

報 文

拮抗能を持つ放線菌を利用したフザリウム病害の抑制
第5報：拮抗微生物資材 A によるダイコン萎黄病の抑制機構*

高木滋樹¹・北村章²・丸本卓哉¹・田中秀平¹・西山雅也¹・石田大作³

¹山口大学農学部

〒753 山口県山口市吉田 1677-1

²東亜大学工学部

〒751 山口県下関市一の宮学園町 2-1

³フマキラー株式会社

〒739-04 広島県佐伯郡大野町梅原 1-11-13

Control of Fusarium diseases using antagonistic Actinomycetes

V. Mechanisms of control of radish yellows with microbial inoculum (Material A)

Shigeki Takaki¹, Akira Kitamura², Takuya Marumoto¹,
Shuhei Tanaka¹, Masaya Nishiyama¹ and Daisaku Ishida³

¹Faculty of Agriculture, Yamaguchi University,
Yoshida 1677-1, Yamaguchi, 753 Japan

²Faculty of Technology, Toa University,
Ichinomiyaakuen-cho 2-1, Shimonoseki, Yamaguchi, 751 Japan

³Fumakilla Ltd.,
Umehara 1-11-13, Ohno, Hiroshima, 739-04 Japan

Mechanisms of control of radish yellows by using a microbial inoculum (Material A) which contains antagonistic Actinomycetes against *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* with an organic carrier were investigated. First, a method for determining the chlamydospore density of *F. oxysporum* in soil was newly developed to enable a more accurate determination of the chlamydospore density in soil. Secondly, the effect of Material A on the control of radish yellows was examined in pot experiments. The suppressive effect of Material A varied with the time of application and sowing. Material A did not exert a significant effect on the total *Fusarium* density but increased the density of the chlamydospores in soil. The disease was well controlled in the soil where the density of chlamydospores was high and that of infection forms, mycelia and conidia, of the fungus was low at the time of sowing. Thirdly, the effect of Material A on *F. oxysporum* was examined in Petri dishes. Material A suppressed the germination of chlamydospores and subsequent hyphal growth, resulting in a high density of chlamydospores in soil. The results obtained suggest that the enhancement of soil fungistasis is one of the mechanisms of control of radish yellows by Material A.

Key Word : *Fusarium oxysporum*, Chlamydospore, Radish yellows, Soil fungistasis, Biological control

はじめに

Fusarium oxysporum は各種作物の病原菌で土壌伝染する。本菌は耐久体として厚膜胞子をつくり、感染力を保ったまま土壌中で長期間生存する。厚膜胞子は宿主植物根からの分泌物を利用して発芽し、発芽によって生じた菌糸が宿主根組織内に侵入、寄生して病害を引き起こす。しかし、厚膜胞子の生存やその発芽から感染までの本菌の活動は、しばしば土壌静菌作用の影響を強く受ける¹⁾。

土壌静菌作用は、拮抗菌を含む土壌の各種微生物の活動によって生じ、概して根圏では発病を抑制する方向に、根圏外では病原菌の生存を助長する方向に働くと考えられる^{1,2)}。土壌に施用された有機物は栄養源となって微生物の活動を促進し、土壌静菌作用を高めることから、各種有機物の施用によりフザリウム病の発生を抑制する試みが多くなされている。このうち、Adamsら^{3,4)}は、セルロースやコーヒー粕の土壌施用は土壌静菌作用を高め、土壌中の *F. oxysporum* 密度を低下させないにもかかわらず、フザリウム病を抑制したことを報告している。

筆者らは、前報^{5,6,7)}で5株の放線菌と汚泥コンポストから成る拮抗微生物資材 A (以下資材 A とする) の土壌施用が *F. oxysporum* f. sp. *raphani* (以下は *F. oxysporum* とする) によるダイコン萎黄病の発生を抑制することを示したが、その機構はまだ明らかにされていない。しかし、資材 A は、Adamsら^{3,4)}の用いた資材と同様に土壌中の *F. oxysporum* 密度を極端には低下させないこと、および資材 A の施用によって土壌および根面で増加する微生物は資材 A 中に含まれる拮抗放線菌だけではないこと⁸⁾から、本資材によるダイコンの萎黄病抑制の機構には、単に添加拮抗放線菌の抗菌活性ばかりでなく、静菌作用も関与している可能性がある。

