

Trichoderma の *Fusarium oxysporum* に対する抗 菌力について

小倉・寛典・林三徳

(農学部植物病理学研究室)

On the Antagonistic Activity of *Trichoderma* spp. to *Fusarium oxysporum*

Hirosuke OGURA and Mitsunori HAYASHI

(Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture)

Abstract: On the antagonistic activity of *Trichoderma* spp. to *Fusarium oxysporum*. Hirosuke OGURA and Mitsunori HAYASHI, Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture. Though *Trichoderma* grew in soil ubiquitously, this fungus inhabited more in soil planted tomato or cucumber than in non-cultivated soil, and was one of dominant group in the microflora there. At the competition for nutrient in soil *Trichoderma* was most vigorous one among this dominant group and then *Fusarium oxysporum* was following. At the competition between *Trichoderma* and *F. oxysporum* the former occupied more pieces of straw than latter, generally, but this phenomenon varied with assortment each isolate. In *F. oxysporum* group the saprophytic type had more severe colonized ability to rice straw in soil than the pathogenic type under the presence of *Trichoderma*. Antagonistic activity of this fungus to *F. oxysporum* increased in alkali side of medium and lower concentration of nitrogen sources. When corn powder as low nitrogen source was added in soil, the activity of *Trichoderma* increased and ratio of damped cucumber caused by *F. oxysporum* decreased. This phenomenon was appeared in soil even when the *Trichoderma* isolate had not activity to *F. oxysporum* on Czapek medium. The other hand when clover leaf powder as high nitrogen source was added in soil the activity of *Trichoderma* was less than in soil added corn, and damping ratio was appeared severely.

土壤病害は、病原菌が土壤中で腐生的に生存し、増殖することにより、その場所で他の土壤菌に対して優位性を獲得することによって起る。さらに寄主植物を利用することにより病原菌は生存域を拡大する。一方、土壤中には多くの微生物が自己の生存の場を獲得するために養分競合や空間競合を行なっている。この競合は養分の多い植物残渣や生活根の周辺ではげしく起ると考えられる。土壤病原菌は一般に腐生競合に弱く、微生物相構成員の組合せ、物理的条件、化学的条件などの複合的要因により生存が左右されやすい。Sanford^{1,2)}, Henry^{3,4)} は土壤病害の発生と土壤微生物相、さらに土壤中の拮抗微生物との関係について報告している。Porter⁵⁾ は植物残渣上でおたがいに隣接した微生物の間には生育の阻害、共存あるいは無関係な行動があることを述べている。土壤中に生息する糸状菌についての多くの報告は、特定の条件を除いては、優勢菌群として *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* その他ある程度限られた菌群を挙げ、そのうちの若干の菌群は抗菌力をもつことが調べられている。これらの菌の競合あるいは拮抗については Waksman⁶⁾, Park⁷⁾, Clark⁸⁾, らが、*Trichoderma* については西門・渡辺⁹⁾, 大島¹⁰⁾ をはじめ多くの報告がある。

本報告は、キュウリつる割病菌に対する *Trichoderma* の抗菌力について検討した。

実験方法ならびに実験結果

1. 土壌中の *Trichoderma*

当研究室所属の圃場に2年間キュウリおよびトマトをそれぞれ連作、あるいは休閑した場合、それぞれの圃場における *Trichoderma* の菌数を調査した。耕作地は毎年4月に反当イネわら 1000 kg, 油粕 120 kg を施用し、1カ月後にそれぞれの作物を定植した。休閑地は人為的処理は行なわず、時々除草を行なった程度である。調査は7月に行ない、寒天稀釈法と残渣法を併用した。培地はいずれもローズベンガル 150ppm, ストレプトマイシン 50ppm を含むジャガイモ煎汁寒天培地を用い、寒天稀釈法では土壌 20g を、残渣法は水を加えた 200g の土壌より浮上する残渣小片 100 片を用い、4日間 25°C に静置して出現する菌数を調査した(第1表)。

