

第Ⅵ章 対抗植物の輪作体系導入による作物間相互作用を利用した インゲン根腐病の制御

これまでに、土壌管理による根腐病抑止対策を考えるうえで、輪作体系の改善の重要性を指摘し、土壌微生物活性および微生物相の変化が土壌病害の発生程度や衰退性に関与することを指摘した。しかし、輪作による根腐病の抑止効果をより確実なものにするためには、現行の畑作物によらない新しい作物、すなわち土壌病害の抑制効果の高い作物の選択が重要と考え、根腐病菌に対する抗菌性を持った付加価値の高い作物の検索と輪作体系への導入の可能性について検討した。

第1節 インゲン根腐病を抑止する作物種の検索

現行の作付作物と異なる数10種の異種作物をインゲン

マメの連作土壌に作付し、後作インゲンマメの根腐病抑止効果の高い作物種を検索した。

1. 実験方法

1) インゲン根腐病を抑止する抗菌性作物種の検索

a. 供試土壌、供試作物ならびにポット試験の手順

インゲンマメの4年連作土壌を1/5000 aポットに充填し、全区共通して1.2gの化成肥料S644 (N-P₂O₅-K₂O=72-288-168mg/pot)を施与した。表Ⅵ-1には抗菌性を検索するための供試作物52種を記載した。その内訳は、野菜類19種、緑肥作物類10種、アレロパシーを持つ可能性のある植物としてその抗菌活性が注目されるハーブ類14種、および花き類9種である。

表Ⅵ-1 供試作物の名称、播種量ならびに収穫時の根新鮮重

種類 ¹⁾	作物名	科名	栽培後		種類 ¹⁾	作物名	科名	栽培後	
			播種量 ²⁾ (粒/pot)	根新鮮重 (g/pot)				播種量 ²⁾ (粒/pot)	根新鮮重 (g/pot)
野菜	カラシナ	アブラナ	11	5.8	緑肥	トウモロコシ	イネ	5	44.6
	タカナ	〃	11	4.9		エンバク	〃	11	10.5
	コカブ	〃	11	16.7		ライムギ	〃	11	22.2
	ノザワナ	〃	11	10.6		ソルゴー	〃	6	15.5
	ハツカダイコン	〃	9	15.2		イタリアンライグラス	〃	0.2g	19.3
	チンゲンサイ	〃	11	6.1		レバナ	アブラナ	0.2g	7.8
	アオシソ	セリ	17	11.5		ペルコ	〃	0.2g	9.6
	アカシソ	〃	17	8.8		マリーゴールド	キク	5	23.2
	ナンバン	〃	7	1.4		アルファルファ	マメ	0.25g	15.4
	パセリ	〃	17	4.4		アカクロバ	〃	0.25g	16.2
	ミツバ	〃	17	5.1	ハーブ	ガーデנקレス	アブラナ	20	4.7
	ニンジン	〃	7	89.2 ³⁾		ウォータークレス	〃	20	2.6
	ニラ	ユリ	17	13.0		スペアミント	シソ	20	6.6
	ナガネギ	〃	11	31.9		ペパーミント	〃	20	8.1
	レタス	キク	17	4.2		セージ	〃	7	6.8
	シュンギク	〃	17	17.4		ローズマリー	〃	7	1.0
	ピーマン	ナス	7	0.8		ソーレル	〃	20	11.2
	シシトウ	〃	7	0.8		オレガノ	〃	20	6.3
	ハウレンソウ	アカザ	11	4.6		バジル	〃	20	8.7
花き	ローダンセ	キク	11	19.6		チャービル	セリ	17	3.3
	ヤグルマソウ	〃	11	16.6		スーゼルリー	〃	20	7.7
	キンセンカ	〃	8	20.1		オニオンホワイト	ユリ	11	4.6
	コスモス	〃	7	11.5		チャイブス	〃	17	9.0
	アスター	〃	11	11.4		ルバーブ	タデ	3	5.0
	センニチコウ	ヒユ	8	2.6		(連作) インゲンマメ	マメ	4	21.1
	スイートピー	マメ	2	9.9					
	ワスレナグサ	ムラサキ	20	16.4					
	キンギョソウ	ゴマノハグサ	20	20.0					

1) ハーブ類の区分は文献¹⁴⁹⁾によった。マリーゴールドは緑肥類に含めた。

2) 緑肥種子の一部はg単位で散播した。

3) ニンジンは葉根含む。

アルファルファは現在のところ緑肥作物として用いられる事例は少ないが、生物的窒素固定が旺盛であることから今後実用に供しうると考え、緑肥類に含めた。これらの作物を表VI-1に記載した播種量で5月15日に播種し、6月中旬まではガラス室内で、それ以降は戸外に置き、約50日間栽培した。なお、各作物の栽培期間は前後一週間程度のずれがある。その他、インゲンマメを上記の作物と同様に作付した連作区と無栽植区も設け、無栽植区を対照区とした。なおインゲンマメ以外は市販の種子を使用した。以上を前処理とする。各作物を上記の栽培期間後、茎葉を刈り取り、さらに根を可能な限り土壌から分離して採取し、新鮮重(表VI-1)を測定し、病原菌に対する抗菌活性を調査するために -25°C で保存した。また跡地土壌は同一ポットに充填し直し、約40日間無栽植状態で戸外に放置した(以後上記の処理系列を搬出処理と呼ぶ)。ただし供試した作物種のうち緑肥類およびインゲンマメについては採取作物体を約1cmに裁断後、茎葉15gと根10g(採取作物体の新鮮重がこれに満たない場合は全量)を土壌とよく混和して40日間放置する系列(すき込み処理と呼ぶ)も設けた。その後、両処理ともに、ポットあたり4粒のインゲンマメを無肥料条件で播種し50日間栽培した。これが本処理である。ポット試験はいずれも3反復で行い、50日間の栽培後に根腐病発病程度を調査した。なお、緑肥作物のすき込み処理系列では後作のインゲンマメに対する出芽障害は認められなかった。

b. 土壌微生物相におよぼす緑肥作物の搬出、すき込み処理の影響

上記試験における搬出処理およびすき込み処理後の後作インゲンマメ作付前の土壌微生物数を測定した。

c. インゲン根腐病菌に対する抗菌活性の調査方法

インゲンマメも含む53作物種の茎葉と根の含有物の抗菌活性はペーパーディスク法⁶⁶⁾に従い、気中菌糸の生育抑制率を測定することによって調査した。すなわち、前処理後に採取し保存しておいた各種作物の茎葉と根の新鮮物1gを乳鉢で摩砕し、5mlの95%メタノールを加え一時間抽出後濾過した。この濾液(被検液)の25 μl を直径6mmのペーパーディスクにスポットし、十分に乾燥した。*F. solani* f. sp. *phaseoli* (以下、Fsと略記)と褐変部位より分離された*F. oxysporum* (以下、Foと略記)も併せて供試し、これらの2菌株について前章第2節の方法で得た胞子を約 10^4ml^{-1} となるようにPDA培地に混和し、シャーレに分注して固結後、前記のペーパー

ディスクをシャーレ内に正三角形に設置し、各々16 μl の殺菌水を滴下した。これを 30°C で5日間培養し、気中菌糸の生育阻止円のディスク外縁からの距離を測定した。対照としてシクロヘキシミド 300mg L^{-1} 溶液を用い、対照との距離の比で被検液の抗菌活性を表示した。実験は6反復で行った。

2) インゲンマメ連作条件下における後作緑肥の栽培がインゲン根腐病におよぼす影響

インゲンマメ連作土壌において、緑肥作物としてアルファルファ(品種: パータス)、レバナ(レバナ)、エンバク(スワン)、アカクロバ(メジウム)を供試し、インゲンマメを前年6~9月まで慣行で栽培後、上記緑肥作物を後作として9月上旬から10月下旬まで栽培し、全量すき込む処理を行った。なお、各年の緑肥作物の播種量はアルファルファ3g、アカクロバ2g、レバナ2g、エンバク 15gm^{-2} とした。緑肥を作付しないインゲンマメ連作区を対照区として、これらの土壌で翌年5月より再びインゲンマメを栽培し、根褐変程度、収量を調査した。この処理を1990年(連作3年目)から1993年まで4年継続した。1区4 m^2 、2反復で行った。

2. 実験結果

1) インゲン根腐病を抑止する抗菌性作物種の検索

(1) 異種作物の作付がインゲン根腐病におよぼす影響

表VI-2に作物体搬出処理における後作インゲンマメの根腐病抑止効果を示した。対照区の根褐変指数は2.65、インゲンマメ連作区のそれは2.76であったが、本指数が2.5以上になると根重は急激に減少した。インゲンマメの連作を除くすべての作物の作付跡で後作インゲンマメの根褐変が抑制されたので、表VI-2には対照区の根褐変指数に対する各区の根褐変指数の低下率を算出し、根褐変指数の実数を併記した。低下率が10%程度にとどまったのは全体の17%で、レタスやエンバク、アカクロバ、ソルゴーなどには抑制効果があまり認められなかった。低下率が11~20%の作物は、アオシソやホウレンソウ、トウモロコシ、レバナ、セージ、ローズマリーなどであった。なおローズマリーはバレイショのそうか病菌に抗菌性をもつことが報告されている^{27, 163)}。

対照区(無栽植区)やインゲンマメ連作区の根褐変程度はかなり大きく、それを改善しインゲンマメの根を健全化するには指数2前後の、胚軸1/4の褐変程度までは軽減する必要がある。根褐変指数低下率21%程度以上がそれに該当した。低下率21%以上の作物は、全体の約56%を占め、そのうち21~30%程度まで抑制したものは、

