

テンサイ工場排出土壌から分離された *Rhizoctonia solani* AG 1の新しい培養型 IC とその諸性質

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 角野,晶大
発行元	日本植物病理學會
巻/号	50巻4号
巻号補足	
掲載ページ	p. 507-514
発行年月	1984年10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



テンサイ工場排出土壌から分離された *Rhizoctonia solani* AG 1 の新しい培養型 I C とその諸性質*

百町満朗**・角野晶大**

Mitsuro HYAKUMACHI** and Akio SUMINO** : New Morphological Type
(IC) in *Rhizoctonia solani* AG 1 Isolated from the Sugarbeet-
Manufactory-Waste-Soils and Some of Its Characteristics*

Abstract

New morphological type in *Rhizoctonia solani* AG 1 was obtained from the sugarbeet-manufactory-waste-soils. This type was easily differentiated from two known types in Japan, 1A and 1B, in cultural appearance, especially in the size and distribution of sclerotia. Many small sclerotia (0.2-0.8 mm) with dark brown to black were scattered evenly on the medium, and zonation could not be seen. In USA three types (type 1, type 2, type 3) are known in *R. solani* AG1. Cultural appearance and properties of this new morphological type were almost the same as those of the type 3. Type 1 and type 2 correspond to 1B and 1A, respectively. So, we propose to designate this new type corresponding to type 3 as morphological type 1C.

Optimum temperature for hyphal growth of this type was 30°C and the linear growth was 34.7 mm/24 hr on PDA. The width of mature main hyphae was $6.69 \pm 1.92 \mu\text{m}$. The difference of the frequency of hyphal anastomosis was seen in any combination of 1A, 1B and this type. This type had a high pathogenicity to the seedlings of Japanese radish, sugarbeet, bean, lettuce, cabbage, tomato and eggplant. This type had also been obtained from the field soils of Hokkaido, Tochigi and Fukuoka as well as from the sugarbeet-manufactory-waste-soils

(Received April 16, 1984)

Key Words : new morphological type (1C), *Rhizoctonia solani* AG 1.

緒 言

Rhizoctonia solani は未分化寄生菌で各種作物に病原性を示すとされているが、形態的、生理的に異なる菌群が存在すること、さらに各菌群ごとに作物に対する病原性に特異性がみられることなどが知られている^{6-9, 11)}。

我が国では、これまで渡辺・松田¹¹⁾ が培養型と病原性により *R. solani* を6型7系に、生越⁹⁾、国永ら⁵⁾、本間ら²⁾ が菌糸融合により8群2型に類別している。両方法により類別された群はほぼ一致しており、病原

性の面を加味して考えると、両類別群を折衷して菌群を示すのが最も適当とされている^{7, 8)}。つまり、*R. solani* の菌群は現在、AG 1(1A), AG 1(1B), AG 2-1, AG 2-2(IIIB), AG 2-2(IV), AG 3, AG 4, AG 5, AG 6, AG 7, AG BI の11群があると一般に認められている⁷⁾。

著者らは、テンサイ工場排出土壌中の病原菌の存在の有無を調べたところ、これらの土壌から *R. solani* が分離され、そのうち AG 1 が多数を占めること、また、これら AG 1 の中には渡辺・松田¹¹⁾ の報告にある1A, 1B と異なる培養型を示す菌株が大半を占めることに気付いた。一方、米国では *R. solani* AG 1

* 本研究の概要は、日本植物病理学会北海道支部会(1983年9月)において発表した。

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

の中に type 1, 2, 3 の三型があることが知られている¹⁰⁾。米国の type 1, 2 はそれぞれ我が国の 1B, 1A に相当するが, type 3 に相当する培養型については明らかでない。

本研究は, AG 1 の新しい培養型の培養形態, 菌糸融合率, 菌糸幅, 菌糸伸長速度, 病原性などの諸性質について, 既存の 1A, 1B および米国の AG 1 type 3 と比較したものである。