Table 1. Number of fungi in soil

Field isolated fungi	Method for isolation			
	Agar dilution		Plant debris	
	Total fungi	<i>Trichoderma</i>	Total fungi	<i>Trichoderma</i>
Tomato field	* 21.1×10 ³	4310	** 235	28
Cucumber field	16.2×10 ³	3120	195	21
Non planted	8.5×10 ³	1750	182	12

* Number of fungi per 1g of dry soil

** Number of fungi per 100 pieces of plant debris

休閑地の糸状菌数は耕作地に比してやゝ少ない。*Trichoderma* の出現比率は寒天稀釈法によれば3土壌ともあまり差は認められないが、同時に出現する優勢菌群には *Penicillium* や *Aspergillus* のように胞子を多く形成する菌が多い。これに対し、残渣より出現する *Trichoderma* の比率は寒天稀釈法のそれに比べて小さく、とくに休閑地では耕作地よりも *Trichoderma* の占める割合はかなり低い。一方、出現する優勢菌の種類も、稀釈法では *Trichoderma*, *Penicillium*, *Chaetomium*, *Aspergillus*, *F. oxysprum*, *F. roseum*, *Pullularia* となるのに対し、残渣法では *F. roseum*, *F. oxysporum*, *Trichoderma*, *Myrothecium*, *Pullularia*, *Humicola*, *Cladorhinum*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Coniothecium*, *Paprospora* と多様化の傾向が認められる。

2. 優勢菌群間の土壌中での競合

上記の実験において残渣上から出現する菌群のうち、いずれの土壌からも検出され、しかも、完成の数が出検される *F. roseum*, *F. oxysporum*, *Trichoderma*, *Myrothecium*, *Pullularia*, *Humicola*, *Cladorhinum*, *Chaetomium*, *Pythium* について土壌中での序列を検討した。供試9菌株は各菌群のうちで培地上の生育の良好のものから選んだ。あらかじめ Czapek 液を添加したパーミキュライトに 25°C で10日間培養した各菌株を腰高ペトリ皿内で約 10ml ずつ混和し、殺菌した土壌を加えて 200ml とし、均一に混合したのち殺菌水で湿度を60% (v/v) に調整し 25°C に保った。処理後10日ごとに、殺菌した稲わらを挿入して3日後に取出して水洗し、ジャガイモ煎汁培地上に置き、出現する菌を調査した(第2表)。

菌数は実験のたびに変動し、この傾向は数の少ない菌株にしばしば認められる。第2表はその一部にすぎないが、供試した各菌のうちでは *F. oxysporum*, *Trichoderma* は実験の期間を通じて数も多く安定した生存を示すと思われる。また、*Myrothecium*, *Humicola*, *Chaetomium* も数は

Table 2. Competition on plant debris in soil for fungi in dominant group

Fungi*	Days after inoculation in soil			
	10	20	30	40
<i>F. oxysporum</i>	**40	60	47	35
<i>F. roseum</i>	81	52	13	10
<i>Trichoderma</i>	45	68	52	51
<i>Myrothecium</i>	8	9	10	13
<i>Pullularia</i>	32	11	10	4
<i>Humicola</i>	16	22	11	15
<i>Cladorhinum</i>	41	2	8	3
<i>Chaetomium</i>	6	0	11	6
<i>Pythium</i>	4	5	0	0

* Fungi were isolated from cucumber and tomato field at the experiment of Table-1.

** Number of fungi on 100 pieces of rice straw buried in soil.

少ないが比較的変動が少ない。その他の菌株は時間の経つにつれて減少するが、その減少の程度は実験のたびに一定していない。

3. *Trichoderma* と *F. oxysporum* との競合

上記の結果より、土壌中では *Trichoderma* が各菌群の間では優位を保ち、*F. oxysporum* がこれに次ぐ傾向が認められる。両菌を土壌より採取して稲わらへの着生の程度を調査した。供試菌株は *F. oxysporum* f. *cucumerinum* 3菌株 (F 501, F 504, F 507号菌), キュウリやトマトに対し病原性をもたず腐生型と思われる *F. oxysporum* 3菌株 (F 105, F 109, F 112号菌),

