

# *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* に拮抗する 放線菌群の性質

小倉 寛典・矢羽田 二郎

(農学部植物病理学研究室)

## The characters of Actinomycetes with antagonistic activities to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*

Hirosuke OGURA and Daijiro YAHATA

Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture

**Abstract:** The characters of Actinomycetes with antagonistic activities to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. Hirosuke OGURA and Daijiro YAHATA. Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture.

There were many groups of Actinomycetes with antagonistic activities to *F. oxysporum*. Their distribution was different in every field but not at kinds of crop. The antibiotics to *F. oxysporum* was not a simple substance. They were different at diffusible activity in soil, inhibition to mycelial growth and to spore germination, but could not appear the lysis of mycelia. Though the absorption of glucose and nitrate-nitrogen was different in each strain, this character was not always agree with the activity of antagonism by antibiotic production. Many of strains required a lot of nitrogen than *F. oxysporum*. When antagonistic strain was in competition with *F. oxysporum*, activity of the strain was influenced by nutritional condition in soil, and the strain having severe antagonistic activity on medium was not always in severe suppressive to pathogen in soil. Even the strain having non-inhibitive ability to pathogen suppressed the increase of *F. oxysporum* in soil, if it had severe competitive ability successively. From these results it is appeared that the activity of Actinomycetes might be pointed out by two ways: the one is the production of antibiotics and the other is the saprophytic competitive ability.

自然土壌には土壌病原菌の生育あるいは胞子の発芽を阻害する拮抗作用があり<sup>3,13)</sup>、その一因は放線菌によるとされている<sup>8)</sup>。また、土壌病原菌の防除に土壌生息性微生物を利用しようとする試みは古くから行なわれている<sup>1,12)</sup>。土壌中に生息する放線菌は抗菌性物質を生産するものが多く、その特異性は病原菌に対する微生物環境の面から無視しえない。ダイコン萎黄病の発生しやすい赤土には黒ボク土壌に比べてこの病原菌に拮抗的な放線菌が少ない<sup>6)</sup>。また、放線菌の抗菌力は培地上での活性と土壌中での活性は必ずしも一致しない<sup>14)</sup>。放線菌の拮抗に関する多くの報告は抗菌性物質の生産について検討を加えている。一方、糸状菌の拮抗あるいは溶菌については、土壌拡散性物質による活性の低下、膜物質の機能低下に起因する自己消化現象、あるいは養分飢餓ならびに膜物質の分解についていくつかの知見が得られている<sup>2,4,5,8)</sup>。

本報告は *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* に対する拮抗の様相を放線菌を用いて検討した。

### 実験方法および結果

#### 1. 放線菌の採取

1978年4月から5月に南国市のビニールハウス地帯より作物の発病の有無に関係なく無作為にビニールハウスを掘り、畝の表土下5cmの位置の土壌を採取して寒天稀釈法により放線菌を得た。

供試温度 25°C, 供試培地はジャガイモ 100 g 煎汁, ペプトン 2 g,  $K_2HPO_4$  0.5 g,  $MgSO_4$  0.5 g, NaCl 0.5 g, グリセリン 5 ml, 寒天 25 g/l である。採取した放線菌は各ビニールハウスごとに菌そうの形態により14群に区分し, 保存した。

各菌群を代表する菌株を上記の培地を注入した径 9 cm のペトリ皿の一端に長さ 5 cm の線状に接種し, 25°C に静置し, 3日後に *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (保存番号 F 501) を他端に接種した。両菌の間隔は 3.5 cm である。*F. oxysporum* 接種3日後に阻止帯を測定した(第1表)。

供試菌株のうち 26.5% は *F. oxysporum* に対し抗菌力を示したが, その分布は栽培作物よりも地域により, あるいは各ビニールハウスごとに差異が認められた。

Table 1. Antagonistic activity of Actinomycetes to *F. oxysporum* on agar plate.