本研究では、資材 A によるダイコン萎黄病抑制機構の解明を目的とし、本資材が *F. oxysporum* に及ぼす影響を土壌静菌作用の観点から検討した。なお、土壌中の *F. oxysporum* の計数について、駒田⁹⁾は選択培地を使用して希釈平板法により検出される土壌中の *F. oxysporum* 密度は土壌中の厚膜胞子密度に一致するとしている。しかし、土壌中に分生子や菌糸が混在する場合、これらも同時に検出され、土壌中の厚膜胞子密度が正確に測定されないおそれがある。そこで、本研究の始めに、

土壌中の厚膜胞子密度をより正確に測定する方法を検討した。

実験方法

1. *F. oxysporum* 厚膜胞子の検出方法の検討

耐久体である厚膜胞子は分生子と比較して温度等環境因子に対する耐性が高い点に着目し、次の実験を行った。実験には岡山県で採取したダイコンの萎黄病罹病根から分離した *F. oxysporum* を供試した。

岡崎⁹⁾の方法により *F. oxysporum* の厚膜胞子懸濁液を調製した。すなわち、potato glucose broth (PGB) で 28°C、7 日間培養した *F. oxysporum* の菌叢を殺菌水中で磨砕し、3 回遠心洗浄した後、無機塩培地^{9,10)} (BM 培地: KCl, 43 mg; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 92 mg; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 179 mg; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 123 mg; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 270 mg; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mg; NH_4Cl , 107 mg; 蒸留水, 1 l) に植菌し、15 日間培養した。得られた菌叢を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に懸濁して 2 回遠心洗浄し、さらに超音波処理した後、同緩衝液に再懸濁した。この懸濁液を 325 mesh および 400 mesh ふるいでろ過して菌糸を除去した後、5,000 rpm で 3 回遠心洗浄して沈殿を少量の同緩衝液に再懸濁し、これを厚膜胞子懸濁液とした。

また、*F. oxysporum* 菌叢を Cappellini & Peterson¹¹⁾の CMC 液体培地で 7 日間培養し、2 重のガーゼでろ過して菌糸を除き、ろ液を殺菌水で 3 回遠心洗浄して沈殿を少量の殺菌水に再懸濁し、これを分生子懸濁液とした。

次に、厚膜胞子と分生子の懸濁液をそれぞれ殺菌水で希釈して約 1×10^4 CFU ml⁻¹ の濃度に調整し、47°C の恒温水槽中で 0, 60, 90 および 120 分間熱処理した後、駒田培地⁹⁾を用いて希釈平板法により両懸濁液中の生菌数を測定した。

2. 資材 A 施用時期の違いによる土壌中の *F. oxysporum* 密度の変化と宿主発病の関係の調査

土壌中の全 *F. oxysporum* および厚膜胞子の密度と宿主発病の関係をポット実験により調査した。実験区として資材 A 施用および病土添加の時期を変えた 6 区を設けた (Table 1)。

a/5,000 ワグネルポットを使用し、大野土壌の

高圧蒸気殺菌土に病土 (*F. oxysporum*; 2.67×10^5 CFU g⁻¹ 乾土) および資材 A (ポットあたり 20 g すなわち $1 \text{ t } 10 \text{ a}^{-1}$) を、それぞれ所定の時期に添加した。病土の接種は、殺菌土と病土を 5 : 1 (wt/wt) の割合で混合することにより行った。ダイコン (品種: 耐病総太り) はポットあたり 12 粒を播種し、播種 2 週間後に 3 株を残して間引き、播種 4 週間後に抜き取って、発病を調査した。調査は前報⁷⁾と同じ方法で行い、発病株率、発病度および防除価を算出した。また、所定の時期に各ポットから土壌を採取し、後に述べる方法で希釈平板法により土壌中の全 *F. oxysporum* 密度と厚膜孢子密度を測定した。栽培は各区 3 反復とし、ビニールハウス内で行った。

