

# *Pythium aphanidermatum* の遊走子の行動に関する土壌条件

小倉 寛典・山本 好伸\*・吉本 均\*\*  
(農学部 植物病理学研究室)

## Soil conditions related with behaviour of zoospores of *Pythium aphanidermatum*

Hirosuke OGURA, Yoshinobu YAMAMOTO and Hitoshi YOSHIMOTO  
*Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture*

**Abstract :** Soil conditions related with behaviour of zoospores of *Pythium aphanidermatum*. Hirosuke OGURA, Yoshinobu YAMAMOTO and Hitoshi YOSHIMOTO *Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture*, The behaviour of zoospores of *Pythium aphanidermatum* were observed on soil conditions. Most of zoospores stopped their migration within six hours in sterilized water, and turned to cyst type. They continued however their activities six hours or more in soil with rough spaces and high humidity. Soil microorganisms did not inhibit their movement. Root exudates from cucumber roots inhibited their migration and turned them to cystzoospores little earlier. The more the zoospores continued their movement, the more they arrived at far distance. On the other hand, zoospores turned to cystzoospores easily at a lot of plant exudates or organic materials. There was no relative phenomenon, however, between making cystspore and germination of them. The pathogenicity of cystzoospore to cucumber seedlings was disappeared about 5 days after cyst formation. This fact was clear in each soil condition, though zoospore activities were different in each soil condition.

From these results it is considered that there are two types about the lost of zoospore's move. One is for contact to something physically, and other is for accept some chemicals. The former will be appeared on the way to disperse themselves, and the later will be to store the potential for activities. It seems that these procedures of the fungus are governed by soil conditions which the fungus behave in.

*Pythium aphanidermatum* は一般に新鮮な残渣や有機物を利用して腐生生存する競合力の弱い菌とされている。不適な環境の下では厚膜の卵胞子を形成して生残り、環境の好転により短期間のうちに遊走子を大量に形成して広範囲に伝搬する。このため、本菌は自然条件下で菌の消長がはげしく、圃場における潜在的な病害となりうる可能性がある。この原因の1つである遊走子の土壌中での動向については調査がほとんど行われていない<sup>1, 2, 5, 6, 7)</sup>。

本報告では、*P. aphanidermatum* の遊走子の移動あるいは被のうの過程で影響があると考えられる土壌要因が遊走子に与える利害について検討した。

---

\* 現在 日本農薬株式会社 生物研究所

\*\* 現在 和歌山県農業試験場

## 実験材料

供試菌は *Pythium aphnidematum* (保存番号 P501) である。遊走子はずぎの方法で調整した。供試菌を V 8 ジュース寒天培地上に接種し、同時に接種源から約 2 cm はなれた位置に 2.5 cm × 2 cm の滅菌したセロファンを敷き 25°C に静置した。6 日後にセロファン上の菌そうをセロファンとともに取り出して 30 ml の殺菌蒸留水に入れ、4 時間後に遊走子の放出をたしかめたのち菌そうとセロファンを取出して遊走子懸濁液とした。この懸濁液を適宜稀釈して所定の遊走子濃度として実験に供した。

## 実験方法および結果

**実験 1. 土壌の条件と遊走子の運動** 土壌中の遊走子の動きに関係ある要因として土壌粒子の大きさ、土壌微生物および土壌養分について調査した。

土壌粒子の大きさ：土壌のかわりにガラス球を用いた。直径 2.5 mm および 1 mm のガラス球 10 ml を径 18 mm の試験管に入れ、水を加えたのち、実験開始時まで 25°C に保った。遊走子懸濁液 ( $7 \times 10^4$  遊走子/ml) を 2 ml を加え 25°C に静置した。加える水量を調整し、含水量を約 90% および 50% とした。

土壌微生物：当研究室所属の圃場より採取した土壌を等量の水と混合攪拌し、10 分後にその上澄液を吸引ろ過し、土壌微生物懸濁液とした。殺菌土壌抽出液はこの懸濁液を加圧殺菌した。それぞれの液を等量の遊走子懸濁液を混ぜ、25°C に静置した。

土壌養分：殺菌蒸留水、上記の殺菌土壌抽出液およびキュウリ根浸出液を用いた。キュウリ根浸出液は約 1 週間生育させた幼苗を根に付着する土壌を水洗したのち、ペントレックス 1250 ppm 水溶液で 1 時間浸漬したのち、50 ml の殺菌水に根を浸し、24 時間 25°C の陽光恒温器に保ち、浸漬液を遠沈して上澄液を用いた。各液は等量の遊走子懸濁液と混合し、25°C に静置した。

