

土壤中における *Pythium aphanidermatum* の 遊走子の行動¹⁾

小倉 寛典・山本 好伸²⁾

(高知大学農学部)

各種作物に苗立枯病や根々され病をおこす *Pythium* は土壤浅層部で生息する多犯性の土壤生息菌である (HENDRIX and CAMBELL, 1973)。 *Pythium* は未分化型寄生菌としての性格を有し, 寄生相では幼苗期や老化期の作物を侵す場合が多く, 腐生相では新鮮な残渣や有機質上で生育するが, 基質がない場合には卵胞子や胞子のうの形で残存し, 環境の好転に伴って運動性をもつ遊走子を多量に形成し広範囲に伝搬蔓延して各作物の地際部や根部を侵害する (HENDRIX and CAMBELL, 1973; 一谷, 1981; 小倉, 1966, 1985; STANGHELLINI and HANCOCK, 1971; 宇井, 1975)。この諸性質のため *Pythium* は自然条件の下で菌数の消長が激しく, 圃場における潜在的な病害をひき起こす菌となりうる可能性がある (LUMSDEN ら, 1976)。また, *Pythium* による病害は高水分状態の土壤で発生蔓延がはげしく, その原因は遊走子の形成, 活動によるとされている (一谷, 1981)。

本報告は, *Pythium aphanidermatum* の遊走子の植物体への集合および侵入の様相を調査し, 遊走子の活性の持続ならびに遊走子が植物体に到達するまでに影響をうける土壤水分について検討した。

実験材料

1. *P. aphanidermatum* 遊走子懸濁液の準備: 供試した *P. aphanidermatum* はキュウリ苗の病患部から分離し, 当研究室に保存してある菌株記号 P 501 号菌である。供試菌株を V 8 ジュース寒天培地上に接種し, 同時に接種源から約 2 cm はなれた位置に 2.5 cm × 2 cm の滅菌したセロファン片を置き, 25 °C で培養した。6 日後, セロファン片を菌そぞごと 30 ml の殺菌蒸溜水に投入し, 4 時間後に遊走子の放出をたしかめたのちセロファンをとり出し, 遊走子懸濁液とした。

2. 土壤: 壤土および砂土を供試した。前者は当研究室所属圃場より採取し, 2 mm 以下に篩別したものをそのままあるいは風乾して供試した。後者は海岸砂を 2 mm 以下に篩別し, 塩酸により有機物などを除去したのち水洗した。また, 土壤の代りにガラス球(径 1 mm)を供試した。

3. 供試植物: 大部分の実験はキュウリ(四葉)を用いたが, その他に, トマト(福寿 2 号), スイカ(天竜 2 号), ピーマン(西洋早生), エンドウ(うすい), エンバクも供試した。各種子を 0.1 % 昇汞 30 % アルコール水溶液で 30 秒殺菌後水洗し, 25 °C で催芽し, 殺菌した砂土を入れた 200 ml 容ビーカーもしくは径 8 cm の鉢に播種して 25 °C の陽光恒温器に置いた。土壤水分を 40 ~ 50 % (v/v) に調整し, 各植物の第 1 本葉が現われる時点で実験に供した。

1) Behavior of zoospores of *Pythium aphanidermatum* in soil.

By Hirosuke OGURA and Yoshinobu YAMAMOTO

現在 日本農薬株式会社生物研究所

Proc. Assoc. Protec. Shikoku, No. 20 : 11 ~ 18 (1985).

