

土壌中における *Fusarium oxysporum* の分生胞子の動向

小倉寛典・森本徳右衛門・坪井福俊*

(農学部植物病理学研究室)

Behaviour of conidia of *Fusarium oxysporum* in soil

by

Hirosuke OGURA, Tokueemon MORIMOTO
and Fukutoshi TSUBOI*

(Laboratory of Phytopathology, Faculty of Agriculture)

Abstract

In this paper conidia formation and their pathogenicities of *Fusarium oxysporum* f. *cubense* were studied. The activities of microconidia of this fungus decreased step by step with expiration of time after their formation, and their decreases were more rapid in dry condition. Damage of cucumber seedlings by microconidia of this fungus increased with increase of spores inoculated in soil, but it was appeared in non-continuance in case of active spores and was in continuance by increase of inactivated spores though damage was in decreased. Number of conidia of *F. oxysporum* and *F. solani* increased in rich of NaNO_3 or K_2HPO_4 , and *F. roseum* did not form conidia but did chlamidospores in same media. In each fungus germinated ratio of microconidia was lower than that of macroconidia, and germination of the former was like to be affected by nutrient condition at that time of conidial formation. For invasion into cucumber by microconidia it was appeared the same phenomena as germination. At migration of microconidia in soil they moved very few in clayey loam and in sand they moved considerably in vertical but merely in horizontal.

From these results it is considered that conidia especially microconidia of *F. oxysporum* f. *cubense* are concerned in invasion or multiplication at narrow space or for a short time, but their inoculum potential is seemed to be in unstable for provided condition of their formation.

病害の発生は植物の病原菌に対する感受性とともに関病原菌が環境の中で獲得する侵害力がかなり影響すると考えられる。寄主と病原菌が同時におかれる相対的な場の中での病原菌の行動には、Garrett³⁾は病原菌本来の性質のほかに関菌密度、菌の活性、利用物質、環境要因の重要性について言及している。*Fusarium oxysporum*は生存器官として厚膜胞子のほかに関大型分生胞子、小型分生胞子を形成する。このうち小型分生胞子は生存期間も短かく、発芽率も大型分生胞子や厚膜胞子に比して小さい⁸⁾。しかし、*F. oxysporum*では小型分生胞子は他の胞子に比して大量に形成される菌株が多いので、本報告は小型分生胞子の動向について検討した。

* 現在、横浜植物防疫所調査課

実験材料

全実験を通じてキュウリより分離した *F. oxysporum* f. *cubense* (F507号菌) を、実験Ⅱではそのほかに土壌より分離した *F. solani* (F101号菌) および *F. roseum* (F103号菌) を用いた。また、検定植物としてキュウリ (四葉) を供試した。

実験1. *F. oxysporum* の小型分生胞子によるキュウリ幼苗立枯病の発生

分生胞子の発芽活性持続期間を知るためにジャガイモ煎汁寒天培地上にセロファンをおき、その上に *F. oxysporum* を接種して25°Cに10日間静置した。その後セロファン膜を菌そうごと剥ぎとり7日, 21日, 49日間 (すなわち, 接種後14日, 28日, 56日) 殺菌したペトリ皿内に保存した。このセロファン膜上の分生胞子を水滴中に懸濁し, 25°Cで発芽率を調査した。また培地上で7日, 14日, 28日, 56日に形成された分生胞子の発芽率も調査した (第1表)。

Table 1. Conidial germination of *F. oxysporum* in different duration after their formation.

Stored condition	Days after inoculation	Germinated ratio	
		Microconidia	Macroconidia
Air drying	* 14	12%	22
	28	2	9
	56	0	9
On medium	** 7	56	61
	14	42	54
	28	8	52
	56	7	36

* Mycelia cultured for 7 days on medium and then stored in dried petri-dish.

** Mycelia cultured for these days at 25°C.

小型分生胞子, 大型分生胞子はいずれもその発芽活性は経時的に低下し, とくに乾燥に対して非常に弱いが, とくに小型分生胞子では7日間の乾燥 (接種後14日) で急に発芽率が低下することは

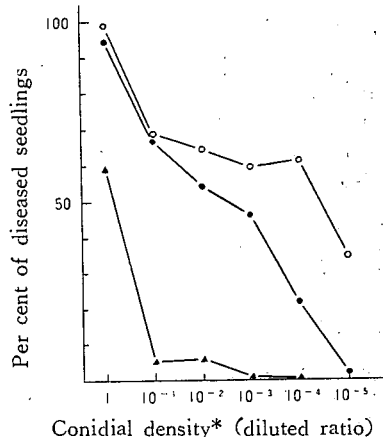


Fig. 1. Relation between diseased cucumber seedlings and conidial densities in soil. ○—○ Conidia from 7 days cultured, ●—● Conidia from 14 days cultured and ▲—▲ conidia from 28 days cultured. Original conidial suspension contained 10^{-8} spores in 1 view ($\times 400$).

