

土壤中における *Fusarium* 菌の定量に関する問題点

木谷清美・国安克人
(農林省四国農業試験場)

緒 言

トマト萎凋病の発病生態や防除の研究には病原菌の土壤中における適確な定量法が重要なことである。土壤中における本病菌の定量は土壤稀釈平板法によると、その結果に変動が多く、ときには *Fusarium* 菌の分離率が非常に低下することをしばしば体験している。その原因については *Fusarium* 菌が土壤有機物中に埋没していること (Warcup, 1955), また土壤懸濁液中では沈降しやすい形であり、したがって懸濁液では、浮遊しやすい他の菌種が優先し、*Fusarium* 菌の分離がさまたげられているといわれている (Watson, 1960)。これらの欠点を補う方法として、土壤平板法 (Warcup, 1950), ベルジャーダスター法 (駒田ら 1965) および Soil Washing Technique (Watson, 1960) が応用され、問題は解決されつつある。しかし、いずれにしても培養基を用いた間接的定量法では growth units のみを定量することになるとしている。

Warcup (1955) は *Fusarium* 菌の菌そうの多くは土壤有機物から生ずるとしていることからみると、本菌については主として有機物片に埋没した菌体が growth units となるものと考えられる。しかし、菌そうを生じた有機物片中における病原菌の生態については明らかにしていないため、菌そうが有機物中の1個の厚膜胞子によるものか、厚膜胞子群によるものか不明である。

このことについては *Fusarium* 菌の定量と重要な関係があると考えられるので、われわれも土壤有機物中の菌の生態について研究しているが、2, 3の知見をえたので報告する。

沈降法による分画土壤と *Fusarium* 菌の分離

土壤稀釈平板法による *Fusarium* 菌の定量においては分離結果に変動の多いことは前述のとおりであるが、われわれはまずこれらの点を明らかにするため、土壤懸濁液中における *Fusarium* 菌の生態について実験を行なった。

トマト萎凋病発病圃場より採集した土壤を5mmの篩にかけ、その10gに300mlの水を加えて5分間振とうし、細目のかんれいしゃ布で粗大な土壤有機物と礫をのぞき、さらに水を加えて1000mlに増量して、よく攪拌し、1000mlのメスシリンダーに移した。

この懸濁液を20分間静置したのち、上液を静かに別の1000mlのメスシリンダーに移し、この方法を20分毎に2時間繰返し、そのたびに上液10mlと沈降土を採集した。

沈降土は1000rpmで15分遠沈して上清をすて、沈降土を攪拌して、その0.2mlをピペットで吸取り、これをPCNB加用酸性馬鈴薯寒天培地 (駒田ら, 1965) 10.0mlに加え、よく混合したのち5枚のシャーレに分注し、28°Cで4日間培養して現われた菌そうを調査した。一方10mlの上液は攪拌しながら0.5mlをとり、沈降土の場合と同様に100mlの培地に移して培養した。

なお、かんれいしゃの上に残った粗大な有機物は砂礫をのぞき洗滌したあと、これをシャーレに分注したPCNB加用酸性馬鈴薯寒天培地上に1個当り150個ずつおき菌の分離状況を調査した。

1) Ecological problems on estimating the number of *Fusarium* sp. in soil. By Kiyomi Kitani and Katuto Kuniyasu. Proc. Assoc. Pl. Prot. Sikoku, No. 2 : 73-78 (1967)

なお、実験にはシャーレ 1 回 5 個ずつ使用し 5 回反覆した。
結果は第 1 表に示した。

第 1 表 土壤の沈降時間による分画と *Fusarium* 菌分離の関係

区分	沈降時間	<i>Fusarium</i> 菌	他の糸状菌	総計	<i>Fusarium</i> 菌分離率 (%)
沈降土	20 分	139	375	514	270
	40 "	139	439	578	240
	60 "	88	429	517	170
	80 "	62	330	392	158
	100 "	62	359	421	147
	120 "	49	381	430	114
上液	20 分	8	168	176	45
	40 "	8	159	165	48
	60 "	5	162	167	30
	80 "	5	144	149	34
	100 "	3	152	155	19
	120 "	3	162	165	18
有機物片		77	251	328	235

沈降土と上液からの *Fusarium* 菌の分離状況をみると、えられた菌そうは上液に比べて沈降土に著しく多かつた。また沈降土でも上液でも沈降時間の短いほど *Fusarium* 菌の菌そう数が多い傾向がみられた。総菌そう数に対する *Fusarium* 菌菌そう数の分離割合をみると沈降土の方が上液よりも高く、菌そう数と同様の傾向を示した。

