

Fusarium oxysporum f. *cucumerinum* に対する *Penicillium* sp.
の土壤中の抗菌の様相

小倉寛典*・山口英夫*

*高知大学農学部植物病理学研究室

A mode of antagonistic action of *Penicillium* sp. to
Fusarium oxysporum f. *cucumerinum* in soil.

Hirosuke OGURA* and Hideo YAMAGUCHI*

(*Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture)

Abstract: A mode of antagonistic action of *Penicillium* sp. to *Fusarium oxysporum* f. *cucumerinum* in soil. Hirosuke OGURA and Hideo YAMAGUCHI, *Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture*. Though the population of *F. oxysporum* were decreased step by step in soil after cultivation of cucumber plant, the survival of propagules in debris were more in cultivated soil than in non cultivated soil. In spite of cultivation lower population of *F. oxysporum* were sometimes found locally in the field. A kind of *Penicillium* being characterized by antagonistic activity to *F. oxysporum* was found. This fungus colonized the debris, where *F. oxysporum* spread already, and then occupied it by production of antibiotic substances. These phenomena were intensified in soil drying, in upper part of soil, and in cucumber rhizosphere soil. Conidia of *F. oxysporum* germinated more promptly than spores of *Penicillium* but chlamydospores did more slowly. In both case the germination and mycelial growth of *Penicillium* were seemed to promote the germination of *F. oxysporum* spores, but consequent mycelial growth were inhibited by *Penicillium* mycelia. The figure were as follow: protoplasm turned to gel, then cell inclusion disappeared but cell membrane were little in lysis. The conidia and chlamydospores were late for formation and decreased in number and in extreme non of them formed, because of mycelial lysis. From these results it is suggested that in antagonistic action of *Penicillium* the first step of lysis demonstrated by Lockwood group is appeared as the inhibition in growth of *F. oxysporum* and this phenomenon is related with microflora and nutrients in soil. This action is not so severe in soil except particular environment like as lower competition in microflora or as the existence of more nutrient sources. It is considered that there is an antagonistic mode like this phenomenon as *Penicillium* sp. and it is a reason for locality of antagonism in soil

緒 言

Fusarium oxysporum f. *cucumerinum* は土壤中の残渣あるいは生活根を利用して腐生的あるいは寄生的に生存し、他の微生物との競争に耐えるという弱腐生菌の典型的な面を備えている。一方、土壤中には種々の阻害作用があり、その多くは微生物に由来する現象である。土壤中の胞子は静菌作用により発芽を抑制され^{6,19)}、菌糸は抗生⁹⁾や溶菌^{2,4,5)}により死滅あるいは耐久生存への転換を余儀なくされる。

本報告は土壤中に生息する糸状菌で、*F. oxysporum* に抗生する *Penicillium* sp. を用いて抗生の様式について検討した。

実験方法と結果

実験1. 自然土壌中での拮抗菌の存在

キュウリを連作した当研究室所属の圃場から土壌を採取し、径 30 cm の鉢に入れ、ガラス室内でキュウリ（品種：四葉）を30日栽培した。各鉢の土壌を篩別して残根を除き、*F. oxysporum* f. *cucumerinum*（保存記号 F 501）の分生胞子を土壌 1 g 当り 10^6 程度加えて再びガラス室に静置し、適時灌水した。10, 30, 50日後に土壌中の *Fusarium* 数を残渣法により調査した。対照としてキュウリを栽培しない土壌に *F. oxysporum* を接種して同様の調査を行なった。*F. oxysporum* の検出には 2 mm 以下の残渣を水洗し、pH を 4 に調整したストレプトマイシン添加 5 倍希釈のジャガイモ煎汁寒天培地上に移し、25°C に置いて出現する菌数を残渣 100 あたりの出現比率として表わした (Fig. 1)。明らかにキュウリを栽培した土壌では *F. oxysporum* の出現する頻度は高く、処理後30日頃までは残渣の中に多く存在し、その後次第に減少する。しかし、鉢によってその残存の程度は異なり、キュウリの残根のあるにも拘らず残存率の低い場合も認められる。このような異常な鉢の残渣から出現する糸状菌の構成を比率で示すと Fig. 2 のようである。キュウリを栽培しない土壌での菌相は優勢菌群が日数の経過にあまり影響なく推移し、*F. oxysporum* も残渣上では優位を占めない。キュウリ栽培土壌では *F. oxysporum* の残存が大きく、他の菌群を圧迫するが、残渣から出現する菌群数も多い。しかし、キュウリ栽培土壌でありながら *F. oxysporum* の減少のはげしい土壌では *Penicillium* の増加が著しい (Fig.

