

# 土壌中の *Fusarium oxysporum* の活性の評価

## Ⅱ. 土壌中の *F. oxysporum* の植物根面への移行

小倉 寛典・馬 俊栄・梅澤 武司・山田 伸二  
(農学部植物病理学研究室)

Estimate on Activities of *Fusarium oxysporum* in Soil.  
Ⅱ. Colonization of *F. oxysporum* to Rhizoplane in Soil.

Hirosuke OGURA, Junrong MA, Takeshi UMEZAWA and Shinji YAMADA  
*Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture*

**Abstract:** The fungal situation colonized on crop roots in soil was observed. There were no relation with soil material on colonization of *F. oxysporum* onto cucumber roots, except nutrients in soil. There were more population of the pathogen in rich nutrient soil and then more pathogen colonized on cucumber roots and invaded in them. It was very easy to observe the phase on colonization, that is, root was dug up carefully, was washed in 100 ppm of dihydro-streptomycine few times and was kept on fusaria-selecting medium at 25°C. The causal fungi appeared on medium from colonized parts of root. When the surface of root was sterilized its surface with disinfectant like antiformin and so on, the causal pathogen in root was appeared. When whole roots were spread on medium, the location of diseased or colonized parts was clear in the root system. Many fusalia, maybe many of them were pathogenic to cucumber plant, were colonized on cucumber, soybean, egg-plant and sorghum. They were parasite on cucumber and saprophyte on other crops, however, in spite of non suscept soybean having the most abundant root system among these crops brought up a lot of the fungus in field. The poor population grew on egg-plant and sorghum roots. The germinated rate of chlamydo spores of the pathogen in root exudates of each crop had make order as same as above, too.

### 緒 言

土壌中に多くの病原が存在するか、あるいは作物の生育が軟弱でない限り、多くのフザリウム病の発生は作物の栽培盛期に徐々に起るように見える。また、被害面積も疫学的な拡りを示さず、徐々に数年の間に拡り、しかも土壌中に定着する<sup>1)</sup>。この一因として、フザリウム病菌とくに *Fusarium oxysporum* は宿主範囲が狭く、かつ、腐生競合力が弱い<sup>2,3)</sup>ため新鮮な残渣や生活根が耐久体の近辺に存在しない限り、菌糸活性は増大しない<sup>2,3)</sup>。小倉ら<sup>4)</sup>は前報において土壌中の *F. oxysporum* の生存単位を分生孢子由来と厚膜孢子由来に分けて考え、それを区分する方法を検討した。また、土壌から根面への移行の難易についても検討した<sup>5)</sup>。

本報告は土壌中で賦活した *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* の厚膜孢子に由来する菌体が根面に移行し着生する現象を量的に知る方法について検討した。

## 実験方法及び結果

1 キュウリの生活根面への *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* の着生: 径 1 mm のガラスビーズ、有機物を除去した洗砂および風乾し 2 mm に篩別した畑土壌をそれぞれ 200 ml のトルビーカーに約 3/4 まで入れ加圧殺菌した。キュウリつる割病菌 (菌株番号 F501) の分生孢子懸濁液を孢子密度  $10^3$  あるいは  $10^2$  / 土壌 1 ml になるように各ビーカーに加え、殺菌水にて土壌湿度 50% (v/v) に無菌的に調整した。種子表面を昇永水で殺菌したキュウリ種子 (品種: 四葉) を 25℃ の温室で催芽し、幼根が約 3 mm 伸長した時点で各ビーカーに移植した。12 時間照明で 25℃ に保ち、7 日後に抜き取って pH 4.0 に調整したストレプトマイシン 150 ppm 水溶液にて根を表面洗浄した。1 個体の根を適宜切り放ち、全根をフザリウム選択培地上に並べて 25℃ に静置した。出現する *Fusarium* を計数し、根長をキルピオメーターで計測して単位根長あたりの着生菌数を計算した。

さらに抜き取った根を次亜塩素酸ソーダ 2% 水溶液に 1 分間浸漬後水洗して培地上に並べ出現する菌そうを根内侵入菌として計数した。

Table 1. Colonization of *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* on cucumber roots planted in different soil materials infested by the pathogen.

