

蛍光顕微鏡による土壌病原菌と *Trichoderma* 菌との拮抗現象ならびに根面侵入の観察

松本 卓生・孫工弥寿雄・中嶋 大地 (エーザイ生科研株式会社研究開発部)

Fluorescent microscopic observations of antagonism of *Trichoderma* sp. to soil-borne pathogens and of the rhizosurface penetrated by those pathogens.
Takuo MATSUMOTO, Yasuo SONKU and Daichi NAKAZIMA (Eisai Seikaken, Co., Ltd., Nishihara-mura, Aso-gun, Kumamoto 861-24)

筆者等は前報⁹⁾において「*Trichoderma* 菌の拮抗性能と病害防除効果」について報告した。今回は蛍光色素 calcofluor white (略称 CFW : カヤホール FB コンク) で染色した病原菌の *Trichoderma* 菌による拮抗的形態変化、根面侵入等の観察を行ったので報告する。本研究のねらいは従来の FITC 結合抗体による特異蛍光観察が複雑な手法であるため、より簡便な手法の開発が必要と考えたこと、生菌のまま細菌や糸状菌等の形態変化や、侵入行動が簡単に観察出来ること等である。本研究にあたり、九州農業試験場微生物制御研究室長梅川学博士には蛍光顕微鏡使用について多大の便宜を賜わり厚くお礼申し上げます。

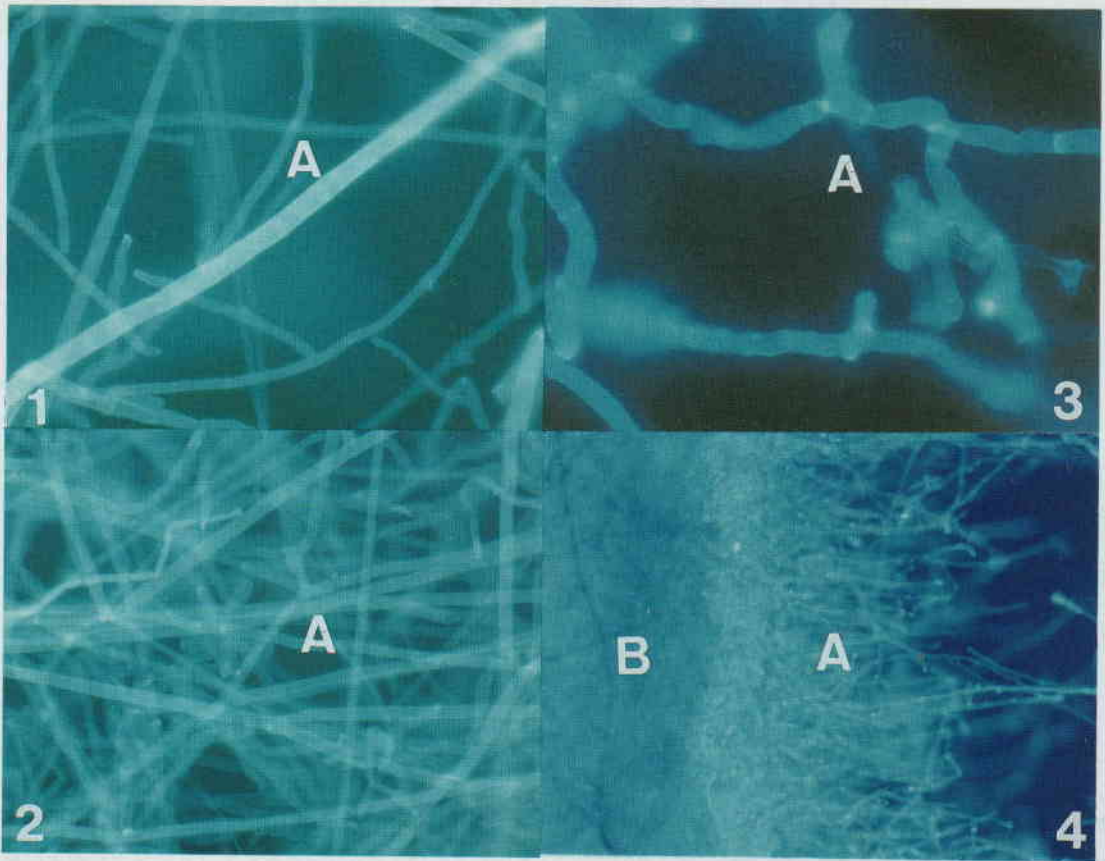
1. 蛍光色素培地に生育した土壌病原菌の培養日数と菌体蛍光輝度の差異およびその利用限界

