

土壌中の *Fusarium oxysporum* の活性の評価

I. 土壌中の *F. oxysporum* の厚膜孢子型生存

小倉 寛典・梅澤 武司・馬 俊栄

(農学部植物病理学研究室)

Estimate on Activities of *Fusarium oxysporum* in Soil.

I. Survival by Chlamydospores of *F. oxysporum* in Soil.

Hirosuke OGURA and Takeshi UMEZAWA and Junrong MA.

Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture

Abstract: We established the methods to realize fungal population or distribution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* inhabited in soil. The number of the fungus examined by agar dilution method shows that of propagules originated from conidia mainly, because they were easy to put off from mycelia to suspended water, so, it is difficult to recognize the survival of the fungus in soil. The fungal number originated from chlamydospore was obtained by soil plate method with soil grain washed by sterilized water with shaking three times or more. In successive 40°C condition the chlamydospores were survived and other propagules died away. These phenomena were more clear in dry than in wet. From these results it is necessary to investigate the survival of chlamydospore to know the real state of long term soil infestation by the pathogen, though the activities in favourable conditions for the fungus is enough to count the propagules originated in conidia. For this purpose it is better that soil sample must be dried in 40°C for 10 days or more after sieved under 1 mm grain and is cultured by soil plate method with fusaria-selecting medium.

緒 言

土壌中に生息する植物病原菌は生息場所の土壌環境により活性を左右される。*Fusarium oxysporum* は土壌中においても小型分生孢子や大型分生孢子を生産するが、菌糸の活性の低下により菌糸起原あるいは大型分生孢子起原の厚膜孢子を形成して耐久生存する。^{1,2)} 本菌の土壌中の菌密度や分布を調査する際、多くの研究者は間接定量法を用いているが、定量に由来する菌体については不問に付されている場合が多い。

キュウリつる割病を起こす *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* は厚膜孢子の形態で土壌中で数年にわたって耐久生存しているが、生活根の接近による根圏物質の刺激により発芽し、根の方向に向けて菌糸を伸長させて根面に到達し、侵入する。一部の菌糸は根面に分布し、あるいは根内より根面に現われ、分生孢子を形成する。この孢子は近距離に分散し新たな発病源となる。罹病宿主の枯死や罹病組織の崩壊により本病原菌は寄生生存から腐生生存に移り、やがて養分の費消と他の微生物との腐生競争に敗れて死滅するが、菌体の一部は厚膜孢子を形成して耐久生存に移る。土壌中で本菌の生活を支える新鮮な残渣上でも同様の腐生競争が行なわれる。枯死組織や残渣に形成された厚膜孢子は他の微生物の生活作用による組織の崩壊により土壌中に放出され休眠を続ける。

本報告は土壤中に生存する *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* の菌数の調査方法について検討した。

実験方法及び結果

1. 土壤中の *F. oxysporum* の検出:

キュウリを連作し、毎年若干のつる割病の発生する当研究室実験圃場（砂壤土, pH 6.2）の土壤を供試した。土壤はキュウリ栽培の畝に沿って約 2 m 間隔で設定した 5 地点の株間の中間点の表土下 5-10cm の位置から採取し *F. oxysporum* を計数した。採取土壤を径 2 mm に篩別し、その 20 g を殺菌水で稀釈し、フザリウム選択寒天培地³⁾を加えて 25℃ で培養して出現する菌を調査し、乾土 1 g あたりの菌数を計数した。実験は 5 月 20 日より 10 日間隔で 4 回行なったが、調査予定日は 2 日前までに降雨日のある場合には順延した。

Table 1. Population * of *F. oxysporum* in field soil appeared wilt disease slightly

Plot	Date for soil sampling			
	May 20	May 30	June 9	June 21
A	**2170	2815	2285	3103
B	1023	1075	2751	1385
C	716	1682	4221	1855
D	1341	1266	1158	1283
E	986	1968	1007	1046

* Agar dilution method with fusaria-selecting medium

** The number of *F. oxysporum* in 1 g of dry soil

2 m 間隔で設定した各地点のフザリウム菌数は異なり、また、増減の様相にも共通点は見出せなかった（第 1 表）。実験期間中、供試畝のキュウリには外見上の病徴は認められず、また、第 3 回以後の土壤採取点にはキュウリの根が拡っていた。