遊走子の検出：各区より所定時間後、供試した懸濁液をとり出して検鏡し、視野内の全遊走子および遊泳遊走子を計数し、遊泳比を求めた。土壌粒子の大きさにおける遊泳比の調査では、各区の管内の添加水量が一定になるように水を加え、過飽和の状態にしたのち、ピペットで管の上位、中位、下位から添加した水を採取し、遊走子を検鏡し、生存は平均で示した。

遊走子の遊泳時間は土壌粒子の大きさにより異なり、粗い粒子は細かい粒子よりも運動遊走子は多く、遊泳時間も長く 12 時間をすぎても遊泳するものが認められた。含水量は高い程遊泳には有利であるが、粗い粒子では過湿状態は適湿状態に比べてつねに遊走子に好適な環境を与えるが、細かい粒子では過湿状態は粗い粒子ほどの影響があらわれなかった。遊走子が遊泳中に接触あるいは接近する土壌微生物は遊走子の行動を阻止するには至らず生存数、生存時間ともに有意の差を示さなかった。土壌溶液に含まれる物質は遊走子の遊泳に影響を与え、本菌の寄主作物であるキュウリの根からの浸出物は短時間のあいだに遊泳を停止させた。しかし、土壌抽出物はその効果が明らかではなかった (第 1 図)。

つぎに条件の異なる土壌中の遊走子の移行について検討した。遊走子のスライドガラス上の水滴中の軌跡は特殊の場合を除いては直線的に移行することなく多くは複雑な曲線を示した。さらに水滴中に粘土鉱物を加えると遊走子の行動は多岐にわたり軌跡は観察のたびに異っていた。それ故、遊走子の到達距離は行動時間に必ずしも比例しなかった。

遊走子の到達を確認するのに本実験ではトラップ法を用いたが、トラップの種類について調査した。トラップとして、挽き割りトウモロコシ、キュウリ幼苗根、Czapek 寒天片 (寒天 2.5%)、水

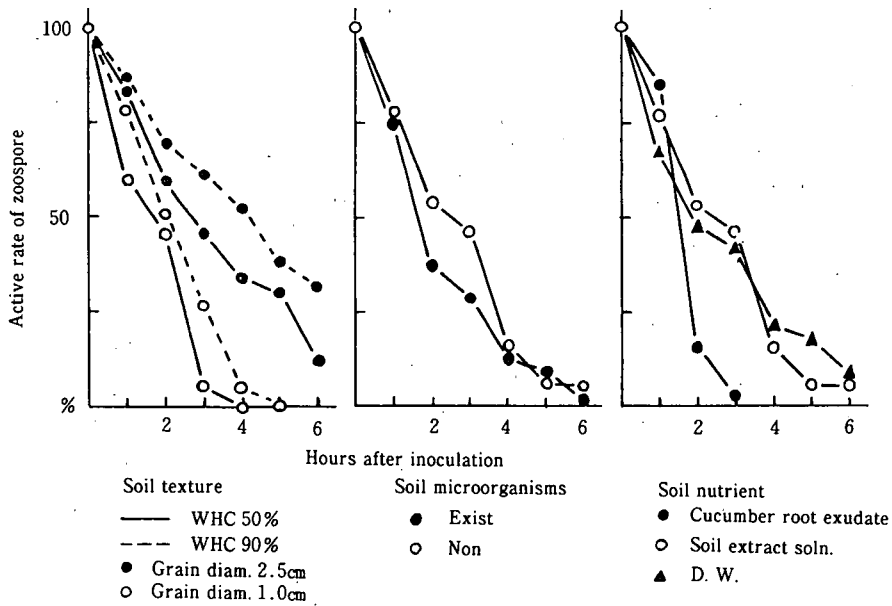


Fig. 1 Soil conditions related to activities of zoospores of *P. aphanidermatum*.