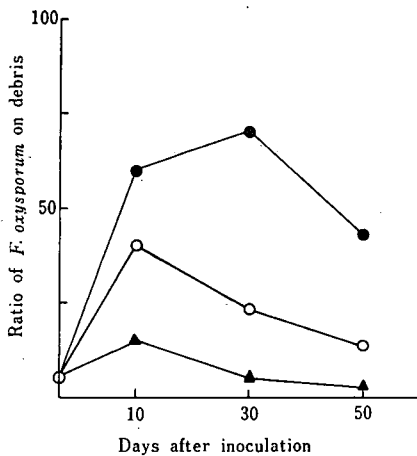


Fig. 1 Survival ratio of *F. oxysporum* on debris in soil planted cucumber plant. ●-●, ○-○: cucumber soil, ▲-▲: non planted soil

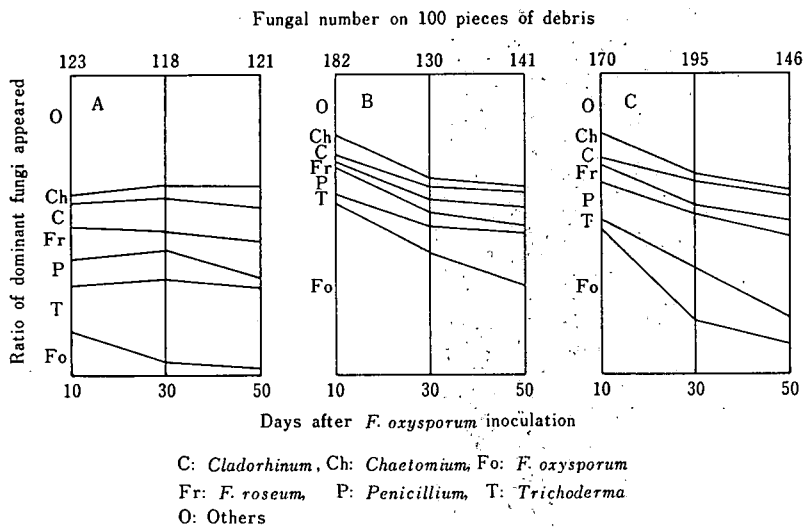


Fig. 2 Change of fungal flora on debris in soil inoculated *F. oxysporum*. A: non planted, B and C: cucumber planted

2-C)。この様相は一部の鉢にしか認められないが、残渣上の菌数は他よりも多く、表示した以外の菌も他と異った種類が出現するがこれらは菌数も少なく一定の傾向が認め難いので *Penicillium* についてのみ検討する。

残渣から得た *Penicillium* は 5 菌系であるが、そのうち 1 菌系だけが異常に多く、他は菌数も少なく、他の土壌と類似した増減を示すので、*F. oxysporum* の減少に関係するものは 1 種だけと判断した。この菌株については未だ同定していないが、その形態から *Fasciculata* に属すると思われる（この菌の同定については後日報告する）。

実験 2. *F. oxysporum* と *Penicillium* sp. との競合

前記の実験で得た *Penicillium* sp. の *F. oxysporum* に対する競合を確認するために以下の実験を行なった。

1. 残渣への着生 前記の土壌を篩別したのち、径 2mm 以下のキュウリの根を約 1cm に切り、土壌容量の 0.5% 程度加えて均一に混合した。これに *F. oxysporum* と *Penicillium* sp. の胞子を土壌 1 g 当り $10^5 \sim 10^6$ 接種し、径 9 cm の腰高ベトリ皿に入れ 25°C に保った。5, 25, 45 日後に残渣をとり出して 5 倍稀釈のジャガイモ煎汁培地上で両菌の出現菌数を調査した。Fig. 3-A は両菌のいずれかの着生した残渣数を 100 として両菌の残渣占有比を示した。*F. oxysporum* は経時的に減少するが、*Penicillium* sp. の増加は *F. oxysporum* の減少よりも大きく、残渣は次第に *Penicillium* に占拠される。同じ土壌を 30 日間室内で風乾させたのち、水分を調整して同じ実験を行なった (Fig. 3-B)。*F. oxysporum* の減少は風乾しない場合と同じ傾向を示すが、*Penicillium* の残渣の占有は非常に大きく、*F. oxysporum* との共有の場面も多く、やがて *F. oxysporum* は消滅した。

