

土壤病原菌の腐生生活に関する研究

第6報 病原型および腐生型の *Fusarium oxysporum* の土壤中での変動

小倉 寛典・山田 巧

(農学部 植物病理学研究室)

Studies on saprophytic behaviour of soil borne pathogenic fungi.

VI. Change of pathogenic and saprophytic *Fusarium oxysporum* in soil.

by

Hirosuke OGURA and Takumi YAMADA

Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture

Abstract : Studies on saprophytic behaviour of soil borne pathogenic fungi. VI. Change of pathogenic and saprophytic *Fusarium oxysporum* in soil. Hirosuke OGURA and Takumi YAMADA, Laboratory of plant pathology, Faculty of Agriculture. In this paper, the difference about survival and spore formation in soil between saprophytic type and pathogenic type of *Fusarium oxysporum* were studied. The saprophytic type of this fungus grew better in soil at poor nutrient condition than the pathogenic one, but the later formed chlamydo spores more quickly. Thus, the population of saprophytic type continued the change for a while and then turned slowly to stable stage by chlamydo spore formation, but the population of pathogenic one altered in stable stage early after inoculation. This pattern was recognized for many of strains tested, though there were some exceptions. This stable strain, like cucumber pathogen, came to active in soil planted cucumber continuously, when the soil was sterilized. But this strain had not activity, when the soil was not sterilized. This phenomenon appeared in soil planted cucumber was clearly for cucumber pathogen, but obscurely for tomato pathogen. The active strain, like saprophytic type, produced conidia and few chlamydo spores in sterilized soil, and the stable strain did chlamydo spores and few conidia, reversely. However, in natural soil both of them fell into stable, even if the soil was the one planted cucumber. From these results it is considered that many of pathogenic type would have closely some responses to specific plant or metabolites from its plant and would have severe susceptibility for soil fungistasis, and many of saprophytic type would have a little responses and weak susceptibility for fungistasis.

多くの畑地作物を侵す病原菌として土壤中に生息する *Fusarium* 属は長期間にわたって生存し、寄主作物を侵害するため輪作体系への障害となる^{1,16,18)}。*Fusarium oxysporum* は土壤生息型の病原菌⁴⁾として、土壤中での生存は寄主生活根のほか、植物残渣や土壤有機質をも利用して活性型あるいは非活性型として菌糸や厚膜胞子の形で生き残る。また、非寄主植物根もこの菌の生存を助長するばかりでなく、寄主作物以上の活性を与える場合もある^{14,16,18)}。土壤中の *F. oxysporum* には病原菌以外にも病原性をもたない菌群が生息し、物質の分解にも関与していると思われる。土壤中に生息する各菌は養分利用の難易や胞子形成能の差異により、それぞれ異った生活様式を持ち、土壤微生物相の一員として他菌との競争に耐えて生き残ると思われる。

本報告は土壤中に存在する病原型あるいは腐生型の *F. oxysporum* の生活様式の異同を比較した。

実験方法ならびに結果

1. *F. oxysporum* の採集

農学部構内および周辺のキュウリ栽培圃場あるいはトマト栽培圃場の土壌あるいは罹病部位より *F. oxysporum* を分離し、ジャガイモ煎汁培地上での生育の同等な菌株を実験に供した。

各菌株のキュウリオよびトマトに対する病原性を知るために、湿度 60% (v/v) の殺菌した砂に各菌株の孢子懸濁液を加え、25°C に静置してキュウリ種子 (四葉) あるいはトマト種子 (福寿) を播種した。10日後に植物体を抜き取り、立枯症状あるいは根の侵害程度を調査して罹病度を判定した。また、湿度60%の殺菌した砂に孢子懸濁液を加え、25°C で20日間静置のち、寒天稀釈法にてジャガイモ煎汁培地上に出現する菌数を調査し、接種した菌数に対する百分比を求めて生存率とした (第1表)。

Table 1. Characters of isolates of *F. oxysporum* in soil.