表VI-2 52種の作物種の作付による後作インゲンマメの根腐病抑制効果（搬出処理系列）

根褐変指数 低下率(%) ¹⁾	作物名				該当作物数 割合(%) ²⁾
	野菜類	緑肥類	ハーブ類	花き類	
0~10	レタス	エンバク ライムギ アカクロバ イタリアンライグラス ソルゴー	ソーレル オニオンホワイト	キンセンカ	17.3
[2.65~2.38]					
11~20	カラシナ アオシソ ノザワナ ナンバン ピーマン ホウレンソウ	トウモロコシ レバナ	ガーデンクレス ウォータークレス セージ ローズマリー	ローダンセ	26.9
[2.37~2.12]	シシトウ				
21~30	アカシソ ミツバ ニンジン タカナ シュンギク ナガネギ ハツカダイコン	マリーゴールド	チャイブス オレガノ ルバーブ バジル スーパセルリー	ワスレナグサ スイートピー キンギョソウ センニチコウ	32.7
[2.11~1.85]					
31~40	ニラ チンゲンサイ パセリ	ベルコ アルファルファ	ペパーミント チャービル	コスモス ヤグルマソウ アスター	19.2
[1.84~1.59]					
41以上	コカブ		スペアミント		3.8
[1.58~]					

1) 対照区（無栽植）の根褐変指数(2.65)に対する低下率。[]は根褐変指数の実数

2) インゲンマメを除く供試作物全体数に対する割合。

ニンジン、ナガネギ、ハツカダイコン、マリーゴールド、ルバーブ、バジル、スーパセルリーなどであり、花き類が比較的多く含まれていた。このうちナガネギは混植してユウガオの割れ病(*F. oxysporum* f. sp. *lagenariae*)を抑制し⁸⁾、マリーゴールドはセンチュウを抑制する効果を持つ¹²⁵⁾ことが知られている。ただし供試した連作土壌にセンチュウのシストは認められなかった。

また低下率30%以上の作物はニラ、チンゲンサイ、ベルコ、アルファルファ、ペパーミント、コスモス、コカブ、スペアミントなどで、最大はスペアミントの46%であった。このなかでは、ニラがカーネーションの萎凋細菌病(*Pseudomonas caryophylli*)¹⁵⁶⁾やユウガオの割れ病⁸⁾に効果をもつことが報告されている。なお、2種類以上の作物が属する科の抑制効果を分散分析した結果、供試した異種作物の科による差は認められなかった。

(2) 緑肥作物の搬出およびすき込み処理がインゲン根腐病におよぼす影響

図VI-1には緑肥作物とインゲンマメ残渣の搬出、すき込み処理が後作インゲンマメの根褐変指数におよぼす

影響を示した。なお表VI-2で前述した搬出処理系列の根褐変指数低下率の低い順に並べた。搬出処理ではベルコ、アルファルファが低下率30%以上の高い抑制効果を示したが、緑肥作物はすき込みが前提であり、実用上はすき込み処理の抑制効果が重要である。すき込み処理系列の根褐変指数低下率はベルコ、アルファルファ、マリーゴールド以外の作物で搬出処理系列の当該作物より上昇した。この中で搬出すると効果は小さいが、すき込むと30%以上となるものに、アカクロバ、トウモロコシがあり、ソルゴーもほぼそれに近い値を示した。またインゲンマメの残渣物を緑肥としてすき込んでも抑制効果が認められ、注目すべき現象であった。この現象には病原菌に対する免疫的な作用が関与しているものと思われるが、今のところその因果関係は不明である。

(3) 緑肥作物の作付が土壌微生物相におよぼす影響

表VI-3には、根腐病に対して大きな抑制効果を示した緑肥作物5種について、緑肥作物収穫後40日目のインゲンマメ作付前の土壌微生物相を測定した結果を示した。搬出処理系列では、根褐変の激しかったインゲンマメ跡に比べて、緑肥栽培跡地土壌で糸状菌、*Fusarium*

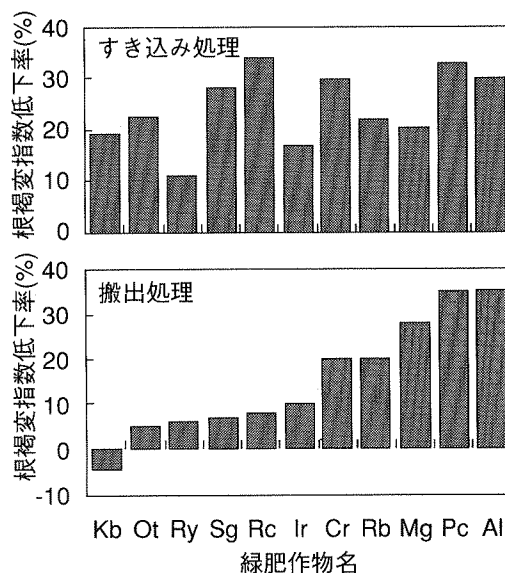
属菌数はやや低下したが、明瞭な緑肥作物間差は認められなかった。一方、すき込み処理系列では搬出処理系列に対し、*Fusarium*属菌を除く微生物数が増加する場合としない場合があった。土壌中での緑肥作物の分解速度が異なるためその差を一概に論じられないが、インゲンマメやアルファルファ、アカクローバでは細菌あるいはCV耐性菌数の増加程度が大きく、このことがインゲン根腐病抑制の一因になった可能性もある。しかし、すき込み処理系列で根腐病抑止効果の大きかったペルコ、トウモロコシの跡地土壌では、各種微生物相の変動に一定の傾向が認められず、本表による土壌微生物相の変化から緑肥作物の根腐病抑止効果を共通的に論ずることはできないと考えられる。

(4) 緑肥作物茎葉・根のメタノール抽出物が有する根腐病菌に対する抗菌活性

表VI-4には緑肥作物のすき込み処理系列各区の根腐変指数低下率を小さい順から大きい順に並べ、緑肥作物の茎葉、根メタノール抽出物の抗菌活性との対応関係を示した。その結果、FsとFoの両菌に対するインゲンマメ、マリーゴールド、およびレバナの根の抗菌活性、同じくエンバクの茎葉と根の抗菌活性が比較的良好に対応した。アルファルファでも茎葉および根の抽出物の抗菌活性がいずれも認められ、やや根で高く、これら緑肥類の中では相対的に最も高かった。また、抑止効果が搬出処理系列では認められず、すき込み処理系列で大きかったアカクローバは、茎葉がFsに対する強い抗菌活性を示すことも認められた。ライムギは、根のメタノール抽出物の抗菌活性が比較的高いにも関わらず、根腐病抑止効果は小さく、ペルコではこれと逆の関係が認められ、トウモロコシ、ソルゴーでも抑止効果が大きい割には抗菌活性が低く、必ずしも抑止効果と抗菌活性の両者は対応しなかった。

このように根腐病を抑制した緑肥作物には病原菌に対する直接的な抗菌活性を有するものが多く、アルファルファやマリーゴールドなどのように抑止効果と病原菌に

対する抗菌活性が相対的によく対応するものが認められたが、対応に関係しないものもあった。



図VI-1 インゲンマメ連作土壌における緑肥作物の栽培によるインゲン根腐病抑止効果

インゲンマメ：Kb、トウモロコシ：Cr、エンバク：Ot、ライムギ：Ry、ソルゴー：Sg、イタリアンライグラス：Ir、レバナ：Rb、ペルコ：Pc、マリーゴールド：Mg、アルファルファ：Al、アカクローバ：Rc

2) インゲンマメ連作条件下における後作緑肥の栽培がインゲン根腐病におよぼす影響

輪作に導入可能と考えられる緑肥作物に着目し、抑止効果の高い作物を圃場レベルで検索した（表VI-5）。対象作物は前項1)の結果から、抑止効果を異にし、かつ抑止効果と*F. solani* f. sp. *phaseoli*に対する抗菌活性が比較的良好に対応し、秋の短い期間にも作付可能な緑肥作物を選択した。この結果、対照区（インゲンマメの連作区）に比べ、各種緑肥作物のうちレバナを除きいずれも後作緑肥としての抑止効果が認められた。作物別にはアルファルファによる根腐病抑止効果が4作物中最も

表VI-3 緑肥作物作付後の搬出処理、すき込み処理が跡地土壌の微生物相におよぼす影響

作物名	細菌数(10^6 g $^{-1}$)			CV耐性菌数(10^5 g $^{-1}$)			糸状菌数(10^4 g $^{-1}$)			<i>Fusarium</i> 属菌数(10^2 g $^{-1}$)		
	搬出(a)	すき込み(b)	b/a	搬出(a)	すき込み(b)	b/a	搬出(a)	すき込み(b)	b/a	搬出(a)	すき込み(b)	b/a
インゲンマメ	9.6	25.9	2.70	8.4	23.9	2.84	14.6	17.2	1.18	66.7	79.4	1.19
アルファルファ	9.3	15.6	1.68	13.9	40.7	2.93	10.2	8.6	0.84	49.5	54.5	1.10
ペルコ	13.1	13.4	1.02	17.0	13.4	0.79	11.9	9.6	0.81	50.2	62.8	1.25
アカクローバ	14.9	13.3	0.89	10.6	35.8	3.38	5.5	10.7	1.95	50.0	59.5	1.19
トウモロコシ	20.6	12.8	0.62	15.4	12.3	0.80	11.8	14.8	1.25	45.6	55.2	1.21

表VI-4 緑肥作物の茎葉・根メタノール抽出物の抗菌活性

作物名	根褐変指数 ¹⁾ の低下率(%)	抗菌活性相対値 ²⁾			
		茎葉		根	
		Fs	Fo	Fs	Fo
ライムギ	11	0	0	33	37
イタリアンライグラス	17	2	0	0	24
インゲンマメ	19	5	0	15	74
マリーゴールド	21	0	0	35	120
エンバク	22	15	11	40	100
レバナ	22	0	22	27	59
ソルゴー	28	0	43	1	22
トウモロコシ	30	0	15	15	67
アルファルファ	30	42	146	46	163
ペルコ	33	2	9	7	50
アカクローバ	34	70	17	0	113

1)すき込み処理系列の低下率の低い順に並べた。

2)ペーパーディスク法によるシクロヘキシミド300mgL⁻¹に対する被検液の

抗菌活性

Fs: *F.solani* Fo: *F.oxysporum*

高く、とくに作付2年目に最も大きくなり、以下エンバク、アカクローバの順であった。なお、各年の秋のすき込み量はアルファルファ茎葉30～100、根40～80、アカクローバ茎葉20～40、根30～50、レバナ茎葉900～2500、根300～800エンバク茎葉1000～2000、根400～1000gm⁻²であったが、前年秋における緑肥作物の生育量と翌年の根腐病抑止効果の関係は判然としなかった。以上の、アルファルファを始めとする緑肥作物の根腐病抑止効果は、前項のポット試験の結果とほぼ一致した。

