

インゲン栽培土壌中における *Pythium* spp. の耐久生存器官

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	景山,幸二 宇井,格生
発行元	日本植物病理學會
巻/号	48巻3号
巻号補足	
掲載ページ	p. 308-313
発行年月	1982年7月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



インゲン栽培土壌中における *Pythium* spp. の耐久生存器官

景山幸二*・宇井格生*

Koji KAGEYAMA* and Tadao UI*: Survival Structure
of *Pythium* spp. in the Soils of Bean Fields

Abstract

The propagules of *Pythium acanthophoron*, *P. paroeocandrum*, *P. spinosum* and *Pythium* sp., which were responsible for persistence of the fungi in field soils, were shown by direct observation to be the oospore or zoosporangium. They survive in small particles of organic matter and/or soils. *P. myriotylum* survives in the residues of bean roots and they act as the primary infection sources.

(Received November 9, 1981)

Key Words: survival structure in soil, *Pythium* spp., bean.

緒 言

Pythium 属菌の土壌中の耐久生存器官は、卵胞子や遊走子のうで、それらは感染組織の残渣中あるいは土壌中に遊離して存在するとされる^{4,12)}。しかし、自然汚染土壌中の耐久生存器官の種類やその生存状態について直接観察した研究は少なく、土壌希釈平板法を応用し、*P. aphanidermatum*の卵胞子¹⁰⁾、*P. zingiberum*の遊走子のう、遊走子および卵胞子⁵⁾を観察した例などがあるにすぎない。また、Burrら³⁾は、同様な方法により、*P. aphanidermatum*の卵胞子は感染宿主組織の分解により遊離し、宿主の存在しないあいだも土壌中で耐久生存していると報告している。

著者らは、北海道立北見農業試験場のインゲン連作および6年輪作圃場には7種の *Pythium* 属菌が存在し、*P. myriotylum* と *Pythium* sp. が連作障害に関係することを明らかにした^{7,8)}。これら *Pythium* 属菌の土壌中における生存形態について、前記の Burrら³⁾の方法を改良した直接観察法により検討した。また、前年栽培されたインゲン地下部残渣が第1次伝染源となりうるかを確かめるため、残渣から *Pythium* 属菌の直接分離および間接分離を行った。

本研究を行うにあたり、材料を提供されるとともに

多くの御援助を頂いた現在北海道立中央農業試験場土壌肥料科成田保三郎氏、北見農業試験場土壌肥料科平井義孝科長、同山口宏氏、ならびに種々御教示・御協力を賜った同病虫予察科の諸氏に感謝の意を表わす。

材料および方法

材料 北海道立北見農業試験場の連・輪作試験圃場中の連作区および6年輪作区の前年インゲン栽培圃場より、播種前の1980年5月6日、5月23日および1981年5月20日に残渣と土壌を採取した。供試した残渣は、土壌中で分解が十分に進んでいない前年栽培のインゲンの根である。供試土壌は圃場表層部および残渣に付着していたものである。

***Pythium* 属菌の生存形態の観察** 土壌1gを100mlの0.2%の寒天を溶解した蒸留水に希釈し十分に攪拌した。集落数の多い場合には希釈割合を1:500とした。希釈液1mlに同量の殺菌蒸留水を加え、9cmペトリ皿に入れた10mlの選択培地⁹⁾表面に広げ、これを25℃暗所で培養した。約30時間後、流水で培地表面を洗い土壌を除き、集落の中心を検鏡し、菌糸が卵胞子、遊走子のうなどの何れから伸長しているかを観察した。さらに同定のため集落の一部をトウモロコ

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

シ煮汁寒天斜面上に移植した。各土壌とも1回につき3枚のベトリ皿を使用し2回回復した。

残渣からの *Pythium* 属菌の分離 (1)直接分離 前年栽培されたインゲン根の残渣を2~6cmに切り取り十分に水洗し、表面の水分を口紙で吸い取り、選択培地表面に置いた。25C暗所で培養し、出現した集落を分離同定した。(2)間接分離 連作圃場から採取した前年栽培されたインゲン根の残渣を約1cmに切り、その生重5~7gを直径8.5cm、容積450cm³の紙コップに入れた殺菌土壌と混合した。コップ1個当たりインゲン(品種:大正金時)を5粒播種し、20~25Cのグロースキャビネットで約3週間栽培し、苗根を観察し、病変部から *Pythium* 属菌を分離した。