上記の実験において、土壤を殺菌水に稀釈する際にまず土壤 20 g を 200 ml の水とともに 10 分間振とうし、15 分静置後その上澄液を所定の倍数に稀釈したが、この上澄液を捨ててさらに殺菌水を加えて 10 分間毎分 80 回の割合で振とうし、15 分静置後に上澄水を捨てた。このように土壤を殺菌水で 3, 5 回洗滌したのち、土壤残渣を殺菌したシャーレに薄く拡げて 35℃ で約 2 時間乾燥した。乾土を集めてミクロスパチュラで一定量とり、シャーレにフザリウム選択培地とともにに入れて培養し、出現する *F. oxysporum* を調査した。

Table 2. Population of *F. oxysporum* in field soil washed with sterilized water by soil plate method

Repeat of water washing	Plot *			
	A		B	
	June 9	June 21	June 9	June 21
non washing	**			
1	1052	1466	1085	842
3	487	550	572	475
5	350	320	230	218
	320	315	225	210

* Same plot in Table 1.

** The number of *F. oxysporum* in 1 g of dry soil.

A, B 2 地点の土壤中には増減は逆であったが同程度の *F. oxysporum* が認められた。洗滌により菌数は減少したが, 3 回以上の洗滌で両区とも出現する菌数は定常化し, 水に懸濁する菌体は殆んど除去された。出現する菌そうを早期に検鏡したが, その多くは土壤粒子がその中心部に認められた (第 2 表)。この現象から土壤中に形成され, 容易に水に懸濁する分生胞子は数回の洗滌により除去されて土壤粒子と固結する厚膜胞子や菌糸のみが検出されると思われ, その数は分生胞子ほどに短期間に変動しないものと考えられる。

2. 土壤中の *F. oxysporum* の厚膜胞子の検出 : *F. oxysporum* の各胞子の生存を異なった土壤温度の下で調査した。前記の圃場の土壤を 2 mm に篩別し, 室温にて風乾し, その 100 ml を 200 ml 容三角フラスコに入れ, 加圧殺菌した。予め, PDA 上に 25°C で培養した *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (保存菌株番号 F 501) の分生胞子懸濁液を土壤 1 ml あたり 10^3 胞子の割合でフラスコに接種し, さらに水を加えて容水量を 50% (v/v) に調整した。全フラスコを 25°C にて 15 日間静置し, その一部にて土壤中に分生胞子, 厚膜胞子の形成を確認したのち 30, 35, 40, 45°C に移し, 各胞子の生存を 3, 6, 10, 15, 20, 30 日にわたって調査した。なお, 土壤の水分含量を保つため 10 日ごとに殺菌水を加えて土壤湿度を調整した。胞子の生存は発芽率によった。各フラスコの土壤に稀薄養液 (アスパラギン 0.02%, ガラクトーズ 0.2%, ストレプトマイシン 50 ppm) を加えて振とうし, 上澄液を遠沈して分生胞子を集め, 上記の養液に懸濁して 25°C にて 8 時間後の発芽を調査した。厚膜胞子は上記の上澄液を除去した土壤残渣をスライドグラスにとり, 養液を滴下して 25°C の湿室内におき 15 時間後に塗抹法⁴⁾にて発芽を調査した。各胞子とも 25°C で培養した時の発芽率を 100 として比数で示した。

Table 3. Survival ratio of spores of *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* in soil treated with different temperatures

Soil temperature	Survival ratio of spores *						
	0 days	3	6	10	15	20	30
Microconidia							
30°C	100	105	85	37	34	18	2
35	100	91	37	3	7	7	0
40	100	87	4	0	—	—	—
45	100	66	0	—	—	—	—
Macroconidia							
30	100	92	92	81	74	21	27
35	100	99	66	25	7	8	11
40	100	86	70	1	0	—	—
45	100	54	22	0	—	—	—
Chlamydospores							
30	100	97	92	94	98	91	90
35	100	93	95	80	84	70	72
40	100	96	92	84	84	60	45
45	100	94	91	36	6	0	—

* Soil samples incubated with the pathogen at 25°C for 10 days were set into different temperature conditions. At this setting time three kinds of spores were tested for their germination and the germinated ratio was expressed the relative ratio.