本研究を行なうに当たり, 常に有益な御指導を下された北海道大学名誉教授 宇井格生博士に深く感謝する。なお, 土壌試料の採集に御協力を頂いたホクレン中斜里製糖工場技術課の関係者各位に対し深く感謝する。また, 菌株を分譲して頂いたカリフォルニア大学の E. E. Butler 博士, 並びに日本甜菜製糖株式会社の神沢克一博士に対し深く感謝する。

実験材料および方法

供試土壌 テンサイ工場から排出される遊離土 6 種, フリューム土 4 種, 脱水余剰汚泥土 2 種を用いた。遊離土はテンサイ根収穫後, 工場構内あるいは圃場周辺の貯蔵場に運びこまれたテンサイ根から, 土砂分離機により除去された土壌であり, フリューム土はテンサイ根をフリュームという貯蔵場底部に設けた溝に入れ, 洗浄工程まで流送する際生じた廃水を静置沈殿し堆積乾燥したものである。また, 脱水余剰汚泥土は工場内の製造過程で生じた廃水を活性汚泥法で浄化処理後, 脱水したものである。

テンサイ苗立枯率 供試した各土壌をそれぞれ 9 cm の素焼きポットに入れ, テンサイ (品種: モノヒル) を 1 ポット当たり 15 粒播種した。温室 (最高 29°C, 最低 15°C) で 3 週間栽培後, 苗立枯率を調べた。実験は 5 反復行なった。

テンサイ立枯苗からの病原菌の出現 立枯病発病個体を滅菌水道水中に 25°C で一昼夜浮かべ, これより出現する菌糸および遊走子の形状により, テンサイ立枯病菌である *Rhizoctonia solani*, *Aphanomyces* sp., *Pythium* spp. の種類を同定し¹¹⁾, これらの出現率を求めた。

***R. solani* の分離と類別** 供試した各土壌中からの *R. solani* の分離はアマ茎トラップ法を用いた。2 cm の乾燥アマ茎 100~120 本を各土壌に挿入し, 2 日後に取り出した。水洗後, 乳酸酸性素寒天培地 (WA, pH 4.5) 上に並べ, 25°C, 2 日間培養後, 本菌が出現したアマ茎の割合を *R. solani* の出現率とした。WA

上に伸長した菌糸の先端部からジャガイモ・グルコース寒天 (PDA) 斜面培地に分離した菌株は, 菌糸融合により類別した。すなわち, 既知の *R. solani* の菌糸融合群 (AG 1~7 および AG BI) より, それぞれの代表株を選び, 分離した菌株との菌糸融合の有無を調べた。

AG 1 の新しい培養型と既知の培養型との諸性質の比較 類別した *R. solani* の中で AG 1 に属したもののうち, 既知の培養型 1A, 1B と異なる培養型を示すものについて, 1A, 1B および米国の AG 1 type 3 (以後 type 3 とする) と培養形態, 菌糸融合率, 菌糸伸長速度, 菌糸幅, 病原性などの諸性質を比較した。(i) 供試菌株: 新しい培養型に属する菌株 F2, P2, RH 28, 1A 型に属する菌株 C-325, Cs-2, Cs-A, 1B 型に属する菌株 B-32, B-39, R2, type 3 に属する菌株 189 (ATCC 13248) を供試した。(ii) 培養形態: PDA 培地に 25°C, 2 週間培養後, 菌叢の色, 培地の着色程度, 菌核の色, 数, 大きさなどを調べた。(iii) 菌糸融合率: WA 上で各培養型の菌株を対峙させ, 菌叢が交差した箇所を寒天と共に切り取り, スライドグラスに乗せ, アニリンブルーで染色後 100 倍で 10 視野検鏡し, 菌糸の交差および融合箇所を数えて, 菌糸融合率を求めた。(iv) 菌糸伸長速度: PDA 培地に各培養型の菌糸片を移植し, 15~32°C, 24~72 時間培養後に測定した。(v) 菌糸幅: 各培養型の菌糸片を WA に移植し, 2~3 日培養後, 主軸菌糸の先端 2~5 細胞の菌糸幅を測定した。(vi) 病原性: ダイコン, テンサイ, インゲン, レタス, カンラン, トマト, ナスの幼苗に対する病原性を調べた。接種源には, 各培養型の菌糸片をあらかじめ大麦粒に 25°C, 10 日間培養したものを用いた。これらを加圧殺菌した土壌に 1% (w/w) の割合で混合し, 直径 7 cm のビニールカップに詰め, 各作物を播種した。温室 (最高 29°C, 最低 15°C) で 3 週間栽培後に抜き取り, 立枯れの程度を健全 0—枯死 5 とした発病指数を用いて調べた。

