

土壌から分離された *Rhizoctonia solani* の異常株の諸性質

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	百町,満朗 宇井,格生
発行元	日本植物病理學會
巻/号	50巻2号
巻号補足	
掲載ページ	p. 255-262
発行年月	1984年4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



土壌から分離された *Rhizoctonia solani* の異常株の諸性質*

百町満朗**・宇井格生**

Mitsuro HYAKUMACHI** and Tadao U[†]: Properties of Diseased
Isolates of *Rhizoctonia solani* Isolated from Soil*

Abstract

Diseased isolates of *Rhizoctonia solani* (DIRS) which show abnormally slow growth in the early stage (less than half of the hyphal growth of healthy isolates during 5 days on potato dextrose agar) were isolated from the artificially inoculated sugarbeet field soil. DIRS were also obtained from the soil in the sugarbeet root-rot disease declined field. Among DIRS though the degree of disease is different, disease characteristics such as slow growth, hyphal distortion, lysis of protoplasm, thin density of hyphae in the apical part of the colony, and bad formation of sclerotia are commonly observed. Hyphal growth rate from the basal part of the colony of DIRS is better than that from the apical part of DIRS. DIRS could not be cured by incubation in the medium containing various amounts of streptomycin, ethyldibromide, chloramphenicol, or cycloheximide. Disease agent(s) of DIRS could not be transferred to healthy isolates by hyphal anastomosis, and dsRNA also could not be detected from DIRS. Pathogenicity of DIRS varies from isolate to isolate, but is rather lower than that of healthy isolates. DIRS could be obtained in any of the *R. solani* anastomosis groups preserved by routine transfers. It has been suggested that if DIRS increase in field soil, inoculum potential becomes low as their low pathogenicity and slow growth, and consequently, disease is reduced and declines.

(Received November 5, 1983)

Key Words: diseased isolate, *Rhizoctonia solani*.

緒 言

菌糸の生育が普通の菌株と比較して著しく遅い生育異常株が存在することは、植物病原菌を含む数種の菌類で知られている^{5,10,12,14)}。これら生育異常は菌株の“老化 (senescence)”¹⁴⁾、栄養死 (vegetative death)”¹⁰⁾、あるいは“病気 (disease)”¹³⁾によるとされる。とくに植物病原菌では生育異常をおこす因子を正常株に移し、その病原性を低下あるいは喪失させる試みがあり、すでにクリ胴枯病菌 (*Endothia parasitica*) では生育異常株を用いた防除も報告されている²²⁾。

Rhizoctonia solani の生育異常株は、これまで継代

移植培養²⁾、単胞子分離⁶⁾、および放射線照射¹⁸⁾によって得られている。Castanho・Butler²⁾は、継代移植培養で得た *R. solani* 菌糸融合群第1群の生育異常株を用い、“病気”の因子が菌糸融合により正常な株に移行することを実験的に明らかにし、その因子は2本鎖RNA (dsRNA) であるとしている³⁾。

これら菌類の生育異常株は、*Helminthosporium victoriae* と *Endothia parasitica* との場合を除いては、いずれも *in vitro* で得られたもので、ほ場から直接得られたものはない。

筆者らは *R. solani* 菌糸融合群第2群第2型を接種したポットの土壌にテンサイを繰り返し栽培したところ、栽培回数の増加に伴い生育異常株を多数分離した⁸⁾。また、これと培養性質の類似した生育異常株が

* 本報告の概要は、日本植物病理学会大会 (1980年4月) において発表した。本研究の一部は、文部省科学研究費補助金 (課題番号548034) によった。

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

テンサイほ場の土壌からも多数分離され、さらに *R. solani* の各菌糸融合群からも得られた。これら生育異常株の諸性質について報告する。

実験材料および方法

供試土壌 *R. solani* を分離するため、(1)テンサイを8年連作し、テンサイ根腐病の発生が衰退した網走市と本別町の両ほ場（以下それぞれ網走ほ場、本別ほ場とする）、(2) *R. solani* 菌糸融合群第2群第2型を接種しテンサイ根腐病が激発した帯広市清川町のほ場（清川ほ場とする）から採集した土壌を供試した。前二者はテンサイ収穫期（1979年10月）に根腐病に激しく罹病した株の周辺土壌¹⁵⁾ から、後者は接種後、病気がはじめて発生した年の翌春5月（1980）に激発株跡地の枯死した残存株の周辺土壌から採取したものである。なお、清川ほ場では、病原菌を接種し、根腐病が激発した跡地に、翌年テンサイを連作したが発病は極めて軽微で、病気は衰退した⁹⁾。