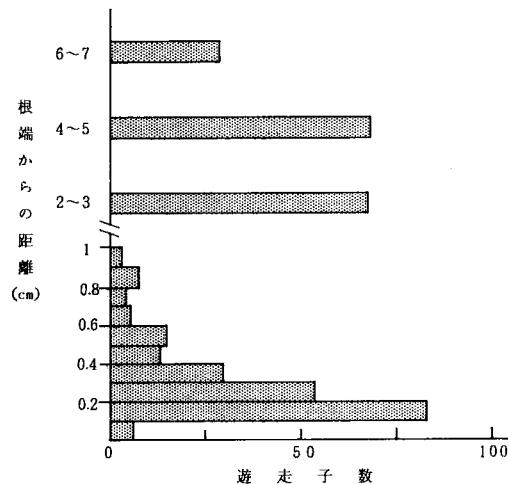
実験方法および結果

1. *P. aphanidermatum* 遊走子の植物根への集合

キュウリ幼苗を 30 ml の遊走子懸濁液 (5×10^4 遊走子/ ml) に 1 時間 25°C で静置したのち、根面上の遊走子を検鏡した。

キュウリの根への遊走子の集合は浸漬後 30 分以内に始まるが、1 時間後には幼若な組織、とくに根端部に強い誘引が見られた(第 1 図)。また、検鏡の結果では遊走子は側根基部、付傷部、地際部などにも多くの集合が認められた。

キュウリの根への遊走子の集合を経時的に観察するために、 200 ml の土壌を入れたビーカーにキュウリを植え、 50 ml の遊走子懸濁液を加えて 25°C に静置し、72 時間まで根面の遊走子を観察した。所定の時間後抜取った根を、主根は 15 cm まで、側根は 10 cm まで 1 cm ごとに切断し、 1250 ppm のペントレックス水溶液に浸したのちコーンミール寒天培地上に置き、 25°C で 24 時間培養後本菌の出現する根片の数で集合の頻度とした。供試根は 10 本である。



第 1 図 キュウリ根への *P. aphanidermatum* の遊走子の集合(処理 1 時間後)

第 1 表 *P. aphanidermatum* の遊走子のキュウリの根への集合

根端からの距離 (cm)	遊走子の集合した根片数 *											
	主 根						側 根					
	3 時間	6	12	24	48	72	3 時間	6	12	24	48	72
1	4	6.5	7.5	9	10	10	7	8	8	9	9	9
2	1.5	4	6	5.5	7	8	5	4	4	5	7	7.5
3	6	4	6	8	6	10	5	5	6	7	5	8.5
4	4	5	7	7	7	7	4	4	6	5	5	7
5	4.5	7	7	8	8	7	5	3	4	5	4	6.5
6	4	7	7	6.5	7	7	1	2	3	4	3	5
7	6	6.5	6	6	7	7	1	0	2	5	1	2
8	4	5.5	5	5	9	5	0	0	1	3	1	0
9	2	3.5	5	4	7	7	0	0	1	2	0	0
10	2.5	5.5	4.5	3.5	8	10	0	0	0	1	0	0
11	4	4	4	3.5	2	10						
12	4	1	2	2	2	7						
13	0	0	1.5	2	2	2						
14	0	0	1	1	0	0						
15	0	0	0	0	0	0						

* 10 根片中の該当根片

3時間後には主根にはすでに根端から10cmあたりまで遊走子の集合が見られ、その数は経時的に増加するとともに集合域も拡大した。側根では3時間後には根端から5cmあたりまでは主根と同じ程度の頻度で遊走子は集まつた。その後12時間をする頃から集合域は拡大したが、集合の頻度は根端から5cm以内で大であった(第1表)。

2. *P. aphanidermatum* の遊走子に由来する菌糸の植物根への侵入

キュウリを生育させたビーカーに50mlの遊走子懸濁液を加え、25℃に静置して経時に72時間まで根への侵入を調査した。所定の時間ごとに抜き取った根は2%アンチホルミンで表面殺菌し、前記と同様の方法で本菌の出現する根片数で頻度を表わした。また、スイカ、トマト、ピーマン、エンバク、エンドウについては72時間後の本菌の各作物の根への集合および根の侵害の程度を調査し、併せて径8cmの鉢に50mlの遊走子懸濁液を加えることにより10日後に生じた各作物の罹病の程度を調査した。被害の程度は、0：健全、1：根の1部が変色、2：半数以上の根に変色、3：枯死、の4段階とした。さらに変色部分を任意にとり出して培地上で培養し、病原菌の有無を確認した。