この種の胞子の生存期間がきわめて短いことを示している。

小型分生胞子によるキュウリ幼苗の侵害は第1図に示す通りである。すなわち、本菌をジャガイモ煎汁培地に植えつけ、7日、14日、28日後に殺菌水にて胞子懸濁液をつくった。胞子濃度は1視野あたり(×400)約10~8である。これを原液、1/10、1/100、1/1000、1/10000、1/100000倍に稀釈して砂150mlを入れた腰高ペトリ皿に50mlずつ添加し、キュウリ(四葉)を播種して25°Cに保って10日後に根部の罹病度を調査した。

砂土中の胞子密度はキュウリ罹病率と必ずしも平行関係をもたず、胞子密度が低下してもある濃度までは罹病率は維持される。しかし、胞子形成後の日数により胞子は急速に活性を失うようであり、28日培養の胞子では他に比して発病はきわめて少ない。

実験II. 培地の養分の相違と *F. oxysporum* の分生胞子の活性

培地の組成を Czapek, Czapek 処方 of NaNO_3 を等量の窒素の glutamic acid で置き換えたもの、10倍稀釈 Czapek, 10倍稀釈 Czapekに NaNO_3 , K_2HPO_4 , glutamic acid, sucrose をそれぞれ原量添加したもの7種とし、30mlの液中に、*F. oxysporum*, *F. solani*, *F. roseum* を接種して25°Cに静置し、10日後の菌体重を測定した(第2表)。

Table. 2. Mycelial weight of Fusaria in different media

Media	Mycelial weight		
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. roseum</i>
Czapek	*** 0.023 g	0.072	0.145
Czapek+glutamic acid*	0.113	0.285	0.344
1/10 Czapek	0.012	0.044	0.041
1/10 Czapek+ NaNO_3 **	0.023	0.075	0.058
1/10 Czapek+ K_2HPO_4 **	0.010	0.018	0.034
1/10 Czapek+glutamic acid*	0.042	0.112	0.124
1/10 Czapek+sucrose**	0.018	0.056	0.134

* Added the same of nitrgen of Czapek's prescription in place of NaNO_3 .

** Added the same weight of Czapek's prescription.

*** Cultured for 10 days at 25°C in 30 ml of solution.

養分量の多い培地では *F. oxysporum* は生育は良好であるが、稀薄養分でも窒素源、とくに glutamic acid の多い場合には生育は良く、 K_2HPO_4 は生育には直接的な影響は認められない。この傾向は *F. solani* ではさらに明瞭であるが、*F. roseum* ではかえって炭素源量により生育は規正されるようである。

つぎにこれらの菌の分生胞子の形成を調査した(第3表)。上記7種の寒天培地上に3菌を接種し、25°Cに7日間静置したのち50mlの殺菌水を添加してよく振とうした。この胞子懸濁液を遠沈し、さらに数回殺菌水に稀釈遠沈洗滌した。これを正確に50mlに稀釈して分生胞子の形成数を計測した。また、25°Cに静置して各培養による胞子の発芽率を調査した(第3表)。

F. oxysporum は大型分生胞子よりも小型分生胞子を多く形成する。また、胞子数は養分状態が悪く、しかも NaNO_3 あるいは K_2HPO_4 が多量に含まれる場合に増加する。*F. solani* も *F. oxysporum* と同じ傾向を示すが、小型分生胞子よりも大型分生胞子を形成する。これらに対し、*F. roseum* は分生胞子の形成は少なく厚膜胞子を多数形成するようである。各菌とも小型分生胞子の発芽率は大型分生胞子に比して悪く、この傾向は *F. solani* において大きい。また、小型分生胞子の発芽率は大型分生胞子に比して培地の組成によりかなりの相違を示している。

