

アルファルファの草勢が異なる土壌の浸出液中におけるフザリウム菌の動態

誌名	北海道農業試験場研究報告 = Research bulletin of the Hokkaido National Agricultural Experiment Station
ISSN	03675955
著者名	佐藤, 倫造
発行元	北海道農業試験場
巻/号	132号
巻号補足	
掲載ページ	p. 87-93
発行年月	1981年12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



アルファルファの草勢が異なる土壤の 浸出液中におけるフザリウム菌の動態

佐藤 倫 造*

I は じ め に

アルファルファの永続性は栽培土壤の種類によって異なり、火山灰土（有珠系火山灰土は例外）では2～3年で草勢の衰退がみられるのに沖積土では10年以上も維持されることがしばしば観察されている^{1,7)}。これには種々の理由が考えられ、病理学的には土壤病原菌であるフザリウム属菌の関与が明らかにされている⁸⁾。すなわち、沖積土で栽培されるアルファルファにはフザリウム属菌病害がほとんど発生しない。また、土壤に病原菌を導入しても発病しにくく、短時日のうちに病原菌量が減少する¹⁰⁾。このようなことから、沖積土には病原菌(*Fusarium* spp.)が定着しにくい要因が存在すると考えられた。ここではフザリウム菌による発病の難易が何によるかを知るため、火山灰土および沖積土の浸出液中における病原菌の動態を走査型電子顕微鏡により観察した。

報告にあたり、御助言ならびに御協力をいただいた北海道農試病理昆虫部三井康氏、草地開発第二部佐藤徹氏、同松本直幸氏に深謝申し上げる。

II 実験材料および方法

本実験に供試した菌はアルファルファ萎ちょう病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*)で、ジャガイモ煎汁寒天培地上10～14日間培養した菌叢上の分生胞子を3回水洗して用いた。

土壤は永続性が異なる豊畑沖積土壌(pH 5.8-6.0)と早来火山灰土壌(pH 5.0-5.5)で、それぞれ草地周辺の表層30 cm以内からとり、風乾後、ポリバケツに保存した。各土壤10 gを蒸留水100 mlに入れ、20℃で2～3時間振とうし、のち濾紙(東洋濾紙 No. 2)により濾過した。これらの土壤浸出液をそれぞれ

昭和56年8月11日受理

* 草地開発第二部牧草第3研究室

二つに分け、一方を高圧殺菌(120℃ 20分)し、他方を無殺菌とした。

ミリポアフィルター上に前記の孢子懸濁液をのせ、土壤浸出液を入れたシャーレ内に浸漬し、25℃で保持、経時的にとり出して試料とした。

走査電顕用試料は1%グルタルアルデヒドで24時間固定し、エタノール(50, 60, 70, 80, 90, 95, 99%)シリーズで各10分間脱水処理、酢酸イソアミルで15分間置換させたのち臨界点乾燥(JCPD-3)し、蒸着装置(JFC-1100)によりAuを蒸着、走査型電子顕微鏡(JSM-T200)で検鏡した。

III 実験結果および考察

両土壤の浸出液について殺菌および無殺菌処理を加えた場合の*F. oxysporum*の動態をPlate 1-6に示した。

まず、殺菌した土壤浸出液におけるフザリウム菌の動態は土壤間に差異が認められず、3, 7, 14および21日目の観察時でも菌糸の表面は平滑で、その伸長も良好であった(Plate 1, 2)。また、新たに形成された分生胞子がしばしば観察されたが、厚膜胞子の形成はみられなかった。

次に、無殺菌の土壤浸出液におけるフザリウム菌の動態は、早来火山灰土浸出液では菌糸の伸長は良好で、表面に微生物の着生がみられたが数は少なく、概して殺菌した浸出液中の状態と変らなかった。また日数が経過してもこの状態に変化がみられなかった(Plate 3)。

これに対し豊畑沖積土浸出液では、3日目にすでに孢子および菌糸の表面に多数の微生物の着生が観察され(Plate 4)、また厚膜胞子の形成もみられた。

10日目の観察では、菌糸表面の平滑さがやや失われ、厚膜胞子の形成は増加した。発芽を終えた胞子にPerforation(穿孔)がおこるのが散見された(Plate 5)。

