インゲン根腐病発病抑止土壌における病原菌大型分生胞子の発芽阻害と土壌微生物*

古屋広光**・宇井格生**

Hiromitsu FURUYA** and Tadao Ue** : The Significance of Soil Microorganisms on the Inhibition of the Macroconidial Germination of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* in a Soil Suppressive to Common Bean Root Rot*

Abstract

The macroconidial germination of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* was inhibited in the field soil of Kitami Agricultural Exp. Sta. in Kun-neppu (K-soil) which was suppressive to common bean root rot. The inhibition was nullified by autoclaving or steaming (60-82°C), and partially nullified by γ radiation of the soil. It was re-established when the autoclaved soil was inoculated with a small amount (1/100) of original soil or Tokachi soil which is conducive to the disease. Also, it was partially re-established by the inoculation with the water extract of K-soil, but was failed to re-establish when the extract was autoclaved or filtered through membrane filter. From these results, the suppression of germination in K-soil was suggested to be biological origin. Furthermore, in autoclaved, aerated steamed or γ radiated K-soil, the germination rate of macroconidia was slow in comparison with equally treated conducive Tokachi soil and the morphology of germ tubes was abnormal. This germination delaying effect found in sterilized K-soil possibly operates in untreated K-soil and concerned with the inhibition of germination of macroconidia.

(Received September 29, 1980)

緒 言

北海道常呂郡訓子府町の一部地域では、*Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* によるインゲン根腐病の発生が極めて少ない。この地域から採取した土壌では、本菌大型分生胞子の発芽と発芽管の生長、厚膜胞子の形成と発芽が著しく阻害され、その結果この土壌に栽培したインゲンの本菌による感染、発病が阻害される。このことから、本土壌をインゲン根腐病の発病抑止型土壌のひとつとした¹⁾。これまで報告された各種病害の発病抑止土壌の研究で、発病が抑制される原因として土壌中の微生物が関係するとされた例が多い^{2,7,9,11)}。本報告では、*F. solani* f. sp. *phaseoli* 大型分生胞子の発芽に対するインゲン根腐病発病抑止土壌の作用を検討するため、温度の異なる蒸気、あるいは γ 線と土

壌を処理し、微生物の活動を抑制した場合の胞子の発芽率、発芽の状態を比較した。

なお、供試した土壌は北海道立北見農業試験場および、同十勝農業試験場の病虫予察科の圃場の土壌で、その採取ならびに運搬は中山利彦前北見農業試験場長、楠 隆前十勝農業試験場長の御好意によるものであり、また、前十勝農業試験場赤井純、前北見農業試験場坪木和男両病虫発生予察科長には研究を遂行する上で、多大な御協力を頂いた。ここに改めて感謝の意を表わす。

材料および方法

供試した土壌は前報でインゲン根腐病発病抑止型土壌（北見土壌）としたもので、必要に応じ対照として本病の発生、病原菌大型分生胞子の発芽とともに抑制

* 本研究の一部は、文部省科学研究費補助金によった。また概要は、日本植物病理学会北海道部会（1978年11月）および同大会（1980年4月）で発表した。

** 北海道大学農学部 Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan

しない土壌（十勝土壌）を用いた。土壌の保存法、供試したインゲン品種、インゲン根腐病菌の菌株、接種源の調製法、土壌中の大型分生胞子発芽と発芽率の測定に用いた土壌なすり付け法とセロファン法はすべて前報⁴⁾と同じである。

低温蒸気による土壌の部分殺菌 Dawson ら³⁾の方法に準じた。すなわち、圧力 0.4~1.0kg/cm² の蒸気に室温の空気を種々の割合で混入して低温の蒸気をつくり、これを 22×22×35cm の木製容器内に噴出、充満させた。なお空気の混入割合は、蒸気噴出ノズルの近くに設けた空気取り入れ口の広さ、あるいは蒸気噴出速度を変えることにより調節した。容器内が均一に所定温度に達した時、そのほぼ中央に 5g あるいは 10g の土壌を入れた小型ペトリ皿を置いた。土壌にデジタル式温度計のセンサーを直接挿入し、所定の温度に達してから30分間保ち、部分殺菌を行った。処理容器内に置いた土壌が所定温度に達するまでに、2~5分を要した。

土壌のγ線照射 北海道大学附属理工系ラジオアイソトープセンターのγ線照射装置を用いた。照射時間を1020分とし、線源（⁶⁰Co）からの距離を変えて土壌の吸収線量を 98.6, 306, 442, 799, 1020 および 3094 Krad とした。なお吸収線量は、同センターが Flicke の線量計により測定した値から算出した。大型分生胞子の発芽をセロファン法で調査する場合は土壌 10g を小型ペトリ皿（内径45mm）に入れ、土壌なすり付け法の場合には 5g を三角フラスコ（30ml）に入れ、ポリエチレンフィルムで密封してγ線を照射した。終了後40分以内に胞子を接種し発芽の調査を開始した。