3. *F. oxysporum* に対する資材 A の影響の調査

1) 厚膜孢子的発芽に対する影響

水分 20% に調整した大野土壌と八束土壌 (pH 6.8, EC; 0.06 mS cm^{-1}) を使用し、これらの殺菌土と無殺菌土および資材 A を 10% 量 (wt/wt) 添加した無殺菌土をそれぞれ滅菌シャーレに詰めた。一方、殺菌メンブレンフィルター (ミリポア製、直径 25 mm, 孔径 $0.3 \mu\text{m}$) 上に、 $1 \times 10^8 \sim 10^4$ CFU ml⁻¹ に希釈した *F. oxysporum* の厚膜孢子液 1 ml を滴下して吸引し、厚膜孢子をフィルター上に固定した。このフィルターを殺菌スライドガラス上に置き、上記のシャーレ内各土壌に埋没させ、25°C で 12 時間培養した。培養後、各フィルターを取り出し、ラクトフェノールトリパンブルー法¹¹⁾で染色し、光学顕微鏡下で発芽および未発芽厚膜孢子を計数して発芽率を算出した。なお、各区 6 反復とし、各区の平均発芽率を求めた。

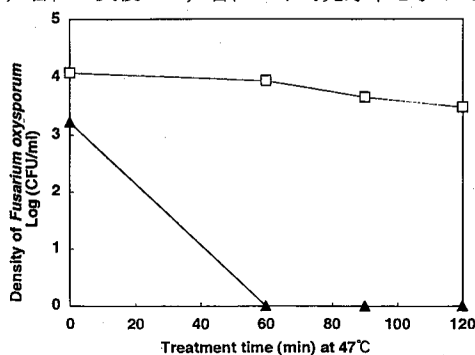


Fig. 1 Heat tolerance of chlamydospores (□) and conidia (▲) of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*.

次に、Adams ら⁴⁾の方法により資材 A 添加土壌の静菌力を測定した。水分量 20% に調整した大野土壌の無殺菌土を用い、この土壌に資材 A を 10% (wt/wt) 添加した。また、対照区として同土壌の資材 A 無添加土壌を用いた。資材 A 添加の直後および 4, 7 日間 25°C で保存後の両土壌にグルコース水溶液を 0.01% または 0.1% になるように添加し、前述の厚膜孢子固定フィルターを埋没させ、25°C で培養した。培養開始 12 時間後に、各フィルターを取りだし、前述と同じ方法で厚膜孢子的発芽率を調査した。なお、本実験では、資材 A が実際に施用される土壌の条件を考慮して、土壌の風乾や前培養は行わなかった。

2) 菌糸生育に対する影響

前述のメンブレンフィルター法を用い、*F. oxysporum* の菌糸生育に対する資材 A の影響を調査した。水分量を 20% に調整した大野土壌を用い、殺菌土区、無殺菌土区、殺菌土に資材 A 10% 量 (wt/wt) 添加区の 3 区を設定した。厚膜孢子をメンブレンフィルター上に固定して各実験区土壌に埋没し、1, 3, 7 日後に取り出して染色後、光学顕微鏡下で観察して写真撮影を行った。各区 6 枚の写真上で、総菌糸長を測定した。実験は各区 2 反復で行った。

結果および考察

1. *F. oxysporum* 厚膜孢子的検出方法

F. oxysporum 分生子と厚膜孢子的の温度耐性を懸濁液中で比較した。47°C、10 分間の熱処理で分生子は完全に死滅した。一方、厚膜孢子的はそのほとんどが生存しており、分生子よりも明らかに温度耐性が高かった (Fig. 1)。なお、菌糸の温度耐性については、菌糸を厚膜孢子里から完全に分別して集菌することが困難なため、本研究では調査できなかった。しかし、菌糸と分生子の温度耐性に極端に大きな差はないと推察される。それゆえ、厚膜孢子和その他の菌体の温度耐性の差に基づいて、土壌中の全 *F. oxysporum* と厚膜孢子的のそれぞれの密度を測定できることが分った。そこで、採取土壌を無処理で測定した時の *F. oxysporum* 密度を全 *F. oxysporum* 密度とし、同土壌を 47°C、90 分間熱処理した後測定した *F. oxysporum* 密度を厚膜孢子的密度とした。