Isolate	Derivation of isolate	Degree of spore formation	Pathogenicity		Survival ratio in sand
			to cucumber	to tomato	
F 104	Soil	* +	0 %	0 %	** 32.81 %
F 105	"	++	0	0	92.71
F 107	"	+	5	0	36.00
F 108	"	++	0	0	85.71
F 109	"	++	17	0	55.80
F 111	"	++	0	0	105.55
F 113	"	+	0	0	31.19
F 115	"	++	0	0	76.45
F 116	"	+	0	0	42.57
F 121	"	++	0	0	78.52
F 501	Cucumber	++	85	0	85.45
F 502	"	++	72	0	16.33
F 504	"	+	100	0	46.56
F 505	"	++	80	0	56.00
F 507	"	++	53	0	79.14
F 508	"	+	85	0	23.41
F1001	Tomato	++	0	75	68.63
F1003	"	+	0	85	15.68
F1004	"	+	0	30	25.00
F1034	"	++	0	100	73.02
F1035	"	++	0	100	63.26

* Spore formation on PDA, ++: many, +: a few

** Number appeared at 20 days after / Number inoculated in sterilized sand × 100

キュウリより得た菌株はいずれも程度の差はあるがキュウリに対し、トマトより得た菌株はトマトに対して病原性を示したが、土壌より得た菌株はほとんど病原性を示さなかったか、あるいは示しても低い価であった。また、殺菌した砂の中での残存は、菌株の由来には関係がなく、また、孢子形成能との関連も認められなかった。これらの結果より、以後の実験には主として生存率の高い菌株、すなわち、腐生型菌株として F105、キュウリ病原型菌株として F504、F507、トマト病原型菌株として F1034 を供試した。

2. *F. oxysporum* の砂土中での生存

植物の影響のない砂の中での *F. oxysporum* の経時的残存を知るために3カ月にわたって菌数の変動を調査した。

前述の F105, F504, F507, F1034 菌株を平板培養したのち殺菌水を加えて分生孢子懸濁液を得た。これを殺菌した砂 150 ml を入れた径 9 cm, 高さ 5 cm の腰高ペトリ皿に加え均一に攪拌したのち、水を加えて湿度 60% (v/v) に調整した。孢子数は土壌 1 ml あたり 300~600 になるように調整した。各ペトリ皿は 25°C に静置し、約 10 日間隔で *Fusarium* 撰択培地⁹⁾ を用いて菌数を計測した。また、上記分生孢子懸濁液に変えてトウモロコシ・バーミキュライトを接種源として同様の調査を行なった。すなわち、150 ml のバーミキュライトに約 1/20 量のトウモロコシ粉末を加え、含水量 60% とし、各菌株を植付けて 25°C で 10~15 日間培養し接種源とした。腰高ペトリ皿に砂と接種源を 15:1 の割合で混合し、湿度を 60% とした。培養および菌数の調査は孢子懸濁液接種と同じである (第 1 図)。

孢子懸濁液を接種源とした場合はトウモロコシ・バーミキュライトを接種源にした場合に比して土壌中の菌数は初期に変動が大きく、時間の経過につれて漸次安定化するようである。しかし、キュウリ病原型菌株は他菌に比して安定化は早い。一方、腐生型菌株は

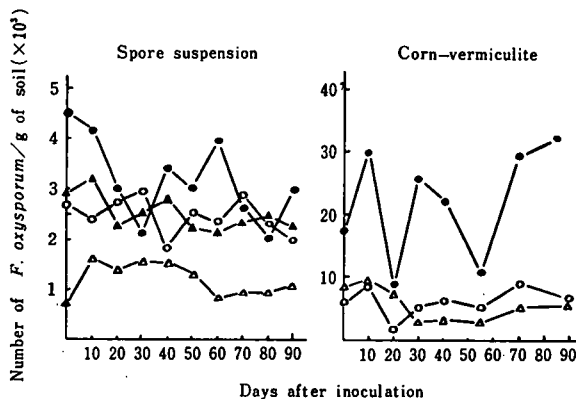


Fig. 1. Change of *F. oxysporum* inoculated in sterilized sand by spore suspension or by corn-vermiculite inoculum.

●—●: Saprophytic type (F105), △—△ and ▲—▲: Cucumber pathogenic type (F504 and F507), and ○—○: Tomato pathogenic type

Table 2. Propagules of saprophytic and cucumber-pathogenic type of *F. oxysporum* in sterilized sand inoculated conidial suspension.