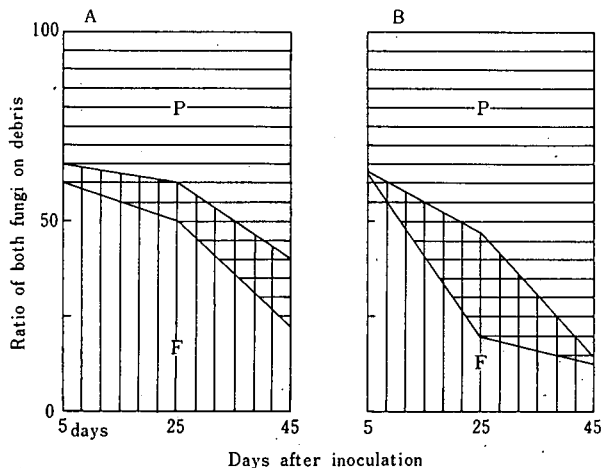


Fig. 3 Change of survival ratio of *F. oxysporum* and *Penicillium* sp. on debris in soil added both fungi.

Survival ratio was shown as number of debris appeared causal fungus/total number of debris appeared each or both fungi $\times 100$.

A : natural soil, B : soil dried for 30 days in room and then moistened again before inoculation, F : *F. oxysporum*, P : *Penicillium* sp.

2. 土壌深度と両菌の競合 径 7 cm 高さ 35 cm の塩化ビニールの円筒に、あらかじめジャガイモ煎汁で湿度 60% (v/v) に調整したパーミキュライトで各菌を 25°C で 10 日間培養した接種源を上記の圃場の土と 1 : 30 の割合に混ぜて詰めた。円筒を土壌中に立てて 10 日ごとに 5, 10,

15, 25cm の位置の土壤をとり出して両菌の変動を調査した。菌数の計測はガラクトーズ・アスパラギン培地およびジャガイモ煎汁培地を用い、寒天稀釈法によった。また、各筒にキュウリ幼苗を植えて、10日ごとに菌数を調査した。

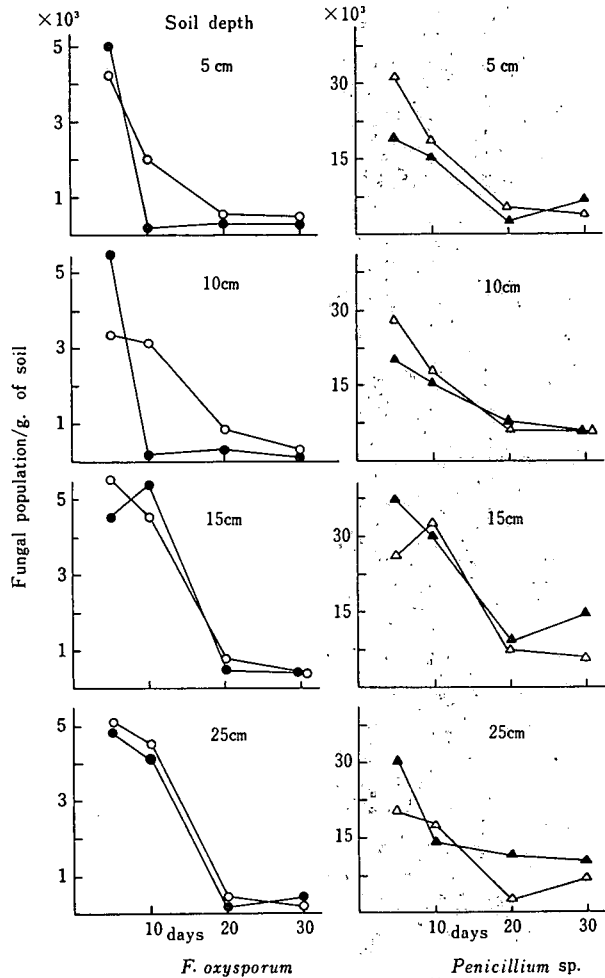


Fig. 4 Survival of *F. oxysporum* and *Penicillium* sp. at different depth in soil cylinder