接種3時間後には菌糸の侵入が地際部に認められた。この地際部への侵入の様相は主根長が15cmを越えるため第2表には示していない。この時期には根端部あるいは5、10cmの位置に一部の被のう胞子の発芽による侵害が認められた。24時間以降各部位の侵害は多くなり、72時間後には根端から10cmまでのあらゆる部位に侵入が認められた。しかし、地際部での侵入は各部位を上廻っていた。側根では、6時間後には根端部近辺で侵入がはじまり、この傾向は時間の経過とともに大きくなつたが、被害の部位のほとんどは根端から5cm程度に限定されていた(第2表)。各時期の根面を検鏡すると、1時間後に観察された被のう胞子は3時間後には発芽し、一部は表皮細胞の縫合部より侵入しはじめていた。12時間後には菌糸は皮層内に認められ、経時に菌糸は増加し、48時間では根内菌糸は再び根面に現われた。72時間では組織の一部に卵胞子が認められた。

第2表 *P. aphanidermatum* の遊走子に由来する菌糸のキュウリ根への侵入

根端からの 距離(cm)	侵害された根片の数*											
	主 根					側 根						
	3時間	6	12	24	48	72	3時間	6	12	24	48	72
1	1	0	0	2	3	5	0	2	2	3	5	9
2	1	3	0	0	0	3	0	1	1	0	0	7
3	0	3	3	0	3	0	0	1	0	1	1	6
4	0	0	0	0	0	2	0	0.5	1	3	4	2
5	0	0	0	0	0	2	0	0.5	1	1	1	1
6	2	0	0	2	3	0	0	0.5	0	3	2	1
7	2	0	0	2	6	5	0	0	0	0	2	0
8	0	0	0	0	7	6	0	0	0	0	0	0
9	0	0	2	0	5	6	0	0	0	0	0	1
10	1	3	6	6	2	0	0	0	0	0	0	0
11	4	0	0	6	4	0						
12	1	0	1	4	0	0						
13	1	0	0	0	0	0						
14	0	0	0	0	0	0						
15	0	0	0	0	0	0						

* 10根片中の該当根片

各作物の *P. aphanidermatum* による被害はウリ科作物で大きいが、作物により罹病指数や立枯率はまちまちであった。遊走子はいずれの作物の根にも集まるが、侵入ならびにそれに続く発病は必ずしも遊走子の集合の程度と相関を示さなかった。各作物の根の組織内の菌糸は検鏡していないが、質的な罹病の程度にはかなりの差があり、その結果、各作物の立枯率は異なると思われる（第3表）。

第3表 *P. aphanidermatum* の遊走子による各作物の被害

供試植物	遊走子の集合	菌糸の侵入	罹病指数	立枯率
キュウリ	7.8 * a	6.0 * b	80.9 * c	42.8 * d
スイカ	6.5	5.6	61.9	30.7
トマト	6.3	5.4	57.7	20.0
ピーマン	6.3	4.6	40.4	0
エンドウ	6.6	5.7	61.9	6.6
エンバク	6.0	5.8	66.6	20.0

* a 接種 72 時間、10 個体当たりの平均出現個体数

* b 同上の菌糸侵入平均個体数

* c 罹病指標 0：健全、1：根の一部変色、2：半数以上の根に変色、3：枯死

$$0 \times n_0 + 1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3 \quad \times 100$$