Type	Isolate	Days after inoculation				
		0	15	30	45	60
Cucumber-pathogenic	F 501	*146	321	265	243	233
	F 502	247	345	167	281	165
	F 504	110	173	144	136	119
	F 505	237	394	336	215	326
	F 507	323	357	277	246	237
	F 508	145	244	213	196	220
Saprophytic	F 104	245	262	325	299	210
	F 105	322	257	376	327	198
	F 108	173	301	145	225	271
	F 111	236	201	177	275	246
	F 113	126	216	177	146	135
	F 115	277	311	165	256	241
	F 116	141	265	219	111	136
	F 121	245	265	237	238	187

* Number of *F. oxysporum* per 1 g of sand

病原型菌株に比して、両接種法ともに変動は大きい。

つぎに、病原型6菌株と腐生型8菌株の分生胞子を用いて土壤中での安定度を調査した。供試土壌、分生胞子接種方法はいずれも上記の実験と同様である(第2表)。

キュウリ病原型各菌株の変動は同一傾向を示すとは限らず、60日までの調査では初期を除いては比較的安定した存続を示す群と変動の中の大きい群とが観察される。概して、安定型はジャガイモ煎汁培地上で小型分生胞子の形成が少ない傾向が認められる。腐生型菌株は変動型を示すものが多く見出される。

これらの実験に供した砂に含まれる成分を実験前および85日後に定量した。炭水化物は灼熱損量法、全窒素はケルダール法、水溶性リン酸は Denings 法により調査した(第3表)。

Table 3. Chemical components in sand inoculated pathogenic *F. oxysporum*.

	Carbon source	Nitrogen source	Phosphate
Before inoculation	1.96 %	0.042 %	0.012 %
At 85 days after inoculation	1.50	0.021	0.011

各成分はいずれも実験開始後に減少するが、85日後の成分は菌体も含めた測定値であることを考慮すれば、砂に含まれる成分は菌の生育に利用されたと思われる。

3. キュウリ栽培土壌中での *F. oxysporum* の生存

上記の結果より、*F. oxysporum* は土壌中で安定型と変動型があるように思われる。また、土壌成分、あるいは接種形態などが菌数変動の要因となると考えられるので、キュウリ栽培土壌を用いて腐生型菌株、病原型菌株の変動を調査した。

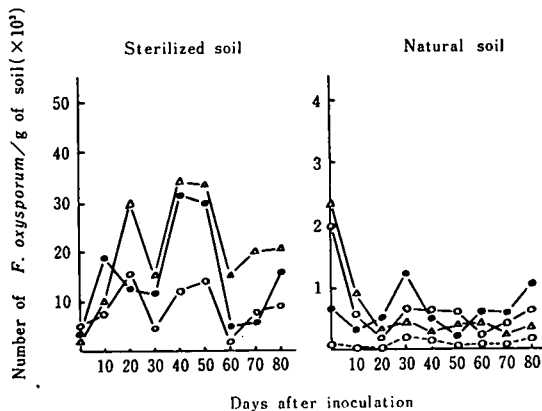


Fig. 2. Change of *F. oxysporum* in soil planted cucumber continuously.

●—●: Saprophytic type, △—△: Cucumber pathogenic type, ○—○: Tomato pathogenic type, and ○---○: Native *Fusaria*.

数の増加が認められ、とくに後者は前者を上廻る傾向が認められる。しかし、無殺菌土壌では3菌株ともに変動は少なく、接種後いずれも短期間に菌数は減少するが、土壌に土着する *Fusarium* よりは常に高い菌密度で残存する。この場合、腐生型菌株は病原型菌株に比して菌数の変動は大きい。

キュウリを3年間連作した圃場においてキュウリ栽培中の土壌を採取し、2mmのふるいで篩別、風乾後、腰高ペトリ皿に入れ、160°C、30分間乾熱滅菌した。供試土壌の成分は、炭素源4.20%、全窒素0.142%、リン酸0.027%である。これに前記実験と同様に腐生型、キュウリ病原型、トマト病原型各菌株の分生胞子懸濁液を接種し、湿度60%、25°Cに保った。また、無殺菌土壌にも各菌株を接種した。調査期間は80日である(第2図)。

殺菌したキュウリ連作土壌では、3菌株とも変動が認められるが、これは土壌中に存在する成分の利用によると思われる。腐生型およびキュウリ病原型菌株は菌

Table 4. Spores of *F. oxysporum* formed in soil added spore suspension.