21日目の試料では、菌体上に細菌や放線菌などの微生物が多数着生し、着生された *F. oxysporum* の菌体表面はやや平滑さを失い、菌体の損傷や溶解もみられた。また穿孔を伴う菌糸や内容物が溶解消失した菌糸片も観察された (Plate 6)。

以上の土壌浸出液中のフザリウム菌動態の観察結果から、アルファルファの衰退し難い豊畑沖積土壌は病原菌 (フザリウム属菌) の生息に不適な条件、主として生物的要因の関与が考えられ、種類の確定には至らなかつたが *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis* 菌体の損傷あるいは溶解に主動的に関与する土壌微生物の存在は明らかである。なお穿孔を伴うフザリウム菌の菌体周辺に食菌性アミーバ^{2,9)}を確認できなかったが、これについてはさらに精査の必要がある。

殺菌処理をしない豊畑沖積土浸出液中のフザリウム菌菌体上では、3日目にすでに多数の細菌、放線菌など微生物の着生 (寄生) がみられ、また7日目以降は菌糸の溶解がみられたことから、これらのコロナイザーがフザリウム菌の溶解に関与していると考えられる。竹内¹¹⁾はダイコン萎黄病菌を土壌中に埋没した場合、フザリウム菌の胞子上には細菌や放線菌の増殖も穿孔もみられず、この場合の溶菌現象は自己分解によるものとした。

豊畑沖積土を供試してフザリウム菌を埋没し、経時的に微生物相の推移を調べた試験では、導入後1週間で細菌・放線菌数が増加し、これに併行して病原菌数が減少したが¹⁰⁾、Plate 4-6はこの現象を説明していると考えられる。さらに豊畑沖積土から分離した *Streptomyces* spp. は *in vitro* で *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis* の菌糸を奇形化あるいは溶解⁹⁾することから、これらの菌が産生する fungitoxic substances³⁾の役割も考えられる。

IV 摘 要

マメ科牧草の草勢の持続性を異にする2種類 (火山灰土、沖積土)の土壌を用い、その浸出液に萎ちょう病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*) の分生胞子を加え、その動態を走査型電子顕微鏡により観察した。土壌浸出液はオートクレーブした場合には土壌のちがいによる差が認められなかったが、無殺菌では菌の動態に明らかな差異が認められ、火山灰では微生物の着生が少なく菌糸の伸長も良好な

のに対し、沖積土では菌体上に多くの微生物が着生し、菌体の損傷や溶解現象が観察された。したがって、両土壌間における草勢の持続性の差異には生物的要因の関与が示唆された。

引用文献

- 1) 荒木隆男・佐藤倫造・島貫忠幸(1970): マメ科牧草の永続性に関与する土壌病原菌について(講要). 日植病報, 36, 362.
- 2) HONMA, Y., J. W. SITTON, R. J. COOK and K. M. OLD (1979): Perforation and destruction of pigmented hyphae of *Gaeumannomyces graminis* by vampyrellid amoebae from Pacific north-west wheat field soils. *Phytopathology*, 69, 1118-1122.
- 3) LOCKWOOD, J. L. (1959): *Streptomyces* spp. as cause of natural fungitoxicity in soils. *Phytopathology*, 49, 327-331.
- 4) MITCHEL, R. and M. ALEXANDER (1963): Lysis of fungi by bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 9, 169-177.
- 5) OLD, K. M. and J. N. WONG (1976): Perforation and lysis of fungal spores in natural soils. *Soil Biol. Biochem.*, 8, 285-292.
- 6) OLD, K. M. and J. F. DARBYSHIRE (1978): Soil fungi as food giant amoebae. *Soil Biol. Biochem.*, 10, 93-100.
- 7) 酒井隆太郎・荒木隆男・佐久間勉・佐藤倫造・島貫忠幸(1971): 北海道におけるイネ科およびマメ科牧草の病害発生調査. 北農, 38 (1), 1-23.
- 8) 佐藤倫造・荒木隆男(1974): マメ科牧草萎ちょう病菌 *Fusarium oxysporum* の分化型について(講要). 日植病報, 40, 116.
- 9) 佐藤倫造・荒木隆男(1977): 土壌の種類と2種のフザリウム属菌の動態(予報)(講要). 日植病報, 43, 107.
- 10) 佐藤倫造・荒木隆男(1978): 土壌の種類と *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis* の生存(講要). 日植病報, 44, 72-73.
- 11) 竹内昭士郎(1976): 走査電顕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. 日植病報, 42, 49-52.
- 12) WONG, J. N. F. and OLD, K. M. (1973): Electron microscopical studies of the colonization of *Cochliobolus sativus* by soil microorganisms. *Soil Biol. Biochem.*, 6, 89-96.