$$\text{発芽数} (n_0 + n_1 + n_2 + n_3) \times 3$$

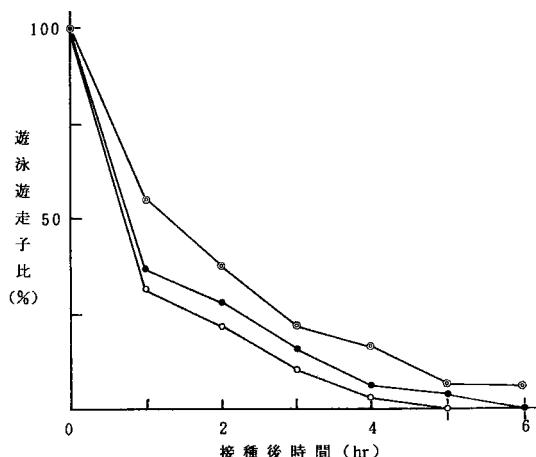
* d (立枯苗数 / 発芽数) × 100

3. *P. aphanidermatum* の遊走子の運動性ならびに活性の維持

土壤 10 ml を径 18 mm の試験管に入れ、アルミホイルで封をした。その一部は乾熱滅菌した。対照として砂も同じく処理した。全試験管を 25 °C に保ち、遊走子懸濁液 ($7 \times 10^4 / ml$) を 5 ml ずつ加え、1 時間ごとに一部の試験管をとり出して滅菌蒸留水 5 ml を加え、しばらく静置した。上澄液をとり出して遊泳する遊走子を計数した。

無殺菌土壤中では遊走子は急速に運動性を失ない、1 時間後には約 $2/3$ が運動を停止した。4 時間後にはほとんどの遊走子は運動性を失なった。殺菌土壤中では停止の程度は無殺菌土壤に比べてやや少ないが 4 時間後にはほとんどの遊走子が停止した。砂においても同じ傾向を示したが、その停止の程度は緩慢で、6 時間後にも少数のものは運動を持続した（第2図）。

遊走子の運動は土壤水分と関係があるといわれているので、乾湿の程度と運動性の維持について調査した。土壤の構成を一様にするために、土壤



第2図 土壤中における遊走子の運動性

○—○ 無殺菌壤土、●—●殺菌壤土、
◎—◎ 殺菌砂

の代りに径1mmのガラス球を用いた。他は上記の実験と同様である。遊走子懸濁液2mℓ(7×10^4 /mℓ)を加えたのち、懸濁液も含めて土壤水分が最大容水量の0-15%, 30-45%, 60-75%, 90-100%, 120%(v/v)になるように殺菌蒸溜水を加え、1時間ごとに遊走子の運動性を調査した。調査時に加える水は処理時に加えた水と併せて全量で10mℓになるようにした。

遊走子は乾燥状態では1時間以内に運動性を失なったが、60%以上の土壤水分の下では3時間後にも50%近くが運動性を維持し、過湿状態では6時間後でも10%以上のものが運動性を持続していた(第3図)。

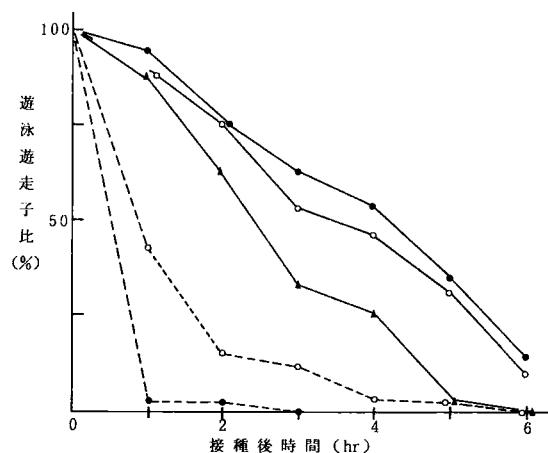
遊走子は土壤中で運動を停止し被のう化する。この被のう遊走子の生存期間を知るためにつきの実験を行った。殺菌あるいは無殺菌土壤をそれぞれ100mℓずつ腰高シャーレに入れ、遊走子懸濁液(1×10^5 /mℓ)35mℓを加え、土壤水分を最大容水量の75-90%になるように調整し、25℃で静置した。処理後20日間にわたり、少量の土壤を取り出し殺菌蒸溜水で懸濁し、コーンミール寒天培地を薄くひいたスライドグラス上に滴下拡散した。スライドグラスを25℃の温室に6時間保ち、被のう遊走子の発芽を観察した。