calcofluor white (CFW) 色素を細菌のラベルに使用したのは、DARKEN^{2,3,4)} が最初であり、その後 PATON¹⁰⁾ が追試している。国内では東北大学医学部の石田ら^{5,6)} が Phagocytosis の解明に使用したのが最初のように、植物病理学の分野では久原^{7,8)} が柑橘のかいよう病に、浅賀¹⁾ がイネいもち病に使用しているが、病原体の検出に使用した例は少ない。本研究は、1%CFW (日本化薬製 : 励起348, 吸収 442nm) 含有0.85%食塩水を PSA 培地に50倍希釈となるように加えて高圧滅菌し、平板として所定の菌を培養した。観察はオリンパス蛍光顕微鏡 VANOX (AH2-FL) によりU励起法 (UG1, L420) で観察した。供試した菌は、ハウレンソウの立枯病を起こす *Pythium paroeandrum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, ダイズ白絹病菌 *Corticium rolfsii*, ウメ白紋羽病菌 *Rosellinia necatrix*, トマト青枯病菌 *Pseudomonas solanacearum* の6種類で、比較として拮抗菌 *Trichoderma viride* (T-30) を使用した。培養期間は各菌共に3~10日間とし各培養菌そのの先端部分を直径8mmのコルクボーラで打ち抜き、

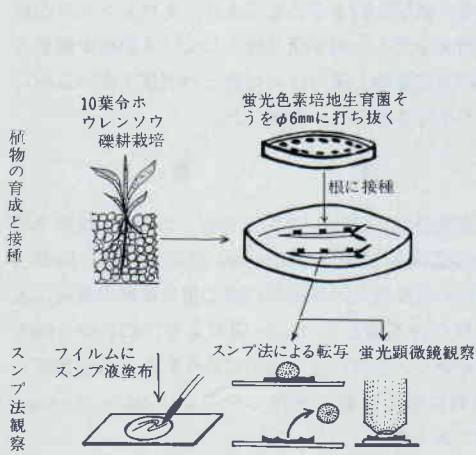
検視した。結果は第1図、第1表に示したように、*Rhizoctonia* 菌のように、培養5日以降の気中菌糸では指数5以下と低かったが、基菌糸では指数100と高く差異が認められた菌と、*Corticium* 菌のように初めから両者ともに蛍光輝度の低かった菌があった。全般に培養10日目まで蛍光を強く維持した菌は *Pythium* 菌、*Rosellinia* 菌であった。しかし、全般的にみると *Pythium* 菌を除いて各菌共に培養3日目に比べて10日目の菌その先端の菌糸の蛍光輝度はかなり落ち、根面侵入菌等の実用的な観察には培養後3~5日目までの菌その使用が良好であった。ただ、培地にペプトン2gを添加した培養10日目の菌その周辺を打ち抜いた後、再度 CFW 液に浸漬した場合は伸長した菌糸の輝度がかかなり回復した。

