

土壤病原菌の腐生生活に関する研究

第2報 *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*,
Pythium aphanidermatum の植物残渣の利用

小 倉 寛 典

(農学部植物病理学研究室)

Studies on saprophytic behaviour of soil borne pathogenic fungi.

II. On utilization of plant debris in soil by *Rhizoctonia solani*,
Fusarium oxysporum and *Pythium aphanidermatum*.

by

Hirosuke OGURA

(Laboratory of Phytopathology, Faculty of Agriculture)

Summary

The components of plant debris utilized by 3 pathogens in soil were studied.

Pythium aphanidermatum utilized well only water soluble substances in debris, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* did these substances, pectin, α -cellulose, β -cellulose, γ -cellulose and hemicellulose, but did not lignin in debris. Every pathogen utilized well nitrogen sources at the beginning of cultivation. In the field contaminated each pathogen, the decrease of weight of rice straw buried in soil was not different in each prot, ie, water soluble substances, pectin, and cellulose were well utilized by soil microorganisms from early period of burying, but lignin was in later. These decreases in soil were more rapidly than that in flask in which the pathogen cultured on rice straw under sterilized condition.

It is considered from these results, that the microflora on straw in soil contaminated each pathogen is recognized no differences in ecological or in physiological, and that *P. aphanidermatum* has only short active period on plant debris for want of nutrients, but other 2 pathogens, especially *F. oxysporum*, exist for a long periods on plant debris competing with other soil microorganisms.

土壤生息的性質を多分に具備した土壤病原菌は、程度に多少の差はあるが、いずれも土壤中において寄主植物の存否にかかわらず何らかの形で養分を獲得し、腐生的生存をしているものと考えられる。この場合、これら病原菌の利用しうる栄養源としては土壤中の可溶性物質、植物残渣、非寄主植物の生活根などが考えられる。しかも、前報⁷⁾において報告したように、*Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium aphanidermatum* が腐生相においてその生活を土壤中に散在する植物残渣に依存する割合はかなり大きいと思われる。

本報告は *R. solani*, *F. oxysporum*, *P. aphanidermatum* の3病原菌が利用しうる土壤中の植物残渣の成分について検討した。

実験材料

供試した病原菌はいずれもキュウリ幼苗を侵す *R. solani* (RS508号菌), *F. oxysporum* (F507号菌), *P. aphanidermatum* (P502号菌) で, 植物残渣はイネわらを用いた。

実験方法ならびに実験結果

1. 病原菌による植物残渣の利用

各病原菌が植物残渣を利用する場合, 残渣に含まれる物質のうちいずれをもっともよく利用するかについて検討した。すなわち, 250 ml 容三角フラスコに長さ5 cm のわらを入れ殺菌したのち, Czapek 培地上におかれた径8 mm のセロファン円板上を伸展した各病原菌を各フラスコに10枚ずつ接種し, 25°C に静置して, 1, 2, 4, 6, 8, 10 週間後にわらを取り出してわらの重量の減少を測定した(第1図)。第1図は接種前のわらの重量を100として各時期の重量を比数で表わした。

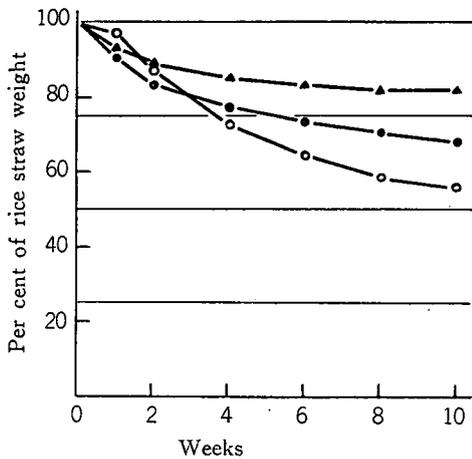


Fig. 1. Decrease of weight of rice straw inoculated pathogens in flask.