被のう遊走子の土壤中の分布は不均一で調査試料ごとの変動が大きいが、その平均値を第4図に示した。調査初期の変動はことに大きいが、土壤中の被のう遊走子は急激に活性を失ない処理1, 2日以内に $\frac{2}{3}$ が消滅した。その後10日頃までは活性を徐々に失なったが、15日以降は生存し得なかった。この傾向は土壤の殺菌の有無に関係なく認められた。

考 察

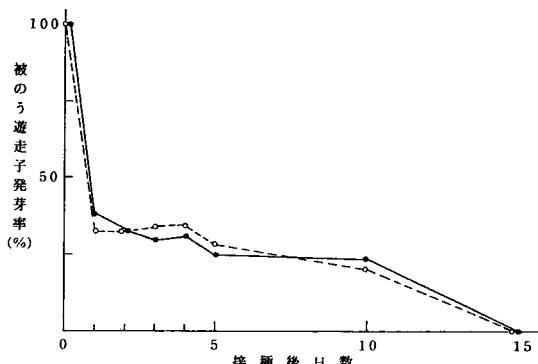
P. aphanidermatum の生活は他の競合微生物の存在しない、あるいは影響を受けることの少ない場所に限定される。それ故、この菌の動向は腐生的生存の持続よりも耐久体の残存と短時日の間に宿主に到達し侵入する遊走子の行動が重要視される(HENDRIX and CAMPBELL, 1973: 小倉, 1985: STANGHELLINI and BURR, 1973)。

遊走子の植物根への集合について、KIMら(1974)



第3図 遊走子の運動性と土壤水分との関係

- 含水量 120 %,
- 90 ~ 100 %,
- ▲—▲ 60 ~ 75 %,
- 30 ~ 45 %,
- 0 ~ 15 %



第4図 土壤中の被のう遊走子の活性の維持

- 殺菌土壤,
- 無殺菌土壤

はインゲンで、KRAFTら(1967)はベントグラスで、SPENCER and COOPER(1967)はワタでそれ観察し、本報告と同様に根端部(根冠後方の伸長部)や付傷部が多く集ると報告している。遊走子の集合は接種後30分以内に始まるが、1時間後には主根の根端部や側根分岐部に多く見られる。側根では主に根端部に集まるが、主根よりもやや遅れるようである(第1図、第1表)。遊走子が供試した多くの作物根に集まることは、本菌の走化性が宿主からの誘引物質により生じるとしても(鈴木・高橋、1978)，その物質は植物にかなり普遍的に存在する物質であろうと思われる。KRAFT and ROBERTS(1969)は遊走子が走化性により宿主への着生部位を撰択することは遊走子と宿主根の偶然の会合に幾分かの有利性をもたらすと述べている。

遊走子による植物根への侵入は地際部、根端部、付傷部が多く、いずれも遊走子が多く集まる部位である(第2表)。CUNNINGHAM and HAGEDORN(1962)は*Aphanomyces euteichus*の侵入の難易は遊走子の集合量により決まり、多数の遊走子の集合はその部分に組織の壊死が起ると報告している。侵入は3時間頃から始まるが、1日あるいは2日後に寄主組織は崩壊しはじめ、3日後には次期伝搬の胞子が形成されはじめめる。侵入が被のう遊走子量と相関があるとしても、顕微鏡観察によれば、時として発芽した被のう遊走子群が侵入菌糸群となり得ず根面から剥落する場合が認められる。また、KRAFTら(1967)は遊走子による根毛感染をあげているが、本実験の検鏡の結果では、まれに1遊走子の根毛上での被のうを認める程度で、侵入の主流をなすとは認め難い。各作物根の遊走子の誘引、発芽した菌糸の侵入については詳しく観察していないが、ほぼ類似した傾向が認められる。しかし、病徵の発現や立枯の程度にはかなりの差を生じることは、侵入後の菌糸と植物組織との間の競合によるものと思われる(第3表)。

