学会賞受賞者講演

リゾクトニア属菌の完全, 不完全世代の生態学的研究[†]

内 藤 繁 男*

NAITO, S.*: Ecological studies on teleomorphic and anamorphic stages in *Rhizoctonia* fungi

Rhizoctonia 属は多くの種を含み分類学上混乱の時代もあったが、1970年代初期に Parmeter や生越によって属や種の整理と定義づけが行われた。また種内菌株群の類別法として菌糸融合群の概念が世界的な統一類別基準として用いられるようになった。その後、分類・同定基準の

遺伝的背景が分子学的に説明され、分類は大きく進歩した。この現況下、*Rhizoctonia* 菌の生態研究は病原の特定化により詳細な動態解析が可能となってきた。

多様な *Rhizoctonia* 菌の中で、*R. solani* (完全世代 *Thanatephorus cucumeris*) は最重要視されている。本種は生理・生態・遺伝的特性の異なる菌株群を含む複合種とされ、現在、それらは菌株間の菌糸融合の有無により13種の菌糸融合群 (AG) に類別されている。さらに6種のAGにはサブグループがある。生態研究では本菌が典型的な土壌伝染性の病原菌とされてきたこともあり、*Thanatephorus* 世代はほとんど対象にされてなかった。特に植物病害との関連では、*T. cucumeris* の担子胞子の生態的な役割や *R. solani* 個体群の遺伝的多様性との関連性は不明であった。著者は、野外での子実体形成の実態、担子胞子の離脱・飛散、胞子感染による発病と蔓延の機構、土壌中での生存、および *R. solani* 個体群の遺伝的多様性との関連性について一連の研究を実施した。

また、*R. solani* 世代では、テンサイ根腐病 (病原菌 AG-2-2 IV) の衰退現象を解明する過程で、激発株周囲土壌中の菌核を好んで摂食、崩壊する土壌小動物ジャガイモクロバネキノコバエ (*Pnyxia scabiei*) 幼虫を発見した。そこで、本幼虫が菌核の崩壊・死滅に果たす役割を解明した。

さらに *R. solani* による様々な新発生病害の診断と病原

菌の同定をしてきた中で、既知の標準菌株との菌糸融合頻度や培養諸性質は必ずしも AG あるいはサブグループの決め手にならない事例をダイズおよびタバコからの新系統 AG-2-3 と AG-2-1 (タバコ系) で見出した。

1. 葉部病害発生に果たす完全世代担子胞子の役割

(1) 野外における子実体形成 野外での子実体形成の実態は不明であった。北海道および東北5県の耕地・林地の約240ヵ所における調査結果から、多くの植物種で完全世代を認め、関与する菌種を含め子実体形成実態の全貌が明らかとなった。子実体は6月上旬から9月中旬にかけて降雨数日後の比較的气温の高いとき、植物の茎葉で覆われた茎上や地表面に初め白色のち灰白色～淡褐色の粉状物として観察された。耕地では子実体形成植物の種類は *R. solani* AG-5 で最も多く、ついで2核 *Rhizoctonia* spp. (BNR), AG-2-2 IV の順で、そのほか AG-1 IA, AG-1 IB, AG-2-1, AG-2-3, AG-3, AG-4 による子実体も見られた。林地では AG-6 による子実体が多く植物種で見られ、ついで BNR であり、そのほか AG-1 IB, AG-2-BI, AG-5 による子実体も観察された。すなわち、耕地と林地では子実体形成の菌種が大きく異なった。子実体は気温 20°C 以上で、降雨後 2～5 日間晴天が続いたとき、また畑地では春先に耕起された圃場で形成が目立った。

(2) 担子胞子の飛散 テンサイ畑では、子実体からの胞子の離脱は日没後に始まり、葉が結露してから2時間後の21時頃から急増し、夜半過ぎに最高となった。その後明け方にかけて胞子数は減少し、日中は全く認められなかった。テンサイ葉腐病は地表面や葉柄基部上の子実体からの胞子飛散が開始された後、約1週間目に初めて認められた。大形の葉腐病二次病斑が形成されるとその裏面に多数の子実体が形成され、大気中の胞子数は急激に増加した。胞子数