寒天片 (寒天2.5%) を用い、同時に土壌から直接に菌を分離した。トウモロコシはペントレックス1250 ppm 液であらかじめ煮沸し、冷却したのち、5 mm 立方の碎片としたものを用いた。キュウリ根は種子を表面殺菌後2日25℃の湿室に置いて発芽させた幼苗の根のみを切断して用いた。Czapek 寒天片および水寒天片は5 mm 立方の碎片を用いた。径2 mm に節別した砂を径15 cm、高さ4 cm のシャーレに入れて殺菌後、殺菌水あるいは土壌浸出液を加えて含水量を90% (V/V) とし25℃に静置した。シャーレを動かすことなく、その一部に1 ml の遊走子懸濁液 ( $5 \times 10^2$  遊走子/ml) を点注し、その点を中心に放射線上に所定の距離に各トラップを深さ0.5 cm に埋めた。24時間後にトラップを取り出し、2%アンチホルミンで洗滌後、コーンミール培地上に移して *P. aphanidermatum* の出現の割合を調査した。土壌からの本菌の分離はトラップを埋めたのと同じ距離から土壌0.01 g を取り出し、コーンミール培地上に並べて出現する本菌を調査した。

Table 1. Trap material for catch of zoospores of *P. aphanidermatum* in soil.\*<sup>1</sup>

Trap	Add sterile water				Add soil extract soln.			
	* <sup>2</sup> 3 cm	4.5	6	7.7	* <sup>2</sup> 3 cm	4.5	6	7.5
Cucumber root	* <sup>5</sup> +++	++	+	±	* <sup>5</sup> ++	+	+	-
Corn grain * <sup>3</sup>	+++	+++	+	-	++	+	+	-
Czapek's agar disk	++	+	±	-	±	±	-	-
Water agar disk	+	±	-	-	±	-	-	-
Soil grain * <sup>4</sup>	++	++	-	-	±	±	-	-

\* 1 Use sand added sterile water or soil extract solution

\* 2 Distance from zoospore inoculated point.

\* 3 Corn grain boiled in hot water added pentrex.

\* 4 Isolated the zoospores from sand directly.

\* 5 Rate of occupied trap by the fungus. +++:100%, ++:75%, +:50%, ±:25%, and -:0%

トラップの精度はキュウリ根とトウモロコシ碎片が良好であり水寒天片は悪かった。Czapek 寒天片もある程度の精度をもつが、土壤懸濁液添加により細菌汚染を阻止出来なかった(第1表)。この結果より、以下の実験においては常時入手して使用可能であるトウモロコシ碎片を用いて遊走子の移行を調査した。

土壤環境として水分含量、土壤粒子、土壤微生物、土壤養分の遊走子の移行への影響を調査した。いずれの実験においてもとくに言及しない限り径15cm、高さ4cmのシャーレに径2mmに節別し、水洗後乾燥した砂を入れ、水分含量を80-90% (V/V) に保ち、その一端に遊走子懸濁液1.5mlを静かに点注し、25℃に静置した。接種点から放射線上に3, 4.5, 6, 7.5cmの位置にトラップを埋め、24時間後にトラップに着生する *P. aphanidermatum* を調査した。

土壤含水量は乾燥した砂を入れた上記のシャーレに0-15%, 30-45%, 60-75%, 90-100%, 120%になるようにそれぞれに噴霧器で全面に殺菌水を噴霧し、少時静置ののち遊走子を接種した。土壤粒子の大きさの影響は、上記の砂のほかに、殺菌した壤土、径1mm, 2.5mmのガラス球を用いて調査した。土壤微生物としては前記の土壤浸出液を殺菌あるいは無殺菌で加えて含水量を調節した。土壤養分は前記の殺菌蒸留水、殺菌土壤抽出液およびキュウリ根浸出液を用いた。

Table 2. Soil conditions related with zoospore migration of *P. aphanidermatum*.

Soil condition	Migrated distance				
	*1 3cm	4.5	6	7.5	
Water holding capacity (V/V)	0-15%	*2 -	-	-	-
	30-45	±	-	-	-
	60-75	+	±	-	-
	90-100	+++	++	+	-
	120	+++	+++	++	-
Soil texture	Glass ball 2.5cm diam.	+++	+++	+++	+++
	Glass ball 1cm diam.	+++	+++	++	++
	Sterilized sand	+++	++	+	-
	Sterilized loam	++	++	-	-
Soil microorganisms	Exist	++	+	±	-
	Non	++	++	+	-
Soil nutrients	Cucumber root exudates	+++	+++	±	-
	Soil extract	++	++	+	-
	Sterilized water	+++	++	+	-

\*1 Distance from zoospore inoculum

\*2 Rate of occupied corn grain trap by the fungus. +++:100%. ++:75%. +:50%. ±:25%. -:0%