DUKES and APPLE(1962)は遊走子の運動期間と病原性との間には正の相関があるとし、DUNIWAY(1976)は土壤のmatric potentialが増大すると遊走子の運動性は低下すると報告した。遊走子は土壤中では数時間で運動を停止し、一部は被のう化してしばらくは活性を維持する。土壤孔隙の多い砂土は壤土よりも遊走子の運動性を持続するのに有利であるが、土壤微生物の存在の有無は運動性にはほとんど関係しない。また、土壤水分とくに自由水の存在は遊走子の運動性にきわめて有利な条件である。この場合、遊走子は6時間を越えてもなお活性を維持している(第2、3図)。PIECZARKA and ABAWI(1978)は高水分土壤では本菌による病害がはげしいことを示したが、本報告でもキュウリの侵害が地際部ではげしいことは土壤表面水中での遊走子の運動の持続が長いことおよび競合する微生物が根系の分布する土壤中よりも土壤表面には少ないとあるいは酸素の供給が容易なことなどによると考えられる。土壤中で運動性を消失した遊走子は被のう化するが、1日後には $2/3$ が活性を失なう。実験ごとに結果はかなり異なるが、少なくとも5日後には発芽可能の被のう遊走子は全体の $1/3$ 以下になる。また、その活性の維持は被のう後10日前後まで、それ以後は発芽力は失なわれるようである(第4図)。*Phytophthora*の被のう遊走子は1週間から1ヶ月も生存する(MACDONALD and DUNIWAY, 1978)、あるいは2週間以内に消滅する(HWANG and KO, 1978)など、疫病菌についての報告は多いが、その結果はまちまちである。供試した菌株や実験環境の相違により必ずしも一定の傾向は認め難いものと思われる。また、土壤中で被のう化した遊走子が宿主を侵害する能力を何時頃まで維持するか、あるいは侵害が位置的に可能か否かについても今後検討せねばならないであろう。

要 約

*Pythium aphanidermatum*の遊走子の植物体への集合、それにつづく侵入の様相を調査し、遊走子の活性に關係する土壤水分についても検討した。

遊走子懸濁液に浸したキュウリの根の近辺の遊走子は処理30分後には根に到達しはじめ、1時間後には根冠につづく伸長部(根端部)に多く集まつた。根端より5cmまでに多く、その後方に集まる遊走子は

極度に少なかった。到達した遊走子は被のう遊走子になった。

土壤中の遊走子はキュウリの地際部、主根の根端部、側根基部、側根先端部に集りやすく、侵入も同じ場所から始まった。侵入は遊走子の到達後3～6時間のちから起った。遊走子の根への蝋集は作物の種類に関係なく起り、各作物への菌糸の侵入もほぼ同等に認められたが、発病は作物により異なった。

遊走子の土壤中での運動は砂・壤土であり、殺菌土壤は無殺菌土壤よりやや勝る程度であった。運動開始後5時間前後で殆んどの遊走子は停止した。過湿土壤とくに自由水の多い場合には遊走子は6時間をすぎても未だ遊泳した。しかし、土壤中で被のうした遊走子は1日後にはその $\frac{2}{3}$ が発芽力を失ない、10日をすぎるとほとんどの被のう遊走子も活性を失なった。

