

## レタス栽培圃場における土壤微生物相の解析

星川圭一・今津道夫・井上直人

信州大学農学部食料生産科学科

### 要 約

長野県内の3地域（洗馬、野辺山、信大農学部）のレタス栽培圃場の土壌を採取し、希釈平板法により細菌数、放線菌数、糸状菌数、*Fusarium oxysporum* 数を計測した。野辺山と信大農学部の圃場では放線菌、糸状菌が洗馬の圃場と比較して多い傾向があった。また、レタスを連作した圃場と転作した圃場では全ての微生物数に差異が認められた。分離菌株の病原性試験の結果、全 *F. oxysporum* に占める *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* の割合は洗馬の圃場で16~28%、野辺山の圃場で0~6%であると推定された。これらのことから、レタスの連作は土壤微生物相に影響を与えていることが考えられた。

キーワード：希釈平板法，微生物相，レタス根腐病，*Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*，病原性試験

### 緒 言

長野県のレタス生産は昭和22年ごろから本格的な栽培が始まり、全面マルチ栽培の普及や優良品種の普及など生産技術の確立が図られ、作付面積は増加していった。平成13年のレタス作付面積は約6050ha、出荷量は約168900 tで、ともに全国第1位である。しかし、近年になって県内の露地栽培の結球レタスにおいて定植後間もない時期に萎凋症状を示し、収穫不可能となるレタス株が発生し、レタス根腐病であることが確認された<sup>1)</sup>。レタス根腐病はその後、県内他産地でも次々に発生が報告され、レタス産地における最も重要な病害の一つとなった<sup>2)</sup>。レタス栽培が始まってから現在までレタス生産現場で土壤病害が問題になった事例はなく、レタス産地では生産者や関係者の間に危機感が高まっている。このように近年になって突発的に生じ、被害の拡大が続いているレタス根腐病は典型的な連作障害であるとされているが、その発生生態については未だに明らかな点が多く残されている。そこで本研究ではレタス栽培圃場の土壤環境に注目し、それを構成する細菌、放線菌、糸状菌、*Fusarium oxysporum* などの土壤微生物相の解析を試み、さらにレタス栽培圃場における最も重要な病害として、特にレタス根腐病に注目して、病原菌の動態についても解析を行った。

### 材料および方法

#### 1. 調査地と供試土壌

長野県塩尻市洗馬の2ヶ所の圃場（以下、洗馬AおよびBとする）、長野県南佐久郡南牧村信州大学農学部付属アルプス圏フィールド科学教育研究センター（AFC）野辺山ステーション内の圃場（以下、野辺山とする）、長野県上伊那郡南箕輪村信州大学農学部構内の植物病理学研究室実験圃場（以下、信大農学部とする）を調査地とした。洗馬（標高約720m）は準高冷地の気候を生かしレタス、キャベツ、ハクサイなどの野菜生産が盛んに行われている地域である。4月中旬から10月下旬にかけて春レタスと夏秋レタスの年2作のレタス栽培が行われ、長野県内の主要レタス生産地として知られている。洗馬Aの圃場および洗馬Bの圃場は同一生産者が管理する圃場であり、場所は約100m離れて位置している。ともに2002年はレタスを栽培し、レタス根腐病の発生が確認された。2003年は洗馬Aの圃場では4月下旬から6月中旬にレタスが栽培され、8月下旬から10月下旬にはキャベツが栽培された。洗馬Bの圃場では4月中旬から6月上旬と8月下旬から10月下旬にかけてあわせて2作のレタスが栽培された。野辺山の圃場はAFC野辺山ステーション構内（標高約1350m）にあり、高冷地という環境条件に合った作物栽培が行われている。レタス根腐病の発生はこれまで認められておらず、以前にはハクサイやソバが栽培され、2003年5月にはライムギがすき込ま

表1 供試土壌

調査地	栽培作物	土壌採取日				備考
		植付け期	生育中期	収穫期	休閑期	
洗馬A	レタス	'03/4/23	'03/5/29	'03/6/18		レタス収穫後、ロータリーをかけ2作目のための畝立てをした。
	キャベツ	'03/8/25	'03/9/5	'03/10/27		
洗馬B	レタス	'03/4/23		'03/5/29		レタス収穫後、ロータリーをかけ2作目のための畝立てをした。
	レタス	'03/8/25	'03/9/5	'03/10/27		
野辺山	レタス	'03/6/15	'03/7/13	'03/8/3	'03/9/3	レタス収穫後、そのまま放置された圃場より土壌を採取した。
信大農学部	レタス	'03/5/14	'03/6/27	'03/7/22	'03/9/5	レタス収穫後、そのまま放置された圃場より土壌を採取した。