第2節 アルファルファの各種作付利用方式とインゲン根腐病の制御

前節までに、緑肥作物の中では、アルファルファの栽培による根腐病抑止効果が高く、その効果は栽培後、すき込まずに根を除去した場合と根、茎葉をすき込んだ場合の両者で同等に認められている。実際の圃場条件においては、緑肥作物の根を除去することは考えにくい、

アルファルファの高い根腐病抑止効果に着目し、これまでの結果を圃場レベルで確認するとともに、実際の利用に適したアルファルファの栽培条件を検討し、かつ抗菌性発現要因の解析の一助とすることを目的として、以下の試験を実施した。

1. 実験方法

1) インゲンマメとアルファルファの混作がインゲン根腐病におよぼす影響

抗菌性の発現がアルファルファの分解過程で生じるものか、栽培根からの影響によるのかを、現象的に把握するため、インゲンマメとアルファルファの混作実験を行った。インゲンマメ2年連作後にコムギを栽培した土壌において、インゲンマメ播種の一週間前および生育中期に畦間にアルファルファ(品種バートス)を播種し、根腐病および生育に対する影響を調べた。なお、アルファルファの播種量は3(標準播種量)、6kg10a⁻¹の2段

表VI-5 インゲンマメ連作土壌における緑肥作物の作付がインゲン根腐病および収量に及ぼす影響¹⁾

試験区	1990		1991		1992		1993	
	褐変 ²⁾	収量	褐変	収量	褐変	収量	褐変	収量
インゲンマメ(対照)	1.70	(18.0)	2.18	(8.6)	1.67	(8.5)	1.45	(7.6)
レバナ	0.88	96	2.33	115	1.54	71	1.50	101
エンバク	1.28	111	1.95	147	1.40	115	1.58	125
アカクローバ	1.60	117	2.10	130	1.23	108	1.34	105
アルファルファ	0.25	119	0.61	181	0.58	136	0.74	145

1)インゲンマメ連作区(対照)において収穫後、後作として毎年秋に緑肥作物を栽培する作付様式を4年継続し、翌年、根腐病を検定した。

2)褐変:根褐変指数の実数、収量:g/株、収量は対照区のみ実数で他は対照区を100とした比。

表VI-6 インゲンマメとアルファルファ (AL) の混作試験処理区別

処理区 区名	処理内容
1 混A3	インゲンマメ播種前の5月中旬にAL播種 ($3\text{kg } 10\text{a}^{-1}$)
2 混A6	インゲンマメ播種前の5月中旬にAL播種 ($6\text{kg } 10\text{a}^{-1}$)
3 混B3	インゲンマメ生育期の7月中旬にAL播種 ($3\text{kg } 10\text{a}^{-1}$)
4 混B6	インゲンマメ生育期の7月中旬にAL播種 ($6\text{kg } 10\text{a}^{-1}$)
5 無処理A+N4	インゲンマメ播種前の5月中旬にN $4\text{kg } 10\text{a}^{-1}$
6 無処理B+N4	インゲンマメ生育期の7月中旬にN $4\text{kg } 10\text{a}^{-1}$
7 無処理	

インゲンマメ2年連作後にコムギを栽培した土壌を供試
 ALはインゲンマメの畦間に散播。播種時にN $4\text{kg } 10\text{a}^{-1}$ 共通施肥 (NO. 7区以外)
 NO. 5, 6区はALを播種せず、畦間に施肥のみ。
 インゲンマメは5月30日播種、全区共通慣行施肥N-P₂O₅-K₂O=4-16-9 $\text{kg } 10\text{a}^{-1}$

階とし、畦間に散播したアルファルファに対してもアルファルファの播種前に $4\text{kg } 10\text{a}^{-1}$ の窒素を施用し、対照区 (無栽植区) にも同様に窒素を施肥した。インゲンマメの施肥は施肥標準量である。1区12㎡, 2反復で行った。(表VI-6)

2) インゲンマメ連作土壌におけるアルファルファの栽培時期, すき込み時期が根腐病におよぼす影響

インゲンマメ連作2, 3年目, 同8, 9年目圃場を用いて, アルファルファの栽培時期とすき込み時期の違いによる後作インゲンマメの根腐病抑止効果を検討した。供試品種はバートス, サイテーション, キタワカバの三種である。インゲンマメ連作圃場に後作としてアルファルファを作付し, 当年秋または翌年春にロータリーすき込み後 (写真4), インゲンマメを栽培し, 収量, 根褐変指数を調査した (表VI-7)。また, インゲンマメを一年休閑し, アルファルファを1作期間栽培する交互作区も設置した。この後, 翌年または当年にインゲンマメを栽培して収量, 根腐病を調査した。この調査をアルファルファの作付翌年および作付3年目 (2年作付) の1993, 94年に行った。なお, 交互作区は茎葉のみ刈り取り, 圃場から搬出し, 根のみ土壌と混和した。単年度のアルフ

アルファの播種量は $3\text{kg } 10\text{a}^{-1}$ とし, 施肥はN-P₂O₅-K₂O=4-16-9 ($\text{kg } 10\text{a}^{-1}$) を播種時に施用し, ローラーで鎮圧した。インゲンマメに対する施肥は施肥標準量である。処理区は1区12㎡, 2反復で行った。

3) 土壌を異にした連輪作圃場におけるアルファルファの栽培時期, すき込み時期を変えた場合の根腐病抑止効果

芽室町内の現地3カ所 (褐色低地土2カ所および淡色黒ボク土1カ所) において, アルファルファ栽培が根腐病および収量におよぼす影響を検討した (表VI-8)。アルファルファ秋作付2回区およびアルファルファ交互作区と, インゲンマメ連作区を設けたほかに, 比較として通常の作物の輪作区も併せて設置した。ただし, 10月下旬に輪作作物の茎葉残渣およびアルファルファ交互作区のアルファルファ茎葉は搬出した。品種はバートスを用い, 播種量と施肥法は前項2) と同様である。インゲンマメの施肥は施肥標準で行い, 防除などは農家慣行で行った。1区16.5㎡, 2反復で行った。

4) 前作を異にしたインゲンマメに対するアルファルファの根腐病抑止効果

表VI-7 インゲン根腐病および収量におよぼすアルファルファ (AL) の栽培時期, すき込み時期試験の処理区別

処理区	略称	1年目 (1992)		2年目 (1993)		3年目 (1994)	1年目および 2年目のALの すき込み時期
		5-9月	9-10月	5-9月	9-10月	5-9月	
1 インゲンマメ連作区	連作区	インゲンマメ	—	インゲンマメ	—	インゲンマメ	—
2 アルファルファ秋作付1回区	AL秋1回区秋	インゲンマメ	AL	インゲンマメ	—	インゲンマメ	当年秋
3 同	AL秋1回区春	インゲンマメ	AL	インゲンマメ	—	インゲンマメ	翌春
4 アルファルファ秋作付2回区	AL秋1回区秋	インゲンマメ	AL	インゲンマメ	AL	インゲンマメ	当年秋
5 同	AL秋1回区春	インゲンマメ	AL	インゲンマメ	AL	インゲンマメ	翌春
6 アルファルファ交互作区	AL交互作区	インゲンマメ	—	AL	—	インゲンマメ	当年秋

3年目のインゲンマメを調査

表VI-8 インゲン根腐病および収量におよぼすアルファルファ（AL）の栽培時期，すき込み時期試験の処理区別（現地試験）

処 理 区	処 理 内 容				
	1年目(1992)		2年目(1993)		3年目(1994)
	5-9月	9-10月	5-9月	9-10月	5-9月
1 3年連作区	インゲンマメ	—	インゲンマメ	—	インゲンマメ
2 AL秋作付2回区	インゲンマメ	AL	インゲンマメ	AL	インゲンマメ
3 AL交互作区	インゲンマメ	—	AL	—	インゲンマメ
4 輪作区	エンバク	—	バレイショ	—	インゲンマメ

3年目のインゲンマメを調査
ALは各年秋すき込み

表VI-9 前作条件を異にする圃場におけるアルファルファ（AL）栽培有無の処理区

処理区	圃場条件	処 理 法
1 AL作付なし	バレイショ跡地	前年の各作物収穫後、8月25日にALを播種。
2 AL作付あり	〃	翌年5月下旬にすき込み後、5月31日に
3 AL作付なし	コムギ跡地	インゲンマメを播種し調査した。
4 AL作付あり	〃	

アルファルファを秋に栽培することを前提として、連輪作圃場を用いてバレイショ跡およびコムギ跡地におけるアルファルファ栽培が根腐病抑制におよぼす効果を検討した（表VI-9）。供試品種はバータス、播種量を $3 \text{ kg } 10\text{a}^{-1}$ とした。施肥は $\text{N}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{K}_2\text{O}=4-16-9$ ($\text{kg } 10\text{a}^{-1}$) をアルファルファ（AL）播種時にAL作付なし、あり区とも共通に施用し、ローラーで鎮圧した。翌春（1995年）のインゲンマメの施肥は施肥標準量である。1区18㎡とし、3反復で行った。

2. 実験結果

1) インゲンマメとアルファルファの混作がインゲン根腐病におよぼす影響

アルファルファ混作区の根褐変指数は、インゲンマメ播種前（A処理）および生育中期（B処理）のアルファ

ルファ播種区とも、対照区と比べ、生育初期にわずかに低下するにとどまり、3, 6 kgの播種量の違いによる差も認められなかった（表VI-10）。一方、インゲンマメの生育は、A処理では畦間に生育したアルファルファのために抑制される傾向にあり、減収した。B処理では、アルファルファは草丈15cm程度の生育であり、インゲンマメの生育が抑制される傾向は認められないが、無処理（+N4）区と収量は同等であった。なお、A、B処理とも播種量の違いによるアルファルファの生育量には差がなく、10月下旬の生育量は播種量が6 kgで、A処理で茎葉、根とも約 $200 \text{ kg } 10\text{a}^{-1}$ 、B処理で同様に約70kgであった。以上のことから、アルファルファの混作による根腐病抑止効果は判然とせず、むしろインゲンマメとの生育競合により減収する可能性があった。