Table 3. Conidial formation and germination on different media

Medium*	<i>F. oxysporum</i>				<i>F. solani</i>				<i>F. roseum</i>			
	Microconidia		Macroconidia		Microconidia		Macroconidia		Microconidia		Macroconidia	
	No.	Germ. ratio	No.	Germ. ratio	No.	Germ. ratio	No.	Germ. ratio	No.	Germ. ratio	No.	Germ. ratio
Czapek	35	47	13	61	12	56	43	88	3	17	7	41
Czapek + glutamic acid**	18	48	2	54	10	61	18	83	2	25	11	44
1/10 Czapek	21	22	10	56	20	41	31	81	4	18	10	36
1/10 Czapek + NaNO ₃ ***	100	61	38	72	40	52	128	94	9	28	27	49
1/10 Czapek + K ₂ HPO ₄ ***	70	61	24	58	25	61	133	89	12	28	25	42
1/10 Czapek + glutamic acid***	11	31	4	51	18	44	26	81	4	26	16	37
1/10 Czapek + sucrose***	18	31	8	56	10	39	17	84	2	22	16	38

* On agar media

** Added the same of nitrogen of Czapek's prescription in place of NaNO₃.

*** Added the same weight of Czapek's prescription.

**** Number of conidia in 5 view of ×400

上記7種の異った培地より得た *F. oxysporum* の小型分生胞子によるキュウリ幼苗侵害を第2図に示した。10日間25°Cで培養した各寒天培地上の胞子を教回遠沈洗滌後、さらに遠沈により大型分生胞子と小型分生胞子に分別し、各胞子濃度を1視野(×400)あたり40~30とし、前記同様に砂を入れた腰高ペトリ皿にてキュウリ幼苗の侵害を観察した。この場合大型分生胞子懸濁液中には多少の小型分生胞子が混入していたが、これらの分別はなし得なかった。

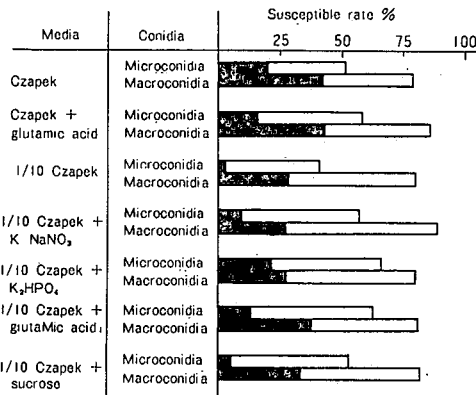


Fig. 2. Appearance of diseased cucumber seedlings by conidia in soil. ■: Per cent of damped seedlings, □: Per cent of diseased one slightly. * Conidia gathered from dease media cultured for 10 days at 25°C. Glutamic acid was used in place of NaNO₃. NaNO₃, K₂HPO₄ or sucrose of original Czapek's prescription was added in 1/10 Czapek's media.

小型分生胞子は大型分生胞子よりもいずれもキュウリ侵害力は弱く、寄主倒伏率は小さい。また、培養条件によりかなりの差を生じるようである。これに反し、大型分生胞子は被害度の軽重には差が認められるが、全被害率はあまり差が認められず、胞子形成時の条件の差はほとんどないものと思われる。

実験Ⅲ. *F. oxysporum* 小型分生胞子の土壤中の移動

上記の実験においてキュウリ幼苗の罹病部位にはかなりの量の小型分生胞子が形成されていることを検鏡により確かめたので、これら分生胞子が土壤中をどの程度移行しうるかについて検討した。

径 5 cm のガラス円筒カラムに砂土あるいは埴壤土を深さ 5, 10, 15 cm になるように入れ、その表面にあらかじめ 25°C で 14 日間培養した菌そうを小片にして並べた。この菌そうの形成した胞子量は ×400 倍 1 視野あたり 10~11 胞子である。カラム上方から 1 回 50 ml ずつの水を断続的に加え、カラム下方のコックを調整して土壤層透過の水量を 4 ml/min になるようにした。カラム流下水は 50 ml ずつに分けて集め、10 ml 中の胞子を遠沈法により 2 ml とし、5 視野 (×400) 中の胞子数を計測した (第 3 図)。