[†] 平成18年6月3日 平成18年度大会で行われた学会賞受賞者講演の要旨

* 北海道大学大学院農学研究院 Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Kita 9, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo 060-8589, Japan

は地面に近いほど多かったが、地上 185 cm の高さの位置からも多数の胞子が捕捉された。またテンサイ畑から 70 m 離れたインゲン畑の地上 83 cm に設置した素寒天培地上 (18×18 mm) で10個の胞子 (AG-2-2 IV) が採集された。胞子の長距離飛散が推定されたが、その確証を得るに至らなかった。

(3) 葉面に到達した胞子の発芽と侵入 テンサイ葉では多湿で温度 20~28°C のとき、胞子発芽率は36~51%, 侵入率は16~19%であった。圃場条件下では種々の湿度条件に遭遇するが、セロファン膜上の胞子は相対湿度32~81%に保持したとき、18日間発芽能力を維持していた。これら胞子が宿主に感染できるかは不明であった。

葉面の発芽胞子は付着器下から表皮細胞に侵入し、表皮細胞内あるいはその直下の葉肉細胞にストロマ様菌糸塊 (平均 46×57 μm) を形成した。ついで放射状に菌糸が組織内を蔓延し、直径 1 mm 前後の一次病斑を形成した。ストロマ様菌糸塊は胞子感染時だけに形成される特有なものであった。このような一次病斑と菌糸塊は AG-2-3, AG-3 (ジャガイモ系), AG-2-2 IV それぞれによるダイズ、ジャガイモ、およびシロザ・ヒユの胞子感染による葉部病害でも同様に確認された。多湿な天候が続くと、一次病斑から葉面に伸び出した菌糸が葉の気孔から感染し、周囲に 3 mm 前後の二次病斑が 1~2 個形成される。さらに多湿条件下で最初の二次病斑からの菌糸が繰り返し気孔から感染し不定形の大形病斑を生じ葉全体へと病斑が拡大した。

(4) 担子胞子の生存 地面に落下した胞子は土壤静菌作用により発芽することはなかった。一方、テンサイ葉腐病の罹病葉を10月中旬に土壤に埋め、翌年それらを回収し病原 (AG-2-2 IV) の分離率を調べたところ、罹病組織を通じて菌の一部が土壤に定着し、翌年根腐病や葉腐病を起こすことがわかった。担子胞子は宿主への感染発病を通して、その一部は土壤定着すると考えられた。

(5) *Rhizoctonia solani* 個体群の遺伝的多様性 *R. solani* に汚染した圃場には体細胞不和合性の個体群 (SCG) が多数存在する。これら多様な SCG の発現と担子胞子の関係は不明であった。そこで、土壤法により人為的に子実体を形成させ、単胞子分離株を得た。テンサイ根および葉から分離した *R. solani* AG-2-2 IV の菌株、およびその後代単胞子株はいずれも単独で子実体を形成した。また担子胞子はほとんどが単核であった。菌糸完全融合反応を指標とし後代単胞子解析をしたところ、テンサイ根腐病株からの分離菌の多くは後代で異なる SCG を多数生じた。一方、葉腐分離菌株は後代で単一の個体群からなる胞子を生じた。このことから、圃場における *R. solani* 個体群構成は完全世

代を通じて影響を受けると考えられた。

野生親株 (ヘテロカリオン) とその後代単胞子株 (ホモカリオン) をそれぞれ隔離した圃場のテンサイ株元に土壤接種した。親株を接種した圃場では葉腐病は分離菌株の SCG 解析から、異なる多数の個体群によって生じていることが明らかとなった。一方、単胞子株を接種した圃場では、土壤接種後 2 年を経過しても葉腐病は単一の個体群によって発生していた。

