



Title	土壌中の Rhizoctonia solani Kühn の菌核から分離された微生物とその作用
Author(s)	内記, 隆; NAIKI, Takashi; 宇井, 格生 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 8(3), 252-265
Issue Date	1972-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11836
Type	departmental bulletin paper
File Information	8(3)_p252-265.pdf



土壌中の *Rhizoctonia solani* KÜHN の菌核から 分離された微生物とその作用

内記 隆・宇井格生

The microorganisms associated with the sclerotia of *Rhizoctonia solani* KÜHN in soil and their effects on the viability of the pathogens

By

Takashi NAIKI and Tadao UI

(Department of Botany, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo)

Received November 22, 1971

緒 言

植物病原菌の菌核が土壌中で微生物の侵害により、次第に死滅することは今日までしばしば観察されてきている^{3), 4), 7), 8)}。 *Trichoderma* 属菌を接種すると菌核が死滅することから、これを病害防除に応用しようとする試みもなされている¹⁶⁾。しかし、土壌病をこの種拮抗微生物により防除する試みが必ずしも成功しないことはすでに指摘されている所である²¹⁾。しかしながら、土壌中における *Rhizoctonia solani* KÜHN の菌核の生存に微生物が関与することは、無殺菌土壌と殺菌土壌で生存期間が著しく異なること、また無殺菌土壌中の菌核細胞は内容物が速やかに消失し、他の糸状菌が菌核細胞内に侵入すること¹⁵⁾、などから明らかである。しかし、土壌中における *R. solani* の菌核の死滅に対し、菌核上の微生物がどのような作用をもつかは不明な点が多い。

本実験は土壌中で生存期間の異なる2菌株¹⁵⁾を用い、土壌中の菌核の表面に発達する微生物相と、それら微生物が菌核の発芽や生存におよぼす影響について比較検討し、菌核の土壌中の生存と微生物との関係を明らかにすることを目的としたものである。

本研究を行なうにあたり分離菌の同定をして頂いた醸酵研究所、横山竜夫博士に心から感謝の意を表す。

実験材料および方法

1. 供試菌株 北海道大学農学部植物学教室保存菌株のうち、*R. solani* F-15 と B-5 の2菌株を用いた。F-15

の完全時代は *Thanatephorus cucumeris* (FRANK) DONK とされ、アマ子苗に立枯を起こす病原菌である²²⁾。B-5 は完全時代の形成はみないが、てんさい苗立枯病や肥大した根部に根腐病を起こす菌株で渡辺ら²⁴⁾によりIB型とされた *R. solani* である。これら2菌株は培地上や土壌中で菌核を多数形成するが、土壌中の生存期間は B-5 > F-15 である。また、両菌株の菌核を土壌に埋めると、F-15 ではすみやかに発芽能力が低下し、休止状態で生存を続けるが、B-5 は長い間発芽能力を維持している¹⁵⁾。

2. 菌核形成方法 供試2菌株の菌核は二重シャーレ法²⁰⁾により形成させた。すなわち、内側の小シャーレに0.1% yeast extract 加用 Czapek-Dox 寒天培地を入れ、外側を2% 脱塩水寒天培地とする。内側に供試菌株を接種し、25°C、3週間培養すると、菌糸は外側の培地に生育し、培地の表面に成熟した菌核が多数形成される。この方法によると、栄養を含む培地の付着しない菌核を得ることができる。この菌核のうち、大きさのほぼ等しいものを取り実験に供した。

3. 供試土壌および菌核埋没方法 札幌市北海道大学農場内の休閑地の土壌(植壤土 pH 5.4)を採取し、2mmの篩でふるい、その300gを用いた。この土壌に少量の土壌と共にナイロンメッシュに包んだ菌核50個を埋め、土壌湿度を最大容水量の40~45%に保ちながら、室温に置いた。これら菌核を埋めた土壌を多数用意し、所定期間毎に取り出し、実験に供した。

実験結果

1. 土壌に埋めた菌核の微生物数

土壌に埋めた F-15, B-5 菌核から分離される細菌, 放線菌, 糸状菌数のちがいと, 土壌に埋めたのち, 日数がたつにつれ, その数がどのようにかわるかについて検討した。

実験方法 供試 2 菌株の菌核を土壌に埋め, 1 日後から所定期間毎に 90 日後まで取り出し, その表面の微生物数の定量を行なった。方法は次の通りである。土壌から取り出した菌核を篇 (35 メッシュ) の上にのせ, 強い水流で付着土壌粒子を除いたのち, 100 ml の殺菌水中で 20 分間振盪し, さらに殺菌水で洗い, 過剰の水分を殺菌濾紙で除いた。この菌核の 0.2~0.3 g を 50 ml 殺菌水とともに無菌的にホモジネートをつくり, これを原液とし, 希釈平板法により, 菌核の微生物数を定量した。なお, これと平行し, 菌核を埋めない土壌の微生物数を希釈平板法により調査した。細菌, 放線菌, 糸状菌について, それぞれ Thornton's standardized medium, Glycerol-asparaginate agar, Synthetic acid agar 培地¹⁰⁾ を希釈平板の培地として用いた。なお, 菌核, 土壌の微生物数はそれぞれ乾重 1 g 当たりの数として表わした。

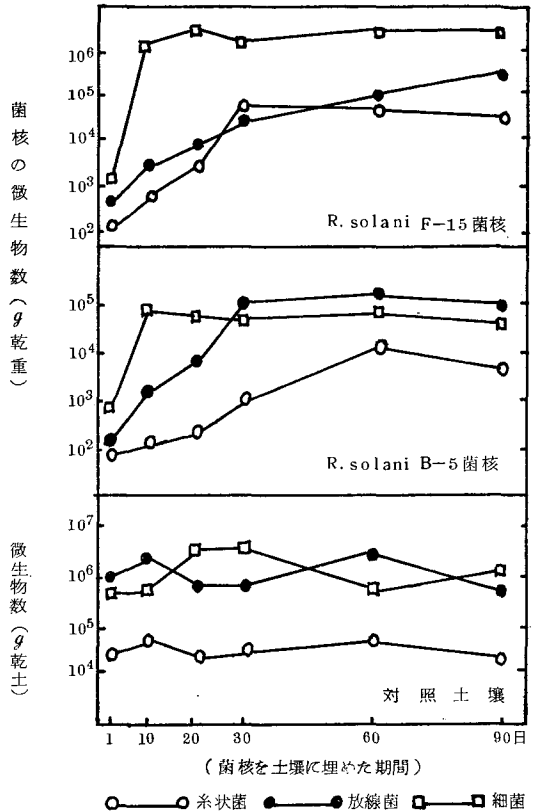
実験結果 菌核を土壌に埋めたのち, 日数の経過に伴う細菌, 放線菌, および糸状菌数と菌核を埋めない土壌の微生物数を第 1 図に示した。

F-15 および B-5 の菌核を土壌に埋めたとき, 菌核の微生物数は次第に増加する。そのうち, 細菌についてみると, 両菌株とも埋めて 10 日後まで著しく増加するが, その後はほとんど変化しない。ついて放線菌は細菌よりおくらせて増加する。B-5 の菌核では放線菌の増加が著しく, 30 日以後には細菌数より多くなる点が F-15 と異なっている。糸状菌数は細菌, 放線菌数に比べて少ないが, 出現する糸状菌の種類は菌株により著しく異なり, 平板のコロニーを一見しただけで差異がわかる (図版 I-1)。一方菌核を埋めない土壌では 90 日の間に細菌, 放線菌, 糸状菌数は何れも著しい変化はみられなかった。

これらのことから *R. solani* の菌核を土壌に埋めると, 菌核表面や内部に微生物が増殖をはじめ, その数は増加するが, 菌株により放線菌の増加傾向が異なるといえる。