小型分生胞子は40℃で10日後には死滅したが、35℃では次第に菌数は減少するが20日間生存した。この胞子は短命であるとの一般の説を考慮すれば変温後も残存菌糸より生産されたと考えられる。大型分生胞子は30℃、35℃では徐々に減少するが、1ヶ月後も生存した。40℃で15日、45℃で10日後には消滅した。この胞子は供試菌株では数は少ないが、その一部は35℃および40℃において厚膜化が認められたので、表示から除外したが、この数を加えれば長期生存の可能性はある。厚膜胞子は45℃で20日後に消滅したが、40℃以下の温度で生残る可能性は高い（第3表）。

この結果、40℃は3型の胞子の生存を区分する限界であり、45℃ではすべての胞子は生存に長短はあるが時間の経過につれて死滅すると思われる。しかし、本実験の手法は繁雑であり、多数の試料を短期間に処理し難い。

つぎに土壤中の各胞子の耐乾性を調査した。上記同様にF 501菌株を25℃で15日間培養し、その土壤を35℃、40℃にて風乾した。また、土壤湿度を保ったまま35、40℃に静置した。6、10、15日後に上記の方法で分生胞子、厚膜胞子の発芽を調査した。

Table 4. Survival ratio on spores of *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* in soil at dry or wet condition.

Soil condition	Soil temperature	Survival ratio of spores *				
		0 days	6	10	15	
Microconidia	Dry	35	100	62	0	0
		40	100	0	—	—
	Wet	35	100	37	31	0
		40	100	4	0	—
Macroconidia	Dry	35	100	71	5	0
		40	100	12	0	—
	Wet	35	100	86	25	2
		40	100	70	1	1
Chlamydo spores	Dry	35	100	84	91	88
		40	100	90	87	88
	Wet	35	100	95	80	84
		40	100	92	70	76

* The survival ratio was estimated as described in Table 3.

小型分生胞子は乾燥により急速に発芽力を失ない35℃でも10日目には死滅した。この胞子は乾燥により養液中に懸濁せず土壤に固着して死滅するため、胞子の採取は少なく、発芽率は実測値をさらに下廻ると思われる。大型分生胞子も小型分生胞子よりも耐乾性、耐熱性はあるもののその消長は同じ傾向を示した。厚膜胞子は分生胞子と異なり乾燥条件の下では湿性条件よりも生存率は安定していた（第4表）。この結果、厚膜胞子の検出は土壤を40℃の乾燥状態に保ち、10日間放置して他の菌体を死滅させてから土壤平板法^{5,6)}と選択培地を併用することにより行なうことができ、多くの試料からの量的検出も可能になった。

これらの結果から、土壤中の *F. oxysporum* の量的な調査は分生胞子由来の現象と厚膜胞子由来

の現象とを区分することが可能になる。供試圃場の土壤中の *F. oxysporum* の分布や経時的変動を調査するには立毛中の根の近辺などの特殊状況を除けば厚膜胞子の定量が有意義の場合が多いと考えられる。

3. キュウリつる割病汚染圃場の *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* の消長: 調査地点は当研究室付属圃場を含む13地点で、いずれも数年来キュウリを連作し、程度の差はあるがつる割病の発生を確認した圃場である。その多くはビニールハウス栽培で、土壌採取時期は病害の発生の有無に関係なく5月および11月とした。普通栽培は冬作は休耕、ビニールハウス栽培は抑成、促成2連作で夏期休耕であり、輪作の場合はキュウリは抑成栽培であった。また、夏期にイネ栽培を行なう2地点は土壌を灌水前に採取した。各圃場のつる割病害は栽培末期の地上部の被害で表わした。その表示は枯死の程度よりも発病面積を重視し、++: 全面に発生、+: 局部的に集団化して発生、±: 局部的に散発、-: 発病なしの4段階表示とした。

圃場より採取した土壌を2mmに篩別して40℃に保温乾燥し、10日後に細かく摩砕し1mmに篩別した。この土壌をミクロスパチュラでシャーレに移し、フザリウム選択培地を注いで均一に分散し固化した。25℃に静置して出現する菌数を調査した。