Group No.	Inhibited zone	Crop in field	District isolated
1-1	0	Cucumber	Nankoku-shi Tamura
1-2	0		
1-3	0		
1-4	0		
1-5	0		
1-6	0		
1-7	0		
1-8	0		
1-9	0		
2-1	0	Cucumber	Nankoku-shi Tamura
2-2	0		
2-3	0		
2-4	0		
2-5	0		
2-6	0		
3-1 (A 801)*	11	Cucumber	Nankoku-shi Eida
3-2	6		
3-3	0		
3-4	0		
3-5	0		
3-6	0		
4-1	2	Melon	Nankoku-shi Monobe
4-2	0		
4-3	0		
4-4	0		
4-5	0		
4-6	0		
4-7	0		
4-8	0		
4-9	0		
4-10	0		
4-11	0		
5-1 (A 805)*	11.3	Egg plant	Nankoku-shi Eida
5-2 (A 802)*	11		
5-3 (A 803)*	12.3		
5-4	4.7		
5-5	1.5		
5-6	1		
5-7 (A 808)*	0		
5-8 (A 809)*	0		
5-9	0		
5-10	0		
5-11	0		
5-12	0		
5-13	0		
5-14	0		

Group No.	Inhibited zone	Crop in field	District isolated
6-1 (A 804)*	18.7	Water melon	Fac. of Agriculture
6-2	6.5		
6-3	0		
6-4	0		
6-5	0		
6-6	0		
6-7	0		
6-8	0		
6-9	0		
6-10	0		
6-11	0		
7-1	5.5	Bean	Fac. of Agriculture
7-2	1.1		
7-3	0		
7-4	0		
7-5	0		
7-6	0		
7-7	0		
8-1 (A 806)*	8.7	Melon	Fac. of Agriculture
8-2 (A 807)*	8.3		
8-3	5.7		
8-4	4.5		
8-5	4		

\* Strain mark used in following experiment

2. 放線菌生活域における *F. oxysporum* の生育阻害

供試菌株として第1表に示した9菌株を用いた。各菌株を2cm間隔で前記の培地上に線状に接種し、3日後に菌そうの間隙の寒天を7mmの円板に切り取った。この寒天片を培地上に並べ、*F. oxysporum* に対峙させた(第2表)。

Table 2. Inhibition of mycelial growth of *F. oxysporum* by agar block\* near Actinomycetes mat

Strain	Inhibited zone	Strain	Inhibited zone
A 801	1.5 mm	A 806	8.3
A 802	0	A 807	0
A 803	11.5	A 808	0
A 804	9	A 809	0
A 805	0		

\* 7 mm of agar blocks were cut off from spaces between two lines of Actinomycetes mat with 20 mm interval.

A 803, A 804 の寒天円盤は明らかに *F. oxysporum* の生育を阻止し、菌そう周縁部の菌糸は厚膜化した。第1表で多少とも阻止力をもつ菌株から得た寒天片は *F. oxysporum* の菌糸と接触した場において、あるいはそれ以前において菌糸の伸長を阻止するが、A 808, A 809 のように阻止力を認められない菌株では寒天片全面に *F. oxysporum* が伸展した。

上記と同様に培地の中央部に線状に放線菌を接種し、培養後菌そう周辺より0, 1, 2 cmの位置から得た各菌株の径7mmの寒天円板を湿室内のスライドガラス上に並べ、1mlあたり $1.0 \times 10^5$ の *F. oxysporum* 分生孢子懸濁液を噴霧して25°Cに7時間静置し、寒天片上の発芽率を調査した(第3表)。

Table 3. Germination of microconidia of *F. oxysporum* on agar plate near Actinomycetes mat.

Strain	Distance from Actinomycetes mat		
	0 cm	1 cm	2 cm
A 801	* 0 %	4.5	87.1
A 802	0	0	87.5
A 803	0	48.1	84.3
A 804	21.3	28.1	68.8
A 805	0	46.2	100
A 806	34.7	58.9	75.5
A 807	100	100	100
A 808	24.4	59.0	79.2
A 809	100	100	100

\* Per cent of germination: The germination of conidia of *F. oxysporum* on PDA or water agar is in 100 %.