以上の結果から *Fusarium* 菌は土壤懸濁液の中ではかなり速やかに沈降することが判明した。なお、この傾向は他の土壤菌に比べて顕著であった。かんれいしゃの上に残った粗大な土壤有機物片からも *Fusarium* 菌の分離は比較的高率であったことから、特定の大きさの土壤粒子からとくに多くの *Fusarium* 菌が分離される傾向はみられなかった。

土壤懸濁液についてその沈降経過を観察すると、時間の経過とともに、多数の有機物がかなり速やかに沈降するのがみられたが、*Fusarium* 菌の分離状況から推察すると、沈降土に *Fusarium* 菌の多いことと、有機物との間になんらかの密接な関係のあることが想定された。

Fusarium 菌菌そうの起源について

Warcup (1955) は平板法によって土壤菌を分離するさいに現われる菌そうの起源について研究した。*Fusarium oxysporum sensu Sn. et. H.* は 58% は土壤有機物から菌そうを生じ、42% は孢子から生じたと報告した。われわれは前項でトマト萎凋病発病圃場からえられる有機物片から、かなりの *Fusarium* 菌が分離されることを認めた。

そこで菌そうの起源、とくに有機物と *Fusarium* 菌の関係を明らかにするため実験を行なった。

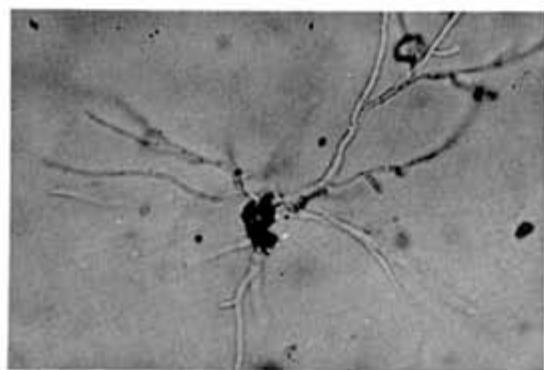
発病圃場より採集した土壤を 5mm の篩にかけ、その 10g を 300ml の水と共に 5 分間振とうし、細目のかんれいしゃで粗大な有機物、礫などを除いたあと、スターで攪拌しながら 50ml をとり、1000rpm で遠沈して上液を捨て、遠沈管にわずかに残した水で土壤懸濁液を作り、0.2ml を PCNB 加用酸性馬鈴薯寒天培地に加えた(この濃度は 1 個の点滴培養から大体 1 個の菌そうが現われる濃度) これらをよく混合し、カバーガラスの

中央に直径約4mmの点滴をおき、湿室としたシャーレにハンチーゲンセルを固定した上に懸垂させ、28℃の恒温器に保ち、生育する菌糸を24時間毎に観察した。1回の実験に240個の点滴を供試し、4回反覆した。菌が点滴全体に進展したのち、酸性馬鈴薯寒天培養地を分注したシャーレに移植して菌を同定した。菌そうを生じた土粒が有機物であるかどうかを確認するために菌糸の一部を他の培地に移植したのち50%弗化水素酸で処理し、溶解するかどうかを調べた。Fusarium菌の生じた有機物の大きさは、マイクロメータで測定した。

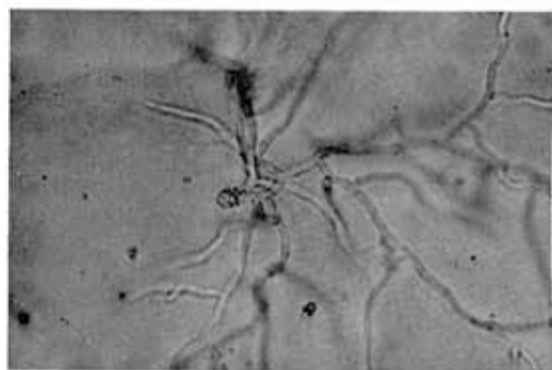
結果は第2表に示した。また菌そうの生育状態は第1、2図に示した。

第2表 Fusarium菌菌そうの起源について

実験回次	総菌数	Fusarium菌 総数(A)	Fusarium菌菌そう数 (起源別)					
			有機物片		胞子		不明	
			菌そう数(B)	B/A	菌そう数(C)	C/A	菌そう数(D)	D/A
1	209	26	17	65.4%	6	23.1%	3	11.5%
2	157	42	26	61.9%	4	9.5%	12	28.6%
3	165	40	22	55.0%	2	5.0%	16	40.0%
4	223	53	35	66.0%	7	13.2%	11	20.8%
平均	188	40	25	62.5%	5	12.5%	10	25.0%