表VI-10 インゲンマメとアルファルファの混作がインゲン根腐病および収量におよぼす影響

処理区 区名	根褐変指数 ¹⁾		子実重 ($\text{kg } 10\text{a}^{-1}$)	同左比 ²⁾	百粒重 (g)
	6月25日	8月8日			
1 混A3	1.21	1.40	164	91	80.8
2 混A6	1.33	1.89	162	90	77.7
3 混B3	—	1.75	221	122	73.9
4 混B6	—	1.90	236	130	75.9
5 無処理A+N4	1.58	1.65	230	127	82.3
6 無処理B+N4	—	2.20	241	133	77.1
7 無処理	1.18	1.65	181	100	81.7

1) —は調査日の時点で処理区なし

2) 同左比は無処理(No.7)を100とした。

表VI-11 インゲン根腐病, 収量におよぼすアルファルファ (AL) の栽培時期, すき込み時期の影響 (連作2, 8年目)

処理区	品種	連作2年目				連作8年目			
		出芽率 6月18日 (%)	根褐変指数 6月24日	収穫期		出芽率 6月18日 (%)	根褐変指数 6月24日	収穫期	
				子実重 (kg 10a ⁻¹)	同左比			子実重 (kg 10a ⁻¹)	同左比
1 連作区		92.6	0.73	125	100	87.8	1.80	77	100
2 AL秋1回区秋	ハートス	93.3	0.31	158	126	91.7	1.75	62	81
	サイテーション	94.4	0.33	161	129	90.0	1.84	71	92
	キタワカハ	96.7	0.41	132	106	91.7	1.33	83	108
	平均	94.8	0.35	150	120	91.1	1.64	72	94
3 AL秋1回区春	ハートス	83.3	0.20	155	124	76.7	2.08	81	105
	サイテーション	71.1	0.47	155	124	75.0	1.72	70	91
	キタワカハ	67.8	0.11	162	130	65.0	1.50	109	142
	平均	74.1	0.26	157	126	72.2	1.77	87	113

1) AL秋1回区春は6月18日において両連作土壌とも生育不良個体が増加した。

表VI-12 インゲン根腐病, 収量におよぼすアルファルファ (AL) の栽培時期, すき込み時期の影響 (連作3, 9年目)

処理区	品種	連作3年目				連作9年目			
		出芽率 6月13日 (%)	根褐変指数 6月21日	収穫期		出芽率 6月13日 (%)	根褐変指数 6月21日	収穫期	
				子実重 (kg 10a ⁻¹)	同左比			子実重 (kg 10a ⁻¹)	同左比
1 連作区		89.1	1.54	109	100	85.1	2.31	54	100
2 AL秋1回区秋	ハートス	85.6	1.34	141	129	95.6	2.03	57	106
	サイテーション	80.0	1.33	113	104	83.3	1.59	71	132
	キタワカハ	85.6	1.22	154	141	87.8	1.57	54	99
	平均	83.7	1.30	136	125	88.9	1.73	61	113
3 AL秋1回区春	ハートス	86.7	1.23	106	97	81.1	1.81	56	103
	サイテーション	81.1	0.72	109	100	92.2	1.73	60	111
	キタワカハ	95.6	1.27	100	92	92.2	1.70	44	82
	平均	87.8	1.08	105	96	88.5	1.75	53	98
4 AL秋2回区秋	ハートス	93.3	0.89	123	113	70.0	1.62	61	113
	サイテーション	90.0	0.94	118	109	95.6	1.96	72	133
	キタワカハ	83.3	0.74	116	106	85.6	1.67	79	146
	平均	88.9	0.86	119	109	83.7	1.75	66	122
5 AL秋2回区春	ハートス	91.1	1.02	136	125	84.4	1.50	61	113
	サイテーション	88.9	0.73	139	128	91.1	1.91	71	131
	キタワカハ	87.8	1.04	137	126	90.0	1.75	85	157
	平均	89.3	0.93	138	127	88.5	1.72	72	133
6 AL交互作区	ハートス	82.2	0.90	185	170	95.6	1.81	101	187
	サイテーション	95.6	1.13	151	139	72.2	1.66	86	160
	キタワカハ	75.6	1.09	157	144	81.1	2.10	106	195
	平均	84.4	1.04	165	151	83.0	1.85	98	181

1) 連作3年目の3区は土壌乾燥程度が大きかった。

2) インゲンマメ連作土壌におけるアルファルファの栽培時期、すき込み時期が根腐病におよぼす影響

連作8年目のアルファルファ秋1回区秋すき込み処理を除き、全般にアルファルファ秋作付区および交互作区で根腐病が軽減され、アルファルファ秋作付区においては平均10～30%程度の増収効果が認められた(表VI-11, 12)。アルファルファ交互作区では秋作付区よりも大きく50～80%の増収効果が認められた(写真5 a, b, c, d)。なお、アルファルファ交互作区で前年秋にアルファルファの茎葉を搬出したのは、還元有機物量をなるべく減らすことを目的とした。各連作土壌、年次においてアルファルファ品種間での明らかな差は認められなかった。アルファルファの根腐病抑止効果は、発病の少なかった連作2, 3年目圃場で大きく、連作8, 9年目圃場では根褐変が改善されるものの、増収効果は小さいといえる。アルファルファ秋作付区の作付回数では、1回よりも2回の方がやや効果が大きかった。インゲンマメ作付時期の前年秋と当年春のすき込みの時期の差については、判然としなかった。なお、アルファルファの秋すき込み時の生育量は年次により変動はあるが、いずれの品種でも草丈3～5 cmで被覆度は小さく、茎葉、根とも40～50 kgであり、春すき込み時では同様に5～7 cm、茎葉50～100 kg、根40～50 kg $10a^{-1}$ であった(写真4)。またアルファルファ交互作区のアルファルファ根量は10 cm深で450 kg $10a^{-1}$ であった。当年春のすき込み処理において、1993年のように播種後低温、多雨に経過した場合には、インゲンマメの出芽不良を起こす場合があり、この原因と

して春のすき込みの時期(5月中旬にロータリーすき込み)が遅かったと考えられ、注意が必要である。しかし1994年には4月下旬および5月上旬の2回のロータリー攪拌を行い、天候も良好に経過したため出芽率の低下は認められなかった。

3) 土壌を異にした連輪作圃場におけるアルファルファの栽培時期、すき込み時期を変えた場合の根腐病抑止効果

褐色低地土-1, 2試験地では秋作付2回区(秋すき込み)および交互作区ともインゲンマメ連作区よりもほぼ根腐病が軽減され増収効果も高かった(表VI-13)。また交互作で秋作付2回区よりもやや優った。淡色黒ボク土試験地においては、対照として用いた連作区の根褐変指数が小さく、抑止効果は判然としないが、増収効果は認められた。また、3試験地とも、アルファルファ作付による増収効果は、エンバク、バレイシヨ等の作物による輪作と同等かやや大きいことが認められた。

4) 前作を異にしたインゲンマメに対するアルファルファの根腐病抑止効果

バレイシヨ跡地、コムギ跡地とも輪作区であるため根褐変指数が小さく、アルファルファ栽培が根腐病におよぼす影響は小さかったが、バレイシヨ跡地ではアルファルファの栽培により、インゲンマメの初期生育が増加し、増収効果が高かった(表VI-14)。コムギ跡地における増収効果は小さかった。この理由として、コムギ跡地のほうが収量レベルが高くアルファルファの作付効果が小さかったものと推察される。前年10月下旬のアルファルファ生育量は、バレイシヨ跡で草丈10～15 cm(茎葉重で約100 kg)、コムギ跡で5～8 cm(茎葉重で約70 kg)であった。なお、アルファルファの春すき込みがインゲンマメの播種2日前と遅れ、バレイシヨ跡地でやや出芽率が低下したが、間引きによる株立て本数の範囲内であったため、とくに問題ないものと考えられた。

表VI-13 インゲン根腐病および収量におよぼすアルファルファ(AL)の栽培時期、すき込み時期の影響(現地試験)

試験地 処理区	出芽率 (%)	根褐変指数 6月20日	収穫期	
			子実重 (kg 10a ⁻¹)	同左比
淡色黒ボク土				
1 3年連作区	95.6	0.62	184	100
2 AL秋作付2回区	97.8	0.36	203	110
3 AL交互作区	93.9	0.30	190	103
4 輪作区	93.3	0.59	207	113
褐色低地土-1				
1 3年連作区	95.0	2.03	204	100
2 AL秋作付2回区	96.7	1.42	239	117
3 AL交互作区	88.3	1.10	262	128
4 輪作区	91.7	1.22	227	111
褐色低地土-2				
1 3年連作区	92.2	1.56	120	100
2 AL秋作付2回区	78.3	1.59	147	123
3 AL交互作区	85.6	1.01	151	126
4 輪作区	93.9	1.10	146	122

褐色低地土-2試験地は土壌乾燥による出芽不良が認められた。

第3節 インゲン根腐病に対するアルファルファの抗菌性発現要因

これまでに、インゲン根腐病を抑制する作物種のうち、導入に供しやすいアルファルファがかなり有望と考え、作付方式を検討した。本節ではアルファルファによるインゲン根腐病抑止効果の抗菌性発現要因についてさらに検討を加えた。

表VI-14 前条件を異にする圃場におけるアルファルファ（AL）栽培がインゲン根腐病および収量におよぼす影響

処理区	前作条件	6月14日 出芽率 (%)	6月23日 根褐変指数	7月28日 茎葉重 (g/株)	9月4日 子実重 (kg 10a ⁻¹)	同左比 ¹⁾
1 AL作付なし	バレイショ跡地	90.3	1.11	11.1	142	100
2 AL作付あり	ク	76.7	1.07	15.3	182	128
3 AL作付なし	コムギ跡地	88.3	1.09	13.9	198	100
4 AL作付あり	ク	87.7	0.64	12.8	206	104