2. 菌株の菌核微生物の質的变化

菌核を土壌に埋めたとき, 菌核に生育する細菌, 放線菌, 糸状菌の種類は, 菌株によりどのようにちがうかを

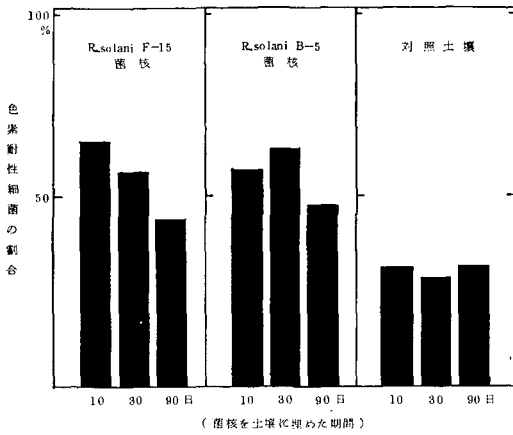


第 1 図 土壌中の菌核および土壌の微生物 (菌核を土壌に埋めた期間との関係)

菌核を埋めたのち, 一定の期間ごとに検討した。

実験方法 前記の菌核ホモジネートから希釈平板上に現われた細菌, 放線菌, 糸状菌のコロニーのうち, それぞれ任意のもの 50 個を分離し, 純粋培養した。この糸状菌については, 前と同じ方法により殺菌水で洗った菌核を酸性脱塩水寒天培地上に並べ, 菌核から生じた他の糸状菌の菌糸を分離し, 純粋培養をした。細菌は半流動性ブイヨン培地, 放線菌は glucose-asparagine 斜面寒天培地, 糸状菌は蔗糖加用ジャガイモ煎汁斜面寒天培地にそれぞれ培養保存した。分離した細菌はクリスタル紫に対する色素耐性の有無, 放線菌はチロシナーゼ活性と気菌糸の形態に基づき大別した。また, 糸状菌はその形態により同定を行なった。菌核を埋めない土壌から, 希釈平板法により細菌, 放線菌, 糸状菌を分離し, これらについても同様の類別を行なった。

実験結果 1) 菌核から分離される細菌 分離した全細菌をクリスタル紫 200 ppm を含むブイヨン液体培地に接種し, 25°C, 4~6 日間培養後, 生育の有無により色素



第2図 菌核から分離された全細菌中の色素耐性細菌の割合(菌核を土壌に埋めた期間との関係)

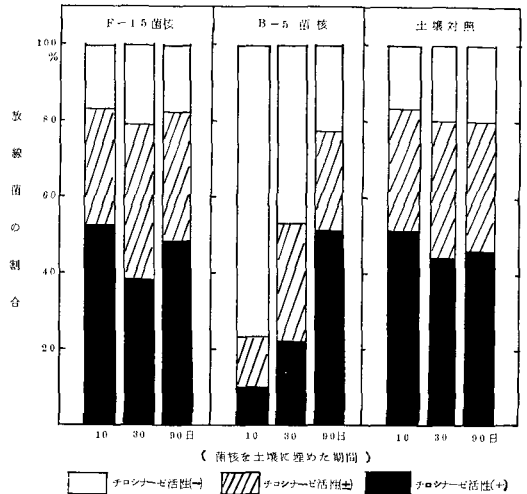
耐性を検討し、全細菌数中に占める割合を求めた(第2図)。

土壌に埋めたF-15とB-5の菌核から得られる細菌のうち、色素耐性細菌の占める割合は菌核を埋めない土壌よりも著しく高いが、菌株のちがいでによる差は認め難い。また、菌核を土壌の中に90日間埋めたとき、その割合は減少するが、なお、土壌中の色素耐性菌の占める割合より高い。一般にクリスタル紫に耐性を示す細菌はグラム陰性細菌が多いとされている所から、土壌中の*R. solani*の菌核には、最初グラム陰性細菌が著しく増殖し、のち次第にグラム陽性細菌が多くなる。

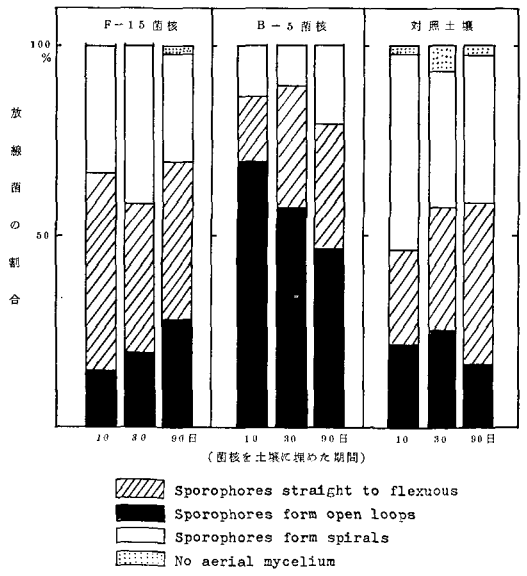
2) 菌核から分される放線菌 両菌核と土壌から分離した放線菌をチロシナーゼ加用培地²³⁾に接種し、4~5日間培養後メラニン型色素の生産による培地の着色程度により、チロシナーゼ活性の強弱を判定した。その基準は培地の着色の著しいもの; (+), 培地がわずかに着色するもの; (±), また全く着色しないもの; (-)とした。気菌糸の形態は脱塩水寒天培地に接種し、10日間培養後、顕微鏡下で観察し、Waksman (1961)の基準²³⁾に従って i) sporophores straight to flexuous, ii) sporophores form open loops, iii) sporophores form spirals, iv) no aerial mycelium の4つのグループに分けた。調査時期ごとに得られた放線菌のうち、チロシナーゼ活性程度の異なるものの割合を第3図に、気菌糸の諸形態を異にするものの割合を第4図に示した。

放線菌のチロシナーゼの強弱をみると、F-15の菌核と土壌から分離される放線菌の中にはチロシナーゼ活性(+)のものが最も多く、ついでチロシナーゼ活性(±)の

もので、両者が放線菌中の大部分を占めている。それらの占める割合は菌核を土壌に埋めた日数には、ほとんど関係なく、ほぼ同じであった。これに反し、B-5菌核の放線菌はF-15や土壌のそれとは異なり、30日後までチロシナーゼ活性(-)の放線菌がその大部分を占めていた。しかし、90日後にはチロシナーゼ活性(+)の放線



第3図 土壌中の菌核から分離された放線菌のうちチロシナーゼ活性程度により分けた3菌群の割合(菌核を土壌に埋めた期間との関係)

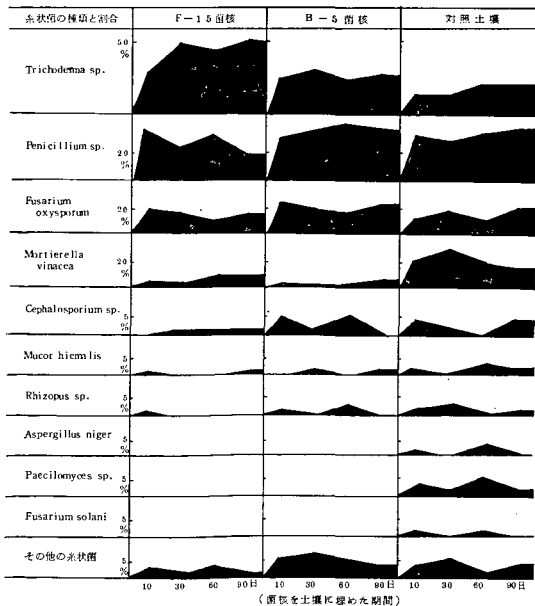


第4図 土壌中の菌核から分離された放線菌のうち形態をこととする4菌群の割合(菌核を土壌に埋めた期間との関係)

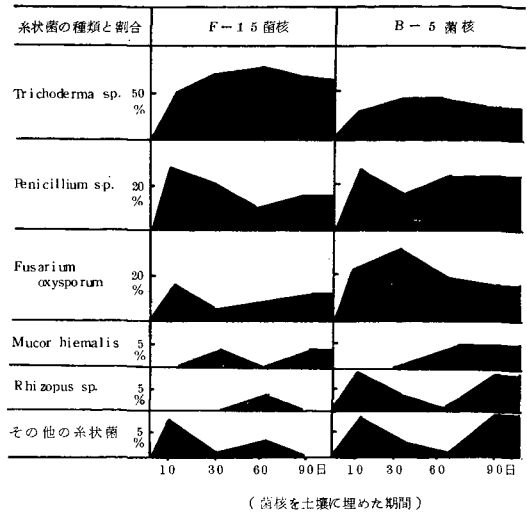
菌が増加し、3群の放線菌の割合はF-15の菌核や対照土壤中の放線菌と同じになった。

