対照区との間に混入後45日間にわたり差はないようであった。嫌気性従属栄養細菌数の変動をFig.4-4に示す。部分分解稲わらあるいはセルロースの1%添加により、嫌気性従属栄養細菌数は混入後20日間にわたり対照区に比べて約3倍に増加し、混入後45日目においても菌数は2倍以上であった。セルロース0.1%処理によっても従属栄養細菌数は対照区よりも多くなった。

土壌 pH の変動（携帯用ガラス電極 pH メーター、HM-1K TOA Electronics Ltd. により測定した）を Fig. 4-5 に示す。稲わら、部分分解稲わら、セルロースの混入により土壌 pH は低下した。pH の最低値はセルロース 1% 添加区における 6.1 であったが、混入後 20 日目を過ぎるとこの値は徐々に上昇した。

3) ロールチューブ培養からの単離菌の A R A 測定および顕微鏡観察

単離菌 15 株について A R A 測定を行った。9 株に窒素固定活性があった。活性の高い株は 238 n mole エチレン / 1 ml 液体培養液 · 12 時間、低いものは 4 n mole / 1 ml · 12 時間であった。無窒素培地上の大型のコロニーからの単離菌の大半は窒素固定活性があったが、

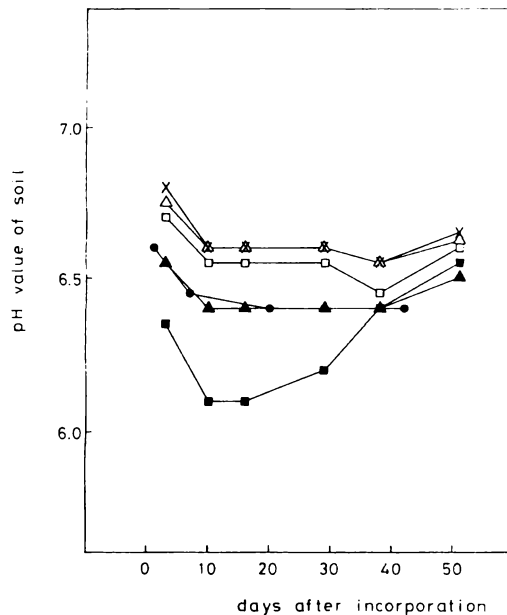


Fig. 4-5. Fluctuations in pH value of soil. ×, control soil; ●, soil with straw at 1%; △ and ▲, soil with partially decomposed straw at 0.1% and 1%, respectively; □ and ■, soil with cellulose at 0.1% and 1%, respectively.

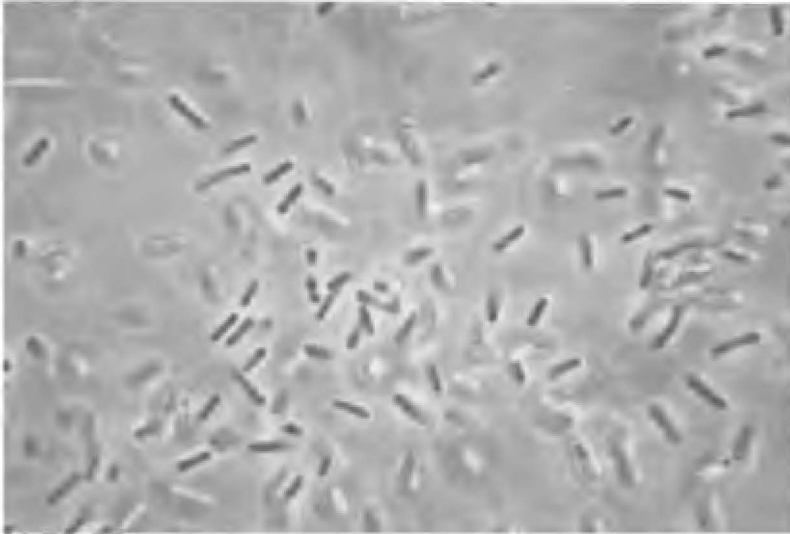


Plate 4-1. One isolate from large colonies grown on nitrogen-free medium ($\times 1,000$).
A R A of the isolate was 132 n mole ethylene/1 ml culture solution · 12h.