1)それぞれの前作条件でのAL作付なし区を100とした。

1. 実験方法

1) インゲン根腐病に対するアルファルファの部位別抑止効果の比較

インゲンマメ連作8年目土壌（1993年）において、6月28日にアルファルファ（品種キタワカバ、1992年より栽培し同日に収穫したもの）の茎葉、根を10cm程度に裁断したもの各新鮮物500gを1㎡枠に15cmの深さまですき込み、50日後の8月18日にインゲンマメを播種し、2週間後に根褐変指数を調査した。また同じ枠を用いて連作9年目（1994年）の5月31日にインゲンマメを播種し、再度根褐変指数を調査した。

2) アルファルファの栽培ならびにすき込みによる土壌微生物特性への影響

第1節、実験2）において、1993年春における各緑肥作物跡地土壌（インゲンマメ作付前）の微生物相および同年秋における緑肥作物栽培後の微生物活性を調査した。また第2節、実験2）および3）における土壌微生物活性を調査した。

3) 機器分析によるアルファルファ根の抗菌性物質の推定

根腐病菌に対する抗菌活性ならびに根腐病抑止効果の最も高かったアルファルファの根について、含有される抗菌性物質を機器分析により検討した。

a. 供試植物体の準備

第1節、実験1）の結果から、生育約50日のアルファルファによるインゲン根腐病菌に対する抗菌活性は、根が茎葉よりやや高く、本実験では新鮮根を供試することとした。十勝農試圃場において、夏期に品種バートスを約70日間栽培し、収穫後、根に付着した土壌を水洗し以下の実験に供するために-25℃で保存した。

b. 抗菌性物質の抽出溶媒

最初に、水、アセトン、メタノール3者を用いて出発点の抽出溶媒の検討を行った。第1節に述べたバイオアッセイの方法により病原菌*F. solani*ならびに*F. oxysporum*に対する抗菌活性を調査した結果、メタノール抽出物の抗菌活性が最も強く、抽出効率も考慮し、70%メタノールを使用することとした。

c. 抗菌性物質の分画

-25℃に保存しておいた新鮮根250g(乾物63.5g)を70%メタノール1200mlでホモジナイズし、1日間、室温で抽出し、吸引ろ過した。その後、800mlの70%メタノールで2日間毎の再抽出を行い、1, 3, 5日目の3回合計で約2700mlの抽出液を得た。この抽出液を減圧濃縮し約500mlとした後、4℃に冷蔵保存した。減圧濃縮物は以下のように3分画した。まず酢酸エチル200mlで3回振とう分液を繰り返し、合計300mlの酢酸エチル抽出液を得た(酢酸エチル抽出画分)。続いて、残りの水層をn-ブタノール100mlで3回振とう分液を繰り返し、合計約600mlのn-ブタノール抽出液(ブタノール抽出画分)を得た。これらの画分を減圧濃縮乾固し、真空デシケータで乾燥後収量を測定した。残りの水層約400mlは、凍結乾燥した(水画分)。以上を第1段階の分画とし、いずれの画分も前記の2菌株を供試したバイオアッセイを行った。

ブタノール画分は、カラムクロマトグラフィーを用いてさらに6分画した。すなわちシリカゲルカラム(ワコーゲルC-200, 40g, 300mm×20mm i.d.)に溶出溶媒(クロロホルム-メタノール系)を加えスラリー状にし、これをガラスカラムに流し込んで一晩放置したものに、シリカゲルに吸着させたブタノール画分をのせ、クロロホルム-メタノール(V/V)=95:5, 90:10, 80:20, 70:30, 50:50, 0:100の6溶媒各200mlを段階的に流し、各画分を集め、濃縮乾固した。各画分の番号を順にFr1~6とした。これを第2段階の分画とする。次に、

上記のクロマトグラフィーによって得た最も抗菌活性の大きい画分(Fr 4, 70:30)のうち, 抗菌性の認められた画分(Fr 4-1)を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)でさらに細分画し, 2つの画分を得た。分取条件は以下の通りである。ポンプ：日本分光880-PU型, RI検出器：日本分光880-RI, カラム10mm i.d.×300mm, YMC AM 324 ODS, 溶出溶媒：メタノール-水=98:2, 溶出速度2.5ml/min。これを第3段階の分画とする。

d. 機器分析による2つの抗菌性物質の推定

上記の高速液体クロマトグラフィーによって得られた画分のうちFr 4-1画分を濃縮乾固後, その50mgを2mlのピリジンに溶解し, その後1mlのacetic anhydrideを加え, アセチル化した。12時間後に酢酸エチル(20ml, 3回)で抽出し, HPLC(SiO₂ Lincrosorb SI60, 250mm×7.5mm i.d., n-hexane-EtOAc 60:40, V/V)およびpreparative TLC(Merck silica gel 60F-254, n-hexane-EtOAc 50:50, V/V)により, 2つのアセチル化物, 1(20mg), 5(5mg)を得た。

この2つのアセチル化物についてNMR(核磁気共鳴)スペクトルを日本電子EX-270を用いて重メタノールで測定した。ケミカルシフトは, ¹H-NMR(270MHz)を δ H 3.35ppmとして, ¹³C-NMR(67.5MHz)を δ C 47.1ppmとして記録した。IRスペクトルは, 島津IR-435を用いてKBr錠剤法で行った。FAB-MSは島津KRATOS CONCEPT-II-Hを用いて測定した。旋光度は日本分光DIP-370旋光計を用いて測定した。

4) アルファルファサポニンの添加が根腐病におよぼす影響

インゲンマメ連作10年目土壌を供試し, 150ml容のガラスビンに生土130gを充填し, アルファルファ根より抽出した粗サポニン(ブタノール抽出物)15mgおよび100

mgを添加混合した。なお, この15mgの添加量は0.56g/ビン(約1500kg 10a⁻¹相当)の根をすき込んだものと仮定し, 前項実験3)の結果から根に含まれる粗サポニン含有率を2.6%として換算した。1ビンあたり2粒のインゲンマメ種子を播種し, 播種15日後の根褐変指数, 生育を調査した。

5) 土壌中におけるアルファルファ植物体の分解が各種作物の出芽におよぼす影響

アルファルファ(品種キタワカバ)の茎葉, 根を供試し, 生土壌3kgに対し, 茎葉2kgm⁻²に相当する量の茎葉新鮮物(57g), 根新鮮物(12g)を5cmに裁断後混和し, 25℃で培養した。混和1日後, 2週間後に混和土壌を採取し, この土壌を用いて各種作物に対する出芽試験を行った。供試作物は, インゲンマメ, コムギおよびハツカダイコンを用い, 100ml容のビーカーあたり110gの土壌を充填し, 播種量をそれぞれビーカーあたり, 2, 8, 5粒とし, 4反復で行った。混和1日後土壌は, 播種6日目の出芽および生育, 混和2週間後土壌は播種8日目の出芽と10日目の生育について調査した。

2. 実験結果

1) インゲン根腐病に対するアルファルファの部位別抑止効果の比較

アルファルファすき込み1年目の対照区の根褐変指数は, インゲンマメの栽培時期が遅かったためか小さかったが, すき込みにより根褐変指数は低下し, 部位別の抑制程度は茎葉よりも根でやや大きかった(表VI-15)。2年目に行ったインゲンマメの通常の栽培時期の調査では, アルファルファ根のすき込みによる根腐病抑止効果が大きかった。

表VI-15 インゲンマメ連作土壌におけるアルファルファ(AL)茎葉・根のすき込みがインゲン根腐病, 生育におよぼす影響

処理区	93年9月3日			94年6月20日		
	根褐変指数	乾物重(g/株)		根褐変指数	乾物重(g/株)	
		茎葉	根		茎葉	根
対照区	1.49	1.58	0.23	2.47	0.88	0.07
AL茎葉すき込み	0.76	1.69	0.27	1.91	0.85	0.07
AL根すき込み	0.52	1.56	0.28	1.62	1.05	0.10

93年6月28日に茎葉、根とも500gfw/m²をすき込み、8月18日(50日後)に播種。

94年は5月31日播種。

表VI-16 インゲンマメ連作土壌における緑肥作物の作付土壌微生物特性におよぼす影響*

処理区	細菌数	CV耐性菌数	蛍光性	放線菌数	糸状菌数	<i>Fusarium</i> 属菌数
	(10^6 g^{-1})	(10^5 g^{-1})	<i>Pseudomonas</i> (10^4 g^{-1})	(10^6 g^{-1})	(10^4 g^{-1})	(10^2 g^{-1})
対照 (連作)	15.8	17.5	2.7	7.71	11.3	31.0
エンバク	11.6	10.5	8.3	6.14	10.7	17.8
レバナ	14.9	26.3	16.5	7.89	14.1	24.4
アカクローバ	12.2	10.4	4.1	7.30	11.3	55.0
アルファルファ	11.7	14.0	33.0	6.13	9.3	16.6

処理区	土壌呼吸量	フォスファターゼ活性	セルラーゼ活性	培養N
	($\text{mgC } 100\text{g}^{-1}$)	($\text{nmol g}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	($\text{mgN } 100\text{g}^{-1}$)	
対照 (連作)	23.7	18.2	2.8	1.7
エンバク	27.0	17.4	3.0	2.0
レバナ	25.4	18.2	3.3	2.7
アカクローバ	26.8	17.9	3.5	2.0
アルファルファ	27.9	18.6	3.6	1.6

*上段：微生物相、下段：微生物活性

微生物相：93年5月21日、微生物活性：同10月28日(緑肥栽培後)