Table 3. *Trichoderma* and *F. oxysporum* on rice straw in sterilized soil added causal both fungi

<i>Trichoderma</i> / <i>Fusarium</i>	Saprophytic type			Pathogenic type		
	F 105	F 109	F 112	F 501	F 504	F 507
T 101	* 92/66	93/46	93/56	85/36	91/50	100/22
T 102	81/70	76/55	73/69	91/58	86/73	92/41
T 103	86/59	91/56	77/61	83/56	79/50	87/31
T 104	76/61	90/56	73/65	73/51	78/53	81/44
T 105	90/55	96/44	82/77	85/36	83/36	91/21
T 106	72/62	81/37	76/57	75/49	73/51	73/42
T 107	92/71	95/33	92/51	93/35	87/39	97/22
T 108	82/44	93/33	75/50	86/39	83/32	88/31
T 109	92/37	100/32	93/51	96/39	92/45	100/41
T 110	52/52	66/46	56/59	62/51	55/56	73/49
T 111	76/50	85/44	73/50	82/46	78/55	88/41
T 112	52/58	61/42	55/57	58/46	60/49	62/40
T 113	68/70	72/51	65/65	71/49	72/45	78/39
T 114	85/51	92/50	82/71	91/34	93/34	97/23
T 115	93/52	90/45	93/53	93/35	98/36	94/23

* Per cent of appeared fungi at 20 days after inoculation in soil : *Trichoderma* / *Fusarium*

Trichoderma spp. 15菌株である。上記の実験と同様にパーミキュライトで各菌株を培養し、*F. oxysporum* と *Trichoderma* をそれぞれ約 20ml ずつを 100ml の殺菌土壌に混和し、湿度を 60% (v/v) に保ち 25°C で20日間静置した。この土壌に長さ 2 cm の殺菌した稲わらを挿入して3日後にその中央部 5 mm を切取って出現する菌を調査した (第3表)。

ほとんどの場合、*Trichoderma* は *F. oxysporum* より優位にあるが両菌株の組合せによってはかなりの差異が生じる。*F. oxysporum* は、腐生型の場合は病原型のものに比して *Trichoderma* に対して競合力が強いようである。

Table 4. Antagonistic activity of *Trichoderma* to *F. oxysporum* on PDA medium

<i>Trichoderma</i>	Activity to <i>Fusarium</i>
T 101	* ++
T 102	—
T 103	±
T 104	—
T 105	++
T 106	—
T 107	++
T 108	++
T 109	—
T 110	—
T 111	±
T 112	—
T 113	—
T 114	++
T 115	++

* Antagonistic activity; — : none, ± : slight, ++ : severe.

Table 5. Antagonistic activity of *Trichoderma* to *F. oxysporum* on PDA medium at different pH

pH	<i>Trichoderma</i> *	
	T 104	T 105
4.0	** —	±
5.0	—	+
6.0	—	++
7.0	±~—	++
8.0	±~—	+

* T 104 was a isolate not inhibited growth of *F. oxysporum* but T 105 was a isolate inhibited it severity.

** Antagonistic activity. — → ++ : non → severe

つぎに *Trichoderma* の *F. oxysporum* に対する抑制の有無を培地上で調査した。ペトリ皿内のジャガイモ煎汁培地上に *F. oxysporum* (F 504号菌) と *Trichoderma* を対峙させ、25°C に 5 日間静置したのち 両者の拮抗を調査した (第4表)。

F. oxysporum に対する抗菌力により *Trichoderma* は 3 群に分けられる。抗菌力の強い菌株 (T 101, T 105, T 107, T 108, T 114, T 115号菌) は *F. oxysporum* の菌糸を黄変させ生育を阻止するが、抗菌力を示さない菌株 (T 102, T 104, T 106, T 109, T 110, T 112, T 113号菌) は逆に対抗菌により菌糸の生育抑制をうける。また T 103, T 110号菌は両者の中間型として、対抗菌の生育を遅延させるが、その作用は弱い。これらの結果より、以後の実験には抗菌力を示さない T 104号菌、抗菌力の強い T 105, T 115号菌を、病原菌としては孢子形成は少ないが病原性の強い F 504号菌を用いた。