小型のコロニーについては今回の測定方法では活性は確認できなかった。顕微鏡観察により、窒素固定活性のあった9株はすべて桿菌であり、Clostridiumの形態をもつ株が見られた (Plate 4-1)。

4. 考 察

本実験で用いた改変無窒素Clostridium培地上には多種類のコロニーがあらわれた。いくつかの単離菌のA R A測定結果および顕微鏡観察により、この無窒素培地上で良好に生育した嫌気性細菌は窒素固定性であり、主に細胞内に孢子を持つ窒素固定性Clostridiumのようであった。ところで、土壤微生物実験法の窒素固定性Clostridiumの計数の項 (土壤微生物研究会編, 1975) において、窒素固定性Clostridiumの培養液 (ショ糖10g, 4%硫酸ナトリウム水溶液10ml, リン酸二カリウム1g, クエン酸鉄 7.0%水溶液10ml, 硫酸マグネシウム 0.2g, 炭酸カルシウム1g, 塩化ナトリウム 0.2g, モリブデン酸ナトリウム 0.005g, 蒸留水 1,000ml) で嫌気培養し、できたコロニーのうち培養日数の経過と共に大きくなるものを計数するとかなり正確な計数値となる、と記載されている。この培養液と本実験で用いた無窒素培地の組成を比較すると、水溶性糖類を炭素源としたほぼ同様の培地とみなすことができる。このことから、今回用いた無窒素培地上にL M C

を形成する耐熱性嫌気性細菌を窒素固定性Clostridiumと判断することは妥当であろうと推察した。他方、無窒素培地上の極小コロニーについては窒素固定性が否かについて確認できなかった。測定方法を改変することにより窒素固定活性を示す可能性があり、これら極小コロニーの単離・同定・窒素固定活性測定についてはなお検討課題として残されている。

本実験では、土壌希釈液を80℃10分間または60℃30分間加熱処理することで孢子形成性細菌を選択的に計数しようとした。得られたHANBの計数値は60℃30分間処理の方が80℃10分間処理よりも大きくなったため、孢子形成性細菌を計数するには80℃10分間処理の方が好ましいようであった。また、無窒素培地上の全コロニー数については、第3章における実験室レベルの試験ではセルロース1%添加により対照区の約30倍に増えたが、ここでのポット試験ではセルロース添加による増加は見られなかった。この結果の相違および稲わら1%添加により全コロニー数が対照区に比べて減少したことについては、本実験での80℃または60℃加熱処理が影響している可能性がある。稲わらまたはセルロースを添加した土壌中の嫌気性細菌相において、熱感受性の細胞あるいは非孢子形成性嫌気性細菌の占める割合は相当高いかもしれないからである。

HANB数の変動の結果の内、窒素固定性Clostridiumの菌数変動を反映していると考えられる無窒素培地上にLMCを形成する細菌数の変動について考察を進める。稲わら1%処理により、混入後20日間にわたりLMC数が対照区に比べわずかに増加し、これが窒素固定性Clostridium菌数の増加であろうと判断した。嫌氣的土壌へのグルコース添加は無窒素培地上のLMC数を著しく増加させることから(Adachi *et al.*, 1989)、稲わら1%添加によるLMC数のわずかな増加は稲わら中に少量含まれる水溶性糖類により引き起こされたのでであろうと推察した。一方、部分分解稲わらあるいはセルロースを1%添加した土壌においては、嫌気性従属栄養細菌数は対照区と比べて約3倍に増加したが、無窒素培地上のLMC数の変動は対照区とほぼ同じであった。このときの嫌気性従属栄養細菌数の増加は添加有機物の分解・資化に関与した微生物の増殖を意味するが、増殖した微生物は窒素固定性Clostridiumではないことが示唆された。言い換えれば、水田土壌還元層へ均一混入されたセルロースあるいは稲わらの分解・資化における窒素固定性Clostridiumの寄与は小さいであろうという可能性が示唆された。しかしながら、例えば水田土壌中に施用された稲わらの表面あるいは土壌中の極端に多量の稲わらが存在する部位等において、局所的に水溶性糖類の供給が確保されている条件では窒素固定性

Clostridiumは増殖し、嫌気性細菌相のかなりの部分を占めるであろうと考えられる。

第3章において、嫌气的条件下のセルロースまたは稲わら分解における嫌気性セルロース分解細菌と嫌気性窒素固定細菌の共同によるBNFの存在が示唆された。稲わら施用により励起されるBNFにおいて、水田土壌還元層では嫌気性窒素固定細菌の主役は窒素固定性Clostridium以外の細菌のようである。Fig. 4-5に示したようにセルロースあるいは稲わらを還元層へ混入すると土壌 pH は低下する。これは分解産物として有機酸が生成しているためと考えられる。おそらく、嫌气的土壌における有機酸の生成・資化が鍵となって、第3章で示唆した嫌気性セルロース分解細菌と嫌気性窒素固定細菌の共同において前者は有機酸を生成し、後者は資化しているのではなかろうかと予想される。