結 果

1. テンサイ苗立枯率および立枯病菌の出現率

テンサイ工場から排出された各土壌におけるテンサイ苗の立枯率と, 立枯苗からの病原菌の出現率を調べたところ, 遊離土, フリューム土ではテンサイ苗にかなりの頻度で立枯れが見られ, また, 立枯苗からは *Aphanomyces* sp., *Pythium* spp. などと共に, *R. solani* の出現が見られた (Table 1)。一方, 脱水余剰

Table 1. Frequency of damping-off of sugarbeet-seedlings raised in the sugarbeet-manufactory-waste-soils and isolation of the pathogenic fungi from the damped-off seedlings

Soils ^{a)}	No.	Frequency of damping-off %	Percent of pathogenic fungi isolated from damped-off sugarbeet-seedlings		
			<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Aphanomyces</i> sp.	<i>Pythium</i> spp.
Residual soil	1	0.0	0.0	0.0	0.0
	2	31.3	0.0	11.4	0.0
	3	46.8	19.4	95.2	35.5
	4	75.0	0.0	0.0	0.0
	5	87.0	11.5	60.9	0.0
	6	49.3	34.3	0.0	0.0
Flume soil	1	83.4	20.0	85.0	0.0
	2	80.0	0.0	100.0	0.0
	3	85.0	0.0	14.8	0.0
	4	100.0	18.0	90.0	0.0
Sewage sludge	1	0.0	0.0	0.0	0.0
	2	0.0	0.0	0.0	0.0

a) Residual soil =residual soil of raw beet piles
 Flume soil =water conveying flume soil
 sewage sludge=dehydrated surplus sewage sludge

Table 2. Isolation of *Rhizoctonia solani*^{a)} from the sugarbeet-manufactory-waste-soils and their anastomosis groups

Soils ^{b)}	No.	Appearance of <i>R. solani</i> %	Percent of anastomosis group										
			AG 1			AG 2		AG 3	AG 4	AG 5	AG 6	AG 7	AG BI
			New type	1A	1B	2-1	2-2						
Residual soil	1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	2	3.5	75.0	0.0	0.0	0.0	25.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	3	52.0	84.6	0.0	0.0	0.0	5.8	0.0	9.6	0.0	0.0	0.0	0.0
	4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	5	8.3	0.0	0.0	20.0	0.0	80.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	6	12.0	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Flume soil	1	58.0	65.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	29.3	5.2	0.0	0.0	0.0
	2	8.6	88.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	11.1	0.0	0.0	0.0	0.0
	3	2.5	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	4	42.0	69.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	26.2	4.8	0.0	0.0	0.0
Sewage sludge	1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

a) Isolated from the flax stem buried as a bait in the soils
 b) Residual soil =residual soil of raw beet piles
 Flume soil =water conveying flume soil
 Sewage sludge=dehydrated surplus sewage sludge