A 802, A 801, A 805, A 803 の分生孢子発芽抑制力は強く, A 807, A 809 では抑制は認められない。また, A 803, A 804 の寒天片上の分生孢子には厚膜化したものや崩壊したものが他に比べて多く認められた。しかし, 菌そうからの距離により抑制の程度は劣化し, その様相は菌株により異なる。これは生産物の拡散性の相違と思われる。

### 3. 放線菌の炭素源および窒素源の費消

炭素源としてグルコース, 窒素源として硝酸態窒素を用いた Czapek 液にチアミン 200  $\mu\text{g}$ , ビオチン 1  $\mu\text{g/l}$  を加え, 放線菌各菌株および *F. oxysporum* を接種し, 25°C で16日間培養した。但し, *F. oxysporum* は13日とした。滲液に残留する  $\text{NO}_3\text{-N}$  をフェノール硫酸法, グルコースをフェノール比色法で測定し, 吸収量を調査した。また, 各菌株の乾燥菌体重も調査した (第4表)。

Table 4. Utilization of carbon and nitrogen sources by Actinomycetes in Czapek's solution.

Strain	Mycelial weight	Glucose		$\text{NO}_3\text{-N}$	
		Utilized quantity	Utilized ratio	Utilized quantity	Utilized ratio
A 801	81.3 mg	8.4 mg/ml	40.38 %	159.3 $\mu\text{g/ml}$	69.47 %
A 802	46.0	5.2	25.0	186.1	81.16
A 803	50.3	10.4	50.0	156.2	68.12
A 804	56.1	10.2	49.04	144.5	63.02
A 805	41.6	6.9	33.17	168.5	73.48
A 806	34.9	7.8	37.50	179.1	78.11
A 807	78.9	14.4	69.23	177.7	77.49
A 808	45.0	10.6	50.96	161.3	70.34
A 809	78.2	11.2	53.85	195.1	85.08
<i>F. oxysporum</i>	93.6	14.0	67.31	110.7	48.28

菌そうの生育は A 801, A 807, A 809 が良く, グルコースの費消は A 807, A 809, A 808, A 803, A 804 が,  $\text{NO}_3\text{-N}$  の費消は A 809, A 802, A 806, A 807 が大きい。*F. oxysporum* はグルコースの費消は放線菌より大きい, 窒素源は放線菌ほど必要としない。供試した放線菌のうち, 限定された養分環境の中で *F. oxysporum* と養分競合しうるのは炭素源を多量に消費する A

803, A 804, A 807, A 808, A 809 であろうと思われるが, その活性は窒素源の有無に左右されると考えられる。

4. 土壤中における Actinomycetes による *F. oxysporum* の抑制

*F. oxysporum* に対する放線菌の抑制要因として菌糸の生育阻害, 胞子発芽阻害, 養分奪取を培地を用いて調査したが, 土壤中での抑制が培地と同様に生じるか否かを検討した。

当研究室所属の圃場より採取した土壌を 2 mm に篩別し, 腰高ペトリ皿に入れて加圧殺菌したのち, 放線菌各菌株を *F. oxysporum* とともに混和した。Czapek 液を加えて湿度を 60% (v/v) とし, 25°C で 15 日間静置したのち, 菌数を調査した (第 5 表)。菌数の調査は放線菌はコロイドキチン培地<sup>7)</sup>, *F. oxysporum* は駒田の選択培地<sup>6)</sup> を用いた。

Table 5. Suppression of *F. oxysporum* by Actinomycetes in sterilized soil.\*

Strain	Actinomycetes ( $\times 10^6$ )	<i>F. oxysporum</i> ( $\times 10^5$ )	Ratio of existence of <i>F. oxysporum</i>
A 801	9.2	6.4	** 29.1 %
A 802	7.8	10.6	48.2
A 803	18.3	3.1	14.1
A 804	18.8	2.7	12.3
A 805	25.2	10.3	46.8
A 806	6.6	20.9	95.0
A 807	9.3	5.0	22.7
A 808	5.1	5.8	26.4
A 809	20.2	7.6	34.5
<i>F. oxysporum</i>	—	22.0	100

\* Soil incubated at 25 C for 15 days after contamination by both microorganisms.