Table 1 Effect of application of Material A on the control of radish yellows

No.	Treatment			4 weeks after sowing		
	0 week	1 week	2 week	Infection (%)	Disease severity*	Suppression (%)
1	Infected soil**	Sowing		100.0± 0.0***	100.0± 0.0	—
2	Infected soil	Material A	Sowing	88.9±15.7	88.9±15.7	11.1
3	Infected soil	Material A	Sowing	66.7± 0.0	59.3± 5.3	40.7
4	Material A	Infected soil	Sowing	88.9±15.7	44.4±15.7	55.6
5	Material A	Infected soil	Sowing	55.6±41.6	33.3±27.2	66.7
6	Material A	Infected soil	Sowing	55.6±31.4	40.7±27.7	59.3

* : (Number of dead plants×3+number of damaged plants×2+number of slightly damaged plants×1)/(number of inspected plants×3)×100.

** : Addition of soil infected with *F. oxysporum*.

*** : Standard deviation.

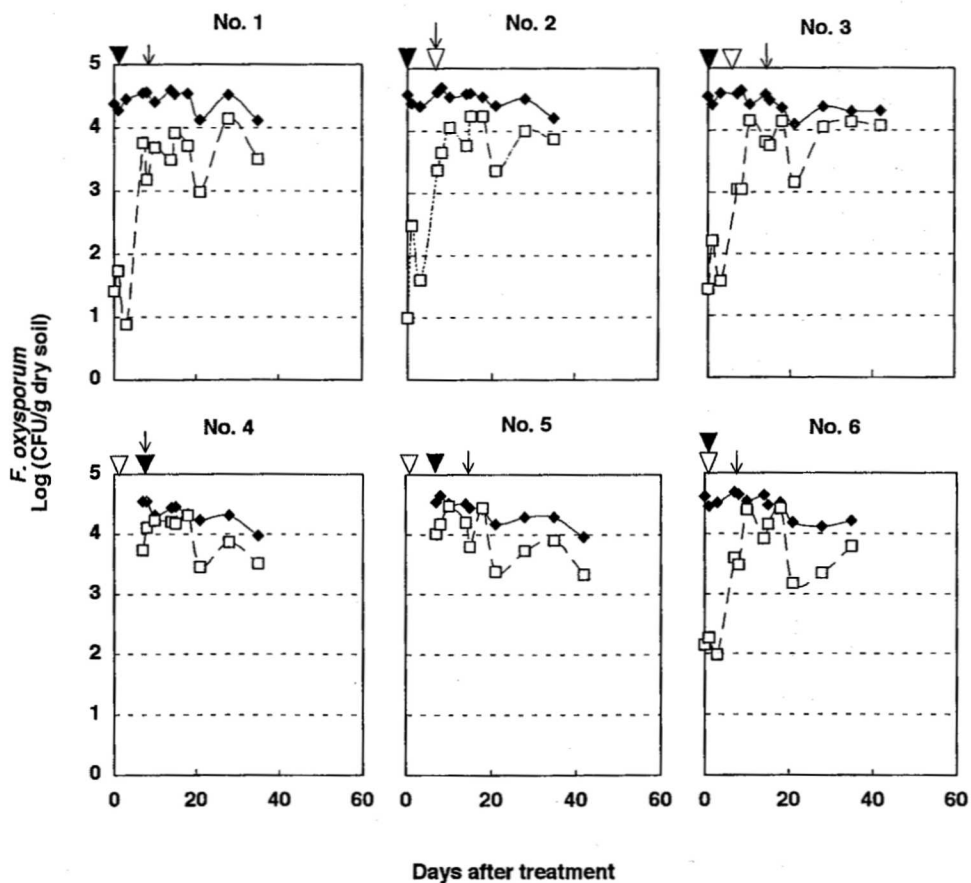


Fig. 2 Changes in densities of total *Fusarium oxysporum* (◆) and chlamydospores (□) in pot soil. ↓ sowing, ▼ Addition of infected soil, ▽ application of Material A