Sort of Soil	Treatment	Inoculum	Spore	Days incubated		
				30	60	90
Sand	Sterilized	F 105	Conidia	*113	32	19
			Chlamyospores	3	16	12
		F 504	Conidia	7	3	0
			Chlamyospores	18	22	17
		F 1034	Conidia	17	4	9
			Chlamyospores	9	21	14
Soil	Sterilized	F 105	Conidia	217	77	44
			Chlamyospores	11	29	28
		F 504	Conidia	178	46	31
			Chlamyospores	33	18	21
		F 1034	Conidia	78	23	5
			Chlamyospores	12	26	21
	Non-sterilized	F 105**	Conidia	55	125	40
			Chlamyospores	12	29	9
		F 504**	Conidia	31	4	0
			Chlamyospores	17	11	14
		F 1034**	Conidia	18	12	0
			Chlamyospores	10	6	4
Non	Non	Conidia	21	12	10	
		Chlamyospores	8	4	7	

* Number of spores in 0.1 g of soil.

** Number of this plot was that excepted the number of native *Fusaria* appeared in non inoculated plot.

4. 土壤中の *F. oxysporum* の胞子の形態

腐生型1菌株, キュウリ病原型2菌株およびトマト病原型1菌株の分生胞子をそれぞれ前記の実験で用いた砂およびキュウリ栽培土壤に接種し, 25°C に静置した。各菌株により接種した胞子密度は一定していないが, 大略土壤1g 当り300-500である。各土壤10g を50ml の殺菌水中で振とうし, 水中に懸濁する胞子を顕微鏡で計数した。第4表の胞子数は0.1g の土壤中に存在する胞子数である。なお無殺菌土壤中の胞子は調査胞子数から胞子懸濁液無添加土壤に出現する胞子数を除去した数値である(第4表)。

各処理土壤に出現する分生胞子は腐生型菌株が多く, 病原型菌株は厚膜胞子を形成しやすい。しかし, キュウリ病原菌はキュウリ栽培土壤では殺菌した場合には分生胞子と厚膜胞子との比率は無殺菌土壤に比して多い。また, トマト病原菌に比べても分生胞子が多い。このことは, 土壤中への作物の影響が病原菌に何らかの作用をもつと考えられる。

考 察

土壤中に生息する *F. oxysporum* には病原菌以外にも多くの腐生型菌株が認められるが, いずれも糞分利用の面では生活根や残渣あるいは有機質に依存していると考えられる^{15,16,17)}。作物を栽培すると, 土壤中の病原型菌株は発芽後これを侵して増殖し, 連作によって土壤中の菌数は増大するが, 一方, 腐生型菌株も生活根を利用して増加する。この場合, 病原型と異なる点は腐生型菌株

は侵害が部分的あるいは作物の生育時期的に限定されることである^{14,15,17})。また、いずれの菌株も養分の欠除により厚膜胞子を形成して長期間の生存を続ける^{11,12,18})。

土壌あるいはキュウリ、トマトから得た *F. oxysporum* は培地上の性質あるいは土壌中の残存率からは腐生型、病原型の区別は困難である。土壌に分生胞子を加えると直ちに発芽する。Hsu & Lockwood⁷⁾ は胞子の発芽には外部よりの物質流入を報告し、Warrén & Kommendahl¹⁸⁾ は *F. oxysporum* は土壌養分の少ない所では他の *Fusaria* に比して優位になることを報告した。発芽した菌糸はやがて養分の欠乏によって消滅するかあるいは厚膜胞子に変わり土壌中に永存する。岡崎¹³⁾ は厚膜胞子の形成量は菌糸数に比例すること、および培地中の炭素源の消費に伴ない厚膜胞子が形成されると報告し、Griffin^{5,6)} も同様の見解を述べているが、Ford ら³⁾ は菌体内の飢餓分布は一様でなく、分生胞子と厚膜胞子が部分的に形成されることを観察している。土壌中での *F. oxysporum* は養分の少ない砂では土壌に比して菌数の変動も少なく、接種後10日をすぎれば厚膜胞子により安定して推移するが、形成される胞子の数は少ない。