●—● *R. solani*
○—○ *F. oxysporum*
▲—▲ *P. aphanidermatum*

わらの成分分析は, 各時期のわらをベンゼン・エチルアルコール(1:1)にて脱脂したのち, 粗く粉砕し, 温水に2時間浸漬して水可溶性物質を抽出した。この残渣を0.5%しゅう酸アンモニウム液に85°Cで1時間浸漬したのちろ過し, ろ液に3倍量の95%酸アルコール(95%エチルアルコール1ℓに塩酸数滴添加)を加えて放冷し, 析出するペクチンを秤量した。ペクチン抽出残渣に72%硫酸を加えて10°Cにて12時間放置後, 水を加えて3%硫酸とし, 1時間静かに沸騰させ, リグニンを秤量した。また, ペクチン抽出残渣に次亜塩素酸ナトリウム10%溶液を加え, 10~15°Cに24時間放置後, 残渣を乾燥し, さらに17.5%水酸化ナトリウム液を加えて1時間後に水洗し, α -セルロースを秤量した。また, 次亜塩素酸ナトリウム処理残渣と α -セルロースとの差をもって β - γ -セルロース, ヘミセルロース混合物とした。また, 全窒素はケルダール法によって測定した。供試したわらの成分比は第1表の通りである。

各病原菌を接種したわらの水可溶性物質の消費率(第2図)については, 3菌のうち, *P. aphanidermatum* は接種後1週間の間にその消費がはげしく, 4週間以降は消費が認められない。これは本菌の生育の低下, 自己消化現象などによるものと考えられる。しかし, *R. solani* や *F. oxy-*

病原菌を接種すると, いずれも時間の経過とともにわらの重量は減少するが, *P. aphanidermatum* を接種した場合には初期のわらの消費がはなはだしく, 1週間以後の減量は次第に少なくなり, 4週間を過ぎればその消費はごくわずかである。これと同じ傾向は *R. solani* でも認められるが, 本菌では接種後10週間を経過してもなおわずかながらもわらの減量が続くようである。しかし, *F. oxysporum* では, 接種後の第1週よりもそれ以後の1週間のわらの減量が大きく, その後のわらの減少の割合は次第に小さくなるが10週間を経てもなお減少が続く。本実験では, わらに菌糸が付着したまま計量しているため, 培養初期には実際のわらの減量は大きくなり, 培養後期には菌糸の自己消化のため減少の割合はやゝ小さくなるものと思われる。

sporum では培養初期には一様に本物質は減少するが、その後は一時増加し、次いでふたたび徐々に減少がはじまる。このことは、これら2菌はわらの中の水可溶性物質を利用するとともに、さらに高分子物質をも利用し、この分解によって水可溶性物質が一時的にわらの中に蓄積し、さらに病原菌がこれを利用するものと思われる。この性質は *R. solani* で大であるが、*P. aphanidermatum* ではほとんど他の物質を利用せず、水可溶性物質を利用して急速に菌量を増すものと考えられる。

ペクチンの消費については(第3図)、*P. aphanidermatum* は本物質をあまり利用しないが、他の2菌はいずれもよく利用し、2週間後にはほとんど検出されない。しかし、ペクチンは脱メチルされると本実験に用いた方法では凝集しないので、病原菌により全く消費されたか、あるいは低分子物質として残存しているかは不明であるが、部分的に分解されたことはたしかであろう。

セルロースの消費については(第4図)、*P. aphanidermatum* は α -セルロースを利用し得ないようであるが、他の2菌はこの物質を利用する。しかも、*R. solani* は α -セルロースを接種後2週間までにかかなりよく利用し、それ以後は次第に利用度が低下する。これに

Table 1. Components of rice straw tested.

Water extract	18.88 %
Pectin	6.42
α -Cellulose	30.58
β -, γ -Cellulose and Hemicellulose	7.72
Lignin	22.61
Total nitrogen	4.42

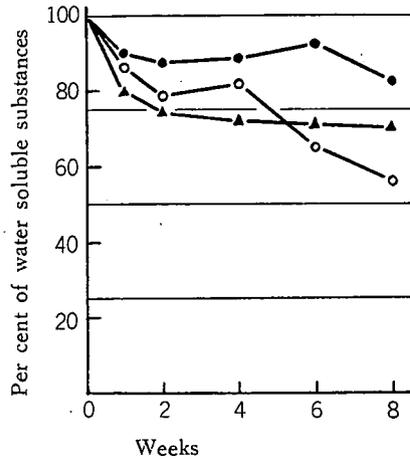


Fig. 2. Water soluble substances in straw digested by pathogens in flask.