殺菌土壌に対する無殺菌土壌あるいは土壌浸出液の接種 高圧蒸気殺菌した北見土壌に、北見あるいは十勝土壌中に存在する微生物を接種し、その増殖をはかる目的で、少量の無殺菌土壌あるいはそれらから得た土壌浸出液を加え一定期間保った後、大型分生胞子の

の発芽を調査した。その方法は次の通りである。

(1) 土壌の接種；300ml 三角フラスコに入れた北見土壌 100 g（最大容水量 MWC の約26~33%）を 1 kg/cm² で20分間高圧蒸気殺菌し、これに10% (w/w) あるいは 1 % (w/w) の殺菌しない原土壌もしくは十勝土壌を加え充分攪拌し、25日間25℃の暗所に保った。対照として、高圧蒸気殺菌した北見あるいは十勝土壌を接種源とした。

(2) 土壌浸出液の接種；200ml 三角フラスコに入れ 1 kg/cm² で15分間高圧蒸気殺菌した北見土壌 50g（土壌水分 MWC の約26~33%）に北見土壌浸出液あるいは十勝土壌浸出液 1 ml を接種し、充分攪拌し、25℃で5日間暗所に保った。土壌浸出液は、土壌 100g（土壌の水分は MWC の約27%）に蒸留水 100ml を加え、155rpm/min で60分間振とうした後、濾紙（東洋濾紙、No 2）で濾過したものである。また、高圧殺菌あるいはメンブランフィルター（東洋濾紙、TM-2、孔径0.45μm）により除菌した土壌浸出液を同様に接種し対照とした。

実験結果

高圧蒸気殺菌した北見土壌における大型分生胞子の発芽

殺菌しない北見土壌ではインゲン根腐病菌の大型分生胞子はほとんど発芽しないが、高圧蒸気殺菌したとき胞子は48時間後に土壌なすり付け法によると約 77 %、セロファン法によると 95~100 %が発芽した。すなわち、無処理北見土壌における発芽抑制作用は高圧蒸気殺菌により失われた（Table 1）。一方、十勝土壌における大型分生胞子発芽率は、セロファン法によると高圧殺菌の有無にかかわらずほぼ 100 %であったが、土壌なすり付け法ではこれより低く、無殺菌土壌の場合約60%、高圧殺菌土は約75%であった。

高圧蒸気殺菌した北見土壌における大型分生胞子の

Table 1. Germination of macroconidia of *F. solani* f. sp. *phaseoli* in autoclaved and unautoclaved Kitami and Tokachi soils

Soils	Autoclaved		Unautoclaved	
	Smear m. ^{a)}	Cellophane m. ^{b)}	Smear m. ^{a)}	Cellophane m. ^{b)}
Kitami	77.3±8.7 ^{c)}	98.4±1.3	1.0±1.0	0.8±1.2
Tokachi	74.8±7.8	100	59.8±9.8	94.8±3.6

a) Smear method; incubated for 48 hr at 25 C after the direct inoculation of soils with macroconidia, 5×10⁵/g dry soil.

b) Cellophane method; incubated for 48 hr at 25 C.

c) Standard deviation of the mean percentage germination of macroconidia.

Fig. 1. Macroconidia of *F. solani* f. sp. *phaseoli* in untreated Kitami (A) and Tokachi (C) soils, and growth of germ tubes of macroconidia in autoclaved Kitami (B) and Tokachi (D) soils. Cellophane method, incubated for 24 hr at 25 C.

発芽速度は、同じく殺菌した十勝土壌と比べると極めて遅く、生育した発芽管は全体に太くかつ一部はさらに膨大し、分岐が著しく多いなどの異常が認められた (Fig. 1)。

無殺菌土壌を接種した高圧蒸気殺菌北見土壌における大型分生胞子の発芽

高圧蒸気殺菌した北見土壌に、少量の殺菌しない北見あるいは十勝土壌を接種したのち大型分生胞子の発芽を比較した (Table 2)。

土壌なすり付け法、セロファン法の何れでも発芽率は殺菌土壌を接種した対照区に比べ明らかに低かった。但し、発芽率はその検定法によりことなり、いずれの場合でも土壌なすり付け法の方がセロファン法より低かった。