遊走子の移行に及ぼす諸要因の影響は第2表に示した。土壤含水量が大になるにつれて遊走子の移行量および移行距離は大になった。とくに、含水量が90%を越えると遊走子には好適な環境となり、過飽和の状態は遊走子の遊泳にはきわめて有利であった。土壤粒子は大きい程遊走子の移行に好環境であり、しかも均一な粒のガラス球径は不均一な粒径の砂土よりも移行量、移行距離ともに大であった。壤土は移行は困難であった。土壤微生物は遊走子の移行を阻止出来ないが、トラップからの出現率は低下した。これはトラップに着生する微生物群が本菌の着生を阻止するか、あるいは着生した遊走子の活性を低下させたと思われる。土壤中のキュウリ根よりの浸出物は遊走子の移行距離を低下させた。しかし、接種点に近い距離では移行菌量は多く認められた。土壤抽出液は遊走子の移行には何の影響も認められず、移行の様相は蒸留水を加えた場合と異なるところはなかった(第2表)。

## 実験2 被のう遊走子の活性維持

遊走子のうより放出された遊走子は過湿土壌中あるいは水中を遊泳しながら移行し、やがて植物体に到達すると被のう遊走子となり発芽菌糸により植物体内に侵入する。この実験では遊走子の集合の様相ならびに被のう後の活性の低下について検討した。

遊走子の誘引材料としてキュウリ (品種：四葉) およびトウガラシ (品種：シシトウ) の幼苗の根、オガクズ、イネわら、脱脂綿、V8ジュース寒天片、水寒天片を用いた。植物根は100 ppm ストレプトマイシン加用0.0025%リン酸水溶液に10分浸漬後、殺菌水で洗滌した。他の材料は加圧殺菌後、薄片として用いた。スライドグラスに $2 \times 10^4 / ml$ の遊走子懸濁液0.2 mlを滴下し、各材料薄片を加えて25℃の湿室に静置した。30分後に単位面積当りの被のう遊走子を計数し、各材料の被のう孢子比数を求めた。また、発芽した被のう孢子を観察した。

Table 3. Activities of cystzoospores on materials in soil.

Material	Rate of cystzoospore	Germ rate of cystzoospore
Cucumber root	*425	75.8%
Sweet pepper root	252	68.4
Saw dust	27.3	14.5
Rice straw	34.0	2.9
Cotton fiber	few	0
V-8 juice agar block	16.0	25.7
Water agar	2.5	5.1

\* Rate of zoospore on material per unit area

遊走子は生活根に集まりやすく、次いで植物残渣に集まった。これらに比べて誘引有機物量の滲出の少ないと見られる寒天片および脱脂綿には殆んど着生しなかった。しかし、被のう孢子の発芽は生活根に次いでV-8ジュース寒天片に多く見られた。他の材料よりも利用可能な有機物が多いと思われる (第3表)。

つぎに遊走子の被のう後の活性維持を被のう孢子の発芽とキュウリ幼苗の病害の発生で観察した。土壌要因と遊走子の遊泳の実験より、殆んど遊走子は10時間前後までに運動を停止し、被のうすることを知った。本実験では処理1日後から調査を開始した。実験1と同様に、土壌粒子として径1 mmのガラス球を用い、50 mlを三角フラスコに入れて殺菌後、遊走子懸濁液25 mlを接種した。土壌微生物の影響は、殺菌あるいは無殺菌の土壌抽出液25 mlを等量の遊走子懸濁液と混合して調査した。土壌中の養分として、キュウリ根浸出液、土壌抽出液、蒸留水のそれぞれ25 mlを等量の遊走子懸濁液と混合した。実験はいずれも25℃の恒温の下で行った。供試した懸濁液はいずれも $1 \times 10^5$ 遊走子/mlであった。砂100 mlを入れて殺菌した径9 cmの腰高シャーレに表面殺菌後、蒸留水で催芽させたキュウリを播種し、接種後1, 2, 3, 4, 5日目に各処理遊走子懸濁液30 mlを加えた。さらに殺菌水を加えて土壌湿度を75-90% (V/V)とした。7日後にキュウリを採取って被害の程度を調査した。また、各処理液を砂に接種する時にその一部を採取してコーンミール寒天培地を薄く敷いたスライドグラス上に滴下し、25℃で6時間培養に検鏡し、被のう遊走子の発芽を調査した。なお、ガラス球実験区では、砂に接種する時に殺菌水25 mlを加えて他区と同様に50 mlとした。