●—● *R. solani*,
○—○ *F. oxysporum*
▲—▲ *P. aphanidermatum*

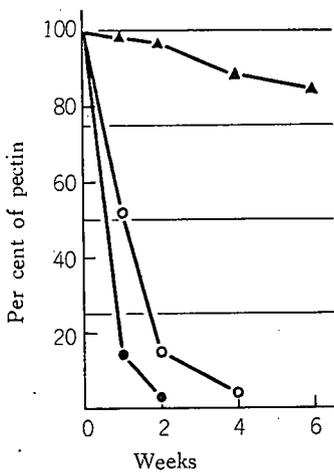


Fig. 3. Pectin in rice straw digested by pathogens in flask.

●—● *R. solani*, ○—○ *F. oxysporum*
▲—▲ *P. aphanidermatum*

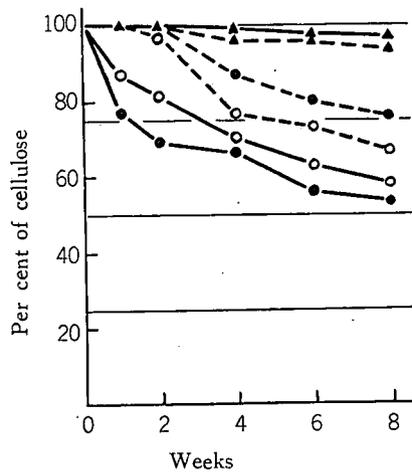


Fig. 4. Cellulose in rice straw digested by pathogens in flask.

—: α -cellulose, ----: β -, γ -cellulose and hemicellulose, ●: *R. solani*, ○: *F. oxysporum*, ▲: *P. aphanidermatum*

対し、*F. oxysporum* は各時期とも大体同じ割合で利用するようである。 α -セルロース以外のヘミセルロースおよび β -、 γ -セルロースでは、*P. aphanidermatum* はほとんど利用せず、また、他の2菌も培養直後から利用するのではなく、*F. oxysporum* では1週間後、*R. solani* では2週間後にこれらの物質の減少が認められる。しかし、後者は前者に比して利用度はやゝ劣るようである。

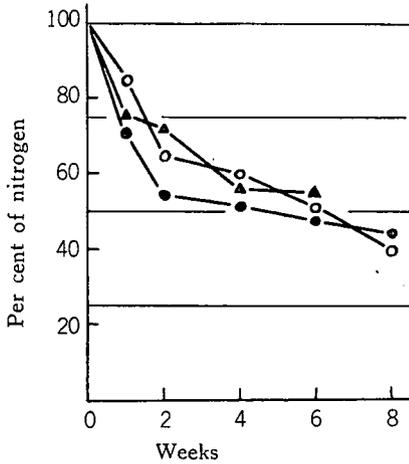


Fig. 5. Total nitrogen in rice straw digested by pathogens in flask.

●—● *R. solani*, ○—○ *F. oxysporum*
▲—▲ *P. aphanidermatum*

各時期別のわらの重量の減少は第6図に示す通りであるが、各病原菌汚染の有無にかかわらず、わらの減少はほとんど同じ傾向を示している。

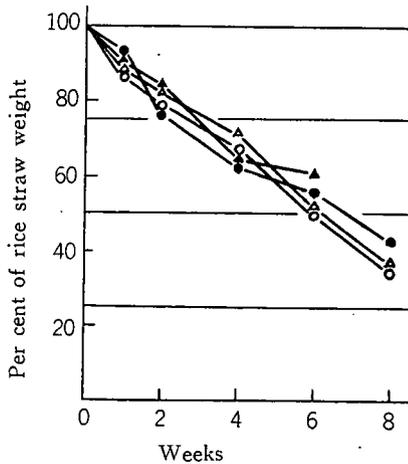


Fig. 6. Decrease of weight of rice straw buried in soil infested by pathogens.