5. 要 約

ポット試験により稲わら、部分分解稲わら、セルロースを乾土に対して 0.1%および 1%の割合で水田土壌還元層に均一に混入した。耐熱性嫌気性窒素固定細菌 (HANB) 数の変動を、改変無窒素Clostridium培地を用いた嫌气的ロールチューブ法により調べた。土壌希釈液は培地に接種する前に80℃10分間または60℃30分間加熱処理した。稲わら1%添加土壌において、混入後20日間にわたり無窒素培地上で良好に生育したコロニー数が対照区に比べてわずかに増加した。この良好に生育したコロニーは、いくつかの単離菌のアセチレン還元活性測定および顕微鏡観察、Clostridiumの培地であること、並びに、土壌希釈液を加熱処理したことから判断して、主に窒素固定性Clostridiumのようであった。その他の処理土壌においては、HANB数は対照区とほぼ同じであった。他方、部分分解稲わらあるいはセルロースを1%添加した土壌中の嫌気性従属栄養細菌数は対照区と比べて約3倍に増加した。この嫌気性従属栄養細菌数の増加は窒素固定性Clostridium菌数の増加によるものではない。以上の結果より、水田土壌還元層へ混入されたセルロースあるいは稲わらの分解・資化における窒素固定性Clostridiumの寄与は小さいであろうという可能性が示唆された。

総 合 考 察

土壌への有機物施用は、養分の供給と共に、土壌の物理性・化学性の向上、土壌微生物相の改善等の目的で行われるが、施用された有機物は微生物により分解されるため土壌微生物相の変動を伴う。効率的にしかも長期的に作物生産を維持・向上させるためには、有機物施用に伴う微生物相の変動が植物生育に良い影響をもたらすように検討していかなければならない。

さて、本論文では畑土壌における微生物起因の土壌病害と水田土壌における生物窒素固定（BNF）を取り上げた。前者では、第1章において、畑土壌へ有機物としてカニ殻の主成分のキチンと、バーク堆肥等に含まれるリグニンを施用した。これは、特徴的な微生物相の変動を引き起こす有機物であるためであり、Fusarium病害に対するリグニン添加効果、キチン添加効果および両方を添加したときの効果を明らかにすることにより、土壌病害に対する有機物施用効果を評価・判定する一般的理論を引き出せないかと考えたためである。また、第2章において、畑土壌への作物残渣という有機物のすき込みが土壌病害を助長する事実に、キュウリつる割病病原菌 *Fusarium oxysporum* の産生する植物毒素フザリン酸（FA）がどの程度関係しているかについて検討した。

次に、後者では、水田土壌への稲の作物残渣である稲わらの施用がBNFに及ぼす影響に関する研究を行った。第3章では、実験室レベルの完全嫌氣的条件下における稲わら添加に伴うBNFの詳細を明らかにし、稲わら中のセルロースあるいはヘミセルロース画分のBNFへの寄与が大きいことを明らかにした。第4章では、ポット試験のレベルで、稲わらを添加した水田土壌還元層における孢子形成性嫌氣性窒素固定細菌数の変動を調べることにより、稲わら施用に伴うBNFにおける窒素固定性Clostridiumの寄与を評価しようと試みた。

以上のように、本論文は畑土壌における *Fusarium oxysporum* が引き起こすキュウリつる割病に関する二章と、水田土壌における稲わら施用に伴うBNFに関する二章の大きな二つの部分から構成されている。ここで、各章で得られた知見の内最も重要な部分を簡潔にまとめてみたい。

〔畑土壌に関して〕

(1-1) 畑土壌におけるFusarium病害へのリグニンとキチンの添加効果を調べるため、3年間の長期にわたる微生物相の変動を追跡した。その結果キチンはFusarium病害の生物的

防除に有効であるが、リグニンの添加はキチンの効果を抑制することが明らかになった。リグニンについては、難分解性であり土壤中に残存しやすいことから、その施用により土壤微生物相を悪化させ、植物生育に悪い影響を及ぼすおそれがあると推察された。人工接種により大過剰となった土壤中の *F. o. c.* 菌数は連作土壌では $10^3 \sim 2 \times 10^4$ のレベルへと収束した。

(1-2) 畑土壌へリグニン添加、キチン添加および *F. o. c.* 接種した実験が三元配置の実験となっていることを利用して、繰返しのない実験の統計解析を行った。キチン添加により放線菌数が著しく増加し、糸状菌数も増加したこと、リグニン添加がキチンによる糸状菌数を増加させる効果を抑制したこと、リグニン添加の糸状菌の増殖を抑える効果が長期にわたって見られたことが統計学的に示された。