汚泥土では立枯れは起こらず、病原菌の存在は認められなかった。

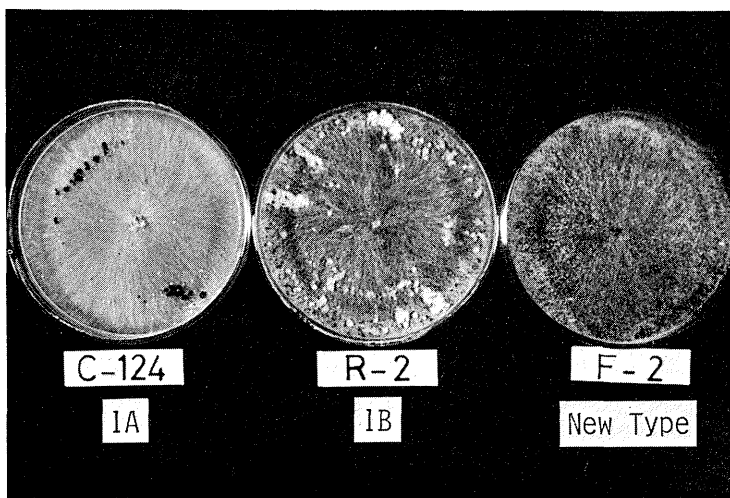


Fig. 1. Comparison of cultural appearance among three types of *Rhizoctonia solani* AG 1. Isolates C-124, R-2 and F-2 belong to morphological type 1A, 1B and new type, respectively.

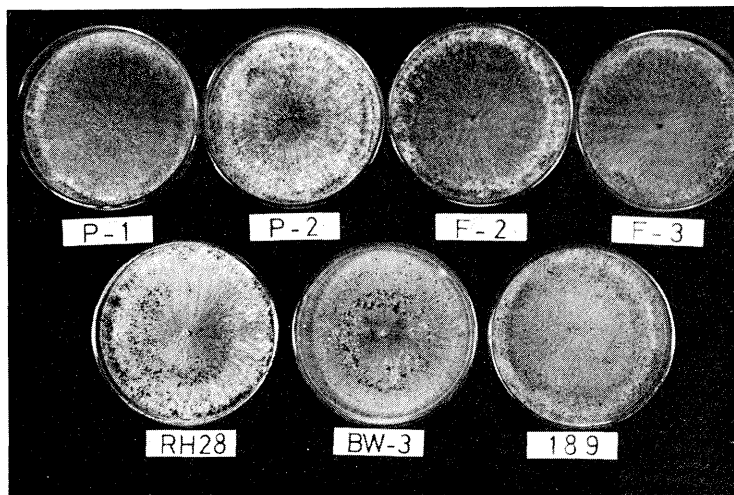


Fig. 2. Cultural appearance of several isolates belonging to new morphological type of *Rhizoctonia solani* AG 1 and a representative isolate of *R. solani* AG 1 type 3. P-1, P-2; Isolates obtained from the sugarbeet-manufacture-waste-soils (residual soil of raw beet piles). F-2, F-3; Isolates obtained from the sugarbeet-manufacture-waste-soils (water conveying flume soil). RH-28; An isolate obtained from the field soil of Hokkaido. BW-3; An isolate obtained from the field soil of Tochigi. 189; A representative isolate of *R. solani* AG 1 type 3.

2. *R. solani* の分離と類別

各土壌からのアマ茎トラップ法による *R. solani* の

出現率は、テンサイ立枯苗からの出現率と同様の傾向が認められた。土壌から分離した *R. solani* を菌糸融合により類別したところ、AG 1, 2-1, 2-2, 4, 5 に属す菌株が得られ、中でも AG 1 が極めて高い分離頻度を示した (Table 2)。また、分離した AG 1 の大半の菌株は、菌叢の色調や菌核の形状がこれまで我が国で知られている AG 1 の培養型 1A, 1B とは明らかに異なり、1つの新しい培養型に類別された (Fig. 1)。

3. 培養形態

新しい培養型に属する菌株を PDA 上に培養した場合の菌叢は、はじめ無色で後に淡褐色となり、培地は淡褐色に着色する。菌核は表面が滑らかで類球形、暗褐色または黒褐色、大きさは 0.2~0.8 mm、培地上に極めて多数形成される。これらの培養形態は、米国の type 3 に属する菌株 189 に極めて類似していた (Fig. 2)。本培養型と、既に報告されている 1A, 1B および米国の type 1, 2, 3 の PDA 上での培養形態を比較した結果を Table 3 に示した。この結果からも、本培養型は type 3 と同一であった。

