走査型電子顕微鏡によるダイコン萎黄病菌胞子の 土壌中における形態変化の観察*

竹 内 昭士郎**

Shoshiro TAKEUCHI**: Scanning Electron Microscopical Observations of
Fusarium oxysporum f. sp. *raphani* in Soil*

Abstract

The most part of conidia and germ tubes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* placed in natural and crab-shell amended soils are flattened within several days. The observations suggest that the occurrence of flat conidia and germ tubes is not affected by any direct action of other soil microorganisms, thus being regarded as a process of autolysis.

(Received May 20, 1975)

糸状菌の胞子や菌糸の土壌中における溶菌現象は広く知られている¹⁾が、その機構や過程についてはまだ十分に解明されていない。そこでダイコン萎黄病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*) の分生胞子をメンブランフィルターに付着させて土壌に埋め、経時的な形態変化を走査型電子顕微鏡で観察し、とくに溶菌と他の土壌微生物との関連を明らかにしようとした。

ダイコン萎黄病菌を PSA 培地で 26°C、約 10 日間培養した菌そうから分生胞子浮遊液 (ほとんどが小型分生胞子) を作り、メンブランフィルター (Millipore VMWP) の表面に噴霧した。10 メッシュのふるいを通した農事試験場圃場の畑土とこれに、これを高圧蒸気殺菌した土あるいは、30 メッシュのふるいを通したカニガラ粉を 1.2w/v% の割合で混入して 26°C に 7 日間保持した土、の 3 種の土壌を径 9 cm の腰高シャーレに詰めてその水分を畑状態に調整した。その中に上記の菌付着メンブランフィルターを埋めて 26°C に保ち、所定期間後に取り出して軽く余分の土を払い落とし、ホルマリン蒸気で固定後、カーボンと金の二重蒸着を行って走査電顕 (日本電子 JSM-U3) で観察し

た。メンブランフィルターの埋没と取り出しの操作は、埋没スライド法に準じた。なお固定後の試料の一部を石炭酸-ローズベンガルで染色し、水洗、乾燥後カナダバルサムで封入して光顕観察を行い、走査電顕観察と比較、対照した。

殺菌土 (S) 中では埋没の翌日から、多数の胞子が発芽して発芽管を伸長する。5 日後には伸長した菌糸から分生子梗を生じて若干の小型分生胞子の新生が見られ、9 日後には菌糸の一部に厚膜胞子の形成が認められた (Plate I-1~3)。対照としてメンブランフィルターに胞子を付着させ、単に湿室に保ったものでは、胞子の発芽や発芽管の伸長は良好であったが、分生胞子の新生や厚膜胞子の形成は見られなかった (Plate I-4)。畑土 (N) やカニガラ添加土 (K) に埋没した分生胞子も翌日から発芽するものがあるが、発芽率は極めて低く、発芽管長も短い。埋没 3 日めごろから発芽胞子や発芽管、あるいは未発芽の胞子が偏平化し始め、やがてほとんどが完全に偏平になって内容が消失したように見受けられる (Plate I-5~9, II-10, 11)。偏平化の速度や程度は N よりも K で大であり、N や K 中では分生胞子新生や厚膜胞子形

* 本研究の一部は日本植物病理学会昭和 50 年度大会において発表した。

** 農林省農事試験場

Central Agricultural Experiment Station, Ministry of Agriculture and Forestry, Konosu, Saitama, Japan.

1) Watson, A. G. and Ford, E. J. (1972). Ann. Rev. Phytopath. 10:327-348.

成がほとんど見られない。そして偏平化が観察される時期が、顕微鏡観察において、胞子や発芽管の細胞壁部分だけが、ローズベンガルでごく淡紅色に染色される時期とはほぼ同じであることから、この偏平化は溶菌、あるいは少なくともその過程の一部と推定される。

一方、NやKに埋没したメンブランフィルター上には、Kでは埋没1～3日後、Nでは7日後ごろから種々の微生物が着生しているのが観察される。その中でもっとも多く見られるのは放線菌で、菌糸や胞子の形態によって数種のものが見分けでき、とくにKで頻度が高い。*Penicillium* 属菌、細菌の集落、その他不明の菌糸や胞子も時々観察される。またまれに、本菌や他菌の菌糸に放線菌がまつわりついたり、本菌の胞子上やその近くに放線菌の胞子が見いだされることもある (Plate II-12～16)。しかし一般に、放線菌や細菌が、その偏平化した部分も含めて、本菌の胞子や菌糸の周辺にとくに高密度に存在する傾向は認められない。

このようにダイコン萎黄病菌の分生胞子をメンブランフィルターに附着させて土中に埋め、スライドガラス面などよりも自然土壌中に近いと見られる条件下で観察した結果、Wong ら²⁾ が *Cochliobolus sativus* で認めたような、胞子表面での細菌、放線菌の増殖や、胞子の穿孔は見られなかった。そして本菌の溶菌は、少なくとも初期段階では、他の土壌微生物の直接の作用によらず自己分解であるとみられた。しかし、Ko ら³⁾ が述べているように、自己分解による溶菌が微生物活性に基づく養分の収奪によるとすれば、溶菌する菌体の周辺での微生物の増殖が想定されるが、本試験ではそのような増殖は認められなかった。もちろん、溶菌に及ぼす土壌微生物の影響を否定するものではなく、NよりもK中で偏平化が著るしかつたように、放線菌などの増殖に適した条件、あるいは増殖の結果としてもたらされた土壌中の環境が、本菌の自己分解を促進する方向に作用しているものと考えられる。

Explanation of plates

Scanning electron micrographs of *Fusarium oxysporum* f.sp. *raphani* and soil microorganisms. Conidia adhering to membrane filters were placed in sterilized soil (Plate I-1～3), in natural soil (Plate I-5～9, II-12), in crab-shell amended soil (Plate II-10～16, except 12), and in moist chamber (Plate I-4), then recovered after respective days and examined.

Plate I

1. Germinated conidium, after 1 day.
2. Newly developed conidia, after 5 days.
3. Chlamydospore, after 9 days.
4. Germinated conidia, after 9 days.
5. Partially flattened conidia, after 1 day.
6. Germinated conidium, after 1 day.
7. Partially flattened conidium and germ tube, after 5 days.
- 8 and 9. Completely flattened conidia, after 7 days.

Plate II

10. Partially flattened conidium and germ tube, after 3 days.
11. Completely flattened conidium, after 5 days.
12. Small colony of rod shaped bacteria, after 5 days.
- 13 and 14. Some kind of actinomycete spores, after 12 and 7 days respectively.
15. Actinomycete surrounding unknown mycelium, after 7 days.
16. Actinomycete spores on conidium surface, after 5 days.

2) Wong, J. N. F. and Old, K. M. (1973). Soil Biol. Biochem. 6:89-96.

3) Ko, W. and Lockwood, J. L. (1970). Phytopathology 60:148-154.

Plate I

Plate II