- : *F. oxysporum* in soil inoculated this fungus,
- : *F. oxysporum* in soil inoculated both fungi,
- △—△ : *Penicillium* sp. in soil inoculated this fungus,
- ▲—▲ : *Penicillium* sp. in soil inoculated both fungi

F. oxysporum は *Penicillium* sp. の存在しない土壤中では、10cm の深さまでは菌数は徐々に減少するが、深度が増すと急激に減少する。しかし、接種後10日頃までは下層土壤では残存の割合はおそく、その後の減少は速い。この土壤に *Penicillium* sp. が存在すると、深度に関係なく急速に減少する。しかし、下層土壤では減少の時期はおくれ、*Penicillium* sp. の存在の有無に関係なく同じ様相を示す。一方、*Penicillium* sp. は *F. oxysporum* の有無に関係なく菌数の減少は同じ様相を示す。土壤円筒にキュウリを栽培すると、*F. oxysporum* は *Penicillium* が存在しない場合には浅層土壤では菌数の減少はなくなり、10cm では根の分布の拡りに応じて一旦減少した

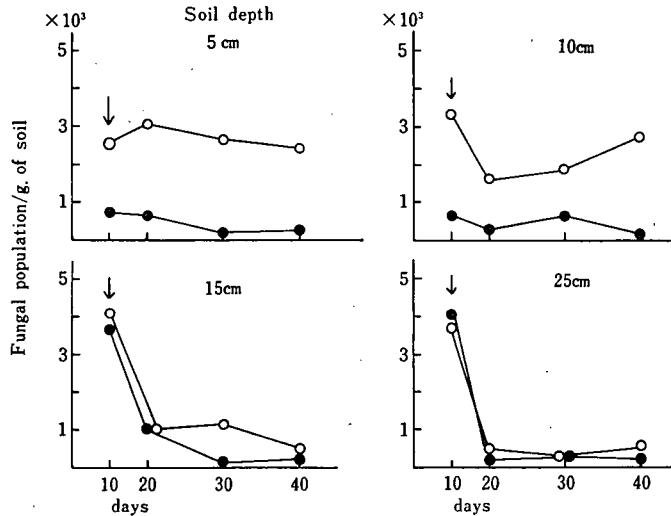


Fig. 5 Survival of *F. oxysporum* at different depth in soil cylinder planted cucumber plant

○—○ : soil inoculated *F. oxysporum*
 ●—● : soil inoculated *F. oxysporum* and *Penicillium* sp.
 ↓ : cucumber planting

菌数は増加すると見られる。植付け後30日でキュウリの根の分布は 10cm あたりまでは多く見られるが、15 cm では少なく、25 cm には存在しない。この土壌に *Penicillium* が存在すると、菌数の増加は認め難く、無栽培と同じ様相を呈する。

実験3. *Penicillium* sp. による *F. oxysporum* の形態の変化

以上の自然土壌中での *F. oxysporum* に対する *Penicillium* sp. の行動をさらに詳しく確認するために、他の微生物を除去した状態で両菌の行動を調査した。

Penicillium sp. あるいは土壌懸濁液を加えた殺菌した砂に Czapek 液を加えて *F. oxysporum* を培養し、孢子形成の様子を観察した。*F. oxysporum* は 10^5 の分生孢子を、*Penicillium* は 10^8 の孢子を、また、土壌微生物懸濁液はその中の微生物数が寒天平板に出現する菌数の 1/50 程度になるように調整して砂に加え、径 9 cm の腰高ベトリ皿に入れて Czapek 液で湿度を60% (v/v)

Table 1. Change of spores of *F. oxysporum* in soil added microbe suspension

Microbes added in soil	Spores	Days after inoculation			
		5	10	20	30
Microbes extracted from soil * ^a	Microconidia	* ^c 527	288	104	0
	Macroconidia	0	41	46	8
	Chlamydo spores	0	2	17	31
<i>Penicillium</i> sp. * ^b	Microconidia	31	136	215	98
	Macroconidia	0	0	8	6
	Chlamydo spores	0	0	4	12

*^a Microbes number in suspension were about 1/50 in natural soil.