また、これら放線菌を気菌糸の形態のちがいにより分けると、F-15の菌核では sporophores straight to flexuous なものが多く、ついで sporophores form open loops のものと sporophores form spirals のものがみられた。B-5の菌核では sporophores form open loops のものが最も多く、sporophores straight to flexuous のものがこれについて分離された。土壌からは sporophores form spirals のものと sporophores straight to flexuous なものが多く分離されるが、菌核からは希にしか分離されない no aerial mycelium のものが常に分離された。このうち、sporophores form open loops の放線菌は F-15 ではその菌核を土壌に埋めたのち、日数がたつにつれ分離される割合が増加するが、B-5 では反対に減少の傾向を示した。チロシナーゼ活性および気菌糸の形態からみると、F-15 菌核の放線菌は土壌の放線菌と類似するものが多いが、B-5 の菌核の放線菌は土壌あるいは F-15 の放線菌と異なるものが多い。

3) 菌核から分離される糸状菌 土壌に埋めた F-15、B-5 両菌核のホモネジートの希釈平板に現われる各種糸状菌について調査した結果を第5図に示し、また、菌核を脱塩水寒天培地に並べたとき分離される糸状菌に関する



第5図 土壤中の菌核から分離された糸状菌の種類とその割合(希釈平板法により分離)
(菌核を土壌に埋めた期間との関係)



第6図 土壤中の菌核から分離された糸状菌の種類と割合(Plate法により分離)
(菌核を土壌に埋めた期間との関係)

る結果を第6図に示した。

両菌核のホモネジートからは *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp.*, *Fusarium oxysporum* が最も頻度高く分離された。とくに F-15 の菌核からは、全期間を通じ *Trichoderma sp.* が最も多く分離され、*Penicillium sp.* がこれについで。B-5 菌核からは逆に *Penicillium sp.* が多く、ついで *Trichoderma sp.*, *F. oxysporum* であった。土壌から分離される各糸状菌の割合は B-5 菌核から分離される糸状菌に類似した傾向を示すが、他に *Mortierella sp.* など菌核よりは分離される種類が多い。

菌核を酸性脱塩水寒天培地上に並べたとき分離される糸状菌も、F-15 菌核は *Trichoderma sp.* が最も多く、B-5 では *F. oxysporum* が多い。これらの結果から、土壌中の菌核には *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp.*, *F. oxysporum* が増殖するが、これら全糸状菌のなかに占める割合は菌株により異なる。

3. 菌核から分離される *R. solani* に対する抗菌性微生物

R. solani の菌核が土壌中で休止状態となったり、死滅する¹⁵⁾原因として、菌核に増殖する微生物の作用が考えられる。そこで菌核から分離される微生物のうち、*R. solani* に対し、どのような微生物が抗菌作用をもつかを知るため、次の実験を行なった。

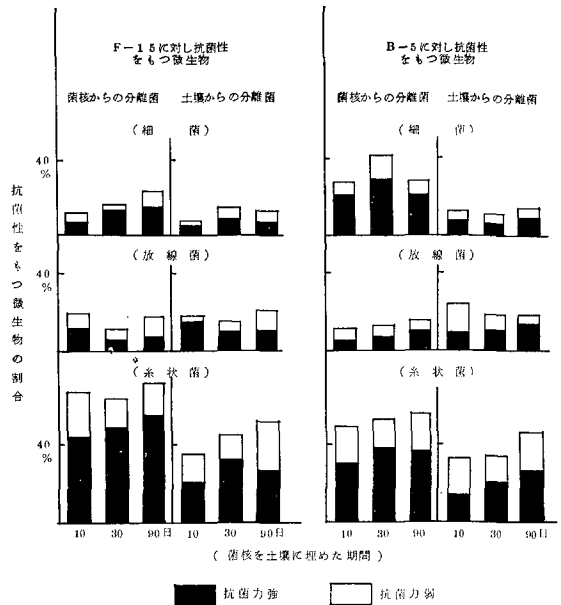
1) 菌核を土壌に埋めたのちの抗菌性微生物数の変化

実験方法 2の実験で土壌に埋めた菌核から分離した細菌、放線菌、糸状菌について対峙培養を行ない、F-15、

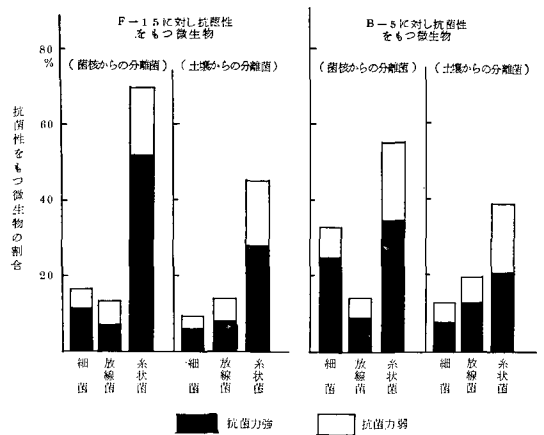
B-5 両菌株の菌糸生育抑制程度により抗菌力を比較した。細菌、放線菌の対峙培養にはシャーレ(径9cm)1枚当たり、15mlの0.1% yeast extract 加用 Czapek-Dox 寒天培地、糸状菌には土壤煎汁寒天培地を用いた¹⁰⁾。検定する細菌、放線菌は平板に接種し、25°C、2日間培養後、コロニーより2cm離れた所に *R. solani* を対峙して植えた。糸状菌は平板に植えると同時に3cm離れた所に *R. solani* を植えた。F-15 菌核から分離した菌はF-15 菌株と対峙し、B-5 菌核から分離した菌はB-5 菌株と対峙した。その他菌核を埋めない土壤から分離した菌はF-15、B-5とそれぞれ対峙し、これらと菌核から分離した微生物と抗菌力を比較した。細菌、放線菌は25°C、3~4日対峙培養後、また、糸状菌は5~6日後に次のような判定基準により、*R. solani* に対する抗菌力を判定した。すなわち、*R. solani* に対し全く抗菌力を示さず、相互の菌叢が互に入り組み、*R. solani* の生育が対照と変わらないもの；抗菌力無し、(-)と、*R. solani* の生育は対峙菌と接触前後抑制され、対峙菌の菌叢表面を生育するが、その菌糸は非常に少ないもの；抗菌力弱、(±)、また、*R. solani* と対峙菌の間に阻止帯のみられるものや *R. solani* の菌糸は対峙菌と接触すると生育がとまり、やがて対峙菌により分解、消滅するもの；抗菌力強、(+)とした。この判定基準により、F-15、B-5 菌核および土壤から分離した微生物について、*R. solani* に対し各抗菌力の程度を示すものの割合を求めた。

実験結果 菌核および土壤から分離した細菌、放線菌、糸状菌のうち、抗菌力の強いものと弱いものの割合を各微生物の分離時期別にまとめ図示し(第7図)、また、細菌、放線菌、糸状菌の各々について総計したときの割合を第8図に示した。

菌核から分離される微生物のうち、F-15、B-5に対し、抗菌力を示すものの割合は、菌核を土壤に埋める期間が長くなっても、とくに著しく変るとは認められない。また、細菌、放線菌、糸状菌のうち、両菌株に対し抗菌力をもつものの割合が多いのは糸状菌で、続いて細菌、放線菌の順であった。F-15 および B-5 の菌核から分離される細菌、放線菌、糸状菌全体のうち、抗菌力を示すものは、それぞれ33.9%と34.4%であり、両菌株の間に差は認められない。また、土壤から分離した全供試菌数のうち、F-15、B-5 に対し抗菌力を示すものは、それぞれ23.6%と24.5%であり、菌株に対する差は認められない。このことから、*R. solani* の菌核上の微生物は周囲の土壤よりも抗菌力をもつものの割合がやや多いと認められる。



第7図 菌核および土壤から分離した微生物のうち *R. solani* に対し抗菌性をもつものの割合(菌核を土壤に埋めた期間との関係)



第8図 菌核および土壤から分離される微生物のうち *R. solani* に対し抗菌性をもつものの割合

2) 抗菌性微生物の種類

菌核あるいは土壤から分離された微生物のうち、*R. solani* に対し、抗菌力をもつ微生物の種類、性質などについて、2.で行なったと同じ方法で類別し、その結果を第1表に示した。