Table 5. *Fusarium* population in fields cultivated continuously the same crops

Place	Soil	Crop	Population *		Disease ** develop.	Remark ***
			December	May		
高知大学農学部	Grey soil	Cucumber	510	420	++	Open field
同上	Grey soil	Soy-bean	780	515		Open field
同上	Grey soil	Tomato	150	104		Open field
香美郡土佐山田町	Grey soil	Cucumber	96	91	-	Protected
香美郡野市町西野	Grey soil	Cucumber	125	211	±	Protected
香美郡野市町西野	Grey soil	Cucumber	8	5	-	Paddy
南国市立田	Grey soil	Cucumber	24	26	-	Paddy
南国市浜改田	Sandy soil	Cucumber	107	135	++	Protected
南国市浜改田	Sandy soil	Cucumber	75	102	+	protected
香美郡赤岡町岸本	Red soil	Cucumber	85	116	++	Open field
香美郡赤岡町岸本	Red soil	Cucumber	117	114	+	Protected
香美郡夜須町手結	Red soil	Cucumber	23	51	±	Protected
安芸郡芸西村西分	Red soil	Cucumber	94	105	±	Protected

* Population from chlamydospore in 1 g of dry soil.

** Diseased area in field tested; ++: Disease appears overall, +: separates locally, ±: slightly, -: non disease.

*** Protected: Cultivate in twice, namely late raising and forcing culture.

いずれのシャーレにも出現した *F. oxysporum* の多くは土壌粒子に固着した胞子から菌そうを生育させていることが検鏡により確認された。各圃場により出現する菌数は異なるが、いくつかの示唆が得られた。多くの圃場では作物の栽培盛期は休閑期あるいは栽培末期よりも菌数は少なかった。これは厚膜胞子の賦活による減少と考えられる。作目の相違は菌数の多少に関係したが、キュウリが菌数維持に有利とは限らなかった。水田湛水は菌数を増加させず、病害も発生しなかった。土壌の種類は、*F. oxysporum* の生息密度を異にし、灰色土は赤色土より多く、砂土は赤色土と同等かやや少なかった。しかし、病害の発生面積は必ずしも菌数と相関せず砂土や赤色土は灰色土に比して菌数の割に広がった (第5表)。

考 察

土壌微生物や土壌生息性病原菌の生態学的研究にあたり、まず考えねばならぬことは土壌中に生息する当該微生物の密度ならびに分布である。今まで多くの研究者はその時代の学問の進歩に応じて微生物の分離方法を考案し、業績をあげてきた。また、それぞれの微生物を単離する特定培地も案出され、当該微生物の生活様式も解明されつつある。

病原型 *F. oxysporum* の土壌中での位置付けは根系生息菌であり、腐生競合力が弱く宿主依存型の生活を行なうとされた⁷⁾。すなわち、厚膜胞子の形で土壌中で耐久生存した本菌は生活根や新鮮な残渣からの浸出物により発芽し、菌糸の伸長、栄養源の専有とともに小型分生胞子により生活域の拡大をはかる。その後、宿主の消滅、残渣の老廃化により菌体の一部に厚膜胞子を形成し、土壌粒子や枯死組織に附着して種を温存すると考えられる。^{1,8,9)}

土壌中の微生物の分離に通常用いられる寒天稀釈法は土壌粒子から離れやすい菌群や菌体が主な対象になる。*F. oxysporum* では主として分生胞子に由来する数値が大勢を占める。分生胞子生産時期は本菌が好環境の下で活性を維持している時期にあたり、年間を通じての生存のうちの特定の短期間である。また、分生胞子は環境耐性も小さく、土壌中の数的変動も避けられない。土壌を水に懸濁し、洗滌すると水に浮遊可能な菌体は急激に減少し、土壌粒子に固着する厚膜胞子に由来する菌そうが検出可能になり、3回以上の洗滌でこの状態は安定する (第1, 2表)。

地温を上昇させるとまず小型分生胞子が、次いで大型分生胞子が消滅する。その限界は40℃にある。厚膜胞子は40℃で10日間は安定で、それ以降徐々に菌数は減少する。45℃でも6日間は安定であり、15日以降では死滅する。土壌を乾燥すると分生胞子の活力は湿土壌よりも早く低下するが、厚膜胞子は湿土壌中よりも安定して生存する。このことは、土壌を40℃で乾燥状態に保つと10日間で厚膜胞子のみ生存の状態の土壌が得られる (第2, 3, 4表)。小玉¹⁰⁾ は *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* の病土は40℃で14日以上、45℃で6日以上経過すると病原は死滅すると述べ、KATAN¹¹⁾ も *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* や f. sp. *vasinfectum* の死滅温度は湿熱により低下すると報告した。