れた。野辺山の圃場では2003年6月中旬から8月上旬にかけてレタスが栽培された。信大農学部（標高約770m）の圃場は植物病理学研究室の管理する圃場で、2001年はエダマメ、2002年はシントウと毎年異なる作物が植え付けられたがレタス根腐病の発生はこれまで認められていない。信大農学部の圃場では2003年5月中旬から7月下旬にかけてレタスが栽培された。全ての圃場で、レタス栽培にはマルチ被覆が行われたが、洗馬Aの2作目であるキャベツ栽培にはマルチは用いられなかった。

2003年4月よりレタスの生育段階（植付け期、生育中期、収穫期）に合わせて各圃場でそれぞれ4～6回にわたって土壌を採取した（表1）。各圃場において、マルチ下（洗馬Aの2作目に関しては土壌表面から約1cm下）の作物株間の土壌約100gを5～8ヶ所からランダムに採取した。採取した土壌はビニール袋に入れて冷蔵庫内（約4℃）に保存し、実験に供試した。

## 2. 土壌微生物数の測定

各供試土壌中の土壌微生物数（細菌、放線菌、糸状菌、*Fusarium oxysporum*）の測定には希釈平板法<sup>3)</sup>を用いた。供試土壌30gを滅菌蒸留水270ml入りの三角フラスコに加え、ゴム栓をして往復振とう機で10分間振とうし、これを1次希釈液とした（ $10^{-1}$ ）。これを手で数秒間振り、すばやく滅菌ピペットで5mlとり、滅菌蒸留水45ml入りの三角フラスコに加え2次希釈液（ $10^{-2}$ ）とした。これを手で40回振り、すばやく滅菌ピペットで5mlとり、滅菌蒸留水45ml入りの三角フラスコに加え、3次希釈液（ $10^{-3}$ ）とした。以下同様にして、6次（ $10^{-6}$ ）ま

での希釈液を作製した。細菌・放線菌の分離にはアルブミン寒天培地<sup>3)</sup>、糸状菌の分離にはMartin & Johnsonのローズベンガル寒天培地<sup>3)</sup>、*F. oxysporum*の分離にはFo-w培地<sup>4)</sup>を使用した。細菌類・放線菌類の測定には5次・6次希釈液より、糸状菌の測定には3次・4次希釈液より、*F. oxysporum*の測定には2次・3次希釈液より、それぞれ各分離培地を用いて塗沫平板法により分離を行った。アルブミン寒天培地は28℃で14日間、ローズベンガル寒天培地は25℃で5日間、Fo-w培地は25℃で10日間培養後、それぞれ分離培地上に出現したコロニー数を計測した。微生物数は乾土率（生土/乾土）を乗じ、乾土1g当たりのcfu（コロニー形成単位）に換算した。

## 3. *Fusarium oxysporum* 菌株のレタスへの病原性試験

前項の実験終了後、洗馬A、洗馬B、野辺山の各供試土壌を用いたFo-w培地による培養平板から*F. oxysporum*のコロニーを調査地ごとにそれぞれランダムに50個以上分離し、ジャガイモ煎汁寒天（PDA）斜面培地上で培養した。その後、各菌株をジャガイモ煎汁液約15mlの入った試験管に移植し、25℃で7日間振とう培養して分生子の形成を促進させた。こうして得られた*F. oxysporum*の培養液を直径6cmのプラスチックポットに充填した園芸培土に流し入れて1週間以上培養し、汚染土壌とした。これにレタス種子（品種：パトリオット）を2粒播種し、30日以上育苗した。そして本葉4～5枚になった段階で罹病の有無を調査した。レタスの外観から病徴を判断し、全体的な萎凋症状や外葉の黄化