●—● Soil infested by *R. solani*,
○—○ " by *F. oxysporum*, ▲—▲ " *P. aphanidermatum*, △—△ Non infested soil

また、3菌ともリグニンは全く利用しないようである。

わらのもつ窒素源は、3菌とも接種2週間までに急速に消費されるが、それ以後の消費は緩慢である(第5図)。

2. 土壌中における植物残渣の利用

本実験は実験開始前1年間にわたって2、3カ月ごとに各病原菌を混入して放置した汚染圃場を用いた。1区30m²の各病原菌汚染土壌に長さ10cmに切ったわらを深さ5~10cmに全面にすき込み、1、2、4、8週間後に掘出してわらの分解程度を検討した。実験期間中の温度は、地下10cmで最低20°C、最高28.2°Cである。

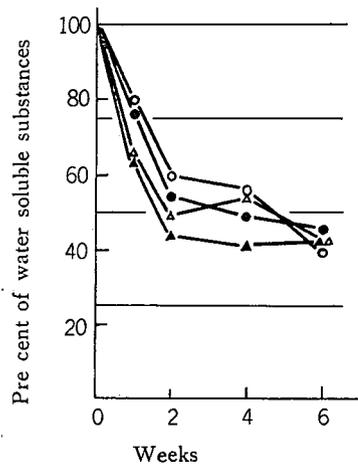


Fig. 7. Water soluble substances in rice straw buried in soil infested by pathogens.

●—● Soil infested by *R. solani*,
○—○ " by *F. oxysporum*, ▲—▲ " *P. aphanidermatum*, △—△ Non infested soil

わらの各成分のうち、水可溶性物質の減少は、各区に多少の差が認められるが、いずれもわらを埋没して2週間以内に急激に減少するが、それ以後はごくわずかしか減少しない。これは、最初に

わらに着生した微生物により本物質が利用されるため減少がおこるが、次いで高級な物質が分解される過程で生産される水溶性物質が検出されるために減少率は低下すると考えられる。土壌中に埋没したわらはは6週間後から次第に腐朽して原型をとどめなくなり、水溶性物質の測定はかなり差を生じてくるので、6週間以降の測定は中止した(第7図)。

ペクチンの消費は、*R. solani* 汚染土壌がもっとも早く、2週ンを過ぎればほとんど消費されるが、他区は同じ傾向が認められ、*P. aphanidermatum* 汚染土壌でも無処理区と差は認められない。しかも各区とも6週ンを過ぎればほとんど測定は不能である(第8図)。

α -セルロースの減少は、*P. aphanidermatum* 汚染土壌での初期の減少が他区に比してやや少ない以外は、各区とも同じ傾向が認められ、わらを埋没するとすぐに減少が始まるが、埋没1週間後から4週間まではやや減少の割合は低下し、それ以後は再び減少の速度が増すようである(第9図)。 β -、 γ -セルロースおよびヘミセルロースは α -セルロースに比して利用時期はややくれ、*F. oxysporum* 汚染土壌では他区に比して早く、無接種区ではおくれるが、実験終了時には各区とも利用の程度には差が認められない(第10図)。

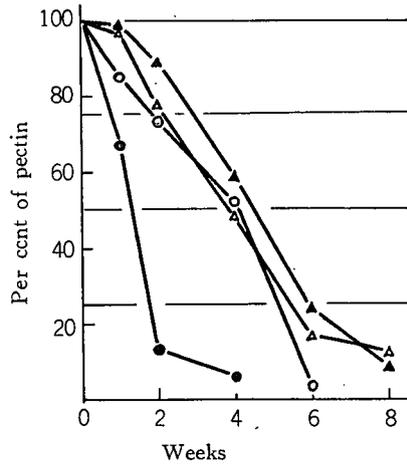


Fig. 8. Pectin in rice straw buried in soil infested by pathogens.
●—● Soil infested by *R. solani*,
○—○ " by *F. oxysporum*, ▲—▲ " by *P. aphanidermatum*, △—△ Non infested soil