Soil material	Inoculum density	Colonization	
		On root	In root
Glass beads (1mm in diameter)	$10^2$ / ml of soil	0.15 / cm	0.01
	$10^3$	0.36	0.04
Sand (washed)	$10^2$	0.25	0.007
	$10^3$	0.35	0.05
Soil (Loam)	$10^2$	2.71	0.07
	$10^3$	5.66	0.37

いずれの区も接種源が多いと根面に着生する菌数も多く、根内への侵入も増加した。ガラスビーズは洗砂と同程度の着生、侵入が見られたが、接種源の腐生養分が少なく、生活根のみを養分としたための菌数の減少、あるいは生活があったと思われる。土壌では殺菌により養分は接種菌が利用し、さらに生活根の到来で活性が増加したと考えられる (第 1 表)。

この結果、材質の異なる土壌中からの根への定着は根を培養することで容易に確認できる。

上記の実験は土壌素材に重点を置いたが、他の微生物の存在について検討した。

つる割病汚染圃場の土壌を 5 号鉢に入れ、ガラス室内に並べた。また、同鉢の半数を 2 気圧 10 分間加圧殺菌した。各処理区の半数に本菌 (F501 号菌) の分生孢子懸濁液を噴霧し、土壌 1 g 当たり  $10^3$  孢子の割合で接種した。7 日後にキュウリの催芽種子を播種し、10 日後に根を抜き取って前記同様に根面への着生、根内への侵入を調査した。また、この時点で前報<sup>9)</sup>により土壌中の菌数を土壌平板法で調べた。

供試土壌は本病汚染土であり、土壌 1 g 当たり  $1.3 \times 10^2$  程度の *F. oxysporum* が生息し、キュウリ根面に容易に着生した。そのうちの若干は根内にも侵入した。病原菌を接種すると各割合は増大し、土壌を殺菌後に病原菌を接種するとその比率はさらに増大した (第 2 表)。この結果、この手法は自然土壌中の根についても寄生相だけでなく根面で腐生生存する本菌についても用いることが出来る。

Table 2. *F. oxysporum* on cucumber roots and in soil.\*<sup>a</sup>

Soil sterilization * <sup>b</sup>	Inoculate pathogen * <sup>c</sup>	Colonization * <sup>d</sup>		
		On root	In root	In soil (×10 <sup>2</sup> ) * <sup>e</sup>
None	Non	0.22	0.02	1.3
	Added	1.58	0.28	9.8
Steriliz.	Non	0	0	0
	Added	2.04	3.67	12.1

\*<sup>a</sup> Pot test in green house.

\*<sup>b</sup> Soil with pot sterilized by autoclave added 2 atms.

\*<sup>c</sup> Soil contaminated by cucumber wilt pathogen (F 501)

\*<sup>d</sup> The number of colonized pathogens/cm of root.

\*<sup>e</sup> The number of pathogens was established by soil plate method with fusaria-selecting medium.

2. 非宿主作物根のキュウリつる割病菌への影響：上記の実験よりキュウリの病原菌は土壤中より容易にキュウリの根に着生し、その菌数の如何によっては侵入も起こることを知った。また、マクロの侵入部位も認知出来る。根への侵入は着生後3～4日と推定された。本項では本病原菌が他作物の生活根を利用しうるか否かについて検討した。

2mmに篩別し、夾雑物を水洗して除いた殺菌した砂に本病原菌の分生孢子懸濁液をジャガイモ煎汁と共に加えて湿度50% (v/v) として25℃で培養した。2週間後に砂を検鏡し、厚膜胞子の形成を確認後、過剰の殺菌水を加えて攪拌振とうして分生孢子などの菌体を浮遊させて除去した。これを数回繰返し、残余の砂を40℃で10日間乾燥し、厚膜胞子のみを有する接種源として室温で保存した。菌体密度は土壤平板法で計数した。圃場より採取した土壤を無殺菌あるいは加圧殺菌して接種源砂と混合し、10<sup>2</sup>/mlの割合に調整した。これを径20cmの鉢に入れ、表面殺菌した種子を1鉢あたり10粒ずつ播種した。供試作物はキュウリ (品種：四葉), ダイズ (三保白鳥), ナス (千両), ソルガム (スタックス) である。7日, 14日後に根を抜き取り, 上記同様に培地上に根を拡げて25℃で培養し, 出現する *F. oxysporum* を調査した。

Table 3. Colonization of *F. oxysporum* onto roots of crops in soil infested by cucumber wilt pathogen.