(1-3) 宿主キュウリの生育に及ぼすリグニン添加、キチン添加、*F. o. c.* 接種の効果については、リグニン添加によりキュウリの地上部乾物重が減少する傾向があった。また、植物切片プレート法により、栽培期間中に萎凋症状のあらわれなかった株において、接種菌 *F. o. c.* による感染株が存在することが確認された。有機物施用による *Fusarium* 病害の軽減・防除を、植物生育に及ぼす効果を指標にして評価・判定しようとする場合には、*Fusarium* により感染されているが萎凋症状はあらわれていない株が存在することに注意を払いつつ、生育量、萎凋株数および感染株数等から総合的に判断することが必要であると推察された。

(2) 砂耕栽培したキュウリへの F A 添加試験を行ったが、キュウリつる割病病徴の発現を培地中（土壌中あるいは砂中）の F A により説明することは困難であった。しかし、intact および semi-intact plant を用いた F A 浸漬試験では、semi-intact plant にキュウリつる割病病徴に類似の症状が見られたことから、キュウリつる割病病徴の一つである萎凋症状の発現において、植物体内で病原菌 *F. o. c.* が F A を産生する場合、F A が役割を持つ可能性のあることが示唆された。

[水田土壌に関して]

(3) 水田土壌還元層への稲わらの施用が B N F に及ぼす影響について検討し、実験室レベルで完全嫌氣的条件下の稲わら添加による A R A の変動の詳細を、グルコースあるいはセルロース添加による A R A の変動と比較することにより明らかにした。土壌中の塩酸分解性窒素量の増大を確認することにより、A R A の結果の裏付けを行った。また、嫌氣的条件下の稲わら添加による B N F を担う微生物については、これまでに注目され

てきた水溶性糖類を資化する窒素固定性Clostridiumよりも、セルロースあるいはヘミセルロースを分解・資化する嫌気性セルロース分解細菌と嫌気性窒素固定細菌の共同であることが示唆された。

(4) ポット試験レベルで、稲わらを水田土壌還元層へ1%添加したとき、主に窒素固定性Clostridiumと判断される無窒素培地で良好に生育した耐熱性嫌気性細菌数のわずかな増加が見られた。しかし、部分分解稲わらとセルロースを1%添加した土壌では、耐熱性嫌気性窒素固定細菌数は対照区とほぼ同じであり、嫌気性従属栄養細菌数は対照区と比べて約3倍に増加した。この嫌気性従属栄養細菌数の増加は窒素固定性Clostridium菌数の増加によるものではない。以上の結果より、水田土壌還元層へ施用されたセルロースあるいは稲わらの分解・資化における窒素固定性Clostridiumの寄与は小さいであろうという可能性が示唆された。

ここで、畑土壌に関して得られた知見により、Fusarium病害をどのようにして防除すべきであるのかについて考察してみたい。有機物施用によりFusarium病害を防除しようとする試みの中には、次の二つのアプローチが含まれていると考える。一つは、Fusariumに対して拮抗的あるいは競合的に働く微生物を増殖させることによりFusarium菌数を減少させようとするアプローチであり、この典型的なものが、カニ殻などキチンを含む有機物の添加により放線菌数を増加させる方法である。放線菌数の増加に伴い、土壌中のキチナーゼ活性が高まり、キチン質でできているFusariumの細胞壁を溶かしてしまうといわれている。他方、もう一つのアプローチは、Fusariumの土壌中での活動を抑えることによりFusarium病害を防除しようとする試みであり、例えば、コーヒーカすやバーク堆肥等の施用によるリグニン関連物質の静菌作用あるいは糸状菌毒性を利用しようとするアプローチである。この二つのアプローチとの関連で今回の実験結果を見てみると、1) キチン添加により、放線菌数は増加し、糸状菌では主にPenicillium属の糸状菌が増殖し、接種菌*F. o. c.*の菌数が急激に減少した。2) リグニン添加により、総数としての糸状菌の増殖は抑えられたが、接種菌*F. o. c.*の生存は助長された。3) リグニンとキチンの両方を添加すると、放線菌数の増加は見られたが、総数としての糸状菌の増殖は抑えられ、*F. o. c.*菌数の急激な減少はなく、キチンの効果は抑制された。従って、これまでキチンの効果は放線菌の働きによると言われてきたが、キチン添加により増殖する糸状菌にも*F. o. c.*菌数を減少させる作用の一端があると推察された。すなわち、糸状菌どうしの競合作用である。