plate 1

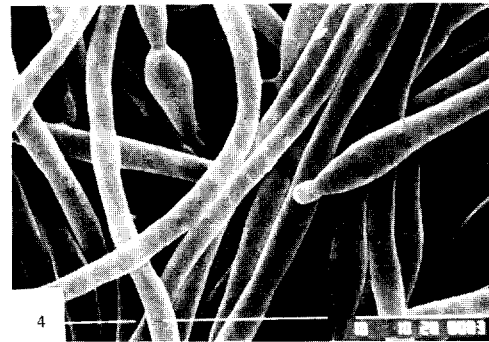
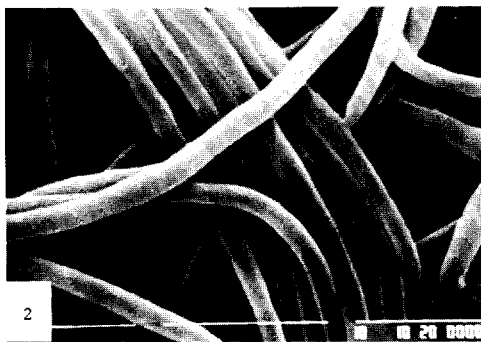
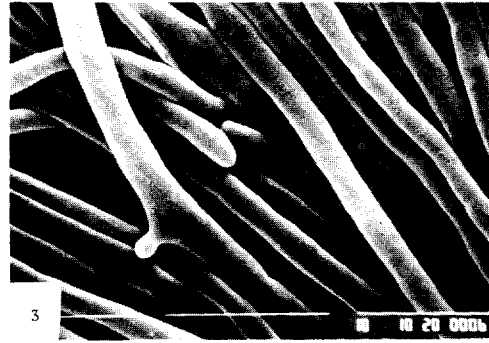
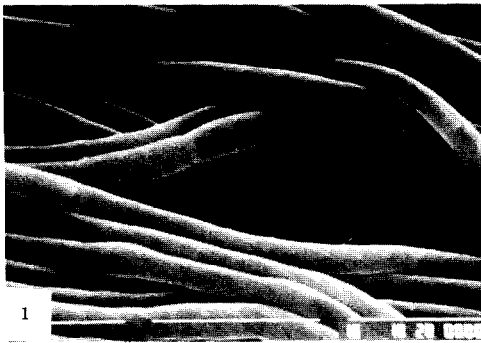