培地の pH が両菌の競合に及ぼす影響を知るために、pH の異なるジャガイモ煎汁培地に両菌を対峙させた (第5表)。

Trichoderma の生育はいずれも pH が増加すると低下するにも拘らず、アルカリ側では、抗菌力を示さない T 104菌でもわずかながら抗菌力が認められた。T 105, T 115号菌は中性付近で抗菌力が強く、アルカリ側ではやや低下するが、酸性側ではさらに抗菌力は低下する。しかし、同じ実験を Czapek 培地で行なうと、T 104号菌は全く抗菌力を示さなかった。

また、養分濃度の異なる培地上での両菌の競合を観察した。すなわち、Czapek 処方

源あるいは炭素源の量を変えた培地上、あるいは NaNO_3 に換えて V 8 ジュースを用いた培地上で両菌を 25°C で対峙させた (第6表)。

Table 6. Antagonistic activity of *Trichoderma* to *F. oxysporum* on Czapek's medium at different nutrient condition

<i>Trichoderma</i>	Conc. of C source*					Conc. of N source**					
	1/10	1/5	1	2	5	1/10	1/5	1	2	5	V8***
T 104	****-	-	-	-	-	++	+	-	-	-	++
T 105	-	±	±~-	±~-	+	++	++	±~-	-	-	++

* Sucrose was added at different ratio in Czapek's preparation. Unit 1 was standard preparation.

** NaNO₃ was added at different ratio in Czapek's preparation. Unit 1 was standard preparation.

*** V 8 juice was added in Czapek's agar medium that was taken off NaNO₃.

**** Antagonistic activity. - → ++ : non → severe.

抗菌力を示さない T104 号菌は窒素源の少ない培地上ではあきらかに *F. oxysporum* の生育を阻止した。抗菌力をもつ T105 号菌は炭素源や窒素源の割合により抗菌力に差が認められる。両菌株ともに V 8 ジュースを添加すれば抗菌力は増大する。

以上の結果、菌をとりまく栄養環境により各菌株の活性に相違が認められるので、土壌中での残渣の質的な差異と抗菌力との関連を検討した。砂土の中にトウモロコシ粉末およびクローバーの粉末をそれぞれ砂に対する比率が 1/75 の割合に混ぜ、殺菌後、パーミキュライト中に生育させた各菌株を単独あるいは混合して接種した。接種量は 2~4ml/150ml の割合とした。土壌湿度を 60% (v/v) とし、20 日間 25°C に置いたのち、寒天希釈法で各菌数を調査した (第 7 表)。加えた植物残渣の窒素量は 1g あたりトウモロコシは 24.6mg、クローバーは 44.8mg であった。

Table 7. *F. oxysporum* or *Trichoderma* in sand added corn powder or clover leaf powder as residue

Plant residue	Fungi inoculated in soil	Fungi isolated from soil *		
		F 504	T 104	T 105
Clover	F 504	** 24		
	T 104		1164.8	
	T 105			632.8
	F 504+T 104	13.6	5.6	
	F 504+T 105	7.2		65.6
Corn	F 504	11.2		
	T 104		1436.8	
	T 105			1093.6
	F 504+T 104	0.8	187.2	
	F 504+T 105	0.8		496

* Fungi were isolated by agar dilution methods.