2. スライドガラス上の *Trichoderma* 菌と CFW で染色した土壌病原菌との対峙培養による拮抗現象の観察

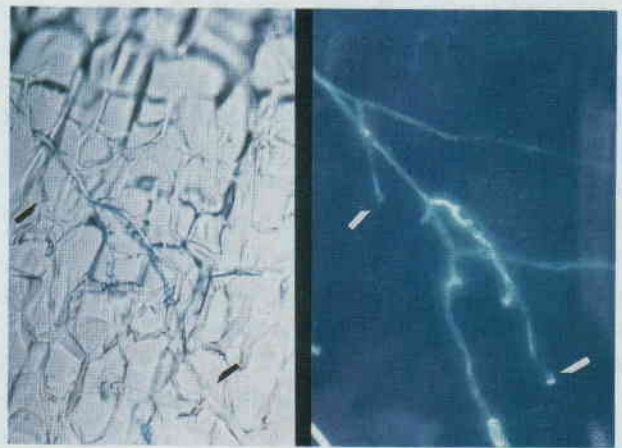
1) スライドガラス上の対峙培養による拮抗現象の観察
ろ紙とスライドガラスを入れたシャーレを殺菌後、滅菌水で湿室として、*Trichoderma* 菌 (T-30) と各菌を間隔22mmで対峙培養し、3日または7日間30°C (白紋羽病菌は25°C) で培養後、既述の方法で観察した。スライドガラス上を伸長した CFW 染色病原菌糸と *Trichoderma* 菌糸との交差部での拮抗現象は、蛍光源との混合照明により顕著に染め分けされ、前回報告時より拮抗タイプがさらに多く、かつ鮮明になった。第2表に示したように *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Fusarium*, *Corticium*, *Rosellinia* の各菌を通じて共通的な拮抗タイプ分けをすると、菌糸の変形、細胞質顆粒化、細胞壁穿孔の3タイプが観察され、前回の3タイプと合わせると合計6タイプとなり、*Trichoderma* 菌の土壌病原菌に対する衰退機構が一層鮮明となった。なお、各菌に対する特異性も観察されたが、とくに注目されたのは損傷の程度が対象菌により異なり、



第1図 蛍光色素培地で培養した菌糸の培養3日と10日目の蛍光輝度の差異
 1 培養3日目の *Pythium* 菌糸 2 培養10日目の *Pythium* 菌糸
 3 培養3日目の *Rhizoctonia* 菌糸 4 培養10日目の *Rhizoctonia* 菌糸



第2図 病原菌の根面侵入の観察法



第3図 ホウレンソウ根面での *Pythium* sp. 菌の侵入観察
 A: 普通光源での観察 B: 蛍光光源での観察
 ↑↑: 侵入部位

第1表 蛍光色素培地で培養した菌糸の培養日数と蛍光輝度の衰退

病原菌の種類	調査部位	培 養 日 数		
		3日	5日	10日
<i>Rhizoctonia solani</i>	{ 気中菌糸	80~90	<5	<5
	{ 基菌糸	100	100	95~100
<i>Pythium paroeandrum</i>	{ 気中菌糸	100	100	80~85
	{ 基菌糸	100	100	100
<i>Fusarium oxysporum</i>	{ 気中菌糸	65	65	35
	{ 基菌糸	100	100	95
<i>Corticium rolfsii</i>	{ 気中菌糸	65	30	0
	{ 基菌糸	60	20	<5
<i>Rosellinia necatrix</i>	{ 気中菌糸	100	100	75
	{ 基菌糸	100	100	95

注) 蛍光輝度を0 (暗) ~100 (明) で表示した。

第2表 *Trichoderma* 菌による各病原菌の拮抗タイプ

病原菌の種類	拮 抗 タ イ プ					
	密 着	巻き付	切 断	細胞壁穿孔	菌糸変形	細胞質顆粒化
<i>R. solani</i>	●	●	●	○	○	○
<i>P. paroeandrum</i>	○		○		○	○
<i>R. necatrix</i>			○		○	○
<i>F. oxysporum</i>			○		○	○
<i>C. rolfsii</i>			○		○	○

注) ●: 前回⁹⁾ 報告したタイプ, ○: 新たに観察されたタイプ

Rhizoctonia 菌に対する損傷が最も強く印象的であり、ついで *Pythium*, *Rosellinia*, *Fusarium*, *Corticium* の順となった。なお、培養3日目の菌糸蛍光輝度は高く、7日目は全般的に劣った。