このように、Fusarium病害に対するリグニンとキチンの添加効果を明らかにすることにより、連作に伴って多発してきた微生物起因の土壤病害を生物的に防除する一つの方針が示されたと考える。すなわち、有機物施用による土壤病害の生物的防除において目指すべき微生物生態系について、次のように考える。まず、1) 静菌作用により病原性糸状菌の活動を抑制するやり方では、非病原性の微生物にも影響が及んでしまい、微生物生態系を悪化させるおそれがあると言える。従って、2) 病原性糸状菌に対して拮抗作用をもつ放線菌を増殖させるばかりでなく、非病原性糸状菌をも増殖させ、そこに糸状菌どうしの競合作用を生じさせる。つまり、拮抗作用をもつ微生物を含めて、微生物生態系を全体として増殖させ、活性化させることにより、連作により菌数を増してきた病原性糸状菌を再び系外へ押し出してしまふ。あるいは、病原性糸状菌がその生態系へ容易に入り込めなくする。そのような、ここであえて抽象的な形容詞を使わせてもらうならば「豊かな」微生物生態系を目指すべきであると考え。そして、2) のような生態系を作り上げ、かつ、維持していくような有機物施用により、微生物起因の土壤病害は十分に防除できると考え。

ここで、土壤中の病原性糸状菌Fusariumと細菌群とのかかわりあいについては、土壤中では当然何らかの作用を相互に及ぼしあっているであろう。しかし、本研究で得られた知見から、接種菌*F. d. d.*と土着の土壤微生物群との相互作用およびその結果としての接種菌数の変動・消長において、細菌群との相互作用よりも放線菌群および非病原性糸状菌群との拮抗作用・競合作用の方がより明確な形であられたことと、この放線菌群および非病原性糸状菌群の作用の方がより大きな影響を及ぼしているであろうという著者の見解から、病原性糸状菌Fusariumと細菌群とのかかわりあいについては、本論文では、細菌数の変動の結果を示すにとどめていることを申し添えなければならない。

今後、畑土壌における有機物施用については、土壤微生物生態系における病原性糸状菌の生態、そしてときには生理面にも目を向けつつ、有機物施用に伴う微生物相の変動を追跡する手法により、効率的にしかも長期的に作物生産を維持・向上させるような有機物施用を検討していきたい。

次に、水田土壌に関して得られた知見から、嫌氣的条件下の水田土壌における稲わら施用に伴うBNFに関する研究の今後の展望について述べたい。従来より、湛水状態の水田土壌におけるBNFについて多くの研究がなされてきた。最近では、持続性のある農業

(sustainable agriculture) という観点から水田土壌が注目されている。水田土壌は長年にわたり肥沃度を維持しており、この肥沃度維持にBNFが寄与していると言える。さて、湛水土壌への稲わら施用が窒素固定性微生物に及ぼす影響に関する研究において、Rice and Paul (1972) の報告以来、嫌氣的条件下のBNFにおける窒素固定性Clostridiumの存在がクローズアップされてきた。水田土壌還元層に着目し、嫌氣的条件・暗所で稲わらを水田土壌へ添加したとき、はたして励起されるBNFの主役は窒素固定性Clostridiumであろうか。第3章・第4章では、この点に関し、窒素固定性Clostridiumの寄与は小さいであろうことが示唆され、嫌氣的条件下の稲わら添加に伴うBNFを担う微生物は、稲わらに多量に含まれるセルロースあるいはヘミセルロースを分解・資化する嫌氣性セルロース分解細菌と嫌氣性窒素固定細菌の共同であることが示唆された。今後、この共同によるBNFについて活発に研究すべきであると考え。前述したように、窒素固定性Clostridium以外の嫌氣性窒素固定細菌には、硫酸還元菌の一部、光合成細菌等がいる（両者共、有機酸を利用して生育できる）。硫酸還元菌については、湛水土壌中の窒素固定全体に対するその寄与は小さいという報告があり（Durbin and Watanabe, 1979）、著者もネガティブな結果を得ている。光合成細菌については、稲わらの表面施用による著しい増殖が確認されているが（Ladha *et al.*, 1987）、嫌氣的条件・暗所で稲わら添加した場合には光のエネルギーの供給がないため、活発な活動を期待しにくい。一つの可能性として窒素固定性メタン生成菌の存在がある。メタン生成菌は、炭酸ガスの還元反応または酢酸のメチル転移反応を経てメタンを生成する。セルロースの嫌氣的分解とメタン生成菌との関連が示されているため（Barker, 1956）、今後、水田土壌におけるメタン生成菌による窒素固定の寄与についても検討する必要がある。