***R. solani* の分離** 供試菌は、アマ茎捕捉法²⁰⁾と篩別浮上法²¹⁾とにより土壌から分離した。すなわち、前者は土壌中に2日間埋没したアマ茎を、後者では土壌から回収された *R. solani* の菌核と植物残渣とを、それぞれ pH 4.5 とした 乳酸酸性素寒天培地（酸性 WA）に置き、それらから生育した *R. solani* 菌糸の先端部約 4 mm² を培地とともに切り取り、直ちに次の方法で生育の状態を調査した。

生育異常株の判定 分離した菌糸は、ジャガイモ・グルコース煎汁寒天培地（PDA）を入れた生長管（横断面 1.5 cm の正方形、長さ 20 cm）の一端に移植し、25℃ で5日間、菌糸の生長を観察した。それらのうち、菌糸の形態および生長速度が、第2群第2型の標準保存菌株と類似しているものを正常株とし、菌糸の生長開始が著しく遅く、菌糸の状態が標準株と異なり、移植5日後の菌糸の生長距離が標準株の50%以下のものを生育異常株とし、分離菌株のうちそれらの占める割合を生育異常株出現率とした。

生育異常株の形態 生育異常株を WA と PDA 平板に培養し、菌糸および菌糸の形態を観察した。

生育異常株の菌糸生長速度の測定 PDA 平板の異常株の菌糸の各箇所から、径 5 mm のコルクボーラーで寒天円盤を打ち抜き、前述の PDA を入れた生長管の一端に移植し、経時的に菌糸生長距離を測定した。

薬剤処理による生育異常株の正常株への回復

ミトコンドリア機能の阻害剤である streptomycin, ethyldiubromide, chloramphenicol, cycloheximide の濃度を異にした PDA 培地に、生育異常株を移植し、その菌糸の状態から正常株への回復の有無を判定した。

生育異常因子の正常株への移行 網走、本別および清川ほ場から分離した生育異常株と正常株をそれぞれ PDA 平板に対峙培養した。両者の菌糸が接触交叉後、所定期間ごとに異常株の菌糸が交っていない正常株の菌糸部の寒天片を切り取り、新たに PDA に移植し、その菌糸の形態を観察した。菌糸形態が生育異常株の形態と類似した場合、生育異常因子が正常株に移行したものとみなした。

生育異常株からの dsRNA の抽出 dsRNA の抽出は Castanho ら³⁾ の方法に従った。

生育異常株の病原性 各ほ場より分離した生育異常株および正常株を PDA 10 ml を容れた径 9 cm のペトリ皿にそれぞれ移植し、25℃ 15日間培養後、その上加圧殺菌土壌 80 g を加え、テンサイ種子（品種モノヒル、発芽率95%）を各ペトリ皿当たり10粒播種した。実験は3反復行い、室内で2週間栽培後テンサイ子苗の立枯率を調査し⁸⁾、病原性を調べた。

***R. solani* 各菌糸融合群の保存菌株における生育異常株の存在** PDA 斜面培地に継代培養し保存中の各菌糸融合群のうちから、任意の菌株を PDA に移植し、生育異常株の存在の有無を調べるとともに、培養上の諸性質を土壌から分離した菌糸融合群第2群第2型の生育異常株と比較した。

結果および考察

1. ほ場における生育異常株の存在

土壌から分離した *R. solani* の生育の程度は、菌株によりほとんど成長しないものから、旺盛に生長するものまでであるが（Fig. 1）生育異常株の分離率はほ場により異なっていた（Table 1）。生育異常株はいずれのほ場の土壌、また菌核、アマ茎、植物残渣のいずれからも分離された。清川ほ場では分離された菌株の約60%が生育異常株であった。同ほ場から高率に異常株が分離された理由として、分離時期が病原菌の菌核の多くが死滅した越冬後⁹⁾であるためと考えられる。