2) *Rhizoctonia solani* に対する *Trichoderma* 菌の特異的拮抗性

今回観察されたのは、菌糸変形、細胞質顆粒化、細胞壁穿孔の3タイプで、前報の切断、巻ヒゲタイプを入れると5タイプとなり *Trichoderma* 菌の *Rhizoctonia* 菌に対する強烈な損傷加害能力と、それによる拮抗性能、各種病害の防除効果機構が鮮明となった。*Rhizoctonia* 菌糸に対する隔膜部の切断、穿孔の頻度が頗る高く、常に *Trichoderma* の菌糸が *Rhizoctonia* の菌糸に寄り添い巻ヒゲ状に密着し隔膜部を溶菌、強烈に引き裂き分裂させる状況が生々しく観察された。その後の分断された菌糸片は養分補給や増生する事なく細胞質の顆粒化凝固、死滅する傾向を示した。

3. CFW で染色した土壤病原菌接種による根面侵入の観察

根面からの土壤病原菌の侵入機構については、土壤中での観察が困難なため、その報告も S.D. GARRETT (1944) の先駆的報告以来数編を数えるにすぎない。今

回は新手法の開発を兼ね、第2図に示したように、先ず CFW で染色した *Pythium* 菌をホウレンソウの根面に接種し、27°C で3日目に開放後、スンプ法で根表面の菌糸および表皮細胞を粘着および転写した後、蛍光顕微鏡で侵入行動を観察した。

その結果、第3図に示したように、蛍光光源と普通光源の両者で観察比較することにより、ホウレンソウの根面から蛍光を発した病原菌が侵入している箇所が観察され、根の表皮細胞と菌の侵入行動との関係を調べるのに有効な手法であることが判明した。

摘 要

1) 蛍光色素 (CFW) を1%含有した PSA 培地で培養した染色菌糸の間で *Rhizoctonia* 菌のように、培養5日以降から気中菌糸と基菌糸の間で蛍光輝度の衰退に著しい差異がある菌と *Corticium* 菌のように初めから両者に差異が無く、輝度の低い菌が認められた。培養10日目まで両者共蛍光を強く維持したのは *Pythium*, *Rosellinia* の両菌であった。

2) スライドガラス上で対峙培養した *Trichoderma* 菌と CFW で染色した土壤病原菌を蛍光と普通光の混合照明により観察すると、菌糸の変形や細胞質顆粒化、細

胞壁穿孔等の差異がきわめて鮮明であり、これにより拮抗タイプも前回より3タイプが新たに観察された。

3) *Trichoderma* 菌の *Rhizoctonia* 菌に対する特異的な拮抗性は、極めて明瞭であった。すなわち、*Trichoderma* の菌糸は常に *Rhizoctonia* 菌糸に寄り添って、巻ヒゲ状に密着し、また、隔膜部の溶菌や強烈な引き裂き、細胞質の顆粒化凝固を起こし、遂には死滅する過程が観察された。

4) CFW で染色した *Pythium* 菌をホウレンソウの根面に27℃で3日間接種後、スンプ法観察した。観察は蛍光、普通光の混合により行ったところ、根面上に蛍光染色菌糸が伸長し、侵入している箇所が明瞭に観察された。

引用文献

- 1) 浅賀宏一 (1980) 北日本病虫研報 31 : 30-31.
- 2) DARKEN, M.A. (1961) Science 133 : 1704.
- 3) DARKEN, M.A. (1962) Appl. Microbiol. 10 : 387-393.
- 4) DARKEN, M.A. and SWIFT, M.E. (1963) Appl. Microbiol. 11 : 154-156.
- 5) 石田名香雄ら (1962) 臨床病理 10 : 60-66.
- 6) 石田名香雄ら (1965) 日本細菌学雑誌 20(11) : 623-626.
- 7) 久原重松 (1977, 1978) 果樹試口之津支場年報
- 8) 久原重松 (1978) 日植病報 47(1) : 113.
- 9) 松本卓生・孫工弥寿雄・中嶋大地 (1989) 九病虫研会報 35 : 16-19.
- 10) PATON, A.M. and AYRES, J.C. (1964) Nature 204 : 803.

(1990年5月10日 受領)