以上のように、嫌氣的条件下の稲わら添加に伴うBNFについては、現象面においてなお解明すべき点があると言える。水田土壌還元層における稲わら施用によるBNFを明かにすることは、水田土壌におけるBNFの全体像を明かにする大切な一助となるであろう。さらに、この現象を明らかにすることは、稲わらの持つBNFを高める潜在能力を有効に引き出す技術開発への可能性を秘めており、作物生産に貢献する道へとつながるであろう。例えば、窒素固定効率を高める稲わらの嫌氣的堆積処理を考案する等、稲わらという有機物を有効利用する応用面へとつながるであろう。

謝 辞

本研究は京都大学農学部農芸化学科植物栄養学研究室教授高橋英一博士の御懇切な御指導のもとに行われたものであり、ここに衷心より感謝の意を表します。また、本研究を進めるにあたり適切な御指導と御協力をいただいた同研究室助教授小林達治博士に深く感謝の意を表します。

本研究の一部は国際稲研究所（IRRI）においてなされたものであり、同研究所土壤微生物研究室部長渡辺巖博士には多くの御助言と御指導をいただきました。記して深く感謝いたします。

実験の遂行にあたっては、植物栄養学研究室の皆様方にたいへんお世話になり、とりわけ、田知本正夫氏、木村紫晃氏には多くの御助言をいただきました。皆様方に深く感謝いたします。また、生物窒素固定に関する実験手法を教えていただいたIRRI土壤微生物研究室の皆様方に深く感謝いたします。

島根大学RIセンターにおきましては、研究および論文著述の継続にあたり御助言と御協力をいただきましたトレーサー実験施設放射線取扱元主任者落合英夫博士、現主任者柴田均博士、並びに、本研究の一部の遂行にあたり御協力と御助言をいただいた島根大学農学部生物資源科学科教授森忠洋博士、同助教授若月利之博士、生物生産科学科助教授山本広基博士、同助手長縄貴彦博士に深く感謝いたします。また、Clostridiumの同定に御協力いただいた生物生産科学科学生前沢正浩君に感謝いたします。

引用文献

- Adachi, K., Kobayashi, M. and Takahashi, E. 1987: Effect of the application of lignin and/or chitin to soil inoculated with *Fusarium oxysporum* on the variation of soil microflora and plant growth. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **33**, 245-259.
- Adachi, K., Watanabe, I., Kobayashi, M. and Takahashi, E. 1989: Effect of the application of glucose, cellulose and rice straw on nitrogen fixation (acetylene reduction and soil-nitrogen components) in anaerobic soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **35**, 235-243.
- 安達克樹 1990: 稲わらを添加した水田土壌還元層における胞子形成性嫌気性窒素固定細菌数の変動. *土と微生物*, **36**, 21-27.
- 安達克樹・小林達治・高橋英一 1990: *Fusarium oxysporum* 接種, リグニン添加, キチン添加が土壌中の糸状菌数および放線菌数に及ぼす効果の統計解析について. キチン添加の効果が対象とする土壌により変化することの一つの簡単なモデル. *土肥誌*, **61**, (印刷中).
- 安達克樹・小林達治・高橋英一 1991: キュウリの intact および semi-intact plant を用いたフザリン酸起因の萎凋症状の発現. *土肥誌*, **62**, (印刷中).
- Adams, P. B., Lewis, J. A. and Papavizas, G. C. 1968: Survival of root-infecting fungi in soil. IX. Mechanism of control of *Fusarium* root rot of bean with spent coffee grounds. *Phytopathology*, **58**, 1603-1608.
- Arias, J. A. 1985: Secretory organelle and mitochondrial alterations induced by fusaric acid in root cells of *Zea mays*. *Physiological Plant Pathology*, **27**, 149-158.
- Barker, H. A. 1956: Biological formation of methane. *Ind. Eng. Chem.*, **48**, 1438-1442.
- Barna, B., Sarhan, A. R. T. and Király, Z. 1983: The influence of nitrogen nutrition on the sensitivity of tomato plants to culture filtrates of *Fusarium* and to fusaric acid. *Physiological Plant Pathology*, **23**, 257-263.
- Barna, B., Sarhan, A. R. T. and Király, Z. 1985: The effects of age of tomato and maize leaves on resistance to a non-specific and host specific toxin.

Physiological Plant Pathology, 27, 159-165.