被のう遊走子の発芽はいずれの条件の下でも経時的に低下するが、形成後5日までは50%あるいはそれ以上を維持していた。とくにキュウリ根抽出液中では高い発芽率を示し、ガラス球がこれに次ぎ、土壌抽出液は蒸留水と比較して差異は認め難かった。土壌中の微生物を含む土壌溶液を添加

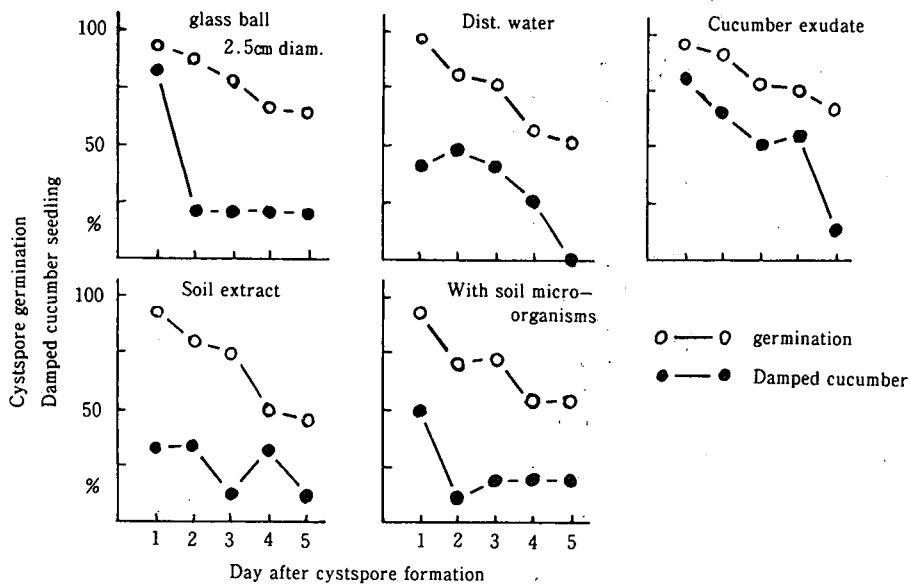


Fig. 2. Continuance of cystozoospore activities of *P. aphanidermatum* in different soil conditions.

しても2日目でやや他よりも発芽が劣る程度で、明らかに微生物群による発芽活性の阻止はなかった。

被のう遊走子によるキュウリの苗立枯病の発生は、いずれの条件でも被のう5日になると発病率は極度に低下した。土壤微生物の存在、ガラス球の存在は被のう遊走子の活性を2日目にすでに低下せしめた。類似の傾向は土壤抽出液中でも認められ、いずれも蒸留水添加の場合よりも発病低下の様相が早く出現した。これに対し、キュウリ根浸出液を加えた場合の被のう遊走子は発病力は強く、4日目までは高い病原性を示した。

## 考 察

*P. aphanidermatum* は腐生競争の弱い pioneer fungus とされている。それ故、本菌の生活は他の競争微生物の影響の少ない場所に限定され、腐生的生存とともに遊走子による移動と胞子による耐久生存が本菌の生活史の中で注視されている<sup>2, 3, 5, 6</sup>。

小倉・山本<sup>6</sup>は *P. aphanidermatum* の行動は壤土よりも砂土で大で、しかも過湿で有利であると報告した。土壤条件をさらに検討すると、土壤中の微生物は遊走子の行動を阻止するには至らない、また、土壤中の水溶性成分も遊走子にはほとんど影響を与えない。しかし、土壤粒子は粗大であれば遊泳には有利であり、さらに過湿であることは遊走子の遊泳空間を拡大する。粒子が微細であれば土壤水分の有効性は制限される。Duniway<sup>1</sup>は同じ現象を *Phytophthora cryptogea* で報告し、小倉・吉本<sup>7</sup>も *P. zingiberum* で類似の現象を観察している。遊走子の移動距離も上記の条件を満たす場合には大きくなる。Mac Donald and Duniway<sup>4</sup>は遊走子の運動性の消失は土壤粒子との物理的接触による被のう化であるとした。しかし、移動における土壤自由水あるいは重力水の効果、土壤の界面効果や吸着については検討する必要がある (第1図, 第1表, 第2表)。