\*\* Number of *F. oxysporum* contaminated with Actinomycetes / Number of *F. oxysporum* with none  $\times 100$

放線菌を添加すると A 806 以外はいずれの菌株を用いても *F. oxysporum* の増加を抑制する。A 803, A 804, A 807, A 808, A 801, A 809 はその程度が大きい。放線菌の増加も A 805, A 809, A 803, A 804 は大きい。

A 804 は抗菌物質を生産する菌株であり, A 809 は抗菌物質を生産しないことが第 2, 3 表から知られている。この両菌株を *F. oxysporum* とともに殺菌土壌あるいは無殺菌土壌に接種し経時的な変動を調査した (第 6 表)。

殺菌土壌では A 809 は A 804 に比べて菌数の増加がはやく起り, それに応じて *F. oxysporum* の抑制も早くから認められる。しかし, A 804 による抑制は後期には A 809 によるそれ以上にげしくなった。自然土壌中でもこの傾向は殺菌土壌中と同様であるが, 殺菌土壌中のように明確にはあらわれない。おそらく他の微生物による多くの要因が放線菌の活性に関与していると同時に *F. oxysporum* に対しても作用し, 菌数の低下がはげしいために放線菌の作用が隠蔽されたものと考えられる。

供試した放線菌と共存した場合の *F. oxysporum* の生存を殺菌土壌, 無殺菌土壌, Czapek 液を加えた無殺菌土壌中で調査した。方法は上記の殺菌土壌の場合と同様である (第 7 表)。

無殺菌土壌中では殺菌土壌に比べて放線菌の活性は著しく低下する。しかし, 無殺菌土壌に養分を加えると活性の増高する群とさらに低下する群とに分かれる。前者には A 802, A 804, A 805,

Table 6. Survival of Actinomycetes and *F. oxysporum* in soil contaminated with both microorganisms.

Actinomycetes inoculated		Days after inoculation			
		I	6	11	16
A 804	Actinomycetes ( $\times 10^5$ )	2.3	6.4	4.4	16.5
	<i>F. oxysporum</i> ( $\times 10^4$ )	7.5	23.1	29.9	15.1
	Ratio of survived <i>F. oxysporum</i> (%) <sup>*</sup>	132	136	65.5	38.2
A 809	Actinomycetes ( $\times 10^5$ )	4.8	30.6	28.3	19.2
	<i>F. oxysporum</i> ( $\times 10^4$ )	5.9	7.8	26.3	21.4
	Ratio of survived <i>F. oxysporum</i> (%) <sup>*</sup>	104	45.9	57.3	54.2
None	<i>F. oxysporum</i> ( $\times 10^4$ )	5.7	17.0	45.9	39.5
	Ratio of survived <i>F. oxysporum</i> (%) <sup>*</sup>	100	100	100	100
In natural soil					
A 804	Actinomycetes ( $\times 10^5$ )	12.2	18.8	6.3	22.9
	<i>F. oxysporum</i> ( $\times 10^4$ )	5.6	3.9	0.38	3.0 <sup>**</sup>
	Ratio of survived <i>F. oxysporum</i> (%) <sup>*</sup>	91.8	103	88.4	46.2
A 809	Actinomycetes ( $\times 10^5$ )	29.3	29.8	26.6	52.9
	<i>F. oxysporum</i> ( $\times 10^4$ )	5.6	3.3	0.31	3.0 <sup>**</sup>
	Ratio of survived <i>F. oxysporum</i> (%) <sup>*</sup>	91.8	86.8	72.1	46.2
None	Actinomycetes ( $\times 10^5$ )	5.9	6.4	13.8	14.6
	<i>F. oxysporum</i> ( $\times 10^4$ )	6.1	3.8	0.43	6.5 <sup>**</sup>
	Ratio of survived <i>F. oxysporum</i> (%) <sup>*</sup>	100	100	100	100

\* Ratio of *F. oxysporum* compared with them in soil added none of Actinomycetes.