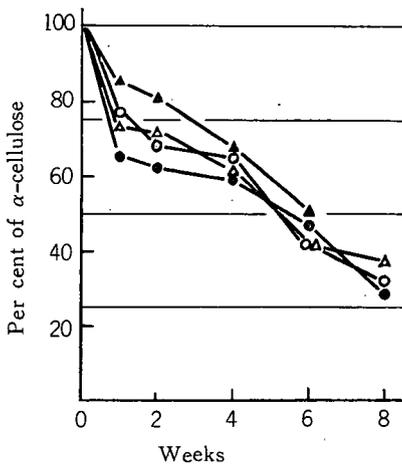


Fig. 9. α -cellulose in rice straw buried in soil infested by pathogens.
●—● Soil infested by *R. solani*,
○—○ " by *F. oxysporum*, ▲—▲ " by *P. aphanidermatum*, △—△ Non infested soil

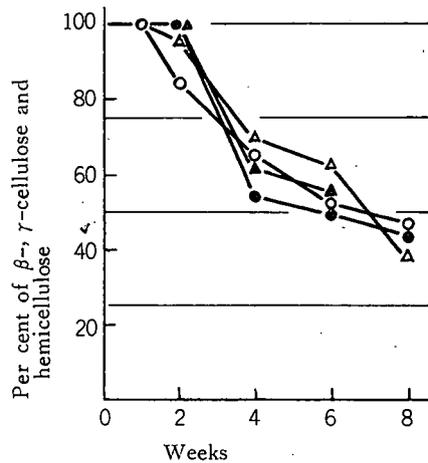


Fig. 10. β -、 γ -cellulose and hemicellulose buried in rice straw in soil infested by pathogens.
●—● Soil infested by *R. solani*, ○—○ " by *F. oxysporum*, ▲—▲ " by *P. aphanidermatum*, △—△ Non infested soil

リグニンの利用は各区とも2週間以後にはじまり、6週間以後からはかなり利用されるようであるが、わらを埋没後8週間に至っても約30%が利用されるにすぎない(第11図)。

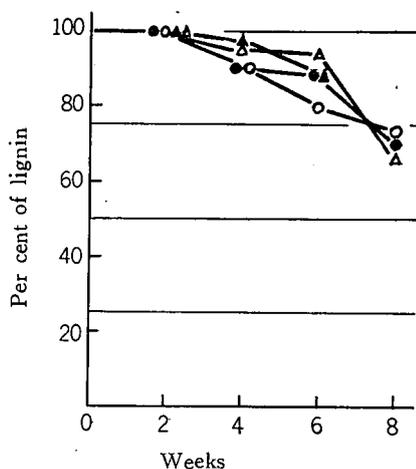


Fig. 11. Lignin in rice straw buried in soil infested by pathogens.

●—● Soil infested by *R. solani*,
○—○ " by *F. oxysporum*, ▲—▲ " by *P. aphanidermatum*, △—△ Non infested soil

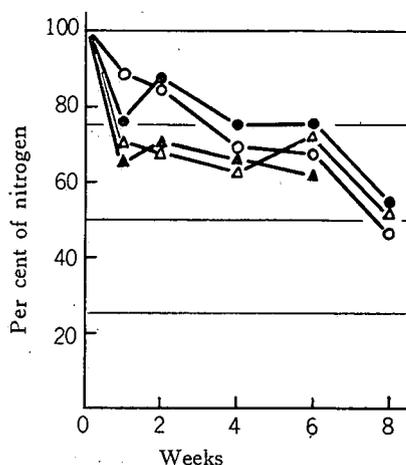


Fig. 12. Total nitrogen in rice straw buried in soil infested by pathogens.

●—● Soil infested by *R. solani*,
○—○ " by *F. oxysporum*, ▲—▲ " by *P. aphanidermatum*, △—△ Non infested soil

また、窒素源は埋没後1週間までにかかなり減少するが、それ以後の減少の割合は低下し、6週間をすぎれば再び減少しはじめる(第12図)。

つぎに、これら病原菌汚染土壌に埋没したわら上に着生した病原菌数の変動を知るために、わら埋没後1, 2, 4, 6, 8週間における各区のわら上の病原菌を分離し計数した。すなわち、所定の時期に各汚染区の土壌中からわらを100本ずつ取出し、その中央部を0.5 mm 四角に切り取り、殺菌水中で振とう水洗し、さらに数回殺菌水にて水洗して、さらに付着する非活動性の胞子を洗い去り、ローズベンガル、ストレプトマイシン各30 ppm 添加ジャガイモ煎汁培地上にこのわら切片を移し、25°Cに静置して各病原菌の出現を確認した(第2表)。

Table 2. Per cent of pathogens appeared on rice straw in soil.