両菌株の菌核から分離される抗菌力の強い細菌は全てグラム染色陰性、短桿、極毛を有する細菌であり、そのうちブイオンおよび0.1% yeast extract 加用 Czapek-

株である。

実験方法 試験管に入れた殺菌パーミキュライト1gに5倍に希釈した0.1% yeast extract 加用 Czapek-Dox 培養液3 mlを加え、これに抗菌性微生物を接種し、5~6日間培養した。ついで大きさの等しいF-15あるいはB-5の菌核25個ずつ加え、25°C、30日間保ったのち、その生存の割合を調べた。その方法の一つは試験管から取り出した菌核を殺菌水で良く水洗後、酸性脱塩水寒天培地上に並べ、発芽率を調査した。他の方法は別に準備した試験管内で無菌的に生育させたアマ子苗胚軸部に菌

核を2週間接触させておいたのち取り出し、酸性脱塩水寒天培地上に並べ、発芽率を調べた。また、抗菌性微生物と別に、抗菌力のない細菌、放線菌、糸状菌について同じような実験を行なった。これらの対照として、蒸留水、培養液のみ加えたパーミキュライトに微生物を接種せず、これに埋めた菌核の生存を調査した。

実験結果 F-15、B-5 菌株の菌核を25個ずつ用い、2回回復した実験の結果、細菌、放線菌接種菌核の発芽率を第2表に、糸状菌接種菌核の発芽率を第3表に示した。

第2表 菌核から分離された細菌、放線菌を接種した菌核の生存率

菌核に接種した菌	抗菌力 ^{a)}	F-15 菌核		B-5 菌核		
		発芽率 ^{b)} (%)	発芽率 ^{c)} (%)	発芽率 ^{b)} (%)	発芽率 ^{c)} (%)	
(細菌)						
グラム(-), 短桿, 極毛, 色素生産(+)	{FB-7 BB-27	{+ +	{56 60	{96 100	{82 78	{98 100
" (-)	{FB-12 SB-26	{+ +	{94 90	{— 98	{98 94	{— 98
グラム(+), 長桿, 周毛	{SB-8 SB-43	{+ +	{88 94	{94 —	{92 96	{96 —
その他の細菌	{FB-24 BB-49	{— —	{96 98	{— —	{96 98	{— —
(放線菌)						
チロシナーゼ活性(+)						
Sporophores straight to flexuous	{SS-4 SS-46	{+ +	{96 94	{— 98	{100 92	{— 100
Sporophores form open loops	{FS-8 BS-12	{+ +	{92 88	{96 94	{96 92	{— 98
チロシナーゼ活性(-)						
Sporophores form open loops	{SS-24 SS-17	{+ +	{92 84	{96 98	{94 94	{96 98
Sporophores form spirals	{FS-36 BS-9	{+ +	{90 98	{96 —	{98 98	{— —
その他放線菌	{FS-27 BS-47	{— —	{98 84	{— 96	{96 96	{— —
対照無接種区	{パーミキュライト+殺菌水 パーミキュライト+培地		{96 98	{98 —	{98 100	{100 —

供試菌核数; 各50個, 培養期間30日

- 培地上で *R. solani* と対峙したときの抗菌力
- 酸性脱塩水寒天培地上での発芽率
- 寄生植物(アマ)の胚軸部接触後の発芽率

第3表 菌核から分離された糸状菌を接種した菌核の生存率

菌核に接種した糸状菌	抗菌力 ^{a)}	F-15 菌核		B-5 菌核	
		発芽率 ^{b)} (%)	発芽率 ^{c)} (%)	発芽率 ^{b)} (%)	発芽率 ^{c)} (%)
<i>Trichoderma sp.</i> 1	+	0	48	14	88
2	+	0	42	40	94
3	+	2	54	36	92
<i>Penicillium sp.</i> 1	+	2	96	86	98
2	+	4	94	78	96
3	-	10	90	80	100
<i>Fusarium oxysporum</i>	+	66	92	86	98
<i>Mortierella vinacea</i>	+	82	—	98	—
<i>Cephalosporium sp.</i>	-	80	—	94	—
<i>Mucor hiemalis</i>	-	98	—	92	—
対照無接種区	パーミキュライト+殺菌水 パーミキュライト+培地	98	98	100	100
		100	100	100	100

供試菌核数；各 50 個，培養期間 30 日

- a) 培地上で *R. solani* と対峙したときの抗菌力
 b) 酸性脱塩水寒天培地上での発芽率
 c) 寄主植物（アマ）胚軸部接触後の発芽率

F-15, B-5 に対し強い抗菌力を示す細菌を菌核に接種すると，グラム陰性，短桿，極毛細菌で色素を生産する FB-7, BB-27 菌は，F-15, B-5 両菌核の発芽率を低下させた。抗菌性細菌を接種した菌核のうち，寒天培地上の発芽率が抑制されたものは，アマ胚軸部に接触させると 96% 以上が発芽することから，抗菌性の細菌により，死滅する菌核は少ないと認められる。また，用いた放線菌には F-15, B-5 両菌核の発芽を著しく抑制するものはなかった。

糸状菌についてみると，菌核の発芽率を著しく低下させたものは *Trichoderma sp.* と *Penicillium sp.* で *F. oxysporum* はこれについていた。他の糸状菌も発芽率をやや低下させた。*R. solani* の菌株間のちがいをみると，F-15 菌核は B-5 よりも糸状菌により発芽の抑制される程度が強い。糸状菌を接種した菌核をアマ胚軸部に接触させると，ほとんどのものは発芽したが，*Trichoderma sp.* 1, 2 の 2 つの菌株を接種した F-15 菌核は約半数が発芽せず，これらは死滅したと認められる。*Trichoderma sp.* 1 菌株を接種した F-15, B-5 両菌核の内部形態をミクロトーム切片により観察すると，*Trichoderma sp.* の菌糸は F-15 菌核細胞内に侵入し，そこに胞子を形成していた（図版 II-7, 8）。一方，B-5 の菌核細胞のうち，侵入を受けているものは稀であった。

これらの結果から，*R. solani* の菌核発芽や死滅に関与するものは，細菌，放線菌よりも糸状菌，とくに *Trichoderma sp.* と *Penicillium sp.* であることがわかる。また，供試した *R. solani* 2 菌株の菌核は *Trichoderma sp.* の侵入に対し，耐性を異にする。

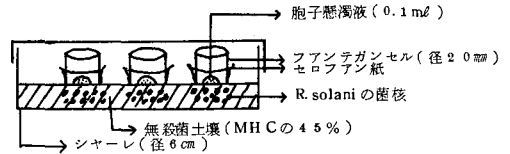
5. 菌核による *Trichoderma* 属菌の分生胞子の発芽促進

Trichoderma 属菌の分生胞子や厚膜胞子は無殺菌土壤中で静菌作用により発芽することなく，生存するとされている^{2), 11), 17)}。従って，この菌が土壤中の菌核の上で増殖し，それに侵入するためには，分生胞子の発芽が必要となる。本実験では菌核から分離される *Trichoderma* 属菌の分生胞子が菌核周辺の土壤中で発芽が促進されるかどうかについて検討した。

実験方法 菌核を埋めた土壌表面での *Trichoderma* 属菌の分生胞子の発芽調査は常田 (1971)¹⁹⁾ の方法に従った。シャーレ (径 6 cm) に最大容量の 45% に補正した無殺菌土壌 30 g を入れ，そこに *R. solani* の生菌核あるいはプロピレンオキサライドで殺した菌核を 1.5 g ずつ埋め，土壌表面を平滑にする。その上に煮沸し，可塑性を除去したセロファン紙を掲げ，*Trichoderma* 属菌の分生胞子の発芽床とした。セロファン紙を土塵と密着させるため，セロファン紙は第 9 図に示したように，ファ

ンテガンセル (径 20 mm) の一面にはったもので、これを高圧滅菌後シャーレに入れた土壤に3個ずつ置いた (図版 II-9)。供試 *Trichoderma sp.* の分生胞子は 3% malt extract 寒天培地に、25°C、14 日間散光下で培養したコロニー上に形成させたものを用いた。分生胞子塊を取り、菌糸片を濾別し、遠沈により3回水洗したのち希釈し、胞子懸濁液 ($10 \times 10^5 / \text{ml}$) をつくった。その 0.1 ml をセロファン表面の中央に滴下し、湿室状態とし、25°C、20 時間暗所に保った。その後乳酸酸性アニリンブルー溶液でセロファン表面の分生胞子を染色し、発芽率と発芽管の長さを調査した。発芽率は約 100 個の胞子につき観察し、また、発芽管長は 30 個の発芽した胞子について測定した。すべての結果は3回くり返した実験の平均値をもって表わした。用いた *R. solani* は F-15 と B-5 の2菌株で、*Trichoderma* 属菌は *T. viride* と