引　用　文　獻

- CUNNINGHAM, J. L. and D. J. HAGEDORN (1962) : Penetration and infection of pea roots by zoospores of *Aphanomyces euteichus*. *Phytopathology*, 52 : 827 - 834.
- DUKES, P. D. and J. L. APPLE (1962) : Relationship of zoospore production potential and zoospore motility with virulence in *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Phytopathology*, 52 : 191 - 193.
- DUNIWAY, J. M. (1976) : Movement of zoospores of *Phytophthora cryptogea* in soil of various texture and matric potentials. *Phytopathology*, 66 : 877 - 882.
- HENDRIX, F. F. and W. A. CAMPBELL (1973) : *Pythium* as plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopath.*, 11 : 77 - 89.
- HWANG, S. C. and W. H. KO (1978) : Biology of chlamydospores, sporangia and zoospores of *Phytophthora cinnamomi* in soil. *Phytopathology*, 68 : 726 - 731.
- 一谷多喜郎(1981) : ピシウム病研究の課題. 第10回土壤伝染病談話会講演要旨集 : 88 - 97.
- KIM, S. H., J. G. KANTZES and L. O. WEAVER (1974) : Infection of aboveground parts of bean by *Pythium aphanidermatum*. *Phytopathology*, 64 : 373 - 380.
- KRAFT, J. M., R. M. ENDO and D. C. ERWIN (1967) : Infection of primary roots of bentgrass by zoospores of *Pythium aphanidermatum*. *Phytopathology*, 57 : 86 - 90.
- KRAFT, J. M. and D. D. ROBERTS (1969) : Influence of soil water and temperature on the pea root rot complex caused by *Pythium ultimum* and *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. *Phytopathology*, 59 : 149 - 152.
- LUMSDEN, R. D., W. A. AYERS, P. B. ADAMS, R. L. DOW, J. A. LEWIS, G. C. PAPAVIZAS and J. G. KANTZES (1976) : Ecology and epidemiology of *Pythium* species in field soil. *Phytopathology*, 66 : 1203 - 1209.
- MACDONALD, J. D. and J. M. DUNIWAY (1978) : Influence of soil texture and temperature on the motility of *Phytophthora cryptogea* and *P. megasperma* zoospores. *Phytopathology*, 68 : 1627 - 1630.
- 小倉寛典(1966) : 土壤病原菌の腐生生活に関する研究, 日植病報, 29 : 155 - 161.
- 小倉寛典(1985) : *Pythium ultimum* の卵胞子の発芽とそれに起因する病害発生の様相. 高知大学研報., 33(農学) : 71 - 81.
- PIECZARKA, D. J. and G. S. ABAWI (1978) : Influence of soil water potential and temperature on severity of *Pythium* root rot of snap beans. *Phytopathology*, 68 : 766 - 772.
- SPENCER, J. A. and W. E. COOPER (1967) : Pathogenesis of cotton by *Pythium* species zoospore and mycelial attraction and infectivity. *Phytopathology*, 57 : 1332 - 1338.

- STANGHELLINI, M. E. and J. G. HANCOCK (1971) : The sporangium of *Pythium ultimum* as a survival structure in soil. *Phytopathology*, 61 : 157 - 164.
- STANGHELLINI, M. E. and T. J. BURR (1973) : Germination in vitro of *Pythium aphanidermatum* oospores and sporagia. *Phytopathology*, 63 : 1493 - 1496.
- 鈴木公雄・高橋 実(1978) : キュウリ根分泌物中に含まれる *Pythium aphanidermatum* 遊走子に対する走化性物質. *日植病報.*, 44 : 241 - 246.
- 宇井格生(1975) : 糸状菌と高等植物の相互関係 - 土壤伝染性植物病原菌を中心として. 微生物の生態 2. 87 - 103. 微生物生態研究会編, 東京.

Summary

In the present paper the behavior of zoospores of *Pythium aphanidermatum* around host plant was studied.

The zoospores began to arrive at host root at 30 minutes after submerging it in zoospore suspension, and then they turned to encysted spores on the root surface. After one hour a number of zoospores gathered on the roots of elongated part near root cap or basal parts of naturally wounded lateral root. The zoospores in soil gathered also on the roots near tip and crown or with naturally wounded ones, and then mycelia from encysted zoospores begun to penetrate into the root epidermis three to six hours after at the place where they encysted.

Gathering of zoospores onto roots occurred with no relation to species of crop and penetration into each crop by mycelia emerged from zoospores seemed to occur easily, though a little differences were observed among the crops. But development of mycelia into root tissues is different for every crop.

Movement of zoospores were more vigorous in sand than in loam, and was slightly active in sterile soil than in non sterile one. The zoospores in soil with normal humid condition mostly lost their activities within five hours or so and some of them encysted, though they lost their activities within one hour without encysting in extremely dried soil. Some of them however had activities to spare of their movement for six hours or more in over-wet soil, especially in the soil containing enough free water. One third of the encysted zoospores in soil lost their germinability after one day and all of them lost by fifteen days.