4. 菌糸融合率

各培養型の菌株について菌糸融合率を調べたところ、同一培養型間の菌糸融合率は、同一菌株間が 50~60% で、異なる菌株間の 40~45% より高かった (Table 4)。また、同一培養型同志は 40~60% で、異なる培養型間では 30~35% より高く、各培養型間の融合の組合せによって菌糸融合率に有意差が認められた。

Table 3. Comparison of some cultural properties of new morphological type with the known types of *Rhizoctonia solani* AG 1 reported in literatures

Cultural property	New type	Watanabe&Matsuda(1966)		Sherwood (1969)		
		1A	1B	Type 1	Type 2	Type 3
Colony : color	white-light brown	white-light brown	white-light brown	light brown-dark reddish brown	white-light brown	white-light brown
Medium (PDA) : color	light brown	brown	—	reddish brown	—	—
Sclerotium : color	dark brown or black	brown	brown	reddish brown or dark brown	dark brown	dark brown or black
: size	small 0.2-0.8 mm uniform in size	2-3 mm	1-5 mm	large 1-9 mm variable in size	1.5 mm uniform in size	small 0.4-0.8 mm uniform in size
: shape	spheroid	spheroid	flat to subspheroid	spheroid or subspheroid	—	spheroid
: surface	fine	fine	coarse	—	—	—
: quantity	very abundant	—	—	a few	a few to abundant	very abundant

Table 4. Frequency of hyphal anastomosis in any combination of three morphological types of *Rhizoctonia solani* AG 1

Combination of three morphological types	Percent of hyphal anastomosis
N. type ^{a)} × N. type X ^{b)}	59.2 f ^{c)}
Y	44.3 d
1A × 1A	58.3 f
Y	46.8 e
1B × 1B	47.1 e
Y	37.6 c
N. type × 1A	33.9 b
N. type × 1B	33.7 b
1A × 1B	31.1 a
N. type × 189 ^{d)}	42.3
189 × 189	56.9

a) N. type; new morphological type.

b) X; between same isolates. Y; between different isolates.

c) Values followed by the same letter do not differ significantly ($p=0.05$) according to Duncan's multiple range test.d) 189; a representative isolate of *Rhizoctonia solani* AG 1 type 3.

5. 菌糸伸長速度

各培養型の菌株について、PDA 上で15~32℃における24時間当りの菌糸伸長速度を調べた (Fig. 3)。15~28℃では各培養型はほぼ同じ伸びを示したが、30~32℃では1A, 1Bに比べ本培養型の生育が良く、生育速度に有意差が認められた。特に32℃では、1A, 1Bが急激に生育が悪くなるのに対し、本培養型は比較的生育が良かった。最適温度は1A, 1Bが28℃、本培養型が30℃であった。また、菌株189は最適温度が30℃であり、15~32℃の各温度とも本培養型とほぼ同じ菌糸伸長速度を示した。

6. 菌糸幅

各培養型の菌株について、主軸菌糸の幅を調べた。いずれも平均 6.0~6.9μm であり、培養型間に差は見られなかった。また、菌株189の菌糸幅も各培養型と大差なかった。

7. 病原性

各培養型の菌株とも、ダイコン、テンサイ、インゲンの幼苗に強い病原性を示し、培養型間に差は認められなかった。また、本培養型の菌株はレタス、カンラン、トマト、ナスの幼苗に対しても、強い病原性を示した (Table 5)。