2. 生育異常株の形態

生育異常株は、正常株に比べて著しくその生育が遅く、生育先端部の菌糸密度が低いために菌糸周縁部が不明瞭になること（Fig. 2）、また菌核の形成が少な

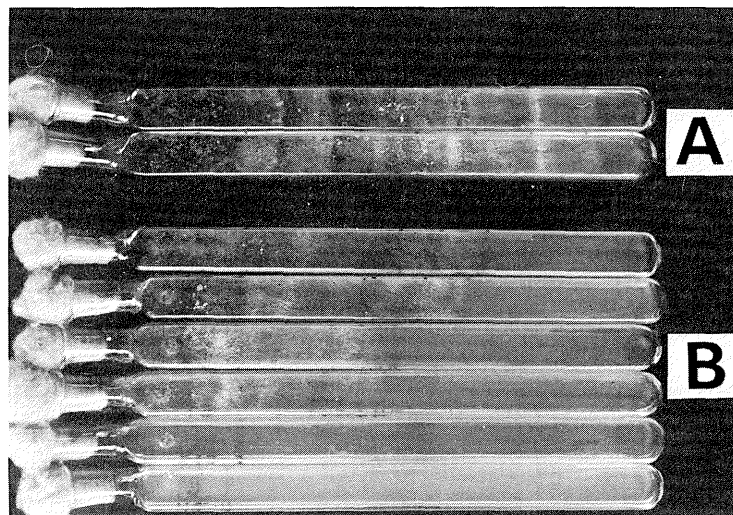


Fig. 1. Different growth of *Rhizoctonia solani* AG2-2 grown on potato dextrose agar for 10 days A: Normal isolates, B: Slow growth isolates.

いといった特徴がある。

菌糸は歪み (distortion) が著しく (Plate I-1), 菌糸先端細胞は空胞化し, 生育が停止することがある (Plate I-2)。異常株の中には, *R. solani* 菌糸の特徴である頂位優勢 (apical dominance) が認められず, 側枝が主軸菌糸を越えて伸びることもある (Plate I-3)。また, 菌糸は諸所で原形質が認められず細胞壁の

み残ることが多く (Plate I-4), この傾向は特に菌そうの基部よりも先端部に多い。さらに異常株の菌糸にはパーオキシダーゼの染色液 (4-chloro-1-naphthol 30 mg, 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) 100 ml, 1% 過酸化水素水 0.1 ml)¹⁶⁾ と反応し, 濃紫色を呈する細胞がみられるが, 正常株では反応しない (Plate I-5, 6)。

3. 生育異常株の菌糸生長

一般に *R. solani* の菌糸生長速度は菌株によりほぼ一定であるが, 生育異常株はその生育に変動があり, ときには数日間生長を停止した後再び開始するなど不規則性がみられる (Fig. 3)。このような現象は *Neurospora crassa* の “stop-start” 現象¹⁾ と極めて良く似ている。また,

生育異常株の菌そうから無作意に菌そうを含む寒天を切り取り, 移植すると, 移植後の菌糸生長は良いものから極めて劣るものまであり一様でなく, Castanho・Butler²⁾ の菌株と同様であった。菌そう先端部から基部に向けて 5 mm 間隔に直径 5 mm の菌そうを含む寒天を生長管に植菌し, それぞれの菌糸の生長を比較したところ, 菌そう基部に近い部分ほど菌糸の伸び

Table 1. Appearance of diseased isolates from naturally and artificially infested sugarbeet fields, soils^{a)}

Field	Source of isolation	No. of diseased isolates/ No. of isolates tested	Frequency of diseased isolates (%)
Abashiri	Sclerotia	0/18	0.0
	Plant residue	1/19	5.2
	Bait ^{b)}	0/8	0.0
Hombetsu	Sclerotia	3/16	18.8
	Plant residue	1/22	4.5
	Bait	2/11	18.2
Kiyokawa	Sclerotia	5/15	33.3
	Plant residue	16/23	69.6
	Bait	23/38	60.5

a) Naturally infested fields' soils were sampled from Abashiri and Hombetsu fields in October 1979 and artificially infested field's soils were sampled from Kiyokawa field in May 1980. Sugarbeets were continuously cropped in Abashiri and Hombetsu fields from 1972, and root-rot disease decline occurred in Abashiri field in 1979 and in Hombetsu in 1976. In Kiyokawa field, root-rot fungus had been artificially infested in June 1979 and root-rot disease occurred severely in 1979.

b) Flax stems were used for bait.