第1図 菌そうの起源
土壌有機物中の菌体より形成



第2図 菌そうの起源
直接胞子の発芽により形成

菌糸の生育初期の段階では、第1、2図に示したようにその菌そうの起源が明瞭に区別できたが、この時期をすぎると菌糸が密に生育し、その起源が確認できない場合があった。菌そうの現われた土粒は弗化水素酸で溶解しなかつたために土粒の組成は有機物と考えられた。第2表にみられるように分離したFusarium菌のうち、55~66%、平均62.5%は有機物中の菌体から生じた。胞子より直接菌そうの生じた場合は、平均12.5%とかなり低率であったことから、Fusarium菌の大部分は有機物に埋没した菌体から生ずるようであった。

土壤有機物中における *Fusarium* 菌のミクロトーム切片による観察

土壤中における *Fusarium* 菌の多くが、有機物中に存在することについて前項で述べた。また土壤中の粗大有機物片中からも *Fusarium* 菌の分離率が比較的高いことが判明したので、*Fusarium* 菌が有機物の中でどのような形で生存しているかを知る目的で実験を行なった。

トマト萎凋病発病圃場より土壌を採集し、5mmの篩を通したあと、10gの土に300mℓの割合で水を加え、5分間振とうした。これを細目のかんれいしゃでろ別して土壤有機物を集めよく水洗した。拡大鏡のもとでトマト残根と考えられるものをなるべく選びだし、これらの有機物をPCNB加用酸性馬鈴薯寒天培地を分注したシャーレに5個ずつおき、28℃、48時間定温器内に保ち菌糸の生じた時、有機物片を菌糸を残して抜き取り、2%寒天液を分注した別のシャーレに移し、このシャーレを4℃の冷凍室に入れた。

一方菌糸を残したシャーレは再び定温器内に戻し菌そりを発育させて菌を同定した。

そこで冷凍室保存の有機物片の中から *Fusarium* 菌の菌そりの現われたものに該当する有機物片のみを集めて合成樹脂製容器に密閉し、Minderman (1956)の方法を一部応用して、50% 非化水素酸を冷暗室で48時間作用させ、有機物片に附着した砂礫が完全に溶解したことを確かめたのち、ホルマリン・酢酸・アルコール(FAA)で1昼夜以上固定し、n-ブチルアルコール(西山, 1961)で脱水し、常法によりパラフィン包埋を行ない、ミクロトームで15μの厚さに切り、脱ろう後、無染色で有機物内の *Fusarium* 菌を観察した。

第3図に示したように、土壤有機物の内部で厚膜胞子の発芽ならびに菌糸の進展した状況が観察された。

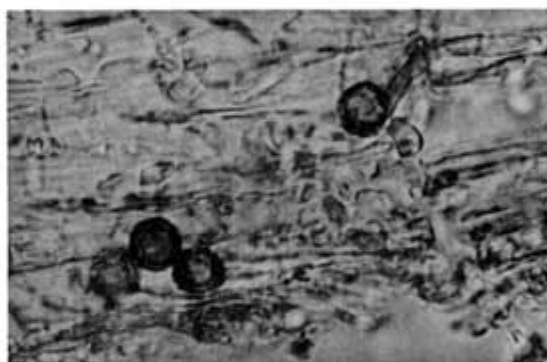
つぎに *Fusarium* 菌菌そりのえられた有機物片のうちから、3切片を任意に選び、その内にある厚膜胞子数の調査を行なったが、結果を第3表に示した。表中の厚膜胞子数は3切片からえられた胞子数の平均値である。また有機物切片の大体の大きさを長径と短径を測って推測し、さらに1mm²当りの厚膜胞子数を概算した。この結果によると、各有機物片によって単位容積当りの厚膜胞子数は著るしく異なり、約400~7000の範囲にわたっていた。同一有機物の中でも厚膜胞子は一様に分布せず局在する傾向が強く、とくに有機物の周縁部に多く分布していた。

供試した20片の有機物からは総て *Fusarium oxysporum* 菌がえられたが、接種試験によって同定した結果、20菌株の内11菌株からトマト萎凋病の発病がみられた。この接種試験は後述と同様の方法で行なった。

分離した *Fusarium* 菌の分類

松尾(1962)の分類方式にもとづいて、*Fusarium oxysporum* まで同定し、トマト萎凋病菌の同定は接種試験によって行なった。

前記試験によってえられた *Fusarium oxysporum* 菌のうち、119菌株を任意に選び、馬鈴薯寒天培地で斜面培養を行なったものを供試した。径5cm、高さ13cmのガラスポットに畑土、パーライト3:1の混合物を詰めて、トマト苗(品種世界一)を移植し、本葉4枚展開時に培養菌の懸濁液を1ポット当り10mℓずつ注入し接種した。発病する毎に発病茎より菌を再分離し、接種50日後に最終的に発病調査を行なった。119菌株のうち38%はトマト萎凋病菌であることを確認した。