考 察

なお、type 3 の菌株189同志の融合率は56.9%、189と本培養型の融合率は42.3%であり、本培養型同志の融合率と大差なかった。

テンサイ工場から排出された土壌のうち、遊離土、

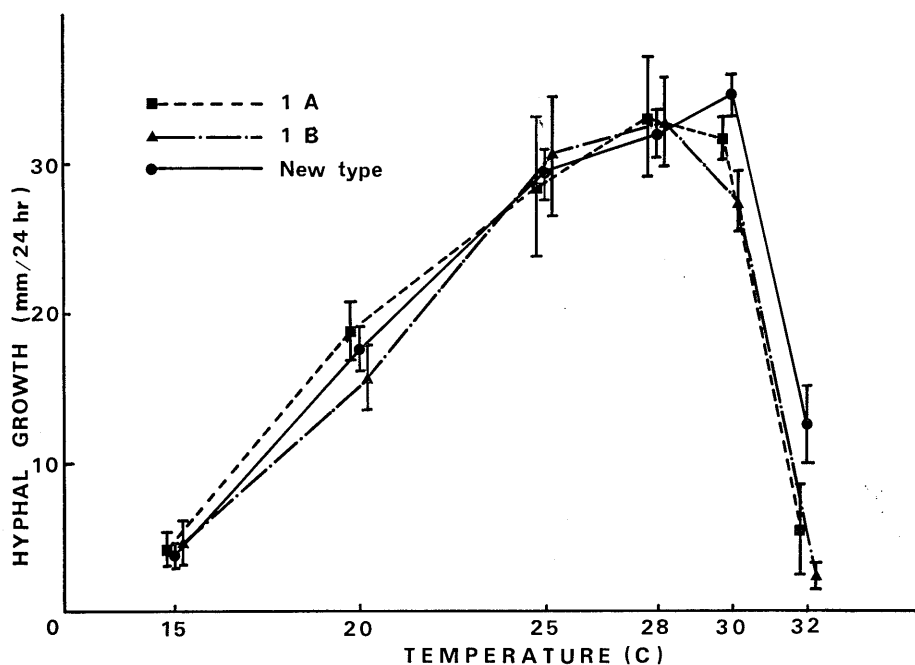


Fig. 3. Comparison of hyphal growth among three morphological types of *Rhizoctonia solani* AG 1.

Table 5. Comparison of pathogenicity among three morphological types of *Rhizoctonia solani* AG 1 to the seedlings of some crops

Morphological type	Isolate	Pathogenicity ^{a)}						
		Radish	Sugarbeet	Bean	Lettuce	Cabbage	Tomato	Eggplant
New type	F2	4.36	4.93	4.33	2.15	5.00	1.96	3.22
	P2	3.32	4.63	3.17	1.04	2.29	2.38	1.53
	RH28	4.21	4.70	3.83	1.31	4.29	2.79	1.89
	av.	3.96a ^{b)}	4.75a	3.78a	1.50	3.86	2.38	2.21
1A	C-325	3.71	4.78	4.67	— ^{c)}	—	—	—
	Cs-2	3.86	3.96	5.00	—	—	—	—
	Cs-A	3.43	4.93	4.50	—	—	—	—
	av.	3.67a	4.56a	4.72a	—	—	—	—
1B	B-32	3.61	4.85	1.25	—	—	—	—
	B-39	3.11	4.70	4.17	—	—	—	—
	R-2	1.21	4.41	4.83	—	—	—	—
	av.	2.64a	4.65a	3.42a	—	—	—	—

a) Disease rating; 0=no disease, 5=most severe disease

b) Values followed by the same letter do not differ significantly ($p=0.05$) according to Duncan's multiple range test

c) —; not determined

フリューム土からテンサイ苗の立枯病菌である *R. solani* AG 1 が分離された。これら菌株の中には、培養形態が従来我が国で知られていた培養型 1A, 1B¹⁾ と明らかに異なり、Sherwood の報告した AG 1 type 3¹⁰⁾ と酷似したものが多数存在した。これらの菌株は、菌叢の色、菌核の形状などの培養形態以外にも菌糸融合率、菌糸伸長速度、菌糸幅が type 3 にほぼ一致したことから、本培養型は Sherwood の報告した type 3 と同一の培養型と考えた。

AG 1 内の同一培養型間の菌糸融合率は、異なる培養型間より高い傾向がみられた。しかし、菌糸融合率において培養型間に極端に差があるとは思わず、AG 1 を菌糸融合率の違いで AG 2 にみられる AG 2 type 1, AG 2 type 2 のような type 型に分けることは難しいと思われた。