表VI-17 アルファルファ (AL) の栽培が土壌化学性および微生物特性におよぼす影響*

処理区	5月20日			7月14日		
	トルオーグリン酸 ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$)	熱抽N ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$)	交換性カリ ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$)	土壌呼吸量 ($\text{mgC } 100\text{g}^{-1}$)	バイオマスC ($\text{mgC } 100\text{g}^{-1}$)	培養N ($\text{mgN } 100\text{g}^{-1}$)
1 連作区	6.8	4.0	21.4	16.3	7.5	1.6
2 AL秋1回区春	6.2	4.4	22.2	16.7	9.6	1.5
3 AL秋2回区春	5.7	5.3	17.7	15.3	10.6	2.5
4 AL交互作区	9.3	4.4	23.5	19.4	10.8	2.5

*表VI-12の土壌 1994年の連作9年目土壌を分析

2) アルファルファの栽培ならびにすき込みによる土壌微生物特性への影響

第1節、実験2)における1993年春の各緑肥作物跡地土壌(インゲンマメ作付前)の微生物相をみると、緑肥作付の有無にかかわらず細菌、CV耐性菌など一般微生物にはあまり差がないが、蛍光性*Pseudomonas*属菌は緑肥作物跡地で増加する傾向を示し、アルファルファの栽培跡地でとくに高まった。また*Fusarium*属菌数はアルファルファ区で減少する傾向であった(表VI-16)。なお、一般微生物の結果は第1節実験1)のポット試験結果と傾向が一致した。一方、緑肥栽培後の土壌微生物活性はセルラーゼ活性および土壌呼吸量がやや高まるが、その程度はそれほど大きくなかった(表VI-16)。また、第2節、実験2)および3)の農試場内および現地圃場における土壌化学性、微生物活性を調査した(表VI-17, 18)。インゲンマメの連作区(対照区)に比べ、アルファルファ秋作付区およびアルファルファ交互作区で土壌呼吸量、バイオマス、および培養Nなどの微生物活性が高まる場合が認められたが、試験地により明瞭でなかった。土壌化学性に関しては、アルファルファ栽培による影響は明らかでなかった。

以上の結果から、アルファルファの秋作付における土壌微生物活性の増加程度は小さく、一般土壌微生物相への影響も小さいが、*Fusarium*属菌数の減少および蛍光性*Pseudomonas*属菌の増加など一部の微生物相に対する効果が認められた。

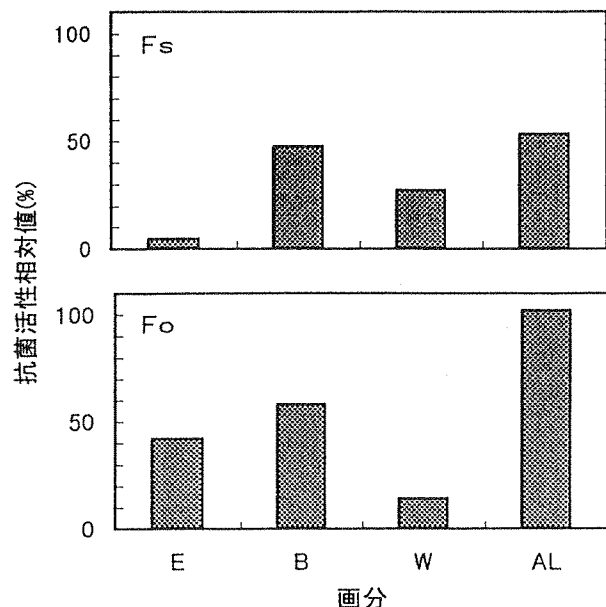
表VI-18 アルファルファ (AL) の栽培および輪作が土壌微生物特性におよぼす影響

試験地 処理区	土壌呼吸量 ($\text{mgC } 100\text{g}^{-1}$)	バイオマスC ($\text{mgC } 100\text{g}^{-1}$)	培養N ($\text{mgN } 100\text{g}^{-1}$)
淡色黒ボク土			
1 3年連作区	13.8	11.9	1.8
2 AL秋作付2回区	21.1	10.2	2.5
3 AL交互作区	22.1	13.9	3.1
4 輪作区	29.0	11.5	2.4
褐色低地土-1			
1 3年連作区	14.1	10.9	1.7
2 AL秋作付2回区	13.4	11.0	1.8
3 AL交互作区	14.9	14.1	2.0
4 輪作区	12.6	12.3	1.3

*表VI-13の土壌 94年7月14日調査

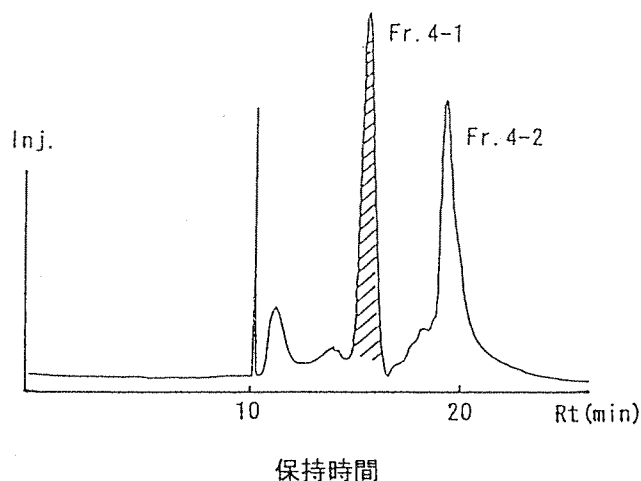
3) 機器分析によるアルファルファ根の抗菌性物質の推定

酢酸エチル (E), ブタノール (B), 水 (W) の順番に分画を進めた結果, E, B, W画分は, それぞれ乾物で0.1712 g, 5.2059 g, 8.911 g得られた。この第1段階のE, B, W画分の抗菌活性を検討し, シクロヘキシミド 300mg L^{-1} の活性を100とした相対値で示した (図VI-2)。なお, 供試した各画分の量は, 比較に用いたALの新鮮物1:5抽出物から換算した量に合わせた。以下のバイオアッセイについても同様である。この中では,



図VI-2 70%メタノール抽出後の3画分における *F. solani* f.sp. *phaseoli* (Fs) および *F. oxysporum* (Fo) に対する抗菌活性の相対値*

E: 酢酸エチル, B: n-ブタノール, W: 水,
AL: メタノール抽出液 (比較)
*シクロヘキシミド 300mg L^{-1} を100とする比で表示



図VI-3 HPLCによるFr 4の分画
斜線部 (Fr 4-1) を機器分析に供試。

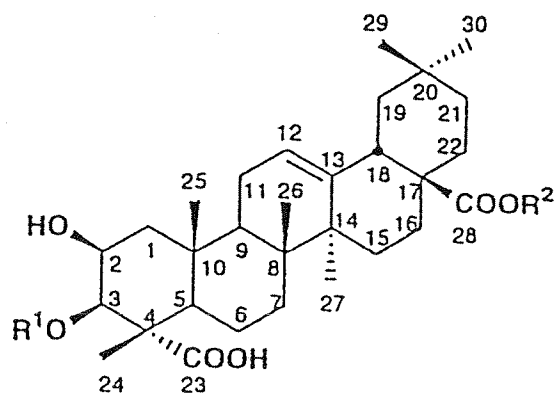
Fs (*F. solani*), Fo (*F. oxysporum*) とともにB画分が最も高い活性を示した。このB画分について, シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって, フラクション(Fr) 1~6の部分に分け, それぞれの抗菌活性を同様に測定し, 両病原菌に対して最も大きい画分Fr 4 (収量418.1mg)についてさらにHPLCによる分画を行い, NMR分析に供した。

図VI-3には, Fr 4の逆相のODSカラムを用いて分画したHPLCのチャートを示した。ここでは2本の大きなピークが出現したが, 鋭敏ではなく, 混合物と考えられた。なおここでFr4-1は97.4mg, 4-2は148.6mg得られた。この2成分について抗菌活性を調査したところ, Fr4-1 (78mg kg^{-1} に濃度を調整) についてのみ抗菌活性が認められ, 4-2には認められなかった。このことから, クロマトグラムの斜線で示す鋭敏なFr4-1を機器分析に供試することとした。Fr4-1をアセチル化した結果, 2つの成分1 (20mg) および5 (15mg) が得られた (図VI-4)。

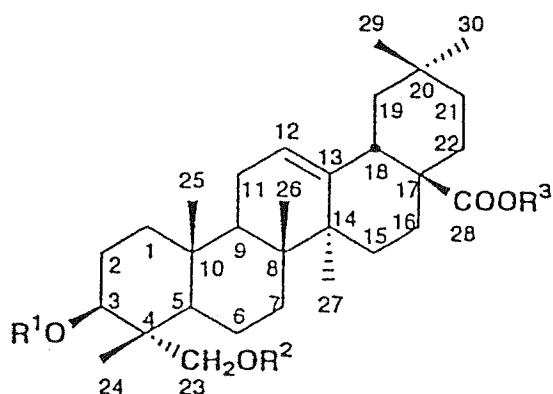
2-acetoxy-3-O- β -D-tetraacetylglucopyranosyl-medicagenic acid (1),

colorless syrup, FABMS m/z 913.4 $[M+K]^+$,
[α] $_D^{20} = +39.4^\circ$ ($c=0.48$, CHCl_3); IR KBr cm^{-1}
3400, 1760, 1380, 1235, 1050.