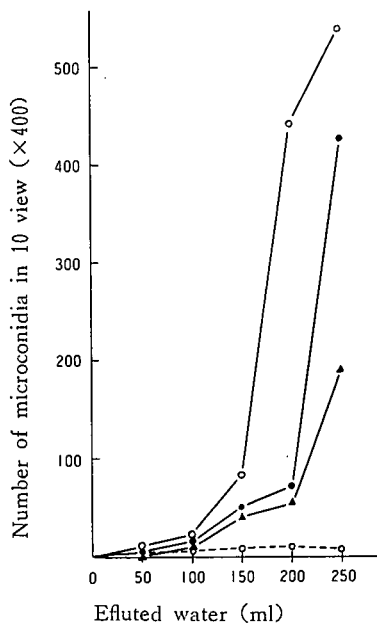


Fig. 3. Effluence of conidia at each 50 ml of water in different soil depth. ○—○ 5 cm of soil depth in sand, ●—● 10 cm of soil depth in sand, ▲—▲ 15 cm of soil depth in sand, and ○—○ 5 cm of soil depth in clayey loam

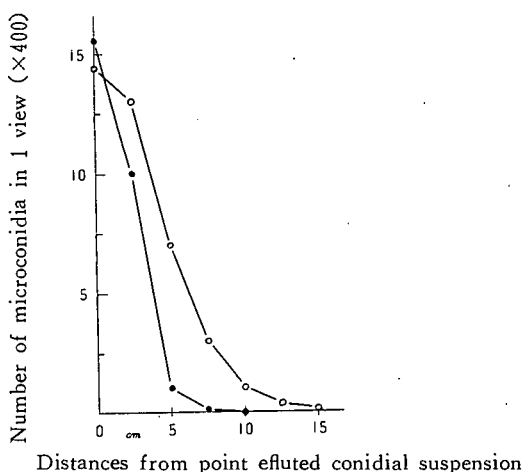


Fig. 4. Conidial migration in horizontal. ○—○ migration in sand, ●—● in clayey loam

小型分生胞子は砂土中を垂直方向に移行し、最初の流下量は少ないが、添加水の増加につれて急激に流下しはじめる。この傾向は時間的なおくれはあるが、深さ15cmにおいても認められる。しかし、埴壤土中では移行はほとんど認められず、5cmの深さにおいて多少流下する程度であり、流水量が増加しても胞子は砂土のように流下しないようである。また、深さ10cm、15cmでは全く流下しない。

さらに水平方向の移行を知るために径40cm深さ15cmの容器に砂あるいは埴壤土を入れ、1視野(×400)あたり10胞子の懸濁液約1500mlを15ml/minの割合で滴下した。その後、滴下点から2.5、5、7.5、10、12.5、15cmの各点よりそれぞれ2ヶ所ずつ深さ1cmから5cmまでの土を取り、100mlの水とともに振とうし、その40mlを遠沈により10mlとして胞子を検鏡した(第4図)。

砂土中の胞子の水平方向への移行は5cmで半減し、10cmに到ればほとんど検出されない。さらに埴壤土ではその移行は少なく、5cmでほとんど検出されない。

考 察

土壌中に生活する *Fusarium* 属菌は厚膜胞子の形で生存し、寄主あるいは特定の有機質の出現により活性を回復すると云われている。そして活性の菌糸は大型分生胞子、小型分生胞子あるいは厚膜胞子を形成し個体の増殖をはかる。この場合、病原菌は寄主植物へ侵入して被害を及ぼす。*F. oxysporum* ではこの病患部に小型分生胞子が多く形成されるのが認められる。

Dobbs, Hinson & Bywater²⁾, Jackson⁶⁾, Lockwood⁷⁾ らは土壌は *Fusarium* に静菌作用をもつことを指摘しているが、Nash・Christou & Snyder⁹⁾ は分生胞子の土壌中での発芽を報告し、松田・尾崎・下長根・渡辺⁸⁾ は分生胞子は厚膜胞子よりも静菌作用打破力をもつと推測している。これらのことは土壌中の植物上に形成された分生胞子も病害発現の一端をなしうものと考えられる。*F. oxysporum* の小型分生胞子が活性を維持する期間は短かく、発芽現象に端的に表明されるが、胞子の量的増加によりキュウリへの侵害は増加する。Rao & Rao¹²⁾ は殺菌土壌中では *F. oxysporum* によるワタ萎凋病の発現は菌量に比例すると述べているが、Gooding & Lucas⁴⁾ は *Phytophthora* によるタバコの被害はある菌量で急に増加すると報告している。*F. oxysporum* によるキュウリの被害はやはりある胞子量に達すると急に増大するが、この場合、胞子の質的な活性を考慮すべきであり、形成後の期間の長い小型分生胞子では過密な胞子数でも発病には到り得ない。また、分生胞子は養分条件により形成量が異なるが、発芽力は大型分生胞子があまり形成条件に左右されないのに対し、小型分生胞子は多少影響をうけるようであり、さらに寄主侵害力にも明らかな差が認められる。小型分生胞子の土壌中の移行については埴壤土では垂直方向、水平方向にほとんど移行しないが、砂土中では垂直方向にかなり移行するが水平方向にはあまり移行しない。Hirst⁵⁾ は土壌病原菌の胞子は土壌中の移行に適した形をとると報告しているが、Burgess¹⁾, Nicot¹⁰⁾ は下方への胞子の移行について、小倉、森本¹¹⁾ は水平方向への *F. oxysporum* の罹病箇の拡がりについて本報告と同様の現象を表明している。