** Number of causal fungi : ×10³/1g of soil.

Fusarium と *Trichoderma* は土壌中での孢子形成量が異なり、このため寒天希釈法では両菌の土壌中での菌量を必ずしも正しく評価し得ないが、クローバーを添加した場合、各菌を単独に加えた場合と両菌を混合した場合を比較すると、*Trichoderma* の減少の割合は、*F. oxysporum* のそれに比べていちじるしい。しかし、抗菌力をもつ T105 号菌は T104 号菌に比べて *F. oxysporum* との競合に強いと思われる。また、トウモロコシを加えた土壌では *F. oxysporum* の減少はクロ

ーバーを加えた場合よりもいちじるしく、かつ、*Trichoderma* の両菌株による差異は見出だせなかった。このことは、両菌間の競合は土壤添加物によりかなり左右されるものと思われる。

つぎに、このような競合が土壤中で起る場合の病害の発生について検討した。上記の実験と同様に腰高ペトリ皿に砂とトウモロコシの粉末あるいはクローバーの粉末を加え、殺菌後、各菌株を単独あるいは混合して接種し、全量を 150ml とした。土壤湿度を60% (v/v) として10日間 25°C に静置したのち、表面殺菌後催芽させたキュウリ (品種、四葉) の種子を播種し、陽光の下で 25°C に保った。播種 7 日後にすべてのキュウリ苗を抜き取って水洗し、罹病の程度を調査した。供試したキュウリは各区40本である (第 8 表)。

Table 8. Occurrence of damped cucumber seedlings caused by *F. oxysporum* in soil added *Trichoderma* and corn powder or clover leaf powder as residue

Plant residue	Isolate added	Pathogenicity		
		Damping-off Preemergence	Postemergence	Root browning Slightly
Clover	F 504	100%		
	F 504+T 104	100		
	F 504+T 105	100		
Corn	F 504	7.5	92.5	
	F 504+T 104		12.5	55.0 30.0
	F 504+T 105		20.0	45.0 30.0

クローバーを土壤に添加した場合には、*Trichoderma* の有無に関係なくキュウリは発芽前に枯死した。トウモロコシを添加した土壤では、ほとんどの苗は発芽後に枯死するが、*Trichoderma* を加えた場合には被害は軽減された。この場合、*Trichoderma* 両菌株が培地上で示した抗菌力の強弱による差異はほとんど見られなかった。

考 察

土壤中に生存する微生物はおたがいに競合することによりその土壤に特有の生活系を形成する。土壤病原菌もこの系の一員として行動する^{2,5)} が、人為的に作物を土壤に導入することにより系は攪乱される。この場合、病害の発生は寄主作物、寄生菌、一般微生物との相互関係に支配される^{11, 12, 13)}。*Trichoderma* は多くの土壤中から優勢菌として検出され、また、その抗菌性についての報告も多い^{6, 9, 10, 14, 15, 16)}。耕地土壤には、未耕地に比して *Trichoderma* が多く認められるが、これは土壤に施用した有機質によると考えられる。また、土壤中の有機質上には菌群が混在するが、*Trichoderma* や *F. oxysporum* が残渣上に占める割合は大きい。Tribe¹⁷⁾、Tyner¹⁸⁾、小倉¹⁵⁾ は残渣の成分により競合菌群の順位には変動が起ることを報告しているが、*F. oxysporum*、*Myrothecium*、*Humicola* などは *Trichoderma* の存在の下でも生残るようである。Park⁷⁾ は拮抗菌は必ずしも競合に勝つとは限らないと述べている。拮抗菌が培地上と土壤中では作用力の異なる場合が報告されている^{12, 13)} が、供試した *Trichoderma* のうち、培地上で抗菌力の大きい菌株は土壤中でも抗菌力を示すようであるが、抗菌力を示さない菌株でも栄養条件の如何によっては多少とも抗菌力を示すようである。大島¹⁰⁾ は *Trichoderma* の孢子発芽、菌糸の生育はともに酸性側で、また、白絹病に対する抗菌力は窒素の多い場合に大であると報告している。筆者らの一人である林¹⁹⁾ の研究でも *R. solani* に対する *Trichoderma* の抗菌力は大島の報告と一致するが、