結 果

土壌中の生存器官

希釈平板上に出現した集落の中心には、土壌粒子(Plate I-8)、分解が進み容易に崩壊する微小残渣(Plate I-9)あるいは球形器官(Plate I-1~7)が認められ、これらから菌糸が伸長しているのが観察された。中心の土壌粒子や微小残渣を軽く針で砕くと、菌糸が球形器官から発しているのが認められた。まれに

培地表面を洗った際に、流亡したためか集落の中心を欠くこともあった。供試した土壌の希釈平板に現われた集落を分離培養したところ *P. acanthophoron*, *P. paroecandrum*, *P. spinosum* あるいは *Pythium* sp. によるものであった。

そのうち *P. acanthophoron* は、1981年5月に採取した輪作区の土壌および残渣に付着した土壌を用いた希釈平板上で、それぞれ1個の集落から得られ、前者は微小残渣から、後者は蔵卵器と思われる表面にとげのある球形器官から生じていたものである(Plate I-7)。

P. paroecandrum の集落は、連・輪作両区とも球形器官と微小残渣および土壌粒子から生じ、その割合はほぼ等しかった(Table 1)。微小残渣あるいは土壌粒子を砕くと、集落中心に球形器官が認められることから、何れも球形器官の状態で存在するものと認められた。球形器官には、やや扁平の亜球形あるいは洋ナシ型のものも認められ、大きさは10~28×8~24μm(平均18.4×15.5μm)で、細胞壁の薄いものと厚いものがあった。また、これらの多くは1か所まれに2か所から発芽していた(Plate I-1, 2)。

P. spinosum の集落は、連作区ではほとんど現われ

Table 1. Origin of colonies of *Pythium paroecandrum* from field soils on selective medium^{a)}

Plots and sampling date	Number of colonies originated from			
	Spherical structures	Organic matters ^{b)}	Soil particles ^{b)}	No origin ^{c)}
Monoculture plots				
May 6, 1980 I	1	1	1	2
II ^{d)}	1	1	6 (2)	0
May 23, 1980	4	1	8 (1)	2
May 20, 1981 I	1	2 (1)	0	0
II ^{d)}	10	11 (6)	2	2
Rotation plots				
May 6, 1980 I	4	0	8	0
II ^{d)}	0	0	8 (4)	1
May 23, 1980	6	1	15 (2)	1
May 20, 1981 I	8	14 (5)	0	0
II ^{d)}	6	23 (10)	2	0
Total	41	54 (22)	50 (9)	8

a) Soil dilutions of 1:100 or 1:500 were inoculated at 25C for about 30 hours on the selective medium. Data are the sum of 2 replications, 3 plates per replication.

b) Figures in parentheses are the number of colonies originated from spherical structures by crushing organic matters or soil particles with needle.

c) Origin could not be detected.

d) Samples were collected from soils around the residues of bean roots.

Table 2. Origin of *Pythium spinosum* from field soils on selective medium^{a)}

Plots and sampling date	Number of colonies originated from			
	Spherical structures	Organic matters ^{b)}	Soil particles ^{b)}	No origin ^{c)}
Monoculture plots				
May 6, 1980 I	0	0	0	1
II ^{d)}	0	0	0	0
May 23, 1980	0	0	0	0
May 20, 1981 I	0	0	0	0
II ^{d)}	0	0	0	0
Rotation plots				
May 6, 1980 I	0	0	1	0
II ^{d)}	0	0	2 (1)	1
May 23, 1980	0	0	0	0
May 20, 1981 I	0	3	0	0
II ^{d)}	0	7 (2)	1	1
Total	0	10 (2)	4 (1)	3

a) Soil dilutions of 1:100 or 1:500 were inoculated at 25 C for about 30 hours on the selective medium. Data are the sum of 2 replications, 3 plates per replication.

b) Figures in parentheses are the number of colonies originated from spherical structures by crushing organic matters or soil particles with needle.

c) Origin could not be detected.

d) Samples were collected from soils around the residues of bean roots.