これらの結果より、*F. oxysporum* f. *cubense* の分生型子は厚膜胞子のように長期に亘る耐久器官として本菌の土壌生息性を助長するような作用はもたないが、限られた位置における増殖を受けもつ器官であろうと推測される。その様式の1つは罹病組織周辺への勢力拡大であり、もう1つは新たな厚膜胞子形成の原基であろうと思われる。しかも形成時の環境によりその活性は左右されやすく、それゆえ本菌は非常に不安定な inoculum potential を示すものと考えられる。

稿を終るにあたり本実験に御助力頂いた当研究室山本多恵子氏に謝意を表する次第です。

摘 要

Fusarium oxysporum の分生胞子の動向について検討した。本菌の小型分生胞子は形成後経時的に活性は低下するが、とくに乾燥に対し非常に弱い。小型分生胞子によるキュウリ幼苗の罹病度は活性の大きい胞子では土壌中の胞子密度と一致せず胞子の減少につれて非連続的に罹病率は低下する。しかし、活性の低下した胞子群では胞子密度の低下につれて罹病率は急速に減少する。胞子形成は *F. oxysporum*, *F. solani* では NaNO_3 , K_2HPO_4 の増加により増大する。しかし、*F. roseum* では分生胞子は少なく厚膜胞子が形成されやすい。各菌とも小型分生胞子は大型分生胞子に比して発芽率は低く、また胞子形成時の栄養条件に左右されやすい。キュウリ侵害程度も小型分生胞子は大型分生胞子に比して低く、かつ、形成時の影響をうける。小型分生胞子の土壌中の移行は墾壤土では少ないが砂土では垂直方向にのみかなり移行する。

以上の結果より *F. oxysporum* f. *cubense* の分生胞子とくに小型分生胞子は限られた位置における増殖を受け持つが、形成条件により非常に不安定な inoculum potential を示すものと考えられる。

文 献

1. Burges, A. (1958) Microorganisms in the soil. London pp. 86—88
2. Dobbs, C. G., Hinson, W. H. & Bywater, J. (1960) In Ecology of soil fungi (Edited by Perkinson, D. & Waid, J. S.) Liverpool pp 130—147
3. Garrett, S. D. (1960) In Plant pathology (Edited by Horsfall, J. G. & Dimond, A. E.) New York Vol 3. pp 23—57
4. Gooding, G. V. & Lucas, G. B. (1959) Phytopath. 49: 274—276
5. Hirst, J. M. (1965) In Ecology of soil-borne plant pathogens. (Edited by Baker, K. F. & Snyder, W. C.) Los Angeles pp 69—81
6. Jackson, R. M. (1960) In Ecology of soil fungi. (Edited by Perkinson, D. & Waid, J. S.) Liverpool pp 168—176
7. Lockwood, J. L. (1960) Phytopath. 50: 787—789
8. 松田 明・尾崎克巳・下長根鴻・渡辺文吉郎 (1967) 土と微生物. 9: 30—40
9. Nash, S. M., Christou, T. & Snyder, W. G. (1961) Phytopath. 51: 308—312
10. Nicot, M. J. (1960) In Ecology of soil fungi. (Edited by Perkinson, D. & Waid, J. S.) Liverpool pp 94—97
11. 小倉寛典・森本徳右衛門 (1964) 高知大学研報. 13 自然科学II: 65—72
12. Rao, M. V. & Rao, A. S. (1966) Trans. Brit. mycol. Soc. 49: 403—409

(昭和43年9月30日受理)