2. 資材 A 施用時期の違いによる土壌中の *F. oxysporum* 密度の変化と寄主発病の関係

資材 A の施用によりダイコン萎黄病の発生が抑制された (Table 1)。抑制の程度は資材 A を病土添加前および病土添加と同時に施用した区 (No. 4, 5, 6) でとくに高かった。一方, 病土添加後に資材 A を施用した区 (No. 2, 3) のうち, 資材 A 施用 1 週間後に播種を行った区 (No. 3) でも比較的高い抑制効果が認められたが, 資材 A 施用と播種を同時に行った区 (No. 2) では顕著な抑制効果は認められなかった。前報⁷⁾でも示したように, 資材 A の施用とダイコン播種の時期により萎黄病抑制の程度が著しく異なることが確認された。

上記の実験期間中, 各実験区土壌における全 *F. oxysporum* 密度と厚膜胞子密度の推移を調べた。*F. oxysporum* 密度は各実験区においてほぼ同様の傾向を示して推移し, 実験区間で大きな差はなかった (Fig. 2)。しかし, 厚膜胞子密度は資材 A 施用の有無と時期により実験区間で大きく異なった。

ダイコン萎黄病の発生には播種時の *F. oxysporum* 密度が大きく影響すると考えられる⁷⁾ので, この時期の厚膜胞子密度および菌糸などの活性型菌体の密度と発病抑制の関係を Fig. 2 に示した結果から解析した。最初に病土を接種した区 (No. 1, 2, 3) のうち, 萎黄病の発生が多かった資材 A 無施用対照区 (No. 1) と No. 2 では厚膜胞子密度が小さく, 菌糸や分生子など活性型菌体の密度が大きかった。これに対し, 最初に資材 A を施用し高い発病抑制効果の得られた実験区 (No. 4, 5, 6) のうち, No. 4 と No. 5 では播種から数日間, 厚膜胞子密度が概して高い水準で保たれ, 活性型菌体の密度が小さかった。資材 A の発病抑制効果は基本的には不活性型である厚膜胞子の密度の増大と菌糸などの活性型菌体の密度の減少に起因すると推察される。なお, 前者のグループの実験区 No. 3 と後者のグループの実験区 No. 6 では, かなり高い発病抑制効果が得られたにもかかわらず, 播種時の厚膜胞子の密度が比較的 low, 活性型菌体の密度が高かった。しかし, No. 3 では播種の前後の厚膜胞子密度が極めて高く, 全 *F. oxysporum* の大部分を占めていたこと, また, No. 6 では播種時に厚膜胞子密度が急激に増大している最中で, その 3 日後には活性型菌体がほとんど検出されなくなっていることから, 両

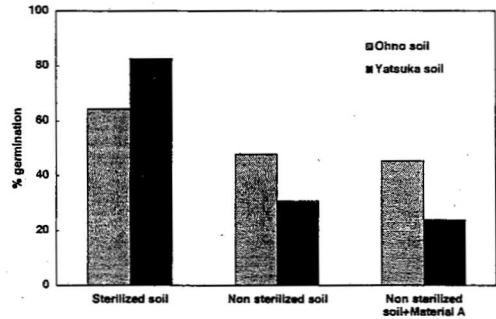


Fig. 3 Effect of Material A on germination of chlamydozoospores of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* in 2 types of soils.

実験区では播種の時点での活性型菌体の活力がかなり低下していた可能性が考えられる。

3. *F. oxysporum* に対する資材 A の影響

1) 厚膜胞子発芽に対する影響

大野と八束の両土壌において殺菌土区と無殺菌土区の間で厚膜胞子の発芽率を比較したところ, 発芽率はいずれも殺菌土区で高く, 無殺菌土区で低かった (Fig. 3)。無殺菌土には, もともとかなり強い発芽抑制作用が存在すると考えられる。しかし, 資材 A は無殺菌土中で厚膜胞子の発芽をほとんど抑制しなかった。

次に, 大野土壌の静菌力を Adams の方法^{3,4)}で測定した。資材 A 添加区の厚膜胞子発芽率は, 実験開始直後は無処理区の静菌力と顕著な差がなかったが, 添加 4 日後と 7 日後には無処理区よりも明らかに低くなった (Fig. 4)。このことから, 無殺菌土に資材 A 施用すると一定の期間後に静菌力が強まると考えられた。Adams ら³⁾はコーヒー粕を土壌に添加すると, 最初は厚膜胞子の発芽が促進されたが, 以後次第に静菌力が強まり, 厚膜胞子の発芽が強く抑制されたことを報告している。本研究で得られた結果も同様の現象を示していると考えられる。