Table 3. Origin of *Pythium* sp. from field soils on selective medium^{a)}

Plots and sampling date	Number of colonies originated from			
	Spherical structures	Organic matters ^{b)}	Soil particles ^{b)}	No origin ^{c)}
Monoculture plots				
May 6, 1980 I	3	0	0	3
II ^{d)}	4	0	1	1
May 23, 1980	1	0	3 (1)	1
May 20, 1981 I	0	0	0	0
II ^{d)}	0	0	0	0
Rotation plots				
May 6, 1980 I	1	0	0	0
II ^{d)}	0	0	0	0
May 23, 1980	0	0	0	0
May 20, 1981 I	0	0	0	0
II ^{d)}	0	0	0	0
Total	9	0	4 (1)	5

a) Soil dilutions of 1:100 or 1:500 were inoculated at 25 C for about 30 hours on the selective medium. Data are the sum of 2 replications, 3 plates per replication.

b) Figures in parentheses are the number of colonies originated from spherical structures by crushing organic matters or soil particles with needle.

c) Origin could not be detected.

d) Samples were collected from soils around the residues of bean roots.

ず、輪作区で数は少ないが、何れも微小残渣および土壌粒子から現われ、それらの中心が球形器官と認められるものもあった (Table 2)。これらには、細胞壁の薄いものと厚いものがあり、大きさは $14\sim 18\mu\text{m}$ 、何れも1か所から発芽していた (Plate I-3, 4)。

Pythium sp. の集落は、輪作区ではほとんど現われず、連作区で数は少ないが、土壌中に遊離している球形器官および土壌粒子から生じ、微小残渣からの集落はなかった (Table 3)。土壌粒子を砕くと球形器官がまれに観察された。それらの中には、やや扁平の垂球形のものもあり、大きさは $8\sim 20\times 8\sim 20\mu\text{m}$ (平均 $17.2\times 15.4\mu\text{m}$) で、細胞壁が薄いものと厚いものがあり、何れも1か所から発芽した (Plate I-5, 6)。

残渣からの *Pythium* 属菌の分離

土壌中に残っている前年栽培されたインゲンの地下部組織で分解が十分に進まない残渣が、第1次伝染源となりうるかを確かめるため、これらからの直接分離およびそれらを接種源として間接分離を行った。

直接分離により *P. acanthophoron*, *P. myriotylum*, *P. paroeocandrum*, *P. spinosum* および *Pythium* sp. の5種類が分離された。分離率は低いが、*P. acanthophoron*, *P. myriotylum* および *Pythium* sp. は連作区のみから、*P. spinosum* は連・輪作両区から分離された。これに比べ *P. paroeocandrum* は、連・輪作両区の残渣から高頻度に分離された (Table 4)。

間接分離のため連作区の残渣を接種源として殺菌土壌に混合しインゲンを栽培した。その結果、根は著しく褐変し、そこには多くの卵胞子が観察され、それから *P. myriotylum* のみが分離された。

考 察

P. paroeocandrum, *P. spinosum* および *Pythium* sp. は、純粋培養中に球形器官として、前2者は卵胞子と遊走子のう、後者は遊走子のうを形成する。本実験において、土壌中でこれらの種は細胞壁の厚いあるいは薄い球形器官が観察され、それらの大きさは純粋培養で形成される卵胞子や遊走子のうの範囲内にあった⁷⁾。したがって、膜の厚いものは卵胞子、薄いものは遊走子のうあるいは発芽時に細胞壁が薄くなった卵胞子と考えられる。これらの器官は、分解の進んだ微小残渣を砕くと、その中に観察されることから、感染組織中に形成された卵胞子あるいは遊走子のうが、組織の枯死分解にともない土壌中に遊離したものと考えられる。

Pythium sp. は、純粋培養では卵胞子を形成しない

Table 4. Frequency of isolation of *Pythium* spp. from the residues of bean roots in monoculture and rotation plots^{a)}

<i>Pythium</i> species	Monoculture		Rotation	
	1980	1981	1980	1981
<i>P. acanthophoron</i>	2.1%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>P. myriotylum</i>	4.2	0.0	0.0	0.0
<i>P. paroeocandrum</i>	60.4	9.4	31.3	39.1
<i>P. spinosum</i>	4.2	7.8	8.3	0.0
<i>Pythium</i> sp.	0.0	3.1	0.0	0.0
Total	70.9	20.3	39.6	39.1

a) Isolation with the selective medium after 1-5 days incubation at 25 C. Data are presented as the percentage of the residues from which *Pythium* spp. were isolated.