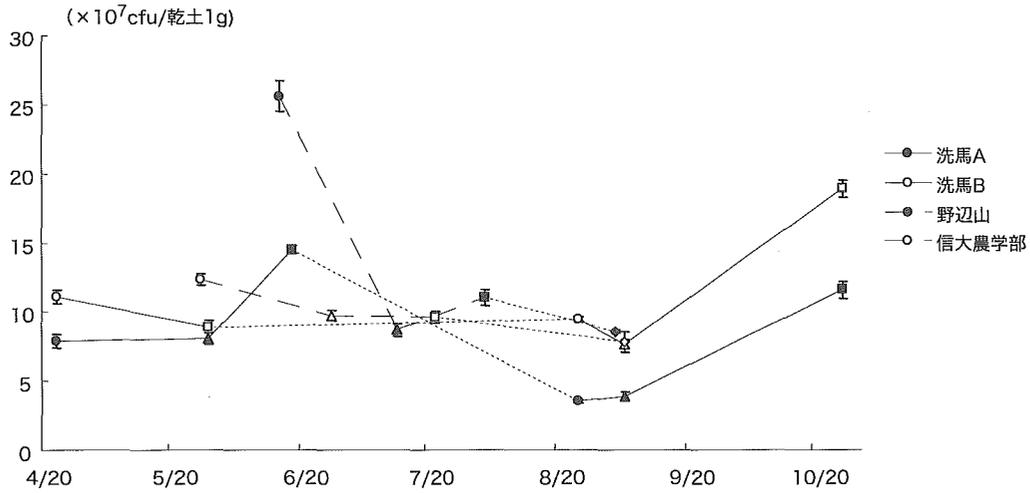


図1 細菌数の推移

—— レタス栽培期    ..... 休閑期    ● 植付け期 ▲ 生育中期 ■ 収穫期 ◆ 休閑期  
 \* 図中のバーは標準誤差(n=5)を表す。

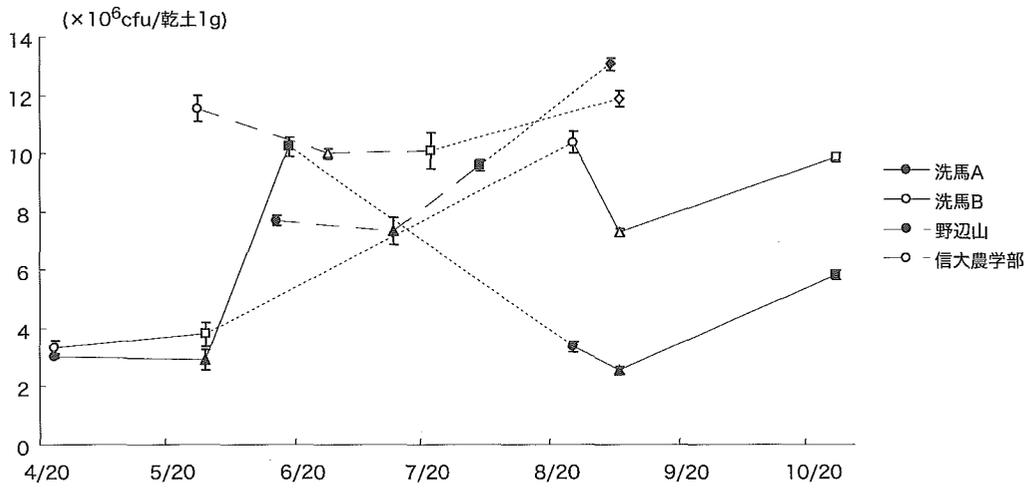


図2 放線菌数の推移

—— レタス栽培期    ..... 休閑期    ● 植付け期 ▲ 生育中期 ■ 収穫期 ◆ 休閑期  
 \* 図中のバーは標準誤差(n=5)を表す。

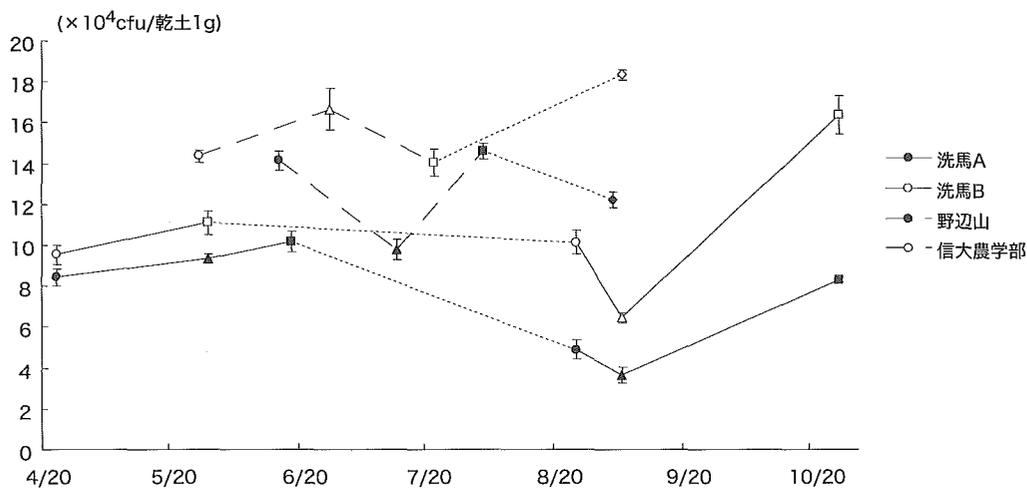


図3 糸状菌数の推移

—— レタス栽培期    ..... 休閑期    ● 植付け期 ▲ 生育中期 ■ 収穫期 ◆ 休閑期  
 \* 図中のバーは標準誤差(n=5)を表す。

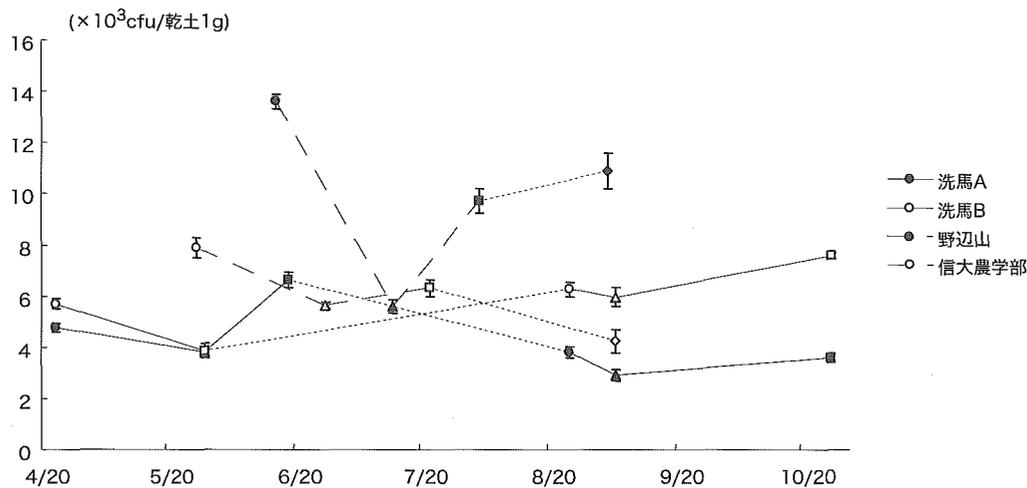


図 4 *Fusarium oxysporum* 数の推移

—— レタス栽培期 ..... 休閑期 : ● 植付け期 ▲ 生育中期 ■ 収穫期 ◆ 休閑期  
 \* 図中のバーは標準誤差 (n = 5) を表す。

を観察すると共にレタス植物体をポットから取り除いてその根部を縦に切断し、維管束部に褐変を生じているものを罹病個体と判定し、その接種菌株をレタスに対して病原性をもつレタス根腐病菌 *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* と判断した。病原性試験は 6 月～11 月に信大農学部圃場に隣接するガラス室の中で行い、11 月～12 月には 28°C の温度条件に設定したグロースチャンバー内で行った。

## 結 果

### 1. 土壤微生物相の解析

レタス栽培圃場における各土壌微生物数の推移を図 1～4 に示した。

細菌数では野辺山の圃場の植付け期においてとくに高い値がみられたが、これを除けばいずれの圃場も  $3.5 \times 10^7 \sim 1.9 \times 10^8$  cfu/乾土 1 g で推移し、圃場間で互いに近い値を示した。洗馬 A と洗馬 B の圃場では、1 作目の植付け期が危険率 5% 水準で有意な差がみられたが生育中期には有意な差は見られず、栽培期を通して細菌数はほぼ同じ水準で推移した。しかし、2 作目には栽培期を通して危険率 1% 水準で有意な差がみられ、洗馬 B の細菌数が洗馬 A を上回った。