- Beckers, C. J. M., Keller, D. S. and Balch, W. E. 1987: Semi-intact cells permeable to macromolecules: Use in reconstruction of protein transport from the endoplasmic reticulum to the golgi complex. *Cell*, 50, 523-534.
- Buxton, E. W., Khalifa, O. and Ward, V. 1965: Effect of soil amendment with chitin on pea wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. *pisii*. *Ann. Appl. Biol.*, 55, 83-88.
- Campbell, N. E. R. and Evans, H. J. 1969: Use of Pankhurst tubes to assay acetylene reduction by facultative and anaerobic nitrogen fixing bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 15, 1342-1343.
- Chakrabarti, D. K. and Chaudhary, C. B. 1980: Correlation between virulence and fusaric acid production in *Fusarium oxysporum* f. sp. *carthami*. *Phytopath. Z.*, 90, 43-46.
- D'alton, A. and Etherton, B. 1984: Effects of fusaric acid on tomato root hair membrane potentials and ATP levels. *Plant Physiol.*, 74, 39-42.
- Davis, D. 1969: Fusaric acid in selective pathogenicity of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 59, 1391-1395.
- 土壤微生物研究会編 1975: 土壤微生物実験法, p. 205, 養賢堂, 東京.
- Durbin, K. J. and Watanabe, I. 1979: Sulfate-reducing bacteria and nitrogen fixation in flooded rice soil. *Soil Biol. Biochem.*, 12, 11-14.
- Gäumann, E. 1957: Fusaric acid as a wilt toxin. *Phytopathology*, 47, 342-357.
- Gomez, K. A. and Gomez, A. A. 1984: Statistical Procedures for Agricultural Research, 2nd, ed. , A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, Inc. , New York, 680 pp.
- Harper, S. H. T. and Lynch, J. M. 1984: Nitrogen fixation by cellulolytic communities at aerobic-anaerobic interfaces in straw. *J. Appl. Bacteriol.*, 57, 131-137.
- Heitefuss, R., Stahmann, M. A. and Walker, J. C. 1960: Production of pectolytic enzymes and fusaric acid by *Fusarium oxysporum* f. *conglutinans* in relation to cabbage yellows. *Phytopathology*, 50, 367-370.

- Hungate, R. E. 1969: A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. /n *Methods in Microbiology*, Vol. 3B, Ed. J. R. Norris and D. W. Ribbons, p. 117-132, Academic Press, London.
- 石川馨・藤森利美・久米均 1967: 第5章 多元配置法. 第2項 三元配置法(繰返しなし). 化学者および化学技術者のための実験計画法(上), p. 143-148, 東京化学同人, 東京.
- Ito, O. and Watanabe, I. 1981: Immobilization, mineralization and availability to rice plants of nitrogen derived from heterotrophic nitrogen fixation in flooded soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 27, 169-176.
- 香川尚徳 1981: 第1章第1項 土壌試料の採取と調製. 土壌微生物実験法, 土壌微生物研究会編, p. 1-7, 養賢堂, 東京.
- 駒田日・竹内昭士郎・井上義孝 1965: ダイコン萎黄病の生態学的研究. I. 土壌中における病原菌と他の微生物との関係, およびキチン添加による生物的防除. 土と微生物, 7, 41-48.
- Komada, H. 1976: Studies on the evaluation of activity of *Fusarium oxysporum*, Fusarium wilt pathogen of vegetable crops, in the soil. *Bull. Tokai-Kinki Natl. Agric. Exp. Stn.*, 29, 132-269.
- Kuo, M. S. and Scheffer, R. P. 1964: Evaluation of fusaric acid as a factor in development of fusarium wilt. *Phytopathology*, 54, 1041-1044.
- Ladha, J. K., Tirol-Padre, A., Daroy, M. L. G., Punzalan, G. and Watanabe, I. 1987: The effects on nitrogen fixation (acetylene reduction), bacterial population and rice plant growth of two modes of straw application to a wetland rice field. *Biol. Fert. Soils*, 5, 106-111.
- Lingappa, B. I. and Lockwood, J. L. 1962: Fungitoxicity of lignin monomers, model substances, and decomposition products. *Phytopathology*, 52, 295-299.
- Lumsden, R. D., Ayers, W. A., Adams, P. B., Dow, R. L., Lewis, J. A., Papavizas, G. C. and Kantzes, J. G. 1976: Ecology and epidemiology of *Pythium* species in field soil. *Phytopathology*, 66, 1203-1209.
- Magnegneau, B. and Branchard, M. 1988: Toxicity of fusaric acid observed on callus cultures of various *Cucumis melo* genotypes. *Plant Physiol. Biochem.*

(*PARIS*), 26, 585-588.