が、明らかに膜の肥厚した球形器官が土壌中に存在した。このことは、*Phytophthora* 属菌の heterothallic な種で知られているように、土壌から分離された *Trichoderma* 属菌²⁾や細菌¹¹⁾などの刺激により卵胞子が形成されると同様、感染組織の分解中に微生物の影響で卵胞子形成が誘起される可能性も考えられる。

P. acanthophoron は、土壌中に表面にとげのある器官が認められ、その大きさと形態は、純粋培養で形成される蔵卵器と同一であり、蔵卵器内の卵胞子が生存していたと認められる。

P. myriotylum は、前年栽培されたインゲン根部残渣からの直接分離によって得られたが、本圃場に存在する *P. irregulare* および *P. ultimum* と同じく、希釈平板上にコロニーは現われなかった。この理由として、卵胞子は形成後休眠状態になるとされ^{1,9)}、著者らの他の実験で純粋培養で形成させた本菌の卵胞子は数%以下しか発芽せず、また連作土壌から土壌平板法によってもほとんど分離されない⁹⁾ことから、多数の卵胞子が耐久生存していても希釈平板法上で発芽しないため、コロニーを形成しなかったと考えられる。*P. myriotylum* の耐久生存器官は、直接法で明らかにし得なかったが、残渣からの分離結果から分解の十分に進んでいない前年栽培されたインゲン根部の残渣中に生存し、第1次伝染源となることは明らかである。

摘 要

北海道立北見農業試験場のインゲン連作および6年輪作圃場に存在する7種の *Pythium* 属菌について越冬した耐久生存器官について検討した。*P. acantho-*

phoron は、分解が進み容易に崩壊する微小残渣中、あるいは土壤中に遊離した卵胞子が、*P. paroecandrum*, *P. spinosum* および *Pythium* sp. は、同様な状態の遊走子のうおよび卵胞子が耐久生存していることが知られた。*P. myriotylum* の生存器官は、直接観察法

では明らかでないが、分解の十分に進んでいない前年栽培されたインゲン地下部の残渣中に生存し、第1次伝染源となる。本圃場に存在する他の種すなわち *P. irregulare* および *P. ultimum* の生存器官は明らかでなかった。

引用文献

1. Ayers W. A. and Lumsden, R. D. (1975). *Phytopathology* 65: 1094-1100.
2. Brasier, C. M. (1971). *Nature, New Biol.* 231: 283.
3. Burr, T. J. and Stanghellini, M. E. (1973). *Phytopathology* 63: 1499-1501.
4. Hendrix, F. F. and Campbell, W. A. (1973). *Ann. Rev. Phytopathol.* 11: 77-98.
5. 一谷多喜郎 (1981). 関西病虫研報 23: 60.
6. 景山幸二・宇井格生 (1980). 日植病報 46: 544-546.
7. 景山幸二・宇井格生 (1981). 同上 47: 313-319.
8. 景山幸二・宇井格生・成田保三郎 (1981). 同上 47: 320-326.
9. Lumsden, R. D. and Ayers, W. A. (1975). *Phytopathology* 65: 1101-1107.
10. 望月寛人・一谷多喜郎・田上義也 (1975). 関西病虫研報 17: 115.
11. Mukerjee, N. and Roy, A. B. (1962). *Phytopathology* 52: 583-584.
12. Stanghellini, M. E. (1974). *Proc. Am. Phytopathol. Soc.* 1: 215-223.

Explanation of Plate

Plate I.

Originating propagules of *Pythium* spp. on the selective medium after 30 hours incubation at 25 C.

- 1, 2. *P. paroecandrum*
 1. A propagule with a thin cell wall.
 2. A propagule with a thick cell wall.
- 3, 4. *P. spinosum*
 3. A propagule with a thin cell wall.
 4. A propagule with a thick cell wall.
- 5, 6. *Pythium* sp.
 5. A propagule with a thin cell wall.
 6. A propagule with a thick cell wall.
7. *P. acanthophoron*

A propagule with numerous spines.

Colonies originated from a soil particle and an organic matter on the selective medium after 30 hours incubation at 25 C.

8. A soil particle.
9. An organic matter.

Scale bars represent 30 μ m.

Plate I