放線菌数では信大農学部の圃場が  $1.0 \times 10^7 \sim 1.2 \times 10^7$  cfu/乾土 1 g と栽培期間を通じて高い水準で推移した。野辺山の圃場は植付け期が  $7.7 \times 10^6$  cfu/乾土 1 g、生育中期が  $7.3 \times 10^6$  cfu/乾土 1 g と信大農学部の圃場よりやや低い値を示したが、収穫期には  $9.6 \times 10^6$  cfu/乾土 1 g、休閑期には  $1.3 \times 10^7$  cfu/乾土 1 g と増加した。洗馬 A と洗馬 B の圃場で

は、1 作目の栽培期には危険率 5% 水準で有意な差はみられず、洗馬 A の圃場の 1 作目植付け期から生育中期と洗馬 B の圃場の 1 作目植付け期から収穫期がそれぞれ  $3.0 \times 10^6 \sim 3.0 \times 10^6$  cfu/乾土 1 g、 $3.4 \times 10^6 \sim 3.8 \times 10^6$  cfu/乾土 1 g とたがいに近い値を示した。しかし 2 作目の栽培期には危険率 1% 水準で有意な差がみられ、洗馬 A の圃場が  $2.6 \times 10^6 \sim 5.8 \times 10^6$  cfu/乾土 1 g、洗馬 B の圃場が  $7.3 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$  cfu/乾土 1 g と洗馬 B の圃場が 2 作目栽培期を通して大きく上回った。

糸状菌数では信大農学部の圃場が  $1.4 \times 10^5 \sim 1.8 \times 10^5$  cfu/乾土 1 g と最も高い水準で推移し、次いで野辺山の圃場が  $9.8 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^5$  cfu/乾土 1 g と高い値を示した。洗馬 A と洗馬 B の圃場では、1 作目の植付け期に危険率 5% 水準で有意な差がみられたが、それぞれ  $8.4 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5$  cfu/乾土 1 g、 $9.5 \times 10^4 \sim 1.1 \times 10^5$  cfu/乾土 1 g とたがいに近い値で推移していた。しかし、2 作目は栽培期を通して危険率 1% 水準で有意な差が見られ、洗馬 B の圃場の菌数が洗馬 A を上回り、また両圃場で収穫期に菌数の増加が見られ、収穫期の洗馬 B の菌数は洗馬 A の菌数の約 2 倍に達した。

*Fusarium oxysporum* 数は、野辺山の圃場で  $5.6 \times 10^3 \sim 1.4 \times 10^4$  cfu/乾土 1 g と生育中期に低い値を示したのを除けば信大農学部、洗馬 A、洗馬 B の圃場と比較して最も高い水準で推移した。信大農学部の圃場は  $4.2 \times 10^3 \sim 7.9 \times 10^3$  cfu/乾土 1 g で全体を通して減少傾向はみられたが大きな変動は見られなかった。洗馬 A と洗馬 B の圃場では 1 作目の植付け期に危険率 5% 水準で有意な差がみられたが、

栽培期を通して *F. oxysporum* 数はほぼ同じ水準で推移した。しかし、2 作目にはいずれの栽培期も危険率 1%水準で有意な差がみられ、洗馬 B の菌数が洗馬 A を大きく上回り、生育中期と収穫期には洗馬 B の菌数は洗馬 A の菌数の約 2 倍となった。

2. *Fusarium oxysporum* 菌株のレタスへの病原性試験

レタスは *F. oxysporum* による汚染土壌に播種してから 3~5 日後に出芽し、播種後約 30 日で本葉 4~5 枚の苗となった。初期の生育はどのレタス苗も違いはなかったが、出芽して約 1 週間後から葉が黄化する苗がみられた。さらに、第 2 葉が展開する時期からは全身的な萎凋症状を呈する苗が認められるようになった。罹病したレタスの発病の程度は、軽症の場合には根部の維管束部にわずかな褐変が見られる程度であったが、罹病の程度が激しいものでは

根部の維管束部が腐敗して空洞化したり、枯死にいたるものも認められた(図 5)。病原性試験の結果、それぞれ供試した 50 菌株のうち、調査地や土壌の採取日により 0~14 菌株の病原性菌株が認められた(表 2)。このうち洗馬 A の 6 月 18 日、8 月 25 日、9 月 5 日に採取した土壌から分離した *F. oxysporum* 菌株の病原性試験は 8 月下旬から 9 月下旬にかけて屋外のガラス室で順次行ったが、播種して約 30 日後に罹病の有無を確認するまでの間に外気温の低下によるレタス苗の生育不良がしばしば生じてしまった。このことはレタスの発病に影響を与えたと考えられるため、これらの *F. oxysporum* 菌株のレタスへの病原性については再度病原性試験を行った上で検討する必要がある。この点を考慮してこれらのデータを除外すると全 *F. oxysporum* に占める *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* の割合は、洗馬 A で 22~28%、洗馬 B で 16~26%、野辺山で 0~6%と