*^b Spores of *Penicillium* inoculated were about ten fold of them of *F. oxysporum*.

*^c Spores : $\times 10^3$ /g of soil

Table 2. Change of mycelial number of *F. oxysporum* in sand added microbe suspension (Contact slide method)

Microbes added	Days after inoculation			
	5	10	20	30
Non addition	* ^c 205 (-)	261 (+)	171 (++)	194 (++)
Microbes extracted from soil * ^a	216 (+~++)	146 (++)	33 (++)	17 (++)
<i>Penicillium</i> sp. * ^b	32 (-~+)	70 (+~++)	41 (++)	40 (++~+++)

*^a Microbes number in suspension were about 1/50 in natural soil.

*^b Spores of *Penicillium* inoculated were about ten fold of *F. oxysporum*.

*^c Mycelial number crossed slide glass in soil at 2 cm of the central horizontal axis. Lysis of mycelia; -: non lysis, +: protoplasm turned to gel, ++: cell inclusion disappeared, +++: cell membrane disappeared.

に調整し、25°C に保った。その後、経時的に砂をとり出して孢子懸濁液をつくり、各形態の孢子を検鏡して土壌 1 g あたりの量に換算した (Table 1)。

土壌微生物の存在する砂では小型分生孢子は急速に減少し、厚膜孢子が形成される。大型分生孢子は数も少なく出現時期もおそいが 20 日をすぎれば消滅するが、その一部が厚膜化しはじめる。*Penicillium* を加えた砂でも同じ傾向を示すが、各孢子とも量は少なく形成時期はおくれる。

また、上記と同じ処理を行なった腰高ベトリ皿の砂にスライドガラスを垂直に挿入して経時的に菌糸の変化を観察した (Table 2)。

他の微生物が存在しない砂の中では *F. oxysporum* は 10 日頃に菌糸数は最大となり、以後緩やかに減少するが、時間の経過につれて原形質は凝集し、自己消化が認められる。土壌微生物を加えると 5 日頃から自己消化様の変化が認められ、細胞内部は次第に空胞化する菌糸が増加し、20 日以降は膜物質も消失し、30 日後には多くの菌糸はスライドガラス上に痕跡のみが認められ、残りの菌糸も活性菌糸はなく、厚膜孢子が散見される。*Penicillium* sp. を加えた砂ではスライドガラス上には *Penicillium* の菌糸が多く、その様相は *F. oxysporum* の自己消化と同じ推移を示すが、*Penicillium* と共存する *F. oxysporum* は菌糸数は少なく、5 日頃からすでにその一部に自己消化様の徴候が認められ、20 日後には細胞内容物の消失する菌糸が多いが、この時期には膜の消失は起らない。この時期に *Penicillium* の菌糸が *F. oxysporum* にまきついているのが観察されているが、殺生か寄生かは確認していない。30 日後には膜物質も一部消失し、大半の菌糸は死滅する。

実験 4. 培地中での *F. oxysporum* と *Penicillium* sp. との競合

室外、室内の土壌中での実験より、*F. oxysporum* は *Penicillium* sp. によって生育を阻害されるが、その現象は菌糸に対する阻害のようである。この実験では上記の現象を培地中で検討した。

1. 培地上での *Penicillium* sp. による *F. oxysporum* の生育阻止 ジャガイモ煎汁寒天平板上に両菌を対峙させると明らかに *Penicillium* sp. は阻止帯を形成して *F. oxysporum* の生育を阻止する。この効果はアルカリ側よりも酸性側で大きい。*F. oxysporum* の菌糸の伸長は pH 4 でやや低下するが、実験に供した pH の範囲では差を認め難い。つぎに生育温度を比較すると、両菌とも類似した適温域を有する。しかし、阻止帯は適温域では小さくなる。これは *F. oxysporum* の活性が *Penicillium* のそれを上廻るためと思われる。また、養分濃度の稀薄は両菌とも生育量を減少させるが、阻止帯の中も減少する。これは *Penicillium* sp. の生産する抗菌性物質は養分量に規正されるか、あるいは生産菌自体の急速な活性の低下のために生産が阻害されると見られる。

Table 3. Inhibition of mycelial growth of *F. oxysporum* caused by *Penicillium* sp. on agar media.