\*\* This value is not  $\times 10^4$  but  $\times 10$ .

Table 7. Survival ratio of *F. oxysporum* in soil contaminated with Actinomycetes.

Strain	Soil condition		
	Sterilized	Natural	Natural (added nutrients <sup>*</sup> )
A 801	** 29.1 %	67.7	85.5
A 802	48.2	73.8	43.5
A 803	14.1	66.2	84.1
A 804	12.3	46.2	33.3
A 805	46.8	64.6	21.7
A 806	95.0	98.5	99.3
A 807	22.7	69.2	137.7
A 808	26.4	69.2	127.5
A 809	34.5	46.2	43.5

\* Added Czapek's soln.

\*\* Ratio of *F. oxysporum* compared with them in soil added none of Actinomycetes incubated for 15 days at 25 C.

A 809 があり、後者には A 801, A 803, A 806, A 807, A 808 がある。

## 考 察

土壤中に生息する放線菌は拡散性物質を生産して糸状菌の活性を抑制し、胞子の発芽阻害や溶菌を起こさせることは Lockwood 一派により報告されている<sup>8)</sup>。土壤中に生息する放線菌のうち、*F. oxysporum* に抗菌力を有する菌株は地域によりかなり分布の差異が認められ、隣接する圃場でもその数は異なっている。また、形態的にも生理的にも異なる菌群が認められる。

放線菌の菌そうに隣接する寒天片は *F. oxysporum* の菌糸の生育を阻害し、多くの菌株は細胞内容物の凝集を起こさせた。Hsu and Lockwood<sup>2)</sup> は放線菌の周辺では糖やアミノ酸の消失を認めているが、本実験で分生胞子は養分を含ませ寒天片でも発芽することから、寒天内には発育阻害物質が拡散していると考えられる。この拡散域は菌株により異なることから、単一物質ではなく、拡散速度の異なる物質があり、その生産は菌株により異なると思われる。また、*F. oxysporum* の阻害も菌糸と胞子では異なる菌株がかなり認められる。しかし、阻害物質を含む寒天片上では菌糸の溶菌は認められない。Ko and Lockwood<sup>5)</sup>, Hsu and Lockwood<sup>2)</sup> らは溶菌は養分欠乏が関係することを報告している。

*F. oxysporum* の存在する土壤に放線菌を加えると *F. oxysporum* の菌数は減少する。この傾向は両菌以外の存在しない殺菌土壤で顕著であるが、抗菌性物質生産菌株が必ずしも抑制効果が大いとは限らない。高橋<sup>14)</sup> は同じ現象を *Pythium* について認めている。Hsu and Lockwood<sup>2)</sup> も放線菌と *F. oxysporum* の接触点での養分欠乏で生育が阻止されることを認めている。本実験に供試した放線菌 A 807, A 809 も寒天培地での阻止力はないが、殺菌土壤中では *F. oxysporum* を抑制する。これら両菌株は生育は他の菌株に比べて旺盛であり、養分の吸収力、とくに糖の吸収力が大きい。供試した *F. oxysporum* もまた糖を多く要求するので土壤中での養分競合が起ったと考えられる。抑制力の小さい A 802, A 805, A 807 は *F. oxysporum* との養分競合に劣ると考えられる。このことは A 506 で顕著である。また、*F. oxysporum* は放線菌群に比べて窒素源要求が少なく、多量の窒素源を用いる A 809, A 802 の活性は土壤中の窒素源量によっても活性を左右されると思われる。同様の現象は抗菌力を示す *Trichoderma* でも認められている<sup>9)</sup>。無殺菌土壤での放線菌各菌株による *F. oxysporum* の抑制は A 804, A 809 以外はかなり劣化する。他の微生物による干渉のためと考えられるが、*F. oxysporum* 自体の減少は著しく、残余のものは厚膜化し安全状態になるため<sup>6,10)</sup> 放線菌の活性低下と相俟って抑制効果は減少すると思われる。この無殺菌土壤に養分を加えると、共存する放線菌の菌株により抑制効果が増大する場合と、却って抑制効果が一層減少する場合が見られる。この現象は放線菌の生育量、物質利用特性、抗菌力のいずれとも相関が認められない。さらに多くの菌株を供試しなければ解明されないものと思われる。