化合物1は, 無色シロップ状で, FABMSデータから分子量は874であった。化合物1の ^1H NMRスペクトルでは, 6つのシングレットメチル (δ H 0.75, 0.91, 0.92, 1.11, 1.25, 1.33) と5つのアセチル基由来のメチルシグナル (δ H 2.00, 2.02×3 , 2.08) とともに, δ H 3.7-5.2ppmに糖に由来する多重分裂して重なったプロトンシグナルが観測された。これらの糖由来のシグナルは, 互いのカップリング定数が8.1-9.7Hzで, 環上でアキシアル配置をとることが考えられた。さらに, アノメリックプロトンのシグナルと考えられる δ H 4.57のシグナルは $J=8.1\text{Hz}$ のダブルットシグナルで, 化合物1はアセチル化された β -glucosideと考えられた。化合物1と既知の化合物4のNMRデータの比較^{100, 101)}は, ^{13}C NMRで化合物1のシグナルが糖部分のシグナルを除いて化合物4のそれとよく類似していることから, 化合物1がアセチル化されたmedicagenic acid (3)の配糖体であることを示唆した。さらに化合物1の $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY, $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ COSY, COLOCの測定により, 化合物1の構造は3-O- β -D-glucopyranosyl-medicagenic acid (2)のアセチル化物であることが判明した。



- 1 : R¹=tetraacetyl-*O*-β-D-glucopyranosyl, R²=H
 2 : R¹=*O*-β-D-glucopyranosyl, R²=H
 3 : R¹=R²=H
 4 : R¹=tetraacetyl-*O*-β-D-glucopyranosyl, R²=diacetyl-*O*-β-D-xylopyranosyl-(1-4)-diacetyl-α-L-rhamnopyranosyl-(1-2)-triacyl-α-L-arabinopyranosyl



- 5 : R¹=diacetyl-*O*-α-L-arabinopyranosyl-(1-2)-tetraacetyl-β-D-glucopyranosyl-(1-2)-triacyl-α-L-arabinopyranosyl, R²=Ac, R³=H
 6 : R¹=*O*-α-L-arabinopyranosyl-(1-2)-β-D-glucopyranosyl-(1-2)-α-L-arabinopyranosyl, R²=R³=H
 7 : R¹=R²=R³=H
 8 : R¹=diacetyl-*O*-α-L-arabinopyranosyl-(1-2)-triacyl-β-D-glucopyranosyl-(1-2)-triacyl-α-L-arabinopyranosyl, R²=Ac, R³=tetraacetyl-*O*-β-D-glucopyranosyl

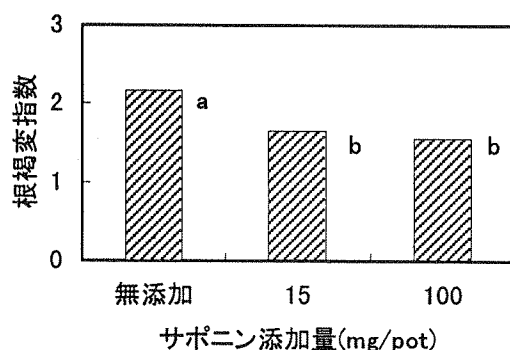
図VI-4 本実験で存在が判明したアルファルファサポニン(2, 6)と類縁物質の化学構造

2, 3-acetoxy-3-O-[α -L-diacetyl-arabinopyranosyl-(1-2)- β -D-triacetylglucopyranosyl-(1-2)- α -L-triacetyl-arabinopyranosyl]-hederagenin (5).

colorless syrup, HR-FABMS m/z 1299.58299 [$C_{64}H_{92}NaO_{26}$ Calc. M, 1299.57748] [α] $_D$ +45.0° (c=0.48, $CHCl_3$); IR KBr cm^{-1} 3400, 1760, 1235, 1050.

化合物5は、無色シロップ状で、FABMSのデータから分子量1276であった。化合物5の 1H NMRは、6つのシングレットメチル (δ H 0.76, 0.78, 0.91, 0.93 $\times$ 2, 1.12) と9つのアセチル基由来のメチルのシグナルが、 δ H 3.5-5.3ppmに糖に由来する多重分裂して重なったプロトンシグナルが観測された。化合物5と既知の化合物8のNMRデータの比較^{100, 101)}は、 ^{13}C NMRで化合物5のシグナルが糖部分のシグナルを除いて化合物8のそれとよく類似していることから、化合物5がアセチル化されたhederagenin (7)の配糖体であることを示唆した。さらに化合物5の 1H - 1H COSY, ^{13}C - 1H COSY, COLOCの測定により、化合物5の構造は3-O-[α -L-arabinopyranosyl-(1-2)- β -D-glucopyranosyl-(1-2)- α -L-arabinopyranosyl]-hederagenin (6)のアセチル化物であることが判明した。

これらの結果から、Fr 4-1は図VI-4中のオリジナルのサポニン2と6の混合物と考えられる。抗菌活性もFr 4-1に認められており、これらのサポニン類がアルファルファの抗菌活性発現に関与している可能性が大きいと考えられた。



図VI-5 インゲンマメ連作土壌におけるアルファルファサポニンの添加がインゲン根腐病におよぼす影響*

*同一文字を含む処理間にt検定(5%)による有意差なし。

4) アルファルファサポニンの添加が根腐病におよぼす影響

粗サポニンの添加により、根腐病の抑制効果が認められた(図VI-5)。しかし、添加量15mg区および100mg区における効果の差は認められなかった。

5) 土壌中におけるアルファルファ植物体の分解が各種作物の出芽におよぼす影響

アルファルファ混和1日後と2週間後の土壌における各作物で生育量の量的比較はできないが、インゲンマメでは、出芽率にはアルファルファ混和の影響はなく(表VI-19)、生育量は混和1日後でアルファルファ根混和区がやや減少したものの、2週間後には差がなかった。ハツカダイコンでは、出芽率、生育量ともに混和1日後でアルファルファ茎葉、根混和とも明らかに低下し、根混和でやや強かったが、2週間後の土壌ではいずれの処理も差がなかった。コムギでも両者とも混和1日後でや

表VI-19 アルファルファ(AL)の土壌混和が作物の出芽および生育におよぼす影響

処理区 項目	インゲンマメ		ハツカダイコン		コムギ	
	混和1日後	2週間後	混和1日後	2週間後	混和1日後	2週間後
出芽率(%)						
対照(無添加)	87.5 a	100.0 a	31.4 a	25.0 a	55.0 a	100.0 a
AL茎葉	100.0 a	100.0 a	9.4 b	25.0 a	45.0 a	95.0 a
AL根	87.5 a	100.0 a	6.5 b	34.4 a	45.0 a	95.0 a
生育量(茎葉+根乾物mg) *						
対照(無添加)	912 a	999 a	84	41	69 a	84 a
AL茎葉	865 a	920 a	29	54	53 a	79 a
AL根	722 a	944 a	25	50	54 a	74 a

*生育量の数字はインゲンマメ、コムギはピーカーあたり、ハツカダイコンは4ピーカーの合計量。同一文字間にt検定による有意差なし。ただしハツカダイコンは検定せず。

や低下するが、2週間後には差が認められなかった。これらのことから、アルファルファの茎葉、根の土壌混和により作物の出芽、生育に対し阻害作用が認められる場合があるものの、緑肥のすき込み時において通常2週間程度必要とされるすき込み後の放置期間¹⁴⁵⁾の範囲内におさまると考えられる。

第4節 考 察

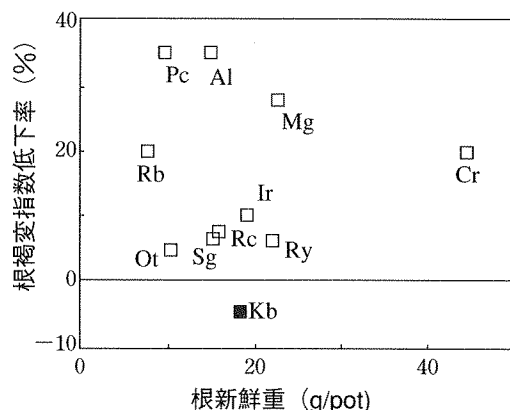
難防除病害であるインゲン根腐病について、現行の作物を用いた輪作体系の改善や土壌理化学性による抑止対策に加えて、新規の導入作物を用いた作付体系の改善、すなわち作物間相互作用の利用により抑止対策の確立を図った。新規作物の検索を行い、実際の輪作への効果的な導入方法ならびにその抗菌作用の発現について論議した。

1) 異種作物による根腐病抑止効果の発現機作

土壌病原菌に対する異種作物の抗菌活性の発現には、①何らかの抗菌性物質が異種作物の根から滲出する場合と、②栽培後の残渣（残根）の分解に伴ってそれが放出される場合が推定され、土壌中でこれらの抗菌性物質は拡散、移動し、病原菌に対し直接的な抗菌活性を示すと考えられる。実際の作付体系下における根腐病の抑制を目的とした異種作物の栽培法としては、前者には混作（間作）が、後者には輪作が該当するであろう。一方、③根や残渣からは抗菌性を持たない他の物質も滲出、放出されるため、これまで本研究で述べてきたように、それらが土壌微生物相に及ぼす影響を介して間接的な静菌効果を示す場合があると推定される。まず52種の作物を供試した搬出処理系列を考えてみると、この処理では地上部とともにできるだけ残根も除去するようにしたので、②の残根の分解に伴う抗菌活性の発現は考えにくい。各作物根のメタノール抽出物の抗菌活性と根腐病抑止効果のバラツキの結果は、土壌における根滲出物の病原菌に対する影響を調査する必要があることを示すと同時に、異種作物が抗菌性物質を滲出してから、抗菌活性が発現するまでの時間やその持続期間を調査する必要があるを示している。本実験の結果は異種作物の栽培期間を約50日に限定したものであるが、栽培期間の長短によっては異なった反応を示す作物種も存在すると思われる。

さらに異種作物根から滲出した物質の直接的な抗菌活性と根腐病抑止効果とが必ずしも一致しない要因として、根圏効果の影響も考慮する必要がある。すなわち根から滲出される抗菌性物質の活性に加えて、同一容積土

壤（1/5000aポット）内の根量（あるいは根表面積）の違いを考慮する必要がある。図VI-6には前処理において栽培した緑肥作物の根量と搬出処理系列における根腐病抑止効果との関係を示したが、全般にみると両者の間に相関は認められなかった。ただしトウモロコシの



図VI-6 緑肥作物収穫時の根重と搬出処理系列におけるインゲンマメの根腐変指数低下率の関係

インゲンマメ：Kb，トウモロコシ：Cr，エンバク：Or，ライムギ：Ry，ソルゴー：Sg，イタリアンライグラス：Ir，レバナ：Rb，ペルコ：Pc，マリーゴールド：Mg，アルファルファ：Al，アカクロバ：Rc

搬出処理系列区で20%の抑止効果が認められた一つの要因は、根量がかかなり多かったことにあるかも知れない。前作がトウモロコシ跡である場合にアズキ落葉病菌が抑制されることが認められているが、コムギやダイズに比べてトウモロコシの単位土壌容積あたりの根長が大きいことが抑制効果を大きくさせる要因であると報告されている¹⁵⁴⁾