1. pH		pH				
		4	5	6	7	8
Inhibition zone		11.6 mm	11.7	10.5	9.5	9.3
2. Temperature		Temperature (°C)				
		15	20	25	30	
Inhibition zone		9.1mm	8.9	8.7	9.1	
Mycelial growth	<i>F. oxysporum</i>	+	##	##	++	
	<i>Penicillium</i>	+	##	##	++	
3. Nutrient in medium		Nutrient source				
		Potato extract	Czapek	1/5 Czapek	Soil ext.	
Inhibition zone		9.3 mm	9.3	7.5	4.1	

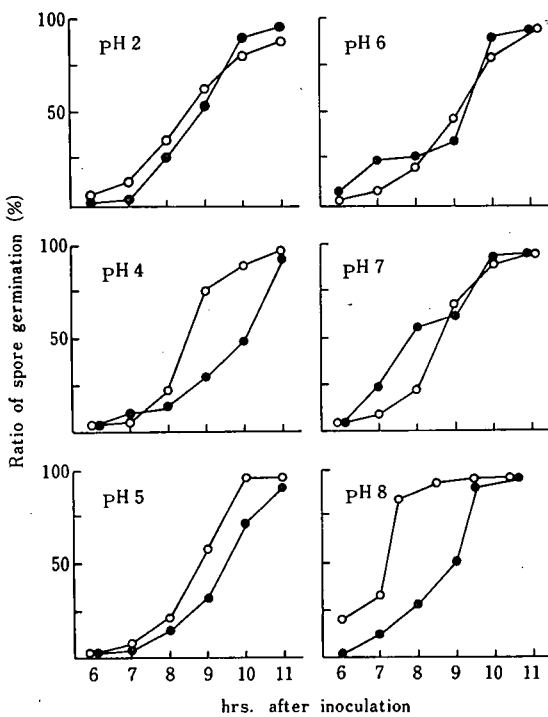


Fig. 6 Conidial germination of *F. oxysporum* or *Penicillium* sp. in PD broth
 ●—● : *F. oxysporum*
 ○—○ : *Penicillium* sp.

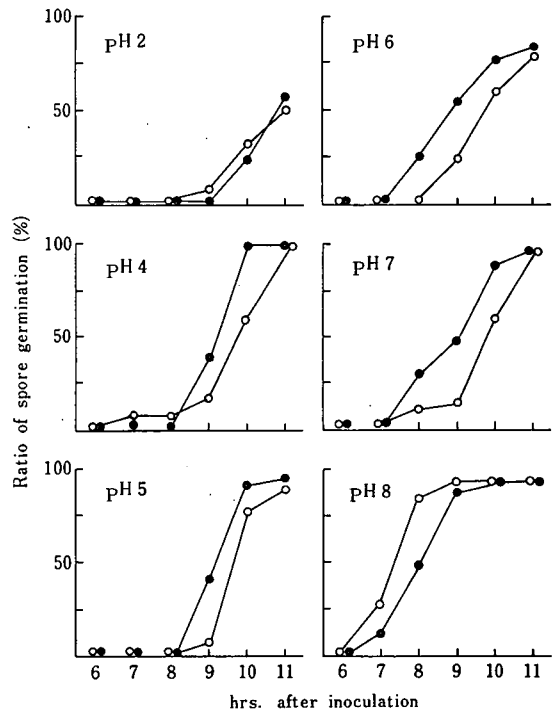


Fig. 7 Conidial germination of *F. oxysporum* and *Penicillium* sp. in PD broth mixed both fungi
 ●—● : *F. oxysporum*, ○—○ : *Penicillium* sp.