R. solani の菌核から分離した *Trichoderma sp. 1* の2つである。なお、対照として、菌核を埋めない土壤について同様に *Trichoderma sp.* の分生胞子の発芽を調査した。



第9図 *Trichoderma sp.* の分生胞子の土壤表面における発芽試験法

実験結果 供試した *Trichoderma sp. 2* 菌株の分生胞子の発芽は *R. solani* の生菌核、死滅菌核を埋めた土壤表面で促進される (第4表)。

第4表 菌核を埋めた土壤表面の *Trichoderma sp.* の胞子の発芽^{a)}

土壤に埋めた菌核の種類と状態	<i>Trichoderma sp. 1</i>		<i>Trichoderma viride</i>	
	胞子発芽率 ^{b)} (%)	発芽管長 ^{c)} (μ)	胞子発芽率 ^{b)} (%)	発芽管長 ^{c)} (μ)
F-15 生菌核	56.2	11.7	50.3	14.7
B-5 生菌核	48.3	11.3	32.9	14.6
F-15 死滅菌核	87.9	>75.0	68.2	>50.0
B-5 死滅菌核	34.4	>50.0	56.6	>50.0
対照土壤	0	0	0	0

a) 改良セロファン法により20時間後測定

b) 約100個の胞子について調査; 3反復の平均値

c) 30個の胞子について調査; 3反復の平均値

発芽率は生菌核より、死滅菌核を埋めた土壤表面で、また、*T. viride* よりも菌核から分離した *Trichoderma sp. 1* 菌株の分生胞子で高い。また、B-5 よりも F-15 の菌核を埋めた土壤の表面で分生胞子の発芽率が高い。発芽管の長さは生菌核より死菌核を埋めた土壤表面の方がはるかに長い、F-15 と B-5 菌核を埋めた土壤の間では大差は認められなかった。菌核を埋めない土壤の表面では *Trichoderma sp. 1* および *T. viride* とともに分生胞子の発芽は認められなかった。さらに、菌核から分離した *Trichoderma sp. 1* 菌株の胞子懸濁液を F-15、B-5 菌核に直接接種し、25°C、散光下で2週間培養したとき、F-15 菌核の上では著しい胞子形成が認められたが、B-5 菌核上には胞子が形成されなかった (図版 II-10)。これらのことから、F-15 菌核の上では B-5 より *Trichoderma*

属菌の胞子の発芽や胞子形成が著しく、*Trichoderma* 属菌の増殖に適していることがわかる。

6. 土壤中の菌核に侵入する糸状菌

これまでの *in vitro* における実験結果から、*R. solani* の菌核に *Trichoderma* 属菌が侵入することが明らかになった。また、前の報告で、土壤に埋めた菌核構成細胞の中には糸状菌菌糸がみられ、そこで胞子を形成していることが示された¹⁵⁾。そこで土壤中における菌核の細胞が、他の糸状菌の侵入をうける程度、また、菌核に侵入する糸状菌の種類を F-15、B-5 の2菌株の菌核について比較した。

実験方法 無殺菌土壤に埋めた菌核を取り出し、良く水洗後、殺菌水を加え、ホモゲナイザーにより菌核細胞を遊離させ、細胞懸濁液をつくる。これを低速遠心(3,000

r.p.m., 20分) で2回水洗をくり返したのち、乳酸酸性 0.1% Yeast extract 加用 Czapek-Dox 寒天平板培地の表面に一定量ずつ滴下し、一様に広げる。25°C, 12~24時間培養後、菌核構成細胞内に形成された他の糸状菌の胞子が発芽し、菌核細胞から外部の培地上にのびるのを顕微鏡下で観察する。*R. solani* の菌核細胞の発芽管と菌核構成細胞内に形成された他の糸状菌の胞子の発芽管はその起源、形状などから明確に区別できる(図版 II-11, 12)。この方法により、F-15, B-5 の菌核を土壌に埋めて、30日後から所定期間毎に菌核構成細胞数約300個を検鏡し、そのうち菌核構成細胞内に他の糸状菌胞子の存在するものを侵入をうけた菌核細胞とし、その全観察細胞に対する百分率を求めた。また、同様にして土壌に埋めてから1年後の両菌株の菌核について、菌核構成細胞に侵入した糸状菌をそれぞれ25菌株ずつ分離し、菌核構成細胞侵入糸状菌として同定を行ない比較した。

実験結果 F-15, B-5 菌核を土壌に埋めたのち、30日目から1年後まで所定期間毎に他の糸状菌の侵入をうけた菌核構成細胞数を数え、そのときの全観察菌核構成細胞数に対する割合を第5表に示した。

第5表 菌核を土壌に埋めた期間と糸状菌により侵入をうけた菌核構成細胞の割合

土壌に埋めた期間 (日)	糸状菌の侵入をうけた 菌核構成細胞の割合 ^{a)}	
	F-15 菌核 (%)	B-5 菌核 (%)
30	0.2	0
60	2.6	0
120	9.6	0.7
240	11.7	4.8
360	13.1	7.2

a) 菌核構成細胞約300について測定

その結果、F-15 菌核では30日後から細胞内に他の糸状菌の胞子の形成がみられるが、その割合は非常に少ない。60日、120日後と侵入をうけた細胞数は次第に増加するが、1年後でもわずか13.1%の菌核構成細胞が侵入をうけるにすぎない。B-5の菌核ではF-15の菌核より、侵入をうける細胞が少なく、60日後でも菌核構成細胞内に他の糸状菌胞子の形成はみられない。120日後から菌核構成細胞内に他の糸状菌の胞子がみられるが、1年後でも7.2%にすぎず、F-15に比べ侵入をうける細胞は少ない。

また、土壌に埋めて1年後の両菌株の菌核に侵入した糸状菌の種類をみると(第6表)、両菌株とも *Tricho-*

第6表 菌核構成細胞に侵入した糸状菌の種類と割合

供 試 <i>R. solani</i>	侵入をうけた 菌核構成細胞 の割合 ^{a)} (%)	侵入糸状菌 ^{b)}	
		<i>Tricho-</i> <i>derma sp.</i> (%)	<i>F. oxy-</i> <i>sporum</i> (%)
F-15 菌核	13.1	92.0	8.0
B-5 菌核	7.2	88.0	12.0

1年間土壌に埋めた菌核を供試

a) 約300細胞観察

b) 侵入細胞から発芽、生育した糸状菌25菌株中の割合

derma sp. の分離される割合が最も高く、菌核構成細胞侵入糸状菌の90%近い値を示した。その他に *F. oxysporum* が分離された。

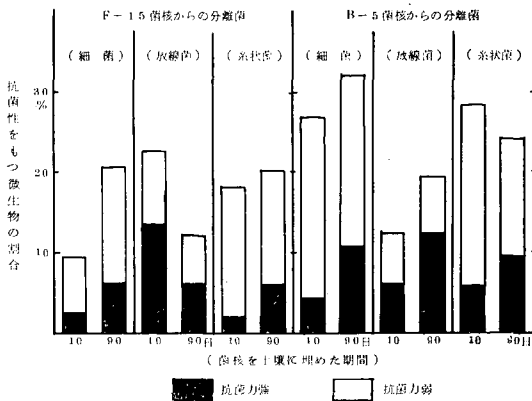
これらの結果から、無殺菌土壌中でも *R. solani* の菌核は他の糸状菌、とくに *Trichoderma sp.* により侵入をうけるが、その割合は比較的少なく、また、菌株により異なり、B-5の菌核細胞はF-15より *Trichoderma sp.* などの侵入をうけ難いことがわかる。