土壌中に植物の浸出物が存在すると遊走子の運動は停止し、被のうし、従って移動距離も小さくなる。この場合、被のう遊走子は他の条件で被のうした遊走子に比べて発芽率も高く、寄主作物を侵す力も強く、かつ、菌数も多い(第1, 2図, 第2表)。このことは、遊走子が運動性を消失する場合に、物理的接触などによる外因的な運動性の消失の場合と、栄養物あるいは何らかの物質的刺激に反応して運動性を消失する場合があります、被のう遊走子のもつ活性は明らかに後者で大である。このように、土壌中での遊走子の行動を考える場合には、移動伝搬を考慮する active な面と、早く被のう化して活性を維持し病原力を保持する negative な面の両方に注意を払う必要がある。

遊走子は土壌中に有機物を生産する存在に向けて集まり、被のうする。とくに生活根には多くの被のう胞子が認められ、被のう後の早い時期に発芽する(第3表)。しかし、イネわら、オガくず、V-8 ジュース寒天のように遊走子の集合とそれに続く被のう遊走子の発芽は各材料の含有物質により異なっている。Rai and Storobel<sup>8)</sup>は *Aphanomyces cochlioides* のビートに対する行動から遊走子の集合にはビートの生産する糖類が、発芽と菌糸の伸長にはアミノ酸が関係すると報告している。被のう遊走子の発芽は被のうを生じた土壌条件により多少の差異があるが、5日後でも半数が発芽可能である。小倉・山本<sup>6)</sup>がさきに報告した例はこの時点で全体の1/3しか活性を示していないが、被のうを形成する環境による影響が大きく作用したと見るべきであろう。

環境が異なるにも拘らず本実験で形成した被のう遊走子は大略類似の発芽様相が認められたが、キュウリ幼苗の侵害は明らかに異なっている。さきに述べたキュウリ根浸出液中で形成された遊走子を除いて、土壌溶液中での被のう遊走子はキュウリを侵す potential が低く、ガラス球の存在の下で形成されたものは高い活性を示すが、やはり2日以降は急激に活性を失なう(第2図)。

*P. aphanidermatum* の遊走子は土壌の条件により分散距離や分散密度は異なり、移動後の被のうの様相も異なる。さらに被のう後の時間の経過とともに次第に活性を失ない、発芽勢の消滅、発芽はしても感染能の消滅などの現象が認められ、そのいずれもが被のう遊走子を形成した時の土壌条件と関わりがあると思われる。

## 要 約

*Pythium aphanidermatum* の遊走子の行動を土壌要因の関連の下で観察した。

遊走子は大略6時間でほとんどが活性を失ない被のうした。土壌粒子が大きく過湿の下では運動性は6時間を越えて持続した。土壌微生物は遊走子の行動をほとんど阻害しなかった。キュウリの根の浸出物は遊走子の活動を阻止し、被のうの時期は早かった。遊走子の移動距離は運動性持続期間と正の相関があった。遊走子の被のうは有機物の生産あるいは浸出の多い場所で多くみられた。しかし、被のうと発芽は関連のない現象であった。キュウリに対する病原性は被のう後5日で消滅した。

以上の結果から、遊走子の運動性の消失は物理的な接触による被のうと栄養物に反応して生じる被のうの両型があり、前者は拡散の行程で起り、後者は活性の保蔵であろう。いずれも遊走子の置かれた土壌条件により支配されてると思われる。

## 文 献

- 1) Duniway, J. M. *Phytopathology*, 66 : 877-882 (1976)
- 2) Hendrix, F. F. and Cambell, W. A. *Ann. Rev. Phytopath.*, 11 : 77-89 (1973)
- 3) 一谷多喜郎 土壌病害の手引, 日植防協会編. 東京, 130-132 (1984)
- 4) MacDonald, J. D. and Duniway, J. M. *Phytopathology*, 68 : 1627-1630 (1978)

- 5) 小倉寛典 高知大学研報., 33 農学 : 71-81 (1985)
- 6) 小倉寛典・山本好伸 四国植防研., 20 : 11-18 (1985)
- 7) 小倉寛典・吉本均 高知大学研報., 32 農学 : 69-76 (1984)
- 8) Rai, P. V. and Strobel, G. A. *Phytopathology*, 56 : 1365-1369 (1966)

(昭和61年 9月29日受理)

(昭和61年12月27日発行)