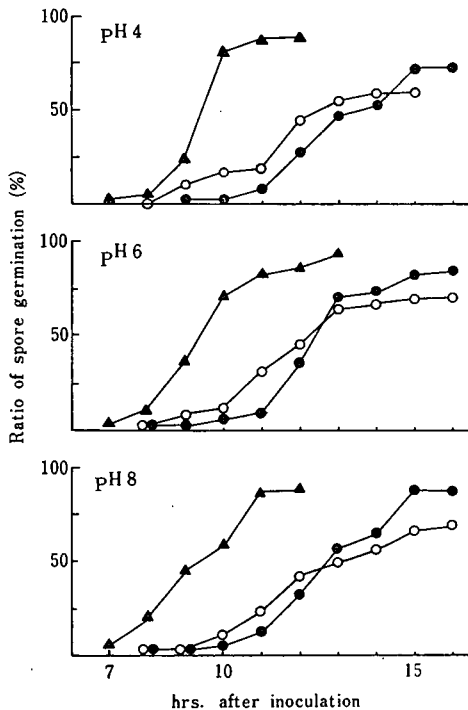


Fig. 8 Germination of chlamydospores of *F. oxysporum* and conidia of *Penicillium* sp. in PD broth

●—● : germination of *F. oxysporum* in broth inoculated only this fungus, ▲—▲ : germination of *Penicillium* sp. in broth inoculated only this fungus, ○—○ : germination of *F. oxysporum* in broth inoculated both fungi

考 察

F. oxysporum f. *cucumerinum* は土壤中の残渣や生活根を栄養源として生活する弱腐生菌群の1つであるとされている。Lockwood⁶⁾, Watson & Ford¹⁰⁾によれば土壤には孢子発芽を阻害する静菌作用があり、その原因は孢子周辺の微生物による物質吸収と抑制物質生産である。この作用は孢子への物質供給により弱められるが、菌糸の伸長の過程で溶菌が起こる。これは菌糸周辺の微生物による自己消化の促進と膜物質の溶解の2段階に分けられる^{1,2,4,9)}。

キュウリを栽培した圃場ではキュウリ病原型の *F. oxysporum* が活性をもつ⁸⁾。しかし、局部的には、あるいは土壤の種類によっては *F. oxysporum* の活性を妨げる微生物が生息し、その多くは放線菌であり、細菌である⁹⁾。糸状菌もその一部であるが⁷⁾、供試した土壤中の残渣の微生物相の変化から *Penicillium* も拮抗菌群の一員である。この菌は *F. oxysporum* にややおくれて残渣に到達し、*F. oxysporum* と残渣を共有するが、やがて残渣を独占する。*Penicillium* は抗菌性物質を生産するが、その場合には養分が十分あること、生活環境がこの菌に有利であることが必要である。土壤中での抗菌物質の生産は残渣や植物種皮のような養分の豊富な場所でのみ起こる¹¹⁾、抗生物質生産菌は必ずしも土壤中で優位を保つとは限らない⁹⁾などの報告は、拮抗菌は土壤中に普

2. 培地中での孢子の発芽 菌糸の伸長の前段階となる *F. oxysporum* の孢子の発芽におよぼす *Penicillium* sp. の影響を調査した。あらかじめ、ジャガイモ煎汁寒天培地に培養した両菌の菌そうから孢子を集めて、pH を調整したジャガイモ煎汁に懸濁し、25°C の温室に保った。孢子密度は1視野(×400) 2~3個である (Fig. 6, 7)。

F. oxysporum の分生孢子の発芽は pH7 でやや良いが、すべての pH 域で極度の差は認められない。*Penicillium* sp. では微酸性からアルカリ側にかけて孢子の発芽は促進される。両菌の混在する培地中では、*F. oxysporum* は中性か微酸性では単独で存在する場合と差はないが、アルカリ側と酸性側、とくにアルカリ側では単独の場合に比して発芽は促進される。しかし、発芽管の伸長はいずれの場合でも *Penicillium* の存在する場合にはおそい。一方、*Penicillium* sp. は pH8 を除いては単独の場合よりも発芽は遅延する。

F. oxysporum の厚膜孢子に *Penicillium* sp. の孢子懸濁液を加えると、初期の発芽は単独の場合よりもやや良いが最終的な発芽率は低下する傾向にある。また、*Penicillium* と混在する場合には発芽管の伸長はおそく、ときには生育停止の現象も見られる。*Penicillium* sp. の発芽は単独の場合と差が認め難い。

通的には存在しない、あるいは活性は普遍的ではないことを説明しているが、この報告でも同じような場面が認められる。供試した *Penicillium* が乾燥による微生物相の崩壊で抗菌力を増し、植物根の存在により *F. oxysporum* 以上の活性を示すのもこの理由によると考えられる。*Penicillium* が表層土壌で抗菌力が強く、下層土壌では活性が減少するにも拘らず *F. oxysporum* も下層土壌で減少するのは *Penicillium* のためだけではないと考えられる。