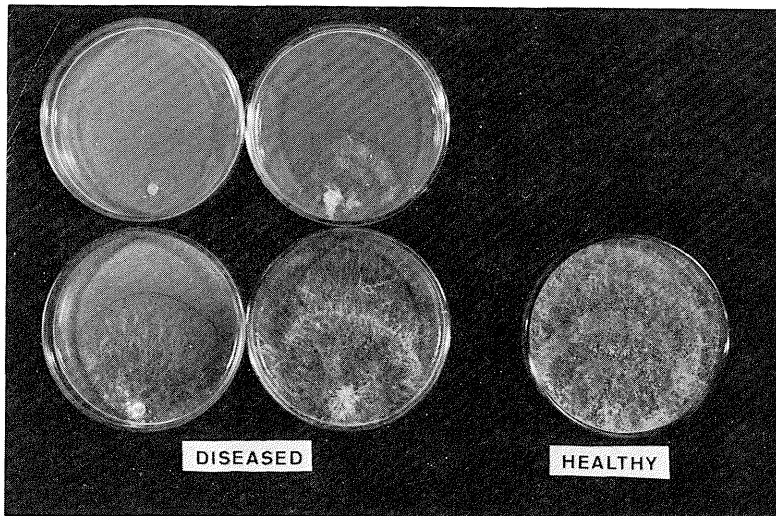


Fig. 2. Cultural appearance of healthy and diseased isolates of *Rhizoctonia solani* AG2-2 grown on potato dextrose agar for 10 days.

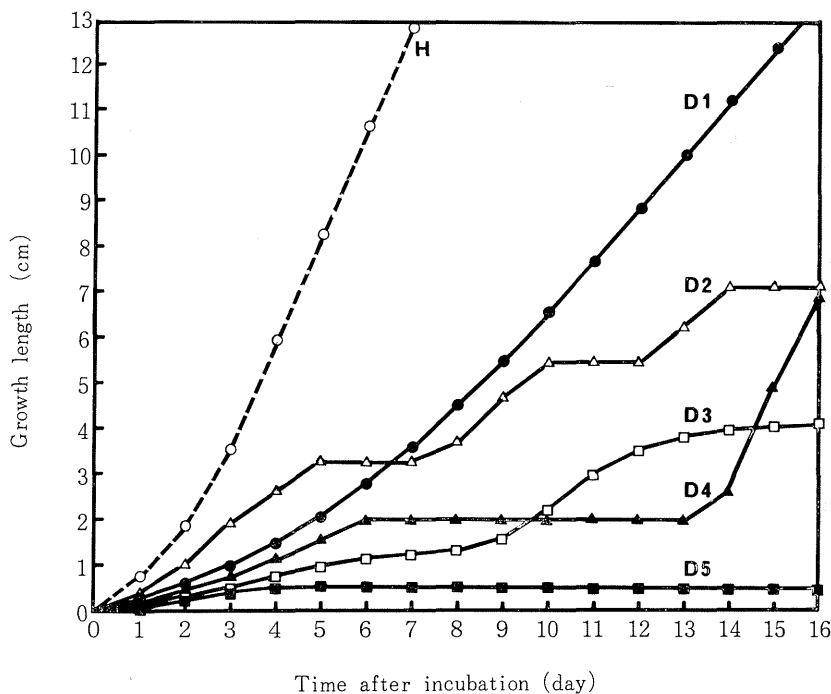


Fig. 3. Patterns of the mycelial growth of healthy (H) and diseased (D1-D5) isolates of *Rhizoctonia solani* AG 2-2.

は速く、逆に先端部付近は著しく劣った (Table 2)。コットンブルー液により菌そうを染色すると、基部に近いものほど染色性の高い細胞が多くみられ、また菌糸密度は先端部が著しく粗で基部に近いものほど密である。このことから、生育異常株の菌そう先端部から

移植したとき菌糸の生長が劣るのは、原形質を含む細胞数が少ないことが一つの原因と考えられる。しかし、Lin・Gottlieb¹¹⁾が指摘しているように、*R. solani*の生育異常は細胞の養分吸収の低下が関係する可能性もある。

Table 2. Mycelial growth taken from various distances from the margin of the colony of diseased isolate of *Rhizoctonia solani* AG 2-2

Distance from the margin of the colony ^{a)} (mm)	Growth length of mycelium (mm)
0-5	6.0
10-15	7.0
20-25	7.4
30-35	19.2
40-45	36.8
50-55	58.7

a) The colony was grown on potato dextrose agar at 25 C for 14 days, and its radius was around 60 mm.