顕微鏡下での菌糸完全融合反応を指標として得られた、野生親株とそれら後代単胞子株の遺伝的多様性は RAPD や ISSR-PCR 解析によっても同様に確認された。以上のことから、テンサイ圃場では担子胞子は感染と発病を経由して *R. solani* AG-2-2 IV の個体群の遺伝的多様性に関与していることが示唆された。しかし、ヘテロカリオン合成における単胞子株の機能については現在実験中であり、十分な結論を得るに至らなかった。

2. 畑土壤中の *Rhizoctonia solani* 死滅に果たす土壤小動物の役割

土壤動物による摂食行動は根部病原菌の物理的崩壊、穿孔、伝播、腸内での不活化あるいは菌体死滅などにより病原菌の個体群動態に影響すると考えられる。

(1) 菌核の崩壊・死滅 キノコバエの一種である *Pnyxia scabiei* 幼虫が *R. solani* AG-2-2 IV の衰退に関与しているかを検討した。テンサイ株周囲の幼虫数は根腐病の発病程度が高まるに伴い急増し、しばしば発病株当たり 5000 頭に達していることが明らかとなった。その大半は根面あるいは根の周囲 2 cm 以内に集中分布した。

10 μm (幼虫通過不可) あるいは 250 μm (幼虫通過可) のナイロンメッシュのフィルター付きの菌核生存検定容器 (外径 30 mm, 内径 17 mm, 厚さ 5 mm) に AG-2-2 IV の菌核 15 個を入れ、根腐病激発株あるいは健全株の周囲土壤中に 3 週間埋めた。菌核の崩壊は発病株の周囲に埋めた 250 μm の容器区にのみ観察され、その容器内には幼虫も確認されたことから、本幼虫による *R. solani* 菌核の崩壊が実際に圃場で起きていることがわかった。

(2) *Pnyxia scabiei* 幼虫による発病抑制 *R. solani* AG-2-2 IV を接種した土壤をペーパーポット (テンサイ用) に詰め、生幼虫あるいは殺虫剤やプロピレンオキサイドで処理した死幼虫を加えテンサイを播種し育苗した。生幼虫添加区では苗立枯病が死幼虫添加区あるいは幼虫無接種区に比べて著しく減った。ついで圃場の根腐病発病枯死株とその周囲土壤から集めた生罹病残渣を *R. solani* AG-2-2 IV 接種土壤を詰めたポットに加えテンサイを栽培したとこ

ろ、残渣無添加区あるいは残渣を 100°C で 10 分間加熱処理した区に比べて根腐病が著しく減少した。殺虫剤処理 + 生残渣区（本幼虫死滅区）は発病抑制が見られたものの、その程度は生残渣区に比べてやや劣った。すわなち、拮抗微生物のほか、*P. scabiei* 幼虫によっても *R. solani* の菌核密度を低下させていることが示唆された。

菌核は次年度の感染源として重要な役割を果たし、また菌核が大きいほど生存能力が高いとされている。したがって、*P. scabiei* 幼虫の摂食によって粉碎化された *R. solani* AG-2-2 IV の菌核は感染源としての重要性が低下すると考えられた。本幼虫はテンサイ根腐病が発生したあと急増した病原菌を加害する一種の天敵として機能するようである。

3. *Rhizoctonia* spp. の同定

Rhizoctonia spp. の AG の類別は供試菌株と既知の標準菌株との菌糸融合反応に基づいている。一般にこの方法では、同一の AG あるいはサブグループ内の菌株同士は高頻度 (≥50%) で融合するが、異なる AG 菌株間では低頻度 (<30%) あるいは全く融合しない。これまで、著者はさまざまな植物および土壌からの分離菌株について従来の菌糸融合による類別基準で矛盾なく AG やサブグループの同定を扱ってきた。しかし、最近、これまでの類別基準と矛盾する 2 種類の新しい AG サブグループを発見した。