Smith & Snyder¹⁵⁾ は腐生型の *F. oxysporum* の胞子の発芽は土壌の種類に関係ないが、病原型では発病土壌で有利であると報告した。養分の少ない土壌では病原型菌株は厚膜胞子を形成して安定するが、キュウリ栽培土壌ではキュウリ病原菌は活性が増高する。トマト病原菌も同じ傾向は認められるが、その程度は前者に比べて小さい。このことは土壌中の分生胞子の形成量からも推察出来る。しかし、無殺菌土壌中ではこの活性促進作用は消失し、休眠化が進むようである。これは他の微生物の作用による刺激物質の消滅や、養分の欠乏あるいは静菌作用が関与すると考えられる^{8,10,15)}。一方、腐生型菌株は病原型菌株よりも静菌抑制による阻害は小さく、分生胞子を形成し、増殖しうる能力が大である。この性質により腐生型菌株は悪環境下でも活性を維持することが可能であり、病原型菌株に比して菌株の変動が大きくなるものと考えられる。腐生型あるいは病原型菌株を集めると、前者には変動型が多く、後者には安定型が多い傾向が認められ、また、前者には培地上で分生胞子の形成が多いのに対し、後者では分生胞子の形成が少なく厚膜胞子が比較的多く認められる傾向がある。

土壌中の *F. oxysporum* は基質の分解に関与するが、質と量の利用には菌系によって差異が認められ、病原型菌系は物質利用の巾が狭く、寄主植物と特異的な反応を示すとともに土壌静菌作用に感受的な菌群であり、腐生型菌系は特定植物との反応の少ない菌群であると考えられる。

要 約

土壌中に生息する *Fusarium oxysporum* は養分利用の難易や胞子形成の差異により異った生活様式をもつと思われる。

土壌に腐生的に存在する菌株は養分の少ない砂土中でもある程度の活性を維持し、しばらくは増殖するが、病原型菌株は厚膜胞子を形成して休眠する。キュウリ連作土壌中での生存は、土壌を殺菌した場合にはキュウリ病原菌は活性が特異的に増高するが、トマト病原菌では活性の増高は低い。腐生型菌株は活性は増高するが、その傾向は砂土中と類似する。しかし、キュウリ栽培土壌を無殺菌のまま用いるとキュウリ病原菌ですら活性は低下し、他の菌株と差異は認め難い。これらのことは土壌中に存在する胞子の種類とも一致し、活性型の存在する土壌では分生胞子が多く認められるが、不活性化につれて厚膜胞子が検出される。

これらの結果より、病原型菌株は特定植物と特異的に反応するとともに土壌静菌作用に対する感受性が大である。一方、腐生型菌株は特定物質との特異的反応は少なく、病原型に比して土壌静菌作用に対する感受性は小さいと考えられる。

文 献

1. Armstrong, G. M. & Armstrong, J. K. 1948. *Phytopath.* 38 : 808-826
2. Cook, R. J. & Schroth, M. N. 1965. *Ibid.* 55 : 254-256
3. Ford, E. J., Gold, A. H. & Snyder, W. C. 1970. *Ibid.* 60 : 479-484
4. Garrett, S. D. 1956. *Biology of root infecting fungi*, London
5. Griffin, G. J. 1970. *Can. J. Microbiol.* 16 : 733-740
6. Griffin, G. J. 1970 *Ibid.* 16 : 1366-1368
7. Hsu, S. C. & Lockwood, J. L. 1973. *Phytopath.* 63 : 334-337
8. Ko, W. H. & Lockwood, J. L. 1967. *Ibid.* 57 : 894-901
9. 駒田 且 1972. *東近農試研報.* 23 : 144-178
10. Lockwood, J. L. 1964. *Ann. Rev. Phytopath.* 2 : 341-362
11. Nash, S. M., Christou, T. & Snyder, W. C. 1961 *Phytopath.* 51 : 308-312
12. Newcombe, M. 1960. *Trans. Brit. mycol. Soc.* 43 : 51-59
13. 岡崎 博 1974 *土と微生物.* 16 : 52-57
14. Palmer, L. T. & Kommendahl, T. 1969. *Phytopath.* 59 : 1613-1617
15. Smith, S. N. & Snyder, W. C. 1972. *Ibid.* 62 : 273-277
16. Smith, S. N. & Snyder, W. C. 1975. *Ibid.* 65 : 190-196
17. Warren, H. L. 1969. *Ibid.* 59 : 1056
18. Warren, H. L. & Kommendahl, T. 1973. *Ibid.* 63 : 103-108

(昭和50年9月30日受理)