また、これら微量の土壌を接種したときの大型分生胞子発芽の状態は、殺菌しない北見土壌におけると同様で、胞子の一部あるいは短い発芽管上に異常な膨大が見られた。

以上から、高圧蒸気殺菌により発芽抑制作用の失われた北見土壌に、殺菌しない同土壌もしくは十勝土

壌を接種すると発芽抑制作用が回復し、これは接種した土壌の微生物によるものと考えられる。

土壌浸出液を接種した高圧蒸気殺菌北見土壌における大型分生胞子の発芽

高圧蒸気殺菌した北見土壌に、殺菌しない土壌浸出液を加えたのち、大型分生胞子発芽をセロファン法で調査した (Fig. 2)。

高圧蒸気殺菌した北見土壌に殺菌しない北見あるいは十勝土壌の浸出液を加えたとき、大型分生胞子の発芽率は、それぞれ約35%、78%であった。これに対し、両土壌の浸出液を予め高圧殺菌あるいはメンブランフィルターで除菌して加えたときは、高圧殺菌直後の北見土壌におけると同様ほぼ100%であった。すなわち、高圧蒸気殺菌した北見土壌に無処理の土壌浸出液を加えると発芽抑制作用は回復するが、殺菌あるいは除菌した浸出液では回復しない。このことは前項の無殺菌土壌を接種したときと同様、浸出液中に存在する微生物によると考えられる。しかし、土壌を加えた場合に比べ回復の程度が弱いのは、接種した微生物数が少ないこと、あるいは接種後の培養日数が短いこと

Table 2. Re-establishment of inhibition of macroconidial germination in autoclaved K-soil by the inoculation with Kitami and Tokachi soils

1) Germination of macroconidia of *F. solani* f. sp. *phaseoli* directly inoculated to the soils^{a)} (Soil smear method, incubated for 48 hr at 25 C)

Ratio of inoculum and inoculated soils (w/w)	Autoclaved Kitami soil was inoculated with			
	Kitami soil		Tokachi soil	
	autoclaved	unautoclaved	autoclaved	unautoclaved
1/10	54.1±4.4 ^{b)}	5.4± 3.9	48.5±6.8	1.5± 2.2
1/100	60.5±5.5	3.0± 1.2	53.7±7.1	1.2± 1.3

2) Germination of macroconidia of *F. solani* f. sp. *pahseoli* on the soils^{a)} (Cellophane method, incubated for 48 hr at 25 C)

Ratio of inoculum and inoculated soils (w/w)	Autoclaved Kitami soil was inoculated with			
	Kitami soil		Tokachi soil	
	autoclaved	unautoclaved	autoclaved	unautoclaved
1/10	98.4±1.2 ^{b)}	19.0±17.9	97.0±0.5	12.4±12.3
1/100	97.6±1.6	28.0±20.1	98.4±1.0	11.8± 2.1

a) Each 100g of autoclaved Kitami soil was incubated for 25 days at 25 C after the inoculation.

b) Standard deviation of the mean percentage germination of macroconidia.

Fig. 2. Re-establishment of inhibition of macroconidial germination in autoclaved Kitami soil by the inoculation with water extracts of original and Tokachi soils. The autoclaved soil was inoculated with 2% (v/w) of Kitami (open columns) or Tokachi (blocked columns) soil extract, and incubated for 5 days at 25 C. Germination of macroconidia of *F. solani* f. sp. *phaseoli* on the soil was tested with cellophane method, incubated for 48 hr at 25 C. Soil extracts autoclaved or filtered with membrane filter (0.45 μm) were used as control. Each vertical bar indicates the standard deviation.

Fig. 3. Germination of macroconidia of *F. solani* f. sp. *phaseoli* in the soils, treated with aerated steam. —; Kitami soil, ---; Tokachi soil. Germination was observed by soil smear method (●) and by cellophane method (○), incubated for 48 hr at 25°C. Each vertical bar indicates the standard deviation.

などによると考えられる。

大型分生孢子発芽に及ぼす土壌の部分殺菌の影響

低温蒸気による部分殺菌：40, 50, 60, 71, 82, 97°Cの蒸気で30分間部分殺菌をした北見土壌および十勝土壌における大型分生孢子発芽を、土壌なすり付け法とセロファン法で調べた (Fig. 3)。

40°Cあるいは50°C30分の部分殺菌をした北見土壌では、無処理と同様、孢子の発芽は認められなかった。しかしこの土壌を60°C以上の温度で処理したとき、孢子はセロファン法で100%近く発芽したが、土壌なすり付け法では約20%にすぎず、処理する温度が高くなるにつれて徐々に発芽するものが増加し、82°C30分で対照とした十勝土壌と等しくなった。