7. 菌核から分離される *Trichoderma sp.* に対する抗菌性微生物

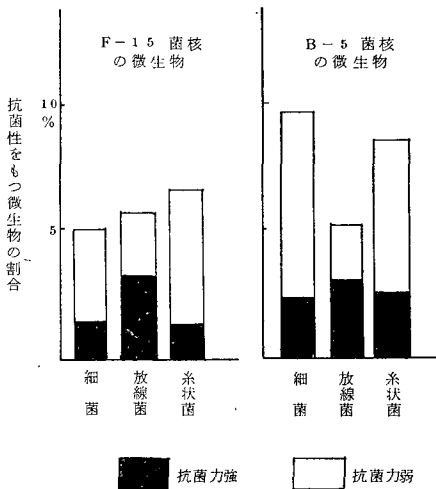
土壌に埋めた B-5 菌核は F-15 の菌核と比較して、*Trichoderma sp.* の分離される割合が少なく、また、それにより侵入をうける菌核細胞数も少ない。その原因の一つとして、B-5 菌核表面の微生物相は F-15 とは異なり、*Trichoderma sp.* に対する抗菌性微生物数が多いためとも考えられる。そこで土壌に埋めた F-15, B-5 両菌核から分離した細菌、放線菌、糸状菌を用いて、菌核に侵入する *Trichoderma sp.* に対する抗菌性微生物の割合を比較した。

実験方法 F-15, B-5 の菌核を土壌に埋めてのち、10日と90日目に分離した細菌、放線菌、糸状菌各々100菌株について、菌核細胞内から分離した *Trichoderma sp.* 1菌株に対する抗菌性の有無を調査した。供試細菌、放線菌、糸状菌および *Trichoderma sp.* の接種方法、供試培地および抗菌力の判定基準は3.に述べた方法に従った。

実験結果 土壌に埋めてから10日と90日後の F-15 および B-5 の菌核から分離した細菌、放線菌、糸状菌について、*Trichoderma sp.* に対する抗菌力の有無を検定した結果、抗菌力(±)、および(+)のものの割合を第10図に示し、また、F-15 および B-5 から分離した全ての細菌、放線菌、および糸状菌についてまとめた結果を第11図に示した。



第10図 菌核から分離した細菌、放線菌、糸状菌の *Trichoderma sp.* に対し抗菌性をもつものの割合 (菌核を土壌に埋めた期間との関係)



第11図 菌核から分離した細菌、放射菌、糸状菌の *Trichoderma sp.* に対し抗菌性をもつものの割合

F-15 菌核を土壌に埋めてから、10日と90日後に分離される微生物の *Trichoderma sp.* に対し、強い抗菌力を示すものはそれぞれ5.7%と5.8%を占める。B-5 から分離される微生物についてみると、10日後7.5%、90日後8.3%を占め、両菌核とも土壌に埋める期間による差は認め難い。菌核を土壌に埋めた期間とは無関係に強い抗菌力を示すものについてみると、F-15の菌核微生物では全体の1.8%、B-5では全体の2.8%を占め、B-5菌核の微生物のなかに *Trichoderma sp.* に対し抗菌力を示すものがとくに多いとは認め難い。両菌核の菌核から分離される微生物のうち、*Trichoderma sp.* に対し

強い抗菌力を示す細菌は先の実験で得られた *R. solani* に対し、抗菌力をもつものとは異なるものであった。放線菌の場合、*R. solani* に対し強い抗菌力を示すものは、*Trichoderma sp.* に対しても抗菌力を示した。糸状菌のうち、*Trichoderma sp.* に対し抗菌力を示すものは未同定の胞子形成菌であり、この菌は *R. solani* に対し抗菌力をもたなかった。

これらのことから、F-15およびB-5の菌核が *Trichoderma* 属菌の侵入に対し耐性の異なる原因を菌核の微生物相、とくに *Trichoderma sp.* に対する抗菌性を示す微生物の占める割合のちがいに説明することは難しい。

考 察

一般に植物病原菌の菌核は、土壌中で長い年月にわたり生存されるとされている^{6),13)}が、これら耐久体とみなされる菌核の上には他の微生物が増殖し、それらが発芽を抑制したり、あるいは菌核細胞に侵入し、死滅の原因になるとされている^{3),8),9),14),18)}。*R. solani*の菌核も土壌に埋めたのち、日数の経過に伴い、細菌、放線菌、糸状菌の増殖が認められる。これら菌核の微生物の種類は菌株により異なる。細菌についてみると、菌核を埋めない土壌と比較し、土壌中の *R. solani* の菌核からはクリスタル紫耐性細菌の分離される割合が多い。すなわち、土壌中の *R. solani* の菌核にはグラム陰性細菌が増殖すると結論される。放線菌についてみると、F-15およびB-5の菌核から分離される菌の性質は異なり、B-5菌核からはチロシナーゼ活性(-)、*sporophores form open loops*のものが多く分離されるが、F-15菌核から分離されるものは、チロシナーゼ活性(+)、*sporophores straight to flexuous*なものが多い。菌核から分離される糸状菌も菌株により異なるが、土壌よりも単純である。F-15の菌核からは *Trichoderma sp.* が最も多く分離されるが、B-5では *Penicillium sp.* の占める割合が多い。土壌中の菌核に着生する微生物は生きている菌核と死滅したものでは異なり⁵⁾、菌核からの浸出液により影響される⁷⁾とされているが、上の結果から明らかのように同じ *R. solani* であっても菌株が異なるとその菌核に増殖する微生物の数や質に異なるものがある。

F-15の菌核はB-5の菌核と比較し、土壌中で発芽能力がすみやかに低下し、休止状態となり、その生存期間も短い¹⁵⁾。その原因として、両菌株の菌核で増殖する抗菌性微生物数のちがいが想定される。土壌に埋めたF-15、B-5の菌核から分離される微生物のうち、培地上

で両菌株に対し強い抗菌力を示すものは、糸状菌の中に最も多く、細菌、放線菌には比較的少なく、この相対的關係は両菌株間で同じである。また、F-15、B-5 菌株の間で菌核から分離される微生物のうち、両菌株に対し、抗菌性をもつものの割合に著しい差は認められない。土壤中の白絹病菌の菌核の発芽力は、その周辺に発育する微生物の拮抗作用により左右されるとされるが⁸⁾、*R. solani* の場合、強い抗菌力を示す細菌、放線菌、糸状菌を菌核に接種すると、菌核を死滅させるものは、*Trichoderma sp.* のみであり、それにより受ける影響も *R. solani* の菌株により異なる。F-15 の菌核構成細胞は *Trichoderma sp.* の侵入をうけるものが多く、菌核はすみやかに死滅する。多くの植物病原菌の菌核が、*Trichoderma* 属菌の侵入を受け、それにより菌核の生存期間が短くなるとされている^{1),12),16)}。*Trichoderma* 属菌は土壤中で分生孢子や厚膜孢子の形で存在し²⁾、土壤の静菌作用により発芽が抑制された状態で生存している^{11),17)}ので、菌核の表面で発芽増殖することが必要となる。このことについて、菌核から分離した *Trichoderma sp.* の分生孢子が菌核を埋めた土壤表面で発芽が促進され、その傾向は F-15 の菌核を埋めた土壤で著しいことが明らかになった。また、F-15 の菌核の上の *Trichoderma sp.* の孢子形成は、B-5 の菌核と比較し、極めて旺盛である。さらに、土壤中の菌核のうち、*Trichoderma sp.* の侵入をうけた細胞数も、F-15 菌核の方が多い。これらのことから、F-15 菌核が B-5 菌核より、土壤中で生存期間の短い原因の一つとして、*Trichoderma sp.* がその表面ですみやかに生育し、容易に侵入するためと考えられる。

土壤中の菌核の上で増殖する微生物の数は、菌核の分泌液や土壤に加えた有機物の種類により異なるとされ、また、そのうち抗菌性をもつものの割合や抗菌力の程度も異なり、これらの作用により菌核の発芽が抑制されるとされている^{7),8)}。本実験では *R. solani* の菌株により、土壤中の菌核の微生物の数が異なることを指摘した。このように菌核の上の微生物相のちがうことは、これら微生物の *Trichoderma* 属菌に対する拮抗の程度が異なり、それによって *Trichoderma* 属菌の侵入が F-15、B-5 の菌核で異なることも考えられる。しかしながら両菌株の菌核から分離される微生物の間で *Trichoderma sp.* に対する抗菌性微生物数の割合に著しい差は認められず、菌核上の微生物が *Trichoderma sp.* に拮抗し、その侵入を妨げ、その結果菌核の生存に対し、保護的役割をもつとは考え難い。これまでの *in vitro*