2) 菌糸生育に対する影響

殺菌土と無殺菌土の両方で, 厚膜胞子の土壌埋没 3 日後までは菌糸の旺盛な生育が観察されたが, 7 日後には菌糸の溶解が多く観察されるようになった (Fig. 5)。菌糸生育は無殺菌土よりむしろ殺菌土の方で旺盛であった。一方, 資材 A を添加した殺菌土では菌糸生育が著しく抑制された。資材

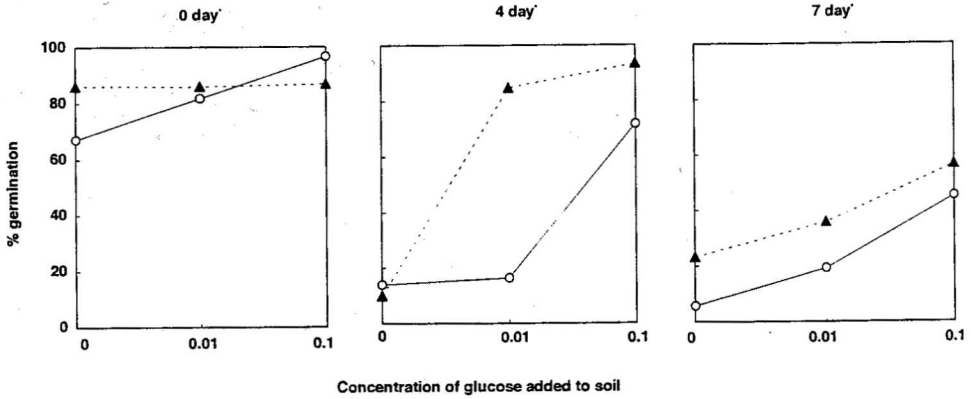


Fig. 4 Fungistatic level of natural, nonamended soil (▲) and soil amended with microbial inoculum (Material A) at the rate of 10% (○) in relation to chlamydoconidia of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*.

* Soils after incubation at 25°C for 0, 4, 7 days.

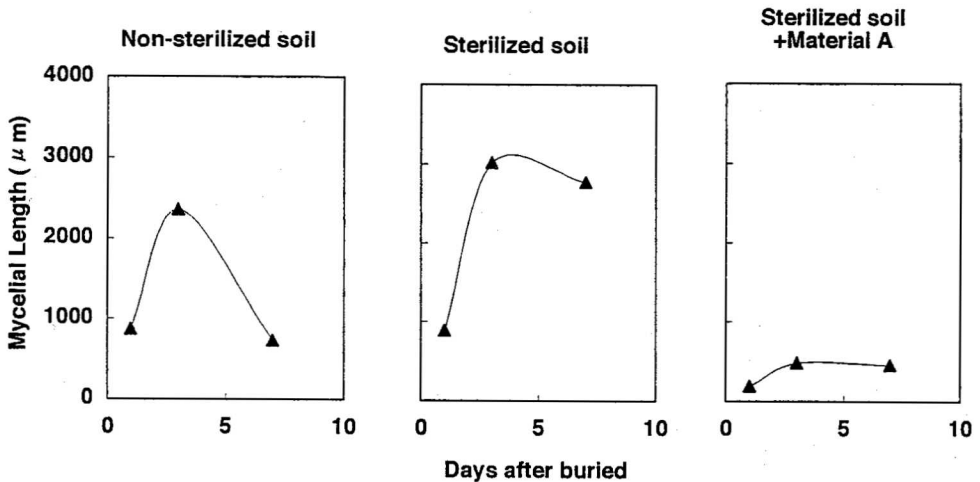


Fig. 5 Effect of Material A on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*. Mycelial growth is expressed by the total length of mycelia measured on 6 photographs.