すき込み処理系列における残渣（茎葉、根）の根腐病抑止効果は、それ自身が抗菌性を保持することによる場合と、抗菌性を持たず単に新鮮有機物として土壌微生物の基質になり、他の土壌微生物の生育が病原菌の生育よりも旺盛になる結果、間接的に病原性が抑制される場合が考えられる。当然、後者ではその逆に病害を助長する現象も起こり得るが、この間接的な影響は搬出処理系列に比べ少なくないと推測される。前者の場合でも、何らかの抗菌性物質による*Fusarium*属菌の抑止効果と、一方では栄養源としての増殖効果という相反する性質を持つと考えられるので抑止効果の発現に当たっては要因が複雑である。本報告では、抗菌活性の測定はメタノール可溶性画分で行ったので、その他の不溶性画分については不明であり、このことも抑止効果と抗菌活性が必ずしも対応しなかった一要因とも考えられる。

2) アルファルファの抗菌性発現要因と輪作体系下の作付方式

本研究では、根腐病抑止効果の高い緑肥作物としてアルファルファに注目した。これまでに、アルファルファの施用がインゲン根腐病を軽減したとの報告はあるが⁹⁷⁾、実用的な輪作体系下での作付利用や根腐病菌に対する抗菌性の発現要因について検討した例はみあたらない。本章第1節で行ったポット試験の結果について、圃場レベルでアルファルファ(AL)の抗菌性発現要因を作付様式を変えることにより検討した。この結果、①ALの根腐病抑止効果は茎葉、根を搬出しても、すき込んでも同等に認められること、②ALの混作では抑止効果が小さく、逆にインゲンマメは生育抑制を受けること、③ALの部位別には根の効果が大きいこと、④間作による抑止効果は被覆度が小さい程度の生育状況でも軽度の根腐病発生圃場に効果があり、輪作区と同等以上の収量も挙げ得ること、⑤一年間、インゲンマメを休閑しALを栽培した交互作区(茎葉搬出)で最も抑止効果が大きいことなどが、現象的に明らかとなった。

前項1)で行った考察から、アルファルファ茎葉・根からの抗菌性物質の放出、アルファルファ栽培による土壌微生物性の変化、およびアルファルファ残根の根圏効果などが考えられるが、この実験条件ではアルファルファの根系は小さく、根圏効果の要因は考えにくい。また、本実験におけるアルファルファの高い抑止性については、一般微生物性のみでは説明できず、前章で述べた蛍光性*Pseudomonas*属菌他の拮抗的に作用する土壌微生物相、およびその他の要因も考慮する必要があった。とくにアルファルファには、アレロパシーあるいは自家中毒として作用する特性が認められている^{16, 23, 25, 31, 108, 133, 139, 186)}

そこで本実験ではアルファルファに含有される抗菌性成分を検討し、そのうちサポニン類がアレロパシーの原因物質として注目された。すなわち、機器分析により存在が示唆されたmedicagenic acid glycosideはアルファルファに含有される主なサポニンの一つであり、2種のサポニンは高い生物活性を持つ^{90, 91, 135, 139)}。このうちアグリコンのmedicagenic acidは乾物中に0.9~9 g kg⁻¹程度含まれていることが知られている¹⁴⁰⁾。また、土壌微生物に対するこれらサポニンの影響に関しては、既に各種の植物病原菌(*Phytophthora cinnamoni*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum*, *Sclerotinia rolfii*)に対する抗菌活性の測定例も報告されている^{90, 91)}。しかし、アルファルファ根中のサポニン類は16種類以上におよび、分離が難しいことから、個々のサポニン化合物の

全容を明らかにすることは非常に難しいとされ¹⁸⁴⁾、今回の実験においても2種のサポニンの存在が示唆されるにとどまった。そこで、本実験でサポニン類の持つ根腐病抑止効果を判定する際には、根のブタノール抽出物を粗サポニンとして行った。既報でも、同様の方法で得た粗サポニン(ブタノール抽出物)を用いて生物活性が検定されており^{100, 101)}、サポニン類が根腐病を抑制する物質と考え得る。これまで、アルファルファサポニンの研究は、物質構造解析とそれに関連する生物活性の検討例が多く^{22, 133, 135, 139)}、アレロパシー原因物質としての定量的な研究^{134, 186)}が少なかった。さらに作物に阻害的に作用する物質として取り扱われることが多かったが、作物間相互作用の利点をもたらす原因物質として、今後も機能解明を継続させていく必要がある。

ただし、圃場条件における実際の抗菌性の発現は、第3節、実験2)の第1、第2段階の分画試験で、他の画分においても抗菌活性が認められたように、サポニン類のみによって発揮されるものではないことが推測される。また、すき込み残渣物が非常に少ない場合でも抑止効果が認められること、すき込み残渣物が少ない場合でも蛍光性*Pseudomonas*属菌が特徴的に増加する、などの事実があった。アルファルファ秋作付では土壌微生物活性を増加させる効果は小さいが、交互作を含めて考えてみると、微生物活性の向上が根腐病の軽減に寄与した可能性もある。すき込み処理では、抗菌性物質を含有する部位(茎葉、根)とその抗菌活性の程度が問題となるが、すき込むべき作物体の生育時期やその量、およびすき込み後における抗菌性物質の分解程度や、その抗菌活性の持続期間などを、他の土壌微生物への影響も考慮しながら多面的に解析していく必要があろう。現時点では、特異的拮抗作用を含めたこれらの総合的な抗菌性の発現がインゲン根腐病の抑制に結び付いたと考えられるが、少量のアルファルファ根すき込みがもたらす植物ホルモンの効果の有無など不明な点も多い。一方、アルファルファの持つ生育阻害的なアレロパシー作用については、本実験条件では、すき込み後2週間程度の放置により後作に対する問題はなかった。しかし、低温時にはインゲンマメの出芽阻害が認められており、この作用は他の緑肥作物と同様に一般的なもの¹⁴⁵⁾と考えられるが、他の緑肥作物に比べ根のC/N比は比較的高いため、分解が遅れる可能性もある。本研究で、実験を行った以外の作付様式、たとえば何年間かアルファルファを栽培し続けた土壌における根腐病抑止効果や多量の茎葉すき込みの影響を検討できなかった。また、アルファルファの輪作畑導入による雑草増加が観察されることが今後の問

題として残される。しかし、本研究においては、アカクロバ、エンバクなど短い作付期間でも根腐病軽減に有効な緑肥作物を認め、とくにアルファルファのような抗菌活性を有する対抗植物を輪作体系下で利活用する方策を新たに構築することにより、インゲン根腐病を生態的に制御できる可能性を示した。

第5節 まとめ

1) インゲン根腐病を抑止する作物種の検索

- (1) インゲンマメ連作土壌を充填したポット条件下で、野菜、緑肥、ハーブ、花きなど52作物種の作付が後作のインゲン根腐病発生におよぼす影響を検討した。作物体搬出処理では全作物種による抑止効果が認められ、根褐変指数の低下率が31%以上の大きい抑止効果を示した作物種は、ニラ、チンゲンサイ、ペルコ、アルファルファ、スペアミント、コカブなど全体の23%であった。
- (2) 緑肥類10種については、作物体の搬出処理の他にすき込み処理も設けた結果、アルファルファ、ペルコ、マリーゴールドではいずれの処理系列でも根腐病抑止効果が大きかった。搬出処理に比べてすき込み処理で効果が大きい作物はアカクロバ、トウモロコシ、ソルゴーであった。
- (3) これらの異種作物によるインゲン根腐病の抑止要因としては、栽培、すき込みによる土壌微生物相の変化が考えられるが、本実験条件では抑止性を異にする作物間で一定の傾向を見いだせなかったことから、栽培作物自身の持つ抗菌活性に注目した。
- (4) 緑肥作物種の大部分はインゲン根腐病を抑制し、これらの作物を病原菌に対するメタノール抽出物の抗菌活性から、①強：アカクロバ、アルファルファ、②中：マリーゴールド、レバナ、エンバク、③弱：トウモロコシ、ペルコ、ソルゴーの3種に分類した。

2) アルファルファの抗菌性発現要因と輪作体系下の作付方式

- (1) 圃場条件で、インゲンマメ連作土壌に4種の緑肥作物をインゲンマメ収穫直後の秋に後作緑肥として作付しすき込んだところ、アルファルファ、アカクロバ、エンバクに次年度のインゲン根腐病抑止効果が認められ、その効果はアルファルファでとくに大きく、作付2年目に最も高い抑止効果を認めた。
- (2) インゲンマメとアメファルファの混作では抑止効果が小さく、逆にインゲンマメは生育抑制を受けた。
- (3) アルファルファ根のすき込みによる抑止効果は茎葉のすき込み効果よりも大きかった。
- (4) アルファルファの後作緑肥としての抑止効果は、アルファルファの被覆度が小さい場合のすき込みでも、軽度のインゲン根腐病発生圃場に効果があり、輪作区と同等以上の収量を上げた。
- (5) 一年間インゲンマメを休閑しアルファルファを栽培した交互作区（茎葉搬出）で、最も抑止効果が大きかった。
- (6) アルファルファの根に含有される抗菌性成分をバイオアッセイと機器分析により検討した結果、2種のサポニン類、medicagenic acid glycosideおよびhederagenin glycosideが推定され、粗サポニンの土壌施用により根腐病の抑制効果が認められた。
- (7) 一方、アルファルファのすき込み量が少ない場合でも土壌中に蛍光性*Pseudomonas*属菌が特徴的に増加することから、アルファルファの作付による特異的拮抗作用の発現が推察された。また、アルファルファの秋作付では土壌微生物活性を増加させる効果は小さく、微生物活性向上による根腐病抑止効果に対する上記の抗菌性成分の寄与度は小さいと考えられた。
- (8) 後作のインゲンマメに対するアルファルファの阻害的なアレロパシー作用は、アルファルファすき込み後2週間後にインゲンマメを栽培した実験により認められないことを確認した。