十勝土壌では何れの温度で処理しても、無処理と同様孢子は常に高い発芽率を示した。

これらの実験における孢子の発芽状態を見ると処理温度の如何にかかわらず、北見土壌における大型分生孢子の発芽は十勝土壌に比べ遅く、発芽管も高圧蒸気殺菌した北見土壌におけると同様、幅が太くかつ不均一で分岐が多いなど対照とした十勝土壌におけるとは異なっていた (Fig. 4-A)。

なお、土壌 pH (土壌：蒸留水 = 1 : 2.5) は何れの温度で処理しても無処理と異ならず、北見土壌 4.9 ~ 5.0, 十勝土壌 5.4 であった。

以上の結果から、北見土壌では *F. solani* f. sp. *phaseoli* 大型分生孢子の発芽抑制に、60~82°Cの低い温度で失活する微生物が関係すると考えられる。

γ線照射による土壌殺菌：吸収線量が 98.6~3094 Krad となるよう γ線を照射した北見土壌及び十勝土壌における大型分生孢子発芽を、土壌なすり付け法とセロファン法で調べた (Fig. 5)。

北見土壌では、セロファン法を用いたとき、線量 98.6 Krad の γ線で処理しても無処理と同様大型分生孢子はほとんど発芽しなかったが、306 Krad では発芽し、442 Krad のときの発芽率は最も高く 57.6% であった。このときの孢子の発芽状態は同じ処理をした十勝土壌に比べ発芽は遅く、発芽管の長さも短く、高圧蒸気殺菌あるいは60°C30分の蒸気殺菌した北見土壌におけると同様、その形態は異常であった (Fig. 4-B) 照射線量が、これ以上になると発芽率は逆に低下し 3094 Krad では全く発芽しなかったが、このとき無処理土壌で見られる孢子細胞の膨大は認められなかった。一方、土壌なすり付け法によると、何れの線量の場合も大型分生孢子はほとんど発芽しなかった。

十勝土壌では、土壌なすり付け法、セロファン法の何れでも、1020 Krad 以下の線量で孢子は無処理区と同様高率で発芽し、発芽管の生長はやや良好となったほか、γ線照射の影響は見られなかったが、3094 Krad

のとき発芽率はやや低下した。

両土壌とも、何れの線量の γ 線を照射しても pH は変化しなかった。

考 察

インゲン根腐病菌 *F. solani* f. sp. *phaseoli* の大型分生胞子は発芽に際し外部の養分を必要とせず⁵⁾, 土壌拮菌作用 (soil fungistasis) に感受性が低く¹²⁾, 一

Fig. 4. Growth of germ tubes of macroconidia of *F. solani* f. sp. *phaseoli* in Kitami soil. A; on the steamed soil (60 C 30 min), B; γ radiated soil (442 Krad). Cellophane method, incubated for 48 hr at 25 C.

Fig. 5. Germination of macroconidia of *F. solani* f. sp. *phaseoli* in the soils radiated with γ ray. —; Kitami soil, ---; Tokachi soil. Germination was observed by soil smear method (●) and by cellophane method (○), incubated for 48 hr at 25C. Each vertical bar indicates the standard deviation.

般に土壌中で容易に発芽する¹⁰⁾。しかし、北海道立北見農業試験場圃場より採取した土壌では、本菌の大型分生胞子は発芽せず、胞子細胞壁の一部または極めて短い発芽管の先端が異常に膨大する。すなわち同土壌の根腐病菌大型分生胞子に対する阻害作用は発芽管の生長抑制と細胞壁の異常にあると認められる。

上記の実験で明らかのように、北見土壌に見られる発芽の抑制作用は、高圧蒸気殺菌により失なわれるが、これに極く少量の無殺菌北見土壌やその土壌浸出液を接種し一定期間保つと回復する。また殺菌しない十勝土壌を接種しても同様の回復が認められる。これに対し予め高圧蒸気殺菌した土壌あるいは土壌浸出液、メンブランフィルターで除菌した浸出液の何れを接種しても抑制作用は回復しない。これらのことから殺菌した北見土壌における発芽抑制作用の回復は、微生物、おそらくは北見、十勝両土壌に存在する非特異的な微生物の作用によると考えられる。

これら微生物は、低温蒸気による部分殺菌の実験から、60～82℃30分で失活することが認められた。Baker¹¹⁾は土壌の低温蒸気消毒は土壌中の微生物を選択的に除き、60℃30分間で死滅する腐生性土壌微生物は *Pseudomonas* 属細菌、硝化細菌などで、82℃では腐生性 *Bacillus* spp. であるとしている。本実験では処理後土壌に残存した微生物の種類については調査しなかったが、北見土壌に見られるインゲン根腐病菌大型分生胞子の発芽抑制は、耐熱性が82℃30分以下の微生物によると認められる。