日本産ダイズの葉および根からの分離菌株は標準菌株の AG-2-1 と高頻度 (>75%) で融合したが、AG-2-2 IIIB および IV や AG-BI（最近 AG-2-BI に変更）とは低頻度 (<16%) であった。融合頻度を優先させると、AG-2-1 に属することになる。この仮説は培養形態および菌糸生育温度特性などからも示唆された。しかし、ダイズ菌株はチアミン要求性であり、AG-2-2 の菌株と類似した。RFLP 解析結果からは既存のサブグループと異なることが確認されたことから、結論としてダイズ菌を AG-2 内の新しいサブグループとし、AG-2-3 と命名した。

イタリアおよびフランスのタバコ根からの特定の菌株群 (Nt-isolates) は AG-BI と高い頻度で菌糸融合したが、AG-2 内の既知標準菌株との融合頻度は低かった。しかし、形態、チアミン要求性、脂肪酸組成、rDNA-ITS RFLPs およびペクチナーゼ泳動多型は AG-2-1 に類似した。菌糸融合反応を優先させると、タバコ菌は AG-BI に相当する。すなわち、タバコ菌は *R. solani* AG の既知の類別手法の枠内では説明がつかなかった。ITS 領域における rDNA 塩基相同性は AG-2-1 と高く (>93%)、AG-BI や AG-2 内の他のサブグループとは低かった。このことから、菌糸融合頻

度は低いものの、AG-2-1 内のタバコ系とした。

ダイズやタバコ菌は類似した菌の特徴や菌糸融合頻度を重視した類別に限界があることを示した最近の良い事例となった。したがって、*R. solani* の AG やサブグループの同定のためには、分子学的手法併用による解析が必要とされる。

おわりに

Rhizoctonia 菌の完全世代の生態研究が少なかった理由として、被害の主体が土壌中菌糸の感染によることから不完全世代が衆目を集めたこともあるが、完全世代の人為的大量形成の困難性や野外での子実体形成に注意が注がれなかったことが挙げられる。本研究では、完全世代形成のための従来の土壌法に改良を加え、年間を通して人工気象室で大量に孢子形成させることができ、完全世代の生態に関する一連の研究を実施することができた。野外では様々な *Rhizoctonia* 菌が子実体を形成していることから、本研究で明らかにした *R. solani* AG-2-2 IV, AG-2-3, AG-3 以外の *R. solani* AG や 2 核 *Rhizoctonia* spp. の子実体の耕地および林地における生物学的役割も今後解明されていくものと期待される。とくに、ヘテロカリオン形成に果たす担子孢子の遺伝学的な役割などの研究が待たれる。

土壌中では微生物のほか多数の土壌小動物が生息し、有機物分解過程で生物遷移現象が起きている。発病株の周囲で急増した病原菌もそれら遷移系列下にあると考えられる。本研究で明らかとなった菌食性の *P. scabiei* は *R. solani* に対する一種の天敵ともいえる、耕地生態系の作り出した病原菌の浄化作用としての機能を持つとの解釈も可能である。最近の分子学的手法の導入により、耕地土壌での病原菌の個体群あるいは密度変動を正しく理解することが可能となってきたと考えられ、今後生態研究の一層の深化が期待される。

本研究に当たり、研究の動機と終始有益なご指導を賜った杉本利哉博士、生越 明博士、(故) 宇井格生博士には深謝の意を表する。また圃場調査に当たり、北海道内製糖会社 3 社並びに北海道立十勝農業試験場、青森農業試験場には多大なご協力を賜った。さらに、国内のリゾクトニア研究者ならびに国際リゾクトニア委員会のメンバーからは研究上の活発な議論を賜った。本研究は農林水産省北海道農業試験場、同東北農業試験場、および北海道大学大学院農学研究科在職中に行ったものである。長期間にわたり研究を継続できたことは、各職場での上司および室員のご理解とご協力があったからこそ成しえたものである。この場を借りて多くの関係各位に厚くお礼申し上げる。