F. oxysporum の分生胞子は *Penicillium* の胞子よりも発芽は早いため、*Penicillium* の発芽を妨げるのは養分奪取によるのも一因であろう。厚膜胞子では *Penicillium* の発芽が早く、養分的に発芽を妨げると見做される。しかし、分生胞子も厚膜胞子も *Penicillium* の胞子の発芽以降に発芽率が一時的にでも増高することは、*Penicillium* からの発芽促進効果があると考えられる。この効果は *Penicillium* の生活不適環境では弱化される。

発芽管およびそれに続く菌糸の生育は *Penicillium* により抑制される。菌糸には原形質の凝集が認められ、やがて空胞化するが膜物質の溶解はあまり認められない。これは溶菌の第1段階への作用^{4,5)}が *Penicillium* により惹起されると考えてよいであろう。また、*Penicillium* の混在により *F. oxysporum* は胞子形成に遅延を来し、数的にも低下することは菌糸の生育阻害に伴随する現象であり、胞子形成自体の生理に *Penicillium* が関与するか否かは不明である。

以上の点から、*Penicillium* の抗生は *F. oxysporum* の発芽にはむしろ促進効果を示すが、それに続く生活菌糸の生育を阻害し、その結果、形成される胞子は減少し、極端な場合には胞子を形成し得ないものと見られる。その現象は土壌中では根による養分補給や、微生物相の崩壊などの場面で強調されると見て良いであろう。そして、この様式は抗生現象が土壌で普遍的でなく局在するといわれる根拠の1つでもあると考えられる。

要 約

土壌中で *Fusarium oxysporum* f. *cucumerinum* は静菌、溶菌、抗生など多くの抑制作用に耐えて生存する。この報告は *F. oxysporum* に拮抗的に作用する *Penicillium* sp. の抗菌作用について検討した。

キュウリ栽培土壌には局部的に *F. oxysporum* の残存を低下させる糸状菌があり、1種の *Penicillium* である。この菌は残渣に *F. oxysporum* よりおくれて着生するが抗菌物質の生産により残渣を独占する。その効果は土壌を乾燥させると強化され、浅層土壌でキュウリの根が存在する場合にも強化される。このことは、抗生は養分の存在と他の微生物の除去により有利になる。

F. oxysporum の分生胞子は *Penicillium* の胞子よりも早く発芽し、厚膜胞子はおそく発芽するが、いずれも発芽が促進される傾向がある。しかし、それに続く菌糸の生育は阻害され、原形質は凝集し、やがて内容物は消失する。しかし、膜物質の溶解はあまり明らかではない。また、胞子の形成も遅延し、数的にも少ないが、これは菌糸の活性低下、消滅に起因する現象である。

これらの結果、*Penicillium* sp. による *F. oxysporum* の生育阻害は溶菌の第1段階に作用する現象であり、土壌微生物相や土壌中の養分とも関連するもので、この菌の抗生現象は土壌中に局在するといわれる様式の1つを示していると考えられる。

文 献

- 1) Ford, E. J., Gold, A. H. and Snyder, W. C. *Phytopathology* 60, 124-128 (1970).
- 2) Ko, W. H. and Lockwood, J. C. *Ibid.* 60, 148-154 (1970).
- 3) 駒田旦 東近農試研報. 29, 132-269 (1970).
- 4) Lloyd, A. B. and Lockwood, J. C. *Phytopathology* 56, 595-602 (1966).

- 5) Lloyd, A. B., Novaroske, R. L. and Lockwood, J. C. *Ibid.* 55, 871-875 (1965).
- 6) Lockwood, J. C. *Ann. Rev. Phytopath.* 2, 341-362 (1964).
- 7) 小倉寛典・林三徳 高知大学研報. 23, 179-186 (1974).
- 8) 小倉寛典・山田巧 同上. 24, 115-121(1975).
- 9) Park, D. *Ann. Rev. Phytopath.* 1, 241-258 (1963).
- 10) Watson, A. G. and Ford, E. J. *Ibid.* 10, 327-348 (1972).
- 11) Wright, J. M. *Ann. appl. Biol.* 44, 561-566 (1956).

(昭和53年9月30日受理)

(昭和54年3月30日発行)