Pathogen	Per cent of pathogen isolated from straw ^{a)}				
	^{b)} 1 week	2	4	6	8
<i>R. solani</i>	30	34	29	26	15
<i>F. oxysporum</i>	27	32	35	34	26
<i>P. aphanidermatum</i>	15	16	3	1	0

a) : 100 pieces of straw were tested in each pathogen.

b) : Weeks after burying straw in soil

この結果、わらに着生しうる病原菌は時期によって差が認められ、*P. aphanidermatum* はわらを埋没後2週間をすぎれば急激に減少するが、*R. solani* は2週間後に出現菌数は最大となり、それ以後は徐々に減少する。*F. oxysporum* は、わらを埋没した直後よりも4週間前後を経過した頃に菌数は最大となり、8週間ごろに至ってわら上の菌数は減少しはじめる。

これら3病原菌がわらの主成分であるペクチン、セルロース、リグニンをどの程度利用しうるかについて検討した。すなわち、しょ糖を除いた Czapek 処方寒天培地にペクチン、セルロース、リ

グニン、しょ糖およびイネわら粉末をそれぞれ 20 g/l ずつ添加し、平面培地とした。これに各病原菌の cellophane inoculum を接種したのち 25°C に置き、菌糸の伸長および菌糸量を測り、添加物質の利用程度を判定した (第 3 表)。

Table. 3. Utilization of carbon sources by 3 pathogens on agar media.

a) Medium	<i>R. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. aphanidermatum</i>
Sucrose	23mm ^{b)} †† ^{c)}	6 - 8 ††	25-26 ††
Rice straw decoction	23-25 ††	7 ††	25-26 ††
Peetion	20-22 +	6 - 7 +	20-25 ±
Cellulose	18-23 +	7 +	0-6 - ^{d)}
Lignin	0 - ^{d)}	0 -	0 -

a) : Medium containing non-organic substances in Czapek's prescription and 20 g/l of each carbon sources

b) : Mycelial growth for 24 hrs. (mm)

c) : Amount of mycelia, †† → - : many → non

d) : A few of irregular mycelia were developed.

各菌はいずれもしょ糖添加培地上でもっともよく生育するが、菌糸の伸長速度はリグニン添加培地以外ではほとんど差を認め難い。しかし、*P. aphanidermatum* ではセルロース添加培地上でも菌糸は伸長し得ないようである。*R. solani*, *F. oxysporum* は添加物により菌糸量にあきらかに差が認められ、セルロース、ペクチン添加培地ではしょ糖、イネわら添加培地に比して菌糸量は少ない。*P. aphanidermatum* でもペクチン添加培地上の菌糸量はきわめて少ないようである。

考 察

土壤病原菌の多くは土壤中で生存する場合、土壤中の植物残渣を利用して腐生的活性を維持していると思われる。この場合、病原菌の利用する残渣は各病原菌の種類により質的にはかなり異なっている^{6,7,10}。*P. aphanidermatum*, *R. solani*, *F. oxysporum* をわらに接種すると、いずれも培養初期によく生育するが、*P. aphanidermatum* は 1 カ月前後でほとんど生育を停止する。これに対し、他の 2 菌では、2 カ月をすぎてもわらの消費が認められるが、とくに、*F. oxysporum* ではこの傾向がいちじるしい。わらに含まれる窒素の消長もこの消長と大略同じ傾向を示している。しかし、汚染土壤中に混入したわら切片の消費と窒素の消費とは同じ傾向を示さない。わらの主成分は水可溶物質、セルロース、リグニンなどであるが、*P. aphanidermatum* はおもに水可溶物質を利用して生存し、この物質の消費とともに活性は急速に低下すると思われる。*R. solani*, *F. oxysporum* はこれ以外に α -セルロース、ペクチンなども利用するが、 β -、 γ -セルロースおよびヘミセルロースなどは他の物質をある程度消費してから利用するようである。