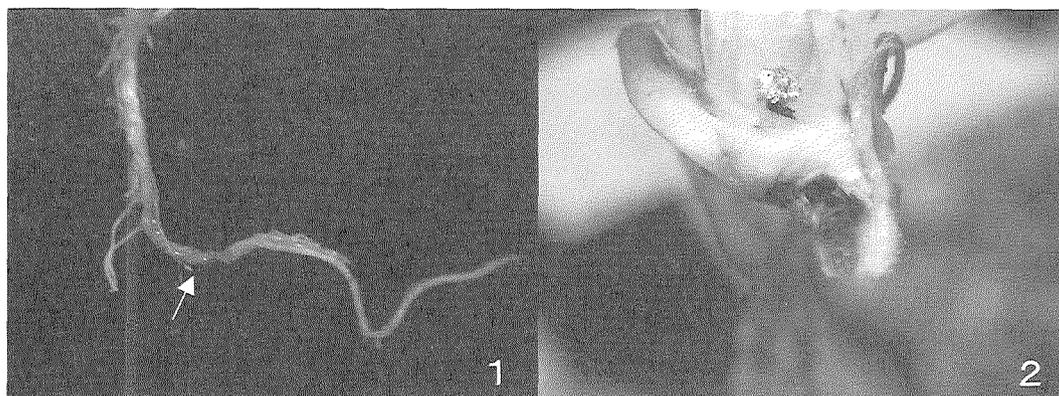


図 5 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* によるレタス罹病苗  
 1. 根部褐変の見られるレタス苗  
 2. 根部褐変の縦断面。維管束部が腐敗し、空洞化が見られる。

表 2 *Fusarium oxysporum* 菌株のレタスへの病原性試験の結果

調査地	土壌採取日	供試菌株数(A)	病原性菌株数(B)	B/A(%)
洗馬 A	4 / 23	50	14	28%
	5 / 29	50	11	22%
	6 / 18*	50	4	8%
	8 / 25*	50	4	8%
	9 / 5 *	50	5	10%
洗馬 B	4 / 23	50	13	26%
	5 / 29	50	11	22%
	8 / 25	50	12	24%
	9 / 5	50	8	16%
野辺山	6 / 15	50	3	6%
	7 / 13	50	2	4%
	8 / 3	50	0	0%
	9 / 3	50	2	4%

\* 8 月下旬以降に屋外のガラス室で病原性試験を行った。

なり、洗馬Aと洗馬Bの圃場では野辺山の圃場よりも明らかに高いことが示された。

### 考 察

レタス栽培圃場における土壤微生物相の解析の結果、土壤微生物の中でもとくに放線菌数と糸状菌数において圃場間で差が認められ、信大農学部圃場が全般的に最も高く、次いで野辺山の圃場が高いことが示された。洗馬Aおよび洗馬Bの圃場はいずれも1作目と2作目で放線菌数と糸状菌数に変動がみられたが、全体としてその数は信大農学部および野辺山の圃場と比較して低い傾向が認められた。これらは各圃場の土壤の生物的環境を示すものであり、量的な点から信大農学部、野辺山、洗馬の順に土壤微生物相が豊かであると評価できる。こうした圃場間の差異を生じさせた背景としてさまざまな要因を考察することができるが、本研究の調査地である信大農学部、野辺山、洗馬に関して言えば、とくに圃場の管理や利用方法が大きく影響していると考えられる。信大農学部と野辺山の圃場はいずれも実験圃場として用いられ、集約的な利用がされることはほとんどなく、毎年異なる作物が栽培されているが、洗馬の圃場では年2作のレタス栽培が恒常的に行われ、集約的な利用がなされている。こうした作付け体系や栽培方法の違いは、土壤微生物の生活の場としての土壤環境に反映する。とくに同一作物の連作が土壤環境に与える影響は大きく、土壤の物理性や化学性の悪化を引き起こすとともに土壤の生物性としての土壤微生物相の変化をももたらすことが知られている<sup>5)</sup>。1作目のレタス栽培の後、2作目でキャベツに転作した洗馬Aの圃場と2作目ともにレタスの連作を行った洗馬Bの圃場において、1作目栽培期には細菌数、糸状菌数、*F. oxysporum*数がほぼ同じ水準で推移していたのに対して、2作目栽培期には両圃場間で差を生じ、いずれの土壤微生物においても洗馬Bの圃場が洗馬Aの圃場を大きく上回る結果を示したことは、転作や連作が土壤微生物相におよぼす影響を示唆するものと考えられる。