第3図 土壤有機物中の厚膜胞子

第3表 *Fusarium* 菌菌そうのえられた土壤有機物中の厚膜胞子数 (3切片の平均値)

有機物切片の大きさ	厚膜胞子数	1mm ² 当り 厚膜胞子数	トマト萎凋病菌
6 2 5 × 2 7 5 × 1 5 ^(μ)	3	1 2 0 0	+
5 7 5 × 3 0 0 × 1 5	2	8 6 7	+
1 3 7 5 × 3 2 5 × 1 5	7	1 0 6 7	-
2 0 7 5 × 9 5 0 × 1 5	1 5	5 3 3	-
1 7 0 0 × 4 5 0 × 1 5	5	4 0 0	-
6 2 5 × 6 2 5 × 1 5	1 3 9	1 8 6 7	+
9 2 5 × 3 7 5 × 1 5	1 3	2 4 6 7	+
1 0 0 0 × 4 2 5 × 1 5	2 3	3 6 3 3	+
5 0 0 × 5 0 0 × 1 5	1 1	2 9 3 3	+
1 5 5 0 × 3 0 0 × 1 5	3 3	4 8 0 0	-
2 0 0 0 × 7 5 0 × 1 5	1 5 6	6 9 3 3	+
1 2 0 0 × 4 5 0 × 1 5	1 7	2 0 6 7	-
2 0 7 5 × 7 5 0 × 1 5	1 0 4	4 4 0 0	+
5 0 0 × 5 0 0 × 1 5	6	4 4 6 7	-
2 0 0 0 × 9 5 0 × 1 5	1 5 8	5 5 3 3	+
1 3 7 5 × 6 7 5 × 1 5	1 1	6 6 7	+
1 4 5 0 × 7 5 0 × 1 5	1 6	1 0 0 0	+
1 2 5 0 × 6 2 5 × 1 5	2 3	1 9 3 3	+
8 0 0 × 2 1 7 5 × 1 5	1 6	6 0 0	-
2 5 0 0 × 6 7 5 × 1 5	1 0 5	4 1 3 3	+

註 +はトマト萎凋病菌の検出されたもの。
-は " の検出されなかったもの。

考 察

Fusarium 菌菌そうの62.5%は有機物中の菌体から生じ、胞子から生じたものは12.5%に過ぎなかった。しかしこれらの胞子も分離操作中に有機物中から遊離したものではないかと考えられる点も多い。

Warcup (1955) は、*Fusarium* 菌は主として有機物中で厚膜胞子の形で生存していると報告しているが、われわれが有機物の切片によって観察した結果でも厚膜胞子を多数発見した。しかし厚膜胞子の密度は有機物片によって著しく異り、1mm²に換算すると400-6933個の中のあることがみられ、またこれらの*Fusarium* 菌の発生した有機物の大きさも1mmから30μまでに及んでいる。これらの有機物が " growth

unit# となる場合には、分離菌そう数で土壌中の *Fusarium* 菌の定量をする場合、その結果に変動の生ずることは容易に推察せられるところであり、こんごこのような問題点をいかに解決するかはきわめて重要なことである。

摘 要

1 土壌懸濁液から *Fusarium* 菌を分離する場合は、上液に比べ沈降土から分離率が高く、さらに沈降時間の短いほど分離率が高かった。

2 分離した *Fusarium* 菌の菌そうの起源が確認されたもののうち、625%は土壌有機物から生じ、125%は直接孢子から生じた。

3 *Fusarium* 菌菌そうの生じた土壌有機物の大きさは、1mm 以上の粗大有機物から 30 μ の大きさまでの巾があり、有機物の大きさと分離菌数には一定の傾向はみられなかった。

4 *Fusarium* 菌の所在を確認した有機物中の厚膜孢子数は 1mm² 当り約 400-6933 の範囲で不均一に分布しているようであった。

5 個々の *Fusarium* 菌菌そうの起源となる有機物はその大きさのみでなく、厚膜孢子の密度にも変動があり、これらの有機物が菌そうの生育単位となる計量法にはなお問題がある。

引 用 文 献

駒田旦・井上義孝 (1965) : 土と微生物, 7 : 49-55.

西山市三 (1961) : 細胞遺伝学研究法 : 養賢堂, 547.

松尾卓見 (1962) : 土壌病害の手引, 日本植物防疫協会 : 57-67.

Minderman, G. (1956) : Plant and soil, 8 : 42-48.

Warcup, J. W. (1950) : Nature, 166 : 117-118.

————— (1955) : Trans. Brit. Mycol. Soc., 38 (3) : 298-301.

Watson, R. D. (1960) : Phytopathology, 50 (11) : 792-794.

(1967年4月13日 受領)