Table 3. Pathogenicity of healthy and diseased isolates obtained from different fields' soils on sugarbeet seedlings

Field	Isolate (AG 2-2)	No. of sugarbeet seeds	No. of pre-emergence damped-off sugarbeets	No. of post-emergence damped-off sugarbeets	% of total damped-off sugarbeets
Abashiri	Healthy	20	5	10	75.0
	Diseased	20	1	0	5.0
Hombetsu	Healthy	30	17	11	93.3
	Diseased	30	3	2	16.7
Kiyokawa	Healthy	30	11	18	96.7
	Diseased	30	2	7	30.0

4. 正常株への回復

Streptomycin, ethydiumbromide, chloramphenicol および cycloheximide を各種濃度 (20~50 µg/ml) 添加培地で生育異常株を培養したが、いずれの菌株も菌糸生長速度の回復および菌そうの正常化は認められなかった。

生育異常株にみられる菌糸の歪み、菌糸先端部の空胞化、および生育停止などの現象は *Podospora ancerina* の老化現象¹⁴⁾ と良く類似するが、*P. ancerina* の場合はミトコンドリア機能の阻害剤である streptomycin あるいは ethydiumbromide 処理により老化を防ぐことができた点¹⁹⁾ で異なる。

異常株を1ヶ月以上にわたり培養しているうちに正常株に回復することもあった。このような現象をおこした菌では、空胞化した菌糸細胞に再び原形質が充満し、あるいは菌そう基部から新たに菌糸が伸展し、菌そう周辺の菌糸密度が増加していた。

5. 生育異常因子の正常株への移行

網走、本別および清川は場から得られた異常株と正常株とを、PDA 上に対峙培養し菌糸融合によって異

常因子が正常株へ移行するか否かを調べた。両者の菌そうが交叉後1~10日に正常株の菌そう部分から取った株はすべて正常であり、いずれも因子の移行によるとみられる正常株の生育の低下は認められなかった。とくに清川は場の場合、土壤に接種した菌株と土壤から再分離した生育異常株とは完全融合し、同一クローン¹⁷⁾と思われるにもかかわらず異常因子の正常株への移行はみられなかった。

6. 生育異常株からの dsRNA の抽出

生育異常株から dsRNA の抽出を試みたが、その存在は認められなかった。

7. 生育異常株の病原性

各は場より分離した生育異常株は株によって病原性には差があったが、いずれも正常株に比べ著しく弱かった (Table 3)。

8. 各菌糸融合群の生育異常株

正常株を継代培養して保存していると、いずれの菌糸融合群の菌株の中にも生育異常株が認められた。生育異常を示す各群の任意の菌株について、土壤から分離した第2群第2型の異常株の性状と比較したとこ

る、菌糸が歪む、原形質が消失する、菌そう先端部の菌糸密度が薄い、菌核の形成が悪いこと、および菌そうの先端部と基部から移植した場合、前者から生長した菌糸は生育速度が著しく劣るなどの諸性質は共通していた。また、異常株と対峙した正常な元株に異常因子が移行することもなかった。

前報⁸⁾で明らかにしたように生育異常株は、ポットの土壤に *R. solani* を接種し、テンサイ苗を繰り返し栽培したときに土壤から捕捉法により分離されたが、本実験では、テンサイを連作し根腐病が衰退した、あるいは激発した跡地土壤からも分離された。このことから、生育異常株がほ場の土壤中にも存在することが明らかである。また、*R. solani* の各菌糸融合群を継代培養して保存した菌株にも生育異常を示すものがあった。これらは何れも菌糸、菌そうの形態、培養性質が良く類似していた。

以上得られた生育異常株からは、菌類の異常因子とされる dsRNA が検出されず、またその因子が菌糸融合により正常株に移行し病原性を低下させることも認められなかった。しかし、生育異常株は病原性が弱く、また生育が遅いところから、ほ場土壤中に異常株が相対的に増加すれば、Garrett⁹⁾ の定義する感染源ポテンシャルが低下し、その結果、病気の発生が減少し衰退したとも考えられる。