*F. oxysporum* 汚染殺菌土壤に放線菌を加え、経時的に両菌の変動を見ると、抗菌性を有しないが、養分競合力のある A 809 は明らかに *F. oxysporum* と競合し、早い時期から優位を保つが、その効果が経時的に強化されないのは養分の限界を示すかあるいは *F. oxysporum* の耐性型への移行によると見られる。この現象は抗菌力を有する *Penicillium* との共存でも認められる<sup>11)</sup>。一方、抗菌力を有する A 804 は生育が A 809 より劣るため *F. oxysporum* の抑制は早くからあらわれないが、その結果は養分競合とともに経時的に強くなる。無殺菌土壤の場合も同様の傾向が認められる。このことは放線菌の作用には抗菌性物質の生産と養分奪取の二面があり、菌株によって特異的な競合を行なうと考えられる。

## 要 約

*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* に拮抗する放線菌の特性について検討した。

拮抗放線菌の分布は一様でなく、栽培作物よりも地域により異なる。また、形態的にも生理的にも異った菌群が見られる。*F. oxysporum* に対する抗菌性物質は単一物ではなく、拡散性にも差異があり、作用も菌糸の生長阻止、胞子の発芽阻止などに差異が認められるが溶菌現象は認め難い。また菌株によっても生産物質は異なる。

グルコースや硝酸態窒素の吸収は放線菌の菌株によっても相違があり、抗菌活性とは一致しないが、*F. oxysporum* よりも多くの窒素源を要求する菌株が多い。

土壌中では培地上で抗菌力の強い菌株が必ずしも *F. oxysporum* を抑制するとは限らない。他の微生物の存在は抗菌力を低下させる傾向が認められるが、抗菌性物質を生産する菌株と養分競合力のすぐれた菌株は *F. oxysporum* の活性を低下させる能力をもつと考えられる。

## 文 献

1. Gregory, K. F., Allen, O. N., Riker, A. J. & Peterson, W. E. 1952 *Phytopathology* 42 : 613-622
2. Hsu, H. C. & Lockwood, J. L. 1973 *Ibid* 63 : 334-337
3. Jefferys, E. G. & Hemming, H. G. 1953 *Nature* 172 : 872-873
4. Ko, W. & Lockwood, J. L. 1967 *Phytopathology* 57 : 894-901
5. Ko, W. & Lockwood, J. J. 1970 *Ibid* : 60 : 148-154
6. 駒田 旦 1976 東近農試研報, 29 : 132-269
7. Lingappa, Y. & Lockwood, J. L. 1962 *Phytopathology* 52 : 317-323
8. Lockwood, J. L. 1964 *Ann. Rev. Phytopath.* 2 : 341-362
9. 小倉寛典・林 三徳 1974 高知大学研報 23 : 179-186
10. 小倉寛典・高木 廣・菅野広士・山口英夫 1977 同上 26 : 203-209
11. 小倉寛典・山口英夫 1978 同上 27 : 149-158
12. Park, D. 1956 *Trans. Br. mycol. Soc.* 39 : 239-257
13. Stevenson, I. L. 1956 *J. gen. Microbiol.* 15 : 372-380
14. 高橋 実 1968 坂本正幸教授還暦記念論文集 287-297

(昭和54年9月29日受理)

(昭和55年3月27日発行)