Crop	Colonization			
	On root		In root	
	7 Days	14	7	14
Sterized soil				
Cucumber	*0.30	0.75	0.03	0.93
Soybean	1.85	0.79	0	0.01
Egg plant	0.15	0.05	0.03	0
Sorghum	0.41	0.24	0	0
Non sterilized soil				
Cucumber	0.21	0.66	0	0.75
Soybean	0.63	0.23	0	0
Egg plant	0	0.27	0	0
Sorghum	0.43	0.75	0	0

\* The number of colonized pathogens/cm of root

キュウリつる割病菌はキュウリ以外の作物根の表面にも着生した。キュウリの根では時の経過につれて着生数は増加したが、他の非宿主作物では幼苗期には本菌の着生は認められても2週間後には減少した。これは殺菌土壌で顕著であった。殺菌土壌では非宿主植物にも本菌の侵入が認められた(第3表)。

つぎに、厚膜胞子は根の浸出物により発芽が左右される。このことは土壌中の作物の根の量が胞子の賦活を決める一つの要因と思われるので、各作物の生育について調査するとともに浸出物の厚膜胞子発芽への影響についても調査した。

湿度50% (v/v) の殺菌した砂に各作物をそれぞれ播種して12時間明期で25℃に保った。2週間後に作物を抜き取り根部を洗浄したのち、1個体あたりの根の総体積を浸漬法により、また、根の総伸長をキルビオメーターで測定した。第4表中の数値は標準的生育を示した10個体あたりの平均値である。

作物の根の浸出物の調整は下記の通りである。作物根量の差をなくすため、キュウリ、ダイズ、ナス、ソルガムの種子はそれぞれ10, 5, 100, 50粒を基準とした。有機物を除去した湿度50% (v/v) の殺菌した洗砂100mlに表面殺菌した各種子を播種し、12時間明期で25℃に保った。8日後、各区の細菌増殖の如何を調査後、砂と同量の殺菌水を加えて攪拌振とうし、遠沈により固型物を除去し、さらに濃縮して5mlとした。

厚膜胞子懸濁液はつぎの通りに調整した。病原菌を液体培養し、その菌そうを水に移して4日間放置、さらに土壌懸濁上澄液と置きかえた。25℃で10日間静置し、すでに菌そうの一部に溶菌の認められる菌そうをホモジナイザーで碎片とした。遠沈で胞子を残しながら、0.5%酢酸、次いで100 ppm ストレプトマイシン水溶液で表面洗浄後、多少の菌体破片も含めて厚膜胞子粗懸濁液とした。上記の浸出液試料に厚膜胞子懸濁液を加え1%水寒天で全面を被ったスライドグラス上に滴下し25℃の湿室に10時間保ったのち発芽率を調査した。

Table 4. Root amount of crops and germination of chlamyospore of *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* in root exudate of crops.

Crop	Amount of root * <sup>a</sup>		Germination of * <sup>b</sup> chlamyospore
	Volume	Length	
Cucumber	0.4ml	36.2cm	35.9%
Soybean	0.94	70.3	36.4
Egg plant	0.02	11.7	22.8
Sorghum	0.25	17.7	23.5
(Water)			4.7

\*a 2 weeks age of plant in sand culture. Total roots of a plant.

\*b Germinated rate after 10 hours

ダイズはキュウリを根量においても根長においても約2倍上廻っていた。ソルガムはキュウリの約1/2、ナスは根長は1/2であったが、根量は貧弱であった。根の浸出物による厚膜胞子の発芽についてはダイズはキュウリと同程度であったが、ソルガムとナスはやや劣っていた(第4表)。これらの結果は、非宿主の根の浸出物は本菌の厚膜胞子の発芽を促進させるが、その程度は作物によって異なることを示し、ダイズのように宿主であるキュウリと同等の賦活力を有するものもある。

## 考 察

*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* の土壌中の安定生存は厚膜胞子であり、生活根の伸長により発芽し、着生する。西村ら<sup>6)</sup>の *F. oxysporum* f. sp. *tulipae* の動向はチューリップの根の伸長との相関性を暗示させ、Katan<sup>7)</sup>は *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* の根への着生を観察している。小倉<sup>8)</sup>は植物と病原菌との間にみられる保菌的性質を3通りに区分し、病原性を偶発的片利共生、親和性の弱い寄生性、および寄生性とは別の行動としての病原性として説明している。

土壌微生物が土壌中より根に移行する際には両者のpHの差により行動に難易があり、それにより微生物をグループ分け出来る<sup>9)</sup>が、土壌中の菌量が多ければ根面に着生する菌量も多く、また侵入量も多い。さらに土壌のもつ養分供給能も菌の行動と正の相関をもつ。本実験の材料は幼苗期のみを対象としたが、全根を大型シャーレの培地上に置き、ストレプトマイシン水溶液の薄層を敷いて根系全体を培地上に拡げる。その後、ストレプトマイシン液を排除して培養することにより根系の被害位置を知りうる。本実験に供試したキュウリつる割病菌は根面に着生するのに根と接触あるいは接近したのち2日を必要とし、さらに2、3日後に侵入する模様である。このことは根の伸長量と培地上での菌の分布位置から推定される(第1, 2表)。