これら微生物による胞子発芽抑制作用の検定はセロファン法と土壌なすり付け法を併用したが、各種処理した土壌における発芽率は前者が常に高かった。このことは Lockwood⁹⁾ が指摘するように土壌静菌作用の検定に際し、胞子と土壌との間の距離が近いほど胞子は鋭敏に反応することを示している。

北見土壌を306～1020Kradのγ線で照射すると、セロファン法では胞子発芽抑制作用が一部失活したが、土壌なすり付け法の場合、すなわち土壌に直接加えた大型分生胞子はほとんど発芽せず、γ線照射の影響は認められなかった。土壌をγ線照射により完全殺菌するには、3000Krad以上の線量が必要とされること⁶⁾から、土壌なすり付け法で発芽が認められないのが、306～1020Kradの処理をしても死滅しない微生物の直接的な発芽抑制作用によるものか、あるいは微生物

以外のγ線照射により失活しない何らかの発芽阻害要因によるかは不明である。しかし、照射線量を高め3094Kradとしたとき、セロファン法でも胞子は全く発芽せず、また、無処理北見土壌に加えたときに見られる細胞壁の異常な膨大も認められなかった。これは、γ線照射により土壌その他に何らかの変化があったためとも考えられる。

無処理北見土壌に加えた大型分生胞子の多くは、その一部あるいは極く短い発芽管が異常に膨大するが、高圧殺菌、低温蒸気殺菌、γ線照射(1020Krad以下)により発芽抑制作用が見られなくなった土壌でも、発芽管の生長は無処理の十勝土壌より遅く、分岐も多く、その一部が膨大するなどの異常が見られる。このことから、北見土壌の *F. solani* f. sp. *phaseoli* 大型分生胞子の発芽抑制は非特異的な土壌微生物の作用によるものであり、また、この土壌に特異的な耐熱性の非生物的要因がこれに関与する可能性も考えられる。

摘 要

1. 北海道北見地方の一部に存在するインゲン根腐病発病抑止土壌(北見土壌)が示す *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* の大型分生胞子に対する発芽阻害作用について、土壌微生物の関与を検討した。

2. 高圧蒸気殺菌した北見土壌で胞子は発芽し、発芽抑制は失なわれる。これに殺菌しない同土壌、あるいは発芽抑制を示さない十勝土壌を少量接種すると抑制作用は回復した。

3. 北見土壌を低温蒸気で60～82℃30分処理すると、発芽抑制作用は完全に失なわれ、306～1020Kradのγ線を照射するとセロファン法では20～60%の胞子が発芽するようになった。

4. これらの処理により発芽した胞子の発芽管は生長が遅く、分岐が多くまた太いなどの異常が認められた。

5. 対照とした十勝土壌では胞子の発芽は良好で、上と同じ土壌処理により何らの影響を受けなかった。

6. 以上から、北見土壌の示す胞子に対する作用は、発芽の抑制と、胞子細胞壁の一部の異常で、その原因は非特異的な微生物の作用であるとともに、この土壌に特異的な非生物的要因も関与する可能性がある。

引用文献

1. Baker, K. F. (1957). The U. C. System for Producing Healthy Container-Grown Plants, Univ. Calif. Agr. Exp. Sta. Extens. Service.
2. Burke, D. W. (1965). *Phytopathology* 55: 1122-1126.
3. Dawson, J. R., Johnson, R. A. H., Adams, P. and Last, F. T. (1965). *Ann. appl. Biol.* 56: 243-251.
4. 古屋広光・大和田正幸・宇井格生 (1979). *日植病報* 45: 608-617.
5. Griffin, G. J. (1970). *Can. J. Microbiol.* 16: 733-740.
6. Jackson, N. E., Corey, J. C., Frederick, L. R. and Picken, J. C. Jr. (1967). *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 31: 491-494.
7. 駒田 旦 (1976). *東海近畿農業試験場報告* 29: 132-269.
8. Lockwood, J. L. (1977). *Biol. Rev.* 52: 1-43.
9. Louvet, J., Rouxel, F. and Alabouvette, C. (1976). *Ann. Phytopathol.* 8: 425-436.
10. Nash, S. M., Christou, T. and Snyder, W. C. (1961). *Phytopathology* 51: 308-312.
11. Smith, S. N. (1977). *Ibid.* 67: 502-510.
12. Steiner, G. W. and Lockwood, J. L. (1969). *Ibid.* 59: 1084-1092.