F. oxysporum に対しては中性あるいはアルカリ側で抗菌力が増す傾向が認められた。また、腐生型の *Fusarium* は病原型よりも *Trichoderma* に抗して残渣を占有する力が大きいことなどから、*Trichoderma* と *F. oxysporum* との間に示される抗菌力は、菌株自体のもつ抗菌能力に併せて、環境に対する両菌の活性の平衡の破綻がいずれの菌に不利に作用するかを考慮する必要がある。残渣を加えた土壤中での両菌の動向も、クローバーの場合には *F. oxysporum* の活性の増大は *Trichoderma* のそれを上廻り、そのために抗菌力の弱い菌株は強い菌株よりもはげしく抑制されるが、トウモロコシ添加土壤では *F. oxysporum* の活性よりも *Trichoderma* 菌が大であり、このため抗菌力の弱い菌株でも強い菌株と同じ作用を *F. oxysporum* 菌に対して表わしたと解釈される。このような時点にキュウリの根が導入されると、両菌の間の既存の平衡は破れ、キュウリの根から連続的に生産される物質を加えた環境の下での両菌の競合が起るものと考えられる。

稿を終えるにあたり、本研究に御助力頂いた現大塚化学株式会社伴正敏氏に謝意を表する次第です。

摘 要

土壤中に普遍的に生息する *Trichoderma* の *Fusarium oxysporum* に対する抗菌力について検討した。本菌は未耕地よりも既耕地に多く認められる優勢菌群の一つである。優勢菌群間の競合では本菌は多くの場合上位に存在し、ついで *F. oxysporum* が優位を保つ傾向がある。*Trichoderma* 菌株群と *F. oxysporum* 菌株群の間の残渣への着生競合では *Trichoderma* が優勢であるが、*F. oxysporum* では病原型よりも腐生型の方が着生競合力が強い。*Trichoderma* の抗菌力は pH 中性かアルカリ側で強くなる。また、養分では糖過多あるいは窒素過少で抗菌力を増す。土壤中にクローバーを添加すると、トウモロコシを添加した場合よりも抗菌力は小さい。この土壤にキュウ리를植えると、発病率はトウモロコシ添加土壤の方が小さくなる。これらのことは、*Trichoderma* の抗菌力は *F. oxysporum* の活性と相関があり、両菌の環境に対する反応を考慮する必要がある。

文 献

1. Sanford, G. B., *Sci. Agr.*, 13, 638—641 (1933)
2. Sanford, G. B., *Soil Sci.*, 61, 9—12 (1946)
3. Henry, A. W., *Canad. J. Res.*, 4, 69—77 (1931)
4. Henry, A. W., *Ibid*, 5, 407—413 (1931)
5. Porter, C. L., *Amer. J. Bot.*, 11, 168—188 (1924)
6. Waksman, S. A., "Microbial Antagonisms and Antibiotic Substances" The Commonwealth Fund, New York (1945)
7. Park, D., In "The Ecology of Soil Fungi" ed. by Parkinson, D. and Waid, J. S., pp. 148—159 (1960)
8. Clark, F. E., In "Ecology of Soil-borne Plant Pathogens" ed. by Baker, K. F. and Snyder, W. C., pp. 339—344 (1965)
9. 西門義一, 渡辺清志, 農学研究, 43, 126—133 (1955)
10. 大島俊市, 岡山たばこ試報., No. 27, 1—56 (1966)
11. Park, D., *Ann. Rev. Phytopath.*, 1, 241—258 (1963)
12. 斉藤紀, 坂本正幸教授還暦記念論文集, pp. 275—279 (1968)
13. 高橋実, 同上, p. 287—297 (1968)
14. 小倉寛典, 同上, p. 281—285 (1968)
15. 小倉寛典, 高知大学農紀., No. 15, 1—60 (1965)
16. Munneke, D. E., Kolbenzen, M. J. and Wilbur, W. D., *Phytopath.*, 63, 1352—1357 (1973)

17. Tribe, H. T., *Trans. Brit. myc. Soc.*, 49, 457—466 (1966)
18. Tyner, L. F., *Phytopath.*, 51, 625—634 (1961)
19. 林三徳, 未発表

(昭和49年9月30日受理)