最近、国永・横沢は *R. solani* の DNA 塩基配列の相同性を比較した結果、同一菌糸融合群内に遺伝的に分化した系統が存在すること、および培養型による類別と DNA の相同性による類別が極めて良く一致することを示唆している^{3,4)}。本培養型と 1A, 1B との DNA 相同性は明らかに異なるとされる（国永私信）ことから、本培養型は 1A, 1B と遺伝的類縁性が低い可能性がある。

本培養型の分布に関しては不明な点が多い。しかし、本培養型はテンサイ工場排出土壌以外に、北海道のジャガイモ畑およびテンサイ畑からも分離された。さらに、保存培養中の菌株を調べた結果、過去に栃木県でソバ、福岡県および北海道でテンサイの各圃場からも分離されていることが明らかとなった。本培養型は、菌糸伸長速度の結果から 1A, 1B よりさらに好高温性であり、その分布はかなり広範囲なものと思われる。

本培養型は 1A, 1B と同様に各種作物の幼苗に対して激しい立枯れを起こすことから、今後、北海道のみならず我が国の各地域で、各種作物に対する重要な病原菌として問題になろう。

本培養型は、前述のように培養形態および培養性質において米国の AG 1 type 3 と同一と認められた。我が国では、米国の type 1 が 1B, type 2 が 1A であることから、本培養型を 1C と呼ぶことを提案したい。

摘 要

1. テンサイ工場排出土壌の遊離土、フリューム土から苗立枯病菌である *Rhizoctonia solani* が多数分離された。
2. 分離した *R. solani* の大部分は菌糸融合により VG 1 に類別されたが、これら AG 1 に属す大半の菌株は、我が国で従来知られていた 1A, 1B の菌叢とは明らかに異なり、1つの培養型を示した。
3. 本培養型の菌叢ははじめ無色で後に淡褐色となり、培地は淡褐色に着色した。菌核は表面が滑らかで類球形、暗褐色または黒褐色、大きさは 0.2~0.8 mm、培地上に極めて多数形成された。これらの培養形態は米国の AG 1 type 3 と同一であった。
4. AG 1 内の同一培養型間の菌糸融合率は 40~60 % と高いのに対し、異なる培養型間の融合率は 30~35 % と低かった。
5. 本培養型の菌糸は PDA 上 15~32 C で生育し、生育適温は 30 C、生育速度は 34.7 mm/24hr であった。
6. 本培養型の菌糸幅は $6.69 \pm 1.92 \mu\text{m}$ で 1A, 1B と大差なかった。
7. 本培養型は 1A, 1B 同様、各種作物の幼苗に対して強い病原性を示した。
8. 本培養型は、テンサイ工場排出土壌以外に北海道、栃木県、福岡県の一般畑からも分離されており、その分布はかなり広範囲なものと思われた。
9. 本培養型を、*R. solani* AG 1 の新しい培養型 1C とすることを提案する。

引 用 文 献

1. 鑑谷大節 (1964). 土壌病害の手引(II). 日本植物防疫協会編 pp. 25-27.
2. 本間善久・山下洋子・石井正義 (1983). 日植病報 49: 184-190.
3. Kuninaga, S. and Yokozawa, R. (1982). Ann. Phytopath. Soc. Japan 48: 659-667.
4. 国永史朗・横沢菱三 (1984). 日植病報 50: 100 (講要).
5. 国永史朗・横沢菱三・生越 明 (1978). 日植病報 44: 591-598.
6. 生越 明 (1976). 農技研報告 C 30: 1-63.
7. 生越 明 (1983). 北海道畑作物の土壌病害. 北海道畑作物の土壌病害刊行会編 pp. 323-331.

-
8. 鬼木正臣 (1981). 植物防疫 35 : 132-136.
 9. Parmeter, J. R. Jr. Sherwood, R. T. and Platt, W. D. (1969). *Phytopathology* 59 : 1270-1278.
 10. Sherwood, R. T. (1969). *Ibid.* 59 : 1924-1929.
 11. 渡辺文吉郎・松田 明 (1966). 指定試 (病虫害) 3 : 1-131.