における実験から、*Trichoderma sp.* は菌核細胞への侵入菌として重要であるが、実際土壤中の菌核でこの菌の侵入をうける細胞は非常に少なく、1年後でも 7.2~13% 程度にすぎない。このことから、土壤中における *R. solani* の菌核の死滅を *Trichoderma* 属菌の侵入のみでは説明し難く、さらに他の要因についても検討を必要とする。

摘 要

1. 土壤中の生存期間が異なる *R. solani* の 2 菌株 (F-15、B-5) の菌核を土壤に埋めたとき、そこに生育する微生物と、それら微生物の菌核の発芽と生存におよぼす影響について比較検討した。

2. 土壤に *R. solani* の菌核を入れると、各種微生物が菌核上に急速に増殖するが、その増加傾向は菌株により異なる。土壤中の菌核からはクリスタル紫耐性細菌、すなわち、グラム陰性細菌が多く分離される。菌核の放線菌、糸状菌相は菌株により異なるが、土壤の微生物相よりも単純である。菌核から分離される糸状菌のうち、F-15 では *Trichoderma sp.* が最も多く、B-5 では *Penicillium sp.* が最も多い。

3. F-15、B-5 両菌核から分離される細菌、放線菌、および糸状菌のうち、*R. solani* に抗菌性を示すものは、糸状菌の中に最も多く、細菌、放線菌では少ない。また、これら微生物のうち、抗菌性をもつものの割合は菌株間で著しい差異は認められない。しかし、*R. solani* の菌核の上には周囲の土壤よりも抗菌性をもつものがや多い。

4. F-15、B-5 の菌核から分離される抗菌性の強い細菌、放線菌、糸状菌はそれぞれ同じ性質のものである。しかし、これらは土壤から分離される抗菌性微生物とは異なっており、土壤から分離される抗菌性微生物の種類は多い。抗菌性糸状菌のうち、分離される割合は *Trichoderma sp.* が最も高い。

5. 強い抗菌力を示す細菌、放線菌、糸状菌を両菌株の菌核に接種した場合、菌核を死滅させるものは *Trichoderma sp.* のみであり、とくに F-15 の菌核はすみやかに死滅し、菌核構成細胞内に *Trichoderma sp.* の菌糸が侵入し、そこに孢子を形成するのが観察された。

6. 菌核から分離される *Trichoderma sp.* の分生孢子は菌核を埋めた土壤表面で発芽が促進される。その発芽率は F-15 の菌核を埋めた土壤で著しく高い。また、F-15 の菌核の上には、B-5 の菌核と比較し、*Trichoderma sp.* の孢子が多数形成される。

7. F-15, B-5 の菌核から分離される微生物のうち, *Trichoderma sp.* に対する抗菌性微生物数の割合に著しい差は認められない。このことから, 菌核で増殖する微生物が, *Trichoderma sp.* の菌核侵入に対し, 拮抗的役割を果すとは考え難い。

8. これら *in vitro* における実験結果から, F-15 菌核が B-5 菌核より土壌中の生存期間が短い原因の一つとして, *Trichoderma sp.* などの抗菌性微生物に対する耐性が弱いことが考えられる。しかし, 実際土壌中の菌核で *Trichoderma sp.* の侵入をうける細胞が少ないことから, *R. solani* の菌核の死滅を *Trichoderma sp.* の侵入のみでは説明できない。

引用文献

- 1) ALUKO, M. O., and T. F. HERING. (1970): Trans. Brit. mycol. Soc., **55**: 173-179.
- 2) CALDWELL, R. (1958): Nature (London), **181**: 1144-1145.
- 3) CAMPBELL, W. A. (1947): Mycologia, **39**: 190-195.
- 4) CURL, E. A., and J. D. HANSEN. (1964): Plant Dis. Repr., **48**: 446-450.
- 5) FEGUSON, J. (1953): Phytopathology, **43**: 471 (Abst.).
- 6) GARRETT, S. D. (1956): Biology of root-infecting fungi. pp. 293. Cambridge University Press, London and New York.
- 7) GILBERT, R. G., and R. G. LINDERMAN (1971): Can. J. Microbiol., **17**: 557-562.
- 8) HENIS, Y., and I. CHET (1968): Phytopathology, **58**: 209-211.
- 9) HERZOG, W., and H. WARTENBERG (1960): Ber. deutsch. Bot. Ges., **73**: 345-348.
- 10) JOHNSON, L. F., E. A. CURL, J. H. BOND, and H. A. FRIBOURG (1959): Methods for studying soil microflora-plant disease relationships. pp. 178. Burgess publishing Company, Minneapolis.
- 11) KO, W. H., and J. L. LOCKWOOD (1967): Phytopathology, **57**: 894-901.
- 12) MAKKONEN, R., and O. POHJAKALLIO (1960): Acta. Agr. Scand., **10**: 105-126.
- 13) MENZIES, J. D. (1963): Botan. Rev., **29**: 79-122.
- 14) MOUBASHER, A. H., M. A. ELNAGY, and S. E. MEGALA (1970): Plant and soil, **33**: 305-312.
- 15) 内記 隆・宇井格生 (1969): 北大農邦文紀要 **6** (4): 430-436.
- 16) 西門義一・渡辺清志 (1955): 農学研究 **43** (2): 103-112.
- 17) SMITH, P. L. (1967): Diss. Abstr., **27** (7): 2458-2459.
- 18) TRIBE, H. T. (1957): Trans. Brit. mycol. Soc., **40**: 489-499.
- 19) 常田昭彦 (1971): 北海道大学大学院農学研究科修士論文 pp. 68.
- 20) 宇井格生 (1966): 日植病報 **32** (4): 203-209.
- 21) ——— (1968): 坂本教授還暦記念論文集 259-267.
- 22) ———・三井 康・原田幸雄 (1963): 日植病報 **28**: 270-279.
- 23) WAKSMAN, S. (1961): The actinomycetes Vol. 2, Classification, identification and descriptions of genera and species. pp. 363. Baltimore, The Williams and Wilkins Company.
- 24) 渡辺文吉郎・松田 明 (1966): 指定試験 (病虫害) 第7号: 1-131. 茨城県農業試験場.

Résumé

The microorganisms associated with the sclerotia of *Rhizoctonia solani* KÜHN incubated in unsterilized soil and their antagonistic action to the fungus were studied by comparing two different isolates, i. e. F-15 and B-5. The longevity of the former sclerotia in the soil was shorter than the latter.

Characteristic microflora developed on the sclerotia in soil, and the number of microorganisms on the sclerotia increased with the incubation up to 10-30 days in soil. The ratio of dye-tolerant gram-negative bacteria to the total number was consistently higher on the sclerotia of both isolates than in soil. The actinomycetes isolated from sclerotia were different in their tyrosinase activities and morphological characters of aerial mycelium in both isolates. The most prevalent fungi on the sclerotia of F-15 was *Trichoderma*, while those of B-5 was *Penicillium* followed by *Trichoderma*. Other fungi such as *Fusarium*, *Mortierella*, *Cephalosporium*, *Mucor*, and *Rhizopus* were also isolated from the sclerotia and the soil.