一方、土壤病原菌の*F. oxysporum*数についてみ

ると野辺山の圃場でもっとも高く、信大農学部および洗馬Aと洗馬Bの圃場がいずれもこれよりも低く、ほぼ近い値を示した。これに対して、病原性試験の結果明らかになった全*F. oxysporum*に占めるレタス根腐病菌*F. oxysporum* f. sp. *lactucae*の割合では、洗馬Aと洗馬Bの圃場が野辺山の圃場と比較し、栽培期を通していずれも高い結果が得られた。これは放線菌や糸状菌、さらに*F. oxysporum*の各土壤微生物の数において、洗馬Aと洗馬Bの圃場が野辺山の圃場よりも低かったこととは逆の結果となった。洗馬の圃場において集約的なレタス栽培が恒常的に行われていることを考慮すると、このことも作付け体系や栽培管理に起因すると考えられる。とくにレタスの連作による土壤環境の変化が全体的な土壤微生物相の貧弱化をもたらすと同時に、レタス根腐病菌*F. oxysporum* f. sp. *lactucae*にみられるような特定の病原菌分化型の増加を引き起こしたことが推定される。

本研究では希釈平板法により圃場内の各種土壤微生物数を定量したが、洗馬の圃場間でみられたように同様の栽培管理を行ってきた圃場での菌数は類似していたことからこの方法による菌数定量は土壤微生物相の解析に有効であると考えられた。しかしその一方で、土壤微生物数の変動は作物の生育時期よりもむしろ季節的な要因に影響されていることが解析結果から示唆された。したがって異なる圃場間で比較を行うには、土壤採取の時期を合わせることを望ましいと考えられた。今後さらに多くの調査地における継続的な調査を行い、圃場における土壤微生物の動態に関する知見が蓄積されることによって、病害の発生予測や圃場診断法の確立に寄与することが期待される。

### 謝 辞

本研究を行うにあたり、塩尻市洗馬での土壤採取に御指導、御鞭撻を頂きました長野県中信農業試験場の吉田清志氏、松本農業改良普及センターの小口久寿氏、油井敏弘氏にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

### 引 用 文 献

- 1) 藤永真史・和田健夫. 1997. 長野県に発生した露地レタスの根腐病. 関東東山病虫研報 44: 29-31.
- 2) 小木曾秀紀・藤永真史・清水時哉. 2000. レタス根腐病の発生生態と防除. 植物防疫54: 322-326.
- 3) 土壤微生物研究会編. 1975. 土壤微生物実験法, pp.21-24, pp.431-434. 養賢堂, 東京.
- 4) 長野県中信農業試験場編. 2002. 土壤肥料標準実験法, pp.20.
- 5) 新版土壤病害の手引き編集委員会編. 1984. 新版土壤病害の手引き, 日本植物防疫協会. 東京.

## Analysis of soil microbial flora in the lettuce fields

Keiichi HOSHIKAWA, Michio IMAZU, Naoto INOUE

Department of Food Production Science, Faculty of Agriculture, Shinshu University

### Summary

Soil microbial flora of 3 lettuce fields (Seba, Nobeyama, Shindainougakubu) in Nagano Prefecture were investigated using the dilution plate method. In comparison with in Seba fields the numbers of actinomycetes and fungi found in Nobeyama and Shindainougakubu fields are larger. There were differences in the numbers of each microorganism between the fields where the lettuce was grown twice consecutively and fields where the lettuce cultivation was followed by cabbage cultivation. From the results of pathogenicity tests of *Fusarium oxysporum* strains isolated from Seba and Nobeyama fields, it was estimated that the rate of the *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* in total number of *F. oxysporum* of Seba field was 16~28% and that of Nobeyama field was 0~6%. These results suggested that the continuous lettuce cultivation had an influence on the soil microbial flora in the lettuce fields.

**Key word** : dilution plate method, microbial flora, lettuce root rot, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, pathogenicity test