- Matsuguchi, T. 1979: Factors affecting heterotrophic nitrogen fixation in submerged rice soils. *In* Nitrogen and Rice, p. 207-222, International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines.
- 松尾卓見・遠藤敏夫・吉井幸子 1976: 日本産 *Fusarium moniliforme* Sheldon 菌株の性状. 日菌報, 17, 295-305.
- Maurer, C.L. and Baker, R. 1964: Ecology of plant pathogens in soil. I. Influence of chitin and lignin amendments on development of bean root rot. *Phytopathology*, 54, 1425-1426.
- Mitchell, R. and Alexander, M. 1962: Microbiological processes associated with the use of chitin for biological control. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 26, 556-558.
- Mitchell, R. 1963: Addition of fungal cell-wall components to soil for biological disease control. *Phytopathology*, 53, 1068-1071.
- 西村正暘 1957: 西瓜蔓割病の病理化学的研究, 第5報. 蔓割病菌の代謝生産物に就いて (其の1). 日植病報, 22, 215-219.
- 西村正暘 1958: 西瓜蔓割病の病理化学的研究 (第11報). *Fusarium*属菌のフザリン酸産生について (続報). 日植病報, 23, 210-214.
- 西村正暘 1962: ジベレリン酸, フザリン酸濃度勾配の変化がイネ苗の生育におよぼす影響. 日植病報, 27, 152-154.
- 西村正暘・高柴順紀・広江勇 1967: 植物病原菌の毒素としてのフザリン酸の評価をめぐって. 植物防疫, 21, 364-368.
- 西村正暘 1980: 第7章 フザリウム病およびフザリウム病菌の病理化学. 作物のフザリウム病, 松尾卓見・駒田旦・松田明編, p. 257-274, 全国農村教育協会, 東京.
- Rice, W.A. and Paul, E.A. 1972: The organisms and biological processes involved in asymbiotic nitrogen fixation in waterlogged soil amended with straw. *Can. J. Microbiol.*, 18, 715-723.
- Rudolph, K. 1976: Non-specific toxins. *In* Physiological Plant Pathology, Ed. by Heitefuss, R. and Williams, P.H., p. 270-316, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

- Santiago-Ventura, f., Bravo, M., Daez, C., Ventura, W., Watanabe, I. and App, A. A.
1986: Effects of N-fertilizers, straw, and dry fallow on the nitrogen balance of a flooded soil planted with rice. *Plant Soil*, **93**, 405-411.
- Sanwal, B. D. 1956: Investigations on the metabolism of *Fusarium lycopersici* Sacc. with the aid of radioactive carbon. *Phytopath. Z.*, **25**, 333-384.
- 下長根鴻・尾崎克巳 1980: 第9章 フザリウムの防除対策. 第4節 生態的防除. 作物のフザリウム病, 松尾卓見・駒田旦・松田明編, p. 338-360, 全国農村教育協会, 東京.
- Stevenson, F. J. 1982: Nitrogen - Organic forms. // *Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbiological Properties, Agronomy Monograph No. 9, 2nd ed.*, p. 625-641, ASA-SSSA, Madison, Wisconsin.
- 玉利勤治郎・加治順 1952-1953: Fusarinic Acidの植物生育阻害作用の機構に関する研究(第1~5報). *農化*, **26**, 223-227, 295-298, 298-303, 345-349, 349-353, Fusarinic Acidの植物生育阻害作用の機構に関する研究(第6~8報). *農化*, **27**, 245-249, 249-252, 302-306.
- Ventura, W. and Watanabe, I. 1984: Dynamics of nitrogen availability in lowland rice soils: The role of soil below plow layer and effect of moisture regimes. *Philipp. J. Crop Sci.*, **9**, 135-142.
- Watanabe, I. 1984: Anaerobic decomposition of organic matter in flooded rice soils. // *Organic Matter and Rice*, p. 237-258, International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines.
- 渡辺恒雄 1980: 植物の土壤病害[5]. *農及園*, **55**, 101-105.
- 藪田貞治郎・神戸勝二・林武 1934: 稲の馬鹿苗病菌の生化学(第1報). 馬鹿苗病菌の新生産物Fusarinsäureに就て. *農化*, **10**, 1059-1068.
- 米山伸吾 1980: 第2部 各論 キュウリつる割病. 作物のフザリウム病, 松尾卓見・駒田旦・松田明編, p. 441, 全国農村教育協会, 東京.
- Yoneyama, T., Lee, K. K. and Yoshida, I. 1977: Decomposition of rice residues in tropical soils. IV. The effect of rice straw on nitrogen fixation by heterotrophic bacteria in some Philippines soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **23**, 287-295.