松田<sup>9)</sup>は感受性の宿主は病原の増殖を有利にすると報告し、小倉ら<sup>10)</sup>は土壌と植生と微生物相を考慮に入れることを提案した。宿主植物では病原菌の着生が経時的に増加し、それに応じて侵入も増加する。非宿主植物では幼若根に着生は多いが、やがて減少が始まる。駒田<sup>11)</sup>は厚膜胞子の発芽に要する根の浸出物は作物特異性はないと報告した。幼若根から若令根に移るにつれての着生率の減少は根の浸出物の低下あるいは非親和性の発達を意味する。明らかに根令により非宿主への着生は容易に識別出来る程の低下率を示すが物的証明は得ていない。土壌の殺菌の有無による着生の差は病原菌の増殖量によると考えられる。非宿主への本菌の侵入は偶発的現象と思われ、宿主への侵入の場合のような規則性をもたない(第2, 3表)。

土壌中に占める根の体積、扱ひはキュウリはダイズの $\frac{1}{2}$ である。ほぼ同量と推定された両者の根からの浸出物は同程度の発芽活性を与える。このことは一定容量の土壌中ではダイズ根からの浸出物の方が腐生競合力の弱い微生物に与える影響は大きいと思われる。同じ考え方によればソルガムの根系の影響力は小さく、ナスはさらに小さいと見ていいであろう(第3表, 第4表)。小倉<sup>12)</sup>は根面着生は根の行動に応じた場所的偶然性を指摘し、馬・小倉<sup>13)</sup>は根面分布と根内侵害の生活の差異について報告した。

本報で示したように根系あるいは根の一部を直接培地上に置くときは、病原菌の着生侵入、汚染の現況を速やかに確認出来る。また培地を適宜入れかえることにより非宿主の根面での動向をも知りうる。前報<sup>4)</sup>の土壌中の厚膜胞子の耐久生存の解明と併せて根系への着生は *F. oxysporum* の生活様式の一面を知る手段であろう。

## 要 約

土壌中に耐久生存する *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* の作物根面への移行を知る手法を検討した。

土壌中の本菌は菌数に応じてキュウリ根面への着生数は異なり、さらに侵入数も異なる。土壌中の養分もこの行動を規制する。土壌中の微生物は本菌の着生を妨害出来るが完全に阻止することは出来ない。非宿主作物の根面も着生の場になるが、その数は経時的に減少するのに対し、宿主作物では増加する。しかし、侵入は非宿主作物では偶発的であり、宿主作物では必然的である。土壌中の根

量はダイズが多く、キュウリはこれに次ぐが、ソルガム、ナスは少ない。この浸出物による厚膜胞子の発芽はキュウリとダイズは同等であるが、ナス、ソルガムは劣る。

これらの結果、培地上に根系を拡げて本菌の着生、侵入を調査する方法は環境条件の差異による着生の様相の差異、作物の親和性などを知るのに有利である。

## 文 献

- 1) 小倉寛典: 日植病報., 50:119(1984).
- 2) 小倉寛典: 同上, 48, 525~526(1979).
- 3) LOCKWOOD, J. L.: In "Biology and Control of Soil-borne Plant Pathogen" ed. by BRUEHL, G. W. Am. Phytopath. Soc., S. Paul, pp 194~202(1975).
- 4) 小倉寛典・梅澤武司・馬俊栄: 高知大学研報., 39 農学: 9-15(1990).
- 5) 小倉寛典: 土と微生物 34: 9-17(1989).
- 6) 西村正賜・松永碩哉・廣江勇: 鳥取大砂丘研報. 7: 9-15(1966).
- 7) KATAN, J.: Phytopathology. 61: 1212-1217(1971).
- 8) 小倉寛典: 作物のフザリウム病 松尾卓見・駒田旦・松田明編: P 103-136, 全農教協会, 東京(1980).
- 9) 松田明: 野菜の土壤病害: 275 pp 農文協会, 東京(1977).
- 10) 小倉寛典・山田巧: 高知大学研報. 24 農学: 115-121(1975).
- 11) 駒田旦: 東海近畿農試研報. 29: 132-269(1975).
- 12) 小倉寛典: 日植病報. 53: 106(1987).
- 13) 馬俊栄・小倉寛典: 同上. 56: 132(1990).

(1990年 9月29日受理)

(1990年12月27日発行)