plate 2

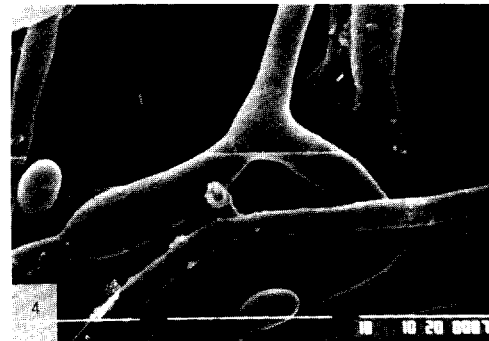
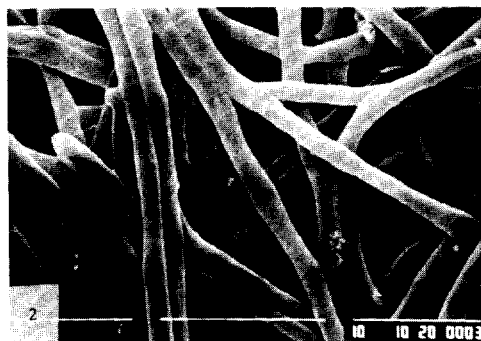
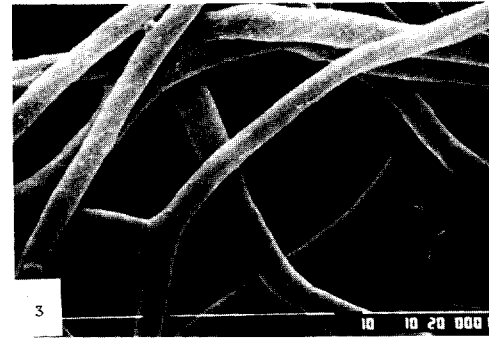
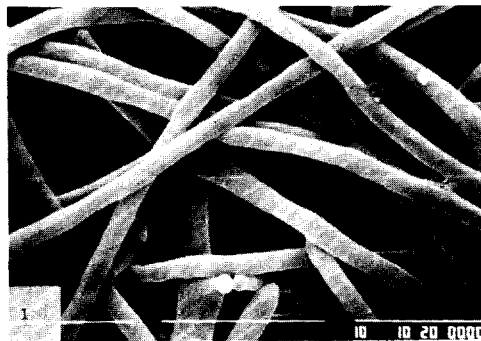


plate 3

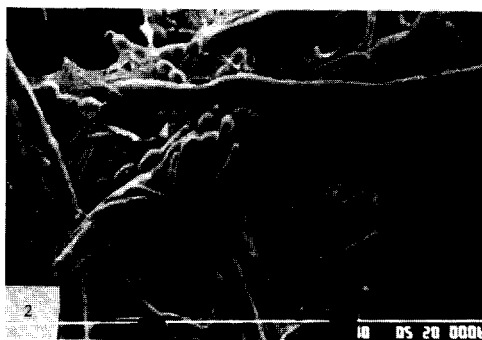
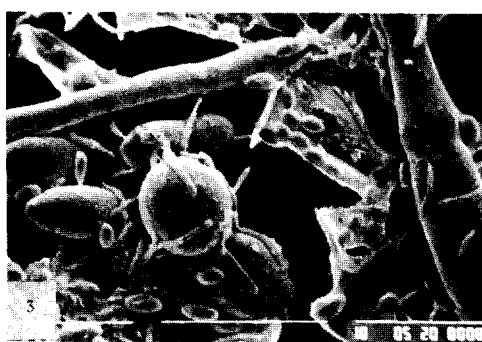
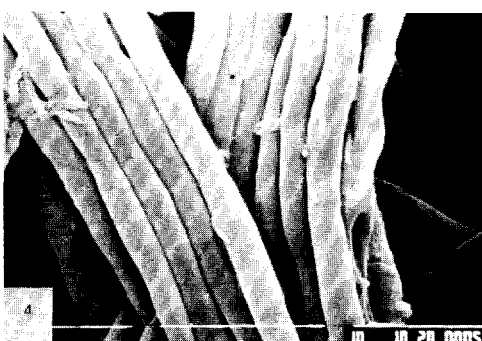
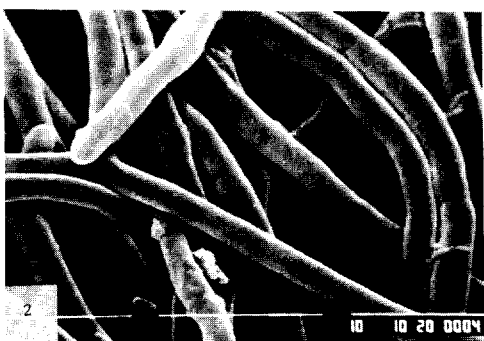
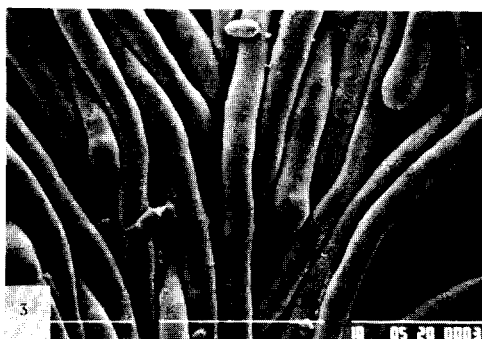
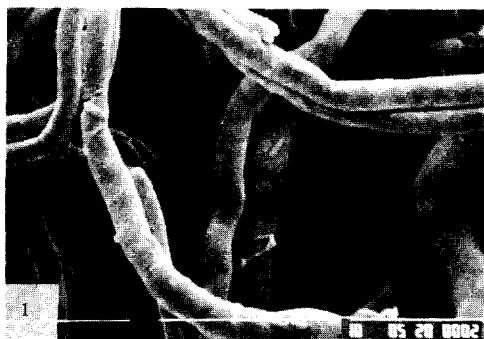
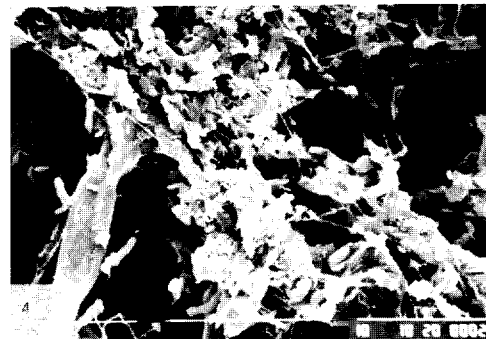
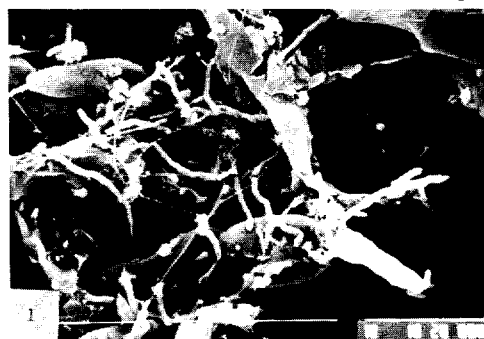