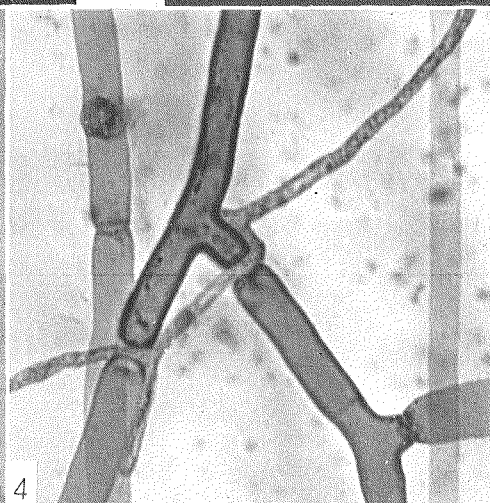
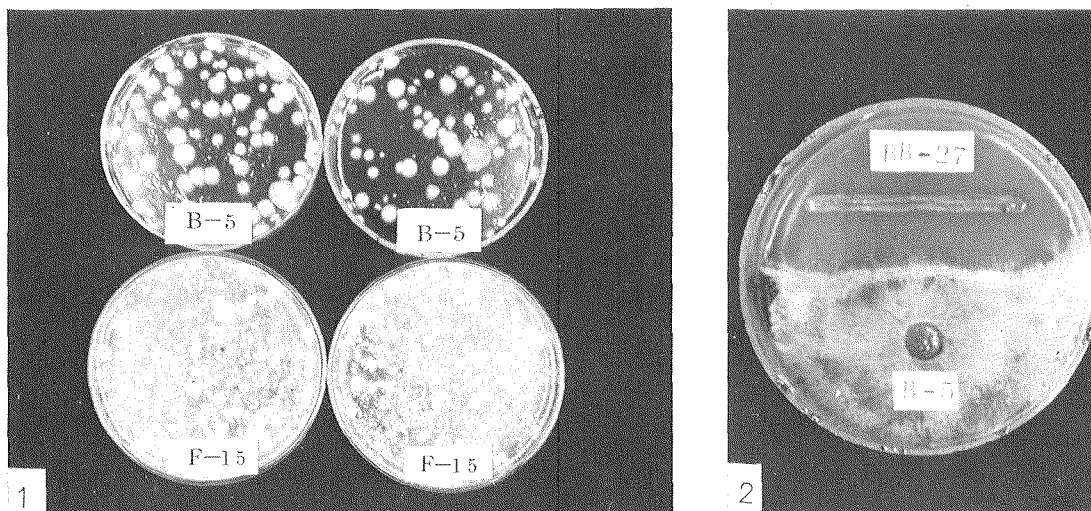
The antagonistic action to *R. solani* was examined on agar plates with the microorganisms obtained from the sclerotia and the soil. Among these, the strongest inhibition of mycelial growth of the fungus was observed in the gram-negative rods which produced yellow pigment and they were found consistently associated with the sclerotia of both isolates. Though various bacteria including the above mentioned ones and actinomycetes suppressed

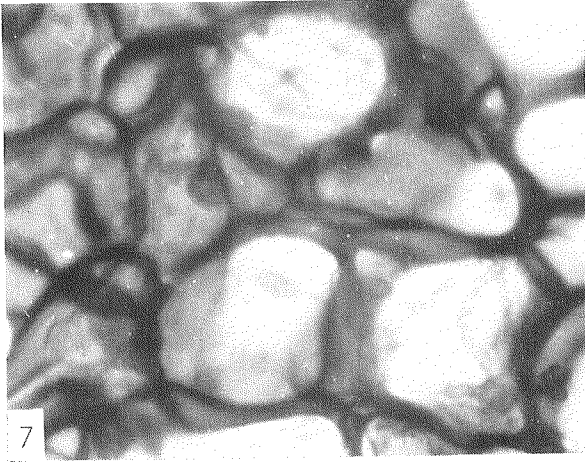
the hyphal growth of the fungus on agar plates, they hardly inhibited the germination of the sclerotia. *Trichoderma* obtained from sclerotia did not suppress the hyphal growth, however they were found to be parasites of *R. solani* and inhibited the germination of sclerotia which were inoculated with the conidia of *Trichoderma*. Such sclerotia

were invaded and the conidia of the fungus were produced inside the invaded cells of sclerotia and on the surface of F-15, abundantly. The invasion by *Trichoderma* occurred in the sclerotia incubated in unsterilized soil, though this was not as frequent as in the inoculated ones. The percentage of invaded cells in those of F-15 was higher than B-5.

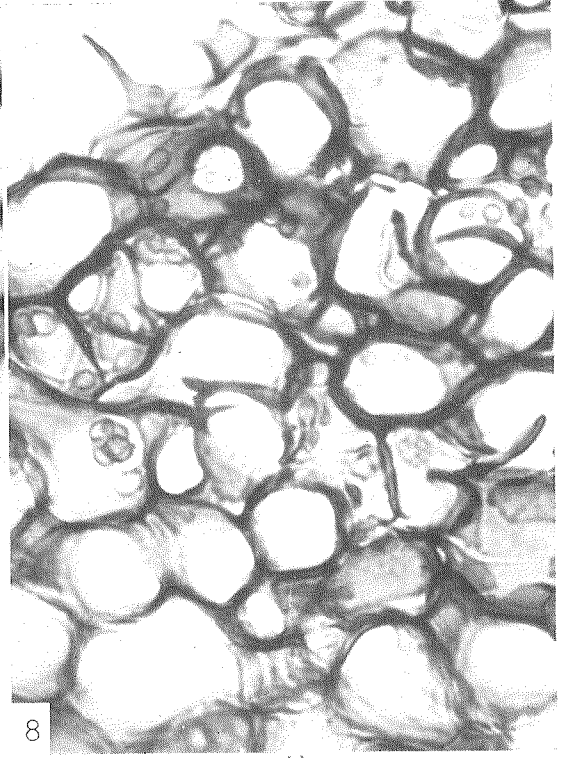
図版説明

- 図版 I**
1. *R. solani* F-15 と B-5 の菌核の糸状菌 (希釈平板法による比較)
 2. 土壌に埋めた菌核から分離された抗菌性細菌
 - 3~4. *Trichoderma sp.* 1 菌株の *R. solani* F-15 の菌糸への寄生
 - 5~6. *Trichoderma sp.* 1 菌株の *R. solani* B-5 の菌糸への寄生
- 図版 II**
- 7~8. *Trichoderma sp.* の F-15 菌株の菌核細胞内への侵入と孢子形成
 9. 菌核を埋めた土壌表面における *Trichoderma* 属菌の分子孢子発芽試験法
 10. 菌核表面における *Trichoderma sp.* の分生孢子の形成
 - 11~12. 菌核構成細胞内に侵入した *Trichoderma sp.* の分生孢子の発芽

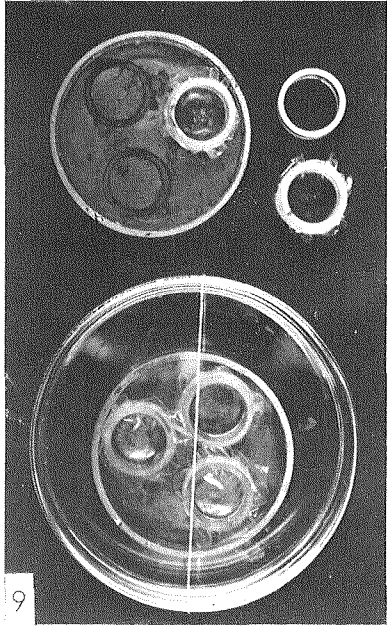




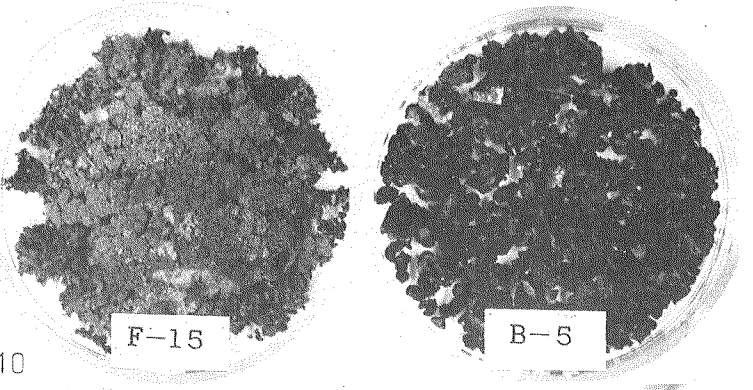
7



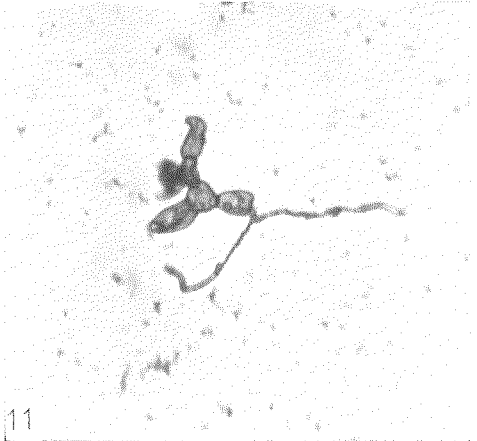
8



9



10



11



12