上記の乾土処理を行った各圃場の土壌の休閑期の菌数は栽培期を上廻る。馬・小倉¹²⁾ は立毛中の *F. oxysporum* の活性維持を原因とし、小倉・梅澤¹³⁾ は植物根と分生胞子形成と種の維持の3つの現象から説明した。また、土壌の種類により生息数が異なる現象は HORIKAWA ら¹⁴⁾ は土壌鉱物の凝集を、小倉・稲葉¹⁵⁾ は微生物相の質あるいは拮抗菌群の性質を挙げている。

土壌中の *F. oxysporum* の動向を知るのに、環境による変動の大きい分生胞子を対象とするのはその場の一時的な活性の変動を知るのに好都合であり、厚膜胞子を対象とするのは長期にわたって安定して存在する発病ポテンシャルの消長を知るのに好都合であろう。

要 約

土壌中に生息する *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* の菌密度や分布を知る方法について検討した。

寒天希釈法は分生孢子由来の菌数を示し、耐久生存の経時的変動を知るのに困難である。土壌を3回以上振とう洗滌すると厚膜孢子由来の菌数が明らかになる。地温を上げると40℃を限界として厚膜孢子が生残る。土壌を乾燥させると、分生孢子は湿土壌よりも短命になり、逆に厚膜孢子は長命になる。これらの結果、一時的な活性の変化を知るには分生孢子由来の菌体を対象とすれば十分であるが、長期にわたる土壌汚染の実態を知るには厚膜孢子由来の菌体を調査すべきである。そのために、土壌試料を2 mm以下に篩別したのち、40℃で10日間乾燥し、さらに1 mmに篩別した試料を用いて土壌平板法により菌数の調査をすれば良いであろう。

この調査方法で圃場の *F. oxysporum* の分布を調べた。栽培期と休閑期の圃場土壌中には厚膜孢子由来の *F. oxysporum* は前者に少なく後者に多い。作物により菌数は異なるが、同じキュウリ栽培圃場でも水田圃場を除いては発病程度の類似した圃場では砂土や赤色土に比べて灰色土壌では多くの *F. oxysporum* が出現した。

文 献

- 1) 小倉寛典・高木 廣・菅野広士・山口英夫：高知大学研報., 26農学, 203-209 (1977).
- 2) 小倉寛典・佐橋憲生：同上, 35, 37-46 (1986).
- 3) 駒田 旦：東近農試研報., 29, 132-269 (1976).
- 4) NASH, S. M., CHRISTOU, T. and SNYDER, W. C.: *Phytopathology*, 51, 308-312 (1961).
- 5) WARCUP, J. H.: *Nature*, 166, 118 (1950).
- 6) JOHNSON, L. F. and MANKA, K.: *Soil Sci.*, 92, 79-84 (1961).
- 7) GARRETT, S. D.: "Pathogenic Root Infecting Fungi", 294pp. Cambridge Univ. Press, London (1970).
- 8) 西村正暘・松永碩哉・広江 勇：鳥取大砂丘研報., 7, 9-15 (1966).
- 9) 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. 103-135, 全農教協会, 東京(1980).
- 10) 小玉孝司：野菜病害虫防除に関するシンポジウム, 日植防協会編, p. 14-23 (1980).
- 11) KATAN, J.: *Annu. Rev. Phytopath.*, 19, 211-236 (1981).
- 12) 馬 俊栄・小倉寛典：日植病報., 56, 132 (1990).
- 13) 小倉寛典・梅澤武司：同上, 54, 104 (1988).
- 14) HORIKAWA, Y., TERAJ, T. and OGURA, H.: *Soil Sci. Plant Nutr.*, 25, 357-364 (1979).
- 15) 小倉寛典・稲葉登志夫：日植病報., 50, 115 (1984).

(1990年 9月28日受理)

(1990年12月27日発行)