plate 5



plate 6



Explanation of plates

- plate 1.** Hyphae of *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* (FOM) in autoclaved soil extracts.
1. Alfalfa- nonpersistent soil extract (NPS, 3rd day).
 2. Alfalfa-persistent soil extract (PS, 3rd day).
 3. NPS (7th day).
 4. PS (7th day).
- plate 2.** FOM hyphae in autoclaved soil extracts.
1. NPS (14th day).
 2. PS (14th day).
 3. NPS (21st day).
 4. PS (21st day).
- plate 3.** FOM hyphae in unautoclaved soil extracts.
1. NPS (3rd day).
 - 2,3. NPS (10th day).
 4. NPS (21st day).
- plate 4.** FOM hyphae in unautoclaved soil extracts.
- 1-4. PS (3rd day).
- plate 5.** FOM hyphae in unautoclaved soil extracts.
- 1-4. PS (10th day).
- plate 6.** FOM hyphae in unautoclaved soil extracts.
- 1-4. PS (21st day).

Behavior of *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* in Alfalfa-Persistent and-Nonpersistent Soil Extracts

Rinzo SATO

Summary

Conidia of *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*, the pathogen of Fusarium wilt of alfalfa, were introduced into soil extracts, and the process of fungal development was observed under the scanning electron microscope. Two soils employed were alfalfa-persistent soil (alluvial soil) and alfalfa-nonpersistent soil (volcanic ash soil) which were abbreviated to PS and NPS, respectively. In the PS extract, various microorganisms colonized hyphae of *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis*, and

subsequently the hyphae lysed. In the NPS extract, however, colonization of microorganisms was infrequent, and the pathogen developed vigorously. Meanwhile, no significant differences were observed in development of *Fusarium* between the extracts of PS and NPS, when they were autoclaved. These results suggest that biological factors contribute to a difference in persistency of alfalfa between the two soils.