Aは厚膜胞子の発芽だけでなく菌糸の生育も抑制すると考えられた。

以上の結果から、土壌への資材Aの施用は、土壌静菌作用を高めることにより *F. oxysporum* の菌糸生育と厚膜胞子発芽を抑制し、結果的に病原菌としては不活性型である厚膜胞子の密度を高く保ち、活性型菌体の密度を低下させることが推察された。すなわち、資材Aによるダイコン萎黄病の抑制には静菌作用も関与すると考えられる。この静菌作用が資材A中の拮抗放線菌に由来する

のか、または有機物が土壌中の他の各種微生物の活性を高めることにより誘導されるのかについては不明である。しかし、各種有機物の静菌作用の増強効果については既往報告^{3,4)}があるので、資材A中の有機物も静菌作用の増強に一定の役割を果たしていることも考えられる。

要 旨

(1)拮抗微生物資材A(資材A)の土壌施用によるダイコン萎黄病(病原菌 *Fusarium oxysporum* f.

sp. *raphani*) 抑制の機構を土壤静菌作用の観点から調査した。

(2) 土壌を 47°C で 90 分間熱処理することにより、土壌中の *F. oxysporum* 厚膜胞子密度を比較的に正確に測定する方法を考案し、全 *F. oxysporum* 密度と厚膜胞子密度の動態調査に用いた。

(3) ポット試験の結果、資材 A 施用とダイコン播種の時期により萎黄病抑制の程度が異なった。資材 A は全 *F. oxysporum* 密度には影響をあまり及ぼさないが、厚膜胞子密度を高めることが明らかとなった。また、ダイコン播種時に厚膜胞子密度が高く、菌糸など活性型菌体の密度が低い実験区で萎黄病抑制効果が高い傾向が認められた。

(4) シャーレ内土壌における実験から、資材 A の施用は土壤静菌作用を強め、*F. oxysporum* の厚膜胞子発芽と菌糸生育を抑制することが明らかになった。その結果、土壌中の厚膜胞子密度は高く維持されることが推察された。

(5) 以上の結果から、資材 A のダイコン萎黄病抑制効果の発現機構の一つとして土壤静菌作用が考えられた。

謝 辞

本稿をまとめるにあたり、有益かつ貴重なご助言を賜った岐阜大学百町満郎博士に深く感謝致します。

引用文献

- 1) Lockwood J. L. (1986) Soilborne plant pathogen : Concept and connections, *Phytopathology*, **76**, 20~27
- 2) 百町満郎 (1993) 土壤静菌作用：糸状菌の生活に及ぼす生態的意義, *土と微生物*, **42**, 13~20
- 3) Adams, P. B., Lewis, J. A. and Papavizas, G. C. (1968) Survival of root-infecting fungi in soil. IX. Mechanism of control of Fusarium root rot of bean with spent coffee grounds, *Phytopathology*, **58**, 1603~1608
- 4) Adams, P. B., Lewis, J. A. and Papavizas, G. C. (1968) Survival of root-infecting fungi in soil. III. The effect of cellulose amendment on chlamydospore germination of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* in soil, *Phytopathology*, **58**, 373~377
- 5) 高木滋樹・北村章・丸本卓哉 (1992) 拮抗能を持つ放線菌を利用したフザリウム病害の抑制 第1報：拮抗菌のスクリーニング, *土と微生物*, **39**, 35~40
- 6) 高木滋樹・北村章・丸本卓哉 (1992) 拮抗能を持つ放線菌を利用したフザリウム病害の抑制 第2報：有機物の選抜と拮抗放線菌資材の調製, *土と微生物*, **39**, 41~48
- 7) 高木滋樹・北村章・丸本卓哉・石田大作・田中秀平 (1996) 拮抗能を持つ放線菌を利用したフザリウム病害の抑制 第3報：異なる土壤環境条件における微生物資材の土壤微生物相への影響とダイコン萎黄病に対する効果的施用法の検討, *土と微生物*, **47**, 51~58
- 8) 駒田旦 (1976) 野菜のフザリウム病菌, *Fusarium oxysporum*, の土壌中における活性評価技術に関する研究, *東海近畿農試研報*, **29**, 132~269
- 9) 岡崎博 (1975) Factors affecting the germination of chlamydospore of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*, *日植病報*, **41**, 314~320
- 10) 岡崎博 (1974) *Fusarium* 菌の厚膜胞子の形成と発芽, *土と微生物*, **16**, 52~57
- 11) 松尾卓見ら (1980) 作物のフザリウム病, 143~150, 全国農村教育協会, 東京