3 菌の物質分解については、Elarosi⁴⁾, Bateman¹⁾ は、*R. solani* がペクチン分解酵素を生産することを報告し、Papavizas & Ayers⁸⁾ は、本菌は病原性とは無関係にペクチン分解酵素を生産すると述べている。Garrett⁵⁾ は、本菌は土壤中でセルロースに着生し、これを分解すると述べ、Bateman²⁾ は本菌のセルロース分解酵素生産能は本菌の腐生的活性と密接な関係をもつことを報告している。また、Trione⁹⁾ は、*F. oxysporum* f. *lini* で、Deese & Stahmann³⁾ は、*F. oxysporum* f. *cubense* でペクチン分解酵素ならびにセルロース分解酵素の分泌を確認している。さらに、Winstead

& McCombs¹¹⁾ は、*P. aphanidermatum* がペクチン分解酵素ならびにセルロース分解酵素を持つことを認めている。これらの報告は、各病原菌がいずれもペクチン分解酵素、セルロース分解酵素をもつことを明らかにしているが、本報告に供試した病原菌の物質利用の結果は、*P. aphanidermatum* は腐生相での生存には両酵素を活用しているとは考え難い。また、*R. solani* と *F. oxysporum* では各物質の分解や利用に多少の差があると思われる。

病原菌汚染土壌にわらを混入すると、わらの重量および各成分の減少の割合はフラスコに病原菌を接種した場合よりも早い。これは他の多くの土壌微生物がわら分解に関与するためであろう。また、各病原菌汚染区から分離される病原菌は時間的に差が認められ、前報⁷⁾ と同じ傾向が認められるが、わらの消費の程度には多少の遅速はあるにしても顕著な差は認められない。これは、各病原菌に汚染された土壌中でもわらに着生する菌相は生態的な差異は認め難いものと考えられる。そして、*P. aphanidermatum* が2週間後にわら上から消失するのはわら上における養分の欠乏が一因であると思われる。しかし、*R. solani* や *F. oxysporum* はリグニン以外のわらの成分をかなりよく利用し、前者は他菌との競合により4週間以後次第に菌数を減ずるが、後者はかなり長期間植物残渣上で菌数を維持するものと思われる。

稿を終えるにあたり、種々御助言を頂いた高知大学農学部森本徳右衛門教授、鴛淵武雄教授、楠瀬博講師に、また、本実験に御助力頂いた同学部永野律氏に謝意を表する次第である。

要 約

土壌中における *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium aphanidermatum* の利用しうる植物残渣の成分をイネわらを用いて検討した。

P. aphanidermatum は水可溶性物質以外はほとんど利用しないが、*R. solani*, *F. oxysporum* はこの外セルロース、ペクチンをよく利用する。また、各菌とも窒素源は接種初期によく利用する。各菌汚染土壌中では混入されたわらの消費は同じ傾向を示し、いずれも水可溶性物質、ペクチン、セルロースをよく利用するが、リグニンはかなりおくれて消費される。しかもフラスコ内で病原菌をわらに接種した場合よりも消費が早い。

これらのことから、各病原菌汚染土壌中でもわらに着生する菌相は生態的な差異は認め難く、*P. aphanidermatum* は養分欠乏のため早期に植物残渣上から消失するのに対し、*R. solani* や *F. oxysporum* は他菌と競合しながら植物残渣上に生残るものと考えられる。

文 献

1. Bateman, D. F. (1963) *phytopath.* 53: 197—204.
2. Bateman, D. F. (1964) *Ibid.* 54: 1372—1377
3. Deese, D. C. & Stahmann, M. A. (1962) *Ibid.* 52: 247—255
4. Elarosi, H. (1958) *Ann. Bot.* 22: 399—416
5. Garrett, S. D. (1962) *Trans. Brit. mycol. Soc.* 45: 115—120
6. Garrett, S. D. (1963) *Ibid.* 46: 572—576
7. 小倉 寛典 (1966) *日植病報.* 32: 238—245
8. Papavizas, G. C. & Ayers, W. A. (1965) *Phytopath.* 55: 111—116
9. Trione, E. J. (1960) *Ibid.* 50: 480—482
10. 渡辺文吉郎 (1960) *日植病報.* 25: 111—112
11. Winstead, N. N. & McCombs, C. L. (1961) *Phytopath.* 51: 270—273

(昭和41年9月13日受理)