摘 要

テンサイほ場の土壤から *Rhizoctonia solani* の生育異常株の分離を試みるとともにその諸性質を調べた。

1. テンサイ畑に人工的に菌を接種し、著しく発病した株の周辺土壤から、通常の *R. solani* 第2群第2型の菌株と比較して初期生育の極めて遅い株（生育異常株）が、次年の春に高率に分離された。
2. 異常株は、テンサイを8年間連作して根腐病が衰退したほ場の根腐病発病株の周辺土壤からも収穫期（10月）に分離された。
3. 異常株は分離株により異なるが、菌糸が歪む、原形質が消失する、菌そう先端部の菌糸密度が薄い、菌核の形成が悪いなどの点で正常株と異なる。
4. 生育異常株の菌そうの各部分から移植した菌糸の生長は、菌そうの基部に近いところ程良好であり、先端部付近では著しく劣る。
5. 異常株を streptomycin, ethyldiubromide, chloramphenicol, cycloheximide を加えた培地に培養しても、正常株には回復しない。
6. 菌糸融合により異常因子の正常株への移行は認められない。また、異常株に dsRNA は存在しなかった。
7. 異常株の病原性は、正常株に比べ著しく劣る。
8. 異常株はいずれの菌糸融合群についても継代培養した保存菌株のなかに認められた。

引用文献

1. Bertrand, H., McDougall, K. J. and Pittenger, T. H. (1968). J. gen. Microbiol. 50 : 337-350.
2. Castanho, B. and Butler, E. E. (1978). Phytopathology 68 : 1505-1510.
3. Castanho, B., Butler, E. E. and Shepherd, R. J. (1978). Ibid. 68 : 1515-1519.
4. Garrett, S. D. (1965). In Ecology of Soil-Borne Plant Pathogens (Baker, K. F. and Snyder, W. C. eds.) Univ. Calif. Press, Berkeley, Los Angeles and London. pp. 4-17.
5. Grente, M. J. (1965). C. R. Seances Acad. Agric. Fr. 51 : 1033-1037.
6. 本間善久・宇井格生 (1975). 北大農邦紀 9 : 177-185.
7. 百町満朗・生越 明・神沢克一・宇井格生 (1979). 日植病報 47 : 388. (講要)
8. 百町満朗・宇井格生 (1982). 同上 48 : 600-606.
9. 百町満朗・宇井格生 (1982). 同上 48 : 628-633.
10. Jinks, J. L. (1959). J. gen. Microbiol. 25 : 397-409.
11. Lin, F. K. and Gottlieb, D. (1974). Phytopathology 64 : 1220-1228.
12. Lindberg, G. D. (1959). Ibid. 49 : 29-32.
13. Lindberg, G. D. (1960). Ibid. 50 : 457-460.
14. Marcou, D. (1961). Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg. 2 : 653-764.
15. Naiki, T. and Ui, T. (1977). Soil Biol. Biochem. 9 : 377-381.
16. Nakane, P. K. (1968). J. Histochem. Cytochem. 16 : 557-560.
17. 生越 明・宇井格生 (1983). 日植病報 49 : 239-245.
18. 小倉寛典・佐藤 徹・赤井重恭 (1963). 同上 28 : 280-282.
19. Tudzynski, P. and Esser, K. (1977). Molec. gen. Genet. 153 : 111-113.
20. 宇井格生・生越 明 (1964). 北大農邦紀 5 : 5-16.
21. 宇井格生・内記 隆・秋本正信 (1976). 日植病報 42 : 46-48.
22. Van Alfen, N. K., Jaynes, R. A., Anagnostakis, S. L. and Day, P. R. (1975). Science 189 : 890-891.

Explanation of plate

Plate I

Morphology and cytology of diseased isolates of *Rhizoctonia solani* AG 2-2.

1. Hyphal distortion.
2. Lysis of protoplasm (LP) at hyphal tips.
3. Abnormal hyphal branching.
4. Lysis of protoplasm (LP) in many parts of hyphae.
- 5-6. Peroxidase reaction (PR) of diseased isolate (Fig. 5) and healthy isolate (Fig. 6).
Stained hyphal cells show PR.

Plate I

